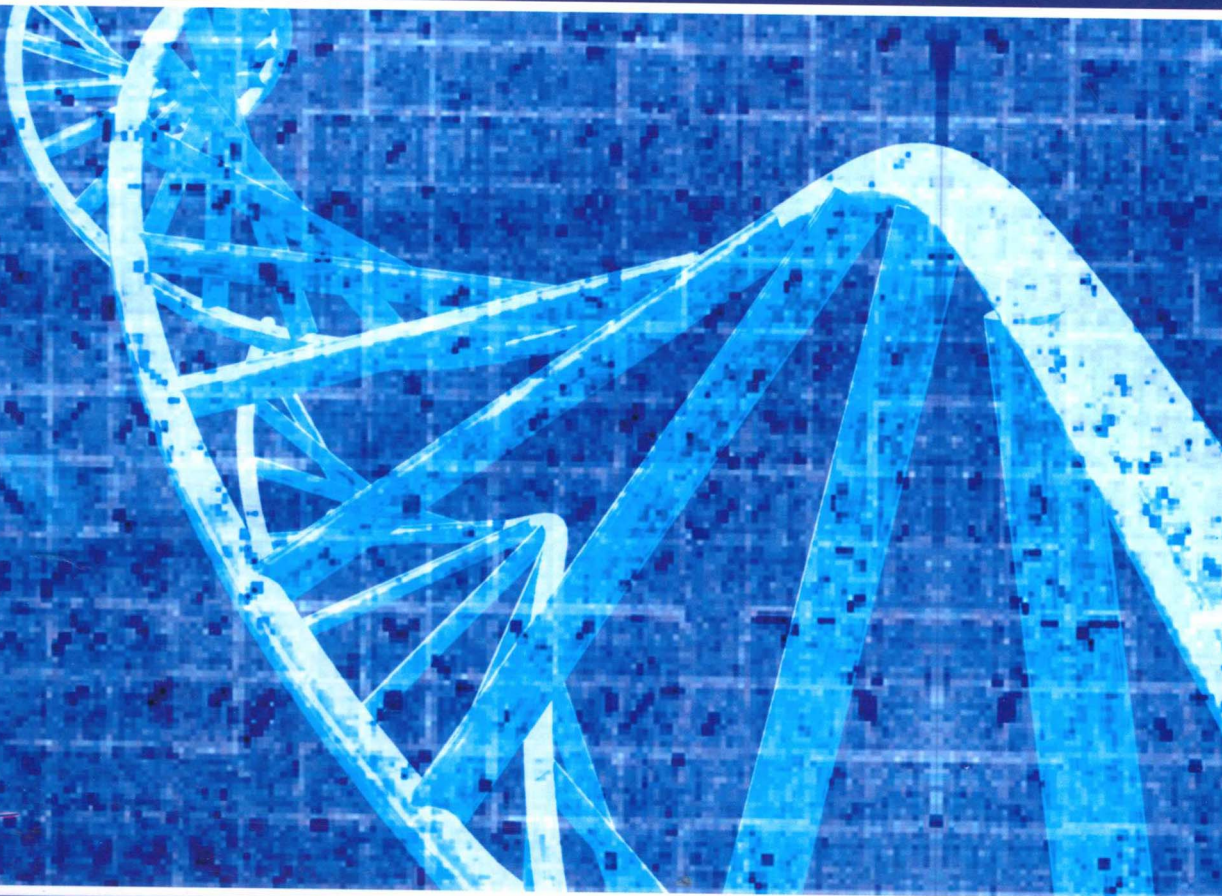




营养基因组学

主编 蒋与刚 高志贤



科学出版社



营养基因组学

中国医药出版社



中国医药出版社

天津市科协自然科学学术专著基金资助出版

营养基因组学

主 编 蒋与刚 高志贤

科 学 出 版 社

北 京

天津市科协自然科学学术专著基金资助出版

内 容 简 介

营养组学是后基因组时代营养食品科学与组学交叉形成的一个新的分支学科,包括营养基因组学、营养转录组学、营养蛋白质组学、营养代谢组学、营养系统生物学等,主要从分子水平和人群水平研究膳食营养与基因的交互作用及其对人类健康的影响,进而建立基于个体基因组结构特征的膳食干预方法和营养保健措施,实现个体化营养。本书在阐述组学技术原理与方法的基础上,重点介绍组学技术在营养科学、食品科学领域应用的最新进展,旨在帮助读者了解营养组学的研究背景、研究思路、基本方法和最新成果。

本书可供营养学、食品卫生学、预防医学、生物化学、分子生物学、生物技术等学科的科研工作者、研究生及医学院校有关专业的教师和高年级学生参考,对于综合性院校、农业院校相关专业的人员及科研管理、企业研发部门的人员也有参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

营养基因组学 / 蒋与刚,高志贤主编. —北京:科学出版社,2012.5

ISBN 978-7-03-034182-2

I. 营… II. ①蒋… ②高… III. 营养学-基因组-研究 IV. R151

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 085781 号

责任编辑:肖 锋 李 植 / 责任校对:包志虹

责任印制:刘士平 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年5月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012年5月第一次印刷 印张:22 1/2 插页:2

