

使用蛋白质组学工具发现结肠癌相关的生物标志物

D.Haid¹, F.Bahram¹, A. Jorsback¹, O. Rønn¹, A. Wanders², H. Bergling.

1 GE Healthcare, Amersham Biosciences AB, SE-751 84 Uppsala, Sweden.

2 Department of Surgery, University Hospital, S-751 85 Uppsala, Sweden

介绍

目前蛋白质组学技术已被广泛应用于包括发现生物标志物和药物开发在内的许多临床研究上。本文利用当前蛋白质组学最前沿的技术,对结肠癌组织进行了生物标志物发现及蛋白质性的研究。

研究的目的是通过两种不同的蛋白质组学研究途径鉴定并定性结肠癌组织中的生物标志物,其中第一个途径是基于凝胶的荧光差异双向电泳(Ettan DIGE)结合MALDI ToF质谱鉴定,另一个途径是通过多维液相色谱(Ettan MDLC)连接Finnigan离子阱质谱进行鉴定。

方法

2D DIGE 研究流程

对来源于5个病人的样本,包括正常和肿瘤组织,进行了组织学分析。使用Ettan研磨试剂盒研磨并裂解(8 M 尿素, 2 M 硫脲, 4% CHAPS, 30 mM Tris, 5 mM MgAc)冻干的结肠组织,将pH调至8.5后用Ettan 2D蛋白定量试剂盒对蛋白质浓度进行测定,然后用CyDye荧光染料对样品进行标记,并各取等量的所有样本混合后单独标记作为DIGE系统分析所需的内标。样本按实验设计混合在Immobiline™ DryStrip 24cm pH3-10 NL(及pH3-7和pH6-11)胶条上进行等电聚焦分离,然后在12.5%的Ettan DALT胶上进行SDS-PAGE的第二向分离。电泳后的凝胶使用Typhoon™ 9410多功能图像扫描仪扫描并用DeCyder 6.5软件进行分析。候选蛋白点使用全自动点处理工作站(Ettan spot handling workstation)进行自动切取和酶解处理后,用Ettan Maldi ToF-Pro质谱仪分析,并用内含的Profound搜索引擎将期望值定为0.05进行鉴定。

MDLC 研究流程

分别从健康和患病的人群中取等量的蛋白质样本混合,创建2个样品混合物。将这2个样品混合物烷基化处理后用胰蛋白酶降解,然后使用Ettan MDLC连接带有纳喷雾源接口的Finnigan LTQ线性离子阱质谱进行分析。将1µg样品上样

至2.1 * 250 mm的SCX柱(BioBasic, Thermo Electron),用氯化铵阶段洗脱至trap柱上(Zorbax, Agilent, 0.3*5 mm),脱盐后再进一步至RPC柱(0.075 * 150 mm Zorbax, Agilent column)分析。用60分钟的线性梯度洗脱至60%B完成RPC分离(A液:0.1%甲酸,B液:84%乙腈和0.1%甲酸)。两套trap/分离柱平行进行分析/平衡。使用X! Tandem搜索引擎进行多肽的鉴定。

结果

在双向电泳的凝胶上,共发现了69个p值小于0.01的差异蛋白点,分属于39个特定的蛋白质。通过DeCyder扩展数据分析软件(DeCyder EDA),将这些蛋白质分成了3个主要的类别,(I)结构蛋白、(II)转录调节因子、(III)信号转导因子。其中9个蛋白已知在不同的肿瘤中均有差异表达。EDA的强大分析功能还能对生物学相关的差异蛋白质进行分组,并分析它们所参与的不同信号通路,进而为功能蛋白质组学研究提供了强有力的方法。结果参见以下的图表。

使用Tandem算法在人类蛋白质数据库中搜索基于MDLC流程所得的MS/MS图谱,期望值设为0.05,从对照样本混合物中鉴定了174个蛋白,从癌变样本混合物中鉴定了270个蛋白,见表3。有趣的是,其中所得到的在肿瘤样品中差异表达的蛋白质,都未在基于2D的流程中获得,证实了两种流程在技术上的互补性。

