

虾夷扇贝性腺和闭壳肌蛋白质双向电泳分析

沈妍^{1,2}, 刘伟^{1,2}, 湛垚垚^{1,2}, 黄显雅^{1,2}, 穆琳琳¹, 徐蕾¹, 丁君^{1,2}, 常亚青^{1,2}

(1. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023; 2. 农业部北方海水增殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 本研究建立了虾夷扇贝性腺、闭壳肌蛋白质双向电泳体系, 比较分析了不同等电聚焦时间对虾夷扇贝性腺、闭壳肌蛋白质双向电泳结果的影响, 进一步利用该双向电泳系统分离了性腺和闭壳肌可溶性全蛋白, 并利用计算机图像分析软件对虾夷扇贝性腺和闭壳肌蛋白质双向电泳图谱进行了检测分析。实验结果表明, 采用细胞超声破碎-丙酮沉淀除盐-50 mmol/L Tris-HCl (pH6.8)复溶, 1000V, 3 h 等电聚焦, 12%SDS-PAGE 和高灵敏度银氨染色, 可获得分辨率较高、重复性良好的双向电泳图谱。通过PDQuest8.0 图像分析软件检测分析, 发现 pH5~8 条件下, 虾夷扇贝性腺和闭壳肌组织的蛋白质主要分布于 pH5~7, 相对分子质量 97~20.1 ku 范围, 性腺组织双向电泳图谱检出的蛋白质斑点数为 265 个, 闭壳肌组织检出 161 个蛋白质斑点。结果显示, 虾夷扇贝性腺、闭壳肌可溶性蛋白质表达谱各具特点, 性腺组织可溶性蛋白种类较闭壳肌组织丰富。本研究实验结果可为进一步研究扇贝蛋白质组学以及功能基因组学奠定一定的基础。

关键词: 虾夷扇贝; 性腺; 闭壳肌; 双向电泳; 电泳图谱分析

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)06-0010-07

doi: 10.11759/hyxx20120910001

虾夷扇贝属瓣鳃纲(Lamellibranchia)、珍珠贝目(Pterioidea)、(Suborder)亚目、扇贝科(Pectinidea), 学名 *Patinopecten (Mizuhopecten) yessoensis*(Jay), 属冷水性、滤食性双壳贝类, 原主要产于日本、俄罗斯千岛群岛南部水域、日本北海道及本州北部, 具有个体大、耐低温、抗逆性强等特性, 是世界最重要的养殖经济贝类之一, 也是目前我国北方沿海地区重要的经济养殖贝类^[1-2]。虾夷扇贝自 20 世纪 80 年代初引入中国以来, 我国学者针对该种相继开展了人工增殖^[3-5]、精子冷冻^[6]、遗传多样性^[7-9]、形态性状与重量性状间相关性^[10-11]、同工酶^[12]等多方面的研究工作, 但目前, 就虾夷扇贝各组织蛋白质表达的相关研究, 国内外尚鲜有报道。

蛋白质双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术是蛋白质组学研究的常用分离方法和核心技术^[13-14], 是当前用于分离组织、细胞蛋白质最有效的手段。蛋白质双向电泳的突出特点是灵敏度高, 能够全面了解被研究对象的蛋白表达谱, 发现蛋白质水平的细微变化。利用这一技术, 可以研究不同组织、不同条件下各种蛋白质的特异性或差异性表达。近年来, 随着蛋白质组学研究在海洋生物领域的不断深入, 双向电泳技术也逐渐被广泛应用于海胆^[15-20]、

海兔^[21-22]、西施舌^[23]、贻贝^[24-25]、对虾^[26-27]、牙鲆^[28-29]等海洋生物的各方面研究当中。本文旨在通过建立优化虾夷扇贝性腺和闭壳肌可溶性全蛋白双向电泳体系, 利用计算机图像分析软件对所得的蛋白质双向电泳图谱进行检测分析, 明确虾夷扇贝繁育性状(性腺)和经济性状(闭壳肌)蛋白的表达特点, 以期为进一步深入研究虾夷扇贝蛋白质组和功能基因组奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

