

锯缘青蟹对病原菌感染的功能蛋白质组学研究

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 200226074

UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

锯缘青蟹对病原菌感染的
功能蛋白质组学研究

*Functional proteomics related to pathogenic
bacteria infection in Scylla serrata*

苏 静

指导教师姓名: 彭宣宪 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2005年8月3日

论文答辩时间: 2005年8月7日

学位授予日期: 2005年

答辩委员会主席: 林文雄 教授

评 阅 人: _____

2005年 8 月 2 日

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：苏静

2005 年 8 月 8 日

目 录

摘要.....	II
Abstract.....	III
1 前言.....	1
1.1 蛋白质组学的研究.....	1
1.2 APR (acute phase respon) 研究进展.....	9
1.3 无脊椎动物的先天免疫反应.....	13
1.4 无脊椎动物的先天免疫反应中的特异性及免疫记忆现象.....	16
1.5 本论文的研究对象、内容、目的和意义.....	19
2. 材料与方法.....	21
2.1 材料.....	21
2.2 实验方法.....	24
3. 锯缘青蟹对病原菌急性反应的结果和讨论.....	31
3.1 结果分析.....	31
3.2 讨论.....	34
4. 细菌对锯缘青蟹免疫攻毒的结果和讨论.....	37
4.1 结果分析.....	37
4.2 讨论.....	38
5. 锯缘青蟹对病原菌免疫反应的结果和讨论.....	41
5.1 结果分析.....	41
5.2 讨论.....	58
6. 小结.....	64
7. 前景与展望.....	65
8. 参考文献.....	67
致谢.....	74
附录 1.....	75
附录 2.....	75
附录 3.....	79

摘 要

先天免疫是指生物无特殊针对性的对病原体等的天然抵抗力，具有作用范围广、反应快、相对稳定，激发源广泛以及参与的细胞和因子多样等特点。APR 指生物体受刺激后早期的生理变化所涉及的一系列反应，可归于先天免疫系统。几乎所有动物受到创伤和感染等外界伤害时都会启动 APR，合成 APP 进行快速自我保护，抵御微生物的入侵，促进创伤的修复，帮助机体恢复正常静息状态等。

本文应用差异蛋白质组学技术，研究锯缘青蟹肌肉组织对不同种属细菌感染 15 分钟的 APR 反应。结果检索到 3 个相关蛋白，并对这 3 个蛋白在 APR 中的意义进行了初步探讨，为研究甲壳动物 APR 反应提供了初步实验依据。

本文首次对锯缘青蟹的抗感染免疫反应及其中出现的特异性免疫保护现象进行了研究。试验采用副溶血弧菌和嗜水气单胞菌分别进行两次免疫后的锯缘青蟹再进行同种攻毒和异种交叉攻毒。根据各试验组的保护率来评价其免疫反应特征。结果发现，无论是同种细菌分别免疫和攻毒，还是异种细菌分别免疫和攻毒均表现出一定的保护作用，其中除嗜水气单胞菌免疫和副溶血弧菌攻毒组无明显差异外，其余均有显著差异。特别重要的是，同种细菌免疫攻毒的保护率明显高于对异种细菌攻毒的保护率。这些结果说明，尽管青蟹的免疫保护反应对不同种属的病原菌具有一定作用，但还是具有种特异性。

在此基础上，进一步探讨了上述免疫保护性的差异蛋白质组。结果发现，锯缘青蟹肌肉和肝胰腺分别具有 23 和 27 个差异蛋白。采用质谱技术 (MS/MS 分析正在进行中)，从中相应鉴定了 17 和 10 个蛋白，并对其中部分蛋白的差异表达进行了 Western-blot 验证。其中锯缘青蟹肝胰腺组织中发现了 5 个可能具有特异免疫保护性的蛋白。试验还通过与牛血清白蛋白注射组相应表达图谱的比较，初步研究了锯缘青蟹在抗感染免疫中具有特异免疫反应特征的蛋白质。这些研究结果为无脊椎动物先天免疫中的特异性和免疫保护性现象提供了新的分子证据。

关键词：蛋白质组；先天免疫；APR；锯缘青蟹；免疫保护

Abstract

Innate immunity system provides the body with its first line of protection against external injury and such a rapid, extensive, non-specific mechanism can almost be found all through the living kingdom. It involves a large number of functional proteins and functions in a variety of defense-related activities. At the initiation stage of innate immunity is addressed as acute phase response (APR). A large number of acute phase proteins (APP) is produced in APP for limiting the dispersal of infectious agents, repair of tissue damage, killing of microbes and restoration of healthy state. Both cells and secreted molecules of innate immunity and APR are dynamic in regard to their readiness status and the process of cell activation during the adaptive alteration of cell physiology, so proteomics is an ideal tool to research innate immunity and APR.

