嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告

特定尿液蛋白質做為疾病標記物之探討

計畫編號：CNBT-93-01

執行期間：民國 93 年 1 月 1 日至民國 93 年 12 月 31 日止

主　持　人：葉東柏　(E-mail: idongyeh@mail.chna.edu.tw)

執行單位：生物科技系

中　華　民　國　94　年　2　月　28　日

嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告

特定尿液蛋白質做為疾病標記物之探討

計畫類別：■個別型計畫　　□整合型計畫

計畫編號：CNBT-93-01

執行期間：93 年 01 月 01 日至 93 年 12 月 31 日

主 持 人：葉東柏　教授　　嘉南藥理科技大學生物科技系

E-mail: idongyeh@mail.chna.edu.tw

一、中文摘要

從健康及糖尿病病患之志願者之尿液，經由丙酮沉澱、超過濾或超高速離心等方法分離出尿液蛋白質，藉由定量及 SDS-PAGE 比較不同方法的蛋白質回收率。再探討雙向的聚丙烯醯胺膠體電泳法（2D-PAGE）分離尿液蛋白質的較佳條件，進而建立正常人尿液蛋白質之電泳圖譜，並與糖尿病病患之電泳圖譜做比較，發現主要的差異在於 Zn-α2-GP, albumin 片段, IgG heavy /fibrinogen, amylase 及 α1-antitrypsin 等蛋白質明顯增加，而 kininogen 及 cathepsin 則下降。這些資料對於尿液蛋白質的蛋白體學分析應用於疾病的篩檢應具有相當的意義。

關鍵詞： 蛋白質尿液 蛋白質定量 SDS-PAGE　2D-PAGE

二、緣由、實驗設計與目的

尿液蛋白質的蛋白體學分析是一種具發展前景的新興技術，因為尿蛋白質可做為研究腎臟生理學、病理生理學，以及確定腎臟，甚或其他疾病的生物標記的。在以往的尿液蛋白鑑定中，西方墨點法及其他免疫學方法最爲成功。但是由於專一性抗體的可用性以及每個試驗中只能檢查幾個蛋白質，使得這些技術具有局限性，因而如能同時檢查大多數尿液蛋白質的特定變化，將成爲生化檢測技術上的重大突破。

在後基因體時代，蛋白體學分析已經有了相當程度的發展，從而用於微生物、細胞及組織蛋白質的大規模研究。通常，雙向的聚丙烯醯胺膠體電泳法（2D-PAGE）用於蛋白質的分離，而質譜分析法（MS）則用於蛋白質鑑定。應用這些技術，可以同時對多達 10,000 個的蛋白質點進行研究。但由於蛋白質含量不高，正常人尿液的蛋白體學資料目前仍然相當有限。

由於蛋白質多變的物理及化學特性，不可能用單一的蛋白質分離方法鑑定所有的蛋白質成分。本研究旨在設計正常人尿液蛋白體學之圖譜建立最佳的技術，初期將著重於比較數種可行的蛋白質濃縮技術(包括丙酮-TCA沉澱、超過濾及超高速離心法等)之優劣，蛋白質用量、去除核酸必要性及電泳條件等之探討，進

而比較正常人與第二型糖尿病患尿液蛋白質之差異。這些資料對於尿液蛋白質的蛋白體學分析應用於疾病的篩檢是相當重要的。

三、實驗材料與方法

主要設備

1.High speed refrigerated centrifuges: Jouan BR4i & Hitachi CR22G
2.Ultra filtration concentrating systems
3.Spectrophotometer
4.Isoelectric focusing system (Bio-Rad Mini 2-D electrophoresis Cell)
5.Refrigerator
6.Light microscope
7.Polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad Mini-Protean 3)
8.Image-Scanner(APB)
9.Digital Camera (Nikon 3400)

尿液收集

收集健康及糖尿病患之志願者之尿液，尿液檢體 (10mL) 加入 1mL 的蛋白酶-抑制劑的雞尾酒溶液 (0.1 mg/mL leupeptin, 0.1 mg/mL PMSF（phenylmethylsulfonyl fluoride 及 1 mM/L sodium azide 溶於 1 mol/L Tris，pH 6.8），並且立刻進行下列分離程序。

檢體製備

所有的分離步驟在 4℃下操作。檢體通過 0.34mm Whatman 層析法用的濾紙，然後以轉速 1,000 x g 離心五分鐘。之後除去細胞碎塊及細胞核。上清液用血液細胞計算器在顯微鏡下觀察沒有殘留的細胞或粒子。上清液以超過濾方式濃縮蛋白質。沉澱物或濃縮蛋白質以 250mM/L 蔗糖+10mM/L 三乙醇胺做成懸浮液。每個檢體的蛋白質濃度以 Bradford 方法呈色，並配合標準品(BSA)檢量線以測定蛋白質含量。樣品以小量分裝再冷凍備用。

