
蛋白质芯片技术的研究进展

生物芯片(Biochip)主要是指通过微细加工工艺在固体芯片表面构建的微型化学分析系统,从而实现对细胞、蛋白质、DNA 以及其他生物组分的准确快速与大信息量的检测。其反应结果可用同位素法、化学荧光法、化学发光法或酶标法显示,然后用精密的扫描仪或 CCD(charge-coupled device)摄像技术记录,最后通过计算机进行数据处理以得到综合的信息。常用的生物芯片分为三大类:基因芯片(Genechip, DNA chip, DNA microarray)、蛋白质芯片(Proteinchip)、芯片实验室(lab-on-a-chip)。

人类基因组(genome)排序工作的完成是人类医学史上的里程碑。基因芯片虽可在 mRNA 水平上分析整个基因组表达的情况,并得到了迅猛发展,但生命活动的主体是人体内存在的 10 万种以上的蛋白质,发展蛋白质芯片这一高新技术已成为生物芯片领域的挑战性课题。

1 蛋白质芯片的发展概况

蛋白质能直接反映基因携带的遗传信息,它的功能一旦出现异常就可能引起疾病,破坏人体健康。如 Alzheimer's 病人脑脊液中微量 淀粉样蛋白肽的出现 b 是目前公认的脑神经退行性变的标志物。蛋白芯片可以将数十万个与生命相关的信息集成在一块厘米见方的芯片上,对抗原活体细胞和组织进行测试分析,同时蛋白质芯片的特异性高,亲和力强,受其他杂质的影响较小,因此对生物样品的要求较低,可简化样品的前处理,甚至可以直接利用生物材料(血样、尿样、细胞及组织等)进行检测。

蛋白质芯片是指固定于支持介质上的蛋白质构成的微阵列。又称蛋白质微阵列(Protein microarray),最早是在生物功能基因组学研究中继基因芯片之后,作为基因芯片功能的补充发展起来的。是在一个基因芯片大小的载体上,按使用目的的不同,点布相同或不同种类的蛋白质,然后再用标记了荧光染料的蛋白质结合,扫描仪上读出荧光强弱,计算机分析出样本结果。最早进行蛋白质芯片研究的是德国科学家 Lueking。目前,国内也有学者在从事蛋白芯片的研究。

2 蛋白质芯片的原理

蛋白芯片技术的研究对象是蛋白质,其原理是对固相载体进行特殊的化学处理,再将已知的蛋白分子产物固定其上(如酶、抗原、抗体、受体、配体、细胞因子等),根据这些生物分子的特性,捕获能与之特异性结合的待测蛋白(存在于血清、血浆、淋巴、间质液、尿液、渗出液、细胞溶解液、分泌液等),经洗涤、纯化,再进行确认和生化分析;它为获得重要生命信息(如未知蛋白组分、序列、体内表达水平生物学功能、与其他分子的相互调控关系、

药物筛选、药物靶位的选择等)提供有力的技术支持。

2.1 固体芯片的构建 常用的材质有玻片、硅、云母及各种膜片等。理想的载体表面是渗透滤膜(如硝酸纤维素膜)或包被了不同试剂(如多聚赖氨酸)的载玻片。外形可制成各种不同的形状。Lin, SR 等人引采用 APTS-BS3 技术增强芯片与蛋白质的牢固结合。

2.2 探针的制备 低密度蛋白质芯片的探针包括特定的抗原、抗体、酶、吸水或疏水物质、结合某些阳离子或阴离子的化学集团、受体和免疫复合物等具有生物活性的蛋白质。制备时常常采用直接点样法,以避免蛋白质的空间结构改变。保持它和样品的特异性结合能力。高密度蛋白质芯片一般为基因表达产物,如一个 cDNA 文库所产生的几乎所有蛋白质均排列在一个载体表面,其芯池数目高达 1600 个 / cm^2 ,呈微距阵排列,点样时须用机械手进行,可同时检测数千个样品。

2.3 生物分子反应 使用时将待检的含有蛋白质的标本如尿液、血清、精液、组织提取物等,按一定程序做好层析、电泳、色谱等前处理,然后在每个芯池里点入需要的种类。一般样品量只要 2-10 μL 即可。

