



生物实验室系列
Biology Lab Manual Series

Proteomics

A COLD SPRING HARBOR

LABORATORY COURSE MANUAL

冷泉港蛋白质组学 实验手册

[美] A. J. 林克 (Andrew J. Link) 编
J. 拉巴厄 (Joshua LaBaer)

曾 明 王恒樑 王 斌 等译



化学工业出版社

Proteomics

A COLD SPRING HARBOR

LABORATORY COURSE MANUAL

冷泉港蛋白质组学 实验手册

[美] A. J. 林克 (Andrew J. Link) 编
J. 拉巴厄 (Joshua LaBaer)

曾 明 王恒梁 王 斌 等译



化学工业出版社

· 北 京 ·

翻译人员名单

主 审 苏国富

译 者 (按姓氏笔画排序)

么山山 王 波 王 斌 王恒樑 朱 力
任慧梅 苏国富 李丽莉 李 娜 陈 沁
岳俊杰 赵志晶 袁蓉蓉 梁昊宇 董晓宇
喻 钢 曾 明 廖 翔 魏 波

各章译校人员:

章节	译	校
简介	曾 明	王恒樑
实验 1	王 斌	王恒樑
实验 2	喻 钢	王恒樑
实验 3	王 波 岳俊杰	廖 翔 王恒樑
实验 4	魏 波 岳俊杰	廖 翔 王恒樑
实验 5	廖 翔	苏国富 王恒樑
实验 6	朱 力 王恒樑	王 斌
实验 7	么山山	曾 明
实验 8	朱 力 王恒樑	王 斌
实验 9	赵志晶	曾 明
实验 10	梁昊宇	曾 明
实验 11	李丽莉	朱 力
附录 1、附录 2	李 娜	王 斌
附录 3、附录 4	董晓宇	王 斌
附录 5、附录 6	任慧梅	苏国富
附录 7、附录 8	袁蓉蓉	苏国富
附录 9、附录 10	陈 沁	王 斌
附录 11	李 娜	王 斌

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶，现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学时时刻刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展的实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了《生物实验室系列》图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，邀请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

《生物实验室系列》图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域

(如医学、药学、农学)的专业研究人员,企业或公司的生产、研发、管理技术人员,以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望《生物实验室系列》图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要,同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议,也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者,以便我们能够集思广益,将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种,推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学,为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意!

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂,欣欣向荣!

化学工业出版社
生物·医药出版分社

前言

正当 DNA 测序专家们加速完成人类基因组测序之际，舆论界的追捧已臻狂热，我们中的许多人也不能将自己置身于生物学中最有意义的大分子——蛋白质之外。诚然，DNA 测序比对蛋白质的鉴定、测序或研究要容易得多。剪接变异和大量可能的翻译后加工步骤，从加合物到选择性分裂，都产生了惊人数量的潜在蛋白质种类。蛋白质比其他任何一种大分子都要复杂；每一种蛋白质的独特化学性质使得不可能开发出对研究所有蛋白质都适用的方法。但是，生命中最美好的东西难道不需要尽最大努力去研究它们吗？

生命发生于蛋白质水平。蛋白质为生物学提供了动力，它们建造、加工、活化和失活；它们聚合、修复、维持、修饰、降解、折叠、迁移和运输；它们变短、发信号、裂解、抑制、消化、发荧光、诱导、切除、携带和阻遏；它们结合、转移、转位、扩增、校正、调节和执行数不胜数的活动。当情况变糟时，蛋白质毋庸置疑处于问题的核心。大多数疾病是由蛋白质功能异常导致的，并且实际上所有药物都通过修饰蛋白质功能起作用。

基因组测序计划的实施是蛋白质及其功能研究的分水岭。基因组序列信息产生了可预测蛋白质的许多氨基酸序列，导致了目前常规用于蛋白质质谱鉴定的信息学工具的发展。该信息也能鉴定出重组蛋白质中能被克隆的基因序列。并且，从更深层意义上来说，测序计划是将在物理学研究中常用的一种做法引入到生物学中，这依赖多学科团队的共同努力。因此开创了一项蛋白质研究的新方法——蛋白质组学，即将基因组计划的大规模策略和多学科方法应用于蛋白质及其生物学作用的研究当中。

实际上，所有类型的 DNA 实验从根本上都基于相同碱基的化学变化——核苷酸碱基通过氢键配对。相反，每一种蛋白质都有独特的化学性质和结构，使得不大可能使用通用方法。因而蛋白质组学研究手段必然比核酸研究手段数量更多且更复杂，至今我们仍然在学习如何在一定规模上应用这些手段。

