

文章编号 1006-8147(2016)04-0359-05

论 著

毛细管电泳差异性检测尿液蛋白方法初探

姚 远, 景换利, 高卫平

(天津医科大学生物医学工程学院, 天津 300070)

摘要 目的:使用毛细管电泳(CE)与二极管阵列检测(DAD)联用技术(CE-DAD)的差异检测方法,优化膀胱癌患者尿液特异性蛋白的检测条件。方法:对5例膀胱癌患者及5例健康志愿者尿液蛋白中的低丰度蛋白进行含量的差异检测,并使用电解质添加剂对原缓冲体系进行优化,对电渗流进行有效控制,提高低丰度蛋白的分离效率。结果:确立了使用毛细管电泳与二极管阵列检测联用技术对正常人组与非肌层浸润性膀胱癌患者组尿液蛋白的差异检测最佳条件,并经ELISA法平行试验,显示两组低丰度蛋白存在差异相关性。结论:对CE-DAD的差异检测条件进行了初步的探索,为未来标准化检测方法的建立奠定了基础。

关键词 毛细管电泳;尿液蛋白;差异检测;电渗流

中图分类号 R318.6

文献标志码 A

Study on the difference detection method for urinary proteomic by CE-DAD technology

YAO Yuan, JING Huan-li, GAO Wei-ping

(College of Biomedical Engineering, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To explore an optimized method for difference detection of urinary proteomic in patients with bladder cancer (BCs) by capillary electrophoresis separation technique coupled with diode array detector (CE-DAD). **Methods:** For detecting the difference in the contents of each urinary low-abundance proteins between the two groups, electrolytic additives were used to improve the buffer system, and the concentration of electro-osmotic flow was well controlled in this condition, in order to increase the separation efficiency. **Results:** The optimal conditions were established to detect the difference between the bladder cancer and the control group by CE-DAD, and the difference and correlation were also tested by the parallel experiment of ELISA method. **Conclusion:** This paper makes a preliminary exploration on the condition of difference detection by CE-DAD, and establishes the foundation for the institution of standardized experimental method in the future.

Key words capillary electrophoresis; urinary proteomic; difference detection; electro-osmotic flow

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,患病男女比例为4:1,其中70%~80%的患者为非肌层浸润性膀胱癌,20%~30%为肌层浸润性膀胱癌^[1]。对于膀胱癌的临床筛查,检测效率尤为重要。毛细管电泳(CE)这一分离手段,因其成本低、操作简便、耗时短等独特的优点而广泛的应用到相关检测研究中^[2-3]。本文拟探讨优化一种毛细管电泳与二极管阵列检测器联用技术(CE-DAD)的差异检测方法的条件,使用超滤离心管对低丰度蛋白质进行有效提取,并使用电解质添加剂提高分离过程中缓冲溶液的离子强度;观察分离过程中电流的波动情况,并通过对电流稳定性的干预提高检测结果的重复性,从而对正常人与膀胱癌患者的尿液低丰度蛋白质进行差异检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料 Agilent 7100 高效毛细管电泳仪

作者简介 姚远(1991-),男,硕士在读,研究方向:医学仪器;通信作者:高卫平, E-mail: gaoweiping@tjmu.edu.cn。

(美国 Agilent Technology),带有柱上二极管阵列检测器(波长范围:190~400 nm);弹性石英毛细管(河北省永年县润丰有限责任公司),内径75 μm;高速冷冻离心机(德国 Sigma),用于尿液样本的离心;1.5 mL/100 KDa 超滤离心管和PVDF膜(德国 Millipore);BLCA-4 ELISA 试剂盒(上海研生生化);使用安捷伦化学工作站和SPSS 17.0 计算机软件进行数据处理。

1.2 试剂的选取与制备 在整个试剂制备过程中,所有的化学品均属分析纯及以上,试剂制备中均使用 Milli-Q 超滤后的超纯水。原溶液的准备:乙腈、甲酸、甲醇、25% 氢氧化铵溶液、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)溶液、4 mol/L 氯化钠溶液及2% 十二烷基硫酸钠(SDS)溶液,以上所有的溶液必须通过0.45 μm 薄膜过滤器进行过滤之后使用,以防止存在大颗粒物阻塞毛细管。此外,为了防止溶液在电泳过程中产生气泡,在所有样本上机测试前,需使用超声清洗器进行气泡去除工作5 min。

