

技术与方法

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.015

精索静脉曲张不育患者精子蛋白组双向电泳技术的建立与优化

何 犇, 唐 伟, 罗华铭, 郭 毅, 李跃华

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:建立与优化精索静脉曲张不育患者精子蛋白质组双向凝胶电泳技术。方法:采取 Percoll 密度梯度离心法提取精索静脉曲张不育患者精子,比较不同精子蛋白样品制备方法、不同胶条、不同上样量和不同水化方式对双向凝胶电泳结果的影响。结果:使用 clean-up kit 法对样品进行预处理,选取 pH 5~8 的固相化 pH 梯度胶条,采用 250 μ g 的上样量和主动水化方式能获得背景干净、分辨率高的双向电泳(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)图谱。结论:成功建立了精索静脉曲张不育患者精子蛋白双向凝胶电泳平台,所获 2-DE 图谱的分辨率高、重复性好,为进一步探讨精索静脉曲张导致不育的分子机制奠定了技术基础。

【关键词】精子蛋白质;精索静脉曲张;双向电泳;蛋白质组学

【中国图书分类法分类号】R697.24

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-23

Establishment and optimization of two-dimensional gel electrophoresis for proteomics research of sperm protein of varicocele patients

HE Ben, TANG Wei, LUO Huaming, GUO Yi, LI Yuehua

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish and optimize a set of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) techniques for proteomic research of sperm protein of varicocele patients. Methods: Spermatozoa in the semen were purified by Percoll gradient technique. The effects of different sample preparation methods, different gels, different amount of protein loads and different rehydration methods to the 2-DE maps were compared. Results: After the sample was treated with clean-up kit, a high resolution and clear 2-DE map for sperm protein of varicocele patients was obtained with pH 5~8 gel, 250 μ g protein loads and initiative rehydration method. Conclusion: The 2-DE map of sperm protein of varicocele patients is successfully obtained with good repeatability and high resolution, which paves the way for the further proteomic research of infertility caused by varicocele.

【Key words】sperm protein; varicocele; two-dimensional gel electrophoresis; proteomics

随着人类基因组测序的完成,生命科学研究已进入了后基因组时代。在这个时代,生命科学的主要研究对象包括结构基因组研究和蛋白质组研究。蛋白质组(Proteomics)的内涵是一个细胞、一类组织或一种生物的基因组所表达的全部蛋白质^[1],由 Marc Wilkins 于 1994 年首次提出^[2],现已广泛用于生命科学的各个领域。

双向电泳(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)是蛋白质组研究的核心分离技术之一^[3],获得分辨率高、重复性好的 2-DE 图谱是蛋白质组学研究的基础。但因不同组织来源的样本有各自的组成特点,以及其它诸多因素的影响,到目前为止尚无一种 2-DE 分离方法能针对所有组织来源的样本进行蛋白分离^[4]。关于精索静脉曲张不育患者精子蛋白组

2-DE 的条件优化尚未见报道。原发性男性不育症患者 30%~50%存在精索静脉曲张,世界卫生组织已把精索静脉曲张列为男性不育的首位病因^[5],但其引起不育的机制尚不明确。本研究比较不同精子蛋白样品制备方法、不同胶条、不同上样量和不同水化方式对双向凝胶电泳结果的影响,为进一步探讨精索静脉曲张导致男性不育的分子机制奠定了技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 蛋白质定量试剂盒和 PMSF 均由碧云天生物技术研究所提供;Percoll 为 Biosharp 公司产品;固相化 pH 梯度胶条(Immobilized pH gradient IPG 17 cm pH 3~10 L、pH 3~10 NL 和 pH 5~8)、Bio-Lyte、clean-up kit 试剂盒及尿素均购自美国 Bio-Rad 公司;硫脲、CHAPS、二硫苏糖醇(DTT)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、碘乙酰胺(IAA)、十二烷基磺酸钠

