

高密度蛋白微阵列芯片技术及其在疾病研究中的应用

杨国香, 胡朝军[△]

(1. 内蒙古自治区医院检验科, 呼和浩特 010017; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院 100730)

摘 要: 许多具有高通量特点的蛋白质组学分析技术成为大规模研究蛋白分子间相互作用, 快速高效地揭示机体许多生命活动现象的必备手段, 并在近几年得到迅猛发展, 高密度蛋白微阵列芯片 (Protein microarrays chip) 技术就是其中之一。大规模同时检测分析一个物种的蛋白, 以及对这些蛋白进行亚细胞定位和相关功能的分析, 同时提供不同蛋白间的相互作用是高密度蛋白微阵列芯片的用途之一。

关键词: 高密度蛋白微阵列芯片; 高通量; 蛋白检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0601-03

高密度蛋白微阵列芯片 (Protein microarrays chip) 技术已经远不是传统观念中能同时检测数十种蛋白的芯片技术了。目前的高密度蛋白微阵列芯片能同时检测数万种蛋白。采用该技术能同时对 1 个物种 85% 以上的蛋白进行相关研究分析。Zhu 等^[1] 采用高密度蛋白微阵列芯片同时检测分析了酵母的 5 800 多个蛋白 (占酵母全部 6 200 个蛋白的 94%), 其研究成果发表于世界顶级科学杂志《Science》, 并被频繁引用接近 1 200 次。由此可见该技术将来在生物学研究领域中的应用前景。随着包括人类基因组在内的 90 多个物种基因组解码的完成, 进一步揭示这些基因的功能显得迫在眉睫。研究不同物种整个基因组编码蛋白的相关功能成为新的研究领域和挑战, 这对于在分子水平上阐明不同细胞功能, 研究不同疾病状态等复杂生命活动过程有着重要作用。要在 1 个物种成千上万个基因及其编码蛋白中研究不同蛋白的功能, 传统的蛋白研究方法显然已经没法满足这一要求, 要揭示它们之间的内在联系和相互作用, 势必要以整个蛋白质组学的规模进行相关研究。因此, 许多具有高通量特点的蛋白质组学分析技术成为大规模研究蛋白分子间相互作用, 快速高效地揭示机体许多生命活动现象的必备手段, 并在近几年得到迅猛发展, 高密度蛋白微阵列芯片技术就是其中之一。大规模同时检测分析 1 个物种的蛋白, 以及对这些蛋白进行亚细胞定位和相关功能的分析, 同时提供不同蛋白间的相互作用是高密度蛋白微阵列芯片的用途之一。

高密度蛋白微阵列芯片技术是一种高通量、高灵敏的蛋白检测分析技术。经过近 10 年的飞速发展, 目前采用的高密度蛋白微阵列芯片检测通量上万, 检测灵敏度可高达 fg 级^[2], 这对于进行人类蛋白质组学研究非常有利, 可以研究蛋白-蛋白、蛋白-核酸、蛋白-脂类、酶-底物、蛋白-药物间的相互作用, 该技术的出现对于疾病诊断、蛋白筛选以及药物开发有举足轻重的作用。高密度蛋白微阵列芯片技术的出现离不开高通量蛋白表达纯化技术和高密度蛋白点样技术。目前的高密度蛋白微阵列芯片技术已经能达到在显微镜载玻片大小规格 (7.5 cm × 2.5 cm) 上点样 30 000 个以上的蛋白。因此, 发展这一技术就必须有大量的不同纯品蛋白。为了满足同时获得某个物种的大多数蛋白, 以蛋白质组学的规模高通量表达纯化蛋白, Braun

