

## 家蚕丝腺蛋白质组学研究方法的建立

# An Established Methods of Researching Silk Gland of Silkworm( *Bombyx mori* L. ) with Proteomics

刘鸿丽 夏庆友\* 侯 勇 赵 萍 邹 勇 官 建

LIU Hong-Li , XIA Qing-You \* , HOU Yong , ZHAO Ping , ZOU Yong and GUAN Jian

西南大学农业部蚕学重点开放实验室 重庆 400716

The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry , Southwest University , Chongqing 400716 , China

**摘 要** 通过高精度的双向电泳技术对家蚕中部丝腺组织的蛋白质进行分离,采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对其中一些表达量较高的蛋白点进行鉴定,并利用 GPMW(General Protein/Mass Analysis for Windows)软件结合家蚕基因组预测的蛋白质数据库构建本地的肽质量指纹图谱数据库,对所得到的肽质量指纹图谱进行分析。研究发现,经过双向凝胶电泳及其图象分析技术,硝酸银染色和考马斯亮蓝染色分别能分离出 500 个以上和 100 个以上的蛋白点。这些蛋白点主要集中在分子量 15~90kD 区域,等电点 pH 3.5~7 之间。MALDI-TOF-MS 鉴定的 25 个考染蛋白点中有 60% 以上的 PMF(Peptide Mass Fingerprint)的信号峰较强。在数据库检索过程中,利用家蚕肽质量指纹数据库所得检索结果与在 Mascot 的检索结果相比,前者不仅能够准确鉴定出一些已有研究报道的蛋白,从而验证检索方法的可行性,而且还能够对一些已经被家蚕基因组数据库所预测但未曾报道的新蛋白质进行鉴定,从而建立了一整套适合于家蚕蛋白质组研究的方法,并为其它绢丝昆虫蛋白质组研究提供了重要参考。

**关键词** 中部丝腺,双向电泳, MALDI-TOF-MS, GPMW

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0112-05

**Abstract** We separated proteins of the middle silk gland through high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, and identified the high expressional proteins using MALDI-TOF-MS and analyzed the PMF in protein database by GPMW(General Protein/Mass Analysis for Windows). The protein database was forecasted through silkworm genome database. More than 500 spots were obtained from each gel by silver stain and more than 100 protein spots were obtained from gel by Coomassie brilliant blue stain. Most of them were distributed in the area from 15kD to 90kD with pH 3.5~7. Among the 25 Coomassie brilliant blue stained spots identified by MALDI-TOF-MS, more than 60% have relatively strong signal. Comparing with the result of using Mascot, the method using PMF database of silkworm not only can identify some known proteins, but also can identify some unknown proteins that have been forecasted in silkworm genome database. Accordingly, we founded a complete set of method that fit for researching proteome of silkworm.

**Key words** middle silk gland, two-dimensional electrophoresis, MALDI-TOF-MS, GPMW

Received: May 29, 2006; Accepted: June 28, 2006.

This work was supported by the grants from NSFC(No.30471313), MOSI(No.2005CB121000) and the Key Project of Chongqing Science and Technology Commission(No.2004-8571).

\* Corresponding author. Tel: +86-23-68250099; Fax: +86-23-68250099; E-mail: xiaqy@swau.cq.cn

国家自然科学基金(No.30471313),国家重点基础研究发展计划(No.2005CB121000)和重庆市科委重点项目(No.2004-8571)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

家蚕基因组框架图的绘制和功能基因组学研究的开展,有助于我们从分子水平上阐明家蚕的生物学特性,让家蚕更好地为人类服务<sup>[1]</sup>。蛋白质组学研究作为功能基因组学研究的重要手段,在基因功能的研究中发挥了重要作用。近年来在家蚕蛋白质组学方面已有一些初步报道。1999年,钟伯雄等对家蚕的丝腺等五个组织进行了蛋白质组学的研究,2004年他们又利用双向电泳技术对家蚕不同发育时期的卵进行了比较研究<sup>[2,3]</sup>。2003年靳远祥等利用双向电泳和MALDI-TOF-MS等技术对家蚕的雌性附腺及其分泌物进行过较为详细的研究<sup>[4,5]</sup>。2005年张平波等利用干胶挖点质谱鉴定的方法在家蚕蛋白质组学方面进行了探讨<sup>[6]</sup>。虽然家蚕蛋白质组学研究有了较大进展,但大多数研究还集中在双向电泳分离的水平上。有些研究对家蚕的蛋白点进行了鉴定,但在数据库检索过程中大多采用果蝇的蛋白质数据库,这在很大程度上影响了蛋白的鉴定效率。

