

文章编号:1005-6947(2008)09-0897-05

· 基础研究 ·

两种方法提取胰腺组织总蛋白的质谱分析

党军强, 蔡文科, 李丙所, 周红兵, 任彦顺, 鲁传龙, 陈勇

(第四军医大学西京医院 肝胆外科, 陕西 西安 710032)

摘要:目的 通过不同方法提取大鼠胰腺组织总蛋白,以期建立提取胰腺组织总蛋白的标准方法。方法 分别用总蛋白提取试剂盒和笔者自制的裂解液提取胰腺组织总蛋白,测定蛋白浓度,并分别进行基质辅助激光电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)做蛋白全谱。结果 总蛋白提取试剂盒和自制裂解液总蛋白提取量依次为 (19.5 ± 1.3) mg和 (22.2 ± 1.8) mg, MALDI-TOF-MS蛋白全谱的谱峰数分别为 (404.4 ± 13.7) 个和 (437.2 ± 18.1) 个($P < 0.05$)。结论 自制裂解液与常规的总蛋白提取试剂盒相比,前者具有蛋白提取率高、蛋白溶解性好等优点。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(9): 897-901]

关键词: 胰腺肿瘤; 总蛋白; 蛋白质组学; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 裂解液

中图分类号: R 735.9

文献标识码: A

Mass chromatographic analysis of two methods of total protein extraction from pancreatic tissue

DANG Junqiang, CAI Wenke, LI Bingsuo, ZHOU Hongbing, REN Yanshun,
LU Chuanlong, CHEN Yong

(Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract: **Objective** To establish the standard method to extract total protein of pancreatic tissue by using different methods of pancreatic tissue protein extraction in rats. **Methods** The total protein extract kit and the author self-made lysate were used to extract the total protein of pancreatic tissue, then the protein level was measured and the protein was analysed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectra (MALDI-TOF-MS) respectively. **Results** The amount of total protein extracted with total protein extract kit and self-made lysate was (19.5 ± 1.3) mg and (22.2 ± 1.8) mg respectively. The MALDI-TOF-MS protein spectra peak was (404.4 ± 13.7) and (437.2 ± 18.1) respectively. **Conclusions** The self-made lysate extraction method has higher protein extraction rate and better protein dissolubility as compared with total protein extract kit extraction method.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(9): 897-901]

Key words: Pancreatic Neoplasms; Total Protein; Proteome; Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectra; Lysate

CLC number: R 735.9

Document code: A

目前用于诊断胰腺癌的肿瘤标志物的敏感性和特异性均不理想,故寻找一种更好的肿瘤标志

物成为当前胰腺癌研究的热点之一。蛋白质组学(proteomics)的出现为此带来了希望^[1]。但是该学科的相关技术体系建立时间较短,仍存在许多待改进之处,尤其在蛋白样品制备方面。目前常用的组织总蛋白提取试剂盒在溶解疏水性蛋白以及蛋白的分离效果方面存在缺陷,直接影响蛋白质组分析结果的全面性和准确性。本实验尝试用笔

收稿日期:2008-03-03; 修订日期:2008-08-01。

作者简介:党军强,男,第四军医大学西京医院硕士研究生,主要从事胰腺肿瘤方面的研究。

通讯作者:陈勇 E-mail:cheny@fmmu.edu.cn

者自制的裂解液和常用的总蛋白提取试剂盒分别提取胰腺组织总蛋白,并用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行两种方法提取的质谱蛋白全谱(MS charting)比较,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性SD大鼠20只,体质量240~250g(第四军医大学试验动物中心)。试剂包括:尿素,硫脲,辛酰基硫代甘氨酸三甲内盐(SB3-10)及IPG buffer (pH3~10)(Sigma公司);蛋白酶抑制剂(cock tail),胰酶抑制剂,3-[(3-胆酰胺丙基)一二乙胺]-丙磺(CHAPS)(Solarbio公司);二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)(北京鼎国公司);Bradford蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime公司)及总蛋白提取试剂盒(AnMei生物公司)。仪器包括:VCX 130 PB超声破碎仪(美国Sonics公司),低温超速离心机(美国Beckman公司),Ultro-spec 1100 Pro紫外分光光度计(瑞典Amersham公司)和MALDI-TOF-MS质谱仪(ABI公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集 取大鼠的新鲜胰腺组织,1×磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗(去除血液和其他组织)。新鲜标本分为两份,一份留作实验用,另一份立即放入液氮中速冻后转存于-70℃冰箱中。

