

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000100

人尿液蛋白质的超滤离心制备及其双向凝胶电泳分析

彭 扬,周林科,吴 波,杨涌涛,詹 远,陈建军,谢 鹏

(重庆医科大学神经科学研究中心,重庆 400016)

【摘要】目的:优化尿液蛋白质制备方法以获得蛋白点数多且分辨率高的尿液双向凝胶电泳(two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)图谱,为尿液蛋白质组学研究提供技术支撑。**方法:**首先,使用 6 种不同方法制备尿液蛋白质后比较蛋白质得率,并分析这些方法的 2-DE 谱蛋白点数及 3 次重复匹配率,进行统计分析计算 P 值;最后利用 2 种固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)胶条和不同的聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)胶浓度进行 2-DE 分析,比较所得蛋白图谱的蛋白点数及分辨率。**结果:**与其他方法相比,超滤离心法制备尿液蛋白能获得更多的蛋白总量 $[(791 \pm 17) \mu\text{g}, P=0.000]$,得到的电泳图谱蛋白点数也更多 $[(724 \pm 29) \text{个}, P=0.000]$;利用 pH 3~10 IPG 胶条和 12.5% PAGE 分离有利于尿液蛋白质的整体分析,特别是酸性和碱性蛋白质点信息,而 pH 4~7 IPG 胶条能使等电点为 4~7 蛋白质的 2-DE 谱分辨率更高($P<0.05$)。**结论:**建立了与 2-DE 兼容的尿液蛋白质制备方法,获得了更为全面的尿液蛋白点信息,为临床生理和疾病的尿液蛋白质组学研究奠定了基础。

【关键词】尿液;蛋白质;双向凝胶电泳;超滤离心法**【中图分类号】**R446.12**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-02-28

Ultrafiltration and two-dimensional gel electrophoresis analysis of human urinary protein

Peng Yang, Zhou Linke, Wu Bo, Yang Yongtao, Zhan Yuan, Chen Jianjun, Xie Peng

(Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To optimize urinary protein preparation method, to obtain a two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) map with more urinary protein spots and higher resolution, and to provide technical supports for urinary proteomic researches. **Methods:** Firstly, urinary protein was extracted by 6 different preparation methods and then the total protein content between them were compared; secondly, protein spots as well as three-time repeated matching rate of 2-DE maps of these six methods were ana-

作者介绍:彭 扬, Email: pengyang.1989@163.com,

研究方向:尿液蛋白质组学。

通信作者:谢 鹏, Email: xiepeng58@21cn.com。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(编号:2009CB918300)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000100.html>

general population[J]. J Clin Virol, 2008, 43(3): 317-322.

[11] 徐晓艳, 金 戈, 张 亮, 等. 抗博尔纳病毒核蛋白多克隆抗体的制备和鉴定[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(3): 212-215.

[12] Staeheli P, Sauder C, Hausmann J, et al. Epidemiology of Borna disease virus[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt9): 2123-2135.

[13] Bode L. Human infections with Borna disease virus and potential pathogenic implications[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1995, 190: 103-130.

[14] Staeheli P, Sauder C, Hausmann J, et al. Epidemiology PCR of Borna disease virus[J]. J Gen Virol, 2000, 81(7): 2123-2135.

[15] 徐鸣明, 张英英, 展群岭, 等. 博尔纳病毒生物学特点以及检测方法[J]. 医学教育探索, 2010, 9(10): 1419-1424.

[16] Yamaguchi K, Sawada T, Yamane S, et al. Synthetic peptide-based electrochemiluminescence immunoassay for anti-Borna Disease Virus P40 and P24 antibodies in rat and horse serum[J]. Ann Clin Biochem,

2001, 38(Pt 4): 348-355.

[17] Ibrahim MS, Watanabe M, Palacios JA, et al. Varied persistent life cycles of Borna disease virus in a human oligodendroglioma cell line[J]. J Virol, 2002, 76(8): 3873-3880.

