

三斑海马蛋白质组学双向电泳技术的建立与优化

王清蓉, 万德光, 国锦琳, 陈璐*

(成都中医药大学 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用省部共建
国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**建立适于三斑海马干药材蛋白质组研究的双向电泳技术,为后期进行深入的中药材海马蛋白组学研究奠定基础。**方法:**对影响蛋白质双向电泳的几个关键环节——提取方法、裂解液、纯化方法、上样量进行优化,筛选最佳方法流程。**结果:**优化出的海马蛋白质提取方法为液氮研磨法,最佳蛋白质提取裂解液为 $7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲,含4% Chaps, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF, $65\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT和0.2% Bio-Lyte,最佳蛋白质纯化方法为超滤+TCA 丙酮沉淀两步纯化法,双向电泳最佳上样量为 $300\text{ }\mu\text{g}$ 。Image master 7.0 软件对电泳图谱分析共检测出三斑海马蛋白质斑点236个,相对分子质量在 $14.4\sim 97.4\text{ kDa}$ 均有分布,分布差异不明显;蛋白质等电点主要分布在 $\text{pH}4\sim 9$,其中以碱性蛋白质最为丰富。**结论:**利用上述方法所得的双向电泳图谱斑点清晰、分离均匀,图谱质量佳,该方法流程适合三斑海马药材蛋白质组学分析。该研究能为后期进行深入的海马蛋白质组学研究,筛选特征性蛋白质奠定基础。

[关键词] 三斑海马; 双向电泳; 蛋白质组学; 动物药

[中图分类号] R284.1;R931.74;R22;R22-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0050-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018050050

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171213.0851.016.html>

[网络出版时间] 2017-12-13 10:58

Establishment and Optimization of Two-dimensional Electrophoresis Technique for Proteomics of *Hippocampus trimaculatus*

WANG Qing-rong, WAN De-guang, GUO Jin-lin, CHEN Lu*

(State Key Laboratory Breeding Base of Research and Development of Chinese Medicinal Resources
Co-sponsored by Sichuan Province and Ministry of Education, Key Laboratory for Standardization of Traditional
Chinese Medicine (TCM) Under Ministry of Education, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) protocol for the proteomic study of *Hippocampus trimaculatus*, in order to lay the foundation for further research on Hippocampus in the late stage. **Method:** The methods of protein extraction, lysis, purification, and sample loading quantity were optimized. **Result:** The optimized protein extraction method was the liquid nitrogen grinding method. The best lysate contained $7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Urea, $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Thiourea, 4% Chaps, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF, $65\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT and 0.2% Bio-Lyte. The best protein purification method was ultrafiltration + TCA/acetone precipitation. The best sample loading quantity was $300\text{ }\mu\text{g}$. A total of 236 protein spots were detected by image analysis, all of which were distributed within the range between $14.4\sim 97.4\text{ kDa}$, with unobvious differences. Protein isoelectric points were mainly distributed between $\text{pH}4\sim 9$, among which alkaline protein was the most abundant. **Conclusion:** The two-dimensional electrophoretic map obtained by the method mentioned above shows clear spots, uniform

[收稿日期] 20170817(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403056);四川省中医药管理局青年中医药研究项目(2014K083)

[第一作者] 王清蓉,在读硕士,从事生药学研究,Tel:028-61800231,E-mail:wqr_hippo@126.com

[通信作者] *陈璐,博士,副教授,从事中药品种、品质与资源研究,Tel:028-61800231,E-mail:cl_hippo@126.com

separation and a good quality. The method is suitable for the proteomic analysis of *H. trimaculatus*. This study can lay the foundation for further studying the proteomics of *H. trimaculatus* and screening characteristic proteins.

