

# 大鼠附睾液蛋白质组二维液相色谱分离的实验研究

刘芙君 李建远 王培林 张成林 王海燕 王修海

**【摘要】** 目的 建立一种利用二维液相色谱分离和质谱鉴定大鼠附睾液蛋白质组的实验方法,为以后研究其他哺乳动物附睾蛋白质组提供实验基础。**方法** 分离提取大鼠附睾头、体、尾部管腔蛋白,样品经脱盐、浓缩,利用起始缓冲液置换,进行一维色谱聚焦分离,收集 pH4.0 ~ 8.5 之间的组分进行二维反相色谱分离,并通过自动馏分收集器收集分离组份;最后将获得的二维 UV 图通过 ProteoVue 软件转换成二维 pI/UV 图谱;选择含高丰度蛋白的馏分经冷冻干燥浓缩后进行质谱鉴定。**结果** 通过二维液相色谱成功分离了大鼠附睾头、体、尾部附睾液蛋白并建立了二维 pI/UV 图谱;对二维获得的含高丰度蛋白的馏分进行了质谱鉴定,获得大鼠附睾头、体、尾部主要蛋白。**结论** 为进一步利用二维液相色谱全面分离附睾蛋白和研究附睾功能奠定了基础。

**【关键词】** 蛋白质组; 二维液相色谱分离; 附睾蛋白质

## Experimental Research on Rat Epididymal Fluid Proteins by Two-dimensional Liquid Chromatography

LIU Fu-jun<sup>1,2</sup>, LI Jian-yuan<sup>1</sup>, WANG Pei-lin<sup>2</sup>, ZHANG Cheng-lin<sup>1</sup>, WANG Hai-yan<sup>1</sup>, WANG Xiu-hai<sup>2</sup> (<sup>1</sup>The Affiliated Yuhuangding Hospital of Qingdao University, Shandong Stem Cell Engineering Research Center, Yantai 264000; <sup>2</sup>Department of Medical Genetics, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, P. R. China) Corresponding author: LI Jian-yuan. E-mail: sdsdi@126.com

**【Abstract】 Objective** To establish an experimental method of studying rat epididymal fluid proteome by two dimensional liquid chromatography and MALDI-TOF MS and provide a foundation of studying other mammal epididymal proteome. **Methods** The epididymal fluid proteins extracted were exchanged with start buffer and separated by chromatofocusing in the first dimension. The fractions between pH4.0 and pH8.5 collected from 1D were separated by reverse-phase HPLC. The fractions were collected by automatic fraction collector. The UV maps were transformed into pI/UV maps by ProteoVue software; The fractions including high abundance proteins were identified using MALDI-TOF MS. **Results** We successfully isolated rat epididymal fluid proteins by two dimensional liquid chromatography, constructed pI/UV maps and obtained some high abundant proteins (ERABP, Clusterin, CRISP). **Conclusion** Our studies provide a foundation for further isolating of epididymal fluid proteins and studying of epididymal functions.

**【Key Words】** Proteome; Two dimensional liquid chromatographic fractionation; Epididymal proteins

附睾是哺乳动物精子成熟、获得受精能力、储存和保护精子的重要器官。睾丸中产生的精子从其形态结构和染色质角度看已基本成熟,但还不具备运动和精卵结合的能力,只有在进入附睾后循附睾头、

体、尾运行的过程中,与附睾液成分相互作用,才能最终获得成熟<sup>[1,2]</sup>。

自 20 世纪 60 年代中期以来许多研究人员对附睾的结构、基因表达、蛋白合成与功能等做了研究。

近几年也有一些关于哺乳动物附睾液蛋白质组学的研究报道,但其分离技术受限于二维凝胶电泳,虽然传统的固相 2D(双向凝胶电泳)技术仍是目前蛋白质组分离的主流技术,但是其具有重复性差、灵敏度低等缺点,而逐步发展的二维液相色谱等新型

基金项目:山东省科技发展计划基金(No. 032050102)

作者单位:264000,青岛大学附属烟台毓璜顶医院,山东省干细胞工程技术研究中心(刘芙君、李建远、张成林、王海燕);266021,青岛大学医学院生物学教研室(刘芙君、王培林、王修海)

通讯作者:李建远(E-mail: sdsdi@126.com)

