

·技术研究·

适于表皮组织蛋白质组分析的双向电泳技术

聂燕芳¹, 曾耀英¹, 吴晓萍¹, 刘钧澄², 黄秀艳¹

(1.暨南大学组织移植与免疫中心,广东 广州 510632;2.中山大学附属第一医院小儿外科,广东 广州 510080)

摘要:【目的】建立适于表皮组织的双向电泳技术,并应用质谱技术对人表皮组织蛋白质组进行初步分析。【方法】利用组织匀浆法制备人表皮组织总蛋白、固相 pH 梯度胶条进行双向电泳、PDQuest 7.4 软件比较和分析电泳图谱,利用质谱技术鉴定部分蛋白斑点。【结果】成功建立了适用于表皮组织蛋白质组分析的双向电泳技术,获得和比较了表皮组织双向电泳四种染色图谱。表皮组织的蛋白质在 pH5~8 范围内分布均匀,分子量集中在 15~100 ku 之间。银染图谱获得的蛋白斑点数为 586 ± 14 ;对质谱兼容的几种染色方法进行比较分析,结果表明 Neuhoff 胶体考染更适用于表皮组织蛋白质的双向电泳分析,其在上样量为 350 μg 时蛋白斑点数达 394 ± 9 ,匹配率为 85.53%。利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术成功获得了 Neuhoff 胶体考染的两个蛋白斑点的肽质量指纹图谱,并鉴定为 Caspase 14 前体和 27 ku 热激蛋白 1。【结论】建立的表皮组织双向电泳技术及其图谱可为皮肤蛋白质组学研究提供参考,为人皮肤蛋白质组学平台的构建奠定良好基础。

关键词: 表皮组织;双向电泳;蛋白质组;肽质量指纹图谱

中图分类号:Q51 文献标识码:A 文章编号:1672-3554(2008)03-0337-05

Two-dimensional Electrophoresis for Proteomics Analysis of Human Epidermis

NIE Yan-fang¹, ZENG Yao-ying¹, WU Xiao-ping¹, LIU Jun-cheng², HUANG Xiu-yan¹

(1.Institute of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Department of Pediatric Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To establish two-dimensional electrophoresis (2-DE) technology for human epidermis, and analyze the proteome of human epidermis by mass spectrometry.【Methods】Total proteins of epidermis were extracted by homogenization and separated by 2-DE using immobilized pH gradient (IPG) strips. The 2-DE maps were matched and analyzed using image analysis software PDQuest 7.4, and some of the protein spots were identified by mass spectrometry.【Results】The 2-DE methods for proteomics analysis of human epidermis was successfully established, and four different staining 2-DE profiles were obtained and compared. Proteins spots were well distributed in pH 5~8 and molecular weight range of 15 ku~100 ku. 586 ± 14 protein spots were detected in the silver staining maps. Within the three staining methods compatible with mass spectrometry, Neuhoff's colloidal staining was most suitable for the proteomics analysis of human epidermis. With 350 μg protein loaded, 394 ± 9 protein spots were detected with a match rate of 85.53%. Finally the peptide mass fingerprinting (PMF) of two of the proteins were obtained using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry, and then identified as Caspase 14 precursor and Heat shock 27ku protein 1.【Conclusion】The established 2-DE methods and maps of epidermis provide reference data for skin proteomic studies, and help to construct the platform for human skin proteomics.

Key words: epidermis; two-dimensional electrophoresis profiles; proteome; PMF

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(3):337-341]

收稿日期:2007-11-21

基金项目:国家重点基础研究规划项目 973 计划项目(2004CB720100);国家重点基础研究发展计划 973 项目(2006CB504201)

作者简介:聂燕芳(1979-),女,广东博罗人,在读博士研究生, E-mail: snyanf@jnu.edu.cn;曾耀英,通讯作者,研究员,博士生导师, E-mail: tzengyy@jnu.edu.cn

目前,蛋白质组学技术在人皮肤研究领域的应用仍处于初步发展阶段,而表皮蛋白质组双向电泳图谱大多建立在人角质形成细胞系^[1-4]或者原代培养的角质形成细胞^[5]的基础上,关于人表皮组织蛋白质组的报道并不多见,在国内更尚未见报道。以人表皮组织为研究对象,能真实地展示表皮组织的蛋白质表达谱,同时也利于比较不同生理、病理过程中皮肤组织蛋白质组的表达差异情况,可为探讨人皮肤疾病的发病机理提供理论依据,并为疾病的诊断和预后提供特殊的生物标记^[6]。为了方便蛋白质组学技术在人皮肤疾病方面的研究,本实验建立了适用于人表皮组织的双向电泳技术,拟为人皮肤蛋白质组研究奠定基础,并为皮肤蛋白质组学研究提供参考图谱。

