

整合实验班综合实验——蛋白质组学技术

张广欣^{*}，王彦琦，王初[†]

北京大学 元培学院，北京 100087

【摘要】 本次实验包含提取和分离蛋白质组、质谱分析、定量蛋白质组学分析、化学蛋白质组学分析，从分离纯化膜蛋白、可溶蛋白，配胶，过萃取柱，二甲基化标记等动手实验，到对于蛋白质数据库的检索都有涉及，在得到蛋白质相应的数据后，也进行了后续数据分析：测定了膜蛋白和可溶蛋白浓度并分析了它们的蛋白组成、找到了 LPS 刺激前后巨噬细胞表达发生变化的蛋白、观察了基于活性的荧光探针染色情况。通过本次试验，体验蛋白质组学的研究范式，学习了相应的实验技能。

【关键词】 质谱分析，凝胶电泳，数据库，蛋白质组学

1 引言

术语“蛋白质组”是由澳大利亚博士生 Marc Wilkins 于 1994 年在意大利锡耶纳举行的研讨会上提出。蛋白质组学是对蛋白质组的研究，研究不同的蛋白质之间如何相互作用以及它们在生物体内发挥的作用。

本次实验我们主要学习了基于凝胶和基于质谱的蛋白质的组学技术，学习内容理论与实践结合。从绘制蛋白质的吸光曲线，配 SDS-PAGE 胶，考马斯亮蓝染色、切胶等方法逐步分离膜蛋白和可溶性蛋白，到进行质谱分析得到相应数据，再到使用定量质谱线方法分析 Raw246.7 巨噬细胞对于 LPS 的反应，再到使用基于活性的化学探针等，实验组成较为系统。

2 实验目的

2.1 提取和分离蛋白质组的基本原理与技术

1. 学习裂解细胞，获得膜蛋白的操作方法。
2. 学习配 SDS-PAGE 胶的方法，以及后续的

跑胶、染色和切胶的方法。

3. 学习分光光度法测定蛋白质含量。

2.2 质谱分析技术在蛋白质组中的应用

1. 学习胶块脱色、以及后续处理的方法和原理。
2. 了解质谱仪的工作原理。

2.3 定量蛋白质组学分析技术

1. 了解同位素标记法在蛋白质组学中的应用。
2. 学习二甲基化标记技术和使用固相萃取柱。

2.4 化学蛋白质组学分析技术

1. 了解基于活性的化学探针，制作荧光胶图。
2. 学习数据库检索技术。

3 实验原理

3.1 超声波处理

利用超声加热的方法，将细胞破碎。要设定好超声时间和间隙时间，一般超声时间不超过 5 秒，间隙时间最好大于超声时间，这些都有利于保护酶的结构。

3.2 分光光度法以及二辛可宁酸测定法（BCA 测定法）

3.2.1 BCA 测定法

BCA 储备溶液在 pH 值为 11.25 的强碱性溶液中，包含：二喹啉甲酸、碳酸钠、碳酸氢钠、酒石

实验时间: 2022-10

报告时间: 2022-12

[†] 指导教师

*学号: 2000012272

*E-mail: 2000012272@stu.pku.edu.cn

酸钠和硫酸铜(II)五水合物。

BCA 检测主要依赖于两个反应。首先,蛋白质中的肽键将 Cu^{2+} 离子从硫酸铜(II)还原为 Cu^+ 。还原的 Cu^{2+} 量与溶液中存在的蛋白质量成正比。接下来,两个二辛可宁酸分子与每个 Cu^+ 离子螯合,形成紫色络合物,强烈吸收波长为 562 nm 的光。二喹啉甲酸 Cu^+ 复合物在蛋白质样品中受半胱氨酸/胱氨酸、酪氨酸和色氨酸侧链的影响。之后可以通过测量吸收光谱并与已知浓度的蛋白质溶液进行比较来量化溶液中存在的蛋白质的量。

3.2.2 分光光度法

分光光度法是通过测定被测物质在特定波长处或一定波长范围内光的吸收度,对该物质进行定性和定量分析的方法。在分光光度计中,将不同波长的光连续地照射到一定浓度的样品溶液时,便可得到与不同波长相对应的吸收强度。

具体可通过朗伯比尔定律计算:当一束平行单色光垂直通过某一均匀非散射的吸光物质时,其吸光度 A 与吸光物质的浓度 c 及吸收层厚度 b 成正比,而与透光度 T 成反相关。

$A = \lg(\frac{1}{T}) = Kbc$ A 为吸光度, T 为透射比(透光度),是出射光强度(I)比入射光强度(I_0)。 K 为摩尔吸光系数,它与吸收物质的性质及入射光的波长 λ 有关。 c 为吸光物质的浓度,单位为 mol/L , b 为吸收层厚度,单位为 cm 。

3.3 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)

