

# 质谱技术在筛选肺癌血清差异多肽与蛋白质的应用

陈东仕,金宏伟,黄慧英,翁鹭娜,黄河清\*

(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:**采用凝胶排阻层析 (SEC) 与 MALD FTOF 质谱非在线联用技术研究男性血清中多肽与蛋白质的组成与分布. 实验结果表明,分离介质 Sephadex G-75 比 Sephadex G-50 和 Sephadex G-100 更加适合血清多肽与蛋白质的预分离. 男性血清经 Sephadex G-75 层析柱预分离和 MALD FTOF 质谱分析后,可获得 56 个多肽与蛋白质的分子离子峰. 差异比对实验表明,在正常人与患有肺癌疾病的男性血清中,正常男性血清存在着 7 种不同质荷比 ( $m/z$ ) 的差异多肽与蛋白质,其  $m/z$  的比值分别为 4 808, 6 867, 6 912, 7 036, 27 990, 28 120, 50 687; 反之,在肺癌患者血清中发现差异的  $m/z$  值为 6 139, 6 544, 8 417, 8 480, 11 109. 这些差异多肽与蛋白质为临床诊断正常人和患有肺癌疾病患者的标记物提供一条途径.

**关键词:** Sephadex G-75; MALD FTOF 质谱; 血清; 肺癌; 临床诊断; 差异多肽

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479 (2006) S-0047-03

MALD FTOF 质谱具有高通量、高灵敏度和简易测定的优势,是人血清蛋白质组学研究的主要分析技术之一. 至今,已报道了许多潜在的诊断疾病的标记物的研究均采用 MALD FTOF 质谱技术. 由于人血清蛋白含有 6~8 种高丰度蛋白质,例如白蛋白、铁传递蛋白、免疫球蛋白、脂蛋白、结合珠蛋白等,它们占血清蛋白和多肽总量的 90% 以上<sup>[1]</sup>,加上血清盐的干扰,使直接采用 MALD FTOF 质谱分析血清中的多肽与蛋白质受到限制. 去除高丰度蛋白是提供 MALD FTOF 质谱分析人血清中低丰度蛋白质,筛选诊断各类疾病标记物的最有效的样品前处理方法之一. 相关的研究报告也陆续发表,但仍然存在许多缺陷,例如:许多干扰蛋白质仍然覆盖相当数量的低丰度蛋白所产生的质谱峰,导致难于发现一些有价值的低丰度蛋白质,从中限制人血清蛋白组技术在人类各类重大疾病临床诊断领域中的应用<sup>[1, 2]</sup>. 显然提高与改善 MALD FTOF 质谱分析人血清中多肽与蛋白质的种类与灵敏度潜在着科学意义及价值. 本论文采用不同筛孔的凝胶作为分离介质,借助 MALD FTOF 质谱作为检测手段,用于筛选诊断健康人群和患有肺癌疾病男性的血清多肽与蛋白质研究,其拓展的分析技术和所发现的诊断标记物,具有临床诊断与应用价值.

## 1 材料与方法

收稿日期: 2005-12-25

基金项目: 厦门大学预研基金 (2004xdcx207; XDKJCX20051009) 和厦门市科技项目 (3502Z2001262) 资助

作者简介: 陈东仕 (1982 - ), 男, 硕士研究生.

\* 通讯作者: hqhuang@xmu.edu.cn; Bio-center@xmu.edu.cn

### 1.1 仪器与试剂

REFLEX 型 MALD FTOF 质谱 (德国 BRUKER 公司), 蛋白质核酸监测器 HD 21C-A (上海康华仪器厂), 葡聚糖凝胶 Sephadex G-50, G-75 和 G-100 (Pharmacia 公司), 介子酸 (SA)、2, 5-二羟基苯甲酸 (DHB) (Sigma 公司), 乙腈、三氟乙酸 (美国 TED A 公司).

