技术方法

文章编号:1000-5404(2007)23-2292-02

人肝癌细胞株QGY-7701亚细胞蛋白质组双向电泳技术的建立

袁拥华[1],杨晓兰[1],李 伟[1],李龙江[2],汤为学[2],余 瑜[1] (重庆医科大学:[1]药学院药物化学教研室,[2]基础医学院病理生理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 优化人肝癌细胞株QGY-7701的蛋白质样品制备方法,建立其亚细胞蛋白质组双向电泳技术。**方法** 分步提取人肝癌细胞株QGY-7701细胞质、细胞膜和细胞核蛋白,采用不同的方法除盐、浓缩样品,然后分别采用2种不同的水化上样缓冲液重悬样品,进行双向凝胶电泳。**结果** 使用三氯乙酸/丙酮的除盐效果好,样品损失少;采用上样缓冲液(7 mol/L尿素+2 mol/L硫脲+4% CHAPS+40 mmol/L Tris+65 mmol/L DTT+2%两性电解质)有利于蛋白的溶解,获得更多的蛋白信息,检出的细胞质蛋白点数可达(995±53),细胞膜蛋白点数可达(1 035±58),细胞核蛋白点数可达(893±45)。**结论** 获得了清晰的人肝癌细胞株QGY-7701亚细胞蛋白质组双向电泳图谱。

蛋白质组学(proteomics)概念自1994年提出以来,得到了突飞猛进的发展[1]。然而,整个细胞的蛋白组成极其复杂,直接对其进行蛋白质组学分析,会丢掉很多蛋白质信息,由此衍生出了亚细胞蛋白质组学[2,3]。本研究采用亚细胞抽提试剂盒,分步提取人肝癌细胞株QGY-7701细胞质、细胞膜、细胞核蛋白,并分别进行双向电泳,通过比较不同的样品处理方法,旨在为以该细胞株为模型的药物蛋白质组学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

亚细胞抽提试剂盒购自美国Merk公司,固相pH梯度胶条(IPG干胶条,pH 3~10,线性,L=17 cm)购自美国Bio-Rad公司;水化上样缓冲液Ⅰ(8 mol/L尿素+4% CHAPS+40 mmol/L Tris+65 mmol/L DTT+2%两性电解质)、水化上样缓冲液Ⅱ(7 mol/L尿素+2 mol/L硫脲+4% CHAPS+40 mmol/L Tris+65 mmol/L DTT+2%两性电解质)均为自制。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞质、细胞膜、细胞核蛋白质制备 人肝癌细胞株QGY-7701生长于含10%小牛血清的RPMI1640培养液中,待细胞培养至对数生长期,用亚细胞抽提试剂盒1次分步提取细胞质、细胞膜、细胞核蛋白,取少量上清液用Bradford法测定总蛋白质的浓度[4]。

1.2.2 样品除盐浓缩 丙酮沉淀:于提取液中加入4倍体积的冰丙酮,使蛋白在-20 ℃沉淀至少2 h,18 000×g,4 ℃离心15 min。三氯乙酸/丙酮沉淀:将三氯乙酸加到细胞提取液中,终质量浓度为10%,再加入4倍体积的冰丙酮使蛋白在-20 ℃沉淀至少2 h,18 000×g,4 ℃离心15 min,最后再用冰丙酮清洗沉淀,去除三氯乙酸。

1.2.3 双向电泳及图像分析 按Bio-Rad公司的2-DE操作指南进行双向电泳:被动水化12~16 h,250 V 1 h,1 000 V 1 h,10 000 V 5 h,最后稳定在10 000 V,60 000 Vh下进行等电聚焦。采用文献[5]的方法进行银染。用Amersham ImageMasterVDS-CL型凝胶成像系统进行扫描,PDQuest 7.4.0软件进行图像分析。

1.2.4 蛋白质的鉴定 蛋白斑点经胶内酶解后,用美国ABI公司的Voyager DE-PRO MALDI-TOF质谱仪分析。选择Matrix Science网站提供的搜索引擎Mascot进行查询[6]。

