

·学科进展与展望·

蛋白质芯片技术的研究进展

鲁劲松¹ 孙启玉² 谢宜学² 张宏印¹ 包尚联¹

(1 医学物理和工程北京市重点实验室和北京大学肿瘤物理诊疗技术研究中心,北京 100871;

2 山东万杰医院,山东淄博 255200)

[摘要] 蛋白质芯片技术是采用微阵列方法,对样品中蛋白质进行高通量、高灵敏度分析的技术。它不仅是蛋白质组学研究中强有力的工具,也是临床应用中疾病早期诊断、预后和治疗效果评测的新手段,其研究成果拓展了与人类健康更加贴近的应用领域。本文较为全面地介绍了蛋白质芯片技术的原理和分类、固相基质和蛋白质的固定、信号检测等方面的进展。

[关键词] 蛋白质组,蛋白质芯片,微阵列,高通量

1 前言

高通量分析的微阵列技术已经在核酸研究领域中得到了长足的发展。使用基因芯片研究样品 mRNA 表型是大规模分析蛋白质组的前序,而 mRNA 的丰度和相应蛋白质浓度之间的关系不是线性的,同时很多蛋白质的功能随翻译后修饰的不同而变化。使用蛋白质芯片对这些修饰后产物进行检测,可以报告整个生化过程的参数,直接反映机体状态,比测定 mRNA 的丰度更有意义^[1,2]。

由于特定的蛋白质和其他物质混合在一起,浓度很低,在不同时期其丰度变化可达 5 个数量级^[3],故要求检测手段具有非常高的灵敏度、特异性和大的动态响应范围。

蛋白质芯片技术利用编码的微量探针,对样品中蛋白质分子进行高灵敏度并行分析。这种技术包含芯片构建、表面化学、蛋白质的固定、与样品的反应、探针分子的制备和信号的检测等内容。在名词的使用上,国外渐渐使用具体的“microarray”代替了“chip”,国内则仍多使用“芯片”一词。

2 蛋白质芯片的原理

蛋白质芯片技术可诠释为离体的“高通量的微量蛋白质识别技术”,实现的基础是探针分子的大

模集成,和探针分子与样品中靶蛋白分子的特异性结合。该技术中,探针分子和样品中被测量蛋白的分子的浓度都很低;探针点所处的微环境特殊,符合高灵敏反应的条件^[4]。即使集中在很小面积上的探针分子数量有限,它与样品中靶蛋白的特异性结合所获得的信号,也比传统生化分析得到的信号更强、更准确^[2,4]。

3 蛋白质芯片的类别

根据蛋白芯片实现的功能可分为检测芯片和功能芯片两大类。探针分子可以是抗原或抗体、蛋白质、糖类、核酸、药物、重组蛋白或多肽等,用于检测抗原-抗体、蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸、蛋白质-糖类、蛋白质-脂类、蛋白质-多肽,蛋白质-药物等分子之间的相互作用。构建芯片时,需要根据待检物质的种类和特异的亲和反应选择探针。

4 蛋白质的固定

与核酸不同,蛋白质是高度复杂和精巧的分子,任何导致其构象变化的步骤都将极大地影响其生物学功能。故蛋白质芯片技术中很关键的步骤是如何将蛋白质固定到基质上,并且不丧失生物学活性。对于固相基质,需要它有良好的稳定性及生物兼容性,并适合于特定的检测方法。研究人员采用的材

国家自然科学基金资助项目、教育部重点项目、博士点基金资助项目。
本文于 2005 年 6 月 10 日收到。

料有滤膜、尼龙材料、玻璃片或石英玻璃片、凝胶层、金膜和它们的衍生物等,不同的材质决定蛋白质固定方式和检测方式。蛋白质固定到固相基质上有物理吸附和化学键作用两种方式,前者固定不够牢固,而后者受到蛋白质本身结构的制约。

4.1 蛋白质的固定方式

(1) 物理吸附

物理吸附是蛋白质固定中最简单的方式,主要作用力是难于控制的疏水作用力、离子键和氢键。在溶液里,吸附表面有可能跟溶液交换所吸附的蛋白质分子,强烈的冲刷也会使吸附了的蛋白质解离下来。吸附在疏水表面,吸附作用力太强,或蛋白质和固相基质间作用位点过多,都可能导致蛋白的变性。蛋白质的吸附位点和活性部位间太近会不利于配体的结合。总体上说,物理吸附对蛋白质的活性保持有一定优势^[5]。

