

纳升液相色谱-高分辨串联质谱研究 冻存条件对唾液多肽组的影响

徐金玲¹ 洪晓愉¹ 李水明² 王勇^{*2}
(深圳大学生命与海洋科学学院, 深圳市微生物基因工程重点实验室¹,
深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室², 深圳 518060)

摘 要 唾液多肽组学为疾病相关的生物标记物研究提供了新方法,但冻存条件对分析结果的影响并不清楚。本研究采用氧化石墨烯-磷酸镧纳米复合材料分离富集唾液多肽,利用纳升液相色谱-高分辨串联质谱技术,考察唾液样品分别置于-80℃与-20℃冻存 6 个月对唾液多肽组的影响。结果表明,在-80℃冻存条件下的唾液样品中,共鉴定出归属于 33 种蛋白的 429 条肽段;在-20℃冻存条件下的唾液样品中,鉴定出 595 条肽段,对应 31 种蛋白。实验结果表明,相比于-80℃,唾液置于-20℃条件下的新增加肽段主要来源于已有肽段的降解,并且唾液中的蛋白质也发生了一定降解。本研究在肽段序列水平上考察了冻存条件对多肽的影响,结果表明,-20℃冻存条件不适合长期保存用于多肽组分析的唾液样品。本研究结果可为相关医学研究提供借鉴。

关键词 唾液; 多肽组; 纳升液相色谱-高分辨串联质谱; 肽段

1 引 言

唾液是体液生物标志物的重要来源之一,具有易于采集和处理等优点^[1~4]。机体内的生物活性分子可通过主动运输、被动运输或细胞外超滤作用进入到唾液,因此与血液类似,唾液中的成分也与人体生理和病理状态有关,并且二者在组成上具有相关性^[5]。例如,血液蛋白中约 30% 的蛋白质也存在于唾液中,约 20% 唾液总蛋白在血浆中被发现^[6]。

多肽组学是以机体中内源性多肽和低分子量蛋白质为研究对象,研究多肽组的成分、功能、变化规律及其相关联系^[7],与蛋白质组学不同,多肽组通常研究的是分子量小于 10 kDa 的肽段。多肽组学技术的应用之一是寻找生物标记物,例如,有些研究者利用基质辅助激光解吸电离质谱 MAIDI-TOF MS 在膀胱癌^[8]和 IgA 肾病^[9]等疾病的早期诊断中寻找多肽生物标志物。但是,由于不能给出肽段序列,以上方法是主要通过比较不同体系中所检测的肽段分子量差异或者相同分子量肽段离子强度的差异寻找多肽生物标志物,很难给出肽段序列及相应的蛋白质归属。利用纳升液相色谱-高分辨串联质谱技术则不仅可以鉴定肽段序列,还可以给出半定量信息^[10]。唾液多肽组学多与口腔疾病密切相关^[11],例如,唾液中低水平的富酪蛋白(Statherin)与龋齿易感性相关^[12];口腔鳞状细胞癌患者唾液中多肽特性被用于寻找早期的生物标志物^[13]等,但是,唾液多肽组与其它疾病的关系尚需进一步研究。

在实际分析工作中,临床样品的取得和后续的分离分析通常存在一定时间间隔,因而需要冷冻保存,唾液中多肽在保存过程中是否和如何发生变化是多肽组学中的一个基本问题。多肽稳定性与冻存条件有关,但是,冻存温度和时间对唾液多肽组的详细影响并不是十分清楚。有研究者利用表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱仪 SELDI-TOF MS,通过比较质谱峰及分子量的差异,发现在-20℃条件下冻存 1 个月后有些肽段离子强度开始下降,冻存 6 个月后降低更为明显,而在-80℃条件下仅有一些很弱的离子峰消失^[14]。de Jong 等将唾液样品分别置于-80℃和-20℃过夜,质谱鉴定到 41 条相同多肽,比较这些目标肽段的强度,认为放置于-80℃条件下唾液多肽丰度增加,而唾液采集后短时间(5, 10 和 15 min)内多肽丰度水平几乎没有变化,置于室温 24 h 后,大多数唾液多肽丰度减少^[15]。但是该研究未

