

## 中国明对虾血浆蛋白质组双向电泳技术的建立与 主要高丰度蛋白点的质谱鉴定

王宝杰<sup>1,2</sup>, 刘梅<sup>1</sup>, 蒋克勇<sup>1</sup>, 张国范<sup>1</sup>, 王雷<sup>1\*</sup>

(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 100039)

**摘要:** 中国明对虾的血浆脱盐处理后, 通过固相 pH 梯度胶条等电聚焦、SDS-PAGE 垂直电泳对蛋白质进行分离, 对不同 pH 范围 IPG 胶条、脱盐方式、上样量等进行了优化, 并分别利用硝酸银和胶体考染方法进行染色, 应用 PDQuest 软件对图谱进行了初步分析, 采用基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱法对主要的高丰度蛋白点进行了质谱鉴定。结果显示, 中国明对虾血浆在 pH 4~7 范围、18 cm 的 2-DE 胶上得到了很好的分离, 上样量为 150  $\mu\text{g}$  左右, 采用银染可以获得较好的分析胶图谱; 而上样 1 000  $\mu\text{g}$  左右, 采用胶体考染方法能获得较好的制备胶图谱; 通过 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定的 11 个最主要的高丰度蛋白点都是血蓝蛋白。建立并优化了中国明对虾血浆蛋白质组学双向电泳技术体系, 为进一步开展对虾等甲壳动物的血浆蛋白质组学研究奠定了基础。

**关键词:** 中国明对虾; 血浆; 双向电泳; 蛋白质组学; 血蓝蛋白

**中图分类号:** TQ 37; S 917

**文献标识码:** A

随着后基因组时代的到来, 蛋白质组研究越来越受到国内外科学工作者的密切关注, 蛋白质组学技术在无脊椎动物的研究中得到了广泛的应用<sup>[1-3]</sup>。蛋白质组学理论和技术的发展也为海洋无脊椎动物带来了新的思维方式和研究方向。目前, 蛋白质组学技术在甲壳动物中的应用仍处于初步发展阶段, 秦兆宇等<sup>[4]</sup>初步建立了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) 肝胰腺蛋白双向电泳技术并探索了白斑综合症中国明对虾肝胰腺差异蛋白质组学研究。WANG 等<sup>[5]</sup>利用双向电泳技术分别对凡纳滨对虾 SPF 组与 WSSV 感染组的胃组织细胞的蛋白进行了分离, 并采用 LC-nanoESI-MS/MS 技术对筛选出来的差异蛋白质进行了鉴定。黄冰心等<sup>[6]</sup>提取中国明对虾的血浆蛋白用 SDS-PAGE 进行分离, 利用液相色谱-串联质谱系统进行质谱分析, 鉴定了 66 个中国明对虾血浆蛋白质, 但总体上目前国内外关于对虾血淋巴蛋白质组的研究报道较少。

双向电泳技术(2-DE)是蛋白质组学研究的首要条件和关键技术。本研究通过对中国明对虾血浆样品双向凝胶电泳的几个关键环节的分析, 建立了一种适合于有效分离对虾血浆蛋白质的双向凝胶电泳技术方案, 得到了比较理想的双向凝胶电泳图谱, 并对主要的高丰度蛋白点进行了串联质谱鉴定, 建立了一套完整的血浆蛋白质组分析技术平台, 为今后中国明对虾血浆蛋白质组工作的开展提供了技术支持和保障。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要仪器与试剂

高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); PowerWave XS 微孔板酶标仪(美国 BioTek 公司); Ettan IPGphor 3, SE600 Ruby 标准垂直电泳系统, 冷却水循环系统、AKTA Purifier 蛋白纯化仪(美国 GE 公司); 纯水装置(美国 Millipore 公司)。固相 pH 梯度干胶条 IPG strip(美国 GE 公

收稿日期:2010-04-14 修回日期:2010-11-03

资助项目:国家自然科学基金项目(30600458)

通讯作者:王雷, Tel:0532-82898722, E-mail:wanglei@ms.qdio.ac.cn

司,线性 pH 4 ~ 7, 18 cm)。CHAPS、DTT、TBP、尿素,硫脲,碘乙酰胺、丙烯酰胺、甲双丙烯酰胺、TEMED、APS、Tris、甘氨酸和 SDS(美国 Bio-Rad 公司)。其他试剂均使用国产分析纯试剂。所有溶液均用 MilliQ 水配制。