[18] Furrer E, Bilzer T, Stitz L, et al. Neutralizing antibodies in persistent Borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis[J]. J Virol, 2001, 75(2): 943-951.

[19] Horimoto T, Takahashi H, Sakaguchi M, et al. A reverse-type sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Borna disease virus[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(7): 1661-1666.

[20] 杨爱英, 张凤民, 李均辉, 等. 用蛋白印迹试验检测精神分裂症患者血清中博尔纳病毒 P24 抗体的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17(1): 85-87.

(责任编辑: 冉明会)

lyzed, and P value for statistical analysis was set; finally, for the best method, 2 different polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) concentrations and 2 different immobilized pH gradient (IPG) strips were utilized to compare protein spots and resolution of 2-DE maps.

Results: Method named ultrafiltration got the most proteins ($(791 \pm 17) \mu\text{g}$, $P=0.000$) as well as maximum protein spots (724 ± 29 , $P=0.000$). Utilization of 12.5% PAGE gel combined with IPG pH 3–10 strip was beneficial for the whole analysis of urinary proteins, especially for the acid and basic proteins, however, when combined with pH 4–7 strip, a 2-DE map of higher resolution within the isoelectric point range of 4–7 ($P<0.05$) can be obtained. **Conclusion:** This research establishes a 2-DE compatible urinary protein preparation method and obtains more comprehensive urinary protein spots information, which lays a solid foundation for urinary proteomics research of clinical physiology and diseases.

[Key words] urine; protein; two-dimensional gel electrophoresis; ultrafiltration

尿液具有无创性、易获取、蛋白稳定等特点,其蛋白质组学广泛用于内源性和外源性物质的体内代谢、毒理学及许多疾病诊断的研究^[1–6]。双向凝胶电泳(two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)技术是蛋白质组学研究中常用的分离技术,由于尿液中含有大量的盐份影响蛋白质的分离,目前基于 2-DE 技术的尿液蛋白组学研究存在许多困难^[7];因此,为了优化尿液蛋白制备方法,本实验以正常人尿液蛋白为研究对象。首先,采用 6 种不同方法制备样品,比较所得蛋白总量;其次,分析各方法 2-DE 图谱蛋白点数量及 3 次重复匹配率;最后对优选方法进行不同聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)胶浓度、不同固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)胶条的 2-DE 图谱比较,拟获得蛋白点数较多、分辨率较高的尿液 2-DE 图谱,为临床生理和疾病的尿液蛋白质组学研究提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

尿素、硫脲、3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐{3-[(3-cholanidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate, CHAPS}、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、Bio-lyte、溴酚蓝、17 cm 固相 pH 梯度(IPG 3–10 非线性, 4–7 线性)干胶条、甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、四甲基乙二胺、过硫酸氨、碘乙酰胺(indoleacetic acid, IAA)、甘氨酸(均购自美国 BIO-RAD 公司);丙酮、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)、硝酸银(均购自上海生工公司);超滤离心管 Amicon Ultra-15 centrifugal filter devices (cutoff: 10 KD) 购自美国 Millipore 公司。IPG-phor 等电聚焦仪、垂直电泳仪、PDquest v8.0.1 分析软件(均为美国 BIO-RAD 公司产品);

EPSON EXPRESSION 10000XL 扫描仪,美国 ThermoFisher 公司低温离心机,中国海尔公司-80 °C 超低温冰箱,美国 BIO-RAD 公司 Imark microplate reader 酶标仪。

1.2 溶液的配制

上样缓冲液:7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,50 mmol/L DTT,0.2% Bio-lyte;buffer A:6 mol/L 尿素,2% SDS,0.375 mol/L Tris-HCl(pH 8.8),20%甘油,2% DTT;缓冲液 B:6 mol/L 尿素,2% SDS,0.375 mol/L Tris-HCl(pH 8.8),20%甘油,2.5% IAA。

