

文章编号 1006-8147(2014)05-0404-04

论 著

毛细管电泳-发光二极管诱导荧光分析尿液蛋白

宋 琰¹, 范清杰², 包日煌¹, 姚 远¹, 高卫平¹

(1. 天津医科大学生物医学工程系, 天津 300070; 2. 天津市兰力科化学电子高技术有限公司, 天津 300384)

摘要 目的: 建立人体尿液蛋白质毛细管电泳分析方法, 检测正常人与膀胱癌患者尿液蛋白质成分的差异性。方法: 对正常人与膀胱癌患者尿液蛋白质用异硫氰酸荧光素进行荧光标记, 进行毛细管电泳-发光二极管诱导荧光法分析, 获得人尿液蛋白质电泳图, 比较两种电泳图的差异。结果: 建立了人体尿液蛋白质毛细管电泳分析方法, 成功将正常人与膀胱癌患者尿液中的多种蛋白质分离并得到相应电泳图谱, 正常人与膀胱癌患者尿液蛋白质电泳图谱存在差异。结论: 毛细管电泳-发光二极管诱导荧光法能检测到正常人与膀胱癌患者尿液蛋白质的差异。

关键词 毛细管电泳; 发光二极管; 诱导荧光; 尿液蛋白质

中图分类号 R318.04

文献标志码 A

Analyzing urine proteins by capillary electrophoresis combined with light-emitting diode induced fluorescence

SONG Long¹, FAN Qing-jie², BAO Ri-huang¹, YAO Yuan¹, GAO Wei-ping¹

(1. Department of Biomedical Engineering, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Lanlike Chemistry and Electron High Technology Co., Ltd., Tianjin 300384, China)

Abstract Objective: To study the value of capillary electrophoresis combined with light-emitting diode induced fluorescence detecting to detect the difference between normal human protein and bladder cancer urine protein. **Methods:** Proteins in normal and bladder cancer urine were labeled using fluorescein isothiocyanate and analyzed by capillary electrophoresis. Optimum conditions were developed. Electrophoretograms were applied. **Results:** Capillary electrophoresis was successfully applied to human urine proteins. Series of proteins in both normal and bladder cancer urine were detected and electrophoretograms were achieved simultaneously. Significant distinctions between normal and bladder cancer were found in the electrophoretograms. **Conclusion:** This method can detect the difference between normal protein and bladder cancer protein. Capillary electrophoresis combined with light-emitting diode induced fluorescence may be a useful method for urine protein analysis.

Key words capillary electrophoresis; light-emitting diode; induced fluorescence; urine proteins

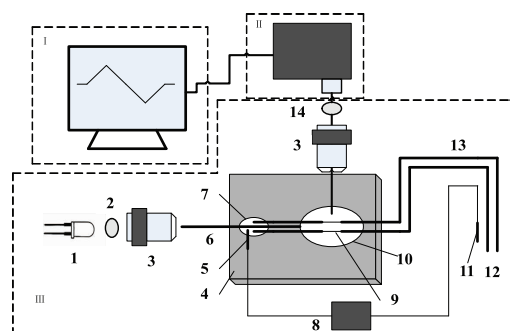
蛋白质组学是寻找癌症生物标志物的重要方法^[1]。有研究用蛋白质组学的方法, 比较正常人尿液与膀胱癌患者尿液蛋白质成分的差异, 成功检测出膀胱癌并具有高灵敏度和特异性^[2]。目前用于蛋白质组学分析的方法有双向电泳^[3-4]、免疫^[5]、色谱^[6]、毛细管电泳^[7]等。毛细管电泳-发光二极管诱导荧光(capillary electrophoresis-light-emitting diode induced fluorescence, CE-LED-IF)法作为一种快速、低成本、高灵敏度的分离检测方法而受到关注^[8-10]。本文使用异硫氰酸荧光素(FITC)标记尿液蛋白质, 用CE-LED-IF法分析被标记蛋白质, 检测正常人与膀胱癌患者尿液蛋白质的区别, 初步阐述该方法在尿液蛋白质分析、膀胱癌标志物探索中的价值。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料 毛细管电泳平台原理图如图1

