



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104076085 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201310101053. 8

(22) 申请日 2013. 03. 27

(71) 申请人 中国医学科学院基础医学研究所
地址 100005 北京市东城区东单三条 5 号

(72) 发明人 高友鹤 贾露露

(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 27/62 (2006. 01)

G01N 33/48 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

人肾脏特异尿液蛋白的用途

(57) 摘要

本发明涉及人肾脏特异尿液蛋白的用途。具体而言,本发明涉及利用离体大鼠肾脏灌流技术和质谱分析获得的人肾脏特异尿液蛋白在制备人肾脏疾病标志物中的用途。本发明利用离体大鼠肾脏灌流技术检测出肾脏特异蛋白,从而排除了血浆蛋白对尿蛋白质组的影响,更准确、更特异地反应肾脏的功能和状态,为肾脏疾病的早期诊断、治疗过程中的检测和预后评估提供了更准确的结果。

1. 一种灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白在制备人肾脏疾病标志物中的用途,所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q9Y696、Q9Y5Y2、Q9Y5P6、Q9Y5L0、Q9Y5K8、Q9Y547、Q9Y4P1、Q9Y3I0、Q9Y342、Q9Y303、Q9Y2V2、Q9Y2T3、Q9Y266、Q9Y226、Q9UQ80、Q9UNS2、Q9UNM6、Q9UKL6、Q9UHY7、Q9UHN6、Q9UHD1、Q9UBQ5、Q9UBB4、Q9NZL9、Q9NX46、Q9NWX4、Q9NVZ3、Q9NRX4、Q9NRN7、Q9NQW7、Q9NQR4、Q9NQE9、Q9HBJ8、Q9HB40、Q9HAV0、Q9HAB8、Q9H993、Q9H832、Q9H756、Q9H6S3、Q9H3K6、Q9H2M3、Q9H2A2、Q9H299、Q9H0W9、Q9H008、Q9GZZ9、Q9GZS3、Q9GZP4、Q9GZN7、Q9BY44、Q9BV57、Q9BUT1、Q9BUL8、Q9BU89、Q9BU02、Q9BTW9、Q9BTE6、Q9BT78、Q9BS40、Q9BS26、Q9BRF8、Q9BRA2、Q9BQA1、Q99707、Q99471、Q96S37、Q96QR8、Q96IU4、Q96IJ6、Q96HD9、Q96GK7、Q96GG9、Q96GA7、Q96FL8、Q96F10、Q96EK5、Q96DG6、Q96BJ8、Q969T7、Q92783、Q92616、Q8TDQ7、Q8TBX8、Q8NHP8、Q8NBF2、Q8N8N7、Q8N392、Q8IW45、Q86VN1、Q86V88、Q86TX2、Q7Z4H3、Q7Z3U7、Q7Z3J2、Q7L5N1、Q7L2H7、Q7L266、Q7L1Q6、Q6ZQN7、Q6ZNA5、Q6XQN6、Q6P587、Q6IA69、Q6BCY4、Q6A162、Q5VWZ2、Q5VW32、Q5T6J7、Q5T2W1、Q5T013、Q5SRE7、Q5R3I4、Q562R1、Q53H82、Q3ZCW2、Q3LXA3、Q3KQV9、Q2M3M2、Q15813、Q15435、Q15386、Q15181、Q15154、Q15102、Q15056、Q15046、Q14353、Q13630、Q13347、Q12792、Q07020、Q06323、Q04917、Q02750、Q00534、P99999、P63010、P63000、P62888、P62873、P62851、P62834、P62753、P62750、P62333、P62330、P62280、P62277、P62070、P61970、P61586、P61457、P61106、P61088、P61081、P61077、P60953、P60900、P60510、P58546、P55209、P52758、P52565、P51665、P51452、P51149、P50502、P50135、P49789、P48556、P47897、P41250、P40925、P39023、P36873、P35241、P31946、P31323、P30047、P30043、P30039、P28161、P27348、P25786、P22694、P20472、P20340、P15941、P15586、P15374、P14868、P14324、P14174、P13716、P11234、P10619、P0CG30、P09525、P08865、P08697、P08263、P07902、P07858、P07437、P05026、P04745、P02792、P00492、P00441、095861、095786、095373、094979、094915、094903、076071、075663、075347、075191、060888、060763、060256、043681、043617、043598、043592、015511、015498、015244、015145、014980、014638、014579、000429、B0I1T2、A6NFQ2、A6ND91、A4D1P6、A0PJK1、Q9P0P0、Q9NZL4、Q9NXJ5、Q9NSY2、Q9NQA3、Q9HBL8、Q9H6Q4、Q9H3H3、Q9H2P9、Q9BT73、Q99873、Q96S19、Q96QU6、Q96NL6、Q96JD6、Q96GX9、Q96FN9、Q96CD2、Q8WWX8、Q8WUX2、Q8N6F8、Q8IYD1、Q8IYB7、Q8IWI9、Q8IUZ5、Q86YJ6、Q86TU7、Q7Z6M1、Q7LG56、Q7L8W6、Q6YHU6、Q6V1X1、Q6P3X3、Q6P2I3、Q5H9R7、Q5F1R6、Q32M88、Q16576、Q16548、Q14CX7、Q0VDG4、P62256、P61923、P55854、P49454、P48507、P12004、P10746、P0CG29、095486、075830、000743、A8MWX3、A6NK44、A4D126、A2VDF0、A2RU49、Q9Y600、Q9Y285、Q9UNQ0、Q9UNA1、Q9UN86、Q9ULW0、Q9UKG9、Q9UK32、Q9UHL0、Q9NTZ6、Q9NRD1、Q9NPF4、Q9HBK9、Q9H9A6、Q9H3S4、Q9H254、Q9H1Z4、Q9GZT4、Q9BXJ9、Q9BQ69、Q99487、Q96Q11、Q96N87、Q92878、Q92576、Q8WW22、Q8TDJ6、Q8TBE9、Q8NFP9、Q8NF91、Q8N5Z0、Q8IVL1、Q7Z3D6、Q5T4S7、Q16878、Q16772、Q16186、Q15349、Q15276、Q14765、Q14738、Q13642、Q13564、Q13363、Q13232、Q13158、Q06203、Q03393、P84098、P67775、P57772、P54922、P53611、P49914、P47989、P20132、P17516、P14920、P11245、P08397、P07864、P07327、P00374、095848、095749、075153、060443、043704、043432、043324 和 015111。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q9Y696、Q9Y5Y2、Q9Y5P6、Q9Y5L0、Q9Y5K8、Q9Y547、Q9Y4P1、Q9Y3I0、Q9Y342、Q9Y303、Q9Y2V2、Q9Y2T3、Q9Y266、Q9Y226、Q9UQ80、Q9UNS2、

Q9UNM6、Q9UKL6、Q9UHY7、Q9UHN6、Q9UHD1、Q9UBQ5、Q9UBB4、Q9NZL9、Q9NX46、Q9NWV4、Q9NVZ3、Q9NRX4、Q9NRN7、Q9NQW7、Q9NQR4、Q9NQE9、Q9HBJ8、Q9HB40、Q9HAV0、Q9HAB8、Q9H993、Q9H832、Q9H756、Q9H6S3、Q9H3K6、Q9H2M3、Q9H2A2、Q9H299、Q9H0W9、Q9H008、Q9GZZ9、Q9GZS3、Q9GZP4、Q9GZN7、Q9BY44、Q9BV57、Q9BUT1、Q9BUL8、Q9BU89、Q9BU02、Q9BTW9、Q9BTE6、Q9BT78、Q9BS40、Q9BS26、Q9BRF8、Q9BRA2、Q9BQA1、Q99707、Q99471、Q96S37、Q96QR8、Q96IU4、Q96IJ6、Q96HD9、Q96GK7、Q96GG9、Q96GA7、Q96FL8、Q96F10、Q96EK5、Q96DG6、Q96BJ8、Q969T7、Q92783、Q92616、Q8TDQ7、Q8TBX8、Q8NHP8、Q8NBF2、Q8N8N7、Q8N392、Q8IW45、Q86VN1、Q86V88、Q86TX2、Q7Z4H3、Q7Z3U7、Q7Z3J2、Q7L5N1、Q7L2H7、Q7L266、Q7L1Q6、Q6ZQN7、Q6ZNA5、Q6XQN6、Q6P587、Q6IA69、Q6BCY4、Q6A162、Q5VWZ2、Q5VW32、Q5T6J7、Q5T2W1、Q5T013、Q5SRE7、Q5R3I4、Q562R1、Q53H82、Q3ZCW2、Q3LXA3、Q3KQV9、Q2M3M2、Q15813、Q15435、Q15386、Q15181、Q15154、Q15102、Q15056、Q15046、Q14353、Q13630、Q13347、Q12792、Q07020、Q06323、Q04917、Q02750、Q00534、P99999、P63010、P63000、P62888、P62873、P62851、P62834、P62753、P62750、P62333、P62330、P62280、P62277、P62070、P61970、P61586、P61457、P61106、P61088、P61081、P61077、P60953、P60900、P60510、P58546、P55209、P52758、P52565、P51665、P51452、P51149、P50502、P50135、P49789、P48556、P47897、P41250、P40925、P39023、P36873、P35241、P31946、P31323、P30047、P30043、P30039、P28161、P27348、P25786、P22694、P20472、P20340、P15941、P15586、P15374、P14868、P14324、P14174、P13716、P11234、P10619、P0CG30、P09525、P08865、P08697、P08263、P07902、P07858、P07437、P05026、P04745、P02792、P00492、P00441、095861、095786、095373、094979、094915、094903、076071、075663、075347、075191、060888、060763、060256、043681、043617、043598、043592、015511、015498、015244、015145、014980、014638、014579、000429、B011T2、A6NFQ2、A6ND91、A4D1P6 和 A0PJK1。

3. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在於所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q9P0P0、Q9NZL4、Q9NXJ5、Q9NSY2、Q9NQA3、Q9HBL8、Q9H6Q4、Q9H3H3、Q9H2P9、Q9BT73、Q99873、Q96S19、Q96QU6、Q96NL6、Q96JD6、Q96GX9、Q96FN9、Q96CD2、Q8WWW8、Q8WUX2、Q8N6F8、Q8IYD1、Q8IYB7、Q8IWI9、Q8IUZ5、Q86YJ6、Q86TU7、Q7Z6M1、Q7LG56、Q7L8W6、Q6YHU6、Q6V1X1、Q6P3X3、Q6P2I3、Q5H9R7、Q5F1R6、Q32M88、Q16576、Q16548、Q14CX7、Q0VDG4、P62256、P61923、P55854、P49454、P48507、P12004、P10746、P0CG29、095486、075830、000743、A8MWX3、A6NK44、A4D126、A2VDF0、A2RU49、Q9Y600、Q9Y285、Q9UNQ0、Q9UNA1、Q9UN86、Q9ULW0、Q9UKG9、Q9UK32、Q9UHL0、Q9NTZ6、Q9NRD1、Q9NPF4、Q9HBK9、Q9H9A6、Q9H3S4、Q9H254、Q9H1Z4、Q9GZT4、Q9BXJ9、Q9BQ69、Q99487、Q96Q11、Q96N87、Q92878、Q92576、Q8WW22、Q8TDJ6、Q8TBE9、Q8NFP9、Q8NF91、Q8N5Z0、Q8IVL1、Q7Z3D6、Q5T4S7、Q16878、Q16772、Q16186、Q15349、Q15276、Q14765、Q14738、Q13642、Q13564、Q13363、Q13232、Q13158、Q06203、Q03393、P84098、P67775、P57772、P54922、P53611、P49914、P47989、P20132、P17516、P14920、P11245、P08397、P07864、P07327、P00374、095848、095749、075153、060443、043704、043432、043324 和 015111。

4. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在於所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q9Y600、Q9Y285、Q9UNQ0、Q9UNA1、Q9UN86、Q9ULW0、Q9UKG9、Q9UK32、Q9UHL0、Q9NTZ6、Q9NRD1、Q9NPF4、Q9HBK9、Q9H9A6、Q9H3S4、Q9H254、Q9H1Z4、Q9GZT4、Q9BXJ9、Q9BQ69、Q99487、Q96Q11、Q96N87、Q92878、Q92576、Q8WW22、Q8TDJ6、

Q8TBE9、Q8NFP9、Q8NF91、Q8N5Z0、Q8IVL1、Q7Z3D6、Q5T4S7、Q16878、Q16772、Q16186、Q15349、Q15276、Q14765、Q14738、Q13642、Q13564、Q13363、Q13232、Q13158、Q06203、Q03393、P84098、P67775、P57772、P54922、P53611、P49914、P47989、P20132、P17516、P14920、P11245、P08397、P07864、P07327、P00374、095848、095749、075153、060443、043704、043432、043324 和 015111。

5. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q9POP0、Q9NZL4、Q9NXJ5、Q9NSY2、Q9NQA3、Q9HBL8、Q9H6Q4、Q9H3H3、Q9H2P9、Q9BT73、Q99873、Q96S19、Q96QU6、Q96NL6、Q96JD6、Q96GX9、Q96FN9、Q96CD2、Q8WWW8、Q8WUX2、Q8N6F8、Q8IYD1、Q8IYB7、Q8IWI9、Q8IUZ5、Q86YJ6、Q86TU7、Q7Z6M1、Q7LG56、Q7L8W6、Q6YHU6、Q6V1X1、Q6P3X3、Q6P2I3、Q5H9R7、Q5F1R6、Q32M88、Q16576、Q16548、Q14CX7、Q0VDG4、P62256、P61923、P55854、P49454、P48507、P12004、P10746、P0CG29、095486、075830、000743、A8MWX3、A6NK44、A4D126、A2VDF0 和 A2RU49。

6. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q16772、P08263、P48507、A2RU49、Q8N5Z0、P0CG29、P0CG30、Q86YJ6、Q9Y600、Q9NXJ5、Q9H3S4、Q16773、043704、A6NK44、Q99487、Q03013、P52888、Q86TX2、P00374、Q6P2I3、Q9HBL8、P67775、P62491、Q14749、P18440、P11245、Q96JD6、Q8N6F8、P20132、095848、Q96S19、Q96F10、Q13509、Q96GX9、P30566、Q03393、Q9Y285、Q9BUF5、075688、P48556、P56192、060333、Q8NBF2、P55212、Q53H82、P29144、P49753、Q99460、Q16719、Q96EK6、Q9BV57、Q08752、095394、Q99436、015305、Q13630、Q96GK7、Q15008、Q16881、P48506、Q9Y3A5、Q14353、000338、P31153、Q9NQW7、Q5T013、Q8TDX5、P32929、Q86X76、P58546、Q9H2A2、P45381、P53004、Q96KN2 和 Q15493。

7. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:P37837、Q9Y289、P61106、Q99685、043895、P21281、Q5T2W1、P27487、Q16819、Q07837、Q06830、P13866、P21283、P14550、P15144、P05937、Q9NYQ3、P61204、P08473、P60953、P22392、014638、Q9UNQ0、P43005、094903、Q9H4M9、P09327、P18206、A0PJK1、P30711、Q6ZQN7、P36543 和 000231。

8. 根据权利要求 1 到 7 任一项所述的用途,其特征在于所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白利用下述步骤获得:1)按已知方法将离体大鼠肾脏进行灌流操作,分别在单循环冲洗时间、有氧灌流时间和无氧灌流时间的规定时间段收集灌流液,2)离心收集的灌流液,将上清用 SDS-PAGE 进行分离,蛋白条带按分子量切胶,然后进行胶内酶切,反相色谱柱分离,质谱鉴定,3)所有二级质谱结果用 mascot 软件进行数据库检索获得对应的大鼠蛋白,所用数据库为 ipi.rat.v3.87,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;可变修饰:Deamidated(NQ),Oxidation(M),Orbitrap 质谱数据检索容许误差为:母离子 10ppm,子离子 0.5Da;Tripletof5600 数据:母离子 0.05Da,子离子 0.05Da,4)将上述大鼠蛋白进行同源性分析,获得对应的人类蛋白。

9. 根据权利要求 1 到 8 任一项所述的用途,其特征在于所述人肾脏疾病标志物用于检测受试者健康状态、监测肾脏疾病治疗进程和 / 或评估肾脏疾病预后。

10. 一种检测受试者健康状态、监测肾脏疾病治疗进程和 / 或评估肾脏疾病预后的方法,其包括如下步骤:

- 1): 分别获得正常人和病人的尿液,
- 2): 分别获得正常人和病人的尿蛋白,
- 3): 利用定量质谱方法, ELISA 方法, Western 方法或其他方法检测正常人和病人尿液蛋白中的上述权利要求 1 至 8 任一项所述用途中所述的人肾脏疾病标志物的表达水平,
- 4): 通过比较权利要求 1 至 8 任一项所述用途中涉及的人肾脏疾病标志物的表达水平差异判断受试者健康状态、监测肾脏疾病治疗进程和 / 或评估肾脏疾病预后。

