

胆管癌血清双向凝胶电泳技术的优化

练惠辉¹, 韩 鹏¹, 康劲翮¹, 李华亮¹,
邱乒乓¹, 戴燕燕¹, 李文岗^{2*}, 陈清西^{1*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 福建医科大学附属厦门第一医院, 福建 厦门 361004)

摘要: 本研究为筛选胆管癌变标志物, 开发相应的药物研究, 通过对胆管癌血清双向电泳的样品处理、pH 范围、上样量的选择、电泳参数的设置和 SDS 凝胶电泳染色方法等进行比较优化。确定了样品预处理后通过 Millipore 公司推出的 Montage Albumin Deplete kit 去除血清中高丰度的白蛋白, 再经丙酮沉淀, 用裂解液溶解后, 采用 pH 3.5~10 与 pH 5~8 的两性载体电解质以体积比 1:4 混合使用, 100 μg 的上样量, 12.5% 的 SDS-PAGE 胶, 16 mA 胶进行双向电泳的电泳体系。优化了胆管癌血清双向凝胶电泳的条件, 得到了分辨率较好的胆管癌血清的蛋白图谱, 为进一步的研究奠定了基础。

关键词: 胆管癌; 双向电泳; 蛋白质组学; 血清

中图分类号: R 135.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)S2-0075-04

胆管癌 (cholangiocarcinoma) 是一种恶性高、难于早期诊断和治疗的恶性肿瘤^[1]。从世界范围看, 胆管癌占所有人类胃肠道肿瘤的 3%, 是第 2 种多见的原发性肝癌。1840 年 Durand Fardel 首先报道胆管癌病例, 以后逐渐认识到不论肝内胆管癌或是肝外胆管癌均源自胆道系统的导管上皮^[2]。迄今为止, 大多数胆管癌病人在诊断时肿块已无法切除, 其病程平均少于 12 个月, 当出现继发性胆道梗阻和反复脓毒症、肝功衰竭时, 则构成很高的死亡率。包括切除手术病人在内的全部胆管癌患者的 5 年生存率仅为 5%, 确实值得重视^[2]。

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 (2-DE) 和质谱 (MS) 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, 本实验对胆管癌血清蛋白质 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, 为进一步的胆管

癌血清蛋白质组学研究奠定基础^[3]。

1 材料与方法

1.1 样品来源及处理

样品来自福建省厦门市第一医院胆管癌患者和健康志愿者捐献, 年龄均为 30~70 岁, 男女比例相当。通过静脉穿刺取病人晨血 5 mL, 20 凝血 2 h 后, 3 000 g, 4 min, 离心 15 min, 取上清混合后, 等体积分装成两部分^[4]。一部分直接用裂解液 (含 9 mol/L/ml urea, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% 的两性电解质载体 (pH 3~10, pH 5~8=1:4), 超纯水) 1:9 直接裂解后室温震荡 1 h, 置于 15℃, 以 15 000 g 离心 1 h。离心后取上清冻存在 -80℃ 备用。另一部分通过 Montage Albumin Deplete kit 试剂盒处理, 所有操作均按说明书在室温下操作, 然后迅速冻存在 -80℃。制备的样品用 Bradford 法测蛋白浓度。

1.2 主要试剂

超纯尿素 (urea), 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自 Amersco 公司。丙烯酰胺 (acrylamide) 甲叉双丙烯酰胺 (N,N'-methylenebisacrylamide) 购自 BDASA 公司, 十二烷基磺酸钠 (SDS), 二硫苏糖醇 (DTT) 购自 BBI CHAPS, 四甲基乙二胺 (TEMED), 过硫酸铵购自 Sangon 公司。两性电解质 (Ampholine) pH 5~8, pH 3~10, SDS 分子量标准蛋白均购自 Amersham Bioscience 公司。白蛋白去除试剂盒 (Montage Albumin Deplete kit) 为 Millipore 公司产品, 考马斯亮蓝 R-250 购自 Sigma 公司。

