

结核分枝杆菌菌体蛋白双向电泳技术的优化

张 鹭^{1,2} 王庆忠² 路福平¹ 王洪海²

(1 天津科技大学生物工程学院, 天津市工业微生物学重点实验室 天津 300222

2 复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室, 遗传学研究所 上海 200433)

摘要 目的: 提取结核分枝杆菌菌体蛋白并建立一种利用双向电泳分离结核分枝杆菌蛋白质的方法。方法: 分离提取结核分枝杆菌菌体蛋白。样品采用不同 pH 梯度的 IPG 胶条进行第一向等电聚焦, 12% SDS-PAGE 凝胶进行二向电泳。银染后双向电泳图谱用 Molecular Image Fx 激光图像扫描仪扫描, PDQuest 6.0 软件完成配比分析。结果: 优化了结核分枝杆菌菌体蛋白的提取方法, 用裂解液 8mol/L 尿素结合 2mol/L 硫脲, 140mmol/L DTT, 0.5% biolyte, 4% CHAPs, 400mg/ml OG 处理, 成功提取了蛋白, 并通过结核分枝杆菌双向电泳技术体系的优化, 建立了结核分枝杆菌菌体蛋白的分解图谱。pH4-7 及 pH7-10 两胶面上共 1387 个点, 占所检测到的蛋白总数的 86%, 绝大部分(1194 个)蛋白位于 pH4-7 范围内。结论: 为进一步开展结核分枝杆菌的比较蛋白质组学研究提供了方法学参考。

关键词: 蛋白质组; 双向电泳; 结核分枝杆菌; 菌体蛋白质

中图分类号: Q936 **文献标识码:** B

Optimizing of two dimensional chromatography technology about cytosolic protein of *Mycobacterium tuberculosis*

ZHANG Lu^{1,2}, WANG Qing-zhong², LU Fu-ping¹, WANG Hong-hai²

(1 The College of Biotechnology, Tianjin University of Science Technology, Tianjin key Laboratory of industrial microbiology, Tianjin 300222, China

2 State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Handan road 220, Shanghai 200433, China

ABSTRACT Background and Objective: To extract and develop an approach for fractionating the cytosolic proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE). **Methods:** After extracting, cytosolic proteins were separated by 2-DE with different pH IPG and 12% SDS-PAGE. 2-DE maps were scanned with Molecular Image Fx scanner and then compared with PDQuest 6.0 software after silve stained. **Results:** We successfully optimized lytic buffer and technologic systems of 2-DE for sample preparing, built 2-DE maps of cytosolic proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. There are total 1387 spots on gels of pH4-7 and pH7-10, 86% of all proteins detecting on 2-DE maps, and many proteins(1194) appeared on pH4-7 gel. **Conclusion:** Our study laid a foundation for further studies of *Mycobacterium tuberculosis* cytosolic proteins with comparative proteome.

Key Words: Proteome; Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; *Mycobacterium tuberculosis*; Cytosolic protein

前言

微生物蛋白质组学研究的基本目标是鉴定与微生物活动相关的蛋白质, 结合基因组学数据, 蛋白质组学能够在整体水平上研究病原菌在不同环境下基因表达的变化情况。蛋白质组学的发展以双向电泳技术(Two-dimensional Electrophoresis, 2-DE)为核心, 这是目前公认的最好的分离技术。但分辨率和重复性是其面临的最大挑战, 直接影响蛋白质组学的分析结果。

由于结核病的猖獗, 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, M.tb)一直是病原菌研究的一个重点^[1]。但 M.tb 生长周期长, 具有特殊的富含脂质的细胞壁, 加之其对人类的致病性, 所以关于 M.tb 菌体蛋白质组的研究相对缓慢^[2,3]。已经建立的分枝杆菌蛋白质组数据库^[4,5]也以实验室标准株

H37Rv 的分泌蛋白为主, 2-DE 胶上分辨的菌体蛋白数量只有 1150 个左右, 与菌体内蛋白质实际含量相差甚远。

本研究的目的是建立结核分枝杆菌菌体蛋白的适宜的提取方法, 优化双向电泳分离体系, 以尽可能多的分离出结核分枝杆菌菌体蛋白, 为后续结核分枝杆菌菌体蛋白表达谱的建立、菌体蛋白的比较蛋白质组学分析提供方法学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

