

文章编号: 1674-7054(2017)02-0225-07

不同方法提取珊瑚总蛋白质的比较

程华民 杨婷寒 项楠 赵洪伟 周海龙 刁晓平

(海南大学 热带农林学院/海口市环境毒理学重点实验室, 海口 570228)

摘要: 以海南省近岸海域的鼻形鹿角珊瑚(*Acropora nasuta*)和箭排孔珊瑚(*Seriatopora hystrix*) 2种硬珊瑚为研究对象, 比较了 TRIzol 试剂提取法和 BP-酚提取法在珊瑚蛋白质提取量、双向蛋白点数量和分布上的差异。结果表明, BP-酚抽提法的蛋白质得率相对较高。通过 1-DE 及 2-DE 电泳比较分析发现 2 种方法获得的蛋白样品存在较大差异。BP-酚抽提法能够获得更多蛋白条带和点数, 并且具有较少的拖尾现象。在低相对分子质量蛋白的提取方面, TRIzol 试剂提取法具有优势; 在高相对分子质量的提取方面, BP-酚抽法具有明显优势。研究结果有望为硬珊瑚的蛋白质组学研究奠定一定的基础。

关键词: 硬珊瑚; 蛋白质组; 蛋白提取方法; 1DE; 2DE

中图分类号: Q 959.135.3

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.02.017

在海洋生态系统中, 珊瑚礁生态系统具有极高的生物多样性, 被誉为“蓝色沙漠中的绿洲”、“海洋中的热带雨林”, 为人类提供源源不断的高蛋白食物和丰厚的经济收入^[1]。近几十年来, 由于全球气候和环境变化, 世界范围内发生了珊瑚白化死亡现象^[2-3], 如 1997—1998 年的大规模珊瑚礁白化现象极有可能在未来 20 年里频繁发生。这将严重威胁到珊瑚礁生态系统和海洋经济鱼类的种群数量, 导致生态类型转变, 引起珊瑚礁生态系统发展的不平衡, 给人类带来危害。据不完全统计, 仅 1998 年珊瑚白化就导致 1999 年旅游业损失达 5 454 万美元, 并危及近 5 亿海岸人民的主要食物和经济来源^[4]。珊瑚白化是一种生态现象, 影响珊瑚白化的关键因素主要有海水温度的异常(过高或过低)、太阳辐射与紫外线辐射、海水盐度的偏离、珊瑚疾病、海洋污染、长棘海星的爆发以及人类的过渡渔业和全球 CO₂ 浓度升高等。其中, 海洋表面水体温度的异常升高是导致珊瑚白化的主要因素^[5-7], 约 1/3 的珊瑚物种因为全球变暖而处于灭绝的边缘^[8]。近年来, 珊瑚礁的保护与修复在国际上受到重视, 但珊瑚礁的破坏依旧严重。过去对造礁石珊瑚白化的研究主要集中在对共生虫黄藻细胞及其生理变化的描述上^[9-10], 而近年来, 随着分子生物学技术在造礁石珊瑚研究中的应用, 越来越多的学者开始从珊瑚细胞本身的角度来研究^[11-12], 其中, 蛋白质组学技术在国际学术范围内正越来越受到关注。Hédouin 等^[13]提出通过蛋白质组分子标记评价珊瑚礁健康的方法, 为珊瑚的生态学变化及鉴定提供了新的研究方向和技术手段; Drake 等^[14]和 Weston 等^[15]均运用蛋白质组学技术分别报道了在萼形柱珊瑚中 36 种骨骼蛋白在胁迫作用下与钙信号转导及氧化还原状态之间的关系。这些文献报道对珊瑚蛋白质组学研究具有重要的参考价值。优质蛋白样品的获取是蛋白质组学研究的重要前提条件, 坚硬的骨骼是硬珊瑚生物体的主要构成成分, 对总蛋白的提取有一定的干扰。因此, 选择一个适合的蛋白提取方法是珊瑚蛋白质组学的先决条件。笔者以海南省近岸海域的鼻形鹿角珊瑚(*Acropora nasuta*)和箭排孔珊瑚(*Seriatopora hystrix*) 2种硬珊瑚为研究对象, 利用 TRIzol 试剂提取法和 BP-酚提取法提取珊瑚蛋白质, 比较了 2 种方法在蛋白提取量、双向蛋白点数量和分

