

# CD34<sup>+</sup>造血干 / 祖细胞蛋白质组双向电泳图谱的建立

魏永强 袁茹 袁正山 袁启发 第一军医大学南方医院血液科 广东 广州 510515 窑

**摘要** 目的 探讨骨髓(M)和动员后外周血(MPB)CD34<sup>+</sup>细胞的蛋白质差异表达情况。方法 应用免疫磁珠法分离纯化正常人骨髓和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员后外周血单个核细胞(MNCs)中的CD34<sup>+</sup>细胞。然后提取CD34<sup>+</sup>细胞的全细胞蛋白质进行双向电泳,并对电泳结果进行图像分析。结果 纯化后CD34<sup>+</sup>细胞的平均纯度为92.33%。每次纯化获得的CD34<sup>+</sup>细胞数平均为(1.12±0.42)×10<sup>6</sup>个。优化的双向电泳技术获得较为理想的蛋白质组图谱,显示出不同来源的CD34<sup>+</sup>细胞存在不同的蛋白质表达。结论 免疫磁珠联合双向电泳适用于造血干 / 祖细胞的蛋白质组研究。骨髓和动员后外周血CD34<sup>+</sup>细胞的蛋白质表达存在差异。

**关键词** 抗原CD34/血液造血干细胞动员;基因表达;免疫磁化分离;电泳凝胶双向 / 方法

中图分类号 R551; Q503 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2003)11-1161-04

## Establishment of two-dimensional gel electrophoresis profiles of proteome from CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem/progenitor cells

WEI Yong-qiang, FENG Ru, YI Zheng-shan, LIU Qi-fa

Department of Hematology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** Objective To investigate the differential expression of proteins in bone marrow (BM) and mobilized peripheral blood (MPB) CD34<sup>+</sup> cells. Methods Immunomagnetic beads were used to separate and purify CD34<sup>+</sup> cells from the BM and the MPB mononuclear cells (MNCs) mobilized by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) of normal subjects. The whole cell proteins in CD34<sup>+</sup> cells were extracted by freeze-thaw lysis, and applied for two-dimensional electrophoresis (2-DE), the results analyzed with image analysis software. Results The average purity of CD34<sup>+</sup> cells was 92.33% (依.65% in output, with an average cell number of (1.12依.42)伊0<sup>6</sup>. 2-DE techniques were optimized, which yielded satisfactory 2-DE profiles of the proteome, showing the different expressions of the proteins between different CD34<sup>+</sup> cells. Conclusions Immunomagnetic beads in combination with 2-DE is applicable for research of hematopoietic stem/progenitor cells proteome. There are differences in the protein expressions between BM- and MPB-derived CD34<sup>+</sup> cells.

**Key words:** antigens, CD34/blood; hematopoietic stem cell mobilization; gene expression; immunomagnetic separation; electrophoresis, gel, two-dimensional/method

CD34 抗原是目前公认的造血干 / 祖细胞主要表面标志之一。既往研究证实,不同来源的 CD34<sup>+</sup>细胞之间存在着明显的差异。我们曾比较过同一个体来源的骨髓和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员后外周血中 CD34<sup>+</sup>细胞的基因表达情况,并构建出差异基因谱。本研究从蛋白质组的角度对同一个体不同来源的 CD34<sup>+</sup>细胞的差异性进行研究,旨在进一步了解骨髓和动员后外周血中 CD34<sup>+</sup>细胞的功能差异。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

##### 1.1.1 试剂 CD34<sup>+</sup>细胞纯化试剂盒购自德国 Miltenyi

收稿日期 2003-09-14

基金项目 广东科技计划项目(2002C30306)

Supported by the Sci-tech Development Program of Guangdong Province (2002C30306)

作者简介 魏永强, 1973- 窑男, 袁正山, 宁盖县人, 2003 年毕业于第一军医大学。袁茹, 副主任医师。电话: 020-61647091。E-mail: yq@fimmu.com

