

# 肽文库富集荷斯坦奶牛血浆和血清中 低丰度蛋白的效果研究

李珊珊,王加启,杨永新,卜登攀,魏宏阳,张乐颖

(中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室,北京 100193)

【摘 要】 【目的】获取牛血浆和血清蛋白质组中低丰度蛋白的表达信息。【方法】采用肽文库试剂盒 ProteoMiner 富集荷斯坦奶牛的血浆和血清,运用二维凝胶电泳结合液相色谱串联质谱方法,分析富集前后血浆和血清中蛋白的变化。【结果】牛血浆和血清经 ProteoMiner 试剂盒富集,白蛋白含量显著下调(血浆和血清的差异显著水平分别为  $P=0.02$  和  $P=0.01$ ),载脂蛋白 E 显著增加(血浆和血清的差异显著水平分别为  $P=0.02$  和  $P=0.01$ )。【结论】该法在降低牛血浆和血清中高丰度蛋白的同时有效富集了低丰度蛋白,有利于血浆和血清中低丰度蛋白质组的研究。

【关键词】 血浆;血清;低丰度蛋白;二维凝胶电泳;串联质谱

【中图分类号】 Q503

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)06-0056-05

## Protein profiling of enrichment of low-abundance proteins in bovine plasma and serum using hexapeptide library

LI Shan-shan, WANG Jia-qi, YANG Yong-xin, BU Deng-pan,  
WEI Hong-yang, ZHANG Le-ying

(State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** 【Objective】 The objective of this study was to improve the expression of low-abundance proteins in bovine plasma and serum. 【Method】 Low-abundance proteins in bovine plasma and serum were enriched by ProteoMiner kit. Plasma and serum proteins of the dairy cows were separated and identified using two-dimensional electrophoresis (2-DE) combined with HPLC tandem ion trap spectrometry. 【Result】 The results showed that, albumin abundance was down-regulation (plasma  $P=0.02$  and serum  $P=0.01$ , respectively), at the same time, the abundance of other protein such as apolipoprotein E was increased (plasma  $P=0.02$  and serum  $P=0.01$ , respectively). 【Conclusion】 The findings may provide valuable information for the research of low abundance proteome in plasma and serum.

**Key words:** plasma; serum; low-abundance protein; 2-DE; mass spectrometry

血浆和血清中的蛋白质是血液的重要成分,在维持内环境稳定、承担物质运输、免疫防御、凝血以及抗凝血等方面具有重要作用<sup>[1]</sup>。发生疾病时,病

变组织或细胞的蛋白可以进入血液系统,进而导致蛋白种类和丰度发生变化<sup>[2]</sup>。因此,血浆和血清是人体以及动物临床研究中常用的试验材料。但血浆

\* [收稿日期] 2009-12-09

[基金项目] 国际科技合作项目(2009DFB30530)

[作者简介] 李珊珊(1985—),女,黑龙江牡丹江人,在读硕士,主要从事反刍动物营养和牛奶质量改良研究。

E-mail: leeshanshanshan@163.com

[通信作者] 王加启(1967—),男,安徽宿州人,研究员,博士生导师,主要从事反刍动物营养和牛奶质量改良研究。

E-mail: wang-jia-qi@263.net

和血清组成复杂,蛋白质组动态范围极大,可达  $10^{10}$  数量级以上,既含有白蛋白等高丰度蛋白,同时也存在约 10% 的被高丰度蛋白掩盖表达信息的低丰度蛋白<sup>[3-4]</sup>。

为了尽可能容纳大动态范围的全部蛋白质,已有许多移除高丰度蛋白、富集低丰度蛋白的策略<sup>[5-6]</sup>,色谱、电泳和免疫等诸多方法,均可达到此目的<sup>[7-9]</sup>,目前以免疫去除法为主。免疫去除法能非常有效地富集低丰度蛋白,但是需要使用特异性抗体;另外,在不同动物利用特异性抗体富集低丰度蛋白时,会受到物种间差异的限制,而且这种方法成本昂贵<sup>[10-11]</sup>。基于 20 种天然氨基酸合成的六肽配体组合文库,理论上可与  $20^6$  个蛋白的氨基酸残基结合,一旦六肽饱和,过量的蛋白就会被冲洗掉,这种肽文库在有效降低高丰度蛋白的同时,相对富集了低丰度蛋白<sup>[12]</sup>。此外,这种六肽组合文库还没有种属限制,可用于所有样品,并且具有良好的重复性、敏感性和兼容性<sup>[13]</sup>。基于这种肽文库的商业产品 ProteoMiner 试剂盒 (Bio-Rad, USA) 已得到应用<sup>[14-15]</sup>。本研究采用 ProteoMiner 试剂盒处理牛血浆和血清,以分析其在牛血浆和血清蛋白质组研究中富集低丰度蛋白的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

