

中华鳖肌肉组织双向电泳的条件优化

张超¹, 何中央^{2*}, 许晓军², 张海琪², 王春琳¹

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211; 2. 浙江省水产技术推广总站, 浙江 杭州 310012)

摘要: 通过不同的样品处理方式、IPG 缓冲液浓度、染色方法和 pH 等条件的对比试验, 优化建立了中华鳖肌肉组织蛋白质的双向电泳技术体系。结果表明: 蛋白样品经试剂盒纯化后可显著提高等电聚焦效果; IPG 缓冲液浓度为 0.5% 的聚焦效果好于 2.0% 浓度; 考染所获蛋白质点较少, 而银染所获蛋白质点明显增多; pH 4~7 胶条的等电聚焦效果明显好于 pH 3~10 的胶条。

关键词: 中华鳖; 双向电泳; 等电聚焦

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 03-0001-05

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*), 俗称甲鱼、团鱼、王八等, 属爬行纲(Reptilia)、龟鳖目(Testudiformes)、鳖科(Trionychidae)、鳖属(*Pelodiscus*)。在我国除西藏、新疆及青海以外其它地区均有分布, 长江流域及华南地区较为多见^[1], 国外主要分布于朝鲜、越南及日本^[2]。中华鳖是我国中华鳖重要的名特优水产品之一, 也是浙江省第一大水产养殖品种。但随着养殖规模的扩大, 相应的疾病以及种质退化、滥交等现象也愈来愈严重, 因此, 对其种苗的保护以及病害防治等相关基础工作和研究势在必行。目前在中华鳖种质相关研究方面主要基于分子标记技术, 而在双向电泳方面的研究尚属空白。

双向电泳技术(Two-dimensional Electrophoresis, 2-DE)是由 O'Farrell 等人于 1975 年建立, 基于蛋白质的等电点和分子量不同的特性进行分离^[3], 是分离复杂蛋白质最有效的方法之一^[4]。但是这项技术对蛋白质样品的制备要求很高, 条件优化把握很复杂, 须去除盐离子、核酸、多糖以及脂类复合物等干扰物质, 否则会严重影响第一向等电聚焦^[5], 直接导致电泳图谱不理想。目前双向电泳技术在水生生物中的研究已有不少, 如波斯鲟(*Acipenser persicus*)^[6]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[7]、黄盖鲮

(*Limanda yokohamae*)^[8]、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[9]等, 但尚未有中华鳖组织样品双向电泳研究报道。

本研究以中华鳖为对象, 以双向电泳技术为基础, 对其肌肉组织样品的制备以及双向电泳相关条件进行优化, 获得较理想蛋白质图谱, 为今后中华鳖基于此技术的包括种质、病害等相关研究奠定技术基础。

1 材料方法

1.1 实验动物

实验所用中华鳖日本品系购自浙江萧山省级中华鳖日本品系良种场, 解剖后取肌肉组织在液氮中闪动后于 -80℃ 冻存备用。

1.2 主要试剂和设备

CHAPS、尿素、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、溴酚蓝、考马斯亮蓝(G250、R250)、固相干胶条(pH 3~10 和 pH 4~7)、IPG buffer(pH 3~10 和 pH 4~7)、覆盖油等主要试剂购自美国 GE Healthcare 公司, 其它辅助试剂均为分子生物学级。

Ettan IPGphor III 等电聚焦仪、ImageScanner 激光凝胶扫描仪、MultiTemp III 恒温循环水浴仪以及垂直电泳仪购自美国 GE Healthcare 公司。

收稿日期: 2013-01-05.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省水产新品种选育重大科技专项(2012C12907-1)。

第一作者: 张超(1986-), 男, 河北唐山人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 中华鳖种质与选育。E-mail: chao_zhang_nbu@163.com

*通信作者: 何中央(1962-), 男, 浙江定海人, 研究员, 主要研究方向: 水产经济动物育种。E-mail: zjscxpz@126.com

1.3 样品的制备

取中华鳖肌肉组织于液氮中研磨,取0.1 g研碎组织放入500 μL 裂解液($8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, 4%CHAPS, $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT)中,用电动匀浆机匀浆,室温放置5 min,于 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min,取上清液即为蛋白初提取液,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存.取上步骤的初提液,用2D-clean up 试剂盒对蛋白样品进行纯化,最终将纯化后的蛋白保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.4 第一向等电聚焦

1.4.1 蛋白初提液与纯化后蛋白的电泳比较

分别取初步提取液和纯化后的蛋白样品混合于水化液($8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, 2.0% CHAPS, 0.5% IPG 缓冲液, 0.002%溴酚蓝, $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT)中,将冻存的IPG胶条室温平衡30 min后,浸泡在水化液中过夜,表面覆盖一层覆盖油,胶条溶胀后进行等电聚焦.等电聚焦程序为(以7 cm, pH 3~10的胶条为例): (1)Step and Hold: 300 V, 30 min; (2)Gradient: 1 000V, 30 min; (3)Gradient: 5 000 V, 80 min; (4)Step and Hold: 5 000 V, 2 000 Vh.

