

· 专论与综述 ·

蛋白质组学的研究方法^{*}饶友生^{1,2} 张细权¹

(1 华南农业大学动物科学学院 广州 510642 2 江西教育学院 南昌 330029)

摘要:近年来,蛋白质组学的研究在生物医学领域正逐步深入,研究方法也正逐步完善。本文综述了蛋白质组学的几种研究方法,指出了各种方法的优点及局限性,并且对蛋白质组学的研究方法和前景进行了展望。

关键词:蛋白质组;二维凝胶电泳;生物质谱;蛋白质微阵列;生物信息学

中图分类号:Q51 **文献标识码:**B

Methods for Proteomics Study

RAO You - sheng^{1,2}, ZHANG Xi - quan¹

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642;

2 College of Science, JiangXi Education Institute, NanChang, 330029, Jiangxi, China)

ABSTRACT: Proteomics research has been probing into biological medicine area in recent years, the methods in proteomics research are getting more and more perfect. In this paper, several methods in proteomics research have been summarized, pointing out the advantages and deficiencies of various methods, and the prospects and the methods for proteomics research have been forecasted.

Key words: Proteome; Two - dimensional gel electrophoresis; Mass spectrometry; Protein microarray; Bioinformatics

蛋白质组学(proteome)的概念是1994年由澳大利亚科学家 wilkins 等首次提出来的。它是指一个基因组、一个细胞或组织所表达的全部蛋白质的总和。蛋白质组学是后基因组时代研究的一个新领域,旨在通过在蛋白质水平上对细胞或机体基因表达的终产物进行定性和定量的研究,揭示生命活动的过程和规律及基因表达的调控机制。其研究范围包括:细胞、组织和体液中蛋白质数量和种类的确定和鉴别;细胞在正常生理情况和异常情况下(病理情况下)蛋白质表达水平的差异;蛋白质翻译的后修饰以及蛋白质的转运和定位;蛋白质和蛋白质、蛋白质和糖类、脂类、DNA、RNA 的相互作用等^[1,2]。2003年 Lefkovits 等^[3]提出了结构蛋白质组学和功能蛋白质组学的概念。结构蛋白质组学研究的是细胞中蛋白质的种类和数量、蛋白质的一级结构和高级结构;而功能蛋白质组学研究的是蛋白质的生理功能以及细胞在生长发育和分化过程中蛋白质表达水平的动态变化。Lefkovits 等认为这一区分是必须的,可以有效地避免一些重复性的研究工作。相对于基因组的研究而言,蛋白质组的研究明显滞后,其原因大致包括:①一个个体或一个细胞的基因组是相对稳定的,而一个个体在生长发育的不同阶段、一个细胞在生长发育和分化的不同时期,蛋白质的表达水平千差万别,因此蛋白质组是一个动态的概念。②蛋白质组是一个比基因组膨大数倍的单位(如人的基因组基因的数目约3万个,编码约10万种蛋白质)。一个基因可能编码一种、数种蛋白质,也可能不编码蛋白质;一个蛋

白质分子也可能由几个基因共同编码。③蛋白质存在复杂的后修饰以及在细胞和组织中的转运和定位问题。④相对于蛋白质组而言,基因组(包括DNA和RNA)在化学组成和性质上具有较高的同源性,基因组的分离、测序、克隆和体外扩增技术均已十分成熟并已逐步实现自动化。蛋白质由于其在细胞中行使的功能各异,结构各不相同,生理生化特性也严重歧化,适用于某种蛋白质的研究条件和手段往往并不适用于另一种蛋白质。

目前,基因组的研究工作突飞猛进,伴随着多个物种测序工作的完成和一些正在进行的测序工作,基因组的研究技术日趋完善,新基因在不断地发现。与此同时,研究者们也越来越意识到,尽管基因组的研究能够提供蛋白质的某些一级结构信息,但蛋白质的高级结构、蛋白质的修饰、定位、活性、蛋白质间的相互作用以及蛋白质的功能的信息却微乎其微。虽然有些学者^[4]在几种组织中对DNA-RNA-蛋白质的动态模型进行了一些分析,但基因的活性、mRNA的丰度以及蛋白质的丰度三者的关系并不明了。蛋白质研究方法和技术的相对滞后已成为了制约蛋白质组学进一步深入的瓶颈。如何结合基因组的研究并充分利用现有的数据库进行大规模的蛋白质组的研究是广大研究者们共同面临的一个课题。经过近十年的探索,蛋白质组学的研究方法取得了重要进展。这些方法包括二维凝胶电泳、生物质谱、蛋白质微阵列、生物信息学等。

