

正常与重金属铅注射的兔脑蛋白质双向电泳图谱比较与鉴定

赵锐^{1,2)} 纪建国¹⁾ 郝守进¹⁾ 陈倩¹⁾ 袁洪生¹⁾ 管华诗²⁾ 茹炳根^{1)*}

(¹⁾北京大学生命科学学院, 蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871;

²⁾青岛海洋大学海洋药物与食品研究所, 青岛 266003)

摘要 重金属污染对人类健康的威胁日益受到关注, 为了了解大量重金属摄入对脑蛋白质的影响, 对比研究了正常兔脑组织蛋白质与重金属铅腹腔注射 2 周后的兔脑组织在蛋白质双向电泳图谱中的差异, 分析重金属注射对脑蛋白质表达的可能影响. 通过对脑组织蛋白质的提取, 分离出水溶性的蛋白质组分, 经双向电泳图谱比较正常与注射重金属铅的兔子在脑蛋白质表达上的差异, 其中 3 个蛋白质斑点经提取, 反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分离, 基质辅助激光解析电离质谱 (MALDI-TOF MS) 确定了分子质量, 并利用肽质量指纹图谱检索数据库确定蛋白质的归属. 实验结果表明正常兔脑与金属铅注射的兔脑在水溶性蛋白质的表达上具有显著性差异.

关键词 蛋白质组学, 双向电泳, 基质辅助激光解析电离质谱, 电喷雾质谱, 脑蛋白

学科分类号 Q51

重金属中毒是目前环境污染中严重的问题之一, 其中铅、锌、汞、砷、锡、铬等元素, 是水体中重金属污染物质的来源. 重金属中毒将引起人类的许多疾病^[1]. 蛋白质是生物体生命过程中三大结构与功能分子之一, 是执行生命过程各种活动的主要分子, 生命中的许多过程都是由蛋白质来实现完成的. 研究蛋白质在重金属中毒的变化, 将有助于我们了解重金属中毒的过程, 找到解决治疗的方法. 研究表明许多脑病都与重金属的大量摄入有关, 如老年痴呆, 脑水肿等疾病, 但重金属是如何影响脑内蛋白质变化的呢? 重金属是否能影响到脑蛋白的表达和正常的功能呢?

蛋白质组学技术的发展, 可以将成千上万的蛋白质展现在双向电泳图谱中, 并利用生物质谱技术 (如基质辅助激光解析电离质谱 (MALDI-TOF MS), 离子阱质谱/质谱 (ION TRAP MS/MS) 等) 将所分离的蛋白质的分子质量、结构序列信息依次鉴定出来, 从而得到有关蛋白质的尽可能多的数据^[2]. 双向电泳 (two-dimensional gel electrophoresis, 2DE) 作为蛋白质组学的核心技术, 首先是在 1975 年由 O'Farrell^[3] 提出并实现在两相电泳中将复杂蛋白质混合物分离出来, 目前已经发展到仪器化程度相当高的水平, 使实验的重复性和可操作性大大提高. 同时质谱在生物大分子研究中的应用逐渐增加, 电喷雾 (ESI)、基质辅助激光解析/解离 (MALDI) 离子化技术的发展, 使人们对进入后基因组时代, 揭示

细胞的结构和功能更有信心. 蛋白质组学技术已经成为蛋白质化学研究中的相当有潜力的分析工具^[4].

本实验利用双向电泳和质谱技术, 分析正常兔脑和腹腔注射氯化铅的兔脑在蛋白质表达上的差异, 双向电泳中的差异蛋白质, 经提取从凝胶上分离出来, 液相分离分析后, 经 MALDI-TOF 和 ESI-MS/MS 测定分子质量, 肽质量指纹图谱检索数据库确定蛋白质归属, 初步建立了脑组织重金属中毒研究的比较蛋白质组学方法, 为其进一步研究提供实验基础.

