

文章编号: 1000-5862(2012)06-0569-05

东亚飞蝗消化系统蛋白质组双向电泳的分析

李燕良, 邬玉兰, 闫 浩, 杨芷菁, 陈义坤, 刘志刚*

(深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060)

摘要: 为了优化东亚飞蝗消化系统双向电泳技术, 建立东亚飞蝗消化系统蛋白表达图谱, 探讨雌、雄东亚飞蝗消化系统蛋白组分的差异, 利用 pH 值为 3~10 和 pH 值为 4~7 的胶条分别对雌、雄东亚飞蝗消化系统进行双向电泳分析, 进行蛋白组学分析. 研究结果发现: 雌性东亚飞蝗消化系统蛋白种类多于雄性, 雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白中偏酸性蛋白数量与偏碱性蛋白相当, 而雄性东亚飞蝗消化系统特异蛋白中酸性蛋白多于碱性蛋白. 在雌、雄东亚飞蝗消化系统相匹配蛋白中, 含量差异达 3 倍以上的蛋白约占总匹配蛋白的 50%. 可见, 雌、雄东亚飞蝗消化系统蛋白组分存在差异.

关键词: 东亚飞蝗; 消化系统; 蛋白组分; 双向电泳; 差异性分析

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

0 前言

功能基因组学包括结构基因组研究和蛋白质组研究等^[1], 由于基因错综复杂的表达, 再加上翻译后修饰作用, 各蛋白存在形式及其构象的不同, 所以大多数功能基因组研究仍然建立在蛋白质水平上.

蛋白质组学作为功能基因组研究的一个重要平台, 包含双向电泳技术、质谱技术和生物信息学 3 大核心技术. 其中双向电泳是最早应用于蛋白质组学的研究方法, 也是目前应用最多的研究方法. 它以蛋白质的等电点和相对分子质量作为独立参数, 第一向电泳根据蛋白质等电点的不同, 对样品进行等点聚焦分离(IEF), 第二向根据相对分子质量大小的不同, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离, 从而达到分离蛋白的目的, 为蛋白质的鉴定提供技术支持^[2]. 蛋白质双向电泳技术可以获得高分辨率的 2 维图谱, 在一块凝胶上可分辨出 1 800 多个蛋白质点^[3]. 目前, 双向电泳技术已广泛应用于生物、医学等领域的蛋白质组学研究^[4-5]. 小鼠、果蝇和大肠杆菌等模式生物都已建立了高质量的双向电泳数据库, 双向电泳技术在昆虫学研究领域也得到了广泛的应用. 目前国内外已有关于昆虫较为深入的蛋白质组学的研究,

涉及昆虫免疫调节、生理发育、昆虫行为活动等重要的生物学问题^[6]. 例如, 蔡来来等^[7]采用不同方法对小菜蛾血淋巴进行了双向电泳, 建立了一套适用于小菜蛾血淋巴蛋白质组分析的双向电泳体系.

东亚飞蝗(*Locusta migratoria manilensis* (Meyen)) 是一种对农业危害性极大的害虫, 数十年来, 人们通过喷洒农药预防蝗灾, 导致蝗虫产生抗药性^[8]. 消化道已被国内外学者认定为研究蝗虫抗药性的重要器官, 但国内外的研究大都集中在蝗虫消化系统的形态结构上^[9-13]. 本研究通过对雌、雄 2 类东亚飞蝗消化系统进行蛋白组学分析, 优化雌、雄 2 类东亚飞蝗消化系统蛋白双向电泳技术体系, 获得东亚飞蝗消化系统的蛋白图谱. 同时, 鉴别雌、雄东亚飞蝗在环境适应过程中消化道出现的差异性, 为进一步更好地进行蝗虫防治奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 东亚飞蝗由中国农业科学院植保所提供. 饲养条件: 常温下喂养麦麸和麦苗, 光照时间小于 2 h/d.