2 结果

2.1 2种不同除盐浓缩方法的结果

采用Bradford法对除盐后的蛋白样品进行蛋白定量,结果见表1。

表1 丙酮沉淀和丙酮/三氯乙酸沉淀后的蛋白浓度

蛋白类型	蛋白浓度(mg/ml)	丙酮沉淀后		丙酮/三氯乙酸沉淀后	
		蛋白浓度(mg/ml)	蛋白损失率(%)	蛋白浓度(mg/ml)	蛋白损失率(%)
细胞质	0.87	0.46	47.13	0.61	29.89
细胞膜	1.03	0.53	48.54	0.69	33.00
细胞核	1.28	0.69	46.09	0.87	32.03

2.2 2种不同水化上样缓冲液的结果

图1~3分别是采用2种水化上样缓冲液所获的细胞质、细胞膜、细胞核蛋白的典型2-DE图。经软件分析,结果显示水化上样缓冲液Ⅰ中得到细胞质蛋白点(976±45)个,细胞膜蛋白点(628±32)个,细胞核蛋白点(875±41)个;水化上样缓冲液Ⅱ中得到细胞质蛋白点(995±53)个,细胞膜蛋白点(1 035±58)个,细胞核蛋白点(893±45)个。

基金项目:国家自然科学基金(30371632)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371632)

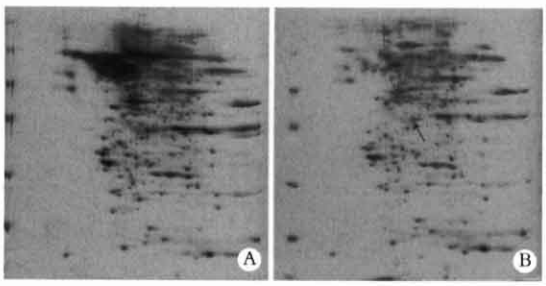
作者简介:袁拥华(1977-),女,湖北省松滋市人,博士研究生,药剂师,主要从事药物蛋白质组学方面的研究。电话:(023)68485808,E-mail:yonghuayuancq@163.com

通讯作者:余 瑜,电话:(023)68485808,E-mail:yuyu@163.com

收稿日期:2007-05-31;**修回日期**:2007-09-03

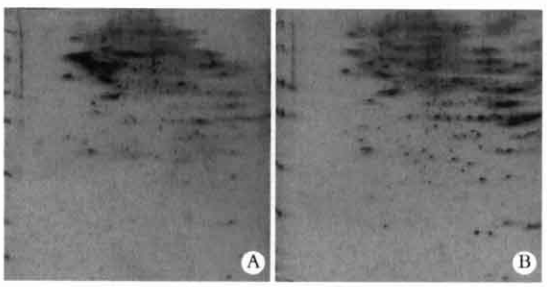
2.3　蛋白点的鉴定结果

由于质谱鉴定差异蛋白点的成功与否受到多方面的影响，尤其是蛋白显色方法的选取。为此，我们挖取图 1B 中（↑）的蛋白点进行质谱分析，结果成功确定该蛋白为 L-lactate dehydrogenase B chain。



