

大鼠附睾蛋白质组的提取和二维液相色谱分离^{*}刘芙君^{1,2} 李建远¹ 王培林² 张成林¹ 王海燕¹ 王修海²

(1. 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院中心实验室 烟台, 山东 264000)

(2. 青岛大学医学院生物学教研室 青岛, 山东 266021)

摘要 背景与目的: 提取大鼠附睾液蛋白并建立一种利用二维液相色谱法分离附睾蛋白组的方法。方法: 分离提取大鼠附睾液蛋白, 样品利用起始缓冲液置换后, 进行一维色谱聚焦分离, 然后收集 pH8.5-4.0 之间的组份进行二维反相高压液相色谱分离, 最后将获得的二维 UV 图通过 ProteoVue 软件转换成 PI/UV 图谱。结果: 成功提取了附睾液蛋白, 并通过二维液相色谱成功建立了大鼠头体尾部附睾液蛋白的二维 PI/UV 图谱, 收集了一维色谱聚焦分离的 pH8.5-4.0 区间的 20 个组份, 并将每个组份进行二维色谱分离后转换为 PI/UV 图谱。结论: 为进一步全面研究附睾蛋白功能和体液差异蛋白质组研究打下了基础。

关键词: 蛋白质组; 二维液相色谱分离; 附睾蛋白质

Extraction and two-dimensional liquid chromatographic fractionation of rat epididymal fluid proteins

LIU Fu-jun^{1,2}, LI Jian-yuan¹, WANG Pei-lin², ZHANG Cheng-lin¹, WANG Hai-yan¹, WANG Xiu-hai²

1. Central Laboratory, Affiliated Yuhuangding Hospital of Qingdao University, Yantai, Shandong, 264000, China

2. Department of Medical Genetics, Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266021, China

ABSTRACT Background and Objective: To extract rat epididymal fluid proteins and develop an approach for fractionating the proteins by two dimensional liquid chromatography. **Methods:** The epididymal fluid proteins extracted from three rats were exchanged with start buffer and separated by chromatofocusing in the first dimension, the fractions between pH8.5 and pH4.0 collected from 1D were separated by non-porous silica reverse-phase HPLC. The UV maps were transformed into PI/UV maps by ProteoVue software. **Results:** We successfully extracted epididymal fluid proteins and 20 fractions between pH8.5- pH4.0 were collected, each fraction was separated by 2D and the UV maps were transformed into PI/UV maps. **Conclusion:** Our study laid a foundation for further studies of epididymal fluid proteins and other body fluid Differential Proteome.

Key Words: Proteome; Two dimensional liquid chromatographic fractionation; Epididymal proteins

蛋白质组学研究是生命科学的研究热点和前沿, 自从 1994 年澳大利亚学者 Wilkins 等提出蛋白质组学概念至今十余年间, 蛋白质组学研究取得了快速发展, 蛋白质组学研究的快速发展不断改进, 虽然传统的固相 2D 技术仍是目前蛋白质组分离的主流技术, 但是其具有重复性差, 灵敏度低等缺点, 而逐步发展的二维液相色谱等新型分离技术有补充和取代双向凝胶电泳的趋势^[1-3], 本实验通过利用 Beckman 的 ProteomeLab™ PF2D 系统建立一种大鼠附睾液蛋白的分离方法, 为附睾蛋白质组的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

成年雄性 wistar 大鼠, 100-120 天, 体重 180-200g (山东绿叶制药有限公司提供); 二维液相色谱系统 ProteomeLab™ PF2D 及配套 ProteomeLab™ PF2D 试剂盒购自 Beckman 公司, 试剂盒包括 HPCF 1D 色谱柱 (2.1mm, 250nm), HPRP 2D 无孔硅胶 C18 反相色谱柱 (4.6mm, 33mm), 起始缓冲液 (StartBuffer, SB) 洗脱缓冲液 (EluentBuffer, EB) 和 G25 PD-10 脱盐柱 (Sephadex™ G25); 色谱级纯乙腈, 三氟乙酸 (TFA), 亚甲基乙酸, 甲醇, 异丙醇购自 Sigma 公司, 蛋白酶抑制剂混合物购自