1.4.2 水化液中不同浓度 IPG 缓冲液的电泳比较

取纯化后的蛋白样品,用含不同浓度IPG缓冲液(0.5%和2.0%)的水化液溶胀胶条,胶条溶胀后按上述步骤进行等电聚焦.

1.4.3 不同 pH 范围胶条的电泳比较

对纯化后蛋白样品分别用pH 3~10和pH 4~7的胶条进行等电聚焦,等电聚焦过程与水化液成分与1.4.1一致.

1.5 胶条平衡

第一向等电聚焦完毕后,分别对胶条浸泡于SDS平衡液($6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $75\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 29.3% 甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝, $65\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT或 $135\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺)中进行DTT平衡和碘乙酰胺平衡操作(平衡操作在暗处进行),分别平衡15 min.

1.6 第二向垂直电泳以及染色

对平衡好的胶条进行第二项 SDS-PAGE 垂直电泳,胶浓度为12.5%.电泳过程中进行循环水浴,水浴温度为 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.电泳结束后分别对胶进行硝酸银染色(以下简称银染)和考马斯亮蓝染色(以下简称考染).最后对染色好的胶用ImageScanner 激光凝胶扫描仪扫描图像.

2 结果

2.1 蛋白初步提取液和纯化后的蛋白样品电泳结果比较

分别将初步提取液和2D-clean up 纯化后的蛋白样品用pH 3~10的胶条进行等电聚焦,结果如图1所示.由图1可见,初提液蛋白聚焦结果很差,实际操作中,其等电聚焦最大电压仅达到800 V,远未达到设定的最大电压5 000 V,说明其中盐离子较多,严重影响第一向等电聚焦.粗提取液经2D-clean up 试剂盒纯化后,聚焦结果较好.

2.2 不同浓度 IPG 缓冲液电泳结果

分别在水化液中加入浓度为0.5%和2.0% IPG

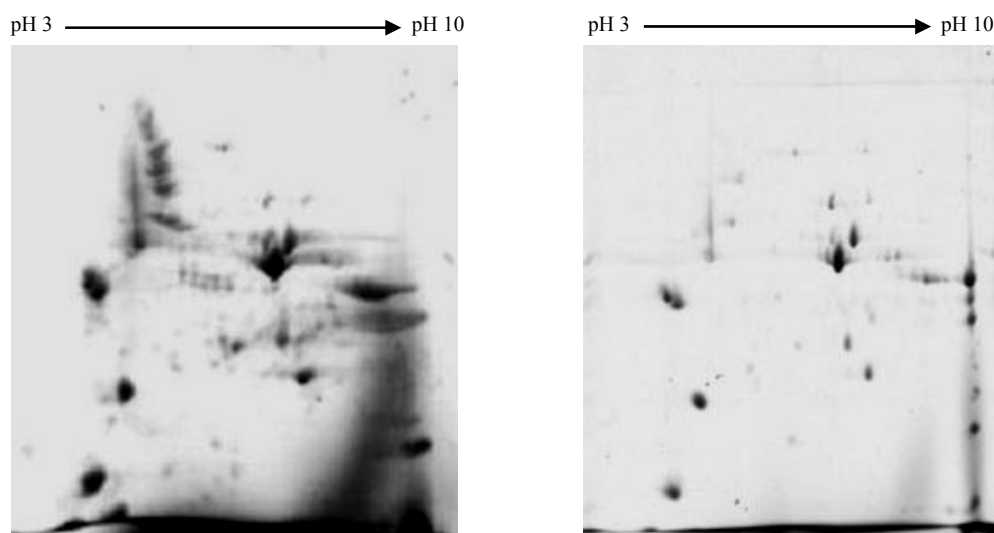


图1 蛋白初提液(左)和纯化液(右)的考染电泳图谱

缓冲液,用 pH 3~10 的胶条进行聚焦电泳,结果如图 2 所示.比较了 2 种不同浓度的 IPG 缓冲液结果,发现 2.0% 的 IPG 缓冲液会使等点聚焦效果不理想,说明此浓度偏高,实际实验中,最大聚焦电压仅达到 1 800 V;而 0.5% 的 IPG 缓冲液浓度较为合适,等电聚焦效果良好.

