

• 研究论文 •

毛细管电泳检测肺癌及癌旁正常组织蛋白质混合物差异

刘勇^{a,b} 王荣^{*,a,b,c} 高岚^b 贾正平^{a,b} 谢华^a
张军莉^a 马骏^a 张爱梅^d 谢希晖^c

^a 兰州军区兰州总医院临床药理基地 兰州 730050)

^b 兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

^c 兰州大学药学院 兰州 730000)

^d 西北师范大学生命科学院 兰州 730070)

摘要 以建立的毛细管电泳(CE)-激光诱导荧光(LIF)检测蛋白质的方法对提取肺癌及癌旁正常组织蛋白质混合物(变性/活性)差异进行检测. 采用异硫氰酸荧光素(FITC)为衍生剂, 电泳缓冲液为1×TBE (TBE为Tris-硼酸-EDTA, 变性电泳pH 10.0, 活性电泳为pH 8.3且含有2 mg/L考马斯亮蓝), 分离电压15 kV, 柱温15 °C, 电动进样(10 kV×10 s), 激发波长/发射波长=488/520 nm 检测时, 肺癌及癌旁正常组织蛋白质混合物样品得到较好分离且有明显差异. 与目前常用蛋白分析方法: 变性 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)以及活性蓝绿温和胶电泳(BN-PAGE)进行比较. BN-PAGE结果显示肺癌组织相比正常组织有较明显蛋白种类差异; SDS-PAGE 结果表明一些蛋白质表达量差异也是肺癌及癌旁正常组织的显著差别, 且主要集中在20~116 kDa. CE-LIF检测结果与PAGE结果大致相同, 且CE-LIF检测蛋白质的灵敏度高于PAGE, 能更准确反映肺癌及癌旁正常组织的蛋白质差异. 结论是CE-LIF可用于蛋白质差异检测, 时间短, 效果较好, 对活性蛋白质进行分析体现了其优点: 可提供较强的动力——电压, 及强动力下良好的温度稳定性.

关键词 蛋白质组学; 毛细管电泳; 肺癌; 蛋白质混合物; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 蓝绿温和胶电泳

Capillary Electrophoresis Detection of Lung Cancer and Adjacent Normal Tissue Differences in Protein Mixture

Liu, Yong^{a,b} Wang, Rong^{*,a,b,c} Gao, Lan^b Jia, Zhengping^{a,b} Xie, Hua^a
Zhang, Junli^a Ma, Jun^a Zhang, Aimei^d Xie, Xihui^c

^a Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of the Chinese People's Liberty Army, Lanzhou 730050)

^b Life Science College, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

^c Pharmaceutical School, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

^d Life Science College, Northwest Normal University, Lanzhou 730070)

Abstract Protein mixture (denatured and native) differences of extracted from lung cancer and adjacent normal tissue by established method of capillary electrophoresis (CE)-laser-induced fluorescence (LIF) detection of protein was detected using the fluorescein isothiocyanate (FITC) as a derivative agent. When detected by the 1×TBE electrophoresis buffer solution (pH 10.0 of denaturing gel electrophoresis and pH 8.3 of native gel electrophoresis containing 2 mg/L Coomassie brilliant blue), separation voltage of 15 kV, column temperature of 15 °C, electric injection (10 kV×10 s), and excitation wavelength/emission wavelength of 488/520 nm, lung cancer and adjacent normal tissue protein mixture samples obtained a better separation and there was significant difference. Comparing with the current commonly used analysis methods, the SDS-denatured polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as well as the Blue Native polyacrylamide

* E-mail: wangrong-69@163.com

Received May 17, 2010; revised June 7, 2010; accepted October 26, 2010.

国家自然科学基金(Nos. 20775089, 30970312)资助项目.

gel electrophoresis (BN-PAGE), the BN-PAGE results showed that compared to normal tissue, the lung cancer tissue had more significant protein type differences. But the SDS-PAGE results showed that some differences of protein expression had significant difference between the lung cancer and adjacent normal tissue, and mainly concentrated in 20~116 kDa. CE-LIF detection results were roughly the same with PAGE, and CE-LIF is more sensitive than PAGE and it can more accurately reflect protein differences of lung cancer and adjacent normal tissue. We concluded that the CE-LIF could be used to detect protein differences. And the time was shorter, effect was better, and analysis of active protein reflected its advantage of providing a strong driving force-voltage and a well temperature stability by strong motivation.

