

嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告

口腔癌細胞蛋白質二維電泳之分析

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：90-PH-07

執行期間：90/1/1 – 90/12/31

計畫主持人：林美惠

執行單位：嘉南藥理科技大學藥學系

中華民國 91 年 2 月 20 日

計畫名稱：口腔癌細胞蛋白質二維電泳之分析

計畫編號：90-PH-07

執行期間：90/1/1 – 90/12/31

計畫主持人：林美惠

一、中文摘要

二維電泳 (two dimensional gel electrophoresis, 2-DE) 能依等電點及分子量大小二特性分離出不同的蛋白質。因二維電泳可分析成分複雜的樣本，如細胞之蛋白質圖譜；亦可將蛋白質轉印到 nitrocellulose membrane，再以抗體進行免疫染色檢測蛋白質。如今已知人類完整基因密碼，所以在後基因體時代細胞蛋白質的表現及功能之研究就顯得非常重要。由於二維電泳可結合質譜技術以迅速分離與鑑定蛋白質，因此廣泛用於蛋白質體學及基因體學的研究。本研究之主要目標為建立二維電泳的技術平台以應用於蛋白質圖譜之分析，首先我們以台灣口腔癌細胞為模型設計一系列研究方法。藉由 2-DE 分離及純化癌細胞產生的蛋白質，再以 silver stain 呈色。期能與正常細胞比較後，找出相異蛋白質並以質譜技術分析之。

關鍵詞：二維電泳、口腔癌

Abstract

Two dimensional (2D) gel electrophoresis is able to separate proteins by their isoelectric points and molecular weights. Establishing the 2D map of cancer samples provides a tool to identify novel tumor markers and prognostic factors, as well as to search for potential targets for therapeutic intervention. To begin with, we utilize cultured oral cancer cells to set up the techniques. The goal of this project is to use 2D gel electrophoresis to look for protein markers that are differentially expressed between normal and oral cancer samples. The markers can then be identified by mass spectrometry.

Keywords: oral cancer, two dimensional gel electrophoresis

二、緣由與目的

2-DE 是種生化分離技術，也是一個有效且廣泛用於分析自細胞、組織或其他生物樣品中抽提之複雜蛋白質混合物的方法。這個技術是以：第一維的 isoelectric focusing (IEF)，依等電點 (isoelectric points; pI) 分離蛋白質；及第二維的 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)，依分子量大小分離蛋白質。用這兩種蛋白質特性跑出來的 2D gels，其中的每個點大多是樣品中的單一種蛋白質，因此幾乎可將樣品中每一個蛋白質都分離出來，而得到約上千種不同的蛋白質。目前雖由於微陣列 (Microarray) 晶片技術的開發及應用，使研究者得以快速明瞭基因型 (genotype) 及表現型 (Phenotype) 間的相關性。然而，人類的 DNA 序列中大概僅有部份是能產生蛋白質的基因，因此要從人類基因組中辨認出有功能的基因仍有待努力。2-DE、質譜技術則可提供相關於蛋白質表現的實驗數據。此外，在 2-DE 方面也可藉聚焦程度來純化特殊蛋白質，或應用於細胞分化、疾病標記及療程監測。癌細胞株可能表現的蛋白質與正常細胞株不同，而口腔癌在台灣為男性十大癌症排名第五。罹患率上升極快且致死率又高，尤其台灣南部嚼檳榔的人口眾多，所以罹患者也特別多。故本研究以口腔癌細胞為研究模型，先確定出一套可信且有效的 2-DE 技術平台，然後用質譜探索其特殊蛋白質，以期可篩選出新的口腔癌標記。

三、結果與討論

起初製得的 2D gel 聚焦程度不高，產生不少水平拖尾現象。歸納可能造成的原因：第一，因樣品量加的太多或太少。因此調整 IEF 的樣品量；第二，可能是 DNA、RNA 污染。所以以丙酮或 TCA 沈澱樣品。第三，可能是 strip rehydration 不完全。所以改變 rehydration 時的

電壓、時間等條件。Fig. 1 為 silver staining 後的口腔癌細胞抽出物之 2D gel，以 30 μg 的樣品跑出來的結果。第一維 IEF 用 11 公分的 strip，自左到右為酸到鹼(pH 3-10)；第二維 SDS PAGE 從上而下為分子量大到小。此膠約分離出 500 個點，pH 4-7 之間的點最多。所以可改用 pH 4-7 之 IPGphor strip 使蛋白質分離效果更好，或用較大的 strip 分離出較大量的蛋白質。由此可證實 2-DE 只需微量樣品就可分離出口腔癌細胞大部分的內含物，而且解析度好。所以 2-DE 可同時分離及純化蛋白質複合物，以方便蛋白質進行進一步的研究。

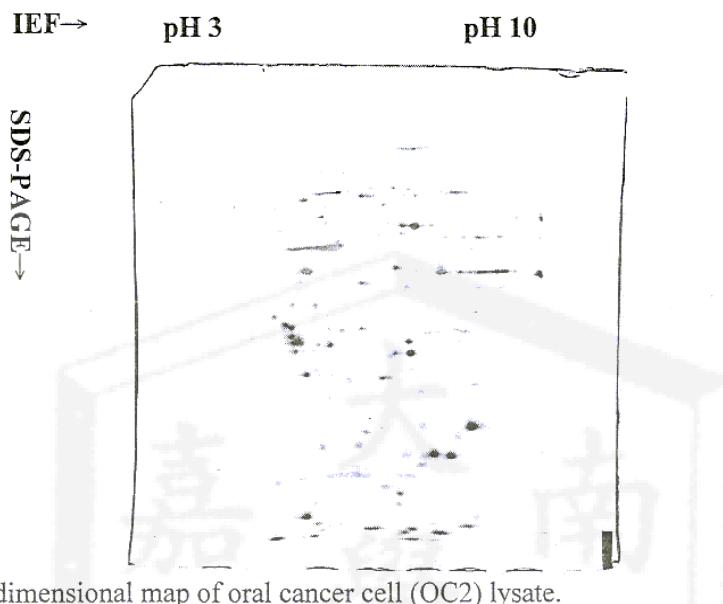


Fig. 2 Two dimensional map of oral cancer cell (OC2) lysate.

2-DE 是一個找出新的標記蛋白質之快速及有效的方法，可望用於疾病的診斷及治療。因此，為了與口腔癌細胞比較，所以未來研究方向是正常口腔癌細胞的 2D gel。目前我們正在比較正常細胞與癌細胞之 2D gel 的不同點。

另外，2-DE 分離出之蛋白質圖譜需結合其他技術，如質譜技術、色層分析、自動定序儀、NMR 等方法，以進行蛋白質體學方面的分析。我們的終極目標為找尋癌細胞內結構或表現發生改變的基因。表達差異之蛋白質可能與癌症的發生有關，或可作為臨床藥物診斷及治療的標記，甚至可延伸到基因組研究方面的應用。

四、參考文獻

1. Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, Tsai CC. (1995) J. Oral Pathology & Medicine. 24, 450-453
2. Celis JE, Gromov P. Curr Opin Biotechnol. 1999;10(1):16-21.
3. Ramsby ML, Makowski GS. Methods Mol Biol. 1999;112:53-66.
4. Rabilloud T. Methods Mol Biol. 1999;112:9-19.
5. Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. Electrophoresis. 2000; 6:1037-1053.