

成年和老年小鼠脑蛋白质组双向电泳图谱比较*

丁勤学¹⁾ 阙海萍¹⁾ 郭尧君^{2)**} 景书谦³⁾ 刘少君^{1)**}

(¹⁾军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; (²⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101;

(³⁾美国 Amgen 公司分子遗传学实验室, Thousand Oaks, 加利福尼亚州 91320)

摘要 使用双向电泳 (2-DE) 比较成年和老年小鼠脑蛋白质差异, 从分子水平初步探索老年脑蛋白整体变化规律. 以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向, SDS-聚丙烯酰胺凝胶水平电泳 (PAGE) 为第二向进行 2-DE. 图象分析软件 Imagemaster 2D Elite 分析电泳图谱. 重复性实验结果显示, 同组样品在三次不同实验中所获得蛋白质斑点数目的相对标准差 (变异系数) 为 $4.43\% \pm 0.25\%$; 同一蛋白质斑点在三次实验中等电点、分子质量和蛋白质量的相对标准差分别为 $8.76\% \pm 5.14\%$, $13.00\% \pm 4.22\%$ 和 $10.84\% \pm 9.16\%$. 成年和老年小鼠脑组织 2-DE 图谱分别获得 996 和 1256 个蛋白质斑点, 其中 8 个蛋白质在老年脑组织中含量降低, 20 个蛋白质斑点含量增加. 另至少有 4 个蛋白质斑点在老年脑组织中缺失, 14 个蛋白质点为老年脑特有. 以上差异点的发现为研究脑老化和退行性疾病机理提供了有益的线索.

关键词 老年, 脑蛋白, 固相 pH 梯度, 双向电泳, 蛋白质组

学科分类号 Q51, R592

蛋白质组技术是后基因时代的重要研究工具^[1~3], 它利用高分辨双向电泳 (2-dimensional electrophoresis, 2-DE) 对复杂组织进行蛋白质分离, 然后采用生物质谱等技术对分离蛋白进行鉴定. 通过对比研究, 能够从大量蛋白质中直接筛选出与年龄、性别、疾病、损伤等因素有关的特异蛋白质^[4]. Fountoulakis 等^[5]利用比较蛋白质组方法揭示新生大鼠和成年大鼠脑蛋白差异, 发现甲胎蛋白仅存在于新生鼠脑, 而在成年期缺失, 许多蛋白质在新生期和成年时期表达水平有程度不同的变化. 本文拟用 2-DE 技术, 通过比较成年和老年小鼠脑蛋白 2-DE 图谱差异, 从蛋白质分子水平探索老年脑蛋白整体变化规律, 为探索老年脑功能衰退和疾病发生提供基础.

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

丙烯酰胺、N, N-甲叉双丙烯酰胺、尿素、3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)、n-decyl n, n-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate (SB3-10)、十二烷基磺酸钠 (SDS)、二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Sigma 公司; 碘乙酰胺 (IAA) 等购自 Fluka 公司. 低分子质量蛋白标准、线性固相 pH 梯度预制胶条 (ImmobilineTM DryStrip pH3-10L, 18 cm)、SDS 缓冲电极胶条 (ExcelGelTM SDS Buffer Strips) 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司. 其他常用试剂为国产分析纯市售商品. 健康雌性昆明种

小鼠购自军事医学科学院实验动物繁殖中心, 成年鼠龄 2 个月, 体重 (20 ± 2) g; 老年鼠龄 2.5 年, 体重 (40 ± 2) g.

主要实验仪器及软件包括 Diix 900 型组织匀浆仪 (德国 Heidolph 公司), Beckman L7-65 超速离心机 (美国 Beckman 公司), UV330 型紫外分光光度计 (英国 Unicam 公司); 自动凝胶染色仪 (美国 Hoefer 公司); IPhor 固相 pH 梯度等电聚焦仪、Multiphor II 多功能水平电泳仪、图象扫描仪, ImageMaster 2D Elite 图象分析软件 (瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司) 等.

1.2 实验方法

1.2.1 脑蛋白提取: 成年和老年健康小鼠各三只, 颈动脉放血后迅速取出全脑, 预冷三蒸水洗去血渍, 去除脑外膜后剪碎, 按 10 倍体积加入预冷的样品液 (5 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% CHAPS, 2% SB3-10, 1% DTT, 溶于三蒸水, 内含蛋白酶抑制剂 35 mg/L PMSF, 0.3 g/L EDTA, 0.7 mg/L 抑肽素 a, 0.5 mg/L 亮肽素), 冰水浴, 3 档转速匀浆. 匀浆液 10 000 g 离心 10 min (4℃), 取上清超速 150 000 g 离心 45 min. 上清液蛋白浓度用 Bradford 法^[6]定量, 浓度约为 8 g/L. -75℃冻存储备用.

