维普资讯 http://www.cqvip.com



论 著 文章编号:0253-3626(2007)12-1233-04

# 人肝癌细胞株 QGY-7701 蛋白质组学研究技术及二维电泳图谱的建立

袁拥华[1],李 伟[1],杨晓兰[1],李龙江[2],汤为学[2],黄开顺[3],余 瑜[1]

(1. 重庆医科大学药学院药物化学教研室;2. 重庆医科大学病理生理学教研室;
3. 重庆医科大学基础医学研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立人肝癌细胞株 QGY-7701 蛋白质组学研究技术。方法:利用两种不同的裂解液提取细胞蛋白,进行双向电泳,经 PDQuest 软件分析与比较后,挑选匹配良好的 10 个蛋白点,进行基质辅助激光解析/电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)的鉴定。结果:建立了稳定的人肝癌细胞株 QGY-7701 的双向电泳图谱,裂解液Ⅱ比裂解液Ⅰ提取的蛋白质量多 25%,2-DE 胶上蛋白点数多 32%,从 10 个候选蛋白中鉴定出 9 个有意义的蛋白($P<0.05$)。结论:初步建立了人肝癌细胞株 QGY-7701 的蛋白质组学研究技术,为进一步开展药物蛋白质组学研究奠定基础。

【关键词】人肝癌细胞株 QGY-7701;蛋白质组学;双向电泳
【中国图书分类法分类号】R979.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-02-04

# Establishment of proteomic techniques and two-dimensional electrophoregram of human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7701

*YUAN Yonghua, et al*

(*Department of Medicinal Chemistry, Chongqing Medical University*)

【Abstrac】 *Objective*: To establish proteomic technique system of human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7701. *Methods*: Two different lysis buffer were taken to extract cell proteins. After two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and PDQuest analysis, 10 good-matched protein spots were chosen to be identified by MALDI-TOF-MS. *Results*: A steady 2-DE electrophoregram of hepatocellular carcinoma cell line QGY-7701 was established. Compared with lysis buffer Ⅰ, protein quantities extracted from lysis buffer Ⅱ increased by 25%; protein spots in 2-DE gel increased by 32%. 9 out of 10 candidate protein spots were successfully identified ($P<0.05$). *Conclusions*: Our established proteomic technique of human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7701 can be effectively applied in comparative proteomics of drugs.

【Key words】 Human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7701; Proteomics; 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

蛋白质组学(Proteomics)是指对一个细胞或一个组织基因组所表达的全部蛋白质的研究[1],它在整体水平上研究细胞内的蛋白质组成及其调控规律。其基本技术是利用双向电泳对蛋白进行分离,然后利用质谱等技术进行鉴定。通过比较正常体与病变体、给药前后蛋白质谱的变化,筛选出在各种生理或病理过程中的关键蛋白质,以提供疾病发生、药物作用和药物不良反应的分子机制信息[2,3]。国内外学者已进行了许多关于某一特定组织或细胞蛋白质组学研究[4,5]。本研究拟采用双向电泳、基质辅助激光解析/电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和生物信息学方法构建人肝癌细胞株 QGY-7701 的蛋白质表达谱,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。

作者介绍:袁拥华(1977- ),女,博士生,
主要研究方向:药物蛋白质组学。

基金项目:国家自然科学基金(30371632),
重庆医科大学优秀博士学位论文科研基金。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

固相 pH 梯度胶条(IPG 干胶条,pH3~10,线性,L=17cm)、两性电解质(pH3~10)购自美国 Bio-Rad 公司;

维普资讯 http://www.cqvip.com



α－氰基－4－羟基肉桂酸（CHCA）、蛋白酶抑制剂混合物（Protease inhibitor cocktail）、碘乙酰胺、二硫苏糖醇（DTT）、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸（CHAPS）、三羟基甲基氨基甲烷（Tris）、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自美国 Sigma 公司；尿素、硫脲、甘油、甘氨酸购自上海生工生物工程公司；胰蛋白酶购自 Promega 公司。裂解液Ⅰ（8mol/L 尿素 +4% CHAPS+ 40mmol/L Tris+65mmol/L DTT+2% 两性电解质 +Protease inhibitor cocktail），自制；裂解液Ⅱ（7mol/L 尿素 +2mol/L 硫脲 +4% CHAPS+40mmol/L Tris+65mmol/L DTT+2%两性电解质 +Protease inhibitor cocktail），自制。

