



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103207107 B

(45)授权公告日 2016.09.07

(21)申请号 201210012275.8

(22)申请日 2012.01.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103207107 A

(43)申请公布日 2013.07.17

(73)专利权人 中国医学科学院北京协和医院
地址 100005 北京市东城区王府井帅府园1号
专利权人 中国医学科学院基础医学研究所

(72)发明人 刘雪姣 贾露露 高友鹤 李明喜
李雪梅 李学旺

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟

(51)Int.Cl.
G01N 1/40(2006.01)

页.

CN 101177715A ,2008.05.14,说明书第5页,10页.

CN 101799421A ,2010.08.11,全文.

WO 2010/131140A1 ,2010.11.18,全文.

CN 1877289A ,2006.12.13,说明书第1-2页.

US 2005/0014203A1 ,2005.01.20,全文.

崔莲仙等.用硝酸纤维素膜固定的蛋白质制备单特异性抗体.《基础医学与临床》.1993,第13卷(第6期),55-57.

T.I.PRISTOUPIL et al..ON THE MECHANISM OF ADSORPTION OF PROTEINS TO NITROCELLULOSE IN MEMBRANE CHROMATOGRAPHY.《Journal of chromatography A》.1969,第42卷367-375.

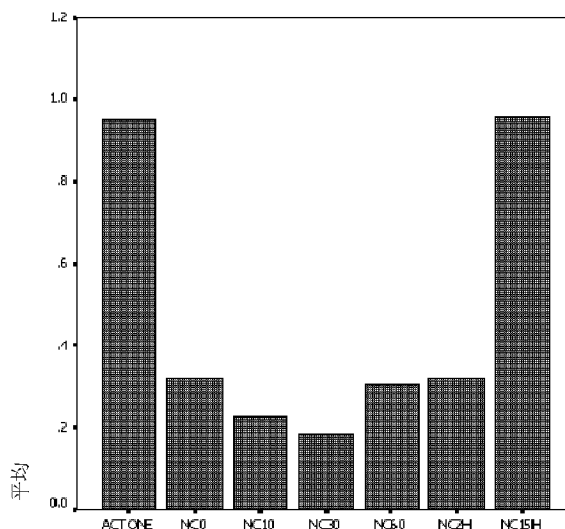
审查员 张晶

(56)对比文件
CN 1877289A ,2006.12.13,说明书第1-2

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称
硝酸纤维素膜富集体液蛋白质组蛋白的用途

(57)摘要
本发明涉及硝酸纤维素膜富集体液蛋白质组蛋白的用途,特别是硝酸纤维素膜富集尿液蛋白质组蛋白、血清蛋白质组蛋白、血浆蛋白质组蛋白、脑脊液蛋白质组蛋白和组织液蛋白质组蛋白的新用途。本发明还涉及使用硝酸纤维素膜富集体液蛋白质组蛋白的方法,以及富集体液蛋白质组蛋白的试剂盒。



1. 一种硝酸纤维素膜在制备富集体液蛋白质组蛋白膜制品中的应用,其中体液蛋白质组中至少一半种类的蛋白均被富集在硝酸纤维素膜上。

2. 根据权利要求1所述的硝酸纤维素膜在制备富集体液蛋白质组蛋白膜制品中的应用,其中体液蛋白质组中全部种类的蛋白的60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%均被富集在硝酸纤维素膜上。

3. 根据权利要求1所述的硝酸纤维素膜在制备富集体液蛋白质组蛋白膜制品中的应用,其中体液蛋白质组中全部种类的蛋白的95-100%均被富集在硝酸纤维素膜上。

4. 根据权利要求1所述的硝酸纤维素膜在制备富集体液蛋白质组蛋白膜制品中的应用,其中体液蛋白质组中的蛋白均以其天然含量成比例富集在硝酸纤维素膜上。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的硝酸纤维素膜在制备富集体液蛋白质组蛋白膜制品中的应用,其特征在于所述的体液蛋白质组蛋白包括尿液蛋白质组蛋白、血浆蛋白质组蛋白、血清蛋白质组蛋白、脑脊液蛋白质组蛋白和组织液蛋白质组蛋白。

6. 根据权利要求1至4任一项所述的硝酸纤维素膜在制备富集体液蛋白质组蛋白膜制品中的应用,其特征在于所述的体液蛋白质组蛋白包括将体液一次性通过硝酸纤维素膜所得的蛋白,或者将体液循环通过硝酸纤维素膜所得的蛋白。

7. 根据权利要求6所述的硝酸纤维素膜在制备富集体液蛋白质组蛋白膜制品中的应用,其中体液一次性通过硝酸纤维素膜的流速无限制,该流速为0.1ml/min~1000ml/min,其中体液循环通过硝酸纤维素膜的循环时间在15小时以下,体液在0~10℃下通过硝酸纤维素膜。

