

# 正常人眼小梁组织的二维凝胶电泳及质谱分析

彭蔚<sup>1</sup>, 余敏斌<sup>1</sup>, 吴开力<sup>1,2</sup>, 马璇<sup>1</sup>, 刘炜<sup>2</sup>, 杨扬帆<sup>1</sup>

(中山大学 1.中山眼科中心//眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510060; 2. 中山医学院蛋白质组学实验室, 广东 广州 510080)

**摘要:** 【目的】应用二维电泳和质谱对正常人眼小梁组织蛋白质组进行初步分析。【方法】采用二维凝胶电泳对正常人眼小梁组织进行蛋白分离和图像分析。分别用(7 cm×8 cm, 13 cm×16 cm, 18 cm×16 cm)3种不同尺寸大小凝胶分离蛋白,并结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析及数据库搜索从而鉴定部分蛋白质斑点。【结果】建立小梁组织蛋白样品处理及二维凝胶电泳的实验条件及方法,获得正常人眼小梁组织二维凝胶电泳蛋白图谱。3种不同尺寸大小凝胶的蛋白质分离斑点数为230个、875个、1213个。质谱鉴定出14个蛋白点。【结论】完成人眼小梁组织蛋白质的二维电泳凝胶“标准”图谱并作质谱分析的方法性探索对同类研究具有参考意义,为分析小梁组织在青光眼发病过程中蛋白质表达改变研究提供了新的方法及途径。

关键词: 小梁组织; 二维凝胶电泳; 质谱; 蛋白图谱

中图分类号: R775.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0672-05

## Proteomics Analysis of Human Trabecular Meshwork by Two-dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry

PENG Wei<sup>1</sup>, YU Min-bin<sup>1</sup>, WU Kai-li<sup>1,2</sup>, MA Xuan<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, YANG Yang-fan<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Ophthalmology // Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. The Proteomics Lab, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the proteome of normal human trabecular meshwork (TM) by two-dimensional gel electrophoresis(2-DE) and mass spectrometry. 【Methods】 Protein of the normal human TM was separated by two-dimensional gel electrophoresis at various gel sizes (7 cm×8 cm, 13 cm×16 cm, 18 cm×16 cm). Image analysis was carried out with Image Master Elite 3.10 software package. Protein spots on 2-DE gel were identified by matrix assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and database searching. 【Results】 Systemic processing and essential conditions of sample preparation and 2-DE for human trabecular meshwork were established successfully. The 2-DE gel patterns of human trabecular meshwork with three sizes (7 cm×8 cm, 13 cm×16 cm, 18 cm×16 cm) were obtained. There were about 230, 875 and 1213 protein spots detected on these three gels respectively. 14 protein spots were identified successfully by MALDI-TOF-MS. 【Conclusion】 The approach of proteomic analysis using 2-DE and MALDI-TOF-MS and the gel patterns of human TM were accomplished successfully, which offers a new approach for further study on human TM protein related glaucoma.

Key words: trabecular meshwork; two-dimensional gel electrophoresis; mass spectrometry; protein map

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):672-676]

目前认为小梁网病变是原发性开角型青光眼

致病机制中的关键环节, 小梁细胞结构和功能的

收稿日期: 2006-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371513); 广东省重大科技专项(2004A30801001); 广东省自然科学基金资助项目(031732)

作者简介: 彭蔚(1976-), 女, 江西赣州人, 硕士生, 现在中山大学附属第二医院眼科(510120); 余敏斌, 通讯作者. E-mail: max-yu@163.net

net

异常、细胞外基质成分的变化、组织纤溶系统等均与此致病过程密切相关。小梁网组织蛋白的异常改变在青光眼发生发展中的作用已被不少研究所证实。目前的研究多以 TIGR 蛋白、细胞外基质蛋白及细胞骨架蛋白为研究对象<sup>[1,2]</sup>。Bhattacharya<sup>[1]</sup>等在小梁网组织中分离出 cochlin 蛋白,并且初步认为 cochlin 蛋白与青光眼的发病相关,这是对青光眼相关蛋白新的发现。蛋白质组学(proteomics)方法是进行蛋白质研究最理想的工具,具有高通量、高灵敏度的特点。本研究用二维凝胶电泳的方法对正常人眼小梁组织进行蛋白分离,建立小梁网组织二维电泳凝胶图谱并对其中蛋白质斑点进行初步质谱鉴定,从而为进一步建立其蛋白表达谱打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及设备

