一种家用收集和保存尿液蛋白质的方法

秦伟伟, 王婷, 黄鹤, 高友鹤*

北京师范大学生命科学院基因工程药物及生物技术北京市重点实验室, 北京 100875

* 联系人, E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn

收稿日期: 2017-08-01; 接受日期: 2017-09-26; 网络版发表日期: 2018-01-29

国家重点研发计划(批准号: 2016YFC1306300)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB530805)、北京自然科学基金(批准号: 7173264, 7172076)、中央高校基本科研业务费专项资金资助(批准号: 2015KJJC21)、北京合作建设项目(批准号: 110651103)和北京师范大学项目(批准号: 11100704)资助

摘要 尿液是研究疾病早期标志物的重要来源. 大规模收集尿液样本, 建立尿液生物样本库具有长远的科学意义. 本实验室曾提出用膜来吸附尿液蛋白质并干燥真空保存的方法. 该方法具有经济便捷、占用存储空间小、样本可室温保存等特点, 但所需设备以及操作, 仅适应于实验室. 为方便全国各地的患者在家自行收集、保存尿液, 并将样本室温运输, 在此提出一种滤器联合注射器的简易装置. 注射器提供压力, 使尿液依次通过滤器内两层膜. 第一层聚偏二氟乙烯膜隔离尿液中的细胞及碎片, 第二层硝酸纤维素膜吸附尿液中蛋白质. 结果显示, 聚偏二氟乙烯膜有效地去除了尿液中细胞及碎片, 具有很好的技术重复性. 样本可室温保存10天, 使样本远距离运输更加经济方便.

关键词 尿液, 家用收集, 室温保存, 生物样本库

生物标志物是与生理或病理生理过程相关的可监测的变化, 其本质是变化^[1]. 尿液是血液经肾小球滤过、肾小管重吸收和分泌生成. 尿液作为机体的代谢废物, 不受内环境稳态机制调节, 比血液包含更多反映机体变化的信息^[1,2]. 据Urinary Protein Biomarker Database (6/29/2017更新)显示^[3], 有924个尿液候选蛋白质标志物与159种疾病相关. 除泌尿系疾病, 尿液还可以反映全身各系统疾病状态, 如脑部疾病、心脏衰竭、小肠出血^[4-7]. 因此, 尿液作为挖掘早期生物标志物的重要生物样本, 应与临床病历在疾病的各个阶段一同保存下来.

本实验室提出了用膜保存尿液中生物成分的方法,

将尿液中的生物成分吸附在膜上(硝酸纤维素膜吸附蛋白质, 尼龙膜吸附核酸), 将吸附有生物成分的膜干燥并真空保存^[8,9]. 相较传统的超低温冻存液体尿液样本方法, 该方法经济便捷、占用存储空间小、避免样品降解, 使大规模收集、存储尿液样本成为可能. 但该方法及其设备更适合专业人员于实验室操作. 为方便全国各地的患者在家自行收集、保存尿液, 并且将样本室温运输, 一种更加简单的方法亟待提出.

本文提出一种滤器联合注射器的简易装置. 注射器提供压力, 使尿液依次通过滤器内两层膜. 第一层聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜隔离尿液中的细胞及碎片, 第二层硝酸纤维素(nitrocellulose,

引用格式: 秦伟伟, 王婷, 黄鹤, 等. 一种家用收集和保存尿液蛋白质的方法. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 556-561

Qin W W, Wang T, Huang H, et al. A method for collecting and preserving urine protein in household (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 556-561, doi: 10.1360/N052017-00178

NC)膜吸附尿液中蛋白质. 将结合有蛋白质的NC膜与干燥剂一同放入密封袋中, 室温存放. 本文旨在评估该方法的技术重复性、隔离膜的隔离效果以及室温存放时间.

1 材料与方法

1.1 材料

可换膜滤器(内径47 mm)、NC膜(0.22 μm)、PVDF膜(0.45 μm)购自Millipore公司(美国). 黄金胰酶购自Promega公司(美国). 碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)购自Sigma公司(美国). Oasis HLB小柱购自Waters(美国). 其他试剂均为分析纯级别.

1.2 方法

(1) 伦理学声明. 在采集尿液样本前, 每一位受试者被口头告知该研究项目的风险与预期利益, 并签署知情同意书. 该项目经中国医学科学院基础医学研究所伦理委员会审查通过(项目编号: 018-2013).

