

PHÂN TÍCH HỆ PROTEIN NƯỚC TIÊU BỆNH NHÂN GHÉP THẬN CÓ BIẾN CHỨNG THAI GHÉP CẤP TÍNH

Phạm Đức Đan¹, Nguyễn Thị Minh Phương¹, Phạm Đình Minh¹, Hà Phan Hải An², Nguyễn Bích Nhi¹, Phan Văn Chí¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức

TÓM TẮT

Ghép thận là một phương pháp điều trị thay thế tối ưu cho bệnh nhân bị suy thận giai đoạn cuối. Thái ghép là trở ngại chính của kỹ thuật ghép do giới hạn về thời gian tồn tại của mô ghép. Hiện nay, chẩn đoán đào thải ghép thận cấp tính được thực hiện thông qua sinh thiết, đây là phương pháp khá bất tiện và tốn kém đồng thời đi kèm với những rủi ro đáng kể, vì vậy cần phát triển các phương pháp không xâm lấn và đáng tin cậy để phát hiện các chỉ thị sinh học trong thái ghép thận cấp. Proteomics là một cách tiếp cận mới đầy hứa hẹn để phát hiện các chỉ dấu sinh học trong các dịch sinh học như nước tiểu, huyết tương và huyết thanh. Trong số các dịch này, nước tiểu được coi là mẫu nghiên cứu hấp dẫn do một số lợi thế. Trong nghiên cứu này, SDS-PAGE được thực hiện để phân tách hệ protein nước tiểu sau khi đã tinh sạch bằng ProteoSpin™ Urine Protein Concentration Micro Kit. Sau khi nhuộm, bản gel sẽ được cắt bằng và thủy phân bằng enzyme trypsin. Hỗn hợp peptide chiết ra được phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng nano một chiều (1D nanoLC) kết hợp với khối phổ (NanoESI-Q-TOF-MS/MS). Các protein được nhận diện bằng phần mềm MASCOT v1.8. Trong số 30 protein được nhận diện đã cho thấy nhiều protein liên quan đến bệnh thái ghép thận cấp tính như Uromodulin, AMBP protein và Beta-2-microglobulin... Những nghiên cứu tiếp sau sẽ tập trung tìm hiểu những protein này.

Từ khóa: Khối phổ, nhận diện protein, nước tiểu, proteomics, thái ghép thận cấp tính

MỞ ĐẦU

Suy thận mạn tính giai đoạn cuối là tình trạng suy giảm gần như hoàn toàn chức năng của thận. Theo nhiều nghiên cứu, ghép thận là phương pháp điều trị tốt nhất cho bệnh nhân suy thận giai đoạn cuối. Tuy nhiên thái ghép luôn là khó khăn gặp phải sau quá trình phẫu thuật, đặc biệt là thái ghép cấp tính. Thái ghép thận cấp tính đặc trưng bởi sự suy giảm đột ngột chức năng của thận được ghép. Thông thường nó được phát hiện thông qua sự gia tăng creatinine huyết thanh trong quá trình theo dõi lâm sàng sau phẫu thuật ghép. Thái ghép cấp thường xuất hiện trong những tuần đầu sau ghép (thường ở tháng thứ 3 và tháng thứ 4 sau ghép), cơ chế là do phản ứng miễn dịch tế bào, có thể được điều trị rất hiệu quả nếu phát hiện sớm bằng cách tăng liều thuốc ức chế miễn dịch.

Hiện nay, chẩn đoán đào thải ghép thận cấp tính được thực hiện thông qua sinh thiết, đây là phương pháp khá bất tiện và tốn kém đồng thời đi kèm với những rủi ro đáng kể. Vì vậy, có một nhu cầu cao để phát triển các phương pháp không xâm lấn và đáng tin cậy để phát hiện các chỉ thị sinh học trong thái ghép thận cấp. Proteomics là một cách tiếp cận mới

