本文引用:邵利伟,詹合琴,崔泰震,等. 红细胞预处理对小鼠脾组织 P 物质蛋白条带表达的影响[J]. 新乡医学院学报,2015,32(10):903-906.

【基础研究】

红细胞预处理对小鼠脾组织 P 物质蛋白条带表达的影响

邵利伟[1], 詹合琴[1], 崔泰震[1], 孙祥德[2], 刘 巍[2]
(1. 新乡医学院药学院药理学教研室,河南 新乡 453003;2. 新乡医学院药学院药物分析教研室,河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 针对蛋白质印迹技术难以检测常规方法处理后的脾组织中的 P 物质(SP)蛋白,探讨更佳的脾组织处理方法。**方法** 小鼠颈椎脱臼处死,取脑组织测质量后进行粉碎,离心弃上清液,按照 1∶10(*W*∶*V*)的比例加入细胞组织快速放射免疫沉淀裂解液和蛋白酶抑制剂混合物,裂解 30 min 后进行提取。脾组织蛋白按照以下 3 种方法进行提取:(1)采取与脑组织蛋白提取方法一致的常规方法进行提取;(2)脾组织预先采用胶原酶Ⅰ进行消化,用红细胞裂解液裂解和 Hank's 液洗涤处理后再进行蛋白提取;(3)脾组织不进行 Hank's 液洗涤,其他步骤均与第 2 种方法一致。最后所有组织均按相同步骤进行蛋白质印迹技术检测,观察 SP 蛋白表达水平。**结果** 用常规方法提取后,脑组织总蛋白中 SP 蛋白条带表达明显,脾组织总蛋白中未检测到 SP 蛋白条带。脾组织用红细胞裂解液处理后提取的总蛋白中 SP 蛋白表达条带较为明显,但有非特异性条带。脾组织用红细胞裂解液和 Hank's 液洗涤处理后提取的总蛋白中 SP 蛋白条带表达明显,无非特异性条带。**结论** 用红细胞裂解液和 Hank's 液预处理小鼠脾组织,可排除红细胞的干扰,提高其蛋白提取率,有利于 P 物质在蛋白质印迹技术中的条带表达。

关键词: 脾组织;红细胞裂解液;差异性处理;P 物质;蛋白质印迹;小鼠
中图分类号: R392.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2015)10-0903-04

Effect of pretreatment of red blood cell on expression of substance P protein bands in spleen tissue of mice

SHAO Li-wei[1], ZHAN He-qin[1], CUI Tai-zhen[1], SUN Xiang-de[2], LIU Wei[2]
(1. *Department of Pharmacology, College of Pharmacy of Xinxiang Medical University, Xinxiang* 453003, *Henan Province, China*; 2. *Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy of Xinxiang Medical University, Xinxiang* 453003, *Henan Province, China*)

Abstract: **Objective** To investigate better treatment for spleen tissue, because substance P(SP) was difficult to be detected by Western blot after disposing spleen tissue by routine method. **Methods** All the mice were decapitated, and the brain tissue was weighed and pulverized. The supernatant was discarded after centrifugation, and the mixture of radio-immunoprecipitation assay lysis buffer and protease inhibitors were joined according to the scale of 1∶10(*W*∶*V*), protein was extracted after cracking of 30 min. Spleen tissue protein was extracted as following ways: (1) Extraction method of spleen tissue proteins was in accordance with the conventional extraction method of brain; (2) Digested spleen tissue with collagenase Ⅰ at first, cracked spleen tissue with red blood cell lysing buffer, washed by Hank's balanced salts, and then extracted protein; (3) Spleen tissue wasn't washed by Hank's balanced salts, and other procedures were the same as Step 2. At last all tissues were detected by Western blot technology as the same way, and the level of SP protein expression was observed. **Results** After extracting total proteins by routine method, the bands of brain SP protein were clear, but it couldn't detect SP protein bands in the spleen. Extracted the spleen total proteins after the spleen tissue were treated with red blood cell lysing buffer, the bands of SP protein were more clearer, but there were nonspecific bands. The spleen total protein was extracted after spleen tissue cracked by red blood cell lysing buffer, and washed by Hank's balanced salts, the bands of SP protein were clear, and there was no nonspecific bands. **Conclusion** Pretreatment of spleen tissue by red blood cell lysing buffer and Hank's balanced salts can eliminate the interference of red blood cells, conductive to further protein extraction and more easily to observe the SP expression by Western blot.

