

文章编号: 1001-4721 (2011) 01-0001-04

梅花鹿角柄骨膜蛋白质组学初步研究

徐代勋^{1,2}, 王桂武², 赵海平², 杨颖², 宁浩然², 李春义^{2*}

(1.江苏科技大学, 江苏 镇江 212018; 2.中国农业科学院特产研究所, 吉林 吉林 132109)

摘要: 为了利用蛋白质组学技术探索鹿茸研究模型中的特异性蛋白, 本试验探索了一套完整的梅花鹿角柄骨膜蛋白提取及纯化方法。角柄是雄鹿头上着生的永久性骨桩, 鹿茸每年由该骨桩上脱落和再生。本试验采集了梅花鹿角柄骨膜, 利用冷冻液氮研磨法提取蛋白样品。蛋白样品分别经过丙酮沉淀和TCA-丙酮沉淀处理。结果显示, TCA-丙酮沉淀处理后电泳图谱斑点清晰, 分辨率较高, 是双向电泳蛋白提取样品的较优处理方法。

关键词: 梅花鹿; 角柄骨膜; 双向电泳; TCA-丙酮沉淀

中图分类号: Q816

文献标识码: A

Proteomics Study On Pedicle Periosteum of Sika Deer

XU Dai-xun^{1,2}, WANG Gui-wu², ZHAO Hai-ping², Yang ying², Ning Hao-ran², LI Chun-yi^{2*}

(1. School of Biotechnology and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China; 2. Institute of Special Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 132109, China)

Abstract: To develop an optimal proteomics technology for extracting specific proteins from periosteum for deer antler research, we constructed a suite of methods for protein extraction and purification from pedicle periosteum. Fresh pedicle periosteum was collected from 1-year-old male sika deer. Pedicles are the deer cranial permanent bony protuberances, from which antlers cast and regenerate. Protein was extracted from the frozen periosteum in liquid nitrogen. Two different methods, Acetone and TCA-Acetone precipitation, were used to purify the protein samples. The results showed that samples prepared by TCA-Acetone precipitation had clearer protein spots and higher resolution of the electrophoretic map. So TCA-Acetone precipitation method is the most suitable protein purification method for preparing the samples for 2-DE for pedicle periosteum.

Key words: Sika deer; Pedicle periosteum; Two-dimensional electrophoresis; TCA-Acetone precipitation

鹿茸为鹿科动物雄鹿未骨化、带茸毛的幼角, 具有较高的药用价值。鹿茸还是惟一能完全再生的哺乳动物器官^[1,2]。因此, 鹿茸可以作为一种绝佳的生物医学模型来探索哺乳动物组织或器官再生之谜。进一步研究表明, 鹿茸再生是从角柄上发生的, 是基于干细胞的过程, 该过程取决于角柄远端骨膜干细胞受到周期性的激活^[3]。那么在鹿茸再生的过程中, 角柄骨膜干细胞中是否存在特异蛋白或者基因对其进行调控? 以往的研究多从形态学、组织学以及基因方面对鹿茸再生进行研究, 而从蛋白质方面进行的研究很少。本试验拟探索一套适合角

柄骨膜组织的蛋白质组的方法研究角柄骨膜干细胞中的特异性蛋白, 进而探索鹿茸再生之谜。

双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术是当前分辨率最高、信息量最大的电泳技术。它是利用蛋白质的带电性和分子量大小的差异, 通过两次凝胶电泳达到分离蛋白质组的技术。蛋白双向电泳技术是目前蛋白质组学研究的三大核心技术之一, 广泛应用于农业、医学等研究领域^[4]。

双向电泳图谱的质量和完整性直接反映了该试验蛋白质组的相关信息。然而, 在整个双向电泳试验过程中, 影响所获图谱质量的因素很多, 其中蛋白样

收稿日期: 2010-12-21

基金项目: 国家自然科学基金(31070878)

作者简介: 徐代勋(1986-), 男, 河南信阳人, 在读硕士研究生, 从事鹿茸生物学研究。

*通讯作者: 李春义, E-mail: chy.li@agresearch.co.nz.

