

# 优化提取与分离海兔大脑神经节蛋白质组

詹恂婕, 陆永进, 卓慧钦, 凌雪萍, 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:** 蓝斑背肛海兔 (*Notarcus Leachii cirosus* Stimpson, NLCS) 属于海洋软体动物。NLCS 大脑神经节 (cerebral ganglion, CG) 富含高丰度的脂类物质, 并干扰了三氯醋酸-丙酮法沉淀 CG 蛋白质。本实验的目的是找到一种适合提取、分离海兔 CG 蛋白的方法。经各种实验方法对比后, 发现超速离心法能有效分离 CG 破碎液中的脂类化合物, 提高双向凝胶电泳法分离 BG 蛋白质组的分辨率, 大约可检测到 450 个蛋白质点。

**关键词:** 海兔; 大脑神经节; 蛋白质组; 优化分离

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)S-0198-04

海兔 (*Aplysia*) 属于软体动物, 主要分布在热带及亚热带的浅海海域。在厦门各浅海区域内均可发现海兔生活的踪迹, 主要品种是 NLCS。神经科学家爱瑞克·康德尔曾以海兔为实验模型, 研究学习与记忆机理和神经突触可塑性, 其主要研究成果获得 2000 年诺贝尔医学奖<sup>[1]</sup>。近几十年来, 国内外许多神经科学家认为, 海兔 CG 多肽与蛋白组的组成、分布、结构与功能与海兔学习与记忆有着密切的联系。海兔中枢神经系统 (central nerve system, CNS) 一直是神经分子生物学研究过程中常用的比对模型, 主要原因在于它的 CNS 相对简单、易分离和细胞易定位等特点<sup>[1-3]</sup>。Phares 和 Loyd<sup>[4]</sup> 曾从 1 000 只海兔 CG 中分离到大脑多肽 1 (cerebral peptide 1, CP1), 并测定 CP1 的一级结构。近期, Hummon 和黄河清<sup>[5,6]</sup> 等分别发现美国加州海兔 (*Aplysia californica*, AC) 口腔神经节 (buccal ganglion, BG) 含有亮氨酸-亮氨酸多肽内切酶。Rubakhin 等曾采用基质辅助激光解吸飞行时间质谱 (Matrix-assisted laser desorption/ionization/time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 技术研究海兔囊细胞 (bag cell) 表层酸性多肽 (acidic peptide, AP) 组成<sup>[7]</sup>。Li 吴韩志和黄河清等<sup>[8-10]</sup> 分别采用 MALDI-TOF-MS 技术研究海兔 CNS 的神经连索外表层多肽组成与分布, 并阐明部分多肽的生理功能。尽管相关分析技术较为成熟, 但有关海兔 CNS 多肽与蛋白质的研究报道却不多。经分析认为海兔 CNS 中含有高丰度的脂类化合物, 从而

限制了通过使用常规双向凝胶电泳法有效分离 CNS 蛋白质组, 并供于蛋白质组研究。

本文侧重阐明优化海兔 CG 蛋白质组提取与分离技术, 其实验结果和所建立的分离技术将为今后开展海兔中枢神经系统蛋白质组学相关研究奠定良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

NLCS 每只净重在 150~300 g 之间, 实验前, 在人工海水中喂养 2 天, 消除其自身体内所携带的污染物。双向凝胶电泳的试剂均购于 Amersham Biosciences 公司 (Sweden)。基质  $\alpha$ -氰-4 羟肉桂酸 (HCCA) 购于美国 INC 生物医学公司。标准酸性多肽 (2 960.5 Da) 由美国依利诺斯生物技术中心合成<sup>[5]</sup>。实验所需的 CG 按常规神经解剖技术分离, 并剥离非 CG 组织。标准牛血清白蛋白含量为 98.0%。实验所需的质谱仪是美国应用生物系统公司生产的 Voyager DE-STR MALDI-TOF 质谱仪。三氯醋酸 (TCA) 等其他化学药品均为分析纯。

