

利用不同电泳技术对东亚蝎毒素 ITX 蛋白组分分离的研究

高峰¹, 曹俊娜², 齐伟³, 高革³, 高孟哲⁴, 刘文第^{2*}

(1. 河南省医药科学研究所, 郑州 450052; 2. 华北煤炭医学院, 河北 唐山 063000;
3. 新乡医学院, 河南 新乡 453000; 4. 郑州大学医学实验中心, 郑州 450052)

[摘要] 目的: 初步建立蝎毒素 ITX (Immunotoxin) 蛋白组分的电泳分离方法和蛋白质组表达谱。方法: 阴极电泳 (T = 18%, C = 6%) 对蝎毒进行分离, Bio-Rad Quantity-one 电泳软件分析条带; 双向电泳技术: 第一向为固相 pH 梯度等电聚焦, 第二向电泳为垂直平板 SDS-PAGE (T = 18%)。在以上过程中分别对上样方式、等电聚焦程序等条件进行优化控制, 利用 PDQ7.1 软件分析获得二维凝胶图像。结果: 阴极电泳图谱显示蝎毒素 ITX 由 7 个蛋白组分组成; 二维凝胶图谱显示蝎毒素 ITX 包含相对分子质量相同 (约为 5.8×10^3) 而等电点不同 9 种蛋白组分, 其中酸性蛋白质 4 种, 碱性蛋白质 5 种。结论: 通过各种条件的优化, 初步建立了 ITX 的阴极电泳和双向电泳方法, 获得了分辨率和重复性较好的阴极电泳图谱和二维凝胶图谱。

[关键词] 蝎毒素; 阴极电泳; 双向电泳

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0082-03

蝎毒是一种毒性仅次于蛇毒的生物毒素, 因具有复杂的成分及性质而产生多种生理、药理活性。本课题组经过多年的研究发现, 我们实验所使用的蝎毒素 ITX 与国内外分离得到的具有明显药效的蝎毒素分子量在相近或相同的区段^[1-2]。并在前期的药效学研究发现, 微小剂量下 ITX 对体外培养的人类急性 T 淋巴细胞白血病细胞系 JurkatE6-1 细胞的淋巴转化有促进作用; 并能有效刺激小鼠外周多种免疫细胞的活化, 各种细胞 CD69 活化率在 8 ~ 12 h 达到高峰, 而对 CD4 + T 细胞活化不明显。因此, 对该组分进行进一步分析鉴定, 不但可以发现新的蛋白组分及异构体, 而且可能更详尽的查明各组分的药理学效应, 极有利于天然药物的开发。电泳技术是蛋白质研究的主要方法, 特别是双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 技术, 已成为蛋白质组学的核心技术之一, 是目前常用的唯一一种能够连续在一块胶上分离数千种蛋白质的方法, 广泛应用于生物研究的各方面。

本研究拟采用阴极电泳联合 2-DE 技术, 开展蝎

毒素 ITX 的蛋白质组学研究, 以期获得蝎毒素 ITX 所含成分的信息, 为进一步研究其结构和作用机制奠定基础。

1 材料

1.1 样品的制备 蝎毒素 ITX 由新乡医学院分析测试中心提供。自河南产马氏钳蝎经电刺激蝎尾取蝎毒, 粗蝎毒经常压柱层析得蝎毒素 ITX, 相对分子质量分布为 $5.0 \times 10^3 \sim 6.5 \times 10^3$ 。

1.2 主要试剂与设备 17cmpH3-10 线性 ReadyStrip IPG 胶条、盐桥、矿物油、GS-800 型凝胶图像扫描仪、PDQuest7.1.1 凝胶图像分析软件、灌胶模具、SDS-PAGE 垂直电泳单元、预制双向电泳纯化试剂盒、Bio-Rad Quantity-one 软件 (美国 Bio-Rad 公司); Ettan IPGphor 3 等电聚焦仪 (瑞典 Amersham 公司); 精氨酸、甲基氯、HEPES, CHAPS, Tricine, 二硫苏糖醇 (DTT) (Sigma 公司)。

2 方法

2.1 蝎毒素 ITX 蛋白样品的纯化 将蝎毒素 ITX 蛋白标本依照每 Eppendorf 管 2mg 的蛋白量分装, 置于冻干机中冻干; 采用预制双向电泳纯化试剂盒, 按说明书操作纯化蛋白质, 除去盐分 and 多余杂质; 采用 Bradford 法^[3] 进行蛋白含量测定, 样品终浓度为 $4.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 阴极电泳 将纯化后的样品溶解于阴极电泳上样缓冲液中 (上样缓冲液组成 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 25% 甘油, 0.002% 甲基氯); 按照文献 [4] 配制 T =

