

研究简报

利用胶束电动毛细管电泳比较五种提取鲫鱼总蛋白方法研究

黎 锋<sup>1</sup> 吴海强<sup>1</sup> 戈早川<sup>2</sup> 刘志刚<sup>1</sup>

(1. 深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060; 2. 深圳大学理学院, 深圳 518060)

COMPARISON OF FIVE EXTRACTION METHODS BY ANALYZING  
THE TOTAL PROTEINS FROM CARP USING EMKC

LI Feng<sup>1</sup>, WU Hai-Qiang<sup>1</sup>, GE Zao-Chuan<sup>2</sup> and LIU Zhi-Gang<sup>1</sup>

(1. Auergy and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen 518060;

2. School of Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060)

关键词: 提取方法; 食物过敏原; SDS-PAGE; MEKC

Key words: Extraction method; Food allergen; SDS-PAGE; EMKC

中图分类号: Q503 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)01-0125-04

毛细管电泳又称高效毛细管电泳 (High-performance capillary electrophoresis, HPCE) 是 20 世纪 80 年代问世的一种高效液相分离法。毛细管电泳分离效率高, 样品用量少, 灵敏度高, 快速, 分析范围广, 广泛应用于离子、小分子、糖类、核酸、多肽、蛋白、病毒、细菌的分离<sup>[1]</sup>。本实验采用的是胶束电动毛细管电泳 (Micellar electrokinetic chromatography, EMKC), 基本原理是利用溶质在胶束与水相间分配系数差异达到分离目的, 不但能够分离带电物质, 而且能够分析不带电荷的中性物质。因此 EMKC 常被用于蛋白质和多肽的分离, 如 Nishi H. 等<sup>[2]</sup>利用 EMKC 电泳成功分离了  $\beta$ -内酰胺抗菌素 ( $\beta$ -lactam antibiotics)。

本文利用 SDS-PAGE 和 MEKC 对鲫鱼总蛋白的提取方法进行了分析, 目的在于探讨毛细管电泳在食物过敏原分离鉴

定中的价值, 并找到最适合 EMKC 的提取方法, 为鱼类食物过敏原的指纹图谱打下基础。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 电源、垂直电泳槽 (Bio-Rad 公司); 冷冻真空干燥机 (MODULYOD-230, Thermo savant 公司); 毛细管电泳仪 (P/ACE<sup>TM</sup> MDQ System, Beckman 公司); 弹性石英毛细管 (河北永年锐沅色谱器件有限公司); 蛋白 Marker (SM0661, 深圳晶美生物工程有限公司); Trizol 试剂 (Invitrogen 公司); CHAPS, PMSF (Amresco 公司); 蛋白质含量测定试剂盒 (BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit, Pierce 公司); 其他试剂都为 Sigma 公司产品。新鲜鲫鱼从深圳水产品市场随机选购, 购回后立即进行实验。提取液成分 (表 1)。

表 1 五种方法的提取液组成

Tab. 1 Composition of five isolation buffer

方法 (提取液名称) Methods	提取液的组成 Composition of isolation buffer
a (Trizol reagent)	Invitrogen 公司
b (裂解液 b, pH 8.0)	50mmol/L Tris-HCl; 0.15mol/L NaCl; 4% Triton-100; 0.25% 脱氧胆酸钠; 1mg/mL PMSF <sup>[3]</sup>
c (裂解液 c, pH 8.0)	8mol/L 尿素; 40mmol/L Tris-HCl; 2% CHAPS; 1mmol/L PMSF; 1mmol/L EDTA

收稿日期: 2006-01-23; 修订日期: 2006-11-21

基金项目: 广东省科技重点计划项目 (No. 2003A3080502); 广州市重点科技计划项目 (No. 2002-Z2E4021); 深圳市科技计划项目 (No. 200326);

国家 863 计划 (No. 2006AA100308) 资助

作者简介: 黎锋 (1981—), 男, 汉, 湖南浏阳人; 在读硕士研究生; 研究方向为医药生化与分子生物学。E-mail: maplelife238@126.com

通讯作者: 刘志刚, 教授, 博士生导师; E-mail: lzg@szu.edu.cn

续表

方法(提取液名称)Methods	提取液的组成 Composition of isolation buffer
d (Coca s 液 ,pH 8.2)	NaCl 5g ,NaHCO <sub>3</sub> 2.75g ,结晶酚 4g ,加入超纯水至 1L
e (PBS 液 ,pH 8.0)	137mmol/L NaCl ;2.7mmol/L KCl ;10mmol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ;2mmol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

