

蛋白质组技术研究人血清功能蛋白质的新进展

金宏伟¹, 曾新华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 361005)

(2 厦门大学生命科学学院分析测试中心, 厦门 361005)

关键词: 蛋白质; 蛋白质组技术; 分离; 进展; 标志物

在人血清蛋白质组的组成、结构与功能研究领域中, 目前已拓展一种较为完善的非在线双向凝胶电泳分离与质谱鉴定联用分析技术, 可同时鉴定人血清中 490 种蛋白质^[1], 使医学科学家从当初对人血清单个蛋白质结构与功能的研究模式跨入对人血清蛋白质组研究的新阶段。人血清蛋白质研究的延伸过程大致可分为 3 个阶段 (1) 人血清单个蛋白质认识的初步阶段: 在此阶段, 科学家主要是采取简便的化学粗分离方法来认识、发现和研究血清单一蛋白质; (2) 人血清单个蛋白质组成与功能研究阶段: 侧重采用酶学检测和单克隆抗体方法研究人血清蛋白质的生理功能; (3) 人血清蛋白组研究阶段: 主要是采取各种现代分离、分析与鉴定蛋白质等技术, 高分辨地分离人血清蛋白质组, 旨在发现更多低丰度功能多肽、蛋白质和其他生物大分子, 并鉴定其组成、类型、结构和功能。采纳比较筛选学, 筛选与肿瘤疾病有关的特异性标志蛋白质^[2], 用于诊断人类各种重大疾病, 尤其在早期诊断。例如: Adkins 等^[1]曾在 2002 年报道了用液相色谱/液相色谱/质谱/质谱 (LC/LC-MS/MS) 联用技术同时鉴定了人血清中 490 种蛋白质; Poon 等^[3]选用双向凝胶电泳分离与质谱分析 (2DE-MS) 联用技术对原发性肝癌 (HCC) 患者的血清蛋白质组进行较为详细地研究, 发现了 HCC 患者血清中除了甲胎蛋白 (AFP) 上调外, 还伴有补体因子 C4 和铜蓝蛋白的上调; 指出补体因子 C4 和铜蓝蛋白可能是原发性肝癌的标志物。

目前由双向凝胶电泳 (或双向无胶分离)、质谱分析技术和生物信息学组成的蛋白质组技术已经在研究人血清功能蛋白质组和筛选诊断人类重大疾病标志物等方面的研究发挥极其重要的作用, 尤其在临床诊断方面所起的作用更为显著^[4], 是目前生命科学研究领域中最具挑战性和前瞻性的分析技术之一。

一、高效分离人血清蛋白质技术的进展

无论是建立人血清蛋白质组数据库或采用蛋白质组技术研究人类重大疾病发病机制、疾病诊断、药物疗效和

药物作用靶标等医学科学难题, 其中最关键的问题之一在于如何有效富集人血清中的低丰度蛋白质。目前常用的分离技术多数均以双向凝胶电泳和多维色谱分离法为主要手段, 但这 2 种分离技术仍然无法完全去除高丰度蛋白质, 这给拓展临床诊断疾病应用范围研究带来了一定的难度^[1,4]。为解决这一难题, 近年来, 医学科学界中的部分科学家侧重于开展人血清蛋白质组预分离研究, 促使优化分离方法的研究成为人血清蛋白质组学研究领域中的热点课题之一^[4,5]。常用于人血清样本预处理方法有以下几种。

1 超滤离心法 Georgiou 等^[6]发现了超滤离心技术能有效去除血清白蛋白和部分其他高丰度蛋白质。人血清中白蛋白、免疫球蛋白、转铁蛋白和脂蛋白等高丰度蛋白质一旦经超滤离心去除后, 所富集的低丰度蛋白质适合于直接质谱分析^[7]。此外, 在超滤分离高丰度蛋白质过程中, 有机溶剂洗脱相常常会引起部分蛋白质发生去折叠现象, 从而削弱白蛋白与其他小肽或蛋白质之间相互作用强度, 有利于直接质谱分析。如果低丰度蛋白质或小肽经胰酶酶解后, 再经强阳离子交换柱分离和毛细管液相色谱与串联质谱在线分析后, 可鉴定出 340 种蛋白质, 其中没有发现任何肽段是来自人血清白蛋白的酶解产物。