2016-03-21 收稿;2016-10-19 接受

本文系深圳市重点项目(No. JSGG20140703163838793)和深圳市基础科学布局项目阿尔茨海默症临床研究(No. 基 20150006)资助

* E-mail: wyong@szu.edu.cn

分析肽段序列的定性变化,也未考察冻存时间的影响。因此,目前冻存条件对唾液多肽组影响的研究主要集中在肽段的强度变化,对肽段种类和序列的影响并不清楚。本研究利用氧化石墨烯-磷酸镧纳米磁性复合材料(LaGM)富集分离唾液中的多肽,LaGM是由石墨烯、 LaPO_4 纳米棒和 Fe_3O_4 纳米粒子构成的三重复合材料,能够应用于低丰度多肽的快速富集,基质辅助激光解吸-飞行时间质谱(MALDI-TOF)证明该方法可有效富集唾液中的多肽^[16]。通过液相色谱串联质谱LC-MS/MS分析比较-20℃及-80℃冻存6个月的唾液样品,探究冻存条件对唾液多肽组的影响。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Eksigent nanoLC-Ultra™ 2D 二维纳升液相色谱系统、TripleTOF 5600 高分辨质谱仪、Protein Pilot 4.5 软件(美国 AB SCIEX 公司);真空冷冻干燥机、超纯水仪(美国 Thermo 公司); C_{18} 反相色谱捕集柱(30 mm × 100 μm, 3 μm, 150 Å, 美国 Eksigent 公司); C_{18} 反相色谱分析柱(150 mm × 75 μm, 3 μm, 120 Å, 美国 Eksigent 公司)。

氧化石墨烯-磷酸镧纳米磁性复合材料(LaGM)按照文献[16]方法制备;纳升反相色谱流动相 A: 98% 水、0.1% 甲酸和 2% 乙腈,纳升反相色谱流动相 B: 2% 水、0.1% 甲酸、98% 乙腈;所用试剂均为色谱纯;实验用水为超纯水。

2.2 唾液样品采集与多肽富集

唾液样品由 6 名健康捐献者饮食 2 h 后漱口采集,收集过程中保持冷藏,每人约 1 mL,共收集 6 mL 唾液样品。在 10 mL EP 管内混匀,收集时间控制在 15 min 内,迅速分装均等两份,分别置于-20℃和-80℃冻存 6 个月,取出后置于冰上充分融化后,进行多肽富集,(1)各取 1.5 mL 唾液样品,在 4℃以 12000 r/min 离心 10 min;(2)按照健康捐献者唾液与 30 mg/mL 的 LaGM 复合材料体积比为 50:1 的比例混合,涡旋振荡充分结合 15 min;(3)去离子水洗涤 LaGM 复合材料(磁珠)3 次,每次涡旋磁珠分离 5 min,将蛋白质成分去除;(4)用含 1% TFA、80% 乙腈溶液洗脱两次,每次洗脱用量为 20 μL,将洗脱的多肽溶液冷冻干燥。

