

中枢神经蛋白质组分析中双向电泳技术的建立*

赵从建¹⁾ 贾宇峰¹⁾ 丁勤学¹⁾ 阙海萍 刘少君²⁾

郭尧君²⁾

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 建立和优化了中枢神经组织蛋白质组分析所需的双向电泳及相关技术。由于中枢神经组织结构的特殊性, 样品处理非常困难。对样品液组成、样品处理、上样方式、上样量、IPG 胶条和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色方法和保存等相关技术进行了比较研究和条件优化后, 以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向和 SDS 均一胶 ($T = 12.5\%$) 的水平电泳为第二向, 成功地得到了神经组织双向电泳图谱。

关键词 蛋白质组, 双向电泳, PC12 细胞, 中枢神经组织

学科分类号 Q51

随着后基因时代的来临, 研究生命活动的直接执行体——蛋白质的科学——蛋白质组学 (proteomics) 应运而生^[1~3]。双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 作为蛋白质组研究的开门技术, 得到生物学界的充分关注^[4, 5]。

双向电泳是目前分析组分复杂蛋白质分辨率最高的工具之一。2-DE 技术的第一向等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 是基于蛋白质等电点不同而将其分离; 第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 是基于蛋白质亚基分子质量不同将一向分离后的蛋白质进一步分离。双向电泳后, 将 2-DE 凝胶染色, 然后扫描; 再用专业分析软件包对 2-DE 图谱进行分析、比较。

由于双向电泳的分辨率涉及蛋白质样品处理、IEF、SDS-PAGE、染色等技术, 操作有一定难度。特别是由于神经组织结构的特殊性, 对神经组织, 尤其是中枢神经组织进行双向电泳, 更有其难度。迄今为止, 仅见 Klose 等^[6~8]三篇神经组织双向电泳报告。我们采用固相 pH 梯度 (immobiline pH gradients, IPG) 等电聚焦作一向, 采用水平 SDS-PAGE 为第二向, 对大鼠中枢神经系统 (脑、脊

* 国家自然科学基金 (39928015) 资助项目。

¹⁾ 作者对本文有同等贡献。

²⁾ 通讯联系人。

刘少君 Tel: (010) 66932379 (L), 66931304 (O);

E-mail: liusj@nie.bmi.ac.cn

郭尧君 Tel: (010) 64888562, E-mail: yaojun@263.net

收稿日期: 2000-02-29, 修回日期: 2000-05-10

髓)的蛋白质进行了双向电泳的初步尝试,获得了满意的电泳图谱.

1 材 料

1.1 设备

DIAX900 匀浆仪(德国, Heidolph 公司), Beckman L7-65 超速离心机(德国, Beckman 公司), UV330 紫外分光光度计(英国, Unicam 公司); IPGphor 电泳单元、灌胶模具、梯度混合器、Multiphor II 水平电泳单元、EPS-3501 电源、循环水浴、Hoefel 自动凝胶染色仪均购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司.

1.2 试剂和材料

pH3 ~ 10 线性(linear, L)和非线性(nonlinear, NL) 11 cm、18 cm IPG 预制胶条、IPG 缓冲液、SDS 缓冲胶条、低分子质量蛋白质标准、2-DE 蛋白质标准试剂盒均购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、尿素、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、苯甲基磺酰氟(PMSF)购自 Sigma 公司; N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED)、碘乙酰胺购自 Fluka 公司.

1.3 溶液配制

1.3.1 样品液 a: 8 mol/L 尿素、4% CHAPS、40 mmol/L Tris, -20℃ 保存. **样品液 b:** 40 mmol/L Tris、7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、10 mmol/L DTT、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L PMSF; -20℃ 保存.

1.3.2 IPG 泡胀储存液: 尿素 8 mol/L、4% CHAPS、2% IPG 缓冲液、少量溴酚蓝, -20℃ 保存. 使用前加 DTT: 2.5 ml IPG 泡胀液储存液加入 7 mg DTT.

1.3.3 平衡液: 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8、6 mol/L 尿素、30% 甘油、2% SDS、少量溴酚蓝, -20℃ 保存. **平衡液工作液 a:** 使用前 10 ml 平衡液储存液加 100 mg DTT. **平衡液工作液 b:** 使用前 10 ml 平衡液储存液加 250 mg 碘乙酰胺.

1.3.4 SDS 凝胶缓冲液: 1.5 mol/L Tris-HCl、0.4% SDS pH 8.8, 4℃ 保存.

1.3.5 SDS 均一胶配方见表 1.

1.3.6 银染溶液和保存液参照郭尧君著^[9]《蛋白质电泳实验技术》配制.

表 1 SDS-PAGE 均一胶配方

储存液	浓缩胶 (T = 4.8%)	分离胶 (T = 12.5%)
29.1% 丙烯酰胺/0.9% 甲叉 双丙烯酰胺储存液	0.8 ml	8.4 ¹⁾ (11.2) ²⁾ ml
凝胶缓冲液	1.25 ml	5.0 (6.67) ml
87% 甘油	2.0 ml	1.0 (1.33) ml
双蒸水	0.95 ml	5.6 (7.47) ml
TEMED	2.5 μ l	10 (13.33) μ l
10% 过硫酸铵	24 μ l	96 (128) μ l
终体积	5 ml	20 (30) ml

¹⁾用于灌制 250 mm × 110 mm × 0.5 mm 的凝胶. ²⁾用于灌制 250 mm × 180 mm × 0.5 mm 的凝胶.

2 实验方法

2.1 样品处理

2.1.1 PC12 细胞蛋白提取: 吸出培养液, 加入 PBS, 1 000g 离心 10 min; 弃上清, PBS 洗 3 次后; 加入 5 倍体积裂解液, 混匀, 液氮中反复冻融三次后, 15℃, 40 000g 离心 30 min. 上清用 Bradford 法^[10]定量, 蛋白质浓度约为 3 ~ 4 g/L.

2.1.2 中枢神经组织蛋白提取: 预冷生理盐水冲洗新鲜大鼠脑(脊髓)组织中的血液, 用滤纸吸去多余的液体, 称重后液氮冻存. 混合液氮用研钵将液氮冻存的样品研成粉末, 按 1 g 样品加入 0.5 ml 样品液 a, 匀浆 30 s, 再加入 1 ml 样品液 b 或 1 g 样品仅加入 1.5 ml 样品液 b, 匀浆 30 s. 组织悬液 10 000g 离心 10 min; 上清液 4℃, 150 000g 离心 45 min, 小心避开上层漂浮的脂质层, 吸取离心上清; 6℃ 40 000g 再次离心 50 min, 取离心上清. Bradford 法定量, 蛋白质浓度约为 8 g/L.

2.2 制胶

按表 1 配方配制凝胶液, LKB 生产的梯度混合器搅拌, 保持一定高度重力灌制 SDS 凝胶. 分别灌制成 250 mm × 180 mm × 0.5 mm 或 250 mm × 110 mm × 0.5 mm 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶.

2.3 等电聚焦电泳

将 IPG 预制胶条在室温中平衡 10 min, 在 IPG 条状电泳槽(strip holder)中加入适当的 IPG 胶条泡胀液(18 cm 加入 350 μ l, 11 cm 加入 200 μ l)后, 将 IPG 胶条面向下放入条状电泳槽中, 然后滴加覆盖液, 在 IPGphor 上泡胀 12 h 以

上。泡胀后进行等电聚焦电泳。等电聚焦电泳按表 2 参数进行电泳。

表 2 IEF 电泳参数设置 (20°C)

IPG 胶条	时相	V/v	I/mA	t/h
18 cm	泡胀	30 ~ 60	50	12
	1	500	50	1
	2	1 000	50	1
	3	8 000	50	4
11 cm	泡胀	30 ~ 60	50	12
	1	500	50	1
	2	1 000	50	1
	3	8 000	50	2

2.4 平衡

等电聚焦电泳后, IPG 胶条在平衡液 a 平衡 15 min, 再在平衡液 b 中平衡 15 min, 用湿润的滤纸吸去胶条多余的平衡液。

2.5 SDS-PAGE

IPG 胶条平衡后, 在靠近阴极缓冲条侧 1.5 mm 处, 胶面向下放置于 SDS 凝胶上, 电泳参数设置见表 3。在时相 1 的电泳条件下进行蛋白质转移。转移结束后移去 IPG 胶条, 将阴极缓冲条前移, 覆盖在原胶条处。待溴酚蓝前沿进入阳极条后 5 ~ 10 min, 停止电泳。

表 3 SDS-PAGE 参数设置 (15°C)

SDS 胶规格	时相	V/v	I/mA	P/W	t/min
250 mm × 180 mm × 0.5 mm	1	200	20	40	40
	2	800	40	40	150
250 mm × 110 mm × 0.5 mm	1	100	20	30	30
	2	600	40	30	100

2.6 银染和 SDS 胶的保存

参照郭尧君著^[9]《蛋白质电泳实验技术》银染方法, 用 Hoefler 自动凝胶染色仪编制的程序染色。染色后, 将 SDS 胶在 10% 甘油中浸泡 30 min 后, 放于玻璃平板, 用 10% 甘油浸湿的玻璃纸包在 SDS 胶上, 晾干。

3 结 果

我们采用 IPG 等电聚焦为第一向, SDS 水平电泳为第二向的电泳体系, 按照上述改进的实验步骤, 按照上述改进的实验步

骤, 对 PC12 细胞和大鼠中枢神经组织使用了不同的提取方法, 取得了满意的 PC12 和大鼠脑、脊髓蛋白质 2-DE 电泳结果。结果见图 1 ~ 图 4。

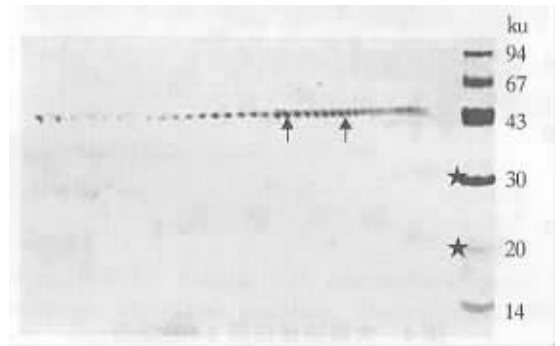


图 1 2-DE 蛋白质标准图谱

pH3 ~ 10L IPG 胶, 250 mm × 110 mm × 0.5 mm SDS 凝胶 (12.5%), 2 μl 2-D 蛋白质标准, 泡胀时加低电压, 银染。

↑: 2-DE 蛋白质标准, ★: 低分子质量蛋白质标准。

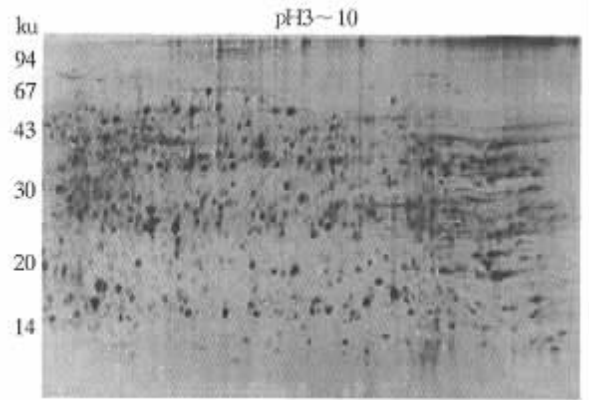


图 2 PC12 细胞蛋白质 2-DE 图谱

pH3 ~ 10NL IPG 胶, 250 mm × 110 mm × 0.5 mm SDS 凝胶 (12.5%, 总蛋白质量 100 μg 与泡胀液混合上样, 泡胀时加低电压, 银染。

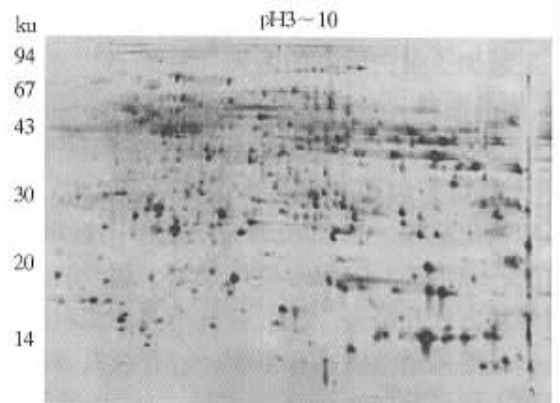


图 3 大鼠脊髓蛋白质 2-DE 图谱

pH3 ~ 10L IPG 胶, 250 mm × 180 mm × 0.5 mm SDS 凝胶 (12.5%), 总蛋白质量 100 μg 与泡胀液混合上样, 泡胀时加低电压, 银染。

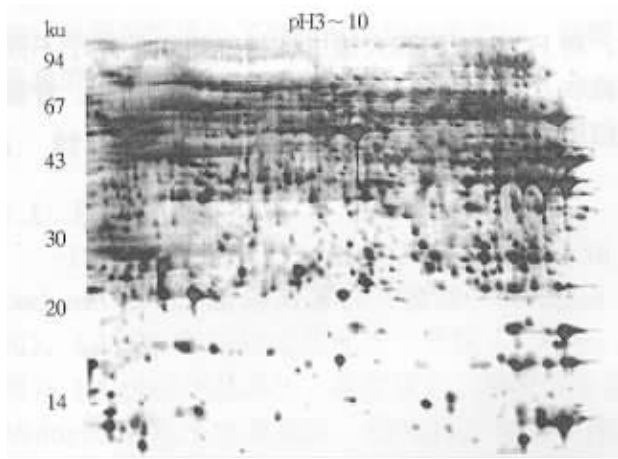


图 4 大鼠脑蛋白质 2-DE 图谱

pH3 ~ 10NL IPG 胶, 250 mm × 180 mm × 0.5 mm SDS 凝胶 (12.5%), 总蛋白质量 100 μg 与泡胀液混合上样, 泡胀时加低电压, 银染.

4 讨 论

本文以 IPG 等电聚焦为第一向、水平 SDS-PAGE 为第二向, 对 PC12 细胞、中枢神经蛋白质样品提取、等电聚焦上样方式及上样量对电泳的影响、泡胀条件、等电聚焦电泳参数、SDS-PAGE、SDS 胶染色及保存进行了研究和实验条件优化.

PC12 细胞与组织相比成分单一, 影响因素少, 蛋白质提取方法简单. 中枢神经组织中富含脂类, 对蛋白质的提取、溶解及 2-DE 电泳都会有极大的影响. 实验中我们观察到, 由于大量的脂质影响, 如果使用去脂步骤 (三氯乙酸 (TCA) / 丙酮法^[11]), 可以获得分离较好的电泳图谱, 但由于去脂过程造成蛋白质的丢失会影响 2-DE 蛋白质点数, 使得中枢神经的样品制备十分困难. 实验中, 我们实践了超离心的方法, 取得了良好的去脂效果, 又减少了蛋白质点的丢失 (图 2).

4.1 样品制备

4.1.1 细胞和组织破碎: 细胞和组织的破碎方法^[11, 12]有组织匀浆法、超声波法、压力法、冻溶法、酶消化法等. 细菌和培养细胞多用超声波法、压力法、冻溶法, 组织多用匀浆法、超声波法, 也可用多种方法相结合. 我们曾试用多种细胞破碎的方法, 最终采用液氮冻存组织, 混合液氮研磨成粉末, 加入样品溶液再匀浆的方法; PC12 细胞蛋白的提取则用反复冻融法.

4.1.2 样品液组成: 样品的预处理是 2-DE 成功与否的关键^[5, 13]. 样品中的盐离子、色素、酚类、核酸物质将影响等电聚焦. 一般用鱼精蛋白将核酸

析出或用 DNA 酶/RNA 酶降解, 并可用丙酮或透析方法进一步纯化^[5, 11, 14]. 另外, 样品缓冲液需加蛋白酶抑制剂以防蛋白质水解, 目前多用 PMSF、1 mol/L EDTA/EGTA 或甲苯磺酰赖氨酸氯甲酮 (TLCK) / 甲苯磺酰苯丙氨酸氯甲酮 (TPCK) 等^[6, 14]. 处理不同的组织还应加入组织特有酶的相应抑制剂^[6, 7].

为了尽可能溶解蛋白质, 本实验采用了下述几种辅助剂以提高蛋白质的溶解性. 尿素可以增加蛋白质的溶解. 使用高浓度的尿素 (5 mol/L 以上) 应注意不要对溶液进行加热, 因为超过 30℃ 会导致蛋白质氨基甲酰化改变蛋白质的等电点. Pasquali 等^[15]证实硫脲可提高蛋白质的溶解度, 并获得更多的 2-DE 斑点数, 为我们实验采用.

等电聚焦电泳必须使用非离子或兼性离子的表面活性剂, 而 SDS 为阴离子活性剂, 因此作为变性剂并非首选. 1996 年 Rabilloud^[13]报告: 在样品提取早期, 样品液中使用 SDS, 在后期用非离子表面活性剂稀释. Triton X-100、NP40、cetylglucoside 等表面活性剂可溶解大部分的蛋白质, 近年来国际上多用 2% ~ 5% CHAPS、8 mol/L 尿素. 我们选用 4% CHAPS, 得到满意的结果.

为了完全使蛋白质折叠打开, 需断开蛋白质分子内的二硫键, 一般使用 DTT. 但碱性条件下可能会干扰等电聚焦的 pH 梯度, Herbert 等^[16]使用三正丁基膦 (tributyl phosphine, TBP) 替代 DTT, 能大大提高蛋白质溶解度及提高蛋白质从第一向到第二向电泳中的转移.

4.2 上样量与上样方式

低丰度蛋白质, 如 fmol 级的蛋白质一直是研究的热点. 1 000 拷贝每个细胞的蛋白质能被染色、分离和鉴定, 但由于“化学噪声”——蛋白质分离中胶基质的吸附、蛋白质水解及外部环境的影响, 目前只有少数实验室能够达到这一水平. 要满足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. 上样量提高有利于低丰度蛋白质检测; 但上样量过高, 高丰度蛋白质的斑点过大会影响其他蛋白质点的分离和分析. 有报告^[13, 17~20]采用简化处理步骤、应用组织粉碎仪、超速离心和亲和色谱等方法富集低丰度蛋白质和去除看家基因 (housekeeping gene) 表达产物的掩盖作用. Murakami 等^[21]用亲和技术预先去除人乳中的 sIgA 等三种高丰度蛋白质, 成功地观察、分析了低丰度蛋白质. 样品上样量取决于目标蛋白的丰

度。如上所述,样品上样量过低和过高都会影响 2-DE 的蛋白质点数。还必须考虑到所使用染色方法的灵敏度,进而决定合适的蛋白质上样量。由于采用了灵敏度较高的染色方法,在作者所使用的电泳体系中,50~100 μg 上样量能满足 2-DE 分析的要求。

在实验中,我们对不同的上样方式(加样方式:a.在泡胀前样品与泡胀液混匀共同进行泡胀;b.在泡胀后样品从 IPG 条状电泳槽加样孔加入。)进行了比较性研究:a.使用上述几种辅助剂溶解较好的样品。电泳结果显示这两种加样方式没有大的差异,因前一种方式上样方便,而且有利于蛋白质进入 IPG 胶,所以对溶解较好的样品我们多用该方法;b.溶解较差的样品,尤其是含有较高离子强度(50 mmol/L)的样品,用前一种方式上样,在电泳中蛋白质会从 IPG 胶上沉淀、析出,故我们使用泡胀后加样的方式;或将样品脱盐后再上样。我们在研究中证实了 Görg^[22]的方法:在 IPG 胶条泡胀时,加上 30~60 V 低电压泡胀 12 h,可有效地提高图谱的质量。

4.3 IPG 等电聚焦

IPG 等电聚焦分辨率高,而且 IPG 预制胶条重复性好,操作简便;因此我们使用 IPG 等电聚焦为一向。在 IPG 胶条的选用上,考虑到神经组织及细胞株中蛋白质种类多,在试用了 11 cm 的胶后,为了观察组织蛋白质,使用了较长和 pH 范围较宽的胶条,即 pH3~10 的 18 cm 胶条。从电泳结果观察到神经组织中蛋白质广泛分布于 pH3~10 的范围,但在胶条两端,仍有部分蛋白质没有在等电聚焦得到很好的分离。可能是神经组织中含有较多的酸性和碱性蛋白和使用了非线性胶条分离距离短的原因。

4.4 SDS-PAGE

第二向 SDS-PAGE 有垂直、水平两种方式:垂直方式的特点是可以同时走多张胶,且可以是较厚的凝胶,有利于提高上样量;电泳后可有足够蛋白质量进行进一步分析。缺点是需大量的缓冲液,电泳时间长,分辨率低,不便于保存。水平电泳特点是分辨率高,速度快,灵敏度高,凝胶大、小、厚度可任选,可用半干技术;由于有支持膜,更便于长期保存。Görg^[22]曾报道第二向使用水平电泳的分辨率高于垂直电泳。

4.5 染色和保存

我们使用的改进银染方法^[9],用 Hoefer 自动

染色仪进行染色。Hoefer 自动染色仪的应用使染色各个操作步骤的时间、温度、染色盘的振荡控制有较高的可控性和重复性,进而使 2-DE 胶染色有较好的可比性,便于后续的 2-DE 胶分析。

使用的 SDS 胶保存方法简便,材料易得,无须干燥仪。但是如果使用高分辨率的扫描仪,对电泳后的湿胶直接扫描,可以避免干燥保存后固缩造成的波纹对凝胶图谱分析的影响。

参 考 文 献

- 1 Wasinger V C. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995, **16** (7): 1090~1094
- 2 Kahn P. From genome to proteome: looking at a cell's proteins. *Science*, 1995, **270** (5235): 369~370
- 3 Swinbanks D. Government backs proteome proposal. *Nature*, 1995, **14**: **378** (6558): 653
- 4 Jungblut P R. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious disease. *Electrophoresis*, 1999, **20** (10): 2100~2120
- 5 Blackstock W P, Weir M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*, 1999, **17** (3): 121~127
- 6 Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 1995, **16** (6): 1034~1059
- 7 Lanfen H, Berndt P, Röder D. Two-dimensional map of human brain proteins. *Electrophoresis*, 1999, **20** (4~5): 907~916
- 8 Edgar P F, Douglas J E, Faull R L. Proteome map of the human hippocampus. *Hippocampus*, 1999, **9** (6): 644~650
- 9 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999. 141~142
- 10 GUO Y J. *Experimental Technique in Protein Electrophoresis* Beijing: Science Press, 1999. 141~142
- 10 Bollag D M, Edelman S S. *Protein Methods*. 2nd. New York: Wiley-Liss, Inc. 1996. 50~55
- 11 Görg A. Two-dimensional electrophoresis of proteins using immobilized pH gradients. <http://www.weihenstephan.de/blm/deg>. 1998
- 12 Bollag D M, Edelman S S. *Protein Methods*. 2nd. New York: Wiley-Liss, Inc. 1996. 27~45
- 13 Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis*, 1996, **17** (5): 813~829
- 14 Lopez M F. Proteome analysis I Gene products are where the biological action is. *J Chromatography B*, 1999, **722** (1~2): 191~202
- 15 Pasquali C, Fialka I, Huber L A. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis*, 1997, **18** (14): 2573~2581
- 16 Herbert B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1999, **20** (4~5): 660~663
- 17 Fountoulakis M, Langen H, Evers S, et al. Two-dimensional map of *Haemophilus influenzae* following protein enrichment by heparin chromatography. *Electrophoresis*, 1997, **18** (7): 1193~1202
- 18 Perrin-cocon L A, Marche P N, Villiers C L, et al. Purification of intracellular compartments involved in antigen processing: a new method based on magnetic storing. *Biochem J*, 1999, **338**

(pt-1): 123 ~ 130

- 19 Corthals G L , Molloy M P , Herbert B R , *et al.* Prefractionation of protein samples prior to two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1997 , **18** (3 ~ 4): 317 ~ 323
- 20 Coumans J V , Humphery-smith I , dos Remedios C G , *et al.* Two-dimensional gel electrophoresis of actin-binding proteins isolated by affinity chromatography from human skeletal muscle. *Electrophoresis*, 1997 , **18** (7): 1079 ~ 1085
- 21 Murakami K , Lagarde M , Yuki Y. Identification of minor protein of human colostrum and mature milk by two -dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1998 , **19** (14): 2521 ~ 2527
- 22 Görg A. Bough G. Obermaier C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis immobilized pH gradients in the first dimensional the state of the art and the controversy of vertical and horizontal systems. *Electrophoresis*, 1995 , **16** (7): 1079 ~ 1086

Improvement of Two-dimensional Gel Electrophoresis for Proteomics of Rat Central Nerve System.

ZHAO Cong-Jian , JIA Yu-Feng , DING Qin-Xue , QUE Hai-Ping , LIU Shao-Jun (*Institute of Basic Medical Sciences , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100850 , China*); GUO Yao-Jun (*Institute of Biophysics , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China*).

Abstract Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) is a key technique for proteomics. To analyze the proteome of PC12 cells and rat central nerve tissues , including brain and spinal cord , 2-DE technique is established. Due to much lipid and other non-protein interfering constituents , protein extraction is much more difficult for nerve tissues than for other tissues. Two different methods , i. e. , precipitation with trichloroacetic acid/acetone and ultra-centrifugation were employed to extract protein from rat brain and spinal cord for 2-DE. Other factors such as method and volume of loading sample , choice of IPG gels , concentration of SDS gels , preset of electric parameters , protocol for staining and drying the gels were also improved. Using the proper method described above , satisfactory 2-DE maps of PC12 cells , rat brain and spinal cord were obtained.

Key words proteome , two-dimensional electrophoresis , PC12 cell , central nerve system