

## PHÂN TÁCH VÀ XÁC ĐỊNH HỆ PROTEIN NƯỚC TIỂU Ở BỆNH NHÂN GHEP THẬN CÓ BIẾN CHỨNG THẢI GHEP CẤP TÍNH

Phạm Đức Đan<sup>1</sup>, Đỗ Hữu Chí<sup>1</sup>, Hà Phan Hải An<sup>2</sup>, Nguyễn Bích Nhi<sup>1</sup>,  
Phan Văn Chí<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

<sup>2</sup>Khoa Thận và Lọc máu, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức

\*Email: [chi@ibt.ac.vn](mailto:chi@ibt.ac.vn)

Đến Toà soạn: 5/12/2011; Chấp nhận đăng: 17/11/2012

### TÓM TẮT

Tìm kiếm chỉ thị sinh học trong mẫu nước tiểu là một chủ đề chính của y học lâm sàng. Ngày nay, sự phát triển của kỹ thuật proteomics đã nhanh chóng làm thay đổi sự hiểu biết về thành phần hệ protein của nước tiểu. Điện di 2 chiều kết hợp khối phổ là kỹ thuật được lựa chọn cho phân tích hệ protein nước tiểu trong những năm gần đây và cũng đã đưa ra được nhiều kết luận có giá trị. Trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung vào các vấn đề có liên quan đến thu thập, bảo quản, tinh sạch và phân tích bằng điện di 2 chiều kết hợp hệ thống khối phổ các mẫu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính. Những kết quả này là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp sau về hệ protein nước tiểu trên đối tượng này, đồng thời cũng định hướng cho việc tìm kiếm các ứng viên đặc hiệu nhằm phát hiện sớm bệnh phục vụ công tác điều trị bệnh.

*Từ khóa:* chỉ thị sinh học, điện di hai chiều, hệ protein nước tiểu, khối phổ, thải ghép thận cấp tính.

### 1. MỞ ĐẦU

Nước tiểu là đối tượng nghiên cứu quan trọng vì dễ lấy mẫu, lấy được thường xuyên và không xâm lấn. Nghiên cứu thành phần và số lượng các protein nước tiểu thường có ý nghĩa lâm sàng. Trong nhiều trường hợp, các protein nước tiểu có thể phản ánh những thay đổi về mặt sinh lí, sinh hóa hay tình trạng bệnh lí của một cá nhân. Do đó, nghiên cứu hệ protein nước tiểu sẽ cung cấp một công cụ mạnh cho sự hiểu biết vấn đề về sinh lí và bệnh lí thận. Nó sẽ giúp xác định, cung cấp đầy đủ hơn danh sách các protein từ các vùng riêng biệt của thận, các tế bào, và bào quan, cũng như các protein tín hiệu. Những công cụ này sẽ được sử dụng để xác định không chỉ các protein tham gia chu trình truyền tín hiệu, mà còn những biến đổi của chúng qua thời gian. Protein được xác định trong mô liên kết với các mô hình bệnh tật sẽ giúp hiểu biết rõ hơn về bệnh cầu thận và các bệnh thận khác. Tuy nhiên, nghiên cứu hệ protein nước tiểu gặp nhiều trở ngại do đặc thù mẫu chứa nhiều thành phần bài tiết của cơ thể. Hơn nữa, sự biểu hiện rất khác nhau của các protein và các quá trình biến đổi cũng cho thấy sự phức tạp của đối tượng này

[1]. Đặc biệt, mẫu nước tiểu có nhiều muối và urea, điều này sẽ làm ảnh hưởng lớn đến các kĩ thuật nghiên cứu.

Ngày nay, kĩ thuật proteomics đã và đang phát triển với độ nhạy cao và đặc hiệu là cơ sở cho việc phát hiện tìm kiếm chỉ thị sinh học. Đặc biệt, nhiều nghiên cứu đã đưa ra những lợi thế quan trọng của 2-DE kết hợp với khối phổ và tin sinh để khám phá biomarker trong nước tiểu [2] và khả năng phân biệt các dạng biến đổi sau dịch mã của các protein, các dạng biến đổi này có thể do quá trình glycosyl hóa hoặc biến đổi sau dịch mã khác [3]. Những khám phá biomarker trong mô và dịch lỏng sẽ dẫn đến việc nâng cao chất lượng chẩn đoán bệnh thận. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào các phương pháp thu nhận, tinh sạch mẫu và phân tích bằng các kĩ thuật điện di hai chiều kết hợp hệ thống khối phổ nhằm bước đầu tìm hiểu hệ protein nước tiểu của bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Mẫu nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải 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.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Thu thập và bảo quản mẫu

Mẫu nước tiểu được lấy giữa dòng vào lần thứ 2 của buổi sáng trước khi ăn theo quy trình chuẩn của dự án hệ protein niệu và thận người (Kupp, <http://www.hkupp.org/Urine%20collectiion%20Documents.htm>) [4]. Sau đó, mẫu được ly tâm ở 2500 vòng/phút trong 10 phút loại bỏ phần cặn và bảo quản ở -20°C.

