

海马组织蛋白不同染色方法的比较

陆彩玲^a, 唐深^b, 刘楠楠^a, 黄玲^a, 李习艺^a, 郭松超^a

摘要: [目的] 通过实验, 比较不同染色方法对海马组织蛋白质双向凝胶电泳(2-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)分离效果的影响, 为类似的海马组织蛋白分离研究提供参考。[方法] 分离、制备大鼠海马组织总蛋白样品并进行蛋白定量, 不同含量海马蛋白质经 2-DE 分离后分别采用改良考马斯亮蓝染色、硝酸银染色法, 中浓度上样量的凝胶经考马斯亮蓝染色后也用考马斯亮蓝-硝酸银进行复染, 比较不同染色方法对 2-DE 分离效果的影响。[结果] 不同染色方法随上样量增加, 所见蛋白斑点增加, 干扰物质也增加。在本研究条件下, 700 μg 上样量采用硝酸银染色效果最佳, 考马斯亮蓝则显示 1 800 μg 上样量效果更优。1 200 μg 考马斯亮蓝-硝酸银复染的效果较单独考染效果好。[结论] 硝酸银染色较改良考马斯亮蓝更敏感, 凝胶所见蛋白质斑点更多, 考马斯亮蓝-硝酸银复染效果较单独改良考马斯亮蓝好。

关键词: 蛋白质组学; 海马; 染色

Comparison of Different Staining Methods for Hippocampal Proteomic Analysis LU Cai-ling^a, TANG Shen^b, LIU Nan-nan^a, HUANG Ling^a, LI Xi-yi^a, GUO Song-chao^a (a.Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health b.Department of Immunology, School of Preclinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China). Address correspondence to GUO Song-chao, E-mail: scguo54@yahoo.com.cn · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To compare different staining methods for hippocampal proteomic analysis using 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and to provide basis for similar researches. [Methods] Rat hippocampus were isolated and prepared for total protein samples. Supernatant was determined by Bradford method and separated by 2-DE. Modified Coomassie brilliant blue staining and silver staining were employed for the detection of total protein loaded in samples of different hippocampus protein levels. Specially, Coomassie brilliant blue-silver staining was applied again for the medium loading sample. [Results] With the loading protein increasing, the protein spots and impurities were increasing. In the present study, silver staining was ideal for the loading amount of 700 μg protein and modified Coomassie brilliant blue staining for 1 800 μg. Coomassie brilliant blue-silver dual staining was superior to Coomassie brilliant blue staining alone for the 1 200 μg loading sample. [Conclusion] More spots can be observed after silver staining which is more sensitive to 2-DE hippocampus separation than modified Coomassie brilliant blue staining. The sensitivity of Coomassie brilliant blue-silver dual staining is better than single modified Coomassie brilliant blue staining.

Key Words: proteomics; hippocampus; staining

神经系统疾病危急、复杂, 病程长久且干预效果不理想, 学者一直对其发展及转归进行积极探讨以找到有效的防治办法。自 1994 年蛋白质组学技术问世以来, 许多学者利用该高通量的分离技术在该领域进行了更深层次的研究并取得了巨大的成就^[1-2]。该技术通路上包含了双向凝胶电泳(2-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)分离蛋白、显色技术观察、分析胶内蛋白、质谱鉴定及数据库搜索获取真实可靠的蛋白生物信息学

等环节。理想的凝胶显色方法不仅需要高的灵敏度、宽的定量线性范围、较高的重复性、低毒安全和对环境无不良影响, 而且还要求与后续质谱分析相兼容^[3]。目前应用广泛的 2-DE 胶染色方法主要有改良的考马斯亮蓝染色法及硝酸银染色法。不同胶条 pH 范围、胶条长度, 染色方法不同, 蛋白上样量尚无统一标准。本研究拟在确定的胶条 pH 范围及长度下, 比较改良的考马斯亮蓝、硝酸银染色法对不同含量海马组织蛋白 2-DE 分离效果的影响, 为类似的海马组织蛋白分离研究提供借鉴。

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 30660156); 广西教育厅课题(编号: 200810MS1057)