đầy hứa hẹn để phát hiện các chỉ dấu sinh học trong các dịch sinh học như nước tiểu, huyết tương và huyết thanh (Wu *et al.*, 2010). Trong số các dịch này nước tiểu được coi là mẫu nghiên cứu hấp dẫn do một số lợi thế: (i) Không xâm lấn và dễ dàng lấy được với lượng mẫu lớn (ii) Các protein và peptide trong nước tiểu khá ổn định và ít phức tạp (iii) Số lượng và thành phần của hệ protein trong nước tiểu trực tiếp phản ánh những thay đổi trong chức năng của thận và đường niệu sinh học. Mặc dù nước tiểu cũng là mẫu khó nghiên cứu vì phổ dải nồng độ rất rộng của hệ protein, điều này có thể được khắc phục bằng tiêu chuẩn hóa trên cơ sở của creatinine (Vestergaard, Leveritt, 1958) hoặc sử dụng các "peptide keepinghouse", những peptide có mặt hầu hết trong nước tiểu của con người mà không liên quan đến tuổi tác, giới tính, sức khỏe (Theodorescu *et al.*, 2005). Gần đây, nghiên cứu protein trong nước tiểu đã trở thành phương pháp tiếp cận quan trọng và hiệu quả để phát hiện các chỉ thị sinh học có trong bệnh thận.

Trong nghiên cứu này, phương pháp được sử dụng là điện di một chiều kết hợp với khối phổ nhằm nghiên cứu tổng thể hệ protein có trong nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng đào thải cấp tính.

Sau khi mẫu được tinh sạch sẽ được phân đoạn bằng điện di một chiều SDS-PAGE. Các phân đoạn khác nhau của hệ protein sẽ được cắt ra và thủy phân với trypsin và được phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng HPLC và được nhận diện bằng hệ thống khối phổ (MS/MS) kết hợp với các phần mềm tin sinh học. 30 protein đã được nhận diện ở các phân đoạn khác nhau. Trong đó nhiều protein có hàm lượng thấp và một số protein được nhận diện ra liên quan trực tiếp đến biến chứng thai ghép thận cấp tính. Đây có thể là những nghiên cứu đầu tiên về hệ protein nước tiểu bằng kỹ thuật khối phổ ở Việt Nam. Tuy còn nhiều hạn chế nhưng có thể là tiền đề cho những nghiên cứu sâu hơn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thai ghép cấp tính tuổi từ 20 - 60, được cung cấp bởi Khoa thận & lọc máu, Bệnh viện Hữu Nghị Việt Đức, Hà Nội, Bộ Y tế.

Các hóa chất sử dụng đều có độ tinh sạch cần thiết cho sinh học phân tử, bộ kit phân tách protein nước tiểu ProteoSpin™ Urine Protein Concentration Micro Kit (Norgen Biotek, Canada). Hệ thống máy sử dụng có độ tin cậy cao cùng với các trang thiết bị khác của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp

Thu nhận hệ protein nước tiểu bằng ProteoSpin™ Urine Protein Concentration Micro Kit

Lấy 1 ml mẫu nước tiểu, điều chỉnh về pH 3,5 bằng 40 µl Đệm điều chỉnh pH. Hoạt hóa cột 2 lần với 500 µl Đệm rửa và hoạt hóa cột. Đưa 600 µl mẫu nước tiểu được điều chỉnh pH vào cột đã hoạt hóa và ly tâm trong thời gian 2 phút với tốc độ 7500 vòng/phút, thực hiện cho đến khi hết 1 ml mẫu. Rửa cột bằng 500 µl Đệm rửa và hoạt hóa cột và ly tâm 2 phút ở tốc độ 7500 vòng/phút, quá trình rửa cột thực hiện 2 lần. Chuyển cột đã được rửa sang ống eppendorf có chứa 9,3 µl Neutralizer và thời với 100 µl Dunge dịch thổi. Dung dịch được thổi ra có chứa protein tổng số đã được tinh sạch.

Phương pháp điện di SDS-PAGE

SDS-PAGE được thực hiện theo Laemmli, 1970 với các thiết bị của hãng Bio-Rad (Laemmli, 1970).

