

优化海兔肝蛋白质组提取与分离技术

李志丹, 包晓东, 黄慧英, 黄河清*

(厦门大学生命科学学院 生物化学与生物技术学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 为了提高海兔肝脏蛋白质组的提取及研究效率, 本文描述和比较了 3 种提取海兔肝脏蛋白质组的方法: 裂解液浸泡 - 超速离心, 丙酮 - TCA 沉淀 - 裂解液浸泡, 裂解液浸泡 - 丙酮 - TCA - 裂解液溶解. 然后采用常规 SDS-PAGE 双向电泳对提取出的蛋白质进行检验, 用 Melanie 4 Trial 软件分析电泳图谱, 通过对蛋白质分辨率和斑点总数的比较, 选出一种更适合海兔肝蛋白质的提取方法. 结果表明采用丙酮 - TCA 沉淀 - 裂解液浸泡法提取海兔肝蛋白质所得的双向电泳图谱不论从蛋白质斑点分辨率还是总数上都优于其他两种方法, 更适合提取分离海兔肝脏蛋白质.

关键词: 海兔肝; SDS-PAGE 双向电泳; 提取与分离; 优化分离; 蛋白质组

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479 (2006) S-0194-04

海兔 (*Aplysia*) 系杂食性动物, 属软体动物门腹足纲 (Gastropoda) 后腮亚纲 (Opisthobranchia) 海兔科 (Aplysiidae) 动物, 广泛分布在热带及亚热带海域, 以底栖矽藻和沉积在海滩上的有机质、绿藻和底栖挠足类等为食. 海兔系雌雄同体的海洋软体动物, 它在我国福建、广东、山东等省的海域均有分布. 厦门最常见的海兔品种是蓝斑背肛海兔 (*Notarchus leachii cirrosus* Simpson, NLCS). 现在海兔已经成为生物研究的一种模式生物, 尤其是在神经节蛋白质组的研究上. 经国内外各大数据库检索后, 发现有关海兔肝的蛋白质组学研究尚未见详细报道. 由于海兔肝脏中蛋白质种类相对较少, 更适合开展肝脏蛋白质组学研究. 本次实验以建立海兔蛋白质组学数据库为目标, 对海兔肝的蛋白质组学进行系列研究. 近期, 基质辅助激光解吸离子化飞行时间 (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight, MALDI-TOF) 质谱技术^[1]已用于分析软体动物和足类动物的神经功能多肽种类和结构, 表现出高灵敏度、超微量和快速等特点. 优化蛋白质组分离方法是开展蛋白质组学最基本实验步骤之一. 本论文探讨海兔肝蛋白质组的提取与分离方法, 阐明海兔肝蛋白质种类与分布情况, 其技术可为今后深入开展软体动物肝脏蛋白质组学研究提供可行性技术.

1 材料与方 法

收稿日期: 2005-12-25

基金项目: 福建省自然科学基金 (C0310006) 和厦门大学预研基金 (2004xdcx207; XDKJCX20051009) 资助

作者简介: 李志丹 (1983 -), 男, 硕士研究生.

* 通讯作者: hqhuang@xmu.edu.cn

1.1 材料与试剂

NLCS 取材于厦门浅海区域. 分离海兔肝蛋白质组所需要的试剂和配方参考常规的 SDS-PAGE 双向电泳技术^[2,3], 但进行适当优化.

丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、二硫苏糖醇 (DTT)、超纯尿素 (urea)、NON DE-TP-40 (NP-40)、CHAPS 均购自上海生工; 载体两性电介质 (pH 3 ~ 9, pH 5 ~ 8, pH 4 ~ 6) 购自北京军事医学科学院; 胰蛋白酶 (V5111) 购自 Promega 公司; SDS 分子量标准购自 Fermentas 公司; 葡-4 羟肉桂酸 (HCCA) 购自美国 CN 生物医学公司.

1.2 分离蛋白质组的基本仪器设备

双向电泳槽: DYCZ-26 型多用途电泳槽, 北京六一仪器厂; 垂直电泳槽: DYCZ-24 型, DYCZ-24A 型, 北京六一仪器厂; 水平脱色摇床: WD-9405B 型, 北京六一仪器厂, 沃德生物医学仪器公司; SCP55H 超速冷冻离心机: Hitachi, 日本.

