

- tein [J]. *Endocrinology*, 2004, 145:2607 - 2612
- 12 Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, *et al.* Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus [J]. *Regul Pept*, 2005, 126:55 - 59
- 13 Zigman JM, Jones JE, Lee CE, *et al.* Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 494:528 - 548
- 14 Kluge M, Schüssler P, Schmidt D *et al.* Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in women [J]. *J Clin Endocrinol Metab* [J]. 2012, 97(3): E448 - 451
- 15 Kluge M, Schmidt D, Uhr M, *et al.* Ghrelin suppresses nocturnal secretion of luteinizing hormone (LH) and thyroid stimulating hormone (TSH) in patients with major depression [J]. *J Psychiatr Res*, 2013, 47(9):1236 - 1239

(收稿日期:2014 - 03 - 26)

(修回日期:2014 - 06 - 10)

液质联用多反应监测法定量肝纤维化非实质细胞中的 ATPA 蛋白质

张姣丽 贾小芳 尹林 刘晓茜 吕建新 张丽军

摘要 目的 建立液质联用多反应监测方法定量复杂样品中的蛋白质。**方法** 合成标准多肽,建立较通用的蛋白质多肽定量方法;挑选目标蛋白质及其定量离子对。采用 SDS - PAGE 方法分离复杂样品中的蛋白质,切取目标蛋白质条带进行胶内酶解和液质联用 MRM 定量,运用定量 PCR 方法分析目标蛋白在蛋白质和 mRNA 水平的一致性。**结果** 选择在二维凝胶电泳中具有 3 倍差异的 ATPA 蛋白质进行了 MRM 定量分析,ATPA 的 4 条多肽 513.8、586.4、644.5 和 777.3 对应的 10 个离子对均能特异地被质谱 MRM 方法检测,与正常对照相比,酒精性肝纤维化样本中 ATPA 的 10 个离子的曲线下面积变化基本一致,均表现为上调。MRM 定量结果也表明 ATPA 在酒精性肝纤维化样品中上调了 3.19 倍,与二维凝胶电泳检测结果一致。进一步的定量 PCR 分析结果显示,该蛋白质的表达变化同步发生在 mRNA 和蛋白质水平。**结论** 本研究构建了一种简单有效的液质联用 MRM 定量 SDS - PAGE 分离的复杂样品中蛋白质的方法。

关键词 蛋白质 多反应监测 定量 液相色谱串联质谱

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.010

MRM Quantifying ATPA in Nonparenchymal Cell from Liver Fibrosis. Zhang Jiaoli, Jia Xiaofang, Yin Lin, *et al.* College of Medical Laboratory Science, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To establish mass spectrometer with multiple reaction monitoring quantification (MRM) method for target protein in complex samples. **Methods** By synthesis of polypeptide standards, we established a general quantitative method. According to the requirements, we selected the target protein and its quantitative ion pair. The complex protein samples was separated by SDS - PAGE. Then the target protein bands were cut and digested. the quantification of target protein was detected by mass spectrometry with MRM method. we used quantitative PCR method to analyze the consistency of target proteins in the protein and mRNA levels. **Results** Four polypeptides of ATPA were specifically detected by MRM method. Compared with the normal control, the areas under the curve which represented 10 ion pairs of ATPA in alcoholic liver fibrosis were basically the same. MRM quantitative results that ATPA was up to 3.19 times were consistent with 2DE's in the sample of alcoholic liver fibrosis. The results of quantitative PCR analysis further showed that the changes of ATPA occurred simultaneously at mRNA and protein levels. **Conclusion** We successfully established a simple and effective MRM quantitative method for complex protein samples.

Key words Protein; Multiple reaction monitoring (MRM); Quantification; Liquid chromatography - mass spectrometry (LC - MS)

基金项目:国家科技重大专项课题(2012ZX09303013)

作者单位:325035 温州医科大学检验医学院、生命科学学院(张姣丽、吕建新、张丽军);201508 上海市公共卫生临床中心(张姣丽、贾小芳、尹林、刘晓茜、张丽军)

通讯作者:张丽军,博士,教授,硕士生导师,电子信箱:zhanglijun1221@163.com;吕建新,教授,博士生导师,电子信箱:jxlu313@163.com