## 1.2 实验动物与样品采集

中国明对虾[体长(13.5 ± 0.5) cm],购自青岛即墨田横对虾养殖场。对虾购入后蓄养于中科院海洋研究所水族楼室内的 PVC 水槽中,环境条件为室温(20 ~ 22 °C)、养殖海水盐度为 30 以及自然光周期。实验前暂养 7 d 左右使其适应室内养殖环境。

取血前将对虾放入自制的低温循环水族箱内,启动水族箱制冷程序使水温缓慢降至 12 ~ 14 °C,低温下对虾进入休眠状态,活动能力下降,取血时对虾应激反应弱,便于取血。以 2.5 mL 的一次性注射器由对虾第一腹节基部血窦抽取血淋巴液,所有过程均在冰上完成,所采得的血淋巴液加入等体积的抗凝剂[450 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L EDTA, protease inhibitor cocktail (Roche, Germany), pH 7.4],均匀混合后立即以 800 × g, 4 °C 离心 10 min,舍弃血细胞及沉淀物,所得上清液为血浆(plasma),分装保存于 -70 °C 冰柜中。

## 1.3 血浆蛋白样品的脱盐处理与定量

脱盐柱脱盐 对虾血浆经 0.45 μm 滤膜(Millipore)过滤,经 Hitrap Desalting 色谱柱脱盐后冷冻干燥保存备用或直接用于双向电泳。

10% TCA/丙酮法 将血浆样品与 -20 °C 预冷的 10% TCA/丙酮溶液按体积比 1:3 混合,-20 °C 孵育过夜,12 000 × g, 4 °C 离心 5 min,沉淀用预冷丙酮洗 3 次,室温晾干。

蛋白定量采用 BRADFORD<sup>[7]</sup>法,在波长 595 nm 条件下,用标准牛血清白蛋白绘制标准曲线,对制备样品蛋白溶液定量。

## 1.4 对虾血浆样品的双向电泳

参照 IPGphor 等电聚焦系统指南和 GORG 等<sup>[8]</sup>的方法加以改进。

第一向等电聚焦电泳 自 -20 °C 取出的胶条,室温下平衡 10 min,分别以 150、180、200 μg 的上样量(银染的分析胶)与 800、1 000、1 200 μg 上样量(胶体考染的制备胶)在每份样本中加入适量水化上样液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫

脲,4% CHAPS,65 mmol/L DTT,1% 两性电解质),上样于泡胀槽中,加入矿物油覆盖。IPGphor 仪器运行参数设定为快速 500 V 0.5 h,快速 40 V 6 ~ 9 h,快速 500 V 1 h,线性 1 000 V 2 h,线性 3 000 V 2 h,线性 5 000 V 2 h,线性 8 000 V 2 h,快速 8 000 kV 补齐至 80 kVh。

IPG 胶条的平衡 等电聚焦电泳后 IPG 胶条在平衡液 1(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8,6 mol/L urea,30% glycerol,2% SDS,0.002% 溴酚蓝,1% DTT)中平衡 15 min;然后置入平衡液 2(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8,6 mol/L urea,30% glycerol,2% SDS,0.002% 溴酚蓝,2.5% iodoacetamide)同样平衡 15 min。

第二向 SDS-PAGE 垂直电泳 采用 12.5% 的均匀 SDS-PAGE。将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶的上方,0.5% 的琼脂糖封胶。上下槽加入电极缓冲液(Tris 5 mmol/L, Gly 192 mmol/L 和 SDS 0.1%)。初始电流强度为每块胶 40 mA,电泳 20 min,然后以每块胶 60 mA,直至溴酚蓝前沿。

## 1.5 凝胶染色

电泳结束后,分析胶采用硝酸银染色法,通过固定,硝酸银染色,显影,停显及脱色,至背景清晰。

制备胶参照 CANDIANO<sup>[9]</sup>介绍的胶体考染方法,去离子水短暂洗涤两次后放入胶体考马斯亮蓝染液(0.12% 考马斯亮蓝 G-250 + 10% 硫酸铵 + 10% 磷酸 + 20% 甲醇)水平摇床上染色 12 h,然后去离子水水洗涤至背景清晰。

## 1.6 图像分析

凝胶通过 UMAX PowerLook 1100 投射扫描仪进行扫描获取 2-DE 凝胶图像,PDQuest 2-DE 凝胶图像分析软件进行点检测、数目统计、凝胶匹配等处理。

