

金乌贼视神经节蛋白质组分离方法的初步研究

黄福生, 黄河清*, 黄慧英

(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: 选用 TCA/丙酮沉淀法、缓冲液法、柱层析法、裂解液法和裂解液-超速离心法分别提取金乌贼视神经节蛋白质, 其中蛋白质得率较高的方法有裂解液-超速离心法、裂解液法, 其次为 TCA/丙酮沉淀法。经双向凝胶电泳分离, 并采用 Melanie 4 Trial 软件统计蛋白质斑点数目。发现 pH 5~8 范围的载体两性电解质适合于分离视神经节蛋白质组, 其电泳图谱中多数蛋白质斑点清晰可见, 显示出高分辨率、重复性好和易取样供质谱分析的优点, 适合于开展视神经节蛋白质组学研究。裂解液-超速离心法是金乌贼视神经节最佳蛋白质提取方法。

关键词: 金乌贼; 视神经节; 双向凝胶电泳; 蛋白质组

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)03-0406-05

金乌贼(*Sepia esculenta*, Hoyle) 属于软体动物门(Mollusca) 头足纲(Cephalopoda) 二鳃亚纲(Dibranchia) 乌贼目(Sepioidea), 俗称墨鱼、乌鱼, 是福建海域内常见的头足类动物。头足类动物是软体动物门的重要类群, 它们不仅是海洋渔业重要经济动物之一, 而且是海洋生态系统数量调节的关键因素之一^[1]。头足类神经系统复杂, 神经节集中于头部; 眼球构造呈晶体状, 与高等动物很类似^[2]。近年来, 国内外科研机构和养殖渔业对开展头足类动物的科学研究投入逐年递增, 并有大量的研究报道, 但对头足类蛋白质组学的研究尚未见详细报道。现今, 蛋白质组学技术已经得到了长足的进步: 固相 pH 梯度技术的应用大大提高了上样量; 质谱分析中基质辅助激光解析电离飞行时间和电喷雾电离技术的应用, 使蛋白质鉴定的速度、灵敏度大大提高; 酵母双杂交系统等技术, 在蛋白质功能模式研究中逐渐展开; 生物信息学的发展取得了突破性进展^[3]。这些技术的进步使蛋白质组学更加广泛的应用于生命科学的各个领域。应用蛋白质组学技术可以同时研究大量蛋白质的功能、组成、多样性及其动态变化, 将其用于神经系统的研究, 将为神经疾病发病机制的深入研究及相关神经药物的开发开创一个崭新的领域^[4]。应用蛋白质组学的方法, 可以对细胞生长、分化过程中细胞信号传导通路上的蛋白质之间的相互作用进行更为深入的研究, 有望发现控制特定生物学行为的诸多蛋白质和信号分子^[5]。

细胞或组织蛋白质样品制备是开展蛋白质组学研究的关键环节之一^[6], 本文以金乌贼视神经节为研究对象, 比较 TCA/丙酮沉淀法、缓冲液法、柱层析法、裂解液法和裂解液-超速离心法提取神经节蛋白质的优缺点, 可为今后深入开展视神经系统蛋白质组学研究提供可行性科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料与试剂

金乌贼捕获于厦门内海区域。

实验试剂丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、超纯尿素(Urea)、过硫酸铵(APS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、NONDETP-40(NP-40)及 CHAPS 等均购自上海生工; 载体两性电解质(pH 3~10, pH 5~8)购自北京军事医学科学院; SDS 分子量标准购自 Fermentas 公司; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-15 购自上海试剂厂。

1.2 仪器设备

双向电泳槽: DYCZ-26 型, 北京六一仪器厂; 垂直电泳槽: DYCZ-24B 型, 北京六一仪器厂; 超速冷冻离心机: SCP55H, Hitachi; 冷冻干燥机: FREEZONE 18, LABCONCO。

1.3 蛋白质提取液

从文献中总结挑选出以下 3 种蛋白提取液:

(1) 有机溶剂提取液(TCA/丙酮)^[7]: 称 10 g TCA 和 0.2 g DTT 溶于 100 mL 丙酮。

(2) 提取缓冲液(Tris-HCl)^[7]: 200 μ L PM SF(100 mmol/L) + 80 μ L 的 250 mmol/L EDTA 溶液, 用 0.02 mol/L Tris 缓冲液(pH = 7.4)溶解并定容至 20

收稿日期: 2006-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(30470372)和厦门大学预研基金(2004xdcx 207; XDKJXC20051009)资助

* 通讯作者: hhuang@xmu.edu.cn

mL.

