

检测心肌细胞钾离子通道蛋白活化水平方法的优化

王曦¹, 张磊¹, 周士胜², 邹伟¹

1 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029

2 大连大学医学部, 大连 116622

摘要:介绍了一种如何合理的利用蛋白质免疫沉淀和蛋白质免疫印迹相结合的方法检测大鼠心肌细胞钾离子通道蛋白 Kv1.2 和 Kv1.5 的表达与活化水平。实验结果表明, 与单独利用免疫印迹的方法相比较, 本实验是对钾离子通道蛋白及其它亚家族的钾通道蛋白磷酸化表达水平检测方法的一种优化, 从而获得一套可行、简单、合理的实验方案, 同时也提高了检测的准确性, 敏感性及特异性。

关键词: 蛋白质免疫沉淀, 大鼠心肌细胞, 钾离子通道蛋白

Optimization of Method for Detecting the Activation of Potassium Channels in Rat Cardiac Muscle Cells

Xi Wang¹, Lei Zhang¹, Shisheng Zhou², and Wei Zou¹

1 Department of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

2 Department of Medicine, Dalian University, Dalian 116622, China

Abstract: To detect the phosphorylation of potassium channel protein (Kv1.2 and Kv1.5) in rat cardiac muscle cells accurately, we applied the combined method of immunoprecipitation and Western blot in this study. Compared with using Western blot alone, the combination of immunoprecipitation and Western blot displayed high sensitivity to detect the activation of potassium channel proteins. Because of its simplicity, quickness and reproducibility, we find that this method was promising for detecting the phosphorylation of Kv1.2 and Kv1.5 proteins or other potassium channel proteins in rat cardiac muscle cells.

Keywords: immunoprecipitation, rats cardiac muscle cells, potassium channel proteins

蛋白质免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础, 主要用于抗原或者抗体的定性检测, 是确定蛋白质在细胞内完整生理性作用的有效方法^[1-4]。将蛋白质免疫沉淀和蛋白质免疫印迹方法相结合已被越来越广泛地运用到通道蛋白的表达检测中^[5-7]。

大鼠心肌细胞膜分布有各种离子通道, 其中,

钾离子通道的种类很多, 表达活性各不相同^[8]。有研究表明, 大鼠心肌细胞钾离子通道的活化形式之一是通道蛋白发生磷酸化^[9]。但由于磷酸化作用较弱, 且钾离子电压门控通道 Kv1.x 各亚型之间具有一定程度的同源性^[10], 结构非常相似, 通常情况下, 检测通道蛋白活性时杂带很多, 其他亚型的钾离子通道蛋白往往会干扰目的蛋白的免疫沉淀过程。本文

Received: July 5, 2007; Accepted: December 14, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No.30570665).

Corresponding author: Wei Zou. Tel: +86-411-82159360; E-mail: weizou60@126.com

国家自然科学基金资助 (No. 30570665)。

探讨了如何准确、快速检测出大鼠心肌细胞内钾离子通道蛋白活化水平的方法,旨在为相关研究者提供了一种更便利的实验方法。

1 材料与方法

1.1 材料

60 日龄健康成年 SD 大鼠, 大连医科大学实验动物中心; 细胞裂解液(20 mmol/L Tris pH 7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 5 mmol/L Na_3VO_4 , 50 mmol/L NaF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin, 1% Triton X-100); 蛋白质 G 琼脂糖珠(Protein G Agarose, Fast Flow), 酪氨酸磷酸化蛋白抗体(4G10, recombination 和 PY20), 购自 Upstate 公司; 钾离子通道蛋白抗体(Kv1.2 Voltage Gated Potassium Channel 和 Kv1.5 Voltage Gated Potassium Channel), 购自 Chemicon 公司; 辣根过氧化物酶体山羊抗兔(H+L), 辣根过氧化物酶体山羊抗小鼠(H+L), ECL 显色试剂盒, 购自武汉博士德生物公司; 其余化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌细胞蛋白的获得

将大鼠断颈处死后, 冰上分离出心脏组织, 用生理盐水进行心脏灌流处理, 之后在显微镜下分离出原生的心肌细胞, 收集到离心管中, 加入细胞裂解液(500 $\mu\text{L}/2 \times 10^7$ 个)得到全细胞蛋白, 采用 Bradford 法测定全细胞蛋白质的浓度。

