

# 应用 nanoLC/MS/MS 对人羊水的蛋白质组学分析

季煜华<sup>1</sup>, 曾耀英<sup>1</sup>, 周坚<sup>2</sup>, 何贤辉<sup>1</sup>, 邢飞跃<sup>1</sup>, 肇静娴<sup>1</sup>, 朱斌<sup>2</sup>

(1. 暨南大学组织移植与免疫中心, 广东 广州 510632; 2. 何贤纪念医院妇产科, 广东 广州 511400)

**[摘要]** 建立应用 nano LC/MS/MS 技术寻找羊水特异性表达蛋白质的蛋白质组学方法. 羊膜穿刺获取两份正常妊娠晚期的羊水, 通过 Cibacron blue 和 Protein A 吸附去除血清白蛋白和 IgGs, 样品经变性、还原和烷基化后酶解, nano LC/MS/MS 分析, 鉴定了 62 种蛋白质. 通过与已有的羊水和血浆蛋白质表达数据库比对, 从中新发现 22 种只在羊水中表达的蛋白质, 其中 4 种已知是子宫或妊娠特异的. 本研究建立了 nano LC/MS/MS 对羊水进行蛋白质组学分析的方法并发现了一些可能的羊水特异表达蛋白.

**[关键词]** 羊水; 蛋白质组学; nanoLC/MS/MS

**[中图分类号]** R714.12; Q517 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)01-0099-06

## Proteome analysis of human amniotic fluid by nanoLC/MS/MS

Ji Yu-hua<sup>1</sup>, ZENG Yao-yin<sup>1</sup>, ZHOU Jian<sup>2</sup>, HE Xian-hui<sup>1</sup>, XIN Fei-yue<sup>1</sup>, ZHAO Jing-xian<sup>1</sup>, ZHU Bin<sup>2</sup>

(1. Institute of Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Department of Gynecology and Obstetrics, Hexian Hospital, Guangzhou 510632, China)

**[Abstract]** To establish proteome analysis methods for human amniotic fluid (AF) with nanoLC/MS/MS for searching specific protein expressed in AF. Two specimens of normal AF were collected by trans-amniotic puncture, albumin and IgGs were depleted by Cibacron blue and protein A adsorption, then the protein samples were denatured, reduced, alkylated, digested and analyzed by nano LC/MS/MS. The proteins identified in the present study were compared with the proteins already identified in AF and human plasma. 62 proteins identified in the present study, among which 22 were the new found proteins exclusively presented in AF, 4 of them had already been described to be placenta or pregnancy specific. In the present study we establish proteome analysis methods for human amniotic fluid (AF) with nanoLC/MS/MS and find several possible AF specific protein candidates.

**[Key words]** amniotic fluid; proteomics; nanoLC/MS/MS

羊水(amniotic fluid, AF)对于胎儿的正常发育至关重要,其生成量和成分与胎儿的发育、胎盘和羊膜腔的功能密切相关<sup>[1]</sup>. 虽然对其成分及生理作用进行了深入的研究,也建立了针对  $\alpha$ -fetoprotein、prolactin、hCG 等多种蛋白的免疫分析方法,但目前对胎膜早破 (premature rupture of fetal membranes,

PROM)等多种妊娠相关疾病的早期检测仍缺少公认的标准,寻找更为特异性的标志物成为解决问题的关键. 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生物医学研究中最强有力的工具,蛋白标志物的发现是蛋白质组学的重要应用. 本研究应用 nano LC/MS/MS 建立了对 AF 进行蛋白质组学分析

**[收稿日期]** 2007-11-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30600587); 暨南大学引进人才启动基金(51205066)

**[作者简介]** 季煜华(1972-),男,助理研究员,博士,研究方向:蛋白质组学. E-mail:jiyuhua@tom.com

方法,并发现了一些可能在羊水中特异表达的蛋白,这为进一步寻找羊水的特异标志物奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