(3) 裂解液^[8]: 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 PMSF, 0.5% CA, 0.000 2% 溴酚蓝. 每 0.5 mL 分装, -20℃ 保存待用.

1.4 提取视神经节蛋白质组方法

(1) TCA/丙酮沉淀法: 称取 0.1 g 金乌贼视神经节置于 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μ L -20℃ 预冷的 TCA/丙酮溶液, 戳碎神经节, -20℃ 静置 4 h 后, 离心 10 min (4℃, 12 000 r/min). 所得沉淀重悬浮于 -20℃ 冷丙酮溶液中, -20℃ 静置 1.5 h, 离心 15 min (4℃, 12 000 r/min), 弃上清. 随后在 4℃ 冰箱内风干沉淀物. 加入 500 μ L 裂解液溶解沉淀, 所得液体作为双向电泳样品 (a).

(2) 缓冲液法: 将 0.1 g 视神经节置于小研钵中, 加入 3 mL 提取缓冲液, 冰上研磨 3 min, 将液体转移到 10 mL 离心管中. 用 5 mL 缓冲液清洗研钵, 并转移到同一离心管中. 4℃ 静置 1.5 h 后, 离心 30 min (4℃, 16 000 r/min). 取其上清液, 低温冷冻干燥成粉末之后, 用 500 μ L 裂解液溶解, 所得液体作为样品 (b).

(3) 柱层析法: 将适量葡聚糖凝胶 Sephadex G-15 灌入 1 mL 塑料注射器中, 制成高 25 mm 内径 6 mm 的层析柱. 重复 1.4(2) 步骤直至取得样品粉末, 用 500 μ L Tris-HCl 缓冲液溶解. 每次取 100 μ L 过柱, 用 Tris-HCl 缓冲液洗脱. 收集 5 管, 每管收集 100 μ L 洗脱液. 总共收集了 25 管, 每管分别取 3 μ L 液体用 Bradford 法^[9]测蛋白浓度, 将测得有蛋白存在的管中的液体合并, 低温冷冻干燥成干粉之后, 用 100 μ L 裂解液溶解, 所得液体作为样品 (c).

(4) 裂解液法: 将 0.1 g 视神经节置于 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μ L 裂解液, 戳碎神经节. 置于 -20℃, 冻成固体后, 取出在冰上融解, 重复冻融 2 次, 之后置于 4℃ 过夜. 将样品离心 15 min (4℃, 12 000 r/min), 取其上清液作为样品 (d).

(5) 裂解液-超速离心法: 将 1.4(4) 所得到的样品 (d) 超速离心 35 min (4℃, 100 000 \times g). 避开上层的脂

类和下层的沉淀, 吸取中间澄清的液体作为样品 (e).

1.5 样品浓度的测定

根据 Bradford 法^[9]分别测定样品 (a), (b), (c), (d), (e) 的蛋白浓度.

1.6 双向凝胶电泳分离及染色

双向凝胶电泳常用溶液的配制及双向电泳的步骤参见文献^[8]. 银染溶液、保存液的配制及银染方法参照郭尧君著《蛋白质电泳实验技术》^[9]. 染色后, 利用图像扫描仪对 SDS 凝胶进行透射扫描. 所得的图像用软件 Melanie 4 Trial 分析计算蛋白亚基斑点数.

