

เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์เพื่องานวิจัยทางการแพทย์

ศิริพร (ภัทกรกิจกำร) ประงวิทยา^{1, 2*}, วชิรญา กลิ่นทอง³, มนทิรา จะนันท์³, ธนกร ประงวิทยา¹

Received: December 21, 2011

Revised & Accepted: April 3, 2012

บทคัดย่อ

โปรตีโอมิกส์ ถูกใช้ในการศึกษางานด้านโปรตีน เช่น การแสดงออกของโปรตีน มีความสามารถสูงในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ ในระดับเฟมโตโมล อีกทั้งยังสามารถใช้ศึกษาโปรตีนได้คราวละจำนวนมาก ปัจจุบันเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ที่ใช้ในการศึกษาที่สำคัญ ได้แก่ แมสสเปกโตรเมทรี องค์ประกอบของเครื่องดังกล่าวได้แก่ 1) ส่วนผลิตไอออน (ion source) ที่ได้จากระบบของ electrospray ionization (ESI) และ matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) 2) ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) โดยมีหน่วยเป็นมวลต่อประจุ 3) ส่วนตรวจวัด (ion detector) 4) ส่วนประมวลผล (data system) ซึ่งถูกควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมโยงกับฐานข้อมูล (database) เช่น NCBI homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) และ expasy proteomics tools (<http://www.expasy.ch/tools>) เป็นต้น การประยุกต์ใช้งานได้แก่ การทำ peptide mass fingerprints (PMF), การค้นหาสารบ่งชี้ต่างๆ, การทำ MALDI-biotyper และการทำ MALDI-tissue imaging เป็นต้น สรุปได้ว่าเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ได้ถูกพัฒนาและสามารถนำมาใช้งานทางการแพทย์ในหลายมิติ

คำสำคัญ: โปรตีโอมิกส์, แมสสเปกโตรเมทรี

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ในตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ



Proteomics tools for medical researches

Siriporn Proungvitaya^{1,2*}, Wachiraya Klinthong³, Montira Janan³, Tanakorn Proungvitaya¹

Abstract

Proteomics has been used for the systematic study of proteins in a cell e.g. protein expression. Proteomic analysis is a highly sensitive method which can be used for the detection of a very small amount of protein sample with detection limit of femtomole. Moreover, this method provides very high throughput. At present, mass spectrometry is widely used in proteomic analysis. The mass spectrometry composes of four principal compartments including ion source, mass analyzer, ion detector, and data system. In the first compartment, ion source, electrospray ionization (ESI) and matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) are ion generators. The second compartment, mass analyzer, is used for an analysis of mass to charge ratio. The third compartment is an ion detector. The last compartment, data system, is the work station for data processing and analysis with computerized system that can be linked to several kinds of database for example NCBI homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Expasy proteomics tools (<http://www.expasy.ch/tools>) and etc. Several applications of proteomic analysis have been implemented in protein study such as typing peptide mass fingerprints (PMF), detecting bio-markers and performing MALDI-Tissue Imaging, etc. Taken together, proteomics is the promising method that can be applied for medical sciences in many aspects.

Keywords: Proteomics, Mass spectrometry

¹Centre of Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories,

²Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center,

³Graduate student (Medical Science), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Thailand

* Corresponding author: (e-mail: sirpat@kku.ac.th)

บทนำ

เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ (proteomics) มีบทบาทอย่างมากในการค้นพบสารบ่งชี้ทางชีวภาพ เพื่อการวินิจฉัยการพยากรณ์และติดตามการรักษาโรค⁽¹⁾ นอกจากนี้ยังสามารถระบุชนิดของเชื้อก่อโรคในงานด้านจุลชีววิทยาด้วย matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) biotyper⁽²⁻³⁾ การศึกษาด้านพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อด้วย MALDI tissue imaging⁽⁴⁾ การศึกษาด้านโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนมีความสำคัญต่อการพัฒนาองค์ความรู้พื้นฐานในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์เชิงประยุกต์และทางการแพทย์ สำหรับเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ที่มีความสำคัญและนิยมใช้ศึกษาอย่างแพร่หลาย ได้แก่ two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) และแมสสเปกโตรเมตรี⁽⁵⁻⁶⁾ ซึ่ง mass spectrometry มีบทบาทมากเกี่ยวกับงานวิจัยด้านการแพทย์

1. แมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry; MS)

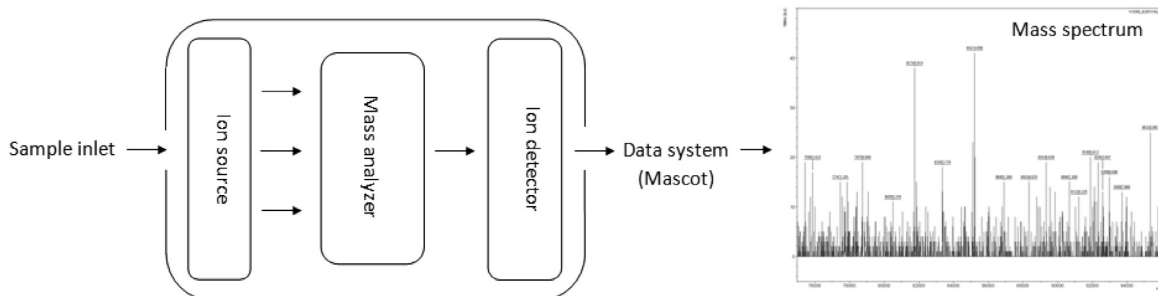
แมสสเปกโตรเมตรีเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ⁽⁷⁾ เช่น การระบุชนิดและขนาดโปรตีน การทำนายลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน และการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในพยาธิสภาพที่แตกต่างกัน เป็นต้น โดยอาศัยหลักการตรวจวัดมวลต่อประจุ (mass to charge ratio; m/z) ที่จำเพาะของตัวอย่างโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ถูกทำให้เกิดประจุ โดยสารตัวอย่างถูกฉีดเข้าช่องเติมสารตัวอย่างเข้าเครื่อง (sample inlet) แล้วทำให้แตกตัวเป็นประจุในส่วนผลิตไอออน (ion source) ประจุที่เกิดขึ้นจะผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์

มวล (mass analyzer) เพื่อแปลงเป็นสัญญาณที่ส่วนตรวจวัด ion detector) แล้วส่งสัญญาณไปยังส่วนประมวลผล (data system) ซึ่งถูกควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมโยงกับฐานข้อมูลโปรตีน⁽⁸⁾ (รูปที่ 1) เทคนิคนี้จัดเป็นเทคนิคขั้นสูงและความไวในการตรวจวิเคราะห์ในระดับเฟมโตโมล (femtomole)⁽⁹⁾ สามารถทำการศึกษาซ้ำได้ (high reproducibility) สามารถแยกโปรตีนได้ดี (high resolution) และได้คราวละจำนวนมาก (high throughput) จึงเป็นที่สนใจสำหรับประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอย่างแพร่หลาย