收稿日期: 2016-12-23

修回日期: 2017-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560165); 海南省国际合作项目(KJHZ2015-11); 海南省自然科学基金(417053)

作者简介: 程华民(1990-), 男, 海南大学热带农林学院 2014 级硕士研究生, E-mail: 1119091826@qq.com

通信作者: 刁晓平(1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 海洋生态毒理学, E-mail: diaoxip@hainu.edu.cn

布上的差异,以期筛选出最佳的提取方法,为开展珊瑚蛋白质组学研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料 鼻形鹿角珊瑚(*Acropora nasuta*) 箭排孔珊瑚(*Seriatopora hystrix*) 均采自海南周边海域。海水泡养带回实验室, -80°C 冷冻保存。

1.2 试剂与仪器 尿素(Urea)、硫脲(Thiourea)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙硫酸(CHAPS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、硫酸铵、考马斯亮蓝 G-250 购自 Sigma(St. Louis, MO, USA); 24 cm IPG 胶条(pH4~7)和琼脂糖购自 GE Healthcare(Uppsala, Sweden); 丙烯酰胺(Acr)、甲叉双丙烯酰胺(Bis)和交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP) 购自 Bio-Rad(Richmond, CA, USA); TRIS、Triton X-100、 β -巯基乙醇、TEMED 购自 Ameresco(USA); TRIzol(Invitrogen, USA); 紫外分光光度计(UV-2000, USA), Ettan IPGphorII 等电聚焦仪(GE Healthcare); Ettan Dalt six 电泳仪(GE Healthcare); Image Scanner III 扫描仪(GE Healthcare)。

1.3 TRIzol 试剂提取法 采用 TRIzol 试剂法^[16]并加以改进提取蛋白。分别称取 2 种质量约 5 g 的不同分枝珊瑚组织于干净并预冷的研钵中,用液氮充分研磨至粉末,迅速装入干净无菌离心管, -80°C 冰箱中保存待用。分别称取 2 种已研磨好的珊瑚样品粉末各 1 g 于 10 mL 离心管中,重复 3 次。每管加入 1.5 mL TRIzol 试剂。涡旋振荡 10 min,冰上静置 5 min 后在 4°C 条件下, $13\,000\text{ g}$ 离心 10 min,取上清至新的 2 mL 离心管,加入 200 μL 氯仿,剧烈振荡 3 min,室温静置 3 min 后, 4°C $13\,000\text{ g}$ 离心 15 min,弃上清,留下中下层,加入 300 μL 乙醇,涡旋混匀即可,室温静置 3 min,在 4°C 条件下, $2\,000\text{ g}$ 离心 5 min。转移上清到新的 10 mL 离心管,每管加入 1.5 mL 异丙醇,稍微混匀即可,放置 -20°C 下冷冻约 3 h。取出, $13\,000\text{ g}$ 4°C 条件下离心 15 min,小心去除上清液,收集沉淀。沉淀用甲醇洗涤 2 次,丙酮洗涤 2 次,室温干燥后溶解于蛋白裂解液($7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲, 2% CHAPS, $13\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT) 中, -80°C 下分装保存备用。

1.4 BP-酚抽提法 采用改进的 BP-酚抽提法(borax/phenol)进行蛋白质提取^[17]。分别称取 5 g 左右的 2 种不同分枝珊瑚组织于干净并预冷的研钵中,用液氮充分研磨至粉末,迅速装入干净无菌离心管, -80°C 冰箱中保存待用。分别称取 2 种已研磨好的珊瑚样品粉末各 1 g 于 10 mL 离心管中,加入含有 3 mL BP 缓冲液(硼砂 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 维生素 C $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1% Triton-100, 2% β -巯基乙醇和 30% 蔗糖, pH 8.0),重复 3 次。在室温下涡旋混匀 10 min,再加入 2 mL Tris 饱和酚(pH ≥ 7.8),室温涡旋 10 min,在 4°C 条件下, $15\,000\times\text{g}$ 离心 15 min。转移上层酚相至另一新的 10 mL 离心管,加入等体积 BP 蛋白提取液,室温涡旋 5 min,在 4°C 条件下, $15\,000\times\text{g}$ 离心 15 min。吸取上层清液转入另一离心管,加入 5 mL 冰冷的过饱和硫酸铵甲醇溶液,混匀后在 -20°C 下沉淀过夜。再取出后在 4°C 条件下, $15\,000\times\text{g}$ 离心 15 min,小心去除上清液,收集沉淀。沉淀用甲醇洗涤 2 次,丙酮洗涤 2 次,室温干燥后溶解于蛋白裂解液($7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲, 2% CHAPS, $13\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT) 中, -80°C 分装保存备用。

