

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ แบบแผนฟอสโฟโปรตีนในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

โดย นางสาวศิริพร ภัทรกิจกำจร

มีนาคม 2554

สัญญาเลขที่ MRG5280033

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ แบบแบบฟอสโฟโปรตีนในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อไต

ผู้วิจัย นางสาวศิริพร ภัทรกิจกำจร

สังกัด คณะเทคโนโลยีการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้จัดสรรทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2552 ภายใต้ชุดโครงการสุขภาพชาวอีสาน: การพัฒนาชุดวินิจฉัยมะเร็งตับในอีสาน และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ในตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนการวิจัย รวมทั้งศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ ที่มอบทุนผู้ช่วยวิจัยให้แก่นางสาวมณฑิรา จะนันทน์ ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. โสพิศ วงศ์คำ นักวิจัยที่ปรึกษา ที่สนับสนุนการเข้าร่วมรับทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ หลังจากผู้วิจัยเพิ่งสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอก ปี พ.ศ. 2551 โดยนักวิจัยที่ปรึกษาให้การสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ สารเคมีที่จำเป็น การให้ข้อมูลข่าวสารอันเป็นประโยชน์ต่อการส่งเสริมนงานวิจัย และนักวิจัยที่ปรึกษาเป็นตัวอย่างที่ดีของคณวิจัย ซึ่งเป็นความภาคภูมิใจอย่างยิ่งของผู้วิจัย

ขอขอบคุณนักวิจัย ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล และเจ้าหน้าที่สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงาน ขอขอบคุณนักศึกษาทุกคนที่ตั้งใจทำงานและให้ความร่วมมือในงานส่งส่งไปด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยศิริ วงศ์คำ และบุคลากรภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์, ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ในตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, บุคลากรกลุ่มวิชาเคมีคลินิก, รองศาสตราจารย์ ดร. เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์ และบุคลากรศูนย์วิจัยและพัฒนากาตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสนับสนุนให้ผู้วิจัยดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วง และขออภัยที่ไม่สามารถกล่าวนามได้ทั้งหมดด้วยเนื้อที่จำกัด แต่ผู้วิจัยจะระลึกถึงท่านเสมอที่มีส่วนร่วมในความสำเร็จครั้งนี้

ท้ายสุดขอขอบคุณและมอบความดีที่เกิดขึ้นจากองค์กรความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้แต่ผู้วิจัยจะเร่งทำหน้าดีทุกท่าน ที่ได้อนุญาตให้ใช้ตัวอย่างต่างๆ ในการวิจัยครั้งนี้

นางสาว ศิริพร ภักทรกิจกิจกร
ผู้วิจัย
มีนาคม 2554

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5280033

ชื่อโครงการ: แบบแผนฟอสโฟโปรตีนในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

ผู้หลักวิจัยและสถาบัน: นางสาวศิริพร ภักธกิจจักร คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: sirpat@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ และจำเพาะของประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการยังไม่มีสารบ่งชี้มะเร็งที่เหมาะสม สำหรับกลุ่มของโปรตีนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตในกระบวนการ Post-translational modifications ซึ่งจะถูกเรียกว่า ฟอสโฟโปรตีน (Phosphoproteins) ถูกพบว่ามีความสำคัญในการทำงานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี วัตถุประสงค์ครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาฟอสโฟโปรตีนที่ถูกสร้างในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี อาทิ KKU-M213 โดยเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงท่อน้ำดีปกติ MMNK1 โดยตัวอย่างจะถูกย่อยในบัฟเฟอร์ที่มี Phosphatase inhibitors แล้วตัวอย่างที่ได้จะถูกนำมาแยกกับฟอสโฟโปรตีน ด้วย SwellGel[®] Gallium-Chelated Disc. จากนั้นฟอสโฟโปรตีนจะถูกนำมาย่อยด้วย Trypsin ซึ่งจะได้เป็น Phosphopeptides และถูกตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS จากนั้นวิเคราะห์ผลโดย Decyder[™] MS 2.0 differential analysis software พบอย่างน้อย 37 phosphopeptides ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และความแตกต่างของแบบแผนฟอสโฟโปรตีนถูกยืนยันด้วยวิธี 2DE-western blot กับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฟอสโฟโปรตีน แบบแผนฟอสโฟโปรตีนที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีอาจนำไปสู่การศึกษาในสิ่งสังตรวจของผู้ป่วย เพื่อนำมาพัฒนาการตรวจหาแบบแผนอย่างง่ายต่อไป

คำหลัก: ฟอสโฟโปรตีน, มะเร็งท่อน้ำดี

Abstract**Project Code:** MRG5280033**Project Title:** Phosphoprotein patterns of Cholangiocarcinoma cell lines**Investigator:** Miss Siriporn Patrakitkomjorn**E-mail Address:** sirpat@kku.ac.th**Project Period:** 2 years

Phosphorylation is an important post translational modification of proteins. Modified proteins called phosphorylated proteins are associated with pathways that regulate cancer cells. Phosphorylated proteins that modulate activities of those proteins become more interesting to be the specific markers for this cancer. We objected to study the differential profiling of phosphorylated proteins in cholangiocarcinoma cell lines and used immortalized MM/NK1 cells as control. To purify phosphorylated proteins, treated cell lysates were subjected into SwellGel[®] Gallium-Chelated Disc. Eluted phosphorylated proteins were reduced, alkylated, and digested with trypsin, consequently identified with LC-MS/MS. DeCyder[™] MS 2.0 differential analysis software was used for visualization, detection, comparison, and relative quantitation of LC-MS/MS data. In this study, all data was analyzed as two-dimensional intensity maps. In cholangiocarcinoma cell line, at least 37 phosphopeptides showed an average difference of 2 times ($p < 0.05$). The differentiations of phosphorylated protein profiles in label-free cells may be used as potential markers for cholangiocarcinoma.

Keywords: Phosphoproteins, Cholangiocarcinoma

บทนำ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่จำเพาะและสำคัญของชาวอีสาน นับแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดขึ้นในคนไทย มีสมมุติฐานของโรคที่แตกต่างจากคนในประเทศตะวันตกและประเทศในแถบเอเชียตะวันออก ดังนั้นข้อมูลและองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในชนชาติอื่น จึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยได้โดยตรง จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่นักวิจัยไทยต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานและองค์ความรู้เกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยเอง

เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่ไม่มีอาการแสดงในระยะเริ่มแรก และยังไม่มีการวินิจฉัยหรือการตรวจกรองที่จำเพาะต่อโรคในระยะเริ่มแรก ผู้ป่วยจึงมักมาพบแพทย์เมื่ออาการหรือโรคได้ดำเนินถึงระยะท้ายแล้ว ซึ่งในระยะดังกล่าวมักมีการกระจายของมะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะอื่นที่ใกล้เคียงหรือห่างไกล และเป็นเหตุสำคัญที่ทำให้การบำบัดรักษาและพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีไม่ได้น่าพอใจ และทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ดังนั้นการวินิจฉัยโรคให้ได้อย่างจำเพาะในระยะเริ่มแรกและระยะแพร่ลุกลามของมะเร็งจึงเป็นแนวทางที่มีความเป็นไปได้สูงในการลดความรุนแรงและสูญเสียที่เกิดจากมะเร็งท่อน้ำดีในภูมิภาคนี้

ปัจจุบัน ยังไม่มีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพในการการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ที่สูงมากพอ จากการวิจัยเบื้องต้นของผู้วิจัยในการเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับคนปกติ โดยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ อาทิ วิธี two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) และ Mass spectrometry พบความแตกต่างของกลุ่มโปรตีนบางชนิด ซึ่งมีลักษณะความแตกต่างที่อาจเกิดจาก post-translational modification (PTM) เช่น phosphorylation, glycosylation กระบวนการดังกล่าวมีความสำคัญในกลไกการดำเนินโรคของมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี อย่างไรก็ตามกลุ่มฟอสโฟโปรตีนดังกล่าวอาจเป็นโปรตีนที่ถูกสร้างและปล่อยออกมาจากเซลล์มะเร็งโดยตรง หรือเกิดจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล เป็นผลให้การนำฟอสโฟโปรตีนเหล่านี้มาเป็นตัวบ่งชี้ภาวะมะเร็งมีความจำเพาะต่ำ ดังนั้นการศึกษาของกลุ่มฟอสโฟโปรตีนที่สร้างหรือหลั่งออกมาจากเซลล์มะเร็งมะเร็งท่อน้ำดีโดยตรงอาจให้ข้อมูลที่นำมาใช้ในการหาแนวทางเพื่อพัฒนาตัวบ่งชี้มะเร็งที่จำเพาะได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาแบบแผนของฟอสโฟโปรตีนในเซลล์มะเร็งมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี two dimensional gel electrophoresis และเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงท่อน้ำดีปกติ ผลการศึกษานี้นอกจากเป็นแนวทางเบื้องต้นในการพัฒนาตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีแล้ว ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับกระบวนการสังสัญญาณระดับโมเลกุลในเซลล์มะเร็ง เช่น การจำแนกชนิด และการจัดกลุ่มโปรตีน (protein identification and categorization) เพื่อศึกษา protein-protein interaction ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำหรือยับยั้งของโปรตีนในภาวะ phosphorylation

เป็นการตรวจหาสัญญาณ (signal transduction) ที่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งสามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาพัฒนาเป็น marker ในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีอย่างจำเพาะมากขึ้นในการวิจัยระยะ (phase) ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการ

- ศึกษาแบบแผนฟอสโฟโปรตีนในเซลล์เฉพาะเลี้ยงที่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงท่อน้ำดีปกติ โดยเทคนิคทางโปรตีนโอมิกส์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกระบวนการ phosphorylation และฟอสโฟโปรตีนที่สัมพันธ์กับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
- ความรู้เบื้องต้นเพื่อวิจัยต่อยอดในการพัฒนาฟอสโฟโปรตีนที่สนใจเป็นตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยต่อไป
- เผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการและการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
- พัฒนาการเรียนการสอน และสร้างนักวิจัยใหม่

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review) และเอกสารอ้างอิง

ฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) เป็นโปรตีนที่เกิดจากกระบวนการ post-translational modification (PTM) โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตที่กรดอะมิโน serine, threonine หรือ tyrosine การเติมและตัดหมู่ฟอสเฟตของโปรตีนอาศัยเอนไซม์ protein kinase และ phosphatase ตามลำดับ กระบวนการ phosphorylation เป็นกลไกที่สำคัญในการควบคุมการทำงานและระบบยังชีพ (survival) ของเซลล์ เช่น proliferation, differentiation และ apoptosis เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำความรู้เกี่ยวกับการแสดงออกของยีนและโปรตีนต่าง ๆ ในมะเร็งมาประยุกต์ใช้เป็น marker ในการวินิจฉัย รักษาและติดตามผลการรักษาของมะเร็งหลายชนิด มีการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับ tyrosine phosphorylation ในมะเร็งเพื่อใช้เป็น drug target การศึกษา tyrosine kinase และ substrate เพื่อประโยชน์ด้าน tumor marker และการศึกษา substrate ของ serine/threonine kinase เพื่อควบคุม cell signaling (1) เป็นต้น แต่ยังไม่มีการศึกษาใดที่ใช้โปรตีนที่ถูกควบคุมผ่านทาง PTM โดยเฉพาะ phosphorylation (1) เป็น marker ในการวินิจฉัยมะเร็ง

ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับยีนของ protein kinase ประมาณ 518 ยีน และประมาณ 100 ยีนเป็น tyrosine kinases ซึ่งมากกว่า 50 เปอร์เซนต์ของ tyrosine kinase มีความเกี่ยวข้องกับสาเหตุของการก่อมะเร็งในมนุษย์ พบว่าในกระบวนการพัฒนาของมะเร็งในแต่ละขั้นตอนมีความแตกต่างกันในการทำงานของกลุ่ม protein tyrosine kinase และ protein tyrosine kinase substrate ข้อมูลเหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้เป็น

เป้าหมายในการพัฒนายารักษามะเร็งหลายชนิด เช่น Herceptin (trastuzumab) ใช้รักษาการกระจายของมะเร็งเต้านมโดยต้าน ErbB2 receptor tyrosine kinase เป็นต้น (2)

รองศาสตราจารย์สุพิศ วงศ์คำและคณะฯ ได้ศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนและโปรตีนหลายชนิดในมะเร็งท่อน้ำดีและไตนำมาประยุกต์ใช้เป็น marker ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีทางคลินิก แต่ยังไม่แพร่หลายเนื่องจากยังมีข้อจำกัดของความไวและความจำเพาะ เช่น mucin ชนิด MUC5AC (3, 4) และ biliary alkaline phosphatase (5) เป็นต้น

การศึกษาระบบแผนของโปรตีนในสภาวะจำเพาะหนึ่ง ๆ เป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษากลไกหรือกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่สนองตอบภายใต้สภาวะนั้น โดยนัยนี้ทำให้ให้นักวิทยาศาสตร์ติดตามสัญญาณโมเลกุลหรือเครือข่าย (Network) ที่แสดงถึงความจำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้ เช่น การศึกษาการยับยั้งการทำงานของ methionine aminopeptidase 2 (MetAP2) ต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยการศึกษาแบบแผนโปรตีนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในสภาวะดังกล่าวพบว่าโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจนและน่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการดังกล่าวคือ cyclophilin A ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีรายงานในมะเร็งหลายชนิดแล้วว่ามีความสำคัญในการแบ่งเซลล์ การต่อต้านการตายแบบ apoptosis และการดื้อยาเคมีบำบัดของมะเร็ง เป็นต้น

การศึกษากลไกการก่อมะเร็งท่อน้ำดีที่เกี่ยวข้องกับกลไกของ PTM และ phosphorylation พบว่าทั้งสองกลไกมีความสัมพันธ์กับกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดี เช่น พบว่ากรดน้ำดี (bile acid) สามารถกระตุ้น phosphorylation ของ epidermal growth factor receptor (EGFR) และเพิ่มการแสดงออกของ cyclooxygenase-2 (COX-2) โดยผ่านกระตุ้นของ MAPK p42/44 และ p38 โดยอาศัยกลไก phosphorylation (6) นอกจากนี้ยังพบว่า phosphorylation ของ cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) มีผลให้ hepatocyte growth factor (HGF) และ interleukin 6 (IL-6) เหล่านี้ทำให้เกิดการการปล่อยกรด arachidonic (AA) และการผลิต prostaglandin (PG) ซึ่งมีผลต่อการเติบโตของมะเร็งท่อน้ำดี (7) การเหนี่ยวนำ PG โดย COX-2 สามารถกระตุ้น phosphorylation ของ Akt (phospho-Akt (Thr (308)) ซึ่งเป็น protein kinase ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของมะเร็งท่อน้ำดี (8) จากรายงานต่าง ๆ ดังกล่าว ทำให้ทราบว่า phosphorylation เป็นกลไกที่สำคัญในระบบการสื่อสารและการควบคุมของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฟอสโฟโปรตีนในภาพรวมย่อมจะแสดงให้เห็นแบบแผนที่จำเพาะมากกว่าการศึกษาฟอสโฟโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังนั้นการศึกษาระบบแผนฟอสโฟโปรตีนในเซลล์เฉพาะมะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเซลล์ท่อน้ำดีปกติ โดยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ จะทำให้ทราบกลไกการควบคุมการดำรงชีวิตระดับโมเลกุลที่สำคัญในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาแบบแผนฟอสโฟโปรตีนในเซลล์เพาะเลี้ยงที่จำเพาะต่อมะเร็งต่อมน้ำดี

● เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งต่อมน้ำดี

ได้ทำการสนับสนุนเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งต่อมน้ำดีชนิดต่าง ๆ ซึ่งพัฒนาโดย รศ.ดร. บรรจบ ศรีภาณุเนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

● การเตรียมตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งต่อมน้ำดี

เลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งต่อมน้ำดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ HAM-F12 ใน 10% fetal calf serum สกัดโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์เพาะเลี้ยงและเก็บที่ -20°C เพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

● การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Lowry

● การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2-DE

แยกวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่ตัด โดยในมิติแรกด้วยวิธี isoelectric focusing electrophoresis (IEF) โดยผสมกับสารละลายที่ประกอบด้วย urea และ dithiothreitol (DTT) แยกโปรตีนในซีรัม (100 μg) โดยใช้ IPG-strip ซึ่งมี pH gradient 3-10 pH unit และให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจล ในจำนวนอนที่ 400, 600 และ 1000 volt ใน 30, 30 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นแถบโปรตีนบนเจลจะถูกวิเคราะห์ในมิติที่ 2 โดยใช้ SDS-PAGE ใช้ polyacrylamide gel linear gradient 7.5-10% และย้อมแผ่นเจลด้วยวิธี silver staining และ phosphoprotein staining

● การวิเคราะห์แบบแผน 2-DE ด้วยคอมพิวเตอร์

แบบแผน 2-DE ที่ได้จะถูกบันทึกลงในคอมพิวเตอร์และเปรียบเทียบผลที่ได้โดยใช้ 2-DE Gel Analysis Software

2. การคัดเลือกแบบแผนฟอสโฟโปรตีนที่จำเพาะต่อมะเร็งต่อมน้ำดี

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

- แยกเลี้ยง cancer cells และ MMNK1 cells ใน 15-cm cell culture dishes ด้วย serum-free medium จากนั้นเก็บsecreted proteins โดยใช้ Amicon Ultra-15 tubes (molecular mass cutoff 3 kDa)

- นำซีรัมผู้ป่วยหรือคนปกติ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ phosphate buffer (20 mM phosphate buffer pH 7.4, 0.5 M NaCl pH7.4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมน้ำมันเม็ด bead ที่มี chelating ligands แบบ metal ions free ให้ติดกับ metal ions ที่ต้องการ คือ Fe^{3+} ซึ่งมีประจุบวกและเมื่อ

นำไปรวมกับตัวอย่างที่มี phosphorylated proteins ที่มีประจุลบก็จะเกิด complex ส่วนเกินด้วย washing buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 6, 300 mM NaCl, 7 M Urea) และแยกกับ phosphorylated proteins โดยการใช้ elution buffer 100 ไมโครลิตร (50 mM sodium phosphate buffer pH 4, 300 mM NaCl, 7 M Urea)

2.2 การแสดงแบบแผน

- ทำการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และย้อมด้วย silver staining จะถูกนำมาทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแถบโปรตีน โดยอาศัยพื้นที่ใต้กราฟ แล้วคำนวณออกมาเป็นตัวเลขและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าที่ได้ ด้วยโปรแกรม Imagequant400 (GE healthcare)

ผลการทดลอง

1. ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ห่อน้ำดี

1.1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งห่อน้ำดี

จากการเลี้ยงเซลล์มะเร็งห่อน้ำดีชนิด KKU-M213 cells จำนวน 50,000 เซลล์ ด้วย Ham's F12 media (Seromed, Berlin, Germany) ที่ประกอบด้วย penicillin (200 U/mL) และ streptomycin (200 µg/mL) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนกระทั่งมี confluent ราว 80% พบว่าเซลล์ KKU-M213 ดังกล่าวมีลักษณะค่อนข้างกลมเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) เมื่อเทียบกับรายงานของ รศ. บรรจบ ศรีภา (unpublished data) พบว่ามีลักษณะเหมือนกัน แสดงว่าเซลล์ที่ได้มีลักษณะเหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ทั้งนี้ได้เพิ่มการเลี้ยงเซลล์มะเร็งห่อน้ำดีอีก 3 ชนิด อาทิ ชนิด KKU-M214, KKU-100, KKU-OCA17 เป็นต้น (รูปที่ 1)

1.2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ห่อน้ำดีปกติ

จากการเลี้ยงเซลล์ห่อน้ำดีปกติชนิด immortalized MMNK1 cells จำนวน 50,000 เซลล์ ด้วย Ham's F12 media (Seromed, Berlin, Germany) ที่ประกอบด้วย penicillin (200 U/mL) and streptomycin (200 µg/mL) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนกระทั่งมี confluent ราว 80% พบว่าเซลล์ MMNK1 ดังกล่าวมีลักษณะเรียวยาวเป็นกระสวยคล้ายกับ fibroblast เมื่อเทียบกับรายงานการศึกษาของ Masanobu Maruyama และคณะ ในปี 2004 (9) พบว่ามีลักษณะเหมือนกัน แสดงว่าเซลล์ที่ได้มีลักษณะเหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ (รูปที่ 1)

2. ผลการการทดสอบ mycoplasma contamination

เมื่อทำการตรวจวัดการปนเปื้อนของ mycoplasma โดยวิธี PCR พบว่าทั้งเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-M213, KKU-M214, KKU-100, KKU-OCA17 และ MMNK1 ให้ผลลบ แสดงว่าไม่พบ mycoplasma contamination และเซลล์ทั้งสองชนิดเป็น mycoplasma free cell lines (รูปที่ 2)

3. ผลการศึกษาแบบแอมฟอสเฟอโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี 2DE

ได้นำตัวอย่างโปรตีนจาก cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยง KKU-M213 และ MMNK1 จำนวน 10 µg มาศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE และวิธี western blotting โดยใช้ rabbit anti-phosphotyrosine polyclonal antibody (ab9319-100, abcam) เมื่อเปรียบเทียบกับแบบแอมฟอสเฟอโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 3) พบความแตกต่างของฟอสโฟโปรตีนที่ตำแหน่งขนาด ~ 43-45 กิโลดาลตันและเมื่อทำการศึกษาด้วยวิธี 2DE และ วิธี western blotting พบฟอสโฟโปรตีนจำนวน 20-30 spots (จากการทดลอง 3 ครั้ง) และยังพบว่าตำแหน่งขนาด ~ 43-45 กิโลดาลตัน เกิด phosphorylation pattern ที่แตกต่างกันระหว่าง

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด K KU-M213 และ MMNK1 ดังรูปที่ 4A และ 4B จากผลการศึกษาดังกล่าวจะได้นำไปศึกษาชนิดของโปรตีนต่อไป อีกทั้งยังต้องพัฒนาวิธี IMAC เพื่อเพิ่มการพบฟอสโฟโปรตีนในการศึกษาต่อไป

การใช้ rabbit anti-phosphotyrosine polyclonal antibody (sc-7020, Santa Cruz) ในการศึกษาครั้งนี้พบแบบแผนฟอสโฟโปรตีนดังกล่าวปรากฏแบบลักษณะคล้ายกับการศึกษาของ Anna Dubrowska และคณะ ในปี 2005 (10) ที่ได้ศึกษาฟอสโฟโปรตีนใน MCF10A human breast epithelial cells แต่เมื่อทำการใช้ IMAC พบว่าสามารถเพิ่มการพบฟอสโฟโปรตีนในการศึกษาดังกล่าว

4. ผลการศึกษาแบบแผนฟอสโฟโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี LC-MS/MS

ได้นำตัวอย่างโปรตีนจาก cell lysate ของเซลล์เพาะเลี้ยง K KU-M213 และ MMNK1 มาแยกกับฟอสโฟโปรตีนด้วยวิธี IMAC (SwellGel[®] Gallium-Chelated Disc.) จากนั้นฟอสโฟโปรตีนจะถูกนำมาย่อยด้วย trypsin ซึ่งจะได้เป็น phosphopeptides และถูกตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS จากนั้นวิเคราะห์ผลโดย DeCyder[™] MS 2.0 differential analysis software พบอย่างน้อย 37 phosphopeptides ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 5, ตารางที่ 1-2).

5. ขั้นตอนการคัดเลือกชนิดของฟอสโฟโปรตีน โดยอาศัยข้อมูลของสารคัดหลั่งมะเร็งท่อน้ำดี

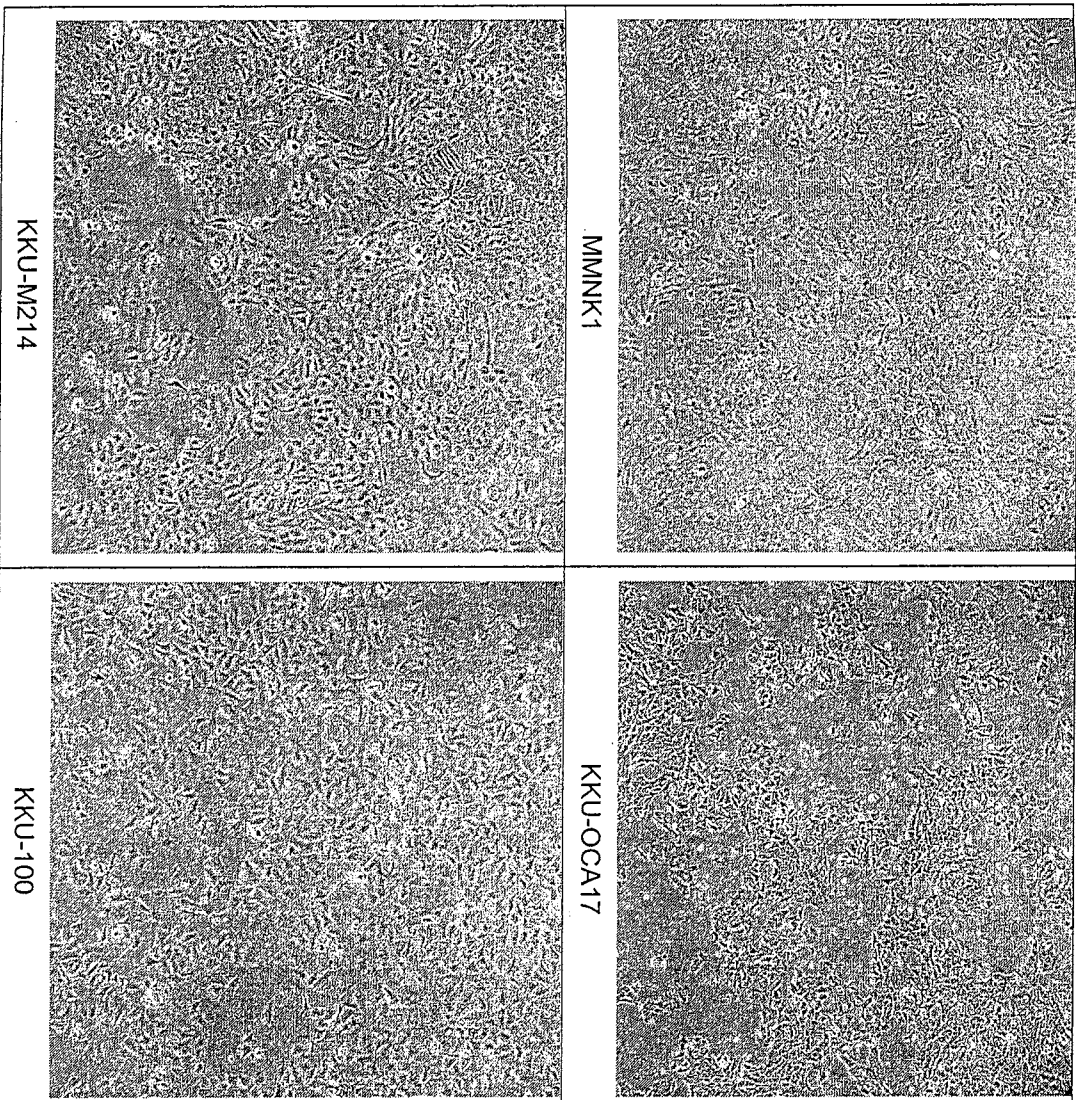
Candidate proteins ที่จำนำมาศึกษาต่อ เบื้องต้นจะถูกพิจารณาการศึกษา secretome study โดยการเตรียม conditioned medium จากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์ปกติ แล้วทำการสร้างแบบแผน Conditioned medium จากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์ปกติ (รูปที่ 6) ผลที่ได้จะนำมาใช้ในการเลือกชนิดของฟอสโฟโปรตีน อย่างไรก็ตามจากรูปที่ 6 แสดงให้เห็นว่า Conditioned medium มีจำนวนโปรตีนมาก จึงต้องมีการแยกชนิดของโปรตีน (protein identification) แล้วนำมาประเมินหาตำแหน่งของกลูทามิโนฟอสโฟโปรตีนที่เหมาะสมต่อไป ทั้งนี้พบแบบโปรตีนขนาด 28, ~ 43-45, 85 กิโลดาลตันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจกรอง peptides ของ conditioned medium จากเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์ปกติ ด้วยวิธี MALDI-TOF แยกความแตกต่างของ mass peaks (รูปที่ 7) ความต่างของ pixel (รูปที่ 8, 9) แต่มีข้อจำกัดในความหลากหลายของโปรตีนตัวอย่าง จึงนำไปสู่การศึกษาด้วยวิธี LC-MS/MS ใน phase ต่อไป

6. ขั้นตอนการคัดเลือกชนิดของฟอสโฟโปรตีน โดยอาศัยข้อมูลของซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์ฟอสโฟโปรตีนในซีรัมด้วยวิธี IMAC พบความแตกต่างของแบบแผนฟอสโฟโปรตีนจากซีรัมทั้ง 2 ชนิด คือในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตำแหน่ง 225, 95, 71, 59 และ 43 กิโลดาลตัน มีความเข้มของแถบฟอสโฟโปรตีนมากกว่าในผู้ที่มีสุขภาพดี ซึ่งพบความแตกต่างกันดังรูปที่ 10 แสดงว่าซีรัมทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกันของแบบแผนฟอสโฟโปรตีน จากนั้นนำแถบที่พบมาคำนวณหาค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เพื่อใช้ในการแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีออกจากผู้ที่มีสุขภาพดี พบแถบของฟอสโฟโปรตีนที่ตำแหน่ง 225, 95, 71, 59 และ 43 กิโลดาลตัน ให้ค่าความไว 41, 33, 50, 33

และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และความจำเพาะ 100, 57, 42, 71 และ 42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับดังรูปที่ 11
ซึ่งแบบแผนที่พบนี้อาจนำมาใช้อ้างอิงในการวินิจฉัยแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้



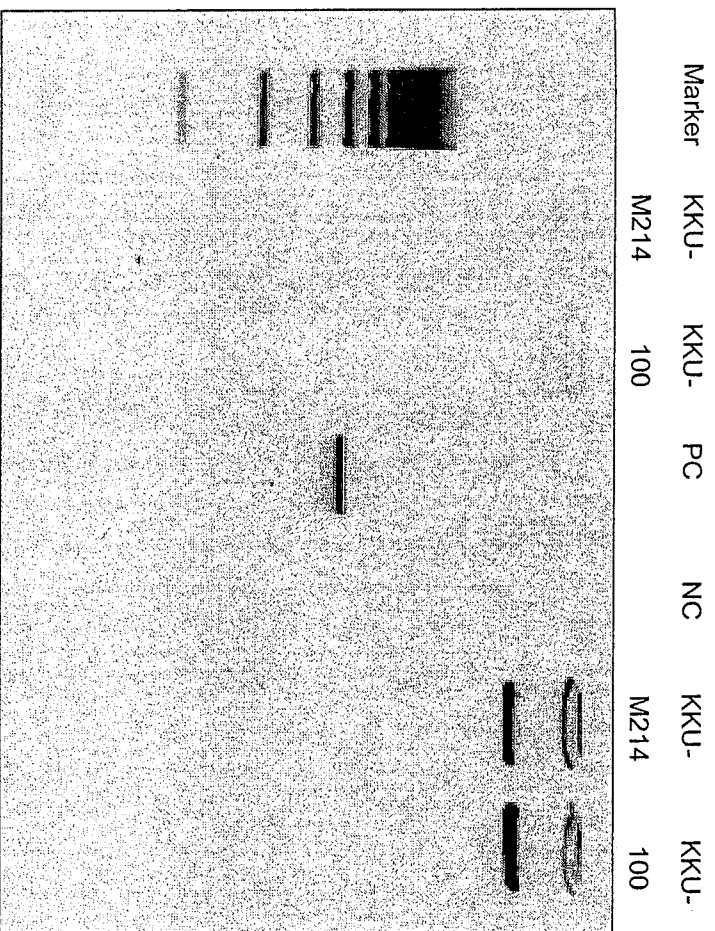
รูปที่ 1 ภาพลักษณะเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MMNK1 (บ่นซ้าย), KKU-M214 (ล่างซ้าย), KKU-100 (ล่างขวา) และ KKU-OCA17 (บนขวา)

