

# 家蚕催青后期胚胎蛋白质双向电泳图谱分析

钟伯雄<sup>1</sup>, 陈金娥<sup>1</sup>, 颜新培<sup>1</sup>, 徐孟奎<sup>1</sup>, 梁建设<sup>2</sup>

(1. 浙江大学动物科学学院生物资源科学系 杭州 310029; 2. 浙江大学生物化学有限公司 杭州 310029)

**摘要:** 采用蛋白质双向电泳技术分析家蚕 *Bombyx mori* 催青后期胚胎蛋白质图谱的变化。研究发现: 在头胸分化期(戊<sub>3</sub>)、反转期(己<sub>1</sub>)、毛瘤发生期(己<sub>2</sub>)、点青期(己<sub>3</sub>)、转青期(己<sub>4</sub>)和孵化期(己<sub>5</sub>)胚胎蛋白质的双向电泳图谱中共检测到 209 个特异蛋白斑点, 其中己<sub>3</sub> 和己<sub>4</sub> 两个胚胎出现的特异蛋白斑点数在整个催青期胚胎中为最多, 分别达 55 和 77 个。与催青前期胚胎出现的特异蛋白斑点变化规律相似, 这些特异蛋白斑点大多也是在随后邻近的胚胎发育中消失。推测这些特异蛋白可能与相应胚胎的形体特征发育有关。

**关键词:** 家蚕; 蛋白质; 双向电泳; 图谱分析; 胚胎发育

中图分类号: S881.2; Q72 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)04-0637-06

## Analysis of protein patterns from embryo of silkworm *Bombyx mori* at later stages by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

ZHONG Bo-Xiong<sup>1</sup>, CHEN Jin-E<sup>1</sup>, YAN Xin-Pei<sup>1</sup>, XU Meng-Kui<sup>1</sup>, LIANG Jian-She<sup>2</sup> (1. Department of Bioresource Science, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Biochemistry Co. Ltd. of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** Using two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and image analysis system, the changes of the proteins from later stages (after the shortening stage) of embryo of silkworm *Bombyx mori* were analyzed to discover the protein changing pattern during embryo development. A total of 209 specific protein spots were found in the 2D-PAGE pattern of embryos at the head thorax differentiation, reverse, tubercle appearance, head pigmentation, body pigmentation and hatch stages. Among them, the specific protein spots expressed in the head pigmentation stage and body pigmentation stage embryo contributed the largest quantity, namely 55 and 77 respectively. Similar to the changing pattern of the specific protein spots of embryo at the earlier stages, most of these specific protein spots disappeared in the embryos shortly afterwards. This suggested that those specific proteins might be related to the corresponding body characteristics in embryo development.

**Key words:** *Bombyx mori*; protein; two dimensional electrophoresis (2D-PAGE); image analysis; embryo development

家蚕 *Bombyx mori* 属于鳞翅目卵滞育的全变态昆虫, 解除滞育的蚕卵在 25℃ 条件下培养(催青), 经 11 个形态特征明显不同的胚胎时期: 临界 II 期(丙<sub>2</sub>)、神经沟出现(丁<sub>1</sub>)、腹肢突起(丁<sub>2</sub>)、上唇突起(戊<sub>1</sub>)、缩短(戊<sub>2</sub>)、头胸分化(戊<sub>3</sub>)、反转(己<sub>1</sub>)、毛瘤发生(己<sub>2</sub>)、点青(己<sub>3</sub>)、转青(己<sub>4</sub>)和孵化(己<sub>5</sub>)成为幼虫。蚕桑生产上将前 5 个胚胎时期定为催青前期, 后 6 个胚胎时期定为催青后期。家蚕催青期胚胎发育是蚕体内一系列生理生化反应的体现, 是控制胚胎发育的基因有序表达的结果。通过对基因功能的体现者——蛋白质的研究, 可直接了解基因表达调控的某些规律, 发现新的功能基因。颜新培等

