

# 人晶状体蛋白的质谱分析

姚志斌, 曲 勃, 赵 宇, 张劲松

基金项目: 中国辽宁省沈阳市科学技术计划基金资助项目(No. 1091172-1-05)

作者单位: (110005) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学第四临床学院眼科 辽宁省晶状体学重点实验室

作者简介: 姚志斌, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 张劲松, 男, 硕士, 主任医师, 眼科主任兼副院长, 研究方向: 白内障. cmu4h-zjs@126.com

收稿日期: 2010-07-20 修回日期: 2010-08-25

## Mass spectrometric analysis of proteins in human lens

Zhi-Bin Yao, Bo Qu, Yu Zhao, Jing-Song Zhang

**Foundation item:** Shenyang Municipal Science and Technology Planned Project, Liaoning Province, China(No. 1091172-1-05)

Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital, China Medical University, Key Laboratory of Lens Research of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Jing-Song Zhang. Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital, China Medical University, Key Laboratory of Lens Research of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. cmu4h-zjs@126.com

Received: 2010-07-20 Accepted: 2010-08-25

### Abstract

• **AIM:** To detect the protein compositions in human lens by mass spectrography.

• **METHODS:** Prefractionation of complete lens proteins were carried out for reduction of complexity of samples. Then the proteins were separated by one-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (1D SDS-PAGE), the gels were divided into slices in accordance with Coomassie brilliant blue staining, after digestion in the gel with trypsin, coupled with reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) separation and linear ion trap tandem mass spectrometry (LTQ) for analysis of eluted peptides. Bioinformatics tools were used for metabolic process analyses of identified proteins.

• **RESULTS:** A total of 574 lens proteins were identified. A number of unknown lens proteins and proteins isoforms were identified, including 38 proteins analogous to some proteins, 56 uncertain proteins, 27 uncharacterized proteins, 42 proteins known molecular weight but unknown functions. Meaningful results about metabolic process analyses were obtained by bioinformatics analyses for identified proteins.

• **CONCLUSION:** This study provide abundant data analyses of many unknown proteins of human lens and their corresponding metabolic processes.

• **KEYWORDS:** lens proteins; electrophoresis; polyacrylamide

gel; reversed-phase high-performance liquid; mass spectrometry; bioinformatics chromatography

Yao ZB, Qu B, Zhao Y, et al. Mass spectrometric analysis of proteins in human lens. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(10):1888-1891

### 摘要

**目的:** 应用质谱法检测人晶状体蛋白质组成。

**方法:** 完整晶状体预分离后再通过 1D SDS-PAGE 凝胶分离晶状体蛋白质, 依照考马斯亮蓝染色后的结果分成条带后进行胶内酶解, 酶解后的肽段通过反相液相色谱再次分离, 用线性离子阱串联质谱仪(LTQ)对洗脱出的肽段进行分析。运用生物信息学方法分析鉴定出的蛋白质。

**结果:** 共鉴定出人晶状体蛋白质 574 种, 许多未知蛋白和蛋白亚型被鉴定出, 相似于某种蛋白有 38 种, 不确定蛋白有 56 种, 没有特征的蛋白有 27 种, 已知分子质量但不知功能蛋白有 42 种。通过生物信息学分析实验鉴定出的晶状体蛋白质数据, 获得晶状体蛋白质一些重要代谢过程的结果。

