

三氯乙酸/丙酮蛋白质提取法在白内障晶状体蛋白提取中的应用

储兆东, 卢国华, 谭英, 刘毅, 李朝伟

作者单位: (213003) 中国江苏省常州市, 南京医科大学附属常州第二人民医院眼科

作者简介: 储兆东, 男, 毕业于南京医科大学, 硕士, 住院医师, 研究方向: 白内障及眼表相关疾病研究。

通讯作者: 储兆东. anyidachu@163.com

收稿日期: 2013-07-23 修回日期: 2013-11-08

Application of TCA/acetone protein extraction in the cataract lens protein extract

Zhao-Dong Chu, Guo-Hua Lu, Ying Tan, Yi Liu, Chao-Wei Li

Department of Ophthalmology, Changzhou No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhao - Dong Chu. Department of Ophthalmology, Changzhou No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China. anyidachu@163.com

Received: 2013-07-23 Accepted: 2013-11-08

Abstract

• **AIM:** To compare the effectiveness of different protein extraction method in the cataract lens protein extract, and look for the best protein extraction method suitable for cataract proteomics research.

• **METHODS:** Cataract lens samples were dissolved in lysis buffer and sonication; the samples were extracted by TCA/acetone and protein extraction kit after centrifugation. Lens proteins of the samples were analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE), gel electrophoresis and staining, image acquisition and image analysis.

• **RESULTS:** According to the results obtained from two-dimensional electrophoresis gel image, the molecular weight of protein points were localized at 14-97.4kDa, PI5-9. The molecular weight of high abundance crystallins were localized at 20-31kDa, the molecular weight of lower abundance crystallins were localized at 35-45kDa. The 2-DE image background of cataract lens sample with hyaluronic acid extracted by TCA/acetone was clear, no obvious vertical bands, point of proteins were more clear, and 35 to 40 protein points were detected.

• **CONCLUSION:** TCA/acetone extraction method has better purification compared to other methods in human cataract lens proteomics, and provides the reliable two-dimensional polyacrylamide gel image for human cataract

lens proteomics mass spectrometry analysis.

• **KEYWORDS:** crystallins; protein extraction; two-dimensional gel electrophoresis; TCA/acetone

Citation: Chu ZD, Lu GH, Tan Y, et al. Application of TCA/acetone protein extraction in the cataract lens protein extract. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(12):2377-2380

摘要

目的: 比较不同蛋白质提取方法在白内障晶状体蛋白提取中的效果, 寻找适合白内障晶状体蛋白质组学研究的蛋白质提取方法。

方法: 采用裂解液溶解白内障晶状体组织样本, 超声裂解离心后分别采用三氯乙酸/丙酮法和 ReadyPrep 2D Cleanup Kit 对晶状体蛋白样本进行提取、二维电泳, 并对电泳后凝胶进行染色、图像采集和图像分析。

结果: 在 2-DE 图谱上蛋白斑点的相对分子量在 14~97.4kDa 之间, 等电点在 5~9 之间, 其中高丰度蛋白相对分子量处于 20~31kDa 范围内, 低丰度蛋白斑点相对分子量处于 31~43kDa 范围内。经 TCA/丙酮沉淀法处理的含有透明质酸钠白内障晶状体蛋白样本, 二维电泳凝胶图谱背景较清晰, 蛋白斑点较清楚, 共检测到 35~40 个左右的蛋白斑点。

结论: 在白内障晶状体蛋白质组学研究中, TCA/丙酮法具有较好的纯化效果, 为晶状体组织蛋白质组学的质谱分析研究提供了可靠的二维电泳凝胶图谱。

关键词: 晶状体蛋白; 蛋白质提取; 双向凝胶电泳; 三氯乙酸/丙酮

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.12.04

引用: 储兆东, 卢国华, 谭英, 等. 三氯乙酸/丙酮蛋白质提取法在白内障晶状体蛋白提取中的应用. *国际眼科杂志* 2013; 13(12):2377-2380

