

新技术讲座

蛋白质与抗体微阵列及其在生物医学研究中的应用*

虞伟^{1,2)} 孙永康¹⁾ 顾宁¹⁾** 武建国²⁾⁽¹⁾东南大学, 教育部分子与生物分子电子学开放研究实验室, 南京 210096;⁽²⁾南京军区南京总医院, 全军医学检验中心临床免疫实验室, 南京 210002)

摘要 随着人类基因组测序的顺利完成及其他相关领域如机械制造、微电子加工技术及生物信息学方面所取得的进展, 以蛋白质为研究对象的蛋白质组学愈显重要, 高通量的蛋白质与抗体阵列芯片分析技术正日益为人们关注. 对蛋白质分析策略及以阵列为基础的蛋白质芯片分析原理、相关的制备方法与检测技术及其在生物学研究、医学与实验诊断应用方面进行了阐述, 并对现阶段该技术存在的不足与发展前景进行了讨论.

关键词 蛋白质, 阵列, 微阵列, 抗体, 生物芯片, 高通量

学科分类号 R392-33

随着人类基因组测序的顺利完成, 使得功能基因组的研究成为可能. 以蛋白质为研究对象的蛋白质组学越来越重要. 蛋白质与抗体阵列芯片分析正是为了适应这一要求而发展起来的一种全新的技术, 但这方面的研究才刚刚起步. 特别是随着其他相关领域如机械制造、微电子加工技术及生物信息学方面所取得的进展, 其研究和应用前景则使人们备受鼓舞^[1]. 早期应用的分析蛋白质组的工具是二维电泳 (2DE) 技术, 它先通过等电点聚焦, 凭借分子质量大小来解析复杂的蛋白质混合物, 再用质谱法 (MS) 进行分析, 但该技术受限于其通量, 无法平行分析大量样品, 需要个别地加以纯化. 只有将一个生物系统中的 DNA 序列、mRNA 图谱和代谢物浓度等信息与全部蛋白质组信息加以整合, 对这一生物系统有一个全面、多维、动态的认识, 并将这些认识与生物表型, 包括其生老病死在内的所有生命活动联系在一起, 才能最终阐明生命的奥秘.

1 蛋白质分析策略与意义

近年来发展了以阵列为基础的方法, 可在 mRNA 水平上分析整个基因组中基因表达的情况, 但却不能提供基因表达的转录后调控、蛋白质合成与含量变化、蛋白质降解速度以及蛋白质转译后修饰等信息. 实际上基因-蛋白质动力学并非一确定的线性关系, 绝大多数的蛋白质结构修饰、丰度变化及其活性形式等也并非由单一基因控制, 而是由多基因和多种环境因素综合作用的结果^[2].

蛋白质作为生命活动的执行者, 其结构或表达

丰度的改变极有可能导致细胞功能发生变化, 甚至可以引起机体发生病变. 由于蛋白质结构与功能的复杂性, 要沿用 DNA 芯片 (DNA chip) 模式来分析蛋白质还不可能实现, 主要是基于如下两种理由^[3]: 首先蛋白质尚无类似 DNA 扩增的方法; 第二是蛋白质在细胞核糖体内的合成过程中, 需要进行多步骤的修饰, 才可确保其在细胞内的活性作用. 如信号肽与起始因子的剪接, 某些化学基团 (如己酰基、甲基、磷酸基团、多糖和磷脂类) 的掺入等, 目前已发现有 100 多种的翻译后修饰方式. 另一需要加以考虑的因素是蛋白质在序列水平上的高度多态性. 很显然, 实施对蛋白质的高通量检测并发现与疾病相关的蛋白质具有重要意义, 其最终目的是为每种蛋白质提供丰富的信息内涵, 包括其序列功能、结构域、亚细胞定位、翻译后修饰、变异的解释; 阐明整个蛋白质分子和结构域与其他蛋白质的同源性, 与伴侣分子的相互作用及对涉及到的疾病或细胞的作用机制. 而在这些方面, 蛋白质与抗体阵列芯片的制作新策略及其在分析蛋白质功能方面的应用业已取得了长足的进展^[4].

