

技术与方法

蛋白质双向电泳图像分析*

贾宇峰¹⁾ 林秋霞¹⁾ 郭尧君²⁾** 郭 鹞³⁾ 刘少君¹⁾**¹⁾ 军事医学科学院基础医学研究所神经生物学研究室, 北京 100850;²⁾ 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101;³⁾ 第四军医大学预防医学系放射医学教研室, 西安 710032)

摘要 随着人类基因组计划的接近完成, 蛋白质组 (proteome) 研究成为新的热点. 其中高分辨率的双向电泳 (two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) 技术使对组织或细胞的整个蛋白质组的综合分析成为可能. 近年来这一技术有了很大的改进和提高, 特别是图像分析系统, 算法更为先进, 功能日益强大, 操作也更简便, 为大规模研究提供了良好的工具. 使用新一代的 2D 图像分析系统, 对离体培养的雪旺氏细胞的蛋白质样品双向电泳结果进行了初步分析, 探讨了在图像扫描、点检测、背景消除、匹配、结果报告和数据分步中的技术问题, 并报告了进行 2D 图像分析的体会.

关键词 双向电泳, 蛋白质组, 图像分析, 软件, 雪旺氏细胞

学科分类号 Q51

双向电泳 (two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) 技术是蛋白质组研究中最广泛应用的蛋白质分离方法^[1]. 而 2D 图像分析作为 2-DE 的重要一步, 其作用是评价和量化电泳结果. 在蛋白质组研究中, 从样品制备、第一向等电聚焦 (IEF)、第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、2D 图像分析到基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF-MS) 或液相色谱-串联质谱连用 (LC-MS/MS) 分析, 整个技术过程环环相扣, 更加复杂. 在各个环节中, 图像分析既要上游各步的结果做出定性和定量的评价, 将一个直观的蛋白质二维图谱数字化, 还要为下一步的分析提供依据. 特别是在表达蛋白质组学研究中, 需要用图像分析软件通过正常和异常细胞、组织等电泳图谱间的匹配, 找出差异蛋白质点: 哪些点消失了? 哪些点是新出现的? 哪些点是相同蛋白, 而表达水平有差异等等. 将这些目标点切下, 通过氨基酸组成分析、N 端测序或质谱分析, 确定是何种蛋白质, 再结合图像分析数据和与内部和外部数据库比较的结果, 做出结论. 由此可见, 2D 图像分析在蛋白质组研究中是不可或缺的.

正当人类基因组计划即将完成之时, 越来越多的实验室开始涉足后基因组 (post-genome) 领域,

蛋白质组研究正在升温. 在一些科研机构和技术公司的努力下, 2-DE 技术不断出现突破性进展, 2D 凝胶的分辨率也越来越高. 在这种情况下, 简单的图像比较是远远不能满足研究需要的, 图像采集系统和分析软件必须能够检测到最小的差别和获取最多的信息^[1].

随着 2-DE 技术和计算机技术的发展, 2D 图像分析系统的性能有了很大的提高, 高分辨率高速度的扫描仪如 ImageScanner、STORM scanner 和 Model GS-710 Imaging Densitometer 等, 再加上新一代功能强大的软件如 ImageMaster 2D、PDQuest^[2]、Melanie II^[3,4] 等, 为大规模分析做好了准备.

我们的实验室正在利用 2-DE 技术开展神经生物学方面的蛋白质组研究工作, 已经建立了全套 2-DE 系统, 并且应用图像扫描系统和 2D 图像分析软件对提取的雪旺氏细胞蛋白质样品电泳结果进行了初步分析研究.

* 国家自然科学基金资助项目 (39928015).