结核分枝杆菌 H37Rv 标准株 *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC93009) 来自中国药品生物制品检定所。尿素(Urea), 甘氨酸(Gly), 二硫代苏糖醇(DTT), 三羟甲基氨基甲烷(Tris Base), 低熔点琼脂糖(Agarose), 十二烷基磺酸钠(SDS), 丙烯酰胺(Acrylamide), 甲叉双丙烯酰胺(Bis-acr), 二甲氨基丙磺酸

• 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目资助。2004AA215202

作者简介: 张鹭, 女(1970-), 在读博士, 副教授。研究方向: 生物工程联系方式: zlace@163.com

(收稿日期: 2006-07-02 接受日期: 2006-08-30)

(CHAPs),两性电解质 biolyte(pH7-9),矿物油(Mineral Oil),固相 pH 梯度干胶条(immobiline pH gradient, ReadyStrip ITC Strips, pH7-10, 17cm),均为 Bio-Rad 公司产品;苯甲基磺酰氟(PMSF),乙二胺四乙酸(EDTA),硫脲为 Sigma 公司产品,辛基葡萄糖苷(Octyl- β -D-Glucopyranoside, OG)为华舜进口分装产品,标准蛋白购自上海西巴斯生物技术开发有限公司。PowerPac 3000 电泳仪, Molecular Image Fx 凝胶图像扫描仪, PDQuest 6.0 图像分析软件,均为美国 Bio-Rad 公司产品。高速离心机、U-3000 分光光度计为 HITACHI 公司产品。

1.2 菌体蛋白的提取

添加 10% ADC(DIFCO, 0.5% 牛血清白蛋白, 0.2% 葡萄糖, 140mmol/L NaCl)的 200mL Middlebrook 7H9 培养基中接种 2×10^8 结核分枝杆菌, 37℃ 恒温静置培养 7-10 天, 当菌体浓度达到 $1 \times 10^8 - 2 \times 10^8$ /mL 或光密度(OD600)为 0.8-1 之间收取菌体。4000g, 4℃ 离心 15min 沉淀菌体, 用 pH7.4 的 PBS 缓冲液洗涤沉淀细菌 2 次。用 1mL PBS 重新悬浮沉淀细菌并转入 1.5mL EP 管。6000g, 4℃ 离心 15min 沉淀细菌。用 2mL 菌体超声缓冲液(1mmol/L PMSF, 10mmol/L EDTA, MilliQ 水溶解)悬浮。冰浴超声裂解细菌 15min, 振幅 70%, 200W 超声 1min, 停 20sec。

1.3 2-DE 样品的制备

缓慢加入样品裂解液(8mol/L 尿素, 2mol/L 硫脲, 140mmol/L DTT, biolyte 0.5%, 4% CHAPs, 400mg/mL OG), 充分变性还原。置于室温 2h, 间隔振荡。10000g, 20℃, 15min 离心 2 次, 合并上清, -80℃ 冻存。Bradford 法测蛋白质浓度。

1.4 双向凝胶电泳(2-DE)

采用被动水化, 低电压胶内泡胀法。在 1mL 水化上样缓冲液(尿素, 7mol/L; 硫脲, 2mol/L; CHAPs, 4%; 溴酚蓝, 0.001%; MilliQ 水溶解)中加入 0.01g DTT, Biolyte 4-6, 5-7 各 2.5(1, 充分混匀。从中取出 300(L, 加入 80(g 样品(约 100(L), 充分混匀。沿着聚焦盘槽的边缘线性加入样品, 将 ITC 胶条(17cm)胶面朝下置于聚焦盘上, 室温静置 30min 后, 在每根胶条上缓慢覆盖 2-3mL 矿物油, 对好正、负极, 盖上盖子。设置等电聚焦程序。胶条的极限电流 50-70(A/根, 聚焦温度 17℃。50V, 12-16h; 250V, 30min; 1000V, 1h; 10000V, 70, 000Vh; 500V, 保持。聚焦结束的胶条平衡 30min, 水平放置在 12% SDS-PAGE 凝胶上端, 用 PROTEIN II Cell 进行第二向 SDS-PAGE 电泳。以每根胶条 5mA(17cm)进行恒流电泳, 待样品完全走出 ITC 胶条, 浓缩成一条线后, 再加大电流至 30mA/gel, 溴酚蓝指示剂达到底部边缘时停止电泳。

