

儿童原发性肾病综合征尿蛋白质组样品 预处理方法的研究

王秋霞¹ 王建华^{2,3} 曹力¹ 牛勃² 王国亮² 钟儒刚³

(1. 北京大学首都儿科研究所教学医院肾内科, 北京 100020;
2. 北京大学首都儿科研究所教学医院生物技术研究室, 北京 100020;
3. 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100022)

[摘要] 目的 优化儿童原发性肾病综合征尿蛋白质组样品的预处理方法。方法 取原发性肾病综合征儿童尿液, 采用称量、SDS-PAGE 及双向电泳(2-DE)等方法比较不同 pH、冷丙酮沉淀不同时间等条件下所得到的蛋白质, 优化蛋白提取的条件。结果 pH 2.7 条件下所得到的蛋白种类最多; 冷丙酮沉淀 0.5 h 获得的蛋白量明显少于 1 h 及 2 h 的蛋白量($P < 0.05$), 而冷丙酮沉淀 1 h 和 2 h 获得的蛋白量没有显著性差异。pH 2.7 条件下冷丙酮沉淀 1 h 为样品预处理的最佳条件, 可获得满意的 2-DE 分离效果。结论 pH 2.7 条件下, 冷丙酮沉淀 1 h 为尿蛋白质组样品预处理的最佳条件。 [中国当代儿科杂志, 2011, 13(2): 157-160]

[关键词] 肾病综合征; 尿液; 蛋白质组; 双向电泳; 儿童
[中图分类号] R725 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)02-0157-04

Pretreatment methods of urine proteomics in children with primary nephrotic syndrome

WANG Qiu-Xia, WANG Jian-Hua, CAO Li, NIU Bo, WANG Guo-Liang, ZHONG Ru-Gang. Department of Nephrology, Teaching Hospital, Capital Institute of Pediatrics, Peking University, Beijing 100020, China (Wang J-H, Email: fywjh@163.com)

Abstract: Objective To optimize a pretreatment method of urine proteomics in children with primary nephrotic syndrome. **Methods** Urine from children with primary nephrotic syndrome was treated in different pH and isolated by cold acetone precipitation for different durations. Then the amounts and kinds of proteins were compared by quantify, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and two-dimensional electrophoresis (2-DE) in order to optimize a way to deal with urine protein. **Results** Most proteins were obtained at pH 2.7. The amounts of protein precipitated by acetone for 0.5 hr was obviously less than those precipitated for 1 and 2 hrs ($P < 0.05$), while there was no significant difference between the amount of protein precipitated for 1 and for 2 hrs. Protein precipitated by cold acetone for 1 hr at pH 2.7 was selected as the best pretreatment method. Satisfactory 2-DE maps can be acquired. **Conclusions** Urine protein can be best obtained at pH 2.7 and precipitated by cold acetone for 1 hr. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(2): 157-160]

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

尿液是含有大量标志物的体液之一, 多种肾脏疾病会出现蛋白尿, 对尿蛋白的定性及定量分析已用于研究肾脏生理及各种疾病, 对尿蛋白的鉴定有助于进一步加深对肾脏疾病的理解。原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)是最为常见的小儿肾脏疾病之一, 大量蛋白尿为其主要的病理生理基础和临床表现, 应用蛋白组学方法对 PNS 患儿尿中蛋白的检测可能对本病的分型、治疗及预后有一定启示。由于尿液成分的复杂性, 目前国内外研究者对于尿液蛋白质标本的制备尚无统一的方法, 而选择有效的标本预处理方法是开展蛋白质组学研究的前提, 样品的制备对蛋白质组学等有着重要影响。本研究以儿童 PNS 患者的蛋白尿为研究对象, 比较不同 pH、冷丙酮沉淀不同时间等条件下所得到的蛋白质质量和种类, 优化尿蛋白提取的条件, 获得了满意的结果。

