

加热洗脱硝酸纤维素膜上保存的尿蛋白质

秦伟伟¹, 高友鹤^{1,2}

1 中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

2 北京师范大学生命科学学院 生物化学系, 北京 100875

秦伟伟, 高友鹤. 加热洗脱硝酸纤维素膜上保存的尿蛋白质. 生物工程学报, 2015, 31(9): 1387-1392.

Qin WW, Gao YH. Elution of urinary proteins preserved on nitrocellulose membrane with heating. Chin J Biotech, 2015, 31(9): 1387-1392.

摘要: 用膜保存尿蛋白质对于生物标志物的研发意义重大, 从保存尿蛋白质的硝酸纤维素膜上洗脱蛋白质的有效性, 决定着保存方法被接受的程度和应用的范围。加热洗脱蛋白质的方法, 通过提高硝酸纤维素膜溶解时的温度等方式; 并运用 SDS-PAGE 和 LC-MS/MS 分析加热洗脱方法所制备的尿蛋白质样品, 将其与强烈涡旋洗脱方法和直接丙酮沉淀方法所制备的尿蛋白质样品比较。结果显示, 加热洗脱方法比强烈涡旋洗脱方法获得更多的蛋白质 ($P < 0.05$), 且蛋白质无降解; 加热洗脱方法和直接丙酮沉淀方法制备的蛋白质样品, 质谱所鉴定到蛋白质重叠率无明显差异 (分别是 92.6%、96.8%), 蛋白质丰度 CV 值 $< 20\%$ 的蛋白质占总蛋白质的比例均很高 (分别是 85.2%、94.4%)。加热洗脱法具有很好的技术重复性, 操作更加高效、简单, 有利于用膜保存尿蛋白质方法的推广应用。

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

Received: January 20, 2015; **Accepted:** March 23, 2015

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2012CB517605, 2013CB530805), 111 Project (No. B08007).

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

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2012CB517605, 2013CB530805), 111 计划 (No. B08007) 资助。

网络出版时间: 2015-05-06

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150506.1034.003.html>

Elution of urinary proteins preserved on nitrocellulose membrane with heating

Weiwei Qin¹, and Youhe Gao^{1,2}

1 National Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China

2 Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: The preservation of urinary proteins on a membrane plays a vital role in biomarker research, and the efficient elution of proteins preserved on nitrocellulose membrane (NC membrane) determines the application of this method. During the heating elution procedure, we raised the temperature to reduce the intense vortexing time, and kept gentle rotating while precipitation to prevent nitrocellulose reformation. We also used SDS-PAGE and LC-MS/MS to analyze the urinary proteins prepared by heating elution procedure, intense vortexing elution procedure and acetone precipitation method. There was no degradation of proteins prepared by heating elution procedure. Compared with proteins prepared by heating elution method and acetone precipitation method, the overlapping rates of the proteins was almost the same (92.6% versus 96.8%) and the ratios of CV values (< 20%) of the proteins were both high (85.2% and 94.4%). The heating elution procedure achieved good technical reproducibility, and was much simpler and more efficient than the previous one. It can facilitate the application of the preservation of urinary proteins on membrane.

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

血液受稳态机制调节, 各理化成分保持相对恒定。尿液作为血液滤过排出的废物, 包含更多能够反映机体变化的信息。生物标志物的本质是变化, 因此尿液是更好的寻找生物标志物的来源^[1-3]。目前, 据 Urinary Protein Biomarker Database 所收录的信息^[4], 尿液中一些能够反映不同疾病状态的候选标志物被报道^[5-7]。尿液作为重要的生物样本, 如果能将其与临床病历在疾病的每个阶段一同保存下来, 那么在未来寻找生物标志物的回顾性和前瞻性研究中, 特别是在大规模临床验证实验中, 将起到不可估量的作用^[8-11]。

传统-80 °C 冻存尿液样本的方法, 高能耗且面临蛋白质降解的风险, 限制了尿液样本的大规模长期保存。膜保存尿蛋白质: 将尿蛋白质吸附在一张薄膜上, 干燥后保存在真空袋中^[12]。

此方法经济、环保、占用存储空间小, 干燥保存避免蛋白质降解, 从而使系统全面的收集尿液样本成为可能。但是现存的从硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose membrane, NC) 上洗脱蛋白质的方法并不是最优化的, 需要强烈涡旋 10 min 使 NC 膜完全溶解、在干燥蛋白质沉底时膜易再次形成, 这束缚了用膜保存尿蛋白质的应用^[13]。本实验旨在通过提高温度来减少强烈涡旋的时间, 从而进一步简化蛋白质洗脱方法。