(2005)对家蚕催青前期胚胎蛋白质进行了分析, 发现每一个胚胎期都能够检测到特异蛋白质斑点, 这些斑点大多在随后的胚胎发育中消失。我们对家蚕催青后期胚胎蛋白质变化进行了分析, 以便全面了解蚕卵整个催青期胚胎蛋白质变化的规律, 为从分子水平阐明家蚕胚胎发育的机理提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

多化性家蚕品种 P50(大造)由西南农业大学鲁成教授和日本九州大学藤井博教授、伴野丰副教授提供,

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271004); 国家重点基础研究发展规划“973”项目(2005CB121003)

作者简介: 钟伯雄, 男, 1958 年生, 教授, 博士生导师, 从事分子生物学研究, E-mail: bxzhong@zju.edu.cn

收稿日期: Received: 2004-09-07; 接受日期: Accepted: 2005-01-12

制种后采用即时浸酸方法解除滞育 25℃ 下培养。

## 1.2 家蚕催青后期胚胎蛋白质电泳

采用磷酸缓冲液顺序抽提法制备催青后期家蚕胚胎蛋白质样品 (Zhong *et al.*, 2002; 钟伯雄等, 2003), 按 Bradford 法 (詹显全等, 2002) 测定蛋白质浓度, 等电聚焦按照胶内加样方法 (Görg *et al.*, 2000) 进行, 线性干胶条 pH 3 ~ 10、长度 24 cm, 蛋白上样量 200 µg。SDS-PAGE 的分离胶浓度为 15%, 浓缩胶浓度为 5%, 电泳后凝胶银染色 (谢锦云等, 2003)。电泳图谱采用 Amersham Biosciences 公司生产的 ImageMaster 2D™ 图像分析软件检测蛋白斑点, 分子量、等电点和含量 (贾宇峰等, 2001)。

## 2 结果与分析

### 2.1 家蚕催青后期胚胎蛋白斑点的特征

由家蚕催青后期胚胎蛋白质凝胶电泳分析得知, 头胸分化期 (戊<sub>3</sub> 胚胎) 反转期 (己<sub>1</sub> 胚胎) 毛瘤发生期 (己<sub>2</sub> 胚胎) 点青期 (己<sub>3</sub> 胚胎) 转青期 (己<sub>4</sub> 胚胎) 孵化期 (己<sub>5</sub> 胚胎) 和蚁蚕分别出现 11、11、11、55、77、22 和 22 个特异蛋白斑点, 己<sub>3</sub> 和己<sub>4</sub> 胚胎出现的特异蛋白斑点较多 (表 1 和图 1), 其中许多特异蛋白斑点相对含量低于 0.1, 是低丰度蛋白。

表 1 家蚕催青后期胚胎特异蛋白斑点特征

Table 1 Characteristics of the special expressed protein spots from embryo of silkworm at different incubation stages

