·研究简报·

对虾组织膜蛋白制备方法及其多肽组成

梁　艳[1,2,3]，黄　倢[1]，易志刚[1]，张培军[2]

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室，中国水产科学研究院 黄海水产研究所，山东 青岛 266071；2. 中国科学院 海洋研究所，实验海洋生物重点实验室，山东 青岛 266000；3. 中国科学院 研究生院，北京 100039)

摘要：选取凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的4种组织(鳃、血淋巴、肝胰腺、肌肉)，着重对膜蛋白的提取方法及其多肽组成进行分析。在对虾组织膜蛋白提取过程中，使用了5种蛋白酶抑制剂(苯甲基磺酰氟PMSF、胃酶抑制剂、亮抑酶肽、胰凝乳蛋白酶抑制剂、胰蛋白酶抑制剂)，以减少组织自身的酶将蛋白降解的可能。电镜观察，可见纯度较高的、细胞膜结构卷曲形成的小泡样、封闭的结构。使用Gel-Pro软件对提取产物的SDS-PAGE图谱分析，确定了这几种组织的特征多肽分子量分别为75.0 kD、70.5 kD、26.7 kD和71.2 kD。

关键词：凡纳滨对虾；膜蛋白；多肽组成

中图分类号：Q959.223　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1005－8737－(2005)03－0348－04

白斑综合征病毒(WSSV)是目前引起养殖对虾暴发性、大规模死亡的主要病毒之一。有研究证实该病毒与其宿主——对虾原代培养细胞间存在特异性的结合现象[1]，即在对虾细胞膜上存在病毒受体。找到在病毒入侵过程中起关键作用的病毒蛋白和位于对虾细胞膜上存在病毒受体，是阻断病毒侵染细胞途径，从而防止病害发生的有效手段。易志刚[2]等借助酶标显色系统，建立了评价WSSV黏附蛋白和对虾细胞膜受体蛋白活性的简单可靠的检测方法。该方法使用提取的对虾细胞膜作为实验材料，绕开了组织培养这一繁琐工作，而且进一步证实了WSSV与细胞膜间的结合是由病毒黏附蛋白与膜上受体蛋白的特异性相互作用所介导。梁艳等(另文待发)已经确认了4个位于病毒囊膜的黏附蛋白，为进一步阐明病毒与其受体间的相互作用机理奠定了基础。基于此，通过不同途径来寻找病毒吸附的抑制剂，或受体阻断剂使病毒病得到有效控制[3]，也是水产动物病害综合防治的一条有效途径。本研究对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)各组织膜蛋白的制备方法及其多肽组成进行初步分析，为进一步深入研究膜上受体与WSSV的特异性结合提供材料基础。

1　材料与方法

1.1　材料

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)购于青岛市南山水产市场，体长约8 cm，暂养1周，经核酸探针检测不带WSSV。

1.2　方法

1.2.1　膜组分的分离　方法参考文献[4－5]。选取10尾凡纳滨对虾，分为2组，每组5尾。以3.8%的柠檬酸钠做抗凝剂，用1 mL无菌注射器从对虾心室采取血淋巴，4 ℃下600 g离心10 min，收集沉淀的血细胞；用匀浆缓冲液悬起细胞沉淀，置于冰浴Dounce氏玻璃匀浆器中抽研10－20次，匀浆；匀浆液4 ℃下600 g离心10 min，弃沉淀中未破碎的细胞及细胞核；上清(含细胞膜、线粒体和细胞溶胶)4 ℃下8 000 g离心10 min，沉淀线粒体，弃沉淀；上清用角转头离心，4 ℃下100 000 g离心20 min，弃上清；小体积的缓冲液重悬沉淀，分装后保存于－75 ℃，蛋白浓度用Broadford法测定。