[作者简介] 陆彩玲(1978—), 女, 博士, 讲师; 研究方向: 锰神经毒及其防治; E-mail: lcling78@163.com

[通信作者] 郭松超教授, E-mail: scguo54@yahoo.com.cn

[作者单位] 1. 广西医科大学 a. 公共卫生学院营养与食品卫生学教研室 b. 基础医学院免疫学教研室, 广西 南宁 530021

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备及试剂

主要仪器设备有美国通用电气公司的 IPGphor IEF System 型等电聚焦仪, Hoefer SE 600 Unit 型垂直电泳仪, 2D 24Ettan

24 cm 垂直电泳系统, Image Master Scanner 扫描仪, UV-1700 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司), 320R 型台式高速离心机(德国 Hettich 公司), Milli-Q 超纯水仪(美国密理博公司), Kimble 微量电动组织匀浆机(瑞士 Kimble 公司)。固相 pH 梯度(imobilized pH gradients, IPG)预制胶条(24 cm, pH 4-7), 购自美国 Amersham Bioscience 公司; 尿素、硫脲、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)、二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、3-[(3-胆酰胺丙基)-二甲氨基]-丙磺酸(3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate, CHAPS)、标准分子量蛋白、甘氨酸、考马斯亮蓝(G-250), 均购自美国 Amersco 公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 蛋白样品制备

据海马组织大小按 1:19 比例加入适量裂解液(5 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF), 剪碎, 微量电动组织匀浆器匀浆, 制成 5% 的组织匀浆液, 25000 × g 离心 45 min, 小心撇去上层脂质抽取中间组织匀浆液, 重复离心后再取中间层蛋白液, 再次 25000 × g 离心 30 min 后小心吸取中间层蛋白液, 海马总蛋白用考马斯亮蓝法^[4]进行蛋白定量。

1.3 双向电泳实验

按改良考马斯亮蓝、硝酸银染色两种不同方法设计低、中、高 3 种不同蛋白含量的海马组织蛋白进行一向等电聚焦、二向垂直电泳进行分离蛋白后染色。改良考马斯亮蓝染色法 3 组蛋白含量分别为 600、1200、1800 μg, 硝酸银染色法的蛋白含量分别为 300、700、1200 μg。不同含量的蛋白样品用水化液[5 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% (质量浓度) CHAPS, 65 mmol/L DTT, 0.5% IPG 缓冲液, 0.002% 溴酚蓝]将体积均调整至 450 μL 混匀后滴加至上样槽中, 加 IPG 胶条进行等电聚焦。等电聚焦过程依次经低电压水化、去盐、水化、聚焦等程序, 限流 50 μA/胶, 总聚焦约为 80000~100000 vhs。一向等电聚焦结束后进行胶条平衡, 转至 12.5% 聚丙烯酰胺分离胶顶端并进行电泳, 0.15% 低熔点琼脂糖封胶, 10 mA/胶电泳 30 min 后加大电流至 20 mA/胶, 直至溴酚蓝到达胶的底部, 终止电泳。各含量蛋白样品重复 3 次平行实验。不同方法染色后用 Image Master Scanner 扫描图像, Image Master 2D Platinum 5.0 软件进行图像分析。

1.4 显色方法

取出聚丙烯酰胺凝胶, 经超纯水快速冲洗后, 按如下染色方法进行显色。下列每步操作皆在摇床上进行。各染色法组份及操作如下: (1) 改良考马斯亮蓝染色法^[5], 凝胶先经超纯水漂洗后, 固定液(40% 甲醇+10% 乙酸+50% 超纯水)固定 30 min 或过夜, 再用考马斯亮蓝(G250)染色液(10% 磷酸、10% 硫酸铵、0.12% 考马斯亮蓝 G250、20% 甲醇+60% 超纯水)着色过夜, 超纯水脱色 2~4 次直至背景清晰; (2) 硝酸银染^[6], 凝胶漂洗后先经固定液(10% 乙酸+40% 甲醇+50% 去离子水)固定 30 min, 随后分别用含 30% 甲醇、6.8% 乙酸钠(NaAC)、0.2% 硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)致敏 30 min, 超纯水清洗 3 次, 每次 5 min, 再用预冷的 0.25% 硝酸银(AgNO₃)着色 20 min, 超纯水再次清洗 2 次, 每次 1 min, 2.5% 碳酸钠(Na₂CO₃)+0.04% 甲醛显色,

