

曼氏无针乌贼墨囊蛋白质提取及双向电泳条件优化

詹萍萍^{1,2}, 王春琳^{1,2*}, 宋微微^{1,2}, 母昌考^{1,2}, 李荣华^{1,2}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 应用海洋生物教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 应用 TCA/丙酮沉淀法、裂解液法、裂解液一超速离心法以及层析法 4 种蛋白质样品制备方法, 比较了曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)墨囊蛋白质双向电泳的样品制备效果。在此基础上, 比较了不同样品处理方法、不同胶条范围以及不同上样量等对电泳结果的影响, 筛选出一套较优的分离墨囊蛋白质的双向电泳条件。研究表明: TCA/丙酮沉淀法较适合曼氏无针乌贼墨囊蛋白质双向电泳的样品制备。该方法制备的曼氏无针乌贼墨囊蛋白质样品经双向电泳分离, 用固相 pH 5~8 梯度胶条进行等点聚焦, 上样量 300 μ g, 电泳结束后硝酸银染色, 最终获得了分辨率高、重复性好的双向电泳图谱。经过初步图像分析, 检测到(389 $\pm$ 19)个蛋白点, 背景清晰且蛋白质得率较高。

关键词: 墨囊; 蛋白质; 双向电泳

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 02-0001-06

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)俗称乌贼、墨鱼、墨斗鱼、花粒子等, 隶属于软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、乌贼目(Sepioidea)、乌贼科(Sepiidae)。曼氏无针乌贼在我国近海分布广泛, 是一种重要的经济渔业资源, 由于其具有重要的经济价值而为人们所熟知, 曾是我国东海渔场传统的四大海产渔业(大黄鱼、小黄鱼、墨鱼与带鱼)之一。乌贼以喷墨作为逃避敌害和捕获食物的主要手段。乌贼墨中含有多种活性物质, 是一种重要的海洋生物药, 目前已有许多学者对其药用价值进行了研究^[1-8]。墨囊是乌贼墨的主要发生器官, 文献[9]已对曼氏无针乌贼的墨囊形成、墨汁成分及三级卵膜进行了研究, 但目前尚未发现乌贼墨囊基因组学和蛋白质组学方面的相关研究报道。

现今虽然蛋白质组学研究进展迅速, 但是利用蛋白质分子量和电荷差异性建立的双向电泳技术(2-DE), 仍是进行复杂蛋白质样品分离的重要技术之一^[10]。蛋白样品的制备是 2-DE 的关键, 也是进行蛋白质组学分析的前提^[11]。科学的样品制备

方法能使样品中的蛋白质充分溶解、分离、变性和还原, 这对获得理想的双向电泳图谱至关重要^[12]。墨囊组织中含有的多糖、核酸、色素及其他次生代谢产物能够干扰蛋白分离, 影响电泳结果的分辨率和重复性, 因此获得理想的 2-DE 图谱较为困难^[13]。所以, 建立成熟的蛋白质双向电泳技术平台是进行蛋白质组学研究的前提^[14]。

笔者以曼氏无针乌贼墨囊为研究对象, 比较 TCA/丙酮沉淀法、裂解液法、裂解液一超速离心法以及层析法 4 种蛋白质样品制备方法的优缺点。同时对双向电泳方法进行改进, 建立了可靠的曼氏无针乌贼墨囊的蛋白质双向电泳技术平台和乌贼墨囊的蛋白质图谱, 筛选出了不同发育时期的差异蛋白质, 以进一步寻找乌贼墨囊发育相关蛋白或分化标志性蛋白, 研究这些蛋白在墨囊发育及功能完善中的作用, 探寻控制墨囊发生的关键蛋白。

1 材料与方法

1.1 实验材料

曼氏无针乌贼样品于 2009 年 3 月采自福建霞

收稿日期: 2013-01-06.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://nbdxlg.paperopen.com/>