实验用虾夷扇贝, 取自大连獐子岛养殖场, 8 只, 雌性, 1 龄半, 置冰盘上活体解剖, 分别取性腺和闭

收稿日期: 2013-10-08; 修回日期: 2014-03-23

基金项目: 海洋公益项目(2012 05031); 国家“863”计划项目(2012A-A10AA410); 国家“948”项目(2011 12G); 校博士启动基金项目(SYYJ2010002)

作者简介: 沈妍(1986-), 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种, 电话: 15942894467, E-mail: shenyan0218@hotmail.com; 常亚青, 通信作者, 博士, 教授, 从事海水养殖及水产动物遗传育种研究, 电话: 0411-84762691, E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

壳肌组织,称质量,-80℃冰箱保存备用。

1.1.2 实验试剂

超纯尿素(Urea)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、过硫酸铵(Ammol/Lonium Persulfate)、甘氨酸(Glycine)、四甲基乙二胺(Tetramethylenediamine, TEMED)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、Triton X-100、甘油(Glycerol)、丙烯酰胺(Acrylamide)、N, N'-甲叉双丙烯酰胺(N, N'-Methylene Bisacrylamide)购自北京索莱宝科技有限公司;载体两性电解质(pH3~10, pH5~8)为 Amersham Pharmacia 公司产品;SDS-PAGE 电泳缓冲液,二硫苏糖醇(DTT),相对低分子量蛋白质标准购自大连宝生物公司;其他试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 实验仪器

高压电泳仪,北京六一仪器厂;ISO-DALT 电泳槽及 MV II 型垂直板电泳槽,大连竞迈生物科技有限公司;Z36HK 型离心机,HERMLE Labor Technik GmbH;ELGA 超纯水仪, Purelab Ultra Genetic, 英国;79-2 磁力加热搅拌器,国华公司;低温恒温槽,上海精密科学仪器有限公司;微量进样器,宁波镇海三爱仪器厂;酶标仪,达科为生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 虾夷扇贝性腺、闭壳肌组织可溶性全蛋白提取

在冰盘上分别取虾夷扇贝性腺和闭壳肌,放入匀浆器中匀浆后进一步超声破碎裂解,工作时间 9s,间歇 5s,重复 20 次,8000 r/min,4℃,离心 20 min,取上清,加入 5 倍体积预冷丙酮过夜沉淀,8000 r/min,4℃,离心 30 min,弃上清,沉淀于低温冻干,复溶于 50 mmol/L Tris-HCL(pH6.8)缓冲液中,即为相应的可溶性全蛋白。分别取少量虾夷扇贝性腺和闭壳肌可溶性全蛋白溶液采用 Bradford 法测定蛋白质含量^[30],其余样品于-20℃冻存储备用。

1.2.2 载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦为第一向的双向电泳

取 30 μg 蛋白样品与等体积的 2×样品缓冲液^[30]混合,室温放置 1h。将 0.6 g 尿素,540 μL 超纯水,pH5~8 载体两性电解质 24 μL,pH3~10 载体两性电解质 4.8 μL,200 μL 30%丙烯酰胺溶液,轻缓混匀后依次加入 3 μL 10%过硫酸铵和 2 μL TEMED,轻轻混匀,快速吸取 80 μL 上述混合液,从专用玻璃管(直径 1 mm,长 8 cm)的一端缓慢均匀灌入,避免产生气泡,室温聚合。组装好 ISO-DALT 电泳槽,使用微量