Thủy phân protein trong gel

Các phân đoạn protein được cắt ra và đưa vào ống eppendorf 1,5ml. Protein được thủy phân bằng trypsin theo quy trình đã được mô tả (Vũ Minh Thiết et al., 2006). Trypsin được bổ sung vào dung dịch với tỷ lệ tương ứng enzyme: cơ chất/ 1: 50 và ủ tại 37°C qua đêm. Phản ứng được dừng lại bằng axit formic với nồng độ 0,1% (v/v).

Phân tích và ghi phổ 1DnanoLC-ESI-MS/MS

Hỗn hợp peptide sau khi thủy phân được phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng nanoLC. Peptide được loại muối và cô đặc trên cột TRAP C18 và phân tách trên cột sắc ký ngược pha C18. Mẫu được đưa lên cột với tốc độ dòng 0,2 µl/phút bằng FA 0,1% và thổi ra khỏi cột C18 bằng gradient nồng độ từ 0 đến 100% đệm B (85% ACN và 0,1% FA) trong 60 phút. Quá trình thực hiện khối phổ liên tiếp được tiến hành trên máy QSTAR^{XL}.

Nhận diện protein bằng phần mềm Mascot v1.8.

Phổ khối MS/MS được phân tích bằng phần mềm Mascot v1.8 (Matrix Science Ltd., London, Anh) và Ngân hàng Dữ liệu Protein NCBI (Mỹ) trên hệ thống máy chủ Workstation XW6200 BASE UNIT với hơn 7,3 triệu trình tự protein của các loài khác nhau (được cập nhật đến tháng 12/2008). Phần mềm Mascot có khả năng phân tích dữ liệu phổ MS/MS dựa trên thuật toán Mowse (Matrix Science Ltd., London, Anh).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thu nhận và tinh sạch hệ protein nước tiểu

Mẫu nước tiểu được chạy qua ProteoSpin™ Urine Protein Concentration Micro Kit như mô tả trong phần II.2.a. Đây là kỹ thuật giúp loại muối và các tạp chất. Sau khi thu nhận sẽ được kiểm tra trên gel polyacrylamide nồng độ 12,6% (kết quả không trình bày ở đây). Kết quả thu nhận và tinh sạch tốt, đường chạy điện di sắc nét và mẫu không bị mất trong quá trình thu nhận.

Phân đoạn hệ protein

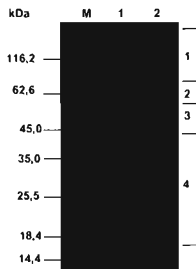
Hệ protein nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thai ghép cấp tính sau khi tinh sạch được phân tách trên gel polyacrylamide nồng độ 12,6%. Tiếp đó, các đường chạy của bản điện di sẽ được phân đoạn như trên hình 1. Phương pháp phân đoạn hệ protein trong bản gel điện di một chiều đem lại nhiều lợi thế cho quá trình nhận diện bằng khối phổ

vì có thể phân đoạn hệ protein rõ ràng và đặc biệt là tinh sạch hệ protein. Sau đó các phân đoạn gel sẽ được cắt ra và thủy phân bằng trypsin và nhận diện bằng khối phổ.

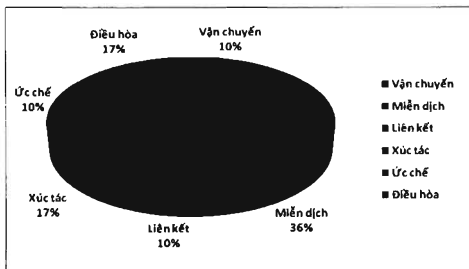
Phân loại hệ protein nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thái ghép cấp tính

Hệ protein sau khi được phân tích bằng hệ thống khối phổ kết hợp với các phân mềm tin sinh học, đã nhận diện được 30 protein, trong đó có nhiều protein có hàm lượng thấp đã được tìm thấy. Hệ protein này được phân nhóm theo chức năng dựa vào chủ giải của GO (Ashburner *et al.*, 2000). Theo sự phân nhóm này hệ protein nước tiểu chia làm 6 nhóm bao gồm: nhóm protein thực hiện chức năng miễn dịch gồm 11 protein (36%), Nhóm protein thực hiện chức năng liên kết 3 protein (10%), Nhóm protein thực hiện chức năng xúc tác 5 protein (17%), nhóm protein thực hiện chức năng vận chuyển 3 protein (10%), nhóm protein thực hiện chức năng ức chế bảo vệ 3 protein (10%) và nhóm protein thực hiện chức

năng điều hòa 5 protein (17%).



