

蛋白质组分析中蛋白质分步提取方法的建立*

兰彦^{1,2,3)} 钱小红³⁾ 王阁¹⁾ 李勇¹⁾ 罗凌¹⁾ 柳正良²⁾ 贺福初¹⁾**

(¹⁾军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850; ²⁾第二军医大学药物分析教研室, 上海 200433;

³⁾国家生物医学分析中心, 北京 100850)

摘要 利用细胞裂解液充分溶解细胞蛋白质是成功进行蛋白质组分析的先决条件. 尝试利用三步提取法, 即以三种溶解性能不同的裂解液分步提取细胞中的蛋白质组, 并分别进行二维聚丙烯酰胺凝胶电泳 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-D PAGE) 分离. 通过对 2-D PAGE 蛋白质图谱的比较, 发现其与常规方法相比, 具有蛋白质提取率高、双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 分辨率高等优点.

关键词 分步提取, 蛋白质组, 二维聚丙烯酰胺凝胶电泳

学科分类号 Q51

功能基因组研究的兴起促使蛋白质组研究成为后基因组时代重要方法之一^[1,2]. 由于蛋白质组研究相关技术体系建立时间较短, 仍存在许多有待改进之处, 特别是在蛋白质样品制备方面. 目前常用的蛋白质一步提取法在完全溶解细胞蛋白质 (特别是疏水蛋白质) 以及蛋白质的分离效果等方面存在缺陷. 这些不足直接影响了蛋白质组分析结果的全面性和准确性. 本文尝试采用三步提取法, 即以三种分别适合溶解高、中、低亲水性蛋白质^[3]的裂解液分步提取细胞中的蛋白质组成分, 并分别进行二维双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE), 以提高疏水蛋白质的提取率和蛋白质的分辨率.

1 材料和方法

1.1 试剂

固相 pH 梯度干胶条 (IPGs, immobilized pH gradient DryStrip) 购自安发玛西亚公司. 辛酰基硫代甘氨酸三甲内盐 (caprylyl sulfobetain, SB3-10), 购自 Sigma 公司. 二硫苏糖醇 (DL-dithiothreitol, DTT) 购自 Promega 公司. 三正丁基磷 (tributyl phosphine, TBP) 购自 Acros 公司.

1.2 设备

IPGphor 等电聚焦电泳仪 (安发玛西亚公司); 垂直电泳系统, GS-710 光密度扫描仪, PDQUEST 2-DE 图像分析软件 (伯乐惠众公司).

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的培养和收集: cos7 细胞株培养于含 10% 血清的 DMEM 培养液中. 待细胞培养至对数生长期, 用 0.25% 胰酶消化后离心去掉胰酶加入培养液重新悬浮. 计数后分成两份, 离心弃去培养

液. 用低盐溶液 PBS 清洗三次.

1.3.2 蛋白质组的分步提取:

第一步, 水溶液提取: 约 5~15 mg (湿重) 细胞加入 2 ml 裂解液 I (40 mmol/L Tris-base, pH 8.3~8.4). 反复冻融 3~4 个循环, 加入 20 µg/ml DNase I 和 5 µg/ml RNase A, 至 4℃作用 15 min 后, 再振荡混匀 5 min, 10℃下 12 000 r/min 离心 10 min. 收集上清液置冷冻干燥器中抽干后即为首步提取物, 余下的沉淀用 40 mmol/L Tris-base 溶液洗两次.

第二步, 含 Urea-CHAPS-DTT 的溶液提取: 在含有上一步沉淀物的 Eppendorf 管中加入 500 µl 裂解液 II (8 mol/L 尿素, 4% 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸 (CHAPS), 100 mmol/L DTT, 40 mmol/L Tris-base 和 0.5% Pharmaltes, pH 3~10, 20 µg/ml DNase I 和 5 µg/ml RNase A). 强烈振荡混匀 5 min 后, 10℃下 14 000 r/min 离心 60 min. 收集上清液即为第二步提取物. 余下的沉淀用 40 mmol/L Tris-base 溶液洗两次.

第三步, 含硫脲-SB3-10-TBP 的溶液提取: 在含有上一步沉淀物的 Eppendorf 管中加入 200 µl 裂解液 III (5 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% CHAPS, 2% SB3-10, 2 mmol/L TBP, 40 mmol/L Tris-base 和 0.5% Pharmaltes, pH 3~10, 20 µg/ml DNase I 和 5 µg/ml RNase A). 强烈振荡混匀 5 min 后, 10℃下 12 000 r/min 离心 10 min. 收集上清液

* 国家自然科学基金重大项目 (39990600) 与 973 项目 (G1998051213) 部分资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931246, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2000-06-28, 接受日期: 2000-08-23

即为第三步提取物, 此步后基本无残余蛋白质沉淀.

1.3.3 蛋白质组的一步提取: 约 5~15 mg (湿重) 细胞加入 2 ml 裂解液 II (8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 100 mmol/L DTT, 40 mmol/L Tris-base 和 0.5% Pharmaltes, pH 3~10). 反复冻融 3~4 个循环, 加入 20 μ g/ml DNase I 和 5 μ g/ml RNase A, 至 4 $^{\circ}$ C 作用 15 min 后, 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 30 min. 收集上清液即为蛋白质提取物.

1.3.4 双向电泳: 2-DE 主要按文献 [4~6] 和安发玛西亚公司的 2-DE 操作指南进行. 主要步骤如下: a. 蛋白质定量和上样, b. 等电聚焦, c. IPGs 的平衡, d. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE). 电泳条件: 重泡涨和等电聚焦在 20 $^{\circ}$ C 下自动进行 (30 V 6 h, 60 V 6 h, 200 V 1 h, 8 000 V 梯度

5 h, 8 000 V 7 h, 总电压时间积为 80 000 Vh); SDS-PAGE 按 10 mA/胶电泳 30 min 后换用 20 mA/胶, 直至溴酚蓝到达胶的底线.

1.3.5 蛋白质检测: 采用郭尧君改进的高灵敏度银染色法^[7].

1.3.6 图像分析及数据处理: 将银染后的凝胶放在 GS-710 光密度扫描仪上. 扫描后的图像用 PDQUEST 2-DE 软件分析, 选择部分匹配的蛋白质斑点 (用线框标注) 进行比较.

2 结果与讨论

2.1 难溶疏水蛋白质的溶解

比较图 1c 和图 2 的匹配率, 所得相关系数为 0.01, 表明图 1c 所含的蛋白质与图 2 有显著不同.

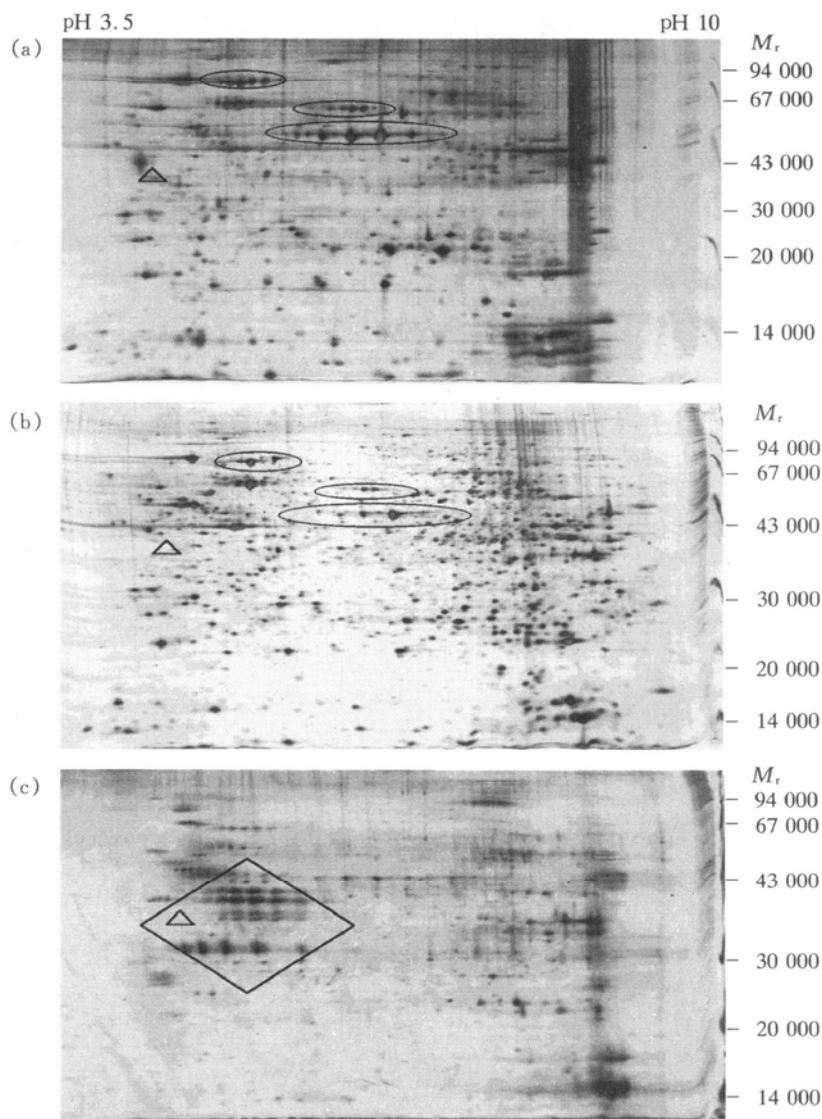


Fig. 1 Two-dimensional IEF/SDS PAGE profile of sequential extraction of cos7 cell lysates

(a) The extract of step 1; (b) The extract of step 2; (c) The extract of step 3. Ellipses indicate limited overlap of some protein spots between Fig. 1 and 2. Triangle indicates spots occurred only in Fig. 1a and 2. Rhombus indicates some only in Fig. 1c.

这是因为第三步裂解液溶解了一步法所不能溶解的疏水性蛋白质, 检测到了一些一步法丢失的蛋白质

斑点. 如在图 1c 中菱形区中所显示的蛋白质斑点, 在图 2 中未被检测到.

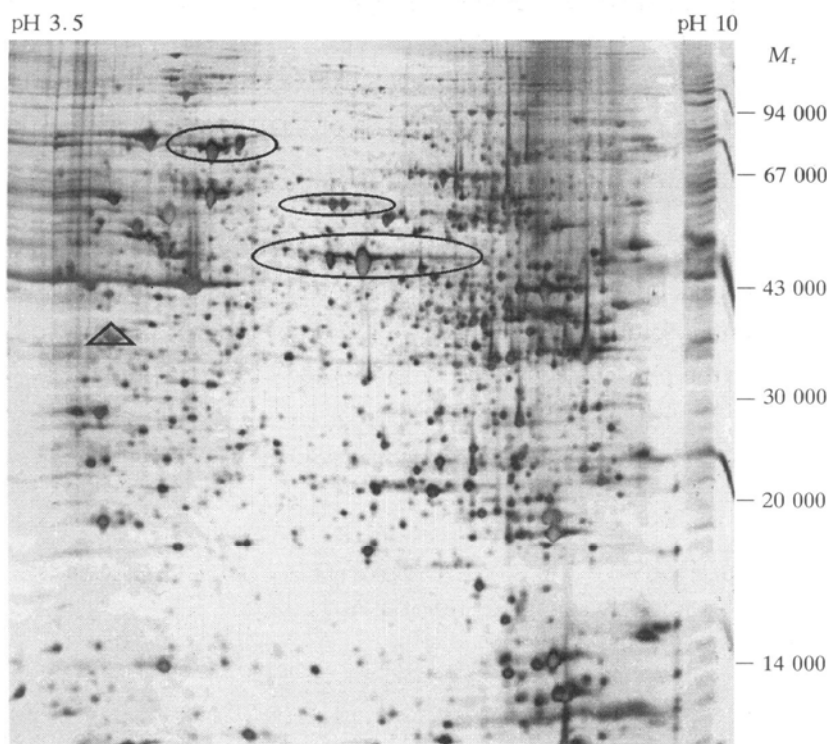


Fig. 2 Two-dimensional IEF/SDS PAGE profile of a single step extraction of cos7 cell lysates

Ellipses indicate limited overlap of some protein spots between Fig. 1 and 2. Triangle indicates spots occurred only in Fig. 1a and Fig. 2.

2.2 2-DE 分辨率的提高

分别比较图 1a、b 和图 2 的椭圆形区域, 图 1a、b 蛋白质斑点的数量与分离程度有明显的提高. 这是因为对三种裂解液提取的蛋白质分别进行电泳增加了有效分离面积, 从而减少蛋白质斑点相互覆盖的现象.

2.3 三维分离效果的初步体现

分步提取法从亲水性、等电点和分子质量三方面分离蛋白质, 即三维分离, 不但提高了分离效果, 而且对待鉴别的蛋白质斑点可提供更多的信息^[8]. 如某一蛋白质斑点只在图 1a 和图 2 中出现, 而在图 1b、c 中不出现 (如三角形区域). 说明该蛋白质是高亲水性的, 能够完全溶解在水溶液中.

从以上结果可以看到, 分步提取法有利于获得较全面和准确的蛋白质组分析结果.

致谢 此实验完成过程中, 军事医学科学院四所李成文教授给予了宝贵的建议, 本所鱼咏涛博士等同志给予许多有益帮助.

参 考 文 献

- 1 Editorial. Making genomics functional. *Nature Biotechnology*, 1998, **16**: 1
- 2 Stanley F, Yuji Kohara, David J L, *et al.* Functional genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 8825~ 8826
- 3 Mark P M, Herbert B R, David J L, *et al.* Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 1998, **19**: 837~ 844
- 4 Rabiloud T, Adessi C, Giraudel A, *et al.* Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 307~ 316
- 5 Kruger N J. The bradford method for protein quantitation In: Walker J M, ed. *The Protein Protocols Handbook*. New Jersey: Human Press Inc, 1996. 15~ 20
- 6 Sanchez J C, Rouge V, Pisteur M, *et al.* Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 324~ 327
- 7 郭尧君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展. *生物物理学报*, 1991, **18** (1): 32~ 37
- 8 Guo Y J. *Chin Acta Biophysics*, 1991, **18** (1): 32~ 37
- 8 Williams K L. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis*, 1999, **20**: 678~ 688

The Establishment of Sequential Extraction Method in the Proteome Analysis*

LAN Yan^{1, 2, 3)}, QIAN Xiao-Hong³⁾, WANG Ge¹⁾, LI Yong¹⁾,
LUO Ling¹⁾, LIU Zheng-Liang²⁾, HE Fu-Chu¹⁾**

(¹⁾ *Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;* ²⁾ *Department of Pharmacuetic College of the
Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;* ³⁾ *National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China)*

Abstract A three-step sequential protein extraction method was applied in proteomics analysis: using three kinds of solutions with differential solubility to replace one kind of solution. The method increases the efficiency of extraction and separation of the proteins compared with method of one solution.

Key words sequentially extract, proteome, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

* This work was supported by grants from National Natural Science Foundation of China for Key Program and "973" Research Programs of China.

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931246, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

Received: June 28, 2000 Accepted: August 23, 2000