

摘要

20世纪中期以来,随着DNA双螺旋结构的提出和蛋白质空间结构的X射线解析,开始了分子生物学时代,对遗传信息载体DNA和生命功能的主要体现者蛋白质的研究,成为生命科学研究的主要内容。90年代中期,在人类基因组计划(Human Genomic Project)研究发展及功能基因组学的基础上,国际上萌发产生了一门在整体水平上研究细胞内蛋白质的组成及其活动规律的新兴学科——蛋白质组学(Proteomics),它以蛋白质组(Proteome)为研究对象。蛋白质组学(proteomics)已经成为功能基因组学研究的重要领域,其重要性和战略意义日益显著。

蛋白质组学研究主要有两种路线:第一种是传统的双向凝胶电泳(2-DE)分离技术。但是双向凝胶电泳技术仍然存在许多不足和一些难以克服的缺陷,比如有限的动态范围,分离样品中分子量差别较大的蛋白、低拷贝蛋白、疏水蛋白以及极酸极碱蛋白的分辨能力比较差,而且其操作过程费时费力,自动化程度低。针对这些固有的技术上的缺陷,具有快速,高效,自动化程度高等优点的液相色谱技术得到了长足发展,并成为蛋白质组学研究的第二条技术路线。发展二维乃至多维色谱分离技术,提高峰容量和分离能力是根本上解决复杂样品分离问题的方法。从理论上说,只要组合在一起的两种模式的分离机理正交,整个二维系统的峰容量是每一维峰容量的乘积,特别适合于复杂样品的分析。在过去的十几年中,已经出现了一些被认为是突破性的进展,Jorgenson(多维色谱-电泳技术),Yates(Shot-gun技术),Aebersold(ICAT技术)等科学家在蛋白质组学新方法的研究方面打开了一个崭新的局面。

目前,蛋白质组学面临的两大挑战是高丰度蛋白质压制低丰度蛋白质造成低丰度蛋白质检测困难以及蛋白质的定量问题。Shot-gun为代表的bottom-up技术在分离之前将蛋白质样品进行酶解,一个蛋白质酶解成多个肽段,这势必使原本就很复杂的样品变得更加复杂,不仅给色谱的分离能力与质谱的扫描速度提出挑战,不利于低丰度蛋白质的检测,而且将蛋白质酶解成肽段的同时又损失了完整蛋白质的信息。ICAT技术在蛋白质的相对定量方面发挥了重大作用,然而已有的定量技术仅局限在相对定量方面。因此,现有的多维色谱技术在解决蛋白质组学的两大问题上存在许多不足,本论文就是围绕当前蛋白质组学研究中存在的问题开展工作的,建立发展多维色谱技术方法达到实现高丰度蛋白质的去除以及完整蛋白质的分离鉴定以及定量等目的。

本论文共分五章。主要内容摘要如下:

第一章总结了蛋白质组学的现状与发展以及多维色谱与其相关技术在蛋白质组学中

的应用与进展。介绍了二维/多维分离方法的理论依据，探讨了目前蛋白质组学研究使用的技术模式的成功与不足。并介绍了本论文选题的目的和意义，着重在于如何利用多维液相色谱的技术实现在完整蛋白水平上的分离，去除高丰度蛋白质以及利用多维液相色谱技术同时实现对蛋白质的定性定量等问题。

第二章以鼠肝为研究对象比较了不同的提取环境对动物组织中蛋白质提取的影响。主要研究了三种提取环境：酸性、中性和碱性环境。利用双向凝胶电泳分离成像技术比较了在三种不同环境下提取的蛋白质的分布的差异性，通过实验证明了在不同的提取环境下提取的蛋白质在种类和含量上都是不同的，同时也证明了在蛋白质组学的研究中不同的分离路线或分离模式应该根据具体分离条件的酸碱度的不同选用不同的蛋白提取方法，以避免在分离的过程中因沉淀问题而损失蛋白质，为后续工作打下基础。

第三章针对肝脏组织蛋白建立了反相高效液相色谱/双向凝胶电泳（RPLC/2-DE）的三维分离系统。2-DE 技术是比较成熟的蛋白质分离手段，但是样品负载量低是影响中低丰度蛋白检测的一个重要原因，同时 2-DE 技术对于复杂的蛋白质样品的分离能力是有限的。RPLC 是生物分析中常用的高效的分离模式，对蛋白或肽等有很好的分离能力，还具有除盐纯化样品的能力。RPLC 与 2-DE 的分离机理正交，两种技术联合使用能在很大程度上提高样品的分辨率。本章工作以大鼠的肝脏组织蛋白为研究对象建立了实验路线并确立了实验条件。研究表明，蛋白质样品经过 RPLC 预分离之后，不同的蛋白就被富集浓缩到不同的馏份中，极大的提高了单个馏份中的蛋白在 2-DE 上的上样量和分辨率，这一点在凝胶扫描图上可以直观的反映出来，同时，实验证明 RPLC 分离蛋白质有着很好的重现性，据此可以对同一样品进行平行收集，以达到进一步增大单个馏份中蛋白的上样量的目的。因此，将 RPLC 作为预分离手段用于 2-DE 之前对样品进行预分离可以提高蛋白质在 2-DE 上的上样量和分辨率。这条技术路线已经在中国人肝项目表达谱的研究中得到应用。

第四章直接采用多维液相色谱的方法通过多维色谱分离的手段去除生物样品中的高丰度蛋白。中心思路就是：首先利用多维色谱技术对蛋白样品进行有效分离，在完整蛋白分离的基础上，将高丰度蛋白质在酶解成更复杂的肽段之前除掉。这条技术路线目前还没有类似报道。具体路线简述如下：

发展了强阳离子交换色谱/反相高效液相色谱（SCX/RPLC）分离系统，对鼠肝组织蛋白进行高效的分离。使用连续地线性盐梯度将蛋白质从 SCX 色谱柱上洗脱下来，得到 62 个馏份，每个馏份进一步使用常规的 RPLC 进行第二维地分离，整个分离过程使用紫外信号对蛋白的色谱峰进行监测，在第二维的分离过程中将信号强也就是量大的高丰度蛋

白单独收集，其余中低丰度的蛋白进行合并、浓缩和酶解，然后使用毛细管反相色谱（cRPLC）进行分离，之后进行质谱鉴定，62个馏份分别如法炮制。结果表明，一次实验流程可以去除77个高丰度蛋白，占总蛋白量的34.5%，与不经过去除高丰度蛋白的样品进行比较，鉴定蛋白的数量提高了2到3倍之多。

在此基础上，我们进一步简化实验路线并提高方法地通量。来自SCX分离之后的62个馏份经过RPLC进一步分离之后，我们将所有含有中低丰度蛋白的洗脱液合并浓缩到一起，共同酶解之后使用在线的二维分离系统，即shot-gun技术对酶解之后的肽段进行分析鉴定。简化后的实验路线对中国人肝样品进行了分析，58个高丰度蛋白质被去除，共鉴定出1213个蛋白质。

总之，这套系统对降低蛋白质样品地复杂性，避免高丰度蛋白质在分离和质谱鉴定过程中压制中低丰度蛋白提供了一个新的手段和思路。另外，通过多维液相色谱分离的方法去除高丰度蛋白质，相对通常使用的免疫亲和的手段，无疑更具有通用性、灵活性、低成本和周期短的优势。

第五章发展了多维液相色谱的Top-down技术路线，即SCX/cRPLC/靶上酶解/MALDI-TOF-TOF分离鉴定系统。采用SCX/cRPLC分离系统，实现了在完整蛋白水平上的二维分离，本实验室发展的新方法靶上酶解技术的采用将蛋白质分离与质谱鉴定有效的结合起来，从而实现了蛋白从分离、酶解到鉴定这样一个完整的Top-down路线。蛋白质样品经过常规柱SCX分离之后，得到62个馏份，每个馏份继续使用毛细管反相柱cRPLC进行第二维分离，cRPLC作为第二维具有除盐和纯化样品的作用，为直接酶解提供了可能，利用自动点样仪将经过cRPLC的洗脱液直接收集到标准的MALDI靶板上，点样频率为30秒/个，经过靶上单点酶解之后用MALDI-TOF-TOF鉴定。整个系统对中国人肝蛋白进行了鉴定，共鉴定出3313个唯一蛋白。

与通常采用的shot-gun技术相比，我们发展的多维液相色谱的Top-down技术路线更能充分的分离蛋白质，得到更多的包括肽谱和疏水性等有关蛋白质的信息。与2-DE相比具有成本低和自动化高等优势。

在此基础上，我们进一步发展为三维蛋白分离系统，即SEC/SCX/RPLC系统，对肝脏蛋白进行更为完全的分离，利用紫外可见检测对蛋白峰进行归一化处理，进一步计算出蛋白的含量，相对应的蛋白质色谱峰同时进行浓缩、酶解、进而MALDI-TOF-TOF检测定性分析，以达到对单个蛋白同时进行定性和定量的目的。这条路线已经进行了有成效的探索，得到一些初步的结果，为蛋白质组学中的定量问题提供了一个可行的有价值

的新思路。

总之，本论文围绕蛋白质组学的研究热点，以液相色谱分离系统为基础，发展了多种有效的分离系统，以完整蛋白质的分离为指导思想，建立了反相色谱预分离结合双向凝胶电泳的分离路线；开创了基于多维色谱分离为基础的高丰度蛋白质去除系统；发展了多维液相色谱的 Top-down 技术路线，试图在蛋白质研究主流的 2-DE-MS 技术之外，另辟蹊径，对蛋白组学新方法学的建立进行了有益的探索和研究，而且多数实验路线已经在中国人肝项目中投入使用，贡献了大量的有价值的实验数据。

关键词：多维液相色谱，双向凝胶电泳，蛋白质组学，Top-down 技术，完整蛋白质

Abstract

Since 1950's, scientific interest has been increasingly shifting to molecular biology with the accomplishment of the gene sequencing of Human Genome Project (HGP). Proteomics has been the focus due to the role of executor of the life function. Proteomics refers to the analysis of all the proteins expressed in a cell or tissue. The investigation of functional proteome is of great significance given that functions of most of genes are still not well understood. Presently *proteomic research focuses on differential proteome analysis of human diseases, which is designed to find key proteins with potentials to be used as markers for diagnosis or targets for medication.* Proteomics is also becoming the spotlight of analytical chemistry.

2D PAGE is the most universal method for proteomics and posses high resolve power for proteins. Some problems in 2D PAGE, however, are still difficult to be overcome such as *limited pH range, time-consuming and inefficient sensitivity for low abundant proteins.* The reality has motivated considerable effort in developing new technique to resolve proteomics as alternative approach to 2D PAGE.

Liquid chromatography technologies are powerful technology to resolve proteins. But conventional one dimensional LC systems are incapable of completely resolving all the components in a complex mixture due to insufficient peak capacity. The development of two- or multi-dimensional column based separation techniques greatly improve the resolve power and peak capacity. During the past decade, a lot of analysts contributed to this field, such as Jorgenson's multi-dimensional separation, Yates' shot-gun technique, Aebersold's ICAT technique and so on.

This dissertation is divided into 6 parts.

In the first chapter, advances in 2D and multidimensional separation techniques were summarized with details. The theory basis of multidimensional separation techniques was introduced and the advantages and shortcomings of existing technical modes were discussed. The intention and meaning of this dissertation were explained.

In chapter 2, we used rat as animal model to compare the effect of different extraction conditions on the extracted proteins. The extract methods of tissue sample at acidic, neutral and basic pH were described and compared by using two-dimensional gel electrophoresis and reversed-phase liquid chromatography. The images on gel and mass spectra showed that the

different method can enrich proteins at different pH range. Different pH extract methods can be applied into corresponding liquid chromatography mode with the compatible mobile phase so that the loss and precipitation could be avoided. The good reproducibility enables the sample preparation methods to be widely applied in proteomics analysis.

In chapter 3, we describe an approach for fractionating complex protein samples from rat liver prior to 2-DE using RPLC. The study indicated that RPLC prefractionation can provide strong enrichment effect which enabled us to visualize additional and less abundance proteins. Chromatographic enrichment was also demonstrated by the peptide mass fingerprint data, which gave mass spectra with increased number of detected peptide and improved signal intensity. The reproducibility of this prefractionation technology allows pooling of several consecutive runs of the same sample, resulting in a highly enrichment of low abundance proteins. This technology route has been applied into the study of profiling mode of Chinese Human Liver Proteomics Project (CHLPP).

In chapter 4, for the first time a comprehensive two-dimensional (2D) liquid-phase separation system, coupling strong cation exchange chromatography (SCX) to reversed-phase high performance liquid chromatography (RPLC), instead of immuno-affinity chromatography, was developed at the intact protein level for depletion of high abundance proteins from rat liver. The core idea was to deplete the high abundance proteins before the digestion.

Proteins bound to the SCX phase were eluted off using a consecutive linear salt gradient. After salt fractionation, 62 fractions were obtained. Every fraction was separated further by RPLC. Ultraviolet signal was used to detect the separation process. The protein peaks with signal intensity above 0.1 AU was defined as high abundance proteins, whereas the other was defined as middle- or low high abundance protein. Then, the effluents contained high abundance proteins were collected individually and other effluents were pooled together. The combined middle- or low high abundance proteins were lyophilized, digested and separated by capillary reversed phase liquid chromatography (cRPLC). Mass spectrometry was used to analyze the protein. 62 fractions were treated using the same method. The results were that 77 high abundance proteins were depleted in an experimental process and identified proteins number was increased 2-3 times.

Based on the results, a simplified rapid-speed and high-throughput protocol was put forward further. Instead of separating every fraction using cRPLC, all effluents containing

middle- or low abundance protein were combined, enriched, digested and separated by online shotgun technology. The simplified method was used to analyze Chinese liver sample. 58 high abundance proteins were depleted and 1213 proteins were identified.

In summary, the system presented a novel idea about the depletion of high abundance proteins. In contrast with affinity technology, this strategy with the advantages of low-cost and saving-time has no bias to any proteins and could realize the global proteins analysis.

In chapter 5, for the first time, the 2-D separation platform based on the liquid chromatography combined with on-probe digestion technique and identification of mass spectrometry was constructed in intact proteins level for separation and identification of complex liver tissue proteins. The 2-D liquid chromatographic system was constructed by coupling SCX with cRPLC. Proteins were prefractionated by SCX according to charge in the first dimensional separation. 62 fractions eluting from the first dimension were subjected automatically to cRPLC to separate similarly charged proteins on the basis of their various hydrophobicities. A novel rapid on-target digestion technique was adopted to couple effectively the separation technique and mass spectrometry technique. After digestion, the matrix was deposited on the same spot, respectively. Then, the dried plate was analyzed by mass spectrometry. This new technology coupled the top-down approach and bottom-up technologies. The high efficiency of system was demonstrated for analysis of intact proteins from the soluble lysates of normal human liver. A total of 3313 proteins were identified.

We further developed three-dimensional separation system combined SEC with the SCX/RPLC mentioned above. This 3D system exhibited the potential of further high resolution for extremely complicated mixture. The intention of 3D system was to realize the identification and quantification of proteins. We had explored some relative experiments and made some effective results.

In a word, the main contributes of this dissertation is the development of effective separation system based multi-dimensional system. We aim at exploring and finding out new technological systems for proteomics, so that more breakthroughs can be obtained at the qualitative analysis and quantification study.

Keyword: multi-dimensional separation, two-dimensional gel electrophoresis, proteomics, Top-down, intact protein

第一章 蛋白质组学现状与发展以及多维色谱与其相关技术在蛋白质组学中的应用与进展

1. 引言

随着人类基因组计划的完成,生命科学研究已进入了后基因组时代[1]。在这个时代,生命科学的主要研究对象是功能基因组学,包括结构基因组研究和蛋白质组研究等[2]。尽管现在已有多个物种的基因组被测序,但在这些基因组中通常有一半以上基因的功能是未知的。目前功能基因组中所采用的策略,如基因芯片、基因表达序列分析(Serial analysis of gene expression, SAGE)等,都是从细胞中mRNA的角度来考虑的,其前提是细胞中mRNA的水平反映了蛋白质表达的水平。但事实并不完全如此从DNA到蛋白质,存在三个层次的调控,即转录水平调控(Transcriptional control),翻译水平调控(Translational control),翻译后水平调控(Post-translational control)。从mRNA角度考虑,实际上仅包括了转录水平调控,并不能全面代表蛋白质表达水平。实验也证明,组织中mRNA丰度与蛋白质丰度的相关性并不好,尤其对于低丰度蛋白质来说,相关性更差[3]。更重要的是,蛋白质复杂的翻译后修饰、蛋白质的亚细胞定位或迁移、蛋白质-蛋白质相互作用等几乎无法从mRNA水平来判断。毋庸置疑,蛋白质是生理功能的执行者,是生命现象的直接体现者,对蛋白质结构和功能的研究将直接阐明生命在生理或病理条件下的变化机制。蛋白质本身的存在形式和活动规律,如翻译后修饰、蛋白质间相互作用以及蛋白质构象等问题,仍依赖于直接对蛋白质的研究来解决。虽然蛋白质的可变性和多样性等特殊性质导致了蛋白质研究技术远远比核酸技术要复杂和困难得多,但正是这些特性参与和影响着整个生命过程。传统的对单个蛋白质进行研究的方式已无法满足后基因组时代的要求。这是因为:(1)生命现象的发生往往是多因素影响的,必然涉及到多个蛋白质。(2)多个蛋白质的参与是交织成网络的,或平行发生,或呈级联因果。(3)在执行生理功能时蛋白质的表现是多样的、动态的,并不像基因组那样基本固定不变[2-4]。因此要对生命的复杂活动有全面和深入的认识,必然要在整体、动态、网络的水平上对蛋白质进行研究。

因此,在上世纪90年代中期,国际上产生了一门新兴学科—蛋白质组学(Proteomics),它以细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象[5]。可以说蛋白质组研究的开展不仅是生命科学研究进入后基因组时代的里程碑,也是后基因组时代生命科学研究的核心内容之一。

蛋白质组(proteome)一词是澳大利亚Macquarie大学的Wilkins和Williams在1994年首次

提出,最早见诸于文献是在1995年7月的《Electrophoresis》杂志上[6-7]。它是指一个有机体的全部蛋白质组成及其活动方式。他们认为,生命科学的重点将要转移到在蛋白质组水平上揭示生命活动规律。1997年举行了第一次国际性的“蛋白质组学”会议,并于同年出版了第一部蛋白质组学的专著。现已不但开展了大肠杆菌、酵母等低等生物的蛋白质图谱,而且也有进行人类细胞的蛋白质图谱研究报道,并均已着手建立蛋白质组数据库。目前,澳大利亚、欧洲、日本和美国等已纷纷成立了有关的研究机构和公司,美国各主要大学和药厂,均迅速启动了蛋白质组学研究。值得注意的是,公司和药厂等出于筛选新药等应用前景的考虑,已经开始进行环境变化、病毒感染、药物应用等对细胞作用的研究。这充分显示出,在蛋白质组学这个研究领域,基础研究与实际应用研究几乎呈并驾齐驱的趋势。可以这样认为,蛋白质组学是研究细胞内所有蛋白质及其动态变化规律的科学,它是从更为深入的一个层次上去认识生命活动的规律。自1995年蛋白质组概念的提出到现在,虽然只有短短的十一年时间,蛋白质组学研究却已经得到了突飞猛进的发展。在目前功能基因尚不很清楚的情况下,直接发现功能蛋白有重要的意义。蛋白质组学作为后基因组学中的重要组成部份的地位正在得到加强,蛋白质组学正在成为本世纪科学研究的前沿。

2 蛋白质组学及其发展现状[8-54]

2.1 蛋白质组与基因组

基因组是指一个细胞或生物体所携带的全部遗传信息或整套基因。生物体基因数量很多,单细胞的细菌的基因组约含有4000个基因,目前已确定人类基因组所包含的基因多达10万个以上。如此众多的基因,在某一特定时期也只有一部分能产生蛋白质、多肽产物。这就是说,不同品种、不同功能的基因产物分子数目差异很大。即使对同一分子而言,其在细胞内的数量也会随时间、环境的变化而变化。

遗传信息从DNA(基因)转变为中间转载体mRNA,然后再合成各式各样的结构蛋白质和功能蛋白质,构成一种有机体,完成生命的功能。基因→mRNA→蛋白质,三位一体,构成了遗传信息的流程图,这即是传统的中心法则。现在已经证明,一个基因并不只存在一个相应的蛋白质,可能会有几个,甚至几十个。什么情况下会有什么样的蛋白,这不仅决定于基因,还与机体所处的周围环境以及机体本身的生理状态有关。并且,基因也不能直接决定一个功能蛋白。实际上,往往是通过基因的转录、表达产生一个蛋白质前体,在此基础上再进行加工、修饰,才成为一个具生物活性的蛋白质。这样的蛋白质还通过一系列的运输过程,到组织细胞内适当的位置才能发挥正常的生理作用。基因不能完全决定这样的蛋白质后期加工、修饰以及转运定位的全过程。而且,这些过程中

的任何一个步骤发生微细的差错即可导致机体的疾病。近些年来人们又发现蛋白质间亦存在类似于mRNA分子内的剪切、拼接，具有自身特有的活动规律。这种自主性不能从其基因编码序列中预测，而只能通过对其最终的功能蛋白进行分析。因此说，基因虽是遗传信息的源头，而功能性蛋白是基因功能的执行体。基因组计划的实现固然为生物有机体全体基因序列的确定、为未来生命科学研究奠定了坚实的基础，但是它并不能提供认识各种生命活动直接的分子基础，其间必须研究生命活动的执行体—蛋白质这一重要环节。

由此可知蛋白质组与基因组相对应，都是一个整体的概念，但二者又有根本不同之处。一个有机体只有一个确定的基因组，组成该有机体的所有不同细胞都共享同一个基因组；但基因组内各个基因表达的条件和表达的程度则随时间、地点和环境条件的不同而不同，因而它们表达的模式，即表达产物的种类和数量随时间、地点和环境条件也是不同的。所以，蛋白质组是一个动态的概念。它不仅在同一机体的不同组织和不同细胞中不同；在同一机体的不同发育阶段，直至最后消亡的全过程中也在不断变化；机体处于不同生理状态下不同；在不同外界环境下也是不同的。正是这种复杂的基因表达模式，表现了各种复杂的生命活动。实际上每一种生命运动形式，都是特定蛋白质群体在不同时间和空间出现，并发挥功能的不同组合的结果。

2.2 蛋白质组研究的主要技术手段

蛋白质组学的科学研究之所以能够取得蓬勃的发展，主要依赖于大规模高通量分离、分析技术的突破性进步。在蛋白质组学研究中，目前最成熟、最有效的技术仍然是双向凝胶电泳分离——生物质谱鉴定技术，即首先用双向凝胶电泳分离纯化蛋白质，结合计算机定量分析得到的电泳图谱，再进一步用生物质谱技术对分离出的蛋白质进行鉴定，并运用现代生物信息学的技术对所得到的天文数字的数据进行处理，对蛋白质以及它们执行的生命活动做出尽可能精细、准确及本质的阐述。下面简要介绍一下目前蛋白质组学主要技术的发展。

2.2.1 双向凝胶电泳技术

双向凝胶电泳（Two-dimensional gel electrophoresis, 2DE）在1975年由O'Farrell以及Klose 和 Scheele 等人提出。2DE 的基本原理是，第一相为等电聚焦，基于蛋白质等电点的不同进行分离，第二相为SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，按分子量的不同进行分离。样品经过电荷和质量两次分离后，可以得到分子的等电点和分子量两方面的信息，把复杂混合物中的蛋白质在二维平面上展开，这是目前所有分离技术中分辨率最高，信息量最多的技术。对分离蛋白质组所有蛋白质的两个关键参数是高分辨率和可重复性。高分辨

率使更多的不同种类的蛋白质得以分开；而可重复性才能使不同批次的实验数据之间，以及不同实验室在相同条件下得到的数据可以相互比较。早期双相电泳中第一相载体两性电解质产生pH 梯度，固相pH 梯度 (IPG) 等电聚焦技术，即IPG 胶条的商品化，从根本上解决了双向凝胶电泳重复性的问题。为了提高电泳的分辨率，发展了窄IPG 技术，即把IPG 胶条的pH 梯度范围缩小至1~1.5 pH 单位，通过多个连续pH范围的窄IPG 代替单个宽范围的IPG。利用这种技术，对于高等真核细胞，可以得到超过10,000个蛋白质点。Klose报道了用增加分离距离的方法提高双向凝胶电泳的分辨能力。24 cm 长的IPG 胶条已经得到成功应用，用24 cm 的窄IPG 胶条可以得到非常高的分辨率。另一种增加分辨率的策略是对样品进行预分组。可以预先分离亚细胞结构或利用蛋白质的溶解性差异用不同溶解能力的提取液分步提取，也可以用溶液等电聚焦进行预分离。在目前情况下，双向凝胶电泳的一块胶板(16×20 cm)可分出3~4千个，甚至上万个可检测的蛋白质斑点，使得双向凝胶电泳真正成为了蛋白质组分析的支撑技术之一。

但是双向凝胶电泳技术仍然存在许多不足。目前对双向凝胶电泳技术的改进主要集中在憎水性蛋白质样品的制备，分离能力的改善，以及染色方法等方面。

2.2.2 生物质谱技术

生物质谱 (Bio-Mass Spectrometry) 在最近20 年间得到了迅猛发展。由于具有迅速、灵敏、准确的优点，并能进行蛋白质序列分析和翻译后修饰分析，质谱已经无可争议地成为蛋白质组学中分析与鉴定肽和蛋白质的最重要的手段。生物质谱技术在离子化方法上主要有两种软电离技术，即基质辅助激光解吸电离 (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI) 和电喷雾电离 (Electro-spray ionization, ESI)。MALDI 是在激光的激发下，使样品从基质晶体中挥发并离子化，它可测的分子量高达30万，对盐和表面活性剂有较强耐受力，适于分析简单的肽混合物，通量较高，因此在利用肽指纹图谱高通量鉴定蛋白质方面有极其广泛的应用；ESI 使分析物从溶液相中电离，适合与液相分离等手段 (如液相色谱和毛细管电泳) 的在线联用 (LC-ESI-MS)，适合复杂样品的分析。软电离技术的出现大大拓展了质谱的应用空间，而质量分析器的改善也大大推动了质谱仪器技术的发展。对于生物质谱来说，最重要的性能是灵敏度、分辨率、质量精度和串级质谱能力。生物质谱的质量分析器主要有四种：离子阱 (iontrap, IT)、飞行时间 (time of flight, TOF)、四极杆 (quadrupole, Q) 和付立叶变换离子回旋共振 (Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR)。它们的结构和性能各不相同，每一种都有自己的长处与不足。它们可以单独使用，也可以互相组合形成功能更强大的仪器。离子阱质谱灵敏度较高，性能稳定，具备多级质谱能力，因此被广泛应用于蛋白质组学研究，不足之处是

质量精度较低。最近发展起来的线性(或称二维)离子阱与传统的三维离子阱不同,离子可储存在一个圆柱状的空间内,显著改善了离子阱质谱的灵敏度、分辨率和质量精度。与离子阱相似,傅立叶变换离子回旋共振质谱也是一种可以“捕获”离子的仪器,但是其腔体内部为高真空和高磁场环境。它具有高灵敏度宽动态范围、极好的分辨率和质量精度(质量准确度可很容易地小于1 ppm)。这使得它可以在一次分析中对数百个完整蛋白质的分子进行质量测定和定量。FTICR-MS的一个重要功能是多元串联质谱。与通常的一次只能选一个母离子的串联质谱方式不同,FTICR-MS可以同时选择几个母离子进行解离,这无疑可以大大增加蛋白质鉴定工作的通量。但是它的缺点也很明显:操作复杂、肽段断裂效率低、价格昂贵等。这些缺点限制了它在蛋白质组学中的广泛应用。MALDI通常与TOF质量分析器联用,以获得肽段的精确质量,而ESI常与离子阱或三级四极杆质谱联用通过碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)获取肽段的碎片信息。近年来新型的质谱技术层出不穷,对蛋白质组研究将产生潜在的深远影响MALDI-Q-TOF这一先进平台的出现,为自动化高通量的应用提供了广阔的前景。Q-TOF优异的质量精度、灵敏度和碰撞伴随电离(CAD)能力改善了数据库搜索结果,并使其成为手工(de novo)测序的有力工具。

2.2.3 多维液相色谱分离技术

液相色谱(liquid chromatography, LC)、毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)等高效分离技术具有多种分离模式,其分离度高,耗样量少,且易于和质谱检测技术实现在线联用,已成为生物大分子快速分离鉴定的有利工具。色谱技术近年来有了飞速的发展,亲和色谱、反相色谱等技术随着色谱柱技术的完善,其分离时间和分离效率均有显著的改善。毛细管电泳是另一种高效的分离技术,因其分离度高、分离速度快且易于和电喷雾离子化质谱技术(ESI-MS)实现在线连接,在蛋白质分析中的应用也极为广泛。确定蛋白质分子的性质,尤其是面对其复杂多变的翻译后修饰作用,就使得一维的分离手段显得力不从心。二维分离(以shot-gun技术为代表)的结果明显优于一维,在复杂的生物大分子的分析中具有应用前景。关于液相色谱研究现状与进展及其在蛋白质组学中的应用在下面的内容将有详细介绍。

2.2.4 蛋白质芯片技术

蛋白质芯片是将蛋白质排列在玻璃片(glass slides),多孔胶片(porous gel pad slides)或微井(microwells)上,将标记后的探针靶分子与微点阵(microarrays)进行杂交,用合适的检测系统即可确定蛋白质之间是否存在交互作用。确定蛋白质间的相互作用,可以对细胞活动机制及功能有更深一层的了解。一个生命活动的发生,常常是多个蛋白质

共同作用的结果。酵母双杂交系统是一种应用极为广泛的鉴定蛋白质相互作用的方法，但操作复杂，而新兴的蛋白质芯片技术则是高通量分析蛋白质相互作用的有利工具。蛋白质分离芯片是蛋白质芯片研究的另一个主要领域，是以玻璃、多孔硅或一些高分子材料作为基质，通过一定的技术在基质上刻蚀出各种形式的孔道，通过色谱、电泳不同的分离模式或不同方法和模式的组和，实现蛋白质或肽段的分离。蛋白质芯片以其上样量小、分辨率高、设备简单、相对成本低等特点越来越引起广大研究者的关注。

2.3 蛋白质组研究面临的挑战

首先，低丰度蛋白质难以检测。众所周知，蛋白质组具有多样性和可变性，即在同一物种的不同细胞中或同一细胞在不同时期，其蛋白质组也是在不断的变化的，造成蛋白质组异常复杂，同时由于蛋白质存在翻译后修饰，所以一个mRNA往往对应多个蛋白质，也就是说，蛋白质的数量远远多于基因的数量，对于人类，这个数目起码是三倍。蛋白质在大小、相对丰度、酸碱度和疏水性方面差异很大，仅在相对丰度上，高丰度蛋白质与低丰度蛋白质相差六个数量级甚至更高，而且，由于蛋白质无法像DNA一样被“扩增”，这些都造成许多含量低的蛋白质在大规模的检测中很难被检测到。然而，那些对细胞功能产生重大影响的蛋白质，其表达量往往是比较低的。因此，要从分子水平上，深入研究生命过程的规律，探索生命现象的奥秘，必须对一些具有重要生理功能的低丰度蛋白质进行分析监测，这对目前的分析技术和手段不能不说是一个严峻的挑战。

蛋白质的定量问题是目前蛋白质组学面临的又一个挑战。蛋白质组定量分析，即定量蛋白质组学（Quantitative Proteomics），是指通过某种方法或技术，对生物样品（细胞、组织或体液等）中某些蛋白质的含量进行的比较分析。不同于基因组的普遍性和均一性，蛋白质组存在着时间上和空间上的多样性，即在同一物种的不同细胞中或同一细胞的不同生长时期，其蛋白质组是在不断变化着的。因此，精确地描述细胞内存在的全部蛋白质的状态及相关的蛋白质组是很难实现的。目前，对疾病的研究主要是采用比较蛋白质组学的方法，即通过比较某一生长阶段，正常与异常生物样品（细胞或组织）中蛋白质表达水平的差异，进行初步筛选，进而找到与人类疾病密切相关的蛋白质，然后结合其他生物学方法（如免疫组化、免疫印迹、聚合酶链反应及基因转录、转染等）进一步确定其表达水平的差异，并进行功能验证，确定与疾病相关的目标靶分子，为临床诊断、病理研究、药物筛选、新药开发、新陈代谢研究等提供理论依据和基础。因此蛋白质组学中，定量分析的主要任务仅仅局限于解决不同条件下蛋白质表达水平的变化情况。

目前，比较蛋白质组学主要有两种定量分析技术，即基于双向聚丙烯酰胺凝胶电泳分离-质谱鉴定的定量分析技术和基于稳定同位素标记-质谱鉴定的定量分析技术。双向凝胶

电泳比较蛋白质组学定量分析的准确程度很大程度上取决于凝胶染色的方法。凝胶上电泳分离的蛋白质可通过不同的方法进行染色,有染色剂法、放射性检测方法以及荧光试剂染色法等。稳定同位素标记技术(isotope labeling technique)是目前比较蛋白质组学中较新也是比较准确可靠的定量分析方法。根据标记过程的不同可以将稳定同位素标记技术分为两大类,一类是提取前标记方法,又称为代谢标记方法;另一类为提取后标记方法,又称为化学标记方法。但是无论哪种技术都存在着许多自身无法克服的局限性,不涉及绝对定量问题,而且它不能分析组织中的蛋白质和一些低丰度的蛋白质,这是这些低丰度蛋白质往往在体内发挥重要调节功能并参与一些重要的生理过程中。

从以上分析可以看出,无论是低丰度蛋白质的检测问题还是蛋白质定量问题,只有在分析技术手段上有所突破才能从根本上解决这些蛋白质组学研究道路上的瓶颈。只有随着新的研究方案也不断提出,检测灵敏度不断提高,才能准确找到那些对细胞功能产生重大影响的蛋白质。因此如何检测这些蛋白质,并对其进行准确的定量分析,已成为蛋白质组学研究中必须解决的两大难题,也将成为今后功能蛋白质组技术方法学上的研究重点之一。

3 多维色谱技术的发展及其在蛋白质组学中的应用

3.1 理论基础

与一维分离模式相比,多维分离技术的最大特点是可极大地提高峰容量。Giddings [55]指出峰容量的提高程度和样品组分分布的有序程度有着密切的关系。他还提出了样品维数(sample dimensionality)(能够精确识别样品组分的变量数)的概念,并认为当样品维数大于系统维数时,组分的峰分布是无序的,会限制分离的效果;如果样品的维数小于系统维数,尽管组分的峰分布是有序的,但多维系统的高峰容量的性能并没有得到发挥;只有当这两个维数相等时,才能充分发挥多维系统的分离能力。

根据Giddings建立的数学模型,多维分离模式的峰容量应为其构成的各个一维分离模式的峰容量的乘积[56]。然而由于溶质在多维分离模式下保留行为的相关性减少了在限制性区域内的保留空间,该公式只能用来对多维模式的峰容量进行估计。Liu等[57]在考虑各一维模式的峰容量、正交分离中峰展开角(spreading angle)和二维保留空间的基础上,从理论上得到了二维分离模式下实际峰容量的计算公式。该表达式不仅能够评价多维分离模式的性能,而且可以用于系统的条件优化。Slonecker等[58]也采用定性信息相似性技术(qualitative informational similarity technique),通过对信息熵、交互信息和信息相似性的计算,根据46种不同性质的溶质在各种一维分离模式下(反相液相色谱、超临界色谱、气

液相色谱和胶束电动色谱)的保留时间推测出其在二维模式下信息的正交性。这种方法可以在较短的时间内确定出适合溶质分离的二维系统。

在二维分离模式下,第二维的采样速度不仅决定了样品的分析时间,而且对系统的选择性也有着至关重要的影响。Murphy等[59]从理论和实验上对二维色谱中采样速度的影响进行了深入的研究。结果表明进入第二维分离的采样时间越短,整个系统的选择性越高。为了获取最大的选择性,对于同步采样来说,进入第二维分离的每一个峰应该至少采样3次;而对于非同步采样,采样的次数则应该增加到至少4次。这些结果为多维色谱方法的发展奠定了理论基础。

3.2 多维色谱分离技术的进展

人们对蛋白组的研究可以分为“全谱”(profiling mode)和“目标谱”(target mode)两种模式。前者是对于复杂混合物(如细胞的溶解产物)中所有蛋白质的分析;而后者则是对其其中一种或某一类组分的分离分析。针对不同的研究目的,在多维液相分离中采用的分离模式也将不同。前者主要采用几种高分辨率的分离模式,而后者其中的一维通常是高选择性的亲和分离模式。根据分离机理的不同,可以将多维分离模式大致分成多维HPLC、多维CE以及多维HPLC-CE三大类。此外,根据各维分离模式间连接方式的不同,也可以分为在线分离和离线分离两类。由于在线分离具有分辨率高、无样品损失、快速、高通量和易于实现自动化操作等优点收到广泛关注和应用,离线方式具有重复收集增大上样量、重现性好、灵活性高等特点也发挥着重大作用。

近年来,高效液相色谱(HPLC)和毛细管电泳(CE)的发展为蛋白质和多肽的分离分析提供了新的手段[60]。然而一维分离模式所能提供的分辨率和峰容量往往十分有限。多维HPLC方法可以采用多种不同的HPLC模式(交换色谱(IEC)、亲和色谱(AC)和反相液相色谱(RPLC)等)和CE模式(毛细管区带电泳(CZE)、毛细管凝胶电泳(CGE)、等电聚焦(CIEF)、胶束电动色谱(MEKC)和毛细管电色谱(CEC)等)通过在线或离线的方式进行偶联,从而实现复杂样品的分离。因此,作为和2D PAGE互补的一种分离模式,它在蛋白组学研究中已开始发挥重要的作用。

目前多维 HPLC 在蛋白组学研究中占有十分重要的地位,是一种主导技术,因为 HPLC 在可靠性、重现性和使用范围方面有优势。反相液相色谱具有分析速度快、分离效率高、流动相组分与 MS 匹配等优点,通常被选为多维色谱分离中最后一维的分离模式。而 SEC, IEC 和 AC 等可以作为样品的预分离模式。2D HPLC 分离可分为两种方式:中心切割(Heart-Cutting)和全二维(comprehensive 2D)方式。在中心切割方法中,经第

一维分离后只有一部分流出物被选择性地转移到第二维进行再次分离；而全二维分离中样品中的所有组分都经过了二维的分离，并且第一维的分离效率和分离度在后续分离中得到保持，其峰容量高，不损失组分，是近年 2D HPLC 发展的热点。

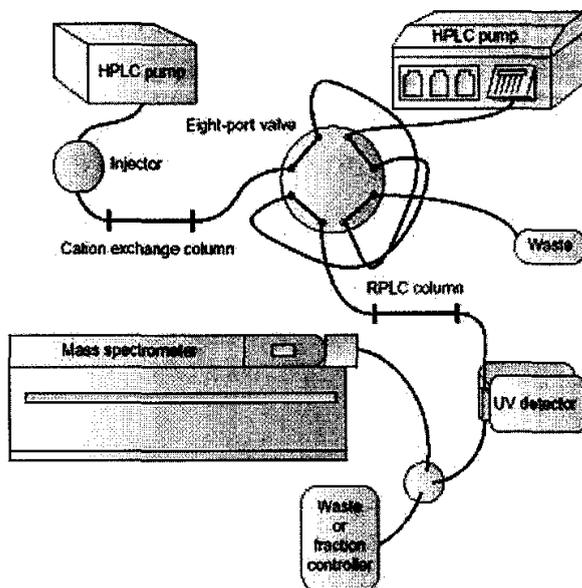


图 1-1 全二维 IEC-RPLC 装置示意图

第一个真正意义上的全二维 HPLC-HPLC 于 1990 年由 Jorgenson[61]的小组完成，他们通过八通阀 IEC 与 SEC 柱连接起来，八通阀上连接两根样品环，利用阀的切换将样品环中的样品送入第二根柱子，两个环交替使用，利用此系统对血清样品进行分析，显示了其对一维分离的优越性(图 1.14, 除 MS 部分)。1995 年，Jorgenson[62]等又将微柱 IEC 与微柱 RPLC 通过阀接口连接起来，实现对微量样品的分析。1997 年，全二维 HPLC-HPLC 首次实现了 MS 的在线连接[63]（图 1-1），是二维分离的重要突破，该系统的第一维采用了阳离子交换色谱（SCX）模式，第二维是 RPLC 分离，接口沿用了八通阀，3cm 的 RPLC 短柱加快了第二维的分离速度，在 2 小时内可以完成样品分离、脱盐和鉴定。

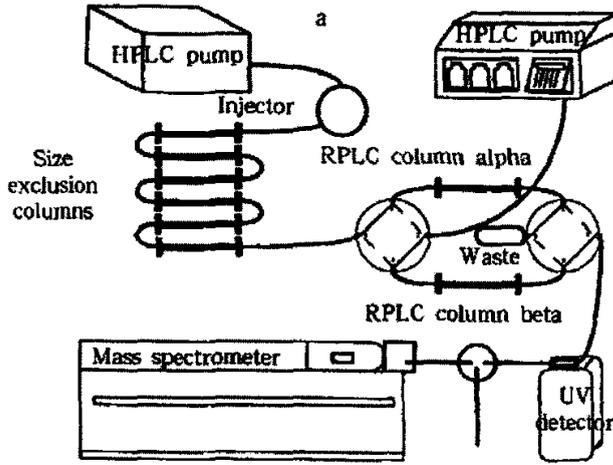


图 1-2 IEX/RPLC (2 根平行柱) 全二维系统

Opiteck 和 Jorgenson [64]还发展了另一种接口技术, 该接口抛弃了样品环的使用, 而是使用了 2 根平行的 RPLC 柱子 (图 1-2), 通过两根柱子的交替使用完成样品的切换, 这种接口避免了大体积样品的收集, 同时样品在第二维的柱头得以富集, 但这种接口要求 2 根柱子有完全一致的保留特性。在 3h 内, 采用紫外(UV)可以检测到人血清白蛋白 49 个胰蛋白酶酶解产物中的 48 个, 而利用 MS 可以检测到 58 个肽(49 个胰蛋白酶酶解肽和 9 个非胰蛋白酶酶解肽)。为了缩短二维分离时间, Wagner[65]等在第二维使用 14mm 的 C18 键合无孔硅胶 RP 柱, 在 20min 内完成了快速全二维 HPLC-HPLC 分离。该系统的峰容量可以达到 600, 蛋白质保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 1%($n=10$)和 15% ($n=15$)以内; 蛋白质的平均检测限可以达到 300ng。他们进一步改善系统[66], 在第二维使用 4 根平行柱, 对快速 2D HPLC 进行了改进, 将样品预处理与二维分离整合成一个整体, 分离能力更强大。系统包括 2 个梯度泵, 2 个 UV 检测器, 1 个等度泵, 4 根 RP 柱, 一根 IEX 柱, 4 个十通阀, 1 个进样阀, 2 个馏分收集器, 整个系统由工作站自动控制。样品首先经过带有离子交换功能团的 RAM (Restricted Access Materials) 柱进行预分离, 得到分子量小于 20kDa 的馏分。然后再进行 SCX 或 SAX--RPLC 二维分离, 两个梯度泵和两个 UV 检测器同时工作, 同时第三根 RP 柱进样, 第四根 RP 柱平衡。在 96 分钟内分离得到 1000 个峰。Vissers 等[67]通过一维流出组分的收集和再进样的方式实现了不同 HPLC 分离模式的在线偶联。这种方法不仅易于实现自动化, 而且能够有效地避免一维和二维分离中流动相的混合, 大大优化了系统的设计。

Yates 等[68]发明了一种双相柱 (图 1-3) (Biphasic Column) IEX/RPLC 的二维方法, 称为 MudPIT。双相柱是在线 2D LC 的新型技术, 它将两种不同的固定相—SCX 和 RPLC

填料，分段装填在一根管柱内，避免了复杂的阀切换系，减少了系统的死体积。整个色谱分离过程包括一系列依次增加的盐浓度台阶梯度洗脱和有机溶剂的线性梯度洗脱，多肽流出 RPLC 填料后直接进入 MS 进行解析。样品在第一维 SCX 上被分步洗脱，洗脱下的组分在第二维 RPLC 上进行分离，这种技术不是严格意义上的全二维 HPLC 分离，但它利用了固定相本身的特性实现样品的转移，仪器和操作都非常简单，将该二维系统与串联质谱 (MS/MS) 联用，是效率很高的蛋白组学研究技术，一次分析可同时鉴定 288 种蛋白质。他们采用“shotgun”的实验方案，即总蛋白提取、酶切后用二维色谱-串联质谱联用的方法分析蛋白质，将整体蛋白化为肽段，综合离子交换、反相色谱的分离能力和质谱的质量分辨及序列分析能力可以大大提高蛋白质鉴定的通量和自动化程度。利用该方法已成功地从酵母细胞中分离鉴定出近 2000 种蛋白质，其中包括低丰度蛋白(如转录因子和蛋白激酶)和 131 个膜区域的蛋白质[69]。所有识别的蛋白跨越的动态范围至少可达 10000: 1。最近他们还利用三固定相柱系统实现了 3D RPLC-IEC-RPLC 对在转录和后转录阶段蛋白质修饰的研究。

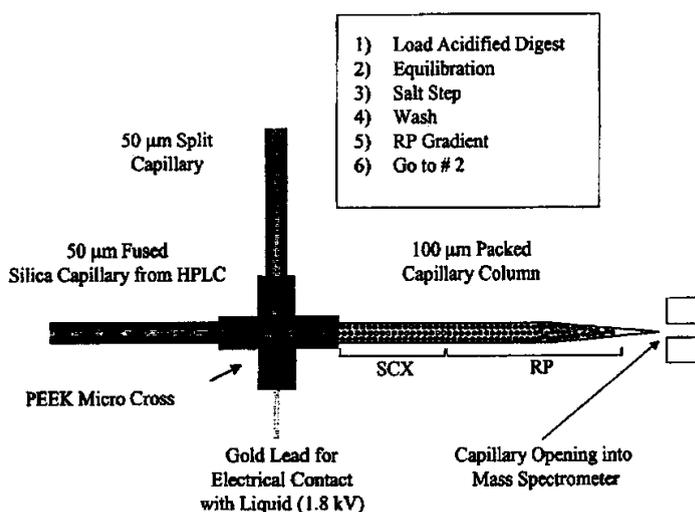


图 1-3 双相柱(SCX-RPLC)与 ESI 的接口用于 MudPIT

除在线偶联的多维 HPLC 分离模式外，一些离线的多维分离方式也被应用于蛋白组研究。Zhang 等[70]通过 2D SEC-RPLC 实现了对复杂样品中蛋白质变体的分析，Richter 等[71]通过 2D IEC-RPLC-MS 建立了血液滤液中肽的质量和序列数据库；而 Chen 等[72]也通过 2D RPLC-RPLC 模式对人红白血病细胞的全细胞溶解产物中的蛋白质进行了快速的

识别和扫描。尽管离线方式可能会导致样品在多维分离进样过程中部分损失等问题，但它可以使整个系统得以简化。

最近 Shen 等[81]采用超高效 SCX-nanoRPLC-MS/MS 分离鉴定了人血浆蛋白组。SCX 柱采用 80 cm × 320 μm i.d. 石英毛细管柱，内填 3 μm，300 Å 孔径的 SCX 填料。采用连续梯度进行 SCX 洗脱。NanoRPLC 采用 85 cm × 30 μm i.d. 石英毛细管柱和 3 μm，300 Å 孔径的 C18 填料。RPLC 柱前连接一根 4 cm × 75 μm 的微 SPE 柱，SCX 收集的馏分 ~10 μl 上样在 SPE 柱 (2 min 内)，然后切换进行反相分离和 ESI-MS/MS 质谱鉴定。系统的峰容量达到 10⁴，分析蛋白的动态线性范围达 8 个数量级，在 35 mg/ml 的高浓度血清白蛋白存在下，分离鉴定了 ~pg/ml 级的低丰度蛋白。图 1-4 是 SCX/nanoRPLC/ESI-MS/MS 分析结果，使用 365 μg 样品，总共有 800~1682 种蛋白得到鉴定（根据鉴定标准的不同，蛋白鉴定数也不同）。