· 基金项目:国家重大基础研究规划项目(编号为G2000016102)

作者简介:饶友生,男,汉,(1965-),博士,副教授。研究方向:分子遗传学

E-mail: rys8323571@yahoo.com.cn

(收稿日期:2006-07-10 接受日期:2006-08-28)

1 二维凝胶电泳

二维凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2DE)是1975年由Klose和O'Farre在各自的实验室单独发明的。利用这项技术他们成功地分离了大肠杆菌(*Escherichia coli*)溶菌液中的多种蛋白质。二维凝胶电泳的第一向为等电聚焦(iso-electric focusing, IEF),根据蛋白质分子的等电点(PI)的不同而将其分离;第二向为SDS-PAGE,根据分子量的大小而将其分离。最早采用的是载体两性电解质pH梯度进行等电聚焦,直到九十年代中期固相化pH梯度(immobilized pH gradient)等电聚焦技术的发明,二维凝胶电泳才成为了蛋白质组学研究的有力工具。由于其具有大规模地快速分析和鉴定蛋白质的能力以及具有较好的可重复性和可比性,Glokler和Angenendt^[5]相对于蛋白质微阵列(protein microarray)将其称为蛋白质宏阵列(protein macroarray)。

使用二维凝胶电泳研究蛋白质组学的基本步骤是:蛋白质样品(溶液)的制备→通过2DE上样分离→2D凝胶上蛋白质印迹点的计算机数字化处理→通过质谱技术(MS)对所研究的蛋白质进行初步鉴定→搜索数据库获取相关信息后对蛋白质进行最终鉴定。

二维凝胶电泳的上样溶液可以是细胞裂解液,也可以是多种蛋白质的混合溶液。固相化pH梯度凝胶^[6,7]在等电聚焦向的成功应用使二维凝胶实现了商业化和标准化,也使实验具有了较高的可重复性。蛋白质样品通过二维凝胶电泳,用考马斯亮蓝(Coomassie Blue stain)染色后可获得标准的肉眼可见的蛋白质图谱(protein map);银染(modified silver stain)后可用于MS分析。

二维凝胶电泳技术的优点十分突出,归纳起来主要有:①二维凝胶电泳结合MS分析可以实现较大规模的蛋白质的分离和鉴定;②二维凝胶电泳特别适用于后修饰的蛋白质(如糖基化、磷酸化、脱氨等)的发现和鉴别。③二维凝胶电泳技术研究蛋白质组学的各个步骤可相互分离,相关工作可在不同的实验室完成。二维凝胶还是蛋白质的“纯化收集器”和蛋白质保存的“文件夹”。干凝胶上的蛋白质在室温下可保存数月甚至数年。长期保存在凝胶上的蛋白质用胰蛋白酶处理后同样可用于MS分析。这对于某些珍贵的样本如一些稀少的组织瘤样本的保存有十分重要的意义。④二维凝胶电泳技术相对廉价,MS分析和生物信息资源的搜寻可通过共享资源或有偿服务来实现。

二维凝胶电泳技术的不足也非常明显。其最大的不足是不可能对整个蛋白质组进行分析和研究。通过染色显示出来的蛋白质图谱只是一些高丰度的蛋白质。低丰度的蛋白质如受体、调节蛋白等很难反映出来。一些分子量比较极端的蛋白质(过大过小的蛋白质分子)以及碱性蛋白和疏水蛋白也不能进行分离和鉴定。典型的如膜蛋白,由于其高的疏水性和表达的低丰度,二维凝胶电泳技术很难应用到膜蛋白的研究中。其二,通过二维凝胶电泳分离的蛋白点(protein spot)不一定只代表一种蛋白质。据报道^[8-10],通过二维凝胶电泳获得的真核细胞的蛋白质图谱有20%的点包括了至少两种或两种以上的蛋白质,而原核细胞的蛋白质图谱甚至达到40%。其