字数:531 000

定价:98.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《营养基因组学》编写人员

主 编 蒋与刚 高志贤

编写人员 (按姓氏汉语拼音排序)

蔡辉国 中国医学科学院血液病研究所
陈照立 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
程道梅 成都医学院
房恒通 吉林大学
高蔚娜 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
高志贤 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
郭长江 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
胡红芳 第二炮兵卫生防疫防护队
蒋与刚 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
宁保安 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
李培兵 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
刘 静 四川大学
刘 楠 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
牛 超 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
庞 伟 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
沈 慧 第二军医大学
苏 璞 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
王红霞 国家生物医学分析中心
王军军 中国农业大学
吴蕴棠 天津医科大学
颜贤忠 国家生物医学分析中心
杨红澎 天津农学院
姚 伟 总参管理保障部卫生防疫队
周焕英 军事医学科学院卫生学环境医学研究所
朱胜坚 军事医学科学院卫生学环境医学研究所

序

营养组学(营养基因组学、营养转录组学、营养蛋白质组学、营养代谢组学)是后基因组时代营养食品科学与组学交叉形成的一个新的分支学科,代表了营养学学科发展的前沿。目前,该领域国内外研究非常活跃,着力从分子水平和人群水平研究膳食营养与基因的交互作用及其对人类健康的影响,建立基于个体基因组结构特征的膳食干预方法和营养保健措施,实现个体化营养。

本书由蒋与刚、高志贤两位教授主编,组织了20多位在该领域一线工作的专家和青年科技骨干编写,详细介绍了常用的组学技术,并重点阐述了营养组学领域的国内外研究进展,体现了本领域的最新研究成果和发展动态,具有较高的学术价值和应用价值,对今后我国营养组学研究的进一步开展也有积极的推动作用和指导意义。

该书有三个特点:①编写内容上注重组学技术的基本理论与实际应用相结合;研究进展与研究实例相结合。②充分吸收了各位专家在国家科技计划、国家自然科学基金项目资助下完成的最新科研成果。③编写者以中青年一线科研骨干为主,科研思路活跃,充满活力。

我们相信,本书的出版必将进一步促进我国分子营养学、营养组学等相关领域的发展,推动营养与食品科学事业的发展。

顾景范

2011年9月

前 言

伴随着基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学等各种组学技术的出现及发展,营养基因组学(nutrigenomics)应运而生,并迅速成为营养学研究的新前沿。营养基因组学是指利用结构基因组学提供的信息,采用高通量的功能基因组学技术研究个体对膳食反应的科学。其主要研究营养素或膳食成分在特定时间对机体细胞、组织或器官的转录组、蛋白质组和代谢组的影响。通过营养基因组学研究,我们可以探寻营养素、食物活性成分与基因的相互作用,确认个体对营养素的反应,建立基于个体基因组结构特征的膳食干预方法和营养保健措施,使营养学的研究成果更有效地应用于疾病的预防,促进人类健康。

我们从2000年涉足这一领域,取得了点滴成绩,有了一些感悟和体会。一方面,希望通过本书对该领域的国内外研究概况与进展进行全面的回顾与总结,与诸位同仁分享;另一方面,鉴于营养基因组学研究在我国起步晚、底子薄的现状,本书想为有志于该领域研究的同事提供一些帮助和启迪,为推动我国营养基因组学研究略尽绵薄之力。

本书共分十二章。第一章是营养基因组学概论;第二至五章分别介绍基因组学技术、蛋白质组学技术、代谢组学技术和生物信息学技术;第六至八章分别阐述基因组学技术、蛋白质组学技术和代谢组学技术在营养学研究中的应用;第九至十一章分别阐述基因组学技术、蛋白质组学技术及代谢组学技术在食品科学研究中的应用;第十二章是营养基因组学研究展望,重点介绍个体化营养、营养系统生物学。为增加读者对营养组学研究的兴趣和实际认识,特别在第六至十一章中增加了“研究实例”一节,所列研究实例均源于作者的课题研究。另外,还特地设计了四个附录,分别是组学常用词汇表、组学常见缩略词表、常用组学网址荟萃及营养组学重要国际组织、会议、期刊一览表等,以期为读者提供更丰富的相关信息和工具。

我们特别高兴地邀请到我国著名营养学家、原中国营养学会理事长顾景范教授为本书作序;同时也非常感谢各位作者的辛勤劳动。李君文、李勇、吴伟宗、孙寿丹、宋楠对本书的编辑也有贡献,在此表示感谢!

衷心感谢天津市科协自然科学学术专著基金对本书出版给予的大力资助!

