

两种蛋白芯片筛选血清蛋白标志物的对比分析

徐明辉, 邓敬恒, 李 山, 李 梅, 李若林, 王茂水, 秦 雪

基金项目: 广西医疗卫生重点科研课题(桂卫重 200627)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院临床医学实验部(徐明辉, 李 山, 李 梅, 李若林, 王茂水, 秦 雪); 广西医科大学公共卫生学院(邓敬恒)

作者简介: 徐明辉(1983-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 临床免疫学。电话: 13481013313, E-mail: fangfang8307@163.com

通信作者: 秦 雪, E-mail: qinxue919@163.com

[摘要] 目的 从 CM10、IMAC3-Cu 这两种芯片中选择适合应用于血清蛋白质指纹图谱研究的芯片种类。方法 选择慢性乙型肝炎患者、肝硬化患者和健康人血清各 13 例, 采用 CM10、IMAC3-Cu 两种蛋白芯片, 经 SELDI-TOF-MS 技术对样本进行检测比较。结果 在 2000-50000Da 范围内, CM10 和 IMAC3-Cu 芯片在各实验组捕获的有效蛋白峰数的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 CM10 能得到更多慢性乙型肝炎患者、肝硬化患者和健康人的有意义的蛋白峰值, 能更好的应用于血清蛋白组学的实验研究。

[关键词] 蛋白质组学; 表面增强激光解吸/电离时间飞行质谱; 蛋白质芯片

[中图分类号] Q 753 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2009)04-0333-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.04.004

Comparative analysis of two kinds of protein chips on screen of serum protein markers XU Ming-hui, DENG Jing-huan, LI Shan, et al. The Clinic Laboratory Department of the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China

[Abstract] Objective To select a suitable protein chip for detection of serum protein fingerprint from two kinds of chips(CM10 and IMAC3-Cu). Methods Serum samples from 13 patients with chronic hepatitis B, 13 patients with liver cirrhosis and 13 normal control people were collected respectively, peptide spectra were determined by SELDI-TOF-MS measurement. Results In the range from 2000Da to 50000Da, the number of significant protein peaks captured in each experimental group has a significant difference between CM10 and IMAC3-Cu chips($P < 0.05$). Conclusion CM10 chips can detect more significant difference protein peaks compared with IMAC3-Cu chips and preferably apply to the research of the serum protein fingerprints.

[Key words] Proteomics; Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; Protein chip

蛋白质是基因和细胞功能的执行者, 近年来开展的蛋白质组学(proteomics)研究是后基因组时代的重要研究领域^[1]。晚近 Hutchins 和 Yip 提出了一种新的质谱技术表面增强激光解吸/电离时间飞行质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)^[2], 又称蛋白指纹图谱技术, 具有大规模、超微量、高通量、全自动筛选蛋白质等方面的特点, 为蛋白质组学研究提供了一种高效的研究方法。蛋白

质芯片按其结合蛋白质的不同可以分为不同类型, 由于不同样品的盐离子浓度、pH 值、蛋白质种类不同, 因而需根据样品的特征选择不同的芯片^[3]。为了寻找适合慢性乙型肝炎和肝硬化患者血清蛋白质指纹图谱研究的芯片种类, 我们对弱阳离子交换型芯片(CM10)和固定金属亲和芯片(IMAC3-Cu)做了以下对比实验, 报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 血清样品 血清标本均来自广西医科大学第一附属医院,其中肝硬化患者 13 例,男性 10 例,女性 3 例,平均 (30.2 ± 10.8) 岁;慢性乙型肝炎患者 13 例,男性 10 例,女性 3 例,平均 (31.2 ± 9.5) 岁。健康人组 13 例,为同时期体检中心的健康体检者,平均 (31.0 ± 9.8) 岁。以上血清在抽取后均放置 4℃ 冰箱 1~2 h 使血液自然凝固析出血清,3000 rpm 离心 10 min,分装放 -80℃ 低温冰箱保存。

1.1.2 试剂和仪器 尿素、无水醋酸钠、乙腈、二硫苏糖醇 (DTT)、聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton x-100)、磷酸盐缓冲液 (PBS)、羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、三氟乙酸 (TFA) 和 SPA (sinapinic acid) 均购自美国 Sigma 公司;蛋白芯片生物系统 (PBS II-C)、蛋白芯片、CM10、IMAC3-Cu 均购自 CIPHERGEN 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CM10 芯片操作步骤

1.2.1.1 标本的处理: -80℃ 冰箱中取出血清样品,置冰盒上溶解;以 10000rpm,4℃ 离心 5min;取血清 10 μ l,加入 2 倍体积 U9 缓冲液(含 DTT)混匀;冰浴 300rpm 震荡 30min,加入 360 μ l 结合缓冲液(50mM NaAC, pH4.0)冰上混匀。