2 免疫亲和层析 Steel 等^[8]发现在抗人血清白蛋白 (HSA) 的单克隆抗体免疫亲和柱分离血清样本过程中, 可以起到去除白蛋白和白蛋白酶解片段的效果。Pieper 等^[5]用免疫亲和层析法在去除血清高丰度蛋白质基础上, 又采用阴离子交换和排阻色谱技术分离血清样本为 74 个单元组分, 随后采用双向凝胶电泳分离技术对这些单元组分逐一分离, 最终获得 3 700 个蛋白质斑点。这些蛋白质斑点经质谱鉴定后, 发现其中 325 个蛋白质斑点是来自于修饰蛋白质, 检测灵敏度为 10 μ g/L, 例如白细胞介素、组织蛋白酶和肽类激素等微量组分均能被有效分离与检测。大量实验结果表明, 免疫亲和层析法不仅

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470372)。

作者简介: 金宏伟, 男, 1975 年生, 学士, 主管技师, 主要从事临床化学检验和蛋白质功能研究。

通讯作者: 黄河清, 联系电话: 0592-2186630。

具有特异性好的优势,而且能有效地去除血清中的干扰物,其分离效果优于超滤离心法。

3 等电聚焦预分离法 利用蛋白质相对分子质量的大小和抗原抗体的特异性反应也是有效去除血清中高丰度蛋白质的有效措施。如果根据蛋白质具有等电点差异性和不同等电聚焦的特点,对人血清蛋白质组馏为一系列连续不同 pH 值的混合组分,并按常规电泳分离方式进行二次分离,其结果至少能提高血清蛋白质上样量 6~30倍,适合于低丰度蛋白质的分离与纯化,起到富集低丰度蛋白质的浓缩效果^[9]。Wang等^[10]用电聚焦方法将血清样本分成为 20个组分,然后用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术鉴定出 262个蛋白质和多肽组分。

4 多维液相色谱法 Adkins等^[11]用白蛋白/球蛋白(A/G)方法去除血清免疫球蛋白(高丰度蛋白质),并用强阳离子交换柱分离不同肽段的组分,最后再采用反相毛细管液相色谱法和质谱技术在线鉴定了 490个蛋白质组分,其检测效果比现有的分析技术提高 3~5倍,检测蛋白质浓度的下限范围为 μg 水平,可以检测到血清浓度为 0.15~2.5 ng/L的血管紧张素原。还可检测如人血清中的人生长激素(human growth hormone, hGH)、白细胞介素-12、前列腺特异抗原等微量蛋白质。虽然目前多维液相色谱分离法一直是分离人血清蛋白质组的有效方法之一,但如果能进一步对血清样本进行优化预处理,其结果不仅能大幅度提高鉴定血清蛋白质种类,而且还能筛选出更多具有医学价值的微量或超微量的蛋白质标志物。

二、血清蛋白质的筛选与鉴定

根据人血清蛋白质组中有许多蛋白质具有相似的理化特性特点,学者们曾对人血清蛋白质组进行亚蛋白质组分类,其目的在于降低分析与鉴定的难度。表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术兼并上述优势,能使分析与鉴定人血清中目标蛋白质组的过程简单化。该技术通过固定在蛋白质芯片上的特殊功能基因专一性地结合目标蛋白质,去除非结合性蛋白质亚组,从而提高质谱分析目标蛋白质的灵敏度,并具有快速、高通量特点。此外,SELDI-TOF-MS技术可以同时筛选多个生物标记物及鉴定低丰度、小相对分子质量的蛋白质,但该蛋白质芯片成本较高,不适合在地方医院进行临床推广应用^[11]。以美国 Ciphergen Biosystems公司的产品为例,蛋白芯片分为化学表面芯片和生物表面芯片,其中化学表面芯片又分为疏水、亲水、阳离子、阴离子、金属离子螯合等 5种芯片,将血浆蛋白质依据理化性质分为 5类,可以检测到小相对分子质量、低丰度和未知的蛋白质。一旦相应的蛋白质与芯片结合后再经 SELDI-TOF-MS检测后,所获得蛋白质的质量指纹图谱适用于各类疾病的早期诊断、药物疗效判定和不良反应的监测。Zhang等^[12]将血浆糖蛋白接合在固相载体上,利用稳定同位素标记糖肽,再用肽 N-端糖苷酶 F降解 N-连接糖蛋白,回收

