

尼罗罗非鱼肌肉蛋白质双向电泳体系的建立

赵永强¹, 李娜^{1,2}, 李来好^{1*}, 杨贤庆¹, 郝淑贤¹,
魏涯¹, 岑剑伟¹, 张红杰^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室,
国家水产品加工技术研发中心, 广东广州 510300;

2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 为建立1种尼罗罗非鱼肌肉组织蛋白质的双向电泳体系, 实验将尼罗罗非鱼肌肉组织蛋白质提取后, 用双向电泳(2-DE)分离蛋白质, 分别对蛋白质样品的制备方法、IPG胶条长度及pH范围、SDS-PAGE凝胶浓度及染色方法4个关键因素进行了探索和优化。结果显示, 采用液氮研磨-丙酮沉淀法制备样品蛋白质, 使用24 cm pH 4~7的IPG胶条进行第一向等电聚焦电泳, 第二向SDS-PAGE电泳采用浓度为12.5%的凝胶进行, 双向电泳后的凝胶采用硝酸银染色法进行染色处理, 该条件下扫描所得尼罗罗非鱼肌肉蛋白质二维电泳图谱具有蛋白质分离程度好、斑点清晰、分辨率高及横纹少等优点。研究表明, 技术体系适用于尼罗罗非鱼肌肉蛋白质的分离, 可用于后续罗非鱼肌肉蛋白质组学研究。

关键词: 尼罗罗非鱼; 肌肉蛋白质; 双向电泳; 蛋白质组学

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

蛋白质组(proteome)指“细胞、组织或机体内的基因在特定生理条件下表达的所有蛋白质”^[1], 蛋白质组学(proteomics)是对一个机体的全部蛋白质进行系统的研究, 包括蛋白质的变化、翻译后修饰及蛋白质与蛋白质之间的相互作用^[2]。蛋白质组学研究可以从蛋白质水平上对生物体的各种生理过程有更全面的认识, 已成为生命科学研究的热点, 被广泛应用于生物学、生物化学和生物医学研究中^[3], 现已逐渐延伸到食品科学及水产科学方面^[4-7]。而双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)是目前蛋白质组学研究中常用的蛋白质分离技术之一^[8], 已有关于大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)肝脏^[9]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)表皮^[10]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)肝脏^[11]、斑节对虾(*Penaeus*

monodon)血淋巴^[12]蛋白质双向电泳体系建立的研究, 目前尚未有关于罗非鱼肌肉蛋白质双向电泳体系建立的报道。

罗非鱼具有生长速度快、繁殖能力强、食性杂、抗病力强等特点, 且骨刺少、肉质厚^[13], 是我国主要的淡水鱼养殖产品之一。本研究以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为实验材料, 通过比较样品制备方法, 提取肌肉全蛋白, 对IPG(immobilized pH gradients)胶条、SDS-PAGE胶浓度、染色方法的选择进行探索, 优化双向电泳关键步骤的条件, 以期建立一种适于罗非鱼肌肉蛋白质的双向电泳体系, 获得斑点清晰、分辨率高、横纹少的二维电泳图谱, 为后续罗非鱼肌肉蛋白质组学的研究奠定基础, 也为其他鱼类肌肉蛋白质组学研究提供参考。

收稿日期: 2015-10-12 修回日期: 2016-07-19

资助项目: 国家现代农业(罗非鱼)产业技术体系建设专项(CARS-49); 国家科技支撑计划(2015BAK36B06, 2015BAD17B03); 国家自然科学基金(31401563, 31271957); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2015B06YQ01)

通信作者: 李来好, E-mail: laihao@163.com

1 材料与方法

1.1 实验仪器和材料

Milli-Q超纯水机, 美国Millipore公司; UV2550型紫外-可见分光光度计, 日本SHIMADZU公司; GB204型电子天平, 瑞士METTLER公司; DW-86L626型超低温冰箱, Haier公司; 3K30型台式高速冷冻离心机, 德国Sigma公司; Powerpac® Basic基础电泳仪, 美国Bio-Rad公司; Ettan IPG phor3等电聚焦系统, 美国GE公司; JY-IIDN型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Image Scanner III扫描仪, 美国GE公司。

IPG胶条、载体两性电解质(Bio-Lyte, pH3~7)、2D Clean-up试剂盒购自美国Bio-Rad公司; 二硫苏糖醇(Dithiotherito, DTT)、乙二胺四乙酸(EDTA)、过硫酸铵、矿物油、碘乙酰胺(IAA)、丙烯酰胺、3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐(CHAPS)、四甲基乙二胺(Tetramethylenediamine, TEMED)、Bradford蛋白定量试剂盒购于上海生工生物工程有限公司; 其他常见试剂均为分析纯。

