

# 硝酸纤维膜和丙酮沉淀尿蛋白质保存方法的比较

王小蓉, 李逊斗, 贾露露, 高友鹤

中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医科大学基础医学院 生理与病理生理学系 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

王小蓉, 李逊斗, 贾露露, 等. 硝酸纤维膜和丙酮沉淀尿蛋白质保存方法的比较. 生物工程学报, 2014, 30(6): 982-989.  
Wang XR, Li XD, Jia LL, et al. Comparison of two urinary protein preparation methods: nitrocellulose membrane preservation and acetone precipitation. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 982-989.

**摘要:** 硝酸纤维膜法是一种简单、快速、经济的尿液蛋白质保存方法,但其与传统尿液蛋白质丙酮沉淀方法的差异有待进一步研究。相同尿液分别经硝酸纤维膜法和丙酮沉淀法制备尿蛋白质,经液相串联质谱分析鉴定蛋白质,采用谱图数定量,研究两种不同方法的差别。结果显示硝酸纤维膜法和丙酮沉淀法鉴定蛋白质数目几乎相同,鉴定蛋白质在谱图数的分布上几乎相同,鉴定蛋白质在蛋白质变异系数的分布上也几乎相同。因此,硝酸纤维膜法处理尿蛋白质与丙酮沉淀法基本一致,可以应用于大规模临床尿液样本的保存。

**关键词:** 尿蛋白质保存, 硝酸纤维素膜, 蛋白质组学, 生物样本保存

## Comparison of two urinary protein preparation methods: nitrocellulose membrane preservation and acetone precipitation

Xiaorong Wang, Xundou Li, Lulu Jia, and Youhe Gao

National Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

**Abstract:** Nitrocellulose membrane based urinary protein preservation method is simple, fast and economic, but its

**Received:** December 20, 2013; **Accepted:** May 5, 2014

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2012CB517606, 2013CB530805), Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University-PCSIRT (No. IRT0909), 111 Project (No. B08007).

**Corresponding author:** Youhe Gao. Tel: +86-10-69156493; E-mail: gaoyouhe@pumc.edu.cn

Lulu Jia. E-mail: jluyu@126.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2012CB517606, 2013CB530805), 高校长江学者创新研究团队 (No. IRT0909); 111 计划 (No. B08007) 资助。

advantage over the traditionally used acetone precipitation method is still unclear. In this work, we prepared urinary proteins by the two methods by LC-MS/MS. Then we used protein spectra counts to assess the reproducibility of the two methods. Proteins identified by the two methods were almost the same in number, spectral count distribution and distribution of coefficients of variation value. In conclusion, nitrocellulose membrane method is generally the same as acetone precipitation method. It can be used for large scale preservation of clinical urine samples.

**Keywords:** urinary proteins preservation, nitrocellulose membrane, proteomics, biological samples preservation

生物标志物的最重要特征是变化。血液是人体内环境的一部分，由于受稳态机制的影响不易容纳变化，而尿液没有任何稳定的机制，所以尿液也可能是比血液更好的生物标志物来源<sup>[1-2]</sup>。尿蛋白质是尿液富含信息的重要承担者<sup>[3]</sup>，然而正因为尿蛋白质承担着容纳人体变化的重要角色，影响尿蛋白质变化的因素也众多<sup>[4-7]</sup>。因此，尽管利用蛋白质组学已成功地找到了一批能够反映不同疾病变化的具有广大临床应用前景的候选标志物（群），但在真正应用于临床之前还需对这些候选标志物（群）进行大规模的临床样本验证<sup>[8-11]</sup>。而这无疑对大量保存尿蛋白质临床样本的技术提出了挑战。

尿液由于具有蛋白质浓度稀、体积大、含盐高和原液中蛋白质易降解的特点，不适合直接大规模的原液保存，需要将尿液蛋白质提取出来保存<sup>[12-13]</sup>。丙酮沉淀是常用的尿液蛋白质提取方法<sup>[14-16]</sup>，但需要耗费大量的有机溶剂，不利于实验室及临床的应用，而尿蛋白质的膜上保存是可行的解决方案之一。将尿液直接快速通过硝酸纤维膜，尿液蛋白质被吸附在硝酸纤维膜上，将膜干燥后真空保存。此种方法简单、快速、经济及占用保存空间小，蛋白质被吸附在膜上干燥保存阻止了蛋白质的降解，非常适合于临床大量尿液样本蛋白质的保存<sup>[17]</sup>。