1.1.1 研究对象 正常人眼球标本来源于广东省眼库,死亡年龄 25~35 岁,男女性别不等,死后 4-16 小时取材,共取 60 个眼球小梁组织。

1.1.2 试剂及设备 一向等电聚焦所用的固定 pH 梯度胶条 (immobilized pH gradient strip, IPG strip)、再水化液、覆盖液、2-D Clean-Up 试剂盒均为英国 Amersham 公司产品。二向聚丙烯酰胺凝胶电泳用的丙烯酰胺、N,N'-2 亚甲双丙烯酰胺、Tris 碱、四甲基乙二胺 (TEMED)、过硫酸胺 (APS)、十二烷基硫酸钠 (SDS) 等,二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺、细胞裂解液、乙腈、三氟乙酸、肉桂酸(基质)、及考马斯亮兰染色试剂 (R250) 等试剂均购自德国 Sigma 公司。胰酶 (trypsin) 购自美国 Promega 公司。三种垂直板电泳槽为美国 Bio-Rad 公司。等电聚焦电泳仪及相关组件 (Ettan IPG phor IEF system)、质谱分析采用的 Ettan Spot handling workstation、Ettan MALDI-TOF-PRO 及图像分析软件采用的是 Image Master elite 3.10 均购自英国 Amersham 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 取材与蛋白提取 参照 Bhattacharya 等<sup>[1]</sup>人眼小梁组织取材方法,在解剖显微镜下沿角膜缘 360° 剪取小梁组织。进行蛋白提取:小梁组织样品经过剪碎、碾磨及超声粉碎等步骤后于裂解液 (8 mol/L Urea 40 g/L CHAPS 40 mmol/L Tris) 中浸

泡过夜,得到混悬溶液,再经过 4 低温超速离心 12 000  $\times$ g, 30 min (Sigma 1K15 冷冻高速台式离心机),取上清蛋白溶液再经过 2D clean up 试剂盒去盐处理后,溶解于不同胶条对应容积的再水化液 (8 mol/L 尿素,40 g/L, CHAPS,20 g/L Pharmalyte3~10 临用前每 2.5 mL 加 7 mg DTT),充分混匀溶解,再次低温超速离心取上清液 (12 000  $\times$ g, 30 min, 4 )。

1.2.2 蛋白浓度测定 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒 (南京建成生物工程公司) 测定样本液蛋白浓度,并据此浓度确定二向凝胶电泳的上样量。

1.2.3 二维凝胶电泳 本实验第一向等电聚焦电泳采用三种不同长度 IPG 胶条 (分别为 7 cm、13 cm、18 cm)。经过 3 次 8 cm  $\times$  7 cm  $\times$  0.1 cm 尺寸凝胶预试验,获得较稳定的实验条件。再分别用不同大小凝胶进行实验。上样量及电泳参数见表 1。IPG 胶条平衡:等电聚焦结束后,立即用 10 g/L 的 DTT 平衡液及 25 g/L 的碘乙酰胺平衡液分别平衡 IPG 胶条 15 min。第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳:采用厚度 1 mm 浓度 120 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶,选用恒定电流模式,开始设定恒流 20 mA,待溴酚蓝指示剂进入分离胶后,设定恒流 40 mA,直至溴

