

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.05.004

桔小实蝇蛋白质双向电泳体系的建立及在口岸检疫中的运用前景分析^①

高雪萌^{1,2}, 夹福先², 魏冬², 王进军²

1. 温州出入境检验检疫局, 浙江温州 325027;

2. 西南大学植物保护学院昆虫学及害虫控制工程重庆市市级重点实验室, 重庆 400716

摘要: 通过蛋白样品、上样量、聚焦时间、重复性等多个方面的优化, 建立了桔小实蝇蛋白质双向电泳技术体系, 并分析了双向电泳技术在口岸检疫中的运用前景. 结果显示使用 bio-rad 公司的 Readyprep 2-D 净化试剂盒可以使图谱质量提高; 上样量采用 300 μg , 等电聚焦时间 60 000 VH 最佳, 可以用于后续的蛋白质组学研究. 而利用双向电泳技术对检疫性病虫害、医学媒介生物进行分类鉴定, 是一种准确性高、重复性好、不限制于样本形态的方法, 极大地扩充了生物的分类鉴定技术. 随着技术的进一步提高, 双向电泳将在口岸检疫性病虫害和医学媒介生物的鉴定中发挥更大的作用.

关键词: 桔小实蝇; 双向电泳; 蛋白质组学; 检验检疫; 分析

中图分类号: S436

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)05-0019-07

蛋白质组(Proteome)是由前人于 1994 年首次提出, 并定义为“由基因组所表达的全部蛋白质”^[1]. 目前, 蛋白质组学已成为现代生物技术的重要组成部分, 而分离高质量的蛋白质是开展蛋白质组学研究的基础. 迄今为止, 通常用于分离蛋白质的技术包括 SDS-PAGE、双向凝胶电泳、蛋白芯片技术等^[2]. 双向凝胶电泳(2-DE)是通过 2 次方向互相垂直的电泳, 将样品中的蛋白质按等电点(isoelectric point, pI)和相对分子质量(molecular weight, Mr)的不同呈点状分离^[3]. 2-DE 具有高分辨率和高通量等特点, 能同时对上千种蛋白质进行分离, 因而可能是分离蛋白质中应用得最多的技术^[4-5].

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel), 是中国、东南亚、印度次大陆和夏威夷群岛一带的危险性果蔬害虫. 国内分部地区主要有广东、广西、福建、海南、四川、台湾等省区. 该虫严重影响果实的产量和品质, 许多国家将其列为重点检疫对象^[6]. 关于桔小实蝇的双向电泳研究在国内却没有报道, 国际上也仅有 1 篇^[7]. 因此, 建立桔小实蝇双向电泳体系并针对其常见问题进行分析, 对开展桔小实蝇蛋白质组学的研究具有极其重要的意义.

由于双向电泳步骤繁琐, 影响因素多, 其中蛋白样品、聚焦时间、上样量和操作的规范性是影响双向电泳成功的关键因素^[8]. 本文就桔小实蝇双向电泳的主要条件进行了调整与优化, 对过程中存在的常见问题进行了归纳和汇总. 本研究建立的桔小实蝇双向电泳体系分辨率高、重复性好, 为后续桔小实蝇差异蛋白质组学研究奠定了坚实的基础.

① 收稿日期: 2014-03-27

基金项目: 农业部国家现代柑橘产业技术体系岗位科学家经费(CARS-27).

作者简介: 高雪萌(1990-), 男, 山西太原人, 硕士研究生, 主要从事昆虫分子生物学研究.

通信作者: 王进军, 教授, 博士研究生导师.

1 材料和方法

1.1 供试虫源

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) 于 2007 年采自海南, 在实验室使用人工饲料饲养多代. 饲养条件为温度 $(27 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ 、相对湿度 70%~80%、光照 14: 黑暗 10 h^[9].

