

· 论 著 ·

## 肿瘤细胞蛋白质组的二维液相色谱分离

彭艳<sup>1</sup>, 郑颖<sup>2</sup>, 蒋平<sup>1</sup>, 何玮<sup>2</sup>, 侯彦强<sup>3</sup>, 周聪<sup>2</sup>, 郭春香<sup>2</sup>, 倪健<sup>2\*</sup>, 焦炳华<sup>1\*</sup>

(1. 第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 2. 上海富纯中南生物技术有限公司, 上海 201203; 3. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:** 建立一种利用二维液相色谱法分离肿瘤细胞全细胞裂解液的方法。**方法:** 将肿瘤细胞裂解样品用初始缓冲液置换后, 进行一维色谱聚焦分离, 然后先对二维色谱条件进行优化和重现性分析, 再将一维收集的 pH 值 8.5~4.0 之间的组分分别进行二维反相 HPLC 分离, 利用 ProteoVue 软件将 UV 图转换成胶图。**结果:** 一维色谱聚焦分离 pH 值 8.5~4.0 之间的组分共收集到 16 个, 每个组分的二维 UV 图转换成 pI/UV 胶图。**结论:** 二维液相色谱分离法是一种有效的分离肿瘤细胞裂解液的方法。

**[关键词]** 蛋白质组; 肿瘤细胞; 二维液相色谱分离

**[中图分类号]** Q 503 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0862-03

### Two dimensional liquid phase chromatographic fractionation of cancer cell lysates

PENG Yan<sup>1</sup>, ZHENG Ying<sup>2</sup>, JIANG Ping<sup>1</sup>, HE Wei<sup>2</sup>, HOU Yan-Qiang<sup>3</sup>, ZHOU Cong<sup>2</sup>, GUO Chun-Xiang<sup>2</sup>, NI Jian<sup>2\*</sup>, JIAO Bing-Hua<sup>1\*</sup> (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Shanghai Fuchun Zhongnan Bio-technology Co. Ltd, Shanghai 201203; 3. Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital, Second Military Medical University)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To develop an approach for fractionating cancer cell lysates by two-dimensional (2-D) liquid phase chromatographic fractionation. **Methods:** The cancer cell lysates were exchanged with start buffer and separated by chromatofocusing in the first dimension, which were followed by optimizing the chromatographic condition of the second dimension and analysis of reproducibility. The fractions between pH 8.5 and pH 4.0 were separated by non-porous silica reverse-phase HPLC. The UV maps were transformed into gel-like maps by ProteoVue software. **Results:** There were 16 fractions between pH 8.5 and pH 4.0 after chromatofocusing in the first dimension and the UV maps of each fraction were transformed into pI/UV gel-like maps. **Conclusion:** 2-D liquid phase chromatographic fractionation is an effective method to separate cancer cell lysates.

**[KEY WORDS]** proteomics; cancer cell; twodimensional liquid phase chromatographic fractionation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 862-864]

蛋白质组学(proteomics)<sup>[1]</sup>是 1995 年产生的一门新兴学科, 它以细胞内全部蛋白质为研究对象, 定量检测蛋白质水平上的基因表达, 从而揭示生物学行为(如: 疾病过程和药物效应)以及基因表达调控机制的学科。蛋白质组学的发展既受技术所推动也受技术所限制, 利用蛋白质的等电点(pI)和相对分子质量通过双向凝胶电泳的方法将各种蛋白质区分开来是一种很有效的手段, 但它具有繁琐、不稳定和低灵敏度等缺点<sup>[2]</sup>。目前二维液相色谱等新型分离技术有补充和取代双向凝胶电泳之势。本研究利用二维液相色谱仪建立一种将肿瘤细胞蛋白质组按等电点和疏水性进行二维液相分离的方法。

### 1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 二维液相色谱仪 ProteomeLab™ PF2D 和及其配套试剂盒 ProteomeLab™ PF2D 试剂

盒均为 Beckman 公司产品, 试剂盒包括 HPLC 1D 色谱柱(2.1 mm × 250 mm)、HPLC 2D 无孔硅胶 C<sub>18</sub> 反相色谱柱(4.6 mm × 33 mm)、起始缓冲液(start buffer, SB)、洗脱缓冲液(eluent buffer, EB), 和 PD10 G-25 脱盐柱(Sephadex™ G-25, Amersham Pharmacia Biotech)。正辛基 β-D-吡喃葡萄糖苷(n-octyl-β-D-glucopyranoside, OG)、Tris-(carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP)、蛋白酶抑制剂混合物(protease inhibitor cocktail)、亚氨基二乙酸(iminodiacetic)均购于 Sigma 公司, 乙腈、三氟乙酸(TFA)、甲醇等均为色谱纯(上海申越公司), 所用的水均为 Milli-Q 制备的 HPLC 级水。

