

优化硝酸银染色在心肌线粒体蛋白 双向电泳后凝胶染色中的应用

魏义勇¹ 李科² 刘云³ 喻守佳⁴ 王海英¹ 喻田^{5*}

(¹遵义医学院附属医院麻醉科, 遵义 563000; ²遵义医学院附属口腔医院麻醉科, 遵义 563000;

³遵义医学院医学与生物医学研究中心, 遵义 563000; ⁴遵义市第一人民医院ICU, 遵义 563000;

⁵遵义医学院贵州省麻醉与器官保护基础研究重点实验室, 遵义 563000)

摘要 蛋白组学研究中双向电泳(2-DE)后的SDS-PAGE凝胶染色存在灵敏度和质谱兼容性问題。线粒体中存在大量微量蛋白, 对于这类亚细胞器蛋白质2-DE后的凝胶染色, 这两种特性显得尤为重要。经典的硝酸银染色虽灵敏度高, 但之后的质谱鉴定兼容性欠佳。因此, 该研究通过优化硝酸银染色方法观察大鼠心肌线粒体蛋白质2-DE后的凝胶染色效果, 挖取部分蛋白质斑点酶解后行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定, 验证优化硝酸银染色与质谱鉴定的兼容性。结果表明, 优化后的硝酸银染色方法灵敏度高, 与MALDI-TOF-MS兼容性好, 是一种线粒体蛋白质2-DE后染色的理想方法。

关键词 硝酸银染色; 线粒体; 蛋白组学; 双向电泳

Application of Optimized Silver Staining in the Gel Dyeing of Myocardial Mitochondria Protein after Two-Dimensional Electrophoresis

Wei Yiyong¹, Li Ke², Liu Yun³, Yu Shoujia⁵, Wang Haiying¹, Yu Tian^{5*}

(¹Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; ²Department of Anesthesiology, Stomatological Hospital Affiliated of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; ³Research Center for Medicine & Biology, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China; ⁴Department of Critical Care Medicine, Zunyi First People's Hospital, Zunyi 563000, China;

⁵Guizhou Key Laboratory of Fundamental Research on Anesthesiology and Organ Protection, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

Abstract There are the problems of the sensitivity and mass-spectrum compatibility for staining after two-dimensional electrophoresis (2-DE) in proteomics. There are a lot of micro-proteins in mitochondria. These two properties are particularly important for the gel staining after 2-DE. Although the classic silver staining has a high sensitivity, the compatibility of mass spectrometry identification is low. Therefore, we optimized the silver staining for rat myocardial mitochondrial proteomics. We observed the image of gels and extracted some protein spots that were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) to verify the compatibility of mass spectrometry. The experimental results showed that the optimized method of staining has high sensitivity and good compatibility with mass spectrometry. The optimized silver staining is an ideal method in myocardial mitochondrial proteomics.

Keywords silver staining; mitochondria; proteomics; 2-DE

收稿日期: 2017-12-06 接受日期: 2018-05-21

卫生部公益性行业科研专项(批准号: 200802173)和贵州省科技厅、遵义市科技局、遵义医学院联合基金(批准号: 黔科合字LKZ[2013]31号)

*通讯作者。Tel: 0851-28609838, E-mail: zunyiyutian@163.com

Received: December 6, 2018 Accepted: May 21, 2018

This work was supported by the Special Scientific Research Fund for Public Welfare, Ministry of Health (Grant No.200802173) and the Joint Fund of the Science Technology Department of of Guizhou Province, the Science and Technology Bureau of Zunyi City, Zunyi Medical College (Grant No.LKZ[2013]31)

*Corresponding author. Tel: +86-851-28609838, E-mail: zunyiyutian@163.com

网络出版时间: 2018-08-29 14:36:55 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180829.1436.008.html>

