

UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分析人血白蛋白及人免疫球蛋白中非目标蛋白成分

张姮婕, 唐瑶, 王觉晓, 蒋佳兴, 龙丽娟, 马晶, 王叔桥, 李炎*, 杨蕾[四川省药品检验研究院(四川省医疗器械检测中心), 国家药品监督管理局疫苗及生物制品质量控制与评价重点实验室, 四川省药品监督管理局生物制品质量监测与风险评估重点实验室, 成都 611731]

摘要:目的 采用超高效液相色谱-串联线性离子阱-轨道阱组合高分辨质谱技术对人血白蛋白及人免疫球蛋白中非目标蛋白成分进行定性分析。方法 采用 ACQUITY UPLC peptide BEH C₁₈(300Å, 1.7 μm, 2.1 mm×100 mm)色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈为流动相进行梯度洗脱, 质谱采用 Full MS/dd-MS²(TopN)扫描模式。结果 从人血白蛋白及人免疫球蛋白中共鉴定出非目标蛋白 52 个, 其中人血白蛋白样本中鉴定非目标蛋白 25 个, 人免疫球蛋白样本中鉴定非目标蛋白 27 个。结论 建立的定性方法可快速、准确、系统地识别出人血白蛋白及人免疫球蛋白中多种蛋白, 为该类药物质量控制及进一步的临床应用提供参考。

关键词: 超高效液相色谱-串联线性离子阱-轨道阱组合高分辨质谱技术; 血液制品; 非目标蛋白; 定性研究; 人血白蛋白; 人免疫球蛋白

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)19-2713-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223178

引用本文:张姮婕, 唐瑶, 王觉晓, 等. UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分析人血白蛋白及人免疫球蛋白中非目标蛋白成分[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2713-2720.

Analysis of Non-target Proteins in Human Albumin and Human Immunoglobulin by UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS

ZHANG Hengjie, TANG Yao, WANG Juexiao, JIANG Jiaying, LONG Lijuan, MA Jing, WANG Shuqiao, LI Yan*, YANG Lei[Sichuan Institute for Drug Control(Sichuan Testing Center of Medical Devices), NMPA Key Laboratory for Quality Control and Evaluation of Vaccines and Biological Products, SCMPA Key Laboratory for Quality Monitoring and Risk Assessment of Biological Products, Chengdu 611731, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze and identify non-target proteins in human albumin and human immunoglobulin by ultra high performance liquid chromatography tandem linear ion trap orbitrap mass spectrometry. **METHODS** The extract was separated on a ACQUITY UPLC peptide BEH C₁₈(300Å, 1.7 μm, 2.1 mm×100 mm) column and the gradient elution was performed with mobile phase consisting of 0.1% formic acid aqueous solution-0.1% formic acid acetonitrile. The analytes were detected in Full MS/dd-MS²(TopN). **RESULTS** A total of 52 non-target proteins were identified from human albumin and human immunoglobulin. Among them, 25 non-target proteins were identified in human albumin samples, and 27 non-target proteins were identified in human immunoglobulin samples. **CONCLUSION** The established qualitative method can rapidly, accurately and systematically identify various proteins in human albumin and human immunoglobulin. The results provide reference for the quality control of the preparation as well as its further clinical application.

KEYWORDS: UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS; blood products; non-target proteins; qualitative analysis; human albumin; human immunoglobulin

人血浆是一种高度复杂的混合物, 含有多种血浆蛋白。这些蛋白质大多具有不同的生理功能和不同物理化学性质。人血浆蛋白按其功能的不同, 可分为白蛋白及其他传输蛋白、免疫球蛋白、凝血和纤维蛋白溶解系统蛋白、补体系统蛋白、

蛋白酶抑制剂及其他微量蛋白成分等。

由健康人血浆^[1]或经特异免疫的人血浆, 经分离、提纯或由重组 DNA 技术制成的血浆蛋白组分, 以及血液细胞有形成分统称为血液制品。血液制品属于生物制品行业的细分领域。血液制品主要

基金项目: 国家药典委员会国家药品标准制修订研究课题(2022S06)

作者简介: 张姮婕, 女, 硕士, 主管药师 E-mail: hedy_zhj@163.com

共同第一作者: 唐瑶, 女, 硕士, 药师 E-mail: 1340450081@qq.com

*通信作者: 李炎, 男, 硕士, 主任药师 E-mail: 34904523@qq.com

包括三大类：人血白蛋白、人免疫球蛋白和人凝血因子。血液制品大多只是富含目标蛋白(如人血白蛋白)的蛋白混合物浓缩剂而已。因此，不仅应关注目标蛋白，也应关注其他蛋白。

本研究采用超高效液相色谱-串联线性离子阱-轨道阱组合高分辨质谱(UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS)技术对人血白蛋白及人免疫球蛋白中非目标蛋白成分进行定性分析，以期理解血液制品并整体提升其质量控制水平以及进一步规范血液制品提供数据基础和科学依据。

1 材料

1.1 仪器

e2696-2489 液相色谱仪搭配紫外检测器、ACQUITY UPLC peptide BEH C₁₈(300Å, 1.7 μm, 2.1 mm×100 mm)色谱柱均来自美国 Waters 公司；Vanquish 液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司)；Q Exactive Plus 高分辨傅里叶变换静电场轨道阱质谱、X3R 高速冷冻离心机均购自美国 Thermo Fisher 公司；TSK G3000SW(7.5 mm×600 mm)色谱柱(日本 TOSOH 株式会社)；超滤管(德国 Eppendorf 公司，截留 10 kDa)。