1.2 主要试剂

尿素、硫脲、溴酚蓝、甘油、甘氨酸、Tris、低熔点琼脂糖、过硫酸胺、G-250、硫代硫酸钠、硝酸银、无水碳酸钠、EDTA 和其他常用试剂购自北京鼎国公司; CHAPS、DTT、Bio-Lyte、PMSF、SDS、1:29 聚丙烯酰胺贮液、IPG 干胶条(17 cm)、TEMED 购自美国 BIO-RAD 公司.

1.3 桔小实蝇蛋白的提取与定量

将 7 头桔小实蝇加入到液氮迅速冷冻, 研钵研磨至粉末. 称取一定粉末, 加入适量裂解液(每 10 mL 包含 4.805 g 尿素、1.52 g 硫脲、0.4 g CHAPS、0.009 g DTT、10 μL Bio-Lyte、0.0014 g PMSF), 继续匀浆. 充分裂解后, 15 000 r/min、4 $^\circ\text{C}$ 离心 60 min, 收集上清. 如需纯化则使用 bio-rad 公司 ReadyPrep 2-D 净化试剂盒按照说明书进行. $-80 ^\circ\text{C}$ 超低温冰箱保存备用. 根据 Bradford 的方法进行蛋白质质量分数的测定^[10].

1.4 双向电泳技术流程

1.4.1 第一向等电聚焦(IEF)

取适量的蛋白样品和水化上样液(每 10 mL 包含 4.805 g 尿素、0.4 g CHAPS、10 μL 1% 溴酚蓝贮液, 0.009 g DTT、5 μL Bio-Lyte), 加入水化盘. 将水化盘放进 PROTEINRR IEF 等电聚焦仪内, 17 $^\circ\text{C}$ 恒温水化 12 h. 结束后转移至聚焦盘并覆盖 3 mL 矿物油; 放入等电聚焦仪, 设置温度 17 $^\circ\text{C}$ 、保护电流 50 μA /根, 编辑聚焦程序(250 V 30 min, 线性; 1 000 V 1 h, 快速; 10 000 V 5 h, 线性; 10 000 V 到适宜的等电聚焦时间), 进行第一向等电聚焦电泳.

1.4.2 胶条平衡与转移

聚焦后用滤纸吸干胶条上的矿物油及多余样品并转移至水化盘中, 加入 6 mL 平衡缓冲液 I (每 100 mL 包含 36 g 尿素、4 g SDS、25 mL 1.5 mol/L Tris-HCl、30 mL 甘油、2 g DTT), 在 THZ-C 恒温振荡器中摇晃 15 min. 结束后将胶条移至水化槽, 加入 6 mL 平衡缓冲液 II (每 100 mL 包含 36 g 尿素、4 g SDS、25 mL 1.5 mol/L Tris-HCl、30 mL 甘油、2 g IAA), 在水平摇床上继续缓慢摇晃 15 min. 结束后, 转移至 SDS-PAGE 胶上进行第二向垂直电泳.

1.4.3 第二向垂直 SDS-PAGE 电泳

灌制 10% SDS-PAGE 胶, 待凝固后用 1 \times 电极缓冲液冲洗 SDS-PAGE 凝胶. 用 1 \times 电极缓冲液冲洗平衡结束的胶条. 向两玻璃板中间注入琼脂糖封胶液, 用压舌板轻推胶条, 使胶条和 SDS-PAGE 胶表面紧密结合. 放入一块吸附 Protein Marker 的滤纸片, 继续补充封胶液, 直到短玻璃板上边缘. 封胶液凝固后移至 PROTEIN II XL 大型蛋白质垂直电泳系统. 低电流(5 mA/gel)电泳, 等样品浓缩成一条线后, 再加大电流(20~30 mA/gel), 待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳; 电泳结束后, 轻轻撬开玻璃板取出凝胶开始染色.