* 国家自然科学基金资助 (39928015).

** 通讯联系人.

刘少君 Tel: 010-66931304, E-mail: liusj@nic.bmi.ac.cn;

郭尧君 Tel: 010-64888562, E-mail: Yaojun.g@263.net

收稿日期: 2000-10-26, 接受日期: 2000-12-22

1.2.2 IPG-DALT 双向电泳: 参考 Gorg 等^[7] 方法, 将电泳参数做适当调整后, 进行脑蛋白质 2-DE^[8]. 采用胶内加样 (in-gel rehydration), 蛋白质上样量为 150 μg . 等电聚焦 (25 000 Vh)、凝胶平衡、水平 SDS 电泳方法同前^[8], 凝胶在自动染色仪进行硝酸银染色^[9].

1.2.3 图象分析及统计学处理: 图象扫描仪经强度校正 (intensity calibration) 后, 透射扫描 2-DE 凝胶 (光学分辨率 300DPI, 像素深度 8 bits), 所得图谱借助图象分析软件 ImageMaster 2D Elite 进行详细分析、比较蛋白质斑点差异. 图象分析时首先将同组的三张 2-DE 凝胶拟合成一张平均胶, 即成年鼠脑平均胶和老年鼠脑平均胶. 然后以前者为参考胶, 将后者与之比较, 根据斑点的位置、大小、形状等参数, 图象分析软件自动将不同图谱中的相同蛋白质点匹配, 不能匹配的蛋白质斑点视为

差异点. 蛋白质分子的等电点和分子质量根据 IPG 胶条 pH 标示范围和低分子质量蛋白标准测算; 每个蛋白质的相对含量以其占总蛋白质的百分数表示. 应用 Excel 工具软件进行数据处理. 统计学差异使用 t 检验.

2 结 果

2.1 实验重复性比较

以三张正常成年小鼠脑组织 2-DE 图谱为例, 蛋白质斑点匹配率平均为 85%. 同一蛋白质的等电点 (pI)、相对分子质量 (M) 和蛋白质表达量 (Volume) 在三次实验中的相对标准差分别为 8.76 ± 5.14 , 13.00 ± 4.22 , 10.84 ± 9.16 ($n = 30$), 具有较好的重复性.

