

褐色橘蚜全蛋白双向电泳体系条件优化

刘莹洁 王瑛丽 王 琴 杨方云 周 彦* 周常勇*

(西南大学柑桔研究所/中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

摘要: 为优化有效分离褐色橘蚜 *Toxoptera citricida* 全蛋白的双向电泳体系, 比较了饱和酚抽提法、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)/丙酮沉淀法、直接裂解液法和 Tris-HCl 法 4 种蛋白提取方法, 以及蛋白上样量、聚焦条件和固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)胶条对褐色橘蚜全蛋白双向电泳的影响。结果表明, TCA/丙酮沉淀法和直接裂解液法获得的全蛋白浓度分别为 4.25、4.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 显著高于饱和酚抽提法和 Tris-HCl 法, 且 TCA/丙酮沉淀法所提取的蛋白种类丰富度最高。采用 TCA/丙酮沉淀法获得全蛋白, 当上样量为 100 μg 时, 所得蛋白质点多、分辨率高、背景清晰, 除盐 3 h, 等电聚焦量 45 000 V·h, 并选用 pH 3~10 非线性 IPG 胶条时, 双向电泳图谱中横向拖尾现象少, 蛋白点相对清晰, 分布均匀。表明所建立的双向电泳体系, 结合银染, 可从褐色橘蚜全蛋白中识别出 1 264 个蛋白点, 且重复性研究匹配率高, 可用于褐色橘蚜蛋白质组学研究。

关键词: 褐色橘蚜; 全蛋白提取; 双向电泳; 条件优化

Optimization of two-dimensional gel electrophoresis technology system for total protein from brown citrus aphid *Toxoptera citricida*

Liu Yingjie Wang Yingli Wang Qin Yang Fangyun Zhou Yan* Zhou Changyong*

(Citrus Research Institute, Southwest University/Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: In order to optimize a two-dimensional electrophoresis (2-DE) system for studying total protein of brown citrus aphid *Toxoptera citricida*, four different methods of protein extraction including saturated phenol extraction, trichloroacetic acid (TCA)/acetone precipitation, lysate extraction and trihydroxymethyl aminomethane (Tris-HCl) buffer extraction methods were compared. Moreover, the factors including loading amount of protein samples, isoelectric focusing protocols and pH of immobilized pH gradient (IPG) strips were optimized. The results showed that TCA/acetone precipitation and lysate extraction yielded much higher amounts of proteins than other extraction methods, and the protein extraction rate was 4.25 and 4.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectively. Furthermore, TCA/acetone precipitation yielded the best richness of proteins. For *T. citricida* 2-DE, the optimized system included a loading amount of 100 μg protein, desalinated for three hours, with an isoelectric focusing of 45 000 V·h, pH 3–10 nonlinear IPG strip and silver staining, which could produce good background, clear protein spots and few slight streak. This method had detected a total of 1 264 protein spots with a highly reproducible result in the proteomic study of *T. citricida*.

Key words: *Toxoptera citricida*; total protein extraction; two-dimensional electrophoresis (2-DE); condition optimization

基金项目: 国家现代农业(柑桔)产业技术体系(CARS-26-05B), 重庆市基础与前沿研究重点项目(cstc2015jcyjBX0043), 重庆市科委社会事业与民生保障科技创新专项(CSTC2016SHMS-ZTX80003)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: zhouyan@cric.cn, zhoucy@cric.cn

收稿日期: 2017-10-12

柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)引起的柑橘衰退病,是世界上最严重的柑橘病害之一,褐色橘蚜 *Toxoptera citricida* 是其有效的传播媒介(Bar-Joseph et al., 1989)。20世纪80年代后期随着我国柑橘产业结构的调整及柚类、甜橙和杂柑等敏感品种的种植比例增加,CTV危害变得日益严重(Zhou et al., 1996; 周彦等, 2008)。前期研究表明,褐色橘蚜对CTV的传毒能力受取食时间、毒源植株和受毒植株的种类、环境条件以及蚜虫中CTV含量等多个因素影响(Broadbent et al., 1996; 周彦等, 2007; 2015)。近些年研究表明,CTV可通过结构蛋白CPm和非结构蛋白p61、p65与褐色橘蚜的食窦进行特异结合,从而实现该病毒的传播(Killiny et al., 2016)。但褐色橘蚜体内与CTV结合的受体蛋白仍不清楚。因此通过获得褐色橘蚜的全蛋白,进而鉴定出与CTV特异性结合的蛋白受体,对于揭示褐色橘蚜传播CTV的分子机理具有重要意义。

双向电泳技术是当前筛选、鉴定媒介昆虫中病毒蛋白受体的重要手段。Li et al. (2001)采用Tris-HCl裂解液法,并结合双向电泳技术和质谱分析从麦长管蚜 *Sitobion avenae* 头部蛋白中鉴定出了结合大麦黄矮病病毒-MAV (*Barley yellow dwarf virus*-MAV, BYDV-MAV)的2个蛋白受体。TCA/丙酮沉淀法、酚饱和法也被用于桃蚜 *Myzus persicae*、麦二叉蚜 *Schizaphis graminum*、灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 等媒介昆虫蛋白的提取,并通过与双向电泳、液质联用双相色谱、质谱分析、基质辅助激光解析串联飞行时间质谱等分析手段相结合,能鉴定出多个与病毒互作的蛋白受体(Dombrovsky et al., 2007; Cilia et al., 2011; Li et al., 2011)。此外,双向电泳还可与液质联用双相色谱相结合,用于分离、鉴定麦二叉蚜唾液蛋白和马铃薯长管蚜 *Macrosiphum euphorbiae* 的差异蛋白(Nguyen et al., 2008; Nicholson & Puterka, 2014)。