在北京市大兴区沧达福奶牛养殖基地选择 10 头临床健康的中国荷斯坦奶牛(泌乳时间为  $(27 \pm 1)$  d),用真空 EDTA 抗凝和无抗凝剂采血管(BD Vacutainer™)于尾静脉采集血液,抗凝血于  $4^\circ\text{C}$ 、 $3\,000\text{ g}$  离心 15 min 分离血浆;非抗凝血于室温放置 4 h 后离心分离血清。将血浆和血清分装,  $-20^\circ\text{C}$  保存。

### 1.2 方 法

1.2.1 蛋白样品的制备和二维凝胶电泳(2-DE) 溶解血浆和血清样品,按照六肽文库试剂盒 ProteoMiner 操作说明富集低丰度蛋白。操作步骤如下:取血浆和血清样品各 1 mL,加入完全平衡的柱子中,在温和振荡条件下室温孵育 2 h,洗涤离心除去未与六肽珠子结合的蛋白,最后用样品缓冲液振荡洗脱蛋白,合并洗脱液后用 BCA 法测定蛋白浓度。

取 0.4 mg 血浆或血清蛋白,分别与  $330\text{ }\mu\text{L}$  水化上样缓冲液(8 mol/L 尿素,40 g/L CHAPS,65 mmol/L DTT,体积分数 0.5% IPG buffer,痕量溴

酚蓝)混合, $10\,000\text{ g}$  离心 10 min。将样品均匀加入聚焦盘,覆盖 17 cm、pH 4~7 的固相化 pH 梯度(IPG)胶条,IPG 胶条经被动水化过夜后,进行等电聚焦。等电聚焦结束后,将 IPG 胶条置于 5 mL 平衡液 I (0.375 mol/L Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L 尿素,体积分数 20% 甘油,20 g/L SDS,20 g/L DTT)中还原 12 min,再置于 5 mL 平衡液 II (用 25 g/L 碘乙酰胺取代平衡液 I 中的 20 g/L DTT)中烷基化 12 min。将 IPG 胶条移至 12% SDS-PAGE 胶上,用 5 g/L 琼脂糖封 IPG 胶条,进行二维垂直 SDS-PAGE 电泳。设置程序为起始功率 1 W、30 min,然后加大功率至 46 W,待溴酚蓝指示剂到底部时停止电泳。考马斯亮蓝 G-250 染色<sup>[16]</sup>。

1.2.2 图像采集和蛋白酶解 用 Umax Power-Look 2100XL 扫描仪(Umax,台湾)扫描 2-DE 凝胶。从考马斯亮蓝染色的凝胶上切 1~2 mm 大小的胶粒,用去离子水清洗 30 min,再用体积分数 50% 乙腈和 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液冲洗 30 min,重复 1 次,脱色过夜;加  $100\text{ }\mu\text{L}$  纯乙腈干燥;然后用  $10\text{ }\mu\text{L}$  20 ng/ $\mu\text{L}$  胰蛋白酶孵育, $37^\circ\text{C}$  过夜酶解;酶解完成后,上清转到新的离心管中。在凝胶颗粒中加  $10\text{ }\mu\text{L}$  提取液(含体积分数 50% 乙腈和体积分数 2% 甲酸的水溶液)在室温下抽提,超声处理 30 min;抽提液转入第 1 次上清液中,抽提过程重复 1 次。

1.2.3 质谱鉴定 混合肽采用液相色谱串联离子阱质谱系统(LCQ Deca Xp plus, Thermo Finnigan, USA) 分析。样品上样量为  $20\text{ }\mu\text{L}$ ,流速  $120\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 。所获数据用整合在质谱仪上的 Bioworks 软件中的检索软件 SEQUEST,来搜索 NCBI 非冗余蛋白质数据库。