基金项目: 国家自然科学基金(41176124, 41206114); 教育部博士点基金(20103305110003)。

第一作者: 詹萍萍(1985-), 女, 辽宁本溪人, 助理实验师, 主要研究方向: 水产动物遗传育种。E-mail: zhanpingping@nbu.edu.cn

*通信作者: 王春琳(1965-), 男, 浙江台州人, 教授, 主要研究方向: 水产经济动物繁育及人工养殖。E-mail: wangchunlin@nbu.edu.cn

浦养殖场, 平均体长(10.5 ± 0.5) cm, 平均湿重(118.5 ± 10.2) g. 乌贼在冰上处死后迅速剥离完整新鲜的乌贼墨囊组织, 倒置墨囊使墨汁流出, 用滤纸吸干表面水分后放入离心管中, 液氮保存, 过程在 10 min 内完成, 然后移至超低温冰箱保存. 制备样品时, 取出墨囊组织, 去除残留在墨囊中的墨汁后, 转移到提前消毒预冷的研钵中, 在液氮环境中充分研磨成粉末.

1.2 主要实验仪器

等电聚焦系统(Protean IEF Cell System), SDS-PAGE 垂直电泳系统(Protean II xi Cell System), 扫描仪 GS-800, PDQuest 2-D Analysis Software (Version 7.4.0, BIO-RAD Healthcare)均购自美国 Bio-Rad 公司; 高速低温离心机购自 Sigma 公司.

1.3 主要试剂

IPG 干胶条, IPG buffer, 低熔点琼脂糖封胶液, 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA- Na_2), 蛋白测定试剂盒均购自 Bio-Rad 公司. 尿素(urea)、硫脲($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$)、二硫苏糖醇(DTT)、矿物油、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、Tris 碱(Tris-base)、甘氨酸、硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 、考马斯亮蓝 G-250 以及溴酚蓝均购自 Amresco 公司. 其他试剂为国产分析纯.

1.4 4 种不同的蛋白质制备方法

1.4.1 TCA/丙酮沉淀法

称取 1 g 曼氏无针乌贼墨囊粉末置于 10 mL 离心管中, 置于 -20°C 预冷的 TCA/丙酮溶液中, -20°C 静置 1 h, 4°C $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 用 75% 酒精清洗沉淀后, 4°C $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 沉淀在 4°C 冰箱干燥成粉末, 加入 2 mL 裂解液 I, 4°C 静置 1 h, 4°C $14\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 h, 取上清液, 所得液体作为双向电泳样品(a).

1.4.2 裂解液法

称取 1 g 曼氏无针乌贼墨囊粉末置于 2 mL 离心管中, 加入 2 mL 裂解液 I, 4°C 静置 1 h, 将样品离心 4°C $14\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 h, 取上清液, 所得液体作为双向电泳样品(b).

1.4.3 裂解液—超速离心法

将 1.4.2 所得样品(b)在 4°C $20\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 超速离心 1 h. 吸取上层脂类和下层沉淀间的澄清液体作为双向电泳样品(c).

1.4.4 层析法

将方法 1.4.1 所得样品经过 Bio-Spin 层析柱, 所得液体作为双向电泳样品(d).

1.5 蛋白浓度的测定

参考 Bradford 方法^[15]测定样品.

1.6 双向电泳

1.6.1 等电聚焦(17 cm IPG 预制胶条)

等电聚焦电泳主要按照 Grog 的描述方法^[8], 并参照 Bio-Rad 仪器系统操作指南. 根据测得的样品蛋白浓度, 上样量分别为 200 μg 和 300 μg , 筛选最佳上样量. 选择固相 pH 梯度胶条(pH 3~10, pH 4~7, pH 5~8), 筛选最适胶条. 水化和聚焦在 20°C 自动进行, 每胶条限流每根 50 μA , 等电聚焦参数设定见表 1.