1 材料与方法

1.1 材料

胰蛋白酶购自 Promega 公司。碘乙酰胺 (Iodoacetamide, IAA)、二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) 购自 Sigma 公司。Oasis 小柱购自 Waters 公司。硝酸纤维素膜 0.22 μm 购自 Millipore 公司。

其他试剂均为分析纯级别。

1.2 伦理学声明与尿液采集

收集 4 位健康受试者 (2 男 2 女, 24–28 岁) 混合尿液样本约 200 mL。经中国医学科学院基础医学研究所伦理委员会评审, 该研究项目的风险与预期利益的权衡是合理的, 获取知情同意的程序符合伦理学原则。此研究通过伦理审查委员会审查 (项目编号: 040-2014)。

1.3 硝酸纤维膜保存尿蛋白质及蛋白质的洗脱

硝酸纤维膜保存尿蛋白质操作方法参照文献[12], 每张膜保存 20 mL 尿液。

1.3.1 加热洗脱蛋白质方法

将吸附尿蛋白质的硝酸纤维膜剪碎置于 2 mL 离心管中, 依次加入 1.7 mL 丙酮, 0.2 mL 0.5% NH_4HCO_3 ; 溶解: 将混合物室温强烈振荡 20 s, 置于 55 °C 干浴器 60 min, 且每隔 20 min 停止加热强烈振荡 30 s; 尿蛋白质沉淀: 4 °C 轻

摇 2 h, 12 000 r/min、18 °C 离心 15 min, 弃上清, 室温放置 5–10 min, 晾干; 重溶蛋白质: 加入 300 μL 裂解缓冲液, 吹打后超声 3 min; 12 000 r/min、18 °C 离心 15 min, 取上清, Bradford 法测蛋白质浓度。详细步骤见图 1A。

1.3.2 强烈涡旋洗脱蛋白质方法

强烈涡旋洗脱蛋白质方法参照文献[12], 详细步骤如图 1B 所示。

1.4 丙酮沉淀尿蛋白质

丙酮沉淀尿蛋白质方法参照文献[14], 20 mL 尿液上清, 加入 60 mL 预冷的丙酮, -20 °C 沉淀 4 h。Bradford 法测蛋白质浓度。

1.5 尿蛋白质酶切与 LC-MS/MS 分析

取 200 μg 尿蛋白质, 按 Wisniewski 等^[15] 方法酶切, 酶切后肽段用 Oasis 小柱除盐。除盐后肽段溶于 0.1% 甲酸, 色谱分离 (Waters UPLC): 洗脱时间 60 min, 色谱柱流速 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$, 洗脱

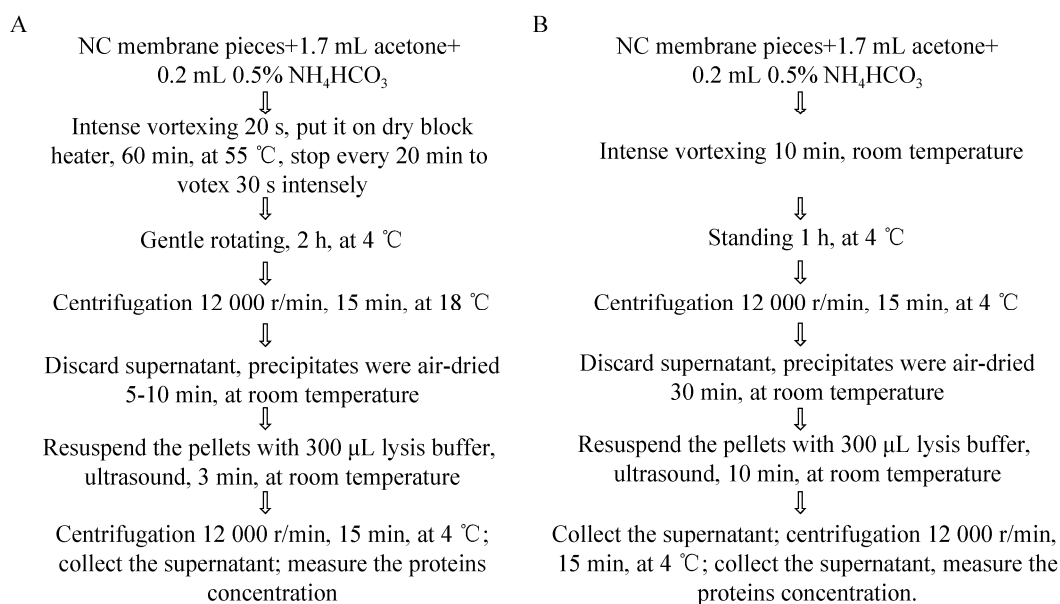


图 1 加热洗脱蛋白质方法和强烈涡旋洗脱蛋白质方法操作流程

Fig. 1 The procedures of heating elution method (A) and intense vortexing elution method (B).