由于蚜虫个体小,蛋白质含量低且不同蚜虫的取食习惯差异较大,不同蚜虫虫体内色素、多糖、多酚等干扰物质较多且差异较大,使得双向电泳的重复性差,因此不同蚜虫需采用不同的全蛋白提取方法和双向电泳条件(武丽娟等, 2014)。目前尚无褐色橘蚜全蛋白提取、分离鉴定的报道。本研究通过比较、改进不同全蛋白提取方法,优化上样量、聚焦条件、固相pH梯度(immobilized pH gradient, IPG)胶条等因素,以期建立适合褐色橘蚜全蛋白的双向电泳体系,从而为褐色橘蚜蛋白受体鉴定提供技术

支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:褐色橘蚜,中国农业科学院柑桔研究所国家柑桔苗木脱毒中心提供,饲养于养虫室的锦橙 *Citrus sinensis* 实生苗中。蚜虫生长温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、光周期为16 L:8 D、相对湿度为60%~80%。选取0.03 g无翅成蚜,将其收集于离心管中,经液氮速冻后, -80°C 保存备用。

试剂及仪器:IPG胶条和IPG缓冲液、矿物油、3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-propane sulfonate, CHAPS)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、过硫酸铵、四甲基乙二胺、二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)、 β -巯基乙醇(2-mercaptoethanol, 2-ME)、碘乙酰胺、溴酚蓝、尿素,美国GE公司;30%丙稀酸胺/甲叉双丙稀酰胺溶液(29:1)、Bradford蛋白质定量试剂盒,美国Bio-Rad公司;Protein Ruler II, 中国TransGen公司;三羟甲基氨基甲烷,德国Biofroxx公司;其它试剂均为国产分析纯。PROTEAN IEF System等电点聚焦仪、PROTEAN II Xi Cell垂直电泳系统、PD Quest 8.0.1凝胶蛋白点分析软件,美国Bio-Rad公司;Image Scanner 2D光密度扫描仪,瑞典Amersham公司;恒温水循环仪,瑞典Pharmacia公司。

1.2 方法

1.2.1 褐色橘蚜全蛋白的抽提方法

饱和酚提取法:参照安少利等(2010)方法并略作修改。0.03 g褐色橘蚜液氮研磨后,加 -20°C 预冷10% TCA/丙酮溶液1 mL,充分混匀后, -20°C 沉淀过夜。分别用 -20°C 预冷的甲醇和80%丙酮溶液悬浮沉淀,室温干燥并加入Tris饱和酚溶液500 μL 和蔗糖/SDS缓冲液(0.1 mol/L pH 8.0 Tris-HCl、2% SDS、2% 2-ME、30% 蔗糖)500 μL ,混匀振荡;于 4°C 、12 000 r/min下离心10 min,取酚相;加入3倍体积0.1 mol/L乙酸铵/甲醇溶液, -20°C 过夜。分别用 -20°C 预冷80%丙酮溶液和丙酮悬浮沉淀。于 4°C 、12 000 r/min下离心10 min,室温干燥沉淀, -80°C 保存备用。

三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)/丙酮沉淀法:参照Nguyen et al. (2007)方法并略作修改。0.03 g褐色橘蚜液氮研磨后,加入预冷的含2% 2-ME 10% TCA/丙酮溶液1 mL,混匀后 -20°C 过夜;于 4°C 、

12 000 r/min 下离心 20 min, 分别用预冷的 10% TCA/丙酮和 80% 丙酮悬浮沉淀, -20℃ 静置 30 min, 重复 2 次。于 4℃、12 000 r/min 下离心 20 min, 室温干燥沉淀, 于 -80℃ 保存备用。

直接裂解液法: 参照 Wang et al. (2009) 方法并略作修改。0.03 g 褐色橘蚜液氮研磨后, 加蛋白裂解液 (8 mol/L 尿素、4% CHAPS、40 mmol/L DTT、2% Bio-lyte) 500 μ L; 充分混匀后静置 5 min, 于 4℃、12 000 r/min 下离心 20 min, 上清液中加入 2 倍体积预冷的丙酮, 4℃ 下静置 30 min; 于 4℃、12 000 r/min 下离心 15 min, 沉淀室温干燥, 于 -80℃ 保存备用。

Tris-HCl 法: 参照 Li et al. (2001) 方法并略作修改。取 0.03 g 褐色橘蚜液氮研磨后, 加裂解液 (9 mol/L 尿素、50 mmol/L Tris-HCl pH 6.8、4.5% SDS、2% 2-ME、2% Bio-lyte) 500 μ L。后续步骤同直接裂解液法。

