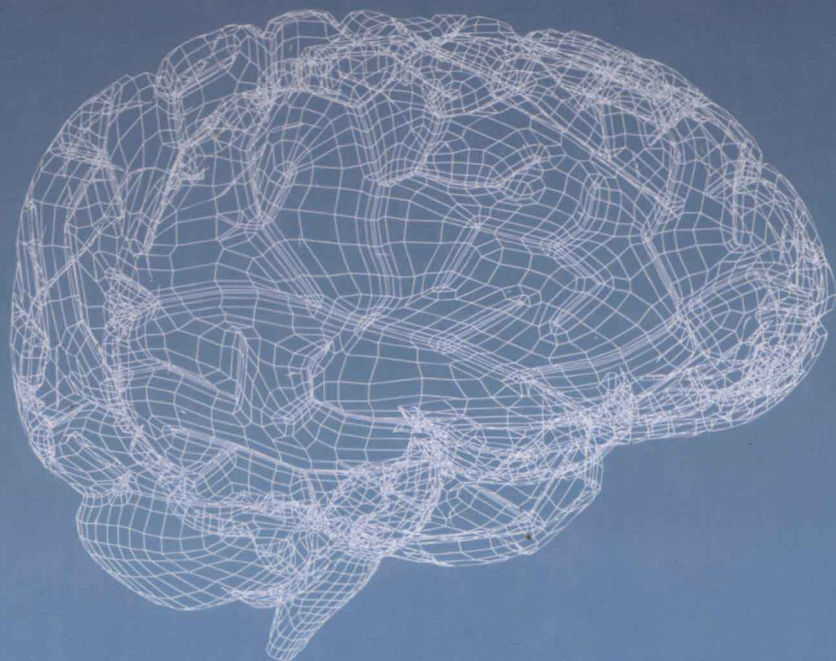


中枢神经系统疾病 蛋白质组学

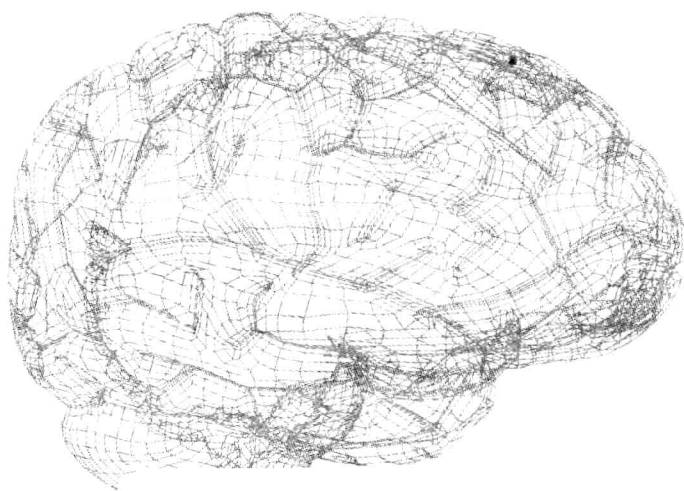
主 审 朱剑虹 杨芑原
主 编 刘英超 庞 琦



山东科学技术出版社
www.lkj.com.cn

中枢神经系统疾病 蛋白质组学

主 审 朱剑虹 杨芃原
主 编 刘英超 庞 琦



图书在版编目(CIP)数据

中枢神经系统疾病蛋白质组学/刘英超, 庞琦主
编. —济南: 山东科学技术出版社, 2010

ISBN 978 - 7 - 5331 - 5675 - 6

I. ①中… II. ①刘…②庞… III. ①中枢神经系
统—蛋白质—基因组—研究 IV. ①R338.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 189691 号

中枢神经系统疾病蛋白质组学

主审 朱剑虹 杨芃原

主编 刘英超 庞 琦

出版者: 山东科学技术出版社

地址: 济南市玉函路 16 号

邮编: 250002 电话: (0531) 82098088

网址: www.lkj.com.cn

电子邮件: sdkj@sdpress.com.cn

发行者: 山东科学技术出版社

地址: 济南市玉函路 16 号

邮编: 250002 电话: (0531) 82098071

印刷者: 日照昆城印业有限公司

地址: 日照市北京路北段

邮编: 276826 电话: (0633) 8373328

开本: 787mm × 1092mm 1/16

印张: 24

版次: 2010 年 9 月第 1 版第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5331 - 5675 - 6

定价: 49.00 元

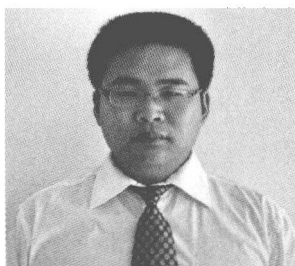
主 编 刘英超 庞 琦
副 主 编 金 红 傅艺冰 吴劲松 贺红卫
主编助理 厚瑞萍 晏国全 顾士欣