2.3 不同染色方法的比较

分别对 pH 3~10 的 7 cm 胶条聚焦电泳结果进行考染和银染,其中考染上样量为 50 μ g,银染上样量为 5 μ g.如图 3 所示,考染所得的蛋白质点较少,而采用银染后,检测到的蛋白质点明显增多.

2.4 不同 pH IPG 胶条的比较

分别对用 pH 3~10 和 pH 4~7 的 7 cm 胶条对纯

化后的蛋白样品进行等电聚焦,最终结果采用银染.如图 4 所示, pH 4~7 的胶条较 pH 3~10 胶条的分离效果好,无说平拖尾,蛋白点均呈规则点状.

3 讨论

双向电泳技术(Two-Dimensional Electrophoresis, 2-DE)是当前蛋白质分离技术中使用最广泛的技术,此技术联合质谱(MS)蛋白质组学分析已成为蛋白质组学研究的主要方法^[4,10].目前在中华鳖蛋白组学相关研究方面鲜有报道,本研究可为将来以 2-DE 技术为基础的相关研究奠定技术基础.

肌肉组织的蛋白含量丰富,占 20%以上,用尿素裂解液很容易使其蛋白质变性溶解,对于难溶

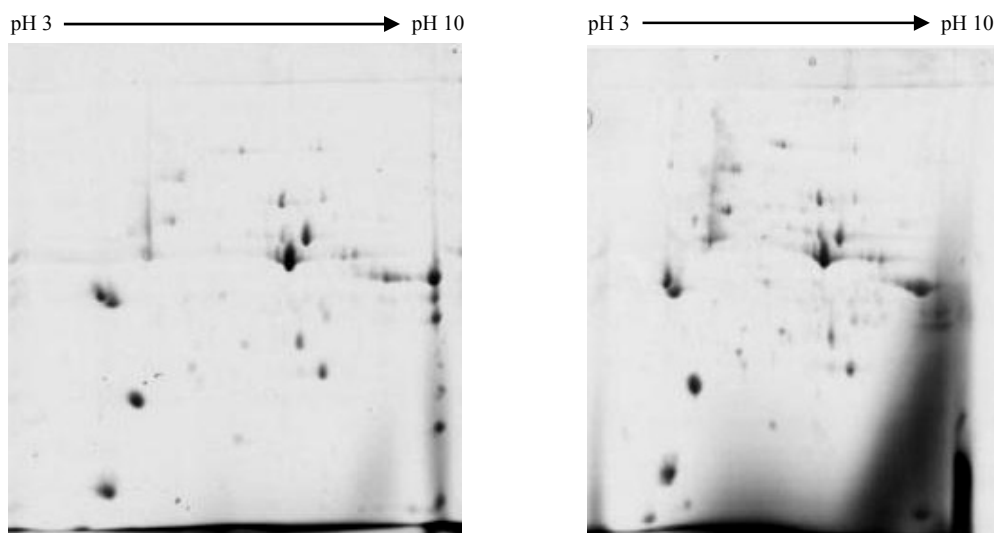


图 2 水化液中加入 0.5% IPG 缓冲液(左)和 2.0%IPG 缓冲液(右)的考染电泳图谱

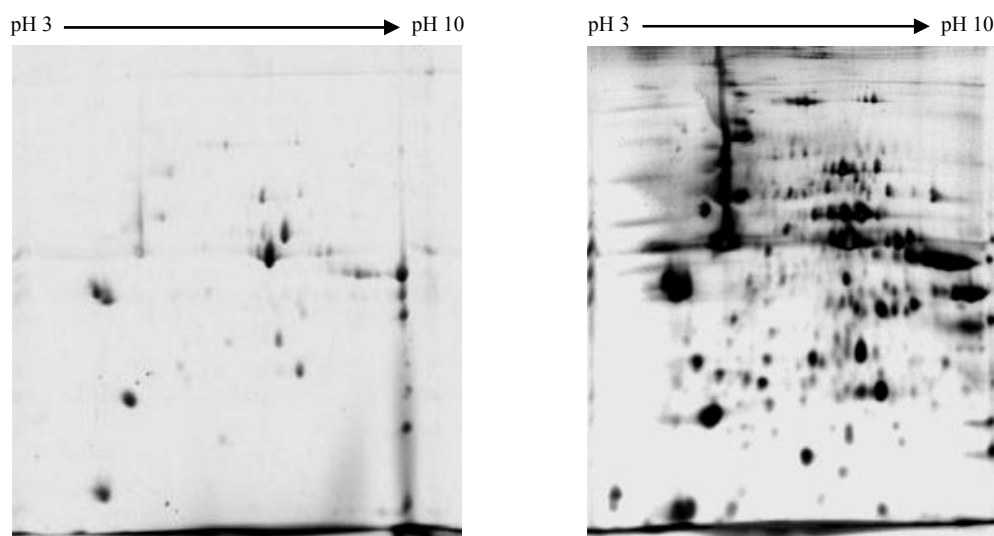


图 3 pH 3~pH 10 的胶条考染图谱(左)和银染图谱(右)

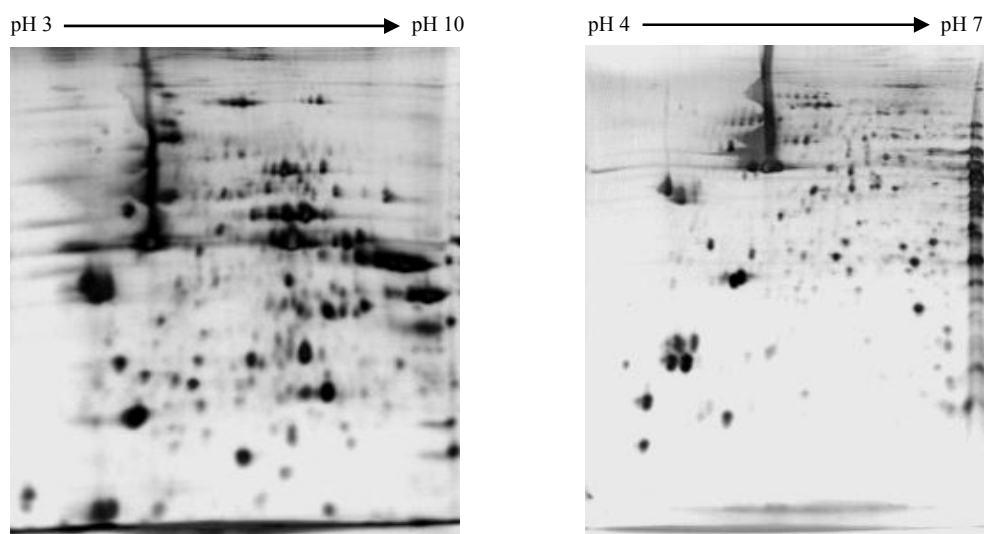