采集所需组织(鳃、肝胰腺、肌肉)。用4 ℃的匀浆缓冲液[250 mmol/L蔗糖，10 mmol/L HEPES(pH 7.4)，1 mmol/L EDTA，1 mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟)，5 μg/mL胃酶抑制剂，5 μg/mL亮抑酶肽，5 μg/mL胰凝乳蛋白酶抑制剂和5 μg/mL胰蛋白酶抑制剂，临用前加入各种抑制剂]冲洗各组织3～5次，再将组织块剪碎；用匀浆缓冲液漂洗组织碎块，并将其置于冰上；加入5倍(体积比)与组织块体积的缓冲液，置于冰浴Dounce氏玻璃匀浆器中抽研10～20次，匀浆组织；匀浆液4 ℃下600 g离心10 min，弃沉淀中未破碎的细胞及细胞

收稿日期：2004－08－13；**修订日期**：2004－10－27.
基金项目：国家重点基础研究规划项目(G1999012002)；国家自然科学基金资助项目(30271020)；山东省自然科学基金资助项目(Q2002D03－2－JZP－10).
作者简介：梁　艳(1976－)，女，博士生，从事对虾病害方面研究. E-mail:happiestyan@yahoo.com.cn
通讯作者：黄　倢. E-mail:aqudis@public.sd.cn
注：易志刚现在复旦大学上海医学院分子病毒室，博士研究生.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

核;上清(含细胞膜、线粒体和细胞溶胶)4 ℃下 8 000 g 离心 10 min,沉淀线粒体,弃沉淀;上清用角转头离心,4 ℃下 100 000 g离心 20 min,弃上清;小体积的缓冲液重悬沉淀,分装后保存于 -75 ℃,蛋白浓度用 Bradford 法测定。

1.2.2　SDS-PAGE　在 PROTEAN® II Xi 电泳槽(BIO-RAD)中不连续电泳。分离胶 T 为 12%(1.28 mL ddH_2O, 1.6 mL 30% Acr, 1.04 mL 1.5 mol/L TrisHCl(pH 8.8), 40 μL 10% SDS, 40 μL 10% APS, 1.6 μL TEMED);浓缩胶 T=5%(1.05 mL ddH_2O, 248 μL 30% Acr, 188 μL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 15 μL 10% SDS, 15 μL 10% APS, 1.5 μL TEMED);Tris 甘氨酸缓冲液(5 倍储液:25 mmol/L Tris, 250 mmol/L 甘氨酸, 0.1%SDS,使用前稀释);25 μL 样品与等体积上样液(2 倍 SDS 凝胶加样缓冲液:100 mmol/L pH 6.8 Tris, 200 mmol/L二硫苏糖醇,4% SDS, 0.2%溴酚蓝,20%甘油)混合后,100 ℃煮沸 3 min;60 V/120 V 电泳,考马斯亮蓝 R250(90 mL 甲醇,90 mL H_2O,10 mL 冰乙酸混匀后,溶解 0.25 g 考马斯亮蓝 R250,并过滤)染色 2 h;将染好后的胶置于脱色液(90 mL 甲醇,90 mL H_2O,10 mL 冰乙酸)中脱色至背景干净,条带清晰。

2　结果

2.1　膜蛋白

用电镜负染技术对细胞膜纯度及其结构进行鉴定,观察到由膜性结构卷曲形成的封闭小泡(图 1)布满视野。

用 Bradford 法测定提取产物中的膜蛋白含量,并对得率进行计算(表 1)。提取的鳃、血淋巴组织膜蛋白浓度较高,肝胰腺组织膜蛋白浓度较低。抽取的血淋巴中含有抗凝剂,无法计量体积,没有进行得率的计算,测得其蛋白浓度为 3.013 mg/mL。