### 1.2 方法

#### (1) 海兔 CG 组织切片制备和蛋白质测定

在解剖镜下, 分离出海兔 CG, 并置于普通显微镜下拍摄 CG, 剥离非 CG 组织与神经连索。按常规组织固定方法固定 CG, 并在组织切片机上把 CG 组织切成 15~25  $\mu\text{m}$  厚的薄片<sup>[11]</sup>。切片染色后, 在 Olympus 高倍光学镜下观察, 并选择具有代表性区域进行拍摄及定位。去除组织切片上的干扰化学物质后, 按常规固定法技术, 把切片直接固定样品靶上; 随后把足量的基质直接点滴在切片上, 待样品干燥后, 立即置于 MAL-

收稿日期: 2006-01-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30470372) 和福建省自然科学基金 (C0310006) 资助

作者简介: 詹恂婕 (1980-), 女, 硕士研究生。

\* 通讯作者: hqhuan@xmu.edu.cn

DITOF 质谱仪内; 选择线性分析模型和不同的激光强度直接分析 CG 组织切片内的多肽与蛋白质种类与分布。

### (2) 丙酮沉淀法提取 CG 的蛋白质

将从 25 只海兔中提取的 CG 置于小研钵, 加入 0.2 g 石英砂, 冰浴条件下研磨 10 min, 随后把粉末转移至 1.5 mL 的离心管, 加入 1.0 mL 10% TCA / 0.07%  $\beta$ -巯基乙醇的丙酮组成的沉淀液, 在  $-20^{\circ}\text{C}$  下放置 1.5 h, 紧接着离心 15 min ( $4^{\circ}\text{C}$ , 15 000 r/min), 弃上清液, 收集沉淀物; 用含 0.07%  $\beta$ -巯基乙醇的冷丙酮溶液冲洗后, 再悬浮于此液中, 随后再次把样品置于在  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中 1.5 h, 之后离心 15 min ( $4^{\circ}\text{C}$ , 15 000 r/min)。重复上述离心沉淀步骤, 尽可能地收集沉淀样品。所获得沉淀物在真空浓缩仪中浓缩干燥 2 h 使之成干粉状; 随后向沉淀物加入 330  $\mu\text{L}$  细胞裂解液, 在  $30^{\circ}\text{C}$  水浴下处理 1 h, 离心 15 min ( $20^{\circ}\text{C}$ , 15 000 r/min), 所获得上清液再次离心 5 min ( $20^{\circ}\text{C}$ , 15 000 r/min), 收集上清液, 最后采用双向凝胶电泳法分离 CG 蛋白质组。此外, 还采用类似方法制备加洲海兔 CG 上清液样品, 并选用高压液相色谱仪进行 CG 蛋白质组的梯度分离, 收集 50 管样品<sup>[2]</sup>。

### (3) 直接裂解和离心法提取 CG 蛋白质

将 16 个 CG 置于 500  $\mu\text{L}$  的离心管内, 加入样品裂解液 150  $\mu\text{L}$ , 超声破碎 5 min, 收集样品, 于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中静置过夜。之后把悬浮液样品置于冷冻超速离心机内离心 25 min ( $4^{\circ}\text{C}$ , 100 000 r/min); 分离脂类物质和收集含有混合蛋白质的上清液, 供双向凝胶电泳分离与纯化。

### (4) 基质配制和 MALDI-TOF 质谱分析

在 40% 乙腈 (ACN) 和 60% 的 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 的混和溶液加入过量的  $\alpha$ -氰-4-羟肉桂酸 (HCCA), 配成 HCCA 饱和溶液, 然后进行超声处理 5 min, 随后在 8 000 g 条件下, 离心 5~8 min, 取离心上清液作为实验基质。样品和饱和基质溶液按 1:1 体积比混合后, 取 0.8  $\mu\text{L}$  混合物直接点滴在 MALDI-TOF 质谱仪专用样品靶上, 待样品自然干燥后, 将样品靶直接放入质谱仪的靶箱内, 进行多肽与蛋白质组成分析。质谱分析条件为: 脉冲氮激光器 (337 nm) 作为离子解吸离子源, 分析模型选择高分辨率的发射模型, 加速电压控制在 20 kV。平均每次测定样品的激光脉冲次数为 140 次。采用外标法标定多肽质谱峰位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 NCLS 大脑形态显微摄影图

