

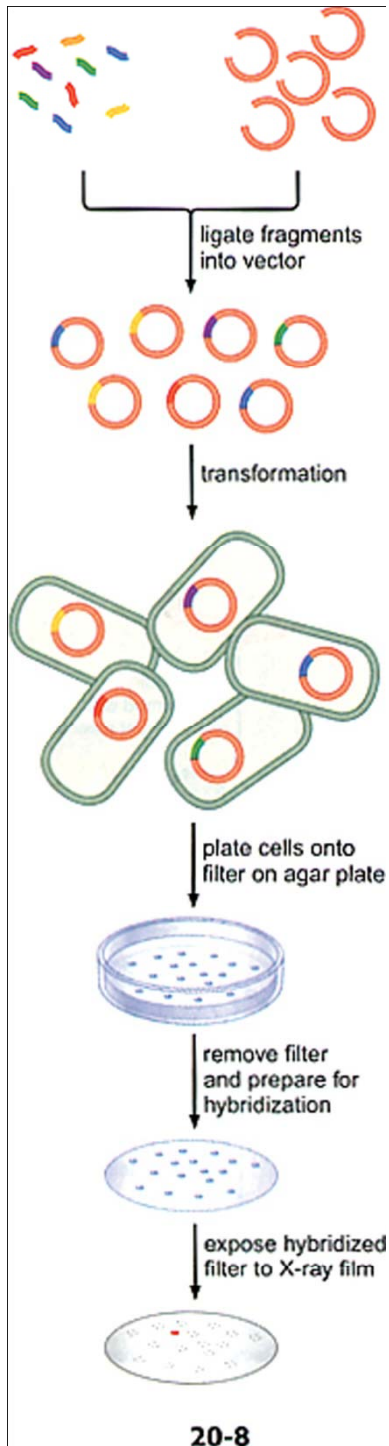
基因组DNA文库(Genomic library)构建

把某种生物的基因组DNA切成适当大小，分别与载体组合，导入微生物细胞，形成克隆。汇集包含基因组中所有DNA序列的克隆（理论上每个序列至少有一个代表），这样的克隆片段的总汇，称为基因组DNA文库。

基因组DNA文库是由一种生物的所有基因组DNA构建而成的。

构建基因组文库最常用：

- λ 噬菌体载体（克隆能力约15—20 kb）
- 限制性内切酶部分消化法。



基因组DNA文库的容量

可用**Clark**和**Carbon**公式预测一个完整基因组文库应包含的克隆数目：

$$N = \ln(1-p) / \ln(1-f)$$

- **N**表示一个基因组文库克隆总数
- **p**表示所期望的靶基因在文库中出现的概率
- **f**表示重组克隆平均插入长度与基因组DNA总长之比。

以人为例，其基因组大小为 3×10^9 bp，若要求 $p = 99\%$ ，平均插入片段大小为20 kb，则 $N = 6.9 \times 10^5$ 。

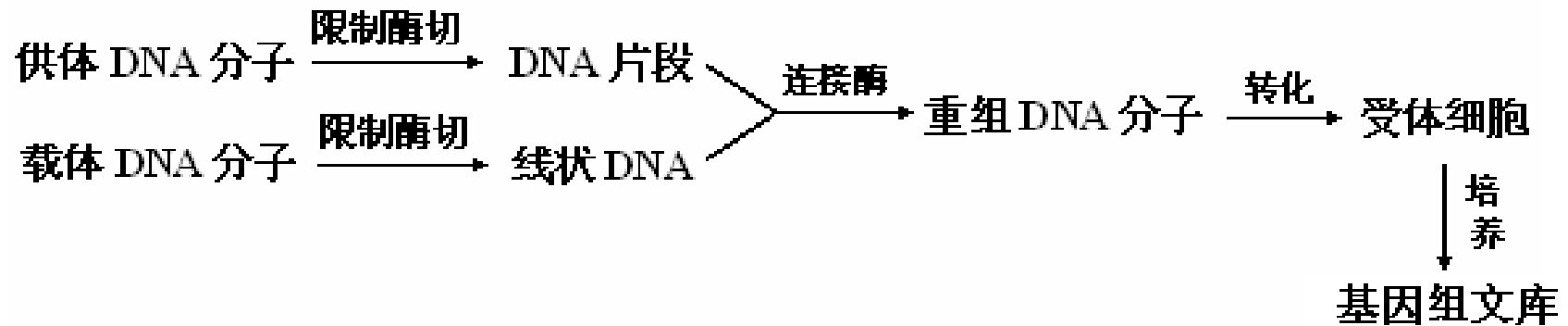
建立基因组文库，取决于两项技术系统

- 具有包装能力的载体系统：
 - λ 噬菌体和粘粒等
- 离体包装系统：
 - A. 对带有外源DNA的杂合分子有直接筛选和富集的作用。
 - B. 提高重组DNA分子产生克隆的频率

构建基因组文库使用的载体

- **λ噬菌体**：可承载25kb DNA左右片段(有效的范围为15 kb)
- **粘粒**：可承载45kb DNA左右片段(有效的范围为<40 kb)
- **质粒**：可承载15kb DNA左右片段 (有效的范围为<10kb)
- **人工染色体**（酵母等，构建高等真核生物基因文库设计）

构建基因组文库的程序



1. 载体DNA片段的制备

DNA分离纯化 \longrightarrow 限制酶切 \longrightarrow 脱磷酸化反应

2. 供体DNA片段的制备

总DNA分离纯化 \longrightarrow 机械剪切法 \longrightarrow 分离特定大小DNA片段

酶法 \longrightarrow 部分酶切 \longrightarrow 分离特定大小DNA片段

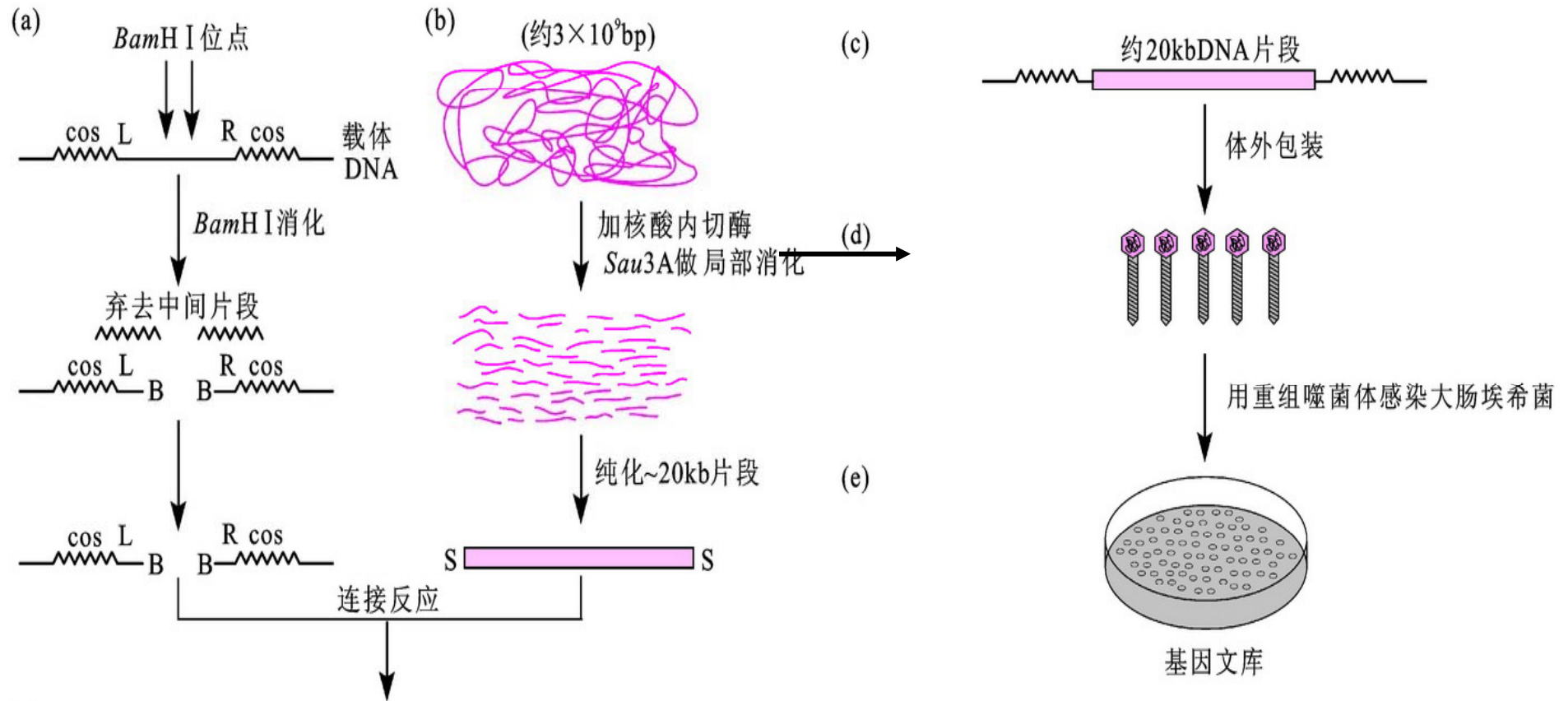
酶法 \longrightarrow 完全酶切 \longrightarrow 分离特定大小DNA片段

3. 供体与载体DNA连接

4. 重组DNA分子的转化或侵染宿主细胞

5. 重组克隆的挑选和保存

用Sau3A限制性核酸内切酶消化真核生物基因组DNA 并利用λ噬菌体载体构建基因组文库



用识别4个核苷酸的核酸限制性内切酶*Sau3A*，与*Bam*HI是一对同尾酶消化DNA，由*Sau3A*酶切产生的DNA片段可插入到经*Bam*HI消化的 λ 噬菌体载体上。

基因组DNA文库的质量标准

一个理想的基因组DNA文库应具备下列条件：

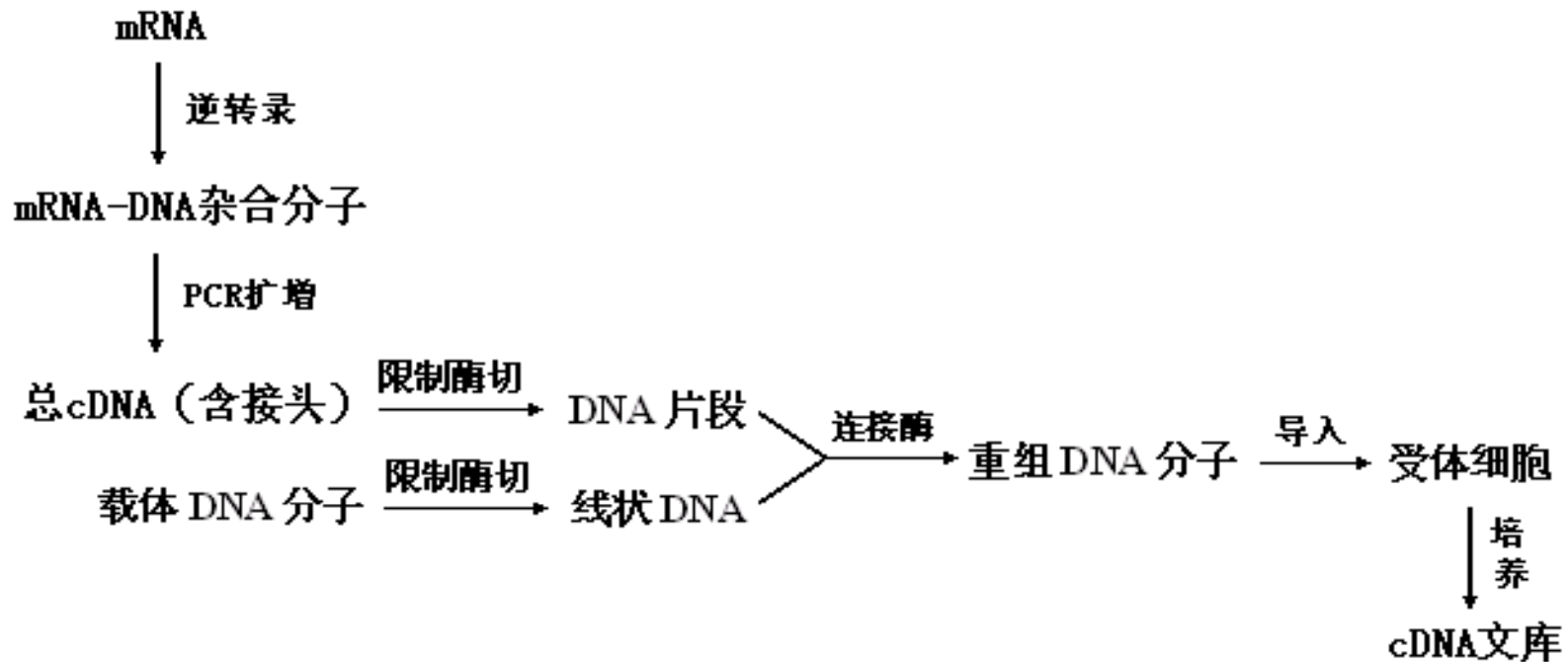
- 重组克隆的总数不宜过大，以减轻筛选工作的压力
- 载体的装载量最好大于基因的长度，避免基因被分隔克隆
- 克隆与克隆之间必须存在足够长度的重叠区域，以利克隆排序
- 克隆片段易于从载体分子上完整卸下
- 重组克隆能稳定保存、扩增、筛选

此外，还有很多大容量克隆载体，如柯斯质粒、细菌人工染色体（**BAC**）、P1源人工染色体（**PAC**）、酵母人工染色体（**YAC**）等都可用于基因组文库的构建。

它们的优点是可以插入更大片段DNA，但是稳定性一般较差，在大量复制的过程中容易出现缺失现象。操作也相对较困难。

cDNA文库

- 真核生物基因组**DNA**庞大，有大量重复序列，很难直接分离得到靶基因片段。
- 而**cDNA**来自反转录的**mRNA**，无冗余序列，通过筛选**cDNA**文库，可较快地分离到相关基因。



建立cDNA文库的一般程序



1. 载体DNA片段的制备

2. 多聚(A) RNA的分离与纯化

3. 双链cDNA的合成

1) 单链cDNA的合成: 反转录法

2) 第二条cDNA的合成: 碱解或酶解 (RNaseH) 法除去RNA分子

4. ds-cDNA与载体DNA相连

1) 人工接头: 要求具平端ds-cDNA, 酶切时可能导致某些cDNA链断裂

2) 同聚物加尾: 可大大减少载体DNA自身连接

3) cDNA的定向插入

5. 重组cDNA分子的转移和文库的建立

选用载体为质粒, 可直接转化*E.coli*;

