

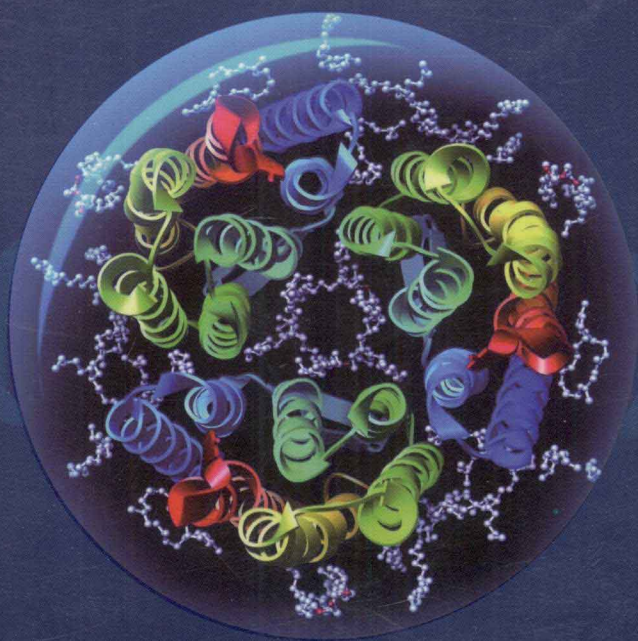
陈执中◎编著

蛋白质组学

研究的新分析技术及其应用

DAN BAI ZHI ZU XUE

YAN JIU DE XIN FEN XI JI SHU JI QI YING YONG

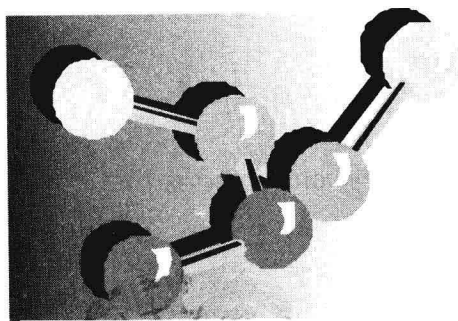


中国医药科技出版社

Q51
C659

蛋白质组学研究的新分析技术及其应用

陈执中 编著



中国医药科技出版社

内 容 简 介

本书阐述了最新发展的分析技术及其在蛋白质组学研究及新药研究中的应用。内容共分21章:1章介绍蛋白质组学概念和人类蛋白质组学计划;2~4章对蛋白质三维分离、快速鉴定进行了阐述;5~15章对近代新的分析方法、分析技术及新的联用技术进行了较为详细的叙述;16~21章对蛋白质-DNA相互作用、蛋白质复合体混合物分析和鉴定及蛋白质复合体相互作用以及其他分析鉴定新技术进行了讨论。

本书可供从事蛋白质组学研究、蛋白质分析工作者及从事蛋白质、肽类基因工程药物研究的科技人员,药厂新药研究开发中心及质量控制工作人员,高等医药院校的师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质组学研究的新分析技术及其应用/陈执中编著. —北京:中国医药科技出版社,2011. 10

ISBN 978 - 7 - 5067 - 5179 - 7

I. ①蛋… II. ①陈… III. ①蛋白质 - 基因组 - 研究 IV. ①Q51

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第183261号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行:010-62227427 邮购:010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 710×1000mm $\frac{1}{16}$

印张 12 $\frac{1}{2}$

字数 223千字

版次 2011年10月第1版

印次 2011年10月第1次印刷

印刷 三河市华新科达彩色印务有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978 - 7 - 5067 - 5179 - 7

定价 35.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

前 言

2001年6月国际蛋白质组学会议的召开和同年10月人类属蛋白质组学计划的制订,翻开了蛋白质组学研究新的一页。2002年英国《焦点》月刊4月号文章题为“超越基因组:破译蛋白质”中指出了蛋白质组学和蛋白质组学计划的重要性。2003年人类基因组序列绘制成功,从而进入了后基因组时代,功能基因组学包括蛋白质组学研究的分析技术更有了新的发展。

蛋白质组学研究的新分析技术包括新分析方法和新的联用技术。这类分析技术也为生化新药和基因工程新药的研究、新药报批和产品质量控制等提供基础。

鉴于目前国内尚无这类分析技术专著,作者根据近10年来国内外有关文献资料和应邀讲学内容并结合研究生课程《近代仪器分析》和《基因工程药物分析》教学,编写了本书,以供从事蛋白质组学研究及有关新药开发研究的人员参考使用。

本书的编写得到章月华主任药师的协助和支持,谨此致谢。

新的分析技术发展迅速,本书内容信息难以赶上科技飞速发展的步伐,且限于编者的水平,书中难免有疏漏甚至错误之处,敬请读者不吝指正。

编 者

2011年1月

1 绪论 / 1

- 1.1 生命的物质——蛋白质 (1)
- 1.2 蛋白质组和蛋白质组学 (1)
- 1.3 人类蛋白质组计划 (2)
- 1.4 蛋白质组学的研究领域 (3)
- 1.5 蛋白质组学研究的技术平台和研究策略 (3)
- 1.6 差异显示蛋白质组学（比较蛋白质组学） (6)
- 1.7 翻译后修饰 (6)
- 1.8 蛋白质组学研究与医药科学的发展 (8)

