

計畫名稱：癌細胞蛋白質染色及定序之研究

計畫編號：90-PH-06

執行期間：90/1/1 – 90/12/31

計畫主持人：方嘉德

一、中文摘要

癌細胞可能表現的蛋白質與正常細胞株不同，而口腔癌在台灣為男性十大癌症排名第五。罹患者上升極快且致死率又高，尤其台灣南部嚼檳榔的人口眾多，所以罹患者也特別多。故本研究以口腔癌細胞為研究模型，藉由二維電泳分離及純化癌細胞產生的蛋白質，再以 silver stain 呈色，然後用質譜儀探索其特殊蛋白質，以期可篩選出新的口腔癌標記。

關鍵詞：質譜儀、蛋白質定序

Abstract

Oral cancer is one of the leading causes of death among malignant tumors in Taiwan. Epidemiological studies indicate that oral cancer is prevalent in male and in southern Taiwan. Risk factors for this type of cancer include alcohol consumption, cigarette smoking, and particularly betel quid chewing. Although recent studies have made progress on the diagnosis and treatment, the etiology of oral cancer remains to be elucidated. We hypothesize that expression of certain proteins may be different between normal and cancer cells and these proteins may be involved in the pathological processes of oral cancer. The goal of this project is to set up the mass spectrometry technique and to identify proteins by mass spectrometry that may play a role in various stages of oral cancer.

Keywords: mass spectrometry, protein sequencing

二、緣由與目的

隨著人類基因密碼(human genome project)的揭曉，目前已邁入後基因體時代。因此基因及其對應蛋白質的關係已逐漸被解讀開來，所以功能性基因體學(functional genomics)之研究便成了現下最熱門的話題。而基因研究逐漸被生物醫學學者重視之發展正促進此新奇領域的興起，同時也加速了功能性基因體學在藥物研發，疾病預防及診斷治療上的應用。目前功能性基因體學之技術主要包括蛋白質體學(Proteomics)及微陣列(microarray)晶片技術。微陣列晶片技術可研究細胞間所產生 mRNA 的差異，具有大量篩選，高靈敏度，及快速等優點。然而細胞 mRNA 的多寡與蛋白質的表現並不完全吻合，細胞的表現型乃由蛋白質所決定，因此若能直接辨認出有表現的蛋白質，對細胞性狀研究應較能提供直接的證據。另外，微陣列晶片技術只能偵測已知基因之 mRNA 表現差異，對未知基因無法偵測。蛋白質體學則可找出細胞間表現有差異之蛋白質，並進一步對蛋白質進行胺基酸定序。蛋白質體學技術除了可偵測已知之蛋白質，亦可找尋未知之蛋白質，因此可避免上述微陣列晶片技術的缺點。

目前常用於蛋白質定序的方法包括 Edman degradation 與 mass spectrometry (質譜儀)。雖然蛋白質可用 Edman degradation 來定序，但是此方法有以下的缺點：(1)耗時；(2)所需蛋白質量高(需 pmole 的蛋白質)。近幾年質譜儀鑑定蛋白質技術已有長足之發展，實驗流程時間較短且靈敏度較高。除了定序之外，質譜儀亦可用來定量或偵測蛋白質的轉譯後修飾(例如 phosphorylation, glycosylation, methylation)，並判斷出所修飾的氨基酸位置。另外質譜儀也曾應用於蛋白質的四級構造的探討以及蛋白質與受質間鍵結的關係。由於質譜儀在蛋白質體學中屬於關鍵性技術，因此本研究計劃擬利用本校已購置之 LC-MS/MS 質譜儀建立蛋白質鑑定之技術平台。

三、結果與討論

我們先利用現成 peptide 來建立 LC/MS/MS 的條件，進而利用 SDS-PAGE 使多種已知的蛋

白質變性，再進行 trypsin digestion，利用建立起的 LC-MS/MS 條件來測試鑑定這些已知蛋白質的能力，從而再進一步改善 LC-MS/MS 的鑑定技術平台。我們一開始以 bradykinin，一種由 9 個胺基酸構成的 peptide，當作標準來觀察它是否可藉由 tandem mass spectrometry (LCQ Duo, Finnigan) 被確認出來，由光譜獲得的資料隨後與 NCBI 之 Blast 資料庫做比對。吻合的序列具有 9 個胺基酸(RPPGFSPFR)是由 bradykinin 鑑別。correlation factor (Xcorr) 以及 delta cross correlation factor (DelCn) 分別為 2.8 與 0.228。一般 Xcorr 大於 2.0 表示具高意義之吻合，DelCn 高於 0.1 表示屬最佳的吻合與其次高度吻合具高區分性。這種結果表示 LC-MS/MS 光譜是可以去鑑別已純化的 peptide。

