# การทำบริสุทธิ์โปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อวิเคราะห์โปรตีโอมด้วยแมสสเปกโทรเมทรี

## Purification of Plasma Membrane Proteins for Mass Spectrometry-based Proteomic Analysis

แววลี โชคแสวงการ

Waeowalee Choksawangkarn

*ภาควิชาชีวเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

*Department of Biochemistry and Center of excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University*

Received : 19 May 2017

Accepted : 21 July 2017

Published online : 7 September 2017

**บทคัดย่อ**

เยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่ขวางกั้นระหว่างสิ่งแวดล้อมภายในและภายนอกเซลล์ ดังนั้น โปรตีนบนเยื่อหุ้ม เซลล์จึงทำหน้าที่สำคัญในการสื่อสาร การจดจำชนิดของเซลล์ การส่งสัญญาณ และการขนส่งระดับโมเลกุล ด้วยเหตุนี้การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจึงอาจนำไปสู่การค้นพบตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ และการพัฒนาตัวยาใหม่ เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยและการรักษาโรค ในปัจจุบันการพัฒนาของเทคโนโลยีทางด้านแมสสเปกโทรเมทรีเปิดโอกาสให้สามารถศึกษาภาพรวมของโปรตีนทั้งหมดในระบบได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว แต่การศึกษาโปรตีโอมของเยื่อหุ้มเซลล์ยังคงมีข้อจำกัดบางอย่าง ปัญหาหลักของการวิเคราะห์เกิดจากปริมาณโปรตีนที่มีอยู่น้อย และคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกของโปรตีนบนเยื่อหุ้ม บทความนี้มุ่งเน้นไปที่การรวบรวมหลักการและการประยุกต์เทคนิคเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ เพิ่มความบริสุทธิ์ และลดการปนเปื้อนจากออร์แกเนลล์ชนิดอื่น รวมถึงวิธีการทั่วไปและเทคนิคขั้นสูงซึ่งมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน การพิจารณาเลือกวิธีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเพิ่มขีดความสามารถในการระบุชนิดของโปรตีน และการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เพื่อนำไปสู่การค้นพบหน้าที่ของโปรตีนเหล่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะการเกิดโรค

**คำสำคัญ** : เยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีโอมิกส์ แมสสเปกโทรเมทรี อนุภาคนาโน การติดฉลากไบโอติน

*Corresponding author. E-mail : waeowalee@go.buu.ac.th

## Abstract

As a barrier between intracellular and extracellular environment, plasma membrane (PM) proteins play crucial roles in cell communication, cell recognition, signaling and molecular transport. Thus, detection of changes in PM proteome could lead to identification of novel biomarkers for disease diagnostics and development of novel drug targets for therapeutics. Current development of mass spectrometry technologies has made it possible to study a snapshot of all proteins presented in the system; however, there are some limitations for the PM proteomic study. Main challenges result from their low abundance and their hydrophobic property. This review focuses on principles and applications of commonly used and advanced approaches for enrichment of the PM proteins, in order to increase their purity and deplete contaminating proteins from other organelles. Since each method has its own advantages and limitations, careful consideration for sample preparation techniques could help enhancing PM proteins identification and quantification to elucidate their roles in disease-associated cellular responses.


**Keywords :** plasma membrane, proteomics, mass spectrometry, nanoparticle pellicle, biotinylation

**บทนำ**

เยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) เป็นบริเวณแบ่งแยกระหว่างองค์ประกอบภายในเซลล์และสิ่งแวดล้อมภายนอก จึงมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการทางชีวภาพ เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยฟอสโฟลิพิดที่จัดเรียงตัวเป็นเยื่อหุ้มสองชั้น (phospholipid bilayer) ซึ่งมีสารชีวโมเลกุล เช่น คาร์โบไฮเดรต คอเลสเทอรอล และโปรตีน จัดเรียงตัวอยู่ภายในชั้นของฟอสโฟลิพิด โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสารผ่านเข้าออกจากเซลล์ ช่วยในการสื่อสารระหว่างเซลล์ เร่งปฏิกิริยาบนผิวเซลล์ และทำหน้าที่ส่งสัญญาณชีวภาพ (Josic & Clifton, 2007) ในสภาวะที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อตอบสนองต่อพยาธิสภาพ โปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ก็มีการเปลี่ยนแปลงทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ ด้วยเหตุนี้โปรตีนที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์จึงเป็นเป้าหมายของยา (drug target) โดยมีรายงานวิจัยระบุว่ามากกว่าร้อยละ 60 ของยาที่อยู่ระหว่างการวิจัยพัฒนามีเป้าหมายที่โปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ (Overington *et al.*, 2006) และประมาณร้อยละ 30 ของโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของการเกิดโรคมะเร็งนั้นเป็นโปรตีนเยื่อหุ้ม (membrane protein) ด้วยเช่นเดียวกัน (Josic *et al.*, 2008)

จากความสำคัญของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ที่กล่าวมาข้างต้นทำให้การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีโอม (proteome) ในเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง และเทคโนโลยีที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งหมดในระบบ คือการใช้แมสสเปกโทรเมทรีสำหรับการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (mass spectrometry-based proteomics) เนื่องจากวิธีนี้สามารถระบุชนิดของโปรตีน และระบุชนิดของการเปลี่ยนแปลงโปรตีนหลังการแปลรหัส (post-translational modification) ได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว รวมทั้งเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของโปรตีนในระบบที่ต่างกันได้ โดยวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายคือการวิเคราะห์แบบ bottom-up ซึ่งหมายถึงการระบุชนิดของโปรตีนจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์สายสั้นๆ ที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ เช่น ทริปซิน (trypsin) ซึ่งสามารถตัดพันธะเปปไทด์ที่บริเวณปลายคาร์บอกซิล (c-terminus) ของกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จีนีน เป็นต้น จากนั้นทำการแยกเปปไทด์ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งเชื่อมต่อ

กับบริเวณที่ทำให้เกิดประจุ (ionization chamber) และทำการวัดอัตราส่วนระหว่างมวลต่อประจุของเปปไทด์ (MS1) และของไอออนที่เกิดจากการสลายพันธะเปปไทด์ (MS2) ด้วยแมสสเปกโทรมิเตอร์ ข้อมูลที่ได้จะถูกรายงานในรูปของแมสสเปกตรัม (mass spectrum) การแปลผลการทดลองนั้นจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) และฐานข้อมูลโปรตีน (protein database) เพื่อระบุลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ เพื่อนำไปสู่การระบุชนิดของโปรตีนจากเปปไทด์ต่อไป (Wu & Yates, 2003)

อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์โปรตีนเยื่อหุ้มนั้นมีอุปสรรคหลายอย่าง เนื่องจากคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกของส่วนที่แทรกตัวอยู่ในชั้นของฟอสโฟลิพิด ทำให้โปรตีนไม่ละลายน้ำ และไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ เนื่องจากการเข้าถึงบริเวณตัดจำเพาะบนสายโปรตีนเป็นไปได้ยาก ทั้งยังเป็นอุปสรรคต่อการทำให้เกิดประจุเพื่อวิเคราะห์มวลด้วยแมสสเปกโทรมิเตอร์ และอีกสาเหตุหนึ่งที่เป็นอุปสรรคต่อการศึกษาโปรตีนเยื่อหุ้ม คือการแสดงออกของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีปริมาณน้อย หากพิจารณาจากองค์ประกอบของเซลล์จะพบว่าปริมาตรของเยื่อหุ้มเซลล์คิดเป็นอัตราส่วนเฉลี่ยร้อยละ 2 ของปริมาตรเซลล์ทั้งหมดเท่านั้น (Kearney & Thibault, 2003) ในการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโทรเมทรี โปรตีนที่มีปริมาณมากกว่าและมีความสามารถในการเกิดไอออไนเซชันสูงจะให้สัญญาณที่ดี และส่งผลให้ไม่พบไอออนจากโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีปริมาณน้อย

