

# 原发性肝癌组织双向电泳技术优化

邱芳华<sup>1</sup>, 聂静<sup>1\*</sup>, 沈顺利<sup>2</sup>

(中山大学附属第一医院 1. 蛋白质组学实验室; 2. 肝胆外科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】优化双向凝胶电泳的实验步骤,总结出一套适用于原发性肝癌组织的双向凝胶电泳技术。【方法】对双向电泳实验中的关键环节:样本处理、上样方法、聚焦条件等进行研究与优化,考马斯亮蓝染色后进行凝胶图像比较。【结果】采用 7 mmol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、40 g/L CHAPS、100 mmol/L DTT、5 g/L (pH 3-10) IPG buffer、1 mmol/L PMSF 作为裂解液,丙酮沉淀蛋白,主动水化上样法,聚焦电压达到 140 kV 可以得到分辨率高、重复性好的结果。【结论】上述改良提高了 2-D 图谱中蛋白位点的分辨率和重复性,为原发性肝癌组织的蛋白质组学研究奠定了基础。

**关键词:** 原发性肝癌; 蛋白质组学; 双向电泳

**中图分类号:** R34      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2010)04-0577-05

## Establishment of Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Techniques for Hepatocellular Carcinoma Tissues

QIU Fang-hua<sup>1</sup>, NIE Jing<sup>1\*</sup>, SHENG Shun-li<sup>2</sup>

(1. Laboratory of Proteomics, 2. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To establish a set of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) techniques for proteomic research of hepatocellular carcinoma (HCC) tissues. 【Methods】 Different methods or condition for key procedures of 2-DE were adjusted and optimized, including sample preparation, sample loading methods, iso-electronic focusing (IEF), comparing with the gel after Commassie blue staining. 【Results】 High-resolution results with repetitiveness could be obtained according to the condition: 7 mmol/L urea, 2 mmol/L thisurea, 4%CHAPS, 100 mmol/L DTT, 0.5% (pH 3-10) IPG buffer, 1 mmol/L PMSF as lysis buffer, actone precipitate protein, initiative rehydration method and IEF to 140 kV. 【Conclusion】 The optimized method provided 2-D results with high resolution and repetitiveness, which pave the way for the proteomic research for HCC tissues.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; proteomics; two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(4):577-580]

原发性肝癌(以下简称肝癌)是我国最常见的恶性肿瘤之一,死亡率在我国恶性肿瘤中位居第二<sup>[1]</sup>。蛋白质组学是研究肿瘤发生机制<sup>[2]</sup>,寻找肿瘤标志物的重要工具,对于肝癌发生机制和治疗作用靶点的研究具有重要意义<sup>[3]</sup>。我国早在 2003 年就启动了人类肝脏蛋白质组计划(HUPO),并取得了一定的研究成果。但关于肝癌组织双向电泳

的技术却少完整系统的报道,为了建立高分辨率可重复的肝癌组织双向凝胶电泳技术,我们对人肝癌组织的双向电泳技术中的关键环节进行了研究对比,优选出一套适合肝癌组织的双向凝胶电泳方法,供从事肝脏蛋白质组学双向电泳的技术人员参考。

收稿日期: 2009-05-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30871033)

作者简介: 邱芳华,本科,主管技师,主要从事蛋白质组学科研工作,E-mail:41459731@sohu.com; \* 通信作者: 聂静,女,教授,博士生导师,E-mail:niejing@mail.sysu.edu.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 标本采集 原发性肝癌组织来自我院肝癌切除术患者。组织离体后立即以预冷 PBS 冲洗,在冰上分装置入冻存管,液氮中速冻,后转入-80 ℃冰箱中保存备用。所有病例均经术后病理证实为原发性肝细胞癌。

1.1.2 试 剂 丙烯酰胺、甲叉双丙稀酰胺、过硫酸胺、四甲基乙二胺(TEMED)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、尿素、十二烷基硫酸钠(SDS)、3-[3-(胆酰氨基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、甘氨酸、IPG 缓冲液(pH 3 ~ 10)、蛋白酶抑制剂、碘乙酰胺(IAA)、硫脲、18 cm 胶条(pH 3 ~ 10 NL)均为 Amersham 公司产品。TCA、丙酮为 Sigma 公司产品。无水乙醇为国产分析纯(广州化学试剂厂),所有溶液均用去离子水配制。