2 蛋白质与抗体微阵列芯片

2.1 原理概述

蛋白质芯片是高通量、微型化和自动化的蛋白

* 国家自然科学基金 (69890220) 和教育部优秀青年教师科研教学奖励基金 (2000 年) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 025-3794960, E-mail: Guning@seu.edu.cn

收稿日期: 2001-10-12, 接受日期: 2001-12-28

质分析技术,主要有两种方法^[5]:一种是以阵列为基础,即在固相支持物表面高密度排列的探针蛋白或抗体点阵,可特异地捕获样品中的分子,用 CCD (charge coupled device) 照相技术与激光扫描系统获取阵列图象,最后利用专门的计算机软件包进行图象分析、结果定量和解释.具体方法有直接检测模式和间接检测模式,前者是将样品中蛋白质预先用荧光素或同位素标记,结合到芯片上的蛋白质就会发出特定的信号;而后者则采用的是标记第二抗体分子,其原理和操作过程类似于 ELISA 方法.这种以阵列为基础的芯片检测技术操作简便、成本低廉、结果重复性较好,并能很快获得测试结果.另一种则是微流路芯片装置,也就是微型化的凝胶电泳板,它将毛细管电泳、质谱分析 (MS) 和荧光检测技术融为一体,在电场作用下,样品中的蛋白质通过芯片上的孔道分离开来,经喷雾直接进入质谱仪中进行检测,以确定样品中蛋白质的分子质量和种类.就临床应用前景而言,人们更关注第一种阵列芯片.

2.2 蛋白质与抗体阵列芯片的制备

蛋白质与抗体微阵列上的探针,可根据研究目的不同,选用某些特定的抗原、抗体、酶和受体等具有生物活性的蛋白质制成低密度芯片.制作高密度蛋白质阵列芯片,则需使用基因表达产物,将一个 cDNA 克隆库所产生的几乎全部蛋白质排列在一个表面上^[6];亦可以将纯化的液相表达培养物自动点样固定于基片表面制成蛋白质阵列^[7].

用单克隆抗体构筑的阵列芯片可用于检测蛋白质表达丰度及确定新的蛋白质.传统的杂交瘤细胞技术用于单克隆抗体的研制所需时间长,制约了抗体阵列密度的发展,而基因工程抗体则给抗体阵列芯片的发展带来了新的机遇^[8],噬菌体抗体库技术就是典型的代表,它可同时有效地处理大量分子,而且抗体分子可以不经动物的阴性选择,能从任一种属获得少有的抗体专一性和提高亲和力.最近 de Wildt 等^[9]用 scFv 抗体文库制作微阵列,阵列化的抗体在数周乃至数月仍保持稳定.

由于蛋白质要比 DNA 难于合成,所以蛋白质与抗体阵列芯片要比 DNA 芯片复杂得多,且定位固相于载体表面的蛋白质与抗体分子易于改变空间构象,而失去原有的生物学活性,成为影响蛋白质与抗体阵列芯片应用的主要障碍.为此有必要寻找新的固相化途径,选择合适的载体并进行修饰,理想的表面是渗透滤膜(如硝酸纤维素膜、尼龙膜、

或 PVDF 膜)或包被了不同试剂(如多聚赖氨酸或聚丙烯酰胺)的载玻片,通过机械手臂自动将蛋白质或抗体分子点制于其表面制作微阵列^[10].最近, Mendoza 等^[11]借鉴了传统的 ELISA 微孔板模式,设计了一种微阵列大大提高了检测密度.该阵列是由疏水的聚四氟乙烯围圈制成的 96 孔平滑玻璃片.这种阵列形式是作为高密度微阵列和不同多组分分析样品平行检测很有希望的折衷方式.同样的想法, Rowe 等^[12]将捕获抗体和分析样本阵列于带有交叉流动室的载玻片表面,该技术有高通量的潜能.为了在表面生成三维阵列, Guschin 等^[13]则用光刻胶或过硫酸盐引发的相互聚合技术在聚丙烯酰胺凝胶上生成寡核苷酸、DNA 及蛋白质阵列,其提供的吸附容量较二维载玻片大 100 倍,从而显著提高了测定灵敏度.

2.3 蛋白质与抗体阵列芯片的检测

为捕获并分析特定标记的蛋白质,已有复杂配体包被的表面可供选择,如表面增强激光离子化解吸作用 (SELDI) 蛋白质芯片和各种不同的生物分子相互作用分析 (BIAcore) 芯片等.比较有代表性的主要有如下两种方法: a. 蛋白质与抗体分子标记法,如 Haab 等^[14]采用的双色荧光显示系统,以 Cy5 标记样本中的蛋白质,而用固定浓度的 Cy3 标记物作为内置参照,通过测试其荧光灰度比值,即可反应检样中的蛋白质或抗体水平. b. 第二抗体分子标记法,如 Bussow 等^[6]用含有针对组氨酸印记表位的抗体和标记二抗,分别与人脑 cDNA 文库的细菌克隆阵列 (hEx1) 作用,用于其重组融合蛋白的检测.另一方法则是以质谱分析为基础的直接检测技术,如表面增强激光离子化解吸-飞行时间质谱技术 (SELDI-TOF-MS),可使吸附在阵列芯片表面的靶蛋白离子化,在电场力作用下飞行,通过检测离子的飞行时间计算出其质量电荷比,用以分析蛋白质的分子质量和相对含量. Frears 等^[15]采用该技术成功地检测到了纳摩尔的淀粉样 β 蛋白 (A β),而且定量地评价了 A β 40 与 A β 42 的比例,为进一步研究老年性痴呆的发病机理、发现生物标记物及 γ -1-42 分泌酶的特异抑制剂提供了基础.