(2) 共价连接

共价连接是普遍采用的通过化学键连接的方式。对探针分子进行化学修饰,使之能与固相基质上相应的活化位点通过共价键直接或间接连接起来。共价连接的方式作用位点少,但作用力强,固定牢固,整体反应也较为容易控制。如果知道蛋白质分子的三级结构,就可能实现定点修饰,使其生物活性部位向外,达到一种“定向”的效果,提高灵敏度。使用重组蛋白技术,或使用特定低聚物修饰的表面都能够实现这一效果。

(3) 利用碱基配对

将核酸片段固定在芯片上,固定结合了互补核酸的蛋白质。这种借助基因芯片实现蛋白质芯片的技术综合了两者的优势,非常有利于芯片上蛋白质分子的定向。蛋白质的固定准确,活性高,容易定量控制,整张芯片表现出较好的均一性。

4.2 不同的固相基质

(1) 凝胶、滤膜类

滤膜、凝胶类软基质容易吸附蛋白,且容易保持蛋白质维持活性所需要的水环境。滤膜对蛋白质的固定效果好^[1],利用基质的通透性,将多张滤膜叠在一起,可一次点样得到多张芯片。滤膜的生物学、化学性能都比较稳定,但是背景噪声大,点样密度也受到限制。凝胶膜的光学性能比滤膜要好,它所形成的芯片实质上是一种“3D芯片”,动态响应范围大,具有多孔亲水结构,利于蛋白活性的保持。滤膜、凝胶类基质的主要问题是非特异性吸附较强,从芯片上洗脱捕获的分子比较困难;需要较长的杂交时间

才能达到反应平衡;凝胶芯片制作工艺较为复杂;样点形态不易控制,难以实现“高密度”,因此不适合直接用作蛋白质芯片的基质。

(2) 玻璃片及改良玻璃片

玻璃片或石英玻璃片是普遍使用的固相基质。在 280 nm 的激发光条件下,玻璃片会吸收部分激发光,发出干扰测定的二次荧光;石英玻璃片几乎没有二次荧光效应,但造价高。玻璃片表面可以高密度地进行蛋白质点样,并且可以标准化及与大多数商业扫描仪兼容。另一方面,这类平板芯片的容量较小,水分保持能力较差。为了避免蛋白质干燥,可以在样品缓冲液中按照一定比例加入甘油、在点样时使用加湿器保持环境的湿度等。

玻璃片的表面并不适合直接用于蛋白质固定,需要改良。目前的改良方法借鉴了基因芯片的一些经验,如使用环氧物、醛类、多聚赖氨酸等包被玻璃片^[3]。芯片点样后需要“灭活”(封闭固相基质上未使用的活化基团以尽量减少非特异性反应),用于灭活的小分子物质会残留在芯片上。如果探针是小分子,就很容易被灭活物质掩盖。Cretich M^[6]使用物理吸附法,在玻片表面包被了 DMA、NAS 和 MAPS 共聚物,这种方法表面亲水性好,制作简便,对探针分子的活性保持得很好,灵敏度可达数十到数百 amol。Cha T 等^[5]在高密度的 PEG 膜包被 Si(111) 的表面上固定了多组氨酸连接的蛋白分子,这种方式非特异性吸附小,能控制蛋白质的分子方向,蛋白质活性保持好。使用 X-射线光电子波谱(XPS)可以定量测定每一步反应化学物质在表面富积的程度,有可能不用纯化蛋白。

(3) 特殊结构

Zhu H 等^[7]在标准玻璃片上利用 PDMS (polydimethylsiloxane) 制作了一种表面开放的微孔结构 (microwell)。微孔利于水分的保持,并将交叉污染和背景噪声降到很低。因为其开放的结构,不同组分和缓冲液可以按一定顺序加入,这对生化通路分析是非常有利的。此外,可以很容易的洗脱捕获分子。若使用金粒子包被微孔,则有可能用质谱分析和表面等离子共振技术 (surface plasmon resonance, SPR) 检测。此方法最大的缺陷则是需要特殊的设备来制作高密度的微孔。

Weng S 等^[8]开发了 mRNA-蛋白质杂合体的核酸部分,来构建蛋白芯片。mRNA-蛋白质杂合体指与相关 mRNA 共价连接的肽段或蛋白质。通过杂交,结合了核酸部分的蛋白质就自动地结合到相应

