DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2017.04.004

西花蓟马蛋白的提取及双向电泳体系的建立

王金鑫, 杨 爽, 张鑫鑫, 张炬红, 席景会, 王 军*
吉林大学植物科学学院, 吉林 长春 130062

摘要: 【目的】蛋白样品的制备是获得良好双向凝胶电泳(2-DE)图谱的前提,建立合理的西花蓟马蛋白的双向电泳体系,获得分辨率较高、重复性较好的图谱,能够为后续的研究提供有力支撑。【方法】实验以西花蓟马成虫为实验材料,对比了饱和酚法、TCA/丙酮法和直接裂解法 3 种蛋白提取方法,从中选出最适宜双向电泳分析的一种蛋白提取方法。【结果】3 种方法蛋白提取率差异显著,直接裂解法蛋白提取率最高,饱和酚法的蛋白提取率最低;3 种方法的 SDS-PAGE 条带数差异不明显;TCA/丙酮法的双向凝胶图谱效果最好,蛋白点最多。【结论】TCA/丙酮法能够有效去除西花蓟马蛋白中的干扰物质,是最适合西花蓟马双向凝胶电泳的蛋白提取方法,为后续西花蓟马在蛋白组学方面的研究奠定了基础。

关键词: 西花蓟马; 双向凝胶电泳; 蛋白质组学; 蛋白提取

Protein extraction of *Frankliniella occidentalis* and establishment of two-dimensional electrophoresis system

WANG Jinxin, YANG Shuang, ZHANG Xinxin, ZHANG Juhong, XI Jinghui, WANG Jun*
College of Plant Science, Jilin University, Changchun, Jilin 130062, *China*

Abstract: 【Aim】 Protein sample preparation is the prerequisite to obtain an optimal two-dimensional electrophoresis (2-DE) gel map. Establishing a suitable 2-DE system can provide a strong support for the subsequent research. 【Method】 This study used *Frankliniella occidentalis* adults as experimental materials, and compared three protein extraction methods: Tris-phenol, TCA/acetone precipitation, and direct decomposition extraction. The most suitable method of 2-DE system was defined through the analysis of 2-DE protein images. 【Result】 Experimental results revealed that the three methods showed significant differences in protein extraction rate, among which the direct decomposition method was the highest while Tris-phenol method was the lowest. The three methods got similar SDS-PAGE results. TCA/acetone method had the best quality of 2-DE gel map, with the highest number of protein spots. 【Conclusion】 The results suggest that TCA/acetone method could remove interfering substance effectively and was optimal for protein extraction of *F. Occidentalis*. It laid foundation of further study on the proteomics of *F. occidentalis*.

Key words: *Frankliniella occidentalis*; 2-DE; proteomics; protein extraction

蛋白质组学分析是后基因组时代的重要技术手段(黎飞,2010),蛋白质双向电泳(two-di-mensional electrophoresis,2-DE)是蛋白质组学研究的重要技术之一(Wang *et al.*,2008)。尽管蛋白质组学研究的技术进展比较迅速,2-DE 仍然是进行复杂蛋白质样品分离的核心技术,蛋白质样品的制备是 2-DE 的关键,也是进行后续蛋白质组学研究的前提(刘倩等,2010)。

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande)又称苜蓿蓟马,属缨翅目 Thysanoptera 蓟马科 Thripidae,是一种危害性严重的外来入侵物种,寄主种类多(张安盛等,2012; 周卫川等,2006)。随着国际贸易往来的日趋频繁,该虫随花卉和蔬菜的远距离运输迅速向世界各地扩散(张桂芬,2014)。为从蛋白层面上揭示西花蓟马的入侵机制,建立适用于蛋白质双向电泳分析的蓟马全蛋白提取方法十

收稿日期(Received): 2017-06-21 **接受日期(Accepted):** 2017-08-15
基金项目: 国家自然科学基金项目(31201576); 吉林省科技发展计划项目(20150309006NY、20160520035JH)
作者简介: 王金鑫, 女, 硕士研究生。研究方向: 昆虫分子生物学。E-mail: jxwang16@mails.jlu.edu.cn
* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: wang_jun@jlu.edu.cn