3 蛋白质与抗体微阵列芯片的应用

3.1 生物学标志物的检测

蛋白质芯片能够同时检测生物样品中,与某种疾病或环境因素损伤可能相关的全部蛋白质的含量

变化情况, 即表型指纹 (phenomicfingerprint) 分析. 对于疾病的诊断或筛查来说, 表型指纹要比单一标志物准确可靠得多. 此外, 表型指纹对监测疾病的进程和预后, 判断治疗的效果也具有重要意义. 蛋白质阵列在临床医学中最有可能应用于自身免疫病的实验室诊断, 以确定特异性自身抗体谱的存在. 例如全身性红斑狼疮 (SLE) 患者中存在有高滴度的针对各种不同核蛋白与复合体的抗核抗体, 可允许对疾病作出明确诊断, 尤其是那些症状表现多样化或疾病早期症状不典型的患者更有意义.

由于蛋白质与抗体阵列芯片探针的特异性高、亲和力强, 受其他杂质的影响较低, 因此对生物样品的要求较低, 可简化样品的前处理, 甚至可以直接利用生物材料 (血样、尿样、细胞及组织等) 进行检测. 其高通量性质, 加快了生物标志物发现和确认的速度. CIPHERGEN Biosystems 公司利用蛋白质芯片检测了来自于健康人和前列腺癌患者的血清样品, 在短短的三天之内发现了 6 种潜在的前列腺癌的生物标志物^[16]. 如果利用过去的方法, 也许要花费数月甚至数年的时间.

3.2 用于生物分子间的相互作用研究与质谱分析

蛋白质阵列芯片技术由于是在体外条件下进行操作, 突破了酵母双杂交系统技术的局限, 可直接检测目标蛋白质. Ge 等^[17]应用了一低密度通用蛋白质阵列 (universal protein array, UPA) 系统来研究蛋白质、DNA、RNA 和小分子化学配体探针的相互作用, 通过测试人蛋白 p52 与点在硝酸纤维素膜上纯化的 48 种蛋白质的反应, 用高浓度盐水清洗渗透膜来鉴别高亲和力蛋白质间的相互作用. 结合二维凝胶电泳技术, 现今的蛋白质阵列芯片无疑将会填补基因组学和蛋白质组学之间的信息空缺. 通过与逆向来源的 DNA 芯片和二维凝胶电泳结果进行对比, 可将蛋白质表达与 DNA 序列信息有机地联系在一起, 比较健康和带病的细胞蛋白质谱图, 将有可能认清细胞内信号传导和新陈代谢途径.

3.3 药物靶标及其作用机理的研究

疾病的发生发展与某些蛋白质的变化有关, 如果以这些蛋白质构筑芯片, 对众多候选化学药物进行筛选, 直接筛选出与靶蛋白作用的化学药物, 将大大推进药物的开发. 另外, 蛋白质阵列芯片有助于了解药物与其效应相关蛋白质的相互作用. 并允许对化学药物作用机制细节不够清楚的情况下, 直接研究蛋白质谱, 这可能将化学药物作用与疾病联系起来, 以反应药物是否具有毒副作用、判定药物

的治疗效果, 为指导临床用药提供实验依据, 并能进一步建立和发展外源化学药物与蛋白质表达谱的数据库, 促进药理学和毒理学的研究^[3].

4 存在不足和发展前景

目前在制作与应用 DNA 芯片方面业已取得了重要进展. 如果将这些技术进行整合并用于改善和发展蛋白质微阵列, 在阵列中设置阳性与阴性质控对照, 有助于对芯片检测结果与背景信号作出准确的判断和解释. 其他需要改进的方面包括: 高速的阵列化制作方法、保持微阵列腔室的湿度、阵列的冷藏存储、高通量的在线杂交检测设备以及高效的图象处理和资料分析工具. 改进制作蛋白质阵列的另一重要因素就是提升蛋白质表达系统, 使其能生产大量可溶性、初生态表达的重组源蛋白. 现有的 *E. coli* 表达系统尚存有许多不足之处, 尚不能执行转录后修饰、二硫化异构、磷酸化与糖基化作用, 且表达蛋白在包含体中易累积聚合, 相对于人类编码习惯的差异而易导致蛋白质的断裂. Lucking 等^[18]最近采用 *Pichia pastoris* 与 *E. coli* 建立的双重蛋白质表达系统, 结合了两者的优点, 无需亚克隆, 提高了可溶性蛋白的表达水平.

