

• 基础实验研究论著 •

探讨 Lys-C 胰蛋白酶对于质谱法测定糖化血红蛋白的应用价值*

宋智心^{1,2}, 田恩冰¹, 马怀安³, 王清涛^{1△}

(1. 首都医科大学附属北京朝阳医院, 北京 100020; 2. 北京市房山区良乡医院, 北京 102401;

3. 首都医科大学, 北京 100068)

摘要:目的 探讨 Lys-C 胰蛋白酶在国际临床化学组织(International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC)推荐的质谱法测定糖化血红蛋白的参考方法中的应用价值。方法 分别用两种特异性蛋白水解酶(GLU-C 胞内蛋白酶和 Lys-C 胰蛋白酶)酶解血红蛋白后,进行 SDS-PAGE 电泳,衡量蛋白酶解的效率,再将消化后的血红蛋白进行质谱分析,测定标本中糖化血红蛋白的浓度。结果 在相同的电泳条件下,Lys-C 胰蛋白酶酶解血红蛋白的效率优于 GLU-C;酶解后的血红蛋白标本经质谱方法分析可知,两种蛋白酶用于检测糖化血红蛋白浓度时,可以得到基本一致的结果,由两种方法绘制的标准曲线 r^2 分别为 0.929 和 0.998。结论 在 IFCC 推荐的糖化血红蛋白参考测量方法中,一直使用 GLU-C 胞内蛋白酶酶解血红蛋白,该研究尝试通过 Lys-C 胰蛋白酶的使用,降低整个实验成本。经结果分析,证实应用这两种特异性的蛋白酶检测糖化血红蛋白时,可以得到基本一致的结果,推荐使用文中所列方法将 Lys-C 胰蛋白酶作为酶解糖化血红蛋白的特异性蛋白酶。

关键词: 血红蛋白 A, 糖化; 质谱分析法; Lys-C 胰蛋白酶; GLU-C 胞内蛋白酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0257-03

Application value of Lys-C trypsin for the detection of HbA1c by using mass spectrometric method*

Song Zhixin^{1,2}, Tian Enbing¹, Ma Huaian³, Wang Qingtao^{1△}

(1. Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China; 2. Beijing Fangshan District

Liangxiang Hospital, Beijing 102401, China; 3. Capital Medical University, Beijing 100068, China)

Abstract: **Objective** To explore the application value of Lys-C trypsin for the detection of glycosylated hemoglobin A1 (HbA1c) using the mass spectrometric method as reference method recommended by International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine(IFCC). **Methods** Hemoglobin was enzymatically hydrolyzed by two kinds of proteolytic enzymes, including intracellular protease GLU-C and Lys-C trypsin. SDS-PAGE was performed to measure the enzymatic hydrolysis efficiency, and after digestion of hemoglobin, mass spectrometry was used to determinate the HbA1c concentration. **Results** According to SDS-PAGE results, under the same electrophoresis conditions, the hydrolysis efficiency of Lys-C trypsin higher than GLU-C. According to LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer analysis results, HbA1c concentrations in specimens treated with the two kinds of protease might be basically consistent, and r^2 values of the two standard curves of the two methods were 0.929 and 0.998 respectively. **Conclusion** Treatment of Lys-C trypsin and GLU-C could acquire the same detection results of HbA1c detected by reference method recommended by IFCC, and Lys-C trypsin could replacing GLU-C for the detection of HbA1c.

Key words: hemoglobin A, glycosylated; mass spectrometry; trypsin Lys-C; endoproteinase GLU-C

