技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)06-0894-03

反相高效液相色谱法分析肝癌血清蛋白质组

罗 婵,黄丽华,母昭德
(重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立肝癌血清蛋白质组 RP-HPLC 技术筛选肝癌血清差异蛋白质。方法:8 例肝癌和 20 例正常组血清样品采用 Agilent 高丰度蛋白质分离系统洗脱白蛋白等高丰度蛋白质后,样品采用色谱柱 ZORBAX 300SB-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm)分离,以 A=0.1%三氟乙酸溶液,B=0.09%三氟乙酸乙腈为流动相梯度洗脱,在波长 280 nm 处检测。结果:在肝癌血清和健康志愿者血清的 RP-HPLC 图谱中存在一组疏水性较强的差异蛋白质。结论:建立的血清蛋白质 RP-HPLC 技术可以发现肝癌发生发展过程中血清蛋白表达谱质的变化,从而为肝癌的早期诊断及治疗打下基础。

【关键词】血清蛋白质组学;蛋白质组;RP-HPLC
【中国图书分类法分类号】R446.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-23

Establishment of reversed-phase high-performance liquid chromatography for serum proteomics

LUO Chan, et al
(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmaceutical, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To improve the early diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC), a reversed-phase high-performance liquid chromatography(RP-HPLC)was employed to identify the differential proteins of serum related to HCC. *Methods*: The sera from 20 healthy volunteers and 8 HCC patients were collected. After the depletion of six serum proteins of the highest abundance with the Multiple Affinity Removal System (MARS) technologies from Agilent, the sera were subjected to RP-HPLC. The chromatographic conditions were: analytical column: ZORBAX 300SB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); column temperature, 25℃; the elution was performed with linear gradient elution of A: 0.1% trifluoroacetic acid water solution and B: 0.09% trifluoroacetic acid ACN solution at a flow rate of 0.75 ml/min. The detection wavelength was 280 nm. The time procedure was: 1%B was held 3 min, then the gradient ran from 1 to 100% B in 100 min, then was held for another 10 min, at last, the gradient ran from 100 to 1%B in 5 min and was held for another 5 min. *Results*: There was a group of differential proteins of strong hydrophobicity in the serum between healthy persons and patients. *Conclusion*: This method can be useful in detecting protein expression alteration resulting from the carcinogenesis and development of HCC, and newly discovered biomarkers might be an aid in the early diagnosis and therapy of HCC.

【Key words】Serum proteomics; Proteome; RP-HPLC

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是临床常见的恶性肿瘤,在我国其死亡率占全球肝癌死亡人数的 53%[1]。而传统的甲胎蛋白(Alpha fetoprotein, AFP)对肝癌诊断的特异性和灵敏性均不高。因此,寻求新的 HCC 早期诊断指标是 HCC 相关研究的一大热点。在 HCC 的比较蛋白质组学研究中应运的主要技术是双向凝胶电泳(Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DE)和质谱(Mass spectrometry, MS),但是 2-DE 对于膜蛋白、强疏水性蛋白的有效分离还存在困难,使其对疾病标志物的识别具有一定的局限性。本研究建立的 RP-HPLC 法分析肝癌病人血清蛋白质组分的方法,可以有效的分离强疏水性蛋白,具有灵敏度高,分辨率好,准确度高,自动化程度高,适于在线分离复杂样品(如血液中低丰度蛋白质组的研究)等优点,为肝癌血清特异蛋白质的寻求提供了一种新的途径,同时也为肝癌早期诊断方法的建立提供了一定的依据。

作者介绍:罗 婵(1985-),女,硕士,
研究方向:药物分析。
通讯作者:母昭德,女,副教授,E-mail:MZD2008@tom.com。
基金项目:重庆市自然科学基金项目资助(编号:CSTC,2008BB5398)。