[收稿日期]2010-03-10; [修回日期]2010-08-20
[基金项目] 博士后科学基金面上资助(No. 20090450272)。
[作者简介] 王秋霞, 女, 博士研究生, 医师。
[通信作者] 王建华, 教授。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Beckman 公司的高速低温离心机,北京赛多利斯股份公司产 UB 系列 pH 计,瑞江牌系列离心机 RJ-TGL-16C, -20℃ 冰箱,752 紫外光栅分光光度计,Bio-rad PROTEAN IEF Cell 电泳仪,北京市六一仪器厂 DYY-8C 型电泳仪,BINTA 2020D 扫描仪。

1.2 主要试剂

IPG 胶条(pH 3~10,线性,7 cm),CHAPS,Bio-Lyte(3/10) Ampholyte,尿素,碘乙酰胺,低熔点琼脂糖,十二烷基磺酸钠(SDS),甲叉双丙烯酰胺,丙烯酰胺,考马斯亮蓝 G250 及 R250,蔗糖,二硫苏糖醇(DTT),TEMED,磷酸等购自 Bio-rad 公司。

1.3 溶液配制

①水化上样缓冲液:加样时现配,最终浓度分别为 7 mol/L, 尿素;40 g/L CHAPS;2 g/L Bio-Lyte;65 mmol/L DTT;0.01 g/L 痕量溴酚蓝。②胶条平衡缓冲液母液:1.5 mol/L,pH 8.8 Tris-HCl;6 mol/L, 尿素;20 g/L SDS;200 mL/L 甘油,分装后 -20℃ 保存。③胶条平衡缓冲液 I:使用前胶条平衡缓冲液母液 2.5 mL 加 DTT 0.05 g;胶条平衡缓冲液 II:使用前胶条平衡缓冲液母液 2.5 mL 加碘乙酰胺 0.062 g。④30 mL/L 聚丙烯酰胺贮液:300 g/L 丙烯酰胺,80 g/L 甲叉双丙烯酰胺,滤纸过滤后,棕色瓶 4℃ 冰箱保存。⑤考马斯亮兰染色液:0.001 g/L 考马斯亮兰 R250,45% (体积) 乙酸,10% (体积) 甲醇。

1.4 收集标本

符合中华医学会儿科学分会肾脏病学组 2001 年制定的肾病综合征的诊断标准^[1],北京大学首都儿科研究所教学医院肾脏病房收治的肾病综合征儿童共 51 例,临床及实验室检查除外继发性肾病综合征,尿蛋白定性(++)~(++++)。收集晨起清洁中段尿 100~200 mL。

1.5 方法

1.5.1 调节尿液 pH 11 例患儿的尿液分别平均分为 3 份,分别调节 pH 至 2.7^[2],10.0^[3] 及不调 pH(6.5 左右),立即 4℃,5000 G 离心 10 min,取上清。按 1:1 体积缓慢加入预冷(-20℃ 过夜)的丙酮,置 -20℃ 冰箱 1 h 沉淀浓缩蛋白,于 4℃,12 000 G 离心 30 min,弃去上清,沉淀得到的蛋白称重,并分别用 0.25 mol/L 的蔗糖溶液悬浮^[4-5],分装。用 Bradford 法^[6]测蛋白浓度后,取相等的蛋白

质上样行 SDS-PAGE 电泳。

1.5.2 丙酮沉淀不同时间 30 例患儿尿液分别平均分成 3 份,均调节 pH 至 2.7,立即 4℃,5000 G 离心 10 min,取上清。按 1:1 体积缓慢加入预冷(-20℃ 过夜)的丙酮,置 -20℃ 冰箱,每个患儿 3 份尿液丙酮沉淀时间分别为 0.5 h、1 h 及 2 h,于 4℃,12 000 G 离心 30 min,弃去上清,比较得到的蛋白量。