1.2 试剂

二水磷酸二氢钠(分析纯，成都市科龙化工试剂厂，批号：2017020101)；十二水磷酸氢二钠(优级纯，成都市科隆化学品有限公司，批号：2020060101)；甲酸(质谱级，Fisher Scientific，批号：179246)；乙腈(色谱纯，Fisher chemical，批号：F22MAL201)；盐酸胍(批号：F1918055；纯度：99.5%)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA，批号：J1908081；纯度≥99%)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT，上海麦克林生化科技有限公司，批号：C10911206；纯度：99%)；Sequencing Grade Modified Trypsin(Promega Corporation，批号：0000480138)；1M Tris-HCl pH8.0(Invitrogen Thermo Fisher，批号：2328440)；人血白蛋白样品 2 批(厂家 A，批号：202006080B, N20201206B)；人免疫球蛋白样品 5 批(厂家 A，批号：201806001M，201806003M，N20210101M，N20210102M, N20210103M)。

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 制备条件

色谱柱：TOSOH TSK G3000SW

(7.5 mm×600 mm)；柱温：25℃；样品温度：4℃；流速：0.6 mL·min⁻¹；以含 1%异丙醇的 pH 7.0、0.2 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液为流动相；检测波长为 280 nm。

2.1.2 收集 取待测样品适量，用“2.1.1”项下流动相稀释成每 1 mL 约含蛋白质 50 mg 的溶液，即得供试品溶液。在“2.1.1”项色谱条件下，取 100 μL 供试品溶液，注入色谱仪，记录色谱图，典型样品色谱图见图 1。重复收集人血白蛋白多聚体、二聚体流出组分；人免疫球蛋白多聚体、二聚体、裂解体流出组分。

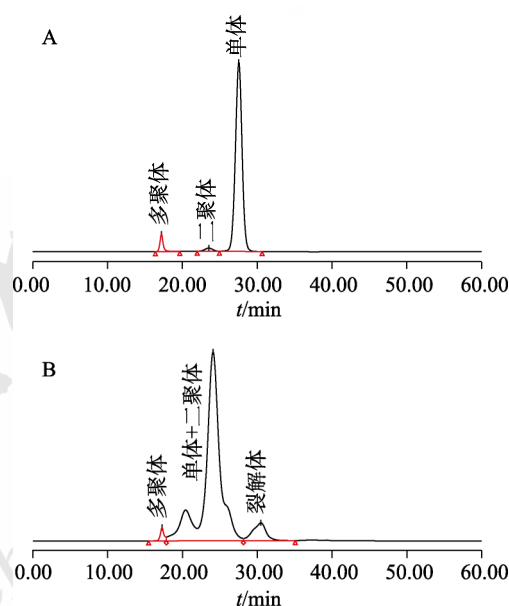


图 1 典型样品色谱图

A-人血白蛋白；B-人免疫球蛋白。

Fig. 1 Chromatograms of typical sample

A-human albumin; B-human immunoglobulin.

2.1.3 浓缩 将收集的流出组分置超滤管中，11 000 ×g 离心 20 min，重复 2 次，以去除样品中的盐并使样品浓缩。取超滤管中截流液，至 1.5 mL EP 管中，用水稀释成每 1 mL 约含蛋白质 2 mg 的溶液。

2.1.4 酶解 取浓缩除盐后的样品各 100 μL，加入 300 μL 8 mol·L⁻¹ 盐酸胍与 8 μL 500 mmol·L⁻¹ DTT 至 1.5 mL EP 管中，56℃水浴 30 min；冷却至室温后，加入 8 μL 1 mol·L⁻¹ IAA 避光反应 30 min；将反应液转移至超滤管中，并加入 100 μL 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl，11 000 ×g 离心 20 min；按 1：30(酶：蛋白)，向蛋白溶液中加入胰酶，使得终体积为 150 μL，37℃孵育 6 h，向上述反应体系中加入适量 10%甲酸，使甲酸终浓度为 1%，以停

止酶解反应。即得上机溶液。

2.2 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分离分析

2.2.1 UHPLC 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC peptide BEH C₁₈(300Å, 1.7 μm, 2.1 mm×100 mm); 柱温: 40 °C, 样品温度: 4 °C; 进样体积: 5 μL; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 以含 0.1%甲酸的水溶液为流动相A, 含 0.1%甲酸的乙腈为流动相B, 采用梯度洗脱(0~5 min, 5%B; 5~65 min, 5%→45%B; 65~68 min, 45%→90%B; 68~69 min, 90%→5%B; 69~80 min, 5%B)。典型色谱图见图 2。

2.2.2 LTQ-Orbitrap-MS 质谱条件 毛细管温度: 320.00 °C; 鞘气流速: 35.00 psi; 辅助气流速: 15.00 arb; 离子源: HESI; 喷雾电压: 3 800.00 V; 扫描模式: Full MS/dd-MS²(TopN)。其中一级 Full MS 全扫描选择分辨率为 70 000 FWHM, dd-MS2 的二级扫描选择分辨率为 17 500 FWHM。典型质谱图见图 3。

2.2.3 数据库检索 将采集的数据用 PD 软件进行数据库搜索, 从 uniprot 蛋白数据库中下载 uniprot-human-filtered-reviewed_yes+AND+organism_