1.2.2 总蛋白提取 (1)总蛋白提取试剂盒提取总蛋白:取0.3g胰腺组织标本,用预冷的1×PBS冲洗,以去除血液和其他组织,在冰面上用眼科剪剪成0.5 mm³小块,并加入按试剂盒说明配置好的3 mL裂解液;匀浆20 s,冰面静置15 s。此过程反复多次,直至无肉眼可见的组织块。4℃放置20 min,期间不时振荡。4℃离心,120 000 r/min,30 min,上清液为总蛋白提取物,标记为A,冻存于-70℃冰箱中。(2)自制裂解液提取总蛋白:取0.3g胰腺组织标本,用预冷的1×PBS冲洗去除血液和其他组织,在冰面上用眼科剪剪成0.5 mm³小块并加入配置好的3 mL自制蛋白裂解液:7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,5 mL/L两性电解质(IPG buffer)(pH3~10),65 mmol/L二硫苏糖醇(DTT),20 g/L辛酰基硫代

甘氨酸三甲内盐(SB3-10),20 g/L CHAPS,5 mg/L蛋白酶抑制剂及10 mL/L胰酶抑制剂。匀浆、离心条件同上。上清液为蛋白提取物标记为B,冻存于-70℃冰箱中。

1.2.3 蛋白含量测定 按照Bradford蛋白浓度测定试剂盒的操作步骤分别测出总蛋白浓度,根据浓度计算出相应的总蛋白含量。

1.2.4 质谱分析 将样品用25%乙睛按1:1 000稀释,取1 μL样品和1 μL基质,用涡旋混合器充分混和均匀,点在不锈钢电样板上,置于空气中自然风干。吸取1.5 μL含1 mL/L三氟醋酸(TFA)的去离子水,点到样品上3~5 s后,将溶液吸掉以去除样品中的盐分。仪器分析条件按参考文献^[2]。

1.3 统计学处理

采用SPSS10.0统计软件行*t*检验,所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总蛋白含量

试剂盒法所得总蛋白量为(19.5 ± 1.3) mg,自制裂解液所得总蛋白量为(22.2 ± 1.8) mg ($n=5$),两种方法提取的总蛋白量差异有显著性($t=2.56, P=0.034 < 0.05$)。说明自制裂解液提取的总蛋白量高于试剂盒法。