Biotec 公司。包括试剂 A1 窑 2 窑 窑 窑 甘氨酸 窑 HAPS 为 Amresco 公司产品。甘油 窑 丙烯酰胺 窑 四甲基二乙胺 窑 EMED 窑 过硫酸胺 窑 SP 窑 超纯尿素 窑 硫脲 窑 二烷基磺酸钠 窑 DS 窑 碘乙酰胺 窑 Nase A 窑 脂糖均购自 Sigma 公司。二甲叉 - 双丙烯酰胺 窑 三羟甲基氨基甲烷 窑 Tris 窑 二硫苏糖醇 窑 TT 窑 为 Becton Dickinson 公司产品。SB3~10 窑 丁基膦 窑 BP 窑 矿物油 窑 两性电解质 窑 io-lyte, pH 3~10 窑 H7~10 窑 及非线性固化 pH 梯度干胶条 窑 H 3~10 NL 窑 均购自 Bio-Rad 公司。蛋白酶抑制剂 cocktail 窑 00 窑 均购自 Pierce 公司。牛血清白蛋白组份 吁为 Roche 公司产品。EDNase 窑 D34-PE 窑 D45-CY 窑 小鼠 IgG1-PE 均为基因公司产品。PBS 窑 BE 窑 0.5% 牛血清白蛋白 窑 mmol/L EDTA 的 PBS 窑 H 7.2 窑 自配。

1.1.2 仪器 MiniMACS 分离器 窑 磁性分离柱及一次性过滤器均为 Miltenyi Biotec 公司产品。流式细胞仪 FACS Calibur 窑 美国 BD 公司。双向电泳系统 窑 Bio-Rad 公司。紫外分光光度仪 窑 Beckman 公司。窑

高速低温离心机德国 Heraeus 公司冤血细胞分离机 S-3000 plus 型美国 Baxter 公司冤

1.2 标本来源

本研究的 3 名测试对象均为于我院进行造血干细胞移植的血液病患者的健康同胞供者遥其中男性 2 名女性 1 名遥G-CSF(惠尔血)动员前抽取静息骨髓液 40 ml 然后连续皮下注射 G-CSF 每天 5 滋/kg s.w. 冤进行动员第 5 天开始用血细胞分离机采集外周血单个核细胞同时留取 2 ml 标本备用遥

1.3 分离 CD34<sup>+</sup> 细胞

收集的骨髓液或动员后外周血分离产品经密度梯度离心法分离出单个核细胞每次取 1(108 个单个核细胞冤加入 PBE 300 滋试剂 A<sub>1</sub> 100 滋试剂 A<sub>2</sub> 100 滋充分混匀冤~12 益孵育 15 min 遥PBE 5~10 ml 洗涤细胞冤离心去上清遥PBE 400 滋重悬细胞冤加入 100 滋试剂 B 冤~12 益孵育 15 min 遥先涂后冤PBE500 滋重悬细胞冤一次性过滤器过滤细胞冤磁场中过柱遥最后用 1 ml PBE 加压冲洗冤即可获得富集的 CD34<sup>+</sup> 细胞遥大约 1伊0<sup>5</sup> 个产品细胞冤标记 CD34-PE 冤CD45-CY 冤流式细胞仪检测 CD34<sup>+</sup> 细胞的阳性率遥

1.4 双向电泳

1.4.1 蛋白提取 纯化后的骨髓或外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞加入细胞裂解液 400 滋渊mol/L 尿素冤 mol/L 硫脲冤 2% CHAPS 冤% SB3~10 冤0 mmol/L Tris 冤.2% Bio-lyte 3~10 冤% TBP 冤% 渊积分分数冤蛋白酶抑制剂cocktail 冤放入液氮反复冻融 3 次冤再加入 DNase 玉至终浓度 1 mg/ml 冤Nase A 至终浓度 0.25 mg/ml 冤混匀冤 益放置 15 min 遥45 000 滋离心 60 min 冤保留上清冤以牛血清白蛋白作为标准品冤采用 Bradford 法检测标本的蛋白浓度冤遥取等量蛋白标本各 100 滋冤加入冰冻丙酮 1.5 ml 冤20 益沉淀过夜冤0 000 r/min 离心 30 min 冤弃上清冤沉淀放入超净台中风干冤

