

结直肠癌组织中泛素化修饰蛋白的蛋白质组学分析

杨照微¹ 王晶莹¹ 李时孟¹ 李晓鸥² 谢风¹ 何成彦^{*1}

¹(吉林大学中日联谊医院检验科, 长春 130062) ²(吉林省肿瘤医院检验科, 长春 130012)

摘 要 蛋白质泛素化修饰在结直肠癌的发生、发展和转移等过程中,发挥着重要作用。本研究提取结直肠癌组织中总蛋白,经胰酶水解得到多肽混合物,利用免疫沉淀技术对其中含-GG 标签的肽段富集纯化,最后利用液相色谱-质谱联用技术对富集肽段进行分析,经数据库检索鉴定蛋白。结果表明,在结直肠癌组织中,鉴定得到归属为 328 种蛋白的 2036 个肽段。其中,含-GG 标签的修饰肽段数为 1497 个,归属 287 种蛋白。在鉴定得到的含有-GG 标签的肽段中,除了大部分含有 1 个-GG 标签的肽段外,还包括 31 个含有 2 个-GG 标签的肽段以及 3 个含有 3 个-GG 标签的肽段。在鉴定得到的泛素化修饰的蛋白中,发现许多与结直肠癌密切相关的蛋白,包括胸腺素 α 原 (Prothymosin α)、转化酸性含卷曲螺旋蛋白 3 (Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3)、中性氨基酸转运蛋白 B(0) (Neutral amino acid transporter B(0)) 等。对所鉴定的泛素化修饰蛋白的生物信息学分析表明,结直肠癌组织中泛素化修饰蛋白涵盖了多种基本的生物学过程和分子功能,在细胞内的各个亚细胞器及胞外基质成分中均有分布。本研究对结直肠癌组织中的泛素修饰蛋白的种类、分布等情况提供了一种特异、有效的研究方法,研究结果为深入研究结直肠癌中泛素化修饰调控分子机制提供了基础数据。

关键词 结直肠癌; 泛素化修饰; 蛋白质组

1 引言

结直肠癌 (Colorectal cancer, CRC) 是临床常见的消化道恶性肿瘤,也是我国肿瘤发病率上升最快的肿瘤之一。结直肠癌的发生、发展、转移以及治疗后复发涉及到机体内的多种重要信号转导通路,是非常复杂的生物学过程。在此过程中,蛋白质翻译后修饰发挥了十分重要的作用^[1,2]。蛋白质翻译后修饰指的是在 mRNA 被翻译成蛋白质后,对蛋白质上特定氨基酸残基进行共价修饰的过程。蛋白质翻译后修饰是调节蛋白质生物学功能的关键步骤之一,是蛋白质动态反应和相互作用的重要分子基础。其中,泛素化修饰是一类最富诱导性和调控作用的翻译后修饰^[3,4]。泛素分子在大多数情况下可通过异肽键与底物蛋白质的赖氨酸残基的 ϵ 氨基共价连接,调节底物蛋白的功能^[5]。有研究表明,在多种类型的肿瘤中都发现泛素化修饰所涉及的一些关键酶 (如 E3 泛素连接酶、去泛素化酶) 存在着异常的表达水平和突变现象^[6,7]。例如,泛素化修饰的关键酶泛素羧基末端水解酶 L1 (Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1, UCH-L1) 在伴有淋巴结转移的结直肠癌组织中显著上调表达,在肿瘤细胞的迁移过程中发挥重要作用^[8]。这些发现提示,蛋白质泛素化修饰调控可能在结直肠癌中扮演重要角色。因此,全面分析鉴定结直肠癌中泛素化修饰蛋白,对于深入理解泛素化修饰通路在结直肠癌发生、发展、转移和复发等病理过程中的分子机制具有重要意义。

对泛素化修饰蛋白的大规模分析研究主要是利用可以特异性识别多肽中赖氨酸侧链 ϵ 氨基上带有 -GG 标签的抗体,从而对泛素化修饰蛋白经胰酶水解后产生的带有 -GG 标签的肽段进行富集,再利用质谱技术对富集的修饰肽段进行分析。该分析策略将传统免疫分析技术的高度特异性和质谱技术的高度灵敏性、高分辨率等特性相结合,已经成为对复杂生物样品中的各种翻译后修饰的蛋白质进行定性、半定量、甚至定量分析的主要手段^[9~11]。目前,对结直肠癌组织的蛋白质组学研究主要集中在总蛋白的大规模分析和表征^[12]。本课题组曾利用蛋白质组学技术分析了结直肠癌组织,发现 PDIA3 等蛋白可能