2 蛋白质组分析中蛋白质的分离 / 11

- 2.1 细胞和亚细胞提取物的制备 (11)
- 2.2 蛋白质的分离 (12)

3 蛋白质快速分离和特性快速鉴定技术 / 18

- 3.1 快速蛋白质液相色谱法 (18)
- 3.2 蛋白质二维色谱分离技术 (22)
- 3.3 蛋白质特性快速鉴定技术 (26)

4 灌注色谱法 / 33

- 4.1 理论基础 (33)
- 4.2 灌注色谱预填充柱 (35)
- 4.3 灌注色谱分离技术 (36)
- 4.4 应用 (38)

5 新型免疫检测技术 / 44

- 5.1 新型免疫检测器及检测系统 (44)
- 5.2 新型免疫检测法 (44)
- 5.3 应用 (47)

6 DNA 芯片技术 / 50

- 6.1 DNA 芯片 (50)
- 6.2 微流路芯片 (54)

7 蛋白质芯片技术 / 56

- 7.1 蛋白质芯片的种类 (56)
- 7.2 光学蛋白质芯片技术 (56)
- 7.3 高通量蛋白质荧光芯片 (58)
- 7.4 生物分子的蛋白质芯片纯化和鉴定技术 (64)
- 7.5 应用 (68)

8 生物质谱分析法 / 71

- 8.1 基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱法 (71)
- 8.2 基质辅助激光解吸离子化-四倍飞行时间质谱法 (76)
- 8.3 基质辅助激光解吸离子化质谱法及其在蛋白质分析中的应用 (82)

9 生物分子相互作用分析 / 86

- 9.1 生物传感芯片 (86)
- 9.2 生物分子相互作用分析原理 (90)
- 9.3 分析仪器及检测技术 (92)
- 9.4 在蛋白质组学研究中的应用 (95)
- 9.5 在新药开发研究中的应用 (98)

10 新的生物活性测定法 / 103

- 10.1 新的生物活性测定法 (103)
- 10.2 生物活性检测仪——BIACORE® probe (105)
- 10.3 应用 (105)

11 液相色谱 – 大气压离子化质谱联用技术 / 107

- 11.1 液相色谱 – 大气压离子化质谱 (107)
- 11.2 LC/MS 的应用 (110)

12 新的液相色谱 – 质谱联用系统 / 114

- 12.1 LC/MS 新离子化技术 (114)
- 12.2 新的离子阱 LC/MS/MS 系统 (117)
- 12.3 展望 (119)

13 生物分子相互作用分析 – 质谱法联用技术 / 120

- 13.1 BIA/MS 联用的分析技术 (120)
- 13.2 BIA/MS 联用技术的应用 (122)
- 13.3 展望 (124)

14 高速逆流色谱新技术和高速逆流色谱联用技术 / 126

- 14.1 离子对逆流色谱 (126)
- 14.2 pH 区带逆流色谱 (127)
- 14.3 新的色谱系统与高速逆流色谱联用技术 (130)
- 14.4 高速逆流色谱 – 质谱联用技术 (130)

15 纳级液相色谱 – 纳电喷雾离子化质谱技术 / 135

- 15.1 NanoLC/nano ESI – MS 系统及分析技术 (135)
- 15.2 应用 (138)

16 染色质免疫沉淀 / 141

- 16.1 ChIP 技术 (141)
- 16.2 活细胞中蛋白质 – DNA 相互作用测定 (142)
- 16.3 应用 (144)

17 核素编码亲和标记法 / 146

- 17.1 ICAT 法的特点 (146)
- 17.2 ICAT 法的原理和分析步骤 (146)
- 17.3 ICAT 法的应用 (147)

18 串联亲和纯化技术 / 154

- 18.1 TAP 技术的原理和方法 (154)
- 18.2 TAP 技术的应用 (158)
- 18.3 展望 (161)

19 其他分析鉴定技术 / 162

- 19.1 绿荧光蛋白技术 (162)
- 19.2 蛋白质复合体的直接分析鉴定 (164)
- 19.3 多维蛋白质鉴定技术 (166)
- 19.4 图像质谱法 (167)

20 微流路芯片毛细管电泳法及其与质谱联用技术 / 173

- 20.1 微流路芯片毛细管电泳法 (173)
- 20.2 微流路芯片毛细管电泳 - 质谱联用技术 (175)
- 20.3 应用 (177)

21 纳米粒子 - DNA 生物条形码测定法 / 179

- 21.1 纳米粒子 - DNA 生物条形码测定法的发展 (179)
- 21.2 蛋白质的测定 (180)
- 21.3 多种蛋白质的同时检测 (181)
- 21.4 DNA 特异性序列检测 (182)
- 21.5 展望 (183)

附录 1 参考表 / 185

- 1.1 十进位数量词头及符号表 (185)
- 1.2 氨基酸的英文缩写 (185)