SDS-PAGE 通常用作分离分子量在 5 至 250 kDa 之间的蛋白质的方法。十二烷基硫酸钠(SDS)和聚丙烯酰胺凝胶的结合使用可以消除结构和电荷的影响,仅根据分子量的差异分离蛋白质。其中的介质(也称为“基质”)是基于聚丙烯酰胺的不连续凝胶。聚丙烯酰胺凝胶通常夹在平板凝胶中的两个玻璃板之间。

此外,使用 SDS(十二烷基硫酸钠)。大约 1.4 克 SDS 与一克蛋白质结合,对应于每两个氨基酸一个 SDS 分子。SDS 充当表面活性剂,掩盖蛋白质的固有电荷并赋予它们非常相似的荷质比。与 SDS 带来的电荷相比,蛋白质的固有电荷可以忽略不计,并且在分离凝胶的碱性 pH 范围内,正电荷也大大减少。

在施加恒定电场后,蛋白质会根据其质量以不同的速度向阳极迁移。这个简单的程序允许按质量精确分离蛋白质。

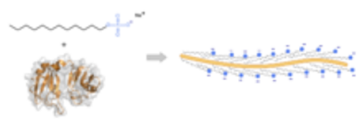


图 1 使用 SDS 展开蛋白质

3.4 考马斯亮蓝染色

考马斯亮蓝是实验室中常规用于蛋白质染色方案的染料系列,在 SDS-PAGE 或聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行。这些蛋白质染料的染色化学基于它们与蛋白质和基质的结合。

染料与蛋白质的碱性氨基酸残基形成复合物,包括精氨酸、组氨酸、酪氨酸和赖氨酸,以便它们可视化。这种结合赋予蛋白质整体负电荷,并根据其分子量促进蛋白质与 SDS-PAGE 凝胶的分离。其灵敏度取决于染色方法中使用的染色剂类型(考马斯亮蓝 G-250 和考马斯亮蓝 R-250)。用染料染色后,将会在胶图上观察到蓝色背景的蓝色条带,应降低背景噪音以使条带更易于可视化。这一步通过使用脱色溶液完成,脱色过程大约需要 10 分钟至过夜,以去除多余的染色并产生背景清晰的条带。

3.5 切胶回收

切胶就是要将整个目的片断所在位置的胶全部回收,注意切胶时需要保证胶处在湿润状态,以及要保证刀片的干净,每次使用后都要用乙醇消毒,最大限度避免污染。

3.6 二硫苏糖醇(DTT)

DTT 是一种还原剂;一旦被氧化,它就会形成一个稳定的六元环,内部有一个二硫键,典型的二硫键的还原通过两个连续的硫醇-二硫化物交换反应进行。

DTT 经常用于减少蛋白质的二硫键,更普遍地,用于防止蛋白质的半胱氨酸残基之间形成分子内和分子间二硫键。通常与十二烷基硫酸钠一起用于 SDS-PAGE 通过减少蛋白质的二硫键使蛋白质进一步变性,从而在电泳过程中更好地分离蛋白质。

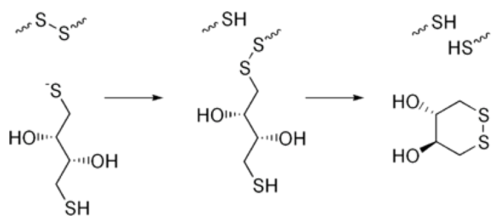


图 2 DTT 还原蛋白质

3.7 碘乙酰胺 (IAA)

碘乙酰胺是一种烷基化试剂。与碘乙酸类似, 常用于封闭蛋白质半胱氨酸残基的巯基, 防止重新形成二硫键, 是一种不可逆的半胱氨酸蛋白酶抑制剂。

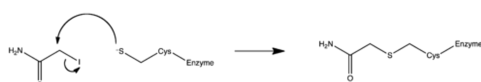


图 3 IAA 封闭巯基

封闭巯基的目的

1. 是为了让保证蛋白质可以去折叠 (即不产生二硫键), 线性状态下可以更充分地酶切开。

2. 保证巯基在被上一步骤还原之后, 在之后的制备过程中不会被再次氧化而影响后续的质谱分析。

3.8 胰蛋白酶 (trypsin)

胰蛋白酶选择地水解蛋白质中所有的由赖氨酸 Lys 或精氨酸 Arg 的羧基所构成的肽键。如果脯氨酸 Pro 残基位于切割位点的羧基侧, 则不发生切割。最适宜条件是 pH 约为 8, 温度为 37°C。

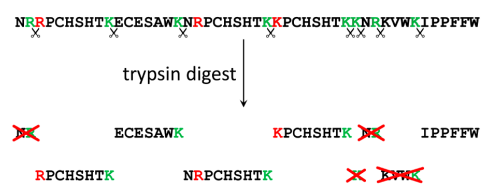


图 4 trypsin 切割肽段

3.9 纳升液相色谱串联质谱 (nanoLC-MS/MS)