鲜活尼罗罗非鱼购于附近超市。

1.2 蛋白质样品制备及定量

将3份尼罗罗非鱼肌肉组织表面清洗干净后混合剪碎备用。肌肉组织破碎方法设2个对照, I: 冰上匀浆法^[14], 取黄豆大小碎肉, 加入1 mL裂解液(7 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、4%CHAPS、65 mmol/L DTT、1% pH 3~10的Bio-Lyte), 用匀浆机在冰上进行裂解组织操作, 每匀浆30 s停5 s以防过热, 直至肌肉组织无块状即可停止。II: 液氮研磨法, 在研钵中倒入液氮预冷, 然后将碎肉组织置于研钵中, 迅速加入液氮进行研磨, 直至组织变成粉末状。

蛋白质的提取方法设3组对照, A: 直接裂解法, 快速称取0.2 g液氮研磨后的粉状样品, 加入1 mL裂解液, 同冰上匀浆法处理的样品一起于4 °C放置4 h, 期间每30 min颠倒混匀一次。离心(4 °C, 12 000 r/min, 20 min), 取上清液备用。B: 丙酮沉淀法, 取A中上清250 μL, 加入4倍体积丙酮溶液沉淀蛋白质, -20 °C放置过夜, 离心(4 °C, 12 000 r/min, 20 min), 吸去上清液, 自然干燥, 得到蛋白质团块。往蛋白质团块中加入

500 μL裂解液, 用枪头将蛋白质团块戳小后反复吹打直至蛋白质充分分散, 2%功率超声助溶。4 °C, 12 000 r/min, 离心20 min, 取上清液备用。C: 2D Clean-up沉淀法, 将A中上清按照说明书逐步操作, 所得上清液备用。采用Bradford法测定蛋白质浓度, 直接上样或分装后于-80 °C保存备用。

1.3 等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF)

IPG胶条设3个对比, 分别为7 cm pH 3~10、17 cm pH 3~10、24 cm pH 4~7。考马斯亮蓝染色7 cm胶条总上样量200 μg, 总上样体积125 μL; 17 cm胶条总上样量300 μg, 总上样体积380 μL; 24 cm胶条总上样量1400 μg, 总上样体积455 μL。银染24 cm pH 4~7胶条总上样量140 μg, 总上样体积455 μL。取出水化盘, 调节水平备用。将-20 °C保存的胶条室温下复温10 min, 取相应量的蛋白质样品, 用水化上样缓冲液(裂解液加1%的溴酚蓝)补充至相应体积, 混匀后加入水化盘的槽中。胶条胶面向下轻放入槽中, 胶条表面加入2 mL矿物油防止样品挥发, 被动水化上样12 h以上。等电聚焦程序见表1。

1.4 胶条的平衡

等电聚焦完成后, 取出胶条, 用滤纸吸取胶条表面多余液体, 依次放入平衡液 I (6 mol/L 尿素, 2%SDS, 50 mmol/L pH 8.8 Tris-HCl, 20%甘油, 1%DTT)、平衡液 II (2.5%IAA代替 I 中1%DTT)中, 于摇床上分别平衡15 min。7 cm胶条用5 mL平衡液, 17 cm和24 cm胶条用10 mL平衡液。

表 1 不同胶条等电聚焦程序
Tab. 1 IEF program of different strips

升压方式 boost method	等电聚焦程序 IEF program		
	7 cm胶条 7 cm strip	17 cm胶条 17 cm strip	24 cm胶条 24 cm strip
线性升压 Stp	100 V, 3 h	100 V, 3 h	100 V, 3 h
线性升压 Stp	250 V, 1 h	250 V, 1 h	500 V, 1 h
快速升压 Grd	500 V, 1 h	1000 V, 1 h	1000 V, 1 h
快速升压 Grd	4500 V, 3 h	8000 V, 4 h	10 000 V, 5 h
线性升压 Stp	4500 V, 25 000 Vh	8000 V, 64 000 Vh	10 000 V, 41 000 Vh
线性升压 Stp	500 V, 保持	500 V, 保持	1000 V, 保持

1.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

取出平衡后的胶条,在电泳缓冲液中浸泡5 s,将胶条正极与电泳仪正极方向一致,胶条下端紧密接触二向胶面,用含有溴酚蓝的低熔点琼脂糖溶液封胶,分别采用SDS-PAGE电泳常用的10%、12.5%、15%的分离胶进行二向电泳。7 cm胶条起始电压80 V,电泳20 min后升至120 V;17 cm和24 cm胶条起始功率2 W/gel,60 min后升至17 W/gel,直到溴酚蓝跑到下缘时结束。

1.6 凝胶染色、扫描及图谱分析

7 cm、17 cm胶条采用考马斯亮蓝染色法(考染)染色,24 cm胶条分别用考染和硝酸银染色法(银染)2种方法进行对照。考染:将胶放入固定液(40%乙醇,10%冰醋酸)中固定2 h;用蒸馏水漂洗2次,每次15 min;放入染色液(0.12%考马斯亮蓝G-250,10%硫酸铵,10%磷酸,20%甲醇)染色6 h以上;蒸馏水漂洗至背景无色。银染:用固定液固定2 h以上;敏化液(30%乙醇,6.8%乙酸钠,0.2%硫代硫酸钠)敏化1 h;蒸馏水漂洗4次,各10 min;银染液(0.25%硝酸银)银染1 h;蒸馏水漂洗2次,各1 min;显色液(2%碳酸钠,