8. 根据权利要求7所述的硝酸纤维素膜在制备富集体液蛋白质组蛋白膜制品中的应用,其中体液在冰浴条件下通过硝酸纤维素膜;所述体液在通过硝酸纤维素膜前通过低速离心预先去除不溶物。

9. 根据权利要求1至4任一项所述的硝酸纤维素膜在制备富集体液蛋白质组蛋白膜制品中的应用,其特征在于所述的硝酸纤维素膜的孔径和孔径均一度无特殊要求,孔径为0.22μm或0.4μm;所述硝酸纤维素膜单层使用或多层叠加或多层分隔使用;硝酸纤维素膜的边缘形状无特殊要求,以能与配套容器配合使用、让体液仅通过硝酸纤维素膜膜孔通过为限。

10. 一种富集体液蛋白质组蛋白的方法,包括将体液通过硝酸纤维素膜以得到体液蛋白质组蛋白,其中体液蛋白质组中的至少一半种类的蛋白均被富集在硝酸纤维素膜上。

11. 根据权利要求10所述的富集体液蛋白质组蛋白的方法,其中体液蛋白质组中全部种类的蛋白的60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%均被富集在硝酸纤维素膜上。

12. 根据权利要求10所述的富集体液蛋白质组蛋白的方法,其中体液蛋白质组中全部种类的蛋白的95-100%均被富集在硝酸纤维素膜上。

13. 根据权利要求10所述的富集体液蛋白质组蛋白的方法,其中体液蛋白质组中的蛋白均以其天然含量成比例富集在硝酸纤维素膜上。

14. 根据权利要求10-13任一项所述的富集体液蛋白质组蛋白的方法,其特征在于所述的体液蛋白质组蛋白包括尿液蛋白质组蛋白、血浆蛋白质组蛋白、血清蛋白质组蛋白、脑脊液蛋白质组蛋白和组织液蛋白质组蛋白。

15. 根据权利要求10-13任一项所述的富集体液蛋白质组蛋白的方法,其特征在于所述的体液蛋白质组蛋白包括将体液一次性通过硝酸纤维素膜所得的蛋白,或者将体液循环通过硝酸纤维素膜所得的蛋白。

16. 根据权利要求15所述的富集体液蛋白质组蛋白的方法,其中体液一次性通过硝酸纤维素膜的流速无限制,该流速为0.1ml/min~1000ml/min,体液循环通过硝酸纤维素膜的循环时间在15小时以下,体液在0~10℃下通过硝酸纤维素膜。

17. 根据权利要求16所述的富集体液蛋白质组蛋白的方法,其中体液在冰浴条件下通过硝酸纤维素膜;所述体液在通过硝酸纤维素膜前通过低速离心预先去除不溶物。

18. 根据权利要求10至13任一项所述的富集体液蛋白质组蛋白的方法,其特征在于所述的硝酸纤维素膜的孔径和孔径均一度无特殊要求,孔径为0.22μm或0.4μm;所述硝酸纤维素膜单层使用或多层叠加或多层分隔使用;硝酸纤维素膜的边缘形状无特殊要求,以能与配套容器配合使用、让体液仅通过硝酸纤维素膜膜孔通过为限。

19. 一种用于执行权利要求10至13任一项所述的富集体液蛋白质组蛋白的方法的试剂盒,其包括硝酸纤维素膜、配套容器及使用该硝酸纤维素膜的说明书,其中使用时硝酸纤维素膜被置于配套容器中或者硝酸纤维素膜被预先置于配套容器中,以将配套容器分隔为上下两个或多个空间,从而使体液仅能通过膜从配套容器的一个空间进入另一个空间,以及可选地,将配套容器加压或减压的设备。

硝酸纤维素膜富集体液蛋白质组蛋白的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane,简称NC膜)的新用途,特别是硝酸纤维素膜富集体液,尤其是血清、血浆、尿液、脑脊液、组织液中的蛋白质组蛋白的新用途。

背景技术

[0002] 本领域技术人员熟知硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane,简称NC膜)在胶体金试纸中用做C/T线的载体,同时也是免疫反应的发生处。NC膜是生物学试验中最重要的耗材之一。其中它主要用于分子杂交。杂交技术有固相杂交和液相杂交之分。固相杂交技术目前较为常用,其中先将待测核酸结合到一定的固相支持物上,再与液相中的标记探针进行杂交。固相支持物常用硝酸纤维素膜。

[0003] NC膜是人类研究最早的微滤膜之一,至今已有百年的历史。NC属于纤维素衍生物的一种,有一定亲水性但不溶于水,可溶于有机溶剂,如丙酮,微溶于醇类,对核酸等大分子物质具有非特异性吸附作用。在生物学上的应用主要有酶联免疫斑点实验,分离DNA、RNA、内毒素、蛋白质等生物大分子物质,Southern斑点实验,Western斑点实验等。NC膜对蛋白质的吸附力分为两部分,即离子作用力和非离子作用力,主要来源于三种作用:(1)载体上所带的硝基所引起的永久偶极距与蛋白质分子上所带的极性基团所引起的多种静电吸附力,(2)氢键,(3)疏水作用力[1]。