Keywords proteomics; capillary electrophoresis; lung cancer; protein mixture; polyacrylamide gel electrophoresis; blue native polyacrylamide gel electrophoresis

随着人类基因组计划的实施和生命科学研究进入后基因组时代,人类基因组研究重心也逐步由“结构”向“功能”转移,也就是蛋白质组学(proteomics)^[1,2].比较蛋白质组学是其重要组成部分,它通过整体比较蛋白调控网络,分析不同蛋白质组之间表达数量、水平和修饰状态的差异,寻找与疾病发生相关的标志性蛋白,或新的药物靶标蛋白.这些特异蛋白质能为研究疾病发病机理,揭示生命活动规律提供线索.在肿瘤研究中的应用日益广泛,尤其在早期诊断、探讨肿瘤发生和转移机理与肿瘤治疗方面的研究,也为肿瘤的诊断提供了更多的思路,已经成为肿瘤研究的热点之一^[3,4].

比较蛋白质组学研究的分离手段主要包括^[5]双向凝胶电泳(2-DE)技术、同位素标记亲和和标签(ICAT)技术、表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱(SELDI)技术和高效液相色谱(HPLC)技术等.近年来产生一些新方法,如亲和层析、毛细管等电聚焦、毛细管区带电泳和反向高效液相色谱等.这些方法各有优点,但缺点也比较明显,如目前使用最广泛的 2-DE 技术,它可以把复杂蛋白质混合物在二维平面上很好地分开,并可对分离出的蛋白斑点进行定性和定量地分析.具有高通量、高灵敏度、高分辨率等优点,但其重复性及对于低丰度蛋白的检测差强人意,且操作环节要求较高^[6].

本实验以荧光素异硫氰酸酯(FITC)为柱前衍生剂,对提取肺癌及癌旁正常组织蛋白质混合物(变性/活性)进行衍生.实验室建立的 CE-LIF 检测变性蛋白质方法对提取肺癌及癌旁正常组织变性蛋白进行检测;电极缓冲液 1×TBE 中加入 2 mg/L 的考马斯亮蓝 G250,改进检测方法,用于活性蛋白质检测,对其分离活性蛋白质的能力进行考察,并与 SDS-PAGE 和 BN-PAGE 进行比较,拟建立一种高效、快速、灵敏的检测蛋白质差异的方法.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

P/ACE System 5000 型毛细管电泳仪、P/ACE System 5000 station 数据处理软件、P/ACE System laser module 488 nm 激光发射器(美国 Beckman 公司);石英毛细管柱(河北永年光导纤维厂);DYY-8C 型电泳仪、DYCZ-24E 型电泳槽(北京市六一仪器厂);P^HS-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂);AE240 型电子天平(瑞士 Mettler 公司);磁力搅拌器(深圳天南海北实业有限公司).

聚环氧乙烷(PEO, $M_r=300000$);丙烯酰胺、*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、考马斯亮蓝 G250 (CBB G-250)、Triton X-100、6-氨基乙酸、Bis-Tis、Tricine 购自上海生工生物工程技术有限公司;γ-甲基丙烯酰基-三(甲氧基)硅烷(MAPS)购自 A Johnson Matthey 公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自上海山浦化工有限公司;硼酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)购自天津化学试剂厂;FITC 购自北京鼎国生物技术有限责任公司;Protein Molecular Weight Marker (Broad) D532S 购自 TaKaRa;活性电泳使用的高分子量标准蛋白购自 GE Healthcare Amersham. 以上试剂均为分析纯.

肺癌及癌旁正常组织取自兰州军区兰州总医院病理科,标本来自肺部切除并经病理切片证实.