เพื่อแก้ไขข้อจำกัดของการวิเคราะห์โปรตีนเยื่อหุ้มด้วยแมสสเปกโทรเมทรี ได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มทำการพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ และลดปริมาณโปรตีนจากไซโทพลาสซึมและออร์แกเนลล์อื่นๆ เพื่อลดปัญหาการรบกวนสัญญาณของไอออนที่มีปริมาณมาก (ion suppression) บทความนี้ได้รวบรวมเทคนิคที่เป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบัน ได้แก่ (1) การปั่นเหวี่ยงผ่านตัวกลางที่มีความหนาแน่นต่างกัน (density gradient centrifugation) (2) การเคลือบด้านนอกเซลล์ด้วยอนุภาคนาโนแบบประจุบวก (cationic nanoparticle pellicle coating) (3) การติดฉลากโปรตีนด้านนอกเซลล์ด้วยไบโอติน (cell surface protein biotinylation) (4) การทำบริสุทธิ์ไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ (cell surface glycoprotein enrichment) และ (5) การตัดเปปไทด์บนผิวเซลล์ด้วยเอนไซม์ (cell surface shaving) โดยเทคนิคเหล่านี้ถูกนำมาใช้เพื่อการเตรียมตัวอย่างโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์โปรตีโอมของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคต่างๆ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนายารักษาโรคและวิธีการรักษาที่ตรงจุด รวมถึงการค้นหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของการเกิดพยาธิสภาพ เพื่อเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว (Leth-Larsen *et al*., 2010; Speers & Wu, 2007)

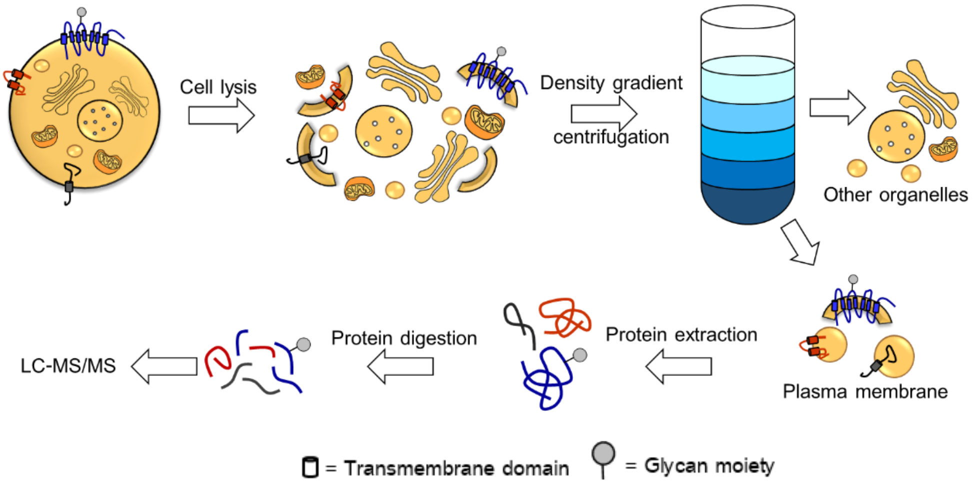
**(1) การปั่นเหวี่ยงผ่านตัวกลางที่มีความหนาแน่นต่างกัน (density gradient centrifugation)**

วิธีการปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกส่วนออร์แกเนลล์หลังการทำให้เซลล์แตกได้รับความนิยมมาเป็นเวลานาน โดยออร์แกเนลล์จะถูกแยกตามความหนาแน่นของตัวกลางที่ถูกแบ่งเป็นชั้น เช่น ซูโครส sorbitol Nycodenz™ Histodenz™ Ficoll และ Percoll (Gasser *et al*., 1988; Cao *et al*., 2008) ซึ่งตัวกลางเหล่านี้จะมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น ออร์แกเนลล์แต่ละชนิดมีขนาด รูปร่าง และความหนาแน่นที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ส่งผลให้มีการกระจายตัวอยู่ในชั้นที่ต่างกันของตัวกลาง หลังจากการปั่นเหวี่ยง ชั้นของเยื่อหุ้มจะถูกแยกออกเพื่อนำไปสกัดโปรตีนเยื่อหุ้มในตัวทำละลายหรือดีเทอร์เจนท์ (detergent) ที่เหมาะสม ก่อนที่จะทำการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ เพื่อวิเคราะห์เปปไทด์และระบุชนิดของโปรตีนด้วย LC-MS/MS (ภาพที่ 1)

ข้อดีของวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านตัวกลางที่มีความหนาแน่นต่างกัน คือสามารถนำออร์แกเนลล์แต่ละชนิดไปทำการทดลองต่อได้ โดยโปรตีนยังคงสภาพธรรมชาติอยู่ และวิธีนี้สามารถทำการทดลองได้ง่าย ไม่ซับซ้อน อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อจำกัดหลายอย่างที่ทำให้ไม่สามารถแยกเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีความบริสุทธิ์สูงได้ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์มีโครงสร้างคล้ายกับเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์อื่น เช่น กอลจิคอมเพล็กซ์ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และไลโซโซม จึงทำให้มีความหนาแน่นใกล้เคียงกัน

ส่งผลให้ไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Tan *et al.*, 2008) นอกจากนี้ เมื่อผ่านกระบวนการทำให้เซลล์แตกแล้ว เยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มที่จะเกิดโครงสร้างของเวสิเคิล (vesicle) เนื่องจากคุณสมบัติแอมฟิพาติก (amphipathic) ของฟอสโฟลิพิด ซึ่งในระหว่างการสร้างเวสิเคิลนั้นอาจมีโปรตีนที่ละลายน้ำบรรจุอยู่ภายในช่องว่าง ทำให้เกิดการปนเปื้อนของโปรตีนจากไซโทพลาสซึมได้ นอกจากนี้ การที่เยื่อหุ้มเซลล์มีรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน ทั้งในรูปของไบเลเยอร์ และเวสิเคิลขนาดต่างๆ ส่งผลให้มีการกระจายตัวในชั้นตัวกลางที่มีความหนาแน่นต่างกัน ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว วิธีการปั่นเหวี่ยงจึงมักถูกใช้ร่วมกับวิธีการแยกเยื่อหุ้มเซลล์แบบอื่นๆ เพื่อเป็นการเพิ่มความบริสุทธิ์ของโปรตีน

มีรายงานวิจัยที่ใช้วิธีการปั่นเหวี่ยงองค์ประกอบของเซลล์ผ่านชั้นของสารละลายซูโครสที่มีความหนาแน่นต่างกันเพื่อการวิเคราะห์โปรตีโอมของเยื่อหุ้มเซลล์ตับในหนู ร่วมกับการใช้สารละลายเกลือที่มี pH สูง ซึ่งเป็นการกำจัดโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องออกจากเยื่อหุ้มและป้องกันการเกิดเวสิเคิล โดยร้อยละ 50 ของโปรตีนทั้งหมดจัดเป็นโปรตีนที่แทรกตัวในเยื่อหุ้ม (integral membrane proteins) (Zhang *et al.*, 2005) และจากรายงานวิจัยของ Rahbar and Fenselau (2004) ซึ่งใช้วิธีการปั่นเหวี่ยงองค์ประกอบภายในเซลล์ผ่านสารละลาย Nycodenz ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50 และร้อยละ 70 ร่วมกับการเคลือบผิวเซลล์ด้วยอนุภาคนาโนแบบมีประจุบวก พบว่าประมาณร้อยละ 43-50 ของโปรตีนที่ระบุชนิดได้จัดเป็นโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์




***ภาพที่ 1*** วิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านตัวกลางที่มีความหนาแน่นต่างกัน เพื่อแยกเยื่อหุ้มเซลล์ออกจากออร์แกเนลล์อื่นๆ ก่อนที่จะสกัดโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

***ตารางที่ 1*** ความหนาแน่นของออร์แกเนลล์ (Graham and Rickwood, 2001)

| Organelles | Nuclei | Mitochondria | Lysosomes | Peroxisomes | Golgi membranes | Plasma membranes |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Density (g/mL) | > 1.30 | 1.17-1.21 | 1.19-1.21 | 1.18-1.23 | 1.05-1.12 | 1.14-1.19 |