对于绢丝昆虫而言,丝腺是家蚕在进入蛹期之前的重要器官,在丝蛋白的分泌和形成过程中起了很重要的作用。按照家蚕丝腺在丝蛋白合成中的作用,可将其划分为前部丝腺、中部丝腺和后部丝腺。前部丝腺不具备合成分泌蛋白质的功能,中部丝腺主要合成分泌丝胶蛋白质,而后部丝腺主要合成分泌丝素蛋白质<sup>[7]</sup>。2005年钟伯雄等曾对家蚕不同时期中部丝腺的不同区段进行过双向电泳研究,比较了中部丝腺不同区段丝腺细胞在蛋白质组学上的差异<sup>[8]</sup>。同时对家蚕4眠期与5龄期后部丝腺细胞蛋白质组成也进行了分析<sup>[9]</sup>。2005年,张平波等人将家蚕丝腺分为六个部分进行研究,鉴定了其中93个蛋白点<sup>[6]</sup>。

本研究以家蚕五龄3d中部丝腺为材料,采用高分辨率的蛋白质双向凝胶电泳分离技术,获得了更为清晰的蛋白质图谱,并利用MALDI-TOF质谱鉴定技术,对其中25个蛋白点进行了肽质量指纹图谱的鉴定。在数据库检索的过程中,利用GPMW软件,通过家蚕预测的蛋白质数据构建PMF库并进行检索,与传统的肽质量指纹图谱的检索方法相比,不仅能够准确鉴定出一些已有研究报道的蛋白,从而验证了检索方法的可行性,而且还能够对一些已在家蚕基因组数据库中预测出但未曾报道的新蛋白质进行鉴定。通过成功建立家蚕丝腺蛋白质组学研究方法,不但为家蚕蛋白质组学研究打下了良好基础,而且为其它绢丝昆虫蛋白质组研究提供了重要参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

家蚕品种:大造,由西南大学家蚕基因库提供。2005年春季饲养到5龄3d取材。

### 1.2 取材

解剖5龄3d幼虫,将丝腺组织置于冰冷的0.75%生理盐水中,按丝腺特征将Z字型中部丝腺取出放置于离心管中,-78℃保存。

### 1.3 蛋白质的提取

取出-78℃低温保存的5龄3d中部丝腺组织,称取约0.1g于研钵中,加1mL PBS(蛋白质磷酸抽提缓冲液:32.5mmol/L  $K_2HPO_4$ , 2.6mmol/L  $KH_2PO_4$ , 400mmol/L NaCl)洗3次,吸干残留的PBS后,液氮研磨,加入裂解缓冲液(8mmol/L Urea, 4% CHAPS, 20mmol/L Tris base, 30mmol/L DTT, 2% IPG buffer)室温振荡1h使其充分溶解,然后在4℃下40 000g离心1h,吸取上清并用Brandford法定量蛋白,然后分装至离心管里保存在-78℃备用或直接使用。

### 1.4 蛋白质双向电泳

按照IPG phor<sup>TM</sup>等电聚焦系统的方法指南进行第一向固相pH梯度等电聚焦。本实验做了两块胶,一块采用18cm干胶条,pH3~10,蛋白质上样量为40 $\mu$ L,约100 $\mu$ g,聚焦总电压时间为36 000Vh,采用硝酸银染色。另一块采用7cm干胶条,pH3~10,蛋白质上样量为90 $\mu$ L,约250 $\mu$ g,聚焦总电压时间为15 000Vh,采用考马斯亮蓝染色。二向SDS-PAGE的胶浓度均采用12.5%。

### 1.5 蛋白质电泳图谱分析

蛋白质电泳图谱采用Pharmacia Biotech公司的ImageScanner2D软件进行扫描,用Image Master2D分析软件进行图象分析,从而检测蛋白斑点,并预测其分子量、等电点等。

