

肺癌组织蛋白质组双向凝胶电泳方法的建立和优化

王建设¹, 庞明珍¹, 吴逸明^{2△}

(1. 鹤壁职业技术学院, 河南鹤壁 458030; 2. 郑州大学公共卫生学院, 河南郑州 450001)

摘要:目的 建立和优化肺癌组织蛋白质组双向凝胶电泳(2-DE)技术, 获取高分辨率、重复性好的蛋白质 2-DE 图谱。方法 提取肺癌组织蛋白, 以固相 pH 梯度胶条做第一向等电聚焦电泳, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)为第二向, 在上述过程中分别对蛋白提取、等电聚焦电泳和凝胶染色进行控制和优化, 利用 ImageMaster 2D platinum 6.0 分析软件获得二维凝胶图像。结果 实验重复 3 次, 共获 15 幅二维凝胶图像, 平均蛋白质点数为 $1\ 137 \pm 57$; 随机选取 1 例标本的 2 幅图像, 利用软件对 2 幅图像中蛋白点进行匹配, 匹配率为 90.4%。结论 优化肺癌组织蛋白质组 2-DE 技术可获得高分辨率、重复性好的蛋白质 2-DE 图谱, 为开展肺癌组织蛋白质组学研究打下基础。

关键词: 肺肿瘤; 蛋白质组; 电泳, 凝胶, 双向

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.34.019

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)34-3480-02

Establishment and optimization of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for proteom analysis of lung tumor tissue

Wang Jianshe¹, Pang Mingzhen¹, Wu Yiming^{2△}

(1. Hebi College of Vocation and Technology, Hebi, Henan 458030, China;

2. School of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: Objective To establish and optimize the technique of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2-DE) for proteom analysis of lung tumor tissue in order to obtain 2-DE protein map with high-resolution and better repeatability. **Methods** Proteins from lung tumor tissue were extracted. Immobilized pH gradient (IPG) strips was used to perform isoelectric focusing electrophoresis(the first dimension), and sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) served as the second dimension. In procedures above, protein extraction, isoelectric focusing electrophoresis and gel staining were controlled and optimized, respectively. ImageMaster 2D platinum 6.0 analyzing software was used to gain two-dimensional gel images. **Results** The experiment was repeated three times, and a total of 15 two-dimensional gel images were obtained with average protein spots of $1\ 137 \pm 57$. Two images of a sample were selected randomly. Matching the protein spots in the 2 images using software demonstrated a matching rate of 90.4%. **Conclusion** 2-DE protein map with high-resolution and better repeatability can be obtained by optimizing 2-DE technique for proteom analysis of lung tumor tissue, and lay the foundation for further proteomics research of lung tumor.

Key words: lung neoplasms; proteome; electrophoresis, gel, two-dimensional

随着后基因组时代的到来,蛋白质组研究越来越受到国内外科学工作者的密切关注。蛋白质组的研究能深入了解生命活动的全貌及其本质和规律^[1]。双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)是蛋白质组学研究的重要技术之一^[2], 而蛋白质样品的制备是 2-DE 的关键^[3]。获得高分辨率、重复性好的蛋白质 2-DE 图谱是蛋白质组学研究的前提。本研究以肺癌组织为材料, 采用不同的样品制备方法和聚焦条件的优化进行比较, 确定了适合肺癌组织蛋白质样品的制备方法, 获得了较好的效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 肺癌组织标本: 27 例肺癌组织标本来源于郑州大学第一附属医院胸外科。主要试剂和设备: 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、两性电解质、CHAPS 购自 Sigma 公司; 二硫苏糖醇(DTT)、十二烷基磺酸钠(SDS)购自 Solarbio 公司; 超声细胞粉碎机为宁波新芝仪器研究所生产; 17 cm pH 3~10 IPG 预制胶条(线性)、等电聚焦仪、Image Scanner 型凝胶图像扫描仪、Image Master 2D platinum6.0 凝胶图像分析软件、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)垂直电泳单元等均为美国 GE 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 肺癌组织蛋白样品的制备 将肺癌标本从 -80℃ 冰箱取出, 用预冷的生理盐水(4℃)洗去血污, 取黄豆大小肺癌组织(约 500 mg), 无菌纱布吸去多余水分。参照文献^[4], 采用两种方法提取蛋白: 一步法, 按 1:3 比例在剪碎后的肺癌组织中加入样品裂解液[含 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 40 g/L CHAPS, 65 mmol/L DTT, 0.1 g/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 0.001 g/L Aprotinin], 制备组织匀浆; 冰浴中超声粉碎处理 5 min, 功率 250 W, 工作 5 s, 间歇 10 s, 共 20 次; 15 000 g 4℃ 离心 45 min, 避开脂质层, 吸取上清液后, 再 40 000 g 4℃ 离心 45 min, 吸取上清液。Bradford 法测定蛋白浓度, 分装 -80℃ 冰箱保存。两步法, 上述方法取得的样品用 2-D clean-up kit 处理, 按照 2-D clean-up 试剂盒说明书。