**(2) การเคลือบด้านนอกเซลล์ด้วยอนุภาคนาโนแบบประจุบวก** (cationic nanoparticle pellicle coating)

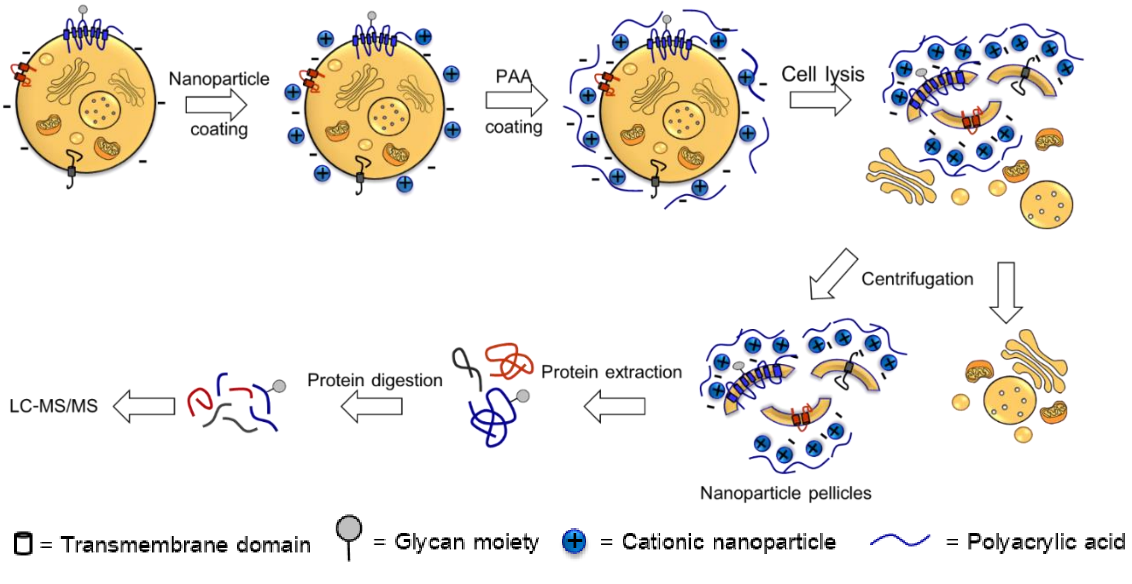
เนื่องจากการแยกออร์แกเนลล์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านตัวกลางที่มีความหนาแน่นต่างกันยังคงมีข้อจำกัดจากความหนาแน่นที่ใกล้เคียงกันของออร์แกเนลล์หลายชนิด ส่งผลให้มีโปรตีนอื่นปะปนมากับโปรตีนเยื่อหุ้ม วิธีการหนึ่งที่จะแก้ไขปัญหานี้ได้คือการเพิ่มความหนาแน่นให้เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยอนุภาคนาโนแบบประจุบวก ซึ่งคิดค้นโดยกลุ่มวิจัยของ Jacobson และคณะ(Chaney & Jacobson, 1983; Stolz & Jacobson, 1992) และถูกนำมาประยุกต์ใช้กับวิธีการทางโปรตีโอมิกส์เพื่อวิเคราะห์โปรตีโอมของเยื่อหุ้มเซลล์ (Durr *et al.*, 2004; Rahbar & Fenselau, 2004) เนื่องจากบนผิวนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ยูคาริโอตส่วนใหญ่มีประจุรวมเป็นลบซึ่งเป็นผลมาจากฟอสโฟลิพิดและหมู่ไกลแคนบนผิวเซลล์ เมื่อมีการเติมอนุภาคที่มีประจุบวกลงไปจะสามารถเคลือบอยู่บนผิวเซลล์ได้ด้วยแรงระหว่างประจุ (electrostatic interaction) สำหรับประจุบวกส่วนเกินบนผิวของอนุภาคจะถูกทำให้เป็นกลางด้วยพอลิอะคริลิก (polyacrylic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ ทำให้เกิดโครงสร้างที่มีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น จากนั้นเซลล์จะถูกทำให้แตกด้วยการทำให้เกิดโพรงอากาศภายในเซลล์ (nitrogen cavitation) (Simpson, 2010) ซึ่งเป็นวิธีการทำลายเซลล์แบบไม่รุนแรง ไม่ทำให้ออร์แกเนลล์ถูกทำลาย และรักษาสภาพธรรมชาติของโปรตีนในเยื่อหุ้มไว้ได้ เยื่อหุ้มเซลล์จะอยู่ในรูปของแผ่นแบนที่ถูกเคลือบด้วยอนุภาคนาโน และพอลิอะคริลิกบริเวณผิวนอก เรียกโครงสร้างนี้ว่า plasma membrane nanoparticle pellicles ซึ่งมีความเสถียรและช่วยป้องกันไม่ให้เกิดโครงสร้างเวสิเคิลขึ้น แผ่น pellicle มีความหนาแน่นที่สูงกว่าเยื่อหุ้มเซลล์ปกติเนื่องจากน้ำหนักของอนุภาคนาโน ทำให้สามารถทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำ เพื่อแยกเยื่อหุ้มเซลล์ออกจากออร์แกเนลล์ที่มีความหนาแน่นใกล้เคียงกัน โปรตีนจะถูกสกัดออกจากฟอสโฟลิพิดด้วยสารละลายดีเทอร์เจนท์ (detergent) หรือคาโอโทรป (chaotrope) โดยอาจใช้การสกัดโปรตีนด้วยคลื่นไมโครเวฟเข้าร่วมด้วย เพื่อช่วยทำลายโครงสร้างของ pellicle (Choksawangkarn *et al.*, 2016) ก่อนที่จะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์เพื่อระบุชนิดของโปรตีนด้วยแมสสเปกโทรเมทรีต่อไป (ภาพที่ 2)

เทคนิคการแยกเยื่อหุ้มเซลล์นี้สามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งเซลล์แบบยึดเกาะ (adherent cell) และเซลล์แบบแขวนลอย (suspension cell) รวมถึงเนื้อเยื่อในร่างกาย โดยประสิทธิภาพของเทคนิคที่ใช้มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ เซลล์แบบยึดเกาะชนิด MCF-7 ที่ผ่านการแยกด้วยอนุภาคนาโนของซิลิกามีสัดส่วนของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์คิดเป็นร้อยละ 50 ของโปรตีนที่ระบุได้ทั้งหมด (Rahbar & Fenselau, 2004) สำหรับเซลล์แบบแขวนลอย มีความแตกต่างของอัตราส่วนโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ต่อโปรตีนทั้งหมดอยู่ระหว่างร้อยละ 18-42 (Rahbar & Fenselau, 2004; Li, Jia *et al.*, 2009; Li, Jin *et al.*, 2009; Prior *et al.*, 2011; Choksawangkarn *et al.*, 2013) และสำหรับการใช้อนุภาคนาโนของซิลิกากับเนื้อเยื่อในร่างกาย มีรายงานถึงการแยกโปรตีนเยื่อหุ้มจากเนื้อเยื่อหลอดเลือดฝอย (microvascular) ในปอดหนูทดลอง พบว่ามีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มเซลล์อยู่สูงถึงร้อยละ 81 (Durr *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Robinson *et al.* (2009) รายงานการใช้อนุภาคนาโนของซิลิกาเพื่อแยกโปรตีนเยื่อหุ้มจากเนื้อเยื่อรกมนุษย์ พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนเยื่อหุ้มชนิด placental alkaline phosphatase สูงถึง 200- 400 เท่า เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยที่ระบุว่าวิธีการใช้อนุภาคนาโนของซิลิกานั้นมีข้อจำกัดในการแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อที่มีความแข็งแรงสูง ซึ่งต้องใช้แรงเฉือน (shear force) เพื่อทำให้เซลล์แตก เช่น เนื้อเยื่อหลอดเลือดหัวใจหนู (mouse heart coronary vasculature) ส่งผลให้มีโปรตีนปนเปื้อนจากออร์แกเนลล์อื่น (Arjunan *et al.*, 2009)

อนุภาคนาโนที่ใช้สามารถออกแบบได้หลากหลาย โดยส่วนใหญ่ใช้ซิลิกาเป็นองค์ประกอบ และมีขนาดอยู่ระหว่าง 20-50 นาโนเมตร อย่างไรก็ตาม มีรายงานวิจัยระบุว่าการเพิ่มความหนาแน่นของอนุภาคนาโน ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการแยกโปรตีนเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มความแตกต่างของความหนาแน่นออร์แกเนลล์ (ตารางที่ 1) กับ plasma membrane nanoparticle pellicle โดยอนุภาค $Fe_3O_4$ ที่เคลือบผิวด้วย $Al_2O_3$ ส่งผลให้ปริมาณของโปรตีน