纳升液相色谱串联质谱是一种液相色谱与质谱联用的技术, 在蛋白质组学的研究中应用广泛。其中, 纳升液相色谱用于样品中不同组分的分离, 与一般液相色谱的原理一样, 纳升液相色谱利用流动相中化合物的重量和化合物与固定相亲和力的不同而使化合物有效分离。串联质谱则用于化

合物的测定, 其原理主要在于通过将化合物离子化后, 检测化合物母离子和子离子的质量和电荷信息, 从而推测获得化合物的结构信息。

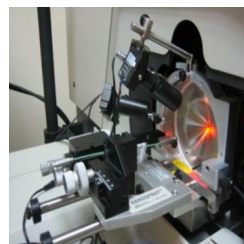


图 5 nanoLC-MS/MS 1

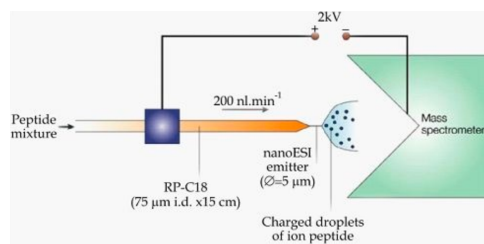


图 6 nanoLC-MS/MS 2

3.9.1 纳升液相色谱

所用的纳升液相色谱柱中有反相 C18 填充料, 直径 5 μm, 其流速为 250 nL/min, 纳升液相色谱可以大致根据多肽的亲疏水性对多肽进行初步分离, 也增加了同一 retention time 出来的溶液中同一种多肽的浓度。与质谱仪之间有 2 kV 的电压, 喷出的混合肽段溶液在此电压下变为喷雾, 多肽上也带了电荷, 实时地进入之后的串联质谱。

这种让喷雾上带电的方法被称作电喷雾离子化 (ESI), 是一种软离子化手段不会打碎肽段 (但我们无法控制最终每个多肽上带了几个电荷)。

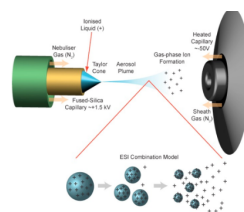


图 7 电喷雾离子化

因此, 对于一系列相对分子质量为 1000 的肽段, 最终能观察到 m/z 可能有 1000, 500, 250 等。

3.9.2 质谱仪部分

只是知道单条多肽的 m/z 的信息无法确定具体的肽段序列, 但将该多肽 (precursor ions, “母离

子”) 碎裂 (得到的二级碎片, “子离子”) 后再测一次质谱, 可以得到该多肽的指纹信息 “finger print”, 之后进行计数, 统计多肽的数量信息, 作为之后搜库的依据。在本次试验中, 在第一级质谱中选取丰度为 TOPN 的多肽进行进一步碎裂 (对实验数据进行观察, 推测 N 应为 15)。

需要指出的是, 从一级质谱由 TOPN 选出来的肽段进行碎裂时, 这种碎裂可能会受到多种因素的影响 (不同肽段的离子化能力不同, 高丰度肽段可能离子化差; 不同肽段碎裂能力不同, 高丰度肽段可能产生的二级谱质量差; 谱峰离子强度是一个相对值, 与流出时间和共流出的其它离子有关;), 因此虽然得到的谱图计数可以在很大程度上反应蛋白质的组成信息, 但并不是一定准确的, 这是一种半定量的手段, 需要多次重复。

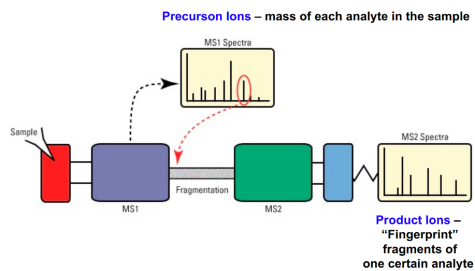


图 8 串联质谱 1

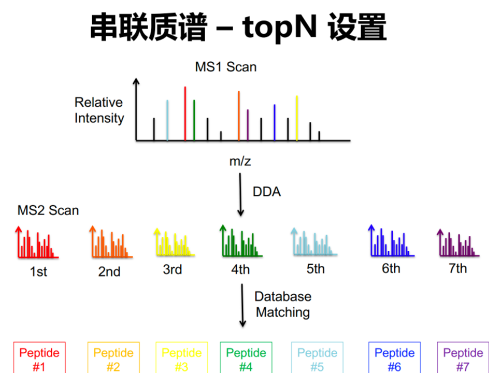


图 9 串联质谱 2

3.9.3 组成蛋白质原子的同位素

组成生物体元素的 HCNOS 在自然界都有稳定的天然同位素, 有相对稳定的比例。因此, 蛋白质分子的相对分子质量会受到其组成原子的同位素影响 (一般影响最大的为 C 原子) 形成一定的分布。