0.8 mol/L甲醛溶液)显色8 min;终止液(11.6 g/L EDTA)终止45 min;蒸馏水漂洗2次,各30 min。采用Image Scanner III扫描仪对凝胶进行扫描后于Imagemaster软件对图谱进行分析。

2 结果与分析

2.1 肌肉组织破碎方法的影响

肌肉组织的充分破碎是释放组织内蛋白质进行后续蛋白质提取的必要前提,组织破碎不充分则会造成蛋白质的损失。该实验采取冰上匀浆和液氮研磨2种方法对罗非鱼肌肉进行破碎,在其他条件相同的情况下提取蛋白质并进行双向电泳。结果显示,用冰上匀浆法破碎肌肉组织所得的双向电泳图谱(图1-a)横纹较多且蛋白质点较少,分辨率低,而用液氮研磨法破碎肌肉组织所得的双向电泳图谱(图1-b)蛋白质点多且清晰,横纹干扰少,分辨率高。由此看出,液氮研磨法破碎肌肉组织效果较好。朱佳杰等^[14]在优化吉富罗非鱼(*GIFT Oreochromis niloticus*)肝脏蛋白质组双向电泳体系的研究中指出液氮研磨法比匀浆法提取蛋白质的效果更好,与该实验结果一致。

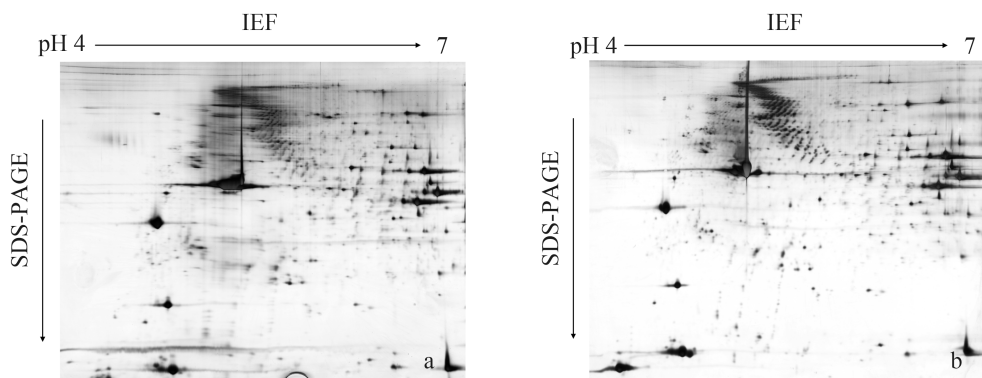


图1 不同肌肉组织破碎方法的2-DE图谱

24 cm pH 4~7胶条; (a)冰上匀浆法; (b)液氮研磨法

Fig. 1 The 2-DE map of different breaking methods for Nile tilapia muscle

strip of 24 cm pH 4~7; (a)homogenized on ice; (b)ground by liquid nitrogen

2.2 蛋白质提取方法对结果的影响

蛋白质样品制备是进行双向电泳的基础,是影响结果的关键因素^[15]。蛋白质提取方法选择不当,会使蛋白质丢失、溶解不充分及大量杂质残留^[16],影响聚焦过程,从而造成图谱中条纹的产生、蛋白质点模糊、分辨率低等。该实验

采用直接裂解、丙酮沉淀和2D Clean-up沉淀3种蛋白质提取方法。直接裂解法是蛋白质经裂解液裂解后直接上样,由于样品未经纯化存在杂质,图谱(图2-a)中出现较多横条纹,且蛋白质未分离开,出现大片模糊。丙酮沉淀法及试剂盒提取是蛋白质组学研究中蛋白质样品提取常用

的方法, 能高效地对样本进行浓缩及除盐^[17], 用丙酮沉淀法(图2-b)和2D Clean-up沉淀法(图2-c)提取蛋白质的图谱中横条纹消失且蛋白质点多而清晰, 优于直接裂解法。丙酮沉淀法(图2-b)和2D

Clean-up沉淀法(图2-c)图谱差异不大, 前者图谱中酸性端横条纹稍多, 但对蛋白质点的分离没有太大影响, 由于2D Clean-up试剂盒价格昂贵, 因此后续实验选用丙酮沉淀法提取蛋白质。