1 材料和方法

1.1 研究材料

健康自愿者血清(重庆医科大学附属第二医院),肝癌患者血清(重庆医科大学附属第一医院)。

1.2 主要试剂和仪器

安捷伦高效液相色谱仪(Agilent-1 100 系列),配置有

Agilent 1 100 四元泵(带真空脱气机),Agilent 1 100VWD 检测器,化学工作站 Agilent l 100 Chemstation(Rev.09.01);安捷伦高丰度蛋白质分离系统 Multiple Affinity Removal System (MARS),4 ml 蛋白质离心浓缩柱 (5×10^3 D),0.22 μm 血清过滤柱,ZORBAX 300SB-C18(250 mm × 4.6 mm,5 μm)色谱柱,缓冲溶液 A,缓冲溶液 B 均购自安捷伦公司;尿素,硫脲,购自上海生工,碳酸氢胺为 Sigma 产品,Millipore 去离子水,色谱纯乙腈(江苏汉邦),KDC-160HR 高速冷冻离心机。

1.3 研究方法

1.3.1 血清样品的收集[2] 健康人对照组:取健康志愿者 20 例,13 例男性,年龄 30 ~ 65 岁,平均(52.3 ± 6.9)岁 HIV、HBV、HCV 和梅毒均为阴性。肝癌患者组:取肝癌患者 8 例,7 例男性,年龄 33 ~ 73 岁(52.5 ± 7.4)岁(表 1)。两组均在空腹时抽静脉血 3 ml,4℃下 4 000 r/min 离心 15 min,上清液在 4℃下 2 400 r/min 离心 5 min 后,分装到硅烷化 EP 管中,-80℃保存备用,其中健康对照组为混合血清。

1.3.2 血清中高丰度蛋白质的去除 按供货商说明书去除血清中的高丰度蛋白质(白蛋白、免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 A、触球蛋白、α-1- 抗胰蛋白酶、转铁蛋白),得到 4 ml 含低丰度蛋白质的溶液,用蛋白质离心浓缩柱(5×10^3 D)在 4℃下 6 600 r/min 离心到大约 200 μl,样品溶液用 20 mmol/L NH_4HCO_3 (pH8.5) 缓冲溶液交换,Bradford 法测定蛋白质浓度,样品用 9 mol/L 尿素和 2 mol/L 硫脲溶液稀释为 50 ng/μl,-80℃保存,备用。

1.3.3 RP-HPLC 分析 色谱柱 ZORBAX 300SB-C18(250 mm × 4.6 mm,5 μm),是可在低 pH(0.8 ~ 8)下使用并免受损害的一种烷基反相柱。流动相为:A=0.1%三氟乙酸溶液,B=0.09%三氟乙酸乙腈;时间程序:开始时 1%B,保持 3 min;到 100 min 时增加至 100%,保持 10 min,到 115 min 时降低至 1%,至 120 min 结束。流速为 0.75 ml/min;检测波长:280 nm;进样量:100 μl;柱温:25℃。

表 1 8 例肝癌病人临床资料

序号	年龄	HBsAg/HBsAb	HBeAg/HBeAb	HBcAb/HCVAb	AFP(ng/ml)
1	46	-/-	-/-	+/-	6.37
2	30	+/-	+/-	+/-	3.95
3	56	+/-	-/+	+/-	1.9
4	49	+/-	-/-	+/-	21.3
5	65	+/-	+/-	+/-	24.32
6	50	+/-	-/-	+/-	1.91
7	54	+/-	-/-	+/-	32120
8	59	+/-	-/+	+/	668.63