### 1.2 样品制备

血清样品制备: 实验中的血液样品由厦门市中山医院和厦门市检验检疫局提供, 分别取自 12 位健康男性和 5 位男性肺癌患者, 志愿者的年龄在 20~70 岁之间. 将每个血样置于 4℃ 下凝结 30 min, 然后在 3 500 g 离心 10 min, 所得的上清液即为实验所需的血清, 置于 -70℃ 保存. 血清使用前事先在 4 000 g 的条件下离心 10 min, 取上清.

质谱分析前的样品制备: 将 SA 加入到基质溶液  $V$  (乙腈)  $V$  (水)  $V$  (三氟乙酸) = 3 7 0.01 中, 直至饱和为止; 同样, 将 DHB 直接加入去离子水中, 直至饱和, 配制成 DHB 基质溶液. 将样品  $V$  (溶液)  $V$  (基质) = 1 1 混匀后, 取 1  $\mu$ L 的混和液点于样品靶上, 置于室温下晾干, 之后放入 MALD FTOF 质谱仪中分析.

### 1.3 透析除盐

根据黄河清等人<sup>[3]</sup>所提的透析方法, 取 1.0 mL 血清置于封闭透析袋 (截留分子量为 3 000 u) 中, 再放入装有蒸馏水的容器中进行透析除盐, 透析时间为 24 h. 所收集的样品直接用于质谱分析.

### 1.4 凝胶柱层析分离

选用规格为 10 mm  $\times$  500 mm 的玻璃层析柱, 分离

介质为 3 种不同筛孔的葡聚糖凝胶,即分别为 Sephadex G-50, G-75和 G-100. 分离胶高度分别为 15 cm, 20 cm 以及 25 cm. 取 0.3 mL 血清样品,以蒸馏水作为洗脱液,控制流速为 0.5 mL/min,蛋白质核酸检测器在 280 nm 波长下检测蛋白质. 用 0.5 mL 的离心管收集样品,并保存于 4℃ 冰箱中备用.

### 1.5 质谱分析基本条件

利用 MALDI-TOF 质谱分析血清收集液中多肽与蛋白的分子量. 仪器分析条件综合参考相关文献资料<sup>[4]</sup>. 最后确定优化条件是:激光波长 337 nm,所有数据均以正离子方式采集,加速电压 23 kV,延迟时间 40 000~1 400 ns 之间. 质谱分析选用线性模式进行分析,并采用外标法进行校正. 校正所采用的标准蛋白为:牛泛蛋白 (8 565 u),马脱辅基红蛋白 (16 952 u),牛胰蛋白酶原 (23 979 u),兔醛缩酶 A (39 218 u).

## 2 结果与讨论

### 2.1 血清直接质谱分析结果

不同来源的血清经透析袋透析后,直接与基质混合,进行质谱分析,可获得图 1 结果. 在图中,  $m/z$  值测

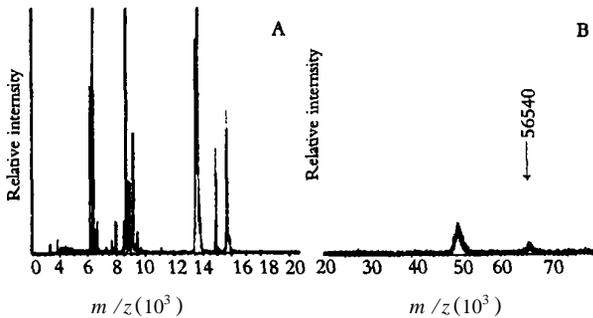


图 1 MALDI-TOF 质谱直接分析血清中多肽与蛋白质的质谱图

测定范围: A: 4 000 ~ 20 000  $m/z$ ; B: 20 000 ~ 80 000  $m/z$

Fig 1 Mass spectra of peptides and proteins measured with the technique of MALDI-TOF MS directly

定范围位于在 4 000 ~ 80 000 之间,只显示了 21 个质谱峰,说明采用直接 MALDI-TOF 质谱只能分析血清中少部分蛋白和多肽组成,与血清含有大量的高丰度蛋白质和各种无机盐有关,例如:白蛋白和转铁蛋白质等. 分析前,去除血清中的高丰度蛋白质和无机盐是目前采用 MALDI-TOF 质谱直接分析血清中多肽与蛋白质最有效的措施之一,也是寻找一些具有诊断各种疾病标记物的最佳做法之一. 因而,优化一种能够降低血清组分的复杂程度,避免高丰度蛋白干扰样品的的方法是采用 MALDI-TOF 质谱筛选人血清疾病诊断标

记物的基本条件之一,具有重要的意义.

