

一种适于意大利蜜蜂中肠总蛋白提取方法的建立和应用*

张素贞¹, 许金山¹, 马振刚¹, 周泽扬^{1,2}

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331; 2. 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716)

摘要:依次采用不锈钢珠破碎结合 IPG 裂解液法、液氮研磨结合 IPG 裂解液法、液氮研磨结合 PBS 裂解液法和不锈钢珠结合 PBS 裂解液法提取意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, Ap)中肠总蛋白,并通过 SDS-PAGE 对获得的总蛋白进行质量检测。结果显示,与其他 3 种方法相比,利用不锈钢玻璃珠破碎处理结合 PBS 裂解液法能够提取并获得丰度较高的 Ap 中肠总蛋白,蛋白质种类较多,分子量大小为 18.4~116 kD,样品的电泳条带清晰可见。应用该方法还开展了 Ap 感染东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*, Nc)后中肠组织蛋白质的差异表达分析,结果显示感染 Nc 的 Ap 中肠出现了蛋白质的上调表达;同时 SDS-PAGE 结果显示该方法也适用于中华蜜蜂(*Apis cerana cerana* Fabricius)中肠总蛋白的提取。利用不锈钢玻璃珠破碎处理结合 PBS 裂解液法提取 Ap 中肠总蛋白方法的建立将有助于对蜜蜂中肠蛋白进行鉴定分析,为深入研究蜜蜂中肠蛋白质组成、功能及其肠道免疫机制奠定基础。

关键词:蜜蜂;中肠;总蛋白;提取方法

中图分类号:Q33; Q956

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2015)04-0049-05

蜜蜂(*Apis mellifera*)是一类重要的经济昆虫,在人类发展、维持自然生态系统和农业生产过程中扮演重要的角色^[1]。蜜蜂的生存受到多种生物与非生物因素的影响,其中以病原微生物和农药为代表的环境变量因素直接威胁着蜜蜂的生存^[2]。由蜜蜂微孢子虫(*Nosema apis*)引起的蜜蜂微孢子虫病能导致蜜蜂出现飞行能力下降、下痢等症状,也导致蜂群采集力下降、成蜂寿命缩短和泌蜡产浆能力降低,从而给蜂业生产带来巨大的经济损失。蜜蜂微孢子虫对蜜蜂的感染始于蜜蜂中肠上皮细胞,成熟的孢子在中肠内发芽并将具有侵染性的胞原质注入宿主细胞,在其中完成大规模增殖^[3]。因此,蜜蜂的肠道上皮免疫可能是宿主抵抗微孢子虫入侵的最初防线。在对果蝇(*Drosophila melanogaster*)的研究中,随食物进入果蝇肠道的细菌能引起中肠上皮细胞产生两种应答方式即局部的抗菌肽应答^[4]和活性氧自由基(ROS)释放^[5],这也是肠道细胞的两种主要应答方式。在家蚕(*Bombyx mori*)中,参与肠道免疫的抗菌肽免疫和活性氧应答的相关基因已得到鉴定^[6]。由此可见,深入探讨蜜蜂中肠免疫方式,获得并鉴定蜜蜂中肠在抵抗蜜蜂微孢子虫侵染过程中的关键因子,对于揭示蜜蜂抵御微孢子虫侵染的分子机制具有重要的意义。

近些年来,蛋白质以及蛋白质组学研究技术在生命科学领域得到了飞速的发展,在昆虫生物学、昆虫免疫学等研究中也得到了广泛的应用。2007年王林玲利用蛋白质双向电泳技术分析了柞蚕微孢子虫(*Nosema antheraeae*)感染家蚕后宿主中肠蛋白质的变化^[7]。2010年,陈洪松等人研究了微孢子虫病家蚕中肠组织蛋白质的变化,结果表明中肠组织蛋白质的 SDS-PAGE 图谱中出现的新增蛋白条带可能是家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)感染后家蚕所产生的抗微生物多肽^[8]。2013年,高坤等人利用蛋白质双向电泳技术分析了家蚕感染质型多角体病毒(BmCPV)后中肠组织的差异蛋白质,结果表明 BmCPV 感染能够引起中肠阴离子通道孔蛋白的下调表达以及与细胞凋亡相关的候选肿瘤抑制因子(Tumor suppressor factor)和多药耐药蛋白(Multi-drug resistant protein)等的上调表达,推测家蚕在 BmCPV 感染的过程中可能启动了细胞凋亡的抗病毒机制^[9]。由此可见,蛋白质研究成为开展蜜蜂中肠免疫相关研究的重要手段之一,且筛选优化蜜蜂中肠总蛋白

