维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2007)02-0117-04

HeLa 细胞蛋白质组双向电泳技术的建立

宋 敏[1],赖国旗[2],邱宗荫[1],夏永鹏[3],胡小龙[4]

(1.重庆医科大学药学院药物分析实验室,重庆 400016;2.重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016;
3.重庆市食品药品监督管理局,重庆 400042;4.重庆医科大学临床医学一系,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立和优化 HeLa 细胞蛋白质组分析所需的样品处理方法和双向电泳技术。方法:用三种不同配方的裂解液提取 HeLa 细胞中的蛋白质,进行双向凝胶电泳,用 Amersham ImageMaster VDS-CL 型凝胶成像系统获取凝胶图像,以 PDQuest (7.4.0)软件进行比较分析。结果:联合使用硫脲和尿素有利于蛋白质的提取,增加碱性蛋白点的检出数量;广谱蛋白酶抑制剂的使用可大大增加双向电泳可检出的蛋白点数,同时使可检出的碱性蛋白点明显增加。结论:本文建立了 HeLa 细胞双向电泳分析方法,提高了 2-DE 图谱中蛋白位点的分辨率和重复性,获得了较为理想、清晰的双向电泳图谱,为其蛋白质组学进一步研究奠定了基础。

【关键词】HeLa 细胞;双向凝胶电泳;蛋白质组
【中国图书分类法分类号】R329.2;Q51 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-07-18

Establishment of a two-dimensional electrophoresis technique for proteome of HeLa cells

SONG Min, et al

(*Laboratory of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish and optimize the two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and the preparation of protein samples for the proteome of HeLa cells. *Methods*: The proteins of HeLa cell were extracted by three different lysis buffers to do 2-DE. The gel images then were acquired by Amersham ImageMaster VDS-CL to do the comparative analysis with PDQuest (7.4.0) software. *Results*: The combination of Thiourea and Urea can be favorable for the extraction of proteins, and increase the amount of the detectable spots for the alkaline protein. The application of broad-spectrum protease inhibitor could increase the amount of the detectable protein spots in 2-DE remarkably, and also the alkaline protein spots. *Conclusions*: A two-dimensional electrophoresis technique for HeLa cells was established and an ideal 2-DE map with higher resolution and better reproducibility for HeLa cells was obtained clearly, which laid a foundation for the further studies on proteome of HeLa cells.

【Key words】HeLa cells; Two-dimensional gel electrophoresis; Proteome

双向电泳技术是分离细胞和组织蛋白质组的核心技术[1,2],而有效的、可重复的样品制备方法是双向电泳成功的关键[3]。因此,选择合适的样品制备方法,对获得较为满意的双向电泳图谱非常重要。本实验通过三种裂解液分别对 HeLa 细胞进行蛋白质提取,所得样品经双向电泳和图像软件分析,建立了 HeLa 细胞蛋白质组的双向电泳分离技术,为 HeLa 细胞比较蛋白质组学的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要设备

Bio-Rad protein IEF cell 型等电聚焦仪及 Bio-Rad protein Ⅱ XI cell 型垂直电泳槽 (Bio-Rad 公司产品);Amersham ImageMaster VDS-CL 型凝胶成像系统(Amersham pharmacia 公司产品)及 PDQuest(7.4.0)图像分析软件(Bio-Rad 公司产品);二氧化碳细胞培养箱。

1.1.2 主要试剂

IPG 干胶条(pH=3~10,L=17cm)、两性电解质(Pharmalyte,pH3~10)、碘乙酰胺(iodoacetamide)均购自 Bio-Rad 公司;低分子量蛋白质 Marker、30%丙烯酰胺(acrylamide)/甲叉双丙烯酰胺(29:1,3.3%C)、甘氨酸(Glycine)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、二硫苏糖醇 (Dithiothreitol,DTT)、硫脲

作者介绍:宋 敏(1976-),男,硕士,
主要研究方向:新药药理与新药开发。

维普资讯 http://www.cqvip.com

(Thiourea)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide,SDS)、超纯脲(ultra urea)、四甲基乙二胺(TEMED)、丙基硫酸盐(CHAPS)、考马斯亮蓝 R-250 及 G250、苯甲基磺酰氟(PMSF)、肽蛋白酶抑制剂均购自 Sigma 公司;其余试剂均为国产分析纯。人宫颈癌(HeLa)细胞由重庆医科大学实验动物中心保存。