编 委

傅艺冰	山东大学附属省立医院妇产科
刘英超	山东大学附属省立医院神经外科
张 浩	复旦大学环境与工程系
张 军	复旦大学化学系
吴劲松	复旦大学附属华山医院神经外科
庞 琦	山东大学附属省立医院神经外科
杨晓雪	山东省鄞城县医院特检科
周永明	复旦大学化学系
金 红	复旦大学化学系
杨柳松	复旦大学附属华山医院神经外科
周厚广	复旦大学附属华山医院神经内科
厚瑞萍	山东大学附属千佛山医院
钟 凡	复旦大学化学系
晏国全	复旦大学化学系
唐 佳	复旦大学化学系
顾士欣	复旦大学附属华山医院神经外科
谢 嵘	复旦大学附属华山医院神经外科
梅广海	复旦大学附属华山医院神经外科
贺红卫	北京天坛医院

摄影及图片处理 顾士欣

主编简介



刘英超,医学博士,1976年生,山东省肥城市人,山东省立医院神经外科副主任医师。2009年毕业于复旦大学附属华山医院神经外科学专业,师从教育部特聘“长江学者”朱剑虹教授,获医学博士学位,发表学术论文20篇,SCI论文5篇。目前以第一负责人承担2009年度山东省科技攻关项目《垂体腺瘤的定量蛋白质组学研究》及2010年度国家自然科学基金项目《LCM纯化的侵袭性巨大泌乳素垂体腺瘤的定量蛋白质组学研究》。在神经外科主任、学科带头人庞琦教授指导下,与哈佛大学医学院附属 Beth Israel Deaconess 医院合作开展了肺癌脑转移瘤脑脊液的分子生物标记物筛选研究,与复旦大学医学院糖复合物卫生部重点实验室和分子医学教育部重点实验室开展了脑胶质瘤的蛋白质组学研究,多篇研究论文在国际权威期刊发表。现主要从事磁共振导航微创诊疗及神经外科临床工作,科研工作主要开展胶质瘤脑脊液及垂体腺瘤的蛋白质组学研究。

通讯地址:山东省立医院神经外科(济南市经五路324号)电子信箱:fdlyc@yahoo.cn



庞琦,男,现任山东大学附属省立医院神经外科主任,教授,博士生导师,新世纪“百千万人才工程”国家级入选人才,享受国务院特殊津贴。现已完成包括科技部国家科技支撑计划及国家自然科学基金在内的多项课题,获得省部级奖项。近5年来共发表论文100余篇,其中SCI收录20余篇。

序 言

如果在 10 年前提到蛋白质组学 (Proteomics), 恐怕知之者甚少, 而在略知一二者中, 部分人还持有怀疑态度。但是, 2001 年的美国《科学 (Science)》杂志已把蛋白质组学列为六大研究热点之一, 其“热度”仅次于干细胞研究, 名列第二。蛋白质组学的受关注程度和在短时间内取得的巨大成就令人刮目相看。

国际上蛋白质组研究进展十分迅速, 不论基础理论还是技术方法, 都在不断进步和完善。相当多种细胞的蛋白质组数据库已经建立, 相应的国际互联网站也层出不穷。2001 年 4 月, 在美国成立了国际人类蛋白质组研究组织 (Human Proteome Organization, HUPO), 目前人类蛋白质组计划已开展 7 个项目: 美国牵头的人类血浆蛋白质组计划, 中国牵头的人类肝脏蛋白质组计划, 德国牵头的人类脑蛋白质组计划 (Human Brain Proteome, HBP), 瑞士牵头的大规模抗体计划, 英国牵头的蛋白质组标准计划, 加拿大牵头的模式动物蛋白质组计划, 日本牵头的糖蛋白质组计划。目前脑蛋白质学在我国也已经蓬勃开展, 并取得了许多可喜的成绩。

开拓新的研究领域时, 每个研究人员将面临同样的挑战: 学习新的术语、概念和理论, 界定该领域当前的研究课题, 并掌握实验所需要的新方法、新技术。找到合适的学习资源也许与掌握课题本身一样困难, 尤其面对快速发展的蛋白质组学研究领域更是如此, 需要从浩如烟海的原始文献中收集合适的研究信息。

本书内容广泛, 涉及到神经系统疾病的各个方面。刘英超博士作为神经外科青年医生, 在蛋白质组学的研究方面积累了一定经验; 山东省立医院庞琦教授是国内著名的神经外科专家, 神经系统疾病的临床和基础研究建树颇多, 两位主编和复旦大学华山医院神经外科医师以及复旦大学化学系蛋白质组学