Hình 1: Điện di đố và phân đoạn cắt gel M: Thang marker protein 1, 2. Đường chạy protein nước tiểu; Phân đoạn cắt gel. 1, 2, 3, 4



Hình 2. Biểu đồ phân loại hệ protein nước tiểu được phát hiện ở bệnh nhân ghép thận có biến chứng thái ghép cấp tính theo chức năng

Nhóm protein miễn dịch

Nhóm protein miễn dịch trong nước tiểu bao gồm 11 protein chủ yếu là các chuỗi Ig tham gia quá trình đáp ứng miễn dịch của tế bào như Ig gamma-1 chain C region, Ig kappa chain V-II region Cum... Trong hệ protein nước tiểu bệnh nhân có biến chứng thái ghép thận cấp, nhóm protein này chiếm số nhiều bên cạnh albumin điều này được giải thích bằng sự đáp ứng miễn dịch chống lại mô ghép ngoại lai vào cơ thể.

Trong nhóm này đáng chú ý có sự xuất hiện của Beta-2-microglobulin. Beta-2-microglobulin là chuỗi Beta của phân tử MHC nhóm 1, có mặt ở hầu hết các tế bào trong cơ thể. Beta-2-microglobulin biểu hiện trong huyết thanh và nước tiểu đã được nghiên cứu từ lâu. Nhiều báo cáo đã cho thấy protein này có biểu hiện tăng rõ rệt ở bệnh nhân thái ghép thận cấp tính và coi đây là chỉ thị sinh học tiềm năng trong chẩn đoán lâm sàng (O’Riordan *et al.*, 2007). Tuy nhiên, đến nay beta-2-microglobulin

vẫn còn đang tiếp tục được nghiên cứu để tìm ra những biểu hiện đặc trưng cho bệnh vì bên cạnh đó beta-2-microglobulin còn biểu hiện ở cả những

bệnh nhân ghép thận ổn định, viêm thận và các bệnh liên quan đến thận khác (Roberts *et al.*, 1979).

Bảng 1. Danh sách protein thuộc nhóm miễn dịch được phát hiện trong nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thận ghép cấp tính.

Số Uniprot	Tên protein	Khối lượng (Da)	Chức năng
P61769	Beta-2-microglobulin	13820	Miễn dịch
P01857	Ig gamma-1 chain C region	36596	Miễn dịch
P01859	Ig gamma-2 chain C region	36505	Miễn dịch
P01860	Ig gamma-3 chain C region	42287	Miễn dịch
P01861	Ig gamma-4 chain C region	36431	Miễn dịch
P01834	Ig kappa chain C region	11773	Miễn dịch
P01614	Ig kappa chain V-II region Cum	12782	Miễn dịch
P01620	Ig kappa chain V-III region SIE	11882	Miễn dịch
P04433	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	12681	Miễn dịch
P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions	11458	Miễn dịch
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	23391	Miễn dịch

Nhóm protein liên kết và xúc tác

Các protein thuộc nhóm liên kết và xúc tác chiếm một phần nhỏ trong nước tiểu. Những protein này chủ yếu có trong huyết thanh như Retinol-binding protein 4, Haptoglobin...

