

一种适合稻水象甲双向电泳的 蛋白质提取方法

杨爽¹, 尹姣², 张炬红¹, 李克斌², 席景会^{1*}

¹吉林大学植物科学学院, 吉林 长春 130062; ²中国农业科学院植物保护研究所,
植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

摘要:【背景】蛋白样品制备是 2-DE 蛋白组学研究的关键步骤, 无杂质、高纯度的蛋白样品是获得良好的 2-DE 结果的基础。选择合适于昆虫蛋白组学研究的常规蛋白提取方法是 2-DE 研究的前提。【方法】通过饱和酚法和 TCA-丙酮法提取稻水象甲成虫总蛋白, 比较 2 种方法的优缺点, 以回避昆虫组织蛋白提取时可能出现的问题。【结果】TCA-丙酮法的蛋白质产率 ($14.55 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) 显著高于饱和酚法 ($9.30 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$), 2 种方法获得的 SDS-PAGE 条带结果相近, 且高丰度表达蛋白在 TCA-丙酮中更高表达; 饱和酚的 2-DE 图谱蛋白点清晰, TCA-丙酮法 2-DE 图谱蛋白点规则但背景模糊, 出现多条横纹。【结论与意义】饱和酚法适合稻水象甲成虫蛋白组学的研究。这 2 种方法也能适用于其他昆虫, 但不同的昆虫体内有不同的干扰组分来干扰蛋白质的提取, 所以获得的蛋白纯度及提取得率可能并不一样。试验结果说明了 2 种蛋白提取方法对 2-DE 研究的影响, 并为稻水象甲成虫的蛋白组学研究提供了一定的参考依据。

关键词: 2-DE; 蛋白提取; 稻水象甲; TCA-丙酮; 饱和酚

A protein extraction method suitable for 2-DE analysis of rice water weevil

Shuang YANG¹, Jiao YIN², Ju-hong ZHANG¹, Ke-bin LI², Jing-hui XI^{1*}

¹College of Plant Science, Jilin University, Changchun, Jinlin 130062, China; ²State Key Laboratory for Biology of
Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of
Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: 【Background】Protein sample preparation is a central step in a 2-DE proteomics as pure protein samples are necessary. There is a need to establish a routine protocol for the application of proteomics analysis in insects. 【Method】This study focused on the specific protein extraction problems in insect tissue and evaluated two protocols to bypass them. The methods of phenol extraction (PE) and TCA/acetone precipitation (TCA) were evaluated for proteins isolation from adult rice water weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel. 【Result】TCA method yielded a greater protein extraction rate ($14.55 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) than the PE protocols ($9.30 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$). The two methods got similar SDS-PAGE results but the expression of protein was higher in TCA than PE; For 2-DE, the PE protocol was optimal, resulting in good background and clear protein spots and TCA had an indistinct background and occurred a few bands were present. 【Conclusion and significance】Among the applied methods, PE precipitation extraction was found to be more suitable than TCA for rice water weevil proteomic analysis. These protocols should also be applicable to other insects. Different insects can vary considerably in the amounts and types of interfering compounds they produce, so the results of protein extraction rate and purity in different insects should be assessed. The study proves that various protein extraction methods result in different protein rates and 2-DE products. It provides basic protocols for proteomic analysis of adult rice water weevil.

Key words: 2-DE; protein extraction; rice water weevil; TCA-acetone; tris-phenol

收稿日期 (Received): 2015-10-12 接受日期 (Accepted): 2015-11-10

基金项目: 国家转基因重大专项 (2014ZX0801101B); 国家自然科学基金项目 (31201576); 吉林省科技发展计划项目 (20150309006NY、20130102045JC)

作者简介: 杨爽, 男, 博士研究生。研究方向: 稻水象甲抗寒机理。E-mail: 664867025@qq.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: jhxi1965@jlu.edu.cn