In the current study, APP profiles were investigated in the muscle of *Scylla serrata* against different pathogenic bacteria with the use of proteomic methodologies. For this purpose, *Scylla serrata* were separately injected with the three pathogenic bacteria and 0.85% brain was used as a control. Samples were prepared from the muscle at the fifteen minutes following the injections. Three proteins with variances were achieved by comparison between the 2-DE maps and elementarily identified With the use of MALDI-TOF/MS and bio-information.

Specific and specific memory is a hallmark of the vertebrate adaptive immune system. However, recent experiments indicate that specific and specific memory might also exist in the innate immune systems of invertebrates. At present, the underlying mechanisms are unknown, yet such phenomenological evidence is relevant for understanding the principles and evolution of immune defence. In our research, we first immunize and infect *Scylla serrata* with same pathogenic bacteria and different pathogenic bacteria. And *Scylla serrata* being

infected and not immunized was used as a control. With test statistics, we found the rate of death of *Scylla serrata* being not immunized were obviously higher than *Scylla serrata* being immunized with same bacteria, indicated the immunity can produce obvious effect of protect. And we found the effect of protect of in *Scylla serrata* being immunized with different bacteria were lower than in *Scylla serrata* being immunized with same bacteria, indicated the effect of protect is specific.

Then, we use technique of proteomic and bio-information, to study the immunoreaction of *Scylla serrata* being infected with pathogenic bacteria and 0.85% brain was used as a control. Twenty-seven and twenty-three proteins with variances in muscle and hepatocirrhosis of *Scylla serrata* were achieved and Seventeen and ten proteins with variances elementarily identified. We analyzed some variances with western-blotting. Through the study of protein with variances of muscle and hepatocirrhosis of *Scylla serrata* being injected with BSA and *Scylla serrata* being immunized and infected with same pathogenic bacteria., we analyzed the specific and effect of protect of immunoreaction of *Scylla serrata* being infected with pathogenic bacteria. In the hepatocirrhosis of *Scylla serrata* being infected with pathogenic bacteria, we found five proteins which can probably produce obvious effect of protect.

Keywords: innate immunity; APR; *Scylla serrata*; proteomic; specific memory

1. 前言

1.1 蛋白质组学的研究

1.1.1 蛋白质组学的概念及产生

随着人类基因组计划的完成, 生命科学的研究进入了后基因组时代. 基因是遗传信息的源头, 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, 只有了解细胞中所有蛋白质的功能和相互作用, 才能更深一步地认识生命的奥秘, 因此, 一门在整体水平上探讨细胞内蛋白质的组成及其活动规律的新兴学科, 即蛋白质组学(proteomics)^[1]应运而生. 蛋白质组研究已成为 21 世纪生命科学发展的先导, 成为生命乃至自然科学最活跃的学科领域。

蛋白质组(Proteome)这一概念由澳大利亚学者 Wilkins 和 Williams 等人于 1994 年提出, 它源于蛋白质(protein)与基因组(genome)两个词的杂合, 指的是由一个细胞或一个组织的基因组所表达的全部相应的蛋白质。但是由于蛋白质种类和数量总是处于一个新陈代谢的动态过程中, 随时发生着变化, 并且因为蛋白质的修饰、构象的变化等与生命活动紧密相关, 其形式也是在一个动态过程中, 故“细胞内存在的全部蛋白质”的“蛋白质组”是一种理想状态。据此, 生物学家又提出了蛋白质组更为全面和准确的定义, 即: 在一种细胞内存在的全部蛋白质。这个定义体现了蛋白质组的动态变化的特点, 包括了基因组表达的蛋白质和修饰后的各种形式的蛋白质, 是细胞内所有蛋白质的集合体。但是在实践上, 由于受蛋白质组学研究技术手段的限制, 细胞“全部蛋白质”的蛋白质组很难得到, 受人力、财力的限制对细胞“全部蛋白质”的研究也是不现实的, 对研究内容必须是有所取舍。为了解决理论和现实的矛盾, 中国学者提出一种新的研究策略: 功能蛋白质组学(Functional Proteomics)。它是从“局部”入手, 研