* 收稿日期:2014-11-21 修回日期:2015-01-27 网络出版时间:2015-5-15 10:55

资助项目:国家高技术研究发展计划(863计划)项目(No. 2012AA101301);国家自然科学基金(No. 31402142);重庆市基础与前沿研究计划项目(No. cstc2014jcyjA80039);重庆师范大学基金项目(No. 14XLB003);重庆市教委科学技术研究项目(No. KJ1110611;No. KJ10627;No. KJ090813);国家级大学生创新创业训练计划项目(No. 201410637005)

作者简介:张素贞,女,研究方向为资源昆虫及其病原微生物学,E-mail:su1213zhen@126.com;通信作者:马振刚,讲师,E-mail:mzgsuw@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20150515.1055.004.html>

的提取方式成为开展蜜蜂中肠蛋白质相关分析的前提。至今,蜜蜂中肠蛋白质组学相关研究尚未见报道。本研究以意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, Ap)中肠为主要生物材料,采用不同的方法提取中肠总蛋白,通过对样品进行检测分析,筛选和建立了适用、有效的中肠总蛋白提取方法,为深入开展蜜蜂肠道免疫机制研究提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验生物材料 试验用的 Ap 和中华蜜蜂(*Apis cerana cerana* Fabricius, Api)均来自荣昌畜牧科技学院,于实验室条件下饲养,温度为 27~29℃,相对湿度为 55%~60%。东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*, Nc)为在重庆东南部酉阳县的蜜蜂养殖场收集感染微孢子虫致死的 Ap 群体并经分离纯化后所得。

1.1.2 主要仪器和试剂 主要仪器:5417R 高速冷冻离心机(EPPENDORF 公司)、Bullet Blender Blue 组织破碎仪(NEXT ADVANCE 公司)、涡旋振荡仪(TOMY 公司)、DYY-12C 型电泳仪(北京六一仪器厂)。主要试剂:丝氨酸蛋白酶抑制剂(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)购于大连宝生物有限公司,CHAPS 和 IPG buffer 购于 Sigma 公司,二硫苏糖醇(DTT)和 SDS 购于上海生工。磷酸盐裂解液(PBS 裂解液,pH 值为 7.4。甲液:0.05 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 溶液;乙液:0.05 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ 溶液。将甲乙液分装在棕色瓶内,于 4℃冰箱中保存,用时甲、乙两液按比例 8:2 混合即可),IPG 裂解液(含 8 mol·L⁻¹ Urea,4% Chaps,20 mmol·L⁻¹ Tris-base,30 mmol·L⁻¹ DTT,0.2% IPG buffer 和 0.1% PMSF,其中 DTT、IPG 和 PMSF 现用现加)。SDS-PAGE 的相关试剂的选用均参考文献[10]。

1.2 方法

1.2.1 中肠的收集 在采用各种方法对 Ap 中肠总蛋白进行提取前,均采用以下方式进行中肠的收集:随机提取 Ap 成年工蜂 10 只,禁食 6 h 后,分别将每只工蜂头部剪去,用镊子拉出整个消化道,迅速取下中肠并置于冰上预冷的灭菌蒸馏水中清洗,于灭菌滤纸上轻轻吸干水后迅速置于 1.5 mL 离心管内,-80℃保存或立刻用于组织蛋白的提取。

1.2.2 中肠总蛋白提取方法比较 采用以下 4 种提取方法进行 Ap 中肠总蛋白提取。

1) 不锈钢珠破碎结合 IPG 裂解液法。将收集到的中肠放于 1.5 mL 离心管内,加入 200 μL 含终浓度为 1 mmol·L⁻¹ PMSF 的 IPG 裂解液,再加入约 0.4 g 直径为 0.05 mm 的不锈钢珠,在高速组织捣碎机内剧烈震荡 5 min;置于 4℃冰箱内裂解 1 h 后于 4℃下 12 000 g 离心 10 min,取上清加入蛋白质电泳上样缓冲液,沸水浴中处理 10 min 后用于 SDS-PAGE 分析。