释放出的糖肽组分,并采用多级质谱技术进行鉴定,从而对血清中的 N 端糖基化的蛋白进行了鉴定和定量分析。为了降低血清蛋白质组分析过程的复杂性,人们陆续拓展了 MALDI-TOF-MS、电喷雾电离飞行时间质谱(ESI-TOF-MS)和 MS/MS 技术,并用于人血清蛋白质组的组成、结构与功能的研究。Wu等^[13]为了探索离子阱质谱技术鉴定和定量复杂生物样品中低丰度蛋白质的可行性,这些学者将质谱鸟枪法应用在人血清蛋白质组的研究,靶蛋白是 1种在人血浆中含量低于 fmol/L 水平的蛋白质——hGH,约为 $1.6 \mu\text{g/L}$ 。如果将外源性 hGH 加入血清中,使其浓度达到原有浓度的 10倍,刚好是疾病状态下血清 hGH 的浓度(如肢端肥大症)。在未经任何预纯化步骤条件下,采用一维和二维液相色谱/串联质谱技术能有效地鉴定 hGH,这说明鸟枪测序法适合于鉴定复杂溶质样本中的低丰度蛋白质,尤其适于鉴定血清中低丰度蛋白质的种类和含量。

由于血清蛋白质组成复杂性、高度异源性等特点,因此对人血清蛋白质组的组成与结构分析相对于其他混合蛋白质体系呈现出更大的难度。但是随着分离与鉴定技术的不断拓展和完善,现有的研究成果已取得实质性进展。目前在人血清蛋白质样本中已有 490个蛋白质被发现和鉴定^[11],同时在筛选与人类各类重大疾病相关的蛋白质和药物毒物反应蛋白质方面的研究也获得了可喜的成果。

Poon等^[14]对 38例肝癌的血清样本进行阴离子交换柱分离和蛋白质芯片及 SELDI-TOF-MS鉴定,确定肿瘤特异性较高的血清蛋白质亚组的特征指纹图谱,提出这一特征图谱对肝细胞癌的诊断具有一定的应用价值,认为已测定的 2384个质谱峰中有 250个质谱峰是肝癌患者血清相对正常人血清所表现的差异峰,这一特征图谱对肝癌的诊断特异度和敏感度分别提升到 90%和 92%。王征等人^[15]采用双向电泳和质谱技术联用技术分析了 10例肝癌患者的血清和 3份正常对照血清,发现在早期肝癌患者血清中,明显下调的蛋白质是与机体免疫功能有关的限制性膜蛋白;明显上调及所表达的蛋白质均与细胞增殖、分化有关的生长因子或肿瘤相关基因的蛋白质,例如转化生长因子 2 β 受体、尿激酶纤维蛋白酶原激活因子受体及起始转录因子 4D等。此外,SELDI-TOF-MS技术不仅可用于肝癌患者疾病的筛选工作,而且适合于卵巢癌、乳腺癌、食管癌、前列腺癌等肿瘤标志物的筛选工作。Petron等^[16]曾将 10 μL 血清加在蛋白质芯片上,利用蛋白质芯片 SELDI-TOF-MS技术进行目标蛋白质组分析,发现质量/电荷(m/z)比在 534.989、2111.2251和 2462.462的 5个质谱峰的丰度同时发生变化,这一技术对卵巢癌诊断有着潜在的应用价值。用血清蛋白指纹图谱进行盲法分析过程中,同样也获得较为理想的分析结果,即灵敏度为 100%,特异性为 95%,阳性预测值为 94%。而相同样本测定糖抗原(CA)125阳性预测值仅为 33%。

这一现象说明,蛋白质芯片质谱联用技术只需要少量血清样本即可在 30 min 内获得诊断结果,在临床诊断方面显示出独特的优势^[17]。

Marshall等^[18]随机选取 6例心肌梗死患者的血清和 6名正常人的血清进行对比试验。先将血清样品稀释 10倍,然后通过反相 C18柱进行脱盐并富集低丰度蛋白质,随后采用 MALDITOF-MS检测与疾病发生和形成相关的差异蛋白质的结构信息,其分析结果为阐明心肌梗死起因新的学术观点。目前临床上诊断肺癌的主要技术是采用非侵入性的放射性检查法【计算机 X线断层扫描(CT)或正电子发射电子计算机断层扫描(PET)】。虽然这类检查可以给肿瘤定位,但却无法辨别是否为恶性,还必须采用组织病理学进一步确诊。然而, MALDITOF-MS检测技术可依靠软件分析功能缩小检测标志物分析范围,提高检测的灵敏度和可靠性,并有可能替代现有的 CT或 PET方法。Howand等^[19]选取 24例肺癌患者及 17名正常人的血清,采用液相等电聚焦(IEF)分离技术将血清进行预分离后,再进行 MALDITOF-MS检测分析。通过对比大量实验数据,发现差异蛋白质实际上是血清淀粉蛋白 A(SAA, m/z为 11 702±14),其结果通过采用酶解测序和免疫印迹法进一步证实。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 SAA,发现肿瘤患者血清中的 SAA 含量(286 ng/mL)显著高于正常人水平(34.1 ng/mL),这些实验结果进一步证实了采用上述实验方法所获得的测试结果的可靠性和可行性。