分离技术有补充和取代双向凝胶电泳的趋势<sup>[3]</sup>, 本实验通过利用 Beckman 的 ProteomeLab™ PF2D 系统首先对大鼠附睾液提取蛋白进行整体蛋白分离, 然后对分离馏分进行浓缩和溶液酶切, 最后选择高丰度蛋白通过 MALDI-TOF MS 鉴定, 成功分离了大鼠附睾液蛋白并鉴定了高丰度蛋白, 为附睾蛋白质组的研究打下基础。

## 1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂: 成年雄性 Wistar 大鼠, 100 ~ 120 d, 体重 180 ~ 200 g (山东绿叶制药股份有限公司提供); 二维液相色谱系统 ProteomeLab™ PF2D 及配套 ProteomeLab™ PF2D 试剂盒 (Beckman 公司), 试剂盒包括 HPCF 1D 色谱柱 (250 mm × 2.1 mm), HPRP 2D 无孔硅胶 C18 反相色谱柱 (33 mm × 4.6 mm), 起始缓冲液 (StartBuffer, SB)、洗脱缓冲液 (EluentBuffer, EB) 和 G25 PD-10 脱盐柱 (Sephadex™ G25); 质谱仪 MALDI-TOF-MS (Vayager-DE™ STR, 美国 PE); 自动馏分收集器 (Gilson 公司); 色谱级纯乙腈、三氟乙酸 (TFA)、亚甲基乙酸、碳酸氢氨、甲醇、异丙醇购自 Sigma 公司, 蛋白酶抑制剂混合物购自 Roche 公司; 胰蛋白酶购自 Promega 公司; 超纯水由 Millipore 纯水系统 (Millipore 公司, 美国) 制备; BCA 蛋白定量试剂盒 (PIERCE)。

1.2 附睾液蛋白的提取: 根据 Kenneth 等<sup>[4]</sup>的方法并作一些改进, 即将大鼠利用过量乙醚处死后, 分离出整个附睾, 将其分为头、体、尾 3 个部分, 用 PBS (137 mmol/L NaCl, 15.4 mmol/L KCl, 7.7 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) 冲洗两次, 将各部分均放入洁净培养皿中并在多处做小的切口, 加入 PBS 4℃ 放置 40 min, 使附睾液释放到缓冲液中, 然后 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 加入 4 × 冷丙酮, -20℃ 沉淀 1 h, 然后 12 000 r/min 离心 1 h, 弃去上清, 并用冷丙酮洗涤沉淀, 待沉淀充分干燥后利用 10 mL 裂解液 (7.5 mol/L 尿素, 2.5 mol/L 硫脲, 12.5 % 甘油, 50 mmol/L Tris, 2.5 % 辛-β-D-吡喃葡萄糖苷, 6.25 mmol/L TCEP, 1.25 mmol/L 蛋白酶抑制剂混合物) 溶解沉淀。

1.3 样品的脱盐浓缩: 利用 25 mL 起始缓冲液 SB 平衡脱盐柱 PD-10, 弃去洗脱液, 加入 2.5 mL 样品, 再用 SB 洗脱并收集前 3.5 mL 洗脱液, 通过 BCA 试剂盒测定收集蛋白的浓度。

1.4 一维色谱聚焦分离: 一维色谱聚焦分离的流动相分别为起始缓冲液 (SB, pH8.5), 洗脱缓冲液 (EB, pH4.0), 1 mol/L NaCl 和 HPLC 级水, 所有溶液实验前通过 0.2 μm 滤膜过滤并超声 10 min, 流速设定为 0.2 mL/min, 检测波长为 280 nm (室温), 流动相 pH 由系统 pH 计在线检测。

进样完毕后, 先用起始缓冲液平衡一维柱 20 min, 然后利用洗脱缓冲液梯度洗脱 75 min, 再用氯化钠高盐溶液洗脱 40 min, 最后用去离子水冲洗一维柱。

1.5 二维反相色谱分离: 二维反相色谱分离的流动相 A 为 0.1% TFA 水溶液和流动相 B 为 0.08% TFA 乙腈溶液, 实验前超声 10 min, 流速为 0.75 mL/min, 检测波长为 214 nm, 50℃ 恒温下进行洗脱分离。

洗脱梯度: 首先以 5 × 柱体积 (CV, column volume) 的流动相 B 和 10 CV 的流动相 A 平衡柱子后, 从 100% A 到 100% B 洗脱 30 min, 并保持 100% B 10 min, 然后 2 min 内切换成 100% A 内进行色谱柱平衡。