分必要。蓟马蛋白质含量相对较低，成份复杂，富含核酸、脂类及多糖等干扰物质，这些物质给蛋白质的定量和分析带来了困难。加之一些几丁质、肌动蛋白、骨骼蛋白等不易溶解，使得蓟马的蛋白提取比较困难。本实验以西花蓟马成虫为材料，对不同的蛋白质提取方法进行了比较研究，为蓟马蛋白质样品的制备提供了实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

西花蓟马采于吉林大学校园的万寿菊中，将其饲养于养虫室自然条件下生长的地被菊上，温度控制在(25±2) ℃、相对湿度 40%~50%、光周期 L∶D=16 h∶8 h。收集成虫作为试虫，采集后分装于离心管中，冻于-80 ℃冰箱中备用。

1.2　蛋白的提取

1.2.1　*饱和酚法*　参考 Faurobert *et al.* (2007)的方法，取-80 ℃冻存的成虫样品，置于液氮中充分研磨，分别加入 1 mL -20 ℃预冷的 10%TCA/丙酮溶液、甲醇和 80%的丙酮溶液，充分悬浮后，于 4 ℃、15000 r·min^{-1}的条件下各自离心洗涤 5 min，弃上清，得到的沉淀于室温下干燥 2 min；加入等体积的饱和酚溶液和 dense SDS buffer (0.1 mol·L^{-1} pH 8.0 Tris-HCl、2% SDS、2% β-巯基乙醇、30%蔗糖)，充分混匀震荡，于 4 ℃、15000 r·min^{-1}离心 5 min，取酚层加入 5 倍体积的 0.1 mol·L^{-1}乙酸铵溶液，于-20 ℃下沉淀 2 h；4 ℃、15000 r·min^{-1}离心 15 min，沉淀用 80%丙酮洗涤 2~3 次，将沉淀于室温下干燥后，置于-80 ℃冰箱中储存备用。

1.2.2　*TCA/丙酮法*　参考 Méchin *et al.* (2007)的方法，取-80 ℃冻存的成虫样品，置于液氮中充分研磨，加入 1 mL -20 ℃预冷的 10%TCA/丙酮，充分震荡混匀，于-20 ℃冷藏 2 h 以上；4 ℃、15000 r·min^{-1}离心 15 min，弃上清；沉淀用 1 mL 冷丙酮充分悬浮，-20 ℃冷藏 30 min；4 ℃、15000 r·min^{-1}离心 5 min，弃上清；沉淀用 1 mL 80%冷丙酮充分悬浮，-20 ℃冷藏 30 min；4 ℃、15000 r·min^{-1}离心 5 min，弃上清；将沉淀干燥 2 min，蛋白沉淀置于-80 ℃冰箱中储存备用。

1.2.3　*直接裂解法*　参考 Nguyen *et al.* (2007)的方法，取-80 ℃冻存的成虫样品，置于液氮中充分研磨，加入适量 4 ℃预冷的裂解液，充分震荡混匀，4 ℃、12000 r·min^{-1}离心 15 min，取上清，4 ℃、15000 r·min^{-1}离心 40 min，取上清，样品冻于-80 ℃冰箱中储存备用。

1.3　蛋白浓度的测定

取-80 ℃冻存的蛋白样品，根据样品的量加入适量的 lysis buffer 充分涡旋，30 ℃孵育 1.5 h，20 ℃、13000 r·min^{-1}离心 30 min，取上清进行蛋白浓度测定。

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。利用 Image J 软件进行图像分析。

1.5　双向凝胶电泳

取 300 μg 蛋白溶液于离心管中，加入 6.8 μL IPG buffer，加入 lysis buffer 至 340 μL 充分震荡混匀，将 18 cm pH 3~10 的 IPG 胶条覆盖于该溶液上方，在水化槽中水化 16 h 以上。在等电聚焦仪中进行第一向等电聚焦。在胶条平衡缓冲液(6 mol·L^{-1}尿素、2%SDS、30%甘油、50 mmol·L^{-1} Tris-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，使用摇床震荡 15 min 进行胶条平衡后将胶条转移至聚丙烯酰胺凝胶中进行第二向垂直电泳。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 ImageMasterTM 2D Platinum 7.0 软件进行图像分析，每种提取方法重复 2 次。