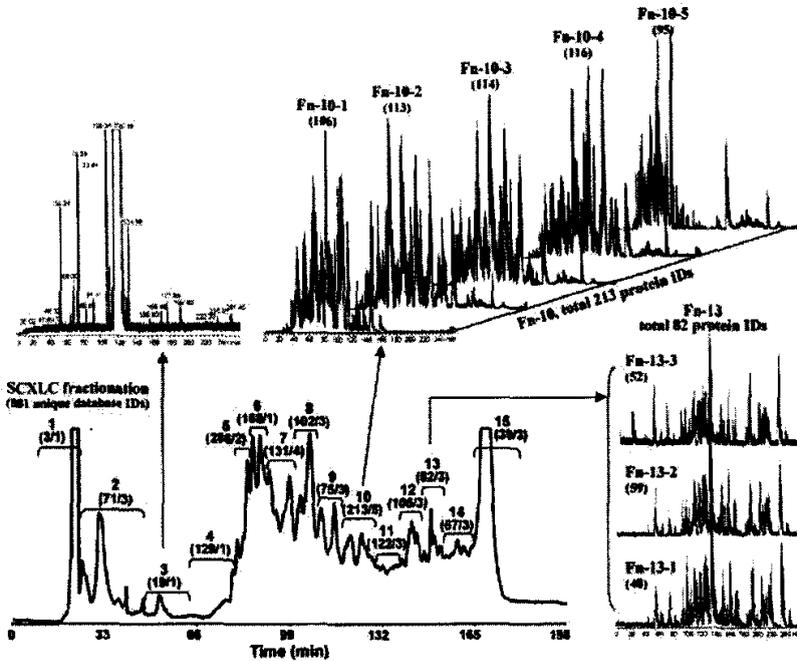


图 1-4 高效 SCX-nanoRPLC-ESI-MS/MS 分离鉴定血浆蛋白组

邹汉法研究组与曾荣研究组[82]采用在线的 SCX/RPLC 多维系统对人血浆蛋白组进行预分离，SCX 柱采用 10 cm × 4.6 mm i.d. 常规柱。采用台阶式梯度进行 SCX 洗脱，RPLC 采用 10 cm × 2.1 mm i.d. 柱，通过一个六通阀实现在线连接。SCX 使用 6 个盐梯度，每个盐梯度又经过 RPLC 分离之后得到 5 个馏份，一共有 30 馏份，蛋白质的分离色谱图如图

1-5 所示。每个馏份进行离线的酶解，酶解后的肽段进一步经过毛细管反相色谱柱分离，在线的 LTQ 质谱检测，SEQUEST 数据分析。一共得到 1292 个蛋白质，其中分离鉴定出小于 10 ng/mL 的蛋白质。

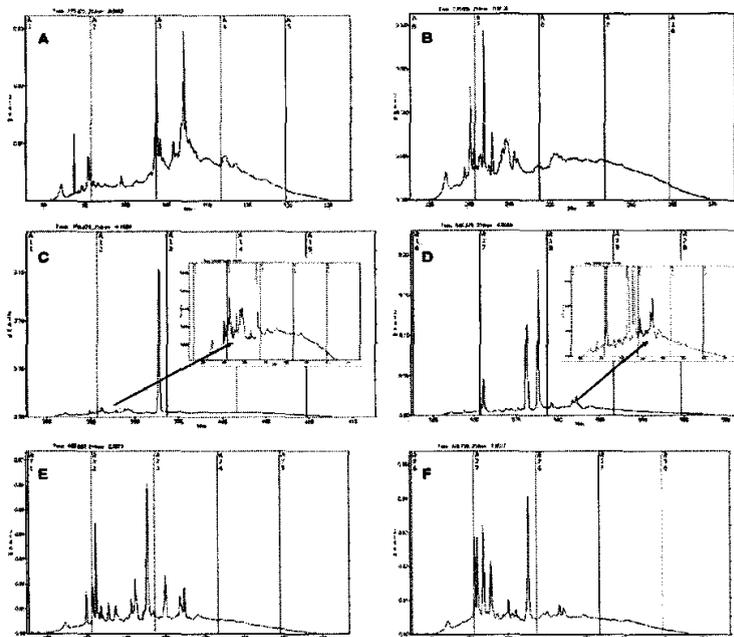


图 1-5 SCX/RPLC 多维系统对人血浆蛋白组进行预分离，SCX 柱采用 10 cm × 4.6 mm i.d. 常规柱。采用台阶式梯度进行 SCX 洗脱，RPLC 采用 10 cm × 2.1 mm i.d. 柱，通过一个六通阀实现在线连接。SCX 使用 6 个盐梯度。

目前，各种不同的分离机理的分离模式包括双向凝胶电泳与液相色谱模式经常结合使用以达到对蛋白质的有效分离的目的。曾荣研究组采用液相等电聚焦离线偶联一维或二维的液相色谱用于蛋白质组学研究得到很好的效果[83-84]。类似的典型的制备级等电聚焦[85-92]或凝胶电泳[93-94]作为第一维与第二维的 RPLC 联用实现对蛋白质的分离。Lubman 及其合作者将提取自细胞裂解液的大约 10mg 的蛋白质使用 Rotofor 一次性进行等电聚焦[85-87]，然后使用 RPLC 作为第二维分离。他们实验组同时还开发了色谱聚焦模式，即使用了阳离子交换柱子在 pH4-7 的范围内对蛋白质进行色谱聚焦。另外 Kelleher 与其合作者开展了基于酸不稳定表面活性剂的制备级聚丙烯酰胺凝胶电泳用于分离酵母蛋白 [93-94]。Lee 等人构建了一个液相毛细管等电聚焦(CIEF)作为第一维，纳升级的反相液相色谱(nano-HPLC)作为第二维的这样一个二维系统[90-92]。

2D-AC-RPLC 在蛋白质的目标谱研究中发挥了重要的作用。Apffel 等[73]利用外源凝集素柱与 RPLC 的在线连接以及 MS 检测对起源于重组 DNA 的糖蛋白水解后产生的不同类型的糖基化肽进行了研究。Frank Hsieh 等[74]通过集成化的免疫亲和-离子交换-柱上酶解-片段捕获和脱盐-RPLC-MS 检测实现了蛋白质初级结构的自动化分析。此外,以外源凝集素为基质的亲和色谱[75]和固载化金属亲和色谱(IMAC)[76]分别与 RPLC 以及时间飞行质谱 TOF-MS 联用技术也已被应用到肽的指纹分析中。Han 等[77]利用 IEC 将细胞微粒体中含有的蛋白质分离,收集出 30 个组分,接着将这些组分进行同位素编码亲和标记(ICAT),水解后再通过 AC-RPLC-MS 进行分析。利用这种方法可以确定出 HL-60 细胞微粒体中 491 个蛋白质,并可以对它们在分化过程中的变化进行定量研究。Goshe 等[78]也采用类似的方法对低丰度的磷蛋白质进行富集和识别。Ficarro 等[79]采用 IMAC-nano flowHPLC-MS 的多维分离模式在酵母细胞溶解产物中检测到 1000 多个磷酸化肽。

Gygi 等[80]建立了离线的 SCX 馏分-AC-RPLC-MS 多维系统对酵母蛋白组进行了分析(图 1-6)。他们认为离线系统在上样量、柱效优化及操作便利方面有优势。样品经过 ICAT 试剂标记,进行定量蛋白组的研究。

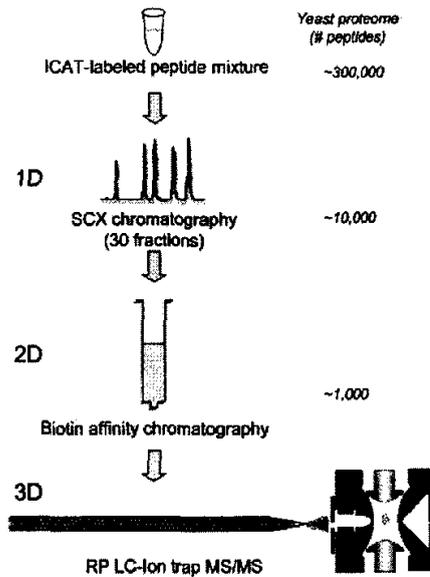


图1-6 利用多维色谱和ICAT策略进行蛋白组分析

4. 本论文选题目的和意义

蛋白组学研究必须建立在强大的分离分析技术平台基础上。多维色谱分离发展多年,在技术多样性、峰容量、分辨率上有了很大的提高,在蛋白质组学研究中的实际样品分

析上越来越多的得到应用。

本论文以目前蛋白质组学研究中面临的挑战等难点问题展开了一系列研究工作。以液相色谱分离系统为基础，对比了目前的样品提取的方法提取蛋白质的种类的不同，发展了多种有效的分离系统，以完整蛋白质的分离为指导思想，建立了反相色谱预分离结合双向凝胶电泳的分离路线；开创了基于多维色谱分离为基础的高丰度蛋白质去除系统；发展了多维液相色谱的Top-down技术路线，将液相色谱分离的优势及Top-down技术路线的优势完美结合在一起，在蛋白质研究主流的2-DE-MS技术之外，另辟蹊径，对蛋白质组学新方法学的建立进行了有益的探索和研究。

尽管本论文针对蛋白质组学研究的热点问题，发展了相关的新技术新方法并进行了实际的应用研究，取得了一定的阶段性的成果。但由于时间及各种条件的限制，仍有一些工作需要进一步的优化和完善。

参考文献

- [1] 王志珍, 邹承鲁, 后基因组—蛋白质组研究, 生物化学与生物物理学报, 1998, 30 (6): 533-699.
- [2] 李淋, 蛋白质组学的进展, 生物化学与生物物理学报, 2000, 27 (3): 227-231.
- [3] M.R. Wi lins, K. L. Wi lliams, R. D. Appel, Proteome Research: NEW Frontiers in Functional Genomics. Springer-Verlag, 1997.
- [4] 李伯良, 李林, 吴家睿, 功能蛋白质组学, 生物工程学报, 2000, 27 (3): 227-231.
- [5] Cordwell.S et al, Electrophoresis,1997,18:1393-1398.
- [6] Wasinger V Cet al. Progress with gene-product of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium, Elcctrophoresis, 1995, 16: 1090-1094.
- [7] Wilin M R et al, From proteins to Proteomics: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amide acid analysis, Bio Thchnology, 1996, 14: 61-65.
- [8] 李伯良, 功能蛋白质组学, 生命的科学, 1998,18(6): 1-4.
- [9] 成海平, 钱小红, 蛋白质组研究的技术体系及其进展, 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 584-588
- [10] 于雁灵, 复旦大学分析化学专业01级博士毕业论文.
- [11] 贺福初, 蛋白质组研究—后基因组时代的生力军, 科学通报, 1999, 44(2):113-122.
- [12] 万晶红, 贺福初, 蛋白质组技术的研究进展, 科学通报, 1999, 44(9): 904-911.
- [13] 俞利荣, 曾嵘, 夏其昌, 蛋白质组研究技术及其进展, 生命的化学, 1998, 18(6):10-16.
- [14] 陈筱潇, 药物蛋白质组学-药物研究的新思路, 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2001, 22 (4) : 212-214.
- [15] 何大澄, 肖雪媛, 差异蛋白质组学及其应用, 北京师范大学学报 (自然科学版), 2002, 38 (4) : 558-562.
- [16] 郝鲁江, 梁泉峰, 生物信息学的发展及其应用, 山东轻工业学院学报, 2000, 14(2): 37-41.
- [17] 张迪, 霍克克, 顾科隆等, 酵母双杂交技术研究进展, 高技术通讯, 2000, 3:98-101
- [18] 杨齐衡, 李林, 酵母双杂交技术及其在蛋白质组研究中的应用, 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(3): 221-225.
- [19] 卞则梁, 王光辉, 质谱与生命科学, 化学通报, 1994, 7: 40-46.

- [20] Johan Gobom, Martin Schuerenberg, Martin Mueller, Dorothea Theiss, et al, *a-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Affinity Sample Preparation. A Protocol for MALDI-MS Peptide Analysis in Proteomics*, *Anal. Chem.*, 2001, 73: 434-438.
- [21] James C. Hannis and David C. Muddiman, *A Dual Electrospray Ionization Source Combined With Hexapole Accumulation to Achieve High Mass Accuracy of Biopolymers in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11, 876-883.
- [22] Thomas P. Conrads, Gordon A. Anderson, Timothy D. Veenstra, Ljiljana Pasijara-Tolic, et al, *Utility of Accurate Mass Tags for Proteome-Wide Protein Identification*, *Anal. Chem.*, 2000, 72: 3349-3354.
- [23] Andrej Shevchenko, Matthias Wilm, Ole Vorm, and Matthias Mann, *Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels*, *Anal. Chem.*, 1996, 68: 850-858.
- [24] Andreas P. Jonsson, Youssef Aissouni, Carina Palmberg, Piergiorgio Percipalle, et al, *Recovery of Gel-Separated Proteins for In-Solution Digestion and Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.*, 2001, 73: 370-5377.
- [25] K. Walhagen, K.K. Unger, M.T.W. Hearn, *Capillary electroendosmotic chromatography of peptides*, *Journal of Chromatography A*, 2000, 887: 165-185.
- [26] Michael P. Washburn, John R. Yates, *New methods of proteome analysis: multidimensional chromatography and mass spectrometry*, *Proteomic: A trends guide*, 2000: 27-30.
- [27] Yun Jiang, Cheng S. Lee, *On-line coupling of micro-enzyme reactor with micro-membrane chromatography for protein digestion, peptide separation, and protein identification using electrospray ionization mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 2001, 924: 315-322.
- [28] Jun Gao, Jingdong Xu, Laurie E. Locascio and Cheng S. Lee, *Integrated Microfluidic System Enabling Protein Digestion, Peptide Separation, and Protein Identification*, *Anal. Chem.*, 2001, 73: 2648-2655.
- [29] Michael T. Davis, Jill Beierle, Edward T. Bures, Michael D. McGinley, et al, *Automated LC-LC-MS-MS platform using binary ion-exchange and gradient reversed-phase chromatography for improved proteomic analyses*, *Journal of Chromatography B*, 2001, 752: 281-291.

- [30] Shihong Wang, Fred E. Regnier, Proteolysis of whole cell extracts with immobilized enzyme columns as part of multidimensional chromatography, *Journal of Chromatography A*, 2001, 913: 429-436.
- [31] Yufeng Shen, Rui Zhao, Mikhail E. Belov, Thomas P. Conrads, et al, Packed Capillary Reversed-Phase Liquid Chromatography with High-Performance Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for Proteomics, *Anal. Chem.*, 2001, 73: 1766-1775.
- [32] Yufeng Shen, Nikola Tolic', Rui Zhao, Ljiljana Pasj;a-Tolic', et al, High-Throughput Proteomics Using High-Efficiency Multiple-Capillary Liquid Chromatography with On-Line High-Performance ESI FTICR Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2001, 73: 3011-3021.
- [33] Andreas Premstaller, Herbert Oberacher, Wolfgang Walcher, et al., High-Performance Liquid Chromatography Electro-spray Ionization Mass Spectrometry Using Monolithic Capillary Columns for Proteomic Studies, *Anal. Chem.*, 2001, 73: 2390-2396.
- [34] Rachel R. Ogorzalek Loo, James D. Cavalcoli, Ruth A. VanBogelen, Charles Mitchell, et al, Virtual 2-D Gel Electrophoresis: Visualization and Analysis of the E. coli Proteome by Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2001, 73: 4063-4070.
- [35] Steven Locke and Daniel Figeys, Techniques for the Optimization of proteomic Strategies Based on Head Column Stacking Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*, 2000, 72: 2684-2689.
- [36] Pamela K. Jensen, Ljiljana Pasj;a-Tolic', Gordon A. Anderson, Julie A. Horner, et al, Probing Proteomes Using Capillary Isoelectric Focusing-Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, 1999, 71: 2076-2084.
- [37] Knut Wagner, Tasso Miliotis, Gyolrgy Marko-Varga, Rainer Bischoff, et al, An Automated On-Line Multidimensional HPLC System for Protein and Peptide Mapping with Integrated Sample Preparation, *Anal. Chem.*, 2002, 74: 809-820.
- [38] Hookeun Lee, Timothy J. Griffin, Steven P. Gygi, Beate Rist, et al, Development of a Multiplexed Microcapillary Liquid Chromatography System for High-Throughput Proteome Analysis, *Anal. Chem.*, 2002, 74: 4353-4360.
- [39] Zheru Zhang, Sergey Krylov, Edgar A. Arriaga, Robert Polakowski, et al, One-Dimensional Protein Analysis of an HT29 Human Colon Adenocarcinoma Cell, *Anal.*

- Chem., 2000, 72: 318-322.
- [40] Tohru Natsume, Hiroshi Nakayama, Osten Jansson, Toshiaki Isobe, et al, Combination of Biomolecular Interaction Analysis and Mass Spectrometric Amino Acid Sequencing, *Anal. Chem.*, 2000, 72: 4193-4198.
- [41] Gerald Marie, Laurent Serani and Olivier Lapre' vote, An On-Line Protein Digestion Device for Rapid Peptide Mapping by Electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2000, 72: 5423-5430.
- [42] Dirk A. Wolters, Michael P. Washburn and John R. Yates, An Automated Multidimensional Protein Identification Technology for Shotgun Proteomics, *Anal. Chem.*, 2001, 73: 5683-5690.
- [43] Thierry Le Bihan, Devanon Pinto and Daniel Figeys, Nanoflow Gradient Generator Coupled with μ -LC-ESI-MS/MS for Protein Identification, *Anal. Chem.*, 2001, 73: 1307-1315.
- [44] 俞利荣, 夏其昌等, 人肝癌细胞系BEL-7404和正常肝细胞系L-02表达的蛋白质组双向凝胶电泳分析, *科学通报*, 2000, 45 (2): 170-17.
- [45] Li-rong Yu, Rong Zeng, Xiao-xia Shao, et al, Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry, *Electrophoresis*, 2000, 21: 3058-3068.
- [46] Youji Shimazaki, Seiichi Ohara, Takashi Manabe, Removal of specific protein spots on the patterns of non-denaturing two-dimensional electrophoresis using protein A agarose and antibodies, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1998, 37: 1-4.
- [47] Haijun Sun, Yu-Ching E. Pan, Using native gel in two-dimensional PAGE for the detection of protein interactions in protein extract, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1999, 39: 143-151.
- [48] Lan Huang, Min Shen, Igor Chernushevich, Alma L. Burlingame, et al, Identification and isolation of three proteasome subunits and their encoding genes from *Trypanosoma brucei*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1999, 102: 211-223.
- [49] Sarka Beranova-Giorgianni, Michael J. Pabst, Tara M. Russell, Francesco Giorgianni, et al, Preliminary analysis of the mouse cerebellum proteome, *Molecular Brain Research*, 2002, 98: 135-140.

- [50] Yannicke Dauphin, Comparative studies of skeletal soluble matrices from some Scleractinian corals and Molluscs, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2001, 28: 293-304.
- [51] Anja Möller, Michael Soldan, Uwe Völker, Edmund Maser, Two-dimensional gel electrophoresis: a powerful method to elucidate cellular responses to toxic compounds, *Toxicology*, 2001, 160: 129-138.
- [52] Seong Hwan Kim, Roman Vlkolinsky, Nigel Cairns, Michael Fountoulakis, et al, The reduction of NADH Ubiquinone oxidoreductase 24- and 75-kDa subunits in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease, *Life Sciences*, 2001, 68: 2741-2750.
- [53] Peter W. Hewett, Identification of tumour-induced changes in endothelial cell surface protein expression: an in vitro model, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2001, 33: 325-335.
- [54] Lirong Yu, Rong Zeng, Xiaoxia Shao, Nan Wang, et al, Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry, *Electrophoresis*, 2000, 21: 2058-2068.
- [55] Divis JM, Giddings JC, Statistical method for estimation of number of components from single complex chromatograms: theory, computer-based testing, and analysis of errors, *Anal. Chem.*, 1985, 57: 2168-2177
- [56] Giddings J C., Concepts and comparisons in multidimensional separation, *J High Resolut. Chromatogr. Commun.*, 1987, 10,319-323
- [57] Liu Z., Patterson D.G., J r. Lee M L., Geometric approach to factor analysis for the estimation of orthogonality and practical peak capacity in comprehensive two-dimensional separation, *Anal Chem* , 1995 , 67(21) :3840-3845.
- [58] Slonecker, P. J. , Li X , Ridgway T H , Dorsey J G. Informational orthogonality of two-dimensional chromatographic separation, *Anal Chem* ,1996 , 68 : 682-689.
- [59] Murphy R E , Schure M R , Foley J P, Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Anal Chem* , 1998 , 70 :1585-1594.
- [60] Issaq, H.J., Chan, K.C., Janini, G.M., Conrads, T.P., Veenstra, T.D. Multidimensional

- separation of peptides for effective proteomic analysis, *J. Chromatogr. B*, 2005, 817, 35-47.
- [61] Bushey, M.M., Jorgenson, J.W., Automated instrumentation for comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography of proteins, *Anal. Chem.*, 1990, 62, 161-167.
- [62] Holland, L.A., Jorgenson, J.W., Separation of nanoliter samples of biological amines by a comprehensive two-dimensional microcolumn liquid chromatography system, *Anal. Chem.*, 1995, 67, 3275-3283.
- [63] Opiteck, G.J., Lewis, K.C., Jorgenson, J.W., Comprehensive on-Line LC/LC/MS of proteins, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 1518-1524.
- [64] Opiteck, G.J.; Jorgenson, J.W. Two-dimensional SEC/RPLC coupled to mass spectrometry for the analysis of peptides, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2283-2291.
- [65] Wagner, K., Racaityte, K., Unger, K.K., Miliotis, T., Edholm, L.E., Bischoff, R., Marko-varga, G., Protein mapping by two-dimensional high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2000, 893, 293-305.
- [66] Wagner, K.; Miliotis, T., Marko-varga, G., Bischoff, R., Unger, K.K. An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 809-820.
- [67] Vissers, J.P.C., van Soest, R.E.J., Chervet, J-P., Cramers, C.A. Two-dimensional capillary liquid chromatography based on microfractionation, *J. Microcolumn Sep.*, 1999, 11, 277-286.
- [68] Wolters, D.A., Washburn, M.P., Yates III, J.R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 5683-5690.
- [69] Liu H., Lin D., Yates, JR III., Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era, *Bio Technique*, 2002, 32(4), 898-902.
- [70] Zhang, Z., Smith, D.L., Smith, J.B. Multiple separations facilitate identification of protein variants by mass spectrometry, *Proteomics*, 2001, 1, 1001-1009.
- [71] Richter, R., Schulz Knappe, P., Schrader, M., Standker, L., Jurgens, M., Tammen, H., Forssmann, W.G. Composition of the peptide fraction in human blood plasma: database of circulating human peptides, *J. Chromatogr. B*, 1999, 726, 25-35.

- [72] Chen, Y., Wall, D., Lubman, D.M. Rapid identification and screening of proteins from whole cell lysates of human erythroleukemia cells in the liquid phase, using non-porous reversed phase high-performance liquid chromatography separations of proteins followed by multi-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis and sequence database searching, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, 1998, 12, 1994-2003.
- [73] Apffel, A., Chakel, J.A., Hancock, W.S., Souders, C., M'Timkulu, T., Pungor J.E. Application of multidimensional affinity high-performance liquid chromatography and electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry to the characterization of glycosylation in single-chain plasminogen activator: Initial results, *J.Chromatogr.A.*, 1996, 750, 35-42.
- [74] Hsieh, Y. L. F., Wang, H.; Elicone, C., Mark, J., Martin, S. A., Regnier, F. Automated analytical system for the examination of protein primary structure, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 3, 455-462.
- [75] Geng, M., Ji, J., Regnier, F.E. Signature-peptide approach to detecting proteins in complex mixtures, *J. Chromatogr. A.*, 2000, 870, 295-313.
- [76] Riggs, L.; Sioma, C.; Regnier, F.E. Automated signature peptide approach for proteomics, *J. Chromatogr. A.*, 2001, 924, 359-368.
- [77] Han, D.K. , Eng, J. , Zhou, H. , Aebersold, R. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry, *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 946-951.
- [78] Goshe, M. B., Veenstra, T. D., Panisko, E. A., Conrads, T. P., Angell, N. H., Smith, R. D. Phosphoprotein isotope-coded affinity tags: Application to the enrichment and identification of low-abundance phosphoproteins, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 607-616.
- [79] Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J.; Hunt, D.F.; White, F.M. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *saccharomyces cerevisiae*, *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20, 301-305.
- [80] Gygi, S. P., Rist, B., Griffin, T. J., Eng, J., Aebersold, R. Proteome analysis of low-abundance proteins using multidimensional chromatography and isotope-coded affinity tags, *J. Proteome Res.*, 2002, 1, 47-54.
- [81] Shen, Y., Jacobs, J.M., Camp II, D.G., Fang, R., Moore, R.J., Smith, R.D., Xiao, W., Davis, R.W. , Tompkins, R.G. Ultra-high-efficiency strong cation exchange

- LC/RPLC/MS/MS for high dynamic range characterization of the human plasma proteome, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 1134-1144.
- [82] Jin, W.H., Dai, J., Li, S.J., Xia, Q.C., Zou, H.F., Zeng, R., Human Plasma Proteome Analysis by Multidimensional Chromatography Prefractionation and Linear Ion Trap Mass Spectrometry Identification, *J. Proteome Res.*, 2005, 4, 613-619.
- [83] Tu, C.J., Dai, J., Li, S.J., Sheng, Q.H., Deng, W.J., Qia, Q.C., Zeng, R., High-Sensitivity Analysis of Human Plasma Proteome by Immobilized Isoelectric Focusing Fractionation Coupled to Mass Spectrometry Identification, *J. Proteome Res.*, 2005, 4, 1265-1273.
- [84] Li, R.X., Zhou, H., Li, S.J., Sheng, Q.H., Qia, Q.C., Zeng, R., Prefractionation of Proteome by Liquid Isoelectric Focusing Prior to Two-Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometric Identification, *J. Proteome Res.*, 2005, 4, 1256-1264.
- [85] Wall, D. B., Kachman, M. T., Gong, S., Hinderer, R., Parus, S., Misek, D. E., Hanash, S. M., Lubman, D. M., Isoelectric Focusing Nonporous RP HPLC: A Two-Dimensional Liquid-Phase Separation Method for Mapping of Cellular Proteins with Identification Using MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1099-1111.
- [86] Kachman, M. T., Wang, H., Schwartz, D. R., Cho, K. R., Lubman, D. M. A 2-D Liquid Separations/Mass Mapping Method for Interlysate Comparison of Ovarian Cancers., *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1779-1791.
- [87] Zhu, K., Kim, J., Yoo, C., Miller, F. R., Lubman, D. M. High Sequence Coverage of Proteins Isolated from Liquid Separations of Breast Cancer Cells Using Capillary Electrophoresis-Time-of-Flight MS and MALDI-TOF MS Mapping, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 6209-6217.
- [88] Yan, F., Subramanian, B., Nakeff, A., Barder, T. J., Parus, S. J., Lubman, D. M. A Comparison of Drug-Treated and Untreated HCT-116 Human Colon Adenocarcinoma Cells Using a 2-D Liquid Separation Mapping Method Based upon Chromatofocusing PI Fractionation, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 2299-2308.
- [89] Zhu, Y., Lubman, D.M. Narrow-band fractionation of proteins from wholecell lysates using isoelectric membrane focusing and nonporous reversed-phase separations, *Electrophoresis*, 2004, 25, 949-958.

- [90] Chen, J., Balgley, B. M., DeVoe, D. L., Lee, C. S. Capillary Isoelectric Focusing-Based Multidimensional Concentration/Separation Platform for Proteome Analysis, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 3145-3152.
- [91] Mohan, D., Pas' a-Tolic', L., Masselon, C. D., Tolic', N., Bogdanov, B., Hixson, K. K., Smith, R. D., Lee, C. S. Integration of Electrokinetic-Based Multidimensional Separation/Concentration Platform with Electrospray Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectrometry for Proteome Analysis of *Shewanella oneidensis*, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 4432-4440.
- [92] Wang, Y., Balgley, B.M., Rudnick, P.A., Evans, E.L., DeVoe, D.L., Lee, C.S. Integrated Capillary Isoelectric Focusing/Nano-reversed Phase Liquid Chromatography Coupled with ESI-MS for Characterization of Intact Yeast Proteins, *J. Proteome Res.*, 2005, 4, 36-42.
- [93] Meng, F., Cargile, B. J., Patrie, S. M., Johnson, J. R., McLoughlin, S. M., Kelleher, N. L. Processing Complex Mixtures of Intact Proteins for Direct Analysis by Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2923-2929.
- [94] Meng, F., Du, Y., Miller, L. M., Patrie, S. M., Robinson, D. E., Kelleher, N. L. Molecular-Level Description of Proteins from *Saccharomyces cerevisiae* Using Quadrupole FT Hybrid Mass Spectrometry for Top Down Proteomics, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 2852-2858.

第二章 蛋白质提取方法对蛋白的预分离和富集效果的比较研究

1 引言

在蛋白质组学研究中,有效地和具有重现地样品准备方法是整个分离分析过程的第一步,是成功分离样品的前提和关键。双向凝胶电泳中样品准备的目的是将原始的样品转化成能够用于第一维 IEF 分离的合适的物理化学状态,同时还要保持样品中蛋白质的固有的电荷和分子量不变。这就意味着样品中的蛋白质需要被做溶解、解离、变性和还原处理,同时还要保证其固有的一些性质不变,否则影响等电聚焦的效果。特殊的样品准备方法首先依据分离的目的的不同相应的选用不同的具有针对性的方法。蛋白质样品准备方法[1-4]也多种多样,范围比较广,从提取比较简单的可溶性的蛋白到使用离液试剂、表面活性剂和还原试剂等来提取复杂的蛋白质复合物,同时样品准备方法包括将复杂的蛋白质混合物重现性分离到适当数量的馏份中,起到对不同目标的分类富集作用,一个有效的样品准备过程能够重现性的溶解一定种类的蛋白质,包括亲水性和疏水性的蛋白,阻止蛋白质的解离,防止聚焦过程中蛋白质因溶解性下降而丢失,避免样品提取后的化学修饰包括因酶和化学反应造成的蛋白质降解,除此之外,一个有效的样品准备过程还包括除去一些干扰分子比如除去干扰的高丰度蛋白或非相关种类的蛋白,使目标种类的蛋白达到可以检测的水平。然而,大多数用于双向凝胶电泳的样品提取方法的目的是在要求的 pI/MW 范围内尽量溶解更多的蛋白。常用的双向凝胶电泳的样品裂解液包括离液试剂(urea, thiourea),还原试剂(DTT),表面活性剂(CHAPS)等[5-10],而且这些裂解液通常在中性范围内,这就导致在很多情况下,一些具有极算极碱等电点的蛋白因为不能溶解在中性裂解液中而丢失。为了避免这种丢失,本工作提出使用酸碱不同的裂解液作为现有中性裂解液的补充,这一想法运用到大鼠肝脏蛋白的提取。双向凝胶电泳分离之后的胶上成像比较显示酸性裂解液能够更多的提取碱性蛋白质,与之相对的是碱性裂解液能够更多的提取酸性蛋白质。换句话说,不同的裂解液能够提取不同等电点范围的蛋白质,一定程度上对复杂的蛋白质起到了预分离的作用,对特定的蛋白质尤其是一些低丰度蛋白质又起到了富集的作用,另外,不同的 pH 的提取方法提取的蛋白质还可以根据流动相与裂解液 pH 的兼容性相应的运用到不同的液相色谱模式上。新的样品准备策略为找到更多的有价值的蛋白或生物标记物提供了更多的机会。另外,匀浆法是机体软组织破碎最常用的方法之一,其工作原理是通过固体剪切力破碎组织细胞,释放蛋白质进入溶液。由于匀浆过程中蛋白质被酶解的可能性较小,所以匀浆法是一种简便、快速、风险

小的组织破碎方法，是实验室首先考虑的方法之一，故本实验中选用匀浆法作为鼠肝组织细胞的破碎方法研究蛋白质的提取。

2 实验部分

2.1 试剂与材料

乙腈 (CAN, 高效液相色谱纯, Merck Co), 三氟乙酸 (TFA, 高效液相色谱纯, Tedia company. inc.), 丙烯酰胺、苯甲磺酰氟(PMSF)、考马斯亮蓝R-250、二硫苏糖醇 (DTT)、3-[3-(胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS) (上海华舜生物工程有限公司), 双丙烯酰胺 (bis, Fluka BioChemika), 甘氨酸 (上海生工生物工程有限公司), N,N,N',N'-四甲基乙烯胺(TEMED)、溴酚蓝 (Pharmacia Biotech), 尿素、柠檬酸铵 (华美生物工程有限公司), 十二烷基硫酸钠 (SDS, 上海生工生物工程有限公司), α -氰基-4-羟基-肉桂酸 (CHCA, Sigma Chemical Co), 测序级胰蛋白酶为Roche 公司产品; 甘油、丙酮、甲醇、乙酸、碳酸氢铵等为国产分析纯试剂, 实验中所用水为Milli-Q 去离子水。

健康大鼠肝组织样品由复旦大学中山医院肝癌研究所提供, 所有样品都在-80℃保存以防止蛋白质降解。

2.2 样品制备

鼠肝组织被切成小块, 用冰生理盐水(0.9% NaCl 溶液)清洗三次以除去体液及血液中一些可能的污染物。接着称重, 均分成三份 (0.1g/份), 以 1: 5 (g: mL) 的比例分别加入不同的提取液, 提取液 1 为: 1 mM PMSF, 0.1% (v/v) TFA, pH 2.8; solution 2: 9 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 50 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 6.2; solution 3: 9 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 50 mM DTT, 1 mM PMSF, 40 mM Tris, pH 9.5。然后置于玻璃匀浆器内进行手动匀浆, 直至组织完全破碎, 整个匀浆过程在冰浴中进行。匀浆液混旋 20 分钟, 在 4℃ 条件下 18000 g 离心 15 min, 取上清液即为提取蛋白, 依次命名为: S1, S2, S3。-80℃ 保存备用, 蛋白质提取液用修饰改进过的 Bradford 法定量[12], 三种提取液的浓度依次分别为 3.8, 10.2, 8.3mg/mL。

方法的重现性通过蛋白浓度的相对标准偏差(RSDs)进行考察, 不同的裂解液平行 5 次提取蛋白, 测量的浓度的相对标准偏差小于 2.1%, 表明方法有良好的重现性, 详细的结果列在表 2-1 中。

2.3 蛋白质的双向凝胶电泳分离

采用IPGphor (Amersham Pharmacia 公司) 电聚焦仪。所有的样品均采用水化泡涨上

样方式。样品的体积依IPG 胶条长度而异, 7 cm 为120~140 μL , 18 cm为340~370 μL , 24 cm 为450~480 μL , 本实验中鼠肝提取的蛋白样品均采用7 cm, pH 3~10的非线性胶条进行等电聚焦, 将适量体积的样品与水化液(8M 尿素, 2% CHAPS, 50mM DTT, 1mM PMSF, 两性电解质)混合加入等电聚焦槽, 对于S1需要另外加入Tris至30mM调节pH值至中性, 否则会使两性电解质失去作用。每种提取液的上样量均为75 μg 。取胶条胶面向下覆盖在样品上, 检查胶条下不能有气泡, 也不能使样品浸没胶条上面。然后在胶条上覆盖一层矿物油以防止水化液挥发。设置仪器控温为20 $^{\circ}\text{C}$, 低压水化12 h, 其中保持30 v电压6个小时, 然后50 v电压6小时。水化结束后, 进行梯度升压, 对于7 cm, 升压程序为250 V/1h, 500 V/1 h, 1000 V/1 h, 2000 V/1 h, 4000 V/6 h, 500 V/12 h。

等电聚焦结束后, 将胶条从聚焦槽内取出, 在两层湿的厚滤纸之间轻压吸去其表面的残留的矿物油以及其他残留杂质或者存放在-20 $^{\circ}\text{C}$ 以便等待后续的分。平衡管内加入平衡缓冲液I: 50mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 10 mg/ml DTT。将胶条背面贴管壁置于平衡管内, 摇床上摇动平衡15min, 取出胶条, 倒出平衡液, 加入平衡缓冲液II: 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 12.5 mg/ml 碘乙酰胺, 摇床上摇动平衡15min。

双向凝胶电泳的第二维采用Bio-Rad公司的Mini-Protean (7cm) SDS-PAGE电泳仪。凝胶为手工灌制的12%的非梯度胶, 大小为7 cm \times 5 cm (1 mm 厚), 顶部留1 cm 左右空间用于放置IPG 胶条。用镊子夹住胶条一端倾斜插入放入制胶的玻璃板内, 使其贴紧凝胶上端面, 加满已加热(\sim 75 $^{\circ}\text{C}$)融化的琼脂糖封胶溶液(25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 192 mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS, 0.5% 琼脂糖, 痕量溴酚蓝)。注意此过程尽量不要引入气泡。等封胶溶液凝固后, 将胶板安装至电泳仪上, 打开电泳仪, 调节电流, 每块胶约10 mA, 以恒电流方式开始电泳。待电泳前沿(溴酚蓝)移动至分离胶时, 调节电流到每块胶20 mA, 继续电泳。当前沿达到胶的底端, 调节电流到0, 关闭电泳仪总开关。取下玻板, 用塑料片小心撬开两玻板, 以去离子水不断冲洗胶面, 至胶与玻板分离。

电泳后的7cm的凝胶用考马斯亮蓝R-250 染色法进行染色5小时或过夜, 然后用脱色液(10%乙醇+10%乙酸)脱色直至背景完全清晰为止。凝胶的扫描使用ImageScanner 扫描仪(Amersham Pharmacia 公司), 图像分析软件为ImageMaster2D version 3.01 (Amersham Pharmacia)。

2.4 胶上酶解与质谱鉴定

因为只进行验证实验并不进行大规模的全蛋白的鉴定, 所以只对小部分蛋白点进行了

鉴定, 采用了手工切胶和酶解的方式。把蛋白质点切下, 移入96孔板内, 对于考马斯亮蓝染色的胶的酶解, 采用如下步骤: 1, 移去96孔板内的液体; 2, 加入100 μL 脱色液 (50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液/50%乙腈) 脱色15 min, 弃上清液, 重复两次, 至凝胶变为无色透明; 3, 加入100 μL 100%乙腈使胶粒脱水10 min, 移去乙腈, 放入37°C烘箱中10 min以确保干胶; 4, 在干燥的凝胶颗粒中加入3 μL 胰蛋白酶液, 酶液用25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液配制, 浓度为12.5 ng/ μL , 于4°C放置30 min 使胶粒完全泡胀, 取出后于37°C恒温酶解3 h 或者过夜; 5, 酶解完毕, 每孔加入60 μL 提取液 (0.1%TFA/50%乙腈), 放置30 min, 将孔内溶液转移到另一个96孔板, 重复两次, 将提取液合并。提取液在 N_2 流保护下, 40°C浓缩至干。

将干燥的肽段重新溶解于0.8 μl 5 mg/mL CHCA 溶液 (溶剂: 0.1% TFA/50%乙腈/0.3 mg/mL柠檬酸铵) 中, 并将其全部点样到MALDI 靶板上。使用4700串联飞行时间质谱仪进行质谱分析 (美国应用生物系统公司, Applied Biosystem)。采用MALDI离子源, 飞行时间分析器, 由4700 ExplorerTM软件控制。激光采用337nm, 200Hz。采用正离子反射模式 (Reflector Positive Acquisition/processing Method)。质谱加速电压为20kV, 串级质谱加速电压为8kV。质量范围设置为800-3200Da。选择每个PMF谱中前6个强度最大的且信噪比大于35的肽段作串级谱。

用 GPS 软件 (version 1.0, Applied Biosystems, USA), Mascot (version 1.6, <http://www.matrixscience.com>, Matrix Science, London, UK) 搜索引擎。检索数据库: NCBI; 检索种属: 鼠 (rat), 可变修饰选为 C 端的脲甲基化 (Carbamidomethyl(C)) 和甲硫氨酸的氧化 (Oxidation (M))。肽质量误差范围设置: $\pm 0.3\text{Da}$; 串联质谱质量误差范围设置为: $\pm 0.4\text{Da}$ 。将马肌红蛋白配成溶液, 热变性之后, 加入胰蛋白酶 (trypsin:蛋白质=1:35, 质量比) 进行酶解, 所酶解的肽段对仪器进行质量校正, 仪器校准之后方可进行蛋白质鉴定。

2.5 蛋白质的反相液相色谱分离

色谱系统由 LC-2010 分离装置和 FRC-10A 馏份收集装置组成 (Shimadzu Corp., Japan)。LC-2010 系统是一套高集成的色谱分离系统, 它由一个低压四元梯度泵, 自动进样器, 在线脱气系统, 恒温系统和一个双波长的紫外可见监测器组成。系统自带的 Class-VP 工作站负责记录和处理数据, FRC-10A 馏份收集系统由 SCL-10A 控制器进行控制 (Shimadzu Corp., Japan)。

色谱柱采用 C18 的反相柱 (大连依利特分析仪器有限公司, 中国), 内径是 4.6mm,

20cm 长, 采用 5 μ m, 300Å, Hypersil 填料, 分析柱前加一个 2cm 长内径为 4.6mm 的保护柱以防止污染或堵塞主柱, 保护柱的填料与分析柱相同。上样量为 100 μ g, 上样前分别用流动相(1:1, v/v)稀释样品 S2 和 S3 避免体系不兼容造成沉淀堵塞柱子。

梯度洗脱溶剂为: A: 100% 水-0.1%TFA; B: 100% 乙腈-0.1%TFA。流动相洗脱梯度为: 0% B 15 分钟, 30 分钟线性上升至 30% B, 接着又用 30 分钟时间从 30% B 线性上升至 50% B, 然后 20 分钟内升至 80% B, 保持 5 分钟, 2 分钟内降至 0% B。流速为 1.0 mL/min, 紫外检测波长为 215nm。

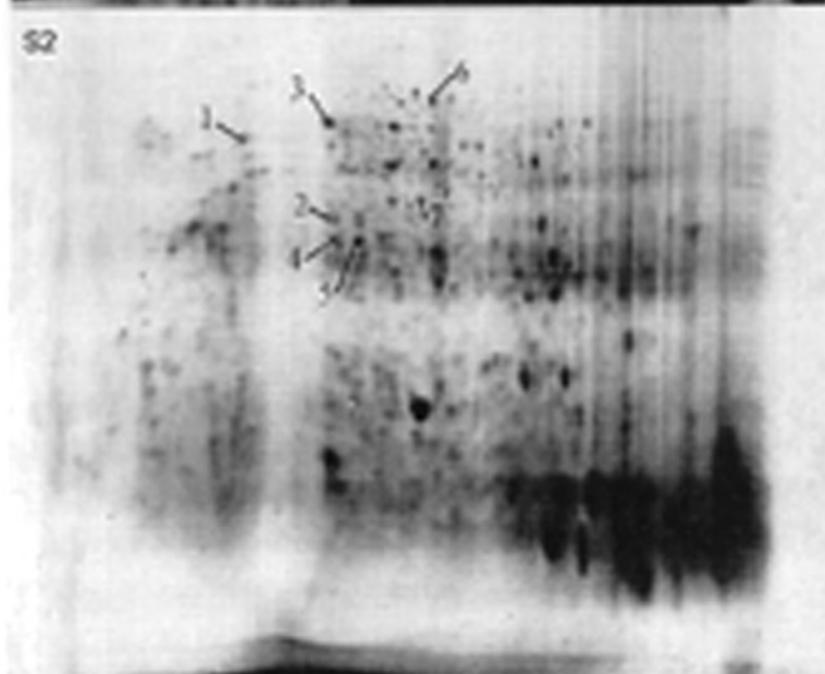
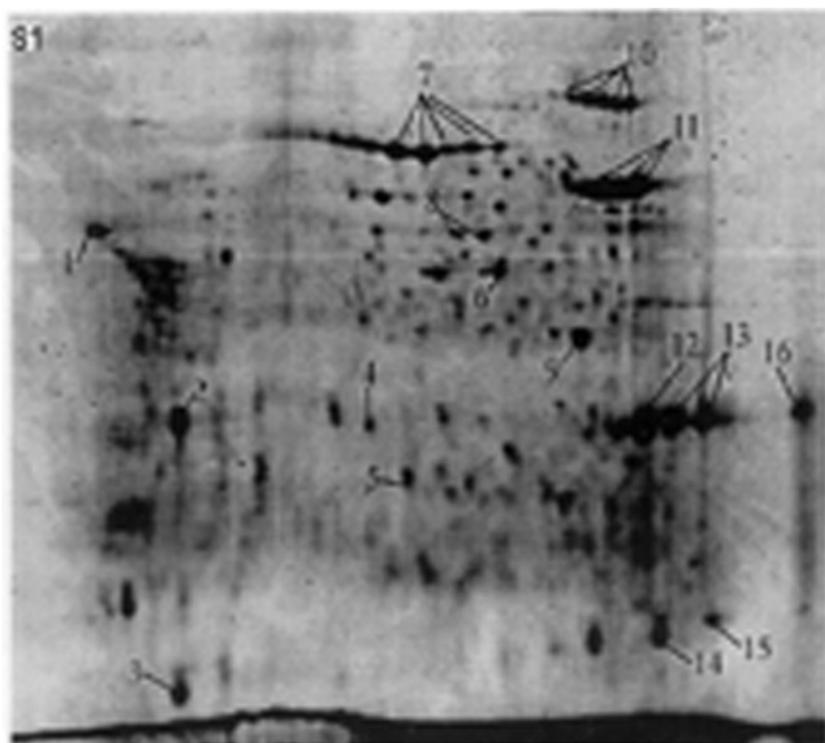
3 结果与讨论

3.1 双向凝胶电泳法对不同环境下提取的蛋白质的比较研究

三种方法提取的不同的蛋白质样品 S1, S2 和 S3 分别使用双向凝胶电泳的方法进行分离, 图 2-1(A-C)给出了双向凝胶电泳图谱, 从这三张谱图的对比可以明显看出蛋白质的分布存在着很大的差异。中性条件下提取的蛋白质种类主要集中在等电点 5-7 的范围内, 酸性条件下提取的蛋白质偏碱性的多, 与之相对, 碱性条件下提取的蛋白质偏酸性的多。根据谱图的两维坐标部分蛋白质的点被选取, 进行切胶、酶解和 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定, 鉴定结果列于表 2-2 中, 在酸性条件下提取的蛋白用 S1 作为前缀, 类似的中性和碱性条件下提取的蛋白质分别用 S2 和 S3 作为前缀来区分。

Table 2-1 不同方法提取鼠肝组织蛋白质的结果比较

Protocol	Concentration (mg/mL)	Volume (mL)	Total amount (mg)	RSD (%) of total amount (n=5)
S1	3.8	0.39	1.48	1.9
S2	10.2	0.42	4.28	1.7
S3	8.3	0.41	3.4	2.1



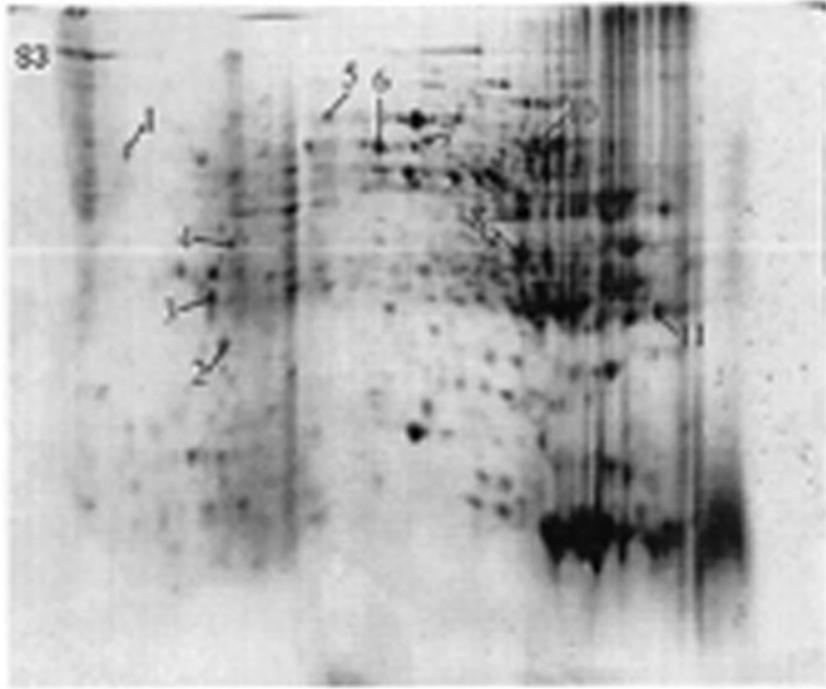


图 2-1 鼠肝组织提取的蛋白质的双向凝胶电泳谱图。(S1)酸性裂解液, (S2)中性裂解液, (S3)碱性裂解液(详细的实验条件见实验部分)。

从图 2-1 和鉴定的实验结果可以看出不同的提取方法可以一定程度上简化整个组织样品的复杂程度, 而且对某些蛋白质可以起到富集的效果。下面举例说明, 过氧化氢酶(Catalase)在酸性条件下被富集成为一个比较大和颜色深的蛋白染色点 (S1 中的 NO. 11), 在中性和碱性条件下含量却比较少, 表现在谱图上就是一个比较小的蛋白点(S2 中的 NO. 7) 和(S3 中的 NO. 10)。反丁烯二酸的乙酰乙酸水化酶(Fumarylacetoacetate hydrolase)在酸性提取物分离的谱图中表现的蛋白点(S1 中的 NO. 9) 远强于其在碱性提取物分离的谱图中表现的蛋白点(S3 中的 NO. 8)。类似的情况, 蛋白的二硫异构酶 A3 前驱体(Protein disulfide isomerase A3 precursor)在碱性提取样品的 2-DE 谱图上的蛋白点(S3 中的 NO. 6) 强于其在中性提取样品的 2-DE 谱图上的蛋白点(S2 中的 NO. 5)。