Li<sup>[8]</sup> 等较为详细地描述了海兔 CNS 的示意图。

NLCS 的 CNS 与其它品种海兔的 CNS 相比之下, 缺少 AG<sup>[9]</sup>, 它只有两条神经连索分别由胸膜神经节 (pleural ganglion, PLG) 直接连接到腹部肌肉。图 1 是 NLCS 的 CG 形态显微摄影图。从图 1 中可以看出, CG 通过神经连索的方式与其它神经节沟通, 其中编号为 1, 2, 3 的左右处的神经连索端分别连接于左右两侧的 PLG、足神经节 (pedal ganglion, PDG) 和腹肌肉。图中编号为 4 的神经连索直接于 BG。图中编号 5 的部位为 CG 区域, 其 CG 表层含有大量可剥离的细胞簇群。推测图中 CG 所呈现的透明状态区域可能含有大量的脂类物质。

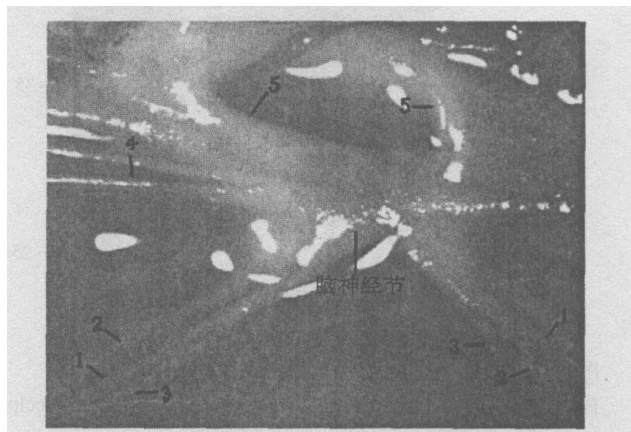


图 1 蓝斑背肛海兔大脑形态图

Fig 1 The configuration of CG from the NLCS

### 2.2 TCA-丙酮沉淀法分离 CG 蛋白质

提取蛋白质方法优化是获得高分辨率的蛋白质组二维电泳图谱且研究蛋白质组成、分布、结构与功能的基本保证之一。细胞及组织中蛋白质种类、含量、释放率高低与细胞破碎效率和蛋白质提取方法有着密切的联系。采取不同的蛋白质提取技术, 可获得不同种类的蛋白质及不同含量, 从而获得不同的分析结果。因而优化提取蛋白质做法是获得良好实验结果的基本保证。TCA-丙酮法是提取动物组织蛋白质组常用的有效方法之一<sup>[12]</sup>, 作者采用前人报道的 TCA-丙酮法提取 CG 蛋白质组方法, 优化双向凝胶电泳分离条件, 并获得 CG 全蛋白质组的双向凝胶电泳图谱 (图 2)。经选用蛋白组学专用分析软件统计, 发现凝胶层析板上的蛋白质亚基斑点数为 40 个左右。这一现象说明了采用 TCA-丙酮沉淀法分离 CG 的蛋白质不仅种类很少, 而且蛋白质含量较低, 推测可能是与 TCA-丙酮混合溶剂难以去除 CG 中高丰度脂类物质有关, 因而无法沉淀全部的 CG 中的全蛋白质, 并被有效分离。

### 2.3 HPLC 技术分离海兔 CG 中的多肽与蛋白质

为了了解海兔 CG 中蛋白质及多肽的种类及分布

情况,作者有意选用 AC 的 CG 作为研究材料,采用石英沙细胞破碎和离心法提取 CG 中的混合蛋白质,并选用反相 HPLC 方法分离 CG 的混合蛋白,进一步去除高丰度的脂类物质及其他干扰化合物,总共收集了 50 管等体积的蛋白质样品. 图 3 是采用 MALD FTOF 质谱技术直接分析第 45 管样品所获得的一张质谱图.