图4 银染后的 pH 3~pH 10 的胶条电泳图谱(左)和 pH 4~pH 7 胶条电泳图谱(右)

解的蛋白质样品可使用尿素与硫脲搭配而成的裂解液,可进一步提高蛋白质的溶解性^[11].在等电聚焦的过程中,盐离子是决定此过程成败的关键因素,有些组织样品盐离子浓度过高,因而在等电聚焦的过程中蛋白质对电流的贡献率很低,主要电流由盐离子生成,最终导致蛋白质得不到有效的聚焦^[12].因而对盐度过高的制备样品应采用脱盐处理,以除去盐离子以及其它干扰物质,目前较为经典的纯化方法为丙酮沉淀法^[13],笔者所用 2D-clean up 试剂盒为在此方法上的改进,能更少减小蛋白质的损失,如图 1 所示,处理后蛋白质样品的聚焦效果较处理前有了明显的提升.在胶条溶胀过程中,IPG 缓冲液的浓度过高也会导致第一向等电聚焦不良的结果,其原理和盐离子浓度过高类似,如图 2 所示,在含 0.5% 的 IPG 缓冲液的水化液中溶胀的胶条,等电聚焦效果明显好于浓度为 2.0% 的水化液.

由于 SDS-PAGE 胶的染色,考染的灵敏度远远低于银染,因而决定了考染的上样量远远高于银染,文中考染的上样量为 60 μg (7 cm 胶条),银染的上样量仅为 5 μg (24 cm 胶条为 50 μg),从图 3 可以看出,考染可检测到的蛋白质点很少,而银染可检测到的点很多.因而在进行考染的情况下要适当提高样品的上样量,但矛盾的是,高的上样量会使蛋白质沉淀的风险升高,并且必然导致等电聚焦时间延长,聚焦效果也会下降,因此在为了更多检测蛋白质差异点的情况下,笔者推荐用银染.

