

[文章编号 1000-1182(2004)03-0177-03]

基础研究 ·

采用水平双相凝胶电泳法对福赛斯拟杆菌蛋白分离的初步研究

黄定明¹, 周学东¹, 久保庭雅惠², 天野敦雄²

(1. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041; 2. 日本大阪大学齿学部, 大阪 日本)

[摘要] 目的 为分离福赛斯拟杆菌蛋白, 建立一种快速、方便、高效、可靠的方法。方法 福赛斯拟杆菌厌氧培养的菌细胞经超声破碎后, 菌蛋白加入固相 pH 梯度 (IPG) 膨润液中或经 ReadyPrep 试剂处理后, 在不使用加样杯、加样杯分别位于 IPG 的阳极端、中间、阴极端, 采用 pH 3~10 的 IPG 聚丙烯酰胺凝胶条作等电聚焦电泳, 梯度为 8%~18% 聚丙烯酰胺板状梯度凝胶进行第二相电泳, 经考马斯亮兰染色或蛋白银染观察其蛋白斑点。结果 等电聚焦电泳时, 未使用加样杯福赛斯拟杆菌蛋白加入膨润液中双相电泳后两种染色都未见蛋白斑点, 用加样杯加入福赛斯拟杆菌蛋白经水平双相电泳后考马斯亮兰染色无斑点出现而银染出现蛋白斑点, 且加样杯位于 IPG 中间位置时蛋白等电聚焦的效果最佳。福赛斯拟杆菌蛋白电泳图谱显示水平双相凝胶电泳能将不同蛋白分离, 且绝大多数蛋白位于 IPG 的酸性端, 即蛋白的等电点 (PI) 在 3~7 之间。结论 采用水平双相凝胶电泳方法可以将福赛斯拟杆菌不同种类的蛋白分离。

[关键词] 水平双相凝胶电泳; 福赛斯拟杆菌; 蛋白分离

[中图分类号] Q939.1 [文献标识码] A

Separation of *Bacteroides Forsythus* ATCC43037 Proteins by Horizontal Two-Dimensional Gel Electrophoresis HUANG Ding-ming¹, ZHOU Xue-dong¹, KUBONIWA Masae², AMANO Atsuo². (1. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral Sciences Methodology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Japan)

Abstract Objective To set up a rapid, efficient, reliable and accurate method for separation of *Bacteroides forsythus* proteins. **Methods** *Bacteroides forsythus* ATCC43037 cells were harvested by centrifugation, washed in Tris buffer to remove excess medium, and lysed by sonication. The sonicated lysis proteins were extracted step by step with ReadyPrepTM Sequential Extraction Kit (Bio-Rad). The supernatant of *B. forsythus* proteins were used for two-dimensional gel electrophoresis. The first dimension IEF (isoelectric focusing) was run with Immobiline DryStrip (pH 3~10) and the second dimension SDS-PAGE was run with Excelgel SDS, gradient 8-18 precast gel and buffer strips. The separated proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue and silver staining kit (Plusone Silver Staining Kit, Protein, Pharmacia Biotech). **Results** 1. The protein spots were clear when sample cups were used in the middle of IPG strip during IEF. 2. *B. forsythus* proteins were separated clearly by horizontal two-dimensional electrophoresis and most of *B. forsythus* whole-cell proteins were acidic proteins (PI 3-7). **Conclusion** Horizontal two-dimension electrophoresis is a useful method for separating *B. forsythus* proteins.

Key words horizontal two-dimensional electrophoresis; *Bacteroides forsythus*; protein separation

福赛斯拟杆菌 (*Bacteroides forsythus*) 作为牙周疾病可疑致病菌¹, Siqueira²、作者采用聚合酶联反应 (PCR) 在感染根管内检出。由于该菌在人工培养基中生长困难³, 因此, 建立一种高效的细菌蛋白分离方法对研究该菌的生物学作用及致病性有十分重要意义。