胚胎期 Embryo stage	蛋白 斑点编号 Protein spot no.	含量 Norm. vol.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)	胚胎期 Embryo stage	蛋白 斑点编号 Protein spot no.	含量 Norm. vol.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)
头胸分化期 (戊 <sub>3</sub> ) Head thorax differentiation	561	0.093	5.053	34.633	转青期 (己 <sub>4</sub> ) Body pigmentation	674	0.419	4.008	24.461
	562	0.053	5.794	40.254		675	0.697	4.106	17.637
	563	0.231	6.089	44.527		676	0.097	5.659	39.616
	564	0.280	6.394	38.570		677	0.181	4.782	25.264
	565	0.062	6.384	37.804		678	0.049	4.555	27.170
	566	0.030	7.130	26.686		679	0.043	4.570	25.113
	567	0.027	7.130	26.226		680	0.038	5.169	25.667
	572	0.105	4.768	36.094		681	0.041	5.288	26.069
	573	0.023	5.219	88.936		682	0.124	5.236	27.318
	574	0.027	5.172	88.704		683	0.146	5.391	33.320
581	0.037	5.908	28.940	684		0.222	5.499	17.527	
反转期 (己 <sub>1</sub> ) Reverse	577	0.084	5.018	67.352		685	0.165	5.494	16.986
	578	0.079	7.279	45.039		686	0.116	3.260	16.079
	580	0.198	6.341	60.610		687	0.391	6.083	42.366
	582	0.042	9.156	29.167		688	1.004	6.310	42.277
	583	0.055	7.722	38.114		689	1.582	6.568	41.928
	584	0.080	6.926	27.000		690	1.755	7.393	41.928
	585	0.070	4.280	25.175		691	0.565	7.223	53.989
	586	0.059	4.212	25.225		692	0.749	6.867	36.107
	587	0.028	5.724	57.116		693	0.316	7.068	36.733
	614	0.024	5.635	43.424	694	0.333	7.053	36.218	
毛瘤发生期 (己 <sub>2</sub> ) Tubercle appearance	615	0.011	5.614	42.739	695	0.324	7.068	35.199	
	579	0.004	4.556	44.677	696	0.530	8.328	43.093	
	588	0.230	4.846	62.264	697	1.589	9.050	42.908	
	589	0.182	4.994	62.105	698	0.144	9.066	30.718	
	590	0.326	5.843	33.416	699	0.090	8.039	28.155	
	591	0.304	8.497	31.662	700	0.093	7.951	27.714	
	592	0.166	4.377	28.008	701	0.126	7.966	26.921	
	595	0.025	7.605	34.687	702	0.123	7.760	26.571	
	596	0.024	7.605	71.235	703	0.073	7.662	26.821	
	597	0.015	7.605	75.472	704	0.234	7.682	25.566	
点青期 (己 <sub>3</sub> ) Head pigmentation	598	0.023	7.088	70.310	705	0.042	8.193	20.449	
	607	0.137	3.570	16.741	706	0.034	8.049	19.717	
	599	0.032	4.582	86.365	707	0.262	7.646	19.221	
	600	0.035	4.632	86.365	708	0.085	7.657	18.780	
	601	0.034	4.980	81.239	709	0.221	7.357	19.675	
	602	0.054	5.367	75.376	710	0.287	7.430	19.140	
	603	0.045	5.284	75.376	711	0.748	7.424	18.506	
	604	0.312	4.272	22.863	712	0.242	7.388	40.217	
	605	0.036	4.212	23.368	713	3.897	7.368	36.444	
	606	0.030	4.123	23.448	714	0.134	7.064	19.717	
转青期 (己 <sub>4</sub> ) Body pigmentation	608	0.063	4.201	22.863	715	0.088	6.914	18.545	
	609	0.081	4.151	22.978	716	0.454	6.728	17.897	
	610	0.210	3.803	18.345	717	0.235	6.377	17.200	
	611	0.320	3.841	16.983	718	0.356	6.397	20.405	
	612	0.056	5.085	22.600	719	0.154	6.392	21.539	
	613	0.293	5.710	32.217	720	0.017	5.716	18.820	
	616	0.241	6.727	36.937	721	0.024	5.716	18.429	
	617	0.075	6.721	37.808	722	1.842	7.455	29.258	