0 引言

白内障是眼科常见疾病, 主要是由于晶状体透明性的改变, 而引起的视力障碍。晶状体或眼球的发育异常以及某些先天性全身综合征, 都可导致晶状体的透明性异常而致白内障。根据白内障可分为先天性、老年性、并发性、代谢性白内障等。白内障的发病机制较为复杂, 其形成的基本病理改变为晶状体蛋白质的改变, 因此, 蛋白质组学方法在其研究中有良好的应用^[1-3]。蛋白质组学研究包括 2-DE 电泳和质谱分析, 蛋白质的提取是保证双向电泳成功的第一步。白内障蛋白质组学研究理想样本为无杂质白内障样本 (捐献者晶状体), 但大量白内障晶状体样本 (如先天性白内障、糖尿病性白内障、老年性白内障) 为手

术过程中收集,因此收集的样本常含有大量透明质酸钠,透明质酸钠对二维电泳有影响,如何去除样本中的透明质酸钠,是白内障蛋白质组学研究的关键。本研究对两种蛋白质提取方法进行比较,探讨适合白内障蛋白质组学研究的晶状体蛋白质提取方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验样本收集 本研究样本取自软核白内障,手术使用透明质酸钠凝胶维持前房,采用抽吸法取出部分晶状体组织,其中含手术中引入透明质酸钠。样本取出后立即置于-80℃冰箱保存。

1.1.2 主要试剂 尿素、硫脲、3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(AP)、甘氨酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、二巯苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、考马斯亮蓝,均购自上海生物工程技术服务公司;三氯乙酸(TCA)、丙酮、甘油、硫代硫酸钠、硝酸银、碳酸钠、甲醇、乙酸均为碧云天生物技术研究所产品;非线性IPG干胶条(pH 3~10, 7cm)、20% (w/v)载体两性电解质、ReadyPrep 2D Cleanup Kit、Starter Kit 购自Bio-Rad公司;BCA蛋白定量试剂盒购自Thermo Fisher Scientific公司。

1.1.3 主要仪器 PROTEAN IEF Cell 电聚焦仪系统、PROTEAN II xi Cell SDS-PAGE 垂直电泳仪及其附件系统、PDQuest 8.0 图像分析软件均为Bio-Rad公司产品;Mill-Q超纯水系统为Millipore公司产品;X-22Ri台式高速离心机为Beckman coulter公司产品;JY92-II超声波细胞粉碎机位宁波新芝生物科技公司产品。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂配制及储存 裂解液:7mol/L 尿素,2mol/L 硫脲,4% (w/v) CHAPS,4mmol/L Tris,1% (w/v) DTT,2% (w/v) Bio-Lyte,1:100 苯甲基磺酰氟(PMSF);100% TCA;水化上样缓冲液:8mol/L 尿素,4% (w/v) CHAPS,65mmol/L DTT(现加),0.2% (w/v) Bio-Lyte(现加),0.001% 溴酚蓝;平衡缓冲液:6mol/L 尿素,2% SDS,0.375mol/L Tris-HCl(1.5mol/L pH8.8),20% 甘油。

1.2.2 TCA和丙酮溶液沉淀透明质酸钠 取适量透明质酸钠溶于裂解液中,4℃条件下15000r/min离心30min,取上清。取4只EP管分为两组,每组2只EP管,其中一支管中加入30μL上清液,另一支管中加入30μL裂解液作为对照。向第一组EP管中加入400μL 25% TCA混匀4℃过夜,向第二组EP管中加入400μL -20℃预冷的90%丙酮混匀,4℃过夜后,将4只EP管4℃条件下15000r/min离心30min,观察沉淀情况。离心后取上清,在第一组EP管中加入预冷的90%丙酮,第二组EP管中加入25% TCA,同样条件下离心,观察沉淀情况。