1.1.2 主要试剂 IPG 干胶条(17 cm × 24 cm, pH=3~10,

收稿日期: 2012-05-07

基金项目: 国家“863”计划(2006AA100308), 国家自然科学基金(30871752), 深圳大学校创新科研团队基金(200904)和深圳市重点实验室组建基金(SW201110010)资助项目.

作者简介: 刘志刚(1959-), 男, 江西南昌人, 教授, 博士生导师, 主要从事免疫学和分子生物学研究.

4~7)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺三羟甲基氨基甲烷 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(TEMED)、Tris-base、矿物油及蛋白浓度检测试剂盒等(美国 BIO-RAD 公司);蛋白 MARKER、丙烯酰胺(上海生工);无水乙酸钠、硝酸银、冰醋酸、无水乙醇、甲醛和考马斯亮蓝 G-250 等。

1.2 方法

1.2.1 东亚飞蝗消化系统蛋白的提取 将饥饿 2 d 后的雌、雄东亚飞蝗处死,迅速解剖并取出其消化系统,用液氮将其研磨成粉末,丙酮去脂过夜,于 13 000 rpm 离心 20 min 去掉上清层丙酮,然后将样品真空冷冻干燥。称取 2 g 样品加入 1 mL 裂解液(8 mol/L 尿素、4% CHAPS、60 mmol/L DTT、0.2% 两性电解质),4 ℃ 搅拌 10 min,于 13 000 rpm 离心 30 min 后,吸取的上清液即为东亚飞蝗消化系统粗提蛋白。通过 Bio-rad 公司试剂盒定量测定总蛋白浓度,其余蛋白用于双向电泳分析。

1.2.2 双向电泳 (1) 第一向等电聚焦电泳(IEF):将总体积为 125 μ L 的样品吸入聚焦盘中,分别将 pH 值为 4~7 和 pH 值为 3~10 的干胶条去保护膜后放入聚焦盘,使样品浸湿整个胶条,覆盖适量矿物油,将聚焦盘放入等电聚焦仪并运行(运行电压依次为 50 V 12 h, 250 V 1 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 4 000 V 3 h)。

(2) IPG 胶条的平衡:将等电聚焦后的胶条放入 2.5 mL 平衡缓冲液 I (0.375 mol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素、20%甘油、2% SDS、2% DTT)中平衡 15 min。再将胶条转入平衡缓冲液 II (0.375 mol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素、20%甘油、2% SDS、2.5%碘乙酰胺)中缓慢摇晃 15 min。

(3) 第二向 SDS-PAGE 电泳:将平衡好的胶条推至 12%的分离胶上端靠紧,吸取 4 μ L 预染蛋白 Marker 与等体积的 0.5%琼脂糖液混合后,加至滤纸片上,然后将滤纸片放置胶条末端一侧,并与分离胶的上端接触。覆盖上适量的 0.5%琼脂糖液进行封顶,凝固后将凝胶转移至电泳槽中,开始电泳。

1.2.3 考马斯亮蓝染色 电泳结束后,剥下胶用考马斯亮蓝 R-250 染色 1 h,脱色至凝胶背景变白。将脱色后的胶用扫描仪进行扫描,并用 PDQuest 软件对凝胶进行分析处理。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 利用 pH 值为 4~7 的胶条对雌、雄东亚飞蝗消化系统蛋白的双向电泳分析 提取的雌、雄东亚飞蝗

消化系统总蛋白,经 pH 值为 4~7 的胶条进行双向电泳分离,得到的电泳图谱如图 1 所示。使用 PDQuest 软件对图 1 中的蛋白点进行匹配分析,雌性东亚飞蝗消化系统共检测到 223 个蛋白点,雄性东亚飞蝗消化系统共检测到 204 个蛋白点。雌、雄匹配的蛋白点有 156 对。雌性东亚飞蝗消化系统特异的蛋白点有 67 个,而雄性东亚飞蝗消化系统特异的蛋白点有 48 个。

