

提取与分离方法影响海兔口腔神经节蛋白质组的分离效果

朱斌琳, 陈东仕, 翁露娜, 颜利, 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: 选用丙酮沉淀法和直接裂解法分别提取离蓝斑背肛海兔 (*Notarus leachii cirrosus* Stimpson, NLCS) 口腔神经节 (Buccal Ganglion, BG) 全蛋白质, 发现采用直接裂解法所获得 BG 蛋白质种类多于丙酮沉淀法。在第一向等电聚焦电泳 (IEF) 中, 分别选用 pH 为 3.0~9.0、4.0~6.0 和 5.0~8.0 的载体两性电解质, 发现载体两性电解质 pH 范围为 5.0~8.0 时分离效果最好。使用 Melanie 4 Trial 软件统计 BG 蛋白质斑点数目约为 290 点, 适于开展 BG 蛋白质组学研究。

关键词: 蓝斑背肛海兔; 蛋白质组; pH; 优化提取与分离

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)S2-0096-04

海兔属于雌雄同体类的软体动物。海兔中枢神经系统 (Central Nervous system, 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)、腹神经节 (Abdominal Ganglion, AG) 和神经连索等部位组成^[1]。蓝斑背肛海兔 (NLCS) 的 CNS 与其他多数海兔不同之处在于缺乏 AG^[2]。从进化角度考虑, NLCS 是否比其他海兔更高等些至今尚未清楚。BG 主要的生理功能是产生口腔肌肉运动, 舌头伸缩, 调控食道蠕动以及嗉囊收缩等一系列生理功能^[3]。

近期, 作者曾采用基质辅助激光解吸电离化飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱技术研究杂斑海兔 (*Aplysia juliana* Quoy & Gaimard) 和美国加州海兔 (*Aplysia californica*) 的 CNS 神经连索外表层多肽过程中, 发现两者均含有丰富的多肽组成, 部分多肽表现出转移现象^[4]。林庆梅等采用 MALDI-TOF 质谱技术研究海兔大脑神经节超微量多肽内切酶和酸性多肽产物, 解释酶解途径与规律^[5]。陈东仕等采用裂解和超声破碎法分离提取 NLCS 的 BG 蛋白质组, 供双向凝胶电泳分离与蛋白质鉴定, 统计出每块胶板中具有 300 个蛋白质斑点, 并对部分蛋白质进行组成鉴定^[1]。如何有效提取与分离海兔 CNS 全蛋白质是开展蛋白质组学的重要实验步骤, 开展相关研究潜在着重要的科学意义。

本文选用厦门 NLCS 的 BG 为研究材料, 选用不同提取方法和的载体两性电解质 pH 研究影响海兔口腔神经节蛋白质组分离效应, 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基础, 尤其在学习和记忆机理方面。

1 材料与方法

1.1 材料

NLCS 捕获于福建省厦门市集美区内海浅滩区域。每只海兔净质量约为 200 g。

丙稀酰胺、甲叉丙稀酰胺、二硫苏糖醇 (DTT)、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)、NON IDETP-40 (NP-40)、CHAPS 均购自上海生工; 载体两性电介质 (pH = 3.0~9.0, pH = 5.0~8.0, pH = 4.0~6.0) 购自北京军事医学科学院; SDS 分子量标准购自 Fermentas 公司。

1.2 方法

取海兔 20 只, 按每只海兔体质量注入等体积的氯化镁溶液 (28 mmol/L)。待海兔组织软化后, 迅速在解剖镜下, 分离海兔 BG, 并用去离子水清洗 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, 备用。

直接裂解法提取海兔 BG 全蛋白: 取海兔 BG, 加入裂解液 (7 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 2 mol/L 硫脲, 60 mmol/L DTT, 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Ampholine 0.000 2% 溴酚蓝) 300 μ L, 匀浆后超声震荡 5 min, 再离心 35 min (4 °C, 100 000 g), 取上清液。

收稿日期: 2008-09-15

基金项目: 国家自然科学基金 (40776060) 资助

* 通讯作者: hqhuang@xmu.edu.cn

丙酮沉淀法提取海兔 BG 全蛋白: 参考詹悻婕报道的方法^[5].

BG 蛋白质组双向电泳分离和银染等实验条件均参考文献 [1, 5]. 选用不同的载体两性电解质优化分离 BG 蛋白质组, 并采用 Melanie 4 Trial 软件统计凝胶上的蛋白质斑点数目.