MMNK1 Cholangiocyte

KKU-M214 Cholangiocarcinoma : MD to PD : Male/Age52

KKU-100 Cholangiocarcinoma : MD to PD : Female/Age65

KKU-OCA17 Cholangiocarcinoma : WD with papillary and mucin producing:
Male/Age38



รูปที่ 2 ผลการตรวจหา Mycoplasma ของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-M214 และ ชนิด KKU-100

Marker

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-M214 ผล Mycoplasma free

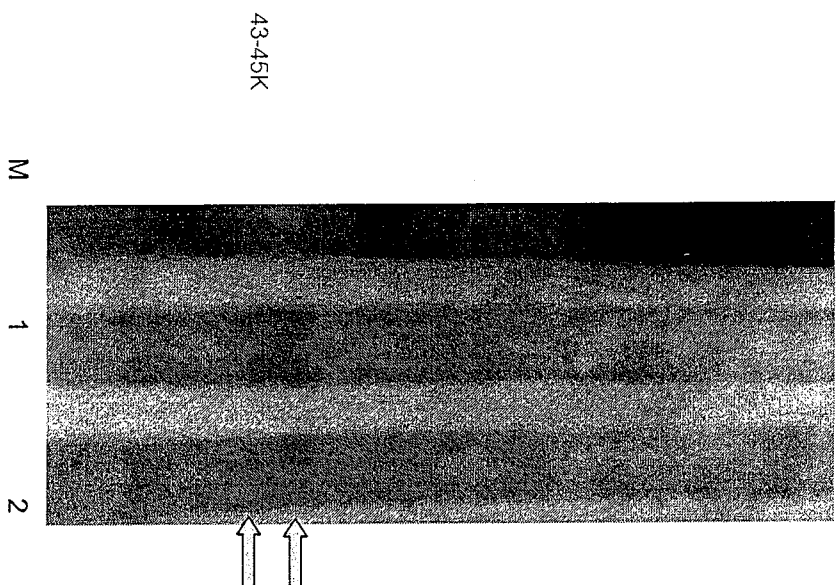
เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-100 ผล Mycoplasma free

PC positive control

NC negative control

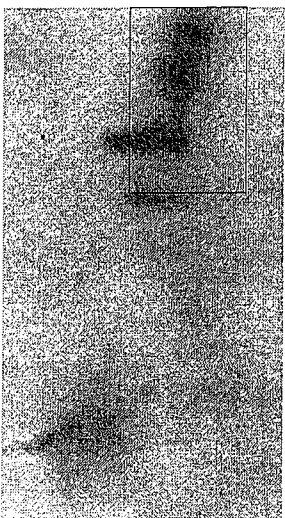
DNA เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-M214

DNA เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-100



รูปที่ 3 แบบแผนฟอสโฟโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-M213 และ MMNK1
(1) แสดงแบบแผนฟอสโฟโปรตีนของ cell lysate จากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-M213 และ (2) MMNK1
ด้วย rabbit anti-phosphotyrosine polyclonal antibody (M) protein standard (ลูกศร) แสดงความแตกต่าง
ของแบบแผนฟอสโฟโปรตีนที่ตำแหน่งขนาด ~ 43-45 กิโลดาลตัน

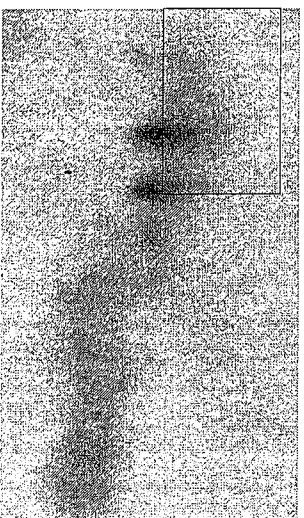
~43-45K



4A

(KKU-M213)

~43-45K

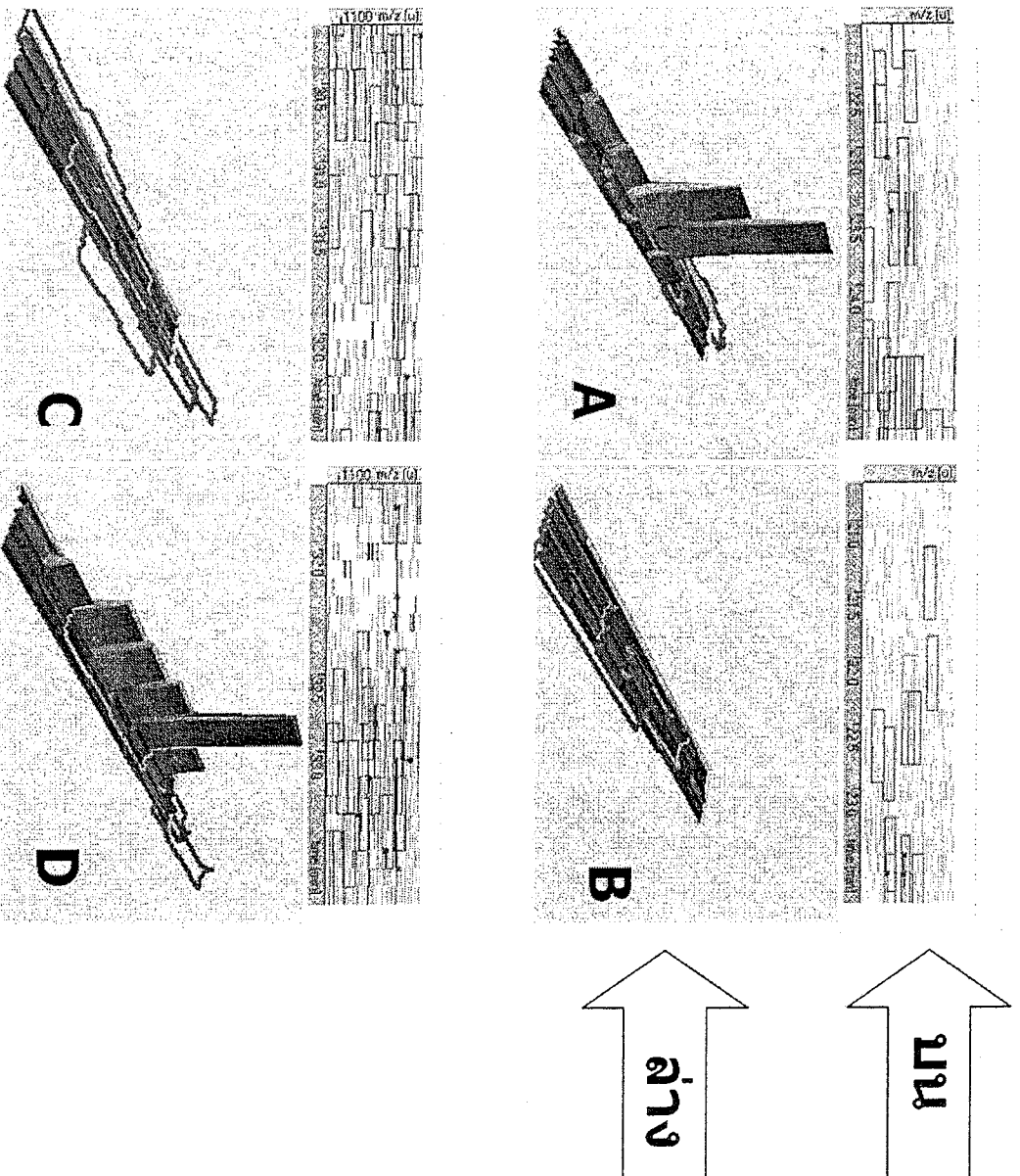


4B

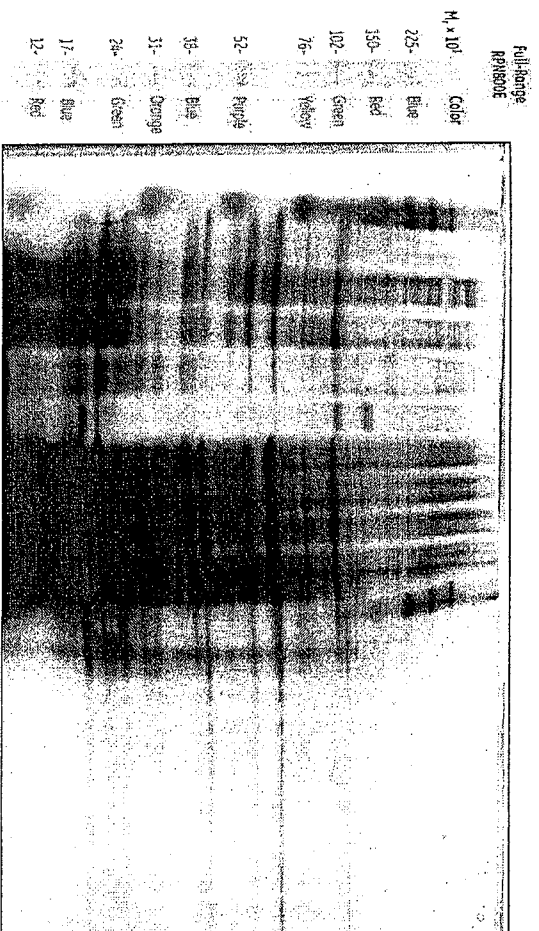
(MMNK1)

รูปที่ 4 แสดงแบบแผน 2 มิติของฟอสโฟโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-M213 และ MMNK1

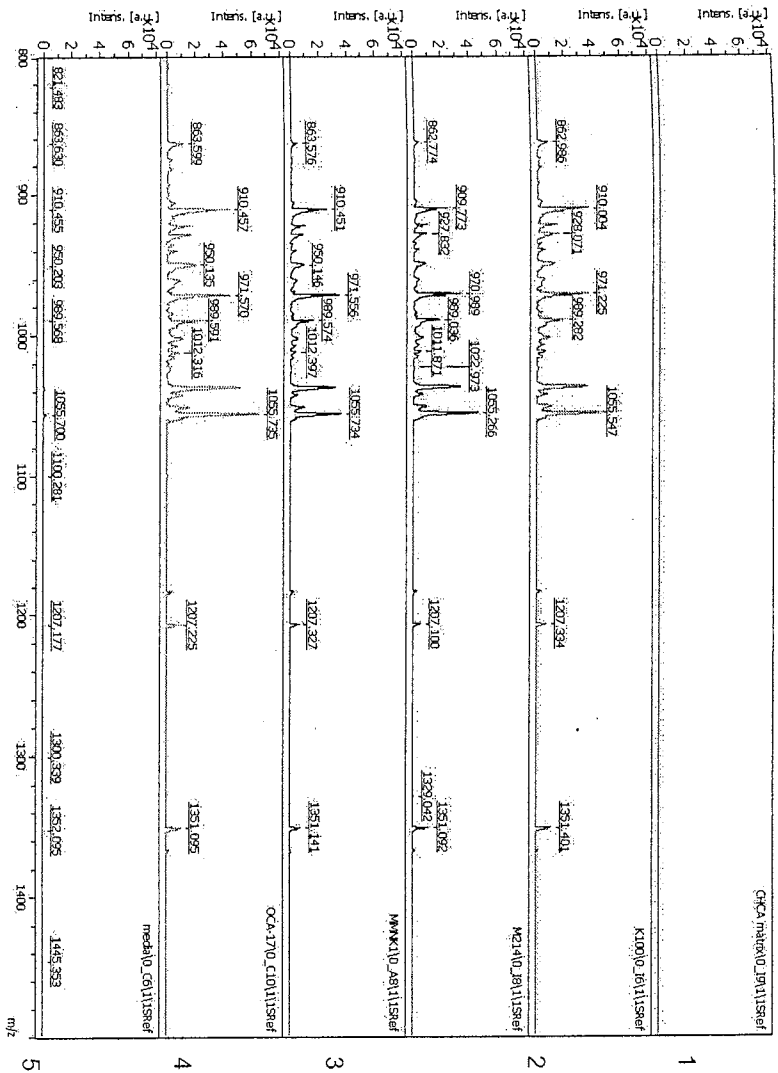
(4A) แสดงแบบแผน 2 มิติของฟอสโฟโปรตีนจาก cell lystae ของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-M213 และ (4B) MMNK1 ด้วย rabbit anti-phosphotyrosine polyclonal antibody (กรอบดำ 4A) แสดง phosphorylation pattern ของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-M213 ที่ตำแหน่งขนาด ~ 43-45 กิโลดาลตัน (กรอบดำ 4B) ไม่ปรากฏ phosphorylation pattern ของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด MMNK1 ที่ตำแหน่งดังกล่าว



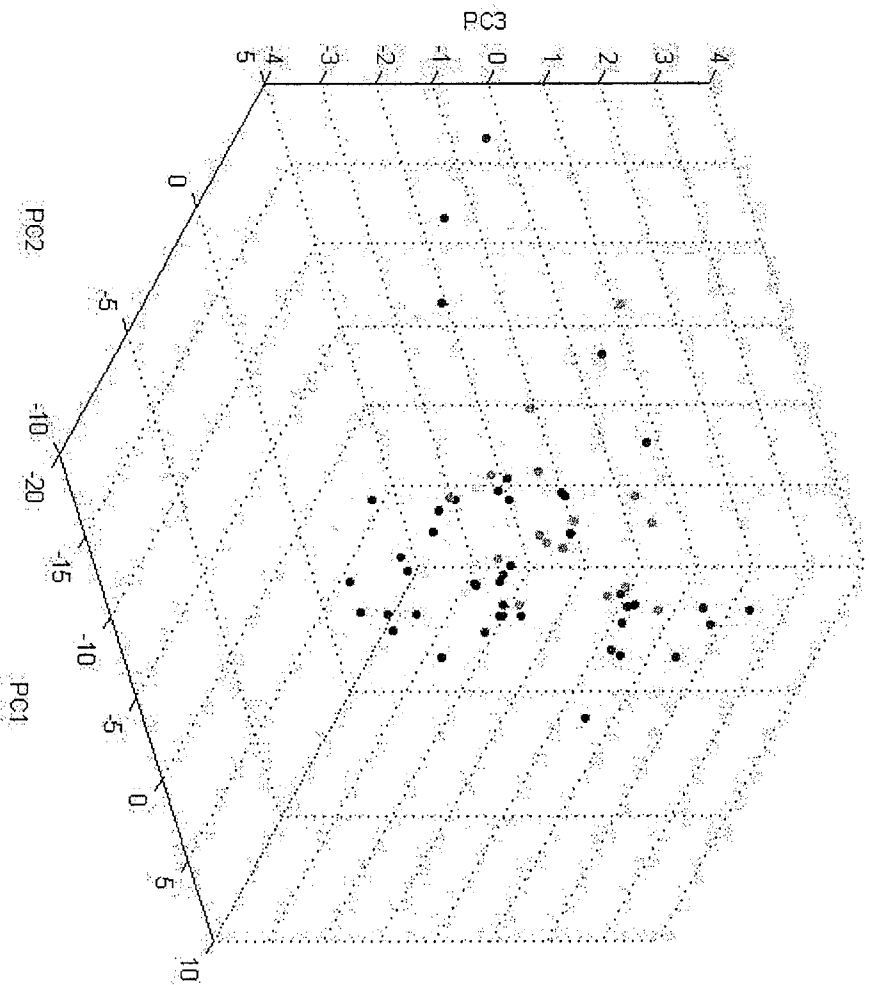
รูปที่ 5 ตัวอย่างการเปรียบเทียบ intensity peaks (ล่าง) ระหว่าง KKU-M213 (B, D) และ MMNK1 (A, C) ที่ mass 1160 (A, B) และ 1112 (C, D) ตามลำดับ จากตารางที่ 1 และ 2D intensity map (บน) แกน x แสดง retention time (min) แกน y แสดง mass/charge