作者介绍:何 犇(1986-),男,硕士,

研究方向:男性不育。

通信作者:唐 伟,男,教授,Email: tangwei2060@126.com。

基金项目:重庆市卫生局面上资助项目(编号:2009-2-348)。

(SDS)、过硫酸铵(APS)、五水硫酸钠、碳酸钠均购自加拿大 BBI 公司;40%丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺购自上海生物工程有限公司;其他试剂为国产分析纯,所有试剂均用 MQ 水配制。

1.1.2 精液样品采集 根据新编写的第五版《世界卫生组织人类精液分析实验室技术手册》(WHO 诊断标准)^[6],收集精索静脉曲张不育患者的精液 20 份(例)。研究对象:①成年男性,年龄 20~35 岁,从事非有害有毒工作;②无吸烟史或吸烟极少,不善于饮酒和近 2 周末饮酒;③符合精索静脉曲张的诊断标准,男性患者的女方妇科检查正常,但婚后 1 年之内无怀孕史;④标本精液量 <1.5 ml,前向运动精子(PR) $<32\%$,用伊红染色活精子 $\geq 58\%$;精子密度 $<15 \times 10^6$ 个/ml;酸碱度 <7.2 (正常范围为 7.2~8.0);⑤无精浆抗体阳性,衣原体和支原体感染;精浆酸性磷酸酶、 α 葡萄糖苷酶、果糖均要求正常,生殖激素检查正常。所有样本均禁欲 7 d 后收集,并经过伦理道德委员会批准和获得志愿者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 精子分离与蛋白提取 37℃水浴箱内精液液化 30 min 后,根据处在不同成熟阶段的精子和各种细胞成分有一定的密度差异^[7],在 4℃采用 50%Percoll 密度梯度离心法 800 g $\times$ 20 min 以去除精浆和圆细胞^[7]。用 Hepes 液连续悬浮沉积物并离心 2 $\times$ 10 min,用洗涤缓冲液调整精子浓度到 1×10^6 个/ml。将精子细胞加入终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF、EDTA 和各 10 U/ml 的 DNase I, RNase A 酶中,摇匀后反复冻融破碎细胞。随后加入裂解液[7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4%CHAPS,65 mm DTT,0.2%(w/v)的 Ampholyte,0.001%(w/v)的溴酚蓝]冰浴条件下裂解精子样品。将获得透明澄清的精子总蛋白溶液在 4℃,20 000 g 离心 10 min,收集上清采用改良 Bradford 法进行蛋白定量。分别采取以下 2 种方法去除杂质:①丙酮沉淀法:加入 4 倍体积的冰丙酮使蛋白在-20℃沉淀 4 h,在 4℃,20 000 g 离心 15 min,自然风干丙酮后用裂解液重溶;②clean-up kit 法:按照美国 Bio-Rad 公司试剂盒说明书操作后,用裂解液重溶。获得的蛋白样品存放在-80℃备用。

1.2.2 第 1 向等电聚焦 从-80℃冰箱中取二种样本后室温溶解,加入上样水化液[7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4%(m/v) CHAPS,65 mmol/L DTT,0.2%Bio-Lyte,0.001%(w/v)的溴酚蓝],分别采用 200,250 μ g 和 300 μ g 的上样量,pH 3~10 L、pH 3~10 NL 和 pH 5~8 的胶条,主动和被动的的水化方式行等电聚焦。

1.2.3 第 2 向十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 将等电聚焦后的 IPG 胶条于 5 ml 平衡缓冲液 I (6 mol/L 尿素、2%SDS 0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8、20%甘油、2%DTT)内振荡平衡 15 min;换用平衡缓冲液 II (6 mol/L 尿素、2%SDS、0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8、20%甘油、2.5%IAA)振荡平衡 15 min。将平衡好的胶条移至 12%的聚丙烯酰胺凝胶上端,上部用 0.5%低熔点琼脂糖封胶。设置电泳参数进行二向垂直平板 SDS-PAGE。

1.2.4 凝胶染色与凝胶扫描 采用改良硝酸银法。银染固定液(体积分数 50%甲醇,体积分数 10%乙酸)固定凝胶 2 h;体积分数 50%乙醇洗涤液漂洗 3 次,10 min/次;敏化液(0.2%