1.1.2 主要设备 Immobiline Dry Strip, Ettan IPG 3 等电聚焦电泳仪, Ettan DALT six 600 垂直电泳槽, Imagescanner 高密度扫描仪, ImageMaster 软件均购自 Amersham 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 蛋白质样品制备 粗样本制备:取肝癌组

织 100 mg,液氮冷冻研磨,加入 0.5 mL 裂解液(含 10 g/L PMSF 蛋白酶抑制剂),裂解液(7 mmol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、40 g/L CHAPS、100 mmol/L DTT、50 g/L (pH 3 ~ 10) IPG buffer, 1 mmol /L PMSF),超声裂解,15 ℃,离心 10 min,取上清液,4 ℃,超速离心 50 min,避开漂浮的脂质层,吸取离心上清 4 ℃,再次离心 50 min;取上清。Bradford 法定量,分装后置-80 ℃保存。为充分去除样本中含有的杂质对等电聚焦的影响,我们采用了常用的三种蛋白沉淀方法,并对结果进行对比。①丙酮沉淀蛋白:加入 4 倍体积的冰丙酮使蛋白在-20 ℃沉淀至少 2 h,4 ℃,离心 15 min,用裂解液重溶。②三氯乙酸/丙酮沉淀:将三氯乙酸加到提取组织液中,终质量浓度为 100 g/L,再加入 4 倍体积的冰丙酮使蛋白在-20 ℃沉淀至少 2 h,4 ℃离心 15 min,最后再用冰丙酮清洗沉淀,去除三氯乙酸,用裂解液重溶。③Cleaning-up 试剂盒沉淀蛋白:按 Amersham 公司的试剂盒说明书操作,用裂解液重溶。

1.2.2 等电聚焦电泳 分别采取目前常用两种上样方法:标准胶条槽上样(主动水化)及杯上样(被动水化),并对结果进行比较分析。聚焦程序参考聚焦系统操作指南,同时利用软件对聚焦电压,电流进行检测,指导聚焦程序的调整,对不同聚焦方法进行比较分析(表 1)。

表 1 不同聚焦条件的比较

Table 1 Comparison of the different condition of isoelectronic focusing(IEF)

Steps	A		Steps	B	
	Voltage	Time		Voltage	Time
1 Step	30 V	120 h	1 Step	30 V	12 h
2 Step	500 V	1 h	2 Step	500 V	3 h
3 gradient	1 kV	1 h	3 gradient	1 kV	2 h
4 Step	1 kV	1 h	4 Step	1 kV	1 h
5 gradient	8 kV	1 h	5 gradient	8 kV	1 h
6 Step	8 kV	10 h	6 Step	8 kV	17.5 h
7 Step	500 V	5 h	7 Step	500 V	5 h

Compared with different protocol to IEF, protocol B can obtain ideal 2-D gel

1.2.3 第二向 SDS 电泳(SDS-PAGE) 等电聚焦后的胶条分别以 SDS 平衡缓冲液(第一次加入 100 mg/10 mL DTT,第二次加入 250 mg/10 mL 碘乙酰胺)平衡两次,每次 15 min。平衡后 IPG 胶条转移至电泳系统,用 125 g/L 的胶进行二向电

泳,每块胶 2 W,电泳 50 min 后改为每块胶 15 W,电泳至溴酚蓝跑到凝胶底部。凝胶进行热考马斯亮兰染色。

1.2.4 凝胶图像采集与分析 染色后凝胶以 Image scanner 高密度扫描仪获取图像,利用 ImageMaster

软件对图像进行蛋白质斑点自动检测,然后手工删除假点,添加未检出的斑点,最后进行斑点匹配,分析。

## 2 结果

### 2.1 蛋白沉淀方法对电泳结果的影响

从图1可见,未经处理的样本蛋白点虽然很多(1 920点),但分辨率很差。丙酮,TCA-丙酮,Cleaning-up试剂盒沉淀后的样本与原始样本相比均有很多改善,但TCA-丙酮丢失的蛋白较多(1 644点),丙酮(1 856点),和Cleaning-up(1 713点)丢失的蛋白较少。图1B中,经TCA-丙酮沉淀后,酸性蛋白大量丢失。图1C中,丙酮沉淀蛋白点多且清楚,无明显拖带和条纹,背景干净清晰,说明蛋白质富集和纯化的效果都比较好。

