技术方法

文章编号:1000-5404(2006)03-0270-02

蛋白质丙酮沉淀对2-DE图谱的影响

蔡 静 (贵阳医学院免疫学教研室,贵阳 550004)

提 要:目的 以丙酮沉淀A549肺腺癌细胞总蛋白,用双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术分析比较蛋白质丙酮沉淀对2-DE图谱的影响。**方法** 采用一次抽提蛋白质的方法,提取A549细胞总蛋白,丙酮沉淀蛋白质,对沉淀前、后的蛋白质进行二维凝胶电泳,分析比较所得蛋白图谱。**结果** 蛋白丙酮沉淀前检测得到473个蛋白点,沉淀后为428个蛋白点,高丰度蛋白点沉淀前后无明显变化。**结论** 二维凝胶电泳时丙酮沉淀蛋白会导致蛋白的丢失,尤其是低丰度蛋白。

自Wasinger等[1]于1995年在Electrophoresis发表第1篇有关蛋白质组(proteome)学的论文后,有关蛋白质组的研究得到了迅猛的发展,并取得了可喜的研究成果。目前对于蛋白质组的研究方法中,二维凝胶电泳-质谱是最流行和较可靠的技术平台[2,3]。而组织细胞蛋白质的抽提则是该技术的关键,选择合适的样品制备方法对获得满意的二维电泳图谱非常重要。沉淀样品中的蛋白,清除杂质是常用的纯化蛋白方法。本研究通过对丙酮沉淀前后的双向电泳图进行对比分析,以了解蛋白质丙酮沉淀纯化对双向电泳图谱的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

碘乙酰胺为Sigma公司产品,DTT为为上海生工公司产品。尿素,SDS,甘氨酸,溴酚蓝,CHAPS,IPG干胶条(pH 3~10),丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,Tris,过硫酸铵,TEMED和低分子量蛋白Marker均购自Amersham Pharmacia公司。丙酮及其余试剂为国产分析纯,所有溶液均用纯水配制。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺腺癌细胞A549由第三军医大学全军免疫学研究所吴玉章教授惠赠。细胞复苏传代后在含10%小牛血清的1640培养液中培养,取对数生长期细胞待用。

1.2.2 细胞总蛋白质的抽提 样品处理参考文献[4],细胞经0.9%生理盐水洗涤3次后离心置1.5 ml EP管,细胞重悬于200 μl裂解液(8 mol/L尿素,4% CHAPS,40 mmol/L Tris,60 mmol/L DTT和0.8% IPG缓冲液),每1×10^7个细胞加入100 μl裂解液,漩涡振荡器上振荡约20 min,室温放置2 h,使细胞蛋白充分溶解,室温12 000 r/min离心30 min,取上清,BIO-RAD公司DC Protein Assay行蛋白定量。

1.2.3 蛋白质丙酮沉淀 取抽提好的上清液加入5倍体积的100%的冷丙酮,-20 ℃过夜,4 ℃,12 000 r/min离心15 min,去上清,用1 ml丙酮洗涤,再次4 ℃,12 000 r/min离心15 min,蛋白沉淀用适当体积的2-D溶涨液充分溶解,BIO-RAD公司DC Protein Assay行蛋白定量。

1.2.4 双向电泳实验 双向电泳主要按Gorg[5]描述的方法,并参照Sanches等[6]改进的胶内加样方法进行,参照IPGphor等电聚焦仪操作指南,1 mg总蛋白与重水化液(8 mol/L尿素,2% CHAPS,60 mmol/L DTT和0.5% IPG缓冲液pH 3~10)混合,总体积250 μl吸入IPG胶槽,IPG干胶条(13 mm,pH 3~10)胶面朝下放入胶槽,覆盖一层矿物油。置于IPGphor等电聚焦仪(Amersham Pharmacia公司)电极板上,重水化和等电聚焦在20 ℃自动进行,总电压时间积20~22 kVh。等电聚焦后于平衡液Ⅰ[10 mg/ml DTT,50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8),6 mol/L Urea,30%(v/v)甘油,2% SDS和痕量溴酚蓝]平衡15 min,再于平衡液Ⅱ(25 mg/ml碘乙酰胺代替平衡液Ⅰ中的DDT)平衡15 min。胶条移置1 mm厚12.5% SDS均匀胶上端,0.5%琼脂糖封胶。SDS-PAGE在SE600电泳仪(Amersham Pharmacia)中进行10 mA胶电泳15 min,换用25 mA胶,直到溴酚蓝达到胶底线近1 cm处。为确定蛋白点的分子量,SDS-PAGE时,加入低分子量Marker。

