

## 第二章 蛋白质组学研究方法

## 2.1 概述

### 1) 蛋白质组学比基因组学研究复杂

- 蛋白质数目大于基因组数目，人类基因2万左右，蛋白质 > 10万；
- 蛋白质是动态的；
- 4种核苷酸-DNA；20氨基酸-蛋白质；
- 蛋白质不能用PCR扩增；
- 蛋白质分析还不能实现完全自动化。



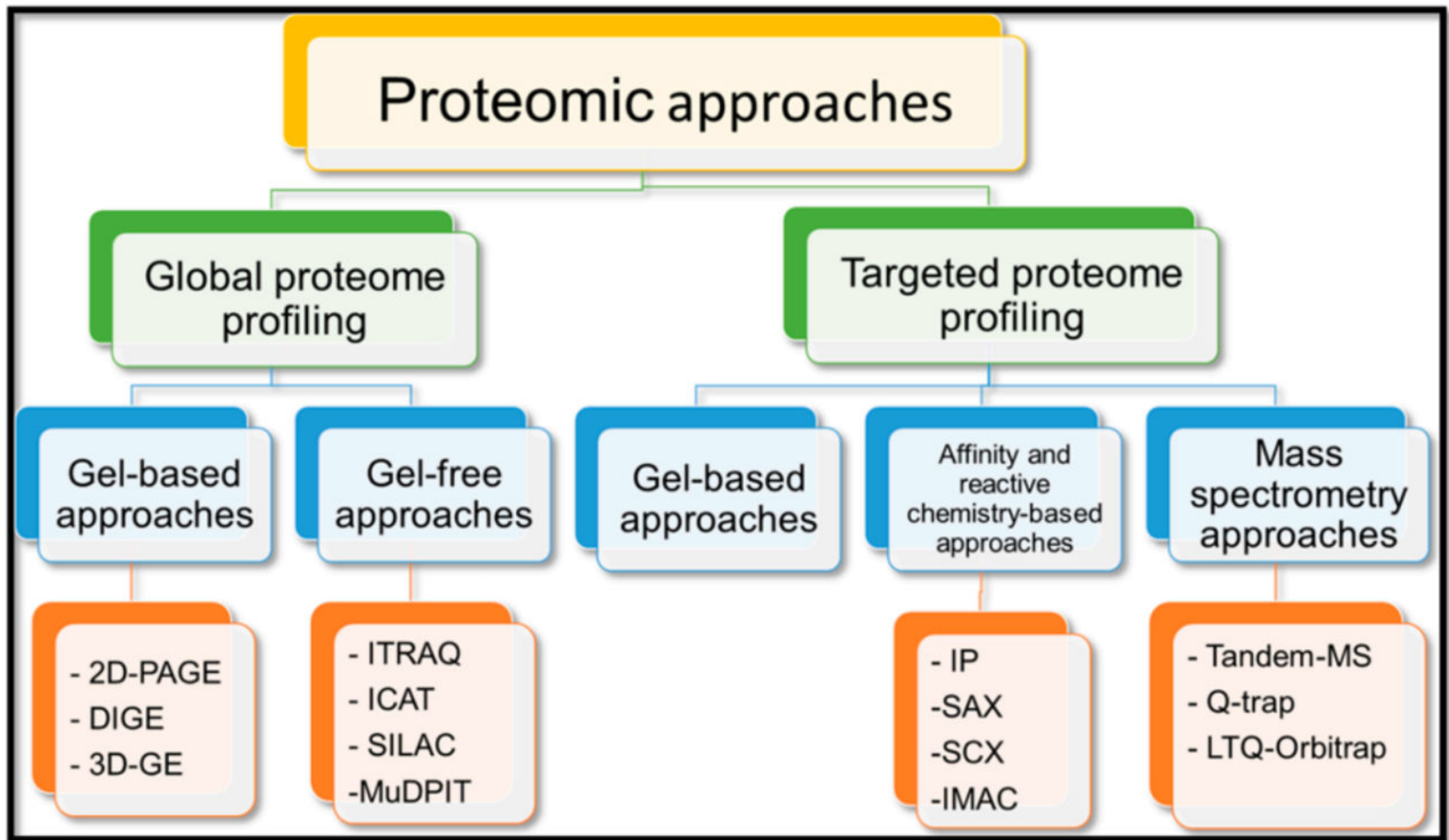
# DNA分析(cDNA Microarray)与蛋白质分析(2-DE-MS)方法比较

	DNA	蛋白质
检测水平/灵敏度	DNA可用PCR扩增 检测极限约为30 copy/transcript	蛋白质无法被扩增 荧光标记: 200 pg 放射标记: <1 pg
检测方法	高度特异性 DNA与互补DNA/RNA的杂交能力 使DNA和容易固定化在靶上并用 荧光探针检测, 可用高密度列阵 荧光扫描仪	非特异性 蛋白质可以用非特异的方法染色或用较特异的 方法如抗体检测
分子的稳定性	DNA是非常稳定的, 即使提高温度 下也不失去生物活性	蛋白质在变性下将丧失天然功能
重复性	重复性好 将DNA固定化在表面已经是成熟的技术, 加之DNA有固有的稳定性, 方法的重复性较好	重复性不好 由于蛋白质分子的稳定性不好, 方法的重复性 需格外关注
消耗	初始的投入较大, 但短期内得到的 数据相当大	目前蛋白质分析方法依赖昂贵的仪器设备
专业化	方法已经相当标准	分析较难, 大部分工作需受过专门训练的人 来操作
时间/自动化 翻译后修饰 动态	已成为高通量的扫描技术 无法研究 5个数量级	目前还达不到工业化需求的高通量 只能用此方法研究 7-12个数量级



## 2) 蛋白质分析技术的发展

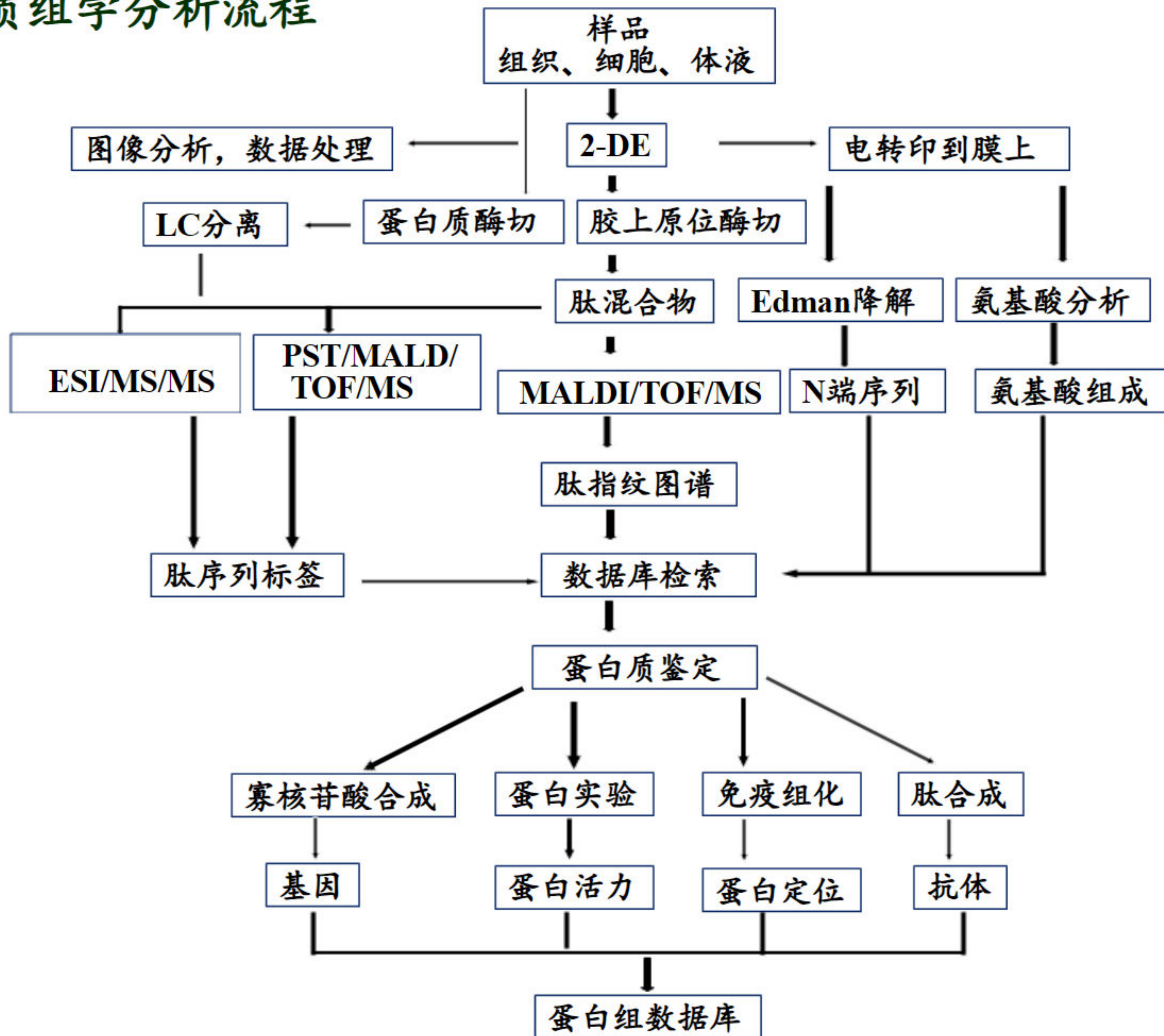
- 2D-PAGE, IPG, 2D-液相色谱
- 图像分析与数据处理技术
- 生物质谱技术 (MALDI-TOF-MS, ESI-MS)
- MudPIT (多维蛋白质鉴定技术, 鸟枪法 (shotgun) )
- 定量蛋白质组学技术 (如: 双色荧光技术、ICAT、iTRAQ等)
- 酵母双杂交
- Protein chip
- AI 技术