用于研究蛋白质的蛋白质组学方法在 21 世纪初兴起，这一迅速发展的领域需要有一门教授这些方法的课程。对于学生、博士后、技术员、实验室管理人员和相关基础研究人员来说，都想在其研究中应用蛋白质组学，但大多数人不知道如何去用。即使当他们能寻求其他人来帮助整理他们的样品的数据时，他们也往往因为不能完全弄懂这些方法而无法解释研究数据。哪些数据可以相信，哪些数据需要质疑？

为适应这一需求，我们和密歇根大学的 Philip Andrews 于 2002 年在冷泉港实验室开设了蛋白质组学课程，这门课程是对该领域深入细致和手把手的介绍。该课程的基本形式是每年选择 16 名学生，教授他们蛋白质组学，包括演示实验过程以及解释数据。正如本书中所述，该课程涵盖的蛋白质组学专题很广，包括各种蛋白质制备和分离方法、质谱分析的一般方法、用于蛋白质表达的编码序列的高通量克隆、蛋白质芯片的制备和使用，以及验证这些数据的分析方法。该课程提供了一些蛋白质组学的最新方法，包括许多尚未公开发表的新方法。课程自从开设以来，深受学生们的欢迎，每年课程的申请者数量达到最终入选者的 5 倍之多。

本实验手册涉及大量一步一步（step-by-step）的操作程序，这些操作程序指导了在过去 6 年教过的大多数实验。实验过程介绍得很详细，包含了技术的注释和特定产品编号，有助于学生在其自己的实验室里重复这些方法。在诸如蛋白质组学这样迅速发展的领域中，现用于研究的部分方法将在未来几年中被新方法所取代。该课程中所教的这些方法也将不断发展成为研究蛋白质的新方法和新途径。当然，本手册中的所有方法都是经过时间检验且非常可靠的方法。我们也打算随着课程内容变化不时地更新本手册。

本书的出版，离不开我们许多杰出助教的协助，他们撰写了实验方案；也离不开我们实验室以及质谱、分析化学、生物信息学以及生物群落领域许多同仁的帮助，他们在开发实验方法上提供了支持。我们感激他们赐予的恩惠。

Joshua LaBaer

Andrew J. Link

译者的话

基因组学研究揭示了生命的蓝图，而功能基因组学研究才能使我们真正了解生命的本质。蛋白质是生命活动的体现者，以其作为研究对象的蛋白质组学是功能基因组学研究的重要组成部分。由于蛋白质几乎参与并主导了生物体中的任何一种生命活动，所以当疾病发生时其往往处于问题的核心，并且几乎所有药物都是通过修饰蛋白质功能起作用。这决定了蛋白质在疾病发病机理及防治研究中举足轻重的地位。同时，正是由于蛋白质参与了各种各样、形形色色的生命活动，使其具有独特的化学特性，远比通过以较为单一的氢键配对形成的 DNA 复杂得多。因此，针对蛋白质研究的方法也多种多样，并且随着物理、化学等其他学科的发展，不断产生新的研究方法。但是，这些方法无论在成熟度还是在高通量方面都需要进一步发展。

为了迎接蛋白质组学研究时代的到来，Andrew J. Link 和 Joshua LaBaer 教授通过对 6 年多来的蛋白质组学课程的教学实践，在不断修改与完善的基础上，总结出版了本书，包括各种蛋白质制备和分离方法、质谱分析的一般方法、用于蛋白质表达的编码序列的高通量克隆、蛋白质芯片的制备和使用以及验证这些数据的分析方法等内容。冷泉港实验室的《分子克隆实验指南》曾影响了一代又一代国内的分子生物学研究的科学工作者，希望本书也能对国内蛋白质组学研究起到一定的推动作用。

中国食品药品检定研究院和军事医学科学院生物工程研究所的相关实验室多年来一直从事蛋白质组学研究，在化学工业出版社的大力支持下，近年来在学习与工作之余组织了工作在科研一线的研究人员和研究生翻译了包括该手册在内的多本蛋白质组学专著。由于蛋白质组学的快速发展，而我们的知识有限，译文中难免存在疏漏和谬误之处，恳请同行和广大读者不吝指正，译者将不胜感激。