รูปที่ 6 แบบแผนของโปรตีนที่ตัดหลัง (conditioned medium) (1-4) และโปรตีนทั้งหมด (cell lysate) (5-8) ของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด MMNK1, KKU-M214, KKU-100 และ KKU-OCA17 และ protein standard (M) โดยการย้อมด้วย silver stain



รูปที่ 7 ตัวอย่างการเปรียบเทียบ intensity peaks (ล่าง) ระหว่าง MMNK1 กับเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ (panel 2-5), matrix (panel 1), และ medium (panel 6)
 แกน x แสดง mass/charge
 แกน y แสดง intensity

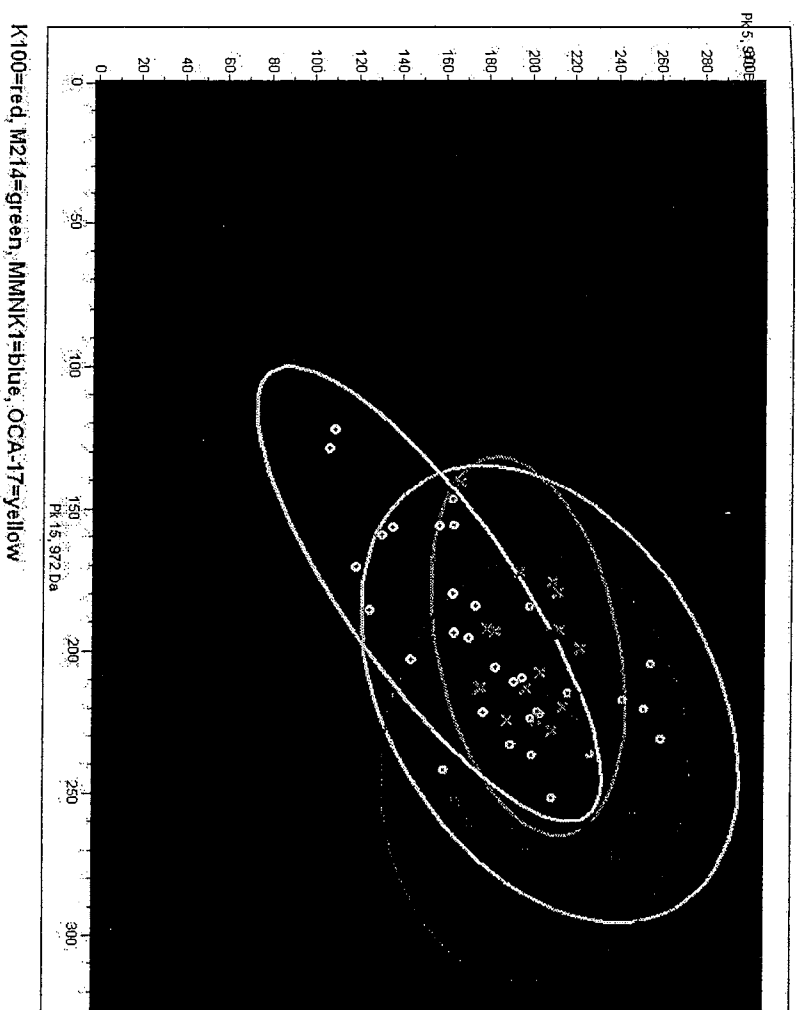


รูปที่ 8 แสดงตัวอย่างการเปรียบเทียบ peptide peaks ระหว่าง MMNK1 กับเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

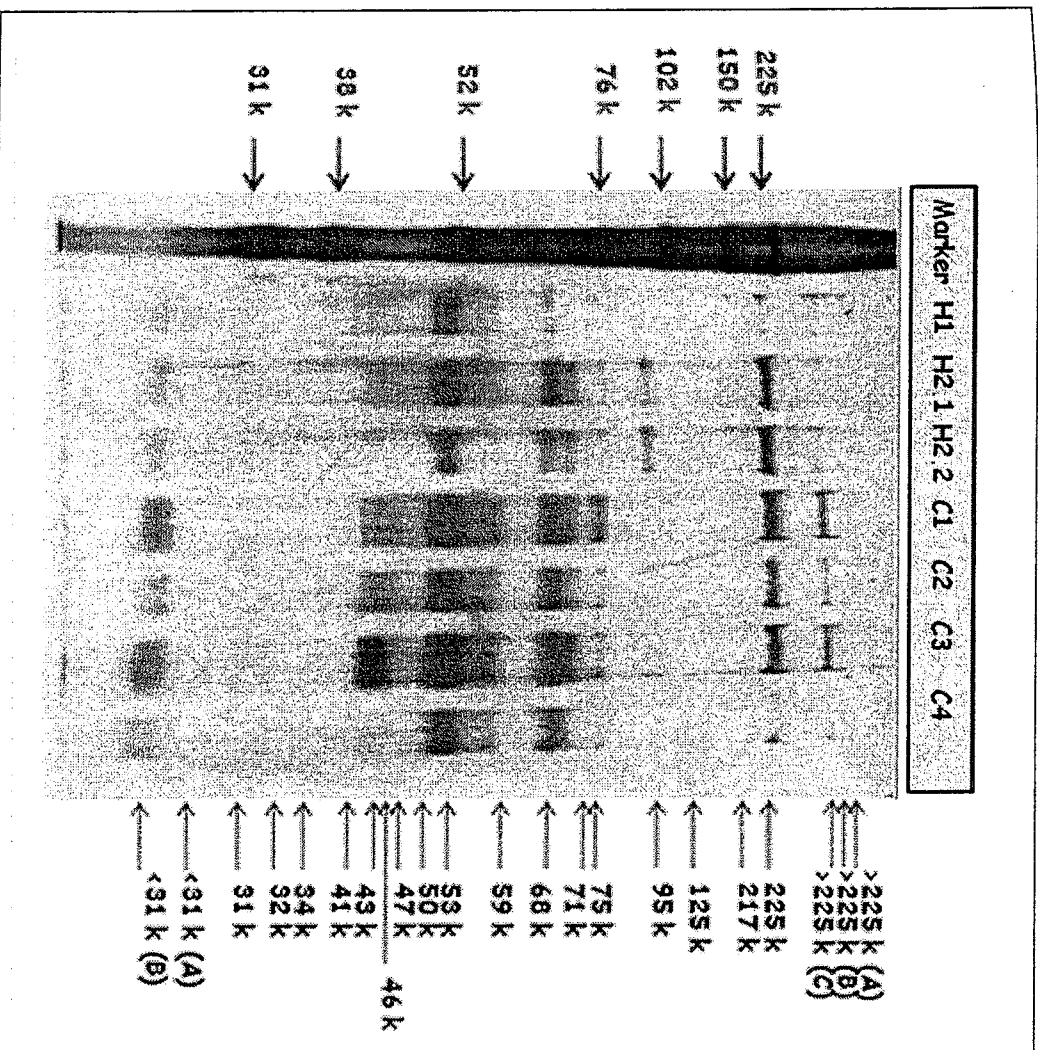
PC1 แสดงแกน x

PC2 แสดงแกน y











PC3 แสดงแกน z



รูปที่ 9 แสดงตัวอย่างการเปรียบเทียบ peptide peaks ระหว่าง MMNK1 กับเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ
แกน x แสดง PK15
แกน y แสดง PK5



รูปที่ 10 แสดงแบบแผนฟอสเฟอไรซ์โปรตีนที่ได้จากการทำ SDS-PAGE แล้วย้อม silver staining ถ่ายภาพด้วยเครื่อง BIORAD GS-710 scanner ของผู้ที่มีสุขภาพดีรายที่ 1 และ 2 (H1 และ H2) และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีรายที่ 1 ถึง 4 (C1-C4) คอลัมน์ด้านซ้ายแสดงแถวของ molecular weight marker และถูกละแสง (duplicate) เมื่อนำ H2 ทั้ง 2 แถว ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม image quant ความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ ไม่มีความแตกต่างกัน ($p = 0.192$) จึงได้นำ H2.1 ไปคำนวณหาความไวและความจำเพาะ

มวลโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	ความไว/ ความจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์)	ผู้ช่วยมะเร็งท่อน้ำดี	ผู้ที่มีสุขภาพดี
225	41/100		
95	33/57		
71	50/42		
59	33/71		
43	75/42		

รูปที่ 11 แสดงแบบแผนจำลองของฟอสโฟโปรตีนด้วยวิธี IMAC ที่พบความแตกต่างในผู้ที่มีผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับผู้ที่มีสุขภาพดี โดยเมื่อแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และย้อมด้วย silver staining

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่าง peptides ที่แตกต่างกัน

Match #	Profiles	Mass (Da)	Time (min)	Time stdev (min)	Av. Diff. (2log)	Av. Ratio (Lin)
934	4	1160.549	22.86312	0.776241	3.584751	11.99824
1064	4	1112.101	32.43415	1.141014	3.82016	0.070797

Match# = Id of the peptide

Profiles = Number of profiles

Mass = Mass of peptide

Time = Elution time (minute)

Time stdev = Elution time standard deviation (minute)Av. Diff. = Average difference.

Calculated as the difference in group means for 2log intensity between population 1 and population 2

Av. Ratio = Average ratio.

Calculated as the difference in group means for linear intensity between population 1 and population 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของฟอสโฟโปรตีนระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด KKU-M213 และ MMNK1

ลำดับ	ตัวอย่างฟอสโฟโปรตีนที่พบ
1	Tubulin
2	Membrane-bound glutamate carboxypeptidase
3	Beta-1, 4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1
4	SPATA20 protein
5	hCG1795804
6	Elongin C
7	Ubiquitin specific peptidase 25
8	N-acylaminoacyl-peptide hydrolase
9	Immunoglobulin light chain
10	Transforming growth factor

บทวิจารณ์

การศึกษาเบื้องต้นของแบบแผนฟอสโฟโปรตีนที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วย LC-MS/MS ได้จากการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี IMAC สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและ immobilized MMNK1 cholangiocyte cells. การตรวจยืนยันด้วย western blotting โดยใช้ anti-phosphotyrosine polyclonal antibody สามารถยืนยันการพบแบบแผนฟอสโฟโปรตีนที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง ในการคัดเลือก candidate phosphoproteins สามารถเลือกกลุ่ม secreted phosphoproteins ได้จากผลการศึกษา secretome study ซึ่งเห็นว่าแบบแผนฟอสโฟโปรตีนที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีนั้น สอดคล้องกับการพบในซีรัม จึงนำมาสู่การสรุปที่ว่า ควรนำผลมีการแยกชนิดของฟอสโฟโปรตีนและการเลือกแบบแผนไปศึกษาต่อด้วยการทำ Multiplex testing โดยอาศัยกลุ่มตัวอย่างซีรัมที่มากขึ้น

การแยกบริสุทธิ์ฟอสโฟโปรตีนด้วยวิธี IMAC นิยมใช้ Fe(III) เป็น metal ion แม้ว่าจะสามารถใช้ Ga(III), Zn(II) และ Al(III) ได้ด้วยก็ตาม ปี 2007 Machida, M. และคณะ (11) พบว่า Ga(III) มีประสิทธิภาพในการการแยกบริสุทธิ์ฟอสโฟโปรตีนที่สุดในภาวะกรด (pH 5.5) และเกลือที่ 0.5M NaCl ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ทั้ง Fe(III), Ga(III) สำหรับการตรวจยืนยันฟอสโฟโปรตีนที่แยกได้ สามารถทำได้ด้วยวิธี western blotting โดยเลือกใช้ antibody ที่จำเพาะ เช่น anti-phosphotyrosine, anti-phosphoserine หรือ anti-phosphothreonine antibody เป็นต้น ในปัจจุบันมีการย้อมฟอสโฟโปรตีนด้วย phosphoprotein staining reagent ที่จำหน่ายหลายบริษัท เช่น Pro-Q Diamond® การย้อมเจลงขนาดเล็ก 10 ตัวอย่าง ต้องใช้ทุนกว่า 30,000 บาท จึงยังไม่นิยมใช้ทั่วไป และประสบการณ์การใช้ย้อมดังกล่าวได้ผลไม่น่าพอใจ กล่าวคือมี reproducibility ต่ำ แต่ในงานวิจัยยังไม่พบการพัฒนาวิธีย้อมเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนั้นยังย้อมตัวอย่างฟอสโฟโปรตีนหลังการชะ (eluted samples) ทำได้โดยการเติม eluted samples ด้วยเอนไซม์ phosphatase ซึ่งทำหน้าที่ในการตัดหมู่ฟอสเฟตออกจากโปรตีนได้ ดังนั้นเมื่อนำไปแยกด้วย SDS-PAGE และย้อมโปรตีน จะเห็นว่าการ shift ของแถบโปรตีนต่ำลงราว 80 ดาลตัน (ขนาดของฟอสเฟตที่ถูกตัดออก)

การย้อมโปรตีนด้วยวิธี Silver staining สามารถย้อมโปรตีนที่มีความเข้มข้นในระดับไมโครกรัมถึงนาโนกรัม แต่ผลการย้อมโปรตีนที่มีปริมาณต่างกันมาก ๆ ในเจลเดียวกัน ความเข้มของสีที่เห็นจะไม่สัมพันธ์กับปริมาณของโปรตีนที่มี โดยเฉพาะแถบโปรตีนที่มีปริมาณมาก ดังนั้นข้อมูลความเข้ม (intensity) อาจเกิดความคลาดเคลื่อน สำหรับการย้อมด้วยสียฟลูออเรสเซนต์ เช่น SYPRO Ruby® ก็มีข้อจำกัดเกี่ยวกับภาคน้ำยาและเครื่องมือพิเศษ เพราะไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

การศึกษาความไวและความจำเพาะของสารบ่งชี้ในมะเร็งท่อน้ำดีพบว่า carcinoembryonic antigen (CEA) และ carbohydrate antigen (CA) 19-9 มีค่าความไว 68 % และ 66 % ส่วนค่าความจำเพาะ 81

% และ 88 % ตามลำดับ แต่ยังมีผู้ป่วยที่มีภาวะอีกเสบหรือพยาธิสภาพของระบบท่อทางเดินน้ำดี ถุงน้ำดีและตับอ่อน ก็สามารถพบ CEA และ CA 19-9 ได้ (12)

แนวทางการหาสารบ่งชี้มะเร็งชนิดต่างๆ ได้มีเพิ่มมากขึ้น โดยในปี 1996 รองศาสตราจารย์ ดร. โสพิศ วงศ์คำ และคณะ พบว่า Soybean agglutinin specific biliary glycoprotein (SBG) เป็นไกลโคโโปรตีนที่ตรวจพบได้ในซีรัม อย่างไรก็ตาม SBG ถูกพบได้ในซีรัมผู้ป่วยที่มีการอักเสบของท่อน้ำดีถึง 84 % จึงอาจพิจารณาการใช้สารบ่งชี้ในการคัดกรองเพื่อหากลุ่มคนที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดี ซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้ (13) ปี 2003 ตรวจพบว่า MUC5AC มีค่าความจำเพาะสูงถึง 97 % และค่าความไว 63 % (3) การตรวจ isoforn ของเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่เรียกว่า biliary alkaline phosphatase ให้ค่าความไวในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มีภาวะเหลืองถึง 85 % และค่าความจำเพาะ 79 % จึงเป็นสารบ่งชี้ที่น่าสนใจในการใช้สนับสนุนการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีเช่นกัน โดยสรุป สารบ่งชี้ที่ใช้สนับสนุนการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในปัจจุบัน ให้ค่าความไวที่ใกล้เคียงกันคือประมาณ 63 - 85 % และความจำเพาะ 79 - 97 % อย่างไรก็ตาม การนำข้อมูลที่ได้ศึกษาแบบแผนในการศึกษานี้มาสนใจ กล่าวคือมีความหลากหลายมากกว่าการศึกษานี้โดยตรง ดังที่ผ่านมา และจะได้นำไปพัฒนาต่อโดยการนำ Multiplex testing เพื่อประยุกต์ใช้ในงานประจำวันต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Lim YP. Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers. *Clin Cancer Res.* 2005 May 1;11(9):3163-9.
2. Shawver LK, Slamon D, Ullrich A. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell.* 2002 Mar;1(2):117-23.
3. Wongkham S, Sheehan JK, Boonla C, Patrakitkomjorn S, Howard M, Kirkham S, et al. Serum MUC5AC mucin as a potential marker for cholangiocarcinoma. *Cancer Lett.* 2003 May 30;195(1):93-9.
4. Boonla C, Wongkham S, Sheehan JK, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Tepsiri N, et al. Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma. *Cancer.* 2003 Oct 1;98(7):1438-43.
5. Bhudhisawasdi V, Muisuk K, Areejitranusorn P, Kularbkaew C, Khamplak T, Saeseow OT, et al. Clinical value of biliary alkaline phosphatase in non-jaundiced cholangiocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004 Feb;130(2):87-92.
6. Yoon JH, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. *Gastroenterology.* 2002 Apr;122(4):985-93.
7. Wu T, Han C, Lunz JG, 3rd, Michalopoulos G, Shelhamer JH, Demetris AJ. Involvement of 85-kd cytosolic phospholipase A(2) and cyclooxygenase-2 in the proliferation of human cholangiocarcinoma cells. *Hepatology.* 2002 Aug;36(2):363-73.
8. Wu T, Leng J, Han C, Demetris AJ. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2004 Mar;3(3):299-307.
9. Maruyama M, Kobayashi N, Westerman KA, Sakaguchi M, Allain JE, Totsugawa T, et al. Establishment of a highly differentiated immortalized human cholangiocyte cell line with SV40T and hTERT. *Transplantation.* 2004 Feb 15;77(3):446-51.
10. Dubrovska A, Soucheinytskyi S. Efficient enrichment of intact phosphorylated proteins by modified immobilized metal-affinity chromatography. *Proteomics.* 2005 Dec;5(18):4678-83.

