

蛋白负染方法在蛋白质组学中的应用评价

刘小青^{1,2} 朱力² 胡威^{1,2} 商娜² 冯尔玲² 魏华^{1*} 王恒樑^{1,2*}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室 江西 南昌 330047)

(2. 军事医学科学院生物工程研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

摘要: 为评价蛋白质负染方法在蛋白质组学分析中的应用, 采用负染和考马斯亮蓝染色两种方法对同一样品的双向电泳胶进行染色, 取相对应的 8 对蛋白点, 并进行胶内酶解及 MALDI-TOF/TOF 分析, 比较两种方法与质谱的兼容性。图像分析显示, 负染方法展示出的蛋白点更多, 但三维峰图不如考染明晰; 质谱结果显示, 8 个负染蛋白点中有 7 个鉴定结果有效, 8 个考染蛋白点鉴定结果均有效。因此可以得出以下结论: 负染的灵敏度高于考染, 与质谱的兼容性良好, 适用于建立双向电泳参考图谱的研究; 但负染后的胶图不适于进行蛋白点丰度对比分析。

关键词: 负染, 双向电泳, 质谱, 蛋白质组学

The Evaluation of Reverse Staining on Proteomics

LIU Xiao-Qing^{1,2} ZHU Li² HU Wei^{1,2} SHANG Na² FENG Er-Ling²
WEI Hua^{1*} WANG Heng-Liang^{1,2*}

(1. The State Key Laboratory of Food Science, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China)

(2. China State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract: To evaluate the application of reverse staining in proteomic research, the same protein samples were run by two-dimensional electrophoresis, then the gels were dyed by reverse staining and coomassie Brilliant Blue (CBB) staining. The reverse staining and CBB staining gels were compared, eight pairs corresponding protein spots from the two different gels were cut out, digested by trypsin and analyzed by MALDI-TOF/TOF. Image analysis showed that the reverse staining gel could display more protein spots than the CBB staining one. Seven of eight protein spots on reverse staining gel were effectively identified by MALDI-TOF/TOF, and eight protein spots on CBB staining gel. So, we consider that the sensitivity of reverse staining is higher than the CBB staining, and its compatibility with MALDI-TOF/TOF is good. Therefore, the reverse staining method can be used to set up the reference map of 2-DE, but not suitable to use on the comparative of proteins.

Keywords: Reverse staining, Two-dimensional electrophoresis, MALDI-TOF/TOF, Proteomics

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30470101, 30700035); 国家 973 计划项目(No. 2005CB522904)

* 通讯作者: 魏华: Tel: 86-791-8334578; ✉: hua_wei114@yahoo.com.cn

王恒樑: Tel: 86-10-66948836; ✉: wanghl@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2009-12-31; 接受日期: 2010-03-19

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

蛋白质组学是分子生物学中正在迅速发展的一一个领域,它可对蛋白质进行系统和大规模分析,它的研究要求有高分辨率的蛋白质分离,良好的染色动态线性范围(Linear dynamic range)及准确、灵敏的质谱鉴定技术。目前,双向电泳(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)是蛋白质组学的两大支撑技术之一^[1]。随着 IPG 胶条的出现,蛋白质组学将 2-DE 的作用发挥到了极致,但是凝胶中蛋白质的着色不仅影响蛋白质分离的分辨率,同时也影响后续的质谱鉴定。常用的蛋白质染色方法有:荧光染色、同位素显色、有机试剂染色、银染及负染。荧光染色以 SYPRO 试剂为主,蛋白质检测灵敏度高,能兼容质谱,但由于需要配备特殊的检测仪器及试剂的昂贵,未被作为常规方法使用;同位素显色则存在安全性和操作局限性等问题^[2-4];有机试剂染色^[5]以考马斯亮蓝染色法为主,在蛋白质分析中常用,并能与质谱兼容,但灵敏度不高,检测下限为 8–10 ng;银染灵敏度高,可接受线性动态范围宽,且随着银染技术的发展,现在已经能做到与质谱很好的兼容性^[6],近年来成为在蛋白质组学研究中被广泛选用的染色法之一。