品的提取与处理是主要的因素之一。因此,组织的获取和蛋白的提取是研究角柄骨膜蛋白质组学的前期关键,而不同的处理方法对电泳结果的影响也很大。本试验从蛋白的提取和后续的处理等方面进行了研究,为后续的蛋白质组学研究奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

取自2岁龄雄性梅花鹿(农业部长白山野生生物资源重点野外科学观测试验站提供)5月份刚脱盘的梅花鹿角柄骨膜。

1.2 仪器与试剂

PowerLook 2100XL-USB扫描仪(UMAX); SmartSpec Plus 分光光度计、PROTEAN IEF Cell、PowerPac Universal、Mini-Protean Tetra Cell(Bio-Rad); Millipore 超纯水系统(Millipore); 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、矿物油、载体两性电解质Bio-Lyte、pH3-10 IPG胶条(Bio-Rad公司); 尿素、硫脲、二硫苏糖醇(DTT)、过硫酸铵(APS)、TEMED、SDS(Sigma公司); 考马斯亮蓝G-250、牛血清白蛋白(BSA)(Amresco公司); 蛋白质提取试剂盒(上海杰美公司)。

1.3 方法

1.3.1 组织采集及蛋白提取 取5月份刚脱盘的雄性梅花鹿角柄骨膜,用PBS清洗1~2遍。4℃,8 000g离心15 min,弃上清液,沉淀用滤纸吸干,然后迅速转移到研钵中。用手术刀和镊子将骨膜组织剪成2 mm×2 mm大小的碎块,液氮预冷,当液氮刚好覆盖样品时进行研磨。按蛋白质提取试剂盒操作说明提取蛋白质,利用分光光度计测定吸光度,根据BSA标准曲线计算出浓度,蛋白样品-80℃保存。

1.3.2 蛋白样品的预处理 丙酮沉淀法处理蛋白样品:取200 μL蛋白样品,加入600 μL -20℃预冷的丙酮, -20℃放置2 h,4℃15 000 rmp离心30 min,去上清,沉淀为蛋白样品;TCA-丙酮沉淀法处理蛋白样品:取100 μL蛋白样品,加1 mL 0.07%β-巯基乙醇的10%TCA溶液, -20℃放置1 h,4℃13 000 g离心10 min,去上清液,沉淀再加7%β-巯基乙醇的丙酮溶液,放置-20℃挥干,沉淀为蛋白样品。

1.3.3 水化上样及第一向等点聚焦电泳 取150 μL~200 μL水化上样缓冲液(水化上样缓冲液:7 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、4%(W/V)CHAPS、65 mmol/L DTT、0.2%(W/V)Bio-Lyte、0.001%溴酚蓝;平衡液母液:6 mol/L尿素、2%SDS、0.375 mol/L pH8.8的Tris-HCl、20%甘油)溶解蛋白样品,放置10 min,15℃15 000 g离心45 min,用移液枪吸取蛋白样品液均匀的铺在聚焦盘内,覆盖2 mL矿物

油。设置适宜的聚焦程序等电聚焦,见表1。

表1 等电聚焦电泳程序与参数

步骤	电压(V)	升压方式	时间(h)	作用
S1	50	快速	12	主动水化
S3	250	线性	1	除盐
S4	500	快速	1	除盐
S5	4 000	线性	4	升压
S6	4 000	快速	20 000伏小时	聚焦
S7	500	快速	任意时间	保持

注:每根胶条的极限电流为30μA/根;聚焦温度为20℃

1.3.4 胶条的平衡及第二向SDS-PAGE电泳 将胶条平铺在湿润的滤纸上,吸去多余液体,平衡液一(平衡液母液2.5 mL加0.05 g DTT)平衡15 min,倒去多余平衡液加入平衡液二(平衡液母液2.5 mL加0.062 5 g碘乙酰胺)平衡15 min。配置12%分离胶,将平衡完的胶条转移至丙烯酰胺凝胶胶面,使之完全接触。加低熔点琼脂糖封胶,冷却后电泳,开始时用低电压[20 V/(gel·7cm)],待样品完全走出胶条浓缩成一条线后再加大电压[80 V/(gel·7cm)],待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时停止电泳。