1.3 方法

1.3.1 原理 Amaya 等^[4-5]使用酸性无盐缓冲液环境对毛细管中尿液蛋白进行分离,重复性好,且有很好的分离效果。本文借鉴了该方法,并在此基础上加以改进,在该方法提出的酸性无盐缓冲液中加入了解电解质,以提高柱效;包日煌等^[6-7]使用发光二极管诱导荧光毛细管电泳(CE-LED-IF)对肝硬化与正常人的血清蛋白图谱分别进行了检测以及差异分析,结果表明两组间血清蛋白差异显著,且重复性好。

BLCA-1 和 BLCA-4 为表达于膀胱肿瘤组织的核转录因子^[8],最初由 Getzenberg 等^[9]发现。其中, BLCA-1 在正常人膀胱组织中不表达,只在膀胱癌患者组织中有表达^[10]; BLCA-4 在膀胱癌组织中及其癌旁组织中都有表达,但正常人膀胱组织中不表达^[11-12]。研究人员曾使用酶联免疫法在尿液中检测 BLCA-4 核基质蛋白,结果表明用此蛋白诊断膀胱癌的灵敏度在 89%~96%之间,特异性达到 100%^[13];另有研究表明用 BLCA-1 蛋白诊断膀胱癌的灵敏度为 80%,特异性为 87%^[10];二者的表达并不受肿瘤分期的影响。然而, BLCA-1 的功能在目前研究还较少,且尚无进一步的证据证明其与膀胱癌进展之间的关系^[14]。因此,本文使用 ELISA 方法检测 BLCA-4 作为平行实验来验证实验的有效性。

1.3.2 尿液样品的采集与预处理 尿液试验样品取自 5 名膀胱癌患者(患者来自天津医科大学总医院,经病理学检查,5 人均被确诊为非肌层浸润型膀胱癌,并在手术摘取癌症组织前取样)和 5 名健康志愿者,分别取其自发第二次晨尿储存,然后取少量尿样置于离心管,以 3 000 r/min 离心 10 min,并离心多次,除去尿沉渣,取其上清液转移到 8 mL 的离心管,以 1/1 000(v/v)的比例加入 PMSF 饱和溶液配制成混合溶液,每个样本分两部分于-20℃冷藏。这两部分样品将分别用于毛细管电泳的检测和 ELISA 的鉴定试验。

1.3.3 样品处理 毛细管电泳检测部分样品处理:取 2 mol/L 尿素, 100 mmol/L 氯化钠溶液, 0.012 5% 氢氧化铵溶液和 0.01% SDS 配成尿素缓冲液,与已经 PMSF 处理过的样品按 1:1 混合加入超滤浓缩离心管,以 10 000 r/min 离心 30 s 之后冷藏在 4℃; ELISA 法鉴定试验部分样品处理:将已经 PMSF 处理过的样品加入超滤浓缩离心管以 10 000 r/min 离心 30 s,收集浓缩后的尿液样品。

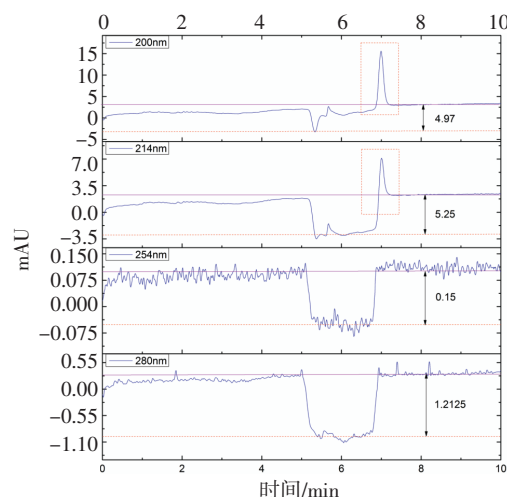
1.3.4 毛细管电泳环境预处理 运行缓冲液的制备:118 μL 的甲酸和 47 μL 的甲醇加入到 10 mL 的乙腈当中,使用超纯水将体积调至 50 mL。每天试验

前需使用 1.0 mol/L 氢氧化钠(压力 990 mbar)将毛细管清洗 30 min 之后才可以使用;尿样通过气压进样(50 mbar, 180 s),每次注入样品之前,毛细管都必须依次通过 0.10 mol/L 氢氧化钠,水,运行缓冲液分别冲洗 3 min。毛细管电泳分离在电压 25 kV、温度 25℃的条件下进行,分离时间 60 min。