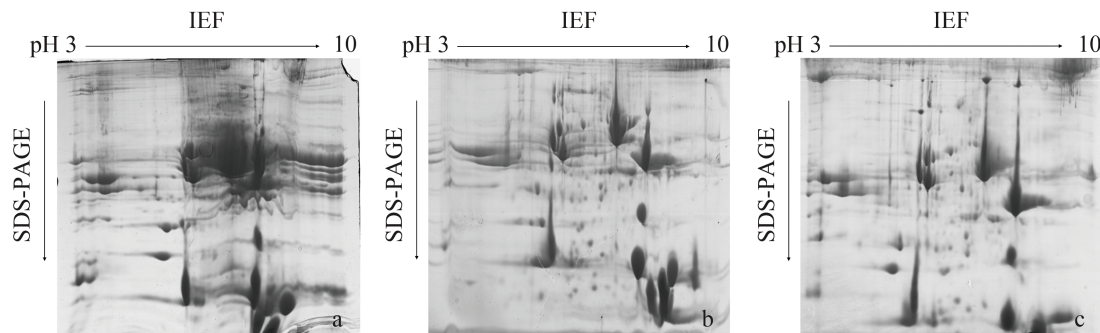


图2 不同蛋白质提取方法的2-DE图谱

7 cm pH 3~10; (a)直接裂解法; (b)丙酮沉淀法; (c)2D Clean-up沉淀法

Fig. 2 The 2-DE map of different protein extraction methods

strip of 7 cm pH 3~10; (a)direct pyrolysis; (b)acetone precipitation; (c) 2D clean-up precipitation

2.3 IPG胶条选择

一向IEF是利用蛋白质等电点的差异以预制IPG胶条为载体进行的, 胶条的选择对双向电泳结果有直接的影响, 包括胶条长度和pH范围的选择。该实验选用4种胶条(7 cm pH 3~10、17 cm pH 3~10、24 cm pH 3~10、24 cm pH 4~7)进行IEF。结果显示, 7 cm胶条(图3-a)图谱中蛋白质点过于拥挤, 部分蛋白质没有分散开造成图谱中有较多蛋白质团的出现; 17 cm胶条(图3-b)蛋白质点分散程度高于7 cm胶条(图3-a), 蛋白质团也较少; 24 cm胶条(图3-c)蛋白质点明显多于7 cm(图3-a)和17 cm(图3-b), 蛋白质点清晰且分散均匀, 蛋白质团块消失。由此可看出, 胶条长度越长则蛋白质分散越均匀, 蛋白质点也越清晰。

张丽等^[18]在优化桃果实总蛋白质双向电泳体系时发现, pH范围较大的胶条对蛋白质的覆盖率大, 而pH范围小的胶条覆盖率小但蛋白质点的相对分辨率高。24 cm pH 3~10的胶条(图3-c)图谱中水平方向蛋白质点主要集中在中间偏酸性端区域, 两端蛋白质点较少, 而pH 4~7的胶条(图3-d)图谱中蛋白质点分散且清晰, 在水平方向上分布均匀。因此, 选择长度为24 cm、pH为4~7的胶条对罗非鱼肌肉蛋白质进行双向电泳, 既能最大范围地覆盖蛋白质, 同时也能得到分辨率高的图谱。

2.4 SDS-PAGE凝胶浓度对结果的影响

SDS-PAGE凝胶电泳是根据蛋白质的相对分子质量来分离蛋白质的^[19], 不同样品中蛋白质的相对分子质量范围不同, 所需要的SDS-PAGE凝胶浓度也具有差异, 因此需要选择合适的凝胶浓度来得到具有较好分离效果的图谱。该实验在其他条件一致的情况下, 分别采用10%、12.5%、15%的分离胶进行二向SDS-PAGE电泳。结果显示, 在垂直方向上, 10%的分离胶(图4-a)所得图谱蛋白质点聚集在凝胶中下部, 与12.5%的分离胶图谱相比, 底部缺少部分蛋白点, 说明小分子量的蛋白质已跑出胶外, 造成蛋白点的损失; 15%的分离胶(图4-c)所得图谱蛋白质点集中在凝胶中上部, 横条纹较多且分离不彻底, 只有12.5%的分离胶(图4-b)所得图谱蛋白质点在垂直方向上均匀分布。这是因为凝胶浓度越大则孔径越小, 蛋白质在胶内的移动速度则越小^[20]。因此, 在二向SDS-PAGE电泳中宜采用浓度为12.5%的分离胶。

2.5 染色方法的影响

染色方法对双向电泳凝胶中蛋白质点检测的灵敏度具有很大影响^[21], 银染及考染是2种常用的方法。该实验分别采用银染和考染对双向电泳凝胶进行染色。结果显示, 银染(图5-a)图谱中蛋白质点多且清晰, 考染(图5-b)图谱中蛋白质

