

nanoUPLC Q-TOF MS/MS 在大鼠肝移植 蛋白质组学研究中潜在生物标记物的应用

薛元臻¹, 芮雯², 王慧³

(1. Waters 科技有限公司, 广东 广州 510170; 2. 广东药学院中心实验室, 广东 广州 510006;
3. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037)

摘要:建立应用纳升级超高效液相色谱-质谱(nanoUPLC Q-TOF MS/MS)联用技术研究大鼠同位肝移植术后不同时间差异表达蛋白质的蛋白质组学方法。建立 10 组大鼠肝移植动物模型后,随机分成术后 3 天组($n=5$)和术后 7 天组($n=5$)。分别于术后 3 天和 7 天处死 5 只受体,取肝组织,提取总蛋白,Trypsin 酶解后,使用 Waters 公司独家专利 MSeTM 无标记定量技术,利用 nanoUPLC-MS/MS 技术对酶解后的肽段进行分析,数据库检索鉴定蛋白质,采用生物信息学工具对所鉴定的蛋白质进行功能分类。7 天组与 3 天组相比,两样品中同时存在的大部分蛋白上调,其中 10 个蛋白点表达水平明显上调,比值变化在 8.5 倍以上。结合数据库搜索得到鉴定,这些明显上调的蛋白的分子功能主要与细胞骨架、离子结合、氧化应激反应、能量代谢等相关。

关键词:生物标记物;纳升级超高效液相色谱;液相色谱-质谱联用;肝移植;蛋白质组学

中图分类号:O 657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2011)05-0314-07

nanoUPLC Q-TOF MS/MS Analysis of Potential Biomarker in Liver Transplant Between Sprague Dawley(SD) and Wistar

XUE Yuan-zhen¹, RUI Wen², WANG Hui³

(1. Waters Technologies Limited, Guangzhou 510170, China;
2. Institute of Materia Medica, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006, China;
3. School of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract: Novel approaches for the qualitative and quantitative proteomics analysis by nanoscale LC/MS was applied to the study of protein expression respond in organ transplant. In this experiment nanoUPLC Q-TOF-based LC-MS/MS platforms was evaluated for shotgun proteomics by compare the protein level after the liver transplant between Sprague Dawley(SD) and Wistar. A brand new technology label-free LC/MS called MSeTM from a nanoUPLC and Q-TOF (Waters) was applied attempt to establish a scientific model to for the liver transplant between Sprague Dawley(SD) and Wistar. The result is most of the protein found in the model are up-regulated between the 3 days sample and the 7 days sample after transplant. The novel LC/MS technology provides a fast and reliable research platform in the modeling of transplant proteomic research, provides the opportunities for discovery of new potential biomarkers.

Key words: biomarkers; nanoUPLC; LC-MS/MS; liver transplant; proteomics

收稿日期:2010-11-30;修回日期:2011-06-01

作者简介:薛元臻(1977~),男(汉族),广东人,博士,生物技术专业。E-mail: johnxyz88@hotmail.com

肝移植动物模型是探讨移植后各种免疫反应发生机制不可缺少的手段。目前国际上涉及大鼠肝移植免疫反应的研究均采用近交系,有较多的排斥模型可供选择,如 DA→AUG、LEW→AUG、DA→LEW、LEW→Brown Norway 等^[1-3]。但国内由于严重缺乏近交系大鼠,所以大多数仍用 Wistar→SD 或 SD→Wistar 建立急性排斥模型^[4-5]。本课题组发现封闭群 SD 和 Wistar 大鼠原位肝移植组合,出现了自然免疫耐受,表现为存活时间较文献报道明显延长^[4-5],难以满足急性排斥反应或免疫耐受研究的需要。