1.2.3 蛋白样本的提取 初步提取:取出白内障晶状体组织标本,加入裂解液振荡溶解,经超滤法^[4]进行初步蛋白质提取,提取方法:超声160W裂解3s 间歇25s 重复20次,在4℃条件下15000r/min离心30min,取上清。采用BCA试剂盒进行蛋白质定量后,分装保存。进一步提取:(1)TCA/丙酮法:取适量上述分装保存的蛋白样本原液加入25%的TCA溶液400μL,摇匀4℃过夜;4℃15000r/min离心30min,弃上清;加入-20℃预冷的90%丙酮(至少预

冷1h)500μL,震荡充分悬浮,-20℃放置10min;4℃15000r/min离心15min,去除上清;再次重复上述步骤丙酮洗2次;将样品在真空抽吸2min,加入水化上样缓冲液,上样、电泳;(2)Cleanup试剂盒蛋白提取法:取适量上述分装保存的蛋白样品原液,加入三倍体积的precipitating agent 1混匀,冰上放置15min;加入100μL precipitating agent 2快速混匀;将上述混合液12000r/min、4℃离心5min;去除上清,加入40μL wash reagent 1,冰浴5min,12000r/min、4℃离心5min;去除上清,加入25μL超纯水,震荡30s完全悬浮蛋白;加入1mL wash reagent(至少-20℃预冷1h)和5μL wash 2 additive,震荡30s;-20℃放置30min,每10min震荡30s;12000r/min、4℃离心5min,去除上清,置空气适度干燥(<5min);加入水化上样缓冲液,上样、电泳。

1.2.4 电泳

1.2.4.1 第一向等电聚焦 等电聚焦采用7cm、pH 3~10非线性IPG预制干胶条。取冷冻保存的水化上样缓冲液(不含DTT,不含Bio-Lyte)置室温溶解,加入65mmol/L DTT,0.2% (w/v) Bio-Lyte充分混匀。向蛋白样品中加入150μL水化上样缓冲液充分混匀溶解,将溶解的蛋白样品移至聚焦盘或水化盘中,用镊子将去除保护层的IPG胶条胶面朝下分清正负极置于样品溶液上。在每根胶条上覆盖1mL矿物油。在PROTEAN IEF Cell系统20℃开始第一向等电聚焦。等电聚焦设置参数如下:50V溶胀12h;250V线性30min;500V快速30min;4000V线性3h;4000V快速20000V·h;500V快速任意时间。

1.2.4.2 平衡及第二向垂直电泳 第一向电泳结束后,用滤纸轻轻吸干IPG胶条上的矿物油及多余样品,将IPG胶条依次在平衡缓冲液I(平衡缓冲液加入2% DTT)和平衡缓冲液II(平衡缓冲液加入2.5%碘乙酰胺)中平衡一次,每次15min。配制7cm的12%聚丙烯酰胺分离胶,在分离胶上方加入6~8mm的5%聚丙烯酰胺浓缩胶。平衡结束后吸除IPG胶条多余的平衡缓冲液,将其完全浸没在1×电泳缓冲液中。在聚丙烯酰胺凝胶的上方加入琼脂糖封胶液,将IPG胶条移至聚丙烯酰胺凝胶上方。电泳起始时用70V低电压,待样品在完全走出IPG胶条浓缩成一条线后,再加大电压至150V,待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时停止电泳。

1.2.4.3 考马斯亮蓝染色与图像采集 将凝胶在250mL考马斯亮蓝染色液染色1h,染色后将凝胶在250mL脱色液中反复脱色直至蛋白点显色清楚,背景基本清除。通过Gel Doc 2000凝胶成像仪采集图像。

2 结果

2.1 三氯乙酸和丙酮去除透明质酸钠效果 在溶有透明质酸钠的裂解液中加入25% TCA后未见任何沉淀,离心后的上清液再加入丙酮后见大量白色沉淀;在溶有透明质酸钠的裂解液中加入丙酮后可见白色沉淀产生,离心后的上清液中再加入25% TCA后未见沉淀,对照组始终未见沉淀出现。通过实验证明透明质酸钠溶于裂解液,15000r/min离心不能够完全去除,透明质酸钠溶于TCA溶液,而不溶于丙酮溶液。