2018-10-19 收稿;2018-12-17 接受

本文系国家自然科学基金项目 (Nos. 81572082, 81472454) 和吉林省科技厅项目 (No. 20150414015YY) 资助

* E-mail: chengyanhe469@vip.sina.com

是结直肠癌的一个新的治疗靶蛋白^[13]。而对于结直肠癌组织中泛素化修饰蛋白的大规模分析研究还未见报导。本研究利用免疫沉淀结合液质联用技术,对结直肠癌组织中泛素化修饰蛋白进行分析,鉴定了 287 种泛素化修饰蛋白,并对所得结果进行了生物信息学分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

QExactive 质谱仪、Easy-nLC 1000 纳升液相色谱系统(美国 Thermo Scientific 公司); PepMap100 C₁₈ 反相毛细管色谱分析柱(150 mm×0.075 mm, 3 μm, 美国 Thermofisher Dionex 公司); Allegra TM X-22R 离心机(美国 Beckman Coulter 公司); 真空冷冻干燥机(美国 Labconco 公司); 垂直电泳及电转系统(Mini-PROTEAN Tetra Cell, Mini Trans-Blot® Cell, 美国 Bio-Rad 公司); Allegra TM X-22R 离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Tanon 6200 凝胶成像仪(中国 Tanon 公司)。

Bradford 蛋白定量试剂盒、尿素、NH₄HCO₃、二硫苏糖醇、碘乙酰胺(美国 Bio-Rad 公司); Sep-Pak C₁₈ 固相萃取柱(美国 Waters 公司); ZipTip C₁₈ 吸头(美国 Millipore 公司); 免疫沉淀试剂盒(Classic IP Kit, 美国 Pierce 公司); 测序级 TPCK 修饰的胰蛋白酶(Promega 公司); Anti-Diglycyl Lysine 抗体(Clone GX41, 美国 Lucerna 公司); Anti-biotin 抗体(美国 Abcam 公司); HRP 标记的兔抗鼠二抗(美国 Santa Cruz 公司); 增强化学发光底物试剂(ECL Prime, 瑞典 GE Healthcare 公司); 甲酸、乙腈、β-巯基乙醇(Sigma 公司); 其它试剂均为国产分析纯试剂。

2.2 实验方法

2.2.1 样品总蛋白提取及多肽样本制备 本研究使用的 8 例新鲜的组织标本来自吉林大学中日联谊医院就诊并手术治疗的结直肠癌患者。样品采集经医院伦理委员会批准,患者知情同意。所有标本经病理学检查证实组织类型,均为 3 期腺癌。标本离体后,立即用生理盐水冲洗,将血液冲净,保存于液氮中。将组织样本切成小块后放入含有高浓度尿素的缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 8 mol/L Urea, 10 mmol/L NEM, 适量蛋白酶抑制剂)。使用全自动组织匀浆仪进行组织匀浆,每次 1 min, 间歇 5 min, 重复 4~6 次循环后,收集上清液,并转移至新的 EP 管中进行混合,使用 Bradford 蛋白定量试剂盒对各个蛋白样品进行定量分析。根据蛋白定量分析结果,将蛋白提取液浓度调整为 5 mg/mL,再将来自 8 个新鲜的组织标本的蛋白样品等体积混合为一个样品。向蛋白溶液中加入 1 mol/L DTT,充分混匀,使其终浓度为 20 mmol/L,56℃ 还原 1 h; 将蛋白溶液温度降至室温,加入 1 mol/L 碘乙酰胺溶液,充分混匀,使其终浓度为 50 mmol/L,在常温下避光反应 30 min。用 50 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液将蛋白溶液稀释 4 倍,按 1:100(w/w) 比例加入测序级胰酶,37℃ 保温过夜。加入甲酸溶液(终浓度为 1%)终止酶解反应,12000 r/min 离心,将上清液转移至新的 EP 管中。酶切后,多肽样品经 Sep-Pak C₁₈ 固相萃取柱脱盐后,冷冻干燥,-20℃ 保存。

