

• 临床检验研究 •

离心超滤法去除血清大相对分子质量高丰度蛋白质的实验研究

李 克, 朱 慧

(南京军区南京总医院检验科 210002)

摘 要:目的 建立离心超滤法去除血清中大相对分子质量高丰度蛋白质的实验方法,研究其去除效果及重复性。方法 取血清与 20 % 乙腈按 1 : 4 (V/V) 混合,将混合后的血清分别加入相对分子质量分离点 (MWCO) 为 100×10^3 、 50×10^3 、 30×10^3 及 10×10^3 超滤膜离心管中,离心 15 min ($8\,000 \times g$)。滤液真空冷冻干燥后,以超纯水按浓缩 10 倍复溶。分别应用 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳法和二元梯度高效液相色谱法 (HPLC) 分析比较血清中大相对分子质量高丰度蛋白质去除效果,考察经 50×10^3 超滤膜离心去除血清中大相对分子质量高丰度蛋白质后保留低丰度蛋白质的重复性。结果 以选择 MWCO 为 50×10^3 和 30×10^3 较为适宜。电泳分离结果显示,经离心超滤后滤过液中相对分子质量高丰度蛋白质,特别是清蛋白得到有效去除。HPLC 检测结果显示,选用 MWCO 为 50×10^3 超滤膜分离后,血清低丰度蛋白质数量保留适中。重复性统计结果显示,小相对分子质量低丰度蛋白质相对保留时间和相对峰面积 RSD 值分别小于 0.46 % 和 5.56 %。结论 离心超滤法去除血清中大相对分子质量高丰度蛋白质步骤较为简便、重复性好,为进一步深入研究血清蛋白质组学奠定了基础。

关键词: 蛋白质组学; 离心超滤法; 高丰度蛋白质; 低丰度蛋白质

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)20-2359-02

The study of depleting high abundance and high molecular weight proteins from serum using centrifugal ultrafiltration

Li Ke, Zhu Hui

(Department of Clinical Laboratory Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Command PLA, 210002, China)

Abstract: **Objective** To establish and validate a centrifugal ultrafiltration method to deplete albumin from serum and investigate its effectiveness and reproducibility. **Methods** Four millilitres of human serum was diluted by the addition of 16 mL 20 % (V/V) acetonitrile, and aliquots of serum ultrafiltered applied onto centrifugal filters with molecular weight cut off (MWCO) of 100×10^3 , 50×10^3 , 30×10^3 and 10×10^3 , respectively. The sample was centrifuged at $8\,000 \times g$ about 15 min, then the filtrate was lyophilized to dryness and resuspended with 100 μ L of H_2O . The resuspended filtrate was analyzed by Tricine-SDS-PAGE method and the binary gradient high performance liquid chromatography (HPLC), and to investigate its effectiveness and reproducibility. **Results** The electrophoresis analysis showed that it was appropriate to select MWCO of 50×10^3 or 30×10^3 . After centrifuging by the centrifugal filters, the high abundance and high molecular weight proteins, in particular, the albumin were depleted effectively. The HPLC results showed that, after using centrifugal filters with MWCO of 50×10^3 , the RSD of relative retention time and relative peak area of the low abundance proteins were $< 0.46\%$ and $< 5.56\%$, respectively. **Conclusion** The centrifugal ultrafiltration method offers a simple and reproducible method to deplete high abundance and high molecular weight proteins, which lays foundation for further studying and exploiting the serum proteomics.