1.2.2 第一向固相 pH 梯度(IPG)等电聚焦电泳 将冻干的蛋白质样品(分别以银染胶 100 μg 和考马斯亮蓝染胶 1 mg 的上样量)重悬于水化上样缓冲液(含 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 40 g/L CHAPS, 65 mmol/L DTT, 2 g/L 两性电解质和 0.01 g/L 溴酚蓝)中, 控制总体积 17 cm 胶条不超过 400 μL, 置冰上 1 h 后, 在胶条上方加矿物油覆盖, 将聚焦槽平稳移置聚焦仪, 设置等电聚焦程序^[5-6]。本实验分别采用 A、B 两种程序, 设置极限电流为每胶 50 μA, 聚焦温度为 17℃, 见表 1。

△ 通讯作者, Tel: 13903717878; E-mail: wuym369@126.com.

表 1 17 cm IPG 胶条等电聚焦程序

程序	50 V 主动	250 V 线性	500 V 快速	1 000 V 快速	10 000 V 线性	10 000 V 快速	500 V 快速
A	12 h	30 min	1 h	—	5 h	60 000 V h	99 h
B	12 h	30 min	1 h	1 h	5 h	60 000 V h	99 h

—: 此项无数据。

完成等电聚焦的胶条, 置水化盘中, 先后加入平衡缓冲液 I (6 mol/L 尿素, 20 g/L SDS, 0.375 mol/L pH 8.8 Tris-HCl, 体积分数 20% 甘油和 20 g/L DTT) 和平衡缓冲液 II (6 mol/L 尿素, 20 g/L SDS, 0.375 mol/L pH 8.8 Tris-HCl, 体积分数 20% 甘油和 25 g/L 碘乙酰胺) 中, 进行二次平衡, 每次平衡 12 min。

1.2.3 第二向 SDS-PAGE 垂直电泳 制备 12% SDS-PAGE 均一胶。将蛋白质 Marker 点样于滤纸, 置胶条的“+”极端, 5 g/L 琼脂糖凝胶封口, 设置电泳程序 (17 cm 胶条, 每胶 10 mA, 30 min 后提高电流至 25 mA), 进行 2-DE, 当溴酚蓝至凝胶下缘 0.5 cm 时停止电泳。

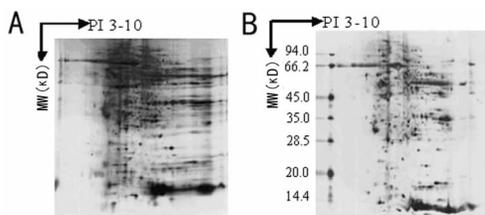
1.2.4 凝胶的染色 采用硝酸银染或考马斯亮蓝染色。参考文献 [7-8] 的方法。

1.2.5 凝胶图像分析 染色后的 SDS-PAGE, 用 Image Scanner 型凝胶图像扫描仪扫描成像, 数字化图像用 Image Master 2D platinum 6.0 软件分析。图像分析过程包括蛋白质点的检测、蛋白质点的匹配和背景的消减等。