1.2.2 褐色橘蚜样品的蛋白含量测定

将 -80℃ 储存的蛋白样品分别溶于 500 μ L 上样水化液 (8 mol/L 尿素、4% CHAPS、40 mmol/L DTT、0.2% Bio-Lyte、0.002% 溴酚蓝), 煮沸 5 min 后, 于 12 000 g 下离心 10 min。参照 Bradford 蛋白定量法 (Bradford, 1976) 计算蛋白浓度。

1.2.3 蛋白样品的 SDS-PAGE 电泳

为比较不同提取方法获得蛋白种类的丰富度, 将 4 种提取方法所得蛋白样品浓度均调至 1 μ g/ μ L, 取 10 μ L 进行单向 SDS-PAGE 电泳, 分离胶和浓缩胶浓度分别为 12% 和 5%。银染 (杨方云, 2012) 后, 用 Image Scanner 扫描仪采集图像信息, 所得图像用 PD Quest 8.0.1 软件进行图像处理和分析, 重复 3 次。

1.2.4 上样量、等电聚焦程度及胶条 pH 值的优化

上样量的优化: 采用 13 cm pH 3~10 的非线性 IPG 胶条, 蛋白质样品上样量分别为 50、100 和 200 μ g, 用上样水化液将上样总体积调至 300 μ L。加样时, 沿着聚焦槽边缘线性加入蛋白样品, 先去除 IPG 胶条上的保护层, 胶面朝下放入聚焦盘, 缓慢移动胶条确保无气泡, 加入适量矿物油覆盖胶条, 使其无水分流失, 盖上胶条槽盖; 水平置于等电点聚焦仪中进行第 1 向等电聚焦。

等电聚焦程序的优化: 参照《Bio-Rad 蛋白质组双向电泳实验操作手册》, 设置 2 个等电聚焦程序, 程序 I: 50 V 被动水化 12 h, 500 V 快速除盐 30 min, 1 000 V 线性除盐 30 min, 5 000 V 快速升压 30 min, 8 000 V 线性升压 1.5 h, 8 000 V 快速聚焦 30 000 V $\cdot$ h, 500 V 保持 10 h, 共除盐 1.5 h, 等电聚焦量 30 000 V $\cdot$ h;

程序 II: 50 V 被动水化 12 h, 100 V 快速除盐 30 min, 250 V 线性除盐 30 min, 500 V 快速除盐 1 h, 1 000 V 线性除盐 1 h, 1 000 V 快速升压 1 h, 8 000 V 快速升压 4 h, 8 000 V 快速聚焦 45 000 V $\cdot$ h, 500 V 保持 10 h, 共除盐 3 h, 等电聚焦量 45 000 V $\cdot$ h。等电聚焦温度设置为 15℃, 每根胶条的极限电流为 50 μ A。

IPG 胶条 pH 值的优化: 为选择适合分离褐色橘蚜蛋白的 IPG 胶条 pH 梯度, 采用 13 cm IPG 胶条, 蛋白上样量控制为 100 μ g, 对 pH 3~10 的非线性和 pH 4~7 的 IPG 胶条分别进行等电聚焦。聚焦完毕后采用两步平衡法, 每步 15 min, 第 1 步平衡液为 6 mol/L 尿素、2% SDS、75 mmol/L Tris-HCl pH 8.8、30% 甘油、0.002% 溴酚蓝、1% DTT; 第 2 步平衡液同第 1 步, 仅是用 2.5% 碘乙酰胺代替 DTT。平衡后经超纯水清洗后, 用 12% 的凝胶进行 SDS-PAGE 电泳。以每块胶恒定电压 60 V 电泳 1 h, 待溴酚蓝指示剂由第 1 向胶条转移到第 2 向凝胶后加大电压至 300 V, 溴酚蓝指示剂接近底部边缘 5 mm 时停止电泳, 电泳全程由水循环仪控制温度为 10℃。银染后用 Image Scanner 扫描仪采集图像信息, 所得图像用 PD Quest 8.0.1 软件进行图像处理和分析, 重复 3 次。

1.2.5 不同抽提方法的蛋白样品双向电泳图谱

采用优化所得的双向电泳体系对饱和酚抽提法、TCA/丙酮沉淀法、直接裂解液法和 Tris-HCl 法获得的褐色橘蚜全蛋白进行双向电泳, 进一步明确褐色橘蚜全蛋白的最适抽提方法。

1.2.6 褐色橘蚜全蛋白双向电泳体系重复性验证

采用上述各预试验筛选所得最佳提取及双向电泳方法, 即 TCA/丙酮沉淀法提取褐色橘蚜全蛋白, 选择长度 13 cm pH 3~10 的非线性 IPG 胶条, 上样量为 100 μ g 进行等电聚焦, 除盐 3 h 和等电聚焦量 45 000 V $\cdot$ h, 第 2 向分离胶浓度为 12%, 银染观察结果, 重复 3 次。

1.3 数据分析

利用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析, 采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 全蛋白抽提方法的比较和选择

2.1.1 褐色橘蚜样品蛋白浓度

TCA/丙酮沉淀法和直接裂解液法抽提的褐色橘蚜样品蛋白浓度最高, 分别为 4.25 和 4.03 μ g/ μ L, 显著高于饱和酚抽提法和 Tris-HCl 法抽提的褐色橘蚜样品蛋白浓度 ($P < 0.05$, 图 1)。