表 1 等点聚焦程序

步骤	胶条长度/cm	时间	电压/V	升压模式	作用
水化	7	12 h	50		主动水化
S1	7	1 h	250	线性	除盐
S2	7	1 h	500	线性	除盐
S3	7	4 h	4 000	线性	升压
S4	7	25 000 Vh	4 000	快速	聚焦
S5	7	任意	500	快速	保持
步骤	胶条长度/cm	时间	电压/V	升压模式	作用
水化	17	12 h	50		主动水化
S1	17	1 h	250	线性	除盐
S2	17	1 h	500	快速	除盐
S3	17	1 h	1 000	快速	除盐
S4	17	6 h	8 000	线性	升压
S5	17	88 000 Vh	8 000	快速	聚焦
S6	17	任意时间	500	快速	保持

1.6.2 IPG 胶条的平衡

聚焦结束后取出胶条, 将 IPG 胶条胶面朝上放入水化盘中, 加入 2 mL 的平衡缓冲液 I (尿素 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SDS 2%(w/v), Tris-HCl $0.375\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.8, 甘油 20%, DTT 2%(w/v)); 再放置于水平摇床上缓慢振荡 15 min, 然后将 IPG 胶条取出移入加有 2 mL 平衡缓冲液 II (尿素 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SDS 2%(w/v), Tris-HCl $0.375\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.8, 甘油 20%, 碘乙酰胺 2.5%(w/v))水化盘中, 置水平摇床上再振荡 15 min; 最后取出 IPG 胶条, 浸入 $1\times\text{SDS-PAGE}$ 电泳缓冲液(Tris $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, glycine $192\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, SDS

0.1%(w/v), pH 8.3)中漂洗 5 s, 将胶条的边缘置于滤纸上几秒钟, 以除去多余的缓冲液.

1.6.3 第二向聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳(SDS- PAGE)

将 IPG 胶条小心地转移到置备好的 SDS 凝胶上, 用预溶的 0.5%低熔点琼脂糖封胶, 加入 1×SDS-PAGE 电泳缓冲液进行垂直凝胶电泳.

1.6.4 银染

参考 Bio-Rad 蛋白质组双向电泳实验操作手册的银染方法进行染色.

1.6.5 图像获得及分析

脱色后的凝胶采用 GS-800 扫描仪扫描 2-DE 凝胶得到凝胶图像, 采用 PDQuest 2-D Analysis Software (Version 7.4.0, BIO-RAD Healthcare)软件对一组凝胶图像进行处理分析, 每个样品进行 3 次重复. 通过以上分析, 得到凝胶蛋白点数、每个蛋白点定量、位置等基本信息.

