

**PHÂN TÍCH HỆ PROTEIN HUYẾT THANH BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYPE 2****Nguyễn Thị Minh Phương<sup>\*</sup>, Phạm Đức Đan, Nguyễn Bích Nhi, Phan Văn Chi**Viện Công nghệ sinh học, <sup>(\*)</sup>minhphuongibt@gmail.com

**TÓM TẮT:** Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp biến tính nhiệt, sắc ký ái lực và kết loại albumin và Ig để phân đoạn protein huyết thanh bệnh nhân đái tháo đường type 2 (ĐTĐT2). Hỗn hợp protein sau khi phân đoạn được thủy phân bằng enzyme trypsin, phân tích và nhận dạng bằng sắc ký lỏng 2 chiều kết nối khối phổ (2DnanoLC ESI-MS/MS). Các protein nhận dạng trong kết quả tìm kiếm, được định danh, phân loại dưới sự hỗ trợ của các công cụ sinh tin học (ID mapping, cơ sở dữ liệu trên Swissprot...) để tiến tới xây dựng cơ sở dữ liệu hệ protein huyết thanh. Kết quả đã xác định được 468 glycoprotein, 1110 protein của phân đoạn nhiệt và 4044 protein tổng số trong 30 mẫu huyết thanh bệnh nhân ĐTĐT2 đã nghiên cứu. Đồng thời, đã phát hiện được 26 protein liên quan đến sự phát sinh và phát triển của bệnh ĐTĐT2.

*Từ khóa:* Cơ sở dữ liệu, đái tháo đường type 2, hệ protein, huyết thanh người, khối phổ.

**MỞ ĐẦU**

Huyết thanh là một thành phần quan trọng trong máu, chứa các protein có nguồn gốc và chức năng khác nhau, tác động lên nhiều cơ quan và quá trình sinh học trong cơ thể. Bất kỳ một thay đổi nào liên quan đến bệnh lý cũng được phản ánh đa dạng và đầy đủ trong hệ protein huyết thanh [2]. Vì vậy, việc sử dụng huyết thanh cho mục đích nghiên cứu là cách tiếp cận hợp lý và hứa hẹn sẽ mang lại nhiều thông tin bổ ích để phát triển công tác nghiên cứu, chẩn đoán, chữa trị các bệnh khác nhau như: chứng viêm nhiễm, ung thư và bệnh trao đổi chất trong đó có đái tháo đường type 2 (ĐTĐT2) [1].

Tại Việt Nam, những nghiên cứu trên proteome huyết thanh bệnh ĐTĐT2 đã và đang được triển khai theo nhiều hướng tiếp cận khác nhau. Bên cạnh việc phân tích mức độ biểu hiện của hệ protein huyết thanh bệnh ĐTĐT2 ở các giai đoạn khác nhau, chúng tôi còn tiến hành xác định nhận dạng toàn bộ hệ protein để có cái nhìn tổng thể nhất về proteome huyết thanh của bệnh ĐTĐT2 nói chung cũng như các bệnh lý khác. Bởi vì mỗi sự thay đổi bất thường về số lượng, thành phần và nồng độ của protein huyết thanh sẽ là cơ sở cho việc phát hiện các chỉ thị phân tử sinh học (biomarker) đối với mỗi trạng thái bệnh lý [9]. Trong nghiên cứu này, phương pháp biến tính nhiệt, sắc ký ái lực và kết loại albumin và Ig đã được sử dụng để phân đoạn protein huyết thanh. Hỗn hợp protein sau khi phân đoạn được thủy phân bằng enzyme

trypsin, phân tích và nhận dạng bằng sắc ký lỏng 2 chiều kết nối khối phổ (2DnanoLC ESI-MS/MS). Kết quả đã xác định được 468 glycoprotein, 1110 protein của phân đoạn nhiệt và 4044 protein tổng số trong huyết thanh bệnh nhân ĐTĐT2. Trong đó, đã xác định được 26 protein liên quan đến sự phát sinh và phát triển của bệnh ĐTĐT2