**[基金项目]** 2003 年专利技术二次专项课题(037252064)。

**[作者简介]** 彭艳(1968-), 女(汉族), 博士, 讲师。

\* Corresponding author. E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

BCA 法蛋白浓度检测试剂盒购于碧云天公司。

1.2 细胞培养和样品制备 高转移肝癌细胞株 MHCC97-H(复旦大学医学院肿瘤研究所提供)培养于含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(Gibco 公司)中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱内。细胞长到对数生长期,胰酶消化,收集约 10<sup>8</sup> 个细胞,用预冷的 PBS 洗 3 次,2 000×g 离心 10 min,在细胞沉淀中加入 0.4 ml 的 50 mmol/L 的 Tris 碱(调 pH 值 7.8~8.2),混匀后加入 1.6 ml 的细胞裂解缓冲液(7.5 mol/L 尿素,2.5 mol/L 硫脲,12.5%甘油,50 mmol/L Tris 碱,2.5% OG,6.25 mmol/L TCEP,1.25 mmol/L 蛋白酶抑制剂混合物),充分振荡,于 4℃、20 000×g 离心 60 min,吸取上清弃沉淀,加 SB 至最后体积为 2.5 ml,然后加入到已用 25 ml SB 平衡的 PD-10 柱,弃掉洗脱液,再用 SB 洗脱并收集前 3.5 ml。BCA 法测定蛋白浓度。

### 1.3 一维色谱聚焦分析

1.3.1 色谱条件 HPCF 1D 色谱柱;流动相为 SB(用 50 mg/ml 饱和亚氨基二乙酸溶液或 1 mol/L 的 NH<sub>4</sub>OH 调节 pH 值至 8.5±0.1)、EB(调 pH 值至 4.0±0.1)、1 mol/L NaCl 和 HPLC 级水,实验前超声处理 5 min;流速为 0.2 ml/min;检测波长为 280 nm;室温下进行;流动相的 pH 值由 pH 计在线监测,每次运行前用 3 个 pH 标准液(pH 4.0、7.0、10.0)校正 pH 计。

1.3.2 分析程序 程序由 32 Karat 软件控制自动运行,以 30 CV(柱体积)的 SB 平衡柱子(约 130 min),然后加入经 SB 置换的样品 2.5 mg,以 SB 冲洗 20 min,洗脱出来的样品是 pI>8.5 的蛋白。洗脱完成后 UV 光密度值返回基线,再用 EB 冲洗 55 min,pH 值开始下降时,每间隔 0.3 个 pH 单元收集 1 份样品,共收集 16 个样品。当流出液的 pH 值为 4.0±0.1 时,用 10 CV 的高盐洗液和 HPLC 级水冲洗柱子。样品可立即进行实验或保存于-80℃冰箱内。

### 1.4 二维反相 HPLC 色谱分析

1.4.1 色谱条件 HPRP 2D 色谱柱;流动相 A 为 0.10% TFA 的水溶液,流动相 B 为 0.08% TFA 的乙腈溶液,实验前超声处理 5 min;流速为 0.75 ml/min;检测波长为 214 nm;50℃恒温下进行。

1.4.2 二维色谱条件的优化和重现性分析 以 10 CV 的流动相 A 平衡柱子,对组分 11 按不同的线性洗脱梯度进行洗脱:(1)洗脱梯度为 0%~30% B,5 min;30%~50% B,30 min;50%~100% B,5 min。(2)洗脱梯度为 0%~100% B,30 min。(3)洗脱梯度

为 0%~20% B,5 min;20%~50% B,20 min;50%~100% B,5 min。将 3 批不同样品的同一 pI 组分重复分析 3 次,计算 t<sub>R</sub> 和峰面积的 RSD 值。