2) 液氮研磨结合 IPG 裂解液法。将收集到的中肠置于液氮预冷的研钵内,加入少量石英砂,液氮充分研磨后将粉末转移至 1.5 mL 离心管内,迅速加入 200 μL 冰预冷的含终浓度为 1 mmol·L⁻¹ PMSF 的 IPG 裂解液,轻轻颠倒混匀,后正置于 4℃冰箱内裂解 1 h,于 4℃下 12 000 g 离心 10 min,取上清加入蛋白质电泳上样缓冲液,沸水浴中处理 10 min 后用于 SDS-PAGE。

3) 液氮研磨结合 PBS 裂解液法。收集到的中肠被置于液氮预冷的研钵内,样品与少量石英砂混合后在液氮中充分研磨至呈粉末状,将粉末转移至 1.5 mL 离心管内并迅速加入 200 μL 预冷的含终浓度为 1 mmol·L⁻¹ PMSF 的 PBS 裂解液,轻轻颠倒混匀后正置于 4℃冰箱内裂解 1 h,在 4℃下 12 000 g 离心 10 min,吸取上清用于 SDS-PAGE 检测。

4) 不锈钢珠结合 PBS 裂解液处理法。收集到的中肠被置于 1.5 mL 离心管内,加入 200 μL 冰预冷的含终浓度为 1 mmol·L⁻¹ PMSF 的 PBS 裂解液,称入约 0.4 g 直径为 0.05 mm 的不锈钢珠,在高速组织捣碎机内剧烈震荡 5 min;然后在 4℃下裂解 1 h 后加入蛋白质电泳上样缓冲液,沸水浴中处理 10 min;4℃下 12 000 g 离心 10 min,吸取上清进行 SDS-PAGE 分析。

SDS-PAGE 具体操作参见文献[10],通过比较样品的电泳条带质量筛选最佳提取方法。

1.2.3 Nc 感染 Ap 后中肠蛋白质差异表达分析 1) Nc 感染 Ap 实验。密封孵育箱放置在 35℃、相对湿度 80% 的黑暗湿润环境中至蜂出房。出房 3~5 d 后,对照组和处理组各选取 200 只 Ap,饥饿处理 24 h。然后处理组饲喂每毫升含 1×10⁵ 个 Nc 的 50% 的蔗糖溶液,即接种 Nc;对照组则饲喂不含 Nc 的 50% 的蔗糖溶液。两组 Ap 于温度为 27~29℃、湿度为 55%~60% 的实验室条件下饲养,每隔 24 h 更换 1 次 50% 的蔗糖溶液,对死亡 Ap 计数并及时清除死亡的蜜蜂。

2) 中肠的收集。在 Nc 感染 Ap 后第 2 d 和第 4 d, 分别随机提取对照组和实验组成年工蜂 10 只, 采用 1.2.1 部分的方法进行中肠的收集。

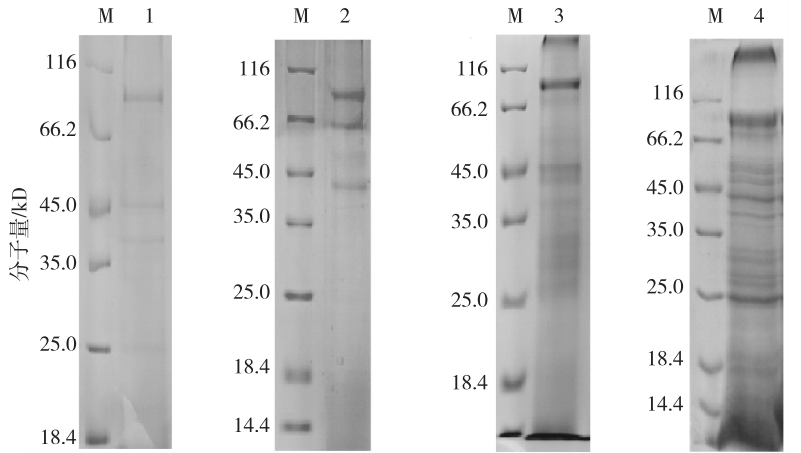
3) 中肠总蛋白的提取和 SDS-PAGE 分析。采用 1.2.2 部分中提取效果最好的方法对中肠总蛋白进行提取, 并进行 SDS-PAGE 分析, 比较两组 Ap 中肠蛋白表达差异。