专家等一起编写了的这本专著。这本书浓缩理论、实验方案和生物信息研究于一体,不仅提供了蛋白质组学简明的基础理论,而且全面提供了神经系统各种疾病的蛋白质组学研究内容。这必将为中枢神经系统疾病蛋白质组学的研究增添更多思路和技术支持。

《中枢神经系统疾病蛋白质组学》无论对于蛋白质组学新领域的有经验的专家,还是从事神经生物学和神经内、外科以及神经内分泌研究的蛋白质组学研究学者,都是极其有价值的信息工具和研究参考用书。尽管蛋白质组学技术和研究日新月异,但通过聚焦于当前所公认的热门研究方向——脑蛋白质组学,我相信在未来数年内这本书都能保持其实用性、科学性和新颖性。

中国工程院院士
首都医科大学附属天坛医院

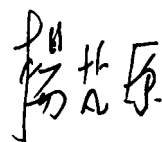
王忠斌

序 言

神经科学一直是生命科学领域的研究热点,神经系统疾病的诊断和治疗越来越受到科学家和临床医生的关注,因此,如何突破现有的研究技术瓶颈和医学难题,在一定程度上将借助于新的实验技术和方法。蛋白质组学作为一个新兴的生命科学分析平台,已经在基础研究和临床疾病诊断方面开始发挥重要的作用。随着人类脑蛋白质组计划(Human Brain Proteome, HBP)的进一步深入和发展,如何解决神经科学中重要的科学问题,如何将蛋白质组学技术和研究思路应用到神经科学的基础研究和临床应用中,需要这两个领域的研究人员能够对彼此专业内的基础知识和发展概况有所了解和掌握。

本书的主编刘英超博士曾在复旦大学华山医院深造学习,并在生物医学研究院完成了博士课题,在蛋白质学研究方面积累了初步的知识。在本专著中,复旦大学生命科学院多位质谱专家以及复旦大学华山医院、山东省立医院的神经外科学方面的专家为我们提供了丰富的中枢神经系统疾病的背景信息、基础知识、实验方案和蛋白质组学的临床应用。本书从最基础的质谱理论介绍,蛋白质组学的样品收集处理到最后的生物学功能验证,都做了详尽的阐述和分析,同时多位临床专家还把自己从事的研究做了详细的描述。这为今后研究者的实验设计和神经系统疾病蛋白质组学研究开展提供了重要的理论和经验依据。相信随着蛋白质组学的进一步发展,本书将为探索神经系统疾病蛋白质组学研究提供更广阔的思路和前景。

国家 973 项目“人类重大疾病蛋白质组学”首席科学家
复旦大学生物医学研究院常务副院长



前 言

蛋白质组学(Proteomics)以分析细胞或机体中整体蛋白成分为主要研究目标,同时鉴定感兴趣蛋白及其功能和相互作用,是生物医学中的一个主要部分,是基因组学深入研究的结果。其研究可以实现与基因组的对接与确认,直接揭示生命活动规律和本质特点以及人类重大疾患发生与发展的病理机制。人类蛋白质组计划(HPP),即在人类基因组计划后继续相关研究,解析人体中所有基因的产物——蛋白质,进而揭示生命活动的奥秘。2001年以来,先后推出了包括人类脑蛋白质组计划(HBPP)的多项计划。神经系统疾病的蛋白质组研究是继人类基因组计划成功实施后生命科学领域一项非常重要的战略性研究热点。

神经系统是人体内最重要的系统,起着“司令部”的作用。目前,神经科学研究日益深入和专业化,几乎没有哪一个科研人员能够精通神经科学的全部领域。中枢神经系统疾病复杂性远远超出了我们目前的认识能力,传统的细胞生物学和分子生物学等的实验室研究对于解决中枢神经系统疾病的发病机制,犹如只见树木不见森林。蛋白质组学的应用,使得我们可能从整体蛋白的水平更清楚地认识中枢神经系统疾病的机制。

和其他任何新兴的科学领域一样,蛋白质组学对于那些每天都进行大规模的蛋白质分析的研究者来说很熟悉,但是不从事该领域的研究者,特别是临床医生,对蛋白质组学并不是很了解。蛋白质组学有很多新的术语,蛋白质组学新技术也日新月异。跟得上新技术的进步确实很困难,有时候即使是蛋白质组学某一领域的专家也很难把他们的知识应用于其他领域。我们希望这本书能够对蛋白质组学专家介入“转化医学”研究起到桥梁作用,更能对从事神经生物特别是从事神经系统疾病研究的临床科研人员有所帮助,告诉他们蛋白质组学技术在神经系统疾病中能做什么,未来需要做什么。本书把蛋白质