## 2 结果与分析

### 2.1 奶牛血浆和血清蛋白的 ProteoMiner 试剂盒富集

由血浆和血清二维凝胶图谱的软件检测结果(图 1)可知,血浆和血清凝胶图谱中的 a 区域蛋白点,经 ProteoMiner 试剂盒处理后丰度明显降低(血浆和血清的差异显著水平分别为  $P=0.02$  和  $P=0.01$ ),b、c、d 和 e 区域蛋白点丰度增加(血浆中蛋白表达丰度 b、c、d 和 e 区域的差异显著水平分别为  $P=0.02$ ,  $P=0.12$ ,  $P=0.03$  和  $P=0.10$ ;血清中蛋白表达丰度 b、c、d 和 e 区域的差异显著水平分别为  $P=0.01$ ,  $P=0.07$ ,  $P=0.05$  和  $P=0.07$ )。在血浆

凝胶图谱中,f 区域蛋白点丰度也增加;在血浆和血清凝胶图谱中,g 和 h 区域蛋白点在 ProteoMiner 试剂盒富集后减少或消失(血浆中蛋白表达丰度 g 和 h 区域的差异显著水平分别为  $P=0.03$  和  $P=0.03$ ;血清中蛋白表达丰度 g 和 h 区域的差异显著水平分别为  $P=0.04$  和  $P=0.24$ )。图 2 展示了血浆和血清凝胶图谱中部分蛋白点的表达量。

2.2 奶牛血浆和血清蛋白点的质谱鉴定

血浆和血清凝胶图谱 a 区域中的蛋白点,经液相色谱串联质谱鉴定为白蛋白,表明 ProteoMiner 试剂盒可以明显降低血浆和血清中白蛋白的浓度,

从而使其他许多低丰度蛋白的表达信息得以显现,特别是 d 和 e 区域的蛋白表达信息。对血浆和血清经试剂盒富集的 b 和 c 区域、血浆 f 区域的 3 个蛋白点以及 1 个富集不显著的蛋白点进行质谱鉴定,结果如表 1 所示。由表 1 可以看出,a 区域为血浆和血清中高丰度的白蛋白,分子质量约为 69.324 ku;蛋白点 2 和 4 均为载脂蛋白 A1,等电点为 5.57,分子质量约为 28.433 ku;蛋白点 1 和 3 为较低丰度蛋白,分别为载脂蛋白 E 和牛纤维原蛋白,等电点分别为 5.55 和 5.49,分子质量分别为 35.980 和 46.576 ku。