人血清白蛋白是血清中丰度最高的蛋白质,它的分子量大约为 66 500 u,由一个具有 585 个氨基酸残基的蛋白质亚基构成<sup>[5]</sup>. Flensburg 等<sup>[6]</sup>发现人血清白蛋白经 MALDI-TOF 质谱分析后,其分子量为 66 671 u 而在图 1B 中,有一个信号峰的  $m/z$  值为 66 540,它与前人报道的分子量很接近,而且具有高丰度特点,因而推测该质谱峰对应的蛋白质是人血清白蛋白.

### 2.2 凝胶排阻层析 - 质谱非在线联用分析的结果

为了提高血清中多肽和蛋白的质谱检出率和灵敏度,本实验采用凝胶排阻层析结合 MALDI-TOF MS 质谱的分离与分析方法,分析血清中的多肽与蛋白质. 取 0.3 mL 的血清样品,加到 10 mm × 180 mm 的葡聚糖 G-75 的凝胶柱上,并进行凝胶排阻层析预分离. 随后采用蒸馏水洗脱,总共收集到 18 管 (0.5 mL 的 EP 管) 样品. 分别取出少量样品与基质相混合,进行 MALDI-TOF 质谱分析,所得的结果如图 2 所示.

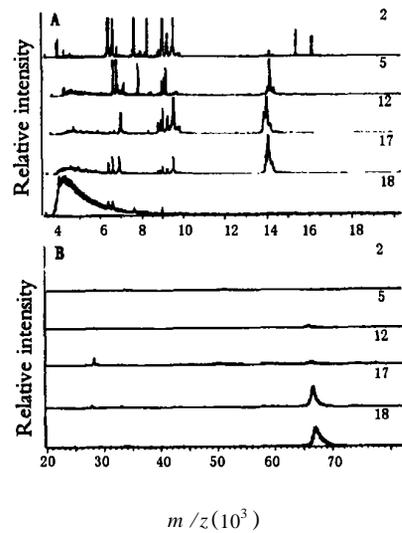


图 2 血清经 Sephadex G-75 凝胶柱层析分离后,用 MALDI-TOF 质谱分别检测所得的 5 张质谱图 (编号为 2, 5, 12, 17, 18),检测范围为 4 000 ~ 20 000 (A) 和 20 000 ~ 80 000 (B)

Fig 2 MALDI-TOF mass spectra obtained after separating serum by Sephadex G-75 column. The peptide and protein ion signals observed in the  $m/z$  range in 4 000 ~ 20 000 (A) and 20 000 ~ 80 000 (B) for five of 18 tubes (tube 2, 5, 12, 17, 18) are overlaid

图 3 是血清经 Sephadex G-75 凝胶排阻层析所得到的色谱图. 图中主要有 4 个吸收峰,并且每个吸收峰上都有几个小峰,特别是第 2 个吸收峰上有 5 个小峰. 这种现象表明每个吸收峰可能均由几种蛋白和多肽组