等^[2] 采用 GST 标记技术在大肠杆菌表达体系中成功地实现了高通量表达完整活性蛋白, 采用该技术, 每天可表达纯化 1 000 多个蛋白。该技术突破性的进展满足了高密度蛋白微阵列芯片技术对大量蛋白种类的需求, 解决了高密度蛋白微阵列芯片技术制备过程的瓶颈之一, 使同时检测分析 1 个物种几乎所有的蛋白成为可能, 对高密度蛋白微阵列芯片技术的发展有着至关重要的作用和影响。高密度蛋白微阵列芯片技术的发展还离不开高密度蛋白点样技术的革新, 传统点样技术已经没法满足目前高密度点样的需求。Avseenko 等^[3] 采用电喷射点样技术把蛋白点样直径从 150 μm 缩小到 30 μm, 这一进步将蛋白点样密度提高了 25 倍, 所以能轻松地在载玻片规格大小的玻片上点上 30 000 个以上的蛋白。该技术的出现彻底解决了高密度的难题, 对高密度蛋白微阵列芯片技术的发展也起了很大的推动作用。

1 高密度蛋白微阵列芯片的种类

高密度蛋白微阵列芯片技术已迅速成为大规模蛋白研究的关键技术, 因此该技术不断推陈出新, 发展迅速, 先后出现了多种载体类型的高密度蛋白微阵列芯片。3D 胶结构的高密度蛋白微阵列芯片由 Guschin 等^[4] 和 Afanassiev 等^[5] 分别研究出来, 这种 3D 胶结构的芯片以凝胶为载体。由于凝胶孔是立体的, 所以该类型的芯片对点样蛋白的容量较大, 制备程序复杂, 步骤繁多, 操作中使用的缓冲液体系特殊, 而且不能采用常规的芯片扫描仪分析检测结果, 因此其使用受到很大限制。Zhu 等在此基础上发展起来以附于玻片上的凝胶为载体的纳米微孔芯片。与 3D 胶结构的高密度蛋白微阵列芯片比较, 其点样孔开放, 使用的缓冲液系统简单, 但是与 3D 胶结构的高密度蛋白微阵列芯片相似, 检测结果需要特殊的扫描设备, 因此使用并不广泛。现在最为通用的是以玻片为载体的芯片。显微镜载玻片样标准规格 (7.5 cm × 2.5 cm) 大小的玻片, 表面经过结合单分子层处理, 点样分子容易牢固结合到载体表面并保持高度活性。由于这种芯片规格大小固定、点样密度高、检测背景低, 易于操作, 而且便于常规通用的芯片扫描仪分析检测结果, 因此使用最为广泛, 发展也最迅速。

高密度蛋白微阵列芯片按其用途可分为: 分析检测型高密度蛋白微阵列芯片和功能型高密度蛋白微阵列芯片。分析检

[△] 通讯作者, E-mail: huchaojun818@sina.com.cn.

测型高密度蛋白微阵列芯片主要是用于同时分析检测某种混合物中的多种物质含量,抗体芯片是其典型代表。Brian 等制备了第 1 个包含了 115 种抗体的抗体微阵列芯片,并且系统研究了该芯片从混合蛋白样品中检测相应特异性蛋白的敏感性和特异性,成为抗体芯片研究的先驱。制备高密度抗体芯片需要大量的单克隆抗体,但是制备成千上万种单克隆抗体是费时费力的工程,因此抗体芯片的使用也在这方面受到了很大限制。与此对应,制备功能型高密度蛋白微阵列芯片需要大量的蛋白纯品,得益于 Braun 等发明的 GST 标记表达技术。因此,目前可以在蛋白质组学的规模高通量表达纯化蛋白,而且成本远低于单克隆抗体的制备,所以功能型高密度蛋白微阵列芯片在这方面没有受到很大限制。功能型高密度蛋白微阵列芯片主要用于大规模研究某个物种内大量蛋白的功能、相互作用以及分子活性分析等,具有较广泛的应用前景。

