

利用 SPR 方法对人尿液中多蛋白组分定量分析

Multi-protein Quantitative Analysis in Human Urine Using Surface Plasmon Resonance

杨姝^{1, #}, 郑非凡^{2, #}, 陈媛媛³, 张璐璐^{2, *}, 杨真威^{3, *}

¹解放军总医院京北医疗区清河门诊部, 北京

²信息学院, 北京化工大学, 北京

³中国科学院生物物理研究所, 北京

*通讯作者邮箱: yzw@moon.ibp.ac.cn; llzhang@buct.edu.cn

[#]共同第一作者/同等贡献

摘要

表面等离子共振 (SPR) 方法可同时在芯片表面不同通道偶联多个蛋白, 待测样品顺序流经各个通道时, 会产生和相应偶联蛋白的结合信号, 因此可实现同时对样本中多个蛋白定量的目的。在本研究中, 为了实现肾病的快速诊断, 需从人尿液中寻找肾病蛋白标记物。实验中, 将人血清清蛋白 (human serum albumin, HSA) 抗体, beta-2 微球蛋白 (beta-2-microglobulin, B2M) 抗体, kappa 轻链蛋白 (kappa light chain) 抗体和 lambda 轻链蛋白 (lambda light chain protein) 抗体偶联在 CM5 芯片表面, 再利用人血清清蛋白、beta-2 微球蛋白、kappa 轻链蛋白和 lambda 轻链蛋白的标准品梯度稀释作为分析物建立标准曲线。利用这些标准曲线, 同时检测人尿液中四种蛋白的含量。在正常人和肾病患者尿液中, HSA 和 B2M 表达量存在显著差异, 因此 HSA 和 B2M 可以作为肾病诊断的蛋白标记物。此方法可以同时检测人血清清蛋白和 beta-2 微球蛋白, 具有良好的灵敏性, 可重复性和特异性。

关键词: 肾病诊断, 人尿液, 人血清清蛋白, beta-2 微球蛋白, 标准曲线

引用格式: 杨姝, 郑非凡, 陈媛媛, 张璐璐, 杨真威. (2023). 利用 SPR 方法对人尿液中多蛋白组分定量分析. *Bio-101* e1011000.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1011000.

How to cite: Yang, S., Zheng, F. F., Chen, Y. Y., Zhang, L. L. and Yang, Z. W. (2023). Multi-protein Quantitative Analysis in Human Urine Using Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011000. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011000. (in Chinese)

Copyright: © 2023 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

材料与试剂

1. CM5 芯片
2. PBS-P+ buffer, 10× 缓冲液 (0.2 M phosphate buffer, 27 mM KCl and 1.37 M NaCl, 0.5% Surfactant P20, pH 7.4, Cytiva Company)
3. 人血清清蛋白及其特异性抗体 (Bio-Rad Company)
4. beta-2 微球蛋白及其特异性抗体 (Sino Biological Inc, China)
5. kappa 轻链蛋白及其特异性抗体 (Bio-Rad Company)
6. lambda 轻链蛋白 (Bio-Rad Company), 其特异抗体 (Exbio Praha)
7. N-hydroxysuccinimide (NHS) (Cytiva Company)
8. N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl carbodiimide hydrochloride (EDC) (Cytiva Company)
9. 10 mM 醋酸钠 (Cytiva Company)
10. 乙醇胺 (GE Healthcare) (Cytiva Company)
11. 甘氨酸盐酸 pH 1.5 (Cytiva Company)
12. 牛血清白蛋白 (BSA)
13. NaCl, NaOH, 甘油以及其他试剂 (北京华泰昕生物医疗技术有限公司)
14. Running buffer (见溶液配方)

仪器设备

1. Biacore T100 (Cytiva Company)
2. SORVALL LEGEND MICRO 17R Centrifuge (Thermo scientific)
3. Millipore 超纯水仪

实验步骤

以 B2M 轻链蛋白为例具体说明实验步骤，其他三种蛋白检测步骤相同。

一、实验前的准备

running buffer 的准备：10× PBS-P buffer 加入 450 mL 超纯水，现用现配。使用前对光肉眼仔细观察，有无杂质；如果有，需用 0.22 μm 膜过滤。（以下简称 buffer）。