1.2 肺癌及癌旁正常组织蛋白质提取

参考文献[7]方法,剪碎组织 10~50 mg,置于 EP 管中,加入 500 μL 蔗糖缓冲液,涡旋均匀后倒入研钵,充分研磨,边研磨边加入液氮;10 mg 均分样品,10000~20000 g 离心 10 min;加入 35 μL 溶解缓冲液(750 mmol·L⁻¹ 6-氨基乙酸, 50 mmol·L⁻¹ Bis-Tis, 0.5 mmol·

L^{-1} EDTA), 涡旋 3~5 min; 加入去垢剂 Triton X-100 (20%) 15 μ L, 溶解 5~10 min, 离心 5~10 min, 取上清, 加入 5 μ L 50% 甘油, 提取蛋白质为活性蛋白质。

1.3 SDS-PAGE 及 BN-PAGE 检测

参考文献[8]方法, 常规 SDS-PAGE 检测, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶为 15%; 提取蛋白质沸水浴变性 5~8 min, 5~10 μ L 上样; 100 V 样品进入凝胶, 200 V 电泳分离, 5 h 左右结束。

BN-PAGE 采用梯度混合仪灌制浓度 4%~13% 梯度分离胶, 浓缩胶为 3.5%, 样品中加入 5 μ L 50 mg/mL CBB G-250), 5~10 μ L 上样; 100 V 使样品进入凝胶, 电流 15 mA, 500 V 继续电泳; 至蓝色运行玻璃板 1/3 处, 移去蓝色阴极缓冲液, 加入无色阴极缓冲液; 电泳继续 4~6 h, 结束后采用传统考马斯亮蓝染色, 并脱色观察结果。

1.4 CE 检测

进样前分别用水和 1×TBE 溶液冲洗涂层毛细管柱 4 min, 再由毛细管电泳仪压力系统自动填充 PEO 溶液 (172 kPa, 5 min), 然后进样检测。涂层毛细管柱长 37 cm×75 μ m, 有效长度 27 cm。

根据文献[9]及之前实验^[10]得到 FITC 标记蛋白质方法对变性及活性蛋白质进行衍生: FITC: 蛋白质=1:100; 标记时间: 避光 4 h; 缓冲液为: 0.5 mol/L pH 9.0 碳酸盐缓冲液。10 kV 负极电动进样 10 s, 激光诱导荧光检测器($\lambda_{ex}=488$ nm, $\lambda_{em}=520$ nm)检测, P/ACE System station 数据处理软件采集数据。之前确定的相应条件进行 CE 检测: 筛分介质 PEO 浓度 0.05%, 电压 15 kV, 温度 15 $^{\circ}$ C, 变性样品电极缓冲液 1×TBE 采用 pH 为 10.0; 活性样品电极缓冲液中添加 CBB G-250, pH 8.3。

2 结果与讨论

2.1 电渗流

为抑制毛细管柱中的电渗流(EOF), 减小其对分离的影响, 根据文献[11]对毛细管柱内壁进行修饰。检测涂层柱及电极缓冲液 1×TBE 中添加 2 mg/L CBB G-250 后涂层柱 EOF 情况, 考察运行稳定性, 结果见图 1。

结果显示, 添加了 CBB G-250 之后涂层柱的电渗流得到更好抑制, 且更加平稳。实验过程中对添加 G250 的比例进行考察, 发现较高浓度 G250 易引起运行过程中较大电流波动, 2 mg/L 效果较好, 浓度低于 2 mg/L 时, 检测响应值降低, 效果变差。

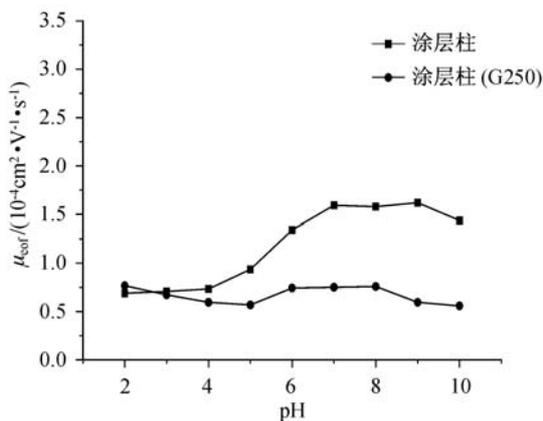


图 1 涂层柱和电极缓冲液 1×TBE 中添加 G250 涂层柱的电渗流

Figure 1 Electroosmotic flow of coated column and coated column of 1×TBE electrode buffer containing G250

Dimethyl sulfoxide concentration: 1%, pressure injection: 3 s, separation voltage at 15 kV, UV detection at 280 nm

2.2 PAGE 结果

2.2.1 SDS-PAGE 结果

将提取肺癌及对应癌旁正常组织蛋白质混合物样品于沸水变性 5~8 min, 加入上样缓冲液, 常规 SDS-PAGE 检测, 浓缩胶浓度 5%, 分离胶浓度为 15%。电泳结束后行常规硝酸银染色脱色, 数码相机采集图像, 结果见图 2。