2 高密度蛋白微阵列芯片在疾病研究中的应用

任何疾病的发生、发展都是非常复杂的多因素过程,因此对疾病的研究也是多方面、多角度的。糖基化研究一直是肿瘤领域的热点,糖基化是蛋白转录后的修饰,涉及到免疫识别、细胞黏附、细胞代谢、细胞迁移以及信号传导等多方面,与肿瘤的发生、发展和转移密切相关,一直受到肿瘤研究者的密切关注。Zhao 等^[6]采用高密度蛋白微阵列芯片对胰腺癌患者进行研究,结果表明肿瘤患者体内存在涉及若干种类蛋白的大范围糖基化改变,以往的研究手段只能关注某个或者某几个蛋白的糖基化,无法从整体上对这些所有糖基化的蛋白进行全面研究分析,往往不能很好地揭示不同蛋白之间的相互联系。高密度蛋白微阵列芯片技术不仅能大规模研究蛋白的糖基化,还可以研究细胞表面的糖基化,Tao 等^[7]采用该技术对人类的 24 种细胞系进行糖基化研究,发现该技术能分析细胞表面的特异性糖基化以及研究这些糖基的功能。肿瘤抗原的研究也是肿瘤领域的热点,这对于肿瘤的诊断和发病机制的研究非常重要。Hudson 等^[8]和 Gunawardana 等^[9]采用包含 5 050 个人类蛋白的高密度芯片对卵巢癌患者进行研究,鉴定出多个与卵巢癌相关的抗原和抗体,这对于卵巢癌的诊断非常有很大的潜在价值。

感染性疾病一直是危害人类的重大疾病之一,该类疾病的早期诊断对患者的治疗至关重要。但是对于像 SARS 这样的突发性传染病,由于缺乏对其足够的认识,其相应的检测诊断手段无从谈起。功能型高密度蛋白微阵列芯片的优势在这种情况下得到充分发挥。Zhu 等将 SARS 冠状病毒和 5 种常见致病病毒编码基因导入酵母表达系统,纯化表达出相应蛋白制备成覆盖 6 种病毒蛋白质组的高密度蛋白微阵列芯片,采用该芯片对 602 例标本(其中 SARS 患者约 250 例)进行检测分析,其区分 SARS 患者的正确率高达 91%,由于该芯片包含了 SARS 冠状病毒和 5 种常见致病病毒的蛋白,其检测结果非常可靠,具有较高的敏感性和特异性,该技术为感染性疾病的检测提供了一种全新的手段。

自身免疫性疾病的研究一直致力于特异性自身抗体的寻找,这有助于疾病诊断和病情评估。如果采用传统方法对单个抗体进行逐个筛查是非常繁琐的事情。采用高密度蛋白微阵列芯片可以一次对患者进行几百种抗体的检测。Joos 等^[10]采

用 18 种诊断标志物制备的高密度蛋白微阵列芯片筛查自身免疫性疾病患者,其检测灵敏度高达 40 fg^[2]。Robinson 等^[11]采用包含 196 种自身抗原的高密度芯片对系统性红斑狼疮、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、类风湿性关节炎等自身免疫病患者进行相关抗体谱筛查,研究结果显示该技术对抗体谱的测定范围可达 1~900 ng/mL。目前的研究结果显示,对于自身免疫性疾病患者自身抗体的筛查,高密度微阵列蛋白芯片的检测敏感性是传统 ELISA 方法的 4~8 倍,特异性与传统方法相似,检测结果稳定性高^[12]。高密度微阵列蛋白芯片的使用不仅可以减少检测成本,而且该方法非常灵活,可以适合很多疾病的联合检测。

过敏性疾病的诊断较为容易,但是过敏原的筛查非常费劲。一般方法对过敏原进行逐个筛查既困难也容易漏筛。高密度微阵列芯片的出现使得这一过程变得简单而且全面。Hiller 等^[13]采用包含 94 种常见过敏原的高密度芯片对过敏患者进行过敏原筛查研究分析,该芯片对 IgE 的检测范围可达 28~2 000 kU/L,仅仅需要 40 μ L 的患者血清就可以在 1 个实验中对约 100 种常见过敏原进行检测,这是传统过敏原筛查方法没法做到的。采用该技术可以避免对患者进行创伤性的过敏原检测,减轻患者检测时的痛苦,是一种过敏原筛查的理想替代方法。