[0004] 近年来蛋白质组学技术取得了很大进展,体液蛋白质组学由于包含了大量关于机体健康的信息,在临床上具有重要的影响,其中尿液蛋白质组学是体液蛋白质组学的一个重要组成部分。尿液采集简便易行,其中富含多种蛋白及小分子多肽,可以反映肾脏、膀胱、前列腺及其他系统的生理功能和疾病状态[2-4]。在疾病状态时,可能存在着尿蛋白量和尿蛋白成分的异常。因此,完全有可能将尿中出现的一些特殊蛋白成分作为特异性的“生物标志物”(biomarker),用于诊断疾病或监测疾病的进程。

[0005] 现有技术中富集尿蛋白的方法包括有机溶剂沉淀法、超速离心法、冻干法和超滤法等[5]。但是,现有的蛋白提取方法较为繁琐,大量的样品长期储存需占用较大空间。为了克服现有技术的不足之处,本发明探索用硝酸纤维素(nitrocellulose,NC)膜收集蛋白使之应用于临床蛋白质组学研究。

发明内容

[0006] 因此,本发明的第一方面涉及一种硝酸纤维素膜在制备富集体液蛋白质组蛋白膜制品中的应用,优选地,体液蛋白质组中至少一半种类的蛋白均被富集在硝酸纤维素膜上,更优选地,体液蛋白质组中全部种类的蛋白的60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%均被富集在硝酸纤维素膜上,更优选地,体液蛋白质组中全部种类的蛋白的95-100%均被富集在硝酸纤维素膜上,最优选地,体液蛋白质组中全部种类的蛋白的100%均被富集在硝酸纤维素膜上;优选地,体液蛋白质组中的蛋白

均以其天然含量成比例富集在硝酸纤维素膜上;优选地,体液蛋白质组蛋白中的白蛋白以相当于其天然存在比例更少的比例被富集。

[0007] 优选地,所述的体液蛋白质组蛋白包括尿液蛋白质组蛋白、血浆蛋白质组蛋白、血清蛋白质组蛋白、脑脊液蛋白质组蛋白和组织液蛋白质组蛋白。

[0008] 优选地,所述的体液蛋白质组蛋白包括将体液一次性通过硝酸纤维素膜所得的蛋白,或者将体液循环通过硝酸纤维素膜所得的蛋白,优选地,体液一次性通过硝酸纤维素膜的流速无限制,更优选地,该流速为0.1ml/min~1000ml/min,优选地,体液循环通过硝酸纤维素膜的循环时间在15小时以下,优选地,体液在0~10℃下通过硝酸纤维素膜,更优选地,体液在冰浴条件下通过硝酸纤维素膜;优选地,所述体液在通过硝酸纤维素膜前通过低速离心预先去除不溶物。

[0009] 优选地,所述的硝酸纤维素膜的孔径和孔径均一度无特殊要求,优选孔径为0.22 μ m或0.4 μ m;优选地,所述硝酸纤维素膜单层使用或多层叠加或多层分隔使用;优选地,硝酸纤维素膜的边缘形状无特殊要求,以能与配套容器配合使用、让体液仅通过硝酸纤维素膜膜孔通过为限。

[0010] 本发明的第二方面涉及一种富集体液蛋白质组蛋白的方法,包括将体液通过硝酸纤维素膜以得到体液蛋白质组蛋白,优选地,体液蛋白质组中的至少一半种类的蛋白均被富集在硝酸纤维素膜上,更优选地,体液蛋白质组中全部种类的蛋白的60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%均被富集在硝酸纤维素膜上,更优选地,体液蛋白质组中全部种类的蛋白的95-100%均被富集在硝酸纤维素膜上,最更优选地,体液蛋白质组中全部种类的蛋白的100%均被富集在硝酸纤维素膜上;优选地,体液蛋白质组中的蛋白均以其天然含量成比例富集在硝酸纤维素膜上;优选地,体液蛋白质组蛋白中的白蛋白以相当于其天然存在比例更少的比例被富集。

[0011] 优选地,所述的体液蛋白质组蛋白包括尿液蛋白质组蛋白、血浆蛋白质组蛋白、血清蛋白质组蛋白、脑脊液蛋白质组蛋白和组织液蛋白质组蛋白。

[0012] 优选地,所述的体液蛋白质组蛋白包括将体液一次性通过硝酸纤维素膜所得的蛋白,或者将体液循环通过硝酸纤维素膜所得的蛋白,优选地,体液一次性通过硝酸纤维素膜的流速无限制,更优选地,该流速为0.1ml/min~1000ml/min,优选地,体液循环通过硝酸纤维素膜的循环时间在15小时以下,优选地,体液在0~10℃下通过硝酸纤维素膜,更优选地,体液在冰浴条件下通过硝酸纤维素膜;优选地,所述体液在通过硝酸纤维素膜前通过低速离心预先去除不溶物。

