

小菜蛾成虫蛋白质组双向电泳图谱的建立及条件优化

张娜娜¹, 许 勤², 李风良³, 程罗根¹

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(2 南京师范大学能源与机械工程学院, 江苏 南京 210042)

(3 贵州省农业科学院植保所, 贵州 贵阳 550006)

[摘要] 通过选择合适的 pH 范围及长度的胶条, 并对蛋白样品上样量、等电聚焦伏小时数、银染时间及样品前处理等进行优化, 建立了以双向电泳技术为基础的小菜蛾成虫蛋白质组学研究方法. 优化结果表明使用 17 cm, pH 3~pH 10 的非线性胶条可以得到分辨率较高的胶图. 该方法的建立为小菜蛾抗药性差异蛋白质组学研究奠定了基础.

[关键词] 小菜蛾, 双向电泳, 蛋白质组学

[中图分类号] S481+.4 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2011)02-0078-05

Establishment of a Proteomic Analysis System by 2-DE From Adult *Plutella Xylostella*

Zhang Nana¹, Xu Qin², Li Fengliang³, Cheng Luogen¹

(1 School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2 School of Electrical and Automation Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210042, China)

(3 Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agriculture Science, Guiyang 550006, China)

Abstract Sample preparation, IEF, appropriate strips and silver staining were optimized to get better 2-DE profiles of adult *Plutella xylostella*. The results showed that 2-DE profiles with high resolution were obtained by using 17 cm, pH 3~pH 10 non linear strips. This study can lay a foundation for future study of differential proteomics.

Key words *Plutella xylostella*, two dimensional electrophoresis, proteomics

小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.) 属鳞翅目菜蛾科, 是一种世界性的蔬菜害虫, 在我国普遍发生. 其主要寄主植物为十字花科蔬菜, 其中又以甘蓝、花椰菜、大白菜、油菜等受害最重, 还会危害马铃薯、葱、洋葱、姜、番茄和一些温室植物. 小菜蛾作为主要的蔬菜害虫, 对生产中应用的绝大部分药剂产生了很高的抗性^[1], 现已成为蔬菜害虫防治的一个主要难点. 因此, 研究小菜蛾抗药性的机理及相应的防控技术成为急待解决的问题.

差异蛋白质组是蛋白质组学研究的主要内容之一, 其核心在于寻找某种特定因素引起的样本之间蛋白质组的差异, 揭示并验证蛋白质组在生理或病理过程中的变化^[2]. 由于差异蛋白质种类较少, 因此容易对其进行较深入的研究. 研究表明小菜蛾对溴氰菊酯的抗药性产生跟解毒酶、钠离子通道蛋白和表皮蛋白等相关^[3], 这些抗性相关蛋白都可以利用差异蛋白质组学的方法进行研究. 双向凝胶电泳 (two dimensional gel electrophoresis, 2-DE) 是蛋白质组学的经典方法, 它利用蛋白质等电点和相对分子质量的不同而将混合蛋白质分离, 具有结果直观、分辨率较高、技术成熟等优点^[4]. 根据 2-DE 图谱, 可获得细胞、组织等生物体中蛋白质的表达谱及差异谱; 配合适当的显示技术, 还可获得蛋白质的修饰谱. 但由于 2-DE 过程复

收稿日期: 2011-01-18

基金项目: 国家自然科学基金 (31071974)、安徽省教育厅重点项目 (KJ2008A137).

通讯联系人: 程罗根, 博士, 教授, 研究方向: 遗传性领域的教学. E-mail: chengluogen@njnu.edu.cn

杂,需要对多个条件进行摸索和优化,才能得到比较好的电泳图谱.本文研究了小菜蛾成虫全蛋白样品的 2-DE 条件,旨在为下一步通过差异蛋白质组学研究小菜蛾相关抗性蛋白的功能提供方法.

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试小菜蛾采自贵州省贵阳市花溪区中曹乡的甘蓝地,经室内饲养 1 代后测得四龄幼虫的 LD₅₀值,与武汉市蔬菜研究所提供的小菜蛾敏感种群四龄幼虫的 LD₅₀值比较,证明供试小菜蛾田间种群为敏感种群.将上述种群小菜蛾经 F₀代测定后不接触任何药剂,单独隔离与选育处理试虫同步饲养.在培养过程中经常进行家系选择,将单对交配的后代分开饲养,从中取样做抗性测试,然后将敏感的族系保留下来,培育为敏感品系^[5].本实验用的材料就是由贵州省农业科学院提供的敏感品系小菜蛾成虫.