## 1.7 主要高丰度蛋白质的质谱鉴定

串联质谱分析 切割蛋白质点置于 Eppendorf 管中,进行胶内蛋白质酶解后,将从蛋白质点抽提提取的肽段用 4 800 串联飞行时间质谱仪[4 800 Plus MALDI TOF/TOF<sup>TM</sup> Analyzer (Applied Biosystems, USA)]进行质谱分析,激光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器,加速电压为 20 kV,采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。肽质量指纹图谱(peptide mass

fingerprinting, PMF)扫描范围为 700 ~ 3 500 u,以强度最大的 8 个峰进行串联质谱分析;图谱用肌红蛋白酶解肽段进行外标校正。

**数据库检索** 将质谱鉴定所得的数据于 GPS (Applied Biosystems, USA)-Mascot (Matrix science, London, UK)软件搜索相应的数据库。搜索参数设置:数据库为美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI);数据检索的方式为 combined;最大允许漏切位点为 1;酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置:PMF 0.3 u, MS/MS 0.3 u。

## 2 结果

### 2.1 宽范围 IPG (pH 3 ~ 10) 胶条的电泳图谱

首先采用宽范围 IPG (pH 3 ~ 10) 胶条对中国明对虾血浆蛋白的总体分布情况进行了分析(图 1), 2-DE 图谱显示中国明对虾的血浆蛋白主要分布在酸性端, 碱性端可见的蛋白点非常少, 因此在后续的实验中采用窄范围 IPG (pH 4 ~ 7) 胶条, 以提高蛋白质的分辨率。

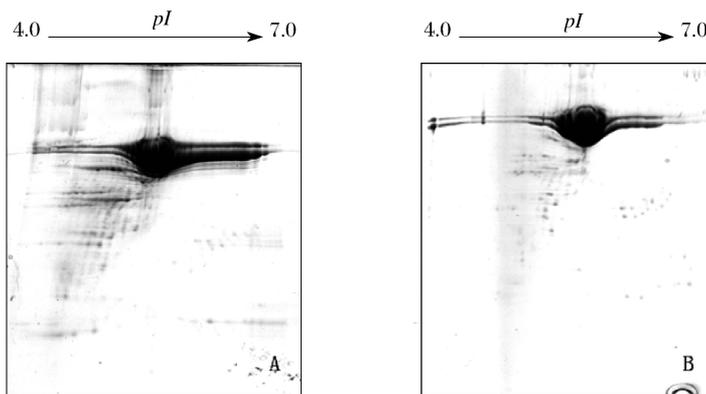


图 2 不同脱盐方式的中国明对虾血浆 2-DE 图谱(胶体考染)

A. 脱盐柱处理中国明对虾血浆的 2-DE 图谱; B. 10% TCA/丙酮沉淀法处理中国明对虾血浆的 2-DE 图谱。

Fig. 2 2-DE maps of *F. chinensis* plasma prepared with different desalting procedures (colloidal Coomassie blue staining)

A. Desalting with hitrap desalting column; B. Desalting by 10% TCA/acetone.

### 2.3 不同上样量的 18 cm 分析胶电泳图谱

实验对 18 cm 银染分析胶的上样量进行了摸索, 结果发现较高的上样量(图 3-A, B)导致高丰度蛋白区域蛋白堆积情况严重, 特别是对于银染的分析胶而言, 上样量过大, 使得染色过程更加不易控制, 高丰度蛋白质的斑点过大也会影响其他蛋白质点的分离和分析。本研究发现, 对于 18 cm 的银染分析胶, 150  $\mu\text{g}$  的上样量所得到的 2-DE 图谱(图

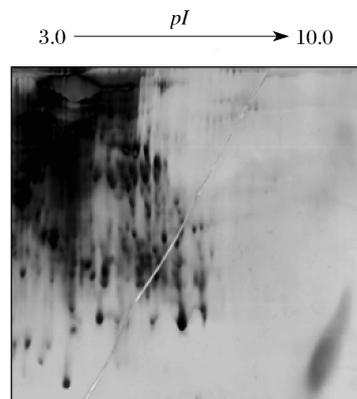


图 1 宽范围 IPG (pH 3 ~ 10) 胶条的中国明对虾血浆 2-DE 图谱(银染)

Fig. 1 2-DE maps of *F. chinensis* plasma with wide range IPG strip, pH 3 - 10 (silver staining)

