

家蚕雌性附腺及其 N_g 突变体蛋白质组双向电泳图谱分析

靳远祥 徐孟奎* 陈玉银 姜永煌

(浙江大学动物科学学院 杭州 310029)

摘 要 分别对家蚕(*Bombyx mori*. L)正常及 N_g 突变体雌蛾性附腺分泌部组织的蛋白质进行提取,并采用双向凝胶电泳和计算机辅助分析方法,对提取的蛋白质混合物进行分离和比较分析。用银染的方法,平均每张电泳图谱可以分离约 700 个蛋白质点,其中大部分的蛋白质点分布在 pH 4~8 范围内,在分子量上主要集中在 30~70 kD 区域。比较分析发现,有 4 种蛋白只在正常性附腺组织中特异表达,而有 2 种蛋白只在 N_g 突变体的组织中特异表达。另外约有 29 种蛋白在正常性附腺分泌部组织中的表达水平明显高于 N_g 突变,而约有 15 种蛋白在 N_g 突变体的分泌部组织中表达水平较高。这些差异蛋白质可能与 N_g 突变的形成和导致这种突变体的性附腺不能正常分泌粘性蛋白的性状有关。

关键词 家蚕,性附腺,蛋白质组,双向电泳

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0590-05

双向电泳是目前蛋白质组研究中最为广泛应用的蛋白质分析方法,该项技术经过几十年不断的发展已有很大的进步,可以高通量地研究蛋白质属性,从而在蛋白质水平上获得对细胞生理和病理状态下调控系统的认识。但是由于蛋白质组本身的复杂性,二维电泳的分辨率和重复性一直是困扰蛋白质组学发展的主要原因。目前,基于固相 pH 梯度等电聚焦(IPG)的二向电泳(2DE)有较高的分辨率和重复性,可实现大规模的蛋白质组成分析。

同许多昆虫一样,家蚕雌性附腺由分泌部和贮存部组成,分泌部分泌胶状蛋白并贮存于贮存部中。昆虫性附腺主要作用是分泌胶状粘液蛋白将产出的卵粘附于外界的物质上,以保证昆虫在有大风大雨的自然环境中也能正常继代。然而在家蚕的一些品种中发现其产下的卵为天然散卵。这些品种的雌体不能正常分泌胶状粘性物质,命名为 N_g 突变。已有一些学者对性附腺及 N_g 突变进行了一些研究,Weerawan^[1]等对性附腺的发育、蛋白质及 RNA 的含量变化进行了研究,Motoko Yago^[2]等研究认为胶状粘液蛋白有极强的粘性,是一种很好的生物材料,但目前尚未检索到有关家蚕性附腺的分泌部组织的

蛋白质或蛋白质组相关文献。本实验以正常家蚕及其 N_g 突变体的雌性附腺为材料,对其分泌部组织的总蛋白进行抽提,并用双向电泳技术对它们的蛋白质组构成进行比较分析,以发现两者分泌部组织在蛋白质组水平的差异。

1 材料和方法

1.1 试剂

本实验所用的主要试剂 IPG buffer(pH 3~10),超纯脲,IPG 干胶条(pH=3~10,24cm),SDS,DTT,CHAPS,TEMED,Tris,丙烯酰胺,甲叉双丙稀酰胺,甘氨酸,琼脂糖,甘油,低分子量蛋白质标记试剂盒,样品研磨试剂盒和样品清洗试剂盒均购于 Amersham Biosciences 公司,碘乙酰胺和硫脲购自 Sigma 公司。

1.2 试验材料

供试蚕品种为本实验室保存品种 E981 及其 N_g 突变系,在冰冷的生理盐水解剖未产卵的处女蛾,取性附腺的分泌部,置于 -78℃ 的低温中保存。本试验所用的第一向等电聚焦系统 IPCphor 及其附件,第二向 SDS-PAGE 垂直电泳系统 Ettan Dalt six 及附

