

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.23.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201116.1138.010.html\(2020-11-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201116.1138.010.html(2020-11-16))

三氯醋酸/丙酮沉淀法与硫酸铵沉淀法去除 血浆高丰度蛋白效果的对比研究

吴天鸽¹, 黄文君^{1△}, 冯嘉轩²

(1. 吉林大学第二医院输血科, 长春 130000; 2. 长春中医药大学临床医学院实验中心, 长春 130000)

[摘要] **目的** 探讨三氯醋酸(TCA)/丙酮沉淀法与硫酸铵沉淀法去除血浆高丰度蛋白的效果。**方法** 选取 2017 年 6 月至 2019 年 6 月长春市中心血站采集的 O 型 RHD 阳性新鲜冰冻血浆 12 例, 组成 4 个样品并分别编号为 A1、A2、B1、B2。采用 TCA/丙酮沉淀法去除 A1、A2 样品血浆中高丰度蛋白, 硫酸铵沉淀法去除 B1、B2 样品血浆中高丰度蛋白, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证血浆中高丰度蛋白去除的效果。Clean-up Kit 去除蛋白质中干扰物质, 并采用 SDS-PAGE 和双向电泳(2-DE)验证 Clean-up Kit 的效果。**结果** 银染的 SDS-PAGE 胶图显示, TCA/丙酮沉淀法与硫酸铵沉淀法均可有效去除血浆高丰度蛋白, 但与硫酸铵沉淀法相比, TCA/丙酮沉淀法的 SDS-PAGE 条带更清晰。SDS-PAGE 和 2-DE 显示两种方法去除清蛋白的血浆 Clean-up Kit 后对去除血浆中其他干扰物质效果并不明显。**结论** TCA/丙酮沉淀法去除血浆高丰度蛋白的效果更好, 且去除血浆中清蛋白后的血浆 Clean-up Kit 对去除效果无显著影响, 可直接进行 2-DE、图像分析及质谱检测分析。

[关键词] 三氯醋酸/丙酮沉淀法; 饱和硫酸铵沉淀法; 血浆; 高丰度蛋白
[中图法分类号] R446.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)23-3876-04

Comparative study on the effect of TCA/acetone-precipitation and ammonium sulfate precipitation in removing plasma high-abundance protein

WU Tiange¹, HUANG Wenjun^{1△}, FENG Jiaxuan²

(1. Department of Blood Transfusion, the Second Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130000, China; 2. Experimental Center of Clinical Medical College, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the difference in the effect of trichloroacetic acid (TCA)/acetone precipitation and ammonium sulfate precipitation on the removal of plasma high-abundance protein. **Methods** The subjects were selected from 12 cases of O-type RHD-positive fresh frozen blood collected from the blood station from June 2017 to June 2019. 4 samples were composed and numbered A1, A2, B1 and B2 respectively. The high-abundance protein in the plasma of A1 and A2 samples was removed by TCA/acetone precipitation, which of B1 and B2 samples was removed by ammonium sulfate precipitation. SDS-PAGE was performed to verify the effectiveness of high-abundance protein removal in plasma. The Clean-up Kit removes interfering substances from proteins and its effect validated using SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis (2-DE). **Results** Silver-stained SDS-PAGE gel shows that both TCA/acetone precipitation and ammonium sulfate precipitation can effectively remove plasma high-abundance protein, but compared with ammonium sulfate precipitation, the belts of TCA/acetone precipitation SDS-PAGE is clearer. After Clean up after removing plasma albumin with the two methods, SDS-PAGE and 2-DE suggested that the effect of removing other interfering substances in plasma is not obvious. **Conclusion** TCA/acetone precipitation method has a better effect on removing plasma high-abundance protein, and Clean up Kit after removing has no significant effect on the removal effect, and can directly perform 2-DE, image analysis and mass spectrometry detection.