**Schematic representation of various proteomics approaches.**

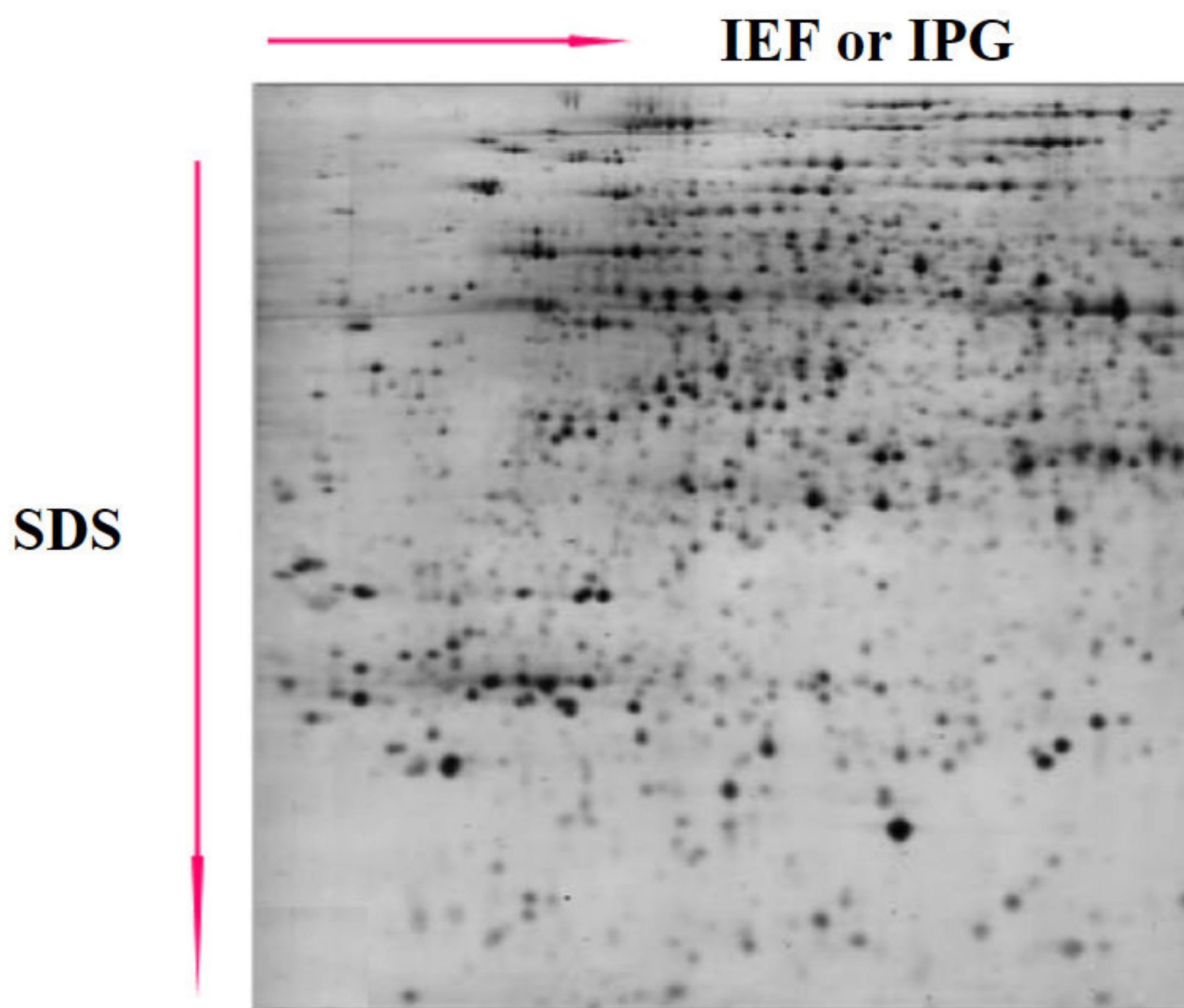


### 3) 蛋白质组学分析流程



## 2.2 大规模的蛋白质分离技术

### 1) 二维凝胶电泳技术 (2D-PAGE)



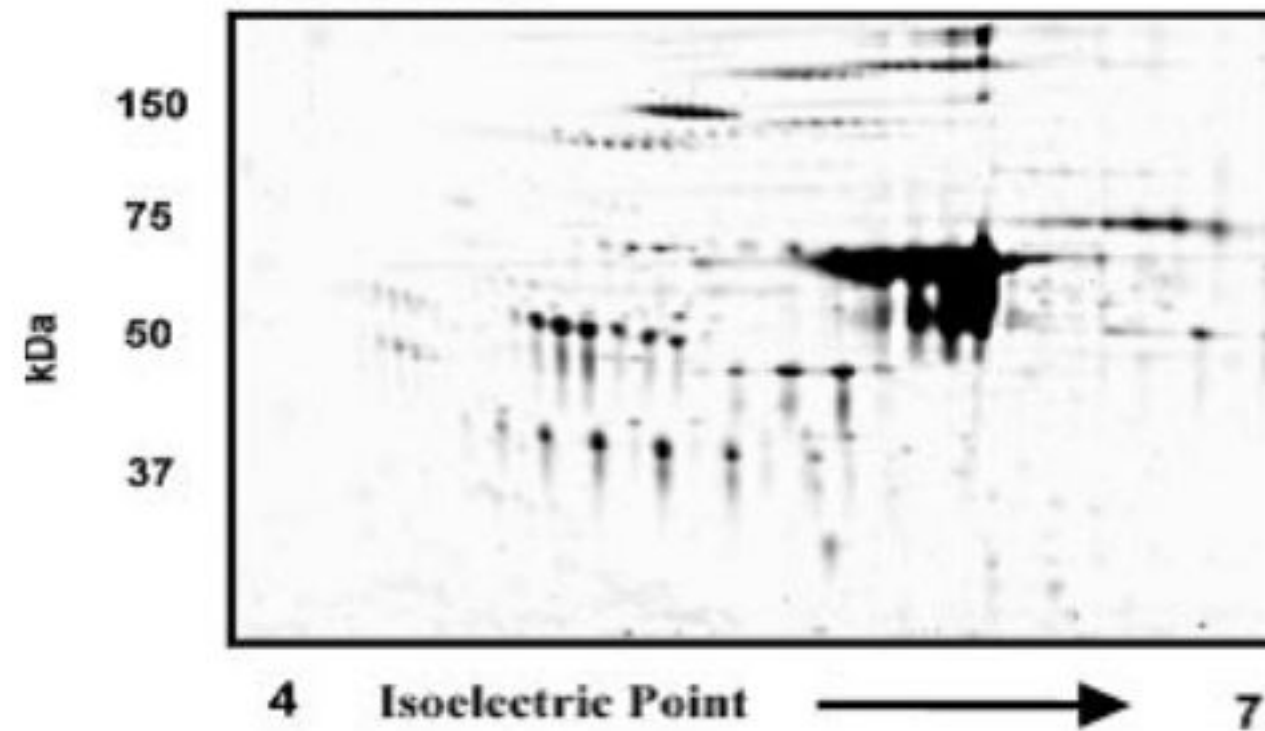
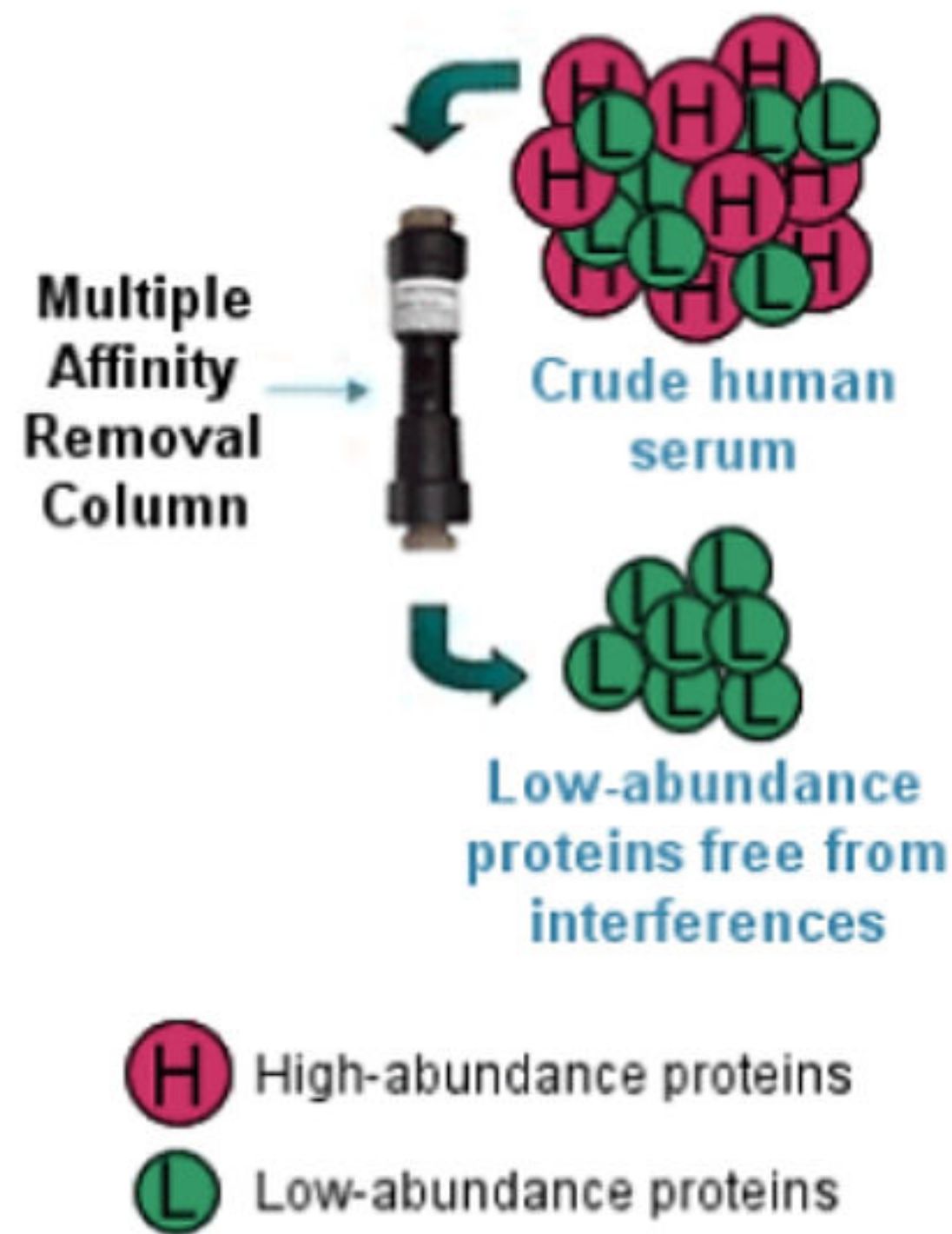