随着蛋白质组学研究的深入和发展,尤其是大量具有差异功能的蛋白质和潜在疾病蛋白质标志物的发现和被鉴定,如何进一步探测这些蛋白质的表达,以阐明其功能和在疾病中的意义,已变得越来越重要。质谱多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)技术是一种兼具灵敏、准确和特异性等突出优点的质谱检测分析方法,适用于多种领域的研究。近年来,MRM方法也逐渐被应用于蛋白质组学目标差异蛋白质的定量^[1,2]。本研究采用酒精性肝纤维化的一个差异蛋白质ATP合成酶 α 亚基(ATP synthase subunit alpha, mitochondrial, ATPA)为研究对象,建立了复杂的生物样品中蛋白质的MRM定量方法。

材料与与方法

1. 材料:(1)实验仪器:岛津LC-20AD型高效液相色谱串联ABI公司三重四级杆质谱仪API3200,戴安纳升液相色谱Ultimate3000串联布鲁克离子阱质谱HCT。BIORAD电泳仪,SDS-PAGE蛋白垂直凝胶电泳装置,GE Image scanner凝胶成像系统。(2)试剂:色谱纯乙腈(acetonitrile, ACN),甲醇(MeOH)购自美国Merck公司;甲酸(FA)购自美国Fluka公司;SDS购自美国Sigma公司。

2. 大鼠肝非实质细胞分离及差异蛋白质的质谱鉴定:根据笔者以前发表文章中的方法进行^[3]。采用percoll密度梯度离心的方法富集大鼠酒精性肝纤维化模型肝非实质细胞,经裂解细胞后获取的蛋白质样品通过二维凝胶电泳分离,ImageMaster软件分析出肝纤维化和正常组差异蛋白质,再通过戴安纳升液相色谱串联布鲁克离子阱质谱对差异蛋白质进行鉴定。

3. 蛋白质分离与质谱MRM定量样品制备:采用浓度为11.5%的SDS-PAGE对酒精性肝纤维化组和正常组蛋白质样品进行分离和G250考马斯亮蓝染色,切取ATPA蛋白质所在相对分子质量的条带,进行脱色,还原烷基化和胰蛋白酶酶切,提取酶切后的多肽用于MRM定量分析。

4. 液相色谱串联质谱定量扫描肽段信号从而定量蛋白质的方法和参数:(1)液质联用MRM定量分析方法:采用岛津LC-20AD高效液相色谱串联美国应用生物系统公司的三重四级杆质谱API3200进行多肽定量分析。液相色谱条件:色谱柱为:C18,戴安1mm×150mm,粒径300nm;流动相A为:0.1%甲酸,流动相B为:80%乙腈,0.1%甲酸;流速设置为:0.06ml/min;流动相梯度为:0~12min,梯度5.0%~62.5%流动相B;12.1~20.0min,等度62.5%流动相B;20.1~25.0min,100%流动相B;25.1~50.0min,5%流动相B。质谱参数设置:利用合成的多肽——ELNNALQNLARTI进行参数设定,该多肽来自ESAT-6(结核早期分泌抗原的64~76号氨基酸序列)。人和哺乳动物的蛋白质中无ESAT-6序列,因此,该肽段被用作目标蛋白质的多肽定量的内标。质谱

仪基本参数设定:CUR为10,IS为5500,TEM为300,GS1为50,GS2为50,CAD为6,DP为50,EP为80;CE为35,CXP为8。利用以上参数同时对需要定量的蛋白质多肽和内标肽的多个离子对进行扫描,获取峰面积。(2)目标蛋白质及其液质联用MRM定量离子对的选取:从二维凝胶电泳鉴定的差异蛋白质中挑选胶点差异明显且质谱鉴定得分较高的蛋白质为目标蛋白质。用于MRM定量的蛋白质多肽的离子对参照文献^[4]报道方法进行选择。本研究选取经二维凝胶电泳检测鉴定的差异蛋白质ATPA为研究对象,该蛋白质在酒精性肝纤维化非实质细胞蛋白质样品中上调了3.10倍。对该蛋白质的四条胰酶酶切肽段进行MRM定量。