人肾脏特异尿液蛋白的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及人肾脏特异尿液蛋白的用途。具体而言,本发明涉及利用离体大鼠肾脏灌注技术和质谱分析获得的人肾脏特异尿液蛋白在制备人肾脏疾病标志物中的用途。

背景技术

[0002] 尿液作为肾脏的主要输出物,在反映肾脏状况方面具有得天独厚的优势,并且可以很容易大量地、无创性地获得,因此尿检常被称为体外的肾活检,在临床上具有重要的诊断意义,人们也一直期望能从中发掘出有价值的潜在的疾病标志物等。

[0003] 与血浆相比,尿液具有以下优点:

[0004] 1) 尿液是可以完全无创、连续收集的体液;

[0005] 2) 尿液是最接近泌尿系统的体液,能直接反映其功能状态;

[0006] 3) 尿液蛋白质组的组成信息丰富。尿液作为血浆经肾小球滤过的滤过液,尿蛋白质组保留了部分血浆蛋白质组的信息,在一定程度上反映血液和整个机体的状态;

[0007] 4) 尿液蛋白质组的组成复杂度较低,更容易观察其中的低丰度蛋白的变化;

[0008] 5) 有一些激素和细胞因子在进入血中以后,会很快完全排泄进入尿液,这些蛋白只能在尿液中检测;

[0009] 6) 与血液不同,尿蛋白可以在较长时间内保持稳定。

[0010] 尿液中的尿蛋白主要来源于:

[0011] 1) 血浆中的蛋白,经过肾小球滤过和近端肾小管重吸收后溢出者;

[0012] 2) 肾组织蛋白,肾小管细胞分泌或毁坏后漏到尿中;

[0013] 3) 尿路蛋白质,被膀胱、尿道、副腺分泌或漏到尿中。

[0014] 正常情况下,成人每日排出的蛋白质 <150mg,蛋白质组成份中血浆白蛋白占 40%,免疫球蛋白片段占 15%,其他血浆蛋白占 5%,肾和泌尿生殖系组织蛋白占 40%⁽¹⁾。

[0015] 然而,尿蛋白质组动态范围较大,这限制了尿蛋白质在临床上的应用范围。现有技术的尿液蛋白标志物研究往往通过比较正常和疾病状态下的尿液来寻找差异蛋白,但是这种方法存在通量低、灵敏度低和寻找到的尿液蛋白标志物特异性差的缺点。

[0016] 尿液中的蛋白总的来说分为来源于血浆滤过的血浆蛋白和来源于肾脏的肾脏特异蛋白。尿液中的血浆蛋白溶液受到非肾脏因素的影响,加之不同种肾脏疾病往往造成类似的肾脏损伤,然后引起类似的来源于血浆的尿蛋白的变化。因此,这部分蛋白往往不能特异地反映不同类型的肾脏疾病。比如来源于血浆的尿蛋白部分容易受到血压的影响等。更严重的一个问题是,尿液中来源于血浆的蛋白往往是尿液中的高丰度蛋白,而来源于肾脏的肾脏特异蛋白往往是低丰度蛋白。在寻找肾脏标志物时,这部分高丰度的来源于血浆的尿蛋白会严重干扰低丰度的肾脏特异蛋白的检测。因此,综合以上原因,传统的蛋白标志物研究方法存在重大缺陷,极大地降低了发现肾脏疾病标志物的效率。如果能够排除掉血浆对尿蛋白质组的影响,直接检测来源于肾脏的尿蛋白,就能直接反映肾脏的功能,这无疑会对了解肾脏的功能具有重大的意义。

[0017] 器官灌流技术排除了其他因素的影响,是研究器官功能的经典技术。离体大鼠肾脏灌流技术能在一定时间窗内保持肾脏器官结构和功能完整⁽²⁻⁴⁾。检测离体灌流状态下的尿蛋白质组,排除了血浆蛋白对尿蛋白质组的影响,从而可以研究肾脏特异蛋白对尿蛋白质组的直接贡献。灌流状态下的尿蛋白质均来源于肾脏,直接反映了肾脏的功能。

[0018] 因此,如果能利用离体大鼠肾脏灌流技术检测出肾脏特异蛋白,从而排除血浆蛋白对尿蛋白质组的影响,将可以更准确、更特异地反应肾脏的功能和状态,从而为肾脏疾病的早期诊断、治疗过程中的检测和预后评估提供更准确的结果。

发明内容

[0019] 因此,本发明的技术目的在于利用离体灌流技术获得人肾脏特异的尿液蛋白,以利用其检测受试者健康状态、监测肾脏疾病治疗进程和/或评估肾脏疾病预后。

[0020] 因此,本发明的第一方面涉及一种灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白在制备人肾脏疾病标志物中的用途,所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q9Y696、Q9Y5Y2、Q9Y5P6、Q9Y5L0、Q9Y5K8、Q9Y547、Q9Y4P1、Q9Y3I0、Q9Y342、Q9Y303、Q9Y2V2、Q9Y2T3、Q9Y266、Q9Y226、Q9UQ80、Q9UNS2、Q9UNM6、Q9UKL6、Q9UHY7、Q9UHN6、Q9UHD1、Q9UBQ5、Q9UBB4、Q9NZL9、Q9NX46、Q9NWV4、Q9NVZ3、Q9NRX4、Q9NRN7、Q9NQW7、Q9NQ4、Q9NQE9、Q9HBJ8、Q9HB40、Q9HAV0、Q9HAB8、Q9H993、Q9H832、Q9H756、Q9H6S3、Q9H3K6、Q9H2M3、Q9H2A2、Q9H299、Q9H0W9、Q9H008、Q9GZZ9、Q9GZS3、Q9GZP4、Q9GZN7、Q9BY44、Q9BV57、Q9BUT1、Q9BUL8、Q9BU89、Q9BU02、Q9BTW9、Q9BTE6、Q9BT78、Q9BS40、Q9BS26、Q9BRF8、Q9BRA2、Q9BQA1、Q99707、Q99471、Q96S37、Q96QR8、Q96IU4、Q96IJ6、Q96HD9、Q96GK7、Q96GG9、Q96GA7、Q96FL8、Q96F10、Q96EK5、Q96DG6、Q96BJ8、Q969T7、Q92783、Q92616、Q8TDQ7、Q8TBX8、Q8NHP8、Q8NBF2、Q8N8N7、Q8N392、Q8IW45、Q86VN1、Q86V88、Q86TX2、Q7Z4H3、Q7Z3U7、Q7Z3J2、Q7L5N1、Q7L2H7、Q7L266、Q7L1Q6、Q6ZQN7、Q6ZNA5、Q6XQN6、Q6P587、Q6IA69、Q6BCY4、Q6A162、Q5VWZ2、Q5VW32、Q5T6J7、Q5T2W1、Q5T013、Q5SRE7、Q5R3I4、Q562R1、Q53H82、Q3ZCW2、Q3LXA3、Q3KQV9、Q2M3M2、Q15813、Q15435、Q15386、Q15181、Q15154、Q15102、Q15056、Q15046、Q14353、Q13630、Q13347、Q12792、Q07020、Q06323、Q04917、Q02750、Q00534、P99999、P63010、P63000、P62888、P62873、P62851、P62834、P62753、P62750、P62333、P62330、P62280、P62277、P62070、P61970、P61586、P61457、P61106、P61088、P61081、P61077、P60953、P60900、P60510、P58546、P55209、P52758、P52565、P51665、P51452、P51149、P50502、P50135、P49789、P48556、P47897、P41250、P40925、P39023、P36873、P35241、P31946、P31323、P30047、P30043、P30039、P28161、P27348、P25786、P22694、P20472、P20340、P15941、P15586、P15374、P14868、P14324、P14174、P13716、P11234、P10619、P0CG30、P09525、P08865、P08697、P08263、P07902、P07858、P07437、P05026、P04745、P02792、P00492、P00441、095861、095786、095373、094979、094915、094903、076071、075663、075347、075191、060888、060763、060256、043681、043617、043598、043592、015511、015498、015244、015145、014980、014638、014579、000429、B011T2、A6NFQ2、A6ND91、A4D1P6、A0PJK1、Q9P0P0、Q9NZL4、Q9NXJ5、Q9NSY2、Q9NQA3、Q9HBL8、Q9H6Q4、Q9H3H3、Q9H2P9、Q9BT73、Q99873、Q96S19、Q96QU6、Q96NL6、Q96JD6、Q96GX9、Q96FN9、Q96CD2、Q8WWX8、Q8WUX2、Q8N6F8、Q8IYD1、Q8IYB7、Q8IWI9、Q8IUZ5、Q86YJ6、Q86TU7、Q7Z6M1、Q7LG56、Q7L8W6、Q6YHU6、Q6V1X1、Q6P3X3、Q6P2I3、Q5H9R7、Q5F1R6、Q32M88、Q16576、Q16548、Q14CX7、Q0VDG4、P62256、P61923、

