维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)12-1268-04

结肠癌蛋白质双向电泳技术的建立

马国中[1],王继生[1],周成林[2]

(1. 四川绵阳市第三人民医院普通外科,绵阳 621000;2. 重庆医科大学药学院,重庆 416000)

【摘 要】目的:建立结肠癌双向电泳技术。方法:利用不同体积的裂解液提取结肠癌中的蛋白质,并通过不同的蛋白质上样量(1mg,2mg,3mg),不同样品制备方式,进行双向电泳,考马斯亮蓝染色,图谱分析。结果:在等电点 3~10,分子量 6.5~200ku 范围内分离得到蛋白质斑点为,1mg 蛋白质上样量为 658 个蛋白质斑点,2mg 为 820 个,3mg 为 845 个斑点。2mg 蛋白质上样量的双向电泳图谱更清晰,分离更好。制备方式 2 可以满足双相电泳的需要。结论:成功建立了结肠癌蛋白质的双向电泳技术。

【关键词】蛋白质组学;双向电泳;结肠癌

【中国图书分类法分类号】Q51,R322.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-04-18

Establishment of a two-dimensional electrophoresis technology on colon carcinoma

MA Guozhong, et al

(*Department of General Surgery, the Third Hospital of Mianyang*)

【Abstract】*Objective*: To establish a two-dimensional electrophoresis technology tissue protein of colon carcinoma. *Methods*: Lysis buffer of different volume was taken to extract tissue proteins of colon carcinoma, and different protein quantities (1mg, 2mg, 3mg) different preparation ways were taken to establish a two-dimensional electrophoresis. Coomassie brilliant blue was applied to stain protein, and patterns were analyzed. *Results*: With a molecular mass between 6.5~200ku and isoelectric points (pI) from 3~10, 1mg proteins obtained 569 protein spots, 2mg 786, and 3mg 835. Pattern of 2mg protein and the sample two were the best. *Conclusion*: A two-dimensional electrophoresis technology on tissue protein of colon carcinoma has been established successfully.

【Key words】 Proteomics; Two-dimensional electrophoresis; Colon carcinoma

结肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤。以 40~50 岁年龄组发病率最高。由于结肠癌具有易复发,复发后恶性程度增高等生物学特性,极大地威胁着患者的生命安全。所以结肠癌的临床处理迄今为止仍然是世界性难题,对结肠癌的病理机制了解有助于临床的诊断和治疗。比较蛋白质组学可以从整体上了解结肠癌的蛋白质变化,有助于了解结肠癌发生的病理机制。蛋白质组学的核心是双向电泳(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术。双向电泳由 O'Farrell[2]于 1975 年首次建立,可同时分离数千种蛋白,后经 Anderson 实验室及其他实验室改进与提高,特别是近年来固相 pH 梯度(Immobilized pH gradient, IPG)胶条的运用,使这一技术日趋完善,从而使今天的蛋白质组研究得以顺利实施[3]。

作者介绍:马国中(1955-),男,副主任医师,
主要研究方向:结肠癌的基础及临床研究。

本实验选取 6 例经过手术切除癌组织为研究对象,其中男性患者 3 例,女性患者 3 例,病例之间无差异。根据变换不同体积的裂解液提取蛋白质,以及不同的上样量,不同的制备方法等因素,分别对上述结肠癌组织蛋白质提取、双向电泳和检测方法等多个关键步骤进行优化,为后续实验研究提供有力的保障。

1 材料与方法

1.1 实验设备

CP 100MX Preparative ultracentrifuge 制备型超速离心机(日本 Hitachi 公司),UV-2501PC 紫外分光光度计(日本岛津公司), PROTEAN IEF cell 型等电聚焦仪(BIO-RAD 公司),PROTEAN - II[R]XI Cell 型垂直电泳槽(BIO-RAD 公司产品),DDY-10C 型电泳仪(北京市六一仪器厂),Amer

维普资讯 http://www.cqvip.com

sham ImageMasterVDS-CL 型凝胶成像系统（瑞典 Amersham 公司），DKZ-2 型电热恒温振荡水槽（上海精宏实验设备有限公司），PDQuest 7.4.0 分析软件（美国 BIO-RAD 公司）。