续表 1 Table 1 continued

胚胎期 Embryo stage	蛋白 斑点编号 Protein spot no.	含量 Norm. vol.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)	胚胎期 Embryo stage	蛋白 斑点编号 Protein spot no.	含量 Norm. vol.	等电点 pI	分子量 Molecular weight (kD)
	618	0.051	6.721	38.526		723	1.051	7.244	29.164
	619	0.093	7.147	102.88		724	0.315	7.781	16.493
	620	0.045	6.185	48.226		725	0.306	7.744	16.182
	621	0.035	6.119	36.178		726	0.098	4.065	32.603
	622	0.390	7.108	50.789		727	0.066	4.060	32.295
	623	0.112	7.020	67.874		728	0.029	4.916	18.352
	624	0.091	7.025	66.372		729	0.336	7.414	28.155
	625	0.433	7.108	67.306		730	0.467	8.926	27.566
	626	0.367	7.235	67.118		773	0.131	3.502	15.908
	627	0.021	7.357	58.008		774	0.089	3.239	18.161
	628	0.155	7.351	55.712		775	0.192	4.256	17.637
	629	0.093	7.163	82.427	孵化期 (己 <sub>5</sub> )	731	0.148	4.311	26.947
	630	0.130	7.125	90.791	Hatch	732	0.294	5.081	28.250
	631	0.432	7.600	101.046		733	0.064	5.183	62.288
	632	0.313	7.500	101.653		734	0.101	7.385	29.668
	633	0.137	7.384	101.959		735	0.514	60850	25.933
	634	0.933	6.948	23.055		736	0.406	7.042	26.398
	635	0.459	7.517	21.952		737	0.261	6.862	27.956
	636	0.156	7.379	20.892		738	0.207	6.705	28.082
	637	0.096	7.959	35.411		739	0.181	6.729	27.115
	638	0.066	7.970	34.805		740	0.104	6.796	37.196
	639	0.688	8.158	34.884		741	0.250	4.960	36.110
	640	0.289	8.429	34.416		742	0.102	9.046	27.536
	641	1.258	8.462	33.362		743	0.351	6.868	31.205
	642	0.599	8.352	31.331		744	0.730	5.851	31.121
	643	0.146	8.473	31.871		745	0.074	5.664	31.798
	644	0.911	8.766	33.510		746	0.108	5.652	31.079
	645	0.083	9.081	32.782		747	0.269	5.454	46.184
	646	0.756	8.350	25.700		748	0.278	5.345	46.401
	647	1.654	7.324	63.663		749	0.243	5.255	46.509
	648	0.014	9.230	31.599		750	0.203	5.189	46.509
	649	0.191	8.915	27.018		751	0.219	50526	76.377
	650	0.021	8.026	25.866		752	0.191	5.454	76.830
	651	0.240	7.749	31.132	蚁蚕	753	0.262	4.420	42.406
	652	0.047	7.091	18.988	Newly-hatched larva	754	0.127	4.774	38.522
	653	0.029	4.190	26.257		755	0.104	4.721	38.657
	654	0.024	6.251	20.170		756	0.094	4.626	38.456
	655	0.058	4.029	58.323		757	0.549	4.821	35.286
	656	0.149	4.538	34.571		758	0.288	4.821	34.860
转青期 (己 <sub>4</sub> ) Body pigmentation	657	0.167	4.679	36.617		759	0.461	4.874	34.535
	658	0.474	5.463	70.670		760	0.224	4.779	33.247
	659	0.438	5.324	70.111		761	0.099	4.890	32.844
	660	0.308	5.205	70.111		762	0.330	6.100	32.250
	661	0.040	5.365	60.587		763	0.093	5.714	29.172
	662	1.244	6.356	100.966		764	0.223	5.688	22.730
	663	0.433	7.001	99.845		765	0.654	4.805	23.919
	664	0.385	6.888	100.404		766	0.459	7.241	26.144
	665	0.218	6.790	99.845		767	0.147	7.061	26.893
	666	0.031	6.661	97.375		768	0.465	7.067	40.529
	667	0.036	5.969	85.081		769	0.133	7.569	38.522
	668	0.025	5.876	84.849		770	0.064	7.764	38.456
	669	0.108	3.054	31.071		771	0.727	7.896	39.003
	670	0.325	4.514	45.579		772	0.200	7.754	40.125
	671	0.030	4.452	41.007		776	0.310	7.616	23.856
	672	0.038	4.452	40.528		777	0.222	6.670	31.630
	673	0.332	4.777	37.961					

