

肾脏病专栏·临床研究

原发性肾病综合征儿童尿液双向电泳图谱的建立

丁娟娟,何庆南,周频,张磊,易著文

(中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室,湖南 长沙 410011)

[摘要] 目的 建立与优化原发性肾病综合征(INS)儿童尿液全蛋白双向凝胶电泳技术(2-DE)。方法 采用4种不同的方法制备蛋白质样本,以固相pH梯度等电聚焦为第一向,12%的SDS-PAGE进行第二向电泳,银染显色。结果 以丙酮浓缩蛋白后透析提纯法,制备蛋白质标本,300 μg为上样量时,可获得图像清晰、分辨率高、重复性好的儿童INS尿液2-DE图谱。结论 建立了稳定的原发性肾病综合征儿童尿液双向凝胶电泳技术,为进一步开展疾病的尿液蛋白质组学研究奠定了基础。 [中国当代儿科杂志,2007,9(2):122-124]

[关键词] 肾病综合征;尿液;双向电泳;儿童

[中图分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)02-0122-03

Establishment of urinary proteomic map on two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in children with idiopathic nephrotic syndrome

DING Juan-Juan, HE Qing-Nan, ZHOU Pin, ZHANG Lei, YI Zhu-Wen. Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Email: heqn2629@hotmail.com)

Abstract: Objective To establish a urinary proteomic map on two-dimensional polyacrylamide gelelectrophoresis(2-DE) in children with idiopathic nephrotic syndrome (INS). **Methods** The proteins from INS children were purified by four various means, separated by 2-DE, and stained by silver. **Results** The sequential preparation of urinary proteins by acetone precipitation and dialysis, when the sample was 300 μg, resulted in a clear background, well-resolved and reproducible 2-DE urinary proteomic map in children with INS. **Conclusions** A steady 2-DE technique for urinary proteomic map in children with INS was established, which can be effectively applied in urinary proteomics of the disease.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (2):122-124]

Key words: Nephrotic syndrome; Urine; Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; Child

原发性肾病综合征(idiopathic nephrotic syndrome, INS)为儿童常见的肾脏疾病,大量蛋白尿为其特征之一。近几年蛋白质组学的飞速发展,为INS的研究提供了一个新的技术平台,而要获得具有高分辨率和重复性的尿液双向凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DE)凝胶图谱,样品制备是关键^[1],尿液组成成分复杂,含有的多种盐分影响蛋白质的分离,目前国内外研究者对于尿液蛋白质标本的制备尚无统一方法^[2-7,13],本实验以INS儿童蛋白尿为研究对象,对2-DE条件进行调整、优化,获得了稳定的INS儿童尿液2-DE技术,为进一步开展疾病的尿液蛋白质组学研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司 IPG-phor、Image Master 2D 分析软件 V3.01, 美国 Bio-Rad 公司垂直平板电泳系统, UMAX 公司 Powerlook III 扫描仪, 法国 Jouan 公司 BRi 低温离心机, 日本 SANYO 公司 -70℃ 超低温冰箱。

1.2 主要试剂

pH 3~10 线性 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)干胶条、IEF 缓冲液购自美国 Pharmacia 公司, 十二烷基磺酸钠、二硫苏糖醇、D7884-1FT 透析袋、碘乙酰胺为 Sigma 公司产品; 丙烯酰胺购自 Bio-

[收稿日期] 2006-09-18; [修回日期] 2006-11-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号 30000184, 30571983)

[作者简介] 丁娟娟, 女, 硕士, 医师。主攻方向: 小儿肾脏病。现在武汉市儿童医院肾内科工作。邮编: 430016。

[通讯作者] 何庆南, 教授, 中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室, 邮编: 410011

Rad 公司。

1.3 收集标本

依照中华医学会儿科学分会肾脏病学组制定的诊断标准^[8],我科收治的 INS 儿童 5 例,男 3 例,女 2 例,均为学龄前儿童,所有患儿均未接受激素治疗,尿蛋白定性 +++ ~ + + + +,定量每 24 h 均 ≥ 50 mg/kg。参照相关文献^[2,3]收集清洁中段尿液,按 1:10 体积比加入蛋白酶抑制剂(10 mmol/L PMSF 及 0.5 mol/L EDTA 溶液),标本收集后 30 min 内在 4℃ 下 4 000 r/min 离心 1 h,取上清,用无菌塑料试管分装 5 mL 后立即 -70℃ 冻存备用。

