

优化分离与鉴定蓝斑背肛海兔口腔神经节蛋白质组

陈东仕¹, 黄河清^{1,2,3}, 吴韩志^{1,3}, 蔡宗苇^{3,4}

(1 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,

2 近海海洋科学国家重点实验室, 3 固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005,

4 香港浸会大学化学系, 香港)

摘要 采用双向凝胶电泳技术优化分离蓝斑背肛海兔 (*Notarcus leachii cirrosus* Stimpson NLCS) 口腔神经节 (Buccal Ganglion, BG) 蛋白质组, 并获得约 300 个蛋白质斑点. 用组合基质辅助激光解吸电离化飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱技术和胶内酶解技术测定 BG 蛋白质组中的 96 个蛋白质斑点的肽指纹 (Peptide mass fingerprint, PMF) 图谱. 经数据库检索与比对后, 发现 96 种蛋白质中仅有 4 种蛋白质可获得较高的匹配率, 它们分别是微管蛋白 (Tubulin)、肌动蛋白 (Actin) 和两个 1,5-二磷酸核酮糖-羧化酶/加氧酶 (Rubisco-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco), 均属于神经细胞骨架蛋白质; 同时还发现一种交配信号肽前体 (Peptide mating pheromone precursor). 利用 LOCtree 软件和分类法对 56 种蛋白质进行亚细胞定位与分类.

关键词 海兔; 口腔神经节; 蛋白质组; 双向凝胶电泳; 质谱

中图分类号 Q51

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)07-1257-05

海兔中枢神经系统 (Central Nervous System, CNS) 是神经科学研究的经典模型之一. 在自然界中, 多数海兔 CNS 主要由口腔神经节 (Buccal Ganglion, BG)、大脑神经节 (Cerebral Ganglion, CG)、胸膜与足部神经节 (Pleura+Pedal Ganglion, PLG/PDG) 及腹神经节 (Abdominal Ganglion, AG) 等组成^[1], 但厦门 NLCS 却缺少 AG^[2]. BG 主要的生理功能是通过神经系统的信号回流产生一系列反馈活动, 其中包括口腔肌肉运动, 舌头伸缩, 调控食道蠕动以及嗉囊收缩等生理功能^[3].

近期, Nargeot 等^[4]采用电生理技术研究 BG 神经节 B52 神经元活性水平与舌头伸缩运动的关系. Hummon 等^[5]和 Huang 等^[6]陆续发现了 BG 含有 Leu-Leu 多肽内切酶. 海兔属于雌雄同体的软体动物, 它所分泌的多肽吸引素的作用主要用于召唤海兔聚集与交配. 口腔是接受和发射吸引素的器官, 它具有识别流动海水中超微量吸引素的功能. 有关吸引素的组成、结构与功能的研究是目前开展神经多肽研究的热点课题之一^[7,8]. 许多神经科学工作者曾分别采用毛细管电泳、生物质谱、免疫标记等分析技术研究海兔神经多肽的理化特性, 但有关海兔神经蛋白组的组成与结构尚未阐明, 其主要原因在于缺乏有效分离海兔 CNS 蛋白质组的方法^[9,10].

本文选用厦门 NLCS 的 BG 为研究材料, 采用双向凝胶电泳技术优化分离 NLCS 的 BG 蛋白质组, 并采用 MALDI-TOF 质谱和数据库检索技术初步鉴定 BG 中部分蛋白质的组成与功能, 其实验结果和分析技术可为今后深入开展海兔 CNS 蛋白质组的组成、结构与功能奠定良好的基础, 尤其在学习和记忆机理方面. 相关的研究在国内外尚未见详细报道.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

双向电泳仪 (Genomic solutions); DYCZ-24B 型垂直电泳槽 (北京六一仪器厂); REFLEX 型

收稿日期: 2005-06-13

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 40276033, 30470372) 和福建省自然科学基金 (批准号: C031006) 资助.

联系人简介: 黄河清 (1956 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事蛋白质结构与功能研究. E-mail: hquang@xmu.edu.cn

MALD FTOF 质谱仪 (德国 Bruker 公司); 超速冷冻离心机 (Beckman 美国); 真空浓缩离心机 (Labconco); Investigator HT Database 图像分析软件 (Genomic Solutions).