2.3 纳升液相色谱-TripleTOF 质谱分析

将磁性材料 LaGM 分离后冻干的多肽样品重新溶解于 98% 水、2% 乙腈和 0.1% 甲酸溶液中,在线 Nano-RPLC 液相色谱在 Eksigent nanoLC-Ultra™ 2D 系统进行,溶解后的样品以 2 μL/min 的流速上样到 C_{18} 反相色谱捕集柱(100 μm × 3 cm, 3 μm, 150 Å)上,然后保持流速冲洗脱盐 10 min。分析柱是 C_{18} 反相色谱柱(75 μm × 15 cm, 3 μm, 120 Å),实验梯度为 0 ~ 42 min, 5% ~ 25% B; 42 ~ 56 min, 25% ~ 40% B; 56 ~ 64 min, 80% B; 64 ~ 70 min, 5% B。质谱采用 TripleTOF 5600 系统(AB SCIEX),结合纳升喷雾 III 离子源,喷雾电压为 2.4 kV,气帘气压为 30 psi,雾化气压为 5 psi,加热温度为 150℃,一级 TOF-MS 单张图谱扫描时间为 250 ms,每次 IDA 循环下最多采集 35 个电荷为 2+ ~ 8+且单秒计数大于 100 的二级图谱,每张二级图谱的累积时间为 80 ms。每次循环时间固定为 2.5 s,碰撞室能量设定适用于所有前体离子碰撞诱导解离(CID),动态排除设置为 11 s。

2.4 数据分析

质谱采集到的原始 wiff 图谱文件,采用 Protein Pilot Software v. 4.5(AB SCIEX, USA)软件进行数据处理和检索分析,数据库为 uniprot 库中的 Homo sapiens 人种专一数据库(包含 20210 条蛋白质序列,2015 年 10 月 3 日下载),检索参数设置为非酶切、磷酸化强调和生物学修饰,检索方式为彻底分析,假阳性率控制为 1% FDR。

3 结果与讨论

3.1 -20℃与-80℃冻存条件下多肽组结果的比较

唾液样品置于-20℃条件下冻存 6 个月共鉴定到 31 种蛋白,595 条特异性肽段信息(这里视序列相同,修饰不同的肽段为不同的肽段),-80℃条件下冻存,共鉴定到 33 种蛋白,429 条特异性肽段信息;

其中相同蛋白 15 种,相同肽段 278 条,−20℃ 条件下多检出肽段 166 条。如图 1 所示,在两种条件下均检出的蛋白质为富组蛋白 1、粘蛋白 7、富酪蛋白和基础唾液富脯氨酸 1 等蛋白质,均为唾液中高丰度多肽或蛋白^[17],而且所检出肽段数目很多;相反,两种温度下不同的蛋白质所对应肽段数目多只有一条。值得注意的是,尽管两种条件下检出的蛋白质数目相近,但是−20℃ 条件下检出的肽段数目明显增加,换言之,−20℃ 条件下检出肽段数目的增加并未相应提高它们所归属的蛋白质的数目。进一步比较了两组中肽段数排名前 9 种的相同高丰度蛋白,发现−20℃ 条件下这 9 种蛋白对应肽段数目合计 556 条,而−80℃ 条件下合计为 368 条(表 1),−20℃ 条件下多检出 188 条。以上结果说明−20℃ 条件下增加的肽段来源于上述 9 种高丰度蛋白,并且在−20℃ 条件下这 9 种蛋白质的肽段数目均多于−80℃,但程度相差较大。

表 1 −80℃ 与−20℃ 条件下前 9 种相同蛋白质的检出肽段数目

Table 1 Number of detected peptides for the top nine proteins stored at −80℃ and −20℃			
蛋白序列号 Accession	蛋白质名称 Protein name	−80℃ 肽段数 −80℃ #peptides	−20℃ 肽段数 −20℃ #peptides
P15515	富组蛋白 1 Histatin-1	113	128
Q8TAX7	粘蛋白 7 Mucin-7	59	105
P04280	基础富脯氨酸蛋白 1 Basic Salivary proline-rich protein 1	54	58
P02810	唾液酸富磷蛋白 1/2 Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	38	64
P02814	颌下腺雄激素调节蛋白 3B Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	24	43
P02808	富酪蛋白 Statherin	21	58
Q6MZM9	未知蛋白 C4orf40 Uncharacterized protein C4orf40	19	50
P02812	基础富脯氨酸蛋白 2 Basic salivary proline-rich protein 2	18	19
Q16378	富脯氨酸蛋白 4 Proline-rich protein 4	22	30
总计 Total		368	556