1.2.2 蛋白质免疫沉淀

将蛋白质溶液的浓度稀释至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 分别向两

管含有 1 mg 蛋白的溶液中加入免疫沉淀的抗体(第一管加入 4 μg 4G10 抗体, 第二管加入 4 μg Kv1.5 抗体), 4 $^{\circ}\text{C}$, 60 r/min 振荡过夜, 向该溶液中加入 100 μL G 琼脂糖珠, 4 $^{\circ}\text{C}$, 60 r/min 振荡 2 h, 之后 14 000 g 离心 5 s, 弃上清, 收集沉淀物, 反覆进行 3 次, 收集沉淀后, 加入 60 μL 的 2 \times Laemmli sample buffer, 沸水浴 5 min, 快速离心后收集上清, 进行蛋白质免疫印迹反应。

1.2.3 蛋白质免疫印迹

10% SDS-PAGE 聚丙烯凝胶, 转膜, 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗孵育过夜, 室温 PBST 洗膜 3 次, 二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 结合 1 h, 室温 PBST 洗膜 3 次, PBS 洗膜 1 次, ECL 曝光, 冲洗胶片。

2 结果

2.1 大鼠心肌细胞总蛋白直接利用免疫印迹方法检测 Kv1.2 和 Kv1.5 的表达和活性

图 1 所示, 直接检测大鼠心肌细胞总蛋白中 Kv1.2 和 Kv1.5 的表达结果, 由于同源蛋白的干扰, 所得到的细胞内 Kv1.2 及 Kv1.5 蛋白的表达情况本身已很难确定, 同时细胞内磷酸化蛋白总量较多, 磷酸化的钾离子通道蛋白所占比例相对较少, 且蛋白免疫印迹方法检测的灵敏度也有一定的限制, 故很难单纯根据分子量来评价 Kv1.2(分子量约 70 kD)和 Kv1.5(分子量约 59 kD)两种蛋白是否发生了磷酸化作用(如图 2 所示)。

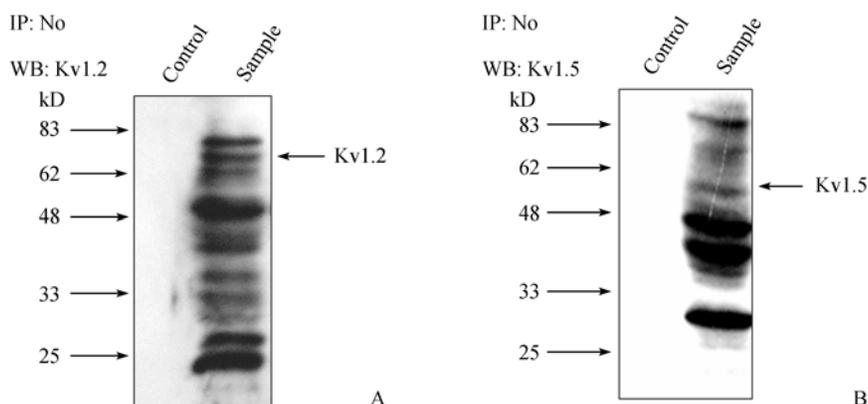


图 1 利用 Western blot 的方法检测大鼠心肌全细胞蛋白 Kv1.2(约 70 kD)和 Kv1.5(约 59 kD)的表达情况
Fig. 1 The expression of Kv1.2 (70 kD) and Kv1.5 (59 kD) in the cardiac muscle cells of rats with Western blot

A: the expression of Kv1.2; B: the expression of Kv1.5.

Control is BSA (20 ng); sample is whole cell proteins of rat cardiac muscle

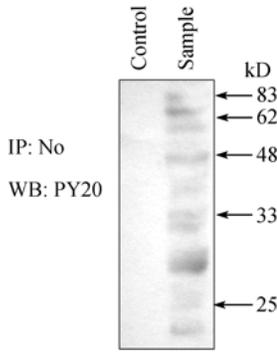


图2 利用 Western blot 的方法检测大鼠心肌全细胞蛋白磷酸化的表达情况

Fig. 2 The phosphorylation of whole cell proteins in the cardiac muscle cells of rats with Western blot

Control is BSA (20ng).

Sample is whole cell proteins of rat cardiac muscle

2.2 大鼠心肌细胞免疫沉淀和免疫印迹结合检测 Kv1.2 和 Kv1.5 的表达和活性

如图3, 4所示, 首先经过4G10磷酸化抗体免疫沉淀先得到全部的发生酪氨酸磷酸化蛋白, 之后再使用Kv1.2和Kv1.5的抗体进行蛋白质免疫印迹反应, 可以清楚、准确的检测出表达量较少的且同时发生酪氨酸磷酸化的Kv1.2蛋白和Kv1.5蛋白, 并排除了其他同源Kv1.x蛋白的干扰(图3, 4)。从而可以准确的确定钾离子通道蛋白Kv1.2和Kv1.5的活化水平。