1.2.1.2 芯片的预处理和上样: 将 CM10 芯片装入生物芯片处理器,每孔加入 200 μ l 结合缓冲液(50mM NaAC, pH4.0)处理 2 次,每次置振荡器 300rpm 震荡 5min,甩掉缓冲液。加入 100 μ l 样品,室温震荡 1h。甩去样品,用结合缓冲液清洗芯片 2 次,每次 5 min,每孔加入去离子水 200 μ l,然后立刻甩出。干燥后分两次加 0.5 μ l 饱和 SPA,干燥待测。

1.2.2 IMAC3-Cu 芯片操作步骤

1.2.2.1 标本的处理: 置冰盒上溶解血清样品,以

10000rpm,4℃ 离心 5min。取血清 10 μ l,加入 2 倍体积 U9 缓冲液(不含 DTT)混匀。其余步骤同 CM10 芯片。

1.2.2.2 芯片的预处理和上样: 在 IMAC3-Cu 芯片加样点表面加 10 μ l 的 100mM CuSO_4 溶液 2 次,每次放入湿盒 10 min,然后放入去离子水中振荡若干次,取出后甩干。加 10 μ l 的醋酸钠 (50 mM, pH4.0) 溶液,放入湿盒 5min。再放入去离子水中振荡,取出后甩干。将芯片装入生物芯片处理器,每孔加入 200 μ l 结合缓冲液(0.05% Triton x-100, 250 mM NaCl in 1 $\times$ PBS)处理 2 次,每次震荡 5 min,甩掉缓冲液。加入 100 μ l 样品,4℃ 震荡 1 h。甩去样品,用结合缓冲液清洗芯片 2 次,每次 5 min。每孔加入去离子水 200 μ l,然后立刻甩出。干燥后分两次加 0.5 μ l 饱和 SPA,干燥待测。

1.2.3 蛋白芯片检测 采用 PBS II-C 型蛋白芯片阅读仪读取芯片信息。用加有标准蛋白质的 All-in-one 芯片校正仪器,使分子量偏差至 0.1% 范围内。用 Ciphergen ProteinChip3.2 软件采集数据,所有原始数据先用该软件做校正(总离子强度及分子量的均一),将所有样本 2000m/z 以上的质荷比峰,用软件的 biomarkwizard 过滤噪音,并应用 Ciphergen Biosystems 软件对三组图谱进行比较分析。

1.3 统计学方法 计量资料以均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用配对 t 检验,应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 利用 CM10, IMAC3-Cu 两种蛋白质芯片,分别对 13 例肝硬化患者、13 例慢性乙型肝炎患者和 13 例健康人血清进行 SELDI-TOF-MS 检测,其中的部分蛋白指纹图谱见图 1~3。

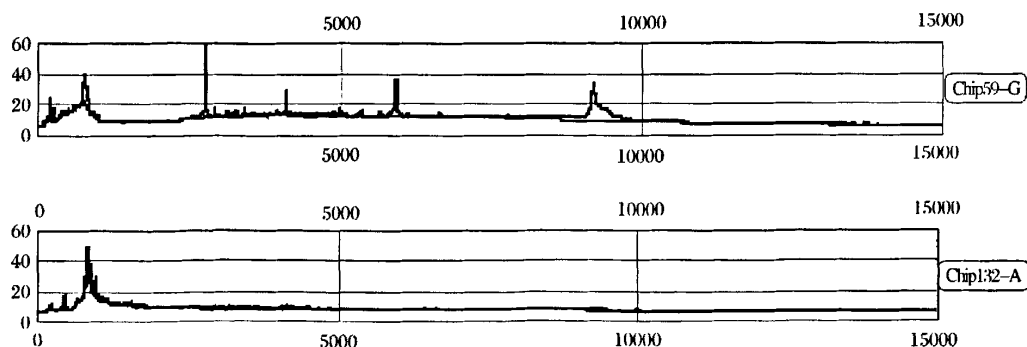


图 1 慢性乙型肝炎病毒感染后肝硬化患者部分血清蛋白指纹图谱
(Chip59-G 为 CM10 芯片检测到的蛋白峰, Chip132-A 为 IMAC3-Cu 芯片检测到的蛋白峰)