附录 2 缩写词的英文中文名称对照 / 187

1 绪论

20 世纪 90 年代，人类基因组组织（Human Genome Organization, HUGO）启动了人类基因组计划（human genome project, HGP）。2000 年 4 月 9 日至 12 日在加拿大温哥华召开了 2000 年国际人类基因组会议，总结了近几年国际研究的丰硕成果和主要研究动向，找到了进一步研究的策略、途径和方法，提出了今后重点发展的研究领域和前沿课题。

2000 年 6 月 26 日参加人类基因组国际合作项目的各国（包括中国）于同一时间正式宣布完成了人类基因组草图。2001 年 2 月 12 日公布了人类基因组“初步解析”，从而拉开了后基因组时代（post Genome Era）序幕，开始对功能基因组学包括蛋白质组学掀起了研究的热潮。

2003 年 4 月 14 日美国人类基因组研究项目首席科学家 Collins 博士隆重宣布人类基因组序列图绘制成功，人类基因组计划的目标全部实现。随着 HGP 的突破性发展和完成，有关蛋白质分析和蛋白质组学研究的分析技术更有了新的进展。

1.1 生命的物质——蛋白质

随着人类基因组计划的完成，科学家们意识到对探索人类生命的奥秘仅仅是开始。基因提供了生命的蓝图，但是根据这些信息产生行动并推动人体功能的却是基因表达的蛋白质，所以蛋白质是生命的物质。

古希腊传说描述了一位名叫 Proteos 的古老海神，蛋白质（protein）一词就是从其派生的。据说这位海神，通晓过去、现在和未来，能够呈现为不同的形状。他在古希腊中被看作是缔造人类新物质的象征。今天，他的传说故事反映了生物学家在寻找认识蛋白质的过程中所面临的核心问题。由于蛋白质储存着有关我们遥远过去的信息并且具有揭示我们未来健康状况详情的潜力，所以蛋白质像海神一样，掌握着打开科学家急于要打开的有关我们生命知识宝库的钥匙。如果没有对人体几十万种蛋白质当中的每一个是如何根据氨基酸的线性排序（蛋白质的氨基酸序列）呈现为最终的形状和功能的认识，基本上是无法获得这方面知识的。

1.2 蛋白质组和蛋白质组学

1994 年 Wilkins 等在第一届国际二维电泳会议上首先提出了蛋白质组（proteome）

的概念。1995 年 Wasinger 等在电泳法杂志 *Electrophoresis* 上提出蛋白质组的定义：一个基因组编码的全部蛋白质。1997 年 Wilkins 和 Williams 编著的《蛋白质组研究：功能基因组学中的新尖端领域》一书中，对蛋白质组定义为：一个基因组或组织所表达的全部蛋白质。1999 年进一步完善蛋白质组的定义为：在一个细胞的整个生命过程中由基因组表达的以及表达后修饰的全部蛋白质。

蛋白质组是由丰富的蛋白质组成具有充分依赖于细胞周期阶段，细胞分化，对营养、温度、重压等环境条件的反应，生命遗传信息转移的生物功能。

蛋白质组学 (proteomics) 是蛋白质组概念的延伸，是蛋白质的规模化研究，从蛋白质水平和生命本质层次上研究和发现生命活动的规律和重要生理、病理现象的本质，揭示基因活动的动态表达。蛋白质水平的分析不仅为生物分子体系提供最有效的实时分析模式而且也获得了 DNA 和 RNA 水平上不易获得的信息。从酵母蛋白质组研究到人体组织和细胞的蛋白质组研究，在整体水平上研究细胞内蛋白质组成及其活动规律从而形成了蛋白质组学的新学科。

蛋白质组学一词，起初是用以描述用二维凝胶电泳和质谱法分离和鉴定蛋白质且用精确的信息学方法消除复杂的质疑的数据以进行基因组表达蛋白质的研究。此方法现称之为“表达”蛋白质组学或“普遍形象”蛋白质组学。1999 年 Blackstock 和 Weir 将蛋白质组学的范围扩大到包括“蛋白质-蛋白质”相互作用（蛋白质复合体）的研究，称之为细胞-图谱蛋白质组学。

1.3 人类蛋白质组计划

早在 1980 年美国做出了一项努力，准备启动人类蛋白质索引 (human protein index, HPI) 的计划。但是由于 20 世纪 80 年代虽然用于分离蛋白质的重要技术——二维凝胶电泳法 1975 年已由 O'Farrell 建立，但进行蛋白质索引研究的许多技术尚未有较大发展，且受到了实施 HGP 的影响则未能开展。

1999 年，瑞士生物信息学研究所 (Swiss Institute of Bioinformatics, SIB) 和欧洲生物信息学研究所 (European Bioinformatics Institute, EBI) 在国际互联网上发布了人类蛋白质组学研究计划 (human proteomics initiative, HPI) 的消息，即为第一次正式提出的计划。

2001 年 6 月在意大利举行了国际蛋白质组学会议后，2001 年 10 月 7 日由人类蛋白质组组织 (Human proteome Organization, HUPO) 主持在美国弗吉尼亚 (Virginia) 州的里斯堡 (Leesburg) 召开了大约 100 位科学家参加的会议，讨论制订了人类蛋白质组计划。国际人类蛋白质组组织主席密歇根大学的 Hanash 博士指出：“人类蛋白质组组织知道循序渐进是重要的”。