P55854、P49454、P48507、P12004、P10746、P0CG29、095486、075830、000743、A8MWX3、A6NK44、A4D126、A2VDF0、A2RU49、Q9Y600、Q9Y285、Q9UNQ0、Q9UNA1、Q9UN86、Q9ULW0、Q9UKG9、Q9UK32、Q9UHL0、Q9NTZ6、Q9NRD1、Q9NPF4、Q9HBK9、Q9H9A6、Q9H3S4、Q9H254、Q9H1Z4、Q9GZT4、Q9BXJ9、Q9BQ69、Q99487、Q96Q11、Q96N87、Q92878、Q92576、Q8WW22、Q8TDJ6、Q8TBE9、Q8NFP9、Q8NF91、Q8N5Z0、Q8IVL1、Q7Z3D6、Q5T4S7、Q16878、Q16772、Q16186、Q15349、Q15276、Q14765、Q14738、Q13642、Q13564、Q13363、Q13232、Q13158、Q06203、Q03393、P84098、P67775、P57772、P54922、P53611、P49914、P47989、P20132、P17516、P14920、P11245、P08397、P07864、P07327、P00374、095848、095749、075153、060443、043704、043432、043324 和 015111。

[0021] 优选地,所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q9Y696、Q9Y5Y2、Q9Y5P6、Q9Y5L0、Q9Y5K8、Q9Y547、Q9Y4P1、Q9Y3I0、Q9Y342、Q9Y303、Q9Y2V2、Q9Y2T3、Q9Y266、Q9Y226、Q9UQ80、Q9UNS2、Q9UNM6、Q9UKL6、Q9UHY7、Q9UHN6、Q9UHD1、Q9UBQ5、Q9UBB4、Q9NZL9、Q9NX46、Q9NWV4、Q9NVZ3、Q9NRX4、Q9NRN7、Q9NQW7、Q9NQR4、Q9NQE9、Q9HBJ8、Q9HB40、Q9HAVA0、Q9HAB8、Q9H993、Q9H832、Q9H756、Q9H6S3、Q9H3K6、Q9H2M3、Q9H2A2、Q9H299、Q9H0W9、Q9H008、Q9GZZ9、Q9GZS3、Q9GZP4、Q9GZN7、Q9BY44、Q9BV57、Q9BUT1、Q9BUL8、Q9BU89、Q9BU02、Q9BTW9、Q9BTE6、Q9BT78、Q9BS40、Q9BS26、Q9BRF8、Q9BRA2、Q9BQA1、Q99707、Q99471、Q96S37、Q96QR8、Q96IU4、Q96IJ6、Q96HD9、Q96GK7、Q96GG9、Q96GA7、Q96FL8、Q96F10、Q96EK5、Q96DG6、Q96BJ8、Q969T7、Q92783、Q92616、Q8TDQ7、Q8TBX8、Q8NHP8、Q8NBF2、Q8N8N7、Q8N392、Q8IW45、Q86VN1、Q86V88、Q86TX2、Q7Z4H3、Q7Z3U7、Q7Z3J2、Q7L5N1、Q7L2H7、Q7L266、Q7L1Q6、Q6ZQN7、Q6ZNA5、Q6XQN6、Q6P587、Q6IA69、Q6BCY4、Q6A162、Q5VWZ2、Q5VW32、Q5T6J7、Q5T2W1、Q5T013、Q5SRE7、Q5R3I4、Q562R1、Q53H82、Q3ZCW2、Q3LXA3、Q3KQV9、Q2M3M2、Q15813、Q15435、Q15386、Q15181、Q15154、Q15102、Q15056、Q15046、Q14353、Q13630、Q13347、Q12792、Q07020、Q06323、Q04917、Q02750、Q00534、P99999、P63010、P63000、P62888、P62873、P62851、P62834、P62753、P62750、P62333、P62330、P62280、P62277、P62070、P61970、P61586、P61457、P61106、P61088、P61081、P61077、P60953、P60900、P60510、P58546、P55209、P52758、P52565、P51665、P51452、P51149、P50502、P50135、P49789、P48556、P47897、P41250、P40925、P39023、P36873、P35241、P31946、P31323、P30047、P30043、P30039、P28161、P27348、P25786、P22694、P20472、P20340、P15941、P15586、P15374、P14868、P14324、P14174、P13716、P11234、P10619、P0CG30、P09525、P08865、P08697、P08263、P07902、P07858、P07437、P05026、P04745、P02792、P00492、P00441、095861、095786、095373、094979、094915、094903、076071、075663、075347、075191、060888、060763、060256、043681、043617、043598、043592、015511、015498、015244、015145、014980、014638、014579、000429、B0I1T2、A6NFQ2、A6ND91、A4D1P6 和 A0PJK1。

[0022] 优选地,所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q9P0P0、Q9NZL4、Q9NXJ5、Q9NSY2、Q9NQA3、Q9HBL8、Q9H6Q4、Q9H3H3、Q9H2P9、Q9BT73、Q99873、Q96S19、Q96QU6、Q96NL6、Q96JD6、Q96GX9、Q96FN9、Q96CD2、Q8WWX8、Q8WUX2、Q8N6F8、Q8IYD1、Q8IYB7、Q8IWI9、Q8IUZ5、Q86YJ6、Q86TU7、Q7Z6M1、Q7LG56、Q7L8W6、Q6YHU6、Q6V1X1、Q6P3X3、Q6P2I3、Q5H9R7、Q5F1R6、Q32M88、Q16576、Q16548、Q14CX7、Q0VDG4、P62256、P61923、P55854、P49454、P48507、P12004、P10746、P0CG29、095486、075830、000743、A8MWX3、A6NK44、A4D126、A2VDF0、A2RU49、Q9Y600、Q9Y285、Q9UNQ0、Q9UNA1、Q9UN86、Q9ULW0、Q9UKG9、

Q9UK32、Q9UHL0、Q9NTZ6、Q9NRD1、Q9NPF4、Q9HBK9、Q9H9A6、Q9H3S4、Q9H254、Q9H1Z4、Q9GZT4、Q9BXJ9、Q9BQ69、Q99487、Q96Q11、Q96N87、Q92878、Q92576、Q8WW22、Q8TDJ6、Q8TBE9、Q8NFP9、Q8NF91、Q8N5Z0、Q8IVL1、Q7Z3D6、Q5T4S7、Q16878、Q16772、Q16186、Q15349、Q15276、Q14765、Q14738、Q13642、Q13564、Q13363、Q13232、Q13158、Q06203、Q03393、P84098、P67775、P57772、P54922、P53611、P49914、P47989、P20132、P17516、P14920、P11245、P08397、P07864、P07327、P00374、095848、095749、075153、060443、043704、043432、043324 和 015111。

[0023] 优选地,所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q9Y600、Q9Y285、Q9UNQ0、Q9UNA1、Q9UN86、Q9ULW0、Q9UKG9、Q9UK32、Q9UHL0、Q9NTZ6、Q9NRD1、Q9NPF4、Q9HBK9、Q9H9A6、Q9H3S4、Q9H254、Q9H1Z4、Q9GZT4、Q9BXJ9、Q9BQ69、Q99487、Q96Q11、Q96N87、Q92878、Q92576、Q8WW22、Q8TDJ6、Q8TBE9、Q8NFP9、Q8NF91、Q8N5Z0、Q8IVL1、Q7Z3D6、Q5T4S7、Q16878、Q16772、Q16186、Q15349、Q15276、Q14765、Q14738、Q13642、Q13564、Q13363、Q13232、Q13158、Q06203、Q03393、P84098、P67775、P57772、P54922、P53611、P49914、P47989、P20132、P17516、P14920、P11245、P08397、P07864、P07327、P00374、095848、095749、075153、060443、043704、043432、043324 和 015111。

[0024] 优选地,所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q9POP0、Q9NZL4、Q9NXJ5、Q9NSY2、Q9NQA3、Q9HBL8、Q9H6Q4、Q9H3H3、Q9H2P9、Q9BT73、Q99873、Q96S19、Q96QU6、Q96NL6、Q96JD6、Q96GX9、Q96FN9、Q96CD2、Q8WWX8、Q8WUX2、Q8N6F8、Q8IYD1、Q8IYB7、Q8IWI9、Q8IUZ5、Q86YJ6、Q86TU7、Q7Z6M1、Q7LG56、Q7L8W6、Q6YHU6、Q6V1X1、Q6P3X3、Q6P2I3、Q5H9R7、Q5F1R6、Q32M88、Q16576、Q16548、Q14CX7、Q0VDG4、P62256、P61923、P55854、P49454、P48507、P12004、P10746、P0CG29、095486、075830、000743、A8MWX3、A6NK44、A4D126、A2VDF0 和 A2RU49。