[**Key words**] *Hippocampus trimaculatus*; two-dimensional gel electrophoresis; proteomics; animal medicine

海马是我国传统名贵动物类中药,被誉为“动物人参”。《中国药典》(2015 年版)规定,海马为海龙科动物大海马、小海马、刺海马、三斑海马和线纹海马的干燥体。本课题组前期市场调查发现,市售海马掺伪现象严重,多种近缘非《中国药典》品种在市场上流通,占市场总销售量的比例达 50% 左右^[1]。目前海马的鉴别研究较少,多应用外观、理化等方法^[2-4],由于混淆品与正品亲缘关系相近,性状与化学成分相似,常难以有效发挥作用。基于品种混乱的现状,亟需开发行之有效的鉴定方法。蛋白质是海马药材中含量最高的一类化学成分,干药材中蛋白质质量分数达到 70% 左右^[5]。已有研究证明,蛋白质(肽)在物种体内具有稳定的含量和物种特异性,可以作为物种鉴定的有效依据^[6-8]。选择合适的技术方案,对蛋白含量丰富的海马药材进行特征性蛋白质筛选,从蛋白质类成分的角度研发品种鉴定新方法是一个有潜力的研究方向。

双向电泳技术(2-DE)是目前应用最广的蛋白质组学研究技术,具有强大的蛋白质分离分析功能,能同时将数千种蛋白质同时进行分离分析,目前 2-DE 技术在医学、农学和微生物学等研究领域^[9-11]已有不少应用,但绝大多数是针对原植物、原动物的细胞和组织,多是从活细胞或新鲜组织中提取制备蛋白质进行分析。相比新鲜的细胞、组织材料,中药干药材中蛋白质在加工、贮藏过程中大量降解破坏,以及多糖、脂肪、盐类等非蛋白类成分的干扰,大大增加了蛋白质提取、纯化和后续等电聚焦(IEF)电泳的难度,使得 2-DE 技术在中药材鉴定领域的应用受到限制,目前中药材蛋白质组分的 2-DE 研究还比较少。本文基于海马市场品种混乱的现状,选择药材市场占有率较大的海马品种^[1]——三斑海马为研究对象,考察影响双向电泳分离分析结果的几个关键环节,建立适合海马干药材蛋白质组分分析的 2-DE 技术平台,为后期进行深入的蛋白质组学研究,筛选可供品种鉴别的特征性蛋白质,开发有效的鉴定新方法奠定基础,同时也能为其他动物类药材蛋白质成分的研究提供参考。

1 材料

三斑海马药材购自成都荷花池中药材市场,经

成都中医药大学中药资源与鉴定系国锦琳教授鉴定为海龙科动物三斑海马 *Hippocampus trimaculatus* 的干燥体。

丙烯酰胺, *N,N'*-甲叉丙烯酰胺, Tris 碱, 甘氨酸, 碘乙酰胺, 四甲基乙二胺(TEMED), 十二烷基硫酸钠(SDS), 尿素, 硫脲, 过硫酸铵, 牛血清白蛋白(BSA)均为 Sigma 公司产品; IPG 胶条(7 cm, 3 ~ 10 NL), 两性电解质(Bio-Lyte, pH 3 ~ 10), ReadyPrep 2-D cleanup kit, 矿物油, 购自 Bio-Rad 公司; 二硫苏糖醇(DTT)为 Merck 公司产品; 考马斯亮蓝 G-250, 溴酚蓝购自鹏程生物; 低相对分子质量 marker 购自中国科学院上海生物化学研究所; 甘油, 三氯乙酸(TCA), 苯甲基磺酰氟(PMSF), 丙酮, 乙醇, 冰乙酸, 盐酸, 甲醇均为分析纯, 水为超纯水。

Power Pac Universal 164-5070 型电泳仪, Mini-Protean 3 小型垂直电泳槽; ProteanLee Cell 等点聚焦系统(美国 Bio-Rad 公司); Sorvall Legend Micro 21 型高速低温冷冻离心机, Varioskan Flash 型全波长多功能酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司), Image Scanner III 型凝胶扫描成像系统(美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 溶液配制 裂解液 I : 9 mol·L⁻¹ 尿素, 4% Chaps, 65 mmol·L⁻¹ DTT(现加), 0.2% Bio-Lyte(现加)。

裂解液 II : 7 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 4% Chaps, 65 mmol·L⁻¹ DTT(现加), 0.2% Bio-Lyte(现加)。

裂解液 III : 7 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 4% Chaps, 1 mmol·L⁻¹ PMSF(现加), 65 mmol·L⁻¹ DTT(现加), 0.2% Bio-Lyte(现加)。