双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)是蛋白组学研究中的核心技术。2-DE后的SDS-PAGE凝胶染色是蛋白组学研究中的关键技术之一。能否获得理想的图谱和质谱鉴定兼容性的好坏是评判染色成功与否的基础。目前,常用的染色方法有考马斯亮蓝染色和硝酸银染色。考马斯亮蓝染色灵敏度为100~250 ng, 质谱兼容性好, 但灵敏度低^[1-2]。线粒体蛋白中包含了大量的微量蛋白, 这对染色的灵敏度要求极高, 从而限制了线粒体蛋白在线粒体蛋白组学中的应用, 本研究前期预实验结果也证明了这种观点。硝酸银染色灵敏度是考马斯亮蓝染色的100倍左右, 最低灵敏度可达到2 ng。就此而言, 硝酸银染色是线粒体蛋白2-DE后凝胶染色的理想选择。然而, 该方法也有很多缺点, 比如染色过程中用到的甲醛使许多的肽被修饰或者发生甲酰化、戊二醛影响质谱兼容性、金属银离子沉积在蛋白质上及凝胶背景深度不易控制等^[2]。研究者们一直尝试着解决这些问题, 但效果并不显著。鉴于此, 本实验在经典硝酸银染色基础上进行优化, 用于大鼠心肌线粒体蛋白质2-DE后的凝胶染色, 取部分蛋白质斑点酶解后行MALDI-TOF-MS鉴定, 探讨优化后的染色方法在线粒体蛋白组学研究中的应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 线粒体的制备 以异戊巴比妥钠麻醉大鼠后, 取心室肌组织, 冰浴下剪碎后匀浆。用差速离心法(1 000 ×g离心10 min; 上清液10 000 ×g离心10 min)离心得到粗提线粒体, 通过Nycodenz密度梯度离心分离纯化线粒体^[3]。

1.1.2 实验试剂 本实验所用试剂有冰乙酸、无水乙醇、甲醛、硝酸银、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2CO_3 及甘氨酸等。以上均为分析纯试剂, 购自成都科龙化工试剂公司。

1.1.3 实验仪器 双向电泳仪、RCDC蛋白定量试剂盒、蛋白纯化试剂盒和PDQuest2D 8.0图像分析软件均购自美国Bio-Rad公司。MltrasflexIII质谱仪(美国Beckman公司)及EPSON扫描仪购自瑞典Amersham Biosciences公司。

1.2 方法

1.2.1 线粒体蛋白的制备 纯化的线粒体样品经裂解、超声破碎, 12 000 ×g离心20 min, 上清即为线

粒体蛋白^[3]。用蛋白纯化试剂盒纯化线粒体蛋白, 去除相关杂质。RCDC蛋白定量试剂盒行蛋白定量后200 μg分装, -80 °C保存。

1.2.2 双向电泳 蛋白上样量为200 μg, 体积500 μL, 选择pH5~8, 24 cm的线性固定pH梯度(immobilized pH gradient, IPG)胶条行第一向等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)后, 固定pH梯度(IPG)胶条进行两次平衡。配制12%的SDS-PAGE凝胶, 将平衡后的IPG胶条转移到预先配置好的凝胶上, 通过低熔点琼脂糖使胶条与凝胶充分接触, 待其凝固后行第二向SDS-PAGE电泳。设置程序为第一步: 80 V, 60 min; 第二步: 220 V, 12 h。

1.2.3 两种硝酸银染色方法的比较 (1)经典硝酸银染色方法的具体步骤。2-DE结束后, 于凝胶中加入固定液(冰乙酸30 mL、甲醇125 mL、甲醛0.125 mL及Milli-Q水95 mL)固定2 h。再用乙醇85 mL, Milli-Q水漂洗3遍, 每遍漂洗20 min。向固定后的凝胶中加入敏化液($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.078 5 g, Milli-Q水250 mL)敏化2 min, 用Milli-Q水漂洗3遍, 每遍漂洗5 min。敏化后的凝胶中加入银染液(甲醛0.15 mL、硝酸银0.5 g及Milli-Q水250 mL)避光慢摇20 min, 再用Milli-Q水漂洗2遍, 每遍1 min。敏化结束后加入显影液($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.001 95 g、甲醛0.15 mL、 Na_2CO_3 7.5 g及Milli-Q水定容至250 mL)手动控制显影时间。最后向凝胶中加入定影液(甲醇125 mL、冰乙酸30 mL及Milli-Q水95 mL)固定凝胶背景。