进样器将处理好的样品液,缓缓注入玻璃管上端,使样品沉淀于胶面上,确定上槽与玻璃管之间无渗漏,倒入电泳缓冲液(阴极电泳缓冲液:20 mmol/L NaOH。阳极电泳缓冲液:10mmol/L H₃PO₄缓冲液),接通电源,4mA 进样后,分别进行 2, 3, 4 h, 1000 V 恒压等电聚焦。等电聚焦结束后,将胶条从玻璃管中挤出,在平衡缓冲液(5% β-巯基乙醇,62.5 mmol/L Tris-HCL (pH6.8),2.3%SDS,10%甘油)中平衡 30 min,后转到浓缩胶为 6%,分离胶为 12%的 SDS-PAGE 胶板上进行 30 mA 恒流电泳。

1.2.3 凝胶染色及图像分析

电泳所得到的凝胶按照文献[30]方法进行高灵敏度的银氨染色。染色后的凝胶用超纯水清洗 3 次,于惠普 CanoScan 图像扫描仪上进行扫描,凝胶蛋白质斑点检测采用 PDQuest 8.0 图像分析软件完成。

2 结果

2.1 不同等电聚焦时间对虾夷扇贝性腺、闭壳肌组织蛋白质 2-DE 的影响

图 1 和图 2 结果显示,等电聚焦 2 h(图 1A、图 2A)的双向电泳图谱,水平横纹较多,蛋白质斑点模糊不清且分散不完全,高相对分子质量蛋白质没有完全分离开(箭头表示);等电聚焦 3 h(图 1B、图 2B)的双向电泳图谱,水平横纹少,图像清晰,蛋白质斑点分散均匀且较清晰,高相对分子质量和低相对分子质量的蛋白质得到了较好的分离;等电聚焦 4 h(图 1C、图 2C)的双向电泳图谱,水平横纹虽比等电聚焦 2 h 的少,蛋白质斑点较等电聚焦 2 h 的清晰,但比较等电聚焦 3 h 的图谱而言,分散于 pH5~8 中段范围的蛋白质斑点丢失较多,在 pH5~8 中后段范围有蛋白质拖尾现象存在(箭头表示)。

2.2 虾夷扇贝性腺、闭壳肌组织蛋白质 2-DE 图谱分析结果

由图 3 可见,利用 PDQuest 2-DE Analysis Software 对虾夷扇贝性腺蛋白质双向电泳图谱进行分析,经过背景消减,点的编辑和匹配,发现在 pH5~8 范围内,性腺组织的蛋白质斑点有 265 个(图 3 B)。

图 4 显示,利用 PDQuest 2-DE Analysis Software 对虾夷扇贝闭壳肌蛋白质双向电泳图谱进行分析,经过背景消减,点的编辑和匹配,发现在 pH5~8 范围内,闭壳肌组织的蛋白质斑点有 161 个(图 4 B)。

图 5 结果显示,通过 2-DE 图谱蛋白质 MARKER

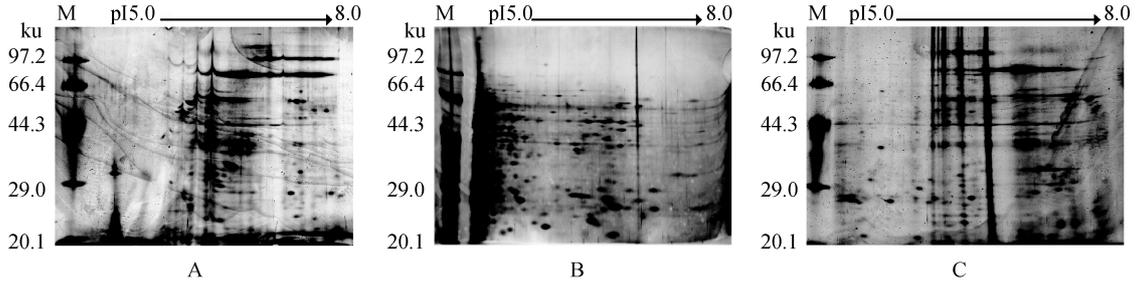


图 1 虾夷扇贝性腺可溶性蛋白不同等电聚焦时间双向电泳图谱

Fig.1 2-DE maps of *Patinopecten yessoensis* gonad total proteins by isoelectrofocusing
A. 2h; B. 3h; C. 4h

