

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2014.01.006

斑节对虾血淋巴低丰度蛋白双向电泳技术体系的优化

徐梦婷^{1,2}, 傅明骏¹, 黄建华¹, 周发林¹, 邱丽华¹, 江世贵¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广州 广东 510300;
2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 文章探索并优化了斑节对虾(*Penaeus monodon*)血淋巴双向电泳技术体系, 对斑节对虾血淋巴总蛋白抽提方法进行优化, 减小高丰度蛋白的影响; 对双向电泳过程各步骤, 如 IPG 胶条 pH 范围的选择、等电聚焦程序、上样量等进行了优化, 得到高分辨率的 2-DE 图谱, 用 PDQuest 软件进行了初步分析。结果表明, 用 PEG 6000 能更快捷有效地去除血淋巴中的高丰度蛋白, 增加低丰度蛋白的点数及浓度; 在抽提蛋白过程中, 利用预冷的 80% 丙酮洗涤, 在一向电泳过程中设置 100 V 低压除盐, 能更有效地去除蛋白中的盐分; 采用 18 cm、pH 3~10 NL 的中型胶条, 能更好地显示低丰度蛋白点的分布; 被动水化上样 300 μg 结合硝酸银染色方法, 能有效提高双向电泳图谱中蛋白点的分离度和分辨率。该试验为斑节对虾及其他甲壳动物血淋巴蛋白质组学相关研究提供了稳定可重复的研究方法。

关键词: 斑节对虾; 血淋巴; 低丰度蛋白; 蛋白质组

中图分类号: S 917

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2014)01-0035-08

Optimization of two-dimensional electrophoresis (2-DE) technique in low abundance hemolymph proteome of *Penaeus monodon*

XU Mengting^{1,2}, FU Mingjun¹, HUANG Jianhua¹, ZHOU Falin¹, QIU Lihua¹, JIANG Shigui¹

(1. Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: We optimized the two-dimensional electrophoresis technique for analyzing hemolymph in *Penaeus monodon*. To obtain high resolution 2-DE patterns, we examined the protein extraction, IPG-strip length, separation scope of IPG strip, sample loading amount and focusing condition by PDQuest software. Results indicate that PEG 6000 removed high abundance protein in haemolymph faster and more effectively, and increased the concentration of low abundance protein. The protein preparation with 80% TCA-acetone extraction treatment in isoelectric focusing was effective. The optimum 2-DE patterns in the proteins of *Penaeus monodon* were successfully separated by using pH 3~10 NL IPG strips with 18 cm length and 300 μg protein sample. The study provides stable and replicable method for relevant studies on hemolymph proteome of *P. monodon* and other similar crustaceans.

Key words: *Penaeus monodon*; haemolymph; low abundance protein; proteomics

收稿日期: 2013-09-10; 修回日期: 2013-10-17

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-47); 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2012AA10A409); 引进国际先进农业科学技术计划(948计划)项目(2013-Z14); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201201B02, A201201C01)

作者简介: 徐梦婷(1988-), 女, 硕士研究生, 从事水产种质资源与遗传育种研究。E-mail: marlynxv@foxmail.com

通信作者: 江世贵(1964-), 男, 博士, 研究员, 从事种质资源与遗传育种研究。E-mail: jiangsg@21cn.com

双向电泳技术是由 O'FARRELL'S 于 1975 年首次建立,成功地分离约 1 000 个大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 蛋白,并表明蛋白质谱不是稳定的,而是随环境而变化^[1]。蛋白质组学最早由 WILKINS 在 1995 年提出,用双向电泳和时间飞行质谱 (MALDI-TOF) 联用的方法对蛋白进行分离鉴定^[2]。差异蛋白质组学是由双向电泳技术发展而来,研究某种特定因素引起的样本本身或不同样本之间蛋白表达差异,鉴定筛选蛋白,并进一步研究编码该差异蛋白的基因,扩展对该基因功能的了解^[3]。在技术不断发展的过程中,双向凝胶电泳技术仍然是研究差异蛋白质组的基础方法之一。目前,蛋白质组学在水产研究中的应用还较少,相关的技术手段仍处于摸索阶段^[4]。秦兆宇等^[5]初步建立了中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 肝胰腺蛋白双向电泳技术,极大拓宽了对虾的免疫生理研究途径。黄冰心等^[6]提取中国明对虾的血浆蛋白用 SDS-PAGE 进行分离,利用液相色谱-串联质谱系统进行质谱分析,鉴定了 66 个中国明对虾血浆蛋白质。YAO 等^[7]则用双向凝胶电泳和质谱相结合的方法,研究中国明对虾注射海带多糖后血淋巴中 AK (arginine kinase) 蛋白的变化情况,并鉴定出中国明对虾 AK 蛋白分子量大小及等电点。WANG 等^[8]也以血淋巴为样本研究了对虾白斑病毒感染的免疫应答。但目前国内外关于斑节对虾血淋巴的研究报道仍较少,在虾血淋巴研究方面,由于对虾等甲壳类动物血淋巴成分与哺乳动物有较大差异,其中高丰度蛋白中的血蓝蛋白为节肢动物和环节动物所特有。在双向电泳技术中,高丰度蛋白的存在易造成背景颜色深、蛋白点拖尾、遮盖低丰度蛋白点等问题,对虾血淋巴蛋白质组的研究造成阻碍。而普通的去除哺乳动物血浆中高丰度蛋白的相关试剂盒并不适用于甲壳动物血淋巴。如何更好地去除对虾血淋巴中的高丰度蛋白,研究低丰度蛋白点,优化血淋巴双向电泳图像,一直有待研究。

