

文章编号 :1004-0374(2006)01-0031-04

蛋白质组学研究中的对角线电泳

陈夫义, 彭宣宪*

(厦门大学生命科学学院, 厦门361005)

摘要:经典的蛋白质组学研究方法包括 IEF/SDS-PAGE 双向电泳和质谱技术的联用,但由于 IEF 的一些不足,限制了其应用范围。对角线电泳是蛋白质组学研究中的一项特殊分离技术,由于其原理与 IEF/SDS-PAGE 不同,正逐渐成为蛋白质组学中电泳分离技术的重要补充,特别是在膜蛋白和蛋白质相互关系的研究中将起到重要作用。本文综述了对角线双向电泳技术的特点、发展和在蛋白质组学研究中的最新进展,比较了双向电泳和对角线电泳的优缺点,展望了对角线电泳在蛋白质组学研究中的应用前景。

关键词:蛋白质组学;双向电泳;对角线双向电泳

中图分类号:Q503 文献标识码:A

Diagonal polyacrylamide gel electrophoresis in proteomics research

CHEN Fu-Yi, PENG Xuan-Xian*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The classical approach in proteomic analysis couples IEF/SDS-PAGE with mass spectrum. However, the shortcomings of IEF restrict its widespread applications. Diagonal polyacrylamide gel electrophoresis, a special protein separation technique, shows its valuable application in proteomic research, especially in membrane proteins and protein-protein interaction because of its different feature characteristics from IEF/SDS-PAGE. This paper summarizes the characters, development and the latest applications of diagonal polyacrylamide gel electrophoresis in proteomics and the comparison between IEF/SDS-PAGE and the diagonal gel electrophoresis.

Key words: proteomics; 2-DE; two-dimensional diagonal electrophoresis

随着人类基因组计划的完成和对基因组研究的深入,人们认识到单纯依靠基因组信息并不可能完全揭示生命的奥秘。这是因为蛋白质才是生物功能的体现者,所以必需考虑基因编码的蛋白质具有什么功能。不仅如此,基因在转录和翻译过程中存在转录和翻译水平的调控,蛋白质往往还要经过剪接、修饰、加工之后,最终才能成为有功能的蛋白质;而且生物体不同组织、不同分化程度和在不同环境下,所表达的蛋白质是不同的,所以单纯从基因组

水平上并不能完全揭示生命活动的规律^[1]。在这种背景下,蛋白质组学(Proteomics)应运而生。1994年Wilkins和Williams提出蛋白质组这一概念后,蛋白质组在生物学界得到了充分关注,并且肝、脑、血清、微生物、药物、毒物、农作物等蛋白质组概念也相继提出。蛋白质组分析的开门技术——双向电泳(2-DE)也随之成为生物研究的热点技术之一。

经典的蛋白质组学研究方法是利用 IEF/SDS-PAGE 分离蛋白质,然后采用质谱技术对蛋白质进

收稿日期:2005-06-17;修回日期:2005-09-09

基金项目:国家“863”高科技发展计划项目(No. 2004AA626030)

作者简介:陈夫义(1982—),男,硕士研究生;彭宣宪(1954—),男,博士,教授,博士生导师,*通讯作者。

行鉴定。虽然 IEF/SDS-PAGE 具有高分辨率和高通量的特点,但它固有的缺点极大地限制了其应用。这些缺点主要有:(1)检测低丰度蛋白的敏感性不够;(2)一些分子量过大(>200 kDa)、极酸性或极碱性蛋白在电泳中会丢失;(3)高疏水性蛋白或不溶性蛋白得不到较好的检测;(4)重复性问题^[2]。

对角线电泳是双向电泳的一种特例。试验将蛋白质样品点在凝胶的一个端点,电泳后进行某种特殊处理,再将凝胶转 90° 进行第二次电泳,此双向电泳即为对角线电泳。如果两次电泳间的特殊处理对蛋白质无影响,则电泳图谱中的蛋白点都在对角线上;如果该特殊处理对其有影响,则电泳图谱中的蛋白点偏离对角线。根据特殊处理的性质,可获得变化蛋白点的相关重要信息。

1966年, Brown 和 Hartlay 采用对角线电泳进行含 -S-S- 肽的定位,这是对角线电泳的最经典应用。对角线电泳现广泛应用于核酸研究^[3-6],在蛋白质分析鉴定中的应用也有一些报道。本文就对角线电泳在蛋白质组学中的应用概述如下。