三、人血清蛋白质分离技术的发展趋势

Magnan等^[20]发现 4种化学材料(玻璃、氨基硅烷化玻璃、透明质盐和硫代透明质盐)具有能吸收人血清蛋白质的特点,并采用双向凝胶电泳给予分离。Wang等^[21]研制出一种亲和旋转过滤管,能有效地去除人血清中高丰度蛋白质并富集低丰度蛋白质,适合于采用双向凝胶电泳进一步分离与筛选新标志物。Martosella等^[22]选用免疫亲和液相色谱技术去除人血清中 6种高丰度蛋白质,对剩余的低丰度蛋白质样本用反相-液相色谱仪进一步分离,并用 MALDITDF-MS技术进行蛋白质鉴定。Chromy等^[4]拓展双相差异凝胶电泳法,在去除 6种人血清高丰度蛋白质的基础上,分离出约 1 500个蛋白质斑点,认为该分离技术适合于研究人血清蛋白质组学。Zimmeran等^[23]发明以单相十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术分离人血清蛋白质,采用胶内酶解和液质联用技术鉴定人血清中的蛋白质,无需事先预分离血清中的高丰度蛋白质就可以获得理想结果。Misek等^[24]选用 3种不同颜色的染料标志物标志人血清中的蛋白质,在去除高丰度蛋白质的基础上,对人血清样本进行三相分离(电荷、疏水性和相对分子质量),最终获得高达 5 000条的蛋白质带,显示出极高的分辨率。Bjrhall等^[25]选用 5根亲和分离柱组成多维分离系统,在去除人血清中高丰度蛋白质后,采用双相凝胶电泳技术进一步

分离低丰度蛋白质;所富集的低丰度蛋白质样本同样也适合于直接质谱分析。

近期,我们曾采用不同的激光强度分解由 24个亚基高度对称性组成的铁蛋白为游离亚基混合物,并形成分子离子供质谱分析。此外,该项技术已用于削弱人血清中蛋白质之间的相互作用强度,提高生物大分子离子化率,并用于筛选可诊断人类各种重大疾病的蛋白质标志物^[26]。鉴于上述对各种电泳和质谱联用技术研究人血清蛋白质组的描述,因此目前分离人血清蛋白质的最大缺陷在于去除高丰度蛋白质同时,会使许多已络合于高丰度蛋白质的多肽随之丢失,推测这些生物大分子多数为具有一定医学价值的新标志物。如何富集这些生物大分子将是今后开展人血清蛋白质组学研究必需解决的一个新的关键性问题。

参考文献

- [1] Adkins N, Vamum SM, Aubeny KJ et al Toward a human blood serum proteome analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry [J]. Mol Cell Proteomics 2002 1(12): 947-955.
- [2] Li LH, Tang H, Wu Z et al Data mining techniques for cancer detection using serum proteomic profiling [J]. Artif Intell Med 2004 32(2): 71-83.
- [3] Poon TC, Johnson PJ Proteome analysis and its impact on the discovery of serological tumor markers [J]. Clin Chim Acta 2001, 313(1-2): 231-239
- [4] Chromy BA, Gonzales AD, Perkins J et al Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins [J]. J Proteome Res 2004, 3(6): 1120-1127
- [5] Pieper R, Su Q, Gatlin CL et al Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome [J]. Proteomics 2003 3(4): 422-432
- [6] Georgiou HM, Rice GE, Baker MS. Proteomic analysis of human plasma: failure of centrifugal ultrafiltration to remove albumin and other high molecular weight proteins [J]. Proteomics 2001, 1(12): 1503-1506.
- [7] Tinunaki RS, Chan KC, Prieto DA, et al Characterization of the low molecular weight human serum proteome [J]. Mol Cell Proteomics 2003 2(10): 1096-1103
- [8] Steel LF, Trotter MG, Nakajima PR et al Efficient and specific removal of albumin from human serum samples [J]. Mol Cell Proteomics 2003 2(4): 262-270.
- [9] Zuo X, Speicher DW. Comprehensive analysis of complex proteomes using microscale solution isoelectrofocusing prior to narrow pH range two-dimensional electrophoresis [J]. Proteomics 2002 2(1): 58-68
- [10] Wang M Z, Howard B, Campa M J et al Analysis of human serum proteins by liquid phase isoelectric focusing and matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry [J].