DTT、Tris base、测序级胰蛋白酶(promega);超纯尿素(Pierce);乙腈(Merck),甲酸(Fluka);Milli-Q级超纯水( $>18\text{ M}\Omega$ )、离心超滤装置YM3、 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤器(Millipore);碘乙酰胺、白蛋白与IgG去除试剂盒(Aurum™)、Brandford蛋白浓度测定试剂盒(Biorad);低分子质量蛋白Marker(东风丽珠)。

### 1.2 蛋白样品的准备

羊膜穿刺法采集两份正常妊娠晚期(37周)的羊水 $5\text{ mL}$ , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $16\text{ }000\text{ g}$ 离心 $15\text{ min}$ 取上清, $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 过滤后分装 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。离心超滤浓缩样品,按照Aurum™试剂盒的程序操作获得 $400\text{ }\mu\text{L}$ 去除白蛋白和IgG,再次离心超滤浓缩,Brandford法测定蛋白浓度,SDS-PAGE检测高丰度蛋白清除的效果。在 $400\text{ }\mu\text{g}$ 浓缩的样品中加入 $8\text{ mol/L}$ 尿素、 $50\text{ mmol/L}$  Tris-HCl( $\text{pH } 8.0$ )溶液变性,终浓度为 $10\text{ mmol/L}$  DTT  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$   $1\text{ h}$ 还原,终浓度为 $25\text{ mmol/L}$ 碘乙酰胺室温避光 $30\text{ min}$ 进行烷基化修饰,最后用 $100\text{ mmol/L}$  Tris-HCl( $\text{pH } 8.0$ )稀释上述样品使尿素浓度低于 $2\text{ mol/L}$ ,加入质量比为 $1:50$ 的测序级胰蛋白酶, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 $16\text{ h}$ 。

### 1.3 NanoLC/MS/MS 分析

酶解的蛋白样品加入终体积分数为 $0.1\%$ 的甲酸后进行NanoLC/MS/MS分析。Agilent 1100 Nano-flow HPLC系统以trap模式运行,分析柱为C18 Vaydac218MS™( $150\text{ }\mu\text{m}\times 150\text{ mm}$ , Grace),捕获柱为C18 PepMap™( $300\text{ }\mu\text{m id}\times 5\text{ mm}$ , LC Packings),流动相包括溶液A(体积分数 $0.1\%$ 甲酸的水)、B溶液(体积分数 $0.1\%$ 甲酸的乙腈),进样体积 $1\sim 8\text{ }\mu\text{L}$ ,连续梯度洗脱,流速为 $1\text{ }\mu\text{L/min}$ 。分析柱的洗脱梯度设置为 $5\%$  B  $5\text{ min}$ 、 $5\%\sim 40\%$  B  $150\text{ min}$ 、 $40\%\sim 80\%$  B  $1\text{ min}$ , $80\%$  B保持 $10\text{ min}$ 后 $5\%$  B柱平衡 $26\text{ min}$ 。四级杆正交TOF质谱仪(QSTARXL, ABI)获取ESI/MS/MS数据,正离子模式运行,第一次MS扫描范围为 $400\sim 1\text{ }600\text{ m/z}$ ,根据离子强度从第一次MS扫描选择3个母离子(离子强度大于10,电荷数为 $+2\sim +4$ )进行IDA(information dependent acquire),并动态排除选择过的离子,由于在MS/MS IDA(information dependent acquire)过程中母离子选择的随机性,对同一样品进行3次分析。分析前用