2003 年 12 月 15 日在北京蛋白质组研究中心成立仪式上，Hanash 博士宣布：国际人类蛋白质组计划正式启动。中国科学家贺福初院士领导并执行首批行动计划中的“人类肝脏蛋白质组计划”，这是中国科学家首次牵头负责重大的国际协作计划。

目前, HUPO 正式提出启动“人类血浆蛋白质组计划”和“人类肝脏蛋白质组计划”两项重大国际合作项目, 从而拉开了人类蛋白质组计划的帷幕。由中国贺福初院士牵头的“人类肝脏蛋白质组计划”, 有 16 个国家和地区的 80 多个实验室报名参加。其目标是: 揭示并确认肝脏的蛋白质, 在蛋白质水平规模化注解和验证人类基因组计划所预测的编码基因, 实现肝脏转录组、肝脏蛋白质组、血浆蛋白质组及人类基因组的对接和整合, 揭示人类基因转录、翻译水平的整体、群集调控规律, 建立肝脏“生理组”、“病理组”, 为重大肝病预防、诊断、治疗和新药研发的突破提供科学基础, 为提高和突破现有肝脏疾病防治水平提供科学依据。

由美国牵头的“人类血浆蛋白质组计划”有 13 个国家的 47 个实验室参加。其目标是: 全面分析人类血浆和血清蛋白成分; 确定不同人种血浆蛋白质的差异程度; 确定不同时期和不同条件下的个体差异。

国际人类蛋白质组大会, 从 2002 年以来, 每年举办一届年会。2004 年 10 月 25 日至 28 日在北京举行“第三届国际人类蛋白质组大会”, 同时举办大型国际“蛋白质组技术与成果”展览会和“人类蛋白质组计划”系列卫星会议。第三届大会的召开和展览会的展出将促进蛋白质组计划的发展。

1.4 蛋白质组学的研究领域

蛋白质组学的研究内容主要有两个方面: 结构蛋白质组学 (structural proteomics) 和功能蛋白质组学 (functional proteomics)。结构蛋白质组学主要是蛋白质表达模式的研究, 包括蛋白质的氨基酸序列分析及空间结构的解析、种类分析及数量确定; 功能蛋白质组学主要是蛋白质功能模式的研究, 包括蛋白质的功能及蛋白质间的相互作用。

蛋白质组学提供一套在蛋白质水平大规模研究基因功能的有用工具。蛋白质组学可分为三个主要领域: ①蛋白质的微特性以供蛋白质的规模化鉴定和他们的后翻译修饰; ②“差异显示”蛋白质组学供蛋白质水平与疾病在广泛范围的有力应用比较; ③应用特定的分析技术如质谱法 (包括串联质谱法、生物质谱法) 或酵母双杂交系统以及其他蛋白质组研究新技术研究蛋白质-蛋白质相互作用。

1.5 蛋白质组学研究的技术平台和研究策略

蛋白质组学的研究阐明一个未知基因的功能, 有四个关键的技术平台: 即样品的制备 (应用二维凝胶电泳、单向凝胶电泳、亲和捕获等进行纯化分离和分析); 获取蛋白质信息 (应用质谱法、降解成肽及序列信息); 蛋白质鉴定 (应用信息学) 及细胞图谱分析 [蛋白质-蛋白质相互作用, 二维结构、细胞定位、翻译后修饰 (posttranslational modifications, PTMs)]。蛋白质组学的技术平台见图 1-1。

蛋白质组学研究策略包括四个部分: 蛋白质分离策略、蛋白质图谱分析、蛋白质鉴定和蛋白质特性分析。

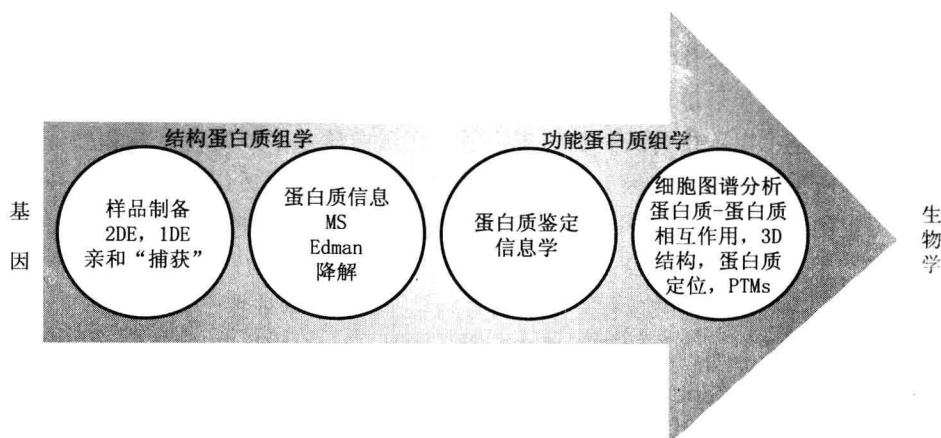


图 1-1 蛋白质组学技术平台 (文献 8)

