

不同裂解液对血管蛋白提取和磷酸化蛋白免疫印迹的影响

任向波¹, 吴秀丽¹, 李 芬^{1,2}

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 资源微生物与功能分子
河南省高校重点实验室培育基地, 河南 新乡 453007)

摘 要:为寻找一种适合血管组织蛋白提取的裂解液配方以及用于磷酸化蛋白的免疫印迹分析,运用3种不同的细胞裂解液A、B和C,分别对经预处理的等量猪冠状动脉血管样品进行总蛋白的提取,BCA法测蛋白含量,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对蛋白进行分离,免疫印迹法检测pERK、p-AKT、p-MLC和p-MYPT1 4种磷酸化蛋白表达以比较3种裂解液的裂解效果.结果表明,3种裂解液均可以满足一般免疫印迹分析的要求,其中C液提取的蛋白浓度最低,B液提取的蛋白含量最高,但不适于低含量的小分子磷酸化蛋白p-MLC的检测,A液用于免疫印迹检测大、中、小3种分子量的磷酸化蛋白效果最佳.即细胞裂解液A(50 mmol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl,150 mmol·L⁻¹ NaCl,0.1% SDS,1% NP-40,1 mmol·L⁻¹ EDTA,1 mmol·L⁻¹ EGTA,临用前加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂)可作为提取血管组织总蛋白进一步用于Western检测的一种理想配方.

关键词:细胞裂解液;血管;总蛋白提取;免疫印迹

中图分类号:Q533

文献标志码:A

约有1/3的哺乳类动物蛋白质以共价键的形式与磷酸盐结合,其可逆磷酸化几乎控制细胞生命的所有方面,如部分蛋白激酶通过与AT II,ET-1,PDGF等多种血管活性物质的相互调控影响血管平滑肌细胞(SMC)的功能和结构,直接参与动脉粥样硬化(arteriosclerosis,AS)、高血压、冠脉痉挛和心肌缺血等心血管疾病的发病^[1-3].故检测猪等哺乳动物血管等组织磷酸化蛋白对于动物一些重大疾病的防治具有十分重要的意义.

检测蛋白磷酸化有多重方法,其中,免疫印迹最为常用;该技术是将凝胶电泳分离蛋白与固相免疫相结合检测多种抗原或病毒抗体的一项分子生物学技术.成功运用此技术的关键是样品的制备,样品处理合适与否、提取蛋白浓度的高低以及质量的优劣都会直接影响实验结果的可靠性.实际上,在生命过程中发挥关键调控作用的功能蛋白质常常是一些低丰度蛋白^[4],因此,在蛋白提取、检测等环节能否保证低丰度蛋白被检测到,往往直接影响实验的成败.目前提取蛋白所用的裂解液种类繁多,效果差异性较大.提取液的盐浓度、pH值、表面活性剂的使用、提取温度以及对提取物的保护等都会影响提取效果.其中,裂解液中所使用的表面活性剂的种类和浓度对细胞的裂解及不同部位蛋白的释放至关重要,直接影响提取的效果.

提取后蛋白的定量对免疫印迹的成功与否也非常重要,常用的蛋白定量方法主要有Lowry法、BCA法、Bradford法、紫外分光光度法、双缩脲法和凯氏定氮法等.其中,Bradford法和BCA使用最为普遍.二者测定原理不同^[5-6].但均会受到裂解液成分的影响,如去污剂Triton X100,SDS,CHAPS等可造成Bradford法定量值的增高^[7-8];而螯合剂EGTA,EDTA和还原剂DTT则分别造成BCA法定量值的降低和增高^[4].同Bradford法相比,BCA法干扰物质少,更灵敏,易于操作^[9].本文在盐浓度、pH值、温度和对提取物的保护一致的前提下,对实验室使用的配方进行改良,运用表面活性剂的种类和浓度不同的3种细胞裂解液对猪冠状动脉血管组织研磨样品进行裂解,BCA法测蛋白含量,并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳对提取的蛋白

收稿日期:2015-03-20;修回日期:2015-07-30.