1 材料

1.1 设备

组织匀浆机 (英国, MSE 公司), Himac CR 21 冷冻超速离心机 (日本, HITACHI 公司), IPGphor 电泳单元、灌胶模具、SE-600 垂直电泳单元、双向电泳仪, EPS-301 电源、AKTA Prime 层析系统 (瑞典, Amersham Pharmacia Biotech 公司) 循环冷凝仪 (德国, Colora 公司), 恒温振荡器 (美国, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC 公司), BIFLEX™ III, 基质辅助激光解离飞行时间质谱 (德国, Bruker 公司), Agilent 1100 高压液

* 通讯联系人.

Tel: 010-62753115, E-mail: rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2001-03-19, 接受日期: 2001-05-17

相-质谱联用 (LC/MSD TRAP) (美国, Agilent 公司) Beckman 121MB 氨基酸分析仪 (美国, Beckman 公司).

1.2 试剂和材料

pH 3~10 线性 (linear, L) 13 cm IPG 预制胶条, IPG 缓冲液, 均购自 Amersham Pharmacia Biotech, 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TMED), 二硫苏糖醇 (DTT)、尿素、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸 (CHAPS) 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、蛋白酶抑制剂等试剂均购自 Sigma 公司, 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA), 色谱纯, Aldrich Chemical Co, INC, 乙腈、甲醇等色谱用试剂均购自 Fisher Scientific. 其他化学试剂购自上海生工公司.

1.3 溶液配制

1.3.1 样品溶解液: 8 mol/L 尿素、40 mmol/L Tris, 2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、10 mmol/L DTT、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L PMSF; -20℃保存.

1.3.2 IPG 溶胀储存液: 8 mol/L 尿素、4% CHAPS、2% 固相 pH 梯度 (IPG) 缓冲液、少量溴酚蓝, -20℃保存, 使用前每 2.5 ml IPG 缓冲液泡胀储存液加 DTT 7 mg.

1.3.3 SDS 平衡液: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)、6 mol/L 尿素、30% 甘油、2% SDS、少量溴酚蓝、-20℃保存. 使用前每 10 ml 平衡液加 DTT 100 mg.

1.3.4 SDS 凝胶缓冲液: 1.5 mol/L Tris-HCl、0.4% SDS, pH 8.8, 4℃保存.

1.3.5 15% SDS 连续电泳均一胶配制参见文献 [7] 方法, 灌制 150 mm × 130 mm × 1.5 mm 凝胶.

1.3.6 凝胶脱色液: 0.2 mol/L NH_4CO_3 溶液: 乙腈 (1:1).

1.3.7 蛋白质提取液: 60% 乙腈, 0.1% TFA 溶液.

2 方 法

2.1 样品处理

正常雌性家兔: 共 2 只, 各约 2 kg. 断头处死后, 迅速取出脑组织并称重共 17.78 g.

重金属铅注射组家兔: 共 2 只, 各约 1.8 kg. 给药量: 每只兔子腹腔注射相当于每公斤体重 20 mg 铅离子的 PbCl_2 溶液, 连续注射 14 d 后处死动物, 迅速取脑组织称重共 14 g.

脑蛋白提取在 Gauss^[5] 的方法基础上改进如

下: 两组实验的脑组织分别放入预冷的生理盐水中, 各加入约 20 ml 样品溶解液, 加 20:1 (g/ml) 的蛋白酶抑制剂, 匀浆 30 s, 超声提取 4 min, 共三次, 合并组织悬浮液 4℃离心 4 000 r/min × 15 min; 上清再 4℃离心 15 000 r/min × 60 min; 小心避开悬浮的脂质层, 吸取上清; 上清用 75% 乙醇 (-20℃) 沉淀过夜, 沉淀过滤抽干, 冷冻干燥. 分别得到粗蛋白. 氨基酸分析测其蛋白质含量.

2.2 凝胶过滤层析

各组粗蛋白各约 500 mg, 溶解于 0.2 mol/L NH_4HCO_3 中, 离心, 上 Sephadex G-25 (fine) 柱: 上样量 590.1 mg (10 ml/次, 共三次), 色谱柱 80 cm × 2.6 cm, 206 nm 检测. 灵敏度 0.2; 记录纸速 0.2 mm/min, 10 mV; 流动相 0.2 mol/L NH_4HCO_3 0.5 min/ml 流速. 收集第一个主峰, 冻干, 称重.