Roche 公司; 系统用水为利用 Milli-Q 制备的 HPLC 级水; BCA 蛋白定量试剂盒 (PIERCE)。

1.2 附睾液的收集及附睾蛋白的提取

将大鼠 (3 只) 利用过量乙醚处死后, 分离出整个附睾, 将其分为头体尾三个部分, 用 PBS (137mM NaCl, 15.4mM KCl, 7.7mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, 0.5mM MgCl₂, 0.5mM CaCl₂, pH 7.4) 冲洗两次, 再将每一部分放入洁净培养皿中剪成小的片段, 加入 PBS 4℃放置 40 分钟, 使附睾液释放到缓冲液中, 然后 12000rpm 离心 5 分钟, 收集上清液, 加入 4 倍冷丙酮, -20℃沉淀 1h, 然后 12000rpm 离心 1h, 弃去上清, 并用冷丙酮洗涤沉淀, 待沉淀充分干燥后利用 10ml 裂解液 (7.5mol/L 尿素, 2.5mol/L 硫脲 12.5% 甘油, 50mmol/L Tris, 2.5% 辛-β-D-吡喃葡萄糖苷, 6.25mmol/L TCEP, 1.25mmol/L 的蛋白酶抑制剂混合物) 溶解沉淀。

1.3 样品的脱盐浓缩

利用 25ml 起始缓冲液 SB 平衡脱盐柱 PD-10, 弃去洗脱液, 加入 2.5ml 样品, 再用 SB 洗脱并收集前 3.5ml 洗脱液, 通过 BCA 试剂盒测定收集蛋白的浓度。

1.4 一维色谱聚焦分离

分离条件: 利用 HPCF 1D 色谱柱, 流动相 A1-A4 分别为 SB (pH8.5), EB (pH4.0), 1mol/L NaCl 和 HPLC 级水, 所有溶液在实验前通过 0.2μm 滤膜过滤并超声 10min, 设定流速为 0.

* 作者简介: 刘芙君 (1978-), 男, 在读硕士, 医学遗传学专业, 导师王培林教授

联系方式: 山东烟台毓璜顶医院中心实验室 E-mail: lfjt@sina.com

(收稿日期: 2006-02-16 接受日期: 2006-03-10)

2ml/min, 检测波长为 280nm(室温下进行), 流动相 pH 由系统 pH 计在线检测, 并在每次运行前利用 pH 标准液(pH4.0, pH7.0, pH10.0)校正。

分离程序: 由仪器自带的 32Karat 软件控制自动运行, 首先以 30 倍柱体积(Column Volume, CV)的 SB 平衡柱子, 然后由进样器进样 2ml 样品, 用 SB 洗脱 20min, 再用 EB 洗脱 55min, pH 值开始下降时, 每间隔 0.3 个 pH 单元收集 1 份样品, 每个样品最多收集 5min, 共收集样品 20 份。当流出液的 pH 为 4.0 时, 用 10CV 的 1mol/L NaCl 和水依次洗脱柱子。

1.5 二维反相色谱分离

分离条件: 利用 HPRP 2D 色谱柱, 流动相 A 为 0.1% TFA 水溶液, 流动相 B 为 0.08% TFA 乙腈溶液, 实验前超声 10min, 设定流速为 0.75ml/min, 检测波长为 214nm, 50℃ 恒温下进行洗脱分离。分离程序: 由 32Karat 软件控制自动运行, 首先以 5CV 的流动相 B 和 10CV 的流动相 A 平衡柱子后, 将一维分离的 pH 值在 8.5-4.0 之间的组份分别以 0%-100% 梯度的流动相 B 在 30min 内进行二维分离。

2 结果

本实验成功的收集了大鼠附睾液, 并获得了足够上样量的蛋白, 样品经 SDS-PAGE 电泳观察到在头体尾部均存在相同的高丰度蛋白条带, 样品经二维液相色谱得到了有效的分离。

