

中国明对虾血浆蛋白质组学研究中高丰度蛋白的超速离心去除技术

王宝杰^{1,2}, 刘梅¹, 蒋克勇¹, 张国范¹, 王雷¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 应用超速离心技术对中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血浆样品进行处理, 比较去除和未去除高丰度蛋白血浆的双向凝胶电泳 (2-DE) 图谱。结果表明: 对虾血浆高丰度蛋白经去除后, 血浆样品中的低丰度蛋白得到较好的分离和浓缩。未处理样品的 2-DE 图谱分离的蛋白质 170 个, 而去除高丰度蛋白后血浆 2-DE 图谱上分辨率增高, 分离出蛋白质点 520 个, 一些低丰度蛋白质被有效分离出来。研究证实, 超速离心技术可有效去除对虾血浆高丰度蛋白 (血蓝蛋白), 提高低丰度蛋白的检出敏感性, 为对虾等甲壳动物的血浆蛋白质组学研究提供了基础保障。[中国水产科学, 2010, 17 (4): 695–700]

关键词: 中国明对虾; 血浆; 蛋白质组; 双向电泳; 高丰度蛋白去除; 血蓝蛋白; 超速离心

中图分类号: Q959; S91

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2010)04–0695–06

血浆蛋白质是甲壳动物血淋巴的重要成分, 在维持内环境稳定、承担物质的运输、免疫防御、凝血以及抗凝血等方面具有重要的作用^[1–2]。对虾等甲壳动物的血淋巴中血蓝蛋白是最主要的高丰度蛋白, 主要以高分子量的寡聚体蛋白存在, 占血淋巴总蛋白含量的 90% 以上^[3]。对虾血浆中血蓝蛋白含量过高, 导致血蓝蛋白在双向凝胶电泳图谱上分子量介于 65~80 kD 之间和等电点介于 3~10 之间弥漫, 掩盖了许多低丰度蛋白^[4]。血浆中最高和最低丰度蛋白的浓度相差在 10 个数量级以上, 对于目前以双向凝胶电泳作为常规技术手段的蛋白质组学研究而言, 由于高丰度蛋白的存在, 使得低丰度蛋白质的分辨率下降, 影响 2-DE 的分离效果, 进一步影响蛋白质质谱的分析鉴定, 这也是目前对虾等甲壳动物蛋白质组学研究缓步不前的重要原因之一。

目前有关对虾等甲壳动物血浆高丰度蛋白的去除技术几乎未见报道, 鉴此, 本研究应用超速离心技术建立中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血浆高

丰度蛋白—血蓝蛋白的去除方法, 比较去除前后对虾血浆 2-DE 图谱的差异以判断去除的效果, 以期建立起稳定、可靠、高效的血浆高丰度蛋白去除方法, 为推进对虾等甲壳动物血浆蛋白质组学研究的进展奠定基础 and 提供有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 固相 pH 梯度干胶条 IPG strip (GE 公司产品, 线性 pH4~7, 18 cm)。CHAPS、DTT、TBP、尿素、硫脲、碘乙酰胺、丙烯酰胺、甲双丙烯酰胺、TEMED、APS、Tris、甘氨酸和 SDS 均为 Bio-Rad 公司产品。Protease inhibitor cocktail 为 Roche 公司产品。Hitrap Desalting 脱盐柱 (5 mL) 为 GE 公司产品。其他试剂均使用国产分析纯试剂。所有溶液均用 MilliQ 超纯水配制。

1.1.2 主要仪器 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司产品); 制备型超速冷冻离心机, Optima™ XL-

收稿日期: 2010-04-06; 修订日期: 2010-04-30.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30600458).