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU****Vật liệu**

Huyết thanh được thu từ máu nguyên của bệnh nhân ĐTĐT2 (30 mẫu được lựa chọn từ 100 mẫu) ở các giai đoạn bệnh, lứa tuổi khác nhau được tuyển chọn và cung cấp bởi Bệnh viện Nội tiết Trung ương, bảo quản ở -80°C và già đông ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Các hóa chất sử dụng cho sắc ký lỏng nano đều được cung cấp bởi các hãng có uy tín, có độ tinh sạch cần thiết cho sinh học phân tử. Hệ thống máy khối phổ QSTAR<sup>®</sup>XL MS/MS (AppliedBiosystem/MDS Sciex, Toronto, Canada) cùng với các trang thiết bị khác của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

**Phương pháp nghiên cứu***Phân đoạn protein trong huyết thanh*

Thu nhận glycoprotein bằng sắc ký ái lực: Hỗn hợp glycoprotein trong huyết thanh được thu nhận qua cột sắc ký ái lực với chất giá Sepharose-4B gắn lectin ConA theo quy trình

đã được mô tả của Vũ Minh Thiết và nnk. (2006) [10].

Phân đoạn nhiệt protein bằng phương pháp biến tính nhiệt: Huyết thanh được trộn với đệm cân bằng (EDTA 20 mM, Tris HCl pH 8,9 0,2 M, polyethylene glycol (PEG) 6000 7%) theo tỉ lệ 1:1. Hỗn hợp huyết thanh và đệm được ủ và lắc 10 phút ở 98°C sau đó để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Mẫu được ly tâm 10 phút với tốc độ 12000 vòng/phút để thu giữ phần dịch nổi. Nồng độ protein trong mẫu được xác định bằng phương pháp Bradford trước khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Kít loại Albumin và Ig: Dịch huyết thanh được loại albumin (HSA) và  $\gamma$ -Immuglobulin (IgG) bằng Aurum serum protein mini Kit (BioRad, Mỹ). Kít gồm có cột MicroSpin là hỗn hợp của Affi-Gel Blue và Affi-Gel protein A. Huyết thanh được hoà vào đệm Aurum và đưa lên cột MicroSpin, phần không bám cột được thu lại bằng ly tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút.

*Thủy phân hỗn hợp protein bằng enzyme trypsin*

Hỗn hợp protein trong huyết thanh sau khi phân đoạn được làm khô và khử cầu nối disulfide bằng dung dịch khử Dithiothreitol 5 mM ở 56°C trong 1 giờ, alkyl hoá gốc cysteine bằng Iodoacetamide 20 mM ở nhiệt độ phòng, không ánh sáng trong 1 giờ, sau đó thủy phân bằng enzyme trypsin (Sigma, Mỹ) với tỷ lệ enzyme/protein bằng 1/50 ở 37°C trong 16 giờ. Hỗn hợp peptide được làm khô ở nhiệt độ phòng trong máy Speedvac và hòa với dung dịch acid formic (FA) 0,1% để ngừng phản ứng.

*Nhận dạng protein trong huyết thanh bằng sắc ký lỏng hai chiều kết nối khối phổ*

Hỗn hợp peptide sau khi thủy phân được phân tích qua hệ thống sắc ký lỏng hai chiều trên cột sắc ký trao đổi cation (SCX) ở chiều thứ nhất và cột ngược pha (RP-C18) ở chiều thứ hai. Cột ngược pha C18 được gắn vào đầu đưa mẫu Silica Tip kết nối với máy khối phổ QSTAR<sup>®</sup>XL bằng nguồn Nano-ESI (Nano-Electrospray ionization). Phổ khối MS/MS được phân tích bằng phần mềm Mascot v1.8. Cơ sở dữ liệu được dùng để tìm kiếm trong Mascot là NCBIInr, một cơ sở dữ liệu protein toàn diện với trên 7 triệu trình tự khác nhau.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân đoạn hệ protein trong huyết thanh người