若为 λ 载体, 则需进行体外包装、感染等。

cDNA文库的规模

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$

f为某一特定cDNA（mRNA）的分子数目与全部
cDNA（mRNA）分子数目之比

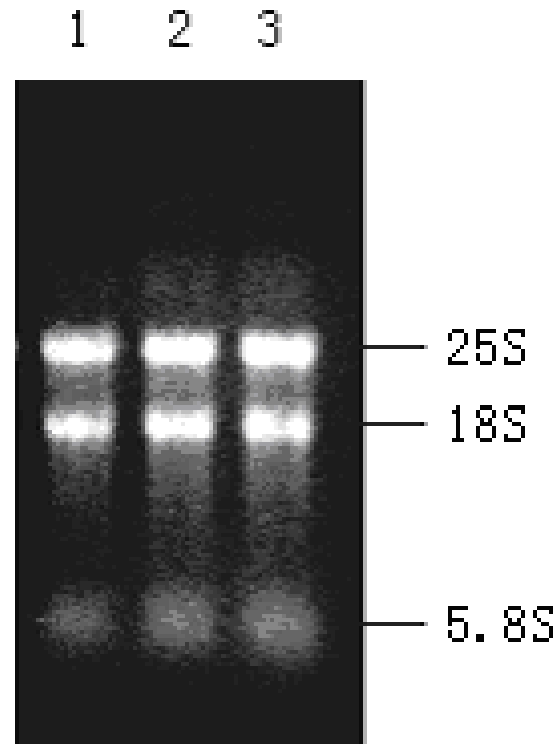
实验步骤

总RNA的提取

一个典型的动物细胞约含 $10^{-5}\mu\text{g}$ RNA，其中：

- **80%-85%为rRNA**
- **15%-20%为tRNA及sRNA**
- **mRNA约占总RNA的1%-5%**

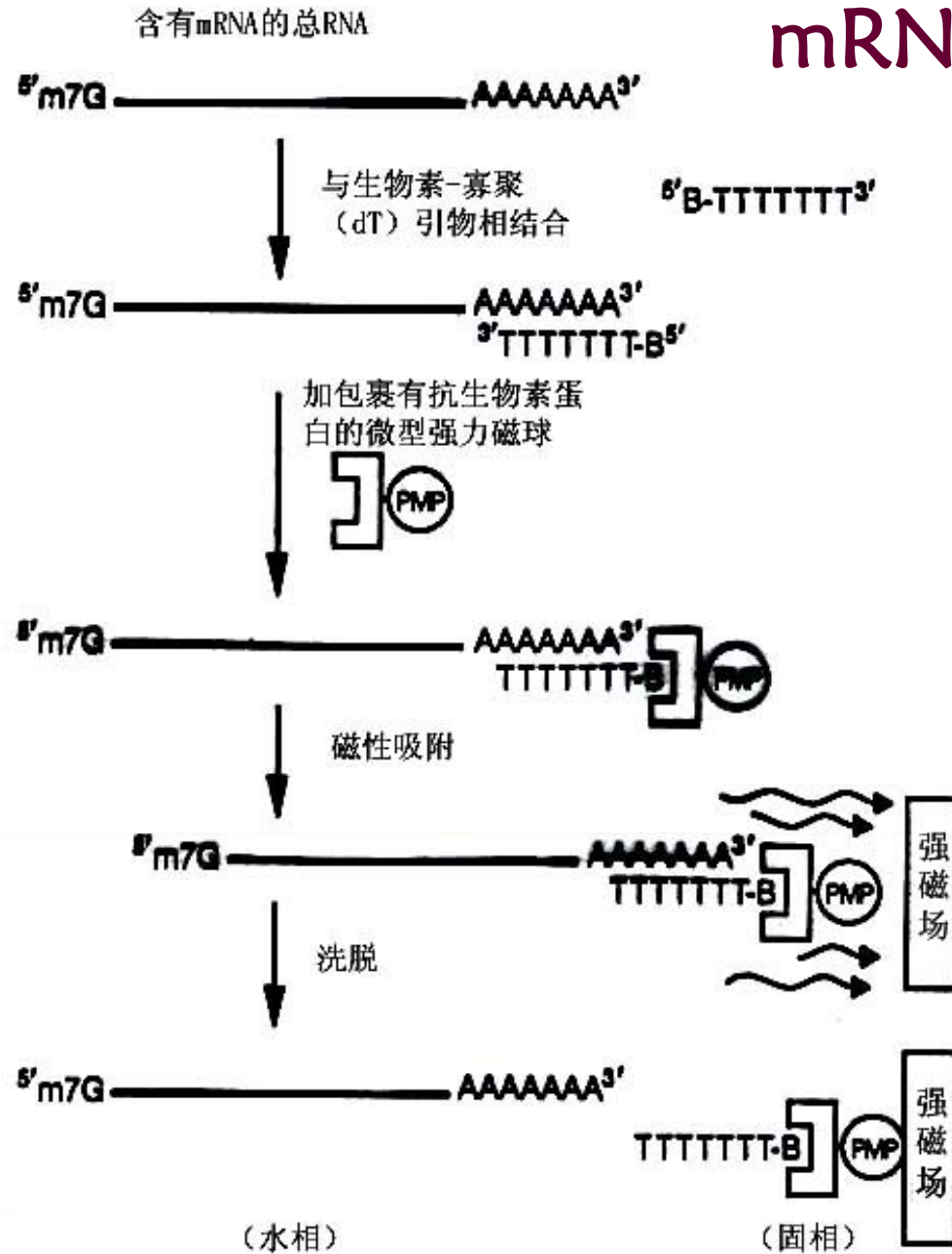
RNA质量的检测



*Trametes gallica*总RNA的甲醛变性电泳

rRNA分子具有确定的大小和核苷酸序列，特别是**28S**和**18S**特征性条带是电泳鉴定总**RNA**纯度和完整性的重要参数。

mRNA的纯化

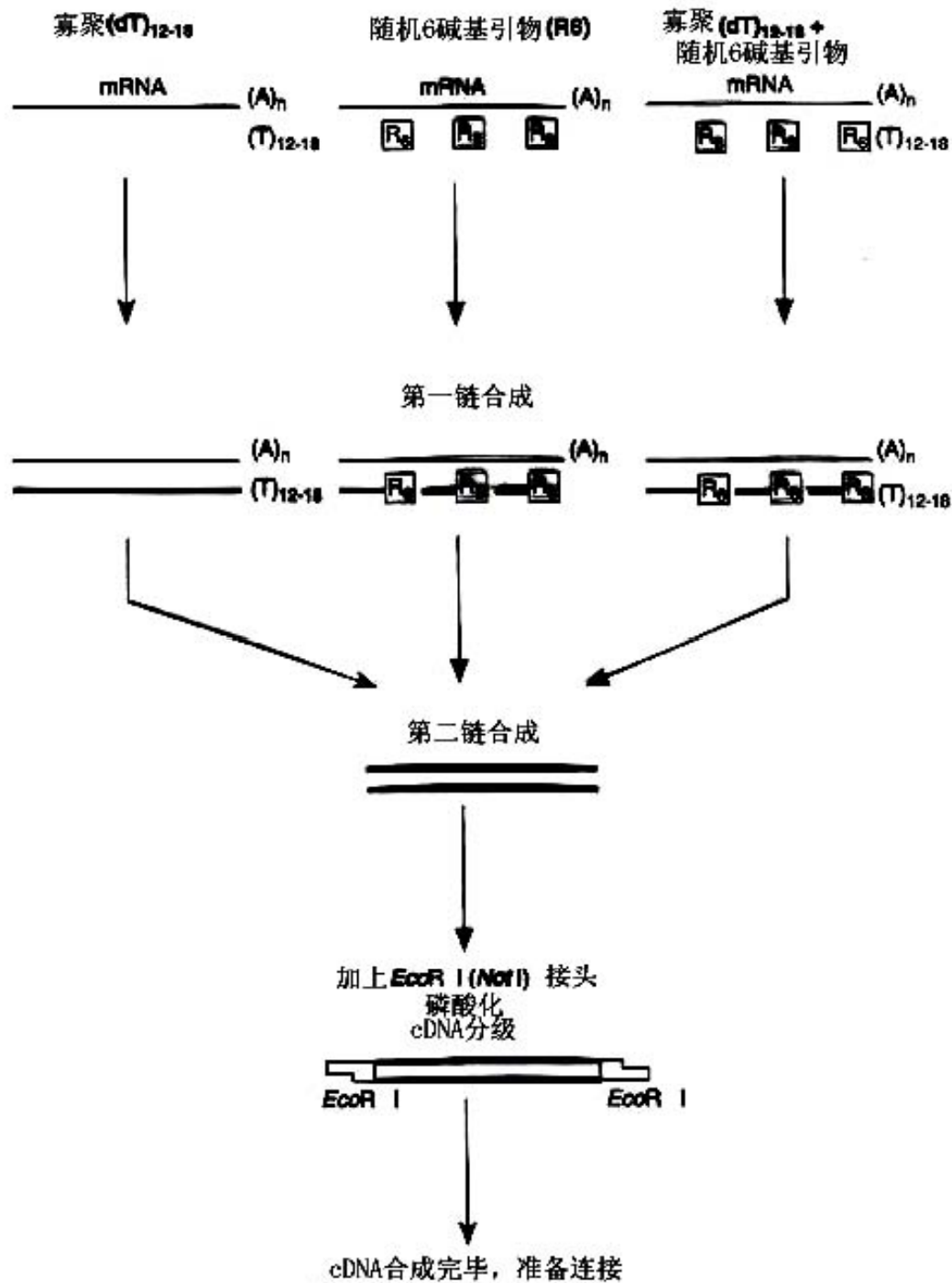


PolyA tract mRNA的分离纯化

RNA的浓度和纯度

可以通过测定 OD_{260} 和 OD_{280} 判断RNA的纯度和浓度:

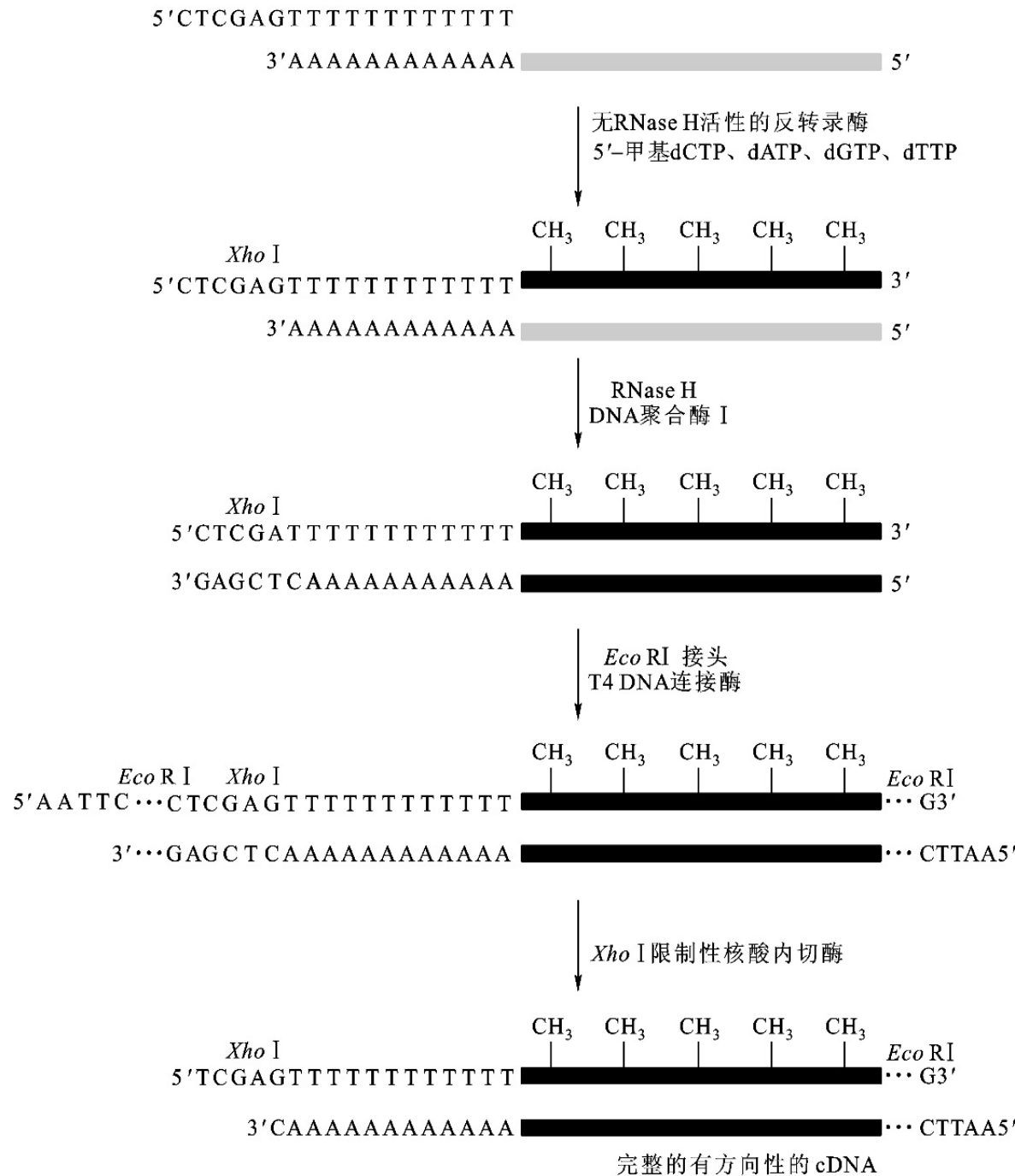
- OD_{260} 为1时相当于浓度为40 $\mu\text{g/ml}$;
- OD_{260}/OD_{280} 的比值如果在1.8-2.0之间, 表示所提取的RNA纯度较好;
- OD_{260}/OD_{280} 的比值将明显低于1.8, 表明样品中有蛋白质或酚污染。



cDNA合成过程

由于RNA分子敏感脆弱，在自然状态下难以被扩增，为了研究mRNA所包含的功能基因信息，一般将其反转录成稳定的DNA双螺旋（cDNA, complementary DNA），再插入到可以自我复制的载体中。

接头及引物序列



完整的有方向性的 cDNA

定向cDNA 合成及 分子修饰

在cDNA合成中，选用活性较高的反转录酶及甲基化dCTP，cDNA两端应加上不同内切酶所识别的接头序列，保证所获得的双链cDNA的方向性。

因为绝大多数大肠杆菌细胞都会切除带有5'-甲基胞嘧啶的外源DNA，所以实验中常选用mcrA⁻mcrB⁻菌株以防止cDNA被降解。

cDNA文库的构建

cDNA的长度一般在**0.5-8 kb**之间，质粒载体和噬菌体类载体都能满足要求。

cDNA文库常用**Uni-zap XR**（一种 λ 噬菌粒载体）做载体，它具备噬菌体的高效性和质粒载体系统利用蓝白斑筛选的便利，可容纳**0-10 kb DNA**插入片段。

重组后可通过体内剪切反应（**In Vivo Excision**）将**cDNA**插入片段转移到质粒系统中进行筛选、克隆和序列分析。

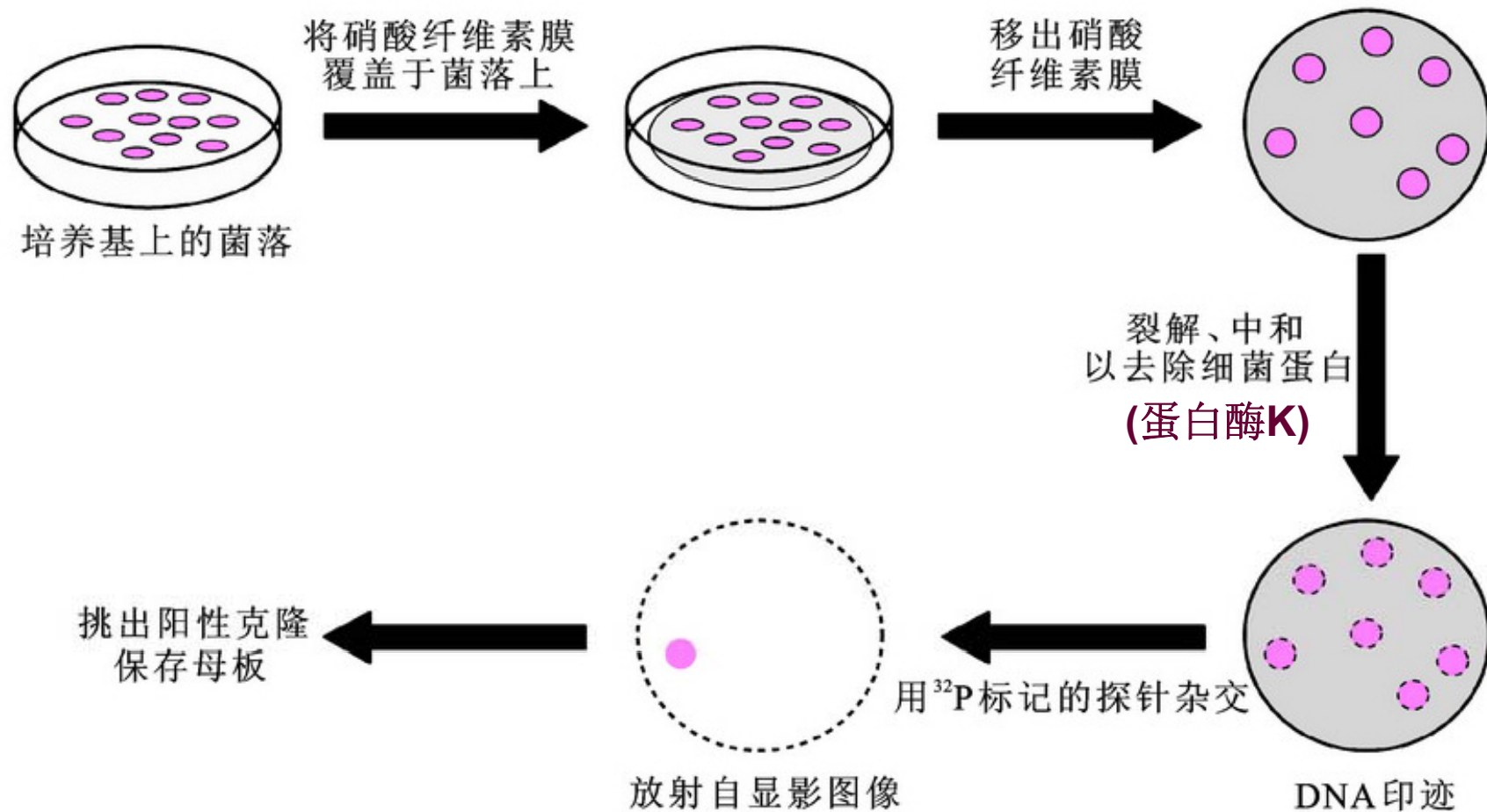
基因文库的筛选

基因文库的筛选是指通过某种特殊方法从基因文库中**鉴定**出含有所需重组**DNA**分子的**特定克隆**的过程。

筛选的方法：

- 核酸杂交法**：利用分子探针对文库进行筛选
- PCR筛选法**：根据保守序列合成引物，扩增特异性片段
- 免疫筛选法**：仅适用于对表达文库的筛选

通过核酸杂交筛选目的克隆

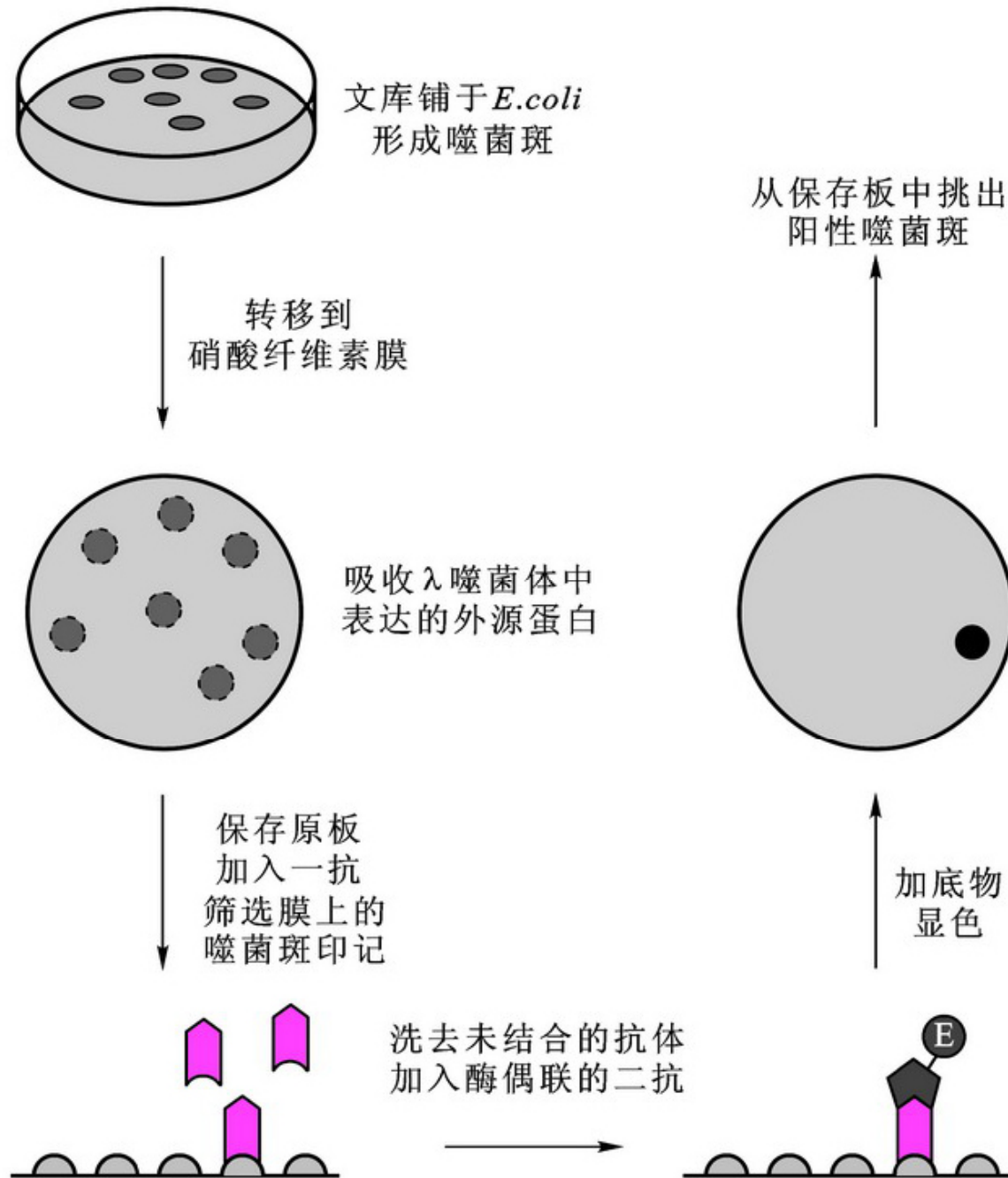


该方法以其广泛的适用性和快速性成为基因文库筛选中最常用的一种方法，用放射性标记的特异**DNA**探针适用于高密度的菌落杂交筛选。

PCR筛选法

将整个文库（以质粒的形式或者细菌的形式均可）保存在多孔培养板上，用设计好的目的基因探针对每个孔进行**PCR**筛选，鉴定出阳性的孔，把每个阳性孔中的克隆再稀释到次级多孔板中进行**PCR**筛选。重复以上程序，直到鉴定出与目的基因对应的**单个克隆**为止。