在以往动物肌肉组织的双向电泳报道中^[14-16],动物肌肉组织的双向电泳多用 pH 3~10 和 pH 4~7 的胶条.从图 4 可以看出, pH 3~10 的胶条所得的电泳图谱中,碱性端蛋白质水平拖带严重,而在第一向等电聚焦时聚焦过程均正常.相比之下, pH 4~7 的胶条等电聚焦效果要好于 pH 3~10 的胶条,此结果与相关报道一致^[17],说明 pH 4~7 的胶条较 pH 3~10 的胶条更适用于肌肉组织的双向电泳分析.

双向电泳是一个非常复杂的过程,受诸多因素的影响,要想获得良好的电泳图谱必须对其多方面进行条件优化.笔者对中华鳖肌肉组织双向电泳的条件优化表明,经 2D-clean up 试剂盒纯化后的蛋白样品,在 IPG 缓冲液的浓度为 0.5% 时,用 pH 4~7 的胶条、银染能得到良好的电泳图谱,可为今后以 2-DE 的蛋白组学相关研究打下了基础.

参考文献:

- [1] 王培潮. 中国的龟鳖[M]. 上海:华东师范大学出版社, 2000:50-56.
- [2] 杨渡远, 唐大由, 刘顺元, 等. 中国龟鳖类原色图谱[M]. 广州: 广东经济出版社, 1997:48.
- [3] O'Farrell P. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10):4007-4021.
- [4] Gorg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics[J]. Proteomics, 2004, 4(12):3665-3685.
- [5] Lenstra J, Bloemendal H. Topography of the total protein

- population from cultured cells upon fractionation by chemical extractions [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1983, 135(3):413-423.
- [6] Keyvanshokoh S, Kalbassi M R, Hosseinkhani S, et al. Comparative proteomics analysis of male and female Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) gonads [J]. *Animal Reproduction Science*, 2009, 111(2-4):361-368.
- [7] Knoll G A, Andre M, Gattegno T, et al. Molecular phenotype of zebrafish ovarian follicle by serial analysis of gene expression and proteomic profiling, and comparison with the transcriptomes of other animals[J]. *BMC Genomics*, 2006(7):46-51.
- [8] Oh J, Kim S, Moon H, et al. Characterization of proteins in the gonad of *Limanda yokohamae* from Masan Bay, Korea[J]. *Biologia*, 2010, 65(4):730-736.
- [9] 岳亮, 王艺磊, 张子平, 等. 日本囊对虾性腺蛋白质双向电泳的样品制备方法的改进[J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2011, 16(4):246-251.
- [10] Chevalier F. Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics[J]. *Proteome Science*, 2010, 8(1):23-27.
- [11] Fialka I, Pasquali C, Lottspeich F. Subcellular fractionation of polarized epithelial cells and identification of organelle-specific proteins by two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(14):2582-2590.
- [12] McDonough J, Marban E. Optimization of IPG strip equilibration for the basic membrane protein mABCI[J]. *Proteomics*, 2005, 5(11):2892-2895.
- [13] Saravanan R, Rose J. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [J]. *Proteomics*, 2004, 4(9):2522-2532.
- [14] Kim N K, Joh J H, Park H R, et al. Differential expression profiling of the proteomes and their mRNAs in porcine white and red skeletal muscles[J]. *Proteomics*, 2004, 4(11):3422-3428.
- [15] Lametsch R, Kristensen L, Larsen M R, et al. Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(4):918-924.
- [16] Jia X, Ekman M, Grove H, et al. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period[J]. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(7):2720-2731.
- [17] 徐永杰, 熊远著. 猪肌肉组织双向电泳分离条件的建立及常见问题分析[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(1): 105-112.

Condition Optimization of 2-DE Technique in Muscle Proteome for Chinese Soft-shell Turtle *Pelodiscus sinensis*

ZHANG Chao¹, HE Zhong-yang^{2*}, XU Xiao-jun², ZHANG Hai-qi², WANG Chun-lin¹

(1.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Fishery Technical Extension Station of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

Abstract: A 2-DE related technique is introduced and optimized for muscle proteome of Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. The comparative tests are conducted between different sample treatment, concentration of IPG buffer, staining methods and pH of IPG strips. The result indicate that the effect of isoelectric focusing (IEF) of purified protein sample is better than that of initial extracting protein, and that the concentration of 0.5% IPG buffer is more suitable than the concentration of 2.0%. Based on stained comparison, we suggest that the silver staining can detect more protein spots than coomassie brilliant blue (CCB) staining.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; 2-DE; Isoelectric focusing

(责任编辑 章踐立)