Như đã biết, có rất nhiều mô, cơ quan đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của bệnh ĐTĐT2 và các hội chứng của chúng. Để xác định được đặc điểm sinh lý của quá trình gây bệnh tạo nên sự phát triển bệnh và tìm ra các liệu pháp để chữa trị thì sẽ phải nghiên cứu nhiều hơn nữa. Đặc biệt, phân tích đặc điểm các protein đặc hiệu mô, tế bào dưới các điều kiện giống như ĐTĐ và kích thích của môi trường khác nhau dẫn tới sự phát triển của ĐTĐ; phân tích các mẫu từ các bệnh nhân ĐTĐ do kháng insulin hoặc sai hỏng trong quá trình điều tiết đường và so sánh chúng với các cá thể khỏe mạnh. Có nhiều mô và cơ quan quan trọng liên quan đến ĐTĐ như: tuyến tụy, gan, mô cơ, mô mỡ, thận, nước tiểu, tim... tuy nhiên, so sánh với các mô đã trình bày ở trên, huyết thanh có nhiều thuận lợi cho nghiên cứu điều trị bệnh. Bệnh nhân có thể cung cấp mẫu máu tốt hơn so với sử dụng các mô sinh thiết. Hơn nữa, huyết thanh là một nguồn cung cấp giá trị trong phân tích proteomic, đây là nơi xảy ra các quá trình sinh lý và bệnh lý trong cơ thể. Tuy nhiên, hệ protein trong huyết thanh rất phức tạp gồm nhiều protein hàm lượng lớn thường gây cản trở cho việc phân tích và nhận dạng các protein có nồng độ thấp hơn nên việc phân đoạn protein để nghiên cứu là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng ba phương pháp để phân đoạn protein: phương pháp biến tính nhiệt, sắc ký ái lực và kít loại albumin và IgG. Nồng độ protein sau khi phân đoạn được xác định bằng phương pháp Bradford và điện di trên gel SDS-PAGE 12,6% (hình ảnh điện di không trình bày ở đây). Kết quả cho thấy trong thành phần protein thu được, nồng độ của albumin và một số protein hàm lượng lớn khác đã giảm đáng kể, tạo điều kiện thuận lợi cho việc nghiên cứu và nhận diện những protein có nồng độ thấp.

### Nhận dạng, xây dựng cơ sở dữ liệu hệ protein huyết thanh bệnh nhân ĐTĐT2

*Xác định và nhận dạng protein trong huyết thanh bệnh ĐTĐT2 bằng sắc ký lỏng hai chiều kết nối khối phổ*

Hỗn hợp protein thu được sau khi phân đoạn được kết tủa bằng acetone lạnh với tỷ lệ protein:acetone/1:4 về thể tích, để qua đêm ở  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sau đó hỗn hợp protein được thủy phân bằng enzyme trypsin và phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hai chiều nano kết nối khối phổ dưới sự hỗ trợ của phần mềm Mascot v1.8 trên cơ sở dữ liệu NCBI nr với hơn 7 triệu trình tự khác nhau. Chỉ những protein có điểm số của ion peptide lớn hơn 35 mới được xác định. Trong tổng số 30 mẫu bệnh ĐTĐT2 được phân tích và nhận dạng, chúng tôi đều thu được có từ 100-999 protein trong mỗi mẫu huyết thanh nghiên cứu, tùy thuộc vào từng phương pháp phân đoạn protein. Các protein nhận dạng được bao gồm các loại immunoglobulin, các thành phần bổ thể, protein liên kết, enzyme, thụ thể và một số protein khác, có sự phù hợp về hầu hết các thành phần cơ bản trong huyết thanh.

