

胃癌细胞 SGC-7901双向电泳系统的建立及优化

贺量, 冷波, 康劲翮, 陈清西*

(厦门大学生命科学学院 教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 文蛤抗癌活性多肽对多种癌细胞有抑制效应, 具有良好的药物开发前景. 双向电泳技术的进步为药物的开发提供了理想的技术平台. 我们通过对胃癌细胞 SGC-7901总蛋白双向电泳技术的建立以及初步优化对一些环节如样品处理的方法、上样量的选择、电泳参数的设置、凝胶浓度和 SDS凝胶电泳染色方法等进行了优化得到了分辨率较好的胃癌细胞的蛋白图谱, 为进一步的文蛤抗癌多肽抑制胃癌细胞作用的蛋白组学研究提供实验工作的基础.

关键词: 胃癌; 双向电泳; 条件优化

中图分类号: R 735.2

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)S-0149-03

蛋白质的双向电泳技术自 1975 年确立以来有了长足的进步, 目前已成为蛋白质组学研究的支撑技术^[1]. 通过双向电泳不仅可以得到正常生理条件下的机体、组织或细胞的蛋白质的图谱以及相关数据, 还可比较分析在变化了生理条件下蛋白质组所发生的变化情况, 这为药物的开发提供了理想的技术平台^[2].

胃癌是一种比较常见的癌症, 其对人类健康的威胁非常巨大, 在癌症死亡疾病中位居第二位. 研究抑制胃癌细胞的分子机理, 开发治疗胃癌的药物有很大的实际意义. 我们从文蛤中分离出具有抗癌活性的多肽物质, 并报道过对胃癌细胞 BGC-823的抑制作用^[3,4]. 利用蛋白质组学技术研究文蛤抗癌多肽对胃癌细胞的影响有利于抗癌多肽药物的开发. 但由于双向电泳技术有一定难度, 因此不容易开展. 我们对蛋白质样品的处理、IEF、SDS-PAGE、染色等环节进行了摸索及初步优化建立起了胃癌细胞 SGC-7901双向电泳系统, 为多肽抗癌机制的深入研究打下基础.

1 材料

1.1 试剂

超纯尿素 (urea), 丙烯酰胺 (Acryl), 甲叉-双丙烯酰胺 (Bis) 购自 BIOASIA. Triton X-100 购自华美公司. SDS、DTT、CHAPS、TEMED 和过硫酸铵 (AP) 购自上海生工. 低熔点琼脂糖购自 BD BASIC 公司. 两性电解质 pH 5~8 购自 Amersham Bioscience 公司.

收稿日期: 2005-12-15

基金项目: 福建省重点科技项目 (2003N0052) 和厦门大学科技创新工程基金 (XDKJX20043001) 资助

作者简介: 贺量 (1981-), 男, 硕士研究生.

* 通讯作者: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

2 实验方法

2.1 样品处理

胃癌细胞 SGC-7901 用裂解液 (9 mol/L urea, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% 两性电解质载体, pH 5~8 超纯水) 直接裂解后在显微镜下观察. 将制备的细胞裂解悬液转移到 1 mL 离心管中, 室温震荡 1 h 置于 15 °C 以 15 000 g 离心 1 h 离心后取上清分装保存在 -80 °C. 制备的样品用 Bradford 法测蛋白浓度^[5].

2.2 第一向等电聚焦胶电泳 (IEF)

采用 pH 范围在 5~8 的两性电解质载体制备胶条. 其方法是在 3 mL 体系中加入 1.65 g urea, 0.06 g CHAPS, 400 μ L Acryl, 150 μ L 两性载体, 1.1 mL 超纯水真空抽气 10 min 然后加入 3.6 μ L 10% AP 和 26 μ L 10% TEMED. 灌好胶后室温放置 3 h 待胶凝固后, 进行管状电泳, 上槽液加入 20 mmol/L NaOH 接阴极, 下槽加入阳极液 10 mmol/L H₃PO₄ 进行预电泳, 时间为 200 V 15 min, 300 V 30 min, 400 V 30 min 然后洗去覆盖液, 上样进行电泳 400 V 12 h 后加电压到 800 V 1 h 结束. 电泳结束后将胶条取出平衡 30 min 然后转移到二向进行 SDS-PAGE.