1.4.4 染色

本实验采用在前人基础上改进的银染方法^[11-12]. 步骤为: 固定, 将胶放入固定液(25 mL $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, 100 mL $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 125 mL H_2O)中固定 30 min; 敏化, 将胶转移至敏化液(6 mL $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 0.5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 17 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, 165 mL H_2O)中敏化 30 min; 清水冲洗 3 次, 每次 5 min; 银染, 银染液(0.625 g AgNO_3 , 250 mL H_2O)中避光 20 min; 清洗 2 次, 每次 1 min; 显色, 显色液(6.25 g Na_2CO_3 , 100 μL CH_2O , 250 mL H_2O)显色 8 min; 终止显色, 终止液(3.65 g $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, 250 mL H_2O)中 10 min; 清洗 2 次, 每次 5 min.

1.5 凝胶成像及软件分析

本研究利用 ChemiDoc™ XRS+凝胶成像仪对图谱进行采集, 采用的是 PDQuest™ 双向电泳分析软件 8.0.1 版进行图谱分析。

2 结果和分析

2.1 蛋白质样品对双向电泳的影响

本实验采用了两种不同的方法提取桔小实蝇蛋白质. 结果发现, 纯化后的蛋白点有 475 个, 未纯化的蛋白点有 488 个, 经软件比对发现两者匹配率为 70.2%. 从图谱质量上看, 纯化后的样品图谱背景更加清晰, 酸碱两端横条纹明显减少, 蛋白点的分辨率更高, 高丰度蛋白的拖尾现象明显改善(图 1A-B). 液氮研磨高速离心后的蛋白样品经定量显示质量浓度在 $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以上. 但由于桔小实蝇组织成分复杂, 使用单纯的液氮研磨后高速离心的方法或许不能充分去除杂质, 而经过 bio-rad 公司 Readyprep 2-D 净化试剂盒处理后的样品, 蛋白质纯度高, 其中盐分、脂类、酚类物质可被有效去除, 净化后质量浓度在 $3.873 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以上. 两种蛋白样品的等电聚焦(IEF)电压均可升至规定电压(10 000 V).

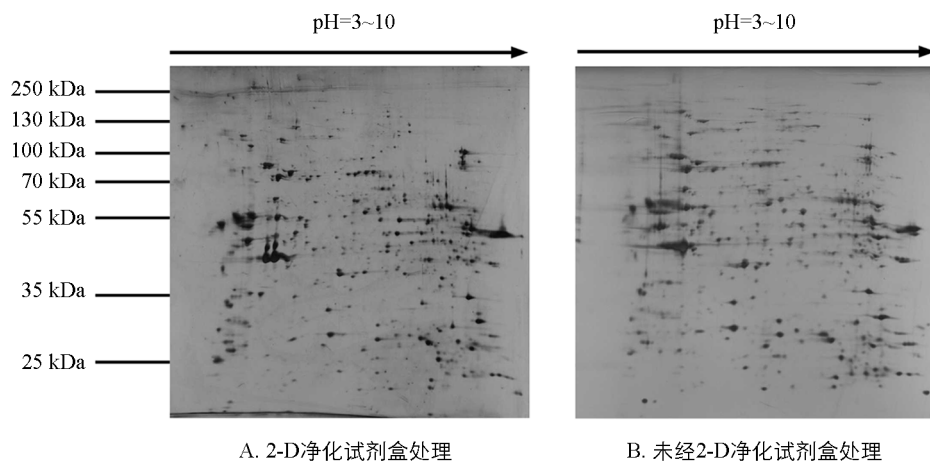


图 1 蛋白样品纯化前后双向电泳图谱的比较

2.2 不同上样量对双向电泳的影响

上样量的多少直接影响双向电泳的实验结果. 上样量过高会导致等电聚焦受到影响, 水平拖尾和蛋白点过饱和现象严重. 上样量过低则会导致蛋白点过少, 直接影响后续的分析. 已报道的不同物种、不同组织、不同发育阶段的上样量均不一致^[7,13-14], 而且目前关于桔小实蝇双向电泳的报导仅有国外的一篇, 更加难以确定合适的上样量. 所以, 深入探究桔小实蝇双向电泳的适宜上样量就显得尤为重要. 本研究利用 17cm pH=3~10 的 IPG 胶条, 选择了 400, 300 和 200 μg 共 3 种不同的上样量, 利用银染进行效果比对. 从图谱上看, 200 μg 和 300 μg 两种上样量的图谱质量明显优于 400 μg , 但 200 μg 上样量的图谱只能检测到 432 个点(图 2A), 上样量偏少, 而 300 μg 上样量的图谱可检测到 583 个点(图 2B). 400 μg 上样量的图谱虽然可检测到超过 500 个点, 但水平拖尾现象较严重(图 2C).