1.3 溶液的配制

(1) 样品裂解液^[4]: 7 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 2 mol/L 硫脲, 60 mmol/L DTT, 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L FMSF, 0.5% CA, 0.0002% 溴酚蓝. 分装, -20 保存待用.

(2) 有机溶剂提取液 (10% TCA 丙酮): 称 10 g TCA, 加 100 mL 丙酮溶解, -20 保存待用.

(3) 平衡液: 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素、30% 甘油、2% SDS, -20 保存. 使用前 10 mL 平衡液存储液加 100 mg DTT

(4) SDS 分离胶缓冲液: 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)、0.4% SDS 的水溶液.

(5) SDS浓缩胶缓冲液: 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 6.8), 0.4% SDS的水溶液。

(6) IEF胶条配方^[1]: 1.10 g超纯尿素, 394 μ L双蒸水, 400 μ L 10% NP-40, 266 μ L 单体储液 (29.1%丙烯酰胺 / 0.9%甲叉丙烯酰胺), 100 μ L载体两性电解质, 4 μ L TEMED, 2 μ L 10% APS,待溶解完全后灌制直径 2 mm高 13 cm的凝胶柱 (2根量)。

(7) SDS均一胶配方参见文献 [1]。

(8) 银染溶液和保存液参见文献 [6]。

1.4 海兔肝脏蛋白质组的分离提取

根据文献 [3], [7], [8]和 [9]总结挑选出以下 3种方法进行比较优化:

(1) 裂解液浸泡 - 超离心法

取 40 mg海兔肝脏组织,并以体积比 1:5加入 200 μ L裂解液,震荡混匀,随后置于 4 $^{\circ}$ C下 8~10 h期间定期震荡,以便裂解液与肝脏碎片充分混匀;促使最大程度地释放蛋白质。次日对破碎样品进行高速 (12 000 g)离心 10 min,去除不溶性细胞碎片等,收集上清液 - 80 $^{\circ}$ C保存备用。

(2) 丙酮 - TCA 沉淀 - 裂解液浸泡法

取 40 mg海兔肝脏组织放入 2 mL离心管中,用 2 mL 10%丙酮 - TCA溶液 - 20 $^{\circ}$ C沉淀 4 h,以 12 000 g高速离心 10 min,随后分离沉淀。用 - 20 $^{\circ}$ C冷丙酮清洗沉淀 3~4次,去除 TCA。紧接着在 4 $^{\circ}$ C冰箱内风干样品。按体积比 1:8加入裂解液,并在 4 $^{\circ}$ C下放置 2~4 h待沉淀绝大部分溶解后, - 80 $^{\circ}$ C保存备用。

(3) 裂解液浸泡 - 丙酮 - TCA 沉淀 - 裂解液溶解法

取 40 mg海兔肝脏组织,并以体积比 1:5加入 200 μ L裂解液,震荡混匀,置于 4 $^{\circ}$ C下约 8~10 h,定期震荡。12 000 g离心,取上清,取 2 mL 10%丙酮 - TCA溶液 - 20 $^{\circ}$ C沉淀 4 h,以 12 000 g离心 10 min,随后分离沉淀。用 - 20 $^{\circ}$ C冷丙酮清洗沉淀 3~4次,去除 TCA。紧接着在 4 $^{\circ}$ C冰箱内风干样品。最后按体积比 1:10加入裂解液,并在 4 $^{\circ}$ C下放置 2~4 h,待沉淀绝大部分溶解后, - 80 $^{\circ}$ C保存备用。将以上处理好的 3种样品溶液 (各 200 μ L)分别置于 5 mL超离心管中,以 350 000 r/min (130 000 g)速度离心 65 min,随后收集上清样品,置于 - 80 $^{\circ}$ C冷藏备用。

1.5 双向电泳

(1) 等电聚焦电泳

按照 1.3(6)配方配置凝胶液,将凝胶液灌入孔径为 0.7 mm的玻璃管中,制成 150 mm \times 0.7 mm的柱状胶条。在上样之前,先加 15 μ L的样品裂解液进行预电泳,其过程按照以下步骤进行: 1) 200 V, 15 min; 2) 300