#### 2.2.2. 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 thổi với 100 µl Dung dịch thổi. Dung dịch được thổi ra có chứa protein tổng số đã được tinh sạch.

#### 2.2.3. Phương pháp điện di hai chiều

Hỗn hợp protein sau khi tinh sạch được tua bằng acetone lạnh với tỷ lệ mẫu/acetone: 1/4 (v/v) tại -20 °C qua đêm sau đó được hòa lại trong 125 µl dung dịch rehydration (8 M Urea, 2 %

CHAPS, 50 mM DTT, IPG 0,8 % pH 3 - 10). Hỗn hợp tiến hành theo phương pháp đã được mô tả của Nguyễn Thị Minh Phương (2007) [5].

#### 2.2.4. Thủy phân protein trong gel

Các điểm protein được cắt ra và đưa vào ống Eppendorf 1,5 ml. Protein được thủy phân bằng trypsin theo quy trình đã được mô tả bởi Vũ Minh Thiết (2006) [6]. 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).

#### 2.2.5. Phân tích và ghi phổ 1D nanoLC- ESI-MS/MS

Hỗn hợp peptide sau khi thủy phân được phân tách trên hệ thống sắc kí lỏng 1 chiều nanoLC. Peptide được loại muối và cô đặc trên cột TRAP C18 và phân tách trên cột sắc kí 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 hệ máy QSTAR<sup>XL</sup> với nguồn ESI ( 1D nanoLC – ESI- MS/MS) theo mô tả bởi Vũ Minh Thiết (2006) [6].

#### 2.2.6. 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).

### 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Xử lí mẫu

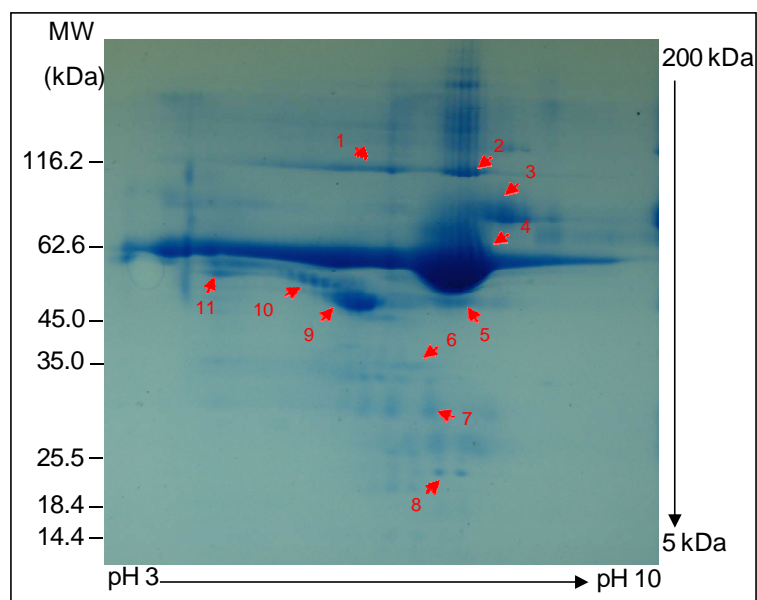
Để loại bớt muối và các tạp chất khác bên cạnh các phương pháp tinh sạch thông thường, mẫu sẽ được chạy qua ProteoSpin<sup>TM</sup> Urine Protein Concentration Micro Kit. Sau đó sẽ được kiểm tra trên gel poly acrylamide 12,6 %. Hình ảnh điện di cho thấy lượng mẫu trước và sau khi được tách kit có sự thay đổi không đáng kể, điều này cho thấy việc sử dụng kit không ảnh hưởng nhiều đến lượng mẫu thu được. Đồng thời mẫu trước khi tách kit hình ảnh điện di mờ và phân tách không rõ ràng. Trong khi đó, hình ảnh mẫu đã qua tách kit cho kết quả rõ ràng (hình ảnh không trình bày ở đây).