作者简介 宋琰(1988-), 男, 硕士在读, 研究方向: 医学仪器; 通信作者: 高卫平, E-mail: weipinggao88@126.com。

所示。



I: 微机; II: PMT 及信号采集板; III: 毛细管电泳实验部分。1.LED; 2.光源滤光片; 3.显微镜物镜; 4.卡槽; 5.铂丝电极(直流高压电源阴极); 6.光纤; 7.废液池; 8.直流高压电源; 9.裸露毛细管; 10.检测窗; 11.铂丝电极(直流高压电源阳极); 12.进样池; 13.石英毛细管; 14.接收滤光片

图1 毛细管电泳装置简图

Fig 1 Schematic diagram of capillary electrophoresis

毛细管电泳仪由天津市兰力科公司提供。硫酸铵, 重蒸水, 正常人尿液, 膀胱癌患者尿液, 冻干人血清白蛋白(human serum albumin, HSA), 毛细管

(内径 75 μm ,总长度 53 cm,有效长度 50 cm),FITC,硼砂,1 mol/L 氢氧化钠和盐酸等,0.45 μm 微孔滤膜,480 nm 波长发光二极管,外径为 50 μm 的光纤。

1.2 方法

1.2.1 原理 刘勇等^[11-12]用 FITC 标记蛋白质、毛细管电泳-激光诱导荧光法检测,成功检测到正常、肺癌及癌旁组织蛋白质的差异性,分离效果好,且快速稳定。本文采用类似方法,用 FITC 标记尿液蛋白质,用 CE-LED-IF 法分离检测,检测正常人和膀胱癌患者尿液蛋白质的差异。William 等^[13]从正常人尿液中用毛细管电泳法分离出了 2 000 多种蛋白质,充分说明毛细管电泳能分离尿液中蛋白质;研究表明膀胱癌患者尿液中有多种多肽类膀胱癌标志物^[2],Getzenberg 等^[4]在膀胱癌患者尿液中分离出 6 种特异性核基质蛋白质,正常人尿液与膀胱癌患者尿液蛋白质成分存在差异。用 CE-LED-IF 法检测,得到两者有差异性的电泳图谱,从而分辨出膀胱癌患者与正常人。

1.2.2 样本采集与处理 尿液成分复杂,受个人的饮食生活习惯影响较大,为了排除其他物质的影响,采用盐析法将蛋白质提取出来。正常人尿液、尿路上皮癌患者尿液,尿液样本均为空腹自发晨尿(早七点到十点),最少 10 mL,在采集后立即处理。4 $^{\circ}\text{C}$,3 500 r/min 离心 15 min,去除大颗粒物,取上清液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。用盐析法提取尿液蛋白质。取适量尿液,将尿液与饱和硫酸铵按 1:1 体积比均匀混合,放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,过滤沉淀,将所得沉淀溶入电泳缓冲液。

1.2.3 样本蛋白衍生 将 FITC 用电泳缓冲液配制成 1 mg/mL,避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取上步骤所得溶液装入 2 mL 样本瓶,加入 1 mg/mL 的 FITC 溶液,避光,4 $^{\circ}\text{C}$ 衍生 4 h。

1.2.4 电泳条件 毛细管总长度 53 cm,有效长度 50 cm;电动进样,进样电压 8 KV,进样时间 10 s;电泳缓冲液 10 mmol/L 硼砂缓冲液,pH 为 9.6;电泳电压 24 KV,发射滤光片和接收滤光片分别为 470~490 nm 和 500~550 nm 带通滤光片;光源是波长为 480 nm 的 LED。

此外,为了防止溶液在电泳过程中产生气泡,以及可能存在大颗粒物堵塞毛细管,在所有样本上机测试前,需超声除气泡 5 min,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。溶液配制过程中,均使用重蒸水,所有试剂均为分析纯。

2 结果

2.1 光源与滤光片 FITC 吸收波长在 460~510 nm

范围内的光子,释放出波长范围在 500~560 nm 的光子。根据这一波长改变,检测时用滤光片滤除光源光子就能检测到释放出来的光信号。如图 2 所示,选 480 nm LED(图中虚线)作为光源,采用图中阴影部份所示双滤光片结构来隔离光源与发射光,光源与发射光几乎没有重叠,从而有效抑制背景噪声。选择 470~490 nm 和 500~550 nm 带通滤光片分别作为光源滤光片和接收滤光片。光源选择波长 480 nm LED。