(2)优化硝酸银染色的具体步骤。2-DE结束后, 于凝胶中加入固定液(冰乙酸25 mL、无水乙醇100 mL及Milli-Q水125 mL)固定2 h。Milli-Q水漂洗3遍, 每遍10 s。固定后的凝胶中加入敏化液($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.088 50 g, Milli-Q水250 mL)敏化1 min, Milli-Q水漂洗3遍, 每遍10 s。向敏化后的凝胶中加入银染液(甲醛0.05 mL、硝酸银0.4 g及Milli-Q水250 mL)避光慢摇30 min, 用Milli-Q水漂洗3遍, 每遍10 s。向银染后的凝胶中加入显影液($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.001 95 g、甲醛0.125 mL、 Na_2CO_3 7.5 g及Milli-Q水定容至250 mL)手动控制显影时间, Milli-Q水漂洗3遍, 每遍10 s。最后于凝胶中加入定影液(甘氨酸1.25 g, Milli-Q水250 mL)固定凝胶背景。

与经典硝酸银染色方法相比较, 优化硝酸银染色方法的区别主要体现在以下几方面^[4]: 固定液中

未使用甲醛, 用无水乙醇代替甲醇; 敏化液中加大了 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的剂量; 银染液中减少了硝酸银和甲醛的剂量, 且延长了染色时间; 显影液中同样减少了甲醛的用量; 定影液用甘氨酸而非甲醇和冰乙酸; 缩短了每个步骤结束后的漂洗时间。

1.2.4 凝胶扫描及图像分析 开启EPSON扫描仪, 设置参数后对凝胶进行扫描, 保存图像及凝胶。利用PDQuest2D 8.0图像分析软件, 评估染色结果的重复性、凝胶图像清晰度、背景深度、蛋白质斑点数量及分布情况。

1.2.5 质谱鉴定 于优化硝酸银染色组随机挖取4个蛋白质斑点胶粒置于250 μL MilliQ水中, 对胶粒进行酶解后行MALDI-TOF-MS, 查询NCBI数据库进行匹配鉴定, 探讨优化硝酸银染色与质谱的兼容性。

1.2.6 统计学分析 PDQuest2D 8.0软件分析后, 两种染色方法所检测到的蛋白质斑点数据, 均采用 $\text{means} \pm \text{S.E.M.}$ 表示, 用SPSS 19.0软件进行统计学分析。组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 蛋白定量

RCDC法蛋白定量操作复杂, 完成一次蛋白定量需要约6 h, 包括涡旋、离心、风干等步骤, 如果取样稍不精确就会影响结果, 甚至不能够获得理想的标准曲线。本研究的RCDC法蛋白定量标准曲线如图1。结果说明, 本实验中双向电泳的蛋白质上样量精确, 为后续研究提供了保障。

2.2 硝酸银染色

两种硝酸银染色方法的凝胶扫描图像结果见图2。其中图2A为经典的硝酸银染色, 图2B为优化的硝酸银染色。PDQuest2D 8.0软件分析发现, 经典的硝酸银染色检测到 305 ± 12 个蛋白质斑点, 而优化后的硝酸银染色共检测到约 438 ± 23 个蛋白质斑点。优化硝酸银染色方法与经典硝酸银染色法相比, 所检测到的蛋白质斑点数量明显增加($P < 0.05$)。本课题组后续研究均使用该优化的染色方法, 共计重复16次。因此, 本研究优化后的硝酸银染色方法图像背景清晰、重复性好、灵敏度高。经MALDI-TOF-MS鉴定提示, 优化染色后的凝胶4个蛋白质均成功