1.5 蛋白样品浓度测定 蛋白质定量主要参考 Bradford 方法^[18],在紫外分光光度计上进行蛋白浓度测定,用牛血清蛋白(BSA)作为标准蛋白,测定样品在紫外光波长 595 nm 处的吸光值,每个样品重复 3 次,计算样品蛋白浓度并统计不同方法提取的蛋白得率。

1.6 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳 单向凝胶电泳(1-DE): 1-DE 主要采用不连续胶 SDS-PAGE 法,用 4% 浓缩胶和 12.5% 分离胶进行电泳分离。每个泳道蛋白量均为 35 μg 。

双向凝胶电泳(2-DE): 使用 24 cm 的 pH4~7 线性 IPG(GE Healthcare) 干胶条,每根胶条上样量为 1 300 μg 蛋白,上样体积 455 μL ,常温水化 18 h 后,第 1 向等电点聚焦在 Ettan IPGphorII 等电聚焦仪(GE Healthcare) 上完成。第 2 向电泳于 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE) 中,在 Ettan Dalt six 电泳仪(GE Healthcare) 下进行。

1.7 凝胶染色及图像采集分析 凝胶染色主要采用考马斯亮蓝(G-250) 染色液进行染色^[19]。脱色干净的凝胶采用 Image Scanner III 扫描仪(GE Healthcare) 进行扫描,用 ImageMaster 2D Platinum 软件(Amersham Bioscience) 图像分析。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法获得的蛋白得率及一维 SDS-PAGE 电泳单向条带比较分析 如图 1 所示,采用 TRIZOL 试剂提取法,鼻形鹿角珊瑚蛋白得率可达 $2.56 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,箭排孔珊瑚蛋白得率可达 $1.77 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,采用 BP-酚抽提法,鼻形鹿角珊瑚蛋白得率可达 $3.76 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,箭排孔珊瑚蛋白得率可达 $1.96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。可见,在 2 种珊瑚得率中,BP-酚抽提法得率高于 TRIZOL 试剂提取法。

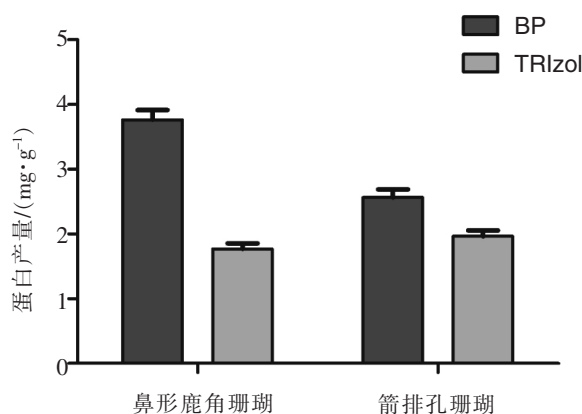


图 1 2 种珊瑚的不同提取方法的总蛋白产量比较
Fig. 1 Total protein yield of two corals extracted by using two extraction methods