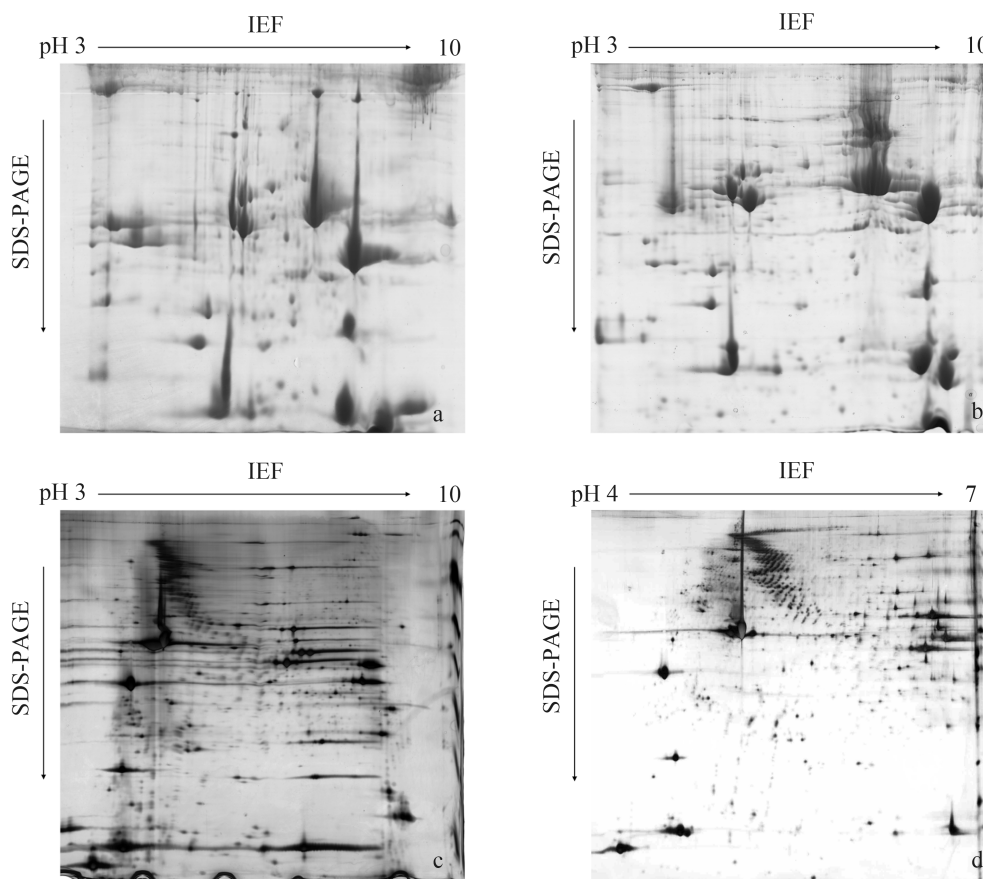


图3 不同IPG胶条的2-DE图谱

Fig. 3 The 2-DE map of different IPG strips

(a) 7 cm pH 3-10; (b) 17 cm pH 3-10; (c) 24 cm pH 3-10; (d) 24 cm pH 4-7

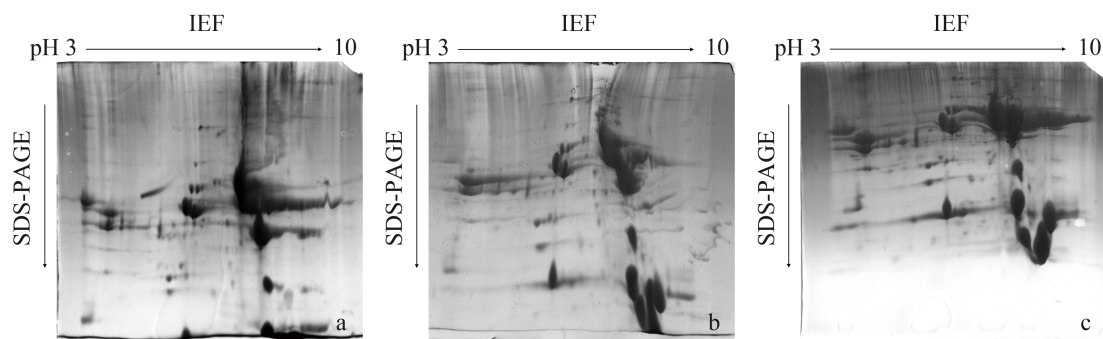


图4 不同SDS-PAGE凝胶浓度的2-DE图谱

Fig. 4 The 2-DE map of different concentration of SDS-PAGE gel

(a) 10%; (b) 12.5%; (c) 15%

点较少, 多数低丰度蛋白质点模糊或没有显色。秦慧等^[22]对几种双向凝胶电泳蛋白质检测方法进行了比较, 指出银染的灵敏度高于考染, 但与质谱的兼容性低于考染。此外, 银染步骤较多, 操作繁琐, 因此在后续进行基于双向电泳的罗非鱼肌肉蛋白质组学研究中, 对比寻找差异点