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白样品的制备

蛋白提取用 TCA-丙酮法^[6],随机取 10 只小菜蛾成虫完整个体,放入到预冷的研钵中,用液氮研磨.将研磨好的样品放入到盛有 1 000 μ L 样品提取液 (10% TCA-丙酮溶液,用时加入 DTT,使其终浓度达到 40 mmol/L) 的离心管中,混匀后,4℃ 沉淀至少 2 h 然后 4℃, 15 000 r/min 离心 30 min 弃上清.沉淀重悬于冰丙酮中,弹匀,4℃ 静置 1 h 后, 12 000 r/min 4℃, 10 min 重复实验步骤重悬于冰丙酮二次,干燥 3 min 左右.离心结束后加入加蛋白样品裂解液 (7M 尿素, 2M 硫脲, 4% (W/V) CHAPS, 2% (V/V) biolyte, 40 mmol/L DTT), 用枪头搅匀, 4℃ 放置 1~2 h 然后 20℃, 15 000 r/min 30 min 取上清.

1.2.2 蛋白定量

1 mg/mL BSA 标准蛋白溶液梯度稀释, Bradford 法^[7]测定蛋白样品浓度,分装后于 -70℃ 下保存备用.

1.2.3 双向凝胶电泳

1.2.3.1 等电聚焦

使用 GE 公司的 Ettan IPGphor 系统进行等电聚焦,首先将泡胀托盘准备好,蛋白样品 300 μ g 加入水化液 (7M 尿素; 2M 硫脲; 2% (W/V) CHAPS, 2% (V/V) biolyte, 0.002% 的 1% 溴酚蓝储备溶液; 在使用前加入 DTE 每 2.5 mL 水化储备液中加入 7 mg DTT) 稀释至 300 μ L, 混匀后, 15 000 r/min 离心 10 min 在泡胀托盘的胶条槽上样,胶条于 -20℃ 取出后室温下放置 10 min, 由酸性端撕去胶条保护膜,胶面朝下放置.应使蛋白溶液铺满整个胶条,避免气泡产生.加入 3 mL 矿物油覆盖胶面.将泡胀托盘盖好,水化 14 h 左右.将水化后的固相 pH 胶条从泡胀盘中移出,用润湿的滤纸稍微吸一下矿物油,转移到等电聚焦的托盘的槽中,胶面朝上.放置润湿的电极条与固相 pH 胶条阴极和阳极两端,安装电极.用 3 mL 固相 pH 干胶条覆盖油覆盖固相 pH 干胶条.聚焦在 20℃ 下自动进行,设置电流上限 50 μ A 胶条,以防胶条被烧焦,具体参数如下: 500 V, 4 h 低压除盐; 1 000 V, 2 h 升压; 10 000 V, 3 h 升压; 10 000 V, 60 000 V h 充分聚焦. EF 结束后,用滤纸吸干胶条表面矿物油,去离子水漂洗 1 遍后放入平衡管内.加入 10 mL 含有 100 mg DTT 的平衡液 I (1.5 mol/L TrisHCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 1% DTT 和痕量溴酚蓝, DTT 在平衡前 30 min 加入).盖上平衡管盖,平放在摇床上,平衡 15 min 取出胶条,放入另一平衡管内,加入 10 mL 含有 250 mg IAA 的平衡液 II (配方同平衡液 I, 2.5% 碘乙酰胺替换 1% DTT, IAA 在平衡前 30 min 加入),盖上平衡管盖,平放在摇床上,平衡 15 min.

1.2.3.2 SDS-PAGE

按凝胶溶液所需成分配制成单一浓度为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶.灌胶至制胶模具顶部 3~10 mm,凝胶上加饱和的正丁醇 2 mL 封胶, 25℃ 下静置聚合.聚合完全后,用电泳缓冲液冲洗凝胶表面 2 遍,取出平衡后的 IPG 胶条,在电泳缓冲液中漂洗 1 遍,小心塞入玻璃板.然后加入预先溶解的 0.5% 琼脂糖封闭液 2 mL,使 IPG 胶条与 SDS-PAGE 凝胶充分接触且无气泡.封闭液完全固化后,将玻璃板放入电泳槽.使 IPG 胶条碱性端对准电泳槽负极.

在电泳槽中加入合适的电泳缓冲溶液 (25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Glycine, 0.1% SDS), 打开冷循环系统,设定电泳温度为 18℃.电泳参数: 1w/ge, 15 min; 13w/ge, 直到溴酚蓝前沿距玻璃板下缘 0.5 cm 时

停止电泳,电泳时间总计约 5.5 h 左右.