Table 2-2 从不同的 pH 条件下鉴定的蛋白质。

Spot	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI
S1-1, S3-1	iodothyronine 5' monodeiodinase	gi 202549	54033.2	4.87
S1-2	regucalcin	gi 13928740	33368.4	5.27
S1-3	phosphatidylethanolamine binding protein	gi 8393910	20788.4	5.48
S1-4	glucokinase - rat (fragment)	gi 2143755	19078.5	5.3
S1-5	Annexin III (Lipocortin III)	gi 51980303	36340.6	5.96
S1-6	aldehyde dehydrogenase	gi 16073616	48239.5	6.06
S1-7, S2-6	albumin	gi 19705431	68674	6.09
S1-8	selenium binding protein 2	gi 18266692	52498.4	6.1
S1-9, S3-8	fumarylacetoacetate hydrolase	gi 8393349	45946.1	6.67
S1-10	Serotransferrin precursor (Transferrin)	gi 6175089	76314.5	6.94
S1-11, S2-7, S3-10	Catalase	gi 51980301	59719.5	7.07
S1-12	rhodanese	gi 57069	33155.7	7.84
S1-13	hypothetical protein XP_216453	gi 27715161	35805.2	8.14
S1-14	peroxiredoxin 1	gi 16923958	22095.3	8.27
S1-15	Chain B, Crystal Structure Of A Mammalian 2-Cys	gi 6435548	22079.3	8.34
S1-16	unnamed protein product	gi 56643	35632.8	8.92
S2-1	ATP synthase beta subunit	gi 1374715	51170.6	4.92
S2-2	similar to actin gamma, cytoskeletal	gi 27683621	41766.8	5.31
S2-3, S3-3	HSP60 protein (AA 1-547)	gi 1334284	57889.7	5.35
S2-4	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	gi 9910256	32561.2	5.57
S2-5, S3-6	Protein disulfide isomerase A3 precursor	gi 1352384	56587.7	5.88
S3-2	Catechol O-Methyltransferase	gi 1633081	24731.4	5.11
S3-4	similar to dnaK-type molecular chaperone hsc73 - rat	gi 27716941	45382.4	5.6
S3-5	dnaK-type molecular chaperone precursor	grp75 gi 2119726	73698.8	5.87
S3-7	carboamyl-phosphate synthetase 1	gi 8393186	164475.5	6.33
S3-9	arginase 1, liver	gi 8392920	34977.3	6.76
S3-11	glutathione S-transferase, alpha 1;	gi 13928688	25303.3	8.78

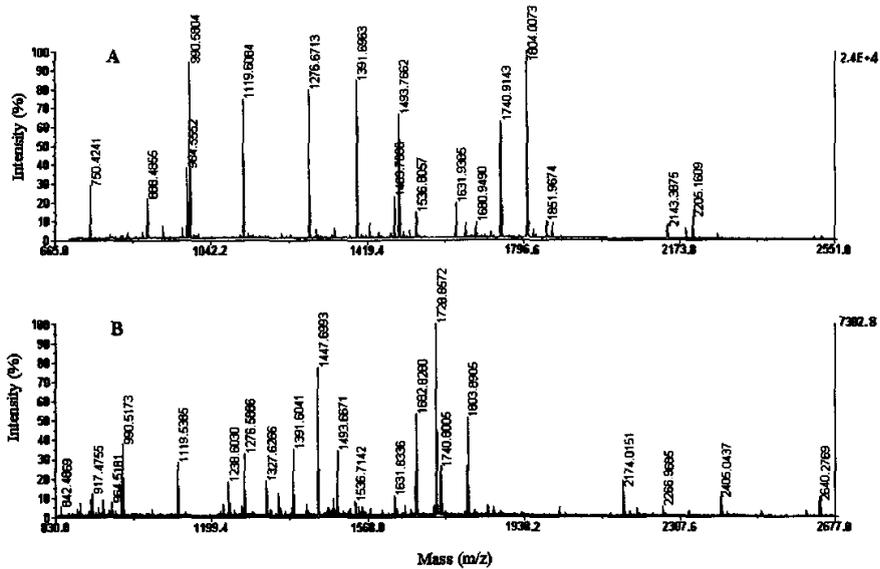


图 2-2 过氧化氢酶(Catalase)的质谱图分别来自(A) S1 中的 NO. 11 (B) S2 中的 NO. 7。

这种策略能分别富集不同的蛋白，进而提高了质谱的质量，比如提高了谱图的信号强度与信噪比而且提高了可以用于做串联鉴定的肽段的数量。以过氧化氢酶(Catalase)为例，经过鉴定，S1 中的 NO. 11 与 S2 中的 NO. 7 都为同一蛋白过氧化氢酶，其序列为：NFTDVHPDYGAR，但是比较二者的质谱图(图 2-2)可以看出，S1-11 的肽谱的信号强度和信噪比都明显强于 S2-7，这归因于提高了可以用于酶解的蛋白的量。对于点 S1-11 肽谱图上有 27 条肽段得到匹配，而点 S2-7 匹配的肽段只有 12 条，而且点 S2-7 匹配的肽段都包含在 S1-11 中，因此相对点 S2-7 来讲，点 S1-11 有更多的肽段用于蛋白鉴定，很大程度上提高了蛋白质鉴定的可靠性，提高用于蛋白鉴定的肽段数量对一些低丰度蛋白质的鉴定更为重要。

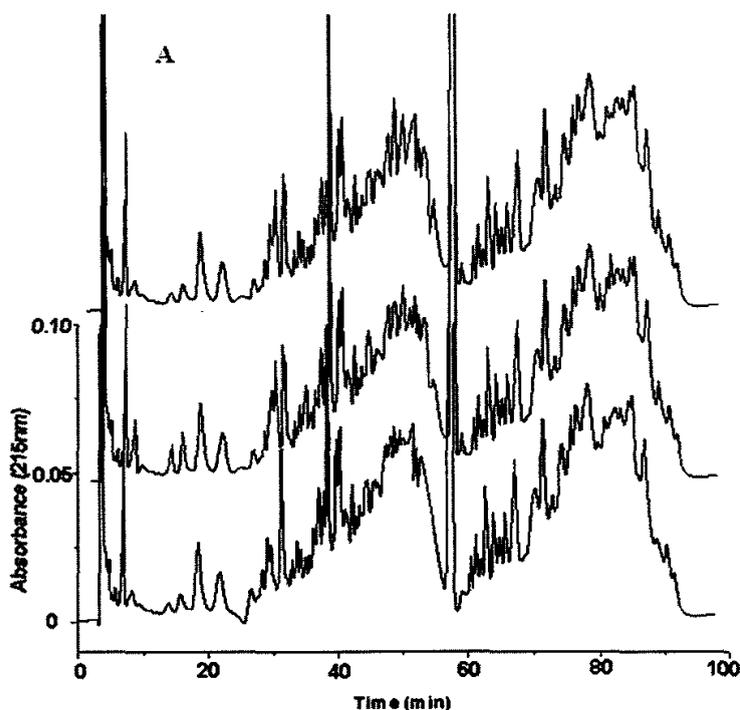
低丰度蛋白质是蛋白质组学研究中的热点，目前来讲提高蛋白质在分离过程中的上样量是使低丰度蛋白质达到可以观测的水平的一个有效手段。根据本论文的实验结果，采用不同的 pH 提取蛋白质也是对部分蛋白的一个富集过程。由 ImageMaster 5.0 分析软件对双向胶 S1-S3 上的蛋白质点的数量进行了计算统计，分别为 1050, 1260, 980，由此可见，可以观察到的总蛋白质点的数量远多于单纯一种方法所能分辨的蛋白质点的数量，也就是说，三种裂解液的联合使用比单独使用标准方法或中性提取方法能够提取更多的蛋白质，提取更多的蛋白质为发现更多的有价值的生物标记物提供了条件和前提。另外，蛋白质组重叠群方法的应用在一定程度上提高了二维凝胶电泳的分离能力，主要是利用

多块在不同 pH 梯度或分子量上相互重叠的双向电泳图谱, 结合图像分析技术拼接成一张完整的双向电泳图谱, 其实质是使每一块凝胶在较窄的 pH 梯度和分子量范围内分离蛋白质, 以提高分辨率。现在国外的主要趋势有第一维电泳采用窄 pH 梯度胶分离。窄的 pH 梯度的 IPGs 胶条的出现为通过提高第一维的分辨率达到提高鉴定蛋白质的数量提供了机会[11, 17]。已经有文章[17]报道碱性 pH 范围的胶条, 如 pH 6-11 和 9-12, 适合有效的重现性的分离等电点在 9.0-10.5 这一范围的碱性蛋白。常用的胶条一般为 7 pH 单位(pH 3-10), 采用窄 pH 胶条之后, 相同的长度上的 pH 范围缩小, 有的降低为 3 个 pH 单位, 有的甚至仅为 1 个 pH 单位, 那么多个连续窄 pH 梯度的胶条的联用(如 pH 4-7, 6-11 和 9-12) 相比一个宽范围的胶条其上样量就显著提高, 相应的分辨率也会得到很大提高。因此, 如果将本工作提出的蛋白质样品提取策略与使用窄的 pH 梯度的 IPGs 胶条结合起来, 即酸性环境提取的富含碱性蛋白的样品使用多个碱性范围窄的 pH 梯度的 IPGs 胶条, 反之, 碱性环境提取的富含酸性蛋白的样品使用多个酸性范围窄的 pH 梯度的 IPGs 胶条, 那么将会进一步增大上样量和分离效率, 为检测更多的蛋白质尤其是中低丰度蛋白提供了可能性和更多机会。

3.2 反相液相色谱法分离比较不同提取条件下提取的蛋白质

液相色谱以其不同的分离机理、高自动化程度、高灵敏度和良好的重现性等优势越来越成为继双向凝胶电泳之后蛋白质组学研究中又一重要的研究手段或重要的技术补充[13-15]。然而, 如果液相色谱流动相的酸碱度与蛋白质的裂解缓冲液的酸碱度不匹配, 那么许多蛋白就很容易发生沉淀现象, 一旦在柱子内部发生沉淀, 柱子就会被堵塞分离过程就不能完成。例如反相液相色谱和强阳离子交换色谱这二者因为流动相中使用三氟乙酸(TFA)所以流动相呈强酸性, 但是如果样品使用本工作所推荐的酸性提取方法, 那么就不存在流动相与样品缓冲液不兼容而沉淀的问题。TFA 是液相色谱流动相中常用的添加剂, 在蛋白质的分离过程中可以作为流动相的改进剂改善色谱峰的峰形和提高回收率, 同时 TFA 又有很强的挥发性在后续的处理过程中容易除掉, 所以 TFA 在液相色谱实验中得到广泛的应用。另外在样品提取过程中, 加入 TFA 意在利用其离子对的效应增加对小分子量蛋白质的溶解。Scheffler 实验组[18]报道通过使用 0.1% TFA 的提取液提高小分子量蛋白质或肽的溶解度的一个高产率的提取方法。类似的报道[15]还有使用 0.05% TFA 作为裂解液来富集心脏肌肉组织中的肌丝蛋白, 另外也有报道使用乙腈和 0.1% TFA 的变性条件提取血清中的蛋白[2]。图 2-3 给出了使用反相液相色谱分离三种提取物的色谱图, 其中图 2-3(A)是 S1 的色谱图, 同时使用相同的梯度对平行三次提取的 S1 分别进行分离所得谱图如图 2-3(A)所示, 从这三张色谱图可以看出这种提取方法有很好的重现

性。另外, S2 和 S3 也使用 RPLC 进行了分离, 相应的色谱图如图 2-3(B)(C)所示, 为了避免分离过程中的沉淀, 进样之前先用流动相 A 相对样品进行稀释。与图 2-3(A)相比, 图 2-3(B)(C)上的色谱峰明显减少。两方面的理由解释了为什么生物组织蛋白能够在低的 pH 条件下提取。首先, 在酸性条件下, 很多酶包括蛋白酶、激酶和磷酸酶等处于比较稳定的状态同时发生后翻译修饰的可能性比较小, 同时为巯基和二硫化物提供了相对稳定的环境[16]。其次, 在相对高的 pH 条件下容易发生的巯基氧化和 thiol-disulfide 的交换反应在酸性条件下也得到抑制, 在中性条件下, 这些反应将会导致蛋白质之间的共价耦联而发生蛋白聚集现象。中性和碱性裂解液提取的蛋白质不仅适合使用双向凝胶电泳分离, 而且也适合使用阴离子交换色谱或疏水性色谱等分离手段。因此, 根据分离使用的具体的分离方法和分离体系相应的选择合适的样品准备方法是非常必要的, 同理不同的样品应该根据其具体的生物及物理化学性质相应的选择最佳的分离方法和相兼容匹配的分体系以达到最佳的分离效果。总之, 液相色谱和以凝胶为基础的分方法相互补充, 为蛋白质组学的研究提供了高的峰容量和分辨率, 为找到有价值的目标蛋白进行后续的研究提供了分离技术平台。



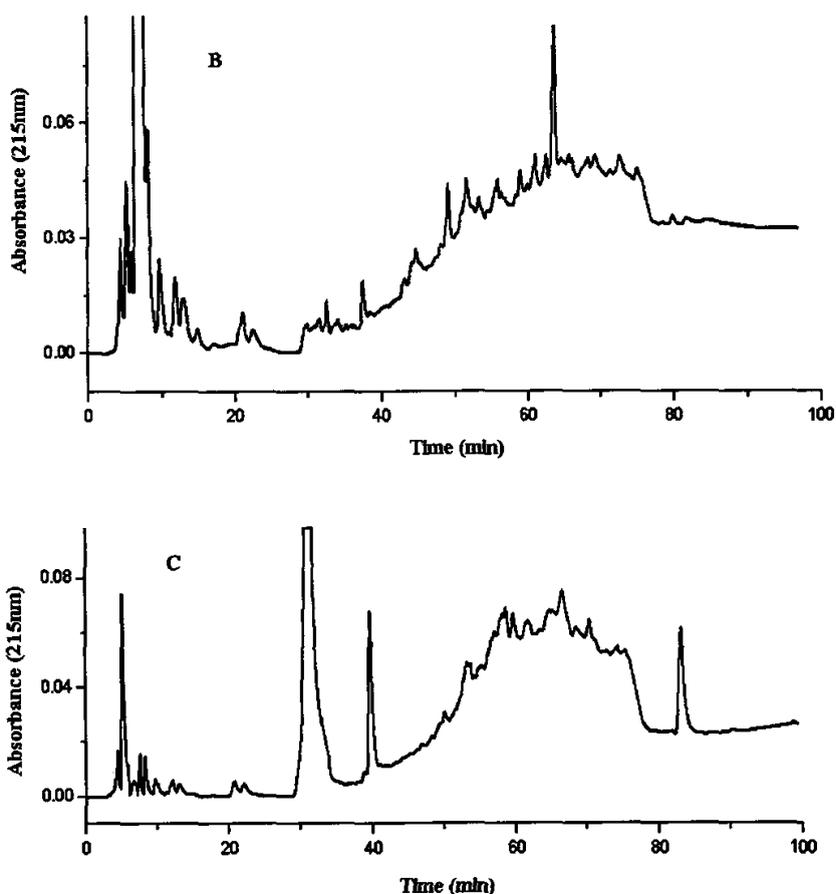


图 2-3 鼠肝组织蛋白的 RPLC 分离的色谱图。(A)S1 的 RPLC 分离的色谱图, 平行三次提取的样品分别经 RPLC 分离的色谱图。(B)S2 的 RPLC 分离的色谱图(C)S3 的 RPLC 分离的色谱图。(详细的实验条件见实验部分)

4 结论

本工作首次对鼠肝组织蛋白在不同pH条件下的提取方法和效果进行了研究, 利用双向凝胶电泳和反相液相色谱两种手段对其进行比较研究, 并提出了合理的解释和建议。双向凝胶电泳的谱图及质谱信号表明这种提取策略能富集不同pH范围的蛋白质, 如果能够进一步结合相应的窄的IPGs胶条进行分离实验, 将会很大程度上提高样品的负载量和分离时的分辨率, 提高对中低丰度蛋白的检测能力。不同的提取方法还可以运用到相应的与之兼容的液相色谱模式中, 增加分离手段的多样性和提高分离效率。实验证明样品准备方法具有良好的重现性, 使之能够在蛋白质组学研究中广泛应用。

参考文献

- [1] Shaw MM, Riederer BM, Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis, *Proteomics* 2003, 3:1408-1417.
- [2] Chertov O, Biragyn A, Kwak LW, Simpson JT, Boronina T, Hoang VM, Prieto DA, Conrads TP, Veenstra TD, Fisher RJ, Organic solvent extraction of proteins and peptides from serum as an effective sample preparation for detection and identification of biomarkers by mass spectrometry *Proteomics*, 2004, 4:1195-1203
- [3] Tastet C, Charmont S, Chevallet M, Luche S, Rabilloud T, Structure-efficiency relationships of zwitterionic detergents as protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis, *Proteomics*, 2003, 3:111-121.
- [4] Luche S, Santoni V, Rabilloud T, Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis, *Proteomics*, 2003, 3:249-253.
- [5] Henningsen R., Gale B.L., Straub K.M., DeNagel D.C., Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Proteomics*, 2002, 2(11): 1479-1488.
- [6] Molloy M.P., Phadke N.D., Maddock J.R., Andrews P.C., Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins, *Electrophoresis*, 2001, 22: 1686-1696.
- [7] Molloy M.P., Herbert B.R., Slade M.B., Rabilloud T., Nouwens A.S., Williams K.L., Gooley A.A., Proteomic analysis of the Escherichia coli outer membrane, *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267: 2871.
- [8] Liberatori S., Bini L., De Felice C., Magi B., Marzocchi B., Raggiaschi R., Pallini V., Bracci R., Acute-phase proteins in perinatal human plasma, *Electrophoresis*, 1997, 18: 520-526.
- [9] O'Connell K.L., Stults J.T., Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of in situ enzymatic digests, *Electrophoresis*, 1997, 18: 349-359.
- [10] Sarto C., Marocchi A., Sanchez J-C, Giannone D., Frutiger S., Golaz O., Wilkins M.R., Doro G., Cappellano F., Hughes G., Hochstrasser D.F., Mocarelli P., Renal cell

- carcinoma and normal kidney protein expression, *Electrophoresis*, 1997, 18: 599-604.
- [11] Garfin DE, Two-dimensional gel electrophoresis: an overview, *Trend in Analytical Chemistry*, 2003, 22:263-272.
- [12] Qu, Y., Moons, L., Vandesande, F., Determination of serotonin, catecholamins and their metabolites by direct injection of supernatants from chicken brain tissue homogenate using liquid chromatography with electrochemical detection . *J. Chromatogr. B.* 1997, 704, 351-358.
- [13] Wei J, Sun J, Yu W, Jones A, Oeller P, Keller M, Woodnutt G, Short JM, Global proteome discovery using an online three-dimensional LC-MS/MS, *J. Proteome Research*, 2005, 4:801-808.
- [14] Jin, W.H., Dai, J., Li, S. J., Xia, Q.C., Zou, H.F., Zeng, R., Human Plasma Proteome Analysis by Multidimensional Chromatography Prefractionation and Linear Ion Trap Mass Spectrometry Identification, *J. Proteome Research*, 2005, 4: 613-619.
- [15] Tyan, Y. C., Wu, H.Y., Lai, W. W., Su, W. C., Liao, P. C., Proteomic Profiling of Human Pleural Effusion Using Two-Dimensional Nano Liquid Chromatography Tandem Mass, *J. Proteome Research*, 2005, 4: 1274-1286.
- [16] Ryden L, Carlsson J, in: Janson J, Ryden L (Eds.), *High Resolution Methods, and Applications*, VCH, Uppsala, 1989, pp. 252-274.
- [17] Bae SH, Harris AG, Hains PG, Chen H, Garfin DE, Hazell SL, Paik YK, Walsh BJ, Cordwell SJ, Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome of projects, *Proteomics*, 2003, 3:569-579.
- [18] Kline TR, Pang J, Hefta SA, Opitck GJ, Kiefer SE, Scheffler JE, A high-yield method to extract peptides from rat brain tissue, *Anal. Biochem.*, 2003, 315: 183-188.

第三章 反相液相色谱/双向凝胶电泳分离系统的建立及其在蛋白质组学研究中的应用

1 引言

传统的二维凝胶电泳技术历经了四分之一个世纪的完善,目前仍然是蛋白质组学研究中的广泛使用的技术[1-4],鉴于蛋白质组高度的复杂性,质谱分析前,对复杂的蛋白体系进行有效地分离是很重要也是非常必要的。第一,可以对复杂体系中某一类的目标蛋白质进行专门研究;第二,可以大大简化分析体系的复杂程度,从而增加鉴定的确定性。目前主要采用预分离的手段简化复杂的蛋白质组体系,主要方法有,亲和色谱分离法[5-9]、亚细胞器的提取、电泳分离及色谱分离等。

生物体中的许多高分子化合物具有和某些相对应的专一分子可逆结合的特性,这种特异性结合能力称为亲和力,根据生物分子间亲和吸附和解离的原理,而建立的色谱法称为亲和色谱法。亲和色谱是吸附色谱的发展。亲和色谱可用于任何两种有特异性相互作用的生物大分子之间。目前亲和色谱技术在蛋白质和生物活性物质的分离纯化应用方面十分广泛,总的说来,主要有利用生物大分子之间亲和力的亲和色谱分离和金属螯合亲和色谱[8],前者利用抗体来选择某类特定的蛋白质,即利用抗原、抗体间的特异性反应来有针对性地选择分离出某一种蛋白质或翻译后修饰的蛋白质,而使分析体系得以简化,后者以普通凝胶作为载体,连接上金属离子制成螯合吸附剂,用于分离纯化蛋白质,蛋白质中某些官能团对某种金属离子具有亲和力是这种方法的理论依据。亲和色谱的优点是操作条件温和,步骤简单,效率高,特别对分离含量极少而又不稳定的活性物质最为有效。这种技术也有局限性,即不是任何生物分子都有其特定的配基,且针对某一特定的分离对象,就需要制备专一的配基并选择特定的色谱条件,同时专一配基的制备需要较高的成本和时间,所以亲和色谱柱使用率较低。

根据细胞(或组织)中各亚细胞器密度的不同,进行亚细胞器的提取[18]。提取方法主要有两种,一是利用不同浓度蔗糖溶液密度的差异进行的密度梯度离心法,一是利用密度不同的亚细胞器的沉降系数的差异进行的差速离心技术。利用提取不同的亚细胞器对生物样品中的蛋白质进行预分离,不仅可以简化复杂的蛋白质组体系,还可以对鉴定出的蛋白质进行细胞定位。目前对提取细胞核、细胞膜、线粒体等亚细胞器已有比较成熟的方法。但是利用提取亚细胞器对蛋白质组进行预分组的方法往往需要的样品量较大,且样品利用率低,即很难一次提取出几种亚细胞器,另外有些亚细胞器目前还没有办法

提到,造成蛋白质在提取过程中的损失。

制备级等电聚焦[13-17]也是常用的一种预分离手段,这种方法很大程度上依赖于仪器设备,代表性的设备有: Rotofor (rotationally stabilized focusing apparatus)[13], continuous free-flow IEF[14], Gradflow (multifunctional electrokinetic membrane apparatus)[15]等。高的上样量是这种方法的主要优点,这种方法不可避免的需要大量使用两性电解质,大量两性电解质的存在就会干扰下游的分离和分析,给后续的分离和分析工作造成困难,目前没有一种很好的方法能够有效的除去两性电解质同时保证较高的蛋白回收率,因此,此方法的推广有待于一些技术环节的突破。

常规液相色谱是一种最常用的分离模式,如反相液相色谱(RPLC)[10-11],离子交换色谱(IEC)[12],体积排阻色谱(SEC)和疏水/亲水作用色谱(HIC)等一般用来对样品进行预处理,也就是说作为正式分析前的粗分。一维的色谱模式的峰容量是有限的,对于蛋白组等非常复杂的体系一维色谱不能满足完全分离要求。多种分离模式的连用,是人们掌握的对复杂混合物分离效率最高的方法。提高分离系统的峰容量是解决复杂体系分离问题的根本途径,将多种基于不同机理的分离模式联合使用成为最佳的选择。常规色谱和传统的二维凝胶电泳连用为解决复杂体系的高效分离提供了可能性。

本工作以肝组织为研究对象采用离线的方式建立了反相液相色谱与二维凝胶电泳联用的分离系统。反相液相色谱首先对样品进行预分离,根据疏水作用力的不同将蛋白进行粗分,利用色谱良好的重现性对同一样品进行平行收集,从而大大提高了蛋白的上样量,尤其是低丰度蛋白的上样量,为检测出更多的蛋白提供了机会,同时反相液相色谱与二维凝胶电泳具有正交的分离机理,极大的提高了系统的峰容量,进而也很大程度上提高了对蛋白的样品的分辨能力。啮齿类动物,以大鼠为例,因为这一物种与人类具有很高的相似性,所以广泛地作为实验动物模型应用于生物学及病理学上地研究。本实验首先以鼠肝蛋白为对象建立了多维分离系统并优化了实验条件,继而将此实验路线运用到人肝蛋白质组表达谱的项目中。

2 实验部分

2.1 试剂与材料

乙腈(ACN, 高效液相色谱纯, Merck Co), 三氟乙酸(TFA, 高效液相色谱纯, Tedia company. inc.), 丙烯酰胺、苯甲磺酰氟(PMSF)、考马斯亮蓝R-250、二硫苏糖醇(DTT)、3-[3-(胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)(上海华瞬生物工程有限公司), 双丙烯酰胺(Fluka BioChemika), 甘氨酸(上海生工生物工程有限公司), N,N,N',N'-四甲基乙烯胺

(TEMED)、溴酚蓝 (Pharmacia Biotech), 尿素、柠檬酸铵 (华美生物工程公司), 十二烷基硫酸钠 (SDS, 上海生工生物工程有限公司), α -氰基-4-羟基-肉桂酸 (CHCA, Sigma Chemical Co), 测序级胰蛋白酶为Roche 公司产品; 甘油、丙酮、甲醇、乙酸、甲醛、硫代硫酸钠、硝酸银、过硫酸铵、碳酸氢铵、氯化钠、铁氰化钾、无水硫酸铜和碳酸钠等为国产分析纯试剂, 实验中所用水为Milli-Q 去离子水。

健康大鼠肝组织样品由复旦大学中山医院肝癌研究所提供, 健康的法国人肝组织由国际人肝组织提供。所有样品都在 -80°C 保存以防止蛋白质降解。

2.2 样品制备

鼠肝组织被切成小块, 用冰生理盐水(0.9% NaCl 溶液)清洗三次以除去体液及血液中一些可能的污染物。接着称重, 以1: 8 (g: mL) 的比例加入提取液(8mol/L 尿素, 2% (w/v) CHAPS, 50mM DTT, 和1 mmol/L PMSF), 然后置于玻璃匀浆器内进行手动匀浆, 直至组织完全破碎, 整个匀浆过程在冰浴中进行。匀浆液混旋20分钟, 在 4°C 条件下 15000 g 离心10 min, 取上清液即为提取蛋白, -80°C 保存备用, 蛋白质提取液用Bradford法定量。

法国人肝组织样品在分发到各个实验室之前, 已经统一在液氮冷却的条件下处理成粉末, 所以直接以1: 8 (g: mL) 的比例加入上述相同的提取液并进行手动匀浆, 直至组织完全破碎, 整个匀浆过程同样在冰浴中进行。然后混旋20分钟, 在 4°C 条件下 15000 g 离心10 min, 取上清液即为提取蛋白, -80°C 保存备用, 蛋白质提取液用Bradford法定量 [19]。

2.3 蛋白质的反相液相色谱的预分离

色谱系统由 LC-2010 分离装置和 FRC-10A 馏份收集装置组成 (Shimadzu Corp., Japan)。LC-2010 系统是一套高集成的色谱分离系统, 它由一个低压四元梯度泵, 自动进样器, 在线脱气系统, 恒温系统和一个双波长的紫外可见监测器组成。系统自带的 Class-VP 工作站负责记录和处理数据, FRC-10A 馏份收集系统由 SCL-10A 控制器进行控制 (Shimadzu Corp., Japan)。

色谱柱采用 C18 的反相柱 (大连依利特分析仪器有限公司, 中国), 内径是 4.6mm, 25cm 长, 采用 $5\mu\text{m}$, 300\AA , Hypersil 填料, 分析柱前加一个 2cm 长内径为 4.6mm 的保护柱以防止污染或堵塞主柱, 保护柱的填料与分析柱相同。为避免体系不兼容, 上样前用流动相稀释样品, 离心取上清, 再次测定浓度, 取 $300\mu\text{g}$ 上样。

梯度洗脱溶剂为: A: 100% H_2O -0.1%TFA; B: 100% 乙腈-0.1%TFA。流动相洗脱梯度为: 0% B 10 分钟, 20 分钟内线性上升至 30% B, 80 分钟内升至 90% B, 保持 5 分钟,

5 分钟内降至 0% B。考虑到系统压力的问题将流速设为 0.8 mL/min, 紫外检测波长为 215nm。

当盐峰过去后, 利用馏份收集装置开始连续收集 LC 的馏份, 在 5 分钟至 131 分钟的时间区间内每 3 分钟收集一次, 然后将所有馏份用冻干机冻成粉末, 接着每相邻的 6 个馏份进行再次溶解合并, 总共得到 7 个馏份。这 7 个馏份在进行双向凝胶电泳之前再次用 Bradford 法进行定量。

2.4 蛋白质的双向凝胶电泳分离

采用 IPGphor (Amersham Pharmacia 公司) 电聚焦仪。所有的样品均采用水化泡涨上样方式。样品的体积依 IPG 胶条长度而异, 7 cm 为 120~140 μL , 18 cm 为 340~370 μL , 24 cm 为 450~480 μL , 本实验中鼠肝提取的蛋白样品均采用 7 cm, pH 3~10 的非线性胶条进行等电聚焦, 将 50 μL 样品与 85 μL 水化液 (8M 尿素, 2% CHAPS, 50mM DTT, 1mM PMSF, 两性电解质) 混合加入等电聚焦槽。反相液相色谱预分离的鼠肝蛋白馏份中除了第一个馏份因为蛋白量比较低的缘故所以上样量为 50 μg , 其余馏份的上样量均为 75 μg 。法国人肝提取的蛋白样品均采用 18 cm, pH 4~7 的非线性胶条进行等电聚焦, 每个馏份的上样量均为 120 μg 。取胶条胶面向下覆盖在样品上, 检查胶条下不能有气泡, 也不能使样品浸没胶条上面。然后在胶条上覆盖一层矿物油以防止水化液挥发。设置仪器控温为 20 $^{\circ}\text{C}$, 低压水化 12 h, 其中保持 30 v 电压 6 个小时, 然后 50 v 电压 6 小时。水化结束后, 进行梯度升压, 对于 7 cm, 升压程序为 250 V/1h, 500 V/1 h, 1000 V/1 h, 2000 V/1 h, 4000 V/6 h, 500 V/12 h, 对于 18 cm, 升压程序为 250 V/1h, 500 V/1 h, 1000 V/1 h, 2000 V/1 h, 4000 V/2 h, 6000 V/2 h, 8000 V/5 h。

等电聚焦结束后, 将胶条从聚焦槽内取出, 在两层湿的厚滤纸之间轻压吸去其表面的残留的矿物油以及其他残留杂质或者存放在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以便等待后续的分。平衡管内加入平衡缓冲液 I: 50mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 10 mg/ml DTT。将胶条背面贴管壁置于平衡管内, 摇床上摇动平衡 15min, 取出胶条, 倒出平衡液, 加入平衡缓冲液 II: 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 12.5 mg/ml 碘乙酰胺, 摇床上摇动平衡 15min。

双向凝胶电泳的第二维采用 Bio-Rad 公司的 Mini-Protean (7cm) 或 Protean II (18cm) SDS-PAGE 电泳仪。凝胶为手工灌制的 12% 的非梯度胶, 大小为 7 cm \times 5 cm 或 18 cm \times 16 cm (1 mm 厚), 顶部留 1 cm 左右空间用于放置 IPG 胶条。用镊子夹住胶条一端倾斜插入放入制胶的玻璃板内, 使其贴紧凝胶上端面, 加满已加热 ($\sim 75^{\circ}\text{C}$) 融化的琼脂糖封胶

溶液 (25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 192 mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS, 0.5% 琼脂糖, 痕量溴酚蓝)。注意此过程尽量不要引入气泡。等封胶溶液凝固后, 将胶板安装至电泳仪上, 打开电泳仪, 调节电流, 每块胶约10 mA, 以恒电流方式开始电泳。待电泳前沿 (溴酚蓝) 移动至分离胶时, 调节电流到每块胶20 mA, 继续电泳。当前沿达到胶的底端, 调节电流到0, 关闭电泳仪总开关。取下玻板, 用塑料片小心撬开两玻板, 以去离子水不断冲洗胶面, 至胶与玻板分离。

电泳后的7cm的凝胶用考马斯亮蓝R-250 染色法进行染色5小时或过夜, 然后用脱色液 (10%乙醇+10%乙酸) 脱色直至背景完全清晰为止。18cm的凝胶采用快速银染的方法进行染色: 50%乙醇-5%乙酸固定20 min; 50%甲醇水溶液洗10 min, 再水洗10 min; 用0.02%的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 敏化1~2 min; 水洗2次, 1 min/次; 浸入预冷的0.1% AgNO_3 中, 4℃放置30 min; 水洗3次, 1 min/次; 加入显影液 (40 μL 甲醛/100 ml 2% Na_2CO_3 溶液), 显影至蛋白点清晰可见; 倒出显影液, 用5%乙酸停止显色, 并将凝胶保存在其中。凝胶的扫描使用ImageScanner 扫描仪 (Amersham Pharmacia 公司), 图像分析软件为ImageMaster2D version 3.0.1 (Amersham Pharmacia)。

2.5 胶上酶解

对于鼠肝蛋白样品, 因为只进行实验路线的可行性验证和相应的条件实验并不进行大规模的全蛋白的鉴定, 所以只对小部分蛋白点进行了鉴定, 采用了手工切胶和酶解的方式。把蛋白质点切下, 移入96孔板内, 对于考马斯亮蓝染色的胶的酶解, 采用如下步骤: 1, 移去96孔板内的液体; 2, 加入100 μL 脱色液 (50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液/50%乙腈) 脱色15 min, 弃上清液, 重复两次, 至凝胶变为无色透明; 3, 加入100 μL 100%乙腈使胶粒脱水10 min, 移去乙腈, 放入37℃烘箱中10 min以确保干胶; 4, 在干燥的凝胶颗粒中加入3 μL 胰蛋白酶液, 酶液用25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液配制, 浓度为12.5 ng/ μL , 于4℃放置30 min 使胶粒完全泡胀, 取出后于37℃恒温酶解3 h 或着过夜; 5, 酶解完毕, 每孔加入60 μL 提取液 (0.1%TFA/50%乙腈), 放置30 min, 将孔内溶液转移到另一个96孔板, 重复两次, 将提取液合并。提取液在 N_2 流保护下, 40℃浓缩至干。

对于快速银染的胶的酶解, 除了脱色方法不同外, 其余步骤相同, 快速银染的胶的脱色液由15 mmol/L铁氰化钾与50 mmol/L硫代硫酸钠溶液按照体积比1: 1混合而成, 加入脱色液脱色15 min, 弃上清液, 重复两次, 然后加入100 μL 水放置15min洗涤, 重复两次, 直至凝胶胶粒由黄色变为无色透明。接下来的干胶、酶解、肽段提取、吹干备用的步骤与考马斯亮蓝染色的胶的处理方法相同。另外, 由于法国人肝蛋白样品需要进行全蛋白的鉴定, 为了降低工作量和劳动强度, 所以采用了半自动胶上酶解的方式, 使用Ettan 切

胶仪 (Amersham Pharmacia) 将某些蛋白质点切割下来, 置96孔板中。使用Ettan自动酶解仪 (Amersham Pharmacia)进行胶上酶解, 酶解过程程序设计如上描述的5个步骤, 考马斯亮蓝染色的胶与快速银染的胶的酶解差别就在脱色步骤上, 分别采用不同的脱色液。

2.6 质谱鉴定

将干燥的肽段重新溶解于0.8 μ l 5 mg/mL CHCA 溶液 (溶剂: 0.1% TFA/50%乙腈/0.3 mg/mL柠檬酸铵) 中, 并将其全部点样到MALDI 靶板上。使用4700串联飞行时间质谱仪进行质谱分析 (美国应用生物系统公司, Applied Biosystem)。采用MALDI离子源, 飞行时间分析器, 由4700 ExplorerTM软件控制。激光采用337nm, 200 Hz。采用正离子反射模式(Reflector Positive Acquisition/processing Method)。质谱加速电压为20kV, 串联质谱加速电压为8kV。质量范围设置为800-3200Da。选择每个PMF谱中前6个强度最大的且信噪比大于35的肽段作串联谱。

用 GPS 软件 (version 1.0, Applied Biosystems, USA), Mascot (version 1.6, <http://www.matrixscience.com>, Matrix Science, London, UK) 搜索引擎。检索数据库: NCBI; 检索种属: 鼠(rattus) (鼠肝样品), 人(human[homo sapien]) (人肝样品), 可变修饰选为 C 端的脲甲基化(Carbamidomethy(C))和甲硫氨酸的氧化(Oxidation (M))。肽质量误差范围设置: ± 0.3 Da; 串联质谱质量误差范围设置为: ± 0.4 Da。将马肌红蛋白配成溶液, 热变性之后, 加入胰蛋白酶 (trypsin:蛋白质=1:35, 质量比) 进行酶解, 所酶解的肽段对仪器进行质量校正, 仪器校准之后方可进行蛋白鉴定。

3 结果与讨论

3.1 反相高效液相色谱预分离实验、条件优化及重现性考察

图 3-1 给出了整个实验方案的流程图, 3-1 (B) 是传统的组织蛋白的分析路线, 与此相对照的 3-1 (A) 是本工作的具体实验路线。首先, 我们对 RPLC 的洗脱梯度进行了优化。图 3-2 (A) 给出了使用一步线性梯度时的色谱图, 具体洗脱梯度是: 0%B 相 10 min, 90 min 内线性上升至 90% B, 然后 2 min 内降至 0%B。从此图可以看出, 大多数蛋白聚集在一起, 一起被洗脱下来形成比较集中的一个大包峰。而与此形成鲜明对照的是图 3-2 (B), 色谱图 3-2 (A) 采用的是经过优化的多步线性梯度, 具体的洗脱梯度在本章中的 2.3 节有详细的介绍。众所周知, 肝脏蛋白是非常复杂的蛋白质混合物其分布不均匀。根据我们的经验, 大多数蛋白集中在乙腈浓度 30%到 50%这一区间被洗脱下来, 因此为了提高分辨率就需要适当的延长这一区间的洗脱时间, 相应地其它区间的洗脱时间可以适当缩短以便节省总的分析所用时间。从图 3-2 (A) 与 (B) 这两个色谱峰可以明显看出

多步线性梯度优于一步线性梯度。因此，在本文中，所有的复杂蛋白样品的色谱洗脱梯度均采用多步线性梯度。

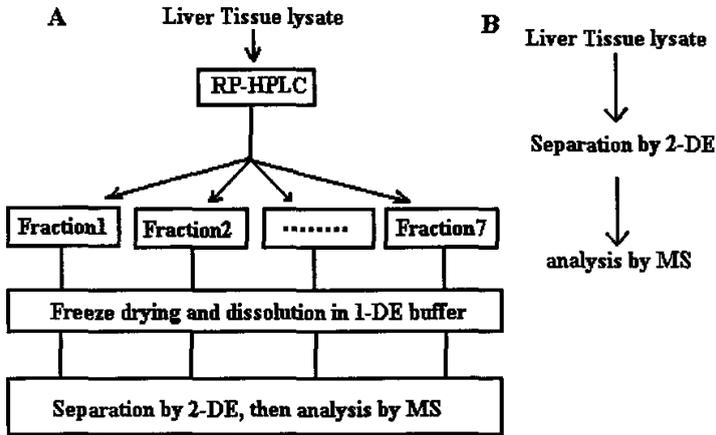
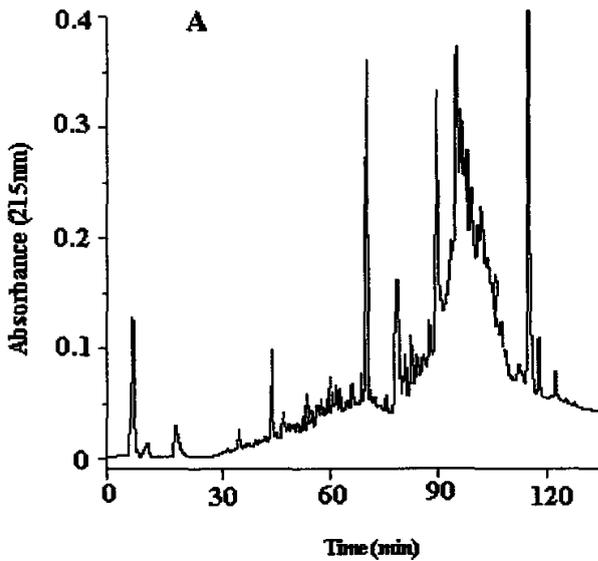


图 3-1 实验流程图 (A) 预分离的流程图 (B) 传统的路线



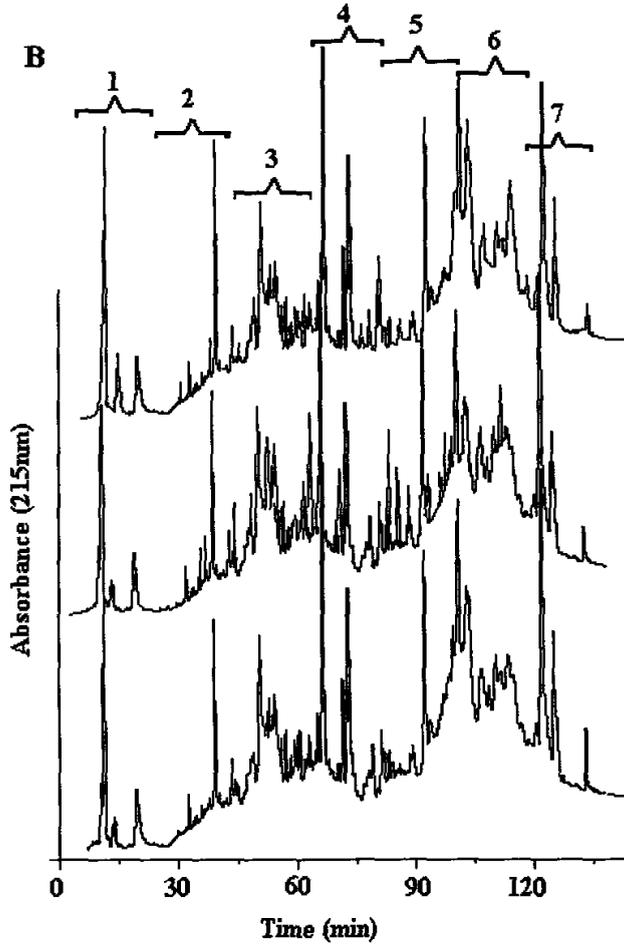


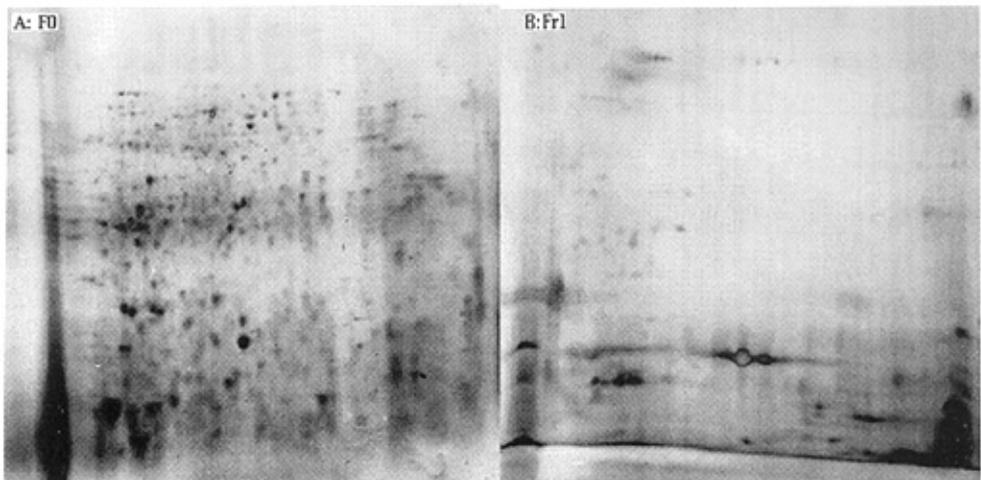
图 3-2 鼠肝蛋白的 RPLC 分离图 (A) 一步线性梯度的 RPLC 分离图; (B) 多步线性梯度的 RPLC 分离图; 色谱条件见实验部分。

蛋白预分离的重现性是至关重要的, 为此我们以同一鼠肝蛋白样品为研究对象, 在相同的实验条件下做了 3 次连续实验, 图 3-2 (A) 给出了这三次洗脱的色谱图, 从图上色谱峰的峰形和保留时间我们可以明显看出 RPLC 分离肝脏蛋白样品是相当重现的。有了良好的重现性, 我们就可以对同一样品进行多次平行分离, 对相同的馏份进行合并, 这样就可以克服一次上样量有限的局限性, 从而增大了后续分离的上样量, 尤其对那些中低丰度蛋白, 经过多次合并富集之后极大的增加了达到被检测的数量级的可能性。另外, 良好的重现性也为定量地比较洗脱馏份中地蛋白表达水平提供了可能和基础。在本实验中, RPLC 每次的上样量是 300 ug, 平行三次实验, 相应地馏份被合并, 进一步经过

冷冻干燥浓缩成粉末。

实验中选择 TFA 作为流动相地添加剂主要是因为 TFA 在蛋白质的分离中能提高色谱峰的峰形、提高回收率而且它具有高的挥发性容易除去等优点[20]。选择 RPLC 作为第一维对样品进行预分离是因为 RPLC 能够起到对样品进行预处理即纯化的作用。在进行双向凝胶电泳之前，RPLC 有效地除去了样品中可能的污染物，包括可能影响等电聚焦的各种盐类小分子等，因此可以免去再次除盐的步骤，简化了实验操作。另外 RPLC 对蛋白具有较好的分辨能力，这一点正如图 3-2 (A) 所示，同时在梯度洗脱时能承受较大的上样量。

在本工作中，我们的目的是针对肝脏蛋白样品评价 RPLC 作为预分离手段是否可行，并且进一步验证预分离中富集效应的存在，而不是进行全蛋白鉴定，因此，实验中相邻的馏份进行合并，最后合成 7 个馏份进行后续地双向凝胶电泳实验，从而牺牲了第一维中的分辨率。当然，如果具体实验需要可以提高收集的馏份数量以便保留高的分辨率和峰容量。同样的原因，对于后续的双向凝胶上显色的蛋白点我们并没有全部进行切胶、酶解和鉴定，而是有针对性地选择了部分点进行鉴定来说明问题。



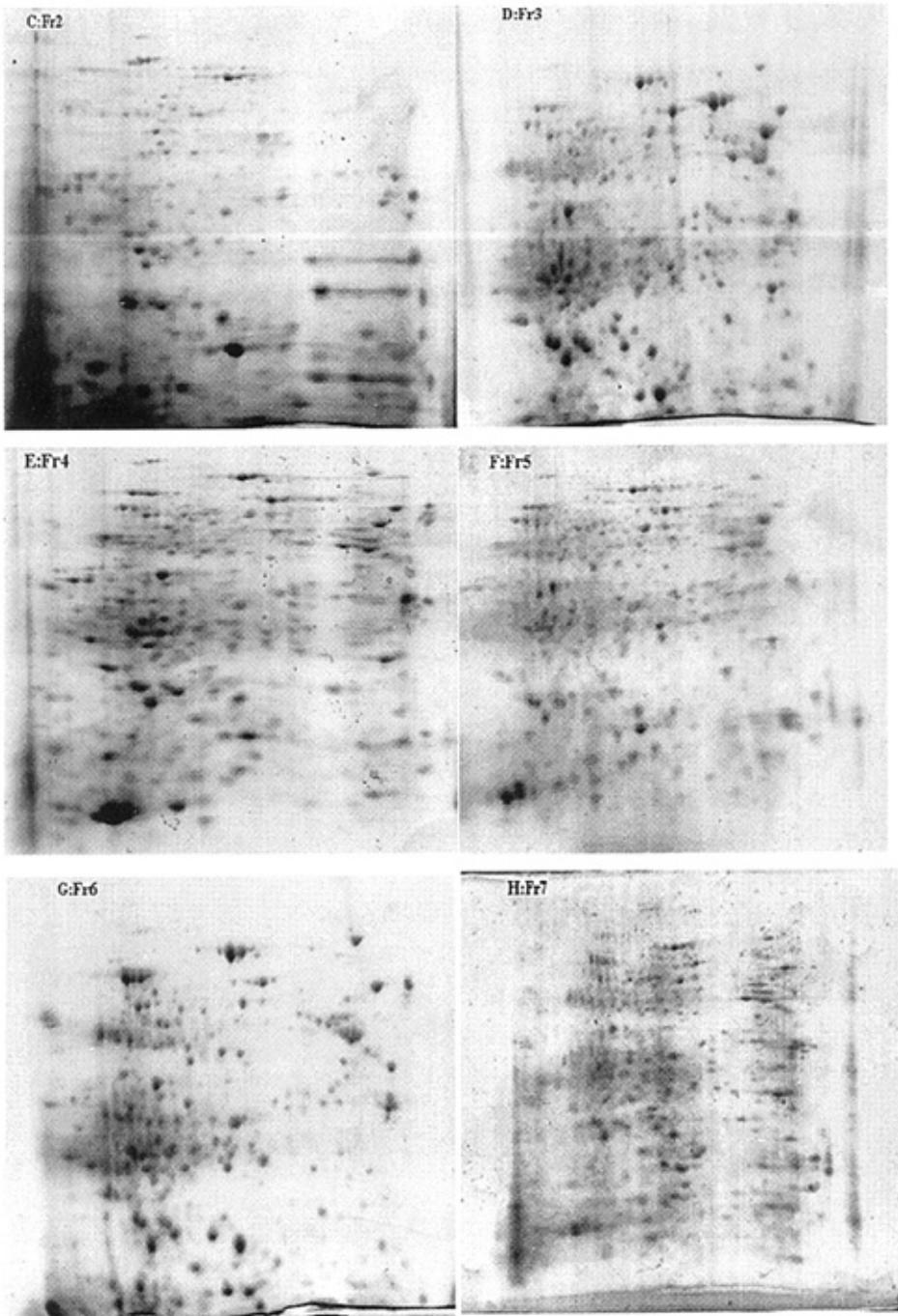


图 3-3 鼠肝蛋白的双向凝胶的电泳图，考马斯亮蓝染色。(A) 75 μg 全蛋白的双向凝胶

的电泳图 (B-H) 经过 RPLC 预分离之后所得馏份的双向凝胶的电泳图, B 的上样量为 50 μg , C-H 的上样量分别为 75 μg 。

表 3-1 双向凝胶电泳图 3-2 (A-H) 上显色的蛋白质点的统计 (蛋白质点的数量由 ImageMaster 5.0 分析软件计算统计)