3.2 −20℃冻存条件下肽段检出数目增加的原因

以肽段数目差异明显的富酪蛋白 (Statherin) 为例,分析−20℃ 条件下高丰度蛋白的肽段数目增加的原因。首先将两种冻存条件下的富酪蛋白对应肽段序列进行比较,找出了相同的肽段序列和不同的肽段序列,两种条件下相同的肽段序列 17 条,在−20℃ 条件下存在而−80℃ 中不存在的肽段数目为 38 条,而只在−80℃ 条件下特有的肽段数目有 4 条,推测可根据肽段序列的特点分析−20℃ 条件下的肽段增加的原因。−20℃ 和−80℃ 条件下富酪蛋白的最长肽段均为: LRRIGRFGYGYG-PYQPVPEQPLYPQPYQPQYQQYTf, 而−20℃ 冻存条件下观察到了一系列序列更短数量更多的该肽段的衍生肽段,均由该最长肽段降解产生,这些衍生的肽段序列之间相差一个或者多个氨基酸,在较长肽段的氨基端和羧基端均可能发生氨基酸的降解和丢失(表 2)。例如

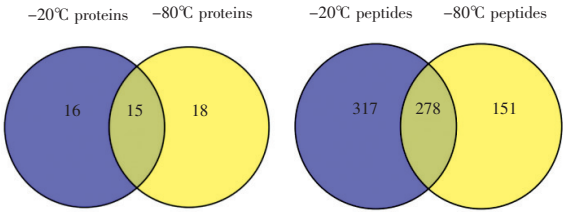


图 1 −20℃ 和−80℃ 条件下唾液蛋白及其肽段数目
Fig. 1 Number of salivary proteins and peptides stored at −20℃ and −80℃

表 2 −20℃ 富酪蛋白增加的肽段序列
Table 2 Increased peptide sequences of statherin stored at −20℃

蛋白名称 Protein name	肽段序列 Peptide sequences
富酪蛋白 Statherin	LRRIGRFGYGYGPYPVPEQPLYPQPYQPQYQQYTf
	LRRIGRFGYGYGPYPVPEQPLYPQPYQPQYQQY
	IGRFGYGYGPYPVPEQPLYPQPYQPQYQQY
	RIGRFGYGYGPYPVPEQPLYPQPYQPQYQ
	IGRFGYGYGPYPVPEQPLYPQPYQPQYQ
	LRRIGRFGYGYGPYPVPEQPLYPQPYQPQ
	IGRFGYGYGPYPVPEQPLYPQPYQPQ
	GYGYGPYPVPEQPLYPQPYQPQ
	GYGPYPVPEQPLYPQPYQPQ
	FGYGYGPYPVPEQPL
	IGRFGYGYGP
	LRRIGRFGYGYGPYPVPEQPLYPQPYQPQY
	LRRIGRFGYGYGPYPVPEQPLYPQPY
	IGRFGYGYGPYPVPEQPLYPQPY
	RFGYGYGPYPVPEQPLYPQPY
	FGYGYGPYPVPEQPLYPQPY
	GYGYGPYPVPEQPLYPQPY

GYGYGPYQPVPEQPLYPQPY 为以上最长肽段在氨基端丢失 7 个氨基酸,在羧基端丢失 9 个氨基酸所致,而 IGRFGYGYGP 则是在 N 端丢失 3 个氨基酸,C 端丢失 23 个氨基酸。表 2 结果说明,在 -20°C 冻存条件下富酪蛋白增加的肽段来源于已有肽段的降解,而不是来源于富酪蛋白的其它序列,例如,由于富酪蛋白基因多态性所导致氨基酸缺失^[18];类似地,表 1 中其它蛋白质在 -20°C 下增加的肽段也均来自于最长肽段的降解,因此, -20°C 冻存条件下肽段检出数目增加的原因是已有肽段的降解。de Jong 等^[15]发现,在 -20°C 下一些质谱峰消失,这可能是由于肽段降解导致多肽含量降低,且低于 SELDI-TOF 质谱仪的检出限。