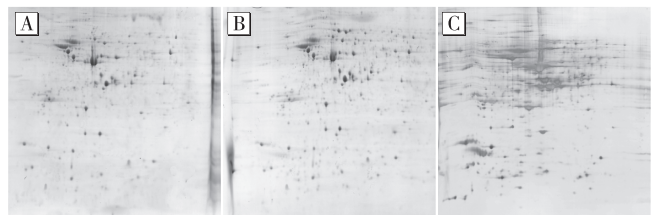
观察显色效果, 至显色适度后, 以乙酸终止显色。本实验同时观察考马斯亮蓝-硝酸银复染的效果。该方法在考马斯亮蓝染色后的凝胶用去离子水脱色(至少 24 h)至背景尽可能干净, 再从敏化步骤开始, 按照硝酸银染色方法进行。

1.5 凝胶扫描及分析

经染色后的凝胶使用 Image Master Scanner 图像扫描仪透射扫描, 分辨率为 300 dpi, 存储为标记图像文件(TIF)格式, 不同染色方法重复 3 次实验。

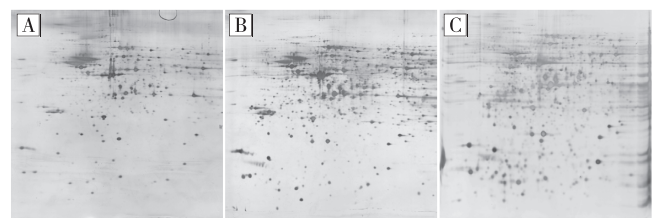
2 结果

染色后 Image master 2D platinum 5.0 软件对不同染色方法所得凝胶进行分析, 包括蛋白斑点检测及编辑、背景调整等。结果发现, 改良考马斯亮蓝染色后 600~1800 μg 蛋白所得蛋白斑点数分别是 212 ± 31、296 ± 46、523 ± 39, 见图 1。不同含量蛋白分离后硝酸银染色所得蛋白斑点数分别是 456 ± 73、617 ± 62、1074 ± 87, 见图 2。结果提示, 在比较的蛋白上样量范围内, 同种染色方法随着蛋白上样量的增加而显现更多的蛋白斑点, 增加的点主要分布在胶体中部, 即中等大小的蛋白分子。随着蛋白上样量的增加, 不同染色方法所得凝胶也可见更多的横向条纹, 该现象提示干扰等电聚焦的物质可能也随之增加, 考马斯亮蓝的横向条纹主要分布在偏酸性端, 而硝酸银染色的横条纹以偏碱性端居多。从染色灵敏度看, 相同或相近含量的蛋白含量, 硝酸银染色所见蛋白斑点数目明显较改良考马斯亮蓝染色多, 即硝酸银染色较改良的考马斯亮蓝染色灵敏度高(图 1A 和图 2B)。就图像质量而言, 改良的考马斯亮蓝所见蛋白质斑点比单纯考马斯亮蓝染色饱满, 但影像依然模糊(图 1B 和图 3)。而硝酸银染色呈现的绝大多数蛋白质点圆润, 边缘锐利(图 2C)。由此可见硝酸银染色较考马斯亮蓝染色灵敏, 分辨率更高。700 μg 海马组织蛋白经 2-DE 分离后硝酸银染色法效果较理想(图 2B), 而 1200 μg 海马组织蛋白经 2-DE 分离后经改良的考马斯亮蓝染色显示更多的蛋白斑点(图 3)。



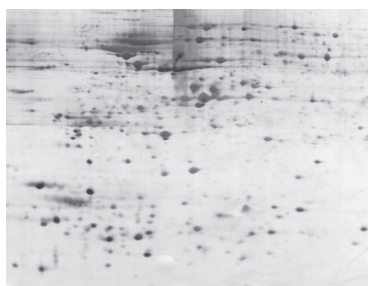
[注]由左至右 pH 值为 4~7。A: 600 μg; B: 1200 μg; C: 1800 μg。

图 1 不同含量海马组织蛋白双向凝胶电泳改良考马斯亮蓝染色法



[注]由左至右 pH 值为 4~7。A: 300 μg; B: 700 μg; C: 1200 μg。

图 2 不同含量海马组织蛋白双向凝胶电泳硝酸银染色法



[注]由左至右 pH 值为 4~7。

图 3 1200 μg 考马斯亮蓝-硝酸银复合染色

3 讨论

蛋白分离技术、质谱技术及生物信息学已成为后基因时代进行蛋白质研究的三大核心技术。在确定的 pH 梯度胶条及胶条长度前提下,根据上样量选择适合的染色方法对获得信噪比高、重复性好、高分辨率的双向凝胶图谱及后续质谱鉴定产率至关重要。