这项研究在蛋白质组学水平上对尿蛋白质的膜上保存技术和丙酮沉淀保存技术进行了比

较，并且推荐了不同技术适用的条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 溶液配制

裂解缓冲液 (10 mL): 尿素 4.2 g, 硫脲 1.54 g, Tris 0.05 g, DTT 0.04 g, 双蒸水定容至 10 mL。

磷酸氢二钠—磷酸二氢钠缓冲液 (pH 6.0): 12.3 mL 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  与 87.7 mL 1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  混匀后, 再用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 6.0。

### 1.2 尿液采集

微量蛋白尿液样本 100 mL, 7 200 r/min 离心 45 min 取上清,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冻存。

### 1.3 丙酮沉淀制备尿蛋白质

取 15 mL 尿液上清, 置于 250 mL 离心瓶中, 加入 45 mL 于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  预冷的丙酮, 置于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中沉淀 4 h。4  $^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 25 min, 弃上清, 室温晾干沉淀后加入适量裂解缓冲液重溶蛋白质, 转移至 EP 管后于 4  $^\circ\text{C}$  下 12 000 r/min 离心 15 min, 将上清转移至新 EP 管中, 测蛋白质浓度后  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冻存备用。

### 1.4 硝酸纤维膜保存尿蛋白质

#### 1.4.1 制备用于尿蛋白质保存的硝酸纤维膜

取尿液上清 15 mL, 加入 7.5 mL 磷酸盐缓冲液, 混匀; 根据真空抽滤瓶的面积剪裁合适的滤纸和孔径 0.22  $\mu\text{m}$  硝酸纤维膜 (一般真空抽滤瓶直径 57 mm, 其有效过滤面积直径为

42 mm); 依次将 4 层滤纸和一层硝酸纤维膜用水润湿后置于真空抽滤瓶上 (滤纸在下, 硝酸纤维膜在上), 连接好真空抽滤装置; 将尿液倒入, 开启真空抽滤装置, 通过调节真空泵, 使尿液逐滴滴下; 取下硝酸纤维膜置 56 °C 烤箱烘干后, 封到真空包装袋内真空保存。

#### 1.4.2 硝酸纤维膜上尿蛋白质洗脱

将硝酸纤维膜裁去未吸附蛋白质的边, 保留有效过滤面积; 然后将吸附蛋白质的硝酸纤维膜裁剪置于 2 mL 离心管中, 依次加入 1.7 mL 丙酮, 250  $\mu$ L 0.5% 碳酸氢铵水溶液后, 强烈振荡 10 min (vortex), 然后 4 °C 放置 1 h; 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 室温放置 30 min, 晾干; 加入 300–400  $\mu$ L 裂解缓冲液, 吹打后超声 10 min, 重溶蛋白质; 吸取重溶后的溶液置于新 EP 管中 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 测蛋白质浓度, -80 °C 冻存备用。

#### 1.5 蛋白质酶切与 LC-MS/MS 分析

取 100  $\mu$ g 蛋白质, 按 Wisniewski 等<sup>[18]</sup>方法酶切, 酶切后肽段用 Oasis 小柱除盐。除盐后肽段上色谱分离 (Waters UPLC): 洗脱时间 120 min, 色谱柱流速 0.5  $\mu$ L/min, 洗脱液由流动相 A (0.1% 甲酸+2% 乙腈+97.9% 水) 和流动相 B (0.1% 甲酸+89.9% 乙腈+10% 水) 组成, 洗脱梯度为 5%–40% 流动相 B。反相柱洗脱下的多肽用 LTQ-Orbitrap Velos 进行质谱扫描。质谱数据采集为数据依赖模式, 全扫描  $m/z$  范围: 300–2 000, 一个全扫描后对丰度最高的 20 个离子分别进行碎裂和二级扫描, 分离宽度: 3  $m/z$ , 动态排除时间: 1 min。全扫描在 Orbitrap 中进行, 母离子分辨率为 60 000, 整个扫描过程把  $m/z$  为 445.120 025 的离子定为内标随时校正质量数偏差; 子离子扫描采用离子阱扫描模式,