2.3 第二向 SDS-PAGE 电泳

采用不连续 SDS-PAGE 配制 12.5% 的分离胶 (中板胶 16 cm \times 14 cm) 和 4% 的浓缩胶, 用水饱和正丁醇封胶. 分离胶放置室温 3 h 以上再灌浓缩胶. 将胶条转移后用 0.5% 的低熔点琼脂糖溶解到平衡液中作为固胶液固定. 电泳采用恒流每块胶在浓缩胶时为 10 mA, 当进入分离胶后加大到每板 20 mA. 待溴酚蓝跑到离胶底边缘 1 cm 处停止电泳, 取胶进行染色.

2.4 染色及扫描

采用银染检测, 二向凝胶放入固定液中固定 3 h

以上. 然后参考文献[6]的方法, 经敏化 40 min 银染 30 min 显色 10~20 min 最后终止液终止. 胶片用 powerlook III 扫描仪进行扫描.

3 结果与讨论

3.1 样品的制备

样品制备是双向电泳成功与否的关键. 目前许多双向电泳的改进方法都着眼于增加蛋白质的溶解度并减少蛋白的降解和丢失. 样品的制备应做到溶解尽可能多的蛋白质. 通常样品裂解液中含有高浓度的尿素(9 mol/L). 高浓度的尿素使蛋白变性去折叠有利于提高蛋白质的溶解度. 样品中的疏水蛋白质由于疏水相互作用而导致蛋白质不易溶解, 因此需要表面活性剂来增加疏水蛋白的溶解性. 以前用得较多的是非离子型表面活性剂 Triton X-100 CHAPS 是目前用得最广泛的表面活性剂, 其对疏水蛋白的促溶解能力比 Triton X-100 强^[7], 因此我们用两性表面活性剂 CHAPS 作为促溶剂, 另外要达到蛋白质的完全去折叠还应断开蛋白质中的二硫键. 用得较多的还原剂有 DTT 和 ME, 它们可以将蛋白质的二硫键还原成巯基有助于蛋白的去折叠. DTT 的还原能力要比 ME 更强, 因此我们采用 DTT 代替 ME. 但应当注意的是, DTT 在水溶液中易分解, 因此使用时需要现用现配. 在裂解细胞制备蛋白样品的方法上, 我们采用了裂解液直接裂解的方法, 此方法简便、省时, 提高了实验效率且电泳结果也比较好. 一般认为在裂解细胞时, 细胞内的蛋白酶会降解自身的蛋白而细胞内的核酸会增加样品的粘性从而影响电泳的结果, 所以人们通常在裂解液中加入一些蛋白酶抑制剂和核酸酶以消除这些因素的影响. 鉴于裂解液本身就有一定的蛋白酶抑制效果, 另外加入到裂解液中的两性电解质可以和核酸结合, 并在随后的高速离心时形成沉淀而除去, 所以我们在裂解液中没有加入蛋白酶抑制剂和核酸酶. 本实验在没有加入蛋白酶抑制剂和核酸酶的情况下, 依然取得较好的电泳效果, 显示了该方案可行性. 同时该方案还可以降低有毒试剂对实验人员健康的威胁, 简化实验步骤, 降低实验成本. 最后在裂解细胞的时候采用了震荡的方法有利于蛋白的充分溶解和样品制备时间的缩短, 减少蛋白的降解.

3.2 第一向等电聚焦 (IEF)

按 O'Farrell^[8]的方法制胶. 由于自备的胶条, 其 pH 梯度不如商品化 IPG 胶条那么稳定, 较高的电压会破坏胶内形成的 pH 梯度并导致胶条变形. 我们探讨电泳的优化条件, 发现用低电压并延长电泳时间的方案可以得到较理想的实验结果, 见图 1.