5. 实时定量PCR:采用Primer 3.0网络版本进行引物设计。其中ATPA的正义链引物为:5'-AGGAACGTTCAAGCTGAGGA-3',反义链为:5'-ACTACACGGCCCAACAGTTC-3',产物长度为191bp。选择GAPDH作为内参基因,其正义链:5'-CGGAGTCAACGGATTGCTCGTA-3',反义链:5'-AGCCTTCTCCATGCTGGAAGAC-3'。严格参照Trizol试剂公司(美国Invitrogen公司)提供的标准操作步骤提取酒精性肝纤维化非实质细胞的总RNA^[5]。经反转录后,取2 μ l cDNA与0.7 μ l 10nmol/L的引物等混合组成25 μ l PCR反应体系进行实时定量PCR。PCR循环条件为:95 $^{\circ}$ C 3min, 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 20s, 72 $^{\circ}$ C 20s, 40个循环。所有反应均设置复孔,GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)为对照。实验进行2次重复。

结 果

1. 目标蛋白质ATPT及其多肽信息:本研究以酒精性肝纤维化大鼠模型(处理6周)的肝非实质细胞蛋白质组研究结果(研究团队未发表的结果)为基础,根据二维凝胶电泳图谱以及质谱分析结果选取ATPA蛋白质进行定量分析。该蛋白质在酒精性肝纤维化样本的三次重复二维凝胶中均表达上调(图1)。质谱分析结果为:蛋白质编号:ATPA_RAT;相对分子质量:59831Da;搜库得分:1076;匹配的肽段数:20(16);emPAI得分:1.62。ATPA质谱鉴定搜库匹配的肽段信息及用于质谱MRM定量的4条多肽见表1。

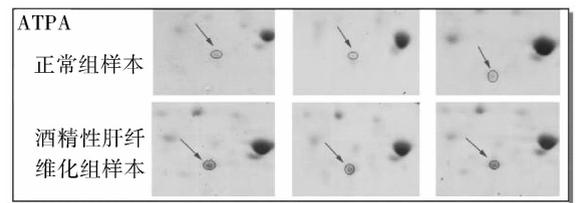


图1 ATPA局部放大二维凝胶电泳图谱

ATPA蛋白质点即箭头所标记点

表 1 ATPA 质谱鉴定搜库匹配的多肽信息

测定质荷比	理论相对分子质量	测定相对分子质量	相对分子质量误差	肽段搜库得分	肽段序列
430.810	859.605	859.495	0.111	36	R. QMSLLLR. R
446.600	891.185	891.481	-0.296	39	K. LELAQYR. E
513.800	1025.585	1025.587	-0.002	46	K. AVDSLVPIGR. G
575.310	1148.605	1148.608	-0.002	28	R. GYLDKLEPSK. I
586.340	1170.665	1170.625	0.041	77	R. VVDALGNAIDGK. G
644.330	1286.645	1286.687	-0.042	60	K. HALIHYDDLK. Q
658.880	1315.745	1315.735	0.011	90	K. TSAIDTHNQK. R
668.870	1335.725	1335.671	0.054	96	K. EIVTNFLAGFEP. -
712.400	1422.785	1422.666	0.119	87	K. TGTAEMSSILEER. I
720.930	1439.845	1438.661	1.185	45	K. TGTAEMSSILEER. I + Oxidation (M)
518.580	1552.718	1552.731	-0.013	20	R. EAYPGDVFYLHSR. L
777.390	1552.765	1552.731	0.034	50	R. EAYPGDVFYLHSR. L
788.370	1574.725	1574.779	-0.053	98	R. ILGADTSVDLEETGR. V
789.440	1576.865	1576.850	0.015	78	K. LKEIVTNFLAGFEP. -
805.890	1609.765	1609.868	-0.102	50	R. TGAIVDVPVGDPELLGR. V
849.470	1696.925	1695.916	1.010	8	R. VVDALGNAIDGKGPVGSK. I
770.330	2307.968	2308.152	-0.184	29	K. QGQYSPMAIEEQVAVIYAGVR. G
780.130	2337.368	2337.160	0.208	69	R. EVAAFAQFGSDLDAATQQLSR. G
1170.150	2338.285	2337.160	1.125	128	R. EVAAFAQFGSDLDAATQQLSR. G
790.760	2369.258	2368.229	1.029	80	K. FESAFLSHVVSQHQSLLGNI. S

黑色加粗标记的 4 条多肽被用于 MRM 定量

2. SDS - PAGE 结果:为了简化样品的制备过程,采用 SDS - PAGE 的方法分离酒精性肝纤维化非实质细胞的蛋白质组,结果见图 2。根据目的蛋白质的相对分子质量大小,切取 ATPA 所在位置的蛋白质条带(图 2 黑框处),先进行质谱鉴定确定目的蛋白质的存在,然后对所有的样品(6 个正常和 6 个酒精性肝纤维化)条带进行 MRM 定量分析。