Isotope	Mass [Da]	% Compos.	Isotope	Mass [Da]	% Compos.
¹ H	1.007825	99.985	¹⁶ O	15.994915	99.76
² H	2.014102	0.015	¹⁷ O	16.999131	0.038
¹² C	12.000000	98.90	¹⁸ O	17.999159	0.20
¹³ C	13.003355	1.10	³¹ P	30.973763	100.0
¹⁴ N	14.003074	99.63	³² S	31.972072	95.02
¹⁵ N	15.000109	0.37	³³ S	32.971459	0.75
			³⁴ S	33.967868	4.21

图 10 天然同位素丰度

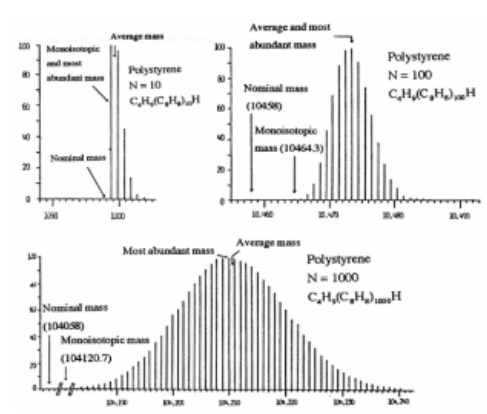


图 11 含同位素蛋白质的 m/z

对于相对分子质量较小的蛋白质, 相对含量最多的应是相对分子质量最小的组合, 但对于比较大的蛋白质, 其丰度最高的相对分子质量可能会高于相对分子质量最小的组合, 呈现的分布应该为二项分布的叠加。因此, 在这种情况下分析 m/z 的数据, 可以从相邻谱线的距离中分析出 $z = 1.0/(\Delta M/Z)$

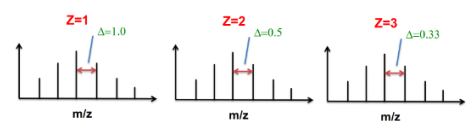


图 12 推算所带电荷量

3.10 同位素标记在蛋白质质谱中的应用

用于同位素仅为相对分子质量有差别, 并不改变任何化学性质。因此对于同一蛋白质, 不论其同位素组成为何, 在液相色谱中的 retention time 都相同, 也总是在同一时间进入质谱仪, 它们的区别只在相对分子质量上, 因此可以测量他们的相对强度以确定它们量之间的关系。

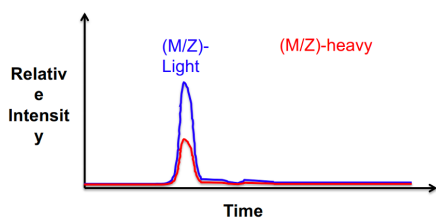


图 13 同位素标记

3.11 二甲基化标记

利用 lysine 或者氨基酸上的 N 端会和甲醛反应, 之后用 NaBH_3CN 进行还原, 可以在氨基上修饰 2 个甲基, 此反应的反应效率很高。本次我们使用的是 28Da 的轻标和 34Da (甲醛为 $^{13}\text{CD}_2\text{O}$) 的重标, 之后在数据分析中, 可以将相应肽链轻标和重标的数据进行对比。

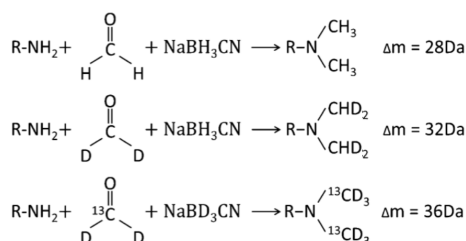


图 14 二甲基化修饰

3.12 LPS (脂多糖) 刺激巨噬细胞

LPS 可以通过巨噬细胞表面的 TLR4 受体激活巨噬细胞活性, 巨噬细胞中许多与免疫过程相关的蛋白上调来完成免疫反应。

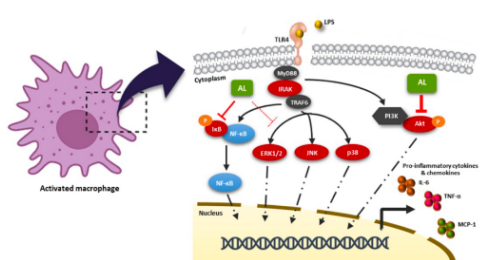


图 15 LPS 刺激巨噬细胞

3.13 固相萃取 (SPE)

固相萃取, 也称固相提取, 是一项结合了选择性保留、选择性洗脱等过程的分离技术。当复杂的样品溶液通过吸附剂时, 吸附剂会通过极性相互作用、疏水相互作用或离子交换等作用力选择性地保留目标物和少量与目标物性质相近的组分,