** 通讯联系人.

刘少君 Tel: 010-66931304, E-mail: liusj@nic.bmi.ac.cn

郭尧君 Tel: 010-64888562, E-mail: yaojun.g@263.net

收稿日期: 2000-04-24, 接受日期: 2000-06-07

1 材料与方法

1.1 2-DE

本文中 2-DE 使用蛋白质样品提取自原代培养的雪旺氏细胞, 上样量 80 μg (Bradford 法^[5], Unicam UV300 紫外-可见分光光度仪定量); 第一向 IEF 使用 ImmobilineTM pH 3~10 线性 IPG 预制凝胶条 (购自 Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 在 IPGphor 电泳仪 (APB 公司) 上完成, 第二向 SDS-PAGE 使用自制 SDS 凝胶 (250 mm $\times$ 180 mm $\times$ 0.5 mm, $T = 13\%$)^[6, 7], 在 Multiphor II 电泳仪 (LKB 公司) 上进行; Hoefer 凝胶自动染色仪 (APB 公司) 银染^[8]; 染色完成后玻璃纸覆盖, 室温下放置数天干胶。

1.2 软件与硬件

ImageMaster 2D Elite 3.01 (图像分析软件)

和 LabScan (扫描控制和分析前处理软件) 是由 Nonlinear Dynamics Ltd. 开发, 购自 APB 公司。

工作站为联想奔月 2000 电脑, (Pentium II 350 MHz CPU, 64 M 内存, 30 G 硬盘空间, 17 寸显示器, 显示分辨率 1024 $\times$ 768), Windows 98 操作系统. ImageScanner 扫描仪 (最高分辨率为 9600dpi (H) $\times$ 9600dpi (V)), 购自 APB 公司。

1.3 图像采集与分析

使用 Labscan 控制 ImageScanner 扫描图像, ImageMaster 2D Elite 3.10 分析。

2 结果与讨论

2.1 分析过程

2.1.1 图像扫描: 在 LabScan 中, 执行扫描. 大多数情况下, 300 DPI (dot per inch) 比较合适, 但对于过大或过小的凝胶, 就应该根据实际情况调