基于质谱技术和生物信息学的蛋白质组学是后基因组时代兴起的新型学科,是从整体水平对蛋白质的综合分析,在了解疾病发生的机制、寻找疾病相关的“生物标记物”(biomarkers)等诸多领域中发挥重要的作用^[6]。本实验使用 Waters 公司独家专利 MSeTM 无标记定量技术(Expression@ Label Free Quantities),通过利用 nanoUPLC-MS/MS 技术观察肝移植后不同时间蛋白质表达谱的变化,进一步验证和探讨大鼠肝移植模型 Wistar→SD 出现自然免疫耐受的原因,为建立动物模型提供量化的指标,以及为发现潜在的生物标记物提供方向和数据支持。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Waters nanoAcquity 纳升流速超高效液相色谱仪,Waters Synapt Q-TOF 高分辨飞行时间质谱仪;美国 Waters 公司产品;过滤器:美国 Millipore 公司产品;超速离心机:美国 Beckman 公司产品。

碳酸氢铵、异硫氰酸胍(Guanidine):美国 Sigma 公司产品;二硫苏糖醇(DTT):美国 Bio-Rad 公司产品;碘乙酸:美国 Pierce Endogen 公司产品;胰蛋白酶(Trypsin):美国 Promega 公司产品;RIPA 裂解液、BCA protein assay kit(蛋白定量试剂盒):美国 Biomed 公司产品。

1.2 实验设计与手术方案

本实验所用大鼠购自中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心,品系为雄性封闭群 Sprague-Dawley (SD)和 Wistar 大鼠,8~10 周龄,体重 200~250 g,受体鼠体重略重于供体大鼠。饲养条件 SPF 级,受体鼠术前 12 h 禁食,自由饮水,术后自由进食水。大鼠原位肝移植采用改良 Kamada^[7] 双袖套法。将 10 只 Wistar 大鼠

作为供体,10 只 SD 大鼠作为受体,术后随机分成两组。第一组:术后 3 天组;第二组:术后 7 天组。手术采用乙醚开放式麻醉,在无菌条件下进行。

1.3 样品处理和蛋白的提取

分别于大鼠肝移植术后 3 天和 7 天处死大鼠,取肝组织后,迅速放入预冷 PBS 中漂洗,去除组织中的血液,用滤纸吸去多余的液体,加入 RIPA 裂解液(50 mmol/L Tris pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, sodium orthovanadate; sodium fluoride, EDTA 等多种磷酸酶抑制剂),用玻璃匀浆器匀浆,直至充分裂解。充分裂解后取 10~14 kg 离心 3~5 min,取部分上清用 BCA 方法测定蛋白浓度,其余上清分装,于 -80 °C 冻存备用。

1.4 大鼠肝移植后差异表达蛋白图谱的建立

1.4.1 nanoUPLC 条件 色谱柱: nanoAcquity 10 cm BEH 柱 100 μ m, 10 k; 流动相 A: 0.01% FA + Water; 流动相 B: 0.01% FA + ACN; 流速 0.3 μ L/min; 进样体积 1 μ L; 柱温 35 °C; 梯度洗脱条件(B%/min): 2/0, 50/60, 80/61, 2/62。

1.4.2 质谱条件 Waters Synapt HDMS Q-TOF, 正离子模式运行, 锥孔电压 25 eV, 碰撞电压 20~40 eV, 毛细管电压 3 kV, 雾化气流速 0.2 L/h, 源温度 100 °C。

1.4.3 样品前处理 样品按照 Waters RapiGestTM SF Surfactant 提供的胰蛋白酶 Trypsin 酶解实验步骤,并根据实际情况做了一些修改。取约 1 mg 总蛋白样品放入离心管中,加入 1 mL 6 mmol/L Guanidine 溶液(配制在 100 mmol/L NH_4HCO_3 中, pH 8.0),得到 1 g/L 蛋白溶液。加入 20 mL 1 mmol/L DTT 到上述离心管中,震荡混合 5 s,并在 60 °C 条件下恒温反应 30 min(以还原蛋白中的双硫键)。加入 25 μ L 新鲜配制在 1 mmol/L NaOH 中的 Iodoacetic acid,避光、室温条件下放置 30 min。将以上样品平均注入 2 个(每个约注入 500 μ L)具有分离 10 ku 以下蛋白的 Centricon filter,以 12 000 r/min 离心 50 min。在以上离心管中分别加入 200 μ L 0.1 mmol/L NH_4HCO_3 ,并离心 30 min。多次重复此操作,以使蛋白样品中的 Guanidine 含量降至 0.5 mmol/L 左右。将以上 2 个离心管滤层上的蛋白样品,分别、多次加入