Gel	Spot number
A(F0)	1260
B(F1)	380
C(F2)	700
D(F3)	1100
E(F4)	1050
F(F5)	900
G(F6)	1000
H(F7)	800

3.2 双向凝胶电泳分离

RPLC 预分离所得的 7 个馏份分别进行双向凝胶电泳分离, 所得谱图如图 3-3 (B-H) 所示, 未经过预分离的鼠肝全蛋白样品的双向凝胶电泳分离图如图 3-3 (A) 所示。从图 3-3 A 与 B-H 的比较可以看出, 在图 3-3 (B-H) 显色的很多蛋白点是图 3-3 (A) 上观察不到的, 这说明 RPLC 预分离起到了富集的作用, 同时, 预分离后的馏份采用相对较低灵敏度的考马斯亮蓝染色而不是较高灵敏度的银染色也说明了 RPLC 预分离起到了富集的作用, 正是富集作用的存在使那些原来观察不到的中低丰度的蛋白能够富集到被染色观察的量级。

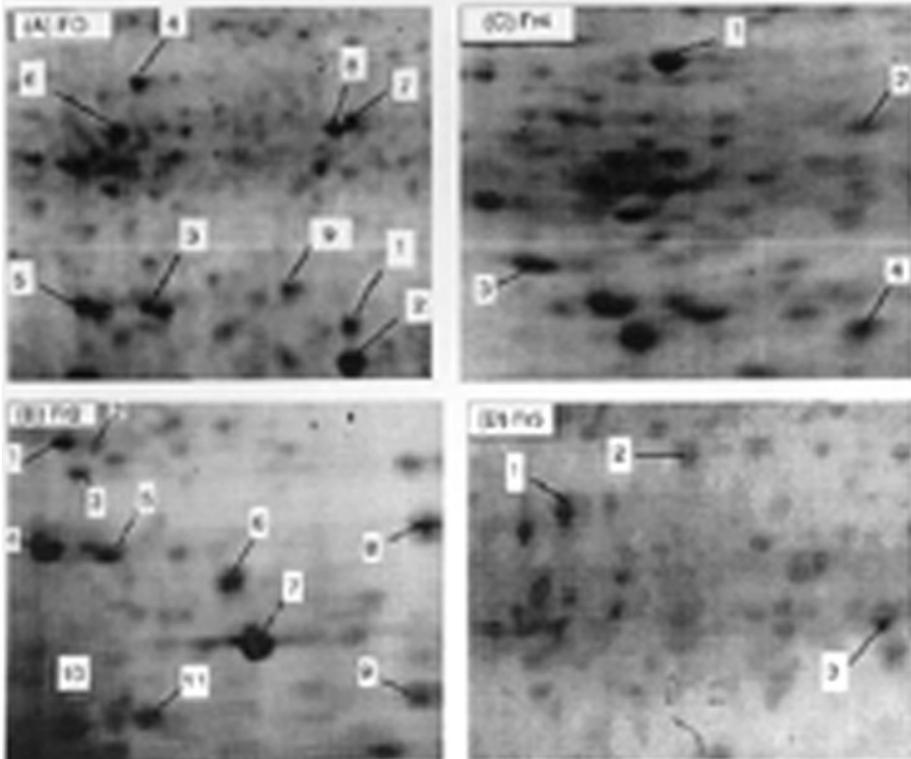


图 3-4 标记的蛋白被 MALDI-TOF-TOF 鉴定，鉴定结果列于表 3-2 中

另外，使用计算机辅助计算对图 3-2A 与 B-H 上的蛋白质点进行了统计，统计结果列于表 1 中。从表 1 中，不难发现图 3-2 B-H 上的蛋白质点的总数几乎是图 3-2A 上蛋白质点的 5 倍，也就是说，经过预分离后能够观察检测的蛋白质点的数量提高了近 5 倍。众所周知，任何凝胶对样品的负载量都有一定的范围，超过了最大负载量就会导致分辨率的丢失，在本实验中，图 3-2A 的上样量仅为 RPLC 上样量的 25%，不难推测，如果使用 RPLC 同样的上样量，那么染色后的凝胶将被高丰度蛋白点所占据，严重干扰其它蛋白的显色。然而，采用 RPLC 预分离之后，根据疏水作用力的不同将蛋白质先进行粗分，对分组后的蛋白分别通过冷冻干燥浓缩之后再行双向凝胶电泳，进而可以增大每个组份中的蛋白的上样量。因此，预分离的手段也是一个对不同蛋白质的富集的方法，这样既可以避免一次上样量过大损失分辨率的问题，又可以提高不同蛋白质的上样量，尤其是被高丰度蛋白掩盖的中低丰度蛋白经过富集之后被显色鉴定的几率明显提高。

表 3-2 鉴定的蛋白列表

spot	Protein ID	Accession NO.	Mr	pI
0-1, 4-4	ATP synthase subunit d	gi 9506411	18751.6	6.17
0-2, 2-7	Cu-Zn superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	gi 203658	15699.7	5.88
0-3, 2-4	carboamyl-phosphate synthetase 1	gi 8393186	164475.5	6.33
0-4, 5-1	arginase 1; arginase 1, liver	gi 8392920	34977.3	6.76
0-5	glutathione peroxidase	gi 2654236	22252.3	7.7
0-6	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 8393418	35805.2	8.14
0-7	Protein disulfide isomerase A3 precursor	gi 1352384	56587.7	5.88
0-8	aldehyde dehydrogenase	gi 16073616	48239.5	6.06
0-9	fatty acid binding protein 1, liver	gi 6978825	14263.3	7.79
2-1	similar to aldolase B	gi 27714457	39500.2	8.66
2-2	Aldolase B, fructose-biphosphate	gi 27476059	39593.2	8.66
2-3	aldo-keto reductase family 1, member D1	gi 20302063	37354.1	6.18
2-5	glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9)	gi 66313	22258.4	7.66
2-6	subunit d of mitochondrial H-ATP synthase	gi 220904	18769.6	5.78
2-8	phosphatidylethanolamine binding protein	gi 8393910	20788.4	5.48
2-9	cyclophilin D	gi 27721223	20542.2	5
2-10	Thiosulfate sulfurtransferase (Rhodanese)	gi 135826	33155.7	7.84
2-11	Glutathione S-Transferase (Isoenzyme 3-3)	gi 442967	25766.1	8.42
4-1	Crystal Structure Of The H141c Arginase	gi 13786702	34925.2	6.72
4-2	protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1) ER60	gi 91897	56587.6	6.38
4-3	Crystal Structure Of A Mammalian 2-Cys	gi 6435547	22079.3	8.34
5-2	myosin heavy chain, polypeptide 6	gi 8393804	223369.6	5.59
5-3	ornithine carbamoyltransferase	gi 6981312	39860.8	9.12

为了验证色谱预分离对蛋白的富集效应, 在所得的凝胶上根据二维坐标选取了一些典

型的蛋白点进行切胶、酶解和鉴定。总共有 32 个点被选取做 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定，得到 27 个可信蛋白。在这 27 个蛋白中，不同的蛋白是 23 个，分别列在表 3-2 中。初提的蛋白样品标记为 F0，来自反相色谱的馏份用其馏份号作为标记前缀。下面用几个具体的蛋白例子说明反相色谱预分离在简化蛋白的复杂性和富集方面的作用。ATP 合成酶亚体(ATP synthase subunit d)(4 号馏份中的 No. 4)，铜-锌超氧化物歧化酶(Cu-Zn superoxide dismutase) (2 号馏份中的 No.7)，碳戊基磷酸盐合成酶(carboamyl-phosphate synthetase) (2 号馏份中的 No.4)，精氨酸酶(arginase) (5 号馏份中的 No.1) 在经过预分离之后的凝胶上都是比较强的蛋白点，然而这些蛋白点在相应地未经预分离的样品的凝胶上明显比较弱。色谱的富集效应也体现在提高质谱信号上，图 3-5 给出了一个代表性的质谱图，来自 ATP 合成酶亚体的肽谱图和串极图，比较图 3-5(A)、(B)与(C)、(D)可以看出，部分蛋白经过预分离富集之后的可以被检测的肽段个数、质谱信号强度以及信噪比都相应提高，为得到更可信的蛋白提供了机会，这点对低丰度蛋白的鉴定将更为重要。

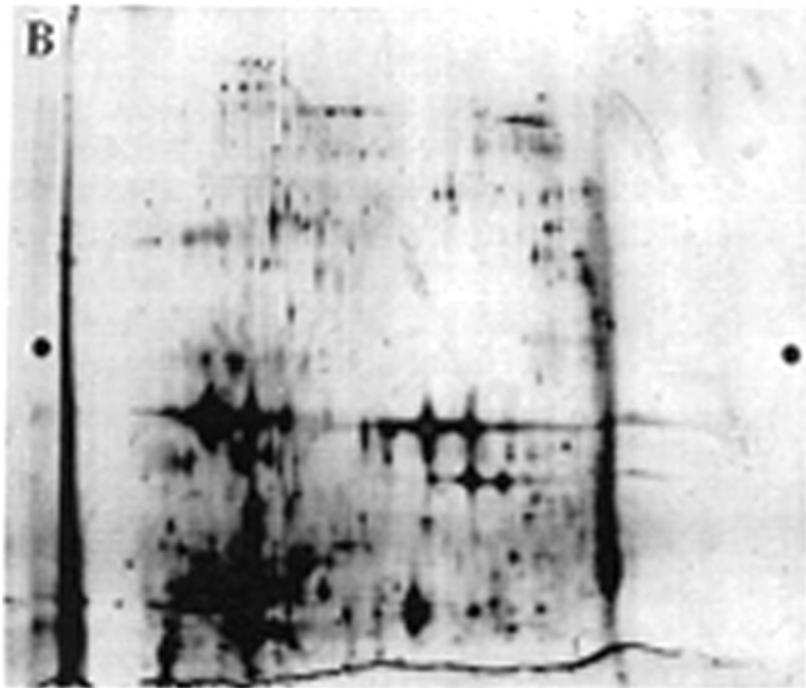
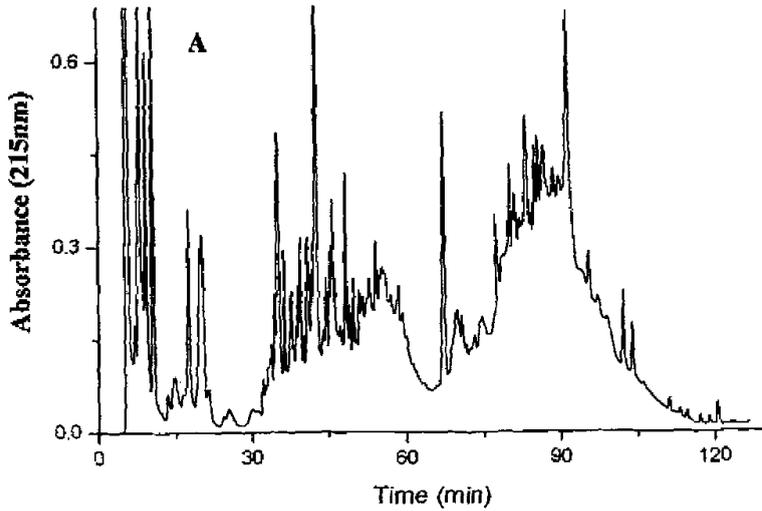
3.3 癌症相关蛋白质举例

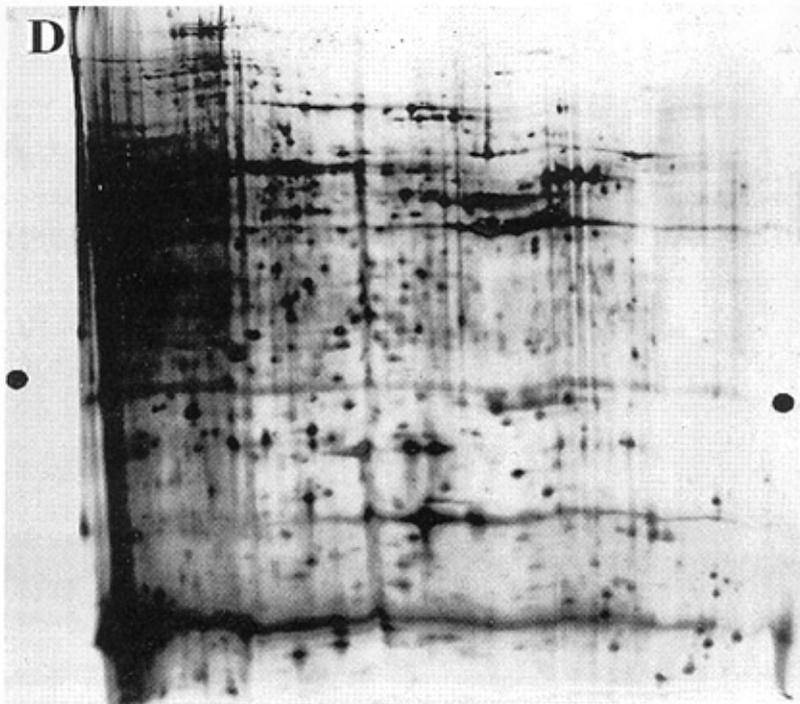
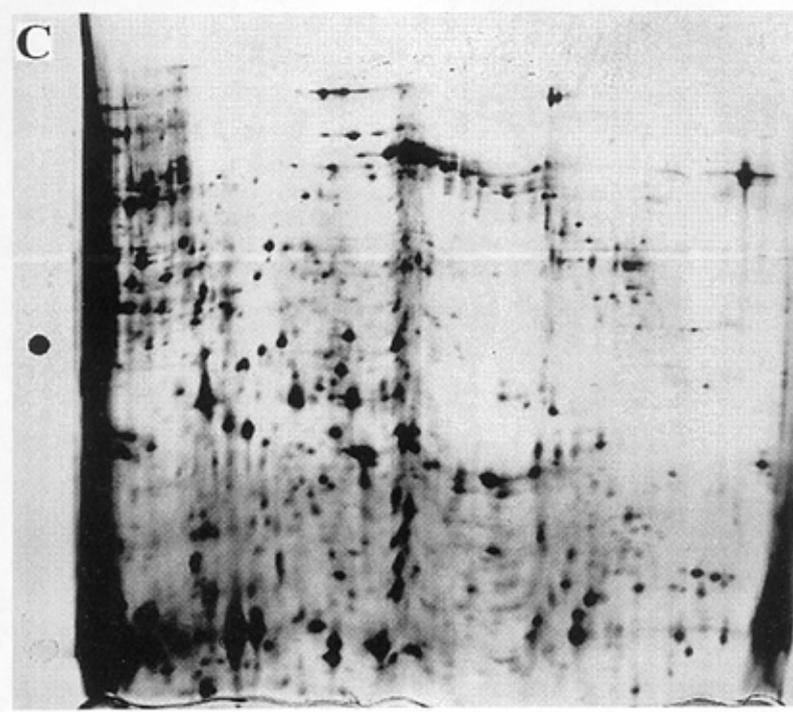
众所周知，人类大约三万种基因调控了大约几十万种蛋白质，这些蛋白质是生物信号和功能的直接执行者，因此，生物体的状态最终反映在蛋白质组学而不是基因组学。目前肝癌是世界范围内最致病的疾病之一，在中国因为肝癌造成的死亡率在恶性肿瘤中已经上升到第二位。因此研究与疾病相关的蛋白是研究肝癌致病机理的关键。分析表明，一些蛋白直接与病理机制相关，可以作为诊断疾病发生和发展的信号。含巯基的肝胱过氧化物酶(lutathione peroxidase)可以作为肝脏肿瘤发生的临床参数[21,22]，ATP 合成酶亚体(ATP synthase subunit d)被发现是与细胞压力、细胞信号和细胞骨架功能相关的蛋白经常被用来辅助做为肺部腺瘤的诊断的潜在生物标记物之一[23,24]，磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)[25]，铜-锌超氧化物歧化酶(Cu-Zn superoxide dismutase)[26]等与细胞剧烈繁殖相关也可以作为肝癌诊断的标记之一。寻找研究这些疾病的生物标记物有利于在疾病发生早期作出判断，以便及早进行相应的治疗，因此具有重大的理论和实际意义。为那些生物学家和医务专家提供强大的样品分离能力，帮助他们找到有价值的生物标记物是我们作技术的人员的义务所在和工作意义所在，本工作也正是围绕这一主题思想开展工作，开创性的提出并建立了多种分离鉴定体系，希望为肝脏蛋白质组学的技术发展作出贡献。

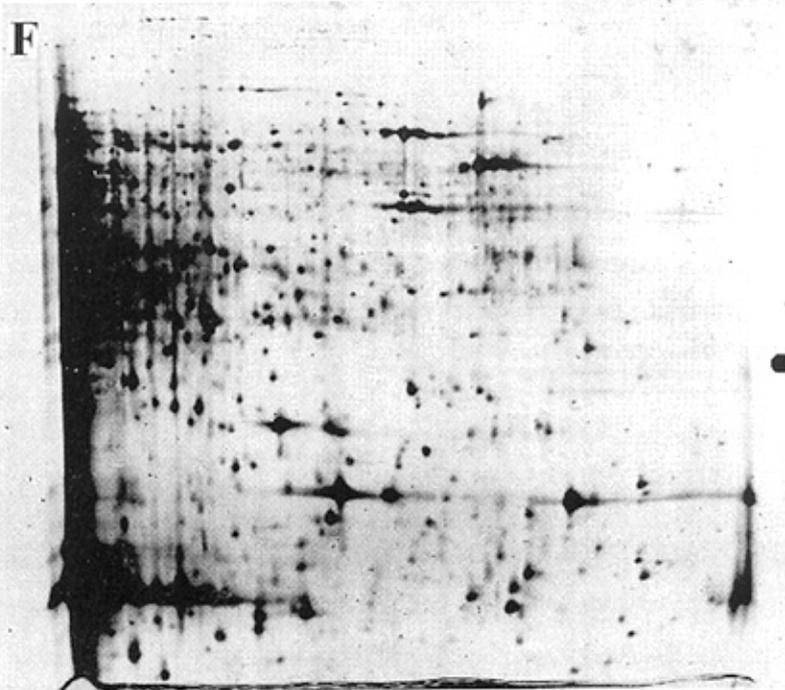
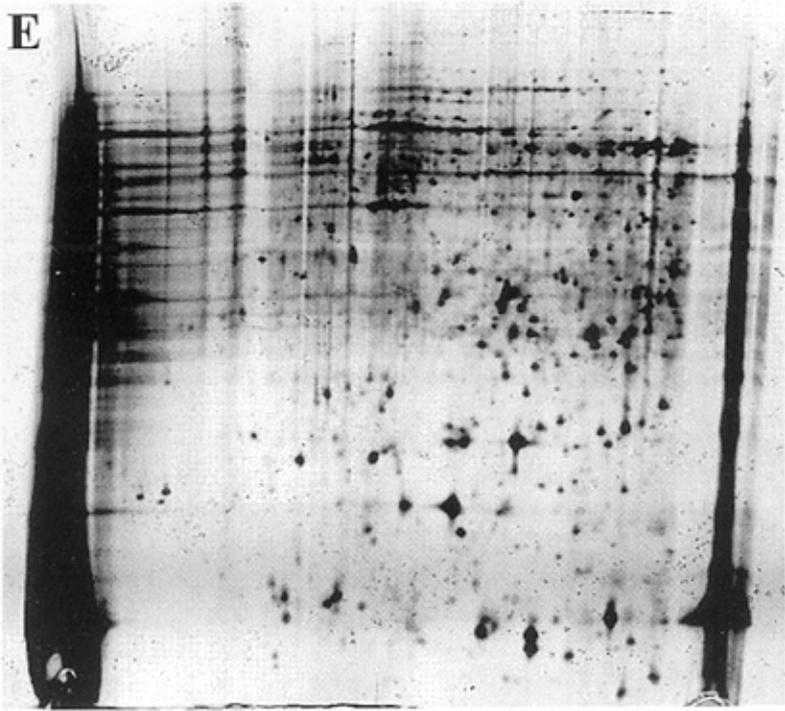
3.4 人肝蛋白的 RPLC/2-DE 分离结果

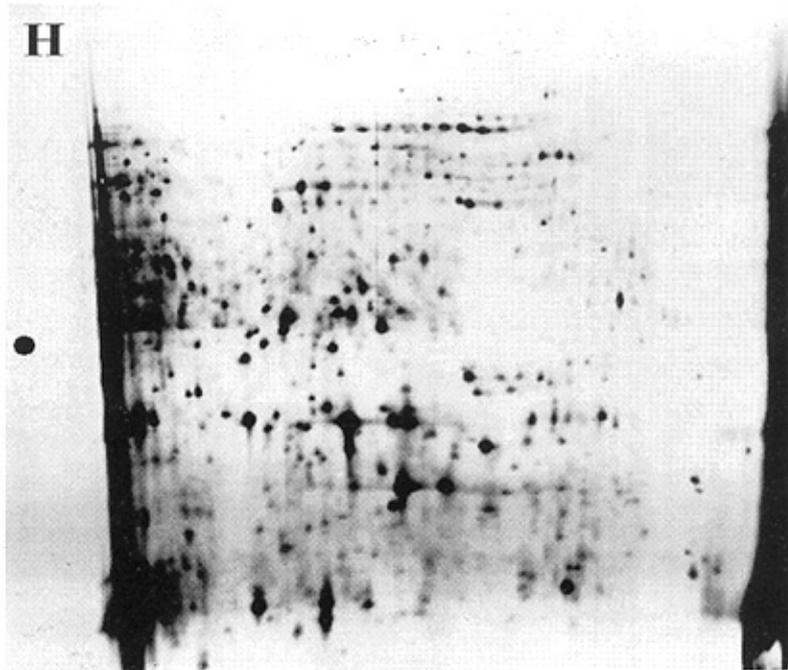
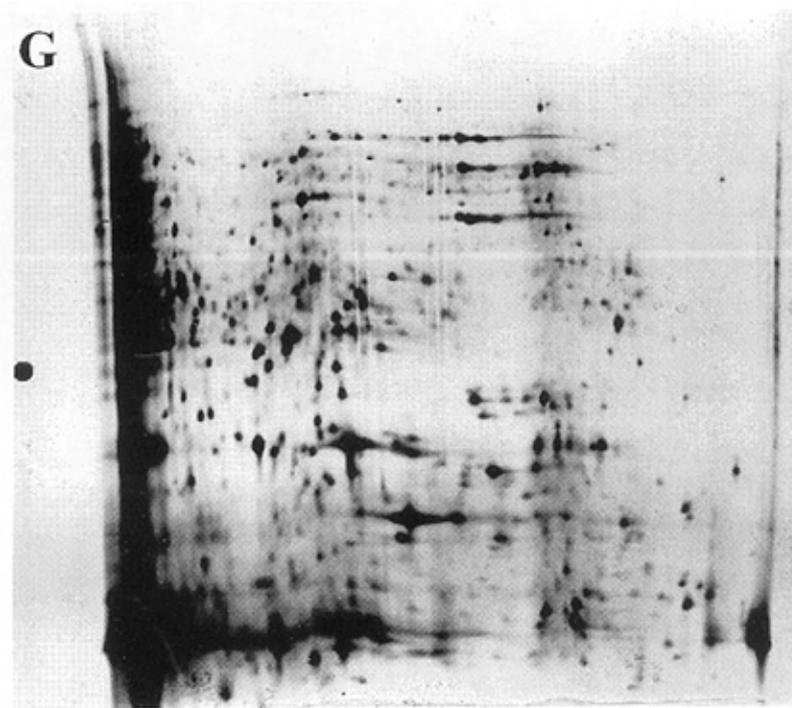
本系统对来自法国的人肝蛋白样品进行了分离，实验结果如图所示。图 3-5 (A)是一维 RPLC 的分离图，图 3-5 (B-I) 是经过 RPLC 分离后所得馏份的双向凝胶电泳的分离

图。从图上我们可以看到，尽管相邻的 2-DE 的凝胶图之间有重叠的蛋白质点，但是总体而言 RPLC/2-DE 的三维分离得到较好的分离效果。对其中两千多个中低丰度蛋白斑点进行切胶、酶解及质谱鉴定，结果得到 812 中不同的蛋白，数据已经上报汇总到中国肝脏蛋白质组学项目中。









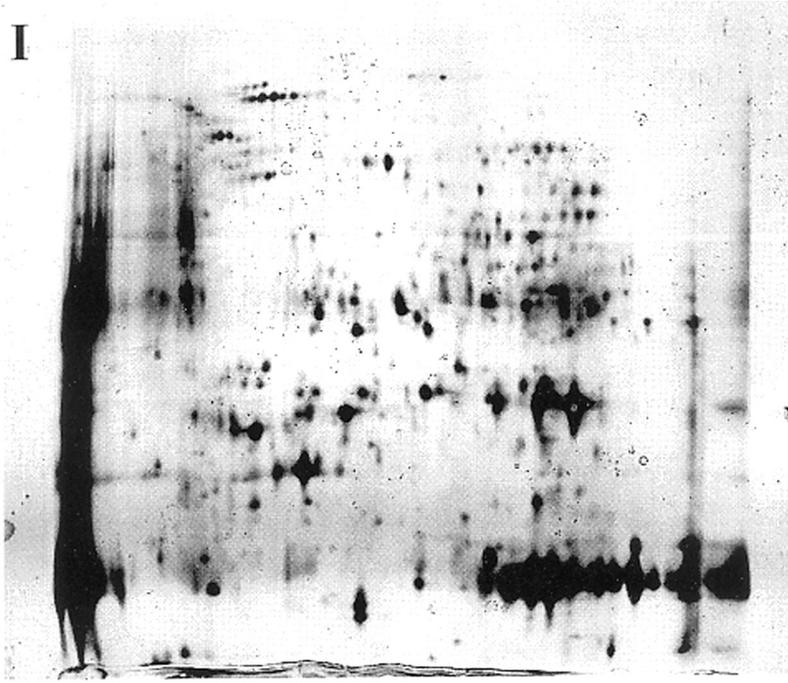


图 3-5(A) 法国人肝蛋白的 RPLC 分离色谱图, (B-I) 经 RPLC 分馏所得馏份的双向凝胶的电泳图。(实验条件详见实验部分)

4 结论

我们首先以鼠肝为研究对象对 RPLC/2-DE 分离系统的可行性进行了验证, 并对液相色谱条件进行了优化和重复性验证, 实验结果表明, 经过色谱预分离之后, 每个馏份中的蛋白质种类相比未分离之前得到简化和富集, 尤其是良好的色谱重现性允许对同一样品进行重复收集, 可以进一步提高样品的上样量。我们又将优化后的方法运用到法国人肝样品的分离鉴定中, 得到较好的实验效果。可以认为这样液相色谱和二维凝胶电泳偶合的分离体系经过进一步的完善和发展, 将成为蛋白质组学研究中的一个有力的技术平台, 能够进行高效和高通量的蛋白质组学研究, 是对现有的研究方法和技术路线的有效地补充。

参考文献

- [1] Anderson, N. G., Matheson, A., Anderson, N. L. Back to the future: the human protein index (HPI) and the agenda for post-proteomic biology, *Proteomics*, 2001, 1, 3-12.
- [2] Hanash S. M., Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: Current status, *Electrophoresis*, 20002, 1, 1202-1209.
- [3] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 1996, 68, 850-858.
- [4] Anja Möller, Michael Soldan, Uwe Völker, Edmund Maser, Two-dimensional gel electrophoresis: a powerful method to elucidate cellular responses to toxic compounds, *Toxicology*, 2001, 160: 129-138.
- [5] Adamczyk, M., Gebler, J. C., Selective analysis of phosphopeptides within a protein mixture by chemical modification, reversible biotinylation and mass spectrometry, *J. Rapid Commun. Mass Spectrom* 2001, 15, 1481-1488.
- [6] Greenough, C., Jenkins, R.E., Kitteringham, N. R., Pirmohamed, M., Park, B. K., Pennington, S. R A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma, *Proteomics* 2004, 4, 3107-3111.
- [7] R. Pieper, C.L. Gatlin, A.J. Makusky, P.S., et al, Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: An innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome, *Proteomics*, 2003, 3, 422-432.
- [8] Ficarro S.B., McClelland M.L., Stukenberg P.T., Burke D.J., Ross M.M., Shabanowitz J., Hunt D.F, White F.M., Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*, *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20, 301-305.
- [9] Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 994-999.
- [10] Badock, V., Steinhusen, U., Bommert, K., Otto, A., *Prefractionation of protein samples for proteome analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography*, *Electrophoresis*, 2001, 22, 2856-2864.
- [11] Bergh, G. V., Clerens, S., Vandesande, F., Arckens, L., *Reversed-phase high-performance liquid chromatography prefractionation prior to two-dimensional difference gel*

- electrophoresis and mass spectrometry identifies new differentially expressed proteins between striate cortex of kitten and adult cat, *Electrophoresis*, 2003, 24, 1471-1481.
- [12] Butt, A., Davison, M. D., Smith, G. J., Young, J. A., Gaskell, S. J., Oliver, S. G., Beynon, R. J., Chromatographic separations as a prelude to two-dimensional electrophoresis in proteomics analysis, *Proteomics*, 2001, 1, 42-53.
- [13] Bier, M., Recycling isoelectric focusing and isotachopheresis, *Electrophoresis* 1998, 19, 1057-1063.
- [14] Hannig, K., New aspects in preparative and analytical continuous free-flow cell electrophoresis, *Electrophoresis* 1982, 3, 235-243.
- [15] Margolis J., Corthals G., Horvath Z.S., Preparative reflux electrophoresis, *Electrophoresis* 1995, 16, 98-100.
- [16] Horvath, Z. S., Gooley, A. A., Wrigley, C. W., Margolis, J., Williams, K.L. Preparative affinity membrane electrophoresis, *Electrophoresis* 1996, 17, 224-226.
- [17] P.G. Righetti, A. Castagna, B. Herbert, F. Reymond, J.S. Rossier, Prefractionation techniques in proteome analysis, *Proteomics*, 2003, 3, 1397-1407.
- [18] H.R. Mahler, E.H. Cordes, *Biological Chemistry*, Harper & Row, New York 1971, pp. 441-461.
- [19] Qu, Y., Moons, L., Vandesande, F. Determination of serotonin, catecholamins and their metabolites by direct injection of supernatants from chicken brain tissue homogenate using liquid chromatography with electrochemical detection . *J. Chromatogr. B.* 1997, 704, 351-358.
- [20] G. Winkler, P. Wolschann, P. Briza, F.X. Heinz, C.J. Kunz, *J. Chromatogr.*, 1985, 347: 83.
- [21] Yeldandi A., Rao M., Reddy J., Mutation Research-fund Amental and Molecular Mechanisms of Muta Genesis, 2000, 448: 159-166.
- [22] G. Kirby, C. Wolf, G. Neal, D. Judahdj, C. Henderson, P. Srivatanakulp, C. Wild, *Carcinogenesis*, 1993, 14: 2613-2619.
- [23] J. Yu, S. Yun, J. Lim, H. Kim, K. Kim, Proteome analysis of rat pancreatic acinar cells: Implication for cerulein-induced acute pancreatitis, *Proteomics*, 2003, 3: 2446-2453.
- [24] G. Chen, T. Gharib, C. Huang, D. Thomas, K. Shedden, J. Taylor, S. Kardia, D. Misek, T. Giordano, M. Iannettoni, M. Orringer, S. Hanash, D. Beer, Proteomic analysis of lung

- adenocarcinoma: Identification of a highly expressed set of proteins in tumors, *Clinical Cancer Research*, 2002, 8: 2298-2305.
- [25] I. Corbin, Y. Gong, M. Zhang, G. Minuk, Proliferative and nutritional dependent regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in the rat liver, *Cell Proliferation*, 2002, 35: 173-182.
- [26] D. Goldenberg, S. Ayesh, T. Schneider, O. Pappo, O. Jurim, A. Eid, Y. Fellig, T. Dadon, I. Ariel, N. de Groot, A. Hochberg, E. Galun, *Mol. Carcinogen*, 2002 33,:113-117.

第四章 多维液相色谱法去除高丰度蛋白质的策略研究

复杂样品体系指组分种类多、含量差别大、已知信息量少的混合物。从组织和细胞中直接提取的蛋白质，以人类细胞为例，种类高达上万种，而高丰度蛋白质与低丰度蛋白质在浓度范围上相差六个数量级甚至更高，样品中低丰度蛋白质含量太少，低于仪器的最低检测限，造成低丰度蛋白质难以检测，增大上样量是解决该问题的最直接的方法。但是增大上样量的同时，样品中高丰度蛋白质的信号就会压制低丰度蛋白质的信号，损失了仪器的分辨能力，实验证明如果不将高丰度蛋白质在检测之前除掉，中低丰度蛋白质在其信号压制下很难检测。因此从复杂样品中将高丰度蛋白质去除是检测低丰度蛋白质的一个前提条件。

一个理想的去除高丰度蛋白质的研究技术平台应当具有三方面的功能：(1) 最大限度的除去高丰度蛋白。(2) 富集检测中低丰度蛋白质。(3) 具有通用性、低成本和快速灵活的特点。目前蛋白组通常所采用的免疫亲和技术因其可作用的对象范围窄而且成本高等局限性远不能满足以上需要，只有靠新的技术和方法的突破才能解决。本工作以上述原则为指导思想，提出并建立了基于多维色谱分离的方法去除高丰度蛋白质的新的技术平台。在本章第一节使用鼠肝中的可溶性的蛋白质样品对系统的可行性进行了验证和初步优化等实验性工作，在第二节将此策略进一步运用到人肝蛋白质中高丰度蛋白质的除去工作中。

第一节 鼠肝蛋白质组中去除高丰度蛋白的方法研究

1 引言

肝癌是世界上最致命的疾病之一，在中国肝癌的致死率在恶性肿瘤中已经上升至第二位，因此研究肝脏蛋白质组学有着重大的理论和实际意义。目前，因为高丰度蛋白质压制中低丰度蛋白质的检测，进而严重影响了生物标记物的寻找和研究，所以高丰度蛋白质的去除问题已经成为构成蛋白质组学研究中的瓶颈之一。据估计，一个细胞中至少含有一万到三万个不同的蛋白质[1]，这些蛋白质在大小、相对丰度、酸碱度和疏水性方面差异很大，仅在相对丰度上，高丰度蛋白质与低丰度蛋白质相差六个数量级甚至更高，在如此大的差别情况下要提高对中低丰度蛋白质检测的灵敏度和检测的数量，增大上样量是最直接的方法。

传统的双向凝胶电泳引进使用以来已经有四分之一世纪之久,现在仍然在蛋白质组学的分离技术中被广泛的使用着[2-4]。然而,这项技术最大的缺点就是在高丰度蛋白质存在下不能很好的检测中低丰度蛋白质,即使提高了样品的上样量,因为高的上样量会损失分辨率,出现高丰度蛋白质掩盖中低丰度蛋白质点的现象。随着技术的发展与进步,以鸟枪法(shot-gun technology)为代表的多维液相色谱技术[7-12]成为蛋白质组学中兴新的补充技术。shot-gun 技术的中心思想就是先将蛋白质酶解成肽段,然后使用二维的液相色谱进行分离,分离之后使用质谱进行鉴定。这种方法在大规模鉴定蛋白质方面发挥了重大作用,然而这用方法的样品处理结果是将原本就很复杂的蛋白质酶解成更为复杂的肽段,而且这种复杂性相比蛋白质的复杂性几乎成指数增长肽段的数量超过几百万,因此分离如此庞大数量的肽段对现有多维色谱的分离能力是一个很大的挑战。在现有技术的分离能力没有突破性提高的前提下,研究人员在简化样品复杂程度及富集中低丰度蛋白方面做了很多工作,目前多采用预分馏的方法[1, 13-21]。

常用的几种典型的预分馏方法有以下几种,首先是经典的亚细胞器的提取[13, 14],该法是基于不同有机体在大小和密度上的差异采用密度梯度离心或差速离心的方法使之分离,但是利用提取亚细胞器对蛋白质组进行预分组的方法往往需要的样品量较大,从而限制了该方法的广泛使用。制备级等电聚焦也是常用的一种预分离手段[15-18],这种方法很大程度上依赖于仪器设备,高的上样量是这种方法的主要优点,这种方法所使用的大量两性电解质就会干扰下游的分离和分析,给后续分离和分析工作造成困难。最近有报道使用反相液相色谱[1, 19, 41]和离子交换色谱[20]用于蛋白质预分离。然而,仅靠简单的预分离是不够的,实验发现只有当高丰度蛋白质从样品中除去之后,中低丰度蛋白质的上样量才能从根本上得到提高。

亲和色谱利用特异性反应来有针对性地选择分离除去某一种或多种高丰度或特定的蛋白质,而使分析体系得以简化[22-26]。Carrie Greenough 研究组报道从人的血浆中特异性的除去 98%白蛋白和 80%的免疫球蛋白[23],也有报道利用一种多组成的免疫亲和色谱一次可以去除十几种蛋白[27],安捷伦技术曾经介绍了一种多目标的免疫亲和柱子,从人的血清中可以一次性去除六种高丰度蛋白质。然而,这种亲和技术只适用于包含少数集中高丰度蛋白质的样品,例如血清或血浆,在血清中六种高丰度蛋白质就占了蛋白质总量的 85%-90%。然而,在很多复杂的生物样品中,高丰度蛋白质并不如此集中,往往含有十几或几十甚至更多种高丰度蛋白质,例如肝脏组织蛋白质。在这种情况下,亲和色谱就不用了。因此寻找一种去除高丰度蛋白质的比较通用的分析方法成为蛋白质研究中一个新的热点。

在本工作中,我们首次提出了一个全新的策略,使用二维液相色谱系统在完整蛋白质水平上去除高丰度蛋白质。常规的强阳离子交换色谱和反相液相色谱联用构成二维去除平台,在本章第一节我们使用鼠肝中的可溶性的蛋白质样品对系统的可行性进行了验证和初步优化,对系统构建和高丰度蛋白质的去除效率进行了评估,在此基础上进一步提出一个简单、快速和高通量的平台。实验说明本策略对蛋白没有歧视效应,可以广泛应用。

2 实验部分

2.1 试剂与材料

乙腈(ACN, 高效液相色谱纯, Merck Co), 三氟乙酸(TFA, 高效液相色谱纯, Tedia comp.any. inc.), 苯甲磺酰氟(PMSF)(上海华瞬生物工程有限公司), α -氰基-4-羟基-肉桂酸(CHCA, Sigma Chemical Co), 测序级胰蛋白酶为Roche公司产品; 碳酸氢铵、氯化铵等为国产分析纯试剂, 熔融石英毛细管(250/75 μm i.d., 380 μm o.d.) 购自河北永年锐泽色谱器件有限公司(河北, 中国)。Zorbax 300SB C8液相色谱填料(5 μm , 300 \AA , Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)和Zorbax BP-SIL 硅胶(7 μm , 80 \AA , DuPont, Wilmington, DE, USA)分别用来装填液相分析柱和制备毛细管柱塞。实验中所用水为Milli-Q 去离子水。

健康大鼠肝组织样品由复旦大学动物实验房提供。所有样品都在-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存以防止蛋白质降解。

2.2 样品制备

鼠肝组织被切成小块,用冰生理盐水(0.9% NaCl 溶液)清洗三次以除去体液及血液中一些可能的污染物。接着称重,以1:8(g:mL)的比例加入提取液(1 mmol/L PMSF, 0.2 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, cocktail试剂(Roche, Basel, Switzerland)和0.1% (v/v) TFA),然后置于玻璃匀浆器内进行手动匀浆,直至组织完全破碎,整个匀浆过程在冰浴中进行。匀浆液混旋30分钟,在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 18000 g离心15 min,取上清液即为提取蛋白,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,蛋白质提取液用由Qu等改进的Bradford法定量[27]。

2.3 SCX 与 RPLC 的二维系统

常规柱分离的色谱系统由LC-2010分离装置和FRC-10A馏份收集装置组成(Shimadzu Corp., Japan)。LC-2010系统是一套高集成的色谱分离系统,它由一个低压四元梯度泵,自动进样器的最大进样量为两毫升,在线脱气系统,恒温系统和一个双波长的紫外可见检测器组成。系统自带的Class-VP工作站负责记录和处理数据,FRC-10A馏份收集系统

由 SCL-10A 控制器进行控制 (Shimadzu Corp., Japan)。本章使用的常规二维分离系统是采用离线的方式对样品进行两维切换。

SCX 色谱柱采用 C18 的反相柱 (Agilent Technologies, USA), 内径是 4.6mm, 25cm 长, 采用 $5\mu\text{m}$, 300\AA , Zorbax 填料, 分析柱前加一个 1.2cm 长内径为 4.6mm 的保护柱以防止污染或堵塞主柱, 保护柱的填料与分析柱相同。

SCX 梯度洗脱溶剂为: A: 0.1%TFA-100% H_2O ; B: 1M 氯化铵-10% 乙腈-0.1%TFA。流动相洗脱梯度为: 0% B 15 分钟, 70 分钟内线性上升至 50% B, 25 分钟内从 50% 上升至 100% B, 保持 10 分钟, 1 分钟内降至 0% B。考虑到系统压力的问题将流速设为 0.8 mL/min, 紫外检测波长为 215nm。馏份采用自动收集, 从 3 分钟到 127 分钟每 2 分钟收集为一个馏份, 一共收集了 62 个馏份。

从第一维 SCX 上收集的馏份依次再经过第二维反相色谱柱分离, RPLC 色谱柱采用 C18 的反相柱 (大连依利特分析仪器有限公司, 中国), 内径是 4.6mm, 25cm 长, 采用 $5\mu\text{m}$, 300\AA , Hypersil 填料, 分析柱前加一个 2cm 长内径为 4.6mm 的保护柱以防止污染或堵塞主柱, 保护柱的填料与分析柱相同。

RPLC 梯度洗脱溶剂为: C: 98% H_2O -2% 乙腈-0.1%TFA; D: 98% 乙腈-2% H_2O -0.1%TFA。流动相洗脱梯度为: 0% D 5 分钟, 55 分钟内线性上升至 30% D, 10 分钟内由 30% 线性上升至 45% D, 10 分钟内由 45% 线性升至 80% D, 保持 5 分钟, 2 分钟内降至 0% D。流速设为 0.8 mL/min, 紫外检测波长为 215nm。

紫外光谱信号作为判断依据来决定这一维的馏份收集的节点。信号强度 0.1 吸收单位 (AU) 作为标准, 这个数值要依据具体实验中样品量的高低相应的信号强弱不同来决定, 本实验中选用 0.1 AU 作为标准, 本实验中根据色谱峰的峰面积比可以推算出信号强度为 0.1 AU 的蛋白质色谱峰的对应的蛋白质的量约为 $5.0\mu\text{g}$, 相应的在组织中的浓度约为 $25\mu\text{g/g}$ 。接下来我们就把信号强度大于 0.1 AU 所对应的蛋白质色谱峰称之为高丰度蛋白质, 反之称之为中低丰度蛋白质。有了这个标准之后, 我们就对洗脱液进行区别收集, 包含高丰度蛋白质的洗脱液分别收集, 其它的部分合并到一起, 如此以来经过 RPLC 之后的馏份体积从 0.4 毫升到 40 毫升不等, 接着将这些馏份使用冷冻干燥机将其冻干成粉末。

测序级的修饰酶溶解在 20mM 的碳酸氢铵溶液中, 按照酶和蛋白质的质量比 1:50 往每个馏份中加入酶溶液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 保温, 酶解过夜。接下来如法炮制, 来自第一维 SCX 的 62 个馏份都用相同的方法进行处理, 即首先经过 RPLC 分离, 分别收集高丰度蛋白质和中低丰度蛋白质, 冻干成粉末, 酶解, 待用。最后, 得到 79 个不同的高丰度蛋白质馏份

和 62 个不同含有中低丰度蛋白质的馏份。

分别取 1.0 微升的不同高丰度蛋白质的酶解产物依次点在标准的 4700 质谱仪所配的靶板 (the 192 well-AB-type, Applied Biosystems) 的不同的靶点上, 等液滴干了之后, 在液滴上分别再滴加一层 0.3 微升的基质溶液, 基质 CHCA 提前溶解在 50% ACN-0.1% TFA 中最后浓度为 5 mg/mL, 等液滴再次干了之后就可以使用 4700 蛋白质组学分析仪 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) 进行鉴定分析。由中低丰度酶解的肽段将需要进一步使用毛细管反相液相色谱 (cRPLC) 进一步分离。

对照实验除了下面一点其余的处理方法与上面描述的相同, 不同的地方就是经过第一维收集到的 62 个馏份进一步使用 RPLC 分离之后, 无需针对色谱峰的信号强弱区别对待, 而是将每个馏份中盐峰之后的所有的洗脱液合并到一起, 然后冻干成粉末, 得到 62 个脱盐后的馏份, 接下来酶解, 等待 cRPLC 的进一步分离和后续的质谱鉴定。

2.4 cRPLC-自动点样系统

2.4.1 色谱柱的填装

柱上塞子用 sol-gel 法制作 [28], 采用高压匀浆法将填料填充入内径为 250 μm , 长为 25cm 的毛细管内。将 5 μm Zorbax 300SB 反相硅胶填料溶于甲醇中, 在超声波中振荡, 使填料颗粒高度分散成匀浆。以甲醇为顶替剂, 将此匀浆液在高压泵的驱动下灌入毛细管柱内。保持 300-400 bar 的装填压力, 同时毛细管柱放在超声中振荡半小时, 保证固定相颗粒均匀紧密装填于柱内。然后逐渐降低压力, 匀速降至常压后, 卸下柱子。

2.4.2 cRPLC 分离肽段

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配有四元梯度泵和化学工作站 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) 用来形成洗脱梯度。cRPLC 梯度洗脱溶剂为: C: 98% H_2O -2% 乙腈-0.1% TFA; D: 98% 乙腈-2% H_2O -0.1% TFA。流动相洗脱梯度为: 0% D 5 分钟, 60 分钟内线性上升至 50% D, 0.1 分钟内由 50% 线性上升至 100% D, 保持 5 分钟, 1 分钟内降至 0% D。流速设为 1.7 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。洗脱液直接通过一个微型的 T 型不锈钢三通装置 (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA) 与 MALDI 的基质溶液相混合, 然后点在 MALDI 标准靶板上, 点样采用隔行点的方式, 便于质谱解析, 整个点样过程使用全自动的点样系统 (Probot (LC Packings, Dionex) micro spotting system) 完成。点样频率为 25 秒/点, 六个校准点手动点在靶板上, 液滴干燥后待用。

2.5 质谱和数据检索

点样完毕, 沉积在靶上的样品完全干燥后送入 MALDI-TOF-TOF-MS (Applied Biosystem, USA)。该质谱仪采用 MALDI 离子源, 串联飞行时间分析器, 由 4700 ExplorerTM 软件控制。激光波长 337nm, 频率 200 Hz。采用正离子反射模式。质谱加速电压为 20kV, 串联质谱加速电压为 8kV。质量扫描范围设置为 800-3500Da, 在 1800Da 附近分辨率最高。选择每个 MS 谱中前 6 个强度最大的且信噪比大于 40 的肽段作串联谱。Trypsin 酶解的马肌红蛋白的肽段用来校准仪器, 仪器校准之后再对其它样品进行检测。

用 GPS 软件 (version 1.0, Applied Biosystems, USA), Mascot (version 1.6, <http://www.matrixscience.com>, Matrix Science, London, UK) 搜索引擎, NCBI 数据库中的 rattus 亚库搜索, 可变修饰选为 C 端的脲甲基化(Carbamidomethy(C))和甲硫氨酸的氧化(Oxidation (M))。肽质量误差范围设置: $\pm 0.3\text{Da}$; 串联质谱质量误差范围设置: $\pm 0.4\text{Da}$, 允许一个漏切位点。使用 GPS 软件对数据进行自动搜索和分析, 最好离子得分大于 29 分同时满足置信度大于 95 的蛋白认为是可信的。