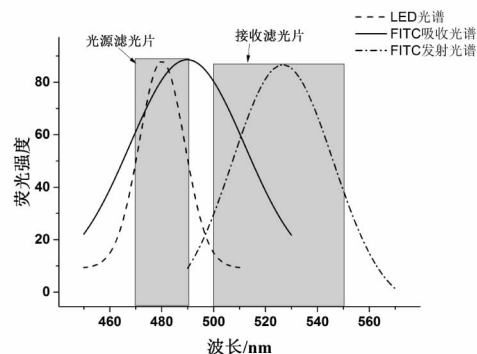


图2 滤光片与光谱

Fig 2 Signal intensity under different optical sources

2.2 电泳条件

2.2.1 缓冲体系和浓度 实验中对比了磷酸盐、硼砂、tris、PBS 分别作为电泳缓冲液,分析正常人尿液的效果。磷酸盐电导率大,电流大,导致焦耳热过大,导致电泳电流变化过大,而且电泳过程中峰型不稳定,可重复性差;PBS 和 tris 缓冲液在实验过程中,没有出现任何峰形;而硼砂缓冲液电流平稳,峰形接近高斯峰。最后选择硼砂溶液作为电泳缓冲液,并对电泳缓冲液中硼砂浓度进行优化。对同一样本重复 10 次,记录稳定出峰次数,表 1 为实验结果。由表得出最佳缓冲液浓度为 10 mmol/L 的硼砂缓冲液。

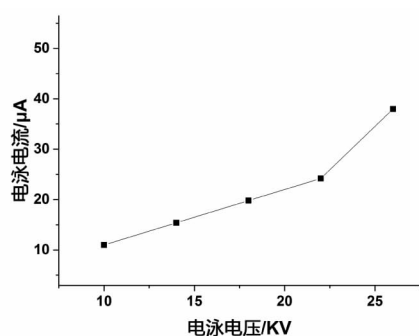
表1 不同浓度硼砂缓冲液检测结果

Tab 1 Detecting different concentrations of borate buffer

缓冲液浓度/(mmol/L)	出峰次数	结果
5	2	不稳定,可重复性差
10	9	稳定性高,可复性好
15	5	较稳定,可重复性较好
20	3	不稳定,可重复性差

2.2.2 电泳电压 电泳电压影响分离效率,是电泳条件的一个重要参数。对最合适电泳电压的选择,可改变电压,测定此时电流,作电压电流曲线,可取线性关系中的最大电压值,并结合实验中的实际情况合理选择最合适电压。将实验中所得的电压和电流的关系作图,如图 3 所示,在 22 KV 时达到线性

最大值。但实验中发现,电压增加到 24 KV 时,因为电压加高,电泳时离子迁移速度快,扩散影响小,峰形更接近高斯峰。综合考虑电压为 24 KV。

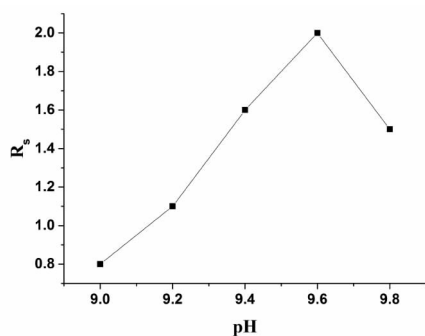


实验条件:电泳缓冲液 pH=9.3, 10 mmol/L 硼砂

图3 电压-电流关系

Fig 3 Voltage vs. current

2.2.3 pH 合适的 pH 是实验成败的关键之一。在 pH>9 的条件下,能取得比较好的蛋白质分离效果。实验中 pH>10 时,电泳时电流变化大,结果不稳定。实验过程中,缓冲液为 10 mmol/L 硼砂,用 1 mol/L 的盐酸和 NaOH 溶液调节 pH 到指定值。在 9~10 内对 pH 进行优化。从图 4 知 pH 为 9.6 时,分离程度最好,选定 pH 为 9.6。