其他组分则透过吸附剂流出小柱, 然后用另一种溶剂体系选择性地目标物洗脱下来, 从而实现复杂样品的分离、纯化和富集。

3.14 基于活性的化学探针 (Activity-Based Chemical Probes, ABPs)

ABP 探针的特点:

- (1) 能够结合并标记蛋白质组中的许多蛋白;
- (2) 标记过程需要是活性依赖的;
- (3) 需要有报告基团。

本次实验中, 我们使用的是 FR-Rho 对于丝氨酸水解酶进行标记, 标记了的有活性的丝氨酸水解酶在荧光成像下的条件下有所显示。

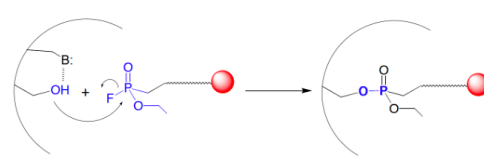


图 16 探针结合活性位点

3.15 数据库搜索

所选择的数据库, 包含该物种理论上所有的蛋白质。选定切割所用的酶之后, 可以产生理论上的所有肽段, 从而生成理论谱图。搜索数据库所进行的操作就是将实验得到的谱图数据和反复比对理论谱图进行反复比对 (也有很多包含其他的参数设定, 包括设置引入的化学修饰等)。需要设置可接受的假阳性率, 没有任何一种搜库算法可以保证结果 100% 正确。

4 实验内容与步骤

4.1 提取和分离蛋白质组的基本原理与技术

4.1.1 Raw 细胞可溶蛋白质组与膜蛋白质组分离和制备

(1) 从 -80°C 的深冷冰箱中取出小鼠 Raw264.7 巨噬细胞, 加入 PBS Buffer 维持 pH, 用移液枪吹打获得细胞悬液。

(2) 超声破碎细胞 Amp30%, 此过程中注意需要保持低温, 使用超声破碎后, 观察到溶液的浑浊度下降, 说明细胞已经被破碎。

(3) 低速离心出细胞碎片, 离心机 4 摄氏度预冷, 1000r 5min。高速离心出膜蛋白, 仪器预冷, 配平 (误差 $\leq 10\text{mg}$), 抽真空, 100000r 的条件下工作

30min。

注：在此过程中保持在4摄氏度是为了抑制其中蛋白酶的活性，防止蛋白被降解。在此温度下水中氢键较多，也有助于维持蛋白质结构的稳定性。

(4) 充分吸出离心后得到的上清液，其中为可溶性蛋白，黄色沉淀为膜蛋白，并向沉淀中加入表面活性剂 Triton 增加膜蛋白溶解度，超声打散后用 20000rcf 离心去除杂质。

4.1.2 蛋白质浓度测定

(1) 分别在细板 6 个孔加入 BSA 牛血清白蛋白做标尺 (0,0.4,0.8,1.2,1.6,2.0mg/L)，再分别将膜蛋白和可溶蛋白稀释 5 倍，加至孔中。后向 8 个孔中分别加入 BCAA-A 试剂和 BCAA-B 试剂。

注：显色和时间有相关性，因此需要保证每次加样的时间相同。为了保证精确性，每次实验都要做一个标准曲线进行定量。

(2) 加热反应 40 分钟后，用分光光度计测定吸光度，并用 Excel 标定浓度-吸光度曲线，用此确定膜蛋白和可溶蛋白浓度。

4.1.3 凝胶电泳, 切胶

(1) 配置凝胶 SDS-PAGE: 下层分离胶 pH=6.8, 上层浓缩胶 pH=8.8。先配分离胶，之后用异丙醇封口来排出气泡，等待 40min 凝胶，倒出异丙醇后加浓缩胶。

(2) 将蛋白稀释到 0.3mg/L，之后加入 SDS，95°C 加热以打开二硫键，之后离心排出水蒸气，防止其影响浓度。

(3) 先跑浓缩胶 (100V) 让蛋白到达同一直线处，再切换电压跑分离胶 (160V)，用蒸馏水洗 3 遍胶。

(4) 用考马斯亮蓝染色液染色 30min，洗胶 20min。

(5) 参照 marker，将分为 75+kD，50-75 kD，25-50 kD，25- kD 四段，将每段切成小块放入离心管。这个过程中注意胶之间不被互相污染，以及保持胶的湿润。

4.2 质谱分析技术在蛋白质谱中的应用

4.2.1 胶块脱色

每个管加入 600 μ L 碳酸氢铵和乙腈 4:1 的混合溶液，37°C 加热，15min 换一次液。胶块逐渐变得透明。

4.2.2 脱水

(1) 使用大枪头小枪头嵌套的方法，吸出离心管中的液体。(防止小胶块被吸入枪头中损失)