(2) 尿液收集和处理. 收集4位健康受试者(2男2女, 24~28岁)随机混合尿液样本约200 mL. 实验设计如图1A. 一部分尿液4℃离心30 min, 5000 $\times$ g, 去除细胞及碎片保留上清, 分成3份(每份20 mL). 将每一份尿液样本按照以前提出的适合于实验室操作的方法保存到NC膜^[8]. 未离心的尿液分成6份(每份20 mL), 用本文提出的家用膜方法保存(图1B). 详细过程如下: (i) 组装. 在可换膜滤器中间放两张膜, PVDF膜和NC膜(为评估PVDF膜的隔离效果, 其中有3份尿液在保存时只放一层NC膜). (ii) 注射器推注20 mL尿液依次通

过滤器中的PVDF膜和NC膜. (iii) 将吸附有蛋白质的NC膜取出, 与纤维覆膜干燥剂(约10 cm^2)一同密封保存在塑料袋中, 室温存放10天.

(3) 尿蛋白质提取和酶解. 用加热洗脱的方法^[10], 将吸附在NC膜上的蛋白质洗脱下来. 取200 μg 尿蛋白质, 进行膜辅助溶液内酶解^[11]. 加入终浓度4.5 mmol/L DTT还原肽键37℃, 60 min, 10 mmol/L IAA烷基化肽键残基室温避光30 min, 最后按照蛋白质与胰酶质量比50:1加入胰酶、37℃过夜. 酶解后多肽混合物用Oasis HLB小柱萃取纯化, 冻干后低温存储备用.

(4) LC-MS/MS分析. 将胰酶酶解后肽段溶于0.1%甲酸溶液, BCA法测肽段浓度. 每个样品500 ng多肽混合物经高效液相色谱(Thermo EASY-nLC 1200 HPLC, 美国)分离: Trap柱(75 $\mu\text{m}\times 2\text{ cm}$, 3 μm , C18, 100 Å)捕获富集, 反相分析柱(50 $\mu\text{m}\times 15\text{ mm}$, 2 μm , C18, 100 Å)分离. 线性洗脱梯度时间为60 min (A相: 0.1%甲酸, B相: 80%乙腈), 流速为0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$. 洗脱下来的肽段经Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, 美国)质谱仪分析鉴定. 仪器参数设置为: 一级全扫描范围为350~1550 m/z , 分辨率为120000; 二级扫描HCD碎裂能量30%, 分辨率30000, 采集模式为高速度模式, 动态排除时间为60 s. 每个样品做3次技术重复.

(5) 数据处理. 所有二级质谱结果用Maxcot^[12] (Matrix Science公司, 版本2.4.0, 美国)软件进行数据库检索. 所用数据库为Swissprot_human database (20214条记录). 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脲基甲基化; 可变修饰为蛋白质N末端乙酰化和蛋氨酸氧化; 母离子和子离子质量精确度分别为 10×10^{-6} 和0.02 Da. 将检索结果导入Scaffold (版本4.4.0)软件进行处理, 肽段水平假阳性率(FDR)<1%^[13], 每个蛋白至少鉴定到1条肽段.

图1 实验设计(A)和家用膜方法工作示意图(B)

2 结果和讨论

2.1 SDS-PAGE分析3种方法所保存的蛋白质样本

离心是去除尿液中细胞及细胞碎片的常用方法^[14]。为方便受试者在家操作, 本实验提出用PVDF膜来隔离去除尿液中细胞及碎片。为评估该家用收集方法的技术重复性, 以及隔离膜的隔离效果, 实验设计如图1A。

将3种方法所保存的尿蛋白质样本进行SDS-PAGE分析, 结果如图2。结果显示, 经过方法2、3保存的蛋白质样本, 条带清晰锐利, 无明显蛋白质降解, 即室温保存10天不会造成蛋白质样本的明显降解。经方法3保存样本(添加PVDF膜来去除细胞和碎片), 相较没有隔离膜的方法2和离心去除细胞及碎片的方法1保存的样本, 在分子量120 kD附近的条带丰度最低。同时, 经方法3收集保存的所有样本, 其条带无明显差异, 显示该方法具有很好的技术重复性。