1.4 尿液蛋白质组样本的制备

每份标本各取 5 mL 混匀,冷丙酮沉淀浓缩蛋白质,透析去离子,蛋白质干粉溶解于 100 μ L 裂解液中。Bradford 法蛋白定量。

1.5 双向电泳的步骤

1.5.1 双向电泳与凝胶显色 2-DE 方法主要按照仪器操作手册进行,IPG 干胶条水化与聚焦在 20℃ 自动进行,其中水化在 30 V 低电压进行 12 h,然后经 500 V,1 h;1 000 V,1 h;3 000 V,1.5 h;6 000 V,1.5 h,最后稳定在 8 000 V 下 5 h 进行等电聚焦。等电聚焦后进行两步平衡,然后在 12% 的 SDS-PAGE 进行第二向电泳。实验在相同条件下重复 3 次。随后按 Pharmacia 公司的蛋白质银染试剂盒的操作手册进行硝酸银染色。扫描仪摄像。

1.5.2 凝胶图像分析 用 Image Master 2D V3.01 分析软件按 Pharmacia 公司的操作手册进行分析。

2 结果

预实验中先后采用 4 种不同的方法制备尿液蛋白质组样本,结果显示丙酮浓缩蛋白后透析提纯法制备蛋白质标本,以 300 μ g 为上样量时,进行 2-DE 可以获得比较满意的凝胶图谱,通过软件检测,三块凝胶的蛋白质点为 204 ± 5 个,平均匹配率为 88.2%,第一向电泳与第二向电泳上的位置平均偏差为 1.36 ± 0.37 mm 和 2.01 ± 0.45 mm。见表 1,图 1,2。

表 1 不同实验方法及结果

方法	结果
三氯乙酸加透析后真空抽干提纯法	等电聚焦失败
三氯乙酸联合丙酮提纯法	凝胶图谱分辨率低
单纯丙酮提纯法	凝胶图谱分辨率低
丙酮浓缩蛋白后透析提纯法	等电聚焦过程顺利,图谱分辨率高

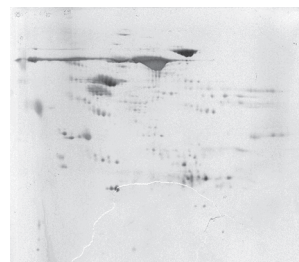


图 1 INS 儿童尿液 2-DE 凝胶银染图谱。图谱背景清晰、分辨率高。

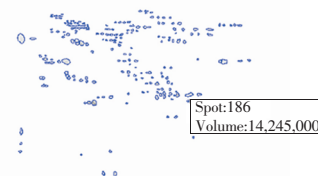


图 2 INS 儿童 2-DE 软件分析图谱。通过软件可读出蛋白质点数及各点对应等电点与分子量。

3 讨论

肾脏的主要功能之一是对血液的超滤作用形成原尿,并经肾小管重吸收后形成的终尿排出体外。正常尿液含有少量的蛋白成分,而在肾脏疾病中,不仅表现为尿中蛋白量的增加,而且尿液蛋白组成成分也不尽相同,因此,分析疾病状况下尿液蛋白质谱的组成,完全有可能发现某一(些)特殊蛋白成分,其可作为特异性的“分子标志物”,用于肾脏疾病的诊断、机制研究、疾病监控及新药的靶标^[9]。

以往对蛋白尿研究采用的蛋白电泳技术,如硝酸纤维薄膜、琼脂糖凝胶、免疫电泳、PAGE 以及 SDS-PAGE 圆盘状电泳等方法,虽各具优点,但都未能获得尿液中完整的蛋白图谱。近年来,国内外众多学者利用蛋白质组学技术建立了 IgA 肾病、肾癌、糖尿病肾病等多种疾病患者尿液的 2-DE 图谱,并从中找到一些有价值的蛋白质分子标志物,对疾病的诊断、疗效观察和揭示发病机制起到了重要作用^[10~12]。

本研究利用固相 pH 梯度 2-DE 技术,建立 INS 儿童尿液全蛋白的 2-DE 图谱,尿液中的任何杂质都会对其后的等电聚焦过程产生影响,而尿液中的蛋白是一种高度复杂的蛋白质混合物,蛋白丰度高低不一,且差别明显,蛋白组成类似于血液,白蛋白是其主要成分,一些小分子蛋白含量甚微;同时尿液