[Key words] trichloroacetic acid/acetone precipitation method; saturated ammonium sulfate precipitation method; plasma; high-abundance protein

蛋白质组学的第一步就是纯化来自细胞或组织 的蛋白质及其分离^[1-2]。因为清蛋白在血浆中含量约

占 55%，进行蛋白质组学二维凝胶电泳(2D-GE)分析时，特别是标本量比较少时，受到其高丰度蛋白的遮蔽影响，较难发现低丰度蛋白点^[3-4]。故而，怎样将血浆所含的高丰度蛋白去除，使低丰度蛋白富集，提高灵敏度是进行蛋白质组学 2D-GE 分析的关键步骤之一。三氯醋酸(TCA)/丙酮沉淀法和饱和硫酸铵沉淀法是目前去除血浆高丰度蛋白较为成熟的技术^[5-7]，但关于二者的去除效果及 Clean-up Kit 后效果比较的研究较少。本研究采用 TCA/丙酮沉淀法、硫酸铵沉淀法对血浆进行高丰度蛋白去除，并采用 Clean-up Kit 去除血浆中其他干扰物质，运用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、双向电泳(2-DE)对去除效果进行评价。

1 材料与方法

1.1 试剂及设备

SDS(美国 Sigma-Aldrich 公司)，TCA、丙酮(北京盖利精细化学品有限公司)，IPG buffer(pH 4~7，美国 Amersham Bioscience 公司)，HEPES、蛋白 Marker、DTT、过硫酸胺丙烯酰胺、溴乙锭、琼脂糖(北京鼎国公司)，甲×丙烯酰胺(上海生工生物公司)，尿素(博越生物公司)，溴酚蓝(美国 Sigma 公司)，蛋白质纯化试剂盒(美国 GE 公司)，TWEEN-20(美国 Thermo 公司)，37%甲醛(北京盖利精细化学品有限公司)。DNM-9602G 酶标仪(北京普朗新技术有限公司)，DHG-9101-2SA 电热恒温鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司)，-80℃超低温冰箱(和利制冷设备有限公司)，恒温金属浴(上海五相仪器仪表有限公司)，平板离心机(上海机械研究所)，凝胶图像分析系统(上海天能公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品准备

选取 2017 年 6 月至 2019 年 6 月长春市中心血站采集的 O 型 RHD 阳性新鲜冰冻血浆 12 例，每袋血浆取 40 μL，每 3 袋血清等体积混合，组成 4 个样品并分别编号为：A1、A2、B1、B2。将所有样品放置于 -80℃待分离检测，采用 TCA/丙酮沉淀法去除 A1、A2 样品血浆中高丰度蛋白，采用硫酸铵沉淀法去除 B1、B2 样品血浆中高丰度蛋白。

1.2.2 TCA/丙酮沉淀法^[5,8]

将置于 -80℃保存的血清样品于 37℃水浴融化，4℃12 000 r/min 离心 5 min，取 20 μL 上清液加入 EP 管中。向装有样品的 EP 管中加入 8 μL TCA 和 72 μL 冷丙酮(或 4 倍体积冷丙酮含 10% TCA)。将 EP 管放入 -20℃冰箱，放置 90 min。4℃15 000×g 离心 20 min，将上清液移入新的 EP 管中，再加入 1 mL 冷丙酮，沉淀蛋白，离心弃上清液用 PBS 溶解沉淀。将预冷的丙酮加入 EP 管中，清洗沉淀，EP 管在冰上放置 15 min。再次 4℃15 000×g 离心 20 min。用再水化液溶解蛋白(现用现配)，溶解后的

蛋白置于 4℃短时间保存。

1.2.3 饱和硫酸铵沉淀法^[9-10]

20 μL 血浆样品 + 80 μL PBS + 900 μL 3.9 mmol/L 硫酸铵。放置 4℃冰箱，静置 3 h。15 700×g 4℃离心 15 min。加入 1 mL 55%饱和度的硫酸铵。放置于 4℃冰箱，15 min。15 700×g 4℃离心 15 min。上清液移入新的 EP 管(分离出清蛋白)。沉淀加入 35%饱和度硫酸铵 500 μL。放置于 4℃冰箱，15 min。15 700×g 4℃离心 15 min。上清液移入新的 EP 管(分离出球蛋白)。沉淀放置 -20℃冻存[分离出的清蛋白和球蛋白分离用 20%冷 TCA(1 mL 液体加 250 μL TCA)沉淀过夜]。15 700×g 4℃离心 20 min，弃上清液。加入 20 μL 冷丙酮。离心，弃上清液，干燥。分离出的清蛋白、球蛋白和剩余蛋白用 140、100、40 μL 的再水化溶液溶解。