2.2 2-DE 图谱特征

成年和老年小鼠脑蛋白 2-DE 图谱见图 1a 和

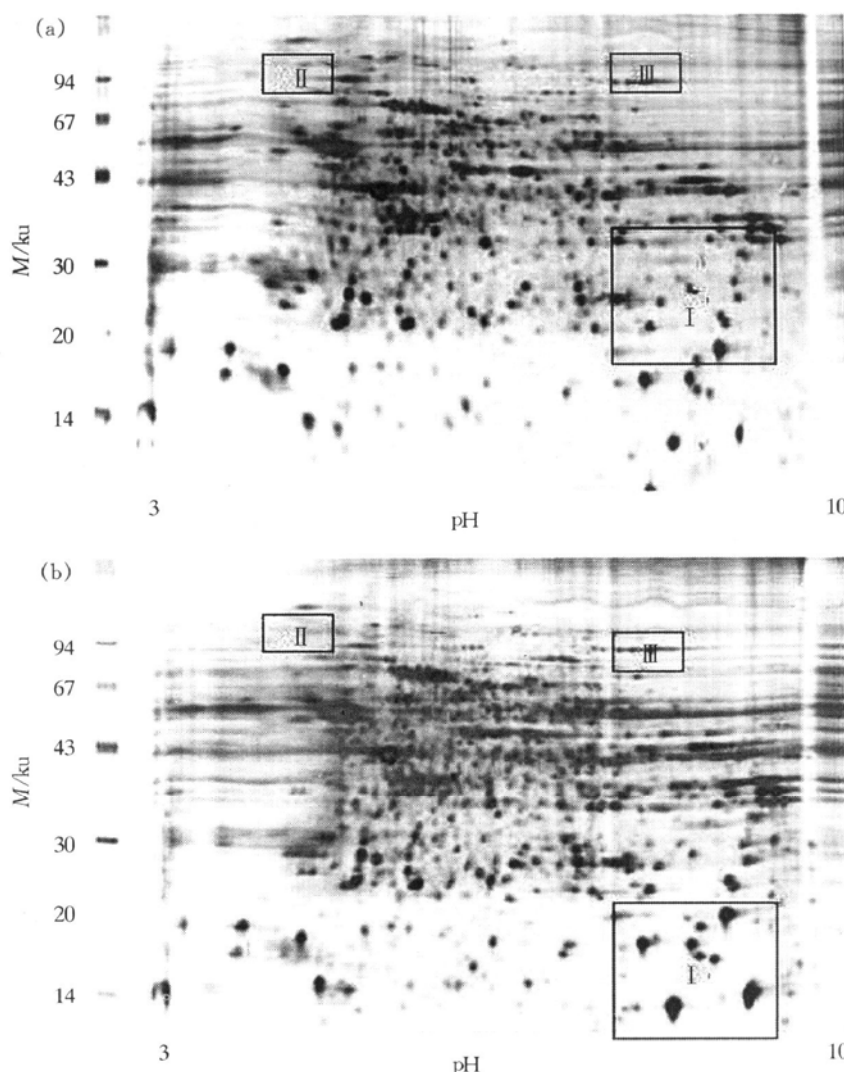


Fig. 1 The 2-DE maps of murine brain

(a) adult mice; (b) aged mice. Gels were silver stained.

图 1b. 根据 Carstein 坐标系统, 从左到右等电点增加, 从下往上分子质量增加. 从图 1 可以看到, 左右两侧斑点较少, 中间 (pI 在 7.0 附近) 斑点数目相对集中, 示意中性蛋白较多; 而碱性蛋白 (图谱右侧) 又明显多于酸性蛋白 (左侧). 蛋白质分子大小主要集中在 20 ku 至 100 ku 之间, 大于 100 ku 和小于 20 ku 的蛋白质分子很少. 各点染色深浅和面积差异很大, 示意蛋白质量各不相同.

2.3 2-DE 图谱分析

使用 ImageMaster 2D Elite 图象分析软件对成年和老年脑组织 2-DE 图谱进行分析. 两者蛋白质斑点数目分别为 (996 ± 42) 个和 (1256 ± 58) 个, 老年脑蛋白质总数明显多于成年 A 鼠 ($P > 0.01$). 局部区域经图象放大后显示明显蛋白质点差异: 部分蛋白质在老年脑组织中含量增加, 其中不少为新增蛋白质点 (图 2), 另有少量蛋白质点在老年图谱中减弱 (图 3) 甚至消失 (图 4). 表 1~表 4 分别给出了老年脑组织缺失、新增以及蛋白质

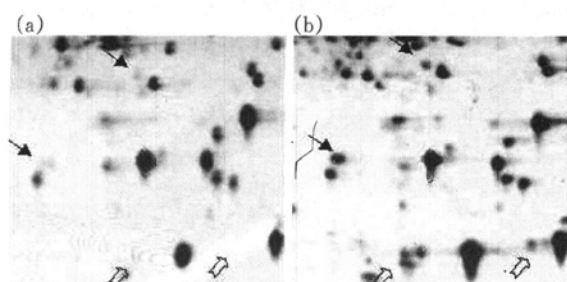


Fig. 2 Enlarged 2-DE images of area I in figure 1 showing additional ($\nearrow$) and volume-increased ($\searrow$) protein spots in aged murine brain (b), compared with the adult (a)

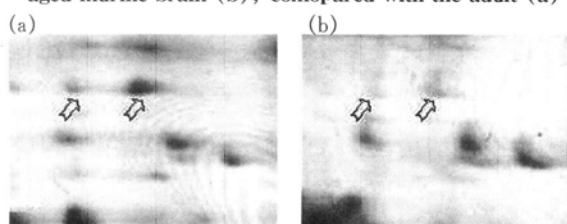


Fig. 3 Enlarged 2-DE images of area II in figure 1 showing volume-decreased protein spots ($\nwarrow$) in aged murine brain (b), compared with the adult (a)

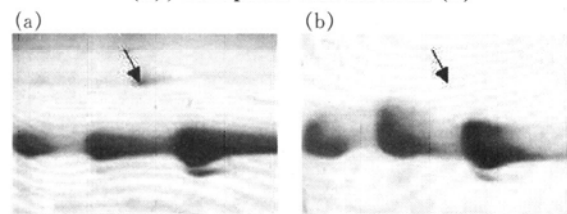


Fig. 4 Enlarged 2-DE images of area III in figure 1 showing disappeared protein spot ($\swarrow$) in aged murine brain (b), compared with the adult (a)

量降低和增加的部分蛋白质斑点. 对比表 1 和表 2 可以发现, 新增蛋白质点的分子质量较小, 等电点

集中在中性偏酸范围. 从表 3 和表 4 中可以看出, 蛋白质降低或增加的幅度大小不一, 表 3 和表 4 仅列出变化幅度超过 30% 的部分蛋白质, 个别蛋白质如 1087# 在老年小鼠脑增加十倍以上.