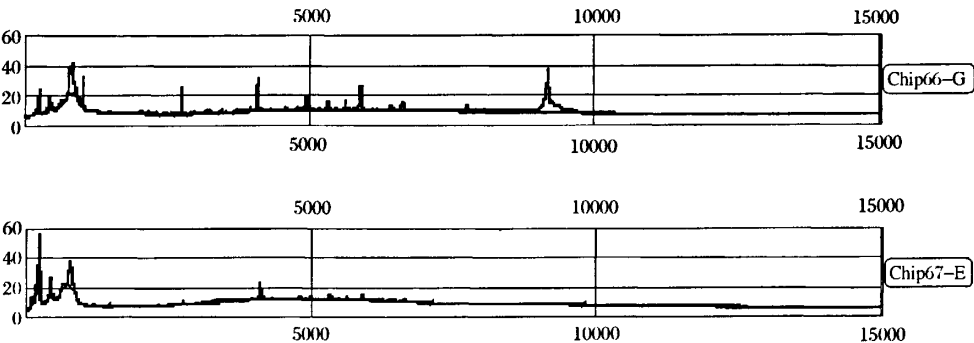


图 2 慢性乙型肝炎病毒携带者部分血清蛋白指纹图谱
(Chip66-G 为 CM10 芯片检测到的蛋白峰,Chip67-E 为 IMAC3-Cu 芯片检测到的蛋白峰)

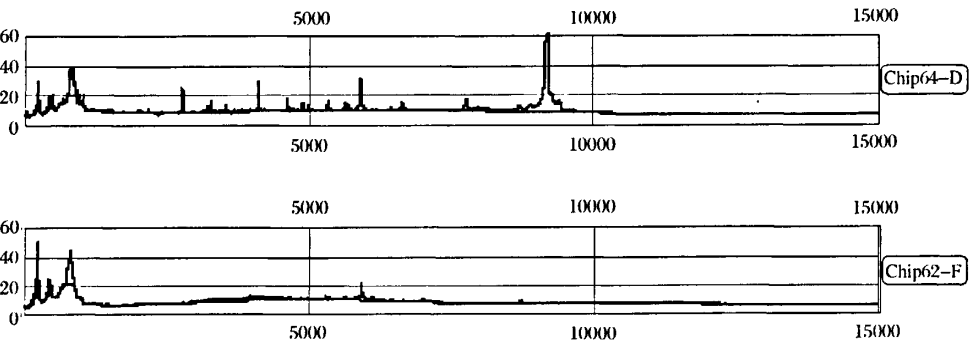


图 3 健康人部分血清蛋白指纹图谱
(Chip64-D 为 CM10 芯片检测到的蛋白峰,Chip62-F 为 IMAC3-Cu 芯片检测到的蛋白峰)

2.2 在 2000 - 50000Da 范围内,应用 CIPHERGEN Biosystems 软件分析两种芯片在各实验组捕获到的有效蛋白峰数并采用 SPSS13.0 统计软件进行配对 *t* 检验,统计结果见表 1。

表 1 CM10 和 IMAC3-Cu 两种芯片在各实验组捕获的蛋白峰数($\bar{x} \pm s$)

组 别	CM10	IMAC3-Cu	<i>t</i>	<i>P</i>
慢性乙型肝炎组	138±9.3	105±8.61	13.942	0.000
肝硬化组	141±14.1	116±15.7	4.124	0.001
健康人组	147±12.3	119±10.8	6.704	0.000

经配对 *t* 检验,CM10,IMAC3-Cu 两种蛋白质芯片在各实验组捕获的有效蛋白峰数的差异均有统计学意义($P<0.05$)。CM10 能得到更多慢性乙型肝炎患者、肝硬化患者和健康人的有意义的蛋白峰值,能更好的应用于实验研究。

3 讨论

3.1 筛选血清小分子蛋白主要选择固定金属亲和结合芯片和弱型阳离子交换芯片,但在经过许多实验比较论证,这两种蛋白芯片之间还是有区别的,具体表现在:CM10 蛋白质芯片由弱羧基阴离子构成活性表面可以和表面带有正电荷的物质结合,如赖

氨酸、精氨酸或组氨酸,用以检测未知的表面带有正电荷的蛋白质或多肽。这类芯片的特点是表面良好的解吸功能和强的亲和与捕获能力,由于在芯片表面掺入了有激光解吸电离基质特征分子,因此激光激发后被结合的蛋白质电离和解吸能力增强^[4];而 IMAC3-Cu 芯片,其表面结合有亚硝基,它可以螯合 Cu 离子,加到芯片表面结合点上的蛋白质通过半胱氨酸等与金属离子结合,主要用于检测磷酸化蛋白及生物标记分子。由于 CM10 芯片结合表面带有正电荷的蛋白质或多肽,而 IMAC3-Cu 芯片只能特异地结合能与 Cu 离子结合的蛋白,因此从理论上 CM10 芯片能比 IMAC3-Cu 芯片结合更多的蛋白。