三,二维凝胶电泳的敏感性差,分离的蛋白质必须要有足够的丰度才能着色。

放射自显影和放射荧光显影在凝胶电泳图谱的标记上效果显著^[11,12],该方法能使蛋白点的边缘更为清晰,并可直接用于质谱分析。蛋白质图谱的计算机处理技术近年来发展很快,相关的处理软件有: Melanie (Geneva Bioinformatics and Bio-Rad Laboratories), ImageMaster (Amersham - Pharmacia Biotech), Phoretix 2D (Phoretix International), Gellab (Scanalytics), Kepler (Large Scale Proteomics), Z3 (Compugen), GD Impressionist (GeneData).等。

二维凝胶电泳技术作为一种基础技术,其发展和应用在很大程度上依赖于其它新技术的发展。基于二维凝胶电泳技术的质谱技术(based-2DE MS,生物质谱技术)近年来发展迅速,在很大程度上克服了二维凝胶电泳技术的不足,拓宽了其应用范围。基于二维凝胶电泳技术的质谱技术也因此成为了当前蛋白质组学研究的有力工具。

2 生物质谱

质谱(Mass spectrometry, MS)作为一种分析技术从上世纪六十年代始应用于一些挥发性化学物质的结构研究。二维凝胶电泳技术自发明后没有得到广泛的应用的一个重要原因即是质谱技术的相对滞后,因为带电荷的蛋白质分子转入真空后通过电子激发容易失活。因此,传统的蛋白质分析方法主要为氨基酸组成分析、Edman降解反应的N末端测序、C末端酶解、C末端化学降解等。这些技术费时费力,灵敏度低,而且对蛋白质样品的含量和纯度都有很高的要求。1988年, Karas和 Hillenkamp发明了基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)。同期, Fenn和 Wilm等发明了电喷雾电离质谱(Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS)^[13-15]。这两种较温和的离子化方法在对大分子进行离子化时不会破坏大分子的结构,从而使蛋白质分子的质谱分析成为可能。

从细胞、组织或生物体液中提取的蛋白质样品经过二维凝胶电泳分离后,所分离的蛋白点用胰蛋白酶降解进行质谱分析,可得到该蛋白质的肽谱图(peptide-mass fingerprinting)。根据肽谱图对蛋白质数据库进行检索,即可识别和鉴定所检测的蛋白质。

用生物质谱进行蛋白质分析具有很高的灵敏度和准确性。银染后获得的蛋白质图谱蛋白质点的检测浓度可低至fmol水平。如上所述,基于二维凝胶电泳技术的生物质谱技术是鉴定后修饰蛋白的最为有效的方法。但生物质谱技术同样有其局限性,质谱分析得到的质谱图的解析是一个相当费时费力的工作。其次,通过二维凝胶电泳获得的蛋白质图谱其蛋白点必须进行酶解,酶解的过程可能导致部分蛋白质和肽段的丢失。当银染的酶解肽段浓度过低时,质谱分析所得的信息可能不足以对蛋白质进行准确的鉴别和确定。同时,基于二维凝胶电泳技术的生物质谱技术自动化程度较低,很多过程都需要人工参与,蛋白质样品及其酶解片段容易受到来自人的皮肤和头发的角蛋白的污染,因而可能对分析的准确

性产生严重干扰。

1999年 Cygi 等发明了一种更为普遍的准确定量蛋白质的方法,即同位素编码亲和标记质谱(Isotope - Coded Affinity Tagging, ICAT),可对蛋白质组进行整体和定量的分析,降低蛋白质混合浓度的复杂性并可富集低丰度的蛋白质^[16]。表面增强激光解吸电离时间飞行质谱技术(surface-enhanced laser desorption/ionization/time-of-flight mass spectrometry, SEDI-TOF)已经广泛应用于人类癌症的早期诊断和早期治疗中^[17]。Solassol 等的研究表明,SEDI-TOF 技术和亲和层析技术的结合能显著地提高癌症早期诊断的准确度^[18]。机器人质谱(Robotic-MS)也是当前的一个研究热点,该项技术旨在把二维凝胶电泳、蛋白质图谱中蛋白点的消化、消化片段的质谱分析以及质谱图的解析整合到一起。这一自动化过程的实现将有效地减少蛋白质的污染,使分析结果更加准确可信。