蛋白抽提和双向电泳技术 (2-DE) 是蛋白质组学研究的重要条件和关键技术。该研究通过去除斑节对虾 (*Penaeus monodo*) 血淋巴样品中高丰度蛋白,提取低丰度全蛋白,并对双向凝胶电泳部分环节进行优化,建立一种能有效显现斑节对虾血淋巴低丰度蛋白的双向凝胶电泳技术,为进一步研究探索斑节对虾血淋巴中低丰度蛋白的功能提供了有效的技术手段。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与预处理

鲜活斑节对虾购于广州市海珠区新港西路,共 10 尾,平均体长 (15.3 ± 0.5) cm,在实验室水箱内加少量冰使水温降至 $12 \sim 14$ °C,充氧暂养数小时,使其处于休眠状态。用预先吸入 0.5 mL 抗凝剂 (柠檬酸三钠 19.3 mmol·L⁻¹,氯化钠 239.8 mmol·L⁻¹,葡萄糖 182.5 mmol·L⁻¹,ED-TA-Na₂ 6.2 mmol·L⁻¹) 的注射器分别从健康对虾第一腹节基部抽取血淋巴 0.5 mL,混匀后 4 °C 下 800 g 离心 20 min,取血浆分装后于 -80 °C 保存备用。

1.2 试剂与仪器

IPG 干胶条 (pH 3 ~ 10 NL/pH 3 ~ 10, 7 cm/ 18 cm)、IPG Buffer ($3 \sim 10$ NL/ $3 \sim 10$)、二硫苏糖醇 (DTT)、硫脲 (thiourea) 和碘乙酰胺购于美国 GE 公司; CHAPS、十二烷基硫酸钠 (SDS) 和尿素 (Urea) 购于 Sigma 公司; 30% 丙烯酰胺混合液、四甲基乙二胺 (TEMED) 购于美国 Bio-Rad 公司; 其他试剂均为国产分析纯。所有溶液均用 Milli-Q 水配制。等电聚焦电泳仪 (Ettan IPGphor III)、垂直板电泳仪 (Ettan DALTsix) 和高分辨扫描仪 (ImageScanner III, 美国 GE 公司出品); 台式冷冻高速离心机 (美国 Hitachi 公司出品); 超低温冰箱 (Haier 公司出品)。

1.3 样品高丰度蛋白的去除

分别向分装为 1 mL·试管⁻¹ 的血淋巴中加入 9%、12% 和 15% PEG 6000,震荡混匀至完全溶解,冰上静置 30 min; $10\ 000$ g, 4 °C 离心 10 min,取上清液。用 TCA/丙酮法抽提得到干燥淡白粉末, -80 °C 保存。

1.4 样品的制备与定量

以 1.3 血淋巴上清液为材料,每管加 1 mL 上清液,3 倍体积预冷 TCA/丙酮 (含 0.7% β -巯基乙醇),震荡混匀, -20 °C 悬重沉淀 3 h 以上, $15\ 000$ g, 4 °C 离心 1 h,弃上清。将上述样品分为 2 组,分别用 2 mL 预冷纯丙酮和预冷 80% 丙酮 (含 0.7% β -巯基乙醇) 洗涤沉淀, -20 °C 悬重沉淀 1 h; $15\ 000$ g, 4 °C,离心 1 h,弃上清。重复洗涤步骤 $2 \sim 3$ 次, $15\ 000$ g, 4 °C 再次离心 1 min,用 10 μ L 枪头吸去残留液体,将沉淀放在通风橱中 $5 \sim 10$ min,得干燥沉淀 -80 °C 保存,或用裂解液

(尿素 $7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、硫脲 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、CHAPS 2%、溴酚蓝 0.001%、DTT $65 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、IPG Buffer 3 ~ 10/3 ~ 10NL $5 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) 溶解后进行后续试验。所有步骤在冰上操作。采用 GE 公司 2D Quant 蛋白定量试剂盒测定蛋白溶液质量浓度。

1.5 SDS-PAGE 电泳

用裂解液分别裂解 9%、12% 和 15% 的样品后, 用 2D Quant 蛋白定量试剂盒测定每份蛋白溶

液质量浓度, 按每孔 $40 \mu\text{g}$ 计算上样量。以 5% 的浓缩胶和 12% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。