蛋白质分离策略主要有：①多维色谱法包括大小排阻色谱法 (size-exclusion chromatography, SEC)、离子交换色谱法 (ion-exchange chromatography, IEC)、反相高效液相色谱法 (reverse-phase high-performance chromatography, RP-HPLC)、疏水性相互作用色谱法 (hydrophobic interaction chromatography, HIC) 等。②多维电泳技术，包括二维凝胶电泳法 (2DE)、自由流动电泳法 (freeflow electrophoresis, FFE)、毛细管区带电泳法 (capillary zone electrophoresis, CZE) 等。③亲和法包括免疫印迹法、亲和捕获。④细胞器，膜的复合体分离。

蛋白质质谱主要有：还原作用和烷基化作用，然后以酶解如胰蛋白酶、V8、蛋白酶 K 等或用化学裂解如溴化氰 (CNBr) 等使蛋白质成为肽片段。

蛋白质鉴定主要有：①氨基和羧基末端序列分析。②肽图谱分析。③质谱法包括肽片段的质谱和串联质谱法 (MS/MS)、新的联用技术以及其他新的鉴定技术 (如绿荧光蛋白技术、大分子蛋白质复合体的直接分析鉴定、多维蛋白质鉴定技术和图像质谱法等)。

蛋白质特性分析主要有：①翻译后修饰：磷酸化作用、糖基化作用等；共价修饰二硫键结合；②蛋白质状态：蛋白水解作用、蛋白质证实；寡聚状态：多蛋白复合物，同型寡聚体，异型寡聚体；③配位体的存在，细胞定位，在体荧光共振能量转换 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)，免疫定位；交替的拼接变异体。

研究的顺序为蛋白质分离策略 (包括①、②、③、④)、肽图谱分析 (蛋白质片段)、蛋白质鉴定、最后蛋白质特性分析，组成了结构蛋白质组学和功能蛋白质组的研究策略。蛋白质分析和鉴定的蛋白质组学研究完整策略见图 1-2。

上述所有分离纯化、分析鉴定的有关技术以及策略中未提到的蛋白质组学研究新分析技术分别在后面各章中详加讨论。

复合体中蛋白质的细胞图谱分析和鉴定，可用亲和捕获法 (affinity capture method)。细胞经过溶胞作用生成溶胞产物经免疫亲和浓缩，亲和相互作用形成大分子

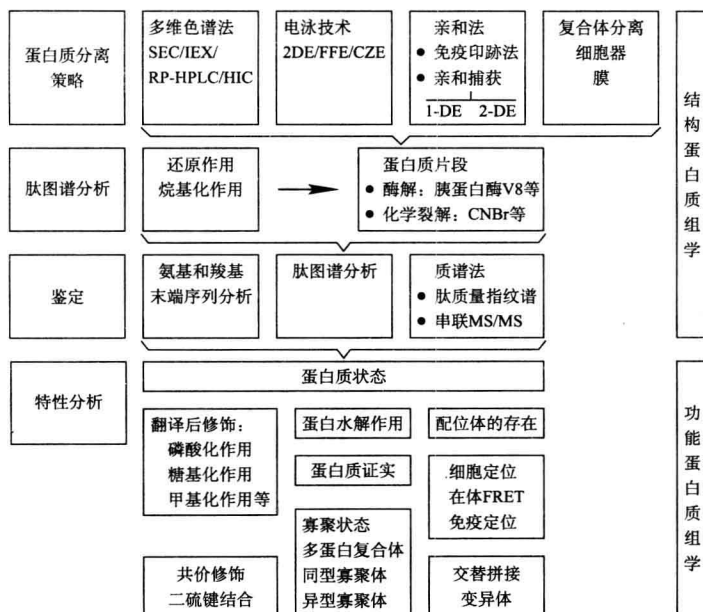


图 1-2 蛋白质分析鉴定的蛋白质组学研究策略 (文献 8)

复合体, 经电泳分离后用液相色谱/串联质谱联用技术分析, 从蛋白质/核苷酸数据库进行蛋白质鉴定。细胞图谱分析鉴定的亲和捕获法见图 1-3。

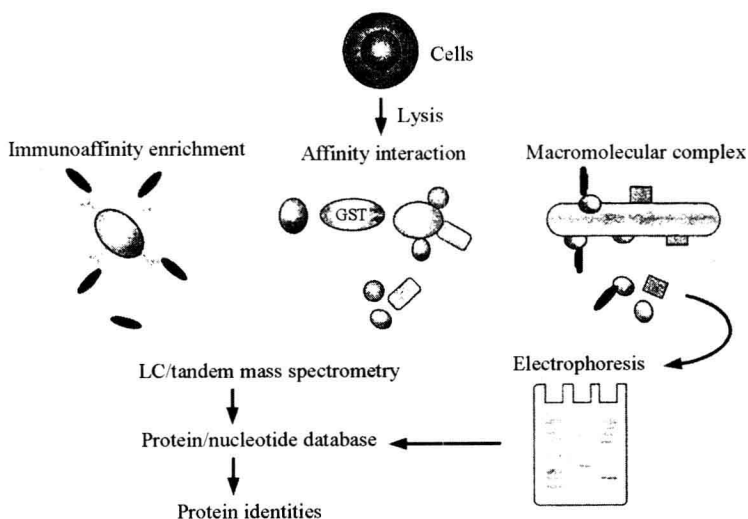


图 1-3 细胞图谱分析鉴定 (文献 8)