Key words: spleen tissue; red blood cell lysing buffer; different treatment; substance P; Western blot; mouse

DOI:10.7683/xxyxyxb.2015.10.003
收稿日期:2015-06-15
基金项目:新乡市重点科技攻关计划项目(编号:ZG14006)
作者简介:邵利伟(1986-),女,河南濮阳人,硕士研究生在读,研究方向:神经精神药理。
通信作者:詹合琴(1967-),女,河南渑池人,硕士,副教授,研究方向:神经精神药理;E-mail:xiaofei1@126.com。

蛋白质印迹技术是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的实验方法,通过此方法可以获得特定蛋白质在细胞或组织中表达情况的信息[1]。蛋白质印迹技术步骤较多,从蛋白提取至最后化学发光显影、灰度检测,每一个细节的处理均对结果的准确性极为重要[2]。在此过程中,蛋白提取是该技术的关键环节,样品处理是否合适,获得的蛋白含量高低以及质量优劣直接影响分析结果的可靠性[3]。不同组织因结构和成分不一,其处理与蛋白提取方法应该有所不同,但作者检索文献发现,以往的研究不管是何种组织,均为参照常规方法进行操作[4-5]。显然,这种无差别的处理方法可能会影响不同组织、不同蛋白质的表达结果。脾是机体最大的免疫器官,是机体细胞免疫和体液免疫的中心[6]。脾功能紊乱与多种疾病相关,对脾组织某些蛋白表达的研究可能涉及多种疾病的发病机制。P 物质(substance P,SP)蛋白是神经肽中含量最丰富的一种脑肠肽,具有痛觉传递、胃肠运动、参与炎症反应和免疫调节等作用[7]。作者在以往实验中发现,在脾组织中正常表达的 SP 蛋白,用常规方法提取后未能检测出目的蛋白。某种物质在某种组织无法检测到的最重要原因可能是确实无表达,或者总蛋白提取质量存在问题。而脾是人体的"血库",含有大量红细胞,红细胞中的大量血红蛋白可能影响某些目的蛋白的检测。本研究主要探讨预先处理脾组织中红细胞对其 SP 蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 *BALB/c* 小鼠 9 只,体质量 18 ~ 22 g,购于河南省华兰生物工程技术有限公司实验动物中心,合格证号:SCXK Henan 2010-0001。

1.2 主要试剂和仪器 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate polyacrylamide-gelelectrophoresis,SDS-PAGE)试剂盒、高灵敏度化学发光检测试剂盒、Super-Bradford 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 上样缓冲液(5 ×)、蛋白酶抑制剂混合物(phenylmethanesulfonyl fluoride,PMSF)和抗 β-actin 单克隆抗体均购自北京康为世纪生物科技有限公司;细胞组织快速放射免疫沉淀裂解液(radio-immunoprecipitation assay lysis buffer,RIPA)、抗 β-actin 鼠单克隆抗体购自上海碧云天生物技术研究所;氯化钠购自南京化学试剂股份有限公司;Tween-20 购自河北赛亿生物科技有限公司;三羟甲基氨基甲烷、胶原酶Ⅰ、红细胞裂解液、Hank′s 液购自美国 Sigma 公司;SP 蛋白兔多克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。JY99-IIDN 超声波细胞粉碎仪(新芝生物科技有限公司),SORVALL Stratos 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),Spectra Max i3x 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),Tetra cell 小垂直板电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),GelDoc-It2 Imagers UVP 凝胶成像系统(美国 UVP 公司)。

1.3 蛋白提取

1.3.1 脑组织蛋白提取 将小鼠颈椎脱臼处死,冰上取脑组织,去除小脑后用分析天平精确测剩余脑组织质量后剪碎,用超声波细胞粉碎仪进行破碎后,加入 1 mL 生理盐水,4 ℃、2 500 r · min^{-1} 离心 5 min 后弃去上清;再按照 1 ∶ 10(*W* ∶ *V*)的比例加入 RIPA 和 PMSF,放置冰上,裂解 30 min(每 10 min 轻轻吹打 1 次,促进裂解);最后在 4 ℃、13 000 r · min^{-1} 下离心 15 min,移取上清备用。