11. Machida M, Kosako H, Shirakabe K, Kobayashi M, Ushiyama M, Inagawa J, et al. Purification of phosphoproteins by immobilized metal affinity chromatography and its application to phosphoproteome analysis. *Febs J*. 2007 Mar;274(6):1576-87.
12. Qin XL, Wang ZR, Shi JS, Lu M, Wang L, He QR. Utility of serum CA19-9 in diagnosis of cholangiocarcinoma: in comparison with CEA. *World J Gastroenterol*. 2004 Feb 1;10(3):427-32.
13. Luengpailin S, Wongkham S, Wongkham C, Sripa B, Sirirajchingkul S, Chauin S, et al. Demonstration of a biliary-associated glycoprotein in human serum. *Clin Chim Acta*. 1996 Jan 31;244(2):237-40.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติหรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
 - 1.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ อยู่ในระหว่างการพัฒนา Proceeding (ภาคผนวก ก และ ข) เพื่อส่งผลงานตีพิมพ์ โดยในกิตติกรรมประกาศมีนาม สกว.
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
 - 2.1 เป็นส่วนหนึ่งของวิชาภาคินพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำเร็จการศึกษาปีการศึกษา 2552 (ภาคผนวก ข)
 - 2.2 เป็นส่วนหนึ่งของวิชาภาคินพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำเร็จการศึกษาปีการศึกษา 2553 (ภาคผนวก ค)
 - 2.3 เป็นส่วนหนึ่งของวิชาวิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2552 จนถึงปัจจุบัน (ภาคผนวก ก,ข)
 - 2.4 เป็นส่วนหนึ่งของวิชาเทคนิคขั้นสูงทางห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ภาคทฤษฎีและปฏิบัติการ) หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2552 จนถึงปัจจุบัน
3. อื่นๆ

3.1 การนำเสนอผลงานในที่ประชุม

ชื่อผลงาน	ชื่อประชุม	ชื่อผู้วิจัย
1. Differential Profiling of serum phosphorylated proteins in Cholangiocarcinoma (ภาคผนวก ง)	The 2 nd Conference on Biochemistry and Molecular Biology for Region Sustainable Development วันที่ 7 – 8 พฤษภาคม 2552 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	Siriporn Patrakitkomjorn, et al.
2. การเปรียบเทียบแบบแผนฟอสโฟโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยง	การประชุมวิชาการประจำปี คณะแพทยศาสตร์	ศิริพร ภัทรกิจกำจร และคณะ

ข้อ 2.4 <https://sites.google.com/site/siripornpat/>

ไฟล์แนบ : secretome analysis

ซึ่งจะอยู่ด้านล่างของหน้านั้นคะ

<p>มะเร็งท่อน้ำดีกับเซลล์ เพาะเลี้ยงปกติ (ภาคผนวก จ)</p>	<p>มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 25 ประจำปี 2552 วันที่ 13 – 16 ตุลาคม 2552 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น</p>	
<p>3. Phosphoproteome study based Cholangiocarcinoma markers (ภาคผนวก ฉ)</p>	<p>การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 10 วันที่ 14 – 16 ตุลาคม 2553 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท ริเจนท์ บีช ฑะอำ จังหวัด เพชรบุรี</p>	<p>Siriporn Patrakitikomjorn, et al.</p>
<p>4. Cholangiocarcinoma cell secretome: an alternative source for markers discovery? (ภาคผนวก ก และ ข)</p>	<p>International Congress of Liver Flukes Date 7 – 8 March 2011 At Pullman Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand</p>	<p>Montira Janan, et al. Siriporn Patrakitikomjorn (Corresponding author)</p>

Cholangiocarcinoma cell secretome: an alternative source for markers discovery?

Montira Janan¹, Sittiruk Roytrakul², Temduang Limpai boon^{1,3}, Sopit Wongkham³, Chaisiri Wongkham³, Siriporn Patrakitkomjorn^{1,3}

¹Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen

²Genome Institute, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), the National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathumthani

³Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) is bile ducts malignant tumor that associated with *Opisthorchis viverrini* infection. This disease is often detected in late stages and high mortality rate. However, the potential biomarkers for CCA are still lacking. Thus, there is an urgent need to find diagnostic biomarkers for detection in early stage. The cancer secretome, proteins secreted from cancer cells has emerged as an attractive subproteome for cancer biomarker discovery in some cancers. The purpose of this study was to investigate the secretome patterns of CCA cell lines (KKU-OCA17, KKU-M213, KKU-M214, and KKU-100) and immortalized cholangiocyte cell line (MMNK1). The secretomes of five cell lines were examined by SDS-PAGE and MALDI-TOF MS. ImageQuant software was used for those secreted protein patterns separated by SDS-PAGE and their intensity were analyzed. At least thirty bands were detected on CCA cell line in each. Some common proteins were found and some were different. Interestingly, 44 and 21 kDa proteins were found only in MMNK1, 42 kDa and 28 kDa proteins were found only in KKU-OCA17 and KKU-100, respectively. Moreover, 85 kDa protein in KKU-OCA17 was three fold higher than other samples. We found a limitation of MALDI-TOF MS analysis for intact proteins was insufficient to distinguish these secretome samples due to high-complexity proteins. In conclusion, CCA secretome patterns can be determined by SDS-PAGE. However, the candidate biomarkers in the differentially expressed protein bands remained to be identified.

Keywords: Secretome, Proteomics, Biomarker, Cholangiocarcinoma

INTRODUCTION

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignant tumor of the biliary epithelium associated with a high metastatic and mortality rate [1]. The disease is notoriously difficult to diagnose and is usually fatal because of its late clinical presentation. It remains an important public health problem due to lacking of potential biomarkers for early diagnosis [2, 3]. Therefore, it is a pressing need to find novel biomarkers that utilize for detection in early stage or can be detected in asymptomatic patients.

The cancer secretome, all proteins released by cancer cells, has been attracting wide attention. These proteins play an important role in many essential physiological and pathophysiological processes [4], emerged to be a promising and reliable source of cancer biomarkers. Several studies on cancer secretome have successfully identified a rich set of potential biomarkers for cancer detection in various cancers [5-7].

Proteomic approaches are the mainstay of cancer secretome analysis and biomarker discovery. Several technologies have been applied in secretome researches including gel-free MS and gel-based MS strategies [7]. GelC-MS/MS proteomics approach is widely used in secretome study by using SDS-PAGE as first-dimensional separation of complex secreted protein mixtures before subsequent LC-MS/MS analysis [8]. Moreover, MALDI-TOF MS was applied in many studies to measure mixtures of complex samples directly [9]. This alternative approaches becomes possible to easily and rapidly analyze secretome samples.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and Cell cultivation

Four CCA cell lines including KKU-OCA17, KKU-M213, KKU-M214, and KKU-100 were kindly provided by Associate Professor Dr. Banchoh Stripa, Liver Flukes and Cholangiocarcinoma Research Center (LFCRC), Faculty of Medicine, Khon Kaen University. An immortalized cholangiocyte cell line, MMNK1 [10] cell lines were grown in Ham's F-12 culture medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. All cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere, 95% air, 5% CO₂.

Secretome samples preparation

Culture media from each cell lines were collected and processed. Briefly, cancer cells were grown about 60-70% confluence then remove contaminated fetal bovine serum by washing twice with 1xPBS and twice with serum-free medium. After that, cells were incubated in serum-free medium for 24 hours [11] and the culture media containing secreted proteins were harvested and centrifuged to remove suspended cells. The samples were concentrated and desalted by centrifugation in Amicon Ultra-15 tubes (modified [12]). The protein concentration of secretome samples were determined by Lowry method [13].

SDS-PAGE analysis

Fifty microgram of protein samples were separated on 12.5% SDS-PAGE (ATTO AE-6530 system). The samples were run at 70 volts for 5 hours, room temperature. After electrophoresis, gel was fixed in fixing solution (50% MeOH, 12% HAc, 0.05% of 37% Formaldehyde) for 30 min, then twice washed in washing solution (35% EtOH) for 5 min each and further sensitized by 0.02% Na₂S₂O₃ for 2 min. After that, twice washed in Milli Q water for 5 min each and stained with silver nitrate solution (0.2% AgNO₃) for 20 min, twice washed in Milli Q water for 1 min before color developed with developing solution (6% Na₂CO₃, 0.05% of 37% Formaldehyde, 0.0004% Na₂S₂O₃) until the desired protein bands was attained. Finally, the staining was stopped by 20 min incubation in 1.5% EDTA solution.

The scanned gel file was imported to ImageQuant software. All bands and their intensity were detected, background was subtracted, calculate molecular weight from Log curve of MW standard lane.

MALDI-TOF MS analysis

The protein samples were prepared to a final concentration of 0.4 µg/µl and mixed with equal volume of matrix solutions (10 mg/ml sinnapinic acid in 50% acetonitrile containing 0.1% Trifluoroacetic acid). Then, 1 µl of each samples were spotted onto a MALDI plate and dried at room temperature for 15 minutes before analyzed by MALDI-TOF MS (Bruker). All data were analyzed by ProClintool software for multivariate analysis.

RESULTS

All secretome samples of MMNK1, KKU-OCA17, KKU-M213, KKU-M214 and KKU-100 were separated by 12.5% SDS-PAGE and visualized by silver-staining as shown in **figure 1**. The secretome patterns are different among cell lines. Furthermore, the results from ImageQuant software showed that two protein bands (44 and 21 kDa) were found only in MMNK1, a unique band at 42 kDa in KKU-OCA17 and a 28 kDa band in KKU-100. Moreover, the intensity of a protein band with molecular mass of 85 kDa in KKU-OCA17 was higher than other samples (> 3-fold). In parallel study, secretome of these five samples were investigated by using MALDI-TOF MS, the results from ProClintool software analysis was shown in **figure 2**, in a preliminary data of cell lines secretome was limited due to the discrimination power was low.

CONCLUSION AND DISCUSSION

Appropriated technique for secretome samples preparation was shown in this preliminary study, with high yield secreted proteins that may use for CCA proteomics analysis. The MALDI-TOF MS analysis of intact proteins is rarely sufficient to distinguish these samples because of complexity proteins need separation step before analyze. The secretome of CCA cell lines was successfully analyzed by SDS-PAGE analysis. The unique pattern of secretome from various CCA cell lines was observed. Accordingly, these secreted proteins were a promising source of biomarkers that needed to be identified and confirmed in clinical samples to get potential biomarkers.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Janthima Jaresithikunchai and Narumon Phaonakrop for technical support at Genome Institute, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), the National Science and Technology Development Agency (NSTDA). This project was supported by The Thailand Research Fund, Khon Kaen University research grant, Graduate School of Khon Kaen University, Faculty of Associated Medical Sciences of Khon Kaen University.

REFERENCES

1. Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. **Hepatology** **2001**; 33:1353-7.
2. Blechacz B, Gores GJ. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Hepatology** **2008**; 48:308-21.
3. Mosconi S, Beretta GD, Labianca R, Zampino MG, Gatta G, Heinemann V. Cholangiocarcinoma. **Crit Rev Oncol Hematol** **2009**; 69:259-70.
4. Xue H, Lu B, Zhang J, Wu M, Huang Q, Wu Q, et al. Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. **J Proteome Res** **2010**; 9:545-55.
5. Makridakis M, Vlahou A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. **J Proteomics** **2010**; 73:2291-305.
6. Pavlou MP, Diamandis EP. The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? **J Proteomics** **2010**; 73:1896-906.
7. Xue H, Lu B, Lai M. The cancer secretome: a reservoir of biomarkers. **J Transl Med** **2008**; 6:52.
8. Piersma SR, Fiedler U, Span S, Lingnau A, Pham TV, Hoffmann S, et al. Workflow comparison for label-free, quantitative secretome proteomics for cancer biomarker discovery: method evaluation, differential analysis, and verification in serum. **J Proteome Res** **2010**; 9:1913-22.
9. Bornsen KO. Influence of salts, buffers, detergents, solvents, and matrices on MALDI-MS protein analysis in complex mixtures. **Methods Mol Biol** **2000**; 146:387-404.
10. Maruyama M, Kobayashi N, Westerman KA, Sakaguchi M, Allain JE, Totsugawa T, et al. Establishment of a highly differentiated immortalized human cholangiocyte cell line with SV40T and hTERT. **Transplantation** **2004**; 77:446-51.
11. Mbeunkui F, Fodstad O, Pannell LK. Secretory protein enrichment and analysis: an optimized approach applied on cancer cell lines using 2D LC-MS/MS. **J Proteome Res** **2006**; 5:899-906.
12. Wu CC, Hsu CW, Chen CD, Yu CJ, Chang KP, Tai DI, et al. Candidate serological biomarkers for cancer identified from the secretomes of 23 cancer cell lines and the human protein atlas. **Mol Cell Proteomics** **2010**; 9:1100-17.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** **1951**; 193:265-75.