3 结果与讨论

3.1 SCX/RPLC 系统建立及蛋白质水平上去除高丰度蛋白

众所周知, 在蛋白质组学研究中高丰度蛋白质总是压制中低丰度蛋白质的信号, 而且只要高丰度蛋白质存在, 其自身的信号或酶解之后的肽段的信号就会相应的压制中低丰度蛋白质或其相应肽段的信号。面对这一技术挑战, 我们提出使用多维液相色谱的方法在酶解过程之前以完整蛋白质的状态将高丰度蛋白质除去, 避免酶解成更复杂的肽段之后造成分离上的困难。

强阳离子交换色谱通常因为其潜在的高的上样量而经常用作多维液相分离中的第二维, 反相色谱以其正交的分离机理、高分辨率和脱盐去杂质的能力或特性而经常被用作多维液相色谱的第二维, 与质谱联用时一般作为与质谱相连的一维。本实验就是将这两种分离模式联合使用, 达到对完整蛋白质的充分的分离。

目前, 强阳离子交换色谱的盐洗脱方式一般分为两种, 一种是台阶式, 另一种是连续梯度式。台阶式的盐洗脱方式对泵和系统的腐蚀性很低, 有利于保护仪器不被腐蚀, 而连续梯度式因为其充分的交换时间所以能够得到很好的分辨率有利于样品的分离, 本论选用的是后者连续梯度式, 同时注意实验结束时的对仪器和柱子中存在盐的除去工作, 做好维护。另外, 可用于盐洗脱的盐种类很多, 常用的醋酸铵因为其在所用波长下吸收很强, 压制住了蛋白质的色谱峰而放弃使用, 本文选用背景吸收少洗脱能力强的氯化铵作为洗脱的盐溶液。同时我们也考虑了馏份收集的时间节点问题, 选择 2 分钟的时间间

隔主要是依据色谱峰的峰宽来定，一般比较好的分辨率的色谱峰的峰宽大约为 1 分钟，2 分钟的时间间隔收集馏份显然损失了分辨率但相应的节省了分离时间，如果实验需要，可以采取缩短馏份收集时间保持分辨率增加收集的馏份数量，但同时后一维的分离所需时间相应延长。

图 4-1A 给出了一个详细的实验过程及方案的流程图。简而言之，组织经过裂解之后提取蛋白质样品，样品经过 SCX 分离之后，得到 62 个馏份，将这 62 个馏份进一步使用 RPLC 分离，然后根据实验部分所述的对高丰度蛋白质的定义，一共找到 79 个紫外信号高于 0.1 的蛋白质的色谱峰，经过质谱鉴定之后，得到 77 个可信蛋白这些蛋白质分别分布在 24 个馏份中，接着这 77 个高丰度蛋白质色谱峰被去除。其余的中低丰度蛋白质的洗脱液进行合并。鉴定的这些高丰度蛋白质列在表 4-1 中。

图 4-2 给出了整个实验流程包括分离和高丰度蛋白质的去除的一个例子。图 4-2(a)给出了鼠肝可溶性蛋白质的 SCX 的紫外分离的色谱图，放大部分展示了馏份收集的时间节点，图 4-2(b)展示的是来自 SCX 的第三个馏份经过 RPLC 分离的色谱图，图上箭头所标记的色谱峰作为高丰度蛋白质的峰分别除去、酶解和质谱鉴定。图 4-2(c)展示了 SCX-RPLC 两维分离的三维立体图，其中部分高丰度蛋白质的色谱峰被标记其上。将高丰度蛋白质去除之后所得的 SCX-RPLC 两维分离的三维立体图如图 4-2 (d)所示。比较色谱图(c)与(d)上可以看出，没有了高丰度蛋白质色谱峰的压制，中低丰度的蛋白质就得到很好的分辨，如果不事先将高丰度蛋白质去除，那么势必造成这些中低丰度蛋白质很难检测。图 4-2(e)是每 8 分钟收集一次 SCX 的洗脱液作为一个馏份，共得到 15 个馏份，经过冷冻干燥浓缩之后，经过 RPLC 分离的色谱图，从图上可以看出由于前一维收集的时间间隔过长，造成后一维 RPLC 的分辨率比较低，蛋白质分不开，对确定高丰度蛋白质的位置及除去造成困难，因此，在后续的实验工作中，我们选择 2 分钟的时间间隔，共得到 62 个组分，这样就很大程度上减轻了第二维蛋白质分离的压力，得到较高的分辨率。

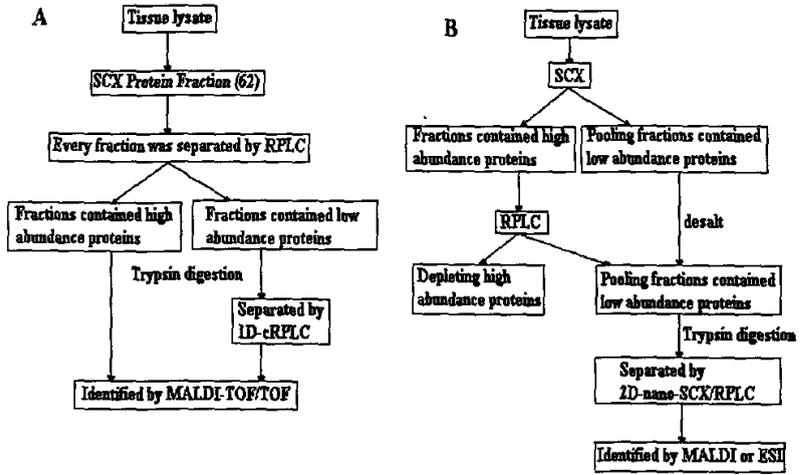
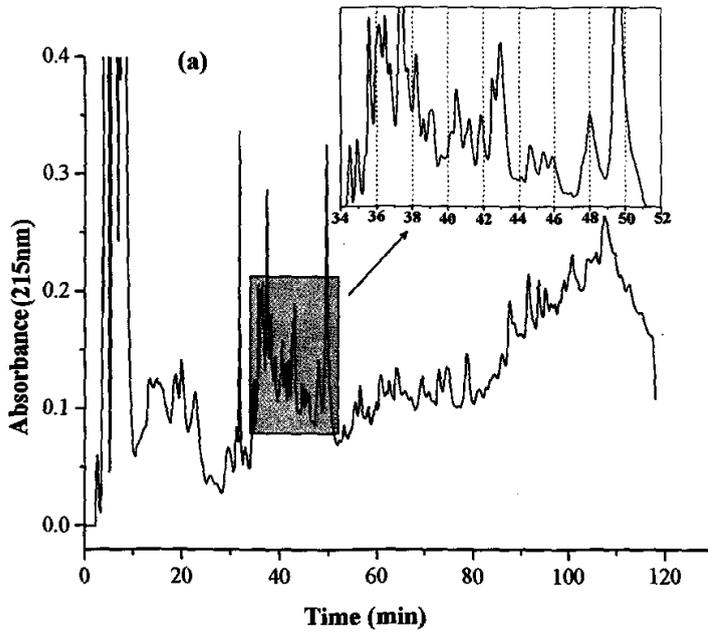
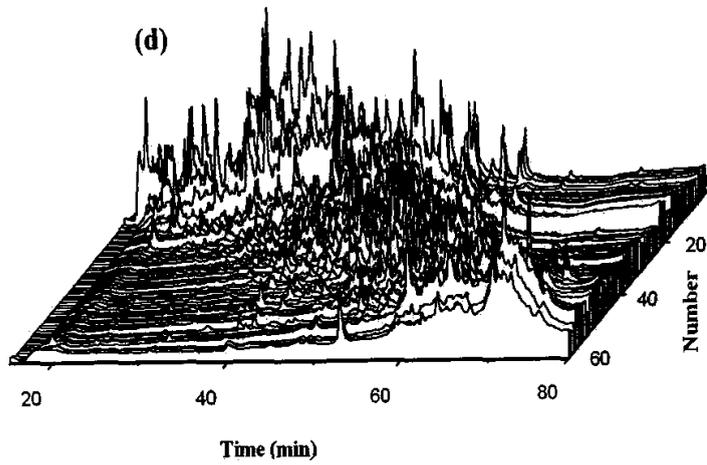
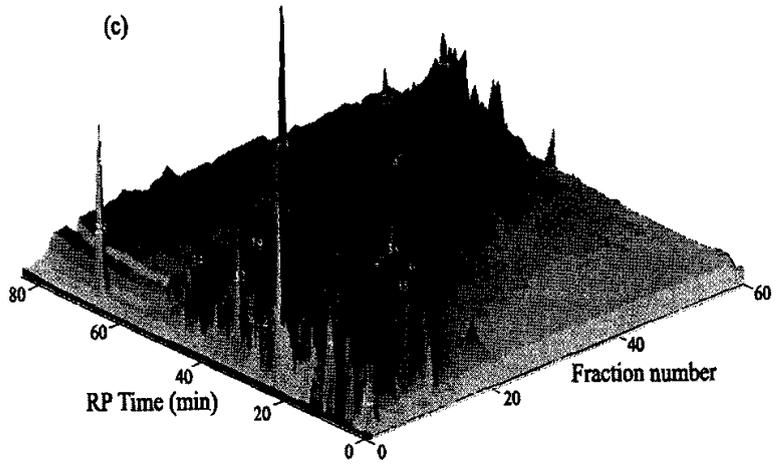
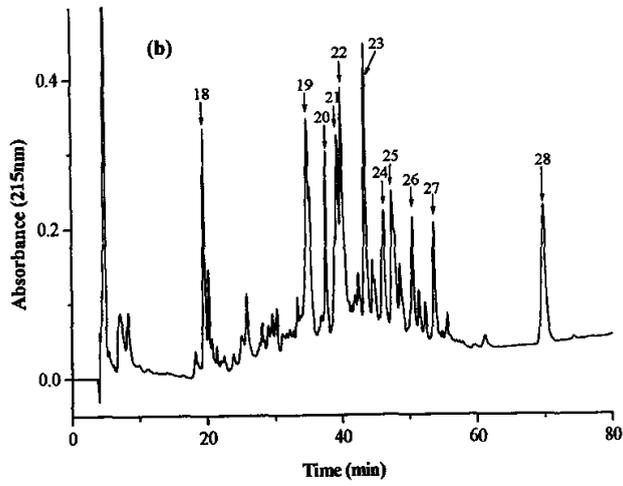


图 4-1 实验过程的流程图(A)本工作使用的用于方法建立条件优化和对照的流程图。(B)设想的下一步实验中的流程图。





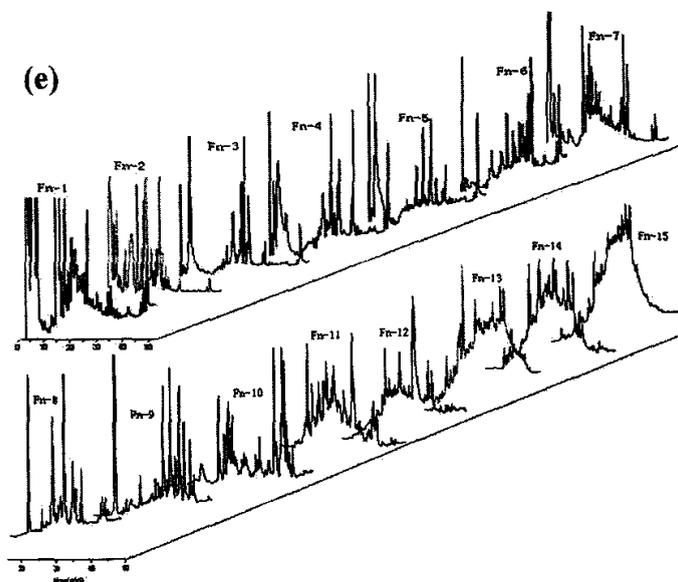


图 4-2(a)鼠肝组织可溶性蛋白质的一维 SCX 分离的色谱图。馏份收集从 3 min 到 127 min, 每 2 min 收集一份, 放大部分为馏份收集的部分示意图。(b)显示的是来自 SCX 的第三个馏份经过 RPLC 的分离色谱图。(c) 展示了 SCX-RPLC 两维分离的三维立体图, 62 个 SCX 馏份被 RPLC 进一步分离, 其中部分高丰度蛋白质的色谱峰被标记其上。(d) 去除高丰度蛋白质后所得的 SCX-RPLC 两维分离的三维立体图。(e)鼠肝组织可溶性蛋白质的一维 SCX 分离后, 馏份收集从 3 min 到 124 min, 每 8 min 收集一份, 得到 15 个馏份经过 RPLC 分离的色谱图。详细的实验条件在本章的实验部分。

表 4-1 本系统鉴定的大鼠肝脏组织蛋白样品中的高丰度蛋白质列表。在坐标(F_x , t_R)中, F_x 代表从 SCX 洗脱下来的馏份收集的序号, t_R 代表 F_x 馏份经过 RPLC 分离时的保留时间。 C ($\mu\text{g/g}$)代表高丰度蛋白质在组织中的浓度。

Rank	Coordinates (F_x , t_R)	C ($\mu\text{g/g}$)	Accession Number	Protein Name	MW (Da)	PI
1	(F1, 5.0)	72.65	gi 310177	muscle glycogen phosphorylase	8083.3	10.35
2	(F1, 5.0)	72.90	gi 1399026	serotonin 5-HT _{2c}	33630.5	9.52
3	(F1, 8.5)	40.10	gi 1943485	Structure of The pleckstrin homology domain from phospholipase c delta In complex	15408.8	8.62

复旦大学博士学位论文

4	(F1, 10.5)	56.15	gi 19173796	zinc finger protein HIT-10	84137.2	9.21
5	(F1, 17.5)	30.10	gi 31543764	alpha-spectrin 2; inhibitory protein factor	284420.1	5.19
6	(F1, 18.5)	70.65	gi 17380501	Spectrin alpha chain	284462.3	5.2
7	(F1, 19.5)	72.30	gi 27679730	similar to KOX31-like zinc finger protein	112945.4	8.5
8	(F1, 22.5)	28.90	gi 16758820	regulating synaptic membrane exocytosis 2	175803.8	9.45
9	(F1, 24.2)	40.20	gi 7804749	voltage gated N-type calcium channel alpha1B	11461.8	9.36
10	(F2, 5.0)	50.65	gi 9506903	beta-microseminoprotein	12741.3	8.85
11	(F2, 10.1)	58.40	gi 12718814	huntingtin interacting protein 1 related	120497.1	6.12
12	(F2, 18.5)	90.51	gi 13592137	suppressor of profilin/p41 of actin-related complex 2/3	41572.7	8.46
13	(F2, 22.5)	60.42	gi 1098563	type I hexokinase	2487.3	5.91
14	(F2, 31.7)	86.75	gi 203734	cytokeratin 8 polypeptide	52677.6	5.49
15	(F2, 31.7)	102.5	gi 39986017	cytokeratin 8	53985.3	5.83
16	(F2, 36.0)	54.21	gi 206671	type II cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	45962.9	4.9
17	(F2, 37.0)	56.11	gi 321311	H-2 class II histocompatibility antigen RT1.B-mu beta chain precursor	27380	8.86
18	(F3, 19.5)	56.65	gi 2047333	putative RNA binding protein 1	15117.6	9.04
19	(F3, 34.8)	36.7	gi 11560048	RAD50 homolog	153688.4	6.64
20	(F3, 37.6)	38.75	gi 22138113	CAST1	110549.9	6.62
					9	
21	(F3, 39.2)	25.15	gi 13540714	plectin	533213.5	5.71
22	(F3, 39.8)	25.55	gi 21743784	filamin A interacting protein 1	137667.3	8.25
23	(F3, 43.3)	62.0	gi 112465	UBF transcription factor, short form	84914.75	5.43
24	(F3, 46.2)	26.15	gi 16555340	liprin alpha 3	115970.9	5.39
					9	
25	(F3, 47.4) (F4, 47.4)	26.55	gi 1791243	ORF2 consensus sequence encoding endonuclease and reverse transcriptase	152666.1	9.76

复旦大学博士学位论文

minus RNaseH						
26	(F3, 50.5)	42.83	gi 13928790	chondroitin sulfate proteoglycan 6	138362.3	7.82
27	(F3, 53.6)	38.35	gi 13928946	SMC1 structural maintenance of chromosomes 1-like 1	143116.1	7.51
28	(F3, 69.8)	40.61	gi 6981306	tumor necrosis factor receptor superfamily	46162.2	8.79
29	(F4, 34.3)	42.25	gi 32964821	senescence marker protein 2A	33180.9	7.63
30	(F4, 41.5)	42.64	gi 13928704	myosin heavy chain 10	228824	5.49
31	(F4, 52.1)	40.45	gi 29027428	transmembrane protein AMIGO2	57722.7	8.81
32	(F5, 45.9) (F6, 45.9)	86.93	gi 554464	keratin K6	3105.6	5.55
33	(F5, 52.3)	92.71	gi 12963511	ribosomal protein S19	16075.6	10.41
34	(F7, 52.1) (F8, 52.1)	30.35	gi 130223	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta 1	138257.2	5.86
35	(F12, 23.3)	26.22	gi 29027428	transmembrane protein AMIGO2	57722.7	8.81
36	(F13, 20.2)	28.41	gi 13027414	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,	46677.8	8.17
37	(F13, 22.6)	34.63	gi 16923958	peroxiredoxin 1	22095.3	8.27
38	(F13, 27.7)	25.85	gi 1552374	2-arylpropionyl-CoA epimerase	39797.4	6.09
39	(F14, 20.2)	58.15	gi 7432970	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain VIa-L, cardiac - rat (fragment)	2449.2	6.48
40	(F14, 20.2)	44.65	gi 2443209	c-met/hepatocyte growth factor receptor	15176.5	7.96
41	(F14, 22.4)	25.75	gi 6681273	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	50422.3	9.11
42	(F14, 23.3)	64.05	gi 38304036	Actin, alpha 1, skeletal muscle	42023.8	5.23
43	(F14, 27.7)	30.71	gi 2492741	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (D-bifunctional protein)	79378	8.77
44	(F14, 27.7)	25.90	gi 27673455	similar to mitochondrial ribosomal protein S16	15233.8	9.59
45	(F15, 24.9)	25.50	gi 207619	uricase precursor (E.C. 1.7.3.3)	33254.9	6.78
46	(F15, 27.7)	54.32	gi 423647	protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1) ERp72 precursor	72788.8	4.99

复旦大学博士学位论文

47	(F15, 29.5)	25.15	gi 38382858	Glucose regulated protein	56587.7	5.88
48	(F15, 31.7)	26.0	gi 13540663	betaine-homocysteine methyltransferase	44947.8	8.02
49	(F15, 37.2)	26.21	gi 202549	iodothyronine 5' monodeiodinase	54033.2	4.87
50	(F16, 23.7)	62.55	gi 37748075	Hemoglobin alpha, adult chain 1	15318.8	7.82
51	(F16, 45.1)	58.22	gi 119596	Liver carboxylesterase 10 precursor	62104.9	6.34
52	(F16, 52.8)	72.15	gi 56385	Hsc70-ps1	70884.2	5.43
53	(F17, 26.9)	46.45	gi 7188365	glutathione S-transferase alpha	25971.7	8.98
	(F18, 26.9)					
54	(F17, 32.5)	25.83	gi 6981324	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide; Protein disulfide isomerase	56828.6	4.82
55	(F17, 35.8)	25.41	gi 350611	transaminase, Glu oxaloacetic	44279.3	8.52
56	(F17, 43.7)	27.05	gi 6978483	aminolevulinate, delta-, dehydratase	36008.4	6.32
57	(F17, 48.8)	46.65	gi 38382858	Glucose regulated protein, 58 kDa	56587.7	5.88
58	(F18, 32.9)	66.30	gi 25742763	heat shock 70kD protein 5	72302.4	5.07
59	(F19, 30.9)	70.41	gi 296485	chaperonin 10	10894.9	8.89
60	(F19, 33.0)	58.25	gi 11560024	heat shock protein 60 (liver)	60927.4	5.91
61	(F20, 41.8)	42.6	gi 118543	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial precursor (GDH)	61389.3	8.05
	(F21, 41.8)					
	(F22, 41.8)					
62	(F20, 58.3)	25.8	gi 66507	acetyl-CoA C-acyltransferase (EC 2.3.1.16) precursor	43792.7	8.53
63	(F21, 43.0)	66.55	gi 1226240	cytochrome P450 Cyp7b1	48196	8.39
	(F22, 43.0)					
64	(F33, 47.5)	25.71	gi 9588098	RNA binding protein p42 AUF1	35993.2	8.14
65	(F33, 47.5)	29.75	gi 9588100	RNA binding protein p40 AUF1	32626	8.23
66	(F33, 47.5)	30.3	gi 9588102	RNA binding protein p37 AUF1	30451	8.53
67	(F33, 52.8)	36.35	gi 38373984	ubiquitin	8559.6	6.56
68	(F33, 60.1)	28.85	gi 14269572	heat-responsive protein 12	14280.5	6.21
69	(F34, 52.8)	30.10	gi 2118151	proteasome endopeptidase complex (EC 3.4.25.1)	28308.9	8.8
70	(F34, 56.6)	32.75	gi 48597082	40S ribosomal protein S28	7836.2	10.7
71	(F38, 50.2)	44.82	gi 1083573	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate	133043.6	5.97

72	(F38, 54.3)	30.45	gi 11560030	protein kinase inhibitor p58	57541.2	5.56
73	(F51, 53.0)	35.51	gi 31542604	Rab6 interacting protein 2	108750.8	6.2
74	(F51, 65.9)	36.65	gi 61557085	spectrin beta 2	273416.2	5.5
75	(F51, 70.4)	37.34	gi 6981616	synaptonemal complex protein 1	110926.3	5.56
76	(F56, 64.9)	39.25	gi 27682913	similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha	10837.8	9.75
77	(F56, 68.8) (F57, 68.8)	36.80	gi 19705431	albumin	68674	6.09

在完整蛋白质水平上的二维系统分离的重现性对分离是至关重要的,它决定着能否准确的除去高丰度蛋白质。2D-SCX/RPLC 分离的重现性使用色谱峰的保留时间和峰高的相对标准偏差进行了评价。为此我们用同一种鼠肝提取样品为研究对象,做五次连续实验,对其中 8 个分辨率较高的色谱峰的保留时间和峰高的相对标准偏差进行了计算统计,结果发现保留时间的相对标准偏差小于 1.9%同时峰高的相对标准偏差小于 2.8%。进一步将来自 SCX 的 3 号馏份(图 4-2(b))作为例子相应的进行 5 次 RPLC 分离,然后我们针对图中标记的色谱峰进行统计,发现其保留时间的相对标准偏差小于 4.3%峰高的相对标准偏差小于 8.1%。全自动的进样系统和馏份收集系统以及良好的色谱柱容量和性能为二维系统良好的重现性提供了保障。

定量蛋白组学是近年来非常重要的蛋白组学分支。Coomassie 亮蓝染色是最常用的方法,但它的灵敏度太低,对低拷贝蛋白组分不适用。虽然银染灵敏度较高,但其动态线性范围太窄,也不适合定量蛋白组的分析。目前,不同的稳定同位素标记技术结合生物质谱技术的出现很大程度上提高了蛋白质定量的效率和准确度[26, 38-40]。高效液相色谱技术结合光谱是对蛋白质进行定量的常用方法之一[33-37]。紫外光谱是相对比较灵敏而且相对线性范围比较宽的有效的可用于定量的依据之一。在本节工作中,我们根据紫外光谱中蛋白质色谱峰的峰面积比对高丰度蛋白质的浓度进行了估算,结果列在表 4-1 中。

3.2 cRPLC 分离中低丰度蛋白质的酶解肽段以及高丰度蛋白质去除策略效果的对照比较

高丰度蛋白移走之后,其余含有中低丰度蛋白质的洗脱液合并酶解然后经过 cRPLC 分离,最后质谱鉴定数据搜索分析。cRPLC-MALDI 系统的实验条件也被优化。为了最大限度的减少分辨率的损失,流动相的流速和点样频率都进行了优化,安捷伦微泵的流速设为 $1.7\mu\text{L}/\text{min}$,点样频率为 25 秒/个。基质溶液($5\text{ mg}/\text{mL}$)通过一个不锈钢的三通其内部是一个同轴套管直接与洗脱液混合点在 MALDI 靶板上,传递基质的流速为 $0.6\mu\text{L}/\text{min}$,

这样设置既满足了最少程度的损失分辨率，同时保证液滴大小合适，液滴体积如果太大就可能因为表面张力不够大而容易造成液滴坍塌而混在一起。

为了比较说明我们提出的高丰度蛋白质去除策略的有效性，我们针对这 77 个高丰度蛋白质所在的 24 个馏份进行了对照研究，具体的实验方法在实验部分有详细地叙述，不同馏份中鉴定的蛋白质数量列在表 4-2 中。从表上可以看出，与对照实验结果相比，使用新策略除去高丰度蛋白质之后鉴定地蛋白质数量提高了 2 到 3 倍，一共有 1530 个蛋白质被鉴定，590 个蛋白质被鉴定在对照实验中。文献报道 229 个蛋白质被鉴定通过使用纳升级的 2D-SCX/cRPLC-MS/MS 系统[32]。鉴定蛋白质数量的提高得益于除去高丰度蛋白质之后中低丰度蛋白质有机会得到富集进而上样量相对增大的结果。同时高丰度蛋白质的去除效率也通过测定蛋白质的浓度进行了估算，去除的高丰度蛋白质的总量约为 1.38 mg，因此大约 34.5%的高丰度蛋白质在一次实验流程中被去除。

表 4-2 高丰度蛋白质去除策略效果与非去除实验的对照。

Fraction	Depleted protein number	Protein identified number	Protein identified number in control
F1	9	49	13
F2	8	51	11
F3	11	57	20
F4	3	44	7
F5	2	41	14
F7	1	36	12
F8	1	42	19
F12	1	64	18
F13	3	72	21
F14	6	77	29
F15	5	79	41
F16	3	81	33
F17	5	80	30

F18	2	76	22
F19	2	75	26
F20	2	65	21
F21	2	60	22
F22	2	51	19
F33	5	39	11
F34	2	43	14
F38	2	36	13
F51	3	27	12
F56	2	31	10
F57	1	29	9
Sum from fractions	24 77	1305	447
Total proteins	unique -	1530	619

目前, 亲和技术仍然是最广泛使用的去除高丰度蛋白质的技术, 在本论文中, 我们开创性的提出了使用强阳离子交换色谱和高效反相色谱联用的多维色谱模式用于去除复杂样品中的高丰度蛋白质, 此系统在以下几个方面优于亲和色谱[22-26], 从而可以作为辅助技术。首先, 我们提出的策略对所有的蛋白质没有歧视效应, 77 个高丰度蛋白质被一次除去, 相比之下, 亲和技术指针对那些有特异性作用的蛋白质起作用。其次, 在很多复杂的生物样品中高丰度蛋白质并不像血清或血浆样品那样集中, 对于存在多种甚至几十种高丰度蛋白质的样品, 有针对性的培养多抗体是很花时间和成本的。因此, 低成本和周期短是本策略的又一个优势。另外, 灵活性也是本策略的优点之一, 可以根据实验需要灵活的某一个或多个馏份用于分离感兴趣的蛋白质。

3.3 存在的问题和解决方法以及下一步的工作设想

本人所在的实验室在多维色谱系统的构建和实现自动化方面做了大量的有价值的工作[29-32], 基于已有的实验结果, 一个快速而且高通量的实验方案被提出。实验方案的流程图如图 4-1B 所示。从已有的实验数据可以看出, 77 个高丰度蛋白质并不是平均的分

布在每个馏份中,而是集中在 24 个馏份中,因此,这就意味着不是所有的 SCX 馏份都需要进一步使用 RPLC 分离,而是只要对其中 24 个包括中低丰度蛋白质的馏份进行 RPLC 分离,除去其中的高丰度蛋白质,其它的 SCX 馏份可以直接的进行合并、除盐,然后这两部分中低丰度蛋白质合并到一起进行酶解,酶解所得的肽段使用微升级或纳升级的 2D-SCX/cRPLC-ESI/MALDI 系统进行分离和鉴定。纳升级的 2D-SCX/cRPLC-ESI 系统的实验条件已经得到优化[32],如果使用 11 个台阶式盐梯度,肽段的二维分离质谱鉴定时间将小于 35 小时,加上蛋白质水平上的分离时间总时间将不会超过 50 小时,因此如果采用上述设计的简化的实验方案,就可以实现一个实验流程除掉 77 个高丰度蛋白质,同时在保证鉴定蛋白质数量的前提下很大程度上缩短了工作时间和降低了工作量。如果肽段分离的过程中采用 3 μm 填料的无孔的快速分析柱子,那么分离所用时间将会进一步缩短。

当然,本章提出的多维色谱除去高丰度蛋白质的策略也存在一些不足,从我们的实验步骤可以看出,针对不同的复杂样品需要花费相对长的时间去对样品进行分离从而确定其高丰度蛋白质的保留时间或色谱峰的位置。然而,一旦实验条件确定,因为完整蛋白质的分离具有良好的重现性而且就某个特定的样品而言其高丰度蛋白质的种类相对稳定,所以在以后的实验就可以如上面所述得到简化。

另外,尽管新策略在很大程度上去除了高丰度蛋白质并且提高了鉴定蛋白质的数目,但是有一点值得注意和改进,我们所用于研究的蛋白质样品是在酸性条件下提取的可溶性鼠肝组织蛋白质,也就是说,样品中不包括所有的肝脏蛋白质而是其中某一部分,因此,造成有些高丰度蛋白质甚至一些经典的肝脏蛋白质没有被提取和检测。在未来的工作中,阴离子交换色谱柱将取代强阳离子交换色谱柱用于分离中性或碱性条件下提取的蛋白质样品。届时两种路线从不同的角度互相补充,为进一步研究蛋白质组学提供技术上的服务。

4 结论

本工作首次从一个完全不同于传统思想的一个崭新的角度开创性地提出了新的从复杂样品中去除高丰度蛋白质的策略,即使用多维液相色谱的方法通过对完整蛋白质的分离达到去除高丰度蛋白质的目的。本节对新策略的可行性进行了探索研究,一个实验流程可以除去 77 种高丰度蛋白质约占蛋白质总量的 34.5%,进而通过比较去除策略和非去除策略在鉴定蛋白质数量上的差异对有效性进行了评价,实验结果是前者在鉴定蛋白质数量上是后者的两倍多,是文献报道的六倍多。实验证明本策略可以用于蛋白质组学的研究中。

第二节 多维液相色谱法去除高丰度蛋白的策略在人肝蛋白质组学中的应用

1 引言

癌症是蛋白质组学疾病研究的最大热点。癌症是一种复杂的多因素导致的疾病，必然有许多蛋白参与其发生和发展，而蛋白质组学的大规模高通量的技术特点正好能适应多个甚至多组蛋白质的筛选[42]。

近年来，复旦大学肝癌研究所通过组织同位移植建立了人肝癌的高、低转移裸鼠模型[43-45]：LCI-D20(高转移)和LCI-D35(低转移)。LCI-D20表现出100%的转移能力，而LCI-D35不发生肝内和邻近器官的转移。该模型为研究肝癌的转移奠定了良好的基础，它已经被用于肝癌转移机制的研究和肝癌转移复发的实验性干预研究[46]。

目前几乎所有疾病蛋白质组研究均以细胞系作为研究对象，因为其均一性较好。但是细胞系与实际生物体存在明显的差异，只有组织才能最真实地反映生物体内的实际生理情况，以组织为对象才能得到最有意义的结果，所以最终疾病蛋白质组学必然以组织为研究对象。虽然蛋白质组是由人类基因组编码而来，但是蛋白质的许多方面，从结构、功能到与疾病有关的变化，都不能由基因组的分析简单推断得到。揭示在疾病状态下蛋白质的变化对于疾病的预防、诊断和治疗都有重要意义，所以人们有必要先建立一个正常人类蛋白质组的知识库。现在一个与基因组计划类似的人类蛋白质组计划（Human Proteome Project）正在开展中。2001年4月，美国成立了“人类蛋白质组研究组织”（Human Proteome Organization, HUPO），随后欧洲、亚太地区都成立了区域性蛋白质组研究组织，试图通过合作的方式融合各方面的力量，完成人类蛋白质组计划。此项计划的主要目标就是表征由人类基因组编码的所有蛋白质，并且测定在正常和疾病状态下的变化程度[47]。

中国是肝病多发大国，肝炎是我国第一大疾病，肝癌是我国恶性肿瘤中的二号杀手。重大肝病的发生发展无法归咎于少数几个基因或蛋白质所呈现的功能状态和信号通路。人肝蛋白质组全谱的表征是人类蛋白质组计划中的一个重要组成部分，特别是对亚洲这样一个肝病高发地区来说更是尤为重要。从蛋白质层面上“全景式”揭示肝脏疾病的生理病理是解决重大肝病的全新策略。从这个意义上说，开展肝脏蛋白质组研究对肝病的实际诊断治疗有重要现实意义。

为了得到一张全面的肝脏组织蛋白的表达谱，中国科学届所有参与此项目的实验组和

科研人员都付出的很大的努力，中国政府也给予了大力支持，同时取得了令世界同行瞩目的成就。本章上一节我们以大鼠肝脏组织蛋白质为研究对象，探索了利用多维液相色谱的方法去除高丰度蛋白质的可行性，对实验条件进行了优化，本节将进一步将此方法推广到人肝蛋白质组学的研究中。

2 实验部分

2.1 试剂与材料

乙腈 (ACN, 高效液相色谱纯, Merck Co), 三氟乙酸 (TFA, 高效液相色谱纯, Tedia company. inc.), 苯甲磺酰氟 (PMSF) (上海华瞬生物工程有限公司), α -氰基-4-羟基-肉桂酸 (CHCA, Sigma Chemical Co), 柠檬酸铵, 测序级胰蛋白酶为 Roche 公司产品; 碳酸氢铵、氯化铵等为国产分析纯试剂, 熔融石英毛细管 ($250/75\ \mu\text{m}$ i.d., $380\ \mu\text{m}$ o.d.) 购自河北永年锐泽色谱器件有限公司(河北, 中国)。Zorbax 300SB C8液相色谱填料 ($5\ \mu\text{m}$, $300\ \text{\AA}$, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) 和 Zorbax BP-SIL 硅胶 ($7\ \mu\text{m}$, $80\ \text{\AA}$, DuPont, Wilmington, DE, USA) 分别用来装填液相分析柱和制备毛细管柱塞。实验中所用水为 Milli-Q 去离子水。

健康的中国人肝组织由中国人肝项目组织提供。所有样品都在 -80°C 保存以防止蛋白质降解。

2.2 样品制备

中国人肝组织样品在分发到各个实验室之前, 已经统一在液氮冷却的条件下处理成粉末, 所以直接以 $1:8$ (g: mL) 的比例加入上述相同的提取液并进行手动匀浆, 直至组织完全破碎, 整个匀浆过程同样在冰浴中进行。然后混旋 30 分钟, 在 4°C 条件下 $18000\ \text{g}$ 离心 15 min, 取上清液即为提取蛋白, -80°C 保存备用, 蛋白质提取液用由 Qu 等改进的 Bradford 法定量[27]。

2.3 SCX 与 RPLC 的二维系统

常规柱分离的色谱系统由 LC-2010 分离装置和 FRC-10A 馏份收集装置组成 (Shimadzu Corp., Japan)。LC-2010 系统是一套高集成的色谱分离系统, 它由一个低压四元梯度泵, 自动进样器的最大进样量为两毫升, 在线脱气系统, 恒温系统和一个双波长的紫外可见检测器组成。系统自带的 Class-VP 工作站负责记录和处理数据, FRC-10A 馏份收集系统由 SCL-10A 控制器进行控制 (Shimadzu Corp., Japan)。本章使用的常规二维分离系统是采用离线的方式对样品进行二维切换。

SCX 色谱柱采用 C18 的反相柱 (Agilent Technologies, USA), 内径是 4.6mm, 25cm 长, 采用 5 μ m, 300Å, Zorbax 填料, 分析柱前加一个 1.2cm 长内径为 4.6mm 的保护柱以防止污染或堵塞主柱, 保护柱的填料与分析柱相同。

SCX 梯度洗脱溶剂为: A: 0.1%TFA-100% H_2O ; B: 1M 氯化铵-10% 乙腈-0.1%TFA。流动相洗脱梯度为: 0% B 15 分钟, 40 分钟内线性上升至 20% B, 30 分钟内从 20% 上升至 50% B, 25 分钟内从 50% 上升至 100% B, 保持 10 分钟, 1 分钟内降至 0% B。考虑到系统压力的问题将流速设为 0.8 mL/min, 紫外检测波长为 215nm。馏份采用自动收集, 从 4 分钟到 128 分钟每 2 分钟收集为一个馏份, 一共收集了 62 个馏份。

从第一维 SCX 上收集的馏份依次再经过第二维反相色谱柱分离, RPLC 色谱柱采用 C18 的反相柱 (大连依利特分析仪器有限公司, 中国), 内径是 4.6mm, 25cm 长, 采用 5 μ m, 300Å, Hypersil 填料, 分析柱前加一个 2cm 长内径为 4.6mm 的保护柱以防止污染或堵塞主柱, 保护柱的填料与分析柱相同。

RPLC 梯度洗脱溶剂为: C: 98% H_2O -2% 乙腈-0.1%TFA; D: 98% 乙腈-2% H_2O -0.1%TFA。流动相洗脱梯度为: 0% D 5 分钟, 50 分钟内线性上升至 30% D, 15 分钟内由 30% 线性上升至 45% D, 10 分钟内由 45% 线性升至 80% D, 保持 5 分钟, 2 分钟内降至 0% D。流速设为 0.8 mL/min, 紫外检测波长为 214nm。

紫外光谱信号作为判断依据来决定这一维的馏份收集的节点。信号强度 0.1 吸收单位 (AU) 作为标准, 这个数值要依据具体实验中样品量的高低相应的信号强弱不同来决定, 本实验中选用 0.1 AU 作为标准, 接下来我们就把信号强度大于 0.1 AU 所对应的蛋白质色谱峰称之为高丰度蛋白质, 反之称之为中低丰度蛋白质。有了这个标准之后, 我们就对洗脱液进行区别收集, 包含高丰度蛋白质的洗脱液分别收集并且合并到一起, 其它的部分合并到一起, 接着将这些馏份使用冷冻干燥机将其冻干成粉末。

接下来如法炮制, 来自第一维 SCX 的 62 个馏份都用相同的方法进行处理, 即首先经过 RPLC 分离, 分别收集高丰度蛋白质和中低丰度蛋白质, 冻干成粉末, 然后将 62 个冻干的高丰度蛋白质馏份合并成一份, 将 62 个冻干的中低丰度蛋白质馏份合并成另外一份。测序级的修饰酶溶解在 20mM 的碳酸氢铵溶液中, 按照酶和蛋白质的质量比 1:50 往每个馏份中加入酶溶液, 37 °C 保温, 酶解过夜, -20°C 保存待用。

2.4 在线微升级 SCX-cRPLC 二维液相色谱系统

2.4.1 色谱柱的填装

柱上塞子用 sol-gel 法制作[28], 采用高压匀浆法将填料填充入内径为 250 μ m, 长为

25cm的毛细管内。将5 μm Zorbax 300SB反相硅胶填料溶于甲醇中，在超声波中振荡，使填料颗粒高度分散成匀浆。以甲醇为顶替剂，将此匀浆液在高压泵的驱动下灌入毛细管柱内。保持300-400 bar的装填压力，同时毛细管柱放在超声中振荡半小时，保证固定相颗粒均匀紧密装填于柱内。然后逐渐降低压力，匀速降至常压后，卸下柱子。

2.4.2 微升级SCX-cRPLC二维液相色谱系统

在线二维液相分离系统由FAMOS 自动进样阀，UltiMate™ 微升级液相色谱系统及SWITCHOS阀切换系统组成。FAMOS 微型自动进样器进行自动进样操作，强阳离子柱（SCX column）洗脱，两维间样品转移，富集，去盐由SWITCHOS 中的辅助四元等梯度泵完成。UltiMate™微升级四元梯度泵用于毛细管反相液相色谱分离。

2D-micro-LC的工作原理及流程类似文献报道的纳升级的2D- SCX/cRPLC系统[32]。简单描述如下，样品由Famos自动进样仪上带的针形泵吸入样品环中，此时SCX 柱与捕集柱相连。当样品被吸入样品环中后，由四元辅助泵以一定流速将样品环中的样品送入SCX柱上。样品中那些能被SCX柱吸附的组份会吸附在SCX柱头上，而不能被SCX柱吸附的组份则会被RP捕集柱捕获。上样结束后，切换阀被切换到清洗和除盐的模式。洗脱液成分与上样液相同，由辅助泵以一定流速泵过捕集柱进行清洗和除盐。在上样和清洗阶段，反相分析柱由流动相A平衡。清洗完成后，与分析柱相连的切换阀发生切换进入分析模式，RP捕集柱与RP分析柱在线连接，吸附在捕集柱上的肽段被反冲入反相柱中进行梯度分离，洗脱下来的肽段点样到MALDI靶板上作离线分析。整个二维分析即是上述过程的循环，不同浓度的盐溶液会依次进样到SCX柱上洗脱带不同电荷的肽段每次洗脱都伴随反相分离和离线的质谱检测，直至所有的肽段都被洗脱和分析，分离过程才终止。

Micro-SCX-cRPLC-MALDI-MS/MS系统中，SCX柱为1mm 内径/150mm 长(Bio-SCX, 300 μm i.d., 150 mm)；弹筒状预柱(C18 PepMap™, 300 μm i.d, 5 mm)购自戴安公司(Amsterdam, The Netherlands)；反相柱为自制的250 μm 内径/300mm 长。上样及冲洗流速为40 $\mu\text{l}/\text{min}$ ，上样及冲洗时间皆为6min，SCX采用台阶式盐梯度的洗脱方式，盐梯度为：0mM, 20mM, 40mM, 80mM 160mM, 320mM, 640mM, 1000mM, 1500mM and 2000mM醋酸铵溶液，原始的醋酸铵储备溶液使用前需要使用0.22 μm 水相膜进行过滤。反相流动相：A:0.1%TFA-98%水-2%乙腈，B:0.1%TFA-2%水-98%乙腈，反相洗脱梯度：0% B 等度冲洗5min, 5min内快速增至10%B, 随后70min内缓慢线性增加到50% B, 0.1min内突变为95%B, 保持5min, 3min内快速降至0%B以平衡系统，等待下一次分离。流速设为1.8 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。洗脱液直接通过一个微型的T型不锈钢三通装置(Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA)与MALDI的基质(5 mg/mL CHCA diluted in 50% ACN-50% H₂O-0.1% TFA-0.3 mg/mL

柠檬酸铵)溶液相混合,然后点在MALDI标准靶板上,点样采用隔行点的方式,便于质谱解析,整个点样过程使用全自动的点样系统(Probotmicro spotting system)完成。点样频率为30秒/点,六个校准点手动点在靶板上,液滴干燥后待用。

2.5 质谱和数据检索

点样完毕,沉积在靶上的样品完全干燥后送入 MALDI-TOF-TOF-MS (Applied Biosystem, USA)。该质谱仪采用 MALDI 离子源,串联飞行时间分析器,由 4700 ExplorerTM 软件控制。激光波长 337nm,频率 200 Hz。采用正离子反射模式。质谱加速电压为 20kV,串联质谱加速电压为 8kV。质量扫描范围设置为 800-3500Da,在 1800Da 附近分辨率最高。选择每个 MS 谱中前 8 个强度最大的且信噪比大于 40 的肽段作串联谱。Trypsin 酶解的马肌红蛋白的肽段用来校准仪器,仪器校准之后再对其它样品进行检测。

用 GPS 软件 (version 1.0, Applied Biosystems, USA), Mascot (version 1.6, <http://www.matrixscience.com>, Matrix Science, London, UK) 搜索引擎, IPI 数据库 (version 2.3.3) 中的 Homo sapiens (Human) 亚库搜索,肽质量误差范围设置: $\pm 0.3\text{Da}$; 串联质谱质量误差范围设置: $\pm 0.4\text{Da}$, 允许一个漏切位点。使用 GPS 软件对数据进行自动搜索和分析,最好离子得分大于 29 分同时满足置信度大于 95 的蛋白认为是可信的。

3 结果与讨论

3.1 人肝蛋白质中高丰度蛋白质的去除结果

根据 Giddings 提出的数学模型,如果所联用的多维色谱的分离机理正交,那么多维色谱分离模式的峰容量应为构成其的各个一维分离模式的峰容量的乘积。离子交换色谱依据物质所带电荷进行分离, RPLC 根据疏水性分离,两者机理正交,另外离子交换色谱所采用的盐流动相对于反相分离无影响,两者适于联用,之所以将反相作为第二维主要考虑其流动相主要由水和非极性挥发性有机溶剂构成容易除掉,同时还有脱盐纯化样品的能力,当与质谱联用时, RPLC 这些特性尤为重要。离子交换的分离效果不如反相色谱,但其上样量较大适用于作为两维分离的第一维。强阳离子交换色谱与阴离子交换色谱相比因其流动相的酸碱度与反相色谱兼容所以二者经常被联用,达到对蛋白质的高分辨的分离的效果。

图4-3给出了人的肝脏组织可溶性蛋白质的SCX的紫外分离的色谱图,图中虚线展示了馏份收集的起始时间以及每个馏份的时间节点,每一个SCX馏份进一步使用RPLC分离。图4-4(A)展示了SCX-RPLC两维分离的三维立体图,从给出的色谱图上可以看出,SCX-RPLC系统在分离可溶性人肝蛋白质方面展示了很高的分辨率,根据实验部分描述的

去除高丰度蛋白质的标准, 53个高丰度色谱峰被确定并且主要集中在馏份1-3和15-18这几个少数的馏份中。在这些高丰度蛋白质色谱峰的压制下, 其它的色谱峰就显得很弱。图4-4(B)展示了在除去馏份1-3和15-18这几个馏份之后的SCX-RPLC两维分离的三维立体图。比较图4-4(A)和(B)可以看出, 如果在高丰度蛋白质被酶解之前将其从中低丰度蛋白中分离出去, 那么中低丰度的蛋白质被检出的几率就大大提高。