### 2.2 不同脱盐方式的 18 cm 电泳图谱

分别采用两种脱盐方式处理的中国明对虾血浆的 2-DE 图谱均无严重的纵向条纹和拖尾现象, 两种方法制备的蛋白质样品的 2-DE 图谱的斑点分布基本相同(图 2)。

3-C) 相对背景清晰, 蛋白质点的分辨率较高, 相对而言高丰度蛋白区域对其他蛋白质的影响较小。

### 2.4 不同上样量的 18 cm 制备胶电泳图谱

实验也对胶体考马斯亮蓝染色的 18 cm 制备胶的上样量进行了摸索, 胶体考染与质谱的兼容性好。结果表明, 对于 18 cm 的胶体考染制备胶, 1 200  $\mu\text{g}$  的上样量过大(图 4-A), 高丰度蛋白斑点过大, 交叉重叠, 掩盖了其他低丰度蛋白的显

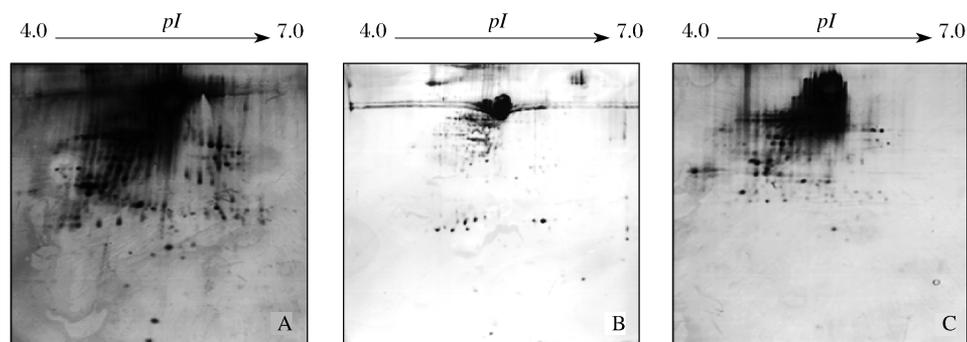


图3 不同上样量的中国明对虾血浆 2-DE 图谱(银染)

A. 中国明对虾血浆 200  $\mu\text{g}$  上样量 2-DE 图谱; B. 中国明对虾血浆 180  $\mu\text{g}$  上样量 2-DE 图谱; C. 中国明对虾血浆 150  $\mu\text{g}$  上样量 2-DE 图谱。

Fig. 3 2-DE maps of *Fenneropenaeus chinensis* plasma with different loading amounts (silver staining)

A. 200  $\mu\text{g}$  loaded; B. 180  $\mu\text{g}$  loaded; C. 150  $\mu\text{g}$  loaded.

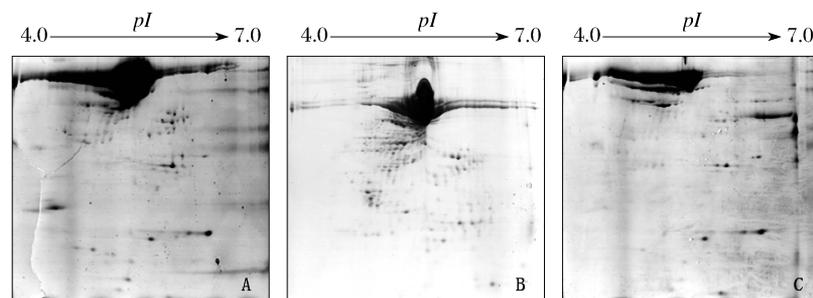


图4 不同上样量的中国明对虾血浆 2-DE 图谱(胶体考染)

A. 中国明对虾血浆 1 200  $\mu\text{g}$  上样量 2-DE 图谱; B. 中国明对虾血浆 1 000  $\mu\text{g}$  上样量 2-DE 图谱; C. 中国明对虾血浆 800  $\mu\text{g}$  上样量 2-DE 图谱。

Fig. 4 2-DE maps of *Fenneropenaeus chinensis* plasma with different loading amounts (colloidal Coomassie blue staining)

A. 1 200  $\mu\text{g}$  loaded; B. 1 000  $\mu\text{g}$  loaded; C. 800  $\mu\text{g}$  loaded.

示;800  $\mu\text{g}$  的上样量(图 4-C)蛋白质斑点稀疏,不利于低丰度蛋白的检出;相对而言 1 000  $\mu\text{g}$  的上样量(图 4-B)蛋白质斑点检出数量为 238 个,斑点明显增多,分辨率明显改善。