1.2 试剂和材料

固相 pH 梯度胶（immobilized pH gradient gel，IPG gel）：pH3~10 线性（linear，L）17cm IPG 预制胶条、20%（w/v）两性电解质（ampholyte）购自美国 BIO-RAD 公司。蛋白质分子量标准（宽）Marker 购自宝生物工程（大连）有限公司，丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、二硫苏糖醇（DTT）购自 BBI 公司。过硫酸胺（APS）、甘氨酸（Glycine）、苯甲基磺酰氟（PMSF）、尿素（Urea）、硫脲（Thiourea）、3-[（3- 胆酰胺丙基）- 二乙胺]- 丙磺酸（CHAPS ）、十二烷基硫酸钠（SDS）购自生工生物工程（上海）有限公司，N，N，N'，N'- 四甲基乙二胺（TEMED）、乙二氨四乙酸（EDTA）为 AMRESCO 公司分装，考马斯亮蓝 R-250、三羟基甲基氨基甲烷（Tris）为 USB 公司分装，碘乙酰胺购自 Fluka 公司，其他化学试剂均为国产分纯。

1.3 溶液配制

1.3.1 样品裂解液（参照国外的文献报道，略作改进[3]）7mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、4% CHAPS，10mmol/LDTT，1mmol/L EDTA、1mmol/L PMSF，40mmol/L Tris-base，-20℃保存。

1.3.2 IPG 胶条水化上样缓冲液 7mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、4%（w/v）CHAPS、65mmol/L DTT、0.001% 溴酚蓝、0.2% Bio-Lyte。

1.3.3 IPG 胶条平衡缓冲液母液 0.375mol/L Tris-HCl（pH 8.8），6mol/L 尿素、20% 甘油、2%SDS，-20℃保存。胶条平衡缓冲液 I：使用前在 10 ml 胶条平衡缓冲液母液中加 200mg DTT。胶条平衡缓冲液 II：使用前在 10ml 胶条平衡缓冲液母液中加 250mg 碘乙酰胺。

1.3.4 SDS-PAGE 电泳缓冲液 25mmol/L Tris，192mmol/L Glycine，0.1%（w/v）SDS。

1.3.5 考马斯亮蓝染色 固定液：40% v/v 乙醇，10% v/v 乙酸。染色液：0.1%（w/v）考马斯亮蓝 R-250，25%（v/v）异丙醇，10%（v/v）冰醋酸。脱色液：25%（v/v）乙醇，8%（v/v）乙酸。

1.4 研究对象

6 例结肠癌患者手术取肿瘤病灶组织，用预冷 MilliQ 水冲洗瘤体中残留的血液，称重后液氮速冻，贮存于 -80℃冰箱中备用。

1.5 蛋白质样品的制备

在液氮冷冻条件下用研钵将样品研成粉末，每 1g 样品分别加入 5ml 裂解液，用玻璃匀浆器在冰浴中进行匀浆。匀浆液于 4℃，12，000g 离心 15min 得样品 1（制备方式 1）；吸取上清液于 4℃，150，000g 超速离心 60min，撇开上层悬浮的脂质层得样品 2（制备方式 2），吸取上清液于 4℃，60，000g，离心 60min，取离心上清液得样品 3（制备方式 3），分别贮存于 -80℃冰箱中备用。

1.6 蛋白质定量

采用 Bradford 法进行蛋白质定量[4]。以牛血清白蛋白（BSA）为标准蛋白，配成浓度为 1μg/μl 的溶液。分别取 10、20、40、60、80、100μl 标准蛋白溶液。加入 1~6 号具塞试管，用 MilliQ 水定容至 100μl，配成浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1μg/μl。以 100μlMilliQ 水为空白对照。各管分别加入 5 ml Bradford 工作液：0.01% 考马斯亮蓝 G-250、4.7% 乙醇（v/v）、8.5% 磷酸（v/v）充分混匀，放置 5min，于 595nm 处测吸光度，20min 内测完。以蛋白浓度为横坐标（x，μg/μl），吸光度为纵坐标（y，A_{595}），作标准曲线，获得线性方程；测出待测样品的 595nm 处吸光度值。

1.7 双向电泳（2-DE）

1.7.1 第一向 等电聚焦电泳（IEF）主要参考 BIO-RAD PROTEAN IEF cell 型等电聚焦仪操作指南进行。本实验采用固相 IPG 预制的线性 17cm 干胶条（pH3~10，L）。取 3 份正常结肠癌样品，蛋白质含量分别为 1mg，2mg，3mg，并使水化上样缓冲液和样品总体积为 400μl，进行电泳。