酶解的BSA对仪器进行外部校正。

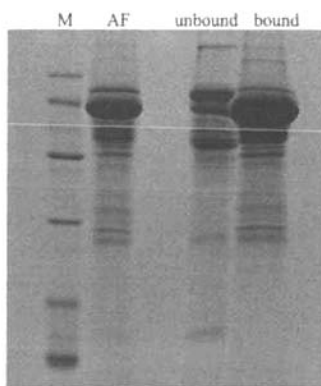
### 1.4 数据分析

肽和蛋白的鉴定通过ProID软件(ABI)进行,数据库为Swiss-Prot,参数设定如下:MS允许误差范围为 $0.15\text{ amu}$ ,MS/MS允许误差范围为 $0.1\text{ amu}$ ,酶漏切位点为1,固定修饰为半胱氨酸甲基化修饰,蛋白鉴定的标准为得分大于1.3(可信度 $>95\%$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 高丰度蛋白的去除

Brandford法测得羊水总蛋白质量浓度为 $1.5\sim 2.0\text{ mg/mL}$ ,其中质量分数 $50\%\sim 70\%$ 的蛋白质为血清白蛋白和IgGs。包括羊水在内的体液样品中存在的这些高丰度蛋白会严重干扰蛋白组学分析,因此分析前需尽可能地去除这些蛋白,目前可以采用的方法包括TCA/丙酮沉淀、亲和吸附、免疫吸附等。本研究所采用的是基于Cibacron blue和protein A分别吸附血清白蛋白与IgGs的方法,SDSPAGE的结果可见大部分的血清白蛋白( $\text{Mw } 66\text{ ku}$ )已被去除(图1)。



M:低分子质量Marker( $97.4, 66.2, 43.3, 31.2, 20.1, 14.4\text{ ku}$ )

AF:羊水;unbound:去除高丰度蛋白后的AF;bound:AF中的血清白蛋白和IgGs

图1 高丰度蛋白去除前后AF的SDS-PAGE

### 2.2 nano LC/MS/MS 对羊水的蛋白组学分析

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步手工操作,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。

近年来在蛋白质组研究中新兴的液质联用(LC/MS/MS)技术因易于与质谱连接,分辨率高、歧视效应小、自动化程度高等优势正成为继2DE/MS技术之后蛋白质组研究最重要的方法。

体液的获取具有非侵入性、易于收集和处理等优点,是研究生物标志物最佳的样品来源<sup>[2]</sup>。PROM的发生率大约为5%,可引起感染和早产,因而早期诊断非常必要,近几年通过对羊水的蛋白质组学分析在PROM等妊娠相关疾病早期诊断标志物的研究中取得了较大进展。Vuadens等<sup>[3]</sup>采用了2DE/MS的方法来比较妊娠妇女的血浆和AF样品,发现了两种只存在于AF而不存在于母体血液的基底膜特异的硫酸类肝素蛋白多糖 perlecan(P98160)和 agrin(O00468)。Nilsson等<sup>[4]</sup>利用LC/FT-ICR/MS分析酶解羊水样品鉴定了43种蛋白,Michel等<sup>[5]</sup>采用OGE/LC/MS/MS从羊水中鉴定了69种蛋白,这也是到目前在羊水蛋白表达谱研究中鉴定蛋白种类最

多的报道,此法首先通过等电聚焦将样品预先分离后然后再进行LC/MS/MS鉴定,这种方法会丢失部分蛋白且过程较为复杂,与Michel的方法相比本研究的方法更为便捷且无蛋白丢失的问题。利用nano-LC/MS/MS本研究从羊水中鉴定了62种蛋白(图2,表1),其中与Michel等<sup>[5]</sup>研究结果相同的32种,不同的30种,这种差异与所采用的技术路线不同有关。Li等<sup>[6]</sup>在研究血清蛋白时也发现不同研究平台所鉴定的蛋白属于不同的亚族,它们之间重叠很小、存在互补的关系;Anderson等<sup>[7]</sup>的研究结果也证实了这一点,通过对来自文献报道、2DE/LC/MS/MS和低分子质量蛋白LC/MS/MS 4种不同来源所获得的人血浆表达蛋白进行了总结和比较,获得到了一个包含1175种蛋白的非冗余血浆蛋白表达数据库,其中仅46种出现在所有的4个来源、195种出现在2个来源,因而采用不同技术路线所获得的结果可以互相印证和补充。