1.2.4 A_{pi} 中肠总蛋白的提取和 SDS-PAGE 分析 中肠总蛋白的提取同 1.2.3 部分, 用 SDS-PAGE 分析提取效果。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白质提取方法的比较

使用 4 种方法对 A_p 中肠蛋白进行提取并进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示, 用不锈钢珠破碎结合 IPG 裂解液法提取到的中肠蛋白种类较少, 且蛋白丰度低, 提取获得的蛋白主要集中在 90, 45 kD, 对低分子量蛋白提取效果较差, 样品的电泳条带模糊(图 1a)。使用液氮研磨结合 IPG 裂解液法提取获得的蛋白种类也非常少, 样品的电泳条带也不够清晰(图 1b)。以上两种提取方法效果不佳可能因为蜜蜂中肠组织 pH 值较高, 故 IPG 裂解液对蛋白的抽提效果较差。使用液氮研磨结合 PBS 裂解液法获取的蛋白种类较为丰富, 提取获得的蛋白质分子量主要分布于 25~116 kD, 但该方法对分子量小于 25 kD 的蛋白质提取效果较差; 而且样品的电泳条带总体较为模糊, 只有部分条带清晰可见(图 1c)。利用不锈钢珠结合 PBS 裂解液处理法获得的蛋白质种类较多, 且丰度较高, 分子量大小为 18.4~116 kD, 对高分子量和低分子量蛋白质的提取效果均较为理想; 样品的电泳条带清晰可见, 可用于挖取条带并进行蛋白质质谱鉴定分析(图 1d)。由此可见, 不锈钢珠结合 PBS 裂解液处理法比其他 3 种提取方法更适合 A_p 中肠组织蛋白质的提取。

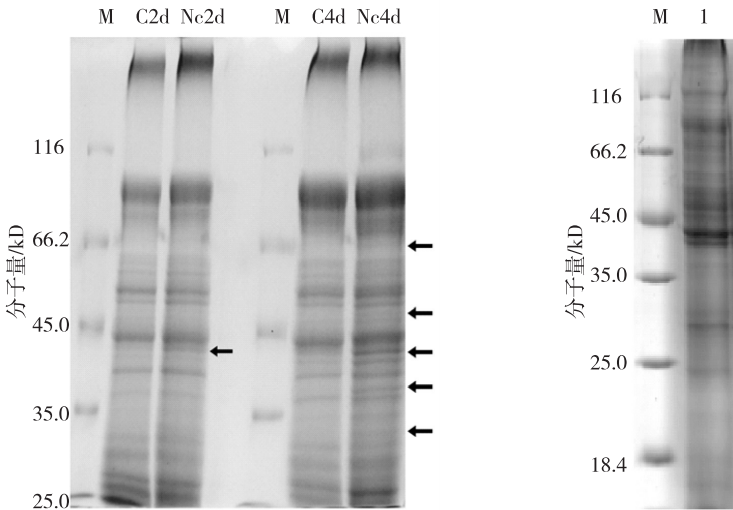


a 不锈钢珠破碎结合 IPG 裂解液法 b 液氮研磨结合 IPG 裂解液法 c 液氮研磨结合 PBS 裂解液法 d 不锈钢珠结合 PBS 裂解液处理法

注: M 表示蛋白质分子量标准, 1~4 为样品。

图 1 经 4 种提取方法得到的 A_p 中肠总蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of total midgut proteins extracted by four different methods



注: M 表示蛋白质分子量标准; Nc2d、Nc4d 分别表示 Ap 感染 Nc 后第 2 d 和第 4 d 的样品; C2d、C4d 分别为上述两者的正常对照。

图 2 用不锈钢珠结合 PBS 裂解液法提取感染 Nc 后 Ap 中肠差异表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of differentially expressed proteins in midgut between infected and uninfected honeybees using the method with crush by Stainless steel bead in PBS buffer