收稿日期: 2008-08-25

基金项目: 福建省医学创新课题 (2007-CXB-9), 厦门市卫生局资助项目 (WSK0602) 和国家自然科学基金人才培养基金 (J0630649) 资助

* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn; kwgl1861@163.com

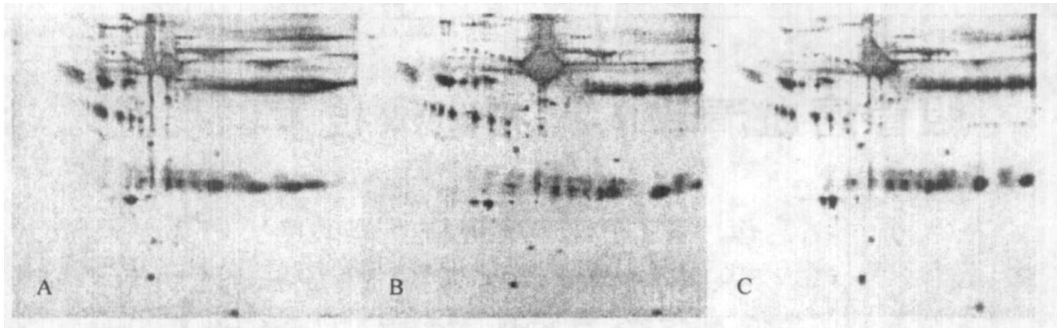


图 1 不同的 pH 载体范围的电泳图谱

(A) pH 范围 3.5~10; (B) pH 范围 5~8; (C) pH 范围 3.5~10 与 pH 范围 5~8 按体积比 1:4 混合

Fig 1 Two dimensional electrophoretic map of the Chololangiocarcinoma serum adjusting different pH range

1.3 双向凝胶电泳

第一向等电聚焦胶电泳 (IEF)电泳参数为: 400 V 电泳 12 h 后 800 V 电泳 1 h 第二向 SDS-PAGE 采用不连续 SDS-PAGE 配制 12.5% 的分离胶采用中板胶 16 cm × 14 cm 和 4% 的浓缩胶, 13 mA / gel (溴酚蓝距胶底约 1 cm 时停止电泳).

1.4 硝酸银染色法

采用非双胺化学显色银染法, 具体操作方案见文献 [6]. 该方案优点为背景较浅, 显色时间长, 较易控制显色的程度, 有利于双向电泳图谱显色的一致性, 且分辨率较高.

1.5 凝胶扫描

凝胶图像通过紫光 D3000 扫描采集, 扫描结果用目前已被大多数研究者所采用的 GE 公司开发的 image master 双向分析软件分析.

2 实验结果

2.1 样品处理效果比较

比较经丙酮沉淀和未经丙酮沉淀的胆管癌病人血清的电泳效果后, 发现经丙酮沉淀的血清的图谱, 蛋白点更清晰, 背景更干净 [7].

