

2-D DIGE能够检测阿尔茨海默病人海马组织内的APOE调控蛋白

C. Osorio^{a,b}, P. M. Sullivan^c, D. N. Hea^b, B. E. Mace^{c,d}, J. F. Ervin^{c,d}, W. J. Strittmatter^{c,d}, O. Alzate^{a,b,*}

a 精神蛋白质组实验室, Duke 大学医学中心, Durham, NC 27710, USA

b 神经生物部, Duke 大学医学中心, Durham, NC 27710, USA

c 医学部e (神经科y), Duke大学医学中心, Durham, NC 27710, USA

d Bryan 阿尔茨海默, 疾病中心, Duke大学医学中心, Durham, NC 27710, USA

* 通讯作者: alzate@neuro.duke.edu

1 这篇文章改编自Osorio, C.等. *Mortalin*在AD病人的海马组织内被APOE调控, 在TR小鼠中被人APOE调控. *Neurobiol Aging*, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.08.011(2006). Copyright 2006. Elsevier Inc. 同意使用。

用于2-D荧光差异凝胶电泳的Ettan™ DIGE系统被用于研究在阿尔茨海默疾病中被APOE基因型(阿朴脂蛋白E)影响的蛋白质的差异表达。2-D DIGE的使用对一种被APOE调控的以前未报道的蛋白的检测十分关键。这种蛋白质通过质谱鉴定为Mortalin。

介绍

阿尔茨海默疾病(AD)是一种最普通的神经退行性疾病, 在全世界范围影响大约2000万人。在AD中的遗传易感性和分子细胞行为之间的关系还没有被完全理解, 但是许多基因已经和AD有关系: Presenilin 1和2、淀粉前体蛋白(APP)、阿朴脂蛋白E(APOE)和sortilin相关受体1(SORL1)。阿朴脂蛋白E是一种多行性疾病危险因子, 和AD发生和发展的年龄相关。在那些小于65岁的人群中, APOE基因多行性和90%的AD病例相关, 而在大于65岁的人群中有60%相关(1)。

apoE蛋白有三种常见的异构体: apoE2、apoE3和apoE4。这些异构体的差异是在112和158位点有一个精氨酸或半胱氨酸。

2-D DIGE能够检测APOE调控蛋白

为了更好地了解apoE4在AD疾病中的作用, 我们使用蛋白质组学的方法鉴定APOE3和APOE4定位替换(TR)的小鼠海马组织中的差异表达的蛋白, 以及在患AD疾病的人类海马组织中带有差异蛋白表达的这些结果的相关性。我们大概的研究方法如图1所示。

本研究的关键组成是使用了用于2-D荧光差异凝胶电泳的Ettan DIGE系统。Ettan DIGE系统含有Typhoon™ 多功能激光扫描系统。CyDye™ DIGE荧光染料和DeCyder™ 2-D软件。系统使用三种CyDye荧光染料标记三种蛋白样品(一种对照或正常样品、一种疾病状态或实验样品和一种内参), 它们被混合在一

起并通过2-D电泳分离。凝胶使用Typhoon™ 多功能激光扫描系统在三种不同的波长下扫描。图像使用DeCyder™ 2-D差异分析软件分析以鉴定出样品中差异的蛋白点。系统能够使研究人员发现蛋白表达中在统计学上低至10%的显著差异。

使用这个系统, 我们在TR小鼠中检测到4种被APOE基因型差异调控的蛋白(图2)。蛋白通过质谱(MALDI MS/MS)鉴定为Motalin的异构体。Motalin蛋白是一种分子量为74,000的蛋白, 属于分子伴侣蛋白中的热休克蛋白70(HSP70)家族。

随后我们从来自正常和AD病人样品海马中寻找差异表达。1-D SDS-PAGE和应用ImageQuant™ TL分析表明有4个蛋白差异表达。然而, 在分子量对应于mortalin的区域的蛋白没有显示差异表达(图3)。

为了更好地检查差异表达, 样品使用2-D DIGE进行分析。正如小鼠模型, 被鉴定为Motalin异构体的4种蛋白在正常和AD样品中显示出差异表达(图4)。2-D DIGE优秀的分辨能力能够检测出这些差异表达, 使用常规的1-D SDS-PAGE方法是无法检测到这些差异表达的。

结论

这些结果第一次表明Motalin异构体在阿尔茨海默病人中被差异调控, 且被AD病人的APOE基因型差异调控。我们假设被APOE基因型调控的Motalin在细胞内执行一种保护性机制, 可以作为一种AD的生物标记。