注: M 表示蛋白质分子量标准, 1 为样品。

图 3 经不锈钢珠结合 PBS 裂解液法提取得到的 A_{pi} 中肠总蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of total midgut proteins isolated from A_{pi} using the method with crush by Stainless steel bead in PBS buffer

2.2 提取方法的初步应用

Nc 是引起西方蜜蜂蜂群衰竭失调症(Colony collapse disorder, CCD)的重要因素之一, 也是一种在世界范围内流行的寄生虫, 在蜜蜂蜂群中呈现出高患病率^[11]; 该病已成为世界上所有养蜂国家重要的检疫性病害。通常情况

下,由被病原污染的食物所引起的消化道感染是病原入侵昆虫的主要方式,昆虫的肠道上皮免疫在抵抗病原入侵的最早期起到重要的作用。由于 Nc 主要通过食物经中肠对蜜蜂进行最初的入侵,故而蜜蜂的肠道上皮免疫可能是宿主抵抗微孢子虫入侵的最初防线。由此可见,比较分析正常蜜蜂中肠与感染 Nc 后蜜蜂中肠组织的蛋白质变化,并从中获得 Nc 诱导后中肠差异表达蛋白,可为研究蜜蜂对 Nc 侵染的中肠应答机制提供线索。本研究使用纯化获得的 Nc 对 Ap 成年工蜂进行感染,并对感染 Nc 后第 2 d 和第 4 d 的蜜蜂中肠进行收集,通过不锈钢珠结合 PBS 裂解液法对正常对照与感染 Nc 的 Ap 中肠总蛋白进行提取并进行 SDS-PAGE 分析。由图 2 可知,在 Nc 感染 Ap 后第 2 d,感染组样品中约 42 kD 附近出现明显的上调表达蛋白条带;在感染后第 4 d 时,有 5 个蛋白质条带出现显著的浓度上调,且分子量主要集中在 30~60 kD。该结果表明在 Nc 感染 Ap 后,Ap 中肠出现了蛋白质的上调表达。对这部分蛋白进行进一步的鉴定分析,可为深入探讨蜜蜂中肠对微孢子虫的免疫与代谢应答方式提供丰富的数据基础。

与 Ap 相比而言,Api 在生产中对微孢子虫的抵抗能力更强,它和 Ap 均为研究微孢子虫侵染机制的理想模型。深入比较分析 Api 和 Ap 中肠感染微孢子虫后的蛋白质表达差异,可以为深入了解二者对微孢子虫入侵的应答机制提供丰富的数据依据。为验证不锈钢珠结合 PBS 裂解液法是否也适用于 Api 的中肠组织蛋白提取,本研究也用该方法进行了相关试验。结果表明,使用不锈钢珠结合 PBS 裂解液处理法获得的中华蜜蜂中肠组织蛋白种类较为丰富,分子量大小为 16~116 kD;且样品的电泳条带清晰可见,显示对蛋白抽提效果较好(图 3)。因此,不锈钢珠结合 PBS 裂解液法对两种蜜蜂中肠组织蛋白提取效果均较理想,具有较好的适应性。

3 结论

本研究采用 4 种方法对蜜蜂中肠蛋白质进行提取并进行 SDS-PAGE 分析,其中不锈钢珠破碎结合 IPG 裂解液法和液氮研磨结合 IPG 裂解液法提取获得的中肠蛋白种类少、丰度低,且蛋白质电泳条带较模糊,推测获得的蛋白在提取过程中可能发生部分降解。液氮研磨结合 PBS 裂解液法和不锈钢珠结合 PBS 裂解液处理法获得的中肠总蛋白较为丰富,但液氮研磨结合 PBS 裂解液法提取的蛋白质电泳条带仍较模糊,且对低分子量蛋白的提取效果欠佳;而不锈钢珠结合 PBS 裂解液处理法获得的蛋白质电泳条带丰度高且较清晰,更适合蜜蜂中肠组织总蛋白的提取。

本研究建立了适用于 Ap 和 Api 中肠总蛋白提取方法,成功开展了蜜蜂微孢子虫诱导蜜蜂中肠蛋白质差异表达分析,表明该方法具有较好的可应用性,这为后续开展蜜蜂中肠蛋白质的鉴定分析和深入研究蜜蜂中肠蛋白功能奠定基础。