2.2.2 免疫沉淀技术富集含-GG 标签的修饰肽段 按照免疫沉淀试剂盒说明书,将 Anti-Diglycyl Lysine 抗体偶联到琼脂糖磁珠表面上,经免疫沉淀缓冲液(50 mmol/L MOPS/NaOH pH 7.2, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 50 mmol/L NaCl)充分清洗后,备用。将冻干的多肽溶解于上述免疫沉淀缓冲液,加入抗体磁珠。混匀后,4℃ 旋转振荡过夜,离心,收集琼脂糖微球。经洗涤后,用洗脱缓冲液进行洗脱。洗脱液经 ZipTip C₁₈ 吸头脱盐后,冻干,于-20℃ 保存。

2.2.3 毛细管液相色谱与质谱联用分析与数据库检索 将干燥的多肽样品溶解在 0.02 mL 缓冲液 A(99% 水-1% 乙腈-0.1% 甲酸,V/V)中,离心后,取适量样品上样于 PepMap100 C₁₈ 反相毛细管色谱柱。再以流动相 A(缓冲液 A)和 B(99% 乙腈-1% 水-0.1% 甲酸,V/V)进行梯度洗脱。洗脱出的多肽经纳升喷雾离子源进入 Q Exactive 质谱进行分析。质谱扫描方式为数据依赖的采集工作模式(Data Dependent Analysis, DDA)。将采集到的质谱数据传输到数据处理工作站,并使用 Maxquant 质谱数据分析软件,在 SwissProt 蛋白质数据库中的人类数据库(Homo Sapiens)进行检索。检索参数设定:Decoy 数据库采用反转逆序(Revert)模式;所使用蛋白酶为胰蛋白酶(Trypsin);允许最多 2 个漏切位点;母离子允许最大误差为 15 ppm,子离子允许最大误差为 0.6 Da;半胱氨酸(Cys)烷基化为固定修饰,赖氨酸(Lys)的

+114.02 Da 以及甲硫氨酸(Met)的氧化和蛋白质 N 端乙酰化为可变修饰。将检索结果的 TXT 文件用 Scaffold 蛋白质组学数据处理软件进行筛选,筛选条件为:蛋白的错误发现率(FDR)控制在 1% 以下,多肽水平阈值为大于 95%。

2.2.4 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 取适量蛋白样品溶液,加入等体积的还原性上样缓冲液(2% SDS, 20% 甘油, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 6 mmol/L β -mercaptoethanol, 微量溴酚兰),煮沸 5 min 后,用垂直电泳仪进行分离。电泳结束后,胶片经硝酸银染色,再用扫描仪扫描。

2.2.5 蛋白印迹分析 将蛋白样品与上样缓冲液煮沸 5 min,进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。将电泳分离的蛋白条带电转移到 PVDF 上,分别用抗泛素蛋白的单克隆抗体杂交后,加入相应的偶联有 HRP 的二抗,以 ECL 增强化学发光法显色。

2.2.6 生物信息学分析 使用 PANTHER(13.1)分析工具对蛋白质组学分析得到的泛素化修饰蛋白进行 GO(Gene ontology)分析^[14],分别在分子功能(Molecular function)、生物学过程(Biological process)、细胞组分(Cellular components)3 个层面对蛋白进行聚类。使用 DAVID(6.8)工具进行 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)信号通路富集分析^[15]。

3 结果与讨论

3.1 结直肠癌组织中泛素化修饰蛋白的免疫印迹检测

为了初步检测结直肠癌组织中泛素化修饰蛋白的整体情况,将提取的结直肠癌组织的总蛋白用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,进行银染(图 1A)。在同样条件下分离另一块 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,在进行转膜、封闭后,用抗泛素化蛋白的抗体对膜上的泛素化修饰蛋白进行检测(图 1B)。结果表明,蛋白印迹法可以检测到结直肠癌组织中泛素化修饰蛋白的大致分布情况:高分子量区域蛋白(>100 kDa)的泛素化修饰程度较为丰富,低分子量区域(<20 kDa)蛋白泛素化程度较少。这主要是由于有些蛋白会发生多聚泛素化,一方面导致被修饰蛋白的分子量大幅增加,另一方面多聚化的泛素蛋白也会大幅增加蛋白印迹的信号强度。