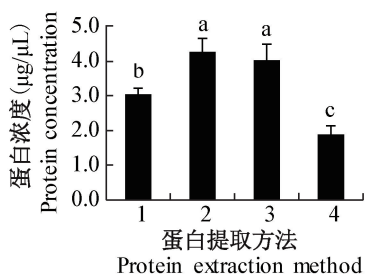


图1 不同提取方法制备的褐色橘蚜样品蛋白浓度

Fig. 1 Protein contents of *Toxoptera citricida* extracted by different protein extraction methods

1~4: 饱和酚抽提法、TCA/丙酮沉淀法、直接裂解液法和Tris-HCl法。图中数据为平均值±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。1~4: Saturated phenol extraction method, TCA/acetone precipitation method, lysate extraction method and Tris-HCl buffer extraction method, respectively. Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.1.2 蛋白样品SDS-PAGE电泳效果

直接裂解液法和Tris-HCl法获得的蛋白分子量主要集中在25~75 kD之间,高分子量和低分子量的蛋白条带少;采用TCA/丙酮沉淀法和饱和酚抽提法提取的样品蛋白条数较多,10~180 kD的范围内分布均匀,条带较清晰,但在10~25 kD范围内,饱和酚抽提法获得的蛋白电泳条带数要少于TCA/丙酮沉淀法(图2),表明采用TCA/丙酮沉淀法的获得的蛋白效果明显优于其它3种方法。

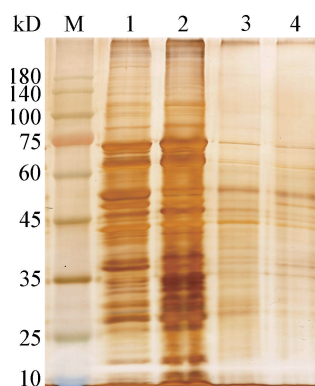


图2 不同抽提方法提取褐色橘蚜蛋白的SDS-PAGE电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoretogram of *Toxoptera citricida* proteins with different extraction methods

M: 蛋白 marker; 1~4: 饱和酚抽提法、TCA/丙酮沉淀法、直接裂解液法和Tris-HCl法。M: Marker; 1~4: saturated phenol extraction method, TCA/acetone precipitation method, lysate extraction method and Tris-HCl buffer extraction method, respectively.

2.2 不同上样量对双向电泳的影响

采用50 μg上样量时,无法鉴定部分分子量在10~45 kD之间的低丰度蛋白(图3-A)。采用100 μg上样量时,蛋白点重叠少,分辨率较高,可有效分离褐色橘蚜的全蛋白(图3-B)。采用200 μg上样量时,第1向等电聚焦不完全,碱性端横条纹加重,部分蛋白质点出现重叠现象(图3-C)。因此对于13 cm pH 3~10的非线性IPG胶条,采用银染分析时,100 μg上样量的分离效果较好。

2.3 不同等电聚焦程序对双向电泳的影响

通过将除盐时间由1.5 h延长至3 h,等电聚焦量由30 000 V·h延长至45 000 V·h,所得电泳图谱聚焦效果更好,横向拖尾的现象少,蛋白点更清晰(图4)。

2.4 不同pH值的IPG胶条对双向电泳的影响

采用13 cm pH 4~7的IPG胶条电泳图谱检测到734个蛋白质点(图5-A),原本聚集在pH 3~10非线性IPG胶条等电点3~5和7~10之间的众多蛋白质点分离效果不明显,部分低丰度蛋白点被高丰度蛋白点所遮盖。采用13 cm pH 3~10的非线性IPG胶条的双向电泳图谱检测到1 226个蛋白质点(图5-B),虽然分子量在90~100 kD之间有部分蛋白质点重合,无法有效分离,但电泳图谱整体蛋白质点分布均匀,分离效果较好。因此,13 cm pH 3~10的非线性IPG胶条适于褐色橘蚜全蛋白的双向电泳分析。

2.5 不同抽提方法的蛋白样品双向电泳图谱

采用饱和酚抽提法、TCA/丙酮沉淀法、直接裂解液法和Tris-HCl法分别获得1 023、1 264、726和563个蛋白质点(图6-A~D)。其中TCA/丙酮沉淀法提取的褐色橘蚜全蛋白的双向电泳图谱获得的蛋白质点数最多且图像清晰。Tris-HCl法获得的蛋白质点最少,在酸性端和碱性端的大量蛋白质点未被有效检测。直接裂解液法相较Tris-HCl法获得的蛋白质点明显增多,但少于饱和酚提取法,且分子量为80~100 kD的蛋白质点未被有效检测。饱和酚提取法有效分离的蛋白质点少于TCA/丙酮沉淀法。结果表明,TCA/丙酮沉淀法更适用于制备褐色橘蚜全蛋白双向电泳样品。

2.6 褐色橘蚜全蛋白电泳体系的重复性验证

以筛选所得最适条件进行3次褐色橘蚜全蛋白双向电泳,分别检测到1 264、1 226和1 278个蛋白质点(图7),重复性较好;3张图谱的匹配率达75%,表明该检测体系具有较好的重复性,可用于褐色橘蚜蛋白质组学分析研究。