作者简介: 王宝杰 (1976-), 男, 助研, 博士研究生. E-mail: wangbaojie@ms.qdio.ac.cn

通讯作者: 王雷, 研究员, 博士. E-mail: wanglei@ms.qdio.ac.cn

80K(美国Beckman Coulter); PowerWave XS微孔板酶标仪(美国BioTek公司); Ettan IPGphor 3, SE600 Ruby标准垂直电泳系统,冷却水循环系统、AKTA Purifier蛋白纯化仪(GE公司产品); 纯水装置(Millipore公司产品)。

1.1.3 实验动物与样品采集 本实验动物为中国明对虾,体长(13.5 ± 0.5)cm,购自青岛即墨田横对虾养殖场。对虾购入后蓄养于中科院海洋研究所水族楼室内的PVC水槽中,环境条件为室温($20 \sim 22^\circ\text{C}$)、养殖海水盐度为30、自然光周期。实验前暂养7 d左右使其适应室内养殖环境。

用于取血的中国明对虾均处于褪皮间期,表观健康。用盛有预冷抗凝剂的注射器从对虾第一腹节的血窦,按照1:1(V/V)比例采血,新鲜收集的对虾血淋巴以800 g于 4°C 下离心10 min,以沉淀除去血细胞,收集上清液,得到无细胞的血浆(Plasma); 分装保存于 -70°C 冰柜。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质样品的制备

(1) 高丰度蛋白(血蓝蛋白)的超速离心去除方法。将离心管加满对虾血浆,排出离心管中的气泡,平衡后加盖密闭,小心放入Ti 80角转子,置于制备型超速冷冻离心机中,选用慢加速工作程序,加速和减速时间均控制在45 min, 4°C ,50 000 r/min,分别离心2 h、4 h、6 h。离心结束后,取出离心管,小心移出上清液,分别将测定蛋白浓度与离心前的对虾血浆蛋白浓度对比,收集上清液进行下面的操作,将沉淀以适量缓冲液溶解并以Native-PAGE(5%)进行分析^[5]。

(2) 脱盐处理。分别将对虾血浆和去除高丰度蛋白后血浆(超速离心后上清液)经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜(Millipore)过滤,以Hitrap Desalting色谱柱脱盐后冷冻干燥保存备用或直接用于双向电泳。

(3) 蛋白质的定量。蛋白定量采用Bradford法,在波长595 nm条件下,用标准牛血清白蛋白绘制标准曲线,对制备样品蛋白溶液定量。

1.2.2 对虾血浆样品的双向电泳 参照IPGphor等电聚焦系统指南和Gorg等^[6]的方法加以改进,每组

3个重复。

(1) 主动泡胀: 所用胶条长度为18 cm(pH 4~7),分别取150 μg 处理后的对虾血浆与未去除高丰度蛋白的血浆分别加水化上样缓冲液(尿素7 mol/L、硫脲2 mol/L、CHAPS 4% (w/v)、两性电解质1% (v/v)、DTT 10 mmol/L,电解质和DTT临用时加)至350 μL ,混匀,均匀加入聚焦盘,撕开干胶条的保护膜,胶面朝下覆盖在混合液上,1 h后用2~3 mL矿物油覆盖胶条,室温下给胶条两端加一较小的恒压(50 V)主动泡胀13 h。

(2) 等电聚焦电泳: 按仪器操作说明书操作,电泳参数设置为: 200 V 30~60 min 快速,250 V 30~60 min 快速,500 V 30~60 min 快速,1 000 V 30~60 min 快速,3 000 V 2 h 快速,8 000 V 2 h线性,8 000 V快速补齐至8 000 V h。

(3) 平衡: 等电聚焦电泳结束后,IPG胶条立即分别在平衡液A(Tris-base 50 mol/L、尿素6 mol/L、甘油30%、SDS 2%、溴酚蓝0.002%和DTT 100 mg)和平衡液B(成分同平衡液1,用400 mg碘乙酰胺代替100 mg DTT)中缓慢摇荡平衡15 min。

(4) 二向SDS-PAGE电泳: 常规操作,条件为12 mA/胶30 min,24 mA/胶至溴酚蓝线达胶底线。

1.2.3 凝胶染色 采用银染法对2-DE凝胶进行染色,银染过程在室温下振荡下进行。凝胶在固定液(40%乙醇,10%乙酸)中固定1 h,水洗20 min 2次,5%戊二醛浸泡1 h,水洗40 min 4次,银氨液温育30 min,显影液((50 mg/L柠檬酸,0.8 mL 36%甲醛)显影至背景出现,5%乙酸定影15 min。