部分氨基酸序列的测定 通常许多蛋白质组学研究的最后一步, 依赖于纯化方法用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel elec-

trophoresis, SDS-PAGE), 或者二维凝胶电泳分离蛋白质用于鉴定和特性分析, 随后电印迹转移至惰性膜上, 原蛋白质可以直接由氨基或羧基序列分析进行鉴定或间接由蛋白质在胶内或膜上经酶解(通常用胰蛋白酶)产生的肽进行鉴定。基于质谱的方法通常用于鉴定从蛋白水解得到肽的分析。此方法的优点是可以容易地从凝胶片及惰性膜上重新获得蛋白水解产生的肽。基于质谱法的蛋白质鉴定, 典型的步骤包括: ①从细胞溶胞产物用亲和捕获分离结合的蛋白质部分。谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 结合蛋白含 SOCS-1 SOCS 盒序列, 单向凝胶电泳后, 凝胶用考马斯蓝染色, 蛋白质区带进行胰蛋白酶消解。②用基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱法 (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 分析胰蛋白酶消解的肽混合物, 获得蛋白质的肽质量指纹谱 (mass fingerprint, PMF)。③用毛细管反相色谱法与电喷雾离子阱质谱仪在线偶联以分析其他肽混合物, 典型的实验必需从质谱中分出最强的离子 (例如质荷比 m/z 为 765.6), 有效的碰撞诱导解离 (collision-induced dissociation, CID) 以产生顺序离子, 从 MS/MS 谱可以用人工解释或用相关实验的数据库算法取得氨基酸序列信息。④用于磷酸肽的分析, 含肽片段从毛细管反相色谱分离进行 MALDI-TOF 分析。

蛋白质和翻译后修饰的质谱鉴定策略示意图解见图 1-4。

1.6 差异显示蛋白质组学 (比较蛋白质组学)

蛋白质组学研究的基本问题是生物系统的两个不同态如正常和害病细胞或组织之间蛋白质表达水平的测定 (例如蛋白质水平的相对数量确定)。这通常称之为差异显示蛋白质组学 (differential display proteomics) 或比较蛋白质组学 (comparative proteomics)。

比较蛋白质组分析, 两个样品 (参比样品和第二个样品) 之间相关蛋白质表达的比较是用核素标记, 在体或体外标记后的蛋白质, 经蛋白质纯化、胰蛋白酶消解, 用液相色谱-串联质谱联用技术 (LC-MS/MS) 测定两者的肽, 比较核素比, 确定蛋白质表达的相关比。测定蛋白质表达 (比较蛋白质组学) 的图解见图 1-5。

1.7 翻译后修饰

所有真核细胞蛋白质大量主要的是翻译后修饰 (PTMs)。1997 年 Krishna 和 Wold 曾报道超过 200PTMs 的氨基酸。实际上 PTMs 是协助增加或者减少分子质量, 所以, 在 PTMs 鉴定和特性分析的蛋白质组学研究中质谱法是理想的工具。

一般地, 质谱法用于蛋白质鉴定也应用于 PTMs 的分析。但由于 PTMs 动态范围低、要求分离其中含有的修饰的肽以及在自然中 PTMs 常常是瞬变的等, 因此 PTMs 分析比简单蛋白质/肽的鉴定更困难。

