

• 研究论文 •

水热法制备质谱专用提取多肽的金属螯合纳米磁珠

王娜^{†,a} 董方霆^{†,b} 张学敏^b 李爱玲^b 王杰^b
王红霞^b 李萍^b 吴胜明^b 杨晓虹^{*,a}

(^a 吉林大学药学院 长春 130021)

(^b 国家生物医学分析中心 北京 100850)

摘要 应用水热法合成质谱专用提取血清多肽的金属螯合纳米磁珠, 可用于质谱对血清中多肽分布情况的研究, 获得血清多肽谱. 对磁珠进行透射电镜(TEM), 原子力显微镜(AFM)和傅立叶红外光谱 FT-IR 的表征, 显示该粒子粒径在 70~90 nm. 并通过质谱验证该金属螯合磁珠能有效提取血清中的多肽, 该磁珠为质谱进行疾病诊断解决样品制备的技术难题, 具有广阔应用前景.

关键词 热水解法; 质谱; 多肽; 金属螯合磁珠

Hydrothermal Synthesis of Metal-Chelated Magnetic Nanobeads for Exclusive Use of Peptides Extraction by Mass Spectrum

WANG, Na^{†,a} DONG, Fang-Ting^{†,b} ZHANG, Xue-Min^b LI, Ai-Ling^b WANG, Jie^b
WANG, Hong-Xia^b LI, Ping^b WU, Sheng-Ming^b YANG, Xiao-Hong^{*,a}

(^a *Pharmaceutical Department of Jilin University, Changchun 130021*)

(^b *National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850*)

Abstract A novel hydrothermal route has been developed to produce metal-chelated magnetic nanobeads which help to study serum peptides profiles by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrum. The obtained particles were analyzed by TEM, AFM and FT-IR techniques, and it showed that the average particle size ranged between 70~90 nm. It is validated by mass spectrum that the metal-chelated magnetic nanobeads can extract serum peptides in an effective way. These beads are very useful in the clinic studies on serum preparation for mass spectrum in future.

Keywords hydrothermal method; mass spectrum; peptide; metal-chelated magnetic nanobead

目前, 生物质谱技术在卵巢癌、鳞状上皮细胞癌、胰腺癌、前列腺癌等疾病诊断中的应用已经获得重要进展, 并显示了良好的应用前景^[1~5]. 而生物质谱快速分析血清中疾病标志肽谱, 是生物质谱和蛋白质组技术用于临床重大疾病早期诊断和预警的关键环节. 生物质谱用于疾病诊断的样品制备技术, 必须实现样品微量化和分析过程快速化、通量化、标准化, 结果具有可重复性和稳定性. 而血清直接用于质谱分析不能获得多肽信

号, 因此关键是发展一套适用于质谱分析血清的专用技术, 金属磁珠是目前最有希望达到上述要求的新技术, 它能与蛋白质中的组氨酸、色氨酸以及含有巯基的氨基酸侧链发生螯合反应^[6], 将蛋白质固定于磁珠表面, 再利用磁珠的磁性对其进行分离, 并将多肽洗脱下来用于质谱分析.

磁珠是近年发展起来并已广泛应用于生物医学领域的一种新型多功能试剂. 磁珠的结构通常由具有磁性

* E-mail: xiaohongyang88@126.com. [†]共同第一作者: 对本文研究工作具有同等贡献.

Received April 11, 2006; revised May 29, 2006; accepted October 27, 2006.

国家 973 计划(No. 2006cb500700)资助项目.

的内核及核外包裹的高分子外壳两部分组成. 由于磁核对外磁场的响应, 磁珠可在磁场中定向移动. 利用这一性质可以对磁珠进行定位, 或将磁珠从周围介质中迅速分离出来. 高分子外壳的表面多样性决定了磁珠可与各种生物活性物质(如抗体、抗原、受体、酶、核酸等)偶联, 这些生物活性物质被固定于磁珠上后可在反应介质中进一步识别相应的抗原或抗体、配体、底物或核酸, 从而达到分离或检测目的^[7~9]. 因此, 磁珠集载体功能和分离功能于一身, 利用物理学、化学和生物医学原理, 将许多烦琐复杂的操作简单化, 使传统测试的周期大大缩短, 这使得它在细胞学、免疫学、微生物学、分子生物学及临床诊断与治疗等许多领域得到了广泛应用^[10,11]. 目前磁珠主要用于免疫磁性分离、细胞及细胞器的分离、微生物的检测以及药物合成中有效化合物的筛选和药品的靶向治疗研究等领域. 国内现有的用于蛋白提取的磁珠主要为免疫磁珠, 通过磁珠表面的特异抗原或抗体与相应的蛋白结合, 但是该方法只提取具有免疫亲和能力的特定蛋白, 不适合于蛋白质组学的应用^[12].