的、固定在芯片表面上的 DNA 探针。核酸组分不仅能正确定位该杂合体在芯片上的位置,而且能统一蛋白质的方向。固定过程高效,系统灵敏。

肽阵列是蛋白质芯片的一种,可用于高通量的蛋白-肽相互作用分析。根据蛋白质与特定肽二级结构作用的情况,可以实现蛋白质的检测。然而当前肽阵列代价过高,需要再引入通用多聚体连接表面,在防止肽的变性问题上也要做很多繁琐的工作。使用蛋白质融合技术实现的肽阵列灵敏度高,制作相对简便,具有很好的应用前景。

(4) 微球系统

当所要并行分析的对象不多(少于 100 种)时,可以选择微球系统^[2]。将不同颜色的固相基质制成大小均一(数百纳米到数微米)的微球,不同颜色的微球结合不同的探针,即利用颜色为探针编码。探针的固定、与样品之间的反应和结果的检测都是在液相环境里完成。微球系统的检测技术类似于流式细胞术:当小球通过特定的检出管道时,受到两束不同波长激光的照射,一束检测小球的颜色,判别探针类别;一束检测小球上所结合荧光素的多少,实现定量测定。

与平板芯片相比,微球系统的优点很突出:首先,改变基质的形状为微球,固定、杂交和检测过程都在液相中完成,利于蛋白质生物活性的保持,因此微球系统也被称为“液相芯片”;其次,变固相芯片的“被动式反应”为“主动芯片”,微球和样品反应更充分,达到反应平衡的时间短,跟靶分子杂交的效率高;第三,微球系统无需使用点样仪,节省了费用。

微球的质量控制至关重要。大小、材质、颜色要严格均一,确保微球上被活化的位点数目尽量一致、编码准确。整个实验过程涉及的环节较多,使得系统很依赖于校验系统。从已有的结果来看,微球系统的灵敏度、准确度和可信度要高于传统 ELISA 法和放免法^[2]。

5 信号的放大和检测

5.1 信号的放大

许多重要的生物标志物在体液或组织中浓度太低,难以使用传统的手段检测出。芯片技术在信号探测的灵敏度上具有天然的优势^[4],使用强荧光素标记等放大信号的手段,能进一步提高探测的灵敏度^[9];在捕获到分子量相等时,直径更小的点上信号更强。如果阵列上的分子不再发生解离或新的吸附,探测到的信号即可反映样品中目标分子的浓度。

可利用 PCR 技术对芯片探测中的信号进行放大。抗体上连接特定序列 DNA 靶区,对靶区进行扩增则可极大地放大信号。但技术中热循环和从电泳的胶中分离产物的步骤却限制了它的使用。RCA (rolling circles amplification) 技术是一种有效的信号后放大手段。当 RCA 引物 5' 末端连接到抗体,存在环形模板、DNA 聚合酶、核苷酸时,就可以发生循环反应。RCA 技术可以在恒温条件下按照线性或几何动力学循环扩增引物,在很短的时间内产生数百互相连接着的拷贝,结果产生了一条连接在抗体上的 DNA 分子长链。放大的信号(长链)可以用多种方法探测。使用 RCA 方法,可将探测灵敏度由通常的 100 ng/l 提高到 0.1 ng/l^[10]。Fredriksson S 等^[11]提出基于两条互补的 DNA 适体探针的信号放大方式,适体连接在靶蛋白上,被固定于 oligo 连接,作为无洗脱、分离步骤 PCR 信号放大的模版。使用这种极度灵敏的模式可以探测到 40 zmol(10^{-21} mol)的血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)

5.2 信号的检测

(1) 荧光法

荧光标记技术成熟、简便、安全,灵敏度能满足绝大多数需求。可以直接用荧光素标记样品,杂交、洗涤后,检测芯片上的荧光强度,可定量得到样品中目标分子的浓度^[13];也可以使用双抗夹心法标记,所固定的抗体与所检测的目标分子结合后,使用荧光标记的二抗来检测。这种技术可以应用于平板芯片,也可以应用于微球系统^[2]。因为存在交叉反应,双抗夹心法不能在一次芯片实验中测定 75 种以上的目标蛋白。

双色标记技术适合于比较不同样品中靶分子的量。Haab B B 等^[12]使用了双色标记技术,用 110 对抗原抗体对来做基于芯片的免疫测定。将两种标记过的样品混合起来,在同一张芯片上杂交,结果可以清楚显示靶分子浓度的不同。如果使用绿色和红色荧光蛋白基因和编码探针蛋白的基因连接起来表达,实现用绿色和红色荧光蛋白标记探针,则无需使用荧光染料就可以研究蛋白质之间的作用情况。

