

人肾组织磷酸化蛋白质组二维凝胶电泳的建立与优化

刘亚伟¹, 戴兵¹, 梅长林^{1*}, 沙伟², 张岩¹, 熊锡山¹

(1. 第二军医大学长征医院肾内科, 解放军肾脏病研究所, 上海 200003; 2. 中国科学院上海生物科学院生物化学与细胞生物学研究所蛋白质组学重点实验室, 上海 200031)

[摘要] **目的:** 利用二维凝胶电泳法分离人肾组织磷酸化蛋白质组。**方法:** 利用金属磷酸盐亲和层析树脂富集人肾组织磷酸化蛋白。样品浓缩除盐后, 进行一维等电聚焦分离和二维 SDS 电泳分离提取人肾组织磷酸化蛋白。**结果:** 成功提取了人肾组织磷酸化蛋白, 并得到了磷酸化蛋白的双向凝胶电泳图谱。**结论:** 磷酸化蛋白富集技术与二维凝胶电泳技术的结合是研究磷酸化蛋白质组的有效方法, 为进一步研究人肾组织磷酸化蛋白奠定基础。

[关键词] 蛋白质组学; 磷酸化蛋白质组; 二维凝胶电泳

[中图分类号] Q 51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0603-04

Establishment and optimization of two-dimensional gel electrophoresis for separation of human kidney phosphoproteome

LIU Ya-wei¹, DAI Bing¹, MEI Chang-lin^{1*}, SHA Wei², ZHANG Yan¹, XIONG Xi-shan¹ (1. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Kidney Disease Research Institute of PLA, Shanghai 200003, China; 2. Key Laboratory of Proteomics, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031)

[ABSTRACT] **Objective:** To separate human kidney phosphoproteome by two-dimensional gel electrophoresis. **Methods:** The phosphorylated proteins from human kidney tissues were enriched with phosphate metal affinity chromatography (PMAC) resin. After being concentrated and desalted, the samples were separated by isoelectric focusing on first dimension and SDS electrophoresis on second dimension. **Results:** The phosphorylated proteins were successfully extracted from human kidney tissues and were separated by two-dimensional gel electrophoresis. **Conclusion:** Phosphoprotein enrichment technique combined with two-dimensional gel electrophoresis is an effective approach to study phosphoproteome, laying a foundation for further investigation of human kidney phosphoproteins.

[KEY WORDS] proteomics; phosphoproteome; two-dimensional gel electrophoresis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6):603-606]

随着人类基因组计划的基本完成, 以功能基因组学和蛋白质组学为主要研究内容的后基因组时代已经来临^[1]。蛋白质组学的复杂性不仅在于细胞中蛋白质数量的庞大, 更在于蛋白质多样的翻译后修饰。而在所有的翻译后修饰中, 可逆的磷酸化(reversible phosphorylation, RP) 可谓是重中之重, 几乎调节着生命活动的整个过程^[2]。经典的二维凝胶电泳技术在磷酸化蛋白质组学研究中仍发挥重要作用^[3]。由于磷酸化蛋白在细胞中含量甚微, 因此应在二维凝胶电泳之前, 对磷酸化蛋白进行富集。目前富集磷酸化蛋白质的抗体免疫沉淀法^[4]、化学修饰法^[5]等存在抗体特异性不强、操作复杂等缺点。而金属磷酸盐亲和层析(phosphate metal affinity chromatography, PMAC)方法的使用使我们简单快速、高效特异地富集细胞和组织中的磷酸化蛋白。本实验拟通过对 PMAC 富集磷酸化蛋白方法中关键因素与环节进行优化, 提高磷酸化蛋白的得

率, 为鉴定和研究磷酸化蛋白的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 主要试剂 BD™磷酸化蛋白富集试剂盒购自 BD Biosciences 公司, 蛋白酶抑制剂 Cocktail Set III, Benzonase Nuclease(DNAase/Rnase 的混合物, 纯度 > 90%) 购自 Novagen 公司。丙烯酰胺、N, N'-甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30330640); 国家自然科学基金面上项目(30271523); 国家自然科学基金(30576867)。Supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China(30330640), General Program of National Natural Science Foundation of China(30271523) and National Natural Science Foundation of China(30576867)。