由图 2(A)可知,雌性东亚飞蝗消化系统在等电点 4.00~5.00 范围内有 10 个特异蛋白点,而雄性东亚飞蝗消化系统特异蛋白点在等电点 4.00~5.00 范围内则有 8 个;雌性东亚飞蝗消化系统在等电点 5.01~6.00 范围内有 42 个点,雄性东亚飞蝗则有 29 个蛋白点;在等电点 6.01~7.00 范围内,雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白点有 15 个,雄性东亚飞蝗则有 11 个蛋白点。可见,雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白主要集中在等电点 4.00~6.00 范围内,约占特异蛋白总量的 85%。而雄性东亚飞蝗消化系统特异蛋白也主要集中在等电点 4.00~6.00 范围内,约占特异蛋白总量的 83%。

由图 2(B)可知,用 pH 值为 4~7 的胶条进行双向电泳分离,雌性东亚飞蝗消化系统相对分子质量小于 10 kD 的特异蛋白点有 7 个,而雄性则有 10 个;雌性东亚飞蝗消化系统介于 10~20 kD 之间的特异蛋白有 15 个,而雄性则有 12 个;相对分子质量为 20~30 kD 的特异蛋白点,雌性东亚飞蝗消化系统有 14 个,而雄性有 9 个;雌性东亚飞蝗消化系统在相对分子质量为 30~40 kD 之间的蛋白点有 16 个,而雄性则有 11 个;在相对分子质量为 40~50 kD 之间,雌性东亚飞蝗消化系统蛋白点有 15 个,而雄性则有 6 个。由以上实验结果发现,雌、雄东亚飞蝗消化系统特异性蛋白在各个相对分子质量区间分布并无统计学显著性差异。

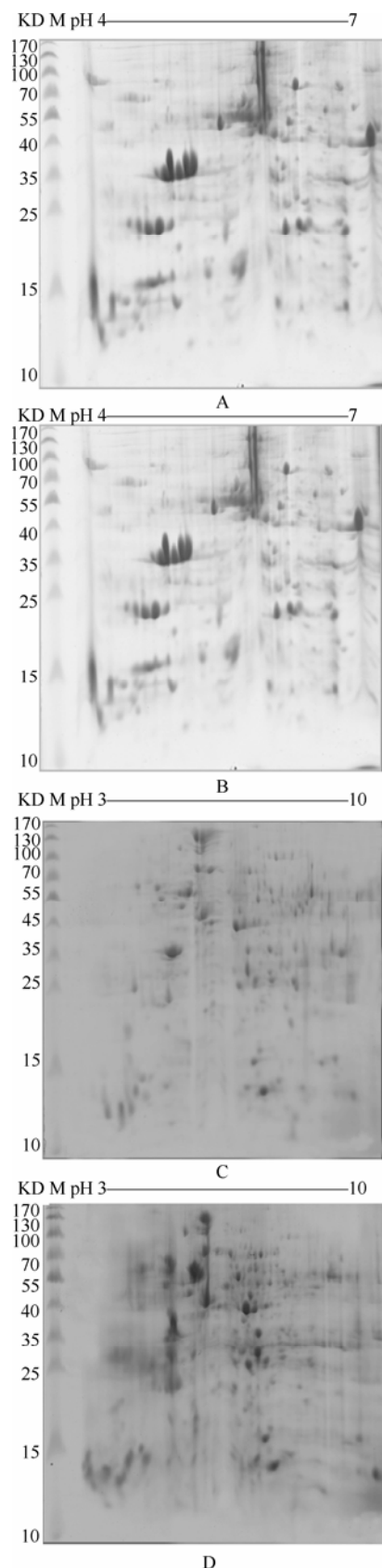
利用 pH 值为 4~7 的胶条进行双向电泳分析,在雌、雄东亚飞蝗消化系统相匹配的蛋白点中,雌、雄含量差距大于 3 倍的有 48 个点,在等电点 4.00~5.00 范围内,有 14 个点;在等电点 5.01~6.00 范围内有 23 个点;在等电点 6.01~7.00 范围内,有 11 个点,见图 3(A)。