1.6 馏分收集: 使用 Gilson 自动馏分收集器, 按照时间收集模式 0.2 min 每孔收集二维分离的组分。

1.7 质谱鉴定: 将收集的二维组分经冷冻抽干后, 加 5 μL 10 μg/mL 的胰酶 37℃ 过夜酶解, 然后在质谱仪金属样品靶上点样 1 μL 酶解后蛋白质样品, 再点样 1 μL CHCA 基质使其混合, 采用线性模式, N<sub>2</sub> 激光波长为 337 nm, 真空度 4 × 10<sup>-7</sup>, 质谱信号单次扫描累加 150 次, 以 CHCA 为基质, 使用标准样品作为外部校正。

获得的质谱数据通过 Mascot 数据库 (www.matrixscience.com) 检索, 检索数据库 Swissprot, 物种选择 *Rattus*、Trypsin 酶, 最多 1 个漏切位点, 设定肽段误差为 0.2 Da, 质量类型为 MH<sup>+</sup>, 单同位素分析。

## 2 结果

2.1 附睾液蛋白的一维色谱聚焦分离: 利用起始缓冲液平衡色谱柱至基线平稳后, 上样 3 mg 蛋白, 通过上述方法进行依次洗脱, 在 96 孔板中, 每间隔 0.3 个 pH 单位收集 1 份样品。每个组分最多收集 5 min, 通过一维分离我们收集了附睾头、体、尾部 pH4.0 ~ 8.5 之间各 18 个组分, 通过一维分离, 可将复杂的附睾液组分大致分为 3 个部分: pH 大于 8.5 的部分, pH 介于 4.0 ~ 8.5 之间的组分和 pH 小于 4.0 的组分, 附睾液蛋白的主要吸收峰在 pH4.5 ~ 6.5 之间, 这与大部分理论计算的 pH 相符合 (见图 1)。