1.2.4 凝胶染色及扫描

采用与质谱兼容的银染方法,所有试剂现配现用.电泳结束后剥胶,去离子水漂洗 2 遍,加入固定液 (40% 乙醇,10% 冰醋酸)固定 30m in 加入敏化液 (30% 乙醇,17 g 无水乙酸钠,0.5 g 硫代硫酸钠,加水到终体积 250 mL)敏化 60m in 水洗 3×10m in 加入银染液 (0.625 g AgNO₃,加水至 250 mL)染色 20m in 水洗 2×1m in 加入显色液 (6.25 g Na₂CO₃,50 μL 37% 甲醛,加水至终体积 250 mL),染色 6m in 左右,直至蛋白点清晰可辨.最后加入终止液 (3.65 g EDTA·Na₂·2H₂O)终止 10m in 染色后的凝胶用 Image Scanner 扫描仪透射扫描,分辨率 300 dpi 保存图像.

2 实验结果

2.1 上样量的优化

利用伯乐公司的 11 cm pH3~10 线性胶条进行双向电泳 (图 1).从图中可以看出,在上样量为 50 μg (图 1A)时,蛋白点很少,只有高丰度的蛋白点出现;在上样量为 100 μg (图 1B)时,比 50 μg 上样量时蛋白点增加;在上样量为 150 μg (图 1C)时,蛋白点数目最多,而且一些丰度比较低的蛋白也有所显现.因此上样量为 150 μg 时可以比较好地在双向电泳图上展现比较多的点.

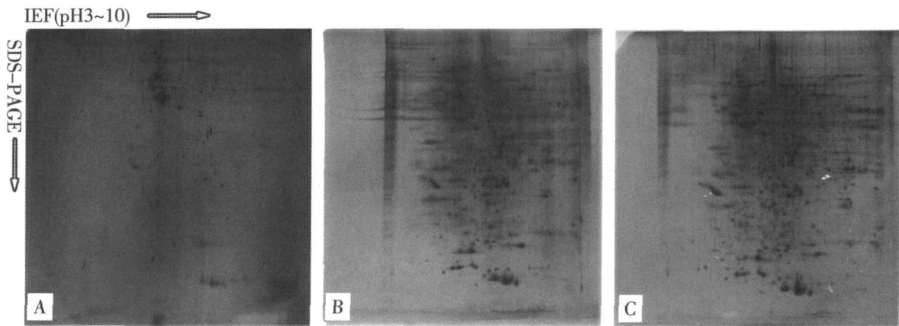


图 1 小菜蛾成虫总蛋白双向电泳: 11 cm pH3~ pH10 线性胶条上样量的优化. 上样量: A: 50 μg B: 100 μg C: 150 μg
Fig 1 2- DE gels of *Plutella xylostella* proteins the optimization of protein loads in 11 cm pH3- pH10 linear strips
Protein loads: A: 50 μg B: 100 μg C: 150 μg

2.2 聚焦伏小时数的优化

从图 1 还可看出,蛋白点大部分集中在胶的中部,且比较密集,分离的效果不是太好.在双向电泳中,等电聚焦环节非常重要,聚焦不好会出现横条纹,而聚焦时候的伏小时数是最大的影响因素,因此我们使用 17 cm pH3~10 非线性胶条,进一步进行了聚焦伏小时数的优化 (图 2).

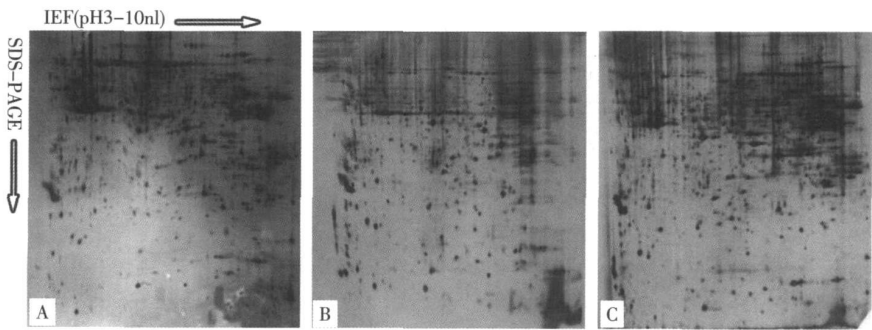


图 2 小菜蛾成虫总蛋白双向电泳: 17 cm pH3~ pH10 非线性胶条聚焦伏小时数的优化.
伏小时数: A: 50 000 Vhr B: 60 000 Vhr C: 70 000 Vhr

