技术方法

文章编号:1000-5404(2009)07-0644-02

以双向电泳为基础的肺癌组织差异蛋白分析策略

靳 胜,张 曼,张秀敏,许华林,张 敏,郝 林 (北京世纪坛医院临床检验中心,北京 100038)

摘 要:目的 优化肺鳞癌组织双向电泳方法,进行蛋白图谱差异分析。**方法** 收集癌组织以及癌外周组织标本,通过优化参数和方法,应用双向电泳技术分离组织总蛋白,比较差异蛋白。用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱得到相应的肽质指纹图谱(PMF),并进一步检索数据库。**结果** 获得了分辨率高、重复性好的双向电泳图谱,得到了若干与细胞增生、分化、周期调控或肿瘤发生有关的蛋白。**结论** 建立了肺鳞状细胞癌组织的双向电泳方法。

目前对肺癌的研究多数是针对单个基因和蛋白的分析,缺乏整体水平的研究,而蛋白质的功能往往是多种蛋白质共同作用的结果。近年来以双向凝胶电泳和质谱技术为基础的蛋白质组学手段在肿瘤研究中受到越来越多的重视[1,2]。我们将蛋白质组学技术应用于肺鳞癌组织的差异蛋白分析,并进一步利用不同pH区间的预制干胶条分析,得到了较稳定可靠的表达图谱和肽指纹图谱鉴定结果,希望以此为探讨肺鳞癌癌变机制及筛选特异性标志物打下方法学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺鳞癌和癌周组织为本院肿瘤中心2004年9月至2006年7月手术标本,经病理诊断分型,其中癌周标本6例,癌浸润组织标本6例。试剂:二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒、两性电解质为伯乐公司产品,二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、考马斯亮蓝购自Sigma公司,固相pH(酸碱性)梯度干胶条(IPG Strip; pH 3~10、pH 4~7、pH 7~10,11 cm)。仪器:BioRad公司PROTEAN IEF Cell等电聚焦仪、PROTEAN Ⅱ xi 2-D Cell垂直电泳槽、GS-800 Calibrated Densitometer凝胶成像系统。用PDQuest2D分析软件进行凝胶图像分析。

1.2 方法

1.2.1 组织标本的获得及处理 准确判定肿瘤和正常组织,避开肿瘤溃烂部分,保证取材位置在肿瘤中心附近(主要病变区,以肿瘤的活跃区为重点);外周组织位于癌组织外围较远部分。取材后立即处理,生理盐水冲洗组织,液氮保存。

1.2.2 组织总蛋白的提取 取30~60 mg组织样品于液氮下充分研碎至粉末状,置于裂解液500 μl(9 mol/L Urea + 4% CHAPs + 65 mmol/L DTT + 0.5%两性电解质)静置15 min,充分涡轮混匀,在液氮中反复冻融3次,然后加入RNase(50 mg/L)以及DNase(100 mg/L)在4 ℃静置15 min,15 000 r/min 4 ℃离心20 min,用BCA蛋白定量液定量,分装后-80 ℃备用。

1.2.3 双向凝胶电泳 等电聚焦(isoelectric focusing,IEF)参照BioRad公司操作指南进行,取pH 3~10、pH 4~7、pH 7~10的11 cm预制胶条分别进行电泳分析。IEF后取出胶条分别于第1、2步平衡液中振摇15 min,将平衡后的胶条移至12%的凝胶上端SDS-PAGE垂直电泳,考马斯亮蓝R250染液(考马斯亮蓝0.25%,甲醇50%,醋酸10%)染色过夜,然后脱色直至背景清晰。

1.2.4 图像分析 利用GS-800 Calibrated Densitometer凝胶成像系统获取图像,用PDQuest2D软件对图像进行背景消减,斑点检测、匹配以及斑点位置重复性分析。