译者

目 录

简介.....	1
实验 1 全细胞裂解物的双向凝胶电泳和 MALDI 质谱分析	11
操作程序 1-1 酵母细胞裂解液的制备	15
操作程序 1-2 IPG 胶条的再水化和等电聚焦	16
操作程序 1-3 等电聚焦胶条的平衡	20
操作程序 1-4 第二向——SDS-PAGE	21
操作程序 1-5 用 SYPRO Ruby 进行全蛋白染色	23
操作程序 1-6 用 Pro-Q Diamond 进行磷酸化蛋白染色	24
操作程序 1-7 用 Pro-Q Emerald 进行糖蛋白染色	24
操作程序 1-8 用考马斯亮蓝进行全蛋白染色	25
操作程序 1-9 用质谱兼容的银染进行全蛋白染色	26
操作程序 1-10 2D 胶的图像分析和蛋白质回收	26
操作程序 1-11 胶内酶切	28
操作程序 1-12 MALDI 点靶	29
实验 2 用于质谱分析的蛋白质复合物的纯化	32
操作程序 2-1 培养并收集 TAP 标记的酵母细胞	33
操作程序 2-2 为纯化 TAP 标记蛋白质复合物制备酵母细胞抽提物	35
操作程序 2-3 第一步亲和富集——利用 IgG 亲和色谱从酵母抽提物中 捕获 TAP 标记的蛋白质复合物	37
操作程序 2-4 第二步亲和富集——TAP-标记的蛋白质复合物的钙调 蛋白亲和色谱	40
操作程序 2-5 与磁珠的结合	42
操作程序 2-6 蛋白质复合物的亲和纯化	45
实验 3 用 MALDI TOF/TOF 串联质谱进行肽的定性和定量分析	49
操作程序 3-1 实验描述	50
实验 4 蛋白质复合物分析——高灵敏液相色谱与串联质谱联用	60
操作程序 4-1 HPLC 柱毛细管的制作	61
操作程序 4-2 填装微毛细管 FSC 柱	64
操作程序 4-3 微毛细管 RP-HPLC 与 ESI-质谱联用	67
实验 5 用 IMAC 和质谱分析磷酸化肽	72

操作程序 5-1 制备 IMAC 样品	73
操作程序 5-2 制备 IMAC 柱和反相捕获柱 (前柱)	75
操作程序 5-3 制备 IMAC 柱	76
操作程序 5-4 样品处理	77
实验 6 全细胞裂解物的多维蛋白质鉴定技术分析	81
操作程序 6-1 使用多维蛋白质鉴定技术分析全细胞裂解物	83
实验 7 全细胞提取物的定量质谱检测技术 (iTRAQ)	88
操作程序 7-1 从酵母细胞制备肽	91
操作程序 7-2 以 iTRAQ 试剂标记肽	93
操作程序 7-3 应用反向色谱柱提纯肽	94
操作程序 7-4 多肽等电聚焦	95
实验 8 串联质谱数据的分析及确认	100
操作程序 8-1 使用 Global Proteome Machine 系统分析 LC-MS/MS 数据	104
操作程序 8-2 使用 ProteinPilot 软件进行肽段和蛋白质鉴定	112
操作程序 8-3 对数据库检索程序鉴定为能够匹配肽段序列的 MS/MS 谱图 进行评价	118
实验 9 开放阅读框的高通量克隆——构建大量表达结构	125
操作程序 9-1 利用 Gateway LR 反应构造表达结构	129
操作程序 9-2 用 Gateway LR 反应产物化学转化感受态细菌	130
实验 10 蛋白质微阵列的构建——核酸可编程性蛋白质阵列	134
操作程序 10-1 用氨基甲硅烷包被载玻片	139
操作程序 10-2 在 96 孔板中制备细菌的培养物	139
操作程序 10-3 从 96 孔板中分离质粒 DNA	142
操作程序 10-4 DNA 的生物素化、沉淀及样品布阵	145
操作程序 10-5 NAPPA 载玻片上蛋白质的表达	147
操作程序 10-6 检测 NAPPA 载玻片上的蛋白质	149
操作程序 10-7 在 NAPPA 芯片上测定 DNA	151
实验 11 使用核酸可编程性蛋白质阵列鉴定蛋白质-蛋白质相互作用	153
操作程序 11-1 NAPPA 芯片与查询蛋白共表达	154
操作程序 11-2 在 NAPPA 芯片上检测查询蛋白	156
附录 1 纳升电喷雾电离离子源和串联质谱装置和示范	159
附录 2 溶液内蛋白质的消化	164
附录 3 凝胶内胰酶消化已分离蛋白	167