1.3.5 ELISA 蛋白鉴定方法 在酶标包被板上设标准品孔 10 孔并对标准品进行稀释;分别设空白孔、待测样品孔,在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL,然后再加待测样品 10 μL,混匀;置 37℃温育 30 min;弃液,每孔加满洗涤液洗涤,重复 5 次;除空白孔,每孔加入酶标试剂 50 μL;再次温育并洗涤;每孔先加入 50 μL 显色剂 A,再加入 50 μL 显色剂 B,混匀,37℃避光显色 15 min;加入终止液 50 μL;以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。

2 结果

2.1 检测波长的选取 根据 DAD 检测器的检测原理,检测蛋白通常会选取 200 nm、214 nm、254 nm 和 280 nm 作为检测波长。如图 1,由于本试验缓冲液中含有尿素,尿素在短波紫外区有强吸收,其缓冲液电泳图在短紫外区(如 200 nm 和 214 nm)受其影响较大(如红色点画框所示),因此不宜作为此试验的检测波长;此外,由于紫外吸收检测法在背景缓冲液具有紫外吸收特性时会有少量补偿,因此在空白检测试验时,缓冲液分别在 200 nm、214 nm、280 nm 波长下出现了很明显的基线下移(右侧黑体数字表示相对负吸收值),这一基线上的变化会提高物质的检出限,因而,为获得更低的检出限,减少这一补偿所带来的影响,本文选用 254 nm 作为检测波长。



运行环境:运行缓冲液为 20%乙腈, 0.94%甲酸;毛细管有效长度为 530 mm,内径为 75 μm,电压为 25 kV

图1 检测波长的选取

Fig 1 Selecting detection wavelength

2.2 对电渗流的抑制

2.2.1 缓冲液中 pH 值的选取 为有效控制电渗流,本文对缓冲液的 pH 值进行考察。图 2 表明不同的 pH 值(2.8~4.2)对尿蛋白分离的影响。本文选用主峰即高分子量蛋白的峰高测量分辨率。随着缓冲液 pH 值的增加,其分辨率也相应增加。pH 为 3.6 时,分辨率达到最大值,之后随着 pH 值的增大而逐渐下降,因此本试验选定缓冲液的 pH 为 3.6。

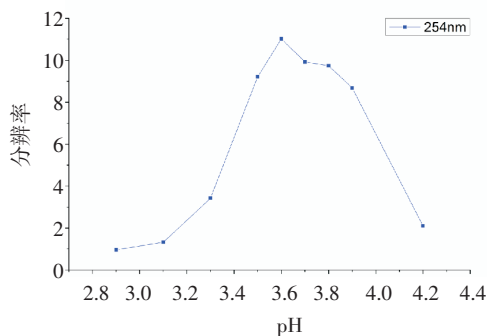


图 2 运行缓冲液 pH 值的选取

Fig 2 Selecting pH values of running buffer

2.2.2 分离过程中的电流控制 使用原酸性无盐缓冲体系分离样品时,因其电解质含量少,加入样本后会破坏分离过程中的背景缓冲液电解质平衡,使得分离过程中电流波动较大,且变化无规律,相应得到的电泳结果的重现性差。为获得更好的分离效果以及重复率,使用缓冲液添加剂技术增加背景缓冲液的电解质浓度,达到提高整体电流,稳定电流波动的目的。

2.2.3 缓冲液中电解质添加含量 本文对电解质(NaCl)的添加含量进行了考察。如图 3,在 0 mol 和 0.002 mol 时,尿液蛋白分离并不完全,在 0.004 mol 和 0.006 mol 时,尿液蛋白有了明显的分离,然而,在 0.006 mol 时的蛋白电泳图谱基线有所上扬,易破坏重复性,因此选用 0.004 mol 的 NaCl 作为电解质添加剂。

2.2.4 毛细管有效长度选择 由于毛细管电泳中因高电压所带来的焦耳热严重影响着试验的重复性,在不更改缓冲液配方的前提下,加长了毛细管的长度,选用了有效长度为 816 mm 的毛细管,使得平均电流值降低了近一倍,且分离过程中的电流依然保留了平缓的特性。