2 结果与分析

2.1 墨囊蛋白提取率比较

本研究进行了墨囊蛋白不同提取方法的比较,

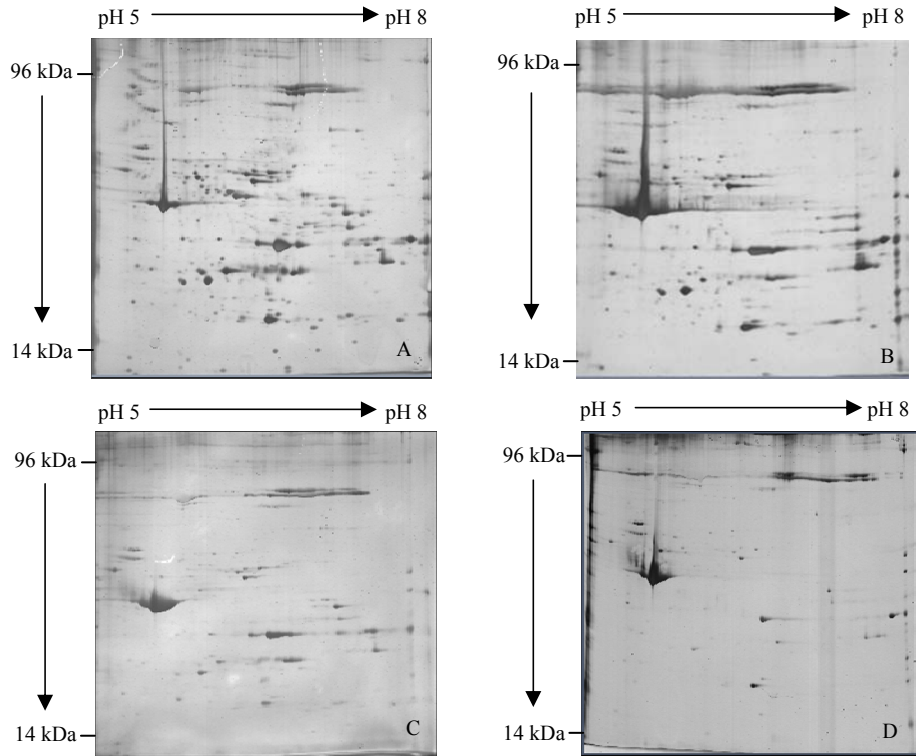
表 2 是墨囊质量相同的情况下, 采用不同方法所测得的蛋白提取率. 从表 2 可以看出, 蛋白质提取率由高到低依次为: 裂解液法、TCA/丙酮沉淀法、裂解液超速离心法, 层析法效果欠佳.

表 2 曼氏无针乌贼墨囊蛋白质提取率

方法	浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	样品总 体积/ μL	蛋白质 总量/ μg	墨囊/ g	提取 率/%
TCA/丙酮沉淀法	15.9	1 100	17 490	0.8	2.18
层析法	6.2	1 000	6 200	0.8	0.78
裂解液法	20.6	1 300	26 780	0.8	3.3
裂解液—超速离心法	17.0	1 000	17 000	0.8	2.12

2.2 蛋白质双向凝胶电泳图谱比较

上述 4 种方法提取的墨囊蛋白质样品, 经双向凝胶电泳分离后(图 1). 用 PDQuest 软件分别分析胶片上的蛋白斑点, 结果见表 3. 从图 1 和表 3 可以直观地看出: 相同上样量, 采用 TCA/丙酮沉淀法较其他 3 种方法检测到的蛋白斑点多, 且图谱中水平和垂直的条纹较少. TCA/丙酮沉淀法较好地溶解了部分疏水性蛋白, 提高了蛋白丰度和蛋白种类, 同时消除了大量干扰物质(如核酸、多糖、色



A 为 TCA/丙酮沉淀法; B 为裂解液法; C 为裂解液—超速离心法; D 为层析法

图 1 曼氏无针乌贼墨囊蛋白质双向凝胶电泳图谱

素等)的影响,因此TCA/丙酮沉淀法更适合墨囊蛋白质的提取。

表3 提取方法与墨囊蛋白质斑点数目对照表

方法	蛋白质点数
TCA/丙酮沉淀法	389±19
裂解液法	205±10
裂解液-超速离心法	165±12
层析法	98±6

2.3 双向电泳体系的优化

2.3.1 不同胶条范围比较

本实验主要采用了7 cm pH 3~10和17 cm pH 5~8、pH 4~7的胶条,染色方法选择改进的银染法,该方法检测的灵敏度较高,有利于低丰度蛋白的检测。7 cm宽pH范围的胶条主要用于确立蛋白的主要分布范围,通过比较2种pH范围的17 cm胶条,确定1种样品分离效果最好的胶条。图2(A)使用pH为3~10的胶条确定蛋白质样品的pH范围,从图2(A)可看出,高丰度蛋白主要存在于左侧低pH端,高丰度蛋白会影响中低丰度的蛋白表达。