附录 4 三氯乙酸蛋白质沉淀法 170

附录 5 氨基酸的单同位素和亚铵离子分子量 171

附录 6 氨基酸二肽分子量 172

附录 7 LTQ 离子阱的使用方法 173

附录 8 肽段混合物离线去盐 180

附录 9 感受态细胞的制备 183

附录 10 DNA 的定量 185

附录 11 注意事项 186

索引..... 193

简介

蛋白质组学已成为研究生物学过程和直接描绘细胞和组织变化的有力手段。在医药学领域，蛋白质组学是寻找人类疾病的新生物标志物和发现药物治疗新靶点的一种主要工具 (Omenn 2006)。现有治疗人类疾病的大多数药物均靶向蛋白质。

冷泉港实验室蛋白质组学课程和本手册用于培训学生、博士后和高级研究人员，教授他们生物医学中的蛋白质组学高新技术和实际应用。在本手册中，课程指导者收集了两周课程所需的基础蛋白质组学技术。这些通用的蛋白质组学技术可在生物医学研究中广泛应用，我们希望本手册能够成为许多工作在实验室一线科学家的手边参考书。

基因组学和蛋白质组学

在有全基因组序列之前，生物医学研究计划主要在少数基因或蛋白质上进行。遗传筛选或生化策略常常被用于鉴定与生物过程有关的新基因或新蛋白质。对基因和蛋白质进行分离和测序是费时和费力的过程。新蛋白质一般通过 Edman 测序法鉴定，需要分离单一蛋白质并且一次只鉴定来自蛋白质多肽的一个氨基酸。

分子生物学、PCR 和大规模 DNA 测序的出现从根本上改变了生物医学研究。由于克隆基因、制备重组蛋白方法的改进，导致各种功能分析方法的涌现，以及蛋白质三维结构数据的指数式增长。快速和廉价的 DNA 测序技术使得阐明大量基因和基因组的核苷酸序列简单化。用结构和生物学信息注释这一序列信息已成为全球性的大胆尝试 (ENCODE Project Consortium 2004; Birney et al. 2007)。利用已注释基因组建立的蛋白质数据库，理论上代表着由生物体基因组编码的全蛋白质组。本手册教授了各种蛋白质组学方法和技术以便在生物医学研究中开发和利用已注释的基因组。

蛋白质组的挑战

蛋白质在大小、形状、等电点、疏水性和生物学亲和力方面差异巨大。氨基酸侧链的多样性和蛋白质折叠成独特三维构象的能力赋予每个蛋白质独特的物理、化学和功能特性。正是这一多样性使蛋白质得以在细胞中表现如此多的不同功能。除物理特性的巨大差异外，蛋白质组中蛋白质丰度可跨多达 6 个数量级。调节蛋白，如转录因子，每个细胞平均只有 1~10 个拷贝，而结构蛋白在每个细胞中可能有 1000000 个拷贝 (Ghaemmaghami et al. 2003)。在人体血液中，蛋白质丰度的动态范围估计为 9~12 个数量级 (Omenn et al. 2005)。蛋白质组学的持续挑战就在于针对物理特性多样和数量迥异的蛋白质进行工作。

与其基因组相比，一种生物体的蛋白质组要复杂得多。选择性的 RNA 拼接、RNA 编辑、蛋白质水解过程和翻译后修饰极大地提高了细胞蛋白质组的复杂性 (Modrek et al. 2001; Zavolan et al. 2002)。据估计，所有人类基因的 40%~60% 产生具有不同外显子的转录子 (Modrek and Lee 2002)。在注释人类基因组的一项研究中，ENCODE 计划估计基因组的蛋白质编码区中每个基因平均有 5~6 个转录子 (Denoed et al. 2007)。这些

选择性的转录子有多少翻译成蛋白质还不清楚。蛋白质翻译后修饰，如增加功能基团至多肽、改变其结构或改变氨基酸化学性质，极大地扩展了蛋白质功能和活性的范围 (Walsh 2006)。这些对蛋白质和编码蛋白质转录子的修饰对蛋白质组的多样性有极大贡献。例如，人类基因组中约 25000 个编码蛋白质的基因估计可产生 500000~2000000 个独特的蛋白质 (International Human Genome Sequencing Consortium 2004; Jensen 2004; Birney et al. 2007)。

虽然一种生物体的基因组相对稳定，但其蛋白质组却非常动态。一种生物体在不同的细胞类型、细胞周期阶段、发育阶段和环境条件下有完全不同的蛋白质表达。在这些情况下，蛋白质相互作用、胞内定位和翻译后修饰不断地改变。蛋白质组学的巨大挑战之一就是准确和广泛地鉴定和定量细胞和组织的蛋白质组变化。