第一相 2D-PAGE

樣品先以利用 Bio-Rad 公司商品化產品，或組裝的迷你毛細管 IEF 電泳裝置，但改變其膠體組成並將樣品直接與單體溶液在聚合前混合，樣本和 monomer solution 混合後脫氣 15 分鐘，加入 10%APS 和 TEMED 混勻並注入毛細管 (1x75mm)，凝膠後利用 500V 電源進行電泳約三小時。

第二相 2D-PAGE

首先製備 10% SDS-PAGE 膠體。在完成第一相的 IEF 電泳後，將膠體自毛細管中擠出，並置入 SDS-PAGE 膠體上。加入平衡液 (0.0625 M Tris HCl (pH 6.8)，2.3% SDS，5.0% β-ME，10% (v/v) glycerol 及少量的 bromophenol blue)，接著每片膠體以 15-30 mA 的電流進行第二相的電泳。

染色

染色法由 EMBL 銀染色法修改。膠體平板用 50%甲醇+5%醋酸固定 20 分鐘，接著用 50%甲醇沖洗 10 分鐘，再用去離子水作用 2 小時。用 0.02%鈉硫代硫酸鹽處理這些膠體 1 分鐘再用去離子水洗 1 分鐘重複 2 次。加入預冷的 0.1%硝酸銀溶液在 4℃下染色 20 分鐘。先用去離子水洗 1 分鐘重複 2 次，再以 0.04% formalin 溶於 2%碳酸鈉溶液作用 3 次(分別為 30 秒，90 秒，最後 90 秒)。再以 5% 醋酸洗一分鐘重複 2 次。最後膠體以 1% 醋酸保存，置於 4℃。

部分膠體樣品以 Imidazole-$ZnSO_4$ 進行負面染色，並與上述之銀染色法比較。

二維電泳圖譜之建立與比對

染色後之電泳圖譜經掃描後，儲存於電腦中，再以 Pharmacia 公司提供的軟體 (ImageMaster 2D Platinum) 分析比較之，以建立健康人與第二型糖尿病患者之蛋白質二維電泳圖譜。接著就發生變化之蛋白質，根據已確定之尿液蛋白質體圖譜進行比對，以找出與出現第二型糖尿病相關的指標蛋白質。

四、結果與討論

從健康及糖尿病病患之志願者之尿液，本實驗分別檢測兩個尿液檢體。經由先前的試驗顯示，發現超過濾的方法較丙酮沉澱簡便而且蛋白質的收率不會減少，(如下圖)甚至可提高來自糖尿病病患之尿液蛋白質濃度。

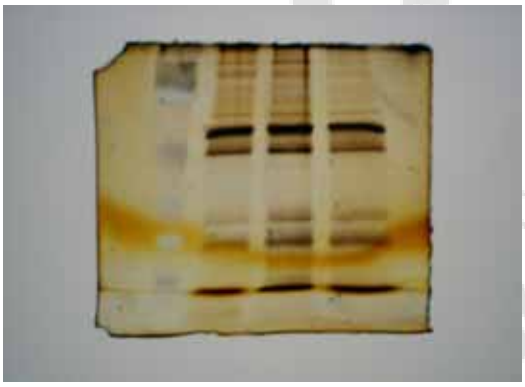


Fig.1. Comparative pattern of a healthy sample treated by 50% or 75% acetone precipitation and ultrafiltering concentration, respectively. (left to right)

正常人及糖尿病病患尿液中之蛋白質含量有顯著的不同(如下表)。圖2為蛋白質定量時以標準品所得到的檢量線。

Samples	Proteins(μg/mL)
Normal 1	15.6
Normal 2	9.3
Abnormal 1	127.3
Abnormal 2	78.4

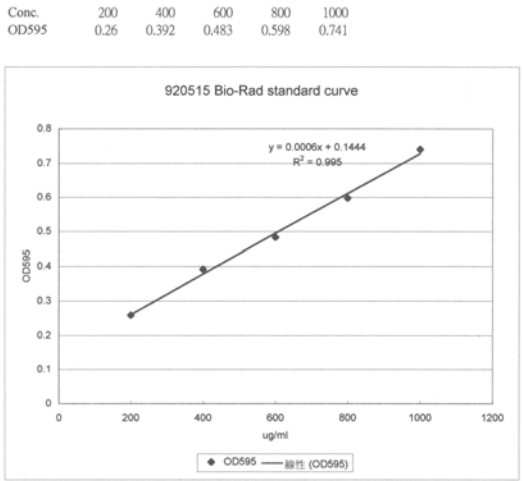


Fig. 2. Standard curve of Bradford method for protein estimation.