科学家牛顿曾谦逊地说:“我好像是一个在海边玩耍的孩子,不时为拾到比通常更光滑的石子或更美丽的贝壳而欢欣鼓舞,而展现在我面前的是完全未探明的真理之海。”如果本书能为读者探索营养基因组学研究的“真理之海”提供一方路径、一只船桨,甚至一盏航灯,那我们将感到无比地欣慰。

在本书即将付梓之际,我们的心情十分复杂。一方面是高兴与欣慰,毕竟本书从策划到出版历经5年有余,终于可以和读者见面了。另一方面是惶恐与不安,因为作者水平所限,难免有疏漏,甚至错误之处,敬请广大读者批评指正。

编 者

2011年9月

目 录

第一章 营养基因组学概论	(1)
第一节 功能基因组学技术概述.....	(1)
第二节 营养基因组学研究概况.....	(7)
第二章 基因组学技术	(17)
第一节 概述	(17)
第二节 DNA 多态性分析技术.....	(19)
第三节 基因表达的差异显示技术	(24)
第四节 基因敲除和 RNAi 技术	(29)
第五节 基因芯片技术	(41)
第六节 悬浮基因芯片技术	(48)
第三章 蛋白质组学技术	(56)
第一节 基于双向电泳分离的蛋白质组技术	(56)
第二节 基于二维液相色谱分离的蛋白质组技术	(67)
第三节 蛋白芯片技术	(68)
第四节 悬浮蛋白芯片技术	(78)
第五节 蛋白质组技术的发展与未来	(81)
第四章 代谢组学技术	(84)
第一节 代谢组学的发展历程	(84)
第二节 代谢组学的研究对象及方法	(86)
第三节 代谢组学数据的处理和分析	(90)
第四节 代谢组学技术的应用	(92)
第五节 代谢组学研究的问题与展望	(96)
第五章 生物信息学技术	(103)
第一节 生物信息学的兴起与基本概念.....	(104)
第二节 生物信息学的研究内容与方法.....	(104)
第三节 生物信息学技术在生物医学研究中的应用.....	(112)
第四节 生物信息学研究展望.....	(113)
第六章 基因组学技术在营养学研究中的应用	(115)
第一节 基因组学技术在营养素功能研究中的应用.....	(115)
第二节 基因组学技术在营养与疾病研究中的应用.....	(131)
第三节 mRNA 差异显示技术在营养学研究中的应用	(144)
第四节 基因多态性分析技术在营养学研究中的应用.....	(148)

第五节	基因芯片技术在营养学研究中的应用	(156)
第六节	研究实例	(160)
第七章	蛋白质组学技术在营养学研究中的应用	(177)
第一节	概述	(177)
第二节	蛋白质组学技术在基础营养研究中的应用	(178)
第三节	蛋白质组学技术在营养与疾病研究中的应用	(180)
第四节	蛋白质组学技术在植物化学物质功能研究中的应用	(181)
第五节	营养蛋白质组学研究展望	(182)
第六节	研究实例	(183)
第八章	代谢组学技术在营养学研究中的应用	(193)
第一节	代谢组学技术在基础营养研究中的应用	(193)
第二节	代谢组学技术在营养与疾病研究中的应用	(200)
第三节	代谢组学技术在其他营养相关研究领域中的应用	(203)
第四节	营养代谢组学研究展望	(206)
第五节	研究实例	(207)
第九章	基因组学技术在食品科学研究中的应用	(224)
第一节	基因组学技术在食品安全研究中的应用	(224)
第二节	DNA 芯片技术在食品安全研究中的应用	(230)
第三节	研究实例	(235)
第十章	蛋白质组学技术在食品科学研究中的应用	(257)
第一节	蛋白质组学技术在食品科学研究中的应用	(257)
第二节	蛋白芯片技术在食品安全研究中的应用	(263)
第三节	研究实例	(265)
第十一章	代谢组学技术在食品安全研究中的应用	(276)
第一节	概述	(276)
第二节	代谢组学技术在动物源性食品兽药残留研究中的应用	(277)
第三节	研究实例	(285)
第十二章	营养基因组学研究展望	(294)
第一节	营养基因组学研究面临的挑战与机遇	(294)
第二节	营养基因组学与个体化营养	(296)
第三节	营养系统生物学研究的目的与策略	(304)
第四节	营养基因组学研究展望	(308)
附录一	组学常用词汇表	(312)
附录二	组学常见缩略词表	(327)
附录三	组学网址荟萃	(332)
附录四	营养组学重要国际组织、会议、期刊	(336)
彩图		

第一章 营养基因组学概论

基因组学(genomics)是 Thomas Roderick 于 1986 年提出的,是指应用 DNA 制图、测序及生物信息学技术,分析生命体全部基因组的结构及功能。基因组学的研究内容包括结构基因组学(structural genomics)和功能基因组学(functional genomics),前者是对基因组分析的早期阶段,以建立生物的遗传图谱、物理图谱和转录图谱及其全序列测序为主;后者则是在前者的基础上系统地研究基因组所有基因的功能,包括研究基因的表达及其调控模式,即从基因组与环境相互作用的角度阐明基因组的功能。20 世纪 90 年代,随着人类基因组测序草图的完成,生命科学从此进入了后基因组时代(postgenomic era),基因组研究的战略重点从结构基因组学转向功能基因组学。

功能基因组学包括转录组学(transcriptomics)、蛋白质组学(proteomics)和代谢组学(metabolomics, metabonomics)。随着这些功能基因组学技术的迅速发展及其在营养学领域的应用,营养基因组学(nutrigenomics)应运而生,并迅速成为营养学研究的新前沿。