引用格式：杨姝，郑非凡，陈媛媛，张璐璐，杨真威. (2023). 利用 SPR 方法对人尿液中多蛋白组分定量分析. *Bio-101* e1011000. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011000. 2

How to cite: Yang, S., Zheng, F. F., Chen, Y. Y., Zhang, L. L. and Yang, Z. W. (2023). Multi-protein Quantitative Analysis in Human Urine Using Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011000. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011000. (in Chinese)

仪器准备：将处于 standby 状态的仪器 stop standby。Unlock chip，取出维护芯片，更换本次使用的 CM5 芯片，注意芯片上箭头方向朝内，dock 芯片。将维护用水更换成 running buffer，prime。

配体的准备：B2M 轻链蛋白抗体，buffer 完全溶解至 1 mg/mL，4 °C，13,000 转离心 3 分钟，转管备用。

分析物的准备：B2M 轻链蛋白标准品，buffer 完全溶解至 1 mg/mL，4 °C，13,000 转离心 3 分钟，转管备用。

以上配体与分析物需要现用现配。

人尿液样本 4 °C，13,000 转离心 8 分钟。取上清用 0.22 μm 过滤膜过滤备用。

二、配体的偶联：配体偶联条件及预实验条件摸索

预实验：运行一个新实验，选择 Fc4，流速 20 μL/分钟。

1. 考察分析物 B2M 轻链蛋白标准品与芯片表面是否存在非特异性结合：1 mg/mL B2M 轻链蛋白标准品，buffer 稀释至 0.1 μM 和 1 μM (B2M 分子量为 13.5KD，1 μM 约为 13.5 μg/mL)，手动进样 60 s，50 mM NaOH 再生。图 1A。结论：没有非特异结合，适合作为分析物。
2. 考察分析物人尿液样品与芯片表面是否存在非特异性结合，前述处理人尿液样品用 buffer 稀释 2 倍，手动进样 120 s，50 mM NaOH 再生。图 1B。无非特异性结合，可以作为分析物。
3. 配体偶联 pH 选择：将 1 mg/mL 的 B2M 轻链蛋白抗体用 pH 4.0, pH 4.5, pH 5.0 (pH 3.5 < pH < PI) 10 mM 醋酸钠分别配制为 10 μg/mL，进样 60 s，50 mM NaOH 再生。溶解时，先在 EP 管中加入醋酸钠 buffer，随后加入 B2M 轻链蛋白抗体的瞬间，观察是否有沉淀。有沉淀的 pH 条件，无法继续实验。选择斜率大，进样结束接近基线的 pH，同等条件选择缓和 pH。这个实验中三个 pH 均可偶联，选择最温和 5.0 的实验条件。图 3。根据目标偶联量确定偶联时配体浓度为 4 μg/mL。图 1C。

三、实验方法的建立

1. 偶联：配体偶联量：这个实验目的是定量尿液样品中的 B2M 轻链蛋白的含量，所以选择中高偶联。运行一个新循环，选择 Fc4，流速 10 μL/分钟。EDC/NHS 避光解冻，10,000 转离心 1 分钟，各取 60 μL 完全混合，进样 420 s 活化，活化高度 100-200RU；1 mg/mL 的 B2M 轻链蛋白抗体用 pH5.0 醋酸钠稀释到 4 μg/mL，进样 300 s，乙醇胺盐酸封闭 420 s。图 2A。
2. 分析物测试条件摸索：运行一个新循环，选择 Fc4-3，流速 20 μL/分钟。将 1 mg/mL B2M 轻链蛋白标准品用 buffer 稀释成 0.1, 1 μM，手动进样 60 s，pH1.8 甘氨酸再生 30 s。初步考察 B2M 轻链蛋白与抗体的结合情况。图 2B。