免疫筛选法



该法仅适用于对表达文库的筛选。若实验中靶基因的序列完全未知但是有针对该基因产物的**特异性抗体**，就可以采用免疫筛选法。

基因克隆 (clone) 技术

在多细胞的高等生物个体水平上，**克隆**表示由具有相同基因型的同一物种的两个或数个个体组成的群体。从同一受精卵分裂而来的单卵双生子 (**monozygotic twins**) 便是属于同一克隆。

在细胞水平上，克隆一词是指由同一个祖细胞 (**progenitor cell**) 分裂而来的一群带有完全相同遗传物质的子细胞。

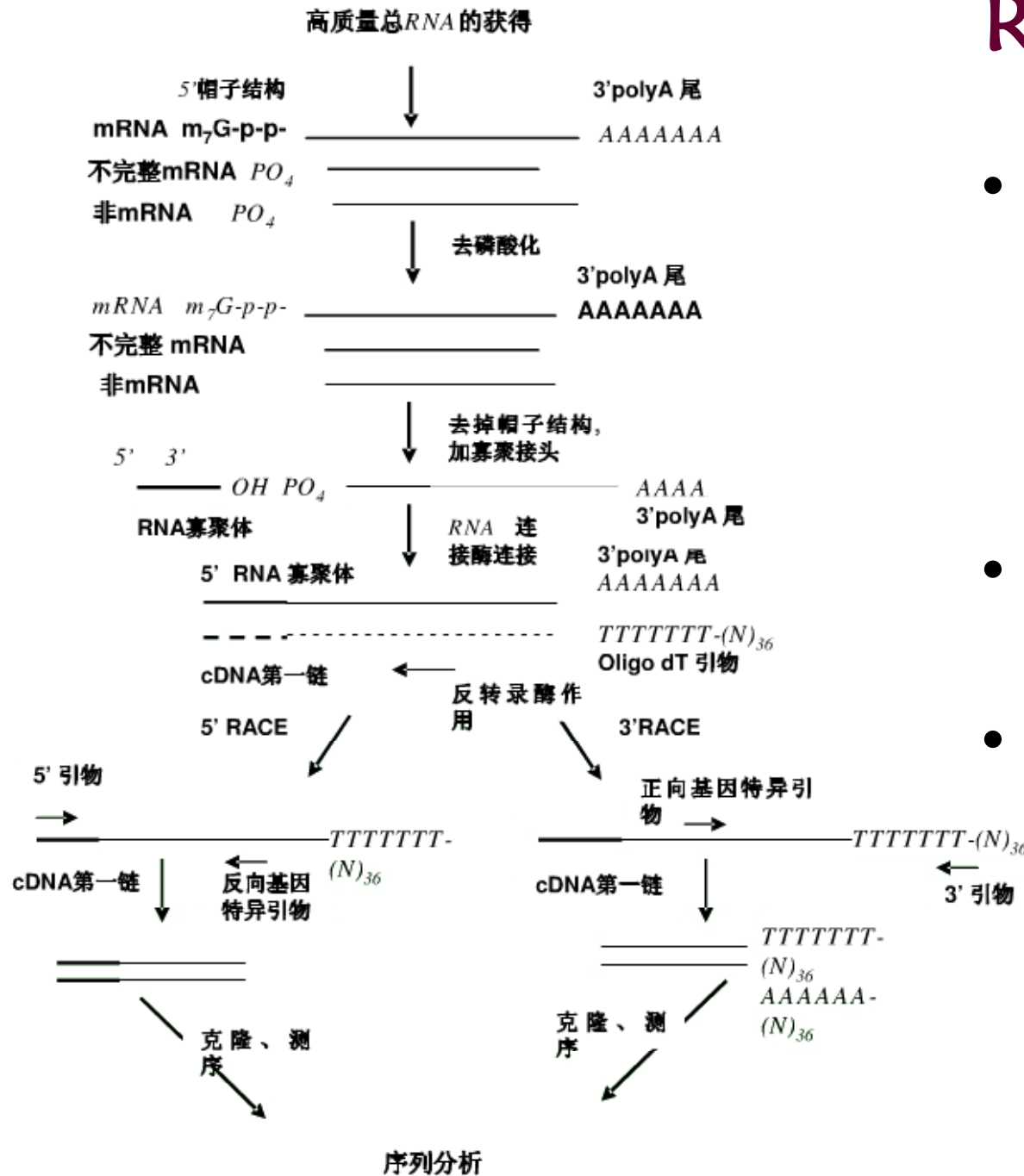
在分子生物学上，人们把将外源**DNA**插入具有复制能力的载体**DNA**中，使之得以永久保存和复制这种过程称为克隆。

RACE技术

Rapid amplification of cDNA ends

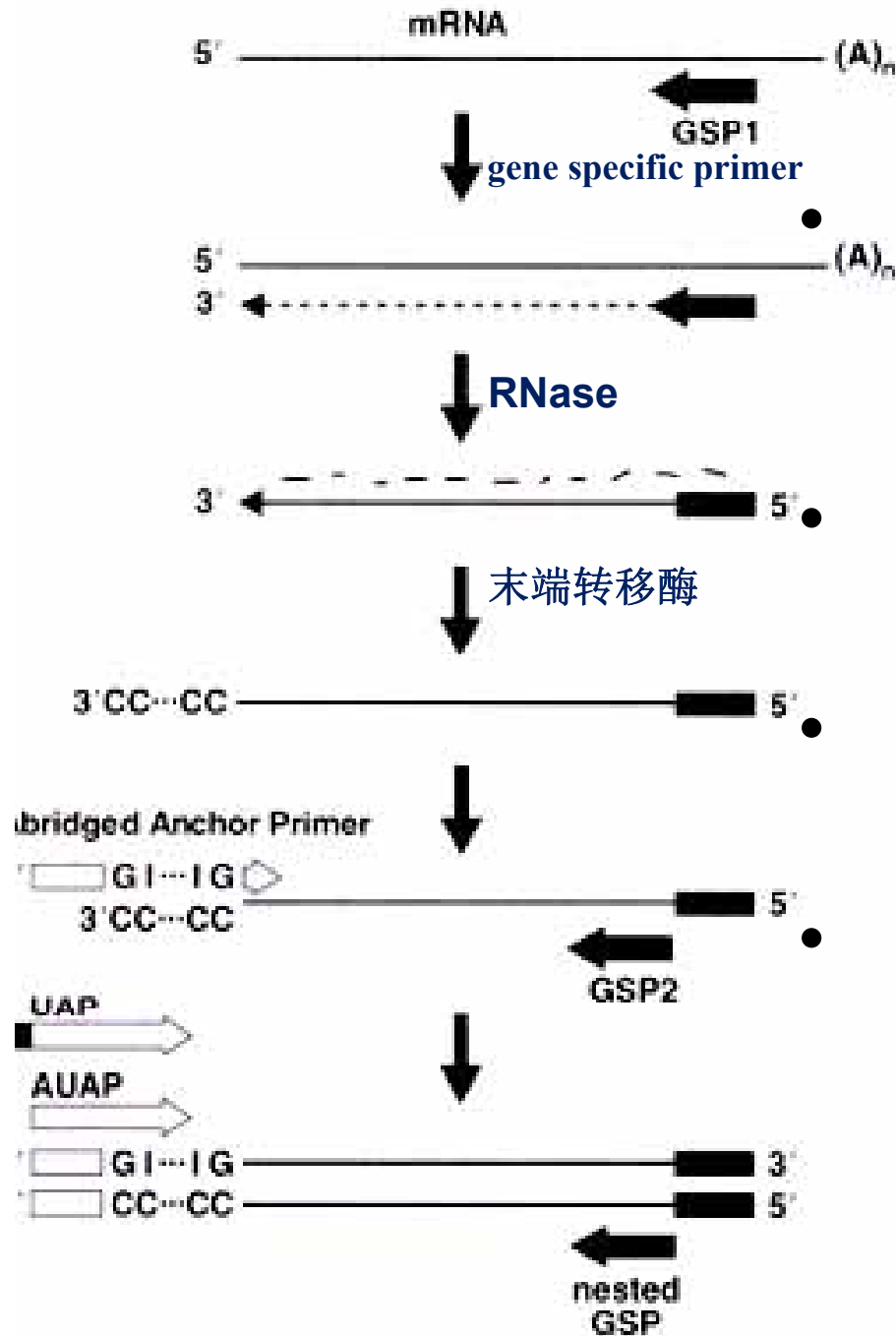
- 在已知**cDNA**序列基础上克隆**5'**或**3'**端缺失序列的技术。根据已知序列设计基因片段内部特异引物，由该片段向外侧进行**PCR**扩增得到目的序列。
- 除了获得全长**cDNA**之外，**RACE**技术还被用于获得**5'**和**3'**端非转录序列，研究转录起始位点的不均一性，研究启动子区的保守性等。

RACE流程



- RACE 技术是由PCR技术发展而来,获得cDNA5'和3'末端的方法,也被称为锚定PCR或单边PCR。
- 用于扩增5'端的方法称为**5'RACE**,
- 用于扩增3'端的称为**3'RACE**。

5' RACE



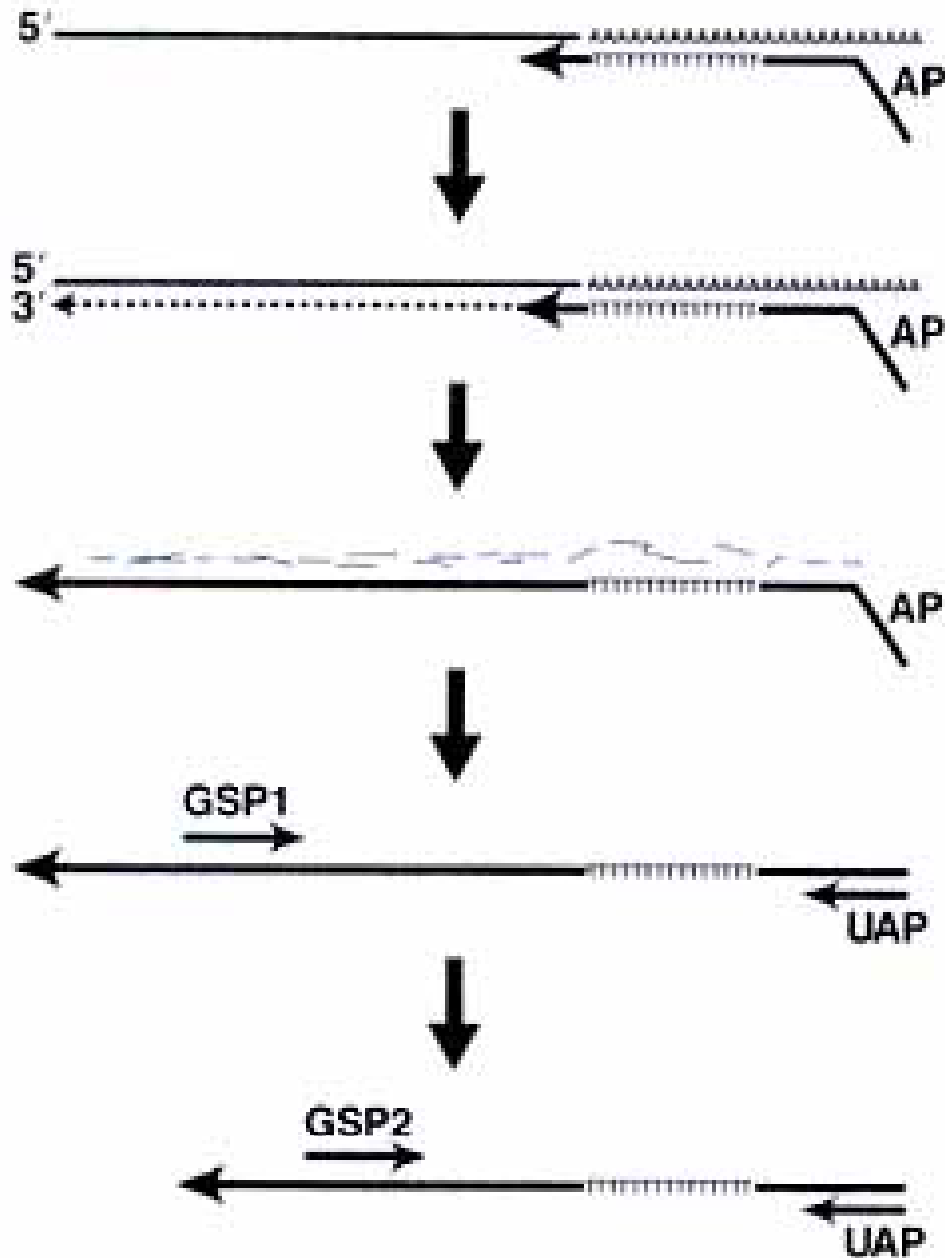
• 在反转录酶的作用下，以基因片段内部特异性引物（**GSP1**）起始cDNA第一条链合成。

• **RNase**降解模板链mRNA，纯化第一链。

• 用末端转移酶在cDNA链3'端加入连续的**dCTP**。

• 以连有**oligo(dG)**的锚定引物和基因片段内部特异的**nested**引物进行**PCR**扩增，得到目的片段，用**nested PCR**检测。

3' RACE



1、用oligo(dT)锚定引物起始cDNA第一链的合成.

2、降解模板mRNA.

3、用通用锚定引物UAP和基因片段内部特异引物进行PCR扩增得到目的3'片段,用nest PCR法检测.

样品要求

◇ 提取**Total RNA**的材料要新鲜，采样后立即放入液氮中速冻或加入样品稳定剂。

◇ **Total RNA**无降解， $OD_{260/280}=1.8 \sim 2.0$ 。

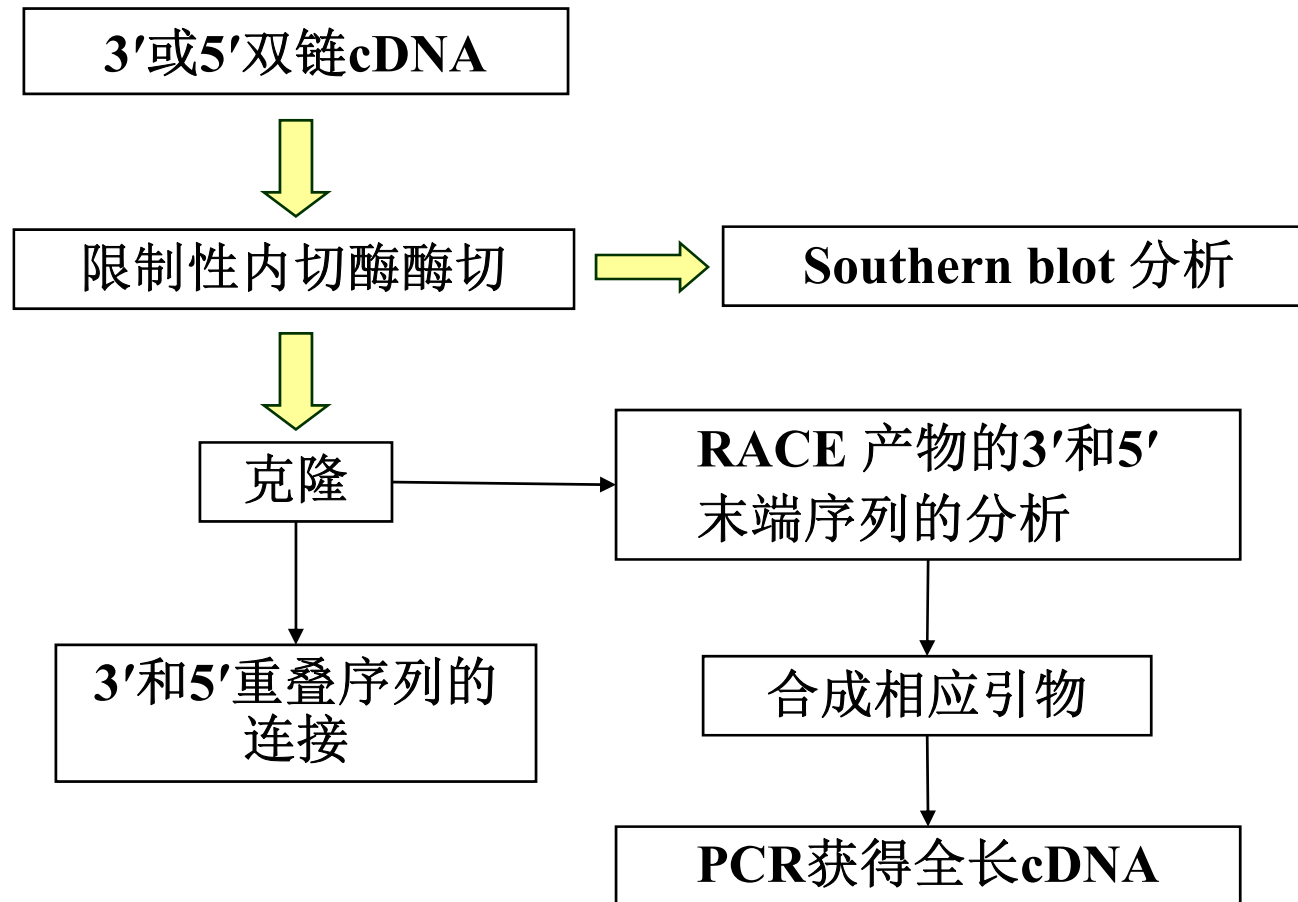
◇ 提供尽量多的实验材料：

3' RACE Total RNA > 15 μg ;

5' RACE Total RNA > 25 μg 。

如果基因的**含量较低**或者**未知序列较长**，**样品量需相应增加**。

RACE 产物的鉴定和全长 cDNA 的获得



应用mRNA差别显示技术克隆目的基因

- 不同基因在生物个体发育的不同阶段或不同的组织、细胞中发生的按时间、空间进行有序表达的方式称为基因的差别表达（differential expression）。
- 1992年，美国波士顿Dena-Farber癌症研究所的科学家P. Liang和A. D. Pardee发明了mRNA的差别显示（mRNA differential display）技术，简称DDRT-PCR，可以从一对不同基因型的细胞群体所产生的约15 000种mRNA中有效地鉴定并分离出差别表达的基因。

应用cDNA差示分析法克隆基因

(RDA, Representation Difference Analysis)