基金项目:国家自然科学基金(30600343);河南省高校科技创新团队支持计划资助(13IRTSTHN009).

第1作者简介:任向波(1992-),男,河北邯郸人,河南师范大学硕士在读研究生,研究方向为细胞生物学,E-mail:510518708@qq.com.

通信作者:李 芬,河南师范大学教授,博士,主要从事分子细胞生物学研究,E-mail:lifen2001@yahoo.com.

进行分离,因本实验室致力于冠状动脉平滑肌细胞收缩及增殖分子机理的相关研究,故以 β -actin(43 kDa)为内参,利用免疫印迹法对样品中与细胞增殖相关的中等分子量含量较高的磷酸化蛋白 pERK (42 kDa)和 pAKT(60 kDa)^[10-11] 以及在平滑肌细胞收缩中起作用的内容较低的小分子量磷酸化蛋白 pMLC (20 kDa)^[12-14] 和分子量较大的磷酸化蛋白 pMYPT1(140 kDa)^[14-15] 的表达情况进行检测,从而确定一种裂解效果好,能满足免疫印迹对小分子、低含量磷酸化蛋白进行有效检测的裂解液配方,为应用血管等组织的免疫印迹为蛋白检测平台的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

猪冠状动脉血管环, β -actin 抗体(Santa Cruze);pERK,pAKT,pMYPT1 和 PMLC 抗体(Cell Signaling)以及辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(Santa Cruze);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天);Pro-light HRP 化学发光检测试剂(Tiangan 公司);彩色预染蛋白分子量 Marker(Invitrogen);其他所用试剂均为国产或进口分析纯。克氏液(K-H 液)按文献^[16]新鲜配制。

1.2 方法

1.2.1 取材及血管预处理

冠状动脉的分离参考杨敬辉等^[17]方法,仔细剔除分离到的冠状动脉血管壁上的脂肪、纤维组织和外膜,注意尽量减少对组织的损伤,将分离出的冠状动脉血管剪成长约 3 mm 的血管环,每个血管环用两根不锈钢微型挂钩贯穿血管管腔,下方固定,上方用一细钢丝连通过张力换能器悬吊于张力传感器的力臂上,水平放入含 10 mL K-H 液的 37 °C 恒温浴槽中,溶液中持续通入含 95% O₂ + 5% CO₂ 的混合气体,调整血管环张力,直至其前负荷为 2.0 g,平衡约 2 h,期间每 15 min 换液一次,使用 Powerlab 生物信号测定系统记录血管环张力变化。平衡后,以 60 mmol/L KCl 反复刺激血管环,每次刺激后用 K-H 液冲洗 3 次,每次间隔 10 min,观察收缩张力的变化,前后 3 次的最大收缩幅度差小于 5% 时即可进行下一步实验^[18-19]。

1.2.2 总蛋白提取和浓度测定

破碎组织采用液氮研磨加机械匀浆法,将预处理的血管环用研钵在液氮冷冻条件下研成粉末,每 1 g 样品分别加入 0.5 ml A、B 和 C 裂解液(配方见表 1),使用组织匀浆器匀浆 30 s;混合物置冰水混合物上裂解 1 h,期间于涡旋振荡器充分混匀 5-6 次以保持悬浮;然后 4 °C 条件下 12 000 r · min⁻¹ 离心 20 min;取上清。按试剂盒说明书用 BCA 法进行蛋白质定量,分装后置 -80 °C 保存或直接电泳。