1.4.2 IPG 胶条重水化 每份标本加入上样缓冲液[含 8 mol/L 尿素冤% CHAPS 冤% Bio-lyte 渊其中 pH3~10 冤 pH 7~10 的比例为 3 冤% TBP] 350 滋冤倒入盛有胶条的泡胀槽中冤h 后加矿物油覆盖冤室温泡胀 12~16h 遥

1.4.3 IEF 电泳 将水化后胶条放入电泳槽中冤矿物油覆盖冤设定自动程序院50 V 伊.5 h 冤00 V 伊.5 h 冤000 V 伊 h 冤000 V 伊 h 冤000 V 冤~冤共 80 000 V h 冤恒温 20 益遥

1.4.4 平衡 将等电聚焦后胶条放入平衡缓冲液玉[6 mol/L 尿素 冤0 mmol/L Tris-HCl 渊H8.8 冤% SDS 冤 20% 甘油 冤% DTT] 中平衡 15 min 冤然后移入平衡缓冲液域渊 2.5% 的碘已酰胺替代 DTT 冤其他同平衡缓冲液玉冤中平衡 15 min 遥

1.4.5 垂直 SDS-PAGE 电泳 配制 (17伊7伊.1) cm 的 13% 的分离凝胶冤室温聚合 2 h 冤将平衡后 IPG 胶条置

于凝胶上端冤用 0.5% 的琼脂糖凝胶固封冤胶条的一端放入蛋白 marker 冤0 mA 恒流电泳冤恒温 16 益冤持指示剂抵达底边时终止电泳遥

1.4.6 银染显色 电泳结束后冤将凝胶放入盛有固定液渊0% 乙醇冤0% 冰醋酸冤的容器冤固定 1 h 冤再加入浸泡液 渊0% 乙醇 冤 g/L 硫代硫酸钠 冤.8 mol/L 醋酸钠 冤浸泡 30 min 冤去离子水漂洗 5 min 伊 次 冤加入银染液渊硝酸银 2 g/L 冤甲醛 0.2 ml/L 冤染色 20 min 冤漂洗 1 min 伊 次 冤加入显色液渊5 g/L 碳酸钠 冤.3 ml/L 甲醛 冤显色冤当时加入中止液渊% 冰醋酸冤中止反应遥

1.5 图像分析

透射扫描 SDS-PAGE 凝胶冤用 MELANIE-3 图像分析软件对所获图像进行分析冤了解两组图像的可比性冤标记差异蛋白质点冤用于以后蛋白质点的质谱分析遥

2 结果

2.1 CD34<sup>+</sup> 细胞纯化结果

3 例研究对象的骨髓和动员后外周血标本共进行 12 次纯化冤CD34<sup>+</sup> 细胞平均纯度为 渊2.33 依 2.65 冤% 冤与文献报道基本一致 冤每次纯化获得的 CD34<sup>+</sup> 细胞数平均为 渊.12 依.42 冤伊0<sup>6</sup> 个 冤图 1 示 1 份纯化后样品经流式细胞仪检测冤CD34<sup>+</sup> 细胞阳性率达 91.42% 遥

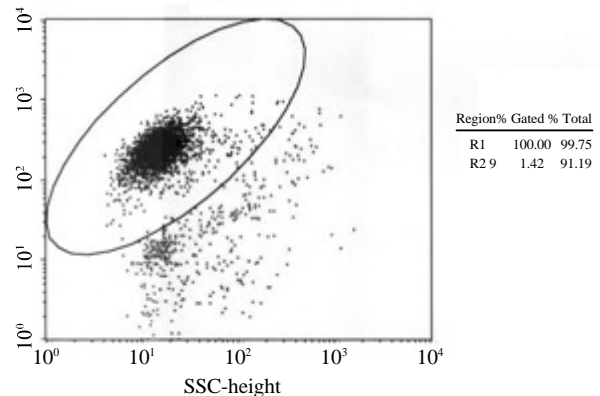


图 1 MiniMACS 分离后产品的流式细胞仪检测结果  
Fig.1 Flow cytometry of the yield separated by MiniMACS