葡萄糖进入红细胞后与血红蛋白 HbA 的 β 链 N 末端缬氨酸残基缩合,先形成一种不稳定的 Schiff 碱(醛亚胺结构),即前 HbA1c,再解离或经 Amadori 分子重排后形成 HbA1c(醌酮结构),此反应的过程是缓慢和不可逆的,并且由于红细胞内没有分解醌酮的酶。因此 HbA1c 浓度只与红细胞寿命和该时期体内血糖的平均浓度有关,不受运动或食物的影响,反映的是过去 6~8 周的平均血糖浓度,是目前国际上公认的用于评估糖尿病患者长期血糖状况的金标准。2002 年 IFCC 推出了一整套的糖化血红蛋白的参考测量方法^[1],即将待测标本溶血后经 GLU-C 胞内蛋白酶(endoproteinase, GLU-C)酶解后应用高效液相色谱串联电喷雾质谱仪或高效液相色谱串联毛细管电泳仪检测。本研究在 IFCC 推荐的质谱法基础上,分别使用 GLU-C 和 Lys-C 胰蛋白酶(trypsin)进行蛋白酶解后,经 LC-MS 质谱仪测定糖化血红蛋白的含量,旨在比较两种特异性的蛋白水解酶酶解糖化血红蛋白的差异,探讨 Lys-C 胰蛋白酶在 IFCC 推荐的质谱法测定糖化血红蛋白的方法中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 (1)仪器:ZLNS-1 型真空离心压缩机(上海青浦仪表厂);MICRO17R 型低温高速离心机(Thermo Scientific);PHS-3E PH 计(上海精科仪表厂);LTQ-Orbitrap Velos 液质联用质谱仪(Thermo Scientific);SDS-PAGE 设备及电泳槽(BioRad)。(2)试剂:实验所需的无机化学试剂均为分析纯,采购自北京化工有限公司;有机化学试剂均为 HPLC 等级,采购自默克公司;购买的 endoproteinase GLU-C 为测序等级,采购自罗氏公司;购买的 Lys-C 胰蛋白酶为测序等级,采购自 Promega 公司。用于清洁及除盐的 oasis HLB 固相萃取柱,购自沃特世公司。

1.2 标准物质 使用满足计量学特性的国际有证标准物质 IRMM/IFCC467 (HbA0) 和国家一级糖化血红蛋白 (GBW09181, GBW09182, GBW09183) 为标准物质,绘制标准曲线;以参考物质 BCR-405 为质控品,标准物质的运输、保存和使用严格按照产品说明书所列要求进行。

1.3 标本 所有标本均来自朝阳医院健康体检患者,空腹采集新鲜抗凝静脉血,经筛查人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体,乙型肝炎表面抗原(HBsAg),丙型肝炎表面抗原均为阴性。

1.4 方法

1.4.1 酶解 分别按照产品说明书所列要求使用两种蛋白酶酶解。

1.4.2 SDS-PAGE 胶电泳 制备厚度为 0.75 mm,分离胶为 12%,浓缩胶为 5%的不连续聚丙烯酰胺凝胶。将酶解前的标本与 GLU-C 胞内蛋白酶和 Lys-C 胰蛋白酶酶解后的标本以 1:10 的比例稀释后与加样缓冲液 1:1 混合,100 ℃ 加热 5 min。上样:预染蛋白上样 Marker 6 μL,各标本上样 20 μL。U=96 V;1=140 mA,跑完浓缩胶,提高电压至 U=120 V 跑分离胶,至溴酚蓝到达玻璃板底部时停止电泳。考马斯亮蓝染色过夜,脱色至出现清晰蛋白条带,背景无色后拍照。

1.4.3 高效液相色谱与质谱参数 见表 1。

表 1 液相色谱和质谱条件			
项目	色谱条件参数	项目	质谱条件参数
流动相	A:水(水+0.1%TFA)	扫描类型	MS2SIM
	B:乙腈	CAP 电压	4 500 V
梯度	0 min 5%B	喷雾气体	氮气
	26 min 50%B	喷雾器压力	30 psi
	36 min 95%B	气体流速	11 L/min
	41 min 95%B	气体温度	300 ℃
流速	42 min STOP RUN	扫描范围	300~2 000 m/z
	300 μL/min		

