

柱层析和 MALD FTOF 质谱技术筛选食道癌血清标志多肽

金宏伟¹, 杨光², 黄河清²

(1. 厦门大学附属中山医院临床检验中心, 福建 厦门 361004;

2. 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 探索建立柱层析和基质辅助激光解吸电离飞行时间 (MALD FTOF) 质谱技术筛选食道癌血清标志多肽的方法。方法 选用 Sephadex G-100 葡聚糖作为分离介质, 自制小型分离层析柱, 分别采集 30 名健康人、30 例食道良性疾病患者和 30 例食道癌患者血清进行多肽分离, 结合 MALD FTOF 质谱仪鉴定。结果 通过多肽质荷比 (m/z) 比对技术, 筛选出 4 种诊断食道癌疾病的潜在血清标志多肽, m/z 分别为 7 651. 76、8 091. 34、9 264. 98、11 784. 79。结论 柱层析和质谱技术筛选食道癌血清标志多肽所建立的分析技术不仅快速简单, 而且同样适合于筛选其他人类重大疾病的血清标志多肽或酶蛋白。

关键词: 多肽; 柱层析; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 食道癌

Screening and analysis of biomarkers of esophageal cancer by combined technology of size exclusion chromatography and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry JN Hongwei¹, YANG Guang², HUANG Heqing². (1. Xiamen Center for Clinical Laboratory, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Fujian Xiamen 361004, China; 2. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University School of Life Sciences, Fujian Xiamen 361005, China)

Abstract: Objective To explore and set up a combined method of separation column of size exclusion chromatography (SEC) and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry (MALD FTOF-MS) for screening and analyzing the polypeptide and protein biomarkers of esophageal cancer. **Methods** The serum polypeptides in 30 healthy subjects, 30 benign esophageal disease patients and 30 esophageal cancer patients were pre-separated by the self-made separation column of Sephadex G-100, and the collected eluents were concentrated for MALD FTOF-MS analysis respectively. **Results** With the technology of polypeptide mass change ratio comparison approach, four different ions m/z at 7 651. 76, 8 091. 34, 9 264. 98, 11 784. 79 were found, which were existing only in esophageal cancer patients. **Conclusions** The combined technology of separation column of SEC and MALD FTOF-MS is a simple and rapid method for screening esophageal cancer patients and it also can be applied to the rapid diagnosis of other diseases.

Key words: Polypeptide; Size exclusion chromatography; Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry; Esophageal cancer

人类血清中含有成百上千种多肽和蛋白质, 其中绝大多数来源于人类器官执行正常生理功能过程中的代谢产物或营养组分等, 因此对特定时期的血清组成进行分析可有效地反映机体的生理状况^[1]。血清中含有约 60~80 g/L 的蛋白质, 其中主要成分是白蛋白 (50%~70%)、免疫球蛋白 (IgG、IgA、IgD、IgM、IgE, 其中 IgG 占总蛋白的 10%~25%)、转铁蛋白、结合珠蛋白和脂蛋白等, 其余大多数为低丰度蛋白^[2], 而这些低丰度蛋白很可能就是一些信号传导和调控的关键蛋白, 但由于高丰度蛋白质和各种无机盐的存在, 严

重影响了基质辅助激光解吸离子电离飞行时间质谱 (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, MALD FTOF-MS) 等分析技术对其进行分析鉴定^[3]。建立去除人血清高丰度蛋白质和脱盐技术, 是提高质谱直接分析能力的有效手段之一^[4]。表面增强激光解吸离子化 (surface-enhanced laser desorption ionization, SELDI) 质谱^[5]、反向高效液相色谱^[3]、亲和层析^[4] 和商业化层析柱等分离与分析技术均具有筛选诊断疾病标志多肽或酶蛋白的能力, 但同时存在着分析成本高和操作步骤复杂等缺点, 不适合在健康人

作者简介: 金宏伟, 男, 1975年生, 主管技师, 主要从事临床生物化学检验工作。

通讯作者: 黄河清, 联系电话: 0592-2186630。

群中大规模普查及筛选患有肿瘤或其他重大疾病的小群体,尤其是无法满足早期疾病筛查的需要。我们通过自制微型层析柱,快速去除人血清中高丰度蛋白质,与 MALD FTOFMS技术和比对法非在线连用快捷筛选出诊断食道癌的潜在血清多肽标志物。此分析方法不仅具有操作步骤简单、分析成本低廉等特点,而且适用于筛选各类疾病的多肽标志物和大规模疾病普查与诊断。