碎裂能量为正常碰撞能量的 35%,  $q$  值 0.25, 活化时间: 10 ms。

#### 1.6 质谱数据检索

二级质谱结果用 Mascot 2.4<sup>[19]</sup> 进行数据库检索, 所用数据库为 Swiss-Prot 蛋白质数据库<sup>[20]</sup>。检索条件: 胰酶酶切; 允许有 2 个漏切位点; 固定修饰为半胱氨酸的脲基甲基化; 母离子质量精确度  $10 \times 10^{-6}$ ; 子离子质量精确度 0.5 Da。肽段评分 (Ions score or expect cutoff) 设定为 0.05, 蛋白质假阳性率 (FDR) <1%<sup>[21]</sup>, 且每个蛋白质鉴定 2 个不同的肽段以上。

## 2 结果

#### 2.1 SDS-PAGE 分析

同一份尿液均匀分成 6 份, 每份 15 mL, 分别采用硝酸纤维膜法和丙酮沉淀方法处理 3 份。每份取 25  $\mu$ g 尿蛋白质进行 SDS-PAGE 分析 (图 1)。

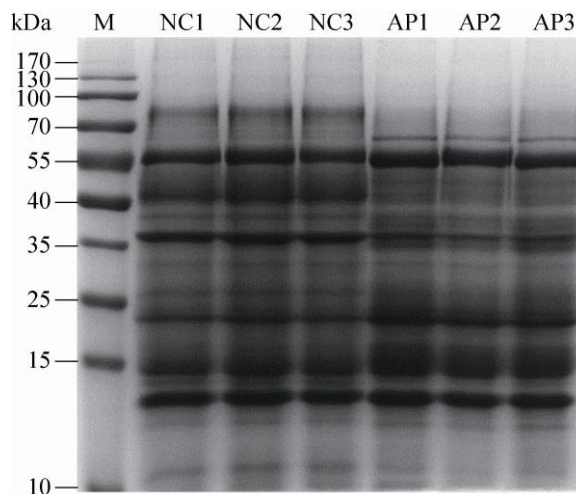


图 1 不同方法制备尿蛋白质 SDS-PAGE 图

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of urinary proteins prepared by two methods. M: protein marker; NC represents proteins prepared by nitrocellulose membrane preservation method; AP represents proteins prepared by acetone precipitation method.

图 1 显示两种处理尿蛋白质方法,从方法重复性上看,均具有较好的重复性;从保存尿蛋白质条带来看,均涵盖了从高到低分子量范围,主要条带类似,但不同条带强度有一些差异。

## 2.2 两种方法质谱鉴定蛋白质重复性比较

分别采用硝酸纤维膜法和丙酮沉淀法处理 3 份同样尿液。经质谱鉴定,硝酸纤维膜法制备 3 份尿液分别鉴定到 402、424 和 393 个蛋白质,总共鉴定了 495 个蛋白质,共同鉴定 326 个蛋白质,蛋白质鉴定的重复率(重复率=共同鉴定出的蛋白质数/平均鉴定出的蛋白质数 $\times 100\%$ )为 80.2% (图 2A);丙酮沉淀法制备 3 份尿液分别鉴定到 395、405 和 377 个蛋白质,总共鉴定 463 个蛋白质,相同鉴定 324 个蛋白质,蛋白质鉴定的重复率(重复率=共同鉴定出的蛋白质数/平均鉴定出的蛋白质数 $\times 100\%$ )为 82.6% (图 2B)。3 份同样尿液硝酸纤维膜法处理共同鉴定

