

小型昆虫蛋白图谱检测方法的比较研究

褚 栋^{1*}, 张柱亭¹, 安志兰², 郭笃发², 周洪旭³

(1. 山东省农业科学院高新技术研究中心, 济南 250100; 2. 山东师范大学人口资源环境学院, 济南 250014; 3. 青岛农业大学植保学院, 青岛 266109)

摘要 以烟粉虱 [*Bemisia tabaci* (Gennadius)] 和温室白粉虱 [*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)] 小型昆虫为研究对象, 比较了这些小型昆虫可溶性蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的检测方法。结果表明, 改进的复合银染法在蛋白质检测中具有效果好、简单快捷的特点。

关键词 烟粉虱; 温室白粉虱; 可溶性蛋白; 复合银染法

中图分类号 Q 599

A comparative study on detection methods for soluble proteins in small insects

Chu Dong¹, Zhang Zhuting¹, An Zhilan², Guo Dufa², Zhou Hongxu³

(1. *High-tech Research Centre, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China;*
2. *College of Population Resource and Environment, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China;*
3. *Department of Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China*)

Abstract Three detection methods for soluble proteins in two small insects, *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), were compared. The results showed that the improved complex silver staining method was good and fast for detection of the proteins.

Key words *Bemisia tabaci* (Gennadius); *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood); soluble protein; complex silver staining method

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 技术是蛋白质分析中最常用的手段之一^[1]。SDS-PAGE 分离后的蛋白质条带, 通常用考马斯亮蓝进行染色, 但是该方法灵敏度相对不高, 背景较深。20 世纪 70

年代产生了一种更为敏感的染色方法——银染法。近几年,又相继报道了许多改进的银染方法,包括二胺银染法、无二胺银染法、照相银染法、负片银染法、正片银染法^[2]和海波银染法^[3]。目前,对染色方法改进主要集中在如何提高蛋白质染色的灵敏度,操作方便与否,费用是否昂贵等方面。如何在保持银染方法高灵敏度的同时,又能够有效地降低染色背景,用无毒的化学物质去替换现在凝胶电泳中常用的有毒物质等,代表了蛋白质条带染色的未来发展方向^[4]。

在昆虫蛋白电泳染色方面,已有研究表明海波银染法在家蝇幼虫蛋白电泳中具有效果较好、简便快速的特点^[4]。而对于小型昆虫可溶性蛋白电泳检测的染色方法报道较少,该方面的研究对于小型昆虫物种鉴定、生理代谢等研究具有重要的实用价值。本研究以北方两种小型昆虫烟粉虱 [*Bemisia tabaci* (Gennadius)] 和温室白粉虱 [*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)] 作为研究对象,分别使用了常规考马斯亮蓝染色法、海波银染法、改进的复合银染法(考马斯亮蓝染色后再用海波银染法染色)3种方法进行了比较研究,结果表明改进的复合银染法得到的胶片底色浅、条带清晰、检测灵敏度高、相关性好,是一种较好的染色方法。并使用这种方法对烟粉虱、温室白粉虱成虫的生理代谢进行了初步比较研究。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及寄主植物

烟粉虱室内继代饲养,供试植物茄子由本实验室种植。温度为 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度(RH)为70%~80%,光周期为L//D=14 h//10 h。温室白粉虱为田间苘麻种群。

1.2 可溶性蛋白的制备及 SDS-PAGE

取1头粉虱成虫置于PCR管中,用15 μL 蒸馏水做裂解液,粉碎后4 $^\circ\text{C}$, 12 000 r/min 离心15 min,取上清液作为蛋白质待测液。凝胶采用Tris-HCl缓冲体系,分离胶浓度为15%, pH=8.8;浓缩胶浓度为4%, pH=6.8;两种凝胶均为过硫酸铵(AP)、四甲基乙二胺(TEMED)系统化学

聚合而成。以0.05%的溴酚蓝作为电泳前沿指示剂。分段控制电压,开始电泳时电压为120 V,当待测液进入分离胶后电压改为200 V,待溴酚蓝指示剂接近分离胶底部约1 cm时停止电泳。考马斯亮蓝法测定单头粉虱成虫蛋白量,重复5头,测定3次。

1.3 不同染色方法的比较

电泳结束后,将同一块胶纵剖成3块,分别用以下方法进行染色:(1)考马斯亮蓝染色;(2)海波银染法染色^[3];(3)考马斯亮蓝染色后再用海波银染法^[3]染色(复合银染法)。其中,考马斯亮蓝染色法步骤为:取下胶片做好标记,在摇床上染色(染色液:0.25 g考马斯亮蓝 G₂₅₀, 100 mL 乙醇, 25 mL 乙酸,用蒸馏水定容至250 mL)约30 min。回收染剂,用蒸馏水冲洗蓝色胶片,再倒入200 mL 脱色液(400 mL 95%乙醇, 100 mL 乙酸,用蒸馏水定容至1 000 mL)脱色,如此脱色数次至蛋白带显现。