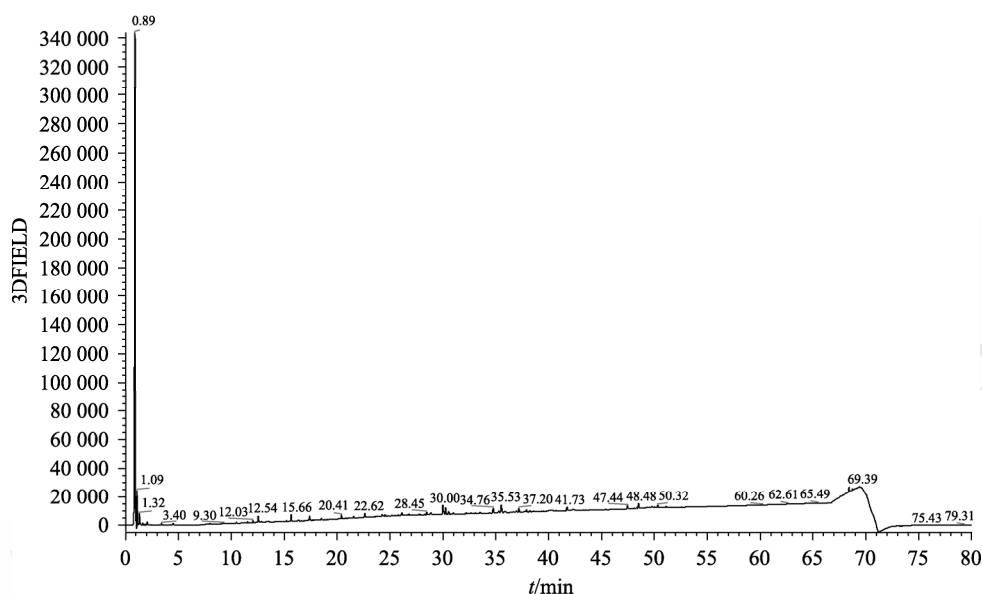


图 2 典型样品光电二极管阵列色谱图

Fig. 2 Photodiode array chromatogram of typical sample

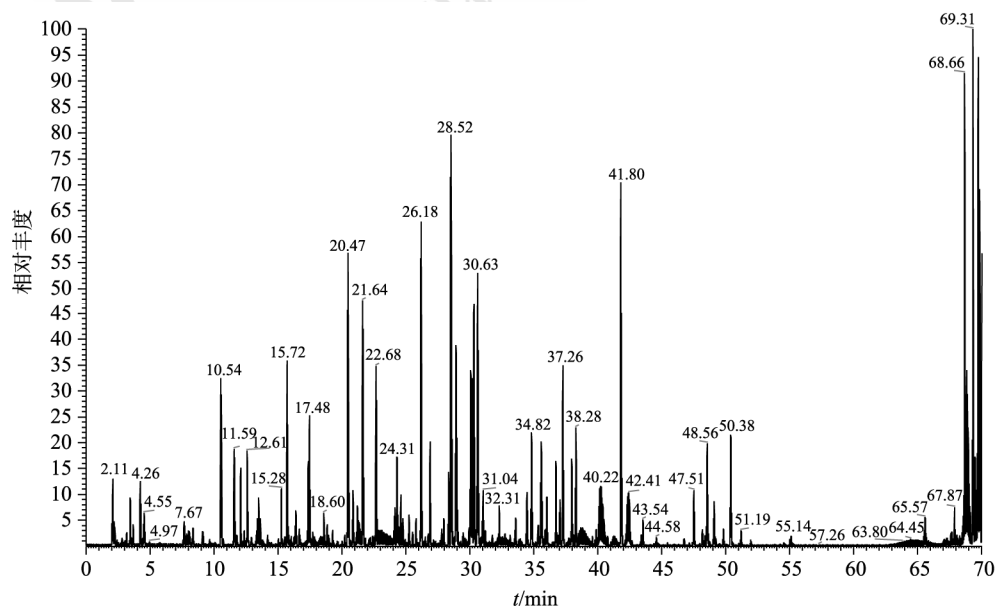


图 3 典型样品质谱图

Fig. 3 MS chromatogram of typical sample

Homo+sapiens+(Human), 进行搜库鉴定。workflow tree 为 MSF Files、PSM Grouper、Peptide Validator、Peptide and Protein Filter、Protein Scorer、Protein Grouping、Protein FDR Validator、Feature Mapper、Precursor Ions Quantifier。

2.3 数据分析结果

2.3.1 样品漏切率 201806001M 批 86.45%的应切点位都已得到酶切, 201806003M 批 87.46%的应切点位都已得到酶切, N20210101M 批 89.07%的应切点位都已得到酶切, N20210102M 批 88.25%的应切点位都已得到酶切, N20210103M 批 87.93%的应切点位都已得到酶切, 202006080B 批 86.02%的应切点位都已得到酶切, N20201206B 批 85.53%的应切点位都已得到酶切, 方法酶解效果良好。人血白蛋白及人免疫球蛋白漏切率饼图见图 4。

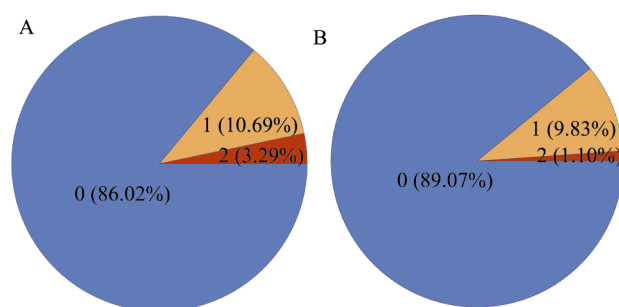


图 4 漏切率饼图

A-人血白蛋白; B-人免疫球蛋白。

Fig. 4 Pie charts of missed cleavages

A-human albumin; B-human immunoglobulin.

