

文章编号: 1001-098X(2003)01-0045-03

## 2DE技术及其在辐射损伤研究中的应用

王治东, 陈肖华

**摘要:** 2DE(二维聚丙烯酰胺凝胶电泳)技术是蛋白质组学研究中的主要分离技术,其分别以蛋白质的等电点和分子量这两个独立的参数为基础,实现蛋白质混合物的分离。2DE在探讨疾病发生机理,寻找肿瘤早期诊断指标,及药物开发研究等方面均有较好的应用,在辐射损伤研究中的应用也有广泛的前景。

**关键词:** 蛋白质分离; 二维聚丙烯酰胺; 辐射损伤

中图分类号: Q5-33, R818.023 文献标识码: A

## Progress in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and application in radiation research

WANG Zhi-dong, CHEN Xiao-hua

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China*)

**Abstract:** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis is the key separation technique in proteomics research, which is designed by protein character: molecular weight and PI. Some progress has been made in disease mechanism detection, tumour indicator research and drug development. This technique also has some potential application in radiation research.

**Key words:** protein separation; two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; irradiation

由于从基因水平研究机体并不能完全阐述机体动态的变化,蛋白质组学应运而生。蛋白质组是指某一物种、个体、器官、组织、细胞乃至体液在某一特定状态下含有的全部蛋白质,研究蛋白质组的科学即蛋白质组学。目前蛋白质组学的主要研究手段包括蛋白质分离技术和鉴定技术。本文将对蛋白质分离技术中的2DE(二维聚丙烯酰胺凝胶电泳, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis)技术及其在辐射损伤研究中的应用作一概述。

### 1 2DE技术的研究现状

2DE技术是由O'Farrel等人于1975年首先提出

收稿日期: 2002-09-27

**作者简介:** ①王治东(1977-),男,军事医学科学院放射医学研究所(北京,100850)硕士研究生,主要从事辐射血液学研究。

②陈肖华(1958-),男,军事医学科学院放射医学研究所放射病实验治疗研究室(北京,100850)副研究员,主要从事放射病实验治疗研究。

审校者:军事医学科学院放射医学研究所 毛秉智

来的。

#### 1.1 样品的溶解

样品的溶解度直接关系到样品蛋白质分离的分辨率。对于2DE技术的蛋白质溶解问题,理论上要求打开蛋白质多肽之间的所有共价键和次级键,使之以多肽混合物的形式存在,但是疏水蛋白质尤其是膜蛋白质很难溶解,而这些膜蛋白质往往又有着重要的功能,这在很大程度上曾限制了2DE的应用。在溶解蛋白质的过程中增溶剂(如变性剂、表面活性剂、还原剂等)的使用则解决了这一问题<sup>[1]</sup>。

#### 1.2 低拷贝蛋白质、极酸或极碱蛋白质、过大或过小蛋白质的分离

对大多数原核生物而言,由于其基因数不超过3 000个,翻译后蛋白质的修饰程度较低,所以蛋白质的数目稍多于其基因数,以目前的2DE技术能够有效地分离,但对低丰度蛋白质仍有困难。对真核生物而言,特别是在哺乳动物细胞,同时表达的基因数至少有5 000个,而且翻译后的修饰作用也较原核生物复杂得多,所以蛋白质的数目就更大。

在这些蛋白质之间,pH值的差异、分子质量之间的差异较大,有些蛋白质的含量很低,在一块凝胶上显示全细胞提取物中的蛋白质就显得力不从心,而且凝胶上的某一点往往包含几种蛋白质,这又增加了以后蛋白质鉴定的难度。采用样品预分级分离的策略可以较好地解决这一问题<sup>[2]</sup>。通过预分级分离把复杂的样品分成几个明确的部分,从而提高2DE检测低丰度蛋白质的能力和检出数目,更好地分离性质差异较大的蛋白质。

### 1.3 结果的可重复性

早期,2DE在第一相等电聚焦电泳中,胶体pH梯度的建立是使用载体两性电解质,存在阴性漂离和电内渗等缺点,严重影响了2DE结果的重复性。固相pH梯度(immobilized pH gradients, IPG)技术则克服了载体两性电解质的缺陷<sup>[3]</sup>,其原理是:胶条由聚丙烯酰胺形成一个整体,pH梯度的产生是由酸性和碱性基团与聚丙烯酰胺以共价键连接而形成。IPG的pH范围可宽可窄,为最大限度地分离不同等电点蛋白质提供了可能。