1.2.4 凝胶图像分析 选择染色较好的2-DE图谱进行分析,凝胶通过UMAX PowerLook 1100投射扫描仪进行扫描获取2-DE凝胶图像,PDQuest软件分析比较扫描图谱。

2 结果与分析

2.1 不同时间超速离心对上清液蛋白质浓度的对比及沉淀的Native-PAGE分析

本研究首先对超速离心不同时间后的对虾血浆

上清液进行了蛋白浓度测定,结果发现,未离心的对虾血浆的蛋白质量浓度为27.17 mg/mL,超速离心2 h、4 h、6 h的上清液的蛋白质量浓度分别为13.81 mg/mL、2.40 mg/mL、2.02 mg/mL。说明在4 h超速离心后,基本能将大部分血蓝蛋白沉淀下来,离心时间的延长对沉淀的蛋白量无显著变化。进一步将超速离心后的蛋白沉淀以Native-PAGE(5%)分析,如图1所示,泳道1为未离心的对虾血浆,泳道2、3、4分别为离心2 h、4 h、6 h后的蛋白沉淀,可以看出超速离心2 h后能将大部分的十二聚体(12mers)等更高的多聚体血蓝蛋白沉淀下来,而六聚体(6mers)血蓝蛋白仍有很多未离心沉淀下来;超速离心4 h后,基本已经能将大部分的多聚体血蓝蛋白都沉淀下来,而继续延长离心时间至6 h,有可能将较低分子量的蛋白除掉。综上,选择超速离心4 h后的上清液用于后续的2-DE分析。

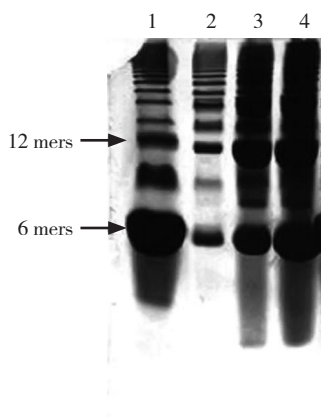


图1 超速离心2 h、4 h、6 h后蛋白沉淀的Native-PAGE分析
Fig. 1 Native-PAGE analysis of protein pellet after 2 h, 4 h and 6 h ultracentrifuge

2.2 高丰度蛋白去除前后对虾血浆的2-DE图谱比较

用PDQuest软件分析扫描后的2-DE凝胶图谱(图2),在未去除高丰度蛋白的对虾血浆凝胶图谱上共检测到170个蛋白质点(图2 GEL 1);超速离心去除高丰度蛋白后的对虾血浆共检测到520个蛋白质点(图2 GEL 2)。对虾血浆中高丰度蛋白(主要是大分子量的血蓝蛋白)去除效果明显,2-DE上蛋白质点数明显增多,背景清晰,相同区域内低丰度蛋白质分辨率也明显增加。

2.3 高丰度蛋白去除前后对虾血浆的2-DE图谱的差异分析

比较分析发现两者的2-DE图谱在不同区域内存在着显著差异。本研究选取了3个区域进行了差异分析,图2 A、B、C 3个区域分别为软件分析的未去除高丰度蛋白的中国对虾血浆和超速离心去除高丰度蛋白的中国对虾血浆的2-DE图谱差异蛋白质点的局部放大图和3D视图。从软件的分析结果可以明显看出,超速离心去除高丰度蛋白后可以明显改善2-DE图谱,在同样的上样量条件下,在局部区域不仅得到了更多的蛋白质点,而且一些原有的蛋白点丰度明显增加。