组学不同技术及其在神经系统各类疾病中的应用组合在一起,以容易接受和掌握的方式呈现给读者。本书在前面章节对蛋白质组学的相关技术和研究方法做了详细的介绍,后半部分章节重点详细论述了神经系统疾病蛋白质组学研究的状况,部分疾病研究直接附带了编写人员自己的实验过程,以便其他研究者借鉴或参考。希望读者通过本书可以对神经系统疾病蛋白质组学研究所涉及的范围和未来研究重点有一个总体的认识。在每一章节末尾都有参考文献,包括一些经典的研究论文和综述,这对有意深入钻研神经系统疾病蛋白质组学的读者大有裨益。

复旦大学附属华山医院神经外科和复旦大学生物医学研究院的编写组成员的耐心、认真和面对紧张的截稿期限的乐观精神,促成了这本书的如期完成。我尤其要感谢我的导师——华山医院神经外科朱剑虹教授。朱老师严谨的治学态度、对科研工作的热爱和执著、胸怀的坦荡与宽广是我一生学习的榜样。朱老师对我不倦教诲的不仅有实验技巧,更有正确的科研思维以及作为一个临床医生和科研工作者应当具备的道德修养。在此我向朱老师表示最衷心的感谢!我要感谢山东省立医院神经外科庞琦教授对我的厚爱,庞主任对本书的整体设计和编稿内容提出了很多宝贵的建议并对本书出版工作大力支持,使本书得以顺利出版。

最后,我也谨以此书献给我的母亲。

山东省立医院



目 录

第一章 绪 论	1
第一节 蛋白质组学研究方法	1
第二节 蛋白质组学研究技术	8
第三节 神经系统疾病蛋白质组学研究策略	16
第四节 中枢神经系统疾病蛋白质组学研究状况	25
第五节 神经系统疾病生物学标记的发现与验证	28
第二章 蛋白质组学样品收集和制备	35
第一节 临床蛋白质组学样本制备基本原则	35
第二节 激光捕获显微切割技术获取组织标本	37
第三节 血液样本的收集和处理	41
第四节 干细胞培养与蛋白质组学样品的准备	45
第五节 脑脊液蛋白质组学样品的制备	51
第六节 免疫组化图像导航激光捕获切割技术制备垂体腺瘤蛋白质组学 研究样品	57
第三章 细胞和亚细胞蛋白质组学样品的制备	68
第一节 蛋白质制备的基本方法	68
第二节 细胞蛋白质的制备	78
第四章 蛋白质二维凝胶电泳分离技术	84
第一节 二维凝胶电泳技术的发展	86
第二节 蛋白质二维凝胶电泳分析的原理	88
第三节 二维凝胶电泳实验操作方法	91
第四节 二维凝胶电泳图像分析	95
第五节 二维凝胶蛋白质组学统计学分析	100
第五章 蛋白质组学研究中的非胶技术	112
第一节 液相色谱法	112
第二节 毛细管电泳	120
第三节 非凝胶技术与质谱联用在蛋白质组学研究中的应用	125

第六章	同位素标记定量蛋白质组学技术	132
第七章	质谱技术与蛋白质鉴定	139
第八章	蛋白质组翻译后修饰研究	166
第一节	蛋白质磷酸化分析	166
第二节	磷酸化蛋白质组学研究技术	170
第三节	金属氧化物在磷酸化蛋白质组学研究中的应用	181
第四节	糖基化蛋白质组学研究	187
第九章	功能蛋白质组学研究	201
第一节	蛋白质相互作用研究技术平台	201
第二节	蛋白芯片-飞行时间质谱技术在中枢神经系统疾病的应用	211
第十章	质谱技术与蛋白质组学数据生物信息学分析	217
第十一章	脊髓肿瘤蛋白质组学研究	226
第十二章	胶质瘤蛋白质组学研究	242
第一节	胶质瘤研究进展	242
第二节	胶质瘤定量蛋白质组学研究概况	247
第十三章	垂体腺瘤蛋白质组学研究	255
第一节	垂体腺瘤蛋白质组学研究进展	256
第二节	垂体 PRL 腺瘤蛋白质表达谱研究	262
第三节	福尔马林固定 PRL 腺瘤蛋白质表达谱研究	269
第四节	人类正常垂体蛋白质表达谱研究	281
第五节	基于同位素标签相对/绝对定量技术的垂体泌乳素腺瘤的定量比较蛋白质组学研究	290
第六节	垂体 PRL 腺瘤差异蛋白质的生物信息学分析	303
第十四章	脑脊液蛋白质组学研究	313
第十五章	脑血管性疾病蛋白质组学研究	320
第一节	脑血管疾病研究进展	320
第二节	蛋白质组学在脑血管相关疾病中的应用	325
第十六章	血浆/血清蛋白质组学在中枢神经系统疾病中的应用	336
第十七章	中枢神经系统损伤蛋白质组学研究	344
第一节	颅脑损伤蛋白质组学研究进展	344
第二节	颅脑创伤后大鼠海马的差异蛋白质组学分析	350
第十八章	神经系统干细胞蛋白质组学研究	358
第十九章	神经退行性疾病蛋白质组学研究	366
第一节	神经退行性疾病研究进展	366
第二节	帕金森病的蛋白质组学研究	367