两种主要的蛋白质翻译后修饰是磷酸化作用和糖基化作用。蛋白质的磷酸化作用是真核生物和原核生物中普遍存在的调节机制。内部细胞的磷酸化作用是由蛋白



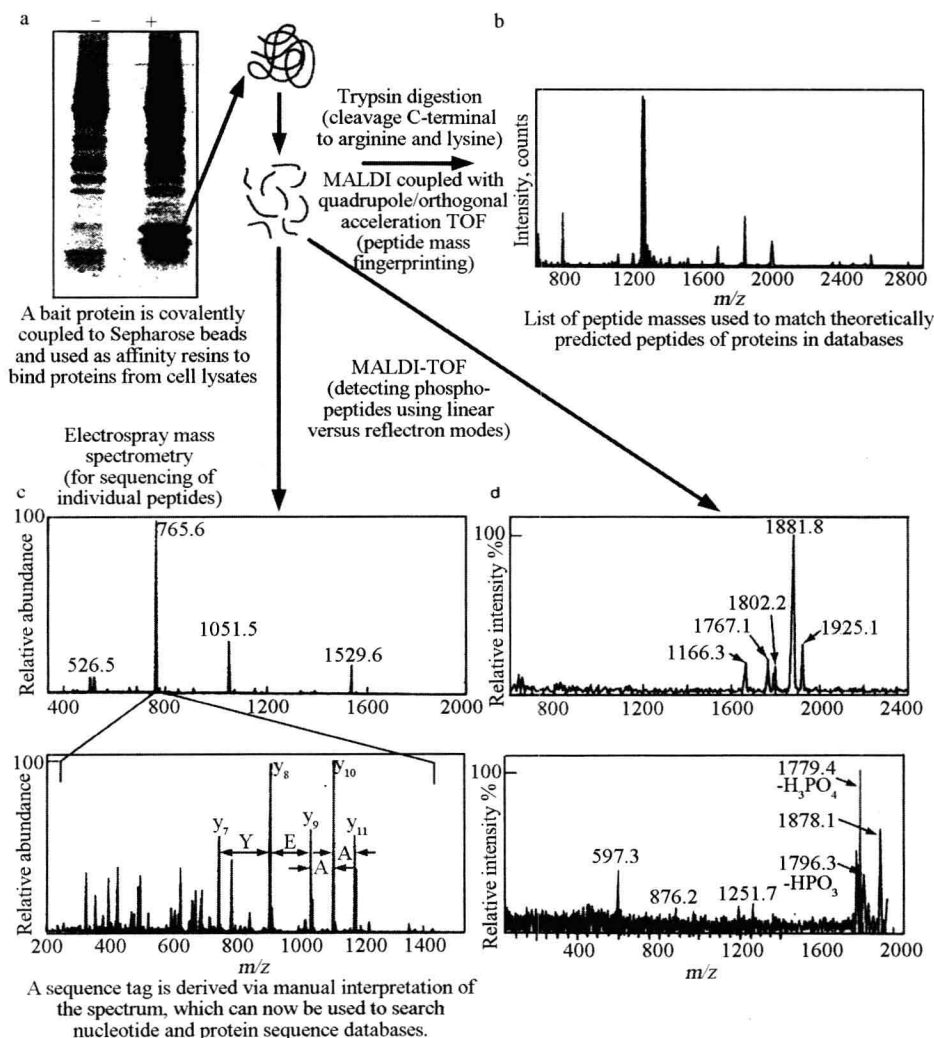


图 1-4 蛋白质和翻译后修饰的质谱鉴定示意图解 (文献 8)

质激酶调节 (脱磷酸作用是由蛋白质磷酸酯酶控制), 它是对外细胞信号激活反应并触发细胞至开启或者关闭多种过程, 例如代谢途径、激酶级联激活作用、膜运送、基因转录作用及游动机制。人基因组 575 蛋白质激酶区域, 相当于总基因组的 2%, 是蛋白质类中第三个众多的区域。

蛋白质磷酸化作用有几种测定方法: ^{32}P -标记蛋白质和肽的磷酸肽图谱分析、Edman 降解氨基酸序列分析及质谱法。

因为蛋白质组中蛋白质类的一个蛋白质在任何给定时间是磷酸化的, 所以在对磷酸化蛋白质/磷酸化肽检定和随后进行微特定分析前, 必需采用一个富集步骤。

细胞或组织分离蛋白质的复合体混合物, 用磷酸特异抗体免疫沉淀磷酸化蛋白

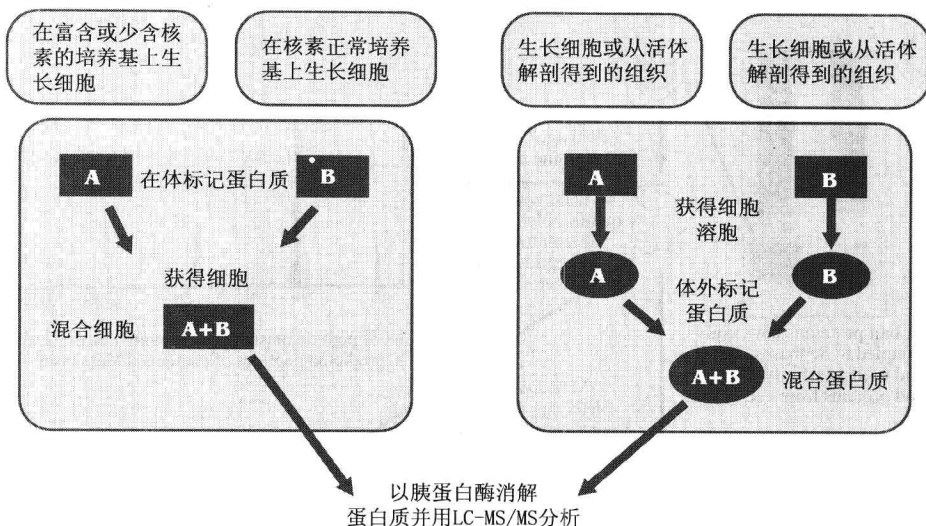


图 1-5 测定蛋白质表达（比较蛋白质组学）图解（文献 8）

质，蛋白质用二维或一维凝胶电泳纯化，用 ^{32}P -标记的磷酸特异抗体以印迹法鉴定磷酸化蛋白质。磷酸化蛋白质混合物用胰蛋白酶消解，以固相化的金属亲和色谱法（immobilized metal affinity chromatography, IMAC）、二维磷酸肽图谱分析及高效液相色谱法（HPLC）富集磷酸化肽。磷酸肽的混合物可用下列方法进行检定和微特性分析：