3.3 -20°C 冻存条件下不同蛋白质来源分析

与 -80°C 相比, -20°C 条件下也出现一些“新”蛋白质的降解肽段,这些蛋白质包括:脂肪酸结合蛋白(Fatty acid-binding protein)、 α 淀粉酶 1(α -Amylase 1)、桥粒胶蛋白(Desmocollin-2)、6 磷酸葡萄糖脱氢酶(6-Phosphogluconate dehydrogenase)、载脂蛋白(Apolipoprotein A-I)和 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶($\alpha 1$ -Antitrypsin)。为确定这些蛋白质的来源,对相同唾液样品进行了蛋白质组学分析,发现它们均是唾液蛋白质组的成分,特别 α 淀粉酶 1(α -Amylase 1)是唾液成分中最主要的蛋白质,唾液淀粉酶含有 496 个氨基酸残基^[18],是一种稳定而又复杂的蛋白质^[19],鉴定到在 -20°C 冻存条件下该蛋白对应肽段数目为 3 条,但在 -80°C 冻存条件下未检测到该蛋白,此结果提示这可能是由于 -20°C 冻存条件下长时间保存使唾液淀粉酶发生降解。进一步推测在 -20°C 冻存条件下,除了已有长肽段发生降解外,唾液中的其它蛋白质也可能发生降解。由于这些蛋白质所检出的肽段数目较少,信号强度也较低,可能其降解程度并不高。

4 结论

本研究表明,样品冻存条件显著影响唾液多肽组学的分析结果,与 -80°C 相比,在 -20°C 条件下冻存 6 个月的唾液中会发生肽段和蛋白质的降解,进而改变了唾液多肽组的组成和含量。肽段降解后不仅会导致样品中低含量肽段的减少,甚至消失,也增加了一系列序列相关的、更短的冗余肽段。因此,在进行多肽组学研究时最好采用新鲜样品,否则可能导致多肽组学结果失真。如条件不允许,样品需放置在 -80°C 保存,但时间也不宜过长, -80°C 冻存条件下时间的影响尚需进一步研究。

References

- 1 Al-Tarawneh S K, Border M B, Dibble C F, Bencharit S. *OMICS*, **2011**, 15(6): 353–361
- 2 Cabras T, Pisano E, Mastinu A, Denotti G, Pusceddu P P, Inzitari R, Fanali C, Nemolato S, Castagnola M, Messana I. *Mol. Cell Proteomics*, **2010**, 9(10): 2099–2108
- 3 Wang Q, Yu Q, Lin Q, Duan Y. *Clin. Chim. Acta*, **2015**, 438: 214–221
- 4 Zhang A, Sun H, Wang P, Wang X. *Clin. Chim. Acta*, **2013**, 415: 261–265
- 5 Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. *Clin. Chem.*, **2011**, 57(5): 675–687
- 6 Amado F M, Ferreira R P, Vitorino R. *Chinese Clin. Biochem.*, **2013**, 46(6): 506–517
- 7 XIE Wei, WANG Jun, YU Wei, YANG Li, LIU Xiao-Li. *Journal of Hygiene Research*, **2013**, 06: 1031–1035
谢尉,王俊,于微,杨翌,刘小立. *卫生研究*, **2013**, (06): 1031–1035
- 8 Villanueva J, Shaffer D R, Philip J, Chaparro C A, Erdjument-Bromage H, Olshen A B, Fleisher M, Lilja H, Brogi E, Boyd J, Sanchez-Carbayo M, Holland E C, Cordon-Cardo C, Scher H I, Tempst P. *J. Clin. Invest.*, **2006**, 116(1): 271–284
- 9 Graterol F, Navarro-Munoz M, Ibernón M, Lopez D, Troya M I, Perez V, Bonet J, Romero R. *Bmc Nephrol*, **2013**, 14: 82
- 10 HONG Xiao-Yu, WANG Hao, XU Jin-Ling, LI Shui-Ming, WANG Yong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(3): 403–408
洪晓愉,王浩,徐金玲,李水明,王勇. *分析化学*, **2016**, 44(3): 403–408
- 11 Zhang J, Zhou S, Zheng H, Zhou Y, Chen F, Lin J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2012**, 421(4): 844–849
- 12 Rudney J D, Staikov R K, Johnson J D. *Arch. Oral. Biol.*, **2009**, 54(1): 91–100
- 13 Xie H, Onsongo G, Popko J, de Jong E P, Cao J, Carlis J V, Griffin R J, Rhodus N L, Griffin T J. *Mol. Cell Proteomics*, **2008**, 7(3): 486–498