### 1.6 蛋白质点胶内消化

将考染胶上较明显的25个点挖出,分别放置于预先用milli-Q和甲醇润洗过的离心管中,然后加入50%ACN/ $NH_4HCO_3$  pH8.0溶液100~150 $\mu$ L洗涤,洗3次(直到胶脱去颜色为止)。除去脱色液后加入适量100%ACN浸泡,进行脱水处理,直到胶呈现乳白色为止。然后去掉ACN,晾干后加入适量胰蛋白酶(由25mmol/L的 $NH_4HCO_3$ 溶液配制而成,胰蛋白酶浓度为10 $\mu$ g/mL)并在37℃消化16~24h。然后用约25 $\mu$ L的50%ACN/5%TFA浸泡30min,并重复1次,合并抽提液后,在真空浓缩仪中进行干燥。用3 $\mu$ L

50% ACN/5% TFA 重新溶解样品后,将 0.5 $\mu$ L 样品与 0.5 $\mu$ L 基质液 CHCA(  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸溶于 50% ACN/0.05% TFA 溶液中所得到的饱和溶液)混合点样于不锈钢点样板上,置空气中自然风干。

### 1.7 蛋白质质谱分析

制备好的样品使用 Voyager<sup>TM</sup> 质谱仪进行分析,采用反射模式,正离子谱测定,离子源加速电压为 20kV,离子延迟提取 100ns,真空度为  $5.33 \times 10^{-5}$  Pa。用基质峰和胰蛋白酶自切峰作为内标校正质谱峰。质量范围为 800D ~ 2500D。利用软件 dataexplore 对所得到的峰图进行分析。

### 1.8 蛋白质肽质量指纹图谱的检索

通过在 NCBI 上下载有关家蚕的所有蛋白质数据,并从 silkDB 网站(ftp://ftp.genomics.org.cn/pub/SilkDB/Gene-Annotation/Proteins/SW-ge2k-BGF.pep) 上下载家蚕基因组中预测的基因,构建本地家蚕蛋白质数据库,并利用 GPMW( General Protein/Mass Analysis for Windows) 软件构建本地家蚕蛋白质的肽质量指纹图谱数据库。用 GPMW6.0 软件在本地蛋白质数据库中进行比较鉴定,同时将肽片段质量数据用 Mascot( http://www.matrixscience.com) 进行检索,利用 NCBI 数据库进行蛋白质查询鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 家蚕 5 龄 3d 中部丝腺蛋白质双向凝胶电泳图谱

中部丝腺蛋白质双向电泳的银染和考染结果分别见图 1、图 2。比较图 1 与图 2 可以看出,虽然两块胶都有较为清晰的效果,但银染的蛋白质点比考染的较多。用 Image master2D 软件分析双向电泳图谱,图 1 中可以识别到 500 多个蛋白质点,图 2 中可以识别到 100 个蛋白质点。这些蛋白质点主要分布在分子量 15 ~ 90kD,等电点 pI3.5 ~ 7 的范围内。

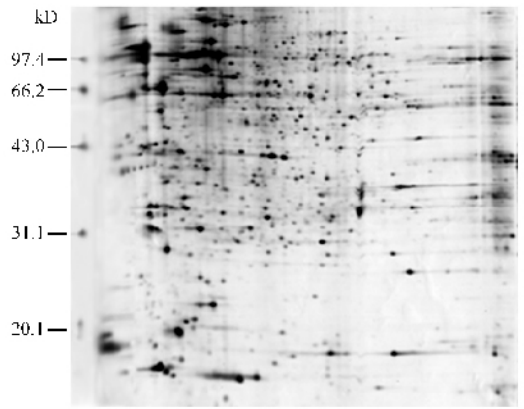


图 1 中部丝腺蛋白质双向电泳银染图谱(18cm, pI 3 ~ 10)

Fig.1 Protein map of the middle silk gland cell from the silver-stained by 2D-Electrophoresis

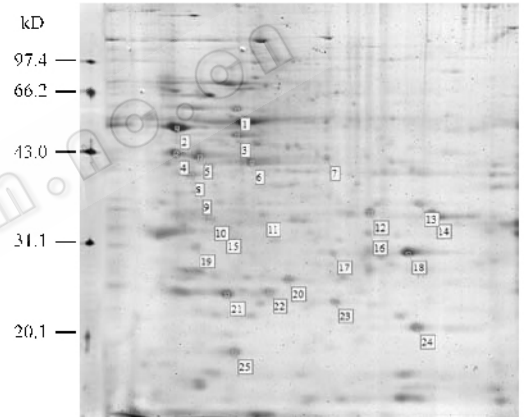


图 2 标注考染胶上较明显的 25 个点

Fig.2 The 25 obvious protein spots of gel stained by Coomassie brilliant blue are labeled

