

افزایش پوشش پروتئوم سلول‌های Hs578T، متعلق به سرطان پستان، در نمایه‌ی الکتروفورز دو بعدی با حذف کارآمد مداخله‌گرهای غیر پروتئینی

حمیدرضا عباسی^۱، ندا سرای‌گرد افشاری^۲، ندا محمدی^۱، محمد مراد فرج‌اللهی^۳، رضا فلک^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: با وجود استفاده‌ی گسترده، پوشش پروتئینی پایین و الگوهای اسمیری، از مهم‌ترین موانع بازدارنده برای استفاده از مطالعات پروتئومیک مبتنی بر ژل در بررسی‌های بالینی می‌باشد. بنابراین، در این مطالعه تلاش شد تا پوشش نمایه‌ی دو بعدی پروتئوم رده‌ی سلولی Hs578T، متعلق به سرطان پستان افزایش یابد و تأثیر کارآمدی روش‌های مرسوم حذف مداخله‌گرهای غیر پروتئینی در افزایش تعداد پروتئین‌ها در نمایه‌ی دو بعدی ارزیابی گردد.

روش‌ها: سلول‌های رده‌ی Hs578T، به منظور استخراج عصاره‌ی خام سلولی، در بافر لیز مناسب تیمار شدند. عصاره‌های سلولی حاصل از استخراج‌های متعدد، با هم همگن و در حجم‌های یکسان تقسیم شدند و در سه تکرار، با روش‌های استون، استون-متانول و تری‌کلرواستیک اسید (TCA یا Trichloroacetic acid) - استون خالص گشتند. سپس، پروتئوم خالص تهیه شده از هر روش، در یک بافر بازآبرسانی استاندارد حل شد و بر روی نوارهای Immobilized pH gradient (IPG) ۱۷ سانتی‌متری بارگذاری گشت. پس از تفکیک ایزوالکتریک در بعد اول، محتوای پروتئوم، یک بار دیگر در سیستم الکتروفورز O'Farrell نیز مورد تفکیک الکتروفوریک قرار گرفت. در نهایت، پس از ظهور نقاط پروتئینی در نمایه‌ی دو بعدی، تصاویر حاصل با استفاده از نرم‌افزار ImageMaster به صورت کمی - کیفی تحلیل شدند.

یافته‌ها: بازده بازیابی پروتئوم، برای روش‌های استون، استون-متانول و TCA - استون به ترتیب 0.100 ± 0.001 ، 0.070 ± 0.002 و 0.120 ± 0.005 نانوگرم به ازای هر سلول محاسبه شد. آنالیز تصویر نیز حضور 9 ± 1299 نقطه‌ی پروتئینی را در نمایه‌ی دو بعدی تخلیص شده با استون نشان داد که این تعداد برای تخلیص با استون-متانول و TCA - استون به ترتیب 14 ± 1698 و 17 ± 1973 بود. نتایج از سه اندازه‌گیری جداگانه به دست آمد.

نتیجه‌گیری: آماده‌سازی نمونه‌ها با روش TCA - استون، نه تنها بالاترین بازده بازیابی پروتئین را دارد؛ بلکه، پوشش پروتئومی بهتری را نیز ارائه می‌دهد. بنابراین، این روش برای مطالعات پروتئومیک مقایسه‌ای توصیه می‌گردد. با این وجود، تخلیص با استون-متانول، با توجه به ارابه‌ی نقاط پروتئینی قوی‌تر، برای مطالعات سرولوژیکی پروتئوم پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: پروتئین، تخلیص، الکتروفورز دو بعدی، رده‌ی سلولی، سرطان پستان

ارجاع: عباسی حمیدرضا، سرای‌گرد افشاری ندا، محمدی ندا، فرج‌اللهی محمد مراد، فلک رضا. افزایش پوشش پروتئوم سلول‌های Hs578T، متعلق به سرطان پستان، در نمایه‌ی الکتروفورز دو بعدی با حذف کارآمد مداخله‌گرهای غیر پروتئینی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۱): ۲۲۰-۲۱۶