表 1 三种不同长度 IPG 胶条实验数据。

Table 1 Experimental data of the IPG gel with three sizes

Gel parameter	IPG strip length (cm)		
	7	13	18
Size (cm)	7 $\times$ 6	13 $\times$ 16	18 $\times$ 16
Suitable sample load ( $\mu$ g)	150	600	900
IEF steps			
Rehydration (h)	12	12	12
500 V (h)	0.5	1	1
1 000 V (h)	0.5	1	1
1 000-8 000 V (h)	0.5	1	2
8 000 V (h)	1	2	4

酚蓝到达胶的下缘,终止电泳。

1.2.4 染色 采用考马斯亮蓝染色 R250 染色<sup>[5]</sup>。

1.2.5 图像扫描与分析及质谱鉴定 利用 ImageScanner 光学扫描仪,在 300 DPI 分辨率下对凝胶进行扫描,使用 Image Master Elite 3.10 软件对图像进行分析,包括蛋白点的编辑、检测、统计、定位、编号及相对丰度分析。考马斯亮蓝染色的凝

胶上选取散在分布的部分斑点进行 MALDI-TOF-MS 质谱鉴定分析见图 1。质谱鉴定由 Ettan Spot handling Workstation 来完成蛋白点的切取、脱色、消化及点样过程<sup>[6]</sup>, 转移至 MALDI-TOF-MS 对肽段进行质谱分析。

## 2 结果

本实验采用 3 种 IPG 胶条分别为 7 cm、13 cm、18 cm, 得到不同大小 (7 cm × 8 cm、13 cm × 16 cm、18 cm × 16 cm) 的正常人眼小梁组织二维电泳凝胶图谱。13 cm × 16 cm 凝胶图谱见图 1, 图中可见凝胶电泳对大部分蛋白质有较好的分离效果。3 种不同大小凝胶经考马斯亮蓝染色所鉴定蛋白斑点数为 230、875、1 213。可以看出, 随着胶条长度和加样量的增加, 同一组织所分离的蛋白点数也随之增加。鉴定出 14 个小梁组织蛋白质斑点。表 2 分别为所鉴定 14 个蛋白点在凝胶上的位置和蛋白质相关信息。比较图 1 和表 2 可见, 所鉴定蛋白质谱分析所得肽质量指纹图谱的有效峰值较多, 与数据库匹配的肽段和覆盖率均较高, 且与

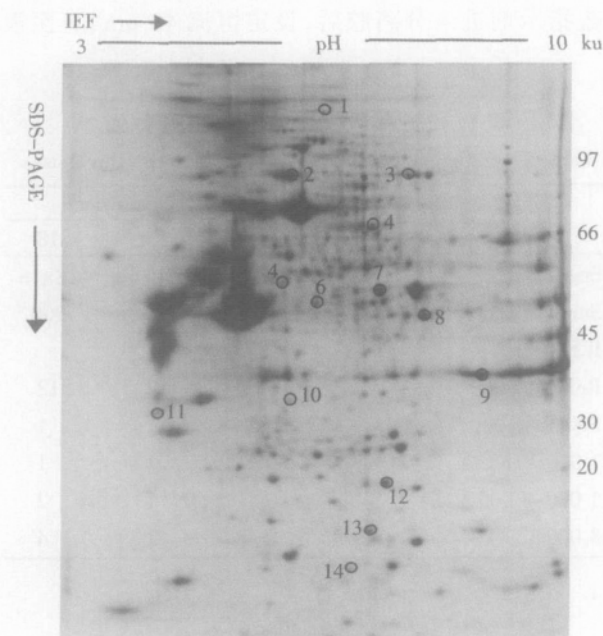


图 1 正常人小梁网蛋白的二维凝胶电泳

Fig.1 2-D gel analysis of normal human trabecular meshwork protein

The proteins were separated on a pH 3-10 nonlinear IPG strip, followed by a 120 g/L SDS-gradient polyacrylamide gel. The gel was stained with Coomassie blue with the size of 13 cm × 16 cm × 0.1 cm. The spots marked with cycle were chosen to be identified by MALDI-TOF-MS.