#### 3.2. Phân tích hệ protein nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính

Hệ protein nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp sau khi tinh sạch được tiến hành chạy điện di hai chiều. Hình ảnh điện di cho thấy các điểm (spot) có khối lượng lớn khá nhiều và tập trung chủ yếu trong dãy pH 5 - 7, nhiều điểm tạo thành các vạch protein ngang nhau (isoform).

Các điểm protein phân tách rõ ràng được cắt ra và xác định bằng hệ thống sắc kí lỏng nano một chiều kết hợp với hệ khối phổ liên tiếp (1D nanoLC-ESI-MS/MS). Sử dụng phần mềm Mascot v1.8 đã nhận diện được 11 điểm protein có hàm lượng lớn như Serum albumin, Alpha-

1-antitrypsin, haptoglobin... (bảng 1). Chúng tôi thấy kết quả này có sự tương đồng với những kết quả của Giovanni C (2010) [7] đã nghiên cứu và công bố.



Hình 2. Ảnh điện di 2 chiều hệ protein nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính

Bảng 1. Danh sách các protein được nhận diện trong nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính

Kí hiệu	Tên protein	Số UniProt	Khối lượng (Da)	pI
1	A single spot chain containing Alpha 1B-glycoprotein	P04217	54238.58	5.58
2	Alpha 2-Macroglobulin	P01023	163174.9	6
3	Serotransferin	P02787	76999.61	6.81
4	Albumin	P02768	69321.49	5.92
5	Beta 2-Glycoprotein	P02749	38272.66	5.80
6	Haptoglobin (Contains: Hapto $\alpha$ chain, Hapto $\beta$ chain)	P00738	45176.56	6.13
7	Ig kappa chain C region	P01834	11773	5.58
8	AMBP protein (Contains : Alpha-1-microglobulin)	P02760	38973.98	5.95
9	Alpha 1-antitrypsin	P01009	46707.02	5.37
10	Alpha 1-antichymotrypsin/ Kininogen	P01001	47620.54	5.33
11	Alpha 2-HS glycoprotein	P02765	39299,71	5.43

Các protein được tiết ra trong nước tiểu chủ yếu là những protein có hàm lượng lớn, thường đặc trưng cho các thành phần điển hình của huyết tương, tuy nhiên khi thận và các cơ quan khác của thận như ống sinh niệu gặp các vấn đề thì việc lọc qua thận cũng như tái hấp thu của protein bị hạn chế. Điều này sẽ làm cho các protein xuất hiện trong nước tiểu, đồng nghĩa với việc có thể coi sự xuất hiện những protein này là dấu hiệu cho chẩn đoán sớm các bệnh thận. Những nghiên cứu trước đây đã chỉ ra nhiều protein như: Albumin, Beta 2-Glycoprotein, Alpha 2-Macroglobulin, Alpha 1- antitrypsin... liên quan đến một loạt các bệnh thận như suy thận, bệnh về ống thận, hội chứng Fanconi ở người lớn, hội chứng Lowe... [8]. Trong việc tìm kiếm các chỉ thị sinh học cho chẩn đoán thải ghép thận cấp tính thì những protein này cũng đóng vai trò quan trọng trong việc tìm hiểu mối tương quan giữa các protein được bài xuất ra.

