维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)02-0163-03

肝癌细胞线粒体的纯化及双向凝胶电泳分析

李 兴[1], 邱宗荫[1], 潘 卫[2], 田昆仑[3], 邱 峰[1]

(1.重庆医科大学医学检验系,重庆 400016;2.贵阳医学院医学检验系,贵阳 550004;
3.第三军医大学野战外科研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立纯化肝癌细胞线粒体的方法,通过双向电泳及酶活力测定确认纯化效果。方法:使用蔗糖密度梯离心法分离纯化线粒体,双向凝胶电泳分析纯化过程中样品蛋白质图谱的变化。结果:通过标志酶活力的监测,梯度离心后线粒体纯提高近 12 倍,线粒体蛋白质在双向凝胶电泳中得到很好的显现。结论:使用蔗糖密度梯度心法可有效地分离纯化线粒体,为线粒体蛋白质组后续研究奠定了基础。

【关键词】线粒体;梯度离心;双向凝胶电泳
【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-09-20

Isolation and 2-DE analysis of mitochondria of cultured hepatoma cells

LI Xing, et al

(*Department of Laboratory Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To make the isolation and 2-DE analysis of mitochondria, in order to prepare the following proteomic study on mitochondria of hepatoma-cell. *Methods*: Mitochondria was separated from cell homogenate by means of density gradient centrifugation, and 2-DE was conducted to examine the protein profile of mitochondrial preparations. *Results*: The increase in purity of mitochondria was found to be 12 times by density gradient centrifugation. Mitochondrial proteins were displayed well in the 2-DE pattern after purification. *Conclusion*: The isolation procedure is practicable, which provides a basis for the following proteomic study on mitochondria.

【Key words】Mitochondria; Density gradient centrifugation; Two-dimensional gel electrophoresis

研究表明,线粒体在细胞凋亡启动中扮演重要角色,它通过释放某些凋亡诱导物启动细胞凋亡[1,2]。但是,在肿瘤发生、发展间的关系仍有待于进一步认识,对肿瘤细胞线粒体蛋白质组的研究将有助于回答这些问题[3]。为了得到可信的研究结果,线粒体的分离与纯化是十分关键的一步。本文用蔗糖密度梯度离心法分离纯化肝癌细胞线粒体,并进行了双向凝胶电泳分析,取得较好效果,为了一步的质谱鉴定、生物信息学分析创造了充分的条件。

1 材料与方法

1.1 研究材料

肝癌细胞株 QGY-7703,购自重庆医科大学超声医学研究所。

作者介绍:李 兴(1967-),男,博士生,
主要研究方向:亚细胞器蛋白质组学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30476021)。

1.2 主要试剂和仪器

pH3-10 固相 pH 梯度胶条(IPG, immobiline pHaradient DryStrip)、两性电解质 Bio-Iyte 购自 Bio-Rad 公司;碘乙酰胺、二硫苏糖醇、丙基硫酸盐(CHAPS) 购自 Sigma 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素购自生工公司。Beckman L7 型超速离心机;Bio-rad proteinlEF cell 型等电聚焦仪及 Bio-rad protein II XI ceII 型垂直电泳槽;Amershan ImageMaster VDS-CL 型凝胶成像系统及 ImageMaster 2DV2002.1 图像分析软件。

1.3 细胞培养和收集

QGY-7703 细胞株培养于含 10% 血清的 RPMI-1640 培养基中,生长至对数期,0.25% 胰酶消化并收集细胞,用 PBS 溶液洗涤细胞 3 次,细胞计数。

1.4 线粒体的分离纯化

1.4.1 细胞的破碎[4] 2×10^8 QGY-7703 细胞悬浮于 8ml 甘油介质(1.2mol/L 甘油,5mmol/L Tris-HCL buffer, pH7.4),4℃ 轻搅 15min,然后 1000g 离心 5min,倾去上清;沉淀中加入 6ml 蔗糖溶液(0.25mol/L 蔗糖,1.0mmol/L Mg^{2+},5mmol/L Tris-HCL buffer, pH=7.4),4℃ 轻搅 20min;细胞悬液于 Dounce 匀浆器中匀浆 10~12 次,相差显微镜观察细胞 95%

维普资讯 http://www.cqvip.com

以上破碎。

1.4.2 线粒体粗提物的分离[5] 细胞匀浆于 1000g 离心 5min,收集上清,上清于 20000g 离心 16min。收集沉淀,用悬浮缓冲液(0.25mol/L 蔗糖,1.0mmol/L Mg^{2+},10mmol/L HEPES-NaOH,pH7.4)洗涤 2 次,此沉淀即为富含线粒体的粗提物;收集 20000g 离心即为富含线粒体的粗提物;收集 20000g 离心后上清,于 100000g 离心 60min,收集沉淀,悬浮缓冲液洗涤 2 次,此沉淀即为富含内质网的粗提物。