### 2.2 不同聚焦条件对电泳结果的影响

图2中,A聚焦电压是80 kV,B聚焦电压

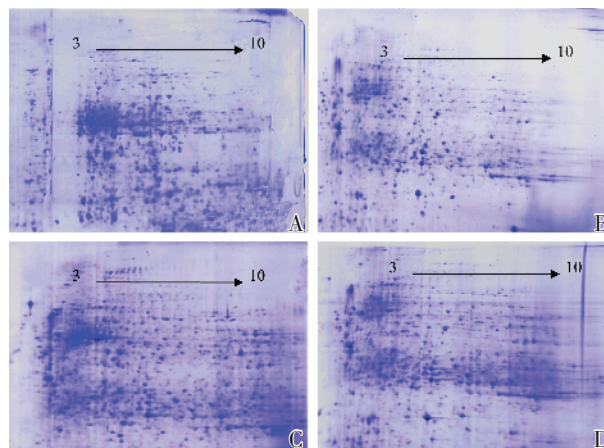


图1 不同方法蛋白沉淀后的双向电泳图谱

Fig.1 Comparison of the different method to precipitate protein

Using different method to precipitate protein: A: crude protein, spots number is 1 920; B: TCA-acetone precipitate, protein spots is 1 644; C: acetone precipitate protein, spots number is 1 856; D: clean-up kit precipitate protein spots 1 713, acetone have good effective to precipitate

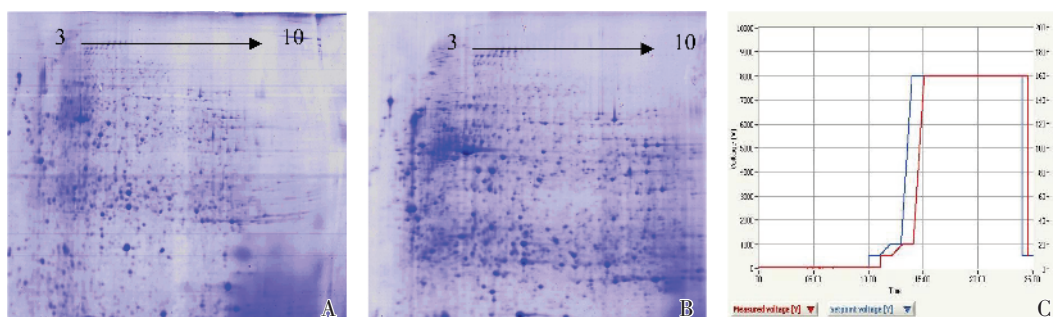


图2 不同聚焦条件的电泳结果

Fig.2 2-D gel under different condition of voltage

A: IEF voltage is 90 kV; B: IEF voltage is 140 kV; C: diagram showing the voltage of picture B, IEF to voltage 140 kV can get more spots

140 kV。由于聚焦时电流较高,将500 V延长2 h,1 kV延长了1 h,从图中可见B的聚焦效果比A有很大改善。图C是我们监测的延长低压聚焦后(图B)的IEF电压走势图,从图中可见电压升至设定的80 kV进行聚焦。图2 B蛋白点数较A明显增多,特别是酸性端,说明B聚焦效果明显好于A。

### 2.3 主动水化与被动水化上样的电泳结果

从图3中可看出,图A中的蛋白点数明显增多,点也更圆,而且没有图B中的横条纹。说明主动水化比被动水化的聚焦效果更好。

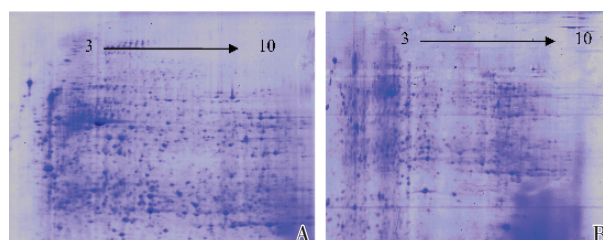


图3 主动水化与被动水化上样的电泳结果

Fig.3 T Comparison of different method to load sample

A: the 2-D gel of initiative rehydration loading; B: the 2-D gel of passive rehydration loading, initiative loading can obtain ideal 2-D gel

### 3 讨论

双向凝胶电泳(2-DE)由于其在展示全部蛋白质表达改变并鉴定特异性蛋白方面的优势,成为目前蛋白质组学研究首选的分离技术<sup>[4]</sup>,近年来得到了较大的发展与改善,但实验结果的重复性和稳定性仍有待提高<sup>[5]</sup>。我国关于肝癌的蛋白质组学研究越来越多,由于肝癌组织成分复杂,干扰成分多,个体差异大使其双向电泳实验条件难以严格控制<sup>[6]</sup>,目前尚没有针对该组织的双向电泳技术的方法学的系统报道,为此,我们对肝癌组织蛋白的制备、一向聚焦程序、上样方法等关键步骤进行研究对比,优化总结出一套可行的,重复性好的双向电泳方法,供大家参考。