目前,高密度微阵列蛋白芯片也用于视神经脊髓炎、多发性硬化和老年痴呆症等神经系统疾病的研究。高密度蛋白微阵列芯片不仅可以用于血清样本的检测分析,同样可以分析蛋白含量较低的脑脊液样本。Roche 等^[14]采用包含 8 295 个人类蛋白的高密度蛋白微阵列芯片对老年痴呆症、呼吸睡眠暂停以及多发性硬化等神经系统疾病患者脑脊液进行研究,研究结果显示该方法能把这 3 种复杂疾病相互区分。虽然该研究样本量较少,其研究结果还需要进一步扩大样本的临床验证,但是该研究开创性的研究了高密度微阵列蛋白芯片用于特殊体液样本的检测,为我们采用高密度微阵列蛋白芯片进行相关研究提供了新的思路。

3 高密度蛋白微阵列芯片的优势、存在问题及应用前景

高通量是高密度蛋白微阵列芯片的最大优势,该技术可以同时分析某个物种的几乎全部蛋白,真正实现对该物种进行蛋白质组学的研究,Zhu 等采用该技术分析了酵母 6 200 个开放阅读基因编码蛋白中的 5 800 多个蛋白的功能,占该物种蛋白总数的 94%,发现 33 种以前从未发现过的结合蛋白,150 种脂结合蛋白^[1]。随后,该研究小组采用该技术检测分析了酵母体内所有 122 酶中的 119 个,占总数的 97%^[15]。这种大规模的进行蛋白全面研究是以往的方法无法完成的,而且与传统方法对单个物质的逐个检测相比,该方法检测过程简单方便,相对成本较低,得到的信息更全面。目前高密度蛋白微阵列芯片主要存在的问题之一是检测的特异性不稳定,由于众多蛋白高密度点样于一个很小的载体表面,检测样本时可能存在非特异性结合反应。随着高密度蛋白微阵列芯片技术的不断发展成熟,这一问题正逐步得到解决,其特异性与 ELISA 方法相当^[12]。高密度蛋白微阵列芯片存在的另一问题是成本受点样的限制,特别是分析性高密度蛋白微阵列芯片需要使用大量的单克隆抗体。目前的技术还无法做到像表达纯化蛋白一样同时制备

成千上万种单克隆抗体,因此分析型高密度蛋白微阵列芯片的发展受到一定限制。只有随着单克隆抗体技术的突破,这一问题才能从根本上得到解决。

高密度蛋白微阵列芯片技术凭借其独特的优势和强大的适应性正受到越来越多医学相关工作者的青睐,并在研究实践中逐步展示出其特有的魅力,其在医学及生物学领域中具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Zhu H, Bilgin M, Bangham R, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips[J]. Science, 2001, 293(5537): 2101-2105.
- [2] Braun P, Hu Y, Shen B, et al. Proteome-scale purification of human proteins from bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 2654-2659.
- [3] Avseenko NV, Morozova TY, Ataullakhanov FI, et al. Immunoassay with multicomponent protein microarrays fabricated by electrospray deposition[J]. Anal Chem, 2002, 74(5): 927-933.
- [4] Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, et al. Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips[J]. Anal Biochem, 1997, 250(2): 203-211.
- [5] Afanassiev V, Hanemann V, Wölk S. Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): 66.
- [6] Zhao J, Patwa TH, Qiu W, et al. Glycoprotein microarrays with multi-lectin detection; unique lectin binding patterns as a tool for classifying normal, chronic pancreatitis and pancreatic cancer sera [J]. J Proteome Res, 2007, 6(5): 1864-1874.
- [7] Tao SC, Li Y, Zhou J, Qian J, et al. Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan mark-