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法的比较

优化提取细胞或组织中全蛋白质组是开展蛋白质组学的关键步骤之一^[6]. 丙酮法是蛋白质组学研究过程中常见的蛋白质沉淀法之一, 目前相当数量的蛋白质组学研究论文均采用丙酮沉淀法^[7-8]. 图 1A 是 BG 样品经丙酮沉淀和裂解液处理后, 所获得的双向凝胶电泳图谱. 图 1B 是 BG 样品直接采用裂解液处理后, 所获得的双向凝胶电泳图谱. 采用 Investigator HT Database 软件对这两张图谱进行比对分析后, 发现图 1A 所显示的蛋白质斑点数目比图 1B 的一半还略低些 (图 1A 为 103 个斑点, 图 1B 为 245 个斑点), 而且多数蛋白斑点染色较浅, 表明这些斑点所对应的蛋白质含量较低. 从图 1A 中还可看出, 蛋白质斑点主要分布在 pH 5.0~8.0 之间, 多数蛋白质斑点 (亚基类型) 分子量在 25~116 ku 之间, 其多数蛋白质等电点属于弱酸、中性和弱碱性范围. 参考图 1A 结果, 图 1B 显示稍不同于图 1A 的实验结果, 其中蛋白质斑点数目不仅增多, 而且分子量范围涵盖于 18~140 ku 之间. 图 1A 和图 1B 蛋白质斑点分布的共同点在于两者多数斑点主要分布在 pH 5.0~8.0 之间, 也均属于弱酸、中性和弱碱性蛋白质. 由此来看, 采用直接裂解法优于丙酮沉淀法加裂解法, 丙酮沉淀法不适合 BG 全蛋白组提取. 为证实 BG 全蛋白质亚基等电点分布情况及规律

是否与载体两性电解质的 pH 范围有关, 作者拟采用不同 pH 的载体两性电解质研究 BG 全蛋白质分布.

2.2 优化上样蛋白量

优化上样蛋白质量是提高蛋白质组分辨率和可进行蛋白质鉴定操作性的关键性因素之一. 过高和过低上样蛋白量均影响到对蛋白质鉴定的效果, 前者因蛋白质浓度过高, 引起蛋白质斑点过大, 而影响到蛋白质分辨率和取样, 易造成人为污染; 后者因蛋白质浓度偏低, 蛋白质斑点显色不清晰, 直接影响到取样和监测灵敏度. 此外, fmol 级的低丰度蛋白质分离与提取是目前开展蛋白质组学研究的难题之一, 目前国内外只有少数实验室能够达到这一水平. 要满足 BG 蛋白质组分析的要求, 必须使用高分辨率的电泳方法和高灵敏度的染色方法. 提高上样量, 是改善低丰度蛋白分离与检测的有效措施之一, 但是上样量过高, 其它高丰度蛋白质含量也随着增大, 使蛋白质显色斑点直径增加, 覆盖低丰度蛋白质斑点, 不利于有效分离与鉴定低丰度蛋白质. 如果选择银染法, 其上样量均在 50~100 μg 左右, 具有低上样量特点. 经反复尝试发现 BG 上样量中的蛋白质浓度为 2.0 mg/mL 时, 采用银染法, 最佳蛋白质提取液上样量为 60 μg 时, 可获得最佳的蛋白质分辨率.

2.3 不同 pH 载体两性电解质的选择

作者分别选用 pH 为 3.0~9.0, pH 4.0~6.0 和 pH 5.0~8.0 的载体两性电解质分别制成不同 pH 梯度的 IEF 胶条, 并以相同凝胶浓度的 SDS-PAGE 作为第二向的 2D-PAGE 方法, 按照文献 [1] 所描述的实验步骤进行分离, 并获得不同分离效果和分辨率的 BG 的 2D-PAGE 图谱, 其结果如图 2.3.4 所示.