2.3 不同聚焦时间对双向电泳的影响

蛋白质在等电聚焦时到达各自等电点所需要的时间与电泳的伏·小时(Vh)数有关, 只有达到某数值以上时才能保证各蛋白质到达各自的等电点^[15]. 在已报道的文献中, 小麦吸浆虫蛋白采用 16 000 VH 进行聚焦^[16], 人表皮蛋白采用 20 000 VH 进行聚焦^[17], 舌苔蛋白采用 70 000 VH 聚焦^[18]. 根据样品不同, 双向电泳的等电聚焦时间存在较大差异. 过高的聚焦时间会造成图谱出现细密的横纹, 而不足的聚焦时间则会使横纹增多且蛋白点数偏少造成分析上的错误^[19]. 所以, 明确桔小实蝇蛋白合适的聚焦时间对优化其双向电泳有着十分重要的意义. 本研究设置了 4 组不同的聚焦时间, 分别为 50 000 VH, 60 000 VH, 70 000 VH 和 80 000 VH. 结果发现, 聚焦 50 000 VH 的图谱横纹明显增多且蛋白点数偏少(图 3A); 聚焦 60 000 VH

的图谱基本消除了横纹影响,可以得到较为理想的蛋白点(图 3B);聚焦 70 000 VH 的图谱酸碱两端横纹明显(图 3C);聚焦 80 000 VH 的图谱整体横纹十分严重(图 3D). 故 60 000 VH 应为最佳聚焦时间.