- 1975年由O'Farrell提出的;
- 是目前唯一能将数千种蛋白质同时分离与展示的分离技术;
- 其原理是在相互垂直的两个方向上, 分别基于蛋白质不同的等电点和分子量将蛋白质分离开;
- 20世纪80年代初出现固相化pH梯度 (IPG) (第一相等点聚焦);
- 不足之处: 膜蛋白, 碱性蛋白, 低丰度蛋白分离困难。

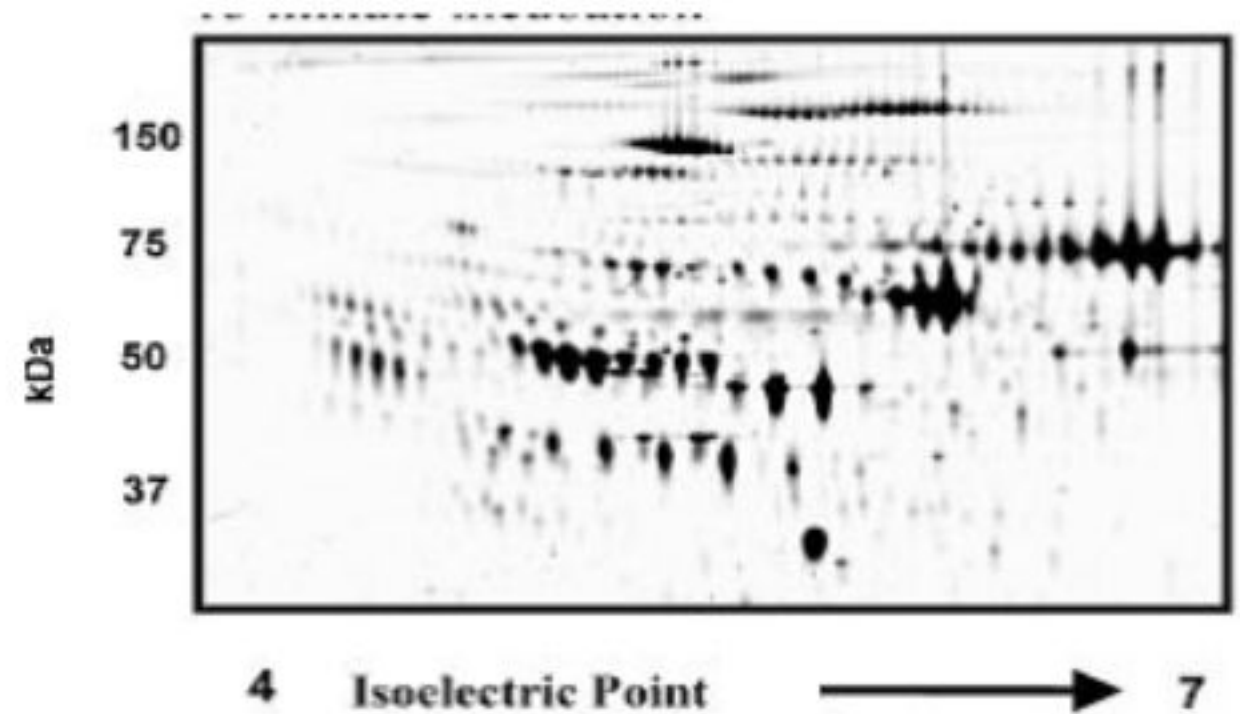
解决办法 ?