เยื่อหุ้ม $Na^{+}/K^{+}$ ATPase เพิ่มสูงกว่าการใช้อนุภาค aluminosilicate และอนุภาค $SiO_2$ ที่เคลือบผิวด้วย $Al_2O_3$ ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบด้วย Western blotting และอัตราส่วนของโปรตีนเยื่อหุ้มต่อโปรตีนทั้งหมดก็เพิ่มสูงขึ้นด้วย (Choksawangkarn *et al*., 2013) นอกจากการแยก pellicle ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงแล้ว ยังสามารถแยกได้โดยใช้สนามแม่เหล็กอีกด้วย รายงานวิจัยระบุว่า การใช้อนุภาคนาโนแม่เหล็กที่เคลือบด้วยซิลิกา เพื่อแยกโปรตีนเยื่อหุ้มจากเซลล์ชนิด K562 มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณโปรตีน $Na^{+}/K^{+}$ ATPase และ flotillin และเมื่อพิจารณาจากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโทรเมทรี พบว่าโปรตีนเยื่อหุ้มคิดเป็นร้อยละ 34 ของโปรตีนที่ระบุได้ทั้งหมด (Li *et al*., 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ลวดนาโน (nanowire) ของ $SiO_2$ และ $Fe_3O_4$ ที่เคลือบผิวด้วยหมู่ฟังก์ชันที่มีประจุบวก เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของแรงระหว่างประจุที่ยึดเหนี่ยวโครงสร้างของ pellicle แต่ประสิทธิภาพของการแยกโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ยังไม่สูงเท่าการใช้อนุภาคนาโน ซึ่งอาจเกิดจาก pellicle มีความแข็งแรงสูง และขัดขวางกระบวนการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี nitrogen cavitation ทำให้พบโปรตีนจากออร์แกเนลล์อื่นปนเปื้อนในตัวอย่าง (Kim *et al*., 2013.; Kim *et al*., 2014)

วิธีการเคลือบด้านนอกเซลล์ด้วยอนุภาคนาโนแบบประจุบวกมีข้อดีคือสามารถทำบริสุทธิ์โปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ในสภาพธรรมชาติได้ เนื่องจากเป็นการแยกเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยังอยู่ในรูปของฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ สามารถประยุกต์ใช้ได้กับเซลล์ทั้งแบบแขวนลอยและแบบยึดเกาะ รวมถึงเนื้อเยื่อต่างๆ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้โดยการเพิ่มขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคอื่นเข้าร่วมด้วย เช่น density gradient centrifugation (Stolz & Jacobson, 1992; Rahbar & Fenselau, 2004) หรือการแบ่งส่วนเฟส (phase partitioning) ของสารละลาย triton X-114 เพื่อแยกโปรตีนตามคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกหลังจากผ่านการสกัดออกจาก pellicle (Mathias *et al*., 2011) อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือไม่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเฉพาะกลุ่ม โดยโปรตีนที่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งด้านนอกและด้านในเซลล์จะถูกแยกจากตัวอย่างพร้อมกับชั้นของฟอสโฟลิพิด และไม่สามารถประยุกต์ใช้กับเนื้อเยื่อที่มีความแข็งแรงสูงได้



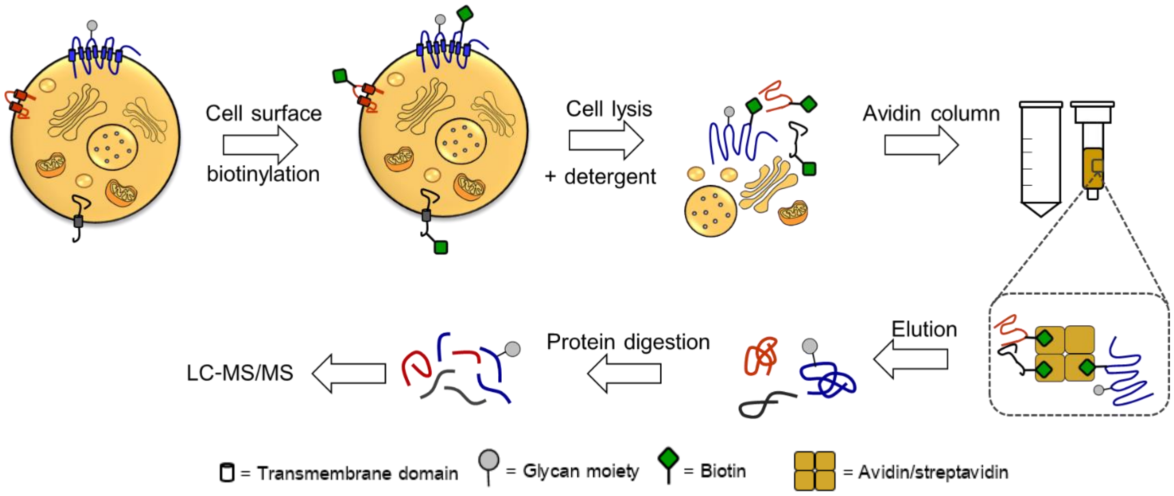

***ภาพที่ 2*** วิธีการเคลือบผิวนอกของเซลล์ด้วยอนุภาคนาโนแบบประจุบวก

**(3) การติดฉลากโปรตีนด้านนอกเซลล์ด้วยไบโอติน** (cell surface protein biotinylation)

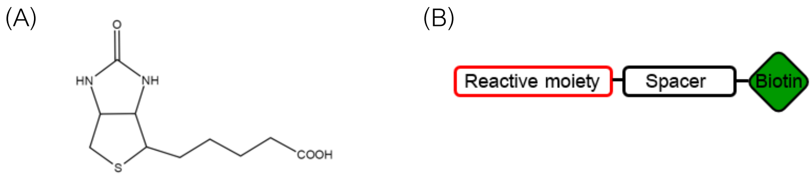
หลักการของวิธีติดฉลากโปรตีนด้วยไบโอติน คือการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนที่อยู่ด้านนอกผิวเซลล์กับรีเอเจนท์ (reagent) ที่มีไบโอตินเป็นองค์ประกอบ เพื่อสร้างพันธะโคเวเลนท์ระหว่างโปรตีนกับไบโอติน จากนั้นเซลล์จะถูกทำให้แตก และโปรตีนถูกสกัดออกจากเยื่อหุ้มด้วยสารละลายดีเทอร์เจนท์ โปรตีนบนผิวเซลล์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin-tagged) สามารถแยกออกจากโปรตีนอื่นได้โดยการสร้างปฏิสัมพันธ์กับอนุภาค avidin/ streptavidin ที่บรรจุในคอลัมน์ เนื่องจากโมเลกุลของ avidin/streptavidin มีความสามารถในการจับกับไบโอตินได้สูง โดยมีค่า dissociation constant ($K_d$) ประมาณ $10^{-15}$ M (Livnah *et al.*, 1993) ในขณะที่โปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์จะถูกชะล้างออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ หลังจากนั้น โปรตีนที่ติดฉลากด้วยไบโอตินจะถูกปล่อยออกจากอนุภาค avidin/streptavidin ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การตัดพันธะโคเวเลนท์ที่เชื่อมระหว่างไบโอตินกับโปรตีน การใช้สารละลายดีเทอร์เจนท์ และการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นภายในคอลัมน์ สำหรับโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์จะถูกนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนถูกวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS (ภาพที่ 3)

รีเอเจนท์ที่ใช้ในปฏิกิริยามีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยโมเลกุลประกอบด้วยสามส่วนหลักคือ (i) ไบโอติน (ภาพที่ 4 (A)) โครงสร้างของไบโอตินมีหมู่ฟังก์ชันของกรดวาเลอริก (valeric acid) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์กับ avidin/streptavidin และหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ spacer และบริเวณที่ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน (ภาพที่ 4 (B)) (Trotter & Hamilton, 1966) อีกองค์ประกอบหนึ่งของรีเอเจนท์ คือ (ii) spacer สายยาวของโมเลกุลที่เชื่อมต่อระหว่างไบโอตินและบริเวณ amino acid reactive group หน้าที่หลักของ spacer คือเพิ่มระยะห่างระหว่างโปรตีนและไบโอติน เพื่อลดความเกะกะ (steric hindrance) ของรีเอเจนท์ ทำให้ไบโอตินยึดติดกับ avidin/streptavidin ได้ดี บริเวณ spacer นี้ถูกออกแบบให้เหมาะสมกับการใช้งาน เช่น Sulfo-NHS-biotin ที่มีความยาว 13.5 Å Sulfo-NHS-LC-biotin ที่มีความยาว 22.4 Å Sulfo-NHS-LC-LC-biotin ที่มีความยาว 30.5 Å Sulfo-NHS-SS-biotin ที่สามารถแยกโปรตีนออกจากไบโอตินด้วยตัวรีดิวซ์ และองค์ประกอบของรีเอเจนท์ส่วนถัดมาคือ (iii) ส่วนที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโน เช่น หมู่ NHS และ sulfo-NHS ซึ่งทำปฏิกิริยากับ primary amine ของกรดอะมิโนไลซีน หมู่ iodoacetyl ซึ่งทำปฏิกิริยากับหมู่ sulfhydryl ของกรดอะมิโนซิสเตอีนที่อยู่บริเวณด้านนอกของผิวเซลล์ (Elia, 2008) ในการพิจารณาเลือกชนิดของรีเอเจนท์ควรคำนึงความยาวของโมเลกุลเพื่อเปิดโอกาสให้ไบโอตินสามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับ avidin/streptavidin และละลายได้ดีในบัฟเฟอร์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อแต่ไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ (non-permeable) ซึ่งจะพบในกลุ่มรีเอเจนท์ที่มีประจุซึ่งไม่สามารถผ่านเข้าชั้นของฟอสโฟลิพิดได้ เพื่อป้องกันการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนภายในเซลล์กับรีเอเจนท์ของไบโอติน