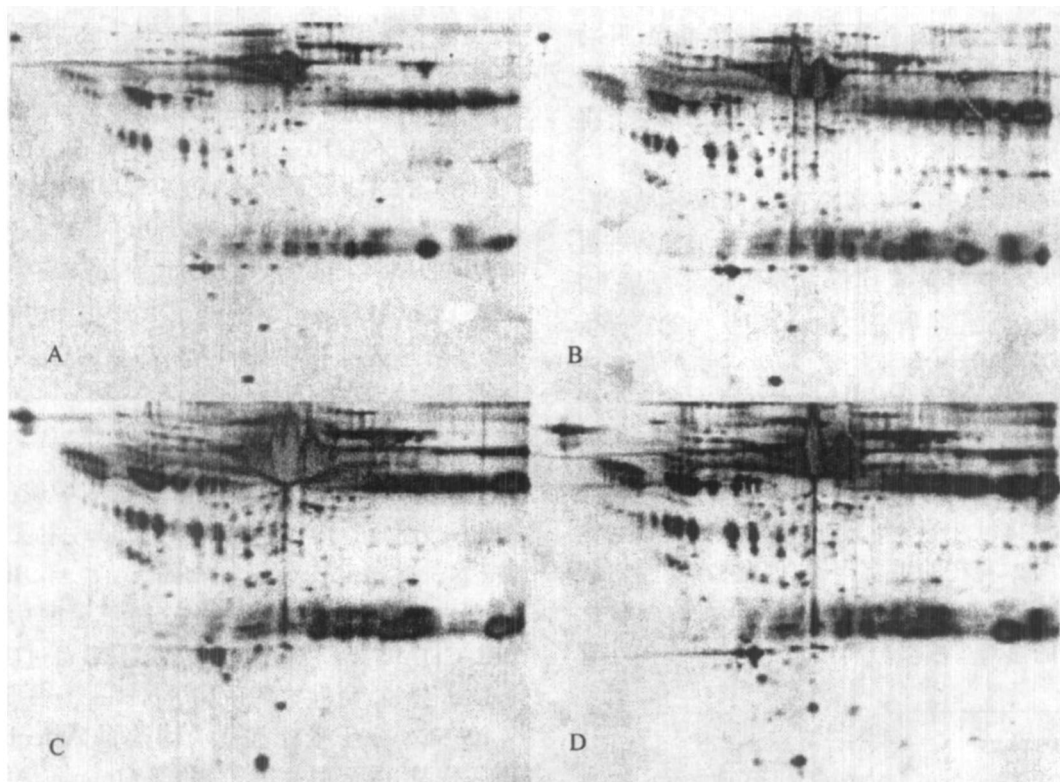


图 2 不同上样量的胆管癌血清样品的电泳图

(A) 50 μg; (B) 100 μg; (C) 150 μg; (D) 200 μg

Fig 2 Two dimensional electrophoretic map of the Chololangiocarcinoma serum loading different protein

2.2 两性载体电解质范围的选择

选用 3 个不同的 pH 值范围方案: (A) pH 范围为 3.5~10; (B) pH 范围为 5~8; (C) pH 范围 3.5~10 与 pH 范围 5~8 按体积比 1:4 混合. 结果见图 1. 当采用 pH 范围 3.5~10 与 pH 范围 5~8 按体积比 1:4 混合时的电泳图谱最清晰, 酸、碱端的蛋白点也没有丢失, 效果最好.

2.3 蛋白上样量对 2-DE 的影响

为了探讨最佳加样量, 本实验分别采用 50、100、150 和 200 μg 的蛋白上样量 (胶条长度为 13.5 cm), 比较了得到的胆管癌血清电泳图谱效果 (图 2). 当采用 100 μg 的蛋白上样量时, 达到蛋白点数量最大化和背景最小化的最好平衡, 如图 2(B) 所示.

2.4 白蛋白的去除处理

参考文献 [8], 在样品处理时, 我们采用 Montage Albumin Deplete kit 对样品进行合适的处理, SDS-PAGE 电泳后, 考马氏亮蓝 R-250 染色结果见图 3. 结果表明, Montage Albumin Deplete kit 可以有效除去全血清中约 70% 的白蛋白, 非特异性吸附其它蛋白 < 10%. 增加了其它蛋白的上样量, 提高了低丰度蛋白的呈现性.

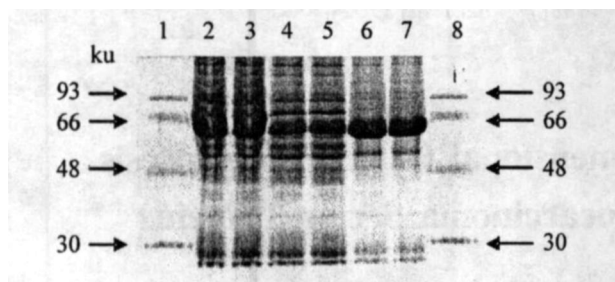


图 3 人血清经 Montage Albumin Deplete kit 处理后电泳图谱 泳道 1~8 标准蛋白; 2~3 全血清; 4~5 处理后血清; 6~7 洗出蛋白

Fig 3 Human serum proteins after depletion of high-abundant proteins using Montage Albumin Deplete kit