脱盐: 样品溶于 0.01 mol/L NH_4HCO_3 中, 经 Hiprep 26/10 Desalting Column 在 ÄKTA prime system 上脱盐, 条件为: 100 mg 样品溶于 10 ml 0.01 mol/L NH_4HCO_3 ; 流速 2 ml/min; 254 nm 检测. 收集蛋白质峰, 冻干, 称重. 氨基酸分析测其蛋白质含量.

2.3 等电聚焦电泳

参照文献 [6], 样品各 200 μg 溶于样品溶解液中 8 mol/L 尿素, 40 mmol/L Tris, 4% CHAPS, 每个胶条含有 1.25 μl 固相 pH 梯度缓冲液; 放入电泳槽 (strip holder) 中, 13 cm IPG 预制胶条在室温中平衡 10 min 后, 胶条胶面向下放入电泳槽中, 避免气泡产生, 然后滴加覆盖油, 在 IPGphor 上泡胀 12 h 以上, 之后进行等电聚焦电泳, 参数设定如下: 500 V, 1 h; 1000 V, 1 h; 8000 V, 5 h.

2.4 平衡

等电聚焦电泳后, IPG 胶条从电泳槽中取出, 在 SDS 平衡液中振摇浸泡 15 min, 用润湿的滤纸吸掉胶条上多余的平衡液.

2.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS PAGE)

IPG 胶条经过平衡后, 放在预先铺好的 SDS-PAGE 胶上, 在 SE-600 电泳仪上进行第二相电泳, 电泳参数设置为恒流 15 mA, 30 min; 30 mA, 约 5 h. 待溴酚蓝前沿至阳极约 1 cm 时, 停止电泳, 固定, 染色, 脱色参照文献 [7] 方法. Sharp JX-330 型扫描仪将图象扫描至电脑中, IMAGEMASTER 3.01 软件分析图像, 分析兔脑在双向电泳上的

差异.

2.6 蛋白质回收

经染色蛋白质斑点, 从胶上切割下来, 溶于脱色液中振荡脱色, 至凝胶上颜色脱净后, 将凝胶切碎, 溶于蛋白质提取液中, 超声提取三次, 提取液减压浓缩后为所要蛋白质^[8].

2.7 蛋白质的分子质量测定

上述蛋白质样品分成两份, 一份均匀铺在基质辅助激光解析电离质谱 (MALDI-TOF MS) 的点样板上, 测定分子质量; 另一份经反相高效液相色谱-质谱联用 (RP-HPLC-MS) 方法测定分子质量.

2.8 蛋白质的凝胶原位酶解

凝胶蛋白质斑点, 溶于含有 2 mol/L 尿素的 0.2 mol/L NH_4CO_3 溶液中, 按蛋白质: 酶 = 50: 1 (质量比), 加入 TPCK 处理的胰蛋白酶 (4℃), 混匀后静置 10 min, 37℃酶解 12~24 h; 酶解完全后, 加甲酸终止反应, 80℃灭活酶, 然后用蛋白质提取液, 将酶解肽段提取出来, LC-MS 检测肽质量指纹谱, www.matrixscience.com 网站上, 利用 MASCOT 软件检索 NCBI 数据库.

3 结果与讨论

3.1 兔脑蛋白质的提取

兔脑蛋白质各步提取结果见表 1.

Table 1 Results of extraction of rabbit brain proteins

steps	ratio of extraction/ %		ratio of protein/ %	
	normal group	Pb injection group	normal group	Pb injection group
Extraction	3. 73	2. 90	36. 7	21. 8
SephagexG- 25	33. 6	57. 8	77. 2	83. 4
Desalting	65. 3	67. 7	92. 9	98. 1

3.2 双向电泳

我们采用相同上样量的正常与铅注射兔脑蛋白质进行双向电泳图比较. 如图 1 和图 2, 其中约有 50~100 个蛋白质斑点, 且在表达上有质和量的差异, 采用改进的双向电泳技术, 所得的电泳图谱重复性较好, 而且易于软件分析. 通过 ImageMaster 软件计算出各个蛋白质点相对分子质量、等电点和相应的斑点密度. 其中 spot 1 仅在正常组兔脑中检测到, spot 24 仅在铅注射组兔脑中表达, spot 26, 28, 48, 51 等点在两组内均有表达, 但表达的量有一定的差异. 我们对 spot 1, 24, 和 26 进行了

分子质量和结构的鉴定.