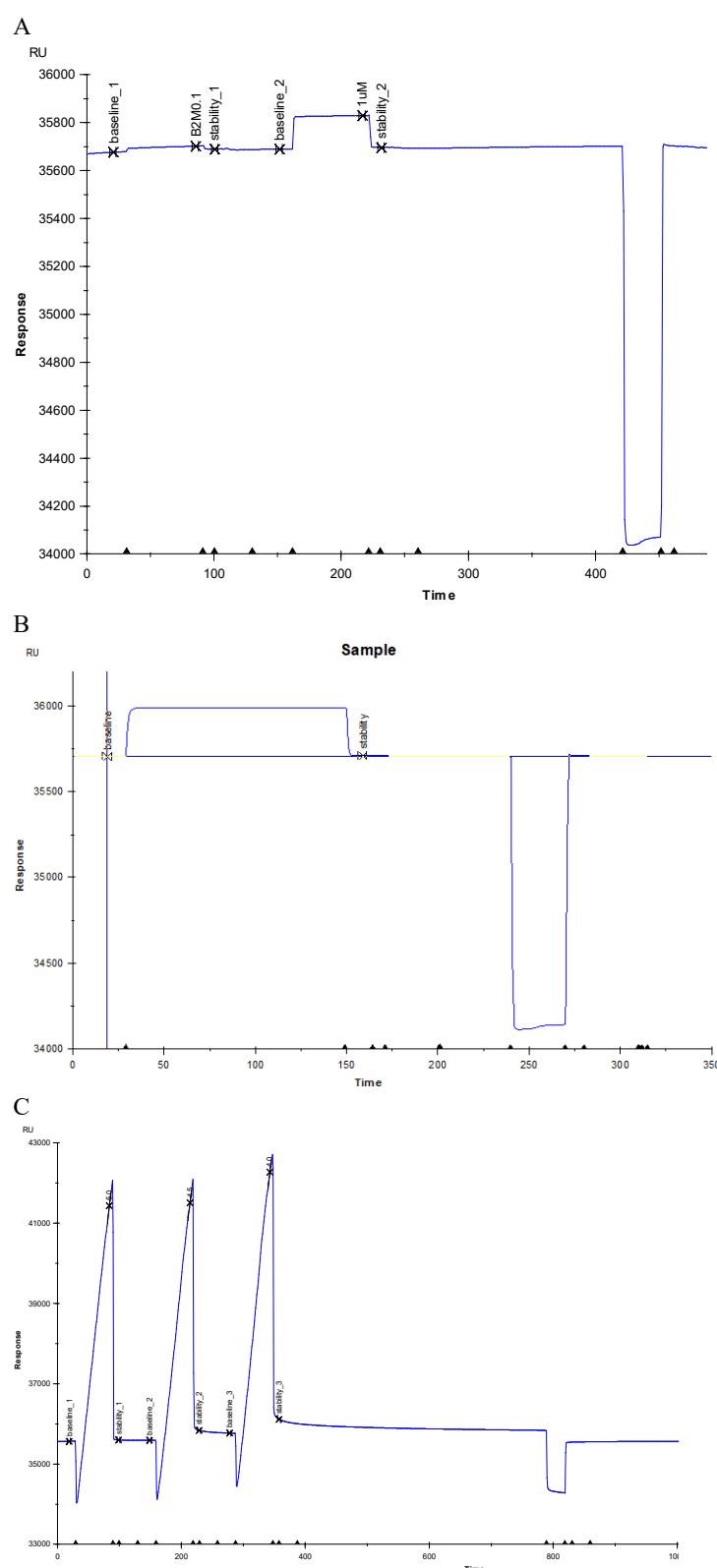


图 1 预实验 (A) 分析物 B2M 轻链蛋白标准品与芯片表面的非特异性结合 (B) 分析物人尿液样品与芯片表面的非特异性结合 (C) 配体 B2M 轻链蛋白抗体偶联 pH 选择

