

# 鼻咽癌细胞株 HNE-1 蛋白质二维电泳图谱的建立

徐守军 袁欣 袁丽春 袁雪华 第一军医大学病理教研室 广东 广州 510515 报

**摘要** 目的 建立及优化聚丙烯酰胺二维凝胶电泳技术结合分析软件,全面展示鼻咽癌细胞株 HNE-1 的蛋白质表达谱为进一步开展鼻咽癌的蛋白质组学研究奠定了基础方法 大规模培养 HNE-1 细胞利用优化的蛋白质抽提技术获得 HNE-1 细胞的总蛋白选用线性及非线性的不同 pH 梯度固相 IPG 胶条对细胞总蛋白等电聚焦以及聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳初步建立了 HNE-1 细胞株总蛋白质的二维电泳(2-DE)图谱结果 采用不同 pH 梯度范围的 IPG 胶条和优化的 2-DE 技术能够有效展示 HNE-1 细胞全蛋白质表达谱结论 重叠窄 pH 梯度范围的 IPG 胶条提高了 2-DE 中蛋白质的分离效果

**关键词** 蛋白质组 二维电泳 pH 梯度 IPG 胶条 HNE-1 细胞

中图分类号 Q937 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)12-1310-04

## Establishment of protein spectrum of nasopharyngeal carcinoma cell line HNE-1 by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

XU Shou-jun, LI Xin, LI Li-chun, LI Xue-hua

Department of Pathology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstracts:** Objective To establish optimized two-dimensional (2-D) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for displaying the full-scale protein expression spectrum of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line HNE-1, which can be instrumental for proteomic study of NPC. Methods Large-scale HNE-1 cell culture was carried out from which the total protein was extracted with optimized method and separated by isoelectric focusing with linear and non-linear immobilized pH gradient (IPG) strips between different pH ranges followed by vertical SDS-PAGE. The 2-D maps of the proteins of HNE-1 cell line were then established. Result 2-D maps of the total protein of HNE-1 cell line were effectively displayed on IPG strips of different pH ranges and with optimized 2-D electrophoresis. Conclusion With IPG strips with overlapping pH ranges, improvement of the protein separation can be achieved in 2-D electrophoresis.

**Key words:** proteome; two-dimensional electrophoresis; pH range; immobilized pH gradient strips; HNE-1 cells

随着人类基因组计划的完成蛋白质组学的研究成为热点二维电泳 two-dimensional electrophoresis 2-DE 发明于在 70 年代中期现在 2-DE 在一张 2-DE 图谱上一般可以检测到 1 000~3 000 个蛋白质目前采用大胶最多可以分离出 10 000 个蛋白质根据估计在一个细胞内可能有将近 50 000 种蛋白质所以现在的 2-DE 分辨率与整个组织细胞的总蛋白之间还存在着很大的差距如何提高微量蛋白的检测能力始终是 2-DE 的关键问题近来出现固相 pH 梯度 immobilized pH gradient IPG 胶条可以进一步分析微量蛋白为蛋白质组学的深入研究提供了有力的帮助本实验通过重叠窄 pH 梯度 IPG 胶条对鼻咽癌细胞株进行 2-DE 建立了鼻咽癌细胞株 HNE-1 的蛋白质 2-DE 图谱

IPG 干胶条 线性及非线性 pH3~10 pH3~6 pH4~7 pH5~8 pH7~10 均为 17 cm 等电聚焦缓冲液 pH3~10 pH7~10 三正丁基膦 Tris 线性 磺基三甲胺乙内酯 Tris, SB3-10 购自 Bio-Rad 公司 尿素 Tris 巯基蔗糖 CHAPS 碘乙酰胺 购自 Sigma 公司 硫脲 购自 Fluka 公司 SDS 聚丙烯酰胺 甲叉丙烯酰胺等均为分析纯

### 1.2 设备

等电聚焦仪 垂直电泳系统 Protean 域 xi 购自 Bio-Rad 公司 透射扫描仪为 Umax PowerLook 1100 图像分析软件 Melanie 是下载试用版本