1.4.3 线粒体的纯化[5] 在 15ml 离心管中先加入 5ml 1.5mol/L 的蔗糖溶液(含 10mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH7.5),然后在蔗糖液面上轻轻加一层 5ml 1.0mol/L 的蔗糖溶液(含 10mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH7.5),形成 10ml 的蔗糖浓度梯度。将线粒体粗提物悬浮于 1.5ml 悬浮缓冲液中,轻轻加于蔗糖浓度梯度上,60000g 离心 30min,线粒体在 1.0mol/L 和 1.5mol/L 蔗糖梯度交界处形成一薄层。吸出线粒体,用悬浮缓冲液稀释蔗糖,20000g 离心 20min 沉淀线粒体。

1.5 线粒体纯度的鉴定[6]

一般通过测定一些与细胞器特定功能相关的酶来作为细胞器纯度的指标。琥珀酸脱氢酶是三羧酸循环的酶之一,可作为线粒体纯度的指标,酶比活力越高线粒体越纯;内质网膜中含有的 NADPH-细胞色素 C 还原酶可作为内质网含量的指标,5'-核苷酸酶作为细胞膜含量的指标。对于线粒体的纯化过程而言,内质网和细胞膜被视为杂质,因此它们的比活力应越低越好。琥珀酸脱氢酶活力按碘硝基四唑紫方法测定,NADPH-细胞色素 C 还原酶活力测定按细胞色素 C 被还原的量来计算,5'-核苷酸酶活力通过测定无机磷的释放量来计算。

1.6 电泳样品的制备

L02 全细胞、线粒体粗提物、纯化线粒体 3 种样品,先分别加 30~100μl 裂解液 I (40mmol/L Tris-base,pH8.4),反复冻融 3~4 个循环,加入 20μg/ml DNase,4℃ 作用 20min,以降解 DNA。然后分别加入 100~300μl 的蛋白质裂解液 II (8M 尿素,4% CHAPS,50mmol/L DTT,0.2% Ampholyte,痕量溴芬蓝,强烈震荡混匀 5min,12000r/min 离心 30min,收集上清即为蛋白质提取物,测定蛋白浓度,液氮保存。

1.7 双向凝胶电泳[7]

1.7.1 等电聚焦 被动水化 12~16h,250V 30min,1000V 1h,10000V 5h,总电压积为 60000Vh。

1.7.2 SDS—PAGE 13% 胶浓度,10mA/gel 电泳 1h,加大电压为 20~30mA/gel 电泳 6h,至溴芬蓝接近凝胶底线。

1.7.3 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。

1.8 图像分析

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

2 结 果

2.1 线粒体纯化结果(见表 1)

表 1 肝癌细胞线粒体纯化结果

纯化指标	提纯物			
	细胞匀浆	线粒体粗提物(2000g 沉淀)	纯化线粒体(梯度离心)	内质网粗提物(100000g 沉淀)
5'-核苷酸酶化活力*	1.96	8.47	0.34	3.47
NADPH-细胞色素 C 还原酶比活力*	0.33	0.74	—	2.84
琥珀酸脱氢酶比活力*	0.62	3.75	7.34	0.58
线粒体纯化倍数**	1	6	12	
线粒体回收率***	100%	54%	31%	

注:*酶活力以酶蛋白作用底物 1h 后所产生的吸光度值来表示;比活力以 100μg 蛋白产生的酶活力来表示。

**线粒体纯化倍数 = 提纯物琥珀酸脱氢酶比活力 / 细胞匀浆琥珀酸脱氢酶比活力

***线粒体回收率 = 提纯物琥珀酸脱氢酶总活力 / 细胞匀浆琥珀酸脱氢酶总活力

琥珀酸脱氢酶比活力的数据表明,线粒体粗提物较之细胞匀浆,线粒体蛋白纯度提高 6 倍;纯化线粒体较之线粒体粗提物,纯度又提高近 2 倍;即是说经过蔗糖梯度离心后,线粒体蛋白纯度提高了 12 倍。5'-核苷酸酶和 NADPH-细胞色素 C 还原酶比活力数据表明,线粒体粗提物中虽然富集了较多的线粒体蛋白,但也含有大量的细胞膜蛋白和相当的内质网蛋白,而在纯化线粒体中基本除去了这两种蛋白质。表中还可看到,通过 20000g 和 100000g 的差速离心,线粒体蛋白和细胞膜蛋白主要存在 20000g 沉淀中,而 100000g 纯度含有大部分的内质网蛋白和部分细胞膜蛋白。因此我们选择 20000g 沉淀来进行蔗糖梯度离心纯化线粒体蛋白。