2.5 全血和除白蛋白样品双向图谱比较

通过去除血清中的丰度蛋白, 可以通过以下两个方面来改善双向图谱的呈现性. 第一: 提高那些跟高丰度蛋白相关的蛋白的呈现性. 第二: 增加低丰度蛋白的上样量. 图 4 中比较了全血清蛋白和经 Montage Albumin Deplete kit 处理的血清的双向电泳图谱. 我们发现经过 Montage Albumin Deplete kit 处理的血清的电泳图谱增加了蛋白的呈现性和低丰度蛋白的上样量. 同时经过处理的血清的双向电泳图谱在白蛋白, 呈现出

不经处理时被掩盖的蛋白点. 改善了白蛋白区域蛋白点模糊, 成片的状况, 更有利于后续的蛋白差异点的匹配和鉴定.

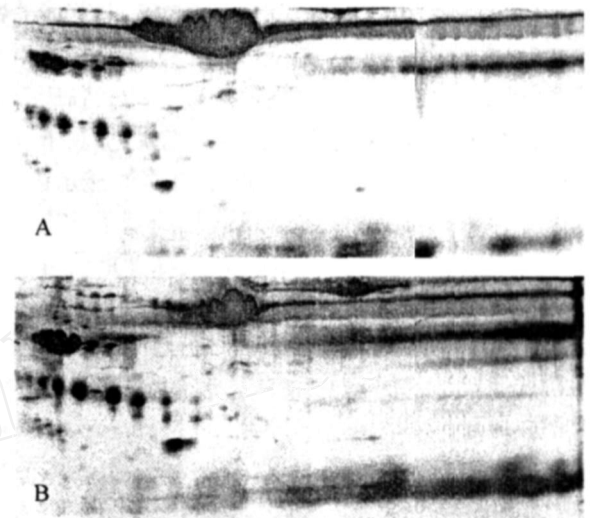


图 4 全血和处理后血清样品双向电泳图

(A) 全血清样品; (B) 处理后血清样品

Fig 4 2-DE protein profiles for crude and depleted serum samples

3 讨论

血清蛋白与组织蛋白、细胞蛋白相比数量最多, 据估计有几万种之多. 不同的蛋白含量差别极大, 可以相差 $10^9 \sim 10^{12}$ 个数量级以上. 然而, 利用 2-DE 方法分离血清蛋白质时, 高丰度蛋白的存在会掩盖许多重要的低丰度蛋白, 使其不能被分离出来^[9], 这也是现有的 2-DE 方法分离血清蛋白质的缺陷, 成为目前这一研究领域的瓶颈. 我们选择了 Millipore 公司推出的 Montage Albumin Deplete kit 去除血清中高丰度的白蛋白. 通过去除占血清总蛋白 70% 以上的高丰度蛋白, 非特异吸附其他蛋白质低于 10%. 可以增加蛋白质上样量, 从而提高蛋白质分离效果^[10].

实验中选用合适的染色方法对于蛋白点的显现至关重要, 特别是在血清样品中. 我们选用的非双胺化学显色银染法获得的电泳图谱背景较浅, 显色时间长, 较易控制显色的程度. 显色灵敏度接近 0.5 ng, 是个适合作为血清蛋白电泳图谱的显色方法.

选用合适的 pH 范围对蛋白质的分离至关重要. 如果选用的两性载体电解质的等电点范围过宽, 则会使蛋白质斑点过分集中在胶板的中心区域, 不利于后续进行蛋白质组分鉴定. 而用等电点范围相对较窄的胶条, 所获得的实验结果蛋白质斑点清晰, 具有较高的分辨率, 有利于后续进行蛋白质鉴定, 但可能丢失了酸性端和碱性端的有意义蛋白. 比较图 1 结果, 可以看到采

用等电点范围为 pH 5~8 的胶条所获得分离效果明显好于等电点胶条为 pH 3.5~10, 但图 1(C) 中我们采用 pH 3.5~10 与 pH 5~8 的以体积比 1:4 混合使用. 实验证明该方案既能得到较好的实验结果, 又不丢失酸碱端的蛋白, 更有利于胆管癌变标记物的筛选.