究内容是细胞内与某个功能有关或在某种条件下的一群蛋白质,介于对个别蛋白质的传统蛋白质研究和以全部蛋白质为研究对象的蛋白质组研究之间的层次。功能蛋白质组学不仅能阐明某一群体蛋白质的功能,并且不断丰富总蛋白质组数据库,在研究许多功能蛋白质组的基础上综合起来,就是接近于“全部蛋白质”的蛋白质组。

1.1.2 蛋白质组学的研究内容和技术

蛋白质组学研究是一项系统性的多方位的科学探索。其研究内容包括:蛋白质鉴定、翻译后修饰、蛋白质的结构、分布、功能、丰度变化、蛋白质与蛋白质的相互作用以及蛋白质与疾病的关联性等。其研究策略可分为完全蛋白质组学和差异蛋白质组学。完全蛋白质组学是指全面获取体系内蛋白质的物理、化学和生理系数,建立完全蛋白质数据库。但是由于蛋白质依据体系所在状态的不同其表达存在很大差异,虽然高密度芯片等技术发展迅速,但是要建立完全蛋白质数据库还需要技术的革新和很长一段时间。差异蛋白质组学主要是通过比较分析不同状态下蛋白质表达图谱,实现对体系内代谢调控的动态监测,从而揭示机体对内外界环境变化产生反应的规律。

目前蛋白质组学的研究手段主要包括分离技术、质谱技术和生物信息学技术。

1.1.2.1 蛋白质组学的分离技术

蛋白质组学研究的分离技术必须要符合高分辨率、高重复率和高通量这三个条件。

1.1.2.1.1 双向电泳技术

样品制备是双向电泳质量好坏的一个关键,其目的是使样品中蛋白质充分溶解并尽可能减少影响等电点聚焦的杂质,特别是带电杂质。近来的研究发现磺基甘氨酸三甲内盐(ASB14-16)的裂解效果最好,而 2mol/l 的硫脲和表面活性剂 4%CHAPS 的混合液能促使疏水蛋白从 IPG 到第二向胶的转换。以三丁基膦(TBP)取代 β -巯基乙醇或 DTT,可以完全溶解链间或链内的二硫

键, 增强了蛋白的溶解度, 并促进蛋白质向第二向的转移^[2]。另外, 对低丰度蛋白的分离识别比较困难, 除了显色技术的局限外, 还存在容易被高丰度蛋白掩盖的问题。这样, 所得到的蛋白图谱很不完整, 而且经常会忽略了那些在生命过程中发挥重要功能的微量活性分子。解决方案包括增加上样量, 对样品进行分级纯化, 富集低丰度蛋白, 采用更高灵敏度的显色方法, 如同位素标记等等。Herbert 等对电泳过程中的烷基化操作进行了详尽的研究, 认为在样品制备时就应该完成烷基化作用, 而不是在一向至二向之间的平衡阶段完成。这样有利于消除蛋白聚合物在碱性区域的产生并促进碱性蛋白的分离。

2-DE 是 1975 年由 O'Farrell^[3]首次建立的, 其基本原理是根据蛋白质具有不同等电点和相对分子质量的二个一级特性, 将蛋白质的混合物在等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF)中进行第一维的分离, 然后转入十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行第二维分离。经典的 2-DE 采用载体两性电解质(carrier ampholyte, CA)进行等电聚焦, 这种方法存在上样量小、长时间电泳过程中 pH 梯度不稳定、阴极漂移而导致碱性蛋白的损失以及不同批次间重复性差等问题。因此限制了 2-DE 的广泛应用。1988 年, 固相化 pH 梯度胶条(Immobilized pH gradient, IPG)技术的建立, 克服了 CA 的缺点, 具有高分辨率、高重复性、信息量大、操作简便等优点^[4]。针对低丰度蛋白质、极酸和极碱性区蛋白质、高分子质量区蛋白以及膜蛋白等, 研究者对 2-DE 进行了许多改进, 如采用窄范围的 pH 胶条(2~3pH 单位和 1pH 单位)、预分离技术; 预分离技术与窄范围 pH 胶条的联合应用等^[5-7]。