营养基因组学是指利用结构基因组学提供的信息,采用高通量的功能基因组学技术研究个体对膳食反应的科学。其主要研究营养素或膳食成分在特定时间对机体细胞、组织或器官的转录组、蛋白质组和代谢组的影响,通过研究膳食营养与基因的交互作用,确认个体对营养素的反应,建立基于个体基因组结构特征的膳食干预方法和营养保健措施,提出更具个性化的营养政策,使营养学研究成果能更有效地应用于疾病的预防,促进人类健康。

本章重点介绍功能基因组学技术体系及其在营养学研究中的应用概况。

第一节 功能基因组学技术概述

一、“组学”的基本概念

基因组是指对所有基因进行基因组制图、核苷酸序列分析、基因定位和基因功能分析的科学。其中结构基因组学的主要任务是应用遗传学及分子生物学方法为不同的生物(尤其是人类)绘制完整的基因组图谱和基因组序列;而功能基因组学旨在发现特定基因的生物学功能,揭示整套基因及其产物在疾病和健康状态下的作用方式。比较基因组学(comparative genomics)是在基因组图谱和测序的基础上,对已知基因和基因组结构进行比较,以了解基因的功能、表达机制和物种进化。

转录组学是在基因组学后新兴的一门学科,即研究细胞在某一功能状态下所含 mRNA 的类型与拷贝数。

在人类基因组草图完成的后基因组时代,生命科学面临的最重要任务之一是对人类基因的注释与确认,即人类基因组中约 1/3 的基因及其功能有待于蛋白质水平上的揭示与确证。因此,澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 和 Williams 于 1994 年首次提出了“蛋白质组(proteome)”的概念。蛋白质组是指一个基因组、一个细胞或组织或一种生物体所表达的

全部蛋白质。蛋白质组学是系统研究分子机器、亚细胞器、细胞、组织、器官,乃至整体等生物体系内蛋白质组成模式及其活动规律的科学。蛋白质组学采用大规模、高通量、高灵敏度的技术手段,通过全局性研究基因组所表达的所有蛋白质在不同时间与空间的表达谱和功能谱,全景式地揭示生命活动的本质。其研究范围涉及蛋白质组制图、蛋白质组成分鉴定、基因产物识别与功能鉴定、细胞分化与发育等重要生命活动的分子机制研究及医药靶分子的寻找与分析等,并已开始应用于对基因突变和一些重要疾病病理进程的研究。

代谢组学是研究细胞和生物体的所有代谢中间体和终产物的一门新兴科学。

现将“组学”的常用术语归纳于表 1-1 中。

表 1-1 组学常用术语

中(英)文名称	释义
表达序列标签(expressed sequence tag)	一个转录基因的序列片段
功能基因组学(functional genomics)	研究编码基因组上所有基因的功能
基因组(genome)	有机体全部 DNA 的总称
基因组学(genomics)	研究基因组,包括基因图谱的绘制和测序
转录组学(transcriptomics)	研究细胞在某一功能状态下所含 mRNA 的类型与拷贝数
蛋白质组学(proteomics)	研究在特定细胞、组织或器官中发现的全部蛋白质
代谢组学(metabolomics)	研究在特定细胞、组织或器官中所发现的代谢谱

二、基因组学技术

1985 年,美国能源部率先提出了旨在阐明人类基因组 DNA 长达 3×10^9 碱基对序列的研究计划,这就是人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)的雏形。1986 年,诺贝尔奖获得者杜伯克将 HGP 计划的基本任务概括为完成 4 张图谱,即遗传图谱、物理图谱、序列图谱和基因图谱的绘制。人类基因组计划与“曼哈顿”原子弹计划、“阿波罗”登月计划并称为自然科学史上的“三计划”,但它对人类自身的影响将远远超过另两项计划。

以下分别介绍结构基因组学技术和功能基因组学技术,以及近年来进行人类基因组研究的新策略——全基因组关联分析技术。

(一) 结构基因组学技术

1. 微量化技术 微量化可保证减少样品量和反应次数。Burns 等已研制出了一种有良好应用前景的芯片测序仪的原始模型,该芯片可使用极少量的标本进行 PCR 扩增,同时又可对扩增产物进行毛细电泳。此外,还有一些其他的致力于开发新染料、不同聚合基质材料及用于毛细电泳的可选择框架等方面的研究,这些研究结果应用后可简化实验步骤,减少循环次数,并降低成本。

2. 高通量 DNA 测序技术 利用该技术可扩增基因组 DNA 片段,同时使用平板凝胶或毛细电泳法可检测 DNA 序列。最近,研究人员已将这些仪器用于啤酒酵母菌和大肠埃希菌等某些单细胞生物的完整基因组序列测定。

3. 单核苷酸测序技术 这是一种使用核酸外切酶从 DNA 的 5' 端对 DNA 进行测序的方法。其中最常用的方法是用不同荧光素标记的 4 种核苷酸组成的 DNA 片段进行检测。当标记的核苷酸结合牢固后可使用荧光检测仪对其进行检测。因为核酸外切酶可连续对一个大约 50 000bp 长的 DNA 序列进行酶切, 所以此技术不仅减少了对重叠区片段的测序, 同时也避免了对短序列测序的繁重工作。