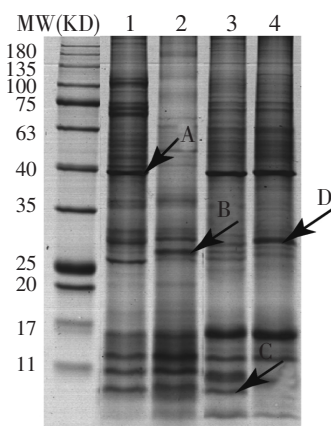


图 2 2 种珊瑚的不同提取方法的 1-DE 电泳图

MW 为标准蛋白 Marker

A:鼻形鹿角珊瑚中 BP-酚抽提法得到的特异条带

B:鼻形鹿角珊瑚中 Trizol 试剂法得到的特异条带

C:箭排孔珊瑚中 BP-酚抽提法得到的特异条带

D:箭排孔珊瑚中 Trizol 试剂法得到的特异条带

Fig.2 1-DE map of two corals by using two extraction methods

MW: standard protein marker

A:Special band obtained from Bp-phenol extraction in *Acropora nasuta*

B:Special band obtained from Trizol reagent extraction in *Acropora nasuta*

C:Special band obtained from Bp-phenol extraction in *Seriatopora hystrix*

D:Special band obtained from Trizol reagent extraction in *Seriatopora hystrix*

利用 2 种方法提取所得总蛋白一维 SDS-PAGE 电泳条带见图 2。条带 1 2 分别是鼻形鹿角珊瑚的 BP-酚抽提法和 TRIZOL 试剂提取法单向条带,条带 3 4 分别是箭排孔珊瑚的 BP-酚抽提法和 TRIZOL 试剂提取法单向条带。结果表明,在鼻形鹿角珊瑚中,相同上样量的蛋白样品,TRIZOL 试剂提取法跑出的条带数目少,但 2 种方法各自显示了特异条带,如图中箭头 A 和 B。同时笔者观察到 TRIZOL 试剂法提取的大分子量蛋白较少,低分子量蛋白偏多。在箭排孔珊瑚中 2 种方法也各自显示了特异条带,如图中箭头 C 和 D。整体上 2 种方法的一维电泳条带还是比较清晰的,说明电泳参数设置以及胶浓度配制等较为适宜。以上结果初步说明 2 种不同方法提取的蛋白不完全相同,不同方法会减少某些蛋白的提取甚至会丢失某些蛋白,因此,需要根据样品特点和实验需要来选取适合材料的蛋白提取方法,同时,二维电泳图谱的比较在选取方法中显得更为重要。

2.2 2 种珊瑚蛋白的 2-DE 分析 如图 3 所示, A B 分别是鼻形鹿角珊瑚的 BP-酚抽提法和 TRIZOL 试剂双向图谱, C D 分别为箭排孔珊瑚的 BP-酚抽提法和 TRIZOL 试剂法双向图谱,直观上可见 BP-酚抽提法得到的样品蛋白点均在 2-DE 图谱上最清晰,纵横向拖尾较 TRIZOL 试剂法少。通过软件分析得出,在鼻形鹿角珊瑚总蛋白点中,BP-酚抽提法和 TRIZOL 试剂法提取的蛋白点平均分别是 (1356 ± 49) 个和 (1042 ± 4) 个,在箭排孔珊瑚总蛋白点中,BP-酚抽提法和 TRIZOL 试剂法提取的蛋白点平均分别是 (972 ± 4) 个和 (915 ± 96) 个。

图 4 左图是鼻形鹿角珊瑚的蛋白点数量,图 4 右图是箭排孔珊瑚的蛋白点数量,在鼻形鹿角珊瑚中,BP-酚抽提法的 2 张胶重复之间的匹配点有 820 个,TRIZOL 试剂法的 2 个重复之间匹配点有 665 个。2 种方法之间的重复率相近。而在箭排孔珊瑚中,BP-酚抽提法的 2 张胶重复之间的匹配点有 796 个,TRIZOL 试剂法的 2 个重复之间匹配点有 704 个。显然 2 种方法的重复性均较好,而 BP-酚抽提法的重复率更高。