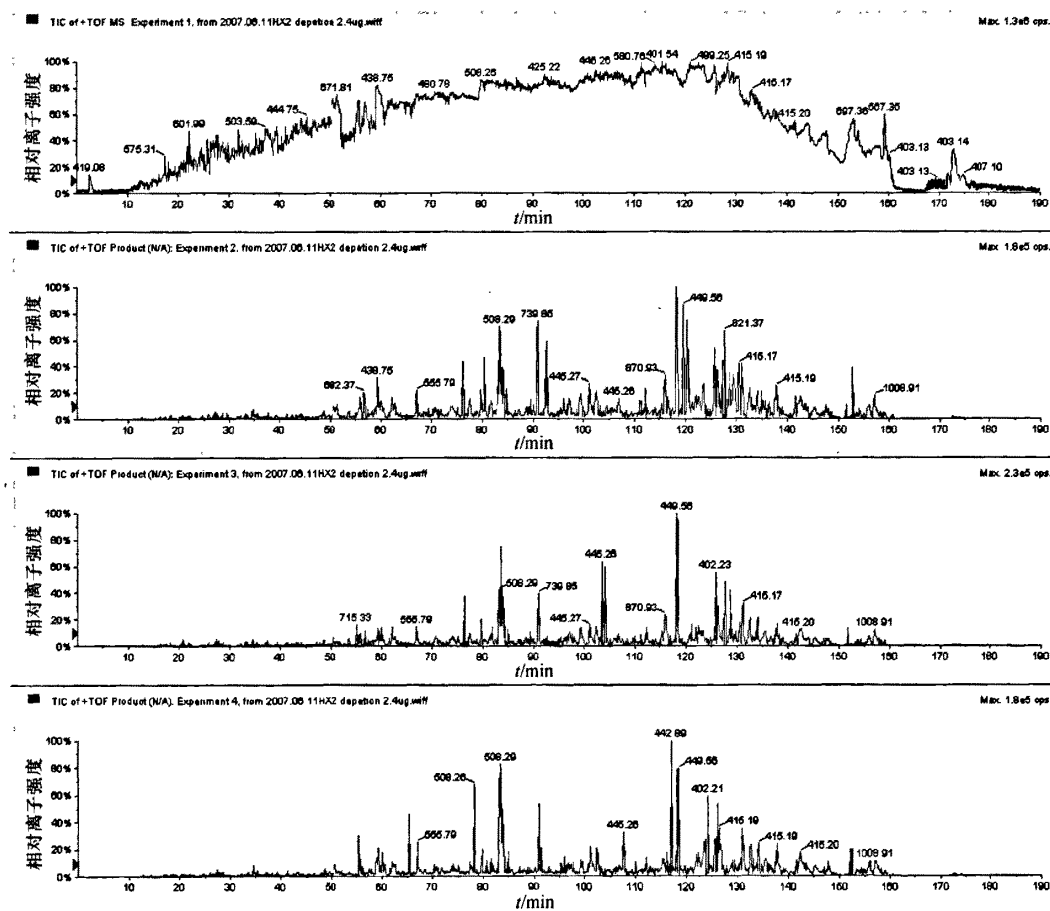


图2 nano LC-MS/MS 分析羊水的总离子流图

表 1 nanoLC/MS/MS 鉴定的蛋白列表及比较

Swiss - Prot accession number	蛋白质名称	纳升液质 联用(62)	OGE/液质 联用 <sup>[5]</sup> (69)	血浆蛋白 <sup>[7]</sup> (1175)
O94832	Myosin Id		x	
P00450	Ceruloplasmin precursor	x	x	x
P00734	Prothrombin precursor	x	x	x
P00747	Plasminogen precursor		x	x
P00751	Complement factor B precursor		x	x
P01008	Antithrombin - III precursor	x	x	x
P01009	Alpha - 1 - antitrypsin precursor	x	x	x
P01011	Alpha - 1 - antichymotrypsin precursor	x	x	x
P01019	Angiotensinogen precursor	x	x	x
P01023	Alpha - 2 - Macroglobulin precursor		x	x
P01024	Complement C3 precursor	x	x	x
P01028	Complement C4 precursor		x	x
P01042	Kininogen - 1 precursor	x	x	x
P01243	Chorionic somatomammotropin hormone precursor	x		
P01833	Polymeric - immunoglobulin receptor precursor		x	x
P01884	Beta - 2 - microglobulin precursor		x	
P02452	Collagen alpha - 1 (I) chain precursor	x		x
P02647	Apolipoprotein A - I precursor	x	x	x
P02652	Apolipoprotein A - II precursor		x	x
P02679	Fibrinogen gamma chain precursor		x	
P02748	Complement component C9 precursor		x	x
P02749	Beta - 2 - glycoprotein I precursor		x	x
P02750	Leucine - rich alpha - 2 - glycoprotein precursor	x		x
P02751	Fibronectin precursor	x	x	x