**Albumin** là protein chính trong nước tiểu được sử dụng trong chẩn đoán lâm sàng. Trong điều kiện sinh lý bình thường sẽ có một lượng nhỏ albumin bài tiết cùng nước tiểu (150 mg/ngày). Halimi (2007) [9] đo albumin được bài tiết ra nước tiểu trong số 616 người nhận thận tại các thời điểm khác nhau sau khi cấy ghép đã cho thấy, khoảng một nửa trong số họ có albuminuria bình thường, một nửa khác nhỏ hơn hoặc lớn hơn. Trong nghiên cứu hiện nay, Albumin được phát hiện bán định lượng và không nhận thấy có sự khác biệt giữa bệnh nhân ổn định và bệnh nhân bị đào thải ghép. Sự bài tiết cũng không đặc hiệu và cụ thể cho các giai đoạn bị đào thải hay ngay giai đoạn sau khi cấy ghép. **AMBP protein:** là protein có chứa alpha 1-microglobulin. Mặc dù mức độ biểu hiện trong huyết thanh và nước tiểu của AMBP protein 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. Kể từ khi chức năng ống thận bị suy yếu trong ngày đầu tiên sau cấy ghép, thì alpha-1- microglobulin được tìm thấy trong tất cả các mẫu nước tiểu của người nhận thận. 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 Fuldner A (2011) [10]. Tuy nhiên độ nhạy và độ đặc hiệu của protein này được xác định trong điều kiện thí nghiệm chặt chẽ của tác giả. **Alpha 1- antitrypsin:** Nồng độ của alpha-1- antitrypsin trong huyết tương tăng lên ở các vùng viêm nhiễm như giai đoạn cấp tính thải ghép thận. Sự bài tiết của protein này trong nước tiểu được đánh giá như một công cụ chẩn đoán cần thiết và thứ yếu trong bệnh tăng huyết áp, nhưng chưa được thừa nhận trong thải ghép thận. Theo nghiên cứu của Fuldner A (2011) [10] alpha-1- antitrypsin không đặc thù cho mẫu thải ghép thận cấp, vì nó biểu hiện tương đồng với cả mẫu bệnh nhân ổn định. Tuy nhiên, nghiên cứu này cũng đưa ra vị trí xuất hiện của alpha-1- antitrypsin không tương ứng với dự kiến và đây có thể là phát hiện ngẫu nhiên cần được tìm hiểu. **Alpha 2-Macroglobulin:** Theo nghiên cứu của J. Steinhoff (1994) [11] nồng độ của Alpha 2- Macroglobulin trong nước tiểu được đánh giá là một dấu hiệu tiềm năng cho những chẩn đoán sau ghép thận. Những nghiên cứu trước đó đã chỉ ra rằng Alpha 2-Macroglobulin không được tìm thấy trong mẫu nước tiểu người bình thường. Đặc biệt, Protein này còn được sử dụng bên cạnh C- reactive protein để phân biệt giữa đào thải và nhiễm trùng cho bệnh nhân sau ghép thận. **Beta 2-Glycoprotein** đã được M. Lapsley (1991) [12] kiểm tra ở 60 bệnh nhân bị bệnh thận và đã cho thấy tăng lên ở 49 bệnh nhân tức là 82 %. Được so sánh với các protein khác đang được sử dụng cho chẩn đoán bệnh thận như Alpha 1- Microglobulin, Beta 2-microglobulin và retinol binding protein... thì cho thấy Beta 2-glycoprotein được phát hiện thường xuyên hơn ở những bệnh nhân suy thận. Ngoài ra nồng độ Beta 2-glycoprotein không bị giảm sút trong thời gian dài nên có thể là một chỉ thị ổn định cho bệnh nhân suy thận. Tuy nhiên, cho đến ngày nay protein này cũng chỉ được ứng dụng trong chẩn đoán bệnh suy thận. Những nghiên cứu về mức độ biểu hiện của Beta 2-glycoprotein trong nước tiểu bệnh nhân thải ghép thận còn nhiều hạn chế.

Trong những năm gần đây, việc phát triển các phương pháp tìm kiếm chỉ thị sinh học từ dịch của cơ thể được tập trung nhiều. Bên cạnh huyết thanh, nước bọt, nước mắt thì nước tiểu cũng được nghiên cứu phổ biến. Nước tiểu có nhiều ưu điểm như dễ lấy mẫu và có thể lấy bất cứ thời điểm nào trong suốt quá trình nghiên cứu diễn biến của bệnh lí. Đặc biệt hệ protein nước tiểu rất phong phú và phản ánh được những thay đổi về mặt sinh lí, sinh hóa của thận và một số bệnh lí khác. Tuy nhiên, bên cạnh những thuận lợi đó thì nghiên cứu hệ protein nước tiểu cũng gặp nhiều khó khăn do tính chất đặc thù mẫu tạo thành. Việc tinh sạch hệ protein nước tiểu bằng ProteoSpin™ Urine Protein Concentration Micro Kit đã giúp quá trình chạy điện di 2 chiều (2-DE) thuận lợi hơn với kết quả khá tốt. Các điểm được phân tách rõ ràng tuy nhiên nhiều protein có hàm lượng thấp vẫn chưa được biểu hiện. Nhiều protein có hàm lượng cao được phát hiện liên quan đến các vấn đề về thận. Những protein này cần được tiếp tục nghiên cứu về mức độ biểu hiện ở các trạng thái bệnh lí cũng như các giai đoạn khác nhau sau phẫu thuật ghép thận nhằm tìm kiếm những chỉ thị sinh học đặc hiệu dự báo sớm khả năng đào thải của thận mới được ghép.