件,二维电泳图谱成像系统及分析软件均为 Amer-sham Biosciences 产品。

1.3 蛋白质的提取

性附腺分泌部组织样本用预冷的磷酸缓冲液 (pH 7.4)清洗 2 次后用滤纸吸干,离心后称取 20mg 放入 1.5mL 的离心管中,分别用裂解缓冲液 A(8 mol/L Urea 4% CHAPS 2% IPG buffer 60 mmol DTT)和缓冲液 B(7 mol/L Urea 2 mol/L Thiourea, 4% CHAPS 2% IPG buffer 40mmol/L Tris, 40mmol/L DTT)抽提组织中的蛋白质,检测两种缓冲液的蛋白质提取浓度。蛋白质抽提时先加 100μL 裂解缓冲液,用研磨试剂盒(Sample grinding kit)在冰上进行充分的研磨,然后加裂解缓冲液至 500μL,轻微混匀,静止放置冰上 30min,期间每 10min 用超声波处理 30s。15 000r/min 4℃离心 30min,转移上清至另一离心管中。取少量上清液用磷酸缓冲液稀释 10 倍,用 Bradford 法进行蛋白质定量^[3]。然后用 SDS 电泳,考马斯亮蓝染色检测蛋白质的提取浓度。蛋白质双向电泳根据蛋白质的提取浓度,从蛋白质浓度大的溶液中约取 200μg 的蛋白质,按照清洗试剂盒的操作说明进行蛋白质样品进行沉淀并进行 2D 分析。

1.4 蛋白质的双向电泳

1.4.1 第一向固相 pH 梯度等电聚焦:按照 Sanchez 等人^[4]改进的胶内加样方法进行。将处理好的蛋白质沉淀用 450μL(24cm 胶条, pH 3~10)溶胀缓冲液(8.0mol/L Urea, 2% CHAPS, 2.8% DTT, 0.5% IPG 缓冲液, 0.002% 溴酚蓝)溶解蛋白质沉淀。加样前进行短暂的离心去气泡和少量未溶解的蛋白质沉淀,将样品加入干胶条瓷质容器中,胶面朝下小心放入 IPG 干胶条,避免产生气泡。在 20℃ 条件下自动进行溶胀和等电聚焦,溶胀采用低电压 30V 时间为 12h,总电压时约 84 000kVh。电泳结束后,将等电聚焦后的胶条放入平衡管中加 15mL 平衡缓冲液(50mmol/L Tris-HCl pH 8.8 6mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝),于摇床上振荡平衡 2 次,每次 15min。第一次平衡缓冲液中 DTT 150 mg,第二次平衡缓冲液中加 0.375g 碘乙酰胺。

1.4.2 第二向垂直 SDS-PAGE 及银染:在第一向聚焦结束 3h 前进行灌胶,胶的厚度为 1mm,凝胶浓度为 12.5%。胶条平衡结束后,将其转移至凝胶的上方,避免气泡的产生,用 0.5% 的琼脂糖封闭。电泳缓冲液 Tris-Glycine-SDS,电泳开始恒功率 5W/块胶,电泳 30min,然后调整功率为 15W/块胶,直至溴酚蓝前沿距玻璃板边缘约 0.5cm 时停止电泳。蛋白质染

色方法为银染^[5]。
1.5 凝胶扫描与图像分析
用高分辨率的专业扫描仪(ImageScanner, Amer-sham Biosciences)采用 400DPI 的分辨率对银染的凝胶进行灰度扫描。用 ImageMaster 2D 分析软件对图像进行背景消减、斑点检测、分子量和等电点分析、蛋白质点量值的标准化分析等。

2 结果

2.1 蛋白质的提取率

用蛋白质裂解缓冲液 A 和 B 对性附腺的分泌部组织分别进行了蛋白质抽提,对抽提得到的蛋白质用 Brandford 法进行了浓度定量。用 500μL 的裂解缓冲液对 20mg 的分泌部进行抽提,每 1mg 组织可以获得的蛋白质量见表 1。从表 1 中可以看出缓冲液 B 对蛋白质的提取率略高于缓冲液 A 的提取率,但两者的差别不明显。用 SDS 蛋白质单项电泳,

表 1 用裂解缓冲液 A 和缓冲液 B 对性附腺组织的蛋白质提取量

Table 1 Protein extraction of colleterial glands organs in silkworm moth by lysis buffer solution A and B	
Secretory region of colleterial glands	
Lysis buffer A	(114.58 ± 4.73) μg/mg
Lysis buffer B	(127.28 ± 5.39) μg/mg