水化上样液 : 8 mol·L⁻¹ 尿素, 4% Chaps, 65 mmol·L⁻¹ DTT(现加), 0.2% Bio-Lyte(现加), 0.001% 溴酚蓝。

胶条平衡缓冲液 I : 6 mol·L⁻¹ 尿素, 2% SDS, 0.375 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8), 20% 甘油, 2% DTT(现加)。

胶条平衡缓冲液 II : 6 mol·L⁻¹ 尿素, 2% SDS, 0.375 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8), 20% 甘油, 2.5% 碘乙酰胺(现加)。

2.2 总蛋白质样品的提取^[12-13] 采用 3 种不同组织破碎方法(匀浆法、液氮研磨法、组织分散法)提取三斑海马蛋白质,比较不同方法提取效率的差别。

2.2.1 匀浆法 称取三斑海马药材样品粗粉约 0.1 g,剪细,置玻璃匀浆器中,加入裂解液 1 mL,匀浆后转入离心管,低温离心 10 min(12 000 × g, 4 ℃),取上清液,再离心 2 次,每次 5 min(12 000 × g, 4 ℃),取上清液,备用。

2.2.2 液氮研磨法 称取三斑海马药材样品粗粉约 0.1 g,剪碎,置预冷研钵中,加入液氮迅速研磨成细粉,加入裂解液 1 mL,研磨浸提后转入离心管,低温离心 10 min(12 000 × g, 4 ℃),取上清液,再次离心 2 次,每次 5 min(12 000 × g, 4 ℃),取上清液,备用。

2.2.3 组织分散法 称取三斑海马药材样品粗粉约 0.1 g,剪碎,置离心管中,加入裂解液 1 mL,分散处理后转入离心管,低温离心 10 min(12 000 × g, 4 ℃),取上清液,离心 2 次,每次 5 min(12 000 × g, 4 ℃),取上清液,备用。

2.3 蛋白质样品的纯化 采用 3 种不同方法对三斑海马总蛋白质进行纯化,比较不同方法对双向电泳图谱的影响。

2.3.1 Readyprep 2-D cleanup kit 纯化法 参照试剂盒说明书方法步骤进行纯化。

2.3.2 TCA/丙酮沉淀纯化法 取总蛋白液,加入 10 倍体积 -20 ℃ 预冷 10% TCA 丙酮溶液(含 0.07% DTT),-20 ℃ 静置 1 h,离心(8 000 × g, 5 min),沉淀用预冷丙酮洗涤 3 次,离心(8 000 × g, 5 min),取沉淀加入水化上样液溶解,室温高速离心 5 min,取上清液备用。

2.3.3 超滤 + TCA/丙酮沉淀纯化法 取总蛋白液,置入预处理好的 Millipore 超滤管(10 kDa, 0.5 mL),离心(3 000 × g, 30 min),取上清液,加入 10 倍体积 -20 ℃ 预冷 10% TCA 丙酮溶液(含 0.07% DTT),-20 ℃ 静置 1 h,离心(8 000 × g, 5 min),沉淀用预冷丙酮洗涤 3 次,离心(8 000 × g, 5 min),取沉淀加入适量 2-DE 水化液溶解,室温高速离心 5 min,取上清液,备用。

2.4 蛋白质定量 采用 Bradford 法,以 BSA(牛血清白蛋白)为标准蛋白进行蛋白质含量测定。

2.5 2-DE

2.5.1 第一向固相 pH 梯度 IEF IPG 预制胶条为 7 cm,pH 3 ~ 10 NL,水化液与样品溶液终体积为

200 μL,被动水化 12 h,聚焦过程搭盐桥,电泳参数设置见表 1。

表 1 等电聚焦程序电泳参数

Table 1 Program of isoelectric focusing

| 程序 | 电压/V | 升压过程 | 时间 |
|----|-------|------|----------|
| S1 | 250 | 线性 | 30 min |
| S2 | 500 | 快速 | 30 min |
| S3 | 4 000 | 线性 | 3 h |
| S4 | 4 000 | 快速 | 20 000 h |
| S5 | 500 | 快速 | 任意时间 |