2.2 正常人动员后外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞蛋白质组的双向电泳

图 2 为其中一例研究对象的动员后外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞蛋白质组双向电泳图谱冤经图像分析可分辨出 741 个蛋白质点遥

2.3 正常人骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞蛋白质组的双向电泳

图 3 所示为同一研究对象的骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞蛋

白质组双向电泳图谱经图像分析可分辨出 758 个蛋白质点

2.4 动员后外周血与骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞蛋白质组图谱的差异性比较

凝胶图像经 Melanie 3 图象分析软件分析发现

例研究对象的骨髓和外周血 CD34<sup>+</sup>细胞共有的差异情况如下院外周血 CD34<sup>+</sup>细胞有 24 个斑点在蛋白水平上出现有意义的升高袁 3 个斑点在蛋白水平上出现有意义的降低

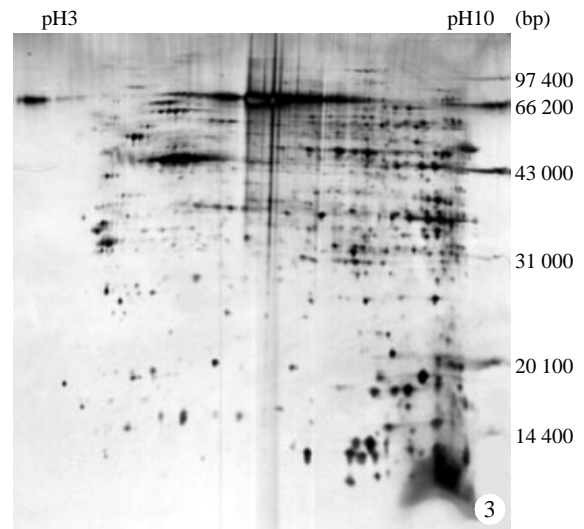
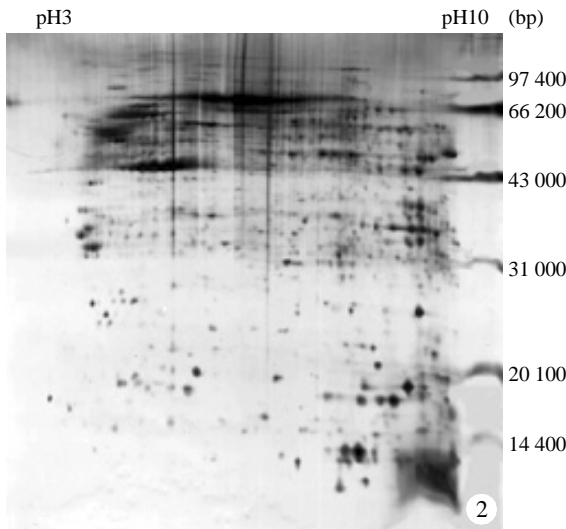


图 2 正常人动员后外周血 CD34<sup>+</sup>细胞蛋白质组双向电泳图

Fig.2 2-DE profile of mobilized peripheral blood-derived CD34<sup>+</sup> cell proteome of normal human subjects

图 3 正常人骨髓 CD34<sup>+</sup>细胞蛋白质组双向电泳图

Fig.3 2-DE profile of bone marrow-derived CD34<sup>+</sup> cell proteome of normal human subjects

