



技术主题

Technology Feature

用 SDS-PAGE 电泳分析 Bt 菌伴胞晶体蛋白组的方法

周燕^{1,2}, 黄飞燕^{1,2}, 李莉^{1,2}, 赵从²

✉ 通讯作者: Crystal.Z.Chow@gmail.com ✉ 作者

1 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学生命科学技术学院, 南宁, 广西, 中国

2 海南省热带农业资源研究所, 三亚, 海南, 中国

基因组学与生物技术, 2013 年, 第 2 卷, 第 3 篇 doi: 10.5376/gb.cn.2013.02.0003

本文首次以英文发表在 *Bioscience Methods*, 2013, Vol. 4, No.1 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

引用格式: Zhou, 2014, Protocol of SDS-PAGE for Proteomic Analysis of Bt Parasporal Crystals, *Bioscience Methods*, 2013, Vol. 4, No.1, 1-4 (doi: 10.5376/bm.2013.04.0001)

摘要 利用 SDS-PAGE 电泳技术能有效观察 Bt 菌株在芽孢形成期产生伴胞蛋白的蛋白组情况(proteomic profile), 是直接了解 Bt 菌伴胞蛋白特征、特性的有效方法。但是 SDS-PAGE 电泳技术操作较为复杂、实验结果易受试验条件、多种试验因素的影响。本文报告了用 SDS-PAGE 电泳技术获得理想实验结果的分析 Bt 伴胞蛋白谱的实验方法和技巧。案例研究证实本报告的实验方法获得的结果可靠、稳定、具有较好的可重复性。

关键词 *Bacillus thuringiensis*; SDS-PAGE 电泳; 伴胞晶体; 蛋白组

Protocol of SDS-PAGE for Proteomic Analysis of Bt Parasporal Crystals

Yan Zhou^{1,2}, Feiyan Huang^{1,2}, Li Li^{1,2}, Cong Zhao²

1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Life Science and Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, China

2. Hainan Tropical Agricultural Resources Institute, Sanya, Hainan, China

✉ Corresponding author, Crystal.Z.Chow@gmail.com; ✉ Authors

Abstract Proteomic profiling is recognized as an effective way to directly understand the characteristics of parasporal protein, and SDS-PAGE technique can be used effectively to observe the parasporal proteins (proteomic profile) in Bt strain. However, the manipulation of SDS-PAGE electrophoresis is complex, while the experimental results are susceptible to experimental conditions as well as some experimental factors. This paper presents an experimental protocol and techniques of SDS-PAGE that can be used to obtain good results for genomic analysis of insecticidal crystal proteins formed by Bt during sporulation. Case study confirmed that the results generated by this protocol are reliable, stable, and reproducible.

Keywords *Bacillus thuringiensis*; SDS-PAGE; Parasporal crystals; Proteome

引言

Bacillus thuringiensis, 简称 Bt, 是革兰氏阳性、芽孢形成菌, 其显著的特征是能在芽孢形成期产生使昆虫致死的伴胞晶体蛋白质。了解 Bt 菌在芽孢形成期产生的伴胞晶体蛋白组, 就可以了解该 Bt 菌可能产生伴胞蛋白的种类和数量以及遗传多样性。因此, SDS-PAGE 电泳技术成为 Bt 菌

伴胞晶体蛋白研究的最常用的方法之一, 也是分离制备伴胞晶体蛋白的技术手段。SDS-PAGE 电泳技术是基于不同的蛋白质由于电泳迁移率不同而被分离的一种实验技术, 常用于鉴定各种生物的蛋白质组分及分子量大小。实验结果易受试验条件、多种试验因素的影响。本文报告了用 SDS-PAGE 电泳技术获得理想实验结果的分析 Bt 伴胞蛋白谱的实验方法和技巧。

1 仪器设备及操作

本实验采用 BIO-RAD Mini-PROTEAN®

收稿日期: 2013 年 11 月 20 日

接受日期: 2013 年 12 月 15 日

发表日期: 2013 年 12 月 26 日

Tetra System 进行 SDS-PAGE 电泳(图 1), 该装置由美国 BIO-RAD 公司生产, 仪器使用步骤请参照 BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra System 说明书。

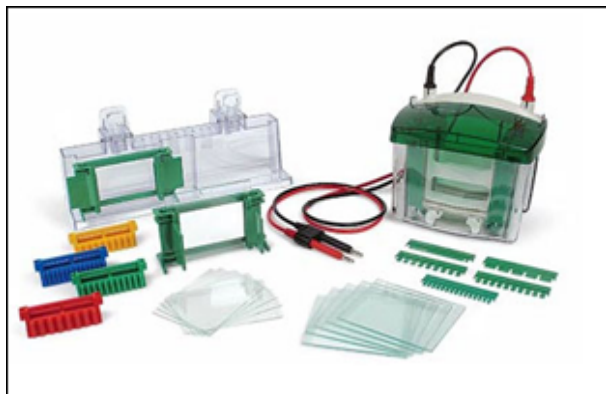


图 1 BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra 系统
Figure 1 BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra System