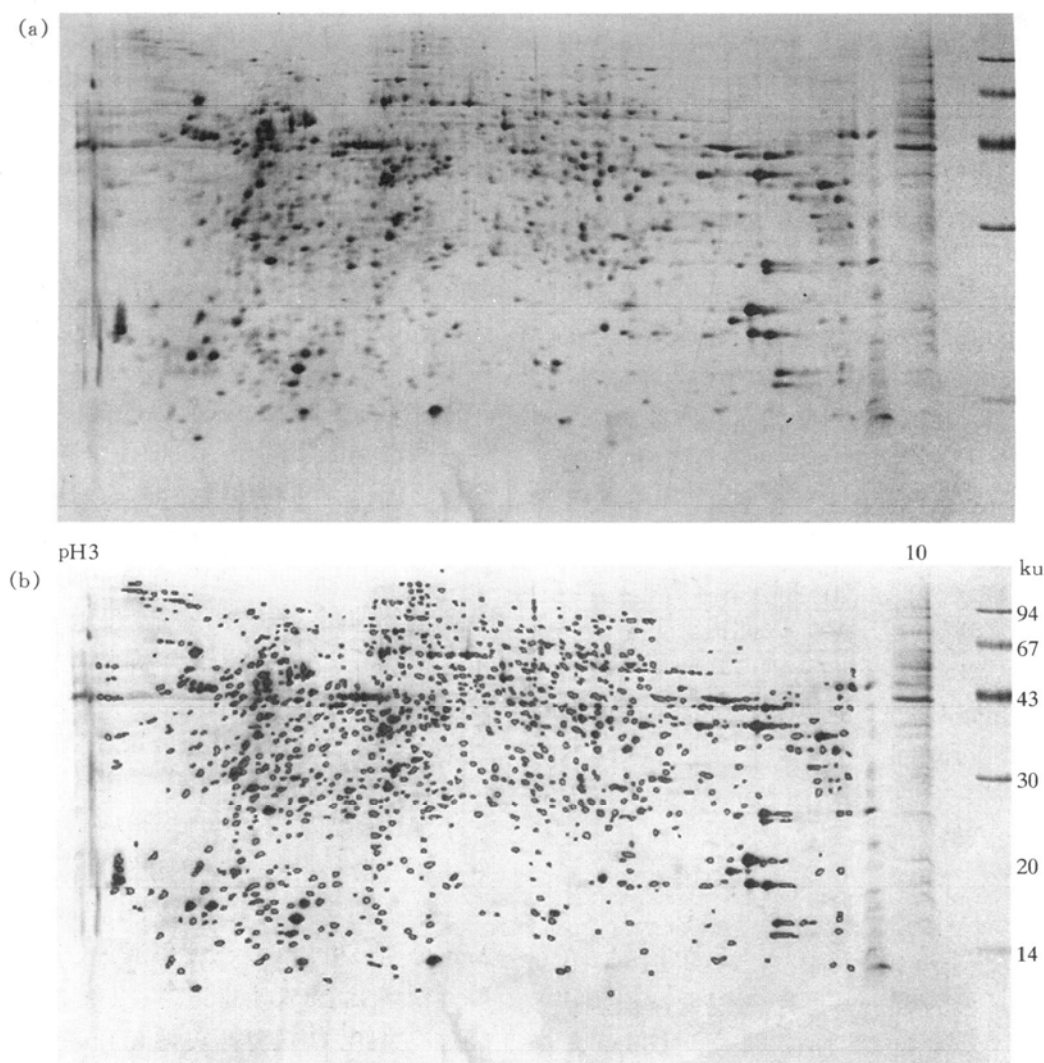


Fig. 1 Scanned original gel image (a) and image after spot detection (b)

节 DPI 值。不过相对于凝胶而言, 缩小的图像会导致图像质量的损失或无法分辨; 而放大的图像则会由于多余的像素而出现内插值 (interpolated values), 甚至会出现像素效应 (pixellation), 影响测定。因此扫描时图像与凝胶大小最好是 1: 1。本文分析采用 300 DPI 扫描的图像 (图 1a)。

应该强调的是, 强度校正 (intensity calibration) 是很重要的, 特别是要使用图像做光密度测定时, 一般是分析凝胶图像的第一步。强度校正可把以任意单位测得的强度值与实际的光密度 (optical density) 或散射密度 (diffuse density) 值匹配。这可以解决图像扫描设备的非线性应答问题, 即图像中的像素值和实际光密度之间无线性关系。

由于光密度仪能够直接提供图像的校正数据, 用此种设备扫描时通常不需要校正^[8]。另外, 也可用扫描软件校正图像。

校正一般使用已知光密度的灰度尺 (step wedge), 即一组灰度呈梯度变化的条带。在软件中可定义灰度尺列表, 添加和删除值。

2.1.2 点检测: 可自动执行, 同时也可调节灵敏度和算子大小, 在高级设置中更有灵敏度、算子大小、背景和噪声四项供调节。使用点检测向导很方便, 首先在整个图像上框选一片区域, 进入下一步, 出现九格窗口, 各个窗格显示的是根据不同灵敏度和算子大小检测得到的效果图, 选择最满意的窗格或直接调节下侧和右侧的灵敏度和算子大小, 直到中间窗格的检测结果达到最佳而其他各窗格结果也较为满意为止, 进入再下一步, 就是消除背景, 最后显示检测结果。上述过程中有两点需要说明, 一是框选区域越小, 图像处理时间越短, 反之亦然; 二是 ImageMaster 2D 除有图像翻转功能外, 不提供任何其他图像调整工具, 因此提交分析的基本是扫描后的原始图像, 一些杂质点和明显的瑕疵也会被误认为是蛋白质点, 这些将在下面的手工编辑和背景消除中得到纠正。