بعدی، که از ابزارهای اصلی پروتئومیک مقایسه‌ای می‌باشد، در ارتقای کیفیت مطالعات دارویی، بررسی تغییرات بیان پروتئین‌ها، به‌ویژه در بافت‌ها و سلول‌های سرطانی که حاوی اطلاعات زیستی فراوانی هستند، اهمیت بیشتری می‌یابد (۱-۲). الکتروفورز دو بعدی، روشی است که در آن پروتئین‌ها در دو بعد، بر اساس بار الکتریکی و سپس

مقدمه

پروتئومیک مقایسه‌ای مبتنی بر ژل ابزاری کارآمد جهت بررسی محتوای پروتئوم است که می‌تواند ایجاد، حذف، افزایش یا کاهش بیان مجموعه‌های پروتئینی را مورد بررسی و مقایسه قرار دهد. از این رو، افزایش تعداد پروتئین‌های قابل مشاهده در الگوی الکتروفورز دو

۱- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده‌ی پیراپزشکی، تهران، ایران

۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

این سلول‌ها مطابق با دستورالعمل مرکز و استانداردهای پذیرفته شده، در محیط کشت *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (Biowest، فرانسه) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) (Biowest، آلمان) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین - استرپتومایسین (Atocel، اتریش) درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند (۱۲). جهت استخراج پروتئوم تام، به ازای ۳۰ میلیون سلول، ۱ میلی‌لیتر بافر لیز کننده (حاوی ۴۰ میلی‌مولار تریس، ۷ مولار اوره، ۲ مولار تیوره، ۴ درصد CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)، ۴۰ میلی‌مولار دی‌تیوتریتول و ۲ درصد آمفولیت (Bio-Rad، هرکولس، کالیفرنیا) اضافه شد. سپس، عصاره با دور $\times g$ ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع رویی حاوی پروتئین و سایر ترکیبات زیستی، در سه میکروتیوب تقسیم و با استفاده از یکی از سه روش رسوب‌گیری استون، استون - متانول و TCA - استون مطابق، با دستورالعمل زیر خالص‌سازی شدند (۱۳).

تخلیص پروتئین با استفاده از رسوب‌گیری استون: به هر حجم از نمونه، چهار حجم استون سرد شده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد اضافه شد. مخلوط نمونه و رسوب دهنده برای مدت یک ساعت در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار شد. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و شتاب $\times g$ ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و مایع رویی تخلیه و رسوب حاصل با یک حجم استون سرد شستشو داده شد. جداسازی محتوای پروتئینی از مخلوط با استفاده از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و شتاب $\times g$ ۱۳۰۰۰ انجام و با حذف مایع رویی تکمیل شد (۱۱).

تخلیص پروتئین با رسوب‌گیری استون - متانول: به هر حجم از نمونه، ۸ حجم از مخلوط استون - متانول (که از قبل با نسبت حجمی ۸ به ۱ تهیه شده و در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد خنک شده بود)، افزوده شد. مخلوط نمونه و رسوب دهنده برای مدت یک شب در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار شد. سپس، محتوای پروتئینی با استفاده از ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور $\times g$ ۱۳۰۰۰ از مخلوط جدا شده، مایع رویی دور ریخته شد (۱۱).

تخلیص پروتئین با رسوب‌گیری TCA - استون: مخلوط رسوب دهنده در این روش، محلول TCA ۲۰ درصد حل شده در استون بود. این محلول از قبل و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد خنک شده بود. به مخلوط رسوب دهنده تا غلظت (Weight/volume یا W/V) ۰/۲ درصد Dithiothreitol (DTT) افزوده شد. هر حجم از نمونه با ۹ حجم از این محلول به خوبی مخلوط شد و یک شب در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار گردید. پس از گذشت این زمان،

وزن مولکولی، درون ژل‌های پلی‌آکریل آمید تفکیک می‌شوند (۳). موفقیت الکتروفورز دو بعدی تا حد زیادی به نحوه‌ی آماده‌سازی نمونه وابسته است. در واقع، شیوه‌ی صحیح استخراج و تخلیص پروتئین، حذف مواد مداخله‌گر و انتخاب صحیح ترکیب بافرهای مورد استفاده، یکی از مؤثرترین عوامل در افزایش تعداد نقاط پروتئینی و کیفیت الگوی آن‌ها در نمایه‌ی الکتروفورز دو بعدی است. نمونه‌هایی که با روش الکتروفورز دو بعدی مورد آنالیز و جداسازی قرار می‌گیرند، می‌بایست پروتئین‌هایی خالص و عاری از هر گونه مواد مداخله‌گر باشند (۴-۵).