Key words: serum proteomics; centrifugal ultrafiltration; high abundant proteins; low abundant proteins

蛋白质作为基因功能的主要体现者,在催化生命体内进行各种反应、调节代谢、抵御外来物质入侵、控制遗传信息等方面都起着至关重要的作用,是生命科学中极为重要的研究对象。血清蛋白质组学是蛋白质组学研究中的重要分支,其研究目标之一就是全面而系统地认识健康和疾病状态下血清蛋白质组成的差异,从中寻找可用于早期诊断疾病和预测预后的血清标志蛋白质^[1-3]。由于血清蛋白质组成极其复杂且丰度差异极大,而这些标志物或靶蛋白在血浆和血清中的含量又大多很低,上千种的低丰度蛋白质只占血清蛋白质总量的约 1 %,而 22 种高、中丰度蛋白质却占了约 99 %^[4]。因此,在进行血清蛋白质组学研究之前,必须尽可能去除那些干扰低丰度蛋白质研究的高丰度蛋白质,同时又能最大可能地保留与之共存的低丰度蛋白质,这是进行血清蛋白质组学研究必须首要解决的问题^[5-7]。本研究探讨了选用不同相对分子质量分离点 (MWCO) 超滤膜对大相对分子质量高丰度蛋白质离心超滤的去除效果,以及对小相对分子质量蛋白质的富集作用。并对 50×10^3 超滤膜去除大相对分子质量高丰度蛋白质的重复性和稳定性进行了考察,建立了一种能有效去除血清清蛋白等大相对

分子质量高丰度蛋白质的离心超滤去除法,为进一步深入研究血清蛋白质组学奠定了基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 10 例本院门诊健康体检者,年龄 23 ~ 35 岁,平均 (30.3 ± 4.3) 岁,分别抽取空腹静脉血 3 mL,分离血清后分装置于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器 高效液相色谱仪 (HPLC) 系统由 Waters 1525 二元泵、Waters 2998 二极管阵列检测器、Waters 717plus 自动进样器及 Empower2 色谱工作站组成 (美国 Waters 公司)。HC-3018R 高速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司),ESP300 电泳仪、VE-180 微型垂直电泳槽 (上海天能公司),R40-8803 真空冷冻干燥机 (香港 Snijders 公司),吹气式浓缩干燥仪 (汉邦科技有限公司)。

1.2.2 主要材料和试剂 Ultracel 离心超滤管 (美国 Millipore 公司),流动相采用色谱纯级乙腈、三氟乙酸 (美国 Tedia 公司) 配制,蛋白质 Marker (invitrogen 公司),除注明外,试验中其余试剂均为分析纯级试剂。试验用水使用超纯水。内标

储备液(1 mg/mL)由硫酸阿托品(含量测定用对照品,中国药品生物制品检定所)配制水溶液,置于 4 ℃ 冰箱中保存。流动相配制:A 流动相(含 0.1% 三氟乙酸的超纯水溶液);B 流动相(含 0.1% 三氟乙酸的乙腈),使用前以 0.45 mm 滤膜减压过滤。

1.2.3 色谱条件 色谱柱:Lichrospher C₁₈-300A 高效液相色谱分离柱(250 mm×4.6 mm,5 μm;江苏汉邦科技有限公司)。检测波长:UV214 nm,流速:0.80 mL/min,进样体积:20 μL,自动进样器温度:22 ℃,色谱分离柱温:30 ℃。梯度洗脱时间程序:5% B 流动相保持 6 min,到 56 min 时 B 流动相增加至 95%,保持 2 min。

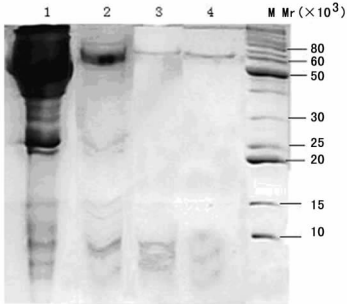
1.2.4 离心超滤去除大相对分子质量高丰度蛋白质 离心超滤管按说明以超纯水清洗预处理。取 4 mL 混合人血清加入 16 mL 20% 乙腈稀释,置摇床轻微震摇 30 min。取 5 mL 稀释血清加至离心超滤管中,20 ℃ 下离心 15 min(8 000×g),滤液立即置于-70 ℃ 冰箱冷冻 24 h 后真空冷冻干燥。