尽管全球都在努力注释基因组和蛋白质组，但许多基因和蛋白质的生物学功能仍不清楚。如啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，有约 6000 个蛋白质组成的较小的蛋白质组，始终是为全面揭示基因组和蛋白质组而开展的大规模遗传学、基因组学和蛋白质组学研究工作的焦点 (Winzeler et al. 1999; Uetz et al. 2000; Tong et al. 2001, 2004; Gavin et al. 2002, 2006; Giaever et al. 2002; Ho et al. 2002; Measday et al. 2005; Krogan et al. 2006)。虽然如此，我们仍只对其蛋白质组 40% 的生物学功能略知一二。

蛋白质组学：原理、技术和应用

蛋白质生物化学和纯化

蛋白质组学的基础是蛋白质生物化学。对于敢于尝试蛋白质组学的学生和学者来说，蛋白质生物化学和蛋白质纯化的基本知识是必要的。对于本手册的使用者，应对蛋白质生物化学和蛋白质纯化知识基本了解。如何收获细胞和组织、制备蛋白质提取物、纯化蛋白质、SDS-PAGE 电泳和检测蛋白质等实际知识将有助于你在蛋白质组学上取得成功。对于那些需要更多基础培训的人来说，有一些很好的资源可以利用 (Marshak et al. 1996; Walker 1996; Golemis 2002; Simpson 2003)。

显示蛋白质组

20 世纪 70 年代，双相 (2D) 凝胶电泳成为从全细胞提取物中解析和显示大量蛋白质的一项有效和灵敏的技术 (O'Farrell 1975; O'Farrell et al. 1977)。通过偶联等电聚焦和 SDS-PAGE，可分离数千个蛋白质 (图 0-1)。2D 胶上点的强度反映了蛋白质的丰度并用于定量蛋白质组。固相 pH 梯度 (IPG)、程序标准化、蛋白质荧光标记以及成像和计算机分析技术的进步，极大地改善了 2D 凝胶电泳的可重复性 (Bjellqvist et al. 1982; Blomberg et al. 1995; Klose Kobalz 1995; Unlü et al. 1997; Link 1998; Wildgruber et al. 2000; Righetti et al. 2004)。该技术已常用于全球范围内细胞和组织蛋白质的描绘。为鉴定蛋白质，从 2D 胶上切取代表性的 2D 斑点，用胰蛋白酶胶内消化，再对得到的多肽进行质谱鉴定。实验 1 训练学生建立和完成全细胞裂解物的 2D 凝胶电泳分析技术，包括对 2D 胶斑点中蛋白质的鉴定。

用质谱法鉴定并定量蛋白质组

质谱已成为推进蛋白质组学的主要技术，已成为灵敏和快速鉴定多肽、蛋白质和翻译后修饰技术的很好选择 (图 0-2)。该项技术能够在短时间内针对大量蛋白质获取大量数据。

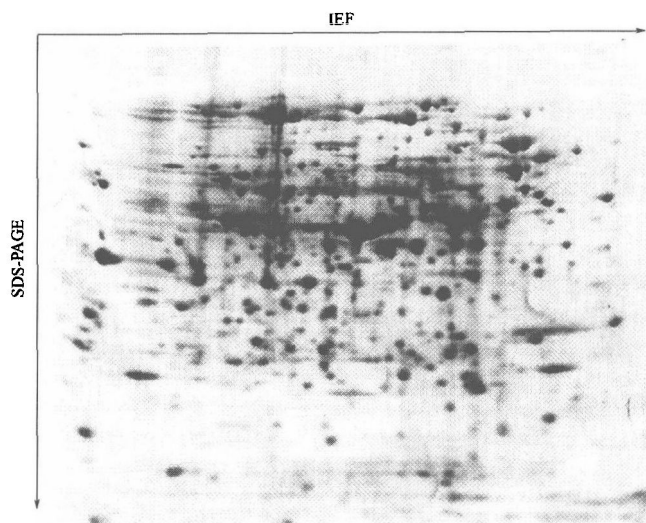


图 0-1 双向凝胶电泳 (2D) 显示的大肠杆菌蛋白质组。大肠杆菌的蛋白质提取物来自生长在富营养培养基上的细菌。首先基于蛋白质 (氨基酸组成) 等电点的不同用等电聚焦 (IEF) 对其进行分离, 然后基于蛋白质分子量 (大小) 的不同通过 SDS-PAGE 进行分离, 2D 点的强度反映了蛋白质组中蛋白质的丰度。考马斯亮蓝染色的凝胶显示了 1000 多个 2D 点 (引自 Link A. J. et al. 2004, © Elsevier 2004)