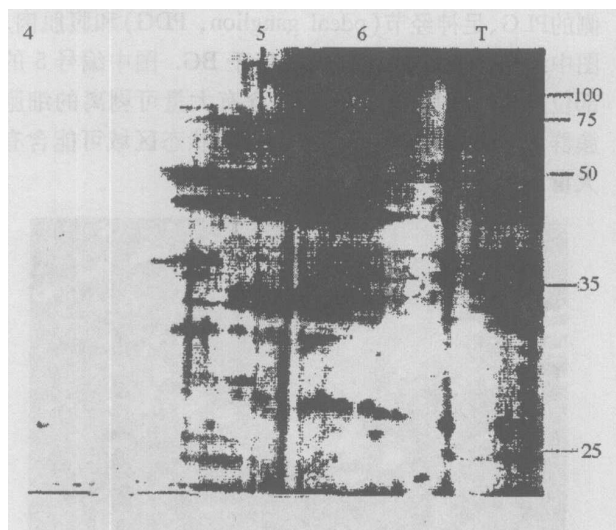
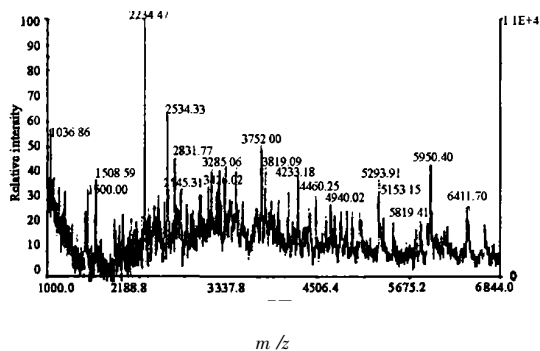


图 2 CG 蛋白质组双向凝胶电泳图 (TCA / 丙酮沉淀法)  
Fig 2 2D-PAGE map of CG protein (TCA / acetone precipitate)

从图中可看出,在质荷比 ( $m/z$ ) 位于 1 000~ 6 844 范围内,质谱峰的总峰数目已经超过 20 个. 这种现象说明 CG 细胞中至少含有数百种不同组成与结构的蛋白质. 认为 CG 中高丰度的脂类物质直接影响到 TCA - 丙酮法的蛋白质沉淀率 (图 2).



9  
图 3 HPLC 分离 CG 蛋白组过程中, 第 45 管样品的蛋白质质谱图  
测定质荷比 ( $m/z$ ) 范围: 1 000.0~ 6 844.0 相对激光强度 2 300 U

Fig 3 Mass spectrogram of protein fraction (tubes 45) of CG separated by HPLC

HPLC 分离技术能有效分离 CG 脂类化合物与蛋白质,但难于获得单一类型的蛋白质 (图 3),从而增加鉴定多肽与蛋白质组成与结构的难度. 因而作者认为

双向凝胶电泳技术仍然是开展 CG 蛋白质组学研究最有效方法之一. 为了进一步证实 CG 确实含有高丰度脂类物质,并影响多肽与蛋白质离子化的论点,作者拟采用 MALD FTOF 技术直接分析 CG 组织表层的多肽与蛋白质种类与分布.

### 2.4 质谱直接分析 CG 组织表层的多肽与蛋白质

NLCS 大脑中细胞以簇的方式分布在大脑组织表层上. 在光学显微镜下,细胞簇很容易被剥离成单细胞,细胞表层的多肽与蛋白质的分布情况可采用 MALD FTOF 质谱技术直接分析<sup>[7,8]</sup>. 吴韩志等<sup>[9]</sup>曾采用类似方法直接分析了 BG 和神经连索表层的多肽组成与分布情况. 因而采用 MALD FTOF 质谱技术直接分析器官组织表层多肽与蛋白质组成与分布是一项可行性分析技术<sup>[7,8]</sup>.

图 4 是 NLCS 大脑组织切片光学显微镜图. 把组织切片直接固定在 MALD FTOF 质谱仪的样品靶上,并浇灌一定量的基质;待样品自然干燥后,把载有组织切片的样品靶置于仪器内,选用不同的激光强度,按图 4 中所指定的区域直接分析组织表层的多肽与蛋白质组的组成及分布情况. 实验结果表明,只测定出少量多肽和蛋白质质谱峰,这说明 CG 中确实含有大量干扰激光直接解吸多肽及蛋白质成为分子离子的化合物,其中高丰度脂类化合物影响最大. 去除 CG 中的脂类化合物是改善双向凝胶电泳技术分离 CG 混合蛋白质的有效措施之一.