1 材料和方法

1.1 材料及设备

1.1.1 皮肤组织来源 正常人皮肤组织标本来源于中山大学附属第一医院小儿外科,2006年8月~2007年6月,取包皮环切术后的包皮,共取18例。

1.1.2 试剂与设备 IPG胶条(7 cm, pH5~8)、两性电解质(Bio-Lyte, pH5~8)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵、碘乙酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸、低熔点琼脂糖及蛋白标准购自Bio-Rad公司,超纯尿素和3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐(CHAPS)购自Pierce公司,蛋白酶抑制剂(protease inhibitor cocktail)和Dispase II购自Roche公司,十二烷基磺酸钠(SDS)、RNase、DNase、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G-250 和考马斯亮蓝 R-250 购自Sigma公司,硫酸铵购自Amresco公司,其余均为国产分析纯试剂。PROTEAN IEF等电聚焦仪、mini-PROTEAN垂直电泳系统、GS800密度扫描仪和PDQuest图像分析软件为Bio-Rad公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 人表皮组织总蛋白的提取 人表皮组织的剥离处理采用酶消化法^[7]。将包皮修剪成5 mm × 5 mm皮片,加入1.25 g/L 分散酶(Dispase II),4℃消化过夜,分离表皮,PBS清洗3次。将PBS清洗后的表皮组织转移至组织匀浆器中。加入1 mL

尿素裂解液(8 mol/L 尿素,40 g/L CHAPS,65 mmol/L DTT,2 mL/L Bio-Lyte,10 mL/L protease inhibitor cocktail,0.025 g/L RNase,20 U/mL DNase),匀浆后4℃放置1 h,再以12 000 × g,4℃离心30 min,收集上清液,保存于-70℃冰箱中备用。蛋白浓度测定采用Bradford^[8]法。

1.2.2 双向凝胶电泳 第一向固相pH梯度等电聚焦电泳:取表皮组织蛋白样品适量,加入IPG胶条水化上样缓冲液(8 mol/L 尿素,40 g/L CHAPS,65 mmol/L DTT,2 mL/L Bio-Lyte,0.01 g/L 溴酚蓝)至终体积为150 μL,充分混合后加样至等电聚焦槽。在PROTEAN IEF等电聚焦仪上进行等电聚焦。水化和聚焦温度为20℃,被动水化13 h。设置聚焦参数为:150 V 慢速升压1 h;250 V 慢速升压1 h;500 V 慢速升压1.5 h;2 000 V 快速升压2 h;4 000 V 快速升压聚焦20 000 V.h。聚焦完成,取出胶条,在平衡液 I (6 mol/L 尿素,0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8,200 mL/L 甘油,20 g/L SDS,20 g/L DTT) 中振荡平衡15 min,再换平衡液 II (6 mol/L 尿素,0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8,200 mL/L 甘油,20 g/L SDS,25 g/L 碘乙酰胺)振荡平衡15 min。第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):配制12%的SDS-PAGE凝胶,将平衡后的IPG胶条置于凝胶的上方,再用5 g/L 低熔点琼脂糖封闭胶条。电泳参数为:75 V 电泳10 min,再将电压升至120 V,继续电泳至溴酚蓝标记线距短板下端5 mm处。

1.2.3 凝胶染色 硝酸银染色参考郭尧君^[9]方法:将凝胶置于固定液(400 mL/L 乙醇、100 mL/L 冰乙酸)中固定1 h,换敏化液(300 mL/L 乙醇、68 g/L 乙酸钠、1.25 mL/L 戊二醛、2 g/L 硫代硫酸钠)敏化30 min后用超纯水漂洗3次,再用2.5 g/L 硝酸银染色液染色30 min,超纯水漂洗2次后,用25 g/L 碳酸钠溶液显色,最后用14.6 g/L EDTA终止显色反应。经典考染参考郭尧君^[9]方法:将凝胶置于染色液(1 g/L 考马斯亮蓝 R-250、400 mL/L 乙醇、100 mL/L 冰乙酸)中染色过夜,然后用脱色液(400 mL/L 乙醇、100 mL/L 冰乙酸)脱去背景色。Neuhoff 胶体考染^[10]:将凝胶置于固定液中固定1 h,然后用水漂洗3次,每次10 min,换染色液(80 g/L 硫酸铵、0.8 g/L 考马斯亮蓝 G-250、8 mL/L H₃PO₄、200 mL/L 甲醇)染色过夜,最后用水洗去背景色。Blue Silver 染色^[11]:将凝胶置