有关Ettan DIGE系统的附加信息和完整的订购信息请登陆 www.gelifesciences.com/DIGE

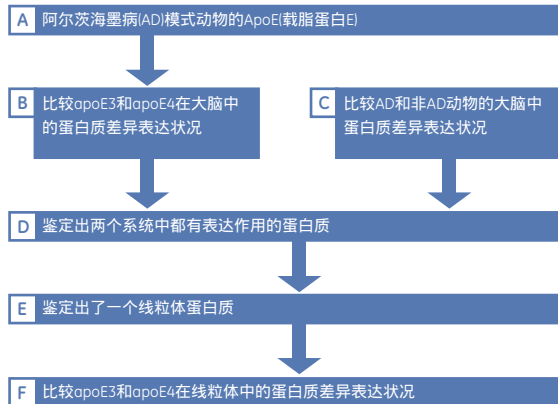


图1. 检测APOE基因型造成的蛋白质差异表达的试验方法

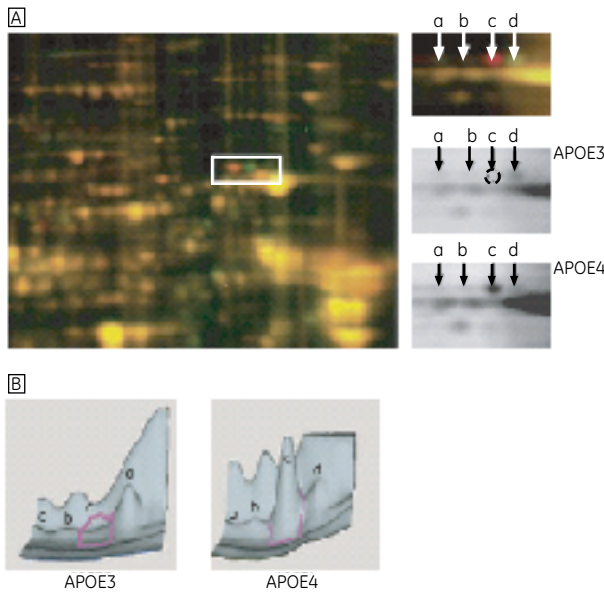


图2. 小鼠海马中双向荧光差异凝胶电泳分析(2-D DIGE)。 (A)双向荧光差异电泳分析的凝胶片段, Cy2(蓝色, 图中未表示出来)用于标记APOE3和APOE4样本的内对照蛋白质, TR小鼠样本中APOE3蛋白用Cy3(绿色)标记, APOE4蛋白用Cy5(红色)标记。共使用六块凝胶完成测试, 比较对照组(APOE3)和APOE4试验组, 我们鉴定得到64个蛋白质出现了差异表达。其中16个蛋白表达量出现上升, 48个蛋白质表达量出现下降。我们发现有一个蛋白质在对照组中完全检测不到, 而在试验组中则表达出一个新的蛋白质点, 如右侧图片所示, 'C'点在对照组中几乎不存在。(B)A图中选择的蛋白质点的三维可视化效果图。蛋白质a,b,c,d以及致死蛋白均用质谱鉴定得到。

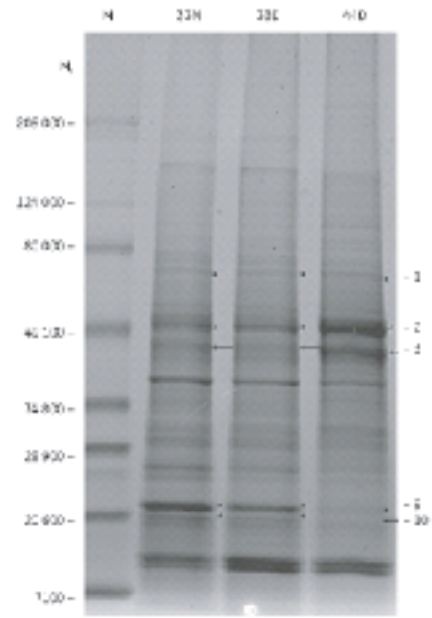


图3. 用单向SDS-PAGE分离人海马区蛋白质。用正常的APOE 3/3基因型(33N), 患阿尔茨海默病(AD)的APOE 3/3基因型(33D)和患阿尔茨海默病(AD)的APOE 4/4基因型(44D)样本做测试, 发现4条蛋白质差异表达条带(2, 3, 9和10)。条带1在各组间没有差异表达, 它的分子量与moratlin吻合。将这4条带从凝胶上切下, 用质谱分析, 结果显示它们分别为胶质纤维酸性蛋白(条带2), ACTB蛋白(条带3), 髓鞘碱性蛋白完整蛋白(条带9), 和BC080654 NID:(髓鞘碱性蛋白)。M为分子量标记。

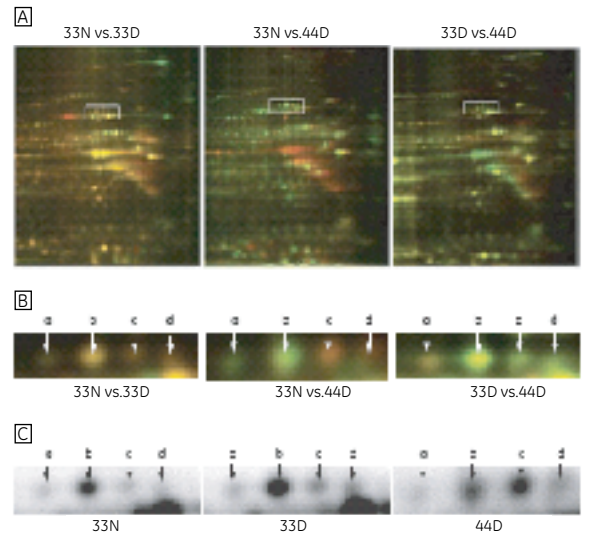


图4. 人海马蛋白双向荧光差异凝胶电泳分析(2-D DIGE)。 (A)左侧一组图, 33N-Cy3(绿色)对比33D-Cy5(红色); 中间一组图, 33N-Cy3(绿色)对比44D-Cy5(红色); 右侧一组图, 33D-Cy5(绿色)对比44D-Cy5(红色)。pI范围为(横轴)4-7, 分子量范围为Mr 260 000到10000。凝胶块上mortalin的区域用白色方框标出。(B)A图中方框区域放大显示。(C)每组试验的对照样本中对应于A图方框的凝胶区域的放大图。