段及GAPDH参比基因,已有相关文献报道此基因于人群中无拷贝数变异多态性[11],具有可靠的代表性。所选择的X染色体扩增片段,在实验过程中,暂未发现人群中的拷贝数变异多态性,但其最终验证尚需大规模人群筛查,此工作有待完善。另外,本法是根据目的基因DNA片段相对拷贝数变化诊断染色体数目异常,不能区分易位型、嵌合体和游离型。

参考文献:

[1] 姚宏, 李力. 染色体病的临床分析及产前诊断[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(12): 1119-1120.
[2] 彭大振, 卢根生, 朱开常, 等. 138例两性畸形的临床诊治分析[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(19): 1901-1904.
[3] 高斌, 肖白, 邹起练, 等. 多重实时荧光PCR相对定量法快速诊断唐氏综合征[J]. 遗传, 2007, 29(8):934-938.
[4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
[5] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, *et al*. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol[J]. Biotechniques, 1997, 23(3): 504-511.
[6] Bryndorf T, Lundsteen C, Lamb A, *et al*. Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by interphase fluorescence in situ hybridization: a one-year clinical experience with high-risk and urgent fetal and postnatal samples[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2000, 79(1): 8-14.
[7] O'Leary P, Breheny N, Dickinson J E, *et al*. First-trimester combined screening for Down syndrome and other fetal anomalies[J]. Obstet Gynecol, 2006, 107(4): 869-876.
[8] Miura S, Miura K, Masuzaki H, *et al*. Microarray comparative genomic hybridization(CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid[J]. J Hum Genet, 2006, 51(5): 412-417.
[9] 郑明明, 胡娅莉, 许争峰, 等. 实时荧光定量聚合酶链反应技术在产前诊断唐氏综合征中的应用[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(10): 678-681.
[10] Yulug E, Yenilmez E, Unsal M A, *et al*. Apoptotic and morphological features of the umbilical artery endothelium in mild and severe preeclampsia[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2006, 85(9): 1038-1045.
[11] Helmy S M, Ismail S, Bassiouni R, *et al*. Sensitivity of DCSR3/GAPDH ratio using quantitative real-time PCR in the rapid prenatal diagnosis for down syndrome[J]. Fetal Diagn Ther, 2009, 25(2): 220-223.

(**收稿**:2009-12-05;**修回**:2010-02-05)
(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2010)13-1481-03

技术方法

尿蛋白质组双向电泳的样品制备

张 渊[1],代 义[1],邱 峰[2],李艳艳[1],邱宗荫[1] (400016 重庆,重庆医科大学:药学院药物分析教研室[1],附属第一医院药剂科[2])

[摘要] **目的** 建立与优化非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者尿液全蛋白双向凝胶电泳技术(2-DE)。**方法** 采用4种不同的方法制备尿液蛋白质样品,以非线性预制胶条进行第一向等电聚焦,12%的SDS-PAGE进行第二向电泳,银染显色。**结果** 以乙腈沉淀蛋白后经过超滤制备的蛋白质样品,在300μg上样量时,可获得图像清晰、分辨率高、重复性好的双向电泳图谱。**结论** 建立了较稳定的非小细胞肺癌患者尿蛋白质组双向凝胶电泳技术。

[关键词] 非小细胞肺癌;尿液;双向电泳
[中图法分类号] R446.12 **[文献标志码]** A

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌的80%,其疗效令人失望,虽然手术是其首选的治疗方法,但大多数患者确诊时已属晚期而失去了手术机会或手术效果不佳。目前肺癌的诊断一般通过纤维支气管镜、影像学及组织细胞学检查,早期诊断率不够高。

尿液中蛋白质种类和数量的变化携带有与疾病发生、发展及预后有关的各种信息;又因为尿能够无创地大量获得,并且相对于其它生物液体而言比较稳定,因此尿蛋白质组学正在成为临床蛋白质组学研究中的一项重要内容[1]。双向凝胶电泳技术(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DE)是目前蛋白质组学研究中的主要分离技术之一。要获得具有高分辨率和重复性的双向凝胶电泳图谱,样品的制备是关键[2]。尿液成分十分复杂,含有的多种盐分和代谢产物都可能影响蛋白质的分离,目前国内外研究者对于尿液蛋白质样品的制备尚无统一方法[3-8]。