1.3 标本采集

30 例健康志愿者均来自重庆医科大学,年龄(26 ± 3)岁,男性 15 例,女性 15 例,无严重系统性疾病,肝功和尿常规均正常。根据 EuroKup/HUKPP 尿液操作规程(<http://www.eurokup.org/>)。采集第 2 次晨尿中断尿,4 °C 下 1 000 g 离心 10 min,去除细胞碎片及不溶性杂质,各取 10 ml 样品等体积混合,共 300 ml 混合样品,按 15 ml/份分装,保存于-80 °C 备用,整个过程在尿液采集后 3 h 内完成。

1.4 蛋白制备

1.4.1 10% TCA 法 取 15 ml 混合样品,加入 TCA 使浓度为 10%,冰上孵育 2 h,于 4 °C 14 000 g 离心 15 min,弃上清,向沉淀物加入丙酮洗涤,冰上孵育 15 min,再离心 14 000 g 20 min,弃上清,重复洗涤操作 3 次后室温干燥沉淀,加入上样缓冲液裂解蛋白 12 h,以牛血清白蛋白作为标准蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度,计算所得蛋白总量,重复此方法 3 次,3 次所得蛋白总量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)显示。

1.4.2 15% TCA 法^[8] 取 15 ml 混合样品,加入 TCA 使浓度为 15%,4 °C 过夜,于 4 °C 17 000 g 离心 15 min,弃上清,向沉淀物加入丙酮洗涤,-20 °C 孵育 10 min,再离心 17 000 g 15 min,弃上清,重复洗涤操作 3 次后室温干燥沉淀,加入上样缓冲液裂解蛋白 12 h,以牛血清白蛋白作为标准蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度,计算所得蛋白总量,重复此方法 3 次,3 次所得蛋白总量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)显示。

1.4.3 丙酮法^[8] 取 15 ml 混合样品,加入等体积丙酮,-20 °C 过夜,于 4 °C 17 000 g 离心 15 min,弃上清,向沉淀物加入丙酮洗涤,-20 °C 孵育 10 min,再离心 17 000 g 15 min,弃上清,

重复洗涤操作 3 次后室温干燥沉淀,加入上样缓冲液裂解蛋白 12 h,以牛血清白蛋白作为标准蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度,计算所得蛋白总量,重复此方法 3 次,3 次所得蛋白总量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 显示。

1.4.4 TCA/丙酮法^[9] 取 15 ml 混合样品,加入 30 ml 含 20% TCA 的丙酮溶液, -20 ℃ 过夜,于 4 ℃ 15 000 g 离心 15 min,弃上清,向沉淀物加入丙酮洗涤, -20 ℃ 孵育 10 min,再离心 15 000 g 15 min,弃上清,重复洗涤操作 3 次后室温干燥沉淀,加入上样缓冲液裂解蛋白 12 h,以牛血清白蛋白作为标准蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度,计算所得蛋白总量,重复此方法 3 次,3 次所得蛋白总量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 显示。

1.4.5 DTT/TCA/丙酮法 取 15 ml 混合样品,等体积加入含 0.2% DTT, 10% TCA 的丙酮溶液, -20 ℃ 过夜, 于 4 ℃ 35 000 g 离心 30 min,弃上清,向沉淀物加入含 0.2% DTT 的丙酮溶液洗涤, -20 ℃ 孵育 1 h,再离心 35 000 g 30 min,弃上清,重复洗涤操作 3 次后室温干燥沉淀,加入上样缓冲液裂解蛋白 12 h,以牛血清白蛋白作为标准蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度,计算所得蛋白总量,重复此方法 3 次,3 次所得蛋白总量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 显示。