1.4.3 分析过程 将一维分离的 pH 值 8.5~4.0 之间的 16 个样品组分(组分 10~25)用第 3 种洗脱梯度分别进行二维分析,ProteoVue 软件自动保存每个样品的 UV 光密度值数据并可转换成胶图。

## 2 结果

肿瘤细胞裂解液进行一维色谱聚焦分离(图 1),pH 值由 8.5 降至 4.0,每间隔 0.3 个 pH 单位收集 1 份样品,在 pH 值 8.5~4.0 之间共收集 16 个组分(组分 10~25)。图 2 为二维反相 HPLC 的 3 次不同洗脱梯度的色谱图。从图中可以看出,第 3 种洗脱梯度分离效果较好,就利用这个洗脱方法进行下面的实验。对 3 批不同样品同一 pI 组分进行 3 次二维 HPLC 重复性分析,t<sub>R</sub> 的 RSD<5%,峰面积的 RSD<10%,可以看出结果的重现性较好。进行二维分析,将得到的每个样品(组分 10~25,共 16 个样品)的二维 UV 图谱经 ProteoVue 软件转换成胶图,每个峰对应一条带,条带的颜色和深浅代表峰面积的大小,转换成的胶图更利于观察(图 3)。

## 3 讨论

实验中的一个重要方面是蛋白质在溶液状态下的溶解度,选择适当的溶解方法对获得全面的蛋白质图谱及后续的分析很重要。样品制备时应避免使用离子型的表面活性剂、磺酸盐或者 Triton X-100 等。本实验在细胞裂解液中加入非离子去污剂 OG 来增加蛋白的溶解度。

研究细胞蛋白质表达谱的传统和经典技术是双向凝胶电泳。该方法可分离超过 1 000 个能反映各细胞特征的蛋白质点,目前已被广泛应用,但仍然存在一些缺点<sup>[2]</sup>。二维液相色谱分离包括液相状态下的一维色谱聚焦(根据 pI 分离)及第二维的无孔硅胶反相 HPLC 分离(根据疏水性分离)。该方法具有几个重要的优点:(1)灵敏度高,最佳上样量为 2~5 mg,有利于低丰度蛋白质的检测,而双向凝胶电泳的上样量为 0.2~0.5 mg;(2)容易自动化,可直接与质谱连接,获得高精度的完整蛋白质的相对分子质量<sup>[3]</sup>;(3)重现性很好<sup>[4]</sup>;(4)分辨率高,改变二维洗脱条件就可以提高分辨率。应用二维液相快速色谱分离方法研究蛋白质组差异将成为寻找癌症等疾病分子标记和药物靶标最有效的方法之一,为进一步寻找肿瘤的特异性蛋白打下基础。

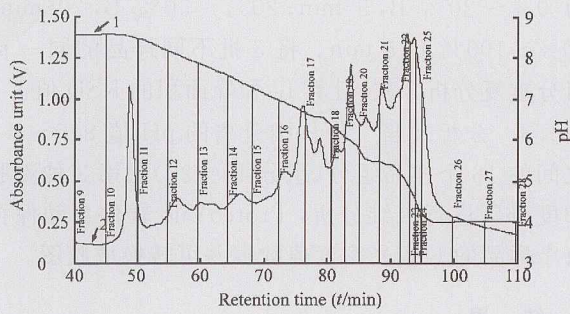


图1 肿瘤细胞裂解液的一维色谱聚焦图  
Fig 1 Chromatofocusing of cancer cell lysates  
1: pH curve; 2: Chromatograph of tumor cell lysates