ข้อดีของการแยกโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธีการติดฉลากนี้คือมีความจำเพาะสูงต่อโปรตีนบริเวณผิวนอกเซลล์ แต่มีข้อจำกัดตรงที่มักพบการปนเปื้อนของโปรตีนบริเวณ extracellular matrix และ cytoskeleton มากับโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย สามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งการทดลองกับเซลล์และเนื้อเยื่อ Zhang *et al.* (2003) วิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์มะเร็งผิวหนัง (A431) โดยใช้ EZ-Link sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) พบว่าปริมาณโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าโปรตีนจากเยื่อหุ้ม ER ถึง 400 เท่า แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการแยกเยื่อหุ้มเซลล์ออกจากเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์อื่น สำหรับการประยุกต์ใช้วิธีการติดฉลากไบโอตินในเนื้อเยื่อเพื่อวิเคราะห์โปรตีโอมของเยื่อหุ้มเซลล์ในร่างกาย มีรายงานการใช้ sulfo-NHS-LC-biotin เพื่อติดฉลากโปรตีนในอวัยวะต่างๆและในเนื้องอกของหนูทดลองผ่านทางหลอดเลือด ก่อนจะวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยระบุว่า cleavable reagent เช่น sulfo-NHS-SS-biotin อาจไม่เหมาะกับการทดลองแบบ *in vivo* เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องความเสถียรของโมเลกุลในสภาวะร่างกาย (Rybak *et al.*, 2005)




***ภาพที่ 3*** วิธีการติดฉลากโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วยวิธี biotinylation



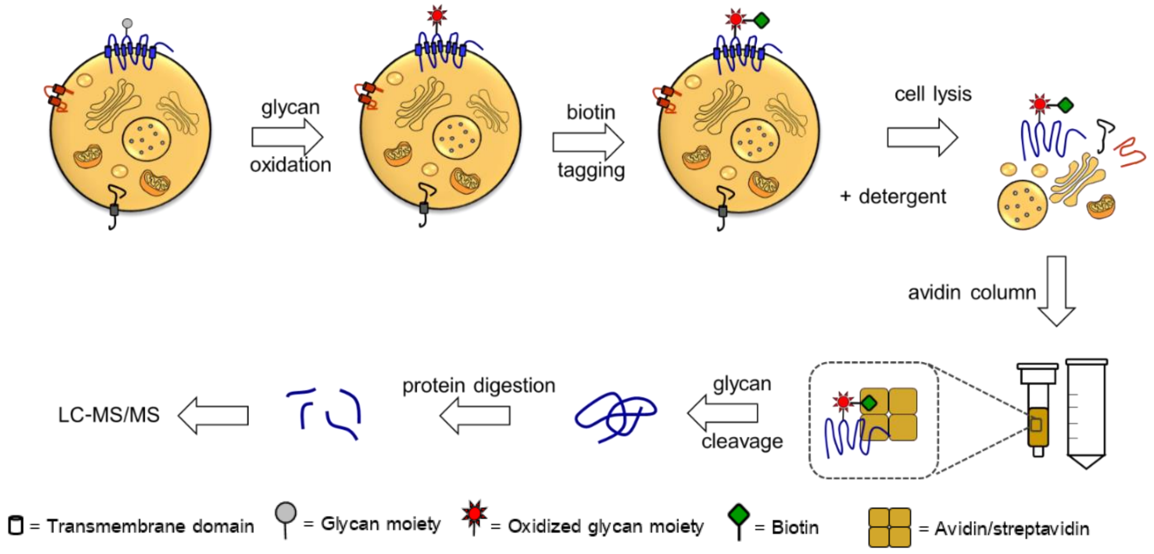

***ภาพที่ 4*** (A) โครงสร้างของไบโอติน (B) แผนภาพโมเลกุลของ biotinylation reagent ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโน spacer และไบโอติน

**(4) การทำบริสุทธิ์ไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์** (cell surface glycoprotein enrichment)

ไกลโคโปรตีนพบมากบริเวณด้านนอกของผิวเซลล์ กระบวนการ glycosylation มีสองรูปแบบคือ *N*-linked glycosylation บริเวณหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนแอสพาราจีน และ *O*-linked glycosylation บริเวณหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนเซอรีนและทรีโอนีน ไกลโคโปรตีนทำหน้าที่หลักในการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์และทำหน้าที่กำหนดเครื่องหมายเพื่อการจดจำของเซลล์ (Ohtsubo & Marth, 2006) วิธีการแยกไกลโคโปรตีนรูปแบบหนึ่งที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือการติดฉลากหมู่ไกลแคนด้วยไบโอตินดังแสดงในภาพที่ 5 หมู่ไกลแคนบนผิวเซลล์จะถูกออกซิไดซ์เพื่อเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชัน *cis*-diols ของไกลแคนให้เป็นอัลดีไฮด์ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับรีเอเจนท์ของไบโอตินที่บริเวณ reactive group (ภาพที่ 4(B)) เพื่อติดฉลากไบโอตินบนไกลโคโปรตีน จากนั้นเซลล์จะถูกทำให้แตกในสารละลายที่มีดีเทอร์เจนท์เพื่อละลายโปรตีนที่อยู่ในชั้นของฟอสโฟลิพิด ไกลโคโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วยไบโอตินจะถูกแยกโดยการใช้โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะโดยอาศัยปฏิสัมพันธ์ระหว่างไบโอตินและ avidin/streptavidin โปรตีนอาจถูกย่อยให้เป็นเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ทริปซินในขณะที่ติดอยู่กับคอลัมน์ เพื่อนำเปปไทด์ไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS หรืออาจถูกชะออกจากคอลัมน์ในรูปของโปรตีนขนาดใหญ่ก่อนที่จะนำไปย่อยต่อก็ได้โดยใช้เอนไซม์ N-Glycosidase F ตัดบริเวณที่มีหมู่ไกลแคน เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อไกลแคนแบบ *N*-linked ที่เป็นองค์ประกอบของลำดับกรดอะมิโนแบบ N-X-S/T (Eichacker *et al.*, 2004)

