

## 细胞质膜及其蛋白质复合物分离与定性方法研究

胡 凡,许志洋,夏峥嵘,王富强,王 玲\*

(南京医科大学分析测试中心,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨细胞质膜及其蛋白质复合物分离与定性的方法。方法:结合差速离心法、密度梯度离心法、双水相法分离得到细胞质膜,并利用透射电镜和 Western blot 等实验手段验证分离所得细胞质膜的纯度。结果:本文采用了蓝绿温和凝胶电泳法对细胞质膜上的蛋白质复合物进行一维分离,得到 23 种蛋白质复合物;接着对 23 种蛋白质复合物进行第二相垂直电泳分离,分离出 135 种蛋白质;最后鉴定 78 种是质膜相关蛋白,其余 57 种来源内膜系统。结论:多种提纯方法的联用可以有效提高蛋白分离率与分离纯度,高纯度的质膜对质膜蛋白质组的研究具有重要意义。

**[关键词]** 细胞质膜;BN-PAGE;蛋白质复合物

**[中图分类号]** R329.28

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)03-407-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130327

## Separation and analysis of protein complexes in plasma membrane

Hu Fan, Xu Zhiyang, Xia Zhengrong, Wang Fuqiang, Wang Ling\*

(Analytical and Testing Center, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** Discuss the methods of plasma membrane and its protein complex separation and qualitative. **Methods:** We evaluated the application of “density gradient ultracentrifugation” and “aqueous two-phase partition” to separate high-quality plasma membrane. Western blot and transmission electron microscope were used in the following research to validate the purity of the separated cell membrane. **Results:** We applied the blue-native method to process the one-dimensional separation of the protein complex in the cell membrane and 23 kinds of protein complex were separated. We also processed the second-dimensional separation of the 23 kinds of complex and identified 135 proteins, of which 78 were proteins correlated to plasma membrane and 57 were from endomembrane system. **Conclusion:** Our results show that the combination of different kinds of purification methods can effectively increase the protein separation rate and separation purity. High purity membrane on plasma membrane proteome research has important significance.

**[Key words]** plasma membrane; BN-PAGE; protein complexes

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 407-411]

细胞质膜(plasma membrane, PM)是所有细胞的结构基础。质膜蛋白质执行细胞与外界环境以及细胞与细胞之间的物质交换、能量转换和信号传递等功能<sup>[1]</sup>。质膜功能主要依赖于其中的蛋白质,膜蛋白在细胞生命活动中承担各种重要功能,人类细胞转录翻译的蛋白质中有 1/3 为膜蛋白,但已知结构功能的膜蛋白数目却只占整个蛋白质数据库的 1% 左右<sup>[2]</sup>。在已经发现的药物靶标中,大约有 2/3 是质

膜蛋白质。因此,细胞质膜蛋白质组学研究具有重要的理论意义和应用前景<sup>[3]</sup>。然而,尽管近年来蛋白质化学与蛋白质组学研究技术取得了很大的发展,但膜蛋白尤其是整合膜蛋白的分析仍然是一个巨大的挑战,这是因为大多数膜蛋白质不仅丰度低,而且由于疏水性强而溶解性差和易于聚集沉淀<sup>[4]</sup>,给蛋白质的提取、酶解和鉴定带来了很多困难<sup>[5]</sup>,因此质膜蛋白质组学研究成为蛋白质组学研究中的难点。

在细胞质膜蛋白质组学研究过程中,高纯度的质膜蛋白是深入研究的重要基础,本文结合差速离心和连续蔗糖密度梯度离心法<sup>[6]</sup>,富集生物膜,其中差速离心利用不同速度使质膜成分各自分离,而

**[基金项目]** 南京医科大学科技发展基金面上项目(2011NJMU69, 2011NJMU70)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: acc@njmu.edu.cn

密度梯度离心则是基于各亚细胞器的密度不同而在如蔗糖等介质中进行分离<sup>[7]</sup>。接着又采用双水相法进一步纯化生物膜。

在本研究中,考虑到乳腺癌肿瘤组织质膜的密度和细胞器密度的相近性,采用连续蔗糖密度梯度离心法:在浓度50%~10%的蔗糖中,质膜层主要集中于40%~30%,显现一段较宽的区带,而质膜的密度主要受控于膜蛋白的种类以及分布<sup>[8]</sup>。