分离胶经染色脱色后可以利用凝胶图象分析系统成像, 然后通过分析软件对蛋白质点进行定量分析, 并且对感兴趣的蛋白质点进行定位。目前使用广泛的蛋白凝胶图像分析专业软件有 HT Investigator, Melanie, ImageMaster, Z3, PDQuest 和 Phoretix 等, 这些软件适用于大规模、高通量蛋白质组学研究实验室, 能快速处理大量 2-D 蛋白电泳凝胶图像, 能够对蛋白质点进行斑点检

测、背景消减与条纹消除、斑点配比、图形匹配、数据分析和数据库构建、定量和比较,容易使用,而且不断地改进和发展。

1.1.2.1.2 高效液相色谱分离技术

液相色谱与电离喷雾质谱(ESI-MS)或电离喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)联用,实现了高通量筛选和鉴定蛋白质混合体系的要求,具有操作过程简单、分析速度快、分离效能好和灵敏度高等优点。目前,蛋白质组研究中高效液相色谱与质谱联用的方式有一维色谱-质谱联用技术(LC-MS/MS)、多维色谱-质谱联用技术以及亲和色谱-质谱联用技术等。

1.1.2.1.3 蛋白质芯片技术

蛋白质芯片技术是利用化学或生物学的方法在硅、云母、各种膜片等载体表面制作成点状芯池,每个芯池用探针修饰。这种探针包括结合蛋白质的抗体或受体、结合某些阳离子或阴离子的化学基团、吸水或疏水物质、酶、免疫复合物等。使用时,先将需要检测的样本按一定的程序做好前处理,然后在每个芯池内点入检测的样品,利用特定的探针和特定蛋白质结合的特性,将样品中的特定蛋白质分离出来,然后对芯片上的蛋白质直接进行质谱检测。蛋白质芯片技术具有分析速度快、简便易行、样品用量少和高通量等特点,可直接用于临床标本的检测。然而,芯片蛋白质组学的蛋白质来源于已知蛋白质且不能识别已知蛋白质的多种异构体。

化学喷墨印迹技术(chemical ink jet printing technology, CHIP)结合了 2-DE 技术与蛋白质芯片技术的优点,被称为是“一个分析真实蛋白质的新方法”。它应用 2-DE 分离的蛋白质阵列转印至 PVDF 膜上,形成一个固相的蛋白质巨阵列(macro-array),然后应用一种特殊的装置对选择的蛋白质点进行原位消化,并从膜上对蛋白质进行质谱分析。该方法省去了 2-DE 分离后蛋白质胶上酶切的多个步骤,而且经 2-DE 分离的蛋白质可以应用多种酶进行蛋白质序列的鉴定。与以往的蛋白质芯片技术不同,CHIP 技术的芯片是巨阵列芯片,即 2-DE 的分离图谱,所分析的蛋白质点代表了真实的蛋白质^[8]。

1.1.2.2 质谱技术

质谱技术的基本原理是样品分子离子化后,根据不同离子间的质荷比(m/z)在真空系统中飞行速度的差异来分离并确定其分子量。生物质谱仪通常包含三个部分:离子源,质量分析器和检测器。

离子化技术的方法主要有基质辅助激光解吸附离子化(MALDI)和电喷雾离子化(ESI),均为软离子法,即大的带电分子可以在温和条件下以最低的碎片化程度被转化为气态离子。MALDI的原理是低浓度样品与高浓度基质在样品板上共结晶后,在真空环境中被UV或IR激发而离子化。基质分子是一些在特定波长中极易吸收激光能量并传递给蛋白分子的有机小分子,如肉桂酸和芥子酸等,它们可以在蛋白分子与蛋白分子,蛋白分子与小分子污染物如缓冲液离子、SDS、尿素等之间形成隔离。这些污染物在重结晶过程中被滤出。MALDI常用于分析蛋白质的酶切提取肽段混合物,进而获得肽质量指纹谱(PMF),是目前蛋白质组研究中最常用的胶上蛋白质鉴定技术。ESI是一种连续离子化的方法,原理是样品溶液在气压作用下低速喷入离子源小孔,在高电场作用下液滴发生“电荷爆破”而离子化。虽然它对污染物的容忍程度不如MALDI,但ESI可以直接与HPLC、capillary electrophoresis(CE)等装置偶联,将被分析物从溶液中离子化,同时具有分离和鉴定功能,常用于鉴定复杂肽混合物,如混合蛋白溶液酶切产物。