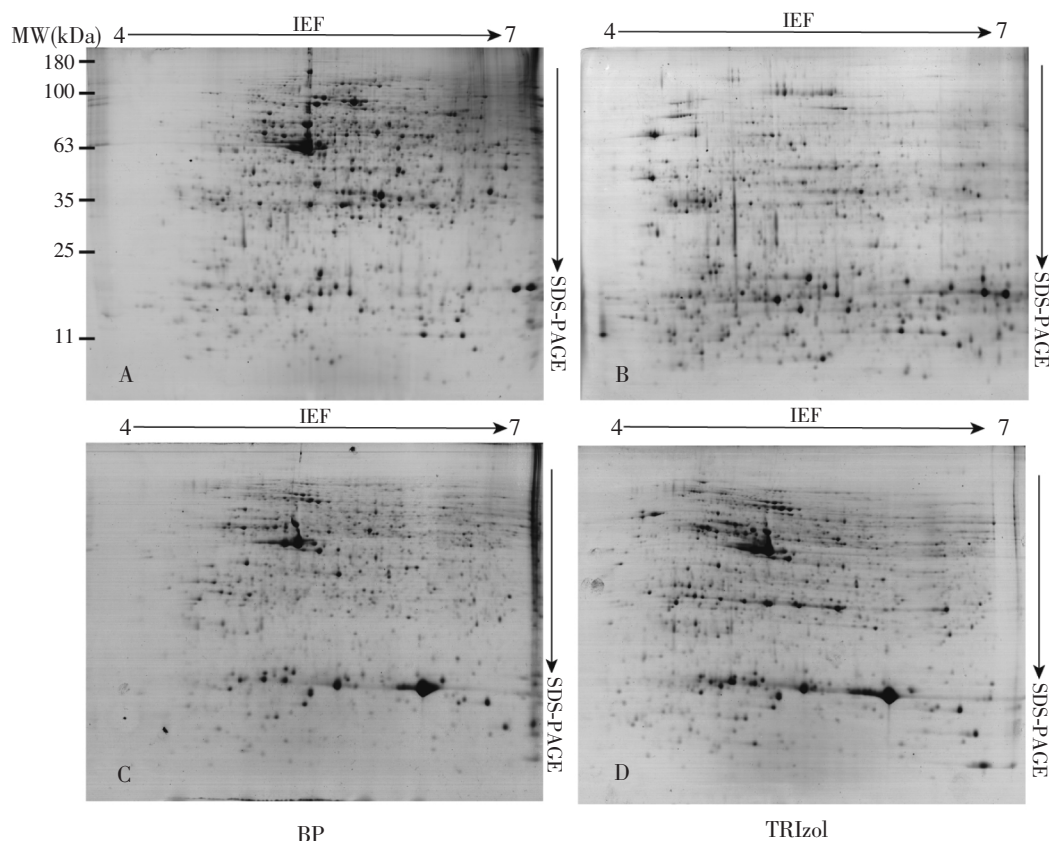


图 3 2 种珊瑚的不同提取方法的 2-DE 电泳图

- A: 鼻形鹿角珊瑚的 BP-酚抽提法双向图谱
 B: 鼻形鹿角珊瑚的 Trizol 试剂法双向图谱
 C: 箭排孔珊瑚的 BP-酚抽提法双向图谱
 D: 箭排孔珊瑚的 Trizol 试剂法双向图谱

Fig.3 2-DE map of two corals extracted by using two extraction methods

- A: 2-DE map of BP-phenol extraction in *Acropora nasuta*
 B: 2-DE map of Trizol reagent extraction in *Acropora nasuta*
 C: 2-DE map of BP-phenol extraction in *Seriatopora hystrix*
 D: 2-DE map of Trizol reagent extraction in *Seriatopora hystrix*

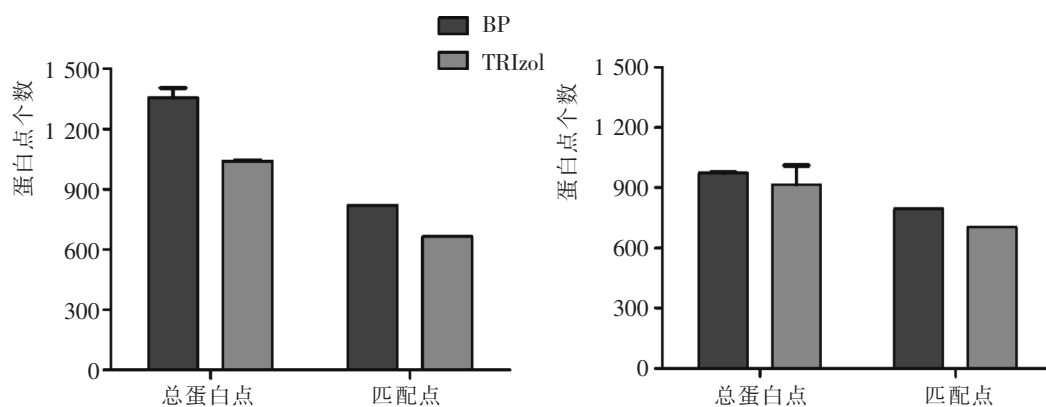


图 4 2 种提取方法所得 2 种珊瑚的总蛋白点和匹配点

Fig.4 Total protein spots and matched spots of two corals extracted by using two extraction methods