梯度为 5%–28% 流动相 B (0.1% 甲酸+99.9% 乙腈+10% 水)。反相柱洗脱下的多肽用 AB SCIEX Triple-TOF 5600 进行质谱扫描。每个样品做两次技术重复。

1.6 数据分析

所有二级质谱结果用 Mascot^[16] (Matrix Science 公司, 版本 2.4.0) 软件进行数据库检索。所用数据库为 Swissprot_human database (数据截止至 2013 年 5 月 3 日)。检索条件: 胰酶酶切; 允许最多 2 个漏切位点; 固定修饰为半胱氨酸的脰基甲基化; 母离子和子离子质量精确度均为 0.05 Da。

采用 Progenesis (Nonlinear 公司, 版本 4.1) 软件对蛋白进行定量, 方法参照文献[17]。选择进行定量的谱峰电荷数为+2、+3、+4; Mascot 肽段评分 (Ions score) >30, 假阳性率 (FDR) < 1%^[18]; 若蛋白只有一条肽段得到鉴定, 即认为该蛋白不具有定量信息。

2 结果

2.1 两种洗脱方法得到的蛋白质的量

加热洗脱蛋白质方法得到的蛋白质的量 ((374±15.74) μg, n=3) 多于强烈涡旋洗脱方法得到的蛋白质的量 ((307±12.59) μg, n=3) ($P < 0.05$)。

2.2 一维聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

每个样品取 25 μg 尿蛋白质进行 SDS-PAGE 分析 (图 2)。用加热洗脱蛋白质方法所制备的尿蛋白质样品, 与强烈涡旋洗脱方法和丙酮沉淀所制备的蛋白质样品相比, 涵盖了绝大部分相同条带、无明显的蛋白质降解, 具有很好的重复性 (图 2)。

2.3 质谱鉴定蛋白质重叠率

用加热洗脱蛋白质方法处理 3 张结合相同

尿蛋白质的硝酸纤维膜, 共鉴定了 530 个蛋白质 (分别鉴定到 492、498 和 503 个蛋白质), 其中 461 个蛋白质在 3 个样品中均被鉴定到, 蛋白质鉴定的重叠率 (重叠率=共同鉴定出的蛋白质数/平均鉴定出的蛋白质数×100%) 为 92.6% (图 3A); 用丙酮沉淀处理 3 份相同的尿液, 总共鉴定 530 个蛋白质 (分别鉴定到 489、508 和 512 个蛋白质), 其中 467 个蛋白质在 3 个样品中均被鉴定到, 蛋白质鉴定的重叠率为 92.8% (图 3B)。其中有 425 个蛋白质在以上两种方法处理的 6 个相同的样品中均被鉴定到, 即两种方法鉴定蛋白质的重叠率为 80% (图 3C)。

2.4 质谱鉴定蛋白质丰度的变异系数

用加热洗脱蛋白质方法处理 3 个样品, 共同鉴定到 461 个蛋白质, 其丰度 CV 值的均数是 9.2%, 且 85.2% 的蛋白质丰度 CV 值 < 20%; 用丙酮沉淀方法处理 3 个样品, 共同鉴定到 467 个蛋白质的丰度 CV 值的均数是 12.6%, 且 94.4% 的蛋白质丰度 CV 值 < 20% (图 4)。

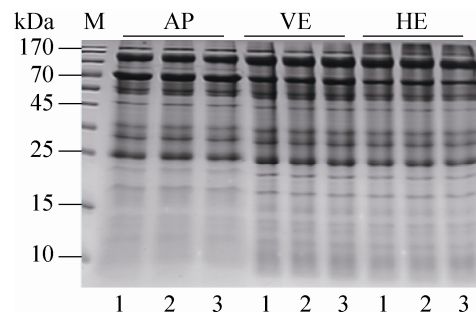


图 2 三种方法制备尿蛋白质 SDS-PAGE 图谱
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of urinary proteins prepared by three methods. AP: proteins prepared by acetone precipitation; VE: nitrocellulose membrane preservation with intense vortexing elution method; HE: nitrocellulose membrane preservation with heating elution method.

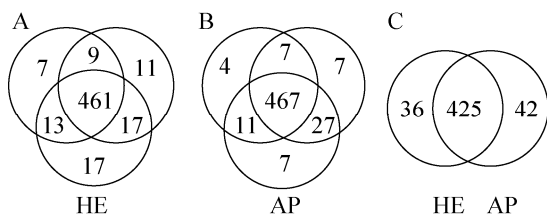


图 3 加热洗脱蛋白质方法和丙酮沉淀法鉴定蛋白质重叠率

Fig. 3 Overlapping rate of protein identifications by nitrocellulose membrane preservation with heating elution method (HE) and acetone precipitation method (AP), respectively, from 3 technical replicates.