根据测定目的不同可选用不同探针结合或与其中含有的生物制剂相互作用一段时间,然后洗去未结合的或多余的物质,将样品固定一下等待检测即可。

2.4 信号的检测及分析 直接检测模式是将待测蛋白用荧光素或同位素标记,结合到芯片的蛋白质就会发出特定的信号,检测时用特殊的芯片扫描仪扫描和相应的计算机软件进行数据分析,或将芯片放射显影后再选用相应的软件进行数据分析。间接检测模式类似于 ELISA 方法,标记第二抗体分子。以上两种检测模式均基于阵列为基础的芯片检测技术。该法操作简单、成本低廉,可以在单一测量时间内完成多次重复性测量。目前,国外多采用质谱(mass spectrometry, MS)分析基础上的新技术,如表面加强的激光离子解析—飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS),可使吸附在蛋白质芯片上的靶蛋白离子化,在电场力的作用下计算出其质量电荷比,与蛋白质数据库配合使用,来确定蛋白质片段的分子量和相对含量,可用于进行检测蛋白质谱的变化。光学蛋白芯片技术是基于 1995 年提出的光学椭圆生物传感器的概念。利用具有生物活性的芯片上靶蛋白感应表面及生物分子的特异性结合性,可在椭圆偏光学成像观察下直接测定多种生物分子。

3. 蛋白芯片的分类

目前蛋白芯片主要有三类:蛋白质微阵列、微孔板蛋白质芯片、三维凝胶块芯片等。

3.1 蛋白质微阵列 哈佛大学的 Macbeath 和 SchreiberL 等报道了通过点样机械装置制作蛋白质芯片的研究,将针尖浸入装有纯化的蛋白质溶液的微孔中,然后移至载玻片上,在

载玻片表面点上 1nl 的溶液，然后机械手重复操作，点不同的蛋白质。利用此装置大约固定了 10,000 种蛋白质，并用其研究蛋白质与蛋白质间，蛋白质与小分子间的特异性相互作用。Macbeath 和 Schreiber 首先用一层小牛血清白蛋白(BSA)修饰玻片，可以防止固定在表面上的蛋白质变性。由于赖氨酸广泛存在于蛋白质的肽链中，BSA 中的赖氨酸通过活性剂与点样的蛋白质样品所含的赖氨酸发生反应，使其结合在基片表面，并且一些蛋白质的活性区域露出。这样，利用点样装置将蛋白质固定在 t3SA 表面上，制作成蛋白质微阵列。

3.2 微孔板蛋白芯片 Mendoza 等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。可直接使用与之配套的全自动免疫分析仪，测定结果。适合蛋白质的大规模、多种类的筛选。

3.3 三维凝胶块芯片 三维凝胶块芯片是美国阿贡国家实验室和俄罗斯科学院恩格尔哈得分子生物学研究所开发的一种芯片技术。三维凝胶块芯片实质上是在基片上点布以 10000 个微小聚苯烯酰胺凝胶块，每个凝胶块可用于靶 DNA、RNA 和蛋白质的分析。这种芯片可用于筛选抗原抗体、酶动力学反应的研究。该系统的优点是：凝胶条的三维化能加进更多的已知样品，提高检测的灵敏度；蛋白质能够以天然状态分析，可以进行免疫测定、受体、配体研究和蛋白质组分分析。

4 蛋白质芯片的应用

4.1 用于基因表达的筛选 Angelika L. 等人从人胎儿脑的 cDNA 文库中选出 92 个克隆的粗提物制成蛋白质芯片，用特异性的抗体对其也进行检测，结果的准确率在 87% 以上，而用传统的原位滤膜技术准确率只达到 63%。与原位滤膜相比，用蛋白质芯片技术在同样面积上可容纳更多的克隆，灵敏度可达到 pg 级。

4.2 用于特异性抗原抗体的检测在 Cavin M. 等人的实验中，蛋白质芯片上的抗原抗体反应体现出很好的特异性，在一块蛋白质芯片上 10800 个点中，根据抗原抗体的特异性结合检测到唯一的 1 个阳性位点。Cavin M. 指出，这种特异性的抗原抗体反应一旦确立，就可以利用这项技术来度量整个细胞或组织中的蛋白质的丰富程度和修饰程度。其次利用蛋白质芯片技术，根据与某一蛋白质的多种组分亲和的特征，筛选某一抗原的未知抗体，将常规的免疫分析微缩到芯片上进行，使免疫检测更加方便快捷。

4.3 用于蛋白质的筛选及功能研究 常规筛选蛋白质主要是在基因水平上进行，基因水平的筛选虽已被运用到任意的 cDNA 文库，但这种文库多以噬菌体为载体，通过噬菌斑转印技术(plaque life procedure)在一张膜上表达蛋白质。但由于许多蛋白质不是全长基因编码，

而且真核基因在细菌中往往不能产生正确折叠的蛋白质,况且噬菌斑转移不能缩小到毫米范围进行,所以这种方法的局限性,靠蛋白质芯片弥补。酶作为一种特殊的蛋白质,可以用蛋白质芯片来研究酶的底物、激活剂、抑制剂等。

蛋白质芯片为蛋白质功能研究提供了新的方法,合成的多肽及来源于细胞的蛋白质都可以用作制备蛋白质芯片的材料。Uetz 将蛋白质芯片引入酵母双杂交研究中,大大提高了筛选率。建立了含 6000 个酵母蛋白的转化子,每个都具有开放性可阅读框架(Open Reading Frame, ORF)的融合蛋白作为酵母双杂交反应中的激活区,此蛋白质芯片检测到 192 个酵母蛋白与此发生阳性反应。