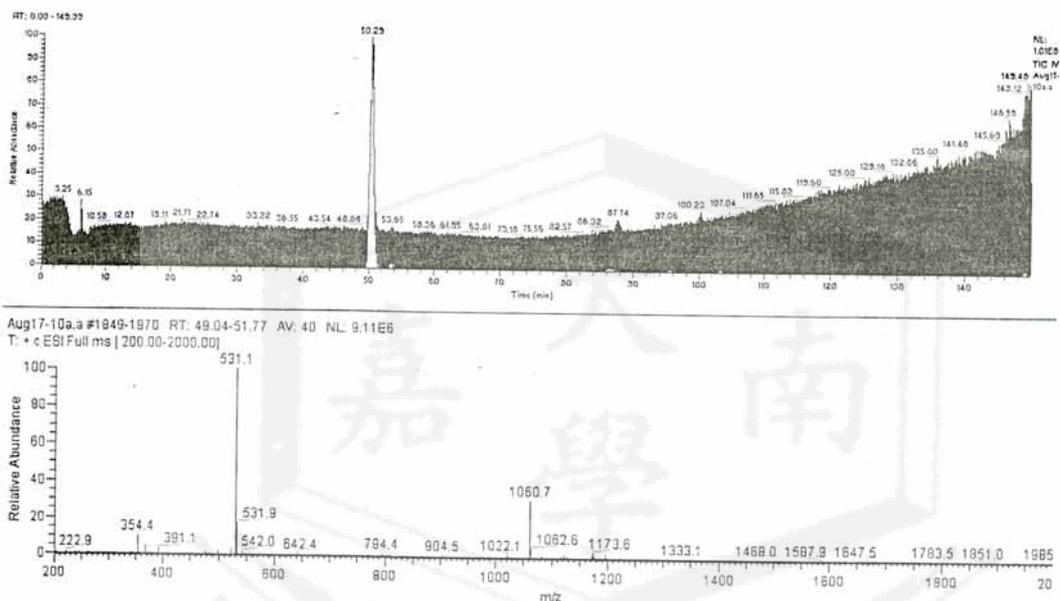


圖 1. bradykinin 的質譜分析。Chromatogram (上圖) 表示 50 分時有單一波峰流析出來。下圖是 bradykinin 質量光譜。蛋白鑑別用 TurboSEQUENT 軟體與 Blast 資料庫來完成。

雖然我們已成功地利用 bradykinin，即一種 nanopeptide，當作質譜儀的標準品，但尚不清楚此步驟是否可應用於 in-gel digested 的蛋白。目前進行的實驗是在測試此步驟是否可應用於 in-gel digested 的 peptide。可能的問題與解決方法如下。首先，digested peptide 須先吸附在毛細管或 pipette tip 管壁。而後需要以甲醇流洗。另外，高鹽濃度可能會干擾分析。為了克服此可能性，脫鹽或繞道 10 分鐘的流析液將需被測試。第三，HPLC 的流析狀況需要調整，包括流動相的組成，管柱填充，流速，以及梯度組成。最後，質量光譜儀必需要調整到最佳化的設定。像 ESI 電壓、毛細溫度、包鞘氣體的流速、碰撞能量，以及 default ionic charge。

四、參考文獻

1. Conrads TP, Issaq HJ, Veenstra TD. New tools for quantitative phosphoproteome analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(3):885-890.
2. Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev.* 2001;101:269-295.
3. Wilm M. Mass spectrometric analysis of proteins. *Adv Protein Chem.* 2000;54:1-30.
4. Resing KA, Ahn NG. Applications of mass spectrometry to signal transduction. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71(3-4):501-523
5. Derrick PJ, Patterson SD. Mass spectrometry of proteomics. *Proteomics.* 2001; 8:925-926