

# 猪卵母细胞蛋白质组双向电泳体系的建立及初步分析

胡惠忠 付强 卢晟盛 张明 陆阳清 蒙冰 卢克焕<sup>\*</sup>  
(广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 广西大学 南宁 530004)

**摘要:** 建立了猪(*Sus scrofa*)卵母细胞蛋白质双向电泳平台,并对裂解液的组成、样品处理、双向电泳程序等相关技术进行优化,得到清晰的微量卵母细胞蛋白质的电泳图谱。利用上述优化后的体系分别对未成熟和成熟的猪卵母细胞进行双向电泳分析,并用 ImageMaster 软件对图谱进行比对分析。结果表明,电泳图谱上大约有 800 个左右的蛋白点,其中差异蛋白 35 个,包括上调蛋白 22 个及下调蛋白 13 个。说明基于双向电泳的蛋白质组学可以用于卵母细胞成熟的蛋白表达差异的研究。

**关键词:** 猪; 卵母细胞; 双向电泳; 蛋白组学

中图分类号: Q492 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2008)04 67 05

## Two-dimensional Electrophoresis Analysis of Porcine Oocyte Proteome: a Preliminary Study

HU Huizhong FU Qiang LU Sheng-Sheng ZHANG Ming LU Yang-Qing  
MENG Bing LU Kehuan<sup>\*</sup>

(Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-Resource Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** The two-dimensional electrophoresis (2-DE) technique for Porcine (*Sus scrofa*) oocyte proteome analysis was established. The components of protein lysis solution, sample treatment, and 2-DE procedure were optimized. A profile of proteins extracted from Porcine oocytes was obtained clearly. The protein expression profiles of immature and *in vitro* matured Porcine oocytes were compared. The ImageMaster 2-DE software was used to characterize different proteins. About 800 protein spots were identified, of which 22 proteins were up-regulated and 13 proteins were down-regulated during oocyte maturation *in vitro*. It proves that proteomics technique base on two-dimensional electrophoresis can be used in further studies on differential protein expressions in Porcine oocyte development.

**Key words:** Porcine; Oocyte; Two-dimensional electrophoresis; Proteomics

蛋白组(proteome)是指由一个细胞或一个组织的基因组所表达的全部相应的蛋白质<sup>[1]</sup>。双向电泳技术(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)是蛋白质组学(proteomics)研究中的关键技术<sup>[2,3]</sup>。其原理是依据蛋白质的等电点(isoelectric point)和分子量(molecular weight)的不同,通过两次方向垂直的电泳,将样品中的不同蛋白呈点状分离。双向电泳是目前电泳技术中分辨率最高、信息量最大的技术<sup>[4]</sup>。

蛋白质对卵母细胞减数分裂成熟调节是一个非常复杂的过程,涉及到许多信号通路和目前尚未发现的蛋白质,一些具体的机制还有待

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30660127),广西科学基金项目(No. 桂科青 0640002, 0447004);

<sup>\*</sup> 通讯作者, E-mail: khlu@gxu.edu.cn;

第一作者介绍 胡惠忠,男,硕士研究生;研究方向:猪繁殖生物学; E-mail: skyhuizhong@163.com.

收稿日期: 2007-10-28, 修回日期: 2008-04-30

于进一步探索<sup>[5]</sup>, 因此差异蛋白组学将有助于揭示卵母细胞的成熟机理。由于材料来源的有限性, 卵母细胞成熟的差异蛋白组学目前研究较少。为了在蛋白质组学水平上研究猪 (*Sus scrofa*) 卵母细胞成熟分子机制, 本实验通过对双向电泳体系的优化, 建立了用于卵母细胞体外成熟前后蛋白质表达差异的检测技术, 为猪卵母细胞功能蛋白组学研究打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 实验材料** 猪卵巢采自屠宰场初情期前的雌猪。