随着昆虫基因组学计划的实施,昆虫分子生物学研究已进入后基因组时代,这一转变的显著标志之一是蛋白质组学的兴起(Tyers & Mann, 2003)。蛋白质组学的重要研究技术是双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)和质谱鉴定(Li *et al.*, 2006)。2-DE 是蛋白质组学中的重要分离技术,尽管蛋白质组学研究技术进展迅速,2-DE 仍是进行蛋白质样品分离不可或缺的技术(Sap *et al.*, 2015)。蛋白质样品的制备是进行后续 2-DE 分析的关键,也是进行差异蛋白质组学研究的前提(翁瑜等, 2005; Campbell *et al.*, 2008)。

由于昆虫组织中含有几丁质、色素、醌类及其他种次生代谢产物,使得蛋白质图谱的分辨率低,较难取得重复性好的 2-DE 图谱。昆虫总蛋白的提取方法较多,已报道的有直接裂解法、三氯乙酸(TCA)-丙酮沉淀法、聚乙二醇(PEG)和饱和酚提取法等(安少利等, 2010; 贾俊峰等, 2009; 刘遥, 2014)。由于生物组织成分复杂,没有标准且泛用的提取方法能适用于大部分虫体,因此选择合适的蛋白质提取方法是做好双向电泳试验的基础(Pan *et al.*, 2013)。

稻水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel 属鞘翅目 Coleoptera 象甲科 Cuidae。原产于美国密西西比河流域, 1959 年从美国南部扩散到加利福尼亚州。1976 年入侵日本, 1980 韩国, 2004 年意大利, 对全球水稻生产构成了严重威胁(Jiang *et al.*, 2008)。我国于 1988 年在河北省唐山市唐海县首次发现稻水象甲, 其后稻水象甲迅速传播, 1990 年台湾、天津市、北京市, 1991 年辽宁省, 1992 年山东省, 1993 年浙江及吉林省先后出现该虫, 随后又蔓延至安徽、江苏、福建、江西、湖南、广东、广西及山西等省(区), 是我国粮食作物重点治理的检疫性害虫之一(邓根生等, 2005; 商晗武和张志涛, 2004; Jiang & Cheng, 2003)。

本试验以稻水象甲为研究对象, 设计了不同的蛋白质样品制备方法, 并对 2-DE 的条件进行了优化, 得到了适合稻水象甲成虫蛋白提取的方法, 为稻水象甲蛋白质组学研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

稻水象甲雌成虫于 2015 年 6 月采自长春周边

水稻田, 采集后放入离心管内, 每管 20 头分装, 称重后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

1.2 稻水象甲总蛋白提取

1.2.1 TCA-丙酮沉淀法 参考 Méchin *et al.* (2007) 的方法, 取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存的成虫 20 头, 置于液氮中充分研磨, 加入 1 mL $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 10% TCA-丙酮, 震荡混匀 30 s, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏 2 h; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 弃上清; 沉淀用 1 mL 冷丙酮充分悬浮, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏 30 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清; 沉淀用 1 mL 80% 冷丙酮充分悬浮, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏 30 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清; 将沉淀干燥 2 min, 蛋白沉淀置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

1.2.2 饱和酚提取法 参考 Faurobert *et al.* (2007) 的方法, 取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存的成虫 20 头, 置于液氮中充分研磨, 分别加入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 10% TCA-丙酮、甲醇和 80% 丙酮溶液进行悬浮及洗涤, 弃上清, 沉淀室温干燥 2 min; 加入等体积的饱和酚溶液和 dense SDS buffer ($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 Tris-HCl、2% SDS、2% β -巯基乙醇、30% 蔗糖), 混匀震荡, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取酚层加入 5 倍体积的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $15000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 沉淀用 80% 丙酮洗涤 2~3 次, 将沉淀干燥, 蛋白沉淀置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

1.3 蛋白浓度测定

取冻存的蛋白质沉淀, 加入适量水化液 lysis buffer ($5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素、 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲、2% SB-10、2% CHAPS、 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCEP、 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT、0.002% 溴酚蓝) 悬浮沉淀, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h; $13000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 吸取上清液测定蛋白浓度。

参照 Bradford (1976) 法测定蛋白质浓度, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.4 SDS-PAGE 凝胶电泳

分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 4%。采用考马斯亮蓝染色法进行染色。染色后的凝胶用 Epson Expression 10000XL 扫描仪扫描。