硫代硫酸钠)敏化 2 min;超纯水洗涤 3 次,5 min/次;加新配制的银染液(0.2% AgNO₃、体积分数 0.075%甲醛)避光银染 25 min 后超纯水漂洗 3 次,1 min/次;加显色液(2%无水碳酸钠、0.000 4%硫代硫酸钠、体积分数 0.05%甲醛)反应 4~15 min 后,终止液(体积分数 50%甲醇,体积分数 10%乙酸)终止反应。保存液(1%乙酸)4℃冰箱保存凝胶。采用 GS-800 Calibrated Densitometer 图像扫描仪透射扫描凝胶。

1.2.5 精索静脉曲张不育患者精子蛋白的重复性检测 使用 clean-up kit 法对样品进行预处理,选取 pH 5~8 的固相化 pH 梯度胶条,采用 250 μ g 的上样量和主动水化方式进行 2-DE,重复 3 次。

1.2.6 图像分析 2-DE 凝胶用 GS-800 Calibrated Densitometer 图像扫描仪透射扫描,将扫描后的图像采用 PDQuest8.0 双向凝胶分析软件自动分析。

2 结果

2.1 不同样品制备方法对电泳结果的影响

选用 pH 3~10 L 的胶条和 250 μ g 的上样量,将经过丙酮沉淀法和 clean-up kit 法制备后的蛋白样品进行等电聚焦,均能顺利升压至最高聚焦电压(10 000 V)。从图 1 中可看出,图 A(clean-up kit 法)背景干净,蛋白点清晰。与图 A 相比,图 B(丙酮沉淀法)丢失了部分小分子蛋白(矩形框标记区域),且背景较深,影响蛋白分离效果。

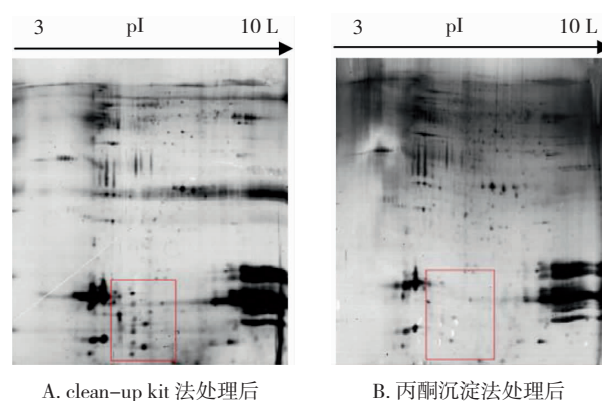


图 1 2 种样品制备方法的双向电泳图谱

Fig.1 2-DE maps of sperm protein by two sample preparation methods

2.2 不同胶条对电泳结果的影响

采用 clean-up kit 处理的样品和 250 μ g 的上样量,选取 3 种不同 pH 范围的胶条对样本蛋白进行分离,得到相应的 2-DE 图谱。结果提示:pH 3~10 L 胶条中蛋白主要集中在中间区域,胶条酸性端蛋白较少,横条纹较多;pH 3~10 NL 胶条使中间区域的蛋白有所分开;pH 5~8 胶条中蛋白点分布均匀,横条纹较少,图谱质量好。故采用 pH 5~8 的胶条对样品进行分离取得了满意效果,结果见图 2。