1.2.5 考马斯亮蓝染色 参照文献[7]进行。

1.2.6 图像采集和分析 Image Master VDS-CL(Amersham Pharmacia)对双向电泳凝胶扫描,数字化图像文件运用Image master2D Elite软件(Amersham Pharmacia)分析。图像分析包括蛋白点的检测、背景扣除和点的匹配,以及等电点和分子量的校准。蛋白匹配以未经丙酮沉淀的凝胶图像作为参考胶。

2 结果

未经丙酮沉淀和经丙酮沉淀的A549细胞蛋白质的双向电泳考马斯亮蓝染色图谱见图1和图2,未经丙酮沉淀的细胞图谱图像分析后检测到473个蛋白点,经丙酮沉淀的检测到428

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30360099)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30360099)

作者简介:蔡 静(1972-),女,云南省昆明市人,硕士,讲师,主要从事遗传免疫方面的研究。电话:(0851)6908464, E-mail: alicecaij@gmc.edu.cn

收稿日期:2005-05-25;修回日期:2005-10-15

个蛋白点。对两张电泳图进行比对发现高丰度的蛋白点在沉淀前后没有太多改变如A、B、C、D、E等点，而低丰度蛋白点如a、b、c、d、e、f等，经过丙酮沉淀后在2-DE图谱上消失。

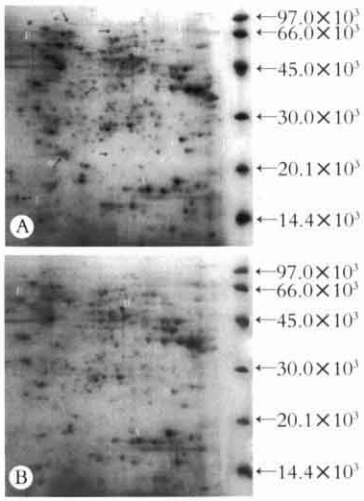


图1　A549未经丙酮沉淀(A)和经丙酮沉淀(B)细胞总蛋白的电泳图谱(考马斯亮蓝染色)

3　讨论

二维凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis，2-DE)是目前唯一能将数千种蛋白质同时分离与展示的分离技术，而组织细胞蛋白质的抽提，则是该技术的关键，选择合适的样品制备方法对获得满意的二维电泳图谱非常重要。丙酮是一种经常用于蛋白质沉淀的有机溶剂，可以清除许多混杂于蛋白中的诸如去污剂、脂类等杂质，使蛋白质得到纯化，故在蛋白质的二维凝胶电泳技术中经常使用[8]。

本研究采用丙酮对肺腺癌A549细胞的总蛋白沉淀后行二维凝胶电泳，并对沉淀前、后的电泳图谱进行比对，沉淀前检测到473个蛋白点，而在沉淀后只检测到428个蛋白点，排除实验误差，在进行丙酮沉淀后有蛋白的丢失。同时发现高丰度的蛋白点在丙酮沉淀前后没有太大变化，丢失的蛋白点可能大部分均是低丰度蛋白。而低丰度蛋白往往是执行重要生物功能的蛋白质，如受体蛋白、信号转导蛋白等。因此，在进行二维凝胶电泳需要对蛋白质进行纯化时，“一步法(one-extract-one-gel)”，即一步提取的细胞总蛋白在一块胶上进行电泳分离不是较好的选择，可能需要改变蛋白质的抽提方法或者采用窄范围的IPG胶条进行电泳，以提高低丰度蛋白的检出率。

关键词：丙酮；蛋白质纯化
中图法分类号：Q503　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] WASINGER V C, CORDWELL S J, CERPA POLJAK A, *et al*. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium[J]. Electrophoresis, 1995, 16(7): 1090-1094.
[2] SZALLASI Z. Bioinformatics. Gene expression patterns and cancer [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(13): 1292-1293.
[3] BAKHTIAR R, NELSON R W. Electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Emerging technologies in biomedical sciences[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59(8): 891-905.
[4] BERKELMAN T, STENSTEDT T. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients principles & methods[M]. USA: Amersham Pharmacia Biotech Inc, 1998: 6-13.
[5] GORG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, *et al*. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037-1053.
[6] SANCHEZ J C, ROUGE V, PISTEUR F, *et al*. Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1997, 18(3-4): 324-327.
[7] 萨姆布鲁克J, 弗里奇E F, 曼尼阿蒂斯T. 分子克隆试验指南[M]. 金冬燕，等译. 第2版. 北京：科学出版社，1998: 885-886.
[8] FLENGSRUD R, KOBRO G. A method for two-dimensional electrophoresis of proteins from green plant tissues[J]. Anal Biochem, 1989, 177(1): 33-36.

(编辑　薛国文)

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法(即从小数点算起，向左向右每3位分1节，节间留出一定空隙)，废除千分撇分节法(如2,431改为2 431)。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部