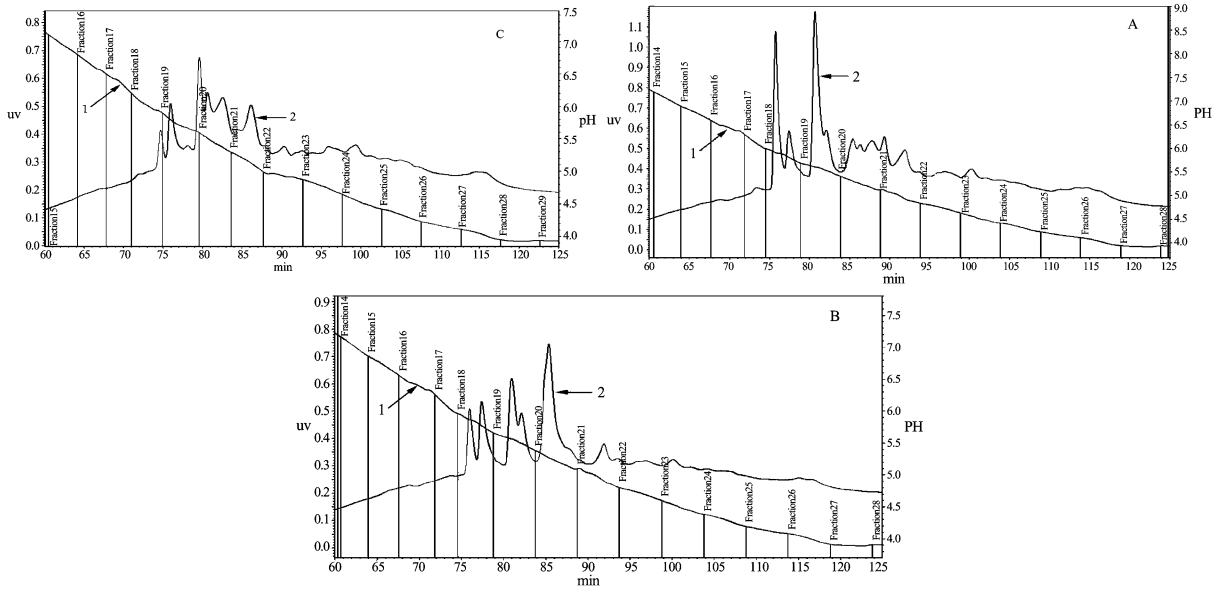


图 1 大鼠附睾液蛋白一维色谱聚焦图谱

Fig. 1 Chromatofocusing of rat epididymal fluid proteins

1. pH 梯度曲线; 2. 一维色谱图; A. 头部; B. 体部; C. 尾部

1. pH curve; 2. Chromatograph; A. Caput; B. Corpus; C. Cauda

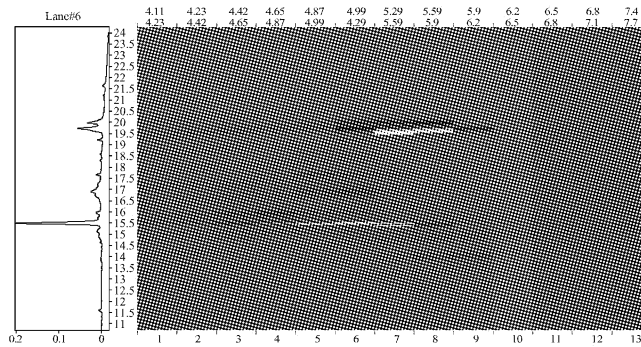


图 2 大鼠附睾液蛋白质(尾部)的二维 pI/UV 图谱

Fig. 2 pI/UV map of epididymal fluid proteins

表 1 通过质谱鉴定的高丰度蛋白

Table 1 High abundant proteins identified by MS

蛋白质名称	数据库序列号	pI	相对分子质量	分布
clusterin	P05371	5.46	51 375	Cap, Corp
E_RABP	P06911	5.24	20 656	Cap, Corp, Cau
CRIS1_RAT	P12020	4.86	27 847	Cap, Corp
PEBP	P31044	5.48	20 657	Cap, Corp, Cau
Serum albumin precursor	P02770	6.09	68 688	Cap
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P07632	5.89	15 771	Cau
Beta-hexosaminidase	P49010	5.27	68 213	Cap, Corp
γ-glutamyltransferase 1	P07314	6.75	61 555	Cap, Corp

头部: Caput; 体部: Corpus; 尾部: Cauda

Cap: Caput; Corp: Corpus; Cau: Cauda

2.2 附睾液蛋白的二维反相色谱分离: 选择一维分离获得的 pH 在 4.0 ~ 8.5 之间的 13 个组分通过二维反相色谱在流动相(0.08% TFA 乙腈)0 ~ 100% 的洗脱梯度下进行二维分离, 通过自动馏分收集器

按 0.2 min 每孔收集二维分离的组份, 最后将得到的二维信息通过仪器自带的 Proteovue 软件转换成直观的高分辨彩色二维蛋白质组图谱(pI/UV), 每一条带代表一个吸收峰, 条带颜色深浅代表峰面积大小(见图 2)。

2.3 二维收集组份的质谱鉴定: 通过二维液相色谱方法对附睾液的分离, 共收集了头、体、尾部各 480 个馏分, 选择二维分离馏分中的高丰度蛋白(UV > 0.02)进行质谱鉴定, 共鉴定 17 个馏分, 获得蛋白 8 个, 提示为附睾液高丰度蛋白(见表 1)。

