维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0821-03

血清蛋白质组双向凝胶电泳技术的建立

母昭德[1,3],彭咏波[1],易发平[2],邱宗荫[3]

(重庆医科大学:1.药学院药物分析教研室;2.生物化学与分子生物学教研室;3.医学检验系,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立血清蛋白质组双向凝胶电泳(2-DE)技术。方法:对血清蛋白质 2-DE 的各种条件进行调整、优化。结果:建立了稳定的 2-DE 技术。结论:已建立的血清蛋白质 2-DE 技术,将为进一步开展疾病的血清蛋白质组学研究奠定基础。

【关键词】血清蛋白质组学;蛋白质组;双向凝胶电泳

【中国图书分类法分类号】R446.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-06-20

Establishment of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for serum proteomics

MU Zhaode, et al

(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmaceutical, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To establish a two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) technique for serum proteomics. *Methods:* Various conditions of serum proteomic 2-DE were adjusted and optimized. *Results:* A steady 2-DE technique was established. *Conclusions:* Our established 2-DE technique of serum proteins can be effectively applied in serum proteomics of diseases.

【Key words】Serum proteomics; Proteome; Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2-DE)

血清具有所含蛋白质种类多、样品获取容易和安全及样品中含机体在各种特殊时刻及时分泌的各种蛋白质表型(phenotype)等特点,是寻求疾病标志物的重要源泉,因此,通过血清蛋白质组学(serum proteomics)研究,寻找特定疾病的特异蛋白质或发现新的疾病相关蛋白质,能为疾病的诊断或治疗提供新的依据,也可能进一步阐明一些复杂疾病的发病机制。

目前,尽管已经发展了多种蛋白质组学研究技术,然而双向凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis,2-DE)和质谱(Mass spectrometry,MS)[1]仍然是蛋白质研究的核心技术。尽管如此,重复性和稳定性仍然是 2-DE 技术存在的主要问题。因此,本实验对血清蛋白质 2-DE 的条件进行了全面的调整优化,建立稳定的血清蛋白质分离技术,为进一步的疾病血清蛋白质组学研究奠定基础。

作者介绍:母昭德(1966-),女,副教授,博士研究生,主要研究方向:血液蛋白质组学研究。

基金项目:重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJ060314)。重庆市高校优秀中青年骨干教师资助计划(渝教人 200415)。

1 材料和方法

1.1 研究材料

血清标本取自重庆医科大学附属第二医院药品临床研究基地,并签定健康志愿者知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器

高丰度蛋白质(白蛋白,免疫球蛋白 A、G,转铁蛋白,亲血球蛋白,抗胰蛋白酶、触珠蛋白)分离柱,4ml 蛋白质离心浓缩柱(5 ku),0.22μm 血清过滤柱,缓冲溶液 A,缓冲溶液 B 均购自安捷伦公司;尿素,二硫苏糖醇(DTT),CHAPS,SDS,Tris,碘乙酰胺,矿物油,甘油,丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺均购自上海生工;两性电解质(pH4~6,pH5~7)购自 Bio-Rad 公司,碳酸氢胺为 Sigma 产品;硫代硫酸钠、碳酸钠、硝酸银、甲醇、无水乙醇、甲醛、冰醋酸等均为国产分析纯;Millipore 去离子水。Bio-Rad 公司等电聚焦仪(Protean IEF Cell)、垂直电泳系统 (Protean Ⅱ XI Cell),中晶 4850Ⅱ透射扫描仪,KDC-160HR 高速冷冻离心机。

1.3 研究方法

1.3.1 血清样品的收集 取志愿者静脉血 3ml,4℃下 4000r/min 离心 15min,上清液在 4℃下 2400r/min 离心 5min 后[2],分装到硅烷化 EP 管中,-80℃保存。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3.2 血清中高丰度蛋白质的去除　去高丰度蛋白质方法按供货商说明书进行，得到 4ml 含低丰度蛋白质的溶液，用蛋白质离心浓缩柱（5ku）在 4℃下 6600 r/min 离心到大约 200μl，样品溶液用 20mmol/L NH_4HCO_3(pH8.5)缓冲溶液交换，Bradford 法测定蛋白质浓度，样品 -80℃保存。