质膜的分离提纯不能靠单一方法,通过以上几种方法的联合应用,分离的质膜在透射电镜的观察下得到证实,其视野下大部分区域为分离后的质膜结构,而Western blot的结果也验证了此种方法提纯的膜蛋白相对全组织裂解产物有明显提高。由于所得的蛋白质复合物分子量较大(>200 000),传统的双向凝胶电泳无法取得理想的分离效果,本文采用蓝绿温和胶凝胶电泳(blue-native polyacrylamide gel-electrophoresis, BN-PAGE)进行一维分离,垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳二维分离,然后通过质谱来对凝胶上的蛋白质点进行分析和鉴定并找出相应的蛋白质分子。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

乳腺癌肿瘤组织共20例,均为南京医科大学第一附属医院乳腺外科2011年1月~2012年7月切除乳腺癌患者送检的组织标本。二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、蔗糖、脱氧胆酸钠、聚乙二醇(PEG 3350)、葡聚糖 T500 (Dextran T500) (Sigma-Aldrich 公司,美国)。实验用水来自于 Milli-Q Plus 纯化系统 (Millipore 公司,美国)。其他试剂均购自南京国药集团。ECL Puls 显色液 (GE Healthcare, 美国)。透射电镜为日本电子 JEOL-1010, 超薄切片 (LEICA, 德国), 纳升级液相色谱 (Waters Nano UPLC, 美国), 线性离子阱串联静电场轨道阱质谱仪 (Orbitrap XL, Thermo LTQ 公司, 美国), 超速离心机 (Optima L-100 XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生物膜分离、纯化、蛋白质提取

将乳腺肿瘤组织剪碎洗涤,加液氮研磨成粉末。用匀浆缓冲液(50 mmol/L 蔗糖, pH7.4, 1 mmol/L 氯化钙, 0.1 mmol/L 蛋白酶抑制剂)溶解。将上述溶液离心(4℃, 600 g) 10 min。取上清液离心(4℃, 24 000 g) 30 min, 用 2 ml 匀浆缓冲液混匀沉淀, 向连续梯度蔗糖溶液(浓度 50%~10%)中加入粗质膜样品离心

(4℃, 24 000 g) 8 h。分层收集离心管中的质膜条带部分, 分别测定其蔗糖浓度。含质膜的样品用洗涤液(50 mmol/L 蔗糖, 0.1 mmol/L 蛋白酶抑制剂)离心洗涤。将所得含质膜的样品加入 PEG 3350 和 Dextran T500 两相混合液(7:13)中, 4℃下静置过夜, 将 PEG 3350 富集得到的上相, 用洗涤液离心洗涤。保存于-70℃冰箱。

#### 1.2.2 蓝绿温和胶凝胶电泳

##### 1.2.2.1 蛋白溶解

从-70℃冰箱里取出质膜样品, 置于 37℃水浴锅中使其快速融化。之后向管中加入溶解液 A (25 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸, 20%甘油, 2%十二烷基麦芽糖, pH7.0), 使 EP 管中溶液总体积达到 1.2 ml。18 000 g 冷冻离心 20 min, 弃上清取沉淀, 并称取沉淀的重量。按照去垢剂:蛋白为 3:1 的比例加入 20%聚乙二醇辛基苯基醚溶液, 使聚乙二醇辛基苯基醚的终浓度为 2%, 用枪头小心混匀样品, 置于冰上裂解 30 min。然后 18 000 g 冷冻离心 20 min, 收集上清, 测定蛋白含量。