1.3.2 脾组织蛋白提取 脾组织蛋白按照以下 3 种方法进行提取:(1)常规方法提取:与提取脑组织蛋白的方法一致;(2)用红细胞裂解液和 Hank′s 液处理后提取:用分析天平精确测量脾组织质量,用剪刀剪碎;按照 1 ∶ 10(*W* ∶ *V*)比例加入 2.33 g · L^{-1} 胶原酶Ⅰ,37 ℃水浴消化 1 h,4 ℃、500 r · min^{-1} 离心 7 min,去除上清;同样按照 1 ∶ 10(*W* ∶ *V*)的比例加入红细胞裂解液,轻轻吹打,冰上裂解 1 ~ 2 min,4 ℃、500 r · min^{-1} 离心 7 min,去上清,收集沉淀,加 1 mL Hank′s 液,4 ℃、500 r · min^{-1} 离心 3 次,每次 3 min;最后加入 RIPA 和 PMSF 混合液,冰上裂解 30 min(每隔 10 min 轻轻吹打 1 次);在 4 ℃、13 000 r · min^{-1} 下离心 15 min 后移取上清待用。(3)免除 Hank′s 液洗涤方法的提取:此部分组织不进行 Hank′s 液洗涤,其他步骤均与第 2 种方法一致。

1.4 蛋白定量与处理 按照 Super-Bradford 蛋白定量试剂盒说明书要求测定组织蛋白在 595 nm 处的吸光度值,稀释蛋白标准品至不同浓度,用酶标仪分别测其在 595 nm 处的吸光度值,绘制标准曲线,计算样品中的蛋白含量。最后用双蒸水将各样品质量浓度定量至 2 g · L^{-1},加 SDS-PAGE 上样缓冲液(还原,5 ×),在沸水中煮 10 min,置于 - 80 ℃冰箱中待用。

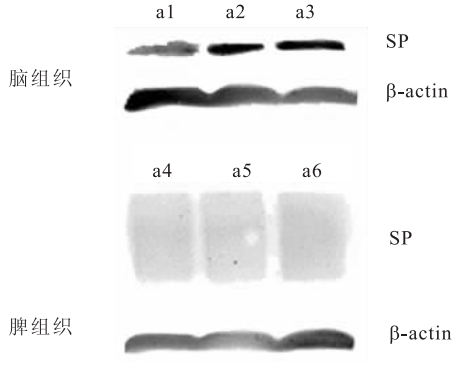
1.5 蛋白质印迹技术步骤 按照试剂盒说明书配制 0.5 g · L^{-1} 浓缩胶和 1.2 g · L^{-1} 分离胶;每个样品加 20 μL,先恒压 60 V,待样品跑至分离胶与浓缩

胶分界处,调电压至 100 V;在恒流 200 mA 下 SP 蛋白转膜 30 min;用三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲盐与 Tween-20 混合溶液(Tris-buffered saline and Tween 20,TBST)配制的 0.5 g · L^{-1}脱脂牛奶封闭 1 h;将转好的膜放在一抗(SP 为体积分数 0.50%,β-actin 为体积分数 0.05%)稀释液中,4 ℃环境下过夜;在 TBST 溶液中洗膜后,室温下孵育二抗(SP 二抗为体积分数 0.05%,β-actin 二抗为体积分数 0.02%)1 h,再在 TBST 溶液中洗膜,最后化学发光显影成像[8]。

1.6　实验条件控制　严格控制实验条件,确保前后实验条件一致,主要措施包括:(1)蛋白提取均在同一时间同一仪器同一环境下进行;(2)均使用同一电泳、转膜装置;(3)电泳液、转膜液配方一致,均为一次性使用。

2　结果

2.1　不同组织蛋白常规方法提取对 SP 蛋白表达的影响　按照常规方法,分别对脑组织和脾组织进行总蛋白提取,然后按常规操作步骤进行 SP 的蛋白质印迹技术检测,结果显示,脑组织中的 SP 蛋白条带表达清晰,而脾组织中的 SP 蛋白未检测到条带,见图 1。



a1、a2、a3:脑组织中 SP 蛋白显影条带;a4、a5、a6:脾组织中 SP 蛋白未显影。

图 1　常规方法提取的小鼠脑组织和脾组织中 SP 蛋白的表达

Fig. 1　Expression of SP protein in brain tissue and spleen tissue of mice extracted by routine methods