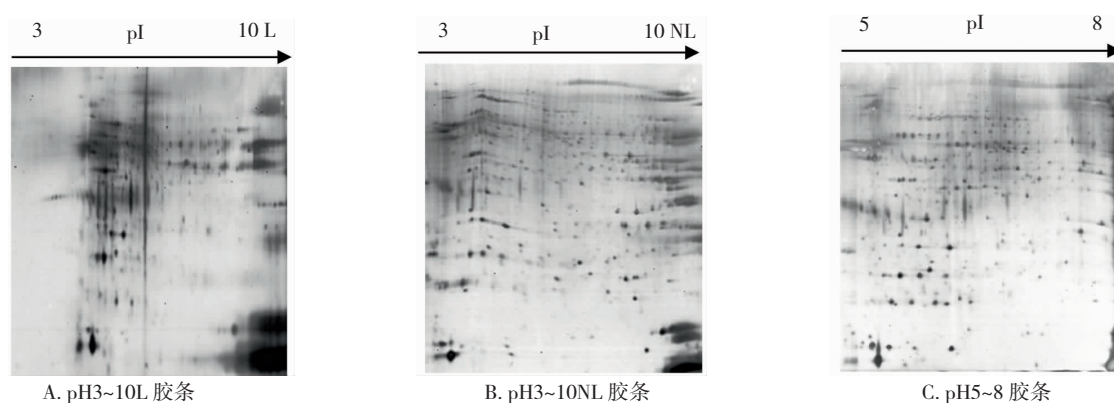


图 2 3 种不同 pH 胶条的 2-DE 图谱

Fig.2 2-DE maps of sperm protein by IPG gels with different pH gradients

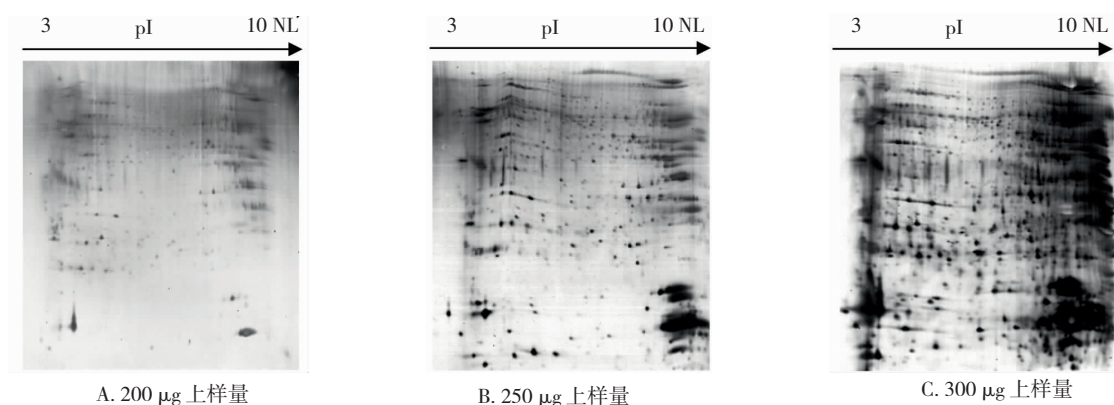


图 3 3 种不同上样量的 2-DE 图谱

Fig.3 2-DE maps of sperm protein by different protein load

2.3 不同上样量对电泳结果的影响

采用 clean-up kit 处理的样品和 pH 3~10 NL 胶条,采用 3 种上样量 200、250 μg 和 300 μg 分别进行双向凝胶电泳,以确定最佳上样量。比较发现,200 μg 上样量的图谱背景较干净,但蛋白点数最少(526);250 μg 上样量的图谱蛋白点数较多(879),且圆润、清晰,背景清晰,分辨率较高;300 μg 上样量的图谱蛋白点数虽然最多(1 258),但背景较深,部分蛋白点融合,横条纹也较多,影响后续分析。结果见图 3。

2.4 不同水化方式对电泳结果的影响

采用 clean-up kit 处理的样品、250 μg 的上样量和 pH 5~8 的胶条,分别使用被动和主动水化方式行双向凝胶电泳。从图 4 中可看出,图 A 中的蛋白点数较多,但蛋白的横纵向拖尾明显,背景不均一。说明主动水化比被动水化的聚焦效果更好。

2.5 精索静脉曲张不育患者精子蛋白双向电泳的重复性

经图像分析软件 PDQuest8.0 分析,实验重复 3 次获得了相似的 2-DE 图谱,平均蛋白质点数为 (821 ± 36) 个,匹配率达 81.6%。图谱在等电聚焦方向上平均偏差为 (0.78 ± 0.14) mm, SDS-PAGE 电泳方向上的平均偏差为 (1.13 ± 0.18) mm,具有较好的重复性。

