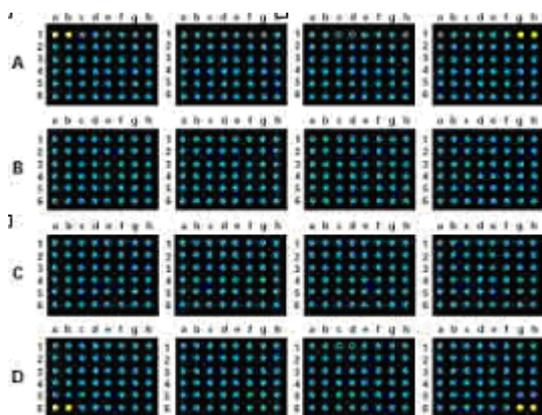


新一代蛋白研究工具——抗体芯片

蛋白组学研究是即基因组学研究后的生命科学发展的一个大方向之一。蛋白质的结构和功能最终直接影响着生命活动的变化，基因转录水平的研究只能在一定程度上反映基因表达产物的变化，而真正发挥功能的蛋白要经过转录后加工、翻译调控以及翻译后加工等许多步骤和调控才能形成，因而对蛋白质的直接研究才能真实的解释各种生命现象。但是目前研究蛋白质的手段和方法还没有很大的发展，所以寻找有效、快捷的蛋白分析技术成为了至关重要的一个环节。

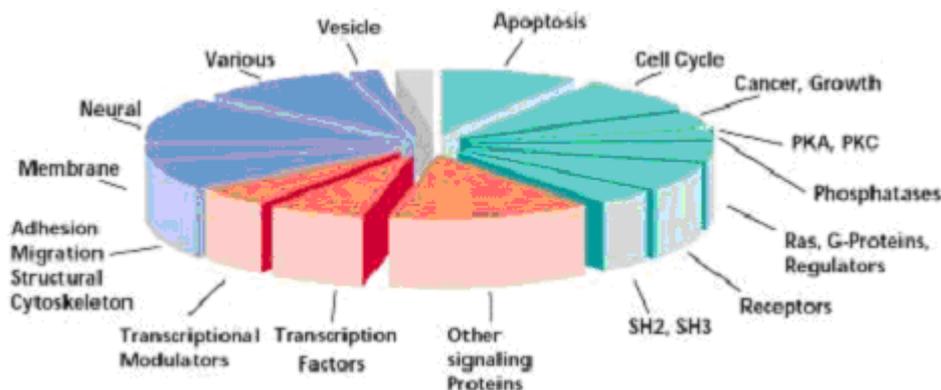
蛋白芯片技术的出现给蛋白组学研究带来新思路。蛋白组学研究中一个主要的内容就是要研究在不同生理状态或病理状态下蛋白水平的量变，微型化，集成化，高通量化的抗体芯片就是一个非常好的研究工具，它也是蛋白芯片中发展最快的芯片，而且在技术上已经日益成熟。这些抗体芯片有的已经在向临床应用上发展，比如肿瘤标志物抗体芯片等，还有很多已经用在研究的各个领域里。

第一张商品化的抗体芯片是由美国 BD Clontech 公司推出的。这是一张用于研究的抗体芯片，芯片上排列了 378 种已知蛋白的单抗 (Ab Microarray 380, 目录号 K1847-1)，这些单抗对应的蛋白都是细胞结构和功能上十分重要的蛋白，涉及信号传导、肿瘤、细胞周期调控、细胞结构、细胞凋亡和神经生物学等广泛的领域。通过这张芯片，我们在一次实验中就能够比较几百种蛋白的表达变化。



Ab Microarray 380 上抗体是经过精心挑选的，这些抗体不仅可以识别人源的蛋白，对小鼠和大鼠样品同样有效。另外，每个抗体的结合亲和力都经过了实验测定，从多种抗体来源的克隆中筛选出反应特异性好，交叉反应程度小，信号明显的抗体，并且还要保证信号与抗原浓度有着良好的线性关系。优化的抗体探针才可以保证反应的特异和灵敏（可检测 20pg/ml 的抗原浓度）。芯片的检测是用荧光报告分子，常用的荧光扫描仪都能够完成。

第一代的蛋白芯片和 DNA 芯片一样是作为一种定性分析的工具，可用于分析样品之间相关蛋白的相对表达丰度；还可以作为 DNA 芯片的补充，用于研究蛋白和基因表达之间的关系。



操作流程

Ab Microarray 380 抗体芯片并不要求特殊的实验操作，只要一般常规的操作就可以完成以往极为复杂耗时的工作。整个操作流程包括：从 50—200mg 组织或细胞、体液中进行蛋白质抽提——用 Cy5 和 Cy3 两种不同颜色的荧光分子分别标记两个样品——洗去多余的标记分子——与芯片杂交孵育——扫描分析结果。整个过程从样品制备到结果分析只要一天即可完成，你只要准备好样品、荧光染料、脱盐纯化柱（处理体液样品时用）和荧光扫描仪，其他的试剂全部由试剂盒提供。

优化的试剂

随芯片试剂盒提供的蛋白抽提/标记缓冲液，是专门为抗体芯片而设计的，非常温和的去垢剂在能高效抽提膜结合蛋白（相比 SDS 煮沸法能抽提 95% 以上的蛋白）的同时能保持蛋白的天然活性（非变性条件），这样能够保证抽提的蛋白的溶解性和代表性，保证以后的实验结果的真实性和原始材料的一致性。

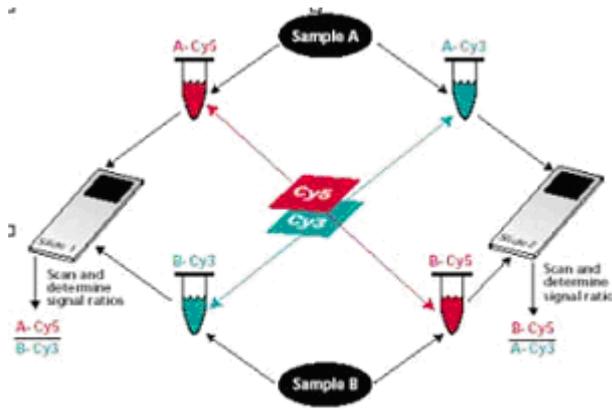


Figure 4. Your array results are internally normalized.

内源标准化信噪比(Internally Normalized Ratio)

内源标准化处理可以得到一个内源标准化信噪比（INR），内源标准化处理是指对两个样品（A、B）中分别用两种荧光标记分子（Cy3 和 Cy5）标记，并交叉与芯片杂交（见图，A-Cy5 和 B-Cy3 一组,A-Cy3 和 B-Cy5 一组分别和芯片杂交），可以作为消除抗原—抗体结合效率差异的对照，也可以消除潜在的不同荧光分子的标记效率差异。假如 Cy5 标记效率高于 Cy3，单纯一个实验的结果就会有偏差（Cy5 标记的样品信号偏高），用这种双向交叉反应就可以消除这种偏差。两芯片杂交结果分别得到两组 Ratio 值，通过免费下载的工具就可以自动算出每个抗体抗原的 INR 值，这就代表在两个样品间某个蛋白的相对丰度。这种内源标准化处理可以大大减小样品分析的偏差。

抗体芯片检测的结果不是蛋白的绝对含量而是 378 个目的蛋白在两个样品之间的相对丰度。值得注意的是由于抗体抗原结合的差异、标记差异等原因，根据芯片结果信号的强弱判断同一样品中两种不同蛋白的多少是不恰当的。