2.1.2 利用 pH 值为 3~10 的胶条对雌雄东亚飞蝗消化系统蛋白的双向电泳分析 利用 pH 值为 3~10 的胶条分离,结果显示雌性东亚飞蝗消化系统共检测到 299 个蛋白点,雄性东亚飞蝗消化系统共检测到 232 个蛋白点。雌性东亚飞蝗消化系统相匹配的蛋白点有 179 个。雌性东亚飞蝗消化系统特异的蛋白点有 120 个,而雄性东亚飞蝗消化系统特异的蛋白点有 53 个。

由图 2(C)可知, 用 pH 值为 3~10 的胶条进行双向电泳, 雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白在等电点 3.00~4.00 范围内有 2 个, 雄性东亚飞蝗则无; 在等电点 4.00~5.00 范围内, 雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白有 20 个, 雄性东亚飞蝗则有 1 个; 在等电点 5.01~6.00 范围内, 雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白有 18 个, 而雄性东亚飞蝗则有 8 个; 在等电点 6.01~7.00 范围内, 雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白点有 16 个, 而雄性东亚飞蝗则有 25 个; 在等电点为 7.01~8.00 范围内, 雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白点有 24 个, 而雄性东亚飞蝗则有 7 个; 雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白点在等电点 8.01~9.00 范围内有 30 个, 雄性则有 10 个; 在等电点 9.01~10.00 范围内, 雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白点有 10 个, 而雄性则有 2 个。可以明显看出, 雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白点主要集中在等电点 4.00~5.00、5.01~6.00、6.01~7.00、7.01~8.00 和 8.01~9.00 范围内, 并且分布很平均。而雄性东亚飞蝗消化系统特异蛋白点主要分布在等电点 5.01~6.00、6.01~7.00、7.01~8.00 和 8.01~9.00, 其中在等电点 6.01~7.00 范围内蛋白点占总特异蛋白点数的 47%。