3.2 结直肠癌组织中泛素化修饰蛋白-GG 标签肽段的制备和亲和富集

进行二硫键还原、碘乙酰胺烷基化后,利用胰蛋白酶对蛋白质混合物进行特异性水解,得到酶解多肽的混合物。再利用抗-GG 标签的特异性抗体(GX41)对多肽混合物中含-GG 标签肽段进行特异性富集。为了初步评价胰酶水解的程度,利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测了蛋白水解前后、抗体亲和富集前后的各个样品(图 2)。结果表明,蛋白样品经胰酶水解后,基本完全水解为多肽。而经过抗体亲和富集后,电泳凝胶上几乎看不到任何条带,本底也更为清晰,说明亲和层析富集后的肽段含量非常少。

3.3 胰酶水解混合物的液相色谱-质谱联用分析鉴定

将免疫沉淀富集的含-GG 标签的修饰肽段经液相色谱-质谱联用分析得到酶解多肽的质谱数据,再通过蛋白质数据库检索,鉴定得到 2036 个肽段,归属 328 种蛋白。其中,含-GG 标签的修饰肽段数为 1497 个,归属 287 种蛋白。表 1 列出了部分蛋白及其修饰多肽的质谱鉴定信息。已有研究表明,这些泛素化修饰蛋白在结直肠癌等恶性肿瘤的发生、发展、转移、复发等过程中发挥重要作用。如结直肠癌组织中的胸腺素 α 原(Prothymosin α , B8ZZQ6)在转录和翻译水平上都有明显上调,并且与肿瘤的浸

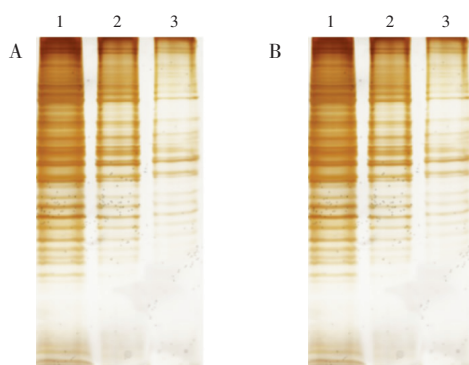


图 1 结直肠癌组织中总蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(A)以及泛素化修饰蛋白的印迹分析图谱(B)

上样量: 条带 1, 20 μ g; 条带 2, 5 μ g; 条带 3, 2 μ g

Fig. 1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of whole protein extract (A) and Western blot analysis of ubiquitinated proteins (B) from CRC tissues

Amount of samples loaded: lane 1, 20 μ g; lane 2, 5 μ g; lane 3, 2 μ g

润、淋巴及远端转移、以及肿瘤的分化密切相关^[16]。有报道发现, 转化酸性含卷曲螺旋蛋白 3 (Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3, Q9Y6A5) 在胃癌^[17] 和乳腺癌^[18] 中表达模式异常, 并与患者的预后情况呈正相关。Neutral amino acid transporter B(0) 也被发现与结直肠癌对单抗治疗药物 Cetuximab 的耐药性有关, 其被抑制后能增加肿瘤细胞对药物的敏感性^[19]。本研究还检测到泛素化修饰的膜联蛋白 A2 (Annexin A2, P07355), 已有研究表明, 膜联蛋白 A2 在结直肠癌中的过表达常会促进肿瘤细胞的浸润与迁徙^[20], 而本研究发现的此蛋白的泛素化修饰为进一步研究其在机体内的精确调控途径和方式提供了新线索。此外, 本研究还发现一系列与泛素化修饰本身密切相关的各种前体和催化酶, 包括泛素-40S 核糖体蛋白 S27a (Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a, P62979) 等。