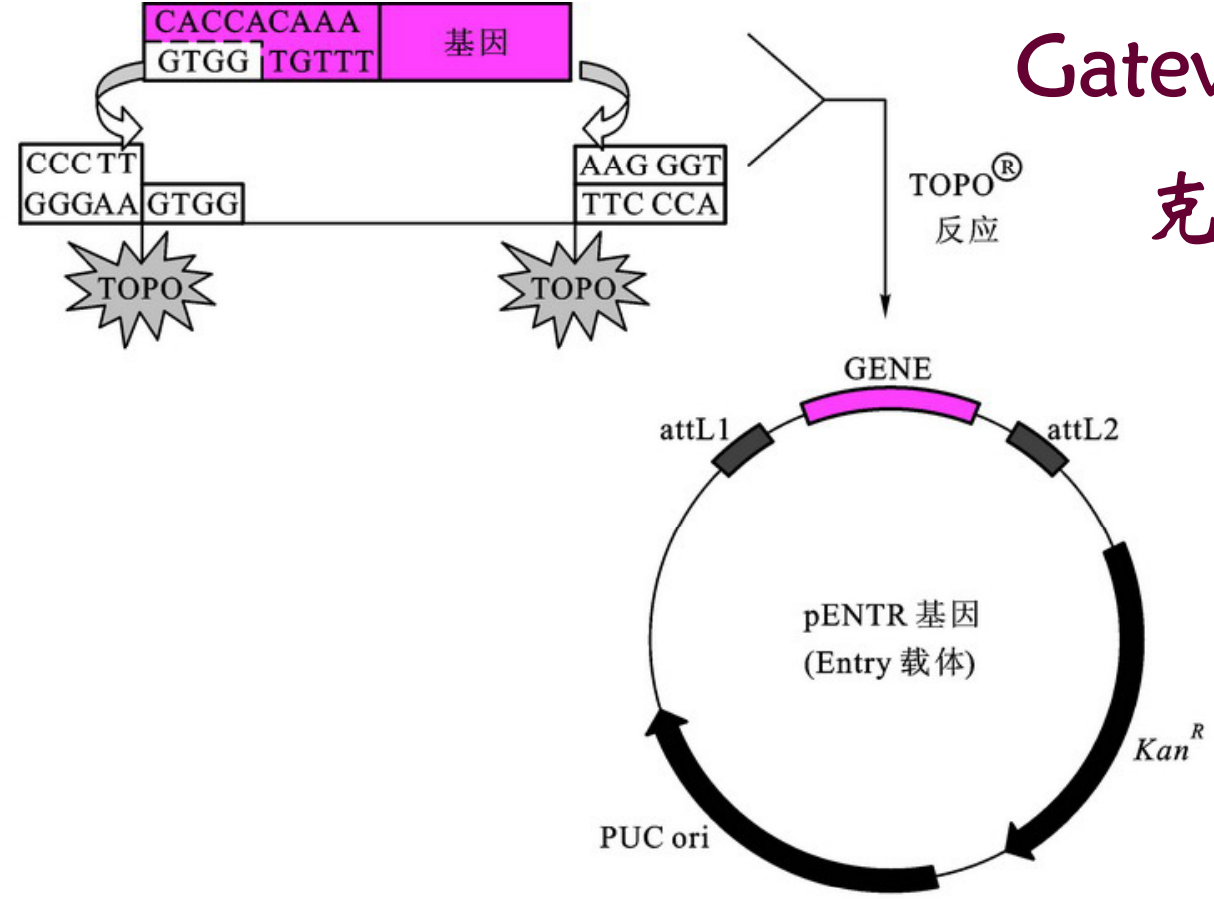
cDNA差示分析法充分发挥了PCR能以指数形式扩增双链DNA模板，而仅以线性形式扩增单链模板的特性，通过降低了cDNA群体的复杂性和更换cDNA两端接头等方法，特异性扩增目的基因片段。PCR产物的特异性和所得的cDNA片段纯度均高。

Gateway大规模克隆技术

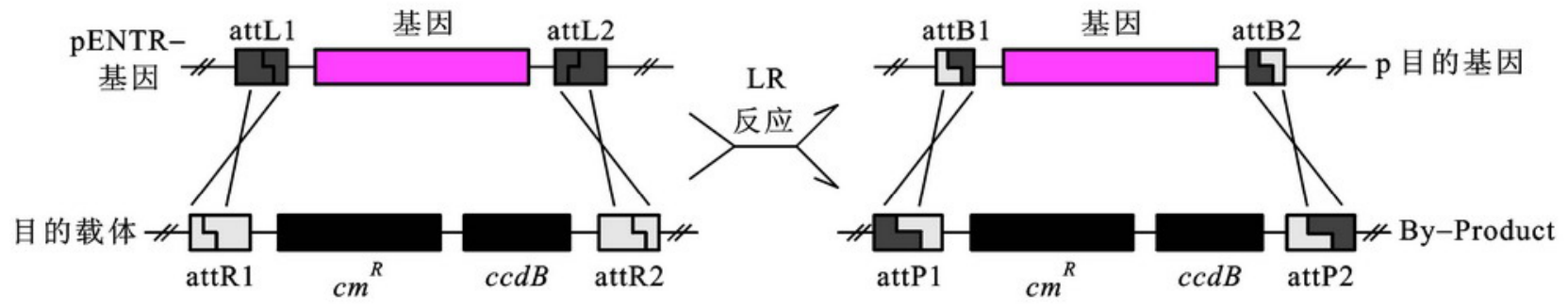
Gateway技术利用 λ 噬菌体进行位点特异性**DNA**片段重组，实现了不需要传统的酶切连接过程的基因快速克隆和载体间平行转移。



Gateway大规模克隆策略



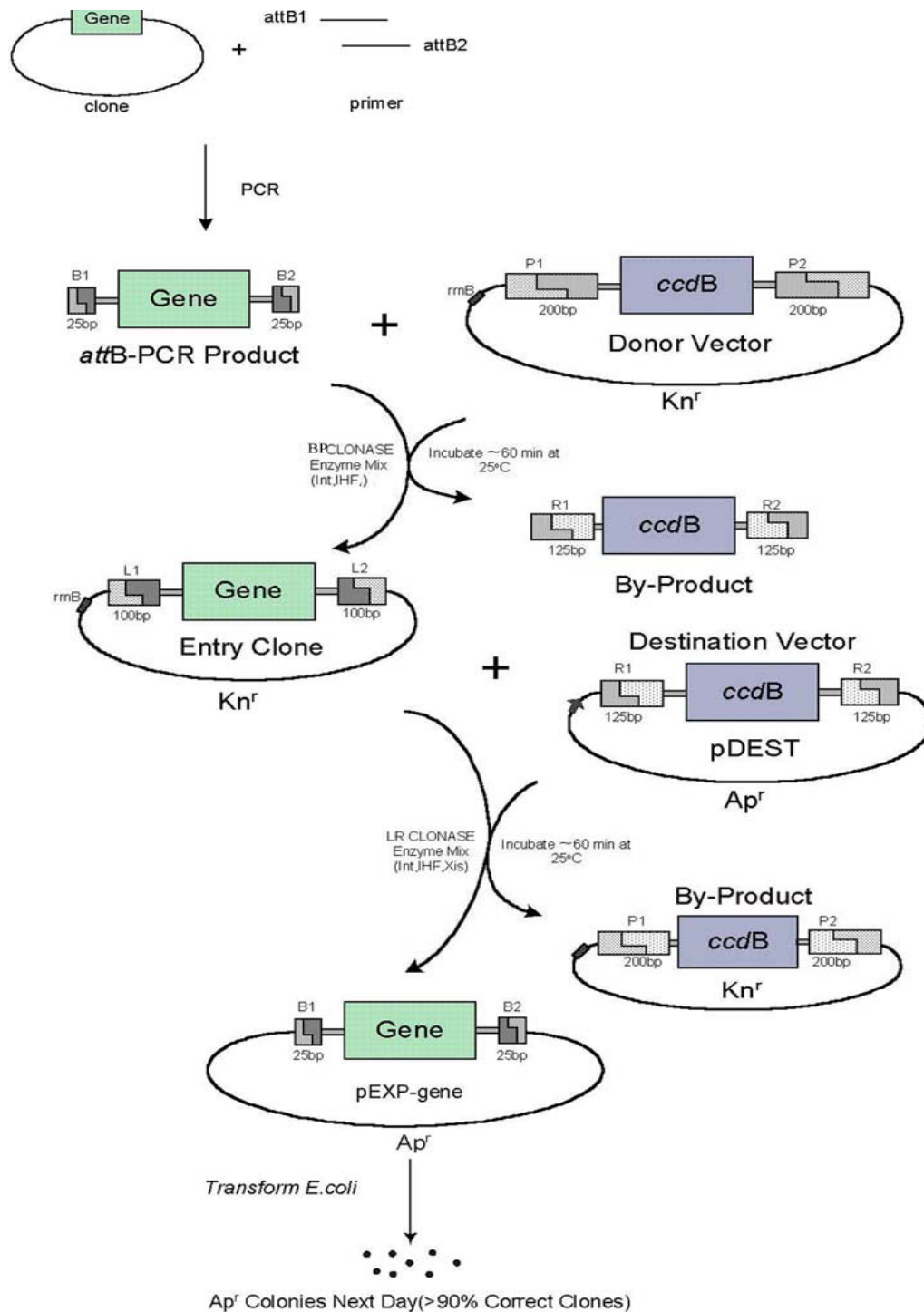
(a)



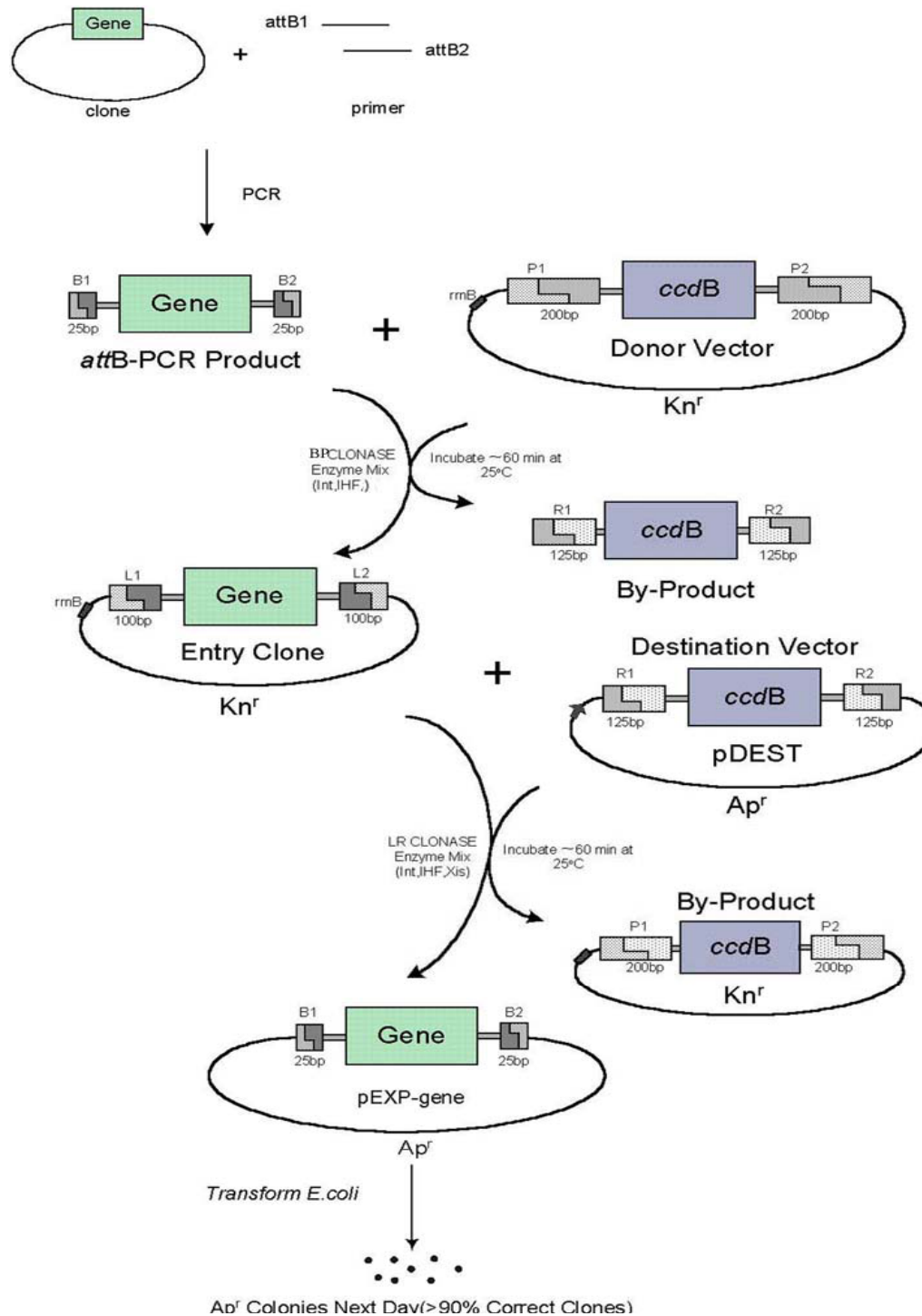
(b)

TOPO反应

将目的基因 **PCR** 产物连入 **Entry** 载体。载体上的 **CCCTT** 被拓扑异构酶所识别，通过与切口处的磷酸基团形成共价键，将该酶偶联在载体上。**5'GTGG** 粘性末端攻击 **PCR** 产物的互补性末端并与接头序列 **CACC** 退火，使 **PCR** 产物以正确方向连入 **Entry** 载体。



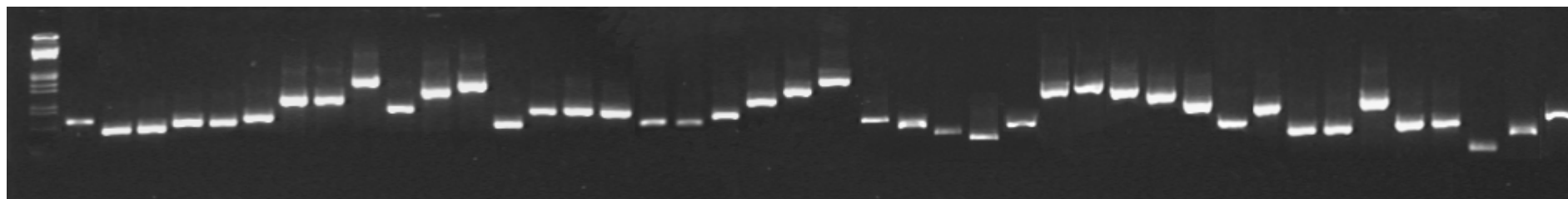
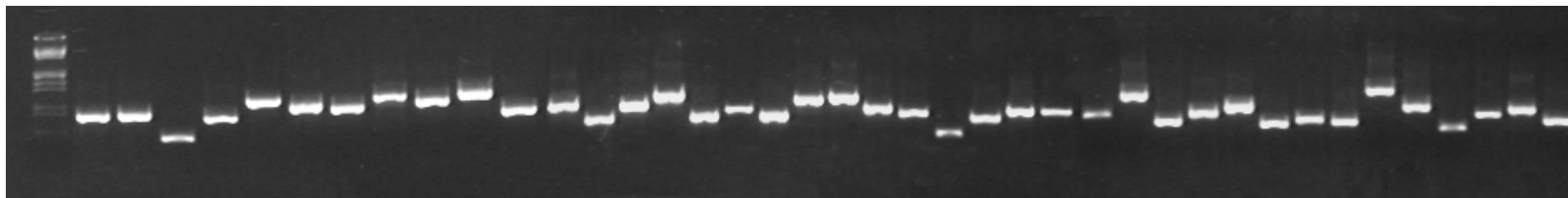
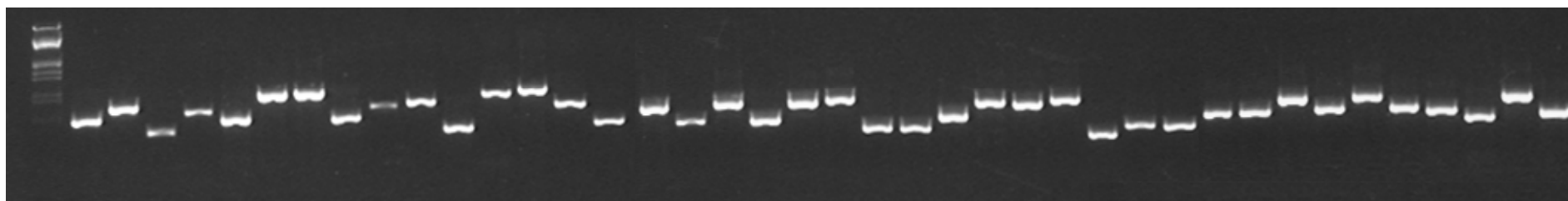
LR反应



将目的片段从**Entry** 载体中重组入表达载体。

Entry 载体上基因两端具有 **attL1** 和 **attL2** 位点，目的载体上含有 **attR1** 和 **attR2** 位点，在重组蛋白的作用下发生定向重组，形成新的位点 **attB1** 和 **attB2**，将目的基因转移到表达载体中。

120 AP2/EREBP genes were cloned



蛋白质的分离纯化

每个蛋白质都有其独特的特性，蛋白质的纯化需要利用其特性，包括大小、电荷、形状以及功能。

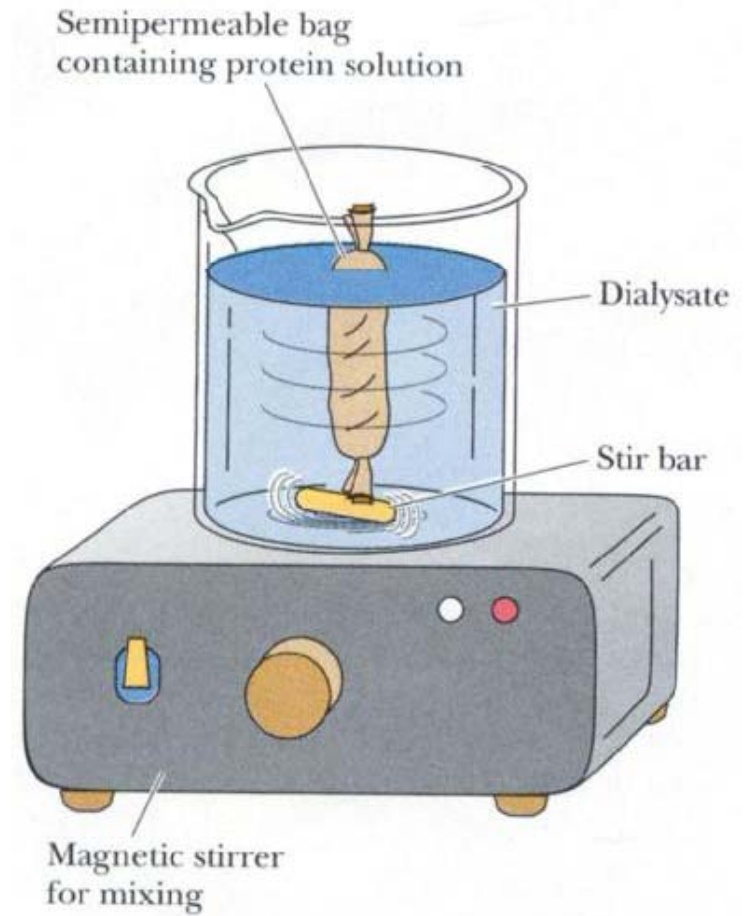
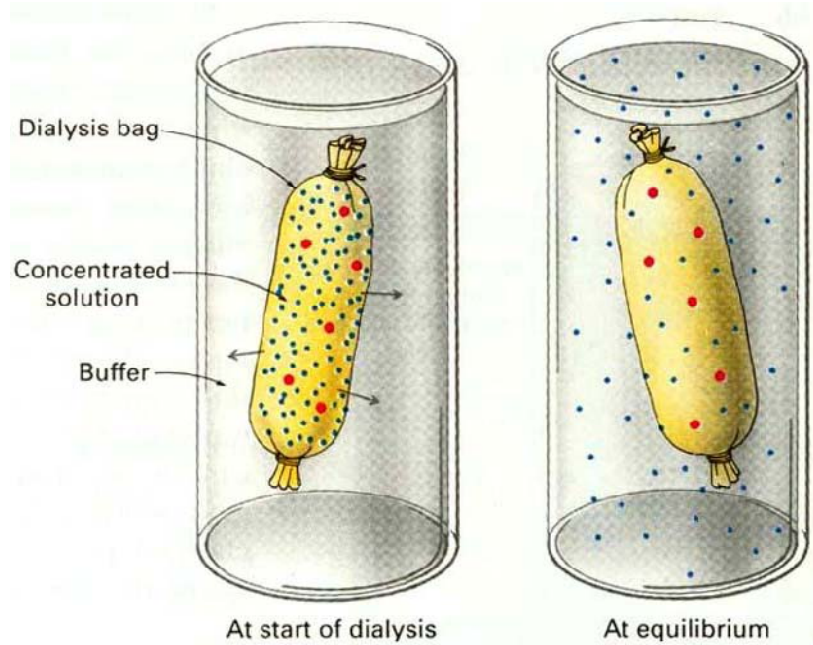
与蛋白质分离纯化相关的理化特性：