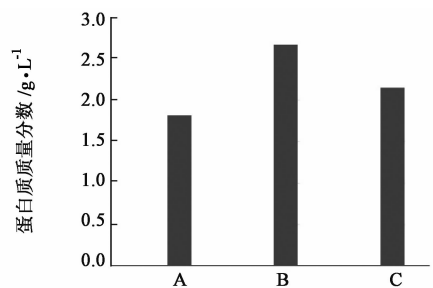
2.5.2 IPG 胶条的平衡 IEF 完成后用滤纸吸干 IPG 胶条表面矿物油,用新鲜配置的平衡缓冲液 I 和平衡缓冲液 II 分别平衡 15 min。

2.5.3 第二向 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 T 12%,C 2.7%,电泳起始用低电压 90 V,30 min 后加大电压至 150 V,待溴酚蓝指示剂到达距凝胶底部约 0.5 cm 时,停止电泳。

2.5.4 凝胶染色及图谱分析 观察分析并拍照保存。采用考马斯亮蓝染色法进行固定、染色和脱色,Image Scanner III 扫描记录后,Image master 7.0 双向电泳分析软件进行图谱分析。

3 结果与分析

3.1 总蛋白提取方法优化 采用 Bradford 法进行含量测定,比较匀浆法、液氮研磨法、组织分散法的提取效率的差别,见图 1。结果显示液氮研磨法提取得到的蛋白质含量最高,选择液氮研磨法为海马蛋白质提取方法。



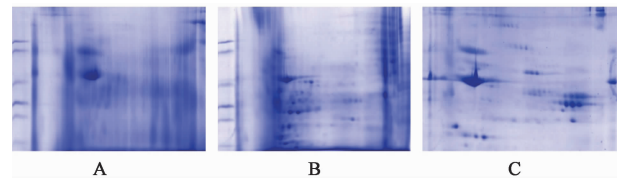
A. 匀浆法;B. 液氮研磨法;C. 组织分散法

图 1 不同提取方法蛋白质质量分数

Fig. 1 Protein contents of different extraction methods

3.2 总蛋白质提取裂解液的选择 使用不同裂解液,液氮研磨法提取总蛋白质后进行 2-DE。从图 2 可见,采用裂解液 I 的 2-DE 图谱模糊,分辨率低,横竖条纹干扰严重,无法有效分离;采用裂解液 II 提取蛋白质的 2-DE 图谱仅能分离部分中性蛋白质斑

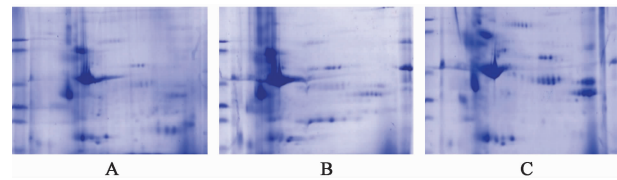
点,酸性端和碱性端分辨率差,拖尾严重;采用裂解液Ⅲ提取蛋白质的 2-DE 图谱分离效果较好,蛋白质斑点较清晰。因此,裂解液Ⅲ是三斑海马蛋白质 2-DE 分析较适合的蛋白质提取液。



A. 裂解液 I; B. 裂解液 II; C. 裂解液 III
图 2 不同提取裂解液的蛋白质 2-DE 谱

Fig. 2 2-DE maps of proteins extracted from different lysates

3.3 海马蛋白质纯化方法的选择 海马干药材化学成分复杂,样品中所含的核酸、脂类、盐类成分都会对 2-DE 产生干扰,必须采用合适的方法对样品液进行纯化。从图 3 可见,TCA/丙酮沉淀纯化和 Readyprep 2-D cleanup kit 纯化法均不能很好去除样品中的非蛋白质类成分,斑点模糊、数量偏少,横竖条纹干扰明显;超滤 + TCA/丙酮沉淀纯化法能较好达到除杂的目的,凝胶背景干净、斑点清晰,且能检测到较多的蛋白质斑点。因此,选择超滤 + TCA/丙酮沉淀纯化法为三斑海马总蛋白的纯化方法。