1.2.4 SDS-PAGE

配制凝胶，进行电泳，最后硝酸银染色。

1.2.5 Clean-up Kit

采用 Clean-up Kit 去除蛋白质中干扰物质，操作参考(美国 GE 公司)蛋白纯化试剂盒说明书。SDS-PAGE 和 2-DE 验证 Clean-up Kit 是否去除了蛋白质中干扰物质。测定血浆蛋白浓度，SDS-PAGE，胶条的再水化及蛋白上样，等电聚焦(IEF)，平衡 IPG 胶条，最后考马斯亮蓝染色。

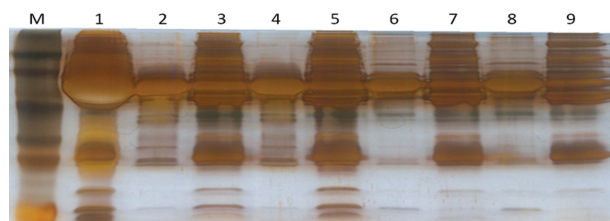
1.3 观察指标

两种方法去除血浆高丰度蛋白的效果：银染的 SDS-PAGE 胶图观察蛋白胶带，分别比较经不同方法去除高丰度蛋白的血浆样品中的清蛋白、下层沉淀蛋白条带的差异。Clean-up Kit 去除血浆蛋白质中干扰物质的效果：SDS-PAGE 分析 Clean-up Kit 前后的血浆蛋白考马斯亮蓝 SDS-PAGE 胶图，分别比较清蛋白、下层沉淀蛋白条带的差异。采用 2-DE 获得蛋白 2D 图像，比较 Clean-up Kit 前后不同方法检测的血浆蛋白的图像变化。

2 结果

2.1 两种方法去除血浆高丰度蛋白的效果

与条带 1 比较，A1、A2、B1、B2 样品中的清蛋白和下层沉淀蛋白胶带蛋白浓度明显更低，且 A1、A2 样品的条带清晰度更高，见图 1。



M: 标志物; 1: 血浆; 2: A1 清蛋白; 3: A1 下层沉淀蛋白; 4: A2 清蛋白; 5: A2 下层沉淀蛋白; 6: B1 清蛋白; 7: B1 下层沉淀蛋白; 8: B2 清蛋白; 9: B2 下层沉淀蛋白。

图 1 银染的 SDS-PAGE 胶图

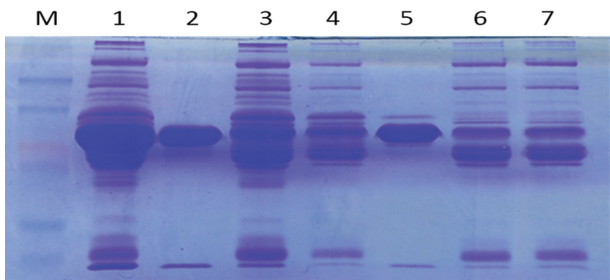
2.2 Clean-up Kit 前后血浆蛋白 SDS-PAGE 分析

TCA/丙酮沉淀法去除血浆清蛋白 Clean-up Kit 后(泳道 4)相比于未 Clean-up Kit 的条带(泳道 3),剩余的蛋白浓度降低,种类不丰富,不利于分析。而硫酸铵沉淀法去除血浆清蛋白 Clean-up Kit 后(泳道 7)相比于未 Clean-up Kit 的条带(泳道 6),蛋白浓度和种类去除不明显,见图 2。