Retinol binding protein (RBP) là một họ protein với các chức năng khác nhau, chúng tương tác với transthyretin để giảm sự mất mát bằng cách lọc qua tiểu cầu thận. Retinol binding protein 4 liên quan đến nhiều bệnh lý, đặc biệt những bệnh về trao đổi chất. **Haptoglobin (Hp)** là một protein được mã hóa bởi gen *Hp*. Haptoglobin liên quan đến sự phát triển của nhiều bệnh viêm nhiễm, chứng xơ vữa động mạch... (Langlois *et al.*, 1996). Hemmingsen L năm 1978 đã sử dụng haptoglobin và ba protein khác là IgA, IgG và transferrin như một xét nghiệm để chẩn đoán phát hiện thải ghép của bệnh nhân sau ghép thận. Phương pháp được sử dụng là kết tủa miễn dịch tự động, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (Hemmingsen *et al.*, 1978). Nồng độ haptoglobin biểu hiện cao trong nước tiểu bệnh nhân thải ghép thận cấp tính, tuy nhiên cho đến nay chưa có nghiên cứu nào đưa ra kết luận cụ thể về protein này. **Uromodulin** một protein được bài tiết nhiều vào trong nước tiểu ở điều kiện sinh lý bình thường. Protein này được hình thành ở thận và được tiết vào nước tiểu thông qua sự phân cắt của protein. Mặc dù chức năng sinh học của nó chưa được biết rõ nhưng những nghiên cứu gần đây đã xác định uromodulin

như là một yếu tố gia tăng nguy cơ bệnh thận mãn tính và gợi ý rằng mức độ biểu hiện của protein này trong nước tiểu có thể là một chỉ thị sinh học tiềm năng cho bệnh suy thận (Rampoldi *et al.*, 2011). Theo nghiên cứu của Susan năm 2010, Uromodulin trong nước tiểu bệnh nhân thải ghép thận cấp có biểu hiện giảm (Susan, 2010). Nghiên cứu này có thể cho thấy đây là protein mang nhiều thông tin hữu ích và cần được tìm hiểu.

Nhóm protein ức chế, điều hòa và vận chuyển

Nhóm protein này có chứa nhiều protein có hàm lượng lớn như Albumin, Protein AMBP, serotransferrin và Kininogen...

Theo nghiên cứu của Viberti và đồng tác giả tổng hàm lượng protein nước tiểu tiết ra là 150 mg/ngày trong đó albumin chiếm khoảng 10 mg/ngày, đặc biệt những bệnh liên quan đến thận hàm lượng albumin còn tăng rất cao (Viberti *et al.*, 1982). Albumin đã được nghiên cứu và ứng dụng trong các bệnh về trao đổi chất, tuy nhiên theo nghiên cứu của Arne năm 2011 trong thải ghép thận cấp tính protein này không đặc trưng vì sự bài tiết không đặc hiệu và cụ thể cho các giai đoạn bị đảo thải hay ngay giai đoạn sau khi cấy ghép (Arne, 2011). **AMBP protein** có chứa alpha-1- microglobulin đi qua cầu thận vào dịch nước tiểu nguyên sinh nơi đó được tái hấp thụ vào ống sinh niệu và được dị hóa. Mặc dù mức độ biểu

hiện trong huyết thanh và nước tiểu đã được nghiên cứu trong ghép thận và trong trạng thái của một số bệnh thận trong nhiều thập kỷ, nhưng ứng dụng lâm sàng chủ yếu vẫn là sử dụng Alpha-1-microglobulin nước tiểu như là chỉ thị sinh học

cho sự tổn thương của ống sinh niệu. Đặc biệt alpha-1- microglobulin được nhận thấy có sự thay đổi về mức độ biểu hiện giữa bệnh nhân ổn định và bệnh nhân có hiện tượng thải ghép (Arce, 2011).

Bảng 2. Danh sách protein thuộc nhóm liên kết và xúc tác trong nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính.

Số Uniprot	Tên protein	Khối lượng (Da)	Chức năng
Q86Y23	Hornenn	283140	Liên kết
P02753	Retinol-binding protein 4	23337	Liên kết
P07911	Uromodulin	72451	Liên kết
Q13219	Pappalysin-1	185645	Xúc tác
P16234	Alpha-type platelet-derived growth factor receptor	123561	Xúc tác
Q9BRQ8	Apoptosis-inducing factor 2	40500	Xúc tác
P00739	Haptoglobin-related protein	39518	Xúc tác
Q13093	Platelet-activating factor acetylhydrolase	50501	Xúc tác