2 培养基、化学试剂及配置

本实验用的 4xTris.HCl/SDS pH8.8 缓冲液、40% (W/V) 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (29:1) 溶液、TEMED、4xTris.HCl/SDS pH6.8 缓冲液、Sangon 5xProtein Loading Dye 均购于上海生工生物工程有限公司, 无水乙醇、甘氨酸、SDS、Tirs 等购于国内各个生物试剂公司。

(1) LB 培养基: 每升水中: Tryptone: 10 g; Yeast extraction: 5 g; NaCl: 10 g; Agar (if desired): 15 g; 用 5 M NaOH 溶液调整培养基的 pH 值为 7.0, 然后高压灭菌(121°C, 20min)。

(2) NB 培养基: 每升水中: Peptone: 5 g; Beef extract: 3 g; NaCl: 5 g; Agar (if dsired): 15 g; 用 5 M NaOH 溶液调整培养基的 pH 值为 7.2, 然后高压灭菌(121°C, 20min)。

(3)过硫酸铵(Ammonium persulfate, APS): 称取 0.05 g APS 溶于 500 μ L milli-Q 超纯水中。

(4) 1×电泳缓冲液: Tris 3.03 g、甘氨酸 14.41 g、SDS 1 g、蒸馏水定容至 1 000 mL。

(5)考马斯亮蓝染色液: Milli-Q H₂O 450 mL, 乙醇 450 mL, 冰乙酸 100 mL, 考马斯亮蓝 R250 1 g。

(6)脱色液: 150 mL 冰乙酸与 850 mL 蒸馏水。

3 实验流程

3.1 准备样品

(1) LB 平板培养基上划线分离单菌落, 于 30°C 恒温培养 18 h。

(2) 用接种环挑取单菌落于 5 ml LB 培养基中, 28°C, 200 rpm/min 培养 12 h。

(3) 取 1 ml 菌液接种到含 200 ml NB 培养基的 500 ml 锥形瓶中, 28°C, 200 rpm/min, 摇床培养。

(4) 在 72h 的培养过程中, 每 4h 取 1mL 菌液, 置于 -20°C 保存待用。

3.2 蛋白提取

(1) 4°C, 12,000g, 离心 10 min 收集伴胞晶体和芽孢混合物(the spores and crystals)。

(2)沉淀用等体积冰冷的的 1 M 的 NaCl 洗涤 3 次。

(3)按照仪器操作, 超声波破碎细胞处理 20 min (model VC-130, Sonics and Materials Inc, USA)。

(4)最后溶于适量 5 mL 的 50 mM 的 NaCO₃ 溶液 (pH 10.0)中或者 ddH₂O 中。

(5)蛋白的浓度用 BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit 进行标定, 以 BSA 蛋白作为标准浓度蛋白, 具体操作按照产品说明书要求进行(Tiagen, Beijing, China)。

3.3 SDS-PAGE 电泳胶的制备

分离胶组成如表 1, 浓缩胶组成如表 2。电泳设备为 Bio-Rad Mini-PROTEAN® system, 玻璃板的装配按说明书进行, 每块 1.5 mm 厚度的凝胶需分离胶溶液 7.5 mL, 注入薄板之间后加入 300 μ L 无水乙醇封顶, 以使胶面平整。25°C 下静置 30 min, 倾去无水乙醇, 以滤纸条吸去残余的无水乙醇, 静置约 10 min 让乙醇完全挥发, 然后配制浓缩胶溶液。每块凝胶需 2 mL, 注入薄板间隔后立即插入梳子, 小心技巧的操作以防产生气泡, 静置 30 min 后, 以保鲜袋包裹制胶架, 25°C 下聚合 2 h 以上。凝胶完全、均匀的聚合, 有利于提高分辨率及减轻边缘效应。

表 1 分离胶组成

药品	9% Gel
Milli-Q H ₂ O	15.53 mL
4xTris.HCl/SDS, pH8.8 缓冲液	7.5 mL
40% (W/V)丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (29:1)溶液	6.75 mL
10%过硫酸铵(Ammonium persulfate, APS)	200 μ L
20 μ L TEMED	20 μ L

表 2 浓缩胶组成

药品	5% Gel
Milli-Q H ₂ O	5 mL
4xTris.HCl/SDS, pH6.8 缓冲液	2 mL
40% (W/V)丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (29:1)溶液	1 mL
10%过硫酸铵(Ammonium persulfate, APS)	60 μ L
20 μ L TEMED	6 μ L

注: 各组分要按顺序加入, 10%过硫酸铵需用现配, 配制量适用于 4 块凝胶的制备

Note: The dosage is for 4 pieces of gel; each component was added according to the order listed

