

中华卤虫无节幼体蛋白质组的双向凝胶电泳分析

周茜^{1,2}, 吴长功¹, 刘凤岐³, 黄冰心¹, 相建海¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛, 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京, 100049; 3. 南开大学生命学院, 天津, 300071)

摘要:应用双向凝胶电泳和图像分析手段, 对比了卤虫 (*Artemia*) 初孵无节幼体和孵化 24 h 无节幼体中蛋白表达的变化情况。结果显示, 随着卤虫幼体的发育, 蛋白表达的种类和个数均明显增多, 仅有个别蛋白的表达量下调。这些差异表达的蛋白可能跟卤虫幼体的发育过程密切相关或起重要的调节作用。

关键词:蛋白质组; 中华卤虫 (*Artemia sinica*); 幼体; 双向电泳

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)07-0062-03

卤虫 (*Artemia*), 是一种分布广泛的广温、耐高盐的小型甲壳动物, 隶属节肢动物门、甲壳纲、鳃足亚纲、卤虫科。我国沿海盐田面积达 34.5 万 hm^2 , 内陆大、中型盐湖有近千个, 其中蕴藏着十分丰富的卤虫资源。卤虫在水产动物养殖, 特别是在水产动物苗种生产中是十分优质的活饵料。目前, 世界上大约有 85% 以上的海水养殖动物种类需用卤虫作为其幼体饵料的主要来源^[1]。卤虫的无节幼体是卤虫在水产养殖中应用最广泛的主要形式之一, 可以直接简便地从卤虫卵孵化得到^[2]。初孵 1~2 d 的无节幼体具有大量的卵黄, 并含有丰富的蛋白质和不饱和脂肪酸, 是鱼、虾、蟹等幼体优良的开口活饵料, 可充分满足对虾、牙鲆等幼体的营养需求^[3]。对于卤虫幼体在水产养殖中的应用已有大量文献报道^[4,5], 但是对于卤虫初孵幼体生物学特征比较的研究却鲜有报道^[6]。本研究采用双向凝胶电泳技术, 研究比较分析了卤虫初孵和孵化 24 h 后无节幼体的蛋白质组表达的变化特点, 探讨了卤虫幼体正常生理发育过程中的蛋白表达状态, 为今后进一步深入研究卤虫幼体的生物学特征打下了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用材料为山西运城中华卤虫 (*Artemia sinica*) 的休眠卵, 已打破休眠。取 10 g 卤虫卵于盛有 30 L 过滤海水的容器中进行孵化, 孵化条件为: 温度 28℃, 盐度 35, 连续充气, 光照 1 000 lx。约 24 h 后, 停止通气并静置 8~10 min, 将孵化容器底部的初孵无节幼体全部虹吸出, 分为两部分。一部分吸干表面水分进行蛋白提取; 另一部分进行虫、卵分离, 将较为纯净的初孵无节幼体继续培养 24 h 后

进行蛋白提取。

1.2 实验方法

2DE 具体操作参照 Amersham Biosciences 的 2DE 技术原理和方法说明书。

1.2.1 蛋白样品制备

三氯乙酸 (TCA)/ 丙酮沉淀法提取卤虫幼体蛋白。取卤虫幼体 3 g 放入预冷的玻璃匀浆器中研磨, 加入 10 mL 40 mmol/L Tris, 4℃ 下混匀, 10 000 r/min 离心 30 min, 将上清液转入另一离心管中, 向管中加入预冷 (-20℃) 的 6 倍体积 10% TCA 溶液 (丙酮配制, 含 0.07% 巯基乙醇), 混匀, -20℃ 沉淀过夜, 10 000 r/min 离心收集沉淀, 丙酮 (含 0.07% 巯基乙醇) 洗涤 3 次, 最后的沉淀经真空干燥得到粉末状蛋白, 放入 -80℃ 冰箱备用。

1.2.2 双向凝胶电泳方法

1.2.2.1 一维固相 pH 梯度等电聚焦 (IEF)

选用 18 cm IPG 胶条 (pH3~10, 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司), 上样量 3 mg。将样品溶于 300 μL 裂解液 (8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris) 中, 溶解后再加入重泡涨液 (8 mol/L 尿素, 2% CHAPS, 溴酚兰痕量) 中, 加 7 mg DTT, 8 μL IPG 缓冲液, 终体积为 400 μL ;

IPG 干胶条 (18 cm, pH4~7) 胶面朝下放入胶槽, 覆盖一层矿物油, 置于 IPGphor 等电聚焦仪电极

收稿日期: 2008-03-01; 修回日期: 2008-04-20

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (20060109Z4016)

作者简介: 周茜 (1980-), 女, 山东青岛人, 博士研究生, 主要从事海洋生物蛋白质组学研究, E-mail: zhouqian@ms.qdio.ac.cn; 相建海, 通讯作者, 研究员, 主要从事海洋动物遗传与生殖工程研究, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