[0025] 优选地,所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:Q16772、P08263、P48507、A2RU49、Q8N5Z0、P0CG29、P0CG30、Q86YJ6、Q9Y600、Q9NXJ5、Q9H3S4、Q16773、043704、A6NK44、Q99487、Q03013、P52888、Q86TX2、P00374、Q6P2I3、Q9HBL8、P67775、P62491、Q14749、P18440、P11245、Q96JD6、Q8N6F8、P20132、095848、Q96S19、Q96F10、Q13509、Q96GX9、P30566、Q03393、Q9Y285、Q9BUF5、075688、P48556、P56192、060333、Q8NBF2、P55212、Q53H82、P29144、P49753、Q99460、Q16719、Q96EK6、Q9BV57、Q08752、095394、Q99436、015305、Q13630、Q96GK7、Q15008、Q16881、P48506、Q9Y3A5、Q14353、000338、P31153、Q9NQW7、Q5T013、Q8TDX5、P32929、Q86X76、P58546、Q9H2A2、P45381、P53004、Q96KN2 和 Q15493。

[0026] 优选地,所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白选自下述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白的一种:P37837、Q9Y289、P61106、Q99685、043895、P21281、Q5T2W1、P27487、Q16819、Q07837、Q06830、P13866、P21283、P14550、P15144、P05937、Q9NYQ3、P61204、P08473、P60953、P22392、014638、Q9UNQ0、P43005、094903、Q9H4M9、P09327、P18206、A0PJK1、P30711、Q6ZQN7、P36543 和 000231。

[0027] 优选地,所述灌流产生的人肾脏特异尿液蛋白利用下述步骤获得:1)按已知方法将离体大鼠肾脏进行灌流操作,分别在单循环冲洗时间、有氧灌流时间和无氧灌流时间的规定时间段收集灌流液,2)离心收集的灌流液,将上清用 SDS-PAGE 进行分离,蛋白条带按分子量切胶,然后进行胶内酶切,反相色谱柱分离,质谱鉴定,3)所有二级质谱结

果用 mascot 软件进行数据库检索获得对应的大鼠蛋白,所用数据库为 ipi.rat.v3.87,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;可变修饰:Deamidated(NQ),Oxidation(M),Orbitrap 质谱数据检索容许误差为:母离子 10ppm,子离子 0.5Da;Tripletof5600 数据:母离子 0.05Da,子离子 0.05Da,4)将上述大鼠蛋白进行同源性分析,获得对应的人类蛋白。

[0028] 优选地,所述人肾脏疾病标志物用于检测受试者健康状态、监测肾脏疾病治疗进程和 / 或评估肾脏疾病预后。

[0029] 本发明的第二方面涉及一种检测受试者健康状态、监测肾脏疾病治疗进程和 / 或评估肾脏疾病预后的方法,其包括如下步骤:

[0030] 1):分别获得正常人和病人的尿液,

[0031] 2):分别获得正常人和病人的尿蛋白,

[0032] 3):利用定量质谱方法,ELISA 方法,Western 方法或其他方法检测正常人和病人尿液蛋白中的上述第一方面所述用途中所述的人肾脏疾病标志物的表达水平,

[0033] 4):通过比较上述第一方面所述用途中涉及的人肾脏疾病标志物的表达水平差异判断受试者健康状态、监测肾脏疾病治疗进程和 / 或评估肾脏疾病预后。

[0034] 换言之,本研究结合蛋白质组学技术和经典的离体大鼠肾脏灌流技术,用于肾脏生物标志物的研究,所发现的生物标志物直接来源于肾脏,能够直接反映肾脏功能,用于肾脏疾病的早期发现,治疗过程中的监测,和预后评价。本发明发现了一系列来源于肾脏的、特异反映肾脏功能、用于肾脏疾病早期诊断、治疗过程中检测和预后评估的蛋白生物标志物。

[0035] 本发明为了寻找到特异的肾脏来源的尿液蛋白,利用离体大鼠灌流技术,排除掉血浆蛋白的影响。在灌流时间窗里获得肾脏灌流液,利用质谱技术对肾脏灌流液蛋白组进行鉴定,获得肾脏灌流液蛋白。对所获得的蛋白质组数据经过严格的生物信息学分析,获得能够特异反映肾脏功能的、用于肾脏疾病早期诊断、治疗过程中检测和预后评估的蛋白生物标志物。

[0036] 本发明发现正常尿液和血浆里都没有的肾脏特异蛋白 57 个,只在尿液里有、血浆里没有的肾脏特异蛋白 240 个,只在血液里有但正常尿液里没有的肾脏特异蛋白 71 个。正常尿液里没有的肾脏特异蛋白只在疾病状态下的病人尿液里出现,具有高灵敏度的特点。正常人血液里没有的肾脏特异蛋白不受其他器官和血浆的影响,具有高特异性的特点。还发现在灌流损伤的情况下有 75 种肾脏特异蛋白比正常人尿液中的表达水平高,当肾脏灌流从有氧方式转到无氧方式的时候,有 33 个肾脏特异蛋白表达升高,这部分蛋白具有显著变化的趋势。本发明为检测肾脏功能、早期诊断肾脏疾病、检测和预后评估肾脏疾病的治疗过程提供了大量的蛋白生物标志物。

附图说明

[0037] 图 1:离体大鼠肾脏灌流示意图,灌流液依次经过在线过滤器、蠕动泵、流速计、恒温系统,从腹主动脉进入右侧肾,经肾静脉汇合后从下腔静脉引出,如此循环。

[0038] 图 2:灌流尿液蛋白与正常尿液蛋白(包括正常尿液 exosome 蛋白),以及肾脏表达蛋白之间的比较。

[0039] 图 3 :肾脏来源的 990 种尿蛋白。“正常尿里无”代表正常尿液检测不到、只在疾病状态下存在的尿液蛋白。“正常血里无”代表正常血浆里检测不到的尿蛋白。“无氧灌流增加”代表当肾脏灌流从有氧方式转到无氧方式的时候,表达升高的尿蛋白。

具体实施方式

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 实施例

[0043] 实施例 1

[0044] 材料与试剂

[0045] 1) 仪器 :离体大鼠肾脏灌流装置一套(离体大鼠肾脏灌流仪、精密蠕动泵和超级恒温泵、混合气 95%O₂ + 5%CO₂) :北京吉安得尔科技有限公司 ;18G 和 24G 密闭式静脉留置针购自 BECTON DICKINSON(B-D) 公司)。LTQ velos Orbi Trap 离子阱质谱仪 :购自 Thermo Finnigan 公司 ;TripleTOF5600 质谱仪 :购自 ABI 公司 ;Agilent1200 高效液相色谱仪 :购自 Agilent 公司 ;MilliQ RG 超纯水系统 :购自 Millipore 公司 ;C18 反相分析柱(RP 柱, 0.1×150mm, 3 μm, 200 Å) :购自 Michrom Bioresources 公司。

[0046] 2) 主要试剂 :去离子水来源于 MilliQ RG 超纯水系统 ;碳酸氢铵从 Merck(San Diego, 美国) 购买 ;K-H 溶液所需试剂均购自北京化学试剂公司 ;手术器械购自北京医药器械公司 ;戊巴比妥钠购自国药集团化学试剂有限公司 ;肝素钠购自上海康捷生物科技发展有限公司。色谱级乙腈、甲酸和甲醇为 Fisher 公司生产 ;碘乙酰胺 (IAA)、碳酸氢铵、二硫苏糖醇 (DTT) 和乙酸铵从 Merck 公司购买 ;测序级胰酶从 Sigma 公司购买 ;