1.3.5 染色及分析 取出凝胶,考马斯亮蓝G-250染色,脱色后拍照,然后用PDQest软件(Bio-Rad)进行分析。

2 结果

2.1 蛋白质定量 BSA标准曲线

利用Bradford法测定BSA标准品在595 nm处的吸光度,制作标准曲线,见图1。

2.2 双向电泳图谱

试验所用7 cm、pH3~10的IPG胶条,蛋白上样体积均为200 μL,蛋白上样浓度及斑点总数见表2。图2显示,经过丙酮沉淀处理的图谱的蛋白斑点数量少于直接裂解法的斑点数量。图3显示,经TCA-丙酮沉淀所获得图谱质量明显优于未经TCA-丙酮沉淀的质量,主要表现在蛋白斑点清晰,斑点染色程度较深,斑点数目多以及没有明显的横纹和竖纹,但是蛋白斑点数量少于直接裂解处理的蛋白提取液。

表2 不同处理方法的蛋白上样量及蛋白斑点数量

处理方法	未经丙酮沉淀	丙酮沉淀	直接裂解液	TCA-丙酮沉淀
蛋白上样质量(μg)	506.75	506.75	152.3	189
斑点总数(个)	174	77	247	225

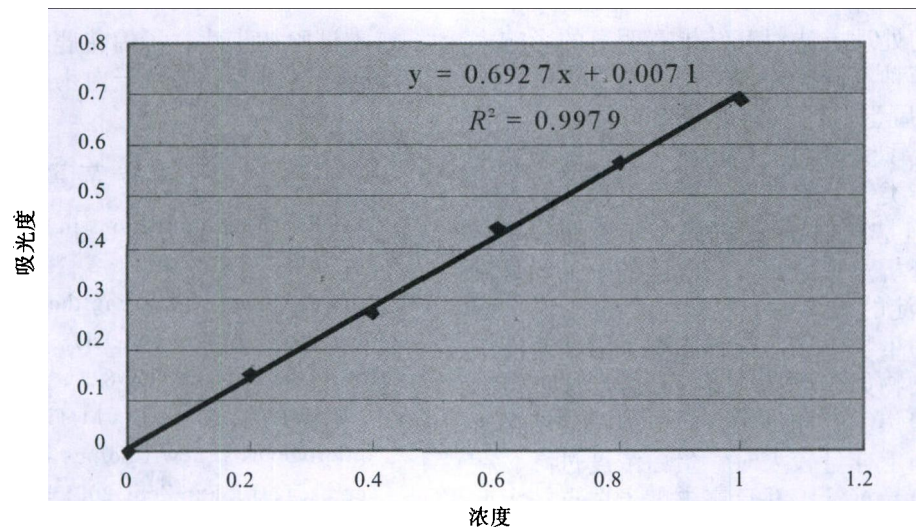


图1 Bradford法测定BSA标准品的标准曲线

3 讨论

作为独特的器官再生模型，鹿茸的生长发育近年来颇受研究人员的青睐，但是大多数有关研究都只是停留在组织形态学水平^[5]。由于鹿茸角柄骨膜材料非常少，研究成本较高而且所含成分未知，所以常规的研究方法很难达到预期的效果。而蛋白质双向电泳是目前蛋白质研究的重要手段^[6]，具有与其他研究方法无可比拟的优点，因此被广泛地应用于蛋白质的研究。本研究通过蛋白质双向电泳对梅花鹿角柄骨膜总蛋白进行初步双向分离，首次获得