## 2.5 主要高丰度蛋白的分析与质谱鉴定

以 PDQuest 2-DE 凝胶图像分析软件对 18 cm 制备胶的 2-DE 图谱进行了分析,确定了表达量最高的 11 个蛋白质点(图 5),经胶内酶切后进行基质辅助激光解析-飞行时间串联质谱(MALDI-TOF/TOF MS)分析,用 GPS Explorer 软件搜索蛋白数据库,结果发现这 11 个蛋白质点都是血蓝蛋白(表 1),说明血蓝蛋白在 2-DE 图谱上是以多个点存在的,丰度很高而且在分子量和等电点都有很大的差别,在对虾血浆中是以“蛋白质群”的形式存在。其中 1 号点的肽指纹图谱、

串联质谱图见图 6。

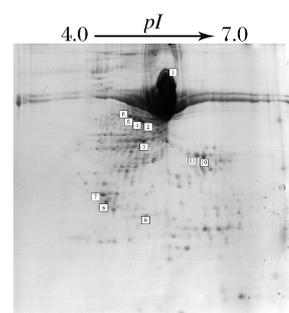


图5 代表性的中国明对虾血浆 2-DE 图谱(一向,IPG 胶条,pH 4~7,18 cm;二向,12.5%)

Fig. 5 A representative 2-DE map of *Fenneropenaeus chinensis* plasma (first dimension, IPG strip, pH 4-7, 18 cm; second dimension, 12.5% SDS-PAGE)

表 1 中国明对虾血浆主要高丰度蛋白点的质谱鉴定

Tab. 1 Identification of major abundant protein spots from plasma of *F. chinensis* by MALDI-TOF/TOF MS

序号 spot no.	蛋白质名称 protein name	蛋白质编号 accession no.	分子量/等电点 MW/pI	肽段数 pep count	蛋白分数 (CI %) protein score	匹配度 intensity matched	总离子分数 (CI %) total ion score
1	Hemocyanin [ <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ]	gi   46486944	7 738.9/4.59	2	100	39.664	100
2	Hemocyanin [ <i>Litopenaeus vannamei</i> ]	gi   854403	74 934.5/5.27	8	99.999	39.911	100
3	Hemocyanin [ <i>Litopenaeus vannamei</i> ]	gi   854403	74 934.5/5.27	12	100	45.334	100
4	Hemocyanin [ <i>Penaeus monodon</i> ]	gi   16612121	51 120.4/5.1	7	100	7.624	100
5	Hemocyanin [ <i>Penaeus monodon</i> ]	gi   16612121	51 120.4/5.1	10	100	25.905	100
6	Hemocyanin [ <i>Penaeus monodon</i> ]	gi   16612121	51 120.4/5.1	12	100	57.293	100
7	Hemocyanin [ <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ]	gi   46486944	7 738.9/4.59	2	100	39.664	100
8	Hemocyanin [ <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ]	gi   46486944	7 738.9/4.59	1	100	29.371	100
9	Hemocyanin [ <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ]	gi   46486944	7 738.9/4.59	1	100	28.577	100
10	Hemocyanin [ <i>Litopenaeus vannamei</i> ]	gi   854403	74 934.5/5.27	9	100	53.151	100
11	Hemocyanin [ <i>Litopenaeus vannamei</i> ]	gi   854403	74 934.5/5.27	5	99.278	50.241	94.762