V, 30 min; 3) 400 V, 60 min。预电泳结束后,将柱中的裂解液抽出,换上样品液,进行电泳: 1) 400 V, 4 h; 2) 600 V, 18 h

(2) SDS-PAGE

按照 SDS均一胶的配方配置凝胶液,将凝胶液灌入预先准备的玻璃板中,制成 200 mm \times 200 mm \times 0.7 mm的 SDS聚丙烯酰胺凝胶。将平衡后的胶条转移到 SDS凝胶上,并在胶条上覆盖一层加有溴酚蓝的 0.5% 琼脂糖,在 140 V的恒定电压下进行 SDS凝胶电泳。待溴酚蓝前沿到达凝胶底端时,停止电泳。

1.6 银染和 SDS胶的保存

参照文献 [5]和 [6]的银染方法进行染色。染色后,利用图像扫描仪对 SDS凝胶进行透射扫描,所得的图谱以 Melanie 4 Trial软件进行图像分析。之后用保鲜膜将 SDS胶封好保存于 4 $^{\circ}$ C冰箱中,以备进一步处理使用。

1.7 优化提取蛋白质方法

(1) 裂解液配方的改进

参考文献 [4]和 [7],本次实验在原配方尿素的基础上增加 2 mol/L 硫脲成分和 4% CHAPS (两性离子表面活性剂),它能有效溶解疏水蛋白,提高双向电泳分离效果。采用 DTT浓度为 60 mmol/L时,SDS-PAGE分离胶条纹最少;如果添加少量载体两性电解质 (小于 1%),将有助于减少蛋白质 - 基质间的疏水相互作用,有利于蛋白质溶解。加 Tris调整 pH至碱性,以使载体两性电解质能与核酸有效结合,并通过超速离心途径去除核酸。经优化后,最终选用 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA和 1 mmol/L PMSF为内切酶活性抑制剂组成配方。

(2) 优化双向凝胶电泳分离技术

作者对 IEF等电聚焦的配方、电泳时间等分离条件进行了优化:

1) 把原始的凝胶浓度从一般的 5%降到 4.5%,减少了大分子蛋白向周围的扩散迁移,也防止过低浓度造成凝胶刚性不足难以进行分离胶分离和处理。优化后电泳分离条件为: 400 V, 4 h; 600 V, 18 h

2) 在 SDS-PAGE电泳分离过程中,选择浓度 12%分离胶较为适合,即可获得大小分子量的蛋白质在胶上分布较均匀的效果。

2 结果与讨论

采用上述 3种不同的方法分别提取的海兔肝组织蛋白质样品,用优化后双向凝胶电泳技术进行分离,可获得图 1~3结果。选用 Melanie 4 Trial软件分析总结后,获得结果如表 1所示。从中可看出,采用 3种不同

方法提取海兔肝组织蛋白质样品,经相同电泳条件分离后,所获得的图谱中蛋白质斑点数目很接近,表明所获得蛋白质数量近似.

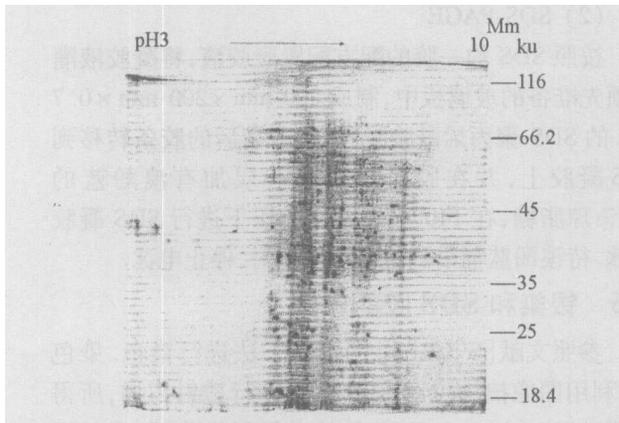


图 1 采用裂解液浸泡 - 丙酮 -TCA 沉淀 - 裂解液溶解法提取海兔肝蛋白质组后所获得的双向凝胶电泳图

Fig 1 Using the hydrolyzate buffer to marinate and then using TCA/acetone buffer to sedimentate and next using the hydrolyzate buffer to dissolve, finally to hypervelocity-centrifugate