现有的蛋白质与抗体阵列的主要缺陷在于芯片表面固定的分子易发生变性或不正确的折叠. 为解决这一问题, MacBeath 等^[19]则采用含 40% 甘油的磷酸盐缓冲液来溶解蛋白质, 点制于醛化处理的载玻片表面而形成稳定的共价键连接, 一方面可有效防止溶剂的蒸发, 另一方面则使被固定的蛋白质与抗体保持原有的分子构型, 确保与相应配体分子发生特异结合的能力. 同时他们还在载玻片表面制作了具有亲水性的自组装膜如 BSA 分子层, 再利用化学反应将探针蛋白锚定于其表面, 可有效防止其变性, 较成功地解决了固相表面蛋白质的活性问题.

5 结 语

蛋白质与抗体微阵列是一种新颖潜在的、具有多功能用途的有效工具, 这一技术对生物医学研究和临床医药的真正影响现已越来越被人们所关注. 与传统的分析设备相比较, 现行蛋白质微阵列技术最主要的优点是对单个样本实施平行分析数以千计的蛋白质成为可能. 可执行高通量的蛋白质与抗体、蛋白质与蛋白质、蛋白质与配体及蛋白质与药物的相互作用、酶底物筛选和发展小型化的蛋白质

芯片分析技术。阵列芯片的第二个主要优点是较传统的检测设备小型化, 检测所需的样本试剂用量小, 更重要的是可大规模地提供重组蛋白并研究其功能, 这使得了解有关 DNA 序列信息与蛋白质产物之间的直接联系变得更为容易。

致谢 本文受上海强士公司大力支持, 特此致谢!

参 考 文 献

- Sanders G H W, Manz A. Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis. *Trends Anal Chem*, 2000, **19** (6): 364~378
- Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 1997, **18** (3~4): 533~537
- Cahill D J. Protein and antibody arrays and their medical applications. *J Immunol Methods*, 2001, **250** (1~2): 81~91
- Emili A Q, Cagney G. Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays. *Nat Biotechnol*, 2000, **18** (4): 393~397
- Dalton R, Abbott A. Can researchers find recipe for proteins and chips. *Nature*, 1999, **402** (6763): 718~719
- Bussow K, Cahill D, Nietfeld W, *et al.* A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (21): 5007~5008
- Lueking A, Horn M, Eickhoff H, *et al.* Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Anal Biochem*, 1999, **270** (1): 103~111
- Borrebaeck C A K. Antibodies in diagnostics from immunoassays to protein chips. *Immunol Today*, 2000, **21** (8): 379~382
- de Wildt R, Mundy C R, Gorick B D, *et al.* Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat Biotechnol*, 2000, **18** (9): 989~994
- Walter G, Bussow K, Cahill D, *et al.* Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening. *Curr Opin Microbiol*, 2000, **3** (3): 298~302
- Mendoza L G, McQuary P, Mongan A, *et al.* High throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biotechniques*, 1999, **27** (4): 778~788
- Rowe C A, Scruggs S B, Feldstein M J, *et al.* An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes. *Anal Chem*, 1999, **71** (2): 433~439
- Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, *et al.* Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Anal Biochem*, 1997, **250** (2): 203~211
- Haab B B, Dunham M J, Brown P O. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol*, 2001, **2** (2): research0004. 1~0003. 13
- Frears E R, Stephens D J, Walters C E. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport*, 1999, **10** (8): 1699~1705
- Senior K. Fingerprinting disease with protein chip arrays. *Mol Med Today*, 1999, **5** (8): 326~327
- Ge H. UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (2): e31~IV
- Lueking A, Holz C, Gotthold C, *et al.* A novel system for dual protein expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2000, **20** (3): 372~378
- MacBeath G, Schreiber S L. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 2000, **289** (8): 1760~1763

Protein and Antibody Microarrays and Their Biomedical Applications*

YU Wei^{1,2)}, SUN Yong-Kang¹⁾, GU Ning^{1)**}, WU Jian-Guo²⁾

⁽¹⁾National Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics, Southeast University, Nanjing 210096, China;

⁽²⁾Laboratory of Clinical Immunology, Center of Medical Laboratory Science, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China)

Abstract With advances in areas such as genome sequencing, robotic, proteomics, microelectronics and bioinformatics, the field of protein and antibody microarrays has recently had an explosion of interest. Current strategies used to generate protein and antibody arrays, their analytical principle and related detection procedure, as well as their current applications in biological research, medicine and diagnostics are reviewed. The shortcomings of these approaches, future developments required, and the potential applications of this technique will be discussed.

Key words protein, array, microarray, antibody, biochip, high-throughput

* This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (69890220) and Promotional Foundation of Ministry of Education of China for Excellent Youth Teachers (2000).

** Corresponding author. Tel: 86-25-3794960, E-mail: Guning@seu.edu.cn

Received: October 12, 2001 Accepted: December 28, 2001