

卵巢癌 COC₁ 细胞不同梯度加药量样品的比较蛋白质组研究

吕 磊^{1,2}, 刘志强^{1,*}, 王兆伏¹, 刘淑莹¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心 长春 130022; 2. 延安大学化学与化工学院, 陕西 延安 716000)

Comparative Analysis of Proteomes for Cisplatin Resistance in Human Ovarian Adenocarcinoma Cell Line, COC₁

Lü Lei^{1,2}, LIU Zhi-qiang^{1,*}, WANG Zhao-fu¹, LIU Shu-ying¹
(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Changchun 130022, China;
2. Department of Chemistry, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

Abstract: A proteomic approach to cisplatin resistance and drug response in human ovarian adenocarcinoma cell line, COC₁. The global proteins have been separated by 2-DE SDS-PAGE. The image analysis revealed obvious differential protein expression of the cells in response to cisplatin treatment. Primary result shows there were 3 protein spots with magnificent differential expression. The proteins, including two up-regulated protein spots and one down-regulated protein spots, were analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and database search. Some of them were the first time detected to be relevant to the drug resistance.

Key words: human ovarian cancer; two-dimension gel electrophoresis (2-DE); proteomics; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)增刊-161-02

卵巢癌是妇科疾病中常见的肿瘤, 死亡率较高。复发后的卵巢癌由于产生耐药性导致化疗失败, 应用蛋白质组学技术研究化疗中的耐药机制和确定临床诊断的标志性蛋白, 对于提高该病的治愈率具有重要的意义。

1 实验部分

1.1 主要仪器

凝胶专用扫描仪 (UMAX Powerlook 1120 UDS, 台湾), 双向电泳仪购自 BIO-RAD 公司 (Hercules, CA, USA), Voyager DE STR MALDI-TOF 质谱仪 (Applied biosystems, ABI, USA)。

基金项目: 国家自然科学基金(20173057)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213-06)资助

作者简介: 吕 磊(1971~), 男(汉族), 陕西人, 博士, 从事生物质谱学研究, E-mail: lvlei10322@163.com

* 通讯作者: 刘志强(1962~), 男(汉族), 吉林人, 研究员, 博士生导师, 从事天然药物化学和有机质谱学研究。E-mail: liuzq@ciac.jl.

1.2 主要试剂和材料

尿素 (Urea)、精胺 (Spermine)、蔗糖 (Sucrose)、甘油 (Glycerol)、Tris、CHAPS、Acrylamide、TMED、PMSF 等购于 Sigma 公司, 三氟乙酸 (TFA) 和乙腈购自 Aldrich 公司, 胰蛋白酶测序级购自 Promega 公司, 其余试剂为国产分析纯。IPG 预制胶条购于 Bio-Rad 公司, 肿瘤细胞 COC₁ 购自 CCTCC (中国典型培养保藏中心)。药品: 顺铂 (DDP) 为山东齐鲁制药厂产品。

1.3 总蛋白样品的制备

将癌细胞 COC₁ 分别置于未加药和含有化疗药 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DDP) 的 RPMI1640 培养液中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中悬浮培养, 待细胞数处于对数生长期且细胞数达到 10^8 时, 收集细胞, 清洗、裂解、提取细胞总蛋白。电泳前, 应用 RC DC Protein Assay Kit 进行总蛋白定量。

1.4 双向电泳分离与质谱分析

双向电泳实验主要参考文献 [1] 的方法进行, 总蛋白上样量为 800 μg 。胶片的染色、扫描参考文献 [2] 进行, 并作适当改动。应用 PDQuest7. 1. 1 软件进行图像分析后, 确定并鉴定显著差异的蛋白点。质谱表征及数据库检索参数设定参见文献 [3-4]。

2 结果与讨论

2.1 二维电泳分析

将加药与未加药细胞株 COC₁ 培养一定数

量后, 在相同的条件下提取总蛋白, 并对蛋白样品进行二维电泳分离, 图 1 为加药与未加药细胞总蛋白质的二维电泳图谱。应用图像分析软件对电泳图进行分析, 建立分析组测定各匹配点之间光密度变化, 初步确定了 3 个显著差异蛋白。为了保证实验结果重复性, 仅选择了有明显变化趋势的点 (光密度差异在 2 倍以上), 其中 spot1、spot3 等蛋白质在药物作用下表达明显上调, spot2 蛋白质表达下调。本文以 spot2 点为例, 对差异蛋白质进行生物质谱分析与鉴定。

2.2 生物质谱分析

将 spot2 蛋白质点切取下来, 并对该点的酶解多肽混合物进行质谱测定。图 2 为 spot2 蛋白的 MALDI 质谱图, 选择若干个强单同位素峰进行蛋白检索, 并应用电泳图中的表观分子量和等电点对检索过程加以限制, 确定 spot2 蛋白质为磷酸丙糖异构酶。同样鉴定 spot1、spot3 蛋白分别为 Chain F, Cypa Complexed With Hvgpia 和 alpha-complex protein1.。