Bio-rad protein IEF cell 型等电聚焦仪、Bio-rad protein Ⅱ Xl cell 型垂直电泳槽及 PDQuest 7.4.0 图像分析软件为美国 Bio-Rad 公司产品；Amersham Image Master VDS-CL 型凝胶成像系统为瑞典 Amersham 公司产品。

### 1.2 细胞培养

人肝癌细胞株 QGY-7701，由重庆医科大学病理生理学教研室提供。细胞生长于含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液中，于 37℃、5%$CO_2$、饱和湿度条件下培养。

### 1.3 细胞总蛋白质制备

取对数生长期细胞，倾去培养基，用 4℃预冷的 PBS 洗涤 3 次，吸净 PBS，加入细胞裂解液Ⅰ或Ⅱ，用细胞刮匙刮取并收集细胞裂解液，快速冻融 3～4 个循环，14000g 离心 15min，取少量上清液用 Bradford 法测定总蛋白质的浓度[6]，其余上清液置 -70℃冰箱内保存备用。取等量蛋白进行双向电泳。

### 1.4 双向凝胶电泳

1.4.1 等电聚焦（IEF） 被动水化 12～16h，250V 1h，1000V 1h，10000V 5h，最后稳定在 10000V，60000Vh 下进行等电聚焦。

1.4.2 SDS-PAGE 采用 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳缓冲液为 Tris-Glycine-SDS，以每一胶条 5mA 恒流电泳 1h 后，30mA 恒流电泳直至溴酚蓝前沿到达凝胶底部为止。

1.4.3 染色 考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 1h，脱色液脱色至背景清晰。

### 1.5 图像分析

用 Amersham ImageMasterVDS-CL 型凝胶成像系统采集图像，利用 PDQuest 7.4.0 对图像进行光滑处理，背景消减，斑点检测，匹配。

### 1.6 蛋白质点的肽质量指纹图谱分析

选取 10 个蛋白质点，做好标记后，用含 50%(V/V) $CH_3CN$ 和 25mmol/L $NH_4HCO_3$ 的溶液进行脱色，真空干燥。加入 10μl 胰蛋白酶液，4℃冰箱放置 60min。待酶液完全被吸收，补充 25mmol/L $NH_4HCO_3$ 10μl，37℃水浴 15h。加入 5%(V/V)三氟乙酸(TFA)50μl 于 40℃水浴 1h，吸出上清液。加入 50%$CH_3CN$/2.5%TFA 50μl 于 30℃水浴 1h，吸出上清液，合并上清液，冷冻干燥。制备好的样品用美国 ABI 公司的 Voyager DE-PRO MALDI-TOF 质谱仪分析。

样品溶于 50%$CH_3CN$/0.1%TFA 溶液中，基质 α－氰基－4－羟基肉桂酸（CHCA）用 50%$CH_3CN$/0.1%TFA 溶液配成饱和溶液，基质与样品以 1:1 体积混合，取 1μl 点样于 100 孔不锈钢金属板，风干后进行质谱分析。参数设置如下：反射模式，正离子谱测定，$N_2$ 激光源波长为 337nm，真空度 $2\times10^{-8}$ Torr，离子源加速电压为 25kV，脉冲宽度为 3ns，离子延迟时间 200ns，Grid 75%，Guide Wire 0.25%，激光强度为 1500～2200 内部单位，质谱信号单次扫描累加 100 次。外标采用混合的 Mixture 2 标准液进行相邻校正，内标采用胰蛋白酶的自切峰（MH+：2211.10u 或 2283.18u 或 2299.18u 和 842.51Da）进行两点或单点校正。