3. 离子对选择及 MRM 定量结果:根据方法中确定的离子对选择标准,确定内标的离子对为 735.5/389.3 和 735.5/215.3; ATPA 的离子对为 513.8/442.3、513.8/486.3、586.4/319.2、586.4/674.3、586.4/973.5、644.5/234.1、644.5/322.2、644.5/435.3、777.3/677.3、777.3/595.8。在确定定量的离子对后,采用岛津 LC - 20AD 高效液相串联 Applied Biosystems API3200 质谱对酶切的肽段进行定量分析,结果见图 3 和表 2。将内标以及分析物离子对的峰面积分别进行加和,并利用每个样品中分析物峰面积之和与内标的峰面积之和相比获得每个样品中分析物的相对量,最后通过将肝纤维化样品的相对量的平均值与正常样品进行比较,获得 ATPA 蛋白质的调节倍数为 3.19。比较二维凝胶电泳鉴定

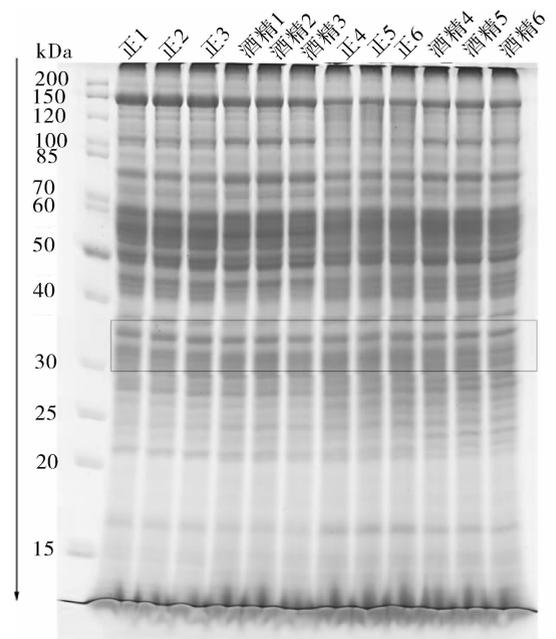


图 2 SDS - PAGE 蛋白质分离图谱

正 1 ~ 正 6 表示正常样本 1 ~ 6;酒精 1 ~ 酒精 6 表示酒精性肝纤维化样本 1 ~ 6;黑框所示为切取 ATPA 所在位置的蛋白质条带

的结果和 MRM 定量的结果,发现两者的结果基本一致。

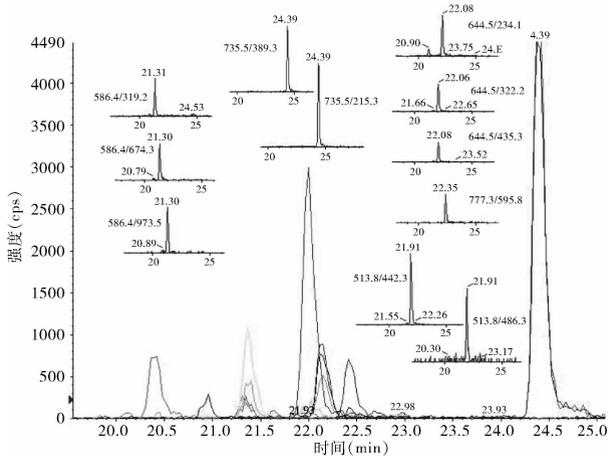


图3 MRM定量内标与ATPA的多肽离子对

内标多肽的离子对为735.5/389.3和735.5/215.3;分析物4条多肽及其离子对为586.4/319.2、586.4/674.3和586.4/973.5;644.5/234.1、644.5/322.2和644.5/435.3;777.3/595.8;513.8/442.3和513.8/486.3

4. mRNA定量分析结果:为了进一步检测所鉴定蛋白质的mRNA表达,本研究对APTA进行实时定量PCR分析。采用相对定量的方法比较ATPA在酒精性肝硬化与正常组中的mRNA表达变化。与正常组相比,ATPA在肝硬化样品中表达上调3.21倍,这与该蛋白质在MRM定量和二维凝胶电泳鉴定的结果基本保持一致,进一步验证了MRM定量方法的可靠性(表3)。