3.4 电泳

(1) 4℃下溶解蛋白样品, 混匀后, 取 30 μ L, 100℃水浴 10 min, 冷却至室温。

(2) 12000×g 瞬时离心, 取 20 μ L 上样, 以 10 μ L Fermentas PageRuler™ Unstained Protein Ladder 为参照。

(3) 在电泳槽中加入 1× Tris-glycine-SDS 电泳缓冲液到达所需刻度。

(4) 25℃下采用恒压进行电泳, 先设定电压为 80V, 待溴酚蓝迁移出浓缩胶 (约 30 min), 且条带较平整时调整电压为 120 V, 直至溴酚蓝迁移至凝胶底端以上约 5 mm 处时停止电泳(约 90 min), 总电泳时间约 2 h。

3.5 染色

加入考马斯亮蓝 R250 染色液, 染色 30 min。

3.6 脱色

移去染液, 加入脱色液, 3 h 后更换脱色液, 9 h 后再更换一次, 继续脱色 12 h。

3.7 拍照

用 Bio-Rad Gel Doc™ XR+ System 进行图像采集, 使用凝胶图像分析软件 BandScan5.0 分析 ICPs 的表达量(Wang Xi, 2011)。

4 例证分析

本案例中, 我们以 Bt 分离株 S2096 在不同时间段蛋白的表达量为实验材料, SDS-PAGE 结果电泳分析 Bt 菌的晶体蛋白。经过菌株培养、蛋白提取、SDS-PAGE 电泳检测, 获得不同时间段蛋白的表达情况 (Xuanjun Fang, et al., 2013), 结果如图 2 所示, 图中为 S2096 几个不同时间段的蛋白表达结果, 由图示可知, S2096 菌株在 48h 时的蛋白表达量最大。

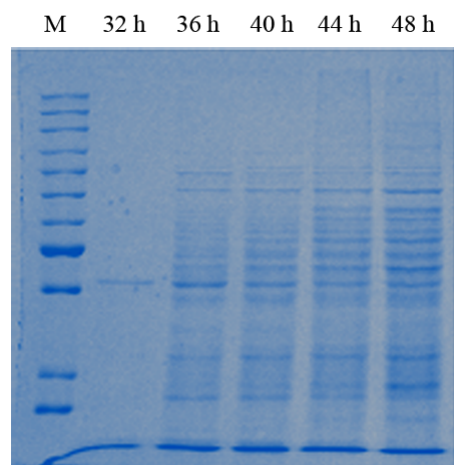


图 2 菌株 S2096 不同时期表达蛋白的 SDS 分析
注: M: Fermentas PageRuler™ 蛋白梯

Figure 2 SDS analysis of protein expression after different periods of S2096 strain

Note: M: Fermentas PageRuler™ Unstained Protein Ladder

5 注意事项

首先, 提取蛋白的过程中裂解要完全, 这样蛋白才能被完全释放。提取待观察的菌体的总蛋白是关键, 提取质量的好坏直接影响电泳的结果。

其次, 过硫酸胺需要现配现用, 它主要提供自由基, 在促凝剂 TEMED 的作用下催化丙烯酰胺的聚合。

另外, 加入浓缩胶时要缓慢均匀, 且不能有气泡, 要及时插入梳子, 还要防止浓缩胶飞溅及梳子插入有气泡。

最后, 染色和脱色环节也是相当重要的, 如果染色不够或是脱色不完全, 蛋白条带将会变得颜色浅且模糊。另一方面, 为了得到漂亮的图片, 我们尽量不要两端的孔道, 在拍照前一定要用蒸馏水将蛋白胶清洗干净, 使之无染色液存在, 这样拍照的背景颜色才会干净一致。

发表文献

Xuanjun Fang, Wang Xi, Wenfei Zhang, Liu Xie, 2013, Bt S2096-2, A *Bacillus thuringiensis* Strain with Highly Larvicidal Toxicity against Hookworm II Rhabditiform Larva (*Necator americanus*), Bt Research, 2013, Vol. 4, No. 4, doi: 10.5376/bt.2013.04.0004

致谢

这是 HITAR 实验室常用的用于 Bt 总蛋白分析的试验方法, 感谢 HITAR 允许将该方法公布。本工作是在广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室进行案例验证。在此表示感谢。

参考文献

- Wang X., The Megaplamid profiles of 30 Wild *Bacillus thuringiensis* Strains and their Toxic Activities of Crystalline Proteins against Hookworm (*Necator americanus*) [D]. Thesis for Master Degree, Guangxi University, Supervisor: Dr. X.J Fang
- Fang X.J., Wang X., Zhang W.F., and Xie L., Bt S2096-2, A *Bacillus thuringiensis* Strain with Highly Larvicidal Toxicity against Hookworm II Rhabditiform Larva (*Necator americanus*) [J]. Bt Research, 2013, 4(4): 21-23.