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)、四甲基乙二胺 (TEMED)、过硫酸铵 (APS)、硫脲、甘氨酸、十二烷基磺酸钠 (SDS)、NONIDETP-40 (NP-40) 及 CHAPS 均购置于上海生物工程公司; 载体两性电介质 ($\text{pH} = 3 \sim 9$, $\text{pH} = 5 \sim 8$, $\text{pH} = 4 \sim 6$) 购自北京军事医学科学院; 胰蛋白酶 (V5111) 购自 Promega 公司; SDS 标准购自 Fementas 公司; α -氰-4-羟肉桂酸 (HCCA) 购自美国 ICN 生物医学公司.

1.2 样品制备

蓝斑背肛海兔 (NLCS) 捕获于福建省厦门市内海浅滩区域. 每只 NLCS 净重在 80~200 g 之间, 采集后置于 14 °C 海水培养箱内人工养殖数天. 取 30 只 NLCS 置于 14 °C 海水中, 按每只 NLCS 体重注入等体积的氯化镁溶液 (28 mmol/L). 待 NLCS 组织软化后, 迅速在解剖镜下, 分离 NLCS 的 BG, 并用蒸馏水清洗 BG 3 次, 以清除其表面盐分和杂质, 收集于 0.5 mL 的离心管中, 置于 4 °C 冰浴中. 加入 300 μ L 裂解液 [8 mmol/L 尿素、40 mmol/L Tris、2 mol/L 硫脲、质量分数为 4% 的 CHAPS、10 mmol/L DTT、1 mmol/L EDTA (pH 约为 7.4)], 采用超声破碎技术振荡破碎 10 min, 收集破碎液置于 4 °C 冰箱中约 24 h, 使 BG 细胞最大量地释放内含物. 将所收集的 BG 内含物置于冷冻离心机内, 以 35 000 r/min 速度离心 45 min, 去除离心液上层的大量脂类化合物, 分离提取离心液中间层的透明澄清蛋白质样品, 即为 BG 蛋白质组提取液, 进行双向凝胶电泳分离.

BG 蛋白质含量测定按常规的考马斯亮蓝法分析, 标准蛋白质选择纯度为 99% 的牛血清白蛋白, 检测波长为 595 nm.

1.3 双向凝胶电泳

按照 1.10 g 超纯尿素 + 394 μ L 双蒸水 + 400 μ L 质量分数为 10% 的 NP-40 + 266 μ L 单体储液 (质量分数为 29.1% 的丙烯酰胺 / 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 质量分数为 10% 的 APS 的配方配置 2 mL 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: (1) 200 V, 15 min; (2) 300 V, 30 min; (3) 400 V, 60 min. 然后, 将柱中的裂解液抽出, 换上样品液, 在电压为 400 V 的条件下进行等电聚焦电泳约 18 h.

等电聚焦结束后, 迅速取出第一个胶条于平衡液 [50 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH} = 8.8$)、6 mol/L 尿素、体积分数为 30% 的甘油、2% 的 SDS、1% 的 DTT] 中平衡 15 min. 将平衡后的胶条转移到质量分数为 12%, 规格为 200 mm \times 200 mm \times 0.7 mm 的 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.

1.4 银染和 SDS 胶的保存

参照文献 [11] 和安发玛西亚关于双向电泳的实验技术指南的银染方法进行染色. 利用图像扫描仪对 SDS 凝胶进行透射扫描, 所得的图谱用 Investigator HT Database 软件进行图像分析. 之后用保鲜膜将 SDS 胶封好保存于 4 °C 冰箱中, 用于肽指纹分析.

1.5 蛋白质的原位酶解

用干净的解剖刀将感兴趣的蛋白点从胶条上切下来, 保存在 0.5 mL 的离心管中, 进行酶解. 酶解和肽段的提取参照文献 [12] 的方法进行. 最后将肽段提取液置于真空浓缩离心机中干燥, 之后加入 2.5 μ L 体积分数为 0.5% 的 TFA 溶液溶解肽段, 用于 MALD FTOF 质谱分析.

1.6 肽质谱指纹分析

将上述溶液与 HCCA 饱和基质溶液 (HCCA 溶于体积分数为 40% 的乙腈, 0.1% 的 TFA 溶液至饱和) 以 1:1 的体积比混合, 取 1 μ L 混合液点滴在不锈钢 MALD FTOF 质谱点样板上, 置于空气中自然风干, 随后进行质谱分析. 采用高分辨率反射模式, 离子源加速电压 1 为 20 kV, 加速电压 2 为 18.85 kV, N_2 激光波长 337 nm, 脉冲宽度 3 ns, 离子延迟提取时间 500 ns, 真空度 5.33×10^{-5} Pa. 质谱信号单次扫描累加 10 次, 正离子谱测定, 用外标法标定多肽质谱峰位.