- ers[J]. Glycobiology, 2008, 18(10): 761-769.
- [8] Hudson ME, Pozdnyakova I, Haines K, et al. Identification of differentially expressed proteins in ovarian cancer using high-density protein microarrays[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 104(44): 17494-17499.
- [9] Gunawardana CG, Memari N, Diamandis EP. Identifying novel autoantibody signatures in ovarian cancer using high-density protein microarrays[J]. Clin Biochem, 2009, 42(4-5): 426-429.
- [10] Joos TO, Schrenk M, Höpfl P. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics[J]. Electrophoresis, 2000, 21(13): 2641-2650.
- [11] Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses [J]. Nat Med, 2002, 8(3): 295-301.
- [12] McBride JD, Gabriel FG, Fordham J, et al. Screening autoantibody profiles in systemic rheumatic disease with a diagnostic protein microarray that uses a filtration-assisted nanodot array lumino-metric immunoassay (NALIA) [J]. Clin Chem, 2008, 54(5): 883-890.
- [13] Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment [J]. FASEB J, 2002, 16(3): 414-416.
- [14] Roche S, Dauvilliers Y, Tiers L, et al. Autoantibody profiling on high-density protein microarrays for biomarker discovery in the cerebrospinal fluid[J]. J Immunol Methods, 2008, 338(1-2): 75-78.
- [15] Zhu H, Klemic JF, Chang S, et al. Analysis of yeast protein kinases using protein chips[J]. Nat Genet, 2000, 26(3): 283-928.

(收稿日期: 2010-10-03)

(上接第 594 页)

- [3] 鄢盛恺. 关于临床血脂测定的建议[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(2): 182-184.
- [4] 许敏, 刘秉文. 人血浆高密度脂蛋白的不均一性[J]. 国外医学临床生物化学与检验分册, 1999, 20(1): 1-5.
- [5] Li ZL, McNamara JR, Ordovas JM, et al. The research development of blood lipid and plasma lipoprotein in coronary heart disease[J]. J Lipid Res, 1994, 35(6): 169-171
- [6] 潘柏申, 吴炯, 赵瀛. 临床常用血脂检验项目在心血管病中的应用进展[J]. 检验医学, 2006, 21(4): 25-28.
- [7] Miremadi S, Sniderman A, Frohlich J. Can measurement of serum apolipoprotein B replace the lipid profile monitoring of patients with lipoprotein disorders[J]. Clin Chem, 2002, 48(2): 484-488.
- [8] Sniderman AD. Apolipoprotein B versus non-highdensity lipoprotein cholesterol and the winner is...[J]. Circulation, 2005, 112(4): 3366-3367.
- [9] Denke MA. Cholesterol guidelines and apo B[J]. Circulation, 2005, 112(4): 3368-3370.
- [10] 马文珠. ApoE 多态性与冠心病关系分析[J]. 中国心血管杂志, 2003(1): 24-26.
- [11] Song Y, Stampfer MJ, Liu S, et al. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease [J]. Ann Intern

- Med, 2004, 141(2): 137-147.
- [12] 王景华, 宁宪嘉, 卢红艳, 等. 脑梗死患者载脂蛋白 E 基因多态性特点研究[J]. 中国综合临床, 2006, 22(2): 118-120.
- [13] 沈丽华, 柯开富, 李作汉, 等. 载脂蛋白 E 基因多态性与脑梗死的相关性分析[J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(10): 445-447.
- [14] Refolo LM, Fillit HM. Apolipoprotein E4 as a target for developing new therapeutics for alzheimer's disease[J]. J Mol Neurosci, 2004, 23(3): 151-155.
- [15] Schiefermeier M, Kollegger H, Made C, et al. The impact of apolipoprotein E genotypes on ages at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease[J]. Brain, 2002, 123(1): 585-590.
- [16] Tziakas DN, Chalikias GK, Antonoglou CO, et al. Apolipoprotein E genotype and circulating interleukin-10 levels in patients with stable and unstable coronary artery disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(12): 2471-2481.
- [17] Verhave JC, Fesler P, Cailar G. Elevated pulse pressure is associated with low renal function in elderly patients with isolated systolic hypertension[J]. Hypertension, 2005, 45(6): 5842-5861.

(收稿日期: 2010-10-08)