双向凝胶电泳分离效果与样品的上样量有着重要的联系. 较少的上样量虽然能够使蛋白图谱清晰, 但低丰度蛋白难以显现, 不利于标志物的查找. 提高上样量在某些方面是有利于提高低丰度蛋白质的显示度, 但太大的上样量有时又会使高丰度蛋白掩盖了低丰度蛋白. 结果提示: 加样量为 100 μg 时, 低峰度蛋白可以较清晰的显示, 高丰度蛋白也没有影响到低丰度蛋白的显示.

通过比较条件优化前后的电泳图谱, 确立了样品预处理后通过 Millipore 公司推出的 Montage Albumin Deplete kit 去除血清中高丰度的白蛋白, 再经丙酮沉淀, 用裂解液溶解后, 采用 pH 3.5~10 与 pH 5~8 的两性载体电解质以体积比 1:4 混合使用, 100 μg 上样量, 12.5% 的 SDS-PAGE 胶, 16 mA 胶进行双向电泳的电泳体系, 得到了分辨率较好的胆管癌血清的蛋白图谱. 为进一步筛选胆管癌的诊断标志物奠定了基础.

参考文献:

- [1] 李蓉, 蔡中起, 张静. 胆管癌诊治进展 [J]. *Chin J Clin Hepatol*, 2002, 118 (14): 204 - 205.
- [2] Hameet M, Gregory J G. Cholangiocarcinoma: modern advances in understanding a deadly old disease [J]. *Journal of Hepatology*, 2006, 45: 856 - 867.
- [3] 母昭德, 彭咏波, 易发平, 等. 血清蛋白质组双向凝胶电泳技术的建立 [J]. *重庆医科大学学报*, 2006, 31 (6): 821 - 823.
- [4] Karin B, Tasso M, Pia D. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples [J]. *Proteomics*, 2004, 4: 1 - 11.
- [5] Farrell O. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. *The Journal of biological chemistry*, 1974, 250 (10): 4007 - 4021.
- [6] 贺量, 冷波, 康劲翻, 等. 胃癌细胞 SGC27901 双向电泳系统的建立及优化双向电泳系统的建立及优化 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2006, 45: 149 - 151.
- [7] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21 (6): 1037 - 1053.
- [8] 李建武, 陈雅蕙. 生物化学实验原理和方法 [M]. 第 2 版. 北京: 北京大学出版社, 1994: 56 - 59.
- [9] Chromy B A, Gonzales A D, Perkins J, et al. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins [J]. *J Proteome Rev*, 2004, 3 (6): 1120 - 1127.
- [10] 曾新华. 蛋白质组技术研究诊断肝癌疾病的血清新标志物 [D]. 厦门: 厦门大学, 2002.

Establishment of a Reliable Two-dimensional Gel Electrophoresis Separation Methods for Cholangiocarcinoma Serum Proteins

LIAN Hui-hui¹, HAN Peng¹, KANG Jin-he¹, LI Hua-liang¹, QIU Ping-ping¹,
DAI Yan-yan¹, LIW en-gang^{2*}, CHEN Q ing-xi^{1*}

(1. Key Lab of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. The First Hospital of Xiamen Attached to the Fujian Medical University, Xiamen 361004, China)

Abstract: The aim of this study is identify candidate biomarkers for Cholangiocarcinoma in clinical serum samples. Efforts were made to establish the two dimensional gel electrophoresis (2-DE) separation of serum proteins. This efforts were focused on sample preparation, pH range selection, loading amount, electrophoresis parameters optimization, and protein staining. The results revealed that high quality protein samples were obtained by TCA/acetone precipitation after depletion of high-abundant proteins using Montage Albumin Deplete kit (Millipore). High resolution, reproduction 2-DE maps were obtained when the ration of Amep line pH 3.5~10 to pH 5~8 was set at 1:4 with 100 μg proteins each, and run under 16 mA. The optimized conditions for serum protein in two-dimensional gel electrophoresis of the Cholangiocarcinoma are the foundation for further study on serum differential proteomics.

Key words: Cholangiocarcinoma, two-dimensional gel electrophoresis, proteomics, serum