**1.1.2 主要试剂** 固相 pH 梯度胶条 (IPG 胶条, pH 3~10)、胶条缓冲液 (IPG buffer, pH 3~10)、碘乙酰胺 (iodoacetamide, IAA)、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、PlusOne Silver Staining 蛋白银染试剂盒等购自 Amersham 公司; 尿素 (urea)、血清白蛋白 (BSA) 购自 Sigma 公司。其他试剂为进口分装或国产。

**1.1.3 溶液配制** 裂解缓冲液: 尿素 12 g, DTT 154 mg, CHAPS 1.0 g, IPG 缓冲液 500  $\mu$ l, 加入双蒸水至总体积为 25 ml。

平衡液 I: 尿素 72.1 g, SDS 4.0 g, Tris-Cl 10.0 ml (pH 8.8), 甘油 69 ml, 1% 溴酚蓝贮存液 400  $\mu$ l, 加入双蒸水至 200 ml, 使用前每 10 ml 加入 DTT 20 mg。

平衡液 II: 尿素 72.1 g, SDS 4.0 g, Tris-Cl 10.0 ml (pH 8.8), 甘油 69 ml, 1% 溴酚蓝贮存液 400  $\mu$ l, 加入双蒸水至 200 ml, 使用前每 10 ml 加入 IAA 300 mg。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 卵母细胞成熟** 用带 12 号针头的 10 ml 一次性注射器抽取卵巢表面直径 2~6 mm 的卵泡中的卵泡液, 在体式显微镜下用玻璃吸管挑选带 2 层卵以上卵丘细胞、胞质均匀的卵母细胞, 先在洗卵液中洗 3 遍, 然后用已经平衡好的成熟培养液洗 2 遍, 最后放入含 1.5 ml 成熟培养液的玻璃培养皿中, 在含有 5% CO<sub>2</sub> 的空气、最大饱和湿度 39℃ 的培养箱中成熟培

养。经 44~48 h 体外成熟后, 放入含 0.1% 透明质酸酶的洗卵液中, 用 200  $\mu$ l 的移液枪吹吸至绝大部分的卵丘细胞、颗粒细胞都被除掉 (大约 1~2 min), 然后在体式显微镜下挑选排出第一极体、胞质均匀的卵母细胞, 再清洗 2 遍。最后放入已平衡好的胚胎培养液中备用。

**1.2.2 样品处理** 将 200~300 枚极体成熟后的卵母细胞用 PBS 洗 3~5 次后用滤纸吸净残液, 加入 30~50  $\mu$ l 裂解缓冲液, 同时加入蛋白酶抑制剂。4℃ 放置 1 h, 每隔 20 min 冲击振荡 30 s。使用超声破碎仪在 70 W 功率下破碎 1 min, 40 000 g (4℃) 超高速离心 1 h。取上清液, 每管分装 30  $\mu$ l, -80℃ 保存。取部分样品用 Bradford 法<sup>[6]</sup> 测定蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳检测蛋白质裂解效果。

### 1.2.3 双向电泳程序

**1.2.3.1 第一向 pH 梯度等电聚焦** 将处理后的样品中加入 IPG 胶条水化液, 使总体积为 500  $\mu$ l, 将 IPG 胶条室温平衡后, 置于样品槽中进行泡涨, 用 Amersham 等电聚焦电泳仪, 按如下程序进行: 30 V 6 h, 60 V 6 h, 500 V 4 h, 1 000 V 1 h, 8 000 V 7 h (总计 30 000 Vh)。

**1.2.3.2 平衡** 将等电聚焦后的 IPG 胶条放入 5 ml 平衡液 I 中, 于摇床上平衡 15 min, 再使用平衡液 II 进行 15 min 平衡。

**1.2.3.3 第二向 SDS-PAGE 电泳** 配制 12.5% 的均一分离胶, 在垂直电泳系统中灌胶并加水覆盖, 将平衡后的 IPG 胶条在电泳缓冲液中润湿后, 直接转移至分离胶顶端。胶条支持膜一侧贴玻璃面, 排出胶条与玻璃面之间的气泡。用 0.5% 琼脂糖封闭凝胶。电泳槽中灌注 500 ml 电泳缓冲液 (下槽 1 $\times$ , 上槽 2 $\times$ ), 4℃ 电泳。电泳参数为 16 mA 30 min, 24 mA 3 h。当溴酚蓝指示剂迁移到凝胶底部时结束电泳。