低丰度蛋白：加大上样量或除去高丰度蛋白、窄范围pH

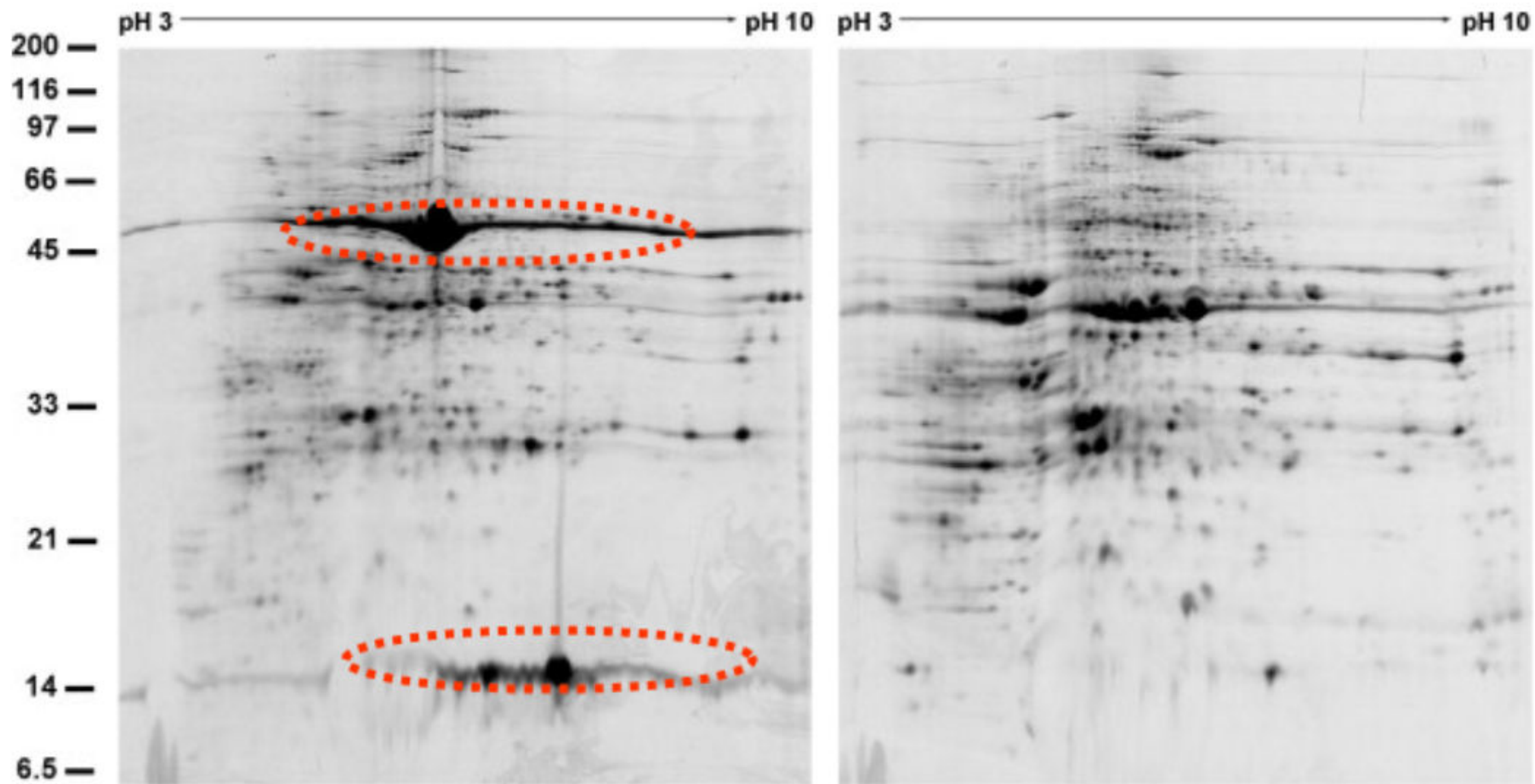


**Before removal of albumin**



**After removal of albumin**

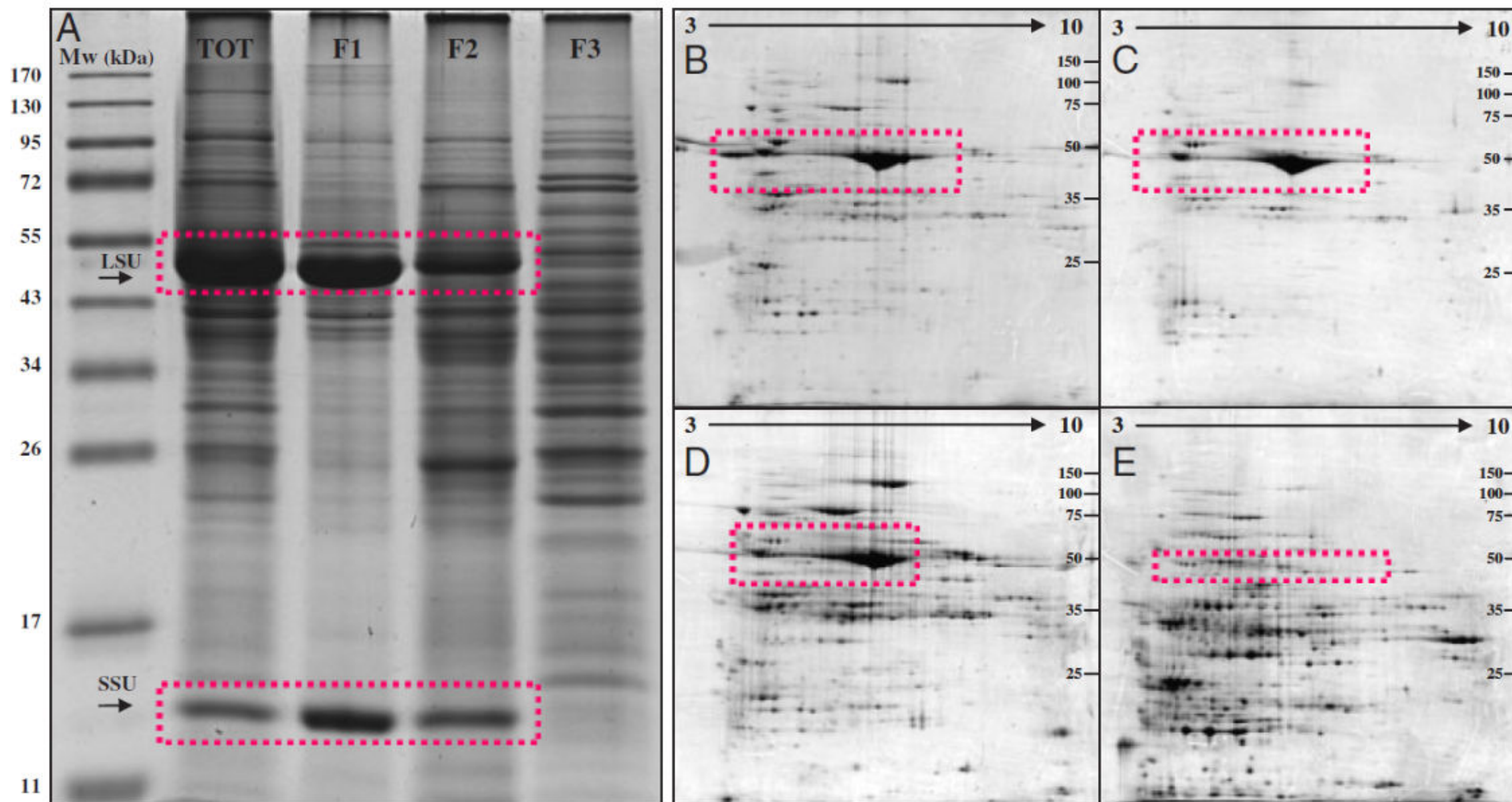




2-DE analysis of non-fractionated soybean leaf proteins **(Left)** and  $\text{Ca}^{2+}$ /phytate fractionated soybean leaf proteins **(Right)**.

(Krishnan et al. (A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. *Phytochem.*2009)