1.2.5 Tricine-SDS-PAGE 电泳 将上述冻干粉用 100 μL 超纯水复溶(原血清浓缩 10 倍)。取复溶液 20 μL,加入上样缓冲液 3 μL(7×)后置于 95 ℃ 水浴加热 5 min。取样品采用 20 μL 等量上样,Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳分离,40 V/胶 20 min,80 V/胶 20 min,然后 100 V/胶 2 h,考马斯亮蓝 R250 染色,脱色液脱色^[8]。

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,以计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示。

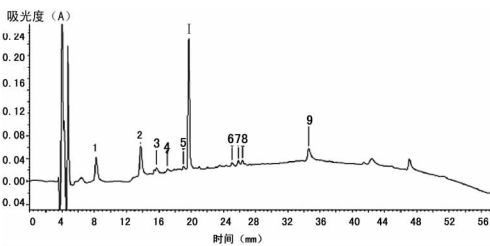
2 结 果

2.1 不同 MWCO 离心超滤管对大相对分子质量高丰度蛋白质的去除效果 分别选取 MWCO 为 100×10³、50×10³、30×10³ 及 10×10³ 超滤膜离心管,取健康体检者血清按“离心超滤去除大相对分子质量高丰度蛋白质”步骤处理后进行蛋白质 Tricine-SDS-PAGE 电泳分离检测,结果见图 1。



泳道 1:100 ×10³;泳道 2:50 ×10³;泳道 3:30 ×10³;泳道 4:10 ×10³;M:标记。

图 1 不同 MWCO 离心超滤管去除血清大相对分子质量高丰度蛋白质后 Tricine-SDS-PAGE 凝胶谱图



I: 内标;MWCO:50 ×10³。

图 2 去除血清大相对分子质量高丰度蛋白质后高效液相色谱图

2.2 重复性实验 选取 MWCO 为 50 ×10³ 超滤膜离心管,平行取 6 份健康体检者混合血清,分别按“离心超滤去除大相对分子质量高丰度蛋白质”步骤处理。将冻干粉用 100 μL 超纯水复溶,配制成供试品溶液,以二元梯度高效液相色谱进样检测。选取 9 个共有峰为考察峰(图 2),结果显示,6 份试样共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值分别小于 0.46% 和 5.56%,见表 1。

表 1 离心超滤去除大相对分子质量高丰度蛋白质重复性分析(MWCO:50 ×10³,n=6)

峰号	相对保留时间		相对峰面积	
	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
1	0.418±0.001	0.239	0.298±0.01	3.356
2	0.700±0.003	0.429	0.401±0.017	4.239
3	0.797±0.002	0.251	0.062±0.001	1.613
4	0.866±0.003	0.346	0.029±0.001	3.448
5	0.967±0.001	0.103	0.026±0.001	3.846
内标	1.000±0.000	0.000	1.000±0.000	0.000
6	1.269±0.002	0.158	0.018±0.001	5.556
7	1.310±0.001	0.076	0.023±0.001	4.348
8	1.335±0.003	0.225	0.034±0.001	2.941
9	1.747±0.008	0.458	0.294±0.011	3.741