材料和方法

一、实验材料

血清样本由厦门大学附属中山医院临床检验中心提供,其中正常人血清样本来源于 11名健康男性和 19名健康女性;食道良性疾病患者血清样本来源于 28例反流性食管炎患者(经食道内镜及活组织病理检查确诊,其中男 10例、女 18例)和 2例食管平滑肌瘤患者(经病理检验确诊,均为男性);食道癌血清样本来源于 30例经病理验证患有食道癌的患者血清(男 12例、女 18例),实验对象年龄 22~72岁,样本保存于 -80℃ 备用。

二、仪器和试剂

1. 主要仪器 德国 BRUKER 公司制造 REFLEX 型 MALD FTOFMS 仪;上海康华生化仪器制造厂生产的 HD 21C-A 型蛋白质 核酸检测仪及 LM17 型记录仪。

2. 主要试剂 Sephadex G-100 葡聚糖购自 Pharmacia 公司;芥子酸(SA)购自 SIGMA 公司;HPLC 级乙腈、碳酸氢铵及三氟乙酸均购自德国 Merck 公司。

三、实验方法

1. 样本预处理 吸取解冻血清样本 0.3 mL 与 0.3 mL 20% 乙腈(含 2.5 mmol/L NH_4HCO_3 , pH 值 8.2),充分混匀。随后将混合液离心 5 min (12 000 r/min,离心半径 6 cm),收集上清液,置于 4℃ 冰箱备用。

2. 血清多肽与蛋白质粗分离 分离介质选用 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶珠,填充于常规玻璃管层析柱(直径为 1 cm,长度为 50 cm),分离介质柱高 15 cm。用 0.1% 三氟乙酸平衡层析柱和洗脱血清样本,采用蛋白质 核酸检测仪在 280 nm 处监测收集样本。控制流速为 0.5 mL/min,实时监测检测仪读数;当蛋白核酸检测器吸收值 > 10 时,用 1.5 mL 的离心管开始收集洗出液;每次平衡时间 5~7 min,分离样本时间约为 5~8 min。

所收集的样本可供 MALD FTOFMS 仪直接分析血清多肽组成与分布。

3. 基质配制 将足量的 SA 溶解在以 30% 乙腈、0.1% 三氟乙酸水溶液为溶剂的溶液中,超声处理 5 min 配成饱和溶液,然后 12 000 r/min(离心半径 6 cm)离心 5 min,取上清液使用,每次均使用新鲜配制的饱和 SA 溶液。取上清基质溶液与层析柱分离收集到的各个血清组分按 1:1 方式进行均匀混合,取 0.8 μL 混合物直接点滴于样本靶上,待样本室温自然干燥后,把样本靶放入 MALD FTOFMS 仪检测。

4. 质谱测定条件 选用脉冲氮激光(337 nm)作为离子源,分析时采用线性模式,加速电压控制在 20 kV,脉冲宽度 0.5 ns,离子延迟时间 40 000 ns,正离子谱测定,平均每次测定样本的激光脉冲次数在 120 次。采用 BRUKER 蛋白混合物作外标标定多肽的质谱峰峰位,获得蛋白质多肽的分子量质谱图。

结 果

一、血清组分质谱检测结果

血清样本经 Sephadex G-100 层析柱分离后,采用 MALD FTOFMS 技术进行逐一分析,共获得质谱图谱 917 张,其中健康人血清质谱图谱 277 张,食道良性疾病患者血清质谱图谱 302 张,食道癌患者的血清质谱图谱 338 张;测定 m/z 范围限制在 2 000~80 000 之间,每张质谱图一般可包含 m/z 从 2 000~80 000 的信号峰数十几到二十几个,且以低丰度小分子量的蛋白质/多肽为主。图 1 是正常对照组编号为 8 的健康人血清第 12 管的多肽与蛋白质质谱图,其图中含有 11 个多肽与蛋白质质谱峰。图 2 是编号为 1 的食道良性疾病患者血清第 6 管的多肽与蛋白质质谱图,其图中含有 10 个多肽与蛋白质质谱图。图 3 是编号为 12 的食道癌患者血清第 5 管的多肽与蛋白质质谱图,其图中含有 20 个多肽与蛋白质质谱峰。由图 1~3 结果可获悉,血清样本经 Sephadex G-100 层析柱分离后,可有效地去除无机盐和高丰度蛋白质的干扰,供质谱对低丰度多肽与蛋白质进行分析,使得采用血清样本和 MALD FTOFMS 非在线联用技术筛选诊断食道癌疾病的标志多肽或蛋白质具有可行性。通过比对健康人群、食道良性疾病患者和食道癌患者血清全多肽与蛋白质组,排除个体之间的差异多肽与蛋白质,最终筛选出