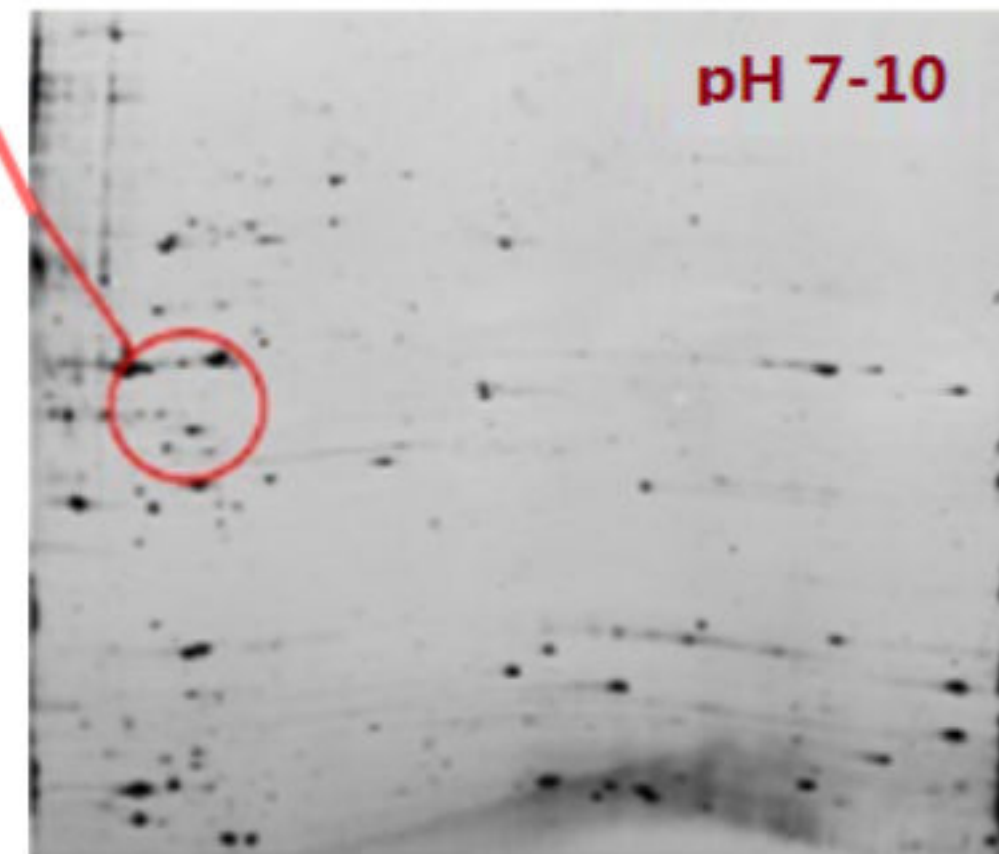
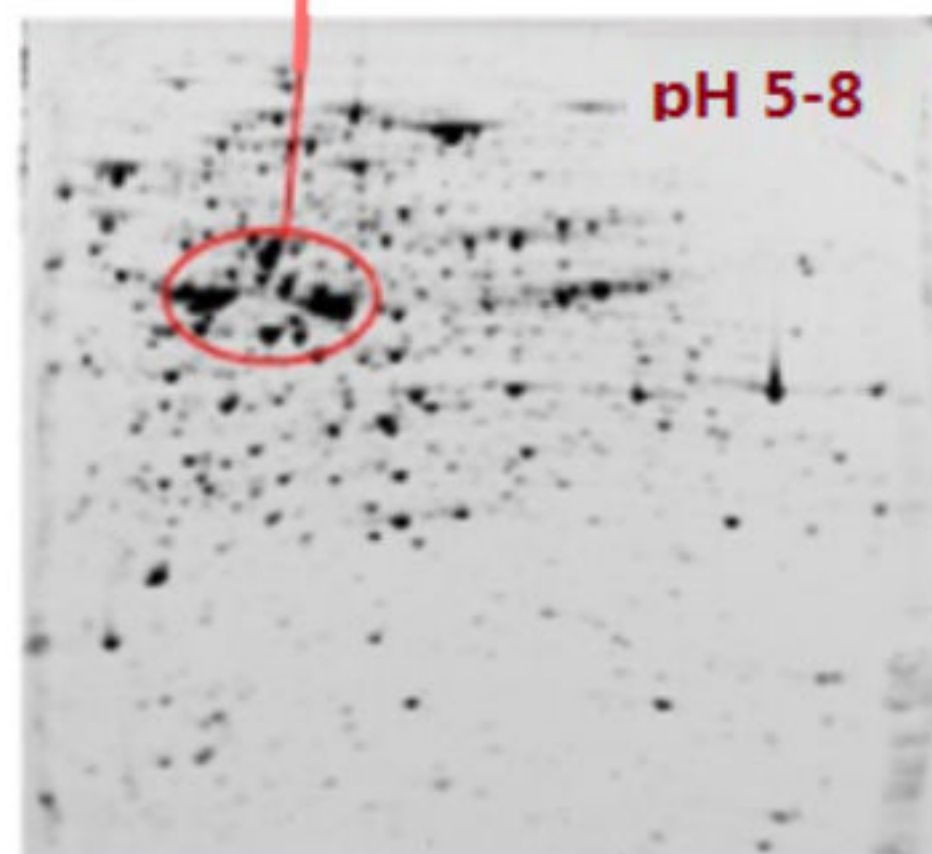
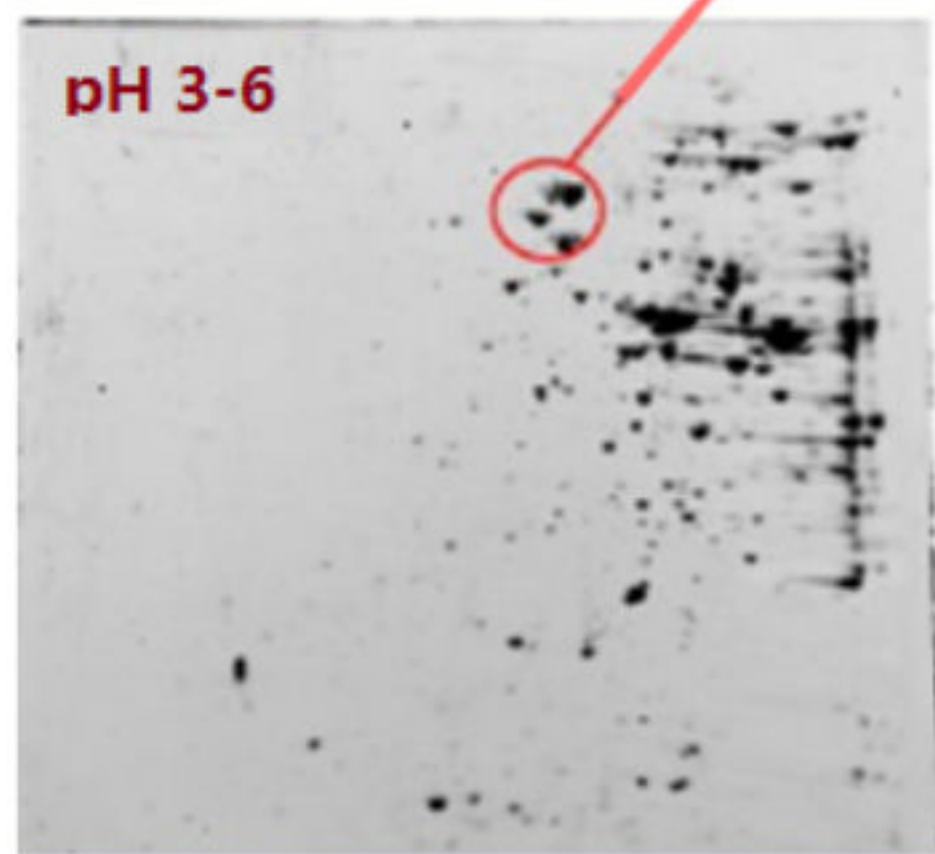
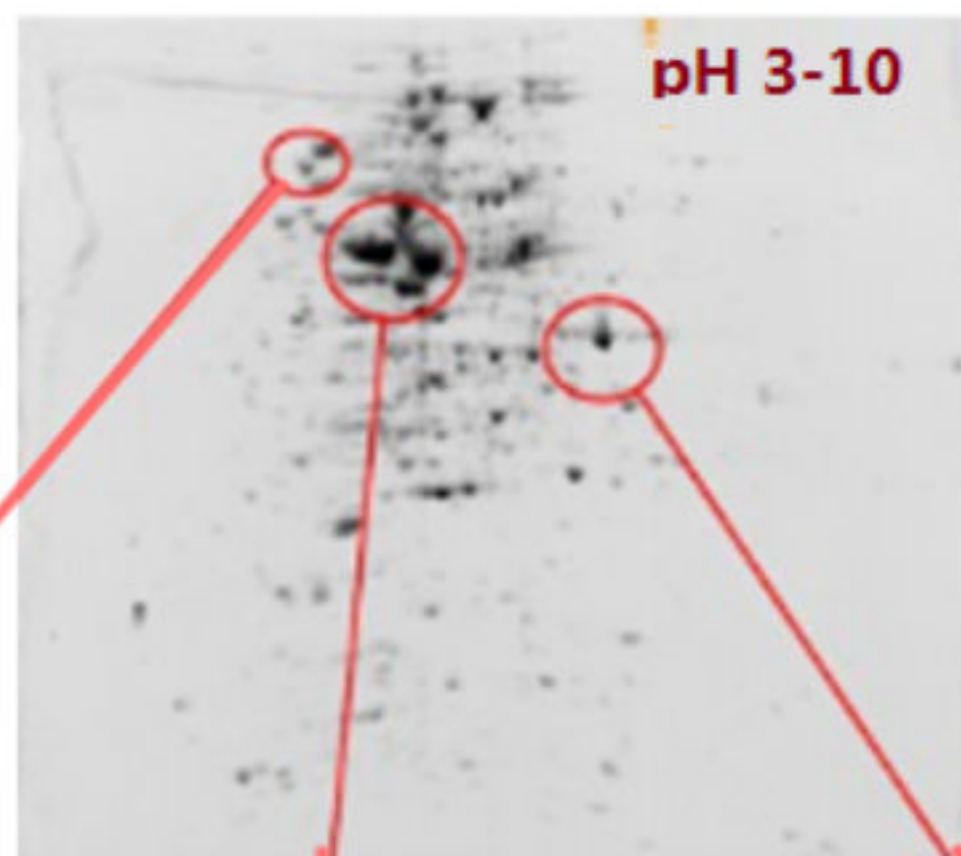




PEG fractionation: (A) 1-D SDS-PAGE of unfractionated and fractionated samples; (B) 2-DE PAGE maps of ‘ ‘Total’ ’ extracted proteins; (C–E) 2-DE maps of PEG fractions: (C) F1 PEG fraction; (D) F2 PEG fraction; (E) F3 PEG fraction.