1.7 质谱数据的数据库检索

进入 MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) 检索网站, 利用 SW ISS-PORT, MSDB 和 NCBI 等 3 个数据库对获得的混合物肽段质量数据进行检索. 检索参数如下: 最大允许的肽质量误差为 0.5 每个肽段允许有 1 个不完全裂解位点, 固定修饰 (Fixed modifications) 选择羟甲基 (Hydroxymethyl) 修饰, 可变修饰 (Oxidation modifications) 选择氧化 (Oxidation) 修饰.

2 结果和讨论

2.1 优化双向凝胶电泳分离 BG 蛋白质组

海兔 CNS 一般都含有丰富的脂类物质, 它对蛋白质提取、溶解以及双向凝胶电泳分离蛋白质组的效果均会产生一定的干扰. 采用常规丙酮沉淀法去除 BG 中大量的脂类时, 由于 BG 中总蛋白含量少, 在去脂过程中将造成部分蛋白质损失, 不适合进行 BG 蛋白质组提取. 同时, 尝试了使用样品裂解液直接破碎 BG 细胞方法, 并选用离心技术分离 BG 蛋白质组. 结果表明, 这一分离与提取技术不仅能有效地去除 BG 的脂类物质, 同时能减少 BG 蛋白质丢失.

此外, 对双向凝胶电泳的上样量和载体两性电解质的 pH 范围进行优化, 发现 BG 上样量中的蛋白质质量浓度为 2.0 mg/mL 时, 采用银染法, 最佳蛋白质提取液上样量为 25~30 μ L. 同时, 采用载体两性电解质的 pH 范围为 5.0~8.0 相对于 pH = 3.0~9.0 和 pH = 4.0~6.0 更有利于 BG 蛋白质组的分离.

采用优化后的双向电泳条件对 BG 蛋白质组进行分离, 结果见图 1.

图 1 结果显示, 在凝胶层析板的中间区域, 蛋白质斑点数目相对集中, 这表明中性蛋白质种类较多; 而左侧蛋白质斑点的数目多于右侧, 这示意弱酸性蛋白质种类多于弱碱性蛋白质. 进一步的分析结果可知, 图 1 所显示的蛋白质分子量由上到下逐步增加, 多数蛋白质分子量位于 35 000~110 000 之间, 超过该范围的蛋白质种类较少. 此外, 图 1 中所显示的各种蛋白质斑点之间的染色深浅和相对面积均存在着较大差异, 反映出 BG 蛋白质组由相对含量差异较大的蛋白亚基组成. BG 蛋白质组的组成与含量呈复杂化特点.

2.2 蛋白点的肽指纹鉴定

选用 Investigator HT Database 软件对图 1 进行图谱分析, 可检测到 300 个左右的蛋白质斑点, 并对其中 96 个斑点进行肽指纹分析. 由于蛋白胶内酶解的操作复杂, 难以回收全部的酶解肽段, 一些疏水性较强的肽段或过长的肽段均可能会丢失, 导致覆盖率仅在 20%~50% 之间. 尽管如此, 蛋白质具有很强的序列专一性, 酶解后产生的肽混合物质量数仍具有特征性, 可通过肽谱分析, 并结合 2D-PAGE 的等电点和分子量信息鉴定蛋白质. 经过数据库检索, 除去了分值比较的结果, 最终鉴定了 NLCS 的 BG 中 56 种蛋白质和多肽.

从检索的匹配情况来看, 在这些蛋白和多肽中, 有 4 个匹配率较高 (得分超过 76) 的蛋白质 (见表 1), 45 个匹配率较为理想 (得分在 50~76 之间) 的蛋白质; 其余均是匹配率较低的蛋白质. 较高匹配率的蛋白质分别是 β 微管蛋白 (No 20, β tubulin)、肌动蛋白 (No 22, Actin) 以及两个 1,5-二磷酸核