1.1.3 溶液配制

1.1.3.1 裂解液:参考 Gorg[4]总结的三种裂解液配方并稍作改进,配制裂解液,具体配方见表 1。

表 1 三种裂解液的配方

试剂种类	裂解液 1	裂解液 2	裂解液 3
脲素	9mol/L	8mol/L	8mol/L
硫脲		2mol/L	2mol/L
DTT	1%	1%	1%
CHAPS	4%	4%	4%
SDS			0.3%
两性电解质,pH3~10	2%	2%	2%
Tris-HCl	40mmol/L		40mmol/L
EDTA		1mmol/L	
PMSF		1mmol/L	
抑肽素		0.7μg/ml	
亮肽素		0.5μg/ml	

1.1.3.2 水化上样液:尿素 8mol/L、4%CHAPS、少量溴酚蓝,-20℃保存。使用前 1ml 加入 0.01gDTT、10μl 两性电解质(20%,m/V)。

1.1.3.3 平衡液:6mol/L 尿素、2%SDS、0.375mol/L Tris-HCl pH8.8、20%甘油、少量溴酚蓝,-20℃保存。平衡液 a:使用前 10ml 平衡液储存液加 200mgDTT;平衡液 b:使用前 10ml 平衡液储存液加 250mg 碘乙酰胺。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HeLa 细胞培养于含 100ml/L 灭活的小牛血清、100kU/L 青霉素和链霉素的 RPMI 1640 的培养液中,培养条件为37℃,50ml/L CO_2。

1.2.2 样品处理

待细胞培养至 80%左右密度时,用预冷的 PBS 清洗 3 次,离心,分别收集 1×10^6 细胞悬于 50μl 的裂解液 1、2 及 3 中。之后,快速冻融 3~4 个循环,以 13000g 离心 1h,收集上清液,用 Bradford 法测定其蛋白浓度[5],样品分装,-80℃保存备用[6]。

1.2.3 双向电泳及图像分析

1.2.3.1 第一向固相 pH 梯度等电聚焦:根据蛋白定量的结果,取三种样品各 1mg 加入水化上样液中,使总体积为 500μl 后加入样品槽,将 IPG 胶条室温平衡后,置于样品槽中进行重泡涨[7],用 IPGphor 等电聚焦仪,按如下程序自动进行:①13h 重泡涨;②250V,30min 除盐;③1000V,1h 除盐;④10000V,5h 线性升压;⑤10000V,6h 等电聚焦;⑥500V,维持 4h。

1.2.3.2 平衡:将等电聚焦后的 IPG 胶条放入 5ml 平衡液中,于摇床上平衡 15min,再进行另 15min 平衡(2.5%碘乙酰胺替代 2%DTT,其余组分同上)。

1.2.3.3 第二向垂直平板 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):配制 12%SDS-PAGE 均匀胶。将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶的上方,用 5%低熔点琼脂糖封闭。凝固后用 Protein Ⅱ XI Cell 电泳系统进行电泳。电泳缓冲液为 Tris-Glycine-SDS(Tris6.04g,甘氨酸 28.8g,SDS2g 于 2000ml 水溶液中),设置温度 15℃,先按 10mA/gel 电泳 40min,再按 30 mA/gel 恒流电泳至溴酚蓝前沿达玻璃板底部停止。

1.2.3.4 考马斯亮蓝染色:将 2-DE 胶放入固定液(500ml 乙醇+100ml 冰醋酸,加水至 1000ml)中固定后,考马斯亮蓝 R-250 染色液(0.5g 考马斯亮蓝 R-250+50ml 冰醋酸+250ml 无水乙醇,加水至 500ml)中染色,然后在脱色液(80ml 冰醋酸+250ml 无水乙醇+670ml 蒸馏水)中脱色至背景清晰,蒸馏水反复洗涤多次。

1.2.3.5 图像的获取:用 Amersham ImageMasterVDS-CL 型凝胶成像系统对考马斯亮蓝 R-250 染色的 2-DE 胶进行扫描,并利用 PDQuest(7.4.0)产生光密度图象,进行斑点检测和对比分析。

2 结 果

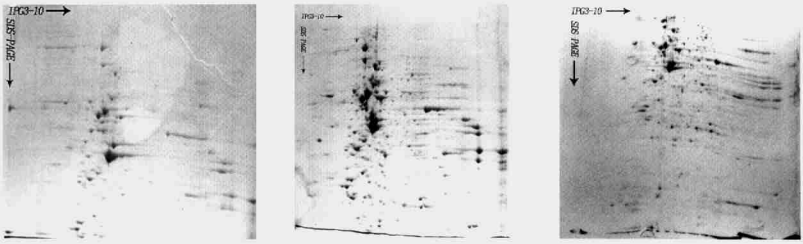
以裂解液 1、2、3 分别提取 HeLa 细胞的蛋白质,所得样品各进行 3 次双向凝胶电泳,用 PDQuest(7.4.0)检出的蛋白质斑点平均数分别是:390±13,820±12 和 628±15,蛋白质斑点匹配率分别是:72.2%,79%,76%,凝胶图像分别见图 3 中 A、B、C。