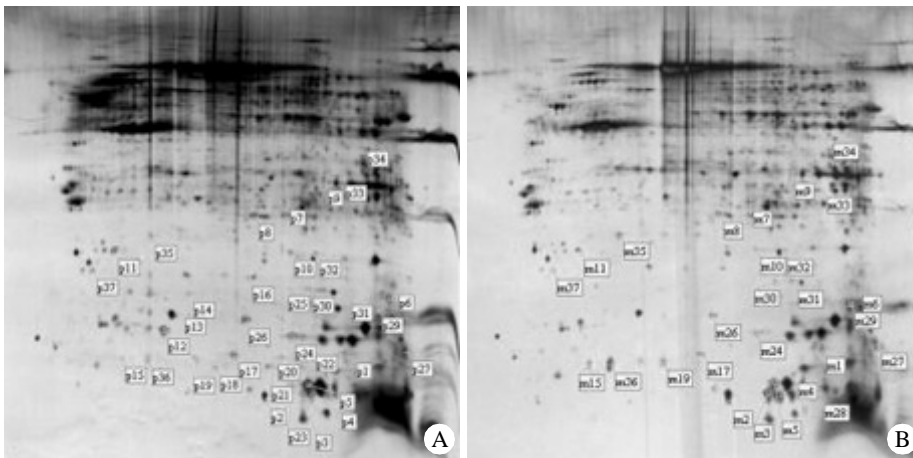


图 4 外周血和骨髓 CD34<sup>+</sup>细胞蛋白质双向电泳图谱  
Fig.4 2-DE map of the proteins from MPB- and BM-derived CD34<sup>+</sup> cells

The differential protein spots were labeled by Melanie 3 image analysis software

3 讨论

双向电泳技术作为蛋白质组分析的核心技术已广泛用于细胞或组织的蛋白质组的研究。其中蛋白质提取和等电聚焦电泳是双向电泳的关键环节。其效果的好坏直接关系到双向电泳的结果。由于提取过程的影响因素较多，整个提取过程应首先尽可能多地使细胞中的蛋白质溶解于裂解液中，尽量减少提取过程中蛋白质的降解和丢失。其次是保证蛋白质样品不被修饰，否则其等电点将会改变。

为满足上述要求，我们采用了改进的裂解液配

方，包括尿素、硫脲、CHAPS、B3-10、Tris、两性电解质。其中两性电解质我们采用了 pH 3~10 和 pH7~10 两种规格。碱性蛋白更易于溶解，同时为减少蛋白质降解和核酸的影响，在提取液中加用了蛋白酶抑制剂 cocktail 和 DNA 酶、RNA 酶。并且注意了整个提取过程尽量在冰槽中完成，为了能够让蛋白质更好地聚焦，我们在处理蛋白样品时应用了丙酮沉淀法，尽量去除样品中残余的离子及核酸。另外，上样缓冲液用非离子还原剂 TBP 替代 DTT，减少带电离子的影响。两性电解质采用了 pH3~10 和 pH7~10

混合液有利于碱性蛋白的聚焦。IPG 胶条使用的是非线性的 pH 3~10 胶条有利于酸性和碱性蛋白的聚焦及整张胶蛋白质点的平均分布。在电压的选择上我们优化了等电聚焦的自动程序使初始电压缓慢递增最后以高电压 8 000 V 聚焦从而使最懒惰的蛋白质分子也向其等电点移动同时可减少胶条表面的蛋白沉积可改善 SDS-PAGE 电泳及银染的效果。凝胶上蛋白质银盐染色是一种高度灵敏的染色方法可以检出凝胶上 0.1~0.5 ng 的蛋白质样品。较普通考马斯亮蓝染色法灵敏度高 50~100 倍。以往的银染方法显色快背景深不易控制。尤其在同时染多块胶的时候容易造成胶与胶之间显色不均。我们通过优化染色方法基本克服了上述缺点。经上述优化后双向电泳图中可分辨的蛋白质点明显增多。获得令人满意的效果。