[作者简介] 刘亚伟, 博士生。E-mail: lyw1025@163.com

* Corresponding author. E-mail: chlmei1954@126.com

(Tris)、二硫苏糖醇(DTT)、硫脲(thiourea)、十二烷基硫酸钠(SDS)购自 Bio-Rad 公司,超纯脲(ultra urea)、四甲基乙二胺(TEMED)、丙基硫酸盐(CHAPS)、氧化铝、原钒酸钠、氟化钠购自 Sigma 公司,低相对分子质量蛋白标准、固相 pH 梯度干胶条(IPGstrip pH 3~10, 13 cm)和 IPG 缓冲液购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司。其他试剂为国产分析纯市售商品。所用溶液均用去离子水配制。

1.1.2 主要仪器及软件 P-2000 分光光度仪(Hitachi 公司),超速离心机,冷却水循环系统(用于电泳冷却,Cole-Parmer 公司)。Ettan 固相 pH 梯度等电聚焦仪、Hofer SE 600 垂直电泳仪和 Image Master 凝胶图像分析软件(Amersham Pharmacia 公司),GS710 scanner 图像扫描仪(Bio-Rad 公司),microcon 10K 超滤管,纯水装置(Millipore 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 组织标本的处理 无菌条件下切取手术后新鲜的肾癌旁正常肾组织(距肿瘤组织>5 cm),用预冷的生理盐水反复清洗组织,以去除血液,尽可能剪去其他组织,处理后的样品立即用于蛋白质的抽提或置于-80℃保存备用。

1.2.2 肾组织总蛋白的提取 将 200~300 mg 冰冻正常肾组织于液氮下充分研磨至粉末状,置于 3 ml 预冷的含有蛋白酶抑制剂和 20 μl Benzonase 的裂解液中,14 000×g 4℃离心 20 min,将上清转入预冷的 5 ml 试管中。轻轻颠倒试管,以混匀裂解液。收集上清,14 000×g 4℃离心 20 min 后收集上清,并进行蛋白定量。

1.2.3 磷酸化蛋白的富集 取肾组织总蛋白约 8 mg 进行磷酸化蛋白的分离纯化,该过程按照磷酸化蛋白的富集手册(BD Biosciences 公司)的说明进行;把肾组织总蛋白通过磷酸化蛋白亲和层析柱,用 Buffer A 洗去杂蛋白及 Buffer B 洗脱磷酸化蛋白,得到纯化的磷酸化蛋白。

1.2.4 磷酸化蛋白的浓缩除盐 依次收集磷酸化蛋白洗脱液 1~5 管共 5 ml,采用 microcon 3K 超滤,由于除盐效果不佳,后改用 microcon 10K 超滤。先在超滤管中加入 1 ml 样本,4℃,12 000×g 离心 30 min 后补加 100~200 μl 50 mmol/L 的 NH₄HCO₃,用枪头缓缓吹打一下,然后再超滤 1 次,而后再加入样品超滤,即加样品超滤和加 NH₄HCO₃超滤交替进行,直到样品浓缩至 50 μl,收集上清,用 BCA 法进行蛋白质定量后分装,-80℃保存备用。

1.2.5 固相 pH 梯度二维凝胶电泳 主要按 IPG-phor 等电聚焦系统指南和 Gorg 等^[6]的方法进行。上样 100 μg,IPG 干胶条水化和聚焦在 20℃自动进行,其中于 30 V 低电压水化 12 h,然后经过 500 V 1 h、1 000 V 1 h,最后稳定在 8 000 V 下进行等电聚焦 5 h。等电聚焦结束后,将胶条进行两步平衡,然后将平衡后的胶条移至 0.75 mm 厚的 12.5%均匀分离胶的上端,进行 SDS-PAGE 电泳(30 mA 40 min,60 mA 至溴酚蓝前沿)。电泳所得到的二维凝胶,按蛋白质银染试剂盒的操作手册进行银染。