在 1497 个含有 -GG 标签的肽段中, 除了大部分含有 1 个 -GG 标签的肽段外, 还包括 31 个含有 2 个

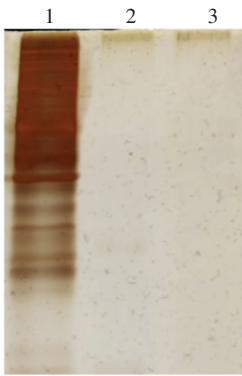


图 2 结直肠癌组织中总蛋白质的酶切及 -GG 标签肽段的亲和富集
条带 1: 酶切前; 条带 2: 酶切后; 条带 3: 亲和富集后
Fig. 2 Tryptic digestion of whole protein extract from CRC tissues and affinity enrichment of the peptides containing -GG tag
Lane 1: before digestion; lane 2: after digestion; lane 3: after affinity enrichment

表 1 部分泛素化修饰蛋白的液相色谱-质谱联用分析鉴定结果

蛋白 Protein	后验错误概率 Posterior error probability (PEP)	鉴定得分 Score	修饰位点概率 GlyGly (K) probabilities	电荷 Charge	质量误差 Mass error (10 ⁻⁶)
tr B8ZZQ6 B8ZZQ6_HUMAN	0	307.15	AAEDDEDDVDTK(0.999)K(0.001)	2	0.15816
	2.83×10 ⁻¹⁴	127.05	AAEDDEDDVDTK(0.133)K(0.867)	3	-0.20388
	0.00506117	76.24	EK(0.5)K(0.5)EVVEEAENGR	3	-0.03303
sp P62979 RS27A_HUMAN	0	269.87	TLSDYNIQK(1)ESTLHLVLR	4	0.98096
	2.52×10 ⁻¹⁰⁰	202.00	LIFAGK(1)QLEDGR	3	0.40295
	1.02×10 ⁻⁶⁷	184.98	YYKVDENGK(1)ISR	2	0.20863
sp P11142 HSP7C_HUMAN	5.53×10 ⁻²⁷	152.38	MQIFVK(1)TLTGK	2	-0.21800
	5.19×10 ⁻¹⁹⁸	239.87	MVQEAEK(1)YKADEK	2	-0.00936
	3.52×10 ⁻¹⁰	139.38	ITITNDK(1)GR	2	0.30910
	2.90×10 ⁻²²	136.39	NQVAMNPTNVFDAK(1)R	2	-0.30471
	7.23×10 ⁻¹⁰	115.56	VSSK(1)NSLESYAFNMK	3	-0.19288
	0.000186982	112.94	AMTK(1)DNNLLGK	2	0.52674
	0.0155467	112.36	LSK(1)EDIER	3	0.55803
	9.34×10 ⁻⁵	104.43	IQK(1)LLQDFFNGK	3	-0.07420
	0.0212092	63.073	ENK(1)ITITNDK	3	-0.12481
	0.0218522	60.17	DNNLLGK(1)FELTGIPPAPR	3	0.04194
	0.0211834	59.27	EEFEHQK(0.095)ELEK(0.905)	3	-0.29737
	0.0110235	58.32	QATK(1)DAGTIAGLNVLR	3	0.01809
sp Q9Y6A5 TACC3_HUMAN	2.17×10 ⁻¹⁷²	225.33	DLDAVVK(1)ATQEENRELRL	3	-0.37110
sp Q15758-3 AAAT_HUMAN	1.85×10 ⁻¹⁸³	225.31	HYRGAGDATVASEK(1)ESVM	3	-0.46030
sp P41440-2 S19A1_HUMAN	1.00×10 ⁻¹⁵⁹	219.03	SAAEEK(1)AAQALSVQDK	3	0.13205
tr E9PPJ0 E9PPJ0_HUMAN	3.20×10 ⁻¹²⁸	218.11	EALQEK(1)EEQK	2	0.86858
	0.0119132	56.14	GIEKPPFELPDFIK(1)R	4	-0.11473
	1.21×10 ⁻¹⁵⁰	214.89	EFLSAK(1)EETPGAGQK	2	0.07854
tr H0YD64 H0YD64_HUMAN	7.91×10 ⁻⁹³	198.81	ELQSK(1)EFLSAK	2	-0.09090
	0.000232501	98.90	EFLSAK(0.003)EETPGAGQK(0.997)	3	0.26079
	7.13×10 ⁻¹³⁸	211.70	SLYYYIQQDTK(1)GDYQK	2	-0.16309

续表 1(Continued to Table 1)