**结论:** 提供大量未知人晶状体蛋白质数据及其代谢过程。

**关键词:** 晶状体蛋白质类; 电泳; 聚丙烯酰胺凝胶; 反相高效液相色谱; 质谱法; 生物信息学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.10.015

姚志斌, 曲勃, 赵宇, 等. 人晶状体蛋白的质谱分析. 国际眼科杂志 2010;10(10):1888-1891

### 0 引言

晶状体是目前生物体中蛋白质含量最丰富的器官, 蛋白质之间信号传导等涉及众多蛋白质的参与, 为真正理解晶状体的生理过程, 对晶状体未知蛋白质鉴定和分析是十分必要的。近年来, 生物质谱技术和生物信息学迅猛发展为蛋白质鉴定和分析提供了坚实的基础。一维聚丙烯酰胺凝胶电泳结合液相色谱串联质谱法, 成为鉴定蛋白质广泛使用的方法<sup>[1]</sup>。面对生物质谱技术分析出来巨大而复杂的蛋白质数据, 运用计算机管理数据, 控制误差、加速分析过程势在必行。生物信息学是在生命科学的研究中, 以计算机为工具对生物信息进行储存、检索和分析的科学。生物信息学大大加快了我们对所拥有的生物数据的整合和利用。我们采用液相色谱-串联质谱(LTQ 质谱仪)技术联合生物信息学对晶状体蛋白质的组成, 代谢途径等进行分析 and 预测, 旨在为研究晶状体蛋白质提供新依据。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 液相色谱仪-Agilent 1100 系列(美国 Agilent technology) 线性离子阱质谱仪 LTQ(Thermo Finnigan, San Jose, CA, 美国 Thermo Finnigan 公司), ImageScanner II 扫描仪, POWER PAC200 电泳仪(美国 Bio Rad 公司),

Optima™ L-80 XP 超速离心机(美国 Beckman 公司), Multiskan MK3 全自动酶标仪(芬兰)。乙腈(HPLC 级,美国 J. T. Baker 公司);测序级胰蛋白酶(trypsin, bovine pancrease)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、丙烯酰胺 Acrylamide Acr-, N, N' 甲叉双丙烯酰胺 N, N'-Methylenebis-acrylamide Bis、溴酚蓝、过硫酸铵、牛血清白蛋白(BSA)和碳酸氢氨购自美国 Sigma 公司。角膜移植后眼球中的正常透明晶状体,由中国医科大学眼科提供,年龄 30~35 岁,排除晶状体疾病、手术和外伤史。离断悬韧带,取出完整的晶状体。采集 6 个晶状体经无菌的去离子水轻柔彻底冲洗后,放入无菌的离心管中在液氮中速冻。

**1.2 方法** 将 6 个完整晶状体混合放入预冷的研钵中加液氮反复研磨成粉末。晶状体粉末中加入 Tris-HCL 缓冲液 50mmol/L, 并加入 0.1g/L DTT、广谱蛋白酶抑制剂匀浆,以 15000g 离心 90min,收集上清液为晶状体蛋白质成分 1。剩余的沉淀物将其再溶于裂解缓冲液(7mol/L 尿素,2mmol/L 硫脲,40g/L CHAPS,50mmol/L Tris-HCL, pH7.4)中,超声匀浆,依然按上述方法离心,收集上清液为晶状体蛋白质成分 2, 剩余沉淀物再溶于 40g/L SDS, 30g/L 巯基乙醇,50mmol/L Tris-Cl (pH8.8)的缓冲液中煮沸 5min, 超声匀浆,依然按上述方法离心,收集上清液为晶状体蛋白质成分 3。应用 Bradford 法对晶状体蛋白质成分 1, 2, 3 进行蛋白定量后,加入 SDS-PAGE 上样缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 20g/L SDS, 50g/L β-巯基乙醇, 50g/L 甘油)95℃ 加热 5min。配置 150g/L SDS-PAGE 不连续聚丙烯酰胺凝胶(浓缩胶 50g/L, 分离胶 150g/L, 丙烯酰胺:双丙烯酰胺=30:1)初步分离晶状体蛋白质,每泳道上各上样量为 20μg, 每个样品平行上样 3 个孔道,电泳电流 30~45mA, 电压 80~120mV, 溴酚蓝到达胶的底端附近(0.5~1cm)停止电泳,采用考马斯亮蓝 R-250 染色,染色后 SDS-PAGE 胶图及切胶位点见图 1, 将每个条带的胶分别切成约 1mm<sup>3</sup> 的小块,分别放于离心管中(碳酸氢氨:乙腈 1:1)脱色,加 DTT 还原样品,再加碘乙酰胺烷基化,冻干,加入测序级胰蛋白酶溶液(0.1g/L),于 37℃ 水浴酶解 16h,以 TFA 水溶液提取酶解肽段,冻干。上述 SDS-PAGE 条带样品的酶解肽段分别用辅助泵以 30μL/min 的流速首先进样到 5mm × 300μm i. d. Zorbax 300SB-C18 预柱上除盐,然后切换到 150mm × 75μm i. d. Zorbax 300SB-C18 分析柱(毛细管反相柱)进行线性梯度洗脱,流动相 A 液为 1g/L 甲酸的水溶液,流动相 B 液为 1g/L 甲酸的乙腈水溶液(乙腈为 84%);0~45min, B 液线性梯度 4%~50%;45~54min, B 液线性梯度 50%~100%;54~120min, B 液维持在 100%。晶状体 SDS-PAGE 条带样品洗脱出的肽段用 Thermo Finnigan LTQ 离子阱质谱进行串联质谱分析,母离子与子离子选择采用正离子模式,MS 全扫描 AGC 设定为 3 × 10<sup>4</sup>, MS/MS 扫描 AGC 设定为 1 × 10<sup>4</sup>, 数据处理采用 TurboSEQUENT 算法搜索相应的人类数据库。具有一个以上独特肽段被认为是鉴定结果。sequest 结果过滤参数为:当肽段所带的 Charge 为 +1, Xcorr ≥ 1.9, 当肽段所带 Charge 为 +2, Xcorr ≥ 2.2, 当肽段所带 Charge 为 +3, Xcorr ≥ 3.75; ΔCn ≥ 0.1; 假阳性率 FPR < 0.05。