1.6 双向电泳

用裂解液裂解蛋白冻粉并定量, 根据浓度进行上样, 选择被动水化。将胶条至于上样盘中, 盖好密封盖, 室温过夜(大于 12 h)。

参照 IPGphor III 等电聚焦系统使用指南进行第一向等电聚焦, 具体见表 1。

表 1 不同方案等电聚焦程序

Fig. 1 Immobiline DryStrip IEF program

升压方式 boost method	程序一 Program I	程序二 Program II	程序三 Program III
线性升压 Stp	—	100 V, 3 h	100 V, 3 h
线性升压 Stp	250 V, 30 min	250 V, 1 h	250 V, 1 h
快速升压 Grd	1 000 V, 30 min	1 000 V, 1 h	1 000 V, 1 h
快速升压 Grd	5 000 V, 2 h	5 000 V, 3 h	8 000 V, 3 h
线性升压 Stp	5 000 V, 50 000 Vh	5 000 V, 50 000 Vh	8 000 V, 64 000 Vh r
线性升压 Stp	500 V, 保持	500 V, 保持	500 V, 保持

等电聚焦完毕后对胶条进行 2 步平衡, 平衡液使用量参照 GE 公司双向电泳简易操作指南。7 cm 胶条使用平衡液 $2.5 \sim 5 \text{ mL}\cdot\text{条}^{-1}$, 18 cm 胶条使用平衡液 $10 \text{ mL}\cdot\text{条}^{-1}$ 。将胶条置于含有 1% DTT 平衡缓冲液的水化槽中, 于摇床平衡 15 min; 取出胶条后放入含有 2.5% 碘乙酰胺平衡缓冲液的水化槽中, 再平衡 15 min。

二向 SDS-PAGE 电泳采用 12% SDS-PAGE 混合溶液。将 2 步平衡后的 IPG 胶条移至凝胶上方, 用 0.5% 的低熔点琼脂糖封胶。上下槽分别加入电泳缓冲液。起始电流为 $10 \text{ mA}/\text{gel}$, 1 h 后加大电流至 $38 \text{ mA}/\text{gel}$, 直至溴酚蓝到凝胶边缘。

1.7 染色

1) 固定(10% 冰乙酸 + 40% 乙醇), 15 min, 2 次; 2) 敏化(30% 乙醇 + 6.8% 乙酸钠 + 0.2% 硫代硫酸钠), 30 min; 3) 水洗 5 min, 3 次; 4) 0.25% 硝酸银银染, 30 min; 5) 水洗 1 min, 2 次; 6) 显色(2% 碳酸钠 + $0.8 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲醛溶液), 5 min, 3 次; 7) 终止($11.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA), 10 min; 8) 水洗 5 min, 3 次。

1.8 凝胶图像扫描与图谱分析

采用高分辨扫描仪对银染凝胶进行灰度扫描, 扫描方式为透射, 图谱保存为 tif 格式。采用 PDQuest

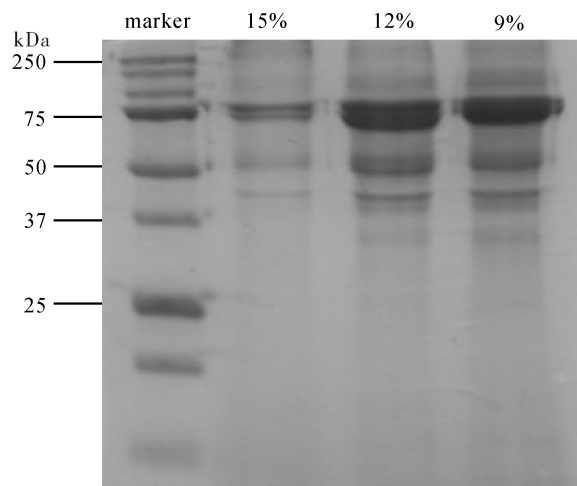


图 1 9%、12% 和 15% 组在 SDS-PAGE 中的分离效果

Fig. 1 9%, 12% and 15% PEG 6000 in protein extraction by SDS-PAGE map

8.0 二维电泳图片分析软件对图谱进行分析。

2 结果

2.1 不同 PEG 6000 浓度组去高丰度蛋白效果比较

样品定量后, 每孔上样量为 $10 \mu\text{L}$, SDS-PAGE 见图 1。9%、12% 和 15% 组中高丰度蛋白质量浓度较空白组都有所降低, 且高丰度蛋白质量