1.5 双向凝胶电泳

胶条水化: 取 $300\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白质溶液、 $6.8\text{ }\mu\text{L}$ IPG buffer, 用水化液 lysis buffer 补足到 $340\text{ }\mu\text{L}$, 置于离

心管中充分混匀,将 18 cm pH 4~7 的 IPG 胶条覆盖于该溶液上方,被动水化 16 h。第一向等电聚焦:聚集温度设置为 17 °C、500 V、1 h;1000 V、1 h;4000 V、1 h;8000 V、1 h;8000 V、4 h。胶条平衡:在胶条平衡缓冲液(6 mol·L⁻¹尿素、2% SDS、30% 甘油、50 mmol·L⁻¹Tris-HCl pH 8.8、0.002% 溴酚蓝)中分别加入 1% DTT 和 2.5% 碘乙酰胺溶液,摇床震荡平衡 15 min。第二向垂直电泳:恒压 300 V、10 mA、30 min;恒压 300 V、26 mA、8.5 h。使用银染方法进行凝胶染色(Yan *et al.*, 2000)。染色后用 Epson Expression 10000 XL 扫描仪扫描,利用 ImageMaster™ 2D Platinum 6.0 软件进行图像分析,每种提取方法重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 2 种方法蛋白产率分析

饱和酚法提取的蛋白为白色固体,TCA-丙酮法提取的蛋白质为淡黄色固体,这 2 种蛋白固体在经水化液溶解离心后,均有一部分不溶的果冻状沉淀。2 种方法提取稻水象甲总蛋白的产率如图 1 所示。饱和酚法蛋白产率为 9.30 μg·mg⁻¹,TCA-丙酮沉淀法蛋白产率为 14.55 μg·mg⁻¹。利用 SAS 9.1 统计软件,使用 ANOVA/LSD 方法分析和检验,通过方差分析,表明 TCA-丙酮沉淀法蛋白产率显著高于饱和酚法($P < 0.05$)。

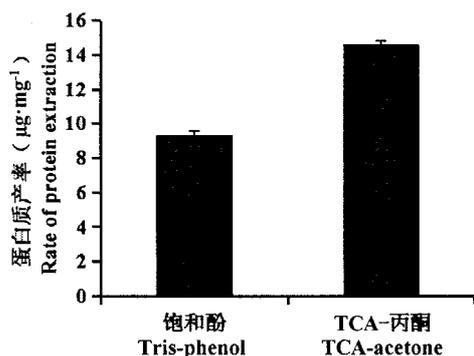


图 1 2 种方法提取蛋白质的产率
Fig.1 The rate of protein extraction from the two methods

2.2 2 种方法提取蛋白的 SDS-PAGE 分析

对饱和酚提取法和 TCA-丙酮法提取的稻水象甲成虫全蛋白进行了 SDS-PAGE 电泳,蛋白上样量相同。结果如图 2 所示,2 种方法获得的蛋白条数基本一致,14.4~116.2 ku 范围内条带呈均匀分布。14.4~35.0 ku 之间条带颜色略浅,此范围内的

蛋白含量较低;35.0~116.2 ku 范围内条带清晰可见,虫体蛋白分子主要位于此区域,其中 45.0 ku 处的蛋白高丰度表达。

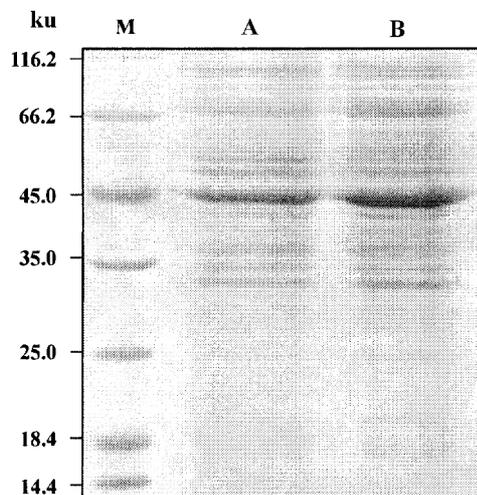


图 2 2 种方法提取稻水象甲总蛋白的 SDS-PAGE 电泳
Fig.2 SDS-PAGE analysis of rice water weevil using two protein extraction methods

A: 饱和酚; B: TCA-丙酮; M: 蛋白质分子质量标准。
A: Tris-phenol; B: TCA-acetone; M: Protein molecular marker.