### 2.2 MALDI-TOF-MS 质谱分析双向电泳考染图谱上的部分蛋白质点(图 3)

将图 2 中蛋白质点重复性好、可信度高的 25 个

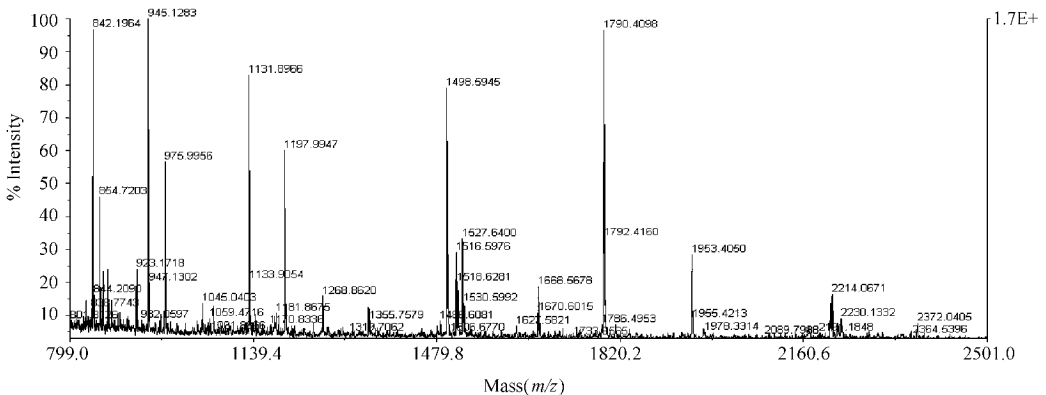


图 3 6 号蛋白质点的肽指纹图谱

Fig.3 Peptide mass fingerprinting of protein spot No.6

点挖出,经胰蛋白酶降解后,用 MALDI-TOF-MS 测出各点的肽指纹图谱,其中有 17 个蛋白点的指纹图谱(60%以上)信号较强(如图 3 所示 6 号蛋白质点的 PMF)。通过肽指纹图谱获得的肽片段质量数据在

家蚕基因组预测的蛋白质肽质量指纹数据库和 NCBI 数据库中进行检索,得到可信度较高的部分点,其蛋白质检索结果和有关信息如表 1 和表 2。

表 1 中部丝腺部分蛋白质点的鉴定结果  
Table 1 Proteins of middle silk gland cell identified by MALDI-TOF-MS

Spot No.	Protein name	Function	NCBI entry	silkDB entry	pI	M(kD)	Sequence matched/%
1	Chaperonin Cpn60	Molecular chaperone	none	Bmb035865	5.37	61.06	30.6
2	Disulfide isomerase	isomerase activity	gi112025459	Bmb022619	4.45	55.58	27.9
3	H <sup>+</sup> -transporting ATPase	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase activity	none	Bmb016644	5.13	54.99	26.9
5	Serpin	Trypsin	none	Bmb041993	4.53	44.28	31.1
6	Actin	Cytoskeleton	gi1113216	Bmb012614	5.19	41.80	24.7
14	Unknown	Unknown	none	Bmb002000	8.88	31.75	46.2
17	Juvenile hormone methyltransferase	Biosynthesis Juvenile hormone	gi13759103	Bmb024689	6.08	32.54	24.5
20	hsp21.4	Molecular chaperone	gi15637832	Bmb018980	5.75	21.40	32.6
21	Fibroin light chain	silk structure protein	gi1289363	Bmb037261	4.93	27.65	33.6
23	Thiolperoxidoredoxin	combine reduced glutathione	gi13826056	Bmb002690	6.11	21.91	29.7

表 2 23 号点经过酶解后检测质与理论质比较

Table 2 Comparison of theoretical masses and observed masses derived from tryptic digests of spot 23