2.2 向凝胶电泳结果

QGY-7703 全细胞双向电泳图谱上有蛋白质斑点数约 870 个左右(图 1),线粒体粗提物图谱上

维普资讯 http://www.cqvip.com

有蛋白质斑点数约 380 个左右（图 2），纯化线粒体图谱上有蛋白质斑点数约 155 个左右（图 3）。

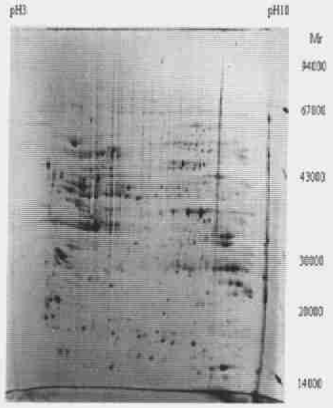


图 1　QGY－7703 全细胞的双向电泳图谱

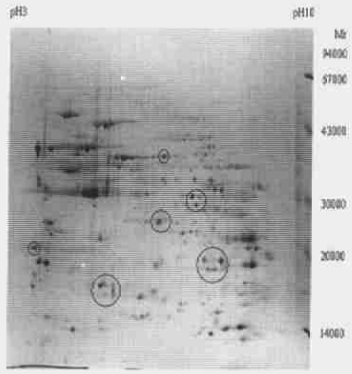


图 2　线粒体粗提物的双向电泳图谱

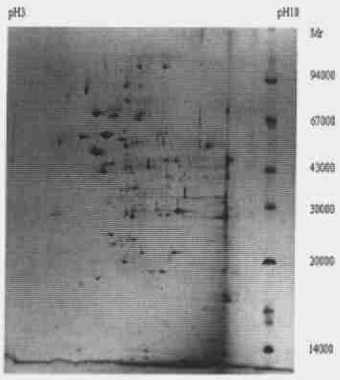


图 3　纯化线粒体的双向电泳图谱

电泳结果表明，线粒体粗提物较之全细胞，蛋白质斑点数减少一半以上，同时也出现了不少新的蛋白斑点，有的甚至呈深染色状（图 2 中圆圈内），说明经过离心能大大降低样品的复杂度，并相应富集某些蛋白质。对比纯化线粒体图谱与全细胞、线粒体粗提物图谱，差别非常显著。纯化线粒体图谱中的蛋白质斑点在全细胞、粗提物图谱上少有发现，蛋白质斑点匹配率非常低。图中还可看到，线粒体蛋白质主要集中在中性、中高分子量区域，经过梯度离心，一些蛋白质已得到高度富集。

3　讨　论

线粒体分离纯化到目前为止还是一个没有很好解决的难题，分离纯化线粒体的技术方法有多种，离心技术是其中不可或缺的核心手段，这是一项技术性、经验性很强的工作。细胞中各种亚细胞结构的构成和性质各不相同，彼此紧密联系，因此，所建立的分离技术路线和条件应尽量避免交叉污染。此外样品的形态和状态也影响着分离纯化的条件，例如组织与培养的细胞、不同的细胞株之间，它们分离纯化条件是不同的，甚至长久传代后的细胞分离纯化条件也会发生变化。本文在分离纯化体外培养的肝癌细胞线粒体时，碰到的主要问题是细胞破碎困难，该细胞株经长期传代，一般的匀浆作用难以将其破碎，我们使用强烈的甘油吸收法结合 Dounce 匀浆器才得到良好的破碎效果。线粒体粗提物离心时，我们将离心速度从文献中的 10000g 提高到 20000g，大大提高了线粒体的回收率。从标志酶的结果看，分离效果是成功的，得到了较好的线粒体纯化度和回收率。

双向电泳的结果表明，粗提物中线粒体蛋白虽已较高富集，但杂质蛋白质仍然很多，电泳图谱中线粒体蛋白质不能得到很好显现，说明用粗提物作为研究线粒体的样品是不合适的。同时还说明，从细胞或组织的双向电泳分析中是不太可能得到很多线粒体蛋白质方面的信息，可以想见其许多它细胞器的蛋白质也会在电泳中丢失，因此纯化过程是亚细胞蛋白质组学十分必要和关键的，它大大提高了目标蛋白质的丰度，使我们在现有的技术条件下能检测到，保证获得真正的亚细胞蛋白质信息。进行亚细胞蛋白质组研究的另一个好处是，能直接将蛋白质与其细胞定位联系起来，这对后续的功能研究是十分有用的。运用 cDNA 克隆研究肝癌细胞基因的差异表达已有相关报道[8]，本文结果则为在蛋白质水平进行肝癌细胞基因差异表达的研究提供了一个途径和基础，从不同的层面得到新的信息。（下转第 177 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