第一章 绪 论

第一节 蛋白质组学研究方法

一、概述

蛋白质组学(Proteomics)研究的目的是从整体的角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态,了解蛋白质之间相互作用与联系,揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律。要对“全部蛋白质”进行研究是非常困难的,“功能蛋白质组学”(Functional Proteomics)的提出解决了这一难题,其研究对象是功能蛋白质组,即细胞在一定阶段或某一生理现象相关的所有蛋白质,它是介于对个别蛋白质的传统蛋白质化学研究和以全部蛋白质为研究对象的蛋白质组学研究之间的层次,并把目标定位在蛋白质群体上,这一群体可大可小,从局部入手研究蛋白质的各个功能亚群体,以便将来把多个群体组合起来,逐步描绘出接近于生命细胞的“全部蛋白质”的蛋白质图谱。蛋白质组学的核心内容之一就是蛋白质的鉴定,基于双向凝胶电泳的图像分析技术可以对组织细胞蛋白质表达的量、表观分子量和等电点等特性进行初步的鉴定,但是对于蛋白质的结构和功能必须借助其他技术手段。目前逐渐形成了以物质谱为核心的鉴定技术,这些技术对推动蛋白质组学的发展起了一定作用。功能蛋白质组学的研究为实际运作带来方便,人们可利用现有的技术手段来研究蛋白质组以及现群体中的各个蛋白质功能亚群,从理论和技术上使以“全部蛋白质”为研究对象的蛋白质组学的抽象概念具体化,使研究者们更易于从时、空、量、效方面动态、整体、深入地研究生理状态下同一组织在不同发育阶段或同一组织细胞在不同个体间或同一基因在不同组织细胞间,以及病理情况下同一疾病的不同发展阶段的蛋白质表达模式和功能模式的变化,揭示一些重要的生命现象和一些重大疾病的发生发展规律。狭义上讲,蛋白质组是指不同条件下细胞内蛋白质的变化,比如正常细胞和异常细胞之间,细胞用药和不用药之间的蛋白质表达谱的区别,这在疾病研究和药物筛选上很有意义,是目前蛋白质组学在应用研究方面最具前景的领域。当然随着蛋白质组研究的不断发展,蛋白质组学的概念也将不断发展和深化。

蛋白质组学主要涉及两方面的内容:一是研究蛋白质组的组成成分,即蛋白质组表达模式的研究,具体地说,就是对蛋白质组表达模式的研究,即检测细胞、组织中的蛋白质,建立蛋白质定量表达图谱,或扫描表达序列(EST)图谱。在整个蛋白质组水平上提供了研究细胞通路、疾病、药物相互作用和一些生物刺激引起的功能紊乱的可能性,对寻找疾

病诊断标志、筛选药物靶点、毒理学研究等具有重要作用。二是研究蛋白质组的功能,即蛋白质组功能模式的研究,目前主要集中在蛋白质组表达模式方面。蛋白质组表达模式研究的主要支撑技术有二维凝胶电泳(2D gel electrophoresis, 2D-GE)和以物质谱(Bio-mass)技术为代表的蛋白质鉴定技术及生物信息学(Bioinformatics)。从细胞、体液或组织等生物样品中提取的蛋白质,经2D-GE分离,染色,得到蛋白质表达谱。采用计算机图像分析技术,可对图谱上的蛋白质点进行定位、定量、图谱比较、差异点找寻等。对蛋白质组功能模式的研究,即确定蛋白质在亚细胞结构中的位置和鉴定蛋白质复合物组成等,便于研究蛋白质在细胞内的行为、运输及蛋白质相互作用网络关系,它对确定蛋白质功能和疾病诊疗的靶位极有价值。目前研究主要集中在蛋白质组表达模式方面,但是蛋白质功能模式的研究是蛋白质组研究的最终目标。