总量约 500 μL 0.1 mmol/L NH_4HCO_3 溶液以完全溶解,并将这些含有蛋白样品的溶液转移至装有 20 μL 的 Trypsin 试管中,再加入 500 μL 0.1 mmol/L NH_4HCO_3 溶液,使试管中液体的总量为 1 000 μL ,Trypsin 约占总量的 1/50。将上述试管恒温在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中反应 16 h,分别吸取 500 μL 上述样品到 2 个 Centricon filter 中,以 13 400 r/min 离心 50 min,这样可以除去多余的 Trypsin,终止酶切反应。将上述 2 个离心管下部的滤出液收集到 1 个离心管中,在 35 $^\circ\text{C}$ 下真空干燥浓缩 60 min。此过程有助于 NH_4HCO_3 的分解并挥发,降低样品中盐的浓度。继续干燥浓缩至样品量到 100 μL 左右,加 0.1% 甲酸溶液定量至所需要的样品浓度,并注意观察样品溶液是否澄清。若样品溶液有浑浊状,需在 12 000~14 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液进样分析。

1.4.4 差异表达蛋白的鉴定 本实验使用 MSeTM 无标记定量技术,通过利用 Waters nano-Acquity 纳升流速超高效液相(nanoUPLC)Waters Q-TOF 高分辨飞行时间质谱仪联用技术,对大鼠的肝组织蛋白提取液进行定性定量比对。为确保数据的精确性和重现性,所有实验均进行标准品(Enolase)、空白、实际样品进样 3 次或以上,连续进样以及隔天进样的严格测试。并在大鼠(M_musculus)蛋白数据库中加入标准品(P00924)的蛋白序列进行数据库搜索。在 ProteinLynx Global ServerTM 2.3 搜索的条件设置上,所有进行定量蛋白必须同一样品重复出现 2 次或以上(3 次),最大限度确保数据的可靠性和重现性。

2 结果与讨论

蛋白质组技术是后基因组时代基因功能研究的重要内容,其中 2DE/MS 是目前蛋白质研究中使用最为广泛的方法。虽然 2DE/MS 技术在一次分析中可以分离、识别上千种蛋白质,但整个过程包括 2DE、蛋白质点切割、蛋白酶解、多肽混合物提取及质谱分析等多个步骤的手工操作,存在耗时长、重复性较差、自动化程度低等缺点,同时蛋白的分离还受到丰度、疏水性、pH 值和分子质量范围等因素的限制。色质联用是近几年发展迅速的方法。蛋白质混合物直接通过液相色谱分离,然后进入质谱获得分子质量信

息并对蛋白进行鉴定。超高效液相色谱(UP-LC)是近年来液相色谱技术的新发展,通过增加液相系统耐高压性能,降低色谱柱固定相粒径、色谱柱内径及长度,从而减小了理论塔板高度、增加了理论塔板数,实现了缩短分析时间、增加色谱峰容量,提高分离度和灵敏度的作用,可以满足对色谱分析的高效、快速、高通量等性能的要求。同时,超高效液相色谱与质谱联用也使得质谱检测的灵敏度显著提高。

蛋白质组学定量方法分为相对定量和绝对定量两部分:相对定量蛋白质组学(也称比较蛋白质组学)是指对不同生理病理状态下,细胞、组织或体液蛋白质表达量进行的相对比较分析,如基于二维凝胶电泳(2-DE)技术直接对处于不同状态下蛋白质表达变化的比较分析^[12]、荧光胶内差示电泳技术(differential in-gel electrophoresis, DIGE)^[13]、基于同位素亲和标签(isotope coded affinity tags, ICAT)与质谱分析结合的相对定量技术^[14-15]、等量标签相对定量方法(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)^[16]和金属元素络合物标签结合质谱相对定量方法等^[17];无标记(label-free)蛋白质组绝对定量原理对质谱数据的分析发现,通过对不同浓度下蛋白质检测到的肽段数目、鉴定的概率得分、被鉴定肽段的离子数、色谱保留时间等研究,蛋白质的浓度经一些相应的数学变换后(如指数变换)与质谱数据的某些参数呈现一定的线性关系。这一发现,可以根据肽段的质谱数据,间接的估计蛋白混合物中单一蛋白的绝对量^[18]。本实验利用 Expression^E 无标识量化系统能够在试验的相对或绝对蛋白质浓度下,为所有需要的蛋白质提供独特的识别能力。高带宽的 UPLC MSE 数据采集功能与利用多肽段、无标识的蛋白质量化识别功能集于一体,采用先进的统计分析技术,综合地绘制出复杂生物系统的结构图谱。