初步检测结果, 包括蛋白质点的编号、面积、量、以及峰值用表格的形式列出, 图像上所有检测到的点都可用同形色块覆盖、轮廓线圈围、十字线或标记等显示 (图 1b)。

自动检测完成后, 仍有一些点未被识别出, 还有一些是“假点”, 另有一些因距离过近被识别成一个点, 需要手工添加、删除或分割。ImageMaster 2D 中提供了一些很好用的编辑工具: 画点、删除点、提高峰值、边缘增加、分割点、选

择点等 (图 2)。

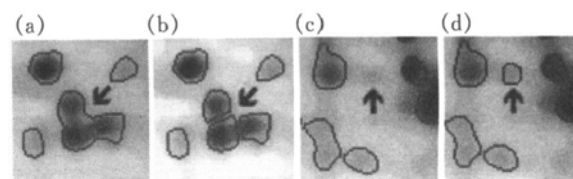


Fig.2 Effects of manual editing

(a) → (b) shows splitting of merged spots, (c) → (d) shows drawing spot.

2.1.3 背景消减: 扫描后的图像一般都有不同程度的背景, 从而影响蛋白质点的精确检测。一些 2D 图像分析软件有较强大的图像调整功能, 可在分析前对图像作平滑、对比增强、消减背景等处理。而 ImageMaster 2D 原则上在检测前不对图像作任何处理 (除了图像翻转), 而是在点检测完成后消减背景, 共有五种方式: 手工消减、边界最低强度消减、边界平均像素值消减、非点模式消减, 后三种均是完全自动的, 如果上述四种方式均不能满足要求, 也可以直接编辑某个点的背景水平。

2.1.4 匹配: 上文已经提到, 匹配是 2D 图像分析中很重要的一步。在 ImageMaster 2D Elite 中, 这也是一个交互式的过程。匹配时首先要创建参考凝胶, 参考凝胶可以是要分析比较的一组凝胶中的一张, 也可以是几张凝胶合并而成的平均胶。用户可以通过改变向量框 (vector box) 和搜索框 (search box) 的大小来操纵匹配。由于电泳过程中的一些影响因素的作用, 即使是同一样品两次电泳图像之间也存在移位或扭曲。在这种情况下, 可以调整上述两个参数得到较好的匹配效果 (图 3)。

2.1.5 结果报告: 在图像分析的过程中, 会产生大量的数据。数据的存储和输出是很重要的。ImageMaster 2D 在整个分析过程中, 无论是图像窗口还是测量窗口的内容变化, 随时都可以拷贝到剪贴板和文件, 其中数据列表还可拷贝到 Excel 文档。检测结果还可生成凝胶报告或蛋白质点报告, 包括图像和列表, 并可存储为 rtf 文件。另外, 软件还可将分析数据自动创建成网页, 点击参考胶任何一个蛋白质点就可以访问相关数据。

2.1.6 1D和 2D 校正: 可通过已知分子质量的标准蛋白确定凝胶上蛋白质点的大致的分子质量 (M_r), 等电点 (pI) 可通过在第一向加入的等电聚焦标准蛋白 (一系列分子质量相同而等电点不同的蛋白)。

2D 校正首先要创建一个蛋白质列表, 这些蛋白质的特性, 主要是分子质量和等电点都是已知

的, 并将这些蛋白质与凝胶上的点关联起来 (即该种蛋白质在凝胶上形成的点), 软件据此进行校正.