"2K1C"所致的兔离体肥厚心肌的僵硬度比正常离体心肌僵硬度大,且肾动脉缩窄时间越长,兔心脏脏壁越厚,其僵硬度越大。"2KIC"所致的心肌僵硬度度增加,主要是因为肾素血管紧张素醛固酮系统的激活引起Ⅰ型和Ⅲ型胶原水平增生[11]。

然而,离体心肌僵硬度和活体心肌僵硬度是存在一定差异,所以更有价值的结果还需进一步在活体状态下进行实验获得。

总之,印压方法对离体心肌僵硬度进行评估,是一种较直接且有效的可行方法。为活体状态下通过心导管术应用印压装置对舒张末期心肌的被动僵硬度进行评估,提供了理论基础和实验依据。

参 考 文 献

[1] Zile Mr, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolicfunction[J]. Circulation, 2002; 105: 1387 - 1393.

[2] Haines DE, Watson DD, Verow AF. Electrode radius predicts lesion radius during radiofrequency energy hearting. Validation of a proposed thermodynamic model[J]. Circ Res, 1990; 67:124 - 129.

[3] Ranch AL, Campbell WG. Adrenal and Vascular tyrosine hydroxylase activity in Goldblatt Hypertension[J]. Hypertension, 1988;12:434 - 442.

[4] Mann T, Golders S, Mudge GH, et al. Factors contributing to altered left ventricular diastolic properties during antgina pectoris[J]. Circulation, 1979;56:14 - 20.

[5] Krayenbuehl HP, turina J, hess OM, et al. Left ventricular function in chronic pulmonary hypetension[J]. Am J Cardiol, 1978;41:1150 - 1158.

[6] 陶祖莱. 生物力学导论[M]. 天津科技翻译出版社公司, 2000:23 - 31.

[7] Maxwell Mh, Lupu AN, Viskoper RJ, et al. Mechanisms of hypertension during the acute and intermediate phases of the one - clip, two - kidney model in the dog[J]. Circ Res, 1977; 40:124 - 128.

[8] Rankin JS, Arentzen CE, McHale PA, et al. Viscoelastic properities of the diastolic left ventricle in the conscious dog[J]. Circ Res, 1977;41:37 - 45.

[9] 陶祖莱. 生物力学导论[M]. 天津科技翻译出版社公司, 2000:16.

[10] Zheng YP, Mak AF, Lue B. Objective assessment of limb tissue elasticity: development of a manual indentation procedure [J]. Rehabil Res Dev, 1999;36:71 - 85.

[11] Brilla CG, Rupp H, Funck R, et al. The renin - angiotensin - aldosterone system and myocardial collagen matrix remodeling in congestive heart failure[J]. Eur Heart J, 1995; 16:107 - 109.

(上接第 165 页)

参 考 文 献

[1] Kroegmer. G. Mitochondrial control of apoptosis[J]. Biochem. Soc. Symp, 1999;66:1 - 15.

[2] Thress, K., Kornbluth, S. & Smith. J. J. mitochondria at the crossroad of apoptotic cell death[J]. J. Bioenerg. Biomembr., 1999;31:321 - 326.

[3] Mukesh Verma, Jacob Kagan, David Sidransky, et al. Proteomic analysis of cancer - cell mitochondria[J]. Nature Reviews cancer, 2003;3:789 - 795.

[4] John M. Graham, Jane K. Sandall. Thissue - culture cell fractionation[J]. Biochem. J., 1979;182:157 - 164.

[5] D. L. 斯佩克物, R. D. 戈德曼, L. A. 来因万德著. 细胞实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2001;356 - 361.

[6] J. M. Graham, J. A. Higgins. Biomembrane Protocols I. Isolation and Analysis[M]. Methods in Molecular Biology, Vol. 19. Totowa: Humana Press Inc., 1993;100 - 102.

[7] 潘 卫, 王应雄, 杨 戎. 小鼠胚泡黏附时已黏附侧与未黏附侧子宫内膜蛋白质组差异的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2004;29(5):572 - 575.

[8] 沈 薇, 吴显才. 肝癌细胞表达差异 cDNA 克隆的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2003;28(1):1 - 3.