Table 1 Protein spots disappeared in the aged murine brain

Protein number ¹⁾	Isoelectro point (pI)	Molecular mass /ku	Protein level ²⁾ /%
54	5.65 (1%) ³⁾	95.5 (7%)	0.028
110	7.97 (1%)	89.1 (9%)	0.036
270	7.48 (1%)	68.3 (10%)	0.056
351	7.18 (1%)	61.4 (11%)	0.074

¹⁾The number of protein spots in the average 2-DE gel for adult murine brain was used here; ²⁾The ratio of each spot volume to total volume of the whole gel spots was used as its protein level; ³⁾The value in parenthesis was the standard deviation of same protein in three experiments.

Table 2 Protein spots only appeared in the aged murine brain

Protein number ¹⁾	Isoelectro point (pI)	Molecular mass /ku	Protein level ²⁾ /%
523	7.84 (2%) ³⁾	49.1 (5%)	0.006
567	6.31 (2%)	45.0 (3%)	0.170
592	7.45 (1%)	44.3 (3%)	0.036
614	6.80 (3%)	43.1 (7%)	0.004
683	6.89 (2%)	39.6 (6%)	0.018
804	6.99 (2%)	32.3 (9%)	0.010
819	6.94 (3%)	31.7 (7%)	0.003
825	5.01 (2%)	31.5 (4%)	0.050
848	6.24 (2%)	29.3 (2%)	0.028
849	6.79 (3%)	30.1 (7%)	0.025
996	5.93 (2%)	23.6 (5%)	0.036
1135	6.73 (2%)	13.2 (8%)	0.004
1164	5.17 (2%)	13.0 (10%)	0.300
1177	4.84 (3%)	12.2 (10%)	0.150

¹⁾The number of protein spots in the average 2-DE gel for aged murine brain was used here; ²⁾The ratio of each spot volume to total volume of the whole gel spots was used as its protein level; ³⁾The value in parenthesis was the standard deviation of same protein in three experiments.

Table 3 Protein spots with decreased volume in the brain of aged mice

Protein number ¹⁾	Isoelectro point (pI)	Molecular mass /ku	Protein level decreased/ %
23	9.43 (1%) ²⁾	108.6 (1%)	76.3
52	6.28 (2%)	99.0 (4%)	80.0
69	5.65 (2%)	97.5 (3%)	87.3
83	4.95 (2%)	92.3 (4%)	71.3
592	7.45 (2%)	44.4 (3%)	75.8

¹⁾The number of protein spots in the average 2-DE gel for aged murine brain was used here; ²⁾The value in parenthesis was the standard deviation of same protein in three experiments.

Table 4 Protein spots with increased volume in the brain of aged mice

Protein number ¹⁾	Isoelectric point (pI)	Molecular mass / ku	Protein level increased/ %
91	6.59 (2%)	91.8 (3%)	70.4
129	6.22 (2%)	83.6 (5%)	67.8
170	6.56 (2%)	76.9 (4%)	210.3
195	7.66 (2%)	74.9 (4%)	439.7
196	8.00 (2%)	76.9 (3%)	176.8
391	8.96 (2%)	56.8 (3%)	120.0
400	5.78 (2%)	55.6 (4%)	212.3
412	5.04 (2%)	55.9 (5%)	159.9
420	9.19 (2%)	54.6 (2%)	210.5
421	9.32 (2%)	54.5 (2%)	454.8
423	9.08 (2%)	55.4 (4%)	312.4
452	5.47 (3%)	52.1 (4%)	583.3
545	7.06 (2%)	46.3 (4%)	120.5
608	8.59 (1%)	42.0 (4%)	135.1
637	6.67 (2%)	41.0 (4%)	451.6
655	8.48 (1%)	40.1 (3%)	50.0
658	7.78 (1%)	39.8 (3%)	77.2
705	6.64 (2%)	37.0 (3%)	112.8
781	5.24 (2%)	32.3 (5%)	291.7
800	9.30 (2%)	32.5 (4%)	230.5
816	5.33 (2%)	30.8 (5%)	255.3
828	7.16 (1%)	30.4 (4%)	290.0
866	5.58 (2%)	28.2 (5%)	313.6
871	7.81 (2%)	29.0 (3%)	191.8
902	7.92 (2%)	27.6 (3%)	136.6
906	5.17 (2%)	26.3 (6%)	106.8
919	7.80 (2%)	27.0 (4%)	223.3
947	5.52 (2%)	24.6 (7%)	548.3
960	7.82 (1%)	24.1 (6%)	997.0
995	5.57 (2%)	22.8 (6%)	254.3
1087	7.19 (1%)	17.6 (5%)	1082.9
1154	8.89 (2%)	14.7 (4%)	629.8
1179	7.76 (1%)	12.6 (6%)	240.5