2 结果与讨论

2.1 样品制备

实验结果表明, 视神经节蛋白质提取率与所选用提取方法有关. 表 1 是在相同金乌贼视神经节重量条件下, 采取不同方法所获得的蛋白质提取率. 从表 1 中可看出, 裂解液法和裂解液-超速离心法所获得蛋白质得率最高, 其次为 TCA/丙酮沉淀法; 缓冲液法和柱层析法提取蛋白质的效率欠佳, 这与缓冲液直接破碎神经节细胞效率低和柱层析分离蛋白质损失率高有关. 提取样品始终维持在 4℃ 环境下, 能起到降低水解酶活性和减少蛋白质降解速率的效果.

裂解液法和裂解液-超速离心法均是靠裂解液提取视神经节中的蛋白质. 裂解液能够提取高产率蛋白质的最大优势在于其中含有高浓度的尿素 (7 mol/L) 和硫脲, 它们均具有较好溶解蛋白质和解折叠多数蛋白质的功能, 尤其是膜蛋白. 裂解液中的去污剂 CHAPS 可以减缓蛋白质通过疏水键作用而聚合沉淀, 起到了提高蛋白质溶解度的效果. 此外, 裂解液中还原剂 DTT 和少量载体两性电解质都可起到促进蛋白质溶解的效果; EDTA 和 PMSF 等有机化合物则具有抑制蛋白水解酶活性的作用, 从而减少蛋白质的降解率^[8]. 由此来看, 裂解液配方中许多有机化合物均对提高蛋白质溶解度起着重要的作用, 因而可获得比采用其他方法更高蛋白质得率的效果.

表 1 金乌贼视神经节蛋白质提取率

Tab. 1 The extracting rate of the protein from the optic ganglion of *Sepia esculenta*

方法	TCA/丙酮沉淀法	缓冲液法	柱层析法	裂解液法	裂解液-超速离心法
浓度(μ g/ μ L)	17.25	5.55	5.87	22.5	21.3
样品终体积(μ L)	500	500	100	500	500
蛋白质总量(μ g)	8625	2775	587	11250	10650
视神经节(g)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
提取率(%)	8.63	2.78	0.59	11.25	10.65

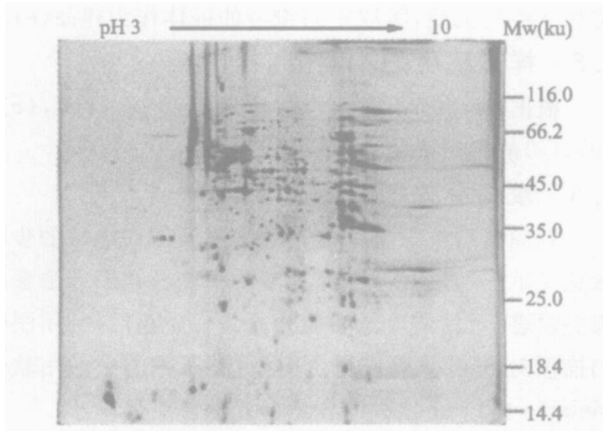


图 1 金乌贼视神经节蛋白质组双向凝胶电泳图谱 (TCA/丙酮沉淀法)

Mw: 分子量

Fig. 1 2-DE map of *Sepia esculenta* optic ganglion proteome precipitated with TCA/acetone buffer

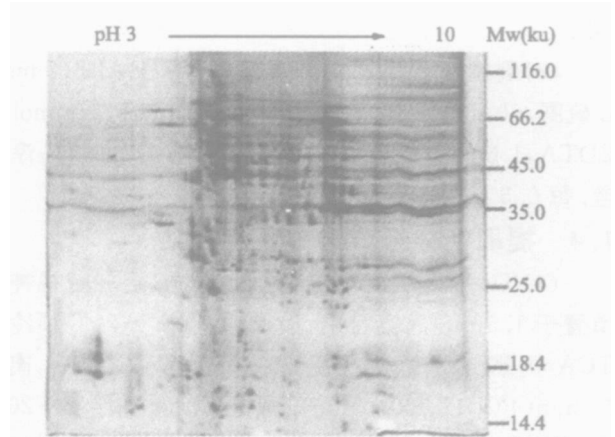


图 2 金乌贼视神经节蛋白质组双向凝胶电泳图谱(缓冲液法)