图2 SDS-PAGE分析3种方法保存的尿蛋白质样本

方法1: 尿液离心; 方法2: 尿液未离心, 不加隔离膜; 方法3: 尿液未离心, 加隔离膜

2.2 LC-MS/MS定性和定量分析

为进一步评估家用膜收集保存方法中PVDF膜的隔离效果, 以及该方法的技术重复性, 对3种方法保存的样本进行LC-MS/MS非标记定性和定量分析。

(1) 3种不同方法保存尿液样本鉴定到蛋白质数目。经方法1保存的3个样本, 每个样本在3次质谱重复鉴定中均鉴定到蛋白质数分别为850, 883, 873 (图3)。同时, 经方法2和方法3保存的样本分别鉴定的蛋白质数为945, 990, 941, 872, 864, 872 (图3)。结果显示, 方法1和方法3在保存蛋白质数目上无明显差异, 方法2所保存的蛋白质种类最多。与SDS-PAGE分析结果比较, 方法3保存的样本在120 kD分子量附近高峰蛋白少, 但质谱没有明显的去除高峰蛋白抑制作用效果。一方面SDS-PAGE分析考马斯亮蓝(R250)染色定量分析时, 对高浓度蛋白的定量不准确。另一方面, 本实验中一维质谱鉴定深度较浅, 没有明显的去除高峰蛋白抑制作用效果。方法2未加隔离膜, 没有去除细胞及碎片, 所以鉴定方法2保存的样本鉴定到蛋白质种类多于方法1与方法2保存的样本。

(2) PVDF膜的隔离效果。鉴于从结合有尿蛋白质的NC膜上洗脱蛋白质的方法简单快捷、技术重复性稳定^[10], 同时从PVDF膜上洗脱蛋白质的方法复杂、回收率低^[8], 因此设计了以上实验(图1A)。方法2是用一层NC膜保存未离心的尿液, 即拦住了尿中所有的蛋白, 以及细胞和碎片。方法3用两层膜(PVDF+NC), 经PVDF拦截之后, 再经过NC膜。理论上, 只要将方法2鉴定到的蛋白减去方法3鉴定到的蛋白, 就是PVDF拦截到的。同时, 方法1用一层NC膜保存离心的尿液, 即保存了去除细胞和碎片之后的尿蛋白质。理论上, 如

图3 3种不同方法保存尿液样本鉴定到蛋白质数目

果PVDF膜能够去除细胞即碎片,那么方法3与方法1在鉴定蛋白质种类和丰度上是相似的。

经方法2保存的3个样本,每个样本3次质谱重复鉴定(共9次鉴定)任意一次鉴定中鉴定到的蛋白质,在方法1与方法3各9次鉴定样品中均没有鉴定到的蛋白质有262种(网络版附表1)。这262种蛋白质在方法3保存的样品中未被鉴定到,是PVDF膜的隔离去除效果。同时,方法1保存的3个样本,每个样本3次质谱重复鉴定(共9次鉴定)任意一次鉴定中鉴定到的蛋白质,在方法3保存的9次鉴定样品中均未鉴定到的蛋白质种类为0。方法3保存的3个样本,每个样本3次质谱重复鉴定(共9次鉴定)任意一次鉴定中鉴定到的蛋白质,在方法1保存的9次鉴定样品中均未鉴定到的蛋白质只有1种(网络版附表2)。以上结果显示,方法1与方法3所保存的样本在蛋白质的种类上是非常相似的,即方法3中隔离膜(PVDF膜)起到了与方法1中离心步骤相似的去细胞及碎片的效果。

为进一步评估方法1与方法3的相似性,对3种方法保存的3个样本,每个样本3次质谱重复鉴定的27次鉴定样品进行非监督聚类^[15]。结果显示,同一种方法保存3个样本,每个样本3次质谱重复鉴定共9次鉴定样品能够非常好地聚集在一起(图4A)。同时,方法1与

方法3两种方法所保存的样本,其质谱鉴定蛋白质结果更相似。

为进一步评估方法3中PVDF膜的隔离效果,即方法1与方法3的相似性,对任意两种方法保存样本鉴定到的每一种蛋白质丰度计算线性相关系数(图4B,网络版附1A和B)。结果显示,方法1与方法3的线性相关系数(R^2)是0.9,方法1与方法2的线性相关系数(R^2)0.84是,方法2与方法3的线性相关系数(R^2)是0.63,即方法3与方法1更相似。

(3) 方法3(家用膜保存法)技术重复性。为评估方法3的技术重复性,比较方法1与方法3分别保存的3个样本鉴定蛋白质丰度的变异系数(CV值)。结果显示,方法1保存的3个样本鉴定蛋白质有90.7%其丰度CV值<30%,方法3保存的3个样本为89.3%(图4C),即方法3的技术重复性很好。为避免引入技术差异,建议在同一个实验中用同一种保存方法。