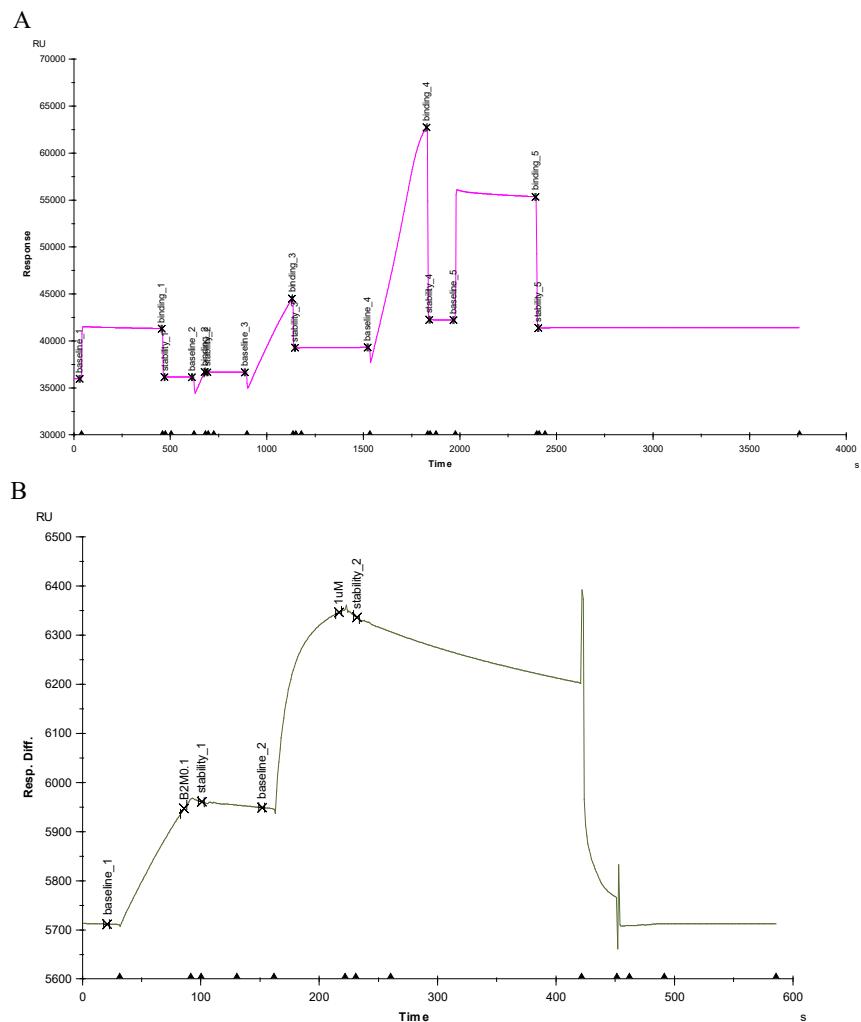


图2 (A) 配体 B2M 轻链蛋白抗体偶联示意图 (B) B2M 轻链蛋白标准品测试条件摸索

3. 建立标准曲线&检测样品：运行一个新实验，选择 Fc3, 4，流速 $30 \mu\text{L}/\text{分钟}$ 。将 1 mg/mL B2M 轻链蛋白标准品用 buffer 稀释成 0 、 0.008438 、 0.01688 、 0.03375 、 0.0675 、 0.135 、 0.27 、 0.54 、 $1.08 \mu\text{g/mL}$ 9 个浓度梯度，以 buffer 为 0 浓度；将准备好的尿液样品，用 buffer 分别稀释 2 倍， 5 倍， 10 倍。运行自动化实验，方法如下：进样 120 s ，解离 90 s ， $\text{pH } 1.8$ 甘氨酸再生 30 s 。

图3以时间为横坐标，Fc4-3 SPR 信号 RU 为纵坐标，获得 B2M 和样品的 SPR 曲线图。图4以浓度为横坐标，Fc4-3 SPR 信号 RU 为纵坐标，在 Evaluation 软件中获得 B2M 轻链蛋白的标准曲线和各尿液样品中 B2M 含量。