3 讨 论

理想的蛋白质去除技术应该是能尽可能地去除所不需要研究的蛋白质,同时又能对所需要研究的低丰度蛋白质类的含量或活性不产生干扰、影响,或者将其影响降到最低^[9]。目前,使用较多的高丰度蛋白质去除法是免疫亲和层析法,它通过配基与目标蛋白质的免疫结合作用而将目标蛋白质提取出来或将其去除。其特点是在去除效率、去除专一性或是一次性去除的蛋白质的种类等方面都具有优势^[10-11]。但该方法成本高,操作繁琐,使其应用受到很大的限制^[12]。超滤离心分离技术是通过膜表面的微孔结构借助离心力作用对蛋白依据相对分子质量大小进行选择分离的技术,是一种更为简便的高丰度蛋白质物理去除方法。血浆中蛋白质浓度分布域可达 10 个数量级^[13],而清蛋白作为血清中含量最高的蛋白质,其相对分子质量约为 60×10³,含量可达总蛋白量的 60% 以上。因此,通过选择合适的 MWCO 超滤膜,可有效地去除血清中清蛋白等高丰度蛋白质。实验显示,当 MWCO 为 100×10³ 时,由于无法截留清蛋白,致使许多低丰度蛋白质的信息被其掩盖,而当 MWCO 为 10×10³ 时,大相对分子质量高丰度蛋白质被去除的同时,某些低丰度蛋白质也被同时截留。因此,实验以选择 MWCO 为 50×10³ 或 30×10³ 超滤膜为宜。电泳分离结果显示,经离心超滤后滤液中大相对分子质量高丰度蛋白质,特别是清蛋白得到有效去除。本实验选择 MWCO 为 50×10³ 超滤膜。实验中加入 20% 乙腈稀释血清,一方面降低了样本的黏稠度,有利于血样通过滤膜。另一方面,加入 20% 乙腈可以破坏低丰度蛋白与清蛋白的相互吸附作用,降低附着效应,更有利于去除大相对分子质量高丰度蛋白质,保留低丰度蛋白质^[14]。当蛋白质液体混合物在离心力作用下流经膜表面时,小分子蛋白质可以透过分离膜,而大分子蛋白质则被膜所截留。离心分离过程应注意控制离心速度和离心时间,以避免膜损伤而使大相对分子质量蛋白质透过。本实验控制离心力为 8 000×g,离心时间 15 min 为宜。(下转第 2363 页)

(mecA)编码合成一种新的青霉素结合蛋白(Penicillin Binding Protein, PBP)2a 导致, PBP2a 与 β -内酰胺类抗菌剂的亲和力低从而产生耐药^[2]。按 CLSI 要求, 当葡萄球菌被确认为 MRS 时, 其对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、碳头孢类和含 β -内酰胺酶抑制剂的抗菌剂均应视为耐药。尽管可能出现体外试验为“敏感”, 体内用药时常为耐药。携带 mecA 基因的 MRS 往往同时也耐氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、盐酸克林霉素类抗菌剂^[3-4]。本院分离的葡萄球菌对万古霉素、替考拉宁 100%敏感, MRS 的中重度感染首选万古霉素、替考拉宁等糖肽类抗菌剂。对呋喃妥因、利福平、复方新诺明、米诺四环素耐药率较低。值得注意的是, 本院分离葡萄球菌的 D 试验阳性率较高(金黄色葡萄球菌为 36%, 凝固酶阴性葡萄球菌为 56%)。提示临床微生物实验室对葡萄球菌进行常规 D 试验的重要性, 以指导临床医师正确使用克林霉素。

革兰阴性杆菌是本院医院感染的主要病原菌。排在首位的是肺炎克雷伯菌, 且对多种抗菌剂耐药率高。ESBLs 的产生和传播是革兰阴性杆菌多重耐药的重要原因之一, 已成为临床感染治疗的严峻挑战^[5]。体外药敏试验头孢他啶的耐药率明显低于头孢噻肟, 与王鹏等^[6]报道的一致, 这与国内医院头孢噻肟的使用量明显大于头孢他啶有关。说明本院革兰阴性杆菌所产生的 ESBLs 主要为 CTX-M 型有关。本次研究显示, 本院分离的革兰阴性杆菌对阿莫西林、替卡西林、头孢噻吩、哌拉西林、头孢呋辛、庆大霉素等耐药率较高, 亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦显示了良好的抗菌活性^[7-8]。

抗菌剂合理使用, 能减缓药物对细菌的选择压力, 减少细菌耐药产生^[7]。本院神经外科 ICU 念珠菌的感染已经比较常

见, 位于常见分离菌株的第 4 位, 占 10%。由于病原菌的多重耐药性与传播性, 除合理应用抗菌剂、加强耐药监测外, 还应加强临床消毒、隔离制度的落实, 医务人员勤洗手, 严格无菌操作, 对病区内环境定期做好监测, 防止院内交叉感染。同时, 加强医务人员有关细菌耐药知识的培训。