成。此外,还有一些低丰度蛋白由于含量太低而无法被检测(280 nm)。因此,我们必需采用 MALD FTOF 质谱对这 18 管样品进行逐一分析。

图 2 是 18 管收集液的质谱分析图中具有代表性的 5 张质谱图。从图中可以看出几乎每一管的质谱分析图的信号峰数都是 30~40 个,而且每张图中均有不同  $m/z$  值的信号峰。经统计,在这 18 管收集液中,总共显示出 56 个不同  $m/z$  值的信号峰。这就说明了血清中至少有 56 种蛋白和多肽可以被 MALD FTOF 质谱检测出来。经比较,作者发现经凝胶柱层析分离后的血清样品所显示的质谱峰数明显高于未经凝胶预分离的,这说明凝胶排阻层析-质谱非线性联用技术确实可以提高血清多肽与蛋白质组分的检出率。

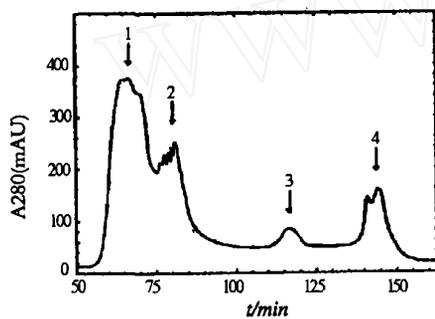


图 3 利用 Sephadex G-75 分离男性血清所得的色谱图

Fig 3 Chromatographic separation chart of male serum equipped with Sephadex G-75 column

## 2.3 凝胶分离介质的选择

表 1 人血清在不同分离条件下所得的质谱峰数

Tab 1 The numbers of mass peaks obtained by detecting sera under different conditions of separation

填充料	柱长 / cm		
	15	20	25
Sephadex G50	26	24	32
Sephadex G75	61	22	58
Sephadex G100	42	22	45

通常凝胶分离介质适合除盐和分级分离,例如:人血清白蛋白、免疫球蛋白、铁蛋白等<sup>[3,4]</sup>。选择适合的凝胶分离介质预分离血清蛋白质,有效分离干扰质谱检测因素是至关重要的。本实验从排阻层析的柱长、凝胶种类来考虑,分别选用了 3 种不同柱长(15、20、25 cm)、3 种不同种类的凝胶(Sephadex G-50、Sephadex G-75、Sephadex G-100)对同一血清样品进行分离,并进一步采用质谱进行检测。实验中我们发现这 3 种添加剂都适合用于分离血清蛋白。血清经过 3 种不同添加剂、柱长的葡聚糖凝胶柱分离,再用 MALD FTOF 质谱分析其组分,得到不同的质谱图。表 1 的数据是分

别对这些质谱图进行质谱峰统计所得到的结果。

表 1 结果表明,从凝胶种类来看,血清经 Sephadex G-75 凝胶柱处理后,再用质谱分析可以得到较多的质谱峰数。可见, Sephadex G-75 比较适合用来分离血清样品。从排阻层析柱的柱长来看,柱长在 15~25 cm 这个范围内变化对凝胶排阻层析的效果影响不大。但从表 1 的数据,我们可以初步判定血清经 15 cm 长的 Sephadex G-75 凝胶柱层析后,再进行 MALD FTOF 质谱分析,可以得到较大的分辨率,总共有 61 个质谱峰。

## 2.4 血清差异蛋白质

利用上述优化分离条件,作者选用分离介质高度为 15 cm, 添加剂为 Sephadex G-75 的层析柱分别对正常人血清(7 个血清样品的混合液)和肺癌患者血清(5 个血清样品的混合液)进行分离,并选用 MALD FTOF 质谱进行检测,其测定结果进行比对和统计。实验结果表明,在正常人群血清中表现出典型差异的质谱峰的  $m/z$  值为 4 808, 6 867, 6 912, 7 036, 27 990, 28 120, 50 687。进一步分析,在患有肺癌疾病的人群血清中表现出的典型差异的质谱峰的  $m/z$  值为 6 139, 6 544, 8 417, 8 480, 11 109。从正常人与肺癌患者人群中的典型差异的  $m/z$  质谱峰,反映出健康人群和患有肺癌疾病的特征多肽组成。因而,作者认为这些差异多肽之间的  $m/z$  比值是典型特征性质,推测可作为诊断人是否患有肺癌或者是否健康的多肽标记物。