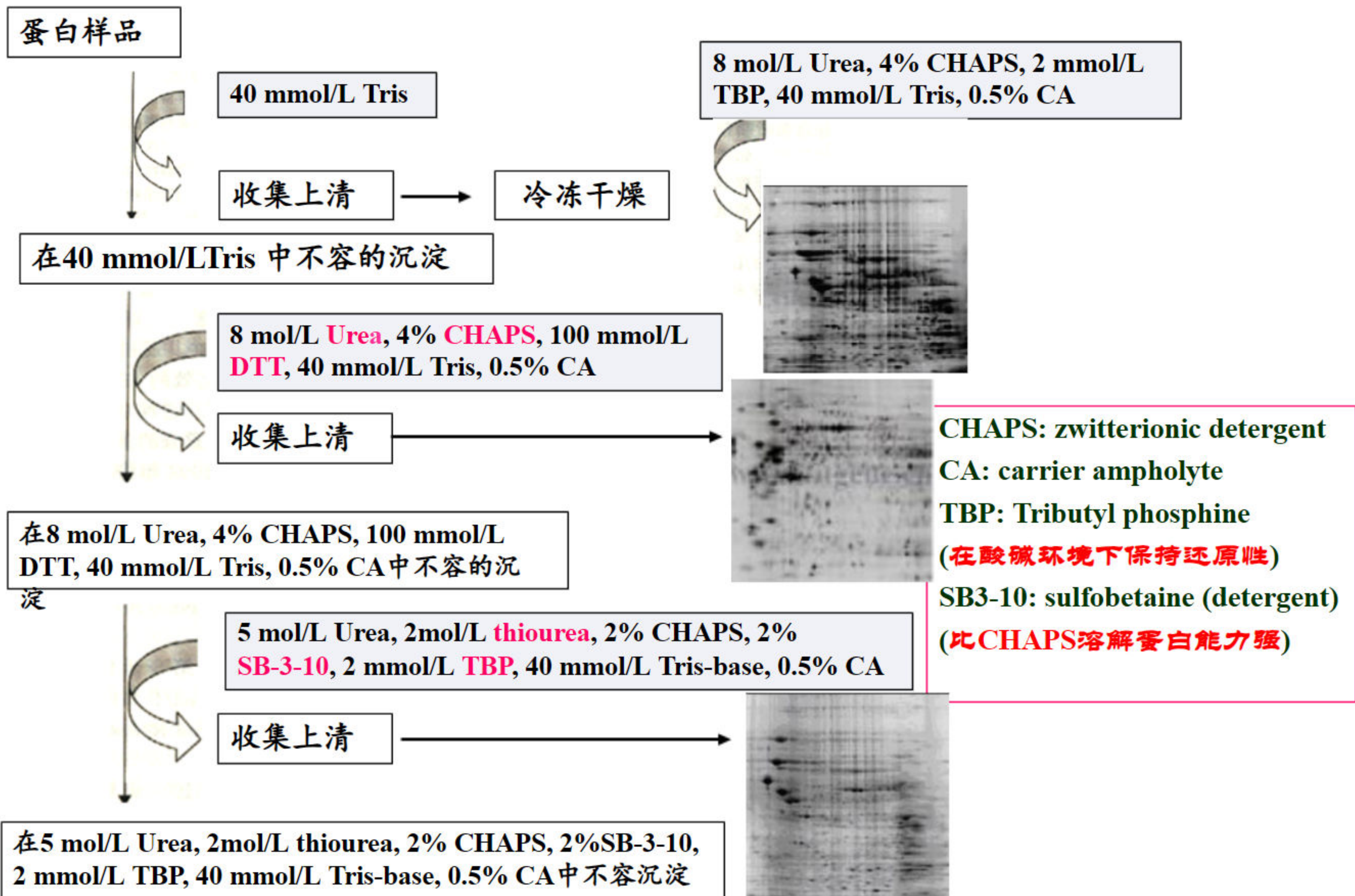


## 碱性蛋白：扩大pH范围 (IPG pH可达12)





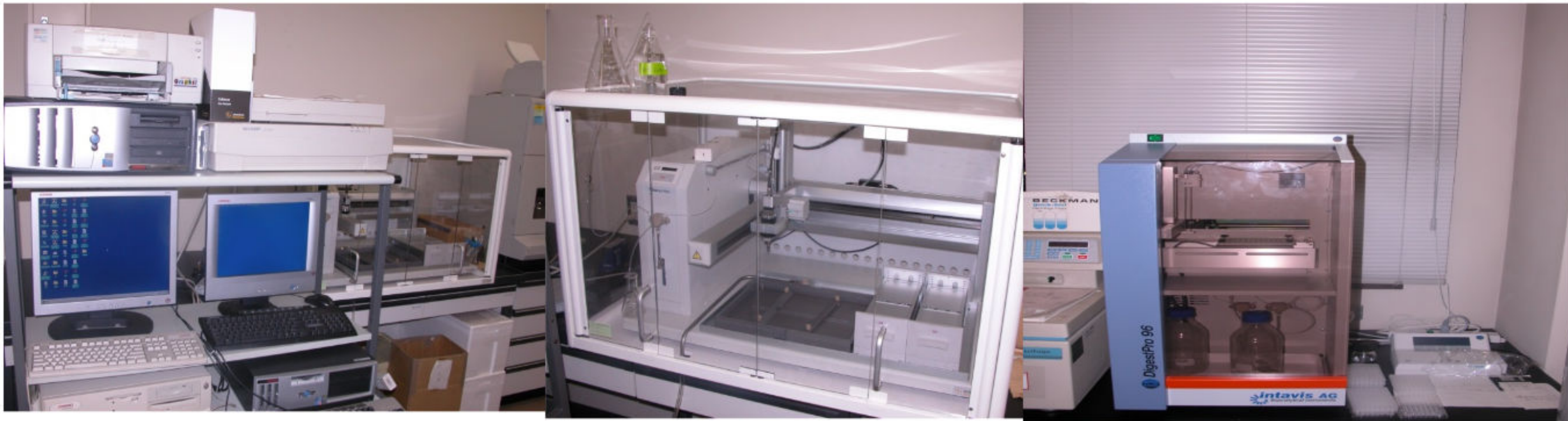
# 膜蛋白：分步提取法





# 高通量与自动化

2D-PAGE/MS为基础的蛋白质组技术体系自动化  
主要集中在2D-PAGE后的样品处理。





# 蛋白质识别系统的自动化

2-DE, 染色, 凝胶分析



胶上蛋白质自动切割  
置于96或384孔板



自动蛋白酶解, 多肽  
可回收, 点样于MS样品靶



自动MS样品分析



自动采集数据  
数据库 检索, 蛋白鉴定

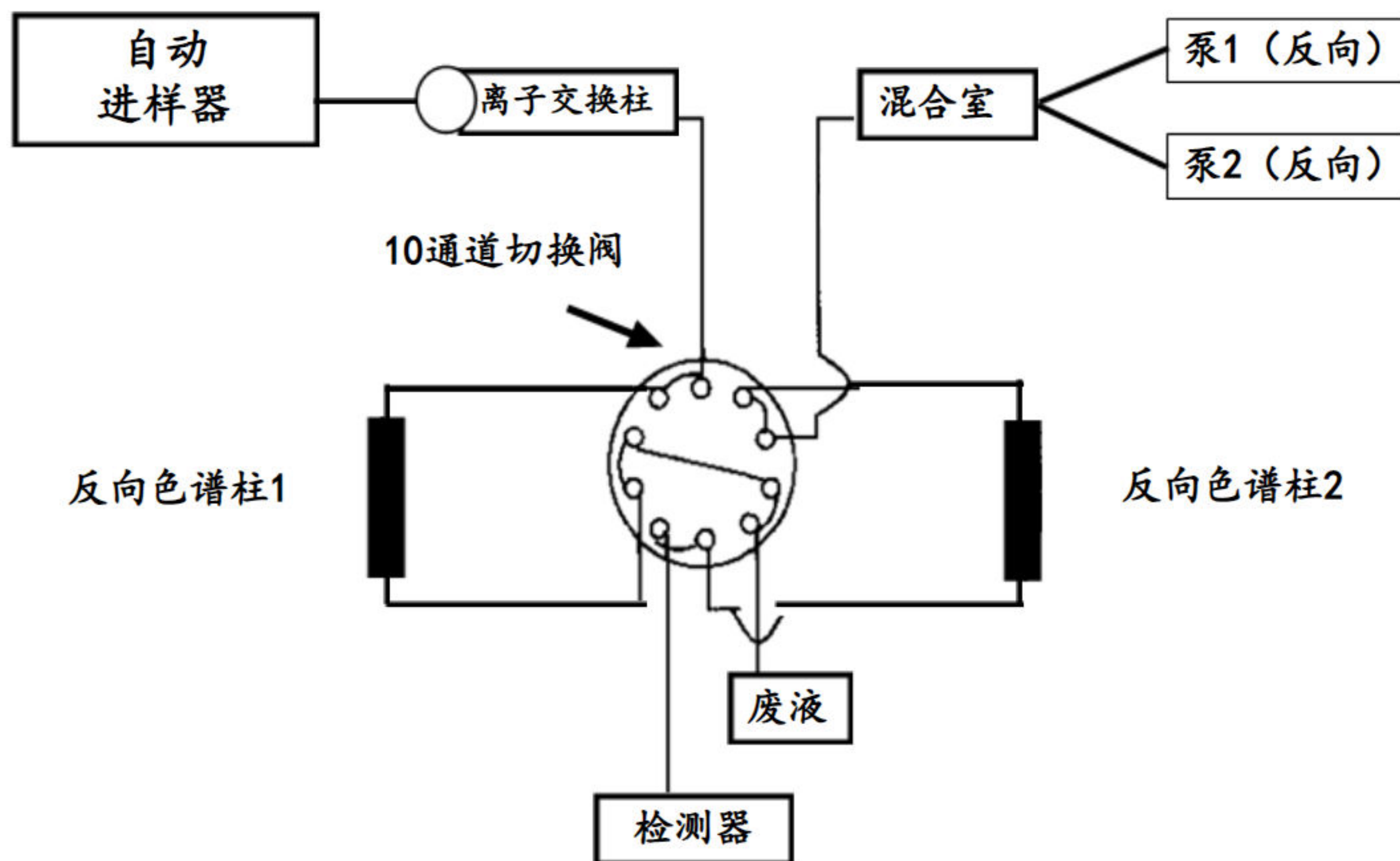
## 2D-PAGE-质谱为基础的蛋白质组学方法的局限性

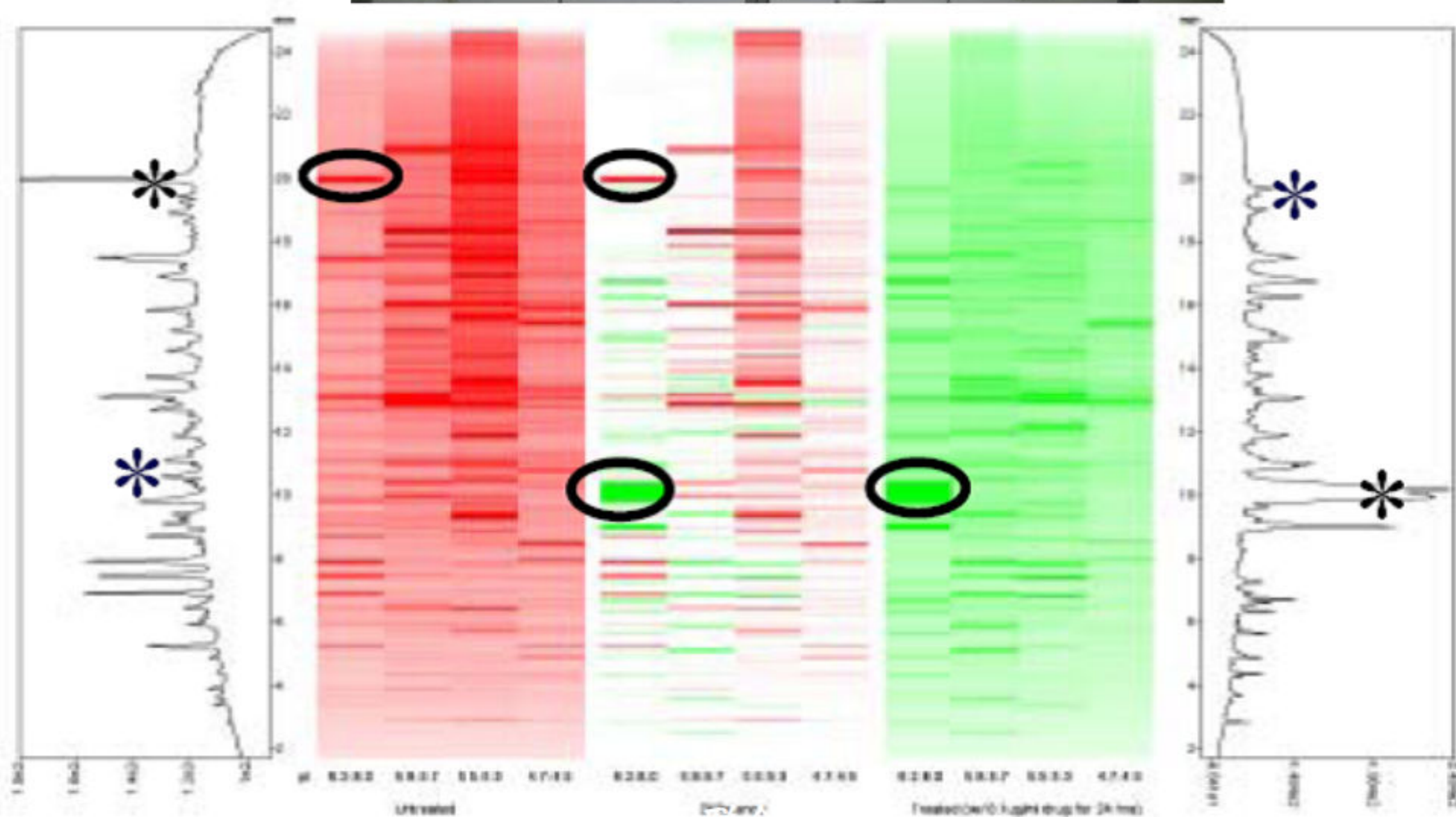