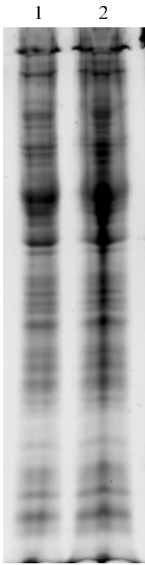


图 1 家蚕性附腺分泌部组织蛋白质 SDS 凝胶电泳图谱
Fig.1 The SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins from colleterial glands organs
1 SDS electrophoresis of the proteins extracted by buffer A;
2 SDS electrophoresis of the proteins extracted by buffer B
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals. im. ac. cn

凝胶进行考马斯亮蓝染色对蛋白质丰度进行进一步检测,结果见图 1。尽管考马斯亮蓝染色的灵敏度较低,电泳图上的条带也非常丰富,而且缓冲液 B 提取的蛋白质条带略浓于缓冲液 A 的条带,这与上述的蛋白质提取率相一致。

2.2 家蚕正常性附腺分泌部组织及其 *Ng* 突变体蛋白质组双向凝胶电泳分析

2.2.1 双向电泳的分辨率:双向电泳第一向根据蛋白质的等电点不同用等电聚焦法分离蛋白质,第二向按蛋白质的分子量的大小把复杂的蛋白质混合物在二维平面上分开。本实验用 24cm 的干胶条进行二向电泳,平均每块胶可平均分离 700 点。

2.2.2 正常性附腺分泌部组织及其 *Ng* 突变蛋白质双向凝胶电泳图谱:对家蚕性附腺分泌部组织用 pH 3~10 的固相胶条分离蛋白质时,发现大部分的蛋白集中在约 pH 4~8 范围内。用 24 cm 的 IPG 干胶条对分泌部组织的蛋白质样品进行二维电泳分离,采用银染方法,两张图谱上均可分辨 700 个以上的蛋白质点,蛋白质的分离效果好,分辨率高。蛋白质的分布范围较广,但大多数集中在 30~70 kD 区域,偏碱性蛋白质较多。本次实验从分泌部组织的随机获得到样品制备和电泳分析各重复 2 次,同一来源的样品之间蛋白质点的匹配率高,能满足 2D 分析的需要。结果见图 2 和图 3。

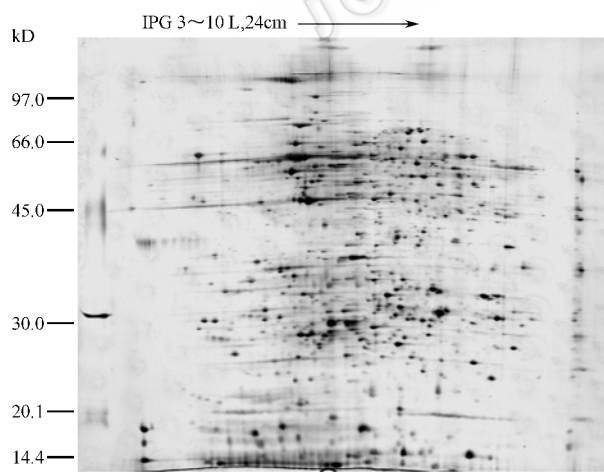


图 2 家蚕正常性附腺分泌部组织双向电泳蛋白质图谱
Fig.2 Two-dimensional electrophoresis protein maps of secretory region of normal colleterial glands

2.2.3 差异蛋白质分析:从图 2、图 3 中可以看出正常及 *Ng* 突变体雌性附腺分泌部组织中的蛋白质点

分布非常相似。利用 ImageMaster 2D 分析软件,以其中一块胶为参考胶进行两者的匹配,并结合肉眼观察比较,发现有 4 种蛋白只在正常性附腺组织中有表达,而有 2 种蛋白只在 *Ng* 突变体的组织中有表达,详见图 4。为了准确描述图谱上蛋白点的量值,利用分析软件将其定义为一个蛋白点占该胶内所有蛋白点的百分比,这是一个相对量,由于这个数字非常小,在计算程序中被自动乘上一个缩放系数。在蛋白点量值校正以前先对胶内的背景进行手工消减,以减少对点量值的影响。这些差异蛋白质的等电点、分子量和标准化相对含量见表 2。此外还发现在几种主要蛋白质表达水平基本相同的情况下,约有 29 种蛋白正常性附腺分泌部组织中的表达水平有明显的升高,而约有 15 种蛋白在 *Ng* 突变体的分泌部组织中表达水平显著升高。