2.2 不同处理方法晶状体蛋白二维电泳图 没有经过TCA/丙酮法处理的含有透明质酸钠白内障晶状体蛋白样本,电泳后的二维电泳凝胶图谱背景有较多的竖条带,蛋白分布成条索状,拖尾明显,各蛋白斑点不宜辨认(图1A);

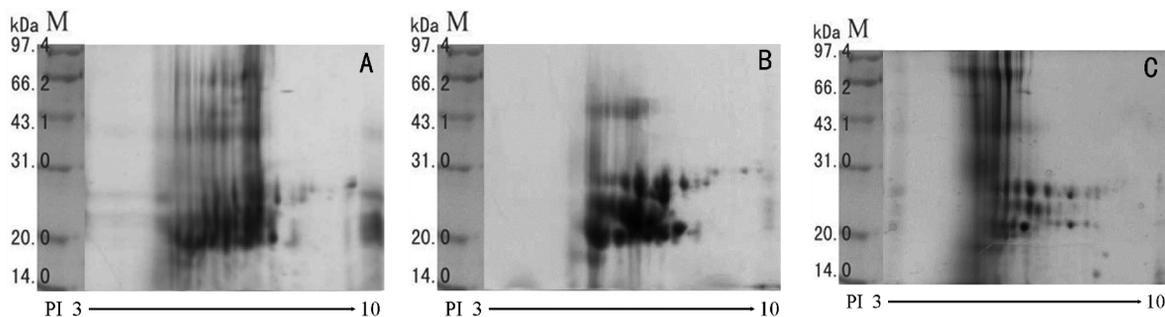


图1 不同处理方法晶状体蛋白二维电泳图 A:标本中含有透明质酸钠,经试剂盒提取的蛋白二维凝胶电泳图谱。图中背景有较多的竖条带,蛋白分布成条索状,拖尾明显,蛋白斑点不易辨认;B:标本中含有透明质酸钠,经TCA/丙酮法提取的蛋白二维凝胶电泳图谱。图中背景较清晰,竖条带不明显,蛋白斑点较清楚。能检测到35~40个左右的蛋白斑点;C:标本中不含有透明质酸钠,未采用TCA/丙酮法提取的蛋白二维凝胶电泳图谱。图中等电点5~6之间的背景有较多颜色较深的竖条带,各蛋白斑点较清楚,无明显拖尾,能检测到30~40个左右的蛋白斑点。

经过TCA/丙酮法处理的含有透明质酸钠白内障晶状体蛋白样本,电泳后的二维电泳凝胶图谱背景较清晰,竖条带不明显,蛋白斑点较清楚,能检测到35~40个左右的蛋白斑点(图1B);经过非TCA/丙酮法处理的不含有透明质酸钠白内障晶状体蛋白样本,电泳后的二维电泳凝胶图谱中等电点5~6之间的背景有较多颜色较深的竖条带,各蛋白斑点较清楚,无明显拖尾,能检测到30~40个左右的蛋白斑点(图1C)。蛋白斑点的相对分子量在14~97.4kDa之间,等电点在5~9之间,其中大部分高丰度蛋白相对分子量处于20~31kDa范围内,小部分低丰度蛋白斑点相对分子量处于31~43kDa范围内。