对胶上蛋白质的鉴定可采用两种不同的技术路线。一种是采用膜转印技术,将胶上的蛋白质转印到膜上(硝酸纤维素膜或PVDF膜),然后采用Edman降解或氨基酸组成分析等传统生物化学的方法进行分析,将分析结果输入特定的程序进行数据库检索,从而实现蛋白质的鉴定。另一种是以质谱为基本技术的蛋白质鉴定技术路线。将胶上蛋白点直接进行蛋白酶切,回收酶切肽段,采用MALDI-TOF-MS测定肽质量指纹谱(Peptide Mapping Fingerprint, PMF),或采用电喷雾串联质谱(ESI-MS-MS)测定肽序列,分别进行数据库检索,实现蛋白质的鉴定。如果是蛋白质数据库中不存在的蛋白质,还可以通过特定的检索程序进行基因数据库的分析检索。以质谱技术为基础的蛋白质鉴定技术,由于其灵敏度高(可以达到fmol)、速度快、易实现自动化,已经成为蛋白质组研究中主要的蛋白质鉴定技术。对已鉴定的蛋白质,还要采用分子生物学的方法进行进一步功能验证。

除了上述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,如用定量蛋白质组学研究的同位素编码亲和标签技术和双色荧光技术等;用于蛋白质-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以及蛋白质芯片技术等。

蛋白质组学的科学研究之所以能够取得蓬勃的发展,主要依赖于大规模高通量分离、分析技术的突破性进步。1999年Gygi等利用稳定同位素稀释原理发明了同位素亲和标签(Isotope-coded affinity tag, ICAT)技术,对复杂混合物中的蛋白质成分可做到快速分离、鉴定及定量分析。同位素标记相对和绝对定量(Isobaric tag for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术是近年来最新开发的一种新的蛋白质组学定量研究技术,具有较好的定量效果、较高的重复性,并可对多达4种甚至8种不同样本同时进行定量。联合应用液相色谱-串联质谱,可以先分离再分析,从而可鉴定二维电泳不易检测到的低丰度蛋白质。

蛋白质组学作为当今分析化学与生命科学的学科交叉点,近年得到了迅速的发展。蛋白质组研究具有观察由多基因事件引起的多蛋白质组分整体变化的独特优势,比基因组学更接近生命现象的本质。它在医学和药物的靶向研究中具有强大的潜在价值,目前已被广泛用于研究各种疾病的发生、发展规律,并在寻找疾病的分子标志物的研究中取得了很多重大的进展。

蛋白质差异定量分析,由于某些组织的获取较困难,必须采用高灵敏度,低样品消耗的方法进行蛋白质差异表达谱的分析,尤其是较低丰度的蛋白鉴定。DIGE 荧光差异蛋白表达分析系统在传统二维电泳技术的基础上,结合多重荧光分析的方法,在同一块胶上共同分离多个分别由不同荧光标记的样品,并引入了内标的概念,极大地提高了凝胶定量的准确性。

纳升级二维液质联用仪(nano-2DLC-MS/MS)系统是目前与二维凝胶电泳结合质谱鉴定系统并行发展的蛋白质组学研究必不可少的手段,由于其样品量非常少、在线分析,鉴定相同数量的蛋白质需要的时间又缩短为原来的 $1/5 \sim 1/3$,而且在仪器运行与分析成本上仅为二维凝胶电泳的 $1/10$ 。因此,是更有发展前途的适合于做相互作用蛋白质组研究新的技术平台。以稳定同位素标记为主,结合多维色谱-质谱大规模分离鉴定的非凝胶定量方法,实现蛋白质分离、鉴定和定量一体化完成,也是新一轮技术的发展方向。

在技术发展方面,蛋白质组学的研究方法将出现多种技术并存,各有优势和局限的特点,而难以像基因组研究一样形成比较一致的方法。除了发展新的技术和方法之外,更强调各种方法间的整合和互补,以适应不同蛋白质的不同特征。另外,蛋白质组学与其他学科的交叉也将日益重要,特别是,蛋白质组学与其他大规模科学如基因组学、转录组学、生物信息学等领域的交叉,所出现的系统生物学(System Biology)研究模式,将成为未来生命科学发展的主流方向。

二、蛋白质组研究中的样品分离

现代分离分析技术包括高效液相色谱(HPLC)、二维电泳、超临界色谱和毛细管电泳等分离模式,每种分离模式各具特点,在生物样品的分离分析中得到越来越广泛的应用。这其中包括了以下几个方面:高效液相色谱用于生物样品、手性样品的分离分析;生物样品的离子和离子交换色谱的分离技术;HPLC 制备分离各类不同极性的样品;二维电泳在生物样品分离分析中的应用;生物样品的超临界色谱分离分析;毛细管电泳、电色谱及芯片技术在生物样品分离分析中的应用。