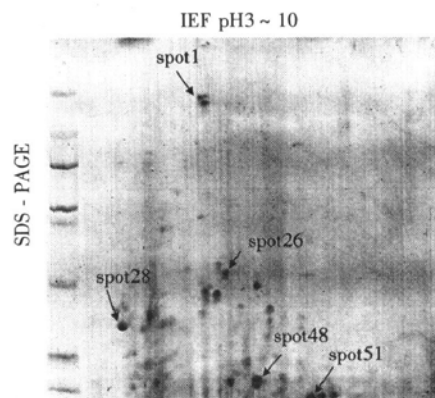


Fig. 1 Coomassie Brilliant Blue stained image of 12.5% 2D PAGE gels in normal rabbit brain

pH range from 3~10 and molecular mass markers represent, from top to bottom, 66.0, 45.0, 36.0, 29.0, 24.0, 20.0, 18.4, 6.5 ku. This image obtained through digitization with potoshop5.0, subsequently processed using ImageMaster 3.01. without processing of this image, such as subtraction of background staining, the spots are detected as well-separated areas throughout the gel. X axis is dimension of IEF pH 3~10, Y axis is dimension of SDS-PAGE.

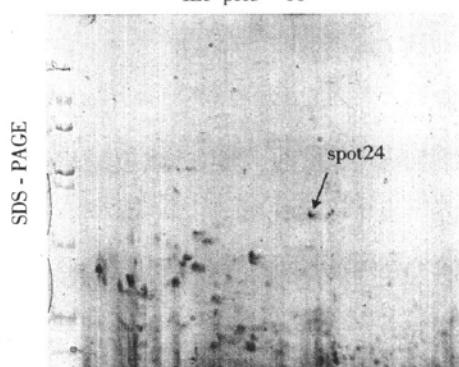


Fig. 2 Coomassie Brilliant Blue stained image of 12.5% 2D PAGE gels in Pb^{2+} induced rabbit brain

pH range from 3~10 and molecular mass markers represent, from top to bottom, 66.0, 45.0, 36.0, 29.0, 24.0, 20.0, 18.4, 6.5 ku. This image obtained through digitization with potoshop5.0, subsequently processed using ImageMaster 3.01. without processing of this image, such as subtraction of background staining, the spots are detected as well-separated areas throughout the gel. X axis is dimension of IEF pH 3~10, Y axis is dimension of SDS-PAGE.

3.3 蛋白质相对分子质量的测定

3.3.1 基质辅助激光解析电离质谱 (MALDI-TOF MS): 经 MALDI-TOF 质谱测定三个主要的蛋白质点 spot 1, 24, 和 26 相对分子质量分别为 66 501, 20 130 和 19 548 (图 3). 它们的相对分子质量与 ImageMaster 软件计算的分子质量基本一致.