1.2.5 胶内酶解制备样品 用剪刀将200 μl Eppendorf吸头尖端剪掉约0.3 cm,用剪断后的吸头从凝胶上戳取蛋白质点,转入200 μl离心管中,每管中加入50 μl脱色液(50%乙腈,25 mmol/L碳酸氢钠);室温放置30 min,吸去脱色液重复以上步骤直至凝胶无色透明。抽真空离心干燥30 min至白色颗粒状,加入10 μl(浓度为10 ng/μl)溶于25 mmol/L碳酸氢钠溶液的胰蛋白酶(Promega公司,测序级),37 ℃孵育30 min,吸去多余液体每份标本再加入8 μl 5%三氟乙酸(ACROS公司),37 ℃孵育1 h,将液体吸净转入另一新离心管中;再次加入8 μl 2.5%三氟乙酸/50%乙腈,37 ℃孵育1 h,将液体吸净与上次所得液体合并;抽真空离心干燥样品,用2 μl的0.5%三氟乙酸充分溶解肽段进行质谱鉴定。

1.2.6 据库查询 将质谱结果在互联网上用MASCOT软件在相关数据库进行肽指纹图谱分析查询检索(http://www.matrix-science.com),肽指纹图谱允许误差0.3 D,相对分子质量允许误差±20%,物种人类。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示,应用SPSS 10.0统计软件对胶蛋白数目进行t检验。

2 结果

2.1 肺鳞癌组织的双向电泳结果及图谱

相同条件下我们对同一份肺鳞癌组织蛋白进行3次重复

作者简介:靳 胜,男,河南省开封市人,硕士,主管技师,主要从事肿瘤的多药耐药机制及其逆转方面的研究,发表论文6篇。电话:(010)63926391,E-mail:js14446@yahoo.com.cn

通信作者:张 曼,电话:(010)63929389,E-mail:manzhang1962@yahoo.com

收稿日期:2008-05-22;修回日期:2008-07-01

实验，得到的蛋白质点数为(346 ± 14)，匹配点数为 (307 ± 12)，匹配率达 76%。蛋白质点在位置上有较好的重复性。选取位置清晰的蛋白点与其他 2 次试验图谱进行对照，在 IEF 方向偏差是(0.98 ± 0.27) mm，SDS-PAGE 方向偏差是(1.23 ± 0.22) mm。如果将窄 pH 范围 2 块胶的蛋白质点的数目相加其和大于 1 块 pH 3 ~ 10 胶上的蛋白质点数目。见图 1。

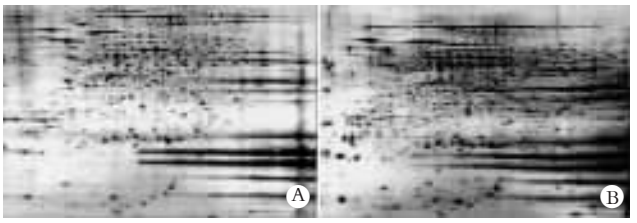


图 1　外周组织(A)与鳞癌组织(B)双向电泳图谱(pH 3 ~ 10)

2.2　癌组织与外周组织总蛋白的双向凝胶电泳图谱比较分析

对所有的标本进行电泳重复分析，发现癌周组织所获得的蛋白点数目要低于癌组织(图 1)。在癌周正常组织中蛋白点数为(285 ± 11)，而肺鳞癌组织则为(322 ± 12)，经 t 检验差异有统计学意义($P < 0.05$)。经过比较获得了若干稳定的重复表达的差异蛋白，其在窄 pH 范围的胶条中的表达也具有较好的重复性。

2.3　质谱鉴定结果

选择较为典型的 10 个蛋白点进行质谱鉴定，其中 8 个肿瘤组织高量表达(5 倍以上)，2 个在癌外周组织中有差异高量表达。选取空白胶以及 3 块胶上匹配的点作为对照，对这 10 个点进行 MALIDI-TOF 质谱分析鉴定。表 1 为部分质谱分析所得鉴定结果，在 10 个点中有与细胞增生、分化或肿瘤发生等有关的蛋白质，如 GADPH、VHL 等。VHL 蛋白在正常外周组织中表达量较高，而在癌组织标本中表达降低。