P02760	AMBP protein precursor	x	x	
P02763	Alpha - 1 - acid glycoprotein 1 precursor	x		x
P02765	Alpha - 2 - HS - glycoprotein precursor	x	x	x
P02766	Transferrin precursor	x	x	x
P02768	Serum albumin precursor	x	x	
P02774	Vitamin D - binding protein precursor	x	x	x
P02787	Serotransferrin precursor	x		x
P02790	Hemopexin precursor	x	x	x
P04004	Vitronectin precursor	x	x	x
P04080	Cystatin - B (Stefin - B)	x		
P04114	Apolipoprotein B - 100 precursor		x	x
P04217	Alpha - 1B - glycoprotein precursor	x	x	
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1		x	
P05154	Plasma serine protease inhibitor precursor		x	x
P05362	Intercellular adhesion molecule 1 precursor	x		x
P05543	Thyroxine - binding globulin precursor	x	x	x
P06702	Calgranulin B		x	x
P06727	Apolipoprotein A - IV precursor	x	x	x
P07093	Glia derived nexin precursor		x	
P07911	Uromodulin precursor	x		
P07988	Pulmonary surfactant - associated protein B precursor		x	x
P08185	Corticosteroid - binding globulin precursor	x	x	x
P08697	Alpha - 2 - antiplasmin precursor	x	x	x
P08833	Insulin - like growth factor binding protein 1 precursor		x	
P09871	Complement C1s subcomponent precursor			
P10451	Osteopontin precursor	x	x	
P10909	Clusterin precursor		x	x

(续表)