在传统临床检测方法中, 主要应用蛋白质双向凝胶电泳(2D-PAGE)和蛋白质芯片技术以及固相萃取小柱等技术^[13,14]提取体液中的蛋白和多肽, 并通过质谱分析技术来比较健康人和疾病患者的特定蛋白质的表达差异. 但是 2D-PAGE 灵敏度较低而且操作复杂, 不适合于大量样品的高通量分析和低含量蛋白质多肽的检测; 蛋白质芯片技术是固定于一种质谱-表面增强激光解吸电离飞行时间质谱的基础上的一种技术, 而且蛋白质芯片的市场价格非常昂贵、提取效率也不能达到最大; 固相萃取小柱是通过各种固相填料来提取分离多肽, 该方法操作也比较复杂, 而且提取效率也不高.

本文研究了水热法合成质谱专用提取多肽的纳米磁珠^[15,16], 并通过透射电镜(TEM), 原子力显微镜(AFM)和傅立叶红外光谱(FT-IR)对磁珠进行了表征; 同时质谱分析也显示了良好的提取效率.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

FeCl₃·6H₂O: 分析纯 AR, 国药集团化学试剂有限公司生产; PEG 1500: *M_r* 1400~1600, FLUKA 产品; 二甲基亚砜: 99.7%, ACROS ORGANICS 产品; 吡咯烷酮(2-pyrrolidone): MERCK-Schuchardt 产品; 乙醚、丙酮、氢氧化钠、环氧氯丙烷、硫酸铜、硝酸、过氧化氢: 均为国产分析纯, 亚氨基二乙酸(IDA): 国产化学纯; 磁珠

提取血清多肽用系列缓冲溶液, 由本课题组自制. 实验所用血清样品购自北京市红十字中心血站.

1.1.2 仪器

CM120 透射电镜, Philips 公司; FTS-65A 傅立叶变换红外光谱仪, Bio-Rad 公司; autoflex 高通量基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS), Bruker 公司; SPM 9500-J3 原子力显微镜, Shimadzu 公司; ICP-MS 7500C, 安捷伦科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 热水解法一步合成表面连有羟基的纳米磁珠

将 FeCl₃·6H₂O (1.35 g)充分溶解在过量吡咯烷酮中, 并在搅拌条件下加入 PEG-1500 (7.5 g), PEG-1500 与 FeCl₃ 的物质的量比为 1:2, 充分混匀后在氮气保护下加热回流 3 h, 然后用弱极性有机溶剂体积比为 5:1 的乙醚/丙酮沉淀纳米磁性粒子, 一步反应得到表面包被羟基的纳米磁珠.

1.2.2 表面螯合金属的纳米磁珠的制备

在上述的纳米磁珠中加入 5 mol/L 氢氧化钠溶液在 80 °C 活化反应 30 min; 再加入 2:4:5 (V:V:V) 的 5 mol/L 氢氧化钠/二甲基亚砜/环氧氯丙烷, 在 40 °C 下继续活化反应 4 h; 然后再加入 1 mol/L 络合试剂亚氨基二乙酸并于 60 °C 水浴反应 4 h, 最后将纳米磁珠置于 0.01 mol/L 硫酸铜溶液中进行反应, 得到表面螯合金属铜的纳米磁珠.

1.2.3 金属螯合磁珠提取血清中多肽

取金属螯合纳米磁珠 5 μL, 用结合缓冲溶液洗 3 次, 使磁珠处于结合缓冲溶液的条件下, 每次用磁场进行分离, 然后加入 5 μL 血清样品, 充分混匀, 并在室温孵育 10 min, 通过磁场进行分离; 再加入冲洗缓冲溶液洗 3 次, 将未结合的蛋白质、多肽及血清中的盐充分洗去, 最后加入洗脱液将结合的蛋白质、多肽洗脱下来, 得到可直接用于质谱分析的蛋白质和多肽样品.

1.2.4 质谱分析

基质为 α-羟基肉桂酸(HCCA), 配置成饱和水溶液; 取磁珠提取的多肽样品 1 μL 与基质以 1:1 (V:V)混匀后点靶; 用 MALDI-TOF-MS 检测血清多肽出峰情况, 得到血清多肽谱图.