附睾液蛋白质通过一维色谱聚焦分离, 收集了 pH 在 8.5 到 4.0 之间的组份, 头体尾部各获得 20 个组份, 并且通过一维显示主要吸收峰出现在 pH6.5- pH4.5 之间(图 1)。将一维获得的组份分别通过二维反相色谱在流动相(0.08% 乙腈)0%-100% 的洗脱梯度下进行二维分离, 最后将得到的二维信息通过仪器自带的 Proteovue 软件转换成直观的高分辨彩色二维蛋白质组图谱(PI/UV), 每一条带代表一个吸收峰, 条带颜色深浅代表峰面积大小(图 2)。

3 讨论

本实验成功的获得了大鼠附睾液成分, 消除了精子蛋白和血液等成分的污染, 降低了附睾蛋白分析的复杂性, 为二维液相色谱分离提供了基础。

通过对获得的附睾液成分进行一维等电聚焦分离和收集组份的二维反相色谱分离, 我们获得了大鼠附睾液蛋白质组的 PI/UV 二维图谱, 对进一步研究附睾蛋白组和其它体液蛋白组有着特殊的意义。传统的固相 2D 技术仍然是目前蛋白质组学研究主流的分选技术, 但是其有着重复性差, 灵敏度低, 难以检测低丰度蛋白, 不利于质谱鉴定等技术瓶颈, 而不断发展的二维或多维高压液相色谱分离技术有着补充和逐步取代传统凝胶电泳的趋势。我们使用的 Beckman 的 Proteome-LabTM PF2D 系统体现了现在二维液相色谱分离的优势: (1) 上样量为 2ng-5mg, 为传统凝胶电泳的 10 倍, 灵敏度高, 有利于低丰度蛋白质的检测; (2) 重复性好; (3) 自动化程度高, 所有分离收集过程有系统自动操作; (4) 分辨率高, 可以根据样品特点改变一维、二维洗脱条件提高分辨率; (5) 与质谱兼容性好, 可以实现在线连用; (6) 通过馏分收集器可方便的收集溶液状态下的馏分; (7) 自带软件分析直观方便, 通过 Proteovue 软件将二维 UV 图转换成直观的 PI/UV 图谱, 然后通过 DeltaVue 软件可比较两个样品的二维图谱差异, 并自动生成第三幅图谱展示差异峰图^[4-6]。因而二维液相色谱是差异蛋白质组特别是体液蛋白质组学研究的有效手段之一。

睾丸中产生的精子从其形态结构和染色质角度看已基本成熟, 但还不具备运动和精卵结合的能力, 只有在进入附睾后循附睾头体尾运行的过程中, 与附睾液成分相互作用, 最终获得成熟^[7-10]。国外已有报道关于一些哺乳动物附睾液成分的蛋白质组学研究^[11-13], 但其分离技术受限于二维凝胶电泳, 本实验利用二维液相色谱成功分离了附睾头体尾部附睾液成分, 为以后我们继续更加深入的研究附睾液蛋白打下了基础。