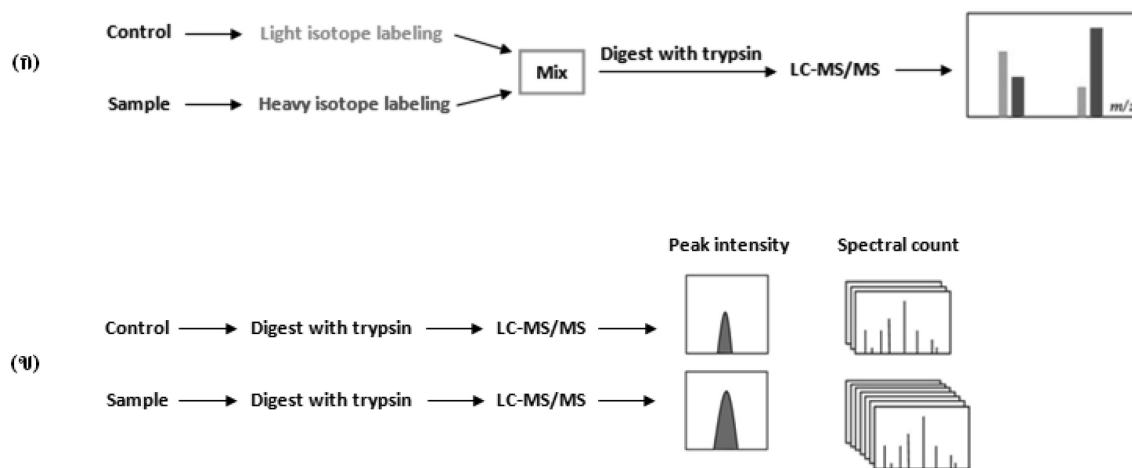
สำหรับเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีที่นิยมใช้ในงานวิจัยปัจจุบัน มี 2 เทคนิค คือ liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) และ matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

2. เทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)

LC-MS คือ การแยกโปรตีนที่อยู่ในสถานะของเหลวด้วยวิธี liquid chromatography และมีการเกิด ion source ด้วยแบบ electrospray ionization (ESI) ซึ่งสามารถระบุชนิดของโปรตีนด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี โดยมวลสารจะถูกตรวจวัดในส่วน mass analyzer นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ยังสามารถเปรียบเทียบในเชิงปริมาณได้ จึงมีประโยชน์ในการเปรียบเทียบการแสดงออกโปรตีนในสถานะที่แตกต่างกัน⁽¹⁰⁾ LC-MS เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ ความไวและความจำเพาะสูง⁽¹¹⁾ ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคนี้ ในการศึกษาโปรตีนได้ใน 2 รูปแบบ คือ label technique และ label free technique



รูปที่ 1 องค์ประกอบของเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี เปปไทด์ตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่เครื่อง ตัวอย่างจะเกิด ionization แล้ว ions จะถูกคัดเลือกและตรวจจับด้วยเครื่อง mass spectrometer จากนั้นจะอ่านค่าตาม mass/charge (m/z) ข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม mascot (modified from Aebersold R, 2003)



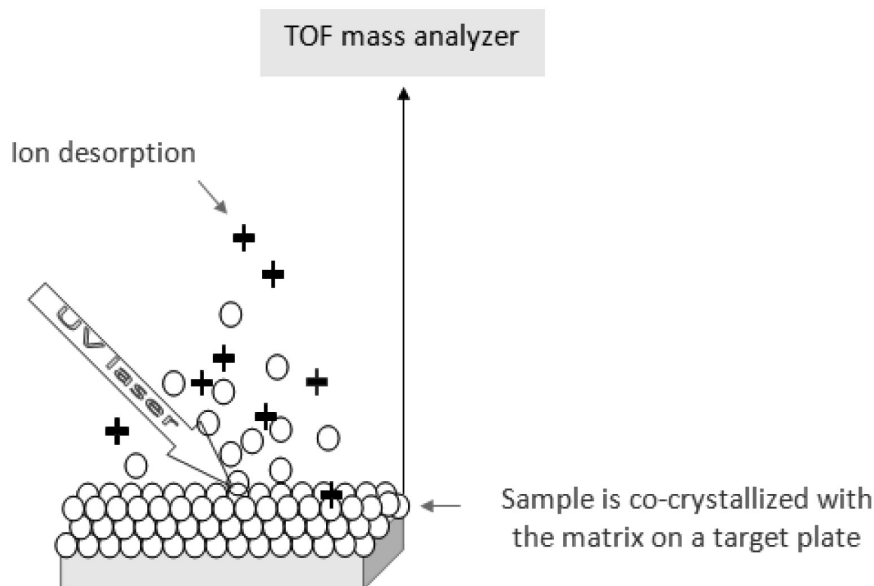
รูปที่ 2 หลักการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค label (isotope) LC-MS (ก) เปปไทด์ของตัวอย่างที่ต่างกัน จะถูกตรึงด้วย isotope ที่ต่างกันแล้วถูกผสมเข้าด้วยกัน เพื่อทำการวิเคราะห์ในคราวเดียวกัน ส่วน label free LC-MS (ข) เปปไทด์ของตัวอย่างที่ต่างกัน จะถูกทำการวิเคราะห์แยกกันด้วยเครื่อง mass spectrometer และผลที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ (Modified from Zhu W, 2010)