1.2.5 不同批次金属螯合磁珠提取血清多肽的稳定性

选择一批血清样品, 按照 1.2.3 节的方法用 3 批磁珠分别为 MB-1, MB-2, MB-3 提取该血清中的多肽, 再用 MALDI-TOF-MS 检测, 观察质谱出峰情况的重复性.

1.2.6 金属螯合磁珠提取血清多肽的重复性

用同一批磁珠在不同时间处理同一血清样品, 处理流程按照 1.2.3 节所述方法, 得到的多肽样品用

MALDI-TOF-MS 检测, 观察出峰情况的重复性.

1.3 分析测试

(1)用透射电镜 Philips CM120、原子力显微镜 Shimadzu SPM 9500-J3 测定磁珠的形态结构和粒径大小; (2)用 Bio-Rad 公司 FTS-65A 傅立叶变换红外光谱仪测定磁珠表面的功能基团; (3)用 HP 公司的电感耦合等离子体质谱检测磁珠铜元素的含量; (4)用 Bruker 公司 autoflex 高通量基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)检测金属螯合磁珠提取的血清多肽的质谱图.

2 结果与讨论

2.1 热水解法制备的质谱专用金属磁珠粒径均匀分布

磁珠的主要制备方法有化学共沉淀法^[17]、单体聚合及水热法^[15]. 化学共沉淀法是早期制备磁性复合微球的方法, 利用该法制备磁性复合微球的优点是方法简单、易于操作, 但是由于此法是有有机高分子直接在无机磁性粒子表面沉积, 所以制得的复合微球的粒径分布较宽, 粒径大小不易控制, 且形状不规则, 因此在应用时受到了很大的限制. 单体聚合法是在无机磁性粒子和有机单体存在的条件下, 根据不同的聚合方式加入引发剂、表面活性剂、稳定剂(包括超分散剂、明胶等)等物质, 聚合制备磁性复合微球的方法. 虽然单体聚合法制备磁性复合微球与化学共沉淀法相比有了相当大的进步, 但是制得的磁性复合微球的磁含量和规整性等方面仍存在很多问题. 而水热法制备出的磁性复合微球的分散性好, 磁含量高, 本文即采用水热法制备纳米金属磁珠. 实验过程中发现回流温度、回流时间及搅拌速度都会影响磁珠的粒径分布, 根据我们的研究需要, 我们优化了一系列实验条件, 最终选择出合适的回流温度为 240 °C 以上, 回流时间 3 h, 搅拌速度控制在 1000 r/min. 在这个实验条件下, 我们得到的磁珠磁响应好、粒径分布均匀, 在 40 nm 左右范围, 而且进一步发生化学反应生成最终的金属螯合磁珠后, 粒径仍可控制在 70~90 nm 范围.

2.2 磁珠合成过程中关键中间体表面包被羟基

热水解法一步合成的表面连有羟基的纳米磁珠中间体, 分布均匀, 透射电镜下观察为椭球形, 粒径在 40 nm 左右(图 1); 红外光谱(图 2)观察结果显示有 PEG 特征峰. PEG 1500 在波数 1100 cm^{-1} 附近存在一组强吸收峰, 对应于 PEG 分子中的 C—O—C 键的伸缩振动, 可用作鉴定 PEG 存在的特征峰位, 用于确定 PEG 是否已成功固载到磁性微球上. 由图可见, 固载 PEG 侧链的磁珠在波数 1100 cm^{-1} 处存在较强的吸收峰, 因此可确

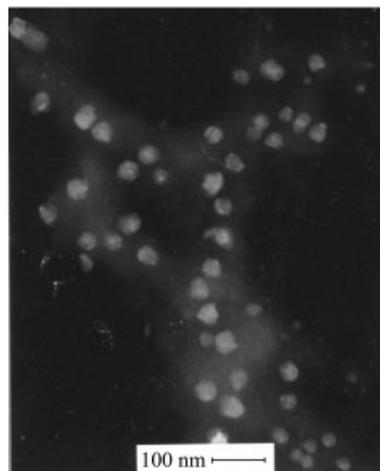


图 1 样品的透射电镜图

Figure 1 TEM micrograph of samples

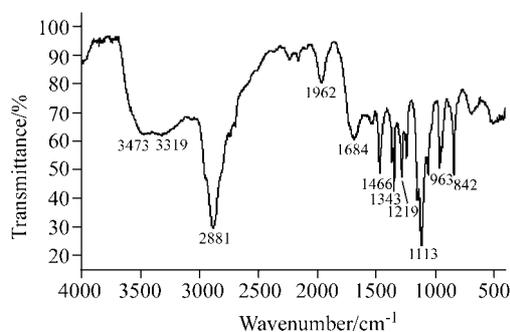


图 2 表面包被 PEG 的磁珠的红外光谱图

Figure 2 FTIR patterns of PEG-modified magnetic beads

证 PEG 侧链已经有效固载. 由谱图可见, 磁珠中存在着羟基.