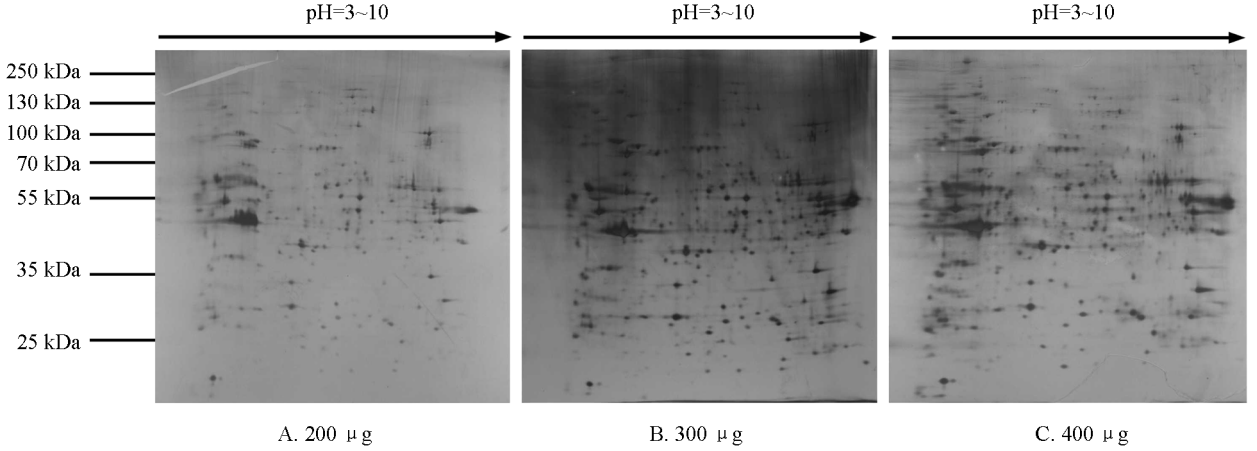


图 2 不同上样量的双向电泳图谱比较

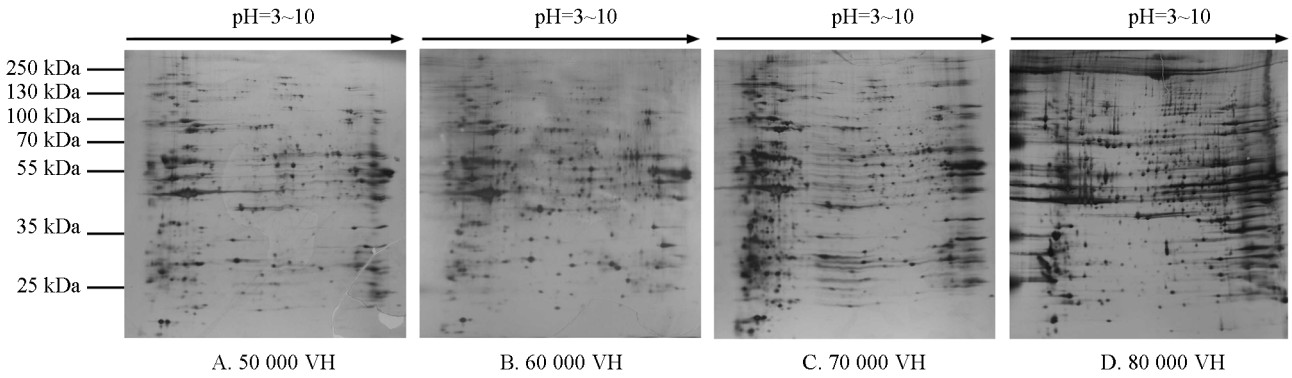
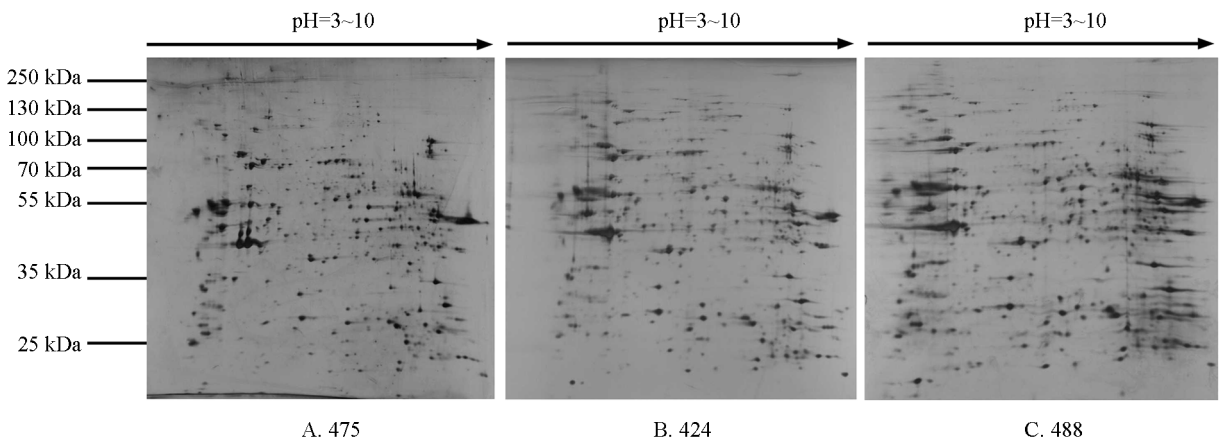


图 3 不同聚焦时间的双向电泳图谱比较

2.4 重复性

由于双向电泳易受到多重因素影响,其重复性往往成为制约双向电泳开展的重要因素,而良好的重复性又是开展蛋白质组学研究的基础,因此本实验对同一蛋白样品在相同条件下进行了 3 次重复,以检验本研究建立的双向电泳体系是否能达到较高的重复性. 结果发现,3 次重复检测到的蛋白质点分别为 475, 424 与 488 个(图 4A-C),图谱间匹配率为 73.8%,能够继续开展后续的蛋白质组学研究.