Swiss - Prot accession number	蛋白质名称	纳升液质 联用(62)	OGE/液质 联用 <sup>[5]</sup> (69)	血浆蛋白 <sup>[7]</sup> (1175)
P11464	Pregnancy - specific beta - 1 - glycoprotein 1 precursor	x	x	
P11684	Uteroglobin precursor	x		
P12830	Epithelial - cadherin precursor	x		x
P13535	Myosin heavy chain, skeletal muscle perinatal		x	
P13987	CD59 glycoprotein precursor		x	
P14543	Nidogen - 1 precursor	x		
P15144	Aminopeptidase N ( EC 3.4.11.2 )	x		x
P19652	Alpha - 1 - acid glycoprotein 2 precursor	x		
P19801	Amiloride - sensitive amine oxidase [ coppercontaining ] precursor ( EC1.4.3.6 )	x	x	
P19823	Inter - alpha - trypsin inhibitor heavy chain H2 precursor		x	x
P20142	Gastricin precursor ( EC 3.4.23.3 )	x		
P24043	Laminin alpha - 2 chain precursor		x	x
P25054	Adenomatous polyposis coli protein		x	
P25311	Zinc - alpha - 2 - glycoprotein precursor	x	x	x
P31025	Von Ebner's gland protein precursor		x	x
P31947	14 - 3 - 3 protein sigma	x		
P35247	Pulmonary surfactant - associated protein D precursor ( SP - D ) ( PSP - D )	x		x
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9		x	
P36955	Pigment epithelium - derived factor precursor		x	x
P41222	Prostaglandin - H2 D - isomerase precursor ( EC 5.3.99.2 )	x	x	x
P43652	Afamin precursor	x	x	
P46100	Transcriptional regulator ATRX		x	
P51884	Lumican precursor	x	x	x
P55290	Cadherin - 13 precursor	x		
P61916	Epididymal secretory protein E1 precursor	x		
P62742	Hemoglobin subunit gamma - 2	x		
P62988	Ubiquitin	x		
P63104	14 - 3 - 3 protein zeta	x		
P83881	60S ribosomal protein L36	x		
P98160	Basement membrane - specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor	x	x	
Q03519	Antigen peptide transporter 2		x	
Q07654	Trefoil factor 3 precursor	x		
Q08380	Galectin - 3 - binding protein precursor	x		
Q12841	Follistatin - related protein 1 precursor		x	
Q13421	Mesothelin precursor	x	x	
Q14204	Dynein heavy chain, cytosolic		x	
Q14624	Inter - alpha - trypsin inhibitor heavy chain H2 precursor		x	x
Q14644	Ras GTPase - activatingprotein 3		x	
Q5R537	Prothrombin precursor ( EC 3.4.21.5 )	x		
Q6NUJ1	Proactivator polypeptide precursor	x		
Q81WL1	Pulmonary surfactant - associated protein A2 precursor	x		
Q8N3R9	MAGUK p55 subfamilymember 5		x	
Q96JQ0	Protocadherin 16 precursor		x	
Q99570	Phosphoinositide 3 - kinase regulatory subunit 5	x		
Q9H299	SH3 domain - binding glutamic acid - rich - like protein 3	x		
Q9HC84	Mucin - 5B precursor	x		
Q9NTG1	Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly related protein precursor	x		
Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein precursor	x		
Q9Y4C8	Probable RNA - binding protein KIAA0682		x	

通过比较本研究 和 Anderson<sup>[7]</sup> 和 Michel 等<sup>[5]</sup> (表 1 中标注的蛋白),检索 UniProt 等在线蛋白数据库,新检测到了 22 种只在 AF 中表达的蛋白,其中 14 种是分泌型蛋白,其余 8 种分布于细

胞膜、细胞质和细胞核,对这些蛋白的已知功能分别说明以下:与妊娠或子宫相关的分泌蛋白有4种:Chorionic somatomammotropin hormone precursor (P01243),绒毛膜生长催乳激素,类似于生长激素;Uteroglobin precursor (P11684),子宫珠蛋白,是羊水中的一种成分,可以调控囊胚的发育,其表达受孕酮的调控;Trefoil factor 3 precursor (Q07654),是一种由子宫或肠上皮细胞表达的分泌型蛋白,具有促进细胞迁移的作用;Nidogen-1 precursor (P14543)巢蛋白前体1,一种硫化糖蛋白,广泛分布于基底膜,与层黏连蛋白(laminin)紧密相连,值得注意的是它同时还与IV胶原和前面提到的perlecan (P98160)相连,在细胞和胞外基质相互作用中发挥作用。在妊娠初期,羊水主要来自母体,12 W后羊水主要来自胎儿的尿液,胎儿“呼吸”和吞咽羊水有助于其肺和消化道系统的发育。本研究也检测到了4种可能与胎儿相关的分泌蛋白:Mucin-5B precursor (Q9HC84),黏蛋白-5B前体是由支气管腺和颌下腺表达的一种蛋白,是唾液中主要的润滑成分;Uromodulin precursor (P07911),尿调节素前体,是正常人尿液中含量最高的蛋白,其功能尚不了解;Pulmonary surfactant-associated protein A2 precursor (Q8IWL1)肺表面活性剂相关蛋白A2前体,是4种肺表面活性剂相关蛋白之一,参与对微生物的防御;Gastricsin precursor (EC 3.4.23.3) (P20142),胃蛋白酶前体,属于肽酶A1家族,可水解多种蛋白。

