

蛋白质微阵列技术及其在医学领域中的应用

贾瑞珺^{1*} 蒋犁¹ 唐祖明²

¹(东南大学临床医学院,南京 210009)

²(东南大学生物医学系,南京 210096)

摘 要 蛋白质微阵列是生物芯片的一种,其主要优势在于应用平面上的有序排列的许多管、腔(孔)或各自独立的点来进行样本检测,使大量样本的平行分析成为可能。应用此技术可同时分析诸多蛋白质的生物化学活性、蛋白质与蛋白质间、蛋白质与 DNA 间、蛋白质与 RNA 间,以及蛋白质与配体间的相互作用,从而在临床诊断、药物研究、环境监测、食品卫生等方面显示出其广阔的应用前景。

关键词 蛋白质微阵列,微阵列,蛋白质,抗体,诊断,药物

中图分类号 Q811.4 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)02-0246-03

随着人类基因组计划的进一步深入,人类后基因组计划的开始,许多新技术发展起来,全面系统地分析基因的功能,基因芯片便是这些新技术中令人瞩目的一种,它可以实现对基因表达和基因序列改变的全面分析。基因芯片通过检测 mRNA 的丰度或者 DNA 的拷贝数来确定基因的表达模式和表达水平,然而根据 mRNA 的水平(包括 mRNA 的种类和含量)并不足以估计蛋白质的表达水平。实际上,对于某些基因,当 mRNA 的水平相等时,蛋白质的表达水平可以相差 20 倍以上;反之,当某一蛋白质的表达稳定于一水平时,各转录 mRNA 的水平也可相差达 30 倍^[1],所以说单凭基因芯片检测结果是不能完全反应出生物体内的蛋白质水平,要想得到完整的生物信息,其解决办法之一就是直接研究基因的表达产物——蛋白质,这就是蛋白质微阵列(Protein microarrays)刚刚兴起就成为研究热点的原因之一。

蛋白质微阵列比传统的分析检测系统的主要优势在于使大量样本的平行分析成为可能。它是应用平面上的有序排列的许多管、腔(孔)或各自独立的点来进行样本分析的,其分析效率与平面上的样本密度直接相关。理想的平面是滤过膜(如硝化纤维素、尼龙膜或聚双氟乙烯膜)或覆盖有各种试剂的玻片(如多聚左旋赖氨酸、聚丙烯酰胺)。微阵列(Microarray)的制备可以通过点样仪高度自动化地完成,因此它更适用于大规模的快速检测样本。微阵列的检测是通过放射性元素或荧光素标记,由 CCD(电荷耦合器件)或激光扫描系统来实现的。

1 蛋白质微阵列分类与制备

目前主要制备有 3 种类型的蛋白质微阵列,分别为在玻片表面(Glass slide)、多孔凝胶垫(Porous gel pad slides)上和微

孔(Microwells)板上构建微阵列。

1.1 在微孔板上构建蛋白质微阵列

由微滴定板制备的蛋白质矩阵(Protein arrays)被用于免疫试验已有数十年了,但此矩阵的密度较低且试剂用量大。Mendoza 等^[2]在传统微滴定板的基础上,利用机械手在 96 孔的每一个孔的平底上点样成同样的四组蛋白质,每组 36 个点(4×36 阵列),含有 8 种不同抗原和标记蛋白质,每个 96 孔板上共有 13 824 个点。由于该板与普通酶标板一样,可直接放入与之相配套的全自动免疫分析仪中使用,通过 CCD 扫描监测,特别适用于蛋白质的大规模、多种类筛选。

Rowe 等^[3]与 Mendoza 的微阵列制作有着异曲同工之处。他们也模仿微滴定板将抗体和分析物固定于载玻片上,通过荧光标记,CCD 显示图像。虽然 Rowe 制作的阵列密度较低(6×6 模式),但因为此技术应用了自动成像分析和微流体学,所以它成为检测酶活性和用于其它试验的很有前途的技术模式。