蛋白质组研究中的样品分离,通常可采用细胞或组织中的全蛋白质组分进行蛋白质组分析。为了鉴定到更多的低丰度蛋白,也可以进行样品预分级,采用各种方法将细胞或组织中的全体蛋白质分成几部分,其中的多维蛋白质鉴定技术(Multidimensional protein identification technology, MudPIT)逐渐发展成为蛋白质组学研究的重要工具,可用体积排阻法对蛋白分子量的大小对蛋白进行初步的预分离后分别进行蛋白质组研究。样品预分离的主要方法包括根据蛋白质溶解性和蛋白质在细胞中不同的亚细胞器定位进行分级,如专门分离出细胞核、线粒体或高尔基体等细胞器的蛋白质成分。

对临床组织样本进行研究,寻找疾病分子标志物,是目前疾病蛋白质组研究的重要方向之一。但临床样本都是各种细胞或组织混杂,而且状态不一。如肿瘤组织中,发生癌变的往往是上皮类细胞,而这类细胞在肿瘤中总是与血管、基质细胞等混杂。所以,常规采用的癌和癌旁组织或肿瘤与正常组织进行差异比较,实际上是多种细胞甚至组织蛋白质的混合物的比较,其中夹杂了许多并不需要研究的细胞,而蛋白质组研究需要的通常是单一的细胞类型,这样才能使研究工作的结果更为准确。近来对组织样本的蛋白质组样品

制备方面也发展了新的技术,20 世纪 90 年代中期发展起来的激光捕获显微切割(Laser capture microdissection, LCM)在病理学、肿瘤生物学等方面具有广泛的应用,它能够快速准确地从复杂组织中分离均一的样品组织或细胞,取到所需的各类目标细胞,可以更好地避免其他的组织或细胞的污染,使得研究具有更好的专一性,可以用来进行对 DNA、RNA 及蛋白等的分析。应用 LCM 可以从胎盘组织中获得单一的滋养细胞,但因 LCM 数小时所获得的蛋白量仅为数百微克,这用常规的 2D-MS 蛋白鉴定是困难的,所以需要结合二维纳升级液相来实现蛋白的鉴定及分离。

样品制备完成后运用 IEF 和 SDS-PAGE 电泳对它进行分离,常采用银染和考马斯亮蓝染色即可观察到具有许多蛋白质斑点的凝胶图像。等电聚焦电泳与 SDS-PAGE 的具体操作步骤已经实现了程序化,均有详细操作流程参考,但是由于样品的不同,不同样品的具体条件还需要试验探索。第二相 SDS-PAGE 运行结束,染色完毕后,进行图像扫描,保存图像后进行分析,找出其中的差异点后进行胶内酶解,提取肽段后用质谱鉴定蛋白质。

三、蛋白质组研究中的样品分析鉴定

在蛋白质组研究中,目前最成熟、最有效的技术仍然是二维凝胶电泳分离-生物质谱鉴定技术,即首先用二维凝胶电泳分离纯化蛋白质,结合计算机定量分析得到的电泳图谱,再进一步用生物质谱技术对分离出的蛋白质进行鉴定,并运用现代生物信息学的技术对所得到的天文数字的数据进行处理,对蛋白质以及它们执行的生命活动做出尽可能精细、准确及本质的阐述。下面简要介绍一下目前蛋白质组学的两大支撑技术——二维凝胶电泳和生物质谱技术的主要发展。

二维凝胶电泳(2D-GE)技术于 1975 年由 O'Farrell 等创立,其原理是第一向在高压电场下进行等电聚焦(IEF),再在与第一向相垂直的方向上进行第二向十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。等电聚焦电泳由最初的载体两性电解质管电泳发展到目前的固相 pH 梯度(IPG)凝胶电泳,由于采用了 IPG 胶条,从而避免了因载体两性电解质引起的聚焦时间延长、pH 梯度不稳定、阴极漂移等现象。目前 IPG 二维凝胶电泳的分辨率达到了分离 1 万多个蛋白质点,但对过于偏酸或偏碱、高分子质量、极微量蛋白质以及极难溶性蛋白质的分辨率仍感困难。由于二维凝胶电泳对批量蛋白质可实现一次分离,具有高灵敏度和高分辨率、便于计算机进行图像分析处理、可以很好地与质谱分析等鉴定方法匹配的优点,因而成为目前分离蛋白质组分的核心技术。此外,二维高效柱层析、毛细管电泳也是分离蛋白质组分的有效技术。