2.2　膜蛋白提取物 SDS-PAGE 及其多肽

选取对虾的 4 种组织(鳃、血淋巴、肌肉、肝胰腺)提取细胞膜蛋白。经过 SDS-PAGE,各组织蛋白条带清晰可见(图 2),并可以了解其多肽组成的基本信息(表 2)。比较分析后得到以下特点:除肝胰腺外,其他组织均在 70 kD 附近有两条含量相对较大的条带;血淋巴和肌肉组织在分子量高于 97 kD 处有明显蛋白带,而其他组织中未见到;肌肉组织多达 8 条蛋白带密集在 37~45 kD 间,另有 5 条清晰条带位于 31~22 kD间;鳃膜蛋白有较多含量微弱条带没有统计在

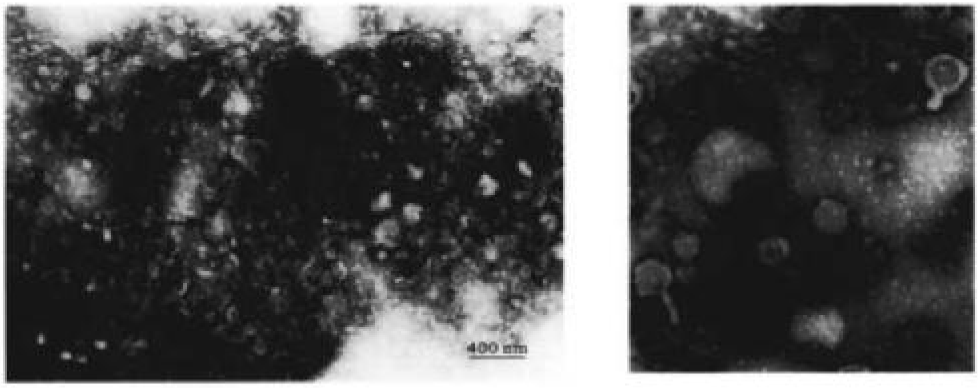

图 1　细胞膜提取物的负染电镜观察

(箭头所指为提取物中的封闭小泡结构)

Fig.1　Observation of cell membrane under TE

(Arrows indicate vesicles formed by membrane fragments)

表 1　对虾组织膜蛋白指标测定值

Tab.1　Observed indexes of membrane protein in *L. vannamei* tissue

组织 Tissue	重量/g Weight	膜提取物蛋白量/mg Quantity of membrane protein	得率/(mg·g⁻¹) Extraction rate	蛋白浓度/(mg·mL⁻¹) Concentration
鳃 Gill	1.032	0.895	0.867	2.237
肝胰腺 Hepatopancreas	1.713	0.167	0.039	0.167
肌肉 Muscle	1.086	0.309	0.285	0.772

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

内,但可见其多肽条带却是4种组织中最多的;肝胰腺膜蛋白有16条带,仅一条多肽分子量为60.7 kD,其他15条多肽分子量均小于43 kD;鳃、血淋巴和肌肉组织的膜蛋白的多肽条带有较多相似性,很多多肽在分子量上很相近,只是在含量上有差异。4种组织的特征多肽分子量分别为75.0 kD、70.5 kD、26.7 kD和71.2 kD。

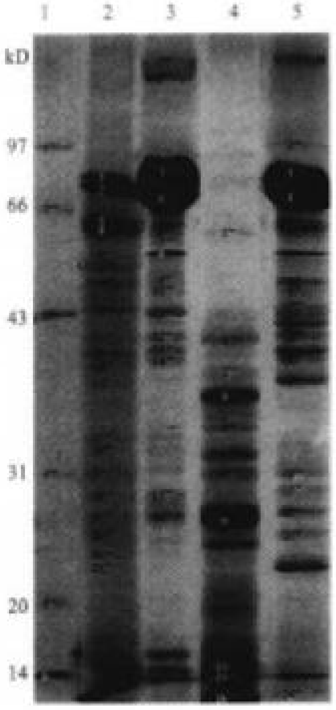

图2　粗提膜蛋白SDS-PAGE图谱

1:低分子量标准;2:鳃;3:血淋巴;4:肝胰腺;5:肌肉.