2　结果与分析

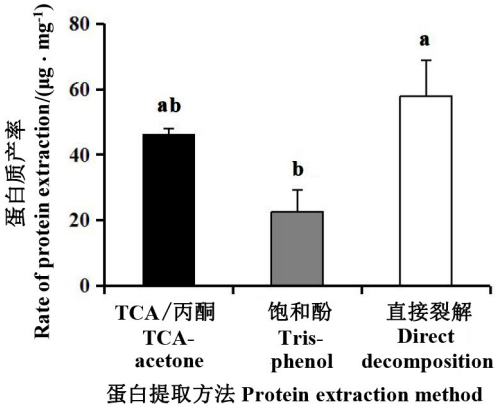
2.1　蛋白产率分析

3 种方法提取的蛋白产率利用 Sigma 软件制作图，结果如图 1 所示，直接裂解法的平均蛋白提取率最高，为 57.9 μg·mg^{-1}，TCA/丙酮法为 46.2 μg·mg^{-1}，饱和酚法为 22.6 μg·mg^{-1}。通过 instat 软件对其进行显著性差异分析，其中 TCA/丙酮法与饱和酚法和直接裂解法差异性不显著(p>0.05)，饱和酚法与直接裂解法具有显著性差异(p<0.05)。

2.2　SDS-PAGE 图谱分析

将 3 种方法提取的蛋白以相同的上样量进行 SDS-PAGE 电泳检测，结果显示，3 种方法的条带数目差异不明显。直接裂解法条带最多，为 31 条，但

蛋白条带不明显;饱和酚法 30 条,TCA/丙酮法 28 条,条带最为清晰明显。蛋白分布差异不大,主要集中于 25.0 ku 以上和 14.4~18.4 ku 之间(图 2)。

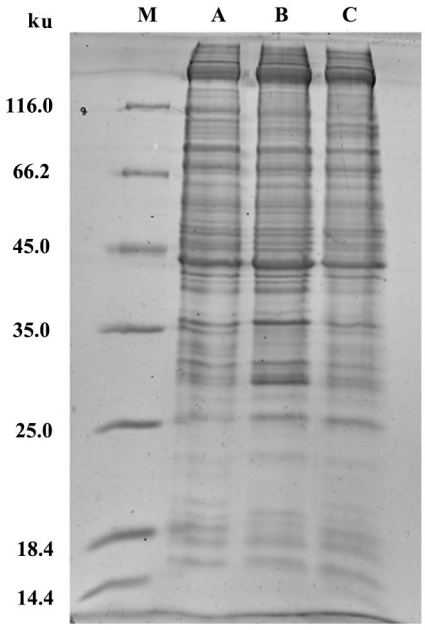


图中数据为平均值±标准差。不同字母表示差异显著(p<0.05)。

Values of the figure are mean±SD. Different letters indicate significant differences (p<0.05).

图 1 3 种方法提取蛋白质的产率

Fig.1 The rate of protein extraction from the three methods



M:蛋白质分子质量标准;A:饱和酚;B:TCA/丙酮;C:直接裂解。

M: Protein molecular maker; A: Tris-phenol; B: TCA-acetone; C: Direct decomposition .