2 结果

2.1 两种聚焦程序比较 任选一例样品在其他处理方面均一致的情况下, 分别采用程序 A 和程序 B 进行等电聚焦, 结果程序 A 聚焦时间为 30 h 50 min, 程序 B 聚焦时间为 27 h 20 min。

2.2 两种蛋白质样品提取方法的凝胶图像分析 分别采用一步法和两步法提取肺癌组织蛋白质, 聚焦程序和染色方法均一致, 获得的二维凝胶图像比较, 一步法凝胶图像 (图 1A) 背景较深, 有纵横条纹和蛋白点的拖尾; 而两步法则凝胶图像 (图 1B) 背景干净, 没有纵横条纹和蛋白点的拖尾。



A: 一步法凝胶图像; B: 两步法凝胶图像。

图 1 蛋白质样品提取方法的凝胶图像

2.3 优化后肺癌组织蛋白质组双向凝胶图像的分析 采用两步法提取肺癌组织蛋白质, 聚焦程序选择 B, 硝酸银染色。标本重复 3 次, 共获 15 幅二维凝胶图像。随机选择其中一个标本在不同时间获得图像来评价实验的重复性。Image Master 2D platinum 6.0 软件对凝胶图像的分析结果显示, 15 幅二维凝胶图像平均蛋白质点数为 $1\ 137 \pm 57$; 两幅图谱中能够匹配的蛋白点为 1 093 个, 匹配率为 90.4%。

3 讨论

自 O'Farrell [2] 于 1975 年首次建立了 2-DE 技术以来, 电泳技术发展迅猛。但是如何制备具有高灵敏度和高分辨率的 2-DE 仍然是现代蛋白质组学研究的重点之一。由于 2-DE 对批量蛋白质可实现一次性分离, 具有高灵敏度和高分辨率, 便于计算机图像处理, 可以很好地与质谱分析等鉴定方法匹配, 因而是目前分离蛋白质组的核心技术。由于各种组织蛋白

的不同, 就要求在实验的各个环节进行摸索和控制。

3.1 组织蛋白质样品的制备 蛋白质样品的制备是关键环节, 关系到蛋白质组研究结果的准确性 [9]。样本制备主要包括蛋白提取与沉淀两个步骤。蛋白提取过程需尽可能地溶解和解聚蛋白质 [10]。通常采用分级提取蛋白的方法, 但是繁琐的样品制备步骤容易造成样品中蛋白质组分的丢失 [11]。为了尽可能减少蛋白丢失, 本研究采用液氮冷冻研磨的方法提取蛋白。蛋白质样品中的盐离子、核酸等物质能够对等电聚焦过程产生显著影响 [12]。盐离子浓度过高将导致水化过程延长, 蛋白质聚焦不完全, 使凝胶图像产生明显的横向拖尾, 甚至会破坏胶条。透析可以降低盐浓度, 但时间太长; 也可以采取凝胶过滤或沉淀重悬法脱盐, 但会造成蛋白质的部分损失。本实验中采用 2-D clean-up 试剂盒处理样品, 去除了盐离子, 缩短了聚焦时间。核酸的残留将影响第二向 SDS-PAGE 中高相对分子质量蛋白分离, 导致明显的纵向拖尾。核酸的去除可采用超声或核酸酶处理, 而加入的外源核酸酶则会出现在最终的 2D 胶上。本实验中采用超声波破碎和高速离心的方法除去大分子的核酸。超声波破碎时应控制好条件, 并防止产生泡沫, 功率不可太高, 在冰浴中进行, 否则产热会加速蛋白的降解, 高速离心时也要保持低温。

3.2 第一向 IPG 等电聚焦 IPG 胶条的应用使等电聚焦变得简单起来, 一般生产厂家都给参考的聚焦程序, 但是由于每种样品的不同, 很难使用统一的标准, 本实验采用的两种聚焦程序, A 程序聚焦时, 电压升得慢, 需要聚集时间延长很多, 并且聚焦后的胶条厚度不均匀, 在正极端较薄; 而 B 程序在 A 的基础上加上一步 1 000 V 快速除盐, 缩短了聚焦时间。