### 1.7 数据库查询

通过 Matrix Science 网站提供的搜索引擎 Mascot 进行查询[8]。查询参数：物种来源选择人类；胰蛋白酶水解；酶解片段不完全选择为 1；肽片段相对分子质量最大允许误差控制在 ± 1u。

## 2 结 果

### 2.1 不同裂解液的 2-DE 结果

用 Bradford 法测定总蛋白质的浓度，在细胞数（$1\times10^4$ 个细胞）相同条件下，用裂解液Ⅰ提取的蛋白浓度为 7.8mg/mL，裂解液Ⅱ提取蛋白浓度为 10.2mg/mL。

用 PDQuest7.4.0 软件对所获的图谱进行分析，裂解液Ⅰ方法所获 2-DE 胶上蛋白斑点 579 ± 24 个，裂解液Ⅱ方法所获 2-DE 胶上蛋白斑点 846 ± 33 个，见图 1。

### 2.2 蛋白鉴定结果

从蛋白质点的分布、稳定性考虑，选取图 1 上标示的 10 个蛋白点。从得分情况、匹配率、等电点及分子量、亚细胞定位考核，获得了有意义的 9 个蛋白质（$P<0.05$），见表 1。图 2 为得分最高的 SSP7602 蛋白点（Alpha-enolase）的肽质量指纹图谱。

## 3 讨 论

蛋白质组学研究技术受诸多因素的影响，我们主要从以下几个方面考虑。

### 3.1 细胞裂解液的选择

目前处理细胞的方法多种多样，并没有统一的方法，针对不同的细胞，采用不同的裂解液。在裂解液的选用上主要注意以下几点：1）充分裂解细胞，

维普资讯 http://www.cqvip.com



尽可能多的提高细胞蛋白的溶解度,减少蛋白的损失;2)防止溶液介质中多肽链的人工修饰。3)破坏蛋白质与其它生物大分子的相互作用,并使蛋白质处于完全变性状态。细胞裂解液一般由变性剂、表面活性剂、还原剂及蛋白酶抑制剂组成。经典的细胞裂解液是由 8mol/L 尿素、4% CHAPS、40 ~ 100 mmol/L DTT、40mmol/L Tris 和蛋白酶抑制剂组成,能破坏氢键,使蛋白质去折叠,从而暴露它们的疏水核。

在我们的研究中,主要比较了两种不同的裂解液,一种是经典的裂解液配方(裂解液 Ⅰ),另一种是我们参考文献的裂解液配方(裂解液 Ⅱ)[7],结果发现,相同的细胞数裂解液 Ⅱ 提取的蛋白比裂解液 Ⅰ 多 25%。裂解液 Ⅱ 与裂解液 Ⅰ 的不同在于,将 8mol/L 尿素换成 7mol/L 尿素, 同时增加了 2mol/L 的硫脲。同时,在相同上样量情况下,双向电泳重复试验的结果发现裂解液 Ⅱ 对 QGY-7701 细胞的提取所获得的蛋白点数比裂解液 Ⅰ 多 32%($P$<0.05),由此表明, 尿素 - 硫脲合用有利于细胞的裂解,蛋白质的溶解,增加了 2-DE 胶上蛋白质数量,获得了更为丰富的信息量。

### 3.2 2-DE 加样量的选择

为了提高低丰度蛋白的检出,同时避免高丰度蛋白对低丰度蛋白的掩盖。我们对不同的上样量(1mg,1.5mg,2mg)进行了研究。结果表明,上样量为 1.5mg 时所得结果较为理想。