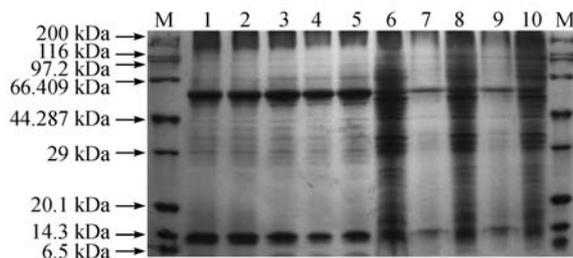


图 2 SDS-PAGE 结果

Figure 2 Result of SDS-PAGE

M: Protein molecular weight marker (Broad) D532S; 1~5: Normal tissue; 6~10: Lung cancer tissue

样品上样量为 10 μ L 时, 条带较浅, 而癌旁正常组织中 44~66 kDa 间一条带较粗, 为得到良好结果并且利于图像采集均衡考虑, 样品 6, 8, 10 上样量为 20 μ L, 其余为 10 μ L。由图可见差异主要集中于 20~116 kDa 之间, 蛋白表达量有较明显变化。而这一分子量范围是国内外报道肿瘤相关基因标志物 ras, p16, p53 等编码蛋白的集中区域。尤其是 44~66 kDa 之间, 蛋白质差异很大, 这是肺癌中广泛研究并已获公认的抑癌基因 p53 基因编码蛋白的分子量(53 kDa)。

2.2.2 BN-PAGE 结果

4%~13%梯度胶对提取的蛋白质在 4 °C 环境下进行检测, 100 V 使样品进入凝胶, 电流 15 mA, 500 V 继续电泳, 5 h 结束后, 考马斯亮蓝染色脱色, 数码相机采集图像, 结果见图 3. BN-PAGE 检测蛋白质时, 对于大分子量蛋白质要求有较高的“动力”也就是需要较高的电压(通常为 500~1000 V), 但较高电压的同时要求运行过程中温度不能过高——温度高易使电泳过程中条带展宽、拖尾乃至蛋白质变性。

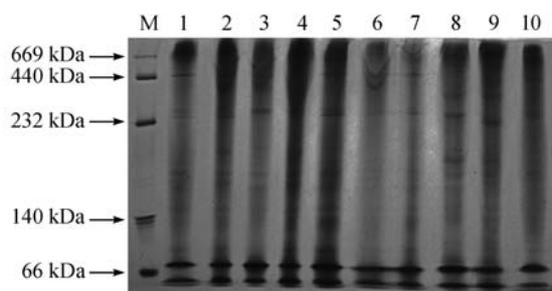


图 3 BN-PAGE 结果

Figure 3 Result of BN-PAGE

M: High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis; 1, 3, 5, 7, 9: Normal tissue; 2, 4, 6, 8, 10: Lung cancer tissue

由图 3 可见, 上方大分子量蛋白质条带拖尾严重, 为高电压下分离蛋白质导致, 不利于结果分析. 分子量高于 440 kDa 的蛋白质条带较少, 多集中于 140~440 kDa 之间, 66 kDa 分子量附近有些小分子量蛋白质, 怀疑为提取或电泳过程中导致的蛋白质变性. BN-PAGE 结果显示, 肺癌及癌旁正常组织中活性蛋白质主要在于种类上的差异.

2.3 CE 结果

将以 FITC 衍生的等量肺癌及癌旁正常组织蛋白质溶于 $1 \times \text{TBE}$ (1 : 1, V : V). 本实验室之前研究^[10]发现 pH=10.0 时更适于变性蛋白质分离, 所建立的方法有良好的重现性, 同时检出限较低为 0.83 mg/L. 其他条件不变, 对衍生变性蛋白样品进行检测, 结果见图 4. 检测结果与 SDS-PAGE 大致相同, 并且一些 SDS-PAGE 检测不出的蛋白质也能得到很好检测. 尤其在进样量方面, SDS-PAGE 为得到良好结果需加倍上样, 而 CE 上样量为纳升级, 对于微量蛋白质的检测更加准确、直观.