- 实验设计，采样量 (LCM)
- 重复性问题
- 动态范围
- 蛋白质的丢失
- 通量与自动化问题



## 2) 色谱—质谱技术

### (1) 二维色谱—串联质谱技术 (2D-HPLC-MS-MS)







# 2-DE与2D-HPLC的比较

---

## 优点

---

## 缺点

---

### 2-DE:

分辨率高,  $> 1000$   
可得到等电点、分子量的信息  
可得到蛋白质表达谱  
可平行多个胶

费时、费力  
不易自动化  
疏水、酸性、碱性、 $< 10$  kDa、  
 $> 1000$  kDa的蛋白质易丢失  
样品载样量受限制

### 2D-HPLC:

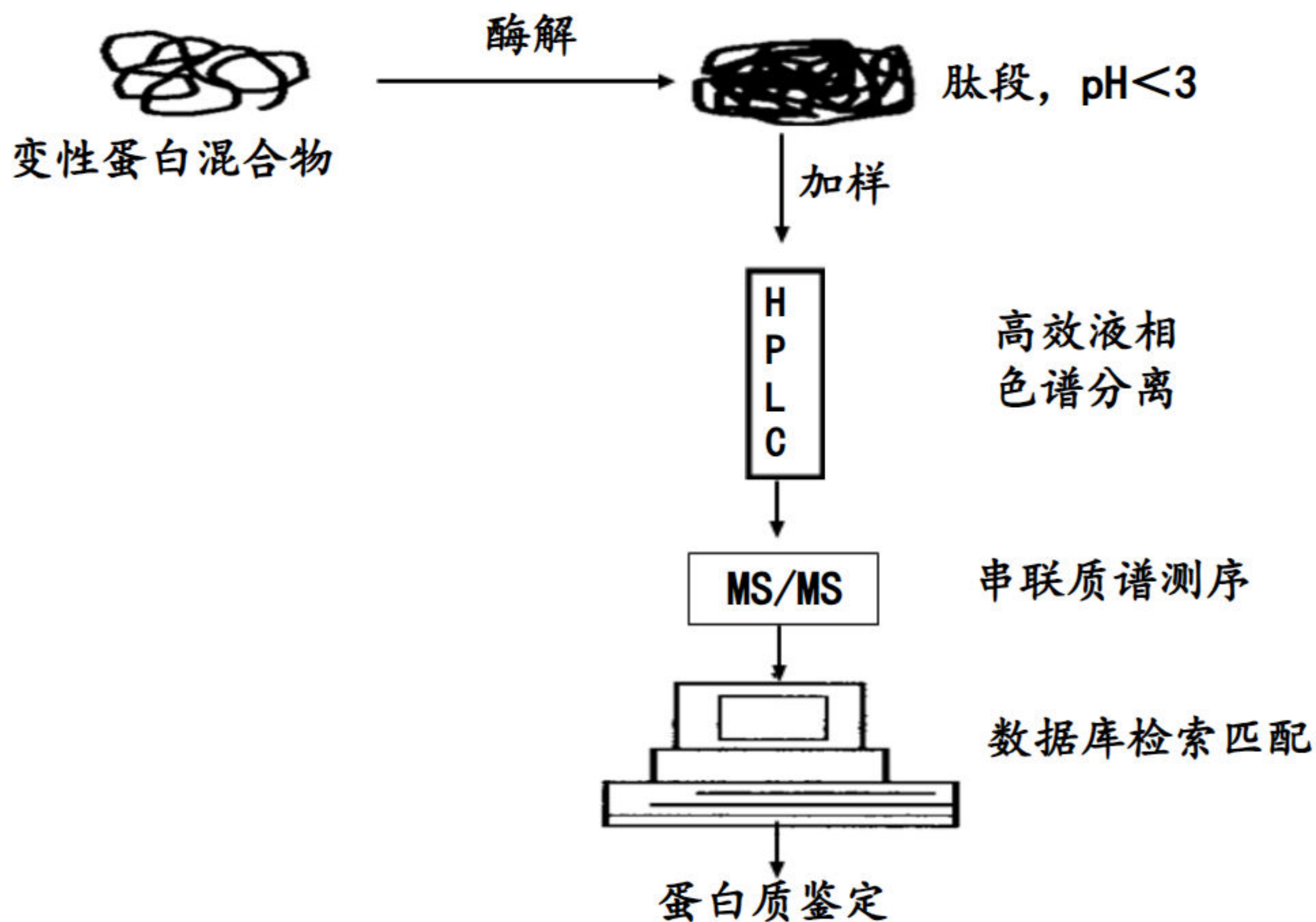
可分离各种蛋白质  
易于自动化  
样品在液相  
流分易收集  
可做样品制备和收集