Fig 2 2- DE gels of *Plutella xylostella* proteins the optimization of Volt- Hour in 17 cm pH3- pH10 nonlinear strips
VoltHour: A: 50 000 Vhr B: 60 000 Vhr C: 70 000 Vhr

从图 2可以看出,聚焦伏小时数在 50 000 Vhr(图 2A)和 70 000 Vhr(图 2C)时,胶图上都出现了横条纹;但在 60 000 Vhr(图 2B)时,横条纹数明显减少. 因此可以选择 60 000 Vhr

2.3 显色时间的优化

本实验使用的是和质谱兼容的银染方法,该方法灵敏度高,但如果显色时间控制不好,则会出现染色过重,使背景颜色很深,导致无法进行后续分析. 从图 3可以看出,在 6m in(图 3A)、10m in(图 3B)、15m in(图 3C)的显色时间中,以 6m in的背景最浅;而 10m in和 15m in的背景较深,会对后续分析造成影响. 因此,以 6m in为合适的显色时间.

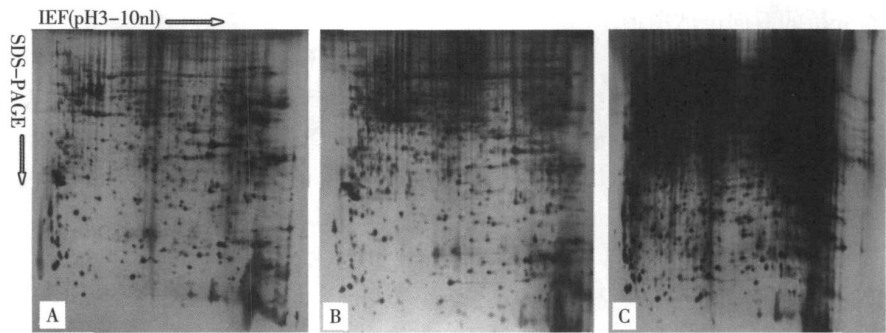


图 3 小菜蛾成虫总蛋白双向电泳: 17 cm pH3~ pH10 非线性胶条显色时间的优化. 显色时间: A: 6m in; B: 10m in; C: 15m in
Fig 3 2-DE gels of *Plutella xylostella* proteins: the optimization of development time in 17 cm pH3~ pH10 nonlinear strips
Dyeing time: A: 6m in; B: 10m in; C: 15m in

2.4 蛋白样品处理的优化

在蛋白样品提取过程中,可能有核酸的污染,导致大分子量蛋白处的地方背景比较深. 因此,我们在蛋白样品经裂解液裂解以后,用超声处理 4次(每次处理 8 s 停 16 s),期望降低核酸的污染. 结果(图 4)表明,经超声处理后(图 4A)大分子量区域的背景明显较未处理对照(图 4B)同区域的背景浅. 说明原先的蛋白样品中可能含有核酸,进行处理以后,核酸的量少了,大分子量蛋白处的背景也浅了.

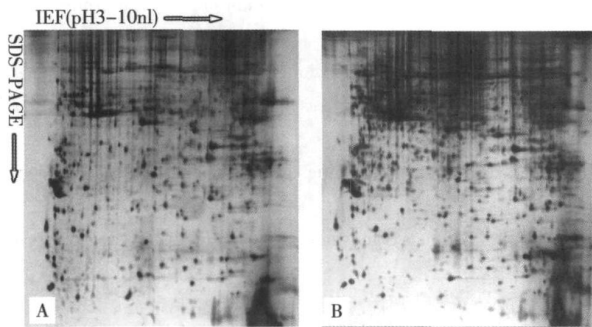


图 4 小菜蛾成虫总蛋白双向电泳: 17 cm pH3~pH10 非线性蛋白样品处理优化. 蛋白样品: A: 超声波处理; B: 没进行超声波处理
Fig.4 2-DE gels of *Plutella xylostella* proteins: the optimization of protein sample treatment in 17 cm pH3~pH10 nonlinear strips.
Protein sample: A: Ultrasonication; B: Non-ultrasonication

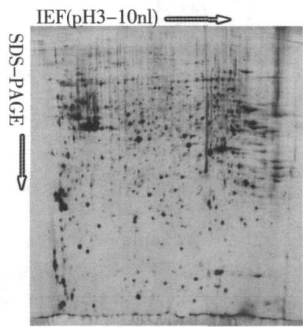


图 5 小菜蛾成虫总蛋白双向电泳: 17 cm pH3~ pH10 非线性胶条最终优化结果
Fig.5 2-DE gels of *Plutella xylostella* proteins: the final optimization result in 17 cm pH3~ pH10 nonlinear strips

2.5 总体优化结果

根据以上实验结果,总体优化后的 2- DE条件为: 采用 17 cm的 pH3- 10非线性胶条; 上样量 300 μg 聚焦伏小时数为 60 000Vhr 显色时间 6m in 蛋白样品用超声波进行处理. 所得到的 2- DE胶质量较好, 能够满足后续分析的要求.