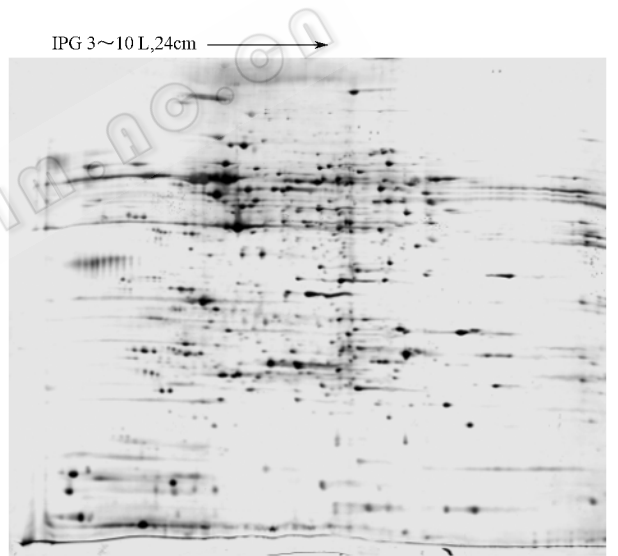


图 3 家蚕 *Ng* 突变性附腺贮存部组织的双向电泳图谱
Fig.3 Two-dimensional electrophoresis protein maps of secretory region of *Ng* mutant colleterial glands

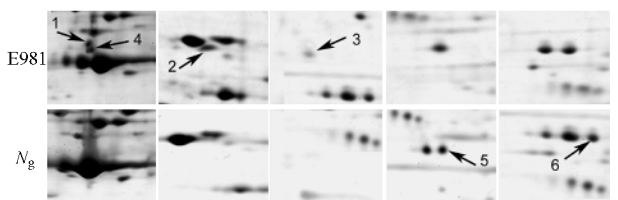


图 4 在 E981 和 *Ng* 突变粘液腺中的差异蛋白质
Fig.4 The differential protein spots appeared between the E981 and its *Ng* mutant

表 2 家蚕正常和 Ng 突变性附腺腺分泌部组织蛋白质组的主要差异蛋白质

Table 2 The main characters of the differential protein spots between normal and Ng mutant of colleterial glands					
Protein spots number	pI	Mr/kD	Relative normalization volume of differential of protein spots		
			Secretory region of normal colleterial glands	Secretory region of Ng mutant colleterial glands	
E981-1	5.579	55.05	0.122	-----	
E981-2	8.539	32.99	0.245	-----	
E981-3	7.119	24.47	0.126	-----	
E981-4	5.585	54.44	0.111	-----	
Ng-5	4.41	26.18	-----		0.278
Ng-6	4.187	30.82	-----		0.241

3 讨论

3.1 蛋白质样品制备及双向电泳

双向电泳实验操作链较长,每一个环节的疏忽都可能对实验结果产生不可预测的结果。本实验采用 Amersham Biosciences 公司的 IPGphor 进行等电聚焦,胶条的重泡胀和等电聚焦在同一容器中进行,IPGphor 内置 8000V 电源和恒温装置,是新一代的专项等电聚焦设备。IPGphor 系统采用瓷质等电聚焦槽,具有良好的控温效果。实验采用将样品直接加入重泡胀液技术,避免了样品杯的使用,从而避免了在胶面某一点加样所致的蛋白质沉淀^[6]。本实验还用了 Amersham Biosciences 公司为双向电泳设计的样本清洗试剂盒对提取的蛋白质样本作进一步的清洗有助于去除样本中蛋白质以外的成分,使凝胶银染的背景更加清晰。