Mw: 分子量

Fig. 2 2-DE map of *Sepia esculenta* optic ganglion proteome extracted by Tris-HCl buffer

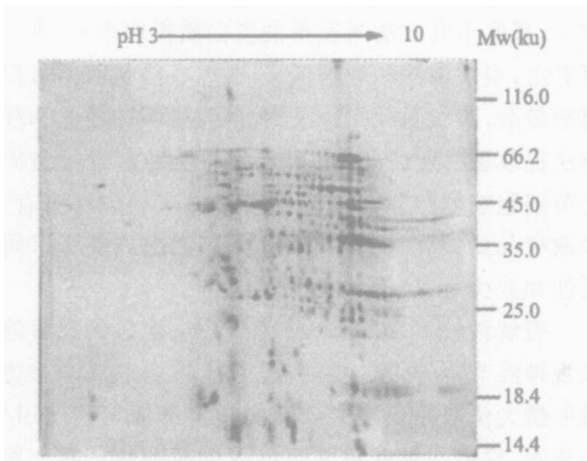


图 3 金乌贼视神经节蛋白质组双向凝胶电泳图谱(柱层析法)

Mw: 分子量

Fig. 3 2-DE map of *Sepia esculenta* optic ganglion proteome using column chromatography

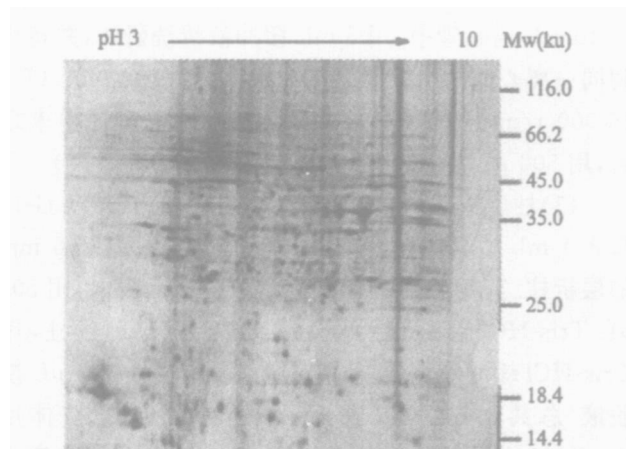


图 4 金乌贼视神经节蛋白质组双向凝胶电泳图谱(裂解液法)

Mw: 分子量

Fig. 4 2-DE map of *Sepia esculenta* optic ganglion proteome dissolved by lysis buffer

2.2 蛋白质组双向凝胶电泳分离

采用上述 5 种不同方法分别提取视神经节蛋白质样品,经双向凝胶电泳分离后,可以得到图 1~5 的结果.用 Melanie 4 Trial 软件分别分析胶片上的蛋白亚基斑点,结果如表 2 所示.

从表 2 和图 1~5 中可直观地看出:采用柱层析

法、TCA/丙酮沉淀法、缓冲液法、裂解液法、裂解液-超速离心法所获得的蛋白质斑点数目分别为 333、386、426、482 和 594,所得蛋白质种类及数量与蛋白质提取技术有关.