结论

运用Ettan 2D DIGE平台和DeCyder分析软件共找到并从功能上定性了9个潜在的肿瘤相关生物标志物。

运用Ettan MDLC连接Finnigan离子阱质谱找到了12个肿瘤相关生物标志物,显示MDLC流程在发现生物标志物上的应用潜力。

两个流程中发现的生物标记没有重复,表明了这两种技术的互补性。

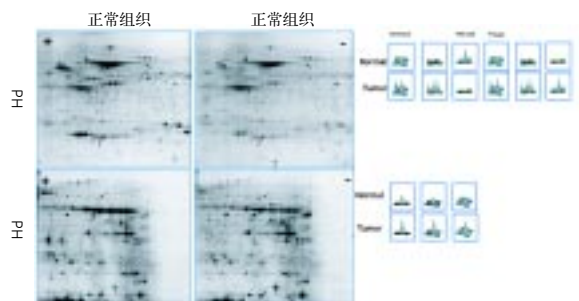


图2. 正常组织和肿瘤组织的2D电泳图, 并标出了肿瘤相关蛋白的位置。右图是差异蛋白点的3D视图。图中以红色标出的蛋白点p值小于0.001 (见表2)

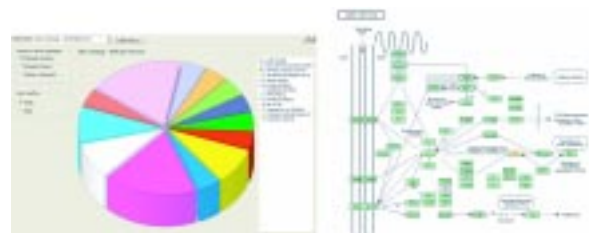


图3. 使用 DeCyder EDA 模块对蛋白进行分析所得差异蛋白的分类和它们所参与的信号通路。右图表示了 ACTG-1 基因产物 (p 值 0.019) 在 tight junction 通路中的位置。

表3. MDLC 数据。以下列出的蛋白质是已知的肿瘤标志物

| 仅在正常组织中表达 | 仅在肿瘤组织中表达 |
|--|---|
| Alpha-1-antitrypsin precursor (Alpha-1 protease inhibitor) (Alpha-1-antiproteinase) (PRO0684/PRO2209) | heat shock 90kDa protein 1, alpha; heat shock 90kD protein 1, alpha [Homo sapiens] |
| heat shock protein 90-beta [validated] - human | TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2 [Homo sapiens] |
| Aldose Reductase (E.C.1.1.1.21) Complex With NADPH | colligin-2 - human |
| GTP binding protein Rab 1a | Chain C, Structure Of The Karyopherin Beta2-Ran Gppnhp Nuclear Transport Complex |
| chaperonin 10-related protein [Homo sapiens] | RAB6B, member RAS oncogene family; small GTPase RAB6B [Homo sapiens] |
| Protein kinase C substrate, 80 kDa protein, heavy chain (PKCSH) (80K-H protein) | GTP-binding protein Rab4 - human |

表2. 已知和肿瘤相关的差异蛋白质

pH 3-7

| Protein name | p-value | Gel annotation |
|--------------------------|---------|----------------|
| Selenium binding protein | 0.0008 | 3 |
| Vinexin beta | 0.0009 | 6 |
| PDZ and LIM domain 1 | 0.0038 | 1 |
| Proapolipo-protein 1 | 0.0049 | 4 |
| Intersection 1 | 0.0063 | 5 |
| NOD 2 | 0.0079 | 2 |

pH 6-11

| Protein name | p-value | Gel annotation |
|--------------|---------|----------------|
| Kalkrein | <0.01 | 3 |
| Enolase | <0.01 | 6 |
| TKT protein | <0.01 | 1 |