

文章编号:1671-9352(2008)05-0006-04

生物体液差异蛋白质组学研究技术体系的建立

秦兆宇¹, 张小葵¹, 何峰¹, 刘师莲^{2*}

(1. 山东大学威海分校海洋学院, 山东 威海 264209;

2. 山东大学医学院生物化学与分子生物学研究所, 山东 济南 250012)

摘要:为探讨以2D-DIGE为核心的生物体液差异蛋白质组学技术体系,取2组不同生物学状态下的体液样本进行研究。每组包含一例人类多发性硬化样本和一例对照样本,共设3组平行实验。经冷丙酮沉淀法除盐提取蛋白并精确定量,分别用分CY5和CY2荧光染料按最小标记法对多发性硬化样本和对照组进行标记。另再取混合蛋白内用CY3标记。混合样品后分别在3块2D-gel上进行电泳,通过Typhoon 9400多功能荧光扫描仪及DeCyder 2-D差异分析软件进行DIGE分析。差异蛋白用MALDI-TOF/TOF进行鉴定,将所得结果录入Metacore计算平台,进行蛋白质相关分析。结果表明,利用该方法研究不同生物学状态下的体液标本,结合网络图谱分析,可得到较多有意义的候选蛋白信息。

关键词:生物体液;差异蛋白质组学;双向荧光差异凝胶电泳;Metacore

中图分类号:Q785 **文献标志码:**A

The establishment of a technique system for differential proteomics of body fluids

QIN Zhao-yu¹, ZHANG Xiao-kui¹, HE Feng¹, LIU Shi-lian^{2*}

(1. Biology Science Department in Marine College, Shandong University at Weihai, Weihai 264209, Shandong, China;

2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

Abstract: In order to establish a technique system for differential proteomics of body fluids, cerebrospinal fluid samples in two different physiological states were studied. There was a Multiple Sclerosis sample and a control for each group, which was done in triplicate. Samples were precipitated with ice-cold acetone and the protein concentration was accurately quantified. The control and abnormal groups were labeled with two different Cyanine Dyes (Cy2 and Cy5) using the minimal labeling method while the internal standard group was labeled with Cy3. Then 2D-E was used and three gels were run. Each gel contained a control group, an abnormal group and the internal standard group labeled with 3 different Cy Dyes. The information including differential express protein spots and their levels were obtained using a Typhoon 9400 scanner and DeCyder 2-D software. Protein spots were identified by MALDI-TOF/TOF. Metacore integrated software was used to analyze the interactions between proteins. The results show that a differential proteomics technique system is effective to discover valuable candidate proteins.

Key words: body fluids; differential proteomics; 2D-DIGE; Metacore

许多生理或病理状态下,生物机体分泌的一些关键调节蛋白在体液(脑脊液,血液,尿液等)中有量或质的变化^[1]。因此,体液差异蛋白质组学分析有助于人们更好地发现各种具有潜在生物价值的候选

蛋白。但是,由于双向电泳的不同凝胶之间有较大差异,用这种经典蛋白质组学方法进行的体液差异蛋白分析无法精确测定其生物学变化。双向差异凝胶电泳(2D-DIGE)是一种在双向电泳之前用CyDye

收稿日期:2008-02-28

基金项目:山东大学威海分校大学生科技资助项目(A07051)

作者简介:秦兆宇(1986-),男,在校大学生,研究领域为蛋白质组学。Email: qinzhao-yu@yahoo.com.cn

*通讯作者:刘师莲(1957-),女,教授,硕士生导师,主要从事神经蛋白质组学研究。Email: liushilian@sdu.edu.cn

DIGE 染料标记蛋白样品的一方法,可在同一双向电泳凝胶中同时分离出多至 3 种不同的蛋白质样品,大幅度减小了胶间系统误差;CyDye DIGE 染料灵敏度很高,相对硝酸银染色法提高了 10~100 倍^[2],因此,2D-DIGE 可对样品间蛋白丰度的差异进行精确分析^[3]。本研究以脑脊液为例,进行差异蛋白质组学分析,旨在探讨以 2D-DIGE 为核心的生物体液差异蛋白质组学技术体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本

生物体液样本以人类脑脊液为例。标本来源于山东大学齐鲁医院。异常组为多发性硬化(MS)患者(经临床诊断),正常组为其他神经系统疾病(NODs)。将新鲜标本离心(4℃, 1.2×10^4 r/min)取上清,去除杂质,存放在 -80℃ 冰箱,待测。