1.5 蛋白银染

将胶取出, 放入固定液(乙醇, 250mL; 冰乙酸, 50mL; MilliQ 水 200mL)中固定 30min, 浸泡液(乙醇 150mL; 醋酸钠, 34g; 硫代硫酸钠, 1g; 定容至 500ml)处理 30min, MilliQ 水漂洗 3 次, 每次 5min。加入银染液(硝酸银, 0.5g; 甲醛 100(L; 定容至 500mL), 20min 后倒掉染液, 加入显色液(碳酸钠, 12.5g; 甲醛 50(L; 定容至 500mL), 肉眼观察至显色完全。用 5% 乙酸停止显色。

1.6 凝胶图像的分析

凝胶用 Molecular Image Fx 激光图像扫描仪扫描, 凝胶分析采用 PDQuest 6.0 软件完成。

2 结果

2.1 M.tb 菌体蛋白提取方法的优化

将超声破壁的菌体用不同裂解液处理, 裂解液成分、配比不同, 对菌体蛋白裂解的影响很明显。如图 1 图 2 所示。图 1 是用高浓度尿素(11 mol/L), 70m mol/L DTT, biolyte(pH3-10, pH4-6, pH5-7)各 0.5%, 200mg/mL OG 处理后得到的全菌胞浆蛋白, ITC 采用 pH3-10, 图 2 用 8 mol/L 尿素结合 2mol/L 硫脲, 140mmol/L DTT, 4% CHAPs, biolyte(pH3-10, pH4-6, pH5-7)各 0.5%, 400mg/mL OG 处理, ITC(pH3-10)。二张图的总体模式近似, 各蛋白点清晰可见, 具有可比性。但以第二种方法为最佳(从二向图谱上分辨的点的数目上看)。因此, 后续的蛋白质样品处理均采用这种裂解液。

2.2 双向电泳技术体系的优化

本实验对同一样品采用 pH3-10, pH4-7, pH7-10 三种 pH 梯度的 ITC 胶条进行分离(图 3-图 5)。软件分析可见, pH3-10 的 ITC 胶条上共有蛋白点 642 个, 而同一份样品采用 pH4-7 的 ITC 胶条, 共检测到 1194 个点。pH7-10 的 ITC 分离出 193 个点。pH4-7 及 pH7-10 两胶面上共 1387 个点, 远远多于 pH3-10 的 ITC 分离胶。实验中绝大部分(1194 个)蛋白位于 pH4-7 范围内, 占所检测到的蛋白总数的 86%。

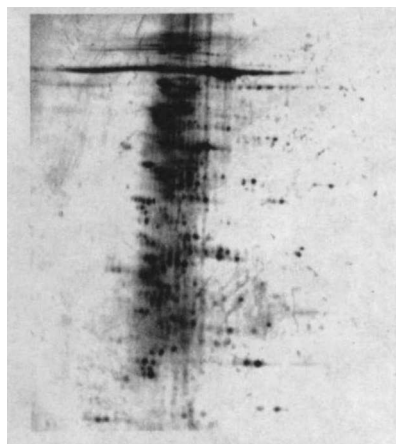


图 1 M.tb 菌体蛋白双向电泳图谱(裂解液:11 mol/L 尿素, 70mmol/L DTT, biolyte(pH3-10, pH4-6, pH5-7)各 0.5%, 200mg/mL OG) ITC pH3-10

Fig 1 2-D maps of M.tb with different sample treatment methods

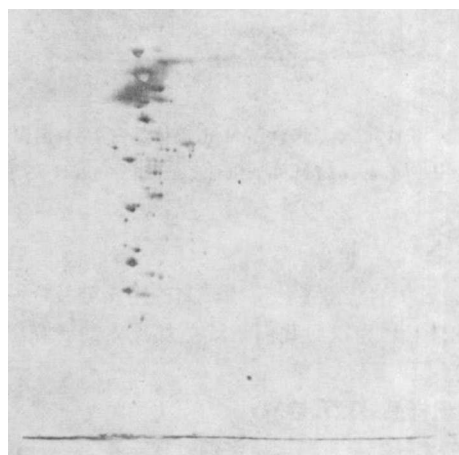


图 2 M.tb 菌体蛋白双向电泳图谱(裂解液:8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 140m mol/L DTT, biolyte(pH3-10, pH4-6, pH5-7), 4% CHAPs, 400mg/mL OG,) ITC pH3-10