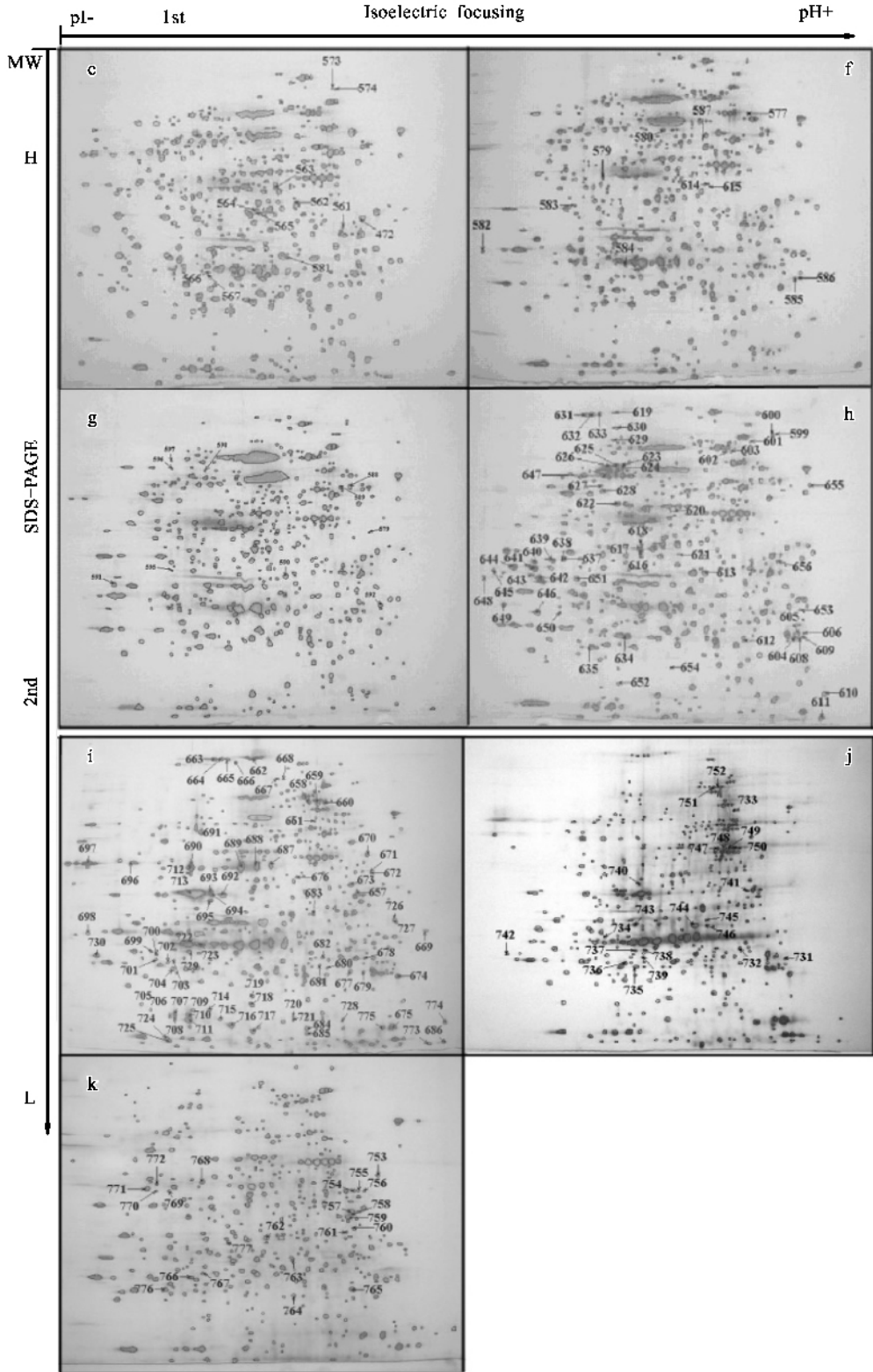


图 1 家蚕催青后期胚胎蛋白质双向凝胶电泳图谱

Fig. 1 2D-PAGE pattern of proteins extracted from the embryo of silkworm *Bombyx mori* at different incubation stages  
 e: 头胸分化期 (戊<sub>3</sub>) Head thorax differentiation; f: 反转期 (己<sub>1</sub>) Reverse; g: 毛瘤发生期 (己<sub>2</sub>) Tubercle appearance; h: 点青期 (己<sub>3</sub>) Head pigmentation; i: 转青期 (己<sub>4</sub>) Body pigmentation; j: 孵化期 (己<sub>5</sub>) Hatch; k: 蚁蚕 Newly-hatched larva.