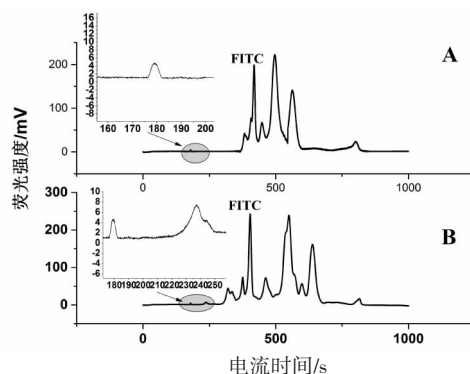
实验条件:电泳缓冲液 10 mmol/L 硼砂,电泳电压 24 kV

图4 pH 与 R_s 关系。

Fig 4 pH vs R_s

2.3 正常人与膀胱癌患者尿液蛋白 CE-LED-IF 分析 用建立的电泳方法分析正常人和膀胱癌尿液样本中蛋白质,对两类尿液样本电泳图谱进行对比分析。从多例实验结果中选出了两个最具代表性的图谱(图 5),展示正常人和膀胱癌患者尿液蛋白质电泳结果的差异性。图 5 中 A 与 B 的差异性主要是蛋白质峰的数目上,B 比 A 多出 3 个峰。两者之间的差异明显,经多次测量结果显示差异性稳定。两个图谱中,某些相邻蛋白质峰之间没有在基线处分离,为了保证蛋白质能尽量多被染色,加入了过量的 FITC(图 5 中 FITC 峰,用添加 FITC 的方法测

得),这些游离的 FITC 使基线提升,而不能在基线处分离。



A: 正常人; B: 膀胱癌患者

图5 尿液蛋白质电泳图

Fig 5 Electrophoretogram of urine proteins

3 讨论

本文中提出的 CE-LED-IF 方法能检测出两种尿液蛋白的差异性,在尿液蛋白质分析、膀胱癌标志物探索中存在潜在应用价值。

LED 诱导荧光检测有 3 种模式:正交、共线和光纤引入 3 种。光纤引入模式由 Zhao 等^[14]最先提出。LED 光纤诱导荧光检测模式,结合 LED 成本低、减小仪器体积等优点的同时,提高仪器抗干扰能力和检测灵敏度。由于毛细管内径小,插入其内部的光纤直径更小(一般在 50 μm 左右),导致入射光较弱。如果能提升光纤的直径,或者光纤与光源耦合效率,使入射光强度增加,该方法的检测灵敏度将会在现在基础上有很大提升,其应用价值将会更大。

CE-LED-IF 检测法使用大功率 LED 光源,其检测下限大约在 1 μg/L 水平^[15]。本实验采用普通 LED 光源,检测下限大约在 50 μg/L 水平,正常人尿液中蛋白质含量在 5 mg/L 水平。而且,提取蛋白时,也对蛋白进行了浓缩。该方法能够达到尿液蛋白检测所需的检测限,并检测到尿液中的多种蛋白质和两种样本之间的差异性。但是,CE-LED-IF 无法鉴定所得到的的是什么蛋白,在后期工作中需要结合其他方法进一步研究。图 5 中显示的蛋白峰的数目较少,分析其可能原因,首先是蛋白质提取过程中有一部分蛋白损失,其次 FITC 虽然在蛋白荧光标记中应用最为广泛,但并不是所有蛋白均能被很好地染色,没被染色的蛋白质无法被检测。所以,本文提出的方法还可以从蛋白提取方法和蛋白染色流程等进行完善。

综上所述,CE-LED-IF 能检测出正常人与膀胱癌患者尿液蛋白的差异性,随着其他相关技术的发

展与研究的深入,这一方法的优势将会更加明显。

参考文献:

- [1] Vrooman O P, Witjes J A. Urinary markers in bladder cancer[J]. Eur Urol, 2008,53(5):909
- [2] Theodorescu D, Wittke S, Ross M M, et al. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis[J]. Lancet Oncol, 2006,7(3):230
- [3] 朱悦,张诗武,张丹芳,等. TA2 小鼠自发乳腺癌血清蛋白质组学研究[J]. 天津医科大学学报, 2013,19(5):373
- [4] Getzenberg R H, Konety B R, Oeler T A, et al. Bladder cancer-associated nuclear matrix proteins[J]. Cancer Res, 1996,56(7):1690
- [5] Feng C C, Wu Z, Jiang H W, et al. Urinary BLCA-4 level is useful to detect upper urinary tract urothelial cell carcinoma[J]. Actas Urol Esp, 2012,36(10):597
- [6] Magliano D J, Polkinghorne K R, Barr E L, et al. HPLC-Detected albuminuria predicts mortality[J]. J Am Soc Nephrol, 2007,18(12):3171
- [7] 蒋银燕,郭丽娟,崔小莹,等. 尿样中三种蛋白质的毛细管电泳分离检测方法研究[J]. 现代生物医学进展, 2010,10(21):4062
- [8] Ji H Y, Li M, Guo L H, et al. Design and evaluation of capillary coupled with optical fiber light-emitting diode induced fluorescence detection for capillary electrophoresis[J]. Electrophoresis, 2013,34(17):2546
- [9] 张洪清,范清杰,叶志海,等. 发光二极管-光纤诱导荧光毛细管电泳仪的研制[J]. 实验室研究与探索, 2010,29(11):28
- [10] Suntornsuk L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis[J]. Anal Bioanal Chem, 2010,398(1):29
- [11] 刘勇,王荣,高岚,等. 毛细管电泳检测肺癌及癌旁正常组织蛋白质混合物差异[J]. 化学学报, 2011,69(5):543
- [12] 刘勇,王荣,高岚,等. 肺癌组织蛋白质混合物检测方法学研究[J]. 分析化学, 2010,38(9):1287
- [13] Mullen W, Albalat A, Gonzalez J, et al. Performance of different separation methods interfaced in the same MS-reflection TOF detector: a comparison of performance between CE versus HPLC for biomarker analysis[J]. Electrophoresis, 2012,33(4):567
- [14] Zhao S H, Xiao D. Optical fiber light-emitting diode-induced fluorescence detection for capillary electrophoresis[J]. Electrophoresis, 2006,27(2):461
- [15] de Jong E P, Lucy C A. Low-picomolar limits of detection using high-power light-emitting diodes for fluorescence[J]. Analyst, 2006, 131(5):664

(2014-03-11 收稿)

.....

(上接第 403 页)

综上所述,医院在加强抗菌药物的监管后,普外科清洁切口手术围手术期预防用药情况已极大地改善,基本趋于合理,但仍需继续加大力度,使清洁切口手术围手术期预防用抗菌药物合理化,减少医院抗菌药物滥用以及细菌耐药的发生,从而保证患者用药安全、有效和经济。

参考文献:

- [1] 李晓红,李立军,于凤辉,等. 临床抗生素应用调查分析[J]. 中国实用医药, 2010, 5(1): 159
- [2] 吴明,王芳,李佳佳,等. 170 例清洁切口手术围手术期抗菌药物应用调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(14): 3139
- [3] 沈毅,顾申勇,谢宁,等. 我院 5 种 I 类切口手术围手术期预防用抗菌药物调查分析[J]. 中国药业, 2012, 21(17): 37
- [4] 吴巧珍,吴文英,朱磊,等. 3 种清洁切口手术围手术期预防用抗菌药物管理成效[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(1): 32
- [5] 许也齐,张静,于静,等. 2010 年住院患者临床抗菌药物使用调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(7): 1424
- [6] 刘玲玲. 我院 I 类切口围手术期预防应用抗菌药物调查分析[J]. 中国保健营养, 2013, 1(2): 33
- [7] Song F, Glenny A M. Antimicrobial prophylaxis in colorectal surgery: a systematic review of randomized controlled trails[J]. Br J Surg, 2008, 85(9): 1232
- [8] 汪淑珍. 住院患者 1 436 例抗菌药物使用情况及分析[J]. 中国社区医师: 医学专业, 2011, 13(22): 173

(2014-02-26 收稿)