Gel-ProAnalyzer3.1软件分析中选取的明显多肽条带,如"+"所示

Fig.2　SDS-PAGE of membrane protein

1:Low molecular weight; 2:Gill; 3:Hemocyte; 4:Hepatopancreas; 5:Muscle.

"+" indicates the bands chosen by Gel-ProAnalyzer 3.1.

表2　4种组织膜蛋白多肽的分子量及含量(%)

Tab.2　Molecular weight and amount (%) of polypeptides from four tissues

条带 Band	鳃 Gill		血淋巴 Hemocyte		肝胰腺 Hepatopancreas		肌肉 Muscle	
	Mol. w.	Amount	Mol. w.	Amount	Mol. w.	Amount	Mol. w.	Amount
1	79.88	12.81	164.99	0.31	60.65	0.31	167.59	2.52
2	**75.03**	**22.35**	150.20	1.70	40.85	1.65	98.42	0.42
3	62.51	8.95	83.29	29.74	38.27	0.44	81.99	28.33
4	61.39	11.42	**70.48**	**47.35**	36.35	11.04	**71.22**	**33.28**
5	59.03	0.34	62.51	0.62	34.95	0.40	63.08	0.90
6	54.58	0.48	61.02	0.14	34.06	0.91	61.39	4.26
7	52.32	0.74	58.15	0.12	32.25	4.08	54.91	2.84
8	51.38	2.20	55.07	2.72	31.05	2.12	48.37	1.40
9	48.37	3.20	48.81	0.28	**26.74**	**22.86**	46.79	0.15
10	43.92	2.23	46.93	0.19	24.96	4.10	44.32	0.35
11	41.06	1.21	43.26	1.95	20.51	0.25	43.00	0.54
12	39.67	2.25	41.13	0.74	19.49	2.06	42.13	1.62
13	38.67	1.09	39.95	0.64	16.49	3.21	41.34	0.56
14	37.37	0.52	39.13	0.32	14.85	18.78	41.13	0.57
15	33.37	0.71	29.09	0.22	14.18	12.33	39.81	2.89
16	32.64	0.41	27.29	1.12	12.87	13.13	39.20	0.39
17	31.00	0.84	15.74	2.80			37.49	2.91
18	28.87	1.26	14.63	3.86			31.00	0.45
19	27.22	1.33	14.12	4.39			29.54	0.38
20	25.67	0.68					27.57	1.06
21	23.90	1.03					25.74	0.52
22	22.83	0.60					22.72	7.00
23	16.88	1.38					14.29	3.04
24	15.09	11.91					13.12	0.88
25	13.33	7.23						
Sum		97.37		99.18		97.67		97.26
In Lane		100.00		100.00		100.00		100.00

注:加黑数值为各组织膜蛋白中含量最高的多肽.

Note: The bold data show the highest amount of polypeptide per tissue.

3　讨论

关于对虾细胞膜蛋白的研究还有很多空白。本研究从提取方法入手,旨在使其相关研究能够深入下去。在膜蛋白的提取过程中遇到的最大问题就是细胞自身含有的多种酶系统对蛋白质的降解,而使细胞膜蛋白组分受到损失。为了使蛋白酶的活性减至最低,首先把分离缓冲液的pH调至中性,因为许多细胞蛋白酶只有在溶酶体的偏酸性pH环境中才具有最大的活性。其次考虑在整个实验过程中保持低温(4℃)以降低内源性蛋白酶的活性。最后,也是最为有效和重要的环节是蛋白酶抑制剂的使用,以减弱蛋白水解作用的发生[4]。本实验中使用了PMSF(丝氨酸蛋白酶蛋白酶抑制剂)、胃酶抑制剂(酸性蛋白酶抑制剂)、亮抑酶肽(巯基蛋白酶抑制剂)、胰凝乳蛋白酶抑制剂和胰蛋白酶抑制剂这一组合以防止目标蛋白的水解。透过电镜观察提取产物为细胞膜碎片卷曲形成的小泡样结构,与其在生理状态下由外层质膜包裹内层脂膜而形成闭合小泡的性质一致,证实本研究中的膜蛋白提取方法可行。为进一步研究对虾白斑综合症病毒与宿主对虾细胞间相互作用关系提供了理想的实验材料。