2 结 果

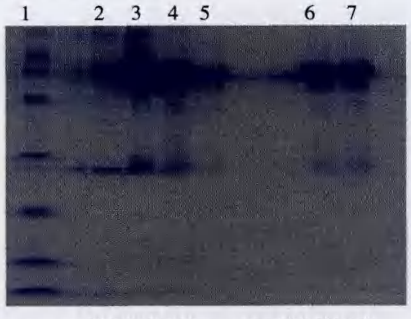
2.1 样品处理

疾病标志物常常是在疾病过程中由机体分泌到血清中的低丰度蛋白质[3],然而占血液总蛋白含量 80%以上的白蛋白等几种高丰度蛋白质的存在,给从血液样品中寻求疾病标志物造成了极大的麻烦,因此去除血液中少数几种占主要含量的高丰度蛋白质是分析低丰度蛋白质,尤其是作为疾病标志物的低丰度蛋白质的关键。目前去除高丰度蛋白质的方法较多[4-7],然而 Agilent 的高丰度蛋白质分离系统以其特异性高、重现性好、非特异键合低、使用寿命长等特点,已成为人类血浆蛋白质组计划(Plasma proteome project,PPP)推荐为分离纯化血液中低丰度蛋白质的主要技术手段[8],通过该技术处理样品后,血清中低丰度蛋白质得到较好的分离和浓缩(图 1)。

2.2 血清样品 RP-HPLC 色谱图

从图 2 中看出,未加血清蛋白质的试剂空白在选定的色谱条件下无干扰样品测定的成分。

将健康对照组混合血清和 8 例肝癌患者血清样品采用 1.3.1 和 1.3.2 方法处理,然后按 1.3.3 的色谱条件进行分析,发现二者之间存在一组具有显著性差异的色谱峰(图 2)。其中的色谱峰 2、3、4 峰面积总和在肝癌患者中明显高于健康人色谱峰 1 的峰面积,将健康志愿者混合血清重复进样 3 次,得到色谱峰 1 峰面积的平均值为 96.67(SD 为 10.45),8 例患者血清分别进样,得到色谱峰 2、3、4 峰面积总和的平均值为 568.07 (SD 为 82.37)(8 例血清样品中色谱峰 2、3、4 的阳性检出率为 4/8),将二者峰面积的平均值进行统计学处理(秩和检验),$P<0.05$,表明二者之间具有显著性差异。

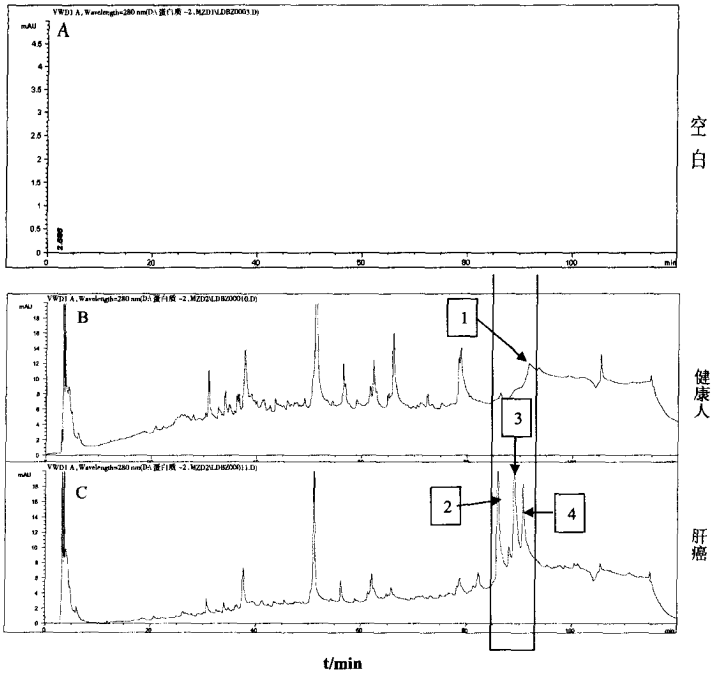


Lane1. 分子量标记;Lane2. 低丰度蛋白;
Lane3、4. 原 血;Lane5、6、7. 高丰度蛋白

图 1 血清 SDS-PAGE 图谱

3 讨 论

临床上以病人 AFP 大于 400 ng/ml 作为肝癌的诊断指标,但是从表 1 中可以看出,肝癌病人的 AFP 不一定都大于 400 ng/ml,因此 AFP 作为肝癌的诊断指标准确度差,同时该指标还具有特异性低、预后差等缺陷,因此单一采用 AFP 诊