##### 1.2.2.2 上样

取出 120 μg 的样品, 加入 3 μl 5%考马斯亮蓝 G250 溶液和 5 μl 50%的甘油, 混匀后上样。

##### 1.2.2.3 电泳

处理好的样品用微量进样器点在上样孔中后, 倒入 1 × 负极液(甘氨酸 8.95 g、咪唑 0.51 g、考马斯亮蓝 0.2 g 加双蒸水至 500 ml) 和正极液(15 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸, 50 mmol/L 三羟甲基氨基甘氨酸), 恒压 100 V 开始电泳, 待样品跑过浓缩胶后, 电压改为 250 V, 之后可以慢慢增大, 到样品最后跑完, 过程中需要控制电流在 50 mA 以内。待样品跑到凝胶的 1/3 处更换负极液, 电极缓冲液(三羟甲基氨基甲烷 3.03 g, 甘氨酸 14.4 g, 十二烷基硫酸钠 1 g, 加双蒸水至 1 000 ml)。

##### 1.2.2.4 固定和染色

电泳结束后, 用固定液(50%去离子水, 40%甲醇, 10%乙酸)固定凝胶 30 min, 水洗 4 次, 每次 15 min。然后将凝胶置于考马斯亮蓝染液中染色过夜。

##### 1.2.2.5 还原

将凝胶根据条带的位置切成长条, 置于含有 1%十二烷基硫酸钠, 1%巯基乙醇溶液中平衡 2 h, 水洗 20 min。

##### 1.2.2.6 转移

将平衡好的胶条摆在二向 SDS 胶的浓缩胶胶

面上,用压胶片把胶条压紧,使二者紧密结合,并保证两个胶面之间没有气泡,再向胶面上封一层琼脂糖(0.05 g 琼脂糖,10 ml 电极缓冲液,30  $\mu$ l 溴酚蓝)。

#### 1.2.2.7 电泳

等琼脂糖凝固后,将玻璃板摆到电泳槽上,倒入电极缓冲液,以 25 mA 恒流开始电泳。等样品跑过浓缩胶后,将电流改为 45 mA 直到电泳结束。

#### 1.2.2.8 银染

固定液(100 ml 乙醇,25 ml 乙酸,125 ml 双蒸水)固定凝胶 30 min,敏化液(0.5 g 硫代硫酸钠,17 g 乙酸钠,75 ml 乙醇,最后定容至 250 ml)敏化 30 min,水洗 3 次,每次 5 min,加入银染液(0.625 g 硝酸银加水至 250 ml)染色 20 min,水洗 2 次,每次 1 min,加入显影液(6.25 g 碳酸钠,50  $\mu$ l 甲醛溶于 250 ml 水中),3~5 min 以后倒掉显影液,快速加入终止液(3.65 g EDTA 溶于 250 ml 水中)终止 20 min。

#### 1.2.3 验证质膜纯度

##### 1.2.3.1 Western blot

将分裂所得质膜蛋白进行 SDS-PAGE 分离(100 V,1 h),转移到硝酸纤维素膜上,放入 1 $\times$  TBST 缓冲液中清洗 3 次,每次 5 min。用封闭液(1% 牛血清白蛋白,10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 pH7.5,100 mmol/L 氯化钠,0.1% Tween20)37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。以 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶抗体为一抗(1:1 000),以 HRP 标记羊抗鼠 IgG 为二抗(1:8 000)。用 ECL Plus 试剂盒检测膜上抗原抗体复合物。

##### 1.2.3.2 电镜观察

用 2.5% 戊二醛固定新鲜的膜样品,室温固定过夜,按如下方法进行样品制备和电镜观察:用 PBS 洗膜 3 次,每次 15 min;2% 锇酸固定 1 h;用 PBS 洗膜 3 次,每次 15 min。依次用 25%、50%、75%、95% 和 100% 丙酮脱水。环氧树脂浸渍过夜,包埋聚合后进行超薄切片,切片厚度为 60~70 nm,并收集于铜网上,用醋酸铀和柠檬酸铅染色,在透射电镜下观察。

#### 1.2.4 蛋白鉴定

##### 1.2.4.1 蛋白酶切

胶粒加乙腈 50  $\mu$ l 脱水 5 min 后 3 000 g 离心 5 min,吸去乙腈晾干。加入 10 mmol/L DTT 50  $\mu$ l,56 $^{\circ}$ C 水浴 1 h。吸干 DTT 后,加入 55 mmol/L IAA 50  $\mu$ l,置于暗室 45 min,吸干 IAA 后,依次用 25 mmol/L 碳酸氢铵、50% 的乙腈及 100% 乙腈脱水,晾干,加入 10 ng/ $\mu$ l 的胰酶酶切过夜。