于固定液中固定 1 h,然后用水漂洗 3 次,每次 15 min,换染色液(100 g/L 硫酸铵、1.2 g/L 考马斯亮蓝 G-250、100 mL/L H_3PO_4 、200 mL/L 甲醇)染色过夜,最后用水洗去背景色。

1.2.4 图像扫描与分析 染色后的凝胶用 GS800 密度扫描仪扫描,并用 PDQuest 7.4 图像分析软件对图像进行分析。

1.2.5 蛋白斑点胶内酶解和质谱分析 切取 Neuhoff 胶体考染凝胶中的蛋白斑点,送至中国科学院上海生命科学研究院蛋白质组学研究分析中心进行胶内酶解和质谱分析,获得蛋白斑点的肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF),进行数据库搜索比对,初步对蛋白点进行鉴定。

2 结果

2.1 样品制备

样品制备中,将人表皮组织的表皮与真皮有效的剥离是实验成功的第一步。使用离散酶(Dispase II)选择地消化真皮和表皮的接触层,4℃

消化过夜后,表皮容易区分和剥离。在人表皮组织总蛋白质的提取方面,报道并不多见。本实验经过反复摸索,获得了稳定有效的表皮蛋白提取方法。在蛋白提取过程中,加入了广谱蛋白酶抑制剂,可以有效防止蛋白质水解;在裂解液中使用 RNase 和 DNase,有效去除了蛋白样品中的核酸,防止核酸污染对蛋白聚焦和凝胶染色的影响。

2.2 人表皮组织蛋白质双向电泳图谱的获得

取人表皮组织蛋白 200 μ g 进行双向电泳,银染结果表明人表皮组织蛋白在 pH5~8 范围内分布均匀,分子量主要集中在 15~100 ku 之间(图 1A)。

对 3 次重复实验的双向电泳图谱进行扫描,然后选取其中一块凝胶作为参考创建标准胶,通过 PDQues7.4 图象分析软件的自动检测和匹配、手工匹配和归一化处理,对蛋白质斑点进行匹配和分析。结果表明,获得的人表皮组织蛋白斑点数为 586 ± 14 ,匹配率为 87.03%。