## 2 结果

**2.1 晶状体蛋白质鉴定结果** 如图 1 所示:最左端泳道表示标准蛋白(Marker),晶状体蛋白质 1, 2, 3 平行上样 3 个

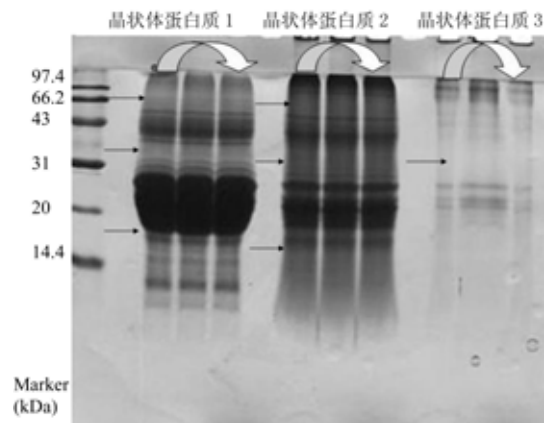


图 1 人晶状体蛋白质一维十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

泳道条带清晰一致,标记分子量在 20~31kDa 条带粗厚浓密。条带用胰蛋白酶酶解成肽段混合物后通过反相液相色谱分离,用 LTQ 串联质谱测试,重复上述实验 3 次后原始数据在人类 IPI human v3.36 蛋白数据库中检索并用严格的参数进行过滤,共鉴定出人晶状体蛋白质 574 种,其中鉴定出蛋白亚型见表 1,一些蛋白尚不能完全确定,类似于某种蛋白有 38 种,不确定蛋白有 56 种,没有特征的蛋白有 27 个,已知分子量但不知功能蛋白有 42 个。