(二) 功能基因组学技术

1. DNA 微阵列(DNA microarray)技术 该技术 1996 年问世, 通过检测细胞 RNA 含量研究其结构和功能。DNA 微阵列技术可用于大规模快速检测基因差异表达、基因组表达谱、DNA 序列多态性、致病基因或疾病相关基因。斯坦福大学的研究人员采用高速点样技术将 cDNA 探针定位于载片的已知位置, 将不同细胞系中分离的 mRNA 反转录为 cDNA 后, 标记上不同的荧光素, 将标记好的 cDNA 片段与芯片上的 cDNA 进行杂交, 进而检测不同细胞间 mRNA 表达的差异。该项技术的一个新用途是在基因表达图谱基础上对人类白血病细胞进行分类。

2. 寡核苷酸芯片(oligonucleotide chip)技术 美国的一个研究小组采用一种寡核苷酸芯片技术, 通过应用照相平板印刷术直接在载片上合成 cDNA 序列。最近, 这些技术使用数字微点阵分布形成真正的杂交膜, 从而降低了成本。

3. 系列分析基因表达(serial analysis of gene expression, SAGE)技术 SAGE 是 1995 年由 Velculesce 等建立的一种新的基因表达模式研究技术, 它可以在整体水平对细胞或组织中的大量转录本进行定量分析, 而不管其是否为已知基因。该技术以转录子(cDNA)特定区域 9~11bp 的寡核苷酸序列为标签, 特异性代表该转录子, 然后通过连接酶将 20~60 个标签随机串联并克隆到载体中, 建立 SAGE 文库。通过对标签的序列分析, 可获得基因转录的分布及表达丰度情况, 从而充分了解基因表达的全貌。SAGE 的研究对象是整个基因组的转录产物, 从而为全基因组基因表达进行整体研究提供了可能。SAGE 对低丰度表达基因有较好检测效果, 操作相对简便, 一般的分子生物学实验室均可进行。该方法的一个优点是避免了 PCR 固有的扩增中产生的序列与序列间的差异, 与微阵列技术相比更具有定量性。利用 SAGE 可以在短期内得到丰富的表达信息, 与直接测定 cDNA 克隆序列方法相比, 减少了大量的重复测序, 大大节省了研究时间。

(三) 全基因组关联分析技术

全基因组关联分析(genome wide association study, GWAS)是应用人类基因组中数以百万计的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)为标记进行病例-对照关联分析, 以期发现影响复杂性疾病发生的遗传特征的一种新策略。GWAS 将在患者全基因组范围内检测出的 SNP 位点与对照组进行比较, 找出所有的变异等位基因频率, 从而避免了像候选基因策略一样需要预先假设致病基因。

2005 年, *Science* 首次报道了年龄相关性视网膜黄斑变性 GWAS 研究结果, 在医学界和遗传学界引起了极大的轰动。截至 2009 年 6 月, 人们通过 GWAS 方法发现的与人类性状或复杂性疾病关联的 SNP 位点已达 439 个, 其中早发心肌梗死 9 个, 2 型糖尿病 18 个, 系统性红斑狼疮 6 个, 克罗恩病(Crohn's disease)32 个, 年龄相关性黄斑变性 5 个。此外,

对肥胖、冠心病、精神分裂症、风湿性关节炎、乳腺癌、前列腺癌、白血病等几十种常见疾病的 GWAS 研究也取得显著进展。主要进展体现在确定了这些疾病的致病基因、相关基因、易感区域和 SNP 变异。通过 GWAS 已经发现许多以前未知的与性状或疾病相关的位点和染色体区域,从而为了解人类复杂性疾病的分子发病机制提供了更多的线索。

GWAS 采用的研究方式与传统的候选基因病例-对照关联分析一致,即如果人群基因组中一些 SNP 与某种疾病相关联,理论上这些疾病相关 SNP 等位基因频率在某种疾病患者中应高于健康对照人群。

目前, GWAS 主要采用两阶段(two-stage design)或多阶段研究(multiple-stage design)。在第 1 阶段(stage 1),用覆盖全基因组范围的 SNP 进行病例-对照关联分析,统计分析后筛选出较少数量的阳性 SNP;对其中与疾病显著关联的阳性 SNP,在第 2 阶段(stage 2)或随后多阶段中采用更大样本的病例-对照样本人群进行基因分型,然后结合两阶段或多阶段的结果进行分析。这种设计策略需要保证第 1 阶段筛选与疾病或者表型关联 SNP 的敏感性和特异性,尽量减少假阳性和假阴性的发生;并在第 2 阶段应用大样本人群,甚至在多种族人群中进行基因分型验证。

确定研究对象的表型是 GWAS 设计中的重要问题。疾病的遗传度(heritability)表示疾病或表型在多大程度上受遗传因素的影响,较低遗传度的表型会降低遗传学关联研究的检验效能。因此, GWAS 中应尽量选择遗传度较高的疾病或表型。进行 GWAS 研究时,应尽可能选择那些可定量反映疾病危险程度的指标,可用于分析疾病临床亚型的特征,或可用于诊断和鉴别诊断疾病的表型特征。GWAS 最主要的特点是应用覆盖人类全基因组的 SNP 进行研究。GWAS 多选择覆盖全基因组的 500 000~1 000 000 个 SNP 作为标记进行研究。