1.4 单头粉虱可溶性蛋白的图谱比较

分别取单头烟粉虱成虫、温室白粉虱成虫可溶性蛋白进行SDS-PAGE,然后利用复合银染法进行染色,并对染色后的图谱进行比较。

2 结果与分析

2.1 不同染色方法效果比较

利用不同的方法对烟粉虱、温室白粉虱可溶蛋白(分别3.811、6.276 μg) SDS-PAGE 染色,结果见图1。从电泳图谱可以看出,用考马斯亮蓝染色得到的胶片条带少,且不清晰,背景较深(图1a);用海波银染法染色后得到的条带比考马斯亮蓝染色得到的要多,但是底色仍然比较重,影响条带的清晰度(图1b);用复合银染法所得条带多、底色轻、条带清晰,效果最好(图1c)。

2.2 复合银染法在两种粉虱可溶性蛋白图谱分析中的应用

利用SDS-PAGE技术对1头烟粉虱、温室白粉虱成虫可溶性蛋白图谱进行比较(图2)。烟粉虱和温室白粉虱在蛋白质迁移率(Rf)为0.355和0.383位置分别有一条明显的特征性蛋白带,可作为区分两物种的依据。

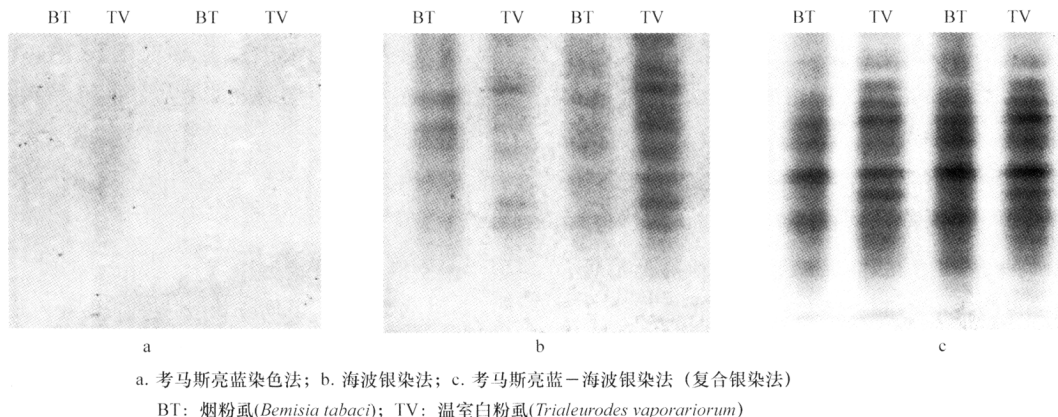


图1 利用3种染色方法对两种粉虱可溶性蛋白染色的效果比较

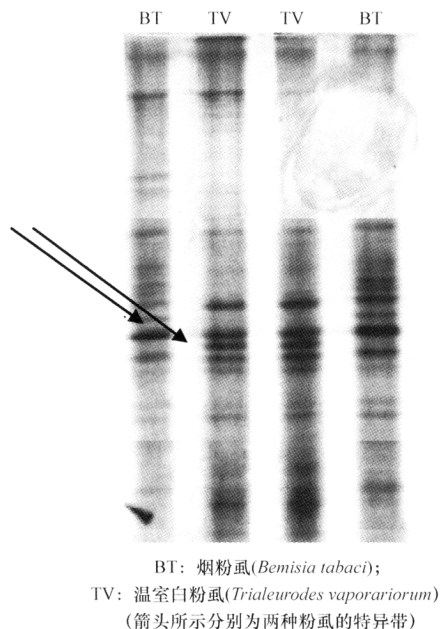


图2 两种粉虱可溶性蛋白的电泳图谱

3 结论与讨论

考马斯亮蓝染色法和银染色法是蛋白质凝胶电

泳两种最主要的染色方法。考马斯亮蓝染色法灵敏度较低,银染色法比考马斯亮蓝染色法的灵敏度约高出100倍,但在应用中显色太快,稳定性和重复性较差。近年来,海波银染色法在昆虫家蝇幼虫蛋白电泳中不仅效果较好,而且简便快速^[4]。本研究将该方法融入了传统的复合银染技术中,不仅具有传统复合银染技术的高灵敏度特点,而且具有简单快速的特点。利用这种方法,1头烟粉虱的1/2溶液(约1.900 μg)也可染出清晰图谱。因此,本研究中的试验方法,可能在小型昆虫的蛋白电泳图谱分析中具有较高的应用价值。

参考文献

- [1] 兰海燕, 李立会. 蛋白质凝胶电泳技术在作物品种鉴定中的应用[J]. 中国农业科学, 2002, 35(8): 916-920.
- [2] Switzer R C, Merrill C R, Shirfin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1979, 98: 231-237.
- [3] 安春菊, 耿华, 李德森, 等. 检测 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中家蝇蛋白的新方法—海波银染色法[J]. 昆虫学报, 2004, 47(2): 273-276.
- [4] 常胜合, 舒海燕, 秦广雍, 等. 凝胶电泳蛋白质染色方法研究进展[J]. 河南农业科学, 2006, 5(1): 8-11.