患者的疗效及预后都有着重要的临床意义。

目前,应用 MALD FTOFMS技术对血清肿瘤标志物的研究尚未见到国内有相关报道,国外已有对肝细胞癌、卵巢癌、宫颈癌和乳腺癌等恶性肿瘤的相关研究报道,但是尚未见到应用质谱技术研究食道癌的血清肿瘤标志物的报道,而且他们使用的分离血清组份的方法操作步骤复杂且成本较为昂贵^[7,8]。凝胶排阻层析所使用的层析介质是一种在微球体内部具有大孔网状结构的凝胶微粒,不同大小的网状孔径像筛子一样,可以把大小不同的生物大分子按分子尺寸大小不同依次分离。血清样本通过凝胶层析介质进行粗分离后不仅可以去除血清中高浓度的无机盐,而且还能有效分离除去高丰度大分子量蛋白质并降低蛋白质之间的相互作用强度,有利于低丰度多肽与蛋白质分子离子化,经层析柱分离后的血清样本在基质和激光辅助作用下,易使血清中许多低丰度蛋白质转化成分子离子,并被 MALD FTOFMS仪中的质量分析器检测,为筛选诊断食道癌的新血清标志物提供了可行性技术。同其他分离手段相比较,凝胶排阻层析主要有如下特点:原理简单;价格便宜;操作简便,可以重复使用;载样量较高;能够获得足够的分辨率。许多蛋白质组学研究都倾向于将色谱与质谱技术的联用,以发挥各自的特点,得到更为详细的信息,并且已经取得了很大的进展。本研究采用乙腈萃取和凝胶排阻层析技术进行分离后非在线联用 MALD FTOFMS技术来筛选正常人、食道良性疾病和食道癌患者之间的血清多肽与蛋白质组的差异组分,将更有效的获得新颖的血清肿瘤标志物,为科研与医学领域提供更为充分的实验依据。

本研究发现通过有机萃取和凝胶排阻层析预先分离血清样本,能够起到降低血清组分复杂程度,去除血清中高丰度蛋白质,获取低丰度蛋白质组分的作用。从而提高了血清组分的质谱检出率,有利于通过 MALD FTOFMS分析来寻找与疾病相关的标志物。

本研究通过设计采用凝胶层析技术和 MALD FTOFMS非在线联用的实验方法来研究正常人、食道良性疾病患者和食道癌患者之间的血清差异蛋白质组,对获得的质谱图谱数据进行比较分析,获得了一些在这 3种人群血清中表达有显著差异的蛋白质,这些蛋白质极有可能成为新的食道癌肿瘤标志物。但仍需要对这些差异蛋白进

行进一步的分析鉴定,以确认这些蛋白质的类型以及结构功能等性质。

想要获得新的、敏感、可靠的食道癌肿瘤标志物,还有许多工作要做,希望本研究结果对此研究工作能有所助益。通过对肿瘤相关血清组分不断的深入了解,相信可以预见在不久的将来,高自动化程度、高稳定性和可靠性的食道癌肿瘤标志物将会出现;简易快速、低成本将是其发展方向,这些最终将使人类直接受益。

参 考 文 献

- [1] Ma PC, Blaszkowsky L, Bharti A, et al Circulating tumor cells and serum tumor biomarkers in small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2003, 23(1A): 49-62
- [2] Steel LF, Trotter MG, Nakajima PB, et al Efficient and specific removal of albumin from human serum samples [J]. Mol Cell Proteomics, 2003, 2(4): 262-270
- [3] Martosella J, Zolotarjova N, Liu H, et al Reversed-phase high-performance liquid chromatographic pre-fractionation of immunodepleted human serum proteins to enhance mass spectrometry identification of lower-abundant proteins[J]. J Proteome Res, 2005, 4(5): 1522-1537.
- [4] Ackemann BL, Bema MJ. Coupling immunoaffinity techniques with MS for quantitative analysis of low-abundance protein biomarkers [J]. Expert Rev Proteomics, 2007, 4(2): 175-186
- [5] Ward DG, Suggett N, Cheng Y, et al Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis[J]. Br J Cancer, 2006, 94(12): 1898-1905
- [6] Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, et al Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(8): 2947-2953.
- [7] Goufman EI, Moshkovskii SA, Tikhonova OV, et al. Two-dimensional electrophoretic proteome study of serum the most stable fraction from patients with various tumor conditions [J]. Biochemistry (Mosc), 2006, 71(4): 354-360.
- [8] Orvisky E, Drake SK, Martin BM, et al. Enrichment of low molecular weight fraction of serum for MS analysis of peptides associated with hepatocellular carcinoma [J]. Proteomics, 2006, 6(9): 2895-2902

(收稿日期: 2009-07-15)

(本文编辑: 龚晓霖)