**1.2.3.4 染色** 采用银染方法对凝胶进行染色, 用 PlusOne Silver Staining 蛋白银染试剂盒进行染色, 操作按说明书进行。

**1.2.4 未成熟和成熟卵母细胞双向电泳** 使用上述双向电泳程序, 分别对未成熟和成熟后的猪卵母细胞进行双向电泳分析。

**1.2.5 图像分析** 用 Amersham ImageMaster VDS-CL 型凝胶成像系统对染色后的 2-DE 胶进行扫描, 并利用 ImageMaster 软件产生光密度图像, 进行斑点检测和对比分析。

## 2 结 果

**2.1 样品处理结果** 以一步裂解法裂解卵母细胞, 经 SDS-PAGE 电泳检测, 得到了较为完整的总蛋白, 如图 1 所示。

**2.2 未成熟与成熟的猪卵母细胞的双向电泳**  
采用优化后的电泳参数, 对猪卵母细胞成熟前后的总蛋白质进行双向电泳, 成功地获得了清晰的电泳图谱(图 2)。染色方法均为银染。每种样品重复 3 次, 通过软件统计显示, 每块胶上大约有蛋白点 800 个左右, 3 个重复间匹配性好, 证明基于双向电泳的蛋白质组学技术可以用于卵母细胞成熟的差异蛋白质表达研究。

通过 ImageMaster 软件对两组图谱分析对比发现, 存在 35 个差异点, 其中 22 个为上调蛋白, 即未成熟卵母细胞表达量低而成熟卵母细胞表达量高, 13 个为下调蛋白。图 3 为局部放大对比图, 其中 1 为上调蛋白, 2 为下调蛋白。

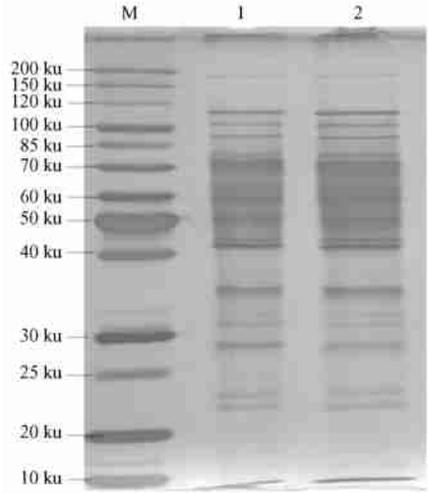


图 1 未成熟和成熟猪卵母细胞的 SDS PAGE 电泳图谱

Fig. 1 SDS PAGE electrophoresis patterns of proteins extracted from immature and *in vitro* matured porcine oocytes

M. 中高分子量蛋白质分子量标准;

1. 成熟前卵母细胞; 2. 成熟后卵母细胞。

M. Medium and high molecular weight protein marker;

1. Immature porcine oocytes;

2. *In vitro* matured porcine oocytes.