### 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养和收集** HNE-1 细胞株为鼻咽癌上皮细胞 中南大学湘雅医学院肿瘤研究所 培养于含有 10% 小牛血清的 1640 培养基中 待细胞培养至对数生长期 用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 遍 然后用细胞刮刮下 000 r/min 离心 10 min 再用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 遍

**1.3.2 细胞蛋白质的提取** 在细胞中加入蛋白裂解液 1 mol/L 尿素 1 mol/L 硫脲 1% CHAPS 1% SB3-10

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂及材料

收稿日期 2003-02-25

作者简介 徐守军 1976- 男 袁丽春 江苏如东人 2003 年毕业于第一军医大学 袁雪华 电话 20-61640114-89100 袁-mail: ygzhi@fimmu.com

2mmol/L TBP 0.2% IEF buffer 混匀然后置于液氮中裂解液完全冻上再缓慢解冻循环冻溶 4 次后加入 DNase 10 流/ml 和 RNase 5 流/ml 混匀静置 20 min 20 益 40 000 g 离心 60 min 收集上清用 Bradford 法测定蛋白浓度为 10 mg/ml 然后分装保存于 -80 益

1.3.3 按照文献 鸣暂进行 2-DE 加样体积全部为 300 流加样缓冲液的成分为 0.5 mol/L 尿素 0.1 mmol/L DTT 2% CHAPS 2% IEF buffer pH 3~10 以及痕量的溴酚蓝其中 pH 7~10 的 IPG 干胶条的加样缓冲液成分为 0.5 mol/L 尿素 0.1 mol/L 硫脲 2% CHAPS 2 mmol/L TBP 0.15% IEF buffer pH 7~10 0.05% IEF buffer pH 3~10 以及痕量溴酚蓝 本实验全部采用胶内加样泡涨 16 h 然后进行第一向 IEF 条件为 250 V 1 h 0 000 V 1 h 0 000 V 3 h 0 000 V 到最后电泳总伏特小时为 75 000 V h 第一向 IEF 完毕之后立即平衡平衡液的成分为 0.5 mol/L 尿素 2% SDS 0.05 mol/L Tris-Cl pH 8.8 20% 甘油 第一次平衡液中加上 2% 的 DTT 第二次平衡液中加上 2.5% 的碘乙酰胺 两次平衡的时间均为 15 min 第二向 SDS-PAGE 按照 16 mA/ 胶 30 min 然后 24 mA/ 胶 恒流电泳到最后溴酚蓝出胶的底线

1.3.4 蛋白质检测 主要按照文献进行银染

1.3.5 图像分析 将染色之后的 PAGE 胶放在 Umax

透射扫描仪上扫描后的图像用 Melanie 软件分析

2 结果与讨论

2.1 加样量与 2-DE 结果的分析

加样量的大小始终是 2-DE 中的一对矛盾 如果增加了加样量 可以提高 2-DE 图谱上蛋白点的数量 能够分析出含量较低的蛋白 但是一旦加样量超过一定的范围 在 2-DE 图谱上就会出现大量重叠的蛋白点 同时含量高的蛋白会掩盖含量低的蛋白 在蛋白点多的区域甚至相互连接 不利于接下来的软件分析 如果为了 2-DE 图谱的清楚 降低加样量 那么就有很多低含量的蛋白无法在最后的图谱上体现出来 同样也无法得到满意的结果 在本实验中 我们用 pH 范围为 4~7 的 IPG 胶条比较了不同加样量对 2-DE 图谱的影响 图 1A B C 分别为加样量 100 流 200 流 300 流 蛋白 可以发现 在图 1A 中 蛋白点分离得比较清楚 但是蛋白点的数量只有 512 个 图 1B 的蛋白点比较清楚 蛋白点增加到 905 个 但是已有蛋白的融合 而图 1C 的有 1 375 个蛋白点 在小分子量的区域可以分离出大量的蛋白 但是在图 1C 中出现了明显的蛋白点的融合以及大的蛋白掩盖小蛋白的现象 所以在加样的时候 一定要综合考虑电泳的结果以及研究的目的