A. TCA/丙酮沉淀法; B. Readyprep 2-D cleanup kit 纯化法; C. 超滤 + TCA/丙酮沉淀法

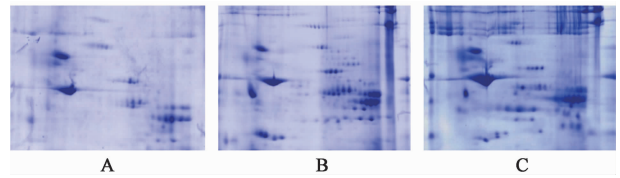
图 3 不同纯化方法的蛋白质 2-DE 谱

Fig. 3 2-DE maps of proteins extracted from different purification methods

3.4 上样量对蛋白质 2-DE 分辨率的影响 除样品制备外,上样量是影响 2-DE 分析效果的另一重要因素。上样量偏低不利于低丰度蛋白质的检测,但上样量过高,会导致部分蛋白在聚焦过程中析出影响聚焦效果,也可能导致 IPG 胶条凝胶孔径堵塞,从而影响其他蛋白质的分离、分析。在样品制备后,选择合适的上样量对获得高品质的 2-DE 图谱也是非常重要的。

从图 4 可以看出,当上样量为 200 μg 时,图谱斑点数量很少;当上样量为 400 μg 时,蛋白质斑点增多,但高丰度蛋白质点过大,掩盖了其他斑点,且

图谱背景较深,横竖条纹明显,出现弥散现象;当上样量为 300 μg 时,蛋白质斑点呈较清晰、分离均匀,图谱质量最佳。



A. 200 μg ; B. 300 μg ; C. 400 μg

图 4 不同上样量的蛋白质 2-DE 谱

Fig. 4 2-DE maps of proteins extracted from different dosage

3.5 适合三斑海马蛋白质组研究的 2-DE 技术 本研究通过对样品提取方法、裂解液、纯化方法、上样量的考察和优化,建立了适合三斑海马蛋白质组分析的 2-DE 技术,利用该技术获得的三斑海马 2-DE 图谱背景清晰、斑点均匀、多样性良好,Image master 7.0 软件分析共检测出蛋白质斑点 210 个(1 个斑点代表 1 种蛋白),蛋白质在 14.4 ~ 97.4 kDa 均有分布,分布差异不明显;等电点范围主要分布在 pH 4 ~ 9,其中以碱性蛋白质最为丰富。

具体操作流程为:取三斑海马药材粗粉大约 0.1 g,液氮研细,加裂解液(7 mol \cdot L⁻¹ 尿素,2 mol \cdot L⁻¹ 硫脲,4% Chaps,1 mmol \cdot L⁻¹ PMSF,65 mmol \cdot L⁻¹ DTT,0.2% Bio-Lyte)1 mL;研磨浸提后低温离心 10 min(12 000 \times g,4 $^{\circ}\text{C}$),取上清液,再次离心 2 次,每次 5 min(12 000 \times g,4 $^{\circ}\text{C}$),取上清液,超滤 30 min(10 kDa,0.5 mL,3 000 \times g),取上清液,加入 10 倍体积 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 10% TCA 丙酮溶液(含 0.07% DTT),-20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h,离心(8 000 \times g,5 min),沉淀用预冷丙酮洗涤 3 次后,加入适量 2-DE 水化液溶解,室温高速离心 5 min,取上清液,Bradford 法测定蛋白含量,上样体积 200 μL ,上样量 300 μg ,按 2.5 项下方法进行双向电泳后,进行染色、扫描记录和图像分析。利用该方法获得的三斑海马 2-DE 图谱,见图 5。