双相凝胶电泳由 O Farrell⁴ 于 1975 年首次建立,

1998 年 Görg⁵ 研制出水平双相凝胶电泳技术, 第一相采用固相 pH 梯度 (immobiline pH gradient, IPG) 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 保证了蛋白等电聚焦, 显著提高沿 pH 梯度轴斑点分布的重复性。IPG pH 范围可在 2~12, 酸性和碱性蛋白都能在凝胶上等电聚焦, 该法一次可将样品中数千种蛋白分离。该技术仍被认为是蛋白质分离的最佳解决技术和对复杂样品蛋白特性分析的方法之一⁶, 被广泛应用于细胞分化的解析, 蛋白质纯度鉴定及微量蛋白精制。本研究目的是建立双相电泳法分离福赛斯拟杆菌蛋白的方法, 为研究其蛋白生物学作用奠定基础。

[收稿日期 2002-12-04; 修回日期 2004-01-10]

[基金项目] 四川省科研基金资助项目 (03JY029-089-1)

[作者简介] 黄定明 (1966-), 男, 四川人, 副教授, 博士

[通讯作者] 周学东, Tel: 028-85501481

1 材料和方法

1.1 细菌菌株及培养⁷

福赛斯拟杆菌菌株为 *Bacteroides forsythus* ATCC43037(由美国标准菌株中心提供)。细菌在以 TSB 为基础培养基加入酵母提取物,氯化血红素,维生素 K₃,DTT 及 NAM 的液体培养基³⁷ 厌氧(80 % N₂,10 %H₂,10 %CO₂)培养 7 d 后,4 离心收集细菌,超声破碎细胞,离心,收集上清液,备用。

1.2 细菌蛋白的水平双相电泳

采用 Immobiline DryStrip 试剂盒,8 % ~ 18 %Excel-Gel SDS 聚丙烯酰胺梯度胶,用 Multiphor II 水平型电泳仪(Amersham Pharmacia Biotech AB 公司,瑞典)根据厂家说明书进行水平双相电泳。

1.2.1 细菌蛋白上样前的准备⁸ 采用 Ready PrepTM Sequential Extraction Kit(Bio-Rad 公司,瑞典)对全菌蛋白进行分步处理,根据蛋白不同溶解性采用不同试剂进行蛋白提取,测定提取液的蛋白浓度,然后用 Reagent III 配制成 1 μg/μl 的蛋白溶液。

1.2.2 等电聚焦电泳 将固相 pH 梯度 IPG(pH 3 ~ 10,长度为 110 mm)的聚丙烯酰胺凝胶干条(Immobiline DryStrip, Pharmacia Biotech 公司,瑞典)用含或不含蛋白样品的 IPG 膨润缓冲液(8 mol/L 尿素,2 % CHAPS,痕量的溴酚兰,2 % IPG 浸润液 pH 3 ~ 10,0.2 %DTT)200 μl 室温下浸泡 12 h。若膨润缓冲液中无蛋白样品,则在等电聚焦电泳时应用加样杯,加样液中含蛋白 100 μg。加样杯位于 IPG 凝胶条的阴极端、中间、阳极端。采用表 1 程序 15 恒温电泳。

表 1 pH3~10,110 mm IPG等电聚焦电泳程序
Tab 1 Isoelectric focusing program in immobilized pH gradients 3~10,110 mm

电泳时相	电压(V)	电流(mA)	功率(W)	时间(h)
1	300	1	5	0.01
2	300	1	5	7.00
3	2 000	1	5	5.00
4	2 000	1	5	6.50

1.2.3 SDS-PAGE 电泳 将等电聚焦电泳后的 IPG 胶条立即置入盛有平衡缓冲液 I 号 10 ml(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30 % 甘油, 2 % SDS, 1 %DTT)的试管中,放在摇荡器上平衡 10 min,然后转移到盛有平衡缓冲液 II 号 10 ml(50 mmol/L, Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30 % 甘油, 2 % SDS, 4.5 %碘乙胺,以及少许溴酚兰)的试管中,放在摇荡器上平衡 10 min 后,去除 IPG 上多余水分,进行第二相电泳。

用预制的 8 % ~ 18 %聚丙烯酰胺梯度凝胶(Ex-

celGel SDS, Pharmacia Biotech 公司,瑞典),以聚丙烯酰胺凝胶缓冲体系与电极凝胶缓冲液条(ExcelGel SDS buffer strips,Pharmacia Biotech 公司,瑞典)中缓冲体系构成不连续缓冲系统,按表 2 程序 15 恒温电泳。