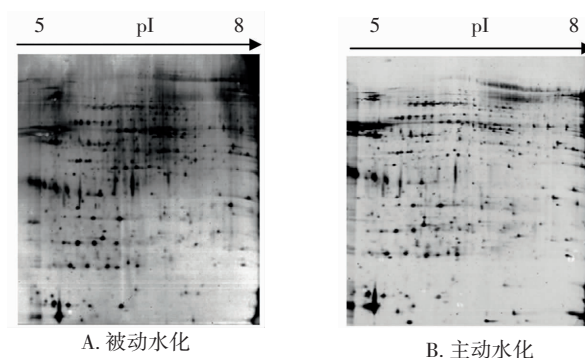


图 4 2 种不同水化方式的 2-DE 图谱

Fig.4 2-DE maps of sperm protein by different rehydration methods

3 讨论

蛋白组学是研究细胞、组织或生物的基因组所表达的全部蛋白质的科学。2-DE 是当前蛋白质组学研究中分辨率最高、信息量最大的常规用于蛋白分离的技术^[8]。目前应用的 2-DE 体系是由 O'Farrell^[9]于 1957 年发明的,其原理是依据蛋白质的等电点和分子量,将蛋白质进行 2 次电泳,即:在第

1 个方向上按等电点高低进行分离,称为等电聚焦;在第 2 个方向上(与第 1 次电泳成直角的方向)上按分子量大小进行分离^[10]。本研究通过对精索静脉曲张不育患者精子蛋白双向凝胶电泳的几个关键环节进行比较与优化,建立了 1 种能有效分离该样品的双向凝胶电泳技术方案。

3.1 样品制备

蛋白质样品的制备是蛋白组学的关键环节,关系到蛋白质组研究结果的准确性^[10,11]。通常在蛋白样品中都含有盐、核酸、多糖、去污剂和代谢物等非蛋白质杂质以及高丰度蛋白,需要去除,否则会影响后续分析^[12]。对于精子细胞而言,由于其头部含有大量 DNA 和蛋白酶,因此在样品处理时加入不含蛋白酶的核酸内切酶混合物和多种蛋白酶抑制剂,并通过高速离心取得了较好的效果。

丙酮法和 clean-up kit 法为目前使用最多的样品预处理方法^[13]。丙酮沉淀法是通过降低水的介电常数,破坏蛋白质胶体的水化层,形成沉淀析出^[14]。同时,蛋白质分子在常温或升温时立体结构展开,丙酮易与其中的色氨酸、酪氨酸等氨基酸进行疏水结合致蛋白变性,因此沉淀过程应使用预冷的丙酮,并且在低温中进行^[15]。Yoichiro Fukao 等人^[16]报道丙酮沉淀法可造成蛋白水解和聚集导致蛋白丢失。本实验也发现其明显丢失了部分小分子蛋白,且背景较深,影响后续分析;而 clear-up kit 法虽价格较高,但具有蛋白图谱背景清晰、操作简单等优势,受到越来越多地运用。

3.2 蛋白上样量

上样量大小的选择与胶条长度、pH 范围及染色方法密切相关。上样量过小,不利于低丰度蛋白质的检测;但上样量过大又会使高丰度蛋白点过大,掩盖了低丰度蛋白,不利于后期的分析,同时可能在聚焦的过程中有部分蛋白在胶条槽中沉淀下来,从而影响到第 1 向等电聚焦。结合通过采用不同的上样量,发现 250 μg 的上样量,检测点数多,电泳结果的分辨率高,所得图谱也较理想。

3.3 固相化 pH 梯度(Immobilized pH gradient, IPG)胶条

IPG 胶条 pH 范围的选择也会影响到蛋白样品的分离效果。目前常见的 IPG 胶条的范围有以下几种:①宽 pH 梯度胶条:pH 3~10 L(线性)和 pH 3~10 NL(非线性),前者用于预实验了解样品蛋白的总体分布情况,但分辨率低,不利于低丰度蛋白的检测;后者扩大了 pH 4~7 段的长度,进一步提高了蛋白点较多的 pH 段的分辨率;②窄 pH 梯度胶条:pH 4~7、pH 5~8 和 pH 7~10 等,进一步分析目标 pH 段的蛋白,提高了分辨率和低丰度蛋白的检出率;③极窄 pH 梯度胶条:pH 4.7~5.9、pH 5.5~6.7 和 pH 6.3~8.3 等,多用于低丰度蛋白的检测。最初我们采用 pH 3~10 线性和非线性胶条,发现对精索静脉曲张不育患者精子蛋白而言,pH 5~8 范围的蛋白点较多,所以选用 pH 5~8 IPG 胶条获得的图谱分辨率最好。这与 Martinez-Heredia, J 等人的报道相一致^[17]。