2.3.2 重复性试验 取一批样品(批号: 202006080B), 同法制备 3 份, 进行试验, 结果显示, 3 次试验分别鉴定到 103, 102, 98 种非目标蛋白, 其中共有蛋白有 98 个, 说明方法重复性良好。

2.3.3 质量偏差 在 0~80 min 内, 99%的偏差在 ± 5 以内。质量偏差散点图见图 5。

2.3.4 非目标蛋白鉴定结果 本研究共涉及两类血液制品, 分别为人血白蛋白和人免疫球蛋白。其中人血白蛋白 2 批次、人免疫球蛋白 5 批次。按照拟定的方法鉴定其中的非目标蛋白。为保证鉴定结果的可靠性, 数据分析时在 PDR 卡值后蛋白可信度为高的基础上, 优先考虑蛋白质中匹配的肽段个数, 综合分析将鉴定阈值设为肽段谱图匹配数(peptide spectrum match, PSM)>30, 汇总结果见表 1。最终共鉴定了 52 个非目标蛋白。其中人血白蛋白样本中鉴定非目标蛋白 25 个, 人免疫

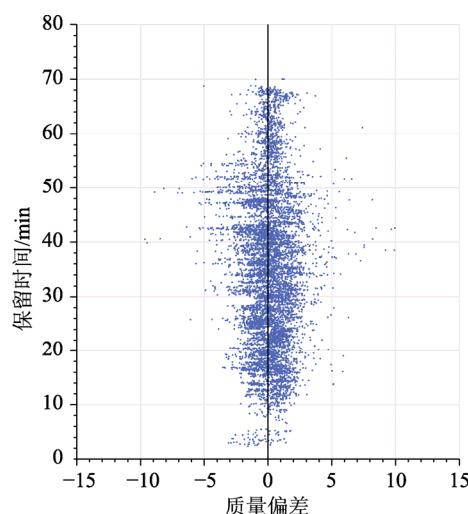


图 5 质量偏差散点图

Fig. 5 Scatter plot of quality deviation

球蛋白样本中鉴定非目标蛋白 27 个。笔者分 2 类来介绍本研究结果。

2.3.4.1 人血白蛋白 人血白蛋白属于血液制品中应用最多的一个品种, 主要用于失血创伤、烧伤引起的休克; 脑水肿及损伤引起的颅内压升高; 肝硬化及肾病引起的水肿或腹水; 低蛋白血症的防治; 新生儿高胆红素血症; 用于心肺分流术、烧伤的辅助治疗、血液透析的辅助治疗和成人呼吸窘迫综合症。白蛋白有着其他药品难以替代的重要作用, 属于不可或缺的国家战略性储备物资。

糖蛋白是其中糖类的一种存在形式, 糖蛋白中的糖含量为 5%~50%, 他们与天冬氨酸、丝氨酸及苏氨酸等氨基酸的侧链基因共价结合。本研究鉴定出的糖蛋白包括 $\beta 2$ 糖蛋白 1、 α -1B 糖蛋白、 α -1-酸性糖蛋白^[2]、富亮氨酸 $\alpha 2$ 糖蛋白^[3]、胎球蛋白 A、Afamin 蛋白、Attractin 蛋白等。 $\beta 2$ 糖蛋白 1 是血浆中一直较丰富的糖蛋白, 它可能是抗磷脂综合征的一种自身抗原, 抗磷脂综合征是一类以血栓栓塞相关事件及病态妊娠为临床表现合并抗磷脂抗体阳性的自身免疫性疾病。传统诊断标准中的抗体包括狼疮抗凝物、抗心磷脂抗体及抗 $\beta 2$ 糖蛋白 1 抗体。在抗磷脂抗体形成的机制中, 细菌或病毒的分子结构与 $\beta 2$ 糖蛋白 1 衍生的氨基酸序列相似, 被认为是产生相关抗体的原因^[4-5]。胎球蛋白 A 是一种带负电荷的血清糖蛋白, 由肝细胞合成。编码的蛋白质由 2 条多肽链组成, 2 条多肽链均由单个 mRNA 编码的前蛋白切割而成。它参与多个过程, 包括内吞作用、大脑发育和骨组织的形成。此外, 它与代谢功能障碍、胰岛素抵抗的诱导有关, 并与糖尿病风险增加有关^[6]。