[0013] 优选地,所述的硝酸纤维素膜的孔径和孔径均一度无特殊要求,优选孔径为0.22 μ m或0.4 μ m;优选地,所述硝酸纤维素膜单层使用或多层叠加或多层分隔使用;优选地,硝酸纤维素膜的边缘形状无特殊要求,以能与配套容器配合使用、让体液仅通过硝酸纤维素膜膜孔通过为限。

[0014] 本发明的第三方面涉及一种用于执行上述第二方面的富集体液蛋白质组蛋白的方法的试剂盒,其包括硝酸纤维素膜、配套容器及使用该硝酸纤维素膜的说明书,其中使用时硝酸纤维素膜被置于配套容器中或者硝酸纤维素膜被预先置于配套容器中,以将配套容器分隔为上下两个或多个空间,从而使体液仅能通过膜从配套容器的一个空间进入另一个空间,以及可选地,将配套容器加压或减压的设备。

[0015] 换言之,由于尿液等体液中某些蛋白的变化与疾病特别是肾脏的疾病的发生、发展有着密切的联系,通过体液蛋白质组学技术有可能发现疾病如肾脏疾病的早期诊断标志物。其中,尿液蛋白质组研究中尿液的收集及蛋白富集方法的选择直接影响后期鉴定的蛋白种类及疾病差异蛋白标志物的发现。

[0016] 目前富集体液蛋白质组蛋白如尿液蛋白质组蛋白的方法包括有机溶剂沉淀法、超速离心法、冻干法和超滤法等[5],但已有的方法都有一定的局限性。本领域技术人员曾对以上几种方法进行了比较,发现冻干法富集尿液蛋白的总量最多,但种类最少;超滤法富集蛋白的总量和种类都不是最好;有机溶剂沉淀法虽然富集尿蛋白总量稍逊于冻干法,但富集蛋白种类最多,且重复性较好[6]。还有人比较了几种不同的有机溶剂,综合富集蛋白总量、蛋白种类、重复性和分离效果,丙酮沉淀富集尿蛋白效果最佳[6,7]。

[0017] 因此,本发明尝试用硝酸纤维素膜(NC膜)来富集体液蛋白质组蛋白,尤其是尿液蛋白质组蛋白,并将其富集的蛋白与现有技术中丙酮沉淀法富集的蛋白进行比较,以评价本发明的尿蛋白富集效果。

[0018] 本发明发现NC膜能够快速富集蛋白,从0min-2h富集的蛋白量没有明显差异,15h富集的蛋白量最多且与丙酮沉淀所得蛋白量无明显差异。NC膜是第一种用来作为蛋白质吸附印迹的膜,蛋白质吸附到膜上的原因较多,目前的研究大多认为其作用力要是静电力、疏水力和化学键力。虽然在其理论方面已有一些研究工作,但具体的吸附机理依然是个未知数。有研究发现,温度较低时蛋白吸附量较大,随着温度的升高,蛋白吸附量下降。这是由于吸附过程多数是放热过程,故吸附量常随温度升高而下降。因此,考虑到蛋白富集量和蛋白降解等情况,本发明的研究均在冰浴下进行。现有技术中使用的硝酸纤维素膜都可以用于本发明。现有销售的NC膜品牌型号包括,但不限于:PALL(美国),MILLIPORE(美国),M135(有背衬/无背衬两种)M180(有背衬/无背衬两种,WHATMAN and SS,Puraband impuraband, SARTORIUS(德国),CN140,伊能(国产),8um,6um,MDI(印度),8um,6um等等,国产的市售硝酸纤维素膜也可以使用,例如,上海今迈生物科技有限公司,北京普利莱基因技术有限公司,硝酸纤维素膜WB501(上海西唐生物技术有限公司生产的产品)。

[0019] 以尿液蛋白质组蛋白的富集为例,通过比较丙酮沉淀法、NC膜富集0min、NC膜富集15h富集蛋白的SDS-PAGE结果(图3)发现,NC膜可以明显减少白蛋白的富集。现有技术对蛋白溶剂pH对NC膜吸附蛋白的影响进行了研究,得出结论蛋白质吸附量在其等电点处吸附量最大。在等电点处,蛋白质分子净电荷为零,分子内的静电排斥力及分子间的相互作用出于最小状态,蛋白质就会失去稳定性,导致溶解度最小,吸附量最大。NC膜明显减少了白蛋白的富集,可能是因为白蛋白的等电点为4.5,而尿液的pH值范围一般为6.5-7.5,此时白蛋白带负电,而由于NC残留的羧基具有微弱的电荷交换能力,当pH>6.5时,NC膜也带负电荷,因此在碱性环境下蛋白质分子表面荷负电,膜表面也带微量负电,二者之间存在静电排斥力,致使只有少量白蛋白吸附在膜上。通过比较丙酮沉淀法、NC膜富集0min、NC膜富集15h富集蛋白的SDS-PAGE结果(图3),本发明还发现,与NC膜富集0min相比,NC膜富集15h,25KD以下的蛋白分子明显增多,且质谱鉴定结果显示NC膜富集0min和丙酮沉淀均能鉴定到500个左右蛋白,NC膜富集15h只鉴定到200个左右蛋白,因此推测15h时间过长,可能导致蛋白发生了降解。因此,虽然现有技术中有关于硝酸纤维素膜可以吸附蛋白质的相关报道,但本申请首次发现,NC膜可以快速、有效地富集体液特别是尿液蛋白质组的蛋白,所获得的蛋白质数