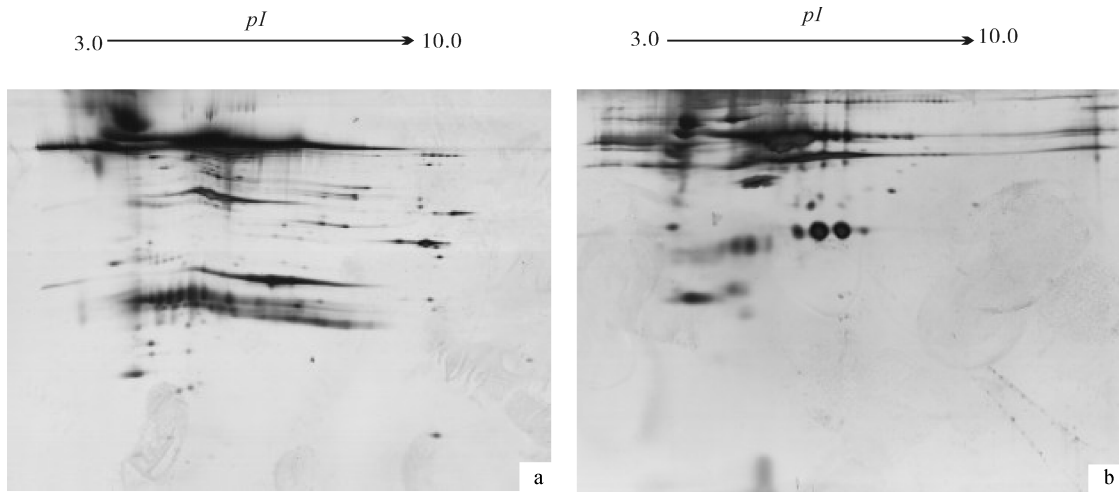


图2 不同体积分数丙酮洗涤蛋白分离效果

a. 方案1; b. 方案2

Fig. 2 Different TAC concentrations in protein extraction by 2-DE maps

a. Program 1; b. Program 2

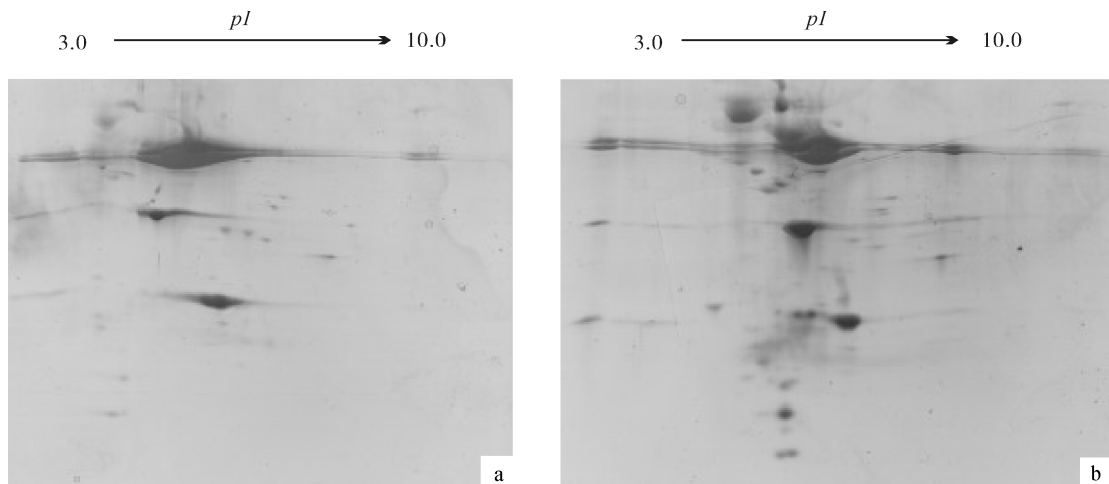


图3 等电聚焦不同程序对蛋白分离效果的影响

a. 程序I; b. 程序II

Fig. 3 Different IPG programs in protein extraction by 2-DE maps

a. Procedure I; b. Procedure II

浓度依次降低。

2.2 80%预冷丙酮处理样品对电泳图的影响

分别用方案1(纯预冷丙酮)和方案2(80%预冷丙酮)洗涤蛋白沉淀后,用程序I进行第一向等电聚焦。通过双向凝胶电泳图显示,用方案1得到的电泳图(图2-a),横纹明显少于方案2得到的电泳图(图2-b)。

2.3 不同一向程序的电泳图谱

用15% PEG 6000 样品上样7 cm pH 3~10 IPG 胶条,上样量为100 μg 。首先用GE推荐程序,即

程序I进行一向等电聚焦,聚焦情况不理想,不同蛋白分离情况较差,蛋白点横向拖尾现象较为严重(图3-a)。用改进程序II进行一向等电聚焦,与程序I结果相比,聚焦情况明显改善,蛋白点图清晰(图3-b)。

2.4 不同pH范围电泳图谱

首先对pH 3~10的IPG胶条用程序II进行双向电泳,可以看出蛋白点堆积,尤其在pH 5~8部分分离效果不佳,且存在拖尾现象(图4-a)。改用pH 3~10 NL的IPG胶条进行比对试验。在pH