2.3 表面螯合金属的纳米磁珠的结构形态

表面螯合金属的纳米磁珠, 分布均匀, 螯合试剂与铜连接后为八面体结构, 其立体结构及吸附蛋白示意图见图 3^[11]. 原子力显微镜下观察为椭球形, 粒径在 80 nm 左右(图 4). 电感耦合等离子体质谱检测磁珠表面铜元素的含量在 5×10^8 g/L.

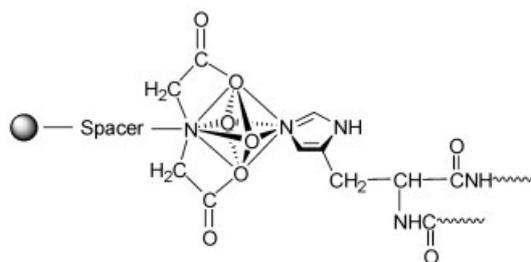


图 3 磁珠的八面体结构

Figure 3 Octahedral structure of magnetic beads

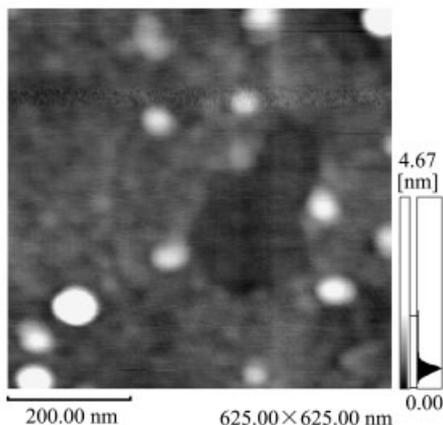


图4 样品的原子力显微镜图
Figure 4 AFM micrograph of samples

2.4 磁珠提取血清多肽用于质谱检测的应用

血清直接分析, 质谱检测不到任何肽段(图略); 金属螯合磁珠提取的血清中多肽与基质混合点靶后, MALDI-TOF-MS 检测到分子量在 1000—10000 Da 之间的大量多肽(图 5)。

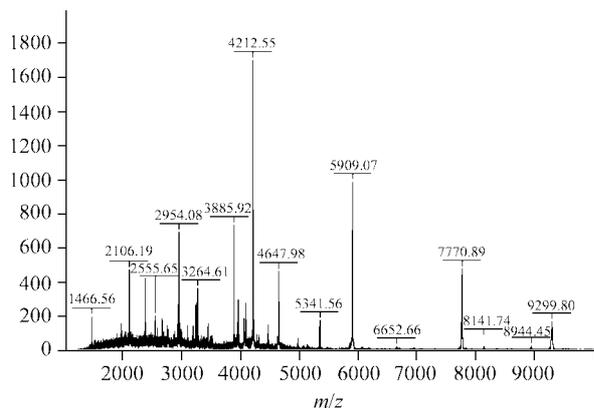


图5 MALDI-TOF-MS 分析金属螯合磁珠提取的血清多肽图
Figure 5 MALDI-TOF-MS spectrum of serum peptides extracted by metal-chelated magnetic beads

2.5 磁珠提取血清多肽的重复性

3 批合成的金属螯合磁珠提取的血清多肽, 质谱检测后出峰情况匹配良好(图 6); 同一批磁珠不同时间提取同一血清样品的多肽, 质谱检测出峰情况匹配良好(图 7)。