目与传统的丙酮沉淀法获得的蛋白质数目和比例均相仿,同时,所获得的蛋白质组蛋白中白蛋白的比例相对降低,所获得的数量足以进行相关的后续检测之用,但NC膜显然比丙酮沉淀等常规方法方便、快捷,所花费的费用也要远远低于传统的方法。

[0020] 本发明进一步比较了用NC膜富集并储存蛋白的效果,发现用NC膜储存蛋白与丙酮沉淀富集的蛋白个数相似,且NC膜富集尿液蛋白只需几分钟,而丙酮沉淀法则需要几个小时甚至过夜,因此可以通过NC膜快速富集尿液蛋白。通过比较NC膜储存蛋白与储蓄尿液所得到的蛋白数目,发现NC膜储存的蛋白,经质谱鉴定,所得蛋白数目多于直接储存尿液。因此,不仅可以应用NC膜来快速富集尿液蛋白,还可以应用NC膜来大量储存尿液蛋白,这样不但可以节省富集尿液蛋白的时间,还可以节省大量的储存空间,适用于大量标本的储存,有利于流行病学调查和临床标本的收集和保存。

附图说明

[0021] 图1为测定装置的示意图,其中圆圈代表蠕动泵,绿色箭头代表蠕动泵转动方向,红色部分代表NC膜所在位置。

[0022] 图2表示不同蛋白富集方法所得尿蛋白浓度变化,其中ACTONE:丙酮沉淀法富集的尿蛋白浓度;NC0-NC15H分别为NC膜法富集0min、10min、30min、60min、2h和15h所富集的尿蛋白浓度。

[0023] 图3表示不同富集方法所得尿蛋白SDS-PAGE电泳图,其中A1-3为丙酮沉淀法富集重复三次所得的尿液蛋白,N01-N03为NC膜法富集0min重复三次所得的尿液蛋白,N15H1-N15H3为NC膜法富集15h重复三次所得的尿液蛋白。

具体实施方式

[0024] 下面将通过下述非限制性实施例进一步说明本发明,本领域技术人员公知,在不背离本发明精神的情况下,可以对本发明做出许多修改,这样的修改也落入本发明的范围。

[0025] 下述实验方法如无特别说明,均为常规方法,所使用的实验材料如无特别说明,均可容易地从商业公司获取。

[0026] 实施例

[0027] 实施例1

[0028] 对象与方法

[0029] 1、样品收集

[0030] (1)收集健康男性和女性志愿者(年龄23-30岁)各2人空腹晨尿作为样品,每人250ML。

[0031] (2)离心5000g*30min去除细胞和碎屑等残渣,-80℃冻存。

[0032] 2、实验分组

[0033] 组1:丙酮沉淀尿蛋白组;

[0034] 组2:NC膜富集尿蛋白组,根据富集时间又分为:0min,10min,30min,1h,2h,15h。

[0035] 3、尿蛋白的富集:

[0036] (1)丙酮沉淀尿蛋白组:取尿液20ML,按尿液与丙酮体积比1:3加入-20℃预冷的丙酮,4℃沉淀过夜,14000×g离心30min,保留沉淀,用细胞裂解液(7M尿素,2M硫脲,1%DTE,

5%Tris)1ML复溶蛋白,14000×g离心10-15min,保留上清,-80℃冻存,重复3-4次。

[0037] (2)NC膜富集法组:参见附图1,标本取尿液各20ML,冰浴中将尿液按10ml/min通过NC膜,分别循环0min(一次性通过),10min,30min,1h,2h,15h,裂解液溶解在市售的NC膜(北京普利莱基因技术有限公司生产的硝酸纤维素膜(NC)孔径为0.22μm,货号为P2110)。结合的尿蛋白,14000g离心10-13min,保留上清,-80℃冻存,每个时间段均重复3次。

[0038] (3)冰冻尿液6个月后应用NC膜富集0min:上述去细胞后尿液,在-80℃冰冻6个月,取尿液20ML,按10ml/min通过NC膜0min,用裂解液溶解NC膜结合的尿蛋白,14000g离心10-13min,保留上清,重复3-4次。

[0039] (4)NC膜富集尿蛋白后冰冻6个月:取尿液20ML,按10ml/min通过NC膜0min,将富集有蛋白的NC膜冰冻6个月,后用裂解液溶解NC膜结合的尿蛋白,14000g离心10-15min,保留上清,重复3-4次。