3 讨论

甲壳类动物的呼吸蛋白为血蓝蛋白,是一种含铜蛋白,脱氧状态为无色,结合氧的状态为蓝色,为甲壳类动物血淋巴中含量最丰富的蛋白质,占到血淋巴蛋白质含量的90%~95%。血蓝蛋白每个单体(由一条多肽链构成)含有600~660个氨基酸残基,分子量为75 kD左右,6个单体(由基因重复产生)在四级结构上联合组成3-3(分子量约为 4.5×10^5)或以六聚体为单位再组成复合六聚体(即整数倍的六聚体)。甲壳动物血蓝蛋白的基本结构为六个亚基组成的六聚体(1×6 mers)构型,2、4、6或8个六聚体可进一步结合成为原血蓝蛋白复合体(native hemocyanin complex),这些大分子的分子量为450~3 900 kD,会依据生物种类不同而有差异。甲壳类动物血淋巴中最主要的原血蓝蛋白复合体为六聚体与十二聚体,其沉降系数分别为16S与24S^[7]。

血浆蛋白的性质具有很大的动态范围(dynamic range)。首先不同血浆蛋白的表达丰度相差很大,同一种血浆蛋白在不同生理和病理条件下浓度变化也很大。血浆蛋白质组含量差异大,也就是血浆动态范围很大。高丰度蛋白浓度达mg/mL级,低丰度蛋白如一些细胞因子等可在ng/mL,甚至pg/mL^[8]。高丰度蛋白对低丰度蛋白影响较大,在双向凝胶电泳图谱中可以干扰低丰度蛋白的表达和鉴别。因此如