1.3.3 双向凝胶电泳[9]

1.3.3.1 电泳样品的制备　取 300μg 血清蛋白质样品，加入含适当浓度尿素、硫脲、CHAPS 的上样缓冲溶液至溶液总体积为 300μl。

1.3.3.2 等电聚焦　被动水化 12~16h，250V1h，1000 V1h，聚焦到 46000 Vh。

1.3.3.3 SDS-PAGE　10%胶浓度，10mA/gel 电泳 30min，改变电泳电流，继续电泳 8h。

1.3.3.4 染色　2-DE 所得凝胶按参考文献[9]进行银性银染色。

1.3.4 图像分析　染色后凝胶由 Image Scaner 采集图像，分离所得蛋白质斑点由 Image Master 软件进行分析。

2 结　果

2.1 去除血清中高丰度蛋白质的结果

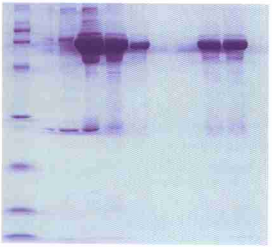
通过去除血清中的高丰度蛋白质后，血清中的高丰度蛋白质明显减少（图 1），低丰度蛋白质得到了分离和浓缩。

2.2 血清 2-DE 结果

通过以上方法，在优化的实验条件下，得到了比较满意的 2-DE 图谱，蛋白质分离效果较好，绝大多数蛋白质斑点能够清晰分辨（图 2B）。

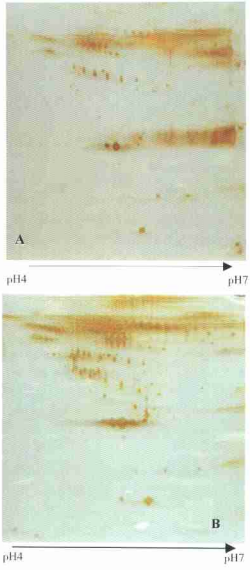
2.3 肝癌病人血清 2-DE 结果

在上述选定的条件下，得到肝癌病人血清电泳 2-DE 图谱（图 4）。



Lane1　molecular weight markers; Lane2　低丰度蛋白; Lane3,4　原血; Lane5,6,7　高丰度蛋白

图 1　原血、高丰度蛋白质、低丰度蛋白 SDS-PAGE 图谱



A　未去除高丰度蛋白质　B　去除高丰度蛋白质

图 2　血清中高丰度蛋白质对 2-DE 图谱的影响

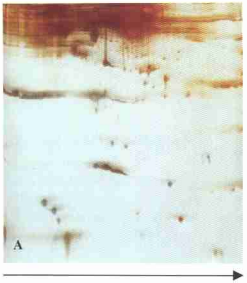
3 讨　论

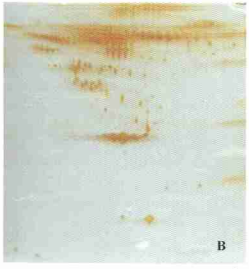
影响 2-DE 分离效果的因素很多，我们主要从以下几个方面对实验的条件进行摸索与优化调整。

3.1 血清中高丰度蛋白质的去除

由于血清中所含的几种高丰度蛋白质，如白蛋白等的大量存在，干扰了低丰度蛋白质的分析，尤其是作为疾病标志物的低丰度蛋白质的分析，因此，去掉少数几种占主要含量的高丰度蛋白质是分析低丰度蛋白质的关键，目前去除高丰度蛋白质的方法较多[9,8]，然而安捷伦的高丰度蛋白分离系统（Multiple Affinity Removal System, MARS）以其特异