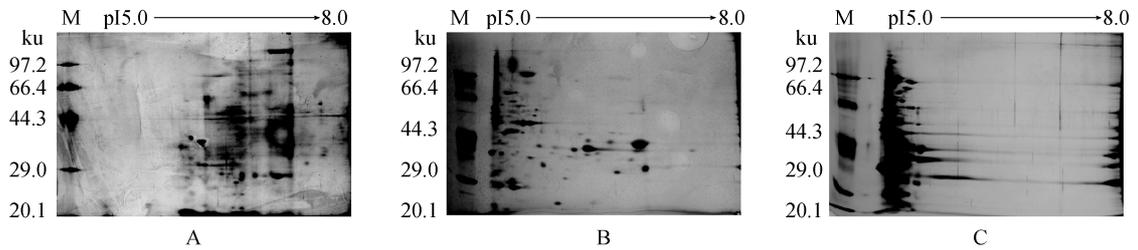


图 2 虾夷扇贝闭壳肌可溶性蛋白不同等电聚焦时间双向电泳图谱

Fig.2 2-DE maps of *Patinopecten yessoensis* muscle total proteins by isoelectrofocusing
A. 2h; B. 3h; C. 4h

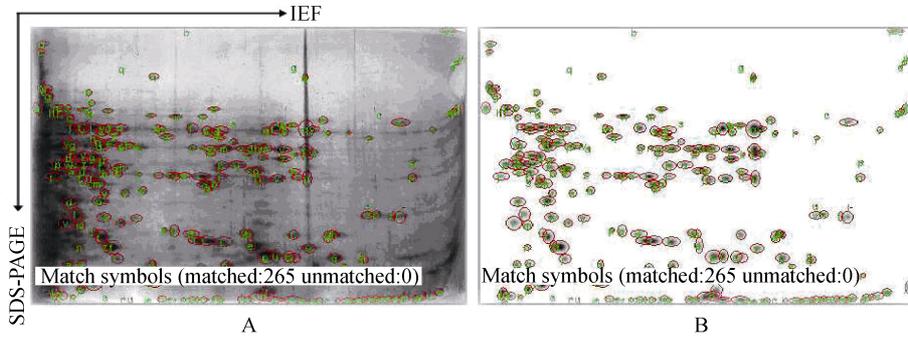


图 3 虾夷扇贝性腺蛋白质双向电泳 PDQuest 软件分析结果

Fig.3 PDQuest software analysis maps of *Patinopecten yessoensis* gonad total proteins
A. 原图; B. PDQuest 软件消减背景噪音后的模式图
A. raw image; B. model image

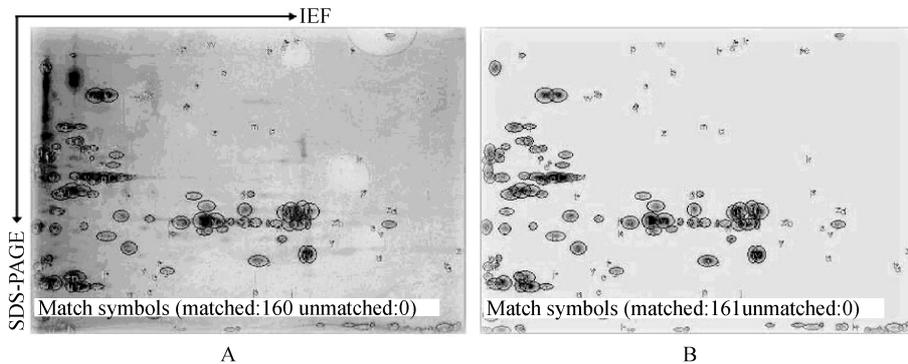


图 4 虾夷扇贝闭壳肌蛋白质双向电泳 PDQuest 软件分析结果

Fig.4 PDQuest software analysis maps of *Patinopecten yessoensis* muscle total proteins
A. 原图; B. PDQuest 消减背景噪音后模式图
A. raw image; B. model image