适量的蛋白质上样量是优化蛋白质组分离、提高蛋白质分辨率和低丰度蛋白质检测灵敏度的关键性要素之一.合理的上样量与蛋白质的种类、数量、凝胶的

表 2 提取方法与视神经节蛋白质斑点数目对照表

Tab. 2 Comparison table between the extracting methods and protein spots of optical ganglion

方法	TCA/丙酮沉淀法 (图 1)	缓冲液法 (图 2)	柱层析法 (图 3)	裂解液法 (图 4)	裂解液-超速离心法 (图 5)
蛋白质点数	386	426	333	482	594

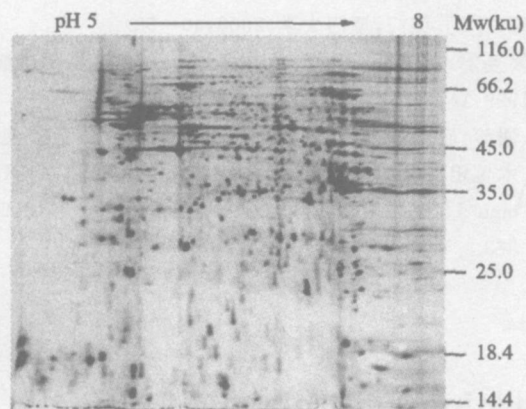


图 5 金乌贼视神经节蛋白质组双向凝胶电泳图谱(裂解液-超速离心法)

Mw: 分子量

Fig. 5 2-DE map of *Sepia esculenta* optic ganglion proteome handled with ultracentrifugation

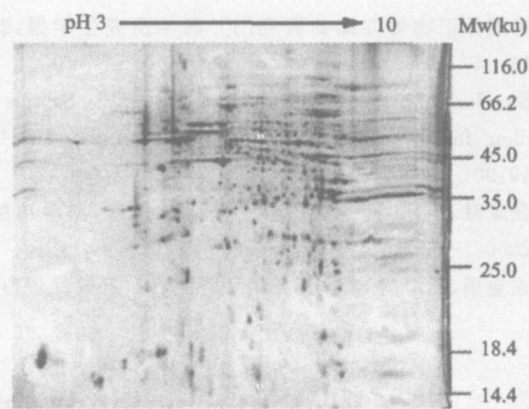


图 6 金乌贼视神经节蛋白质组双向凝胶电泳图谱(裂解液-超速离心法, pH 3~10)

Mw: 分子量

Fig. 6 2-DE map of *Sepia esculenta* optic ganglion proteome handled with ultracentrifugation (pH 3~10)

厚度以及检测方法有关. 为了获得高分辨率的蛋白质组电泳图谱, 作者经过优化分离后, 发现上样量大于 300 μg 时, 蛋白质相邻斑点间显示融合现象, 蛋白质斑点之间的边界不清, 条纹也较浓重, 不利于对蛋白质进行鉴定; 但上样量小于 50 μg 时, 因上样量偏低, 造成蛋白质斑点显色浅淡, 影响后续鉴定工作; 选择 80 ~ 220 μg 蛋白质的上样量是最佳的浓度范围, 这个上样量对于不同的蛋白质提取方法均能获得较好的分离效果和清晰的蛋白质组电泳图谱, 适合于开展蛋白质组学研究.

图 5 与图 6 相比, 它们所用的样品与电泳条件相同, 不同的是所用的载体两性电解质图 6 是 pH 3~10, 而图 5 中用的是 pH 5~8. 从结果来看, 图 6 上的蛋白点比较集中在电泳图的中间, 蛋白点比较密集分离效果较差. 图 5 中蛋白点在电泳图上分布比较均匀, 各点清晰, 分离效果好于图 6. 因此使用 pH 5~8 的载体两性电解质可以获得满意的双向电泳图谱. 在进行第二向 SDS-PAGE 时, 选择浓度 12% 分离胶较为适合, 可获得大小分子量的蛋白质在胶上分布较均匀的效果.

2.3 讨论

上述图表已表明, 采取不同的蛋白质提取方法可获得不同的蛋白质种类和含量. 优化蛋白质组提取技术是开展视神经节蛋白质组学研究的关键要素. 由于金乌贼视神经节比较大, 含有丰富的胶状物质, 即脂类物质含量较高. 采用缓冲液法(图 2)和裂解液法(图 4)均可直接释放出视神经节中大量脂类物质, 虽然获得了较为满意的蛋白质斑点数目, 但所获得的蛋白质斑点的分辨率较低并且清晰性不够, 胶片上条纹也较多,

干扰后续蛋白质鉴定. 采用有机溶剂沉淀法(TCA/丙酮)(图 1)和柱层析法(图 3)均能清除神经节中脂类物质, 但所获得的蛋白质种类和含量明显偏低, 尽管能获得较高蛋白质斑点分辨率和清晰度, 却无法反映出视神经节多数蛋白质的表达情况, 不符合开展完整细胞蛋白质组学研究的基本要求.