蛋白质通过 2D-GE 进行分离,染色后根据蛋白质着色的深度初步判断其表达量的多少。然后将感兴趣的蛋白质切下、酶解后用质谱鉴定。2D-GE 经过 25 年的发展已经成为一项成熟的技术。用 MALDI-TOF 或 ESI-MS/MS 对胶内酶解蛋白质的鉴定也已经被广泛证明是行之有效的。采用该路线进行的许多研究表明,不论研究体系如何,许多鉴定的蛋白质都是相同的,这说明该方法的动态范围很有限。对酵母蛋白质组的系统研究也表明该方法通常只能看到高丰度的蛋白质。这恐怕也是该路线所面临的最大问题。针对这种困难和挑战,2D-GE 的技术也在不断的发展和完善之中,包括更灵敏的染色方法,更高分辨率的分离胶和 2D-GE 分离前样品的预分离等。

对分离蛋白质进行鉴定是蛋白质表达模式的又一重要内容,通常采用的蛋白质微量测序、氨基酸组成分析等传统的蛋白质鉴定技术——质谱法受到了人们的重视和应用,其基本原理是样品分子离子化后,根据离子间质荷比(m/z)的差异来分离确定样品的分子质量。质谱在 20 世纪初就已经产生,多用于无机物或小分子有机物的鉴定,直到 80 年代末随着“软电离”技术的出现而进入生物大分子(如蛋白质)的鉴定领域。所谓“软电离”是指样品分子电离时保留整个分子的完整性,不会形成碎片离子。软电离质谱用于大分子的鉴定,主要有以下特点:灵敏度高、快速,能同时提供样品的精确分子量和结构信息,既可定性又可定量,并能有效的与各种色谱联用,如用 HPLC-MS 来分析复杂体系。目前用于蛋白质鉴定的质谱主要有两种:电喷雾质谱和基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱。但要精确鉴定某一蛋白质通常还需要联合几种鉴定技术。最近,国外建立了一种将 MALDI-TOF-MS 技术直接用于原位分析组织切片或印片的方法,称为 MS-Image,并已制造出现了商业化的仪器上市。

液相色谱(Liquid chromatography, LC)、毛细管电泳(Capillary electrophoresis, CE)等高效分离技术具有多种分离模式,其分离度高,上样量少,且易于和质谱检测技术实现在线联用,已成为生物大分子快速分离鉴定的有利工具。色谱技术近年来有了飞速的发展,亲和色谱、反向色谱等技术随着色谱柱技术的完善,其分离时间和分离效率均有显著的改善。毛细管电泳是另一种高效的分离技术,因其分离度高、分离速度快且易于和电喷雾离子化质谱技术(ESI-MS)实现在线连接,在蛋白质分析中的应用也极为广泛。确定蛋白质分子的性质,尤其是面对其复杂多变的翻译后修饰作用,就使得一维的分离手段显得力不从心。Hancock 等探讨了以 HPLC、HPCE 二维分离技术,MS 检测的方法用于蛋白质组的研究,亦有用二维液相色谱联用分离蛋白质,MS 在线检测。二维分离的结果明显优于一维,在复杂的生物大分子的分析中具有应用前景。毛细管等电聚焦电泳-电喷雾质谱已被认为是取代二维凝胶电泳法的最有效的技术。近来发展的新技术,直接将液相色谱与质谱联用(LC/MS-MS),可以用一种完全自动化的方式迅速可靠地鉴定极微量的蛋白质。与基于抗体的方法比,质谱法还能够鉴定蛋白质或肽段翻译后的修饰,如糖基化、磷酸化等。基因组中新基因及开放阅读框的鉴定有助于丰富数据库信息,提高蛋白鉴定速度。对于 HPLC 而言,现在正朝微型化的方向发展,微型化可以减少溶剂(其中大部分是有害溶剂)的消耗量和珍贵的生物样品的需要量,同时有较高的质量灵敏度,并且易与质谱等其他分析检测手段联用。微型液相色谱至今仍在发展之中,其主要难点是微流量高压输液泵。微型液相色谱一般采用微柱或毛细管柱,而毛细管柱又是今后的发展方向,对流动相的消耗仅有常规 HPLC 的 1%~0.1%,固定相消耗和样品消耗为常规的 1% 以下,因此,微型液相色谱仪除了更加适应微量生物样品的分析外,无论从环保上还是从节能上都具有非常重大的意义。

随着蛋白质组学技术的高速发展,色谱与质谱联用技术已从普通高效液相色谱发展到二维甚至多维高效液相色谱,二维分离技术采用两种分离机制不同的色谱模式结合(如离子交换-反相色谱,亲和色谱-反相色谱),实现高通量、高效率的二维分离。将获得的质谱信息进行数据库搜索,可以大规模的鉴定蛋白质。利用二维色谱还可以研究混合蛋白质的翻译后修饰。多维色谱与质谱技术的联用,使得高通量的蛋白质鉴定研究飞