โครงสร้างของรีเอเจนท์มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับที่กล่าวถึงก่อนหน้านี้ในเรื่องวิธีการติดฉลากโปรตีนด้านนอกเซลล์ด้วยไบโอติน (ภาพที่ 4(B)) โดยประกอบด้วย (i) หมู่ไบโอติน (ii) spacer และ (iii) หมู่ฟังก์ชันที่ทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ของไกลแคนที่ถูกออกซิไดซ์ เช่น hydrazide (Zhang *et al*., 2003) และ amino-oxy (Zeng *et al*., 2009) ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ไกลโคโปรตีโอมด้วยการทำปฏิกิริยากับ biocytin hydrazide ถูกรายงานโดย Wollscied *et al*. (2009) โดยพบว่าร้อยละ 95 ของโปรตีนทั้งหมดที่ระบุได้จัดเป็นไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ ในจำนวนนี้มีโปรตีนในกลุ่ม cluster of differentiation (CD) อยู่ 43 ชนิด ซึ่งจัดเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกน้อยและมีความสำคัญทางภูมิคุ้มกันวิทยา ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคการติดฉลากไกลแคนด้วยไบโอตินมาประยุกต์ใช้กับวิธีการทางโปรตีโอมิกส์เพื่อวิเคราะห์ไกลโคโปรตีโอมในเซลล์และเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น T-lymphocyte (Wollscheid *et al*., 2009) mouse myoblast C2C12 cell (Gundry *et al*., 2009) human thyroid cancer cell (Arcinas *et al*., 2009) human pluripotent stem cells (Boheler *et al*., 2014) *Arabidopsis thaliana* (Song *et al*., 2013) และ human liver tissue (Chen *et al*., 2009) เป็นต้น สำหรับการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาของ amino-oxy-biotin พบในการวิเคราะห์ไกลโคโปรตีโอมของ HIV-infected CEM-T4 T cells (Matheson *et al*., 2015) human cytomegalovirus infected primary human fetal foreskin fibroblasts (HFFFs) (Weekes *et al*., 2014) และ BCG-infected THP-1 macrophages (Long *et al*., 2016) ทั้งนี้ มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้รีเอเจนท์ทั้งสองชนิด (hydrazide และ amino-oxy) ในเซลล์ THP-1 โดยพบว่าการใช้ biocytin-hydrazide ส่งผลให้ระบุชนิดของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ร้อยละ 59-85 ขณะที่การใช้ amino-oxy-biotin จะส่งผลให้ระบุชนิดของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ร้อยละ 65-74 ซึ่งมากกว่า biocytin-hydrazide นอกจากนี้ มีผลการศึกษาระบุว่าวิธีการติดฉลากไกลโคโปรตีนด้วยไบโอติน ให้ความบริสุทธิ์ของโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ที่สูงกว่าการติดฉลากหมู่อะมิโนของโปรตีนด้วย NHS-SS-biotin และสูงกว่าการเตรียม crude membrane ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง ตามลำดับ (Weekes *et al*., 2010) ในรายงานวิจัยอีกฉบับหนึ่งศึกษาเปรียบเทียบวิธีการติดฉลากโปรตีนด้วย sulfo-NHS-SS-biotin การติดฉลากไกลโคโปรตีนด้วย amino-oxy-biotin และวิธีการเคลือบด้านนอกเซลล์ด้วยอนุภาคนาโนซิลิกา พบว่า อัตราส่วนของโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ต่อโปรตีนทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 49 74 และ 55 ตามลำดับ (Hormann *et al*., 2016)

โดยสรุป ข้อดีของวิธีการทำบริสุทธิ์ไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ คือสามารถแยกโปรตีนเฉพาะกลุ่มที่อยู่ด้านนอกผิวเซลล์และถูกดัดแปลงหลังการแปลรหัสด้วยหมู่คาร์โบไฮเดรตได้ดี มีประสิทธิภาพของการทำบริสุทธิ์สูง แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถวิเคราะห์โปรตีโอมทั้งหมดของเยื่อหุ้มเซลล์ในกลุ่มที่ไม่มีการดัดแปลงด้วยหมู่ไกลแคนได้ ทำให้ระบุจำนวนชนิดของโปรตีนและเปปไทด์ได้น้อย นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของเปปไทด์จาก avidin/streptavidin เมื่อทำการย่อยโปรตีนในคอลัมน์อีกด้วย




***ภาพที่ 5*** วิธีการติดฉลากไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วยไบโอติน

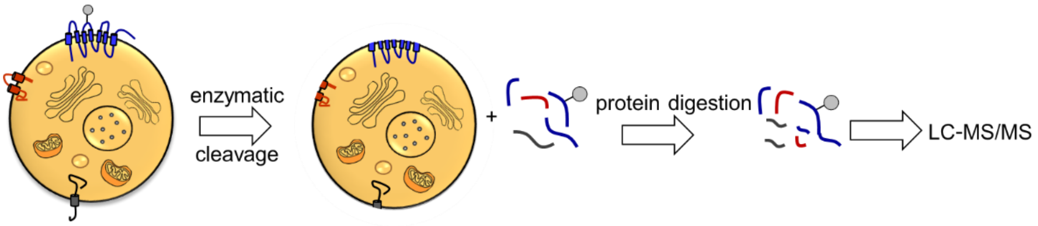
(5) **การตัดเปปไทด์บนผิวเซลล์ด้วยเอนไซม์** (cell surface shaving)

วิธีการนี้อาศัยการตัดโปรตีนที่อยู่บนผิวด้านนอกเซลล์ด้วยเอนไซม์โปรตีเอสในขณะที่เซลล์ยังอยู่ในสภาพปกติ โดยเปปไทด์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะถูกวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS เพื่อระบุชนิดของโปรตีน (ภาพที่ 6) เซลล์ที่เหมาะสมกับวิธีการนี้คือเซลล์โปรแคริโอต (prokaryotic cell) เนื่องจากมีผนังเซลล์ที่มีความแข็งแรง รายงานวิจัยจาก Rodriguez-Ortega *et al.* ใช้เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ร่วมกับ ProteinaseK ในการวิเคราะห์โปรตีนเยื่อหุ้มจาก *Streptococcus* ซึ่งสามารถระบุโปรตีนได้ 72 ชนิด โดยในจำนวนนี้มีโปรตีนจากไซโทพลาสซึมเพียงร้อยละ 6 เท่านั้น แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีการแยกโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ (Rodriguez-Ortega *et al.*, 2006) และวิธีการย่อยโปรตีนแบบเดียวกันนี้ได้รับการพัฒนาโดยใช้ตัวอย่างเซลล์ที่ไม่ผ่านการย่อยเป็นตัวควบคุม โดย Solis *et al.* (2010) วิเคราะห์โปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Staphylococcus aureus* พบว่าร้อยละ 80 ของเปปไทด์ที่ระบุลำดับกรดอะมิโนได้จัดเป็นเปปไทด์จากผิวเซลล์ มีรายงานวิจัยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ต่างชนิดที่ใช้ในการตัดเปปไทด์บนผิวเซลล์ *E.coli* พบว่าเอนไซม์ thermolysin มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนได้เทียบเท่ากับเอนไซม์ทริปซินหากพิจารณาจากจำนวนเปปไทด์บนผิวเซลล์ที่ระบุชนิดได้ด้วย LC-MS/MS และมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เอนไซม์ Proteinase K และ pepsin (Bendz et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ในเซลล์โปรแคริโอตอีกหลายชนิด เช่น *Enterococcus faecalis* (Cathro *et al.*, 2016) *Staphylococcus epidermidis* และ *Mycobacterium smegmatis* (Solis *et al.*, 2016) เป็นต้น

สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเยื่อหุ้มจากเซลล์ยูแคริโอต มีรายงานการประยุกต์ใช้วิธีตัดเปปไทด์บนเยื่อหุ้มโดยทำการแยกเยื่อหุ้มเซลล์จากเนื้อเยื่อ mouse hippocampal ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านตัวกลางที่มีความหนาแน่นต่างกัน ก่อนการย่อยโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ Lys-C ก่อนที่จะย่อยเปปไทด์อีกครั้งด้วยเอนไซม์ทริปซิน การทดลองนี้สามารถระบุชนิดโปรตีนได้ถึง 1600 ชนิด ซึ่งประมาณร้อยละ 60 ของโปรตีนจำนวนนี้จัดเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้ม (Nielsen *et al.*, 2005) และมีรายงานเกี่ยวกับวิธีแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อสมองของหนูทดลอง (mouse brain homogenate) โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH สูงเพื่อทำลายโครงสร้างเวสิเคิลของเยื่อหุ้มให้เปิดเป็นแผ่นฟอสโฟลิพิด และทำหน้าที่ชะโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องออกจากเยื่อหุ้ม จากนั้นทำการย่อยโปรตีนบนฟอสโฟลิพิดแบบไม่จำเพาะต่อชนิดของกรดอะมิโนด้วยเอนไซม์ proteinaseK เพื่อเพิ่ม sequence coverage ของเปปไทด์ พบว่าร้อยละ 28 ของโปรตีน 1600 ชนิด ที่ระบุได้จาก

เนื้อเยื่อ มี transmembrane domain อยู่ในโมเลกุล (Wu *et al.*, 2003) และจากกลุ่มวิจัยเดียวกันนี้ มีการพัฒนาเทคนิคการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยอาศัยการละลายฟอสโฟลิพิดด้วย 90% formic acid แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ proteinaseK ตามด้วยไซยาโนเจนโบรไมด์ (CNBr) โดย CNBr มีความจำเพาะต่อการตัดพันธะเปปไทด์บริเวณกรดอะมิโนเมไธโอนีน (methionine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบมากใน transmembrane domain ของเซลล์ยูแคริโอต ซึ่ง CNBr เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก สามารถเข้าถึงบริเวณไฮโดรโฟบิกของโปรตีนบริเวณ transmembrane ได้ดี จึงทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและเหมาะกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี bottom-up proteomics (Eichacker *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Speers *et al.* (2007) ได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนเยื่อหุ้มจากเซลล์ HeLa โดยใช้วิธีการดังกล่าวร่วมกับการวิเคราะห์เปปไทด์ไฮโดรโฟบิกที่อุณหภูมิสูง พบว่าร้อยละ 98 ของโปรตีนที่ระบุชนิดได้ มี transmembrane domain อยู่ในโมเลกุล