[0040] 4、尿蛋白浓度测定:应用Bradford法[8]测定蛋白浓度。

[0041] 5、1D-SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法比较丙酮沉淀组与NC膜富集尿蛋白组内的0min和15h所富集的尿蛋白的差异。

[0042] (1)凝胶配制

[0043]

	分离胶 12% (15ml)	聚集胶 5% (5ml)
水	4.9	4.1
30%聚丙烯酰胺	6	1
Tris-HCl 缓冲液	1.5mol/L pH8.8 3.8	1.0mol/L pH6.8 0.75
10%SDS	0.15	0.06
10%APS	0.15	0.06
TEMED	0.06	0.06

[0044] (2)1D-SDS-PAGE电泳:80V电压30min,120V电压90min。

[0045] (3)SDS-PAGE凝胶蛋白染色:用考马斯亮蓝染液(0.5g R-250,225ML甲醇,225ML去离子水,50ML冰醋酸)染色120min,用考马斯亮蓝染色脱色液(50ML甲醇,50ML冰醋酸,400ML去离子水)脱色过夜,脱色后蛋白条带呈蓝色。

[0046] 6、蛋白酶切:

[0047] 酶切及肽段除盐采用Mann的方法[9]。

[0048] (1)取组I、组II和组III混合后蛋白样品各100μg,分别加入10-kDa超滤管中(microcon YM-10,Millipore),14000g离心至膜上无液体;

[0049] (2)向超滤管中加入50mM碳酸氢氨溶液100μl,14000g离心至膜上无液体,重复两次;

[0050] 向超滤管中加入100μl 20mM DTT,水浴56℃孵育60min;

[0051] (3)向超滤管中加入1M碘乙酰胺至终浓度50mM,室温下避光孵育30min,14000g离心至膜上无液体,重复步骤(2);

[0052] (4)将超滤膜转移至新的收集管,加入50μl 50mM碳酸氢氨溶液,按胰酶与蛋白1:

50的比例加入胰酶,37℃水浴孵育过夜;

[0053] (5)按胰酶与蛋白1:100的比例加入胰酶,37℃水浴孵育4小时,14000g离心至膜上无液体;

[0054] (6)加入50 μ l 0.5M NaCl,14000g离心至膜上无液体,收集管中液体即为酶切得到的肽段。

[0055] 7、肽段脱盐

[0056] (1)用1ml甲醇清洗Oasis反相柱;

[0057] (2)加入1ml 70%乙腈/0.1%甲酸水清洗;

[0058] (3)加入1ml 0.1%甲酸水平衡;

[0059] (4)将酶切产物上样至Oasis反相柱,待液体自然滴净;

[0060] (5)用1ml 0.1%甲酸水清洗脱盐;

[0061] (6)加入1ml甲醇洗脱吸附于Oasis柱上的多肽,自然滴入1.5mlEp管收集洗脱液;

[0062] (7)真空离心浓缩抽干样品,保存于-80℃冰箱,实验前将样品溶于适量0.1%甲酸水中,浓度调整到5 μ g/ μ l,以备后续液相色谱分离。

[0063] 8、肽段分离及鉴定:

[0064] (1)反向液相色谱分离:10 μ g酶切后样品经Agilent 1200高效液相色谱自动加样器以流速20 μ l/min加入反相Trap柱(Zorbax300SBC18,0.3 \times 5mm,Agilent Technologies, Wilmington,DE),缓冲液为0.1%甲酸水,通过六通阀转换,进行RP色谱柱(0.1 \times 150mm, MagicC18,5 μ m,100 \AA ;Michrom Bioresources,Auburn,USA)分离。洗脱时间60min,色谱柱流速为0.5 μ l/min。RP柱洗脱梯度为5~30%流动相B(流动相A为:0.1%甲酸+2%乙腈+97.9%水;流动相B为:0.1%甲酸+99.9%乙腈)40min,30-95%流动相B 1min,95%流动相B维持5min,95%-5%流动相B 1min,5%流动相B维持13min。

[0065] (2)质谱鉴定:反相柱洗脱下的多肽应用LTQ Orbitrap Velos离子阱串联质谱进行鉴定,Michrom ESI喷雾源,质谱数据采集为数据依赖模式。全扫描m/z范围:300-2000,一个全扫描后对丰度最高的二十个离子进行碎裂并二级扫描,分离宽度:3m/z,动态排除时间:1min。全扫描过程在Orbitrap检测器中进行,母离子分辨率为60000,整个扫描过程把m/z为445.120025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:10ms。

[0066] 9、数据处理:

[0067] 二级质谱结果用Mascot(v2.3.02)进行数据库检索,所用数据库为ipi.human.v3.81。针对非标记定量检索条件为:胰酶酶切,允许有2个漏切位点,半胱氨酸+57Da的固定修饰,检索容许误差5ppm;大于或等于一个特异性肽段匹配的,并且蛋白鉴定可信度>0.99(假阳性率1%)的蛋白被认为是样品中存在的蛋白。