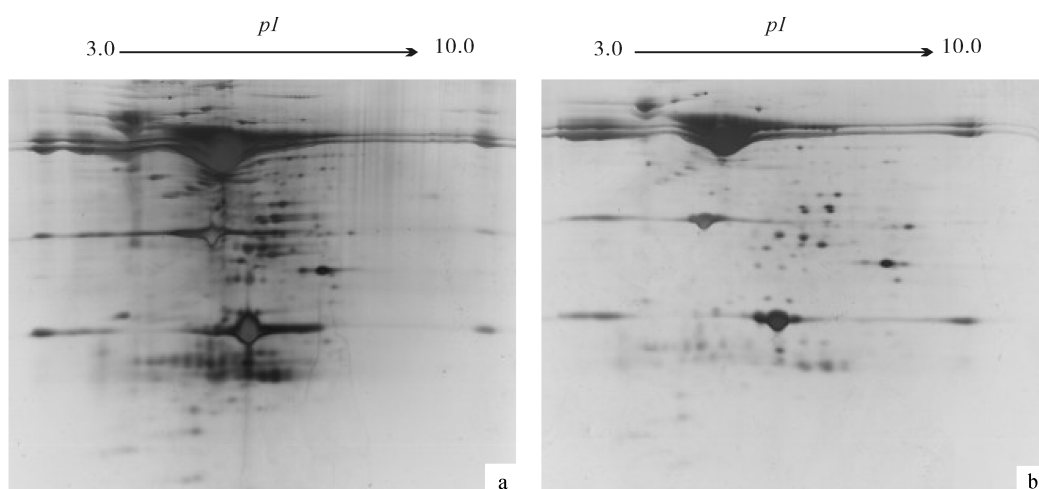


图4 不同 IPG 胶条对蛋白分离效果的影响

a. 7 cm pH 3 ~ 10; b. 7 cm pH 3 ~ 10 NL

Fig. 4 Different IPG strips in protein extraction by 2-DE maps

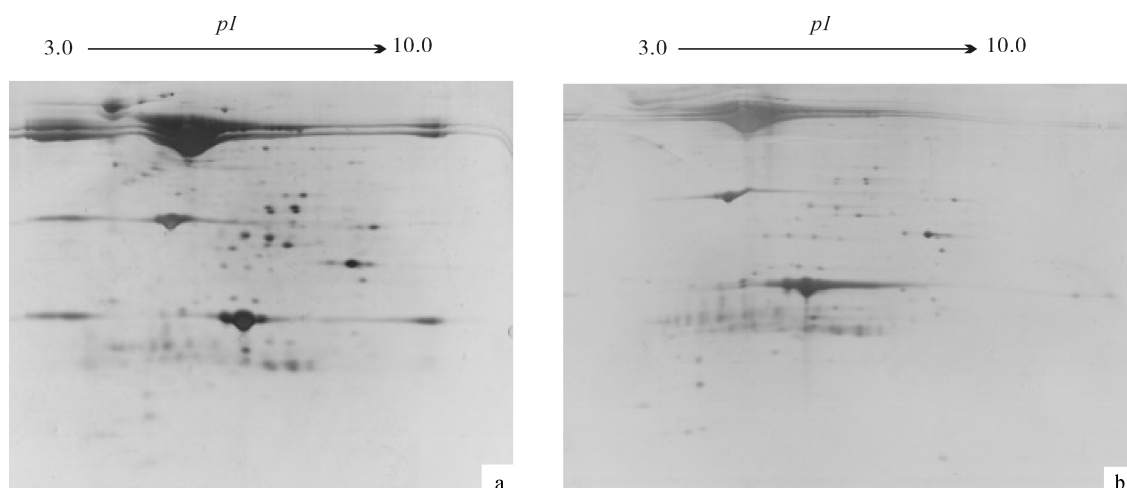


图5 不同长度范围 IPG 胶条对蛋白分离效果的影响

a. 7 cm pH 3 ~ 10 NL; b. 18 cm pH 3 ~ 10 NL

Fig. 5 Different IPG lengths in protein extraction by 2-DE maps

5~8 部分背景清晰度改善, 蛋白点分辨率提高(图 4-b)。

2.5 不同长度范围 IPG 胶条的电泳图谱

先采用 7 cm 的 IPG 胶条进行双向电泳(图 5-a), 得到的电泳图点较为密集, 对蛋白点切胶造成一定影响, 低丰度蛋白很难被分辨。之后采用 18 cm 的 IPG 胶条进行双向电泳(图 5-b), 蛋白点间距加大, 点图清晰。

2.6 不同上样量双向电泳结果的比较

用 18 cm pH 3~10 NL 的 IPG 胶条, 分别上样 150 μg 、300 μg 和 450 μg , 得出的双向电泳图进行比较(图 6-a、b、c)。上样量为 150 μg 时蛋白

点极少, 300 μg 和 450 μg 电泳图差别不大, 因此, 上样量可选择 300 μg 。

2.7 不同 PEG 6000 浓度组去高丰度蛋白的双向电泳图比较

综合上述优化方法, 用 80% 丙酮洗涤蛋白样品, 对 18 cm pH 3~10 NL 的 IPG 胶条上样 300 μg , 并在一向等电聚焦过程中 3 h 100 V 低压除盐程序, 对 PEG 6000 9%、12% 和 15% 组血淋巴蛋白样品进一步进行双向电泳检测。通过 PDQuest 软件扫描, 9% PEG 6000 组有蛋白点 687 个, 12% PEG 6000 组有蛋白点 626 个, 15% PEG 6000 组有蛋白点 429 个。进一步对图 7-a、b、c 中方框内