[收稿日期] 2010-04-16

[第一作者] 高峰, 副研究员, 神经免疫学研究方向, Tel: 0371-66658225, E-mail: gaofeng70@znn.edu.cn

[通讯作者] * 刘文第, 教授, 生物化学与免疫学方向, Tel: 0371-65676788, E-mail: lwd@zzu.edu.cn

18%, C = 6% 的阴极电泳胶; 在电泳仪的上下槽分别加入阴极电泳缓冲液 (30 mmol·L⁻¹ 冰乙酸, 0.01% NaN₃) 和阳极电泳缓冲液 (113 mmol·L⁻¹ 甘氨酸, 5 mmol·L⁻¹ 冰乙酸, 0.01% NaN₃), 开始电泳; 待电泳结束后, 取出凝胶, 参照文献 [5] 的方法, 进行染色; Bio-Rad Quantity-one 图像分析软件分析蝎毒素 ITX 组分含有蛋白质的种类。

2.3 双向电泳 在胶条泡胀盘中加入 400 μL·gel⁻¹ 胶条泡胀液 (8 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 0.5% CHAPS, 1% DTT, 0.52% 100 × Bio-lyte3/10 两性电解质, 0.02% 溴酚蓝), 将 IPG 胶条泡胀 12 h; 取出胶条, 按杯上样的操作方法, 固定好上样杯; 加入纯化后的 ITX 样品 50 μL (约 25 μg), 蛋白样品由水化上样缓冲液 (7 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 50 mmol·L⁻¹ DTT, 0.2% 100 × Bio-lyte3/10 两性电解质, 0.002% 溴酚蓝) 溶解; 置双向电泳仪上等电聚焦, 设置聚焦条件为: 第一步 S1, 梯度电压 500 V, 10 min; 第二步 S2, 梯度电压 4 000 V, 90 min; 第三步 S3, 聚焦电压 7 500 V, 220 min; 最后 S4, 保持电压 500 V, 任意时间。聚焦结束后取出胶条, 依次用平衡液 A (8 mol·L⁻¹ 尿素, 0.15 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 2% SDS, 30% 甘油, 0.1% DTT) 和平衡液 B (8 mol·L⁻¹ 尿素, 0.15 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 2% SDS, 30% 甘油, 1.5 mol·L⁻¹ 碘乙酰胺) 振荡平衡 20 min 和 25 min; 取出胶条在 SDS-PAGE 电泳缓冲液中润洗, 转移至第二向 SDS-PAGE 凝胶上, 琼脂糖封固。第二向电泳采用 18% SDS 参照文献 [6] 的方法进行染色; PDQuest7.1.1 凝胶图像分析软件分析, 获得 ITX 蛋白质组图谱。

3 结果

3.1 阴极电泳结果 图 1 为 ITX 组分进行 18% 聚丙烯酰胺阴极电泳, 用 Bio-Rad Quantity-one 电泳分析软件检测, 共检测出 7 条带, 依照相对分子质量的不同分别编号为 B1-B7。

3.2 双向电泳结果 图 2 为蝎毒素 ITX 蛋白质双

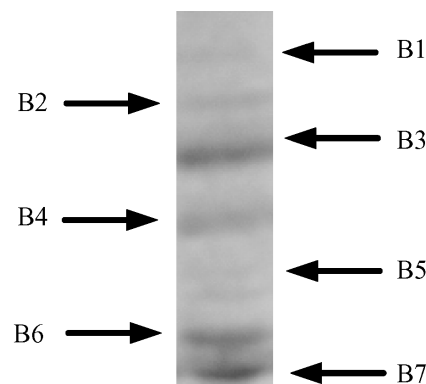


图 1 阴极电泳图谱

向电泳结果, 通过 **Blue silver** 法染色, PDQuest7.1.1 凝胶图像分析软件检测到多个蛋白点, 其中重现性较好的蛋白质点 9 个。其中碱性端蛋白质偏多, pI 小于 6 的蛋白质点为 2 个 (1 号和 2 号), 中性蛋白质点 (pI 为 6 ~ 8) 为 2 个 (3 号和 4 号), 碱性蛋白质点 pI 大于 8 为 5 个。PDQuest7.1.1 凝胶图像定量分析高丰度蛋白质点为 5 个 (5 ~ 9 号), 主要分布在碱性区范围内。所检测到的 9 个蛋白质点, 相对分子质量大约为 5 800 D。

4 讨论

4.1 方法比较 在试验初期, 我们首先采用一维 SDS-PAGE 分离 ITX, 但只有一条带出现, 不能达到较好的分离效果 (结果未列出)。所以本研究采用阴极电泳和双向电泳两种方法对 ITX 蛋白组分进行了分析, 分别检测到 7 种和 9 种重现性较好的蛋白成分。对于高丰度蛋白的检测, 两种方法检测结果基本一致。双向电泳结果表明蝎毒素 ITX 碱性蛋白数量居多, 这与阴极电泳结果相一致。本研究结果验证了双向电泳较阴极电泳具有更高效的分离。

4.2 双向电泳

4.2.1 胶条泡胀 尿素可以使蛋白质变性并打开折叠, 暴露内部的疏水基团, 利于 CHAPS 等表面活性剂溶解蛋白质。硫脲 (thiourea) 可以促进膜蛋白及膜相关蛋白的溶解, 并可溶于高浓度的尿素, 硫脲和尿素合用是双向电泳中样本制备的主要进展之一^[7]。两性电解质代替 SDS 的应用使得样品中的离子成分更稳定。