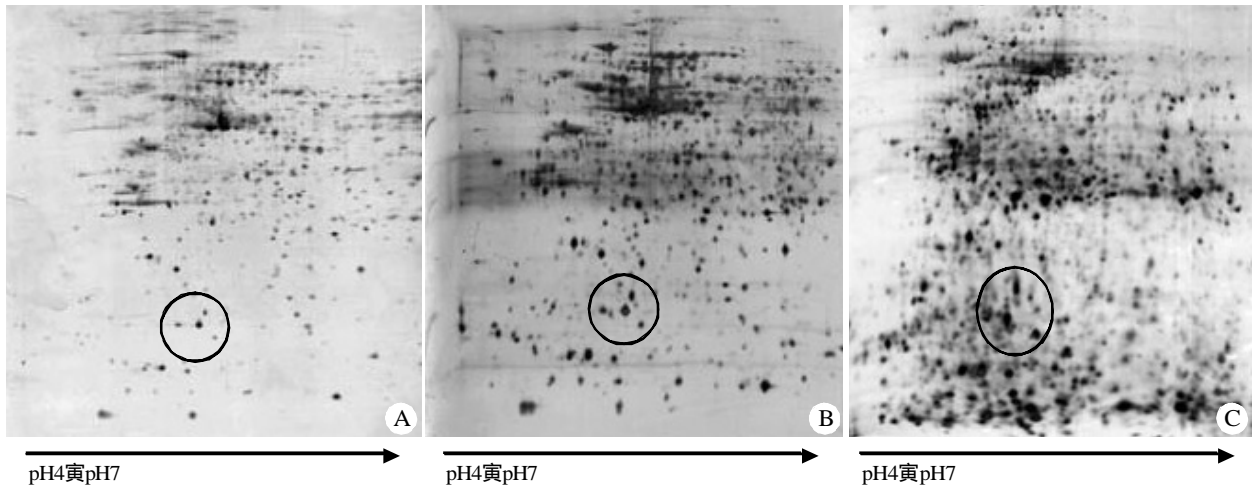


图 1 不同加样量的 2-DE 结果比较

Fig.1 Comparison of the two-dimensional electrophoresis results with different amount of proteins loaded

A: The amount of loaded sample was 100 流; B: The amount of loaded sample was 200 流; C: The amount of loaded sample was 300 流

2.2 线性 IPG 干胶条和非线性 IPG 干胶条的优缺点比较

在采用线性 pH 3~10 干胶条 图 2A 的时候 当加样量超过 150 流 电泳图谱在 pH 4~7 范围的区域出现大块的密集的融合斑 不利于分析该 pH 范围区域的蛋白 同时由于加样量的限制 其他微量蛋白则

不能在电泳图谱上显示 软件检测蛋白点的数量为 689 个 所以单独用线性 pH 3~10 的干胶条只能粗略地分析出该细胞的蛋白质 2-DE 图谱的结构 为进一步研究提供指导 因此我们用非线性 pH 3~10 胶条进行电泳 加样量为 200 流 结果如图 2B 可以明显看出 图 2B 中蛋白点分布比较均匀 蛋白点的数

量也明显多于采用线性的 IPG 干胶条遥经软件检测袁蛋白点的数量为 1 062 个遥这表明通过非线性 IPG 干

胶条有利于提高 2-DE 的分辨率袁同时还有利于提高电泳的加样量遥

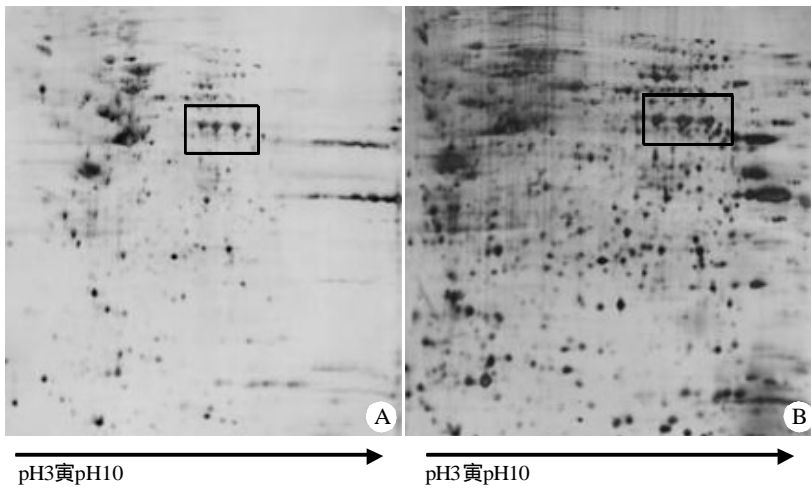


图 2 线性胶条以及非线性胶条对 2-DE 结果的影响  
 Fig.2 Differences between linear and non-linear IPG strips in two-dimensional electrophoresis  
 A:Linear IPG strip pH3-10;B:Non-linear IPG strip pH3-10