负染只染背景,不染蛋白,能保持蛋白质的完整性,改良后的负染方法灵敏度高,接近银染,且无污染及毒性,与质谱的兼容性良好。负染中咪唑锌发展得比较成熟,但是线性动态范围差^[7]。Gupta P. D.^[8-9]第一次采用伊红 B 做为蛋白染料,在酸性环境下伊红通过静电作用和溶液中的蛋白结合,且表现出很宽的线性范围。负染方法的重复性依赖于许多物理化学因素,如染色液的 pH 值,胶中阴离子的浓度和溶液温度,因此,各实验室自行配置的溶液染色结果可能存在差异。而商品化试剂盒具有良好的稳定性、重现性,因此我们选用国内较易获得的 UPN-蛋白负染试剂盒对负染方法在蛋白质组学中的应用进行评价。它采用伊红 B 为主要成分,选择性地与蛋白质结合形成可溶性复合物,使蛋白条带或斑点呈现透明,而凝胶内伊红 B 则沉淀形成均一的凝胶背景从而使蛋白质被检测出来。在国内外,负染在蛋白质组学上的应用几乎没有,因此我们制取了福氏志贺菌 2a 野生株的外膜蛋白样品,对其进行双向电泳后分别用负染和考染的方法染色,取相对应的 8 对蛋白点,并进行蛋白点胶内酶解,

MALDI-TOF/TOF 鉴定,比较鉴定结果,探讨此种改良的负染方法在蛋白质组学研究中的实际应用潜力,以期拓宽蛋白质组学的研究手段。

1 材料与方法

1.1 菌株

志贺菌福氏 2a 2457T 野生株(萘啶酮酸抗性, NaI^r),本实验室保存。

1.2 主要化学试剂与耗材

UPN-蛋白负染试剂盒由温州安得森生物科技有限公司馈赠;蛋白胨与酵母粉购自 OXOID 公司;尿素(电泳级)、硫脲购自 Sigma 公司;IPG 干胶条(18 cm; pH 4.0–7.0)、IPG 缓冲液(pH 4.0–7.0)、矿物油、蛋白定量试剂盒(2D Quant Kit)购自 GE Healthcare 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris 碱、溴酚蓝、过硫酸铵、TEMED、硫代硫酸钠、CHAPS、甘氨酸、SDS、考马斯亮蓝 G-250、RNase A 购自 AMRESCO 公司;二硫苏糖醇(DTT)、DNase I 购自 Promega 公司;尿素(分子生物学级)和碳酸氢铵购自 Fluka 公司;碘乙酰胺、三氟乙酸(TFA)购自 ACROS 公司;蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor cocktail tablets)、测序级胰蛋白酶购自 Roche 公司;冰乙酸、无水甲醇、正丁醇为国产分析纯;甘油为国产优级纯;乙腈为国产一级色谱纯;吸头与离心管购自 AxyGen 公司。

1.3 主要仪器与分析软件

SIGMA 3K 12/3K 30 台式高速冷冻离心机, Optima™ L-100 XP 超速离心机(Beckman 公司), Bio-Rad model 680 Microplate Reader 酶联检测仪, Unico 2100 型分光光度计, SONICS VC 750 型超声仪, ImageScanner 扫描仪、Ettan™ IPGphor™ 水平等电聚焦仪(GE Healthcare 公司), Protean II Xi 垂直板 SDS-PAGE 电泳仪(Bio-Rad 公司), 真空离心浓缩仪(CHRIST 公司, 德国), UltraFlex™ III 型 MALDI-TOF 质谱仪(Bruker 公司)。双向电泳凝胶图像分析软件为 ImageMaster™ 2D Platinum version 5.0 (GE Healthcare 公司)。

2 实验方法

2.1 外膜蛋白样品的制备和双向电泳

志贺菌福氏 2a 2457T 野生株 37℃ 晚期外膜蛋

白样品制备方法和一向等电聚焦(胶条为 18 cm; pH 4.0–7.0), 二向 SDS-PAGE 电泳具体步骤参照文献^[7,10]。该样品使用两根胶条同时进行电泳。

2.2 染色、脱色和扫描

待二向 SDS-PAGE 电泳溴酚蓝前沿刚刚迁移至凝胶底部跑出时停止电泳, 两块胶中一块考马斯亮蓝染色过夜, 另一块采用 UPN-蛋白质负染试剂盒染色。方法如下:

考马斯亮蓝染色液(考马斯亮蓝 G250 400 mL): G250 0.4 g, 无水甲醇 136 mL, 40% (NH₄)₂SO₄ 170 mL, H₃PO₄ 12 mL, ddH₂O 82 mL。将凝胶放入染色液中, 置于摇床上, 低速振荡染色过夜。第 2 天用 1%冰乙酸脱色后扫描。