骨髓和外周血造血干细胞的差异性在临床应用方面主要表现为移植后造血重建时间不同。移植植物抗宿主病、VHD 的发生率不同。以及移植后感染、溶血及对原发病的疗效。前后不同。既往的研究认为这些差异的存在与干细胞分化阶段、克隆形成能力、细胞周期动力学、淋巴细胞亚群数量、血型抗体等有关。已有研究显示不同来源 CD34<sup>+</sup> 细胞基因表达存在明显差异。并证实这些基因水平的差异与临床差异密切相关。众所周知。生物功能的主要执行者是蛋白质。而蛋白质有其自身特有的活动规律。仅从基因的角度来研究是远远不够的。例如蛋白质的修饰加工、转运定位、结构变化。蛋白质与蛋白质的相互作用。蛋白质与其它生物分子的相互作用等活动。均无法在基因组水平上获知。因此。直接从蛋白质水平研究细胞之间的差异具有重要价值。在本研究中。我们应用优化的双向电泳技术比较了同一个体来源的骨髓和 G-CSF 动员后外周血中 CD34<sup>+</sup> 细胞的蛋白质表达情况。两组比较的过程从样品的制备到双向电泳至凝胶银染的全过程条件均一样。它们的双向电泳图谱中也可看出许多蛋白质在位置、形态、大小和染色程度上是一致的。因而它们具有可比性。图像分析显示两组细胞中有较多的差异蛋白。主要是在蛋白表达量上增加或减少。也有个别新增加的蛋白质点。差异蛋白点多为一些中低相对分子质量蛋白质。而这些蛋白质分子较多可能是调节蛋白。因此。它们很可能是造成骨髓和外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞功能差异的关键因素。

#### 参考文献

- 1 Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, et al. A stem cell molecular signature. *Science*, 2002, 298 (5593): 601-4.
- 2 陈捷, 周淑芸, 冯茹. 抑制性消减杂交技术检测骨髓 CD34<sup>+</sup> 细胞基因差异表达. *第一军医大学学报*, 2002, 22(9): 823-5.
- 3 CHEN J, ZHOU SY, FENG R. Identification of differentially expressed genes in bone marrow CD34<sup>+</sup> cells by suppression subtractive hybridization. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(9): 823-5.
- 4 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2001. 42-7.
- 5 Di Nicola M, Bregni M, Siena S, et al. Combined negative and positive selection of mobilized CD34 blood cells. *Br J Haematol*, 1996, 94(4): 716-21.
- 6 Matsui NM, Smith DM, Clauser KR, et al. Immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometric identification of cytokine-regulated proteins in ME-180 cervical carcinoma cells. *Electrophoresis*, 1997, 18(3-4): 409-17.
- 7 Mastro R, Hall M. Protein delipidation and precipitation by tri-n-butylphosphate, acetone, and methanol treatment for isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 1999, 273(2): 313-5.
- 8 Klein J, Harding G, Klein E. A new isoelectric focusing gel for two-dimensional electrophoresis constructed in microporous hollow fiber membranes. *J Proteome Res*, 2002, 1(1): 41-5.
- 9 Norbeck J, Blomberg A. Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3-10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI >7) proteins. *Yeast*, 1997, 13 (16): 1519-34.
- 10 Marley SB, Lewis JL, Zheng B, et al. Peripheral blood progenitor cell mobilisation alters myeloid, but not erythroid, progenitor cell self-renewal kinetics. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27(3): 241-8.
- 11 Thornley I, Nayar R, Freedman MH, et al. Differences in cell cycle kinetics of candidate engrafting cells in human bone marrow and mobilized peripheral blood. *Exp Hematol*, 2001, 29(4): 525-33.
- 12 Klangsinsirikul P, Russell NH. Peripheral blood stem cell harvests from G-CSF-stimulated donors contain a skewed Th2 CD4 phenotype and a predominance of type 2 dendritic cells. *Exp Hematol*, 2002, 30(5): 495-501.
- 13 Lapierre V, Oubouzar N, Auprin A, et al. Influence of the hematopoietic stem cell source on early immunohematologic reconstitution after allogeneic transplantation. *Blood*, 2001, 97(9): 2580-6.
- 14 Steidl U, Kronenwett R, Rohr UP, et al. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells. *Blood*, 2002, 99(6): 2037-44.
- 15 Graf L, Heimfeld S, Torok-Storb B. Comparison of gene expression in CD34<sup>+</sup> cells from bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood by high-density oligonucleotide array analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2001, 7(9): 486-94.
- 16 Fields S, Kohara Y, Lockhart DJ. Functional genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16): 8825-6.