表1 蛋白鉴定结果表

Tab. 1 Results of identified

编号	蛋白名称	分子量/kDa	等电点	PSMs
人血白蛋白				
1	血红素结合蛋白(Hemopexin)	51.6	7.02	771
2	触珠蛋白(Haptoglobin)	45.2	6.58	600
3	维生素 E 结合蛋白(Afamin)	69	5.9	540
4	α -1B 糖蛋白(Alpha-1B-glycoprotein)	54.2	5.86	239
5	触珠蛋白相关蛋白(Haptoglobin-related protein)	39	7.09	234
6	吸引素(Attractin)	158.4	7.31	162
7	胎球蛋白 A(Alpha-2-HS-glycoprotein)	39.3	5.72	156
8	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	62.2	7.55	154
9	β 2 糖蛋白 1(Beta-2-glycoprotein 1)	38.3	7.97	129
10	铜蓝蛋白(Ceruloplasmin)	122.1	5.72	119
11	血浆蛋白酶 C1 抑制剂(Plasma protease C1 inhibitor, C ₁ -INH)	55.1	6.55	119
12	甲状腺结合球蛋白(Thyroxine-binding globulin)	46.3	6.3	116
13	转铁蛋白(Serotransferrin)	77	7.12	93
14	血红蛋白 β 亚基(Hemoglobin subunit beta)	16	7.28	87
15	载脂蛋白 A-II(Apolipoprotein A-II)	11.2	6.62	76
16	α -1-酸性糖蛋白 2(Alpha-1-acid glycoprotein 2)	23.6	5.11	75
17	血红蛋白 α 亚基(Hemoglobin subunit alpha) ^[7]	15.2	8.68	72
18	甲状腺素转运蛋白(Transthyretin)	15.9	5.76	72
19	α 1 微球蛋白(Protein AMBP) ^[8]	39	6.25	72
20	富亮氨酸 α 2 糖蛋白(Leucine-rich alpha-2-glycoprotein)	38.2	6.95	69
21	角蛋白 9(Keratin, type I cytoskeletal 9) ^[9]	62	5.24	69
22	角蛋白 1(Keratin, type II cytoskeletal 1) ^[10]	66	8.12	65
23	α 1-抗胰蛋白酶(Alpha-1-antitrypsin, α 1-AT)	46.7	5.59	40
24	角蛋白 10(type I cytoskeletal 10, Keratin) ^[11]	58.8	5.21	39
25	C1RL 补体(Complement C1r subcomponent-like protein)	53.5	7.2	35
人免疫球蛋白				
1	免疫球蛋白重链恒定区 γ 1(Immunoglobulin heavy constant gamma 1, IGHG1)	36.1	8.19	1 179
2	免疫球蛋白 κ 轻链恒定区(Immunoglobulin kappa constant, IGKC)	11.8	6.52	942
3	免疫球蛋白重链恒定区 γ 2(Immunoglobulin heavy constant gamma 2, IGHG2)	35.9	7.59	935
4	免疫球蛋白重链恒定区 γ 3(Immunoglobulin heavy constant gamma 3, IGHG3)	41.3	7.9	596
5	免疫球蛋白 λ 轻链恒定区 2(Immunoglobulin lambda constant 2, IGHG3)	11.3	7.24	406
6	免疫球蛋白 λ 轻链多肽 5(Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5, IGLL5)	23	8.84	316
7	免疫球蛋白重链恒定区 μ (Immunoglobulin heavy constant mu,IGHM)	49.4	6.77	244
8	免疫球蛋白重链恒定区 γ 4(Immunoglobulin heavy constant gamma 4, IGHG4)	35.9	7.36	237
9	免疫球蛋白 λ 轻链恒定区 7(Immunoglobulin lambda constant 7, IGLC7)	11.2	8.29	177
10	免疫球蛋白重链恒定区 α 1(Immunoglobulin heavy constant alpha 1, IGHA1)	37.6	6.51	134
11	转铁蛋白(Serotransferrin)	77	7.12	115
12	血红素结合蛋白(Hemopexin)	51.6	7.02	61
13	免疫球蛋白重链可变区 3-7(Immunoglobulin heavy variable 3-7,IGHV3-7)	12.9	6.57	54
14	角蛋白 1(type II cytoskeletal 1, Keratin)	66	8.12	45
15	免疫球蛋白重链可变区 5-51(Immunoglobulin heavy variable 5-51,IGHV5-51)	12.7	8.27	44
16	免疫球蛋白重链可变区 3-11(Immunoglobulin heavy variable 3-11,IGHV3-11)	12.9	8.6	44
17	免疫球蛋白重链可变区 4-59(Immunoglobulin heavy variable 4-59,IGHV4-59)	12.9	9.29	43
18	免疫球蛋白重链可变区 3-30(Immunoglobulin heavy variable 3-30,IGHV3-30)	12.9	8.92	42
19	免疫球蛋白重链恒定区 α 2(Immunoglobulin heavy constant alpha 2, IGHA2)	36.6	6.27	40
20	免疫球蛋白重链可变区 3-9(Immunoglobulin heavy variable 3-9,IGHV3-9)	12.9	7.08	39
21	免疫球蛋白重链可变区 3-48(Immunoglobulin heavy variable 3-48,IGHV3-48)	12.8	5.36	37
22	凝溶胶蛋白(Gelsolin)	85.6	6.28	97
23	补体 B 因子(Complement factor B)	85.5	7.06	91
24	J 链(Immunoglobulin J chain)	18.1	5.24	42
25	补体 C3(Complement C3)	187	6.4	40
26	载脂蛋白 H(Beta-2-glycoprotein 1)	38.3	7.97	38
27	免疫球蛋白重链可变区 3-33(Immunoglobulin heavy variable 3-33,IGHV3-33)	13.1	8.94	38

Afamin 是一种糖蛋白,与白蛋白序列同源,与甲胎蛋白、维生素 D 结合蛋白一样,均是白蛋白基因家族的成员,主要在肝脏中表达并分泌到血液中。Afamin 具有 α 和 γ 生育酚结合位点,其水平在代谢综合征和肥胖症中升高^[12], Afamin 可能与胰岛素抵抗密切相关,与 2 型糖尿病高危因子如高血压发生率、腰围增加、高密度脂蛋白下调、甘油三酯上调和葡萄糖浓度增加等显著正相关,而不是通过影响 α 和 γ 生育酚结合位点^[13]。Attractin 是一种糖蛋白, Duke-Cohan 等^[14]在人体血浆中发现其由激活的 T 淋巴细胞表达和释放,在体外能引起 T 淋巴细胞向单核细胞运动,是编码 1 428 个氨基酸残基的单跨膜蛋白,在生物体内广泛分布,它主要高度表达于十二指肠、甲状腺、大脑、小肠、肝等,参与生物体内许多生理和病理事件^[15-17]。由于疏水性,血浆中的脂通常以其与血浆蛋白所形成的复合物形式存在,如载脂蛋白 A-II^[18]。