#### *Xây dựng ngân hàng dữ liệu hệ protein huyết thanh bệnh ĐTĐT2*

Hỗn hợp protein tổng thể, protein bền nhiệt và glycoprotein trong huyết thanh của 30 mẫu bệnh ĐTĐT2 sau khi nhận dạng sẽ được loại bỏ những protein trùng nhau (về tên protein và số đăng ký trên NCBI nr), chúng tôi đã xác định được 942 glycoprotein, 1906 protein trong phân đoạn nhiệt và 5451 protein tổng thể. Sau đó, những protein này tiếp tục được sàng lọc theo nguyên tắc chỉ những protein có số mảnh peptide bắt cặp  $\geq 2$  và tần số xuất hiện ở các mẫu  $\geq 2$  mới được xác định là protein trong hỗn hợp huyết thanh nghiên cứu. Đồng thời, dưới sự

hỗ trợ của công cụ ID mapping và cơ sở dữ liệu glycoprotein của SwissProt [14, 15], cơ sở dữ liệu hệ protein huyết thanh bệnh ĐTĐT2 ở Việt Nam đã được xây dựng với 468 glycoprotein, 1110 protein bền nhiệt và 4044 protein tổng số trong huyết thanh của 30 mẫu bệnh ĐTĐT2 (bao gồm cả 3 giai đoạn bệnh). Cơ sở dữ liệu được thể hiện dưới dạng bảng dữ liệu được sắp xếp như sau đối với mỗi protein: số đăng ký của protein, tên protein được sắp xếp theo thứ tự ABC, số đăng ký Uniprot của protein (được link với trang web có đầy đủ các thông số và kết quả nghiên cứu về protein này), chức năng của protein, vị trí của protein trong tế bào, các biến đổi của protein (nếu có) và liên quan đến sự phát sinh, phát triển của bệnh, đặc biệt là ĐTĐT2 và các bệnh chuyển hóa khác (nếu có).

Như vậy, hệ glycoprotein (468 protein) chiếm số lượng ít so với hệ protein tổng thể với 4044 protein. Số liệu này hoàn toàn hợp lý, bởi vì chỉ một phần protein được tạo ra trong tế bào thực hiện các cải biến sau dịch mã trong đó có quá trình glycosyl hóa. Kết quả 4044 protein tổng thể được nhận dạng cũng phù hợp với những công bố năm 2005 của 35 phòng thí nghiệm trong dự án proteome huyết tương người của HUPO (Human Proteome Organization), với số lượng protein là 3020 và một công bố không chính thức năm 2009, con số này là khoảng 5000 protein trong huyết thanh. Đây là những dẫn liệu đầu tiên về cơ sở dữ liệu hệ protein huyết thanh bệnh ĐTĐT2 ở Việt Nam.

*Bảng 1.* Tỷ lệ các protein liên quan đến bệnh ĐTĐT2 và các bệnh chuyển hóa khác trong hệ protein huyết thanh bệnh nhân ĐTĐT2

Cơ sở dữ liệu	Protein liên quan đến bệnh ĐTĐT2			Protein liên quan đến các bệnh chuyển hóa khác		
	Số lượng protein	Tổng số protein	Tỷ lệ	Số lượng protein	Tổng số protein	Tỷ lệ
Hệ protein tổng thể	22	4044	0,54%	66	4044	1,63%
Hệ glycoprotein	8	468	1,71%	7	468	1,50%
Hệ protein bền nhiệt	18	1110	1,67%	25	1110	2,25%

Bên cạnh đó, trong cả 3 cơ sở dữ liệu hệ protein huyết thanh bệnh ĐTĐT2, chúng tôi đã phân tích và xác định được nhiều protein có liên quan đến tiến trình phát triển của bệnh ĐTĐT2

và các bệnh chuyển hóa khác thường là biến chứng của ĐTĐT2 như tim mạch, béo phì... Trong đó, hệ protein tổng thể có 22 protein liên quan đến bệnh ĐTĐT2, chiếm 0,54% và 66

protein liên quan đến một số bệnh chuyển hóa khác, chiếm 1,63%. Còn hệ glycoprotein lần lượt là 1,71% và 1,51%, hệ protein bền nhiệt là 1,67% và 2,25% (bảng 1).