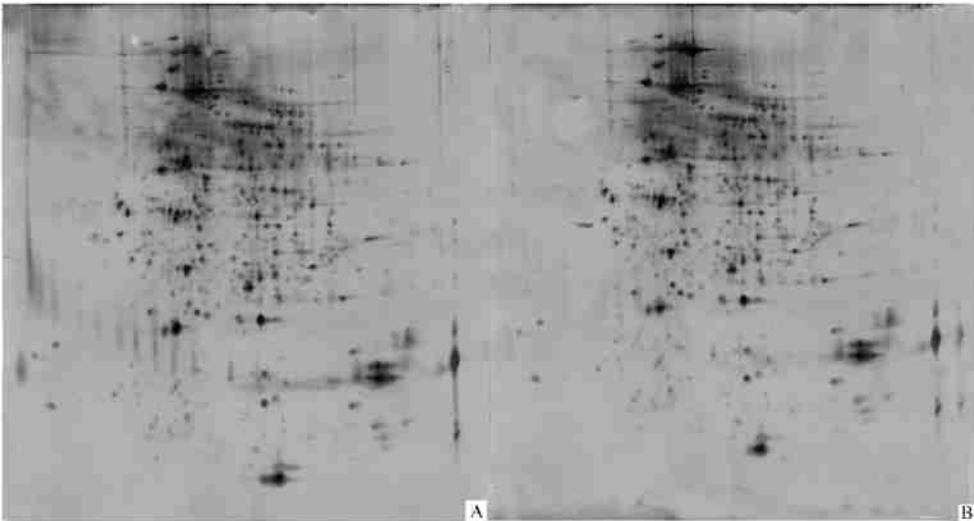


图 2 猪卵母细胞双向电泳图谱

Fig. 2 2DE PAGE patterns of proteins extracted from immature and IVM porcine oocytes

A. 未成熟卵母细胞; B. 成熟卵母细胞。A. Immature porcine oocytes; B. *In vitro* matured porcine oocytes.

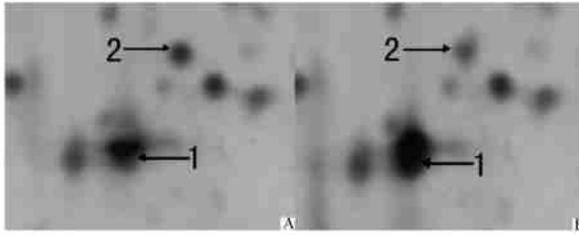


图 3 未成熟和成熟的猪卵母细胞双向电泳图谱局部放大图

Fig. 3 Amplificatory pattern of proteins from part 2DE PAGE image of immature and IVM swine oocytes

A. 未成熟卵母细胞; B. 成熟卵母细胞; 1. 上调蛋白; 2. 下调蛋白。

A. Immature swine oocytes; B. IVM swine oocytes. 1. Up regulated protein; 2. Down regulated protein.

### 3 讨 论

双向电泳技术是分离细胞和组织蛋白质组的核心技术<sup>[2,3]</sup>,而高效的样品制备方法是双向电泳成功的关键<sup>[7-9]</sup>。繁琐的样品制备步骤往往容易造成样品中蛋白质组分的丢失和蛋白质的氧化或修饰,从而影响双向电泳结果的重复性<sup>[10]</sup>。由于猪卵母细胞样品较少,本实验采用一步裂解法来制备卵母细胞总蛋白,这样既简化实验步骤,又提高了实验可重复性。

上样量的选择是获得高质量双向电泳图谱的因素之一,它的大小取决于胶条的长度、pH 范围以及染色方法等,加样量过多或过少都不能获得高分辨率的图谱。加样量过多容易产生横向条纹,而加样量过少则容易造成蛋白点模糊不清。一般来说,胶条越长,pH 范围越窄,上样量越大。银染的加样量范围在 5~100  $\mu\text{g}$  为宜,而使用考马斯亮蓝染色时,上样量可达 1 mg。本实验中,采用银染法并选择 100  $\mu\text{g}$  的加样量取得了良好的效果。另有研究<sup>[11]</sup>表明:使用同一装置进行水化和等电聚焦,样品直接加到 IPG 胶条中一起进行水化上样,可获得最好的蛋白重现率;相反,如果在两个不同的装置进行水化和等电聚焦则会大大降低蛋白的重现率,并且会明显增加蛋白的丢失。所以本实验中采用同一聚焦槽进行水化和等电聚焦。

等电聚焦过程中,设置低电压(30 V, 6 h; 60 V, 6 h)能促使样品更充分地进入凝胶,还可去除非蛋白成分特别是盐离子的干扰<sup>[12]</sup>。在

进行 IEF 时,需在胶条与电极之间加上润湿的小纸片,以便吸收盐离子和补充水分,还可在阴极加 20 mmol/L DTT 润湿纸片,以减少碱性造成条纹和拖尾现象<sup>[13]</sup>。