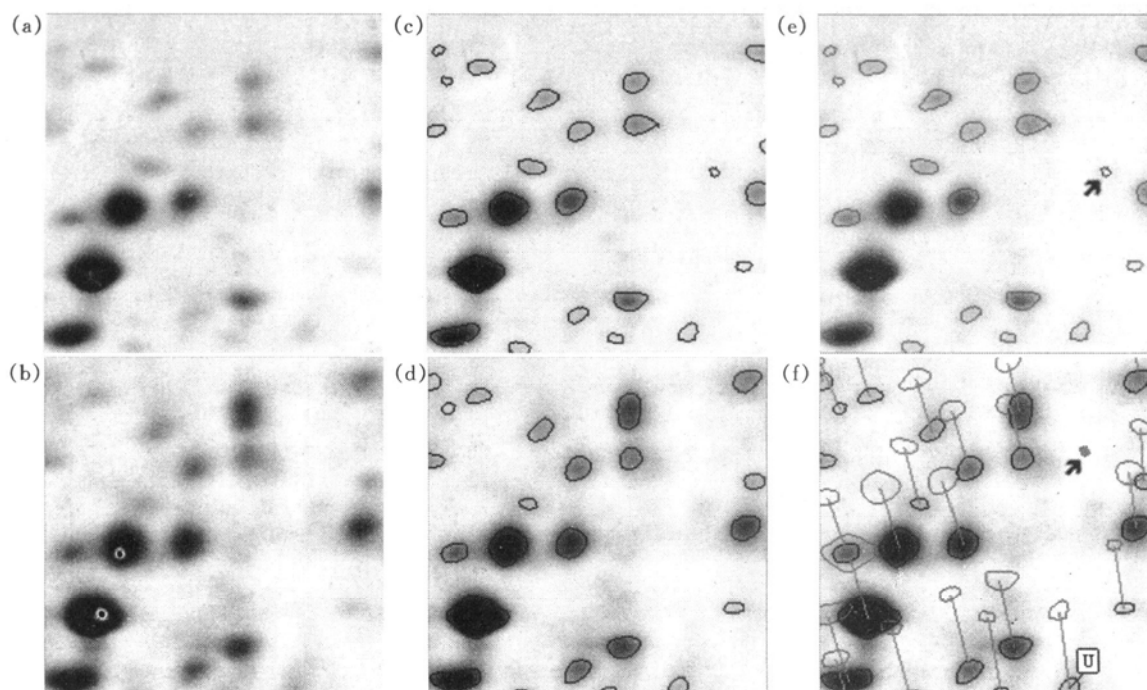


Fig.3 Montage windows of a pair of gels: the upper row, including (a), (c) and (e), shows different display of reference gel and the lower row shows that of matched slave gel. (a) and (b) are original images; (c) and (d) are detected images; (e) and (f) are matched images

A vector going from reference spot into the slave spots indicates a successful match, and the letter 'U' indicates a match manually made by user. The black arrow points to an unmatched spot on reference gel.

2.1.7 数据分析和数据库查询: 在因特网上有许多蛋白质数据库和 2-DE 数据库, 这些数据库中存储着不同来源的和不同形式的蛋白质信息. 2D 分析软件基于分析所产生的蛋白质点的数据, 再通过数据库中的查询, 可以做出更全面的分析. 软件现提供 Biobase、Swiss 2D Page 等 5 个数据库的查询.

2.2 问题与展望

2.2.1 图像调整: 扫描时, 杂质和蛋白质点的拖尾会影响图像的质量, 使分析效率与准确性大大降低. 一些 2D 图像分析软件有较强大的图像调整工具. 可对图像作平滑、对比增强、消减背景等处理, 如 PDQuest 在点检测时, 生成 2D scan、gel image 和 gel spots 三幅图像, 其中 2D scan 是扫描的原始图像, gel spots 是经图像调整后提交检测的图像, gel image 是用于编辑的图像, 也经过了图像调整. 而 ImageMaster 2D 原则上不对图像作任何处理. 在实验初期, 我们为了提高图像分析的效率, 尝试使用 Photoshop 5.0 的图像调整工具和噪声滤镜消减背景和去除杂质点, 但是发现图像调整

后蛋白质点的量值 (volume) 明显变化. 同时我们发现, 即使不调整图像, 通过优化灵敏度、算子大小、背景和噪声等变量的设置, 在点检测时就可排除一些杂质点, 其后的手工编辑也可再作甄别.