板上,重水化和等电聚焦在 20 按如下程序自动进行:水化 12 h;聚焦(1) 250 V, 1 h;(2) 500 V, 1 h;(3) 1 000 V, 1 h;(4) 8 000 V, 5 h;(5) 8 000 V, 60 000 V · h。

1.2.2.2 胶条的平衡

等电聚焦后于平衡液 I [10 g/L DTT, 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.8), 6 mol/L Urea, 30 % 甘油, 2 % SDS 和痕量溴酚蓝] 平衡 15 min, 再于平衡液 (25 g/L 碘乙酰胺代替平衡液 I 中的 DTT) 平衡 15 min。

1.2.2.3 二维聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

聚焦完毕的 IPG 胶条平衡后转移到 12 % SDS-PAGE 分离胶上。0.5 % 琼脂糖覆盖胶条 (SDS-PAGE 电泳缓冲液配制), 电泳条件为:恒温 14 °C, 以 50 V/胶电泳 15 min, 再以恒压 300 V/胶电泳至溴酚蓝到玻璃板底部。为确定蛋白点的分子质量, SDS-PAGE 电泳时, 加入分子质量 Marker。

1.2.3 考马斯亮蓝染色

电泳后的凝胶立即放入考马斯亮蓝染液 (250 mL 脱色液中溶解 0.29 g 考马斯亮蓝 R250) 染色过夜, 用脱色液 (50 % 乙醇, 10 % 乙酸) 脱去底色, 多次置换脱色液直到蛋白点清晰为止。

1.2.4 凝胶图像分析

以 Umax 透射扫描仪获取染色后的 2DE 凝胶

图像, 用 Image Master™ (2D Software version 3.10) 图像分析软件进行详细分析和比较蛋白质斑点差异。图像分析时首先将同组的 3 张 2-DE 凝胶分别拟合成 1 张平均胶, 即卤虫初孵无节幼体平均胶和孵化 24 h 无节幼体平均胶, 前者为参考胶, 将后者与之比较。根据斑点的位置、大小、形状等参数, 图像分析软件自动将不同图谱中的相应蛋白质点进行匹配, 不能匹配的蛋白质斑点视为差异蛋白质。

2 实验结果

初孵无节幼体和孵化 24 h 无节幼体的双向凝胶电泳图谱见图 1。初孵无节幼体组的蛋白质点为 150 个 ±23 个, 孵化 24 h 无节幼体组的蛋白质点为 200 个 ±21 个。2 张蛋白 2-DE 图谱对比分析的结果显示, 总体上 24 h 后无节幼体比初孵无节幼体蛋白表达的种类和数量明显增多, 但是部分蛋白的表达量减少。根据蛋白的分子质量范围, 蛋白表达的差异情况可分为三部分分别讨论: 较高分子质量范围 (45 ~ 120 ku) 的蛋白点个数相近, 但部分蛋白表达量明显降低; 中分子质量范围 (25 ~ 45 ku) 可以检测到部分蛋白的表达量下降, 部分蛋白的表达量上升, 还有一些新表达的蛋白; 低分子质量范围内 (10 ~ 25 ku) 蛋白点的个数 (蛋白的种类) 显著增多。

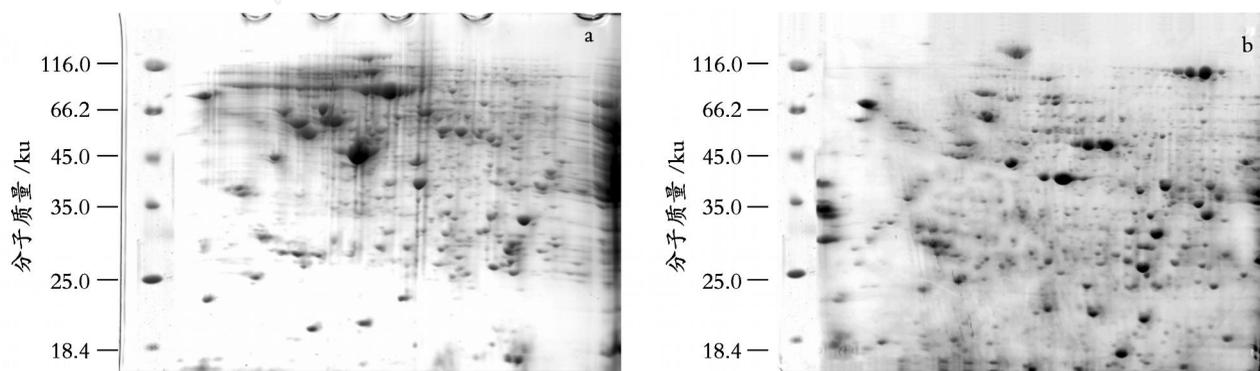


图 1 中华卤虫无节幼体可溶性蛋白双向凝胶电泳图 (pH4 ~ 7, MW: 10 ~ 100 ku)