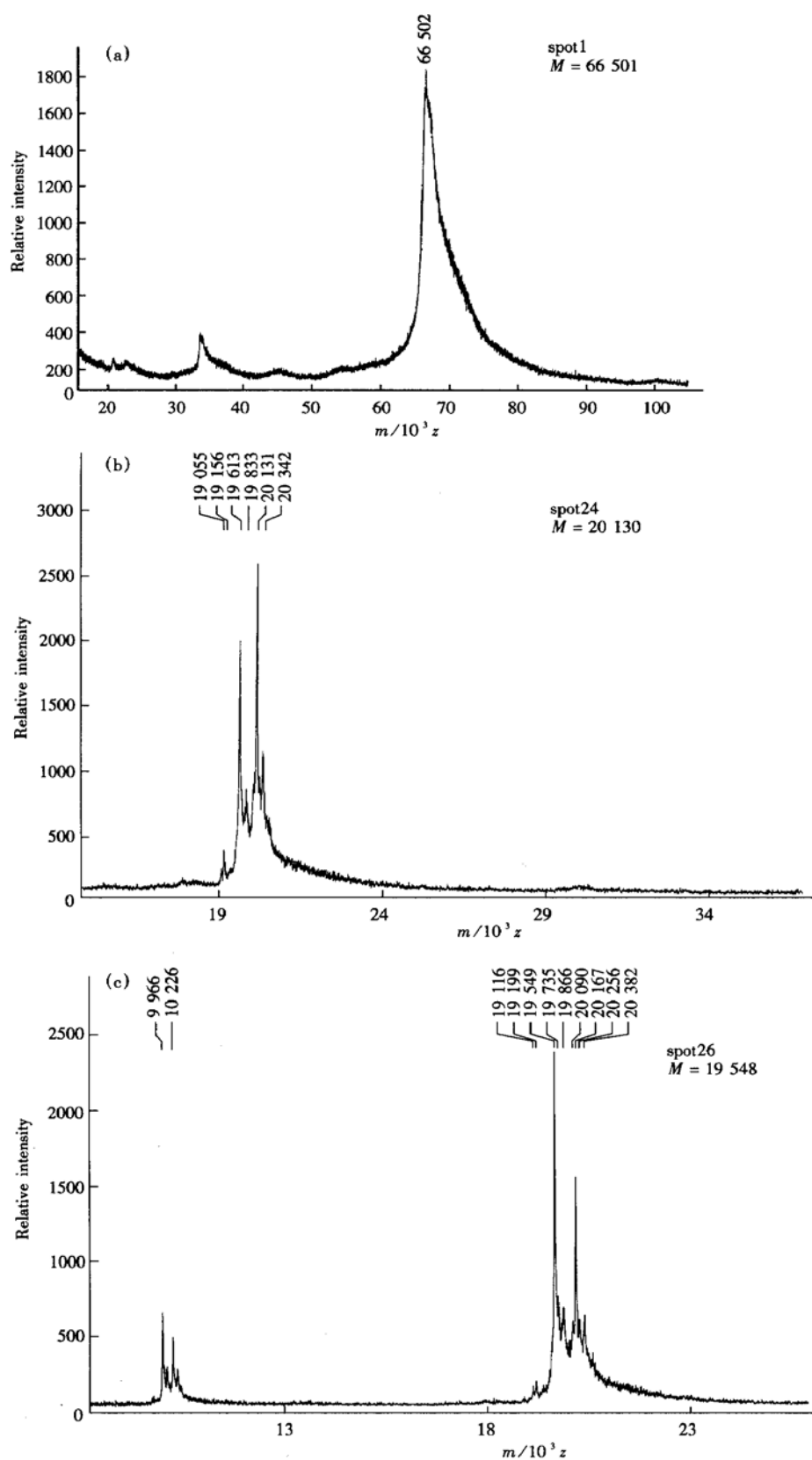


Fig. 3 MALDI TOF MS of spot 1 (a), spot 24 (b) and spot 26 (c) extracted from 2D gel

3.3.2 反相高效液相色谱-质谱联用 (RP-HPLC-MS): 经反向微径 C_{18} 分离凝胶上提取的蛋白质点, 利用 Agilent 1100 系列 MSD 离子阱质谱的电喷雾

原理, 检测 spot1, 24, 26 三个主要蛋白质的分子质量为 66 501, 20 130, 19 648 (图 4).