(MATRIX) Mascot Search Results

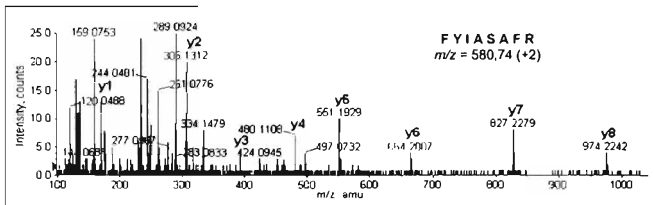
UROM_HUMAN Mass: 72451 Score: 64 Matches: 1(2) Sequences: 1(2) expPAI: 0.22
 Uromodulin OS=Homo sapiens GN=UMOD PE=1 SV=1
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<u>52</u>	491.7402	981.4658	981.4556	0.0103	0	35	0.051	1	0	R.TLDEYWR.S
<u>56</u>	538.2690	1074.5234	1074.5128	0.0106	0	33	0.11	1	0	R.DQPCQTVLTR.N
<u>58</u>	588.2993	1174.5840	1174.5838	0.0002	0	48	0.0032	1	0	R.HAETCVFVLR.C
<u>534</u>	853.4048	1704.7950	1704.7915	0.0036	0	14	4.7	1	0	R.DSTIQVVENGSQQR.F

Hình 3. Kết quả nhận diện Uromodulin trong mẫu nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính bằng phần mềm Mascot v1.8.

Bảng 3. Danh sách protein thuộc nhóm ức chế, điều hòa và vận chuyển trong nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính

Số Uniprot	Tên protein	Khối lượng (Da)	Chức Năng
P01009	Alpha-1-antitrypsin	46878	Ức chế
P01042	Kininogen-1	72996	Ức chế
P02760	Protein AMBP	39886	Ức chế
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23725	Điều hòa
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098	Điều hòa
O75586	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 6	28521	Điều hòa
P02768	Serum albumin	71317	Điều hòa
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34465	Điều hòa
P05090	Apolipoprotein D	21547	Vận chuyển
P02787	Serotransferin	79294	Vận chuyển
P23975	Sodium-dependent noradrenaline transporter	69857	Vận chuyển



Hình 4. Phổ MS/MS của một đoạn peptide từ Alpha-1-acid glycoprotein 1 được nhận diện trong mẫu nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính (FYIASAFR)

Nước tiểu là đối tượng nghiên cứu hấp dẫn do những lợi thế nhất định của mẫu mang lại. Tuy nhiên khi thao tác với đối tượng này cũng gặp nhiều khó khăn, do mẫu không được tinh sạch lẫn muối và các tạp chất, đồng thời khoảng cách về nồng độ giữa các protein rất lớn nên sẽ ảnh hưởng đến nhận diện các protein nồng độ thấp. Sử dụng điện di một chiều và phân đoạn sau đó nhận diện bằng sắc ký lỏng nano một chiều kết hợp khối phổ (1D nanoLC-ESI-MS/MS) là cách tiếp cận hợp lý vì hệ protein sẽ được tinh sạch hơn đồng thời có thể nhận diện những protein có nồng độ thấp trong nước tiểu mà khó có thể nhận ra bằng phương pháp nhận diện trực tiếp. Kết quả đã thu nhận được 30 protein trong đó nhiều protein nồng độ thấp cũng đã được nhận diện và đặc biệt có sự xuất hiện của các protein liên quan đến bệnh thận như: Uromodulin, AMBP protein, Haptoglobin và Beta-2-microglobulin.... Những nghiên cứu tiếp sau sẽ tập trung vào các phương pháp tối ưu hóa điều kiện tinh sạch để có thể nhận diện được nhiều hơn nữa những protein có hàm lượng nhỏ xuất hiện trong nước tiểu nhằm tìm kiếm những protein có biểu hiện bất thường. Đồng thời tiếp tục nghiên cứu sâu hơn những protein đã được tìm thấy.