1.2.6 图像分析及统计学处理 凝胶通过 GS710 scanner 图像扫描仪以及 LabScan 扫描软件进行扫描,获取图像。利用 Image Master 图像分析软件对图像进行强度校正、点检测、背景消减、匹配、建立平均凝胶等分析。

2 结果

2.1 人肾组织磷酸化蛋白的提取和浓缩除盐 本研究利用金属磷酸盐亲和层析树脂从 8 mg 人肾组织总蛋白裂解液中纯化出约 400 μg 的磷酸化蛋白。并通过 microcon 10K 超滤管对磷酸化蛋白进行浓缩除盐。12% SDS-PAGE 条件下浓缩除盐后的人肾组织磷酸化蛋白与人肾组织总蛋白相比,多种高丰度非磷酸化蛋白均已去除(图 1)。12% SDS-PAGE 条件下第 1~5 管洗脱液中磷酸化蛋白的表达情况,可见磷酸化蛋白主要富集在第 2 管和第 3 管(图 2),与磷酸化蛋白富集试剂盒的操作说明符合。第 2 管和第 3 管蛋白定量分别为 205 μg/ml 和 115 μg/ml。

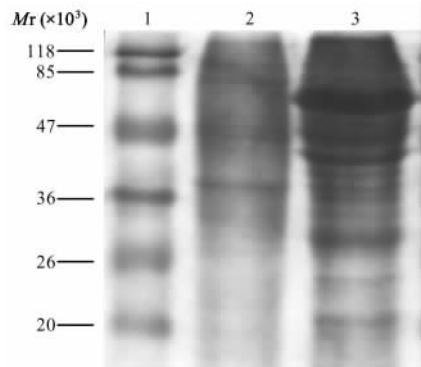


图 1 正常肾组织总蛋白、浓缩除盐后的磷酸化蛋白 12% SDS-PAGE 结果

Fig 1 Total proteins and phosphorylated proteins after concentration and desalting of normal kidney tissues as assessed by 12% SDS-PAGE

1:Protein standard; 2: Total proteins of normal kidney tissues; 3: Phosphorylated proteins of normal kidney tissues after being concentrated and desalted

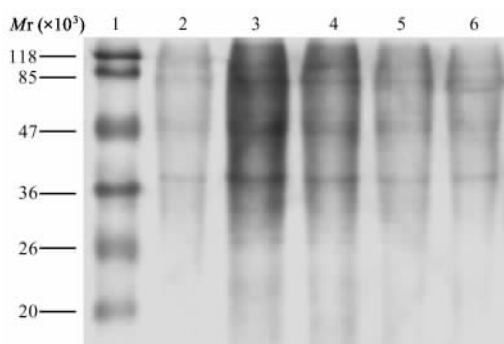


图2 正常肾组织磷酸化蛋白质 12% SDS-PAGE 结果

Fig 2 Extraction of phosphorylated proteins of normal kidney tissues as assessed by 12% SDS-PAGE

1:Protein standard;2-6: The 1st to 5th eluates of the phosphorylated proteins of normal kidney tissues, respectively

2.2 人肾组织磷酸化蛋白的二维凝胶电泳分离

富集后的人肾组织磷酸化蛋白经 microcon 3K 超滤后,发现蛋白质迁移不佳,出现拖尾现象(图 3A),改用 microcon 10K 超滤后,蛋白质分离良好,蛋白点数目明显增加,蛋白斑点边界清晰,拖尾现象明显改善(图 3B)。

3 讨论

翻译后蛋白质的修饰是目前蛋白质组研究中的一个重要课题。许多蛋白质在翻译后会在不同的基团上发生不同的修饰,如磷酸化、糖基化、甲基化、乙酰化等。修饰后的蛋白质在生物体的功能调节上起关键作用^[7]。蛋白质磷酸化是最常见、最重要的一种蛋白翻译后修饰方式。蛋白质磷酸化和去磷酸