1 对角线电泳在膜蛋白分离鉴定中的应用

膜蛋白为疏水性蛋白,其中的一些高度疏水蛋白由于其溶解度的问题在 IEF 时得不到很好的聚焦而不能被较好的分离和鉴定。Rais 等^[7]利用对角线电泳技术在线粒体复合物的 70 多种蛋白质中分离并鉴定了 11 种高疏水性蛋白质。他们设计了标准和反向对角线电泳,利用高疏水性、中度疏水性和水溶性蛋白在不同浓度凝胶中迁移率不同的原理获得分离结果。如果第一向胶浓度低,第二向胶浓度高,则疏水性蛋白全部落在对角线的上面,反之则落在对角线的下面。利用质谱技术对这些蛋白点进行鉴定,可以获得较满意的效果。

由奈瑟球菌引起的流行性脑脊髓膜炎和败血症严重威胁着人类健康。针对它们的疫苗主要是基于细菌的外膜通道蛋白,其中 PorA 和 PorB 是主要抗原^[8]。一直以来,对奈瑟氏球菌属通道蛋白的组成、结构和功能的研究往往是通过将重组 PorA 和 PorB 插入人工合成的细胞膜中进行,很少有报道采用天然的通道蛋白。Sánchez 等^[9]利用非还原/还原 SDS-PAGE 对角线电泳技术,以天然通道蛋白为研究对象,发现奈瑟球菌属的通道蛋白是由 PorA 和 PorB 组成的异源三聚体,而不是以往报道的由 PorA 和 PorB 组成的同源三聚体。

2 对角线电泳在确定二硫键上的应用

对角线电泳最经典的应用是在蛋白质测序过程中确定二硫键的位置。硫氧还蛋白在光合作用中起着电子传递的作用。氧化型硫氧还蛋白被 NADPH 还原后将目标蛋白的二硫键还原成巯基。如果对硫氧还蛋白的目标蛋白有详细的认识,就能更好地了解硫氧还蛋白的功能。Yano 等^[10]利用非还原/还原 SDS-PAGE 来确定硫氧还蛋白的目标蛋白。样品经硫氧还蛋白处理后,利用荧光巯基探针标记巯基,目标蛋白会带上荧光探针。再进行对角线电泳时,如果发现目标蛋白存在分子内二硫键,则经处理后所得的点位于对角线的上方;如果目标蛋白存在分子间二硫键,则经处理后得到的点位于对角线的下方。对角线电泳不仅可以用来确定硫氧还蛋白目标蛋白,而且为确定分子间和分子内的二硫键提供了一种新的方法。

3 对角线电泳在蛋白质复合物研究中的应用

在后基因组时代,蛋白质间的相互关系已经成为研究热点。现在研究蛋白质相互关系的方法主要有免疫共沉淀、酵母双杂交和亲和层析等。对角线双向电泳技术由于其操作的特殊性也已经成为研究蛋白质相互关系的一种新的技术方法。由于对角线电泳操作的特殊性,第一向给以非还原条件,使复合物保持原有的状态,然后第二向给以还原条件,从而使复合物中各种成分得到分离,所以能就复合物的组成和各成分的相互关系进行有效的探讨。

一般认为补体系统起源于后口动物,但是 Zhu 等^[11]通过实验证明在原肢类动物蜚(Carcinoscorpius rotundicauda)中已经存在主要的补体成分。他们用 *Staphylococcus aureus* 等作亲和剂来吸附蜚血清中能与其结合的蛋白,然后用缓冲液洗去细菌,将得到的样品经非还原/还原 SDS-PAGE 电泳后,发现 p75、p50、p36、p34 蛋白均来自一条分子量为 250 kDa 的条带。比较发现, p36 与脊椎动物的 C3 相似,并与较低等的后口动物的 C3 具有较高的序列同源性,进而说明补体系统可能起源于原肢类动物。

BN-PAGE (blue native polyacrylamide gel electrophoresis) 是 Schägger 和 von Jagow^[12] 为了研究膜整合蛋白而设计的一种改进的 PAGE, 因采用 Coomassie Blue G250 作指示剂而得名。第一向的 BN-PAGE 能使分离得到的复合物保持天然状态, 随后的 SDS-PAGE 则使复合物的各组分分开, 从而使

各组分得到有效的分离。BN-PAGE/SDS-PAGE 对角线电泳在线粒体呼吸链复合物^[13]、多蛋白复合物^[14]和蛋白质包涵体^[15]的研究中得到广泛应用。