中还含有大量的电解质、色素和尿素等盐份。针对这种情况,我们在预实验中选用了三氯乙酸(TCA)加透析后真空抽干提纯法、TCA联合丙酮提纯法、单纯丙酮提纯法和丙酮浓缩蛋白后透析提纯法,结果发现前3种方法难于获得比较满意的尿液全蛋白2-DE凝胶图谱;我们推测原因主要是因为其不能有效的降低尿液标本中盐份的含量致使等电聚焦过程蛋白样品导电性高、电压不能达到5 000 V,最后导致电泳图谱拖尾现象明显;与之相比较,丙酮浓缩蛋白后透析提纯法则能较有效地减少尿液中盐份的含量,其等电聚焦过程电压可达到8 000 V,使凝胶图谱的分辨率得以明显提高。另外,白蛋白是尿液中蛋白质的主要成分,如何解决高浓度的白蛋白对尿液中某些低丰度蛋白质成份的“掩盖”也是进行尿液蛋白质组学研究必须考虑的问题,而在去除白蛋白的同时,往往也会除去标本中一些有价值的蛋白成份^[1]。鉴于以上原因,我们在实验中采用丙酮浓缩蛋白后透析提纯法制备尿液标本,也不预先去除尿液中的白蛋白以防止有意义蛋白质分子的同时丢失。

蛋白样品制备完成后,在第一向等电聚焦时,采用胶内加样,这样在低电压(30 V)辅助下,样品在线性pH梯度干胶条水化同时进入胶条。第一向等电聚焦必须维持伏特小时的一致,我们采用分步升压的方法最终稳定在8 000 V下等电聚焦5小时。2-DE凝胶可视化的方法目前主要为考马斯亮蓝染色法与硝酸银染色法。预实验中我们曾采用考马斯亮蓝染色法,但由于其敏感性低,不能很好的显示低丰度蛋白,而尿液标本又存在大量低丰度蛋白质,加大标本上样量同时增加了标本中盐份的含量,盐份影响等电聚焦过程,使电压不能达到8 000 V,故本实验采用了灵敏度较高的银染法。在使用的线性pH 3~10、18 cm干胶条电泳体系中,参考部分文献^[2,13]及预实验的结果,以300 μg为上样量时,图谱背景清晰,蛋白质分辨比较清楚,图谱水平与垂直条带较少。

为验证2-DE分离蛋白的可重复性,我们将标本在相同条件下进行3次重复实验。发现同一样本3次双向电泳的图谱非常相似,通过软件分析,匹配率在70%以上;三块胶在位置上也有较好的重复性,每组胶在第一向与第二向上的偏差均小于3 mm。

因此,本实验采用的尿液标本双向电泳技术分

离蛋白质的方法可重复性强,结果可靠,为建立INS儿童尿液蛋白的尿液全蛋白2-DE蛋白质表达图谱,进一步开展疾病的尿液蛋白质组学研究奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Chromy BA, Gonzales AD, Perkins J, Choi MW, Corzett MH, Chang BC, et al. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant protein[J]. J Proteo Res, 2004, 3(6):1120-1127.
- [2] Tantipaiboonwong P, Sinchaikul S, Sriyam S, Sriyam S, Phutrakul S, Chen S. Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients[J]. Proteomics, 2005, 5(4):1140-1149.
- [3] Meier M, Kaiser T, Herrmann A, Kneuppel S, Hillmann M, Koester P, et al. Identification of urinary protein pattern in Type 1 diabetic adolescent with early diabetic nephropathy by a novel combined proteome analysis[J]. J Diab Compl, 2005, 19(10):223-232.
- [4] Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, et al. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine[J]. Am J Pathol, 2001, 158(4):1491-1502.
- [5] Schaub S, Wilkins JA, Antonovici M, Krokhn O, Weiler T, Rush D, et al. Proteomic-based identification of cleaved urinary β2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts[J]. Am J Transplantation, 2005, 5(2):729-738.
- [6] 吴登龙,张远芳,关明,刘薇,徐月敏,金三宝,等. 蛋白质芯片技术筛选膀胱癌尿液标记物的研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(7):453-455.
- [7] 张岩,梅长林,喻峰,沈学飞,黄音,刘亚伟,等. 常染色体显性多囊肾病患者与正常成人尿液的定量比较蛋白质组学分析[J]. 中华肾脏病杂志, 2005, 21(6):345-350.
- [8] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗[J]. 中华儿科杂志, 2001, 12(39):746-749.
- [9] Thongboonkerd V, Klein JB, Jeans AW, Mcleish KR. Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases[J]. Contrib Nephrol, 2004, 141(1):292-307.
- [10] Park MR, Wang EH, Jin DC, Cha JH, Lee KH, Yang CW, et al. Establishment of 2-DE human urinary proteomic map in IgA nephropathy[J]. Proteomics, 2006, 6(3):1066-1076.
- [11] Thongboonkerd V. Proteomics in nephrology: current status and future directions[J]. Am J Nephrol, 2004, 24(3):360-378.
- [12] Nguyen MT, Ross GF, Dent CL, Devarajan P. Early prediction of acute injury using urinary proteomics[J]. Am J Nephrol, 2005, 25(5):318-326.
- [13] Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, Klein JB. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation[J]. Kidney Int, 2002, 62(4):1461-1469.

(本文编辑:吉耕中)