- 分子大小
- 分子形状
- 带电特性
- 溶解特性
- 与配体特异性结合不同
- 吸附性质
- 变性和复性

根据蛋白质分子量的大小进行分离

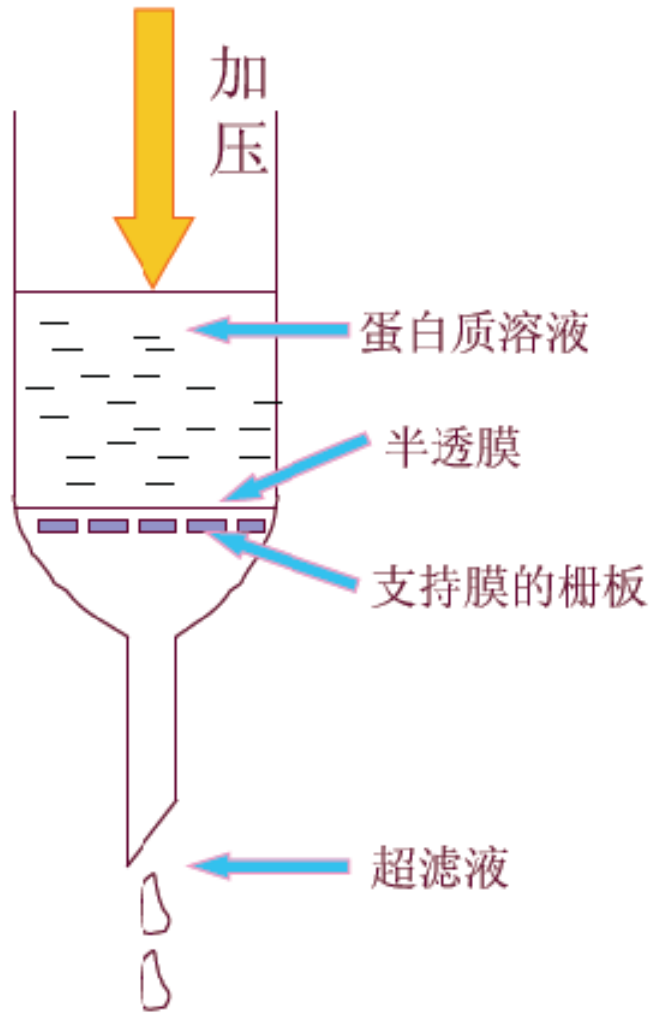
- 大小
 - 蛋白质的分子大小主要取决于蛋白质肽链的数目及每条肽链的氨基酸残基数目。
 - 几百—一百万道尔顿 (Da)
- 常用方法
 - 透析
 - 超滤
 - 凝胶过滤 (分子筛层析)
 - 离心

透析法



透析是利用半透性膜将待纯化蛋白质包裹，沉浸在缓冲液中；由于缓冲液浓度低于膜内部的浓度，因此在半透膜上会发生物质交换；但蛋白质不能通过半透膜，只有盐离子等小分子物质可以通过；因此，待纯化蛋白质中的盐杂质就通过半透膜交换到外面了。

超过滤



超滤是一种加压膜分离技术，即在一定的压力下，使小分子溶质和溶剂穿过一定孔径的特制的薄膜，而使大分子溶质不能透过，留在膜的一边，从而使大分子物质得到了部分的纯化。

根据蛋白质分子形状进行分离

- 形状
 - 形状的不同会导致蛋白质在离心通过溶液时，或通过膜、凝胶过滤填料颗粒或电泳凝胶中的小孔运动时，都会受到它的形状的影响。
- 方法
 - 梯度离心的影响
 - 电泳的影响

根据蛋白质的电荷进行分离

- 原理

- 蛋白质的净电荷取决于氨基酸残基所带正、负电荷总和。若天冬氨酸和谷氨酸占优势，在pH 7.0时带净负电荷，称为**酸性蛋白质**。若赖氨酸和精氨酸占优势，在pH 7.0时带净正电荷，称为**碱性蛋白质**。

- 方法

- 电泳
- 离子交换层析

根据蛋白质的溶解度进行分离

- 原理

- 由于蛋白质分子表面亲水性和疏水性带电基团不同，因此在溶剂中的溶解度不同。

- 方法

- 通过改变pH、离子强度或加入有机试剂，促进蛋白质分子的凝聚进而形成沉淀。
- 盐析法
- 有机溶剂沉淀法
- 等电点沉淀法

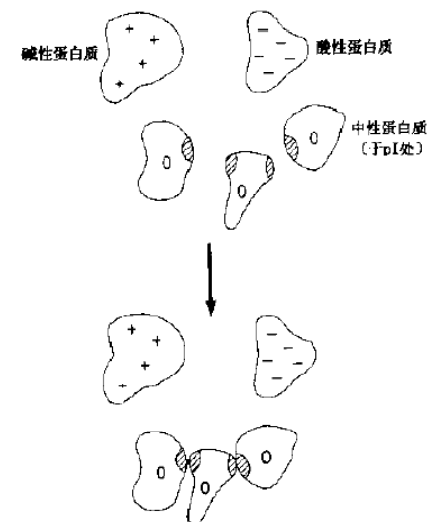
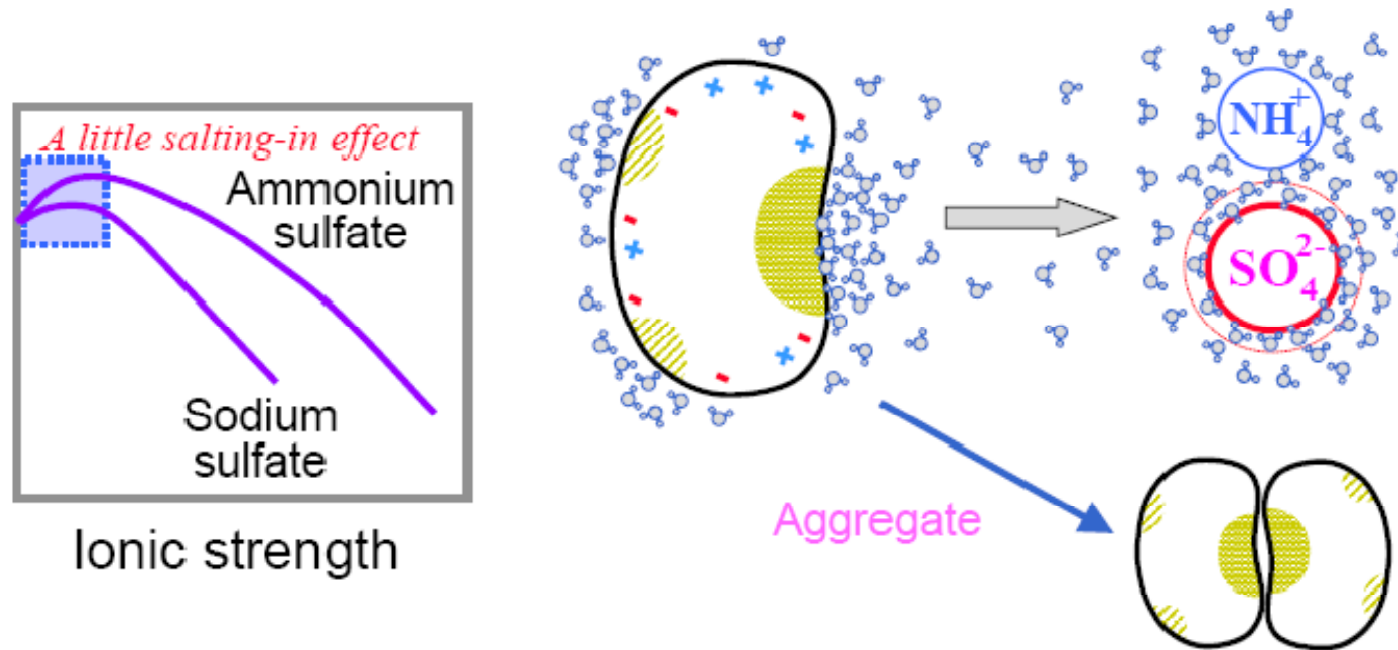


图1-4 等电点沉淀理论的示意图。
阴影部分表示蛋白质表面的疏水补丁。

盐析法

- 蛋白质在高浓度中性盐溶液中会沉淀析出，称为盐析。
- 盐析原理：
 - 高浓度盐离子与蛋白质分子争夺水化水，破坏蛋白质分子表面的水膜，同时盐离子也会影响蛋白质分子所带电荷，从而引起蛋白质沉淀，但通常不会引起蛋白质的变性。



硫酸铵分级沉淀

根据蛋白质的配体特异性结合进行分离

- 原理

- 生物大分子的某些特定结构能够同其他分子相互识别并结合，这种结合是特异的又是可逆的，生物分子间的这种结合能力称为亲和力。

- 方法

- 将具有亲和力的两个分子中的一个固定在不溶性基质上，利用分子间亲和力的特异性和可逆性对另一个分子进行分离纯化。

- 分类

- 免疫亲和层析
- 生物亲和层析
- 金属螯合亲和层析

通过变性和复性进行蛋白的分离和纯化

- 原理

- 蛋白质在一定的理化条件下会失去原有的空间结构、生物学功能及部分理化特性等称为变性。当变性条件去除后恢复原有的空间结构及生物学功能即为复性。

- 方法

- 尿素变性复性从包涵体中纯化原核表达蛋白

分离纯化方法

沉淀法

盐析法、有机溶剂沉淀法、重金属盐沉淀法、生物碱或酸类沉淀法、加热变性沉淀法

层析法

离子交换层析
吸附层析
凝胶过滤（分子筛）
亲和层析
等电聚集层析

电学法

电泳法
等电聚焦

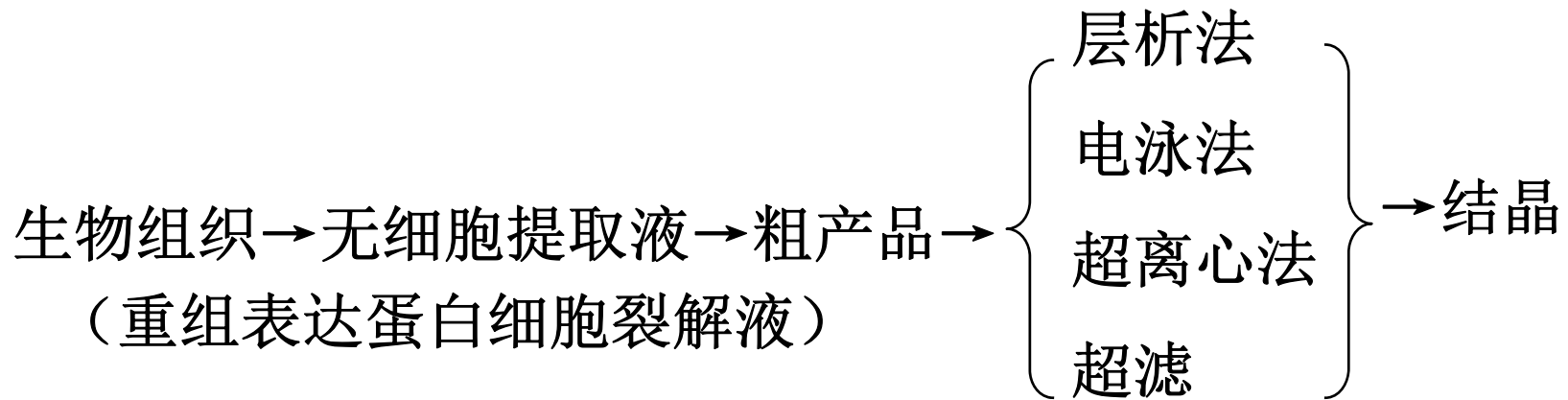
离心法

膜分离技术

透析
超滤

没有一套统一的方法适用于分离纯化所有的蛋白质，但每一种蛋白质可能都有一套适合的分离纯化程序，所用的主要技术手段都基本相同。

蛋白质分离纯化的一般步骤

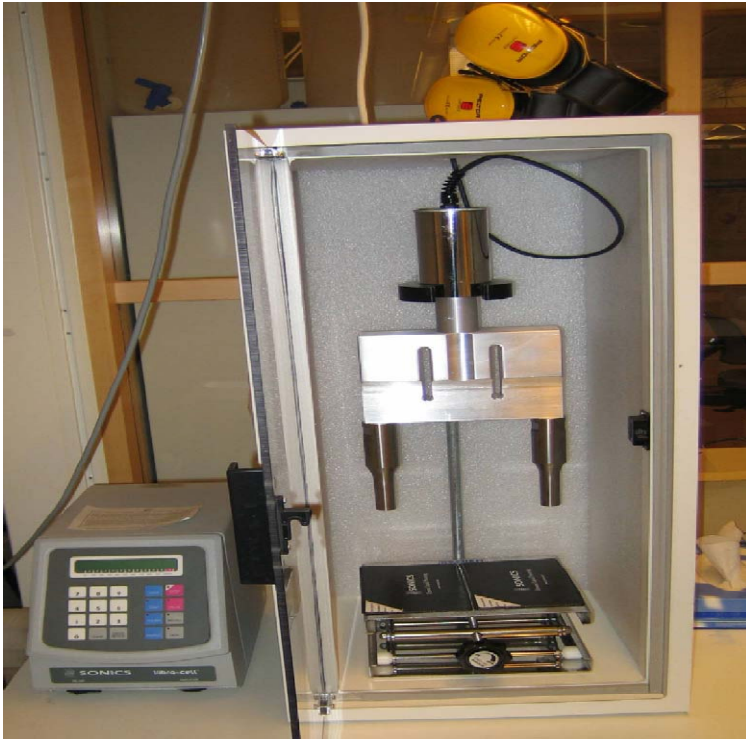


| ← 前处理 → | ← 粗分级 → | ← 细分级 → |

- 材料选择与处理
- 细胞破碎 (机械破碎、溶胀和自溶、酶解、化学处理)

- 盐析 (硫酸铵盐析)
- 等电点沉淀
- 有机溶剂沉淀
- 透析

1.材料破碎



- 机械剪碎
- 研磨
- 反复冻融法
- 超声破碎法
- 高压匀浆法
- 酶解法

2、蛋白质的提取

- 提取分离原则
 - 尽可能多地提取目的蛋白，同时避免因热、**pH**或有机试剂、金属离子、蛋白酶等因素造成活性丢失。
 - 选择合适的**pH**、选择合适的离子强度
 - 选择合适的比例

2、蛋白质的提取

- 提取液成分的确定
 - pH 缓冲液: Tris-Hcl, Tris-Gly, Gly-HCl, 柠檬酸-柠檬酸钠
 - 离子强度: 动物 NaCl, 植物KCl
 - 还原剂:DTT, 2-巯基乙醇
 - 蛋白酶抑制剂: EDTA, PMSF, TPCK,TLCK
 - 金属离子螯合剂: EDTA, EGTA
 - 去污剂:SDS, CHAPS, Triton X-100, Tween-20
 - 甘油
- 温度 0-4°C

3、蛋白质的粗分级

- 使用蛋白质提取缓冲液提取实验材料后，蛋白提取液中目标蛋白质的浓度往往较低，采取一些简单的方法使目标蛋白质浓缩，同时去除大量的杂质，这些纯化方法就属于蛋白质的粗分级。
- 硫酸铵分级沉淀、有机溶剂分级沉淀、超速离心、等电点沉淀、透析、超过滤、蛋白质结晶等。

4、蛋白质的细分级

- 粗分级只是使蛋白质得到浓缩和初步分离纯化，多数情况下还要根据蛋白质分子大小、分子形状、分子表面特征或分子带电状况进一步纯化，这就是蛋白质细分级。
- 常用的实验技术：层析和电泳

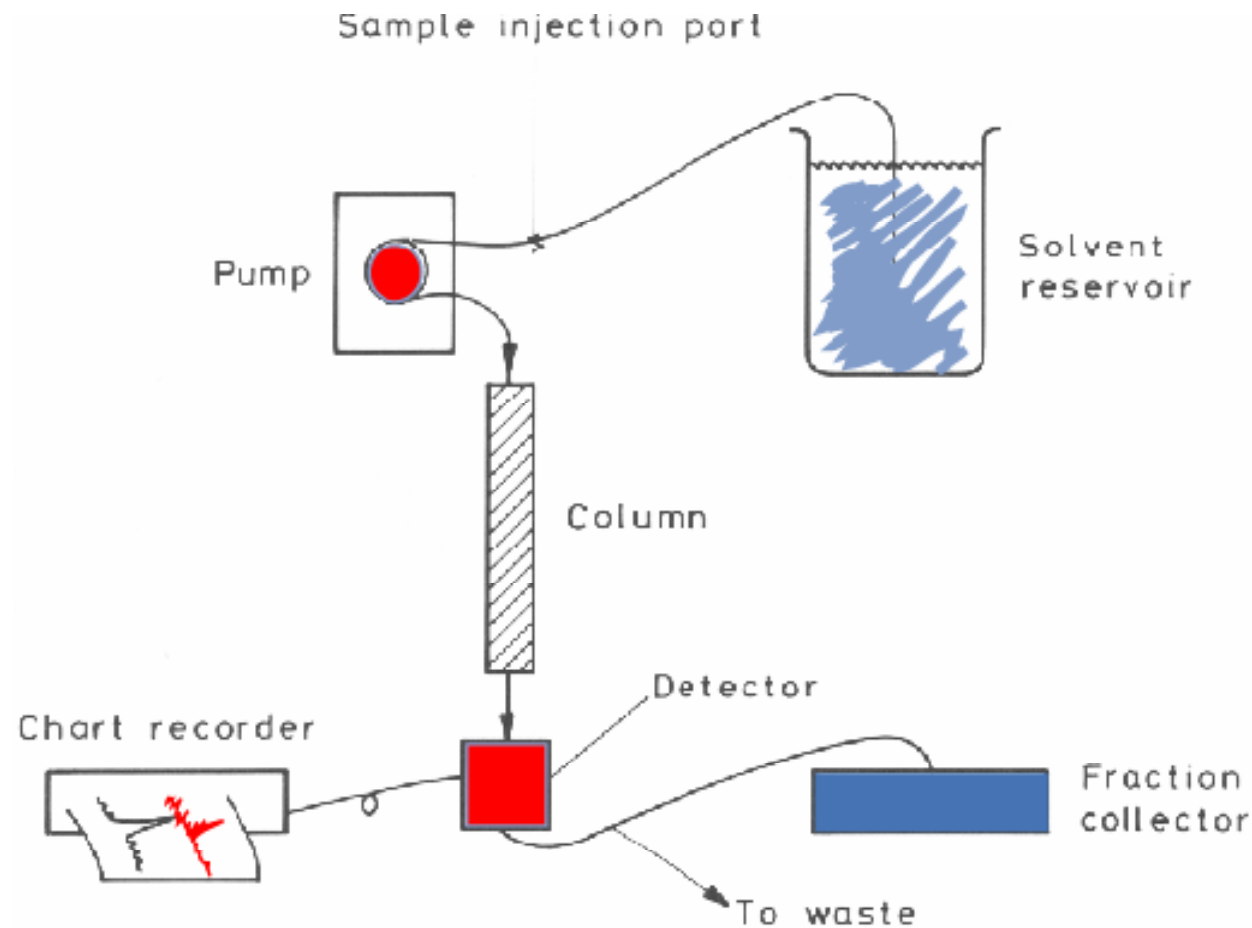
层析 (chromatography)