1.2 在多孔凝胶垫上构建蛋白质

为了在平面上构建三维矩阵,并将蛋白质固定于其中,Arenkov 等^[4]用光聚合合法合成聚丙烯酰胺凝胶微阵列,即在一经硅烷处理过的玻片表面,倒上 3% 丙烯酰胺与交联剂 N,N'(1,2-二羟乙基)双丙烯酰胺(DHEBA)的混合物,加入 DHEBA 是为了提高凝胶的多孔性。透过一含有许多 100 μ m×100 μ m 方形小窗的罩,把聚丙烯酰胺暴露于紫外线(UV)下,以加速凝胶的聚合。未聚合的单分子用水冲洗去除。通过这种方法,他们制备了凝胶垫微阵列,每块凝胶垫的体积为 100 μ m×100 μ m×20 μ m,容积为 0.2nL。或者用戊二醛激活凝胶,或者通过酰肼基部分替代凝胶中酰胺基,来将蛋白质或抗体固定于凝胶中,构建蛋白质微阵列。每块凝胶垫之间

由疏水性的玻璃表面隔开,避免了样本间的相互污染。这种三维的聚丙烯酰胺凝胶提供的固定样本容量超过二维玻片支持物容量的 100 倍以上,因此此技术大大提高了检测的敏感性。

另外, Martin 等^[5]应用凝胶印章,形成蛋白质(如抗体)的亚单分子层,由¹²⁵I 标记后,用原子力显微镜观察结果。这种以凝胶为基础的印章阵列,可以有效地避免实验中的污染问题。

1.3 在玻片表面构建蛋白质微阵列

在玻片表面构建蛋白质微阵列的优势在于此方法可以制备标准的微矩阵,并用基因芯片扫描仪来扫描,获取结果。

MacBeath 等^[6]首先将玻片表面覆盖了一层牛血清白蛋白(BSA),它提供了一层亲水性的界面,用机械手将蛋白质点样于 BSA 表面,将阵列中蛋白质的赖氨酸与 BSA 中的赖氨酸通过化学反应相互结合,从而将蛋白质锚定于 BSA 表面,构建蛋白质微阵列。MacBeath 等利用这种方法构建的蛋白质微阵列,在相当于显微镜载玻片的一半面积上,点样位点超过 10 000 个。

其它的制备蛋白质微阵列的方法有在硅烷单分子层表面^[7]或金膜表面^[8]的光刻平板印刷法和在聚苯乙烯膜表面的喷墨打印法^[9,10]。这些技术的进展都集中在用单分子蛋白质(如牛血清蛋白、亲和素或单克隆抗体等)构建阵列,从而制备小型化免疫试验的模式。为了捕获并分析特异性标记的蛋白质,这些技术均用复杂的配体来覆盖载体表面。

2 蛋白质微阵列技术在医学领域的应用

蛋白质微阵列技术在医学领域中有着潜在的广阔用途。就其应用而言,可分为 2 种类型:一种是蛋白质功能微阵列(Protein function microarray),它由成千上万的天然蛋白质固定在一平面上构建而成,这种微阵列可以同时检测大量蛋白质的功能,故而得名;另一种是蛋白质检测微阵列(Protein-detecting microarray),它是由大量蛋白质结合物质构建的微阵列。

2.1 蛋白质功能微阵列

在蛋白质功能微阵列中,每一个蛋白质位于阵列中的一个特定位点,它可用于同时研究大量天然蛋白质的功能,分析它们的生物化学活性,诸如酶的活性、抗体特异性等。例如 Arenkov 等^[4]在他们制备的聚丙烯酰胺凝胶垫阵列上,检测了此技术在不同类型的免疫反应和抗原检测中的应用。他们还展示了可利用此技术检测固定于凝胶中的 3 种酶(辣根过氧化物酶、小牛肠内的碱性磷酸酶和 β -D-葡萄糖苷酸酶)的活性。又如 Zhu 等^[11]将玻片与微孔两种技术相结合,用以分析酵母蛋白酶。为了显示此技术用于高效的生物化学实验的可行性,他们使用了 17 种底物进行 119 种蛋白激酶的酶促反应。通过对比对于不同的底物的激酶活性,他们发现了其中的 32 种激酶优先磷酸化一种或两种底物,有 27 种激酶显示很容易磷酸化多聚酪氨酸-谷氨酸(Tyr-Glu)。后一结论提示还有许多未知的酵母酪氨酸激酶有待发现。