4. 实验步骤示意图（图5）

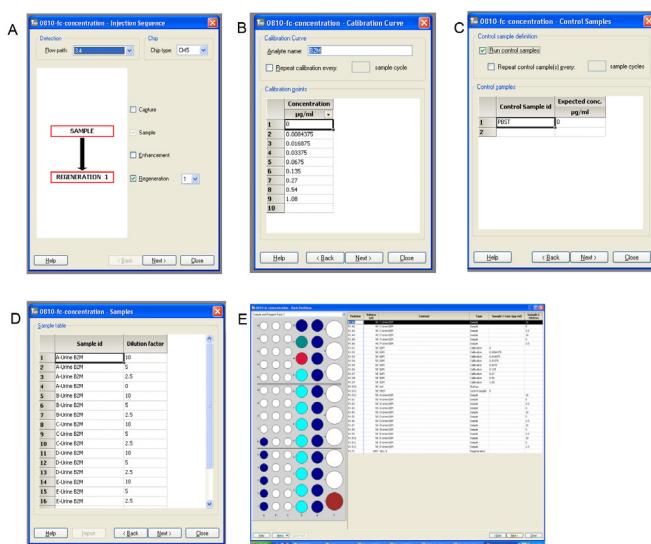


图 3 标准曲线和人尿液样品分析自动化实验方法

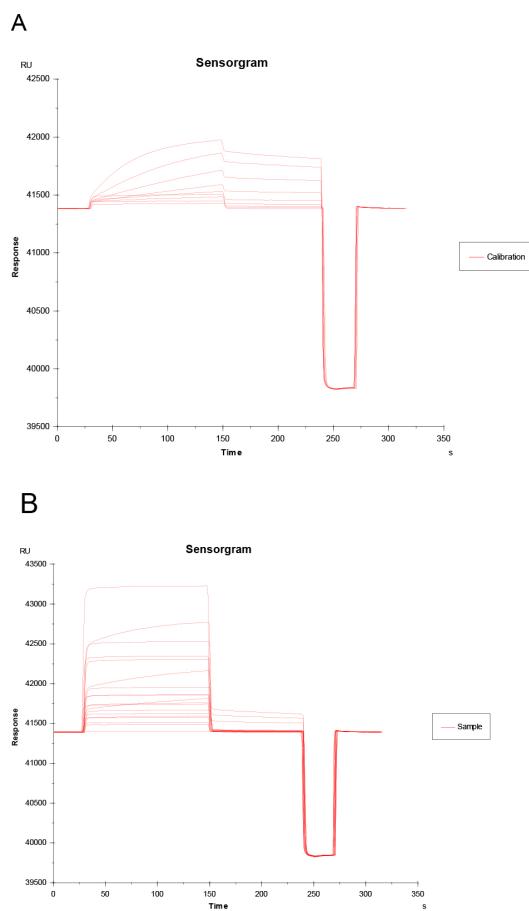


图 4 (A) B2M SPR 曲线图 (B) 各尿液样品 SPR 曲线图

引用格式: 杨姝, 郑非凡, 陈媛媛, 张璐璐, 杨真威. (2023). 利用 SPR 方法对人尿液中多蛋白组分定量分析. *Bio-101* e1011000. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011000.

6

How to cite: Yang, S., Zheng, F. F., Chen, Y. Y., Zhang, L. L. and Yang, Z. W. (2023). Multi-protein Quantitative Analysis in Human Urine Using Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011000. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011000. (in Chinese)

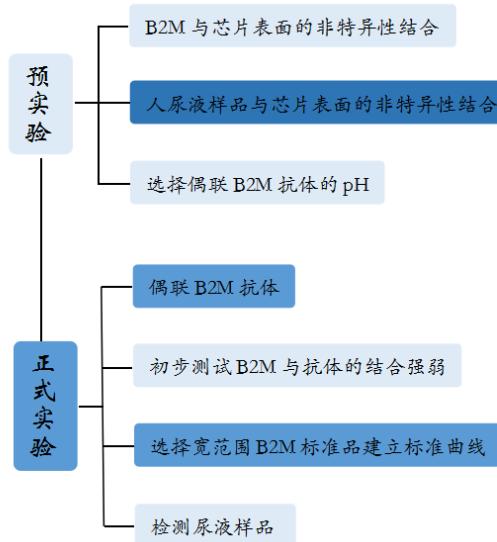


图5 实验步骤示意图

四、数据分析与数据解析

以浓度为横坐标, Fc4 SPR 信号 RU 为纵坐标, 在 Evaluation 软件中获得 B2M 轻链蛋白的标准曲线和各尿液样品中 B2M 含量, 图 6。在 T200 Evaluation Software 中, 选择 Concentration Analysis, Using calibration, 软件自动给出得出标准曲线和 B2M 蛋白含量。选择 Calibration tab 下的 Calibration curve, 左侧为各个标准品的具体反应值, 右侧为标准曲线。其中, 0 浓度的反应值为 4.1, 非常接近 0 点; 9 个浓度梯度呈递增关系; 最高浓度 1.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 反应值为 486.9, 从整个曲线形状看, 已接近饱和。标准曲线校正后的浓度与使用的每个标准品浓度非常接近。综上表明, 这条标准曲线浓度范围区间跨度大且合理。Control Samples tab 下 PBST 反应值 3.5 非常接近 0。Samples tab 下, 右侧为人尿液样品中 B2M 的反应值落在标准曲线中的位置, 均落在标准曲线内; 结合左侧表格, 可以精确定量所有人尿液样品中 B2M 的含量。