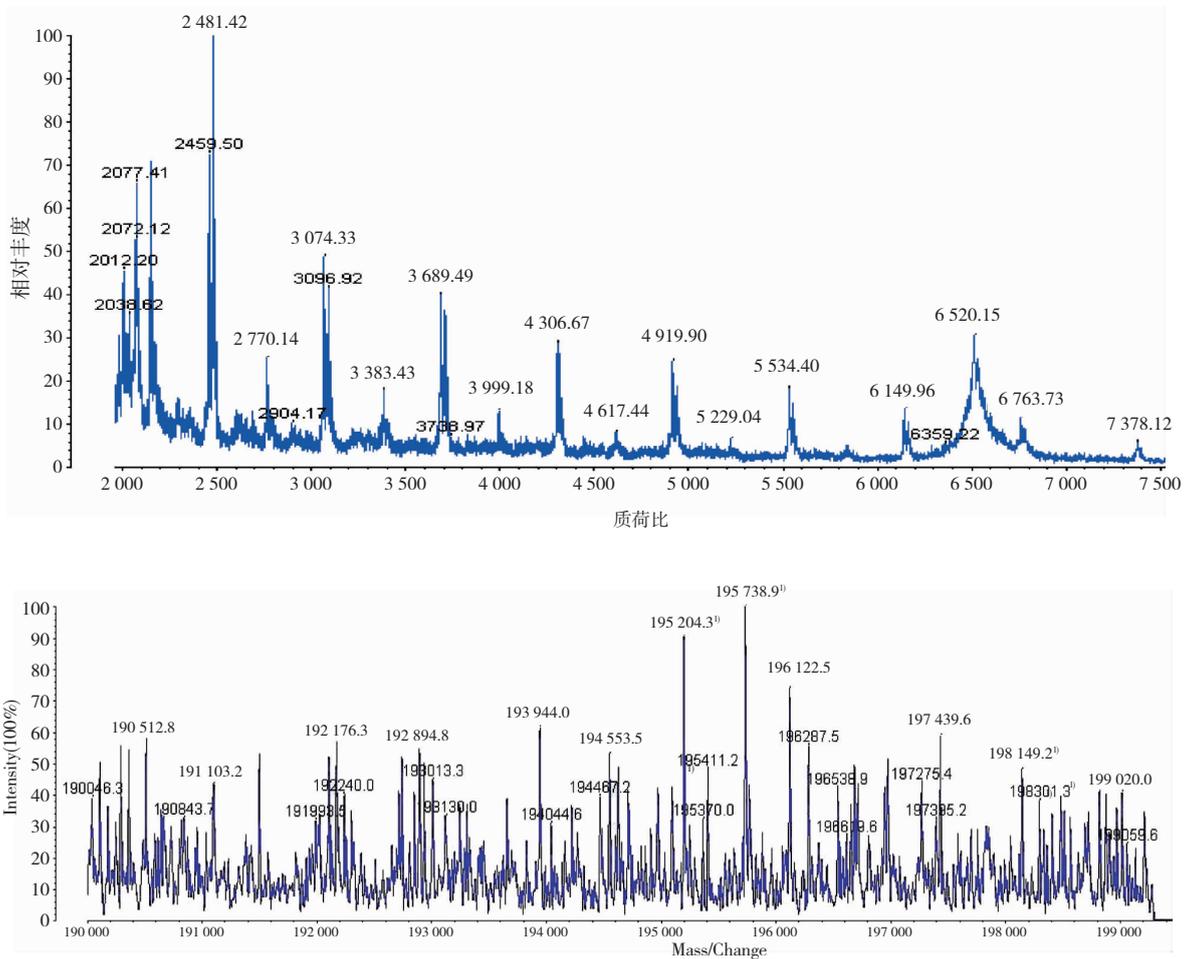
2.2 质谱分析

质谱图中以最强的离子峰(基峰)高为100%,其余峰的峰高用相对于基峰的百分数来表示。不低于基峰5%的离子峰给出相应的质荷比。两种方法重复5次,在相同条件下质谱,除略有差别外,两种方法均有良好的可重复性。两种方法共检测到蛋白/多肽质荷比共446个(如表),质荷比范围1~200 kD。用总蛋白提取试剂盒所得蛋白/多肽质荷比数为(404.4 ± 13.7)个,自制裂解液所得蛋白/多肽质荷比数为(437.2 ± 18.1)个。两种提取方法MALDI-TOF-MS分析蛋白/多肽质荷比数差异有显著性($t=3.2 P=0.013 < 0.05$)。说明自制裂解液可溶解更多的蛋白(表1)(图1)。