2.3 与质谱鉴定兼容的不同染色方法的比较

目前对蛋白斑点进行质谱鉴定仍以考染的凝

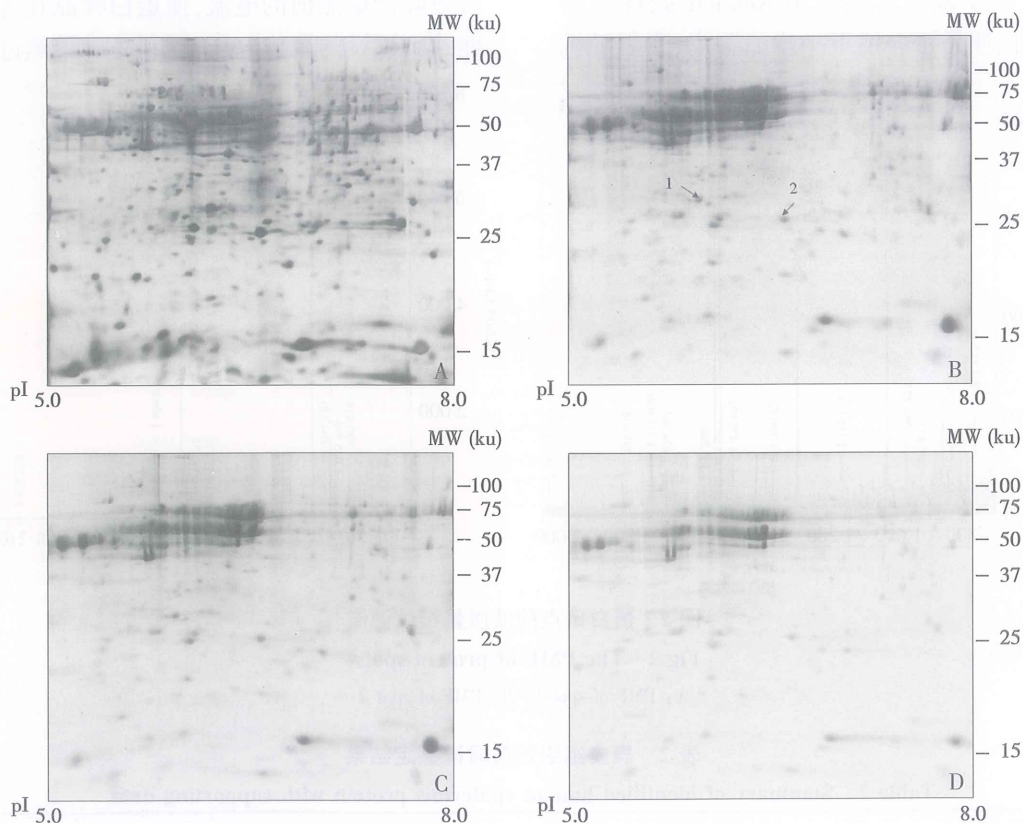


图 1 人表皮组织双向电泳图谱

Fig.1 The 2-DE map of human epidermis

A: stained with silver nitrate; B: stained with Neuhoff's colloidal stain; C: stained with blue silver stain; D: stained with classical Coomassie Blue stain

胶为主。本实验比较了 3 种考染方法在表皮组织双向电泳凝胶染色中的灵敏度。取人表皮组织蛋白样品 350 μg 进行双向电泳, 获得 3 种不同考染方法的双向电泳图谱(图 1 B~D)。

对每种染色方法的 3 次重复实验的双向电泳图谱分别进行扫描, 并各取一块凝胶为参考创建标准胶, 图像分析结果表明(表 1), 经典考染方法灵敏度较低, 图谱检测的斑点数为 279 ± 19 ; Neuhoff 胶体考染与 Blue silver 染色具有相似的灵敏度, 检测的斑点数分别为 394 ± 9 和 389 ± 15 。

表 1 表皮组织考染图谱蛋白质斑点的图像分析结果
Table 1 Detection of protein spots in the 2-DE profiles of human epidermis

Staining method	Number of spots	Matched spots	Match rate (%)
Neuhoff's colloidal staining	394 ± 9	337 ± 48	85.53
Blue silver staining	389 ± 15	330 ± 63	85.05
Classical Coomassie Blue staining	279 ± 19	242 ± 50	86.74

2.4 经 Neuhoff 胶体考染凝胶的蛋白质的质谱分析
为了进一步确认本实验中 Neuhoff 胶体考染凝胶中的蛋白质是否合适下一步的鉴定, 我们随机

选取了图 1B 中所标示的蛋白斑点 1 和蛋白斑点 2 进行分析。通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 分析, 获得了蛋白斑点的肽质量指纹图谱 (图 2 A,B)。

在 [Http://www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com) 网站上利用 Mascot 软件检索 NCBI 数据库, 进行肽片段的搜索和对比, 鉴定结果见表 2。结果表明蛋白斑点 1 为 caspase 14 蛋白前体, 蛋白斑点 2 为 27 ku 热激蛋白 1。

3 讨论

样品制备、等电聚焦和染色方法是影响双向电泳图谱质量的重要因素。样品制备中, 脂质、盐、去污剂、核酸等杂质会使凝胶中的蛋白点出现拖尾、水平条纹等现象, 并造成干扰背景^[12]。为了防止样品中的盐离子在双向图谱中造成蛋白丢失或横向拖尾, 本实验在等电聚焦电泳中, 设置了长时间的低电压, 以达到除盐的效果, 结果表明该处理可以有效降低聚焦前的电流, 使蛋白样品在等电聚焦时能达到预设的聚焦电压, 顺利完成聚焦过程。