3 蛋白质/抗体微阵列(蛋白质/抗体芯片)

蛋白质微阵列(protein microarray)有三个方面的含义:①基片的微型化;②点样的高密度化;③通过该阵列可扫描和分析蛋白质和蛋白质,蛋白质和 DNA、RNA、配体以及其它小分子物质间的相互作用。Lueking 等^[19]把作为探针的 92 个人的 cDNA 克隆片段的蛋白表达产物高密度地固定在聚偏氟乙烯膜(polyvinylidene difluoride, PVDF)上,点样密度达 600 点/c,用单克隆抗体对其进行检测,作平行分析,证实假阳性的检出率较低,并能检测到 10pg 的蛋白测试样品。Mendoza 等^[20]在玻璃平板上设置了 96 个疏水的聚四氟乙烯掩膜(Teflon mask),每个掩膜点 144 种样品,用常规的酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测,然后用 CCD(charge-coupled device)系统对反应的图象进行扫描分析。使蛋白质微阵列过渡到蛋白质芯片的突破性工作是普通的显微玻片基片的使用。玻片耐高温,能承受高离子强度的漂洗,荧光背景低而且便于检测分析,因而具有很强的实用性。Macbeath 等^[21]首次把蛋白质点样在经过乙醛化处理的玻片上获得了成功。

基片的选择以及基片的处理方法是蛋白质芯片制作的关键。目前常用的基片有凝胶、塑料和玻片。作为蛋白质芯片的基片必须满足三个方面的要求:首先,蛋白质分子能稳定地固定到基片上。蛋白质不同于 DNA 分子,有一个带负电荷的磷酸骨架容易和基片或经过化学修饰的基片交联。其次,基片要相对廉价,适于高通量点样,适于低荧光检测分析,并且具有较高的重复性。第三,要尽可能保证交联到基片上的蛋白质的活性。因为蛋白质被固定后,空间构象容易破坏,活性位点或活性结合位点容易丧失。Angenendt 等^[22-24]比较了 11 种不同基片和基片表面修饰方法(包括凝胶、塑料和玻片)在抗体芯片技术中的运用效果。作者发现,用聚赖氨酸和戊二醛修饰的玻片处理过程简单,容易使蛋白质通过静电作用或共价结合而吸附,信噪比高,变异系数小,其缺陷是可检测的极限浓度偏高(2000amol/spot)。聚丙烯酰胺凝胶基片经过 PBS

温育,其检测的灵敏度最高,极限浓度为 1313amol/spot,适于低丰度蛋白的检测,但变异性大。塑料基片 MaxiSorb(translucent)和 MaxiSorb(black)可检测的极限浓度分别为 2000amol/spot、1500amol/spot,虽然有很高的灵敏度但变异最大稳定性最差。所有各种基片均可保存 8 周以上,但保存 2 周后分析效果最好。作者最终得出结论,各种基片及化学修饰方法并无明显的优劣之分,具体选用那种基片及化学修饰方法应视研究的具体目标而定。

蛋白质芯片的模式(protein microarray format)除了上面谈到的平板式外还有另外几种模式。Zhu 等^[25]在研究蛋白质磷酸化激酶时制作了一种微孔式芯片(Microwell array),芯片直径为 1.4mm,深度为 300um,可容纳 300nl 的反应体积。整个芯片制作在一个便携的弹性硅橡胶二甲氧基硅氧烷聚合物(polydimethylsiloxane, PDMS)中。Bernhard 等^[26]在光纤末端连接一个微孔芯片,制作了 pH 和 O₂ 敏感传感器。在微孔芯片模式上发展起来的另外一种芯片模式是微型流体芯片(microfluidic chips)。Cohen 等^[27]通过影印平板术(photo lithographic techniques)研究蛋白激酶 A 时制作了这种芯片。该芯片利用电渗原理通过微型管道转移反应试剂可调控磷酸化反应过程,同时还可控制反应试剂的浓度,估算 Michaelis-Menten 常数。因为生理生化反应都是在溶液中完成的,因此微型流体芯片有更为广泛的应用前景。蛋白质芯片和质谱技术相结合造就了另外一种芯片模式,如表面增强激光解吸电离质谱芯片(SELDI chip)^[28]。该技术把蛋白质样品的制备,生化反应和检测分析都集成在芯片上完成。芯片的发展模式有一个明显的趋势,愈来愈象一个微型实验室。