电泳结果表明,采用裂解液 2 制备的样品较采用裂解液 1、3 制备的样品可获得更多的可检出的蛋白质点,蛋白斑点匹配率也较高;同时,裂解液 2 所得到的样品中,出现了大量碱性蛋白斑点,有的甚至呈深染色状。说明裂解液 2 大大增加了 HeLa 细胞蛋白质的溶解性。

3 讨 论

要获得高分辨和重复性好的双向凝胶电泳图谱,建立有效的可重复的样品制备方法是十分关键

维普资讯 http://www.cqvip.com



A HeLa 细胞双向电泳（裂解液 1） B HeLa 细胞双向电泳（裂解液 2） C HeLa 细胞双向电泳（裂解液 3）

图 2 不同裂解液处理 HeLa 细胞的双向电泳凝胶图

的一步，也是最困难的一步。制备样品时，应使所有待分析的蛋白样品处于溶解状态[9]（包括多数疏水性蛋白），因此，细胞裂解液的选择和配方的优化是一个重要的环节。细胞裂解液含有变性剂、表面活性剂、还原剂、起载体作用的两性电解质以及蛋白质酶抑制剂等。

尿素是常用的变性剂，它可以破坏蛋白质的二级和三级结构，使蛋白质充分伸展，通常在裂解液中使用高浓度（8mol/L）的尿素以尽可能溶解蛋白质，但应注意不要对溶液加热，因为超过 30℃会导致蛋白质氨基甲酰化改变蛋白质的等电点。硫脲的使用可以大大增加蛋白质的溶解性能，特别是改善膜蛋白质的提取[9]，但由于硫脲在水中溶解性差，常需要高浓度的尿素助溶。从研究的实验结果看，裂解液 2、3 中联合使用了 2mol/L 硫脲与 8mol/L 尿素，所获得的蛋白点数均超过了裂解液 1 的样品。

为了完全使蛋白质折叠打开，需断开蛋白质分子内的二硫键，一般使用还原剂 DTT。但碱性条件下，DTT 可能会干扰等电聚焦的 pH 梯度，Herbert 等[10]使用三正丁基膦（tributyl phosphine，TBP）替代 DTT，能大大提高蛋白质溶解度及提高蛋白质从第一向到第二向电泳中的转移。

CHAPS 为两性离子去污剂，主要是破坏蛋白质分子间的疏水相互作用，提高蛋白质的溶解性，通常使用的浓度为 4%。在裂解液 3 中还加入了另一种去污剂 SDS，它能有力地溶解膜蛋白，但不利于稳定等电聚焦中蛋白的等电点。从实验结果看，SDS 的加入使碱性别蛋白点的数量有所增加，但没有达到使用裂解液 2 的效果。

裂解液 2 与其它两种裂解液最大的不同是加入了防止蛋白质水解的蛋白酶抑制剂。由于每一种蛋白酶抑制剂仅对一类蛋白酶发生作用，所以，本研究采用由 1mmol/L EDTA，1mmol/L PMSF，0.7μg/ml 抑肽素，0.5μg/ml 亮肽素组成的广谱蛋白酶抑制剂，其中，PMSF（Phenylmethylsulfonyl fluoride）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，抑肽素（pepstatin）抑制天冬氨酸蛋白酶，亮肽素（leupeptin）抑制多种丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶。在这一配方中，即使没有像裂解液 1、3 那样加入 40mmol 的 Tris-HCl 缓冲液，也获得了比较理想的结果。

本研究结果提示，在制备细胞蛋白质样品时，有两点是需要考虑的：①联合使用硫脲和尿素有利于蛋白质的提取，增加碱性蛋白点的检出数量；②广谱蛋白酶抑制剂的使用可以有效地抑制蛋白质水解，大大增加双向电泳可检出的蛋白点数，同时使可检出的碱性蛋白点明显增加。

实验选用 pH3~10 17cm 的 IPG 干胶条，1~3mg 的蛋白质上样量，聚焦电泳总伏时数不低于 70000 为宜。在 IPG 胶条重泡涨时，对比了主动水化和被动水化方法，主动水化可促进胶条对蛋白质的吸收，尤其是大分子蛋白质的吸收，但是容易丧失小分子蛋白质；而被动水化则容易丢失大分子蛋白质[11]。由于 HeLa 细胞蛋白质中存在很多重要的小分子蛋白质，故本实验经反复比较选用了被动水化。