2.2　红细胞裂解液处理对脾组织中 SP 蛋白表达的影响　脑组织常规处理,脾组织用红细胞裂解液处理后提取总蛋白,然后用常规蛋白质印迹技术进行检测,结果显示,脑组织中 SP 蛋白表达十分清晰,脾组织中 SP 蛋白表达条带较为明显,但有非特异性条带,见图 2。

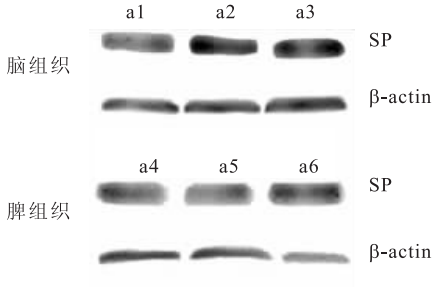


a1、a2、a3:脑组织中 SP 蛋白显影条带;a4、a5、a6:脾组织中 SP 蛋白显影条带。

图 2　红细胞裂解液处理后小鼠脑组织和脾组织中 SP 蛋白的表达

Fig. 2　Expression of SP protein in brain tissue and spleen tissue of mice extracted by red blood cell lysing buffer

2.3　红细胞裂解液和 Hank′s 液洗涤处理对脾组织中 SP 蛋白表达的影响　脾脏组织经红细胞裂解液和 Hank′s 液洗涤处理后提取总蛋白,再进行常规的蛋白质印迹技术检测,结果显示,脾组织中的 SP 蛋白条带无非特异性条带,条带表达较为明显,与脑组织基本类似,见图 3。



a1、a2、a3:脑组织中 SP 蛋白显影条带;a4、a5、a6:脾组织中 SP 蛋白显影条带。

图 3　用红细胞裂解液和 Hank′s 液洗涤处理后小鼠脑组织和脾组织中 SP 蛋白的表达

Fig. 3　Expression of SP protein in brain tissue and spleen tissue of mice extracted by red blood lysing buffer and Hank′s balanced salts

3　讨论

脾是一个储血器官,含有大量的红细胞,而红细胞可能影响其总蛋白提取的质量与含量。针对脾的特殊性,在提取脾组织总蛋白以前要去除红细胞。去除红细胞的试剂主要为红细胞裂解液和 Hank′s 液。

红细胞裂解液是一种去除红细胞最简便易行的试剂,其既不损伤有核细胞,又能充分去除红细胞,主要用于经酶消化分散的组织细胞的分离纯化、淋巴细胞的分离纯化以及组织细胞蛋白与核酸提取等实验中红细胞的去除[9-10]。经红细胞裂解液裂解得到的组织细胞中不含红细胞,可进一步用于原代培

养、细胞融合、流式细胞分析、核酸与蛋白的分离和提取等。Nakazama 等[11]曾用红细胞裂解液裂解脾组织中的红细胞,然后进行脾细胞与骨髓瘤细胞的融合。Shekhar 等[9]用红细胞裂解液裂解脾组织中的红细胞后,从脾组织中分离纯化 T 细胞。因此,本实验在提取脾组织中蛋白前,先用红细胞裂解液对脾组织中的红细胞进行裂解是比较合理的。在本实验中发现,单用红细胞裂解液预处理脾组织后,可观测到较清楚的 SP 蛋白条带,但其条带显色较浅,且含非特异性条带,未达到满意的实验效果。

Hank's 液是常见的平衡盐溶液之一,常用于配制培养基或洗涤细胞等[12]。用 Hank's 液洗涤可以有效去除裂解后的残余成分,进一步降低红细胞的影响,从而提高所提取总蛋白的纯度。本实验中,脾组织先用红细胞裂解液裂解,再用 Hank's 液进行洗涤处理后提取总蛋白,蛋白印迹技术结果显示,SP 蛋白条带表达明显,无非特异性条带,结果较为理想。