表1 MALDI-TOF-MS 检测到的胰腺组织蛋白/多肽质荷比

1 ~ 100kD					100 ~ 200kD					
1058.6	1235.6	1260.4	1300.2	1828.4	100533.4	101280.9	101713.8	102431.1 ¹⁾	102759.3	103330.6
2012.2	2277.4	2459.5	2481.4	2770.1	103852.6 ¹⁾	104474.4	104916.7	105299.2	105663.0	106107.9
2904.1	3074.3	3710.4	3096.9	3383.4	106461.5	106898.8 ¹⁾	107335.5	107788.5	108153.2	108755.9
3689.5	3999.2	4306.7	4919.8	5534.4	109262.5 ¹⁾	109760.0	110161.5	110569.0	111263.4	112015.9
6150.0	6520.2	6763.7	7378.1	7731.0	112915.0	113239.3 ¹⁾	114109.7	114608.6	115470.1	115814.7
7956.2	8210.7	8492.6	9013.5	9496.3	116159.5	116532.0	117487.6	118066.7	118916.0	119557.6
9871.7	10277.9	10523.5	11057.1	11253.9	120081.3 ¹⁾	120376.1	120681.1	120931.2	121601.3	121888.1
11783.0	12177.8 ¹⁾	12433.8	13000.5	13569.9	122196.6	122649.9	123004.8	123519.8	124211.0	124702.5
14376.9	14543.8	15139.1	15738.4	16290.9	125421.0	125874.5	126576.9	127190.7	127515.4	127837.2
16799.5	17085.8	17680.5	18298.1	19157.8	128282.4	128701.0	128997.2	129893.3	130574.4	130933.3
19918.3	20097.4	20799.7	21225.5	21370.3	131319.1	132252.8	133214.1	134325.8	134754.4	135172.1
21878.2	22633.1	22828.2	23380.0	23762.6	135606.8	136377.1	136633.6	137175.8	137328.1	137712.6
24497.6	24774.7	25333.4	25896.9	26849.0	138328.8	139342.5	140095.1	140516.2	141044.8 ¹⁾	141315.2
27489.1	28269.4	28886.7	28322.3	29662.5	141938.7	142254.9	143149.1	143632.4	144024.9	144339.2
29859.0	30060.1	30303.3	31111.4	31868.9	144611.5	145120.6	145863.0	146666.2	147640.6	148187.0
32660.5	33084.4	33267.5	33939.9	34672.3	149083.6 ¹⁾	149350.8	149926.3	150047.5	150114.9	150172.6
35358.5	36144.9	36588.2	37251.1	37978.5	150315.1	151029.9	151354.7	151804.6	152061.8	152229.7
38989.8	39296.5	39633.1	40086.9	40642.9	152531.3	153366.2	153717.7	153900.8	154765.3	154841.7
41350.1	41968.8	42194.5	43210.8	43437.2	155285.8	155667.0	156343.2	156674.7	156711.1	156813.4
43967.0	44476.4	45288.4	45559.4	45748.3	157207.5	157502.2	157691.7 ¹⁾	157588.9	158774.8	158872.0
46001.2	46437.1	47361.6	47716.9	48046.3	159345.3	159473.5	159683.8	159612.5	160207.1	160668.6
48619.2	49286.5	49744.5	49967.3	50264.2	160860.2	160963.9	161671.0	161956.8	162140.8	162406.8
50671.4 ¹⁾	51479.0	52384.9	53056.2	53295.4	163073.9	163308.1	163404.7	163917.4	164205.3	164291.6
53557.7	54155.6	54379.0	54900.5	55134.2	165013.9	165218.4	165514.4	165960.5	166006.7	166118.6
55668.4	55989.0	56513.9	56807.9	57148.2	167068.2	167226.9	167823.4	168270.2	168386.1	168837.9
57454.1	57732.1	57992.5	58771.7	59889.0	169030.0	169772.4	169942.5	170171.3	170407.1	170637.5
60361.3	61074.8	61479.4	61934.1	62317.6	170907.3	171242.3	171733.0	171657.3	172261.3	172471.9
62980.2	63438.2	64260.4	65035.2	65292.2	172528.0	172679.9	173125.0	173362.6	173935.9	174217.6 ¹⁾
65924.1	66190.7	66799.1	67121.8	67651.9	174271.2	174683.1	174741.9	175062.4	175397.1	175746.7
68156.7	68991.0	69271.9	69567.4 ¹⁾	70373.2	175909.4	176078.5	176883.8	176858.8	177114.0	177581.2
70929.7	71500.3	72462.7	72747.3	73226.8	177725.0	178269.0	178380.1	178800.4	179339.8	179504.8
73802.5	74477.9	75152.1	75709.7	76347.8	179742.8	180073.2	180361.3	181245.9	181502.4	181737.1 ¹⁾
77111.0	77349.5	77691.4	78065.6	78459.1	182773.5 ¹⁾	182805.6	182992.7	183219.9	183472.4 ¹⁾	183580.0
79129.1	79476.3	80277.0	81011.2	81343.6	184151.9	184324.7	185061.0	185604.4	185631.1	185726.5
81702.3	82096.8	82770.4	83182.7	83791.1	186568.6	186913.0	186951.4	187429.4	187715.8	188553.8
84215.0	84641.3	84953.0	85311.1	86038.3	188801.0	188846.6	189592.4	189557.2	190046.3 ¹⁾	190512.8
86498.8	87506.6	87961.9	88697.1	89873.2	190843.7	191103.2	191993.5	192176.3	192240.0	192894.8
90241.1	90659.0	91321.9	91933.8	92721.8	193013.3	193130.0	193944.0	194044.6	194467.2 ¹⁾	194553.5
93520.8	94412.8	94788.0	95165.5	95498.0	195204.3 ¹⁾	195411.2	195370.0	195738.9 ¹⁾	196122.5	196287.5
95860.3	96407.2	97295.1	97715.8	97966.5	196538.9	196619.6	197275.4	197395.2 ¹⁾	197439.6	198149.2 ¹⁾
98529.9	98905.4	99613.1	-	-	198301.3 ¹⁾	199020.0	199059.6	-	-	-