表 2 双向电泳凝胶上经 MALDI-TOF-MS 鉴定的蛋白质点

Table 2 The spots identified by MALDI-TOF-MS

Spot number	Cl code	PI	Molecular mass(ku)	Coverage (%)	Measured peptides	Matched peptides
1	309533	5.7	116.79	11	15	8
2	4504165	5.9	86.08	17	19	10
3	5304852	7.2	84.78	30	25	15
4	5031875	6.4	65.17	29	25	13
5	10645186	4.8	76.86	14	8	6
6	21903482	8.9	48.60	27	13	8
7	4503571	7.0	47.49	45	23	18
8	21536288	6.8	43.31	33	20	12
9	13097099	7.7	38.94	17	19	5
10	2914657	5.3	35.17	16	13	5
11	5803225	4.6	29.33	16	14	5
12	299263	6.5	23.23	35	23	7
13	4503057	6.8	20.14	33	15	6
14	3123283	8.9	22.65	33	15	10

Protein name 1: vinculin; 2: gelsolin isoform; 3: aconitate hydratase, EC 4.2.1.3, citrate hydrolyase; 4: lamin A/C isoform 2, 70 ku lamin, progeria 1; 5: meningioma-expressed antigen 5s splice variant; 6: ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2, (complex III subunit II); 7: enolase1, phosphopyruvate hydratase 1, MYOC promoter-binding protein; 8: muscle creatine kinase, creatine kinase M chain; 9: Annexin A2; 10: annexin Iv; 11: tyrosine 3/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, 14-3-3 epsilon, protein kinase C inhibitor protein-1; 12: beta B2-crystallin [human]; 13: crystallin, alpha B [Homo sapiens]; 14: transgelin (SM22-alpha) (22 ku actin-binding protein)

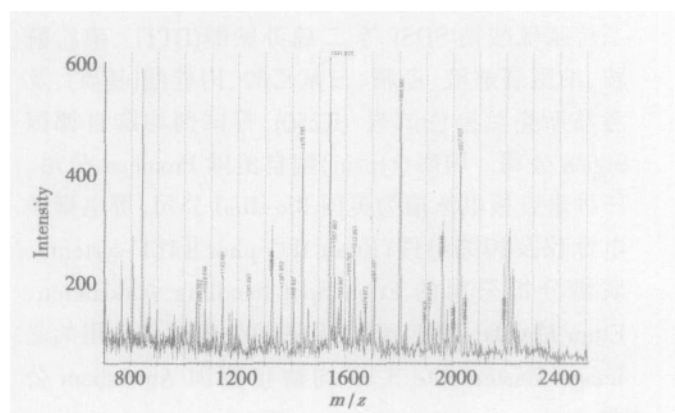


图 2 MALDI-TOF-MS 分析电泳凝胶上 7 号蛋白质点所得的典型肽质量图谱

Fig.2 The peptide mass fingerprinting got by MALDI-TOF-MS of the spot 7

There are 23 good mass spectrum peaks. The search result demonstrate enolase1 (GI 4503571), 18 peptides matched, the coverage is 45%.

该蛋白在凝胶中的位置(分子质量)一致性较好。

### 3 讨 论

随着人类基因组的破译,人们逐渐把目光从基因组学转向蛋白质组学<sup>[2-4]</sup>。蛋白质组学是在人类基因组计划研究发展的基础上形成的新兴学科,旨在识别鉴定细胞、组织或机体全部蛋白质。