[0047] 3) 动物 :雄性 SD 大鼠(体重 250 ~ 250g) 购自北京维通利华,在标准饲养环境中饲养。

[0048] 实验方法

[0049] 1) 离体大鼠肾脏灌流操作步骤,参照文献 (5),其示意图如图 1 所示。

[0050] a) 实验前新鲜配置 2%(w/v) 戊巴比妥钠生理盐水溶液 ;1%(w/v) 肝素钠生理盐水溶液 ;新鲜配制 K-H 溶液(成分 :KCl4.7mM、KH₂PO₄1.2mM、MgSO₄2.1mM、NaCl117mM、NaHCO₃25mM、CaCl₂2.5mM、葡萄糖 11.1g/L、右旋糖苷 6%、肌酐 60mg/dL) ;K-H 溶液里加入葡萄糖 (1g/L) ;逐个加入 20 种氨基酸,氨基酸浓度分别为 :丙氨酸,2mM ;精氨酸 a,0.5mM ;天冬酰胺,0.2mM ;天冬氨酸,0.2mM ;半胱氨酸,0.5mM ;谷氨酸,0.5mM ;谷氨酰胺,2mM ;甘氨酸,2.3mM ;组氨酸,0.24mM ;异亮氨酸,0.3mM ;亮氨酸,0.4mM ;赖氨酸,1mM ;甲硫氨酸,0.33mM ;苯丙氨酸,0.32mM ;脯氨酸,0.31mM ;丝氨酸,1mM ;苏氨酸,0.24mM ;色氨酸,0.07mM ;酪氨酸,0.2mM ;缬氨酸,0.33mM ;K-H 溶液在配置好后 6 小时内使用 ;使用前 K-H 溶液用 0.45 μm 滤膜过滤,95%O₂ + 5%CO₂ 饱和 2 个小时,浓盐酸调 pH 值为 7.4。

[0051] b) 灌流装置准备 :将灌流装置组装完毕,打开恒温系统,连通 95%O₂ + 5%CO₂ 饱和气体,绘制压力 - 流速曲线,根据系统压力校正灌流流速。

[0052] c) 麻醉 :40mg/Kg 戊巴比妥钠腹腔注射。

[0053] d) 手术步骤:对大鼠进行十字形开腹,依次分离出右侧输尿管,腹主动脉,下腔静脉和肠系膜上动脉。使用 24G 密封式留置针对右侧输尿管插管收集尿液;用无菌 1mL 注射器大隐静脉穿刺,取血 1mL,并向大隐静脉内注入 1mL1%(w/v) 肝素钠生理盐水溶液。血取出后置于两个干净的 1.5mL EP 管中,4℃暂时保存。将膈肌与腰静脉之间腹主动脉和下腔静脉上的分支除肾动脉和肾静脉以外全部结扎,然后将肠系膜上动脉结扎。用 18G 密封式留置针从位于肾脏以下的腹主动脉处插管,结扎固定。打开灌流装置确保肾脏始终处于灌注状态。将位于肾脏以上的腹主动脉结扎。从位于肾脏以下部位的下腔静脉处用输液管插管,引流。将位于右肾静脉以上处的下腔静脉结扎,使灌流液只从下腔静脉处经输液管流出。手术操作完毕后将大鼠整体移入 37℃温箱中。

[0054] e) 实验流程:根据系统压力调整肾脏灌注压为 110 ± 5 mmHg。灌流流程分三个阶段:第一个灌流阶段是单循环冲洗时间,冲洗体积是 600ml K-H 灌流溶液,冲洗时间为 10 到 15 分钟;第二个灌流阶段是有氧灌流时间,通过调整流速使大鼠肾脏灌注压始终处于 110 ± 5 mmHg 灌流,灌流体积为 300ml,循环灌流,以 10 分钟为单位,收集输尿管流出液,在每个 10 分钟的中间阶段对血管支路的灌流液取样 1ml,用于测量肾小球滤过率。连续灌流 40 分钟后,灌流停止,收集剩余的灌流液,转入灌流实验的下阶段;第三个灌流阶段是无氧灌流时间,即同一只大鼠重新换上新鲜的灌流液 300ml 继续灌流,仅是在灌流过程中不提供饱和和 95%O₂ + 5%CO₂ 气体,其他条件与有氧灌流条件相同,以 10 分钟为单位,收集输尿管流出液,连续灌流 40 分钟后,灌流停止,收集剩余的灌流液。有氧灌流阶段和无氧灌流阶段全程以 10 分钟为单位记录灌流的压力和灌流速度。

[0055] 2) 样品处理:

[0056] a) 灌流液保存:尿支路灌流液于 4℃ 2000g 离心 10 分钟,取上清,置于新 EP 管内,继续 12000g4℃离心 10 分钟;取上清,-80℃保存。

[0057] b) 尿支路灌流液蛋白经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,对蛋白条带进行考马斯亮蓝染色,脱色后按分子量切胶,然后进行胶内酶切,反相色谱柱分离,质谱鉴定。

[0058] 3) 反相高效液相色谱分离串联质谱鉴定:

[0059] a) 色谱方法:酶切后肽段经 Agilent1200 高效液相色谱自动加样器加入安捷伦公司的反相 Trap 柱,通过六通阀转换,进行 RP 色谱柱(0.1×150mm, Magic C18, 5 μm, 100 Å; Michrom Bioresources, Auburn, 美国)分离。洗脱时间 120 分钟,色谱柱流速为 0.5 μl/min。RP 柱洗脱梯度为 5 ~ 40% 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 +89.9% 乙腈 +10% 水)。

[0060] b) 质谱方法:从反相柱上洗脱下来的多肽应用 LTQ Velos Orbi Trap 离子阱串联质谱和 TripleTOF5600 质谱进行鉴定。

[0061] 4) 数据库检索:

[0062] 所有二级质谱结果用 mascot 软件进行数据库检索。所用数据库为 ipi.rat.v3.87。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;可变修饰:Deamidated(NQ), Oxidation(M)。Orbitrap 质谱数据检索容许误差为:母离子 10ppm,子离子 0.5Da;Tripletof5600 数据:母离子 0.05Da,子离子 0.05Da。

[0063] 实验结果

[0064] 1)来源于两只大鼠的灌流液经过质谱鉴定,基于两肽以上鉴定的蛋白分别为 1782 和 3025 个,共同鉴定的蛋白为 1402 个。对 1402 个大鼠蛋白作人蛋白的同源比对,本发明获得了 1233 个人同源灌流尿液蛋白。

[0065] 2)将 1233 个灌流液的人同源蛋白与人肾脏表达蛋白比较,相同的蛋白即灌流液中出现且在人肾脏表达的蛋白在本发明被认为是人肾脏特异的尿蛋白。本发明共获得了 981 个人肾脏特异的尿蛋白。通过与正常人血浆蛋白和正常人尿液蛋白比较,在这 981 个蛋白之中,613 个蛋白在正常血和尿液中已经鉴定到,240 个蛋白在正常尿液中鉴定到但在正常血液中没有鉴定到,71 个蛋白在正常血液中鉴定到但在正常尿液中没有鉴定到,57 个蛋白在正常血液和尿液中都没有鉴定到。见图 2 和图 3。

[0066] 因此总共有 128 个肾脏特异的蛋白在正常尿液中没有鉴定到,这些蛋白能够成为高灵敏的肾脏疾病标志物,因为这些蛋白在正常尿液中的背景为零。总共有 297 个肾脏特异蛋白在正常血液中没有鉴定到,这些蛋白不会受到其他器官和血浆的影响,可以成为特异的肾脏疾病标志物。尤其是这 57 个蛋白,它们既没有在正常尿液中鉴定到也没有在正常血液中鉴定到,因此这些蛋白既可能是高灵敏的肾脏疾病标志物又可能是高特异的肾脏疾病标志物。

[0067] 240 个在正常尿液中鉴定到但在正常血液中没有鉴定到的蛋白(以蛋白的 uniprot 序列号表示):