#### 4. KẾT LUẬN

Bằng ProteoSpin™ Urine Protein Concentration Micro Kit đã thu nhận và tinh sạch được hệ protein nước tiểu. Tiếp đó, sử dụng kĩ thuật điện di 2 chiều (2-DE) kết hợp hệ thống 1D nanoLC-ESI-MS/MS đã phân tích và nhận diện được 11 protein có hàm lượng lớn trong nước tiểu bệnh nhân ghép thận có biến chứng thải ghép cấp tính. Định hướng tiếp tục nghiên cứu sâu hơn các protein quan trọng đã được nhận diện.

*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

1. Vlahou A. - Clinical proteomics: Methods and protocols, *Methods in molecular biology* **428** (2008) 141-157.
2. Thongboonkerd V., Malasit P. - Renal and urinary proteomics: current applications and challenges, *Proteomics* **5** (2005) 1033-1042.
3. Varghese S. A., Powell T. B., Budisavljevic M. N. - Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* **18** (2007) 913-22.
4. Thomas C. E., Sexton W., Benson K., Sutphen R., Koomen J. - Urine collection and processing for protein biomarker discovery and quantification, *Cancer epidemiol biomarkers prev* **19** (4) (2010) 953-959.
5. Nguyễn Thị Minh Phương, Trần Thế Thành, Nguyễn Bích Nhi, Phan Văn Chi - Phân tích sự thay đổi của các glycoprotein trong huyết thanh bệnh nhân đái tháo đường type 2, *Tạp chí Sinh học* **29** (3) (2007) 90-94.
6. Vũ Minh Thiết, Trần Thế Thành, Nguyễn Thị Minh Phương, Nguyễn Bích Nhi, Phan Văn Chi - Phân tích các glycoprotein trong huyết thanh người, *Tạp chí Công nghệ sinh học* **4** (1) (2006) 13-22.
7. Giovanni C., Laura S., Andrea P. - 2D- electrophoresis and the urine proteome map: where do we stand ?, *Journal of proteomics* **73** (2010) 829-844.

8. Norden A. G., Fulcher L. M., Lapsley M., and Flynn F. V. - Excretion of beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) in renal tubular disease, *Clinical chemistry* **37** (1991) 174-177.
9. Halimi J. M., Hadjadj S., Aboyans V., et al. - Microalbuminuria and urinary albumin excretion: clinical practice guidelines, *Nephrol Ther* **3**(6) (2007) 384–391.
10. Fuldner A. - The urine 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, 2011, pp. 41-42.
11. Steinhoff J., Buhner U., Preuss R., Sack K. - C-reactive protein and alpha 2 macroglobulin in urine as markers of renal transplant rejection, *Transplantation proceedings* **26** (3) (1994) 1768.
12. Lapsley M., Sansom P. A., Marlow C. T., Flynn F. V., and Norden A. G. - Beta 2-glycoprotein-1 ( apolipoprotein H) excretion in chronic renal tubular disorders: comparison with other protein markers of tubular malfunction, *Journal of clinical pathology* **44** (10) (1991) 812-816.

### ABSTRACT

#### SEPARATION AND DETERMINATION OF URINE PROTEOME FROM PATIENTS WITH ACUTE RENAL ALLOGRAFT REJECTION

Pham Duc Dan<sup>1</sup>, Do Huu Chi<sup>1</sup>, Ha Phan Hai An<sup>2</sup>, Nguyen Bich Nhi<sup>1</sup>, Phan Van Chi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi*

<sup>2</sup>*Kidney Diseases and Dialysis Department, Viet Duc University Hospital*

The discovery of urinary biomarkers is a main topic in clinical medicine. The development of proteomics has rapidly changed the knowledge on urine protein composition and probably will modify it again. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) coupled with mass spectrometry has represented for years the technique of choice for the analysis of urine proteins and it is time to draw some conclusions. In this study, we focused on major methodological aspects related to urine sample collection, storage, purification and analysis by 2DE with mass spectrometry in patients with acute renal allograft rejection. The obtained results are considered as preconditions for the subsequent studies about urine proteome in patients with acute renal allograft rejection.

*Keywords:* acute renal rejection, biomarker, MS/MS, urine proteome, 2-DE.