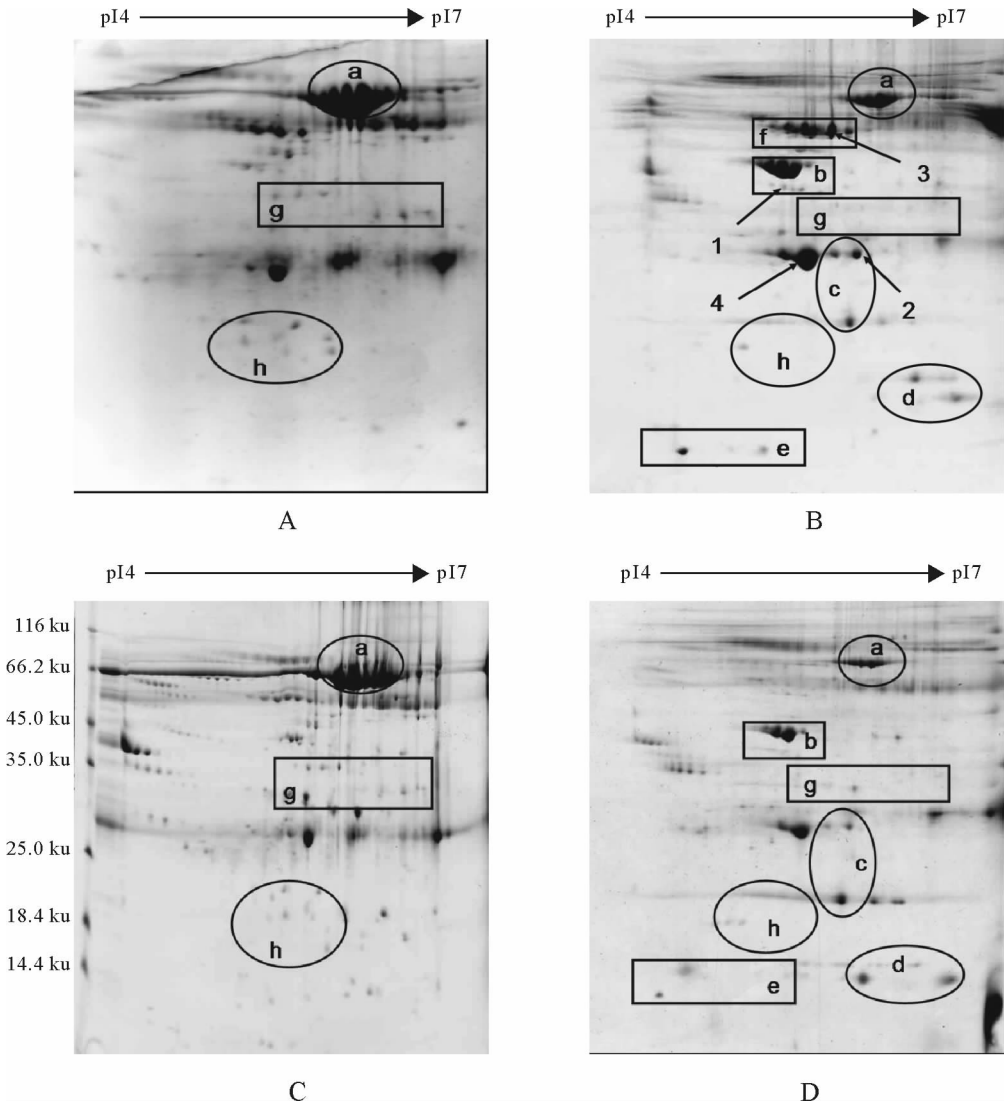


图 1 奶牛血浆和血清蛋白凝胶电泳图谱

A. 血浆蛋白;B. 经 ProteoMiner 试剂盒富集后的血浆蛋白;C. 血清蛋白;D. 经 ProteoMiner 试剂盒富集后的血清蛋白

Fig. 1 Analysis of protein patterns of plasma and serum from dairy cow

A. 2-DE maps of plasma;B. 2-DE maps of plasma protein enrichment with ProteoMiner kit;

C. 2-DE maps of serum;D. 2-DE maps of serum protein enrichment with ProteoMiner kit

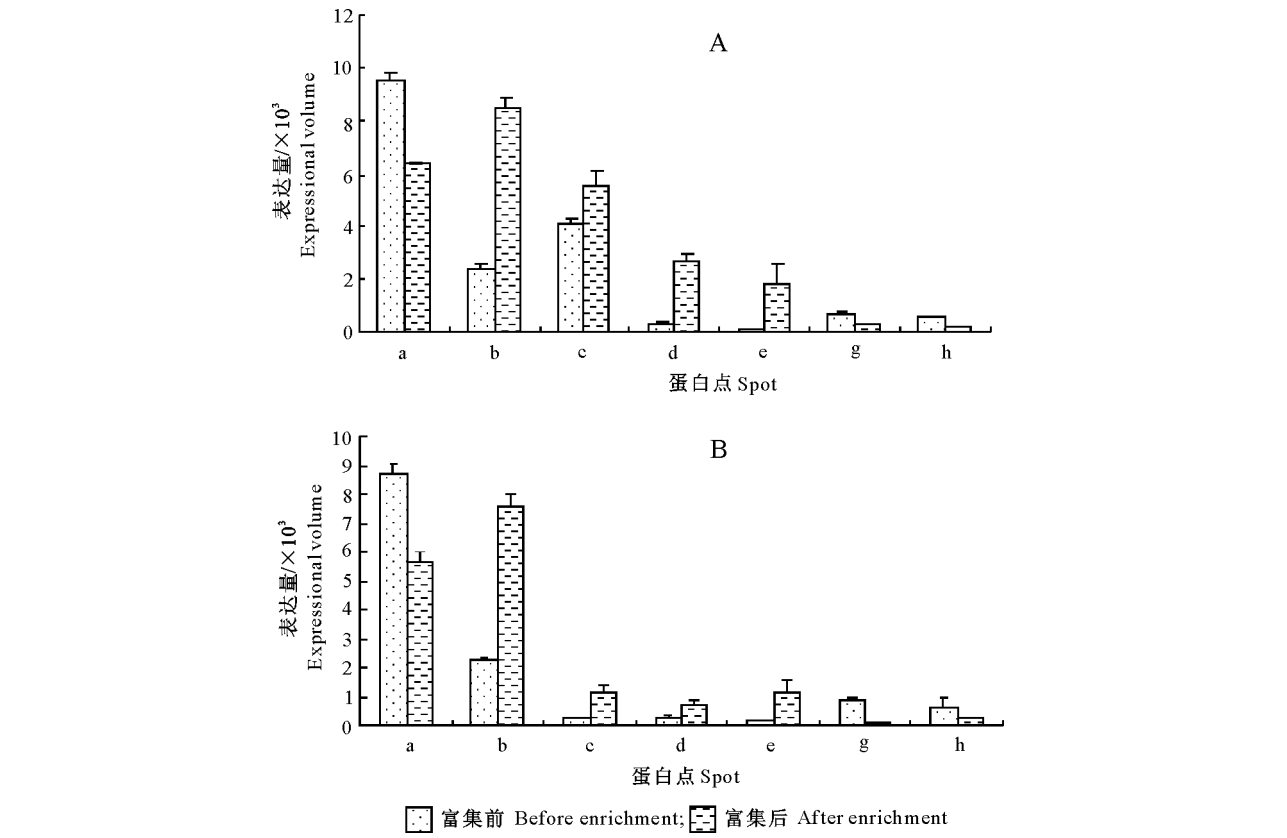


图 2 ProteoMiner 试剂盒富集前后奶牛血浆和血清蛋白丰度的变化  
A. 血浆蛋白的表达变化;B. 血清蛋白的表达变化

Fig. 2 Expressional volume changes of plasma and serum protein enrichment with or without ProteoMiner kit

A. Expressed spots from plasma protein;B. Expressed spots from serum protein

表 1 奶牛血浆和血清蛋白点的液相色谱串联离子阱质谱鉴定结果  
Table 1 Identification of plasma and serum protein spots by LC-MS/MS

| 蛋白点<br>Spot | 蛋白质类别<br>Protein name                                         | 登录号<br>Accession No. | 等电点<br>Isoelectric point | 分子质量/u<br>Molecular weight |
|-------------|---------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------|
| a           | 白蛋白 Albumin                                                   | NP_851335            | 5.82                     | 69 324.1                   |