质量分析器是质谱的核心元件,决定着生物质谱的灵敏度,分辨率,质量准确度。目前有四种基本的质量分析器:飞行时间(TOF),四极杆(Q),离子阱(IT)和傅里叶变换离子回旋共振(FTICR)。MALDI分析器通常和TOF连接用以测定肽段质量数,通常飞行时间越长获得肽段的分辨率和准确度就越高。三级Q分析器通常和ESI相连以选择离子并产生被选择前体的碎片离子谱图。IT是以一定的时间间隔俘获离子,然后进行MS或多级MS分析,具有维护简单,灵敏度高,扫描速度快,性能价格比高等优点,但质量准确度相对较低。FTICR也是一类捕捉式质谱仪,它是在高真空和强磁场中俘获离子,

具有很高的灵敏度，质量准确度，分辨率和动态范围。

这些分析器可以独立使用，也可以串联起来使用以充分发挥各自的优点，如 ESI-Q-TOF, MALDI-Qq-TOF。最近的 MALDI-TOF-TOF 通过第一级 TOF 获得肽质量指纹谱信息，同时选择离子在碰撞池中裂解，由第二级 TOF 分析器读出碎片离子质量，具有很快的扫描速度，很高的灵敏度和质量准确度。这些质量分析器联用的方法充分利用了各种分析器的优点，提高了生物质谱对蛋白质或多肽的鉴定能力。

通过 MALDI-TOF-MS 和 ESI-MS/MS 得到的信息包括酶解肽段产生的指纹图谱(PMF)以及蛋白质部分序列信息，通过这两种信息可以对蛋白质进行鉴定。(1) 肽指纹图谱法：它由 Henzel 等人于 1993 年提出，是质谱技术中进行高通量蛋白分析鉴定的一种最有力的手段，尤其适合于对基因全序列已知物种的分析^[9, 10]。一种蛋白质用胰酶消化后得到特定的肽段模式，通过质谱技术检测这些肽段分子量即得到该蛋白的肽指纹图谱，然后利用相关的搜索软件将实验数据与数据库中的理论指纹图谱相匹配，从而完成对蛋白的鉴定。对于包含 100,000 以上条录的数据库而言，正确鉴定一个蛋白分子只需要 4 到 6 个肽段的信息。而且从理论上讲，当所检索的数据库越小，则所需的匹配肽就可以越少，结果也会更确定。PMF 方法也有它不足的地方，如数据库内可用的蛋白质序列数据不足时不能明确鉴定；小分子蛋白质酶切后不能产生足够的肽段时也不能明确鉴定；样品不纯，含多个蛋白质时也不能鉴定。在这些情况下就需要进行串级质谱分析以获得肽序列信息来帮助鉴定。(2) 用多肽序列信息鉴定蛋白质：经串级质谱分析得到的信息可以通过两种方式进行蛋白质的鉴定。Mann 等提出了肽序列标签(Peptide Sequence Tag, PST)法^[11]，肽序列标签是由一个多肽的部分氨基酸序列和该肽的质量以及该肽未测序部分的质量等组成。此方法非常快速和专一，但检索前需要对多肽的 MS/MS 图谱进行解析并从中提取出肽序列标签。另一种方法是将实验测得肽的 MS/MS 图谱，与数据库中多肽的理论 MS/MS 裂解图谱进行比较。应用

Sequest 和 Mascot 程序, 在一次联机 HPLC ESI-MS/MS 实验中, 能检索数百个 MS/MS 图谱, 而且不需要事先对图谱进行解析, 可实现自动化。相对于 PMF 方法, 将序列信息用于蛋白质的鉴定具有更高的专一性。

1.1.3 蛋白质组生物信息学的发展

生物信息学就是利用计算机科学(信息学)的技术手段来研究生物学的的数据, 如对生物数据进行获取, 存储, 传输, 计算, 分析, 模拟, 预测等等, 包括各种生物数据库、网站、软件、工具和远程网络等等。其研究重点主要包括在基因组学(Genomics)和蛋白组学(Proteomics), 分析和解读核酸和蛋白质序列中所表达的结构与功能的生物信息。生物信息学研究的主要任务包括: 生物数据库的设计、建立和优化; 从数据库中提取有效信息的算法; 为用户设计查询信息的界面; 开发数据可视化的有效方法; 与多种资源和信息建立有效连接; 开发数据分析的新方法; 发展预测的算法, 对新产品、新功能、疾病诊断和治疗等进行预测。其中数据库是最基本的。