- Proteomics 2003, 3(9): 1661-1666.
- [11] Seibert V, Ebert MP, Buschmann T. Advances in clinical cancer proteomics SELDI-TOF-mass spectrometry and biomarker discovery [J]. Brief Funct Genomic Proteomic, 2005, 4(1): 16-26
- [12] Zhang H, Li X, J Martin DB, et al. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(6): 660-666.
- [13] Wu SL, Amato H, Biringer R, et al. Targeted proteomics of low-level proteins in human plasma by LC-MS/MS using human growth hormone as a model system [J]. J Proteome Res, 2002, 1(5): 459-465
- [14] Poon TC, Yip TT, Chan AT, et al. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes [J]. Clin Chem, 2003, 49(5): 752-760
- [15] Wang Z, Ruan YB, Guan Y. Analysis of proteomic components of sera from patients with hepatocellular carcinoma by two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flying mass spectrometry [J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2003, 32(4): 333-336.
- [16] Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer [J]. Lancet, 2002, 359(9306): 572-577.
- [17] Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, et al. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2005, 41(3): 634-642
- [18] Marshall J, Kupchak P, Zhu W, et al. Processing of serum proteins underlies the mass spectral fingerprinting of myocardial infarction [J]. J Proteome Res, 2003, 2(4): 361-372.
- [19] Howard BA, Wang MZ, Campa MJ, et al. Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis [J]. Proteomics, 2003, 3(9): 1720-1724
- [20] Magnani A, Babucci R, Lanponi S, et al. Two-step elution of human serum proteins from different glass-modified bioactive surfaces: a comparative proteomic analysis of adsorption patterns [J]. Electrophoresis, 2004, 25(14): 2413-2424
- [21] Wang YY, Cheng P, Chan DW. A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis [J]. Proteomics, 2003, 3(3): 243-248
- [22] Mantosella J, Zobotarjova 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.
- [23] Zimmerman LJ, Wenke GR, Caprioli RM, et al. Identification of protein fragments as pattern features in MALDI-MS analyses of serum [J]. J Proteome Res, 2005, 4(5): 1672-1680.
- [24] Misk DE, Kucik R, Wang H, et al. A wide range of protein isoforms in serum and plasma uncovered by a quantitative intact protein analysis system [J]. Proteomics, 2005, 5(13): 3343-3352
- [25] Bjorhalla K, Milotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples [J]. Proteomics, 2005, 5(1): 307-317
- [26] Huang HQ, Xiao ZQ, Lin QM, et al. Characteristics of trapping various organophosphorus pesticides with a ferritin reactor of shark liver (*Sphyrna zygaena*) [J]. Anal Chem, 2005, 77(6): 1920-1927

(收稿日期: 2007-08-06)

(本文编辑: 龚晓霖)

• 简讯 •

血栓与止血学临床检验质量保证及新进展学习班通知

拟定于 2008 年 7 月中下旬在南宁市举办国家级继续教育“血栓与止血学临床检验质量保证及新进展学习班”[2008-11-00-040(国), iv 类学分 8 分], 由多学科有丰富经验的优秀专家分别对以下 6 个专题进行学术交流: (1) 血栓与止血学检验质量保证; (2) 血栓与止血学检验新进展; (3) 血栓与止血学检验仪器与使用; (4) 血栓与止血学与临床; (5) 检验医学论文中统计学处理的缺陷分析、循证医学检验统计学方法与循证医学科思维; (6) 医学论文(含 SCI 论文)撰写。欢迎检验与临床医务工作者参加。同时, 接收尚未公开发表的相关论文投稿, 并汇编论文资料。现可通过网上信箱、来信、电话报名或投稿。正式会议通知于会议前一个月寄发。

联系人: 林发全; 手机: 13877118318 信箱: fqlin098@163.com

地址: 广西南宁市双拥路 6 号广西医科大学第一附属医院实验中心; 邮编: 530021