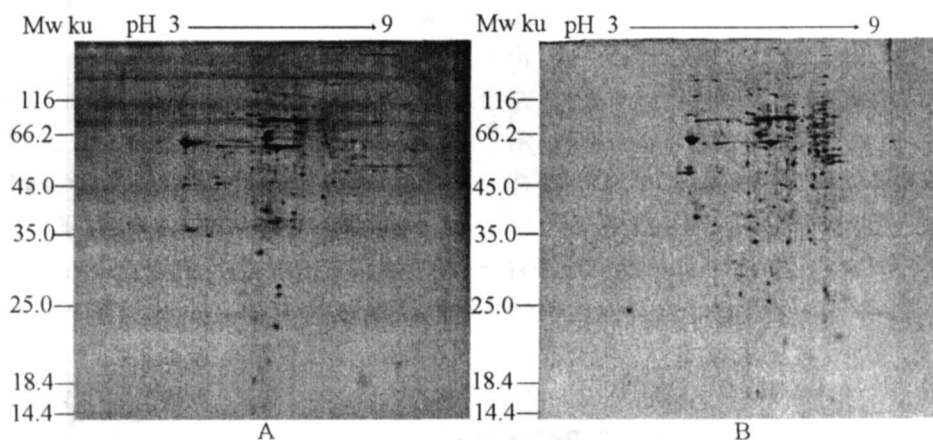


图 1 NLCS 的 BG 全蛋白质双向凝胶电泳图谱 A. 丙酮沉淀法 + 直接裂解法; B. 直接裂解法

Fig. 1 2D-PAGE map of whole BG proteins in NLCS

图 2 是选用载体两性电解质为 pH 3.0~9.0 的双向凝胶电泳图。从图中可以看出, 位于弱酸和弱碱区域内的蛋白质斑点很少, 主要集中在 pH 5.0~8.0 范围内, 即说明了 BG 蛋白质亚基等电点均属于中性或稍偏弱酸性。蛋白质斑点分子量涵盖范围位于 15~130 ku 之内, 显示出较高的分辨率和含有少量高丰度蛋白质斑点。如果不考虑蛋白质斑点数目偏少等的因素, 图 2 结果适合于开展蛋白质鉴定工作。

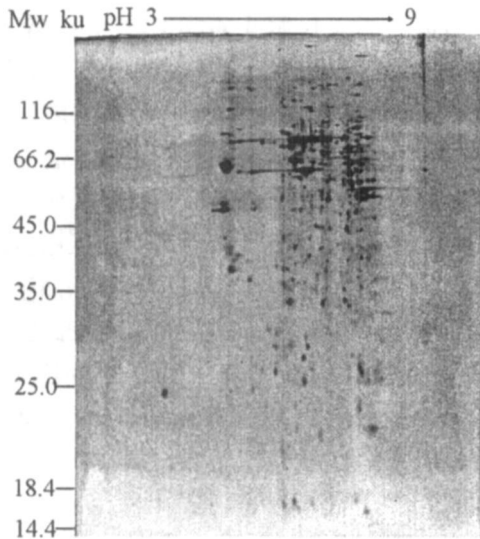


图 2 BG 全蛋白质双向凝胶电泳图谱 (pH 3.0~9.0)

Fig. 2 2D-PAGE map of whole proteins in BG (pH 3.0~9.0)

图 3 是选用载体两性电解质为 pH 4.0~6.0 的 2D-PAGE 图。比较图 2 结果, 第一向 IEF 胶条 pH 范围明显缩小, 限制在 4.0~6.0 范围内, 其目的想进一步提高中性及弱酸性蛋白质的分辨率, 为进一步鉴定 BG 全蛋白质组提供可行性分离条件。但从图 3 中可以看出, 尽管第一向 IEF 胶条的 pH 范围缩小, 但仍然无法改善在弱酸区域中的蛋白质着色斑点。推测可能 BG 缺少弱酸性蛋白质亚基。此外, 蛋白质斑点区域仍然主要位于中性区, 部分小分子蛋白质斑点已丢失, 并显示出比图 2 更多的高丰度蛋白质斑点。相对而言, 图 3 的蛋白质斑点分辨率明显低于图 2 结果, 不太适合进一步开展蛋白质组学研究或进行蛋白质结构鉴定^[6-7]。进一步优化表明, 选择载体两性电解质为 pH 为 5.0~8.0 的第一向 IEF 分离, 可获得最为理想的 2D-PAGE 图谱。比较图 2 和 3 作者发现, 采用直接裂解法, 相同蛋白上样量和相似的分离条件情况下, 选用胶条为 pH 5.0~8.0 作为第一向 IEF 分离可获得最为理想的蛋白质分辨率, BG 全蛋白质较为均匀分布于 pH 5.5~7.5 范围内, 其中蛋白质斑点分子量涵盖范围在 15~

150 ku 之间。采用 Melanie 4 Trial 软件统计图 4 中的蛋白质斑点数目约为 290 个, 与陈东仕等^[1]报道的结果极为接近, 其蛋白质分布情况也很相似。显然图 4 的 2D-PAGE 的胶板中的蛋白质斑点具有较高的分辨率, 其蛋白质斑点数目很可能接近 BG 实际全蛋白质的数目, 适合于开展 BG 蛋白质组学以及结构与功能的研究。建立理想分离细胞及组织全蛋白质的条件, 将为出色完成蛋白质组学研究奠定可行性基础。