- 分子筛层析 (**Gel filtration**)
- 离子交换层析 (**Ion exchange**)
- 疏水作用层析 (**Hydrophobic interaction**)
- 亲和层析 (**Affinity**)
- 羟基磷灰石层析

各类层析的原理和载体

类别	分离原理	基质或载体
吸附层析	化学、物理吸附	硅胶、氧化铝、羟基磷酸
分配层析	两溶剂相中的溶解效应	纤维素、硅藻土、硅胶
凝胶层析	分子筛效应的排阻效应	sepharose 、 sephadex
离子交换层析	离子基团的交换反应	离子交换树脂、纤维素、 葡聚糖
亲和层析	分离物与配体之间有 特殊亲和力	带配基的 sepharose 或 sephadex
聚焦层析	等电点和离子交换作用	多缓冲交换剂（与带有多种电 荷基团的配体相偶联的 sepharose 6B ）

装置 (Chromatographic equipment)



蠕动泵

层析柱

检测器

记录仪

部分收集器

蛋白纯化仪



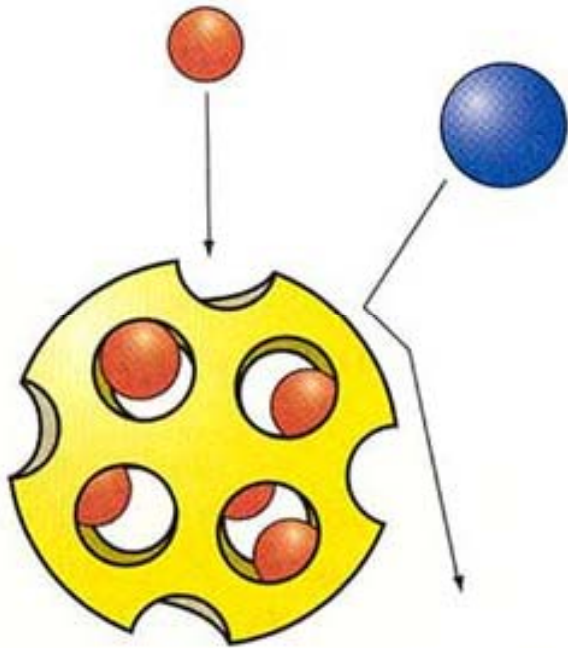
分子筛层析

Gel filtration chromatography

- 原理
 - 分子筛层析, 也称为凝胶过滤、分子排阻层析。
 - 是以多孔性凝胶材料为支持物, 当蛋白质溶液流经此支持物时, 分子大小不同的蛋白质所受到的阻滞作用不同而先后流出, 从而达到分离纯化的目的。
- 凝胶介质
 - 葡聚糖 (**glucose**)
 - 琼脂糖 (**agarose**)
 - 聚丙烯酰胺 (**acrylamide**)
 - 纤维素 (**cellulose**)

分子筛层析

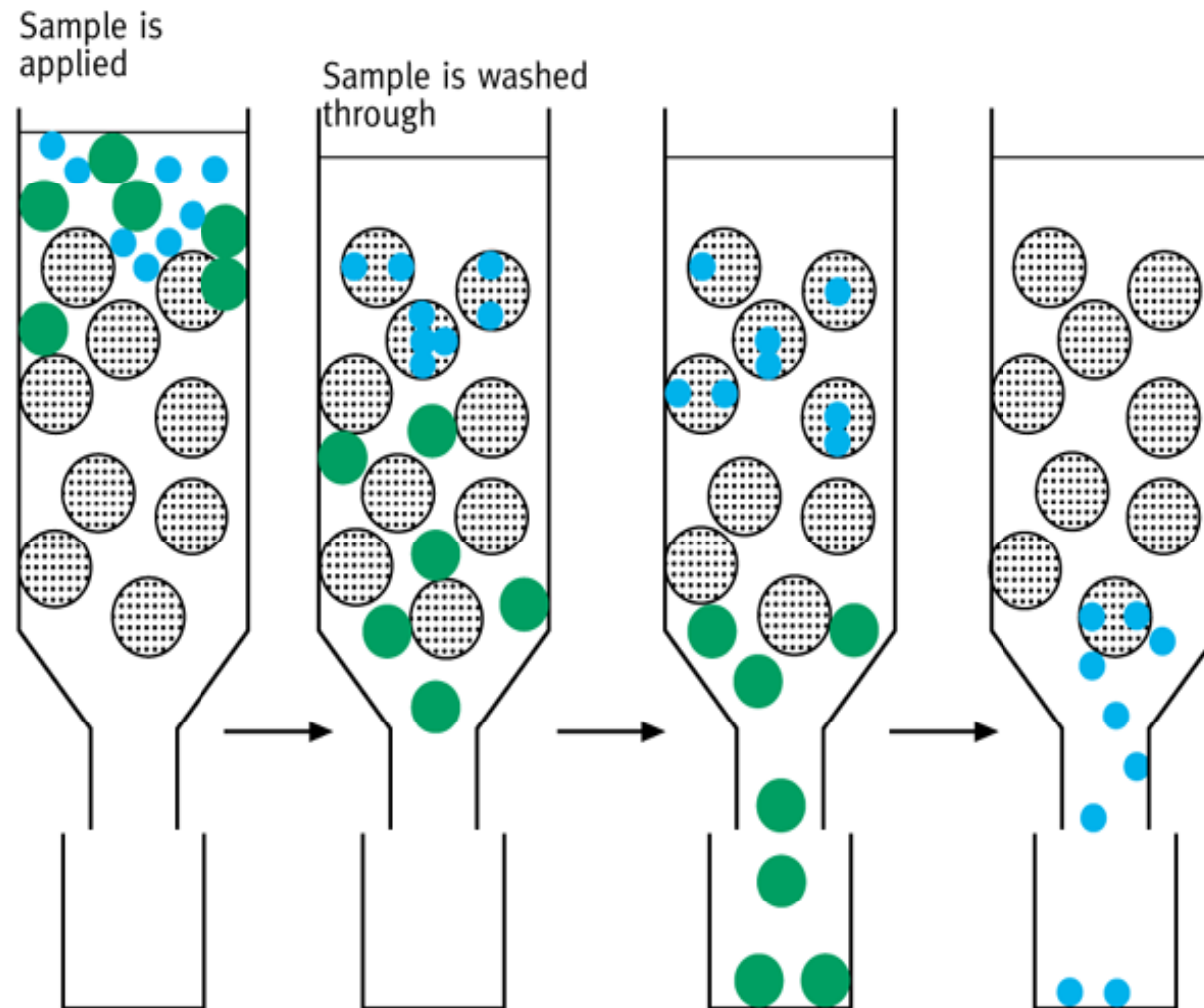
Gel filtration chromatography



- Hydrophilic
- No spontaneous binding to proteins.
- Chemically and physically stable
- Rigid to allow a high linear flow-rate

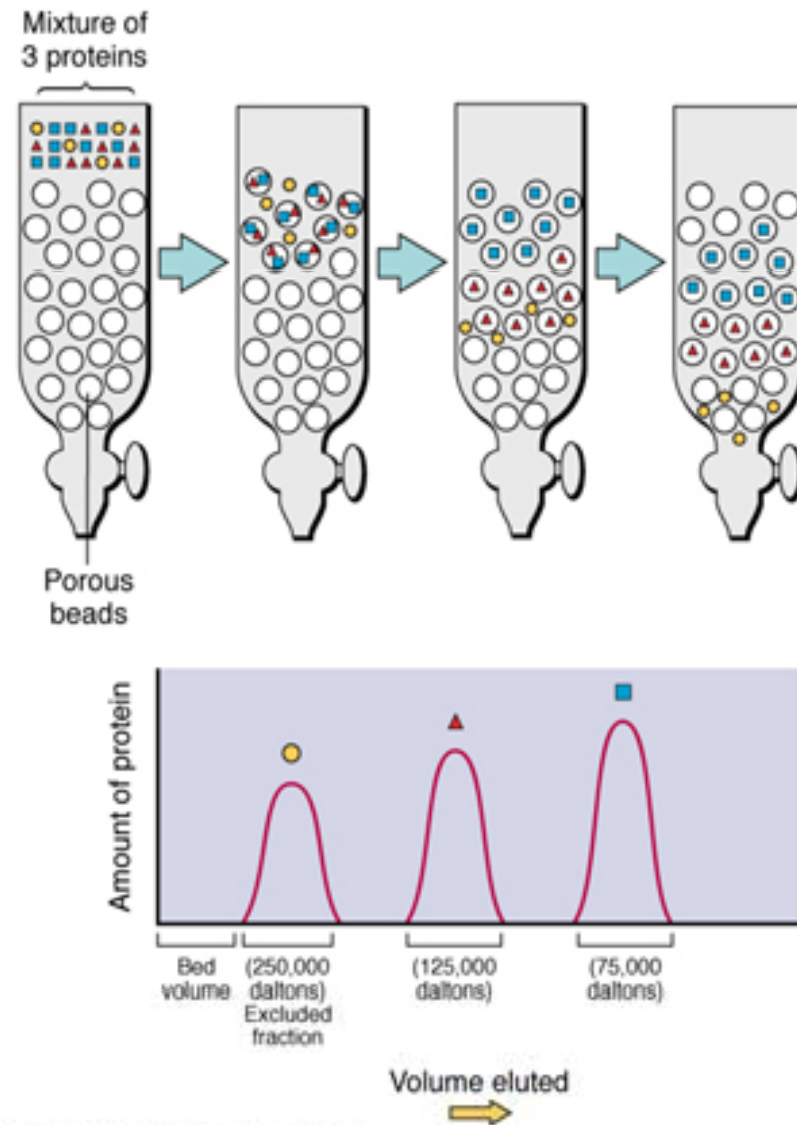
分子筛层析

Gel filtration chromatography



分子筛层析

Gel filtration chromatography



离子交换层析 (Ion exchange)

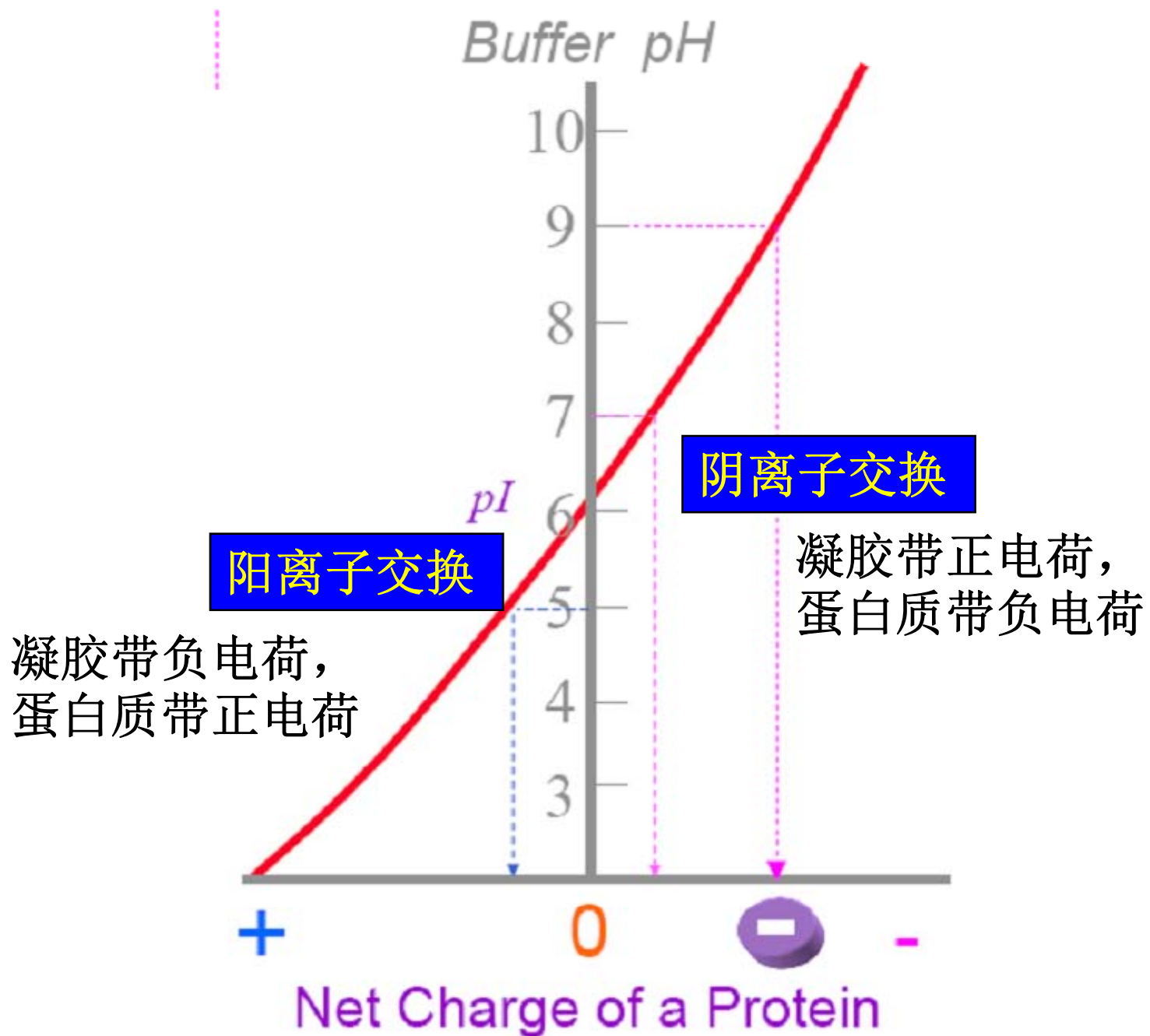
- 原理

- 蛋白质是两性分子，在一定的pH条件下带有电荷，不同的蛋白质带有的电荷的种类和数量不同，因此它们与带电的凝胶颗粒间的电荷相互作用不同。利用蛋白质和带电凝胶的作用力的差别从而把蛋白质分开的层析方法。

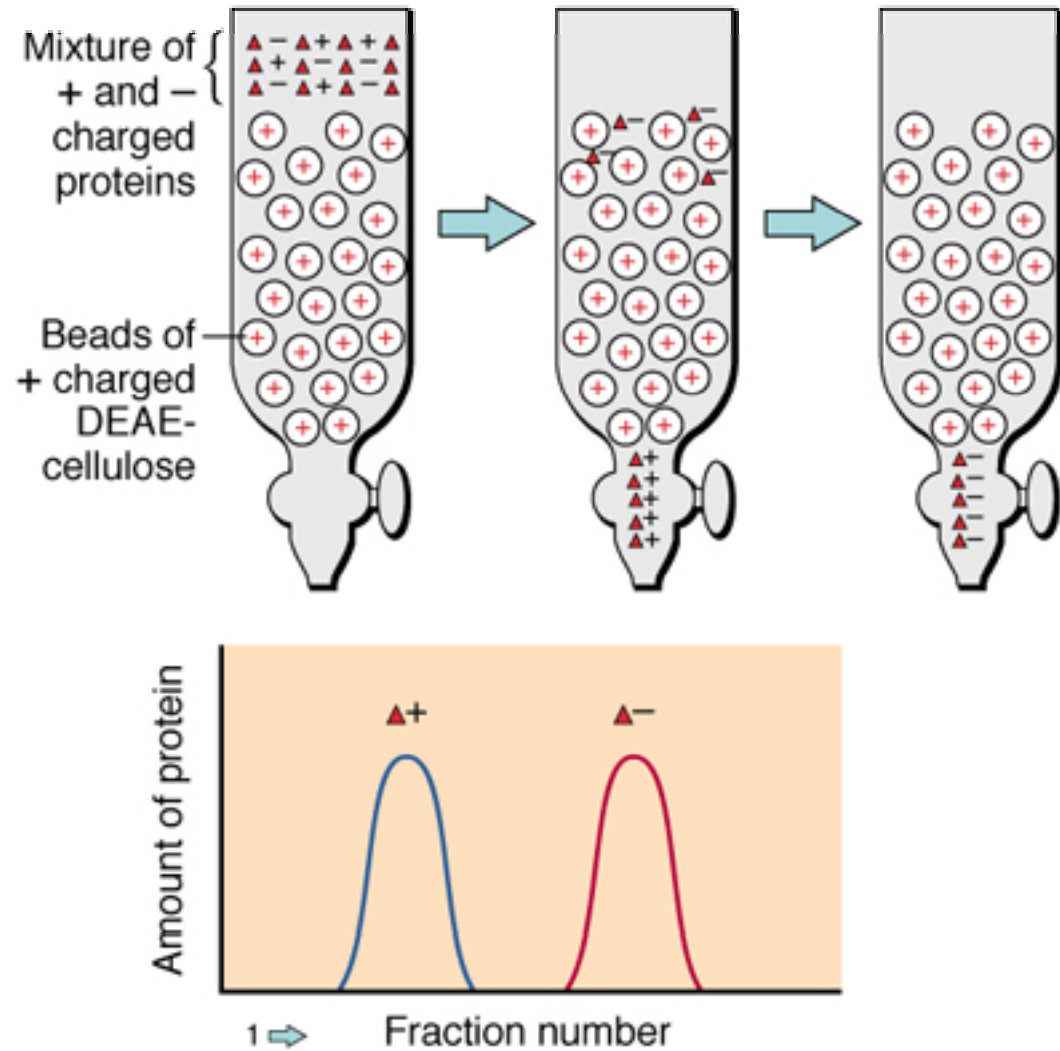
- 介质

- 惰性支持物：琼脂糖，葡聚糖
- 带电基团：羧甲基—带负电 二乙基氨基—带正电
- 平衡离子：负电基团的平衡离子氢或钠离子
正电基团的平衡离子氢氧根离子或氯离子