1.2 方 法

1.2.1 细胞破碎 取新鲜鲫鱼 ,去鱼皮和内脏 ;剪碎 ,液氮反复冻融 3 次 ,并在研钵内反复研磨冻溶后的样品。

1.2.2 鲫鱼总蛋白提取 取破碎后的样品按表 2 提取。提取后将上清冷冻真空干燥 , - 80 保存样品。

表 2 鲫鱼总蛋白提取  
Tab.2 Extraction of total protein

方法 Methods	样品量 Weight (g)	提取液 Buffer	丙酮去脂 De-fat	样品/ 提取液 Concentration (g/ mL)	提取时间 Time	离心 Centrifugation	备注 Note
方法 a Method a	0.1	Trizol	否	1:15	—	—	按说明书操作
方法 b Method b	1	裂解液 b	否	1:10	8min	13000r/ min , 15min	—
方法 c Method c	1	裂解液 c	否	1:10	8min	同上	—
方法 d Method d	1	Coca s 液	是	1:10	6h	同上	去脂至上清
方法 e Method e	1	PBS 液	是	1:10	6h	同上	同上

1.2.3 总蛋白浓度测定 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒。按公司操作说明书 ,采用 96 孔板法测定。将方法 a、b、c、d、e 的鲫鱼总蛋白提取液 ,以及 7 种不同浓度标准蛋白样品 ,酶标仪 562nm 测定样品光收值 ;重复上述过程两次 ,取平均值绘制标准曲线图 ,从标准曲线计算出提取液的总蛋白浓度。

1.2.4 不连续 SDS-PAGE 参照《分子克隆实验指南》<sup>[4]</sup> ,采用分离胶浓度为 15 %的 Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 ,120V ,110min 电泳。

1.2.5 MEKC 上样浓度 称 - 80 保存的方法 a、b、c、d、e 的鲫鱼总蛋白提取液的冻干品 10mg ,用电泳缓冲液 500μL 溶解 ,离心 10000r/ min ×5min。调整毛细管电泳样品的上样浓度为 2mg/ mL。超纯水由 Millipore 公司超纯水机制备。所有样品和溶液在上样以前用 Millipore 公司的 0.22μm 滤膜过滤。

1.2.6 MEKC 取新弹性石英毛细管 (总长度 61cm ,有效长度为 45cm) ,开机后用甲醇洗管 2min ,超纯水洗管 1min ,0.1mol/L 盐酸洗管 2min ,水洗管 1min ,0.1mol/L 氢氧化钠洗管 2min ,水洗管 2min。取浓度为 2mg/ mL 的方法 a、b、c、d、e 的毛细管电泳样品各 150μL 上样 ,每次毛细管电泳按表 3 条件进行。

表 3 毛细管电泳条件  
Tab.3 Capillary electrophoresis conditions

程序 Procedure	条件 Separation condition
洗管 1 Rinse 1	0.1mol/L NaOH , 3min , 20psi
洗管 2 Rinse 2	超纯水 ,3min ,20psi
洗管 3 Rinse 3	电泳缓冲液 ,3min ,20psi
上样 Sample injection	0.3s ,0.5psi
调零 Auto zero	0.5min
检测 Detection	214nm(μv)
毛细管 Capillary I. D.	45cm ×0.75μm
EMKC 电泳缓冲液 EMKC buffer	20mmol/L Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ,50mmol/L SDS ,pH 8.8
温度 Temperature	25
时间 Time	25min
电压 Voltage	15kV

## 2 结 果

### 2.1 五种方法提取液的总蛋白浓度

用 BCA 试剂盒测得方法 a、b、c、d、e 提取的鲫鱼总蛋白浓度分别为:3.91、3.43、3.72、5.36、5.25mg/ mL (562nm)。

### 2.2 鲫鱼总蛋白 SDS-PAGE

电泳时 1 号孔道加入蛋白 Marker 5 $\mu$ L,2—6 号孔道加入各种方法提取的样品 8 $\mu$ L。电泳结果(图 1)。

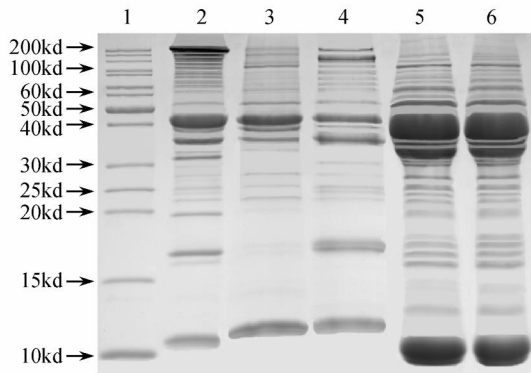


图 1 鲫鱼总蛋白的 SDS-PAGE 图(15%,考马斯亮蓝 R-250 染色)

Fig.1 SDS-PAGE(15%) of carp extracts, coomassie brilliant blue R-250 staining

1. 蛋白 Marker;2. 方法 a;3. 方法 b;4. 方法 c;5. 方法 d;6. 方法 e

Lane 1. Protein Marker;Lane 2. Method a;Lane 3. Method b;