از جمله مداخله‌گرهای مهم در مطالعات پروتئومیک می‌توان به اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها، نمک‌ها و پلی‌ساکاریدها اشاره نمود. این ترکیبات، باعث افزایش گران‌روی و اختلال در مسیر حرکت پروتئین‌ها، گرفتگی منافذ ژل، میان‌کنش با حامل‌های آمفولیتی و پروتئین‌ها و نیز سبب اختلال در مهاجرت الکتروفورتیک، بروز رگه‌های افقی و عمودی در الگوی نهایی و ممانعت از ورود پروتئین‌ها به بستر ژل‌های تفکیک کننده می‌شوند (۶-۷).

یکی از کارآمدترین روش‌ها برای حذف مداخله‌گرها، استفاده از شیوه‌های مختلف رسوب‌گیری پروتئین است. تاکنون چندین مطالعه در راستای بررسی اثرات روش‌های رسوب‌گیری پروتئین بر روی الگوی الکتروفورز دو بعدی بر روی نمونه‌های زیستی مختلف صورت گرفته است. نتایج این مطالعات، نشان دهنده‌ی این واقعیت هستند که کارایی روش‌های مختلف رسوب‌گیری پروتئین‌ها بسته به نوع نمونه متفاوت است و در مورد هر نمونه، می‌بایست به طور مستقل مورد بررسی قرار گیرد (۸-۱۱). بر اساس بررسی‌های انجام شده، چنین مطالعه‌ای در ارتباط با سلول‌های سرطانی بافت پستان که مطالعات پروتئومیک آن از اهمیت بالایی در تشخیص و درمان بیماری برخوردار است، گزارش نشده بود. از این رو، مطالعه‌ی حاضر به منظور افزایش کارایی مطالعات پروتئوم سرطان پستان، با هدف بررسی اثر سه روش مرسوم رسوب‌گیری پروتئین بر روی پروتئوم تام سلول‌های Hs578T در نمایه‌ی دو بعدی انجام شد.

روش‌ها

تمامی مواد شیمیایی استفاده شده برای کشت سلول، آماده‌سازی نمونه و انجام الکتروفورز دو بعدی، به جز در موارد مشخص شده، از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد. تمامی مراحل کار نیز در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پزشکی، واقع در دانشکده‌ی پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران به انجام رسید.

کشت سلول و استخراج پروتئین: رده‌ی سلولی Hs578T از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. جهت تکثیر

یافته‌ها

بررسی‌های انجام شده نشان داد که بازده بازیابی پروتئین تام، برای روش‌های استون، استون-متانول و TCA- استون به ترتیب $0/001 \pm 0/100$ ، $0/002 \pm 0/070$ و $0/005 \pm 0/120$ نانوگرم به ازای هر سلول می‌باشد. به این ترتیب، رسوب‌گیری با TCA- استون بالاترین بازده بازیابی را بین این سه روش به خود اختصاص می‌دهد. این نتیجه، می‌تواند به معنای این باشد که در عین حال که روش توانسته است سهم پروتئین‌های بازی در رسوب پروتئینی را افزایش دهد (ماهیت اسیدی TCA سبب نهشت بیشتر پروتئین‌های بازی در رسوب گردد)، سهمی از پروتئین‌های اسیدی نمونه‌های Hs578T که می‌توانند به دلیل تمایل به محیط اسیدی TCA بعد از رسوب‌گیری از نمونه حذف گردند نیز کوچک بوده و همین عامل، باعث افزایش تعداد لکه‌های پروتئینی در نمایه‌ی مربوط شده است.

نمایه‌ی دو بعدی پروتئوم تخلیص شده‌ی سلول‌های Hs578T، که به سه روش مختلف تیمار شدند، در شکل ۱ قابل مشاهده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تخلیص پروتئین با روش رسوب‌گیری TCA- استون در حذف کشیدگی‌های عمودی و افقی موفق‌تر بوده است. محتوای اسیدی این رسوب دهنده، نقش مؤثری در حذف چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک که عاملی برای بروز کشیدگی‌های عمودی و افقی در نمایه‌های دو بعدی هستند، دارد و از دو روش دیگر مناسب‌تر می‌نماید.