就目前来看,制约蛋白质芯片进一步发展的因素主要有:①抗体和蛋白质资源。抗体芯片面临的最大困难是很难获得大量特异性各异的纯净抗体。尽管有许多单克隆和多克隆抗体上市,但其高昂的价格令人望而却步。蛋白质芯片同样面临大量蛋白质的分离和纯化问题。现阶段常常用核糖体展示文库^[29]和噬菌体展示文库^[30]提供的 scFvs 片段替代,但变异性大。另一种替代品是寡核苷酸^[31],但蛋白质样品中极微量的核酸酶都会使其降解。②基片及基片修饰的选择。如上所述,现在尚无一种理想的基片及基片修饰方法,抗体和蛋白质固定到基片后常常活性丧失或特异性和活性降低,scFvs 片段也存在同样的问题。③蛋白质和抗体芯片的标记。尽管有各种直接或间接的标记方法,但蛋白质样品的标记始终是蛋白质芯片技术发展的一个瓶颈。④数据处理。这同样也是 DNA 芯片所面临的问题。

蛋白质芯片虽然还处在发展的早期阶段,但其在蛋白质组学研究方面的优势已十分明显。它具有高通量、高灵敏度、低上样量的显著特点,已广泛应用于蛋白质表达谱的分析、蛋白质功能及蛋白质-蛋白质相互作用的研究、临床疾病的诊断和疗效评价、药物新靶点的筛选和新药研制的各个领域。

4 生物信息学

生物信息学(bioinformatics)是生物学与计算机科学及应用数学等学科相互交叉而形成的一门新兴学科。它通过对生物学实验数据的获取、加工、存储、检索与分析,进而达到提取数据所蕴含的生物学意义的目的,它由数据库、计算机网络和应用软件三大部分构成。生物信息学主要包含三个方面的内容,即基因组信息学、蛋白质组信息学以及药物设计。生物信息学的任务是通过对已有基因组系列的分析,确定基因在染色体上的位置及其功能,了解基因表达的调控机理,对未知的蛋白质进行结构和功能的预测并根据特定的蛋白质进行药物设计^[32]。

生物信息学虽然以基因组信息学为核心,但其在蛋白质组学研究中的作用日益突出。通过二维凝胶电泳、生物质谱、蛋白质微阵列等方法所获得的大量数据最终都必须依赖生物信息学的方法和手段才能实现对蛋白质的种类、数量、结构和功能的最后确定。生物信息学在蛋白质组学研究中的另外一个重要应用和未知功能的新基因的研究有密切的关系。目前,基因组学发展迅速,新基因在不断发现,但许多新基因的功能却一无所知。有些基因和已知基因的同源性很低或没有同源性,不能通过和已知基因的比较来预知其功能。电泳、层析、质谱虽不失为可行的方法,但费时费力,对少数蛋白质的研究而言,有时并非高效价廉。凭借生物信息学的方法,我们可以对新基因的最终表达产物进行结构和功能的预测。预测虽有假阳性,但计算结果有助于蛋白质研究的实验设计。当基因组的数据足够翔实时,预测的精确度将大大增加。

4.1 蛋白质功能预测

蛋白质功能的预测主要有以下几种方法^[33]:①基于序列相似性比较。蛋白质进化的保守程度比DNA高,因此在DNA水平与已知基因无显著同源性的序列,可能在蛋白质序列库中找到有参考价值的同源序列(包括和功能密切相关的保守残基)。这一方法的理论基础是,进化产生的享有共同祖先的同源性蛋白家族具有相似的序列、结构和功能。通过和已知序列的比较,还可以预测未知蛋白质的性质,如等电点/分子量、疏水性、跨膜螺旋、卷曲螺旋及信号肽等。②基于系统发育谱(phylogenetic profiles)的比较。两个蛋白质享有相似的系统发育谱被认为存在功能连锁。根据系统发育谱可进行蛋白质聚类,当未知蛋白质与一个或几个功能已知的蛋白质归为一类时即可提供未知蛋白的功能信息。③基于结构域融合的方法。两个位于不同基因组的非同源性蛋白组分融合成一条单链时,其相互作用的区域更可能是在进化上产生歧化的热点。如从细菌到真菌的色氨酸合成酶的亚基。④基于mRNA表达类型的比较。分析建立在一种假设上,这种假设认为在条件相同的情况下,表达水平相关联的蛋白质功能上是相连锁的。毫无疑问,合理的基因组水平蛋白质功能预测当然是