ก. Label (isotope) LC-MS การติดฉลากด้วย stable isotope กับโปรตีน ซึ่งทำให้ง่ายต่อการระบุชนิดของโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันใน 2 ตัวอย่างขึ้นไป โดยนำตัวอย่างควบคุม มาติดฉลากด้วย stable isotope ชนิดเบา (light) ส่วนตัวอย่างศึกษา (test sample) ติดฉลากกับ isotope ชนิดหนัก (heavy) แล้วนำตัวอย่างทั้งสองมาผสมกัน ทำการย่อยตัวอย่างผสมด้วยเอนไซม์ทริปซิน แล้วจึงวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS เนื่องจากตัวอย่างทั้งสองชนิดถูกติดฉลากด้วย isotope ต่างชนิดกัน จึงสามารถเปรียบเทียบผลการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละสถานะได้ (**รูปที่ 2ก**) แต่มีข้อจำกัดคือราคาแพงและการติดฉลากดังกล่าวอาจไม่ครอบคลุมถึงตัวอย่างโปรตีนทั้งหมด

ข. Label free LC-MS การเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน 2 ตัวอย่างขึ้นไป แต่ไม่ติดฉลากโปรตีนด้วย stable isotope โดยนำตัวอย่างศึกษากับตัวอย่างควบคุมมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS อย่างไรก็ตามก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ตัวอย่างทั้งสองจะไม่นำมาผสมกัน หากแต่จะวิเคราะห์แยกกัน ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของ peptide signal intensities ณ เวลาเดียวกันในทั้งสองตัวอย่าง⁽¹²⁻¹³⁾ (**รูปที่ 2ข**) แต่ข้อจำกัดคือจำเป็นต้องใช้ software ที่จำเพาะต่อการวิเคราะห์ซึ่งมีราคาแพง

3. เทคนิค Matrix assisted laser desorption-time-of-flight-mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS คือ การทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออนก่อนการวิเคราะห์ โดยผสมสารตัวอย่างกับสารแมทริกซ์ (matrix) ได้แก่ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) เป็นต้น สารดังกล่าวมีส่วนประกอบของกรดหรือด่างจะทำให้ตัวอย่างมีประจุ จากนั้นสารผสมจะถูกนำไปหยดลงบนแผ่นโลหะ (MALDI plate) ซึ่งจะทำให้ส่วนผสมระเหยกลายเป็นผลึก เมื่อสารแมทริกซ์ถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดพลังงานจากแสงเลเซอร์ส่งไปยังโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีประจุและแตกตัวเป็นไอออน ทำให้โปรตีนหรือเปปไทด์สามารถเคลื่อนที่ได้และวิเคราะห์มวลสารด้วย mass analyzer ชนิด time-of-flight (TOF) ซึ่งโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีมวลน้อยจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีมวลมาก จึงเดินทางไปยังตัวรับ (detector) ได้เร็วกว่า ทำให้สามารถคำนวณระยะเวลาที่ตัวอย่างเคลื่อนที่และบอกขนาดมวลสารได้⁽⁸⁾ (**รูปที่ 3**) เทคนิคนี้มีขั้นตอนที่สะดวกและรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค LC-MS แต่ถูกจำกัดด้วยปริมาณของตัวอย่างในการศึกษา นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่อยู่ในสถานะของแข็งได้ เช่น โคโลนิของเชื้อ⁽³⁾ และชิ้นเนื้อ⁽⁴⁾ เป็นต้น ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์ได้หลากหลาย