采用裂解液-超速离心法, 不仅可有效去除脂类物质, 而且蛋白质损失率较低, 可获得较为理想的双向凝胶电泳图谱(图 5). 图 5 结果显示, 所获得的蛋白质斑点数目(表 2)不仅最多, 而且斑点之间边界清晰、拖带少并且横纹竖纹较少, 很适合于开展蛋白质组鉴定分析工作. 繁琐的样品制备步骤往往容易造成样品中蛋白质组分的丢失^[10], 从上面的分析结果可以得出结论, 用裂解液直接裂解金乌贼视神经节组织, 并用超速离心方法去除某些影响二维电泳的杂质的方法, 不仅步骤简单、样品蛋白得率最大, 而且双向电泳图谱上的蛋白斑点数最多、清晰可辨、分离充分、横竖纹和拖带较少, 是适合提取金乌贼视神经节蛋白质组的方法.

参考文献:

- [1] 陈新军. 世界“头足类”经济资源及其开发利用状况[J]. 世界科学, 2005, 3: 25-26.
- [2] 陈品健, 陈小麟. 动物生物学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1996: 173-175.
- [3] 缪红军, 蒋犁. 蛋白质组学在神经系统疾病中的应用[J]. 国外医学儿科学分册, 2004, 31: 25-27.
- [4] 李春阳, 李林. 蛋白质组学在神经系统疾病研究中的作用[J]. 生理科学进展, 2005, 36: 286-289.
- [5] 李刚, 祁晓平, 刘福坤. 肿瘤蛋白质组学在信号传导通路、

- 肿瘤标记物等方面的研究[J]. 医学研究生学报, 2003, 16: 947- 950.
- [6] Staudenmann W, Hatt P D, Hoving S, et al. Sample handling for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 1998, 19: 901- 908.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 1- 62.
- [8] 朱金勇, 黄河清. 镉盐诱导的牙鲆脑、鳃、肝差异蛋白质组研究[C]. 厦门: 厦门大学, 2005: 40- 58.
- [9] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 141- 142.
- [10] 谢玲, 应万涛, 张开泰, 等. 双向电泳和肽质量指纹谱技术鉴定支气管上皮细胞恶性转化相关蛋白 ANX1-human[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16: 569- 573.

The Preliminary Study on the Separation of Proteome from the Optical Ganglion of *Sepia esculenta*

HUANG Fu-sheng, HUANG He-qing^{*}, HUANG Hu-yi-ying

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

Abstract: Five analytical approaches, such as the precipitation separation of TCA/ acetone, the buffer extraction, the column chromatography, the lyolysis buffer, and the lyolysis-ultracentrifugation, were compared to extract and separate the protein from the optic ganglion of *Sepia esculenta*, respectively. With the reference to total protein concentration, both the lyolysis buffer and the lyolysis-ultracentrifugation can obtain the maximum output of the protein, next with the precipitation separation of TCA/ acetone. We indicated that the carrier ampholytes covering range of pH 5.0~ 8.0 is suit for separating the proteome of optic ganglion. Most protein spots in the gel were clearly observed, showing much advantage of high resolution, of perfect repetition, of taking protein spots easily for analysis of mass spectrometry after separated with 2-DE. Thus, we indicated it is suit for employing the proteomic research in the optic ganglion. The lyolysis-ultracentrifugation is a perfect approach for extracting protein in the optic ganglion of *Sepia esculenta*.

Key words: *Sepia esculenta*; optic ganglion; two-dimensional gel electrophoresis; proteome