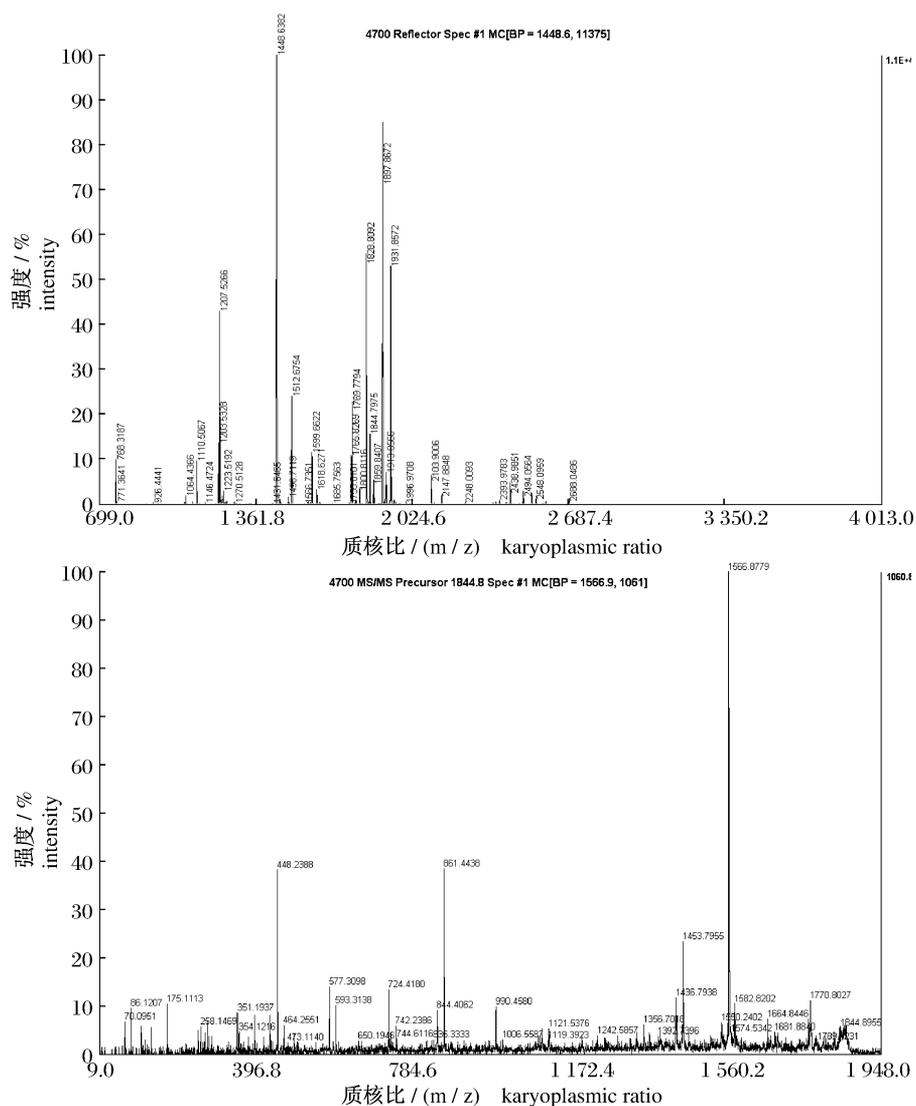


图 6 蛋白点 1 的质谱 (4 800 Proteomics Analyzer) 分析图

A: PMF 图, 匹配的肽段上标有质量值; B: 离子得分最高的肽段 ( $m/z$  1 844.8) 的质量图。

Fig. 6 MS analysis of protein spot 1 (4 800 Proteomics Analyzer)

A. The MALDI-TOF MS map, in which matched peptide peaks with mass value; B. The MALDI-TOF/TOF MS analysis of the peptide with the biggest ion score ( $m/z$  1 844.8).

### 3 讨论

#### 3.1 中国明对虾血淋巴的采集与蛋白样品预处理

双向凝胶电泳可将数千种蛋白质同时分离与展示,是蛋白质组学研究的三大核心技术之一<sup>[10]</sup>。中国明对虾血浆蛋白质组学分析与人血浆等来源的蛋白质组学分析具有一定的共性,也有其特殊之处,其中以样品采集和制备的差别最为突出。

健康的对虾游泳速度很快,对外界刺激的反应敏捷,不易捕捉,取样时挣扎剧烈易产生应激反应。为了避免这种情况,本研究采用了低温诱导休眠的方法。通过缓慢降温至 12 ~ 14 °C,使对虾活动能力下降,逐渐进入休眠状态。取样时对虾比较安静,基本无应激反应。采集血淋巴时,预冷的抗凝剂中加入适量的广谱的蛋白酶抑制剂,同时保证后续操作都在冰上进行,可以有效防止蛋白质降解。本研究采用从腹部血窦取血的方式,取血时将针头顺势插入血窦中,以一个动作完成采集,避免反复抽取而带入其他组织蛋白。