同时,笔者也统计了不同相对分子质量大小和 pI 值下的蛋白分布点数。图 5A、B 分别是鼻形鹿角珊瑚的 2 种方法的不同蛋白相对分子质量和 pI 分布图, C、D 分别是箭排孔珊瑚的两种方法的不同蛋白分子质量和 pI 分布图。很明显可以看出 2 种珊瑚中, 低于 25 kDa 以下相对分子质量的蛋白数量, 在 Trizol 试

剂法提取较多;而大于 63 kDa 以上相对分子质量的蛋白数量,在 BP-酚抽提法提取中更有优势。分子量处在 25 ~ 63 kDa 之间,BP-酚抽提法也是略多于 TRIzol 试剂法的。所以整体上来说,BPP 酚抽提法更适合提取大分子质量蛋白,TRIzol 法更适合提取小分子质量蛋白。在不同 pI 分布中,也能直观看出 2 种珊瑚中,TRIzol 试剂法提取的 pI 处在 4.0 ~ 5.5 之间的蛋白点多于 BP-酚抽提法的;但 BP-酚抽提法提取的 pI 处在 5.5 ~ 7.0 之间的蛋白点多于 TRIzol 试剂法的。

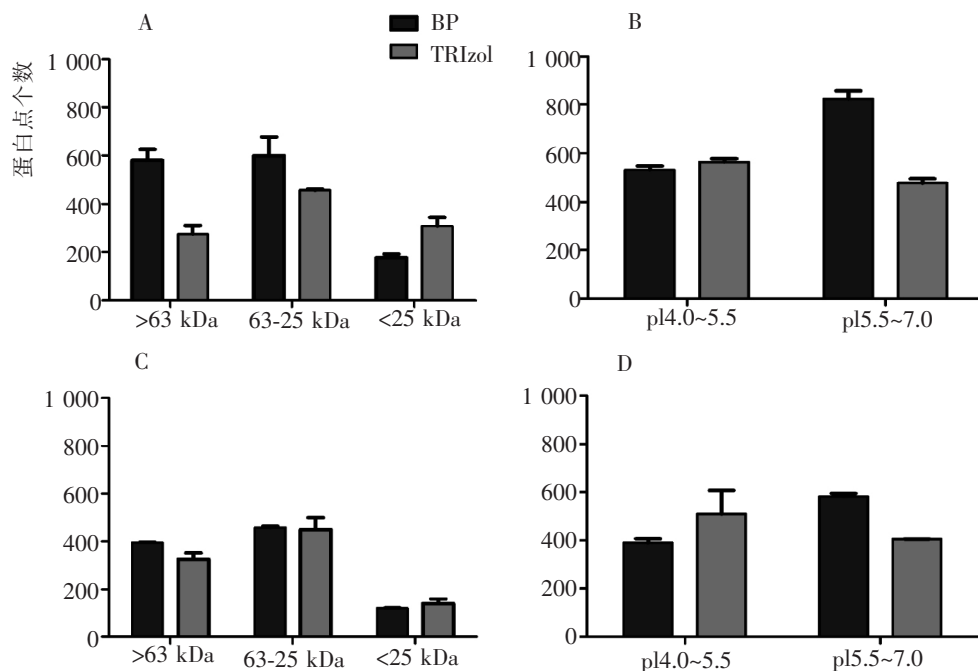


图5 2种提取方法的不同蛋白相对分子质量和 pI 分布图
Fig.5 Molecular weight and pI distribution of different proteins extracted from two corals by two extraction methods

统计 2 种蛋白提取方法中得到共有蛋白点和特异蛋白点。如图 6 所示,在 2 种珊瑚的各自特异蛋白点中,BP-酚抽提法较 TRIzol 试剂法提取的多;同时鼻形鹿角珊瑚的 BP-酚抽提法和 TRIzol 试剂法得到的特异点比箭排孔珊瑚的 BP-酚抽提法和 TRIzol 试剂法得到的特异点均多。其中 2 种珊瑚的共同蛋白点中,箭排孔珊瑚的 2 种方法得到的共同蛋白点较鼻形鹿角珊瑚的 2 种方法得到的共同蛋白点多。说明了不同方法提取同一珊瑚,蛋白有差异;同种方法提取不同珊瑚,蛋白也有差异。整体比较而言,BPP 酚抽提法得到的蛋白点较多,清晰度相对较高,但 2 种方法的重复性均较好,根据它们提取蛋白点分布和种类均有不同,各自有其特点,都可以考虑作为珊瑚蛋白的提取方法来进行后续实验。