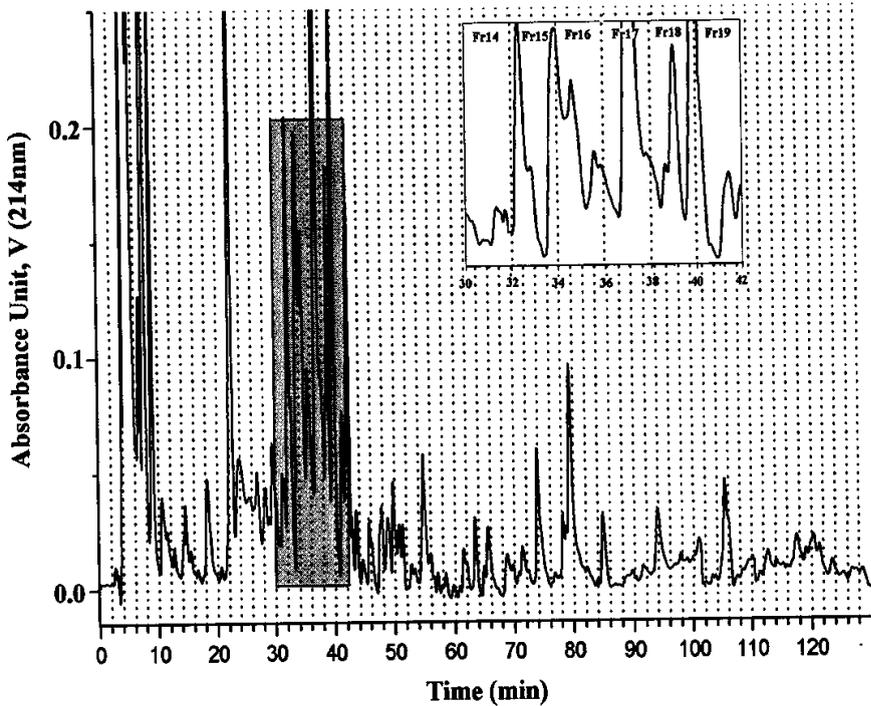


图4-3 人的肝脏组织可溶性蛋白质的SCX的紫外分离的色谱图, 图中虚线展示了馏份收集的起始时间以及每个馏份的时间节点。

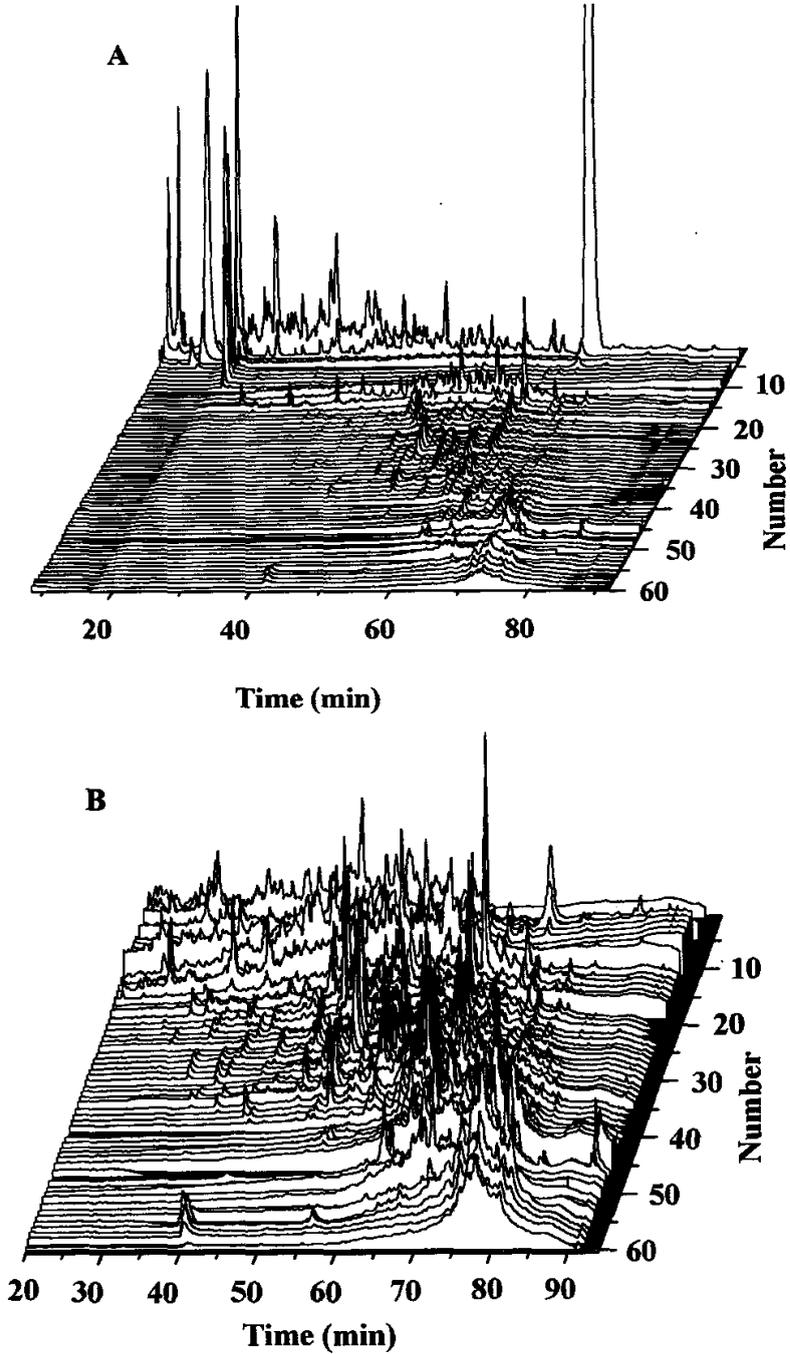


图4-4(A)展示了SCX-RPLC两维分离的三维立体图, (B)展示了在除去馏份1-3和15-18这几个馏份之后的SCX-RPLC两维分离的三维立体图。

同时从色谱图上也注意到，在相邻的几个SCX馏份经过RPLC分离后在相近的位置上有相似的色谱峰出现，导致这一现象的可能原因经过分析得出主要有以下两点，在第一维分离时较大的蛋白质的色谱峰被分成两段或多段收集到不同的馏份中，另外也可能是因为蛋白质样品比较复杂，具有不同的静电作用力的蛋白质却有着相似的疏水相互作用力，导致在SCX分离时具有不同的保留时间却在RPLC分离时色谱峰的位置相近，这也正是多维色谱分离模式的优势所在，不同分离机理模式的色谱方法联用，会达到更大的峰容量和分辨率。

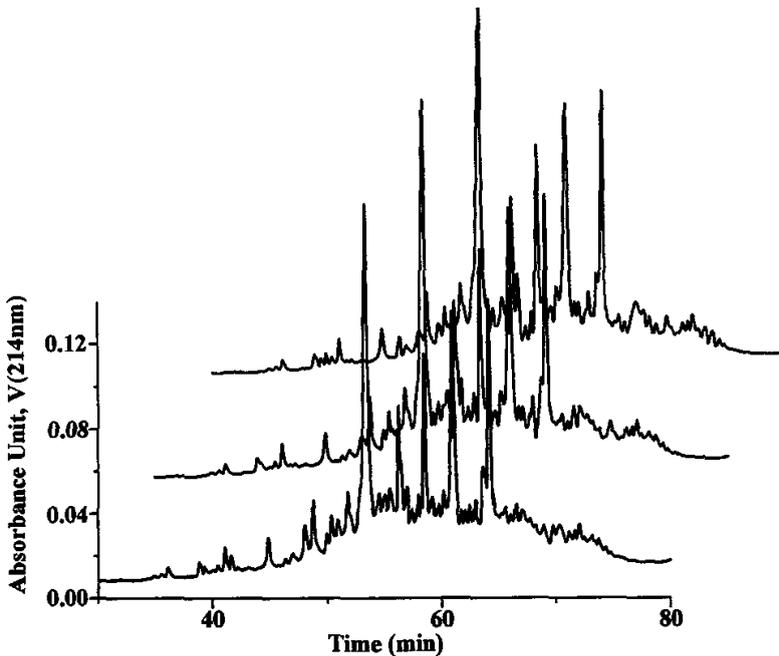


图4-5 RPLC分离来自SCX不同批次的28号馏份的色谱图，平行分离了三次。

常规的离线的2D-SCX/RPLC系统分离的重现性使用色谱峰的保留时间和峰高的相对标准偏差进行了评价。为此我们用同一种人肝提取样品为研究对象，做五次连续SCX实验，对其中8个分辨率较高的色谱峰的保留时间和峰高的相对标准偏差进行了计算统计，结果发现保留时间的相对标准偏差小于2.6%同时峰高的相对标准偏差小于4.3%。进一步将来自SCX的28号馏份作为例子相应的进行3次RPLC分离，分离所得的谱图如图4-5所示，从图上可以看出色谱峰的峰形尤其是吸收比较强的色谱峰的峰形和保留时间都比较相似，显示了蛋白质水平上分离的良好的重现性，全自动的进样系统和馏份收集系统以及

良好的色谱柱容量和性能为二维系统良好的重现性提供了保障。

本工作所提出的高丰度蛋白质去除策略是基于完整蛋白质分离的基础上的。Lescuyer [48]等人对目前用于蛋白质分离的不同的色谱技术进行了综述,从中得出结论:色谱技术因为其能将高丰度蛋白质通过分离而使其聚集到少数几个或多个馏份中,从而越来越成为一种强大的富集低丰度蛋白质的工具或手段。在本工作中,使用的两根色谱柱在分离机理上完全正交,提供了很高的峰容量和分辨率,因此,高丰度蛋白质不仅能够被洗脱到少数几个或多个馏份中而且得到了有效的分离,这就为在完整蛋白质水平上去除高丰度蛋白质提供了机会,同时本工作的蛋白质在SCX柱子的上样量为4mg,如此大的上样量更有利于中低丰度蛋白质富集。另外,目前有文献报道的基于蛋白质分离的多维液相色谱系统仅限于对蛋白质质量的检测,对未知蛋白质的定性方面就显得无能为力,为了做到定性和定量兼顾,很多研究组做了大量的努力,最普遍的方法就是在分离末尾使用一个分离器,例如,在Liu等的工作中,在线SCX/RPLC分离酵母核糖体蛋白样品时就是在柱后使用了一个分馏器,一部分通过SCX/RPLC系统的洗脱液被分离,同时在线的与ESI-TOF-MS相连,直接进行蛋白质质量的检测,另一部分馏份被收集后经过冻干、酶解进而使用MALDI质谱对蛋白质进行定性分析。类似这样的操作步骤冗长且工作量大,相比之下,目前常用的“shot-gun”技术在对未知蛋白质的检测方面有着绝对的优势,因此本工作在除去高丰度蛋白质之后仍然采用“shot-gun”技术对蛋白质进行定性分析,在没有了高丰度蛋白质的压制的情况下中低丰度蛋白质的绝对上样量就得到很大提高,相应的检出几率也会很大提高。

3.2 在线2D-micro-SCX/cRPLC分离以及MALDI检测

CHCA是常用的进行肽分析的MALDI基质。对于大多种类的肽,它能产生较强的质谱信号,但在实验过程中发现在某些质量范围内,如800-900 Da 之间,CHCA会形成簇峰影响该范围样品信号的解读。为了减少基质簇峰的影响,我们根据其他实验组的经验在基质溶液中加入0.3mg/ml 的柠檬酸铵以抑制基质信号,效果明显。

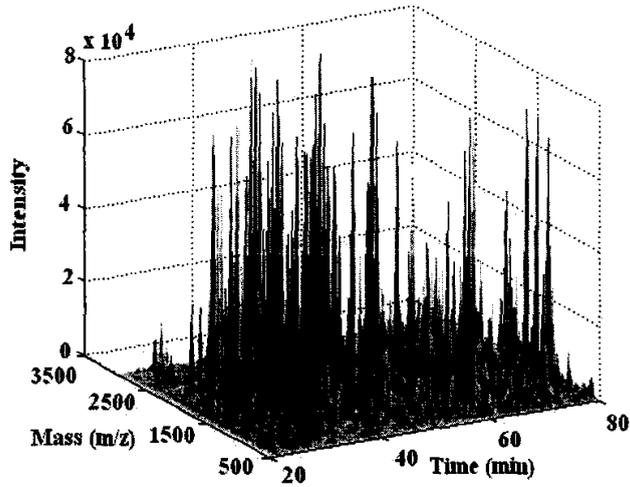


图4-6 其中一个馏份在线二维分离质谱鉴定的三维立体图，肽段洗脱自micro-SCX柱子，洗脱的盐梯度是160 mM NH₄AC。

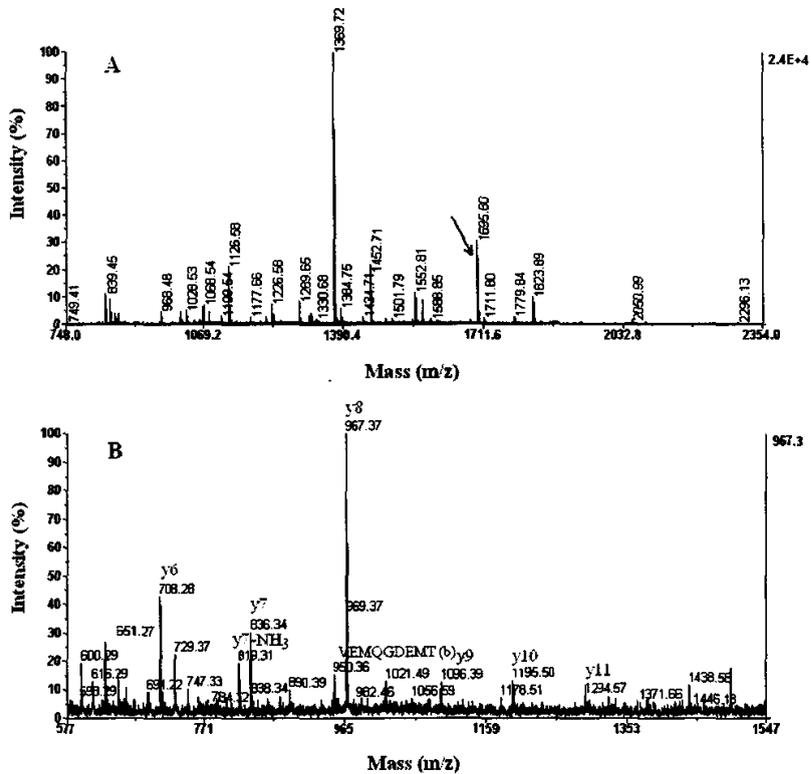


图4-7A肽谱图，箭头标识的母离子 ($m/z = 1695.80$) 的串级谱图列于B，氨基酸序列为：ISGGSVVEMQGDENR，鉴定蛋白质为Tax_Id=9606细胞质的异柠檬酸脱氢酶。

酶解的肽段依次使用在线的2D-micro-SCX/cRPLC系统进行分离然后MALDI质谱检测。含有高丰度蛋白质的馏份分离检测的结果列在表4-3, 可能是分离时共洗脱的原因造成检测到58个蛋白质超过除去的色谱峰的个数。含有中低丰度蛋白质的馏份经过酶解之后, 进一步由在线微升级二维系统进行分离, 然后质谱鉴定, 图4-6展示了一个例子, 160 mM NH₄AC将肽段从micro-SCX柱子上洗脱下来后直接在线脱盐, 接着cRPLC分离质谱检测, 从而得到这个馏份的三维立体图。从图上可以看出大量的信号比较强的肽指纹谱被检测, 这就为得到有价值的串联信息提供了前提, 因为众所周知, 有价值的串联信息是鉴定可靠蛋白质的关键。图4-7A是其中一点的肽谱图及从该点选出的箭头标识的母离子 ($m/z = 1695.80$) 的串联谱图列于图4-7B。从图中标记的离子碎片可读出该前体离子的氨基酸序列为: ISGGSVVEMQGD~~M~~TR, 经过软件分析鉴定为Tax_Id=9606细胞质的异柠檬酸脱氢酶。经过分离总共鉴定了1213个蛋白质。

表4-3 本系统鉴定的中国人肝组织中强的紫外信号对应的高丰度蛋白质。

Rank	Accession number	Protein name	MW	PI
1	IPI00296362	Tax_Id=9606 Splice Isoform 1 of Abnormal spi	409542.15	10.44
2	IPI00218816	Tax_Id=9606 Hemoglobin beta chain	15988.29	6.75
3	IPI00303335	Tax	772727.25	9.1
4	IPI00410714	Tax_Id=9606 Alpha 2 globin variant	15270.94	8.72
5	IPI00005038	Tax_Id=9606 Ribonuclease UK114	14484.61	8.73
6	IPI00018149	Tax_Id=9606 Centrosome pr	290151.21	5.76
7	IPI00296365	Tax_Id=9606 Centromeric protein E	311793.93	5.44
8	IPI00456492	Tax_Id=9606 Ciliary rootlet coiled-coil, rootletin	228387.62	5.44
9	IPI00418175	Tax_Id=9606 Nebulin	348750.43	9.14
10	IPI00013933	Tax_Id=9606 Splice Isoform DPI of Desmoplakin	331570.65	6.44
11	IPI00329536	Tax_Id=9606 Early endosome antigen 1	162367.14	5.53
12	IPI00329694	Tax_Id=9606 Splice Isoform 2 of Golgi autoantigen, golgin subfamily A member 4	255583.03	5.34

13	IPI00014898	Tax_Id=9606 Splice Isoform 1 of Plectin 1	531412	5.73
14	IPI00298057	Tax_Id=9606 Periplakin	204525.9	5.44
15	IPI00477166	Tax_Id=9606 Centromere protein F, 350V400ka	357305.87	5.05
16	IPI00220521	Tax_Id=9606 Splice Isoform 4 of Golgi autoantigen, golgin subfamily A member 4	260790.62	5.32
17	IPI00478625	Tax_Id=9606 152 kDa protein	151903.64	5.76
18	IPI00396977	Tax_Id=9606 Splice Isoform 7 of Nesprin 1	642270.75	5.59
19	IPI00063523	Tax_Id=9606 PREDICTED: similar to Centromeric protein E (CENP-E protein)	741434.43	9.06
20	IPI00473011	Tax_Id=9606 Hemoglobin delta chain	15914.25	7.96
21	IPI00023711	Tax_Id=9606 Envoplakin	231477	6.55
22	IPI00004233	Tax_Id=9606 Splice Isoform Long of Antigen KI-67	358525.56	9.44
23	IPI00029012	Tax_Id=9606 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 1	166468.31	6.38
24	IPI00301293	Tax_Id=9606 Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	358473.68	9.48
25	IPI00006196	Tax_Id=9606 Splice Isoform 2 of Nuclear mitotic apparatus protein 1	236387.29	5.63
26	IPI00550910	Tax_Id=9606 Hypothetical protein DKFZp451G165	196977.28	9.22
27	IPI00174574	Tax_Id=9606 Novel protein	103353.56	8.43
28	IPI00398776	Tax_Id=9606 Plectin 7	512291.81	5.61
29	IPI00479143	Tax_Id=9606 Pericentrin 2	377849.5	5.38
30	IPI00376383	Tax_Id=9606 centriolin	268733.65	5.44
31	IPI00305282	Tax_Id=9606 Splice Isoform 1 of DNA repair protein RAD50	153796.56	6.48

复旦大学博士学位论文

32	IPI00239405	Tax_Id=9606 Splice Isoform 1 of Nesprin 2	795885.5	5.26
33	IPI00001753	Tax_Id=9606 Myosin heavy chain, skeletal muscle, fetal	222874.29	5.67
34	IPI00217791	Tax_Id=9606 Hypothetical protein FLJ40365	56900.98	9.89
35	IPI00549205	Tax_Id=9606 Splice Isoform 2 of DNA repair protein RAD50	154490.92	6.46
36	IPI00455173	Tax_Id=9606 Titin, heart isoform N2-B	2991588.5	6.34
37	IPI00220627	Tax_Id=9606 Splice Isoform 5 of A-kinase anchor protein 9	447476.43	4.94
38	IPI00065051	Tax_Id=9606 Coiled-coil domain containing protein 13	80804.38	8.93
39	IPI00075272	Tax_Id=9606 Chromosome 14 open reading frame 145	127937.31	6.11
40	IPI00473119	Tax_Id=9606 Splice Isoform 9 of Bullous pemphigoid antigen 1, isoforms 6/9/10	586476.12	5.48
41	IPI00295816	Tax_Id=9606 OTTHUMP00000044920	162090.34	8.18
42	IPI00472614	Tax_Id=9606 Splice Isoform 1 of ERC protein 2	110490.02	6.51
43	IPI00001348	Tax_Id=9606 Spindle aSsembly aSSociated Sfi1 homolog iSoform a	147570.54	10.81
44	IPI00334432	Tax_Id=9606 16 kDa protein	15532.11	8.76
45	IPI00107531	Tax_Id=9606 Splice Isoform 3 of DNA repair protein RAD50	138346.48	6.17
46	IPI00220522	Tax_Id=9606 Splice Isoform 4 of Golgi autoantigen, golgin subfamily A member 4	260790.62	5.32
47	IPI00398779	Tax_Id=9606 Plectin 11	515883.65	5.63
48	IPI00220301	Tax_Id=9606 Peroxiredoxin 6	24888.15	6.01
49	IPI00456566	Tax_Id=9606 PREDICTED:	52696.6	11.96

		hypothetical protein XP_498975		
50	IPI00456429	Tax_Id=9606 Ubiquitin and ribosomal protein L40 precUrsor	14718.95	9.86
51	IPI00307155	Tax_Id=9606 Rho-associated protein kinase 2	160811.81	5.75
52	IPI00337325	Tax_Id=9606 Splice Isoform A of Hyaluronan mediated motility receptor	83979.64	5.63
53	IPI00412869	Tax_Id=9606 Similar to Kendrin	364958.37	5.4
54	IPI00470741	Tax_Id=9606 Splice Isoform 3 of Centrosomal protein 4	107507.49	5.61
55	IPI00019359	Tax_Id=9606 Keratin 9	62026.8	5.13
56	IPI00550232	Tax_Id=9606 CMYA3	378998.84	6
57	IPI00555966	Tax_Id=9606 Ubiquitin C splice variant	25741.9	6.86
58	IPI00022542	Tax_Id=9606 Rho-associated protein kinase 1	158075.73	5.65

当然，如同上一节所述，多维色谱除去高丰度蛋白质的策略也存在一些不足，对一个陌生的样品需要较长的繁琐的条件实验，但这相比抗体的培养周期还是短很多，而且成本很低，另一点就是因为存在一个酸碱度匹配的问题导致本系统面对的样品范围比较窄，造成有些高丰度蛋白质甚至一些经典的肝脏蛋白质没有被提取和检测。另外该法与双向凝胶电泳方法得出的结果需要进一步的比对研究。在未来的工作中，阴离子交换色谱柱将取代强阳离子交换色谱柱用于分离中性或碱性条件下提取的蛋白质样品。届时两种路线从不同的角度互相补充，为进一步研究蛋白质组学提供技术上的服务。

4 结论

本节工作主要是将我们发展的多维液相色谱去除高丰度蛋白质的策略运用到人类肝脏蛋白质组学的研究中，共鉴定了 1213 中蛋白质，进一步验证了这一全新的观点的可行性和有效性，尽管如文中所述还有一些地方需要改进和进一步研究，但是不能比承认本章所做工作为蛋白质组学新技术的发展提供了一个新的思路和看问题的一个新的角度。

参考文献

- [1] Badock, V., Steinhilber, U., Bommert, K., Otto, A., Prefractionation of protein samples for proteome analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Electrophoresis* 2001, 22, 2856-2864.
- [2] Anderson, N. G., Matheson, A., Anderson, N. L. Back to the future: the human protein index (HPI) and the agenda for post-proteomic biology, *Proteomics*, 2001, 1, 3-12
- [3] Shevchenko, A., Wilm, M.; Vorm, O., Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 1996, 68, 850-858.
- [4] Shaw, M. M., Riederer, B. M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis, *Proteomics* 2003, 3, 1408-1417.
- [5] Corthals, G. L., Wasinger, V. C., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C., The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research, *Electrophoresis*, 2000, 21, 1104-1115.
- [6] Wasinger, V. C., Pollack, J. D., Humphery, S. I., The proteome of mycoplasma genitalium chaps-soluble component, *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 1571-1582.
- [7] Shen, Y. F., Jacobs, J. M., Camp, D. G., II, Fang, R. H., Moore, R. J., Smith, R. D., Ultra-high-efficiency strong cation exchange LC/RPLC/MS/MS for high dynamic range characterization of the human plasma proteome. *Anal. Chem.* 2004, 76, 1134-1144.
- [8] Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K. E., Yates, J. R. III, A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 532-538.
- [9] McDonald, W. H., Ohi, R., Miyamoto, D. T., Mitchison, T. J., Yates, J. R. III, Comparison of three directly coupled HPLC MS/MS strategies for identification of proteins from complex mixtures: single-dimension LC-MS/MS, 2-phase MudPIT, and 3-phase MudPIT, *Int. J. Mass Spectrom.* 2002, 219, 245-251.
- [10] Washburn, M. P., Wolters, D., Yates, J. R. III, Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 242-247.
- [11] Peng, J. M., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Licklider, L. J., Gygi, S. P. Evaluation of Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

- (LC/LC-MS/MS) for Large-Scale Protein Analysis: The Yeast Proteome. *J. Proteome Res.* 2003, 2, 43-50.
- [12] Fujii, K., Nakano, T., Kawamura, T., Usui, F., Bando, Y., Wang, R., Nishimura, T. Multidimensional Protein Profiling Technology and Its Application to Human Plasma Proteome. *J. Proteome Res.* 2004, 3, 712-718.
- [13] Dreger, M., Subcellular proteomics, *Mass Spec Rev* 2003, 22, 27-56
- [14] N. Karoline Scheficer, Scott W. Millerc, Amy K. Carrollc, Christen Andersonc, et al, Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometric identification of mitochondrial proteins from an SH-SY5Y neuroblastoma cell line, *Mitochondrion*, 2001, 1: 161-179
- [15] Bier, M., Recycling isoelectric focusing and isotachopheresis, *Electrophoresis* 1998, 19, 1057-1063.
- [16] Hannig, K., New aspects in preparative and analytical continuous free-flow cell electrophoresis, *Electrophoresis* 1982, 3, 235-243.
- [17] Margolis J., Corthals G., Horvath Z.S., Preparative reflux electrophoresis, *Electrophoresis* 1995, 16, 98-100.
- [18] Horvath, Z. S., Gooley, A. A., Wrigley, C. W., Margolis, J., Williams, K.L. Preparative affinity membrane electrophoresis, *Electrophoresis* 1996, 17, 224-226.
- [19] Van den Bergh G., Clerens, S., Vandesinde, F., Arckens, L., Reversed-phase high-performance liquid chromatography prefractionation prior to two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identifies new differentially expressed proteins between striate cortex of kitten and adult cat, *Electrophoresis*, 2003, 24, 1471-1481.
- [20] Butt, A., Davison, M. D., Smith, G. J., Young, J. A., Gaskell, S. J., Oliver, S. G., Beynon, R. J., Chromatographic separations as a prelude to two-dimensional electrophoresis in proteomics analysis, *Proteomics*, 2001, 1, 42-53.
- [21] Jacobs, J. M., Mottaz, H. M., Yu, L. R., Anderson, D. J., Moore, R. J., Chen, W.N. U., Auberry, K. J., Strittmatter, E. F., Monroe, M. E., hrall, B. D., Camp, D. G. II, Smith, R. D. *J. Proteome Res.* 2004, 3, 68-75.
- [22] Adamczyk, M., Gebler, J. C. Wu, Selective analysis of phosphopeptides within a protein

- mixture by chemical modification, reversible biotinylation and mass spectrometry, *J. Rapid Commun. Mass Spectrom* 2001, 15, 1481-1488.
- [23] Greenough, C., Jenkins, R.E., Kitteringham, N. R., Pirmohamed, M., Park, B. K., Pennington, S. R A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma, *Proteomics* 2004, 4, 3107-3111.
- [24] Pieper R., Gatlin C.L., Makusky A.J., et al, Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: An innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome, *Proteomics*,2003, 3, 422-432.
- [25] Ficarro S.B., McClelland M.L., Stukenberg P.T., Burke D.J., Ross M.M., Shabanowitz J., Hunt D.F, White F.M., Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*, *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20, 301-305.
- [26] Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 994-999.
- [27] Qu, Y., Moons, L., Vandesande, F. Determination of serotonin, catecholamins and their metabolites by direct injection of supernatants from chicken brain tissue homogenate using liquid chromatography with electrochemical detection . *J. Chromatogr. B.* 1997, 704, 351-358.
- [28] Zhang, X. M., Huang, S. Single step on-column frit making for capillary high-performance liquid chromatography using sol-gel technology *J. Chromatogr. A* 2001, 910, 13-18.
- [29] Mao, Y., Zhang, X. M. Comprehensive two-dimensional separation system by coupling capillary reverse-phase liquid chromatography to capillary isoelectric focusing for peptide and protein mapping with laser-induced fluorescence detection *Electrophoresis* 2003, 24, 3289-3295.
- [30] Yang, X. H., Zhang, X. M., Li, A. Z., Zhu, S. Y., Huang, Y. P. Comprehensive two-dimensional separations based on capillary high-performance liquid chromatography and microchip electrophoresis. *Electrophoresis* 2003, 24, 1451-1457.
- [31] Zhang, J., Hu, H. L., Gao, M. X., Yang, P. Y., Zhang, X. M. Comprehensive two-dimensional chromatography and capillary electrophoresis coupled with tandem

- time-of-flight mass spectrometry for high-speed proteome analysis. *Electrophoresis* 2004, 25, 2374-2383.
- [32] Wang, Y., Zhang, J., Liu, C. L., Gu, X., Zhang, X. M. Nano-flow multidimensional liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for proteome analysis of hepatocellular carcinoma *Analytica Chimica Acta*, 2005, 530, 227-235.
- [33] Bordin, G., Cordeiro Raposo, F., Calle, B. de la, Rodriguez, A.R. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2001, 928, 63-76.
- [34] Ferreira, I.M.P.L.V.O., Caçote, H. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *J. Chromatogr. A*, 2003, 1015, 111-118.
- [35] Merbel, N. C. van de, Mentink, C. J.A.L., Hendriks, G., Wolffenbuttel, B.H.R. Liquid chromatographic method for the quantitative determination of *N*-carboxymethyllysine in human plasma proteins. *J. Chromatogr. B*, 2004, 808, 163-168.
- [36] Bu"nger, H., Kaufner, L., Pison, U. Quantitative analysis of hydrophobic pulmonary surfactant proteins by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection *J. Chromatogr. A*, 2000, 870 363-369.
- [37] Toorop, R.M., Murch, S.J., Ball, R.O., Development of a rapid and accurate method for separation and quantification of myofibrillar proteins in meat, *Food Res. International*, 1997, 30, 619-627.
- [38] Zhu, H.N., Pan, S.Q., Gu, S., Bradbury, E.M., Chen, X. Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics., *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 2002, 16, 2115-2123.
- [39] Gu, S., Du, Y.C., Chen, J., Liu, Z.H., Bradbury, E.M., Hu, C.A., Chen, X. Large-Scale Quantitative Proteomic Study of PUMA-Induced Apoptosis Using Two-Dimensional Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Coupled with Amino Acid-Coded Mass Tagging, *J. Proteome Res.* 2004, 3, 1191-1200.

- [40] Gu, S., Liu, Z.H., Pan, S.Q., Jiang, Z.Y., Lu, H.M., Bradbury, E.M., Hu, C.A., Chen, X. Global Investigation of p53-induced Apoptosis Through Quantitative Proteomic Profiling Using Comparative Amino Acid-coded Tagging, *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3, 998-1008.
- [41] Gao, M.X., Jin, H., Yang, P.Y., Zhang, X.M. Chromatographic prefractionation prior to two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry identifies: Application to the complex proteome analysis in rat liver, *Analytica Chimica Acta*, 2005, 553, 83-92.
- [42] Hochstrasser, D. F., Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D., Hochstrasser, D. F. (Eds.), *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer, New York 1997, pp. 187.
- [43] Tang, Z.Y., Sun, F.X., Tian, J., Ye, S.L., Liu, Y.K., Liu, K.D., Xue, Q., Chen, J., Xia, J.L., Qin, L.X., Sun, H.C., et al, *World J Gastroenterol* 2001 , Oct 7(5):597-603.
- [44] Sun, F.X., Tang, Z.Y., Liu, K.D., Ye, S.L., Xue, Q., *Zhonghua Yixue Zazhi*, 1995,75:673-685.
- [45] Sun, F.X., Tang, Z.Y., Liu, K.D., Ye, S.L., Xue, Q., Gao, D.M., Ma, Z.C., *Int J Cancer*, 1996,66:239-245
- [46] 汤钊猷, 肝癌转移复发的基础与临床, 上海科技教育出版社, 2003.
- [47] Sam Hanash, Building a foundation for the human proteome organization, *J. Proteome Res.*, 2004, 3, 197-199.
- [48] Lescuyer, P., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C., Comprehensive proteome analysis by chromatographic protein prefractionation, *Electrophoresis*, 2004, 25, 1125-1135.

第五章 多维液相色谱的 Top-down 技术路线的探索研究

大量生物体全基因序列的获得,特别是人类基因组序列草图的完成[1-2],为人们了解细胞中蛋白质表达图谱和基因与蛋白质的功能关系奠定了基础[3],也为研究人类基因活性与疾病的相关性提供了有力根据。但是,由于基因表达往往是通过基因的转录、表达产生一个蛋白质前体,在此基础上再进行加工、修饰,才成为一个具有生物活性的蛋白质,所以同样的一个基因在不同条件、不同时间和空间可能不只有一种相应的蛋白质,可能会有几种,甚至几十种对应的蛋白质存在。另外,这样的蛋白质还需要通过一系列的运输过程,到达细胞内适当的位置才能发挥正常的生理作用。在如此错综复杂的表达过程中,任何一个步骤发生细微的差错即可导致肌体发生疾病。研究表明,基因不能完全决定蛋白质的后期加工、修饰以及转运定位的全过程。近年来人们又发现蛋白质间亦存在类似于信使核糖核酸(mRNA)分子内的剪切、拼接,具有自身特有的活动规律。这种自主性不能从其基因编码序列中预测,只能通过对其最终的功能蛋白进行分析才能了解蛋白质在肌体中发挥的不同作用。正是由于基因组学无法回答这些问题,所以,在人类基因组计划完成后,科学家们又进一步提出了后基因组计划,蛋白质组(proteome)研究便是其中一个很重要的内容。蛋白质组学也正是作为功能基因组学的重要支柱在应运而生[4]。

目前,用于复杂的蛋白质混合物的高效分离方法主要有双向凝胶电泳(2-DE)和高效液相色谱(HPLC)两种方法。其中因分离度高并具有直观图谱而被普遍采用的方法为二维凝胶电泳(top-down技术)。二维凝胶电泳与质谱联用技术已经成为蛋白质组学研究中一个较为成熟的技术平台,被广泛应用于蛋白质组学研究的各个方面[5]。但由于该技术伴随其诞生所固有的缺陷,比如有限的动态范围和分离样品中分子量差别较大的蛋白,低含量的蛋白、以及疏水蛋白的能力较差,另外其操作过程费时费力,自动化程度低。为了解决这种方法存在的问题,另一种高效分离方法,即高效液相色谱方法(HPLC)获得了愈来愈多的应用。

液相色谱和毛细管电泳(Capillary Electrophoresis,简称CE)[6]也是蛋白质组学研究中常用的分离分析手段。但是一维系统的分离能力十分有限,往往不能满足复杂蛋白质混合物的分析需要。Giddings[7]指出,多维联用系统的总分辨率约等于各维分辨率平方和的平方根,总峰容量约等于各维峰容量的乘积。根据这一理论,多维分离系统可以减少峰重叠[8-9],提高系统的分辨率和峰容量,为样品的定性提供更多的数据信息。此外,它还具有分离速度快、重现性好、自动化程度高的优点。因此,发展多维液相分离技术对

于蛋白质组学的研究至关重要[10-13]。

鉴于目前使用的 shot-gun(bottom-up)技术存在的一些问题,我们开创性的提出了多维液相色谱的 top-down 技术路线,新的技术路线兼容了原始的“bottom-up”和“top-down”二者的优势。在本章第一节,将这条技术路线运用到中国人肝样品的分析检测中,在第二节中,我们继续将第一节中的两维系统进一步扩展到三维,希望在对蛋白质充分分离的基础上,同时实现对蛋白质的定性和定量检测。

第一节 SCX/cRPLC/靶上酶解/MS 分离鉴定系统的建立

1 引言

蛋白质组学研究的中心任务之一就是蛋白质表达谱的研究,也就是从蛋白质复杂的混合物中鉴定未知蛋白质。目前,对复杂的蛋白质样品的分析一般有两条路线,分别是“bottom-up”和“top-down”。“bottom-up”这条蛋白质组学分析路线通常指“鸟枪法”(shotgun)技术[14-23],这条技术路线在蛋白质组学研究中起到了重要作用,尤其是在大规模鉴定未知蛋白质方面作用突出。“bottom-up”路线的核心或中心指导思想就是,先将整个蛋白质混合样品进行酶解,得到数以百万计的肽段,然后使用多维液相色谱技术将其分离,接着进行质谱鉴定,得到的质谱数据在相应的数据库搜索,从而完成对未知蛋白质的鉴定。尽管“bottom-up”技术路线相对双向凝胶电泳技术对分析低丰度蛋白质有很强的优势,但是这项技术提供了非常有限的关于完整蛋白质的分子信息,尤其在后修饰(PTMs)方面提供的信息量过少[24],在这种基于肽段分离的技术在分析中忽略了很多修饰。为了弥补或提高此路线对后修饰的检测能力,Yates 与其合作者们采用了一些在蛋白质酶解方面的新方法,即采用多种不同的酶对蛋白质进行酶解从而产生重叠的肽段[25]。在这样的实验中,蛋白质混合物通常被三种不同的酶来酶解:胰蛋白酶对蛋白质进行特定位点的酶解,而其它两种酶(subtilisin 和 elastase)进行非特异性的酶解。这种使用多种酶来提高蛋白质序列覆盖度的方法被 Choudhary 研究组[26]以人的血浆为研究对象进行了进一步的研究。

相比之下,“top-down”所代表的蛋白质组学研究路线,在蛋白质的一些特性研究方面有着特有的优势,例如:蛋白质的分子量、等电点、疏水性以及结合特性等,因为这种实验思路是以复杂混合物中完整的蛋白质分离为基础。双向凝胶电泳技术是最成熟和最经典的“top-down”技术,第一维根据等电点不同,第二维根据分子量的不同实现对蛋

白质的分离。然而，这项技术有着固有的缺点，例如对低丰度蛋白质的检出能力不够，成本高，费时费力，自动化程度低等，因此，开拓研究新的经济、快速、重现的分离技术成为当前的需要，多维高效液相色谱(Mud-HPLC)越来越多的应用到蛋白质组学分离平台中。理想的情况是寻找到类似双向凝胶电泳的色谱技术，即使用正交的色谱模式在完整蛋白质水平上实现对蛋白质的分离，达到利用低成本、高效且快速的液相色谱完成2-DE的分离工作，并且取得更好的分离鉴定效果。

最近，基于多维色谱分离蛋白质这方面主要采用离线的方式，典型的是制备级等电聚焦[27-34]或凝胶电泳[35-36]作为第一维与第二维的RPLC联用实现对蛋白质的分离。Lubman及其合作者将提取自细胞裂解液的大约10mg的蛋白质使用Rotofor一次性进行等电聚焦[27-29]，然后使用RPLC作为第二维分离。他们实验组同时还开发了色谱聚焦模式，即使用了阳离子交换柱子在pH4-7的范围内对蛋白质进行色谱聚焦。另外Kelleher与其合作者开展了基于酸不稳定表面活性剂的制备级聚丙烯酰胺凝胶电泳用于分离酵母蛋白[35-36]。Lee等人构建了一个液相毛细管等电聚焦(CIEF)作为第一维，纳升级的反相液相色谱(nano-HPLC)作为第二维的这样一个二维系统[32-34]，用于浓缩和分离完整蛋白质。在这个系统中，电动聚焦/样品堆积导致高的样品浓缩加上系统高的分辨能力这些都为得到超高的灵敏度和较宽的动态范围提供了前提和基础。所有这些系统一般都是以质谱检测蛋白质的分子质量为最终结果。从这些系统可以看出，相比2-DE而言，Mud-HPLC具有经济、快速、易于自动化的优势。

“top-down”技术在对研究蛋白质性质方面比“bottom-up”技术有明显的优势，但是现有的液相色谱模式的“top-down”路线虽然保存了对蛋白质一些物理化学性质研究的优势，同时却牺牲了对未知蛋白质鉴定的能力，尤其是不便于进行大规模的鉴定。因此，更为理想的液相色谱模式的“top-down”路线最好还要能够产生蛋白质碎片信息最终实现蛋白的定性。产生蛋白质碎片即肽段可以通过化学或蛋白酶水解的方法得到，然后利用质谱对肽段进行分析从而鉴定未知蛋白。为了既得到完整蛋白质的信息包括物理化学性质及定量信息有能够实现对未知蛋白质的定性，有些研究组对现有的液相色谱模式的“top-down”路线进行了改进，一般在分离系统之后采用离线的传统酶解的方式[21, 27-31]，即分离系统之后，使用一个分流器，一部分流动相直接进入如质谱测量分子量，相应地分流后的流动相冻干、酶解进行定性分析。这些方法因为其多个转移步骤和低的灵敏度要求高的样品量所以没有得到广泛应用。最近，很多离线或在线的使用固定化胰蛋白酶进行及时酶解的研究越来越多，Ericson等人[42, 49]发展了一种自动的非接触式的点样界面，通过一个脉冲电场将来自并行柱子的洗脱液直接点到MALDI靶板上。David C.

Schriemer等人[43-44]展示了在水相-有机相溶液中的蛋白质的在线酶解系统,它通过一个固定化的胰蛋白酶微柱直接与RPLC相连而实现的。这些方法已经证明对于多维无胶系统是有效地。然而,固定化的酶技术对酶解时间要求非常短,另外市场上还没有商品化的固定化的酶的产品可用,目前实验室使用的固定化的酶的柱子经不起重复使用,再生困难,因此很难在实际应用中推广。

因此,如何让液相色谱模式的“top-down”技术既能保留其固有的测定蛋白质物理化学性质的优势,又能够兼具对未知蛋白质的鉴定尤其是规模鉴定的“bottom-up”技术的优势,这将是蛋白质组学研究的技术领域的又一大挑战。我们的研究组在构建多维色谱系统和实现自动化方面做了很多有意义的工作[50-53],积累了大量的经验。在本章工作中,我们构建了SCX/cRPLC的一个全二维的液相色谱系统用于完整蛋白质的分离,同时,基于已有的直接在MALDI靶板上的酶解[45-47]和双层样品准备方法[48],我们实验室进一步将其发展为靶上酶解技术。这一新的酶解技术的使用完美的克服了固定化酶的技术的缺陷,实现了快速的在线酶解。这新的SCX/cRPLC/靶上酶解/MALDI-MS系统不仅能够完成对未知蛋白质的规模鉴定而且保留了完整蛋白质的很多信息,真正意义上实现了“top-down”与“bottom-up”的完美结合。这个新的策略已经运用到中国人肝蛋白的测定中,一共检测到3313个唯一蛋白质。实验证明该系统是对2-DE的有效的补充,丰富了蛋白质组学研究的技术手段。

2 实验部分

2.1 试剂与材料

乙腈(ACN, 高效液相色谱纯, Merck Co), 三氟乙酸(TFA, 高效液相色谱纯, Tedia company. inc.), 苯甲磺酰氟(PMSF)(上海华瞬生物工程有限公司), α -氰基-4-羟基-肉桂酸(CHCA, Sigma Chemical Co), 柠檬酸铵, 测序级胰蛋白酶为Roche公司产品; 碳酸氢铵、氯化铵等为国产分析纯试剂, 熔融石英毛细管(250 μm i.d., 380 μm o.d.)购自河北永年锐泽色谱器件有限公司(河北, 中国)。Zorbax 300SB C8液相色谱填料(5 μm , 300 \AA , Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)和Zorbax BP-SIL 硅胶(7 μm , 80 \AA , DuPont, Wilmington, DE, USA)分别用来装填液相分析柱和制备毛细管柱塞。实验中所用水为Milli-Q去离子水。

健康的中国人肝组织由中国人肝组织提供。所有样品都在-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存以防止蛋白质降解。

2.2 样品制备

中国人肝组织样品在分发到各个实验室之前,已经统一在液氮冷却的条件下处理成粉末,所以直接以 1: 8 (g: mL) 的比例加入上述相同的提取液并进行手动匀浆,直至组织完全破碎,整个匀浆过程同样在冰浴中进行。然后混旋 30 分钟,在 4°C 条件下 18000 g 离心 15 min,取上清液即为提取蛋白, -80°C 保存备用,蛋白质提取液用由 Qu 等改进的 Bradford 法定量[54]。

2.3 SCX-cRPLC 系统

常规柱分离的色谱系统由 LC-2010 分离装置和 FRC-10A 馏份收集装置组成(Shimadzu Corp., Japan)。LC-2010 系统是一套高集成的色谱分离系统,它由一个低压四元梯度泵,自动进样器的最大进样量为两毫升,在线脱气系统,恒温系统和一个双波长的紫外可见检测器组成。系统自带的 Class-VP 工作站负责记录和处理数据, FRC-10A 馏份收集系统由 SCL-10A 控制器进行控制(Shimadzu Corp., Japan)。本章使用的常规二维分离系统是采用离线的方式对样品进行两维切换。

SCX 色谱柱采用 C18 的反相柱(Agilent Technologies, USA),内径是 4.6mm, 25cm 长,采用 5 μ m, 300Å, Zorbax 填料,分析柱前加一个 1.2cm 长内径为 4.6mm 的保护柱以防止污染或堵塞主柱,保护柱的填料与分析柱相同。

SCX 梯度洗脱溶剂为: A: 0.1%TFA-100% H_2O ; B: 1M 氯化铵-10% 乙腈-0.1%TFA。流动相洗脱梯度为: 0% B 15 分钟, 40 分钟内线性上升至 20% B, 30 分钟内从 20% 上升至 50% B, 25 分钟内从 50% 上升至 100% B, 保持 10 分钟, 1 分钟内降至 0% B。考虑到系统压力的问题将流速设为 0.8 mL/min, 紫外检测波长为 214nm。馏份采用自动收集, 从 4 分钟到 128 分钟每 2 分钟收集为一个馏份, 一共收集了 62 个馏份。

毛细管反相色谱柱子(cRPLC)自行填充,柱上塞子用 sol-gel 法制作[55],采用高压匀浆法将填料填充入内径为 250 μ m, 长为 25cm 的毛细管内。将 5 μ m Zorbax 300SB 反相硅胶填料溶于甲醇中,在超声波中振荡,使填料颗粒高度分散成匀浆。以甲醇为顶替剂,将此匀浆液在高压泵的驱动下灌入毛细管柱内。保持 300-400 bar 的装填压力,同时毛细管柱放在超声中振荡半小时,保证固定相颗粒均匀紧密装填于柱内。然后逐渐降低压力,匀速降至常压后,卸下柱子。

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配有四元梯度泵和化学工作站(Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA)用来形成洗脱梯度。cRPLC 梯度洗脱溶剂为: C: 98% H_2O -2%乙腈-0.1%TFA; D: 98%乙腈-2% H_2O -0.1%TFA。流动相洗脱梯度为: 0% D 5 分钟, 20 分钟内线性上升至 20% D, 60 分钟内由 20% 线性上升至 50% D, 0.1 分钟内由 50% 线性上升至 100% D,

保持5分钟,1分钟内降至0% D。流速设为2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。以Waters 484 可调波长紫外检测器进行紫外吸收柱上检测,检测波长214 nm,数据采集和处理由Echrom98 色谱工作站完成(依利特,大连,中国)。从分离柱末端出来的洗脱液直接利用全自动的点样系统(Probot (LC Packings, Dionex) micro spotting system) 三维平台,点在MALDI标准靶板上,点样频率为30秒/点,六个校准点手动点在靶板上,液滴干燥后待用。

2.4 洗脱蛋白质的靶上酶解

靶上酶解技术是直接采用由本实验室发展的具有专利保护的新技术。实验步骤简单描述如下:测序级的胰蛋白酶溶液使用10mM 的碳酸氢铵溶液稀释成1 $\text{ng}/\mu\text{L}$,使用全自动的馏份收集器(Probot micro spotting system) 的三维平台结合其自备的针泵系统将稀释后的酶溶液点到已经干了的靶板的样品点上,流速为12 $\mu\text{L}/\text{min}$,每5秒点一个点,完成之后,将靶板迅速放入一个相对密封而且潮湿的恒温箱中,50 $^{\circ}\text{C}$ 酶解15分钟,酶解完成之后,将靶板拿出来,室温下利用强风将靶板吹干。然后将馏份收集器的针泵部分中的储存容器中的溶液部分换掉,由原来的酶溶液换成MALDI 基质溶液(5 mg/mL CHCA diluted in 50% ACN-0.1% TFA-0.3 mg/mL citrate ammonium),同样的操作,将基质溶液点到每个点的上部,然后室温风干待用。

2.5 标准蛋白质的靶上酶解

靶上酶解的灵敏度使用三个标准蛋白质进行验证:肌红蛋白(myoglobin),细胞色素C(cytochrome c), β -酪蛋白(β -casein)。这三种蛋白质分别点在MALDI靶板上,点样的量依次是0.07, 0.07, 7 ng,酶解过程如上所述,先覆盖一层酶溶液,50 $^{\circ}\text{C}$ 酶解15分钟,干了之后点上适当的基质溶液。因为仅是几个标准样品点,所以采用手动点样即可。

2.6 质谱和数据检索

点样完毕,沉积在靶上的样品完全干燥后送入MALDI-TOF-TOF-MS (Applied Biosystem, USA)。该质谱仪采用MALDI离子源,串联飞行时间分析器,由4700 ExplorerTM软件控制。激光波长337nm,频率200 Hz。采用正离子反射模式。质谱加速电压为20kV,串联质谱加速电压为8kV。质量扫描范围设置为800-4000Da,在1800Da附近分辨率最高。选择每个MS谱中前8个强度最大的且信噪比大于40的肽段作串联谱。Trypsin酶解的马肌红蛋白的肽段用来校准仪器,仪器校准之后再对其它样品进行检测。

用GPS软件(version 1.0, Applied Biosystems, USA), Mascot (version 1.6, <http://www.matrixscience.com>, Matrix Science, London, UK)搜索引擎, IPI数据库(version 2.3.3)中的Homo sapiens(Human)亚库搜索,肽质量误差范围设置: $\pm 0.1\text{Da}$; 串联质谱质

量误差范围设置为： $\pm 0.2\text{Da}$ ，允许一个漏切位点。使用 GPS 软件对数据进行自动搜索和分析。

3 结果与讨论

3.1 蛋白质水平上的二维分离平台/靶上酶解/MALDI 鉴定系统的构建

本章在前几章研究的基础上构建了一个二维分离平台结合靶上酶解技术以及质谱鉴定技术形成一整套的融合了“bottom-up”和“top-down”技术优势的全新的分离鉴定系统。简而言之，可溶性的蛋白质首先经过强阳离子交换柱分离，同时进行馏份收集，得到 62 个馏份，然后这些馏份依次经过毛细管反相液相色谱分离，同样使用微馏份收集器对分离后的洗脱液进行收集，并且直接收集到 MALDI 靶板上，干燥之后在其上面点上一层酶溶液进行靶上酶解，其方法在实验部分有详细叙述，酶解完成之后，再在其上点上基质溶液，干燥之后可用于质谱检测。经过检测肽谱与串极谱之后，将数据使用特定软件自动搜索，搜索时采用通用的肽谱和串极联合搜索的方式，最后经过去除冗余等生物信息学的筛除总共得到 3313 个可靠蛋白质。