三、蛋白质组学技术

蛋白质是生命功能的执行者,是生命现象的直接体现者,对蛋白质结构和功能的研究将直接阐明生命在生理或病理条件下的变化机制。蛋白质本身的存在形式和活动规律,如翻译后修饰、蛋白质间相互作用及蛋白质构象等问题,仍依赖于直接对蛋白质的研究来解决。蛋白质的可变性和复杂多样性等特殊性质导致了蛋白质研究技术远比核酸技术困难和复杂。因而,传统的对单个蛋白质进行研究的方式已无法满足后基因组时代的要求。因为:①生命现象的发生往往是多因素影响的,必然涉及多个蛋白质;②多个蛋白质的参与交织成网络,或平行发生,或呈级联因果;③在执行生理功能时,蛋白质的表现是多样的、动态的,并不像基因组那样固定不变。因此,要对生命的复杂活动有全面和深入的认识,必然要在整体、动态、网络水平上对蛋白质进行研究。

20 世纪 90 年代,蛋白质组学应运而生。它主要研究细胞或组织内表达的全部蛋白质及其表达模式,因而成为后基因组时代生命科学的核心内容之一。蛋白质组学技术体系主要包括基于双向电泳分离的蛋白质组技术和基于二维液相色谱分离的蛋白质组技术。其中基于双向电泳分离的蛋白质组技术主要包括双向电泳技术、胶内酶切技术、肽质量指纹谱(peptide mass fingerprint, PMF)技术和电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱(electrospray ionization-quadrupole-time of flight, mass spectrum, ESI-Q-TOF MS)测序技术;基于二维液相色谱分离的蛋白质组技术又称“shot gun(鸟枪法)”技术,主要用于全谱蛋白质的鉴定。

(一) 二维凝胶电泳-质谱技术

二维凝胶电泳技术(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)是由 O'Farrell 和 Klose 于 1975 年分别提出的,是目前唯一能将数千种蛋白质同时分离与展示的分选技术。20 世纪 80 年代初期,固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)等电聚焦电泳技术的出现使得 2-DE 的重复性和上样量大大改善。在 2-DE 中,首先根据蛋白质等电点的不同在一向等电聚焦电泳中分离;然后根据蛋白质分子质量大小的不同进行二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。对 2D 胶进行染色,胶内酶切,然后进行 MALDI-TOF-MS 分析肽质量指纹图谱并鉴定蛋白质。

(二) 色谱-质谱技术

色谱-质谱技术包括二维色谱-串联质谱技术(2D-HPLC-MS-MS)和同位素标记-亲和色谱-质谱技术。二维色谱分离蛋白质可采取一维离子交换色谱和二维反相色谱组合模式,或一维凝胶过滤色谱和二维反相色谱组合模式。采用二维色谱-串联质谱技术可以对蛋白质混合物进行直接分离与鉴定,由各生物样本获得的蛋白质混合物,用蛋白酶裂解,得到多肽混合物样品,进行二维色谱分离。质谱分析一般采用电喷雾串联质谱,通过测定肽段的序列对蛋白质进行鉴定。为定量分析与鉴定细胞蛋白质,同位素标记-亲和色谱-质谱技术获得成功应用。同位素编码亲和和标签技术(isotope-coded affinity tag, ICAT)可实现对细胞差异表达蛋白质的定量分析,且大大简化了被分析样品的复杂性,为蛋白质组学技术方法的研究提供了新的思路。ICAT 试剂中间部分分别连接 8 个氢原子(轻链试剂)或重氢原子(重链试剂),中间部分一头连接蛋白质半胱氨酸上的巯基,实现对蛋白质的标记,另一头连接生物素,用于标记蛋白质或多肽的亲和纯化。完成对蛋白质的标记后,接着进行蛋白酶切,对酶切后的多肽混合物进行亲和色谱分离,混合物中被同位素标记的肽段被色谱柱保留,并进入质谱进行鉴定。该方法的不足在于无法分析和鉴定不含半胱氨酸的蛋白质,且分析费用高,限制其普遍应用。

(三) 一维电泳(色谱)-质谱技术

一维电泳(色谱)-质谱技术包括一维 SDS-PAGE 电泳(色谱)-质谱技术和 IEF 电泳-质谱技术。一维 SDS-PAGE 电泳(色谱)-质谱技术主要用于分离鉴定蛋白质复合物,以弥补 2D-MS 技术可能造成蛋白质丢失这一缺点。该技术首先采用免疫沉淀或免疫亲和提取的方法,从生物样本获得蛋白质复合物,采用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质复合物, MALDI-TOF-MS 分析肽质量指纹图谱并鉴定蛋白质,或直接对蛋白质复合物进行蛋白酶切,对获得的肽混合物进行 LC-MS-MS 分析,通过测定肽片段的序列鉴定蛋白质。IEF 电泳-质谱技术采用窄范围的 IPG 胶条进行 IEF 电泳,基质溶液浸泡电泳完毕的胶条,胶条晾干后截成约 4cm 的长度并固定于质谱仪的样品靶上,进行 MALDI-TOF-MS 分析。该方法避免了样品从 2D 胶向质谱鉴定过渡的繁琐操作,将 IEF 电泳与准确、灵敏、高分辨率的相对分子质量测定技术相结合,有望成为 2-DE 的替代方法之一。