本实验使用 Waters 公司独家专利 LC/MS^E 无标记定量技术(Expression^E Label Free Quantities),通过利用 Waters nanoAcquity 纳升流速超高效液相 Waters Q-TOF 高分辨飞行时间质谱联用技术,将大鼠肝移植术后 3 天和 7 天的肝组织经过样品前处理后,可直接进行上样。大鼠肝移植术后 7 天的肝组织色谱图示于图 1。

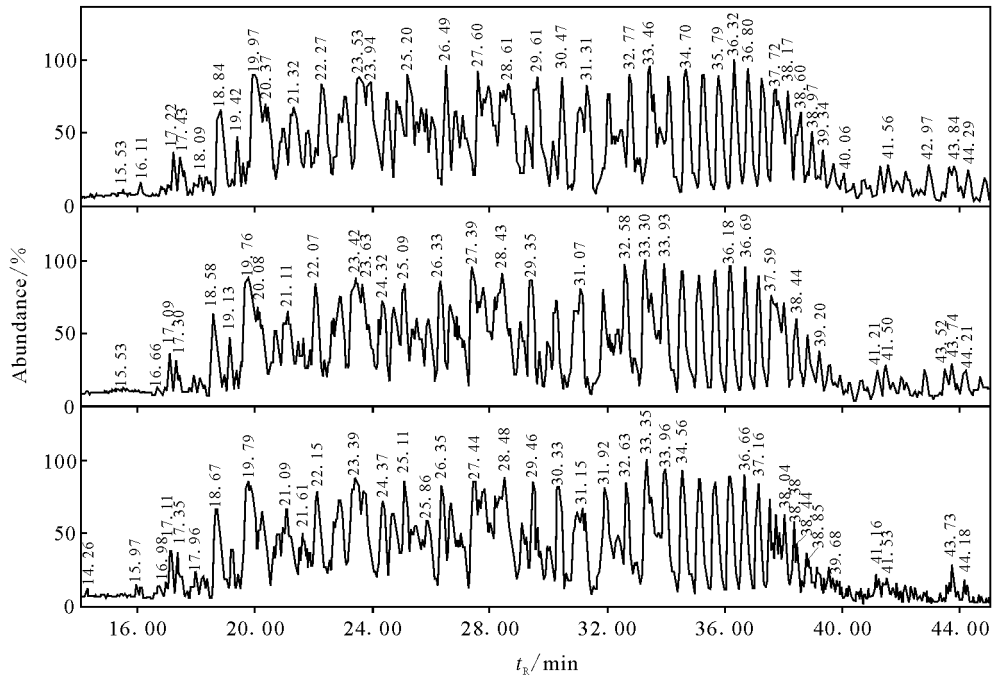


图 1 nanoUPLC-MS/MS 分析大鼠肝移植术后 7 天肝组织的色谱图
Fig.1 nanoUPLC-MS/MS analysis of the sample chromatogram
after 7 days of liver transplantation in rats

近几年,蛋白质组学与代谢组学开始被应用到器官移植的同种异体排异反应以及排异反应相关生物标记物的发现等领域^[8]。Vascotto 等^[9]应用 2-DE 和 MALDI-TOF-MS 技术发现肝移植供体肝脏中有 36 个蛋白在缺血再灌注损伤时发生明显变化,其中多数蛋白在脂质和能量代谢、氧化还原信号以及氧化应激过程中发挥作用。张春潮等^[10]利用荧光差异显示双向凝胶电泳,并整合内标法与正、反相荧光标记,对急性排异组和对照组大鼠肝移植后的肝组织蛋白质表达谱进行了定量蛋白质组学研究,实验结果有助于进一步了解器官移植排异反应的分子机制。