3.2 家蚕性附腺组织蛋白及分泌的粘液蛋白

已有一些学者对性附腺分泌的胶状粘性物质的成分和性质进行了研究。根据 Weerawan^[1]的研究认为分泌的胶状粘性物质主要由 85% 的水、11% 的蛋白质及一些自由氨基酸和一些碳水化合物组成,通过 SDS 电泳发现了两个主要的分子量较大的蛋白质。Katsuiko^[7]等的研究发现,根据日本工业标准 K6850,家蚕分泌的这种粘性物质的平均粘性强度为 11.8 kg/cm²。这种胶状物质是一种有趣的生物材料,其对研究生物粘性的机理非常有意义,并在生物制药和食品工业等领域上有广阔的应用前景。

然而 Ng 突变体家蚕的雌性附腺发育过程中只分泌极少量的粘性物质,因此产天然散卵。就蛋白质的合成来说,Kamijo (1978)的研究发现,与正常的家蚕相比较 Ng 突变体性附腺的分泌部 mRNA 或 rRNA 的降解非常迅速。根据经典遗传学研究,Ng 突变基因定位在家蚕第 12 染色体,雌蛾的性附腺异常,不能形成胶着物质。实验显示化蛾后的正常家

蚕和 Ng 突变家蚕的性附腺的分泌部的蛋白质构成基本一致,但也存在明显差异,主要表现在 2-DE 图谱斑点的缺失和蛋白质表达量的差异,其中有 4 种蛋白质在 E981 中特异表达,而有 2 种蛋白质只在 Ng 突变体中特异表达,而且还有一些蛋白质在两者中的表达量差异很大。生物体中从基因到蛋白质是一个及其复杂的生物学过程,基因序列中 1 个或几个碱基发生突变,就有可能导致正常的功能蛋白不能表达或表达其它性质的蛋白质。本实验发现的差异蛋白质的产生可能是由于一些基因发生了突变,从而导致了组织中不能表达一些功能蛋白或表达一些其它性质的蛋白质,从而直接影响了性附腺分泌部对胶状粘性蛋白的分泌。本实验通过比较 2-DE 图谱,筛选出一些正常和 Ng 突变体性附腺分泌部组织的差异蛋白质点,进一步结合肽质量指纹图谱和氨基酸序列分析来鉴定差异蛋白质,了解这些蛋白质的生物学功能是我们今后的主要工作之一。

REFERENCES (参考文献)

[1] Weerawan Amornsak , Tomoka Noda , Okitsugu Yamashita . Accumulation of glue proteins in the developing colleterial glands of the silkworm , *Bombyx mori* . *J Seric Sci Jpn* ,1992 **61** (2) :123 - 130

[2] Motoko Yago , Toshimasa Mitamura , Shinji Abe *et al* . Adhesive strength of glue-like substance from the colleterial glands of *Antheraea yamamai* and *Rhodinia fugax* . *Int J Wild Silkworm and Silk* ,2001 , **6** :11 - 15

[3] Bradford MM . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of dye binding . *Anal Biochem* ,1976 **72** :248 - 254

[4] Sanchez JC , Rouge V , Pisteu M *et al* . Improved and simplified in-gel sample application using rewelling of dry immobilized pH gradients . *Electrophoresis* ,1997 **18** :324 - 327

[5] Zhan XQ (詹显全) ,Chen ZQ (陈主初) ,Li X (李翠) *et al* . Differential proteomic analysis of human lung adenocarcinoma cell line A-549 and of normal cell line HBE . *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报) ,2002 **34** :50 - 56

rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis*, 1994, 15: 1522 - 1558

[7] Katsuko Yoshida, Masao Nagata. Adhesive strength of the glue substances in the colleterial glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Seric Sci Jpn*, 1997, 66(6): 453 - 456

Two-dimensional Electrophoresis Analysis of Proteins from the Colleterial Gland of Silkworm (*Bombyx mori* L.)