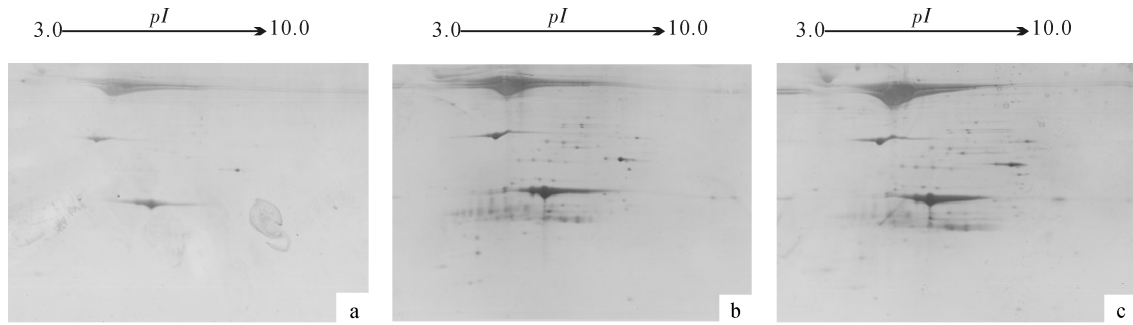


图6 不同上样量对蛋白分离效果的影响

a. 18 cm pH 3 ~ 10, 上样量 150 µg; b. 18 cm pH 3 ~ 10, 上样量 300 µg; c. 18 cm pH 3 ~ 10, 上样量 450 µg

Fig. 6 Different sample loadings in protein extraction by 2-DE maps

a. 18 cm pH 3 ~ 10, sample 150 µg; b. 18 cm pH 3 ~ 10, sample 300 µg; c. 18 cm pH 3 ~ 10, sample 450 µg

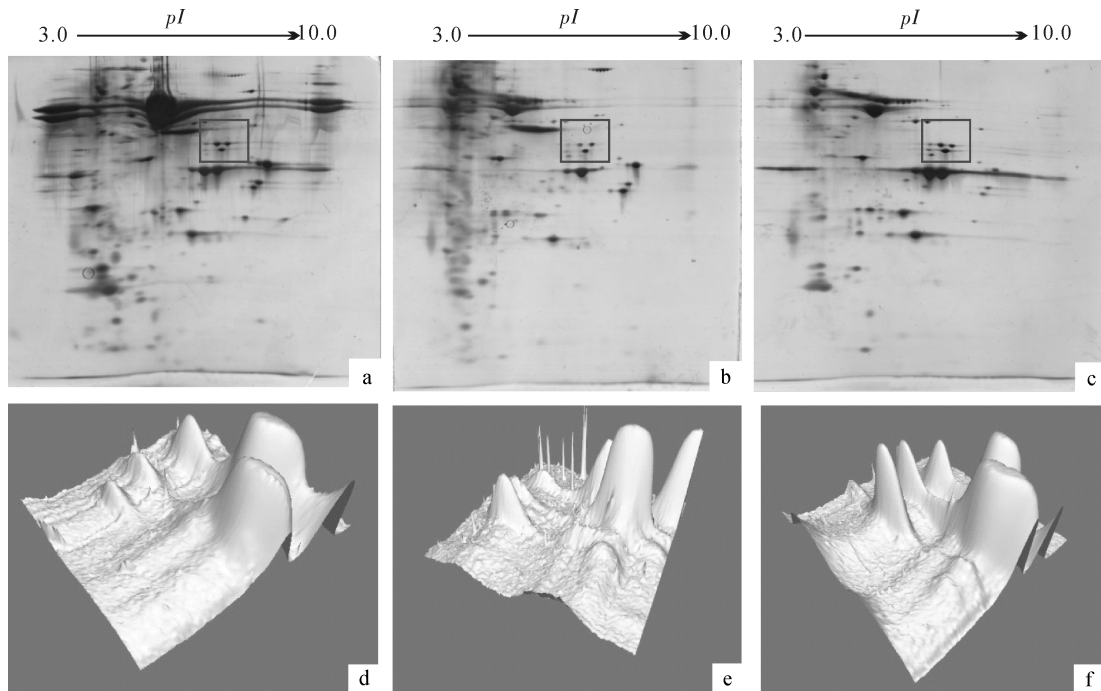


图7 不同 PEG 6000 质量分数的斑节对虾血淋巴蛋白质 2-DE 图谱和 3D 图像显示

a. 9%; b. 12%; c. 15%; d. 9% PEG 6000; e. 12% PEG 6000; f. 15% PEG 6000

Fig. 7 Different PEG 6000 concentrations of hemolymph proteome from *P. monodon* by 2-DE maps and 3D images

蛋白点进行 3D 扫描, 图像显示见图 7 - d、e、f, 低丰度蛋白质量浓度依次升高。

3 讨论

3.1 优化程序对蛋白样品除盐效果的影响

蛋白样品的制备是能否得到清晰的双向电泳图谱的关键步骤^[9]。斑节对虾血淋巴中含有微量无机盐成分^[10], 影响一向电泳的等电聚焦过程。试验基于 ANDERSON^[11]、YASMIN 和 SHARMA^[12]的