#### 3.1 样品制备

蛋白质样品的制备是关键环节,关系到蛋白质组研究结果的准确性<sup>[7]</sup>。样本制备主要包括蛋白提取与沉淀两个步骤。

蛋白提取过程需尽可能地溶解和解聚蛋白质<sup>[8]</sup>。通常采用分级提取蛋白的方法,但是繁琐的样品制备步骤容易造成样品中蛋白质组分的丢失<sup>[9]</sup>。为了尽可能减少蛋白丢失,我们采用液氮冷冻研磨的方法提取蛋白。另外,裂解液的选择也非常关键<sup>[10]</sup>。目前常用的裂解液配方有两种:第一种,7 mmol/L 尿素,4%(CHAPS),0.5%的 IPG,0.1 mmol/L DTT;第二种,将 8 mmol/L 尿素改为 7 mmol/L 尿素,2 mmol/L 硫脲<sup>[11]</sup>。后者添加了硫脲,它可以增强蛋白的溶解,特别是溶解疏水蛋白。Fialka 在对小鼠乳腺上皮细胞亚细胞结构的蛋白提取中,添加了硫脲,获得一系列的亚细胞器膜蛋白的如跨膜蛋白 Ecadherin 等<sup>[12]</sup>。为了尽可能得到肝癌组织的全蛋白,我们采用了含硫脲的裂解液。

蛋白沉淀,目前还有许多问题没有解决,如沉淀后蛋白的溶解,特别是一些疏水蛋白、低丰度蛋白等不容易重溶,而它们可能是药物的靶向位点,或是肿瘤细胞的表面抗原,在疾病发生过程中发挥重要的作用<sup>[13]</sup>。肝癌样本中含有的脂肪、核酸和大量的盐分,影响等电聚焦。盐离子在水化过程中容易渗入胶条,使凝胶内产生不均一的电流分布,导致双向电泳结果出现条纹和不均一背景<sup>[14]</sup>。因此,必须采用蛋白沉淀的方法去除这些杂质,才能

顺利地完 成聚焦。目前,已有不少有关样本沉淀的报道,最常使用丙酮沉淀法,TCA-丙酮沉淀法,和商业化的 Cleaning-up kit 来沉淀蛋白,但沉淀的效果如何,却没人做过系统的比较分析。本文将这三种沉淀方法都进行实验,TCA-丙酮沉淀法蛋白丢失较多,与它的作用原理有关。蛋白质在 pH 值小于等电点的环境中带上正电荷,与 TCA 的酸根结合生成不溶盐而沉淀,再用丙酮将酸根完全抽提,获得较纯的蛋白质样品<sup>[15]</sup>。因此它对碱性蛋白的富集效果较好,但对等电点小于溶液 pH 值的酸性蛋白富集效果差,有机溶剂的多次作用造成了蛋白质溶解性变差也加剧了蛋白质的丢失。图 1B 中用 TCA-丙酮沉淀后酸端蛋白丢失很明显。

丙酮沉淀法是通过降低水的介电常数,破坏蛋白质胶体的水化层,形成沉淀析出<sup>[16]</sup>。但是,蛋白质分子在常温或升温时立体结构展开,丙酮极容易与其中的色氨酸、酪氨酸等氨基酸进行疏水结合导致蛋白变性,因此整个沉淀过程应使用预冷的丙酮<sup>[17]</sup>。

Cleaning-up 试剂盒是商家进行改良后的沉淀法,也获得了很好的电泳图谱,但相比之下,丙酮具有经济方便等优点,所以我们推荐使用丙酮沉淀法。

#### 3.2 聚焦程序

一向聚焦是双向电泳成功的关键,但好的聚焦程序是怎样摸索出来的呢?我们的经验是首先根据 IEF 的原则编排基础聚焦程序;再根据样本是否除盐决定低压聚焦的步骤及时间;最终的聚焦电压以 5 ~ 8 kV 为适,聚焦时间以 10 h 为基础进行调整。为了确保实验的重复性,最终聚焦要选择千伏结束。