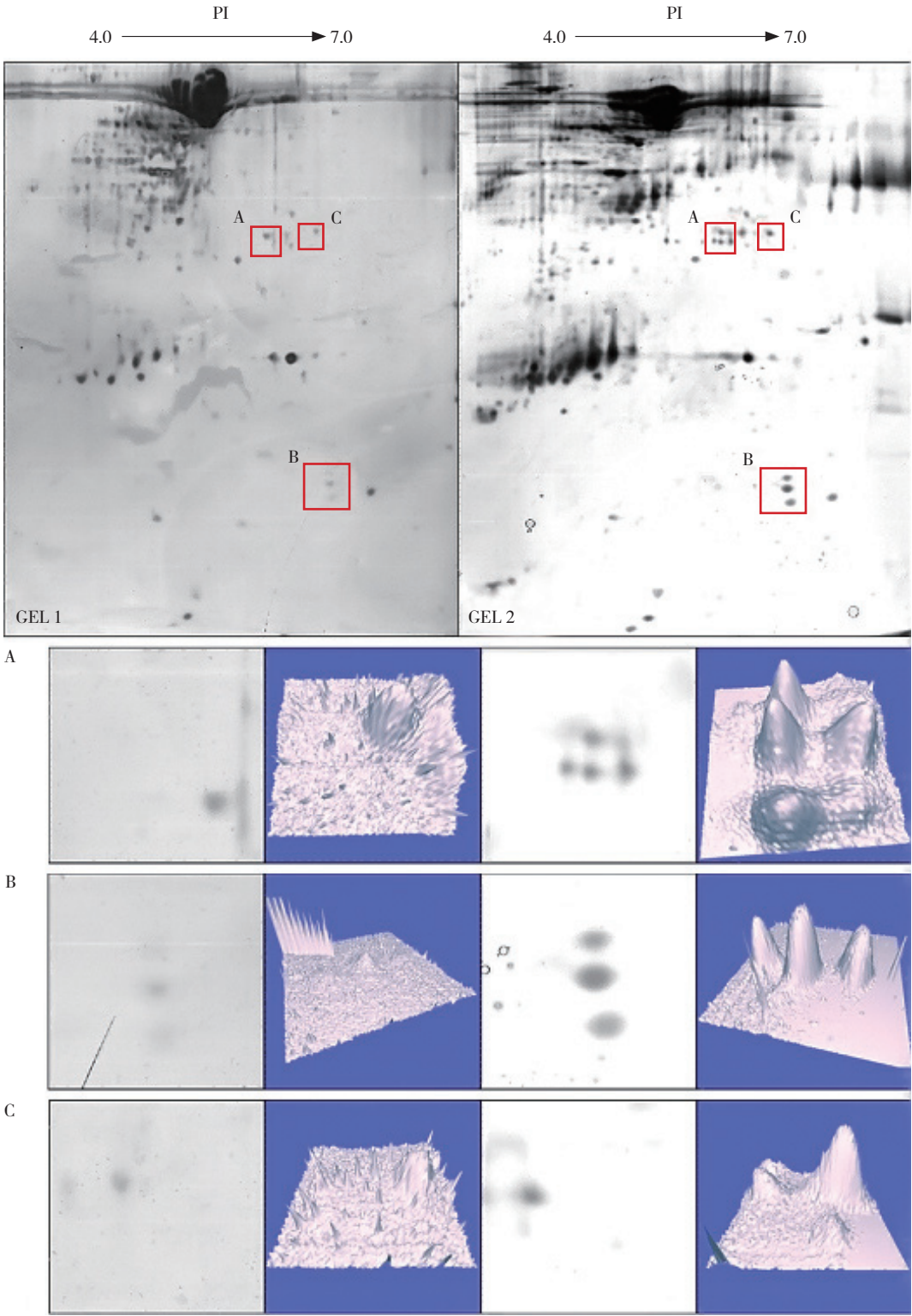


图2 中国明对虾血浆对照组 (GEL 1) 与超速离心去除高丰度蛋白组 (GEL 2) 的2-DE图谱
A、B、C 分别为两组凝胶图谱上对应位置的局部放大图及三维模式图
Fig. 2 Comparison of nondepleted (Gel 1) and depleted (Gel 2) plasma of *F. chinensis* by 2-DE
A, B and C are 2-DE local map and 3-D model through PDQuest software.

何尽量避免或减少高丰度蛋白的影响,提高低丰度蛋白的分辨率是目前血浆蛋白质组学的一个主要技术难点。

对于对虾等甲壳动物而言,血蓝蛋白是一种非常重要的多功能蛋白,然而对于进行对虾血浆双向电泳等蛋白质组学研究而言,血蓝蛋白则是令人非常头疼的干扰物质。由于大部分蛋白质,包括一些具有意义的生物标志物,往往是低丰度蛋白,用少量标本进行蛋白质组学分析时,由于高丰度蛋白的遮蔽,使一些低丰度蛋白点不易被发现,因此,如何尽量避免或减少高丰度蛋白(血蓝蛋白)的影响,提高低丰度蛋白的分辨率是目前甲壳动物血浆蛋白质组学的一个主要技术难点。目前在人类等哺乳动物血浆的高丰度蛋白去除技术中,已有多种商业化的简易工具,例如ProteoExtract[®]高丰富蛋白去除试剂盒(Merck)、ProteoPrep血清高丰度蛋白去除试剂盒(Sigma)等^[9],使得进行血浆蛋白的前处理较为简便,这些产品多是基于抗体技术的免疫亲和吸附法,利用抗体对高丰度蛋白的特异性吸附去除大部分的高丰度蛋白。但是由于研究基础薄弱,目前在对虾等甲壳动物的蛋白质组学研究中没有可以利用的商品化试剂盒,所以研究对虾等甲壳动物的血浆高丰度蛋白去除技术是进行对虾蛋白质组学研究必须要解决的技术瓶颈。

根据对虾等甲壳类动物血淋巴中最主要的原血蓝蛋白复合体为六聚体(450 kD)与十二聚体(900 kD)这一性质,本研究采用了超速离心方法来去除血淋巴中的血蓝蛋白。超速离心是生物化学和分子生物学不可缺少的技术手段。广泛应用于大分子、细胞、细胞器的分离纯化。已有的研究表明,超速离心技术经常用于甲壳动物血蓝蛋白的粗分离^[10]。在本研究中,在50 000 r/min的转速下离心4 h,发现绝大部分的血蓝蛋白都会被沉淀下来,在离心管的底部形成蓝色沉淀,上清液变的无色澄清。结果显示,在不增加上样量的情况下,未经处理的血浆的2-DE图谱中高丰度蛋白聚集成片,能够显示的蛋白质点只有170个,但是经过超速离心去除血蓝