用 PROTEAN IEF cell 型等电聚焦仪，在 17℃条件下，按表 1 参数设置进行第一向。

表 1 IEF 参数设置

步骤（Step）	电压（V）	时间（h）	作用（function）
0	0	14	被动水化
1	250	0.5	除盐
2	1000	1	除盐
3	10000	5	升压
4	10000	6	等电聚焦
5	500	1~2	保持

1.7.2 胶条平衡 等电聚焦后，从电泳槽中取出 IPG 胶条，分别在胶条平衡缓冲液 I、II 中平衡 15min，然后用滤纸吸掉胶条上多余的平衡液。

1.7.3 第二向 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳（Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS- PAGE）将平衡后的胶条在电泳缓冲液中浸泡大约 5s 后转入预先灌制好的 12%SDS-PAGE 分离胶上，在 PROTEIN-II®XI Cell 上进行垂直方向的第二向电泳，设置参数见表 2。

表 2 SDS-PAGE 参数设置

步骤	电压（V）	电流（mA）	功率（W）	时间（h）
1	100	10	50	1
2	300	50	50	7

1.7.4 考马斯亮蓝 R-250 染色 在固定液中固定，经染色液染色，然后在脱色液中脱色，直至凝胶背景变为无色。

1.7.5 凝胶图象分析 采用 Amersham ImageMaster VDS-CL 型凝胶成像系统对考马斯亮蓝 R-250 染色后的 2-DE 胶进行扫描，PDQuest 7.4.0 图像分析软件进行分析，进行蛋白斑点检测，凝胶匹配，根据 Normalized Volume 值的变化来判断蛋白斑点表达量的变化。

维普资讯 http://www.cqvip.com

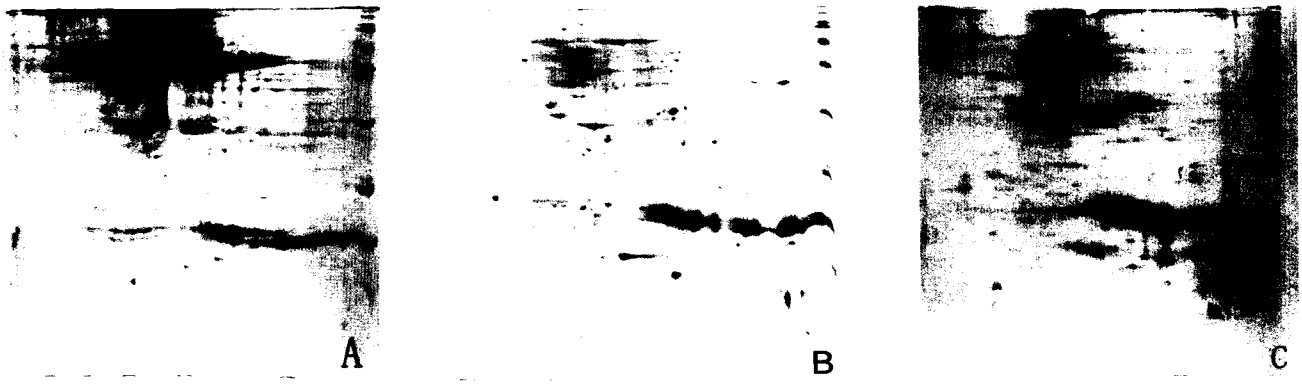
2 结 果

2.1 不同上样量的 2-DE 图谱

按制备方式 3 所得样品经双向电泳、凝胶成像、图像分析，蛋白质上样量为 1mg、2mg、3mg 蛋白质斑点数检测结果分别是：569，786 和 845(图 1)。电泳结果表明，采用 2mg 蛋白质上样量较 1mg 蛋白质斑点数明显增加，3mg 上样量高丰度蛋白质的斑点过大，会造成交叉、重叠，影响其它蛋白质点的分离和分析。综合考虑本实验选择 2mg 的蛋白质上样量。