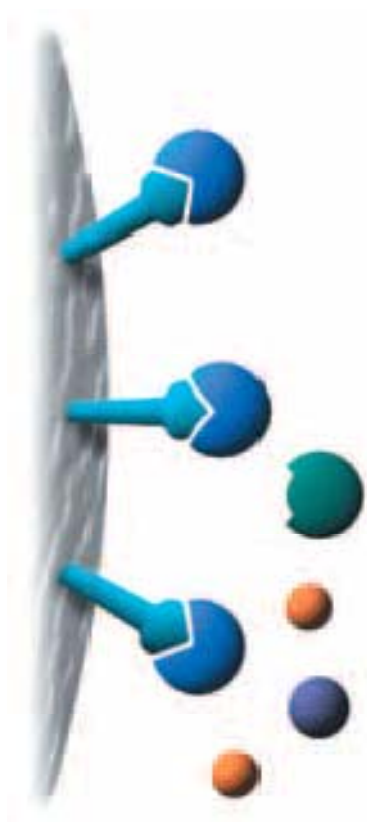
选择离子交换介质



离子交换层析 (Ion exchange)



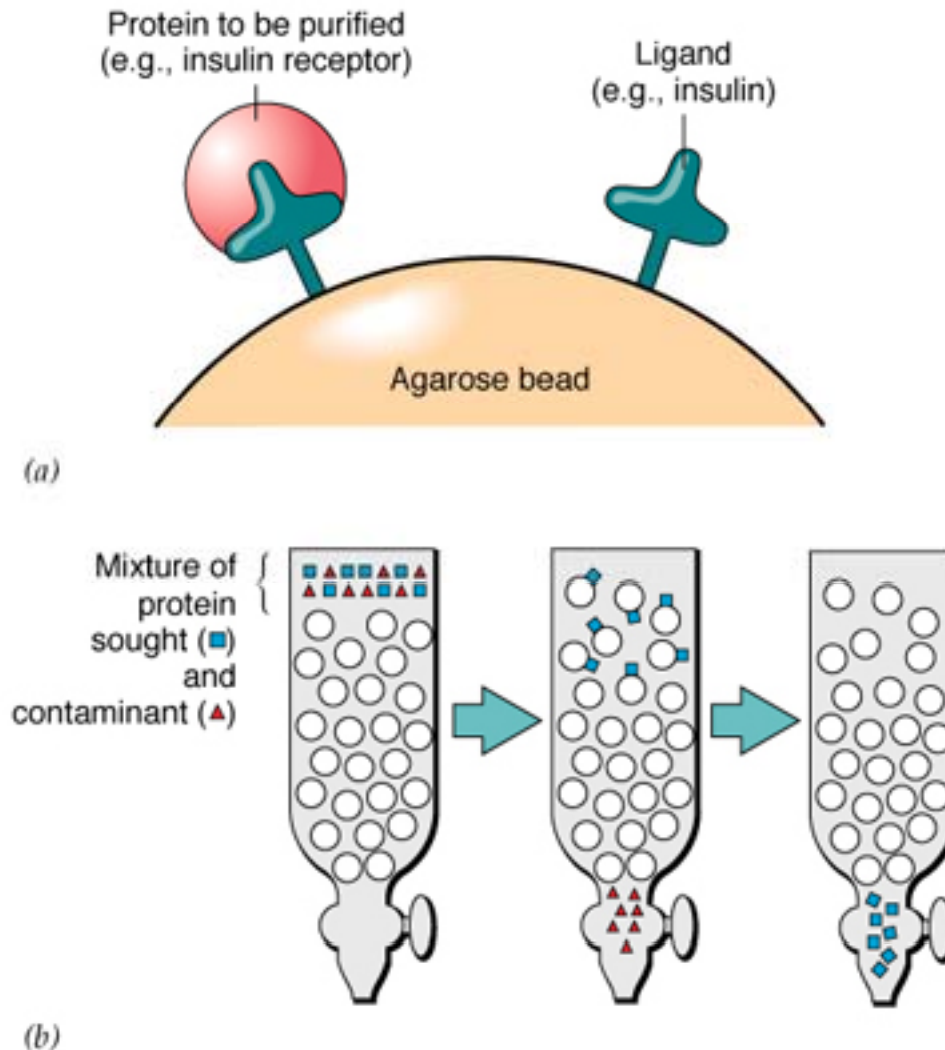
亲和层析 (Affinity chromatography)



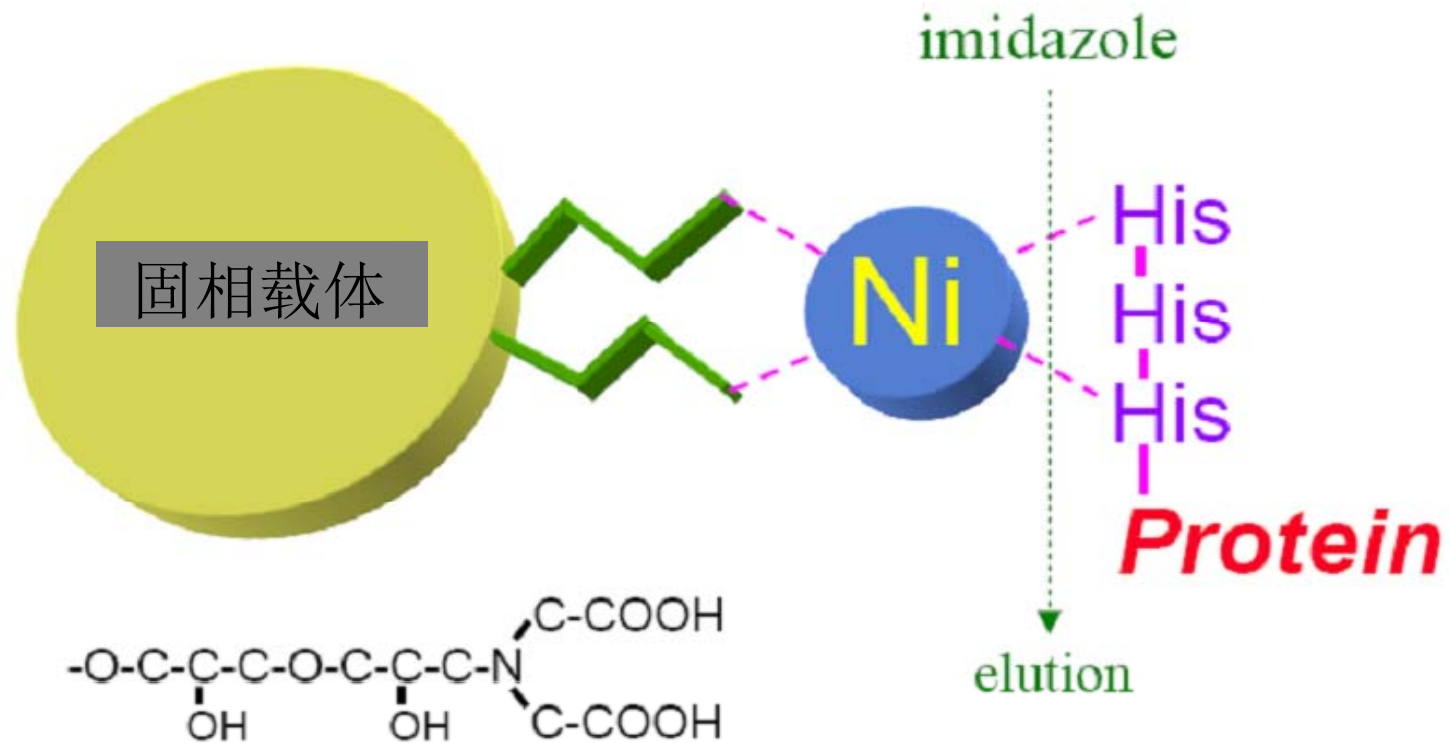
- 原理

- 亲和层析是利用蛋白质与配体专一性识别并结合的特性而分离蛋白质的一种层析方法。
- 将与目标蛋白质专一性结合的配体固定于支持物上，当混合样品流过此支持物时，只有目标蛋白能与配体专一性结合，而其他杂蛋白不能结合。先用结合缓冲液洗脱杂蛋白，然后改变洗脱条件，将目标蛋白洗脱下来。

亲和层析 (Affinity chromatography)

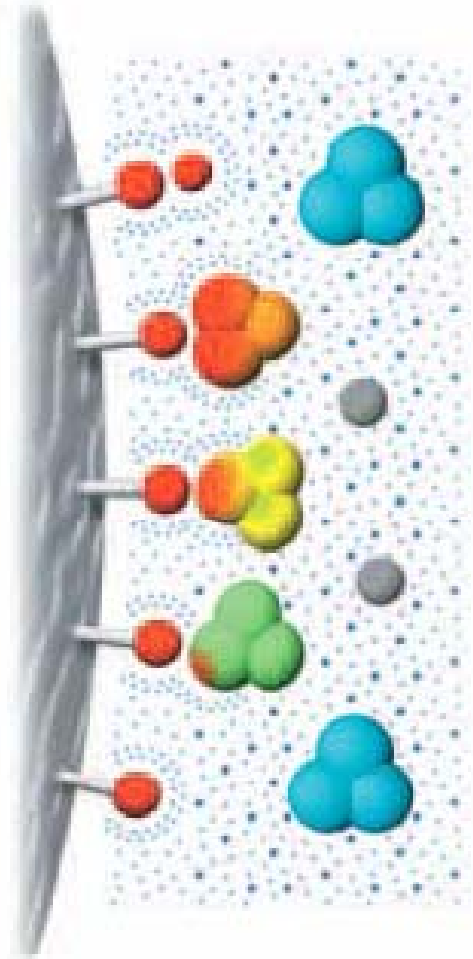


亲和层析 (Affinity chromatography)



Metal Chelate Affinity Chromatography

疏水作用层析



- 原理

- 蛋白质表面的疏水基团与介质的疏水配体的可逆相互作用，高浓度的盐会增强相互作用，低浓度的盐会减弱相互作用。

- 方法

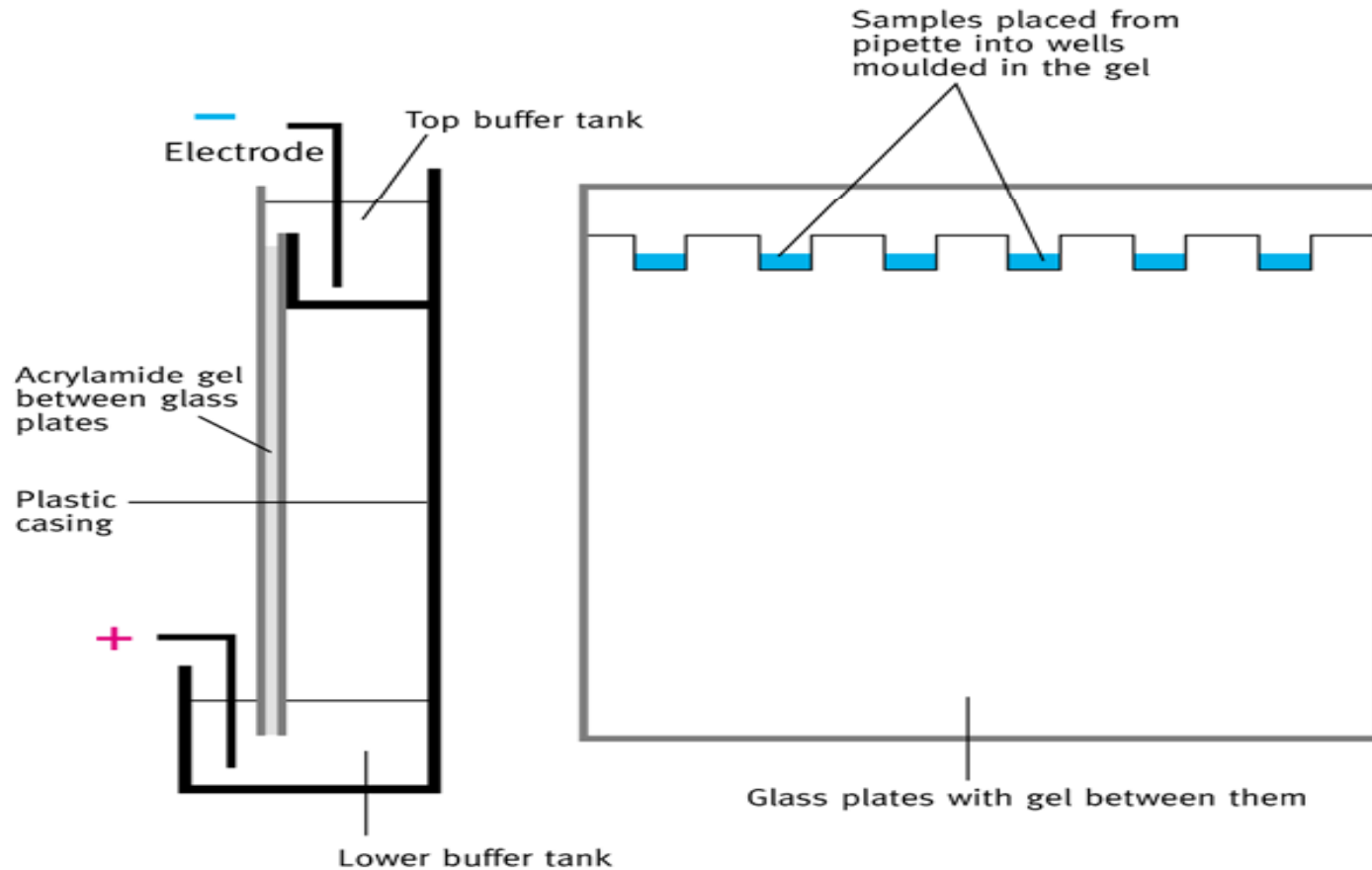
- 高离子强度下待分离的样品吸附在疏水介质上，然后降低离子强度选择性将样品解吸，疏水弱的物质先洗脱，疏水强的物质后洗脱。

羟基磷灰石层析

- 羟基磷灰石是一种特殊的离子交换剂，主要成分是磷酸钙。
- 分子中含有带正电荷的钙离子和负电荷的磷酸根离子。
- 磷酸根离子可以和带正电的蛋白质以离子键结合，可由氯化钠或磷酸钠浓度梯度洗脱。
- 钙离子与带负电蛋白质的自由羧基以金属螯合方式结合，对氯化钠不敏感，可由磷酸钠梯度洗脱。
 - 单梯度洗脱：磷酸钠单梯度洗脱
 - 双梯度洗脱：氯化钠梯度洗脱后，低浓度磷酸钠平衡，再以磷酸钠梯度洗脱。

蛋白质的分析：电泳（Electrophoresis）

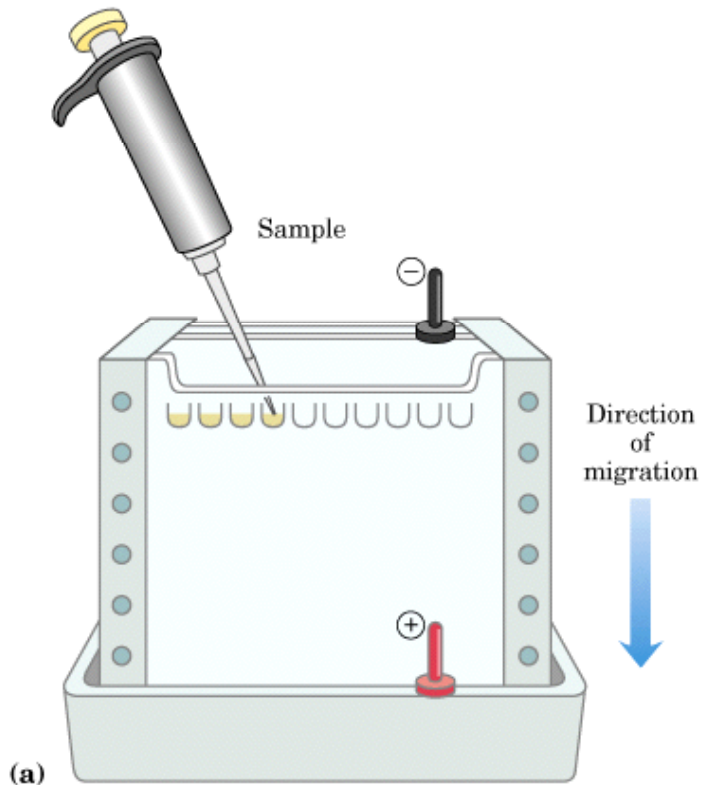
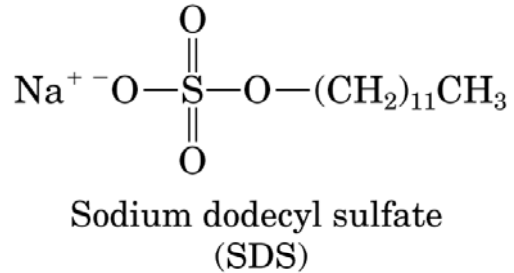
电泳就是带电颗粒在电场作用下，向着与其电性相反的电极移动。