¹⁾The number of protein spots in the average 2-DE gel for aged murine brain was used here; ²⁾The value in parenthesis was the standard deviation of same protein in three experiments.

3 讨 论

良好的实验重复性是应用 2-DE 进行课题研究的基本前提。由于 2-DE 实验涉及蛋白质提取、等电聚焦、蛋白质转移、SDS 电泳、蛋白质染色等多项环节,实验误差(包括系统和人为误差)较难控制。我们在实验中通过使用固相 pH 梯度预制胶条,减少等电聚焦过程中 pH 的漂移,增加了蛋白质等电点的重复性;电泳过程中保持参数和操作的一致性(如等电聚焦的伏每小时控制,蛋白质转移时胶条位置,SDS 电泳的电流电压等指标);使用自动染色仪以减少蛋白质染色过程中的人为误

差。由于采取多种有效措施,保证蛋白质斑点数目、等电点、分子质量以及蛋白质量等在多次不同实验中的具有较好的重复性,所有参数的相对标准差均在 10% 左右。

实验显示老年与成年小鼠脑蛋白存在明显差异,主要表现 2-DE 图谱斑点的增减以及染色的深浅上,提示老年脑蛋白发生了质(蛋白质点的缺失、增加以及位置改变等)和量(蛋白质点染色的深浅)的变化。这种变化可能由以下几种因素引起:首先老年蛋白长期受环境影响,许多蛋白质发生结构修饰,如蛋白质的氧化、磷酸化、以及糖基化等^[10,11]。变化后的蛋白质容易成为水解酶的底物,原有活性蛋白可能降解,产生多个碎片,这可能是老年脑组织蛋白质斑点数量增多的重要原因^[12]。其次,老年个体蛋白质合成过程中容易发生氨基酸突变,如果以带电氨基酸取代非带电氨基酸,蛋白质的等电点和分子质量则发生变化,其在双向图谱中的位置相应发生改变。老年蛋白量的变化很大程度上与蛋白质修饰有关。由于结构修饰,某些与蛋白质合成有关的起始因子以及酶活性降低,导致蛋白质合成速度减慢,蛋白质表达下降;而某些蛋白水解酶的活性降低,又导致蛋白质分解速度减慢,相应的底物在组织含量增加^[13]。

根据蛋白质斑点的分子质量和等电点以及蛋白质来源等信息,利用蛋白质组搜索引擎 TagIdent (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>) 对部分差异蛋白质点进行检索,初步推测 Aged 83 可能为突触相关蛋白(SNAP),Aged 525 可能为胶质细胞纤维酸性蛋白(GFAP)。SNAP 的降低与老年神经元数目减少有关^[14],而 GFAP 为胶质细胞标志物,它的增加与老年脑组织胶质细胞活跃有关^[15]。除 83# 和 525# 外,表 1~4 还列出近 50 个与老年相关的脑蛋白斑点。深入了解这类蛋白质不仅有助于探索脑老化分子机理,而且为诊断/治疗脑衰老和神经系统退行性疾病提供新的标志物/作用靶点。

应该注意,蛋白质斑点的增减不能完全等同于蛋白质的新增或缺失,换言之,蛋白质斑点与蛋白质不是一一对应关系,这是由于: a. 同一基因有不同的表达产物; b. 同一蛋白质因不同的结构修饰而产生不同的斑点; c. 同一蛋白质因降解而成多个蛋白质碎片斑点。以上因素往往导致几个斑点为同一蛋白质(同一全长 DNA)。尽管如此,2-DE 图谱中斑点的改变提示蛋白质(亚基)发生变化,