二维电泳是蛋白质组学的基础,那么样品处理又是二维电泳的基础,首先组织获取要求解剖位置准确。由于小梁组织似海绵状结构,由一些扁平的、相互联系的、有孔的薄膜或条带构成,取材时需要周围组织为依托。本文预实验中将所取组织进行切片染色,显示包含完整的小梁组织结构。需要说明的是,由于尸体眼中小梁网周围毗邻组织解剖结构不如活体清晰,取材时不可避免地带有小部分巩膜组织:Bhattacharya等<sup>[1]</sup>在小梁网蛋白质研究中也带一小部分巩膜组织无法去除,但这并不影响差异蛋白的发现和鉴定。样本处理的另一个重要方面是蛋白提取。理想状态应使样品中的蛋白完全溶解、解聚、并防止降解和丢失。由于生物样本千差万别,研究角度不同,对样本选择、蛋白提取的要求也有所不同,蛋白提取最佳方案通常需要多次实验来摸索。为减少蛋白降解和丢失,本实验取材在冰浴环境下进行,获取样本后立即于-80℃深低温保存。提取蛋白时,去除蛋白以外的如脂质、盐、去污剂、核酸等干扰性成分是成功进行二维电泳的关键。因为这些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。凝胶染色是二维电泳的一个重要步骤,直接关系到蛋白点的定量准确性和可重复性。有人就目前几种有效的荧光染色方法[SyproRuby(SR)染色,Deep Purple(DP)染色和5-hexadecanoylamino-fluorescein(C16-F)染色]、考马斯亮蓝染色(CCB)和银染色方法(SN)做过比较<sup>[9,10]</sup>,发现就同样蛋白量,能分离可见蛋白点数SR>DP>SN>C16-F>CCB。目前各种染色试剂业被商业化做成试剂盒,从而避免试剂污染,保证了条件的重复性。

二维电泳是目前分离组织、细胞蛋白质最有效的手段,由O'Farrell<sup>[4]</sup>于1975年首先建立并发展,基于蛋白质电荷和分组质量的不同,用二维电泳的方法来分离蛋白质比传统的一向聚丙烯酰胺

凝胶电泳(SDS-PAGE)更能精确而有效地分离和分析生物大分子蛋白质,现能达到在一张凝胶上分辨出最多近4000个蛋白质斑点<sup>[7]</sup>。而目前文献中一张胶平均能分离1000~3000个蛋白点<sup>[8]</sup>,本实验18cm×16cm凝胶所分离的蛋白点数约为1213个,与文献中吻合。二维电泳的高通量、高灵敏度、可重复性是现代蛋白质学研究所要求的。目前商品化的各种长度及不同pH梯度的IPG胶条,不同规格的垂直平板电泳仪使之成为可能。本实验分别用长度为7、13、18cm的IPG胶条及对应的板胶对人眼小梁组织进行二维电泳分离,上样量分别为150、600、900μg,在7cm×8cm、13cm×16cm、18cm×16cm凝胶上所见蛋白质斑点分别约为230个、875个、1213个,这说明我们可以通过加大IPG胶条长度,加大上样量,从而在一定程度上避免一些高丰度蛋白组分的背景干扰,发现那些低丰度蛋白。

当然我们还应看到目前二维电泳能分离的蛋白质斑点数一般在1000~3000个之间,远比估计的组织或细胞中总蛋白少。这是因为二维电泳方法本身存在着一些不足:如低丰度蛋白得不到检测,部分蛋白(如膜蛋白)不溶于样品缓冲液,低分子量(<10ku)、高分子量(>200ku)蛋白、极端酸性和极端碱性蛋白在处理及电泳过程中丢失<sup>[11]</sup>。增加上样量、可选用特定pH范围的IPG胶条、优化二维电泳的实验条件等在一定程度上能弥补这些不足。

本实验成功建立对小梁组织进行蛋白样品处理及二维凝胶电泳的条件和方法,经过反复实验及优化实验条件,如样品处理、蛋白上样量、等电聚焦电泳实验参数、染色方法、图像扫描分析设定参数等,获得正常人眼小梁组织不同大小二维凝胶电泳蛋白谱图。同时本文应用质谱肽指纹图谱分析初步鉴定了部分蛋白质斑点。肽质量指纹图谱鉴定蛋白质需要多种数据结合,因数据库资料的限制、存在物种差异、蛋白质的修饰变化及研究者的经验等,所鉴定的蛋白质实际值和数据库理论值不一定完全相符。本文图中蛋白斑点所对应的位置和表中所标明的蛋白质等电点及相对分子质量的理论值基本吻合。从所鉴定的蛋白质来看,为一些代谢相关酶类、基质及细胞骨架蛋白。这些蛋白都与小梁组织生理功能密切相关<sup>[12,13]</sup>。大量研究表明<sup>[14-16]</sup>,小梁细胞参与细胞外基质的合成、分