蛋白 Protein	后验错误概率 Posterior error probability (PEP)	鉴定得分 Score	修饰位点概率 GlyGly (K) probabilities	电荷 Charge	质量误差 Mass error (10 ⁻⁶)
sp P57053 H2BFS_HUMAN	1.59×10 ⁻⁵³	160.87	TK(1)GVDEVTIVNILTNR	3	0.34711
	1.99×10 ⁻⁹	132.88	EMYK(1)TDLEK	2	0.64174
	9.02×10 ⁻⁶	104.55	YGK(1)SLYYYIQQDTK	3	0.03044
	0.0162436	101.46	DLYDAGVK(1)R	3	0.47722
	0.000421811	92.94	TPAQYDASELK(0.995) ASMK(0.005)	3	0.49975
	2.98×10 ⁻¹¹⁹	209.67	HAVSEGTK(1)AVTK	3	-0.27941
	1.31×10 ⁻⁵	126.39	AVTK(1)YTSAK	2	0.29467
	0.00318619	71.93	VLK(1)QVHPDTGISSK	3	-0.10291
sp P28066-2 PSA5_HUMAN	1.09×10 ⁻¹⁰⁷	207.34	EELEEVIK(1)DI	2	-0.18844

-GG 标签的肽段,以及 3 个含有 3 个-GG 标签的肽段(图 3)。对所鉴定得到泛素化修饰肽段的修饰位点附近的氨基酸序列进行分析,未发现特定的序列模式与修饰相关。

3.4 泛素化修饰蛋白的生物信息学分析

借助生物信息学工具 PANTHER 软件对本研究鉴定得到的泛素化修饰蛋白进行生物信息学分析(图 4)可知,这些蛋白具有较广泛的功能分布,涵盖了分子结合(Binding)、催化活性(Catalytic activity)、酶的调节活性(Enzyme regulator activity)、分子运输活性(Transporter activity)、转录调节活性(Translation regulator activity)等多种分子功能。这说明泛素化修饰作为一种生物机体内最基本的一类翻译后修饰,其功能涉及到结直肠癌组织中的许多生物学过程,在结直肠癌组织的多种信号转导通路的交互网络中发挥重要的调节作用。以生物学过程(Biological process)对鉴定得到的蛋白进行富集分析,也得出类似结果。这与肿瘤本身是一种多阶段、多层次、多因素组合,同时又复杂交互作用的结果的观点是相吻合的。细胞组分(Cellular components)的富集结果显示,结直肠癌组织中泛素化蛋白广泛分布在细胞内的各个亚细胞器及胞外基质成分中,如高尔基体(Golgi apparatus)、线粒体(Mitochondrion)、内质网(Endoplasmic reticulum)、胞外成分(Extracellular region)、细胞浆(Cytoplasm)、细胞骨架(Cytoskeleton)以及各种细胞膜成分(Organelle membrane and plasma membrane)。

进一步使用 DAVID 工具对本研究鉴定到的 287 个泛素化修饰蛋白进行 KEGG 信号通路分析,富集得到一系列信号通路信息。排名前几位的信号通路依次为蛋白酶体(Proteasome)、核糖体(Ribosome)、EB 病毒感染(Epstein-Barr virus infection)、内质网蛋白处理(Protein processing in endoplasmic reticulum)等。其中,内质网蛋白加工信号通路中匹配的 6 种蛋白(Hsp70、Hsp90、p97、DSK2、Ufd2、RAD23、DUB)都集中在内质网相关降解途径,并与泛素化介导的蛋白酶体降解途径密切相关(图 5)。此外,内质网蛋白加工通路中的 Derlin 蛋白也被发现在大肠癌组织中表达水平异常,并且能促进肿瘤细胞的增殖^[21]。

4 结论

本研究将结直肠癌组织中总蛋白用胰酶水解后得到酶解混合物,利用免疫沉淀技术将其中含有泛素分子的酶切残余标签(-GG)的肽段进行富集纯化后,经液相色谱-质谱联用分析,成功鉴定得到含-GG 标签的修饰肽段 1497 个,归属 287 种蛋白,包括胸腺素 α 原(Prothymosin alpha)、转化酸性含卷曲螺旋蛋白 3(Transforming acidic coiled-coil-containing protein3)、中性氨基酸转运蛋白 B(0)(Neutral amino