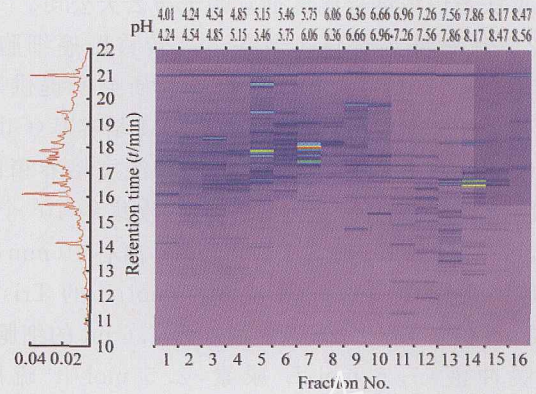


图3 肿瘤细胞裂解液的 pI/UV 图  
Fig 3 pI /UV map of cancer cell lysates

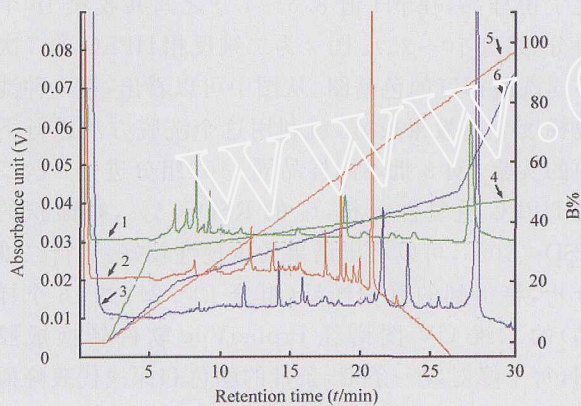


图2 组分 11 的 3 个不同洗脱梯度的反相 HPLC 色谱图  
Fig 2 RP-HPLC chromatographic maps of 3 different gradients of fraction 11  
1: 0%-30% B, 5 min; 30%-50% B, 30 min; 50%-100% B, 5 min; 2: 0~100% B, 30 min; 3: 0%-20% B, 5 min; 20%-50% B, 20 min; 50%-100%, 5 min; 4-6: pH curve of different gradients in 1-3

[参考文献]

[1] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes; *Mycoplasma genitalium*[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16(7):1090-1094.  
[2] Ong SE, Pandey A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics[J]. *Biomol Eng*, 2001, 18(5):195-205.  
[3] Kachman MT, Wang H, Schwartz DR, et al. A 2-D liquid separations/mass mapping method for interlysate comparison of ovarian cancers[J]. *Anal Chem*, 2002, 74(8):1779-1791.  
[4] Yan F, Subramanian B, Nakeff A, et al. A comparison of drug-treated and untreated HCT-116 human colon adenocarcinoma cells using a 2-D liquid separation mapping method based upon chromatofocusing pI fractionation [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(10):2299-2308.

[收稿日期] 2004-02-09

[修回日期] 2004-05-31

[本文编辑] 尹 茶

(上接第 861 页)

并接受体循环血液供应。根据解剖可分为肺内和肺外隔离症 2 种类型。近 2/3 的肺内隔离症位于左下叶后段脊柱旁沟内,其余位于右下叶相应的部位,上叶很少受累。血液供应主要来自降主动脉及其分支,部分来自腹主动脉及其分支。静脉主要回流入肺静脉产生分流,个别进入下腔静脉或奇静脉<sup>[1,2]</sup>。

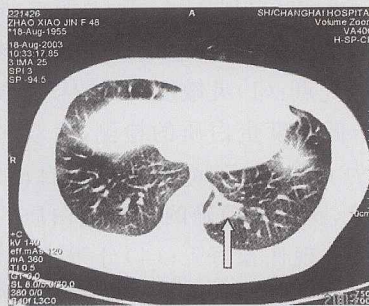


图1 患者 2003 年 8 月胸部 CT 病灶位于左肺下叶后段(左下叶后段脊柱旁沟内),其血供和降主动脉及分支相连

肺隔离症的 X 线表现为主要为圆形、卵圆形或三角形片状阴影、密度均匀,与支气管或胃肠道相通;合并感染后,可见囊肿含气,甚至出现液平面。支气管造影可见正常支气管受压,主动脉造影可显示异常的血供分支,有助于鉴别诊断。治疗主要依靠手术切除。本病例为右乳腺癌术后(pT<sub>2</sub>N<sub>2</sub>M<sub>0</sub>, III A)的患者,肺部的病变易考虑为转移性肺肿瘤,故临床工作中要注意与肺转移肿瘤相鉴别,当然同时也要和原发性肺肿瘤相鉴别。通过本病例,可得出以下鉴别要点:(1)肺隔离症的局部血供来自体循环(降主动脉及分支);(2)病变常常单发;(3)位置多为左肺下叶后段(左下叶后段脊柱旁沟内)。

[参考文献]

[1] 白春学. 肺隔离症[A]. 见:陈灏珠 主编. 实用内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001. 1667.  
[2] 钟文招,唐 震. 肺隔离症的 CT 诊断[J]. 实用放射学杂志, 2001, 17(5):351-353.

[收稿日期] 2003-11-27

[修回日期] 2004-04-09

[本文编辑] 曹 静