1.1.2 主要试剂

二甲基甲酰胺(DMF, 99.9%)、L-赖氨酸(L-Lys)、丙烯酰胺(Acr)、N,N-甲叉双丙烯酰胺(Bis)、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)及其他化学试剂(分析纯)购自中国医药上海化学试剂公司;CyDye DIGE 染料、2-D Quant 试剂盒、非线性固相 pH 梯度预制胶条(IPG strip pH 3~10 NL 18 cm)、两性电解质购自 GE Healthcare 公司;所有缓冲液均用 Milli-Q(Millipore 公司)水配制。

表1 样品的实验设计

Table 1 Experimental design for samples

胶条号	Cy5 标记样品	Cy2 标记样品	Cy3 标记样品
Gel 1	2#(多发性硬化症组)	3#(对照组)	混合样品(对照组 _{1#2#3#} + 多发性硬化症组 _{1#2#3#})
Gel 2	1#(对照组)	2#(多发性硬化症组)	混合样品(对照组 _{1#2#3#} + 多发性硬化症组 _{1#2#3#})
Gel 3	3#(多发性硬化症组)	1#(对照组)	混合样品(对照组 _{1#2#3#} + 多发性硬化症组 _{1#2#3#})

1.2.3 淬灭

加入 1 μ L 10 mmol/L 赖氨酸终止标记反应。充分混合,在黑暗中置于冰上 10 min。

1.2.4 IEF(等电聚焦电泳)

每份样品加入同体积的补充液(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、2% DTT、2% IPG Buffer),用再水化液(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、18 mmol/L DTT、2% CHAPS、0.5% IPG Buffer)将样品体积补至 340 μ L,将 18 cm IPG 胶条(pH3~10, NL)置于胶条槽内,上样后在 IPGphor 固相 pH 梯度等电聚焦仪上行等电聚焦。整个过程避光。

1.2.5 胶条的平衡

等电聚焦 24 h 后,将 IPG 胶条分别放入平衡液 I

其他试剂略^[4]。

1.1.3 主要仪器

MIKRO 22RT 台式冷冻离心机(MIKRO);IPGphor 固相 pH 梯度等电聚焦仪、Typhoon 9400 多功能荧光扫描仪、DeCyder 2-D 差异分析软件(GE Healthcare);PROTEAN II XL CELL 垂直电泳仪、450 nm 酶标仪(Bio-Rad);MALDI-TOF/TOF 4700 (Applied Biosystems);MetaCore 集成软件(GeneGo, St. Joseph, MI)。

1.2 方法

1.2.1 样本处理

分别从异常组、对照组中取 3 例(3 例生物学重复)各 2 mL。分别用 -20℃ 冷丙酮(样品:丙酮 = 1:4)除盐沉淀蛋白(3 次), -20℃ 下过夜,12 000 r/min 离心(4℃)30 min,弃上清。90% 丙酮洗 3 次,12 000 r/min 离心(4℃)10 min,将沉淀用裂解液(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、30 mmol/L Tris、4% CHAPS)充分溶解,用 NaOH 将 pH 调至 8.5,移入 Eppendoff 管中,4℃ 孵育 40 min,12 000 转离心(4℃)10 min。取上清,2-D Quant 试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.2 标记

根据定量结果,6 份标本及 1 份混合内标(6 份样品各 10 μ g)各取 60 μ g 加入 1 μ L 浓度为 480 pmol/ μ L 的 CyDye DIGE 染料(实验设计见表 1),避光,漩涡震荡,彻底混合,12 000 转离心(4℃)10 min,收集底部标记混合物,在黑暗中冰上反应 30 min。

(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 1% DTT)、平衡液 II(2.5% IAA 代替平衡液 I 中 DTT)中各 15 min。

1.2.6 SDS-PAGE(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)

灌制 12% SDS-PAGE 胶,脱氧并保证胶面平齐。小心将 IPG 胶条置放在两低荧光玻璃板间的凝胶面上,用 0.5% 低熔点琼脂糖溶液包埋。恒温 20℃,行 SDS-PAGE 电泳(15 mA/胶, 30 min; 30 mA/胶, 4 h)。过程避光。

1.2.7 扫描及图像分析

电泳所得凝胶用 MilliQ 冲洗数次,用 Typhoon 9400 荧光扫描仪在不同激发光下扫描成像,所使用波长如下: Cy2-488/520, Cy3-532/580, Cy5-633/679。

所得的蛋白质组图谱用 DeCyder 2-D 凝胶图像分析软件进行检测、背景消除、归一化及定量等自动分析,并得出统计学数据。

1.2.8 MALDI-TOF/TOF

将差异表达蛋白从凝胶上抠下,冷冻干燥,加胰酶进行胶内酶切,质谱分析,得到肽质量指纹图谱(PMF)。应用蛋白质搜索引擎 Mascot (http://mascot.proteomics.com.cn/search_form_PMF.html) 进行数据检索。