操作方法, 用 80% 的预冷丙酮代替纯预冷丙酮对蛋白沉淀进行洗涤, 能有效降低样品中的盐分, 减少电泳图谱中的横条纹。由于极性强的有机溶剂丙酮能破坏蛋白质的水化层而使蛋白质沉淀^[13], 同时 20% 的水能有效溶解蛋白沉淀中的盐离子而不至于使蛋白溶解。样品盐分的去除有利于一向 IEF 聚焦, 避免由于聚焦失败导致的蛋白点无法分离。根据双向电泳一向等电聚焦原理, 增加 100 V 低压线性除盐, 根据盐离子和蛋白的带电情况, 在低压

条件下首先去除带少量电荷的盐离子而对蛋白无明显影响。且除盐后的 IPG 胶条通过电流小, 温度低, 能保证高压过程聚焦的顺利进行。同时, 上述 2 种除盐方法具有稳定性强、易操作、成本低廉等优势。一向等电聚焦 (IEF) 过程中对蛋白样品进行有效分离, 以保证二向中识别更多的蛋白点。

3.2 不同 pH 范围电泳图谱的效果比较

合适的 pH 范围能有效地分离蛋白质^[14], 清晰的点图能为后续试验提供基本保障。试验首先用 pH 为 3~10 的 IPG 胶条分析了斑节对虾血淋巴中低丰度蛋白的分布情况, 从 2-DE 图谱中可以看出对虾肌肉蛋白质等电点主要集中在 pH 4~8 部分。刘志远等^[15]尝试用 pH 4~7 和 pH 5~8 的 IPG 胶条进行了对比试验, 其中 pH 4~7 的胶条得到的图谱效果更佳, 但无法避免部分低丰度蛋白被掩盖。SOMBOONWIWAT 等^[16]也在用 2-DE 研究哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 感染斑节对虾的试验中, 同时对 pH 3~10 和 pH 4~7 的 IPG 胶条效果进行了比较, pH 4~7 的图像更清晰, 但与 pH 3~10 的图像相比存在漏点情况。MOLLOY 等^[17]在早期试验中也证实了这种情况。笔者试验选用 pH 3~10 NL 的胶条, 两端 pH 3~5 和 pH 8~10 部分被压缩, pH 5~8 部分呈线性关系, 整体呈非线性关系。利用 pH 3~10 NL 的 IPG 胶条能有效分离低丰度蛋白的同时, 避免靠近酸性端和碱性端胶条两头的蛋白点的丢失, 从而达到良好的分离效果。

3.3 不同长度范围 IPG 胶条的效果比较

试验首先选择长度为 7 cm 的 IPG 胶条进行分析, 可以得到较为清晰的图谱。但由于受长度限制, 蛋白点密集部分分辨率不够, 且蛋白点过于密集对后续切胶的操作会造成一定影响, 使不同蛋白点不能单独分离。在优化试验中, 改用长度为 18 cm 的 IPG 胶条, 蛋白分辨率显著提高, 蛋白点点距加大, 获得更为清晰的图谱。

3.4 不同上样量双向电泳结果的比较

合适的蛋白上样量直接决定了 2-DE 图谱的质量, 上样量过大, 有利于低丰度蛋白的检测, 但过量部分会影响等电聚焦, 使等电荷的蛋白无法较好地聚集而造成蛋白点水平拖尾, 且银染染色时高丰度蛋白会掩盖其周围的一些蛋白点; 上样量过小时, 虽然可以得到较为清晰的图谱, 但总蛋白点数会大大减少, 且一些丰度相对低的蛋白不能被检测, 可能会错过许多有研究价值的蛋白^[18]。GE 手

册中的推荐上样量为 150 μg , 但试验结果证明, 按推荐上样量进行试验得到的图谱点数比预期偏少。武阳等^[19]也在华溪蟹 (*Sinopotamon sp.*) 主要组织蛋白质双向电泳技术体系的建立试验中证实了这一结果。上样量为 150 μg 时因上样量太少造成蛋白点极少; 300 μg 和 450 μg 电泳图谱结果相似, 但上样量为 450 μg 时出现蛋白点水平拖尾现象, 因此上样量选择 300 μg 。

3.5 不同 PEG 6000 浓度组去高丰度蛋白的双向电泳图比较

相同上样量条件下, 9%、12% 和 15% PEG 6000 组高丰度蛋白总量依次减少, 其中 15% 组高丰度蛋白明显减少 (图 1)。VIKARI^[20] 早先利用质量分数为 12% 的 PEG 6000 沉降人血浆中的高密度脂蛋白和低密度脂蛋白取得良好效果。王宝杰^[21]也在关于中国明对虾血淋巴蛋白质组学的初步研究中对固定化金属亲和层析法 (IMAC)、PEG 6000 沉淀法和超速离心法去除血淋巴中高丰度蛋白效果进行了比较, 认为超速离心法和 9% PEG 6000 去除高丰度蛋白效果较好。该试验结果也验证了不同质量分数 PEG 6000 去除血淋巴高丰度蛋白的效果。综合上述优化步骤, 9%、12% 和 15% PEG 6000 组高丰度蛋白总量依次减少, 低丰度蛋白点数及质量浓度相对增加 (图 7)。但由于相同上样量情况下, 15% 组总蛋白点数明显低于其他 2 组, 表明试验过程中也不适宜无限制提高 PEG 6000 质量分数来去除高丰度蛋白。笔者试验采用质量分数为 15% PEG 6000 来去除斑节对虾血淋巴中高丰度蛋白, 优化双向电泳各步骤及试验条件, 得到分辨率较高的 2-DE 图谱, 为斑节对虾低丰度蛋白的研究提供了条件。