[0068] 10、统计学分析:

[0069] 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验,使用SPSS11.0。

[0070] 结果

[0071] 1、NC膜能够快速富集尿液蛋白,NC膜富集尿液蛋白组中,富集0min-2h,富集的蛋白量无显著差异($P>0.05$),15h富集的尿蛋白量最多($P<0.05$)。丙酮沉淀法富集的蛋白量较NC膜富集0min-2h多($P<0.05$),较NC膜法富集15h无显著差异($P=0.953$)。(参见图2)

[0072] 2、与丙酮沉淀法相比,NC膜富集0min和15h得到的尿液蛋白明显减少了白蛋白的富集。(参见图3)

[0073] 3、由于结果1中显示,NC膜富集0min至富集2h蛋白总量没有明显变化,NC膜富集15h所得蛋白量最多。因此在后续蛋白质谱鉴定时,对以下五组蛋白进行了质谱鉴定:丙酮沉淀富集的尿蛋白、NC膜富集0min后的尿蛋白、NC膜富集15h后的尿蛋白、尿液冰冻6个月后NC膜富集0min的尿蛋白和NC膜富集蛋白后冰冻6个月后所得的尿蛋白。其中,每组重复3次,每次重复进行一次质谱鉴定,共进行15次质谱鉴定。质谱鉴定结果如表1。其中,NC膜富集蛋白后冰冻6个月后鉴定到得蛋白数目,与丙酮沉淀所得蛋白数目相似($P=0.134$),多于冰冻尿液所得蛋白($P=0.006$)。

[0074]

表 1:

	蛋白质数			三次共同鉴定 蛋白	蛋白总数	蛋白重复 率	肽段数			肽段总数
	1	2	3				1	2	3	
丙酮沉淀	518	526	532	433	629	0.824	2118	2143	2219	2565
NC膜 0min	443	492	504	329	640	0.686	1856	2087	2209	2825
NC膜 15h	288	159	173	125	323	0.605	1094	520	543	1164
冻尿	486	471	500	430	657	0.885	2067	1769	2015	2779
冻膜	535	546	530	372	620	0.693	2227	2150	2149	2565

[0075] 注:丙酮沉淀:按尿液与丙酮体积比1:3富集过夜所得蛋白;NC膜0min:冰浴中将尿液按10ml/min通过NC膜0min(一次性通过)所得蛋白;NC膜15h:冰浴中将尿液按10ml/min循

环通过NC膜15h所得蛋白;冻尿:去细胞后尿液,在-80℃冰冻6个月后,将尿液按10ml/min通过NC膜0min所得蛋白;冻膜:取尿液按10ml/min通过NC膜0min,将富集有蛋白的NC膜冰冻6个月后所得蛋白。

[0076] 本发明同时还进行了其他体液样品如血清、血浆、脑脊液、组织液的蛋白质组蛋白的NC膜富集研究,结果证明NC膜均可以有效地富集其中的蛋白质组蛋白,由于这些实验与用NC膜富集尿液蛋白质组蛋白的方法高度重复,在此不再赘述。

[0077] 本领域技术人员公知,在不违背本发明精神的情况下,可以对本发明的技术方案做出各种修改,这样的修改也落入本发明的范围。例如,体液样品可以从膜下部的空间进入膜上部的空间,体液样品可以进行适当的浓缩或稀释后再行富集,以避免样品体积过大或样品浓度过高,膜的一侧或两侧可以附加无蛋白吸附能力的固体支撑物,以利于在较高的流速和压力条件下进行蛋白富集;本发明的富集装置可以单独使用,也可以作为另一系统的蛋白富集组件而存在;本发明的富集装置可以串联或并联使用。

[0078] 参考文献

[0079] 1.Pristoupil,T.I.,M.Kramlova,and J.Sterbikova,On the mechanism of adsorption of proteins to nitrocellulose in membrane chromatography.J Chromatogr,1969.42(3):p.367-75.

[0080] 2.Pisitkun,T.,R.Johnstone,and M.A.Knepper,Discovery of urinary biomarkers.Mol Cell Proteomics,2006.5(10):p.1760-71.

[0081] 3.Barratt,J.and P.Topham,Urine proteomics:the present and future of measuring urinary protein components in disease.CMAJ,2007.177(4):p.361-8.

[0082] 4.Goligorsky,M.S.,F.Addabbo,and E.O'Riordan,Diagnostic potential of urine proteome:a broken mirror of renal diseases.J Am Soc Nephrol,2007.18(8):p.2233-9.

[0083] 5.Thongboonkerd,V.,et al.,Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation.Kidney Int, 2002.62(4):p.1461-9.

[0084] 6.Thongboonkerd,V.,S.Chutipongtanate,and R.Kanlaya,Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics:quantity,quality,and variability.J Proteome Res,2006.5(1):p.183-91.