### 1.4 电泳后蛋白质的显色

蛋白质染色技术种类较多。

考马斯亮蓝染色操作简单、费用低,但是灵敏度低,脱色程度不一致,很难进行定量分析。

银染有两种方法:酸性硝酸银法和碱性二氨银法。酸性硝酸银法对胞内恒定蛋白质染色的灵敏度较低,但对酸性蛋白质的灵敏度较高,适合于2DE的染色。银染灵敏度比考马斯亮蓝染色的灵敏度高100倍左右,目前应用较广泛,但由于银染过程中使用甲醛,给进一步的质谱鉴定带来困难。

反相染色时在2DE胶上的背景是不透明或半透明的,而蛋白质点是透明的。反相染色时间短,蛋白质活性保持较好,但不能用于电转膜的染色。

荧光染色灵敏度高,操作方便,且不影响蛋白质的鉴定,但是价格昂贵。

## 2 2DE技术的主要应用

### 2.1 建立人体组织细胞的蛋白质图谱

蛋白质组学研究的一个主要内容就是建立人类蛋白质图谱,但是由于人体不同组织细胞的蛋白质表达不同,建立人类蛋白质图谱的工作量和难度要比建立人类基因图谱大得多。目前,主要是利用2DE技术分离组织细胞中的蛋白质,然后结合质谱

等蛋白质鉴定技术对2DE分离的蛋白质进行鉴定,从而建立相应的蛋白质图谱。

### 2.2 疾病诊断标志物的寻找及机体生理过程、发病机理的探讨

利用2DE技术和蛋白质鉴定技术已研究了一氧化氮合酶、蛋白质激酶C和肌球蛋白的胞内分布和移位,结果与用荧光标记蛋白质后荧光显微镜下观察蛋白质移位的结果一致<sup>[4]</sup>。Celis JE等<sup>[5]</sup>利用2DE技术研究膀胱鳞状细胞癌发病过程,结果显示角蛋白20和角蛋白18的表达缺失是正常尿道上皮鳞状分化的早期表现。Seow TK等<sup>[6]</sup>利用2DE技术研究了肝细胞癌细胞株,分析了400个蛋白质点,发现了一些与癌变相关的蛋白质,如14-3-3蛋白质、连接素、抑制素等。在儿童白血病及其他血液恶性肿瘤的蛋白质表达研究中发现,OP18是一种参与信号转导的含量丰富的细胞质磷酸化蛋白<sup>[7]</sup>。

### 2.3 药物靶标的寻找及药物毒性的分析

2DE技术可以发现在疾病状态下表达异常的蛋白质,这可能作为药物筛选的作用靶点。在药物的药效评价和药物毒理学方面也有一定的应用。Aicher L等<sup>[8]</sup>研究了环孢素A作用于鼠、犬、猴和人体后的肾毒性,结果发现,环孢素A作用后钙结合蛋白表达丰度明显下降,尤其是在鼠和人体内,钙结合蛋白质点的密度与肾脏中钙的沉积量有很好的线性反比关系。

## 3 2DE技术在辐射损伤研究中的应用

1996年,Morimatsu A等用2DE技术研究了人白血病MOLT-4细胞照射后蛋白质变化情况:银染后在照射组的2DE图谱中发现一辐射诱发的蛋白质,其分子质量为41 000,等电点为4.0,通过微测序发现该蛋白质是一组已知基因的产物。兔多克隆抗体检测后发现两个蛋白质点,其分子质量分别为41 000(p41)和42 000(p42),进一步利用电泳后银染和蛋白质免疫印迹检测后发现,p41与照射有时间和剂量依赖关系,照射后4h开始升高,10h达到峰值;在1~10 Gy范围内随剂量增加而升高,其中的机理尚不清楚。Ramsamooj P等<sup>[9]</sup>利用2DE技术研究了具有辐射抵抗性的SQ-20B(鳞状细胞癌细胞系)照射后蛋白质变化情况:通过比较未照射和6 Gy照射后4h的SQ-20B细胞提取物蛋白质谱,在照射组2DE图谱中发现分子质量为40 000的蛋白