- 14 Schipper R, Loof A, de Groot J, Harthoorn L, Dransfield E, van Heerde W. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 847(1): 45–53
- 15 de Jong E P, van Riper S K, Koopmeiners J S, Carlis J V, Griffin T J. *Clin. Chim. Acta*, **2011**, 412(23-24): 2284–2288
- 16 Cheng G, Wang Z G, Liu Y L, Zhang J L, Sun D H, Ni J Z. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(82): 10240–10242
- 17 Huq N L, Cross K J, Ung M, Myroforidis H, Veith P D, Chen D, Stanton D, He H, Ward B R, Reynolds E C. *Inter. J. Peptide Res. Therap*, **2007**, 13(4): 547–564
- 18 Oppenheim F G, Salih E, Siqueira W L, Zhang W, Helmerhorst E J. *Ann N Y Acad Sci.*, **2007**, 1098, 22–50
- 19 Hirtz C, Chevalier F, Centeno D, Rofidal V, Egea J C, Rossignol M, Sommerer N, Deville de Periere D. *Proteomics*, **2005**, 5(17): 4597–4607

Study of Frozen Storage Conditions Impacting on Salivary Peptidomic by High Resolution Tandem Mass Spectrometry

XU Jin-Ling¹, HONG Xiao-Yu¹, LI Shui-Ming², WANG Yong^{*2}

(College of Life and Ocean Science, Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering¹,

Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecology², Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract The salivary peptidomics provides a new method for study of disease biomarkers, but the effect of frozen storage conditions on analysis results is not very clear. In this study, we separated and enriched these peptides in human saliva by graphene-lanthanide phosphate composite nanomaterial (LaGM), then identified them by nano-liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry. The salivary samples were analyzed after these samples were stored at -20°C and -80°C for six months respectively. We identified 429 peptides which belong to 33 proteins at -80°C and 595 peptides corresponding to 31 proteins at -20°C . In comparison with the sample stored at -80°C , the "new" saliva peptides were mainly from the degradation of existing peptides. In addition, some salivary proteins also had a degree of degradation after stored at -20°C . In peptide sequence level, this study illustrated that frozen storage conditions had effects on salivary peptidome, suggesting that saliva sample should not be stored at -20°C for long time when used to analyze peptidomics. This method can provide reference for relevant medical research.

Keywords Saliva; Peptidomic; Nano-liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry; Peptide sequence

(Received 21 March 2016; accepted 19 October 2016)

《生物电化学》

卢小泉、王雪梅、郭惠霞、杜捷 编著

本书在编写过程中努力遵循“加强基础,趋向前沿,反映现代,注意交叉”的现代学科建设理念,从生物电现象及其研究范围、应用现状涉及的电化学基础知识出发,总结了现代生物电化学研究常用方法的基本原理。全书主要内容包括生物电化学基础、生物电现象及酶、微生物、DNA 及免疫电化学生物传感器、生物环境、氧化还原自组装膜界面电子转移研究、数理基础、技术基础、生物电化学的研究领域、进展与应用。

书号: 9787122261441 定 价: 128.0 元

开本: 16 出版日期: 2016 年 10 月