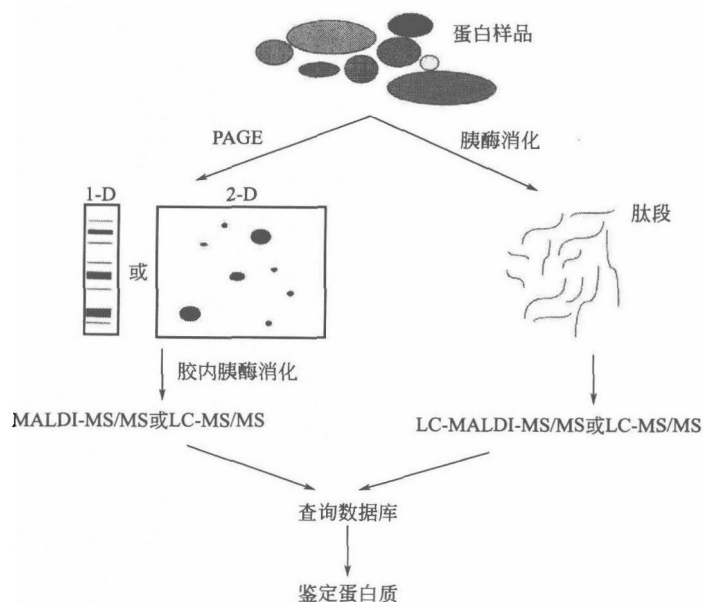


图 0-2 质谱法鉴定蛋白质流程图。蛋白质样品 (如细胞裂解物, 亚细胞组分, 蛋白质复合物或纯化的蛋白质) 需要通过凝胶电泳分离或直接经胰蛋白酶消化。用于凝胶分离的蛋白质, 蛋白质在胶中经胰蛋白酶消化后抽提多肽类, 所得到的多肽类用基质辅助激光解吸离子化技术 (MALDI) 结合串联质谱 (MS/MS) 分析, 获得每个多肽的序列光谱。另一种方法是利用液相色谱与串联质谱联用 (LC-MS/MS) 分析多肽获得串联质谱的光谱。对于这两种方法, 所获得的光谱数据在计算机上与数据库中蛋白质序列的理论特性相比较, 从而鉴定样品中的蛋白质

随着引入用稳定同位素标记多肽和蛋白质的多种方法,质谱已被用于对蛋白质组中大量蛋白质的丰度进行定量。

通常,质谱法测定气相离子的质荷比(m/z),在分析化学中常用于定量和表征各种小分子(<1000Da)的结构。在20世纪80年代后期,两种离子化技术引入用于多肽和蛋白质的离子化。基质辅助激光解吸离子化(MALDI)和电喷射离子化(ESI)属于软离子化技术(Whitehouse et al. 1985; Karas 和 Hillenkamp 1988),它们的典型特征是离子化过程中不降解多肽并且产生多肽和蛋白质离子极其高效。利用MALDI或ESI,质谱法(MS)能精确地测定多肽和蛋白质的 m/z 值。串联质谱法(MS/MS)分离单个多肽离子,然后使其片断化产生测序离子,所得的 m/z 可用于确定多肽的氨基酸序列和结构。实验3、实验4、实验6、实验7和附录1、附录7训练学生应用MALDI和ESI进行MS/MS分析以鉴定蛋白质。

液相色谱与质谱联用(LC-MS)是分析多肽混合物的一项有效分析技术。液相色谱尤其是高效液相色谱(HPLC)对复杂混合物中的多肽预先进行物理分离,然后应用MS分析。小规模、低流速色谱系统的开发极大地提高了LC-MS的灵敏度。时至今日,毛细管液相色谱与MS/MS联用在多肽和蛋白质复杂混合物的蛋白质组学分析中占主导地位,已被证明是快速鉴定和定量多肽、蛋白质以及翻译后修饰的一种极其有效的方法(Aeber-sold Mann 2003; Cravatt et al. 2007)。实验4训练学生建立和操作ESI源将反向毛细管液相色谱和MS/MS联用,来鉴定胰酶消化的低丰度蛋白质。实验7教学生如何将液相色谱和MALDI-MS联用来分析和比较蛋白质组。