注:1)表示只出现在自制总蛋白裂解液中



注:1)表示只出现在自制裂解液中,说明自制裂解液可溶解总蛋白提取试剂盒所不能溶解的组织蛋白

图1 部分胰腺组织总蛋白提取液 MALDI-TOF-MS 分析结果

3 讨论

蛋白样品制备是蛋白质组学研究过程中的首要步骤,其质量的好坏直接影响到最终结果。对于复杂混合蛋白组分研究最常用的是双相凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2DE)技术^[3]。但2DE的缺点是难以分离疏水性膜蛋白和低丰度蛋白^[4-5],不易分离极酸和极碱、极大或极小的蛋白。质谱蛋白全谱分析能在完整组织总蛋白提取物中识别出尽可能多的肽和蛋白混合物中的组分,而且还可以提供准确的肽和蛋白质的相对分子质量和相对丰度。质谱技术测定蛋白非常灵敏,一般只需10~15fmol蛋白即可获得满意的结果。因此该技术更有利于检测出样品中的低丰度蛋白^[6],而且具有良好的稳定性和重复性。

胰腺组织中含有丰富的酶类,大约有700种

蛋白酶。所以胰腺组织蛋白降解速度快不易保存。目前常用的总蛋白试剂盒提取法主要用于一般组织可溶性蛋白的研究,而对于疏水性蛋白溶解性差,可造成疏水蛋白的较多丢失。这些不足直接影响胰腺蛋白质组分析结果的全面性和准确性。本研究应用广谱蛋白酶抑制剂并加入胰蛋白酶抑制剂,将自制的裂解液用于胰腺组织蛋白质组学研究,在裂解液中加入对疏水性蛋白(如膜蛋白)有良好溶解作用的硫脲、CHAPS和SB3-10^[7]。与常规试剂盒法相比较,经MALDI-TOF-MS结果证明,用自制裂解液可溶解更多的蛋白也适用于MALDI-TOF-MS检测要求。Hu等^[8]利用2DE等蛋白组学技术鉴定了302个胰腺蛋白质。从上述实验可见,利用MALDI-TOF-MS作胰腺组织总蛋白全谱,可得到 (437.2 ± 18.1) 个蛋白/多肽质荷比。MALDI-TOF-MS蛋白检测相对于传统的2DE法,具有操作简单、重复性好、

检测敏感性高的特点,有替代传统 2DE 法的趋势。故认为本方法的建立为进一步开展胰腺相关疾病的发生、发展的蛋白质组研究打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] Ashima S, Chetna S, Devendra P, *et al.* Proteomics in clinical interventions: Achievements and limitations in biomarker development[J]. *Life Sciences*, 2007, 80(1):1345 - 1354.
- [2] Huang HQ, Xiao ZQ, Lin QM. Characteristics of structure, composition, mass spectra, and iron release from the ferritin of shark liver (*Sphyrna zygaena*) [J]. *Biophys Chem*, 2004, 111(2):213 - 222.
- [3] Gao MX, Hong J, Yang PY, *et al.* Chromatographic pre-fractionation prior to two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry identifies: Application to the complex proteome analysis in rat liver[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 553(1):83 - 92.
- [4] Abul F, Vanessa R, Dovichi J, *et al.* Analysis of differenti-