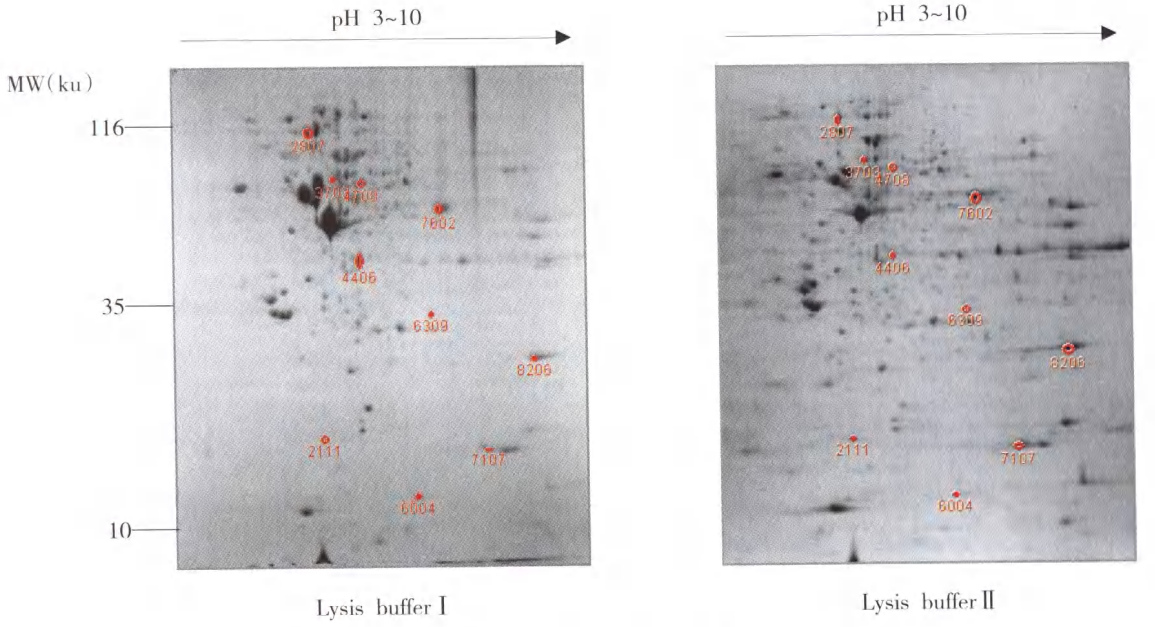



图 1 人肝癌细胞株 QGY-7701 的双向电泳图谱(考马斯亮蓝 R-250 染色)