Fig. 1 The two-dimensional gel electrophoresis map of *Artemia sinica* larvae (pH4 ~ 7, MW: 10 ~ 100 ku)

a. 初孵无节幼体; b. 孵化 24 h 无节幼体

a. the new hatched nauplii; b. the nauplii of 24 h

3 讨论

蛋白质组学能从整体水平上研究蛋白质的属性 (表达水平、翻译后修饰、相互作用等), 并由此在蛋白质水平上获得对应激过程、细胞生理生化过程和调控网络的广泛而完整的认识^[7]。目前, 海洋生物的蛋白质组学已得到广泛的研究, 其主要集中在海洋生物对外界环境变化的适应性研究, 但对于生长

周期中的海洋生物蛋白质组学研究则未见报道。

在本研究中, 作者利用蛋白质组学研究中经典的二维电泳分离技术获得了中华卤虫初孵和孵化 24 h 无节幼体的蛋白表达图谱, 并对两者进行了对比分析。结果表明, 孵化 24 h 的卤虫无节幼体中表达的蛋白整体而言明显多于刚孵化的无节幼体; 对两图谱进一步进行分析后, 发现不同分子量范围的蛋白的表达情况存在明显差异, 这与卤虫不同的发

育阶段和生理状态密切相关。卤虫初孵化的无节幼体消化道尚未形成,不能进食,须靠消耗自身卵黄提供营养,完成代谢;而孵化 24 h 的无节幼体消化道形成,开始食用各种藻类等饵料^[8]。因此,蛋白表达的差异可能有如下几个主要原因:(1) 卵黄的消耗和逐步耗竭使卵黄蛋白的表达量明显下降,这可能是造成图谱上分子质量较大部分的蛋白 (> 45 ku) 表达减少的主要原因之一;(2) 此时蛋白种类的增多,特别是较低分子质量蛋白 (< 25 ku) 明显增多,可能与消化过程密切相关,此时消化道的形成所需的蛋白以及消化过程中所需要的酶类大量的表达;(3) 从初孵无节幼体发育到孵化 24 h 无节幼体,各种发育过程如蜕皮过程中所需要的蛋白以及能量代谢相关蛋白的表达也可能大幅增加;(4) 其他蛋白表达的变化可能受到与卤虫幼体的发育过程相适应的各种生理生化过程的调控,造成表达的质或量的差异。

这些差异表达的蛋白跟卤虫的发育阶段和状态密切相关,可能是伴随着卤虫幼体的发育行使不同的功能,并在促进卤虫幼体发育的过程中起了重要的调节作用,进一步的筛选和鉴定将有助于深入了解卤虫生长周期各阶段的功能基因组变化,揭示卤虫幼体发育不同阶段的生物学特征,为对其更好的

应用提供理论基础。

参考文献:

- [1] 吕光俊. 盐度对卤虫孵化和生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (1): 109-110.
- [2] Abatzopoulos T J, Beardmore J A, Clegg J S, *et al.* ARTEMIA: Basic and Applied Biology[M]. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002. 235-270.
- [3] 侯林, 邹向阳, 姚锋. 卤虫的生物学研究[J]. 生物学通报, 2005, 40 (7): 4-6.
- [4] Lavens P, Sorgeloos P. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2000, 181: 397-403.
- [5] Sorgeloos P, Dhert P, Candreva P. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture[J]. *Aquaculture*, 2001, 200: 147-159.
- [6] 宁卓, 张波. 不同品系卤虫无节幼体的生物学特征[J]. 盐业与化工, 2006, 36: 1, 30-32.
- [7] 丁勤学, 阙海萍, 郭尧君, 等. 成年和老年小鼠脑蛋白质组双向电泳图谱比较[J]. 生物化学和生物物理进展, 2001, 28: 683-687.
- [8] Browne R A, Trotman C N A, Sorgeloos P. *Artemia* Biology[M]. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 1991. 155-183.

Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the proteome in the larvae of bring shrimp, *Artemia sinica*

ZHOU Qian^{1,2}, WU Chang-gong¹, LIU Feng-qi³, HUANG Bing-xin¹, XIANG Jian-hai¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Received: Mar., 1, 2008

Key words: proteome; *Artemia sinica*; larvae; two dimensional gel electrophoresis

Abstract: Brine shrimp (*Artemia*) is a worldwide-distributed crustacean, widely used as a main food resource in aquaculture and applied in basic research areas ranging from developmental biology to evolution and ecology. In the present study, using two-dimensional gel electrophoresis and image analysis system, the changes of protein expression in new hatched and 24 h post-hatching *Artemia* larvae were investigated. Overall, the variety and amount of the proteins increase significantly in accompany with the larvae development. However, the amounts of some proteins were down-regulated. The results suggested that these differentially expressed proteins may tightly associated with, or play important regulative roles in the development of brine shrimp larvae.

(本文编辑:张培新)