4. 4 生化反应的检测 对酶活性的测定一直是临床生化检验中不可缺少的部分。Cohen 用常规的光蚀刻技术制备芯片、酶及底物加到芯片上的小室,在电渗作用中使酸及底物经通道接触,发生酶促反应。通过电泳分离,可得到荧光标记的多肽底物及产物的变化,以此来定量酶促反应结果。动力学常数的测定表明该方法是可行的,而且,荧光物质稳定。Arenkov 进行了类似的试验,他制备的蛋白质芯片片的一大优点,可以反复使用多次,大大降低了试验成本。

4. 5 药物筛选 疾病的发生发展与某些蛋白质的变化有关,如果以这些蛋白质构筑芯片,对众多候选化学药物进行筛选,直接筛选出与靶蛋白作用的化学药物,将大大推进药物的开发。蛋白质芯片有助于了解药物与其效应蛋白的相互作用,并可以在对化学药物作用机制不甚了解的情况下直接研究蛋白质谱。还可以将化学药物作用与疾病联系起来,以及药物是否具有毒副作用、判定药物的治疗效果,为指导临床用药提供实验依据。另外,蛋白芯片技术还可对中药的真伪和有效成分进行快速鉴定和分析。

4. 6 疾病诊断 蛋白质芯片技术在医学领域中有着潜在的广阔应用前景。蛋白质芯片能够同时检测生物样品中与某种疾病或者环境因素损伤可能相关的全部蛋白质的含量情况,即表型指纹(phenomic fingerprint)。表型指纹对监测疾病的过程或预测,判断治疗的效果也具有重要意义。Ciphelxen Biosystems 公司利用蛋白质芯片检测了来自健康人和前列腺癌患者的血清样品,在短短的三天之内发现了 6 种潜在的前列腺癌的生物学标记。Englert 将抗体点在片基上,用它检测正常组织和肿瘤之间蛋白质表达的差异,发现有些蛋白质的表达,如前列腺组织特异抗原,明胶酶 蛋白在肿瘤的发生发展中起着重要的作用,这给肿瘤的诊断和治疗带来了新途径。应用蛋白质芯片在临床上还发现乳腺癌患者中的 28.3KD 的蛋白质;存在于结肠癌及其癌前病变患者的血清 13.8KD 的特异相关蛋白质。

5 存在问题

蛋白质芯片技术与基因芯片相比较,还处在起步阶段,无论在芯片的制备,具体应用过程以及结果的检测方面还有很多的不足。主要表现在:

5.1 灵敏度 大部分病原微生物分子含量很低,必须经过信号放大才能检测到,目前常用的信号放大技术是 PCR,PCR 虽然能扩增目的基因,但如果单独采用,PCR 技术又不能够体现生物芯片的高通量特点,所以新的信号放大技术是蛋白质芯片广泛应用急待解决的问题。

5.2 准确度 虽然蛋白质芯片技术中能对肝炎病毒感染所引发的一系列免疫反应进行监测,但芯片实验的准确性在一定程度上受限于所选择的抗原或抗体的来源、纯度与特异性,并且蛋白类抗体的生产与应用存在着抗原性,免疫原性的强弱、异源抗体的类风湿因子和自身抗体的干扰、罕见抗体的高工作量筛选、克隆株(细胞)的不易保存、无法标准化生产、体内与体外的识别特异性差异、抗体一靶相瓦作用的动力学参数、对温度敏感所发生的不可逆变性等因素,限制了蛋白质芯片技术优势的充分发挥。

5.3 高密度 高密度芯片对病原体准确识别、比较基因组学分析、分型、突变分析及耐药检测是必须的。目前制备高密度芯片的方法主要是美国 AFFYMERTRIX 公司的光蚀到合成专利技术,限制了该技术的普遍采用。近来报导的喷印及分印章原位合成技术虽然避开了专利,但尚不成熟,因此,发展新的高密度合成技术势在必行。

5.4 普及 目前蛋白质芯片技术只限于在少数条件好的实验室进行,对于大多数实验室来讲,设备昂贵,需要一定的时间。但随着经济的进一步改善,从根本上会满足需要。

蛋白质芯片技术在新世纪里不仅会对认识基因组与人类健康错综复杂的关系,对疾病的早期诊断和疗效监测等会产生巨大的推动作用,而且在其他相关领域如环境保护、食品卫生、生物工程、工业制药等方面也将具有广阔的发展前景。特别是随着人类基因组计划的完成,一个以研究蛋白质功能为重点的后基因组时代已拉开序幕,许多人预言,蛋白质芯片技术将从根本上改变生物学和生物技术的观点和效率,为生命科学的发展做出卓越贡献。