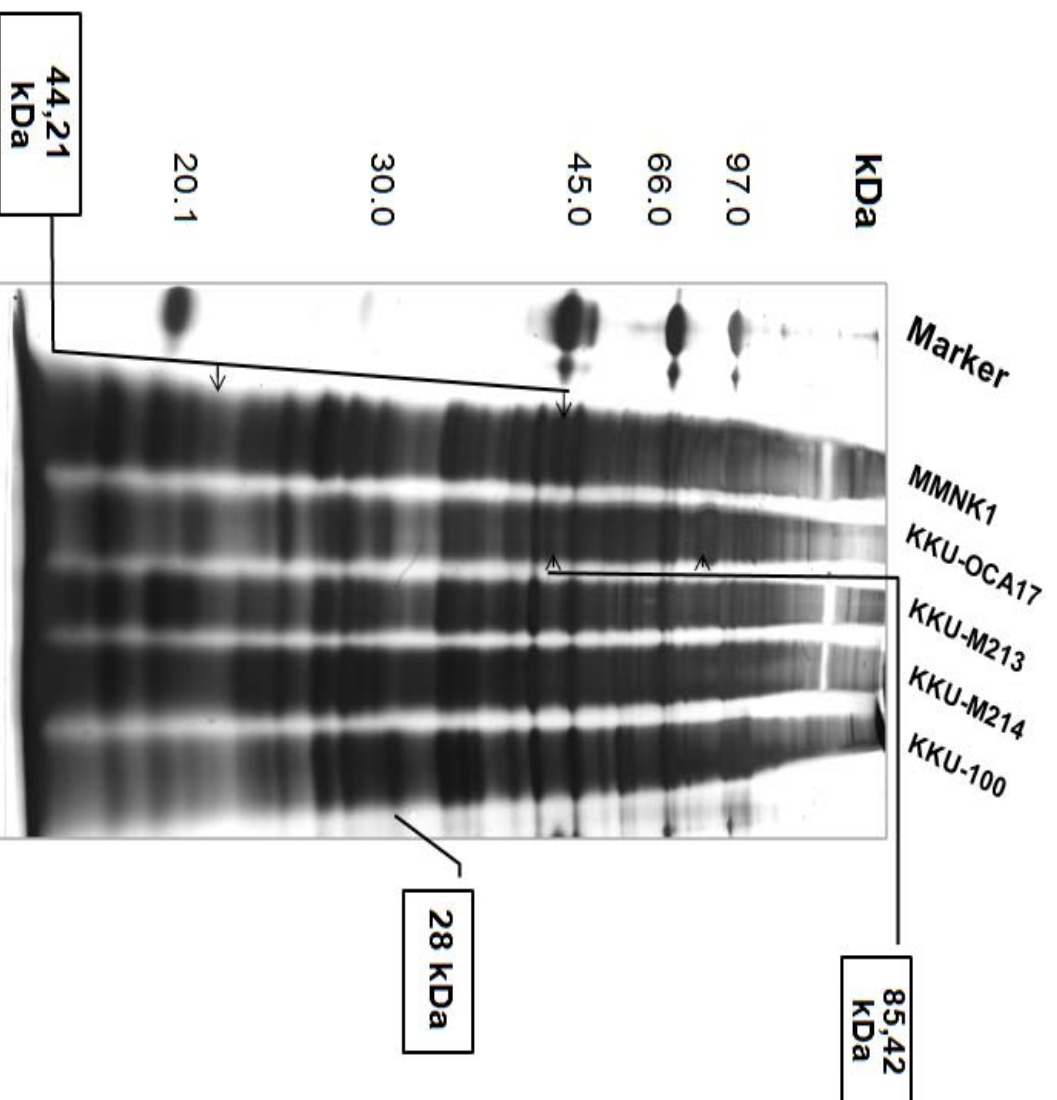
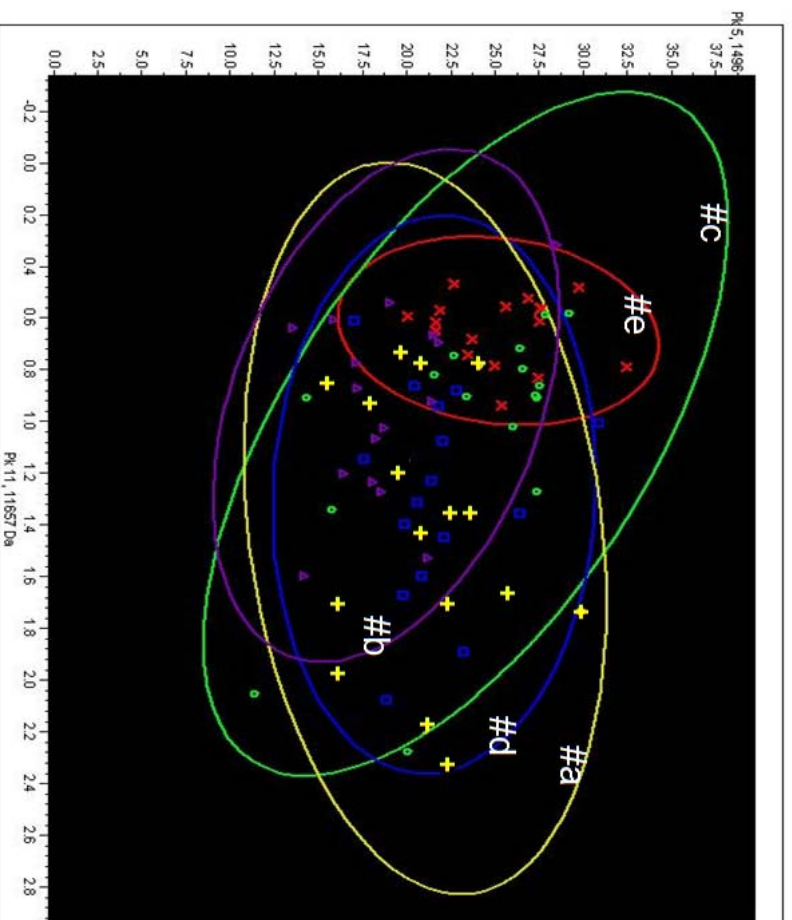


Figure 1 Comparative SDS-PAGE pattern of cell lines secretome. The fifty microgram of proteins from MMNK1, KKU-OCA17, KKU-M213, KKU-M214 and KKU-100 samples were loaded onto 12.5% SDS-PAGE and protein patterns were visualized by silver staining. The molecular markers are shown in kDa on the left, and arrows indicate the positions of the specific proteins differentiated.



- Representative symbols**
- + MMNK1 (#a)
 - Δ KKU-OCA17 (#b)
 - KKU-M213 (#c)
 - KKU-M214 (#d)
 - x KKU-100 (#e)

Figure 2 An overall secretome patterns calculated by ProClintool software. Circles indicate the area distribution of MMNK1, KKU-OCA17, KKU-M213, KKU-M214 and KKU-100 protein masses that indicated by #a, #b, #c, #d and #e, respectively.

PROTEOMIC IN CLINICAL RESEARCH

Lab: Cancer secretome analysis

451741 Advanced Techniques in Medical
Science Laboratory



The Centre for Research and Development of Medical
Diagnostic Laboratories (CMDL); Cancer Research

Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

Objectives

🧩 Explain basic knowledge of secretome analysis and apply these technique in other clinical research

Outlines

Definition and consideration of cancer secretome

Cancer secretome methodology

1. Cancer cell lines culture
2. Collection and preparation of cancer secretome samples
3. Proteomic analysis
 - Protein pre-separation by SDS-PAGE gel
 - Trypic in gel digestion
 - Protein identification by Mass spectrometer
 - Protein validation

Definition and consideration

Cancer secretome : all proteins released by cancer cells

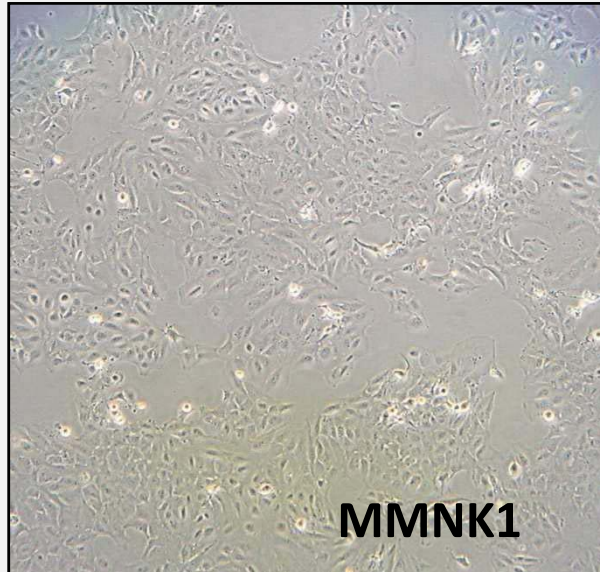
■ These proteins play an important role in many essential physiological and pathophysiological processes such as cell growth and differentiation, invasion, and metastasis

■ These cancer secreted proteins or their fragments always enter into circulation, plausible to measurable in the body fluids samples

Cancer secretome emerged to be a promising and reliable source of cancer biomarkers

Cancer secretome methodology

Cancer cell lines culture

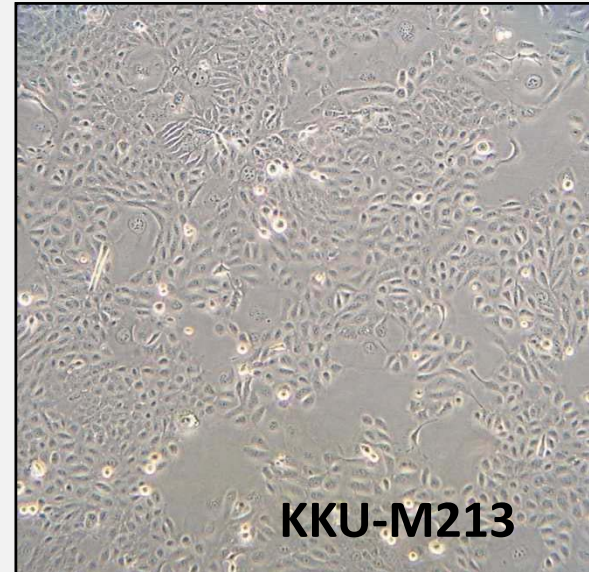


MMNK1

Normal control

: Immortalized cholangiocyte cell line

Vs



KKU-M213

Cancer

: Cholangiocarcinoma cell line

Cancer cell lines culture

Culture medium

1x Trypsin-EDTA

Steriled pipette

1x PBS

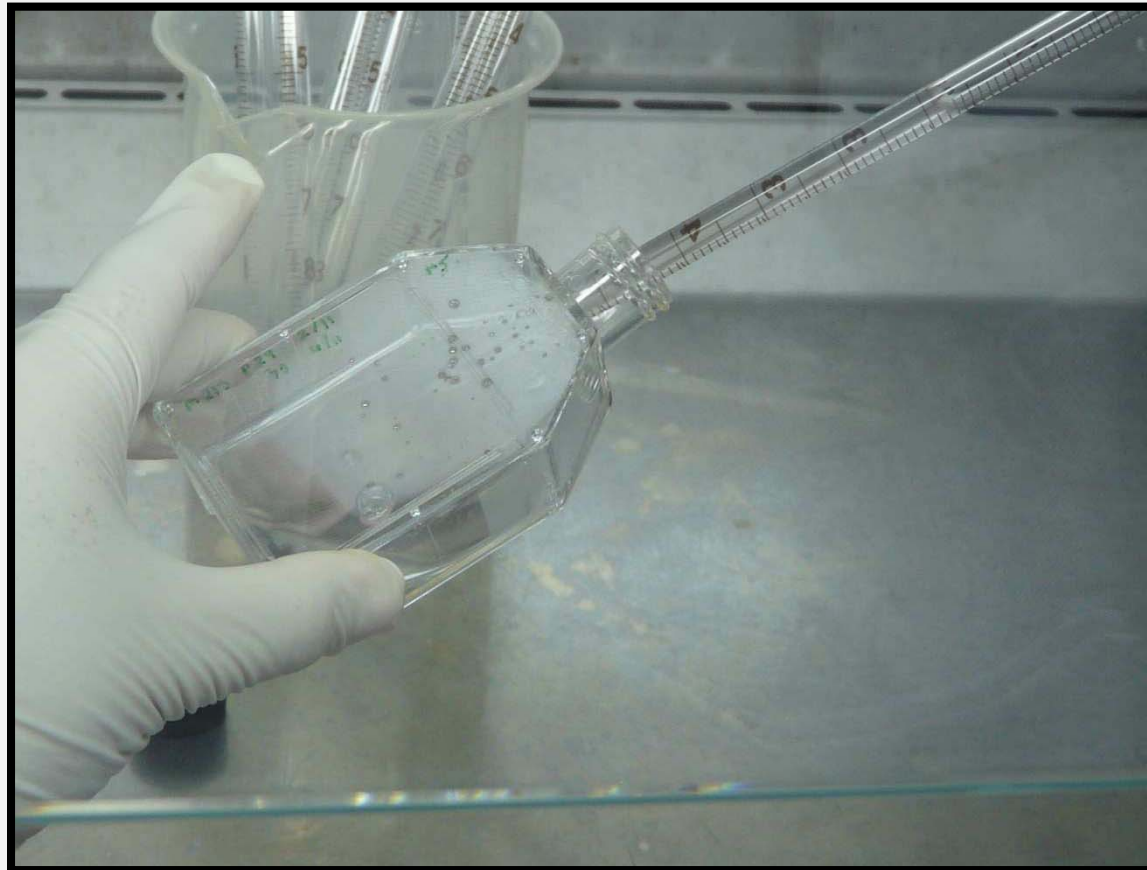


15 CM cell culture dish

Cancer cell lines culture

Step 1

- Wash cell with 1xPBS
- Trypsinize adherent cell with 1xTrypsin-EDTA



Cancer cell lines culture

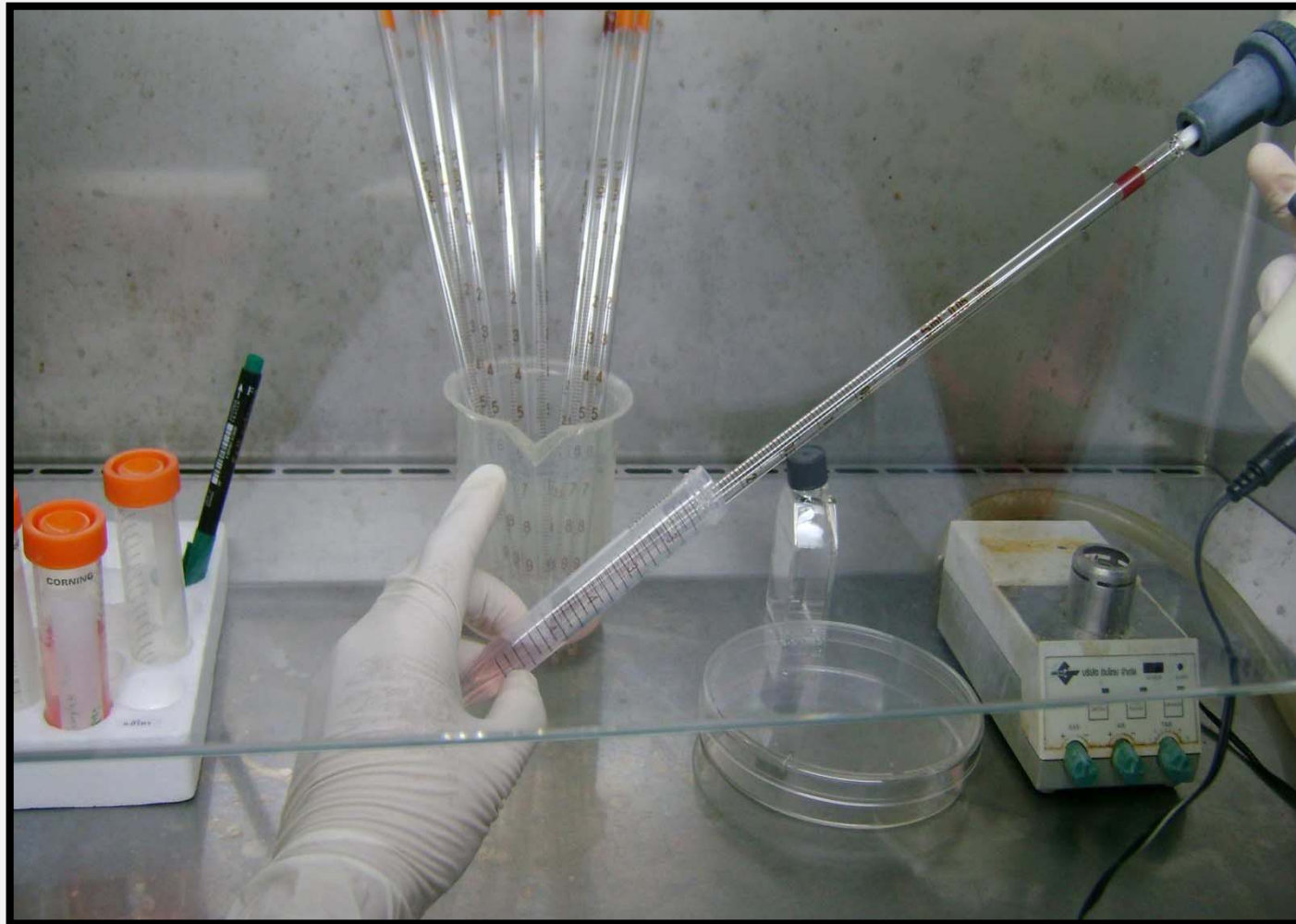
Step 2 • Centrifuge re-suspend cell at 1,800 rpm for 2 min