3.4 水化方式

主动水化是给胶条两端加上 1 个比较低的电压(50 V),促进样品进胶,而被动水化反应则是不加电压。主动水化过程可以促进大分子蛋白进入胶条,但是同时会损失一部分小分子量蛋白。研究中发现,主动水化小分子蛋白损失不明显,且图谱背景均一、干净。

总之,对精索静脉曲张不育患者精子蛋白双向凝胶电泳的条件、样品制备等各个方面进行了比较、优化,成功建立了精索静脉曲张不育患者精子蛋白质双向凝胶电泳平台,所获得双向电泳图谱的分辨率高、重复性好,为进一步探讨精索静脉曲张导致男性不育的分子机制奠定了技术基础。

参 考 文 献

- [1] Marte B. Nature insight: proteomics[J]. Nature, 2003, 422 (s) : 191-193.
- [2] Swinbanks D. Government backs proteome proposal[J]. Nature, 1995, 378 (6558) : 653.
- [3] Stanley B A, Neverova I, Brown H A, et al. Optimizing protein solubility for two-dimensional gel electrophoresis analysis of human myocardium[J]. Proteomics, 2003, 3 (6) : 815-820.
- [4] Reinders J, Sickmann A. Proteomics: methods and protocols[M]. Humana Press, 2009. 17-31.
- [5] Jarow J P. Effects of varicocele on male fertility[J]. Hum Reprod Update, 2001, 7 (1) : 59-64.
- [6] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen[M]. Geneva, Switzerland: WHO press, 2010.
- [7] Mengual L, Ballesca J L, Ascaso C, et al. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls[J]. J Androl, 2003, 24 (3) : 438-447.
- [8] Ananthi S, Santhosh R S, Nila M V, et al. Comparative proteomics of human male and female tears by two-dimensional electrophoresis[J]. Exp Eye Res, 2011, 92 (6) : 454-463.
- [9] O'farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. J Biol Chem, 1975, 250 (10) : 4007-4021.
- [10] Gorg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics[J]. Proteomics, 2004, 4 (12) : 3665-3685.
- [11] Jellouli N, Salem A B, Ghorbel A, et al. Evaluation of protein extraction methods for vitis vinifera leaf and root proteome analysis by two-dimensional electrophoresis[J]. J Integr Plant Biol, 2010, 52 (10) : 933-940.
- [12] Saravanan R S, Rose J K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues[J]. Proteomics, 2004, 4 (9) : 2522-2532.
- [13] Huntley J F, Conley P G, Hagman K E, et al. Characterization of Francisella tularensis outer membrane proteins[J]. J Bacteriol, 2007, 189 (2) : 561-574.
- [14] McCarthy J, Hopwood F, Oxley D, et al. Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis: myth or reality[J]? J Proteome Res, 2003, 2 (3) : 239-242.
- [15] Xia Q C, Zeng R. Protein chemistry and proteomics[M]. Beijing: Science Press, 2004. 261-265.
- [16] Fukao Y, Ferjani A, Fujiwara M, et al. Identification of zinc-responsive proteins in the roots of Arabidopsis thaliana using a highly improved method of two-dimensional electrophoresis[J]. Plant Cell Physiol, 2009, 50 (12) : 2234-2239.
- [17] Martinez-Heredia J, Estanyol J M, Ballesca J L, et al. Proteomic identification of human sperm proteins[J]. Proteomics, 2006, 6 (15) : 4356-4369.

(责任编辑:冉明会)