4 结论

试验通过优化斑节对虾血淋巴双向电泳技术, 得到一套经济快速的试验方法。用 15% PEG 6000 能更快捷有效地去除血淋巴中的高丰度蛋白, 增加低丰度蛋白的点数及质量浓度; 利用预冷的 80% 丙酮进行二次洗涤, 一向电泳过程中设置 100 V 低压除盐, 能更有效地去除蛋白样品中的盐分; 采用 18 cm, pH 3~10 NL 的中型胶条, 能更好地显示低丰度蛋白点的分布; 被动水化上样 300 μg 结合硝酸银染色方法, 能有效提高双向电泳图谱中蛋白点的分离度和分辨率。该试验对斑节对虾血淋

巴双向电泳技术进行优化,减少了高丰度蛋白对试验的影响,提高了低丰度蛋白的点数及质量浓度。为斑节对虾及其他甲壳动物血淋巴蛋白质组学相关后续研究提供可重复和稳定的试验方法。

参考文献:

- [1] FARRELL O. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. *Biol Chem*, 1975, 250(10): 400-421.
- [2] CORDWELL S J, WIKINS M R, CERPAPOLIAK A, et al. Cross-species identification of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption ionisation/time-of-flight mass spectrometry and amino acid composition[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(1): 438-443.
- [3] 袁雪宇, 吴国亭, 韩玉麒. 差异蛋白质组学技术和应用前景[J]. *同济大学学报*, 2004, 25(4): 349-355.
- [4] MARTINEZ I, ŠLIŽYTĖ R, DAUKŠAS E. High resolution two-dimensional electrophoresis as a tool to differentiate wild from farmed cod (*Gadus morhua*) and to assess the protein composition of klipfish[J]. *Food Chem*, 2007, 102(2): 504-510.
- [5] 秦兆宇, 刘师莲, 宋春华, 等. 中国对虾肝胰腺蛋白质组学双向电泳技术体系的建立[J]. *生物医学工程研究*, 2007, 26(1): 80-83.
- [6] 黄冰心, 蒋昊, 张继泉, 等. SDS-PAGE 与液质联用技术分离和鉴定中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血浆蛋白[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(2): 208-213.
- [7] YAO C L, WUA C G, XIANG J H, et al. Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 19(4): 317-329.
- [8] WANG H C, WANG H C, LEUC J H, et al. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection[J]. *Dev Comp Immunol*, 2007, 31(7): 672-686.
- [9] BLACKSTOCK W P, WEIR M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins [J]. *Trends Biotechnol*, 1999, 17(3): 121-127.
- [10] AFREDO M H, AGUSTIN L C, FERNANDO D H. Effects of salinity on electrolyte levels (Na, K, and Cl⁻) in the hemolymph of the Pacific whiteshrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol*, 2010, 5(5): 56-59.
- [11] ANDERSON N L, ANDERSON N G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(11): 845-867.
- [12] AHMAD Y, SHARMA N. An effective method for the analysis of human plasma proteome using two-dimensional gel electrophoresis [J]. *J Proteomics Bioinformatics*, 2009, 12(2): 495-499.
- [13] 孟琳, 田景振. 动物组织蛋白质提纯方法的研究进展[J]. *食品与药品*, 2009, 11(5): 53-55.
- [14] ONG S E, PANDEY A. An evaluation of the use of two dimensional gel electrophoresis in proteomics [J]. *Biomol Eng*, 2001, 18(5): 195-205.
- [15] 刘志远, 励建荣, 李学鹏, 等. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)肌肉组织蛋白质双向电泳技术体系的建立[J]. *水产学报*, 2013, 37(2): 288-295.
- [16] SOMBOONWIWAT K, CHAIKEERATISAK V, WANG H C, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harveyi* infection[J]. *Proteome Sci*, 2010, 8: 39-50.
- [17] MOLLOY M P, HERBERT B R, WALSH B J, et al. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 1998, 19(5): 837-844.
- [18] GORG A, BOGUTH G, OBERMAIER C, et al. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-DALT): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(7): 1079-1086.
- [19] 武阳, 马文丽, 王兰. 华溪蟹主要组织蛋白质双向电泳技术体系的建立[J]. *山西大学学报*, 2011, 34(S2): 108-111.
- [20] VIHKARI J. Precipitation of plasma lipoproteins by PEG-6000 and its evaluation with electrophoresis and ultracentrifugation[J]. *Original Article*, 1976, 36(3): 265-268.
- [21] 王宝杰. 中国明对虾血淋巴蛋白质组学的初步研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.