讨 论

寻找生物标志物是医学研究领域的热点,蛋白质组学技术因为其高通量高敏感度的特点成为标志分子筛选的理想工具,它能通过比较正常和疾病状态下蛋白质的表达水平变化,获得了大量生物标志物。此外,随着生物技术的不断发展,尤其是生物类药物如蛋白质疫苗等的不断涌现,对蛋白质的快速定量需求越来越大。然而如何对这些差异多肽或蛋白质在大

表2 MRM定量的离子对峰面积(x ± s)

离子对	内标 + 正常	内标 + 正常	内标 + 正常	内标 + 酒精	内标 + 酒精	内标 + 酒精
735.5/389.3	38100.00	186000.00	40300.00	13500.00	31500.00	24800.00
735.5/215.3	41400.00	188000.00	41200.00	16500.00	36100.00	23700.00
内标的加和	79500.00	374000.00	81500.00	30000.00	67600.00	48500.00
513.8/442.3	26000.00	26200.00	25000.00	36100.00	26100.00	30400.00
513.8/486.3	161.00	152.00	1480.00	0.00	1290.00	2030.00
586.4/319.2	8270.00	6770.00	7900.00	11200.00	6310.00	10400.00
586.4/674.3	8310.00	6550.00	7200.00	11100.00	5340.00	11400.00
586.4/973.5	3520.00	3450.00	3470.00	5180.00	3080.00	5040.00
644.5/234.1	7040.00	6570.00	6750.00	9770.00	7360.00	9540.00
644.5/322.2	7610.00	7200.00	7430.00	11900.00	8060.00	9960.00
644.5/435.3	4590.00	5520.00	4980.00	7170.00	5010.00	6650.00
777.3/677.3	500.00	679.00	750.00	987.00	277.00	696.00
777.3/595.8	5570.00	4630.00	4440.00	5470.00	3820.00	5580.00
样品的加和	71571.00	67721.00	69400.00	98877.00	66647.00	91696.00
样品/内标	0.90	0.18	0.85	3.30	0.99	1.89
平均(样品/内标)		0.64			2.06	
比率(酒精/正常)			3.19			

正常表示正常样本,酒精表示酒精性肝硬化样本

表3 定量PCR分析ATPA的基因相对表达量

组别	Ct(ATPA)	Ct(GAPDH)	ΔCt	2 - ΔΔCt	平均 2 - ΔΔCt
正常对照组(第1次)	38.54	31.25	7.29	1.00	
酒精性肝硬化组(第1次)	34.34	28.89	5.45	3.58	
正常对照组(第2次)	26.91	21.74	5.17	1.00	
酒精性肝硬化组(第2次)	25.31	21.65	3.66	2.85	3.21

量临床标本中进行快速定量还存在一定的挑战。传统的蛋白质定量方法ELISA和免疫印迹法,依赖于特异性高的抗体,对于那些难以制备抗体的蛋白

质定量,存在困难。而液相色谱串联质谱MRM法特异性高,敏感度及精确度也远远高于单纯的液相色谱法,且样品制备方法简单,是一个很有发展前景的方

法,目前其作为小分子化合物的定量方法已经广泛应用于药学研究领域,也是食品药品监督管理局用于药物评审的标准方法之一^[6,7]。

本研究通过合成标准多肽作为定量内标并联合岛津 LC-20D 型高效液相色谱串联美国应用生物系统公司的 API3200 三重四极杆质谱,建立了对复杂样品中的蛋白质的 MRM 定量方法,并且将该方法用于酒精性肝纤维化大鼠模型非实质细胞蛋白质组研究中发现的一个差异蛋白质(ATPA)进行验证。通过条件筛选笔者首先确定了该蛋白质及其多肽和离子对,然后采用 SDS-PAGE 分离蛋白质复杂样品、胶内蛋白质酶解与液质联用 MRM 定量相结合的方法,最终获得 ATPA 蛋白质的定量结果,即在酒精性肝纤维化样本中 ATPA 上调了 3.19 倍。进一步对该蛋白质进行的定量 PCR 分析也证实了该结果的可靠性,可见 ATPA 在蛋白及 mRNA 水平确实发生了相同变化趋势,同时也表明该定量方法的可行性。MRM 方法选择性和特异性高,其检测敏感度可适用于普通 SDS-PAGE 条带内蛋白质的定量,且其定量结果与二维凝胶电泳以及定量 PCR 结果一致。该定量方法可以推广应用到其他复杂样品中的蛋白质定量。