多维液相色谱方法与MS/MS联用是快速鉴定和比较细胞和组织蛋白质组的一种有效方法(Link et al. 1999; Washburn et al. 2001; Zhen et al. 2004)。与对基因组进行DNA测序类似,“鸟枪法蛋白质组学”涉及用胰酶消化蛋白质组至多肽,用多维液相色谱分离多肽,用MS/MS鉴定单个多肽以及将已鉴定的多肽序列组装成一系列蛋白质等过程。通过同位素氨基酸体内标记细胞或用有化学反应性的同位素标签体外标记从组织细胞中提取的蛋白质,运用多维液相色谱与MS/MS联用可进行蛋白质组的定量比较(Gygi et al. 1999a; Ong et al. 2002; Ross et al. 2004)。实验6训练学生建立和操作多维毛细管液相色谱直接与MS/MS联用以全面分析胰酶消化的蛋白质组。实验7指导学生如何用稳定同位素标记蛋白质组,以及用多维色谱联用MALDI去定量分析和比较蛋白质组(Ross et al. 2004)。

MS数据的处理与分析是蛋白质组学的基本内容。对于大多数学生来说,它是冷泉港实验室蛋白质组学课程培训中最重要和最有用的内容之一。在基因组测序计划之前,对多肽串联质谱的解析是人工进行的。对质谱从头解析以获得多肽的氨基酸序列需要大量的培训和经验。1994年,SEQUEST计划是利用蛋白质数据库和未解析的MS/MS数据鉴定蛋白质的第一个公开计划(Eng et al. 1994)。该计划比较了蛋白质数据库中蛋白质的理论特性与MS/MS实验的实验值。自Sequest算法发表以来,产生了大量利用蛋白质数据库解析MS数据的计划(Perkins et al. 1999; Craig Beavis 2004; Geer et al. 2004; Tabb et al. 2007)。实验8训练学生应用几个MS搜索引擎对MS/MS数据进行分析处理,包括对胰酶消化的蛋白质进行验证以及翻译后修饰确认。

定量蛋白质组

DNA 微阵列谱系分析和其他技术使研究人员可测量细胞和组织的转录活性及 mRNA 的丰度。然而，mRNA 的表达量无法确定其转录后调节水平（决定最终蛋白质表达水平）。几项研究工作显示 mRNA 水平并不一定与蛋白质水平相关（Gygi et al. 1999b; Ideker et al. 2001; Chen et al. 2002; Greenbaum et al. 2003; Washburn et al. 2003; Lu et al. 2007）。定量蛋白质组学，可精确地测定细胞中蛋白质的量，弥补了由转录活性测定所提供的信息。本手册教授了两种不同的定量蛋白质组的方法。实验 1 和实验 7 分别用 2D 凝胶电泳以及同位素标记和 MS 技术定量蛋白质组中的蛋白质。

蛋白质相互作用

一般认为大多数蛋白质以复合体而非单体的形式参与特定的生物学过程（Alberts 1998）。例如，从细胞外转导信号的信号途径由蛋白质-蛋白质相互作用介导。对蛋白质相互作用的鉴定可用于建立生物学网络，从而摸清细胞中的全套相互作用（Uetz et al. 2000; Gavin et al. 2002, 2006; Ho et al. 2002; Rual et al. 2005; Krogan et al. 2006）。

术语“相互作用组”用来描述细胞所有相互作用（Sanchez et al. 1999; Cusick et al. 2005）。鉴定蛋白质与其他大分子（如 DNA 序列、RNA 分子）的相互作用是蛋白质组学研究的主要应用之一。一种未表征蛋白质的功能常常可通过鉴定其与何种其他分子相互作用来推断。对于已表征的蛋白质，发现其与未知蛋白质的相互作用进而认识其新功能。一种蛋白质可以是多蛋白质复合体中的一部分，各自有其独特的功能（Cohen 2002; Sanders et al. 2002）。实验 2 提供了从细胞或组织分离体内蛋白质复合体的两种不同实验方案。实验 11 训练学生如何应用蛋白质微阵列鉴定蛋白质体外相互作用。

翻译后修饰

尽管基因组可预测氨基酸的线性排列，但蛋白质翻译后修饰位点基本上属未知。翻译后修饰（PTM）是对蛋白质的共价化学修饰，典型地发生在自 mRNA 翻译之后。蛋白质的化学修饰极为重要是因为其潜在地改变了一种蛋白质的物理或化学特性、构象、活性、细胞上位置或稳定性。例如，一种蛋白质是否有活性取决于其磷酸化状态。400 多种不同的蛋白质修饰已经被鉴定，并且更多的将被鉴定（Creasy and Cottrell 2004）。蛋白质组学，尤其是 MS，在鉴定蛋白质修饰和修饰酶底物方面起着越来越突出的作用。