Fig 2 2-D maps of M.tb with different sample treatment methods

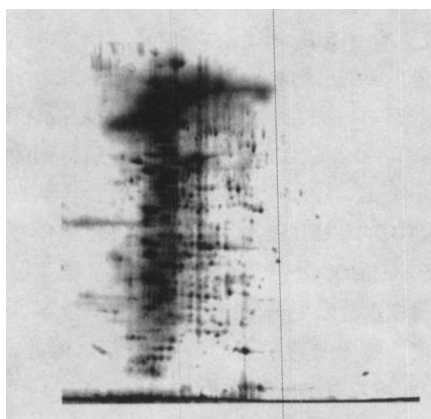


图3 pH3-10电泳条件下 M.tb 菌体蛋白 2-D 图谱
Fig 3 2-DE maps of M.tb cytosolic protein with pH3-10 IPC

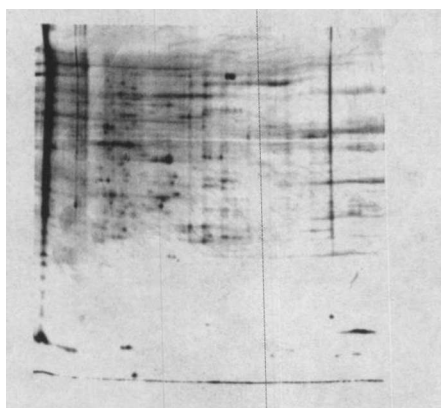


图4 pH7-10电泳条件下 M.tb 菌体蛋白 2-D 图谱
Fig 4 2-DE maps of M.tb cytosolic protein with pH7-10 IPC

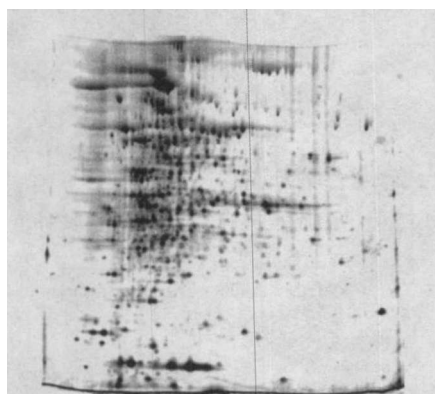


图5 pH4-7电泳条件下 M.tb 菌体蛋白 2-D 图谱
Fig 5 2-DE maps of M.tb cytosolic protein with pH4-7 IPC

3 讨论

本试验成功的获得了分辨率较高的结核分枝杆菌菌体蛋白的 2-DE 图谱,为以后我们继续更加深入的研究结核分枝杆菌蛋白打下了基础。

3.1 蛋白质样品处理和溶解

双向电泳技术是蛋白质组学的一项基本支撑性技术。样品制备和溶解是双向电泳高分辨率和高重复性的基础步骤。其目标是尽可能地溶解和变性蛋白质,以提高分辨率。但由于蛋白样品的类型和来源有着巨大的差异,所以对每一种样品都要根据实验确定具体的最适的方法。目前通常是用化学

法,机械裂解法或二者相结合来处理样品。

在各种化学试剂中,尿素是一种比较理想的非离子变性剂,经常使用的浓度是 5-9.5mol/L。硫脲是继尿素之后的又一种变性剂,与高浓度的尿素配合使用,其增溶能力将更强。但硫脲的存在可以抑制 SDS-Pro 的结合,因此,使用硫脲后,IPG 一定要充分平衡才可以进行第二向电泳^[6]。表面活性剂作为样品溶解液的一个成分,可以和变性剂起协同作用。变性剂能令蛋白的疏水结构域暴露出来,产生疏水相互作用,表面活性剂正好可以消除这种影响。硫代甘氨酸三甲内盐型两性离子表面活性剂(如 CHAPs)证明比非离子型表面活性剂效果好,使用浓度范围为 2-4%。IEF 和蛋白溶解最常用的还原剂是 DTT 和 DTE^[7],通常过量使用(100mmol/L)以避免打开的二硫键再次折叠。