了梅花鹿角柄骨膜总蛋白的双向电泳图谱，为下一部进行梅花鹿角柄骨膜中特异性蛋白的鉴定奠定了基础。样品的制备是双向电泳技术成功的关键^[7]。因此，样品的提取和前期处理就显得尤为重要。骨膜组织韧性较强，破碎困难，提取难度相对较大。本试验优化了骨膜组织的破碎方法，在一定程度上提高了角柄骨膜蛋白的提取效率，为后续的试验奠定了基础。双向电泳的目的是为了分离成千上万种不同

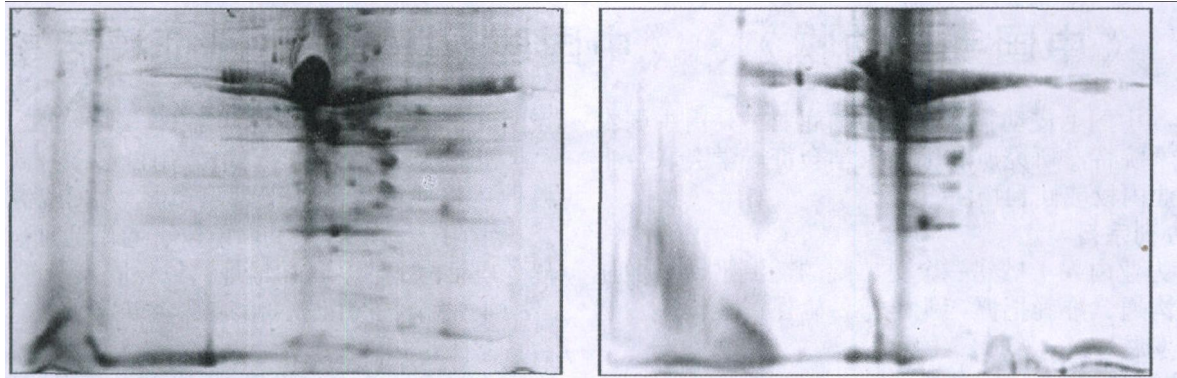


图2 未经丙酮沉淀（左）和经丙酮沉淀（右）所获蛋白样品的双向电泳图谱

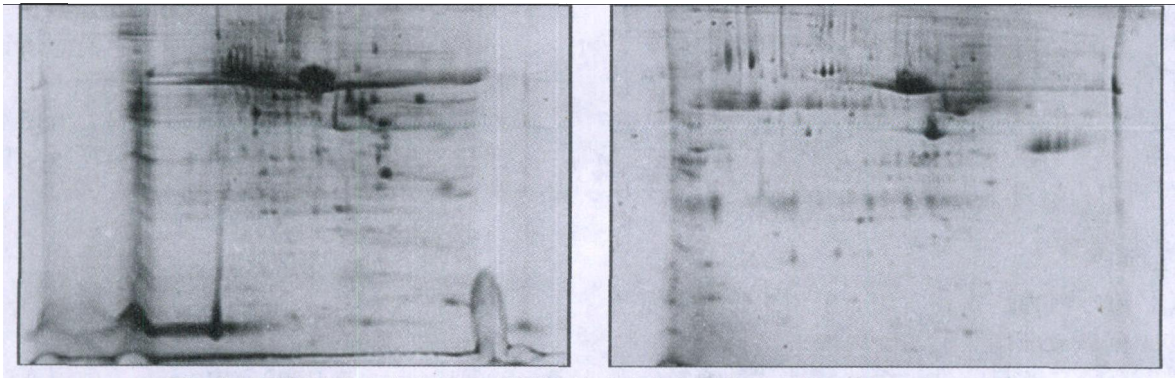


图3 直接裂解法（左）和TCA-丙酮沉淀法（右）所获蛋白样品的双向电泳图谱

的蛋白,不同的处理方法对其结果有明显的影响。本试验采用了两种不同的处理方法,结果表明,经TCA-丙酮沉淀后蛋白的双向电泳效果较好,这是因为沉淀时除去了大量的干扰物质,如盐离子、去污剂、核酸、脂类等,使得图谱质量更加清晰,斑点更加明显,但是TCA-丙酮沉淀会使得部分蛋白丢失,不适合分析全蛋白。丙酮沉淀的效果明显没有TCA-丙酮沉淀的效果好,这可能是由于许多溶于有机溶剂的污染物(去污剂、脂类)留在溶液中了,而这些污染物如脂类会同蛋白结合形成不溶的复合物,影响聚焦。上样量对双向电泳图谱结果影响也较明显。当上样量较大时,蛋白浓度过高,在水化和聚焦时容易沉淀,并且高丰度蛋白点较大而掩盖一些低丰度蛋白;当上样量较小时,蛋白浓度过低,一些表达量较低的蛋白不易被检测。因此,为了在不影响图谱质量的情况下尽可能多的显现蛋白斑点,蛋白上样量应根据不同的样品和不同的条件来确定。

需要注意的是,蛋白处理的步骤越多、时间越长则可能造成的问题越多。步骤越多则蛋白丢失越多而且容易引进杂质;时间长则蛋白容易沉淀和变性从而影响最终结果。不管是用什么方法处理样品,需要遵循的一个原则就是避免蛋白的丢失和修饰降解。这就要求我们尽量使用高质量的试剂,而且操作尽可能保持步骤简单、低温、快速。

本试验初步建立了梅花鹿鹿茸角柄骨膜蛋白质的双向电泳体系,为从蛋白水平研究鹿茸再生奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Goss R J. Future directions in antler research [J]. Anat Rec,1995,241:291-302.
- [2] Price J,Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,2004,359:809-822.
- [3] Li C,Harris AJ,Suttie JM.Tissue interactions and antlerogenesis: new findings revealed by a xenograft approach [J].J. Exp.Zool, 2001,1:290(1):18- 30.