### 2.3 重叠窄 pH 梯度的 IPG 干胶条的优点

通过重叠窄 pH 梯度的 IPG 干胶条袁可以在各个不同的 pH 范围之内分析蛋白袁增加加样量袁能够在相应的范围内检测出含量较低的蛋白袁提高分辨率遥采用 pH 范围为 3~6尧~7尧~8尧~10 的四根 IPG 干胶条对鼻咽癌 HNE-1 细胞的蛋白进行 2-DE 遥

其结果如图 3A尧B尧C尧D 遥重叠窄 pH 梯度的 IPG 干胶条的作用相当于用一根更长的 pH 梯度的干胶条进行 2-DE 袁这样的方法有利于提高 2-DE 的

分辨率遥我们采用的 IPG 干胶条的长度为 17 cm 袁通过使用重叠窄 pH 梯度的干胶条袁就相当于我们在第一向等电聚焦中采用 28 cm 的 pH3~10 的 IPG 干胶条对蛋白进行分析遥同时袁现在已经有商业化的极窄 pH 梯度的 IPG 供应袁这样的干胶条可以进一步把 pH 范围限制得更小袁在单一 pH 梯度的范围内研究蛋白表达谱袁能够有更大的加样量袁这种单一 pH 梯度的干胶条对进一步提高蛋白分离水平提供了有力的帮助遥

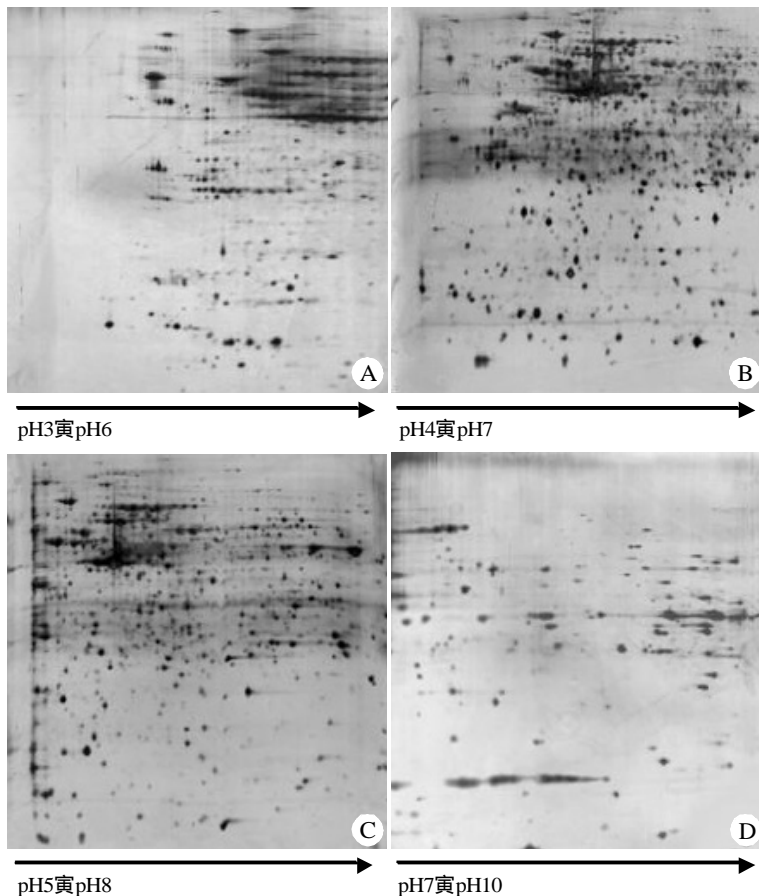


图 3 重叠窄 pH 梯度的 IPG 干胶条对 HNE-1 细胞双向电泳结果的影响  
 Fig.3 Two-dimensional electrophoresis maps showing the effect of IPG strips with overlapping narrow pH range in protein separation of HNE-1 cell line  
 A: pH 3-6;B:pH4-7;C:pH5-8;D:pH7-10