2.2.2 校正和标准化: 影响双向电泳重复性的因素很多, 包括样品制备与上样方式的不同, 染色方法和扫描方式的差异等等. 为了准确地比较分析, 必须采用校正标准化的方法. 首先是强度校正 (intensity calibration), 在扫描前, 使用灰度尺解决图像扫描设备的非线性应答问题. 同时可把图像中的像素值转换为实际的光密度 (optical density, OD); 在匹配时, 可建立平均凝胶 (averaged gel). 所谓平均凝胶, 并非是真的凝胶, 而是通过把一组凝胶经统计学处理合并在一起生成的模拟凝胶. 创建平均凝胶可在同一样品的一组凝胶中生成一张有代表性的凝胶. 如果将其作为参考凝胶进行匹配, 则能得到更多的信息.

2.2.3 自动化: 但是我们也应该看到, 一张凝胶上大约总有一些点未被检测到, 另外一些检测到的

却是“假点”等等, 这些都必须手工调整, 非常耗时间费精力. 另外, 手工匹配也需要大量时间, 而且会导致错配发生. 因此, 2-DE 分析软件的自动化程度还需提高, 应向高分辨率、高灵敏度、智能化的方向发展.

参 考 文 献

- 1 Quadroni M, James P. Proteomics and automation. *Electrophoresis*, 1999, **20**: 664~ 677
- 2 Collins P J, Juhl C, Lognonné J L. Image analysis of 2D gels: considerations and insights. *Cell Mol Biol*, 1994, **40** (1): 77~ 83
- 3 Appel R D, Palagi P M, Walther D, *et al.* Melanie II: a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface. *Electrophoresis*, 1997, **18** (15): 2724~ 2734
- 4 Appel R D, Vargas J R, Palagi P M, *et al.* Melanie II: a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: II. Algorithms. *Electrophoresis*, 1997, **18** (15): 2735~ 2748
- 5 Bollag D M, Rozucki M D, Edelstein S J. *Protein Methods*. 2nd. USA: Wiley-Liss, Inc, 62
- 6 Görg A, Boguth G, Obermaier C, *et al.* Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): The state of the art and the controversy for vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis*, 1995, **16**: 1079~ 1086
- 7 Görg A, Boguth G, Obermaier C, *et al.* Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4~ 12 gradient. *Electrophoresis*, 1998, **19**: 1516~ 1519
- 8 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社. 1999. 142
- Guo Y J. *Experimental Techniques of Protein Electrophoresis*. Beijing: Science Press, 1999. 142

The Image Analysis of Two-Dimensional Gel Electrophoresis*

JIA Yu-Feng¹⁾, LIN Qiu-Xia¹⁾, GUO Yao-Jun^{2)**}, GUO Yao³⁾, LIU Shao-Jun^{1)**}

¹⁾ Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

²⁾ Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

³⁾ Department of Radiation Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Proteome research has become a new hot spot in the post-genome era. High-resolution two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), which provides the most comprehensive analysis system of the whole proteome, was highly improved in recent years. With the development of computer techniques, the powerful and user-friendly image analysis systems appeared to help high-throughput, large-scale proteomic studies. Using new generation two-dimensional image analysis software, ImageMaster 2D Elite, the 2D gels of proteins extracted from cultured Schwann's cells were processed. The analysis procedure, including image acquirement, spot detection, match, background subtraction, pI/M_r calibration, analysis results report and database query, were reported and discussed.

Key words two-dimensional gel electrophoresis, proteome, image process, software, Schwann's cell

* This work was supported by a grant from National Nature Science Foundation of China (39928015).

** Corresponding author.

Liu S J, Tel: 86-10-66930304, E-mail: liusj@nic.bmi.ac.cn Guo Y J, Tel: 010-64888562, E-mail: yaojun.g@263.net

Received: April 24, 2000 Accepted: June 7, 2000