نتایج مربوط به شمارش نقاط پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار ImageMaster (شکل ۱- پنل راست) نیز نشان دادند که تعداد نقاط پروتئینی در بستر ژل با استفاده از رسوب دهنده‌ی استون، 9 ± 1299 ، با استفاده از رسوب دهنده‌ی استون-متانول، 14 ± 1698 و با استفاده از رسوب دهنده‌ی TCA- استون، 17 ± 1973 ، می‌باشد. بنابراین، تخلیص با TCA- استون در غنی‌سازی پروتئین‌های بازی، کارآمد می‌باشد؛ هر چند که تا حدی سبب حذف و/یا تضعیف پروتئین‌های اسیدی شده است.

بحث

در این پژوهش، با هدف افزایش بازده تحقیقاتی پژوهش‌های مرتبط با سرطان پستان، برای نخستین بار بهینه‌سازی الگوی نمایه‌ی الکتروفورز دو بعدی سلول‌های رده‌ی Hs578T در دستور کار قرار گرفت. به این منظور، آن چنان که در بخش‌های پیشین به تفصیل شرح داده شد، تأثیر سه روش مرسوم حذف آلودگی‌های غیر پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت.

پروتئین‌های خالص شده با ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ نمونه‌ها در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور $13000 \times g$ از مخلوط جدا و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل، به منظور حذف کامل TCA، سه بار با محلول شستشو که حاوی ۹۰ درصد حجمی استون، ۱۰ درصد حجمی آب و ۰/۰۲ درصد وزنی DTT بود، شسته شد (۱۱).

انحلال رسوب‌های پروتئینی: پس از رسوب‌گیری با هر یک از روش‌های پیش‌گفته، رسوب‌های پروتئینی خالص شده در مقادیر مناسبی از بافر انحلال (حاوی ۷ مولار اوره، ۲ مولار تیوره، (W/V) ۴ درصد CAHPS، ۱۰۰ میلی‌متر DTT و (V/V) ۲ درصد آمفولیت) حل و در پایان مرحله‌ی اول با استفاده از روش Bradford تعیین غلظت شدند.

الکتروفورز دو بعدی: پروتئوم تخلیص شده از سه روش پیش‌گفته با استفاده از سیستم الکتروفورز دو بعدی تفکیک گشت. به این منظور، در بعد اول جداسازی ۱۸۰ میکروگرم از نمونه‌های پروتئینی تا حجم نهایی ۳۰۰ میکرولیتر با بافر بازآب‌دهی (حاوی ۷ مولار اوره، ۲ مولار تیوره، ۴ درصد CHAPS، ۰/۰۰۲ درصد بروموفنول‌بلو، ۲ درصد حامل آمفولیتی ۱۰-۳ و ۱۲ میکرولیتر/میلی‌لیتر هیدروکسی‌اتیلن‌دی‌سولفید (GE Healthcare)، پسکتاوا، نیوجرسی آمریکا) مخلوط شدند و بر روی نوارهای Immobilized pH gradient (IPG) ۱۷ سانتی‌متری با گستره‌ی pH لگاریتمی در محدوده‌ی ۱۰-۳ (Bio-Rad) هرکولس، کالیفرنیا) بارگذاری شدند و به مدت یک ساعت در دمای اتاق آنکوبه گشتند. پروتئین‌های بارگذاری شده در نوارها سپس با اعمال ولتاژ در دستگاه IEF cell (Bio-Rad) تحت تأثیر متمرکزسازی ایزوالکتریکی قرار گرفتند.

پروتئین‌های متمرکز شده در IPG فاقد بار می‌باشند. پس در دو مرحله‌ی ۲۰ دقیقه‌ای با استفاده از بافرهای مخصوص متعادل‌سازی، با سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate یا SDS) به تعادل رسیدند و بار لازم برای مهاجرت در بعد دوم را کسب کردند. در بعد دوم، نوارهای IPG به ژل‌های ۱۷ سانتی‌متری پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد منتقل شدند تا این بار پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی تحت جریان ثابت ۱۶ میلی‌آمپر برای مدت ۳۰ دقیقه و جریان ثابت ۲۴ میلی‌آمپر برای مدت ۶ ساعت از یکدیگر تفکیک شوند. به منظور رنگ‌آمیزی ژل‌ها و ظهور نقاط پروتئینی از رنگ‌آمیزی نقره نترات سازگار با طیف‌سنجی جرمی استفاده شد (۱۳).