负染(参照试剂盒说明):

(1) 固定: 电泳完成后将凝胶放入 50 mL 固定液中(50%乙醇, 10%乙酸), 于摇床上室温摇动 30 min, 摇动速度约为 40 r/min。

(2) 水洗: 在 50 mL 去离子水中清洗 2 次, 每次 5 min。

(3) 平衡: 在 50 mL 50%甲醇溶液中平衡 10 min。

(4) 染色: 在 300 mL 染色液中染色 15 min。染色液的配置: 取 250 mL N2, 加入 50 mL N1, 混匀即可。

(5) 水洗: 在 50 mL 去离子水中清洗 3 min。

(6) 检测: 将凝胶置于黑色背景下进行扫描。

2.3 胶内酶切和 MALDI-TOF/MS 鉴定

参照文献^[11]描述的方法将经过负染和考染的 2-DE 胶上相对应的 8 对蛋白点, 随后进行胶内酶解, MALDI-TOF 质谱鉴定。所得数据用本地化的 Mascot 程序进行检索, 并对比质谱一级峰值。

3 结果

3.1 负染和考染双向电泳图

志贺菌福氏 2a 2457T 野生株 37°C 晚期外膜蛋白样品制取好后, 用蛋白定量试剂盒, 对其进行定量。以 800 μg 每管分装上样。采用 pH 4.0–7.0 的 IPG 胶条为载体进行一向等电聚焦, 达到等电平衡后, 二向用 12.5% 的 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 下胶后分别以负染和考染两种方法进行染色, 脱色后 PAGE 胶的扫描图如图 1 所示。

比较电泳图可以发现, 同样的样品, 相同的电泳条件下, 负染可以分辨出超过 300 个蛋白点, 考染约 200 个蛋白点, 显然, 负染的灵敏性高于考染, 可以呈现出更多的蛋白点。

3.2 蛋白点三维图像

使用 Imagemaster 2D platinum 软件分析负染和考染胶上相对应蛋白点的三维图像, 如图 2 所示为负染胶上 FT01、考染胶上 LT01 及旁边的一个点的 3D 图像。

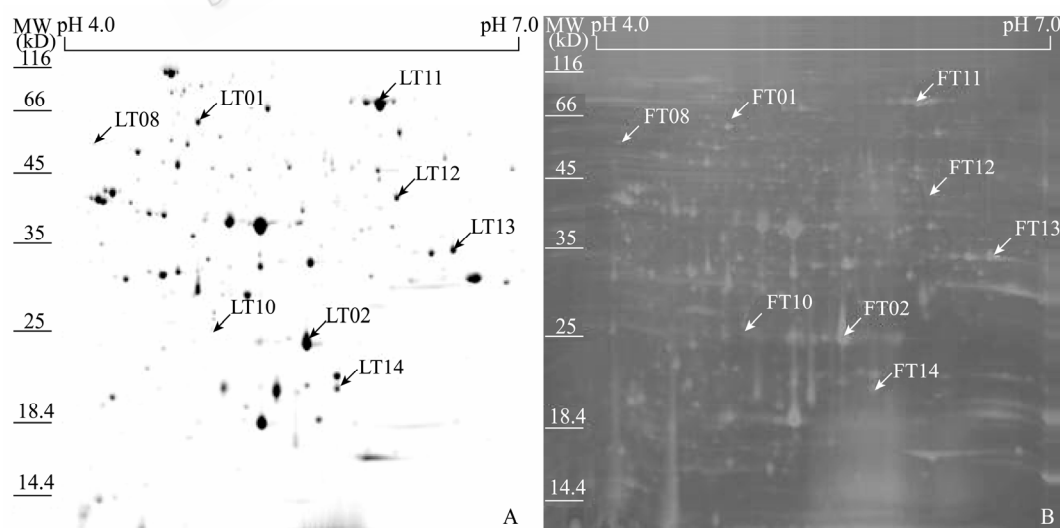


图 1 考染/负染双向电泳图对比

Fig. 1 The comparison of CBB-G250 stained/reverse stained 2-DE gel

注: A: 考染; B: 负染。

Note: A: CBB staining; B: Reverse staining.