3 讨论

双向电泳是蛋白质组学中常用的一种蛋白分离方法, 是进行后续的差异点分析, 质谱鉴定的基础. 但由于其过程复杂, 步骤多, 因此想要得到比较好的双向电泳图谱, 需要对多个条件进行优化. 在以前的研究中, 赵瑞君等对抗性家蝇蛹期多肽进行了双向电泳分析^[8], 程滨等^[9]用小菜蛾做过双向电泳的实验, 但是由于用的胶条及仪器不同, 所以实验过程也存在很大的不同. 因此, 我们利用伯乐公司的预制胶条, 用 GE 公司的 Ettan IPGphor 等电聚焦系统和 Ettan DALT six 大型垂直电泳系统对小菜蛾成虫全蛋白的双向电泳条件进行了优化, 包括胶条的选择、聚焦的伏小时数、显色时间、蛋白样品的处理等, 最终得到比较好的能用于下一步实验分析的双向电泳图谱.

对于蛋白样品的制备, 我们采用了 TCA-丙酮法. 这种方法不仅可以除去蛋白样品中的盐分, 使得聚焦过程顺利升压, 而且还可以除去小菜蛾蛋白样品中的色素, 得到比较纯净的样品. 实验发现高分子量的蛋白处背景较深, 考虑到样品中含有核酸会出现这种结果, 就选择了进行超声处理的方法除去样品中的核酸, 实验结果表明效果很好. 当然, 也可以选择 DNA 酶进行处理, 但是这样的话会给后续的结果分析造成影响, 因为 DNA 酶本身也是蛋白.

在胶条的选择方面, 我们首先选择了 11 cm 的 pH3~pH10 线性的胶条, 但是发现蛋白点多集中在胶条 pH5~pH8 部位, 而且部分蛋白点重叠, 分离效果不是很好, 因此, 需要一种可以在 pH5~pH8 之间可以分离蛋白的胶条, 而且, 为了把尽可能多的蛋白显示在胶图上, 我们选择了 pH3~pH10 非线性的 17 cm 的胶条. 由于这种胶条是非线性的, pH5~pH8 的范围在胶条上占的比例比较大, 所以可以分离大部分的蛋白; 同时, 17 cm 的胶条长度, 可以更好地使蛋白展现在整个胶图上. 因此, 在采用 17 cm pH3~pH10 非线性胶条的基础上, 我们对其他条件进行了优化, 得到的胶图可以满足后续分析的要求. 优化方法的建立为小菜蛾抗药性差异蛋白质组学研究奠定了基础.

[参考文献]

- [1] Shelton A M, Wymann J A, Cushing N L, et al. Insecticide resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in North America[J]. J Econ Entomol, 1993, 86: 11-19.
- [2] 孙言伟, 姜颖, 贺福初. 差异蛋白质组学的研究进展[J]. 生命科学, 2005, 17(2): 137-140.
- [3] Gunning R V, Easton C S, Balfe M E, et al. Pyrethroid resistance mechanisms in Australian helioverpa americana[J]. Pesticide Science, 1991, 33: 473-490.
- [4] O'Farrell P H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins[J]. J Biol Chem, 1975, 250(10): 4007-4021.
- [5] Liu C, Li F, Han Z, et al. Studies on deltamethrin resistance breeding and its resistant mechanism of diamondback moth[J]. Journal of Plant Protection, 1995, 22: 367-372.
- [6] Sakakida G H, Sipongco J, Wade L J, et al. A proteomic approach to analyzing drought and salt responsiveness in rice[J]. Field Crops Research, 2002, 76: 211-219.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [8] 赵瑞君, 李国锦, 殷国荣, 等. 抗性家蝇蛹期多肽的双向电泳分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1997, 8(2): 108-110.
- [9] 程滨, 张娜娜, 许勤, 等. 溴氰菊酯抗感品系小菜蛾成虫差异表达蛋白的鉴定[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2010, 33(2): 87-90.

[责任编辑: 顾晓天]