2.2.5 试验方法的重复性 对同一样本重复 10 次,记录迁移时间、峰高以及峰面积,并计算 10 次测量的相对标准差,来比较优化试验条件前与优化试验条件后的重复率。由表 1 可知,检测条件优化后该

试验的重复率有显著提高。

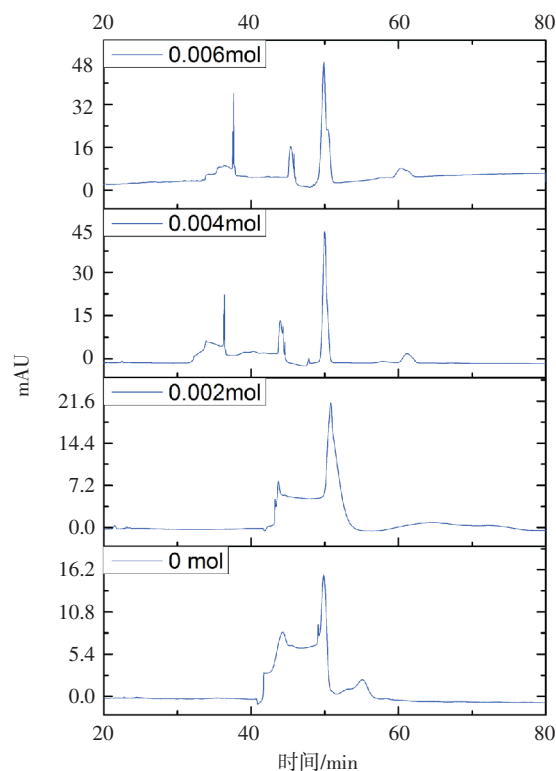


图 3 电解质添加量的对比

Fig 3 Comparison of electrophoretograms among different contents of electrolyte

表 1 不同试验条件下迁移时间、峰面积以及峰高的相对标准差(n=10)

Tab 1 The %RSDs results in the different conditions (n=10)

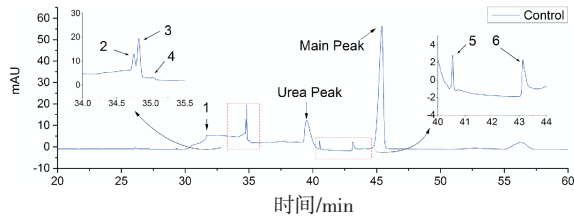
指标	%RSDs *	%RSDs **
迁移时间	9.3	1.2
峰面积	5.8	1.5
峰高	8.9	4.8

* 优化前的电泳环境 ;** 优化后的电泳环境

2.3 方法验证 为验证该检验方法的可靠性,本文收集了 5 名患者的自发性第二次晨尿作为试验样本中的试验组,另收取 5 名健康志愿者的自发性第二次晨尿作为试验样品中的对照组,两组在年龄、性别、种族均不构成统计学差异。

通过两组电泳图谱对比的差异来评价该检测方法的有效性。除主峰外,有 6 个蛋白峰被检测出,依次为 peak '1'、peak '2'、peak '3'、peak '4'、peak '5'、peak '6',见图 4 (正常人尿蛋白图谱)和图 5 (膀胱癌患者尿蛋白图谱)。

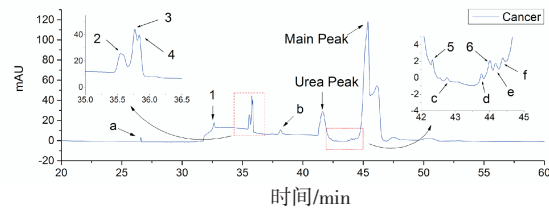
分别对两组中这 6 个峰的各个峰面积进行积分计算,并将结果分别通过 t 检验证明其差异性,数据处理结果见表 2。



peak1~6 为共有蛋白峰。运行环境:运行缓冲液为 20%乙腈,0.94%甲酸,0.004 mol 的氯化钠作为添加剂;毛细管有效长度为 816 mm,内径为 75 μ m,电压为 25 kV

图4 正常人的尿液低丰度蛋白图谱

Fig 4 Separation of urinary proteomes of healthy subjects



peak1~6 为共有蛋白峰,peak'a'~'f'为膀胱癌患者特异性蛋白峰。运行环境:运行缓冲液为 20%乙腈,0.94%甲酸,0.004 mol 的氯化钠作为添加剂;毛细管有效长度为 816 mm,内径为 75 μ m,电压为 25 kV