3 结论

方法2(未离心尿液,未加隔离膜)保存的样本,检测到最多种类的蛋白质。方法3(未离心尿液,加隔离膜)保存样本鉴定到的蛋白种类以及丰度,与方法1(尿液离心)相似,即PVDF膜达到了去除细胞及碎片的隔

图4 3种不同方法保存样本所鉴定到蛋白质的丰度

A: 3种方法鉴定的全部蛋白质非监督聚类(C: 方法1; E: 方法2; F: 方法3); B: 方法1和方法3鉴定蛋白质丰度线性相关系数; C: 方法1和方法3鉴定蛋白质丰度变异系数(CV值)分布

离效果。据报道, 尼龙膜可以很好地吸附尿液中核酸^[9], 因此将本实验方法3中的NC膜换成尼龙膜可收集保存尿液中核酸。

据SDS-PAGE和LC-MS/MS分析结果显示, 方法3

所保存的样品在室温存放10天后, 蛋白质没有出现明显的降解, 并且具有很好的技术重复性。提示该方法方便样本长途室温运输, 可取代昂贵的全程冷链运输, 从而使大规模长期收集尿液样本更加便捷。

参考文献

- 1 Gao Y H. Urine—an untapped goldmine for biomarker discovery? *Sci China Life Sci*, 2013, 56: 1145–1146
- 2 Li M L, Zhao M D, Gao Y H. Changes of proteins induced by anticoagulants can be more sensitively detected in urine than in plasma. *Sci China Life Sci*, 2014, 57: 649–656
- 3 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: M111.010975
- 4 An M, Gao Y. Urinary biomarkers of brain diseases. *Genomics, Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13: 345–354
- 5 Thuijls G, van Wijck K, Grootjans J, et al. Early diagnosis of intestinal ischemia using urinary and plasma fatty acid binding proteins. *Ann Surgery*, 2011, 253: 303–308
- 6 Liu L, Zheng C X, Peng S F, et al. Evaluation of urinary S100B protein level and lactate/creatinine ratio for early diagnosis and prognostic prediction of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neonatology*, 2010, 97: 41–44
- 7 Chugh S, Ouzounian M, Lu Z, et al. Pilot study identifying myosin heavy chain 7, desmin, insulin-like growth factor 7, and annexin A2 as circulating biomarkers of human heart failure. *Proteomics*, 2013, 13: 2324–2334
- 8 Jia L L, Liu X J, 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: 336–339
- 9 Zhang F, Cheng X, Yuan Y, et al. Urinary microRNA can be concentrated, dried on membranes and stored at room temperature in vacuum bags. *PeerJ*, 2015, 3: e1082
- 10 Qin W W, Gao Y H. Elution of urinary proteins preserved on nitrocellulose membrane with heating. *Chin J Biotech*, 2015, 31: 6
- 11 Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Meth*, 2009, 6: 359–362
- 12 Perkins D N, Pappin D J C, Creasy D M, et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 1999, 20: 3551–3567
- 13 Elias J E, Gygi S P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Meth*, 2007, 4: 207–214
- 14 Thongboonkerd V, McLeish K R, Arthur J M, et al. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int*, 2002, 62: 1461–1469
- 15 Caraux G, Pinloche S. PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics*, 2005, 21: 1280–1281

A method for collecting and preserving urine protein in household

QIN WeiWei, WANG Ting, HUANG He & GAO YouHe

Beijing Key Laboratory of Genetic Engineering Drugs and Biotechnology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Urine is a good source for identifying novel biomarkers. Urine samples should be comprehensively collected and preserved. Therefore, we established an urimem method in which urinary proteins were adsorbed onto membranes, following which the membranes were dried and stored in a vacuum bag. This method is economical, and samples can be stored at room temperature. In addition, it is more suitable in laboratories. For collecting urine samples of patients at home, a simple, easy to use method is necessary. The kit used in this method comprises a filter coupled with a syringe. The syringe was used as a pressure generator to pass the urine through the filter, which contained two membranes. The polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane was used for isolating cells, and the nitrocellulose (NC) membrane was used for adsorbing proteins. After adsorption, the NC membrane was placed in a sealed plastic bag with a drying agent and stored at room temperature for 10 days. To assess the stability of the urimem method, SDS-PAGE and LC-MS/MS were performed to qualitatively and quantitatively analyze the proteins that were eluted from the membrane. The results showed that the method was reproducible. This method is highly accessible and convenient for patients to collect urine by themselves at home. Furthermore, it facilitates sample transportation and may be beneficial for identifying research biomarkers in urine.

urine, domestic collection, room temperature preservation, biobanking

doi: [10.1360/N052017-00178](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052017-00178)