ข้อดีของวิธีการตัดเปปไทด์บนผิวเซลล์ด้วยเอนไซม์ คือช่วยลดปัญหาการตกตะกอนของโปรตีนเยื่อหุ้ม เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์เปปไทด์โดยไม่มีการสกัดโปรตีนออกจากฟอสโฟลิพิด และยังทำให้ทราบถึงโครงสร้าง (topology) ของโปรตีนเยื่อหุ้มด้วยว่าบริเวณใดของโปรตีนอยู่ด้านนอกของผิวเซลล์ อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ยังไม่เป็นที่นิยมในการวิเคราะห์เซลล์ยูแคริโอต (eukaryotic cell) (Cordwell & Thingholm, 2010) เนื่องจากในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ถูกเปลี่ยนสภาพ ทำให้การควบคุมการผ่านเข้า-ออกของสารผิดปกติ และนำไปสู่การรั่วไหลของโปรตีนจากออร์แกเนลล์อื่นในเซลล์ออกสู่นอกเซลล์ และปนเปื้อนในสารละลายของโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้




***ภาพที่ 6*** วิธีการย่อยโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วยเอนไซม์

**บทสรุป**

การศึกษาโปรตีโอมของเยื่อหุ้มเซลล์จัดเป็นพื้นฐานสำคัญของการพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคและการคิดค้นยารักษาโรค แต่เนื่องด้วยโปรตีนในกลุ่มนี้มีปริมาณน้อยและมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง จึงเป็นอุปสรรคต่อการศึกษาวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโทรเมทรี ทั้งในแง่ของการถูกรบกวนสัญญาณจากโปรตีนกลุ่มที่ละลายน้ำได้ดี และการสูญเสียโปรตีนจากการตกตะกอนในระหว่างการเตรียมตัวอย่างและระหว่างการแยกเปปไทด์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบของเหลว เนื่องมาจากคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกของโปรตีนส่วนที่อยู่ในชั้นของฟอสโฟลิพิด ด้วยเหตุนี้ จึงมีการพัฒนาเทคนิคใหม่อย่างต่อเนื่องเพื่อที่จะทำบริสุทธิ์โปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ให้สามารถระบุชนิดและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณของโปรตีนกลุ่มที่มีการตอบสนองต่อพยาธิสภาพได้อย่างมีประสิทธิผล บทความวิชาการฉบับนี้รวบรวมหลักการเบื้องต้นของเทคนิคการเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน พร้อมทั้งวิเคราะห์ข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละวิธีการดังกล่าวเพื่อประโยชน์ในการออกแบบการทดลองให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่างที่ต้องการศึกษา การพัฒนาวิธีการทำบริสุทธิ์โปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์อย่างต่อเนื่องนี้อาจนำไปสู่การค้นพบโปรตีนที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ และเป็นเป้าหมายของยารักษาโรคที่มีประสิทธิภาพสูงได้ในอนาคต

## เอกสารอ้างอิง


Arcinas, A., Yen, T.Y., Kebebew, E., & Macher, B.A. (2009). Cell surface and secreted protein profiles of human thyroid cancer cell lines reveal distinct glycoprotein patterns. *Journal of Proteome Research, 8*(8), 3958-3968.

Arjunan, S., Reinartz, M., Emde, B., Zanger, K., & Schrader, J. (2009). Limitations of the colloidal silica method in mapping the endothelial plasma membrane proteome of the mouse heart. *Cell Biochemistry and Biophysics, 53*(3), 135-143.

Bendz, M., Skwark, M., Nilsson, D., Granholm, V., Cristobal, S., Käll L., & Elofsson, A. (2013). Membrane protein shaving with thermolysin can be used to evaluate topology predictors. *Proteomics*, *13*(9), 1467-1480

Boheler, K.R., Bhattacharya, S., Kropp, E.M., Chuppa, S., Riordon, D.R., Bausch-Fluck, D., Burridge, P.W., Wu, J.C., Wersto, R.P., Chan, G.C., Rao, S., Wollscheid, B. & Gundry, R.L. (2014). A human pluripotent stem cell surface N-glycoproteome resource reveals markers, extracellular epitopes, and drug targets. *Stem Cell Reports, 3*(1), 185-203.

Cao, R., He, Q., Zhou, J., He, Q., Liu, Z., Wang, X., Chen, P., Xie, J., & Liang, S. (2008). High-throughput analysis of rat liver plasma membrane proteome by a nonelectrophoretic in-gel tryptic digestion coupled with mass spectrometry identification. *Journal of Proteome Research, 7*(2), 535-545.

Cathro, P., McCarthy, P., Hoffmann, P., & Zilm, P. (2016). Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* membrane proteins using membrane shaving, 1D SDS/PAGE, and mass spectrometry. *FEBS Open Bio, 6*(6), 586-593.

Chaney, L.K., & Jacobson, B.S. (1983). Coating cells with colloidal silica for high yield isolation of plasma membrane sheets and identification of transmembrane proteins. *Journal of Biological Chemistry, 258*(16), 10062-10072.

Chen, R., Jiang, X., Sun, D., Han, G., Wang, F., Ye, M., Wang, L., & Zou, H. (2009). Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *Journal of Proteome Research, 8*(2), 651-661.

Choksawangkarn, W., Kim, S.K., Cannon, J.R., Edwards, N.J., Lee, S.B., & Fenselau, C. (2013). Enrichment of plasma membrane proteins using nanoparticle pellicles: comparison between silica and higher density nanoparticles. *Journal of Proteome Research, 12*(3), 1134-1141.

Choksawangkarn, W., Graham, L.M., Burke, M., Lee, S. B., Ostrand-Rosenberg, S., Fenselau, C., & Edwards, N. (2016). Peptide-based systems analysis of inflammation induced myeloid-derived suppressor cells reveals diverse signaling pathways. *Proteomics*, *16*(13), 1881-1888.

Cordwell, S.J., & Thingholm, T.E. (2010). Technologies for plasma membrane proteomics. *Proteomics, 10*(4), 611-627.

Durr, E., Yu, J., Krasinska, K.M., Carver, L.A., Yates, J.R., Testa, J.E., Oh, P., & Schnitzer, J.E. (2004). Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface in vivo and in cell culture. *Nature Biotechnology, 22*(8), 985-992.

Eichacker, L.A., Granvogl, B., Mirus, O., Muller, B.C., Miess, C., & Schleiff, E. (2004). Hiding behind hydrophobicity. Transmembrane segments in mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry, 279*(49), 50915-50922.

Elia, G. (2008). Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics, 8*(19), 4012-4024.

Gasser, K.W., DiDomenico, J., & Hopfer, U. (1988). Separation of cell organelles in density gradients based on their permeability characteristics. *Analytical Biochemistry, 171*(1), 41-46.

Graham, J. M., & Rickwood, D. (2001). *Biological Centrifugation*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd.

Gundry, R. L., Raginski, K., Tarasova, Y., Tchernyshyov, I., Bausch-Fluck, D., Elliott, S. T., Boheler, K.R., Van Eyk, J.E., & Wollscheid, B. (2009). The mouse C2C12 myoblast cell surface N-linked glycoproteome: identification, glycosite occupancy, and membrane orientation. *Molecular and Cellular Proteomics, 8*(11), 2555-2569.

Hormann, K., Stukalov, A., Muller, A.C., Heinz, L.X., Superti-Furga, G., Colinge, J., & Bennett, K.L. (2016). A Surface biotinylation strategy for reproducible plasma membrane protein purification and tracking of genetic and drug-induced alterations. *Journal of Proteome Research, 15*(2), 647-658.

Josic, D., & Clifton, J.G. (2007). Mammalian plasma membrane proteomics. *Proteomics, 7*(16), 3010-3029.

Josic, D., Clifton, J.G., Kovac, S., & Hixson, D.C. (2008). Membrane proteins as diagnostic biomarkers and targets for new therapies. *Current Opinion in Molecular Therapeutics, 10*(2), 116-123.

Kearney, P., & Thibault, P. (2003). Bioinformatics meets proteomics--bridging the gap between mass spectrometry data analysis and cell biology. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology, 1*(1), 183-200.

