

应用多元分析和ECL Plex™验证的全面差异凝胶电泳(DIGE)研究

Comprehensive Difference Gel Electrophoresis (DIGE) study using multivariate analysis and ECL Plex™ for verification

Phil Beckett¹; Viola C. Ruddat²; Christine R. Rozanas¹; G. Reid Asbury¹; M. Alex Shaw³

¹GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ; ²GE Healthcare Biosciences, Sunnyvale, CA;

³Thomas Jefferson University, Kimmel Cancer Center, Philadelphia, PA

简介

利用预分离技术能够增加2D胶的敏感性和动力学范围。这个研究在进行2D电泳和随后的分析之前先用CyDye DIGE荧光染料预标记样品并用阴离子交换层析进行样品预分离。

对感兴趣的蛋白点进行鉴定，然后应用ECL Plus™和ECL Plex进行Western印迹证实。

材料和方法

由托马斯杰弗逊大学提供8个病人的血清 - 4个对照和4个患代谢综合症。代谢综合症是一种多个症状的总称(腹部肥胖、高血压、胰岛素抗性和升高的甘油三酸酯/降低的HDL水平)，能增加2型糖尿病、冠心病和中风的风险。样品制备包括白蛋白去除和IgG去除，然后用PlusOne 2D清洁剂试剂盒沉淀蛋白质。浓度为5mg/ml的样品重悬在标记缓冲液中(7M 尿素/2M 硫脲，2% CHAPS，30 mM Tris pH 8.5)并用CyDye标记(表1)。

蛋白质在用缓冲液A(25 mM Tris, 8 M urea, 6% IPA, pH 8.5 + 10 mM DTT)重悬前再次沉淀。每个样品的一半上样到Ettan™ LC上的MiniQ™ PE 4.6/50上。蛋白质用缓冲液B洗脱(缓冲液A + 1 M NaCl) - 流速0.5 ml/min，用0 - 20% 缓冲液B超过20 CV。4轮运行中每轮收集共24个(1 ml)组分。选择这些组分的一些合并最终组成9个组分，且每个组分使用旋转层析柱浓缩并进行缓冲液交换(7M 尿素/2M 硫脲，2% CHAPS，65 mM DTT，0.5% w/v IPG缓冲液)。

4轮运行中每轮的9个组分在36 × 2D胶上电泳(第一向：24 cm pH 4-7预制干胶条 Immobiline™ DryStrip，第二向：12.5%聚丙烯酰胺大规格胶(25 × 20 cm))。这些凝胶在Typhoon™ 9400上扫描并应用DeCyder™ 2D进行图像分析。

Western印迹用去除白蛋白和IgG但未分离的样品在1D胶上进行。

表1: 实验设计

	Cy™2	Cy3	Cy5
Tube/run1:	Internal Std.	对照组1	疾病组6
Tube/run2:	Internal Std.	疾病组8	对照组2
Tube/run3:	Internal Std.	对照组3	疾病组9
Tube/run4:	Internal Std.	疾病组10	对照组5

每管蛋白质 = 333 µg IS + 333 µg 对照组 + 333 µg 疾病组

结果:

阴离子交换层析柱全部4轮运行的紫外检测都具有重现性(图1)。当在Typhoon上对96孔板中收集的24个组分扫描时,关于不同标记蛋白的重现性也可以观察到。图2显示全部24个收集的组分的所有三种荧光的定量分布。

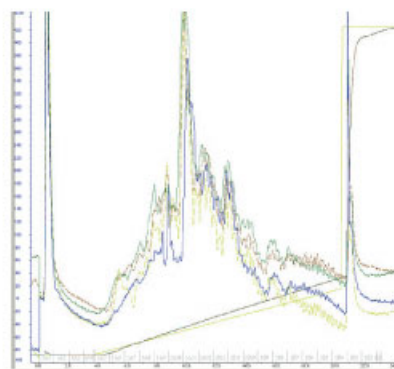


图1: 去除白蛋白和IgG的血清样品4轮重复运行的洗脱组分的UV检测(215 nm)图。



图2: 每轮的24个组分收集在一个微孔板中在Typhoon上对Cy2(激发波长488 nm, 发射滤光片520 BP40)、Cy3(激发波长532 nm, 发射滤光片580 BP30)和Cy5(激发波长633 nm, 发射滤光片670 BP30)成像。图像显示第4轮运行(对照组5和疾病组10)的所有三个通道重叠图。