1.5.3 双向电泳标本处理 10 例患儿尿液,调节 pH 至 2.7,立即 4℃,5000 G 离心 10 min,取上清。按 1:1 体积缓慢加入预冷(-20℃ 过夜)的丙酮,置 -20℃ 冰箱 1 h 沉淀浓缩蛋白质,于 4℃,12 000 G 离心 30 min,弃去上清,沉淀用 0.25 mol/L 蔗糖重新悬浮,分装后 -20℃ 保存备用。Bradford 法测蛋白浓度。

1.6 双向电泳、染色及图像分析

1.6.1 双向电泳 双向电泳主要按照 IPG 胶条操作手册进行,IPG 干胶条水化和聚焦在 20℃ 连续进行。采用不同蛋白上样量,分别为 100 μg、180 μg 及 360 μg,总体积均为 150 μL,连续加入聚焦盘的槽中,轻轻地将 IPG 胶条胶面向下置于聚焦盘中样品溶液上,使胶条正极对着聚焦盘正极,并避免产生气泡。其中水化在 50 V 低电压进行 12 h,然后等电聚焦,条件为 250 V 线性除盐,30 min;500 V 快速除盐,30 min;4000 V 线性升压,3 h;4000 V 快速聚焦,20000 Vh;最后 500 V 快速保持,3 h。

等电聚焦后 IPG 胶条放入平衡母液 2.5 mL 中,于水平摇床上缓慢振荡 20 min×2。其中,第一种平衡液中含 DTT 0.05 g,而第二种平衡液内由 0.062 g 碘乙酰胺取代,然后在 15% 的 SDS-PAGE 进行第二向电泳。电泳条件,开始 70 V/gel,待样品进入 SDS 胶浓缩成一条线,约 20 min 改为 120 V/gel,至溴酚兰接近凝胶底部时停止电泳。

1.6.2 凝胶染色及图像分析 电泳结束后,取下凝胶,切角做标记,进行考马斯亮兰 R250 染色,染色 30 min 停止,加入脱色液脱色,更换脱色液数次至凝胶清晰。BINTA 2020D 扫描仪摄像。用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 软件分析双向电泳图像。每个样品重复 2 次。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析比较不同 pH 条件下获得蛋白量;采用一般线性模型的重复测量的分析方法比较丙酮沉淀不同时间得到的蛋白量,两组间比较采用 LSD 检验方法。 $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 不同 pH 条件下获得蛋白量

本研究发现不同 pH 对沉淀得到的蛋白量没有影响,见表 1。图 1 为不同 pH 条件下获得蛋白的 SDS-PAGE(12%) 电泳图谱。结果显示 pH 调至 2.7 得到的蛋白条带明显多于不调 pH 及 pH 10.0 得到的蛋白条带,在小分子条带尤其明显。

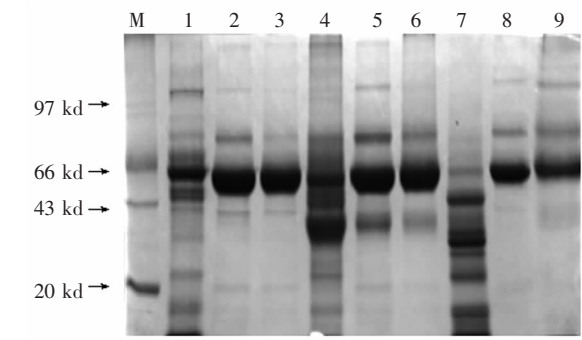


图 1 PNS 儿童尿蛋白在不同 pH 条件下获得蛋白的 SDS-PAGE(12%) 电泳图谱 1、4、7 分别是 3 个患儿 pH 2.7 条件下获得的蛋白,2、5、8 分别是不调 pH(6.5 左右)获得的蛋白,3、6、9 分别是调节 pH 至 10.0 获得的蛋白。每个样品上样量约 15 μg。

2.2 不同丙酮沉淀时间得到的蛋白量

不同丙酮沉淀时间得到的蛋白量有显著差异,沉淀 0.5 h 得到的蛋白量明显少于 1 h 和 2 h 组;而沉淀 1 h 和 2 h 两组间差异无统计学意义。见表 2。