有些研究者在对脾组织中的蛋白进行蛋白印迹技术检测时,并未对脾组织进行特殊处理,如郭勇等[13]研究 MFG-E8 蛋白在梗阻性黄疸小鼠脾脏中的表达水平时,柯琴梅等[14]在研究溃疡性结肠炎大鼠脾脏组织中的 13-arrestin1 表达时,也能得到预期的结果。但是,用蛋白印迹技术检测 SP 蛋白在脾组织中的表达必须经过处理才能实现,这种实验方法的非一致性可能与不同目的蛋白在脾组织中的表达量不同有关。总之,本实验对用蛋白印迹技术检测脾组织 SP 蛋白的方法进行了改良,虽然其总蛋白提取方法也较为繁琐,但对于特殊组织中用蛋白印迹技术难以检测到的蛋白表达不失为一种参照和借鉴。

参考文献:

[1] 张佳俐,梁瑜帧,夏宁. Western blot 蛋白分析中血清蛋白上样量的研究[J]. 广西医科大学学报,2013,30(3):348-349.

[2] Heidebrecht F,Heidebrecht A,Schulz I,*et al*. Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range[J]. *J Immunol Methods*,2009,345(1/2):40-48.

[3] 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.

[4] 董冰,马子芳,余爽,等. 云芝糖肽对 EAC 荷瘤小鼠脾脏 TLR4 信号通路调控机制的研究[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(3):333-337.

[5] Panjwani N,Mulvihill E E,Longuet C,*et al*. GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male ApoE$^{-/-}$ mice[J]. *Endocrinology*,2012,154(1):127-139.

[6] 许守平,姜洪池. 脾脏外科进展[J]. 中国中西医结合外科杂志,2010,16(2):134-137.

[7] 马征,庞久玲,刘丹,等. 烧伤后康复期老年患者抑郁评分与血清 P 物质和神经肽 Y 表达的关系研究[J]. 中国全科医学,2013,16(29):3447-3449.

[8] 李洋,韩莹琰,范双喜,等. 叶用莴苣幼苗幼叶总蛋白 SDS-PAGE 和 Western-blot 方法的优化[J]. 中国农学通报,2012,28(31):153-156.

[9] Shekhar S,Milling S,Jenkins C,*et al*. Identification and phenotypic characterization of γδ T cells in rat lymph[J]. *Res Vet Sci*,2012,93(1):168-171.

[10] Keats J J,Chesi M,Egan J B,*et al*. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma[J]. *Blood*,2012,120(5):1067-1076.

[11] Nakazama M,Mukumoto M,Miyatake K. Immunoelectron microscopy methods and protocols[M]. USA:Humana Press,2010:75-91.

[12] Shioyama T,Haraguchi Y,Muragaki Y,*et al*. New isolation system for collecting living cells from tissue[J]. *J Biosci Bioeng*,2013,115(1):100-103.

[13] 郭勇,熊琦,唐永梁,等. MFG-E8 基因在梗阻性黄疸小鼠免疫组织中的表达及临床意义[J]. 重庆医学,2014,43(16):2019-2021,2025.

[14] 柯琴梅,吴霁,范恒. 乌梅丸对 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎大鼠脾脏组织 β-arrestin1 表达的影响[J]. 山东医药,2013,53(27):23-25.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)

(上接第 902 页)

[6] Pan X Y,Wang F,Zhang Y M,*et al*. Design,synthesis and biological activities of Nilotinib derivates as antitumor agents[J]. *Bioorg Med Chem*,2013,21(9):2527-2534.

[7] Jayabharathi J,Thanikachalam V,Jayamoorthy K,*et al*. Binding interaction of 1-(4-methybenzyl)-2-p-tolyl-1H-benzo[d]imidazole with bovine serum albumin[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*,2012,93:180-184.

[8] Sun Y,Wei S,Zhao Y Y,*et al*. Characterization of the interaction between 4-(tetrahydro-2-furanmethoxy)-N-octadecyl-1,8-naphthalimide and human serum albumin by molecular spectroscopy and its analytical application[J]. *Applied Spectroscopy*,2012,4(66):464-469.

[9] Sharma R,Choudhary S,Kishore N. Insights into the binding of the drugs diclofenac sodium and cefotaxime sodium to serum albumin:calorimetry and spectroscopy[J]. *Eur J Pharm Sci*,2012,46(5):435-445.

[10] 庆伟霞,李明静,王勇,等. 木犀草素及其苷与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 分析试验室,2008,27(5):50-53.

[11] 郁彩虹,张耀东,高裙裙,等. 分子对接和荧光光谱法研究槲皮素与 β-葡萄糖苷酶的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析,2011,8(31):2151-2155.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)