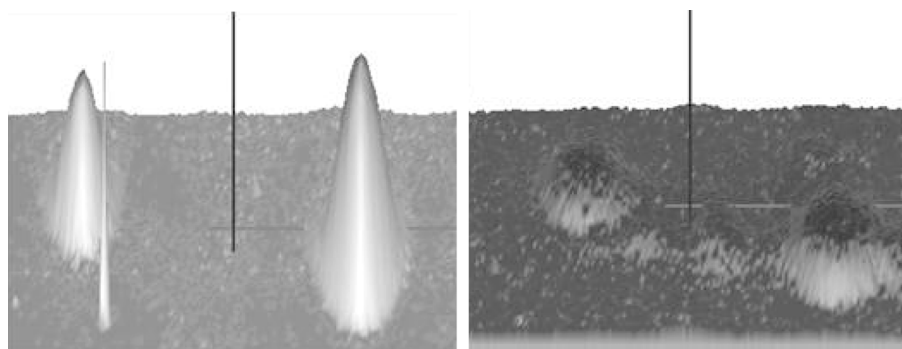


图 2 考染/负染三维图像分析结果

Fig. 2 The 3-D images of CBB-G250 stained/reverse stained protein spots

注: A: 考染; B: 负染.

Note: A: CBB-G250 staining; B reverse staining.

从图 2 中可以看出, 考染胶图上的蛋白点在软件中呈现出圆润饱满的峰型, 而负染胶图上的蛋白点则呈现出很多棘状突起, 而且蛋白点与周边背景的对比不如考染明显。在同一蛋白浓度下, 负染胶图上表现出的信噪比低, 这将影响负染的动态线性范围, 不适合用其做蛋白定量分析。因此, 虽然负染的灵敏度更高, 但考染的胶图更适合进行定量比较。

3.3 蛋白鉴定结果

对比考染和负染胶图, 依据蛋白分子量大小、等电点及蛋白点的染色深浅程度的不同, 选取经过负染和考染的 2-DE 胶上相对应的 8 对蛋白点, 胶内胰酶酶解后进行 MALDI-TOF/TOF 鉴定, 相应蛋白点见图 1 标识。通过 Mascot 从数据库中对每个蛋白点进行查询, 负染的胶图上取的 8 个点有 7 个点被鉴定出, 另外 1 个蛋白点 FT10 无鉴定结果, 而考染的 8 个蛋白点均被鉴定出, 蛋白的质谱鉴定结果见表 1。

从结果中可以看出, 两种染色方法的质谱兼容性均很好。但与考染相比, 经过负染的蛋白点得分略低。虽然点 FT10 没有得到有效鉴定结果, 但其对应点 LT10 的检索得分也是刚刚超过阈值。进一步分析发现, 二者的质谱峰图类似, 如图 3 所示, 得分最高的匹配蛋白是同一个蛋白(其肽段匹配数也完全一致), 差别在于 FT10 质谱结果中的不匹配离子峰偏多。

3.4 质谱峰图对比

串联质谱的检索得分值很大程度上与二级质谱肽段测序的结果好坏相关, 而二级质谱肽段测序具有更强的随机性, 所以一级质谱峰图的好坏能够更加直接地反映出两种染色方法在质谱兼容性上的差

异。由于篇幅的原因, 本文只选取前 4 对相应蛋白点的 MALDI-TOF/TOF 一级质谱峰图, 如图 3 所示。

从图 3 可以看出, 两种染色方法获得的质谱峰图相似, 虽然某些离子峰的强弱对比有所变化, 且经过负染的蛋白点得到的质谱峰图出现更多的离子峰, 但整体没有显著差异, 都能得到准确的鉴定结果, 因此负染与质谱的兼容性是很好的。

4 讨论

显然, 负染灵敏度高于考染, 能分辨更多蛋白, 从分辨率方面考虑, 负染方法优于考染。从本实验来看, 负染与质谱的兼容性良好, 尽管负染蛋白点质谱峰图中出现的未匹配离子峰多于考染蛋白点峰图, 但这并不影响蛋白鉴定的整体结果; 此外, 负染中这些未匹配的峰也可能是蛋白翻译后修饰造成的。商品化的负染试剂盒能够保持染色的重复性和稳定性, 节省染色、脱色的时间, 可以在短期内得到蛋白图谱。因此, 对于蛋白质组学来说, 负染方法的发展无疑能够扩大全菌蛋白库的数据, 使之更加丰富。但本实验发现, 负染也存在如下不足之处: 经过负染的蛋白点三维成像不如考染的圆润, 表现出的信噪比低, 不适于蛋白定量分析, 动态线性范围还是不尽人意; 经过负染的蛋白胶不易保存, 长时间保存后, 胶有些部分出现腐蚀现象, 且背景逐渐降低, 致使难以区分低丰度蛋白, 这样不利于后续蛋白样品的取样及操作。