表 2 家蚕催青后期胚胎发育过程中消失的蛋白斑点分析

Table 2 Disappeared protein spots of silkworm *Bombyx mori* embryo at different incubation stages

胚胎期 Embryo stage	反转期 (己 <sub>1</sub> ) Reverse			毛瘤发生期 (己 <sub>2</sub> ) Tubercle appearance			点青期 (己 <sub>3</sub> ) Head pigmentation			转青期 (己 <sub>4</sub> ) Body pigmentation			孵化期 (己 <sub>5</sub> ) Hatch			蚁蚕 Newly-hatched larva				
头胸分化期 (戊 <sub>3</sub> ) Head thorax differentiation	562	563	566				561			573	574	581								
	567	572																		
反转期 (己 <sub>1</sub> ) Reverse				584			577	578	580	585	586							587	614	615
							582	583												
毛瘤发生期 (己 <sub>2</sub> ) Tubercle appearance							579	591	596	595				588	589					
							597	598												
点青期 (己 <sub>3</sub> ) Head pigmentation										601	610	611	599	600	602			653		
										612	616	617	603	605	606					
										618	621	623	608	609	619					
										624	625	626	620	631	632					
										627	628	629	633	635	637					
										630	634	636	640	643	649					
										638	639	641	650	652	654					
										642	644	645	655							
										647	648	651								
										657	658	659	661	662	663					
转青期 (己 <sub>4</sub> ) Body pigmentation										660	666	667	664	665	668					
										669	677	678	670	671	672					
										679	684	685	676	683	686					
										687	688	689	692	693	694					
										690	691	696	695	699	700					
										697	698	706	701	702	703					
										708	712	716	705	707	714					
										720	721	722	715	718	719					
										723	725	729	724							
										730										
孵化期 (己 <sub>5</sub> ) Hatch																		731	733	734
																		736	738	739
																		741	742	745
																		746	747	748
																		749	750	751
																		752		

## 2.2 家蚕催青后期胚胎蛋白斑点的变化

分析家蚕催青后期各时期胚胎蛋白质双向电泳图谱得知,出现在戊<sub>3</sub>、己<sub>1</sub>、己<sub>2</sub>、己<sub>3</sub>、己<sub>4</sub>、己<sub>5</sub>各个胚胎的特异蛋白斑点,在邻近的下一个胚胎马上消失的蛋白斑点数为5、1、5、27、31和16个,分别占各自胚胎特异蛋白斑点数的45.45%、9.09%、45.45%、49.09%、40.26%和72.73%,在邻近的第二个胚胎消失的蛋白斑点数为0、5、1、22和28个,分别占各自胚胎特异蛋白斑点数的0、45.45%、9.09%、40%和36.36%(表2)。可见在催青期各个胚胎中出现的特异蛋白斑点大多在随后的两个胚胎发育期消失。

## 3 讨论

颜新培等(2005)研究发现家蚕在丁<sub>1</sub>、丁<sub>2</sub>、戊<sub>1</sub>和戊<sub>2</sub>胚胎阶段都出现一些特异蛋白斑点,这些蛋白斑点大部分在随后的两个胚胎发育期中消失。本研究发现在戊<sub>3</sub>、己<sub>1</sub>、己<sub>2</sub>、己<sub>3</sub>、己<sub>4</sub>、己<sub>5</sub>胚胎和蚁蚕的蛋白质双向电泳图谱中检测到共209个特异蛋白斑点,这些特异蛋白斑点大多也是在随后的两个胚胎发育期中消失,说明家蚕胚胎发育过程的特异蛋白具有相类似的变化规律,特定胚胎发育时期出现的特异蛋白可能与相应胚胎的形体特征发育有关。如果能够对这些特异蛋白进行序列分析,将有利于了解这些蛋白的生理功能,为阐明家蚕胚胎生长发育

