

蛋白质点阵/芯片技术的新进展

宋鑫* 曹亚

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 蛋白质点阵/芯片技术是分子生物学技术的重要进展, 在功能蛋白质组研究方面具有广阔的潜在应用价值。目前发展起来的印迹蛋白微阵列、分子扫描技术和传感器生物芯片质谱, 将应用于药靶检测、疾病诊断、蛋白质结构鉴定和/或蛋白质之间的相互作用分析等方面, 具有分析速度快、效率高、样品消耗少等特点, 将成为生命科学与医学领域新的研究工具。

关键词 蛋白质点阵/芯片, 蛋白质组, 质谱

学科分类号 Q503

随着人类基因组测序接近尾声, 预示着“功能基因组时代”的到来。尽管获得了大量的DNA序列, 但仍不能预测下述问题: 基因表达产物是否或何时被翻译; 翻译调节及翻译后修饰的种类与程度; 基因产物的相应含量; 基因剔除或过表达影响; 多基因现象的表型; 蛋白质之间相互作用等等。所以, “基因组时代”的迅猛发展激起了人们对“功能基因组时代”蛋白质组的研究。要使蛋白质组学研究顺利开展并获得突破, 必须在技术方法体系和生物信息学方面的研究获得突破。着眼于蛋白质的功能应用研究(如药物开发), 结构研究或结构与功能研究, 以及由此而产生的生物物理、生物化学、软硬件工程学以及微芯片材料学等诸学科的交叉与技术融合, 使得蛋白质点阵/芯片技术呈现多元化的发展。

1 代表性的蛋白质点阵/芯片技术

1.1 印迹蛋白微阵列

由于蛋白质在固相支持物表面上不易折叠成有功能的结构而丧失其活性, 因此以前的蛋白质多点在酶标板上、微陷阱里, 或者在显微镜载玻片上制备聚丙烯酰胺凝胶垫板、硅弹性体等等这些组织微阵列而在其上点阵蛋白质。然而该芯片的突破点在于MacBeach等^[1]解决了使蛋白质粘附于固相载玻片上而保持活性这一关键技术, 使印迹蛋白微点阵用于高通量功能研究成为现实, 这一技术的关键在于对载玻片的处理。采用含乙醛的特殊试剂处理的显微镜载玻片, 用高精度印迹蛋白的机械手点纳升(nanoliter)量体积的蛋白质于载玻片上(点阵密

度为1600点/cm²), 乙醛与点阵于载玻片上蛋白质的伯胺基起反应形成Schiff's碱从而使蛋白质连接到载玻片上, 再用BSA处理载玻片表面, 然后用N, N'-二琥珀酰基碳酸盐溶液(N, N'-disuccinimidyl carbonate)活化BSA的赖氨酸、谷氨酸残基, 使其易与印迹蛋白的表面胺作用形成共价连接或酰胺连接, 印迹的肽或小分子蛋白质则可在载玻片BSA单层分子表面保持立体构象, 易于与溶液中的大分子起反应。采用荧光Cy3、Cy5及Bodipy-FL1标记药物、抗体及酶, 利用扫描仪扫描获得数据资料, 利用成像装置观察结果, 很容易地检测了点阵中与特有蛋白质结合的有荧光素标记的药样分子靶、抗原与酶的底物。目前在制药业, 重点已放在用蛋白质组学方法来发现药物作用的蛋白靶^[2], 估计用于药靶与疾病诊断的应用芯片不久将会问世并步入日渐成熟的应用阶段^[3]。

1.2 分子扫描技术或质谱成像法

该技术^[4]能对二维凝胶电泳的各蛋白质点同时消化, 然后电转移至PVDF(polyvinylidene difluoride)膜, 该膜直接用MALDI-TOF MS全膜扫描, 所获PMF数据发送到Peptide蛋白质鉴定网(<http://www.expasy.ch/tools/peptide.html>), 利用Peptide软件分析, 把数据变成即刻通过显示器显示的二维点阵点, 即一个可以注释的二维实像(annotated 2D virtual image), 每个点代表一个已知的蛋白质, 通过鼠标点击所示“蛋白质点”即

* 通讯联系人。

Tel: 0731-4805448, E-mail: songxinemail@163.net

收稿日期: 2001-01-18, 接受日期: 2001-02-23

可获得鉴定结果. 该技术在很大程度上实现了高通量与检测一体化. 采用一步消化转移 (one step digestion-transfer) 技术, 结合 MS 与生物信息学方法, 在同一实验中, 完成了高通量的消化、转移、鉴定与成像一系列过程, 极大减少了蛋白质样品的丢失, 对于分布于 PVDF 膜上的消化蛋白质点大小只要达到激光柱垂直横截面大小 (10^{-2} mm^2) 即可获得鉴别分析, 成功地进行了多个蛋白质交叉点的鉴别; 把 PeptIden 结果输入 FindMod^[5], 还允许对蛋白质翻译后修饰进行分析. 而且随着智能软件的开发, 在该扫描图上, 可以自动呈现多色标记的不同的潜在修饰蛋白. 另外, 无论是 2-DE 上的蛋白质点阵还是转移至 PVDF 膜上的消化后的蛋白质产物点阵均无需染色, MS 强度起着“染色剂”的作用. 该技术采用迷你凝胶 (mini-gel), 只用微克水平的上样量, 可检测到皮摩尔水平. 目前, 该点阵技术尚未进入应用阶段.

目前, 发展与应用的方向有待于运用多酶消化、多激光柱多次扫描及迷你二维电泳凝胶, 从而达到多角度、高效率检测蛋白质点数目并且依据该技术原理向高质量的蛋白质芯片发展.