基于荧光标记的检测手段,最主要的问题是检测数据的可靠性问题。同一张芯片上位点密集,从点和其交界区发出的荧光会影响数据的获取。而如果点之间的表面化学条件并不均一,从同一点观察到的荧光信号强度则不稳定。此外蛋白点的形态、拖尾效应等都难以解决。除非数据分析软件足够先

进,否则这些情况会使得分析中的效果很差,导致实验结果错误^[3]。

(2) 放射性同位素

放射性同位素标记是传统检测中常用的手段之一。Morozov V N 等^[13]使用 CCD (charge-coupled device) 来探测蛋白芯片上同位素标记的配体量。探针蛋白点直径为 10—50 μm , 与放射性标记过的样品反应、洗涤、烘干后,面向下放在标准单色 CCD 上进行放射显影。这种检测方式可直接读数、无需校正、探测效率高、灵敏度高(比³²P 标记的灵敏度高 100 倍),且对固相基质的光学性质、点样技术、探针的固定等无特殊要求。其缺点是应用受到硬件的限制:符合芯片大小的特殊 CCD(1—6 cm^2) 价格非常昂贵;放射性标记对生物体有害,操作中需要考虑安全性。这一技术需要提高蛋白点的集成度,使用像素点尺寸小的标准 CCD 芯片,并减小放射性标记的量。

(3) 无标记检测法

因为标记分子有可能会影响蛋白活性,作为直接检测法的无标记模式,在蛋白质天然活性检测方面有着特别的优势。

SELDI 将蛋白质芯片和质谱技术结合在一起,可以对复杂的多种生物分子混合样品进行质谱分析^[14]。其检测原理是,将靶分子、探针与能量吸收分子结合形成复合物,用激光脉冲激发使之气化成离子,测定该离子在电离场中的飞行速度,得到荷质比(m/Z),绘制出质谱图,根据质谱图可分析出蛋白质之间的作用情况。整个过程快速、简便、结果可靠,在蛋白表型的研究、生物标志物的寻找、药物研发等方面得到广泛的应用。

表面等离子共振技术(SPR)是一项用于分析生物大分子之间的相互作用的技术,它利用偏振光与金属膜上自由电子共振的效应来实现检测,可以定性地判断两分子之间是否有相互作用,比较一种分子与其他几种分子之间相互作用的强弱,实时定量的测定分子间相互作用的平衡常数和动力学参数^[15]。

使用传统光学技术时,Wang Z H 等^[16]提出了“光学蛋白芯片”的概念。这种芯片通过表面格式化、表面改良和配基固定形成多元生物活性感应表面;借助高分辨率的生物光学显微成像技术达到识别和检测蛋白质的目的。

使用原子力显微镜对芯片进行检测也是一种高度灵敏的方法。芯片和蛋白质作用以后,表面上的

空间结构会发生改变。通过检测表面拓扑学变化可探测芯片上蛋白质之间的作用情况。

Striebel H M 等^[17]提出通过测量反应前后捕获位点上荧光寿命的变化,来测定所捕获蛋白的量。荧光来自于紫外激发蛋白质内在的色氨酸,所以这一探测方式无需对蛋白质进行标记。这种方式要求先确定蛋白质之间作用前后荧光寿命的变化情况。如果作用前后荧光寿命无变化,则无法实现测量。

检测方法经实验证明大都是可靠的。但是不同实验室、不同批次的产品、检测系统的稳定性会使得数据差异很大,实验室之间如何互相比对、诠释数据是迫切需要解决的问题。当越来越多的工作开始交叉时,共享数据以减小重复劳动,是海量数据分析所需要解决的关键问题。

6 探针分子的制备

抗体是在复杂样品中识别目标蛋白的传统试剂,而多克隆抗体却常常不够特异;传统杂交瘤生产高特异性单克隆抗体的方式非常费时费力,代价昂贵。目前无法仅根据蛋白质的一维结构就设计出其特异的亲和分子。最近发展了抗体替代技术,如噬菌体抗体展示、核糖体展示、mRNA 展示、亲和体(affibody)、SELEX(配体指数系统进化)展示等技术,加速了抗体和类抗体的生产。越来越多探针分子种类的发现是蛋白质芯片技术发展的前提与保障。

7 问题与展望

因为在基础研究、诊断和药物研发中表现的惊人潜力,蛋白质芯片无疑会成为大规模生物分析领域中强有力的工具,在临床应用中很可能替代目前某些正在使用的生化分析仪器。多种系列抗体试剂、从各种不同宿主细胞中获取重组蛋白、其他类型捕获分子生产上的进步,将为这一领域开拓更广阔的天地。