表 2 在电泳系统中 SDS 凝胶电泳程序
Tab 2 SDS-PAGE program in 8 %~18 %Excel Gel with EPS 3500 XL electrophoresis system

步骤	电压(V)	电流(mA)	功率(W)	时间(min)
1	600	20	30	27
2	600	50	30	5
3	600	50	30	80

1.3 水平双相电泳后蛋白的染色检测

用考马斯亮兰对电泳凝胶蛋白染色,若未出现蛋白斑点,则按使用说明书,用蛋白银染试剂(Plusone, Pharmacia Biotech AB 公司,瑞典)对电泳后的聚丙烯酰胺凝胶进行染色,观察细菌蛋白电泳图谱。

2 结果

水平双相聚丙烯酰胺凝胶电泳后考马斯亮兰蛋白染色,未出现蛋白斑点,提示分离后单一蛋白成分量少,故本实验所得结果均用蛋白银染法。

用含福赛斯拟杆菌全细胞蛋白的 IPG 膨润缓冲液处理 IPG 凝胶条,水平双相电泳后无蛋白斑点出现,而在等电聚焦电泳前用加样杯加样,所有的凝胶都出现蛋白斑点。因此,蛋白加样最好使用加样杯。

蛋白电泳图谱中蛋白质的 PI 值不随样品加样杯的位置改变而改变,绝大多数福赛斯拟杆菌蛋白位于 pH 4~7 范围内(图 1,2),且同一样品蛋白质电泳图谱基本相同,但以加样杯位于 IPG 中间位置时蛋白聚焦效果最佳。因此实验的加样杯最好位于 IPG 中间。



图 1 福赛斯拟杆菌蛋白水平双相电泳后银染蛋白图谱(IPG pH 3~10)

图左侧为碱性端(pH 10),右侧为酸性端(pH 3)

Fig 1 *Bacteroides forsythus* ATCC43037 proteins separated with horizontal two-dimensional electrophoresis with silver staining(IPG pH 3~10, left pH 10, right pH 3)

福赛斯拟杆菌蛋白水平双相电泳后电泳图谱显示存在同一等电点不同分子量的蛋白以及同一分子量不同等电点的蛋白质,提示水平双相电泳能更有效

地将不同种类的福赛斯拟杆菌蛋白成分分离开。

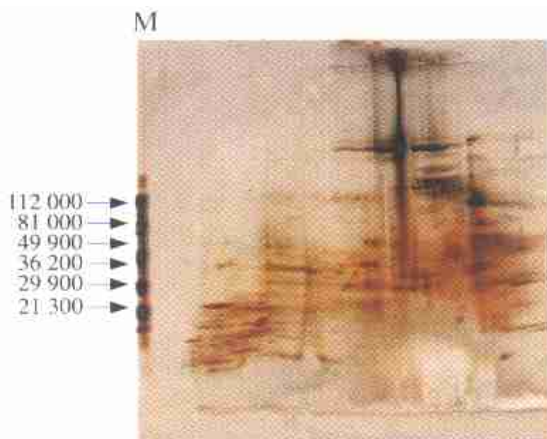


图 2 福赛斯拟杆菌蛋白水平双相电泳后银染蛋白图谱 (IPG pH 4~7)

图左侧为碱性端 (pH 7), 右侧为酸性端 (pH 4)

Fig 2 *Bacteroides forsythus* ATCC43037 proteins separated with horizontal two-dimensional electrophoresis with silver staining (IPG pH 4~7, left pH 7, right pH 4)