蛋白点数.

图 4 同一样品 3 次重复的双向电泳图谱比较

3 讨论

3.1 桔小实蝇双向电泳体系的建立

样品的制备是双向电泳成功的第一步, 亦是得到优质图谱的基础. 许多研究者都曾对样品的制备方法进行过研究. 许多研究者采用不同方法纯化蛋白质后, 均发现纯化后的蛋白样品杂质明显减少, 等电聚焦电压可正常升至规定电压, 图谱质量优于未纯化的蛋白图谱^[20]. 这与本实验所得的结果一致.

双向电泳技术经过多年的发展, 已经较为成熟, 但由于其复杂性、不稳定性等因素, 掌握它仍然比较困难^[21], 而且其上样量、等电聚焦时间是根据样品的不同而变化的. 本研究就桔小实蝇双向电泳合适的上样量和聚焦时间作了详细的探讨, 同时对双向电泳过程中经常出现的问题进行了归纳和分析. 银染对于上样量有着很高的要求, 上样量过低则会使蛋白点偏少, 而上样量过高则会造成图谱拖尾严重和高丰度蛋白过饱和现象; 对于等电聚焦时间的选择同样十分重要, 等电聚焦时间不足会使蛋白点不能有效聚集到相应的等电点, 造成蛋白点不足和弥散的横条纹, 而等电聚焦时间过长则会出现密集而清晰的横条纹. 经过研究发现, 桔小实蝇蛋白质双向电泳银染上样量在 300 μg , 聚焦时间在 60 000 VH 比较适宜, 能够得到蛋白点清晰、重复性较好的蛋白图谱. 本研究建立的桔小实蝇双向电泳体系重复性与其他物种双向电泳体系时的重复率相近^[22], 均在 70% 以上, 表明本研究建立的 2-DE 技术有较好的重复性, 可以用于后续蛋白组学研究开展.

3.2 双向电泳体系在口岸检验检疫中的运用前景

随着全球贸易规模的迅速扩大, 检疫性病虫害、媒介生物入侵形势越发严峻, 而鉴定与识别检疫性病虫害和医学媒介生物的种类是监测与控制检疫性病虫害和输入性疾病发生的基础, 是检疫、疾病预防与控制领域第一时间介入干预的关键, 亦是提供更加准确风险判断的依据. 近年来我国截获的检疫性病虫害、媒介生物种类繁多、数目巨大, 而迄今为止对所截获的生物大部分使用传统分类学方法鉴定.

随着科技的进步和口岸快速通关的要求, 传统的生物学鉴定方法渐现弱势: 一是耗时耗力, 每鉴定一个样品需要大量的时间和精力. 二是人力成本高, 培养一个能够对某属下生物进行鉴定的专业人员需要大量的时间、金钱. 三是传统鉴定限制于样本的发育阶段、性别和完整度. 这些都极大地制约了口岸检疫执法和快速通关效率. 上述这些问题均给口岸依靠形态特征的传统形态学鉴定带来了很大困难, 因而使用一种高效、便捷、准确、不限制于虫态的口岸生物鉴定新技术成为了迫切所需.

双向电泳以其高分辨率、简单、快速等优点在蛋白质组学研究领域得到普遍应用, 在生物鉴定方面也显示出了独特优势.

在昆虫鉴定方面, 李凯等^[23]利用双向电泳技术成功实现了对传统分类学方法较难鉴定的蝇类幼虫的鉴定, 通过对大头金蝇、棕尾别麻、肥须亚麻蝇和巨尾阿丽蝇初孵幼虫蛋白质组双向凝胶电泳和图象分析, 发现各种类间双向凝胶电泳图谱差异显著, 并对相应的等电点和相对分子质量进行聚类 and 判别分析, 表明建立合适的尸食性蝇类初孵幼虫的双向凝胶电泳图谱可用于鉴别形态学极易混淆的昆虫种类^[23]. Valenzuela 等^[24]利用蛋白质组学方法, 分离鉴定一些沙蝇 *Lutzomyia longipalpis* 唾液腺分泌蛋白, 其中有的与利氏曼原虫 *Leishmania chagasi* 寄生人体密切相关, 得出这些蛋白可以作为利氏曼原虫病的诊断标记和疫苗开发的结果.