3.3 凝胶的染色 目前最常用的染色方法有银染和考马斯亮蓝染色。银染的方法种类很多, 但是其准确的染色机制还不是特别的清楚。大致的原理是银离子在碱性 pH 环境下被还原成金属银, 沉淀在蛋白质的表面上而显色。很多银染程序都使用了戊二醛, 它能提高银染的灵敏度和染色结果的重复性, 但是因为戊二醛会修饰蛋白质, 从而会影响对蛋白质点的质谱鉴定和分析 [13-14]。由于银染的灵敏度很高, 可染出胶上低于 1 ng 蛋白质点, 故广泛的用在 2D 凝胶分析上 [15-16]。待找到自己感兴趣的蛋白质点后, 再通过考染富集该目的点, 然后做进一步的肽段指纹图谱分析 (PMF) 或序列测定。

参考文献:

[1] Yoshida M, Loo JA, Lepleya RA. Proteomics as a tool in the pharmaceutical drug design process [J]. *Curr Pharm Des*, 2001, 7(4): 291-310.
 [2] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. *J Biol Chem*, 1975, 250 (10): 4007-4021.
 [3] Stanley BA, Neverova I, Brown HA, et al. Optimizing protein solubility for two-dimensional gel electrophoresis analysis of human myocardium [J]. *Proteomics*, 2003, 3 (6): 815-820.
 [4] 陈主初, 梁宋平. 肿瘤蛋白质组学 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2002: 24. (下转第 3483 页)

圆”状的生长^[9]。

2.2 平滑肌免疫组化鉴定 α 肌动蛋白免疫组化染色可见细胞质内含有与细胞长轴相平行的黄色颗粒,证实为平滑肌细胞,细胞纯度在 95% 以上^[10-11]。

3 讨 论

随着动物组织细胞培养技术和培养基质量的不断提高,目前对于血管平滑肌细胞的体外分离培养有很多报道,但对老龄 SD 大鼠的血管平滑肌细胞的报道少见,由于老龄动物组织细胞较年轻的动物组织细胞不易培养,寻找一种稳定的对老龄 SD 大鼠的血管平滑肌细胞培养的方法是非常重要的,本研究经过多次预实验,包括组织植块培养法、悬浮组织块培养法、酶消化分散细胞原代培养法,发现,植块培养法和悬浮组织块培养法成功率低,不易掌握,不能稳定地获得实验所需的细胞,即使成功,但耗时长,并且易产生成纤维细胞等杂质,0.2% II 型胶原酶消化分离细胞原代培养法可稳定、大量的获得实验所需的细胞。这可能是由于老龄动物血管平滑肌细胞出现增龄变化,分离后休眠期长,进入分裂的细胞而不易在体外生长增殖,而且老龄动物动脉血管中膜,胞外基质增加,血管平滑肌细胞被增高的弹力膜和胶原纤维分隔,组织植块培养法中细胞爬出阻力增大,酶消化法可将胞外基质消化,细胞易游离出来。总成功的老龄 SD 大鼠血管平滑肌细胞培养需要重视以下几点:(1)快速、仔细、彻底剥离血管中膜层,以获得高纯度的平滑肌组织;(2)组织块应尽量剪碎,便于很好地消化,消化程度是以肉眼不见消化液中的组织块,而是均匀黏稠状的混悬液为宜,在相差显微镜下可见大小成团细胞和单个细胞,如果 12~18 h 都不能很好地消化组织块,应及时更换胶原酶;(3)高质量的 II 型胶原酶和胎牛血清是成功的关键;(4)分离组织时动作一定要轻柔,避免对血管组织的过度损伤;(5)在开始培养的 72 h 内,必须绝对静置,以防刚贴壁的细胞重新漂浮而死亡;(6)传代时掌握好消化的时机是成功的关键,当细胞变成不透亮并细胞间有间隙出现,即可终止消化,消化后以成片成团的细胞成活率为高;(7)细胞培养全过程中要求严格的无菌操作^[12]。