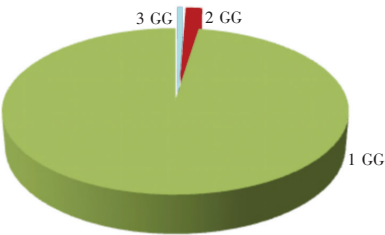


图 3 结直肠癌组织中-GG 标签肽段的质谱鉴定情况(包括含有 1 个-GG 标签、含有 2 个-GG 标签、含有 3 个-GG 标签)

Fig. 3 Mass spectrometry analysis of the peptides containing one, two and three-GG tags from CRC tissues

acid transporter B(0))等。本研究对结直肠癌组织中的泛素修饰蛋白的种类、分布等情况提供了一种特异、有效的研究方法,研究结果可以作为深入研究结直肠癌中泛素化修饰调控分子机制的基础数据。

References

1 Eisenberg-Lerner A, Ciechanover A, Merbl Y. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **2016**, 241(14): 1475–1482

2 Sethi M K, Fanayan S. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, 16(12): 29278–29304

3 Chen Z, Zhou Y, Zhang Z, Song J. *Brief Bioinform.*, **2015**, 16(4): 640–657

4 Popovic D, Vucic D, Dikic I. *Nat. Med.*, **2014**, 20(11): 1242–1253

5 Callis J. *Arabidopsis Book*, **2014**, 12: e0174

6 Fraile J M, Quesada V, Rodríguez D, Freije J M, López-Otín C. *Oncogene*, **2012**, 31(19): 2373–2388

7 Mansour M A. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **2018**, 101: 80–93

8 Ma Y, Zhao M, Zhong J, Shi L, Luo Q, Liu J, Wang J, Yuan X, Huang C. *J. Cell. Biochem.*, **2010**, 110(6): 1512–1519

9 Grossegeesse M, Doellinger J, Fritsch A, Laue M, Piesker J, Schaade L, Nitsche A. *Sci. Rep.*, **2018**, 8(1): 1807

10 Chu X L, Feng M G, Ying S H. *Curr. Genet.*, **2016**, 62(1): 191–201

11 Xie X, Kang H, Liu W, Wang G L. *J. Proteome Res.*, **2015**, 14(5): 2017–2025

12 Coghlin C, Murray G I. *Proteomics Clin. Appl.*, **2015**, 9(1-2): 64–71

13 Yang Z, Liu J, Shi Q, Chao Y, Di Y, Sun J, Zhang J, Huang L, Guo H, He C. *Oncotargets Ther.*, **2018**, 11: 4159–4166

14 Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, Thomas P D. *Nucleic Acids Res.*, **2017**, 45(D1): D183–D189

15 Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. *Nat. Protoc.*, **2009**, 4(1): 44–57

16 Zhang M, Cui F, Lu S, Lu H, Jiang T, Chen J, Zhang X, Jin Y, Peng Z, Tang H. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **2014**, 7(8): 4867–4876

17 Yun M, Rong J, Lin Z R, He Y L, Zhang J X, Peng Z W, Tang L Q, Zeng M S, Zhong Q, Ye S. *Oncol. Rep.*, **2015**, 34(3): 1397–1405

18 Cheng S, Douglas-Jones A, Yang X, Mansel R E, Jiang W G. *Cancer Genomics Proteomics*, **2010**, 7(2): 67–73

19 Ma H, Wu Z, Peng J, Li Y, Huang H, Liao Y, Zhou M, Sun L, Huang N, Shi M, Bin J, Liao Y, Rao J, Wang L, Liao W. *Int. J. Cancer*, **2018**, 142(12): 2578–2588

20 Rocha M R, Barcellos-de-Souza P, Sousa-Squiavinato A C M, Fernandes P V, de Oliveira I M, Boroni M, Morgado-Diaz J A. *Sci. Rep.*, **2018**, 8(1): 11285

21 Tan X, He X, Jiang Z, Wang X, Ma L, Liu L, Wang X, Fan Z, Su D. *Mol. Cell. Biochem.*, **2015**, 408(1-2): 205–213

Proteomic Analysis of Ubiquitinated Proteins
in Colorectal Cancer Tissues

YANG Zhao-Wei¹, WANG Jing-Ying¹, LI Shi-Meng¹, LI Xiao-Ou²,
XIE Feng¹, HE Cheng-Yan^{*1}