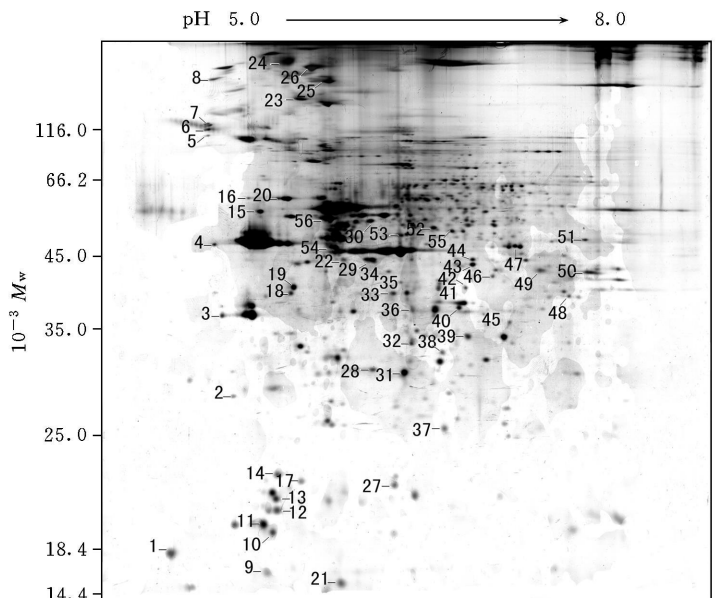


Fig 1 2D-PAGE map of BG proteome with the pH 5.0-8.0

Table 1 BG proteins identified with database search

Spot No	Protein name	Score	M_w	pI	Coverage(%)	Accession No
20	β tubulin	82	50 742	4.73	24	gil30088884
22	Actin	76	41 827	5.30	29	gil224305
25	Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	83	49 302	6.41	20	gil33328604
26	Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase large subunit	80	50 753	6.33	28	gil1771418
41	Peptide mating pheromone precursor Bbp2-5	48	9 645	7.93	36	gil14269434

酮糖-羧化酶加氧酶的大亚基 (Nos 25, 26 ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit 和 ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase large subunit). 除此之外, 还发现一种与海兔信号传导有关的多肽——交配信号肽前体 (No 41, peptide mating pheromone precursor Bbp2-5) (见表 1). 交配信号肽对于海兔的繁殖有着重要意义, 它主要用于吸引其它同类海兔聚集与交配. 目前已经发现的信号肽有吸引素 (Attractin) 和产卵激素 (Egg laying hormone, EIH)^[13-14]. NLCS 口腔神经节蛋白质组中的交配信号肽前体有可能就是海兔用于合成 Attractin 和 EIH 的前体多肽.

通过数据检索与统计, 发现 40 个蛋白质中涉及各种酶类、结构蛋白、转运蛋白以及抗原, 还有一些未知蛋白; 而 16 个多肽涉及信号多肽、蛋白亚基和一些肽段. 这些实验结果说明 NLCS 的 BG 中含有丰富的蛋白质和多肽. 为了获得更多蛋白质组成与功能信息, 依据 Nair 和 Rost^[15] 提供的软件和分类法, 进入 LOCtree server 的网站 (<http://cubic.bioc.columbia.edu/services/locree/>) 对这 56 种蛋白质进行亚细胞定位检索, 并依此进行蛋白质分类. 结果表明, 这些蛋白可分为六类, 即线粒体蛋白 (11 种)、核蛋白 (6 种)、DNA 结合蛋白 (4 种)、细胞质蛋白 (22 种)、细胞外蛋白 (9 种) 以及其它细胞器蛋白, 其具体分布情况可见表 2. 预计这些细胞定位结果将对今后阐明 BG 蛋白质组结构与功能起着重要的作用.

Table 2 The subcellular localization of BG proteins

Subcellular localization	Spot	Sum	Percentage(%)
Cytoplasmic	2, 6, 12, 13, 19, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,	22	39.3
	32, 33, 36, 39, 41, 42, 53, 56		
Extra-cellular	4, 9, 16, 17, 18, 37, 38, 40, 55	9	16.2
Mitochondria	3, 8, 10, 14, 15, 21, 24, 43, 45, 50, 54	11	19.6
Nuclear	11, 20, 34, 44, 47, 52	6	10.7
DNA-binding	5, 35, 46, 48	4	7.1
Organelar	1, 7, 49, 51	4	7.1

3 结 论

本文选用蛋白质组学技术优化 NLCS 的 BG 蛋白质组的分离、纯化. 利用 LOCtree 软件构建 BG 蛋白质组信息图谱, 它可为今后发现 BG 新蛋白质的结构与功能奠定良好的基础. 但由于所采纳的蛋白质组分离与 PMF 鉴定技术存在一些不足之处, 即在进行肽指纹数据库检索时, 由于海兔神经蛋白质理化参数在国际各大数据库中较为缺乏, 加上物种间相同功能蛋白质的一级结构上存在着较大差异等缺陷, 导致检索结果中只有少数的蛋白来源于海兔, 多数蛋白质还需要通过其它分析方法给予逐一证实^[16-19].