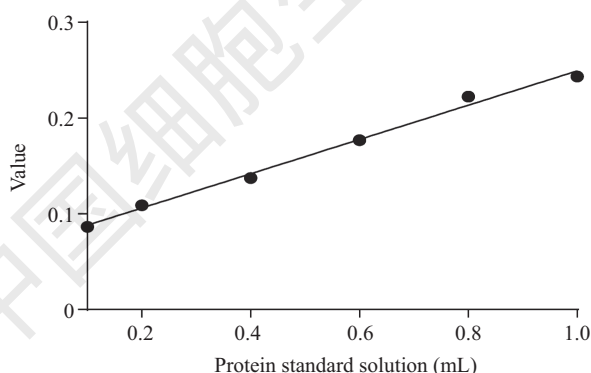
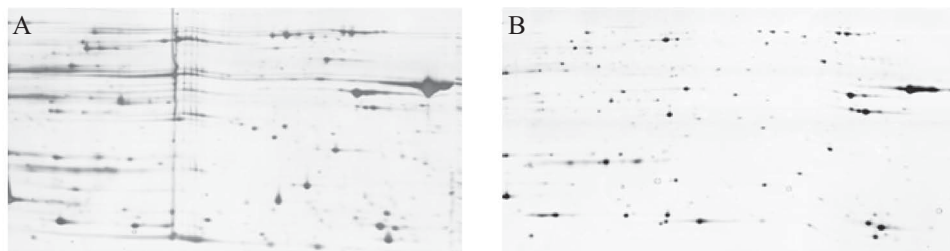


图1 RCDC法蛋白定量标准曲线

Fig.1 Protein quantitative standard curve detected by RCDC

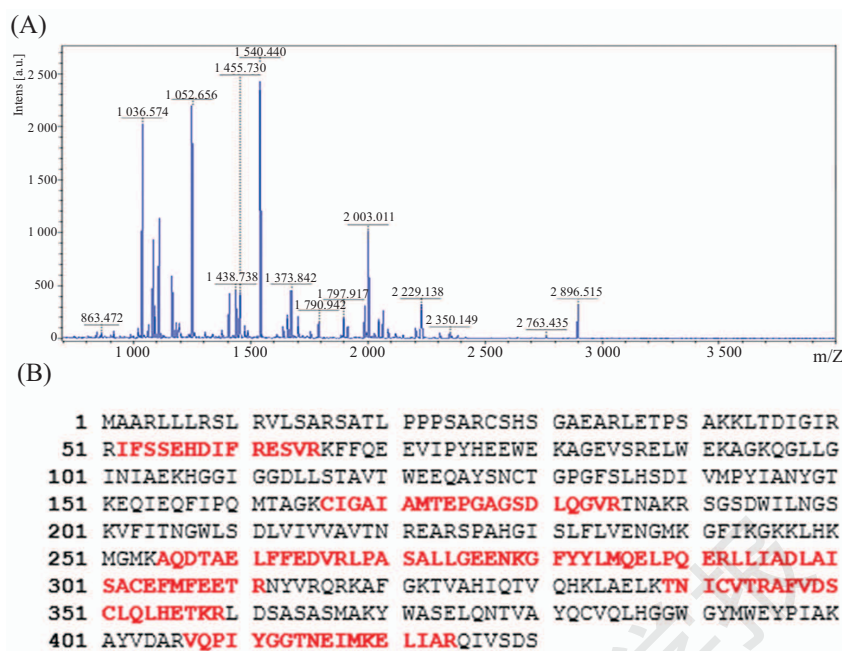


A: 经典硝酸银染色法图像; B: 优化硝酸银染色法图像。

A: the image of classic silver staining; B: the image of optimized silver staining.

图2 两种硝酸银染色图像比较

Fig.2 Image comparison of two silver staining methods



A: 代表性蛋白质的质谱图; B: 代表性蛋白质的氨基酸序列。

A: the mass spectrometry of the representative protein; B: the amino acid sequence of the representative protein.