- [4] 冯海燕,等.双向电泳技术及应用[J].生物技术通报 2009,1:59-63.
- [5] Chunyi Li. Adult Stem Cells and Mammalian Epimorphic Regeneration-Insights from Studying Annual Renewal of Deer Antlers[J].Current Stem Cell Research & Therapy, 2009, 4,237-251.
- [6] Swinbanks D.Government backs proteome proposal [J]. Nature ,1995 ,378(6558) :653-656.
- [7] Molloy MP.Two-Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins UsingImmobilized pHGradients[J]. Analytical Biochemistry,2000,280(1):1-10.

《中国毛皮动物》、《中国鹿业》 征订、征稿启事

《中国毛皮动物》、《中国鹿业》是由中国农业科学院特产研究所和中国农学会特产学会联合主办的业内权威性刊物。

1、办刊宗旨

为业内人士搭建一个更广阔的交流平台,加强信息沟通,准确把握产业走势,确保产业健康、有序地发展。

2、主要栏目

政策法规、专家论坛、综述、研究报告、养殖技术、疾病防治、产品开发与加工、行业新闻、交流平台、市场动态(国内外发展趋势、前景及价格)、产业文化、知识库、企业风采等。

3、订阅

两刊均为双月刊,每本4元(含邮费),全年定价均为24元。可直接从邮局汇款至编辑部订阅。

4、来稿要求

4.1 短小精悍、新颖实用、吸引人,最好是近期的热点问题或业内关注的问题。

4.2 有较高的科学性,综述和评述性文章要观

点明确、论述有据、数据可靠。

4.3 投稿方式自选。最好用E-mail方式,收到稿件后将回复告之,文件可以是Word或纯文本格式。请附作者姓名、工作单位、通讯地址、邮政编码、电话号码、E-mail地址,以便联系。

4.4 稿件采用与否由编委会审定,无论刊登与否,恕不退稿。

4.5 编辑部有权做必要的删改,不同意者请事先声明。

本刊承办各种广告和供求业务,有意者请与编辑部联系。

地址:吉林省吉林市左家镇鹿鸣大街15号

单位:中国农业科学院特产研究所《中国毛皮动物》、《中国鹿业》编辑部

邮政编码:132109

电话:(0432) 66513067

传真:(0432) 66513069

E-mail: zgmpdu@126.com (中国毛皮动物)
zgly08@126.com zgly09@126.com (中国鹿业)