### 3 讨论

附睾是精子发育、成熟、贮存和完善功能的场所, 附睾管腔中约 200 余种分泌蛋白, 但大部分蛋白的功能和分布未被确认, 目前为止, 从 Swissprot 数据

库查询可得, 仅有 6 种大鼠附睾蛋白, 大多数的附睾分泌蛋白还有待确认。

与精子成熟相关的生殖医学基础研究是生命科学的研究热点, 不断发展的蛋白质组学为全面研究附睾蛋白提供了有利工具和思路。国外有报道利用二维凝胶电泳研究一些哺乳动物附睾液成分的蛋白质组学研究, Syntin 等通过微灌注的方法获得猪附睾液, 并对猪附睾分泌蛋白进行了详细的二维电泳分析; Fouchcourt 等对马附睾液蛋白质 2-DE 分离, 发现腔中 201 种蛋白质, 最丰富的是白蛋白及一些分泌蛋白质, 包括乳铁蛋白、PGDS、GPX、HE1/CTP 等; Dacheux 等分离得到人附睾液蛋白并鉴定了附睾头部和尾部主要蛋白<sup>[5-9]</sup>。虽然传统的固相 2D 技术仍是目前蛋白质组分离的主流技术, 但是其有着重复性差、灵敏度低、难以检测低丰度蛋白, 不便于质谱鉴定等技术瓶颈, 我们首次采用二维液相色谱的分离方法成功对大鼠附睾液成分进行了一维等电聚焦和收集组分的二维反相色谱分离, 获得了大鼠附睾液蛋白的 pI/UV 二维图谱。一维色谱的上样量为 2~5 mg, 为传统凝胶电泳的 10 倍, 提高了灵敏度高, 有利于低丰度蛋白质的检测; 通过一维等电聚焦可将复杂的附睾液组分大致分为 pH 大于 8.5, pH 介于 4.0~8.5 之间和 pH 小于 4.0 三个部分, 并按 pH 值梯度和时间模式收集 pH 介于 4.0~8.5 之间的组分, 获得的附睾液蛋白主要吸收峰在 pH4.5~6.5 之间, 这与大部分理论计算的 pH 相一致; 二维液相色谱的分辨率高, 可以根据样品特点改变一维、二维洗脱条件提高分辨率, 并且自带软件分析直观方便, 通过 Proteovue 软件将二维 UV 图转换成直观的 pI/UV 图谱, 然后通过 DetaVue 软件可比较两个样品的二维图谱差异, 并自动生成第三幅图谱展示差异峰图, 通过比较附睾头、体、尾部二维 pI/UV 图谱发现, 虽然头体尾部一维色谱图有明显差异, 但是对应二维色谱图具有相似性, 提示头体尾部主要是低丰度蛋白的差异。

通过自动馏分收集器可方便的收集二维液相色谱分离的溶液状态下的馏分, 与质谱兼容性好, 可以实现在线连用或浓缩后测定肽指纹图。为了评价我们的实验结果, 我们根据二维分离峰图, 选择了头体尾 17 个含高丰度蛋白的馏分进行质谱鉴定, 结果共鉴定出 8 种蛋白, 鉴定结果中的部分理论计算 pH 与实验所得的 pH 有部分差异可能是理论与实际 pH 之间因溶液环境或蛋白质立体构象变化等因素影响所致。通过我们的实验, 对于二维馏分中的 UV > 0.01 的蛋白通过干燥浓缩后质谱鉴定可获得较好的结果, UV < 0.01 的馏分由于浓缩酶解过程的丢失,

不能获得较好效果, 但二维液相色谱具有较好的重复性, 通过多次上样分离收集可获得足够的质谱鉴定量。

二维液相色谱比传统二维凝胶电泳有着上样量大, 灵敏度、分辨率高, 重复性好, 自动化程度高与质谱兼容性好, 自带软件分析直观方便等优势; 可以克服二维凝胶电泳在相对分子质量和 pH 方面的歧视效应, 获得蛋白的 pI 和疏水性的同时可进一步通过 SDS-PAGE 或质谱获得蛋白质的相对分子质量信息, 通过的蛋白质三维信息可更加准确地确定蛋白质<sup>[10-12]</sup>。这种分离方法将成为远比 2D-PAGE 对大量复杂蛋白质样品分离更为有效的方法, 特别在附睾液蛋白质组和其他体液差异蛋白质组分析中起到重要作用。

### 参 考 文 献

- Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *Reprod Fertil Suppl*, 1998, 53: 119-136.
- Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech*, 2003, 61: 7-17.
- Baggerman G, Vierstraete E, De Loof A, *et al.* Gel-based versus gel-free proteomics: a review. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2005, 8: 669-77.
- Roberts KP, Ensrud KM, Hamilton DW. A Comparative analysis of expression and processing of the rat epididymal fluid and sperm-bound forms of proteins D and E. *Biol Reprod*, 2002, 67: 525-533.
- Gatti JL, Druart X, Syntin P, *et al.* Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoproteins. *Biol Reprod*, 2000, 62: 950-958.
- Vreeburg JT, Holland MK, Orgebin-Crist MC. Binding of epididymal proteins to rat spermatozoa *in vivo*. *Biol Reprod*, 1992, 47: 588-597.
- Syntin P, Dacheux F, Druart X, *et al.* Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod*, 1996, 55: 956-974.
- Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli AF, *et al.* Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod*, 2000, 62: 1790-1803.
- Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, *et al.* Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 250: 36-42
- Pirondini A, Visioli G, Malcevski A. A 2D liquid-phase chromatography for proteomic analysis in plant tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 833: 91-100.
- Linke T, Ross AC, Harrison EH. Proteomic analysis of rat plasma by two-dimensional liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2006.
- Soldi M, Sarto C, Valsecchi C, *et al.* Proteome profile of human urine with two-dimensional liquid phase fractionation. *Proteomics*, 2005, 5: 2641-2647.

(收稿日期: 2006-05-19)

(本文编辑: 高巍)