时可采用银染法制备凝胶, 需要结合质谱进行差异蛋白质鉴定时可采用考染法。

3 讨论

2-DE具有高通量、适用范围广、分辨率高等优点, 同时也因操作步骤繁琐, 使得对结果

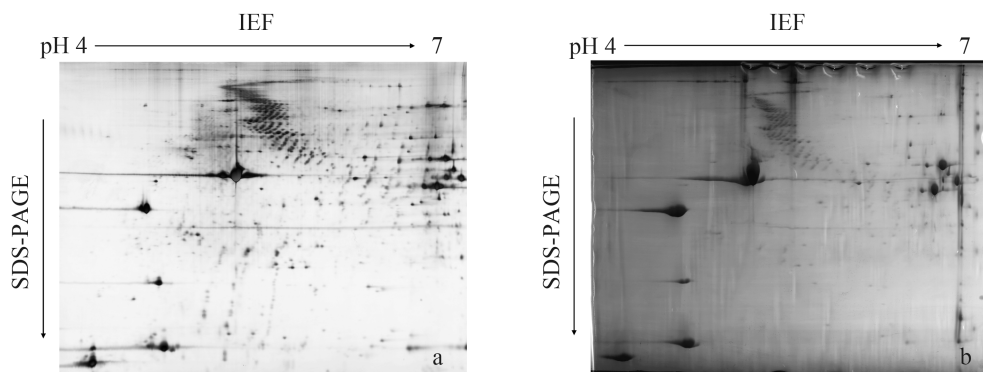


图 5 不同染色方法的2-DE图谱

(a)银染; (b)考染

Fig. 5 The 2-DE map of different staining methods

(a)silver staining; (b)coomassie blue staining

产生影响的因素较多。样品制备的成功与否直接决定2-DE的实验结果, 经过对比实验发现, 破碎组织时采取液氮研磨法效果优于冰上匀浆法, 因为液氮温度为 -196°C , 组织与之接触后立即冻结便于研磨, 且瞬间的超低温能保护组织内成分不易被降解^[23]。罗非鱼肌肉组织中除蛋白质之外还有核酸、多糖、脂类等成分, 在蛋白质提取过程中, 用裂解液裂解后直接上样, 图谱中出现大片模糊, 可能是提取的样品中含有非蛋白质类杂质造成的, 在等电聚焦过程中, 杂质的存在会使电压无法升到最高值导致聚焦不完全, 同时也会在图谱中产生背景。用丙酮和2D Clean-up对样品纯化后, 图谱中大片模糊消失, 表明这2种方法对杂质的去除具有良好的效果, 且所得图谱差别不大, 从经济角度考虑并结合实验效果, 最终选用丙酮沉淀法。通过对IPG胶条选择的优化实验, 发现胶条长度越长则蛋白质点越多、图谱越清晰。pH 3~10的宽范围胶条虽然能够在一张胶上显示更多的蛋白质, 但分辨率较低, 可能会造成部分低丰度蛋白质的遗失, 因极碱性端蛋白质点较少, 所以选用24 cm pH 4~7的胶条。在用不同浓度的SDS-PAGE胶进行第二向电泳时发现, 对罗非鱼肌肉蛋白质而言10%的胶孔径过大, 对蛋白质的滞留作用较小, 15%的胶孔径偏小, 造成蛋白质点重叠, 12.5%的胶能使蛋白质在垂直方向均匀分布, 效果最佳。最终的染色结果表明银染蛋白质点多且分辨率高, 效果优于考染, 但银染与质谱兼容性差^[24], 不利于基于质谱的蛋白质鉴定, 因此可用银染胶进行蛋白质点的分析, 用

考染胶进行蛋白质鉴定。

影响双向电泳结果的因素除上述实验中所优化的条件外, 还有裂解液成分、上样量选择、等电聚焦程序、盐桥搭建等^[25]。该实验所用裂解液包含尿素和硫脲, 起到破坏蛋白质分子间氢键的作用, 能够有效溶解疏水蛋白质或高分子蛋白质; CHAPS作为两性离子去垢剂, 可溶解膜蛋白增强蛋白质的溶解性; DTT作为巯基还原剂, 通过帮助断裂二硫键促进蛋白质溶解; 载体两性电解质Bio-Lyte可以通过电荷与电荷间的相互作用减少蛋白质聚合, 从而增强其溶解性^[26], 该类试剂的结合使用可以保证蛋白质的充分提取。此外, 上样量过多可能会使蛋白质点产生拖尾, 高丰度蛋白也可能会掩盖周围的蛋白质点, 而上样量过少则会使低丰度蛋白检测不到, 该实验采用24 cm胶条、考染时总上样量为1400 μg , 银染时总上样量为140 μg , 均获得较好图谱效果, 说明上样量选择合适。样品本身及提取液中所含的盐离子会对蛋白质的分离和等电聚焦效果产生影响, 该实验的等电聚焦条件设置有逐步增加的低压除盐程序, 保证适当的高压聚焦, 并且搭建盐桥, 以达到良好的聚焦效果。