应用蛋白质功能微阵列,还可分析蛋白质与蛋白质间、蛋白质与 DNA 间、蛋白质与 RNA 间,以及蛋白质与配体间的相互作用。如 MacBeath 等^[6]用其制备的蛋白质微阵列检测

了 3 种已知的蛋白质与蛋白质的相互作用,3 种已知的酶与底物的反应,和 3 种已知的蛋白质与配体相结合的反应,从而证明了可应用蛋白质微阵列来进行大规模的蛋白质相互作用的研究、生物化学实验和药物靶位的分析。又如, Ge^[12]应用低密度的蛋白质阵列来研究蛋白质与蛋白质、DNA、RNA 和小分子化学配体间的相互作用。他们将 48 种纯化蛋白点样于一硝化纤维膜上,在检测人蛋白 p52 与它们的相互作用时,用高浓度的盐溶液(500 ~ 1000mmol/L 的氯化钾溶液)洗涤硝化纤维膜,借此可以识别蛋白质与蛋白质之间的高亲和力相互作用。另外, Uetz 等^[13]也构建了一种蛋白质微阵列,其中的纯化蛋白质源自 6000 个经过转化的酵母克隆,每一个转化体表达一个基因组的开放读框。他们应用这种技术检测了 1004 种酵母蛋白中的 957 种纯化蛋白及其潜在的相互作用。其研究数据揭示了生物学中功能上尚未分类的蛋白质的相互关系和具有相同生物学功能的蛋白质的相互作用。

此外蛋白质微阵列在整个基因组水平上使 DNA 序列信息与蛋白质产物之间建立了直接联系。如 Lueking 等^[14]应用蛋白质微阵列检测了 92 个人胚脑 cDNA 文库的蛋白表达克隆,显示出在研究基因组与蛋白质的前后关系中,蛋白质微阵列是在其基因组水平把基因表达分析与相关蛋白质分子相联系的有力工具。在蛋白质微阵列上,可显示出表达克隆与其它蛋白质(如抗体)相关或多种从核苷酸到小分子配体的分子相关。

2.2 蛋白质检测微阵列

蛋白质检测微阵列上各位点并非天然蛋白质,而是各蛋白质的高特异性配体,这些配体可以在复杂的生物学溶液(如细胞提纯液)中识别它们的靶肽。这种微阵列能够在生物学样本中同时检测大量蛋白质的水平,因此可作为一种分析工具,其应用领域将远远超过基础研究,被广泛应用于临床诊断、药物研究、环境监测等。

蛋白质微阵列具有显示人体液中 DNA、蛋白质、肽和抗体的能力,这将增加对健康及疾病的认识。例如,通过检测并对比人健康与患病状态下的血浆、脑脊液或其它体液成分,将有可能识别疾病相关蛋白,从而不仅可以加深对这种疾病的认识,而且可以借助这些疾病相关蛋白,分析此疾病的易感性,帮助其临床诊断、观察疾病进程、治疗效果和估计预后。

蛋白质微阵列技术在自身免疫性疾病的诊断中将显示其重要的应用前景。此技术可检测出此类疾病中特异性抗体是否存在,例如在全身性风湿病中,可检测到高滴度的抗核抗体^[15]。因此此技术可以对自身免疫性疾病作出明确诊断,尤其在临床症状复杂或在疾病的日期、症状尚不明显时,可为临床诊断提供重要的依据。另外此技术还可通过检测抗原来监测特异性治疗的效果和使用疫苗后的抗体的反应,从而为诊断和估计预后提供信息。

蛋白质微阵列技术还可用于研究药物的代谢动力学、药理学活性、药物作用靶位以及细胞对药物的反应,进而可用于研制和检测新型药物。例如,可以通过监测基因的表达和蛋白质的变化,观察它们的反应是否是有害的,或是有其它的副反应,借此可以确保此新型药物的安全性,了解其在临

床治疗中的疗效及选择合适的剂量。

此外,蛋白质微阵列的应用还将包括环境监测和食品卫生工作中检测微量物质,如有害的化学物质。

3 结 语

蛋白质微阵列技术不仅可以同时对成千上万的蛋白质的活性、功能、相互作用进行分析,而且使检测系统小型化,从而大大节约了样本和试剂的用量,缩短了检测时间,提高了敏感性,使成本效益比大大降低。蛋白质微阵列技术作为一项有着广泛用途的新型技术,一旦投入实际应用,将在 21 世纪医学中的临床诊断、药物研究、环境监测、食品卫生等方面显示出巨大的应用前景和潜在市场。此技术以其独特的优势吸引着诸多国家的研究小组和公司把大量人力、物力、财力投入到这一研究主题,这将推动其获得长足的发展。