Cancer cell lines culture

Step 3

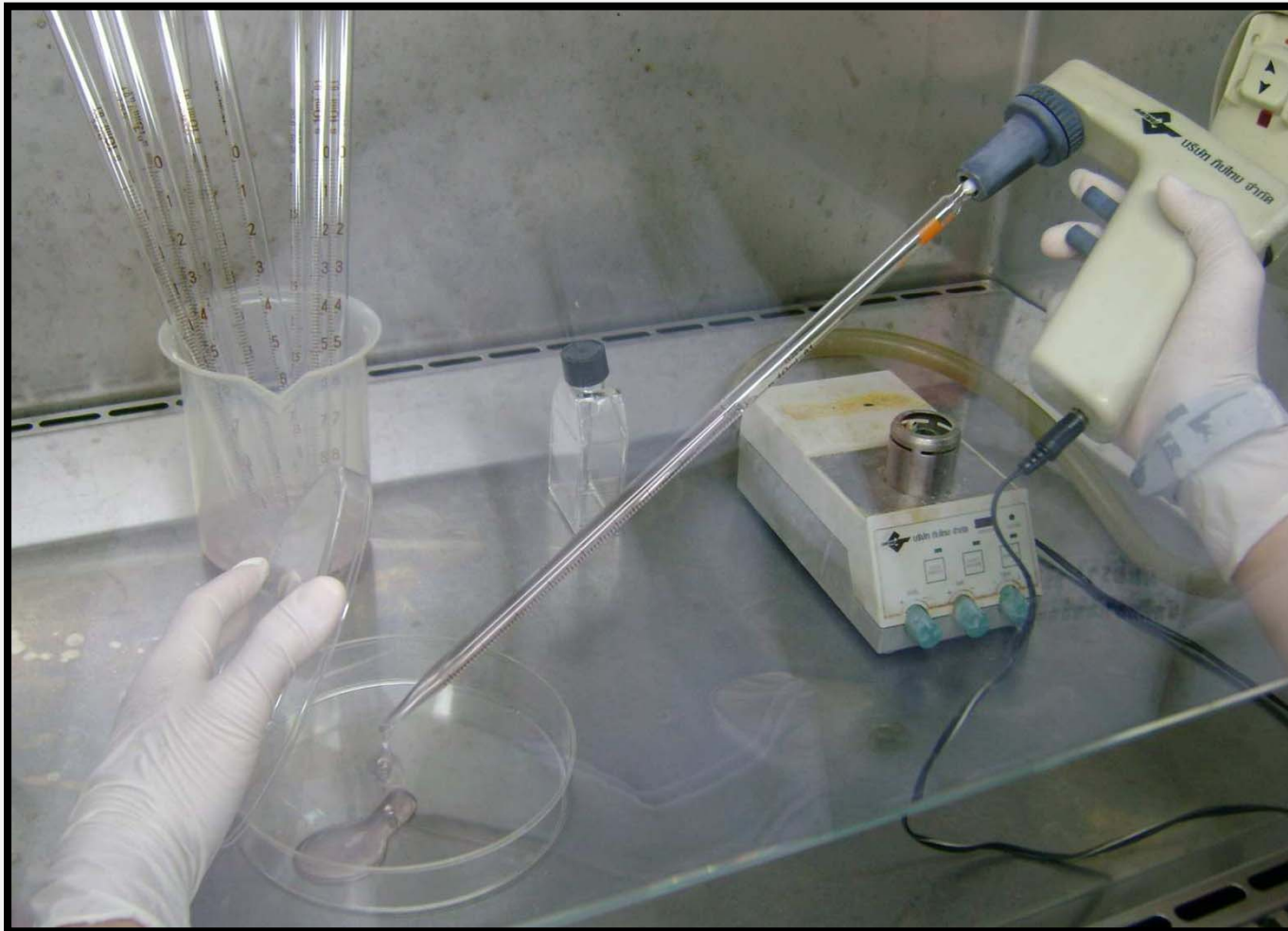
- Remove supernatant
- Re-suspend cell in culture medium



Cancer cell lines culture

Step 4

- Seed re-suspended cell onto 15 CM culture dish
- Add culture medium ~ 20 ml



Cancer cell lines culture

Step 5

- Incubate in CO₂ incubator ~ 2 days
(Cells were grown 60-70% confluence)



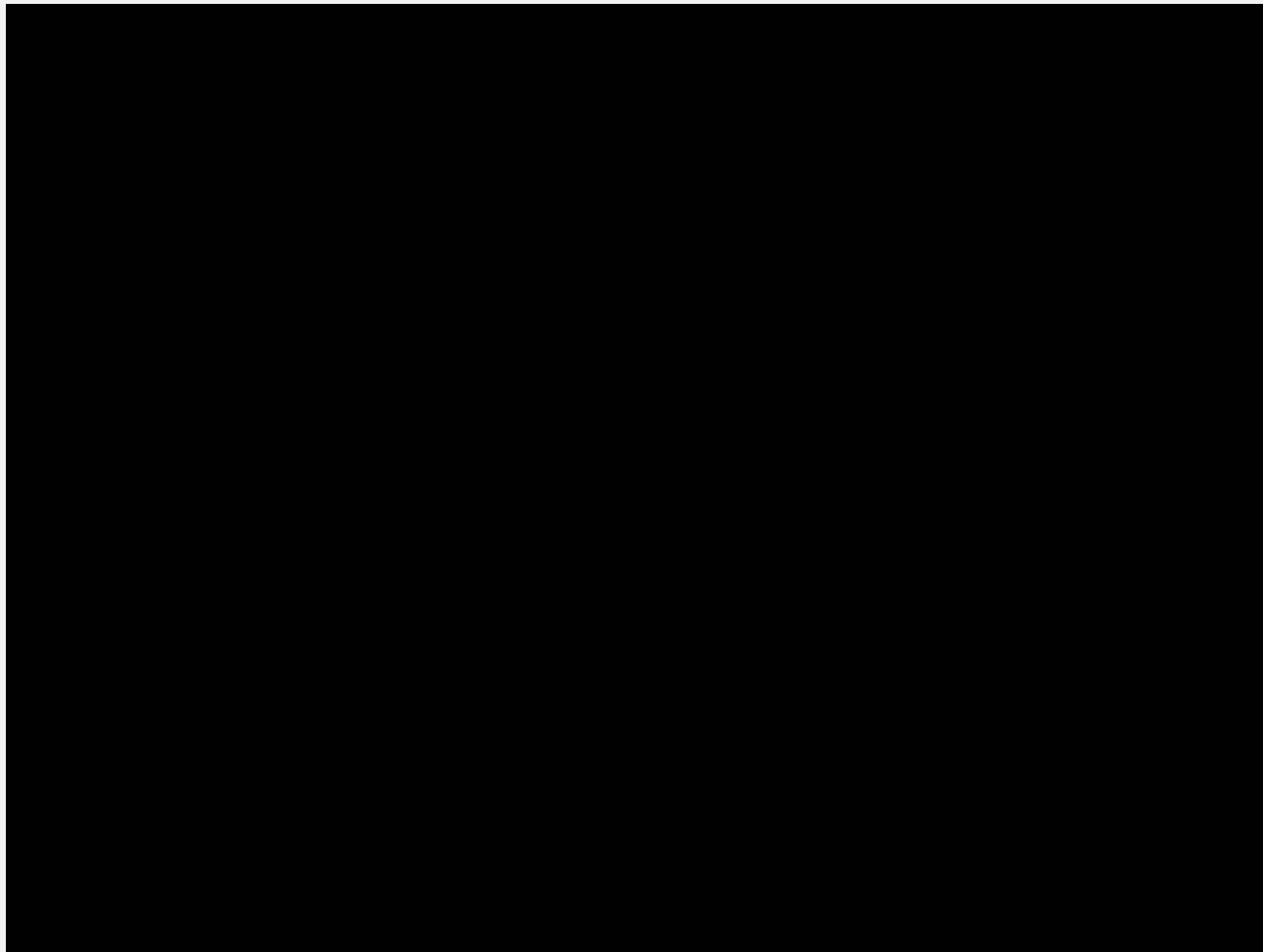
Incubator Condition

- ✓ 5% CO₂
- ✓ 95% air
- ✓ 37°C in a humidified atmosphere

Cancer cell lines culture

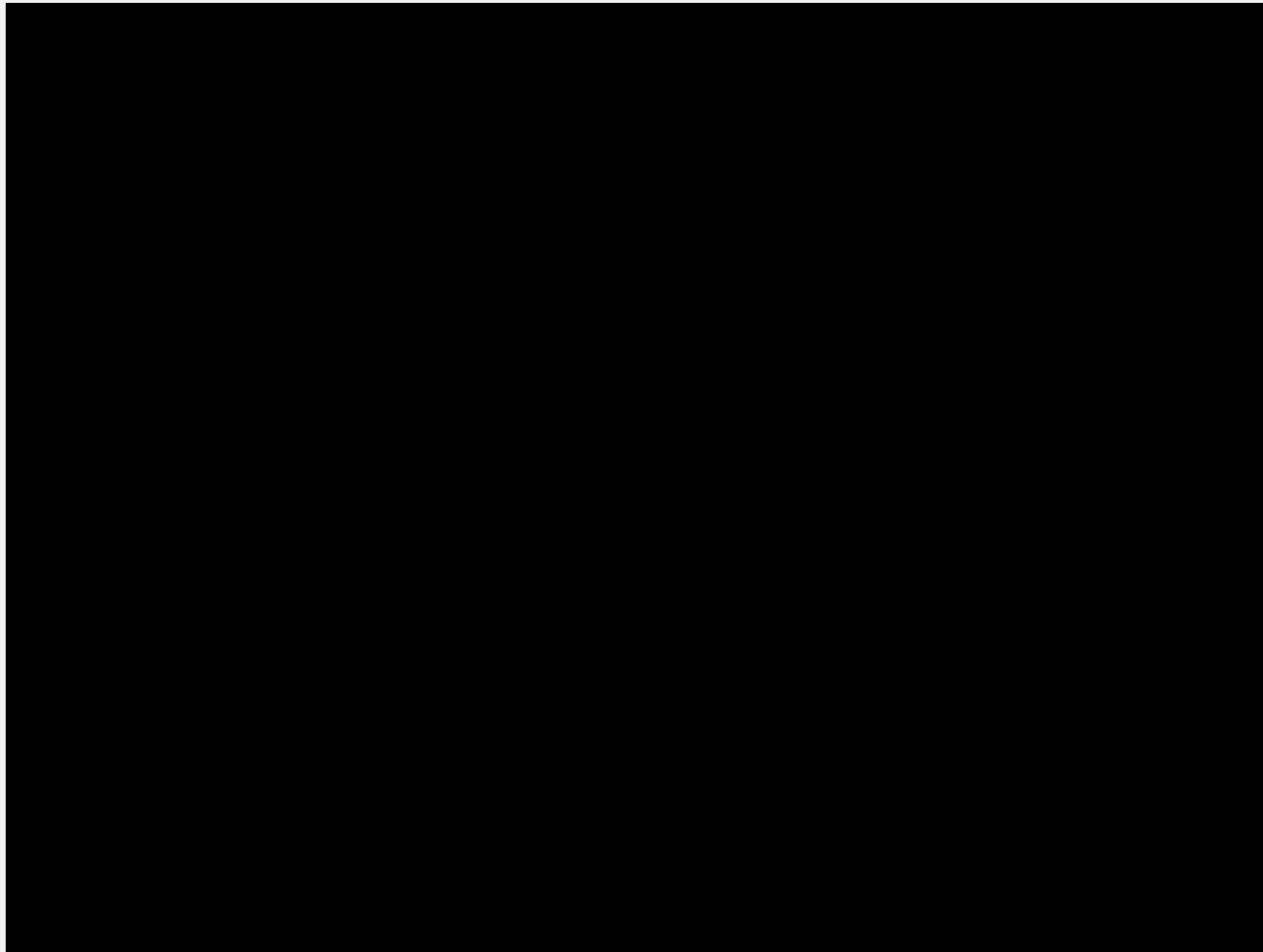
Step 6

- When cells were grown 60-70% confluence
- Remove culture complete medium



Cancer cell lines culture

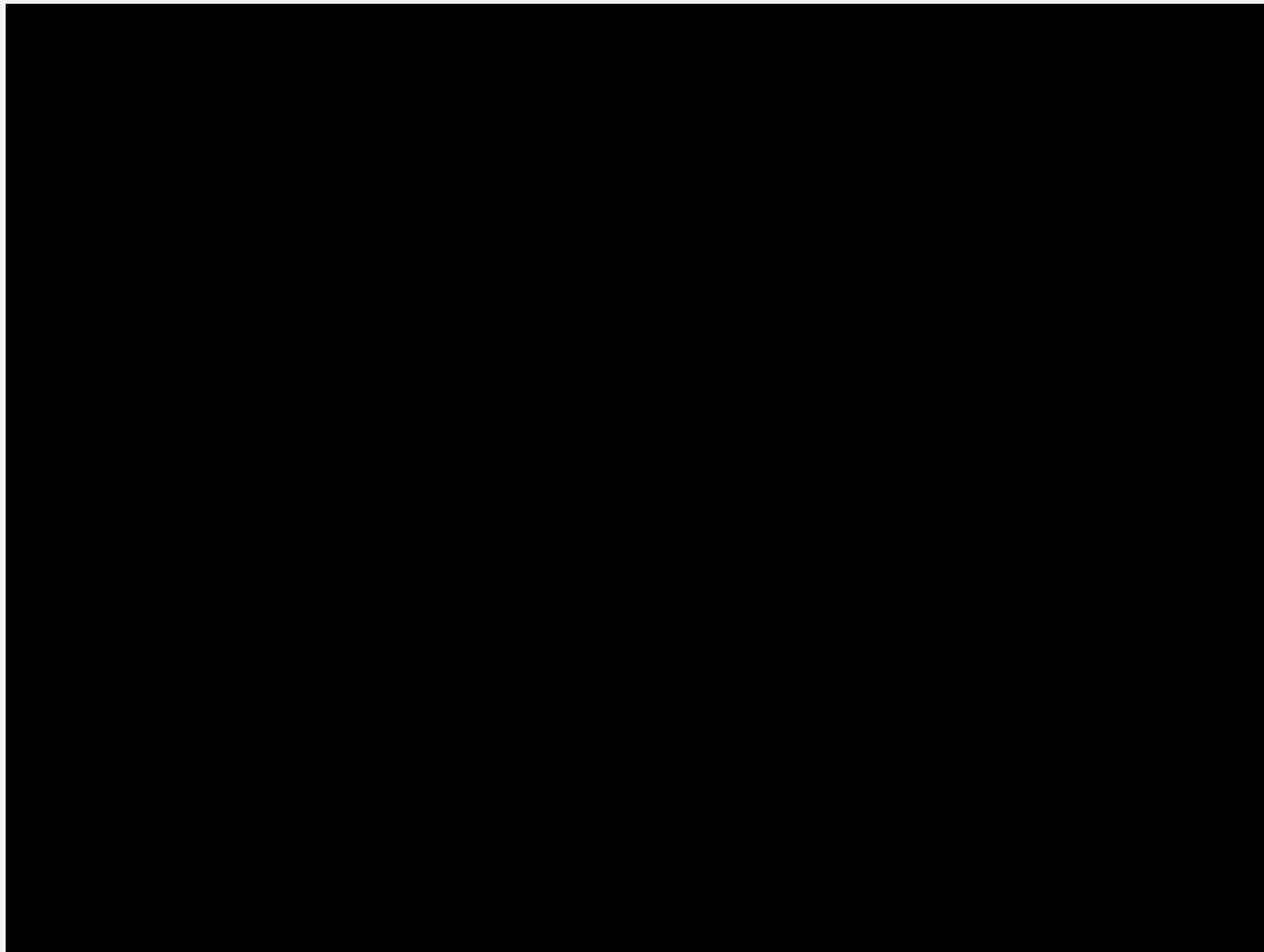
Step 7 • Wash cell with 20 ml of 1xPBS (2 times)