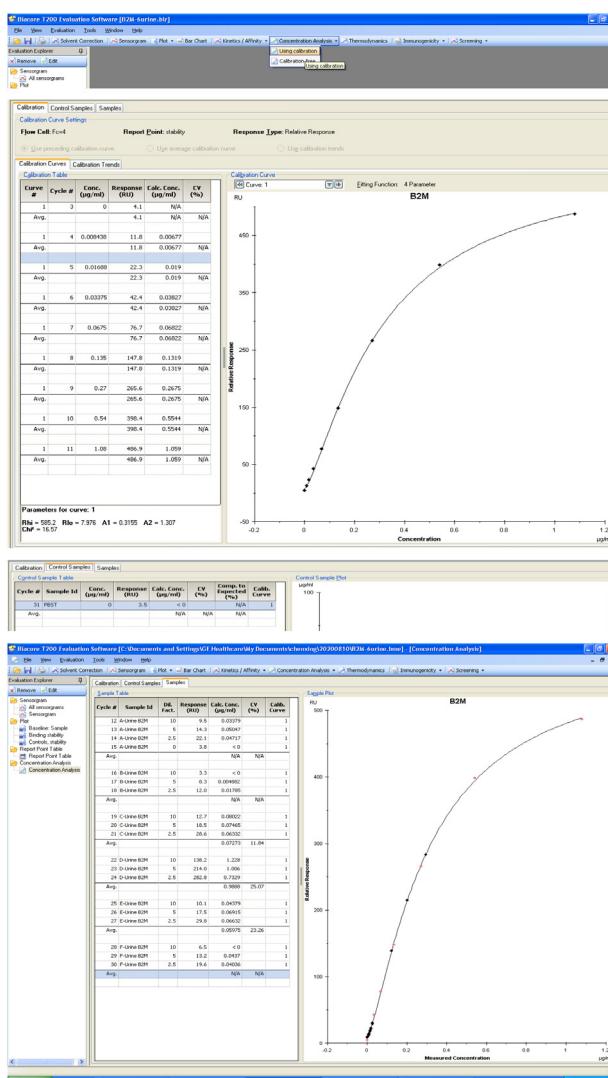


图 6 T200 Evaluation Software 分析标准曲线和人尿液样品

实验注意要点

处理人尿液样品时，必须离心，过滤，防止堵塞 IFC。

结果与数据分析

在 A、B、C、D、E、F 六份人尿液样品中，D-Urine 中 B2M 的含量明显高于其他样品。D-Urine 为病人样品，其他为正常人样品。表明 B2M 可以作为肾病诊断的蛋白标记物。

引用格式：杨姝，郑非凡，陈媛媛，张璐璐，杨真威. (2023). 利用 SPR 方法对人尿液中多蛋白组分定量分析. *Bio-101* e1011000. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011000.

How to cite: Yang, S., Zheng, F. F., Chen, Y. Y., Zhang, L. L. and Yang, Z. W. (2023). Multi-protein Quantitative Analysis in Human Urine Using Surface Plasmon Resonance. *Bio-101* e1011000. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011000. (in Chinese)

溶液配方

1. Running buffer

10× 商品化 PBS-P 50 mL 加入 450 mL 超纯水，现用现配。使用前需确定无杂质（以下简称 buffer）。

致谢

感谢以下资金项目支持：国家自然科学基金项目（No.61971026, 81871505），北京市自然科学基金项目（No.4202053），北化-中日联合项目（XK2020-15）。

参考文献

1. Zhang, L., Wang, H., Zhang, H., Zhang, N., Zheng, X., Li, W., Qiu, X. and Yu, D. (2022). Development of a portable multiplexed instrument for multi-proteins detection in human urine using surface plasmon resonance. *Sens Actuators, B*. 369: 132272. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132272>
2. Zhang, L., Zhang, H., Huang, Y., Zhang, J., Chen, X., Chen, Y., Miao, G., Liu, L., Yu, D., Qiu, X., et al. (2019). Detection of Kappa Light Chain Protein in Human Urine by Surface Plasmon Resonance. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*. 11(12): 1666–1670. <https://doi.org/10.1166/nnl.2019.3052>