## 2.2 采用 KEGG Pathway 研究经鉴定的晶状体蛋白质参与的生物学通路

所用到的数据库为(<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>):(1)参与糖酵解代谢途径(KEGG Pathway ID 号:hsa00010):经本实验鉴定的晶状体蛋白质有果糖-二磷酸醛缩酶-A,-C,α-烯醇化酶,磷酸甘油酸酯激酶-1,3-磷酸甘油醛脱氢酶,丙酮酸激酶同工酶类-M1,-M2,乳酸脱氢酶 A 链-1,γ-烯醇化酶,6-磷酸果糖激酶-1,双磷酸甘油酸变位酶,醛脱氢酶,6-磷酸葡萄糖异构酶,醛糖 1-表异构酶,醛糖 1-差向酶,脂肪醛脱氢酶-1。(2)参与磷酸戊糖代谢途径(KEGG Pathway ID 号:hsa00030):经本实验鉴定的晶状体蛋白质有果糖-二磷酸醛缩酶-A,-C,转酮醇酶,6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶,果糖磷酸激酶-1,37 KDa 蛋白质,6-磷酸葡萄糖异构酶,转醛醇酶,核糖磷酸焦磷酸激酶,磷酸葡萄糖酸内酯酶。(3)参与果糖-甘露糖代谢途径(KEGG Pathway ID 号:hsa00051):经本实验鉴定的晶状体蛋白质有果糖-二磷酸醛缩酶-A,-C,山梨醇脱氢酶,磷酸丙糖异构酶-1,醛糖还原酶,果糖磷酸激酶。(4)参与柠檬酸循环代谢途径(KEGG Pathway ID 号:hsa00020):经本实验鉴定的晶状体蛋白质有苹果酸脱氢酶,异柠檬酸脱氢酶。(5)参与谷胱甘肽代谢途径(KEGG Pathway ID 号:hsa00480):经本实验鉴定的晶状体蛋白质有谷胱甘肽合成酶,37kDa 蛋白,谷胱甘肽 S-转移酶-p, MU-2, MU-3, 线粒体的谷胱甘肽还原酶亚型,马来酰乙酰胺乙酸异构酶,细胞质的异柠檬酸脱氢酶[NADP]。(6)参与促分裂原活化蛋白激酶(MAPK signaling pathway)信号传导(KEGG Pathway ID 号:hsa04010):经本实验鉴定的晶状体蛋白质有促分裂原活化蛋白激酶 3, 细丝蛋白 A, 热休克同源 71kDa 蛋白 1 型,电压依赖性钙通道亚基 α-2/δ-2 前体-3, 细丝蛋白 C 亚型-1, PP13187, 无特征蛋白 TRAF6, 抑制核转录因子-B 激酶亚基抑制剂, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 TAO1 亚型 1, 鸟嘌呤核苷酸释放蛋白亚型 1, 微管相关蛋白 tau-F, 生长抑制和 DNA 损伤诱导蛋白 GADD45-α,

表1 人晶状体蛋白质亚型种类

蛋白名称	亚型种类	蛋白名称	亚型种类
CDNA FLJ 相关蛋白	22	信号传导相关蛋白	5
锌指蛋白	19	RHO 相关蛋白	5
微管蛋白相关蛋白	8	跨膜相关蛋白	4
肌动蛋白相关蛋白	6	过氧化物酶基因	4
膜联蛋白相关蛋白	6	层粘连蛋白	4
与泛素相关蛋白	6	γ 晶状体蛋白质	4
转录相关蛋白	6	组蛋白	4
α 晶状体蛋白	6	热激蛋白质	4
β 晶状体蛋白	6	锚蛋白相关蛋白	3
14-3-3 相关蛋白	5	泛素羧基末端水解酶类	3
细胞色素相关蛋白	5	丝、苏氨酸蛋白激酶类	3
T 复合物相关蛋白	5	DNA 相关酶类	3
谷胱甘肽 S-转移酶	3	硫氧还蛋白	2
连环蛋白	3	核转运蛋白	2
Ras 相关蛋白	3	果糖-二磷酸醛缩酶	2
核糖核酸酶	3	延长因子	2
细胞色素 P450	3	动力蛋白	2
蛋白酶体	3	细胞色素 c	2
同源异形盒	3	26S 蛋白酶体	2
缝隙联结蛋白	3	28S 核蛋白体蛋白	2
筑丝蛋白	2	磷脂酰肌醇-激酶	2
色氨酸-天冬氨酸重复序列	2	蛋白 S100	2
核小体组装蛋白	2		