要获得高分辨率和高度重复的双向凝胶电泳图谱,蛋白质样品的制备是极其关键的步骤。中国明对虾血浆中的盐分较高,这将影响聚焦过程。常用的脱盐方法为透析法、超滤法、有机溶剂沉淀,以及脱盐柱等<sup>[11]</sup>。本文中比较了 10% TCA/丙酮沉淀法与脱盐柱法的脱盐除杂效果,从实验结果来看,两种方法的脱盐效果没有显著差别。在实际应用中,不同的实验室可以根据需要自行选择,10% TCA/丙酮沉淀法具有成本低廉、操作简便等优势;结合本实验室的条件,采用脱盐柱 Hitrap Desalting 与 AKTA Purifier 蛋白纯化仪进行血浆的脱盐处理,该过程用时比较短,大约 1 ~ 2 min 即可完成脱盐处理,处理后的样品可以直接上样或者冻干备用。该方法操作简单,避免长时间操作导致蛋白质降解,并且采用蛋白纯化仪可以设定固定的收集模式,重复性好。

#### 3.2 中国明对虾血浆蛋白的双向凝胶电泳

等电聚焦前胶条溶胀有两种方式:主动溶胀和被动溶胀。它们各有利弊,在预实验过程中,发现采用主动溶胀,试验结果更稳定,与被动溶胀结果

得到的图谱比较,高丰度蛋白区域聚焦更好,这样对于低丰度的掩盖会降低,故选用主动溶胀方式。

实验初期首先使用了宽范围(pH 3 ~ 10)的 IPG 胶条分析蛋白总体情况,从 2-DE 图谱中可以看出对虾血浆蛋白质等电点主要集中在酸性端,因此在后续的研究中选用了窄范围的酸性 IPG 胶条(pH 4 ~ 7),可以将酸性端聚积的血浆蛋白充分分离,蛋白分辨率明显提高。

蛋白质样品的上样量大小也是影响凝胶图谱的重要环节,提高上样量,利于更多低丰度蛋白点检出,但高丰度蛋白斑点过大。交叉重叠,又会掩盖其他蛋白点分离。蛋白上样量太少,容易造成某些蛋白点模糊甚至缺失,选择一个合适的上样量非常重要。本研究中,针对 18 cm 的线性 IPG 胶条(pH 4 ~ 7)分别进行了分析胶(银染)和制备胶(胶体考染)的上样量的摸索,经过多次实验比较,发现一般上样量为 150 μg 左右,采用银染可以获得较好的分析胶图谱;而上样 800 μg 左右,对于胶体考染方法能获得较好的制备胶图谱。

#### 3.3 中国明对虾血浆的主要高丰度蛋白点的质谱鉴定

基质辅助激光—解析飞行时间/串联质谱(MALDI TOF/TOF MS)是目前蛋白质组学研究中应用最广泛的质谱技术之一,获得的数据质量很高<sup>[12-13]</sup>。MALDI TOF/TOF 串联质谱蛋白鉴定服务在一级质谱(MS)的基础上,对多达 10 条酶解肽段进行二级质谱(MS/MS)分析,进一步提高了质谱鉴定的准确性和实验结果的可靠性。本文使用该系统采用了一级质谱结合二级质谱法,对中国明对虾血浆 18 cm(pH 4 ~ 7)的制备胶 2-DE 图谱上的主要高丰度蛋白点进行了分析鉴定,以 protein score CI % 大于 95 或者单个肽段的 Total Ion CI % 大于 95 作为蛋白成功的标准。结果显示丰度最高的 11 个蛋白点的鉴定结果均为血蓝蛋白,这说明作为对虾血浆中最主要的高丰度蛋白—血蓝蛋白在双向电泳图谱上是以多个点的形式出现。近年来,很多研究表明,血蓝蛋白可能具有多样性。章跃陵等<sup>[14]</sup>研究证实,凡纳滨对虾血蓝蛋白在糖基化修饰水平存在多样性,并认为糖基多样性是其功能多样性的分子基础之一。一种蛋白可包含有蛋白前体、剪切体、糖基化、水解后肽段等多种形式。同时还存在蛋白—蛋白复合物、蛋白—糖类、蛋白与脂类等复合物。因此在

电泳图谱上,同一种蛋白可表现为多个点,代表蛋白的各种修饰体、亚基、肽段<sup>[15]</sup>。在本实验制备的2-DE图谱上,丰度最高的11个点都是血蓝蛋白,血蓝蛋白以多种形式存在,一方面说明它能够非常灵活地参与生理活动的调节,发挥重要的功能;另一方面,作为含量最高的组份,在双向凝胶电泳图谱中可以干扰低丰度蛋白的表达和鉴定。因此如何尽量避免或减少血蓝蛋白的影响,提高低丰度蛋白的分辨率是当前甲壳动物血浆蛋白质组学亟待解决的问题。