3 结论

基于目前质谱分析和临床疾病诊断研究的迫切要求, 本课题组研究开发的纳米金属螯合磁珠体系可稳定地提取血清样品中的多肽, 并直接用于质谱分析. 该磁珠利

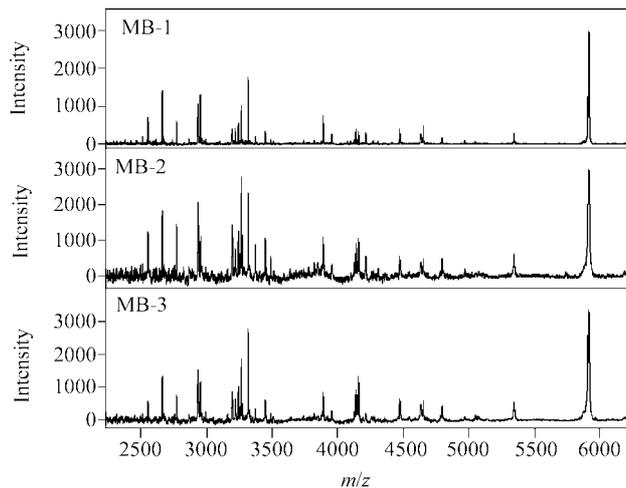


图6 3 批金属螯合磁珠提取血清多肽重复性
Figure 6 Reproducibility of serum peptides extracted by three batch of metal-chelated magnetic beads

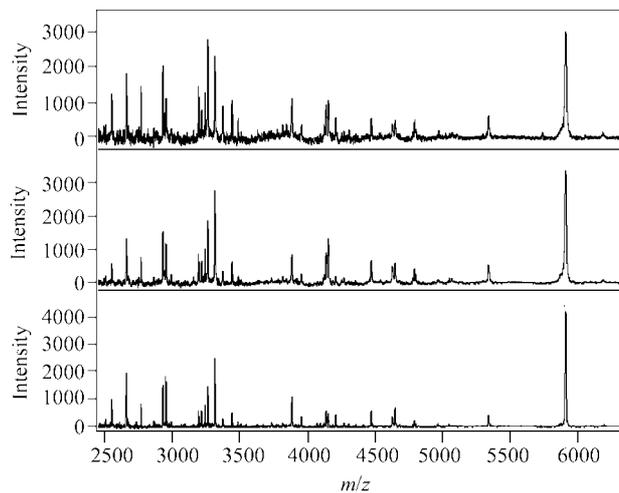


图7 第 1 批金属螯合磁珠三次提取血清多肽质谱图
Figure 7 MS spectra of serum peptides extracted by the first batch of metal-chelated magnetic beads

用金属亲和和层析原理, 配合一套适合于质谱分析的缓冲溶液, 尽量多的从体液中得多肽和蛋白质, 为质谱迅速、高通量鉴定体液中蛋白多肽信号奠定了基础, 同时解决了样品制备的技术难题, 可进一步扩大质谱技术在生物医学研究领域中的应用。

References

- Petricoin, E. F.; Ardekani, A. M.; Hitt, B. A. *Lancet* **2002**, 359, 572.
- Adam, B. L.; Qu, Y.; Davis, J. W. *Cancer Res.* **2002**, 62, 3609.
- Zhang, Z.; Bast, R. C.; Yu, Y. *Cancer Res.* **2004**, 64, 5882.
- Mark, A. R.; Paul, C.; Jason, N. *Cancer Res.* **2003**, 63,

- 6971.
- 5 Kazufumi, H.; Yasuharu, H.; Tomoko, U. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 10613.
- 6 Radhakrishna, S. T.; King, C. C.; Darue, A. P. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 1096.
- 7 Luers, G. H.; Hartig, R.; Mohr, H. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1205.
- 8 John, M. C. L.; Alf, A. L. *J. Immunol. Methods* **1991**, *137*, 1.
- 9 Zhu, Y. H.; Wang, Q.-B.; Gu, H.-C. *Acta Acad. Med. Sin.* **2002**, *24*, 118.
- 10 Seo, K. H.; Brackett, R. E.; Frank, J. F. *J. Food Microbiol.* **1998**, *44*, 115.
- 11 Wei, Q.; Yao, R. H.; Bao, S. X. *J. South Chin. Univ. Technol. (Nat. Sci. Ed.)* **2000**, *28*, 82.
- 12 Hebateer, B. U. *Chemical Engineer*, **2004**, *105*, 57 (in Chinese).
(布和巴特尔, 化学工程师, **2004**, *105*, 57.)
- 13 Anne, K. C.; Shabaz, M.; Jakob, B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1578.
- 14 Scot, R.; Weinberger, R. I.; Viner, P. H. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3182.
- 15 Zhen, L.; Qiao, S.; Mingyuan, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 123.
- 16 Wei, Q.; Yao, R. H.; Bao, S. X. *J. Funct. Polym.* **2000**, *13*, 90 (in Chinese).
(魏琪, 姚汝华, 鲍时翔, 功能高分子学报, **2000**, *13*, 90.)
- 17 Bahar, T.; Celibi, S. S. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *72*, 69.

(A0604116 LI, W. H.; LING, J.)