其它6种分泌蛋白分别是:14-3-3 protein sigma (P31947),受p53调节的G2/M进程抑制蛋白,主要分布在复层鳞状角质化上皮;Deleted in malignant brain tumors 1 protein precursor (Q9UGM3),在黏膜防御系统、细胞免疫和上皮分化中发挥作用;Alpha-1-acid glycoprotein 2 precursor (P19652), $\alpha$ -1酸性糖蛋白2前体,参与急性期免疫应答的调节。Proactivator polypeptide precursor (Q6NUJ1),激活剂多肽前体,其作用尚不了解;Epididymal secretory protein E1 precursor (P61916),副睾分泌蛋白E1前体,参与精子在副睾中的成熟过程的调节;Galectin-3-binding protein precursor (Q08380),半乳糖凝集素3结合蛋白前体,具有促进整合素介导的细胞黏附,促进宿主对病毒和肿瘤细胞的防御。

其余8种差异蛋白分别是:Cadherin-13 precursor (P55290),是一种依赖钙离子的黏附蛋白,是神经元细胞生长的负性调控因子;14-3-3 protein zeta/delta (P63104),又被称为蛋白激酶C抑制蛋白

1,是一种接头蛋白,可通过识别磷酸化丝、苏氨酸调节被结合对象的活性,参与多条信号通路的调节;60S ribosomal protein L36 (P83881)60S核糖体蛋白L36,也被称为细胞迁移诱导基因6蛋白;SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3 (Q9H299)参与调节谷氧还蛋白生物活性的调节;Ubiquitin (P62988)泛素蛋白;Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 5 (Q99570),三磷酸肌醇激酶(PI3K)调节亚基5;Prothrombin precursor (EC 3.4.21.5) (Q5R537),凝血酶原前体;Hemoglobin subunit gamma-2 (P62742)血红蛋白亚基 $\gamma$ 2。

最后需要说明的是,由于本研究采用“shotgun”的蛋白鉴定策略,差异表达蛋白还需要采用western-blot或其他的方法验证以确定是完整的蛋白还是片段。

#### [参考文献]

- [1] MUSSAP M, FANOS V, PICCOLI A, et al. Low molecular mass proteins and urinary enzymes in amniotic fluid of healthy pregnant women at progressive stages of gestation [J]. Clin Biochem, 1996, 29(1): 51-56.
- [2] VEENSTRA T D, CONRADT T P, HOOD B L, et al. Biomarkers: mining the biofluid proteome [J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4(4): 409-418.
- [3] VUADENS F, BENAY C, CRETATZ D, et al. Identification of biologic markers of the premature rupture of fetal membranes: proteomic approach [J]. Proteomics, 2003, 3(8): 1521-1525.
- [4] NILSSON S, RAMSTROM M, PALMBLAD M, et al. Explorative study of the protein composition of amniotic fluid by liquid chromatography electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. J Proteome Res, 2004, 3(4): 884-889.
- [5] MICHEL P E, CRETATZ D, MORIER P, et al. Proteome analysis of human plasma and amniotic fluid by Off-Gel isoelectric focusing followed by nano-LC-MS/MS [J]. Electrophoresis, 2006, 27(5-6): 1169-1181.
- [6] LI XIAOHAI, GONG YAN, WANG YING, 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.
- [7] ANDERSON N L, POLANSKI M, PIEPER R, et al. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources [J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(4): 311-326.

[责任编辑:黄建军]