综上所述, 该研究建立的罗非鱼肌肉蛋白质双向电泳体系: 液氮研磨法破碎组织, 丙酮沉淀法提取蛋白质, 采用24 cm pH 4~7的预制IPG胶条进行一向IEF, 浓度为12.5%的凝胶进行二向SDS-PAGE电泳, 采用银染染色法制备分析胶。采用该体系能够将罗非鱼肌肉蛋白质充分分离, 得到斑点清晰、分辨率高的2-DE图谱,

为罗非鱼肌肉蛋白质组学研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Wilkins M R, Pasquali C, Appel R D, *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis[J]. *Biotechnology*, 1996, 14(1): 61-65.
- [2] Martyniuk C J, Denslow N D. Towards functional genomics in fish using quantitative proteomics[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 164(2-3): 135-141.
- [3] Rodrigues P M, Silva T S, Dias J, *et al.* Proteomics in aquaculture: Applications and trends[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(14): 4325-4345.
- [4] Carrera M, Cañas B, Gallardo J M. Proteomics for the assessment of quality and safety of fishery products[J]. *Food Research International*, 2013, 54(1): 972-979.
- [5] Slattery M, Ankisetty S, Corrales J, *et al.* Marine proteomics: A critical assessment of an emerging technology[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(10): 1833-1877.
- [6] Forné I, Abián J, Cerdà J. Fish proteome analysis: Model organisms and non-sequenced species[J]. *Proteomics*, 2010, 10(4): 858-872.
- [7] 赵永强, 李娜, 李来好, 等. 水产品质量与安全控制的蛋白质组学研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(3): 344-350.
Zhao Y Q, Li N, Li L H, *et al.* Application of proteomics in regulation of aquatic products quality and safety: a review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(3): 344-350(in Chinese).
- [8] Stanley B A, Neverova I, Brown H A, *et al.* Optimizing protein solubility for two-dimensional gel electrophoresis analysis of human myocardium[J]. *Proteomics*, 2003, 3(6): 815-820.
- [9] 吴海庆, 李星云, 叶帅东, 等. 大弹涂鱼肝脏蛋白质双向电泳技术的建立及优化[J]. *生命科学仪器*, 2009, 7(8): 33-36.
Wu H Q, Li M Y, Ye S D, *et al.* Establishment and optimization of 2-DE technique in liver proteome of *Boleophthalmus pectinirostris*[J]. *Life Science Instruments*, 2009, 7(8): 33-36(in Chinese).
- [10] 薛宝贵, 黄智慧, 周洲, 等. 大菱鲆表皮蛋白质组双向电泳技术的建立及优化[J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(2): 41-46.
- [11] 李星云, 冀德伟, 吴海庆, 等. 大黄鱼肝脏蛋白质组双向电泳技术的建立及优化[J]. *水产科学*, 2010, 29(1): 27-30.
Li M Y, Ji D W, Wu H Q, *et al.* Establishment and optimization of 2-DE technique in liver proteome of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(1): 27-30(in Chinese).
- [12] 徐梦婷, 傅明骏, 黄建华, 等. 斑节对虾血淋巴低丰度蛋白双向电泳技术体系的优化[J]. *南方水产科学*, 2014, 10(1): 35-42.
Xu M T, Fu M J, Huang J H, *et al.* Optimization of two-dimensional electrophoresis (2-DE) technique in low abundance hemolymph proteome of *Penaeus monodon*[J]. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(1): 35-42(in Chinese).
- [13] 李娜, 赵永强, 李来好, 等. 冰藏过程中罗非鱼鱼片肌肉蛋白质变化[J]. *南方水产科学*, 2016, 12(2): 88-94.
Li N, Zhao Y Q, Li L H, *et al.* Change of muscle proteins in Nile tilapia fillets during iced storage[J]. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(2): 88-94(in Chinese).
- [14] 朱佳杰, 沈夏霜, 付强, 等. 吉富罗非鱼肝脏蛋白质组双向电泳技术的建立与优化[J]. *西南农业学报*, 2013, 26(5): 2122-2126.
Zhu J J, Shen X S, Fu Q, *et al.* Establishment and optimization analysis of two-dimensional electrophoresis system on GIFT tilapia liver[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 26(5): 2122-2126(in Chinese).
- [15] 王瑞, 傅玲琳, 王彦波. 副溶血弧菌总蛋白双向电泳体系的建立[J]. *中国食品学报*, 2013(12): 146-155.
Wang R, Fu L L, Wang Y B. Establishment of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) system for analysis of total protein in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013(12): 146-155(in Chinese).
- [16] 赵绍辉, 周景文, 堵国成, 等. 酿酒酵母蛋白质双向电泳条件优化及图谱建立[J]. *食品与生物技术学报*,