本實驗再探討利用自行製備的毛細管及 Bio-Rad 公司提共的變性 IPG 試條，先進行 IEF 電泳，再配合 SDS-PAGE 進行第二相的聚丙烯醯胺膠體電泳法（2D-PAGE）分離尿液蛋白質，並就其結果做比較。由圖 3A(由自行製備之毛細管)及圖 3B(利用 Bio-Rad 公司提供的變性 IPG 試條)比較正常人的尿液蛋白質圖譜顯示，毛細管 IEF 電泳分離效果明顯較好，而且超作簡便。

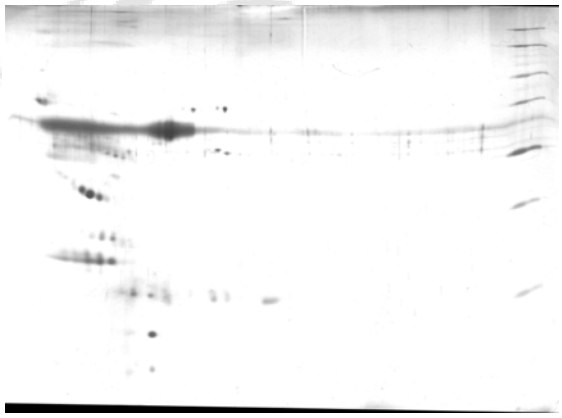


Fig. 3A. 2D electrophoretic pattern of urinary proteins by capillary gel IEFE.

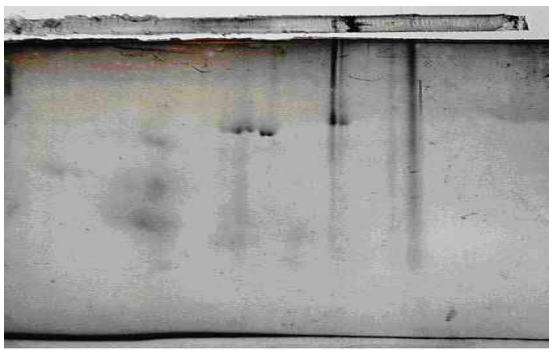
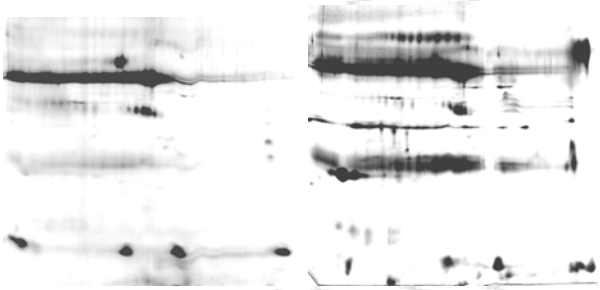
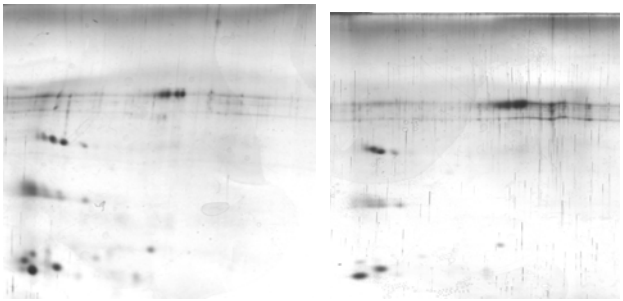


Fig. 3B. 2D electrophoretic pattern of urinary proteins by Bio-Rad IPG strip IEFE.

下圖為唾液蛋白質以 Imidazole-$ZnSO_4$ 進行負面染色(左)與銀染色法(右)的比較。由結果顯示靈敏度前者較差，不過負面染色較簡便快速。尿液蛋白質電泳圖譜，以兩種方法染色的結果類似。