1.4.4 质谱图的提取及结果计算 使用 Xcalibur 分析软件提取质荷比为 348.2、429.2(GLU-C 胞内蛋白酶酶解后的血红蛋白 β 链 N 末端 6 肽段)、476.27 和 557.25(Lys-C 胰蛋白酶酶解后的血红蛋白 β 链 N 末端 8 的肽段)的信号强度(见图 1~4),rsig(信号比率)=(glc β1-6-8)/(β1-6-8);通过定标曲线的线性回归方程,由检测标本的信号比率可以推导出 rconc(HbA1c/HbA0 浓度比率),则检测标本的糖化血红蛋白的百分比浓度为 $HbA1c\% = 100 \times rconc / (1 + rconc)$ 。每个标本重复测定 2 次,取平均值。

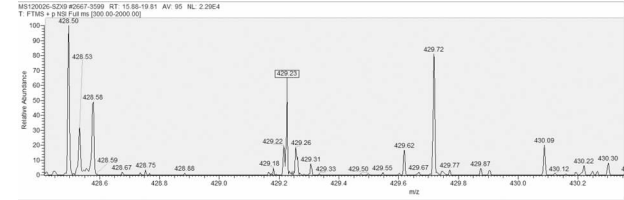


图 1 GLU-C 胞内蛋白酶酶解后的 HbA1c 的质谱峰

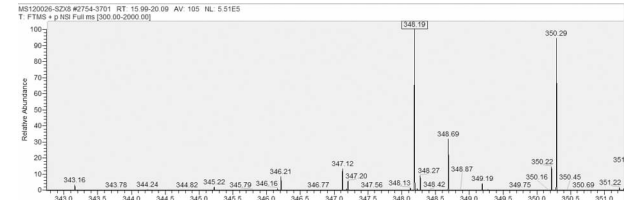


图 2 GLU-C 胞内蛋白酶酶解后的 HbA0 的质谱峰

2 结 果

2.1 经 SDS-PAGE 胶电泳,相对分子质量为 65×10^3 左右的

血红蛋白条带经酶解后明显变浅或消失,证实两种蛋白酶均能很好地完成对血红蛋白的消化且 Lys-C 胰蛋白酶在较高浓度糖化血红蛋白时酶解蛋白的效率优于 GLU-C 胞内蛋白酶(见图 5)。H、L 为未经酶解的标本, $Hb = 50 \text{ mg/mL}$,糖化血红蛋白浓度经 IFCC 方法定值分别为 $L = 3.4356 \text{ mmol/mL}$, $H = 7.9210 \text{ mmol/mL}$;TH、TL 为经 Lys-C 胰蛋白酶酶解的标本;GH、GL 为经 GLU-C 胞内蛋白酶酶解的标本。