图 2 3 种方法提取西花蓟马总蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig.2 SDS-PAGE analysis of *F. occidentalis* using three protein extraction methods

2.3 双向电泳图谱分析

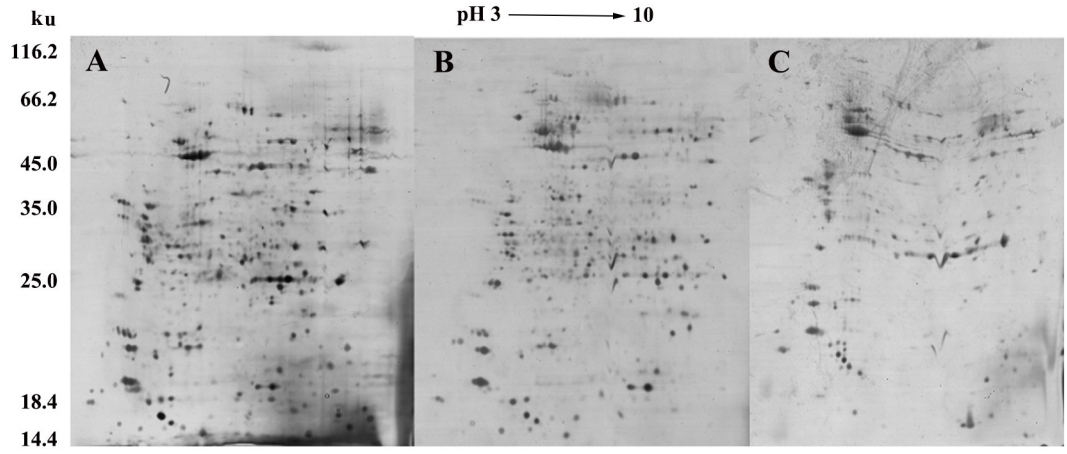
TCA/丙酮法、饱和酚法和直接裂解法提取总蛋白的双向图谱如图 3 所示。相对于直接裂解法,饱和酚法和 TCA/丙酮法得到的蛋白纯度较高,杂质较少,能够得到背景相对清晰的图谱。直接裂解法由于蛋白纯度较低,杂质较多,得到的图谱整体背景不清晰,蛋白点最少且形状不规则,在 45.0 ku 和 25.0 ku 处有明显弥散现象。

TCA/丙酮法、饱和酚法和直接裂解法分别得到平均 429、330 和 235 个蛋白点。TCA/丙酮法蛋白点最多,蛋白点颜色层次分明,蛋白点形状规则;饱和酚法图谱背景较清晰,蛋白点形状规整,但蛋白点颜色普遍较浅,蛋白点较 TCA/丙酮法少。3 种方法提取的蛋白点分子质量大小主要集中在 40 ku 以下,酸性蛋白点略比碱性蛋白点多(图 4)。

3 讨论

蛋白质样品的制备是进行 2-DE 的关键步骤,也是进行昆虫蛋白质组学研究的前提(Gygi *et al.*, 2000)。由于昆虫组织中所含有的色素、几丁质、醌类及其他多种代谢产物的干扰,获得重复性好的 2-DE图谱相对比较困难(Liao *et al.*, 2016)。本研究比较了 3 种不同蛋白提取方法对西花蓟马 2-DE 结果的影响,以寻找一种适用于西花蓟马等蓟马类成虫的双向电泳方法,为后续蓟马类蛋白质组分析奠定一定的基础。

本实验采用的 3 种蛋白提取方法,在蛋白提取率上存在明显差异,直接加入 lysis buffer 的直接裂解法步骤简单,可以避免沉淀造成的蛋白损失(Carpentier *et al.*, 2005; Laville *et al.*, 2009)。它的原理是将可溶性蛋白溶解在裂解液中,能够有效减少蛋白的降解。由于 lysis buffer 中含有高浓度的尿素和硫脲,二者联合发挥协同作用,可以增强溶解疏水性蛋白效应,因此蛋白产率较高。直接裂解法得到的 SDS-PAGE 图谱上的条带较为模糊,蛋白样品中含有杂质较多。样品中盐离子的浓度也会影响 2-DE 的效果。盐离子增加胶条的导电性并引起电内渗,进而干扰蛋白质的等电聚焦,导致聚焦不完全,从而在双向电泳图谱产生水平条纹(刘倩等,2010)。直接裂解法没有洗涤样品的步骤,杂质和盐分含量较高,更多的脂质和核酸会干扰蛋白质的聚焦和分离(Canas, 2007; Lee, 2010)。直接裂解法制备的蛋白在等点聚焦过程中,电压上升慢,耗时长,2-DE 图谱背景不清晰,蛋白点少,出现多处横条纹。