[0085] 7.Thongboonkerd,V.,Practical points in urinary proteomics.J Proteome Res,2007.6(10):p.3881-90.

[0086] 8.Bradford,M.M.,A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.Anal Biochem,1976.72:p.248-54.

[0087] 9.Wisniewski,J.R.,et al.,Universal sample preparation method for proteome analysis.Nat Methods,2009.6(5):p.359-62.

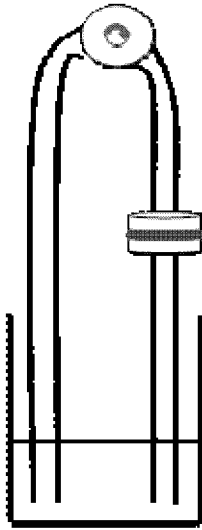


图1

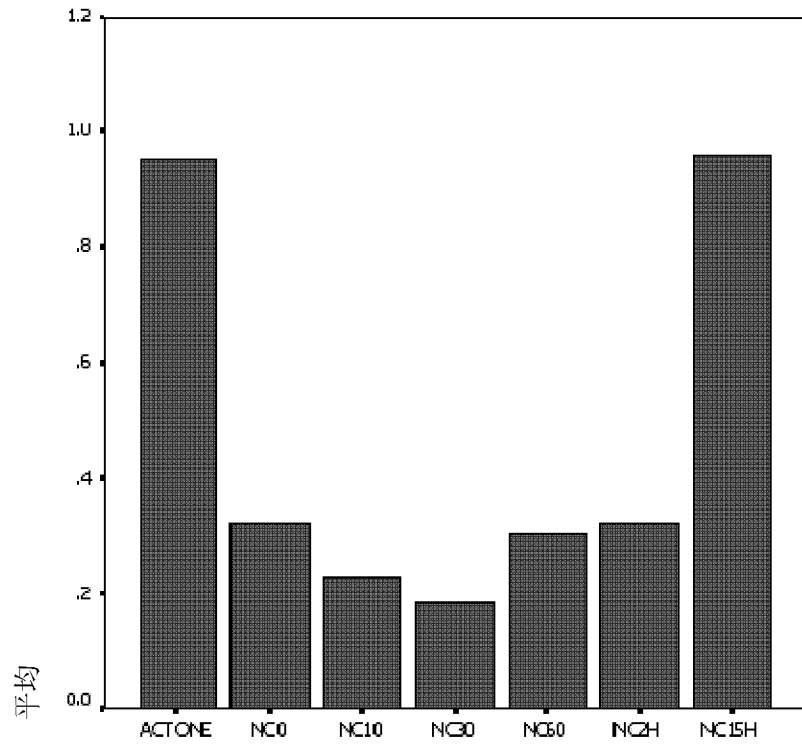


图2

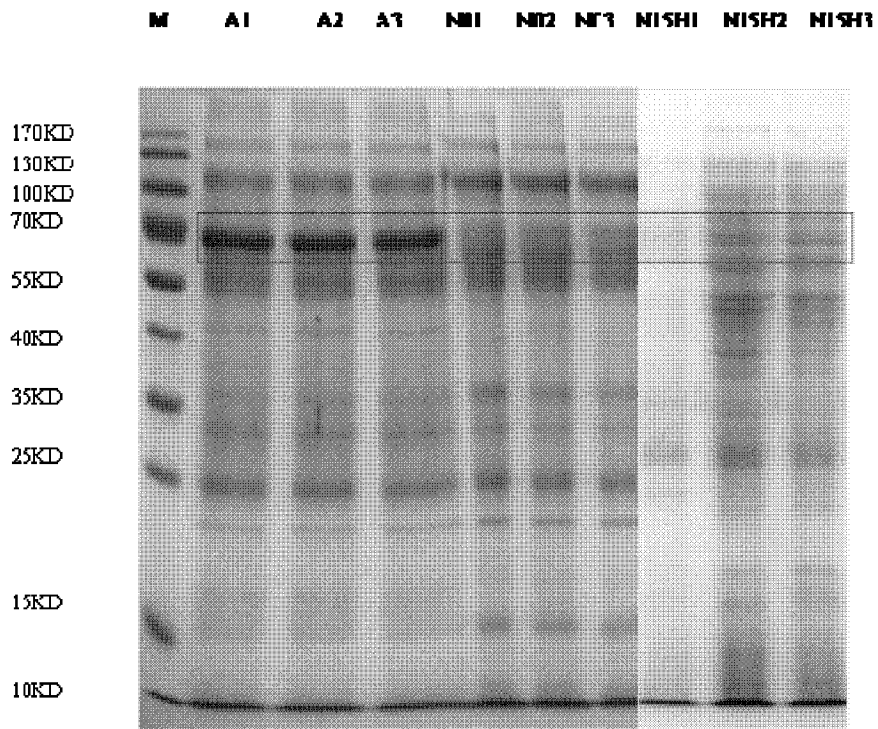


图3