表 1 3 种裂解液配方

作用	组成	裂解液 A	裂解液 B	裂解液 C
缓冲体系	Tris-cl(pH 7.4)	—	50 mmol · L ⁻¹	—
等渗体系	NaCl	150 mmol · L ⁻¹	—	—
还原剂	DTT	—	—	1 mmol/L
表面活性剂	阴离子型	SDS	—	1%
	阳离子型	脱氧胆酸钠	0.5%	0.2%
	非离子型	TrtonX-100	—	—
	NP-40	1%	1%	0.5%
金属螯合剂和金属	EDTA	—	1 mmol · L ⁻¹	—
蛋白酶抑制剂	EGTA	—	1 mmol · L ⁻¹	—
	Aprotinin	—	1 μ g · mL ⁻¹	—
蛋白酶抑制剂	Leupeptin	—	1 μ g · mL ⁻¹	—
	Pepstatin A	—	1 μ g · mL ⁻¹	—
	苯甲基磺酰氟(PMSF)	—	1 mmol · L ⁻¹	—
磷酸酶抑制剂	钒酸钠	—	0.5 mmol · L ⁻¹	—
	氟化钠	—	50 mmol · L ⁻¹	—
	焦磷酸钠	—	2.5 mmol · L ⁻¹	—
	甘油磷酸钠	—	1 mmol · L ⁻¹	—

1.2.3 SDS-PAGE、转移及各蛋白表达的 Western 检测

各组样品均取其最大浓度测量管进行 SDS-PAGE, 预制胶浓度为 4%~12%, 每孔蛋白上样总体积 30 μg (蛋白: 上样缓冲液=1:1), 以彩色预染标准蛋白 Marker 做指示, 100 V 电泳 1 h 左右停止. 取下凝胶, 将与胶等大的 PVDF 膜浸入 100% 甲醇中 10~15 s 至 PVDF 膜呈均一透明并下沉, 取出膜同凝胶、滤纸一起浸入转膜缓冲液中平衡 10 min, 在装有冰水预冷转移缓冲液的容器中按照从正极到负极的顺序依次放置 3 层滤纸、PVDF 膜、凝胶、3 层滤纸, 每层均精确对齐并排除气泡, 100 V 转移 2 h 后, 取出 PVDF 膜, 1 \times TBST 洗涤 3 次(5 min/次), 加入 5% BSA 室温振荡封闭 1 h, 弃封闭液, 1 \times TBST 洗涤 3 次(5 min/次). 对照彩色预染 Marker 分子量为 37 kD、50 kD、80 kD 处将 PVDF 膜剪成 4 条, 分别用 pMLC, pERK (42 kDa)、pAKT 和 pMYPT1 一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. 之后 1 \times TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜 4 次(7 min/次), 与 HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)室温振荡孵育 1 h, 1 \times TBST 缓冲液洗涤 4 次(7 min/次). ECL 显色, 化学发光成像仪(富士 LAS. 3000, 日本)成像, Science Lab2005 软件进行图像进行分析.

1.2.4 统计学处理

所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 GraphPad Prism 5 软件进行方差齐性检验, 组间比较采用 t 检验或单因素方差分析(one way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 3种方法得到的蛋白定量结果

各上清液按 BCA 法进行蛋白质定量(图 1), 由图 1 可知, 3 种裂解液法得到的蛋白含量 B 组最高, A 组居中, C 组最低, 且各组之间比较均具有显著性差异($P<0.05$).

2.2 总蛋白中 pMLC, pERK, pAKT, pMYPT1 和 β -actin 的表达

3 种裂解液提取所得 pMLC, pERK, pAKT 和 pMYPT1 的 Western blot 结果和光密度分析结果见图 2, β -actin 作为内参, 由图 2 可知, 对于中等分子量的 pERK, pAKT, β -actin 和分子量较大的 pMYPT1 等, 3 种裂解方法都可满足免疫印迹方法检测蛋白的要求; 但对于小分子量的 pMLC, B 裂解液所获蛋白几乎检测不到, 检测的 4 种蛋白 A 裂解液所获蛋白均显著高于 C 裂解液所获蛋白(A 与 C 相比: $P<0.01$); A、B 裂解液液所获蛋白得到的 pERK, pAKT 与 β -actin 的光密度比值虽无显著差异($P>0.05$); 但大分子量的 pMYPT1 与 β -actin 比值 A 裂解液所获蛋白显著高于 B, B 与 C 裂解液所获蛋白无显著差异(pMYPT1: A 与 B 相比: $P<0.05$; B 与 C 相比: $P>0.05$); 根据上述蛋白免疫印迹效果分析, A 裂解液为比较理想的血管组织总蛋白提取液.