这种离体(*in vitro*)的分析技术,又是在体(*in vivo*)内生物大分子测量的基础,因为生物大分子在人体内的作用,只能通过分子水平的无创伤成像技术来完成,前面提到的各种技术,包括探针的选择和制备技术,探针分子和被测蛋白质分子之间的特异性结合、稳定性、灵敏度和放大作用等,都是目前分子成像需要研究和解决的问题。

微阵列系统同时也存在着一系列问题:不同批次试剂的稳定性、点的形态差异、点上信号的噪声问

题、微阵列的拖尾效应、非特异性吸附等问题都没有得到很好解决,导致即使使用同一类型芯片的两个实验室的数据也不具有很好的可比性,进而可能导致对结果解释的差异,这对正确确认生物医学、药学研究中所表现的生物分子相互作用会产生极大的干扰。需要尽快出台一种统一的协议和标准,以规范该领域的研究和商业产品,并建立标准的信息交流平台,这对于数据共享和解释有着极为重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Bock C, Coleman M, Collins B et al. Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis. *Proteomics*, 2004, 4: 609—618.
- [2] Desai N, Wu H, George K et al. Simultaneous measurement of multiple radiation-induced protein expression profiles using the Luminex™ system. *Adv Spa Res*, 2004, 34: 1362—1367.
- [3] Schaeferling M, Schiller S, Paul H et al. Application of self-assembly techniques in the design of biocompatible protein microarray surfaces. *Electrophoresis*, 2002, 23: 3097—3105.
- [4] Ekins R P. Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal*, 1989, 7: 155—168.
- [5] Kusnezow W, Hoheisel J D. Solid supports for microarray immunoassays. *J Mol Recognit*, 2003, 16: 165—176.
- [6] Cretich M, Pirri G, Damin F et al. A new polymeric coating for protein microarrays. *Anal Biochem*, 2004, 332: 67—74.
- [7] Zhu H, Klemic J F, Chang S et al. Analysis of yeast poein chips. *Nat Genet*, 2000, 26: 283—289.
- [8] Weng S, Gu K, Hammond P W et al. Generating addressable protein microarrays with PROFusion covalent mRNA-protein fusion technology. *Proteomics*, 2002, 2: 48—57.
- [9] Paweletz C P. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene*, 2001, 20 (16): 1981—1989.
- [10] Hsu H Y, Huang Y Y. RCA combined nanoparticle-based optical detection technique for protein microarray: a novel approach. *Biosen Bioelec*, 2004, 20: 123—126.
- [11] Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat biotech*, 2002, 20: 473—477.
- [12] Lion N, Gellon J O, Jensen H et al. On-chip protein sample desalting and preparation for direct coupling with electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromato A*, 2003, 1003: 11—19.
- [13] Morozov V N, Gavryushkin A V, Deev A A. Direct detection of isotopically labeled metabolites bound to a protein microarray using a charge-coupled device Victor. *J Biochem Biophys Meth*, 2002, 51: 57—67.
- [14] Stevens E V, Liotta L A, Kohn E C. Proteomic analysis for early detection of ovarian cancer: A realistic approach? *Int J Gynecol Cancer*, 2003, 13(suppl 2): 133—139.
- [15] Margulies D H, Plaksin D, Khilko S N et al. Studying interactions involving the T-cell antigen receptor by surface plasmon resonance. *Curr Opin Imm*, 1996, 8: 262—270.
- [16] Wang Z H, Jin G. Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry. *J Imm Meth*, 2004, 285(2): 237—243.
- [17] Striebel H M, Schellenberg P, Grigarabicius P et al. Readout of protein microarrays using intrinsic time resolved UV fluorescence for label-free detection. *Proteomics*, 2004, 4: 1703—1711.

PROSPECTS OF PROTEIN MICROARRAY TECHNOLOGY

Lu Jinsong¹ Sun Qiyu² Xie Yixue² Zhang Hongyin¹ Bao Shanglian¹

(1 Beijing Key Laboratory of Medical Physics and Engineering, Beijing 100871;

2 Shandong WanJie Hospital, Shandong Zibo 225200)

Abstract Protein microarray has been developed for high throughput and high sensitive experiment, and the strong suits of this technology will make it a promising tool in proteomic research, and clinical field such as early diagnoses, after treatment and the evaluation of treatment. This review introduced the progress of protein microarray technology, including elements and types, solid basis, immobilization of capture molecule, and the detection methods of protein microarray. However, technological challenges in this field are still remaining.

Key words proteomic, protein chip, microarray, high throughput