本实验用 0.2% II 型胶原酶(用含的 20% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基配制)消化老龄 SD 大鼠主动脉平滑肌细

胞,并综合运用自然纯化法、差速贴壁法纯化获得高纯度血管平滑肌细胞,经鉴定,细胞纯度可达 95% 以上,本方法稳定易掌握,具有一定的推广价值,为心血管系统病研究提供稳定的细胞来源。

参考文献:

- [1] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 2 版. 北京:世界图书出版社, 2007.
 - [2] 方正旭,王伶,刘东. 关于动脉平滑肌细胞培养的几个问题[J]. 江西医学院学报, 2002, 42(5): 157-158.
 - [3] Di Luozzo G, Bhargava J, Powell RJ. Vascular smooth muscle cell effect on endothelial cell endothelin-1 production[J]. J Vasc Surg, 2000, 31(4): 781-789.
 - [4] Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture[J]. Physiol Rev, 1979, 59(1): 1-61.
 - [5] 周晓莉,雷寒,柳青. 血管平滑肌细胞的培养及鉴定[J]. 重庆医学, 2005, 34(6): 877-879.
 - [6] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社, 2001.
 - [7] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京:北京出版社, 1995.
 - [8] 李萍,杨志刚,文国容,等. 茶多酚对 ACC-M 细胞株 Fas、FasL 表达的影响[J]. 重庆医学, 2010, 39(3): 268-269.
 - [9] 章静波. 细胞生物学实用方法与技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995.
 - [10] 王生兰,苏娟,徐一洲,等. 大鼠血管平滑肌细胞体外培养的表现型转换及其鉴定[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(4): 268-269.
 - [11] 来利红,王如兴,蒋文平. 酶消化法急性分离大鼠主动脉平滑肌细胞及其鉴定[J]. 苏州大学学报:医学版, 2008, 28(1): 23-24.
 - [12] 费雷谢尼. 动物细胞培养-基本技术指南[M]. 张静波,徐存拴,译. 4 版. 北京:北京科学出版社, 2004: 116-120.
- (收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-07-12)
-
- (上接第 3481 页)
- [5] Castillejo MA, Maldonado AM, Dumas-Gaudot E, et al. Differential expression proteomics to investigate responses and resistance to *Orobanche crenata* in *Medicago truncatula*[J]. BMC Genomics, 2009(10): 294.
 - [6] 张慧珍,巴月,杨继要,等. 肺癌相关蛋白的筛选与鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(1): 6-8.
 - [7] Heukeshoven J, Dernick R. Effective blotting of ultrathin polyacrylamide gels anchored to a solid matrix[J]. Electrophoresis, 1995, 16(5): 748-756.
 - [8] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2004, 25(9): 1327-1333.
 - [9] Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics[J]. Proteomics, 2004, 4(12): 3665-3685.
 - [10] 蒋兰兰,姜惠,张克勤. 大鼠成骨细胞分泌组双向电泳样品制备方法的建立[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2007, 27(7): 770-772.
 - [11] Gagné JP, Ethier C, Gagné P, et al. Comparative proteome analysis of human epithelial ovarian cancer[J]. Proteome Sci, 2007(5): 16.
 - [12] 刘健平,陈国华,陈本美,等. 蛋白质组双向电泳实验中一些常见失误的分析[J]. 生命科学研究, 2003, 7(2): 177-179.
 - [13] Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity[J]. Electrophoresis, 1999, 20(3): 601-605.
 - [14] 燕贞,刘桂芝,王建设,等. 蛋白质组学方法筛选早期肺鳞癌相关蛋白[J]. 肿瘤, 2010, 30(2): 130-133.
 - [15] 赵欣,蒲小平. 蛋白质组学在药物研究中的应用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(8): 988-991.
 - [16] 陈倩,谭彬,王应雄,等. 自然流产患者蜕膜组织疾病特异蛋白的初步筛选与鉴定[J]. 重庆医学, 2010, 38(21): 2861-2863.
- (收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-07-28)