泌和代谢过程,小梁细胞通过吞噬作用清除小梁网上的细胞碎片、生物大分子物质和色素颗粒等,以保持房水流出道的通畅,而小梁细胞的吞噬功能有赖于细胞骨架的正常。只有对人眼小梁网组织中的蛋白质组的直接分析,并进一步构建正常人眼小梁组织及青光眼患者小梁组织蛋白表达数据库才有可能全面掌握 POAG 时的分子机制<sup>[17]</sup>。本文在技术方法的探索及所获得的正常人小梁蛋白质二维凝胶图谱,为下一步研究打下基础。随着研究技术改进,数据库更新,人眼正常小梁组织蛋白表达谱必将进一步完善。

#### 参考文献:

- [1] BHATTACHARYA S K, ROCKWOOD E J, SMITH S D, et al. Proteomics reveal cochlin deposits associated with glaucomatous trabecular meshwork[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(7):6080- 6084.
- [2] WASINGER V C, CORDWELL S J, CERPA- POLJAK A, et al. Progress with gene- product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(7):1090- 1094.
- [3] 郭佳岩, 高友鹤, 崔莲仙. 蛋白质组学技术在人体简单系统蛋白质全谱检测的应用[J]. *基础医学与临床*, 2003, 23(2):136- 140.
- [4] O'FARRELL P H. High resolution two- dimensional electrophoresis of proteins[J]. *J Biol Chem*, 1975, 50(10):4007- 4021.
- [5] OBAZAWA M, MASHIMA Y, SANUKE N, et al. Analysis of porcine optineurin and myocilin expression in trabecular meshwork cells and astrocytes from optic nerve head[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(8): 2652- 2659.
- [6] 江培洲, 甘明, 黄华, 等. 运用蛋白质组学技术研究 EB 病毒诱导鼻咽癌细胞 CNE2 表达变化的蛋白质[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(1):29- 33.
- [7] YAMANE K, MINAMOTO A, YAMASHITA H, et al. Proteome analysis of human vitreous proteins vitreous samples [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2 (11):1177- 1187.
- [8] FOUNTOULAKIS M. Application of proteomics technologies in the investigation of the brain [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2004, 23(4):231- 258.
- [9] SMEJKAL G B, ROBINSON M H, LAZAREWV A. Comparison of fluorescent stains: relative photostability and differential staining of proteins in two- dimensional gels[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(15):2511- 2519.
- [10] CHEVALIER F, ROFIDAL V, VANOVA P, et al. Proteomic capacity of recent fluorescent dyes for protein staining[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(11):1499- 1506.
- [11] 司英健. 蛋白质组学研究的内容、方法及意义[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2003, 24 (3):167- 168.
- [12] TIAN B, GEIGER B, EPSTEIN D L, et al. Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(3):619- 623.
- [13] LI A F, TANE N, ROY S. Fibronectin overexpression inhibits trabecular meshwork cell monolayer permeability[J]. *Mol Vis*, 2004, 10(10): 750- 757.
- [14] YUE BY. The extracellular matrix and its modulation in the trabecular meshwork [J]. *Surv Ophthalmol*, 1996, 40(5):379- 390.
- [15] ZHOU L, ZHANG S R, YUE B Y. Adhesion of human trabecular meshwork cells to extracellular matrix proteins [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37(1): 104- 113.
- [16] LA ROSA F A, LEE D A. Collagen degradation in glaucoma: will it gain a therapeutic value?[J]. *Current Opin Ophthalmol*, 2000, 11(2):90- 93.
- [17] STEELY H T, DILLOW GW, BIAN L, et al. Protein expression in a transformed trabecular meshwork cell line: proteome analysis[J]. *Mol Vis*, 2006, 12(4):372- 383.

(编辑 刘清海)