[通信作者] 邱宗荫,电话:(023)68485727,E-mail:zongyin141@126.com

本实验以健康对照者和NSCLC患者尿液为研究对象,对2-DE条件进行调整、优化,获得了较稳定的NSCLC患者尿液蛋白质组的2-DE图谱,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 主要试剂与仪器

尿素、3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐(CHAPS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸、过硫酸氨、碘乙酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)及pH值为3~10 IPG胶条等(均购自美国Bio-Rad公司);二硫苏糖醇(DTT)、甲叉双丙烯酰胺、硫脲、Bradford蛋白质定量试剂盒(均购自上海生工公司)。

双向电泳仪:PROTEAN IEF Cell,PRPTEAN Ⅱ Xi Cell为美国Bio-Rad公司产品;PDQuest Software 7.0为美国Bio-Rad公司产品。

1.2 方法

1.2.1 尿液采集 于清晨采集8例健康志愿者(均来自重庆医科大学,24~28岁,男性4例,女性4例,无严重系统性疾病,1周内未用药,无吸烟史,女性不在月经周期内)的第1次中段尿样各约100 ml,等体积混合,立即加Cocktail蛋白酶抑制剂[9],于-80 ℃贮存。

NSCLC患者尿液标本取自重庆医科大学附属第一医院呼吸内科1例住院患者(男性,58岁)的晨起中段尿,经肺组织活检确诊为NSCLC患者,且尚未进行药物和手术治疗。

1.2.2 样品处理

1.2.2.1 方法1,真空冷冻干燥后直接上样 将解冻后的样品于室温1 500×*g*离心10 min,去除细胞碎片及不溶性杂质,取上清经0.22 μm滤膜过滤后真空冷冻干燥,用上样缓冲液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,4% CHAPS)溶解,低温超声溶解10 min,Bradford法定量蛋白质。

1.2.2.2 方法2,沉淀蛋白后直接上样 将解冻后的样品于室温1 500×*g*离心10 min,去除细胞碎片及不溶性杂质,取上清经0.22 μm滤膜过滤。取20 ml样品加预冻的乙腈1∶5(样品∶有机溶剂)于4 ℃沉淀过夜后,4 000×*g*,10 ℃离心40 min,弃上清,将沉淀物真空干燥。用上样缓冲液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,4% CHAPS)溶解,低温超声溶解10 min,Bradford法定量蛋白质。

1.2.2.3 方法3,冷冻干燥后超滤 将解冻后的样品于室温1 500×*g*离心10 min,去除细胞碎片及不溶性杂质,取上清经0.22 μm滤膜过滤。取20 ml样品直接冷冻干燥后用上样缓冲液(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,4% CHAPS)溶解,低温超声溶解10 min。使用Millipore超滤管Amicon Ultra-10K(Billerica,MA,USA),以超速冷冻离心法(4 ℃,4 000×*g*,离心2 h)浓缩至500 μl左右,以去除小分子干扰物质,用Bradford法定量蛋白质。

1.2.2.4 方法4,沉淀蛋白后超滤 将解冻后的样品于室温1 500×*g*离心10 min,去除细胞碎片及不溶性杂质,取上清经0.22 μm滤膜过滤。取20 ml样品分别加预冻的乙醇、丙酮、乙腈1∶5(样品∶有机溶剂)于4 ℃沉淀过夜后,4 000×*g*,10 ℃离心40 min,弃上清,将沉淀物真空干燥。将真空干燥后的样品溶于裂解缓冲液中(7 mol/L尿素,2 mol/L硫脲,4% CHAPS),低温超声溶解10 min,使用Millipore超滤管Amicon Ultra-10K(Billerica,MA,USA),以超速冷冻离心法(4 ℃,4 000×*g*,离心2 h)浓缩至500 μl左右,以去除小分子干扰物质,用Bradford法定量蛋白质。