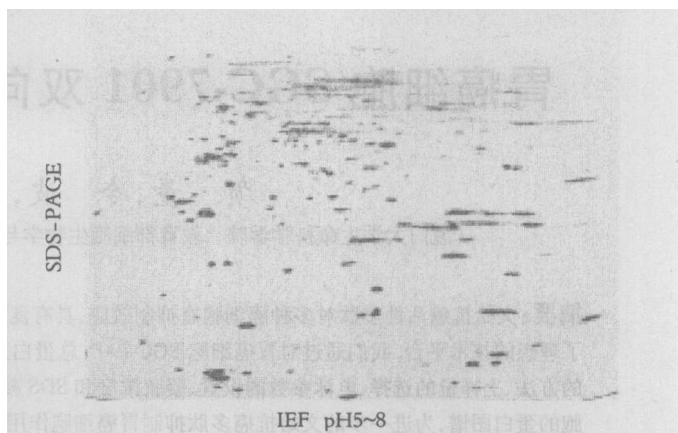


图 1 胃癌细胞 SGC-7901 双向图谱

Fig 1 Two dimensional electrophoretic map of stomach cancer SGC-7901 cells proteome

3.3 第二向 SDS-PAGE 及染色

第二向采用 12.5% 的分离胶分离蛋白可以得到比较理想的电泳结果. 由于第一向的 IEF 为柱状胶, 已经起到了浓缩作用, 所以第二向 SDS-PAGE 中浓缩胶加入与否对于实验结果没有显著的影响. 本文对加浓缩胶以及不加浓缩胶对第二向 SDS-PAGE 的影响进行了对比研究, 结果见图 2 第一向胶的 pH 范围均为 5~8 从实验结果可见, 未加浓缩胶的图谱 B 的点比图谱 A 的点分得更开, 其原因是未加浓缩胶的方法比加有浓缩胶的方法的分离胶的更长, 所需电泳时间也 longer, 相应的大分子量蛋白质也分得更开. 另外不加浓缩胶可以简化实验方案缩短时间, 所以后续实验方案均采用不加浓缩胶进行第二向的 SDS-PAGE.

4 讨论与分析

采用银染色法时的样品上样量一般在 50~100 μg 左右, 虽然银染的分辨率很高可以达到 0.1 ng 级水平, 但细胞中的一些低丰度蛋白质仍然难以被检测出, 因此要提高上样量以便检出更多的蛋白质. 但上样量过大又会使得高丰度蛋白点过大, 掩盖了低丰度蛋白, 不利于后期的分析, 所以选择一个合适的上样量对于双向电泳的分辨率有重要的影响. 我们通过几次的不同上样量的对比实验, 上样量 100 μg 的图谱明显比上样量 50 μg 的图谱蛋白质斑点明显地增多, 说明电泳结果的分辨率更高, 所得图谱也较理想, 高丰度蛋白的影响不大. 而上样量 200 μg 的电泳图谱的高丰度蛋白的点过大, 掩盖了一些低丰度蛋白点. 在转移的过程中使用 0.5% 的低熔点琼脂糖是实验中蛋白质转移成功的关键. 低熔点琼脂糖在室温下不易凝固, 对蛋白质的转移有利, 而低浓度的琼脂糖其交联度低减少对蛋白质的吸附作用, 也有利于蛋白质的转移. 转移胶条