此外, 经过Kv1.5抗体免疫沉淀后, 先得到总的Kv1.5蛋白, 这其中包括磷酸化的和非磷酸化的Kv1.5蛋白, 之后分别用Kv1.5抗体和PY20(酪氨酸磷酸化)抗体进行免疫印迹反应, 也可以清楚地检测

出总的心肌细胞内, Kv1.5蛋白和磷酸化的Kv1.5蛋白都有一定的表达, 且其各自的表达量均随着上样蛋白量的增加而增加。

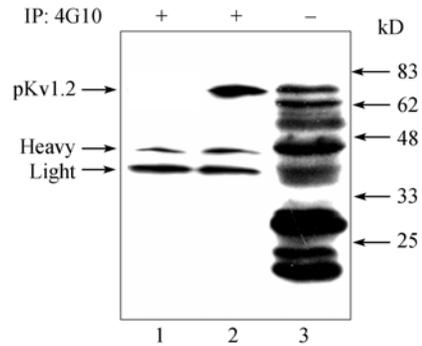


图3 4G10磷酸化抗体免疫沉淀后Kv1.2蛋白表达的检测

Fig. 3 The expression of Kv1.2 after IP of 4G10

1: BSA after IP of 4G10; 2: proteins after IP of 4G10; 3: protein without IP

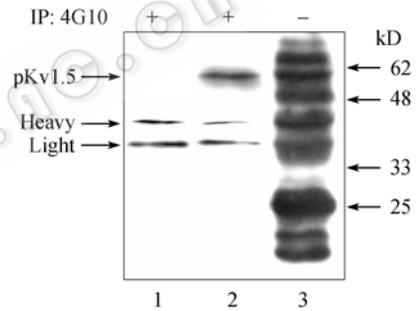


图4 4G10磷酸化抗体免疫沉淀后Kv1.5蛋白表达的检测

Fig. 4 The expression of Kv1.5 after IP of 4G10

1: BSA after IP of 4G10; 2: proteins after IP of 4G10; 3: protein without IP

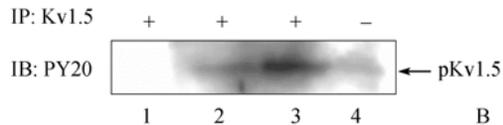
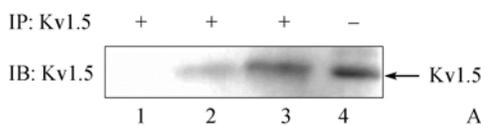


图5 Kv1.5抗体免疫沉淀后的Kv1.5蛋白和磷酸化的Kv1.5蛋白表达水平的检测

Fig. 5 The expression of Kv1.5 and pKv1.5 after IP with Kv1.5

A: the expression of Kv1.5; B: the expression of pKv1.5

1: BSA after IP with Kv1.5; 2,3: proteins (50 µg or 100 µg) after IP with Kv1.5; 4: antigen of Kv1.5 without IP

3 讨论

放射性标记法是研究蛋白质磷酸化的传统方法, 由于存在有放射性污染, 磷酸化、脱磷酸化的速率易受多种因素包括孵育时间等的影响, 故极大地限制了它的应用。而单纯使用蛋白免疫印迹方法, 由于抗丝、苏氨酸磷酸化抗体抗原决定簇较小, 使得抗原抗体的结合位点存在空间障碍, 特异性较差。抗

酪氨酸磷酸化抗体特异性稍好一些, 但也并不理想^[11]。目前, 普遍地采用免疫沉淀和免疫印迹相结合的方法, 但对于心肌钾通道活性的检测仍有一定的难度。

本文先利用免疫沉淀对目的蛋白进行富集, 这样既降低了非磷酸化蛋白质的干扰, 又解决了大鼠心肌细胞钾离子通道蛋白中磷酸化蛋白含量偏低的问题, 再通过免疫印迹检测特异蛋白的表达, 从而提高了检测的准确性和特异性。

本文一共设计了2种实验方案,2种方案均得出了正确的结果,但是也各有利弊。

第一种方案先利用免疫沉淀收集全细胞磷酸化蛋白,之后再用电泳方法进行钾离子通道蛋白表达水平的检测,这样在进行免疫沉淀之后可直接检测目的蛋白的磷酸化水平,不需要再检测所得蛋白是否为磷酸化蛋白。同时在进行免疫沉淀的过程中由于抗体会和样品中的抗原-抗体复合物一同进入下一步的免疫印迹反应中,通过聚丙烯酰胺电泳会将抗体的重链(Heavy)和轻链(Light)分开,免疫印迹反应之后,抗体的重轻链也会出现在结果中,当我们所测蛋白大小在35 kD和45 kD左右时,就会受它们的影响,以至于得到不确定的实验结果。采用第一个方案就可以减轻这种干扰,因为4G10抗体和所选二抗抗性的不同,就可以减轻由4G10抗体产生的重轻链的干扰,但是也不能完全排除这种干扰。再有就是由于细胞内不同蛋白发生磷酸化的程度都不同,若磷酸化程度较高,可以很容易的检测出来,但若是在磷酸化程度不高的情况下,即使在免疫沉淀后其相对含量也不一定能够达到可以进行免疫印迹检测的标准。