1.2.9 构建差异蛋白质相互作用网络图

将检索到的蛋白质上传入 MetaCore 网上软件计算平台,进行相关性在线分析,实验数据以最短通路

算法构建信号网络,构建差异表达蛋白质相互作用网络图。

2 结果

2.1 2D-DIGE 凝胶图谱

经 DeCyder 2-D 分析软件处理分析,所得凝胶图谱见图 1。通过定量分析,在 3 个生物学重复中,发现蛋白表达量差异点 163 个 ($P < 0.05$),将其中变化幅度较大(幅度大于 1.5 倍)的 13 个蛋白进行质谱鉴定。

2.2 MALDI-TOF/TOF

质谱鉴定结果见表 2。

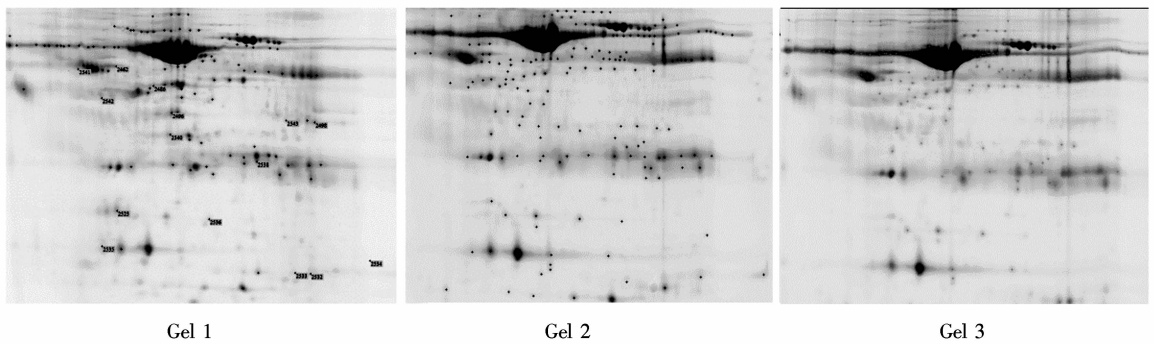


图 1 2D-DIGE 荧光扫描叠加图谱(每块胶同时包括多发性硬化组、对照组及内标)
Fig.1 Representative overlapped gel of 2-D DIGE experiment(Each gel includes a MS group, a control group and the internal standard)

表 2 蛋白质鉴定信息
Table 2 Some information of identified proteins

蛋白质 ID 号	蛋白质描述	Swiss-Prot Summary	变化幅度(多发性硬化症组/对照组)
2462	Vitamin D-binding protein precursor	VTDB_HUMAN	- 1.78 ± 0.012
2532、2532	Hemoglobin beta chain	HBB_HUMAN	6.02 ± 0.015
2523、2536	Haptoglobin precursor	HPT_HUMAN	- 1.56 ± 0.016
2538	Ig kappa chain C regions	KAC_HUMAN	3.18 ± 0.007
2540	Fibrinogen beta chain precursor	FIBB_HUMAN	- 1.92 ± 0.013
2486	Pigment epithelium-derived factor precursor	PEDF_HUMAN	- 1.63 ± 0.035
2541	Actin	ACTG_HUMAN	- 3.24 ± 0.018
2534	Cystatin-C precursor	CYTC_HUMAN	- 1.52 ± 0.018
2542	Apolipoprotein-E precursor(Apo-E)	APOE_HUMAN	- 1.52 ± 0.028
2543	Complement C4 precursor	CO4_HUMAN	- 2.12 ± 0.016
2496	Serum albumin precursor	FIBB_HUMAN	- 1.82 ± 0.021
2498	Ig lambda chain C regions	LAC_HUMAN	1.96 ± 0.018
2535	Transthyretin precursor	TTHY_HUMAN	- 1.61 ± 0.059

2.3 Metacore 蛋白质相互作用网络图

将鉴定出的 13 个差异表达蛋白录入 Metacore,得到差异蛋白质网络图谱(见图 2)。蛋白质相互作用图表明,13 个变化幅度明显的差异蛋白包括 Cystatin-C、Actin、Complement C4 precursor、Vitamin D-binding protein precursor 等,主要涉及免疫调控、细胞周期

调节、脂蛋白运输、磷酸化修饰、信号传导等多种重要的生物通路^[5-7],特别是补体 4、Ig 蛋白等免疫相关因子的差异表达与属于自身免疫系统疾病的多发性硬化有潜在关系^[7,8]。维生素 D 结合蛋白是维生素 D 及其衍生物在体内的主要运输载体,间接参与维生素 D 的免疫及其他调节;它还具有清除血清中