1.3 传感器生物芯片质谱

近年来, 两个常用的技术——表面等离子体共振-生物分子相互作用分析 (surface plasmon resonance-biomolecular interaction analysis, SPR-BIA) 与 MALDI-TOF MS 整合成一个单一的用于研究蛋白质和功能的强有力技术 (BIA-MS), 以一个新的思路和切入点进入了蛋白质组学研究的竞技场, 把分离的分子生物学技术和蛋白质化学融合成一个整体的分析系统, 形成了一个新的功能蛋白质组学方法^[6]. 基于上述理论与技术, 一种全新生物传感器芯片质谱 (biosensor chip mass spectrometry, BCMS)——一种以芯片为基础的蛋白质组学方法诞生了. 这个“lab-on-a-chip”方法成为一个理想的研究蛋白质结构与功能的分析平台^[2]. 该芯片结构是 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 大小的传感器芯片. 制作是在玻璃表面镀上一层金属薄膜, 然后在金属薄层表面进行化学修饰 (EDC/NHS) 以保证可固定的分子 (如受体) 保持活性. 溶液中的分析元件 (analyte) (如配本) 与表面固定的分子结合可得到实时检测, 留在芯片表面的分子可直接进行质谱分析.

该芯片应用于检测抗原决定簇标志肽. 采用不同的 DNA 标签 (DNA tag) 融合或插入未知基因,

然后未知基因在某一表达系统 (如大肠杆菌) 中表达, 用胰蛋白酶消化整个表达系统 (如大肠杆菌), 包含基因标签表达而形成的蛋白质标签的肽片段在该芯片上与针对该标签肽的受体 (如抗体) 结合而被捕获, SPR-BIA 实时检测并量化, 接着 MALDI-TOF MS 分析标签肽, 所获 PMF 数据通过数据库搜寻而鉴别. 可检测到 Sub-fmol 水平. 另外, 还可用于 cDNA 或 DNA 文库鉴定; 基因多态性筛选等方面.

最近, Xavier 等^[7]把 RNA 通过链白素-生物素交联 (streptavidin-biotin linkage) 固定于传感器芯片上, RNA 在化学修饰的芯片表面折叠成三级结构, 用来捕获蛋白质药靶或组合化学产生的小分子药靶, 再利用质谱技术进行药靶鉴定.

2 展 望

基因组测序、生物信息学和分析仪器的快速发展, 开拓了蛋白质组领域. 随着功能基因组时代的到来, 面对细胞产生的复杂蛋白质, 是 one-at-a-time 进行, 抑或高通量地研究, 这个问题无疑摆在人们的面前^[3]. 可以预言, 蛋白质组的发展仍将依赖于用双向电泳分离细胞蛋白、用质谱法与生物信息学方法鉴定蛋白质的三大技术方法体系联姻所取得的进展^[8], 而这一进展的标志是蛋白质芯片技术. 蛋白质芯片的发展很可能取决于在 2-DE 样品制备与仪器一体化、质谱检测仪器和生物信息学方法方面所取得的进展.

总之, 蛋白质组研究正处于技术发展和创新期, 获取高能力的蛋白质鉴定能力面临着技术上的挑战. 各学科之间的交叉进而获得技术上的突破或融合, 仍然是打破蛋白质组/蛋白质研究瓶颈的关键, 在可能的技术到位之前, 蛋白质点阵/芯片无疑仍将有一段艰难的路要走^[6,8].

参 考 文 献

- 1 MacBeach G, Schreiber S L. Printing Proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 2000, **289** (5485): 1760~1763
- 2 Williams C, Addona T A. The integration of SPR biosensors with mass spectrometry: possible applications for proteome analysis. *Trends Biotechnol*, 2000, **18** (2): 45~48
- 3 Service R F. Biochemistry: protein array step out of DNA's shadow. *Science*, 2000, **289** (5485): 1673
- 4 Binz P A, Müller M, Walther D, *et al.* A molecular scanner to automate proteomic research and to display proteome images. *Anal Chem*, 1999, **71** (21): 4981~4998
- 5 Wilkins M R, Gasteiger E, Gooley A A, *et al.* High-throughput

- mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. *J Mol Biol*, 1999, **289** (3): 645~ 657
- 6 Nelson R W, Nedelkov D, Tubbs K A, *et al*. Biosensor chip mass spectrometry: A chip-based proteomics approach. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1155~ 1163
- 7 Xavier K A, Eder P S, Tony G. RNA as a drug target: methods for biophysical characterization and screening. *Trends Biotechnol*, 2000, **18** (8): 349~ 356
- 8 Harry J L, Wilkins M R, Herbert B R, *et al*. Proteomics: Capacity versus utility. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1071~ 1081

New Advance on Protein Array/ Chip

SONG Xin^{*}, CAO Ya

(Cancer Research Insititude, Xiang Ya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Protein array/ chip technique is a significantly-advancing technology on molecule biology. There is wide latent application perspectives in function proteome study. The present developing printing protein microarray, molecular scanning technique and biosensor chip mass spectrometry will apply to the aspects to detection medicine targets, diagnosis diseases, identification proteins, and/or interaction between proteins, etc. Because analyses on these chips have many advantages such as quick detection, high efficiency, little sample consumed and low cost, they will become novel study tools in the field of life science and medicine.

Key words protein array/ chip, proteome, mass spectrometry

^{*} Corresponding author. Tel: 86-731-4805448, E-mail: songxinemail@163.net

Received: January 18, 2001 Accepted: February 23, 2001