目前,MacBeath 和它的研究小组为了使蛋白质微阵列技术加速药物的研究发展,并用于其它更广阔的领域,已开办了一所新的公司——Merrimack,希望能使这一新技术商品化。在基因芯片已商品化的今天,相信蛋白质微阵列的商品化也是不会落后的。蛋白质微阵列作为一项极具应用前景和开发价值的新技术,随着其产业化和规模化的进程,将在生命科学及医学等领域中逐步显示出其特有的魅力。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Gygi S P, Rochon Y, Franz B R *et al.* Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol cell biol*, 1999, **19**(3):1720 ~ 1730
- [2] Mendoza L G, McQuary P, Mongan A *et al.* High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *Biotechniques*, 1999, **27**(4):778 ~ 788
- [3] Rowe C A, Acruugs S B, Felestein M J *et al.* An array immunosensors for simultaneous detection of clinical analytes. *Anal Chem*, 1999, **71**(2):433 ~ 439
- [4] Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A *et al.* Protein microchips use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal Biochem*, 2000, **278**(2):123 ~ 131
- [5] Marin B D, Gaber B P, Patterson C H *et al.* Direct protein microarrays fabrication using a hydrogel ' stamper '. *Langmuir*, 1998, **14**(15):3971 ~ 3975
- [6] MacBeath G, Schreiber S L. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 2000, **289**(5485):1760 ~ 1763
- [7] Mooney J F, Hunt A J, McIntosh J R *et al.* Patterning of functional anti-bodies and other proteins by photolithography of silane monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(22):12287 ~ 12291
- [8] Jones V W, Kenseth J R, Porter M D *et al.* Microminiaturized immunoassays using atomic force microscopy and compositionally patterned antigen arrays. *Anal Chem*, 1998, **70**(7):1233 ~ 1241
- [9] Ekins R P. Ligand assays :from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clin Chem*, 1998, **44**(9):2015 ~ 2030
- [10] Silzel J W, Cercek B, Dodson C *et al.* Mass-sensing ,multianalyte microarray immunoassay with imaging de-tection. *Clin Chem*, 1998, **44**(9):2036 ~ 2043
- [11] Zhu H, Klemic J F, Chang S *et al.* Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet*, 2000, **26**(3):283 ~ 289
- [12] Ge H. UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(2):e3, [~ VIII
- [13] Uetz P, Giot L, Cagney G *et al.* A comprehensive analysis of pro-tei-n-protein interactions in *Sac-charomyces cerevisiae*. *Nature*, 2000, **403**(6770):623 ~ 627
- [14] Lueking A, Horn M, Eickhoff H *et al.* Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Anal Biochem*, 1999, **270**(1):103 ~ 111
- [15] Joss T A, Schrenk M, Hopfl P *et al.* A microarray enzyme-based immuno-sorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis*, 2000, **21**(13):2641 ~ 2650

Protein Microarrays and Their Medical Applications

JIA Rui-Zhe^{1*} JIANG Li¹ TANG Zu-Ming²

¹(Southeast University Clinical Medical College, Nanjing 210009, China)

²(Southeast University Biomedical Department, Nanjing 210096, China)

Abstract The microarrays have revolutionised biomedical experimentation and diagnostics, enabling ordered high throughput analysis. During the past decade, classic solid phase substrates, such as microtitre plates, membrane filters and microscopic slides, were turn into high-density, chip-like structure. The concept of the arrayed library was central to this development which now extends from DNA to protein. The availability of such protein microarrays would facilitate the simultaneous analysis of thousands of interactions within a single experiment. They can be utilized for massively parallel testing of protein function or recognized their target polypeptide in complex biological solution. This article will focus on the current strategies used to generate protein microarray and their applications in biological research, medicine and diagnostics.

Key words protein microarrays, microarray, protein, antibody, diagnostics, drug