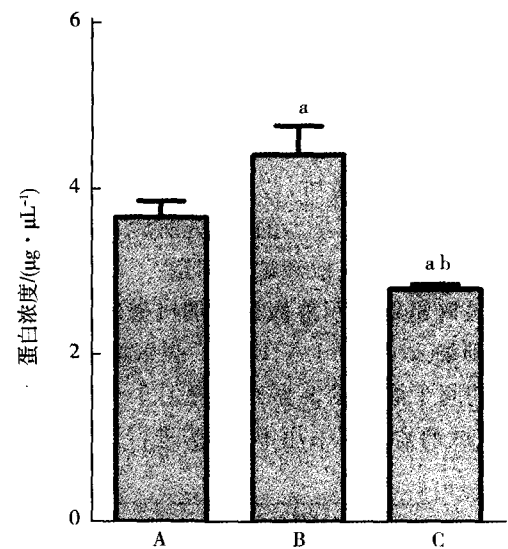


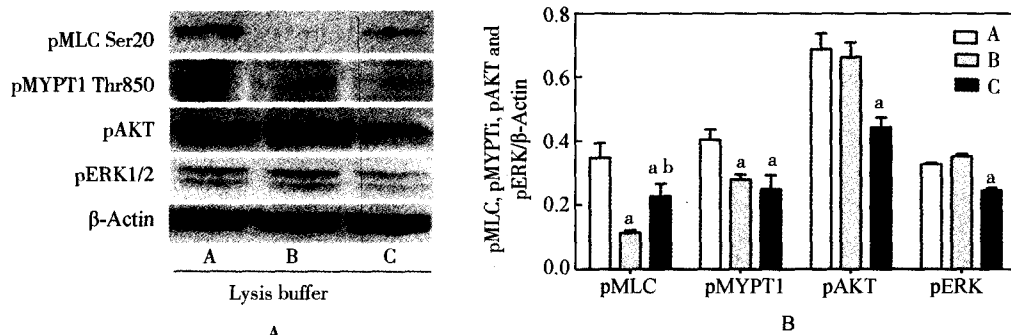
图 1 BCA测定结果

3 讨论

对低含量小分子磷酸化蛋白的免疫印迹检测中, 在样品制备、蛋白提取和免疫印迹等环节通过多种方法提高样品的蛋白总浓度、目标蛋白的浓度和分辨率是改善实验条件的常用策略. 由于匀浆过程中蛋白质被蛋白酶降解的可能性小, 所以匀浆是简便、迅速和风险小的组织破碎方法. 因此, 本文采用液氮研磨和组织匀浆结合的方法破碎血管组织.

在蛋白质的提取这一环节有不同组成、不同浓度的多种裂解液可供选择, 不同的裂解液适用的对象不同、裂解的效果也不一样, 不存在适合所有组织的裂解液配方, 因此根据实验材料和待测目标蛋白种类、存在部位及分子量大小的差异, 选择合适的裂解液是获得可靠的免疫印迹结果的首要前提. 本文以猪冠状动脉血管为研究对象, 通过对表面活性剂组合不同的 3 种裂解液得到样品的蛋白含量和不同分子量磷酸化蛋白免