รูปที่ 3 หลักการทำงานของเทคนิค MALDI-TOF MS เปปไทด์ตัวอย่างจะถูกผสมกับ matrix ที่เหมาะสม แล้วตรึงบน mass plate ที่จำเพาะ จากนั้นแสงเลเซอร์จะกระตุ้นให้เกิด ions เพื่อส่งไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer (Modified from Aebersold R, 2003)

การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีที่มีประสิทธิภาพนั้น ประกอบด้วยกระบวนการหลายขั้นตอน นอกจากการเตรียมตัวอย่างโปรตีนที่ดีแล้ว ขั้นตอนการแยกโปรตีนก่อนการตรวจวิเคราะห์ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากเช่นกัน ซึ่งมี 2 วิธีหลักที่นิยมใช้ในงานวิจัย คือ วิธี gel based และวิธี gel free โดยความแตกต่างระหว่าง 2 วิธีมีรายละเอียด ดังนี้

ก. Gel based เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนรวม อาศัยการแยกโปรตีนเบื้องต้นด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิส เช่น 2D-PAGE ซึ่งโปรตีนจะถูกแยกตามขนาดและค่า isoelectric point (pI) เป็นต้น จากนั้นทำการย่อยโปรตีน แล้วเลือกตัดจุดโปรตีนที่ต้องการออกจากเจล ไปทำการศึกษา โดยโปรตีนที่ตัดแยกได้จะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ได้เป็นสายเปปไทด์สั้นๆ แล้ววิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี⁽¹⁴⁾ วิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างโปรตีนที่มีความซับซ้อนสูง (high complexity) และตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนมาก ซึ่งจำเป็นต้องแยกโปรตีนด้วยเจลก่อนการวิเคราะห์เสมอ

ข. Gel free เป็นทางเลือกหนึ่งของการวิเคราะห์โปรตีนโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแยกโปรตีนด้วย เจลก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี ซึ่งมีข้อดีคือ ลด

ขั้นตอนและระยะเวลาได้ค่อนข้างมาก สามารถนำตัวอย่างที่อยู่ในสถานะของเหลวมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินได้เป็นสายเปปไทด์ แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีได้ทันที โดยมากนิยมวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) ซึ่งมีการแยกสายเปปไทด์ด้วยเทคนิค liquid chromatography ก่อนการวิเคราะห์⁽¹⁵⁾

4. การประยุกต์ใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีในงานวิจัยทางการแพทย์

4.1 การระบุชนิดและขนาดโปรตีน (protein identification) แบ่งเป็น 3 วิธีหลัก ดังนี้

4.1.1 Peptide mass fingerprints (PMF)

ตัวอย่างโปรตีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน โดยโปรตีนจะถูกตัดให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อเอนไซม์ของโปรตีนแต่ละชนิด เรียกลักษณะนี้ว่า peptide mass fingerprint (PMF) ดังนั้นขนาดเปปไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีจึงมีความจำเพาะในโปรตีนแต่ละชนิด เมื่อนำข้อมูลที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน (protein database) จึงสามารถระบุชนิดโปรตีนได้⁽¹⁶⁻¹⁷⁾

4.1.2 MS/MS ion search

การระบุชนิดโปรตีนด้วยวิธีนี้โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีซ้ำ 2 ครั้ง (MS/MS) การวิเคราะห์ครั้งแรกสามารถบอกขนาดมวลของสายเปปไทด์ทั้งหมด และทำการแตกตัวเปปไทด์แต่ละสายด้วยการวิเคราะห์ครั้งที่สอง ซึ่งจะทำให้ทราบขนาดมวลของเปปไทด์แต่ละสาย แล้วนำข้อมูลทั้งหมดเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน จึงสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ถูกต้องและจำเพาะมากกว่าเมื่อเทียบกับวิธี PMF