1.4.6 超滤离心法 取 15 ml 混合样品,将其加入 Millipore 超滤管 Amicon Ultra-10 KD 中, 4 ℃ 5 000 g 离心 40 min,浓缩至约 500 μ l 左右,向渗余物中加入 500 μ l 上样缓冲液, 4 ℃ 离心 5 000 g 10 min,进行基质置换,重复置换操作 3 次后,吸出渗余物,加入上样缓冲液裂解蛋白 12 h,以牛血清白蛋白作为标准蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度,计算所得蛋白总量,重复此方法 3 次,3 次所得蛋白总量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 显示。

1.5 2-DE 及图像分析

2-DE 方法主要按照 BIO-RAD 仪器操作手册进行,第一向固相 pH 梯度等电聚焦采用 17 cm 非线性 IPG 胶条 (pH 3~10),蛋白上样量为 100 μ g,被动水化室温进行 16 h,后经 250 V,线性除盐 0.5 h; 1 000 V,快速除盐 1 h; 10 000 V,快速升压 2 h; 10 000 V,快速聚焦 60 000 Vh,最后稳定在 500 V 保持聚焦状态。等电聚焦结束后,取出胶条先后放入缓冲液 A、缓冲液 B 中各平衡 15 min,然后在 10% PAGE 凝胶中进行二向垂直电泳,用硝酸银染色方法进行凝胶染色^[10],各方法制备样品在相同条件下重复 3 次。

用方法 6 制备的样品分别进行浓度为 10% PAGE, 12.5% PAGE, IPG 胶条为线性 pH 4~7、非线性 pH 3~10 的双向凝胶电泳。

染色后的凝胶用 EPSON Scan A3 扫描仪进行扫描, PDQuest v8.0.1 软件对凝胶进行均一化校准、蛋白点数量及匹配率分析。3 次重复所得蛋白点数量以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 显示;匹配率计算以 1 张胶作为参考胶,另外 2 张胶分别与参考胶匹配,匹配率 = $2 \times \text{匹配的蛋白点数} \times 100 / 2 \text{ 张胶点数之和}$ 。

1.6 统计分析

用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。蛋白总量、胶图蛋白点数量采用单因素方差分析,其组间两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 6 种蛋白制备方法结果的比较

采用 6 种不同的方法制备尿液蛋白质样本,蛋白图谱见图 1,统计图谱见图 2。数据结果见表 1,蛋白总量及蛋白点数量两两比较统计学分析结果见表 2。

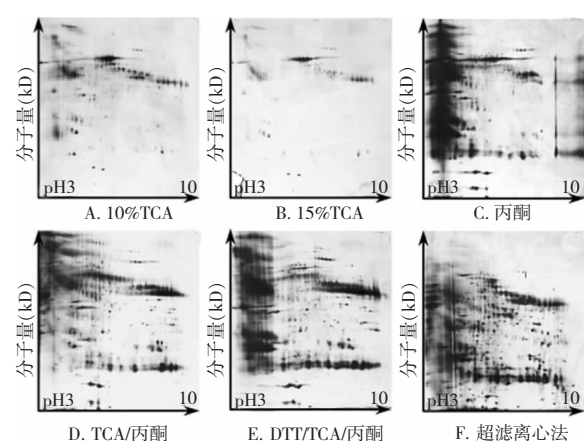
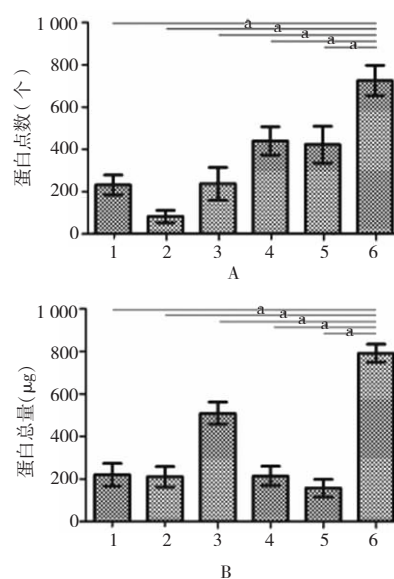