#### 参考文献:

- [1] ALONSO J, RODRIGUEZ J M, BAENA-LOPEZ L A, *et al.* Characterization of the drosophila melanogaster mitochondrial proteome[J]. *J Proteome Res*, 2005, 4(5):1636-1645.
- [2] ZHNAG P B, AS Y C, YAMAMOTO K, *et al.* Proteome analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Proteomics*, 2006, 6(8):2586-2599.
- [3] GUEDES S D, VITORINO R, TOMER K, *et al.* Drosophila melanogaster larval hemolymph protein mapping[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2003, 312(3):545-554.
- [4] 秦兆宇,刘师莲,宋春华,等. 中国对虾肝胰腺蛋白质组学双向电泳技术体系的建立[J]. *生物医学工程研究*, 2007, 26(001):80-83.
- [5] WANG H C, WANG H C, LEU J H, *et al.* Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection[J]. *Dev Comp Immunol*, 2007, 31(7):672-686.
- [6] 黄冰心,蒋昊,张继泉,等. SDS-PAGE与液质联用技术分离和鉴定中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血浆蛋白[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(2):208-213.
- [7] BRADFORD M M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1-2):248-254.
- [8] GORG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6):1037-1053.
- [9] CANDIANO G, BRUSCHI M, MUSANTE L, *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9):1327-1333.
- [10] LOPEZ J L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 849(1-2):190-202.
- [11] BODZON-KULAKOWSKA A, BIERCZYNSKA-KRZYSIK A, DYLAG T, *et al.* Methods for samples preparation in proteomic research [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 849(1-2):1-31.
- [12] GEVAERT K, VANDEKERCKHOVE J. Protein identification methods in proteomics [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6):1145-1154.
- [13] THIEDE B, HOHENWARTER W, KRAH A, *et al.* Peptide mass fingerprinting [J]. *Methods*, 2005, 35(3):237-247.
- [14] 章跃陵,邢立刚,严芳,等. 5种凡纳滨对虾血蓝蛋白的糖基化修饰及功能对比分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(7):655-661.
- [15] 罗小云,吴庆华. 双向凝胶电泳在临床血浆蛋白质组学研究中的技术难点和解决方法[J]. *北京生物医学工程*, 2006, 25(4):434-436.

## Establishment of two-dimensional gel electrophoresis technique for *Fenneropenaeus chinensis* plasma and identification of major high-abundance proteins by MALDI-TOF/TOF MS

WANG Bao-jie<sup>1,2</sup>, LIU Mei<sup>1</sup>, JIANG Ke-yong<sup>1</sup>, ZHANG Guo-fan<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is one of the most economically valuable and widely cultured species in China. The hemolymph is the source of its immunity to disease and environmental factors, which invariably involves protein components. To better understand the physiology of *F. chinensis* and the major protein components expressed during its life cycle, two proteomics approaches, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) in conjunction with MALDI-TOF/TOF MS, were employed to analyze its hemolymph proteins. The proteins of *F. chinensis* plasma were separated using immobilized pH gradient 2-DE after desalting. By optimizing loading amount, and separation scope of IPG strip, the proteins were successfully extracted from Chinese shrimp plasma and were separated by 2-DE. After silver staining or colloidal brilliant blue staining, PDQuest image analysis software was applied to analyze the 2-DE images and a total of 11 proteins highly expressed in shrimp plasma were identified by MALDI-TOF/TOF MS, which are all hemocyanins. The results revealed that when a 150  $\mu\text{g}$  sample, with 18 cm IPG (pH 4 – 7), after silver staining, 2-DE analysis patterns were obtained; and when a 1 000  $\mu\text{g}$  sample, with 18 cm IPG (pH 4 – 7), after colloidal brilliant blue staining, 2-DE prepared patterns were obtained. We have successfully established a 2-DE technique for shrimp plasma proteome, which can lay the foundation for the further study of plasma proteomics of shrimp and other crustaceans.

**Key words:** *Fenneropenaeus chinensis*; plasma; two-dimensional gel electrophoresis (2-DE); proteomics; hemocyanin

**Corresponding author:** WANG Lei. E-mail: wanglei@ms.qdio.ac.cn