核因子 NF-KAPPA-B P105 亚基-2。(7)参与磷脂酰肌醇信号系统(KEGG Pathway ID 号:hsa04070);经本实验鉴定的晶状体蛋白质有 1-磷酸肌醇-4,5-磷酸二酯酶 γ-1,磷脂酰肌醇 4-激酶 α 亚型 1,三磷酸肌醇 1 型受体-2,二酰甘油激酶 ζ,磷脂酰肌醇 3 激酶调节亚基 α 亚型 1,磷酸肌醇 3 激酶调节亚基 β。(8)参与泛素介导的蛋白酶体系统(KEGG Pathway ID 号:hsa04120);经本实验鉴定的晶状体蛋白质有遍在蛋白缀合酶 E2 S,遍在蛋白活化酶 E1, DNA 损伤结合蛋白,转录延伸因子 B 多肽 1,TRIP12 蛋白质,无特征蛋白 TRAF6,CULLIN -2, F-BOX/WD 重复蛋白 8 亚型 1。(9)参与细胞周期(KEGG Pathway ID 号:hsa04110);经本实验鉴定的晶状体蛋白质有 14-3-3 蛋白 ε,ζ,γ,η,α/β 亚型。蛋白 DBF4 同源亚型 1,WEE1 样蛋白激酶,DNA 依赖蛋白激酶催化亚基 1 亚型,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1C 亚型,生长抑制和 DNA 损伤诱导蛋白 GADD45α。

### 3 讨论

晶状体具有完整的囊膜,通过悬韧带与睫状突相连,晶状体样品采集时易和周围组织相分离,这为准确分析其蛋白质成分带来极其便利的条件。由于双向电泳方法对极酸和极碱的蛋白质不易检出,可能会遗漏一些蛋白质的检测。我们采用了一维聚丙烯酰胺凝胶电泳结合液相色谱串联质谱方法,由于晶状体内存在大量高丰度晶状体蛋白质,极大妨碍了晶状体内低丰度蛋白的检出,为了不掩盖低丰度蛋白及未知蛋白的测定,我们通过在一维聚丙烯酰胺凝胶电泳(1D SDS-PAGE)分离样品之前,尽可能将蛋白分离开来,减少样品的复杂程度而分离出更多清晰 SDS-PAGE 条带(如图所示)以利于后续的鉴定分析,在最

后结果鉴定判定上,具有一个独特的肽段也被认为是鉴定的结果。因为匹配有一个独特肽段鉴定的蛋白质在某一组织蛋白质组实验分析中往往有几百个,这样的蛋白质常常是代表低丰度蛋白。日本京都基因和基因组百科全书代谢通路(KEGG)是介绍生化途径和相关酶的代谢图谱,涵盖的代谢通路非常全面。我们通过 KEGG pathway 重点介绍了经鉴定的晶状体蛋白质参与的代谢通路。结果表明参与晶状体糖酵解代谢途径的酶为 16 种,糖酵解代谢途径是晶状体主要的糖代谢途径,其次是磷酸戊糖旁路,本实验验证 10 种酶参与磷酸戊糖旁路,我们发现参与柠檬酸循环即三羧酸循环代谢途径晶状体中的酶较少,只有苹果酸脱氢酶,异柠檬酸脱氢酶。参与果糖-甘露糖代谢途径有 6 种酶,包括山梨醇脱氢酶、醛糖还原酶。醛糖还原酶是多元醇通路的关键限速酶,在血糖正常时,它不被激活,而在高血糖状况下被激活,促使体内的葡萄糖转化为山梨醇。山梨醇脱氢酶使山梨醇转化为果糖。我们鉴定的参与谷胱甘肽代谢途径有 8 种酶。谷胱甘肽使蛋白质巯基保持在还原状态,从而防止蛋白质形成的超高分子量的凝聚物而使晶状体混浊,同时保护膜蛋白质巯基,减少膜的渗透,也有抗过氧化氢等过氧化物类的作用。我们鉴定的参与促分裂原活化蛋白激酶(MAPK signaling pathway)信号传导有 13 种蛋白质,发现促分裂原活化蛋白激酶 3 在晶状体中表达,有报道促分裂原活化蛋白激酶 1 和促分裂原活化蛋白激酶 2 是晶状体 MAPK 传导通路含量最丰富的蛋白激酶<sup>[2]</sup>,而本实验未出现,这需要进一步观察研究。参与磷脂酰肌醇信号系统有 6 种,并鉴定出磷脂酰肌醇 3 激酶调节亚基 α,磷酸肌醇 3 激酶调节亚基 β,磷酸肌醇 3 激酶调节晶状体纤维细胞的分化,并对分