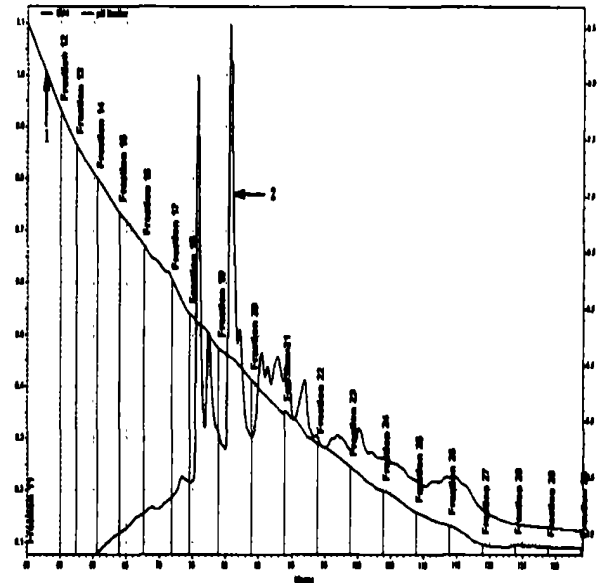


图 1. 大鼠附睾液蛋白(头部)的一维色谱聚焦图谱

1. pH 梯度曲线; 2. 一维色谱图

Fig 1. Chromatofocusing of rat epididymal fluid proteins

1. pH curve; 2. Chromatograph

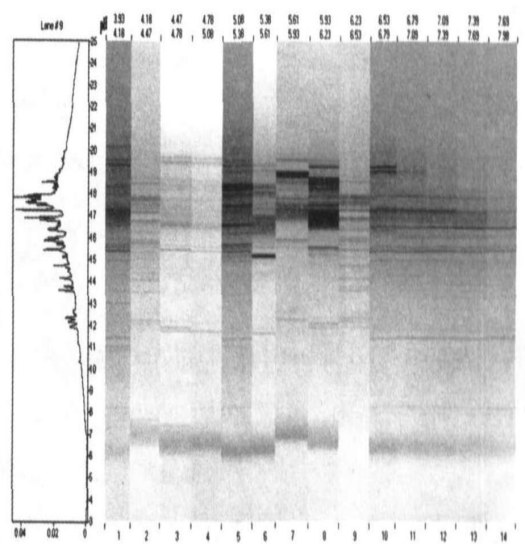


图 2. 大鼠附睾液蛋白质(头部)的二维 PI/UV 图谱

Fig 2. PI/UV map of epididymal fluid proteins

(下转第 35 页)

2.8 相似度评价

采用国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)。该软件具有生成对照图谱的功能,相似度计算方法为夹角余弦法,可支持多点校正。将色谱工作站数据导入中药指纹图谱相似度计算软件,选定以S10(留坝西洋参参根样品)为参照谱,选择保留时间为37.07 min(人参皂苷Re)、60.42 min(人参皂苷Rb1)、63.91和74.26 min的四个峰特征峰为marker峰,进行谱峰匹配,采用夹角余弦算法对各批样品进行整体相似度评价,各样品的相似度依次为:0.421、0.316、0.539、0.218、0.682、0.857、0.855、0.888、0.913、1、0.988、0.888、0.903、0.855、0.888、0.863、0.833、0.833、0.462、0.745、0.532、0.286、0.84、0.832、0.891、0.896、0.861、0.867、0.423、0.861。按照与参根相似度差异,基本可以将西洋参各部位划分为三类:一类成分与根接近,包括芦头、主根(参芯、参皮)、须根,与参根的相似度一般在0.8以上;另一类为叶,与参根的相似度一般在0.3以下;第三类成分与花序接近,包括花序、果实、茎、芽孢,与参根的相似度一般在0.3~0.7。相似度评价与聚类分析结果基本一致,基本反映了西洋参各部位皂苷类成分的差异。

3 讨论

研究发现参根中皂苷类成分的种类和含量分布比较均匀,参须中含量显著高于其它各部分^[10],芦头成分与参根接近,加工时可以保留,参芯中皂苷类成分较参皮略高,可能是由于周皮中含量较低导致。茎叶含量差异较大,实际生产中应加以区别。西洋参叶中人参皂苷含量高,但人参皂苷Rb1较少,人参皂苷Rd较参根高^[11,12],作用异于参根^[13],目前多用于提取皂苷或制作的西洋参含片,但不能代替参根入药。西洋参花序、芽孢、果实等部位产量较低,成分种类和含量与根、叶差异较大,药理性质特殊^[14],应分别收集充分利用。由于用药习惯等因素影响,许多与传统的药材成分接近的其它植物或原植物的其它部位都没有被利用,导致药材原植物的过度开发与浪费。采用指纹图谱技术分析药用植物的不同

部位和近缘植物的化学成分,利用中药相似度评价系统进行相似度分析和SPSS软件聚类分析其差异,可用于筛选化学成分及药理作用相近的代用药材和鉴别药材质量与真伪。对充分开发利用和保护药用植物资源也有重要的意义。