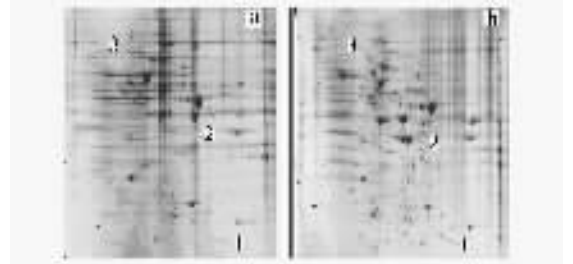


图 1 加药 (a) 与未加药 (b) 细胞总蛋白质的二维电泳图谱

Fig. 1 2-DE map of the cell line COC₁

(a)—adding DDP; (b)—no DDP

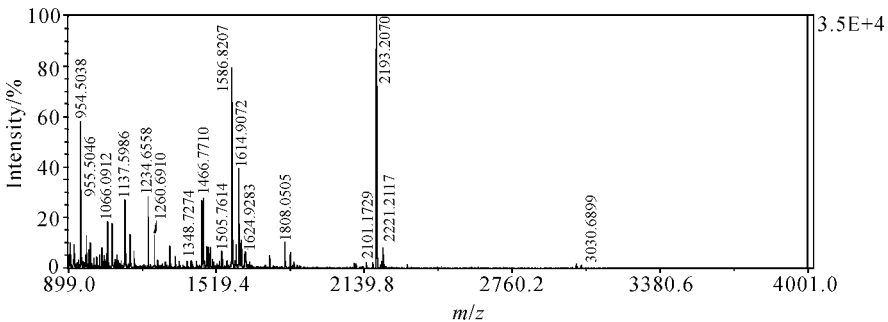


图 2 spot 2 蛋白的 MALDI 质谱图

Fig 2 Peptide mass fingerprint of spot 2 in 2-DE map of human ovarian cancer cell COC₁ proteome.

血液是人体赖以生存的重要物质基础,其中血浆蛋白质是组成血液的重要生化物质基础,与其他重要成分一起维持了血液在沟通内外环境、维持内环境稳定、承担物质的运输、免疫防御、凝血以及抗凝血等方面的重要作用。血浆蛋白质组研究长期以来一直是人们研究的热点,并被国际人类蛋白质组组织(HUPO)列为首批实施的重大国际合作研究项目。对于血浆蛋白质组的深入研究,有助于研究疾病和健康状态下血浆蛋白质的差异,有利于阐明疾病的发生基质,寻找有效的治疗方法,发现有效疫苗极新的药物靶标,这都将极大的促进疾病的早期诊断与治疗。

血浆蛋白质在组成上至少具有 1 万种以上蛋白形式,且丰度差异极大,其中 22 种主要高丰度及中等丰度的蛋白,占血浆总蛋白量的 99% 以上,而其余的 1% 则由众多的低丰度甚至极低丰度的蛋白组成,高低丰度蛋白含量动态范围达到 10^{12} ,远远超出了目前分析方法所具有的效能,对目前蛋白质分离鉴定技术提出了巨大挑战。

因此如何建立适用于血浆蛋白质的样品预处理及高效分离鉴定技术体系,已经成为血浆蛋白质组研究的热点。

本研究建立了一套集高丰度蛋白免疫亲和去除,乙酸酐稳定同位素标记,高精度傅立叶变

换离子回旋共振(FTICR)质谱鉴定,和自主开发的规模化数据分析软件系统(ASMQL.0)的综合血浆蛋白质组学研究策略。

通过去除 12 种高丰度蛋白质的免疫亲和(Seppro TM 柱)整体蛋白预分离策略,成功获得低丰度蛋白流出组分,因而有利于血浆蛋白的鉴定。流出组分酶解后,等分为两份,通过氘或氘乙酸酐稳定同位素标记技术,被标记的肽段在质谱中呈现质量数相差 3.0 Da,峰强度理论比值为 1.0 的一对特征性的同位素峰,因而可以极大的排除非血浆来源质谱峰的干扰,提高了数据的可靠性。单张谱图动态范围为 5 000 的 FTICR 质谱可以成功的捕获到反相色谱分离时共洗脱的低丰度的肽段,对于产生的数据,在 5 ppm 的准确度下,经 Mascot 检索产生 $p < 0.05$ 的鉴定结果,然后通过实验室自行编制的 ASMQL.0 定量分析软件将 Mascot 检索结果和 FTICR 质谱产生的 Raw 文件进行关联,计算被鉴定的同位素标记肽段的峰强度比值(理论比值 1.0),对所有比值计算结果进行正态分布拟合统计分析,计算置信区间 99% 的误差范围,最终建立一套血浆蛋白核心数据集。通过对去除高丰度血浆预实验的结果进行数据分析,已经得到了理想的鉴定结果。

=====

(上接第 162 页)

3 结 论

应用蛋白质组学技术研究卵巢癌细胞在加药和未加药状态下的蛋白质组差异表达,并对有意义的蛋白点进行了生物质谱分析与鉴定,为临床开发肿瘤诊断标志物,寻找抗耐药肿瘤靶标新药以及研究其他药物的作用机制提供理论支持。

参考文献:

[1] Langen H, Roder D, Juranville J F, et al. Electro-

phoresis. 1997,18:2 085-2 090.

[2] Bouley J, Chambon C, Picard B. Proteomics. 2004,4:1 811-1 824.

[3] Yates J R. 3rd. Mass spectrometry and the age of the proteome[J]. J. Mass Spectrum, 1998, 33 :1-19.

[4] 吕 磊,刘志强,李 丽,等. 高等学校化学学报[J]. 2006,4:635-637.