传输蛋白为其中输送营养物质、代谢产物和药物的血浆蛋白。本次研究鉴定出的传输蛋白包括触珠蛋白、铜蓝蛋白、转铁蛋白、血红素结合蛋白、甲状腺素结合蛋白等。触珠蛋白主要的生理功能是结合并运输游离血红蛋白。铜蓝蛋白能通过对铜的结合和传输,调节胃肠道对铜的吸收,并把铜传递给结合铜的酶类如细胞色素 C 氧化酶等,还能维持体内肝铜的稳定。转铁蛋白是铁的主要载体,它能把铁传输给网织红细胞和其他组织。血红素结合蛋白的主要功能是运输游离血红素。甲状腺素结合球蛋白是血液中甲状腺素(T₄)的主要转运蛋白^[19-20]。另外还存在 3 种蛋白质,包括甲状腺素结合球蛋白、甲状腺素转运蛋白和白蛋白,它们负责在血液中携带甲状腺激素甲状腺素(T₄)和 3,5,3'-三碘甲状腺原氨酸(T₃)。

此外,蛋白酶类抑制物在补体系统、凝血系统、纤维蛋白溶解系统、激肽系统以及组织再生等方面都有重要调节作用。本次研究鉴定出的蛋白酶类抑制物包括 α 1-抗胰蛋白酶、血浆蛋白酶 C1 抑制剂等。 α 1-抗胰蛋白酶是机体内一种丝氨酸蛋白酶抑制物,是最主要的蛋白酶抑制物,能保护机体正常细胞不受蛋白酶的破坏和损害,能协助控制感染和炎症,维持机体内环境的稳定^[21]。血浆蛋白酶 C1 抑制剂(plasma protease C1 inhibitor, C₁-INH)是一种蛋白酶抑制物,它属于丝

氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的一员,它的主要功能是抑制补体系统以防止自发激活。C₁-INH 还能抑制蛋白酶的纤溶、凝血、激肽通路。人体缺少 C₁-INH 可导致皮肤及黏膜肿胀,出现血管神经性水肿^[22-23]。

2.3.4.2 人免疫球蛋白 人免疫球蛋白系用健康人血浆经低温乙醇法分离、提取并经病毒灭活后制成的正常免疫球蛋白液体或冻干制剂,含有广谱性抗病毒、抗菌和抗毒素等抗体,主要成分为 IgG,占总蛋白的 90%以上。人免疫球蛋白^[24]是由 2 条重链和 2 条轻链组成的异二聚体蛋白质。它们可以在功能上分为结合抗原的可变区和指定效应器功能的恒定区,例如补体的激活或与 Fc 受体的结合。重链主要有 5 类,每个类别定义了 IgM、IgG、IgA、IgD 和 IgE。IgG 可分为 4 个亚类:IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4,每个亚类都有自己的生物学特性,IgA 也可以类似地分为 IgA1 和 IgA2。同样的,轻链也分为 2 类,分别为 κ 链和 λ 链,据此定义了 κ 型 Ig 和 λ 型 Ig。而根据 λ 链恒定区氨基酸差异,可分为 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 和 λ_4 4 个亚类。

人免疫球蛋白可变区:可变区蛋白能识别并特异性结合抗原,它与抗原结合后,在体内可结合病原微生物及其产物,具有中和毒素、阻断病原入侵、清除病原微生物等功能。如本研究中鉴定出的 IGHV3-7、IGHV5-51、IGHV3-11、IGHV4-59、IGHV3-30、IGHV3-9、IGHV3-48、IGHV3-33^[25-27]。

人免疫球蛋白恒定区:恒定区蛋白参与多个过程,包括激活免疫反应、对其他生物的防御反应和吞噬作用。在多个免疫过程的上游或内部起作用,包括免疫球蛋白介导的免疫反应;超敏反应的正向调节;和吞噬作用的正向调节。如本研究中鉴定出的 IGHG1、IGKC、IGHG2、IGHG3、IGLC2、IGHM、IGHG4、IGLC7、IGHA1、IGHA2。IGHG3 能与中性粒细胞、巨噬细胞上的 IgG Fc 受体结合,从而发挥对巨噬细胞的调理作用,并促进巨噬细胞吞噬功能。IGHG3 还能与树突细胞表面表达的 Fc γ RI 高亲和结合,增加树突细胞将抗原提呈给 T 淋巴细胞的作用^[28-36]。

人免疫球蛋白的其他成分:除上述基本结构蛋白外,本研究还鉴定出一些辅助蛋白。凝溶胶蛋白(gelsolin, GSN)作为凝溶胶蛋白超家族的成员之一,它能以钙依赖的方式通过切断、封端肌动蛋白微丝或者使肌动蛋白聚集成核等方式调控肌