Amino acid residues	Theoretical mass (m/z)	Observed mass (m/z)	Difference	Corresponding sequence
24-33	1124.571	1125.490	0.919	DISLSDYK GK
90-104	1538.813	1538.473	-0.34	QGGLGPMNIPLISDK
111-124	1609.762	1609.363	-0.40	DYGVLEDEETGIPFR
125-132	919.501	919.558	0.04	GLFIIDDK
137-147	1224.683	1224.547	-0.14	QITINDLPVGR
155-164	1195.624	1195.512	-0.11	LVQAFQFTDK

在鉴定出的 10 个蛋白质点中,有 4 个(1 号、3 号、5 号、14 号)为新发现的蛋白质,其余 6 个点在本地库和 NCBI 数据库中的鉴定结果具有一致性。对于新发现的蛋白质,除 14 号点的功能未知外,通过结构域分析预测出其余三个点分别为:1 号点为分子伴侣,3 号点为 H<sup>+</sup> 转运 ATP 酶,5 号点为丝氨酸蛋白酶类。在鉴定出的 6 个已知蛋白质中,包括三种酶类、肌动蛋白、热激蛋白 hsp21.4、蚕丝结构蛋白。

### 3 讨论

合适的样品处理条件是双向电泳成功分离蛋白质的前提和关键。钟伯雄等研究表明,用磷酸缓冲液抽提、蛋白质溶解缓冲液 E 溶解是制备家蚕蛋白质双向电泳样品的好方法<sup>[10]</sup>。本研究中,采用了丙酮/三氯乙酸沉淀、clean up 样品处理试剂盒等不同的处理方法对家蚕丝腺组织蛋白质的提取进行研究,结果发现,本次报道中采用的方法最为合适,该方法处理步骤较少,方便易行,不但能降低蛋白质的损失量,而且能得到更为清晰、分辨率更好的蛋白质

图谱,且蛋白质图谱的重复性也较好,为后续的鉴定工作打下了良好的基础。

肽质量指纹图谱是蛋白质组学中鉴定蛋白最为常用的手段,在人类、大鼠等基因组测序完成的物种中,利用肽质量指纹图谱鉴定蛋白的准确性已经相当高。对于全基因组测序未完成或者研究较少的生物来说,一般是利用较为接近的模式生物的蛋白质作为参照,比如,昆虫的肽质量指纹图谱一般利用果蝇的数据,植物的则一般利用拟南芥的蛋白质预测数据。但由于所研究的物种与模式生物存在物种间的差异,细微氨基酸的差异都会导致分子量的剧烈改变,从而导致蛋白质的鉴定效率大大降低。

家蚕基因组框架图完成以后,我们利用生物信息学的方法预测出了家蚕的蛋白质数据库,但由于 NCBI 还未将家蚕的蛋白质数据库进行处理,因而无法在 MASCOT 网站中利用家蚕基因组预测到的蛋白质进行检索。本研究将家蚕基因组预测到的蛋白数据库与已报道的家蚕蛋白质序列进行了合并,利用 GPMW 软件构建本地数据库。同时,为了验证该方法的可行性,利用在线的 MASCOT 工具对得到的

PMF 也进行了检索。经过比较两种检索方法所得的结果,发现已有报道的家蚕蛋白质在本地库中的检索结果与 MASCOT 检索结果一致,如 2 号点(二硫化蛋白异构酶)、6 号点(肌动蛋白)、20 号点(热激蛋白 hsp21.4)和 21 号点(蚕丝结构蛋白)等,表明利用 GPMW 软件本地构库检索的方法是可行的。另外,利用本地检索得到了一些在 MASCOT 中没有检索结果的蛋白,如 1 号点(分子伴侣)、5 号点(丝氨酸蛋白酶抑制剂)等,将其序列在 NCBI 检索也未发现结果,说明利用这种本地检索的方法得到了一些新蛋白,它们未曾被报道过,但已在家蚕基因组序列中预测到。

虽然我们已成功地建立了一套适合于家蚕蛋白质研究的技术方法,但在这一技术体系中还存在一些有待解决的问题:一方面,由于蛋白的含量较低,在实验中所挖出的蛋白质点中有一部分的肽信号不强,无法得到较好的指纹图谱,因而导致进一步鉴定比较困难<sup>[11-16]</sup>。另一方面,实验中存在一部分蛋白 PMF 的信号峰较强,但在数据库中仍然不能检索到结果,主要原因在于家蚕的蛋白质数据库不够健全或者蛋白在实验的过程中受到了修饰等,给鉴定带来一定困难。我们相信,随着蛋白质组学技术的发展和家蚕蛋白质数据库的不断完善,其蛋白质的鉴定效率将不断提高。

## REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Huang H(黄骥), Xu XZ(徐旭忠), Zhang Q(张琴), et al. Chinese Scientist Draft genome map of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Outlook Weekly*(瞭望新闻周刊), 2003, **47**: 42-43.