上述各种方法的综合运用。

4.2 蛋白质结构预测

根据同源系列的比对和某些关键的氨基酸残基的位置,以已知三维结构和二级结构的蛋白质为依据,通过人工神经网络、遗传算法等可预测蛋白质的二级结构和高级结构。单一序列二级结构预测的准确率可达到60%~80%,多序列比较可显著提高预测效能。目前, α 螺旋预测的精确度较好,而 β 折叠次之,二者之外的无规则二级结构则明显不佳。蛋白质三级结构预测尚无有效的办法,研究发现序列差异较大的蛋白质也可折叠成相似的三维构象,但蛋白质的折叠过程并不十分明确。目前常用的是“同源建模”和“Treading”方法^[34],但效果并不理想,有待于进一步完善。

以上对蛋白质组学研究的几种主要方法进行了较为全面的分析,指出了各自的优点及其局限性。其实,蛋白质组学的研究方法还有许多,比如1-D凝胶电泳、3-D凝胶电泳、层析及酵母双杂交系统等。酵母双杂交系统是Field和Song等^[35]建立起来的研究蛋白质相互作用的一个系统,这一系统是以真核细胞转录激活的结构和活性特点为基础的。利用这一系统已经证实并筛选出了许多具有相互作用的蛋白质及配体。应该说任何一种方法都不是孤立的,各种方法的综合运用才是蛋白质组学研究的唯一正确的方法。同样,基因组学、转录组学以及蛋白质组学的研究也是不可割裂的。基因组学的研究为我们描绘了基因的结构及其表达图谱;转录组学的研究揭示了HnRNA的选择性拼接特点、转录起始点及启动子的位置。而蛋白质组学的研究所展示的蛋白质图谱将为我们进一步揭示各基因所编码的蛋白质的功能以及蛋白质的修饰、定位、活性、蛋白质间的相互作用等,进而从根本上解决生命的遗传和变异、生命的起源和演化等问题^[36-38]。

参考文献

- [1] Williams KL. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology [J]. Electrophoresis, 1999,20(4-5):678-88
- [2] Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins [J]. Trends Biotechnol, 1999,17(3):121-7
- [3] Lefkowitz I. Functional and structural proteomics: a critical appraisal [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2003,5,787(1):1-10
- [4] Brenner SE. Errors in genome annotation [J]. Trends Genet., 1999,15(4):132-3
- [5] Glöckler J, Angenendt P. Protein and antibody microarray technology [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., 2003,797(1-2):229-40
- [6] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures [J]. Electrophoresis, 1999,20(4-5):712-7
- [7] Wildgruber R, Harder A, Obermaier C, et al. Towards higher resolu-