参考文献:

- [1] Dussaubat C, Brunet J L, Higes M, et al. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera* [J]. PLoS One, 2012, 7 (5): e37017.
- [2] Aufaivre J, Misme-Aucouturier B, Vignes B, et al. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91686.
- [3] Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, et al. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 94(3): 211-217.
- [4] Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, et al. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia[J]. Immunity, 2000, 13 (5): 737-748.
- [5] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster* [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 697-743.
- [6] Hu X, Yang R, Zhang X, et al. Molecular cloning and functional characterization of the dual oxidase (BmDuox) gene from the silkworm *Bombyx mori* [J]. PloS One, 2013, 8 (8): e70118.
- [7] 王林玲. 柞蚕微孢子虫核糖体基因及家蚕,柞蚕微孢子虫蛋白质组以及侵染家蚕后中肠的比较蛋白质组学研究[D]. 江苏镇江: 江苏大学, 2007.
Wang L L. The ribosomal RNA gene of *Nosema antheraeae* and the proteomics analysis on *Nosema bombycis* and *Nosema antheraeae*, and comparative proteomics studies in midgut of *Bombyx mori* infected miers Poredia[D]. Zhenjiang Jiangsu: Jiangsu University, 2007.
- [8] 陈洪松, 鲁兴萌. 微孢子虫家蚕中肠组织蛋白质的变化[J].

蚕桑通报, 2010, 41(4): 5-8.

Chen H S, Lu X M. Changes of midgut proteins of silkworm, *Bombyx mori* infected with *Nosema bombycis* [J]. Bulletin of Sericulture, 2010, 41(4): 5-8.

[9] 高坤, 邓祥元, 裘智勇, 等. 家蚕感染质型多角体病毒(Bm-CPV)后中肠组织差异蛋白质分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(13): 2796-2807.

Gao K, Deng X Y, Qiu Z Y, et al. Comparative analysis of differential proteins from midgut of silkworm induced by cytoplasmic polyhedrosis virus infection [J]. Scientia Agri-

cultura Sinica, 2013, 46(013): 2796-2807.

[10] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 141-144, 66.

Guo Y J. The protein electrophoresis experiment technology [M]. Beijing: Science Press, 2001, 141-144, 66.

[11] Aufaivre J, Biron D G, Vidau C, et al. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee [EB/OL]. (2012-03-22) [2014-11-20]. <http://europepmc.org/backend/ptpmrender.fcgi?accid=PMC3310228&blobtype=pdf>.

Animal Sciences

Establishment and Application of a Method Suitable for Extracting Midgut Total Proteins from Honeybee *Apis mellifera ligustica*

ZHANG Suzhen¹, XU Jinshan¹, MA Zhengang¹, ZHOU Zeyang^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. State Key Laboratory of Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Four methods, including crush by stainless steel bead in IPG buffer, grinding with liquid nitrogen in IPG buffer, grinding with liquid nitrogen in PBS buffer and crush by Stainless steel bead in PBS buffer, were developed to extract the total proteins from the midgut of *Apis mellifera ligustica* (Ap). Then, a suitable method was optimized to establish an optimal procedure for honeybee midgut proteins extraction. SDS-PAGE detection revealed that honeybee midgut proteins with higher abundance could be obtained using the method with crush by Stainless steel bead in PBS buffer. And then we preceded a further analysis of differentially expressed proteins in midgut between infected and uninfected honeybees using the established method. Our results indicated that some of the differentially expressed proteins of Ap were up-regulated after infected by *Nosema ceranae*. Moreover, the result of SDS-PAGE showed that this method also can be applied in extraction of honeybee *Apis cerana cerana* Fabricius midgut proteins. The establishment of the method with crush by Stainless steel bead in PBS buffer for extracting midgut total proteins from honeybee Ap, which is conducive to perform the identification of proteins expressed in honeybee midgut, can be helpful for proceeding functional study of isolated proteins from honeybee midgut and understanding intestinal immunity against the infection of pathogenic microorganisms.

Key words: honeybee; midgut; total proteins; extraction method

(责任编辑 方 兴)