除了前面介绍的蛋白质组研究的基本技术外,新的蛋白质组研究技术也不断出现,如用于定量蛋白质组学研究的同位素编码亲和和标签技术和双色荧光技术,用于蛋白质与蛋白质

相互作用研究的酵母双杂交技术、蛋白质复合物免疫分离与质谱鉴定技术,用于大规模蛋白质分离与鉴定的多维色谱-质谱联用技术,用于翻译后修饰,如磷酸化、糖基化蛋白质图谱展示与检测技术及蛋白质芯片技术等。

四、代谢组学技术

相对于 DNA 或蛋白质等生物高分子而言,代谢组学的研究对象一般为分子质量在 1000Da 以下的小分子。不同于基因和蛋白质具有相对严格的种属和细胞特异性,同一代谢物在任何其存在的物种中都具有相同的理化性质。即便如此,代谢物的功能却并不限于代谢途径中某种酶的底物或产物,它们具有结构单元、能量的载体和储存体、信号分子、神经递质、转录和翻译的调控因子、辅酶、分子伴侣、肠道因子和诱变剂等诸多功效,在生命活动中以代谢网络的形式相互作用,参与生命活动的各个过程。代谢网络处于基因调控网络、信号转导网络和蛋白质互作网络的下游,因此,代谢组学研究能反映基因组、转录组和蛋白质组受内外环境影响后相互作用的最终结果,更接近于反映细胞或生物的表现。

代谢组学已成为继基因组学、转录组学、蛋白质组学后的一个重要的组学平台,被广泛应用于医学、药学、动植物学、微生物学、环境科学、营养学等多个研究领域。国际上代谢组学的研究萌芽于 20 世纪 80 年代,于 90 年代末期得到迅猛发展,以磁共振和色谱-质谱为核心技术,逐渐得到广泛应用。英国帝国理工大学和辉瑞等六大制药公司在 COMET 计划中率先采用代谢组学方法来评价药物的毒性,并取得了极大的成功;美国食品药品监督管理局(FDA)已尝试将代谢组学技术作为药物安全评价的一种方法。

代谢组学研究一般包括样品采集和制备、代谢组学数据的采集、数据处理、多变量数据分析、标志物识别和途径分析等步骤。生物样品可以是尿液、血液、组织、细胞和培养液等,采集后首先进行生物反应灭活、预处理,然后运用磁共振、质谱或色谱等技术检测其中代谢物的种类、含量、状态及其变化,得到代谢轮廓或代谢指纹。而后使用多变量数据分析法对获得的多维复杂数据进行降维和信息挖掘,识别出有显著变化的代谢标志物,并研究所涉及的代谢途径和变化规律,以阐明生物体对相应刺激的响应机制,达到分型和发现生物标志物的目的。

代谢组学通过考察生物体系受刺激或扰动前后代谢产物图谱及其动态变化,研究生物体系的代谢网络。与转录组学和蛋白质组学比较,代谢组学具有以下优点:①基因和蛋白表达的微小变化会在代谢物水平得到放大;②代谢组学的研究不需进行全基因组测序或建立表达序列标签(EST)数据库;③代谢物的种类远少于基因和蛋白的数目;④生物体液的代谢物分析可反映机体系统的生理和病理状态。通过代谢组学研究,既可以发现生物体在受到各种内外环境扰动后的不同应答,也可以区分同种不同个体之间的表型差异。

代谢组学技术的核心部分是代谢产物的检测、分析与鉴定,所涉及的主要技术手段是磁共振(NMR)、质谱(MS)、液质联用(LC-MS)和气质联用(GC-MS),其中以 NMR 最为常用。

(一) 磁共振技术

磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)是代谢组学研究的主要技术。通过检测一系列样品的 NMR 谱图,再结合模式识别方法,可以判断出生物体的病理生理状态,并有可

能找出与之相关的生物标志物。NMR 技术是利用高磁场中原子核对射频辐射的吸收光谱鉴定化合物结构的分析技术,生命科学领域中常用的是氢谱(^1H NMR)、碳谱(^{13}C NMR)及磷谱(^{31}P NMR)三种,可用于体液或组织提取液和活体分析两大类,常用的是体液分析研究。以 ^1H NMR 为例,将准备好的生物标本包括各种体液或组织提取液直接上样检测即可。所得的 ^1H NMR 谱峰与样品中各化合物的氢原子对应,根据一定的规则或与标准氢谱比照可以直接鉴定出代谢物的化学成分,信号的相对强弱则反映了各成分的相对含量。

(二) 质谱技术

与 MS 相比,NMR 的优点在于能够对样品实现非破坏性、非选择性的分析,在接近生理条件下进行实时和动态的检测;且没有偏向性,对所有化合物的灵敏度都是一样的,而 MS 则有离子化程度和基质干扰等问题。NMR 的缺点是对每个分子的化学和物理环境敏感,因此样品制备的要求很高;灵敏度较低;NMR 的动态范围有限,很难同时测定生物体系中共存的浓度相差较大的代谢产物,所需硬件的投资也较大。总体而言,NMR 技术应用更为广泛。