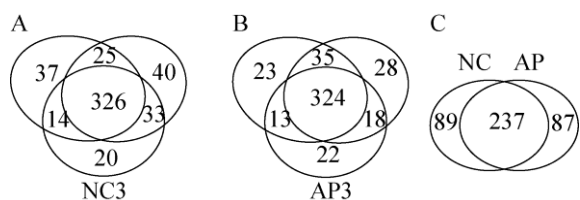


图 2 NC膜法 (NC) 和丙酮沉淀法 (AP) 蛋白质鉴定重复率

Fig. 2 Repetition rate of protein identifications by nitrocellulose membrane preservation method (NC) and acetone precipitation method (AP) respectively. (A) The repetition rate of protein identifications in three urinary samples prepared by nitrocellulose membrane preservation method. (B) The repetition rate of protein identifications in three urinary samples prepared by acetone precipitation method. (C) The comparison of common identified proteins in three urinary protein samples prepared by nitrocellulose membrane preservation method and acetone precipitation method respectively.

蛋白质 (326 蛋白质) 与丙酮沉淀法处理共同鉴定蛋白质 (324 蛋白质) 相比,相同蛋白质有 237 个,两种方法鉴定蛋白质的重复率(重复率=共同鉴定出的蛋白质数/平均鉴定出的蛋白质数 $\times 100\%$ )为 73%。其中有 89 个蛋白质仅在 NC 膜法中重复鉴定,有 87 个蛋白质仅在丙酮沉淀法中重复鉴定。将两种方法独有鉴定蛋白质分别按照蛋白质分子量和等电点分布范围分类,见图 3 和图 4。图 3 显示在蛋白质分子量小于 30 kDa 范围内,丙酮沉淀法独有鉴定蛋白质数目比例比 NC 膜法高,在大于 30 kDa 的范围内,NC 膜法独有鉴定蛋白质数目比例比丙酮沉淀法高。提示在保存分子量小于 30 kDa 的蛋白质时丙酮沉淀法比 NC 膜法更优异,在保存分子量大于 30 kDa 的蛋白质时 NC 膜法比丙酮沉淀法更优异。但是更重要的是在不同分子量范围内,两种方法都有对方未鉴定蛋白质,提示在保存不同分子量的蛋白质样本时,这两种方法都具有互补性。图 4 显示在蛋白质不同等电点分布范围内,两种方法独有鉴定蛋白质数目比例一致,提示两种方法在蛋白质等电点选择偏好性上没有显著差异。在不同等电点分布范围内,两种方法同样均有对方未鉴定蛋白质,说明在保存不同等电点的蛋白质样本时,这两种方法同样都具有互补性。

## 2.3 两种方法质谱鉴定蛋白质谱图数的变异系数比较

三个共同样本经硝酸纤维膜法处理共同鉴定 326 个蛋白质,经丙酮沉淀法处理共同鉴定 324 个蛋白质,两者蛋白质鉴定数目类似。将这些蛋白质按照蛋白质鉴定谱图数的范围进行分类(图 5)。在 200–1 000、100–200 和 50–100 高谱图数区间内,硝酸纤维膜法鉴定蛋白质稍微多一些,但

并不显著，总体看两种方法鉴定蛋白质数在谱图数分布上并没有明显区别。

蛋白质变异系数是评价两种方法重复性的关键指标。蛋白质鉴定的谱图数与蛋白量之间

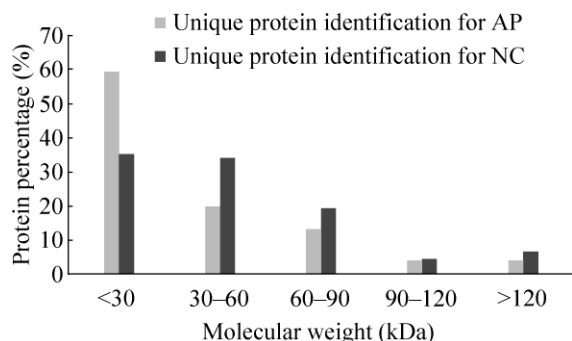


图3 NC膜法和丙酮沉淀法独有鉴定蛋白质分子量分布

Fig. 3 Distribution of molecular weight of unique protein identifications by nitrocellulose membrane preservation method and acetone precipitation method respectively. AP: acetone precipitation method; NC: nitrocellulose membrane preservation method.