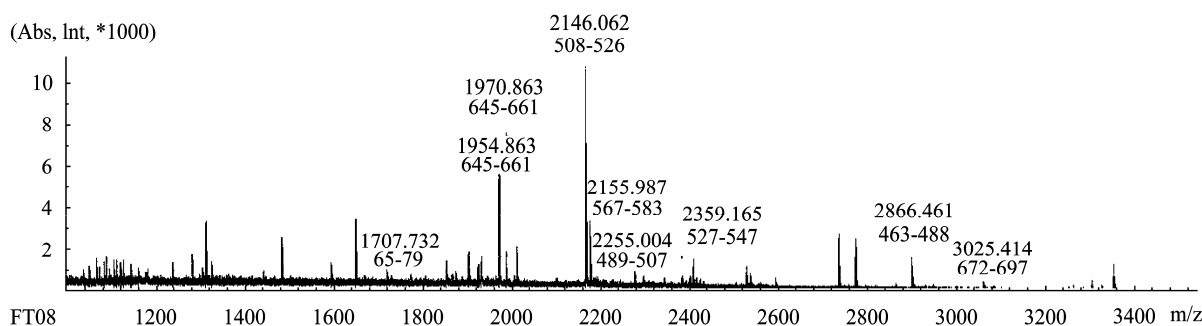
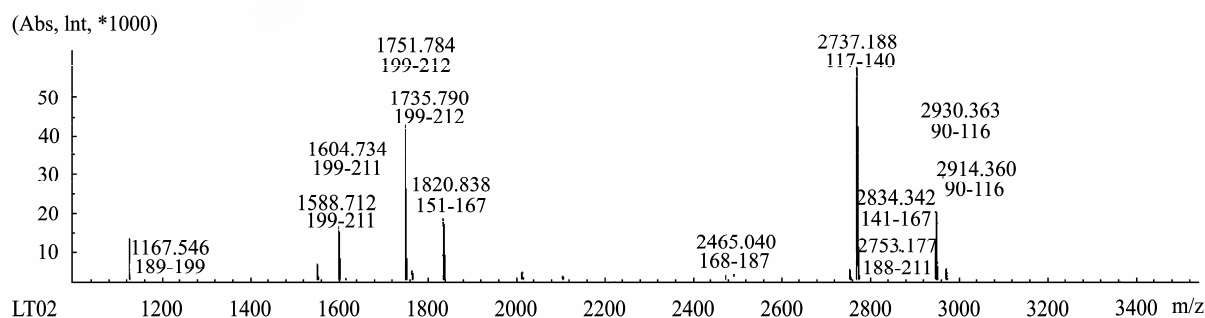
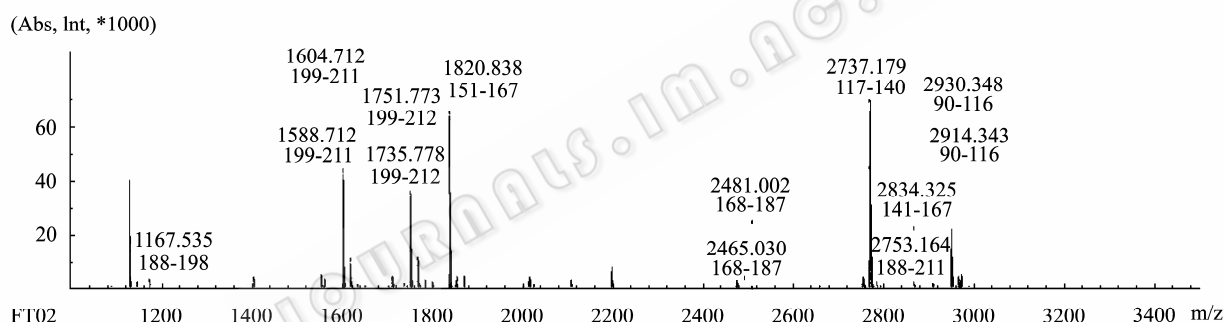
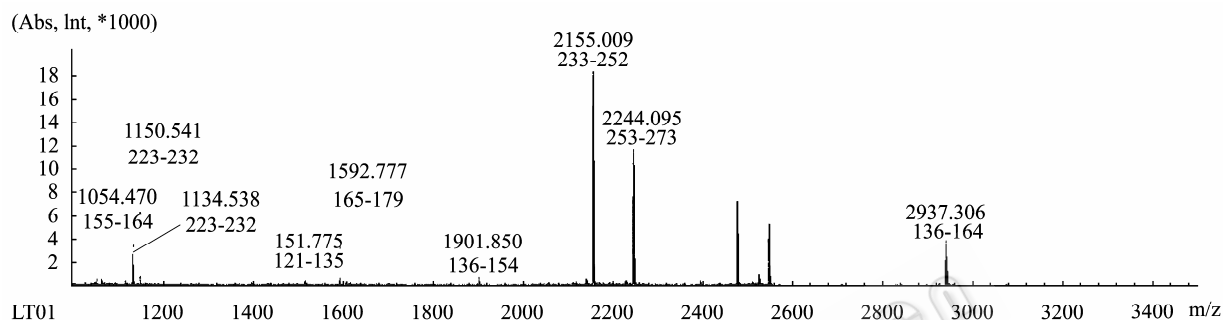