（1）体外或在体用 ^{32}P -三磷酸腺苷（ ^{32}P -ATP）标记，二维磷酸肽图谱分析，从薄层色谱板或高效液相色谱柱洗脱磷酸化肽，Edman 降解鉴定肽的氨基酸序列。

（2）磷酸肽的富集混合物用质谱（MS）或串联质谱（MS/MS）分析。母体离子（precursor ion）扫描，MS/MS 负离子模式/正离子模式。

（3）磷酸化肽的富集混合物用 MS 或 MS/MS 分析，MALDI-TOF 分析。

1.8 蛋白质组学与医药科学的发展

蛋白质组学是应用生物技术、分析技术并结合信息学，通过研究全部基因表达的蛋白质在不同时间与空间的结构与功能，全面地揭示生命活动的本质。

蛋白质组学的特点是采用大规模、高通量、高速度、高分辨率的蛋白质分离技术，高效率的蛋白质鉴定技术，全面地研究在各种特定情况下的蛋白质图谱。通过蛋白质组学研究，寻找目标材料（组织、细胞、细胞器），确认目标蛋白质的所在位置，对组织、细胞、细胞器等进行分级分离，目标蛋白质的快速分离到目标蛋白质的快速鉴定，目标蛋白质在不同时期，不同情况蛋白质表达谱的变化分析，发现疾病不同时期蛋白质标志物，对其进行评价，从而可形成对疾病的诊断并且为疾病的治疗提供理论基础。

疾病诊断的蛋白质组学研究流程如图 1-6 所示。

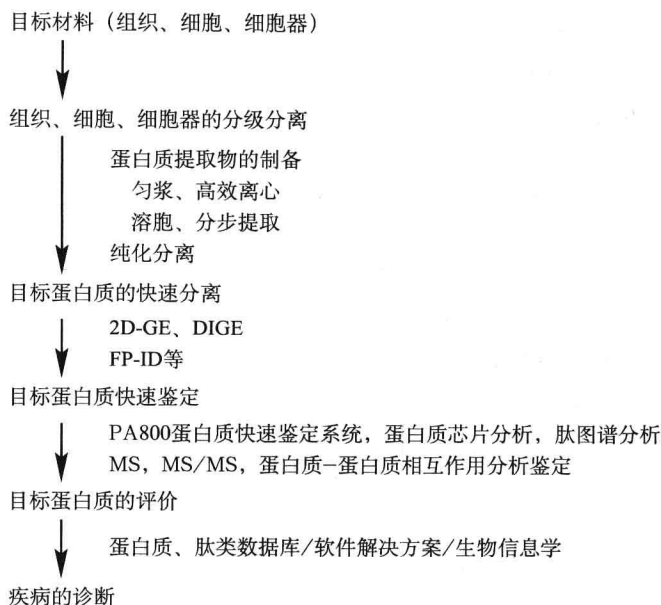


图 1-6 疾病诊断的蛋白质组学研究流程

组织或细胞中蛋白质的提取、纯化、快速分离、分析鉴定等新技术在第 2 章至第 21 章中分别加以讨论。

疾病的发生发展是一个复杂的过程，包括许多蛋白质的表达水平或表达类型上会发生改变。这种蛋白质可被检测出。例如帕金森病，通过对正常小鼠大脑和实验造成的类帕金森病的小鼠大脑组织蛋白质表达的比较，发现蛋白质标志物 FKBP - 12，且表达量很高，而正常大脑组织未检出 FKBP - 12，研究结果表明 FKBP - 12 与帕金森病有关。又如对用药物治疗与未治疗的 HCT - 116 人结肠腺癌细胞蛋白质表达的异差显示蛋白质组学研究，对评价该药物的疗效提供了有力的依据。

应用结构蛋白质组发现和确认药物靶标定近年来新药研究的方向。蛋白质组学研究表明，许多蛋白质是控制人类疾病的药物潜在靶标。在新药研究中，据统计，20 世纪 90 年代中期，全世界制药业寻找新药靶共约 483 个，其中主要是蛋白质。蛋白质组的分析研究可以全面地检测疾病和药物治疗过程中，蛋白质表达谱和蛋白质 - 蛋白质相互作用的变化，从而发现和确认药物靶标。应用蛋白质组学研究分析新技术结合信息学将促进新靶标的发现和验证，并设计和产生新的先导化合物。

蛋白质组学研究有助于疑难病症的诊断和治疗新药的开发，因而许多国家如德国、加拿大、法国、美国、日本和中国均大力开展这方面的研究。

2000 年 1 月法国一家公司宣布绘制成功了揭示幽门螺杆菌体内蛋白质组相互关系的图谱，认为这将有助于研究这种细菌体内各种蛋白质的功能，寻找出治疗胃肠疾病的新方法。德国和加拿大科学家也公布了酿酒酵母的部分蛋白质图谱，并根据这一图谱发现了蛋白质复合体之间相互作用的动态特性，认为这种特性可能有助于