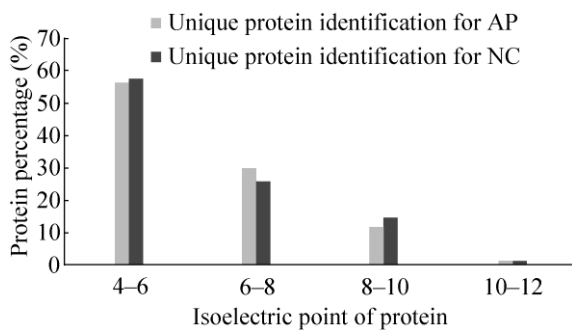


图4 NC膜法和丙酮沉淀法独有鉴定蛋白质等电点分布

Fig. 4 Distribution of isoelectric point of unique protein identifications by nitrocellulose membrane preservation method and acetone precipitation method respectively. AP: acetone precipitation method; NC: nitrocellulose membrane preservation method.

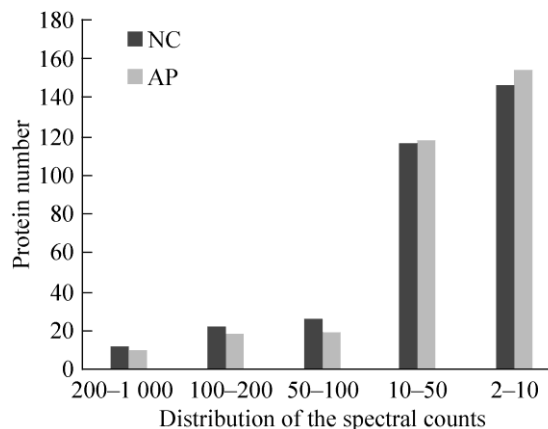


图5 NC膜法和丙酮沉淀法鉴定蛋白质谱图数分布  
Fig. 5 Distribution of spectral counts of proteins by nitrocellulose membrane preservation method and acetone precipitation method respectively. AP: acetone precipitation method; NC: nitrocellulose membrane preservation method.

具有正相关性<sup>[22]</sup>。将两种方法鉴定蛋白质按照蛋白质鉴定谱图数的CV值(变异系数)分类(图6)。两种方法鉴定蛋白质的CV值均主要集中在0-30%区间之内,图6B显示0-30%区间内两种方法鉴定蛋白质数几乎相同,均占到了总鉴定蛋白质数的3/4以上。虽然0-30%区间内两种方法鉴定蛋白质数相同,但是图6A显示硝酸纤维膜法在10%-20%和20%-30%区间内的蛋白质数少于丙酮沉淀法,而在变异系数最小的0-10%区间内多于丙酮沉淀法,而这个区间蛋白质数的区别甚至是图6A六个区间区别中最大的,这说明在低变异系数区间内,硝酸纤维膜法的表现甚至优于丙酮沉淀法。但是总体看两种方法鉴定蛋白质在CV值上并没有显著区别,硝酸纤维膜法处理尿蛋白质鉴定重复性与丙酮沉淀法类似。