图 1 6 种蛋白制备方法的 2-DE 图谱

Fig.1 2-DE of six different protein preparation methods



1~6 分别表示 10% TCA 法、15% TCA 法、丙酮法、TCA/丙酮法、DTT/TCA/丙酮法、超滤离心法; A. 单因素方差分析 $F = 215.154$, $P = 0.000$; B. $F = 497.095$, $P = 0.000$; a. 差异有统计学意义, $P < 0.05$

图 2 6 种蛋白制备方法所得蛋白总量和蛋白点数的统计分析
Fig.2 Statistical analysis of total protein amount and total protein spots of six different protein preparation methods

表 1 6 种蛋白制备方法的数据比较

Tab.1 Comparison on data of six different urinary protein preparation methods

制备方法	尿液体积 (ml)	蛋白总量 ^a ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g}$)	蛋白点数 ^b ($\bar{x} \pm s$)	匹配率 1 ^c (%)	匹配率 2 ^d (%)
10% TCA 法	15	220 $\pm$ 22	230 $\pm$ 19	85	82
15% TCA 法	15	211 $\pm$ 19	81 $\pm$ 12	88	85
丙酮法	15	508 $\pm$ 22	236 $\pm$ 31	79	77
TCA/丙酮法	15	214 $\pm$ 19	438 $\pm$ 27	82	78
DTT/TCA/丙酮法	15	157 $\pm$ 17	421 $\pm$ 35	77	73
超滤离心法	15	791 $\pm$ 17	724 $\pm$ 29	80	84

注:a,蛋白总量为 3 次重复所得数据;b,蛋白点数为 3 次重复所得数据;c,匹配率 1=2 × 胶 1 与胶 2 匹配的蛋白点数 × 100/ 胶 1+ 胶 2 点数;d,匹配率 2=2 × 胶 1 与胶 3 匹配的蛋白点数 × 100/ 胶 1+ 胶 3 点数

表 2 6 种方法蛋白总量及图谱蛋白点数两两比较统计分析

Tab.2 Pairwise comparison on total protein amount and protein spots in maps of six methods

制备方法	10% TCA 法	15% TCA 法	丙酮法	TCA/丙酮法	DTT/TCA/丙酮法	超滤离心法
10% TCA 法	NA	1.000	0.000	1.000	0.027	0.000
15% TCA 法	0.000	NA	0.000	1.000	0.077	0.000
丙酮法	1.000	0.000	NA	0.000	0.000	0.000
TCA/丙酮法	0.000	0.000	0.000	NA	0.055	0.000
DTT/TCA/丙酮法	0.000	0.000	0.000	1.000	NA	0.000
超滤离心法	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	NA

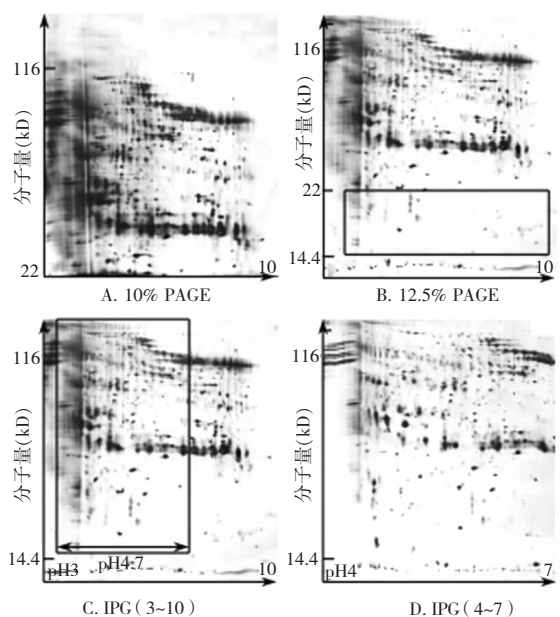
注:NA,没有比较,以 NA 为分界线,右上三角表示蛋白总量的两两比较统计结果,左下三角表示图谱蛋白点数的两两比较统计结果