(2) 向离心管中加入纯乙腈进行脱水，放到摇床中摇动 7min，观察到透明胶块皱缩变白，其中的水分被排出，后续所加的溶液才能顺利进入胶块。

4.2.3 二硫苏糖醇 (DTT) 还原巯基

(1) 称量 20.51mg 的 DTT 固体 (DTT 的相对分子质量为: 154.25)，之后加入 13.3ml 的 dd 水。

(2) 根据离心管中胶量多少加入 DTT 溶液 (需要没过胶块)，之后将其放于金属中加热 30min。

4.2.4 脱水

方法同上，用乙腈操做完后吸干，打开离心管盖子，之后放在机器上加热、抽真空使有机试剂完全挥发。

4.2.5 胶内酶切

(1) 从冰箱内拿出 Trypsin 固体，将其稀释成溶液，终浓度为 0.5ng/ml (酶不易过量，可能会自切干扰检测)。

(2) 按照胶块大小 100 或 200 μ L 加入的 Trypsin 溶液。

(3) 放置在 37°C，恒温环境下反应 15h，保证酶切的充分进行 (之后胶块被封存在)

4.3 定量蛋白质组学分析技术

4.3.1 胶内肽段提取

(1) 从 -25°C 环境中拿出酶切好的胶，解冻。

(2) 向含有胶的管内加入 5% FA (甲酸水溶液，增大蛋白质的溶解度)，50% ACN (乙腈溶液)。

(3) 放入 mixer，20min 充分提取，完成肽段扩散，吸出上清液，其中即为所要的肽段。之后将此过程重复一次。

4.3.2 质谱上机操作 (此过程为助教完成)

上液量为 10 μ L，调整移液枪量程 $\geq 10 \mu$ L，同时需要确定没有杂质进入质谱仪 (杂质会堵塞柱，使其压力急剧升高损坏仪器)。

4.3.3 处理 LPS 刺激过的巨噬细胞

(1) 由助教处理 LPS 刺激过以及没有刺激过的 Raw264.7，得到其蛋白。

(2) 加入 6mol/L 的尿素溶液。作用：溶解可

溶可溶蛋白和膜蛋白, 舒展蛋白质结构

(3) 使用 DTT 还原巯基并用 IAA 封闭, 步骤同上文, 不再赘述。将此溶液用 TEAB 稀释 6 倍防止高浓度尿素影响 Trypsin 的酶切。

(4) 加入 Trypsin, 在 37°C 下反应 4 小时。

(5) 向酶切后的肽段溶液中加入甲醛溶液以及 NaBH_3CN 溶液进行二甲基化标记。对于未经 LPS 处理组, 加入的甲醛为重标记 ($^{13}\text{CD}_2\text{O}$), 经过 LPS 处理组, 加入的甲醛为 CH_2O 。至此, 分别带上了 28Da 和 34Da 的二甲基化标记。

4.3.4 固相萃取柱处理

(1) 使用移液枪枪头, 固相萃取柱, 注射器等组合成简易的手动萃取装置。

(2) 向装置中加入 $100\mu\text{L}$ 甲醇, 重复 3 次。

(3) 加入 $100\mu\text{L}$ 乙腈, 后加入 $100\mu\text{L}$ 50% 乙腈和 1% 的甲酸水溶液 1 次。

(4) 加入 $100\mu\text{L}$ 0.1% 甲酸水溶液三次。

(5) 加入需要除盐的样品, 之后的过程不可以让萃取柱干, 否则需要重新开始。

(6) 加入 $100\mu\text{L}$ 0.1% 甲酸水溶液, 重复三次, 充分洗去杂质。

(7) 洗脱。使用 $100\mu\text{L}$ 50% 的乙腈和 5% 的甲酸水溶液, 将萃取柱中的蛋白质洗脱下来, 收集此过程得到的溶液, 重复 3 次。得到的溶液用于后续的质谱分析。

4.4 化学蛋白质组学分析技术

(1) 取出冷冻的丝氨酸水解酶, 使用 $100\mu\text{L}$ Triton 溶液溶解。

(2) 总共制备 6 组样品用于之后的跑胶。分别为: 荧光 Masker, 不进行荧光标记的丝氨酸水解酶, 使用 FP-Rho 标记的丝氨酸水解酶, 加入 DMSF 与 FP-Rho 的丝氨酸水解酶, 进行 75°C 15 分钟处理的丝氨酸水解酶, 使用 1.2% SDS 处理的丝氨酸水解酶。为了使探针结合到其底物上, 条件设置为 25°C 30min。

(3) 使用 SDS-PAGE 跑胶, 跑胶完成后将浓缩胶和小分子部分截去, 之后对所得的胶片进行荧光成像。

(4) 使用考马斯亮蓝进行染色, 再将多余的染料洗去。拍照获得胶图。

5 实验结果

5.1 标准浓度曲线

这一过程主要以学习技能, 体验这一过程为主, 多数同学都获得了 $R^2 \geq 0.99$ 的标准曲线, 并没有保存所有人的数据。以下是根据其中的一份数据做图:

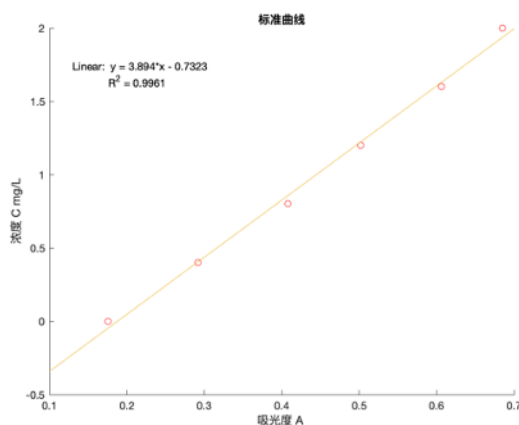


图 17 蛋白质浓度标准曲线

当日测定得到的膜蛋白浓度和可溶蛋白浓度为我们各自的测定数据去除极端数值后的平均:

表 1 蛋白质浓度

膜蛋白 mg/L	可溶性蛋白 mg/L
1.65	1.52

5.2 经过 LPS 刺激前后小鼠 Raw264.7 巨噬细胞中蛋白质含量的变化

认为在经过 LPS 刺激后, 浓度上升超过 1.5 倍为明显上调。此处的 H/L 中 H 为刺激前蛋白质浓度, L 为刺激后的。此处即 $L/H \leq 0.667$ 即明显上调, 借助 Uniprot, 发现以下明显上调的蛋白与免疫反应有关。

蛋白质ID	蛋白质名称	比例H/L	功能
P08905;P17897	Lysozyme C-2	0.22761	溶菌酶主要具有溶解细菌的功能,组织和体液中的溶菌酶与单核巨噬细胞系统有关,并增强免疫剂的活性。
P16110	Galectin-3	0.41479	参与急性炎症反应,包括中性粒细胞的激活和粘附,单核巨噬细胞的化学吸引,凋亡中性粒细胞的调理,以及肥大细胞的激活。
P51150	Ras-related protein Rab-7a	0.57927	在吞噬病原体的吞噬体的成熟和酸化中起作用,如金黄色葡萄球菌和分枝杆菌。在吞噬体与溶酶体的融合中起作用。
P10107;A2BH40	Annexin A1	0.59171	在先天免疫应答中起重要作用

图 18 上调蛋白种类

5.3 得到的质谱数据

为了学习质谱分析软件的使用,对于得到的某一质谱数据,使用 Xcalibur Qual Browser 打开,使用该软件尝试查看数据的相关信息。最上一栏是强度随着 retention time 的变化,第二栏是一级质谱,第三栏是其中最高峰的二级质谱,在其中观察到了天然同位素的存在造成的质量分布,也可推测对于该多肽, $z=3$ 。

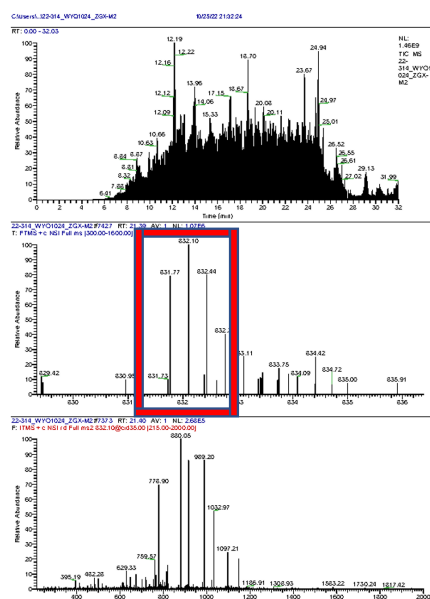


图 19 质谱数据

5.4 小鼠 Raw264.7 巨噬细胞的膜蛋白与可溶蛋白情况

a. 在数据分析中发现,膜蛋白和可溶蛋白的成分存在重合,推测可能是在进行分离的过程中,仅离心无法对这两种蛋白进行较好地分离。其中,对于强度前 10 的蛋白,膜蛋白组和可溶蛋白组中的蛋白种类是完全相同的。但它们在两种蛋白质组中的排名有所区别,集合他们的亚细胞定位,可知这种分离虽然无法很有效地将它们分离,但也有一定效果。

膜蛋白组中的排名	可溶蛋白组中的排名	蛋白质名
1	1	Pyruvate kinase PKM
2	3	Actin, cytoplasmic 1; Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed
3	2	Alpha-enolase
4	8	Vimentin
5	9	78 kDa glucose-regulated protein
6	5	Elongation factor 1-alpha 2
7	4	Heat shock cognate 71 kDa protein
8	7	Tubulin alpha-1B chain
9	6	Heat shock protein HSP 90-beta
10	10	Fructose-bisphosphate aldolase A