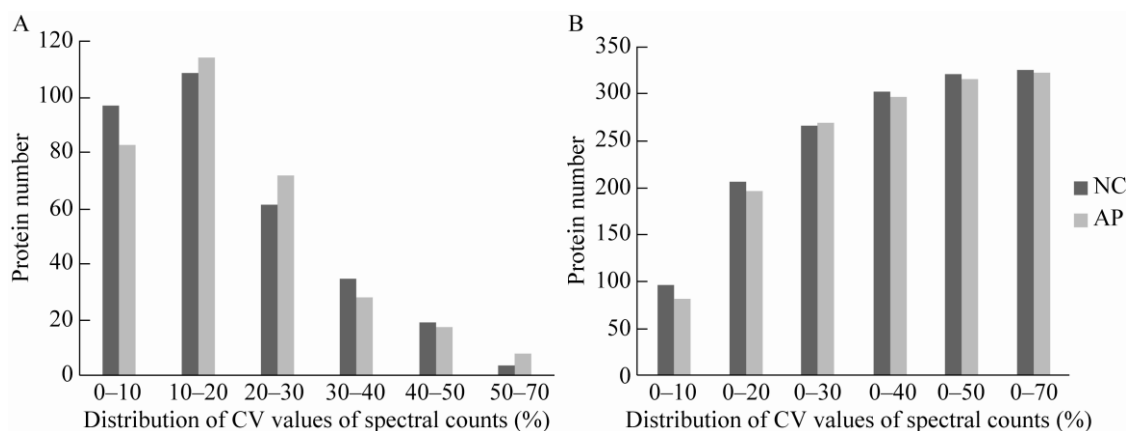


图 6 NC 膜法和丙酮沉淀法鉴定蛋白质变异系数分布

Fig. 6 Distribution of CV values of protein spectral counts by nitrocellulose membrane preservation method and acetone precipitation method respectively. The distribution of CV values of protein spectral counts was according to equal intervals (A) and accumulative intervals (B) respectively. AP: acetone precipitation method; NC: nitrocellulose membrane preservation method.

### 3 讨论

生物标志物研究终将进入大规模临床样本验证阶段。所需保存样本的数量可能成千上万,甚至几十万、上百万都有可能。而且这种保存一定是跨区域(中国各地)和跨时间(保存一个人从出生到死亡不同时间段)的保存。尿液样本中的蛋白质富含人体重要信息,是一个亟待开发的生物标志物“金矿”。因此一个简单、经济、快速和持久保存尿蛋白质样本的方法无疑极大地促进了生物标志物的研究<sup>[23-25]</sup>。将尿液快速通过硝酸纤维膜,蛋白质迅速吸附在硝酸纤维膜上,将膜干燥真空保存,这种方法有望实现长久保存几十万尿蛋白质样本的需求。

丙酮沉淀是常用的尿液蛋白质提取技术。加入丙酮的体积一般是尿液体积的 3 倍,而由于尿液具有体积大、浓度低的特点,丙酮沉淀处理方法需要耗费大量的有机溶剂,不利于丙

酮沉淀方法的应用。本研究主要在方法重复性上将硝酸纤维膜法和丙酮沉淀法进行比较。研究发现两者均具有较高的蛋白质鉴定重复率(硝酸纤维膜法 80.2% vs 丙酮沉淀法 82.6%),两者并没有显著区别。两者鉴定蛋白质数也没有显著区别(硝酸纤维膜法 326 个蛋白质 vs 丙酮沉淀法 324 个蛋白质)。将两种鉴定蛋白质的方法按照蛋白质谱图数的分布归类,两者也没有差异,甚至硝酸纤维膜法鉴定高谱图数蛋白质的数量还要稍多一些。按照谱图数定量,将两种鉴定蛋白质的方法按照蛋白质的 CV 值分布分类,发现不同 CV 值范围内两种方法鉴定蛋白质的数目类似,甚至硝酸纤维膜法鉴定到更多数量的低 CV 值蛋白质。综上所述,硝酸纤维膜法处理尿蛋白质的重复性与丙酮沉淀法一样好。方法的重复性是决定其是否可用的最关键因素,因此硝酸纤维膜法可以应用于大规模临床尿液样本的保存。只是受限于膜单位面积的

载样量, 如果要保存大量的尿蛋白质, 则需要更大的膜面积。对于大量蛋白尿的情况, 需要前期保存大量的蛋白质以便后期去除高丰度蛋白质后还有足够的蛋白质量, 这种情况也许需要采用丙酮沉淀方法处理尿蛋白质。如果不是这种情况, 一般硝酸纤维膜保存的尿蛋白质量足够进行质谱分析和临床验证。