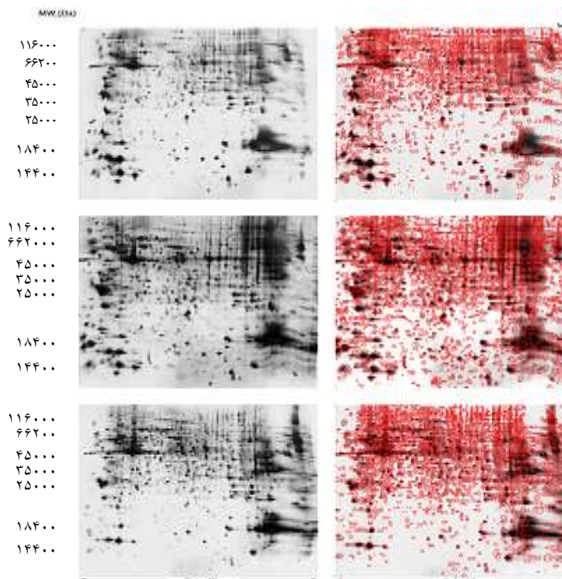
تصویر نهایی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از دانسیتومتر GS-800 (Bio-Rad) و نرم‌افزار Quantity One اخذ و سپس، با استفاده از نرم‌افزار ImageMaster 2D Platinum مورد تحلیل کمی - کیفی قرار گرفت.

یافته‌ها نشان دادند که تخلیص پروتئوم Hs578T با TCA- استون از نظر میزان بازیابی پروتئوم تام، حذف کشیدگی‌های عمودی و افقی و تعداد نقاط پروتئینی قابل مشاهده در نمایه‌ی دو بعدی، از سایر روش‌ها کارآمدتر است.

این روش، بیشترین میزان بازیابی پروتئین تام و نقاط پروتئینی نمایه‌ی دو بعدی را نیز دارد، اما اغلب نقاط پروتئینی دارای غلظت بسیار پایینی هستند تا جایی که تعداد قابل توجهی از آن‌ها، تنها با استفاده‌ی نرم‌افزار آنالیز تصویر قابل شناسایی می‌باشند. از این رو، می‌توان بیان کرد که در پروتئومیک مقایسه‌ای روش TCA- استون بسیار کارآمد است؛ در حالی که در روش استون- متانول، اگر چه تعداد پروتئین‌ها کمتر است، اما بیشتر نقاط قوی می‌باشند و از غلظت بالایی برخوردارند. بنابراین، چنانچه هدف، انجام آنالیز سرولوژیکی پروتئوم باشد که در آن غلظت نقاط پروتئینی اهمیت دارد، استفاده از روش استون- متانول پیشنهاد می‌گردد.

تشریح و قدردانی

این مطالعه، بخشی از یک طرح تحقیقاتی ثبت شده در معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد ثبتی ۲۶۸۴۹-۳۱-۰۵-۹۴ می‌باشد. بدین وسیله، از آن معاونت محترم قدردانی می‌گردد.



شکل ۱. تصاویر ژل‌های دو بعدی از پروتئوم سلول‌های Hs578T. تخلیص شده با روش‌های مختلف رسوب‌گیری که با استفاده از دانسیتومتر GS-800 و نرم‌افزار Quantity one اخذ شده‌اند (پنل سمت چپ) و آنالیز آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImageMaster 2D platinum (پنل سمت راست). شکل‌ها به ترتیب نمایه‌های حاصل از روش‌های رسوب‌گیری الف) استون، ب) استون- متانول و ج) TCA- استون را به نمایش می‌گذارند.