平衡的目的是使 SDS 与蛋白分子充分作用。先在第一步平衡缓冲液 I (含二硫苏糖醇)中平衡 10~15 min,使变性的非烷基化蛋白处于还原状态,平衡缓冲液 II (含碘乙酰胺)中平衡 10~15 min,使蛋白质硫醇基团烷基化,在电泳过程中防止蛋白质再氧化,并可减少半胱氨酸残留反应,利于质谱分析。平衡的时间不宜过长,否则会导致蛋白分子扩散,使结果出现横纹<sup>[14]</sup>,为此,均采用 10 min 的平衡时间。

实验结果表明,大部分蛋白呈点状,基本上没有因蛋白分子的扩散而造成横纹的出现。平衡后的 IPG 胶条与 SDS-PAGE 凝胶的良好接触是影响双向电泳结果好坏的一个重要因素,为了使 IPG 胶条与 SDS 凝胶紧密接触,在分离胶上加入薄层 0.5% 低熔点琼脂糖,再将 IPG 胶条置于其上,可以很好地避免因接触不紧密而导致横纹和竖纹的出现。

本研究在猪卵母细胞的蛋白提取、等电聚焦程序等方面优化了双向凝胶电泳条件,提高了猪卵母细胞 2-DE 图谱中蛋白位点的分辨率及重复性,说明该方法可用于卵母细胞比较蛋白质组学研究。分析成熟前和成熟后猪卵母细胞的双向电泳凝胶图谱后,发现 35 个差异 2 倍以上的蛋白点,初步探讨了猪卵母细胞成熟过程中蛋白质表达的变化。实验中获得了大量差

异表达蛋白质信息,这些蛋白质的结构和功能以及与卵母细胞成熟的关系,还需要进行质谱分析<sup>[5]</sup>。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Wilkins M R, Williams K L, Appel R D, *et al.* Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. Germany: Springer Verlag, 1997.
- [ 2 ] Gygi S P, Corthals G L, Zhang Y, *et al.* Evaluation of two dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *PNAS*, 2000, **97**(17): 9 390~ 9 395.
- [ 3 ] Graves P R, Haystead T A J. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, **66**(1): 39~ 63.
- [ 4 ] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999, 262~ 263.
- [ 5 ] Sirard M A, Bilodeau S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. *Biol Reprod*, 1990, **43**: 777~ 783.
- [ 6 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~ 254.
- [ 7 ] 夏其昌, 曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学. 北京: 科学出版社, 2004, 242~ 248.
- [ 8 ] Rabilloud T. Solubilization of proteins in 2 D electrophoresis: an outline 2 D proteome analysis protocols. *Methods Mol Biol*, 1998, **112**: 9~ 20.
- [ 9 ] Macri J, McGee B, Thomas J N, *et al.* Cardiac sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal proteins separated by two dimensional electrophoresis: Surfactant effects on membrane solubilization. *Electrophoresis*, 2000, **21**(9): 1 685~ 1 693.
- [ 10 ] 谢玲, 应万涛, 张开泰等. 双向电泳和肽质量指纹谱技术鉴定支气管上皮细胞恶性转化相关蛋白. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, **16**(5): 569~ 573.
- [ 11 ] Zuo X, Speicher D W. Quantitative evaluation of protein recoveries in two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, **21**(14): 3 035 ~ 3 047.
- [ 12 ] Rabilloud T. Proteome Research: Two dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. New York: Springer, 2000, 65~ 68.
- [ 13 ] 宋敏, 赖国旗, 邱宗荫等. H4a 细胞蛋白质组双向电泳技术的建立. 重庆医科大学学报, 2007, **32**(2): 117~ 120.
- [ 14 ] 丁勤学, 阙海萍, 郭尧君. 成年和老年小鼠脑蛋白质组双向电泳图谱比较. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28**(5): 683~ 687.
- [ 15 ] 毛立明, 林健荣, 赵峰等. 家蚕蛹期雌雄生殖腺蛋白质双向电泳比较分析. 昆虫学报, 2007, **50**(6): 628~ 633.