化的细胞有保护作用<sup>[3]</sup>。参与泛素介导的蛋白酶体系统经本实验鉴定的晶状体蛋白质有遍在蛋白缀合酶 E2 S, 遍在蛋白活化酶 E1 等 8 种, 晶状体的上皮及晶状体纤维内都存在着泛素-蛋白酶体系统<sup>[4]</sup>, 对维持晶状体的透明性发挥着重要的作用, 在分化的晶状体细胞中遍在蛋白缀合酶 E2 S 和遍在蛋白活化酶 E1 活性升高, 遍在蛋白活化酶 E1 似乎是控制着泛素蛋白酶体系统速率<sup>[5]</sup>。参与细胞周期 (KEGG Pathway ID 号: hsa04110): 经本实验鉴定的晶状体蛋白质有 5 种 14-3-3 蛋白亚型, 14-3-3 蛋白是多功能调节蛋白, 哺乳动物有 7 种亚型 [ $\alpha/\beta, \gamma, \epsilon, \eta, \sigma, \tau$  (也称  $\theta$ ) 和  $\zeta/\delta$  大部分以同源或异源二聚体形式存在于细胞质中<sup>[6]</sup>。

我们鉴定出许多蛋白质亚型, 一种蛋白质的不同亚型往往通过不同的路径, 执行不同的功能, 鉴定出的晶状体蛋白质亚型为进一步深入研究蛋白质不同亚型在晶状体中执行什么样的功能, 通过怎样的途径执行功能提供了先决条件。在本实验中许多晶状体的酶蛋白被鉴定, 通过 KEGG pathway 分析发现酶在晶状体内发挥着非常广泛的功能。我们也鉴定出许多晶状体的未知蛋白质, 生物质谱技术不断日新月异, 已成为鉴定蛋白质重要和强有力的方法, 尤其对一些未知蛋白质的检测显示出独特的优势, 一些检测出蛋白的命名往往以先发现的组织而命名, 或者以一些代码命名, 一种蛋白质可在多种组织出现。这些蛋白质为创造新的实验思路提供了条件, 同时也需要通过实验进一步验证它们的存在。总之, 我们通过对正常晶状体蛋白质进行有效细致的分离, 应用线性离子阱串联质谱

仪 (LTQ) 和先进的生物信息学方法鉴定和分析了晶状体蛋白质组成和代谢途径, 为研究晶状体生理、病理变化奠定一定的实验基础。生物质谱技术和生物信息学加速我们对以蛋白质为基础的生命现象的研究, 为揭示生命的奥秘带来新的机遇和挑战。

致谢: 本研究由沈阳市科学技术计划基金资助 (No. 1091172-1-05)。

#### 参考文献

- 1 Gao BB, Stuart L, Feener EP. Label-free quantitative analysis of 1D-PAGE LC/MS/MS proteome: Application on angiotensin II stimulated smooth muscle cells secretome. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7 (12): 2399-2409
- 2 Li DW, Liu JP, Wang J, et al. Expression and activity of the signaling molecules for mitogen-activated protein kinase pathways in human, bovine, and rat lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44 (12): 5277-5286
- 3 Weber GF, Menko AS. Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary for lens fiber cell differentiation and survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47 (10): 4490-4499
- 4 Pereira P, Shang F, Hobbs M, et al. Lens fibers have a fully functional ubiquitin-proteasome pathway. *Exp Eye Res* 2003; 76 (5): 623-631
- 5 Shang F, Gong X, McAvoy JW, et al. Ubiquitin-dependent pathway is up-regulated in differentiating lens cells. *Exp Eye Res* 1999; 68 (2): 179-192
- 6 Chaudhri M, Scarabel M, Aitken A. Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300 (3): 679-685