References

1. Witzmann FA, Grant RA. Pharmacoproteomics in drug development. *Pharmacogenomics J* 2003; 3(2): 69-76.
2. Saraygord-Afshari N, Naderi-Manesh H, Naderi M. Enhanced reproducibility of the human gel-based tear proteome maps in the presence of di-(2-hydroxyethyl) disulfide. *Biotechnol Appl Biochem* 2014; 61(6): 660-7.
3. Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z, et al. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics* 2014; 11(1): 16.
4. Rabilloud T. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol Biol* 1999; 112: 9-19.
5. Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* 1996; 17(5): 813-29.
6. Hao R, Adoligbe C, Jiang B, Zhao X, Gui L, Qu K, et al. An optimized trichloroacetic acid/acetone precipitation method for two-dimensional gel electrophoresis analysis of qinchuan cattle longissimus dorsi muscle containing high proportion of marbling. *PLoS One* 2015; 10(4): e0124723.
7. Berkelman T. Removal of interfering substances in samples prepared for two-dimensional (2-D) electrophoresis. In: Posch A, editor. *2D PAGE: Sample preparation and fractionation*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 51-62.
8. Nejadi N, Mohammadpoor Masti S, Rezaei Tavirani M, Golmohammadi T. Comparison of three routine protein precipitation methods: Acetone, TCA/acetone wash and TCA/acetone. *J Paramed Sci* 2014; 5(4): 58-60.
9. Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A* 2004; 1023(2): 317-20.
10. Fic E, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Pirog A, Dziedzicka-Wasylewska M. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis* 2010; 31(21): 3573-9.
11. Saraygord-Afshari N, Naderi-Manesh H, Naderi M. Increasing proteome coverage for gel-based human tear proteome maps: Towards a more comprehensive profiling. *Biomed Chromatogr* 2015; 29(7): 1056-67.
12. Butler M. *Animal cell culture and technology*. Abingdon, UK: Taylor and Francis; 2003.
13. Westermeier R, Naven T. *Proteomics in practice: A Laboratory manual of proteome analysis*. Hoboken, NJ: Wiley; 2002.

Improving Proteome Coverage for Hs578T Breast Cancer Cell-Line due to Efficient Interfering Removal

Hamidreza Abbasi¹, Neda Saraygord-Afshari², Neda Mohammadi¹,
Mohammad Morad Farajollahi³, Reza Falak⁴

Original Article

Abstract

Background: In spite of the wide use, low proteome coverage and fuzzy patterns are the most important deterrents for the clinical applications of gel-based proteomic studies. So herein, we tried to increase the 2-dimensional proteome coverage of Hs578T breast cancer cells via investigating the efficacy of the three common techniques, usually used for interfering removal.

Methods: Hs578T cells were incubated in a lysis solution to obtain raw cell extracts. Cellular soups of each extraction were then pooled, homogenized, and aliquoted to be further treated by three different protein-specific purification methods including acetone, acetone-methanol, and trichloroacetic acid (TCA)-acetone, each in triplicates. All the purified protein pellets were then dissolved in a standard rehydration buffer solution, loaded into the 17-cm immobilized pH gradient (IPG) strips, and separated according to their isoelectric points. Proteins were then separated once more according to their molecular weights in an O'Farrell separation system. Finally, by the visualization of the protein spots on the 2-dimensional profiles, quality and quantity of these 2-dimensional proteome patterns were then analyzed using the ImageMaster software.

Findings: The obtained proteome recovery yields and total protein counts for acetone, acetone-methanol, and trichloroacetic acid-acetone methods were 0.100 ± 0.001 , 0.070 ± 0.002 , and 0.120 ± 0.005 ng/cell, and 1299 ± 9 , 1698 ± 14 and 1973 ± 17 , respectively. The results represent data obtained from three independent experiments.

Conclusion: Trichloroacetic acid-acetone purification not only represented the highest recovery yield, suitable for expensive assays, but also showed the most suitable proteome coverage. So, the method is recommended for the comparative proteomic studies. However, the acetone-methanol procedure is more recommended for serological proteome analysis (SERPA); since it represents stronger protein spots which are more fitted to the immunoblotting procedure.

Keywords: Proteome, Purification, Two-dimensional gel electrophoresis, Cell line, Breast cancer

Citation: Abbasi H, Saraygord-Afshari N, Mohammadi N, Farajollahi MM, Falak R. **Improving Proteome Coverage for Hs578T Breast Cancer Cell-Line due to Efficient Interfering Removal.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(471): 216-20.

1- Department of Medical Biotechnology, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Assistant Professor; Department of Medical Biotechnology, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Immunology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Neda Saraygord-Afshari, Email: neda.s.afshari@gmail.com