图5 膀胱癌患者的尿液低丰度蛋白图谱

Fig 5 Separation of urinary proteomes in patient with BCs

表2 两组间蛋白峰的差异比较结果(*t* 检验)和组内蛋白峰的重复性考察(相对标准差)

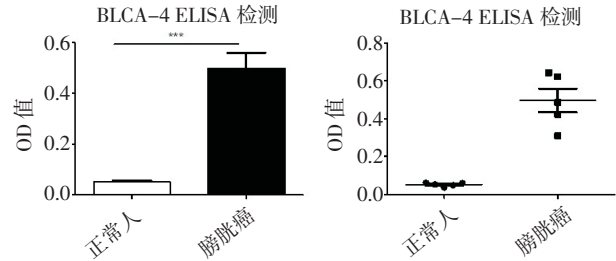
Tab 2 The difference between groups (*t*-test) and the repeatability in the group (%RSDs) of each peaks' areas

峰序号	<i>t</i>	<i>df</i>	Sig.(2-tailed)*	%RSDs	
Peak1	-22.018 58	4	<0.000 1	1.6 ^a	1.3 ^b
Peak2	-2.806 21	2.175	0.054 78	1.4 ^a	1.4 ^b
Peak3	-7.360 18	4	0.001 82	1.2 ^a	1.3 ^b
Peak4	-3.802 48	4	0.019 06	1.5 ^a	1.2 ^b
Peak5	3.593 05	4	0.022 9	1.3 ^a	1.2 ^b
Peak6	0.207 62	4	0.845 67	1.2 ^a	1.3 ^b

* $P < 0.05$; ^a 实验组内的相对标准差; ^b 对照组内的相对标准差

从表中可以看出,peak1、peak3、peak4 和 peak5 在两组间存在明显的统计学差异,其余两个差异不显著。此外,还有 6 个峰只存在于膀胱癌患者的尿液蛋白电泳图谱中,如图 5 所示的 peak 'a'、peak 'b'、peak 'c'、peak 'd'、peak 'e'、peak 'f',推测为膀胱癌患者尿液蛋白谱图的特异性蛋白峰。

为验证本实验中的结果,使用 ELISA 方法对上述毛细管电泳实验结果中膀胱癌患者以及正常人尿液蛋白差异进行验证性鉴定。该平行实验使用与上述毛细管电泳方法分离过后的膀胱癌患者与正常人尿液蛋白样品的同源样本作为检测样本,对比二者中的 BLCA-4 核基质蛋白表达量。



*** $P < 0.01$

图6 膀胱癌患者与正常人尿液中 BLCA-4 的蛋白含量对比

Fig 6 Up-regulation of the BLCA-4 in bladder cancer patients' urine sample

由图 6 可知,BLCA-4 在正常人尿液样品中几乎没有表达,而在患者尿液样品中有高表达,从而证明本实验中毛细管电泳在膀胱癌尿液蛋白图谱所对比得出的差异蛋白峰中应有一个为鉴定中的 BLCA-4。

3 讨论

随着尿液蛋白质组学研究的不断深入,目前以检测氨基酸序列为目的的尿液蛋白质组学的分析技术得到了迅猛的发展^[15-16]。一些基于质谱联用的技术,如 SELDI-MS^[17]、2DE-MS^[18]及 LC-MS^[19]开始广泛用于尿液蛋白的分析。然而,因其成本高昂,耗时长,且操作复杂等原因难以在临床中应用^[20-21]。宋琰^[22]等曾使用 CE-LED-IF 对尿液蛋白进行差异检测,但蛋白提取过程过于简单,高丰度的蛋白没有得到有效的去除,低丰度蛋白也没有有效的浓缩,因此实验结果并不能强有力地证明差异的有效性。