Lane 4. Method c;Lane 5. Method d;Lane 6. Method e

5 种方法提取获得鲫鱼蛋白条带数量和分布各异,Trizol 法获得的条带最多。这 5 种方法 SDS-PAGE 在 17kD、24kD、28kD、38kD、40kD、53kD、70kD 处有共同条带;并且 5 种方法在 40kD 处的量非常多,是高丰度蛋白。

### 2.3 EMKC

#### 2.3.1 观察不同进样时间、电压和温度对 MEKC 的影响

按表 2 条件,采用 Trizol 法的毛细管电泳样品来确定 EMKC 的最佳分离条件:比较 15 和 25 温度;比较 15kV 和 20kV 电压;比较 3s 和 6s 进样时间(图 2)。

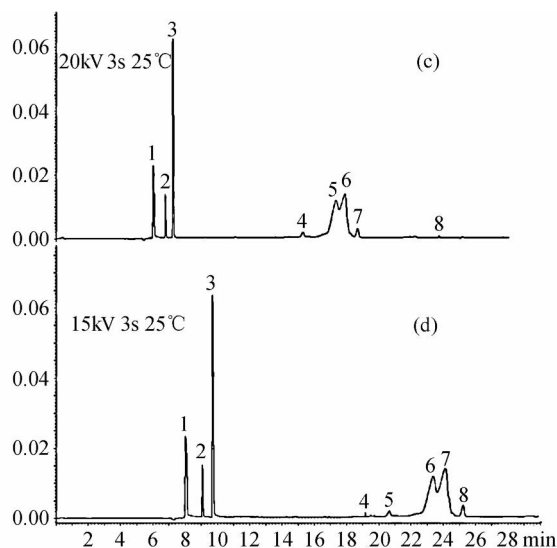
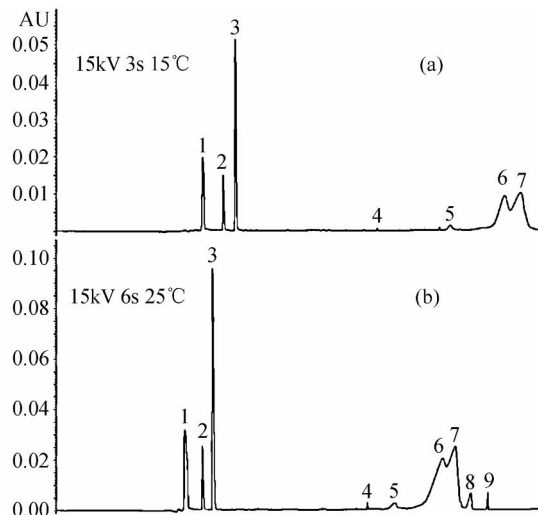


图 2 温度、进样时间和电压对 EMKC 的影响图

Fig.2 Capillary electropherograms of total protein at different temperature, injection time and voltage

(a) 15kV, 3s, 15, 30min; (b) 15kV, 6s, 25, 30min; (c) 20kV, 3s, 25, 30min; (d) 15kV, 3s, 25, 30min;其他条件同表 2

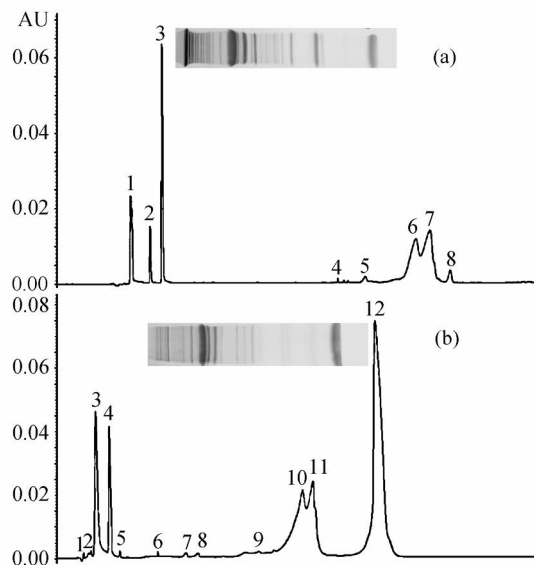
Other conditions refers to Tab.2

从上图可以看出图 2(d) 是最佳电泳图,其分辨率和峰形都最好。所以最佳电泳条件为:15kV, 3s, 25。

#### 2.3.2 五种不同方法提取样品 MEKC 色谱图对比分析

以 15kV, 3s, 25 为电泳条件(其他条件同表 2),进行 5 种不同方法提取样品胶束电动毛细管电泳,并与其 SDS-PAGE 图作比较(图 3)。

如图中所示,鲫鱼总蛋白 SDS-PAGE 图中的紫外吸收峰与 EMCE 图的电泳条带基本对应,其中 SDS-PAGE 图中小分子量的条带对应 EMCE 图中前面几个峰,SDS-PAGE 图中大分子量条带对应于 EMCE 图后面几个峰。