##### 1.2.4.2 质谱鉴定

酶解产物用 0.1% 乙酸溶解,离心后用纳升级液相

色谱分离,色谱柱为 C18 反相柱(100  $\mu$ m id  $\times$  15 cm),上样量为 100 ng 的肽段混合物,控制流速为 500 nl/min。带有纳喷离子源的线性离子阱串联静电场轨道阱质谱仪与纳升级液相色谱相连,用来鉴定肽段,喷雾电压 1.3 kV,质谱一级扫描范围 400~1 800,分离宽度为 3 Da;串联质谱分析采用一级质谱数据依赖的二级碎片扫描模式(data-dependent mode)依次选取一级质谱中离子强度最高的 5 个离子进行碰撞诱导解离(CID)二级串联质谱,二级质谱条件设定为:自动增益控制( $1 \times 10^6$  个离子),1 次微扫描,归一化能量为 35%。

##### 1.2.4.3 蛋白质鉴定

串联质谱数据用 Matrixscience 网站提供的 Mascot 搜索引擎进行数据库检索网址 <http://www.matrixscience.com>。检索条件(Berndt et al,1999):误差容许范围(mass tolerance) 100 ppm;允许有一个氨基酸的误切(miss cleavage);修饰包含半胱氨酸的甲酰化(carbamidomethyl)、甲硫氨酸的氧化(methionine oxidation);实验肽质量指纹谱和理论肽质量指纹谱匹配的肽段至少有 5 个。

## 2 结果

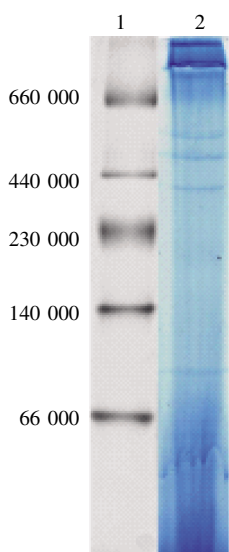
### 2.1 蓝绿温和胶凝胶电泳结果

蓝绿温和胶凝胶电泳分离出 23 种蛋白质复合物。在通常等电点聚焦电泳时,由于膜蛋白的疏水性使其不易在常用的双向凝胶电泳裂解液中完全溶解,相对分子质量过大的酸性或碱性蛋白质在等电聚焦条件下容易丢失。于是我们选择使用一维垂直电泳来分离质膜蛋白,在 SDS 的条件下让膜蛋白直接按照分子大小进行电泳并分离,而跳过易使疏水性整合膜蛋白质聚集沉淀的等电聚焦电泳步骤,避免了疏水性膜蛋白的丢失。如图 1 所示,蓝绿温和胶凝胶电泳从质膜蛋白样品中分离出 23 个蛋白质复合物条带。

### 2.2 Western blot 检测结果

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶是细胞膜特异的整合膜蛋白,通过其单克隆抗体对富集前后提取的蛋白进行 Western blot 验证,如图 2 所示,通过灰度比对可看出,富集后 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶的含量相对于全组织裂解产物有明显提高。有文献报道本文所用方法富集得到的 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶含量比密度梯度离心纯化提高了 10 倍,抗体免疫磁珠纯化提高了 5 倍,比生物素标记法纯化提高了 2.5 倍<sup>[10]</sup>。

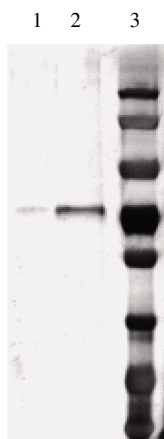
### 2.3 电镜观察结果



1:大分子量标准品;2:质膜蛋白样品蓝绿温和胶凝胶电泳分离结果。凝胶浓度为3%-20%梯度,分离范围:10 000~1000 000。

图1 蓝绿温和胶凝胶电泳分离结果

Figure 1 Results blue-native PAGE



1:全组织裂解产物;2:富集后质膜蛋白;3:中分子量标准品。

图2 Western blot 鉴定样品中 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶含量

Figure 2 Western blot results of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