[0068] Q9Y696、Q9Y5Y2、Q9Y5P6、Q9Y5L0、Q9Y5K8、Q9Y547、Q9Y4P1、Q9Y3I0、Q9Y342、Q9Y303、Q9Y2V2、Q9Y2T3、Q9Y266、Q9Y226、Q9UQ80、Q9UNS2、Q9UNM6、Q9UKL6、Q9UHY7、Q9UHN6、Q9UHD1、Q9UBQ5、Q9UBB4、Q9NZL9、Q9NX46、Q9NWV4、Q9NVZ3、Q9NRX4、Q9NRN7、Q9NQW7、Q9NQR4、Q9NQE9、Q9HBJ8、Q9HB40、Q9HAV0、Q9HAB8、Q9H993、Q9H832、Q9H756、Q9H6S3、Q9H3K6、Q9H2M3、Q9H2A2、Q9H299、Q9H0W9、Q9H008、Q9GZZ9、Q9GZS3、Q9GZP4、Q9GZN7、Q9BY44、Q9BV57、Q9BUT1、Q9BUL8、Q9BU89、Q9BU02、Q9BTW9、Q9BTE6、Q9BT78、Q9BS40、Q9BS26、Q9BRF8、Q9BRA2、Q9BQA1、Q99707、Q99471、Q96S37、Q96QR8、Q96IU4、Q96IJ6、Q96HD9、Q96GK7、Q96GG9、Q96GA7、Q96FL8、Q96F10、Q96EK5、Q96DG6、Q96BJ8、Q969T7、Q92783、Q92616、Q8TDQ7、Q8TBX8、Q8NHP8、Q8NBF2、Q8N8N7、Q8N392、Q8IW45、Q86VN1、Q86V88、Q86TX2、Q7Z4H3、Q7Z3U7、Q7Z3J2、Q7L5N1、Q7L2H7、Q7L266、Q7L1Q6、Q6ZQN7、Q6ZNA5、Q6XQN6、Q6P587、Q6IA69、Q6BCY4、Q6A162、Q5VWZ2、Q5VW32、Q5T6J7、Q5T2W1、Q5T013、Q5SRE7、Q5R3I4、Q562R1、Q53H82、Q3ZCW2、Q3LXA3、Q3KQV9、Q2M3M2、Q15813、Q15435、Q15386、Q15181、Q15154、Q15102、Q15056、Q15046、Q14353、Q13630、Q13347、Q12792、Q07020、Q06323、Q04917、Q02750、Q00534、P99999、P63010、P63000、P62888、P62873、P62851、P62834、P62753、P62750、P62333、P62330、P62280、P62277、P62070、P61970、P61586、P61457、P61106、P61088、P61081、P61077、P60953、P60900、P60510、P58546、P55209、P52758、P52565、P51665、P51452、P51149、P50502、P50135、P49789、P48556、P47897、P41250、P40925、P39023、P36873、P35241、P31946、P31323、P30047、P30043、P30039、P28161、P27348、P25786、P22694、P20472、P20340、P15941、P15586、P15374、P14868、P14324、P14174、P13716、P11234、P10619、P0CG30、P09525、P08865、P08697、P08263、P07902、P07858、P07437、P05026、P04745、P02792、P00492、P00441、095861、095786、095373、094979、094915、094903、076071、075663、075347、075191、060888、060763、060256、043681、043617、043598、043592、015511、015498、015244、015145、014980、014638、014579、000429、B0I1T2、A6NFQ2、A6ND91、A4D1P6、A0PJK1。

[0069] 71 个在正常血液中鉴定到但在正常尿液中没有鉴定到的蛋白(以蛋白的 uniprot 序列号表示):

[0070] Q9Y600、Q9Y285、Q9UNQ0、Q9UNA1、Q9UN86、Q9ULW0、Q9UKG9、Q9UK32、Q9UHL0、Q9NTZ6、Q9NRD1、Q9NPF4、Q9HBK9、Q9H9A6、Q9H3S4、Q9H254、Q9H1Z4、Q9GZT4、Q9BXJ9、Q9BQ69、Q99487、Q96Q11、Q96N87、Q92878、Q92576、Q8WW22、Q8TDJ6、Q8TBE9、Q8NFP9、Q8NF91、Q8N5Z0、Q8IVL1、Q7Z3D6、Q5T4S7、Q16878、Q16772、Q16186、Q15349、Q15276、Q14765、Q14738、Q13642、Q13564、Q13363、Q13232、Q13158、Q06203、Q03393、P84098、P67775、P57772、P54922、P53611、P49914、P47989、P20132、P17516、P14920、P11245、P08397、P07864、P07327、P00374、095848、095749、075153、060443、043704、043432、043324、015111。

[0071] 57 个在正常血液和尿液中都没有鉴定到的蛋白(以蛋白的 uniprot 序列号表示):

[0072] Q9P0P0、Q9NZL4、Q9NXJ5、Q9NSY2、Q9NQA3、Q9HBL8、Q9H6Q4、Q9H3H3、Q9H2P9、Q9BT73、Q99873、Q96S19、Q96QU6、Q96NL6、Q96JD6、Q96GX9、Q96FN9、Q96CD2、Q8WWX8、Q8WUX2、Q8N6F8、Q8IYD1、Q8IYB7、Q8IWI9、Q8IUZ5、Q86YJ6、Q86TU7、Q7Z6M1、Q7LG56、Q7L8W6、Q6YHU6、Q6V1X1、Q6P3X3、Q6P2I3、Q5H9R7、Q5F1R6、Q32M88、Q16576、Q16548、Q14CX7、Q0VDG4、P62256、P61923、P55854、P49454、P48507、P12004、P10746、P0CG29、095486、075830、000743、A8MWX3、A6NK44、A4D126、A2VDF0、A2RU49。

[0073] 3) 每个鉴定的蛋白在鉴定时都具有一个相应的 emPAI 值(每个蛋白被质谱实际检测到的肽段数除以该蛋白理论上能被质谱检测到的肽段数,该比值的指数形式定义为 emPAI,研究证明 emPAI 的大小与该蛋白在样本中的丰度相关(6)),该值可以反映该蛋白在蛋白混合物中的绝对浓度,因此可以根据蛋白的 emPAI 值将鉴定到的蛋白根据蛋白的丰度大小排序。首先将 981 个肾脏蛋白根据在人尿中的丰度大小排序,然后将 981 个肾脏蛋白再根据相对应的大鼠蛋白在灌流液中的丰度大小排序。由于人和鼠同源蛋白的丰度具有一定的联系,如果某一蛋白在大鼠灌流液的丰度排名显著高于该蛋白在正常人尿蛋白中的丰度排名,则该蛋白丰度排名的升高可能是由于灌流损伤所致。通过比较蛋白在两个灌流液样本中的丰度排名顺序和在正常尿液中的丰度排名顺序,本发明获得了 75 个潜在的由于损伤导致浓度增高的蛋白,相对于正常尿液中的丰度排名,此 75 个蛋白在两个灌流样本中都增加了 300 个名次以上。

[0074] 75 个潜在的由于损伤导致浓度增高的蛋白(以蛋白的 uniprot 序列号表示):

[0075] Q16772、P08263、P48507、A2RU49、Q8N5Z0、P0CG29、P0CG30、Q86YJ6、Q9Y600、Q9NXJ5、Q9H3S4、Q16773、043704、A6NK44、Q99487、Q03013、P52888、Q86TX2、P00374、Q6P2I3、Q9HBL8、P67775、P62491、Q14749、P18440、P11245、Q96JD6、Q8N6F8、P20132、095848、Q96S19、Q96F10、Q13509、Q96GX9、P30566、Q03393、Q9Y285、Q9BUF5、075688、P48556、P56192、060333、Q8NBF2、P55212、Q53H82、P29144、P49753、Q99460、Q16719、Q96EK6、Q9BV57、Q08752、095394、Q99436、015305、Q13630、Q96GK7、Q15008、Q16881、P48506、Q9Y3A5、Q14353、000338、P31153、Q9NQW7、Q5T013、Q8TDX5、P32929、Q86X76、P58546、Q9H2A2、P45381、P53004、Q96KN2、Q15493。

[0076] 4) 四只大鼠分别进行有氧和无氧离体肾脏灌流,然后对灌流液蛋白进行质谱分析。采用非标记定量比较蛋白在无氧和有氧灌流液中的蛋白表达量,发现有 39 个大鼠蛋白在无氧灌流的灌流液中蛋白表达量增高。经过人同源蛋白比对,本发明获得了 33 个人肾脏特异蛋白,由于此 33 个蛋白相对应的大鼠蛋白在无氧灌流液中比有氧灌流液中表达增高,

所以此 33 个蛋白可能是人肾脏疾病的潜在生物标志物。

[0077] 33 个在无氧灌流的灌流液中蛋白表达量增高的蛋白(以蛋白的 uniprot 序列号表示)：

[0078] P37837、Q9Y289、P61106、Q99685、043895、P21281、Q5T2W1、P27487、Q16819、Q07837、Q06830、P13866、P21283、P14550、P15144、P05937、Q9NYQ3、P61204、P08473、P60953、P22392、014638、Q9UNQ0、P43005、094903、Q9HAM9、P09327、P18206、A0PJK1、P30711、Q6ZQN7、P36543、000231。

[0079] 5) 将上述灌流产生的肾脏特异尿蛋白合并,共获得 990 种蛋白。其中正常尿液和血浆里都没有、不受其他器官和血浆影响且背景为零、仅在疾病状态下的尿液中出现的有 57 种肾脏特异的尿蛋白。只在尿液里有但血液里没有,不受其他器官和血浆影响的有 240 种肾脏特异的尿蛋白。只在正常血液里有但正常尿液里没有,正常背景为零,仅在疾病状态下的尿液中出现的有 71 种肾脏特异的尿蛋白。33 个灌流产生的肾脏特异尿蛋白当肾脏灌流从有氧方式转到无氧方式的时候,尿里表达量升高,75 个灌流产生的肾脏特异尿蛋白在灌流液中的丰度排序远高于在正常尿液中的丰度排序。

[0080] 参考文献：

[0081] 1. Brenner, B. M. (2001) Brenner & Rector's THE KIDNEY (sixth edition). I.