注:Mm =Molecular mass

比较图 1~3 结果后,作者发现选用裂解液浸泡 - 丙酮 -TCA 沉淀 - 裂解液溶解法所提取的蛋白质,经 SDS-PAGE 双向电泳分离后的图谱 (Fig 1),横竖条纹都较少,而且蛋白斑点更清晰,故推测该方法所获得蛋白质样品中的糖类、核酸及酯类含量相对较少.但在酸性区域中,蛋白质斑点数较少.由此看来,蛋白质斑点主要集中在中性和偏弱碱性区域中.多数蛋白质斑点所对应的分子质量主要涵盖范围在 18~66 ku 之间.

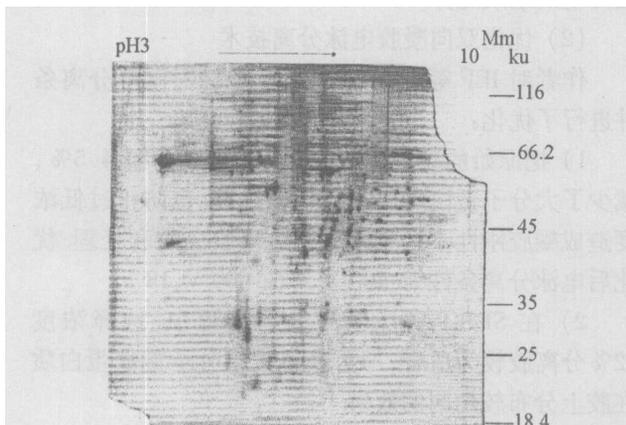


图 2 采用裂解液浸泡 超离心法提取海兔肝蛋白质组后所获得的双向凝胶电泳图

Fig 2 Using the hydrolyzate buffer marinating-hypervelocity centrifugation

注:Mm =Molecular mass

采用裂解液浸泡 超离心法提取的海兔肝蛋白质组,采用相同于图 1 的 SDS-PAGE 双向电泳分离技术分离后,可获得图 2 结果.此方法由于操作步骤最少,蛋白损失相对应最少,点数应最多,但重复性较差.此外,在图 2 中有许多横竖纹及蛋白斑点之间出现的拖带或不清晰,从而影响进一步对蛋白质斑点的鉴定.推测这些条纹由糖类、脂类以及核酸引起.显然,采用裂解液浸泡 - 超离心法提取海兔肝蛋白质样品不太适合于采用双向凝胶电泳进行分离,进而用于蛋白质组学研究.

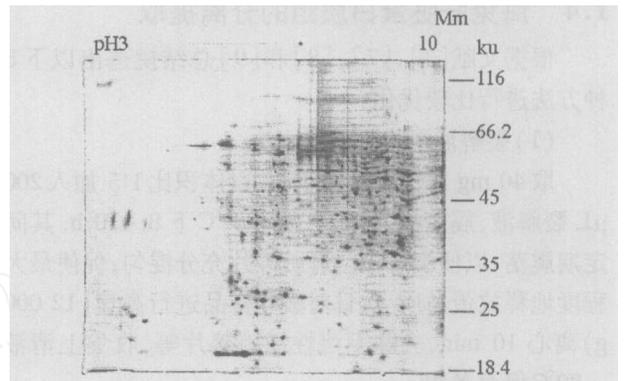


图 3 采用丙酮 -TCA 沉淀 - 裂解液浸泡 - 超离心法提取海兔肝蛋白质组后所获得的双向凝胶电泳图

Fig 3 Using TCA/acetone buffer to sedimentate-the hydrolyzate buffer to dissolve-hypervelocity centrifugation

注:Mm =Molecular mass

采用丙酮 -TCA 沉淀 - 裂解液溶解 - 超速离心法提取海兔肝蛋白质组样品后,并采用相同的双向凝胶电泳分离技术后,可获得图 3 结果.图 3 表明,该方法提取的海兔肝蛋白质样品,经超速分离后,在图中还是显示出一些横纹条.这说明了所提取的样品中还含有少量的糖类、脂类和核酸,从而影响电泳分离效果,但图中绝大多数蛋白质斑点数还是较为清晰,分辨率较高,其分离效果要比图 2 更佳,也适合蛋白质组学研究.