的分子机理提供信息。

颜新培等(2005)研究表明在丙<sub>2</sub> 胚胎检测到的467 个蛋白斑点中,共有193 个蛋白斑点在胚胎发育过程中先后消失,单在己<sub>3</sub> 胚胎中消失的蛋白斑点达19 个,己<sub>4</sub> 胚胎中消失的蛋白斑点达53 个,在己<sub>5</sub> 胚胎中消失的蛋白斑点达40 个,分别占总消失蛋白斑点的9.84%(19/193),27.46%(53/193)和20.73%(40/193),在催青的最后3 个胚胎中合计消失的蛋白斑点数高达58.03%。在家蚕整个催青期胚胎中,己<sub>3</sub> 和己<sub>4</sub> 胚胎出现的特异性蛋白斑点数最多,分别为55 和77 个,而已<sub>3</sub>、己<sub>4</sub> 和己<sub>5</sub> 胚胎的生理生化反应也比较激烈,这一结果暗示了胚胎的生理生化反应与蛋白质的消长变化具有一定的同步性。

### 参 考 文 献 (References)

Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W, 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradient. *Electrophoresis*, 21: 1 037 - 1 053.

Jia YF, Lin QX, Guo YJ, Guo Y, Liu SJ, 2001. The image analysis of two dimensional gel electrophoresis. *Prog. Biochem. Biophys.*, 28(2): 246 - 250. [ 贾宇峰, 林秋霞, 郭尧君, 郭鹂, 刘少君, 2001. 蛋白质双向电泳图像分析. *生物化学与生物物理进展*, 28(2): 246 - 250 ]

Xie JY, Li XL, Chen P, Cao ML, Chen LB, Liang SP, 2003. Preliminary

proteomic analysis of the proteins of thermo-sensitive genetic sterile rice anther. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.*, 19(2): 215 - 221. [ 谢锦云, 李小兰, 陈平, 曹梦林, 陈良碧, 梁宋平, 2003. 温敏核不育水稻花药蛋白质组初步分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 19(2): 215 - 221 ]

- Yan XP, Zhong BX, Xu MK, Liang JS, Shen FY, 2005. Analysis of protein patterns from embryo of silkworm *Bombyx mori* at earlier stage by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Entomol. Sin.*, 48(2): 295 - 300. [ 颜新培, 钟伯雄, 徐孟奎, 梁建设, 沈飞英, 2005. 家蚕催青前期胚胎蛋白质双向电泳图谱分析. *昆虫学报*, 48(2): 295 - 300 ]
- Zhan XQ, Guan YJ, Li C, Chen ZC, Xie JY, Chen P, Liang SP, 2002. Differential proteomic analysis of human lung adenocarcinoma cell line A-549 and normal cell line HBE. *Acta Biochem. Biophys. Sin.*, 34(1): 50 - 56. [ 詹显全, 关勇军, 李萃, 陈主初, 谢锦云, 陈平, 梁宋平, 2002. 人肺腺癌细胞 A-549 和正常细胞 HBE 的蛋白质组差异分析. *生物化学与生物物理学报*, 34(1): 50 - 56 ]
- Zhong BX, Weng HB, Fang WH, 2002. Preparation of protein samples for gel electrophoresis by sequential extraction. *J. Zhejiang Univer. Sci.*, 3(5): 606 - 610.
- Zhong BX, Yan HY, Shen FY, Li JK, Zhou L, 2003. Preparation of silkworm protein using two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Serico. Sin.*, 29(4): 427 - 432. [ 钟伯雄, 颜海燕, 沈飞英, 李建科, 周丽, 2003. 家蚕蛋白质双向电泳的样品制备方法. *蚕业科学*, 29(4): 427 - 432 ]

(责任编辑: 黄玲巧)