3 讨论

人类的晶状体中,蛋白质占湿重的60%和干重的80%~90%,因此蛋白质组学研究方法在晶状体正常生理及某些晶状体疾病发病的研究方面具有良好的应用^[5]。蛋白质样本制备提取是获得可靠的蛋白质组学分析结果的基础^[6],通过蛋白质的提取,去除其它杂质,减少杂质对电泳的影响,使蛋白质样本得到很好的分离。在晶状体蛋白质组学研究中,大多数研究^[4,7-9]以动物晶状体标本作为研究对象。Zhang等^[10]对人透明晶状体进行蛋白质组学研究采用捐献的眼球,这些研究在取晶状体组织时可以连同囊膜将整个晶状体一起取出,基本不会引入杂质,然而以人类白内障晶状体为对象的研究,其样本大多是通过手术获得^[2]。目前由于白内障手术过程中为了使前房维持一定深度,保持清晰的手术视野,减少手术后炎症和并发症的发生,黏弹剂被广泛使用,所以在晶状体标本往往含有大量透明质酸钠,对于完整的硬核晶状体标本可以通过清洗去除表面的透明质酸钠,对于软核性白内障标本,则无法通过清洗去除这些透明质酸钠。

蛋白质组学研究中蛋白质样本提取常用的方法有丙酮沉淀法、TCA/丙酮法、超滤法、氯仿/甲醇沉淀法、硫酸铵沉淀法以及采用试剂盒提取等,Jiang等^[11]研究发现丙酮沉淀法、TCA/丙酮法、超滤法是高效的蛋白样本浓缩与除盐方法。在晶状体组织蛋白质样本提取中,对于完整晶状体基本不会引入杂质,提取过程中多采用裂解液裂解、超声溶解,再经低温超滤后上样电泳^[4,7-8,10,12]。Geoui

等^[13]蛋白质组学研究采用试剂盒提取蛋白,该方法能够较好地去除样本中的离子、盐、核酸、脂质等杂质并浓缩蛋白样本,抽提效率高,并获得满意的蛋白提取效果。然而经该方法处理的蛋白样本的二维凝胶电泳图谱背景有较多的竖条带,蛋白分布成条索状,拖尾明显,蛋白斑点不易辨认,考虑可能由于白内障晶状体蛋白样品中引入透明质酸钠等杂质,该提取方法不能完全去除透明质酸钠。透明质酸钠为白色无定形固体,无臭无味,有吸湿性,溶于水,能够溶解在裂解液中。对于含有透明质酸钠的组织标本,通过超高速离心是不能完全去除的。本研究发现透明质酸钠不溶于丙酮,但是能够溶解在三氯乙酸中,通过三氯乙酸去除晶状体蛋白质样本中的透明质酸钠效果较好,同时三氯乙酸是蛋白质二维电泳过程中常用的蛋白质提取方法之一。本研究蛋白质提取的方法采用TCA/丙酮法,TCA在酸性条件下与蛋白质形成不溶性盐,使蛋白质构象发生改变,暴露出较多的疏水性基团,使之聚集沉淀,通过离心去除其它杂质包括透明质酸钠。然后加入丙酮对沉淀标本进行清洗,抽提残留的TCA。

Magistrini等^[14]研究对丙酮沉淀法、超滤法和TCA/丙酮法在尿蛋白质抽提效率、电泳图谱蛋白斑点清晰度和蛋白斑点数量的比较发现,丙酮沉淀法在三方面效果最好,TCA/丙酮法的抽提效率最低,其它两个方面仅次于丙酮沉淀法均明显优于超滤法。本研究蛋白质样本中含有透明质酸钠,丙酮沉淀法不能去除,所以采用TCA/丙酮法,该方法在蛋白质提取过程中蛋白质损失较多,而对于蛋白质含量较高晶状体组织,这些损失对电泳要求没有太大影响。有研究^[15]认为利用TCA对蛋白质样品进行浓缩和除盐时,随着蛋白质分子量的增大,其结构复杂性与致密性越大,TCA可能渗入分子内部而使之较难被完全除去,在SDS凝胶电泳前样品加热处理时可能使蛋白质结构发生酸水解而形成碎片,而且随时间的延长这一作用愈加明显,在电泳时对于分子质量大的蛋白质,要慎重选择TCA。本研究晶状体蛋白相对分子量多在20~50kDa之间^[4],蛋白样本二维电泳前不需要加热处理,TCA/丙酮法提取蛋白质样本较为合适。