- al detergent fractions of an AtT-20 cellular homogenate using one- and two-dimensional capillary electrophoresis[J]. *Chromatography A*, 2006, 1130(3):182 - 189.
- [5] Kashino Y, Harayama T, Pakrasi HB, *et al.* Preparation of membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Chromatography B*, 2007, 849(2):282 - 292.
- [6] Gianluca Ma, Francesca P, Manuela I, *et al.* Analytical assessment of MALDI-TOF Imaging Mass Spectrometry on thin histological samples. An insight in proteome investigation[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2005, 357(3):210 - 218.
- [7] Shimazaki Y, Takashi M. Detection of activity and mass spectrometric identification of mouse liver carboxylesterase and aldehyde dehydrogenase separated by non-denaturing two-dimensional electrophoresis after extraction with detergents[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2005, 1749(1):95 - 101.
- [8] Hu L, Evers S, Lu ZH, *et al.* Two-dimensional protein database of human pancreas[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(3):512 - 518.

第十五届国际乳腺癌大会暨第三届上海国际乳腺癌论坛将在上海举行

本次大会将于 2008 年 10 月 23 日至 10 月 26 日在上海商城剧院/波特曼丽嘉酒店举行。国际乳腺癌大会是由 1976 年成立的国际乳腺癌学会(SIS)发起,每两年举办一次,是欧洲和美洲最重要的乳腺癌学术活动之一。本次大会是由国际 SIS、中国抗癌协会乳腺癌专业委员会(CBCS)、复旦大学上海医学院及上海交通大学医学院共同主办。由 Umberto Veronesi、孙燕、沈镇宙和徐光炜教授担任大会荣誉主席,意大利的 Bruno Salvadori 教授、香港的周永昌教授和中国的邵志敏教授共同担任大会主席,李亚芬教授担任大会的本地副主席。

本次大会将就乳腺癌各领域中的多个课题进行讨论,包括:流行病学、基础研究、乳腺成像、乳腺病理学、乳腺外科,新辅助治疗、放射疗法、辅助治疗、辅药及康复、转移性乳腺癌、新兴疗法与临床试验。Terry Mamounas、Giuseppe Viale、Stefan Gluck 等世界著名重量级专家将莅临现场并发表精彩学术报告。

本次大会提交的摘要将由大会的学术委员会评审,被选中的摘要将刊登在《大会论文集》上,同时本次大会将举办一系列的学术活动:①SCI 上刊推荐:本次大会与被 SCI 收录期刊《BMC Cancer》(影响因子 2.359)合作;优秀的摘要将有机会被推荐在该 SCI 期刊上发表全文(费用自理)。②本次大会将与《中国癌症杂志》社合作举办“如何在 SCI 期刊上发表文章”的特别课程,将邀请著名的华裔学者陆嘉德教授、邵志敏教授、《BMC Cancer》的特邀编委周永昌教授授课。③本次大会将组织专家团队,在递交摘要中评出:优秀青年医师奖、优秀壁报奖、优秀口头报告奖。④西部资助计划:有机会免费出席本次会议(具体要求详见网站)。⑤病例研讨:本次大会将特设病例研讨专区,将邀请著名临床专家前来就乳腺的疑难杂症展开深入分析、研究及评论;与会者将有机会与业内顶尖专家就特别的病例情况予以直面探讨和沟通,届时还将进行个别案例的辩论,以加强临床学术知识的传播。

本次会议将授予国家级继续教育学分 10 分,欢迎全国从事乳腺癌防治研究,临床及基础研究,护理、心理、康复等专业人员踊跃参加。

更多详情请访问大会网站 <http://www.2008wcbd.com>。大会秘书处联系方式:

电话: +86 - 21 - 22819537 * 802/808; 联系人:孙小姐/谢先生; 邮箱: contact@2008wcbd.com。