本文探讨优化了一种使用 CE-DAD 技术对尿液蛋白进行差异检测方法的条件,以用于非肌层浸润性膀胱癌的低丰度蛋白的检测。为获得更好的检测效果,本文分别对检测波长,分离环境的 pH 值进行了选择和优化,并对分离过程中的电渗流进行了有效的控制。同时,实验过程中还发现分离过程中的电流波动与分离的重复性和结果的稳定性存在关系,为提高检测的重复性,适当提高了缓冲液中电解质的浓度,稳定了分离过程中毛细管两端的电流,并对 5 名已确诊的非肌层浸润性膀胱癌患者与 5 名正常人的尿液样品进行差异检测。结果显示,共有 6 个蛋白峰在两组电泳图谱中共同存在,经过 *t* 检验,其中 4 个蛋白峰显示两组间差异具有统计学意义,余下 2 个差异不明显;另外,还有 6 个蛋白峰为膀胱癌患者特异蛋白峰,只存在于实验组的电泳图谱中;经过 ELISA 方法的分析鉴定,初步证明了该方法能够检测出正常人尿液中和膀胱癌患者尿液中低丰度蛋白质的差异化表现。本实验仅对膀胱癌

患者的毛细管电泳尿液蛋白谱图中的特异蛋白峰进行了初步鉴定,要进一步的逐一鉴定本实验中对比得出的差异蛋白峰,还需在后续实验中通过毛细管与质谱的联用来实现。

综上所述,本文优化了毛细管电泳与二极管阵列检测联用技术的差异检测条件,并对该方法的应用进行了初步的探索,为未来标准化检测方法的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] Van Rhijn B W, Burger M, Lotan Y, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy[J]. *Eur Urol*, 2009, 56(3): 430
- [2] Good D M, Zuerbig P, Argiles A, et al. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(11): 2424
- [3] Rossing P, Zuerbig P, Panagiotopoulos S, et al. Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy[J]. *Diabetologia*, 2010, 53(1): 3304
- [4] Albalat A, Franke J, Gonzalez J, et al. Urinary proteomics based on capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry in kidney disease[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 919: 203
- [5] Weissinger E M, Mullen W, Albalat A. Urinary proteomics employing capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry in the monitoring of patients after stem cell transplantation[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1109: 293
- [6] 包日煌,范清杰,宋珑,等.毛细管电泳-发光二极管诱导荧光检测法分析肝硬化及正常人血清蛋白质的差异[J].*色谱*, 2015, 33(2): 201
- [7] 宋珑,范清杰,包日煌.毛细管电泳-发光二极管诱导荧光分析尿液蛋白[J].*天津医科大学学报*, 2014, 20(5): 404
- [8] Tilki D, Burger M, Dalbagni G, et al. Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer[J]. *Eur Urol*, 2011, 60(3): 484
- [9] Getzenberg R H, Konety B R, Oeler T A, et al. Bladder cancer-associated nuclear matrix proteins[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(7): 1690
- [10] Myers-Irvin J M, Landsittel D, Getzenberg R H. Use of the novel marker BLCA-1 for the detection of bladder cancer [J]. *J Urol*, 2005, 174(1): 64
- [11] Konety B R, Nguyen T S, Dhir R, et al. Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(7): 2618
- [12] Konety B R, Nguyen T S, Brenes G, et al. Clinical usefulness of the novel marker BLCA-4 for the detection of bladder cancer[J]. *J Urol*, 2000, 164(3, 1): 634
- [13] Van Le T S, Miller R, Barder T, et al. Highly specific urine-based marker of bladder cancer[J]. *Urology*, 2005, 66(6): 1256
- [14] 李飞杨,张志凌,吴松,等.BLCA-1、BLCA-4与膀胱癌关系的研究现状[J].*中华临床医师杂志:电子版*, 2013(18): 8393
- [15] Schaub S, Wilkins 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
- [16] 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
- [17] McLerran D, Grizzle W E, Feng Z, et al. SELDI-TOF MS whole serum proteomic profiling with IMAC surface does not reliably detect prostate cancer[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(1): 53
- [18] Banach T, Adaszek L, Wylupek D, et al. Applicability of 2D gel electrophoresis and liquid chromatography in proteomic analysis of urine using mass spectrometry MALDI-TOF[J]. *Pol J Vet Sci*, 2013, 16(3): 587
- [19] Jin X, Yun S J, Jeong P, et al. Diagnosis of bladder cancer and prediction of survival by urinary metabolomics[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(6): 1635
- [20] Qian W J, Jacobs J M, Liu T, et al. Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(10): 1727
- [21] Kolch W, Neuss C, Peizing M, et al. Capillary electrophoresis - Mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2005, 24(6): 959
- [22] 宋珑.毛细管电泳-发光二极管诱导荧光分析蛋白质[D].天津: 天津医科大学, 2014

(2016-01-04 收稿)