根据上述图 1~3 结果和采用 Melanie 4 Trial 软件分析蛋白质斑点数后,其分析结果总结在表 1.从表 1 可看出,采用丙酮 -TCA 沉淀 - 裂解液溶解 - 超速离心法和裂解液浸泡 - 超离心法所获得海兔肝蛋白质斑点数很接近,均为 516 点左右,但采用丙酮 -TCA 沉淀 - 裂解液溶解法所获得蛋白质斑点数略少些.参考图 1~3 和表 1 结果,作者认为第一种蛋白质提取方法的操作虽然步骤较多,但经双向凝胶电泳技术分离后,所显示出蛋白质种类的数量与其余两种方法相似,但所得电泳图中蛋白点更清晰,是相对较为理想的蛋白质提取技术.

表 1 3种提取海兔肝组织蛋白质组双向电泳蛋白质斑点比较

Tab 1 The difference results among the three methods of extracting the proteomics of the *Aplysia s liver*

Method	Spots	MaxGray	Cols	Rows	PixWidth	PixHeight
1	481	255	4187	3960	42	42
2	515	255	3012	2865	64	64
3	516	255	3052	2800	353	353

Method 1: 裂解液浸泡 - 丙酮 TCA 沉淀 - 裂解液溶解 - 超速离心法,

Method 2: 裂解液浸泡 - 超速离心法,

Method 3: 丙酮 -TCA 沉淀 - 裂解液溶解 - 超速离心法.

参考文献:

- [1] 黄河清, Kim Won - Suk, 林庆梅. MALDI-TOF 质谱技术研究海兔神经连索外表层的多肽组成 [J]. 海洋科学, 2004, 28(5): 53 - 57.
- [2] 陈平, 谢锦云, 梁宋平. 双向凝胶电泳银染蛋白质点的肽质谱指纹图分析 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(4): 387 - 391.
- [3] 黄河清, 张凤章, 许良树. 马脾和猪脾铁蛋白理化性质的比较 [J]. 动物学报, 1997, 43: 170 - 177.
- [4] 朱金勇, 黄河清. 镉盐诱导的牙颌脑、鳃、肝差异蛋白质组研究 [C]. 厦门: 厦门大学, 2005: 50 - 58.
- [5] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 141 - 142.
- [6] 朱宏, 柏臣, 张帅. 蛋白质双向电泳双胺染色方法的改进 [J]. 植物研究, 2003, 23(1): 94 - 98.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 61 - 62.
- [8] 陈旭, 黄河清, 孔波, 等. 鲨鱼和鲑鱼肝铁蛋白电泳纯的制备技术 [J]. 海洋科学, 2004, 28(1): 15 - 19.
- [9] 刘国诠, 陈因良, 苏天升, 等. 生物工程下游技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 65 - 92, 305 - 318.

Optimized Techniques of Proteome Extraction and Separation from the *Aplysia s Liver*

LI Zhi-dan, BAO Xiao-dong, HUANG Hui-ying, HUANG He-qing*

(Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005, China)

Abstract: To enhance productivity of protein extracting and to reduce the interference of impurity, we take three methods of protein extraction from the liver tissue of *Aplysia*. The first method is the hydrolyzate buffer marinating-hypervelocity centrifugation; The second is to use TCA /acetone buffer to sedimentate-the hydrolyzate buffer to dissolve-hypervelocity centrifugation. And the last one is to use the hydrolyzate buffer to marinate, then use TCA /acetone buffer to sedimentate, and next use the hydrolyzate buffer to dissolve, finally to hypervelocity-centrifugate. And then I take the SDS-PAGE two dimensional gel electrophoresis to separate the proteomics of the *Aplysia s liver*, and use the Melanie 4 Trial to detect the plot, and then choose the better method to optimize the condition of extracting protein of the plot. The results tell us that the method of using TCA /acetone buffer to sedimentate - the hydrolyzate buffer to dissolve-hypervelocity centrifugation is better than those two. The chosed better method provides the technology of extracting and separating the proteins of the *Aplysia s liver*. So it will help us to investigate deeper in the proteomics realm.

Key words: *Aplysia liver*; SDS-PAGE two dimensional gel electrophoresis; distilling and separating; optimizing technology of extracting proteomics; proteomics