[ 2 ] Yan XH(颜新培), Zhong BX(钟伯雄), Cao JS(曹家树), et al. Establishment of 2D-PAGE protein patterns of silkworm embryo during incubating stage. *Canye Kexue*(蚕业科学), 2004, **30**(1): 28-30.

[ 3 ] Yan XH(颜新培), Zhong BX(钟伯雄), Xu MK(徐孟奎), et al. Analysis of protein patterns from embryo of silkworm *Bombyx mori* at earlier state by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Entomologica Sinica*(昆虫学报), 2005, **48**(2): 295-300.

[ 4 ] Jin YX(靳远祥), Xu MK(徐孟奎), Chen YY(陈玉银), et al. Two-dimensional electrophoresis analysis of proteins from the colleterial gland of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2004, **20**(4): 590-593.

[ 5 ] Jin YX(靳远祥), Xu MK(徐孟奎), Chen YY(陈玉银), et al. Extraction and two-dimensional electrophoresis analysis of proteins from the colleterial gland of silkworm, *Bombyx mori*. *Canye Kexue*(蚕业科学), 2005, **31**(1): 97-99.

[ 6 ] Zhang Pingbo, Aso Yoichi, Yamamoto Kohji, et al. Proteomic analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proteomics*, 2006, **6**(8): 2586-2599.

[ 7 ] Zhejiang Agricultural University. *Understanding Bombyx mori Anatomy and Physiology*. Beijing: Chinese Agriculture Publishing Company(中国农业出版社), 1989, pp.111-125.

[ 8 ] Shen FY(沈飞英), Zhong BX(钟伯雄), Lou CF(楼程富), et al. A comparison of the protein composition of the middle silk gland cells of the fifth instar larvae of silkworm. *Sicentia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2005, **38**(5): 1053-1058.

[ 9 ] Wu W(吴卫成), Zhong BX(钟伯雄), Meng ZQ(孟智启), et al. Composition analysis of protein from posterior silk gland of silkworm *Bombyx mori* between larvae of 4<sup>th</sup> molting stage and the 5<sup>th</sup> instar stage. *Canye Kexue*(蚕业科学), 2005, **31**(3): 273-279.

[ 10 ] Zhong BX(钟伯雄), Yan HY(颜海燕), Shen FY(沈飞英), et al. Preparation of silkworm protein using two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Canye Kexue*(蚕业科学), 2003, **29**(4): 427-432.

[ 11 ] Wang Z(王征), Ruan YB(阮幼冰), Guan Y(官阳), et al. Analysis of proteomic components of sera from patients with hepatocellular carcinomas by two-dimensional electrophoresis and Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flying mass spectrometry. *Chin J Pathol*(中华病理学杂志), 2003, **32**: 333-336.

[ 12 ] Zhan XQ(詹显全), Chen ZC(陈主初), Guan YJ(关勇军), et al. Analysis of human lung squamous carcinoma cell line NCI-H520 proteome by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF-Mass spectrometry. *Chinese Journal of Cancer*(癌症), 2001, **20**(6): 575-582.

[ 13 ] Jin YX(靳远祥), Xu MK(徐孟奎), Chen YY(陈玉银), et al. Studies on the proteome of colleterial gland and its Ng mutant of silkworm (*Bombyx mori*) using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), 2004, **31**: 622-627.

[ 14 ] Sofia de Moraes Guedes, Rui Vitorino, Kenneth Tomer, et al. *Drosophila melanogaster* larval hemolymph protein mapping. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **312**: 545-554.

[ 15 ] Evy Vierstraete, Anja Cerstiaens, Geert Baggerman, et al. Proteomics in *Drosophila melanogaster*: first 2D database of larval hemolymph proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **304**: 831-838.

[ 16 ] Wang Yongqiang, Zhang Pingbo, Fujii Hiroshi, et al. Proteomic studies of lipopolysaccharide-induced polypeptides in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68**(8): 1821-1823.