| 1           | 载脂蛋白 E Apolipoprotein E                                       | NP_776416            | 5.55                     | 35 979.85                  |
| 2           | 载脂蛋白 A1 Apolipoprotein A-I                                    | AAB21444             | 5.57                     | 28 432.8                   |
| 3           | 牛纤维原蛋白<br>The Crystal Structure of Modified Bovine Fibrinogen | 1DEQS                | 5.49                     | 46 575.5                   |
| 4           | 载脂蛋白 A1 Apolipoprotein A-I                                    | AAB21444             | 5.57                     | 28 432.8                   |

注:表中各蛋白点与图 1B 中对应。  
Note:The protein spots in table 1 according to Fig. 1B

### 3 结论与讨论

血浆和血清中大量的蛋白质,包括一些潜在生物标记分子都以很低的浓度存在,由于高丰度蛋白的掩盖,致使许多低丰度蛋白难以或无法检测<sup>[17]</sup>。因此,如何移除高丰度蛋白并富集血浆和血清中的低丰度蛋白,以获得有意义的生物分子,受到研究者的极大关注。

采用 Mimetic blue 和 Protein G 柱子非特异性

结合白蛋白和 IgG,可达到去除高丰度蛋白的目的,然而少量低丰度蛋白也有可能被结合,从而影响低丰度蛋白的富集效果<sup>[18]</sup>。采用硫酸铵沉淀的方法可以除去血浆和血清中的白蛋白,但是在沉淀物中还包含了血清转铁蛋白、抗胰蛋白酶和结合珠蛋白等较低丰度的蛋白,因此该法特异性较差<sup>[19]</sup>。目前,血浆和血清中高丰度蛋白主要采用免疫去除的方法,采用商业化的 MARS 柱(含 6 个最高丰度蛋白的抗体)可移除人血浆或血清中总蛋白的 85%,