WSSV具有很高的侵染性和复制能力,可广泛感染对虾的皮下组织(包括甲壳下上皮、胃上皮、后肠上皮、鳃等)、造血组织、结缔组织、触角腺、血淋巴等组织细胞[8]。本研究选取的4种组织(鳃、血淋巴、肝胰腺和肌肉)中,鳃和血淋巴是WSSV的靶组织,肝胰腺和肌肉则对WSSV不敏感,不易受

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

到浸染。经过 SDS-PAGE 和软件 Gel-Pro Analyzer 3.1 的初步分析,发现鳃组织膜蛋白的多肽丰度高于其他三者,但有很多都是含量较低的弱带。由于鳃组织容易获取,又是 WSSV 的靶组织,制备的膜蛋白产量较高,是用于研究对虾与病毒间相互作用从而弄清病毒感染分子机理的理想选材。

参考文献:

[1] 梁　艳,宋晓玲,黄　倢,等.地高辛标记白斑综合症病毒(WSSV)及其与宿主细胞间结合现象观察[J].海洋与湖沼,2003("973"专辑):1-9.

[2] 易志刚,黄　倢,解飞霞,等.对虾白斑综合症病毒与虾鳃细胞膜特异性结合关系的确立[J].中国病毒学,2003,18(3):295-297.

[3] 陆春玲,黄　倢,李　赟.动物病毒受体阻断剂的研究进展[J].中国水产科学,2004,11(1):82-88.

[4] 马歇克 D R,门永 J T,布格斯 R R,等.蛋白质纯化与鉴定实验指南[M].北京:科学出版社,2000.198-199.

[5] SALAS-BENITO J S, Delangel R M. Identification of two surface protein from C6/36 cells that bind Dengue Type 4 Virus[J]. J Virol, 1997, 71(10): 7246-7252.

[6] 黄　倢,宋晓玲,于　佳,等.杆状病毒性的皮下及造血组织坏死—对虾暴发性流行病的病原和病理学[J].海洋水产研究,1995,16(1):1-10.

Preparation of shrimp cell membrane protein and its property

LIANG Yan[1,2,3], HUANG Jie[1], YI Zhi-gang[4], ZHANG Pei-jun[2]

(1. Key Opening Laboratory of Marine Sustainable Fishery Resources, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 4. Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Four kinds of tissues (gill, hemocyte, hepatopatopncreas and muscle) in *Litopenaeus vannamei* were used for the extraction of cell membrane protein. This study mainly focuses on the way to obtain membrane proteins and the composition analysis of their polypeptides. The materials were collected and homogenized under cold condition before centrifugation in grade. Five protein inhibitors (PMSF, pepstatin, leupeptin, chymostatin and trypsin inhibitor) were used in the preparation of shrimp cell membrane in order to minimize the tissue self-dissection. The close and vesicle-like structure caused by curly membrane was observed under electron microscope, which has high purity in the field. The polypeptides of these four tested tissues were analyzed by Gel-Pro Analyzer 3.1 after SDS-PAGE, and their characteristic polypeptides were 75.0 kD, 70.5 kD, 26.7 kD and 71.2 kD, respectively. The establishment of the preparation method for cell membrane protein and the results of the polypeptide composition analysis provided a reliable material for further study on the interaction between virus and its host shrimp cell.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; membrane protein; polypeptide composition

Corresponding author: HUANG Jie. E-mail: aqudis@public.sd.cn

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn