

西施舌外套膜蛋白质组双向电泳体系的构建

田美, 申欣, 程汉良, 孟学平

(淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005)

摘要:建立了西施舌(*Coelomacra antiquata*)外套膜蛋白质组的双向凝胶电泳体系,比较分析了不同 pH 梯度胶条、水化条件的优化及不同染色方法对双向电泳结果的影响。结果表明:用 pH 4~7 的非线性胶条,水化时加上除盐步骤,采用硝酸银染色,即可获得高分辨率、高重现性的双向电泳图谱,为进一步研究西施舌外套膜蛋白质的组成奠定了基础。

关键词:双向电泳; 蛋白质组学; 西施舌(*Coelomacra antiquata*); 外套膜

中图分类号:Q956

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2009)11-0032-05

西施舌(*Coelomacra antiquata* (Spengler, 1802))属于瓣鳃纲(Lamellibranchia),真瓣鳃目(Eulamellibranchia),蛤蜊科(Mactridae),腔蛤蜊属(*Coelomacra*)。西施舌在福建俗称“海蚌”,在香港称“贵妃蚌”,其肉质脆嫩,其味甘美,在贝类中可与鲍鱼媲美,是海鲜极品之一。西施舌除了是久负盛名的筵席珍品佳肴外,还具有极高的医疗保健价值,据《本草纲目拾遗》中记载,西施舌为“润肺脏,益精补阴要药”,《本草从新》中也有“益精、润肺腑、止烦渴”的记载^[1~2]。

西施舌是一种很有养殖前景的贝类^[3]。自 20 世纪 50 年代起,国内便开始对西施舌的人工育苗及人工养殖进行研究^[4]。关于西施舌的研究在中国还是刚刚起步,国外尚无有关报道。西施舌生态学、组织学、免疫学、遗传学等方面的研究有零星报道^[5~8]。利用生物化学及分子生物学的手段对西施舌生理生化及遗传结构研究的报道逐年增多,孔令峰等研究了山东(3 个群体)和福建(1 个群体)4 个地理群体形态和生化遗传差异以及养殖群体的分子遗传结构^[9,10]; 尤仲杰等用 RAPD 技术研究了中国山东,江苏、福建、浙江和广西五个地理群体的形态和分子遗传差异^[11]; 李晶晶等分离了西施舌微卫星 DNA,研究了其在西施舌遗传学研究中的初步应用。

近年来,蛋白质组学研究已涉足于海洋生物领域,双向凝胶电泳技术是蛋白质组学研究中最基本的实验手段。目前,关于西施舌外套膜蛋白质组学的研究仍未见报道。本研究首次利用蛋白质组学方法构建西施舌外套膜蛋白质组双向电泳体系,为进一步研究西施舌外套膜蛋白质的组成及生理生化机

制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

成体西施舌采自山东日照,用手术刀剥开西施舌,取出所需的外套膜组织,用蒸馏水快速清洗后沥干水份,−80℃保存备用。

1.1.2 试剂

尿素(Urea)、硫脲(Thiourea)、十二烷基硫酸钠(SDS)、Tris 碱(Tris-base)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、过硫酸铵(APS)、甘氨酸(Gly)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二硫苏糖醇(DTT)、苯甲基磺酰氟化物(PMSF)、碘乙酰胺(IAA)、蛋白质定量试剂盒(2D Quant Kit)和固相 pH 梯度干胶条(非线性 pH 3~10 NL 13 cm、pH 4~7 NL 13 cm)、固定 IPG 干胶条(线性 4~7 L, 13 cm)、IPG-Buffer pH 3~10、IPG-Buffer pH 4~7、矿物油均购自安玛西亚生物技术公司产品。蛋白酶抑制剂(PMSF)购自 BBI 公司。考马斯亮蓝 R350 (com-masie brilliant blue R350)为 GE Healthcare 公司产品。甲醛,乙醇,正丁醇,冰醋酸,硝酸银,硫代硫酸钠,碳酸钠均为南京化学试剂有限公司。

收稿日期:2008-10-16;修回日期:2009-02-24

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK2007066)

作者简介:田美(1979-),女,山东成武人,实验师,硕士,主要从事蛋白质组学研究,E-mail:genomeresearch@163.com;孟学平,通信作者,教授,主要从事西施舌资源学研究,E-mail:mxp2002@hotmail.com

1.1.3 仪器

等电聚焦电泳仪 Ettan IPGphor III、凝胶扫描仪 ImageScanner III、图像处理软件 Image Master 2D Platinum 6.0 均为 GE Healthcare 公司产品。二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳仪 Hoefer SE600 Ruby 为安玛西亚生物技术公司产品。超纯水系统为 Millipore 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 西施舌外套膜蛋白样品的提取与定量

取外套膜组织 500 mg,放入预冷的研钵中剪碎,用液氮研磨成粉、转至两个离心管中,分别用 500 μ L 裂解液(8 mol/L Urea、2 mol/L Thiourea、2% CHAPS、10 μ L/ mL PMSF、18 mmol/ L DTT、0.5% IPG 缓冲液、pH 3~10 和 pH 4~7)裂解 2 h。之后将未裂解的组织进行冰上超声破碎(超声 20 s、超声 5 次、间隙 60 s、功率 30 W),将超声后的蛋白混合物于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min ($R = 9$ cm)离心 1 h 去除沉淀,吸取的上清液即为提取的外套膜组织蛋白样品。

采用蛋白质定量试剂盒(2D Quant Kit)测定蛋白质的浓度。取 4 μ L 标准蛋白加 PBS 稀释至 100 μ L,使终浓度为 200 μ g/ mL;将稀释后标准品按 1,1,2,4,6,8,10,15 μ L 分别加入 96 孔板中,加 PBS 补足到 20 μ L。每孔蛋白含量为 0,0.2,0.4,0.8,1.2,1.6,2,3 μ g;加 5 μ L 样品到 96 孔板的样品孔中,加 PBS 到 20 μ L;各孔加 200 μ L Bradford Reagent 混匀,室温放置 5 min;用预热酶标仪测定 OD595;绘制出标准曲线,计算蛋白上样量。

1.2.2 等电聚焦(IEF)

等电聚焦电泳参照 IPGphor III 等电聚焦系统使用指南进行。非线性 IPG 预制胶条 pH 分别为 3~10 和 4~7,根据标准曲线计算出 100 μ g 外套膜蛋白质上样量体积为 53.8 μ L,与水化液(8 mol/ L Urea、2% CHAPS、18 mmol/ L DTT、0.5% IPG 缓冲液 pH 3~10 和 pH 4~7、0.002% 溴酚蓝)充分混合后,上样总体积为 250 μ L。30 V 水化 12 h,120 V 除盐 3 h 后,依次设置为 500 V、1 h;1 000 V、1 h;8 000 V、3 h 和 500 V、3 h 进行等电聚焦,水化和聚焦均在 20 $^{\circ}$ C 进行。

1.2.3 平衡胶条

等电聚焦完毕后,胶条先在 15 mL 平衡液 I (1.5 mol/ L Tris-HCl, pH 8.8、6 mol/ L Urea、87% 甘油、2% SDS、1% DTT、0.2% 溴酚蓝)中于摇床平衡 15 min,再在 15 mL 平衡液 II (2.5% 碘代

乙酰胺替换 1% DTT,其余组分同于平衡液 I)中平衡 15 min。

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

将平衡后的 IPG 胶条转移至 12.5% 的凝胶上端,使 IPG 胶条与凝胶上端紧密贴合,排尽气泡后,用含 0.2% 溴酚蓝的 0.5% 琼脂糖封顶。在电泳槽的下槽加入 3 L 1 \times SDS 电泳缓冲液(10 \times 电泳缓冲液:250 mmol/ L Tris-HCL、192 mmol/ L 甘氨酸、1% SDS)至 9.0 LITER 位置,然后将凝胶玻璃板转移到电泳槽中,上槽再加 1 L 电泳缓冲液至 Max 位置。电泳参数设置:电流按每一胶条 10 mA 电泳 30 min 后换用 20 mA,电压 600 V,功率 100 W。直至溴酚蓝指示线跑至胶底缘时电泳结束。

1.2.5 染色

硝酸银染色:首先对每块凝胶进行固定(25 mL 乙酸、100 mL 甲醇、125 mL 去离子水)30 min,在 250 mL 敏化液(75 mL 甲醇、0.5 g 硫代硫酸钠、17 g 无水醋酸钠、去离子水)中敏化 30 min;去离子水漂洗 3 次,每次 5 min;在 250 mL 银溶液(0.625 g 硝酸银、去离子水)中浸泡 20 min;去离子水漂洗 3 次,每次 1 min;在 250 mL 显色液(6.25 g 碳酸钠、100 μ L 甲醛、去离子水)中显色 2~5 min 至蛋白斑点清晰;用终止液(3.6 g EDTA、去离子水)终止反应 20 min;用去离子水漂洗 3 次,每次 5 min。

考马斯亮蓝 R350 染色:一片考马斯亮蓝 R350 溶于 80 mL 双蒸水中,加速溶解 5~10 min 后,再加入 120 mL 甲醇继续搅拌溶解,用中速滤纸过滤染液以去除颗粒状物质,过滤完后储存于 4 $^{\circ}$ C,临用前用 20% 乙酸 1:1 配比。SDS-聚丙烯酰胺凝胶用双蒸水洗 2 次,用 250 mL 的染液浸泡,将染色盒置于摇床室温过夜。染色后凝胶用双蒸水洗 2 次以洗去多余的染液,然后用脱色液(10% 无水乙醇、10% 无水乙酸)脱色,室温摇动 2 h 以上,其间更换脱色液 3~4 次。当对比度达到要求时,停止脱色。

1.2.6 凝胶图像扫描与分析

脱色后的凝胶用双蒸水洗 2 次,放在 Image Scanner III 扫描仪上,于 256 色灰度和 300 dpi 的分辨率下进行扫描,凝胶点的检测分析用 Image Master 2D Platinum 6.0 图像分析软件完成。

2 结果

2.1 2D Quant Kit 方法检测蛋白质含量

本实验采用 2D Quant Kit 方法测定样品在

595 nm处的 A 值,检测呈梯度的标准蛋白在 595 nm 处的 A 值,绘制标准曲线(图 1),可得到线性方程 $y=11.575x-4.314$, $R^2=0.9827$ 。根据此方程测得外套膜蛋白浓度为 $1.86 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,计算出 $100 \mu\text{g}$ 外套膜蛋白质上样量为 $53.8 \mu\text{L}$ 。

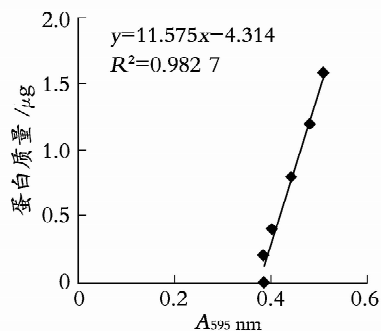


图 1 蛋白定量标准曲线

Fig. 1 The quantitative standard curve of protein

2.2 西施舌外套膜蛋白组的双向电泳图谱

从西施舌外套膜中提取蛋白进行双向电泳均重复 3 次。本实验初始采用 pH 3~10、13 cm 非线性干胶条进行初步判断西施舌外套膜的蛋白分布情况,并采用考马斯亮蓝 R350 进行染色,初步得到西施舌外套膜蛋白双向电泳图谱(图 2)。经图谱分析后确定西施舌外套膜蛋白大部分分布在 pH 4~7 之间,之后作者采用 pH 4~7、13 cm 非线性干胶条进行分离西施舌外套膜蛋白,并采用灵敏度高的硝酸银染色方法,首次获得了西施舌外套膜蛋白质组的高分辨率、高重现性的双向电泳图谱(图 3)。

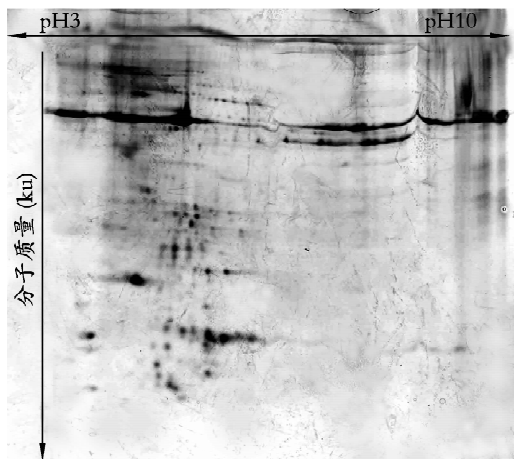


图 2 西施舌外套膜组织考染后的双向电泳图谱

Fig. 2 The two-dimensional electrophoresis map of *Coelomactra antiquata* mantle tissue after coomassie brilliant blue staining

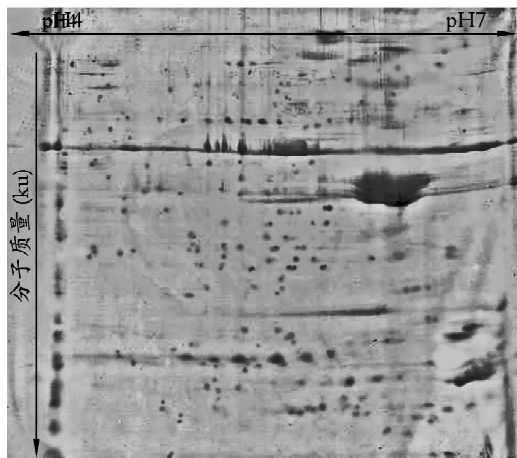


图 3 西施舌外套膜组织银染后的双向电泳图谱

Fig. 3 The two-dimensional electrophoresis map of *Coelomactra antiquata* mantle tissue after silver staining

2.3 西施舌外套膜蛋白质组双向电泳体系的建立

通过实验条件的筛选和优化,成功建立了西施舌外套膜蛋白质组双向电泳体系。其中优化的裂解液的配方为:8 mol/L Urea、2 mol/L Thiourea、2% CHAPS、10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ PMSF、18 mmol/L DTT 及 0.5% IPG 缓冲液。采用研磨、裂解、超声破碎等方法提取西施舌外套膜蛋白质,上样方式选择被动的水化上样;等电聚焦过程中使用较长时间的缓慢升压模式,30 V 水化 12 h,120 V 除盐 3 h 后,依次设置为 500 V、1 h;1 000 V、1 h;8 000 V、3 h 和 500 V、3 h 进行等电聚焦,水化和聚焦均在 20°C 进行。充分聚焦后进行 SDS-PAGE 电泳,凝胶的浓度选用 12.5%。然后采用灵敏度高的硝酸银染色,初步建立了西施舌外套膜蛋白质组双向电泳体系。

3 讨论

西施舌是早负盛名的筵席珍品佳肴并具有较高医疗保健价值的养殖食用性经济贝类,西施舌外套膜是形成西施舌外壳的关键组织,目前关于西施舌蛋白质组学方面的研究还未见报道。本研究为进一步探索西施舌外套膜蛋白质的组成及生理生化机制,初步构建了适合西施舌外套膜蛋白质组的双向电泳体系。

样品处理是双向电泳最关键、最困难的技术。由于样品结构特性各异,又必须使其完全溶解和尽可能少的化学修饰,所以不可能有一个通用的配方。本实验对西施舌外套膜蛋白质的提取主要采用了研磨^[12]、裂解、破碎^[13]、离心等手段。为了使外套膜组织裂解充分并最小限度的减少蛋白质的水解和其他

形式的降解,实验时采用在液氮中将组织研磨成粉末,在含有蛋白酶抑制剂的特定裂解液中裂解,然后经超声破碎,超声时采用短时间多次冲击,并在间隙过程将样品放在冰上冷却,避免产生热量和泡沫。最后高速低温离心去除组织残渣、脂类及其他小分子的干扰,整个过程得到了较为理想的结果。

裂解液和再水化液的选择也尤为重要。使用硫脲可以显著增加蛋白的溶解度,在裂解的过程中应加入适量蛋白酶抑制剂以保证蛋白的高得率。本实验在裂解液中采用 7 mol/L 尿素和 2 mol/L 硫脲,破坏蛋白质二硫键,溶解蛋白。同时加入 4% CHAP 和 2% IPG buffer,足以充分溶解蛋白质,1% 的 DTT 用以阻断蛋白的氧化,裂解时加入了少量的蛋白酶抑制剂 PMSF,可以防止细胞破碎释放的蛋白水解酶水解蛋白质。在再水化液中加入 0.5% IPG Buffer 和 0.28% DTT,有利于蛋白样品进入凝胶,通过参阅大量文献,从整体上优化了裂解液和再水化液,得到较为理想的外套膜蛋白双向电泳图谱。

胶条根据所分离样品的需要,可以选择不同 pH 值范围的固相 pH 梯度胶条。使用窄的(1~3 pH 单位)或极窄的(<1 pH 单位)pH 范围的 IPG 胶条,加大蛋白样品的上样量,能够提高蛋白质的分辨率和双向凝胶的检测灵敏度。其缺点是,使用窄的 pH 梯度分离全细胞裂解液时,大部分蛋白样品并不在 pH 梯度的分离范围内聚焦,未聚焦的蛋白质会严重干扰样品的分离,并且干扰程度会随上样量的增大而加重。本研究首先采用 pH 3~10 较宽范围的非线性梯度胶条对西施舌外套膜蛋白进行分离,得到西施舌外套膜蛋白 pH 3~10 的双向电泳图谱。经图谱分析显示西施舌外套膜蛋白大部分分布在 pH 4~7 之间。因此,我们采用了 pH 4~7 的非线性梯度胶条,重新建立了西施舌外套膜蛋白的双向电泳图谱,从图谱中显示,所获得了西施舌外套膜蛋白双向电泳图谱分辨率高、重现性好。

平衡是双向电泳的过渡阶段,对于实验结果影响十分明显。平衡过程导致蛋白质丢失约 5%~25%,还会使分辨率降低,平衡 30 分钟,蛋白质带变宽 40%,所以平衡时间不可过长;如果不平衡,把等点聚焦凝胶直接放在第二项凝胶上会导致高分子质量蛋白质的纹理现象,并且等点聚焦会黏在 SDS 胶上^[14]。有人建议使用干冰冷却凝胶,即使短短的两分钟,尿素便析出,虽然缩短平衡时间可减少扩散,但同时会减少向第二向的转移。经过多方考虑,本实验选择室温摇床振荡 15 分钟,可得到较好的结果。

蛋白质分离后,需用一定的技术将其显示出来

才能对其做下一步的分析。目前有很多方法可检测双向凝胶上分离的蛋白质,但最常用的染色方法是考马斯亮蓝染色和银染色。本实验分别采用这两种染色方法进行染色,比较发现利用考马斯亮蓝 R350 对凝胶进行染色,脱色后,会导致西施舌外套膜低丰度蛋白损失,而且背景比较模糊,检测灵敏度较低。经银染后的图谱则显示蛋白点数多而清晰,背景色较清亮。并在银染程序中未使用戊二醛,戊二醛虽然能提高银染灵敏度和染色结果的重复性,但其会修饰蛋白质,影响蛋白点的质谱鉴定和分析。在染色过程中本实验对常规的银染方法进行优化,且此方法可与后序的质谱分析相兼容,得到了针对西施舌外套膜样品比较理想的硝酸银染色法。

本实验首次将蛋白质组学技术引入西施舌这一研究领域,初步建立了西施舌外套膜蛋白质组双向电泳体系。通过对双向电泳图谱分析,目前正利用质谱(MALDI-TOF-MS)对所获得的所有蛋白点进行鉴定,为进一步研究西施舌外套膜蛋白质的组成及生理生化机制奠定基础。

参考文献:

- [1] 邢湘成. 西施舌的药用 [J]. 药膳食疗, 2004, 4: 32.
- [2] 孟学平, 程汉良, 董志国. 中国西施舌研究现状及展望 [J]. 河北科技师范学院学报, 2005, 19(4): 71-75.
- [3] Liu H, Zhu J X, Sun H L, et al. Xishi tongue *Coelomacra antiquata* (Spengler), a promising new candidate for aquaculture in China [J]. *Aquaculture*, 2006, 255(1-4): 402-409.
- [4] 陈文龙, 刘德经, 许万竹. 西施舌 (*Macra antiquata* Spengler) 人工育苗初步研究 [J]. 水产学报, 1966, 3(2): 130-141.
- [5] 孟学平, 董志国, 程汉良. 西施舌呼吸率与排氨率的研究 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(12): 2 435-2 438.
- [6] 许星鸿, 孟学平, 阎斌伦, 等. 西施舌消化系统形态学、组织学与组织化学的研究 [J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(6): 409-414.
- [7] 陈寅山, 冯莉. 西施舌血清和肌肉提取液凝集性能研究 [J]. 漳州师范学院学报(自然科学版), 2004, 17(2): 92-96.
- [8] 饶小珍, 许友勤, 陈寅山, 等. 西施舌的核型分析 [J]. 动物学杂志, 2003, 38(2): 2-5.
- [9] Kong L, Li Q, Qiu Z. Genetic and morphological differentiation in the clam *Coelomacra antiquata* (Bivalvia: Veneroida) along the coast of China [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 343: 110-117.
- [10] Kong L, Li Q. Genetic comparison of cultured and wild populations of the clam *Coelomacra antiquata*

- (Spengler) in China using AFLP markers [J]. *Aquaculture*, 2007, 271: 152-161.
- [11] 尤仲杰, 包永波, 张爱菊. 中国沿海西施舌 5 个自然群体形态差异和 RAPD 分析 [J]. 海洋学报(自然科学版), 2007, 29(3): 98-104.
- [12] 万晶宏, 罗凌, 钱小红, 等. 人肺巨细胞癌蛋白质组的二维电泳和计算机图像分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 6: 820-826.
- [13] Kawaguchi S, Kuramitsu S. Separation of heat-stable proteins from *Thermus thermophilus* HB8 by two-dimensional electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(7): 1 079-1 086.
- [14] Burghes A H M, Dunn M J, Dubowitz V. Enhancement of resolution in two-dimensional gel electrophoresis and simultaneous resolution of acidic and basic proteins [J]. *Electrophoresis*, 1982, 3: 354-363.

Establishment of two-dimensional electrophoresis system for proteome of *Coelomactra antiquata* mantle

TIAN Mei, SHEN Xin, CHENG Han-liang, MENG Xue-ping

(College of Marine Science, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Received: Oct. , 16, 2008

Key words: two-dimensional electrophoresis; proteomics; *Coelomactra antiquata*; mantle

Abstract: *Coelomactra antiquata* is a high value economic shellfish which is famous treasure feast food and medical care of aquaculture consumption. The border cells of *C. antiquata* mantle can secrete calcium carbonate to form shells. By comparing the experimental analysis of different pH gradient strips, the optimal conditions of hydration, and different staining methods on the impact of the results of two-dimensional gel electrophoresis, we established the mantle proteome two-dimensional gel electrophoresis system of *C. antiquata*, which provide the basis to study the protein composition of formation of *C. antiquata* mantle from the protein level case. The results showed that: using pH 4~7 with the non-linear strip, the inclusion of hydration desalting step, staining method using silver nitrate staining, can obtain the two-dimensional gel electrophoresis map with a high-resolution and high reproducibility which laid the foundation for further research the protein composition of *C. antiquata* mantle.

(本文编辑:梁德海)