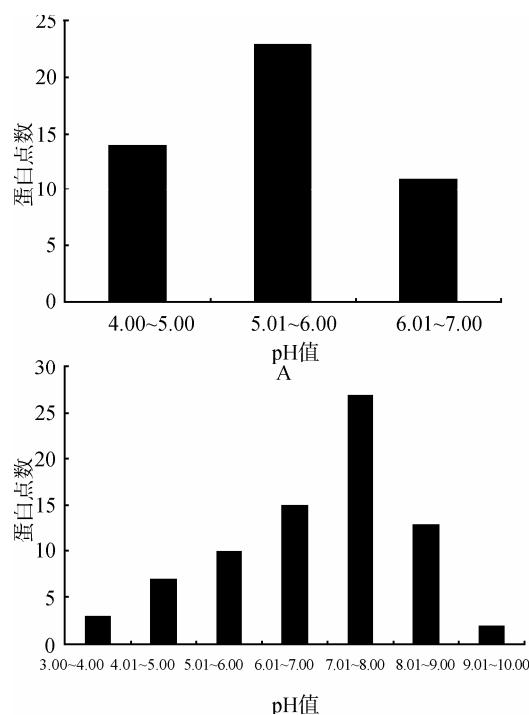
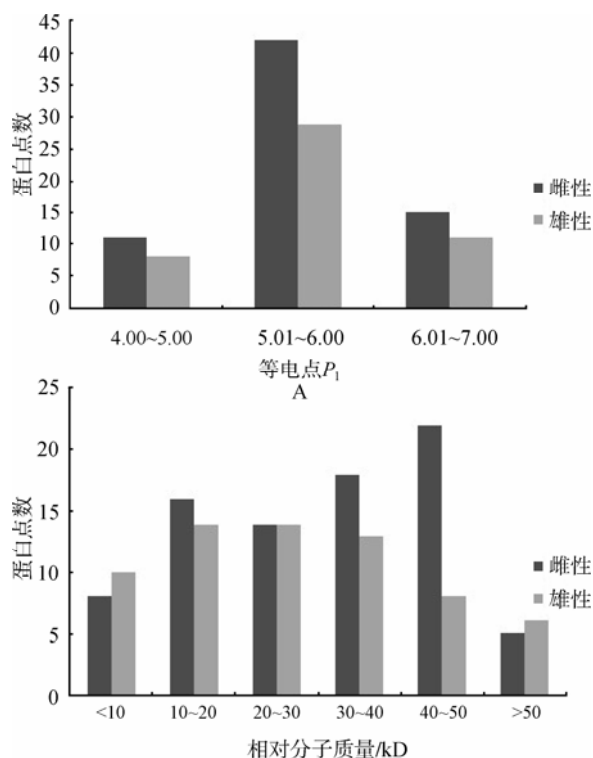
由图 2(D)可知, 在 pH 值为 3~10 的环境下双向电泳, 雌、雄东亚飞蝗消化系统在相对分子质量小于 10 kD 范围内, 均没有特异蛋白点。在相对分子质量为 10~20 kD 范围内, 雌性有 15 个, 雄性有 13 个; 在相对分子质量为 20~30 kD 范围内, 雌性有 29 个, 雄性有 13 个; 在相对分子质量为 30~40 kD 范围内, 雌性有 27 个, 雄性有 10 个; 在相对分子质量为 40~50 kD 范围内, 雌性有 16 个, 雄性有 2 个; 在相对分子质量大于 50 kD 范围内, 雌性有 30 个, 雄性有 13 个。可见, 除相对分子质量小于 10 kD 范围外, 雌性东亚飞蝗消化系统蛋白点在各相对分子质量区段分布较平均。而雄性东亚飞蝗消化系统除在相对分子质量小于 10 kD 和 40~50 kD 外, 在各相对分子质量区段分布较平均。

当 pH 值为 3~10 时, 雌、雄东亚飞蝗消化系统匹配的蛋白点中, 蛋白含量相差 3 倍以上的蛋白点共有 77 个, 在等电点为 3.00~4.00 范围内, 有 3 个; 在等电点为 4.01~5.00 范围内, 有 7 个; 在等电点 5.01~6.00 范围内, 有 10 个; 在等电点 6.01~7.00 范围内, 有 15 个; 在等电点 7.01~8.00 范围内, 有 27 个; 在等电点 8.01~9.00 范围内, 有 13 个; 在等电点 9.01~10.00, 则有 2 个, 见图 3(B)。



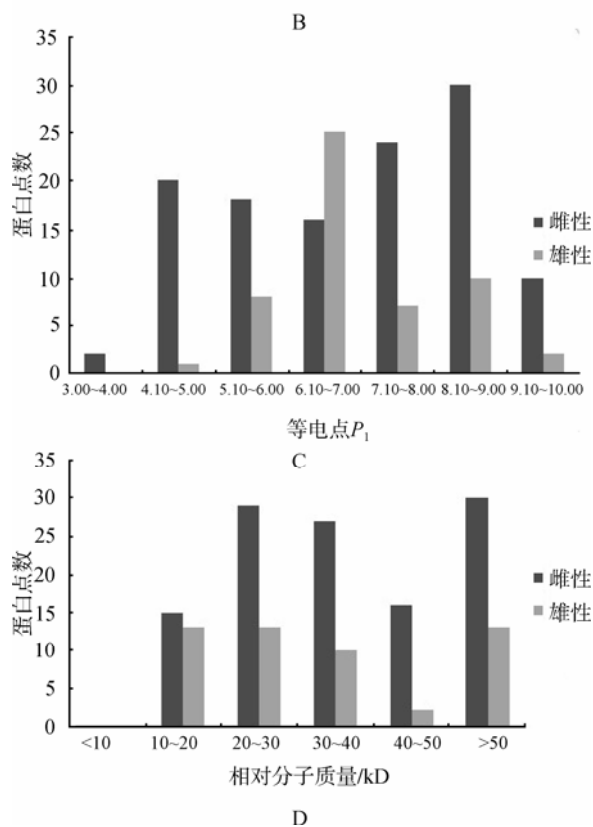
(A)雌性东亚飞蝗在 pH 值为 4~7 的双向电泳图; (B)雄性东亚飞蝗在 pH 值为 4~7 的双向电泳图; (C)雌性东亚飞蝗在 pH 值为 3~10 的双向电泳图; (D)雄性东亚飞蝗在 pH3~10 的双向电泳图。