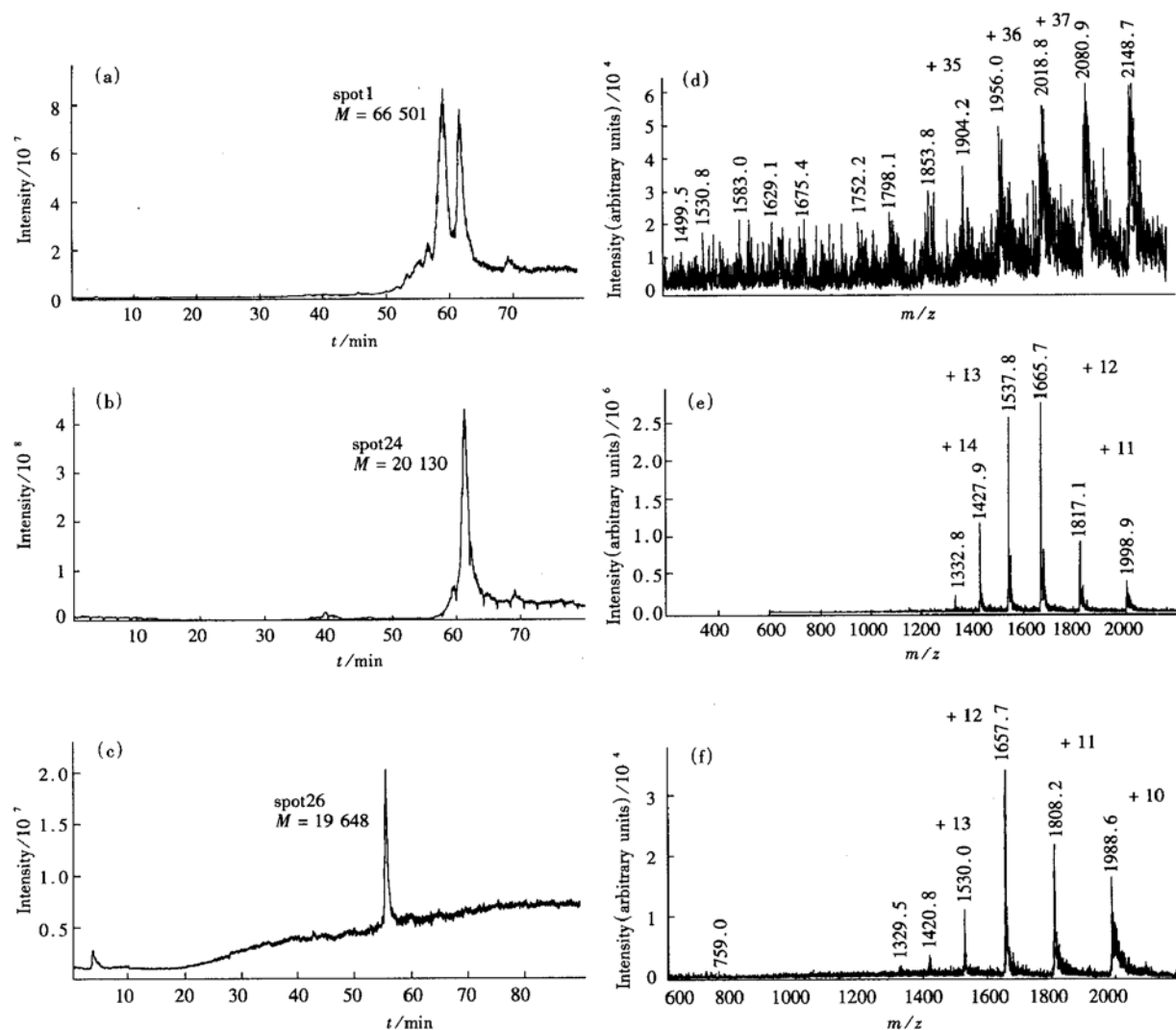


Fig. 4 ESI MS of spot 1, spot 24 and spot 26 extracted from 2D gel

(a) ~ (c) total ion chromatogram; (d) ~ (f) Mass chromatogram of each protein.