图 20 两种蛋白质组中的蛋白质排名

b. 考察膜蛋白组中,强度高且定位确在膜上的蛋白。它们的相对分子质量与切胶划分的纸质量范围符合较好,但仍然有一定比例不符合查出的相对分子质量,举例如下:

蛋白质名称	Mass (Da)	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4	亚细胞定位
Actin, cytoplasmic 1; Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed	41737	2	58	76	47	细胞骨架
Tubulin alpha-1B chain	50152		42	42	19	细胞骨架
Clathrin heavy chain 1	191557	113	20	2	4	细胞质囊泡膜, 膜素体
Heat shock cognate 71 kDa protein	70871	31	58	25	7	细胞膜, 细胞质
Plectin	534188	166	1	2		细胞骨架

图 21 膜蛋白组内蛋白

注: 其中的 fraction1-4 分别对应相对分子质量 $\geq 75kDa$ 、 $50 - 75kDa$ 、 $25 - 50kDa$ 、 $\leq 25kDa$, 下同。

c. 考察可溶蛋白组中,强度高且定位确在细胞质中的蛋白。它们的相对分子质量与切胶划分的纸质量范围符合较好,但仍然有一定比例不符合查出的相对分子质量,举例如下:

蛋白质名称	Mass (Da)	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4	亚细胞定位
Vimentin	53688	1	39	17	15	细胞质
78 kDa glucose-regulated protein	72422	41	14	12	7	细胞质
T-complex protein 1 subunit gamma	60630		22	3	1	细胞质
Rab GDP dissociation inhibitor beta	50537		19	3	1	细胞质
Filamin-A	281222	46	5		3	细胞质

图 22 可溶蛋白组内蛋白

以上提到的膜蛋白和可溶蛋白组内部的关于相对分子质量的偏移可能来源于切胶时刀片没有及时洗干净造成的污染，以及在后续处理中在繁琐的操作过程中可能出现的移液串孔（膜蛋白组中，25kDa-50kDa 和 50kDa-75kDa 发生了一次串孔，后续看来影响不大）

5.5 荧光胶以及考马斯亮蓝胶图

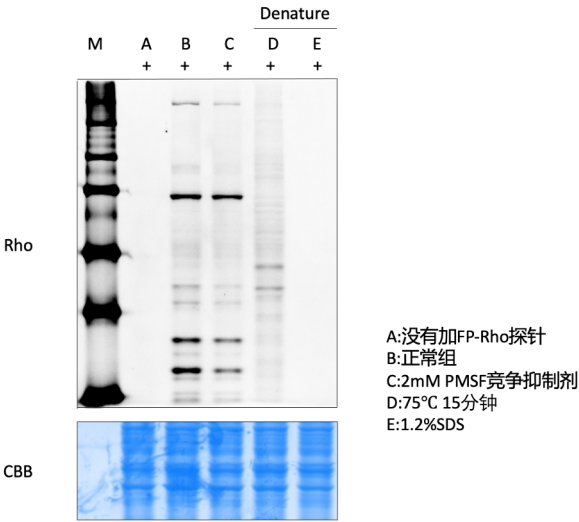


图 23 胶图

第一条道为荧光 Marker，其余 5 条道都加有相同浓度的丝氨酸水解酶，除了第 2 条道（A 组），BCDE 组是加入的 ABP 都为 FP-Rho，控制的条件如上图所示。

对于胶图进行分析，在考马斯亮蓝染色的结果中，对于丝氨酸水解酶的染色结果并无不同。但在荧光胶图中却可以看出较大差异。

没有加入 ABP 的组没有显示出荧光强度，正常组的条带强度强于加 PMSF 竞争抑制剂的组，因为 FP-Rho 与丝氨酸水解酶的结合受到了抑制，它们的模式相同而强度不同。D 组由于高温处理，丝氨酸水解酶的结构发生了改变，荧光探针与其结合较为随机。E 组中，SDS 使得丝氨酸水解酶的结构发生改变的同时包裹其上，阻止了 ABP 与其

结合，因此也看不到荧光强度。

致谢

感谢王彦琦助教和王初老师的认真教学，让我们学习了相关理论知识，补充了相关实验技能，领略了蛋白质组学技术的魅力。也感谢王老师课题组的师兄师姐，给我们提供了学习讨论的时间与空间。

感谢各位一同上课的元培学院整合科学班的同学，我们相互鼓励、共同进步；感谢化学与分子工程学院的廖博雅同学，给我们补充相关背景知识。

感谢化学与分子工程学院为我们的教学实验提供质谱平台的绿色通道，让我们尽快拿到了数据。

参考文献

[1]Boersema, P., Raijmakers, R., Lemeer, S. et al. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. Nat Protoc 4, 484–494 (2009).