¹(Clinical Laboratory, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130062, China)

²(Clinical Laboratory, Jilin Province Tumor Hospital, Changchun 130012, China)

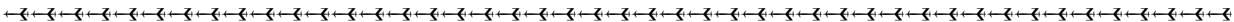
Abstract Protein ubiquitination modification plays an important role in the occurrence, development and metastasis of colorectal cancer. In this work, the total protein extracted from colorectal cancer tissues was hydrolyzed by trypsin to obtain a peptide mixture. Then the peptide mixture containing-GG tag was enriched and purified by immunoprecipitation technique. Finally, the enriched peptides were analyzed by liquid

chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and the proteins were identified by database search. The results showed that 2036 peptides belonging to 328 proteins were identified in colorectal cancer tissues. Among them, 1497 were the modified peptides containing-GG tag, which were derived from 287 proteins. Apart from most of the peptides containing one-GG tag, 31 peptides containing two-GG tags and 3 peptides containing three-GG tags were identified. Among the identified ubiquitinated proteins, many proteins were found to be closely associated with colorectal cancer, including Prothymosin alpha, Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3, Neutral amino acid transporter B (0). Bioinformatics analysis of the identified ubiquitinated proteins showed that ubiquitinated proteins in colorectal cancer tissues were enriched in a variety of basic biological processes and molecular functions, and were distributed in various subcellular organelles and extracellular matrix components. This study provided a specific and effective method for studying the types and distribution of ubiquitinated proteins in colorectal cancer tissues. The results could be used as primary data for further studying the molecular mechanism of ubiquitination regulation in colorectal cancer.

Keywords Colorectal carcinoma; Ubiquitination; Proteomics

(Received 19 October 2018; accepted 17 December 2018)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(Nos. 81572082, 81472454) and the Jilin Province Science and Technology Department (No. 20150414015YY).



中国化学会第 22 届全国色谱学术报告会及仪器展览会

由中国化学会主办,中国化学会色谱专业委员会、中国科学院大连化学物理研究所、复旦大学承办,上海分析仪器产业技术创新战略联盟协办的“中国化学会第 22 届全国色谱学术报告会及仪器展览会”定于 2019 年 4 月 21 日-23 日在上海召开。张玉奎院士担任此次大会主席,张祥民教授和许国旺研究员担任此次大会执行主席。

会议内容包括:大会特邀报告、分会邀请报告、专题报告与讨论、论文墙报展讲。会议期间还将组织色谱相关仪器及配件展示。

会议主题

- 色谱及其相关技术的新进展
- 主题 A——样品预处理 主题 B——色谱应用 主题 C——色谱材料
- 主题 D——组学分析 主题 E——仪器联用与微分离 主题 F——青年论坛

会议费

本届会议的财务及发票委托上海舜宇恒平科学仪器有限公司统一受理并代开发票。会议费包括会议手册、摘要集、胸卡等会议资料,食宿费自理。参会时,需携带会员证/学生证等有效证件。

人民币(元)	2019 年 3 月 15 日前	2019 年 3 月 15 日后	现场注册
非会员	¥ 1800	¥ 2000	¥ 2200
中国化学会会员 * *	¥ 1600	¥ 1800	¥ 2000
非会员学生	¥ 1200	¥ 1400	¥ 1600
中国化学会学生会会员 *	¥ 1000	¥ 1200	¥ 1400

* 学生代表须为全日制在读研究生,注册时须通过会议系统及邮件发送学生证复印件等进行验证; ** 中国化学会会员代表注册时,需要提供有效会员证件和证件编码。

会议时间及地点

- 2019 年 4 月 20 日: 报到 2019 年 4 月 21 日 ~ 23 日: 召开会议
- 地点: 上海光大会展中心国际大酒店
- 联系方式
- 梁 振: 13624989118 邮箱: liangzhen@dicp.ac.cn (会务事宜请联系)
- 高明霞: 13764595930 邮箱: chrom_sh@fudan.edu.cn (参展展商请联系)
- 王 婷: 13700088205 邮箱: conference2019@yeah.net (注册/缴费/投稿请联系)