3.4 肽质量指纹图谱检索结果

肽质量指纹图谱检索结果见表 2。

Table 2 Peptide mass fingerprint data mining results of main protein spots from 2D gel

spot	accession	mass	score	description
1	gi/12735350	66 913	39	dihydropyrimidinase-like 4
24	gi/6225536	20 195	37	probable isopentenyl-diphosphate delta-isomerase
26	gi/535715	19 546	26	(L36050) preproform of 92 ku type IV collagen

4 结 论

利用蛋白质组学方法研究不同个体在不同生理阶段的蛋白质表达情况研究,是目前蛋白质组学研

究的一个方向。双向电泳技术的发展,使得蛋白质展现的方式更加清晰,为了获得清晰的蛋白质双向电泳比较图谱,样品的处理至关重要,我们采用了超速离心、柱层析的方法,将兔脑中的蛋白质提取并与其他杂质分开,利用双向电泳技术对比测定了正常的兔脑组织和重金属铅中毒的脑组织之间的明显差异蛋白质。从中鉴定了三个代表性的蛋白质斑点的分子质量分别为 66 501, 20 130 和 19 548,并利用肽质量指纹图谱检索数据库初步确定三种蛋白质的归属。本实验初步建立了脑组织水溶性蛋白质提取,双向电泳鉴定的方法,从双向电泳图谱比较中,发现重金属中毒的脑组织蛋白质有不同表达的蛋白质存在,这为我们进一步了解脑蛋白质的结构与功能,预防和治疗脑病提供了研究方法和模型。

参 考 文 献

- 1 Serykh L V. Risk for children's population health connected with combined action of heavy metals and ionizing radiation. *Toxicology Letters*, 1995, **78** (1): 74
- 2 Burlingame A L. Mass Spectrometry. *Anal Cham*, 1998, **70** (16): 681R~ 691R
- 3 O'Farrell P. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975, **250** (12): 4007~ 4021
- 4 Wilkins M R, Pasquali C, Appel R D, *et al.* From proteins to proteome: Large-scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio Technology*, 1996, **14** (1): 61~ 65
- 5 Gauss C, Kallum M, Lowe M, *et al.* Analysis of the mouses proteome. (1) Brain protein: separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis*, 1999, **20** (2): 575~ 600
- 6 Görg A, Postel W, Domscheit A, *et al.* Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis*, 1988, **9** (2): 681~ 692
- 7 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999. 140~ 141
- 8 Guo Y J. Experiment Technique in Protein Electrophoresis. Beijing: Science Press, 1999. 140~ 141
- 8 Corbett J M, Dunn M J, Posch A, *et al.* Positional reproducibility of protein spots in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis*, 1994, **15** (4): 1205~ 1210

Comparison and Identification of Rabbit Brain Proteins from the Normal and PbCl₂ Injected Rabbit by High-resolution Two-dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry

ZHAO Rui^{1,2)}, JI Jian-Guo¹⁾, HAO Shou Jin¹⁾, CHEN Qian¹⁾,
YUAN Hong-Sheng¹⁾, GUAN Hua-Shi²⁾, RU Bing-Gen^{1)*}

¹⁾ National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, School of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China;

²⁾ Institute of Marine Drugs and Foods, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract The pollution of heavy metals may affect the human health, in order to study the affect of heavy metals to the brain, the normal alive rabbits and the rabbits which were injected with PbCl₂ for 2 weeks were autopsied, the brain proteins were extracted and separated by gel filtration, and further analyzed by 2-D PAGE, More than one hundred water-soluble proteins of rabbit brain were visualized by Coomassie Brilliant Blue staining. The apparent molecular masses of most water-soluble proteins from rabbit brain were about 6~ 30 ku, pI was about 4~ 9. After matched with normal alive rabbit brain protein spots separated by 2D-PAGE, there obviously exists many differences displayed and unmatched protein spots in the 2-D PAGE maps of Pb²⁺ induced rabbit brain. 3 spots were extracted from the 2D-PAGE and detected by the MALDI-TOF-MS and ESI-MS, The experiments show that rabbit brain proteins would be affected by Pb²⁺ injection.

Key words proteome, two-dimension gel electrophoresis, matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), brain protein

* Corresponding author. Tel: 86-10-62753115, E-mail: rulab@pku.edu.cn

Received: March 19, 2001 Accepted: May 17, 2001