传统的蛋白质考马斯亮蓝染色是最常用的染色方法,该法成本低廉、操作简单、着色易于控制且与下游质谱鉴定技术兼容性好而得到了非常广泛的使用^[5]。然而, μg 级的检测水平往往因漏掉许多重要的低丰度蛋白而限制了该法的广泛使用。许多改良的染色方法大大提高了染色的灵敏度,如秦慧等^[6]报道改良后的考马斯亮蓝染色及胶体考马斯亮蓝染色的灵敏度可达几 ng 至几十 ng。与考马斯亮蓝染色相比,硝酸银染色的灵敏度要较其高 100 倍,可达 ng 级水平,适用于较微量蛋白的检测。本研究结果也提示,硝酸银染色方法较改良的考马斯亮蓝染色灵敏。因此,选择不同的染色方法取决于实验目的,若为了显示更多的蛋白质,则趋向于选择硝酸银染色法;若为了提高后续质谱鉴定产率,则仍宜选择改良的考马斯亮蓝染色法。在兼顾灵敏度及与后续的质谱兼容的双重目的出发,已经衍生出 100 多种不同的改良硝酸银染色法,如、YAN-银染、UPS1-银染、UPS2-银染、BIO-银染、BYT-银染^[7-9]。王欣荣等^[10]采用考马斯亮蓝-硝酸银进行复合染色,该方法先考马斯亮蓝染色再硝酸银染色,顺序不能颠倒使用^[11-12],依次将不同染色阶段显现的蛋白质点切割,则可避免只用考马斯亮蓝染而灵敏度不高所导致的低丰度蛋白的损失,也可避免只用硝酸银染色而使高丰度蛋白染色过度相互掩盖的损失,从而使考染-银染两者互补,相得益彰。本研究仅对 1200 的蛋白上样量凝胶图进行了考马斯亮蓝-硝酸银复合染,结果发现蛋白斑点较考马斯亮蓝染色明显增多。

对比本实验也可看出,在本研究的实验条件下,700 μg 蛋白上样量采用硝酸银染色效果最佳;1800 μg 蛋白上样量则宜

选择改良考马斯亮蓝染色;考马斯亮蓝-硝酸银复染灵敏度介于两者之间。

(志谢:感谢广西大学生命科学与技术学院的付强老师、岑卫健老师、王金子博士等在实验过程中给予的无私协助与良好建议!)

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] YANG JW, CZECH T, LUBEC G. Proteomic profiling of human hippocampus[J]. Electrophoresis, 2004, 25(7/8): 1169-1174.
- [2] EDGAR PF, DOUGLAS JE, KNIGHT C, et al. Proteome map of the human hippocampus[J]. Hippocampus, 1999, 9(6): 644-650.
- [3] 唐秀英, 邵彩虹, 谢金水. 双向电泳中 4 种常用染色方法的比较[J]. 江西农业学报, 2010, 22(7): 100-102.
- [4] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [5] CANDIANO G, BRUSCHI M, MUSANTE L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G250 staining for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [6] 秦慧, 刘霆, 柳斌, 等. 几种双向凝胶电泳蛋白质检测方法的比较[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(1): 168-172.
- [7] YAN JX, WAIT R, BERKELMAN T, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2000, 21(17): 3666-3672.
- [8] JIN LT, HWANG SY, YOO GS, et al. A mass spectrometry compatible silver staining method for protein incorporating a new silver sensitizer in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis gels[J]. Proteomics, 2006, 6(8): 2334-2337.
- [9] GOTTLIEB M, CHAVKO M. Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarose gels[J]. Anal Biochem, 1987, 165(1): 33-37.
- [10] 王欣荣, 刘锋, 刘建华, 等. 一种改进的双向电泳染色方法[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(6): 71-74.
- [11] 张世军. 聚丙烯酰胺凝胶电泳中超微量蛋白的考马斯亮蓝-银染色检测法[J]. 枣庄师专学报, 1996(3): 85-87.
- [12] 肖浩文, 朱平, 张爱玲, 等. 三种染色方法用于检测聚丙烯酰胺凝胶中蛋白质的比较[J]. 解放军广州高专学报, 1998, 21(2): 119-121.

(收稿日期: 2012-02-02)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 郭薇薇; 校对: 王晓宇)