疫印迹效果的比较研究,寻找适合血管组织蛋白提取和磷酸化蛋白免疫印迹的合适裂解液配方,以期为后续的平滑肌收缩信号通路相关研究提供合适的蛋白提取和免疫印迹方法. 研究结果显示,3种裂解液提取的蛋白均可满足 β -Actin等普通蛋白和pERK、pAKT等含量较为丰富的磷酸化蛋白的免疫印迹研究要求,但是样品的蛋白测量浓度与免疫印迹检测效果并不一致,A法得到的蛋白浓度低于B法,但在免疫印迹分析中4种目标蛋白比同等转膜条件下B液裂解得到的条带相当(pERK, pAKT)或更为清晰、明显(pMLC, pMYPT1),原因可能是:①裂解液中某些组成成分可能会对定量结果产生一定干扰. 有研究证明,裂解液中还原剂DDT将 Cu^{2+} 还原为 Cu^{+} ,对BCA法产生较大干扰,会使定量值偏高^[20];BCA法对DDT的最高可接受浓度是 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[21-22],本文仅C液含DDT且其浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,但本文C液得到的蛋白含量最低,故不是还原剂引起的. EDTA和EGTA虽可螯合铜离子,但其在裂解液中的含量低于BCA法的最高耐受浓度 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,不会对结果产生较大影响,且3种裂解液含有等量的EDTA和EGTA;故其浓度差异有可能只是因为表面活性剂的不同产生的,裂解液B与A相比,增加了较高浓度(1%)的强离子去污剂SDS,加入较多的去污剂可一定程度上提高其裂解效果,这可能是B液定量结果高于A液的主要原因. ②多个去污剂同时使用可能会破坏部分蛋白. 裂解效果和蛋白破坏是矛盾的,蛋白裂解效率增加的同时也提高了蛋白被破坏的概率,不考虑蛋白破坏这一因素一味增加去污剂的种类或提高其用量就会造成一定冲突^[23]. B液中使用了SDS, NP-40和脱氧胆酸钠3种去污剂,裂解效果增强的同时可能导致了部分蛋白尤其是小分子蛋白的降解,故其小分子蛋白免疫印迹效果较差. 因此对裂解液中去污剂的种类和用量要根据待测目标蛋白的性质、大小等特征来确定,决不能一味提高总蛋白含量而不顾蛋白的破坏. 由上述分析可知,因B液过多去污剂的使用虽然增强了裂解效果提高了总蛋白浓度,但同时有部分蛋白的降解作用使得免疫印迹灵敏度下降,分辨率降低,尤其是对小分子量蛋白影响更大. 因此,对血管组织的裂解及免疫印迹分析用A裂解液更为合适,该结果为后续研究中对不同磷酸化蛋白的准确分析奠定了坚实的基础.



A: 3种裂解液提取所得pMLC, pERK, pAKT和pMYPT1的Western blot结果, β -actin为内参;

B: 对Western Blot结果的光密度分析

图2 3种裂解液法得到的几种磷酸化蛋白免疫印迹效果比较

参 考 文 献

- [1] Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H, et al. Rho-kinase mediated angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells[J]. Hypertension, 2001, 38(1): 100-104.
- [2] Sauzeau V, Le Mellionec E, Bertoglio J, et al. Human Urotensin II-Induced Contraction and Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation Are Mediated by RhoA and Rho-Kinase[J]. Circ Res, 2001, 88(11): 1102-1104.
- [3] Li F, Yu X, Szykarski CK, et al. Activation of GPER Induces Differentiation and Inhibition of Coronary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation[J]. PLoS ONE, 2013, 8(6): e64771. doi:10.1371/journal.pone.0064771.
- [4] Gonzalez J, Cornejo A, Santos MR, et al. A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite Trypanosoma cruzi[J]. Biochem J, 2003, 374(Pt3): 647-656.
- [5] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [6] Wicheelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation[J]. Anal Biochem, 1988, 175(1): 231-237.