Như vậy, tỷ lệ protein liên quan đến bệnh ĐTĐT2 ở hệ glycoprotein là cao nhất, chiếm 1,71% và thấp nhất là hệ protein tổng thể với 0,54%. Tỷ lệ protein liên quan đến các bệnh chuyển hóa khác thì cao nhất ở hệ protein bền

nhiệt và thấp nhất ở hệ glycoprotein (bảng 1).

Trong số những protein đã được nhận dạng (ở cả hệ glycoprotein, hệ protein bền nhiệt và hệ protein tổng thể), chúng tôi đã phân tích và xác định được 26 protein có liên quan đến tiến trình phát triển của bệnh ĐTĐT2. Đáng chú ý, 10 protein chỉ thấy xuất hiện trong kết quả phân tích của mẫu huyết thanh bệnh nhân ĐTĐT2 mà không thấy trong mẫu người bình thường (bảng 2).

Bảng 2. Số lượng protein có liên quan đến tiến trình phát triển của bệnh đái tháo đường type 2

S TT	Số đăng ký trên NCBI nr	Tên protein	Số mảnh peptide bắt cặp	Vị trí	Chức năng	Biến đổi sau dịch mã
1	gi 556192	51C protein	10	Màng tế bào	Thụ thể, enzyme	Photphoryl, glycosyl hóa
2	gi 4504661	Interleukin 1 receptor accessory protein isoform 1	4	Tế bào chất	Liên kết protein	Photphoryl hóa, acetyl hóa
3	gi 11225607	Interleukin 1 receptor accessory protein-like 2	17	Màng	Thụ thể	Glycosyl hóa
4	gi 2506805	Laminin subunit alpha-2 precursor	18	Tiểu phần riboxom	Thụ thể	Glycosyl hóa
5	gi 189650	Plasma cell membrane glycoprotein PC-1	5	Màng tế bào	Hoạt tính enzyme	Glycosyl hóa
6	gi 7549809	Plastin 3	4	Ngoại bào	Liên kết ion canxi	Liên kết disulfide
7	gi 52000783	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A	6	Tế bào chất	Hoạt tính enzyme	Photphoryl hóa
8	gi 28412326	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta-2a	10	Nhân	Hoạt tính enzyme, thụ thể	Photphoryl hóa
9	gi 1480871	Sulfonylurea receptor	9	Ty thể	Enzyme oxi hóa khử	Acetyl hóa
10	gi 4323171	Type 1 diabetes autoantigen ICA12	27	Nhân, lưới nội chất	Hoạt tính enzyme	Photphoryl hóa

51C protein (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2): đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển độ nhạy của insulin. Kaisaki et al. (2004) [4] cũng đã khẳng định những biến đổi của gen mã hóa cho 51C protein thật sự liên quan đến bệnh ĐTĐT2. Interleukin 1 receptor accessory protein isoform: Claus M et al. (2007) [3] chứng minh rằng, sự biểu hiện đối kháng của interleukin 1 receptor giảm trong đảo tụy của bệnh nhân ĐTĐT2 và nồng độ glucose cao kích thích sản xuất interleukin 1  $\beta$  trong tế bào  $\beta$  của tuyến tụy

dẫn đến bài tiết insulin kém và giảm sự phát triển của tế bào. Sulfonylurea receptor (SUR): Thụ thể SUR là một trong hai tiểu phần thuộc họ ATP-binding cassette (ABC). SUR1 là dưới đơn vị chức năng của ATP sensitive potassium channel ( $K_{ATP}$ ) của tế bào beta.  $K_{ATP}$  đóng vai trò quan trọng quá trình tiết insulin. Vì vậy, những biến đổi xảy ra ở protein này có thể ảnh hưởng đến quá trình kháng insulin, một trong những nguyên nhân quan trọng dẫn đến bệnh ĐTĐT2 [6].