本实验是在封闭群 SD 和 Wistar 之间建立大鼠原位肝移植模型,但术后存活时间较文献报道明显延长,出现了自然耐受现象。为了验证和进一步探索这种现象,使用 MSe™ 无标记定量技术,通过利用 Waters nanoAcquity 纳升流速超高效液相 WatersQ-TOF 高分辨飞行时间质谱联用技术,对肝移植后不同时间的肝组织进行定量蛋白质组学研究。在大鼠肝移植后 3 天和 7 天的肝组织中共鉴定出表达的蛋白 111 个,其中表达量差异有显著的统计学意义的 ($P < 0.05$) 蛋白 48 个,示于图 2。蛋白在大鼠肝移植

后 7 天与 3 天的表达量比值大于 1.5 时,表示蛋白表达量上调,小于 0.67 则表示下调。两样品中同时存在的大部分蛋白上调,最多达到 23.81 倍。这些表达量差异的蛋白的分子功能主要与细胞骨架、离子结合、氧化应激反应、能量代谢相关,列于表 1。Beta-ETF 是一种含有黄素核苷酸辅基的电子载体蛋白,它存在于生物体细胞线粒体膜上,起传递电子作用,是作为还原型脂肪乙酰辅酶 A 脱氢酶和电子传递体系之间的一个连结环节。F-ATPase delta subunit 包括 F1:亲水部分(动物:α3β3γδε 亚基复合体、OSCP、IF1 亚基),线粒体内膜的基质侧颗粒状突起,催化 ATP 合成。F0:疏水部分(ab2c9~12 亚基,动物还有其他辅助亚基),镶嵌在线粒体内膜中,形成跨内膜质子通道。ATP 合酶组成可旋转的发动机样结构:F0 的 2 个 b 亚基的一端锚定 F1 的 α 亚基,另一端通过 δ 和 α3β3 稳固结合,使 a、b2 和 α3β3、δ 亚基组成稳定的定子部分。钙网蛋白(calreticulin, CRT)是内质网/肌浆网主要的 Ca²⁺ 结合蛋白,在细胞功能的调节方面发挥重要作用。图 3、图 4 为选取的清晰的 MS/MS 谱图,通过 ProteinLynx Global Server 软件对肽段碎片做详细裂解分析,显示出此方法对肽段测序

有较高的可靠性。大鼠肝移植术后 7 天与 3 天相比,这些蛋白质表达量的增加说明大鼠的肝脏正在再生和恢复过程之中,与术后存活时间长,

出现自然耐受现象相一致,但就其各个蛋白在自然耐受中的机制还有待于进一步的研究。

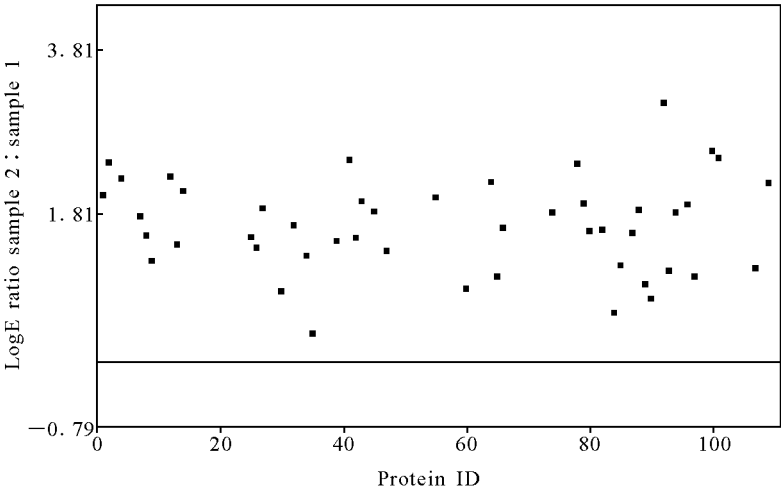


图 2 Protein Lynx Browser 软件分析差异蛋白表达水平
Fig. 2 Protein Lynx Browser software to analyze differences in protein levels