2.3 Clean-up Kit 前后血浆蛋白 2-DE 分析

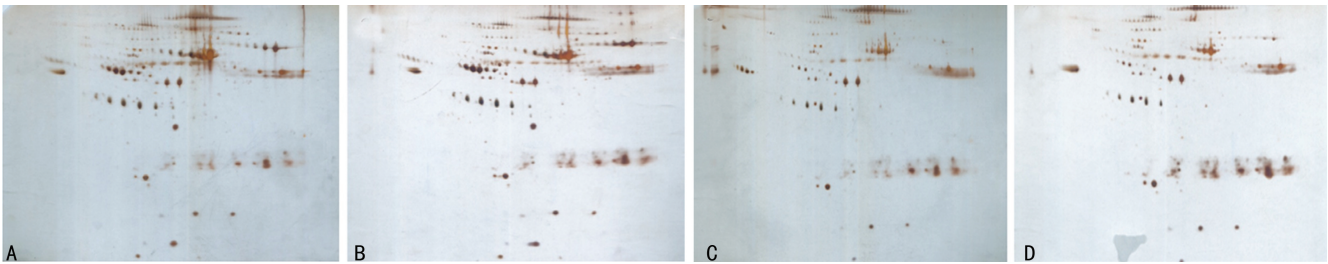
TCA/丙酮沉淀法去除清蛋白后的血浆经 Clean-up Kit 后相比于未 Clean-up Kit,有些蛋白质点更清晰,而有些蛋白质点不清晰,见图 3A、B。与此相类似,硫酸铵沉淀法去除清蛋白后的血浆经 Clean-up Kit 后与未 Clean-up Kit 相比,效果差别不明显,见图

3C、D。



M:标志物;1:血浆;2:TCA/丙酮沉淀法的清蛋白;3:TCA/丙酮沉淀法的下层沉淀蛋白;4:TCA/丙酮沉淀法 Clean-up Kit 后的下层沉淀蛋白;5:饱和硫酸铵沉淀法的清蛋白;6:饱和硫酸铵沉淀法的下层沉淀蛋白;7:饱和硫酸铵沉淀法 Clean-up Kit 后的下层沉淀蛋白。

图 2 考马斯亮蓝 SDS-PAGE 胶图



A:TCA/丙酮沉淀法 Clean-up Kit 前;B:TCA/丙酮沉淀法 Clean-up Kit 后;C:硫酸铵沉淀法 Clean-up Kit 前;D:硫酸铵沉淀法 Clean-up Kit 后。

图 3 血浆蛋白 2-DE 分析

3 讨 论

蛋白质组学研究能够有效识别蛋白,而蛋白水平的表达、修饰水平的变化与临床疾病息息相关^[11-12],尤其是血浆蛋白的分析在临床疾病诊断及进展、预后评估中均有重大意义^[13]。因此,如何安全地分离相应蛋白并对其进行识别、定位成为临床血浆蛋白检测关注的焦点。蛋白组分离技术是实现蛋白组学研究的基础,之后才能应用一维和二维凝胶电泳和色谱等分析,分离技术也对分析的结果直接产生影响^[11]。尽管蛋白组学分析的技术现已较为成熟,但由于血浆蛋白是由极为复杂、丰富的蛋白构成,其中高丰度的蛋白动态范围较大,会一定程度影响低丰度蛋白的检测,尤其是标本量较小时。以 2D-GE 分析为例,血浆中高丰度的蛋白会一定程度遮蔽低丰度蛋白,因此部分低丰度的蛋白点未能被发现。分离血浆高丰度蛋白是富集低丰度蛋白的关键之一,也是提高临床检验敏感度的关键点之一。

本研究采用了 TCA/丙酮沉淀法、硫酸铵沉淀法对血浆进行高丰度蛋白去除,采用银染的 SDS-PAGE 胶图观察去除高丰度蛋白后的血浆样品的清蛋白和下层沉淀蛋白水平,结果提示经过 TCA/丙酮沉淀法的血浆蛋白显像效果更清晰,且条带更为丰富。为了进一步探究干扰物质对血浆丰度蛋白去除效果的影