图5-1给出了蛋白质分离鉴定的流程的举例。可溶性蛋白质的SCX分离图如上一节图4-3所示，馏份收集的起始与结束时间以及每个馏份的时间节点在图上都有明确的标识。cRPLC分离SCX的17-21号馏份的色谱图如图5-1(A)所示，图上的箭头指示的是cRPLC色谱图上的保留时间为45到45.5分钟之一区间的色谱峰，相应的蛋白质的肽谱图在图5-1(B)中给出，从中选出的母离子(m/z 1477.75)的串极谱如图5-1(C)所示，其上标记的是鉴定的b、y离子碎片。鉴定的结果是四羟酮醇脱氢酶(flavin reductase)，序列为：NDLSPTTVMSEGAR。图5-2显示的是一张人肝可溶性蛋白质经过SCX/cRPLC两维分离之后的两维图，使用灰度值表示紫外信号的强弱，图中X轴方向每一个条带分别表示的是来自SCX的馏份，Y轴方向表示RPLC分离蛋白质的保留时间。我们将62个馏份分别经过cRPLC分离、靶上酶解、质谱鉴定后所得的肽谱图分别使用Matlab软件作图，相应的得到62张三维谱图(图5-3)，从图中很清楚的显示出这条技术路线可以将蛋白质充分酶解得到大量的信号比较强的肽谱信息，便于质谱进行串极的检测，从另外的层面提高了蛋白质鉴定的几率。在图5-4中，0.07 ng肌红蛋白的酶解产物经过靶上酶解之后质谱鉴定产生7个肽段相应的得到52%的序列覆盖度(图5-4a)，0.07 ng的细胞色素C的酶解产物中有5个肽段相应的46%的序列覆盖度(图5-4b)，同样的7 ng的 β -酪蛋白酶解产物中对应了8个肽段和25%的序列覆盖度(图5-4c)。这些结果都证明了同一现象，即靶上酶解技术能够很好的酶解低含量的蛋白质，然而，我们也观察到在低浓度的蛋白质酶解的肽段碎片谱图上有胰

蛋白酶碎片峰出现,但是这些碎片并不干扰其它蛋白质的检测。总之,从上述这些图中可以看出SCX/cRPLC二维分离系统在分离完整蛋白质方面展现了很高的分辨率,靶上酶解技术的采用又使分离后的蛋白质可直接酶解并用于质谱鉴定,在保留酶解前的蛋白质的信息的同时实现蛋白质的定性。

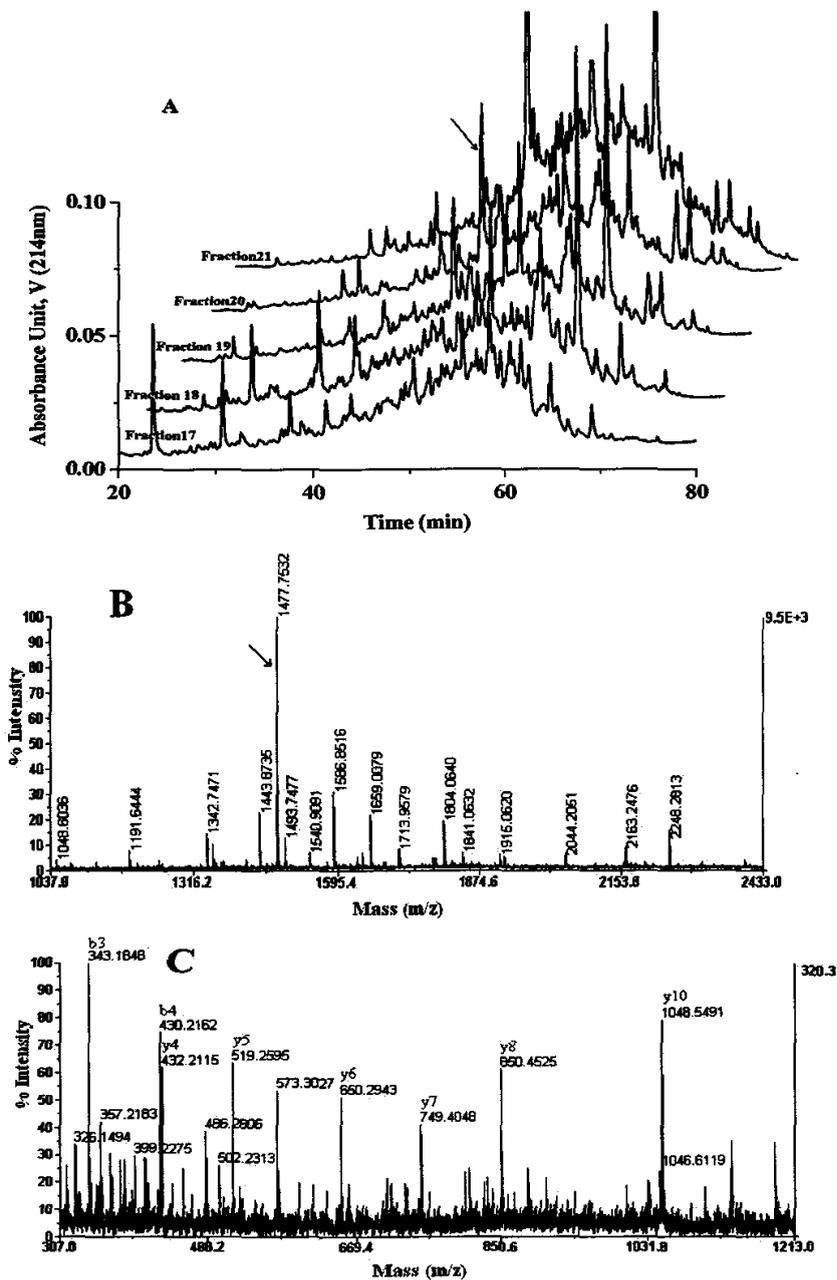


图5-1 给出了蛋白质分离鉴定的流程的举例。可溶性蛋白质的SCX分离图参看上一节图4-3所示，馏份收集的起始与结束时间以及每个馏份的时间节点在图上都有明确的标识。cRPLC分离SCX的17-21号馏份的色谱图如(A)所示，图上的箭头指示的是cRPLC色谱图上的保留时间为45到45.5分钟之一区间的色谱峰，相应的蛋白质的肽谱图在(B)中给出，从中选出的母离子(m/z 1477.75)的串联谱如(C)所示，其上标记的是鉴定的b、y离子碎片。鉴定的结果是四羟酮醇脱氢酶(flavin reductase)，序列为：NDLSPTTVMSEGAR

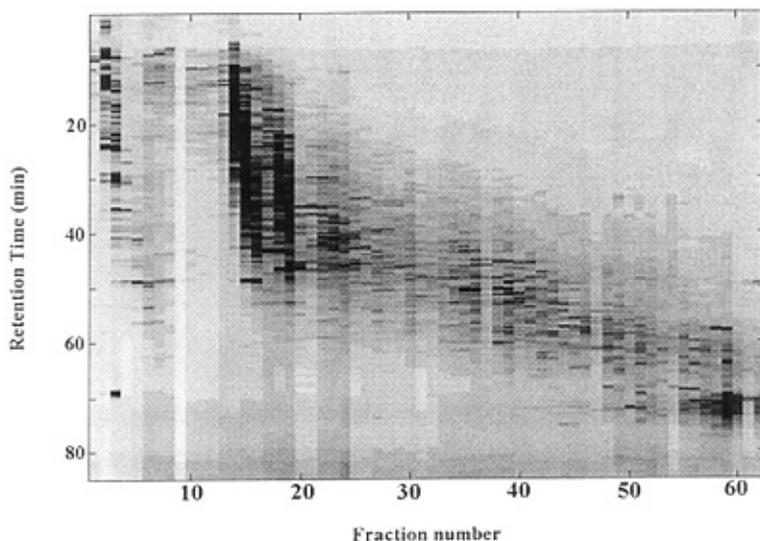
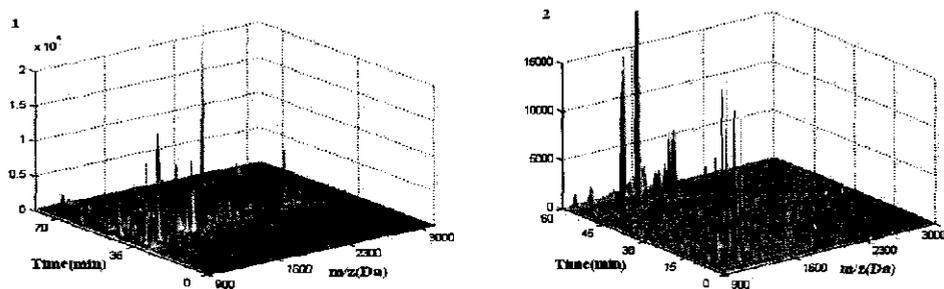
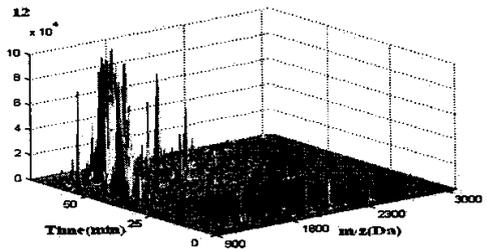
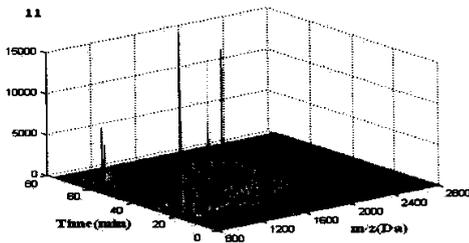
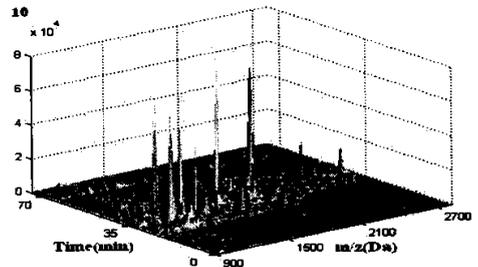
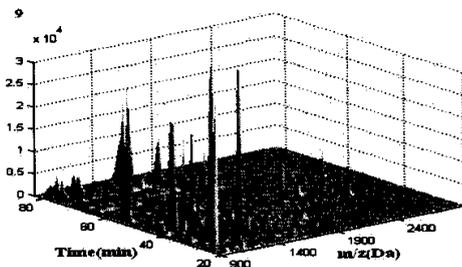
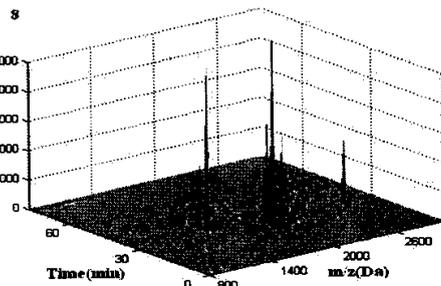
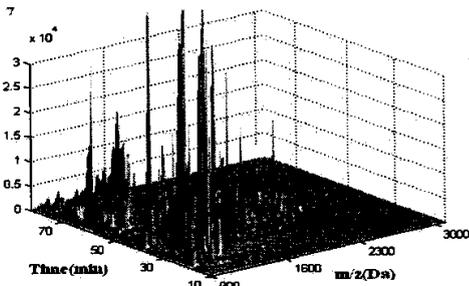
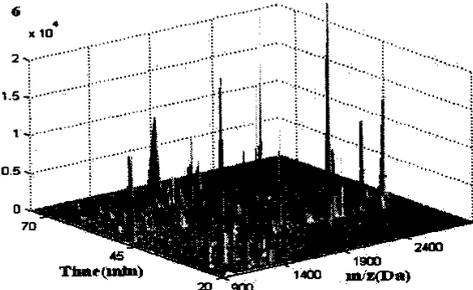
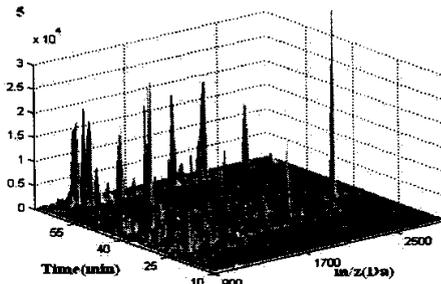
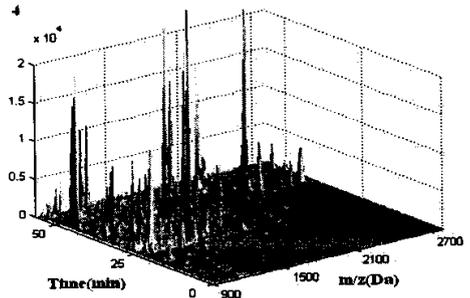
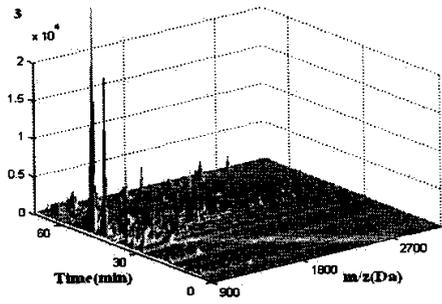
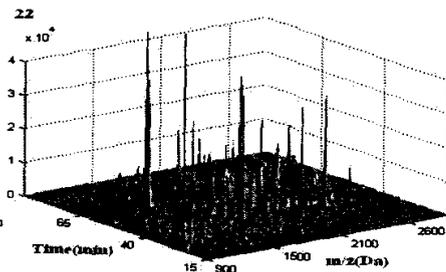
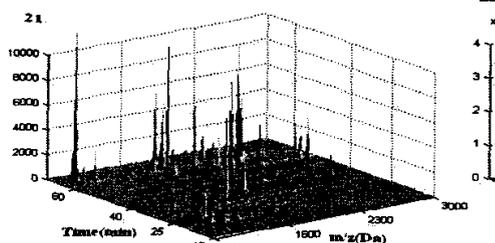
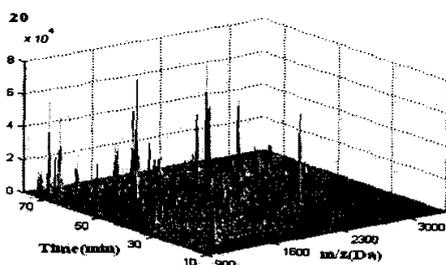
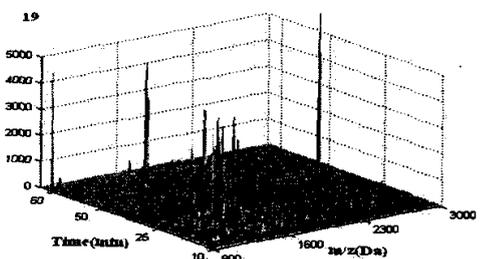
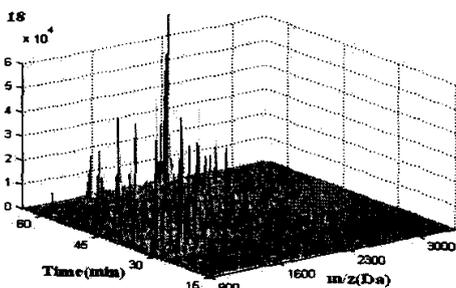
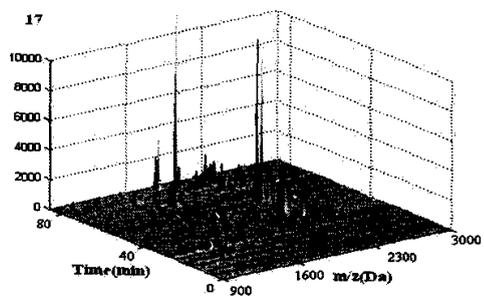
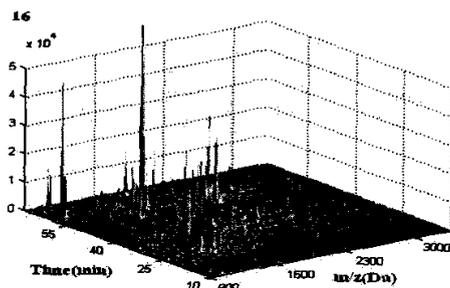
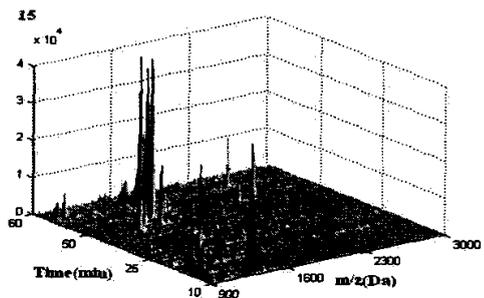
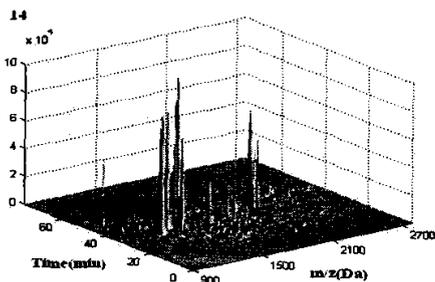
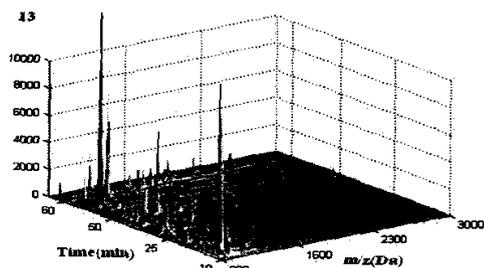
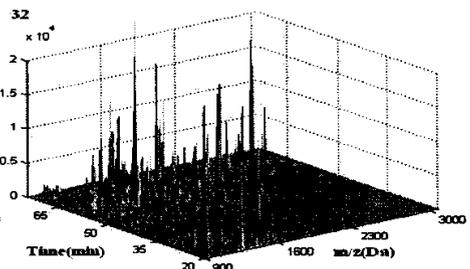
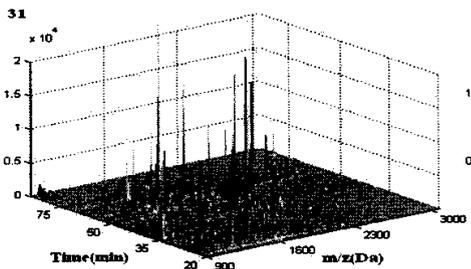
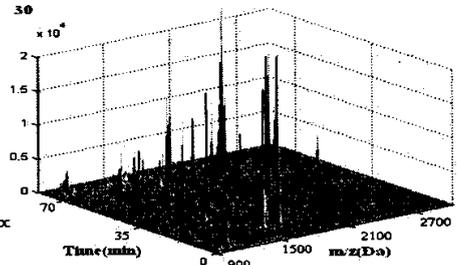
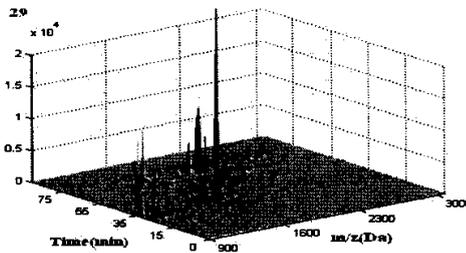
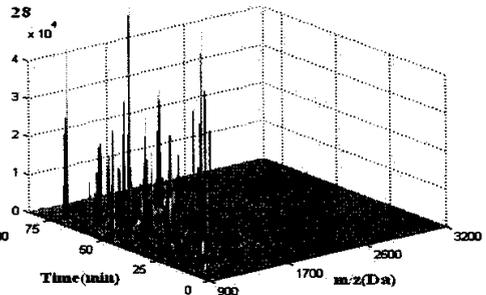
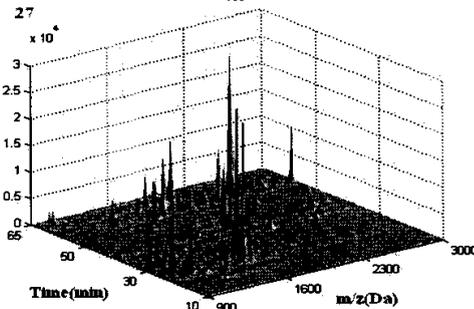
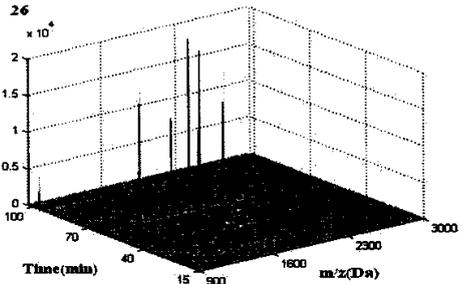
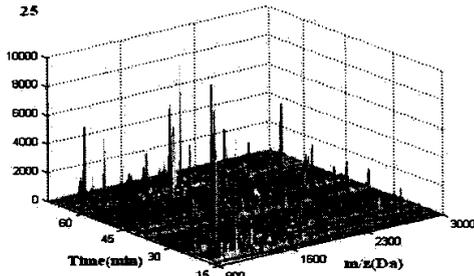
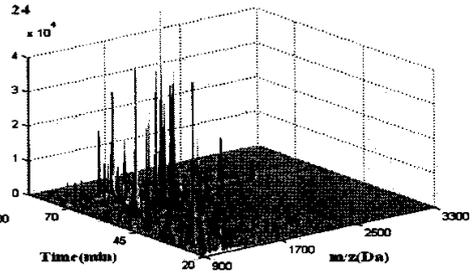
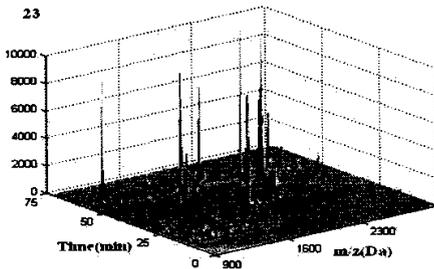


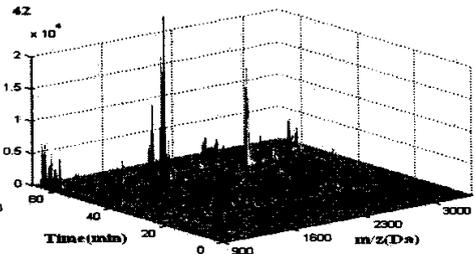
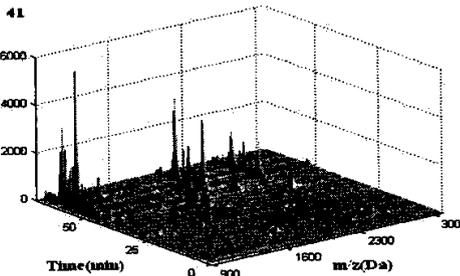
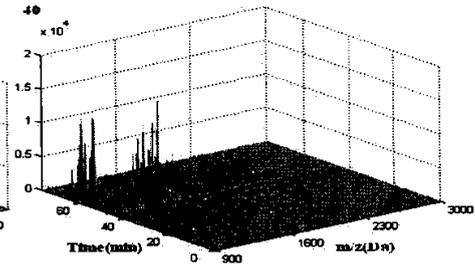
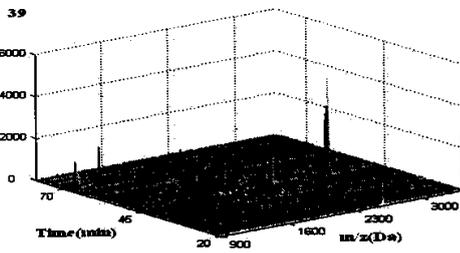
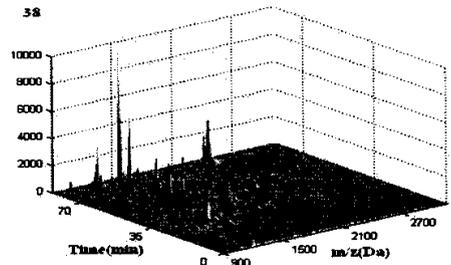
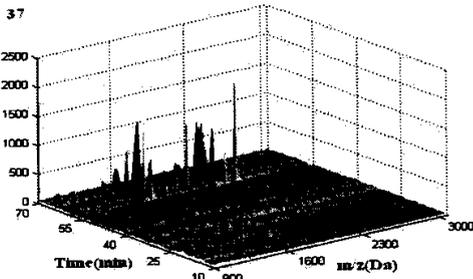
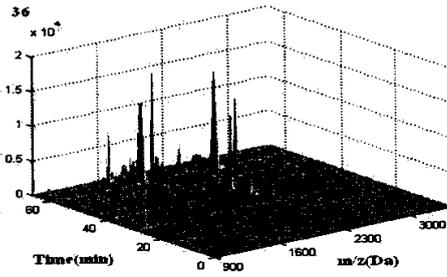
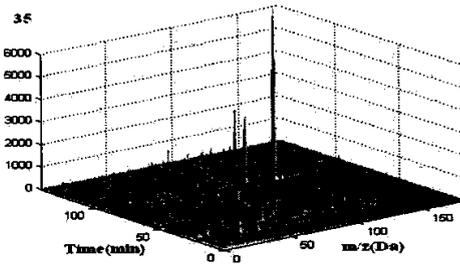
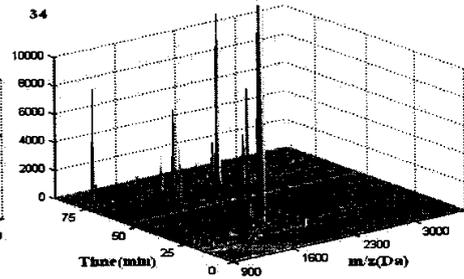
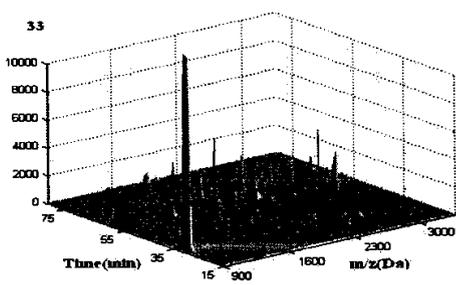
图5-2 人肝可溶性蛋白质经过SCX/cRPLC两维分离之后的两维图。图中横轴方向每一个条带分别表示的是来自SCX的馏份(n)，纵轴方向表示RPLC分离蛋白质的保留时间。

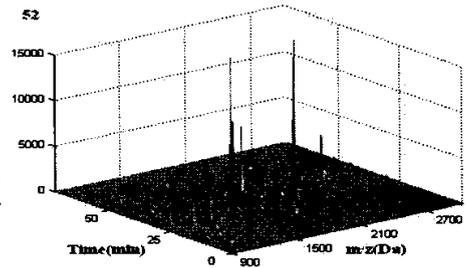
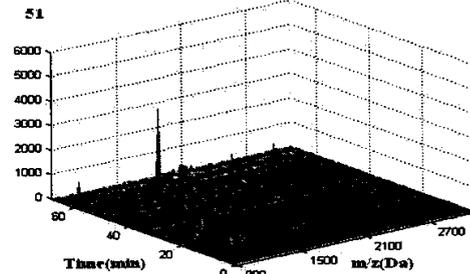
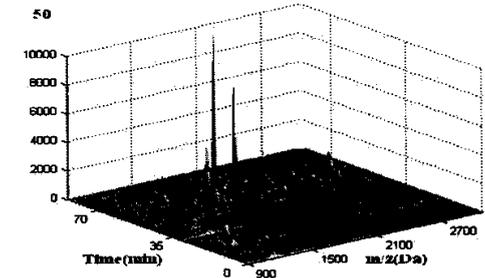
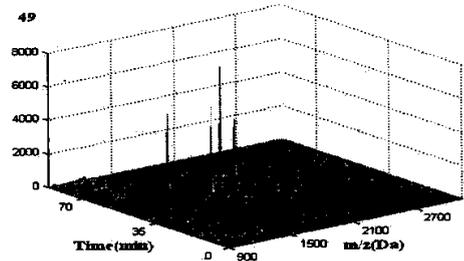
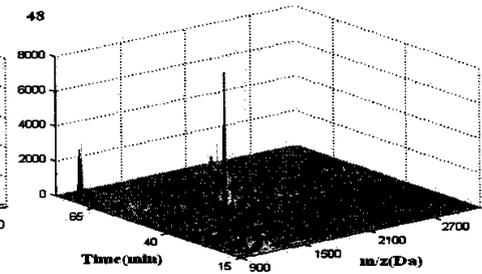
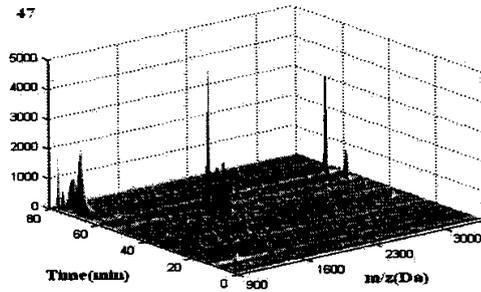
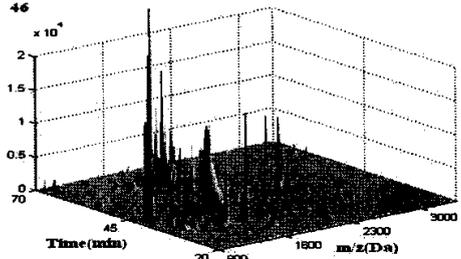
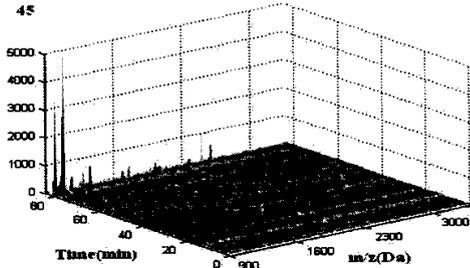
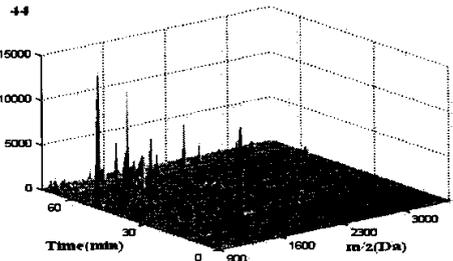
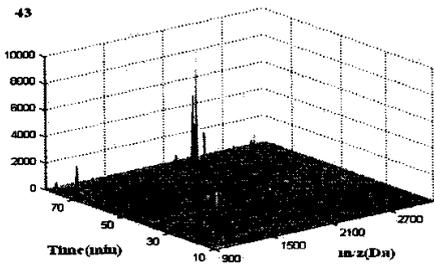












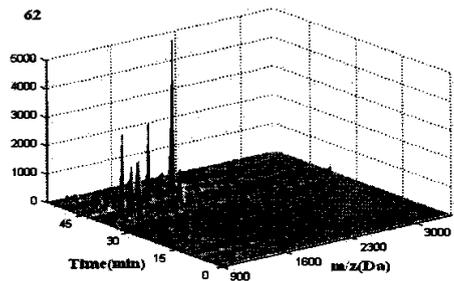
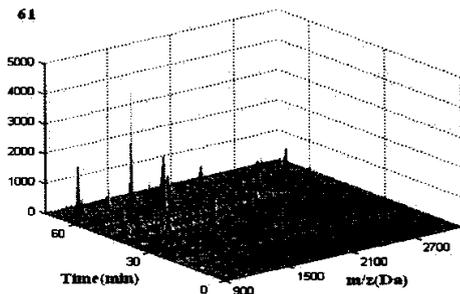
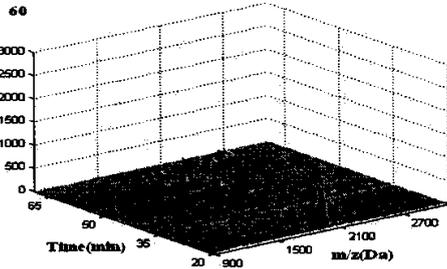
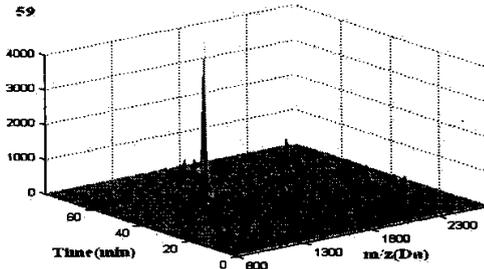
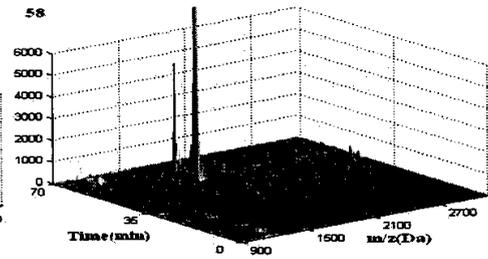
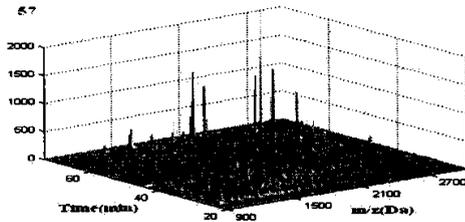
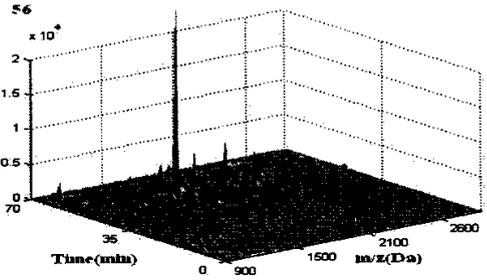
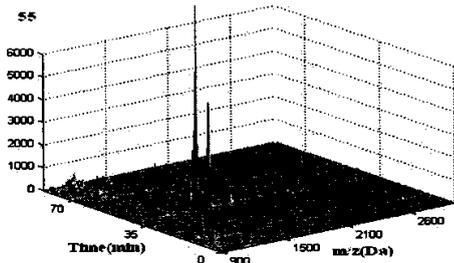
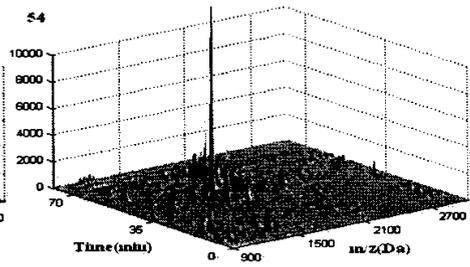
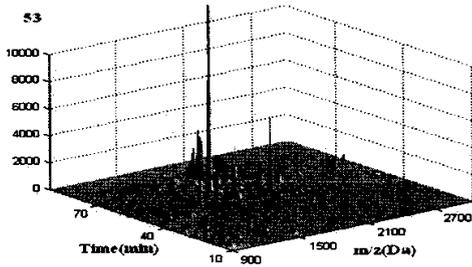


图5-3 人肝蛋白质经过SCX分离之后所得62个馏份，进一步经过cRPLC/靶上酶解/MALDI-MS分离鉴定后的三维谱图。

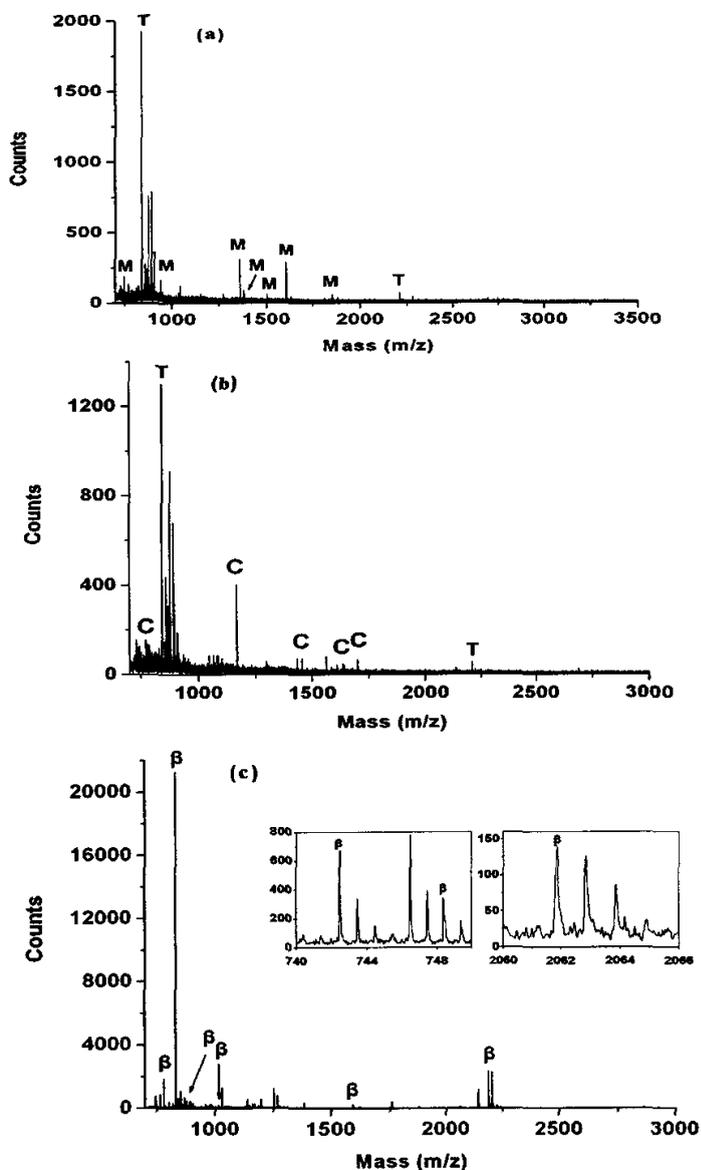


图 5-4, 标准蛋白质经过靶上酶解之后所得肽段的质谱鉴定图。(a) 0.07 ng 肌红蛋白, (b) 0.07 ng 的细胞色素 C, (c) 7 ng 的 β -酪蛋白。

到目前为止，很多不同的有机体都是通过肽段的多维分离进行了研究，像这样的先将

蛋白质酶解成肽段, 然后对混合的肽段进行分离的 *shotgun* 技术路线为蛋白质组学研究中低丰度蛋白质的检测提供了很大的潜力发挥了重要作用。然而, 在这个过程中很容易丢失完整蛋白质的信息, 而且酶解后的肽段数以百万计, 其复杂性远超过了蛋白质的复杂性, 直接的结果就是对多维色谱的分离能力以及现有的质谱的扫描速度提出了严峻的挑战, 在当前质谱的扫描速度没有突破性提高的前提下, 肽段如果不能充分分离就会导致一个色谱峰中共洗脱下来的肽段的串极信息的丢失, 从而降低蛋白质鉴定的数量。

为了得到完整蛋白质的信息, 很多研究人员作出了大量的努力, 制备级等电聚焦与液相毛细管等电聚焦分离通过一个腔体形成溶液pH梯度[27-31], 微型阴离子交换色谱构筑pH梯度洗脱[30], 类似的还有凝胶膜内含不同的pH梯度[56-57], 这些模式一般都作为第一维, 后面紧接RPLC作为第二维进行蛋白质的分离。这些“*top-down*”技术显示了获取蛋白质水平上的物理化学性质的优势同时却损失了对未知蛋白质的鉴定能力。实现对未知蛋白质的规模鉴定仍然是蛋白质组学研究中的重要方面, 所以, 如何将“*top-down*”和“*bottom-up*”路线的优势融合到一起将是蛋白质组学中的一个挑战。在本章的工作中, 构建的SCX/cRPLC/靶上酶解/MALDI-MS系统正如前面所给出的实验结果那样很完美的解决了这个问题或矛盾。其中的关键技术之一就是本组发展的靶上酶解技术, 正如图5-4中所显示的, 0.07 ng的标准蛋白质能够很好的被酶解鉴定, 就有很高的灵敏度, 可以用来批量的酶解液相分离出来的蛋白质样品, 将蛋白质的二维液相分离与酶解肽段的质谱鉴定很好的结合起来, 解决了液相色谱分离时存在的蛋白质定性与蛋白质相关信息的获取相互矛盾的问题, 丰富了蛋白质组学研究中的技术方法。

SCX偶合cRPLC是蛋白质组学中常用的分离模式, SCX具有上样量大的优势, 而cRPLC具备高的分辨率和小的稀释因子的优势, 而且反相色谱还具有在柱头富集样品的能力能够承受样品较大的稀释比, 另外, cRPLC具有除盐的能力, 这一点对cRPLC之后的质谱分析非常有益, 因为大量盐的存在既会影响酶解的效率又会影响质谱的信号。

正如图5-1和图5-2所示, 系统显示了很高的分辨能力, 蛋白质从cRPLC洗脱时的平均峰宽大约为0.6分钟, 如果采用 $R_s=1.5$, 那么在有效的分离时间(60min)内的峰容量为67, 另外, SCX与cRPLC的分离机理完全正交, 所以系统的峰容量就估算为4154 (62个SCX馏份 \times 第二维cRPLC的峰容量67)。在本文选用2分钟的馏份收集时间节省了分离时间却损失了分辨率, 因此, 如果实验需要可以适当增加馏份数量, 尽管牺牲了一些分离时间但是相应的提高了分辨率和系统的峰容量。

另外, 靶上的样品酶解是非常方便的, 因为来自上游的流动相, 例如: 乙腈和TFA, 都是在空气中就可以挥发除去的, 溶解蛋白质的溶剂挥发掉的同时蛋白质就在靶板上得

到了富集。50 °C 这样相对高的酶解温度在一定程度上对蛋白质起到了变性的效果，有利于加速酶解缩短酶解的过程。这种直接将馏份收集到用于质谱鉴定的靶板上并在其上进行酶解，避免了其它的繁琐的样品准备、纯化或转移步骤，大大减少了样品损失。众所周知，胶上酶解之后肽段的转移率相当低，使原本含量就很少的低丰度蛋白又在转移过程中大量损失，造成质谱检测的困难。因此，相比之下，这种直接酶解的方法有富集、时间短、效率高优势便于大规模的对由毛细管液相色谱洗脱的蛋白质进行酶解，实现了高通量。

3.2 系统重现性考察

SCX/cRPLC/靶上酶解/MALDI-MS 分离鉴定系统的重现性经过了考察。同一样品经过 SCX 平行分离三次，然后以 32 号馏份为例进一步使用 cRPLC 分离，所得谱图列于图 5-5，从色谱图上可以看出色谱峰的峰形和保留时间都非常相近表现了良好的重现性，其中对图中标记的五个色谱峰使用靶上酶解的方法进行了鉴定，结果发现不同批次的相同的保留时间的色谱峰鉴定为同一蛋白质，分别为 galactose-1-phosphate uridylyltransferase, splice Isoform 1 of Abnormal spi, alcohol dehydrogenase beta chain, myosin heavy chain, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase。全自动的进样系统和馏份收集系统以及良好的色谱柱容量和性能为二维系统良好的重现性提供了保障。良好的重现性使这个新方法可以运用到差异蛋白质组学中，而且离线的方式可以允许灵活的针对某一馏份的进行分析，具有灵活性。

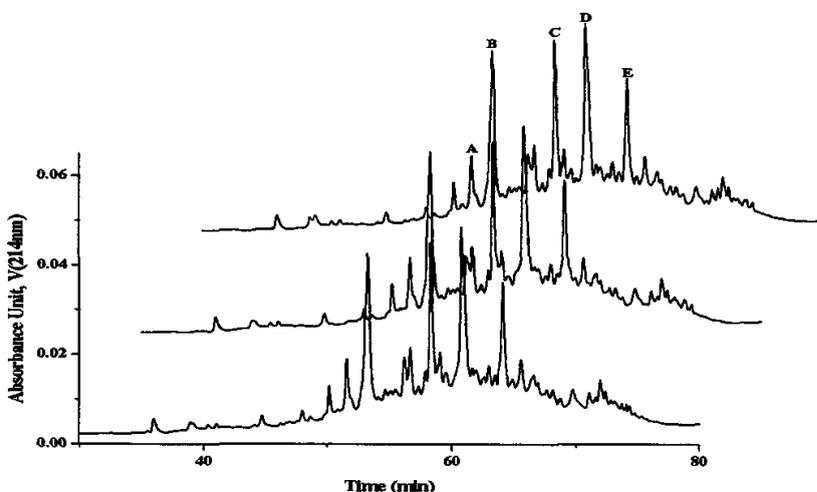


图 5-5 cRPLC 对来自 SCX 同一样品的不同批次的第 32 号馏份进行分离的色谱图，图中标记的色谱峰使用分别使用靶上酶解的技术进行鉴定，结果展示了良好的重现性。

3.3 鉴定的人肝蛋白质的等电点与分子量的分布统计

图 5-6 展示了这种新策略所鉴定蛋白质的等电点(pI)和分子量(MW)的分布图。在这些鉴定的蛋白质中,分子量最大的是 Tax_ID=9606 Titin, 分子量为 $3.81E+6$, 最小的分子量为 Tax_ID=9606 ORF1, 其分子量为 4335。同时,统计发现,在鉴定的蛋白质中有 60.4% 的蛋白质的分子量集中在 20,000 与 100,000Da 之间,8.5% 的蛋白质的分子量低于 20,000, 另有 31.1% 的蛋白质的分子量高于 100,000Da。鉴定的蛋白质的等电点范围主要集中在 4.37 与 13.07 之间,其中有 11.4% 的蛋白质属于碱性蛋白质其等电点大于 10。实际上,对于极端的蛋白质,例如分子量小于 20,000 或大于 100,000, 或者极碱的蛋白质等,对于双向凝胶电泳技术都是比较难以检出的蛋白质。另外,本实验鉴定的等电点范围还宽于已经有报道的 Rotofor 的 pH 梯度[27-31], 液相毛细管电泳等电聚焦[32-34], 固定 pH 梯度的凝胶膜技术[56-57], 也明显宽于阴离子交换色谱的 pH 洗脱范围。从以上结果来看, SCX/cRPLC/靶上酶解 /MALDI 鉴定这条技术路线是分离复杂样品的理想平台。

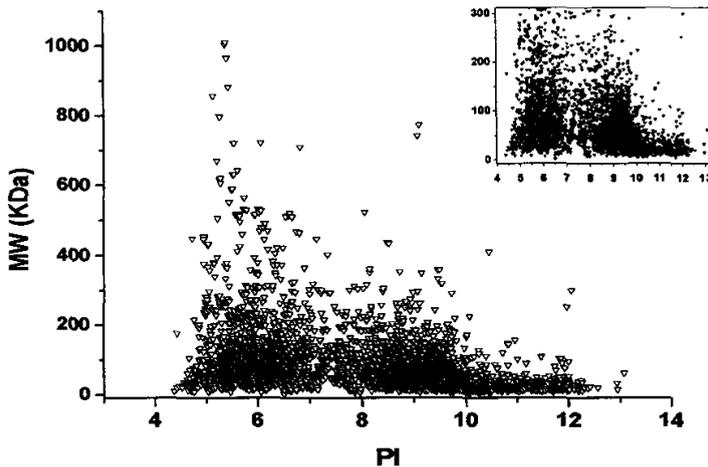


图 5-6 新策略所鉴定蛋白质的等电点(pI)和分子量(MW)的分布图。

3.4 定量分析

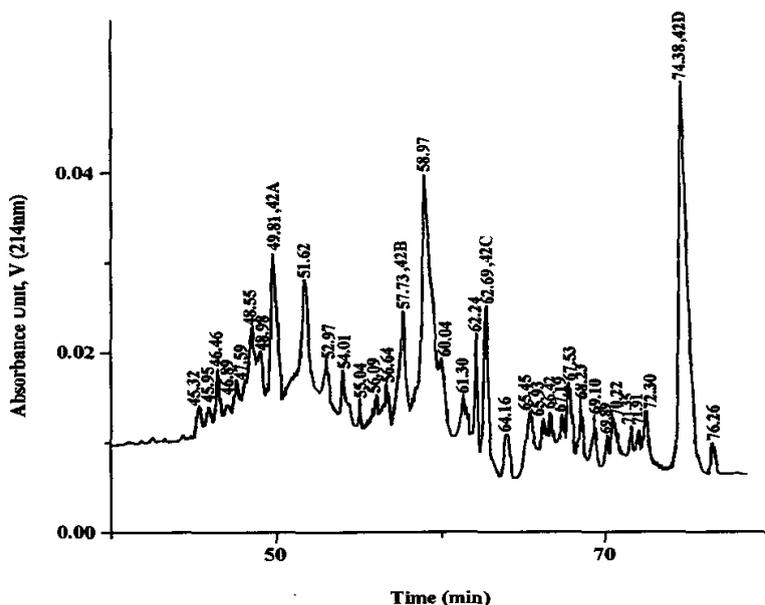


图5-7 来自SCX的42号馏份经cRPLC分离的色谱图，图上的标识为色谱峰的保留时间，部分标记的色谱峰被作定量分析。

蛋白质组学研究的一个重要方面是定量分析，目前，在这方面的技术还并不成熟，还处于研究阶段。考马斯亮蓝与银染是传统的对聚丙烯酰胺凝胶的染色方法经常被用于蛋白质的定量，利用凝胶上染色斑点的深浅来相对判断蛋白质含量的高低，但是因为其相对较窄的动态范围所以并不是非常适合对蛋白质定量，银染的方法的检测限大约为1-10 ng，考马斯亮蓝的染色一般可以检测到100 ng，另外文献报道标准蛋白质的紫外检测可达到10 ng到 20 μg [27]。紫外检测是高效液相色谱上常用的检测手段，其灵敏度与银染相当，定量操作相对简单，所以高效液相色谱与紫外检测越来越多的被用在蛋白质定量分析上[29, 62-66]。

本工作以42号馏份作为一个例子来对定量分析进行说明。这个馏份的蛋白质的上样量为23.7 μg，同时对色谱峰的峰面积进行积分，总面积为 1.99×10^5 ，相应地单个色谱峰42A, 42B, 42C和42D的峰面积分别为： 1.43×10^4 , 0.98×10^4 , 1.06×10^4 , 3.31×10^4 ，那么单个色谱峰的峰面积与总的色谱峰的峰面积的比例就是这个对应的蛋白质在总的上样量的比例。因此，如果假定回收率是100%，那么鉴定的蛋白质的量分别为sorbitol dehydrogenase (42A, $t_R = 51.76$) 是1.70 μg, DLNB07 protein (42B, $t_R = 57.63$)是1.17μg, phosphoenolpyruvate carboxykinase (42C, $t_R = 62.76$)是1.26 μg, centromeric protein E (42D, $t_R = 74.43$) 是3.94 μg。然而在一般的反相色谱的回收率为70%与95%之间[67]，那么如果假定回收率为80%，上

