

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¹ 吴海强¹ 戈早川² 刘志刚¹

(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 Feng¹, WU Hai-Qiang¹, GE Zao-Chuan² and LIU Zhi-Gang¹

(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^[1]。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^[2]利用EMKC电泳成功分离了-内酰胺抗生素(-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(MODUL YOD-230, Thermo savant公司); 毛细管电泳仪(P/ACETM MDQ System, Beckman公司); 弹性石英毛细管(河北永年锐沣色谱器件有限公司); 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(BCATM 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 ^[3]
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: lzhg@szzu.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 ₃ 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 ₂ HPO ₄ ;2mmol/L KH ₂ PO ₄

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 测定样品光吸收值;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》^[4],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 ₃ PO ₄ ,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 5μL,2—6号孔道加入各种方法提取的样品8μL。电泳结果(图1)。

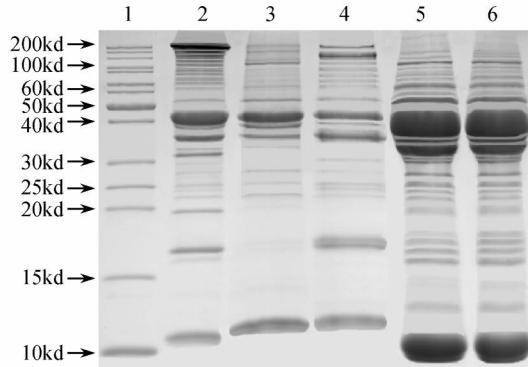


图1 鲫鱼总蛋白的SDS-PAGE图(15%,考马斯亮蓝R-250染色)

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EMCC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)。

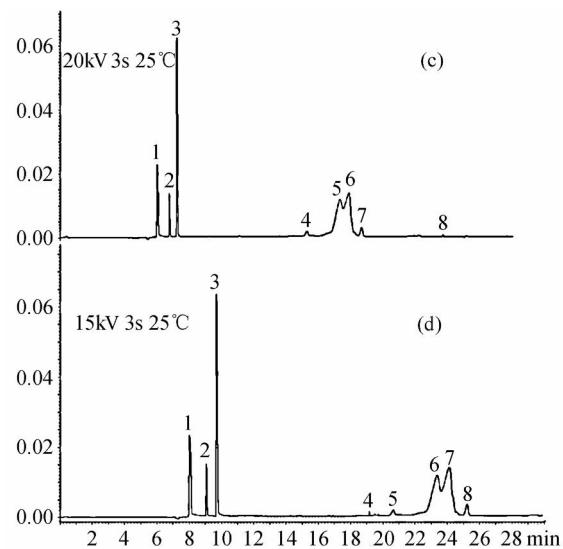
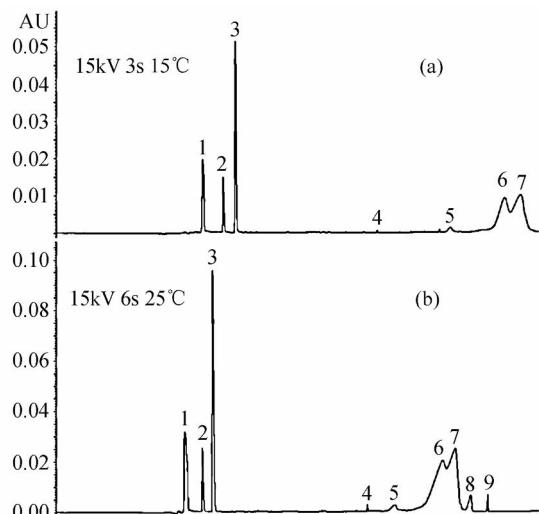


图2 温度、进样时间和电压对EMKC的影响图

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

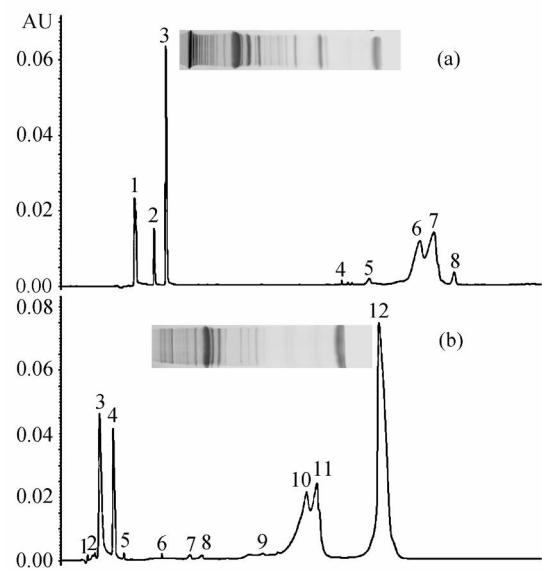
Other conditions refers to Tab. 2

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。



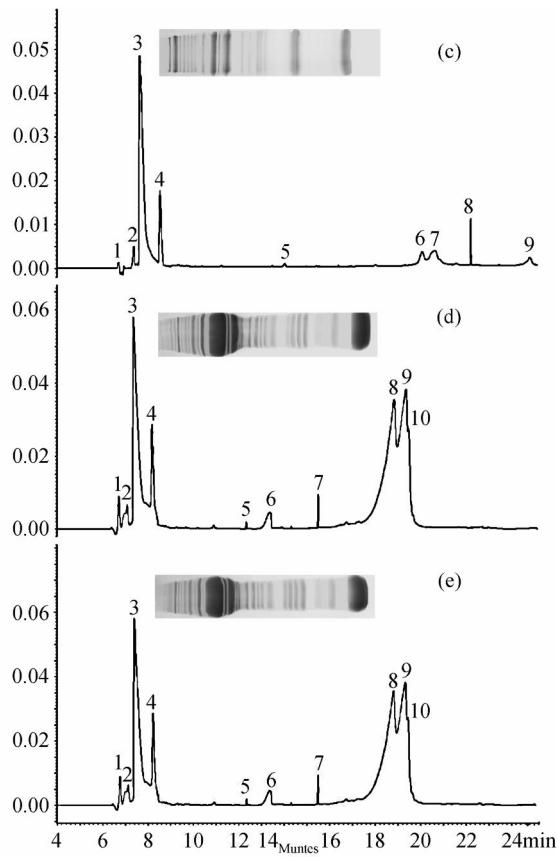


图3 五种不同方法提取样品的MEKC比较以及与SDS-PAGE的比较(4—25min)

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 虽然有许多的优点,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^[5]。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 β -lactam antibiotics by micellar electrokinetic chromatography [J]. Chromatogr. 1989, 477: 259—270
- [3] Sanoj K.S, et al. Quantification of a neurotrophin receptor from submilligram 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 [J 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