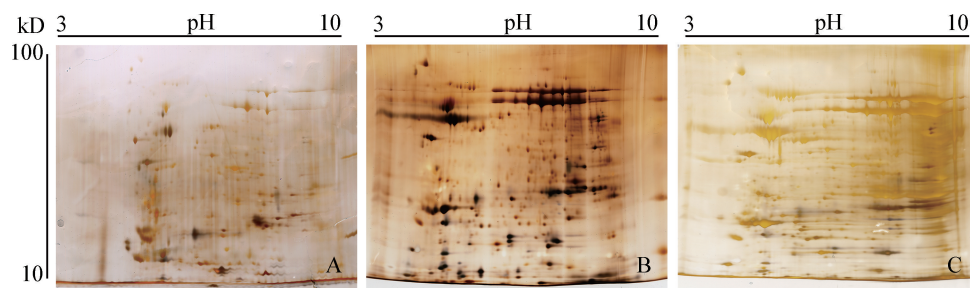


图3 不同上样量时褐色橘蚜蛋白样品的双向电泳图谱

Fig. 3 The 2-DE patterns of *Toxoptera citricida* extracts with different loading sample quantity

A~C: 上样量分别为 50、100、200 µg。A~C: Loading sample quantity with 50, 100, 200 µg, respectively.

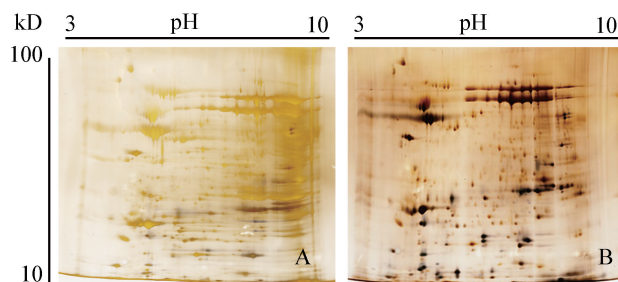


图4 不同等电聚焦程序的褐色橘蚜蛋白双向电泳图谱

Fig. 4 The 2-DE patterns of *Toxoptera citricida* proteins from different isoelectric focusing electrophoresis (IEF) formula

A: 聚焦程序 I; B: 聚焦程序 II。A: IEF formula I; B: IEF formula II.

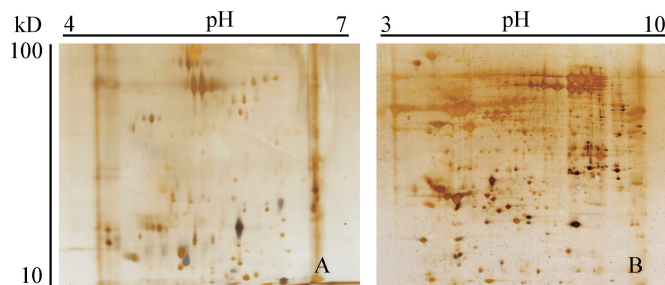


图5 褐色橘蚜蛋白样品不同 pH 梯度范围 IPG 胶条双向电泳图谱

Fig. 5 The 2-DE patterns of *Toxoptera citricida* extracts by using different pH gradient IPG strips

A: pH 梯度范围 4~7 的非线性胶条; B: pH 梯度范围 3~10 的非线性胶条。A: pH gradient range 4~7 IPG strip; B: pH gradient range 3~10 nonlinear IPG strip.

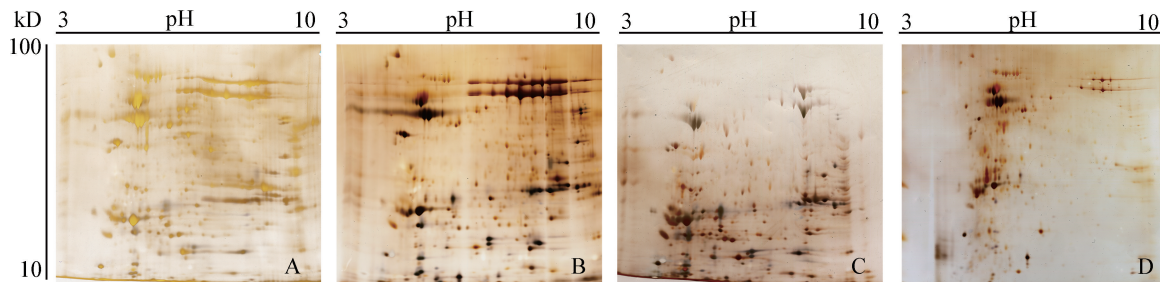


图6 不同抽提方法获得的褐色橘蚜蛋白样品双向电泳图谱

Fig. 6 The 2-DE patterns of different extraction methods for total protein of *Toxoptera citricida*

A~D: 饱和酚抽提法、TCA/丙酮沉淀法、直接裂解液法和 Tris-HCl 法。A~D: Saturated phenol extraction method, TCA/aceton precipitation method, lysate extraction method and Tris-HCl buffer extraction method, respectively.