质表达有所增加,等电点介于 5.2~5.5 之间;通过 Edman 自动测序仪检测了其中 15 个氨基酸序列,发现 SPSD( swiss protein sequence database) 中 10 个氨基酸序列与核仁蛋白 B23 氨基酸序列 100% 同源;利用抗核仁蛋白 B23 的单克隆抗体进行蛋白质免疫印迹后肯定了此一结果,从而推断核仁蛋白 B23 可能参与辐射引起的生化反应。1988 年, Zhivotovsky BD 等利用 2DE 技术研究 4.0 Gy X 射线全身照射大鼠后 1 h 其胸腺核仁蛋白质的表达和磷酸化的变化:比较照射组与对照组的胸腺细胞核蛋白提取物 2DE 图谱,照射后 1h 大鼠胸腺细胞核蛋白质表达未见明显变化,进一步的研究发现 3 种蛋白质在照射后磷酸化程度明显增加,并鉴定出这 3 种蛋白质的分子质量和等电点分别为 20 000, pH 6.8; 35 000, pH 5.8 and 48 000, pH 5.8。这表明蛋白质的磷酸化可能参与辐射损伤过程。Gamble SC 等<sup>[10]</sup>研究发现,人肺上皮细胞系细胞和许多其他细胞系细胞对小剂量电离辐射(<0.2 Gy)高度敏感,但是更高的剂量(0.4~0.6 Gy)却激活细胞的保护性反应;经过 2DE 研究发现,0.5 Gy 照射后 4h, 2DE 蛋白质表达谱变化最为明显,有 7 种蛋白质为 2~5 倍下调,1 种蛋白质 2 倍上调,经进一步鉴定后发现这些蛋白质分别归属于蛋白激酶 C 抑制剂、蛋白激酶 C 激活剂和凋亡过程中的细胞骨架蛋白,从而考虑这些蛋白质可能参与信号转导过程。Gupta A 等<sup>[11]</sup>建立  $\beta$  粒子辐射诱发的皮肤横纹肌肉瘤小鼠模型及其细胞系,经过 2DE 分析后结合 Western blotting 发现,横纹肌肉瘤的细胞系表达肌间线蛋白,为进一步研究辐射诱发横纹肌肉瘤的发病机理和诊断提供了线索。Prasad SC 等<sup>[12]</sup>研究了新生的人前列腺上皮细胞系在 X 射线作用下的成瘤机制,经比较 267B1、F3-SAC(锚地依赖性来源细胞系)、267B1-XR(源于 30Gy X 射线的 267B1)和 267B1-SXR(源于 30 GyX 射线的 F3-SAC)四个细胞系的 2DE 蛋白质图谱发现,在 F3-SAC 蛋白表达图谱中,凝胶溶素表达缺失,在 267B1-XR 和 267B1-SXR 蛋白表达谱上,肌原肌球蛋白和肌浆球蛋白轻链-2 表达分别呈进行性减少,为研究前列腺上皮细胞成瘤过程提供了线索。

2DE 技术在辐射损伤研究中的应用尚处于起步阶段,主要集中在细胞系方面的研究。大剂量辐射损伤是一种不常见的病理生理过程,有着自身的

特点,但是与其他病理生理过程也有着共同之处,2DE 技术作为一种较新的研究方法,应该可以开拓辐射损伤机制的研究思路,为辐射损伤的研究提供新的技术平台。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Moloy MP. Two-dimensional electrophoresis of membrane protein using immobilized pH gradients [J]. *Anal Biochem*, 2000, 280: 1-10.
- [ 2 ] Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, et al. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1104-1115.
- [ 3 ] Chevallet M, Santoni V, Poinas A, et al. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two dimensional electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19: 1501.
- [ 4 ] Nelson PS, Han D, Rochon Y, et al. Comprehensive analyses of prostate gene expression: convergence of expressed sequence tag databases, transcript profiling and proteomics [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21 (9): 1823-1831.
- [ 5 ] Celis JE, Wolf H, Qstergaard M. Bladder squamous cell carcinoma biomarkers derived from proteomics [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(11): 2115-2121.
- [ 6 ] Seow TK, Ong SE, Liang RC, et al. Two-dimensional electrophoresis map of the human hepato cellular carcinoma cell line, HCC-M, and identification of the separated proteins by mass spectrometry[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(9): 1787-1813.
- [ 7 ] Alaiya AA, Franzen B, Auer G, et al. Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1210-1217.
- [ 8 ] Aicher L, Wahl D, Arce A, et al. New insights into cyclosporine A nephro toxicity by proteome analysis[J]. *Electrophoresis*, 1998, 19 (11): 1998-2003.
- [ 9 ] Ramsamoj P, Notario V, Dritschilo A. Modification of nucleolar protein B23 after exposure to ionizing radiation [J]. *Radiat Res*, 1995, 143(2): 158-164.
- [ 10 ] Gamble SC, Dunn MJ, Wheeler CH, et al. Expression of proteins coincident with inducible radioprotection in human lung epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(8): 2146-2151.
- [ 11 ] Gupta A, Andrews KL, Daniel KM, et al. Experimental induction of rhabdomyosarcoma in mice with fractionated doses of beta irradiation[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1999, 125(5): 257-267.
- [ 12 ] Prasad SC, Thraves PJ, Dritschilo A, et al. Cytoskeletal changes during radiation-induced neoplastic transformation of human prostate epithelial cells [J]. *Scanning Microsc*, 1996, 10(4): 1093-1102.