参考文献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S16 Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne: PA, CLSI, 2009.
- [2] 朱以军, 应华永, 卜黎红, 等. 微量肉汤稀释法检测葡萄球菌属诱导型克林霉素耐药的评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(17): 2713-2715.
- [3] 欧阳范献, 鲍时翔. mec 复合体和 SCCmec 盒与 MRSA 耐药性研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2004, 3(4): 375-376.
- [4] 孔海深, 徐根云, 李雪芬, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌多重耐药基因检测[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(10): 1029.
- [5] 马越, 金少鸿. 我国细菌耐药性监测研究的新特点[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4): 344.
- [6] 王鹏, 熊自忠, 王中新. 185 株临床分离肺炎克雷伯菌中超广谱 β -内酰胺酶及耐药性检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(4): 454-456.
- [7] 杨钧, 张淑文, 王红, 等. 感染暨急救医学内科细菌性耐药性监测结果[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 6(5): 531.
- [8] 司文, 李文郎, 谭卫民, 等. 神经外科医院感染常见病原菌耐药性调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(4): 449-450.

(收稿日期: 2011-09-01)

(上接第 2360 页)

离心超滤法去除血清中大相对分子质量高丰度蛋白质步骤较为简便、重复性好, 为进一步深入研究血清蛋白质组学奠定了基础。

参考文献

- [1] Narimatsu H, Sawaki H, Kuno A, et al. A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics[J]. FEBS J, 2010, 277(1): 95-105.
- [2] 姜伟, 王开正, 白克镇, 等. 精神分裂症与急性应激障碍及抑郁症患者血清蛋白质谱初步分析[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(5): 385-387, 391.
- [3] 李明, 沈佐君. 糖基化蛋白的检测及其在临床中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(11): 1015-1016, 1018.
- [4] Plavina T, Wakshull E, Hancock WS, et al. Combination of abundant protein depletion and multi-lectin affinity chromatography (M-LAC) for plasma protein biomarker discovery[J]. J Proteome Res, 2007, 6(2): 662-671.
- [5] Pernemalm M, Lewensohn R, Lehtio J. Affinity prefractionation for MS-based plasma proteomics[J]. Proteomics, 2009, 9(6): 1420-1427.
- [6] Fic E, Kedracka-Krok S, Jankowska U, et al. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis[J]. Electrophoresis, 2010, 31(21): 3573-3579.
- [7] De Bock M, de Seny D, Meuwis MA. Comparison of three methods for fractionation and enrichment of low molecular weight proteins for SELDI-TOF-MS differential analysis[J]. Talanta, 2010, 82

(1): 245-254.

- [8] Schagger H. Tricine-SDS-PAGE[J]. Nat Protoc, 2006, 1(1): 16-22.
- [9] 苟黎明, 邵小宝, 李克. 蛋白质组学研究中高丰度蛋白质去除方法的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(4): 298-211.
- [10] Zolotarjova N, Mrozinski P, Chen H, et al. Combination of affinity depletion of abundant proteins and reversed-phase fractionation in proteomic analysis of human plasma/serum[J]. J Chromatogr, 2008, 1189(1): 232-338.
- [11] Azarkan M, Huet J, Baeyens-Volant D, et al. Affinity chromatography: a useful tool in proteomics studies[J]. J Chromatogr B, 2007, 849(1/2): 81-99.
- [12] Kay R, Barton C, Ratcliffe L, et al. Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(20): 3255-3260.
- [13] Jin WH, Dai J, Li SJ, et al. Human plasma proteome analysis by multidimensional chromatography prefractionation and linear ion trap mass spectrometry identification[J]. J Proteome Res, 2005, 4(2): 613-619.
- [14] Tirumalai 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.

(收稿日期: 2011-09-07)