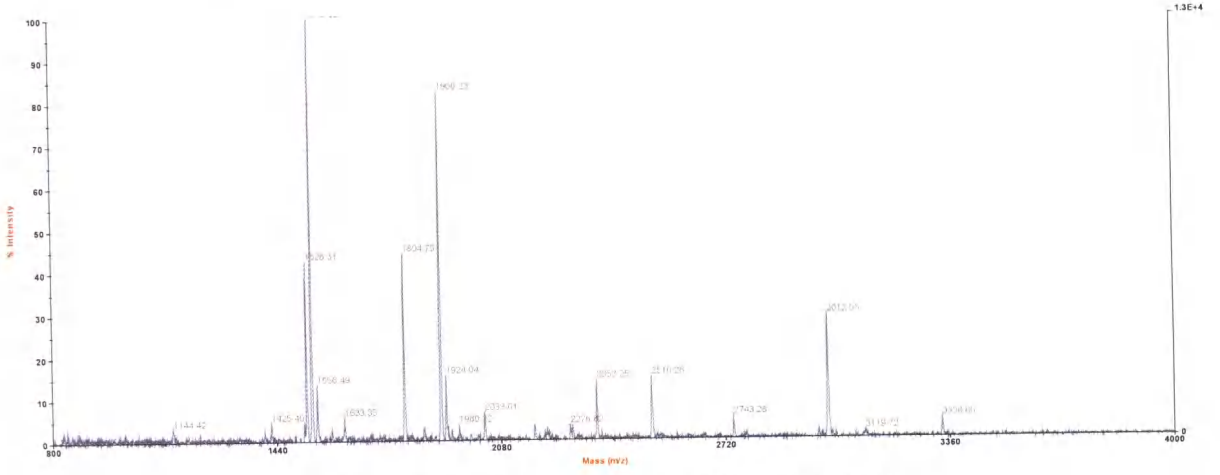



图 2 SSP7602 蛋白点(Alpha-enolase)的肽质量指纹图谱

维普资讯 http://www.cqvip.com



表 1 10 个蛋白点的鉴定结果

| 序号 | SSP** | Accession no. | Protein name | theor Mass/ pI(%) | Cov | Score* | Subcellular location |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4406 | P07195 | L-lactate dehydrogenase B chain | 36508/5.7 | 33.9 | 58 | Cytoplasm |
| 2 | 7107 | P62937 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | 17881/7.8 | 52.0 | 58 | Cytoplasm |
| 3 | 4708 | P30101 | Protein disulfide-isomerase A3 precursor | 56783/6.0 | 38.0 | 112 | Endoplasmic reticulum |
| 4 | 3703 | P10809 | 60 kDa heat shock protein (Hsp60) | 61055/5.7 | 38.0 | 80 | Mitochondrion |
| 5 | 2807 | P07900 | Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86) | 84529/4.9 | 37.2 | 81 | Cytoplasm |
| 6 | 6309 | P18669 | Phosphoglycerate mutase 1 | 28673/6.8 | 69.0 | 148 | Cytoplasm |
| 7 | 8206 | Q06830 | Peroxiredoxin-1 | 22111/8.3 | 65.0 | 99 | Cytoplasm |
| 8 | 6004 | P49773 | Histidine triad nucleotide-binding protein 1 | 13671/6.5 | 60.0 | 56 | Nucleus |
| 9 | 7602 | P06733 | Alpha-enolase | 47038/7.0 | 59.0 | 185 | Membrane |
| 10 | 2111 | Q9NWP1 | SMEK homolog 1 | 95935/4.8 | 17.0 | 43 | Membrane |

*:得分高于 55 是有意义的鉴定结果($P<0.05$) **:SSP 号指蛋白点在胶中的位置编号

### 3.3 蛋白点的鉴定

在 MALDI-TOF-MS 分析时,为了提高分辨率,我们利用了在 Voyager DE-PRO MALDI-TOF 质谱仪的延迟提取功能和反射模式下进行谱图的采集,同时采用了内标和外标法校正,明显提高了可靠性,增加了数据库搜索时的特异性。从 10 个候选蛋白中鉴定了 9 个有意义的蛋白($P<0.05$),成功建立了经 2-DE 分离的人肝癌细胞株 QGY-7701 的 MALDI-TOF 质谱鉴定方法。

另外,实验中的其它一些条件和方法,如等电聚焦的电压设置、SDS-PAGE 电泳的电流设置、质谱分析前的蛋白质样品处理等均是经过反复比较、优化调整而得到。

总之,我们对细胞蛋白提取、双向电泳及质谱分析等方法进行了调整、优化,建立了相对稳定的人肝癌细胞株 QGY-7701 蛋白质组分析方法。为以人肝癌细胞株 QGY-7701 为对象的蛋白质组学研究提供了参考蛋白质表达,为进一步以该细胞为模型的药物蛋白质组学研究奠定良好的基础。

(通讯作者:余 瑜,男,教授,博士生导师,主要研究方向:抗肿瘤药物及其构效关系研究。Email:yuyu3519@163.com.Tel:68485808)

## 参 考 文 献

[1] Dongre AR,Opiteck G,Cosand WI,et al.Proteomics in the post-genome age[J]. Biopolymers,2001;60(3):206-211.

[2] Caron PR,Mulliean MD,Mashal RD,el al.Chemogenomic approaches to drug discovery[J]. Curr Opin Chem Biol,2001;5(4):464-470.

[3] Peet NP,Bey P. Pharmacogenomics:challenges and opportunities [J]. DDT,2001;6(10):495-498.

[4] Freeman WM,Hemby SE.Proteomics for protein expression profiling in neuroscience[J]. Neurochem Res,2004;29(6):1065-1081.

[5] 马 翔,钱 云,谢满鑫,等.小鼠卵巢蛋白质双向凝胶电泳蛋白谱系的初步建立及其功能分析[J]. 北京大学学报(医学版),2004;36(6):581-586.

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

[7] Jiang D,Ying W,Lu Y,et al.Identification of metastasis-associated proteins by proteomic analysis and functional exploration of interleukin-18 in metastasis[J]. Proteomics,2003;3(5):724-737.

[8] 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.