图3 代表性蛋白质的质谱图及氨基酸序列

Fig.3 The mass spectrometry and amino acid sequence of the representative protein

鉴定, 全部为线粒体蛋白。一个代表性蛋白质的质谱图及氨基酸序列见图3。NCBI数据库匹配确定该蛋白质为长链特异性酰基CoA脱氢酶。

3 讨论

2-DE后的凝胶染色是蛋白质组学研究的关键环节。本课题提取大鼠心肌线粒体蛋白质行2-DE, 比较经典硝酸银染色方法与优化硝酸银染色方法用于凝胶染色的效果。与经典硝酸银染色方法相比, 优化硝酸银染色方法凝胶扫描后的图像更清晰、背景深度较佳、蛋白质斑点数目明显增多、重复性及质谱兼容性好。本研究对硝酸银染色方法优化主要原因体现在如下方面: 首先, 甲醛虽然能够提高硝酸银染色的灵敏度和染色结果的重复性, 但它能修饰蛋白质从而影响质谱鉴定结果, 因此本研究于固定液中去除了甲醛, 同时银染液及显影液中减少其用量; 其次, 减少了银染液中硝酸银剂量且延长了染色时间, 这避免了大量未溶解的银离子黏附在凝胶表面, 导致凝胶背景过深, 同时使得溶解的银离子与蛋白质斑点充分附着。最后, 本研究发现, 漂洗时间同样会影响凝胶背景和染色效果, 因此我们缩短了每次漂洗的时间。

硝酸银染色是灵敏度极高的染色方法, 但染色

过程中凝胶背景不易控制且质谱兼容性欠佳。针对这些缺点, 学者们做了大量的改进, 但最终效果均不理想^[5-10]。通过本课题的研究, 我们实验室确立了上述优化方案用于吡那地尔后处理大鼠心肌线粒体蛋白质组学的研究, 最终染色结果较佳^[11]。

综上所述, 本研究优化的硝酸银染色方法对于线粒体蛋白以及其他亚细胞器蛋白2-DE后的凝胶染色具有重要参考价值。

参考文献 (References)

- Noaman N, Abbineni PS, Withers M, Coorssen JR. Coomassie staining provides routine (sub) femtomole in-gel detection of intact proteoforms: expanding opportunities for genuine top-down proteomics. *Electrophoresis* 2017; 38(24): 3086-99.
- Gauci VJ, Padula MP, Coorssen JR. Coomassie blue staining for high sensitivity gel-based proteomics. *J Proteomics* 2013; 90(17): 96-106.
- Cao S, Liu Y, Wang H, Mao X, Chen J, Liu J, *et al.* Ischemic postconditioning influences electron transport chain protein turnover in Langendorff-perfused rat hearts. *PeerJ* 2016; 1(6): 1706-27.
- Timothy Palzkill. *Proteomics*. Germany: Science Press 2001, 1359-63.
- Virginia Espina. *Molecular Profiling*. America: Humana Press 2017, 297-311.
- Liao JL, Huang YJ. Evaluation of protocols used in 2-D electrophoresis for proteome analysis of young rice caryopsis. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2011; 9(6): 229-37.

- 7 Yu J, Sungmoon C. Understanding interactions between cellular matrices and metal complexes: methods to improve silver nanodot specific staining. *Chemistry* 2016; 22(36): 12660-4.
- 8 Keidel EM, Dosch D, Brunner A, Kellermann J, Lottspeich F. Evaluation of protein loading techniques and improved separation in OFFGEL isoelectric focusing. *Electrophoresis* 2011; 32(13): 1659-66.
- 9 Liu W, Li R, Ayalew H, Xia Y, Bai G, Yan G, *et al.* Development of a simple and effective silver staining protocol for detection of DNA fragments. *Electrophoresis* 2017; 38(8): 1175-8.
- 10 Liew YK, Neela V, Hamat RA, Nordin SA, Chong PP. Modified silver staining in 2DE improves protein detection even at extremely low sample concentration. *Electrophoresis* 2013; 34(3): 397-400.
- 11 魏义勇, 李科, 刘云, 刘兴奎, 王海英, 喻田. 吡那地尔后处理大鼠缺血再灌注损伤心肌线粒体的蛋白质组学研究. *中国病理生理杂志*(Wei Yiyong, Li Ke, Liu Yun, Liu Xingkui, Wang Haiying, Yu Tian. Proteomic study of myocardial mitochondria with ischemia/reperfusion injury and pinacidil postconditioning in isolated rat hearts. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2015; 31(12): 2287-90.

中国细胞生物学学报