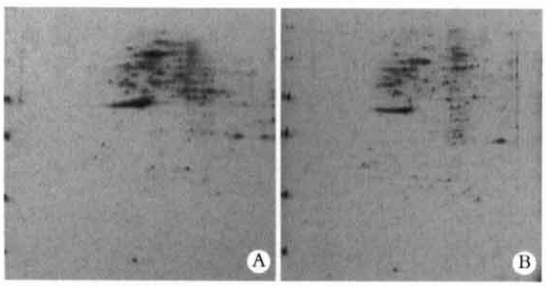
A：水化上样缓冲液Ⅰ；B：水化上样缓冲液Ⅱ　↑：蛋白点

图 1　2 种水化上清液所获的 QGY-7701 细胞质蛋白



A：水化上样缓冲液Ⅰ；B：水化上样缓冲液Ⅱ

图 2　2 种水化上清液所获的 QGY-7701 细胞膜蛋白



A：水化上样缓冲液Ⅰ；B：水化上样缓冲液Ⅱ

图 3　2 种水化上清液所获的 QGY-7701 细胞核蛋白

3　讨论

蛋白质样品的制备是双向电泳成败的关键环节[7]。在其他试验条件相同的情况下，不同样品处理方法有不同的双向电泳图谱。由于试剂盒提取的蛋白浓度低且含盐多，直接将样品与水化上样缓冲液混匀，进行双向电泳，等电聚焦时不能达到预设的电压值。故应对样品进行除盐、浓缩处理。本实验比较了 2 种不同的除盐方法[8]，结果显示 2 种方法除盐后电压都可以达到 10 000 V 并稳态聚焦，减少盐离子造成的横条纹的产生，提高电泳图谱的质量。但由于丙酮沉淀后，样品损失较大，因此，我们选择丙酮/三氯乙酸沉淀法进行除盐处理。

由于细胞质、细胞膜、细胞核各组分具有不同的溶解性能，这些不同的细胞组分需要不同的水化上样缓冲液。因此，本实验比较了两种水化上样缓冲液（Ⅰ/Ⅱ），结果显示，水化上样缓冲液Ⅱ对人肝癌细胞 QGY-7701 细胞质、细胞膜、细胞核蛋白的溶解所获得的蛋白点数比水化上样缓冲液Ⅰ多，尤其对细胞膜蛋白，蛋白点数增加 39%。水化上样缓冲液Ⅱ与上样缓冲液Ⅰ的不同，在于将 8 mol/L 尿素换成 7 mol/L 尿素，同时增加了 2 mol/L 的硫脲，这说明尿素、硫脲的合用可以增加膜蛋白的溶解，获得更多的蛋白信息。

蛋白显色方法的选择也会直接影响着最后的质谱分析。通常考染与质谱分析兼容性较好，但考染的灵敏度较差，低丰度的蛋白很难被显现。目前蛋白组学研究中多采用银染法，银染是一种高度灵敏的染色方法，其种类较多，本实验选用的是改进的低离子浓度的银染显色法，通过选取胶图上的 1 个蛋白点进行质谱分析，获得了有意义的鉴定结果，说明我们的银染方法可以满足后续的质谱分析。因此，本实验从样品除盐、上样缓冲液、染色等对人肝癌细胞株 QGY-7701 亚细胞蛋白质组双向电泳条件进行优化调整，获得了比较理想的细胞质、细胞膜和细胞核蛋白质组双向电泳图谱，比全细胞蛋白质组获得更多的蛋白信息，为进一步以该细胞为模型的药物蛋白质组学研究奠定了良好的基础。

关键词：人肝癌细胞株 QGY-7701；亚细胞蛋白质组；双向电泳

中图法分类号：R466.9　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 贺福初. 蛋白质组（proteome）研究——后基因组时代的生力军[J]. 科学通报，1999，44(2)：113－122.

[2] Jung E，Heller M，Sanchez J C，*et al*. Proteomics meets cell biology：the establishment of subcellular proteomes[J]. Electrophoresis，2000，21(16)：3369－3377.

[3] Taylor S W，Fahy E，Ghosh S S. Global organellar proteomics[J]. Trends Biotechnol，2003，21(2)：82－88.

[4] Brunet S，Thibault P，Gagnon E，*et al*. Organelle proteomics：looking at less to see more[J]. Trends Cell Biol，2003，13(12)：629－638.

[5] Gharahdaghi F，Weinberg C R，Meagher D A，*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.

[6] Kim N，Lee Y，Kim H，*et al*. Potential biomarkers for ischemic heart damage identified in mitochondrial proteins by comparative proteomics[J]. Proteomics，2006，6(4)：1237－1249.

[7] 柏干苹，周丽那，贺伟峰，等. 双向电泳-质谱法寻找类风湿关节炎疾病相关蛋白[J]. 第三军医大学学报，2006，28(7)：726－728.

[8] 汪家政，范　明. 蛋白质技术手册[M]. 北京：科学出版社，2000：8.

（编辑　龙　亮）