据估计 30% 的蛋白质组已被磷酸化（Hubbard and Cohen 1993; Cohen 2001）。磷酸化蛋白质组学是蛋白质组学的一个分支，注重在蛋白质组中鉴定、定量、分类和比较磷酸化蛋白质。实验 5 培训学生从整个蛋白质组富集磷酸化多肽并且利用 MS/MS 鉴定磷酸化位点的技术。

酶促反应对产生每一个翻译后蛋白质修饰起作用。蛋白质激酶、磷酸化酶、乙酰转移酶、脱乙酰转移酶、甲基转移酶、脱甲基转移酶、泛肽连接酶、deubiquitinating enzyme 和蛋白酶是用于翻译后修饰的酶类的实例。据估计翻译的人类基因组中有 5% 用于编码 PTM 的酶（Walsh 2006）。实验 2 和实验 11 教授了鉴定修饰酶的蛋白质底物的几个方法。

功能蛋白质组学

功能基因组已用于调查单个蛋白质的功能。功能基因组典型地要求构建全部开放读码框架（ORF）的一系列克隆，代表一种生物体基因组内的每个基因。克隆的收集促进单

个蛋白质的高通量、系统表达。尽管大规模的 cDNA 克隆已用于鉴定大量的外显子-内显子边界相连的表达基因，但是这些克隆对于蛋白质表达是不合适的，因为有 5'端和 3'端非翻译序列的存在。对于复杂蛋白质的表达，需要克隆全部全长的 ORF。从基因组 DNA 或 cDNA 文库，用 PCR 扩增全部 ORF 已用于从原核和真核生物体构建综合的克隆系列。当重组克隆系统用于克隆这种序列时，ORF 可以方便地转移到许多不同表达载体用于特殊实验 (Hartley et al. 2000)。几个研究小组已开发应用克隆文库的策略 (Braun 和 La-Baer 2003; Rolfs et al. 2008)。实验 9 教授了如何完成 ORF 的高通量克隆以及一系列表达载体的构建。

基因组规模收集克隆的 ORF 的有效性使得能发展高通量策略用于全面鉴定蛋白质相互作用和生化活性成为可能 (Martzen et al. 1999; Uetz et al. 2000)。几个小组已发展利用克隆文库构建蛋白质芯片的策略 (Zhu et al. 2001; Ramachandran et al. 2004) (图 0-3)。蛋白质芯片正在被装配，它的许多应用包括蛋白质-蛋白质和蛋白质-小分子的相互作用以及显示免疫反应 (Zhu et al. 2001; Anderson et al. 2008)。实验 10 教授学生如何利用直接在玻片上表达的 ORF 克隆系列构建高密度的蛋白质芯片。实验 11 教授了一种利用蛋白质芯片鉴定蛋白质-蛋白质相互作用的进展。

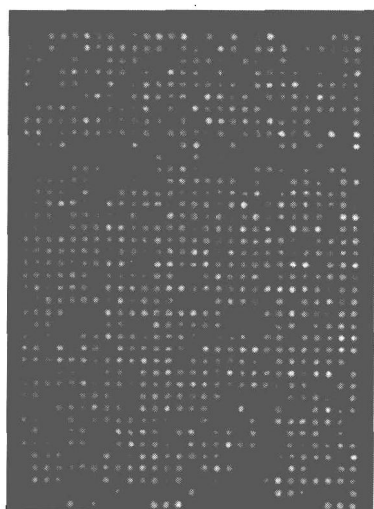


图 0-3 点在玻片上的特定蛋白质的蛋白芯片的一部分 (见实验 10, 图 10-13)。利用针对融合到每个蛋白质的 GST 表位的抗体检测蛋白质。该蛋白质芯片是根据本手册中实验 9 和实验 10 的操作步骤制备

蛋白质组学的授课形式

对于冷泉港实验室蛋白质组学课程，我们每年接受 16 名资质很高和学习欲望强的学生进行两周的课程。学生由有经验的实验室管理者、博士后以及研究生组合而成。我们将学生分为四组，每组把在科学和蛋白质组学方面有经验的成员混合在一起。在这两周中，四个组在本手册描述的不同实验中轮换。我们使用对整个小组的一般性教导和对每组四名学生的单个讲授相结合的教学方法。此外，我们邀请 8~9 名外来讲课人员进行演讲并直接与学生互动。讲课者的演讲内容涵盖了大范围的蛋白质组学话题，这些话题可能不包括在课程中，也可能有助于强化我们所教的实验。学生们大多数时间花在导师指导下完成本手册所描述的实验。我们坚信手把手的传授是教授蛋白质组学的最好方法。本手册描述了我们用于教授蛋白质组学的实验。