目前, 国际上公共数据库有近百种, 其中最著名的核酸和蛋白质序列数据库有几十种。除了公用数据库外, 还有内部数据库。数据库的内容每年都以指数速率增长。这些数据库归纳起来可分为四类: 基因组数据库; 核酸和蛋白质一级结构序列数据库; 生物大分子三维空间结构数据库, 及以这三类数据库为基础的, 具有特殊生物学意义和专门用途的二级数据库。在蛋白质组研究中常用的网站及数据库主要有: (1) 美国国立生物技术信息中心(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的GenBank是一个所有可以公开获得的DNA序列的注释过的DNA数据库。目前, 拥有来自47,000个物种的30亿个碱基。(2) Expert Protein Analysis System (ExpASY, <http://us.expasy.org/>)是一个拥有海量蛋白质信息平台的蛋白质组数据库。它提供经过专家确定并详细注释的蛋白质数据库Swiss-Prot、各种蛋白的结构、功能及疏水性等蛋白信息分析软件、质谱结果分析软件Aldente、PeptideMass以及双向电泳数据库等信息, 而且还提供了有关蛋白质组研究资源的相关链接, 是一个十分全面的网络资源。(3)

质谱的结果需要进行数据搜索,目前有很多网站提供了质谱数据的PMF搜索,如Mascot(http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)、Aldente、PeptideMass、PepSea(<http://www://195.41.108.38/PepSeaIntro.html>)、MS-Fit(<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>)等,其中Mascot采取第四代搜索技术,具有较高的准确性。(4)另有一些软件属于商业性质如Melanie 4.0、PDQuest7.53和Phoretix等等。

1.1.4 蛋白质组学研究的新趋势

随着蛋白质组学研究的深入,又出现了一些新的研究趋势:

(1)相互作用蛋白质组学。又称为“细胞图谱”蛋白质组学,它包含两个方面的内容:研究蛋白质之间相互作用的网络;分析蛋白质复合体的组成。目前这方面的研究较热。

(2)亚细胞蛋白质组学。不同蛋白质在细胞中有不同的定位,在某一亚细胞结构内的所有蛋白质因相互作用较紧密而构成一个小整体,因此又派生出一个与空间密切相关的新领域-亚细胞蛋白质组学,例如细胞器蛋白质组、核膜蛋白质组等。

(3)定量蛋白质组学。即对蛋白质的差异表达进行准确的定量分析。这标志着蛋白质组学研究开始从简单的定性朝向精确的定量方向发展,并已逐渐成为蛋白质组研究的新前沿。如:二维差异凝胶电泳(two dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)是用两种不同的荧光染料 Cy3 和 Cy5,分别标记不同的蛋白质样品,然后将两种样品等量混合,在同一 2-DE 中分离。通过在同一块胶上对比一个蛋白点处两种不同荧光的强度,比较两种状态下特定蛋白质丰度变化、蛋白质的缺失或是否有新蛋白质的出现等^[12]。由 LC-MS 发展来的核素标签色谱分离实现了对细胞差异表达蛋白质的定量分析,如同位素编码亲和标签法(isotope-code affinity tags, ICAT),研究蛋白质磷酸化的磷酸化蛋白亲和标签法^[13]、研究糖基化蛋白的核素编码糖基化定点标签法^[14]、分析蛋白质丰度的串联质量标签法等^[15]。

1.1.5 蛋白质组学的前景展望

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,它是从更深层次上去认识生命活动的规律,也是基因组计划由结构走向功能的必然,是生命科学由分析走向综合的必由之路。随着全球蛋白质组研究技术的快速发展和成熟,蛋白质组与基因组研究成果的互补,以及蛋白质组产业化和市场化的进程,蛋白质组研究将为人们更完整的揭示生长、发育和代谢调控等生命活动的规律和重大疾病的发生机理,为人类进行疾病的诊断、防治和新药开发提供重要的理论基础。我们相信,在整个 21 世纪,蛋白质组研究将带领人们向生命科学的蓝图跨出一大步。