结果显示用超滤离心法得到的蛋白总量最多[(791 $\pm$ 17) μg , $P < 0.05$],电泳图谱蛋白点数最多[(724 $\pm$ 29)个, $P < 0.05$],匹配率较高,分别为 80%、84%。因此与其他 5 种方法相比,采用超滤离心法制备尿液蛋白质最为合适。

2.2 不同 PAGE 胶浓度和不同 IPG 胶条蛋白图谱比较

利用超滤离心法制备的样品,首先,本研究采用了浓度 10% PAGE 凝胶与 12.5% PAGE 凝胶图谱比较,结果见图 3(A)和图 3(B)。在 12.5%凝胶浓度下,大分子量蛋白质几乎都能分辨清晰,相比 10%凝胶浓度,能多分离得到分子量 14.4~25 kD 的蛋白[图 3(B)中方框部分,约 64 个蛋白点],因此 12.5% PAGE 凝胶浓度更适合用于尿液 2-DE 分析。

其次,本实验室利用 IPG 胶条非线性 pH 3~10、线性 pH 4~7 的 2-DE 比较,结果见图 3(C)和图 3(D)。pH 3~10 胶条因其自身的 pH 范围较宽,能分离 pH 7~10 的蛋白质;而在 pH 4~7 范围内[图 3(C)方框部分]仅得到了约(715 $\pm$ 32)个蛋白点,与之相比,pH 4~7 胶条则分离得到了约(940 $\pm$ 86)个蛋白点($P < 0.05$);因此,利用 pH 3~10 IPG 胶条分离有利于尿液蛋白质的整体分析,特别是酸性和碱性蛋白质点信息,而 pH 4~7 IPG 胶条能使等电点为 4~7 蛋白质的 2-DE 图谱分辨率更高。



A, B. 10% PAGE 胶与 12.5% PAGE 胶图谱比较;B 中方框表示 12.5% PAGE 胶图多分离出的蛋白质点;C、D. IPG 胶条 pH 3~10 与 pH 4~7 图谱比较;C 中方框表示 pH 3~10 胶条中分离出的处在 pH 4~7 范围的蛋白点

图 3 不同 PAGE 胶浓度和不同 IPG 胶条蛋白图谱

Fig.3 2-DE of two different gel concentrations of PAGE and two different IPG strips

3 讨 论

本次研究,共采用了 6 种不同方法制备尿液蛋白样品,并对各方法进行 2-DE 分析,而后对 2-DE 不同 PAGE 胶浓度及不同 IPG 胶条进行了比较分析,结果显示利用超滤离心法制备尿液蛋白能得到更多的蛋白总量,得到的电泳图谱蛋白点数也更多;利用 pH 3~10 IPG 胶条和 12.5% PAGE 分离有利于尿液蛋白质的整体分析,特别是酸性和碱性蛋白质点信息,而 pH 4~7 IPG 胶条能使等电点为 4~7 蛋白质的 2-DE 图谱分辨率更高。

由于尿液中小分子有机物和无机盐的影响,尿蛋白质组的 2-DE 分析往往难以得到满意的结果。尿液中小分子物质,特别是无机盐对第一向等电聚焦的影响很大。因此,在进行尿液蛋白质组分析时,蛋白的制备十分重要。本研究采用 5 种实验室常用化学试剂沉淀法和超滤离心法对尿液样本进行处理所得结果表明,丙酮法^[8]、DTT/TCA/丙酮法制备尿液蛋白,由于许多盐在丙酮中不溶,会随着蛋白质一起沉淀,因此达不到充分除盐的效果,导致等电聚焦时电流过大,聚焦不充分,电泳图谱条纹严重,分辨率低;TCA 法^[8]、TCA/丙酮法^[9]制备尿液蛋白,在沉淀蛋白时可能会造成一些蛋白变为不溶性的,不能在上样缓冲液中重溶,从而造成蛋白损失较大,所得电泳图谱蛋白点数少;而超滤离心法制备尿液蛋白能够将蛋白浓缩和脱盐过程一步完成,并且避免蛋白质沉淀和变性,降低了蛋白损失,从而得到较多的蛋白总量且本实验中采用了上样缓冲液置换尿液中的基质进行反复超滤,在除盐浓缩的同时,提高了样品制备与后续 2-DE 过程的兼容性,使得超滤离心法制备的尿液蛋白可以获得蛋白点数最多、匹配率较高和清晰的 2-DE 图谱,建立了与 2-DE 兼容的尿液蛋白质制备方法。