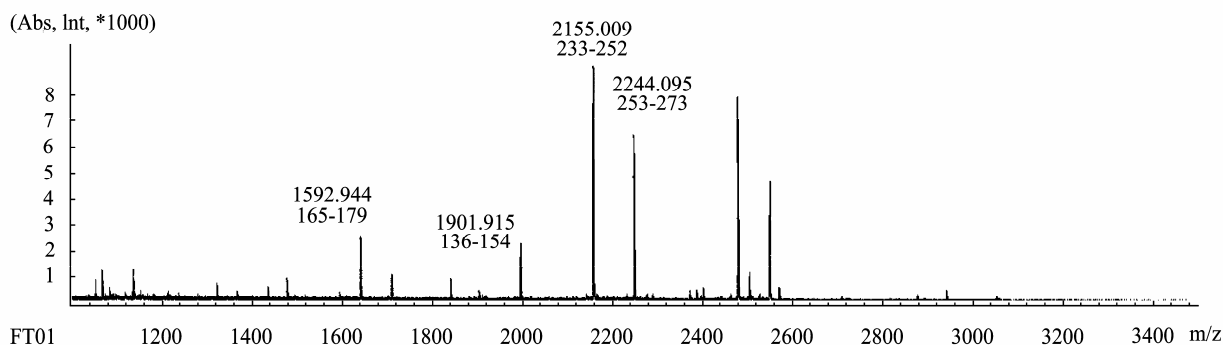
目前商品化的负染试剂盒很少, 且存在上述应用上的局限性, 但是随着它的进一步改良, 发挥负染保持蛋白质完整性、高分辨率及与质谱良好兼容性的优点, 将对生物蛋白质组学的研究具有推动作用。