动蛋白的结构。GSN 是一种机体内普遍存在的多功能的肌动蛋白结合蛋白,对细胞结构和代谢功能具有多种调节作用的蛋白,有血浆型(plasma gelsolin, pGSN)和细胞质型(cytoplasmic gelsolin, cGSN)2种亚型。目前的研究已逐渐扩展到包括细胞凋亡、信号转录、转录调控和遗传改变等多个方面,其在炎症、肿瘤、心血管疾病、阿尔茨海默病、子痫前期、芬兰型家族性淀粉样变性病、急性脑梗死及肝脏疾病等疾病中的作用也得到进一步的阐明^[37-38]。补体 B 因子(complement factor B, CFB)是补体替代途径中的一个重要因子,主要由肝细胞和巨噬细胞合成,是参与补体活化的重要成分。CFB 参与机体防御,在细胞损伤及炎症过程中均起重要作用^[39]。J 链(J chain)是一富含半胱氨酸的多肽链,由浆细胞合成,主要功能是将单体 Ig 分子连接成为二聚体或多聚体。1 个分泌型 IgA 分子由 2 个 IgA 单体借 J chain 连接成二聚体;1 个 IgM 分子由 5 个 IgM 单体借 J chain 连接成五聚体。有助于多种功能,包括免疫球蛋白受体结合活性,肽聚糖结合活性和磷脂酰胆碱结合活性^[40-41]。补体 C3,补体系统是机体的主要防御系统之一,C3 在补体系统的激活中起核心作用。经典和替代补体激活途径都需要其激活^[42]。载脂蛋白 H (apolipoprotein H, APOH)也称为 β -2-糖蛋白 1,它涉及多种生理途径,包括脂蛋白代谢、凝血、止血和抗磷脂自身抗体的产生。绝大部分在肝脏中合成,研究发现肝脏中 APOH mRNA 在门静脉胆管(胆管细胞)的柱状上皮中强烈表达,除肝实质内可检测到的低表达外, APOH 在单个肝细胞和 Kupffer 细胞中均有高表达^[43]。

3 讨论

血液制品通常成分复杂,疗效来源于多种成分的综合利用。一种快速、高效、精确的蛋白鉴定方法对于复杂的血液制品非常重要。本研究结果表明,采用 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术可以快速并系统全面地对人血白蛋白及人免疫球蛋白中的非目标蛋白进行定性分析。在一定程度上弥补了现阶段对人血白蛋白及人免疫球蛋白中非目标蛋白研究的不足,为其质量控制及今后相关的试验研究奠定了基础。

REFERENCES

[1] KE B B, XIE Y Y, WANG D R, et al. Analysis of impurity proteins by biomass spectrometry in human serum albumin[J].

Chin Pharmaceut J(中国药学杂志), 2020, 55(2): 148-152.

- [2] JO M, KIM J H, SONG G J, et al. Astrocytic orosomucoid-2 modulates microglial activation and neuroinflammation[J]. J Neurosci, 2017, 37(11): 2878-2894.
- [3] LIN M, LIU J M, ZHANG F P, et al. The role of leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 in proliferation, migration, and invasion of tumors[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2022, 148(2): 283-291.
- [4] CRUZ-TAPIAS P, BLANK M, ANAYA J M, et al. Infections and vaccines in the etiology of antiphospholipid syndrome[J]. Curr Opin Rheumatol, 2012, 24(4): 389-393.
- [5] JIN Y, ZHANG H T. The promising antibodies of antiphospholipid syndrome[J]. Chin J Nephrol Dial Transplant(肾脏病与透析肾移植杂志), 2022, 31(1): 78-83.
- [6] BIRUKOV A, POLEMITI E, JÄGER S, et al. Fetuin-A and risk of diabetes-related vascular complications: A prospective study[J]. Cardiovasc Diabetol, 2022, 21(1): 6.
- [7] ZANG J T, LI Q H, WU Y, et al. Expression of hemoglobin α and β subunits in different types of rat vasculatures[J]. J Army Med Univ(陆军军医大学学报), 2022, 44(5): 399-405.
- [8] RUTARDOTTIR S, KARNAUKHOVA E, NANTASENAMAT C, et al. Structural and biochemical characterization of two heme binding sites on α 1-microglobulin using site directed mutagenesis and molecular simulation[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1864(1): 29-41.
- [9] WANG B H, XU W H, TANG X J, et al. Analysis of *KRT9* gene mutation in Chinese Han population[J]. J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci(上海交通大学学报: 医学版), 2018, 38(12): 1425-1428.
- [10] OGUNNIGBAGBE O, BUNICK C G, KAUR K. Keratin 1 as a cell-surface receptor in cancer[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2022, 1877(1): 188664.
- [11] HUANG T L, CHOU C C. Effect of mutations on the hydrophobic interactions of the hierarchical molecular structure and mechanical properties of epithelial keratin 1/10[J]. Int J Biol Macromol, 2022(212): 442-450.
- [12] JUHÁSZ I, UJFALUSI S, SERES I, et al. Afamin levels and their correlation with oxidative and lipid parameters in non-diabetic, obese patients[J]. Biomolecules, 2022, 12(1): 116.
- [13] FENG L R, YU W, LIU X L, et al. Proteomics research of serum afamin in type 2 diabetes[J]. J Wuhan Univ Nat Sci Ed(武汉大学学报: 理学版), 2021, 67(1): 103-110.
- [14] DUKE-COHAN J S, GU J, MCLAUGHLIN D F, et al. Attractin(DPPT-L), a member of the CUB family of cell adhesion and guidance proteins, is secreted by activated human T lymphocytes and modulates immune cell interactions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(19): 11336-11341.
- [15] WRENGER S, FAUST J, FRIEDRICH D, et al. Attractin, a dipeptidyl peptidase IV/CD26-like enzyme, is expressed on human peripheral blood monocytes and potentially influences monocyte function[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(3): 621-629.
- [16] CHENG D, LI J, CHI Y, et al. Expression of attractin in the testicular tissues of azoospermia patients with different pathological alterations[J]. Chin J Endourol Electron Ed(中华腔镜泌尿外科杂志: 电子版), 2012, 6(2): 142-145.