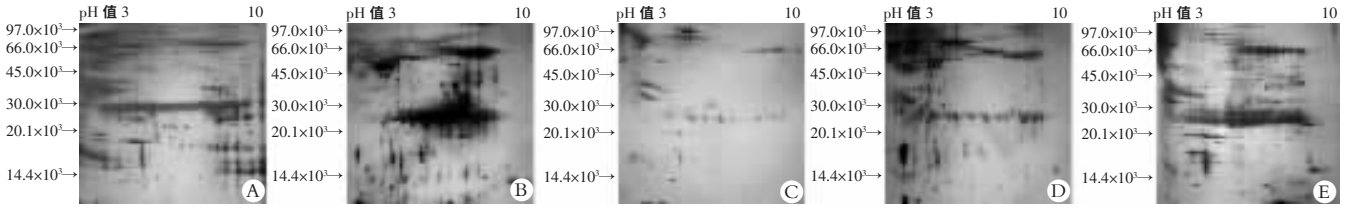
1.2.3 双向电泳及图像分析 第一向固相pH值梯度等电聚焦采用17 cm的非线性预制胶条(pH值为3~10),上样量为300 μg,聚焦时间电压为60 000 Vh,等电聚焦结束后用12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行第二向分离,电泳结束后采用文献[10]报道的方法进行酸性硝酸银法染色。

染色结束后用Imagescanner扫描仪扫描凝胶,用PDQuest 7.0凝胶图像分析软件依次进行点检测、背景消减、2D校正、匹配与建立平均凝胶等分析。根据Normalised Volume值的变化来判断蛋白斑点表达量的变化,从而获取斑点的相关信息。

2 结果

2.1 健康对照者尿液2-DE图谱的建立

采用1.2.2.1处理后的样品,由于盐分太重,等电聚焦时电流太大,电压无法上升,聚焦不成功。采用1.2.2.2处理后的样品,从2-DE图谱上可以看出,横条纹较严重,聚焦不够充分。采用1.2.2.3处理后的样品,从2-DE图谱上可以看到,虽然横条纹明显减少,不过高丰度蛋白处阴影明显,且存在纵向拖尾现象,蛋白质分离不充分。采用1.2.2.4处理后的样品,经3种有机试剂沉淀尿液蛋白质所得2-DE图谱差异较大。以乙醇作为沉淀剂所得到的2-DE图谱,蛋白点很少;以丙酮作为沉淀剂的2-DE图谱,蛋白点数较多,但存在较多阴影及纵向拖尾现象;以乙腈作为沉淀剂的2-DE图谱,蛋白点数多,且各点分布清晰,分辨率较高。见图1。

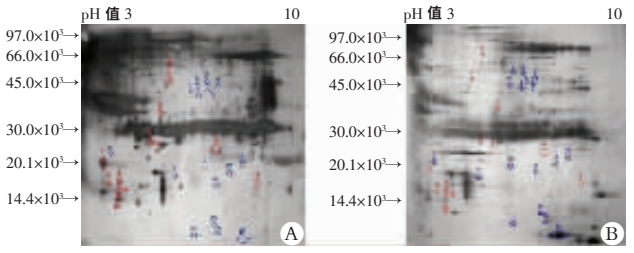


A:方法2;B:方法3;C:方法4(乙醇);D:方法4(丙酮);E:方法4(乙腈)

图1 采用不同处理方法所得到的健康对照者尿蛋白质组双向电泳图谱对比结果

2.2 NSCLC 患者 2-DE 图谱的建立

采用 1.2.2.4(乙腈)分析了 1 例 NSCLC 患者尿液样品,用 Imagescanner 扫描仪对凝胶图像进行扫描并利用 PDQuest7.0 软件进行背景消减、校正、匹配、均一化等分析后,结果表明:健康对照者电泳图谱共检测到 611 个点,NSCLC 患者电泳图谱检测到 589 个点,且两者图谱之间有较大差异,与健康对照者的 2-DE 结果相比,NSCLC 患者的 2-DE 结果中出现了 12 个表达上调的蛋白点,而有 17 个蛋白点表达下调(图 2)。