在 14.4~25.0 ku 间,饱和酚条带浅于 TCA-丙酮条带,说明饱和酚法在此处的蛋白损失大于 TCA-丙酮;在 45.0 ku 以及 116.2 ku 以上的条带,饱和酚条带均浅于 TCA-丙酮条带,说明这些区域饱和酚提取法的蛋白损失均高于 TCA-丙酮法。

2.3 2 种提取法总蛋白双向凝胶电泳分析

TCA-丙酮及饱和酚法提取总蛋白的 2-DE 电泳图谱如图 3 所示。2 种方法提取的蛋白图谱中蛋白点分布基本一致,35.0~116.2 ku 区间内的蛋白点较 14.4~35.0 ku 更多且密集,与 SDS-PAGE 结果吻合。TCA-丙酮法蛋白图谱蛋白点数为 697±15,饱和酚蛋白图谱蛋白点数为 659±13,经 ANOVA/LSD 方法分析和检验,结果差异不显著($P > 0.05$)。TCA-丙酮蛋白图谱背景模糊,在 45.0~116.2 ku 处出现多条横纹,在 45.0 kDa 出现弥散条带及高丰度表达蛋白,此结果与 SDS-PAGE 结果相吻合。高丰度表达的蛋白点 M 影响周围蛋白的正常显示,说明蛋白中的杂质较多,影响了 2-DE 的分辨率及清晰度(图 3A);而饱和酚法蛋白图谱背景清晰,圆形蛋白点规则饱满,说明饱和酚的 2-DE 图谱质量更高(图 3B)。

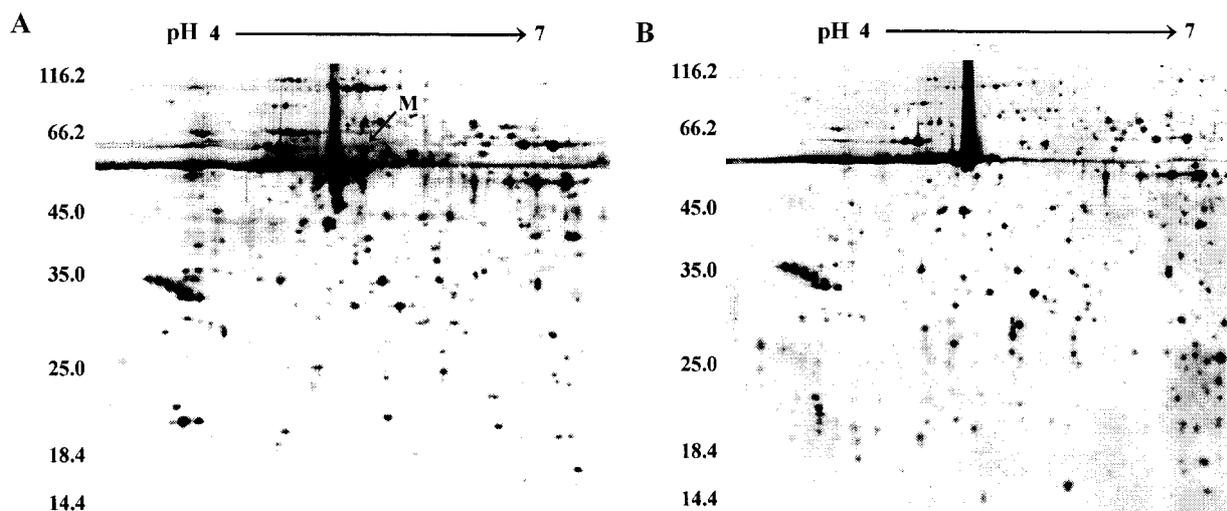


图 3 不同蛋白提取方法的 2-DE 凝胶图谱

Fig.3 2-DE analyses of proteins from the two extraction methods

A: TCA-丙酮; B: 饱和酚。

A: TCA-acetone; B: tris-phenol.