A.空白溶剂；B.健康志愿者血清；C.肝癌患者血清

峰 1 健康人血清中低表达蛋白差异色谱峰；峰 2、3、4 肝癌患者血清中高表达差异色谱峰

图 2 血清蛋白质色谱图

断 HCC 容易造成漏诊和误诊，本研究为肝癌诊断提供了一种新的思路，同时为肝癌诊断新方法奠定了一定的基础。

在蛋白质组研究中，样品质量的高低往往是决定实验成败的关键因素，特别对比较蛋白质组学来说，样品制备过程中如果带入一些人为差异，易导致结果的误判。本研究样品制备的关键在于：血液样品中的高丰度蛋白质的去除，低丰度蛋白质的浓缩。为此选用 HUPO PPP 计划推荐的安捷伦 MARS，同时去除血液中 6 种高丰度蛋白质，严格操作，保证样品制备具有良好的重复性。

2-DE 的技术虽然很成熟，但重复性和稳定性仍然是 2-DE 技术存在的主要问题，而且它复杂的实验过程和大量的样本需求不适应大规模的标本检测，限制了 2-DE 直接用于临床检测，同时 2-DE 对于膜蛋白、强疏水性蛋白的有效分离也还存在困难，使其对疾病标志物的识别具有一定的局限性。在本研究中肝癌患者血清样品中存在的色谱峰 2、3、4 是一组疏水性较强的蛋白质，该强疏水性差异蛋白质组分是不能通过 2-DE 方法分析得到的。这种蛋白质分布的差异，应是由于肝癌病变所引起，对该组差异蛋白质的进一步分离、鉴定以及相关蛋白质的生物学功能分析，可以识别到血清中肝癌的特异蛋白，这将为肝癌标志物的寻求、肝癌药物的开发以及肝癌的机制研究提供有效的理论依据。

为增加蛋白质的溶解度，样品处理中加入了一定量的三氟乙酸。

试验中发现，蛋白质在 280 nm 和 210 nm 处均有较好的吸收，由于在 210 nm 处存在大量的干扰峰样，故选择 280 nm 作为最大吸收波长。

为减少蛋白质在色谱柱中的沉积，延长色谱柱的使用寿命，样品采用低浓度、大体积方法进样，同时要保证色谱柱有足够的冲洗时间。

参 考 文 献

[1] 张思维，李连弟，鲁凤珠，等.中国 1990~1992 年原发性肝癌死亡调查分析[J].中华肿瘤杂志，1999，21(4)：245-249.

[2] Li X, Gong Y, Wang Y, et al. Comparison of alternative analytical techniques for the characterisation of the human serum proteome in HUPO plasma proteome project [J]. Proteomics ,2005, 5(13):3423-3441.

[3] Petricoin E F, Paweletz C P, Liotta L A. Clinical applications of proteomics: protemoic pattern diagnostics[J].Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002,7(4):433-440.

[4] Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, et al. Differences among techniques for high-abundant protein depletion[J].Proteomics, 2005, 5(13): 3304-3313.

[5] Fountoulakis M, Juranville J F, Jiang L, et al.Depletion of the high-abundance plasma proteins [J].Amino Acids, 2004, 27(3-4):249-259.

[6] Chromy B A, Gonzales A D, et al. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins [J].Proteome Res, 2004, 3(6):1120-1127.

[7] Rothemund D L, Locke V L, Liew A, et al.Depletion of the highly abundant protein albumin from human plasma using the Gradiflow[J]. Proteomics, 2003, 3(3):279-287.

[8] Omenn G S, States D J, Adamski M, et al. Overview of the HUPO plasma proteome project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database [J].Proteomics, 2005, 5 (13):3226-3245.

(责任编辑：关蕴良)