Kim, S.K., Choksawangkarn, W., Rose, R., Fenselau, C., & Lee, S.B. (2014). Nanowire pellicles for eukaryotic cells: nanowire coating and interaction with cells. *Nanomedicine (Lond), 9*(8), 1171-1180.

Kim, S.K., Rose, R., Choksawangkarn, W., Graham, L., Hu, J., Fenselau, C., & Lee, S.B. (2013). Comparison of nanowire pellicles for plasma membrane enrichment: coating nanowires on cell. *Journal of Nanoparticle Research, 15*(12), 2133.

Leth-Larsen, R., Lund, R.R., & Ditzel, H.J. (2010). Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. *Molecular and Cellular Proteomics, 9*(7), 1369-1382.

Li, X., Jia, X., Xie, C., Lin, Y., Cao, R., He, Q., Chen, P., Wang, X., & Liang, S. (2009). Development of cationic colloidal silica-coated magnetic nanospheres for highly selective and rapid enrichment of plasma membrane fractions for proteomics analysis. *Biotechnolology and Applied Biochemistry, 54*(4), 213-220.

Li, X., Jin, Q., Cao, J., Xie, C., Cao, R., Liu, Z., Xiong, J., Li, J., Yang, X., Chen, P., & Liang, S. (2009). Evaluation of two cell surface modification methods for proteomic analysis of plasma membrane from isolated mouse hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta, 1794*(1), 32-41.

Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M., & Sussman, J. L. (1993). Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 90*(11), 5076-5080.

Long, J., Basu Roy, R., Zhang, Y.J. , Antrobus, R., Du, Y., Smith, D.L., Weekes, M.P., & Javid, B. (2016). Plasma membrane profiling reveals upregulation of ABCA1 by macrophages leading to restriction of Mycobacterial growth. *Frontiers in Microbiology, 7*, 1086.

Matheson, N.J., Sumner, J., Wals, K., Rapiteanu, R., Weekes, M.P., Vigan, R., Weinelt, J., Schindler, M., Antrobus, R., Costa, A.S.H., Frezza, C., Clish, C.B., Neil, S.J.D., & Lehner, P.J. (2015). Cell surface proteomic map of HIV infection reveals antagonism of amino acid metabolism by Vpu and Nef. *Cell Host & Microbe, 18*(4), 409-423.

Mathias, R.A., Chen, Y.S., Goode, R.J., Kapp, E.A., Mathivanan, S., Moritz, R.L., Zhu, H.J., & Simpson, R.J. (2011). Tandem application of cationic colloidal silica and Triton X-114 for plasma membrane protein isolation and purification: towards developing an MDCK protein database. *Proteomics, 11*(7), 1238-1253.

Nielsen, P.A., Olsen, J.V., Podtelejnikov, A.V., Andersen, J.R., Mann, M., & Wisniewski, J.R. (2005). Proteomic mapping of brain plasma membrane proteins. *Molecular and Cellular Proteomics, 4*(4), 402-408.

Ohtsubo, K., & Marth, J.D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell, 126*(5), 855-867.

Overington, J.P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A.L. (2006). Opinion - How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery, 5*(12), 993-996.

Prior, M.J., Larance, M., Lawrence, R.T., Soul, J., Humphrey, S., Burchfield, J., Kistler, C., Davey, J.R., La-Borde, P.J., Buckley, M., Kanazawa, H., Parton, R.G., Guilhaus, M., & James, D.E. (2011). Quantitative proteomic analysis of the adipocyte plasma membrane. *Journal of Proteome Research, 10*(11), 4970-4982.

Rahbar, A.M., & Fenselau, C. (2004). Integration of Jacobson's pellicle method into proteomic strategies for plasma membrane proteins. *Journal of Proteome Research, 3*(6), 1267-1277.

Reeke, G.N., Jr., Becker, J.W., Cunningham, B.A., Wang, J.L., Yahara, I., & Edelman, G.M. (1975). Structure and function of concanavalin A. *Advances in Experimental Medicine and Biology, 55*, 13-33.

Robinson, J.M., Ackerman, W.E., Tewari, A.K., Kniss, D.A., & Vandre, D.D. (2009). Isolation of highly enriched apical plasma membranes of the placental syncytiotrophoblast. *Analalytical Biochemistry, 387*(1), 87-94.

Rodriguez-Ortega, M.J., Norais, N., Bensi, G., Liberatori, S., Capo, S., Mora, M., Scarselli, M., Doro, F., Ferrari, G., Garaguso, I., Maggi, T., Neumann, A., Covre, A., Telford, J.L., & Grandi, G. (2006). Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A Streptococcus surface proteome. *Nature Biotechnology, 24*(2), 191-197.

Rybak, J.N., Ettorre, A., Kaissling, B., Giavazzi, R., Neri, D., & Elia, G. (2005). In vivo protein biotinylation for identification of organ-specific antigens accessible from the vasculature. *Nature Methods, 2*(4), 291-298.

Simpson, R. J. (2010). Disruption of cultured cells by nitrogen cavitation. *Cold Spring Harbor Protocol, 2010*(11), pdb prot5513.

Solis, N., Cain, J.A., & Cordwell, S.J. (2016). Comparative analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains utilizing quantitative and cell surface shaving proteomics. *Journal of Proteomics, 130*, 190-199.

Solis, N., Larsen, M.R., & Cordwell, S.J. (2010). Improved accuracy of cell surface shaving proteomics in *Staphylococcus aureus* using a false-positive control. *Proteomics, 10*(10), 2037-2049.

Song, W., Mentink, R.A., Henquet, M.G., Cordewener, J.H., van Dijk, A.D., Bosch, D., America, A.H., & van der Krol, A.R. (2013). N-glycan occupancy of Arabidopsis N-glycoproteins. *Journal of Proteomics, 93*, 343-355.

Speers, A.E., Blackler, A.R., & Wu, C.C. (2007). Shotgun analysis of integral membrane proteins facilitated by elevated temperature. *Analytical Chemistry, 79*(12), 4613-4620.

Speers, A.E., & Wu, C.C. (2007). Proteomics of integral membrane proteins--theory and application. *Chemical Reviews, 107*(8), 3687-3714.

Stolz, D.B., & Jacobson, B.S. (1992). Examination of transcellular membrane protein polarity of bovine aortic endothelial cells in vitro using the cationic colloidal silica microbead membrane-isolation procedure. *Journal of Cell Science, 103(Pt 1)*, 39-51.

Tan, S., Tan, H.T., & Chung, M.C. (2008). Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics, 8*(19), 3924-3932.

Trotter, J., & Hamilton, J. A. (1966). The absolute configuration of biotin. *Biochemistry, 5*(2), 713-714.

Weekes, M.P., Antrobus, R., Lill, J.R., Duncan, L.M., Hor, S., & Lehner, P.J. (2010). Comparative analysis of techniques to purify plasma membrane proteins. *Journal of Biomolecular Techniques, 21*(3), 108-115.

Weekes, M.P., Tomasec, P., Huttlin, E.L., Fielding, C.A., Nusinow, D., Stanton, R.J., Wang, E.C., Aicheler, R., Murrell, I., Wilkinson, G.W., Lehner, P.J., & Gygi, S.P. (2014). Quantitative temporal viromics: an approach to investigate host-pathogen interaction. *Cell, 157*(6), 1460-1472.

Wollscheid, B., Bausch-Fluck, D., Henderson, C., O'Brien, R., Bibel, M., Schiess, R., Aebersold, R., & Watts, J.D. (2009). Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nature Biotechnology, 27*(4), 378-386.

Wu, C.C., MacCoss, M.J., Howell, K.E., & Yates, J.R., 3rd. (2003). A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nature Biotechnology, 21*(5), 532-538.

Wu, C.C., & Yates, J.R., 3rd. (2003). The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nature Biotechnology, 21*(3), 262-267.

Zeng, Y., Ramya, T.N., Dirksen, A., Dawson, P.E., & Paulson, J.C. (2009). High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells. *Nature Methods, 6*(3), 207-209.

Zhang, H., Li, X.J., Martin, D.B., & Aebersold, R. (2003). Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nature Biotechnology, 21*(6), 660-666.

Zhang, L., Xie, J., Wang, X., Liu, X., Tang, X., Cao, R., Hu, W., Nie, S., Fan, C., & Liang, S. (2005). Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. *Proteomics, 5*(17), 4510-4524.

Zhang, W., Zhou, G., Zhao, Y., White, M.A., & Zhao, Y. (2003). Affinity enrichment of plasma membrane for proteomics analysis. *Electrophoresis, 24*(16), 2855-2863.