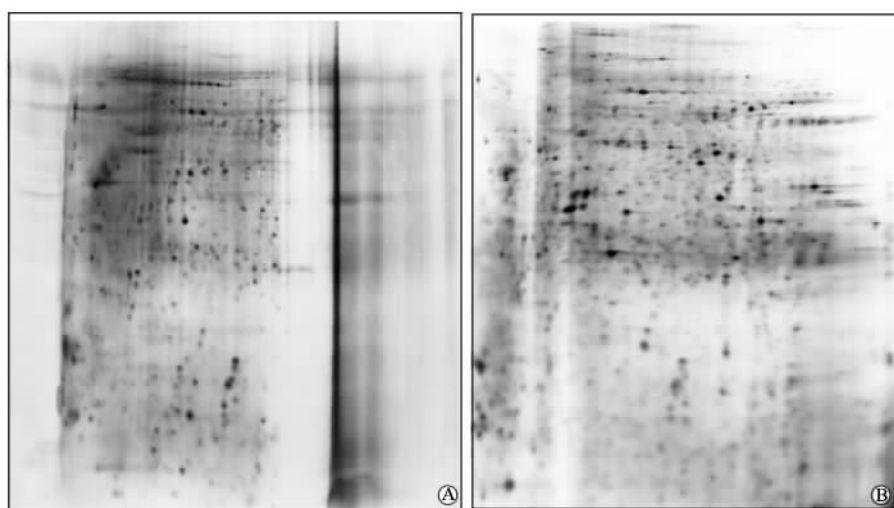


图3 正常肾组织磷酸化蛋白 microcon 3K(A), 10K(B)超滤的二维凝胶电泳

Fig 3 Phosphorylated proteins of normal kidney tissues ultrafiltrated by microcon 3K(A) and 10K(B) as assessed by two-dimensional gel electrophoresis

化几乎调节着生命活动的整个过程,包括细胞的增殖、发育和分化,神经活动,肌肉收缩,新陈代谢,肿瘤发生等。但是蛋白质组中只有一小部分蛋白质发生磷酸化,磷酸化肽在蛋白质水解产物中又常表现为低丰度,质谱对磷酸化肽的鉴定常会被高丰度的非磷酸化肽所干扰。只有当磷酸化肽或磷酸化蛋白被富集后,磷酸化蛋白质组学分析才会变得容易些^[8]。

过去关于磷酸化蛋白富集的方法主要应用针对特定蛋白的抗体进行免疫沉淀。但该方法需要首先对蛋白有所了解,且不适合大规模研究。虽然,近来关于针对磷酸化基团的抗体已经出现,但只有抗磷酸化酪氨酸的抗体效果较好。而抗磷酸化丝氨酸、苏氨酸的抗体特异性均不强^[4]。而后又有学者通过对

磷酸化基团进行化学修饰,从混合物中分离磷酸化蛋白质。但此法相对比较复杂,在反应过程中还需要很多的脱盐程序,敏感度较低^[5]。

近来,磷酸化蛋白富集试剂盒的研制,使我们可以短时、有效的富集磷酸化蛋白并且磷酸化蛋白的结构和活性不受到影响。我们在首次使用磷酸化富集试剂盒,在严格按照说明书进行操作时,发现磷酸化蛋白的得率总是很低。后来,我们对富集方法进行了改进,将得率由原来的约 150 μg ,提高到约 400 μg ,提高了近 3 倍。虽然与文献中报道磷酸化蛋白占细胞总蛋白的 10%~20% 还有一定差距,我们分析可能与组织为冰冻组织,部分磷酸化蛋白丢失有关。在提高磷酸化蛋白得率方面,我们的经验是:(1) 在总蛋白上样于磷酸化蛋白富集柱前,用 Buff-

er A 稀释总蛋白浓度为 0.1 mg/ml,该浓度可以使磷酸化蛋白与金属磷酸盐亲和层析树脂充分结合。浓度过高,则使部分磷酸化蛋白隐藏在总蛋白中,影响其与树脂的结合。(2)适当延长总蛋白与金属磷酸盐亲和层析树脂的结合时间,一般将柱子放在摇床上在 4℃ 轻轻摇晃 40 min 左右。(3)清洗柱子时,在 Buffer A 清洗柱子前,用流出的非磷酸化蛋白裂解液再清洗柱子 1 次,以便少量残留在非磷酸化蛋白中的磷酸化蛋白能够结合在树脂上。(4)上样前的裂解缓冲液中不要加入磷酸酶抑制剂,因为磷酸酶抑制剂中的部分离子成分,会影响磷酸化蛋白与树脂的结合。