如图3所示,膜结构所占比例较大,图中可见3片较大区域的膜结构围成类似空泡的结构,其他区域可见较多散在的较小的膜结构。

### 2.4 蛋白鉴定结果

对第一相分离的23个蛋白复合物条带和第二相分离出的135种蛋白点进行鉴定,并对鉴定结果进行生物信息学分析,发现135种蛋白中,有78种质膜蛋白和与膜相关的蛋白质,其余的57种蛋白质来自于细胞内膜系统如线粒体、内质网和细胞核等细胞器膜。

### 3 讨论

蛋白质组的研究通常利用二维凝胶电泳(2DE)

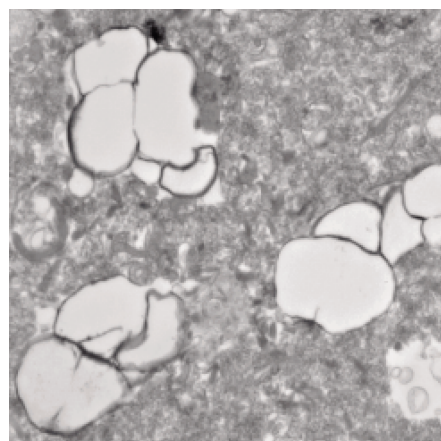


图3 透射电镜观察分离得到的质膜(x30 000)

Figure 3 Transmission electron microscopic image of isolated plasma membrane(x30 000)

进行蛋白质分离,然后通过质谱(MS)及生物信息学蛋白质数据库进行检索比对从而进一步对凝胶蛋白进行分析鉴定<sup>[9]</sup>。但是在实验过程中,由于膜蛋白的疏水性,无法在常用的双向电泳中获得完全分离的膜蛋白<sup>[10]</sup>。在本研究中,选择使用蓝绿温和胶凝胶电泳来分离质膜蛋白,跳过等电聚焦电泳,避免了疏水性膜蛋白的丢失。经一维 SDS-PAGE 电泳之后,获得多个蛋白质混合物条带后,继而采用毛细管高效液相色谱与质谱联用的方法对蛋白质条带的酶切物进行分离鉴定,以达到先用高效液相色谱分离肽段,然后再利用串联质谱得到碎片离子图来进行蛋白质鉴定的目的。

结果表明除了78种质膜相关蛋白之外的其余57种蛋白大多来自于内膜系统,这是由于整个内膜系统具有的均一性,使得线粒体、内质网与膜片的密度很接近,从而分离出的蛋白质中有属于内膜系统的膜蛋白,如HSPs和PDI通常被认为是细胞质蛋白或者内质网蛋白,在最近的研究中揭示了这些蛋白的膜定位<sup>[11]</sup>,所以单纯基于密度差异而分离物质的蔗糖密度梯度离心法难以使这些细胞器完全分离。还有一部分蛋白质在可能已有的数据库中没有明确的功能和定位信息,故而不能明确其位置,其中很可能包含部分质膜及与膜功能相关的蛋白质。实验中分离得到的大多数蛋白为质膜相关蛋白及其复合物,但在结果中仍存在少量非膜相关蛋白,与经典的蛋白富集技术相比<sup>[12]</sup>,本实验分离出的蛋白中非膜蛋白比例已经明显降低。

蓝绿温和凝胶电泳作为一种高效的电泳技术,在蛋白质复合物的分离以及研究蛋白质与蛋白质相互作用中发挥着越来越重要的作用<sup>[13]</sup>,但在第二相

SDS-PAGE 分离时蛋白质斑点容易发生拖尾和横纹现象,这个缺点制约了该技术的使用<sup>[14]</sup>。为了减小各条带间的干扰,减少拖尾和横纹的现象,在实验中对传统的 BN/SDS-PAGE 做了一些改进,即将蓝绿温和凝胶电泳分离得到的各个复合物条带直接切下,经平衡后插入第二相 SDS-PAGE 的加样孔中,固定位置,这样便可以得到清晰锐利的蛋白质条带(斑点)<sup>[15]</sup>。多种方法的联合弥补了一维电泳的缺陷,在蛋白鉴定结果中体现了比较明显的改进作用。