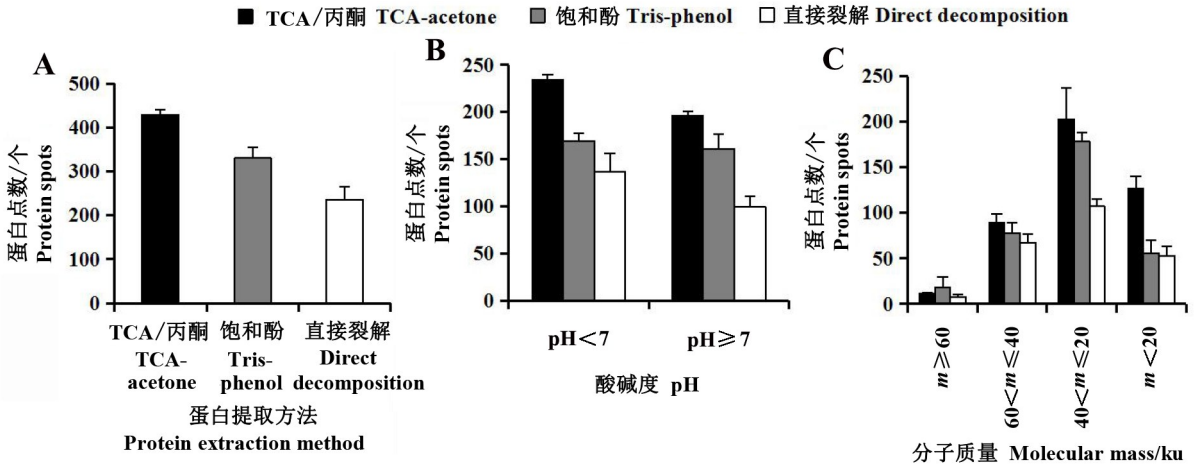


A：TCA/丙酮；B：饱和酚；C：直接裂解。

A: TCA-acetone; B: Tris-phenol; C: Direct decomposition.

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 three extraction methods



A：总蛋白点数；B：蛋白点 pH 分布；C：蛋白点分子质量分布。

A: Total amount of protein spots; B: Distribution of protein spots pH; C: Distribution of protein spots molecular mass.

图 4　不同蛋白提取方法分析

Fig.4　Analysis of different protein extraction methods

酚是强的蛋白变性剂，可以使细胞或组织中的蛋白质变性析出。在提取时，蛋白能很好地溶于酚层，而核酸和一些小分子物质溶于水相而被清除（付涵予等，2011）。饱和酚法得到的图谱背景清晰，在等点聚焦过程中电压升得快，耗时短，但该方法的蛋白提取率较低，操作相对繁琐，出现少量横条纹。

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（杨爽等，2016）。TCA/丙酮法能有效去除蛋白质中的杂质，是一种广泛应用的蛋白提取方法（Hao *et al.*，2015）。丙酮通过有机溶剂破坏蛋白质的水化层，降低介电常数，增强带电蛋白质分子的相互作用，促进蛋白的聚集沉淀；同时作为蛋白质变性剂使蛋白质构象发生改变，暴露出较多的疏水性基团，使之聚集沉淀（Görg *et al.*，2004）。TCA/丙酮法可以很好地去除西花蓟马成虫蛋白中的干扰物质，其 2-DE 图谱背景清晰，蛋白点较多且清晰，形状规则。无论从图谱清晰度还是从蛋白分布情况来看，TCA/丙酮法都是适合西花蓟马蛋白提取的方法。

参考文献

付涵予，任嘉红，黄麟，叶建仁，2011. 松材线虫全蛋白的提取及其双向电泳体系优化. 生物技术，21(5)：58-62.