Stegemann 等^[15]首先将 3D BN-PAGE/SDS-PAGE 对角线电泳技术应用于蛋白质包涵体的研究。由于采用了 BN-PAGE, 使电泳分离范围从原来小于 100 kDa, 到现在大于 1 MDa。实验结果不仅有助于了解蛋白质包涵体形成的动态过程, 而且第一次揭示体内蛋白质包涵体形成模式的复杂性。

近年来, 本实验室主要从事细菌外膜蛋白质组学的研究^[16-18]。最近, 正在将建立的对角线蛋白质组学技术方法应用于外膜功能蛋白质组的研究。在利用非还原 / 还原 SDS-PAGE 进行膜蛋白复合物的研究中, 笔者认为两次电泳之间的处理条件非常重要, 还原剂的量和种类、处理的时间等都对试验结果有很大的影响。同时发现, 第一向电泳后的蛋白条带不需要固定即可以直接进行还原剂处理, 从而节省了时间。

4 IEF/SDS-PAGE 与对角线电泳的比较

4.1 样品处理 IEF/SDS-PAGE 的灵敏度高, 但对样品处理的要求也高, 样品处理的好坏直接影响到 IEF/SDS-PAGE 的重复性, 进而限制了数据在不同实验室间的交流和利用。

对角线电泳对样品处理的要求不高, 因其第一向为 PAGE 或非还原的 SDS-PAGE, 故第一向样品处理很简单。但两次电泳之间胶条的处理是对角线电泳操作的特殊性所在, 要根据不同的实验要求来进行。通过不同的处理, 可以得到相关蛋白质的不同信息。

4.2 上样量 一般情况下, IEF/SDS-PAGE 和对角线电泳的上样量分别约为单向电泳上样量的 6~8 倍和 1.5~2 倍。在对角线电泳中, 有些在第一向时难以觉察的条带, 在第二向时也能成点, 这对很珍贵的样品来说极有好处。

4.3 重复性 与 IEF/SDS-PAGE 相比, 对角线电泳具有较好的重复性, 但在分辨率和通量上是不能和 IEF/SDS-PAGE 相提并论。这因为第一向 PAGE 或非还原的 SDS-PAGE 限制了其分辨率和高通量。

4.4 主要应用范围 在膜蛋白质分离中, 对角线电泳具有一定优势。由于膜蛋白质为疏水性蛋白, 特别是一些高疏水性外膜蛋白由于在 IEF 时得不到很好的聚焦而发生丢失。同样, 不溶性蛋白也得不到很好的检测。但这些蛋白在 PAGE 和 SDS-PAGE

时不会发生丢失, 因而对角线电泳在检测高度疏水性和不溶性蛋白质时有较大的优势。IEF/SDS-PAGE 图谱与对角线电泳图谱具有互补性, 因此, 将 IEF/SDS-PAGE 和对角线电泳结合起来进行膜蛋白的研究将会收到更好的效果。

在蛋白质混合物的分离中, IEF/SDS-PAGE 具有无可比拟的优越性, 但在蛋白质复合物的分离中, 对角线电泳则可以大显身手。这是因为经 IEF/SDS-PAGE 法分离, 组成复合物的各蛋白组分混杂分散于凝胶中; 而采用对角线电泳, 一种蛋白质复合物在第一向 PAGE 中应为 1 条带, 经第二向 SDS/PAGE 后该条带被分离为多个点, 再利用质谱鉴定技术, 便可以确定复合物的确切组分。越来越多的报道指出了在蛋白质复合物鉴定及蛋白质复合物相互关系的研究中对角线电泳的重要性。

5 结语

2001 年, Science 杂志已把蛋白质组学列为当前科学研究的六大热点之一, 蛋白质组学研究技术也成为探讨的重点。经典的蛋白质组学研究方法包括 IEF/SDS-PAGE 和质谱技术的联用, 但由于 IEF 的一些局限性, 限制了其更广泛的应用。对角线电泳由于具有不同于 IEF/SDS-PAGE 的特点, 在蛋白质组学研究中的应用越来越广泛。从最初的二硫键定位到疏水性膜整合蛋白的研究, 再到蛋白质复合物的研究, 逐渐发展和成熟。鉴于目前蛋白质复合物的研究越来越受到关注, 对角线双向电泳, 特别是非还原 / 还原 SDS-PAGE 对角线电泳也逐步成为蛋白质相互关系研究中的一种新的有效手段。值得指出的是, IEF/SDS-PAGE 与对角线电泳技术各有优缺点, 并相互补充, 将两者结合起来用于蛋白质组学的研究将会收到更好效果, 也提示蛋白质组学研究中多种技术联用的重要性。