维普资讯 http://www.cqvip.com





A pH3~10 B pH4~7

图 3 IPG 胶条 pH 范围的选择

性高、重现性好、非特异键合低、使用寿命长等特点，已成为人类血浆蛋白质组计划(Plasma Proteome Project，PPP) 推荐为分离纯化血液中低丰度蛋白质的主要技术手段[1]，通过该技术处理后，与原血相比(图 2A)，血清样品中低丰度蛋白质得到较好的分离和浓缩，2-DE 图谱中蛋白质斑点的数目从 500 增加到 732，并提高了斑点清晰度(图 2B)。

3.2 IPG 胶条 pH 范围的选择

IPG 胶条比较常见的 BC 范围有以下几种：pH3~10L(线性)；用于分析标本蛋白总体情况，但分辨率低，不利于低丰度蛋白检测。pH3~10N(非线性)；扩大 pH4~7 段的相对长度，既能检测标本蛋白总体情况，又能提高蛋白点较多的 pH4~7 段的分辨率。窄 pH 梯度胶条(pH3~6、4~7、5~8 和 7~10) 进一步分析感兴趣的 pH 段，提高分辨率。极窄梯度胶条(pH3.9~5.1、4.7~5.9、5.5~6.7 和 6.3~8.3)；进一步提高上样量，分辨率，检测低丰度蛋白质。最初我们采用 pH3~10L 胶条分析蛋白总体情况，发现血清蛋白主要集中于 pH4~7 段(图 3A)，我们选用 pH4~7 的胶条，提高了蛋白质的分辨率(图 3B)。



图 4 肝癌血清 2-DE 图谱

3.3 样品缓冲液成分和浓度的选择

2-DE 样品缓冲液的配方多种多样，对于不同的蛋白样品，缓冲液的成分和浓度要通过试验调整，以达到最佳蛋白分离效果。开始我们应用了不适合的血清蛋白上样缓冲液，导致实验结果较差。而经过摸索、调整，目前我们应用的上样缓冲液能够达到较好电泳效果。

3.4 2-DE 加样量的选择

加样量过小，不利于低丰度蛋白质的检测；加样量过大，会使蛋白点融合，不利于分析和鉴定。为保证低丰度蛋白质的检测，而又不使蛋白点融合，通过比较，我们选择 300 μg 作为实验中的最佳加样量。

3.5 SDS-PAGE 浓度

实验中发现，如果 SDS-PAGE 胶的浓度过小，对小分子量的蛋白质分离效果较理想，但对大分子量的蛋白质分离效果没有明显的改善，同时胶片易

(下转第 840 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] Tanos V, Brzezinski A, Drize O, et al. Synergistic inhibitory effects of genistein and tamoxifen on human dysplastic and malignant epithelial hreast cells in vitro[J].Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002; 102(2): 188-194.

[2] 汤为学,骆云鹏,王瑞雪.人实体瘤药物敏感试验 MTT 法的建立[J].重庆医科大学学报,1992;17(2):103-108.

[3] Chou TC,Talalay P.Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors[J].Adv Enzyme Regul, 1984; 22:27-55.

[4] Harrington DJ,Lessey BA, Rai V, et al. Tenascin is differentially expressedinendometriumandendometriosis [J].J Pathol,1999;187(2):242-248.

[5] Cappelletti V,Fioravanti L,Miodini P, et al. Genistein blocks breast cancer cells in the G2/M phrase of the cell cycle[J]. J Cell Biochem, 2000; 79(4):594-600.

[6] 颜春洪、韩 锐. Genistein 抑制 HT1080 人纤维肉瘤细胞的体外侵袭作用[J].中华肿瘤杂志. 1999;20(3):170-174.

[7] Akiyama T, Ishida J,Nakagawa S, et al. Genistein a specific inhibitor of tyrosine specific protein kinase[J].J Biol Chem. 1987; 262(12):5592-5595.