但是硝酸纤维膜方法与丙酮沉淀法保存的蛋白质不尽相同。本研究发现在保存分子量小于 30 kDa 的蛋白质时丙酮沉淀法比 NC 膜法更优异, 在保存分子量大于 30 kDa 的蛋白质时 NC 膜法比丙酮沉淀法更优异。但是需要说明的是在不同分子量范围内, 两种方法都有对方未鉴定蛋白质, 在保存不同分子量的蛋白质样本时, 这两种方法都具有互补性。两种方法在蛋白质等电点选择偏好性上没有显著差异, 在保存不同等电点的蛋白质样本时, 这两种方法同样都具有互补性。对于珍贵的蛋白质样本, 建议采用两种方法共同保存。因此在生物样本库建立的初始阶段需要考虑不同方法保存尿蛋白质的异同和各自优缺点, 选择合适的保存技术。

## REFERENCES

- [1] Gao YH. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery? *Sci China Life Sci*, 2013, 56: 1145–1146.
- [2] Li ML, Zhao MD, Gao YH. Changes of proteins induced by anticoagulants can be more sensitively detected in urine than in plasma. *Sci China Life Sci*, 2014, 57: 1–8.
- [3] Adachi J, Kumar C, Zhang Y, et al. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol*, 2006, 7(9): R80.
- [4] Khan A, Packer NH. Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. *J Proteome Res*, 2006, 5(10): 2824–2838.
- [5] Oh J, Pyo JH, Jo EH, et al. Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map. *Proteomics*, 2004, 4(11): 3485–3497.
- [6] Liu X, Shao C, Wei L, et al. An individual urinary proteome analysis in normal human beings to define the minimal sample number to represent the normal urinary proteome. *Proteome Sci*, 2012, 10(1): 70.
- [7] Sun W, Chen Y, Li F, et al. Dynamic urinary proteomic analysis reveals stable proteins to be potential biomarkers. *Proteomics Clin Appl*, 2009, 3(3): 370–382.
- [8] Albalat A, Mischak H, Mullen W. Urine proteomics in clinical applications: technologies, principal considerations and clinical implementation. *Prilozi*, 2011, 32(1): 13–44.
- [9] Shao C, Li M, Li X, et al. A tool for biomarker discovery in the urinary proteome: a manually curated human and animal urine protein biomarker database. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(11): M111 010975.
- [10] Bonomini M, Sirolli V, Magni F, et al. Proteomics and nephrology. *J Nephrol*, 2012, 25(6): 865–871.
- [11] Coon JJ, Zurbig P, Dakna M, et al. CE-MS analysis of the human urinary proteome for biomarker discovery and disease diagnostics. *Proteomics Clin Appl*, 2008, 2(7/8): 964–973.
- [12] Thongboonkerd V. Practical points in urinary proteomics. *J Proteome Res*, 2007, 6(10): 3881–3890.
- [13] Court M, Selevsek N, Matondo M, et al. Toward a standardized urine proteome analysis methodology. *Proteomics*, 2011, 11(6): 1160–1171.
- [14] Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, et al. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int*, 2002, 62(4): 1461–1469.
- [15] Thongboonkerd V, Chutipongtanate S, Kanlaya R.

- Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality, and variability. *J Proteome Res*, 2006, 5(1): 183–191.
- [16] Sun W, Li F, Wu S, et al. Human urine proteome analysis by three separation approaches. *Proteomics*, 2005, 5(18): 4994–5001.
- [17] Jia L, Liu X, Liu L, et al. Urimem, a membrane that can store urinary proteins simply and economically, makes the large-scale storage of clinical samples possible. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(3): 336–339.
- [18] Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359–362.
- [19] Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 1999, 20(18): 3551–3567.
- [20] Bairoch A, Boeckmann B, Ferro S, et al. Swiss-Prot: juggling between evolution and stability. *Brief Bioinform*, 2004, 5(1): 39–55.
- [21] Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods*, 2007, 4(3): 207–214.
- [22] Liu H, Sadygov RG, Yates JR, 3rd. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*, 2004, 76(14): 4193–4201.
- [23] Schaub S, Wilkins J, Weiler T, et al. Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Kidney Int*, 2004, 65(1): 323–332.
- [24] Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, et al. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol*, 2006, 7(3): 230–240.
- [25] Afkarian M, Bhasin M, Dillon ST, et al. Optimizing a proteomics platform for urine biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(10): 2195–2204.

(本文责编 郝丽芳)