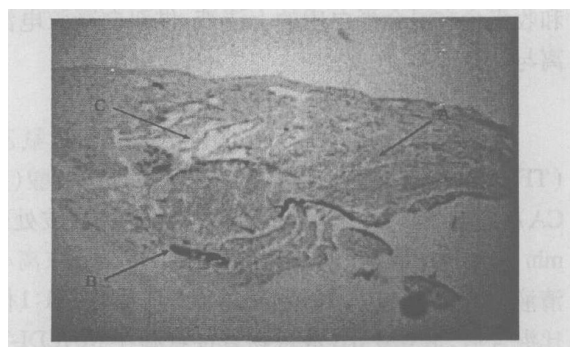


图 4 NLCS 大脑细胞与组织切片显微镜图  
A, B, C 激光解吸大脑组织表层的多肽与蛋白质离子化部位

Fig 4 Microscopy photographs of tissue slice of CG from the NLCS

### 2.5 超速离心法提取 CG 蛋白质组

超速离心技术是常见用于分离脂类化合物和可溶性蛋白质的有效措施之一. 为进一步减少脂类化合物的干扰,作者选用略高于 100 000 g 离心力的速度分离 CG 蛋白质提取液中的脂类化合物,尤其是 CG 外表层的神经胶质物质. 收集可溶性的蛋白质,并采用双向

凝胶电泳分离 CG 蛋白质组。经蛋白质组专用分析软件分析后,可获得 450 个左右的蛋白质斑点,高于图 2 蛋白质斑点数目近 10 倍。这一现象说明了采取超速离心法能有效去除 CG 中的脂类化合物,避免脂类化合物的干扰,提高不同种类蛋白质的溶解度。然而,一旦离心力低于 100 000 g 时,样品中仍然含有少量的不溶解脂类杂质,并影响 CG 蛋白质组的分辨率。

### 参考文献:

- [1] Kandel E R. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses [ J ]. *Biological Reports* 2002, 21(5): 565– 610
- [2] Floyd P D, Li L J, Moroz T P, et al. Characterization of peptides from aplysia using microbore liquid chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry guided purification [ J ]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 830(1): 105– 113
- [3] Fieber L A. The development of excitatory capability in aplysia californica bag cells observed in cohorts [ J ]. *Developmental Brain Research* 2000, 122(1): 47– 58
- [4] Gregg A, Philip E L. Purification, primary structure, and neuronal location of cerebral peptide from Aplysia [ J ]. *Peptides* 1996, 17(3): 753– 761
- [5] Hummon A B, Huang H Q, Kelley W P, et al. A novel of prohormone processing site in Aplysia californica: the Leu-leu [ J ]. *Journal of Neurochemistry* 2002, 82(6): 1398– 1405
- [6] 黄河清. MALDI-TOF 质谱技术分析加洲海兔口腔神经节中超微量 Leu-leu 多肽酶 [ J ]. *分析仪器*, 2004, 141(2): 23– 26
- [7] Rubakhin S S, Graden R W, Fuller R R, et al. Measuring the peptides in individual organelles with mass spectrometry [ J ]. *Nature Biotechnology* 2000, 18: 172– 175
- [8] Li L, Graden R W, Sweedler J V, et al. Single cell MALDI-TOF: A new tool for direct peptide profiling [ J ]. *Trends in Biochemistry* 2000, 18(1): 151– 160
- [9] 吴韩志, 黄河清, 叶庆华, 等. 蓝斑背肛海兔神经连索外表层超微量多肽组成的研究 [ J ]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2004, 43(5): 710– 713
- [10] 黄河清, 孔文松, 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
- [11] 吕杨, 陈美香. 三种不同方法固定的石蜡切片中的 RNA 分析 [ J ]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(4): 247– 251
- [12] Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample prior to proteomic analysis [ J ]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1023: 317– 320

## The Optimized Extraction and Separation of the Proteome from the Cerebral Ganglion in *Aplysia*

ZHAN Yijie, LU Yongjin, ZHUO Huiqin, LING Xueping, HUANG Heqing\*

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

**Abstract** The Aplysia (*Notaricus Leachi cirrosus* Stimpson, NLCS) is an oceanic mollusk. The cerebral ganglion (CG) in NLCS contains high abundant lipid compounds, indicating that the compounds interfere strongly the precipitation of CG proteins with trichloroacetic acid-acetone. The object of this experiment is to find a method of extracting and separating the proteins of CG in aplysia. After comparison of several methods, an overspread centrifugation is discovered to have capacity for removing the lipid compounds in the suspension of CG for proteomic studies. The proteome resolution in CG can be improved with a typical separating approach of 2D-PAGE, which can detect about 450 protein spots.

**Key words** Aplysia, cerebral ganglion, proteome, optimized separation