A:NSCLC 患者;B:健康对照者 图中所示位置为差异蛋白点,红色为上调点,蓝色为下调点

图 2 NSCLC 患者与健康对照者尿蛋白质组双向电泳图谱对比结果

3 讨论

尿液是一种成分高度复杂的混合物,除了占 95%~97% 的 H_2O 外,还含有多种小分子有机物和氯化物、硫酸盐、磷酸盐以及数千种蛋白质和多肽。尿液中的蛋白质组成类似于血液,白蛋白是其主要成分。在健康个体中,尿蛋白质组的 70% 来自肾脏和尿路,30% 来自于肾小球滤过[11,12],因此,对尿蛋白质组的分析不仅可能鉴定出泌尿系统的生物标志物,也可能鉴定全身性疾病的生物标志物,另外由于尿液取样的方便及无创性,使其成为重要的临床诊断标本。

由于尿液中小分子有机物和无机盐的影响,尿蛋白质组的双向电泳分析往往难以得到满意的结果。我们的研究发现,尿液中的小分子物质,特别是无机盐对第一向等电聚焦的影响很大。因此,在进行蛋白质组分析时,尿样的前处理十分重要。本研究用 4 种方法对尿液样本进行处理所得结果表明,由于尿液中的高盐分,如果将尿样冷冻干燥后直接上样,等电聚焦时电流过大、电压无法上升,难以进行聚焦;用有机溶剂沉淀蛋白后直接上样,等电聚焦时电流仍然较大,升压困难,聚焦不充分,导致横条纹严重;将尿样直接冷冻干燥并超滤后上样,纵向拖尾严重,蛋白质分离不充分;用有机溶剂沉淀蛋白并超滤后上样,盐分及其他小分子杂质明显减小,等电聚焦时升压容易,蛋白点清晰,可以获得相对较好的电泳图谱。我们也同时比较了 3 种有机溶剂的沉淀效果,结果显示,采用乙腈沉淀尿液蛋白质可以获得最多的蛋白点和清晰的电泳图谱。

我们将上述优化后的方法用于 NSCLC 患者尿液蛋白质组的分析,并发现了一批差异表达蛋白点。迄今为止,临床尿蛋白质组学的研究主要集中在肾脏与泌尿系统疾病,本研究的初步结果提示,也有可能从 NSCLC 患者尿液蛋白质组的变化中筛选新的生物标志物。

参考文献:

[1] Decramer S, Gonzalez-de-Peredo A, Breuil B, *et al*. Urine in clinical proteomics[J]. Mol Cell Proteomics, 2008, 7(10): 1850 - 1862.

[2] Chromy B A, Gonzales A D, Perkins J, *et al*. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins[J]. J Proteome Res, 2004, 3(6): 1120 - 1127.

[3] Tantipaiboonwong P, Sinchaikul S, Sriyam S, *et al*. Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients [J]. Proteomics, 2005, 5(4): 1140 - 1149.

[4] Meier M, Kaiser T, Herrmann A, *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.

[5] Vlahou A, Schellhammer P F, Mendrinos S, *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.

[6] Schaub S, Wilkins J A, Antonovici M, *et al*. Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts[J]. Am J Transplant, 2005, 5(4 Pt 1): 729 - 738.

[7] 吴登龙, 张元芳, 关明, 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.

[8] 张岩, 梅长林, 喻峰, 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.

[9] Zhou H, Yuen P S, Pisitkun T, *et al*. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery[J]. Kidney Int, 2006, 69(8): 1471 - 1476.

[10] 彭咏波, 马永平, 唐伟, 等. 弱精不育患者与正常生育能力者精浆蛋白质的双向电泳图谱分析[J]. 生殖与避孕, 2007, 27(12): 764 - 767, 771.

[11] Thongboonkerd V, Malasit P. Renal and urinary proteomics: current applications and challenges[J]. Proteomics, 2005, 5(4): 1033 - 1042.

[12] Pisitkun T, Johnstone R, Knepper M A. Discovery of urinary biomarkers[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(10): 1760 - 1771.

(**收稿**:2009-12-07;**修回**:2010-01-11)

(编辑 张 维)