[8] Chang KL,kung ML,Chow NH,et al. Genistein arrest hepatoma cells at G2/M phrase:involvement of ATM activation and upregulation of p21waf1/cip1 and Wee1[J].Biochem Phamacol, 2004; 67(4):717-726.

[9] Frey RS, Li J,Singletary KW. Effects of genistein on cell proliferation and cell cycle arrest in nonneoplastic human mammary epithelial cells:involvement of Cdc2. p21(waf1/cip1), p27(kip1), and Cdc25C expression[J]. Biochem Pharmacol. 2001; 61(8):979-989.

[10] Zhou JR, Mukher-jee P, Gugger ET, et al. Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavone via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis[J]. Cancer Res, 1998; 58(22):5231-5238.

[11] Carroll HP, Ali S, Kirby JA, et al. Accelerating the induction of Fas-mediated T cell apoptosis: a strategy for transplant tolerance[J]?Clin Exp Immunol. 2001; 72(8):1423-1432.

[12] Wong BR, Besser D,Kim N,et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through signaling complex involving TRAF6 and c-src [J]. Molecular cell, 1999; 17(4):1041-1049.

[13] 宋丽萍,邱曙东,李明众,等. 放疗诱导宫颈癌细胞凋亡与 c-myc 蛋白表达[J].第四军医大学学报,2003,124(011):1045-1046.

[14] Michael JH,Ghosh S.Signal transduction through NF-kB[J].Immunol Today,1998; 2:80-88.

[15] 陆东东. 肝癌中 iNOS 与 P16、Bax 的表达及其与细胞凋亡关系[J].临床肝胆病杂志,2003;019(001):58-59.

[16] HO YS, Wang YJ,Lin JY.Induction of P53 and P21/WAF1/CIP1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells[J].Mol Carcinog,1996; 16(1):20-31.

(上接第 823 页)

坏;如果 SDS-PAGE 胶的浓度过大,对绝大多数蛋白质的分离效果均不太理想,经过比较,我们选择 10%的胶浓度。

实验中的其它一些条件和方法,如等电聚焦的电压设置、垂直板 SDS-PAGE 电泳的电流设置、染色方案等均是经过反复比较、优化调整而得到。

总之,我们对 2-DE 的条件、标本预处理等各个环节进行了调整、优化,建立了相对稳定的血清蛋白质 2-DE 技术,2-DE 图谱斑点匹配率为 85%, 为进一步分离、鉴定、分析疾病相关血清蛋白质,开展疾病的血清蛋白质组学具体研究打下了良好的基础。

参 考 文 献

[1] AebersoldR, MannM.Mass spectrometry-based proteomics [J].Nature, 2003; 422(6928): 198-207.

[2] Xiao hai Li, Yan Gong, Ying Wang, et al.Comparison of alternative analytical techniques for the characterisation of the human serum proteome in HUPO Plasma Proteome Project[J].Proteomics, 2005; 5: 3423-3441.

[3] Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. Proteomics, 2004; 4(12):3665-3685.

[4] Mortz E, Krogh TN, Vorum H, et al. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight analysis [J].Proteomics, 2001; 1(11): 1359-1363.

[5] Wang Y. Y., Cheng, P., Chan D.W.A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis [J].Proteomics, 2003; 3(3): 243-248.

[6] Fountoulakis M., Juranville, F., Jiang L., et al.Depletion of the high-abundance plasma proteins[J].Amino Acids, 2004; 27(3-4): 249-259.

[7] Fujii K., Nakano T., Kawamura T., et al.Multidimensional Protein Profiling Technology and Its Application to Human Plasma Proteome [J]. Proteome Res, 2004; 3(4): 712-718.

[8] Bjorhall K., Miliotis T., Davidsson P.Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of serum samples[J]. Proteomics, 2004; 5: 307-317.

[9] Gilbert S, Omenn, David J. States, Marcin Adamski1, et al , Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: Results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset [J]. Proteomics, 2005; 5: 3226-3245.