尚未实现平行操作  
不易得到蛋白质表达谱  
分辨率不高

---



## (2) 多维蛋白质鉴定技术 (Multidimensional protein identification technology, Mud PIT; 鸟枪法 (Shotgun) )





# 多维蛋白质鉴定技术技术的优缺点

## 优点:

- 可以检测动态范围10000:1内的低丰度肽段;
- 大部分蛋白质在酶解后总有部分肽段可用质谱鉴定, 可弥补了碱性、疏水蛋白质、相对分子量极大和极小蛋白质在分离和鉴定方法上的不足;
- 可实现自动化、快速、高通量的蛋白组学分析。

## 缺点:

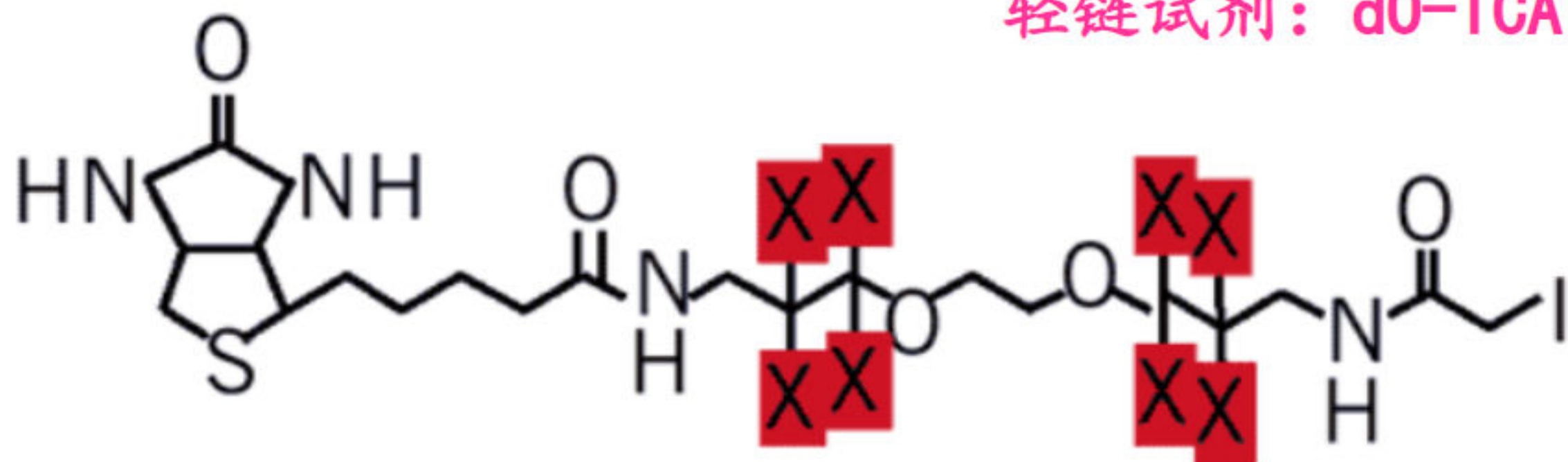
- 经常使用的动态排除过滤, 以牺牲随机抽样为代价;
- 数据冗余复杂, 需要专业人员进行分析。



### 3) 定量蛋白质组学分析技术

重链试剂: dB-ICAT (X=氘)

轻链试剂: d0-ICAT (X=氢)



生物素

连接部分  
(重、轻链)

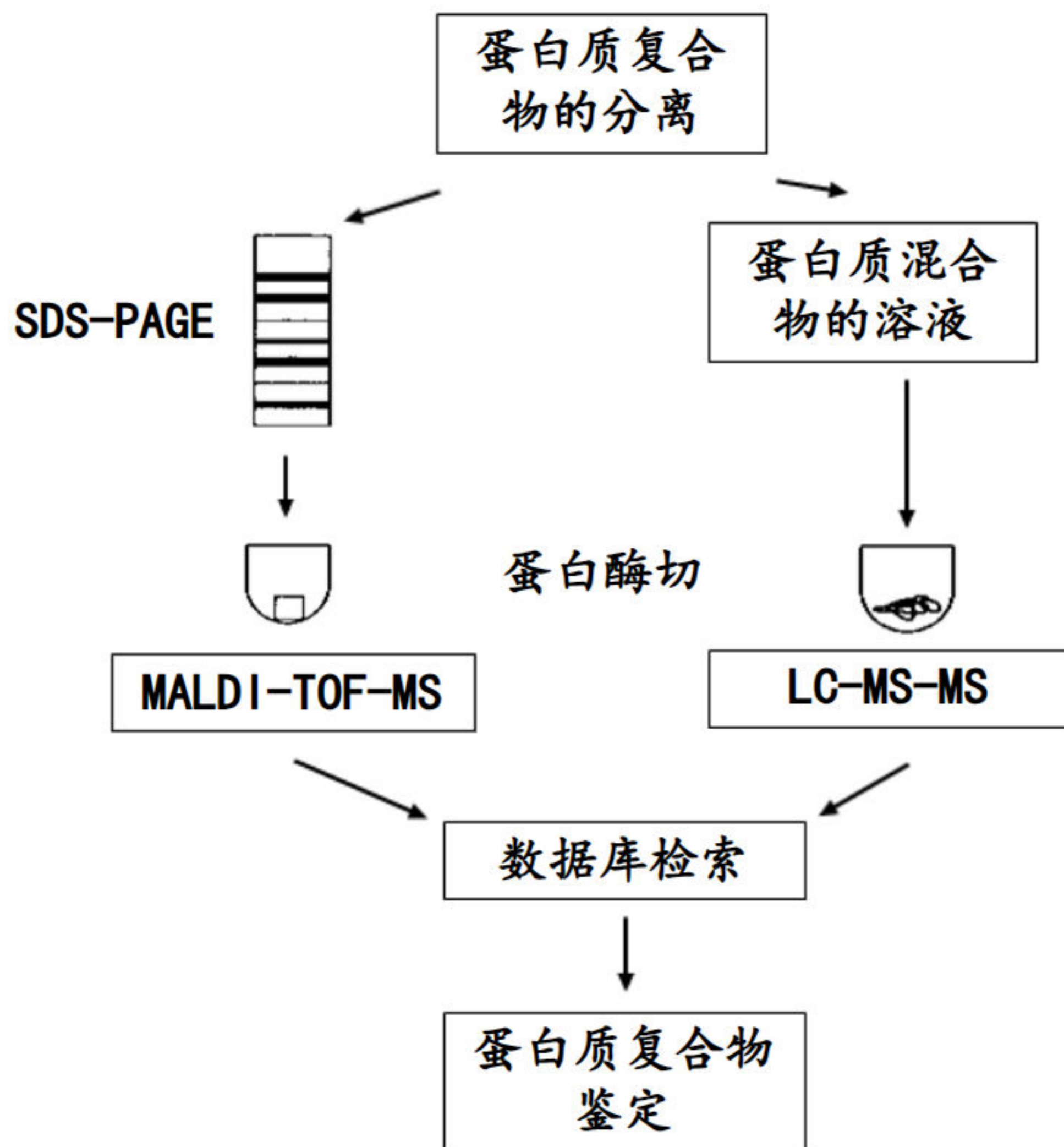
巯基特异反应基团

Isotope-coded affinity tag (ICAT)

同位素编码亲和标记技术



## 4) 一维电泳(色谱)—质谱技术





## 2.3 蛋白质生物质谱鉴定技术

- 1886年Goldstein发明早期质谱仪的离子源，1942年第一台商品化质谱仪出现——分析小分子化合物。
- 20世纪80年代末期的两项软电离质谱技术——基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和电喷雾电离质谱 (ESI-MS)——分析蛋白。
- MALDI-TOF-MS: 高通量，肽指纹图谱，必须有数据库匹配。
- ESI-MS: 肽序列标签，特异性高，混合肽测定，操作繁琐。
- 新生物质谱技术：
  - MALDI QqTOF-MS
  - MALDI-TOF-TOF-MS



## 思考题

1. 蛋白质组学研究常用的主要方法。
2. 比较2-DE与2D-HPLC技术的优缺点。

*Thank  
You*