作为一种分离手段,2-DE 的目的越来越明确,就是鉴定所有的蛋白质。达到这一目的的方法之一是对同一份蛋白样品进行分步抽提,亚蛋白组分被一步步提取出来,分别进行 2-DE 分析^[2,8]。但分步抽提方法是对一个样品的多步骤提取,不仅耗时耗力,而且在提取过程中势必会有一些蛋白的损失,从而会造成结果出现偏差。从目前的研究结果看,2-DE 胶面上蛋白点的数量并未有明显上升。因此,目前使用较多的蛋白提取方法仍然是一步提取法,即综合使用物理、化学等多种方法,在一步反应中令样品的蛋白完全溶出。鉴于结核分枝杆菌具有厚的富含脂质的细胞壁,因此样品处理的关键是破壁、增溶。参考 Rosenkrands^[4]、乐军^[9]、Sinha^[10]等的处理方法,我们将超声破壁的菌体用不同裂解液再次溶解,发现裂解液成分、配比不同,对结果的影响很明显。我们最终所选用的裂解液(8mol/L 尿素,2mol/L 硫脲,140mmol/LDTT, biolyte (pH3-10, pH4-6, pH5-7)各 0.5%, 4% CHAPs, 400mg/mlOG)是一种强化裂解液,有助于疏水性蛋白、低丰度蛋白的溶出。很明显,这种方法得到的蛋白点明显多于其他方法,因此后续的蛋白质样品处理均采用这种裂解液。

3.2 结核分枝杆菌双向电泳技术体系的优化

细胞内有少量的极端酸性或极端碱性的蛋白存在,为了避免这些蛋白在 2-DE 胶上丢失,或被高丰度蛋白屏蔽而降低 2-DE 的分辨率,在 IEF 过程中对同一溶解样品,根据不同的 pH 范围采用多种 pH 梯度的 IPG 胶条进行分离。IPG 的 pH 范围越窄,其分辨率越高。应用这种方法,一份样品可以得到若干张 pH 梯度不同的高分辨率图谱,虽然图谱之间的点可能会有重叠,但这种方法可以避免因分步提取而造成的蛋白损失。类似的 2-DE 方法在近年来的 M.tb 蛋白质组学研究中被广泛采用,探测到的蛋白点较传统的分离方法明显增多^[11,12]。

本实验对同一样品采用 pH3-10、pH4-7、pH7-10 三种 pH 梯度的 IPG 胶条进行分离。软件分析证明,采用不同窄 pH 梯度的 IPG 胶条对同一样本进行精确分析,其分辨率会大幅度增加,能保证探测到尽可能多的蛋白质。同时,也有助于分析样品中蛋白的 pH 分布范围,确定适宜 pH 值的 IPG 胶条的选择。本实验中绝大部分(1194 个)蛋白位于 pH4-7 范围内,占所检测到的蛋白总数的 86%,因此,在后续的比较蛋白质组研究中可以采用 pH4-7 的 IPG 胶条研究菌体蛋白。

(下转第 17 页)

柄和花托。此外,实验还以山茱萸的离体茎段作为组织培养的材料进行了不定芽的诱导,结果表明,不定芽的分化时间长,且污染率高;不定芽长势较弱,同时伴有超度含水态苗的形成,因此,以山茱萸茎段为外植体虽也可以诱导不定芽的分化,进而形成完整植株,但仍非理想的选择。

3.2 不同形态愈伤组织不定芽分化的差异

实验以幼嫩叶片、花柄和花托为外植体分别诱导形成了大量的愈伤组织。其中有的愈伤组织呈灰白色,结构松散,不易分化。在适宜的条件下经多次继代培养后,颜色转为白色或翠绿色,结构变得坚实而紧密,并在分化培养基上诱导出不定芽。但是在继代培养中,如果继代不及时或培养条件不适宜,则最终褐化死亡。薛庆善^[6,7,8]等的研究结果表明,诱导条件不同,愈伤组织的形态和物理性质也有一定的差异。在山茱萸的组织培养中,出现了不同质地、形态和颜色的愈伤组织,且其培养条件、生长速度和分化能力各不相同,白色或翠绿色、结构致密的愈伤组织易于诱导出不定芽,而松散灰白色的愈伤组织只有在转化成白色或翠绿色、结构致密的愈伤组织后才能分化,愈伤组织质地、形态特征与分化之间的关系尚待进一步研究。

3.3 山茱萸组培苗的生根

和绝大多数植物一样^[9,10],降低无机盐的浓度有利于山茱萸组培苗的生根。山茱萸组培苗对于常用生根剂的诱导均不敏感。1.0mg/L的IBA导致少量愈伤组织的产生,随着生长素浓度的升高,山茱萸组培苗基部形成愈伤组织的量逐渐减少,直至完全消失,而所形成根的数量和长度进一步增多和伸长,使得根的质量进一步提高。在试验中还发现,在黑暗条件下,幼苗生长不良,逐渐变黄,叶片脱落,最终死亡。光照条件下山茱萸组培苗的生根情况较好,在1/2MS附加IBA2.0mg/L