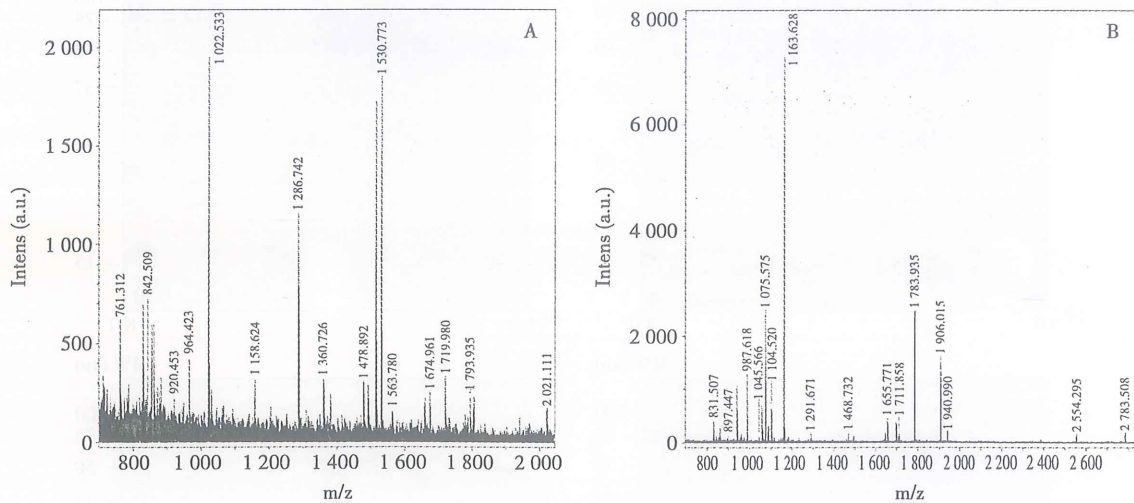


图 2 蛋白斑点的肽质量指纹图谱

Fig.2 The PMF of protein spots

A: PMF of spot 1; B: PMF of spot 2

表 2 表皮组织蛋白质谱鉴定结果

Table 2 Summary of identified human epidermis protein with supporting data

Spot	NCBI accession number	Protein name	Theoretical MW (ku)	Calculated pI	Coverage (%)
1	gi 6912286	Caspase 14 precursor	27.947	5.44	59
2	gi 4504517	Heat shock 27kDa protein 1	22.826	5.98	55

MW: molecular weight; pI: isoelectric point

凝胶染色方法的选择不仅需要考虑到双向图谱的分辨率,还需根据是否进行蛋白斑点的质谱鉴定作出调整。硝酸银染色灵敏度高,能检测到1 ng蛋白斑点,因此被广泛应用于双向电泳的分析型凝胶。若要与质谱兼容,染色过程必须去除戊二醛和甲醛^[13],但此时染色分辨率将会有所降低。

本实验还比较了与质谱兼容的三种考染方法在表皮组织双向电泳凝胶染色中的灵敏度。经典考染方法灵敏度最低,且脱色液中含有乙酸,具有挥发性和刺激性气味。Neuhoff 胶体考染和 blue silver 灵敏度较高,能达到 200 ng 水平。Blue silver 染色方法是 2004 年 Candiano 等人在 Neuhoff 胶体考染的基础上建立起来的^[11],主要改动了染色液部分组分的浓度:将染料考马斯亮蓝的浓度从 0.8 g/L 提高至 1.2 g/L, H₃PO₄ 提高至 100 mL/L。Candiano 等人认为,低的 pH 环境更有利于染料通过离子键与蛋白质中的组氨酸残基、赖氨酸残基和精氨酸残基结合,从而提高 Blue silver 染色灵敏度。但本文经过反复实验证明,Blue silver 染色检测到的斑点数与 Neuhoff 胶体考染没有显著性差异,这也许跟表皮组织蛋白质的性质和组成有关。综合灵敏度因素和试剂成本因素考虑,Neuhoff 胶体考染更适合于表皮组织蛋白质双向电泳分析。

本文建立的人表皮组织双向电泳图谱可为皮肤蛋白质组学研究提供参考图谱,并为人皮肤蛋白质组学平台的构建奠定良好基础。

参考文献:

- [1] Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. *Proteomics*, 2004, 4(12): 3665-3685.
- [2] 李 孜.蛋白质组学研究进展[J].*热带医学杂志*,2003, 3(1):103-108.
- [3] Lee KA, Kanga JW, Shima JH, et al. Protein profiling and identification of modulators regulated by human papillomavirus 16 E7 oncogene in HaCaT keratinocytes by proteomics [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 99(1):142-152.
- [4] 陈 斌, 毕志刚. HaCaT 细胞蛋白质组双向凝胶电泳技术的初步建立 [J]. *中华皮肤科杂志*,2005,38 (11): 706-707.
- [5] Park YD, Jang HS, Kim SY, et al. Two-dimensional electrophoretic profiling of atopic dermatitis in primary cultured keratinocytes from patients [J]. *Proteomics*, 2006,6(4): 1362-1370.
- [6] Azad NS, Rasool N, Annunziata CM, et al. Proteomics in clinical trials and practice:present uses and future promise [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006,5(10): 1819-1829.
- [7] 孟繁剑, 陈家祺. 人皮肤干细胞体外诱导分化构建人工结膜的实验[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(3): 246-249.
- [8] 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, 7(72): 248-254.
- [9] 郭尧君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18(1):32-37.
- [10] Neuhoff V, Arold N, Taube D, et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie brilliant blue G-250 and R-250 [J]. *Electrophoresis*,1988,9(6):255-262.
- [11] 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(9): 1327-1333.
- [12] 彭 蔚,余敏斌,吴开力,等.正常人眼小梁组织的二维凝胶电泳及质谱分析[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(6): 672- 676.
- [13] 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.

(编辑 王晓鹰)