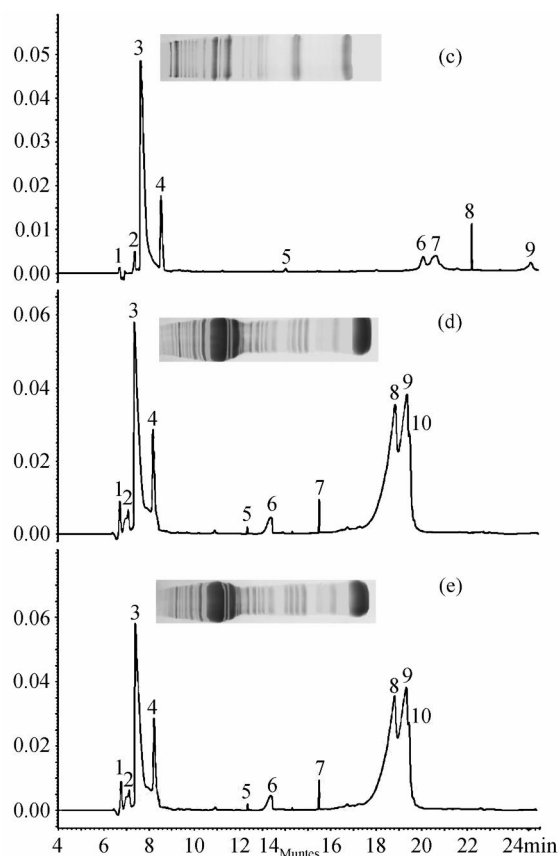


图3 五种不同方法提取样品的 MEKC 比较以及  
SDS-PAGE 的比较(4—25min)

Fig. 3 Capillary electropherograms of total protein isolated by five different methods and comparison to SDS-PAGE respectively (4—25min)

(a) 方法 a; (b) 方法 b; (c) 方法 c; (d) 方法 d; (e) 方法 e

(a) Method a; (b) Method b; (c) Method c; (d) Method d;

(e) Method e

### 3 讨论

蛋白提取的试剂有很多,例如传统的盐离子缓冲液提取法的Coca s液、PBS液。为了进一步提高蛋白质提取的效

率,近几年国内外普遍采用裂解液提取蛋白质。Trizol 试剂是一种适用于从各种组织或细胞中快速分离 RNA、DNA 和蛋白质的试剂。

HPCE 虽然有许多优点,但是在蛋白分离领域,蛋白吸附是一个很大的问题。本实验采用表面活性剂 SDS 来解决吸附问题,收到了良好的效果。此外,SDS 能够阻止分析物对毛细管壁附和防止毛细管堵塞<sup>[5]</sup>。HPCE 对上样量要求是比较严格的,一般上样参数是 0.5psi,5s。本次实验首先采用的是 6s 和 3s 上样时间,优化后采用 3s 上样时间。从 5 种提取方法的 MEKC 图可以看出,Trizol 法提取的蛋白 MEKC 图是最好的,并且在几次重复实验中都能够很好的重复出相同的结果。综合可知,Trizol 法提取鲫鱼总蛋白最适合 EMKC 指纹图谱研究;此外,Coca s 法和 PBS 法也比较适合。

指纹图谱的概念最早来源于 19 世纪末 20 世纪初的犯罪学和法医学。对于食物过敏原蛋白,由于过敏原材料来源不同,提取方法不同,条件的改变等使提取结果往往都有较大差异。因此 HPCE 指纹图谱应用于食物过敏原快速检测研究将有很重要的价值。

### 参考文献:

- [1] Chen Y. Capillary electrophoresis technology and application[M]. Beijing: Chemical Industrial Press. 2000, 2: 7 [陈义. 毛细管电泳技术及应用. 北京: 化学工业出版社. 2000, 2: 7]
- [2] Nishi H, et al. Separation of  $\beta$ -lactam antibiotics by micellar electrokinetic chromatography[J]. *Chromatogr.* 1989, **477**: 259—270
- [3] Sanj K S, et al. Quantification of a neurotrophin receptor from sub-milligram quantities of brain tissue using Western blotting. [J]. *Brain Research Protocols*, 1998, **3**: 88—93
- [4] Joseph S, David W R. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. Beijing: Science Press. 3rd ed. 2002, 9, A8: 40—52 [萨姆布鲁克, D W 拉塞尔著. 黄培堂译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 第三版, 2002, 9, A8: 40—52]
- [5] Shigeru T, et al. Micellar electrokinetic chromatography using high-molecular-mass surfactant between anionic cationic surfactant and effect of modifiers [J]. *Journal of Chromatography*, 1995, **709**: 3—10