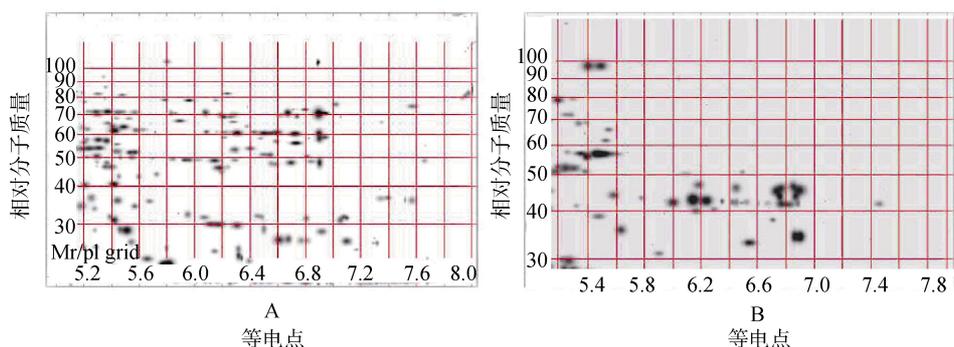


图5 虾夷扇贝性腺、闭壳肌蛋白质双向电泳 PDQuest 软件相对分子量/等电点估算分析图谱

Fig.5 PDQuest software analysis maps of *Patinopecten yessoensis* gonad and muscle total proteins with Mr/pI grid

A. 性腺; B. 闭壳肌

A. gonad; B. muscle

标定参考蛋白质斑点相对分子量,进一步利用 PDQuest 软件初步分析估算图谱中各蛋白质斑点的相对分子量及等电点(pI), 虾夷扇贝性腺组织蛋白质主要分布于 pI 5~7, 相对分子量 90~30 ku 范围内, 闭壳肌组织的蛋白质主要分布于 pI 5~6.8, 相对分子量 100~40 ku 范围内。

3 讨论

蛋白质双向电泳技术是当前蛋白质组研究中应用最广泛且具有良好的灵敏度的蛋白质分离技术, 利用双向电泳技术对虾夷扇贝组织蛋白质进行分离可以获得比其他蛋白质分离技术更为全面的信息, 有助于我们了解虾夷扇贝各组织蛋白质的特异性表达, 为今后深入研究虾夷扇贝蛋白质组和功能基因组奠定基础。

在蛋白质组研究中, 蛋白样品制备和胶条 pH 范围的选择是双向电泳技术的关键步骤, 是决定复杂蛋白质复合物能否被有效分离的关键, 可直接影响双向电泳图谱的质量以及对双向电泳图谱的图像分析。本实验采用混合取样方法以避免由于个体差异产生的蛋白表达差异, 通过细胞超声破碎方法在对虾夷扇贝性腺和闭壳肌组织细胞进行彻底破碎的同时也消除了细胞内的核酸污染, 再利用丙酮沉淀方法对虾夷扇贝性腺和闭壳肌组织蛋白提取液进行除盐处理, 以提升蛋白质样品质量。一般认为, 宽范围胶条(pH3~10, pH3~11)可用于确定样品蛋白质的分布, 窄范围和微小范围胶条可接受更高的上样量, 对目标蛋白进行更好的分离^[31]。本研究预实验发现, 在 pH3~10 范围内, 虾夷扇贝性腺和闭壳肌组织蛋白质斑点主要集中在胶条的中部位置, 两端的蛋白质

斑点分布较少, 中部位置的蛋白质斑点分辨率较低, 这与 Ong 等^[32]报道的生物体中大部分蛋白的等电点为 pH4~8 相一致, 因此, 为了提高大多数蛋白质的分辨率, 本研究采用 pH5~8 的胶条进行研究, 发现在 pH5~8 范围内, 虾夷扇贝性腺和闭壳肌组织蛋白质斑点分布呈均匀分布, 蛋白质斑点主要集中于在相对分子量 97~ 20.1 ku 范围内, 获得了有利于图像分析的蛋白质分辨率。