表 1 蛋白点的质谱鉴定结果
Table 1 Identification results of protein spots by MALDI-TOF/TOF

蛋白点 Spot ID	分值 Score ^a	基因号 GI	串联序列(5'→3') Sequence of peptides ^b	肽段分值 Score of peptides	分子量 MW (D)	序列覆 盖率 Sequence coverage (%)	肽段数 (匹配/查询) Matched/ Searched	蛋白名称 Protein
FT01*	332	gi 30042565	GSSFTLNAGDTATDTTVNGGLFTAR AVNLNEGTLTLNDSTVTTDVIAQR	156 164	73161	6	2/30	外膜菌毛蛋白
FT01*	284	gi 30042564	DTLIYAGGDQTVHGEAHNTR LEGGNQYVHNGGTATETLINR	128 122	30628	25	4/26	外膜菌毛蛋白
FT02	337	gi 30041027	DSWGAAGQVGVDYLINR LDPWVFMFSAGYR	170 88	22913	58	13/86	假想外膜蛋白
FT08	55	gi 30039976			90611	19	9/35	假想外膜蛋白 S0170
FT10 ^c	36	gi 30041798			92636	13	6/32	假想外膜蛋白
FT11	321	gi 30040359	IYQRPFGGQSK LGGNSLLDLVVFR	38 106	64989	54	27/60	琥珀酸脱氢酶 黄素蛋白亚基
FT12	66	gi 18462529			35771	27	5/12	质粒稳定 遗传蛋白
FT13	268	gi 30042548	RFDWQDR DKDFNPLIGR YNVDNAINANFR	20 48 101	139704	15	19/46	丝氨酸蛋白酶
FT14	201	gi 30043220	AEAQVIEQANKR IVAQAQAEIEAER	73 73	17310	26	5/21	膜结合 ATP 合成酶 FO 复合物
LT01*	420	gi 30042564	DGGGQSLNGLAVNTTLDNRGEQWV HGGGK QVIWSSGMAR DTLIYAGGDQTVHGEAHNTR	85 23 187	30628	51	11/36	外膜菌毛蛋白
LT01*	171	gi 30042565	AVNLNEGTLTLNDSTVTTDVIAQR	137	73161	14	6/30	外膜菌毛蛋白
LT02	347	gi 30041027	DSWGAAGQVGVDYLINR LDPWVFMFSAGYR LDPWVFMFSAGYRF	104 86 58	22913	58	13/79	假想外膜蛋白
LT08	206	gi 30039976	EMPFYENFYAGGSSTVR	107	90611	20	12/18	假想外膜 蛋白 S0170
LT10	50	gi 30040307	—	—	20862	40	6/32	烷基氢过氧化物 还原酶 C22 亚基
LT11	525	gi 30040359	IYQRPFGGQSK IYQSTTNAHINTGDGVGMAIR AAGLHLQESIAEQGALHDASESDVE ASLDR KALQECMQHNFSVFR ALQECMQHNFSVFR	49 61 66 67 77	64989	63	32/75	琥珀酸脱氢酶, 黄素蛋白亚基
LT12	153	gi 18462529	LAWLEDGEVR	29	35771	53	14/40	质粒稳定 遗传蛋白
LT13	287	gi 30042548	DYSSHSLYVGAEGYR AGLGYQFDLFANGETVLR	149 115	139704	9	7/68	丝氨酸蛋白酶
LT14	483	gi 30043220	QKEIADGLASAER IVAQAQAEIEAER AEAQVIEQANKR	123 98 107	17310	59	13/37	膜结合 ATP 合成 酶, FO 复合物

注: a: Mascot 软件根据每个蛋白质的匹配状况计算匹配概率给出的得分值, 这个值高于 49 分则认为结果可信, 分值越高可信度也越高; b: 对于使用串联质谱鉴定得到的结果, 给出了相应的匹配肽段序列; c: 分值不够, 鉴定结果不可信, 不能作为有效鉴定; *: 混合物。

Note: a: The score of each protein that based on the matching probability according the Mascort soft and it must be super than 49; b: The sequences of matching peptide that originate from MS-MS; c: Unreliable identification results as the score is lower than 49; *: Mixture.