[0082] 2. Quilley, C. P., and McGiff, J. C. (1990) Isomers of 12-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid reduce renin activity and increase water and electrolyte excretion. *J Pharmacol Exp Ther* 254, 774-780.

[0083] 3. Kamiya, A., Tanigawara, Y., Saito, Y., Hayashi, Y., Aiba, T., Inui, K., and Hori, R. (1990) Moment analysis of drug disposition in kidney. II: Urine pH-dependent tubular secretion of tetraethylammonium in the isolated perfused rat kidney. *J Pharm Sci* 79, 692-697.

[0084] 4. Bell-Quilley, C. P., Lin, Y. S., Hilchey, S. D., Drugge, E. D., and McGiff, J. C. (1993) Renovascular actions of angiotensin II in the isolated kidney of the rat: relationship to lipxygenases. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 676-682.

[0085] 5. Taft, D. R. (2004) The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development. *Curr Drug Discov Technol*, 97-111.

[0086] 6. Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., and Mann, M. (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 4, 1265-1272.

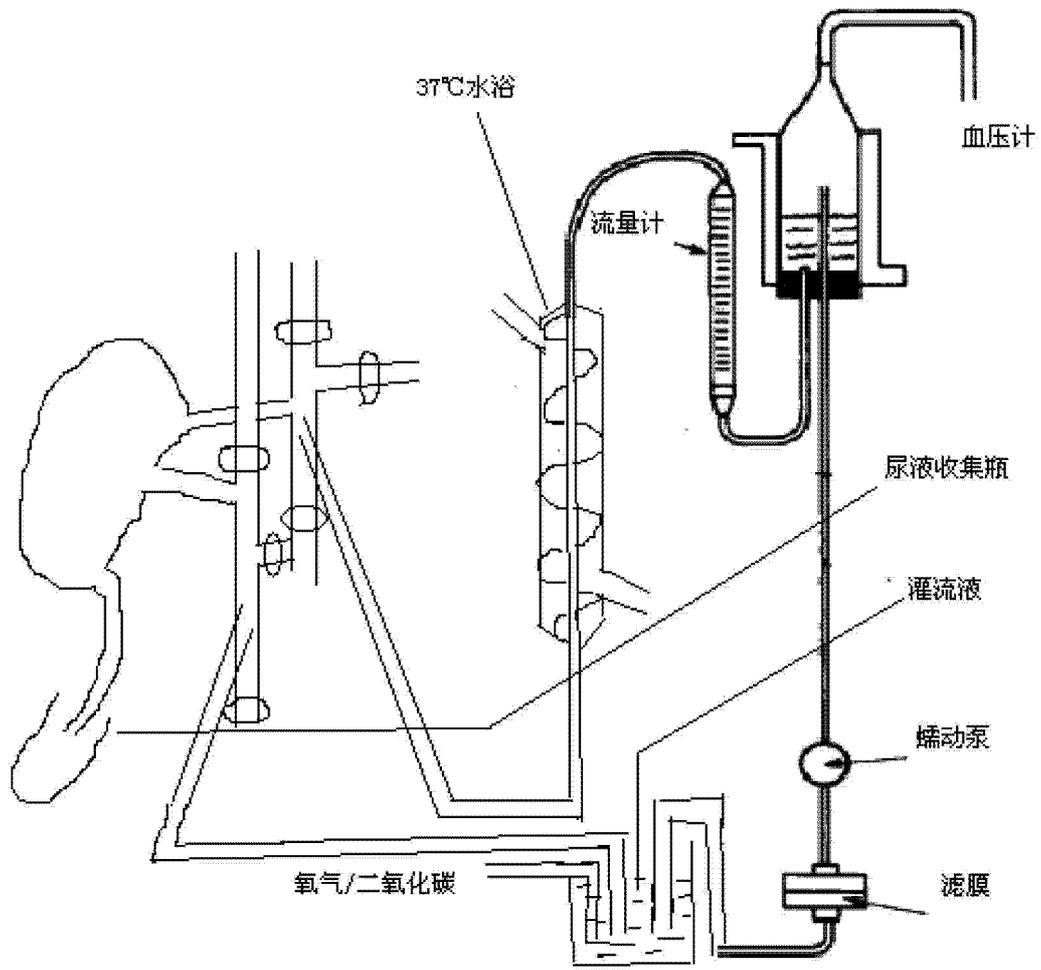


图 1

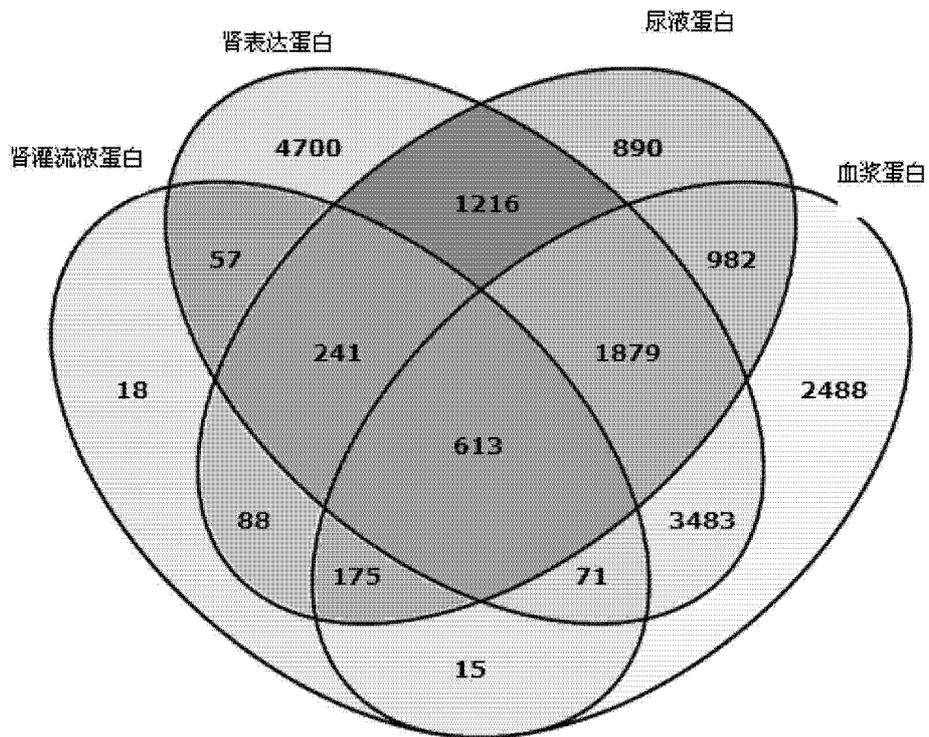


图 2

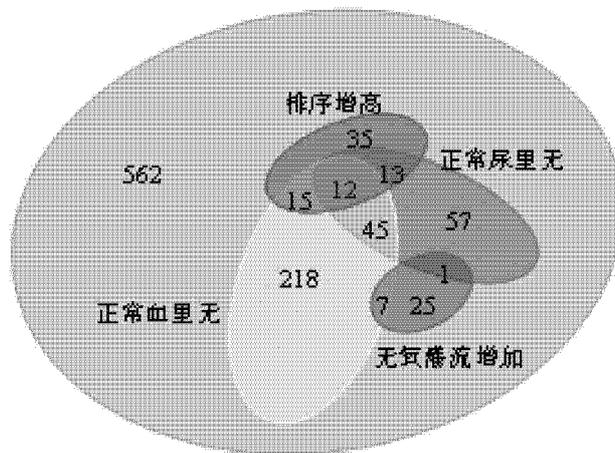


图 3

专利名称(译)	人肾脏特异尿液蛋白的用途		
公开(公告)号	CN104076085A	公开(公告)日	2014-10-01
申请号	CN201310101053.8	申请日	2013-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院基础医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院基础医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院基础医学研究所		
[标]发明人	高友鹤 贾露露		
发明人	高友鹤 贾露露		
IPC分类号	G01N27/62 G01N33/48 G01N33/535		
代理人(译)	程伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及人肾脏特异尿液蛋白的用途。具体而言，本发明涉及利用离体大鼠肾脏灌流技术和质谱分析获得的人肾脏特异尿液蛋白在制备人肾脏疾病标志物中的用途。本发明利用离体大鼠肾脏灌流技术检测出肾脏特异蛋白，从而排除了血浆蛋白对尿蛋白质组的影响，更准确、更特异地反应肾脏的功能和状态，为肾脏疾病的早期诊断、治疗过程中的检测和预后评估提供了更准确的结果。