2.3 双向电泳结果

以蛋白 180 μg(总体积 150 μL 左右)为上样量时,可获得比较满意的凝胶图谱。通过 ImageMaster 2D Platinum 5.0 软件检测,蛋白点 72 ~ 1 00 个/胶,蛋白点多在等电点 4 ~ 8 范围内。不同上样量时双向电泳结果见图 2。

表 1 不同 pH 条件下得到蛋白量的比较 ($\bar{x} \pm s$)		
pH	<i>n</i>	蛋白量(g)
2.7	11	0.43 ± 0.18
6.5	11	0.43 ± 0.18
10.0	11	0.43 ± 0.17
<i>F</i> 值		0.001
<i>P</i> 值		0.999

表 2 丙酮沉淀不同时间得到的蛋白量的比较 ($\bar{x} \pm s$)		
时间	<i>n</i>	蛋白量(g)
0.5 h	30	0.26 ± 0.14
1 h	30	0.34 ± 0.18 ^a
2 h	30	0.35 ± 0.17 ^a
<i>F</i> 值		48.693
<i>P</i> 值		< 0.01

a: 与 0.5 h 组比较,*P* < 0.01

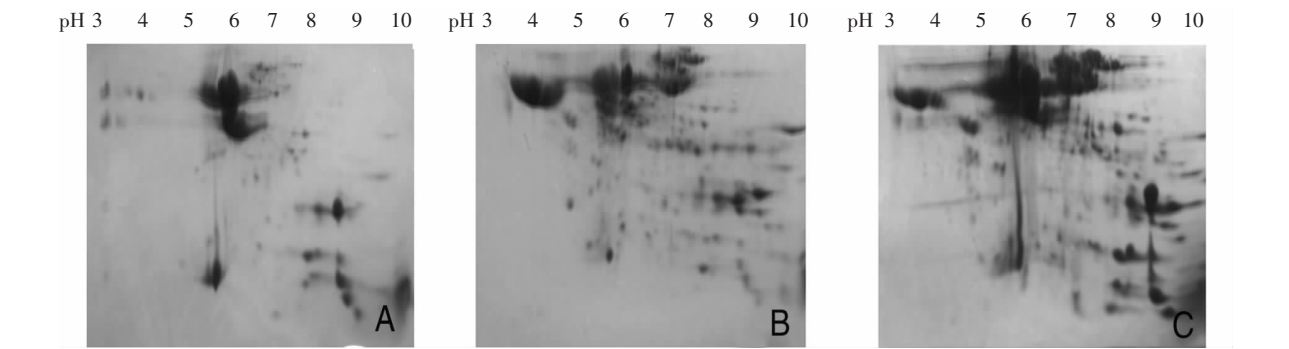


图 2 不同上样量时双向电泳图谱 A、B、C 图分别为蛋白上样量为 100 μg、180 μg 及 360 μg。可见图 A 的蛋白点明显少于后二者,图 C 的蛋白点有明显的纵向拖尾,而图 B 的蛋白点比较多而且拖尾不明显。拖尾示上样量过大。

3 讨论

尿液中的蛋白质浓度低,且盐浓度高,不适合直接用于双向凝胶电泳,尿液蛋白质的处理方法直接影响到电泳结果。正常小儿尿液 pH 6.5 左右,但不同蛋白质的等电点不同,故不同 pH 时沉淀得到的

蛋白质可能也不同。为了了解 pH 调节对尿液样品有无影响,本研究取等量尿液分为 3 组,一组不调 pH(6.5 左右),另外 2 组分别调节尿液 pH 值至 2.7 和 10.0。均采用相同量的丙酮并沉淀相同时间获得蛋白质,然后分别取等量的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,发现 pH 2.7 时得到的蛋白在 SDS-PAGE 凝胶上见到更多的条带,尤其是小分子量的

蛋白。考虑低分子量蛋白在酸性条件下易发生变性沉淀,故调节尿液 pH 至 2.7 时能得到更多种类的蛋白,且 pH 2.7 时可抑制尿液中细菌生长及蛋白降解^[2]。