- 2014, 33(3): 235-240.
- Zhao S H, Zhou J W, Du G C, *et al.* Construction and optimization of proteomic map of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(3): 235-240(in Chinese).
- [17] 储兆东, 卢国华, 谭英, 等. 三氯乙酸/丙酮蛋白质提取法在白内障晶状体蛋白提取中的应用[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(12): 2377-2380.
- Chu Z D, Lu G H, Tan Y, *et al.* Application of TCA/acetone protein extraction in the cataract lens protein extract[J]. International Eye Science, 2013, 13(12): 2377-2380(in Chinese)
- [18] 张丽, 姜丽, 石韵, 等. 桃果实总蛋白质双向电泳优化体系的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(3): 250-257.
- Zhang L, Jiang L, Shi Y, *et al.* Optimization of two-dimensional electrophoresis conditions for proteome analysis of peach fruit[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(3): 250-257(in Chinese).
- [19] 高艳利, 杨思文, 樊凯奇, 等. SDS-PAGE电泳技术分析蛋白质的研究[J]. 辽宁化工, 2007, 36(7): 460-463.
- Gao Y L, Yang S W, Fan K Q, *et al.* Development of SDS-PAGE in protein[J]. Liaoning Chemical Industry, 2007, 36(7): 460-463(in Chinese).
- [20] 李学鹏. 中国对虾冷藏过程中品质评价及新鲜度指示蛋白研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012: 135-136.
- Li X P. Studies on quality assessment and protein indicators of freshness in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) during refrigerated storage[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2012: 135-136(in Chinese).
- [21] Pink M, Verma N, Rettenmeier A W, *et al.* CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility[J]. Electrophoresis, 2010, 31(4): 593-598.
- [22] 秦慧, 刘霆, 柳斌, 等. 几种双向凝胶电泳蛋白质检测方法的比较[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(1): 168-172.
- Qin H, Liu T, Liu B, *et al.* Comparison between protein detection methods for two dimensional gel electrophoresis[J]. Journal of Experimental Hematology, 2006, 14(1): 168-172(in Chinese).
- [23] 左惠心, 韩玲, 牛克兰, 等. 不同细胞破碎方法对肉牛、牦牛背最长肌双向电泳图谱的影响[J]. 肉类研究, 2015(7):11-15.
- Zuo H X, Han L, Niu K L, *et al.* Comparison of different cell disruption methods for two-dimensional electrophoresis analysis of beef and yak muscle[J]. Meat Research, 2015(7):11-15(in Chinese).
- [24] Wang X C, Li X F, Li Y X. A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(10): 1599-1603.
- [25] 甘露, 李殿荣, 臧新, 等. 甘蓝型油菜蛋白质双向电泳体系的建立[J]. 作物学报, 2010, 36(4): 612-619.
- Gan L, Li D R, Zang X, *et al.* Construction of protein two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis system for *Brassica napus*[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(4): 612-619(in Chinese).
- [26] 刘志远, 励建荣, 李学鹏, 等. 中国明对虾肌肉组织蛋白质双向电泳技术体系的建立[J]. 水产学报, 2013, 37(2): 288-296.
- Liu Z Y, Li J R, Li X P, *et al.* Establishment of two-dimensional electrophoresis (2-DE) technique in muscle proteome of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(2): 288-296(in Chinese).

Establishment of two-dimensional electrophoresis (2-DE) system in muscle proteome of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ZHAO Yongqiang¹, LI Na^{1,2}, LI Laihao^{1*}, YANG Xianqing¹, HAO Shuxian¹,
WEI Ya¹, CEN Jianwei¹, ZHANG Hongjie^{1,2}

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture; National R&D Center for Aquatic Product Processing; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a tropical species that prefers to live in shallow waters, and it has the merits of fast growth and high reproductive rate, also has the characteristics of less bone spurs, thick fleshy, which has been widely cultured in southern China, and China is by far the largest producer of farmed Nile tilapia. In order to establish a two-dimensional electrophoresis (2-DE) system for proteomic analysis of Nile tilapia muscle, protein samples of Nile tilapia muscle were separated using 2-DE after extracting. By optimizing different preparation methods, different pH of immobilized pH gradients (IPG) gel strips and their lengths, as well as different concentration of SDS-PAGE gel and staining methods (silver staining and Coomassie blue staining), we obtained the best 2-DE experiment conditions. The results show that the optimum method for protein samples preparation of Nile tilapia muscle is combination of liquid nitrogen grinding and acetone precipitation. For 2-DE assay, using 24 cm pH 4 - 7 IPG gel strips for isoelectric focusing (IEF) and 12.5% gel for the second SDS-PAGE. Besides, dyeing the gels by silver staining could get the optimized 2-DE map of Nile tilapia muscle protein with excellent degree of separation, clear protein points, high resolution and less cross band. The 2-DE technical system was successfully established in this study, which could be used for the separation of proteins in the future Nile tilapia muscle proteomics research.

Key words: *Oreochromis niloticus*; muscle protein; 2-DE; proteomics

Corresponding author: LI Laihao. E-mail: laihao.li@163.com

Funding projects: Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-49); National Science & Technology Pillar Program during the Twelfth Five-year Plan Period (2015BAK36B06, 2015BAD17B03); National Natural Science Foundation of China (31401563, 31271957); Fundamental Research Funds for Chinese Academy of Fishery Sciences (2015B06YQ01)