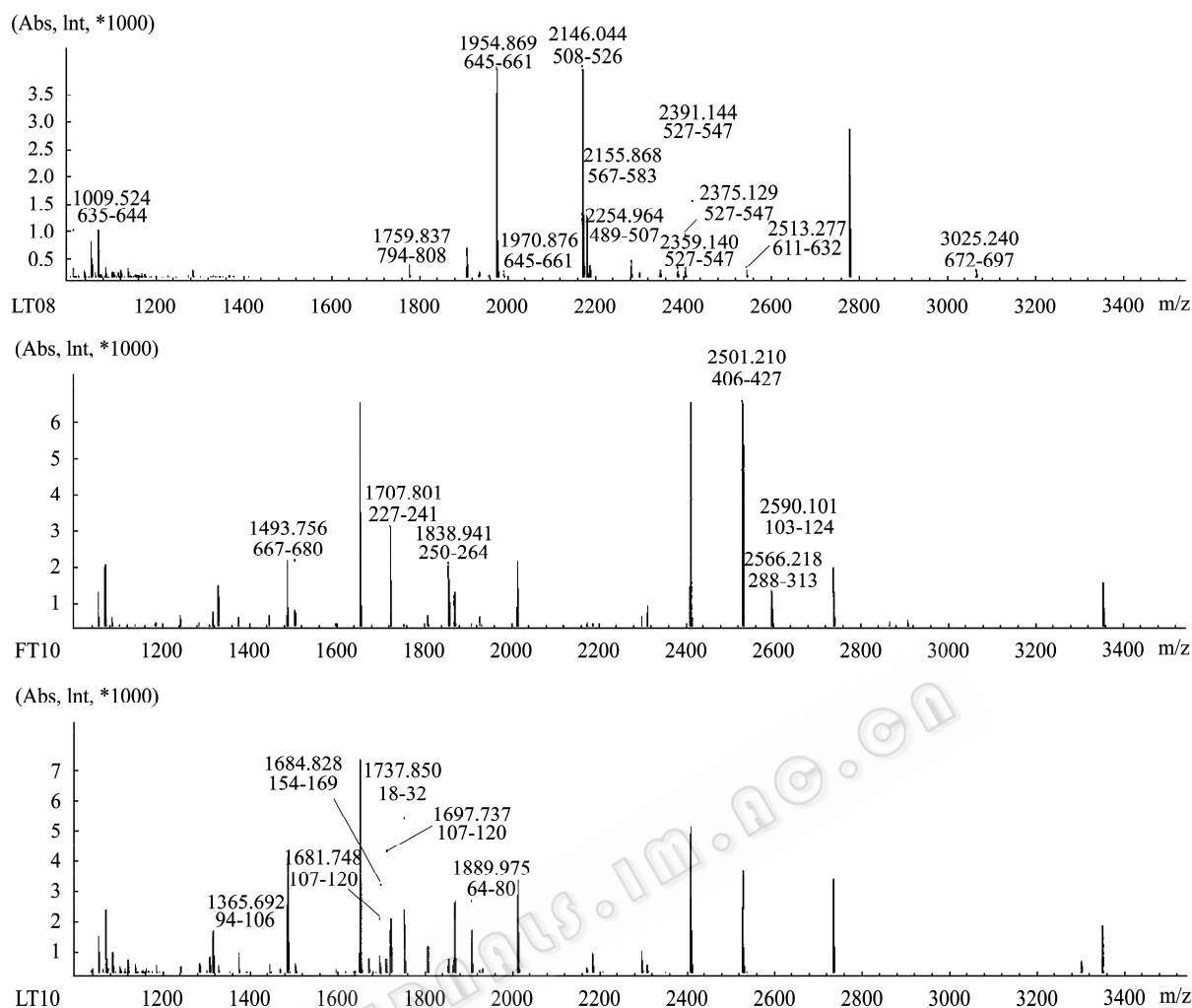


图3 考染/负染中对应蛋白点的MALDI-TOF/TOF一级质谱峰图对比结果

Fig. 3 The mass spectrum of corresponding protein spots on CBB-G250 stained /reverse stained gel

参考文献

- [1] 王恒樑, 袁静, 刘先凯, 等译. 蛋白质组学原理. 北京: 化学工业出版社, 2007: 21.
- [2] Priska D, Von HB, Eugene YI, *et al.* The application of new software tools to quantitative protein profiling via isotope-coded affinity tag (ICAT) and tandem mass spectrometry: Statistically annotated datasets for peptide sequences and proteins identified via the application of ICAT and tandem mass spectrometry to proteins copurifying with T cell lipid rafts. *Mol Cell Proteomics*, 2003(2): 428-442.
- [3] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 1996, **68**(5): 850-858.
- [4] White IR, Pickford R, Wood J, *et al.* A statistical comparison of silver and SYPRO ruby staining for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 2004, **25**(17): 3048-3054.
- [5] Carlos AP, Miguel C, Pedro RC, *et al.* Protein reverse staining: high-efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels. *Anal Biochem*, 1995, **224**(1): 203-211.
- [6] Jun XY, Robin W, Tom B, *et al.* A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, **21**(17): 3666-3672.
- [7] Henningsen R, Gale BL, Straub KM, *et al.* Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2002, **2**(11): 1479-1488.
- [8] Waneed AA, Gupta PD. Application of an eosin b dye method for estimating a wide rang of proteins. *Biochemical And Biophysical Methods*, 1996, **33**(3): 187-196.
- [9] Waneed AA, Rao KS, Gupta PD. Mechanism of dye binding in the protein assay using eosin dyes. *Anal Biochem*, 2000, **287**(1): 73-79.
- [10] 朱力, 刘先凯, 赵格, 等. 弗氏 2a 志贺菌 2457T 株碱性蛋白质组图谱的建立. 生物技术通讯, 2007, **18**(3): 430-433.
- [11] 王鸿丽, 刘炳玉, 谷苗, 等. 改进的质谱兼容的胶内酶切方法. 军事医学科学院院刊, 2005, **29**(2): 168-172.