3.2 在既往的研究也发现弱型阳离子交换芯片(WCX2)比 IMAC3-Cu 芯片结合更多的蛋白。Poon 等^[5]运用 WCX2 蛋白质芯片和 IMAC3-Cu 芯片进行肝细胞癌的研究中发现,在 20 例 AFP<500 μg/L 的肝慢性病患者和 38 例肝癌患者的血清样本中 WCX2 蛋白质芯片可检测到 1297 个蛋白,而 IMAC3-Cu 芯片只检测到 1087 个蛋白。肖雪媛等^[6]在进行肺癌的研究中也发现 WCX2 芯片比 IMAC3-Cu 芯片结合更多的蛋白,她们发现 WCX2

蛋白质芯片可检测到的蛋白平均较 IMAC3 - Cu 芯片所检测到的高出 59.8%。

经过比较实验,我们发现使用 CM10 芯片检测到的蛋白峰确实比 IMAC3 - Cu 芯片多,得到的差异蛋白峰也相应比 IMAC3 - Cu 芯片多。因此,从实际上论证了 CM10 芯片能更好应用于血清蛋白指纹图谱的研究。

参考文献

- 1 翁永强,邱双健,刘银坤,等. 肿瘤标志物的蛋白质组学[J]. 世界华人消化杂志,2004, 12(5):1188-1190.
- 2 Lawrie LC, Fothergill JE, Murray GI. Spot the differences: proteomics in cancer research[J]. Lancet Oncol, 2001,2(5):270-277.

- 3 Tang N, Tornatore P, Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology[J]. Mass spectrom Rev, 2004,23(1):34-44.
 - 4 Yip TT, Lomas L. SELDI ProteinChip array in oncoproteomic research[J]. Technol Cancer Res Treat, 2002,1(4):273-280.
 - 5 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.
 - 6 肖雪媛,卫秀平,何大澄,等. 应用蛋白芯片技术从血清中筛选肺癌标志蛋白[J]. 中国科学(C辑),2003,33(4):323-328.
- [收稿日期 2009-02-24][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

论 著

琥珀酰明胶和羟乙基淀粉血液稀释对肿瘤患者血清电解质和血浆组胺的影响

李文媚, 张 曙, 石海燕

基金项目:东莞市科技局医疗卫生科研项目(编号:B200416)

作者单位:523018 广东,东莞市人民医院麻醉科

作者简介:李文媚(1967-),女,大学本科,医学学士,副主任医师,研究方向:临床麻醉、手术中血液保护。E-mail: liwm10@sohu.com

【摘要】 目的 观察 4% 琥珀酰明胶(succinylated gelatin)和 6% 羟乙基淀粉 130/0.4 (hydroxyethyl starch, 6% HES 130 /0.4)行急性高容量血液稀释(acute hypervolemic hemodilution, AHH)对患者血清电解质及血浆组胺的影响。**方法** 选择食管癌、结肠癌择期手术 60 例,随机分为 G、H 两组($n=30$),G 组输注琥珀酰明胶 15 ml/kg;H 组输注 6% HES 130 /0.4 15 ml/kg。两组患者麻醉诱导后 10 min 开始行 AHH,分别在 AHH 前(T_0),开始 AHH 后 5 min(T_1),开始 AHH 后 30 min(T_2),完成 AHH 后 30 min(T_3),完成 AHH 后 1 h(T_4),完成 AHH 后 3 h(T_5)分别采集静脉血,检测红细胞比容(Hct)和血清电解质 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 的变化及血浆组胺的变化。**结果** (1)血清电解质的变化:组间比较 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 值在各时间点两组间比较差异无统计学意义;组内比较 G、H 两组 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 、 Ca^{2+} 值在 $T_1 \sim T_5$ 时间点与 T_0 时间点比较差异有统计学意义。(2)血浆组胺的变化:组间比较各时间点组胺值 G、H 两组比较差异无统计学意义;组内比较,组胺值与 T_0 比较其余各时间点差异有统计学意义。**结论** 用琥珀酰明胶和羟乙基淀粉实施轻度 AHH 时对血清电解质有一定的影响,但没有明显临床症状,仍可安全应用;两组均可引起血浆组胺轻度升高,但在正常值范围,不引起临床症状。

【关键词】 琥珀酰明胶; 羟乙基淀粉; 急性高容量血液稀释; 组胺

【中图分类号】 R 331 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2009)04-0336-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.04.005

The effect of hemodilution with succinylated gelatin and 6% HES 130/0.4 on serum electrolytes and plasma histamine in cancer patients LI Wen-mei, ZHANG Shu, SHI Hai-yan. Department of Anesthesiology, the