4.1.3 De novo peptide sequencing

เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับโปรตีนที่ยังไม่ทราบลำดับกรดอะมิโนหรือยังไม่มีในฐานข้อมูลโปรตีน ซึ่งจะสามารถบอกองค์ประกอบของโปรตีนได้จากเปปไทด์ขนาดต่างๆ กัน และทำนายชนิดกรดอะมิโนในสายเปปไทด์แต่ละสายได้ด้วยการวิเคราะห์แบบ MS/MS ข้อมูลทั้งหมดถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเฉพาะ เช่น โปรแกรม PepNovo⁽¹⁸⁾

4.2 การค้นหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker discovery)

ปัจจุบันมีหลายการศึกษาพยายามค้นหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพในโรคต่างๆ ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษากลไกการเกิดโรค การวินิจฉัยและเป็นแนวทางในการรักษาโรคได้ จากการศึกษาของ Zeng et al., 2011⁽¹⁹⁾ ทำการตรวจหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพในซีสต์ของผู้ป่วยมะเร็งปอดด้วยเทคนิค LC-MS พบว่าสามารถค้นพบสารบ่งชี้ทางชีวภาพในมะเร็งปอด ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบและการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ ซึ่งอาจใช้ในการวินิจฉัยมะเร็งปอดในระยะเริ่มแรกได้

4.3 Matrix-assisted laser desorption/ionization-biotyper (MALDI- biotyper)

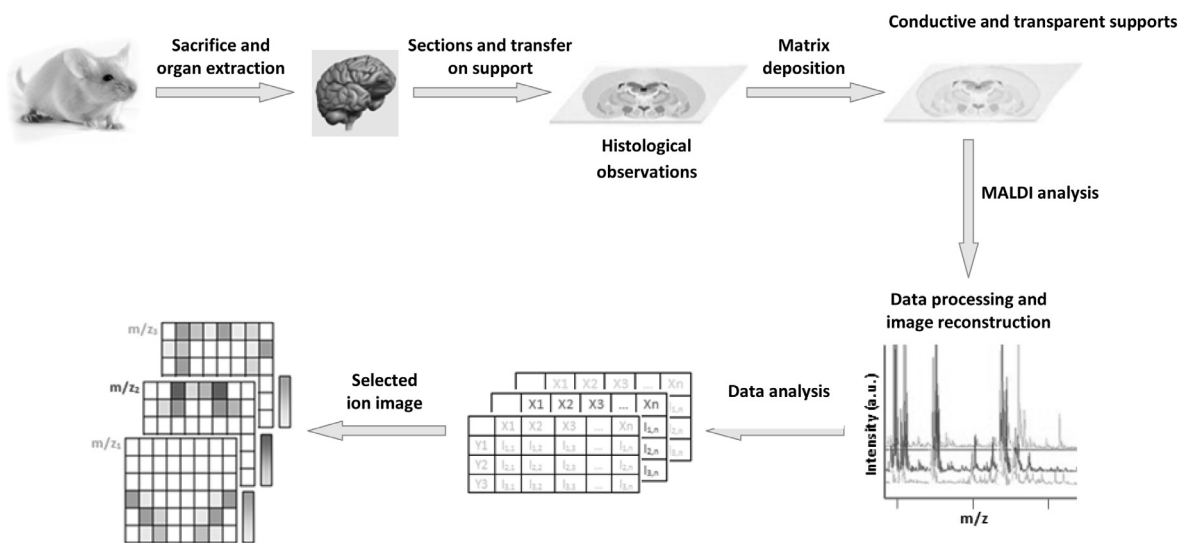
ในอดีตการระบุชนิดเชื้อจากผู้ป่วยใช้เวลาานประมาณ 2-3 วัน และมีหลายกระบวนการ เช่น การเพาะเชื้อ การย้อมสีแกรม การทดสอบทางชีวเคมี เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีเทคนิคใหม่ที่สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบโปรตีนสำหรับการระบุชนิดเชื้อได้ภายในเวลาอันรวดเร็วโดยวิเคราะห์โปรตีนขนาดเล็กที่คาดว่าเป็นคุณสมบัติของเชื้อ