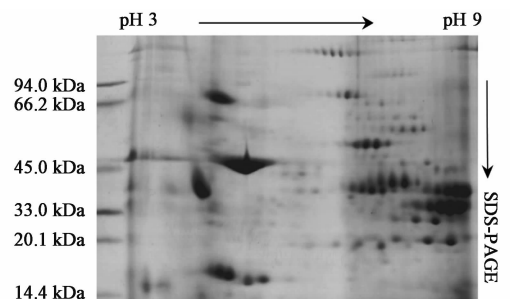


图 5 三斑海马蛋白质 2-DE 谱

Fig. 5 2-DE map of *Hippocampus trimaculatus* proteins

4 讨论

目前海马混淆品与正品比较,有以下特点:(1)基源动物也隶属海龙科海马属,但为不同种;(2)混淆品多数为濒危珍稀野生动物。野生海马是《濒危野生动植物种国际贸易公约》和世界自然保护联盟列名保护物种(CITES,2004;IUCN,2012),在我国被列为国家二级重点保护动物。非《中国药典》品种海马在我国分布极少或无,基本上来自国外,功效、药理活性不明,严重影响临床应用的安全性和有效性。同时,市场对海马药材的真伪不辨也刺激了非法捕捞海马和非法国际贸易,致使海马资源遭到极大破坏,多种野生海马资源面临绝种的危险。

本论文对影响2-DE图谱的几个关键环节,提取方法、提取裂解液、纯化方法、上样量进行了优化和筛选,建立适于三斑海马干药材蛋白质组研究的2-DE技术,为后期进行深入的中药材海马蛋白质组研究奠定了基础。后期应针对市售海马品种混乱的现状,利用2-DE技术分析不同品种海马、海马正伪品间蛋白质组分的差异,筛选和发现可供鉴别的蛋白质斑点并进行鉴定,开发中药材海马鉴定标志物,为保证中药临床用药安全和野生海马资源保护提供依据。

动植物体内蛋白质组分的研究,是目前国际上的研究热点之一。迄今为止已发现数万种生物活性蛋白或多肽,其中近百种已作为药物开发。中药材中的动物药、果实种子中药均富含蛋白质,由于蛋白质类成分构象复杂,加工贮藏过程中易降解变性,研究难度大、成本高,使得蛋白质类组分研究在中药化学领域一直处于落后地位。本课题对动物药海马干药材中的蛋白质组分进行研究,建立了适合海马药材蛋白质组分析的2-DE技术体系,对其他蛋白质类中药的研究和中药蛋白质组分的深入研究也具有借鉴意义。

[参考文献]

[1] 温琬莲,李军德,万德光,等. 海马市场调查与基原动物鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(7):

969-972.

[2] 董婷霞,卢振强,詹华强. 海马类药材的高效毛细管电泳鉴别[J]. 中药材,2001,24(5):328-329.

[3] 王树春,翁小春,吴云山,等. 中药材海马的X射线衍射 Fourier 图谱鉴定[J]. 西北药学杂志,2004,19(6):248-250.

[4] 王斌,任西杰,王燕,等. 基于聚类、主成分和判别分析的海马醇提物红外指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志,2013,48(4):253-258.

[5] 姜素芬,吉爱国,梁浩,等. 我国海马的研究进展[J]. 中药材,2007,30(7):884-887.

[6] 陈佳佳. 蛋白质组学技术在农作物研究中的应用进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(36):20549-20550,20553.

[7] 游丽华. 蛋白质组学技术在啤酒大麦品种鉴定中的应用研究[D]. 无锡:江南大学,2015.

[8] 颜廷进,李群,戴双,等. 小麦醇溶蛋白和麦谷蛋白在品种鉴定中的应用研究[J]. 山东农业科学,2015,47(3):105-107,117.

[9] Barrabés S, Farina-Gomez N, Llop E, et al. Comparative analysis of prostate specific antigen (PSA) by two-dimensional gel electrophoresis and capillary electrophoresis[J]. Electrophoresis, 2016, 38(3/4):408-416.

[10] Karthik D, Ravikumar S. Characterization of the brain proteome of rats with diabetes mellitus through two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry[J]. Brain Res, 2011, 1371(2):171-179.

[11] Kacem N S, Mauro S, Muhovski Y, et al. Diagonal two-dimensional electrophoresis (D-2DE): a new approach to study the effect of osmotic stress induced by polyethylene glycol in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) [J]. Mol Biol Rep, 2016, 43(9):897-909.

[12] 李晓琳,张顺捷,李颖,等. 刺五加与短梗五加种子的蛋白质电泳分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(22):180-183.

[13] 刘畅,严铭铭,邵帅,等. 五味子水溶性蛋白质的提取工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):16-19.

[责任编辑 顾雪竹]