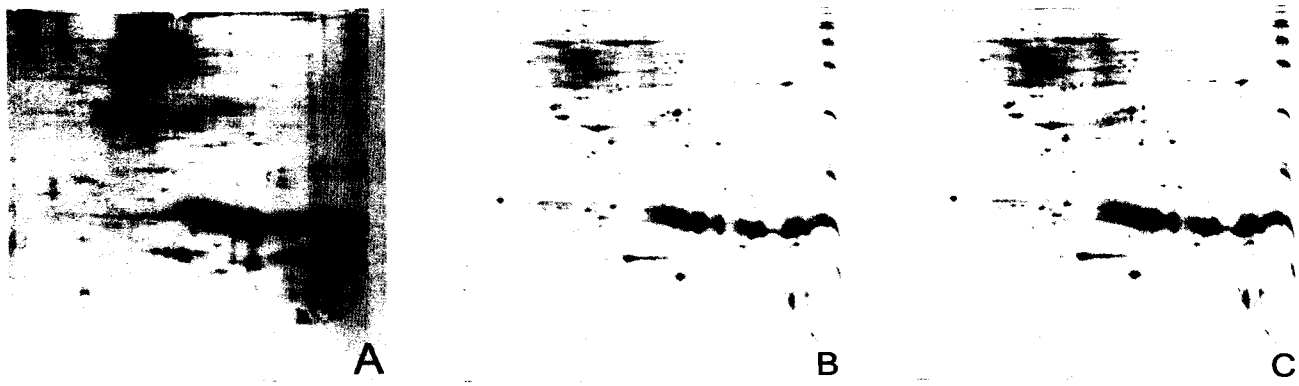
2.2 不同制备方式所得到的 2-DE 图谱

按 1.5 项处理分别得样品 1、样品 2、样品 3，蛋白质上样量为 2mg 蛋白质斑点数检测结果分别是：576，787 和 798(图 2)。电泳结果表明，采用样品 2 的制备方式较样量 1 蛋白质斑点数明显增加，样品 1 蛋白质的斑点过大，造成交叉、重叠，影响其它蛋白质点的分离和分析，说明样品 2 的制备方式是可行的，样品 3 和样品 2 所得到的图谱无明显差别，提示可以在样品 2 的基础上不需要进一步处理。



A.1mg; B.2mg; C.3mg

图 1 不同上样量 2-DE 图谱，pH 3~10，线性，17cm IPG 胶条，考马亮蓝染色



A.样品 1； B.样品 2； C.样品 3

图 2 不同样品制备方式的 2-DE 图谱，pH 3~10，线性，17cm IPG 胶条，考马亮蓝染色

3 讨 论

为了获得高分辨和重复性好的 2-DE 图谱，样品的制备显得十分关键。制备样品时，应尽量使所有待分析的蛋白样品处于溶解状态(包括多数疏水性蛋白)，因此，裂解液的选择和配方的优化是一个重要的环节。我们在进行结肠癌蛋白质组学研究时，首先对病灶细胞蛋白质样品提取、水化上样、等电聚焦、电泳、凝胶固定及染色、脱色等进行了研究和实验条件优化。

组织样品裂解方法包括超声裂解法[5]、研磨法[6]、机械匀浆法、玻璃珠匀浆法等。我们最终采用液氮

维普资讯 http://www.cqvip.com

冻存组织,混合液氮研磨成粉末,加入样品裂解液再匀浆的方法,取得了比较满意效果。

为获得高质量的 2-DE 图谱,必须将结肠癌中中脂类尽可能除去。采用盐析沉淀蛋白质可以达到除去脂类的目的,但是许多蛋白质在高盐溶液中也是可溶的,这样就会造成蛋白质的丢失,并且残留的盐类成分会干扰等电聚焦。因此,此方法只能用来预分离或富集蛋白,不适合 2-DE 样品的制备。我们在文献[1]的基础上进行改进,采用低温超速离心,取得了良好的去脂效果。

为了取得良好的等电聚焦效果,蛋白质必须完全溶解和解聚。因此,裂解液选择显得十分重要。裂解液含有变性剂、表面活性剂、还原剂、两性电解质以及蛋白质酶抑制剂等。其基本成分包括:尿素,一种或几种去污剂。尿素是一种中性促溶剂,能使许多种蛋白溶解并展开来,形成完全随机的结构,所有的离子基团暴露在溶液中。对于较难溶解的蛋白,使用硫脲可以显著增加其溶解性,尤其是膜蛋白,由于其水溶性差,而在尿素浓溶液中其可溶性很好,因此,尿素 - 硫脲合用提高了溶解样品的能力。还原剂 DTT 也可增强样品的溶解性,它可以断裂二硫键,以保持蛋白处于一种还原状态。载体两性电解质(carrier ampholytes)通过电荷与电荷之间的相互作用减少蛋白聚合来增强其溶解性。