[参 考 文 献]

- [1] 吴谋胜, 彭宣宪. 微生物蛋白质组学研究进展. 微生物学报, 2002, 42(2): 251-254
- [2] Lescuyer P, Strub J M, Luche S, et al. Progress in the definition of a reference human mitochondrial proteome. Proteomics, 2003, 3(2): 157-167
- [3] Holloway J W, Beghé B, Turner S, et al. Comparison of three methods for single nucleotide polymorphism typing for DNA bank studies: sequence-specific oligonucleotide probe hybridisation, TaqMan liquid phase hybridisation, and microplate array diagonal gel electrophoresis (MADGE). Hum Mutat, 1999, 14(4): 340-347

- [4] O' Dell S D, Chen X H, Day I N M. Higher resolution microplate array diagonal gel electrophoresis: application to a multiallelic minisatellite. *Hum Mutat*, 2000, 15(6): 565-576
- [5] Day I N M, Spanakis E, Chen X H, et al. Microplate array diagonal gel electrophoresis for mutation research in DNA banks. *Electrophoresis*, 1999, 20(6): 1250-1257
- [6] Rodríguez S, Chen X H, Day I N M. Typing dinucleotide repeat loci using microplate array diagonal gel electrophoresis: proof of principle. *Electrophoresis*, 2004, 25(7-8): 975-979
- [7] Rais I, Karas M, Schägger H. Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics*, 2004, 4(9): 2567-2571
- [8] Hauck C R, Meyer F. 'Small' talk: opa proteins as mediators of *Neseria*-host-cell communication. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(1): 43-49
- [9] Sánchez S, Arenas J, Abel A, et al. Analysis of outer membrane protein complexes and heat-modifiable proteins in *Neisseria* strains using two-dimensional diagonal electrophoresis. *J Proteome Res*, 2005, 4(1): 91-95
- [10] Yano H, Wong J H, Lee Y M, et al. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(8): 4794-4799
- [11] Zhu Y, Thangamani S, Ho B, et al. The ancient origin of the complement system. *EMBO J*, 2005, 24(2): 382-394
- [12] Schägger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 1991, 199(2): 223-231
- [13] Nijtmans L G J, Henderson N S, Holt I J. Blue native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods*, 2002, 26(4): 327-334
- [14] Camacho-Carvajal M M, Woltschaid B, Aebersold R, et al. Two-dimensional blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(2): 176-182
- [15] Stegemann J, Ventzki R, Schroel A, et al. Comparative analysis of protein aggregates by blue native electrophoresis and subsequent sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis in a three-dimensional geometry gel. *Proteomics*, 2005, 5(8): 2002-2009
- [16] Peng X X, Ye X T, Wang S Y. Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* 2a by proteomic methodologies. *Vaccine*, 2004, 22(21-22): 2750-2756
- [17] Xu C X, Wang S Y, Ren H X, et al. Proteomic analysis on the expression of the outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations. *Proteomics*, 2005, 5(12): 3142-3152
- [18] Chen Z J, Peng B, Wang S Y, et al. Rapid screening of highly efficient vaccine candidates by immunoproteomics. *Proteomics*, 2004, 4(10): 3203-3213

· 简讯 ·

上海生科院荣膺两项国家科技大奖

2006年1月9日,全国科学技术大会在北京人民大会堂隆重开幕,这是中共中央、国务院继1956年知识分子会议、1978年全国科学大会、1995年全国科技大会之后召开的第四次全国科技大会,也是新世纪召开的第一次全国科技大会,具有里程碑式的重要历史意义。会议颁发了2005年度国家最高科学技术奖、国家自然科学奖、国家技术发明奖、国家科技进步奖和国际科学技术合作奖。中科院上海生科院荣膺国家自然科学奖、国际科学技术合作奖两项国家大奖:

生物化学与细胞生物学研究所刘望夷研究员主持完成的“核糖体失活蛋白与核糖体RNA结构与功能的研究”成果荣获国家自然科学奖二等奖;神经科学研究所美籍所长蒲慕明教授荣获中华人民共和国国际科学技术合作奖。

“十五”期间上海生科院共计获得9项国家科技奖,其中自然科学奖二等奖5项,科技进步奖二等奖2项,技术发明奖1项,国际科学技术合作奖1项。

摘自 <http://www.sibs.ac.cn>