蛋白之后的蛋白图谱,共检测到520个蛋白质点,相同区域内低丰度蛋白质分辨率明显增加,点数明显增多。在去除高丰度蛋白后的对虾血浆2-DE图谱上有蛋白拖尾的现象,可能是由于脱盐不彻底所致。因此,这是一种稳定、可靠的对虾血浆高丰度蛋白去除方法。因为对虾等甲壳动物的血浆具有一定的相似性,在其他甲壳动物也可以应用该方法对血浆高丰度蛋白进行去除。通过研究建立了对虾等甲壳动物血浆样品中高丰度蛋白的去除技术,初步解决了分析样品中的高丰度蛋白影响蛋白质表达谱分析的重要障碍和技术瓶颈,为甲壳动物血淋巴的蛋白质组研究提供了可靠的技术手段。

但是本方法也存在一定的不足,因为离心管容量较大(12.5 mL/只),无法对微量血浆样品进行处理。下一步的研究中将应用、比较其他的对虾血浆高丰度蛋白去除方法(如免疫亲和吸附法),以提高特异性,开发更加方便、快捷、简单实用的对虾血浆高丰度蛋白去除方法。

参考文献:

- [1] 王雷,李光友,毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼,1995,26(2): 179-185.
- [2] Theopold U O, Soderhall S K., et al. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing [J]. Trends Immunol,2004,25(6): 289-294.
- [3] Beltramini M N, Giomi C F. Quaternary structure and functional properties of *Penaeus monodon* hemocyanin [J]. Febs Journal,2005,272(8): 2060-2075.
- [4] 黄冰心,蒋昊,张继泉,等. SDS-PAGE 与液质联用技术分离和鉴定中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血浆蛋白[J]. 海洋与湖沼,2009,40(2): 208-213.
- [5] Markl J A, Bauer H G. Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: II. Crustacea [J]. J Compar Phys B: Bioch Systemic Envir Phys,1979,133(3): 167-175.
- [6] Gorg A C, Boguth O G. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis,2000. 21(6): 1037-1053.
- [7] Garcia-Carreno FL, Cota K, MAN, Del Toro. Phenoloxidase activity

- of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*: Conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis [J]. J Agr Food Chem, 2008, 56 (15): 6454–6459.
- [8] 罗小云, 吴庆华. 双向凝胶电泳在临床血浆蛋白质组学研究中的技术难点和解决方法[J]. 北京生物医学工程, 2006, 25 (4): 434–436.
- [9] 张雪群, 姜颖, 厉有名, 等. 人血浆低丰度蛋白富集方法的研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29 (10): 947–950.
- [10] Figueroa Soto CG, delaBarca A MC, VazquezMoreno L, et al. Purification of hemocyanin from white shrimp (*Penaeus vannamei* Boone) by immobilized metal affinity chromatography [J]. Comp Biochem Phys B: Biochem Mol Biol, 1997, 117 (2): 203–208.

Depletion of high-abundance plasma proteins from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* for proteomics analysis by ultracentrifugation

WANG Baojie^{1,2}, LIU Mei¹, JIANG Keyong¹, ZHANG Guofan¹, WANG Lei¹

Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: To establish the method for removing high-abundance proteins in shrimp plasma proteomics analysis, depletion of plasma high-abundance proteins, such as hemocyanins, was practiced by ultracentrifugation. The efficiency of the method was assessed by 2-DE. The ultracentrifuge method for removing plasma high-abundance proteins was established to remove most hemocyanins. The proteins spots of 2-DE map were more clear and some low-abundance proteins were visualization after ultracentrifugation. The established methods for high-abundance depletion can be effectively applied in shrimp and other crustaceans plasma proteomic study. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (4): 695–700]

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; plasma; proteomics; 2-DE; high abundance proteins depletion; hemocyanin; ultracentrifugation

Corresponding author: WANG Lei. E-mail: wanglei@ms.qdio.ac.cn