JIN Yuan-Xiang XU Meng-Kui* CHEN Yu-Yin JIANG Yong-Huang
(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract In silkworm moth the colleterial gland markedly enlarged due to the secretion and accumulation of glue like substances before adult emergence. However, the *Ng* mutant female moth only secreted little glue-like substance and laid loose eggs naturally. In the present experiment, it was extracted the proteins of secretory part of the variety E981 and its *Ng* mutant line and analyzed by two-dimensional electrophoresis. More than 700 protein spots were resolved both in two samples and most of the proteins were distributed in the area from 30 kD to 70 kD and pH 4 ~ 8. Through the comparison and analysis, it was found that 4 proteins were only expressed in E981 and 2 proteins were only expressed in *Ng* mutant. Furthermore, there are about 29 proteins were expressed higher in 981 and about 15 proteins expressed volume were higher in *Ng* mutant. These differential proteins may be have some relations with the *Ng* mutant form and directly lead to the *Ng* mutant can't secret the glue-like substance.

Key words *Bombyx mori* L., colleterial gland, protein extraction, two-dimensional electrophoresis

Received: 11-20-2003

* Corresponding author. Tel: 86-571-86971657; Fax: 86-571-86971657; E-mail: Xumengkui@zju.edu.cn

干细胞与癌症

有“万能细胞”之称的干细胞可用于治疗多种疾病,如心肌梗死、中风、肝硬化、糖尿病、皮肤病、帕金森氏症以及癌症等几乎所有的常见病,其中干细胞治疗癌症(恶性肿瘤)更引人关注,预示着干细胞疗法将会决定今后医学发展的未来。目前,对干细胞的研究与应用取得了重要进展。

在我国,解放军 304 医院采用异基因造血干细胞治疗晚期肾转移癌取得成功,能使一位双肺多处转移、濒临危亡的晚期肾癌患者获得新生。所谓异基因指的是患者妹妹的基因造血干细胞、淋巴细胞,表现其相容性。尽管在国外曾于 1999 年有关这方面报道,但国内在这方面的应用研究尚属首次。研究者认为,这项研究成果用于临床治疗取得成功的关键在于两方面:(1) 供造血干细胞进入患者体内有很好的相容性,从植入外源异基因造血干细胞的存活而且显现其功能;(2) 在此基础上分期向患者体内输入供体健康的 T-淋巴细胞,利用移植物的抗肿瘤效应,为患者重建健康的造血功能和免疫功能,以达到杀灭癌细胞的效果。此项干细胞移植技术的应用将为许多常规综合治疗而无效的晚期实体瘤患者开辟一条新的治疗途径。目前该院用造血干细胞移植治疗淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌等实体瘤 200 多例,均取得良好效果,使患者延长了生命,提高了生命质量,有的重返工作岗位;异基因造血干细胞移植治疗白血病(血癌)也取得满意结果;研究者还采用树突状细胞疗法治疗黑色素瘤取得较好疗效,多名晚期恶性黑色素瘤伴多发转移的患者用此疗法进行治疗获得新生。

尽管干细胞移植技术用于治疗某些癌症取得重要突破,确实为癌症患者的康复带来喜讯和希望;但是从另一方面看,又必须引起研究者的思考。就是说,干细胞与癌细胞有相似之处,即有一种相同的蛋白质控制着干细胞和癌细胞的增生,无限的细胞分裂。因此,干细胞移植于宿主细胞治疗疾病,是否会激发癌细胞增生呢?这是干细胞功能作用值得关注的另一面。与此同时,必须调控干细胞增生的“开关”,不致使移植的干细胞变成癌细胞,严防癌细胞攫取干细胞分化成各种组织的特性;重要的是控制增生细胞的“开关”,那就是细胞中的蛋白质即核酸干素(nucleostemin)和 P52 蛋白质,降低它们的水平,则可减少其增生,因此,控制这类分子“开关”有着非常重要的意义。

总之,造血干细胞的研究及其应用所取得的成就和突破,将对人类某些致命性重大疾病的救治,以及挽救生命、延续生命(长寿)具有重大意义,它会不断地创造奇迹。因为这项新型细胞疗法不仅为人类治病包括癌症带来新希望,而且为干细胞特别是造血干细胞及其功能正反两方面的深入探究提供种种机会,里面大有文章可做。至少目前骨髓宝库及造血干细胞的研究、开发、利用以及它们的再生修复功能和机制,它们与宿主环境相互关系作用的分子生态学仍需要作深入探究。