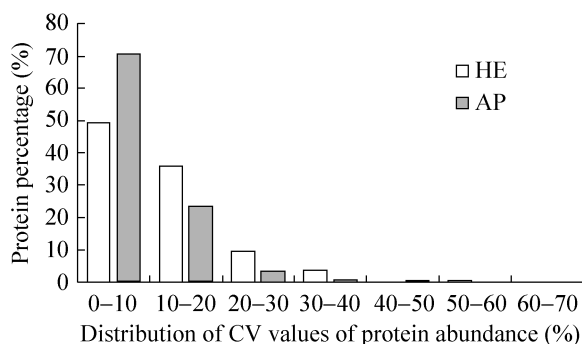


图 4 加热洗脱蛋白质法和丙酮沉淀法鉴定蛋白质丰度变异系数分布

Fig. 4 Distribution of CV values of protein abundance by nitrocellulose membrane preservation with heating elution method (HE) and acetone precipitation method (AP).

3 讨论

尿液作为寻找生物标志物的“金矿”,其保存对于生物标志物的研发意义重大,而膜上蛋白质洗脱的有效性决定着膜保存方法被接受的程度和应用的范围。加热洗脱蛋白质方法,通过提高 NC 膜溶解时的温度,从而减少了强烈涡旋的时间、简化了操作过程,而且加热并没有使蛋白质降解(图 2)。尤其在处理多个样品($n=6$)时,加热洗脱蛋白质方法在 60 min 可以使 20–30 个 NC

膜完全溶解,而强烈涡旋洗脱方法则需要持续强烈涡旋 200–300 min(图 1)。其次,在蛋白质沉淀时,不同于强烈涡旋洗脱方法将样品 4 °C 静置 1 h,而是置于旋转混匀仪 4 °C 旋转 2 h(图 1),这有效地防止溶解的 NC 膜沉淀分层,从而在离心后能够彻底的将蛋白质沉淀分离出来,有效阻止 NC 膜的再次形成,提高了蛋白质的洗脱效率。

本实验着重就加热洗脱蛋白质方法的技术重复性进行评估,并将其与常用的尿蛋白质提取方法丙酮沉淀法^[19-20]作了比较。尿液中蛋白质浓度低,应用丙酮沉淀法直接从尿液中提取蛋白质要消耗大量有机溶剂;膜保存尿蛋白质的洗脱只需少量的有机溶剂。用这两种方法分别处理 3 个同样的样品,两者质谱鉴定蛋白质的重叠率均很高且无差别。通过对每种方法共同鉴定到的蛋白质定量分析、计算蛋白质丰度的 CV 值并比较,本研究发现改良后蛋白质洗脱方法稍逊色于丙酮沉淀法,但其自身依旧具有很好的技术重复性,并且比强烈涡旋洗脱方法操作更加简捷,有利于用膜保存尿蛋白质方法的推广应用。

REFERENCES

- [1] Gao YH. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery? *Sci China Life Sci*, 2013, 56(12): 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(7): 649–656.
- [3] Payne SR, Serth J, Schostak M, et al. DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for non-invasive

- detection. *Prostate*, 2009, 69(12): 1257–1269.
- [4] Shao C, Li ML, Li XD, 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.
- [5] Smith ER, Zurakowski D, Saad A, et al. Urinary biomarkers predict brain tumor presence and response to therapy. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(8): 2378–2386.
- [6] Kentsis A, Shulman A, Ahmed S, et al. Urine proteomics for discovery of improved diagnostic markers of Kawasaki disease. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(2): 210–220.
- [7] Raimondo F, Morosi L, Corbetta S, et al. Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes. *Mol BioSyst*, 2013, 9(6): 1220–1233.
- [8] Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, et al. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(3): S9–S23.
- [9] Huang JT, Chaudhuri R, Albarbarawi O, et al. Clinical validity of plasma and urinary desmosine as biomarkers for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 2012, 67(6): 502–508.
- [10] Pejcić M, Stojnev S, Stefanovic V. Urinary proteomics—a tool for biomarker discovery. *Renal Failure*, 2010, 32(2): 259–268.
- [11] Rodriguez-Suarez E, Siwy J, Zurbig P, et al. Urine as a source for clinical proteome analysis: from discovery to clinical application. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844(5): 884–898.
- [12] Jia LL, Liu XJ, Liu L, et al. Urinemem, 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.
- [13] 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 (in Chinese).
- 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.
- [14] Thongboonkerd V, Mcleish K, Arthur J, et al. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int*, 2002, 62(4): 1461–1470.
- [15] Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359–363.
- [16] Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 1999, 20(18): 3551–3567.
- [17] Hauck S, Dietter J, Kramer R, et al. Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(10): 2292–2306.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.

(本文责编 陈宏宇)