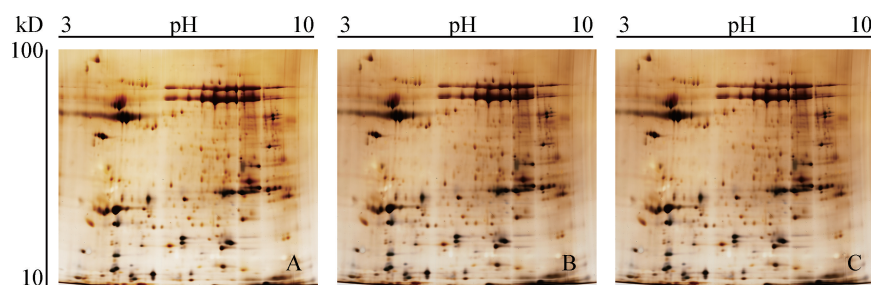


图7 褐色橘蚜蛋白样品的双向电泳图谱

Fig. 7 The 2-DE patterns of *Toxoptera citricida* extracts

A~C: 3次重复。A~C: Three replicates.

3 讨论

全蛋白提取是双向电泳成功并获得优质图谱的基础(Pan et al., 2013)。裂解液提取法因其操作简便是最常用的全蛋白提取方法(Gygi et al., 2000)。原雅伟等(2011)采用直接裂解液法获得了塔玛亚历山大藻 *Alexandrium tamarense* 的全蛋白。本研究通过直接裂解液法获得的全蛋白虽然浓度较高,但由于蚜虫脂类、色素和多糖等干扰物质多,分离效果差。为消除全蛋白中杂质的影响, Liang et al. (2013)和高雪萌等(2016)将直接裂解液法获得的全蛋白再次纯化,提高了电泳图谱的分辨率。Tris-HCl法以 Tris-HCl 和 SDS 为缓冲液,虽保持了蛋白活性,但也导致蛋白尤其是疏水蛋白溶解不足,蛋白得率降低(Wang et al., 2009)。Pan et al. (2013)和 Wongpia et al. (2015)在采用 TCA/丙酮沉淀法时通过多次 TCA 沉淀,去除了样品中的脂质和盐离子,既提高了蛋白质量,也减少了蛋白损耗。本研究采用 TCA/丙酮沉淀法获得的蛋白,不仅浓度最高,且双向电泳时可检测到的蛋白质点最多、重叠少、背景清晰。因此,选用 TCA/丙酮沉淀法提取褐色橘蚜的全蛋白。

双向电泳对全蛋白的分离效果主要受电泳上样量、聚焦条件和固相 pH 梯度胶条等因素影响。其中合适的电泳上样量可提高双向电泳的分辨率,上样量受蛋白样品种类、IPG 胶条长度等因素影响(Jiang et al., 2017; Thagel et al., 2017)。前期研究表明,使用 11 cm pH 3~10 的非线性 IPG 胶条进行全蛋白双向电泳分离鉴定时,可采用 100~400 μg 的蛋白上样量(Li et al., 2011; 武丽娟等, 2014; Thagel et al., 2017)。本研究结果表明,当使用 13 cm pH 3~10 的非线性 IPG 胶条且蛋白上样量为 100 μg 时,双向电泳效果最好,可有效地分离褐色橘蚜的全蛋白。

蛋白质在等电聚焦时到达各自等电点所需要的

时间与电泳聚焦量有关(Ong & Pandey, 2001)。不同样品的双向电泳等电聚焦时间差异较大,聚焦时间过长会造成图谱出现细密的横纹,聚焦时间不足会使横纹增多且蛋白点数偏少(Gorg et al., 2009)。前期研究表明,麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana*、麦长管蚜和豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 采用的等电聚焦量为 16 000~40 000 $\text{V} \cdot \text{h}$ (成卫宁等, 2010; Pan et al., 2013; 武丽娟等, 2014),而本研究当采用的等电聚焦量为 45 000 $\text{V} \cdot \text{h}$ 时,所得电泳图横向拖尾现象较少,蛋白点更清晰。此外,本研究通过延长低电压的除盐时间进一步提高了蛋白的分离效果。

合适的 IPG 胶条也是获得高分辨率电泳图谱的重要条件。Gorg et al. (2000)和 Bruneel et al. (2017)认为,对于未知的蛋白样品,应先采用宽范围 IPG 胶条进行初选,再选择最佳 pH 范围的胶条。此外,刘志远等(2013)和冯浩等(2017)研究表明, pH 4~7 IPG 胶条对部分动物和真菌来源的全蛋白的分离效果最佳。本研究结果表明,当使用 pH 3~10 的非线性 IPG 胶条时,褐色橘蚜全蛋白的分离效果最好,这与 Pan et al. (2013)和武丽娟等(2014)关于麦长管蚜和豌豆蚜全蛋白的结论相似,由此推测该类胶条可能适用于蚜虫全蛋白的分离和鉴定。

本研究结果表明,采用 TCA/丙酮沉淀法提取褐色橘蚜全蛋白,选择长度 13 cm pH 3~10 的非线性 IPG 胶条,上样量 100 μg ,等电聚焦,除盐 3 h 和等电聚焦量 45 000 $\text{V} \cdot \text{h}$,第 2 向分离胶浓度为 12%,采用银染显色,可获得高分辨率、背景清晰、重复性好的双向电泳图谱,但该双向电泳体系对于 pH 3~4 或 100~250 kD 分子量较大蛋白的分离效果还不是很理想,需进一步探索和优化。