参考文献

- 1 Cui J, Kang X, Dai Z, *et al.* Prediction of chronic hepatitis B, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by SELDI-based serum decision tree classification[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007, 133(11): 825-834
- 2 Percy AJ, Parker CE, Borchers CH. Pre-analytical and analytical variability in absolute quantitative MRM-based plasma proteomic studies[J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(22): 2837-2856
- 3 赵倩倩,冯艳玲,贾小芳,等. 免疫性肝纤维化大鼠肝非实质细胞蛋白质组分析[J]. *中国科学:生命科学*, 2013, 11: 928-938
- 4 刘永福,贾小芳,腾珍林,等. 液质联用多反应监测法定量目标多肽或蛋白质[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 1: 86-92
- 5 Li X, Xie C, Cao J, *et al.* An in vivo membrane density perturbation strategy for identification of liver sinusoidal surface proteome accessible from the vasculature[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(1): 123-132
- 6 Liu Y, Uboh CE, Soma LR, *et al.* Efficient use of retention time for the analysis of 302 drugs in equine plasma by liquid chromatography-MS/MS with scheduled multiple reaction monitoring and instant library searching for doping control[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(17): 6834-6841
- 7 Chen J, Sun J, Ma Q, *et al.* CYP2B6 polymorphism and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor plasma concentrations in Chinese HIV-infected patients[J]. *Ther Drug Monit*, 2010, 32(5): 573-578

(收稿日期:2014-05-15)
(修回日期:2014-06-16)

关于超声引导下一点法或三点法颈丛阻滞的效果研究

杨林译 谢红 沈江 卜晓萱 高操 范圣登

摘要 **目的** 比较超声引导下比较超声引导下两种颈神经丛阻滞(颈丛阻滞)方法即 C₄ 横突一点法和 C₂、C₃、C₄ 横突三点法的麻醉效果及并发症的发生情况。**方法** 择期拟行单侧甲状腺次全切除术患者 60 例,性别不限,ASA I 或 II 级,随机分为 2 组(n=30);两组均作双侧颈浅丛阻滞及术侧颈深丛阻滞。颈浅丛阻滞均为在超声引导下将局麻药注射在胸锁乳突肌中点后缘下方。C₄ 横突一点法组(A 组)在超声引导下在 C₄ 横突处注射局麻药 9ml;C₂、C₃、C₄ 横突三点法组(B 组)超声引导下于 C₂、C₃、C₄ 横突处各注射局麻药 3ml。记录起效时间、麻醉优良率、阻滞前和阻滞 5、10、15、20、30min 的生命体征,并观察并发症的发生情况。**结果** 超声引导 C₂、C₃、C₄ 横突三点法颈深丛阻滞和 C₄ 横突一点法颈深丛阻滞进行对比,三点法组的耳大神经分布区域起效时间短于一点法组,而锁骨上神经分布区域起效时间长于一点法组(P<0.05)。三点法组的深部麻醉优秀率较一点法更为完善(P<0.05),两种方法成功率比较,差异无统计学意义。一点法 A 组出现 1 例 Horner's 综合征,两组均无膈神经阻滞、喉返神经阻滞、误入血管、局部麻醉药中毒。**结论** 超声可以作为颈深丛阻滞的定位方法并可进行实时引导颈丛神经阻滞。通过超声准确定位,进行 C₂、C₃、C₄ 横突三点法和 C₄ 横突一点法两种颈深丛阻滞方法的麻醉效果比较发现,三点法颈深丛阻滞比一点法更为完善,术中患者循环更为稳定,且并发症发生例数较少,但差异无统计学意义。

关键词 超声检查 颈神经丛 神经传导阻滞 并发症

中图分类号 R4

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.011

基金项目:国家自然科学基金资助项目(青年项目)(81302047)

作者单位:213000 常州,苏州大学附属第三医院麻醉科(杨林译、沈江、卜晓萱、高操、范圣登);苏州大学附属第二医院麻醉科(谢红)

通讯作者:范圣登,电子邮箱:gjzszg@hotmail.com