

蛋白质组鉴定技术

如果目前分离蛋白质组的最好技术是 2-DE, 那么随之而来的挑战是数百数千个蛋白如何被鉴定. 在这里, 我们不考虑传统的蛋白鉴定方法, 如免疫印迹法、内肽的化学测序、已知或未知蛋白的 comigration 分析, 或者在一个有机体中有意义的基因的过表达. 并不是因为这些方法无效, 而是因为它们通常耗时、耗力, 不适合高流通量的筛选. 目前, 所选用的技术包括对于蛋白鉴定的图象分析、微量测序; 进一步对肽片段进行鉴定的氨基酸组分分析和与质谱相关的技术.

(1) 图象分析技术(Image analysis). “满天星”式的 2-DE 图谱分析不能依靠本能的直觉, 每一个图象上斑点的上调、下调及出现、消失, 都可能在生理和病理状态下产生, 必须依靠计算机为基础的数据处理, 进行定量分析. 在一系列高质量的 2-DE 凝胶产生(低背景染色, 高度的重复性)的前提下, 图象分析包括斑点检测、背景消减、斑点配比和数据库构建. 首先, 采集图象通常所用的系统是电荷耦合 CCD(charge coupled device)照相机; 激光密度仪(laser densitometers)和 Phospho 或 Fluoro imagers, 对图象进行数字化. 并成为以象素(pixels)为基础的空间和网格. 其次, 在图象灰度水平上过滤和变形, 进行图象加工, 以进行斑点检测. 利用 Laplacian, Gaussian, DOG(difference of Gaussians) operator 使有意义的区域与背景分离, 精确限定斑点的强度、面积、周长和方向. 图象分析检测的斑点须与肉眼观测的斑点一致. 在这一原则下, 多数系统以控制斑点的重心或最高峰来分析, 边缘检测的软件可精确描述斑点外观, 并进行边缘检测和邻近分析, 以增加精确度. 通过阈值分析、边缘检测、销蚀和扩大斑点检测的基本工具还可恢复共迁移的斑点边界. 以 PC 机为基础的软件 Phoretix-2D 正挑战古老的 Unix 为基础的 2-D 分析软件包. 第三, 一旦 2-DE 图象上的斑点被检测, 许多图象需要分析比较、增加、消减或均值化. 由于在 2-DE 中出现 100%的重复性是很困难的, 由此凝胶间的蛋白质的配比对于图象分析系统是一个挑战. IPG 技术的出现已使斑点配比变得容易. 因此, 较大程度的相似性可通过斑点配比向量算法在长度和平行度观测. 用来配比的著名软件系统包括 Quest, Lips, Hermes, Gemini 等, 计算机方法如相似性、聚类分析、等级分类和主要因素分析已被采用, 而神经网络、子波变换和实用分析在未来可被采用. 配比通常由一个人操作, 其手工设定大约 50 个突出的斑点作为“路标”, 进行交叉配比. 之后, 扩展至整个胶. 例

如：精确的 PI 和 MW(分子量)的估计通过参考图上 20 个或更多的已知蛋白所组成的标准曲线来计算未知蛋白的 PI 和 MW. 在凝胶图象分析系统依据已知蛋白质的 pI 值产生 PI 网络，使得凝胶上其它蛋白的 PI 按此分配. 所估计的精确度大大依赖于所建网格的结构及标本的类型. 已知的未被修饰的大蛋白应该作为标志，变性的修饰的蛋白的 PI 估计约在 ± 0.25 个单位. 同理，已知蛋白的理论分子量可以从数据库中计算，利用产生的表观分子量的网格来估计蛋白的分子量. 未被修饰的小蛋白的错误率大约 30%，而翻译后蛋白的出入更大. 故需联合其他的技术完成鉴定.

(2) 微量测序(microsequencing). 蛋白质的微量测序已成为蛋白质分析和鉴定的基石，可以提供足够的信息. 尽管氨基酸组分分析和肽质指纹谱(PMF)可鉴定由 2-DE 分离的蛋白，但最普通的 N-末端 Edman 降解仍然是进行鉴定的主要技术. 目前已实现蛋白质微量测序的自动化. 首先使经凝胶分离的蛋白质直接印迹在 PVDF 膜或玻璃纤维膜上，染色、切割，然后直接置于测序仪中，可用于 subpicomole 水平的蛋白质的鉴定. 但有几点需注意：Edman 降解很缓慢，序列以每 40 min 1 个氨基酸的速率产生；与质谱相比，Edman 降解消耗大；试剂昂贵，每个氨基酸花费 3~4\$. 这说明泛化的 Edman 降解蛋白质不适合分析成百上千的蛋白质. 然而，如果在一个凝胶上仅有几个有意义的蛋白质，或者如果其他技术无法测定而克隆其基因是必需的，则需要进行泛化的 Edman 降解测序.