述几种蛋白质的量分别为1.36, 0.94, 1.01, 3.15 μ g。另外本工作采用的是214nm的检测波长, 此波长是对氨基之间的作用力进行检测因此提供了相对低的检测灵敏度, 能对蛋白质进行比较全的检测而不管蛋白质的种类如何[27]。

当然, 无论液相色谱紫外检测还是双向凝胶电泳加上染色定量都面临同样一个问题, 就是如果一个色谱峰或是胶上的一个蛋白质染色点包含两个或两个以上的蛋白质那么就不能很严格的进行定量。对于这种问题, 更进一步的分离工作将蛋白质尽量分开可以在一定程度上解决这个问题, 目前, 不同的同位素标记技术的出现结合质谱技术提高了蛋白质定量的效率和准确性[20, 58-61]。然而, 二维液相谱图仍然能够提供大量的有关蛋白质定量的信息。

4 结论

在本节工作中, 我们突破了现在流行的 shot-gun 技术先将蛋白质酶解成肽段然后分离比蛋白质更加复杂的肽段的这主流思想的限制, 开创性的提出了二维完整蛋白质分离/靶上酶解/质谱鉴定这样一个全新的思路。这一新思想的可行性和有效性在人肝蛋白质组学中得到验证。然而在蛋白质定量方面, 因为有些蛋白质峰分离的不够充分造成定量上的困难, 所以在下一节的工作中, 我们将尝试使用三维的分离的方法希望将蛋白质更充分的分离以达到对更多的蛋白质进行准确的定量的目的。

第二节 SEC/SCX/RPLC三维分离定性与定量系统的探索

1 引言

定量蛋白质组学是指通过某种方法或技术,对生物样品(细胞、组织或体液等)在某些过程中蛋白质的含量进行比较分析。从蛋白质组水平上对基因表达进行准确的定量分析,是比较蛋白质组学的重要内容,是研究重大疾病致病机制以及药理控制机制的必要手段。

目前,在这方面的技术还并不成熟,还处于研究阶段。考马斯亮蓝与银染是传统的对聚丙烯酰胺凝胶的染色方法经常被用于蛋白质的定量,利用凝胶上染色斑点的深浅来相对判断蛋白质含量的高低,但是因为其相对较窄的动态范围所以并不是非常适合对蛋白质定量,银染的方法的检测限大约为1-10 ng,考马斯亮蓝的染色一般可以检测到100 ng,另外文献报道标准蛋白质的紫外检测可达到10 ng到 20 μ g [27]。紫外检测是高效液相色谱上常用的检测手段,其灵敏度与银染相当,定量操作相对简单,所以高效液相色谱与紫外检测越来越多的被用在蛋白质定量分析上[29, 62-66]。

另外,不同的同位素标记技术的出现结合质谱技术[20, 58-61]提高了蛋白质相对定量的效率和准确性。同位素标记不同于一般的内标法,是一种“多”内标技术,或称“广泛”内标技术,而且这种技术只能确定内标肽段与分析肽段在量上的相对关系,不能像一般分析化学中的内标法一样给出被分析物的绝对含量。

无论液相色谱紫外检测还是双向凝胶电泳加上染色定量都面临同样一个问题,就是如果一个色谱峰或是胶上的一个蛋白质染色点包含两个或两个以上的蛋白质那么就不能很严格的进行定量。对于这种问题,更进一步的分离工作将蛋白质尽量分开可以在一定程度上解决这个问题。。随着分析化学方法和技术的不断发展,必将为日益深入的蛋白质组学研究搭建更为有效的技术平台,为人类从蛋白质水平上揭开生命活动的规律,征服疾病,并最终摆脱疾病的威胁提供强有力的武器。

本节工作的主要思路就是希望通过对蛋白质的复杂体系进行完整蛋白质的三维分离以达到对蛋白质的充分分离的目的,结合紫外检测对蛋白质色谱峰进行检测,利用归一法对蛋白质的峰面积作统计处理,从而根据单个蛋白质的峰面积比求得其相应的含量。同时将分离后的蛋白质进行酶解、质谱鉴定从而实现蛋白质的定性分析。

2 实验部分

2.1 试剂与材料

乙腈 (ACN, 高效液相色谱纯, Merck Co), 三氟乙酸 (TFA, 高效液相色谱纯, Tedia company. inc.), 苯甲磺酰氟 (PMSF) (上海华瞬生物工程有限公司), α -氨基-4-羟基-肉桂酸 (CHCA, Sigma Chemical Co), 柠檬酸铵, 测序级胰蛋白酶为 Roche 公司产品; 碳酸氢铵、氯化铵等为国产分析纯试剂, 熔融石英毛细管 (250 μm i.d., 380 μm o.d.) 购自河北永年锐泽色谱器件有限公司(河北, 中国)。Zorbax 300SB C8液相色谱填料 (5 μm , 300 \AA , Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) 和 Zorbax BP-SIL 硅胶 (7 μm , 80 \AA , DuPont, Wilmington, DE, USA) 分别用来装填液相分析柱和制备毛细管柱塞。实验中所用水为 Milli-Q 去离子水。

健康大鼠肝组织样品由复旦大学动物实验房提供。所有样品都在 -80°C 保存以防止蛋白质降解。

2.2 样品制备

鼠肝组织被切成小块, 用冰生理盐水 (0.9% NaCl 溶液) 清洗三次以除去体液及血液中一些可能的污染物。接着称重, 以 1: 8 (g: mL) 的比例加入提取液 (1 mmol/L PMSF, 0.2 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, cocktail 试剂 (Roche, Basel, Switzerland) 和 0.1% (v/v) TFA), 然后置于玻璃匀浆器内进行手动匀浆, 直至组织完全破碎, 整个匀浆过程在冰浴中进行。匀浆液混旋 30 分钟, 在 4°C 条件下 18000 g 离心 15 min, 取上清液即为提取蛋白, -80°C 保存备用, 蛋白质提取液由 Qu 等改进的 Bradford 法定量[54]。

2.3 SEC/SCX/RPLC 系统

常规柱分离的色谱系统由 LC-2010 分离装置和 FRC-10A 馏份收集装置组成 (Shimadzu Corp., Japan)。LC-2010 系统是一套高集成的色谱分离系统, 它由一个低压四元梯度泵, 自动进样器的最大进样量为两毫升, 在线脱气系统, 恒温系统和一个双波长的紫外可见检测器组成。系统自带的 Class-VP 工作站负责记录和处理数据, FRC-10A 馏份收集系统由 SCL-10A 控制器进行控制 (Shimadzu Corp., Japan), 紫外检测波长为 215nm。本章使用的常规三维分离系统是采用离线的方式对样品进行多维切换。

蛋白质体积排阻柱: Shodex PROTEIN KW-803, 8mm \times 300mm (东京, 日本), 流动相: 100%水, 流动相流速: 0.3 mL/min, 等度洗脱, SEC 的馏份收集如图 5-8(1) 所示, 时间节点分别是: (A)41min 之前, (B)41-42min, (C)42-43min, (D)43-47min, (E)47-51min, (F)51-60min。进行 6 次平行收集, 上样量为: 400 μg /次, 以评价 SEC 分离重现性如图 5-8(2) 所示。

SCX 色谱柱 (Agilent Technologies, USA), 内径是 4.6mm, 25cm 长, 采用 5 μm , 300 \AA ,

Zorbax 填料, 分析柱前加一个 1.2cm 长内径为 4.6mm 的保护柱以防止污染或堵塞主柱, 保护柱的填料与分析柱相同。

SCX 梯度洗脱溶剂为: A: 0.1%TFA-100% H_2O ; B: 1M 氯化铵-10%乙腈-0.1%TFA。流动相洗脱梯度为: 0% B 15 分钟, 20 分钟内线性上升至 100% B, 保持 5 分钟, 1 分钟内降至 0% B。流速设为 0.8 mL/min, 每一个 SEC 的馏份经过 SCX 进一步分离, 从 4 分钟到 49 分钟每 1 分钟收集为一个馏份, 得到 45 个亚馏份。6 个 SEC 馏份经过 SCX 进一步分离之后总共有 270 个亚馏份, 这些亚馏份等待 RPLC 的第三维的分离进而定性与定量。

RPLC 色谱柱采用 C18 的反相柱 (大连依利特分析仪器有限公司, 中国), 内径是 4.6mm, 25cm 长, 采用 5 μ m, 300 \AA , Hypersil 填料, 分析柱前加一个 2cm 长内径为 4.6mm 的保护柱以防止污染或堵塞主柱, 保护柱的填料与分析柱相同。

RPLC 梯度洗脱溶剂为: C: 98% H_2O -2%乙腈-0.1%TFA; D: 98%乙腈-2% H_2O -0.1%TFA。流动相洗脱梯度为: 0% D 5 分钟, 65 分钟内线性上升至 50% D, 5 分钟内由 50% 线性升至 100% D, 保持 5 分钟, 5 分钟内降至 0% D。流速设为 0.7 mL/min。

RPLC 分离后的洗脱液每分钟收集为一个馏份, 冷冻干燥后, 加入适量的酶溶液 (测序级的修饰酶溶解在 20mM 的碳酸氢铵溶液中), 37 °C 保温, 酶解过夜。手动的方式使用移液枪加入基质溶液 (5 mg/mL CHCA diluted in 50% ACN-50% H_2O -0.1% TFA-0.3 mg/mL 柠檬酸铵) 将肽段溶解下来进行点样。定量方法同上节所述, 使用面积归一法。

2.4 质谱和数据检索

点样完毕, 沉积在靶上的样品完全干燥后送入 MALDI-TOF-TOF-MS (Applied Biosystem, USA)。该质谱仪采用 MALDI 离子源, 串联飞行时间分析器, 由 4700 ExplorerTM 软件控制。激光波长 337nm, 频率 200 Hz。采用正离子反射模式。质谱加速电压为 20kV, 串联质谱加速电压为 8kV。质量扫描范围设置为 800-3500Da, 在 1800Da 附近分辨率最高。选择每个 MS 谱中前 6 个强度最大的且信噪比大于 40 的肽段作串联谱。Trypsin 酶解的马肌红蛋白的肽段用来校准仪器, 仪器校准之后再对其它样品进行检测。

用 GPS 软件 (version 1.0, Applied Biosystems, USA), Mascot (version 1.6, <http://www.matrixscience.com>, Matrix Science, London, UK) 搜索引擎, IPI 数据库 (version 2.3.3) 中的 rattus 亚库搜索。肽质量误差范围设置: ± 0.3 Da; 串联质谱质量误差范围设置为: ± 0.4 Da, 允许一个漏切位点。使用 GPS 软件对数据进行自动搜索和分析。

3 结果与讨论

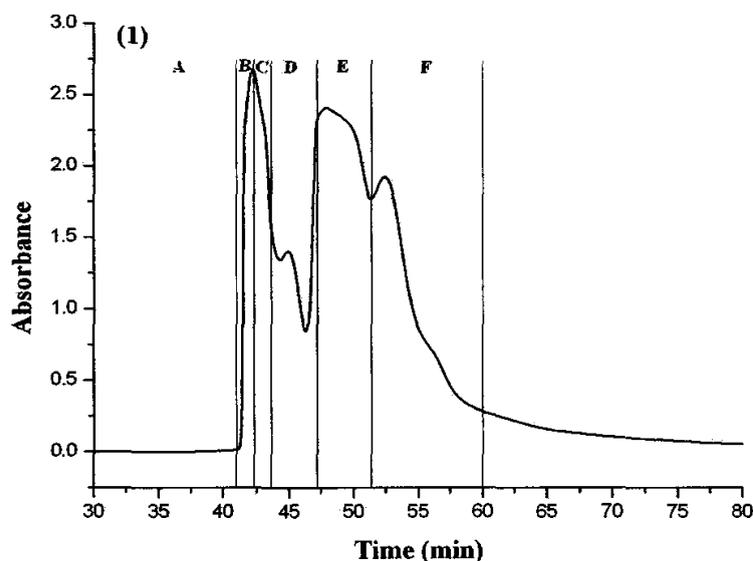
3.1 对三维分离体系的考虑

在上一节的工作中，我们发展了全新的 SCX/cRPLC/靶上酶解/MALDI-MS 系统，对人肝组织进行了高效的分离。在这个工作的基础上，我们加入第三维体积排组色谱 SEC，希望进一步提高峰容量和分辨能力，以期达到对蛋白质的充分分离进而实现定性检测与定量分析。从色谱分离的机理来看，SEC、SCX 与 RPLC 三者是完全正交的，SEC 根据分子量的大小对蛋白质进行分离，SCX 依据静电作用力不同分离蛋白质，RPLC 则是按照疏水作用力的不同实现分离的。

SEC/SCX/RPLC/三维分离的峰容量可进行估算，大约有 36000 (6 个 SEC 馏分×45 个 SCX 馏分×45 个 RPLC 馏分=12150)。随着对 SCX/RPLC 二维分离的优化，整个三维分离系统将会达到理想的分辨能力，更适合于蛋白组样品的定性与定量分析。

3.2 鼠肝组织蛋白的 SEC/SCX/RPLC 三维分离结果

图 5-8(1)是鼠肝组织蛋白质的 SEC 的分离色谱图，图中虚线标明了馏份收集的时间节点，共有 6 个馏份用于下一维的分离，图 5-8 (2) 平行六次的色谱图，表现了很好的重现性。图 5-9(A-F)是 SCX 分离上一维的馏份的色谱图，这一维的馏份收集是按照每分钟一个馏份进行收集的，图 5-10 是将 SCX 中的 D 号分离时的所得的 31-32min 这个区间的馏份中进行了 RPLC 分离，我们将其作为例子进行定性与定量的实验演示。



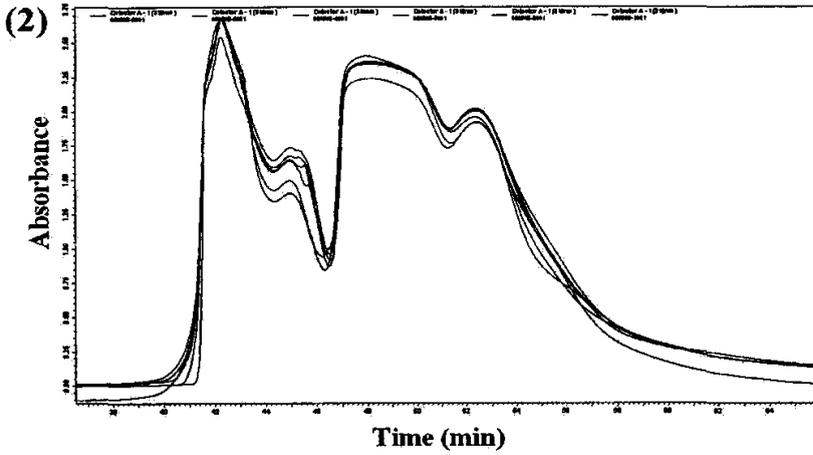
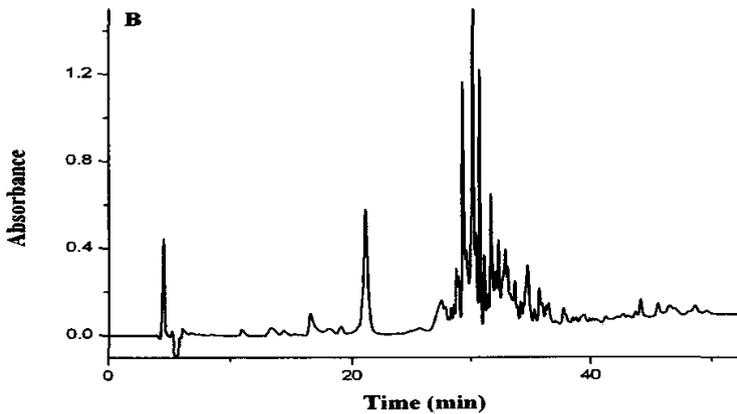
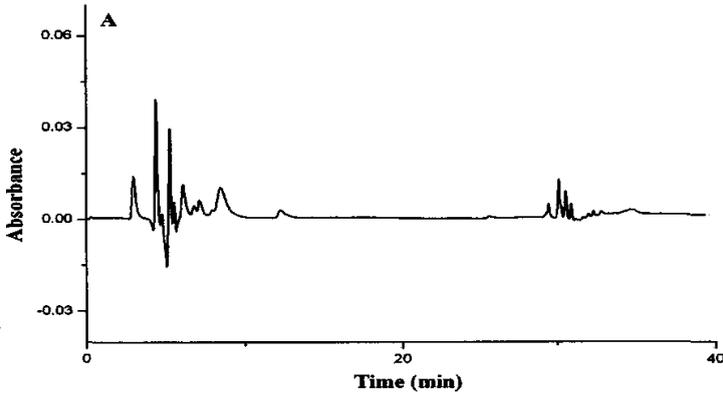
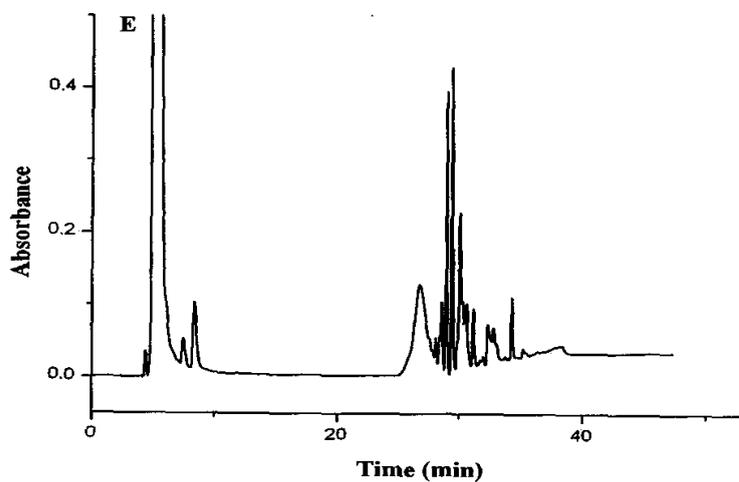
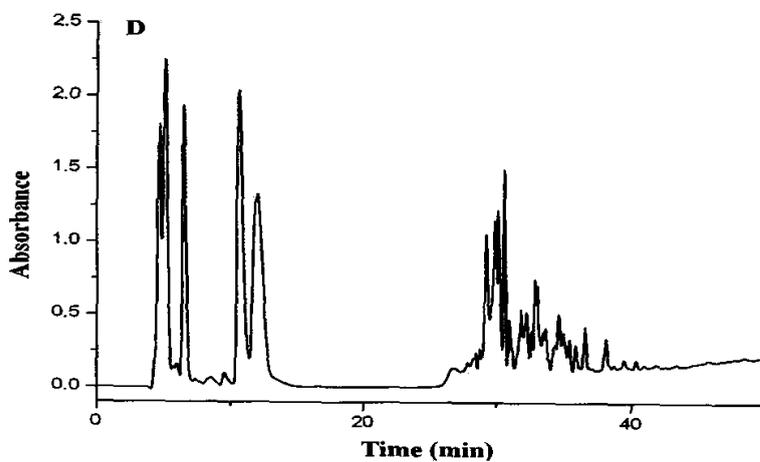
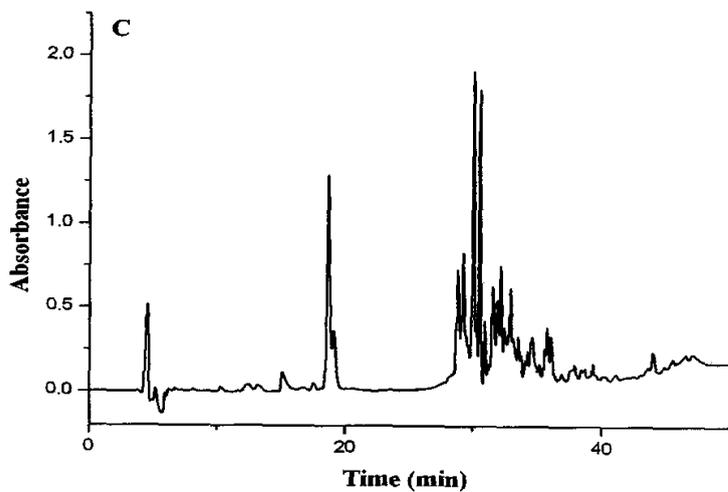


图 5-8 鼠肝组织蛋白质的 SEC 的分离色谱图, (1)馏份收集的时间节点分别是: (A)41min 之前, (B)41-42min, (C)42-43min, (D)43-47min, (E)47-51min, (F)51-60min. (2) 平行六次的色谱图, 表现了很好的重现性。





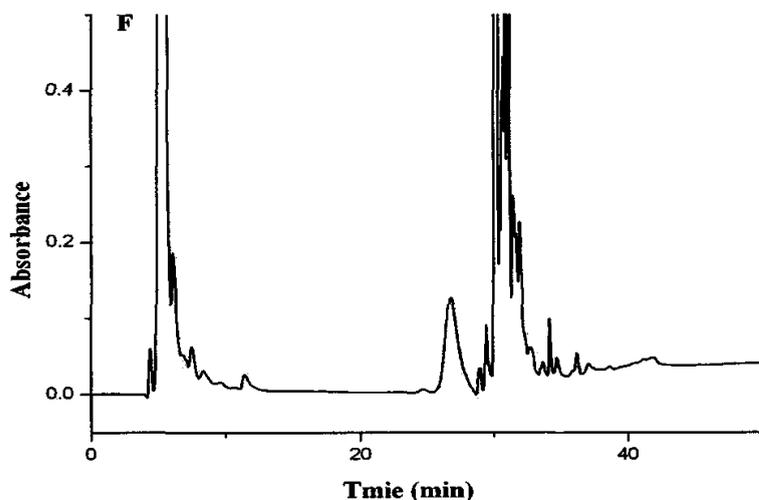


图 5-9(A-F) SCX 分离来自上一维 SEC 的馏份的色谱图。从 4 分钟到 49 分钟每 1 分钟收集为一个馏份，得到 45 个亚馏份。6 个 SEC 馏份经过 SCX 进一步分离之后总共有 270 个亚馏份，有效的亚馏份为 210 个等待 RPLC 的第三维的分离进而定性与定量分析。

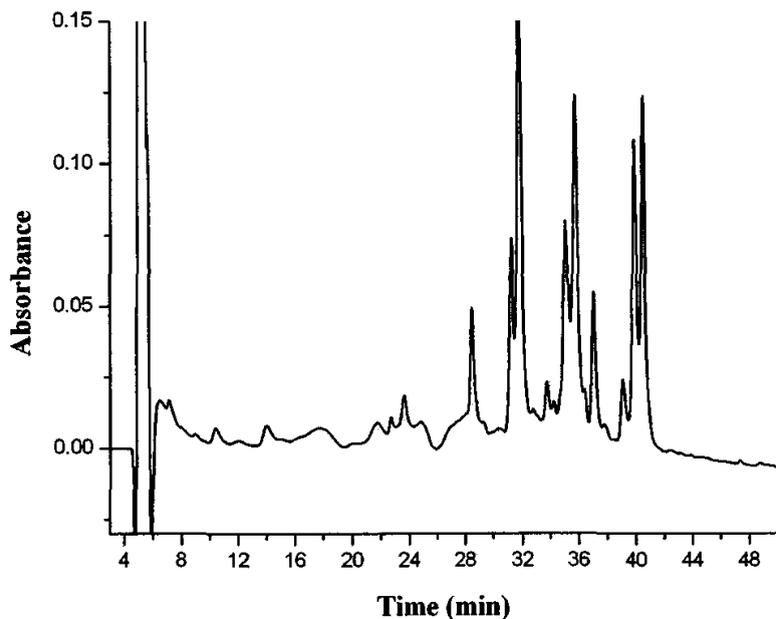


图 5-10 将 SCX 中的 D 号分离所得的 31-32min 的馏份进行了 RPLC 分离，从 4min 到 49min 之间，每分钟收集一个馏份，冻干，酶解，质谱鉴定。鉴定结果如表 5-1 所示。

表 5-1 SCX 中的 D 号分离所得的 31-32min 的馏份进行了 RPLC 分离后鉴定的蛋白质列表。

position	ID	Accession No	MW	PI	C ($\mu\text{g/g}$)
6-7min	Tax_Id=10116 Apoptotic protease activating factor 1	IPI00324110	141062.1	6.01	1.2
7-8min	Tax_Id=10116 PREDICTED: similar to ribosomal protein	IPI00564109	23975.48	10.35	0.98
9-10min	Tax_Id=10116 Exocyst complex component 7	IPI00199842	74998.82	6.27	0.73
10-11min	Tax_Id=10116 Hypothetical protein	IPI00368874	65877.65	6.33	0.89
11-12min	Tax_Id=10116 Shadow precursor	IPI00196291	14702.36	10.38	0.81
12-13min	Tax_Id=10116 23 kDa protein	IPI00206432	23221.66	9.01	0.77
13-14min	Tax_Id=10116 CDK105 protein	IPI00551792	25928.56	9.95	0.95
14-15min	Tax_Id=10116 Insulin receptor substrate-2	IPI00211540	15953.94	10.66	0.62
15-16min	Tax_Id=10116 34 kDa protein	IPI00389020	33732.19	10.19	0.59
16-17min	Tax_Id=10116 Splice Isoform 8 of Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	IPI00230881	306713.2	5.9	0.68
17-18min	Tax_Id=10116 60S ribosomal protein L18a	IPI00192257	20718.89	10.73	0.74
18-19min	Tax_Id=10116 Ethanolamine phosphate cytidylyltransferase	IPI00211445	45191.52	6.2	0.83
22-23min	Tax_Id=10116 51 kDa protein	IPI00565256	51411.8	6.23	0.76
28-29min	Tax_Id=10116 PREDICTED: similar to chromosome 13 open reading frame 12	IPI00567749	13793.19	9.51	0.93
30-31min	Tax_Id=10116 Natural killer cell protease 1 precursor	IPI00189979	27308.35	9.59	0.98
31-32min	Tax_Id=10116 Vimentin	IPI00230941	53568.99	5.06	1.3
32-33min	Tax_Id=10116 60S ribosomal protein L24	IPI00230939	17767.9	11.26	0.78
33-34min	Tax_Id=10116 60S ribosomal protein L24	IPI00230939	17767.9	11.26	0.87
36-37min	Tax_Id=10116 60S ribosomal protein L24	IPI00230939	17767.9	11.26	1.1
38-39min	Tax_Id=10116 PREDICTED: similar to RIKEN cDNA 6330408A02 gene	IPI00366782	95604.21	8.87	0.91
39-40min	Tax_Id=10116 Hypothetical LOC313981	IPI00471826	80188.32	8.38	1.5

3.3 实验结果分析

从三维分离的色谱图可以看出,复杂的蛋白质样品经过了三维分离之后,分辨率在很大程度上得到提高,提高了蛋白质的分离程度,有利于蛋白质的定量分析,同时得到了部分定量数据。对当前蛋白质组学面对的定量问题的挑战提供了一个新的思路和借鉴的方法。

但是从数据结果也可以看出,实验还需要进一步改进的地方。首先,分离实验之后的处理步骤过多,容易造成蛋白质的损失,导致图中部分蛋白质没有鉴定出来。其次,实验的通量需要提高,如果第三维的 RPLC 的分离采用阵列方式结合阵列的检测器,可以很大程度上提高实验通量,缩短时间。再次,一些实验环节需要进一步的优化或改进。第三维的馏份收集时间段过长,应该根据峰宽来决定收集时间,因为实验发现,时间段过长会导致一个馏份中包含两个或两个以上的蛋白质,多个蛋白质在一个点会干扰质谱的检测。同时酶解的时间,酶溶液的用量都需要进一步的优化。

同时,我们也注意到,尽管三维分离之后,色谱峰的分辨率在很大程度上得到提高,相比前一章的两维分离,系统的峰容量也有很大提高,就估算为 12150 (6 个 SEC 馏份 \times 第二维 45 个 SCX 馏份 \times 第三维 45 个 RPLC 馏份),但是仍然有部分蛋白质的色谱峰没有得到充分的分离,对蛋白质进行准确定量仍然存在一定难度。另外,紫外光谱定量的灵敏度仍然不够,下一步可能结合高灵敏度的激光诱导荧光检测对蛋白质进行定量分析。

下一步工作将会对这方面工作做进一步研究、优化和改进,发展自动化的分析平台,由于时间关系对于这个技术平台本论文没有做进一步的工作,但随着各种实验条件的改进和优化,在前几章基于多维分离技术的基础上,应该说这个方法在蛋白组学研究方面将有很大的作为。

4. 结论

多维色谱分离与一维分离技术相比,峰容量得到了极大的提高,而与传统的双相凝胶电泳比较,操作简单、分离时间短,有着显著的优越性。但也存在着一些局限性,如灵敏度、通量等问题。因此发展新的多维柱分离技术平台,高效、高通量、高灵敏地分析复杂样品,成为蛋白组研究的当务之急。本章在这方面做了一些有益的探索,尝试基于三维分离对蛋白质同时进行定量与定性分析,为更进一步的优化完善工作打下了基础。

参考文献

- [1] Venter J C , Adams M D , Myers E W , Li P W , Mural R J , Sutton G G , Smith H O , Yandell M , Evans C A , Holt R A , et al .The sequence of human genome, *Science* , 2001 , 291 : 1304-1351.
- [2] Lander E S , Linton L M , Birren B , Nusbaum C , Zody M C , Baldwin J , Devon K, Dewar K, Doyle M , Fitzhugh W, Funke R , Gage D , et al, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* , 2001 , 409 : 860-921.
- [3] Naaby-Hansen S , Waterfield M D , Cramer R., Proteomics-post-genomic cartography to understand gene function, *Trends in Pharmacological Sciences* , 2001 , 22 (7) : 376-384.
- [4] 贺福初, 蛋白质组研究—后基因组时代的生力军, *科学通报*, 1999, 44(2):113-122.
- [5] 张养军, 蔡耘, 王京兰, 李晓海, 钱小红, 蛋白质组学研究中的色谱分离技术, *色谱*, 2003, 21, 120-26.
- [6] Chen H, Horvath C, High-speed high-performance liquid chromatography of peptides and proteins, *J chromatography A*, 1995, 705: 3-20.
- [7] Dolnik V, Hutterer KM, Capillary electrophoresis of proteins 1999-2001, *Electrophoresis*, 2001, 22: 4163-4178.
- [8] Giddings JC, Concepts and comparisons in multidimensional separation, *J High Resoluti. Chromatogr. Commun.*, 1987, 10: 319-323.
- [9] Divis JM, Giddings JC, Statistical method for estimation of number of components from single complex chromatograms: theory, computer-based testing, and analysis of errors, *Anal. Chem.* 1985, 57: 2168-2177.
- [10] Divis JM, Giddings JC, Statistical method for estimation of number of components from single complex chromatograms: application to experimental chromatograms, *Anal. Chem.* 1985, 2178-2185.
- [11] Jinzhi Chen, Cheng S. Lee, Yufeng Shen, Richard D. Smith, Eric H Baehrecke, Integration of capillary isoelectric focusing with capillary reversed-phase liquid chromatography for two-dimensional proteomics separation, *electrophoresis*, 2002, 23: 3143-3148.
- [12] Hongbin Liu, Dayin Lin, John R. Yate III, Multidimensional separations for

- protein/peptide analysis in the post-genomic era, *Biotechniques*, 2002, 32, 4: 898-911.
- [13] 张丽华, 张维冰, 张玉奎, 马场嘉信, 多维高效液相色谱/毛细管电泳模式在蛋白质研究中的应用, *色谱*, 2003, 21, 1: 32-37.
- [14] Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., Garvik, B. M., Yates, J. R. III, Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17, 676-682.
- [15] Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K. E., Yates, J. R. III, A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21, 532-538.
- [16] Washburn, M. P., Wolters, D., Yates, J. R. III, Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 242-247.
- [17] Shen, Y., Jacobs, J. M., Camp, D. G., II, Fang, R., Moore, R. J., Smith, R. D., Ultra-high-efficiency strong cation exchange LC/RPLC/MS/MS for high dynamic range characterization of the human plasma proteome. *Anal. Chem.*, 2004, 76, 1134-1144.
- [18] Peng, J., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Licklider, L. J., Gygi, S. P., Evaluation of Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC/LC-MS/MS) for Large-Scale Protein Analysis: The Yeast Proteome. *J. Proteome Res.*, 2003, 2, 43-50.
- [19] Fujii, K., Nakano, T., Kawamura, T., Usui, F., Bando, Y., Wang, R., Nishimura, T., Multidimensional Protein Profiling Technology and Its Application to Human Plasma Proteome. *J. Proteome Res.*, 2004, 3, 712-718.
- [20] Han, D. K., Eng, J., Zhou, H., Aebersold, R., Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 946-951.
- [21] VerBerkmoes, N. C., Bundy, J. L., Hauser, L., Asano, K. G., Razumovskaya, J., Larimer, F., Hettich, R. L., Stephenson, J. L. Jr., Integrating "Top-Down" and "Bottom-Up" Mass Spectrometric Approaches for Proteomic Analysis of *Shewanella oneidensis*. *J. Proteome Res.*, 2002, 1, 239-252.
- [22] Gygi, S. P., Rist, B., Griffin, T. J., Eng, J., Aebersold, R., Proteome Analysis of Low-Abundance Proteins Using Multidimensional Chromatography and Isotope-Coded

- Affinity Tags. *J. Proteome Res.*, 2002, 1, 47-54.
- [23] Wu, S.-L., Choudhary, G., Ramstrom, M., Bergquist, J., Hancock, W. S. Evaluation of Shotgun Sequencing for Proteomic Analysis of Human Plasma Using HPLC Coupled with Either Ion Trap or Fourier Transform Mass Spectrometry *J. Proteome Res.*, 2003, 2, 383-393.
- [24] Mann, M., Jensen, O. N., Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 2, 255-261.
- [25] MacCoss, M. J., McDonald, W. H., Saraf, A., Sadygov, R., Clark, J. M., Tasto, J. J., Gould, K. L., Wolters, D., Washburn, M., Weiss, A., Clark, J. I., Yates, J. R. III, Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 2002, 99, 7900-7905.
- [26] Choudhary, G., Wu, S.L., Shieh, P., Hancock, W. S., Multiple Enzymatic Digestion for Enhanced Sequence Coverage of Proteins in Complex Proteomic Mixtures Using Capillary LC with Ion Trap MS/MS. *J. Proteome Res.*, 2003, 2, 59-67.
- [27] Wall, D. B., Kachman, M. T., Gong, S., Hinderer, R., Parus, S., Misek, D. E., Hanash, S. M., Lubman, D. M., Isoelectric Focusing Nonporous RP HPLC: A Two-Dimensional Liquid-Phase Separation Method for Mapping of Cellular Proteins with Identification Using MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1099-1111.
- [28] Kachman, M. T., Wang, H., Schwartz, D. R., Cho, K. R., Lubman, D. M., A 2-D Liquid Separations/Mass Mapping Method for Interlysate Comparison of Ovarian Cancers, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1779-1791.
- [29] Zhu, K., Kim, J., Yoo, C., Miller, F. R., Lubman, D. M., High Sequence Coverage of Proteins Isolated from Liquid Separations of Breast Cancer Cells Using Capillary Electrophoresis-Time-of-Flight MS and MALDI-TOF MS Mapping, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 6209-6217.
- [30] Yan, F., Subramanian, B., Nakeff, A., Barder, T. J., Parus, S. J., Lubman, D. M., A Comparison of Drug-Treated and Untreated HCT-116 Human Colon Adenocarcinoma Cells Using a 2-D Liquid Separation Mapping Method Based upon Chromatofocusing PI Fractionation, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 2299-2308.
- [31] Zhu, Y., Lubman, D.M., Narrow-band fractionation of proteins from wholecell lysates using isoelectric membrane focusing and nonporous reversed-phase separations *Electrophoresis*, 2004, 25, 949-958.

- [32] Chen, J., Balgley, B. M., DeVoe, D. L., Lee, C. S., Capillary Isoelectric Focusing-Based Multidimensional Concentration/Separation Platform for Proteome Analysis, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 3145-3152.
- [33] Mohan, D., Pas' a-Tolic', L., Masselon, C. D., Tolic', N., Bogdanov, B., Hixson, K. K., Smith, R. D., Lee, C. S., Integration of Electrokinetic-Based Multidimensional Separation/Concentration Platform with Electrospray Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectrometry for Proteome Analysis of *Shewanella oneidensis*, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 4432-4440.
- [34] Wang, Y., Balgley, B.M., Rudnick, P.A., Evans, E.L., DeVoe, D.L., Lee, C.S., Integrated Capillary Isoelectric Focusing/Nano-reversed Phase Liquid Chromatography Coupled with ESI-MS for Characterization of Intact Yeast Proteins, *J. Proteome Res.*, 2005, 4, 36-42.
- [35] Meng, F., Cargile, B. J., Patrie, S. M., Johnson, J. R., McLoughlin, S. M., Kelleher, N. L., Processing Complex Mixtures of Intact Proteins for Direct Analysis by Mass Spectrometry, 2002, *Anal. Chem.*, 74, 2923-2929.
- [36] Meng, F., Du, Y., Miller, L. M., Patrie, S. M., Robinson, D. E., Kelleher, N. L., Molecular-Level Description of Proteins from *Saccharomyces cerevisiae* Using Quadrupole FT Hybrid Mass Spectrometry for Top Down Proteomics, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 2852-2858.
- [37] Dogruel, D., Williams, P., Nelson, R.W., Rapid Tryptic Mapping Using Enzymically Active Mass Spectrometer Probe Tips, *Anal. Chem.*, 1995, 67, 4343-4348.
- [38] Hsieh, Y.L.F., Wang, H.Q., Elicone, C., Mark, J., Martin, S.A., Regnier, F., Automated Analytical System for the Examination of Protein Primary Structure, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 455-462.
- [39] Sakai-Kato, K., Kato, M., Toyo'oka, T., On-Line Trypsin-Encapsulated Enzyme Reactor by the Sol-Gel Method Integrated into Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2943-2949.
- [40] Cooper, J.W., Chen, J., Li, Y., Lee, C.S., Membrane-Based Nanoscale Proteolytic Reactor Enabling Protein Digestion, Peptide Separation, and Protein Identification Using Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 1067-1074.
- [41] Samskog, J., Bylund, D., Jacobsson, S.P., Markides, K.E., Miniaturized on-line proteolysis-capillary liquid chromatography-mass spectrometry for peptide mapping of

- lactate dehydrogenase, *J. Chromatogr. A.*, 2003, 998, 83-91.
- [42] Ericsson, D., Ekström, S., Nilsson, J., Bergquist, J., Marko-Varga, G., Laurell, T., Downsizing proteolytic digestion and analysis using dispenser-aided sample handling and nanovial matrix-assisted laser/desorption ionization-target arrays, *Proteomics*, 2001, 1, 1072-1081.
- [43] Slysz, G.W., Schriemer, D.C., On-column digestion of proteins in aqueous-organic solvents, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, 17, 1044-1050.
- [44] Slysz, G.W., Schrieme, D.C., Blending Protein Separation and Peptide Analysis through Real-Time Proteolytic Digestion, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 1572-1579.
- [45] Harris, W.A., Reilly, J.P., On-probe digestion of Bacterial proteins for MALDI-MS, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 4410-4416.
- [46] Gobom, J., Nordhoff, E., Ekman, R., Roepstorff, P., Rapid micro-scale proteolysis of proteins for MALDI-MS peptide mapping using immobilized trypsin, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes.*, 1997, 169, 153-163.
- [47] Kussmann, M., Nordhoff, E., Rahbek-Nielsen, H., Haebel, S., Rossel-Larsen, M., Jakobsen, L., Gobom, J., Mirgorodskaya, E., Kroll-Kristensen, A., Palm, L., Roepstorff, P., Matrix-assisted Laser Desorption/ Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various peptide and protein analytes, *J. Mass Spectrom.*, 1997, 32, 593-601.
- [48] Dai, Y., Whittall, R. M., Li, L., Two-Layer Sample Preparation: A Method for MALDI-MS Analysis of Complex Peptide and Protein Mixtures, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 1087-1091.
- [49] Ericson, C., Phung, Q. T., Horn, D. M., Peters, E. C., Fitchett, J. R., Ficarro, S. B., Salomon, A. R., Brill, L. M., Brock, A., An Automated Noncontact Deposition Interface for Liquid Chromatography Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 2309-2315.
- [50] Mao, Y., Zhang, X., Comprehensive two-dimensional separation system by coupling capillary reverse-phase liquid chromatography to capillary isoelectric focusing for peptide and protein mapping with laser-induced fluorescence detection *Electrophoresis*, 2003, 24, 3289-3295.
- [51] Yang, X., Zhang, X., Li, A., Zhu, S., Huang, Y., Comprehensive two-dimensional separations based on capillary high-performance liquid chromatography and microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, 24, 1451-1457.

- [52] Zhang, J., Hu, H., Gao, M., Yang, P., Zhang, X., Comprehensive two-dimensional chromatography and capillary electrophoresis coupled with tandem time-of-flight mass spectrometry for high-speed proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004, 25, 2374-2383
- [53] Wang, Y., Zhang, J., Liu, C. L., Gu, X., Zhang, X. M., Nano-flow multidimensional liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for proteome analysis of hepatocellular carcinoma, *Analytica Chimica Acta*, 2005, 530, 227-235.
- [54] Qu, Y.; Moons, L.; Vandesande, F. Determination of serotonin, catecholamins and their metabolites by direct injection of supernatants from chicken brain tissue homogenate using liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B*. 1997, 704, 351-358.
- [55] Zhang, X., Huang, S., Single step on-column frit making for capillary high-performance liquid chromatography using sol-gel technology *J. Chromatogr. A.*, 2001, 910, 13-18
- [56] Zuo, X., Echan, L., Hembach, P., Tang, H. Y., Speicher, K. D., Santoli, D., Speicher, D. W., Towards global analysis of mammalian proteomes using sample prefractionation prior to narrow pH range two-dimensional gels and using onedimensional gels for insoluble and large proteins *Electrophoresis*, 2001, 22, 1603-1615.
- [57] Zuo, X., Speicher, D. W., Comprehensive analysis of complex proteomes using microscale solution isoelectrofocusing prior to narrow pH range two-dimensional electrophoresis *Proteomics*, 2002, 2, 58-68.
- [58] Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17, 994-999.
- [59] Zhu, H., Pan, S., Gu, S., Bradbury, E.M., Chen, X., Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, 16, 2115-2123.
- [60] Gu, S., Du, Y., Chen, J., Liu, Z., Bradbury, E.M., Hu, C.A., Chen, X., Large-Scale Quantitative Proteomic Study of PUMA-Induced Apoptosis Using Two-Dimensional Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Coupled with Amino Acid-Coded Mass Tagging. *J. Proteome Res.*, 2004, 3, 1191-1200.
- [61] Gu, S., Liu, Z., Pan, S., Jiang, Z., Lu, H., Bradbury, E.M., Hu, C.A., Chen, X., Global Investigation of p53-induced Apoptosis Through Quantitative Proteomic Profiling Using

- Comparative Amino Acid-coded Tagging. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3, 998-1008.
- [62] Bordin, G., Raposo, F. C., Calle, B. de la, Rodriguez, A.R., Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2001, 928, 63-76.
- [63] Ferreira, I.M.P.L.V.O., Caçote, H., Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *J. Chromatogr. A*, 2003, 1015, 111-118.
- [64] Merbel, N. C. van de, Mentink, C. J.A.L., Hendriks, G., Wolffenbuttel, B.H.R. Liquid chromatographic method for the quantitative determination of N-carboxymethyllysine in human plasma proteins. *J. Chromatogr. B*, 2004, 808, 163-168.
- [65] Bünger, H.; Kaufner, L.; Pison, U., Quantitative analysis of hydrophobic pulmonary surfactant proteins by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. *J. Chromatogr. A*, 2000, 870, 363-369.
- [66] Toorop, R.M., Murch, S.J., Ball, R.O., Development of a rapid and accurate method for separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. *Food Res. International*, 1997, 30, 619-627.

在学期间发表和待发表的论文:

1. **Mingxia Gao**, Hong Jin, Pengyuan Yang, Xiangmin Zhang*, Chromatographic prefractionation prior to two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry identifies: Application to the complex proteome analysis in rat liver, *Analytica Chimica Acta*, 553 (2005) 83-92.
2. **Mingxia Gao**, Na Li, Jie Zhang, Pengyuan Yang, Xiangmin Zhang*, The study of three extraction methods for pre-separation and enrichment: application to the complex proteome separation in rat liver, *Separation and Purification Technology* (Accepted).
3. Jie Zhang, Hualing Hu, **Mingxia Gao**, Pengyuan Yang, Xiangmin Zhang*, Comprehensive two-dimensional chromatography and capillary electrophoresis coupled with tandem time-of-flight mass spectrometry for high-speed proteome analysis, *Electrophoresis*, 25 (2004) 2374-2383.
4. 王彦, 高明霞, 谷雪, 张祥民*, 鼠肝蛋白质组的纳升级多维液相色谱分离, *色谱*, 23 (2005) 41-45.
5. Jie Zhang, **Mingxia Gao**, Pengyuan Yang, Yinkun Liu, Xiangmin Zhang*, Improvements in protein identification confidence and proteome coverage for human liver proteome study by coupling a parallel MS/MS analysis with multi-dimensional chromatography separation, *Analytica Chimica Acta*, (accepted)
6. **Mingxia Gao**, Wenjia Yu, Jie Zhang, Pengyuan Yang, Xiangmin Zhang*, Large-scale depletion of the high abundance proteins and analysis of middle- or low abundance proteins in human liver proteome by multidimensional liquid chromatography, *Proteomics* (submitted).
7. **Mingxia Gao**, Jie Zhang, Xiangmin Zhang*, Novel Strategy of High Abundance Protein depletion Using Multi-Dimensional Liquid Chromatography, *J. Proteome Research* (submitted).

参加会议的会议文章:

1. **Mingxia Gao**, Jie Zhang, Xiangmin Zhang*, Novel Strategy of high abundance protein removal using multi-dimensional liquid chromatography, HUPO 3th World Congress, *supplement to molecular & cellular proteomics*, 3 (2004) 25.17.
2. Xiangmin Zhang*, **Mingxia Gao**, Wenjia Yu, Yan Li, Jie Zhang, New strategy of multidimensional chromatography and electrophoresis coupling to mass spectrometry for proteomic analysis, HUPO 4th World Congress, *supplement to molecular & cellular proteomics*, 4 (2005) 35.29.

参编书目:

<Capillary electrophoresis from small ions to macromolecules> Cchmitt-kopplin(Ed), **Mingxia Gao**, Xiangmin Zhang*, Multi-Dimensional Capillary Electrophoresis and Chromatography for Proteomics Analysis, The Human Press, New York, 2006.

致 谢

弹指一挥间，校训“博学而笃志，切问而近思”已伴我度过了三年的博士学习和研究生生活。此时此刻，感想良多。然而最深的感触是想对那些在这三年中给过我无私帮助的人们说一声谢谢。

我的论文是在导师张祥民教授的悉心指导下完成的。张老师渊博的学识，严谨的态度，海纳百川的胸襟以及对科研的执著和敬业令我获益良多。张老师不倦教诲的不仅是实验的技巧，更重要的是正确的科研方法、对科学的热爱以及作为一个科研工作者应当具备的道德修养。这些宝贵的财富将使我终生受益。在此我向张老师表示最衷心的感谢！

感谢杨芄原教授在实验方向、思路以及实验器材上给予的指导与极大帮助，感谢刘银坤教授在样品提供上给予的方便与指导，感谢陆豪杰、樊惠芝、金红等老师在实验技术上的帮助与支持。

感谢邓春晖老师、晏国全老师在实验室工作和日常生活中所给予的关心和帮助，尤其感谢邓春晖在论文写作与投稿方面给予的良好的建议与帮助。

感谢王彦博士，以及同年级的张婕、于文佳、杨秀晗、李娜同学在实验技术上的无私帮助，让我克服困难，完成实验。我还要感谢在本实验室一起工作和学习的诸多同学，已毕业的毛煜和郭建宇，王小川、李嫣、李宁、胡凤莉、徐秀清、姚宁、林爽、唐佳都让我满怀感激，他们点点滴滴的帮助与关心历历在目，在此一并致谢。

感谢我远在山东的父母和所有亲人多年来对我的理解、关怀和支持。谨向所有关心、帮助、爱护我的人致以最诚挚的谢意和祝福！

三年的博士求学生涯说长不长，说短也不算短。随着时间的推移，这段生活终将变成生命长河中的一个小小的片段，并将永远保存在我的记忆中，成为一个永不褪色的、彩色的片段。

高明霞

2006年4月于复旦大学

论文独创性声明

本论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。其他同志对本研究的启发和所做的贡献均已在论文中作了明确的声明并表示了谢意。

作者签名： 高明霞 日期： 2006.6.2

论文使用授权声明

本人完全了解复旦大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存论文。保密的论文在解密后遵守此规定。

作者签名： 高明霞 导师签名： 张群 日期： 2006.6.2