此外,在 IEF 过程中,利用软件对聚焦时的电压,电流进行实时监测,指导低压聚焦时间及步骤的调整。如电流过高,可在低电压处延长聚焦时间,利用低压达到除盐的效果。

#### 3.3 上样方法

一向等电聚焦最常用的上样方法包括主动水化和被动水化。主动水化中,由于施加低电压有利于大分子蛋白的进入胶条<sup>[18]</sup>,可避免杯上样所产生的渗漏问题。被动水化法可任意调节上样位置,所以特别适合偏酸或偏碱蛋白的聚焦;最高电流可达 75  $\mu$ A,因此对盐的耐受能力较强;同时具有避免蛋白在长时间的低电压水化过程中丢失等优

点。但有些蛋白质的等电点靠近上样处,迁移率及溶解性降低,易沉淀在上样杯处,在二相电泳中表现为在上样处形成条纹状。实验时,应当根据样本类型和实验需要进行选择。本实验中,肝癌组织蛋白主要在 pH 3 ~ 10 之间,通过比较,我们选择主动水化。

蛋白质组学实验涉及的步骤很多,除了上述关键步骤,还有凝胶浓度,染色方法的选择等。实验时要根据感兴趣的蛋白的分子量选择凝胶浓度,常规选择 125 g/L 的凝胶;如果大分子质量的蛋白较多可以选择 100 g/L 的凝胶,相反,如果小分子质量的蛋白多,则选择 150 g/L 的凝胶。常用的染色方法有考染、胶体考染、银染、荧光染色等。一般上样量大于 300  $\mu\text{g}$  时可选择考染或胶体考染;上样量在 100 ~ 300  $\mu\text{g}$  选择银染;小于 100  $\mu\text{g}$  选择荧光染色。

我国肝癌组织蛋白质组学研究已有很多报道,但没有系统的总结双向电泳的方案。本研究充分结合肝癌组织成分特点及双向电泳的具体要求,从双向电泳的全过程进行探讨,通过实验获得理想的双向电泳图谱,形成了一套用于肝癌蛋白质组学研究的稳定可靠的双向电泳技术方案,供从事肝癌蛋白质组学研究人员参考,为进一步的蛋白质组学分析奠定基础。

#### 参考文献:

[1] Bosch FX, Ribes J, Diaz M, et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127 (5 Suppl 1): 5-16.

[2] 冯作化,药立波,周春燕. 医学分子生物学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2005,351-357.

[3] 樊嘉,王征. 肝细胞癌综合治疗 [J]. *外科理论与实践*, 2006, 11(6):467-470.

[4] 廖翔,应天翼,黄留玉,等. 蛋白质组学研究中的双向电泳技术 [J]. *生物技术通讯*, 2003, 14(6):522-524.

[5] Stanley BA, Neverova I, Brown HA, et al. Optimizing protein solubility for two-dimensional gel electrophoresis analysis of human myocardium [J]. *Proteomics*, 2003,

26(3): 815-820.

- [6] 罗新华,杨勤,张权,等. 乙型肝炎肝纤维化组织双向电泳技术的优化 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15 (13):1554-1557.
- [7] Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. *Proteomics*, 2004, 4(12): 3665-3685.
- [8] 蒋兰兰,姜惠,张克勤. 大鼠成骨细胞分泌组双向电泳样品制备方法的建立 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2007, 27(7):770-765.
- [9] 谢玲,应万涛,张开泰,等. 双向电泳和肽质量指纹谱技术鉴定支气管上皮细胞恶性转化相关蛋白 ANX12 human [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16 (5):569-573.
- [10] 宋敏,赖国旗,邱宗荫. HeLa 细胞蛋白质组双向电泳技术的建立 [J]. *重庆医科大学学报:医学版*, 2007, 32(2):117-120.
- [11] 康熙雄. 临床蛋白质组学 [M]. 北京:中国教育文化出版,2006:18-25.
- [12] Fialka, Rabilloud T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 1998, 19 (5): 758-760.
- [13] 夏书华,王明荣,蔡有余. 蛋白质组学中的双相电泳技术 [J]. *国外医学:遗传学分册*, 2001, 24(6):331-336.
- [14] Gorg A, Postel W, Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis immobilized pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 1988, 9(9): 531-546.
- [15] Deshusses JMP, Burgess JA, Scherl A. Exploitation of specific properties of trifluoroethanol for extraction and separation of membrane proteins [J]. *Proteomics*, 2003, 3(8): 1418-1424.
- [16] McCarthy J, Hopwood F, Oxley D. Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis: Myth or reality [J]. *Proteome Research*, 2003, 2(3): 239-242.
- [17] 夏其昌,曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学 [M]. 北京:科学出版社,2004:261-265.
- [18] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京:科学出版社,2000:66-68.

(编辑 王晓鹰)