表 1 大鼠肝移植后 3 天和 7 天肝组织中表达明显上调的蛋白

Table 1 Proteins markedly up-regulated during liver regeneration 3 d and 7 d after liver transplantation in rats

序号	蛋白名称	编号	质量/u	样品 2: 样品:1 [#]	功能*
1	Beta-ETF	Q9DCW4	27 623	23.81	Electron carrier activity
2	F-ATPase delta subunit	Q9D3D9	17 600	13.2	Hydrogen ion transporting ATP synthase activity
3	Beta-2-globin	Q9QUN8	15 703	12.06	Heme binding; Iron ion binding; oxygen binding; oxygen transporter activity
4	Hemoglobin subunit beta-2	P02089	15 878	11.7	Heme binding; oxygen binding; oxygen transporter activity
5	Beta-globin	A8DV59	15 848	11.36	同 3
6	Hbb-b2 protein	Q5D0E8	15 834	11.25	同 3
7	Tropomyosin alpha-3 chain	P21107	32 863	9.58	Actin binding
8	Calreticulin	P14211	47 995	9.39	Calcium ion binding; mRNA binding; sugar binding; unfolded protein binding; zinc ion binding
9	Proteasome activator complex subunit 1	P97371	28 673	9.03	Proteasome activator activity; protein binding
10	Histone H2A. J	Q8R1M2	14 045	8.85	DNA binding

注: [#] 大鼠肝移植术后 7 天组与 3 天组相比蛋白表达量的比值;
* 蛋白质功能分类基于蛋白质组学数据库(<http://www.expasy.org/swiss-prot>)

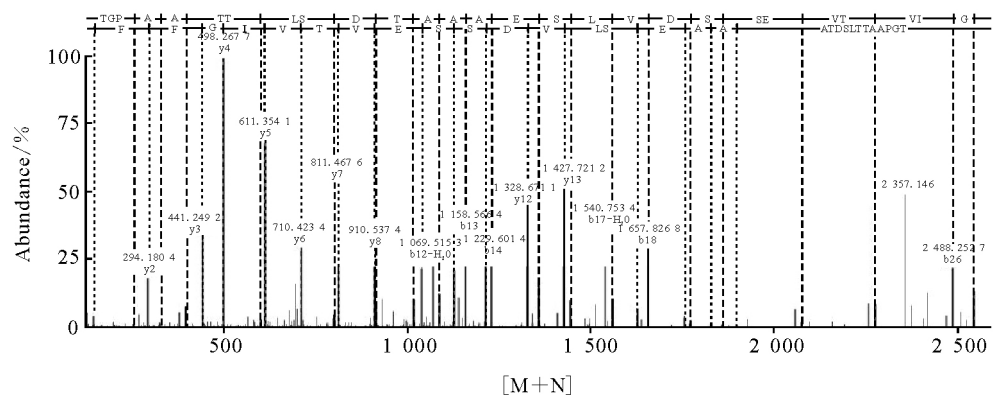
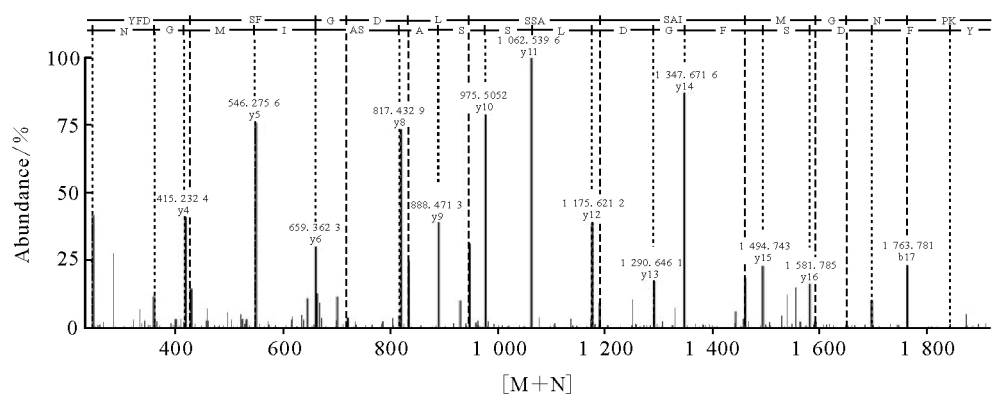