本研究比较经不同方法提纯含有透明质酸钠的晶状体蛋白样本的二维电泳凝胶图谱,可以发现未采用

TCA/丙酮法进行蛋白提取的电泳凝胶图谱背景出现竖的条带,且蛋白斑点拖尾明显,而采用TCA/丙酮法的提纯的电泳凝胶图谱背景较为干净,无蛋白斑点拖尾现象。采用非TCA/丙酮法提取的不含有透明质酸钠蛋白样本的二维电泳凝胶图谱背景在PI 5~6之间出现竖的条带,但无蛋白斑点拖尾现象,分析原因可能是透明质酸钠与蛋白结合,以及白内障标本中的多糖对电泳产生影响。TCA/丙酮法能够较好的去除透明质酸钠,同时去除其它杂质。

在人白内障晶状体蛋白质组学研究中,对于引入透明质酸钠的晶状体组织标本蛋白进行提取时,TCA/丙酮法具有较好的纯化效果,为人晶状体组织蛋白质组学的质谱分析研究提供了可靠的二维凝胶电泳图谱。

参考文献

- 1 Hains PG, Truscott RJ. Proteome analysis of human foetal, aged and advanced nuclear cataract lenses. *Proteomics Clin Appl* 2008;2 (12):1611-1619
- 2 Harrington V, Kirk M. Proteomic analysis of water insoluble proteins from normal and cataractous human lenses. *Mol Vis* 2007;14 (9):1680-1694
- 3 Harrington V, Huynh S, Srivastava K, et al. Crystallins in water soluble-high molecular weight protein fractions and water insoluble protein fractions in aging and cataractous human lenses. *Mol Vis* 2004;19 (7):476-489
- 4 Yao Z, Xuan D, Sha Q, et al. Analysis of protein-protein interactions and proteomic profiles of normal human lenses. *Curr Eye Res* 2010;35 (7):605-619
- 5 Swinbanks D. Government backs proteome proposal. *Nature* 1995;378 (6558):653

- 6 Fountoulakis B, Takács, Methods Enzymol. Philadelphia, PA:Elsevier Inc 2002; 288-358
- 7 Guest PC, Salim K, Tattersall FD, et al. Detection of gender differences in rat lens proteins using 2-D-DIGE. *Proteomics* 2006;6 (2):667-676
- 8 Liu X, Liu Y, Challa P, et al. Proteomic analysis of regenerated rabbit lenses reveal crystallin expression characteristic of adult rabbits. *Mol Vis* 2008;14:2404-2412
- 9 Wilmarth PA, Riviere MA, Duncan MK, et al. Proteomic and sequence analysis of chicken lens crystallins reveals alternate splicing and translational forms of beta B2 and beta A2 crystallins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45 (8):2705-2715
- 10 Zhang C, Wang N, Li Y, et al. Comparison of two tandem mass spectrometry-based methods for analyzing the proteome of healthy human lens fibers. *Mol Vis* 2007;3 (10):1873-1877
- 11 Jiang L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A* 2004;1023 (2):317-320
- 12 Chiou SH, Lee IL, Wang YT, et al. Identification of *in vivo* phosphorylation sites of lens proteins from porcine eye lenses by a gel-free phosphoproteomics approach. *Mol Vis* 2010;24 (16):294-302
- 13 Geoui T, Urlaub H, Plessmann U, et al. Extraction of proteins from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using the Qproteome extraction technique and preparation of tryptic peptides for liquid chromatography/mass spectrometry analysis. *Curr Protoc Mol Biol* 2010;10(27):1-12
- 14 Magistrini R, Lupo V, Furci L, et al. Proteomic analysis of urine from proteinuric patients shows a proteolytic activity directed against albumin. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24 (5):1672-1681
- 15 郭立安, 阎哲, 张晓楠, 等. 三氯乙酸对蛋白质结构稳定性的影响. *第四军医大学学报* 2001;22 (22):封3-01