3 讨论

本研究首次将水平双相电泳技术应用于福赛斯拟杆菌蛋白分析研究,结果显示该方法切实可行,能将福赛斯拟杆菌蛋白成分分离开。在第一相等电聚焦电泳时应用预制脱水固相 IPG 凝胶条, pH 梯度 3~10, 能将酸性蛋白和部分碱性蛋白分离。IPG 应用称之为 Immobiline 缓冲单体形成 pH 梯度, 与传统应用载体两性电解质产生的 pH 梯度性相比, 由于缓冲物质能与固相基质呈共价键结合, 且在 pH 3~10 范围内产生很窄的线形 pH 梯度, 这为多次进行电泳蛋白的性质研究带来了良好的重复性⁹。Görg 等¹⁰ 将蛋白样品加入 IPG 膨润液中随膨润液进入 IPG 凝胶中, 这样使蛋白在凝胶条中分布均匀, 增加蛋白上样量, 且不使用上样杯, 简化操作等优点。本研究发现当超声破碎福赛斯拟杆菌的全菌蛋白直接加入 IPG 膨润液浸泡 12 h 后进行电泳, 银染未见蛋白斑点, 采用加样杯则出现蛋白斑点。这可能是福赛斯拟杆菌蛋白在 IPG 膨润液中溶解性较差, 存在较多的颗粒蛋白而不能进入 IPG 凝胶, 也可能是蛋白液中有许多蛋白水解酶, 室温浸泡 12 h 蛋白质被酶水解。另外, 溶解性差的蛋白或蛋白颗粒进入 IPG 凝胶后, 由于电泳温度低于室温, 部分尿素结晶, 低溶性蛋白凝集沉淀, 堵塞凝胶孔隙, 影响蛋白的等电聚焦电泳。当采用 Ready Prep 试剂时, 福赛斯拟杆菌全菌蛋白在水平双相电泳时获得较满意的分离效果。这可能是试剂中的 SB-3-10、TBP 能增加蛋白溶解性, 阻止蛋白沉淀¹¹。本研究发现加样蛋白总量为 100 μg 时考马斯亮蓝未检出蛋白斑点。这可能是在等电聚焦电泳时, 一部分蛋白沉淀丢失或根本未进入 IPG 凝胶, 另一方面溶解的蛋白经水平双相电泳后, 将数千种蛋白质分

离开, 导致每个蛋白斑点的蛋白含量少于考马斯亮蓝的检出水平。当采用蛋白银染时, 电泳凝胶上的蛋白斑点出现。这也证实了上述的推测, 因蛋白银染的灵敏度是考马斯亮蓝的 100 倍。

本研究发现绝大部分福赛斯拟杆菌蛋白斑点位于 IPG 酸性区, 极少数蛋白斑点位于 IPG 碱性区, 并且在同一分子量水平存在不同等电点的蛋白斑点, 提示这些蛋白质是一类具有分子量相同而等电点不同的蛋白质, 在聚丙烯酰胺单相电泳时这些蛋白质都位于同一位置而无法分离。可以认为, 利用水平双相电泳法鉴定获得的纯化蛋白比 SDS-PAGE 更可靠, 且利用该方法纯化蛋白能更精确地获得目的蛋白。这对于目的蛋白的分子生物学研究如蛋白质氨基酸序列分析, 编码该蛋白的基因推测以及该蛋白的生物学活性研究具有十分重要的意义。

本研究结果显示, 采用水平双相凝胶电泳来分离福赛斯拟杆菌不同种类蛋白的方法是切实可行的。

[参考文献]

- 1] Braham PH, Moncla BJ. Rapid presumptive identification and further characterization of *Bacteroides forsythus* J. J Clin Microbiol, 1992, 30 (3): 649-654.
- 2] Siqueira JF Jr, Rocas IN, Souto R, et al. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections J. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000, 89 (6): 744-748.
- 3] Dzink JL, Smith CM, Socranky SS. Development of a broth medium for *Bacteroides forsythus* J. J Clin Microbiol, 1987, 25 (5): 925.
- 4] O Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins J. J Biol Chem, 1975, 250 (4): 4007-4021.
- 5] Görg A, Pöstal W, Gentler S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients J. Electrophoresis, 1988, 9 (4): 531-546.
- 6] Herbert BR. Advance in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis J. Electrophoresis, 1999, 20 (4): 660-663.
- 7] 黄定明, 周学东, 天野敦雄. 培养基成分对口腔福赛斯拟杆菌生长影响的实验研究 J. 中国微生态学杂志, 2001, 13 (6): 33-34.
- 8] 黄定明, 周学东. Ready Prep 试剂对福赛斯拟杆菌蛋白水平双相凝胶电泳影响 J. 中华医学研究杂志, 2001, 1 (3): 2077-2079.
- 9] Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications J. J Biophys Methods, 1982, 6 (4): 337-339.
- 10] Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. Recent developments in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures J. Electrophoresis, 1999, 20 (5): 712-717.
- 11] Herbert BR, Molloy MP, Govley AA, et al. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent J. Electrophoresis, 1998, 19 (5): 845-851.

(本文编辑 王 晴)