KẾT LUẬN

Đã thu nhận và tinh sạch được hệ protein nước tiểu bằng sử dụng ProteoSpin™ Urine Protein Concentration Micro Kit. Sử dụng kỹ thuật điện di SDS-PAGE để phân đoạn hệ protein và kết hợp với hệ thống sắc ký lỏng nano đa chiều kết nối với khối phổ đã nhận diện được 30 protein trong nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính. Trong số 30 protein được nhận diện đã cho

thấy nhiều protein liên quan đến biến chứng thải ghép thận cấp tính như Uromodulin, AMBP protein và Beta-2-microglobulin.... Những nghiên cứu tiếp sau sẽ tập trung tìm hiểu những protein này.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Allison SJ (2010) Transplantation: Integrative peptidomics identifies acute renal transplant rejection biomarkers. *Nature Reviews Nephrology* 6: 249
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock (2000) Gene ontology: tool for the unifircation of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genet* 25 (1): 25-29.
- Fuldner A (2011) The unne proteome of kidney transplant patients: A new approach for the identification of non-invasive rejection markers. *PhD dissertation*. Medical faculty, Charite – University medical Berlin, Berlin.
- Hemmingsen L, Jensen H, Jest P, Skaarup P (1978) The diagnostic value of protein clearances in rejection of human renal allografts. *Acta Med Scand* 203(1-2): 107-112.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Rampoldi L, Scolan F, Amoroso A, Ghiggeri G, Devuyst O (2011) The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall

protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney International* 80: 338-347.

O'Riordan E, Orlova TN, Podust VN, et al (2007) Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. *Am J Transplant* 7(4): 930-940.

Roberts JL, Lewis EJ (1979) Serum and urine beta-2-microglobulin and lysozyme concentrations in transplant rejection. *Proc Clin Dial Transplant Forum* 9: 145-149.

Theodorescu D, Fliser D, Wittke S, Mischak H, Krebs R, Walden M, Ross M, Eltze E, Bettendorf O, Wulfiging C. et al (2005) Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate

cancer biomarkers in urine. *Electrophoresis* 26(14): 2797-2808.

Vestergaard P, Leverett R (1958) Constancy of urinary creatinine excretion. *J Lab Clin Med* 51(2): 211-218.

Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, et al (1982) Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1:1430-1432

Vũ Minh Thiết, Trần Thế Thành, Nguyễn Thị Minh Phương, Phan Văn Chi (2006) Phân tích các glycoprotein trong huyết thanh người. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 4(1):13-22.

Wu J, Chen Y, Gu W (2010) Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases. *J Zhejiang Univ Sci B* 11(4): 227-237.

ANALYSIS OF URINE PROTEOME FROM PATIENTS WITH ACUTE RENAL ALLOGRAFT REJECTION

Pham Duc Dan¹, Nguyen Thi Minh Phuong¹, Pham Dinh Minh¹, Ha Phan Hai An², Nguyen Bich Nhi¹, Phan Van Chi^{1,*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Viet Duc University Hospital

SUMMARY

Renal transplantation has emerged as the best renal replacement therapy for many patients with end-stage renal failure. Acute rejection is the major impediment for the long-term allograft survival. At present, the diagnosis of renal allograft rejection is made by renal biopsy, which is costly and associated with significant risks. Therefore, there is a high need to develop noninvasive and reliable methods for detecting biomarkers of rejection. Proteomics is a promising approach for the detection of novel biomarkers in biological fluids such as urine, plasma, and serum. Among these, urine is regarded as the most attractive proteomic sample due to several advantages. In this study, SDS-PAGE was used to separate urine proteome after purification by ProteoSpin™ Urine Protein Concentration Micro Kit. After staining, gels with protein bands were cut and digested by trypsin. The peptide mixtures extracted from each gel slice were analysed by one-dimensional nano liquid chromatography (1DnanoLC) coupled online with tandem mass spectrometry analysis (NanoESI-Q-TOF-MS/MS). The proteins were identified by Mascot v1.8 software. Among a total of 30 proteins identified, some proteins are related to acute renal rejection such as Uromodulin, AMBP protein and Beta-2-microglobulin etc. Further research will be focused on these specific proteins.

Keywords: Acute renal allograft rejection, identified protein, mass spectrometry (MS), proteomics, urine

* Author for correspondence: Tel: +84-4-37913657; E-mail: chi@ibt.ac.vn