## 参考文献:

- [1] Ahmed N, Barker G, Oliva K, et al. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum [J]. *Proteomics*, 2003, 3: 1980 - 1987.
- [2] Blackledge J A, Alexander A J. Polyethylene membrane as a sample support for direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of high mass proteins [J]. *Anal Chem*, 1995, 67: 843 - 848.
- [3] Huang H Q, Cao T M, Lin Q M. Characteristics of trapping copper ions with scrolled ferritin reactor in the flowing seawater [J]. *Environ Sci Technol*, 2004, 38: 2476 - 2481.
- [4] Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M. Characteristics of structure, composition, mass spectra, and iron release from the ferritin of shark liver (*Sphyma zygaena*) [J]. *Biophys Chem*, 2004, 111: 213 - 222.
- [5] Benner W H, Hom D M, Jaklevic J M. Simultaneous measurement of flight time and energy of large matrix-assisted laser desorption ionization ions with a superconducting tunnel junction detector [J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 1997, 8: 1094 - 1102.
- [6] Flensburg J, Belew M. Characterization of recombinant

(下转第 53 页)

- from azotobacter vinelandii nitrogenase [J]. Journal of inorganic Biochemistry, 1993, 52: 59 - 75.
- [8] 黄河清,张凤章,陈灿和,等. 细菌铁蛋白释放铁的动力学研究 [J]. 生物物理报, 1996, 12 (1): 33 - 38
- [9] 黄河清,张凤章,林庆梅,等. 马脾铁蛋白释放铁的反应级数和速率相数的转换 [J]. 动物学报, 1999, 45 (2): 170 - 177.

## Kinetic Characteristics of Iron and Phosphate Release from the Pig Pancreas Ferritin

L N Zhi-chao, CHEN Ping, HU Xiao-hui, HUANG Hui-ying, HUANG He-qing\*

(Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The iron core of pig pancreas ferritin (PPF) is composed of 179 phosphates and 1698  $Fe^{3+}$  per molecular PPF. The ratio of phosphate to iron within the PPF core is determined to be 1:9.5. The ratio on the surface of the iron core in PPF is higher than that in the inside of the core. A complete process of iron and phosphate releasing from the PPF is observed using electron spectra technique. The results showed that both the iron and phosphate releasing presented two different rates. In weak acid medium, the releasing rate of iron in PPF is much faster than that in weak basic medium.

**Key words:** ferritin; pig pancreas; iron release; kinetics; phosphate; iron; releasing rate

(上接第 49 页)

human serum albumin using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. J. Chromatogr. A., 2003, 1009: 111 - 117.

## The Application of MALDI-TOF MS in Mining Different Peptides and Proteins from the Sera of Lung-cancer Patients

CHEN Dong-shi, JIN Hong-wei, HUANG Hui-ying, WENG Lu-na, HUANG He-qing\*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** A combined technology of simple column of size exclusion chromatography (SEC) and MALDI-TOF MS was adopted to analyze the peptides and proteins of human male serum (HMS). The experimental results showed that the separation column of Sephadex G-75 separated LAP in the HMS more effectively than Sephadex G-50 and G-100, and 56 proteins and peptides with different mass/charge ( $m/z$ ) from the HMS were directly measured by MALDI-TOF MS after the serum was separated by Sephadex G-75 column. The discrepancy of LAP between HMS and serum of human male with lung-cancer (LCHMS) are directly compared by MALDI-TOF MS, respectively. It is found that the molecular mass of differential proteins with  $m/z$  4808, 6867, 6912, 6867, 7036, 27990, 28120, 50687 from the HMS and 6139, 6544, 8417, 8480, 11109 from the LCHMS, indicating that different proteins of both HMS and LCHMS might be used as the specific biomarkers for diagnosing the diseases of lung-cancer in clinic.

**Key words:** Sephadex G-75; MALDI-TOF MS; serum; lung cancer; clinic diagnosis; differential peptides