Laminin subunit alpha-2 precursor: là một

protein tìm thấy trong chất nền nội bào, mỗi phần của protein này được coi là tiền chất để xây dựng các cơ quan nội bào. Nghiên cứu gần đây của Tae-sun H et al. (1999) chứng minh rằng sự thay đổi nồng độ của protein này cũng có liên quan đến sự xuất hiện của bệnh ĐTĐT1 và ĐTĐT2 [8]. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta2 (PPAR $\gamma$ ): Các thụ thể hoạt hóa sự sinh sản nhanh của peroxisome (PPARs) là các yếu tố dịch mã, điều khiển hoạt động của gen, đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa nồng độ glucose và lipid.

Chất kích động PPAR $\gamma$  thường được sử dụng nhiều trong điều trị bệnh ĐTĐ để cải thiện độ nhạy insulin và để điều hòa đường ở mức bình thường, thông qua việc cải thiện quá trình tiết insulin [12]. Plasma cell membrane glycoprotein PC-1: là một glycoprotein được biểu hiện ở nhiều mô và ức chế tín hiệu insulin ở mức độ thụ thể. PC-1 ở các mô đích insulin đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển kháng insulin của bệnh nhân béo phì và ĐTĐT2.

Đa hình của PC-1 cũng được chứng minh là có liên quan đến sự kháng insulin, một trong những nguyên nhân chính dẫn đến ĐTĐT2 [7]. Bile salt-activated lipase: là một protein được mã hóa bởi gen *CEL* trong cơ thể người. Khuyết tật trong *CEL* là một nguyên nhân của bệnh tiểu đường khởi phát của trẻ loạn rối loạn chức năng ngoại tiết 8 (MODY8), còn được gọi là bệnh tiểu đường và rối loạn chức năng tuyến tụy ngoại tiết [5]. Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3: là một enzyme ở cơ thể người mã hóa bởi gen *EIF2AK3*. Khuyết tật trong *EIF2AK3* là nguyên nhân của hội chứng Wolcott-Rallison (WRS), còn được gọi là loạn sản epiphyseal với hội chứng ĐTĐ khởi phát sớm [13]. Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A (PPRS3): Đây là một enzyme thuộc nhóm kinase, Xia J et al. (1998) chứng minh rằng đa hình của PPRS3 liên quan đến kháng insulin và ĐTĐT2 [11].

## KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp phân đoạn protein kết hợp với sắc ký lỏng hai chiều kết nối khối

phổ, đã phân tích và nhận dạng được 468 glycoprotein, 1110 protein trong phân đoạn nhiệt và 4044 protein tổng số từ 30 mẫu huyết thanh bệnh nhân ĐTĐT2. Trong đó, đã xác định được 26 protein có liên quan đến sự phát sinh, phát triển của bệnh ĐTĐT2 và 10 protein chỉ thấy xuất hiện trong kết quả phân tích của mẫu huyết thanh bệnh nhân ĐTĐT2 mà không thấy trong mẫu người bình thường.

**Lời cảm ơn:** Công trình được đề tài KC 04-14/06-10 và Đề tài Độc lập cấp Nhà nước số 03/2011 PTNTĐ/HĐ-ĐTĐL, phòng Thí nghiệm trọng điểm Quốc gia, Bộ Khoa học và Công nghệ tài trợ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anderson N. L., Anderson N. G., 2002. The human plasma proteome, history, character and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1: 845-867.
2. Anderson N. L., Polanski M., Rembert P., Gatlin T., Tirumalai R. S., Conrads T. P., Veenstra T. D, Adkins J. N., Pounds J. G., Fagan R., Anna L., 2004. The Human Plasma Proteome-A Nonredundant List Developed by Combination of Four Separate Sources. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3: 311-326.
3. Claus M., Larsen M. D., Mirjam Faulenbach M. D., Allan Vaag M. D., Volund A., Jan A., Ehses., Seifert B., Thomas Mandrup-Poulsen M. D., 2007. Interleukin-1-Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 356: 1517-1526.
4. Kaisaki P. J., Delepine M., Woon P. Y., Sebag-Montefiore L., Wilder S. P., Menzel S., Vionnet N., Marion E., Riveline J. P., Charpentier G., Schurmans S., Levy J. C., Lathrop M., Farrall M., Gauguier D., 2004. Polymorphisms in type II SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (INPL1, SHIP2) are associated with physiological abnormalities of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 53: 1900-1904.
5. Raeder H., Johansson S., Holm P. I., Haldorsen I. S., Mas E., Sbarra V., Neramoen I., Grevle L., Bjoerkhaug L., Sagen J. V., Aksnes L., Soevik O., Lombardo D.,