质谱(mass spectrometry, MS)技术是将离子化的原子、分子或是分子碎片按质量或质荷比(m/z)大小顺序排列成图谱,并在此基础上进行各种无机物、有机物的定性或定量分析。新的离子化技术使质谱技术的灵敏度和准确度大大提高。将预处理的体液或组织加至质谱仪,经过汽化、离子化、加速分离及检测分析后即可得到相应代谢产物或代谢组的图谱。图谱中每个峰值对应相应的分子质量,结合进一步的检测分析可以部分鉴定出化学成分及半定量关系。不同组别的质谱图存在差异,可进行代谢产物指纹分析,对其加以区别、鉴定,有助于研究代谢的变化规律及标志性代谢产物。根据代谢组学的研究需要,质谱技术还常与气相色谱(GC)、液相色谱(LC)等技术结合,以提高分析的分辨率和灵敏度。

第二节 营养基因组学研究概况

随着功能基因组学技术的迅速发展及其在营养学领域的应用,营养基因组学应运而生,人们也日益关注后基因组时代一系列组学技术如何影响营养学研究及营养学如何发展。

营养基因组学主要通过应用转录组、蛋白质组和代谢组技术开展营养学研究。其中营养转录组学在 mRNA 水平研究在某种营养状况下某个细胞或某个细胞群的全基因组改变。营养蛋白质组学则通过细胞中蛋白质结构和功能的大规模分析,以及蛋白质与蛋白质之间的相互作用,鉴定营养素或膳食成分生物学作用的分子靶标。营养代谢组学主要检测机体对营养因素刺激整个代谢应答通路上所有的代谢产物的变化规律。

一、营养转录组学研究概况

目前,营养基因组学研究多侧重于多基因表达的分析,即转录组学研究。大多数必需营养素和其他生物活性成分是基因表达模式的重要调节因子。宏量营养素、维生素、矿物质及各种植物化学物可以改变基因转录和翻译,继而影响代谢、细胞生长和分化等一系列参与疾病过程的生物学反应。转录组学在营养学研究中的应用见表 1-2。

表 1-2 转录组学技术在营养学研究中的应用实例

研究对象	细胞/组织类别	膳食、营养素或食物活性成分
细胞	结肠癌细胞	短链脂肪酸、表儿茶素、可可多酚提取物、苹果类黄酮
	前列腺癌细胞	大豆异黄酮
	膀胱癌细胞	金雀异黄素
	神经母细胞瘤细胞	视黄酸
	成骨细胞	维生素 D ₃
	脂肪细胞	花色苷
	胰腺细胞	脂肪酸
	动物	脂肪组织、肝、肌肉
肌肉组织		高脂饲料和抗氧化剂
肝、海马		鱼油
肝、结肠		大豆蛋白、乳清蛋白、酪蛋白、谷蛋白
肝、前列腺		金雀异黄素
脑		植物提取物
结肠黏膜、肺		蔬菜
肝、肠系膜脂肪组织		可可
人体	脂肪组织	能量限制膳食
	血细胞	高碳水化合物和高蛋白早餐

营养转录组学的研究进展主要体现在以下几个方面。

(一) 营养素作用机制的研究

近年来,科学家已经通过基因表达的变化研究了能量限制、微量营养素缺乏、葡萄糖代谢等许多问题。通过应用转录组学技术,科学家能够测定单一营养素对某种细胞或组织基因表达谱(gene expression profile)的影响。

为研究缺锌状况下大鼠肝脂质代谢过程中所出现的分子改变,Dieck 等分析了肝脏转录组的变化。经 DNA 微阵列分析 6200 个靶序列,发现其中 268 个转录体表达水平在缺锌组大鼠肝脏发生改变,43 个基因与肝脂质代谢有关。进一步分析发现,缺锌组大鼠肝脏中参与脂质降解、线粒体和过氧化物酶体中脂肪酸降解通路的基因转录水平下调,而参与脂肪酸重新合成和三酰甘油组装路径的基因转录水平升高。总的来说,参与肝脏脂质生成和脂质降解的基因群表达水平呈现出相反的变化,最终引起肝脏三酰甘油的聚集,肝脏脂肪酸模式变化,脂肪酸氧化降低。而缺锌可能是通过过氧化物酶体增殖物激活型受体(PPAR- α)、甲状腺激素和甾醇调控元件结合蛋白(SREBP)依赖性通路实现对基因转录的不同调控,进而表现出对肝脏脂质代谢的多向性效应。其结果为研究锌依赖性肝代谢改变的复杂调节网络提供了证据和研究思路。

Blanchard 应用 mRNA 差异显示技术比较了缺锌大鼠与常锌大鼠小肠基因表达的变化,结果发现因缺锌所致的小肠中两种肽类激素、小肠脂肪酸结合蛋白、小肠碱性磷酸酶 II 等的 mRNA 均发生显著变化;而且,缺锌组动物小肠 Uroguanylin mRNA 表达较常锌组