- [17] MING Y, XIONG C L. Expression of attractin in the mouse testis[J]. J Math Med(数理医药学杂志), 2014, 27(2): 143-145.
- [18] JIANG Z H, ZHANG Z Y, HE M, et al. The screening and identification of apolipoprotein A-II from serum differential proteins in hepatocellular carcinoma patients[J]. Chin J Hepatol(中华肝脏病杂志), 2010, 18(6): 445-449.
- [19] JANSSEN O E, CHEN B, BÜTTNER C, et al. Molecular and structural characterization of the heat-resistant thyroxine-binding globulin-Chicago[J]. J Biol Chem, 1995, 270(47): 28234-28238.
- [20] CHEN L D, LU H J, GAN Y L, et al. Partial thyroxine-binding globulin deficiency in a family with coding region mutations in the *TBG* gene[J]. J Endocrinol Invest, 2020, 43(12): 1703-1710.
- [21] GHOSH A J, HOBBS B D. Recent advancements in understanding the genetic involvement of alpha-1 antitrypsin deficiency associated lung disease: A look at future precision medicine approaches[J]. Expert Rev Respir Med, 2022, 16(2): 173-182.
- [22] DAVIS A E 3rd. Biological effects of C1 inhibitor[J]. Drug News Perspect, 2004, 17(7): 439-446.
- [23] CICARDI M, ZINGALE L, ZANICHELLI A, et al. C1 inhibitor: Molecular and clinical aspects[J]. Springer Semin Immunopathol, 2005, 27(3): 286-298.
- [24] MORELL A, SKVARIL F. Structure and biological properties of immunoglobulins and gamma-globulin preparations. II. Properties of gamma-globulin preparations[J]. Schweiz Med Wochenschr, 1980, 110(3): 80-85.
- [25] MATSUDA F, SHIN E K, NAGAOKA H, et al. Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus[J]. Nat Genet, 1993, 3(1): 88-94.
- [26] POLJAK R J, NAKASHIMA Y, CHEN B L, et al. Amino acid sequence of the VH region of a human myeloma immunoglobulin (IgG New)[J]. Biochemistry, 1977, 16(15): 3412-3420.
- [27] ZHOU S Q, ZHOU J H, XU Y J, et al. Antibody diversity of hepatitis B immunoglobulin[J]. Acta Anat Sin(解剖学报), 2013, 44(4): 479-484.
- [28] SHI L Y, MOU B H, JIANG T T. Serum IGHG3 and HPT levels in patients with pulmonary tuberculosis[J]. Zhejiang Med J(浙江医学), 2017, 39(9): 699-702.
- [29] KANG S, MAENG H, KIM B G, et al. *In situ* identification and localization of IGHA2 in the breast tumor microenvironment by mass spectrometry[J]. J Proteome Res, 2012, 11(9): 4567-4574.
- [30] YANG N, BAI Z H, QIU X J, et al. Proteomics of urine in patients with acute pancreatitis[J]. Shandong Med J(山东医药), 2018, 58(38): 20-23.
- [31] WALLY J, KICA G, ZHANG Y, et al. Identification of a novel substitution in the constant region of a gene coding for an amyloidogenic kappa1 light chain[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1454(1): 49-56.
- [32] VAN DER BURG M, BARENDREGT B H, VAN GASTEL-MOL E J, et al. Unraveling of the polymorphic C lambda 2-C lambda 3 amplification and the Ke+Oz-polymorphism in the human Ig lambda locus[J]. J Immunol, 2002, 169(1): 271-276.
- [33] ZHANG Z Y, ZHAO X D, JIANG L P, et al. Clinical characteristics and molecular analysis of 21 Chinese children with congenital agammaglobulinemia[J]. Scand J Immunol, 2010, 72(5): 454-459.
- [34] BOTTARO A, CARIOTA U, DE LANGE G G, et al. Multiple levels of analysis of an *IGHG4* gene deletion[J]. Hum Genet, 1990, 86(2): 191-197.
- [35] SCHROEDER H W Jr, CAVACINI L. Structure and function of immunoglobulins[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(2 Suppl 2): S41-S52.
- [36] YU X J, ZHANG F, YU C F, et al. Bioinformatics analysis of structure and function of cluster of differentiation 19[J]. Prog Microbiol Immunol(微生物学免疫学进展), 2021, 49(5): 54-59.
- [37] HUO D, CHEN J. Recent advances in research on gelsolin and related diseases[J]. World Latest Med Inf(世界最新医学信息文摘), 2019, 19(59): 109-111.
- [38] MULLANY S, SOUZEAU E, KLEBE S, et al. A novel GSN variant outside the G2 calcium-binding domain associated with Amyloidosis of the Finnish type[J]. Hum Mutat, 2021, 42(7): 818-826.
- [39] GUO N N, WANG X Z. Research progress of complement factor B[J]. Int J Immunol(国际免疫学杂志), 2022, 45(1): 102-107.
- [40] ZENG P, CHEN J L, LI J Y, et al. A study on differential proteomics in traumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. Orthop J China(中国矫形外科杂志), 2019, 27(5): 453-458.
- [41] BERTRAND F E 3rd, BILLIPS L G, GARTLAND G L, et al. The J chain gene is transcribed during B and T lymphopoiesis in humans[J]. J Immunol, 1996, 156(11): 4240-4244.
- [42] ZHANG M J, DAI S, CHANG D L. Correlation among complements C3 and C4, anticoagulant proteins, hemorheology and onset and prognosis of sudden deafness[J]. Chin J Otol(中华耳科学杂志), 2022, 20(4): 554-559.
- [43] CAO J, GONG J, LI X H, et al. Identification of function and mechanism of apolipoprotein H gene in liver failure based on bioinformatics analysis[J]. J Sun Yat Sen Univ Med Sci(中山大学学报: 医学科学版), 2020, 41(2): 217-223.

收稿日期: 2022-09-09
(本文责编: 陈怡心)