- tion: two - dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 2000,21(13):2610 - 6
- [8] Link AJ, Hays LG, Carmack EB, et al. Identifying the major proteome components of *Haemophilus influenzae* type - strain NCTC 8143 [J]. Electrophoresis, 1997,18(8):1314 - 34
- [9] Venkatram S, Tasto JJ, Feoktistova A, et al. Identification and characterization of two novel proteins affecting fission yeast gamma - tubulin complex function[J]. Mol Biol Cell, 2004,15(5):2287 - 301
- [10] Parker KC, Carrels JL, Hines W, et al. Identification of yeast proteins from two - dimensional gels: working out spot cross - contamination [J]. Electrophoresis, 1998,19(11):1920 - 32
- [11] Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts [J]. Electrophoresis, 1997,18(11):2071 - 7
- [12] Tonge R, Shaw J, Middleton B, et al. Validation and development of fluorescence two - dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology [J]. Proteomics, 2001,1(3):377 - 96
- [13] Ochi H, Horiuchi I, Anaki N, et al. Proteomic analysis of human brain identifies alpha - enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy [J]. FEBS Lett, 2002,528(1 - 3):197 - 202
- [14] Gehanne S, Ceconi D, Carboni L, et al. Quantitative analysis of two - dimensional gel - separated proteins using isotopically marked alkylating agents and matrix - assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002,16(17):1692 - 8
- [15] Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, et al. Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall [J]. Electrophoresis, 2002,23(11):1754 - 65
- [16] Madon - Gurpide J, Wang H, Miesk DE, et al. Protein based microarrays: a tool for probing the proteome of cancer cells and tissues [J]. Proteomics, 2001,1(10):1279 - 87
- [17] Solassol J, Marin P, Maudelonde T, et al. Proteomic profiling: the potential of Seldi - ToF for the identification of new cancer biomarkers. Bull Cancer, 2005,92(9):763 - 8
- [18] Solassol J, Jacot W, Lhermitte L, et al. Clinical proteomics and mass spectrometry profiling for cancer detection. Expert Rev Proteomics, 2006,3(3):311 - 20
- [19] Lueking A, Hom M, Eickhoff H, et al. Protein microarrays for gene expression and antibody screening [J]. Anal Biochem, 1999,270(1):103 - 11
- [20] Mendoza LG, McQuary P, Mongan A, et al. High - throughput microarray - based enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Biotechniques, 1999,27(4):778 - 80C
- [21] MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high - throughput function determination [J]. Science, 2000,289(5485):1760 - 3
- [22] Angenendt P, Gokler J, Murphy D, et al. Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials [J]. Anal Biochem, 2002,309(2):253 - 60
- [23] Angenendt P, Gokler J, Sobek J, et al. Next generation of protein microarray support materials: evaluation for protein and antibody microarray applications [J]. J Chromatogr A, 2003,1009(1 - 2):97 - 104
- [24] Angenendt P, Progress in protein and antibody microarray technology [J]. Drug Discov Today, 2005,10(7):503 - 11
- [25] Zhu H, Klemic JF, Chang S, et al. Analysis of yeast protein kinases using protein chips [J]. Nat Genet. 2000,26(3):283 - 9
- [26] Bernhard DD, Mall S, Pantano P, Fabrication and characterization of microwell array chemical sensors [J]. Anal Chem, 2001,73(11):2484 - 90
- [27] Cohen CB, Chin - Dixon E, Jeong S, et al. microchip - based enzyme assay for protein kinase A [J]. Anal Biochem, 1999,273(1):89 - 97
- [28] Hadd AG, Raymond DE, Halliwell JW, et al. Microchip device for performing enzyme assays [J]. Anal Chem., 1997,69(17):3407 - 12
- [29] Hanes J, Schaffitzel C, Knappik A, et al. Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display [J]. Nat Biotechnol, 2000,18(12):1287 - 92
- [30] Hallborn J, Carlsson R. Automated screening procedure for high - throughput generation of antibody fragments [J]. Biotechniques, 2002, Suppl:30 - 7
- [31] Smith D, Collins BD, Heil J, et al. Sensitivity and specificity of photoaptamer probes [J]. Mol Cell Proteomics, 2003,2(1):11 - 8
- [32] McCarvey PB, Huang H, Barker WC, et al. PIR: a new resource for bioinformatics [J]. Bioinformatics, 2000,16(3):290 - 1
- [33] Petersen TN, Lundegaard C, Nielsen M, et al. Prediction of protein secondary structure at 80% accuracy [J]. Proteins, 2000,41(1):17 - 20
- [34] 梁国栋.最新分子生物学实验手册[M].第一版.北京:科学出版社,2002
- [35] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein - protein interactions [J]. Nature, 1989,40(6230):245 - 6
- [36] Andersson L, Georges M. Domestic - animal genomics: deciphering the genetics of complex traits [J]. Nat Rev Genet, 2004,(3):202 - 12
- [37] Suzuki Y, Sugano S. Transcriptome analyses of human genes and applications for proteome analyses [J]. Curr Protein Pept Sci. 2006,7(2):147 - 63
- [38] Temple G, Lamesch P, Milstein S, et al. From genome to proteome: developing expression clone resources for the human genome [J]. Hum Mol Genet, 2006,15(13):2184