แต่ละชนิดด้วยเครื่อง MALDI-TOF⁽²⁰⁾ ผลที่ได้จะแสดงเป็นลักษณะแบบแผนโปรตีน (protein pattern) ข้อมูลทั้งหมดของเชื้อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมและเทียบกับข้อมูลของเชื้อมาตรฐาน (reference spectra strains) หากข้อมูลตรงกันก็สามารถทราบชนิดของเชื้อได้ เรียกเทคนิคนี้ว่า MALDI-biotyper ข้อดีคือ การแยกชนิดเชื้อมีความจำเพาะสูง ใช้ปริมาณเชื้อในการวิเคราะห์น้อย ทำได้ง่ายและรวดเร็ว⁽²⁾ จากการศึกษาของ Ferreira et al., 2010⁽²¹⁾ ได้พัฒนาเทคนิค MALDI-biotyper สำหรับใช้ในการระบุชนิดเชื้อ *Brucella* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์และติดต่อสู่คนได้ โดยทำการวิเคราะห์เชื้อ 131 โคโลนีที่เก็บได้จากผู้ป่วยด้วยเทคนิค MALDI-TOF พบว่าเทคนิคนี้สามารถระบุชนิดเชื้อในระดับจีนัส (genus) ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม

4.4 Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-tissue imaging

โดยปกติตัวอย่างชิ้นเนื้อจะถูกย้อมสี hematoxylin-eosin แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะของเซลล์ อย่างไรก็ตามหากทราบขนาดโปรตีนจำเพาะที่พบในตัวอย่างชิ้นเนื้อก็สามารถนำมาใช้ทำนายโรคได้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) หรือ MALDI tissue imaging

MALDI-tissue imaging เป็นเทคนิคการวินิจฉัยระดับโมเลกุล สามารถทำในชิ้นเนื้อที่มีก้อนเนื้อร้ายได้โดยตรง ช่วยตรวจหาขอบเขตของมะเร็ง ดูลักษณะเนื้อเยื่อปกติที่อยู่ใกล้เคียงกัน ช่วยให้ตรวจพบพยาธิสภาพในระยะเริ่มแรก และสามารถหาชนิดโปรตีนที่อยู่ในตำแหน่งต่างๆ ของอวัยวะในสิ่งมีชีวิตได้⁽²²⁾ โดยทำการตรึง frozen section จากอวัยวะต่างๆ เช่น สมอง บนสไลด์แก้ว แล้วนำมาเติมแมทริกซ์ และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF ข้อมูลที่ได้จะถูกคำนวณและบันทึกผลรูปภาพด้วย MALDI-tissue imaging software ซึ่งรูปภาพจะแสดงความแตกต่างของสีในแต่ละส่วนของชิ้นเนื้อ ทำให้สามารถทราบตำแหน่งของโปรตีนที่สนใจในชิ้นเนื้อได้⁽²³⁻²⁴⁾ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค MALDI tissue imaging ชิ้นเนื้อจะถูกตรึงบนแผ่นแก้ว จากนั้นจะถูกผสมด้วย matrix ที่เหมาะสม หลังเกิด ionization จะได้ ions ที่จำเพาะ ซึ่งจะถูวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer (Modified from Fournier I, 2008)

จากการศึกษาของ Su et al., 2010⁽²⁵⁾ ที่ได้ศึกษาการกระจายของ crystallin-derived peptides ซึ่งเป็น low molecular weight peptides ที่ได้จากการสลายและสะสมของโปรตีนในเลนส์ตาของคนในช่วงอายุที่แตกต่างกัน เลนส์แช่แข็งที่ได้รับจากผู้บริจาคจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-MS พบว่าเทคนิคนี้สามารถบอกความแตกต่างของ crystallin-derived peptides แต่ละชนิดที่พบในช่วงอายุที่แตกต่างกันได้ รวมถึงสามารถบอกขนาดและตำแหน่งของโปรตีนนั้นบนเลนส์ตาของคนได้ทำให้นำมาใช้งานได้อย่างเหมาะสม