合理的等电聚焦时间是获得高重复性和高分辨率图谱的基础。聚焦时间过短则等电聚焦不完全, 无法有效分离蛋白质样品; 聚焦时间过长会使蛋白图谱变形, 造成部分蛋白质的丢失。本研究通过比较等电聚焦 2, 3, 4h 的蛋白质双向电泳图谱, 发现, 等电聚焦 2 h 的双向电泳图谱水平横纹较多, 分析其原因是等电聚焦不足, 其导致的直接结果体现在蛋白质图谱上为蛋白质斑点模糊不清且在相应 pH 范围内分散不完全; 等电聚焦 4 h(图 1C、图 2C)的双向电泳图谱, 虽然在水平横纹和蛋白质斑点清晰度上要优于等电聚焦 2 h, 但是, 蛋白图谱显示分散于 pH5~8 中段范围的蛋白质斑点丢失较多, 而且, 在 pH5~8 中后段范围有蛋白质拖尾现象存在, 这些现象都是由于等电聚焦过度造成的。理论上讲, 要获得最好的图谱质量和重复性所需最佳时间是等电聚焦分离达到稳定态所需的时间^[30], 本研究发现等电聚焦 3 h 的双向电泳图谱, 水平横纹少, 图像清晰, 蛋白质斑点分散均匀且较清晰, 高相对分子质量和低相对分子质量的蛋白质都具有很好的分离效果, 且获得的电泳图谱重复性较好, 因此判断, 3 h 等电聚焦为虾夷扇贝性腺和闭壳肌双向电泳的最佳等电聚焦时间。

SDS-PAGE 分离胶浓度和凝胶染色方法也是蛋

白质双向电泳系统建立的主要环节。本研究预实验发现,浓度为 10%的分离胶适于分离高相对分子质量的蛋白质,但会造成大部分低相对分子质量蛋白质的丢失,浓度为 15%的分离胶虽保证了低相对分子质量蛋白质的不丢失但却不能有效分离高相对分子质量蛋白质,而采用 12%浓度的分离胶,不但具有较大的分离范围而且能够兼顾高相对分子质量和低相对分子质量蛋白质的有效分离,这一结果与詹堃等人报道的泥蚶双向电泳体系建立使用的 SDS-PAGE 浓度上存在一定的一致性^[33]。此外,本研究采用的能够检测到 0.5~5ng 蛋白的以硫代硫酸钠为增敏剂的银染方法,较 Shi 等^[34]报道的高灵敏度银染方法,其最大优点在于,在保证高蛋白质检测灵敏度的同时能够进行后续的质谱检测鉴定。

计算机图像分析是蛋白质组学研究的重要手段,本研究通过 PDQuest 图像分析软件进行斑点自动检测,高斯模型分离重叠斑点以及图像噪声过滤分别以虾夷扇贝性腺和闭壳肌组织 2-DE 图谱建立 master gel,以 master gel 为模型分别对虾夷扇贝性腺和闭壳肌组织 2-DE 图谱进行消减斑点检测、匹配、量化,获得了虾夷扇贝性腺和闭壳肌组织蛋白质表达信息,结果显示在 pH5~8 范围内,虾夷扇贝性腺检出的蛋白质斑点数为 265 个,闭壳肌组织蛋白质斑点数为 161 个。通过 2-DE 图谱蛋白质 MARKER 标定参考蛋白质斑点相对分子质量,进一步利用 PDQuest 软件初步分析估算图谱中各蛋白质斑点的等电点(pI)及相对分子质量,发现,虾夷扇贝性腺组织蛋白质主要分布于 pI5~7,相对分子质量 90~30 ku 范围内,闭壳肌组织的蛋白质主要分布于 pI5~6.8,相对分子质量 100~40 ku 范围内。结果显示,虾夷扇贝性腺组织蛋白质种类较闭壳肌组织丰富,提示虾夷扇贝蛋白质表达存在显著的组织特异性,此外,由于本实验取材时间为 4 月末正值扇贝繁殖期,扇贝性腺发育正值高峰期,特异性蛋白质表达处于高水平状态,分析是造成性腺蛋白质种类明显多于闭壳肌组织的原因之一。