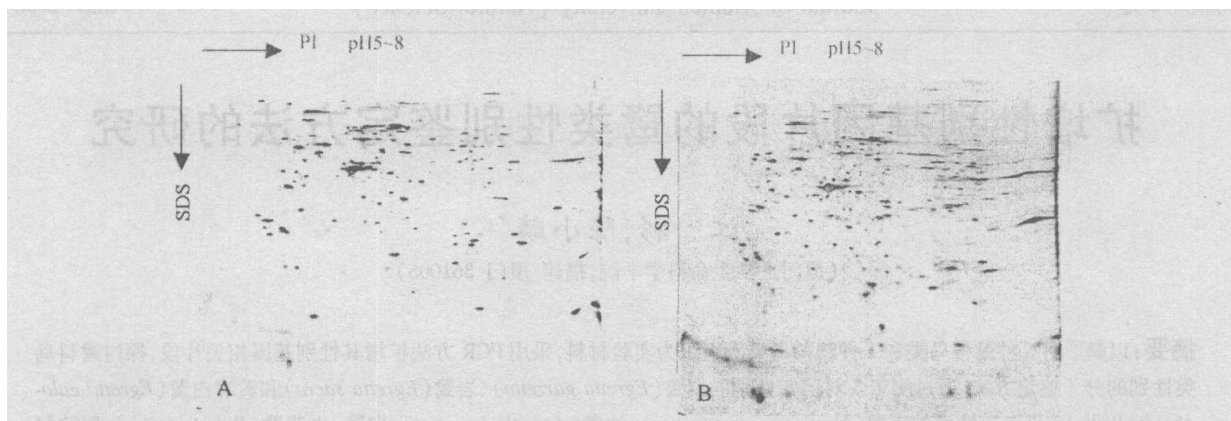


图 2 胃癌细胞 SGC-7901 双向电泳图谱

A: 加浓缩胶; B 未加浓缩胶

Fig 2 The effect of concentrated gels on the two dimensional electrophoretic map of stomach cancer SGC-7901 cells protein

时应注意胶条下面与琼脂糖之间不能有气泡, 否则电泳时会阻碍蛋白的迁移。将胶条放好后放入冰箱让琼脂糖凝固。银染的时候最好使用超纯水, 其染色效果明显比用双重蒸水配的染色试剂好, 用双重蒸水的银染电泳图背景深, 而用超纯水的电泳图背景则比较干净。

综上所述, 经过对样品处理方法、上样量选择、电泳参数设置、凝胶浓度和电泳染色方法等一系列条件的摸索及优化, 本文最终确立了一套实验方案得到了比较理想电泳结果, 为文蛤抗癌多肽抑制胃癌细胞的蛋白质组学研究提供实验工作的基础。

参考文献:

- [1] Lopez M F. Proteome analysis I Gene products are where the biological action is [J]. J Chromatogr B, 1999, 722: 191-202
- [2] Anderson N L, Matheson A D, Steiner S. Proteomics applications in basic and applied biology [J]. Curr Opin Bi-

- tech, 2000, 11: 408-412
- [3] Leng B, Liu X D, Chen Q X. Inhibitory effects of anticancer peptide from *Mercenaria* on the BGC-823 cells and several enzymes [J]. FEBS Letters, 2005, 579: 1187-1190
- [4] 刘小丹, 黄璜, 陈清西. 苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42(1): 102-106
- [5] 李建武, 萧能赓, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1994
- [6] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999
- [7] 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
- [8] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. J Biol Chem., 1975, 250(10): 4007-4021.

Establishment and Optimization of Two-dimensional Electrophoresis for Proteomics of Human Gastric Cancer SGC-7901 Cells

HE Liang, LENG Bo, KANG Jin-he, CHEN Qing-xi*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract We have purified an anti-cancer peptide from the *Mercenaria* which can inhibit proliferation of several breeds of cancer cells such as human gastric gland carcinoma cells (BGC-823). Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) has recently become the preferred method for proteomics and advanced the utility of proteomics in drug discovery process. In this article we established 2-DE technique for SGC-7901 successfully by optimizing a series of factors such as sample preparation, electrophoresis parameters, concentration of EF and SDS gels, protocol for staining and so on. The research will be useful to further study of the effects of anticancer peptide from *Mercenaria* on the SGC-7901 cells.

Key words gastric gland carcinoma, two-dimensional gel electrophoresis, condition optimization