

家蚕卵蛋白的 SDS-PAGE 分析*

姜春宝,王林玲,王 钰,王丽君
(重庆师范大学 生命科学学院,重庆 400047)

摘要 本研究探讨了蛋白质提取方法、十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)条件对家蚕卵蛋白分离效果的影响。分别用裂解液提取法、TCA沉淀法、冷丙酮沉淀法和 TCA-丙酮沉淀法制备蛋白质样品,然后进行6%~12%、6%~15%两种梯度胶的 SDS-PAGE,获得了不同提取方法和电泳条件下的电泳图谱用以比较家蚕卵蛋白分离效果。结果表明用 TCA-丙酮沉淀法除盐,再用含 $9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素、4% CHAPS、1% DTT 的裂解液重悬,最适合家蚕卵蛋白提取,6%~12% 梯度胶对家蚕卵蛋白的分离较为适宜。利用这一优化方法对家蚕感染微孢子虫的蚕卵和正常蚕卵进行了比较研究,在分子量 66 kD 和 85 kD 处找到了与感染微孢子虫相关的蛋白,为进一步进行正常蚕卵和感染微孢子虫蚕卵的蛋白质组学研究奠定了基础。

关键词 家蚕卵 微孢子虫 蛋白质提取 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号:Q503.Q51

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2012)01-0035-03

十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),简称 SDS 电泳。该方法操作简单,能在较短的时间内用于多肽分子量的分析,变性蛋白的分离等^[1]。蛋白质提取是进行蛋白质组学研究的前提和基础,总蛋白的提取方法有裂解液提取法、TCA-丙酮沉淀法、TCA 沉淀法、冷丙酮沉淀法等^[2]。

家蚕微孢子虫是家蚕主要病原微生物,可导致蚕业衰败。法国巴斯德院士研究家蚕微孢子虫病及其防治方法,结果发现了家蚕微孢子虫的病原是微孢子虫(*Nosema bombycis* Nagel, 1897),同时还发现该病原可通过胚种传染;由此他提出了实施母蛾检验,去除病卵的有效防治方法^[3]。本研究对家蚕卵蛋白的提取方法和 SDS-PAGE 条件进行了比较,建立合适的蛋白提取方法和 SDS-PAGE 条件,并以此对感染孢子虫的蚕卵和正常蚕卵蛋白进行分析,从而为找出与微孢子虫相互作用的蛋白质提供一定的思路 and 参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与处理

供试家蚕来自西南大学蚕研所。试验组以家蚕微孢子虫感染 4 龄期家蚕,对照组则添食无菌水,其余条件相同,收集带毒蚕卵和正常卵。

1.2 提取方法

1.2.1 裂解液提取法^[4] 取家蚕卵 30 粒,加液氮后将其研磨至粉状,加入 $200 \mu\text{L}$ 含 $9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素、4% CHAPS 和 1% DTT 的裂解液,在室温下放置 3 h;以 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\,000 \text{ g}$ 条件离心 30 min,取上清液;再次以上述条件离心 30 min,取上清液,充分去除不溶性杂质,上清液即为提取的家蚕卵总蛋白溶液。采用 Bradford 法测定提取的蛋白质浓度^[5]。

1.2.2 TCA-丙酮沉淀法^[6-9] 在通过裂解液提取法获得家蚕卵总蛋白溶液基础上,加入 6 倍体积 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的 TCA-丙酮(即将 10% 三氯乙酸和 0.07% 巯基乙醇溶于 100% 丙酮)溶液,漩涡震荡后静置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下,使蛋白沉淀并过夜;以 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\,000 \text{ g}$ 条件离心 15 min,弃上清液,沉淀用 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 的含 0.07% 巯基乙醇的丙酮溶液悬浮 30 min;再以 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\,000 \text{ g}$ 离心 15 min,并重复 2~3 次;沉淀静置于常温,让丙酮挥发。沉淀加入 1 mL 裂解液,漩涡震荡,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下水浴 1.5 h 以上,再以 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\,000 \text{ g}$ 条件离心 15 min,上清液用于蛋白质电泳分析。蛋白质浓度测定方法同前。

1.2.3 TCA 沉淀法^[9] 利用 20% TCA 进行蛋白质沉淀。蚕卵在加液氮后被研磨至粉末状,加入 $200 \mu\text{L}$ 裂解液,6 倍体积 20% TCA 后静置过夜。其

* 收稿日期 2011-07-03 修回日期 2011-09-04 网络出版时间 2012-01-15 18:09:00

资助项目:重庆市自然科学基金(No. cstc2011jjal322)

作者简介:姜春宝,男,硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学,通讯作者:王林玲, E-mail: wanglinling2005@163.com

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20120115.1809.201201.35_006.html