参考文献:

- [1] 常亚青. 贝类增养殖学[M].北京:中国农业出版社, 2007: 91.
- [2] 王庆成. 虾夷扇贝的引进及其在我国北方增养殖前景[J]. 水产科学, 1984, 3(4): 24-27.
- [3] 张福绥,何义朝,马江虎,等. 虾夷扇贝的引种、育苗及试养[J]. 海洋科学, 1984, 1(5): 38-45.
- [4] 常亚青,相建海,王子臣,等. 药物诱导虾夷扇贝四倍体的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(1): 105-112.
- [5] 曹学彬,张存善,王庆志,等. 虾夷扇贝野生苗与人工培育苗增养殖效果的比较[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(4): 264-267.
- [6] 杨爱国,王清印,孔杰,等. 扇贝精液超低温冷冻保存技术的研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 624-628.
- [7] 常亚青,陈晓霞,丁君,等. 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)5个群体的遗传多样性[J]. 生态学报, 2007, 27(3): 1145-1152.
- [8] 高悦勉,李国喜,赵银丽. 大连沿海虾夷扇贝养殖群体遗传结构的研究[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(2): 142-145.
- [9] 李春艳,丁君,常亚青,等. 虾夷扇贝微卫星标记的分离及其养殖群体的遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 39-45.
- [10] 常亚青,张存善,曹学彬,等. 1龄虾夷扇贝形态性状对重量性状的影响效果分析[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(5): 330-334.
- [11] 张存善,常亚青,曹学彬,等. 虾夷扇贝体形性状对软体重和闭壳肌重的影响效果分析[J]. 水产学报, 2009, 33(1): 87-93.
- [12] 孙秀俊,杨爱国,刘志鸿,等. 两种壳色虾夷扇贝的同工酶分析[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 54-60.
- [13] Görg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics[J]. Proteomics, 2004, 4: 3665-3685.
- [14] Quadroni M, James P. Proteomics and automation[J]. Electrophoresis, 1999, 20: 664-677.
- [15] Roux M M, Townley I K, Raisch M, et al. A functional genomic and proteomic perspective of sea urchin calcium signaling and egg activation[J]. Dev Biol., 2006, 300 (1): 416-433.
- [16] Roux M M, Radeke M J, Goel M, et al. 2DE identification of proteins exhibiting turnover and phosphorylation dynamics during sea urchin egg activation. Dev Biol, 2008, 313 (2): 630-647.
- [17] Sewell M A, Eriksen S, Middleditch M J. Identification of protein components from the mature ovary of the sea urchin *Evechinus chloroticus*(Echinodermata: Echino-