- [7] 范华杰,李闻捷.蛋白质定量方法的合理应用[J].中华国际医药杂志,2003,2(2):126-128.
- [8] 曹稳根,焦庆才,刘茜,等.考马斯亮蓝显色剂变色反应机理的研究[J].化学学报,2002,60(9):1656-1661.
- [9] 邵泓,吕晶,陈钢.蛋白质含量测定方法的规范化研究[J].中国药品标准,2011,12(2):135-138.
- [10] Hua SI, Yao M, Vignarajan S, et al. Cytosolic phospholipase A2 α sustains pAKT, pERK and AR levels in PTEN-null/mutated prostate cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(6):1146-1157.
- [11] Li F, Yu X, Szykarski CK, et al. Correction: Activation of GPER Induces Differentiation and Inhibition of Coronary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7):e64771
- [12] Cao M1, Wang P, Sun C, et al. Amelioration of IFN- γ and TNF- α -induced intestinal epithelial barrier dysfunction by berberine via suppression of MLCK-MLC phosphorylation signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e61944.
- [13] Fairbank N J, Connolly S C, Mackinnon J D, et al. Airway smooth muscle cell tone amplifies contractile function in the presence of chronic cyclic strain[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(3):L479-488.
- [14] Singh D K, Sarkar J, Raghavan A, et al. Hypoxia modulates the expression of leucine zipper-positive MYPT1 and its interaction with protein kinase G and Rho kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. *Pulm Circ*, 2011, 1(4):487-498.
- [15] Cazzola M, Calzetta L, Rogliani P, et al. High glucose enhances responsiveness of human airways smooth muscle via the Rho/ROCK pathway[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(4):509-516.
- [16] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 2版. 北京:人民出版社,1994:886-887.
- [17] 杨敬辉,吴秀丽,王冠峰,等.猪冠状动脉平滑肌细胞的分离、培养及鉴定[J].河南师范大学学报(自然科学版),2014,42(1):111-114.
- [18] 朱金墙,贾晓旭,康立源.丹酚酸B对猪冠状动脉收缩的影响[J].天津中医药,2010,27(5):418-420.
- [19] 郑晓俊,胡志强.参麦注射液对猪冠状动脉环的舒张作用及机制研究[J].中国中药杂志,2011,36(21):3023-3025.
- [20] Sapan C V, Lundblad R L, Price N C. Colorimetric protein assay techniques[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, 29(t2):99-108.
- [21] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000:55-57.
- [22] 徐珊珊,阎春兰,刘黎明,等.细胞裂解液对蛋白质定量方法的影响[J].浙江大学学报(医学版),2008,37(1):45-50.
- [23] 王丽,张永亮,何涛,等.不同细胞裂解液提取总蛋白在免疫印迹中的效果分析[J].泸州医学院学报,2010,33(4):367-369.

Effect Analysis of Different Cell Lysate on the Extraction of Total Protein from Vascular Tissue and Detection of Phosphor-Protein by Western Blot

REN Xiangbo¹, WU Xiuli¹, LI Fen^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2. Key Laboratory for Microorganisms and Functional Molecules, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: To search a suitable cell lysate for extraction of total proteins from vascular tissue for detection of phosphor-protein by Western blot. **Methods:** The proteins were extracted from pretreatment vascular tissue by three different cell lysates: A, B and C. Then total proteins were collected and quantified with the method of BCA assay. The proteins were separated by SDS-PAGE, and the phosphor-protein of pERK, pAKT, pMLC, and pMYPT1 were assessed by Western blot. **Results:** all samples can be used to detect protein level by Western blot. The concentration of proteins extracted by cell lysate C was lowest. Though the concentration of proteins extracted by cell lysate A were lower than by cell lysate B, the effect of cell lysate A was better than that of cell lysate B used in Western blot, especially in detection of pMLC. **Conclusion:** The cell lysate A (50 mmol \cdot L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl, 150 mmol \cdot L⁻¹ NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, 1 mmol \cdot L⁻¹ EGTA, protease and phosphatase inhibitors can be added just before use) is more suitable for extracting proteins from vascular tissue.

Keywords: cell lysate; vascular tissue; protein extraction; western blot