在线虫鉴定方面, 罗茂春等^[25]运用双向电泳技术对形态学上极其相似的近似种拟松材线虫与松材线虫进行成功分析、鉴定了 45 个差异蛋白(其中松材线虫 22 个、拟松材线虫 23 个). 为松材线虫和拟松材线虫的准确鉴定提供新的技术支撑.

在病毒检测方面, 费建明等^[26]利用双向电泳技术对桑花叶型萎缩病类似类病毒的电泳条带进行比较分析, 对其小分子 RNA 病原物进行了成功分离和鉴定, 并以此作为病原物的分子标志物, 为生产上和检疫上的检测提供了方法和技术.

目前, 双向电泳在昆虫、植物、病毒等多个领域均成功开展了相关试验. 尽管双向电泳技术在样品制

备、电泳和蛋白质检测等方面仍然存在问题,开展实验所需成本仍然偏高,但仍是一种准确性高、重复性好、不限制于样本形态的方法,极大地扩充了生物的分类鉴定技术.相信随着该技术的进一步提高,双向电泳将在口岸检疫性病虫害和医学媒介生物的鉴定中发挥更大的作用.

参考文献:

- [1] PENNINGTON S R, WILKINS M R, HOCHSTRASSER D F, et al. Proteome Analysis: from Protein Characterization to Biological Function [J]. Trends in Cell Biology, 1997, 7(4): 168—173.
- [2] 于松,高庆荣,袁凯,等.小麦幼穗蛋白质双向电泳条件的优化[J].基因组学与应用生物学,2012,31(1): 84—89.
- [3] GÖRG A, WEISS W, DUNN CURRENT M J. Current Two-Dimensional Electrophoresis Technology for Proteomics [J]. Proteomics, 2004, 4(12): 3665—3685.
- [4] CHEVALIER F. Review Highlights on the Capacities of “Gel-based” Proteomics [J]. Proteome Science, 2010, 8(4): 1—10.
- [5] LARSEN M R, SØRENSEN G L, FEY S J, et al. Phospho-Proteomics: Evaluation of the Use of Enzymatic De-Phosphorylation and Differential Mass Spectrometric Peptide Mass Mapping for Site Specific Phosphorylation Assignment in Proteins Separated by Gel Electrophoresis [J]. Proteomics, 2001, 1(2): 223—238.
- [6] 梁广勤,梁帆,吴佳教,等.国外危险性实蝇传入应急对策模式研究[J].植物检疫,2002,16(3): 143—147.
- [7] JIN T, ZENG L, LU Y, et al. Identification of Resistance-Responsive Proteins in Larvae of *Bactrocera dorsalis* (Hendel), for Pyrethroid Toxicity by a Proteomic Approach [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2010, 96(1): 1—7.
- [8] 徐幼平,徐秋芳,蔡新忠.适于双向电泳分析的番茄叶片总蛋白提取方法的优化[J].浙江农业学报,2007,19(2): 71—74.
- [9] SHEN G M, JIANG H B, WANG X N, et al. Evaluation of Endogenous References for Gene Expression Profiling in Different Tissues of the Oriental Fruit Fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) [J]. BMC Molecular Biology, 2010, 11(1): 76.
- [10] BRADFORD M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72(9): 248—254.
- [11] SHEVCHENKO A, WILM M, VORM O, et al. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels [J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(5): 850—858.
- [12] YAN J X, WAIT R, BERKELMAN T, et al. A Modified Silver Staining Protocol for Visualization of Proteins Compatible with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization and Electrospray Ionization-Mass Spectrometry [J]. Electrophoresis, 2000, 21(17): 3666—3672.
- [13] COHEN D, RENES J, BOUWMAN F G, et al. Proteomic Analysis of Log to Stationary Growth Phase *Lactobacillus* *Olantharum* Cells and a 2-DE Database [J]. Proteomics, 2006, 6(24): 6485—6493.
- [14] SIMPSON R J, CONNOLLY L M, EDDES J S, et al. Proteomic Analysis of the Human Colon Carcinoma Cell Line (LIM 1215): Development of a Membrane Protein Database [J]. Electrophoresis, 2000, 21(9): 1707—1732.
- [15] GÖRG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, et al. Recent Developments in Two-Dimensional Gel Electrophoresis with Immobilized pH Gradients: Wide pH Gradients up to pH 12, Longer Separation Distances and Simplified Procedures [J]. From Genome to Proteome, 1999, 6(1): 132—137.
- [16] 成卫宁,李怡萍,杨杰,等.麦红吸浆虫滞育不同时期幼虫蛋白质双向电泳分析[J].植物保护学报,2010,37(1): 7—11.
- [17] 聂燕芳,曾耀英,刘钧澄,等.人表皮组织蛋白质组双向电泳技术的建立[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2007,28(6): 581—584.
- [18] 张晓丽,吴正治.舌苔蛋白质双向电泳技术的建立[J].中国中医药科技,2008,15(2): 84—85.
- [19] 陈欣虹,钱锟,卢占军,等.双向电泳分析鸡羽髓蛋白组学方法的建立[J].中国动物传染病学报,2009,17(4): 82—88.
- [20] 陈波,唐滔,郑建伟,等.胆汁双向电泳差异分析样本纯化制备方法的建立[J].外科理论与实践,2007,12(5):