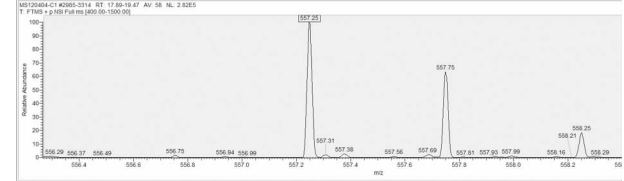


图 3 Lys-C 胰蛋白酶酶解后的 HbA1c 的质谱峰

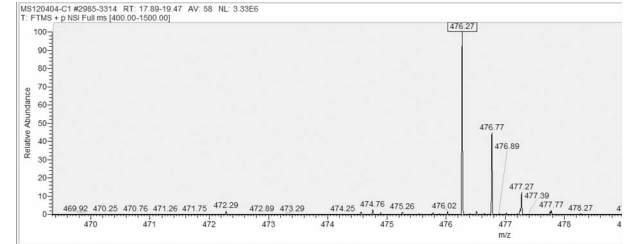


图 4 Lys-C 胰蛋白酶酶解后的 HbA0 的质谱峰

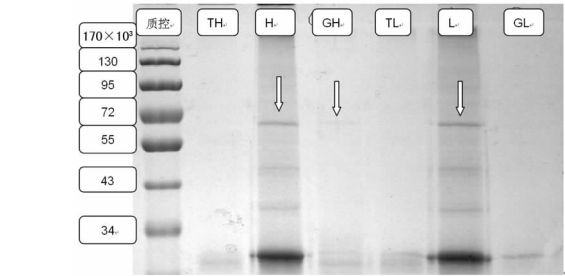


图 5 标本酶解前后 SDS-PAGE 胶电泳结果

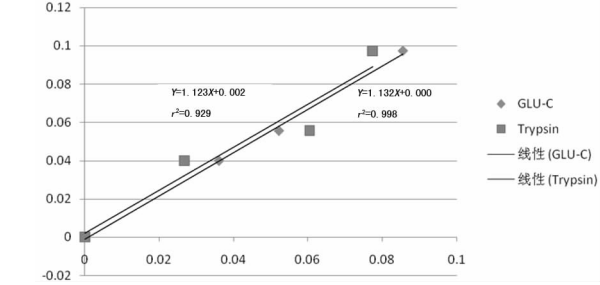


图 6 两种蛋白酶测定糖化血红蛋白的标准曲线

表 2 经两种蛋白酶酶解后测定糖化血红蛋白结果的比较

分组	IFCC 方法均值	Lys-C 胰蛋白酶	GLU-C 胞内蛋白酶
L	3.435 6	3.470 5	3.312 3
M	5.645 5	5.676 1	5.454 1
H	7.921 0	7.838 6	7.739 7

2.2 HbA1c 标准曲线由 0.000%、3.842%、5.268%、8.874% 4 个浓度组成,经溶液内酶解后,等量分装, -70 ℃ 冰箱冻存。每次实验前各取出 1 瓶,室温溶解,经 oasis HLB C18 固相萃取柱清洁及除盐后,真空离心压缩机抽干,0.1%甲酸复

溶后,经质谱仪检测,每瓶即为 1 批,每批重复测定 2 次,取平均值,绘制标准曲线(见图 6)。

2.3 经 LTQ-Orbitrap Velos 质谱仪分析后,对检测结果的均值进行计算绘制相关曲线,结果见表 2、图 7。

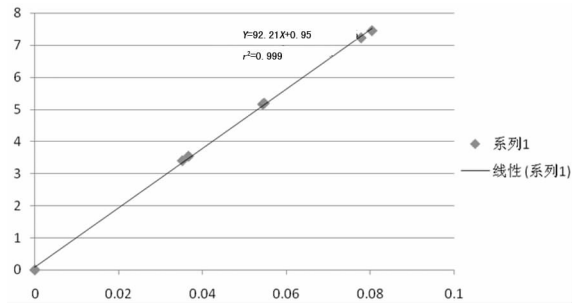


图 7 经两种蛋白酶酶解后测定糖化血红蛋白结果的比较

3 讨 论

2010 年,《新英格兰医学杂志》发表了中日友好医院杨文英教授牵头进行的全国糖尿病流行病学调查,根据这次调查结果推算我国糖尿病患者数已达 9 200 万,居世界首位,另外还有糖尿病前期患者 1.48 亿^[2]。在我国绝大多数糖尿病患者为 2 型糖尿病,由于生活方式的不同,城乡患病率差异很大,由此引起的糖尿病慢性并发症的控制率不足。在以 DCCT^[3] (Diabetes Control and Complications Trial)和 UKPDS^[4] (UK Prospective Diabetes Study)对糖尿病患者的临床测试数据显示,糖尿病的根本核心问题是血管并发症的发生,所以临床上就要求对糖尿病的诊断标准不仅仅是有利于糖尿病的早期发现,更应有利于糖尿病并发症的早期发现和预防,而根据 UKPDS 研究发现,糖尿病并发症的减少和糖化血红蛋白的降低有关,并证实糖化血红蛋白的微小降低可明显减少糖尿病相关病死率及慢性并发症的发生。美国糖尿病协会(ADA)在 2010 年初发布的糖尿病诊疗指南中建议以 HbA1c $\geq 6.5\%$ 作为非妊娠期糖尿病的诊断标准^[5]。在国内,也有不少学者提出类似主张,但对其测定方法意见不一^[6-8]。