- idea) [J]. *Proteomics*, 2008, 8 (12): 2531-2542.
- [18] Mann K, Poustka A J, Mann M. In-depth, high-accuracy proteomics of sea urchin tooth organic matrix[J]. *Proteome Sci*, 2008, 6: 33.
- [19] Mann K, Poustka A J, Mann M. Phosphoproteomes of *Strongylocentrotus purpuratus* shell and tooth matrix: identification of a major acidic sea urchin tooth phosphoprotein, phosphodotin[J]. *Proteome Sci*, 2010, 8 (1): 6.
- [20] Dheilly N M, Nair S V, Smith L C, et al. Highly variable immune-response proteins (185/333) from the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*: proteomic analysis identifies diversity within and between individuals[J]. *J Immunol*, 2009, 182 (4): 2203-2212.
- [21] 李志丹, 包晓东, 黄慧英, 等. 优化海兔肝蛋白质组提取与分离技术[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2006, 45(增刊): 194-197.
- [22] 詹恠婕, 陆永进, 卓慧钦, 等. 优化提取与分离海兔大脑神经节蛋白质组[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2006, 45(增刊): 198-201.
- [23] 田美, 申欣, 程汉良, 等. 西施舌外套膜蛋白质组双向电泳体系的构建[J]. *海洋科学*, 2009, 33(11): 32-36.
- [24] Shepard J L, Olsson B, Tedengren M, et al. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress[J]. *Mar Environ Res*, 2000a, 50: 337-340.
- [25] Shepard J L, Bardely B P. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations[J]. *Mar Environ Res*, 2000b, 50: 457-463.
- [26] 秦兆宇, 刘师莲, 杨银荣, 等. 白斑综合征中国对虾肝胰腺蛋白质组学研究的技术探索[J]. *山东大学学报(理学版)*, 2007, 42(7): 1-5.
- [27] Huang C, Zhang X, Lin Q, et al. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(3): 223-231.
- [28] 那宏坤, 黄清育, 陈盈盈. 蛋白质组学技术筛选与鉴定在甲基对硫磷胁迫下牙鲆脑组织表达的差异蛋白质[J]. *色谱*, 2008, 26(6): 662-666.
- [29] 那宏坤, 黄清育, 黄河清. 差速离心结合蛋白质组学技术研究受镉盐胁迫后的牙鲆肝差异蛋白质[J]. *分析化学*, 2009, 37(7): 1019-1024.
- [30] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[J]. 第二版, 北京: 科学出版社, 2005: 66-157.
- [31] Langen H, Röder D. Separation of proteins from human embryonic kidney cells on narrow-range IPG strips[J]. *Life Science News(Amersham Biosciences)*, 2000, 4: 1-3.
- [32] Ong S E, Pandey A. An evaluation of the use of two dimensional gel electrophoresis in proteomics[J]. *Biomol Eng*, 2001, 18(5): 195-205.
- [33] 詹堃, 李太武, 苏秀榕. 泥蚶肌肉组织蛋白质双向电泳体系的建立[J]. *台湾海峡*, 2008, 27(3): 403-407.
- [34] Shi L, Berg S, Lee A, et al. The carboxy terminus of EmbC from mycobacterium smegmatis mediates chain length extension of the Arabinan in lipoarabinomannan[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(28): 19512-19526.

Establishment of two-dimensional electrophoresis system and analysis of two-dimensional electrophoresis map for gonad and muscle of scallop *Patinopecten yessoensis*

SHEN Yan^{1, 2}, LIU Wei^{1, 2}, ZHAN Yao-yao^{1, 2}, HUANG Xian-ya^{1, 2}, MU Lin-lin¹, XU Lei¹, DING Jun^{1, 2}, CHANG Ya-qing^{1, 2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian 116023, China)

Received: Oct., 8, 2013

Key words: *Patinopecten yessoensis*; gonad; muscle; two-dimensional electrophoresis; two-dimensional electrophoresis map analysis

Abstract: The carrier ampholytes pH gradient two-dimensional electrophoresis for proteins of gonad and muscle tissues of scallop *Patinopecten yessoensis* was established and optimized. The protein expression of gonad and muscle tissues was investigated by the established two-dimensional electrophoresis system with computer image analysis software. The total proteins of gonad and muscle were extracted with method of ultrasonication-acetone sedimentate-50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), and separated by 1000 volt 3-hour isoelectrofocusing and 12% SDS-PAGE. The maps of two-dimensional electrophoresis of gonad and muscle proteins were analyzed by PDQuest8.0 image analysis software. Results showed that gonad and muscle proteins were distributed mainly in pH range of 5~7 and molecular weight range of 97~20.1 ku. In pH 5~8, gonad and muscle proteins contained 265 and 161 protein spots, respectively. The results suggested that there is a significant tissue specific difference at protein level between gonad and muscle of scallop *P. yessoensis*, which might be useful for further proteomics and functional genomics studies on scallop *P. yessoensis*.

(本文编辑: 梁德海)