3 讨论

蛋白样品制备是 2-DE 试验的重要步骤,很大程度上影响了 2-DE 的重复性及 2-DE 图谱的分辨率和灵敏度(杜鹏等,2005;谈旭翡和陈智,2008)。大部分蛋白可溶于水、稀盐、稀酸或稀碱溶液中,少数与脂类结合的蛋白质可溶于乙醇、丙酮及丁醇等有机溶剂中。TCA-丙酮法最早用于植物蛋白的提取,是目前常用的蛋白提取方法。此方法以有机溶剂丙酮为核心,通过多次离心及三氯乙酸沉淀蛋白质,着力于对蛋白质的沉淀及脂质的去除,对多糖、色素等杂质去除效果一般,因此蛋白质沉淀为淡黄色,近似稻水象甲的体色(安少利等,2010)。饱和酚法则是利用两相溶液对蛋白进行提取,多糖和色素等杂质可溶于水相,蛋白质进入酚层,因此提取的蛋白质中没有这些物质的干扰而呈白色。

2-DE 结果会出现很多问题,如背景模糊带色、横纹、纵纹、弥散条带及蛋白点不规则等。出现这些问题的原因和蛋白样品制备、2-DE 条件不当有关。在 2-DE 步骤一定的情况下,背景模糊的原因可能是蛋白质样品纯度不够。蛋白质样品中混有的盐分、核酸,蛋白质溶解不好会造成横纹的出现(舒海燕等,2009)。TCA-丙酮沉淀法中因为经过多次沉淀,易造成蛋白质溶解性不好;饱和酚法中的 SDS 和 β -巯基乙醇为还原剂,SDS 还能作为去污剂,能有效去除蛋白质中的阴离子,促进蛋白质的溶解。高丰度表达蛋白的存在会导致弥散条带,

掩盖 2-DE 图谱中的一些位点的识别,并且限制低丰度蛋白的装载容量(谈旭翡和陈智,2008)。本试验中,2 种方法的 2-DE 图谱中的 45.0 ku 附近均出现了高丰度表达蛋白及弥散条带,昆虫样品中高丰度蛋白的存在对其他蛋白,尤其是低丰度蛋白的检测影响较大,高丰度表达蛋白的去除也是 2-DE 试验的难题之一。

本试验通过 TCA-丙酮沉淀法和饱和酚法提取了稻水象甲成虫总蛋白,应用双向电泳技术,发现 TCA-丙酮能取得较高的蛋白产率,但饱和酚法能获得更适合的稻水象甲成虫全蛋白,试验中可以得到蛋白点规则、背景干净清晰、分辨率高的 2-DE 图谱,更适合稻水象甲成虫蛋白组学的研究。出现这种结果的原因与 TCA-丙酮法及饱和酚法提取蛋白的原理相关,然而对于某种样品蛋白质提取方法的选择,并不能一概而论。

目前尚没有稻水象甲总蛋白质提取的相关报道,而在鞘翅目昆虫的蛋白提取方面,魏振鑫(2015)发现 TCA-丙酮沉淀法能更好地去除暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* Motschulsky 触角蛋白中的盐离子,且 SDS-PAGE 条带清晰;Hidalgo-Galiana *et al.*(2014)在龙虱 *Agabus ramblae* 的双向电泳研究中,采用尿素裂解液液氮研磨法获取了清晰的 2-DE 图谱。出现这些不同方法选择的原因是不同蛋白提取方法的针对性不同,且昆虫组织成分的复杂性,并没有统一且标准的方法来提取高质量的蛋白

质。本试验利用改进的饱和酚法对稻水象甲总蛋白质进行提取,通过蛋白质双向电泳,获得了高分辨率、重复性好的凝胶图谱,在图谱上显示的蛋白点在 650 以上,为稻水象甲蛋白质组学研究奠定了基础。