近来，应用自动化的 Edman 降解可产生短的 N-末端序列标签，这是将质谱的序列标签概念用于 Edman 降解，业已成为一种强有力的蛋白质鉴定. 当对 Edman 的硬件进行简单改进，以迅速产生 N-末端序列标签达 10~20 个/d，序列标签将适于在较小的蛋白质组中进行鉴定. 若联合其他的蛋白质属性，如氨基酸组分分析、肽质质量、表现蛋白质分子量、等电点，可以更加可信地鉴定蛋白质. 选择 BLAST 程序，可与数据库相配比. 目前，采用一种 TagIdent 的检索程序，还可以进行种间比较鉴定，又提高了其在蛋白质组研究中的作用.

(3) 与质谱(mass spectrometry)相关的技术. 质谱已成为连接蛋白质与基因的重要技术，开启了大规模自动化的蛋白质鉴定之门. 用来分析蛋白质或多肽的质谱有两个主要的部分，1)样品入机的离子源，2)测量被介入离子的分子量的装置. 首先是基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)为一脉冲式的离子

化技术. 它从固相标本中产生离子, 并在飞行管中测其分子量. 其次是电喷雾质谱(ESI-MS), 是一连续离子化的方法, 从液相中产生离子, 联合四极质谱或在飞行时间检测器中测其分子量. 近年来, 质谱的装置和技术有了长足的进展. 在 MALDI-TOF 中, 最重要的进步是离子反射器(ion reflectron)和延迟提取(delayed ion extraction), 可达相当精确的分子量. 在 ESI-MS 中, 纳米级电雾源(nano-electrospray source)的出现使得微升级的样品在 30~40 min 内分析成为可能. 将反相液相色谱和串联质谱(tandem MS)联用, 可在数十个 picomole 的水平检测; 若利用毛细管色谱与串联质谱联用, 则可在低 picomole 到高 femtomole 水平检测; 当利用毛细管电泳与串联质谱连用时, 可在小于 femtomole 的水平检测. 甚至可在 attomole 水平进行. 目前多为酶解、液相色谱分离、串联质谱及计算机算法的联合应用鉴定蛋白质. 下面以肽质指纹术和肽片段的测序来说明怎样通过质谱来鉴定蛋白质.

1) 肽质指纹术(peptide mass fingerprint, PMF)是由 Henzel 等人于 1993 年提出. 用酶(最常用的是胰酶)对由 2-DE 分离的蛋白在胶上或在膜上于精氨酸或赖氨酸的 C-末端处进行断裂, 断裂所产生的精确的分子量通过质谱来测量(MALDI-TOF-MS, 或为 ESI-MS), 这一技术能够完成的肽质量可精确到 0.1 个分子量单位. 所有的肽质量最后与数据库中理论肽质量相配比(理论肽是由实验所用的酶来“断裂”蛋白所产生的). 配比的结果是按照数据库中肽片段与未知蛋白共有的肽片段数目作一排行榜, “冠军”肽片段可能代表一个未知蛋白. 若冠军亚军之间的肽片段存在较大差异, 且这个蛋白可与实验所示的肽片段覆盖良好, 则说明正确鉴定的可能性较大.

2) 肽片段(peptide fragment)的部分测序. 肽质指纹术对其自身而言, 不能揭示所衍生的肽片段或蛋白质. 为进一步鉴定蛋白质, 出现了一系列的质谱方法来描述肽片段. 用酶或化学方法从 N-或 C-末端按顺序除去氨基酸, 形成梯形肽片段(ladder peptide). 首先以一种可控制的化学模式从 N-末端降解, 可产生大小不同的一系列的梯形肽片段, 所得一定数目的肽质量由 MALDI-TOF-MS 测量. 另一种方法涉及羧基肽酶的应用, 从 C-末端除去不同数目的氨基酸形成肽片段. 化学法和酶法可产生相对较长的序列, 其分子量精确至以区别赖氨酸(128.09)和谷氨酰胺(128.06). 或者, 在质谱仪内应用源后衰变(post-source decay, PSD)和碰撞