目前,国际上定义糖化血红蛋白化学构成为葡萄糖稳定的连接在血红蛋白 β 链 N 末端缬氨酸(Val)残基上,即血红蛋白(血液)-N-(1-脱氧果糖基)血红蛋白 β 链(β N-1-deoxyfructosyl-hemoglobin)^[9]。书面表达使用“HbA1c”,也可以简写成“A1C”。根据美国病理工作者协会(College of American Pathologists, CAP)和 PT(proficiency testing)数据显示,有将近 30 种不同的方法检测糖化血红蛋白,其检测原理主要为基于电荷不同的液相色谱的方法和基于结构的不同的亲和层析法,但是,这些常规方法在血红蛋白变体存在的情况下,对检测系统产生干扰,虽经过多年技术上的改进,检测不精密度(CV) $<1\%$ 、分辨率有了明显提高,基本可以达到临床需求,但是非特异性的问题仍然不能完全克服^[10-11]。鉴于此,IFCC 在 1997 年建立了 HbA1c 标准化工作组,旨在研究一个可供溯源的参照系统,研发 HbA1c 参考物质和参考方法,该工作组历时 5 年的探索,经过多家实验室的努力,于 2002 年推出了一套 HbA1c 参考方法^[1],是目前为止特异性较好的测量糖化血红蛋白的方法之一。

Lys-C 胰蛋白酶是丝氨酸蛋白酶,可特异性地切开赖氨酸和精氨酸残基的羧基端。天然胰蛋白酶易于自我水解^[12],产

生假胰蛋白酶,存在于胰蛋白酶制剂中的这些自我水解产物能产生多余的肽片段,从而干扰质谱检测到的片段的数据分析,由于 Trypsin 存在自身酶解的现象,IFCC 推荐使用 GLU-C 胞内蛋白酶用于糖化血红蛋白的酶解,本研究选用 Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade(胰蛋白酶,质谱分析级),已经过还原甲基化修饰,成为活性高且稳定的分子,抗拒自我水解的性能特别强。由 SDS-2D-PAGE 胶电泳可见血红蛋白条带经酶解后明显变浅或消失,证实两种蛋白酶均能很好的完成对血红蛋白的消化且 Lys-C 胰蛋白酶在较高糖化血红蛋白浓度时酶解蛋白的效率优于 GLU-C 胞内蛋白酶,通过应用 LTQ-Orbitrap Velos 质谱仪对样本中糖化血红蛋白进行定量分析,经实验证实,两种蛋白酶消化血液标本后,均可以获得比较一致的结果,推荐可以使用文中所列方法将 Trypsin Gold 作为质谱法检测糖化血红蛋白的特异性水解酶。

(致谢:感谢清华大学生命科学院邓海腾教授及实验室全体老师和同学在实验过程中给予的帮助和指导;感谢清华大学生命科学院质谱室工作人员对整个实验的支持和帮助)。

参考文献

- [1] Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(1): 78-89.
- [2] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [3] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus[J]. N Engl J Med, 1993, 329(14): 977-986.
- [4] UK Prospective Diabetes Study(UKPDS)Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes(UKPDS 33)[J]. Lancet, 1998, 352(9138): 837-853.
- [5] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2010[J]. Diabetes Care, 2010, 33(Suppl 1): S11-61.
- [6] 邓兆享,彭杰雄,钟惠霞.糖化血红蛋白、空腹血糖和 50g 糖筛查对妊娠期糖尿病诊治的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 153-155.
- [7] 赖基贤,江文庆,赖胜华,等.糖化血红蛋白在糖尿病诊断中的临床意义[J]. 临床医学, 2011, 31(2): 53-54.
- [8] 喻芳菊.三种糖尿病评估方法分析[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(5): 575-576.
- [9] International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC Scientific Division, Nordin G, et al. Recommendation for term and measurement unit for "HbA1c"[J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(8): 1081-1082.
- [10] 宋智心,许国宾,马怀安,等.糖化血红蛋白测定的标准化现状[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(6): 497-500.
- [11] 居漪.糖化血红蛋白检测技术和质量控制[J]. 临床检验, 2011, 25(11): 914-917.
- [12] Key J, Kassell B. The autoactivation of trypsinogen[J]. Biol Chem, 1971, 246(21): 6661-6665.