为得到更全面和清晰的电泳图谱,选取17 cm, pH 5~8和pH 4~7的预制胶条比较,通过图2(B)和图2(C)比较发现, pH 5~8的样品分离效果较好。

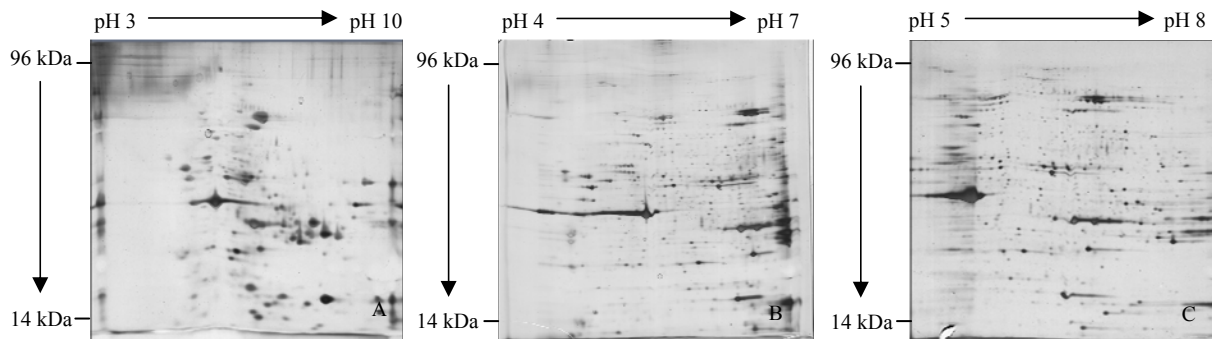
2.3.2 不同上样量范围的比较

在确立了胶条的pH范围后确定胶条的上样量,为防止一些低丰度蛋白不能被检测到,影响最终双向电泳凝胶图谱的蛋白斑点数,尽量不采取上样量较低的方法。提高蛋白的上样量有利于低丰度蛋白质的检测,而蛋白上样量过高时会引起双向电泳图谱的畸变^[16],且高丰度蛋白会掩盖其周围的一些稍低丰度的蛋白点,而使双向电泳图谱质量下降。笔者分析了不同上样量对图谱的影响,由图3可知,在300 μg上样量条件下得到的蛋白点更多,图谱更清晰。

3 讨论

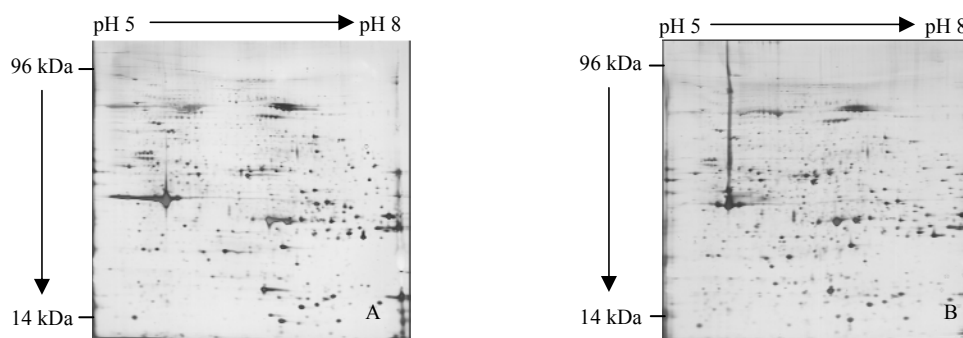
3.1 曼氏无针乌贼墨囊样品制备方法

在蛋白质组学的研究中,双向电泳技术是应用最广泛的蛋白质分离方法之一。蛋白质样品制



A为pH 3~10; B为pH 4~7; C为pH 5~8

图2 不同胶条范围对双向电泳图谱的影响



A为200 μg; B为300 μg

图3 不同上样量对双向电泳图谱的影响

备是双向电泳中的第一步,也是最关键的一步。不同来源的样品制备方法可能不同,但是一般都遵循以下几个原则:(1)减少对蛋白的人为修饰。(2)破坏蛋白与其他生物大分子的相互作用,并且使蛋白处于完全变性的状态。(3)尽可能地提高样品蛋白的溶解度,抽提最大量的总蛋白,减少蛋白的损失^[17]。