表 1　部分质谱分析结果

差异蛋白点	氨基酸数目	等电点	相对分子质量	名称
1	335	8.57	36 030	GADPH
2	248	4.68	27 757	VHL
3	222	7.96	19 813	MN-SOD

3　讨论

在相同的电泳条件以及检测方法下，由于样品处理技术不同而获得蛋白质量不同，亦会得到效果不同的图谱。最初我们加入 40 mmol/L Tris 缓冲液[3,4]，Tris 增加离子浓度延长了胶条的聚焦时间；减掉 Tris 后提高尿素浓度至 9 mol/L，取得了较好的聚焦效果，这可能是因为尿素浓度提高有利于蛋白溶解。但这种选择是否是一个好的尝试，有待进一步研究证实。图 1 示差异蛋白在 PI 4 ~ 8 分布最为密集，进一步应用窄 pH 范围的胶条获得了更好的分离效果，蛋白质的重复性和符合度也较为满意。这说明使用窄范围 pH 胶条对组织蛋白进行进一步的分析是一种合理有效的方法，可以克服一些双向电泳技术本身固有的弱点，有利于结果准确性的提高。

双向电泳的重复性问题影响到不同实验室之间的系统数据交流。本实验取得了较好的重复性，但在 SDS-PAGE 方向偏差要大于 IEF 方向，主要的原因可能是没有采用商品化的二向 SDS-PAGE 凝胶，而是采用了自制的凝胶。在实验中，虽然我们采用了很多方法希望优化结果，但实际上还存在许多问题，比如水平条纹等，有待我们进一步的提高。

本实验建立了较稳定的双向电泳技术用于肺鳞癌组织标本的鉴定分析，发现蛋白质表达的数目和病程发展一致。在 pH 3 ~ 10 胶条实验基础上进一步应用窄 pH 值胶条对肿瘤组织进行研究，得到了较深入的实验结果，同时也对差异蛋白点进行了初步验证。

本研究的 MALIDI-TOF 质谱分析鉴定所得到的蛋白，如 VHL 蛋白参与细胞生长分化的多个过程，是 P53 的负调节因子，在多数肿瘤发生、发展过程中与病程发展成负相关，虽机制未明但可以肯定的是它是一个人类上皮细胞标志物[3]。本研究还发现 MN-SOD 等在肿瘤组织中表达上调，GAPDH 在病程发展中表达下降，和相关文献报道一致，说明蛋白质组学技术对于肿瘤学的研究具有其优势[2,4]。但要进一步确认这些差异蛋白质是否与癌变过程相关，还需扩大样本量进行进一步的分子生物学以及临床标本的实验。本研究表明新兴的蛋白质组学技术如果与经典的分子生物学技术相结合，将有利于寻找癌前病变进展的相关标志物，也有助于理解癌前病变进展的生物学行为，并为最终防治癌变提供线索。

关键词：双向电泳；肺鳞状细胞癌组织；蛋白质组
中图法分类号：R730.43　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Swinbanks D. Government backs proteome proposal[J]. Nature, 1995, 378(6558):653.

[2] Rai A J, Gelfand C A, Haywood B C, *et al*. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples[J]. Proteomics, 2005, 5(13):3262 - 3277.

[3] Hansen W J, Ohh M, Moslehi J, *et al*. Diverse effects of mutations in exon II of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene on the interaction of pVHL with the cytosolic chaperonin and pVHL-dependent ubiquitin ligase activity[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(6):1947 - 1960.

[4] 周建荣，魏莲枝，李银平，等. 不同分化喉鳞状细胞癌蛋白质组差异表达的研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(6)：519 - 521.

（编辑　栾　嘉）