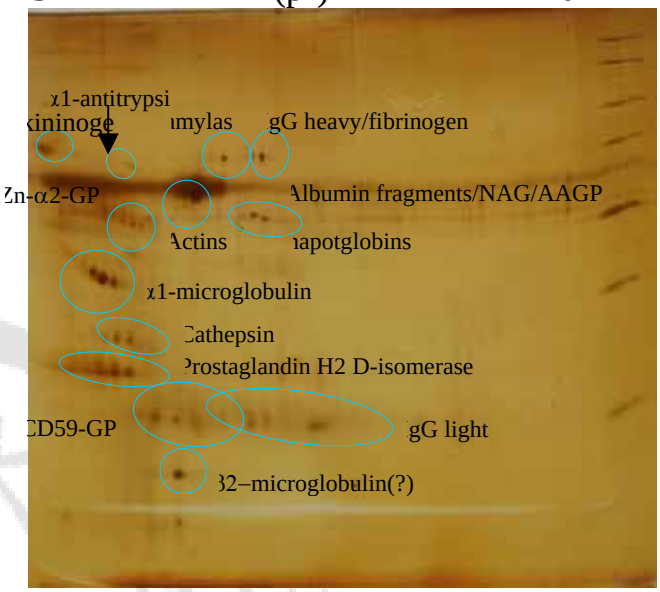


當儲存的蛋白質出現沉澱時，有必要在與 monomer 混合前先震盪或超音波處理再取樣。否則，會造成蛋白質的遺失，下列右圖為正常人尿液蛋白質樣品經離心後，取上清液做分析的結果，若與震盪後再取樣的圖譜比較，可以看出有部分蛋白質不見了。



下圖為正常人的尿液蛋白質電泳圖譜，經與文獻上已確定之尿液蛋白質體圖譜(Lattie 等人及 Pieper 等人的報告)進行比對，所得到的相對應的蛋白質位置，較正式的程序應利用質譜儀進行分析，只是本校現有的設備靈敏度較差，無法符合需要，再本實驗中無法加以應用。下圖的橫向為 pI 值 (3→ 10)，而右側(M)為標記蛋白質，分子量為 200 至 6.7 kDa (由上至下)。

3----------(pI)----------→10 M



而糖尿病病患尿液蛋白質之電泳 圖譜(下圖)，它與正常人的圖譜(上圖)有明顯的差異。特別是糖尿病患的尿中源自血液的 Zn-α2-GP, albumin fragments (分子量約 450kDa), IgG heavy/fibrinogen, amylase 等蛋白質(橘色圈)的濃度有顯著的增加(見下圖)。而 kininogen (綠色圈)之濃度則有降低的現象，而在其右側有新的蛋白質(應為α1-antitrypsin)出現。至於 Hong 等指出部份糖尿病病患之尿液蛋白質中β2-microglobulin 會增加，然而在圖譜上並沒有這項發現。另外，Cathepsins (紅色圈)會減少，甚至幾乎不見了(見後續的二圖)，不過詳情尚待後續探討。

綜合上述的結果，證明本研究所做的改進的確可應用於正常人尿液蛋白質之電泳圖譜分析。不過，由上列的電泳圖譜亦顯示，雖然亦可由此技術找出檢測糖尿病病患之尿液蛋白質的指標物，但由於糖尿病病患之尿液蛋白質(尤其是來自血液的 albumin 片段)濃度偏高，造成 IEF 電泳的蛋白質焦集能力欠佳，以致最後的二維電泳圖譜不甚理想，有待進一步的改進。

五、參考文獻

1. Won-A Joo, Do-Youn Lee, Chan-Wha Kim, Development of an effective sample preparation method for the proteome analysis of body fluids using 2-D gel electrophoresis. *Biosci. Biotech. Biochem.* 67:1574-1577, 2003
2. Bao-Shiang Lee, et al, High-resolution separation of proteins by a three-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide cube gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 317:271-275, 2003
3. Hans Henning von Horsten, An agarose gel subfractionation technique for the recovery of low-abundance proteins. *Anal. Biochem.* 316:139-141, 2003
4. Sarka Beranova-Giorgianni, Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trends in Anal. Chem.* 22:273-281, 2003
5. Daniel Lafitte, et al, Optimized preparation of urine samples for two-dimensional electrophoresis and initial application to patient samples. *Clin. Biochem.* 35:581-589, 2002
6. Visith Thongboonkerd, et al, Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int* 62:1461-1469, 2002
7. Hanne H. Rasmussen, et al, Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer. *The Journal of Urology* 155:2113-2119, 1996
8. Jean-Michel Verdier, et al, Preliminary treatment of urinary proteins improves electrophoretic analysis and immunodetection. *Clin. Chem.* 38:860-863, 1992
9. Ching Ye Hong et al, Urinary protein excretion in type 2 diabetes with complication. J. Diabetes and Its Complications, 14: 259-265, 2000
10. Rembert Pieper et al, Characterization of the urinary proteome. Proteomics, 4: 1159 - 1174, 2004

嘉南大學