笔者针对曼氏无针乌贼墨囊组织采取了4种不同蛋白质制备方式。实验结果表明,墨囊蛋白提取率与提取方法密切相关,裂解液法的提取率最高。因为裂解液法是通过裂解液中高浓度的尿素和硫脲提取墨囊中的蛋白质,尿素和硫脲均具有较好的溶解膜蛋白中蛋白质和解折叠多数蛋白质的功能,样品蛋白未经其他处理而损失较少。裂解液中的Tris可以防止样品蛋白的降解,增大蛋白的溶解性,并且对裂解液pH的变化起到缓冲作用。裂解液中的还原剂DTT和少量载体两性电解质也能促进蛋白质溶解,亮氨酸和PMSF等有机化合物则通过抑制蛋白水解酶活性,减少蛋白质的降解。此外,裂解液中的去污剂CHAPS可以减弱蛋白质间疏水键的相互作用,从而减少蛋白质的聚合沉淀^[18]。由此来看,裂解液配方中的多种成分均能提高蛋白质的溶解度,因而可获得比采用其他方法更高蛋白质得率的效果。虽然TCA/丙酮沉淀法提取率不如裂解法,但是可以获得的蛋白质斑点数目不仅最多,而且斑点清晰,有利于开展蛋白质组鉴定分析工作^[19]。其原因可能是TCA/丙酮沉淀法能较好地溶解某些疏水性蛋白,提高蛋白丰度和蛋白种类,较好地去除核酸、脂类、盐、去污剂等干扰物质。综合考虑,我们选择TCA/丙酮沉淀法提取曼氏无针乌贼墨囊蛋白质。

3.2 曼氏无针乌贼墨囊蛋白双向电泳条件优化

双向电泳条件的优化包括胶条的长度、pH范围、上样量、等电聚焦程序、聚丙烯酰胺凝胶的浓度和染色等。胶条的选择主要根据实验目的和需要而定,小尺寸的胶条电泳时间短,可用于优化样品制备等预实验;大尺寸的胶条电泳时间长,则用于对复杂样品进行更为彻底的分析并鉴别出感兴趣蛋白。宽pH范围的胶条用来分析总蛋白,窄pH范围的胶条可以大大提高分辨率和灵敏度,用于分析特定的蛋白。一般来说,胶条愈长,pH范围愈

窄,则所需上样量愈大。上样量也与染色方法有关,银染灵敏度高,样品上样量少;胶体考染等方法灵敏度稍差,所需上样量较大。聚焦时间一般用达到聚焦所需的伏特小时(Vh)来表示,它主要取决于上样量和样品种类,上样量越大,则需要较多的伏特小时数,但是样品聚焦所需要完成的伏特小时数主要靠经验决定。聚丙烯酰胺凝胶的浓度主要是取决于蛋白质分子量大,聚丙烯酰胺凝胶的浓度越大,交联度越大,孔径越小,蛋白分子移动越慢,反之则快^[20]。染色方法的选择主要取决于其灵敏度和质谱兼容性。

本研究中曼氏无针乌贼墨囊上样量最终采用300 μg,当上样蛋白浓度过高时,容易在重泡胀期和等电聚焦时发生沉淀,影响聚焦效果,而且丰度过高的蛋白斑点过大,容易掩盖某些相近的丰度较低的蛋白点。当上样蛋白浓度过低时,表达量较低的点则不易显现。因此通常在保证图谱质量和检测蛋白斑点数量的前提下,最终确定样品的上样量。

参考文献:

- [1] 吕昌龙. 乌贼墨中微量元素含量的测定[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(9):555.
- [2] 吕昌龙. 乌贼墨对小鼠移植瘤的抑制作用[J]. 实用肿瘤学, 1994, 8(1):6-7.
- [3] 马维娜. 乌贼墨的研究[J]. 长春中医学院学报, 1996, 12(57):52.
- [4] 赫生, 吕昌龙. 乌贼墨抗肿瘤活性的实验研究[J]. 中国医科大学学报, 1996, 25(2):134-135.
- [5] 侯雪云, 孙克任. 乌贼墨对H-(22)癌细胞TPK, PKC及PKA活性的影响[J]. 中国海洋药物, 2001, 6:17-19.
- [6] 江津津. 乌贼墨多酚氧化酶的部分特征[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(4):353-356.
- [7] 郑高利. 鱿鱼墨与乌贼墨部分化学成分与微量元素含量比较[J]. 中国海洋药物, 2002(3):12-14.
- [8] 黄枚. 乌贼墨抗癌活性的实验研究[J]. 福建中医学院学报, 2004, 14(1):22-23.
- [9] 王春琳, 樊晓旭, 余红卫, 等. 曼氏无针乌贼墨囊组织学及墨汁形成的超微结构[J]. 动物学报, 2008, 54(20):366-372.
- [10] Görg A, Postel W, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2002, 21(6):1037-1053.
- [11] Islam N, Lonsdale M, upadhyaya N M, et al. Protein

- extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis[J]. *Proteomics*, 2004, 4:1903-1908.
- [12] 李勤, 黄建安, 刘硕谦, 等. 茶树蛋白质双向电泳样品制备技术研究[J]. *茶叶科学*, 2011, 31(3):173-178.
- [13] 席景会. 低温胁迫下拟南芥差异蛋白质组学研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [14] 黄福生, 黄河清, 黄慧英. 金乌贼视神经节蛋白质组分离方法的初步研究[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2007, 46(3):406-410.
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochemistry*, 1976, 72(7):248-254.
- [16] Görg A, Boguth G, Obermaier C, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-DALT): The state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(7):1079-1086.
- [17] 赵海豹, 林汝仙, 王升启. 蛋白质组学研究相关技术与进展[J]. *生物技术通讯*, 2008, 19(6):903-905.
- [18] 朱金勇, 黄河清. 镉盐诱导的牙鲆脑、鳃、肝差异蛋白质组研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2005.
- [19] 谢玲, 应万涛, 张开泰, 等. 双向电泳和肽质量指纹谱技术鉴定支气管上皮细胞恶性转化相关蛋白 ANXH-human[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16: 569-573.
- [20] 颜真, 张英起. 蛋白质研究技术[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2007.

Optimization of Protein Isolation and Method of Two-dimensional Electrophoresis from the Ink Sac in *Sepiella maindroni*

ZHAN Ping-ping^{1,2}, WANG Chun-lin^{1,2*}, SONG Wei-wei^{1,2}, MU Chang-kao^{1,2}, LI Rong-hua^{1,2}

(1.School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to develop an efficient protein extraction method suitable for two-dimensional electrophoresis (2-DE) from the ink sac in *Sepiella maindroni*, we compared four analytical approaches, which are the precipitation separation of TCA/acetone, the lyolysis buffer, the lyolysis-ultracentrifugation and the column chromatography for total protein extraction. We also compared the effects of different protein extraction methods, different IPG strips and different volumes of sample loaded on the 2-DE. The results show that the TCA/acetone precipitation is the most suitable method for the ink sac protein sample preparation for 2-DE, and the appropriate electrophoresis pattern can be obtained by loading 300 μ g protein samples using the method of TCA/acetone precipitation, with IPG strips of pH 5-8 for the first dimensional electrophoresis and staining with silver nitrate. A total of (389 $\pm$ 19) protein points are obtained by conducting image analysis. The improved TCA/acetone precipitation can achieve the highest resolution of two dimensional electrophoresis and high yield of protein, and the findings can facilitate the research of proteomics on the ink sac in *Sepiella maindroni*.

Key words: ink sac; protein; two-dimensional electrophoresis

(责任编辑 史小丽)