人体存在滤过屏障,尿液中的蛋白质多为小分子量蛋白,因此,本实验采用不同 PAGE 浓度进行比较实验,由于 12.5% 浓度的凝胶孔径更大,使得小分子量蛋白质分辨更清晰,可以获得更多小分子量的蛋白点,因此 12.5% PAGE 胶浓度相比 10% PAGE 胶更适合用于尿液 2-DE 分析。在 pH 3~10 胶条实验中,实验发现尿液中大部分蛋白质集中在 pH 4~7 范围内,因此,本实验后期采用了 pH 4~7 胶条进行比较,结果显示 pH 4~7 胶条较 pH 3~10 胶条在 pH

4~7 范围内能获得更多的蛋白点,分辨率更高;而 pH 3~10 胶条因其自身的 pH 范围较宽,能分离 pH 7~10 的蛋白质。故实验结果显示利用 pH 3~10 IPG 胶条分离有利于尿液蛋白质的整体分析,特别是酸性和碱性蛋白质点信息,而 pH 4~7 IPG 胶条能使等电点为 4~7 蛋白质的 2-DE 图谱分辨率更高。

综上所述,本研究表明以超滤离心法制备尿液蛋白能获得更多的蛋白总量(791 ± 17) μg ,获得蛋白点数更多(724 ± 29)个、匹配率较高和清晰的 2-DE 图谱,建立了与 2-DE 兼容的尿液蛋白质制备方法;利用 pH 3~10 IPG 胶条和 12.5% PAGE 分离有利于尿液蛋白质的整体分析,特别是酸性和碱性蛋白质点信息,而 pH 4~7 IPG 胶条能使等电点为 4~7 蛋白质的 2-DE 谱分辨率更高,结果可靠,可重复性强。为临床生理和疾病的尿液蛋白质组学研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 周育斌,周文霞,张永祥.基于双向电泳技术的体液蛋白质组学研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2003,17(4):292-297.
- [2] O'Riordan E, Orlova TN, Mei JJ, et al. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(12):3240-3248.
- [3] Schaub S, Wikins J, Weiler T, et al. Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Kidney Int, 2004, 65(1):323-332.
- [4] Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, et al. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis [J]. Lancet Oncol, 2006, 7(3):230-240.
- [5] Hewitt SM, Dear J, Star RA. Discovery of protein biomarkers for renal diseases[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(7):1677-1689.
- [6] Lee RS, Monigatti F, Briscoe AC, et al. Optimizing sample handling for urinary proteomics[J]. J Proteome Res, 2008, 7(9):4022-4030.
- [7] 刘靖芳,施秉银.不同蛋白沉淀方法对尿蛋白双向电泳结果的影响[J].山东医药,2010,50(14):101-102.
- [8] Zerefos PG, Vlahou A. Urine sample preparation and protein profiling by two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry[J]. Methods Mol Biol, 2008, 42(8):141-157.
- [9] 林建峰.基于凝胶蛋白质组学技术在前列腺癌研究中的应用[D]. 厦门:厦门大学,2008.
- [10] Yan JX, Wait R, Berkelman T, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2000, 21(17):3666-3672.

(责任编辑:关蕴良)