สรุป

เทคนิคโปรตีโอมิกส์เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญต่อการศึกษางานทางด้านโปรตีน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ อาทิ การระบุชนิดและขนาดโปรตีน การค้นหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพ การระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งการตรวจหาพยาธิสภาพและรอยโรคของเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะการตรวจวิเคราะห์ ข้อดี-ข้อจำกัดของแต่ละเทคนิค เช่น กระบวนการ ionization ที่ต่างกันระหว่าง ESI และ MALDI จะให้ผลที่ต่างกัน รวมถึงการเลือกใช้ software และ database ก็ต้องคำนึงเสมอ ดังนั้นการเลือกใช้เทคนิคให้เหมาะสมกับงาน ย่อมเกิดประโยชน์สูงสุดต่องานศึกษาวิจัยในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Blonder J, Issaq HJ, Veenstra TD. Proteomic biomarker discovery: it's more than just mass spectrometry. Electrophoresis 2011; 32: 1541-8.
2. Ilina EN, Borovskaya AD, Malakhova MM, Vereshchagin VA, Kubanova AA, Kruglov AN, et al. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic Neisseria. J Mol Diagn 2009; 11: 75-86.
3. Lay JO, Jr. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. Mass Spectrom Rev. 2001; 20: 172-94.
4. Cazares LH, Troyer DA, Wang B, Drake RR, Semmes OJ. MALDI tissue imaging: from biomarker discovery to clinical applications. Anal Bioanal Chem 2011; 401: 17-27.
5. Lau AT, He QY, Chiu JF. Proteomic technology and its biomedical applications. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) 2003; 35: 965-75.
6. Roy P, Shukla Y. Applications of proteomic techniques in cancer research. Cancer Therapy 2008; 6: 841-56.

7. Matta A, Ralhan R, Desouza LV, Siu KW. Mass spectrometry-based clinical proteomics: Head-and-neck cancer biomarkers and drug-targets discovery. *Mass Spectrom Rev* 2010; 29:945-61.
8. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207.
9. Roepstorff P. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8: 6-13.
10. Becker CH, Bern M. Recent developments in quantitative proteomics. *Mutat Res* 2010; 722: 171-82.
11. Shushan B. A review of clinical diagnostic applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2010; 29: 930-44.
12. Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol* 2010; ID 840518: 1-6.
13. Haqqani AS, Kelly JF, Stanimirovic DB. Quantitative protein profiling by mass spectrometry using label-free proteomics. *Methods Mol Biol* 2008; 439: 241-56.
14. 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.
15. 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.
16. Thiede B, Hohenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, et al. Peptide mass fingerprinting. *Methods* 2005; 35: 237-47.
17. Webster J, Oxley D. Peptide mass fingerprinting: protein identification using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2005; 310: 227-40.
18. Dancik V, Addona TA, Clauser KR, Vath JE, Pezner PA. De novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry. *J Comput Biol* 1999; 6: 327-42.
19. Zeng X, Hood BL, Zhao T, Conrads TP, Sun M, Gopalakrishnan V, et al. Lung cancer serum biomarker discovery using label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 725-34.
20. Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1946-54.
21. Ferreira L, Vega Castano S, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Cabrero S, Menegotto F, Orduna-Domingo A, et al. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLoS One* 2010; 5: e14235.
22. Rubakhin SS, Hatcher NG, Monroe EB, Heien ML, Sweedler JV. Mass spectrometric imaging of the nervous system. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 3325-34.
23. Franck J, Arafah K, Elayed M, Bonnel D, Vergara D, Jacquet A, et al. MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8: 2023-33.
24. Fournier I, Wisztorski M, Salzet M. Tissue imaging using MALDI-MS: a new frontier of histopathology proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2008; 5: 413-24.
25. Su SP, McArthur JD, Andrew Aquilina J. Localization of low molecular weight crystallin peptides in the aging human lens using a MALDI mass spectrometry imaging approach. *Exp Eye Res* 2010; 91: 97-103.