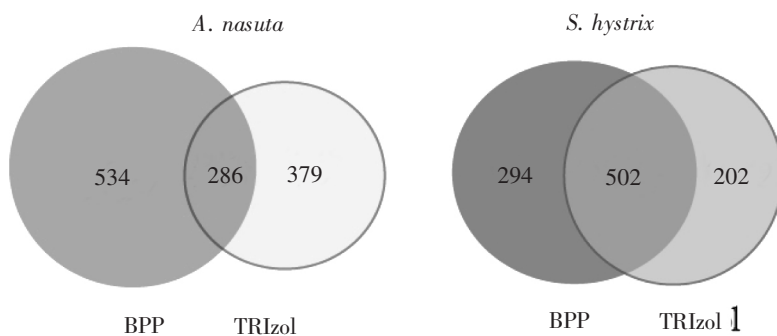


图6 2种提取方法所得特异蛋白点和共有蛋白点
Fig.6 The specific and shared protein spots of the two corals by using the two extraction methods

3 讨 论

蛋白样品制备是蛋白质组学研究的重要因素,而样品提取的方法很大程度决定最终分析的结果。最优的样品制备方法应该能有效地除去影响蛋白质可溶性和电泳分离结果的各种杂质,防止蛋白变性,减少蛋白质的降解、磷酸化和甲基化修饰,保持其活性,并有高的分辨率和良好的重复性。然而珊瑚作为珊瑚-虫黄藻 2 种共生体生物存在的同时还有其他生物附着在骨骼表面,以及一系列生物次生代谢物,这些不利因素将直接导致难以获得无污染、无修饰、完整、高质量的珊瑚-藻蛋白质,从而影响了蛋白质的提取效果、等电聚焦及双向电泳图谱的分辨率。所以在提取蛋白质方法上,选择 1 种有利于本生物蛋白提取方法特别重要。

从本实验结果看出,BP-酚抽提法和 TRIzol 试剂法均能提出高产蛋白,但 BP-酚抽提法更有优势。在 2 种方法的重复性比较上,2 种方法均较好,而 BP-酚抽提法得到的分辨率更高,在总蛋白点数量上,BP-酚抽提法提取的更多,而且得到的特异点较 TRIzol 试剂法的多。在低分子质量的提取上,TRIzol 试剂法具有优势,BP-酚抽提法则丢失了部分蛋白。在大分子质量的提取上,BP-酚抽提法明显具有优势。TRIzol 试剂法得到的蛋白更多的分布在 $pI(4.0 \sim 5.5)$,BP-酚抽提法得到的蛋白更多的分布在 $pI(5.5 \sim 7.0)$ 范围。整体而言,每种方法均有各自特点。

TRIzol 试剂用于提取海洋动物蛋白已有报道^[16],其试剂成分也含有酚类,但对于这 2 种珊瑚共生体蛋白提取而言,BP-酚抽提法优势更多。同时 BP-酚抽提法广泛应用于植物组织蛋白质提取,其分离的蛋白点具有良好的质谱兼容性。这就为后续珊瑚蛋白质组学研究奠定了基础,同时也为其他生物蛋白的提取提供参考。

参考文献:

- [1] Wilkinson C. Status of coral reefs of the world[M]. Townsville: Australian Institute of Marine Science Press, 2004: 316.
- [2] Gleason D F, Wellington G M. Ultraviolet and coral bleaching[J]. Nature, 1993, 65 (28): 836-838.
- [3] Spencer T, Teleki K A, Bradshaw C, et al. Coral bleaching in the Southern Seychelles during the 1997-1998 Indian ocean warm event [J]. Marine Pollution Bulletin, 2000, 40 (7): 569-586.
- [4] 李淑, 余克服. 珊瑚礁白化研究进展[J]. 生态学报, 2007(5): 2059-2069.
- [5] 李秀保, 黄晖, 练健生, 等. 珊瑚及共生藻在白化过程中的适应机制研究进展[J]. 生态学报, 2007(3): 1217-1225.
- [6] 李淑, 余克服, 陈天然, 等. 在细胞水平上对高温珊瑚白化的初步研究[J]. 热带海洋学报, 2011(2): 33-38.
- [7] 黄晖, 许昌有, 袁涛. 造礁石珊瑚白化相关功能基因的研究进展[J]. 热带海洋学报, 2013(4): 43-50.
- [8] Carpenter K E, Abrar M, Aeby G, et al. One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts[J]. Science, 2008, 321(5888): 560-563.
- [9] Dunn S R, Bythelley J C, Tissier M D A L, et al. Programmed cell death and cell necrosis activity during hypothermic stress-induced bleaching of the symbiotic sea anemone *Aiptasia* sp[J]. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2002, 272: 29-53.
- [10] Dunn S R, Schnitzler C E, Weis V M. Apoptosis and autophagy as mechanisms of dinoflagellate symbiont release during cnidarian bleaching: every which way you lose[J]. P Roy Soc-B Sci, 2007, 274(1629): 3079-3085.
- [11] Ainsworth T D, Hoegh-Guldberg O. Cellular processes of bleaching in the Mediterranean coral *Oculina patagonica* [J]. Coral Reefs, 2008, 27(3): 593-597.
- [12] Fitt W K, Brown B E, Warner M E, et al. Coral bleaching: interpretation of thermal tolerance limits and thermal thresholds in tropical corals[J]. Coral Reefs, 2001, 20(1): 51-65.
- [13] Hédouin, Laetitia, Véronique Berteaux-Lecellier. Traditional vs new approaches for assessing coral health: A global overview and the paradigm of French Polynesia[J]. Journal of Marine Science and Technology, 2014, 22(1): 25-35.
- [14] Jeana L. Drake, Tali Mass, Liti Haramaty, et al. Proteomic analysis of skeletal organic matrix from the stony coral *Stylophora pistillata* [J]. PNAS, 2013, 110(10): 3788-3793.
- [15] Weston, Andrew J. Proteomics links the redox state to calcium signaling during bleaching of the scleractinian coral *Acropora microphthalma* on exposure to high solar irradiance and thermal stress[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2015, 14(3): 585-95.

- [16] Wu H , C Ji , L Wei , et al. Evaluation of protein extraction protocols for 2DE in marine ecotoxic proteomics [J]. *Proteomics* , 2013 , 13: 3205 – 3210.
- [17] Wang X , Li X , Deng X , et al. A protein extraction method compatible with proteomic analysis for the euhalophyte *Salicornia europaea* [J]. *Electrophoresis* , 2007 , 28: 3976 – 3987.
- [18] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical biochemistry* , 1976 , 72(1/2) : 248 – 254.
- [19] 孙勇 , 王旭初 , 易小平. 香蕉枯萎病菌双向电泳体系的建立及蛋白质组学初步研究 [J]. *中国农学通报* 2012 28(34) : 211 – 218.

Comparative Study of Different Methods for Extracting of Total Protein of Corals

CHENG Huamin , YANG Tinghan , XIANG Nan , ZHAO Hongwei , ZHOU Hailong , DIAO Xiaoping

(College of Tropical Agriculture and Forestry / Haikou Key Laboratory of Environment Toxicology , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: Availability of high-quality protein is a prerequisite for proteomic research. Hard bones are major structures for corals , leading to certain interference in extracting of total protein of the corals. Therefore , it is necessary to choose an optimum extraction method for proteomic research in corals. Two species of corals *Acropora nasuta* and *Seriatopora hystrix* were extracted by using two extraction methods , TRIzol reagent extraction method and BP-phenol extraction method. The result showed that the protein yield of the extract by BP-phenol extraction was relatively higher. Analysis of the 1-DE and 2-DE electrophoresis showed that the protein samples of the extracts by the two extraction methods were relatively different. The BP-phenol extraction method produced more protein bands and spots with few tailings. The TRIzol reagent method had an advantage of extraction of low molecular weight while the BP-phenol extraction method had an obvious advantage of the extraction of large molecular weight. This result is expected to provide a certain foundation for proteomic studies of stony corals.

Keywords: stony coral; proteomic; protein extraction; 1DE; 2DE