参考文献

- [1] 曹立军,许永华,于淑莲,等.我国西洋参产业发展现状概述[J].人参研究,2002,14(1):36~38
- [2] 邹建伟,杜东娜,李树殿.引种西洋参会不会发生变异[J].人参研究,2001,13(1):8~10
- [3] 苏红文,胡正海.不同年生西洋参的解剖结构及组织化学研究[J].石河子农学院学报,1995,31(3):1~8
- [4] 孟祥颖,李向高,于洋.国产西洋参花蕾化学成分的研究I.人参皂苷的分离、鉴定及含量测定[J].吉林农业大学学报,2000,22(3):1~8
- [5] 丛登立,王丽娟.西洋参茎叶生药学研究[J].吉林农业大学学报,2004,26(5):523~525
- [6] 郑友兰,李向高,鲍建才,等.西洋参芦头化学成分研究[J].中国药学杂志,2005,40(11):815~816
- [7] 刘桂艳.西洋参地上部位化学成分的药理药效学研究概况[J].江苏临床医学杂志,2001,5(5):465~467
- [8] 丁之恩,严平.西洋参果实成分分析及利用价值研究[J].中南林学院学报,1999,12,19(4):48~49
- [9] 鲁歧,孟祥颖,富力,等.国产西洋参化学研究进展[J].人参研究,1995,(4):6~10
- [10] 乔卫,周晶,符敬伟.西洋参侧根及须根的总皂苷含量比较[J].天津药学,2000,11,12(4):83~84
- [11] 许传莲,郑毅男,崔淑玉,等.RP-HPLC法测定西洋参茎叶中6种人参皂苷的含量[J].吉林农业大学学报,2002,24(3):50~52
- [12] Jing-Tian Xie, Sangeeta R. Mehendale, Anbao Wang, Aung H. Hana, Ji An Wua, Joachim Osinski, Chun-Su Yuan. American ginseng leaf: ginsenoside analysis and hypoglycemic activity[J]. Pharmacological Research, 2004,(49):113~117
- [13] 纪凤兰,徐惠波,李延忠,等.西洋参茎叶皂甙药理研究概况[J].特产研究,2000,(1):55~58
- [14] 高燕,杨砚军,宋永贤.西洋参果总皂甙降血脂作用的研究[J].中医函授通讯,1997,8,16(4):39~40

(上接第23页)

参考文献

- [1] Orchard S, Hemjakob H, Apweiler R. Annotating the human proteome[J]. Mol Cell Proteomics, 2005 Apr,4(4):435~440
- [2] Hu Y, Huang X, Chen GY, et al. Recent advances in gel-based proteome profiling techniques[J]. Mol Biotechnol, 2004 Sep,28(1):63~76
- [3] Jamet E. Bioinformatics as a critical prerequisite to transcriptome and proteome studies[J]. J Exp Bot, 2004 Sep,55(405):1977~1979
- [4] Andrea Pirondini, Giovanna Visoli, Aliosha Malcevschi, A 2-D liquid-phase chromatography for proteomic analysis in plant tissues, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed[J]. Life Sci., 2006 Mar 20, 833(1):91~100
- [5] Linke T, Ross AC, Harrison EH. Proteomic analysis of rat plasma by two-dimensional liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2006 Jan 31
- [6] Soldi M, Sarto C, Valsecchi C, et al. Proteome profile of human urine with two-dimensional liquid phase fractionation[J]. Proteomics, 2005 Jul,5(10):2641~2647
- [7] 沈肖方,李建远,王海燕,等.重组人附睾特异表达蛋白ESC42及其生物学鉴定[J].中华男科学杂志,2005,11(2)
- [8] Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. Dacheux. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation[J]. Microsc Res Tech, 2003 May 1, 61(1):7~17
- [9] Gatti JL, Druart X, Syntin P, et al. Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoproteins[J]. Biol Reprod, 2000 Apr,62(4):950~958
- [10] Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa[J]. J Reprod Fertil Suppl, 1998,53:119~136
- [11] Vreeburg JT, Holland MK, Orgebin-Crist MC. Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa in vivo[J]. Biol Reprod, 1992,47(4):588~597
- [12] Syntin, P. et al. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis[J]. Biol Reprod, 1996,55(5):956~974
- [13] Fouchecourt, S., S. Metayer, A. Locatelli, F. Dacheux, and J. L. Dacheux. Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins[J]. Biol Reprod, 2000,62(6):1790~1803