参考文献 (References)

- An SL, Pan YO, Xu P, Zhang JH, Xi JH. 2010. A comparison of protein extraction methods suitable for aphid proteins. *Journal of*

- Environmental Entomology, 32(3): 353–356 (in Chinese) [安少利, 潘怡欧, 许鹏, 张炬红, 席景会. 2010. 蚜虫全蛋白提取方法的比较研究. 环境昆虫学报, 32(3): 353–356]
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF. 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. Annual Review of Phytopathology, 27: 291–316
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1/2): 248–254
- Broadbent P, Brlansky RH, Indsto J. 1996. Biological characterization of Australian isolates of *Citrus tristeza virus* and separation of subisolates by single aphid transmissions. Plant Disease, 80(3): 329–333
- Bruneel A, Habarou F, Stojkovic T, Plouviez G, Bougas L, Guillemet F, Brient N, Henry D, Dupré T, Vuillaumier-Barrot S, et al. 2017. Two-dimensional electrophoresis highlights haptoglobin beta chain as an additional biomarker of congenital disorders of glycosylation. Clinica Chimica Acta, 470: 70–74
- Cheng WN, Li YP, Yang J, Xu XL, Wu JX. 2010. Two-dimensional electrophoresis of proteins in the pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin). Journal of Plant Protection, 37(1): 7–11 (in Chinese) [成卫宁, 李怡萍, 杨杰, 许向利, 仵均祥. 2010. 麦红吸浆虫滞育不同时期幼虫蛋白质双向电泳分析. 植物保护学报, 37(1): 7–11]
- Cilia M, Howe K, Fish T, Smith D, Mahoney J, Tamborindéguy C, Burd J, Thannhauser TW, Gray S. 2011. Biomarker discovery from the top down: protein biomarkers for efficient virus transmission by insects (Homoptera: Aphididae) discovered by coupling genetics and 2-D DIGE. Proteomics, 11(12): 2440–2458
- Dombrovsky A, Gollop N, Chen S, Chejanovsky N, Raccach B. 2007. *In vitro* association between the helper component-proteinase of *Zucchini yellow mosaic virus* and cuticle proteins of *Myzus persicae*. Journal of General Virology, 88(Pt 5): 1602–1610
- Feng H, Wang HY, Feng YQ, Gao XN, Han QM, Huang LL. 2017. Development of two dimensional electrophoresis for hyphal proteins of *Valsa mali*. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 45(6): 155–162 (in Chinese) [冯浩, 王海英, 冯雅琼, 高小宁, 韩青梅, 黄丽丽. 2017. 苹果树腐烂病菌菌丝蛋白双向电泳体系的建立. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 45(6): 155–162]
- Gao XM, Jia FX, Wei D, Wang JJ. 2016. The establish of two-dimensional electrophoresis technology system of *Bacterocera dorsalis* and its application prospect analysis on port quarantine. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 38(5): 19–25 (in Chinese) [高雪萌, 夹福先, 魏冬, 王进军. 2016. 桔小实蝇蛋白质双向电泳体系的建立及在口岸检疫中的运用前景分析. 西南大学学报(自然科学版), 38(5): 19–25]
- Gorg A, Drews O, Luck C, Weiland F, Weiss W. 2009. 2-DE with IPGs. Electrophoresis, 30(S1): S122–S132
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis, 21(6): 1037–1053
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang YN, Rochon Y, Aebersold R. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(17): 9390–9395
- Jiang ZJ, Kumar M, Padula MP, Pernice M, Kahlke T, Kim M, Ralph PJ. 2017. Development of an efficient protein extraction method compatible with LC-MS/MS for proteome mapping in two Australian seagrasses *Zostera muelleri* and *Posidonia australis*. Frontiers in Plant Science, 8: 1416
- Killiny N, Harper SJ, Alfaress S, Mohtar CEI, Dawson WO. 2016. Minor coat and heat-shock proteins are involved in binding of *Citrus tristeza virus* to the foregut of its aphid vector, *Toxoptera citricida*. Applied and Environmental Microbiology, 82(21): 6294–6302
- Li CY, Cox-Foster D, Gray SM, Gildow F. 2001. Vector specificity of *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) transmission: identification of potential cellular receptors binding BYDV-MAV in the aphid, *Sitobion avenae*. Virology, 286(1): 125–133
- Li S, Xiong RY, Wang XF, Zhou YJ. 2011. Five proteins of *Laodelphax striatellus* are potentially involved in the interactions between rice stripe virus and vector. PLoS ONE, 6(10): e26585
- Liang X, Wang JR, Wong KW, Hsiao WL, Zhou H, Jiang ZH, Kam KT, Liu L. 2013. Optimization of 2-dimensional gel electrophoresis for proteomic studies of solid tumor tissue samples. Molecular Medicine Reports, 9(2): 626–632
- Liu ZY, Li JR, Li XP, Li TT, Wang YB, Huang H, Chen HJ, Lu WK. 2013. Establishment of two-dimensional electrophoresis (2-DE) technique in muscle proteome of *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of Fisheries of China, 37(2): 288–296 (in Chinese) [刘志远, 励建荣, 李学鹏, 李婷婷, 王彦波, 黄和, 陈华健, 陆维克. 2013. 中国明对虾肌肉组织蛋白质双向电泳技术体系的建立. 水产学报, 37(2): 288–296]
- Nguyen TTA, Boudreault S, Michaud D, Cloutier C. 2008. Proteomes of the aphid *Macrosiphum euphorbiae* in its resistance and susceptibility responses to differently compatible parasitoids. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38(7): 730–739
- Nguyen TTA, Michaud D, Cloutier C. 2007. Proteomic profiling of aphid *Macrosiphum euphorbiae* responses to host-plant-mediated stress induced by defoliation and water deficit. Journal of Insect Physiology, 53(6): 601–611
- Nicholson SJ, Puterka GJ. 2014. Variation in the salivary proteomes of differentially virulent greenbug (*Schizaphis graminum* Rondani) biotypes. Journal of Proteomics, 105: 186–203
- Ong SE, Pandey A. 2001. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. Biomolecular Engineering, 18(5): 195–205
- Pan Y, An SL, Li KB, Wang T, Fang K, Zhang H, Sun Y, Yang X, Xi JH. 2013. Evaluation of extraction procedures for 2-DE analysis