图3显示36个结果凝胶中有代表性的9个图像的重叠图(Cy2 - 蓝色, Cy3 - 绿色, Cy5 - 红色)。每轮4次重复在视觉检测上显示出极好的重现性, 而且也显示每个组分都有一个显著不同的斑点分布, 因此分离是成功的。

这些点中的一些由于在图像中更绿或更红而被当作潜在的下调表达或过表达, 但为了准确地定量并发现真正的差异, 图像应用DeCyder 2D软件分析。

图4(详细地)显示在组分3中的蛋白质变化-所有的这些点显示很强的下调, 从所有9个组分中共挖取了42个点用于鉴定, 13个点有显著地上调或下调表2)。蛋白质鉴定用MALDI TOF和LC/MS/MS进行。鉴定的这些蛋白质中有两个还用Western印迹验证(图5)并定量验证了表达的差异。由于出版的保密性我们暂时不能公开这些鉴定的蛋白质。

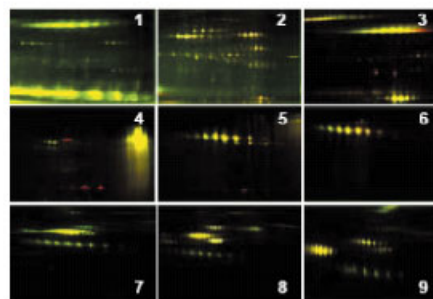


图3. 从组分1到9的凝胶图像重叠点图

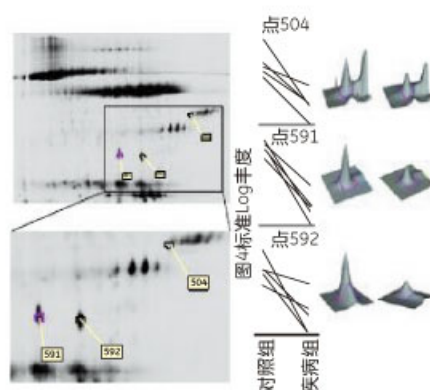


图4. 从DeCyder 2D的BVA部分显示的组分3中每个感兴趣点的代表性图像和3D图。凝胶用Deep Purple™后染色以保证点的挖取和在图像上显示点的位置。进一步的详细信息见表2

表2: 上调或下调的重要的点(-)

组分	点编号	比率*	t体检	组分	点编号	比率*	t体检
3	504	-1.55	0.013	7	489	0.94	0.057
	591	-2.16	0.00067		607	-1.20	0.017
	592	-1.73	0.02		637	1.24	0.05
4	60	1.54	0.012		691	1.32	0.00026
	174	-1.74	0.00083	8	662	1.26	0.0024
5	25	1.26	0.033	9	1023	1.34	0.0002
6	55	-1.36	0.0043				

*比率表示为变化的倍数-如2倍变化是100%的增加而-2是50%的减少。



图5a: ECL Plus™ 蛋白591/592

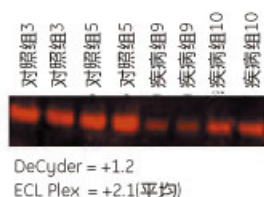


图5b: ECL Plex™ 蛋白609(羊抗兔Cy5显示)

图6显示去除白蛋白和IgG但未分离的血清。在未分离的样品中检测的点的数量比所有9个组分检测到的点大约少3倍(9个组分共检测到3724个点相比未分离的样品中只检测到1259个点)。

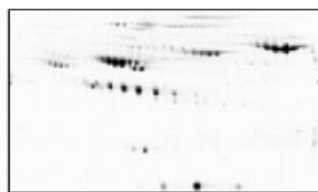


图6: 去除白蛋白和IgG但未分离的样品

结论:

分离的所有方面都是成功的。正如以前的研究所预期的, 真正观察到的差异很少。这些结果表明在DIGE前通过液相预分离能够减少样品的复杂性并潜在地增加了检测低丰度蛋白的能力。

进一步的研究正在继续; 包括使用ECL Plex杂交2D膜以验证那些被鉴定了的蛋白。