468—471.

- [21] GIANAZZA E, ROCCO A G, MARCHETTO A, et al. IPG with Electrode Plateaus (and Other Unusual Procedures for 2-DE) [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28(16): 2953—2956.
- [22] 徐永杰, 熊远著. 猪肌肉组织双向电泳分离条件的建立及常见问题分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(1): 105—112.
- [23] 李 凯, 叶恭银, 胡 萃. 双向凝胶电泳图谱用于常见尸食性蝇类初孵幼虫的鉴别 [J]. *昆虫学报*, 2005, 48(4): 576—581.
- [24] VALENZUELA J G, GARFIELD M, ROWTON E D, et al. Identification of the Most Abundant Secreted Proteins from the Salivary Glands of the Sand Fly *Lutzomyia Longipalpis*, Vector of *Leishmania Chagasi* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2004, 207(21): 3717—3729.
- [25] 罗茂春, 刘 颖, 林静雯, 等. 双向电泳联用质谱技术研究松材线虫和拟松材线虫的差异蛋白 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(25): 32—36.
- [26] 费建明, 白锡川, 于 峰, 等. 分子生物技术检测桑花叶型萎缩病原 [J]. *浙江农业学报*, 2007, 19(2): 115—118.

The Establishment of Two-dimensional Electrophoresis System of *Bactrocera Dorsalis* and Its Application Prospect Analysis on Port Quarantine

GAO Xue-meng^{1,2}, JIA Fu-xian², WEI Dong², WANG Jin-jun²

1. Wenzhou Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. C, Wenzhou Zhejiang 325027, China;

2. Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: With the aim of establishing 2-DE methods for *Bactrocera dorsalis* proteome, we set several experiments to explore the appropriate conditions. The fittest conditions include the protein sample, loading quality, time for IEF and the repeatability were researched. Moreover, we analyzed the differentially expressed proteins after cypermethrin induced. The result showed the 2-DE maps is better after using Ready-prep 2-D Cleanup Kit; the fittest loading quality is 300 μg ; the fittest time for IEF is 60 000VH. We believe that 2-DE methods have the advantage in identifying the quarantine organism and medical vector.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; Two-dimensional electrophoresis; Proteomics; quarantine; analyze

责任编辑 夏 娟