由于蛋白质理化性质的不同,用一种蛋白分离方法鉴定所有的蛋白成分似乎不太可能。选择丙酮沉淀的原因是在低温下丙酮能保持蛋白的活性;丙酮密度低,与沉淀物质的密度差大,便于离心分离;丙酮为挥发性有机溶剂,易蒸发除去,不会残留在样品中,对后续电泳影响小。而盐析虽然能保持蛋白活性,但是加入了电解质,会影响等电聚焦。

关于丙酮沉淀蛋白的时间,各个文献采用的时间不一,从沉淀 10 min 到过夜不等,本研究通过比较分别沉淀 0.5 h、1 h 及 2 h 所获得的蛋白量,发现沉淀 0.5 h 比沉淀 1 h 和 2 h 得到蛋白量少,而丙酮沉淀 1 h 和 2 h 得到的蛋白量没有显著性差异。说明冷丙酮沉淀尿蛋白 1 h 为合适的时间,可得到尽可能多的蛋白量,而进一步延长沉淀时间也未能增加沉淀的蛋白量。白蛋白是尿液中蛋白质的主要成分,尿液中高浓度白蛋白可能会掩盖某些低丰度蛋白质成份,但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。在本实验中未预先去除尿液中的白蛋白以防止有意义蛋白质分子的丢失。进一步研究可预先去除白蛋白了解蛋白质谱有无明显改变。

冷丙酮沉淀浓缩蛋白后,用 250 mmol/L 蔗糖悬浮沉淀的蛋白,这样上样蛋白都是可溶性蛋白,然后检测蛋白浓度,保证上样量的准确性。为了检验尿蛋白处理结果,考虑经济、方便原则初步采用了 7 cm 干胶条行双向电泳。为了选取合适的上样量,分别选用了 100 μ g、180 μ g、360 μ g 为上样量,发现以 180 μ g 为上样量,可获得背景清晰、蛋白质分辨比较清楚的图谱。结果分析得到 72 ~ 100 个蛋白

点/胶,部分文献^[4,7]采用 pH 3 ~ 10、18 cm 干胶条电泳得到约 400 个蛋白点/胶,考虑与考马斯亮兰染色的敏感度低于银染有关。

因此,本研究讨论了尿液蛋白质的相关处理方法,采用了 pH 2.7 条件下,冷丙酮沉淀 1 h 为尿蛋白质组样品预处理的最佳条件,能得到尽可能多的尿蛋白,其重复性好,经济,操作较为简便,为进一步开展疾病的尿液蛋白质组学研究提供了实验依据。

致谢:感谢北京大学首都儿科研究所教学医院肾脏病房和生物技术实验室所有支持本研究的患儿、家长、同学和各位老师。

[参 考 文 献]

[1] 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,2001,39(12):746-749.

[2] Sun W, Li F, Wu S, Wang X, Zheng D, Wang J, et al. Human urine proteome analysis by three separation approaches[J]. Proteomics, 2005, 5(18): 4994-5001.

[3] Meier M, Kaiser T, Herrmann A, Knueppel S, Hillmann M, Koester P, et al. Identification of urinary protein pattern in type 1 diabetic adolescents with early diabetic nephropathy by a novel combined proteome analysis[J]. J Diabetes Complications, 2005, 19(4): 223-232.

[4] 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.

[5] 黄艳军,黄松明,张爱华,费莉,徐颂周,陈荣华. 尿蛋白组学在儿童微小病变型肾病综合症中的初步研究[J]. 中国现代医学杂志,2006, 16(20): 3152-3155.

[6] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京:科学技术出版社,1999:142-144.

[7] 丁娟娟,何庆南,周频,张磊,易著文. 原发性肾病综合征儿童尿液双向电泳图谱的建立[J]. 中国当代儿科杂志,2007, 9(2):122-124.

(本文编辑:王 霞)