使低丰度蛋白浓度提高 10 至 20 倍<sup>[20]</sup>。试剂盒 Proteomelab IgY-12 High Capacity Proteome Partitioning 能够移除人血浆中的 12 个高丰度蛋白<sup>[21]</sup>。这些基于特异性抗体的策略极大程度地富集了低丰度蛋白,为研究低丰度蛋白表达信息奠定了基础。然而,由于抗体的物种间差异限制了其应用。

本试验采用 ProteoMiner 试剂盒富集牛血浆和血清中的低丰度蛋白,发现白蛋白含量显著下调,同时增加了 b、c、d 和 e 区域中低丰度蛋白的表达信息。结果表明,基于六肽文库方法的 ProteoMiner 试剂盒,在降低高丰度蛋白的同时,有效地富集了低丰度蛋白,具有良好的重复性、敏感性和兼容性,为研究其他物种血浆和血清低丰度蛋白质组提供了较好的富集策略。

[参考文献]

[1] Andersom N L, Anderson N G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects [J]. *Mol Cell proteomics*, 2002, 1: 845-867.

[2] Anderson N L, Polanski M, Pieper R, et al. The human plasma proteome [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004(3): 311-326.

[3] Cairoli F, Battocchio M, Veronesi M C, et al. Serum protein pattern during cow pregnancy: Acute-phase proteins increase in the peripartum period [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(8): 1617-1625.

[4] Boschetti E, Righetti P G. Hexapeptide combinatorial ligand libraries; the march for the detection of the low-abundance proteome continues [J]. *Biotechniques*, 2008, 44(5): 663-665.

[5] Chen Y, Lin S, Yeh Y Y, et al. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum [J]. *Electrophoresis*, 2005, 26: 2117-2127.

[6] Rothmund 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): 279-287.

[7] Fountoulakis M, Taka's B. Enrichment and proteomic analysis of low-abundance bacterial proteins [J]. *Methods Enzymol*, 2002, 358: 288-306.

[8] Fountoulakis M, Juranville J-F, Tsangaris G, et al. Fractionation of liver proteins by preparative electrophoresis [J]. *Amino Acids*, 2004, 26: 27-36.

[9] Wang Y Y, Cheng P, Chan D W, et al. A simple affinity spin-

tube filter method for removing high-abundant common proteins of enrichment low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis [J]. *Proteomics*, 2003(3): 243-248.

[10] Steel L F, Trotter M G, Nakajima PB, et al. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003(2): 262-270.

[11] Bjorhall K, Miliotis T, Davidsson P, et al. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples [J]. *Proteomics*, 2005(5): 307-317.

[12] Righetti P G, Boschetti E. The ProteoMiner and the Forty-Niners; searching for gold nuggets in the proteomic arena [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2008, 27(6): 596-608.

[13] Sihlbom C, Kanmert I, Bahr H, et al. Evaluation of the combination of bead technology with SELDI-TOF-MS and 2-D DIGE for detection of plasma proteins [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(9): 4191-4198.

[14] Boschetti E, Righetti P G. The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species [J]. *J Proteomics*, 2008, 71(3): 255-264.

[15] Hartwig S, Czibere A, Kotzka J, et al. Combinatorial hexapeptide ligand libraries (ProteoMinerTM): An innovative fractionation tool for differential quantitative clinical proteomics [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2009, 115(3): 155-160.

[16] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9): 1327-1333.

[17] Freeman W M, Lull M E, Guilford M T, et al. Depletion of abundant proteins from non-human primate serum for biomarker studies [J]. *Proteomics*, 2006, 6(10): 3109-3113.

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

[19] Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1023: 317-320.

[20] Echan L A, Tang H Y, Ali-Khan N, et al. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma [J]. *Proteomics*, 2005, 5(13): 3292-3303.

[21] Schlautman J D, Rozek W, Stetler R, et al. Multidimensional protein fractionation using ProteomeLab PF2D™ for profiling amyotrophic lateral sclerosis immunity: A preliminary report [J]. *Proteome Sci*, 2008(6): 26.