Cancer cell lines culture

Step 8

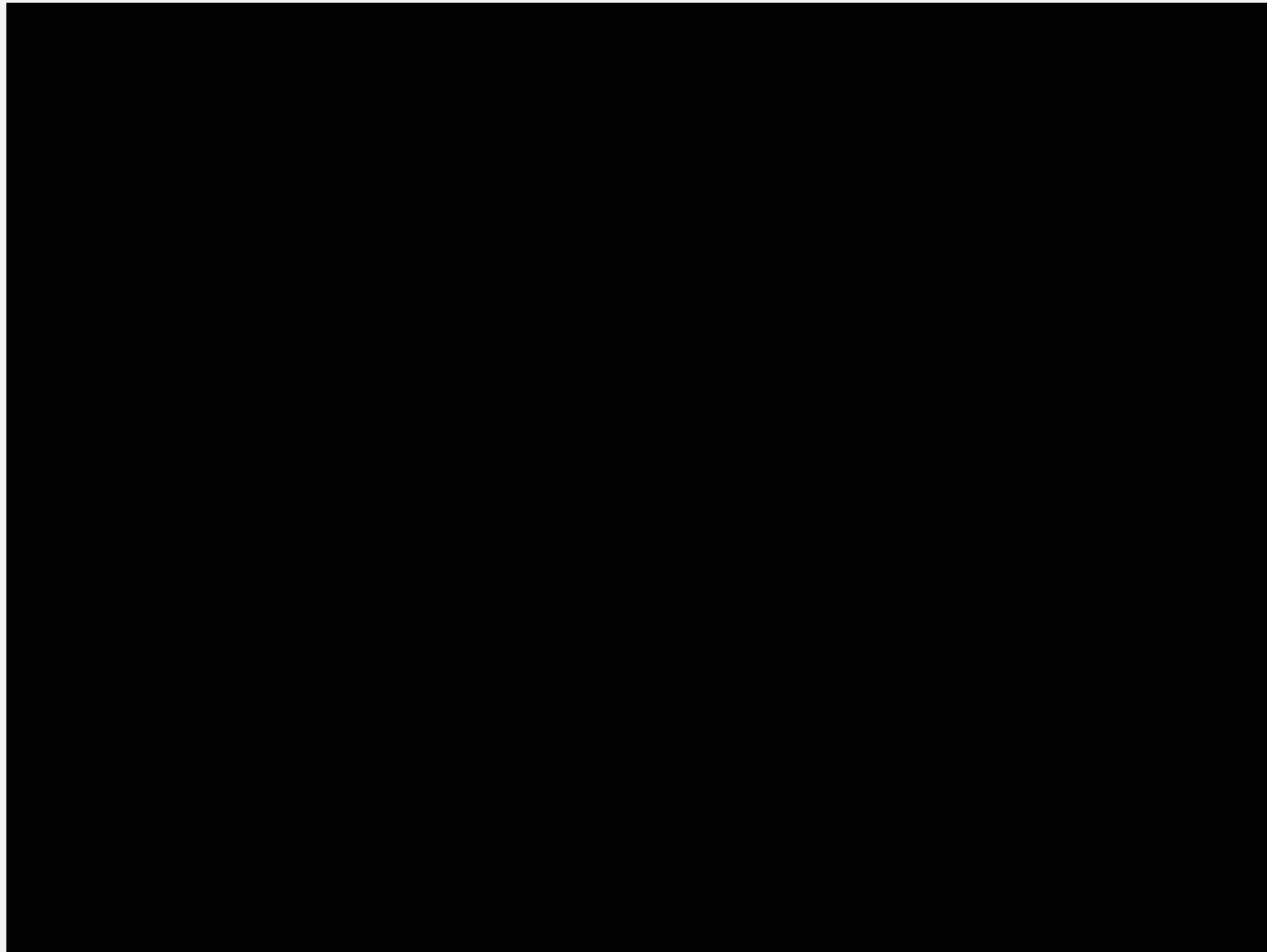
- Wash cell with 20 ml of Serum-Free Medium (2 times)



Cancer cell lines culture

Step 9

- Add 12 ml of Serum-Free Medium
- Incubate for 24 hour



Collection and preparation of secretome samples

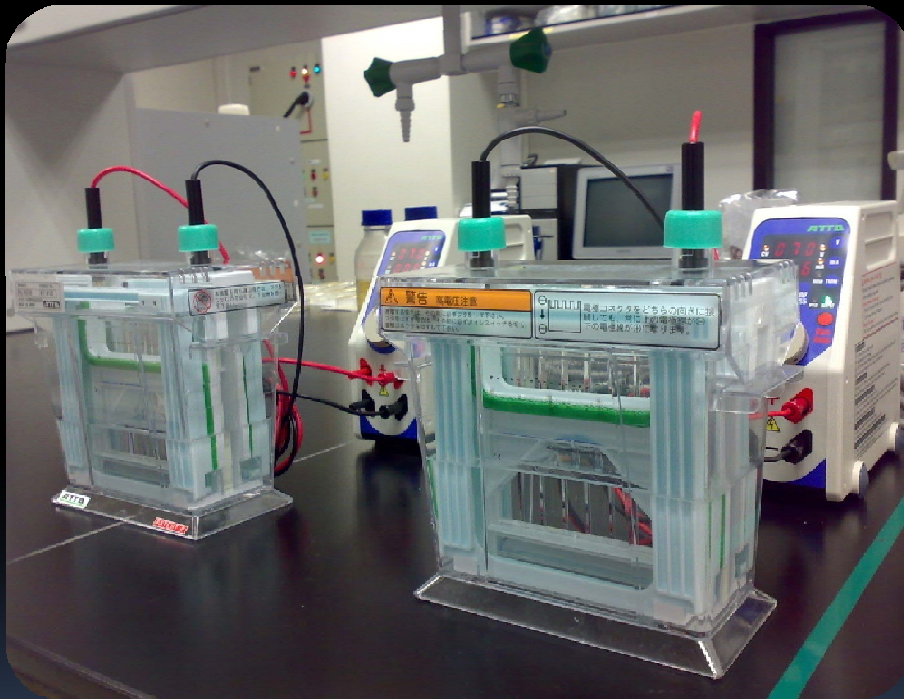
Step 10

- Secretome samples collection (or conditioned medium ; CM)
- Secreted Protein Concentrate with Amicon Ultra-15 tubes

Proteomic analysis

Protein Pre-separation by 15% SDS-PAGE gel

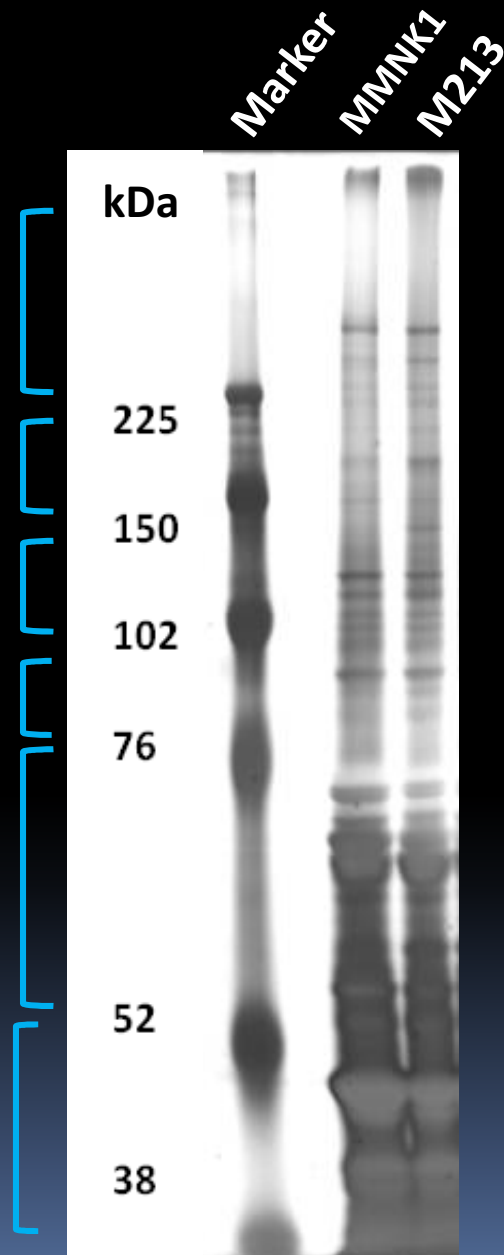
SDS-PAGE and silver stained



ATTO AE-6530 system

- 30 ug of proteins
- 15 % SDS-PAGE gel
- 70 volts for 5 h at RT
- The gel was stained with silver

Tryptic In gel digestion



- ✓ Gels were cut into 6 ranges of marker
- ✓ Excised to 1x1 mm gel pieces
- ✓ The protein were reduced with DTT, alkylated with IAA and **digested with trypsin enzyme**
- ✓ The proteins were extracted



The tryptic peptide mixture was lyophilized and kept at -20°C



Protein identification

Proteins identification by Mass spectrometer

The tryptic peptide mixture was separated by using Liquid Chromatography

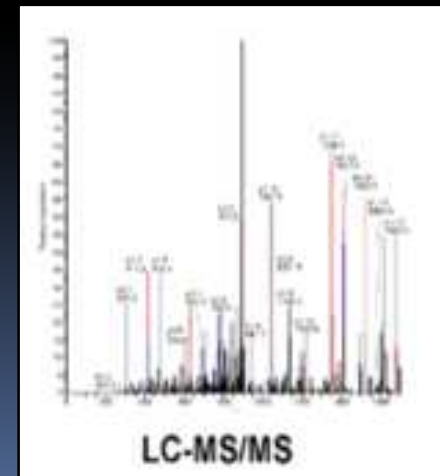
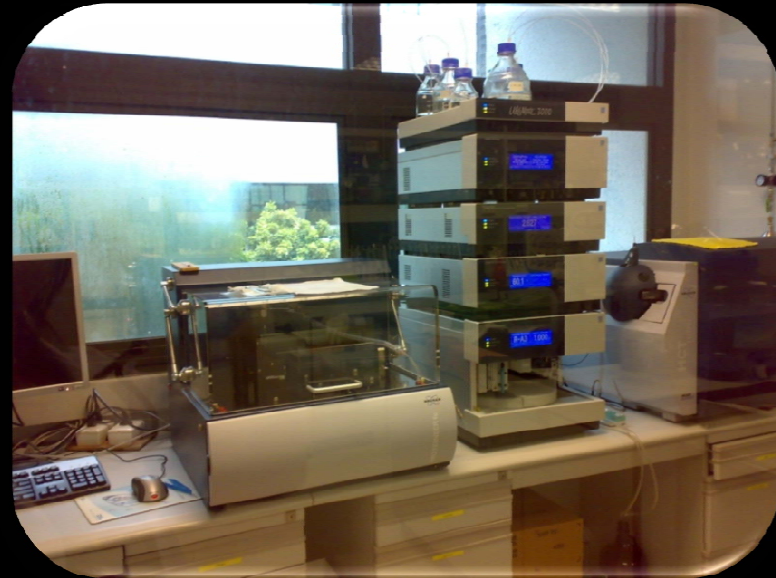


A Thermo Electron HPLC system is interfaced to the mass spectrometer for automated LC-MS/MS analyses



Peptide detection & Data-dependent MS/MS spectra were obtained simultaneously

MS/MS spectra

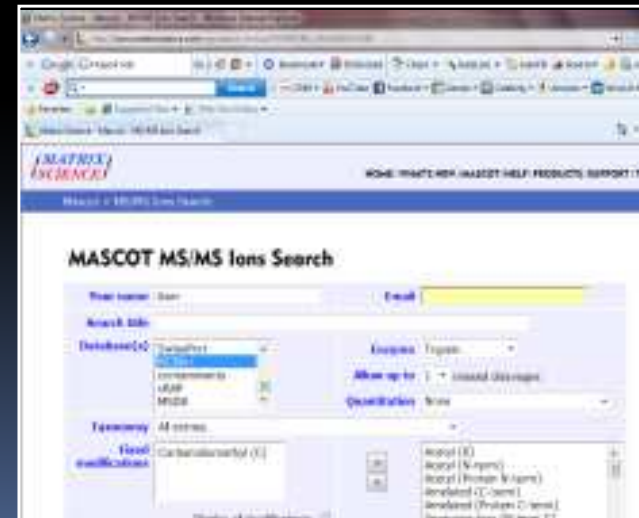
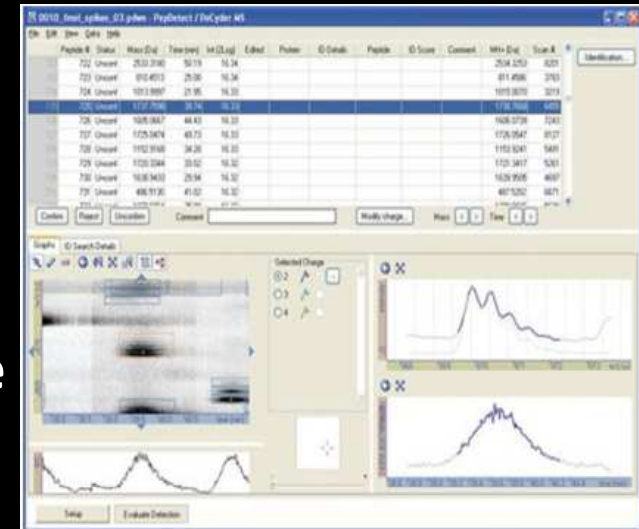


Proteins identification

Comparison and relative quantitation
of LC-MS/MS data among 2 samples using
DeCyder MS 2.0 Differential Analysis Software



Proteins identification
via MASCOT search



5	Accession	Gene Symbol	Protein Name
6	P20982	PTMS	Parathymosin
7	O43837	IDH3B	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta
8	P04792	HSPB1	Heat-shock protein beta-1 (HspB1)
9	P31153	MAT2A	S-adenosylmethionine synthetase isoform type-2
10	Q04895	KRT17	Keratin, type I cytoskeletal 17
11	P49720	PSMB3	Proteasome subunit beta type 3
12	P04083	ANXA1	Annexin A1
13	P30837	ALDH1B1	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial precursor
14	P00918	CA2	Carbonic anhydrase 2
15	P02794	FTH1	Ferritin heavy chain
16	P16401	HIST1H1B	Histone H1.5 (Histone H1a)
17	Q04828	AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1 member C1
18	P55072	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
19	O00244	ATOX1	Copper transport protein ATOX1
20	Q13283	G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1
21	P02795	MT2A	Metallothionein-2
22	P13928	ANXA8	Annexin A8
23	P06702	S100A9	Protein S100-A9
24	P19012	KRT15	Keratin, type I cytoskeletal 15
25	P59998	ARPC4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4
26	Q9Y376	CAB39	Calcium-binding protein 39
27	P25205	MCM3	DNA replication licensing factor MCM3
28	P47914	RPL29	60S ribosomal protein L29
29	Q15843	NEDD8	NEDD8 precursor
30	P49773	HINT1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1
31	Q13177	PAK2	Serine/threonine-protein kinase PAK 2
32	P18085	ARF4	ADP-ribosylation factor 4
33	P17812	CTPS	CTP synthase 1
34	P61201	COPS2	COP9 signalosome complex subunit 2
35	P50454	SERPINH1	Serpin H1 precursor
36	P23229	ITGA8	Integrin alpha-8 precursor

Subsequent proteins validation

- ✓ Protein confirmation and expression pattern by Western blot analysis
- ✓ Evaluation of serum levels by ELISA in serum samples of patients compare with healthy serum



Cancer secretome based biomarker discovery

Acknowledgment

Advisor : Dr.Siriporn Patrakitkomjorn

Thank you for your
attention