CE 检测蛋白质时通常采用极端 pH 法, 偏中性环境下对于蛋白质的检测效果较差. CBB G-250 结合蛋白质使其带负电, 不改变其自身电荷, 这个原理已在 BN-PAGE 中得到应用, 并取得成功. 本实验室之前研究^[10]发现, 在对毛细管柱进行修饰之后, 结合具有动态涂层能力的筛分介质 PEO 可使其 EOF(电渗流)在较中

性范围得到抑制, 并且添加 CBB G-250 后对于活性蛋白质的检测 pH 8.3 与 pH 10.0 大致相同, 为防止长时间检测导致活性蛋白结构变化影响实验结果, CE-LIF 检测提取肺癌及癌旁正常组织活性蛋白质采用的 pH 为 8.3, 其他分离条件不变, 结果如图 5.

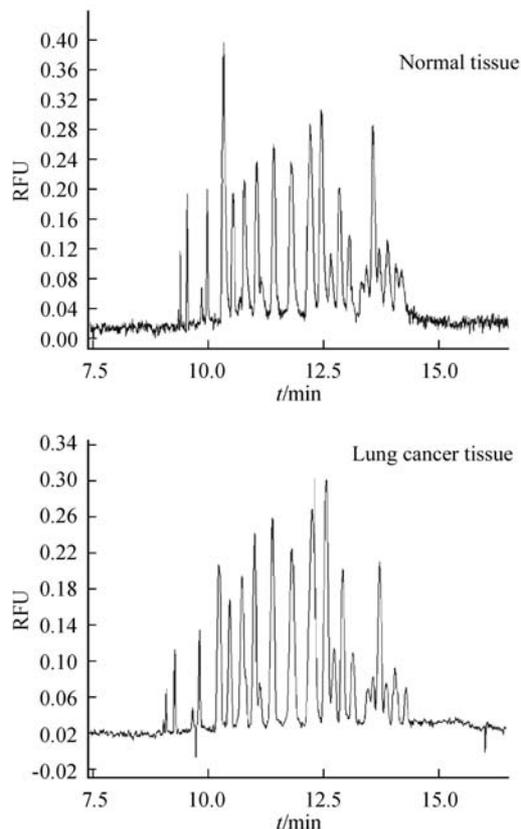


图 4 CE-LIF 检测肺癌及癌旁正常组织变性蛋白质结果

Figure 4 Result of lung cancer and adjacent normal tissues degeneration proteins detection by CE-LIF

CE 能够在提供高电压的同时对温度进行很好的控制, 分离稳定性好, 不存在 BN-PAGE 分离大分子量蛋白质拖尾严重的现象, 分离结果更加直观, 也使它在蛋白质分离方面具有很大的优势.

3 结论

对于肿瘤诊断来说, 仅仅从核酸水平进行检测, 即使是肿瘤标志物, 也没有非常显著的特异性, 检出率往往不能直观反映肿瘤的状况. 为了更细致的认识肿瘤, 近年来从蛋白质水平进行研究, 对核酸研究进行印证, 并想通过这种研究发现新的、更加直观、全面、准确反映肿瘤发生发展状况的证据.