诱导解离(collision-induced dissociation, CID), 目的是产生包含有仅异于一个氨基酸残基质量的一系列肽峰的质谱. 因此, 允许推断肽片段序列. 肽片段 PSD 的分析在 MALDI 反应器上能产生部分序列信息. 首先进行肽质指纹鉴定. 之后, 一个有意义的肽片段在质谱仪被选作“母离子”, 在飞行至离子反应器的过程中降解为“子离子”. 在反应器中, 用逐渐降低的电压可测量至检测器的不同大小的片段. 但经常产生不完全的片段. 现在用肽片段来测序的方法始于 70 年代末的 CID, 可以一个三联四极质谱 ESI-MS 或 MALDI-TOF-MS 联合碰撞器内来完成. 在 ESI-MS 中, 由电雾源产生的肽离子在质谱仪的第一个四极质谱中测量, 有意义的肽片段被送至第二个四极质谱中, 惰性气体轰击使其成为碎片, 所得产物在第三个四极质谱中测量. 与 MALDI-PSD 相比, CID 稳定、强健、普遍, 肽离子片段基本沿着酰胺键的主架被轰击产生梯形序列. 连续的片段间差异决定此序列在那一点的氨基酸的质量. 由此, 序列可被推测. 由 CID 图谱还可获得的几个序列的残基, 叫做“肽序列标签”. 这样, 联合肽片段母离子的分子量和肽片段距 N-、C 端的距离将足以鉴定一个蛋白质.

(4) 氨基酸组分分析. 1977 年首次作为鉴定蛋白质的一种工具, 是一种独特的“脚印”技术. 利用蛋白质异质性的氨基酸组分特征, 成为一种独立于序列的属性, 不同于肽质量或序列标签. Latter 首次表明氨基酸组分的数据能用于从 2-DE 凝胶上鉴定蛋白质. 通过放射标记的氨基酸来测定蛋白质的组分, 或者将蛋白质印迹到 PVDF 膜上, 在 155°C 进行酸性水解 1 h, 通过这一简单步骤的氨基酸的提取, 每一样品的氨基酸在 40min 内自动衍生并由色谱分离, 常规分析为 100 个蛋白质/周. 依据代表两组分间数目差异的分数, 对数据库中的蛋白质进行排榜, “冠军”蛋白质具有与未知蛋白质最相近的组分, 考虑冠亚军蛋白质分数之间的差异, 仅处于冠军的蛋白质的可信度大. Internet 上存在多个程序可用于氨基酸组分分析, 如 AACCompIdent, ASA, FINDER, AAC-PI, PROP-SEARCH 等, 其中, 在 PROP-SEARCH 中, 组分、序列和氨基酸的位置被用来检索同源蛋白质. 但仍存在一些缺点, 如由于不足的酸性水解或者部分降解会产生氨基酸的变异. 故应联合其他的蛋白质属性进行鉴定.

蛋白质组相关设备及试剂:

[色谱系统](#)

[液相 HPLC 系统](#) | [毛细管 LC 系统](#) | [气相色谱系统](#) |
[自动固相萃取系统](#) | [联用色谱系统](#) | [更多...](#)

[质谱系统](#)

[飞行质谱](#) | [四极杆质谱](#) | [离子阱质谱](#) | [等离子质谱](#) |
[磁质谱](#) | [液质联用系统](#) | [气质联用系统](#) | [更多...](#)

[基因组/蛋白组设备](#)

[DNA 测序仪](#) | [基因分型系统](#) | [双向电泳系统](#) |

[蛋白质分析系统](#) | [蛋白质斑点切取系统](#) | [更多](#)

[蛋白纯化](#)

[蛋白提取](#) | [蛋白透析](#) | [蛋白定量](#) | [蛋白稳定](#) | [蛋白纯化](#) | [蛋白浓缩](#) | [蛋白体分离](#) | [亲和标记纯化](#) | [融合标记移除](#) | [病毒移除](#) | [脂移除](#) | [分馏试剂盒](#) | [更多...](#)

[蛋白分析](#)

[PAGE 凝胶制备](#) | [蛋白电泳试剂](#) | [预制蛋白凝胶](#) |

[蛋白标准品](#) | [蛋白凝胶染色](#) | [蛋白检测试剂盒](#) | [更多...](#)