多余肌动蛋白的功能,从而消除免疫反应对组织的继发损伤^[8],而过度的炎症反应正是多发性硬化免疫学发病机制之一^[9]。

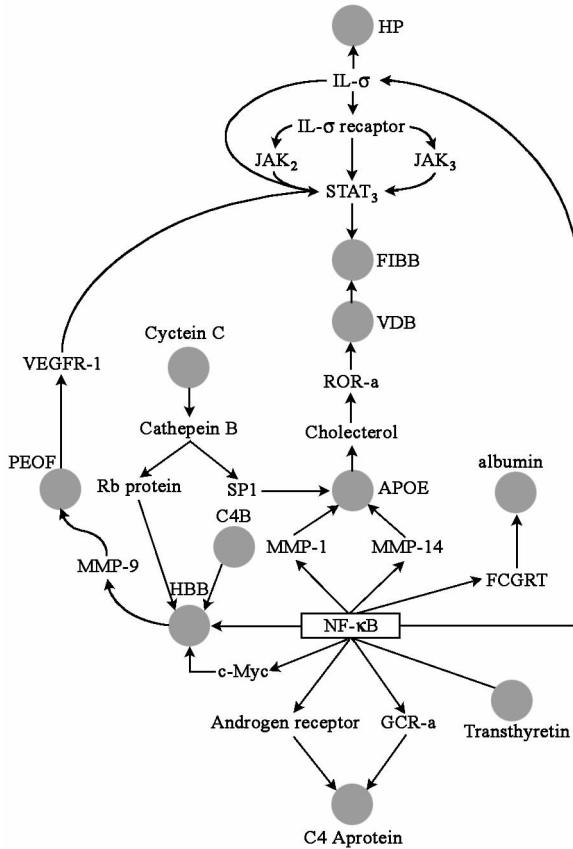


图2 差异蛋白质相互作用网络图

Fig.2 Biological network analysis of differentially expressed proteins

3 讨论

通过双向电泳技术进行差异蛋白质组学研究主要有2种误差需要克服:胶间系统误差和生物个体间的差异。2D-DIGE在胶内引入由所有样品混合物构成的内标,消除了2D-E固有的胶间系统误差,使2DE胶间比较成为可能,由此可通过多生物学重复使生物个体误差亦得到减小,定量差异研究得以实现。样品的实验设计要注意将不同的生物学重复体现出来,通过胶内比对和胶间比对以及统计学分析,可最大限度地降低生物个体差异造成的误差。

体液样本一般均有较高含量的盐分,在样本处理过程中需尽量将盐分去除。结合样本实际情况,冷丙酮隔夜沉淀蛋白,并用丙酮洗涤沉淀多次的方法可较好地达到目的。

两性电解质与含巯基物质可导致荧光标记效率

降低,因此在标记前裂解液与样品缓冲液中不能含有该类物质,改由标记后补加。CyDye DIGE染料对pH有一定要求,其在pH 8.5时效率最高,因此上述2种液体在标记前还需用NaOH调节pH值。此外,标记及其之后的步骤均需尽量避光进行。

在高丰度蛋白存在的情况下,双向电泳对体液样品中的低丰度蛋白的检测仍有困难,2D-DIGE也存在这方面的缺陷。为提高低丰度蛋白的检测率,可对样品进行适当的预先分离处理,如使用高丰度蛋白去除试剂盒、色谱等。

综上所述,经过技术优化的2D-DIGE蛋白质组学技术体系,能够发现生物体液中一批有潜在意义的候选蛋白,对生理病理的研究有很大帮助,是生物体液差异蛋白质组学不可或缺的研究手段。

参考文献:

- [1] 周育斌,周文霞,张永祥. 基于双向电泳技术的体液蛋白质组学研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2003, 17(4):292-297.
- [2] Rita Marouga, Stephen David, Edward Hawkins. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology[J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 382:669-678.
- [3] James A Mackintosh, Hung-Yoon Choi, Soo-Han Bae, et al. A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2003(3):2273-2288.
- [4] 杨银荣,刘师莲,刘芙君,等. 脑脊液 Cystatin C改变与格林-巴利综合征关系的探讨[J]. 山东大学学报:医学版, 2008, 46(1):23-26.
- [5] GRZONKA Z, JANKOWSKA E, KASPRZYKOWSKI F, et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors[J]. Acta Biochim Pol, 2001, 48:1-20.
- [6] Joost Smoldersa, Jan Damoiseauxb, Paul Menheerec, et al. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review [J]. Neuroimmunol doi: 10.1016/j. jneuroim. 2007.11.014.
- [7] HOLMØY T, VARTDAL F. The immunological basis for treatment of multiple sclerosis[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2007, 66:374-382.
- [8] 浦传强,吴卫平,郎森阳. 神经系统感染免疫学[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [9] WHITE Peter, COOKE Nancy. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein[J]. TEM, 2000, 8(11):320-327.

(编辑:孙培芹)