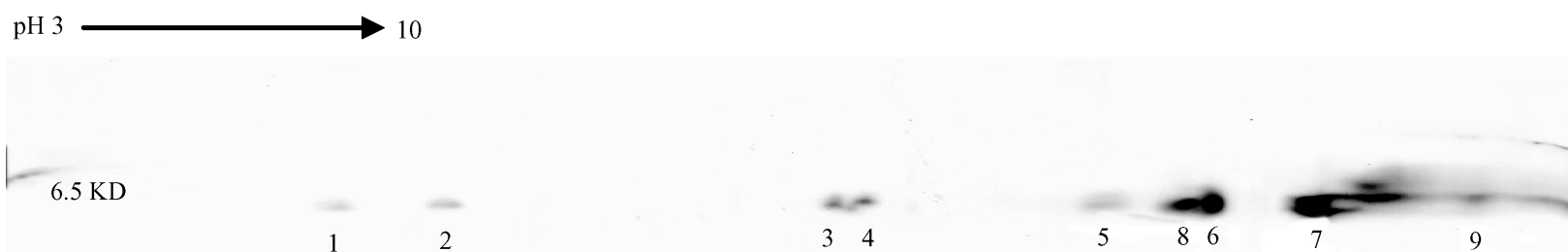


图 2 蝎毒素 ITX 蛋白质双向电泳图谱

4.2.2 上样方式及上样量 本研究采用了杯上样和水化上样 2 种方式,从试验结果来看,对于分离碱性蛋白,杯上样方法更合适。水化上样方法虽然可加大蛋白的上样量,但对于碱性蛋白,不能达到很好的聚焦效果。而采用杯上样的方法,在胶条泡胀 12 h 后,低上样量(本实验采用的是 25 μg) 时,等电聚焦效果较好,上样量过大如达到 100 μg 以上时,会影响高丰度蛋白组分的聚焦。同时,杯上样时,上样量越小,上样体积越大,聚焦效果越明显,原因可能由于,样品浓度大时,分子内部游离的巯基重新形成二硫键,甚至分子间的巯基也会形成二硫键,影响聚焦效果。

4.2.3 平衡时间 平衡时间对于分离小分子蛋白具有重要意义。在最初的实验中,我们多采用每次平衡 15 min,两次共平衡 30 min 的方法,但结果发现,纵向拖尾现象严重,染色区域蛋白呈长条形,不是常见圆形蛋白点。分析原因可能在于,由于 IIX 蛋白相对分子质量小,天然状态下呈紧密球形,平衡缓冲液中的 DTT 因作用时间短不能充分打开蛋白分子内部的二硫键,致使不同形状的蛋白进入第二向后出现拖尾现象; 碘乙酰胺可中和多余 DTT,但碘乙酰胺作用不充分时,就会导致 DTT 进入第二向,出现沉淀,产生拖尾。综合上述因素,我们将平衡时间分别调整为第 1 次 20 min 和第 2 次 25 min。图 2 的结果显示:虽然各蛋白组分虽有不同程度的损失,但最终获得较为满意的蛋白分离结果。

蝎毒素组分复杂,活性多样,不同组分相同活性,同一组分多活性现象普遍。本文初步报道了蝎毒素 IIX 组分的组成情况,后续将对各分离纯化的样品进行质谱鉴定和理化性质研究,建立蝎毒素 IIX 蛋白表达谱和活性谱,为进一步研究其作用机

制奠定基础。

[参考文献]

- [1] 孔天翰,董伟华,周永安. 3 种蝎毒抗癌多肽制剂抑制小鼠肝癌及增强免疫作用的比较 [J]. 河南医科大学学报, 1999, 34(1): 55.
- [2] Vera L. Petricevich, Ivo Lebrun. Immunomodulatory effects of the tityus serrulatus venom on murine macrophage functions *in vitro* [J]. Mediators of Inflammation, 2005, 1: 39.
- [3] Bradford M M A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal. Biochem, 1976, 7(2): 248.
- [4] 郭尧君,余添. 阳极电泳和阴极电泳的快速半干新技术 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(4): 359.
- [5] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 65.
- [6] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. Electrophoresis, 2004, 25 (1): 327 .
- [7] Herbert B. Advanced in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis [J]. Electrophoresis, 1999, 20: 660.
- [8] 吉永华,赵箐. 蝎毒素可被用作构建肽类新药分子的“骨架” [J]. 生命的化学, 1996, 16(4): 32.
- [9] Shah K, Tom Blake J, Huang C, et al. Immunosuppressive effects of a Kv1. 3 inhibitor [J]. Cell Immunol, 2003, 221(2): 100.
- [10] 陈冰,吉永华. 短肽蝎毒素的结构分类与功能特征 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(1): 44.

[责任编辑 顾雪竹]