增加上样量可以提高低丰度蛋白的检出率，但同时可能出现高丰度蛋白对低底丰度蛋白的掩盖。经本研究结果表明，上样量为 1mg 时所得结果较为理想。

此外，在进行 IEF 时，须在胶条和电极之间加上湿润的小纸片，以便吸收盐离子和补充水份，还可以在阴极加上 20mmol/L DTT 湿润纸片以减少碱性

维普资讯 http://www.cqvip.com

端的水平条纹并且有助碱性蛋白质的聚焦。

在第二向 SDS-PAGE 前对胶条进行平衡的目的是打开蛋白分子中的二硫键，使分离的蛋白亚基充分与 SDS 结合。两步平衡是造成蛋白损失的主要原因，大约 7%~10% 的蛋白在此过程中损失，其中第一步的损失较大，凝胶条中的载体两性电解质可以有助于减少蛋白的损失。

在电泳参数一致的情况下分别比较了 10%，12% 分离胶的分离效果，结果显示 10%和 12%的分离胶分离效果均较良好，但在凝胶成像时，10%的分离胶在转移过程中容易弄碎，因此我们选用了 12%的分离胶。

本研究从 HeLa 细胞的蛋白提取、第一向等电聚焦和第二向 SDS-PAGE、染色和 2-DE 图像采集处理等几个方面优化了双向凝胶电泳条件，提高了 HeLa 细胞 2-DE 图谱中蛋白位点的分辨率及重复性，获得了比较理想的 HeLa 细胞的蛋白质双向电泳图谱，该蛋白图谱可用于 HeLa 细胞比较蛋白质组学研究，为其深入研究奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, et a1. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology [J]. Proc Natl Acad Sci, 2000; 97(17): 9390-9395.

[2] Paul R Graves. Timothy A.J. Molecular biologist'a guide to proteomics[J]. Micr and Mole biology review, 2002; 3: 39-63.

[3] 夏其昌，曾 嵘. 编著. 蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京：科学出版社，2004.242-248.

[4] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized PH gradients [J]. Electrophoresis, 2000; 21: 1037-1053.

[5] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976; 72: 248-254.

[6] Bollag DM, Edelstein SJ. Protein Methods [M]. Chapter2: protein extraction, Wiley-Liss, NewYork. 1991.

[7] Bjellqvist B, Righetti P G, Gianazza E. Isoelectric focusing in immobilized PH gradient: principle, methodology and some applications[J]. J Biochem Biothys Methods, 1982; 6: 317-339.

[8] Parker R, Flowers TJ, Moore AL, et al. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina[J]. J Exp Bot, 2006; 57(5): 1109-1118.

[9] Pasquali C, Fialka I, Huber LA. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins[J]. Electrophoresis, 1997; 18(14): 2573-2581.

[10] Herbert B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis[J]. Eloctrophoresis, 1999; 20(4-5): 660-663.

[11] Barry RC, Alsaker BL, Robison-Cox JF, et al. A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure[J]. Proteomics, 2005; 5(11): 2739-2747.

(上接第 116 页)

系统而言，它具有操作简单，重组成功率较高、重组时间较短而被人们广泛应用。并且因为它同时携带了 GFP，可在包装和扩增的同时直接观察转染和感染的效率，大大缩短了基因治疗的构建和鉴定过程，克服了传统方法步骤周期长，效率低的缺点。

本实验构建了含有人全长的 MDR1 基因的腺病毒载体，经酶切鉴定、基因测序、PCR 扩增证实重组腺病毒构建成功，为下一步实验打下良好的基础。

(通讯作者：金先庆)

参 考 文 献

[1] Chun-Bao Guo, Ying-Cun Li, Xian-Qing Jin. Chemoprotection effect of retroviral vector encoding multidrug resistance 1 gene to allow intensified chemotherapy in vivo[J]. Cancer Chemother Pharamacol, 2006; 58: 40-49.

[2] 王 佚，金先庆，王 荠，等. mdrl 基因转染骨髓造血细胞移植联合超剂量化疗治疗兔 VX2 肝癌的实验研究[J]. 中华小儿外科杂志，2004; 25(3): 274-278.

[3] 康 权，金先庆，李英存，等. 多药耐药基因转染小鼠骨髓细胞及在化疗中骨髓保护的研究[J]. 中华小儿外科杂志，2002; 23(4): 351-354.

[4] TONG-CHUAN HE, SHIBIN ZHOU, LUIS T. DA COSTA?, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Medical Sciences, 1998; 95: 2509-2514.

[5] He T C, Zhou S, DaCosta L T, et a1. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509-2514.

[6] 郭春宝，金先庆，康 权，等. 多药耐药(MDR1)基因治疗对中晚期肝癌小鼠生存率的影响[J]. 重庆医科大学学报，2003; 28(5): 580-584.

[7] 王 佚，金先庆，王 珊. 多药耐药(mdr1)基因体外转染兔骨髓造血细胞及其表达与功能的研究[J]. 重庆医科大学学报，2003; 28(4): 409-413.