为了确保样品的完全溶解和防止通过疏水反应而使蛋白质相互作用导致蛋白质聚合。在样品溶液中必须使用非离子或兼性离子去污剂。兼性去污剂 CHAPS 效果较好。SDS 作为阴离子去污剂,对于膜蛋白的溶解非常有效,但由于其阴离子特性,必须和其它去污剂合用。

样品预处理过程中,超速离心将核酸去除。为了防蛋白质水解,还需加蛋白酶抑制剂,由于每一种蛋白酶抑制剂仅对一类蛋白酶发生作用,所以,我们采用由 1mmol/L EDTA,1mmol/L PMSF 组成的复合蛋白酶抑制剂,其中,PMSF 不可逆抑制丝氨酸水解酶和一些半胱氨酸水解酶,EDTA 抑制金属蛋白酶,获得了比较理想的结果。

上样量的大小是的 2-DE 图谱效果的一个重要因素,这与胶条的长度、pH 范围及染色方法等有关。上样量过低,易造成有些蛋白斑点模糊不清甚至无法显示;上样量提高有利于低丰度蛋白质的检测,但上样量过高,高丰度蛋白质的斑点过大,会交叉、重叠,影响其它蛋白质点的分离和分析。同时,还必须考虑到所用染色方法的灵敏度,进而决定合适的蛋白质上样量。一般来说,考马斯亮蓝染色上样量可达 1~3mg,经过分析比较,我们最终选择上样量为 2mg,取得了良好的效果。水化液需当天新鲜配制。尿素溶液加热温度不能超过 37℃,否则蛋白会发生氨甲酰化,引起蛋白质等电点(pI 值)的偏移。

2-DE 在分离蛋白质时必须具有很高的重复性和分辨率。1975 年,虽然应用于全细胞或组织蛋白质混合物分析的双向电泳已形成,但由于生成 IEF pH 梯度的合成载体两性电解质(synthetic carrier ampholyes,SCA)的重复性很难控制,限制了 2-DE 分离的重复性,且 SCA 分子相对较小,在 IEF 过程中易形成“阴极漂移现象”,导致 pH 不稳定。BIO-RAD 公司生产的固相化 pH 梯度(immobilized pH gradient,IPG)胶条则很好地解决了这个问题。我们使用 pH 3~10 的 IPG 线性胶条,得到了较好的图谱。

IEF 过程中聚焦电压是关键的因素之一。17cmIPG 胶条达到 8000V 以上,等电聚焦效果较好。蛋白质样品的纯度、上样量的大小与等电聚焦的电压高低有相关性。在设置的时间内,如果达不到最低的聚焦电压,可通过延长除盐时间和搭盐桥的方法来解决。

综上所述,本实验建立了结肠癌蛋白质组双向电泳技术平台。我们对样品裂解液组成、样品处理、上样量、IPG 胶条和 IEF 参数、凝胶染色方式等相关技术进行了优化后,以固相化 pH 梯度等电聚焦为第一向和 SDS-PAGE 垂直电泳为第二向,成功地得到了结肠癌蛋白质双向电泳图谱,该方法具有很强的代表性,为后续结肠癌比较蛋白质组学研究提供了技术保障。

参 考 文 献

[1] 李占霞,杨 翔,张国峰. 结肠癌抗血管生成治疗研究进展[J]. 中华普通外科志,2006;15(9):707-709.

[2] O,Farrell PH.High resolution two-dimensional eletrophoresis of proteins[J]. J Biol Chem,1975;250(10):4007.

[3] Bjellqvist B,Ek K,Righetti P G,et al. Isoelectric focusing in immobilized pH aradient:principle,methodology and some applications[J]. J Biochem Biophys Meghods,1982;6(4):317-339.

[4] Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation[J]. Methods Mol Biol,1994;32(1):9-15.