- of aphid proteins. *Journal of Separation Science*, 36(3): 532–539
- Thagela P, Yadav RK, Mishra V, Tripathi K, Ahmad A, Dahuja A, Singh PK, Abraham G. 2017. Sample preparation method for tissue based proteomic analysis of *Azolla microphylla*. *Symbiosis*, 72: 207–214
- Wang DZ, Lin L, Chan LL, Hong HS. 2009. Comparative studies of four protein preparation methods for proteomic study of the dinoflagellate *Alexandrium* sp. using two dimensional electrophoresis. *Harmful Algae*, 8(5): 685–691
- Wongpia A, Mahatheeranon S, Lomthaisong K, Niamsup H. 2015. Evaluation of sample preparation methods from rice seeds and seedlings suitable for two-dimensional gel electrophoresis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(2): 1035–1051
- Wu LJ, Fan YL, Song Y, Zhang ZF, Liu XF, Liu TX. 2014. Optimization of two-dimensional gel electrophoresis technology system for aphid proteome. *Journal of Plant Protection*, 41(6): 649–656 (in Chinese) [武丽娟, 樊永亮, 宋月, 张战凤, 刘小凤, 刘同先. 2014. 蚜虫蛋白质组双向电泳体系条件优化. *植物保护学报*, 41(6): 649–656]
- Yang FY. 2012. Differential expression proteomics of sweet orange induced by severe and mild *Citrus tristeza virus* isolates. Ph. D Thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [杨方云. 2012. 不同致病力柑橘衰退病毒株系诱导甜橙表达差异蛋白质组学研究. 博士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Yuan YW, Zheng W, Li SJ, Wang GZ, Zheng TL. 2011. Comparison of three protein extraction methods for proteomic analysis of *Alexandrium tamarense* with two dimensional electrophoresis. *Acta Microbiologica Sinica*, 51(8): 1113–1118 (in Chinese) [原雅伟, 郑伟, 李少菁, 王桂忠, 郑天凌. 2011. 塔玛亚历山大藻双向电泳蛋白的三种提取方法比较. *微生物学报*, 51(8): 1113–1118]
- Zhou CY, Zhao XY, Jiang YH, Tang KZ. 1996. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates infecting pummelo and sweet orange in Sichuan Province, China. //da Graca JV, Moreno P, Yokomi RK. Proceeding of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, USA, pp. 78–82
- Zhou Y, Wang XF, Chen HM, Li ZA, Liu KH, Zhou CY. 2015. Influences of the quantity of *Citrus tristeza virus* on transmissibility by different aphid species. *Journal of Plant Protection*, 42(1): 93–98 (in Chinese) [周彦, 王雪峰, 陈洪明, 李中安, 刘科宏, 周常勇. 2015. 柑橘衰退病毒含量对其蚜传效率的影响. *植物保护学报*, 42(1): 93–98]
- Zhou Y, Zhou CY, Li ZA, Wang XF, Liu KH. 2008. Mild strains cross protection against stem-pitting tristeza of sweet orange. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(12): 4085–4095 (in Chinese) [周彦, 周常勇, 李中安, 王雪峰, 刘科宏. 2008. 利用弱毒株交叉保护技术防治甜橙茎陷点型衰退病. *中国农业科学*, 41(12): 4085–4095]
- Zhou Y, Zhou CY, Wang XF, Liu KH, Song Z, Li ZA. 2007. Effect of virus sources and host plants on the transmissibility of *Citrus tristeza virus* by single aphid of *Toxoptera citricida*. *Journal of Plant Protection*, 34(6): 597–600 (in Chinese) [周彦, 周常勇, 王雪峰, 刘科宏, 宋震, 李中安. 2007. 毒源和寄主对褐色橘蚜传播柑橘衰退病毒效率的影响. *植物保护学报*, 34(6): 597–600]

(责任编辑:张俊芳)