响,研究也对两种去除方法去除后的血浆蛋白样品进行 Clean-up Kit 去除血浆蛋白质中干扰物质,考马斯亮蓝 SDS-PAGE 显示 TCA/丙酮沉淀法去除血浆清蛋白 Clean-up Kit 后能有效降低蛋白的浓度,但是蛋白条带的丰富度减少。而硫酸铵沉淀法 Clean-up Kit 前后蛋白浓度和种类均无显著差异。而通过蛋白质 2D 图像分析显示 Clean-up Kit 对两种方式去除丰度蛋白的血浆样品均无显著影响,这也提示在实际检验中不需要 Clean-up Kit,可直接进行 2-DE、图像分析及质谱检测分析,从而简化实验步骤,节约实验成本。CHEN 等^[14]分别利用 0~20% 的 TCA/丙酮溶液优化血浆中清蛋白的去除方法,发现 10% 的 TCA/丙酮溶液效果最佳。但有研究优化实验得出用 4 倍样品体积的 60% TCA/丙酮溶液去除血浆中高丰度蛋白质的效果最为理想^[1]。本研究采用 4 倍体积冷丙酮含 10% TCA 去除血浆中高丰度蛋白质,其效果通过与研究报道^[5,14]中的图像条带显示结果类似,但本研究尚未设置对照研究,未明确不同 TCA/丙酮溶液梯度及体积对血浆高丰度蛋白去除的效果,仍需进一步深入研究。

综上所述,TCA/丙酮沉淀法去除高丰度蛋白比硫酸铵沉淀法去除高丰度蛋白特异性较好。

参考文献

- [1] 王启迪,罗坚,全灿,等. 蛋白质纯化技术研究进展[J]. 现代生物医学进展,2017,17(32):6389-6392.
- [2] 张丽华,单亦初,张弓,等. 深度覆盖的蛋白质组精准鉴定与定量新技术[J]. 中国基础科学,2018,20(1):49-52.
- [3] 顾一心,何利华,孟凡亮,等. 蛋白电泳凝胶放置时间对蛋白丰度的影响分析[J]. 中国病原生物学杂志,2014,9(5):427-429.
- [4] 王班琴,秦兆宇,柏淑美,等. 双向电泳中人血清蛋白样品不同处理方法的比较[J]. 山东大学学报(医学版),2009,47(11):89-94.
- [5] 王俊,冯里茹,于微,等. 改良 TCA/丙酮沉淀法去除肥胖人群血浆中的高丰度蛋白质[J]. 卫生研究,2013,42(5):741-747.
- [6] HAO R J, ADOLIGBE C, JIANG B J, et al. An optimized trichloroacetic acid/acetone precipitation method for two-dimensional gel electrophoresis analysis of qinchuan cattle longissimus dorsi muscle containing high proportion of marbling[J]. PLoS One,2015,10(4):e0124723.
- [7] QIN, H M, ZHANG X H, LIU H, et al. Mechanism of ammonium sulfate regulation effect on microstructure of Y_2O_3 nanopowders via urea precipitation method[J]. Cryst Eng Comm, 15(25):5076-5081.
- [8] Muhammad A R, LIU H, CHENG Y F, et al. Combining phytate/ Ca^{2+} fractionation with trichloroacetic acid/acetone precipitation improved separation of low-abundant proteins of wheat (*triticum aestivum* L.) leaf for proteomic analysis[J]. J Integr Agric,2013,12(7):1123-1129.
- [9] PENG F, BIAN J, PENG P, et al. Separation and characterization of acetyl and non-acetyl hemicelluloses of arundo donax by ammonium sulfate precipitation[J]. J Agric Food Chem, 2012,60(16):4039-4047.
- [10] LI J S, LIU Z F, WU L, et al. Influence of ammonium sulfate on YAG nanopowders and Yb:YAG ceramics synthesized by a novel homogeneous co-precipitation method [J]. J Rare Earth,2018,36(9):981-985.
- [11] 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.
- [12] LIN B, WHITE J T, WU J, et al. Deep depletion of abundant serum proteins reveals low-abundant proteins as potential biomarkers for human ovarian cancer[J]. Proteomics Clin Appl,2009,3(7):853-861.
- [13] CRISTEA I M, GASKELL S J, WHETTON A D. Proteomics techniques and their application to hematology[J]. Blood,2004,103(10):3624-3634.
- [14] CHEN W R, HE Z L, YANG X E, et al. Zinc efficiency is correlated with root morphology, ultrastructure, and antioxidative enzymes in rice[J]. J Plant Nutr,2009,32(2):287-305.

(收稿日期:2020-03-16 修回日期:2020-07-17)