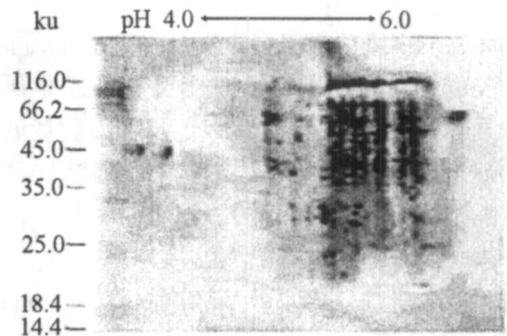


图 3 BG 全蛋白质双向凝胶电泳图谱 (pH 4.0~6.0)

Fig. 3 2D-PAGE map of whole proteins in BG (pH 4.0~6.0)

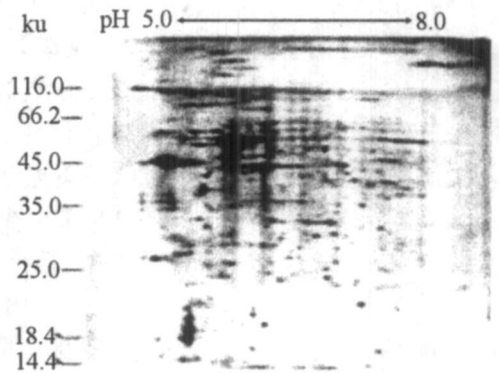


图 4 BG 全蛋白质双向凝胶电泳图谱 (pH 5.0~8.0)

Fig. 4 2D-PAGE map of whole proteins in BG (pH 5.0~8.0)

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 CNS 一直是神经分子生物学研究过程中常用的比对模型, 其主要原因在于它的 CNS 相对简单、易分离和细胞易定位, 尤其细胞数目和细胞内蛋白质种类少于其他海洋动物等特点^[9-10]。这些实验现象和结果, 为进一步证实本论文研究结果真实性和科学性提供了参考信息。

参考文献:

[1] 陈东仕, 黄河清, 吴韩志, 等. 优化分离与鉴定蓝斑背肛海

- 兔口腔神经节蛋白质组 [J]. 高等学校化学学报, 2006, 27: 1257- 1261.
- [2] 林庆梅, 黄慧英, 黄河清, 等. 质谱技术研究海兔大脑神经节超微量多肽内切酶和酸性多肽产物 [J]. 分析化学, 2006, 34: S96- S99.
- [3] Humm on A B, Huang H Q, Kelley W P, et al. A novel phorbol ester response element binding protein in *Aplysia californica*: Leu-Leu rule [J]. J Neurochem, 2002, 82: 1398- 1405.
- [4] 黄河清, Lin W on-Suk, 林庆梅. MALD FTOF 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: 53- 57.
- [5] 詹恽婕, 陆永进, 黄河清. 海兔大脑神经节蛋白质组优化分离与鉴定 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45: S198- S201.
- [6] Simpson R J et al. Proteins and proteomics a laboratory manual [M]. Cold Spring Harbor, New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 2003: 1- 39.
- [7] Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, et al. Acute toxicity profile of cadmium revealed by proteomics in brain tissue of *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquatic Toxicology, 2006, 78: 127- 135.
- [8] Tang H Y, Ali-Khan N, Echan L A, et al. A novel four-dimensional strategy combining protein and peptide separation methods enables detection of low-abundance proteins in human plasma and serum proteomes [J]. Proteomics, 2005, 6: 780- 785.
- [9] Lbyd P E, Connolly C M. Sequence of pdal peptide: a novel neuropeptide from the central nervous system of *Aplysia* [J]. J Neurosci, 1989, 9: 312- 317.
- [10] Wang Y, Price D A, Sahley C L. Identification and characterization of a myomodulin-like peptide in the leech [J]. Peptides, 1998, 19: 487- 483.

Effect of Both Extraction and Separation on Separation Effect of Proteome from the Buccal Ganglion of *Aplysia*

ZHU Bin-lin, CHEN Dong-shi, WENG Lu-na, YAN Li, HUANG He-qing*

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

Abstract The total proteins of buccal ganglion from *Aplysia* were extracted by acetone precipitation or direct lysis. The results showed that more proteins could be obtained on the 2D-PAGE map by the latter approach. The carrier ampholytes of pH range 3.0~9.0, 4.0~6.0 and 5.0~8.0 were used in IEF respectively. It showed that the best separation effect could be obtained in pH range of 5.0~8.0. And there are approximately 290 spots in the gel; these perfect datum indicated that this approach described here was suit for doing research about proteomics.

Key words *Aplysia*, proteome, pH, optimized extraction and separation