黎飞，徐秋芳，臧宪朋，赖亿玉，程维舜，徐幼平，蔡新忠，

2010. 番茄子叶总蛋白双向电泳体系的建立. 园艺学报, 37(4): 661-668.

刘倩, 阮松林, 俞晓平, 马华升, 叶子弘, 2010. 适于茭白茎部蛋白质组分析的双向电泳技术体系的建立. 浙江农业学报, 22(3): 281-286.

杨爽, 尹娇, 张炬红, 李克斌, 席景会, 2016. 一种适合稻水象甲双向电泳的蛋白质提取方法. 生物安全学报, 25(2): 143-147.

余功明, 胡春锦, 魏源文, 史国英, 岑贞陆, 覃丽萍, 黎起秦, 黄思良, 2011. 适于双向电泳分析的水稻纹枯病菌菌体蛋白提取方法的比较. 西南农业学报, 24(6): 2160-2163.

张安盛, 张思聪, 庄乾营, 李丽莉, 门兴元, 周仙红, 于毅, 2012. 外来入侵害虫——西花蓟马在山东省不同地区主要花卉上的分布. 生物安全学报, 21(2): 114-118.

张桂芬, 乔玮娜, 古君伶, 闵亮, 万方浩, 2014. 我国西花蓟马线粒体 DNA-CO Ⅰ基因变异及群体遗传结构分析. 生物安全学报, 23(3): 196-209.

周卫川, 林阳武, 翁瑞泉, 吴宇芬, 王念武, 2006. 西花蓟马在中国的地理分布和年发生代数预测. 昆虫知识, 43(6): 798-801.

BRAD F M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

CANAS B, PINEIRO C, CALVO E, LOPEZ-FERRER D, GALLARDO J M, 2007. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *Journal of Chromatography A*, 1153: 235-258.

CARPENTIER S C, WITTERS E, LAUKENS K, DECKERS P, SWENNEN R, PANIS B, 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5: 2497-2507.

FAUROBERT M, PELPOIR E, CHAB J, 2007. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in Molecular Biology*, 35: 9-14.

GÖRG A, WEISS W, DUNN M J, 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4: 3665-3685.

GYGI S P, CORTHALS G L, ZHANG Y, ROCHON Y, AEBERSOLD R, 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 9390-9395.

HAO R J, ADOLIGEB C, JIANG B J, ZHAO X L, GUI L S, QU K X, WU S, ZAN L S, 2015. An optimized trichloroacetic Acid/Acetone precipitation method for two-dimensional gel electrophoresis analysis of qinchuan cattle longissimus dorsi muscle containing high proportion of marbling. *PLoS ONE*, 10(4): 1-12.

LAVILLE E, SAYD T, MORZEL M, BLINET S, CHAMBON C, LEPETIT J, RENAND G, HOCQUETTE J F, 2009. Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 10755-10764.

LEE H, HAN J, LEE K, KIM E, JIN Y, OH J, HWANG J, KANG H, KIM S, SEO K, KANG S, CHOI Y, 2010. Buffer optimization for bovine longissimus muscle tissues: proteome analysis of Korean native cattle using 2-dimensional gel electrophoresis. *Food Science and Biotechnology*, 19: 1107-1112.

LIAO D J, LU X P, CHEN H S, LU Y, MO Z Y, 2016. Evaluation of four protein extraction methods for proteomic analysis of mango peel. *Genetics and Molecular Research*, 15(3): 1-9.

MÉCHIN V, DAMERVAL C, ZIVY M, 2007. Total protein extraction with TCA-Acetone. *Methods in Molecular Biology*, 355: 1-8.

NGUYEN T T A, MICHAUD D, ClOUTIER C, 2007. Proteomic profiling of aphid *Macrosiphum euphorbiae* responses to host-plant-mediated stress induced by defoliation and water deficit. *Insect Physiology*, 53: 601-611.

WANG W, TAI F, CHEN S, 2008. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of Separation Science*, 31: 2032-2039.

YAN J X, WAIT R, BERKELMAN T, HARRY R A, WESTBROOK J A, WHEELER C H, 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)