蛋白质样品的制备是二维凝胶电泳成败的关键环节。在相同条件、相同检测方法下,由于样品处理方法及样品量不同,可有不同效果的二维凝胶电泳图谱。由于洗脱下的磷酸化蛋白浓度很低且含盐比较多,故应进行浓缩和除盐。除盐的方法有多种,常用的有透析和超滤,由于透析需要的时间较长,为防止样品降解,我们选择了超滤的方法。在使用 microcon 3K 超滤后,发现样本中盐分仍较高,故进一步采用 microcon 10K 进行超滤。我们发现在超滤时加入碳酸氢氨,会有助于盐分的去除。

本实验利用金属磷酸盐亲和层析树脂成功地从组织蛋白提取液中分离纯化出磷酸化蛋白,消除了大量高丰度非磷酸化蛋白造成的背景干扰,从而极大地降低了磷酸化蛋白组学研究的复杂性并大大提高

了分析的敏感性和效率。在获得正常人肾组织磷酸化蛋白后,本实验采用二维凝胶电泳分离技术成功地建立了正常人肾组织磷酸化蛋白质组的二维凝胶电泳图谱,为肾脏磷酸化蛋白质组研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures[J]. J Mass Spectrom, 2001, 36:1083-1091.
- [2] Mumby M, Brekken D. Phosphoproteomics: new insights into cellular signaling[J]. Genome Biol, 2005, 6:230.
- [3] Ong SE, Pandey A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics[J]. Biomol Eng, 2001, 18:195-205.
- [4] Kalume DE, Molina H, Pandey A. Tackling the phosphoproteome: tools and strategies[J]. Curr Opin Chem Biol, 2003, 7: 64-69.
- [5] Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry[J]. Curr Opin Chem Biol, 2004, 8:33-41.
- [6] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000, 21:1037-1053.
- [7] Seo J, Lee KJ. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches[J]. J Biochem Mol Biol, 2004, 37:35-44.
- [8] Reinders J, Sickmann A. State-of-the-art in phosphoproteomics[J]. Proteomics, 2005, 5:4052-4061.

[收稿日期] 2006-04-11

[修回日期] 2006-05-31

[本文编辑] 贾泽军

DNA vaccination using bacillus Calmette-Guerin-DNA as an adjuvant to enhance immune response to three kinds of swine diseases

Zhang S, Guo YJ, Sun SH, Wang KY, Wang KH, Zhang Y, Zhu WJ, Chen ZH, Jiang L (Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] In order to enhance the immune efficacy of DNA vaccination, experiments were conducted to investigate the regulating effects of Bacillus Calmette-Guerin (BCG)-DNA as an adjuvant on immune responses of mice against foot-and-mouth disease (FMD), Aujeszky's disease (Ajd) and classical swine fever (CSF). BCG-DNA was purified from BCG by ion-exchange chromatography. Three DNA vaccines (pVSG, pVgD and pVE2) against the respective infection were constructed, and BCG-DNA was coimmunized to mice by muscle injection. The results showed that titres of specific immunoglobulin (Ig)G to the vaccines mounted remarkably in the sera of the adjuvant covaccinated mice ($P < 0.01$). Antibody isotype IgG2a and IgG1 also increased, respectively, in mice coimmunized with BCG-DNA compared with those of the control groups ($P < 0.01$). Cellular immune cytokine interferon-gamma and cytotoxic T lymphocytes were detected in coimmunized BCG-DNA groups ($P < 0.05$). Whereas interleukin-4, humoral immune cytokine, was not significant ($P > 0.05$). These results suggest that codelivery of BCG-DNA with DNA vaccines against FMD, AjD and CSF can enhance the induction of antigen-specific, especially, cell-mediated immunity.

[Scand J Immunol, 2005, 62:371-377]