参 考 文 献

- [1] HUANG He-Qing (黄河清). Analytical Instrumentation (分析仪器) [J], 2004, 2: 23-27
- [2] WU Han-Zhi (吴韩志), HUANG He-Qing (黄河清), YE Qing-Hua (叶庆华) *et al.*. Journal of Xiamen University, Natural Science Edition (厦门大学学报, 自然科学版) [J], 2004, 43(5): 710-713
- [3] Hom C. C., Kupfermann I. Neuroscience Letters [J], 2002, 323(2): 175-178
- [4] Nargeot R., Baxter D. A., Byme J. H. Neuroscience Letters [J], 2002, 328(2): 85-88
- [5] Humm A. B., Sweedler J. V., Corbin R. W. TrAC Trends in Analytical Chemistry [J], 2003, 22(8): 515-521
- [6] HUANG He-Qing (黄河清), KM Won-Suk, LN Qing-Mei (林庆梅). Marine Sciences (海洋科学) [J], 2004, 28(5): 53-57

- [7] Cummins S. F., Nichols A. E., Rajarathnam K. *et al.* Peptides[J], 2004 **25**(2): 185—189
- [8] Susswein A. J., Nagle G. T. Peptides[J], 2004 **25**(9): 1523—1530
- [9] Rubakhin S. S., Page J. S., Monroe B. R. *et al.* Electrophoresis[J], 2001, **22**(17): 3752—3758
- [10] Kruse R., Sweedler J. V. Journal of the American Society for Mass Spectrometry[J], 2003, **14**(7): 752—759
- [11] GUO Yao-Jun(郭尧君). Experimental Technique of Protein Electrophoresis(蛋白质电泳实验技术)[M], Beijing Science Press 1999 141—142
- [12] CHEN Ping(陈平), XIE Jir-Yun(谢锦云), LIANG Song-Ping(梁宋平). Acta Biochimica et Biophysica Sinica(生物化学与生物物理学报)[J], 2000 **32**(4): 387—391
- [13] Akahli D. G., Cummins S. F., Painter S. D. *et al.* Peptides[J], 2003 **24**(8): 1117—1122
- [14] Susswein A. J., Nagle G. T. Peptides[J], 2004 **25**(9): 1523—1530
- [15] Nair R., Rost B. Journal of Molecular Biology[J], 2005 **348**(1): 85—100
- [16] Huang H. Q., Xiao Z. Q., Lin Q. M. *et al.* Anal. Chem. [J], 2005, **77**(6): 1920—1927
- [17] ZHOU Bo(周波), YANG Wei(杨伟), ZHANG Jing-Hua(张景华) *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2003 **24**(12): 2202—2207
- [18] NE Song(聂松), CHEN Ping(陈平), LIANG Song-Ping(梁宋平). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005 **26**(1): 68—72
- [19] WANG Qun(王群), NI Jir-Zuan(倪嘉纘). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005 **26**(5): 870—873

Optimized Separation and Identification of Proteome from the Buccal Ganglion of *Aplysia (Notarcus leachi cirrosus Stimpson)*

CHEN Dong-Shi¹, HUANG He-Qing^{1,2,3}, WU Han-Zhi^{1,3}, CAI Zong-Wei^{3,4}

(1 The Key Laboratory of MOE for Cell Biology and Tumor Cell Engineering School of Life Science,

2 State Key Laboratory of Marine Environmental Science,

3 State Key Laboratory for Physical Chemistry of the Solid Surface, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

4 Department of Chemistry, Hong Kong Baptist University, Hong Kong, China)

Abstract A separation method of proteome from the buccal ganglion of *aplysia (Notarcus leachi cirrosus Stimpson)*, NLCS) with two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) was optimized, gaining about 300 protein spots. Mass spectrogram of peptide mass fingerprint (PMF) of 96 protein spots from the BG were obtained by a combined off-line technique of the matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and the enzymolysis in gel. Based on the identification *via* the databases searches and PMF maps, we found that four of 96 proteins in the gel showed the characteristics with high match scores, which were indicated to be framework proteins tubulin, actin, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase and oxygenase in neurons cell, meanwhile, a peptide mating pheromone precursor was found. Fifty-six proteins in BG were further classified by a LOC tree software according to the search result of subcellular localization.

Keywords *Aplysia*; Buccal ganglion; Proteome; 2D-PAGE; Mass spectrometry

(Ed: H, J, Z)