余步骤同 TCA-丙酮沉淀法。

1.2.4 冷丙酮沉淀法^[9] 丙酮代替 TCA-丙酮进行蛋白沉淀,其余步骤同 TCA-丙酮沉淀法。

1.3 SDS-PAGE 凝胶电泳^[11]

1.3.1 凝胶制备及电泳 试验采用不连续电泳方式进行电泳,浓缩胶浓度均为 6%,分离胶浓度则分别为 12% 和 15%。取蛋白质溶液,加入 pH 值为 6.8 的 60 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 上样缓冲液(含 2% SDS、0.1% 溴酚兰、25% 甘油以及 14.4 mmol · L⁻¹ β-巯基乙醇),蛋白质溶液与上样缓冲液体积比为 1:4;混匀后在沸水中处理 4 min,放入冰盒中冷却。以 12 000 g 条件离心 15 min,取上清液上样。

研究采用高低压转换的不连续电泳法,比较了恒流和恒压两种方式。在点样孔中加入 20 μL 蛋白质混合液,再按表 1 的电泳参数分别进行电泳,直至溴酚蓝离胶底 1 cm 为止,耗时约 2.5 h。

1.3.2 染色及分析 电泳结束后,采用可兼容质谱分析的考马斯亮蓝 R250 进行染色。染色结束后,对凝胶进行拍照。

表 1 不连续电泳参数设定

Tab.1 The discontinuous electrophoretic parameters set

分离胶浓度/%	浓缩胶浓度/%	分离电压/V	浓缩电压/V
12	6	120	60
12	6	100	80
15	6	120	60
15	6	100	80

2 结果与分析

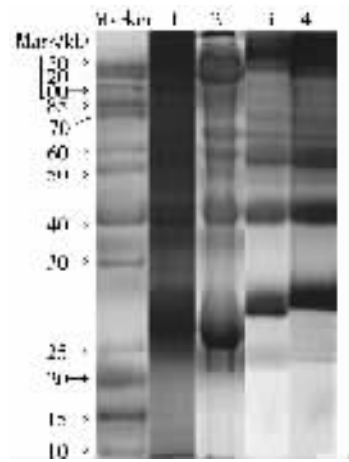
2.1 电泳体系的建立

2.1.1 不同蛋白质提取方法的比较 本研究比较了裂解液提取法、TCA-丙酮沉淀法、冷丙酮沉淀法、TCA 沉淀法等 4 种提取方法对蚕卵蛋白的提取效果。表 2 和图 1 结果显示这 4 种提取方法存在较大的差异,其中 TCA-丙酮沉淀法蛋白质提取效果最好,蛋白质获得率高,SDS-PAGE 条带清晰;其次是裂解液提取法获得的蛋白质最高,条带也较其它清晰;其余两种方法蛋白质获得率低,条带弥散。利用优化的 TCA-丙酮提取法,提取正常蚕卵和感染微孢子的蚕卵,蛋白质含量分别为 125.40、222.7 mg · mL⁻¹。

表 2 4 种提取方法对蛋白质提取的影响

Tab.2 The results of proteins extracted with four methods

提取方法	蛋白质含量/ (mg · mL ⁻¹)	蛋白质 条带数	杂质干扰
裂解液提取法	155.44	18	较多
TCA-丙酮沉淀法	125.40	19	较少
TCA 沉淀法	102.34	11	较少
冷丙酮沉淀法	98.29	11	较多

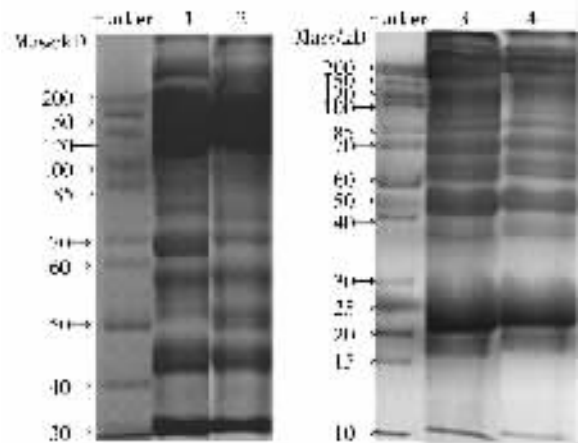


注:1、2、3、4 依次分别为冷丙酮沉淀法、TCA 沉淀法、TCA-丙酮沉淀法和裂解液提取法所获蛋白的 SDS-PAGE 效果。

图 1 4 种不同家蚕卵蛋白提取方法的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 The SDS-PAGE electrophoresis pattern of protein in eggs of *B. mori* extracted with four different methods

2.1.2 不同电泳方式的比较 SDS-PAGE 垂直板电泳分为只有分离胶的连续电泳和有浓缩胶的不连续电泳。本研究比较了不同胶浓度和电压对分离效果的影响(图 2)。结果表明,当不连续电泳的电泳参数设为浓缩电压 60 V 持续 30 min,分离电压 120 V,持续时间 2 h 时,蛋白质条带分离效果最好,条带多而清晰。并且,恒压和恒流两种方式相比较,两者产生的电泳条带差别不大。在比较不同胶浓度对电泳效果的影响时,发现比较适宜的分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 6%。