[5] Corg A,Postel W,Gunther S.The current state of two-dimen-

(下转第 1310 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

肺萎陷,肺通气明显减少,以及缺氧性肺血管痉挛等因素可以引起肺组织炎症反应。

3.2 SIRS 引起 ALI 的机制

严重的 SIRS 可以诱发 ALI[1],在实验中,我们也观察到,一般在食管癌切除术后前 3 天内,呼吸功能同术前比较有不同程度降低,表现在氧饱和度降低,$PaO2/FiO_2$ 降低,氧分压下降。炎症介质在炎症反应中起重要作用,炎症介质之间的相互作用形成炎症瀑布反效应. 当超过机体的代偿能力时,出现过度的炎症反应, 引起广泛的组织细胞损伤 [3-5]。①IL-6 又名 B 细胞刺激因子,具有广泛抑制炎症和免疫调节作用, 研究表明,IL-6 作为炎性细胞分化的主要调节因子, 促进激活的巨噬细胞分化和浸润,还可以上调黏附分子和其他细胞因子的表达,从而加强炎症反应[6]。②IL-8 是由多种参予炎症反应的细胞产生,是最强的多形核细胞和 T 淋巴细胞激活和趋化因子,Aggarwal[7]等认为中性粒细胞肺部浸润的主要趋化因子是 IL-8。③TNF-a 是一种重要的炎性细胞因子,在多种细胞类型可诱导化学趋化素和黏附因子的表达。TNF-a 作用于血管内皮细胞使之表达粘附子, 同时刺激血管内皮细胞分泌 IL-8、趋化因子,使血液中中性粒细胞、淋巴细胞及单核-巨噬细胞等与血管内皮细胞粘附,进而迁移和外渗至局部组织,引起炎症反应;刺激中性粒细胞、内皮细胞、单核-巨噬细胞、血小板等进一步释放脂质介质、溶酶体、前列腺素等炎性介质,引起或加重炎症反应。研究发现,TNF-a 不仅参予了 SIRS,而且直接损害了肺泡表面活性物质(PS)系统[8]。④中性粒细胞在肺内的聚集和激活被认为是急性肺损伤发生发展的重要原因[9]。活化的 PMN(多形核粒细胞)激活补体和许多细胞因子,可进一步激活 PMN,从而引起复杂炎症反应的瀑布放大效应。活化的 PMN 黏附并穿透肺血管内皮细胞后开始脱颗粒,释放髓过氧化氢酶、弹性蛋白酶、乳铁蛋白、氧自由基(OFR)等破坏肺组织,使肺毛细血管通透性增加,导致间质水肿,活化的 PMN 还可以激活磷脂酶 A2 (PLA2), 产生许多血管活性物质如 LTB4, PAF, 使肺血管收缩, 通透性增加, 并进一步促进 PMN 的黏附。

(通讯作者:张在空,副主任医师,重庆市肿瘤研究所胸外科,023-65359434)

参 考 文 献

[1] Haslam PL,Baker CS,Hughes DA,et al.Pulmonary surfactant composition early in development of acute lung injury after cardiopulmonary bypass:prophylactic use of surfactant therapy[J]. Int J Exp Pathol,1997;78(4):277-289.

[2] Beal AL,Cerra FB.Multiple organ failure syndrome in the 1990s,Systemic inflammatory response and organ dysfunction[J]. JAMA,1994;271(3):226-233.

[3] Cavaillon JM,Adib-Conquy M,Fitting C,et al.Cytokine cascade in sepsis[J]. Scand J Infect Dis,2003;35(9):535-544.

[4] Tetta C,Fonsato V,Ronco C,et al.Recent insights into the pathogenesis of severe sepsis[J]. Crit Care Resusci,2005;7(1):32-39.

[5] Summer WR.Severe sepsis:new concepts in pathogenesis and management[J]. Am J Med Sci,2004;328(4):193-195.

[6] Choussat R,Montalescot G,Collet JP,et al. Effect of prior exposure to Chlamydia pneumoniae,or cytomega-lovirus on the degree of inflammation and one-year prognosis of patients with unstable angina pectoris or non-Q wave acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol,2000;86:379-384.

[7] Aggarwal A,Baker CS,Evans TW,et al. G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome[J]. Eur Respir J,2000;15(5):895-901.

[8] 崔社怀,郭先键,钱桂生.肺表面张力与肿瘤坏死因子在急性低氧油酸性肺损伤时的变化[J]. 中国危重病急救医学,2000;12(1):3-6.

[9] Weinacker AB,Vaszar LT.Acute respiratory distress syndrome:physiology and new management strategies[J]. Annu Rev Med,2001;52:221-237.

(上接第 1271 页)

sional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis,1988;9(9):531-546.

[6] Gorg A,Boguth G,Obermaier C,et al. W.Two-dimensional polyacylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension(IPG-DALT):The state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems[J].Electrophoresis,1995;16(7):1079-1086.

[7] T Tsuhi,A Shiozaki,R Kihno,et al. Proteomic profiling and neurodegeneration in Alzhermer's disease[J]. Neurochemical Research,2002;27(10):1245-1253.