第二种方案先利用免疫沉淀方法收集所有磷酸化和非磷酸化的Kv1.5蛋白,然后再进行磷酸化水平的检测。这样可以避免相近分子量蛋白的互相干扰,并且也解决了磷酸化程度不高,蛋白含量低的问题。但是一般按照这样的流程进行免疫沉淀后都要先检测所得蛋白是否为所要蛋白,因为像钾离子通道蛋白这样的特殊蛋白不同亚型之间也有一定的同源性,与其有相似结构的其他类型的钾离子通道蛋白也会同时沉淀,这样一来,往往在免疫沉淀后要进行两次免疫印迹检测,首先是免疫沉淀后特定蛋白的检测,其次才是磷酸化水平的检测,而在进行特定蛋白的检测时就会有较大程度的重轻链的影响,无形当中增加了实验的复杂程度,同时也带入了更多的不可预知的问题。实验本着的是准确、简单、经济、易行的原则进行的,因此针对不同的需要,应选择恰当的方案进行免疫沉淀反应。

蛋白质免疫沉淀方法在检测较低表达量的蛋白表达上具有重要的意义,通过该研究,获得了一套可行、简单、经济的方法来检测大鼠心肌细胞中钾离子通道蛋白磷酸化情况,从而建立了一套完善的

免疫沉淀实验技术,为进一步深入探讨大鼠心肌细胞中钾离子通道的活化情况奠定了一定的实验基础。

REFERENCES

- [1] Barrett B, Wood PA, Volwiler W. Quantitation of gamma globulins in human serum by immunoprecipitation. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicins*, 1960, **55**: 605-615.
- [2] Ren XM, Shand SH, Takimoto K. Effective association of Kv channel-interacting proteins with Kv4 channel is mediated with their unique core peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(44): 43564-43570.
- [3] Zhang W, Thomas D, Karle CA, Kathöfer S, Schenkel J, Kreye VA, Ficker E, Wible BA, Kiehn J. Protein kinase A-mediated phosphorylation of HERG potassium channels in a human cell line. *Chinese Medical Journal*, 2002, **115**(5): 668-676.
- [4] Hotchkiss K, Harvey M, Pacheco Ion M, Sokolowski B. Ion channel proteins in mouse and human vestibular tissue. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 2005, **132**(6): 916-923.
- [5] Hattan D, Nesti E, Cachero TG, Morielli AD. Tyrosine phosphorylation of Kv1.2 modulates its interaction with the actin-binding protein cortactin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(41): 38596-38606.
- [6] Thorneloe KS, Chen TT, Kerr PM, Grier EF, Horowitz B, Cole WC, Walsh MP. Molecular composition of 4-aminopyridine-sensitive voltage-gated K⁺ channels of vascular smooth muscle. *Circulation Research*, 2001, **89**: 1030-1037.
- [7] Vicente R, Escalada A, Villalonga N, Texidó L, Roura-Ferrer M, Martín-Satué M, López-Iglesias C, Soler C, Solsona C, Tamkun MM, Felipe A. Association of Kv1.5 and Kv1.3 contributes to the major voltage-dependent K⁺ channel in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(49): 37675-37685.
- [8] Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sangulinetti MC, Stuhmer W, Wang XL. International union of pharmacology. LIII. nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 2005, **57**: 473-508.
- [9] Holmes TC, Berman K, Swartz JE, Dagan D, Levitan IB. Expression of voltage-gated potassium channel decreases cellular protein tyrosine phosphorylation. *The Journal of Neuroscience*, 1997, **17**(23): 8964-8974.
- [10] Xia M, Chen YH. The interaction of cardiac potassium channels. *Journal of Southeast University (Medical Science Edition)*, 2004, **23**(4): 278-281.
夏敏, 陈义汉. 心脏钾离子通道的研究进展. *东南大学学报(医学版)*, 2004, **23**(4): 278-281.
- [11] Li LM, Wang WL. Progress of research on protein phosphorylation. *Inner Mongolia Med*, 2006, **38**(8): 735-738.
李丽梅, 王文礼. 磷酸化蛋白质组学研究技术进展. *内蒙古医学杂志*. 2006, **38**(8): 735-738.