本文主要是针对细胞质膜上的蛋白复合物进行研究,质膜蛋白的分离纯化是实验的基础,由于质膜蛋白具有低丰度、难溶性等特点,决定了单一方法无法满足提纯需要,所以本研究结合了差速离心与蔗糖密度梯度离心以及利用细胞器表面电荷的两相分配的双水相法对生物膜进行质膜蛋白的提纯。

质膜蛋白质组学研究是复杂而艰难的,但对各种相关疾病的研究特别是临床诊断与治疗有重要的意义,本文着重于对细胞质膜及其蛋白质复合物分离与鉴定方法的研究,其中质膜蛋白的分离纯化,作为蛋白质组研究的物质基础,在最近技术的发展中不断改善和优化,却仍然存在线粒体和内质网的污染从而导致质膜蛋白纯度达不到研究的要求等问题。在发展全新的研究方法之外,利用现有技术的互补串联,无疑将成为质膜蛋白质组研究中的新思路,而实验结果也证明这种思路的可行性,期待一些具有更强溶解性能的去污剂或一些新的质膜蛋白质组研究方法的出现与应用,充分挖掘那些尚未人知的质膜蛋白,更全面的了解人类蛋白质组的成员,从而为新的药物靶点和生物标志物的发现提供新的途径。

#### [参考文献]

- [1] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular biology of the cell[M]. New York: Garland Science, 2002: 842-845
- [2] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics[J]. Nature, 2003, 422(6928): 198-207
- [3] Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents; not just a soap opera [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1666(1-2): 105-117
- [4] Kannicht CE. Posttranslational modifications of proteins;

tools for functional proteomics. methods in molecular biology[M]. Totowa: Humana Press, 2002: 1235-1248

- [5] Sprenger RR, Speijer D, Back JW, et al. Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2004, 25(1): 156-172
- [6] Zhou TY, Zhou J, Cao R, et al. Separation of adult rat hippocampal plasma membrane and its proteomic analysis[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 22(9): 733-743
- [7] Schindler J, Nothwang HG. Aqueous polymer two-phase systems: effective tools for plasma membrane proteomics [J]. Proteomics, 2006, 6(20): 5409-5417
- [8] Naaby-Hansen S, Herr JC. Heat shock proteins on the human sperm surface[J]. J Reprod Immunol, 2010, 84(1): 32-40
- [9] Josic D, Clifton JG. Mammalian plasma membrane proteomics[J]. Proteomics, 2007, 7(16): 3010-3029
- [10] Kashino Y, Harayama T, Pakrasi HB, et al. Preparation of membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 849(1-2): 282-292
- [11] Zhang L, Wang X, Peng X, et al. Immunoaffinity purification of plasma membrane with secondary antibody superparamagnetic beads for proteomic analysis[J]. J Proteome Res, 2007, 6(1): 34-43
- [12] Ruth MC, Old WM, Emrick MA, et al. Analysis of membrane proteins from human chronic myelogenous leukemia cells; comparison of extraction methods for multidimensional LC-MS/MS[J]. J Proteome Res, 2006, 5(3): 709-719
- [13] Reisinger V, Eichacker LA. Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE[J]. Proteomics, 2006, 6(Suppl 2): 6-15
- [14] Manabe T, Jin Y. Performance of nondenaturing micro 2-DE followed by third-dimension SDS-PAGE in the analysis of Escherichia coli soluble proteins[J]. Electrophoresis, 2011, 32(2): 300-309
- [15] Katz A, Waridel P, Shevchenko A, et al. Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant Alga dunaliella salina as revealed by blue native Gel electrophoresis and Nano-LC-MS/MS analysis [J]. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(9): 1459-1472

[收稿日期] 2012-10-09