揭示这类变化(基因的表多样性、蛋白质的翻译后修饰等)正是2-DE和蛋白质组技术的独特优势之一。

总之,本次实验通过比较2-DE图谱,筛选出许多成年和老年小鼠脑蛋白差异点。进一步结合肽质量指纹图谱和氨基酸序列分析等手段鉴定差异蛋白,了解有关蛋白质在脑老化过程中功能退变中的作用将是后继主要工作。

参 考 文 献

- Hochstrasser D F. Proteome in perspective. *Clin Chem Lab Med*, 1998, **36** (11): 825~ 836
- Humphrey S I, Cordwell S J, Blackstock W P. Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis*, 1997, **18** (8): 1217~ 1242
- Anderson N L, Anderson N G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 1998, **19** (11): 1853~ 1861
- Jungblut P R, Zimny A U, Zeindl E E, *et al.* Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis*, 1999, **20** (10): 2100~ 2110
- Fountoulakis M, Hardmaier R, Schuller E, *et al.* Differences in protein level between neonatal and adult brain. *Electrophoresis*, 2000, **21** (3): 673~ 678
- Kruger N J. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 1994, **32** (1): 9~ 15
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1037~ 1053
- 赵从建, 贾宇峰, 丁勤学, 等. 大鼠中枢神经蛋白质组分析中2-DE技术的建立. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (6): 645~ 650
- Zhao C J, Jia Y F, Ding Q X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (6): 645~ 650
- 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999. 142
- Guo Y J. *Experimental Technique in Protein Electrophoresis*. Beijing: Science Press, 1992. 142
- Rattan S I, Derwentzi A, Clark B F. Protein synthesis, posttranslational modifications, and aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1992, **663** (1): 48~ 62
- Rattan S I. Synthesis, modifications, and turnover of proteins during aging. *Exp Gerontol*, 1996, **31** (1~ 2): 33~ 47
- Gillery P, Monboisse J C, Maquart F X, *et al.* Aging mechanisms of proteins. *Diabete Metab*, 1991, **17** (1): 1~ 16
- Rosenberger R F. Senescence and the accumulation of abnormal proteins. *Mutat Res*, 1991, **256** (2~ 6): 255~ 262
- Greber S, Lubec G, Cairns N, *et al.* Decreased levels of synaptosomal associated protein 25 in the brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Electrophoresis*, 1999, **20** (4~ 5): 928~ 934
- Linnemann D, Skarsfelt T. Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain. *Neurobiol Aging*, 1994, **15** (5): 651~ 655

Comparison of the Two-dimensional Electrophoresis Patterns Between Adult and Aged Murine Brains in Proteomatic Analysis*

DING Qian-Xue¹⁾, QUE Hai-Ping¹⁾, GUO Yao-Jun^{2)**}, JIN Shu-Qian³⁾, LIU Shao-Jun^{1)**}

(¹⁾*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;* (²⁾*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;* (³⁾*Laboratory of Molecular Genetics, Amgen, Inc., Thousand Oaks, California 91320, USA)*

Abstract A wide variety alterations are common in brains of aged individuals. Proteomatic analysis is a new power tool to reveal such changes at protein level. The two-dimensional electrophoresis (2-DE) was employed to compare the global protein patterns between adult and aged murine brains. One hundred and fifty micrograms of murine brain protein extracted with 5 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 2% CHAPS plus 2% SB3-10 was run immobilized pH gradient (IPG) isoelectric focusing electrophoresis as the first dimension, and then horizontal SDS-PAGE as the second dimension. The relative standard deviations (coefficient of variation) for protein number, *pI*, molecular mass and volume of protein in three different experiments were 4.43% ± 0.25%, 8.76% ± 5.14%, 13.00% ± 4.22% and 10.84% ± 9.16%, respectively. Totally, 996 and 1 256 protein spots were obtained in adult and aged murine brain map, respectively, of which 8 spots increased and 20 spots decreased in quantity. Furthermore, 4 spots were missing and 14 new spots emerged in aged murine brain compared with adult mice. The differentially displayed proteins between adult and aged murine brain are useful for diagnosing brain degenerative disorders.

Key words aged, brain protein, immobilized pH gradient, 2-dimensional gel electrophoresis, proteomics

* This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (39928015).

** Corresponding author. LIU Shao-Jun Tel: 86-10-66931304, E-mail: liusj@nic.bmi.ac.cn; GUO Yao-Jun Tel: 86-10-64888562, E-mail: Yaojun.g@263.net Received: October 26, 2000 Accepted: December 22, 2000