- Molven A., 2006. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Njoelstad P. R. Nat. Genet.*, 38: 54-62.
6. Reis A. F., Velho G., 2002. sulfonylurea receptor-1: genetic and metabolic evidences for a role in the susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.*, 28: 14-19.
  7. Stefanovic V., Antic S., 2004. Plasma cell membrane glycoprotein 1 (PC-1): a marker of insulin resistance in obesity, uremia and diabetes mellitus. *Clin. Lab.*, 50(5-6): 271-278.
  8. Tae-sun H., Jeffrey L., Barnes., Jennier L., and et al., 1999. Regulation of Renal Laminin in Mice with Type II Diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10: 1931-1939.
  9. Tirumalai R. S., Chan K., Prieto D. A., Issaq H. J., Thomas P., Conrads D. V., 2004. Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome. SAIC-Frederick Inc., Laboratory of Proteomics and Analytical Technology, Mass Spectrometry Center, National Cancer Institute at Frederick, P. O. Box B, Frederick, MD, 21702-1201.
  10. Vũ Minh Thiết, Trần Thế Thành, Nguyễn Thị Minh Phương, Phan Văn Chi, 2006. Phân tích các glycoprotein trong huyết thanh người. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 4(1): 13-22.
  11. Xia J., Scherer S. W., Cohen P. T. W., Majer M., Xi T., Norman R. A., Knowler W. C., Bogardus C., Prochazka M., 1998. A common variant in PPP1R3 associated with insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 47:1519-1524.
  12. Yael R., Yoav S. M., Guy C., Evgenia A., Arie G., Juergen E., Bart S., Michel G., Shlomo S., 2010. The Natural Protective Mechanism Against Hyperglycemia in Vascular Endothelial Cells: Roles of the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxydodecadial and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\delta$ . *Diabetes*, 59(4): 808-818.
  13. [Http://www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).
  14. [Http://www.uniprot.org/mapping](http://www.uniprot.org/mapping).
  15. [Http://us.expasy.org/sprot](http://us.expasy.org/sprot).

## ANALYSIS OF SERUM PROTEOME FROM TYPE 2 MELLITUS PATIENT

Nguyen Thi Minh Phuong, Pham Duc Dan, Nguyen Bich Nhi, Phan Van Chi

Institute of Biotechnology, VAST

### SUMMARY

Serum is an exceptional and special proteome in many respects. It contains a lot of essential information for the study and disease diagnosis. However, the analysis of serum is analytically challenging due to the high dynamic concentration range of constituent protein species. Therefore, the fractionation of serum proteome is very necessary. In this study, a combination of different methods: depletion by Aurum Serum Protein MiniKit, thermostable fraction, affinity chromatography, was used to separate proteins from type 2 diabetes mellitus (T2DM) serum. The protein fractions were then digested by trypsin and analyzed by 2DnanoESI-LC-MS/MS. The proteins were named, classified and used to built database by using bioinformatics tools including ID mapping, Swiss-Prot.... It was shown that 468 glycoproteins, 1110 proteins in thermostable fraction, and totally 4044 proteins from 30 T2DM serum samples were identified. Moreover, 26 proteins were found positively associated with T2DM.

*Keywords:* 2DnanoLC ESI-MS/MS, database, human serum, proteome, type 2 diabetes mellitus.

*Ngày nhận bài:* 25-8-2011