图 1 雌性东亚飞蝗与雄性东亚飞蝗消化系统蛋白的双向电泳图



(A)pH 值为 4~7 胶条双向电泳下雌雄东亚飞蝗消化系统相差 3 倍以上的蛋白等电点分析; (B)pH 值为 3~10 胶条双向电泳下雌雄东亚飞蝗消化系统相差 3 倍以上的蛋白等电点分析.

图 3 雌雄东亚飞蝗消化系统含量相差 3 倍以上的蛋白点分析



(A)pH 值为 4~7 胶条双向电泳下雌雄东亚飞蝗消化系统蛋白等电点分析; (B)pH 值为 4~7 胶条双向电泳下雌雄东亚飞蝗消化系统蛋白分子量分析; (C)pH 值为 3~10 胶条双向电泳下雌雄东亚飞蝗消化系统蛋白等电点分析; (D)pH 值为 3~10 胶条双向电泳下雌雄东亚飞蝗消化系统蛋白分子量分析.

图 2 雌性东亚飞蝗和雄性东亚飞蝗消化系统蛋白等电点和分子量的分析

3 讨论

目前, 蝗虫消化道的研究已是昆虫学研究的热点之一, 其主要研究内容是蝗虫消化道的结构、功能和形态发生. 我国学者已对蝗虫消化系统的超微结构进行了观察, 但目前国内外仍无蝗虫消化系统蛋白组学的相关研究.

本研究通过运用双向电泳技术对东亚飞蝗消化系统进行蛋白组学研究, 通过尝试不同 pH 值胶条的电泳, 建立一套较优的针对东亚飞蝗消化系统的双向电泳方法, 为进一步对东亚飞蝗消化系统的研究奠定基础. 此外, 本研究还分别对雌、雄东亚飞蝗进行蛋白组学分析, 通过分析差异性, 探讨雌、雄东亚飞蝗消化系统在进化以及环境适应过程中的不同. 结果发现, 利用 pH 值为 3~10 的胶条进行双向电泳, 分离得到的东亚飞蝗消化系统蛋白数量多于用 pH 值 4~7 的胶条电泳得到的蛋白. 此外, 无论是用 pH 值为 3~10 的胶条进行电泳还是用 pH 值为 4~7 的胶条, 雌性东亚飞蝗消化系统蛋白点数量都多于雄性东亚飞蝗. 雌性东亚飞蝗消化系统特异蛋白中偏酸性蛋白和偏碱性蛋白比重基本持平, 而雄性东亚飞蝗消化系统特异蛋白中偏酸性的蛋白比重大于偏碱性蛋白. 雌、雄东亚飞蝗消化系统特异蛋白点在相

对分子质量分布上,并无出现显著差异性.在对雌、雄东亚飞蝗消化系统特异相匹配的蛋白点的分析中发现,含量相差3倍的蛋白点约占匹配蛋白点总数的50%,其中弱碱性蛋白和弱酸性蛋白数量基本持平.