传统经典的变性 SDS-PAGE 及活性 BN-PAGE 对于肿瘤蛋白差异所提供的信息各有专长, 变性电泳更好地

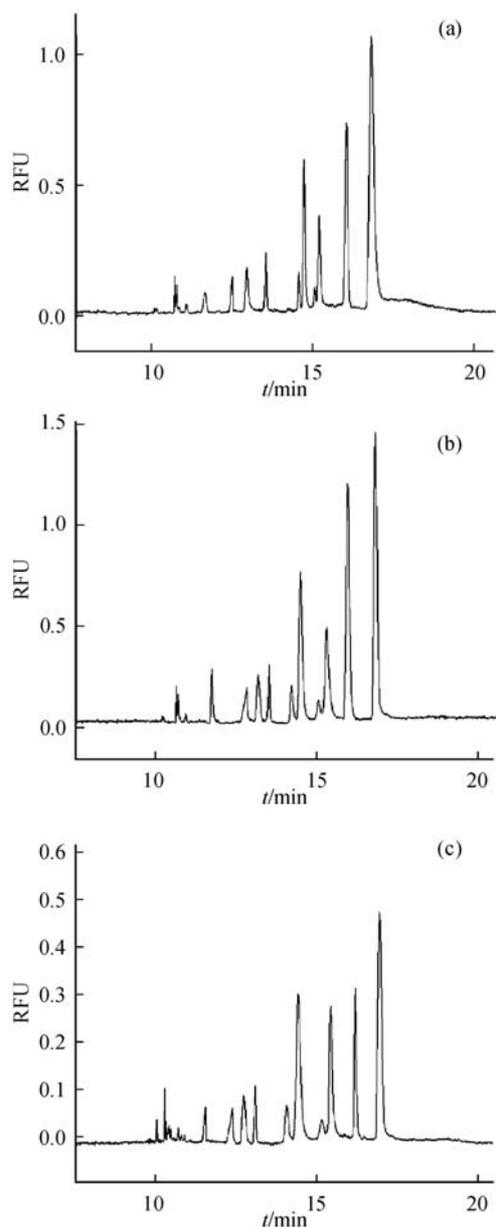


图5 CE-LIF 检测肺癌及癌旁正常组织活性蛋白质结果

Figure 5 Result of lung cancer and adjacent normal tissues native proteins detection by CE-LIF

(a): Normal tissue; (b), (c): Lung cancer tissue from different patient

反映表达量的变化, 如本实验中变性样品 44~66 kDa 之间较大的条带灰度差异; 活性电泳更直观反映蛋白质种类的差异: 肺癌及癌旁正常组织中蛋白质在凝胶中位置的不同. 但这两种方法时间较长(>6 h), 上样量较大, 对于微量蛋白检测灵敏度不高. CE-LIF 结合这两种方

法, 可清楚地获得肺癌及癌旁正常组织蛋白质差异的信息, 无论从时间性、操作性、直观性还是定量的角度都具有很好的优点: CE 能提供较高分离驱动力—电压, 良好的控温能力, 较短的检测时间 (20 min 左右), 高自动化程度, 结合涂层的毛细管及对分离体系的改进, 可对蛋白质进行分析, 效果较好, 上样量少对于较微量蛋白质的检测具有显著优势. 建立的方法可用于蛋白质差异的检测.

生物体是结构与功能的统一体, 结构的分析是首要条件. 该方法结合制备型 CE, 将分离后的活性蛋白质中的不同成分进行二次 CE, 可实现二维分析, 不仅可用于蛋白质差异检测, 还能对其种类进行鉴定, 具有潜在的应用价值.

References

- Pandey, A.; Mann, M. *Nature* **2000**, *405*, 837.
- Pan, H.-Z. *Biological Information Transfer, Scientific Development Trend of 21 Century*, Science Press, Beijing, **2000** (in Chinese).
(潘华珍, 生物信息传递, 21 世纪初科学发展趋势, 科学出版社, 北京, **2000**.)
- Chevalier, F.; Martin, O.; Rofidal, V.; Devauchelle, A. D.; Barteau, S.; Sommerer, N.; Rossignol, M. *Proteomics* **2004**, *4*, 1372.
- Zolg, W. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1720.
- Bai, X.-H.; Yu, X.-P. *Med. Recapitul.* **2006**, *12*, 1071 (in Chinese).
(白晓卉, 于修平, 医学综述, **2006**, *12*, 1071.)
- Zheng, Y.; Shao, S.-J. *Life Sci. Instrum.* **2006**, *4*, 19 (in Chinese).
(郑彦, 邵淑娟, 生命科学仪器, **2006**, *4*, 19.)
- Wittig, I.; Braun, H. P.; Schägger, H. *Nature* **2006**, 418.
- Nováková, Z.; Man, P.; Novák, P.; Hozák, P.; Hodný, Z. *Electrophoresis* **2006**, *7*, 1277.
- Chen, Y.; Xu, L. J.; Lin, J. M.; Chen, G. N. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1302.
- Liu, Y.; Wang, R.; Gao, L.; Jia, Z.-P.; Xin, X.-T.; Xie, H.; Ma, J.; Guo, Z.-Q.; Zhang, A.-M.; Xie, X.-H. *Chin. J. Anal. Chem.* **2010**, *38*(9), 1287 (in Chinese).
(刘勇, 王荣, 高岚, 贾正平, 辛晓婷, 谢华, 马骏, 郭志强, 张爱梅, 谢希晖, 分析化学, **2010**, *38*(9), 1287.)
- Felmlee, T. A.; Oda, R. P.; Persing, D. A.; Landers, J. P. *J. Chromatogr. A* **1995**, *717*, 127.

(A1005171 Zhao, C.)