参考文献

- 安少利,潘怡欧,许鹏,张炬红,席景会,2010. 蚜虫全蛋白质提取方法的比较研究. *环境昆虫学报*, 32(3): 353-356.
- 邓根生,张先平,孙敏,王晓娥,2005. 国内外稻水象甲研究现状. *陕西农业科学* (2): 55-56.
- 杜鹏,冯伟华,郭俊生,2005. 蛋白质组双向电泳技术研究进展. *卫生研究*, 34(2): 237-240.
- 贾俊峰,张雅林,王敦,2009. 斑蝥素合成期的壳聚糖蛋白质表达差异分析. *环境昆虫学报*, 31(3): 203-207.
- 刘遥,2014. 七星瓢虫雌成虫滞育相关蛋白差异表达的研究. 硕士学位论文. 北京:中国农业科学院.
- 商晗武,张志涛,2004. 中国稻水象甲的发生与防治//李典谟,伍一军,武春生,杨冠煌. 当代昆虫学研究——中国昆虫学会成立 60 周年纪念大会暨学术研讨会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社: 503-507.
- 舒海燕,曹刚强,凌华,袁保梅,田保明,2009. 双向电泳过程中的常见问题及解决方法. *安徽农业科学*, 37(3): 1223-1224.
- 谈旭翡,陈智,2008. 蛋白质组学研究中双向电泳的样品制备. *医学分子生物学杂志*, 5(5): 462-465.
- 魏振鑫,2015. 暗黑鳃金龟雌雄触角差异蛋白质组学分析. 硕士学位论文. 长春:吉林大学.
- 翁瑜,曾群力,姜槐,许正平,2005. 双向凝胶电泳比较三种常用蛋白质提取方法. *中国生物化学与分子生物学报*, 21(5): 691-694.
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Campbell P M, Cao A T, Hines E R, East P D and Gordon K H J, 2008. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(10): 950-958.
- Faurobert M, Pelpoir E and Chaïb J, 2007. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues//Thiellement H, Zivy M, Damerval G and Méchin V. *Plant Proteomics: Methods and Protocols*. Totowa NJ: Plant Proteomics Humana Press: 9-14.
- Hidalgo-Galiana A, Monge M, Biron D G, Canals F, Ribera I and Cieslak A, 2014. Reproducibility and consistency of proteomic experiments on natural populations of a non-model aquatic insect. *PLoS ONE*, 9(8): e104734.
- Jiang M X and Cheng J A, 2003. Effects of starvation and absence of free water on the oviposition of overwintered adult rice water weevil, *Lissorhoptus oryzophilus* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Pest Management*, 49(2): 89-94.
- Jiang M X, Way M, Du X K, Ji X and He Y H, 2008. Reproductive biology of summer/fall populations of rice water weevil, *Lissorhoptus oryzophilus* Kuschel, in Southeastern Texas. *Southwestern Entomologist*, 33(2): 129-137.
- Li X H, Wu X F, Yue W F, Liu J M, Li G L and Miao Y G, 2006. Proteomic analysis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) hemolymph during developmental stage. *Journal of Proteome Research*, 5(10): 2809-2814.
- Méchin V, Damerval C and Zivy M, 2007. Total protein extraction with TCA-Acetone//Thiellement H, Zivy M, Damerval G and Méchin V. *Plant Proteomics: Methods in Molecular Biology*. Totowa NJ: Humana Press: 1-8.
- Pan Y O, An S L, Li K B, Wang T, Fang K, Zhang H, Sun Y, Yang X and Xi J H, 2013. Evaluation of extraction procedures for 2-DE analysis of aphid proteins. *Journal of Separation Science*, 36(3): 532-539.
- Sap K A, Bezstarosti K, Dekkers D H W, van den Hout M, van Ijcken W, Rijkers E and Demmers J A A, 2015. Global quantitative proteomics reveals novel factors in the ecdysone signaling pathway in *Drosophila melanogaster*. *Proteomics*, 15: 725-738.
- Tyers M and Mann M, 2003. From genomics to proteomics. *Nature*, 422: 193-197.
- Yan J X, Wait R, Berkelman T, Harry R A, Westbrook J A, Wheeler C H and Dunn M J, 2000. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21(17): 3666-3672.

(责任编辑:郭莹)