本研究还会进一步对差异性蛋白进行质谱学分析,并结合形态学观察以及机理研究,探讨雌、雄东亚飞蝗消化系统蛋白组学上的差异性与生理功能差异性的关联性,最终为东亚飞蝗的生物防治提供理论支持.

4 参考文献

- [1] 邓琳.蛋白质组学趋势和研究进展 [J]. 中国科技信息, 2005, 12: 43-44.
- [2] 庆知, 黄开勋, 徐辉碧. 双向凝胶电泳技术进展 [J]. 生物技术通讯, 2002, 13(2): 28-30.
- [3] 甘露, 李殿荣, 臧新, 等. 甘蓝型油菜蛋白质双向电泳体系的建立 [J]. 作物学报, 2010, 36(4): 612-619.
- [4] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. J Biol Chem, 1975, 250(10): 4007-4021.
- [5] 闫浩, 邬玉兰, 夏立新, 等. 牛乳主要过敏原 α -乳白蛋白基因的克隆及其原核表达载体的构建[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2010, 34(3): 244-248.
- [6] 侯勇. 家蚕丝腺、血液、脂肪体蛋白质双向电泳及质谱分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [7] 蔡来来, 李灵顺, 邹琦, 等. 小菜蛾血淋巴蛋白质双向电泳技术体系的建立及优化 [J]. 应用昆虫学报, 48(2): 332-337.
- [8] Yang M L, Zhang J Z, Zhu K Y, et al. Mechanisms of organophosphorus resistance in a field population of oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2009, 71(1): 3-15.
- [9] 甘雅玲, 郭中伟. 蝗虫消化系统的超微结构 [J]. 电子显微学报, 2002, 21 (5): 582-583.
- [10] 张小民, 李晓玲. 3种蝗虫消化道贲门瓣形态比较 [J]. 动物分类学报, 2005, 30 (4): 692-696.
- [11] 李晓玲, 张小民. 中华稻蝗前后肠内壁齿的扫描电镜观察 [J]. 动物学报, 2005, 51 (增刊): 100-104.
- [12] 张小民, 郭亚平, 马恩波. 蝗虫消化道结构的比较研究 [J]. 动物分类学报, 2007, 32(3): 643-648.
- [13] 徐秋云, 林健荣, 毛立明, 等. 温敏性品种雌雄蚕蛋白质双向电泳图谱差异分析 [J]. 昆虫学报, 2009, 52(3): 327-338.

The Differential Analysis of Two-Dimensional Gel Electrophoresis for the Alimentary System from *Locusta Migratoria Manilensis* (Meyen)

LI Yan-liang, WU Yu-lan, YAN Hao, YANG Zhi-jing, CHEN Yi-kun, LIU Zhi-gang*

(State Key Laboratory of Respiratory Disease for Allergy at Shenzhen University, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518060, China)

Abstract: Two-dimensional electrophoresis system was optimized and carried out to establish protein expression map of alimentary system from *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) and then the proteomics difference was investigated between female *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) and male ones. Two-dimensional electrophoresis was carried in pH 4~7 and pH 3~10 in order to obtain the best condition and to analyze the proteomics difference between female *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) and male ones. It was found that there were more kinds of protein in alimentary system from female *Locusta migratoria manilensis* than that in male ones. Among the special protein from female *Locusta migratoria manilensis*, the quantity of acid protein has the similar level with that of alkaline protein while quantity of acid protein is larger than that of alkaline protein in male *Locusta migratoria manilensis*. In addition, the quantity of the matched protein spots whose abundance in female or male is over 3fold compared with that in male or female is nearly 50% of the total matched protein. Therefore, protein components are different between the alimentary system of male and that of female.

Key words: *Locusta migratoria manilensis* (Meyen); alimentary system; protein components; two-dimensional electrophoresis(2-D); differential analysis

(责任编辑: 刘显亮)