注:1、2 为分离胶浓度为 15% 时的电泳图谱,其中 1 的浓缩/分离电压为 60/120 V 2 的浓缩/分离电压为 80/100 V 3、4 为分离胶浓度 12% 时的电泳图谱,其中 3 的浓缩/分离电压为 60/120 V 4 的浓缩/分离电压为 80/100 V。

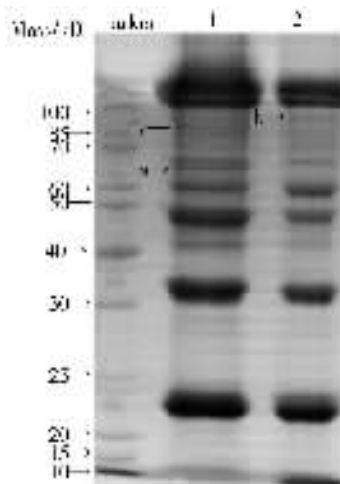
图 2 电泳图谱比较

Fig.2 The comparison of electrophoresis pattern

2.2 用优化的方法分析蛋白质表达的差异

利用优化的蛋白质提取和电泳方法比较了感染

微孢子虫以及正常的蚕卵的蛋白质差异。从图3可以看到,正常和感染微孢子虫蚕卵蛋白条带中有3条有差异。



注 1、2 分别为正常和感染微孢子虫蚕卵蛋白电泳条带, a、b、c 为差异带。

图3 被感染蚕卵和正常蚕卵蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig.3 The comparison of SDS-PAGE electrophoresis pattern of proteins from normal and infection eggs of *B. mori*

3 结论

本研究通过比较研究基本确立了家蚕卵的蛋白质提取、凝胶制备、电泳和染色方法。蚕卵中含有大量脂类、色素,这些杂质会对 SDS-PAGE 效果造成很大干扰,使之出现如拖尾、条带弥散等现象。通过对家蚕卵蛋白质的提取方法以及 SDS-PAGE 方式的比较,本研究认为 TCA-丙酮沉淀法可以较好地去除样品中的杂质,避免它们对 SDS-PAGE 效果产生较大

的影响。电泳浓缩胶、分离胶浓度分别为 6%、12% 时分离效果最好,条带清晰,可以满足蛋白质的凝胶分析。利用以上优化方法,对感染微孢子虫蚕卵蛋白进行了初步研究,找到了差异带,为进一步进行正常蚕卵和感染微孢子虫蚕卵的蛋白质组学研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 66, 141-144.
- [2] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 8.
- [3] Pasteur L. Études sur la maladie des vers à soie[M]. Paris: Gauthier-Villars successeur de Mallet-Bachelier, 1870: 317.
- [4] 钱小红, 贺福初. 蛋白质组学: 理论与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 50-52.
- [5] Brandford R M. Rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [6] Saravanan R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues[J]. Proteomics, 2004, 4: 2522-2532.
- [7] Damerval C, Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins[J]. Electrophoresis, 1986, 7: 52-54.
- [8] 王凤茹. 双向凝胶电泳应注意的几个关键问题[J]. 生物技术通报, 2005(6): 62-64.
- [9] 林金科, 郑金贵, 袁明, 等. 茶树蛋白质提取及双向电泳的改良方法[J]. 茶叶科学, 2003, 23(1): 16-20.

Animal Sciences

SDS-PAGE Analysis of the Eggs of *Bombyx mori*

JIANG Chun-bao, WANG Lin-ling, WANG Yu, WANG Li-jun

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: The paper discusses the effects of different means to extract the protein of eggs of *Bombyx mori* as well as to find the best conditions of SDS-PAGE to separate the proteins of eggs of *B. mori*. Trichloroacetic acid (TCA) precipitation, acetone precipitation and trichloroacetic acid-acetone (TCA-acetone) precipitation were used to extract the protein of eggs of *B. mori*. The protein was separated by different systems of homogeneous gel in a series of concentrations from 6% (separation gel) ~ 12% (spacer gel) to 6% (separation gel) ~ 15% (spacer gel) to search the most appropriate way of extracting the protein of eggs of *B. mori* and the conditions of electrophoresis. Protein maps of different homogeneous gel concentrations (6% ~ 12%, 6% ~ 15%) and different protein extraction methods were obtained. Then the efficiency of the different maps was compared. It showed that removing the salt by TCA-acetone method and dissolving the protein by the lysis buffer consists of urea ($9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), CHAPS (4%) and DTT (1%) were the best way to extract the proteins of eggs of *B. mori*. Meanwhile the suitable gradient of the homogeneous gel is 6% ~ 12%. The optimized method was explicated to analysis the differences between the eggs of the normal *B. mori* and whose infected by *Nosema bombycis*. Finally, the 66 kD protein band and 85 kD protein bands were gained and speculated to associate with the infection of *Nosema bombycis*.

Key words: eggs of *Bombyx mori*; *Nosema bombycis*; protein extraction; SDS-PAGE

(责任编辑 方兴)