#### 2.4 极碱性蛋白的分离

2-DE 中的一个主要问题是极酸性蛋白以及极碱性蛋白的分离尤其是极碱性蛋白的分离。在第一向等电聚焦中使用的加样缓冲液中的还原剂一般为 DTT 但是由于 DTT 本身带有负电荷所以在等电聚焦的时候随着电泳的进行带有负电荷的 DTT 逐渐移动到阳极导致整个胶条体系中失去还原性蛋白质溶解度下降发生沉淀最后蛋白无法继续电泳。

图 4A 通过用不带电的 TBP 取代加样液中的 DTT 再在加样液中加入 2 mol/L 的硫脲以增加蛋白质的溶解性电泳的时候在电极的阴极端额外加上一个用 20 mmol/L DTT 浸泡过的滤纸片以便在电泳的时候 DTT 从阴极向阳极移动维持整个胶条中的还原环境这样可以明显改善 pH 7~10 范围的效果如图 4B。

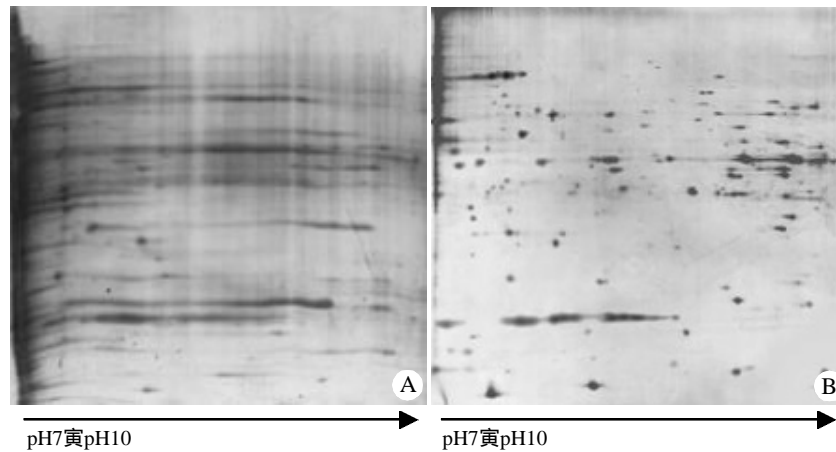


图 4 碱性范围 2-DE 优化前后的比较图谱

Fig.4 Comparison of two-dimensional electrophoresis results before and after optimization of alkaline range

A: Before optimization; B: After optimization

现在已经出现更碱性范围的胶条其 pH 值可以到 3~12 但是对于这种极碱性范围的 IPG 胶条进行电泳主要是由于胶条在电泳时产生的反向电渗流造成水分渗出胶条造成碱性端的水平条纹以及蛋白质的丢失可以通过在加样液中加入一定的异丙醇和甘油同时还要采用加样杯在阴极加样等方法得到改善。

通过各种不同 pH 值范围的 IPG 干胶条对鼻咽癌细胞株 HNE-1 蛋白进行 2-DE 优化了电泳条件初步得到了该细胞较好的 2-DE 图谱为今后的工作打下了基础。

#### 参考文献

Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of

proteins *J Biol Chem*, 1975, 250(10):4007-21.

Klose J. Large-gel 2-D electrophoresis *Methods Mol Biol*, 1999, 112: 147-72.

Güth A, Postel W, Günter S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients *Electrophoresis*, 1988, 9, 531-46.

郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 *北京: 科学出版社*, 1999. 89.

Herbert BR, Molloy MP, Gooley AA, et al. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent *Electrophoresis*, 1998, 19(5): 845-51.

Lanne B, Potthast F, Hoglund A. Thiourea enhances mapping of the proteome from murine white adipose tissue *Proteomics*, 2001, 1 (7): 819-28.

Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins *Electrophoresis*, 1997, 18(3-4): 328-37.