的培养基上,经过30d左右的培养,在山茱萸幼苗基部形成4-5条白而细长的根,每根长3.0-4.0cm,可用于后期的驯化移栽。

山茱萸的不同外植体在适宜的激素组合中可以经过愈伤组织诱导分化出不定芽,继而形成生长健壮、根系较为发达的再生植株,并可进行大量繁殖。这为山茱萸的快速繁殖提供了一种有效途径,并在品质改良以及大面积推广等方面具有重大意义。

参考文献

- [1] 楚晋,李林.山茱萸化学成分及其药理活性的研究[J].中国自然医学杂志,1999,1(1):46-48
- [2] 王浴铭,杨云,刘翠萍.山茱萸临床应用与药理作用[J].河南中医,1999,14(1):61-62
- [3] 赵世萍,付桂香.山茱萸化学成分和药理作用的研究进展[J].中草药,1997,28(3):187-188
- [4] 陈淑利.山茱萸的药理营养保健与开发前景[J].杭州科技,2002,1:35
- [5] 雷福成,史洪中.河南省山茱萸生产技术[J].河南科技,1995,1:11-12
- [6] 薛庆善.《体外培养的原理与技术》[M].科学技术出版社,2001
- [7] Greence, Philliparl. Plant regeneration from tissue cultures of maize, Crop Science [J]. 1975,15:417-418
- [8] 蔡起贵,郭忠琛,钱迎倩,等.玉米原生质体的植株再生[J].植物学报,1987,29:453-458
- [9] 陈敏艳,梁宗锁,王吉吉之,等.地黄组织培养及植株再生的研究[J].西北植物学报,2004,24(6):1083-1087
- [10] 曹建平,刘晓,郝建国,等.大叶秦艽的组织培养与植株再生[J].西北植物学报,2005,25(6):1101-1106
- [5] Mollenkopf HJ, Jungblut PR, Raupach B, et al. A dynamic two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database: the Mycobacterial proteome via internet[J]. Electrophoresis, 1999,20:2172-2180
- [6] Mark P, Molly. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients[J]. Anal biochem, 2000,280:1-10
- [7] Shaw MM, Riederer BM. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2003,3(8):1408-1417
- [8] Marques MAM, Espinosa BJ, da Silveira EKX, et al. Continued proteomic analysis of Mycobacterium leprae subcellular fractions[J]. Proteomics, 2004,4:2942-2953
- [9] 乐军.异烟肼耐药和敏感结核分枝杆菌的比较蛋白质组织学研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(4):258-262
- [10] Sinha S, Arora S, Kosalai K, et al. Proteome analysis of the plasma membrane of Mycobacterium tuberculosis [J]. Comp funct genom, 2002,3:470-483
- [11] Cordwell SJ, Basaee DJ, Bjellqvist B, et al. Characterisation of basic proteins from Spiroplasma melliferum using novel immobilised pH gradients[J]. Electrophoresis, 1997,18(8):1393-1398
- [12] Wasinger VC, Bjellqvist B, Humphrey SI. Proteomic "contigs" of Ochrobactrum anthropi, application of extensive pH gradients [J]. Electrophoresis, 1997,18(8):1373-1383

(上接第10页)

对微生物蛋白质组学尤其是病原微生物蛋白质组学的研究将对包括结核在内的人类疾病的致病机理和防治起到关键性的作用。作为蛋白质组学的支撑性技术,双向电泳的分辨率和重复性决定了这一方法的应用范围。本研究从样品处理和电泳体系两方面进行优化,获得了比较理想的双向电泳图谱,可以为后续结核分枝杆菌菌体蛋白表达谱的建立、菌体蛋白的比较蛋白质组学分析提供方法学参考。

参考文献

- [1] Brooke LU, Stuart JC, Humphrey IS. Comparison of predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of Mycobacterium tuberculosis H37Rv[J]. Biochem bioph res co, 1998,253:70-79
- [2] Mattow J, Schaible UE, Schmidt F, et al. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent Mycobacterium tuberculosis H37Rv and attenuated M. bovis BCG Copenhagen[J]. Electrophoresis, 2003,24:3405-3420
- [3] Bahk YY, Kim SA, Kim JS, et al. Antigens secreted from Mycobacterium tuberculosis: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker[J]. Proteomics, 2004,4:1-9
- [4] Roenkrands I, King A, Weldingh K, et al. Towards the proteome of Mycobacterium tuberculosis[J]. Electrophoresis, 2000,21:3740-3756