图 3 大鼠肝移植术后 3 天 protein(disulfide isomerase OS Mus musculus GN P4hb)中肽段 MS/MS 谱图

Fig. 3 MS/MS spectrum of peptide from protein (disulfide isomerase OS Mus musculus GN P4hb) identified by ProteinLynx Global Server™ software after 3 days of liver transplantation in rats



- 126-129.
- [5] CORDOBA S, WANG C, WILLIAMS R, et al. Gene array analysis of a Rat model of liver transplant tolerance identifies increased complement C3 and the STAT-1/IRF-1 pathway during tolerance induction[J]. *Liver Transp l*, 2006, 12 (4): 636-643.
- [6] 孟珂伟, 宋占文, 周先亭, 等. 大鼠原位肝移植术后急性排斥反应中 Fractalkine 的表达及意义[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 21(5): 528-531.
- [7] 陆炯炯, 杜隽铭, 周学平, 等. 大鼠原位肝移植术后排斥反应病理动态变化[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2007, 27(4): 475-477.
- [8] VIVANCO F, MAS S, DARDE V M, et al. Vascular proteomics[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2007, 1(1): 1 102-1 122.
- [9] KAMADA N, CALNE R Y. Orthotopic liver transplantation in the rat: Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage[J]. *Transplantation*, 1979, 28: 47-49.
- [10] WISHART D S. Metabolomics: The principles and potential applications to transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2005, 5(12): 2 814-2 820.
- [11] VASCOTTO C, CESARATTO L, DAMBROSIO C, et al. Proteomic analysis of liver tissues subjected to early ischemia/reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation[J]. *Proteomics*, 2006, 6: 3 455-3 465.
- [12] LILLEY K S, RAZZAQ A, DUPREE P. Two-dimensional gel electrophoresis: Recent advances in sample preparation, detection and quantitation [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6(1): 46-50.
- [13] ALBAN A, DAVID S O, BJORKESTEN L, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard[J]. *Cell & Molecular Biology*, 2003, 3(1): 36-44.
- [14] GYGI S P, RIST B, GERBER S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(10): 994-999.
- [15] 孟庆芳, 张养军, 蔡 耘, 等. 亲和标记-基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱用于蛋白质相对定量方法的研究[J]. *分析化学*, 2006, 34(7): 899-904.
- [16] CHONG P K, GAN C S, PHAM T K. Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) reproducibility: Implication of multiple injections[J]. *Journal of Proteome*, 2006, 5(5): 1 232-1 240.
- [17] LIU H, ZHANG Y, WANG J, et al. Method for quantitative proteomics research by using metal element chelated tags coupled with mass spectrometry[J]. *Analytical*, 2006, 78 (18): 6 614-6 621.
- [18] 曹 冬, 张养军, 钱小红. 基于生物质谱的蛋白质组学绝对定量方法研究进展[J]. *质谱学报*, 2008, 29(3): 185-189.

中国质谱学会李金英理事长带队参加第二届亚太地区质谱年会

2011 年 8 月 17~19 日, 第二届亚太地区质谱年会(AOMSC)暨第八届韩国质谱年会(KSMS)在韩国釜山国际会展中心 BEXCO 胜利开幕。本届年会的主题为“In Mass Spectrometry, We Unite”, 会议不仅可以促进亚太地区质谱学者之间交流学习, 同时还能增加各个国家与会者间的友谊。

中国质谱学会李金英理事长等一行近 20 多人参加了本次学术交流会。第二届亚太地区质谱年会安排了近 100 场报告, 300 个墙报展。中国质谱学会在本届年会上推荐了 6 个邀请报告, 近 10 个专题报告, 涉及无机、同位素、有机、生物、仪器研发等各个领域。