1.2 APR (acute phase response) 研究进展

APR(acute phase response)指生物体受激后早期的生理变化所涉及的一系列反应,可归于先天免疫系统。APR 是机体在受伤或感染状态下一种普遍的保护性生理反应,以调整机体的营养成分及能量的分布,适应免疫激活,修复伤口和恢复正常生理状态等要求。几乎所有动物受到创伤和感染等外界伤害时都会启动 APR,合成 acute phase protein(APP)进行快速自我保护,抵御微生物的入侵,促进创伤的修复,帮助机体恢复正常静息状态等。对于高等哺乳动物,APR 反映为某些生理指标的变化,如嗜眠、发烧等。参与 APR 过程的器官和系统很多,包括肝、神经内分泌、造血、粘膜、皮肤,大脑及免疫系统等,其中肝脏是 APP 的主要合成器官。

第一个被发现的 APP 是 1930 年 Tillett 和 Frances 等从感染了肺炎球菌的病人血清发现的 C-reactive protein(CRP)。CRP 是一种能和肺炎球菌多聚糖 C 形成沉淀的物质。该蛋白在多种感染源感染的人血清中都有发现。这也是关于机体在炎症情况下生化反应的最早报道,并导致了其它“acute phase protein (APP)”的发现^[16]。有关 APR 的研究在哺乳动物中报道较多。常见的 APP 可归纳为水平呈上升趋势的阳性 APP(Positive APP)和呈下降趋势的阴性 APP(Negative APP)^[17] (表 1-1)。

表 1-1 常见的 APP 分子

Table1-1 some of APP

	Complement system	C3, C4, C9, Factor B, C1 inhibitor, C4b-binding protein, Mannose-binding lectin
	Coagulation and fibrinolytic system	Fibrinogen, Plasminogen, Vitronectin, Tissue plasminogen activator, Urokinase, Prorelin S, Plasminogen- activator inhibitor 1
	Antiproteases	α_1 -Protease inhibitor, α_1 -Antichymotrypsin
Positive APP	Transport proteins	Pancreatic secretory trypsin inhibitor, Inter- α -trypsin inhibitors
	Participants in inflammatory responses	Ceruloplasmin, Haptoglobin, Hemopexin
		Secreted phospholipase A ₂ , Lipopolysaccharide-binding protein, Interleukin-1-receptor antagonist, Granulocyte colony-stimulating factor
	Others	C-reactive protein, Serum amyloid A, Ferritin, α_1 -Acid glycoprotein, Fibronectin, Angiotensinogen
Negative APP	Albumin, Transferrin, Transthyretin, α_2 -HS glycoprotein, Alpha-fetoprotein, Thyroxine-binding globulin, Factor XII, Insulin-like growth factor I	

Koj 等将 APR 网络反应表述为下面的模式图^[18], (图 1-1)

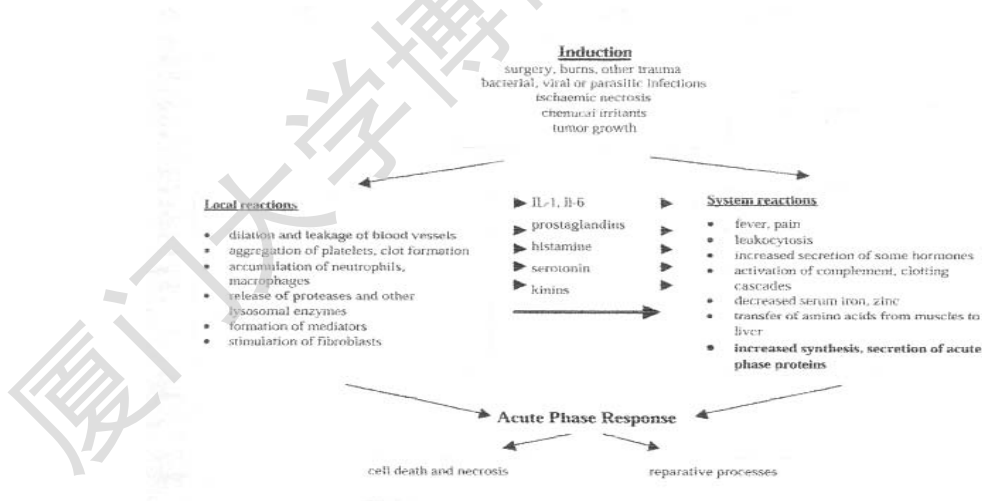


图 1-1 APR 网络反应模式图

Fig1-1 model of network reaction of APR

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库