蛋白质常用电泳技术

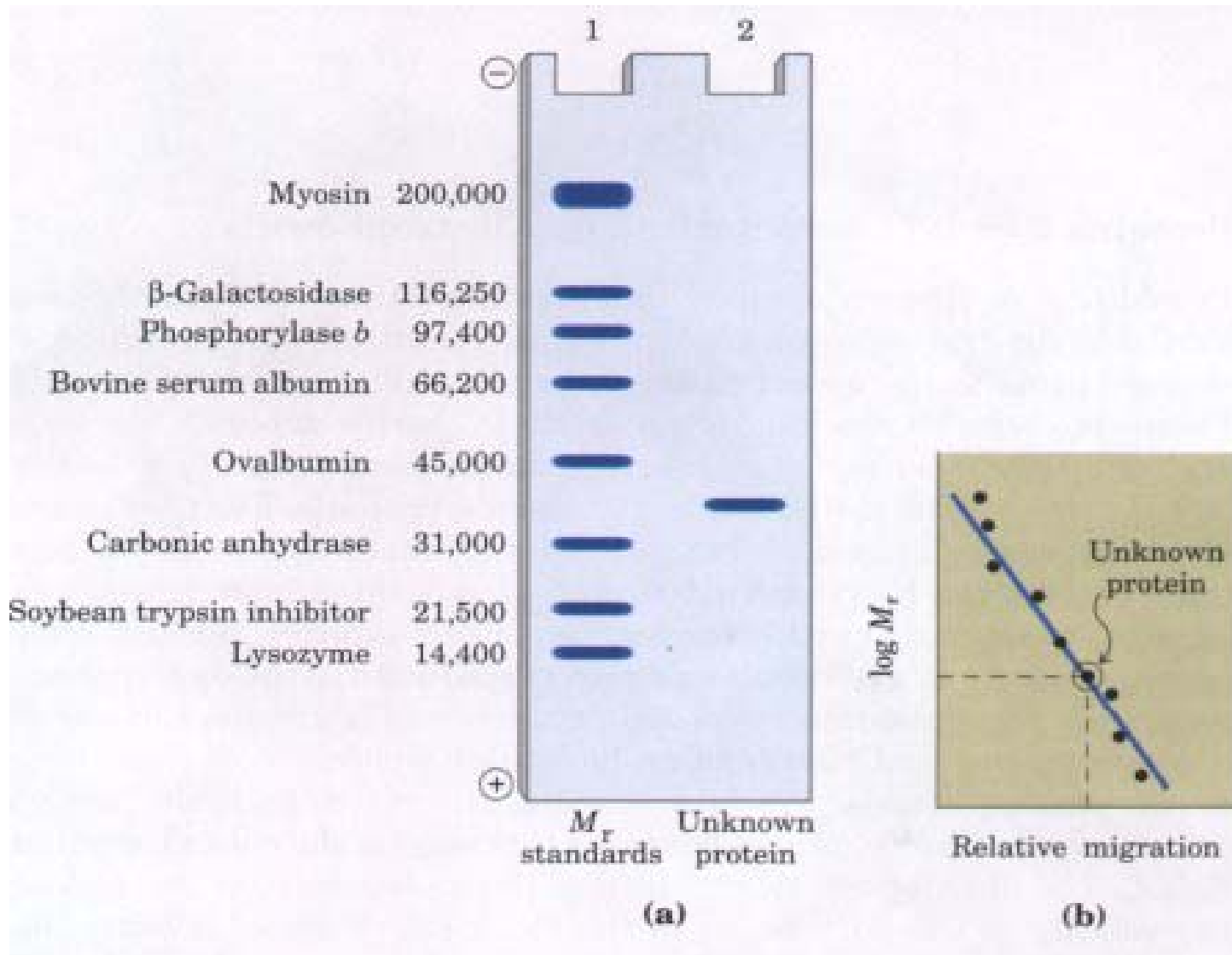
- 聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）
- SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS--PAGE）
- 等电聚焦电泳（ Isoelectric focusing- IEF）
- 双向电泳（ Two Dimensional Electrophoresis ）

SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳

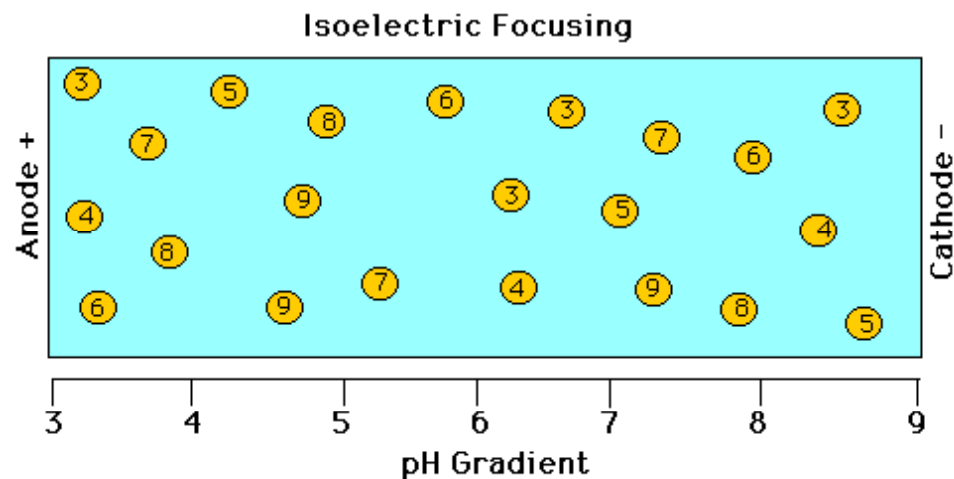
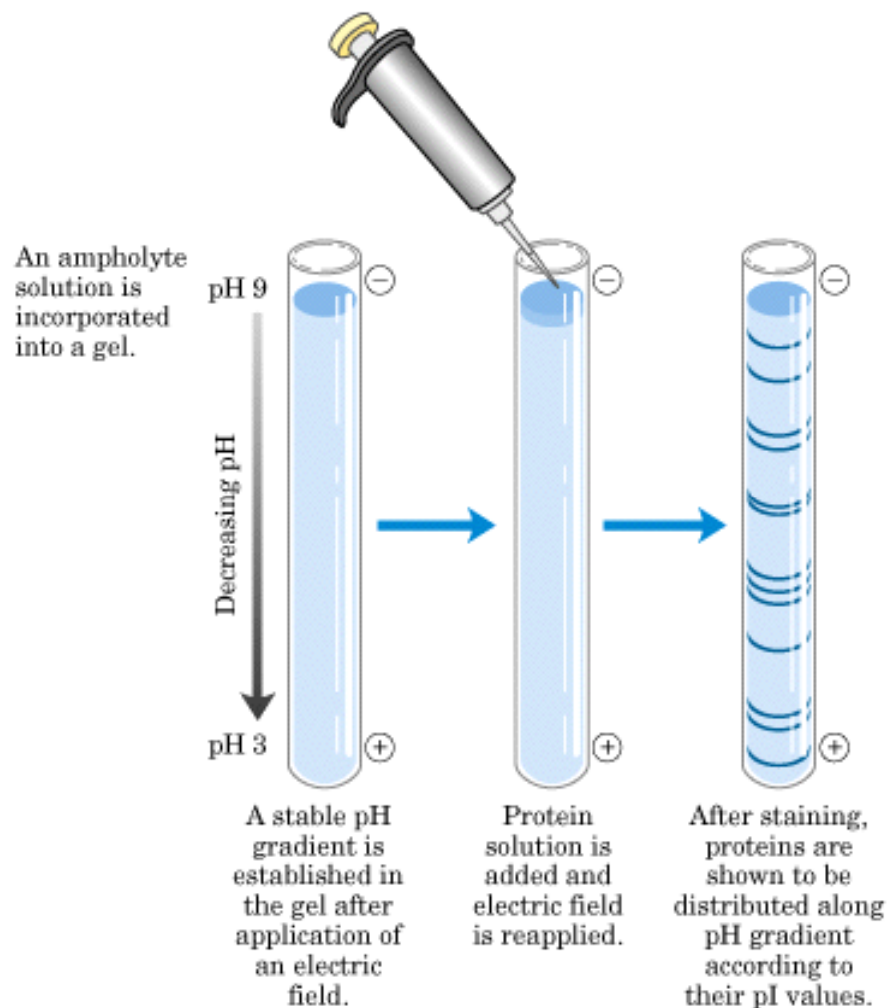


- 由于SDS是阴离子，使多肽表面覆盖的负电荷远远超过蛋白质分子原有的电荷量，消除了原来的电荷差异。
- 改变了蛋白质单体分子的构象，不同蛋白质的SDS复合物的短轴长度都相同，长轴长度随其分子量的大小成正比变化。

电泳法测定未知蛋白的分子量



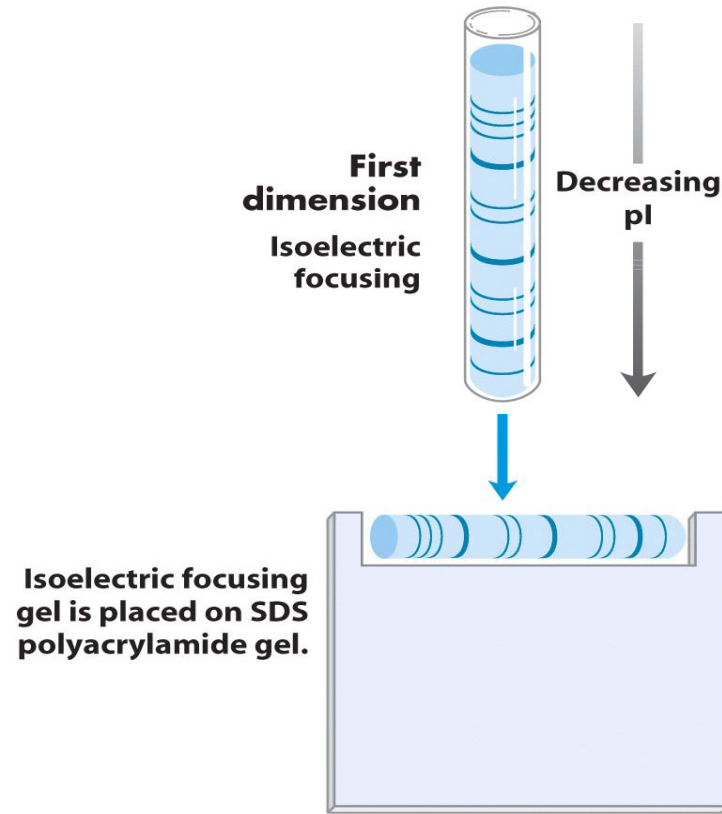
等电聚焦电泳 (Isoelectric focusing—IEF)



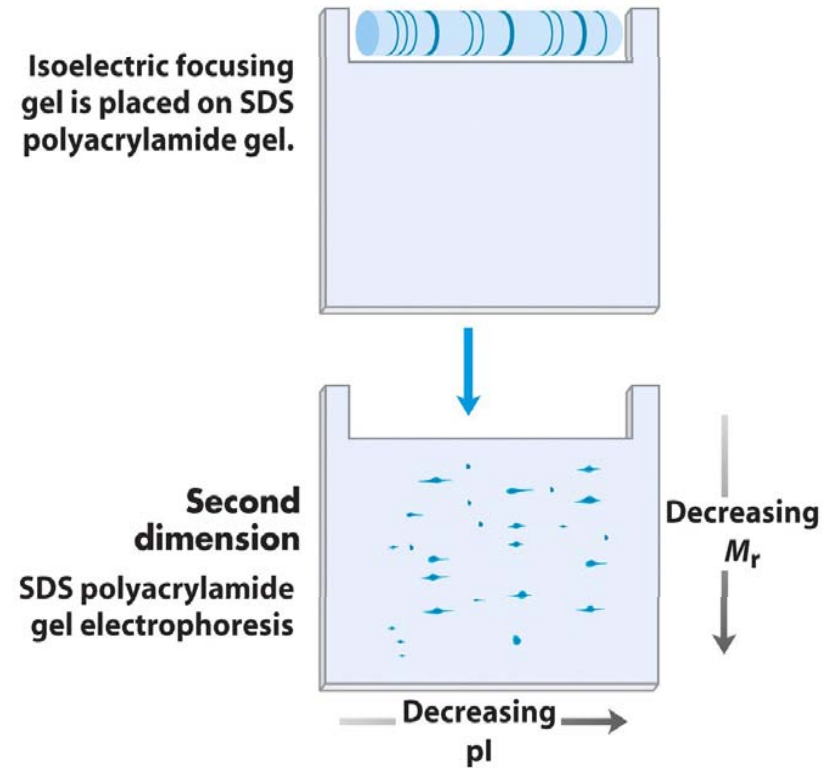
利用特殊的一种缓冲液（两性电解质）在凝胶（常用聚丙烯酰胺凝胶）内制造一个pH梯度，电泳时每种蛋白质就将迁移到等于其等电点（pI）的pH处（此时此蛋白质不再带有净的正或负电荷），形成一个很窄的区带。

双向电泳

Isoelectric focusing



SDS gel electrophoresis



- 第一向通常根据蛋白质的等电点不同进行等电聚焦电泳，然后再根据分子质量的不同进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳作为第二向。
- 双向电泳技术是蛋白质组学研究中蛋白质多肽链分离纯化和鉴定的主要实验技术之一。

Two Dimensional Electrophoresis of E. coli Proteins



- more than 2,000 proteins were visualized

蛋白纯化原则

Guidelines for Protein Purification

- 确定目标
 - purity, activity and quantity
- 充分了解目的蛋白及主要杂质的理化特性
 - to simplify technique selection and optimisation
- 确定活性测定方法
 - fast detection of protein activity/recovery and critical contaminants
- 尽量减少纯化步骤
 - extra steps reduce yield and increase time, combine steps logically

确定纯化目标

Purity requirement examples are shown below.

Extremely high > 99%	Therapeutic use, <i>in vivo</i> studies
High 95- 99 %	X-ray crystallography and most physico-chemical characterisation methods
Moderate < 95 %	Antigen for antibody production N-terminal sequencing

确定活性检测方法

根据特定蛋白质的性质，选择一正合适的方法用于检测特定蛋白质的含量。

- 酶活性测定 (**enzymatic assays**) .
- 与配体结合 (**ligand-binding assays**)
- 免疫学方法 **immunological assays**

活性测定方法的特点：

- 快速、简便、特异和定量

尽量减少纯化步骤

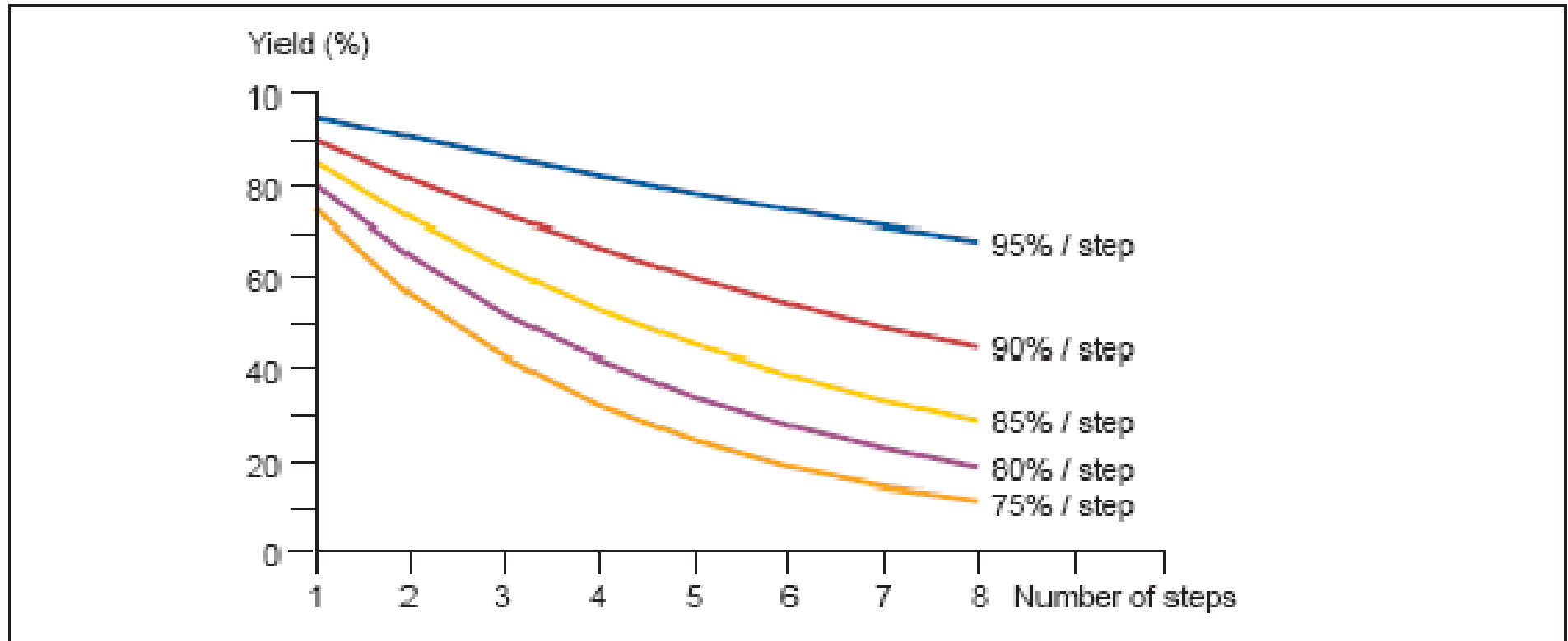


Fig.1. Yields from multi-step purifications.

蛋白纯化原则

Guidelines for Protein Purification

- 减少每步操作时间
 - to avoid lengthy procedures which risk losing activity/reducing recovery
- 减少添加物
 - additives may need to be removed in an extra purification step or may interfere with activity assays
- 早期除去降解物
 - for example, proteases
- 每步使用不同的纯化方法
 - to take advantage of sample characteristics which can be used for separation (size, charge, hydrophobicity, ligand specificity)

蛋白质的鉴定

- 测定蛋白质的浓度
 - 凯氏定氮法
 - 紫外吸收法
 - 分光光度法
- 测定蛋白质的纯度
- 鉴定目标蛋白质
 - 蛋白质分子质量与等电点的测定
 - 氨基酸组成及顺序分析
 - 蛋白质结晶与结构分析
 - 蛋白质活性及功能测定

蛋白质含量的测定

- 凯氏定氮法：
 - 蛋白质平均含氮量为16%，首先测定氮的含量，进而估算蛋白质的含量。
- 紫外吸收法
 - 芳香族氨基酸在280nm附近有最大光吸收，核酸在260nm附近有最大光吸收。
 - 经验公式 蛋白质含量(mg/mL)= $1.45 \times A_{280\text{nm}} - 0.74A_{260\text{nm}}$
- 分光光度法
 - 蛋白质样品与特定的显色剂反应，反应产物在特定的波长的光吸收与蛋白质含量成正比，利用标准曲线即可查得样品的蛋白质含量
 - 考马斯亮兰法等

纯度鉴定

分子量测定

层析法：凝胶过滤；高效液相色谱法(HPLC)

电泳法：PAGE、梯度凝胶电泳、等电聚焦电泳等

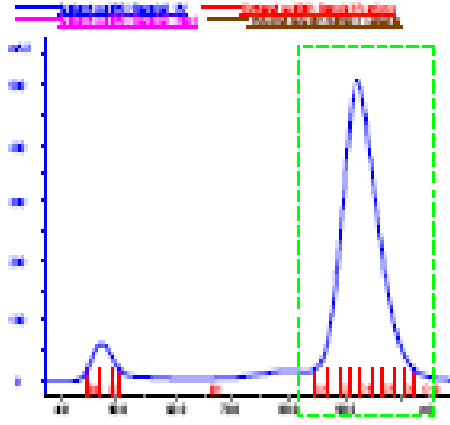
免疫化学法：专一的沉淀线

SDS- PAGE电泳法：测定亚基数

超速离心：成分均一

其它：如, 结晶法.....

纯度鉴定



- 鉴定方法

- 色谱纯：在层析图谱中只有一个洗脱峰
- 电泳纯：在电泳图谱中只有一条电泳条带
- 结晶纯：能够获得蛋白质晶体
- 相互验证：在某一种鉴定方法下表现为均一的蛋白质在另一种方法可能表现为不均一，因此需要互相验证。

蛋白质鉴定

- 分子质量及等电点测定
 - **SDS-PAGE**（蛋白质在**SDS**凝胶电场中的运动速度和距离完全取决于其分子量）
 - **PAGE**
 - 等电聚焦（**IEF**）
- 氨基酸组成及顺序分析
- 结晶及结构分析
- 免疫印迹（**western-blotting**）鉴定
 - 凝胶电泳
 - 转膜
 - 抗原抗体显色反应

氨基酸组成及顺序分析

- 氨基酸组成
 - 水解蛋白质为氨基酸
 - 全自动氨基酸分析仪或高效液相色谱进行测定
- 顺序分析
 - 质谱法
 - 推定法：从已知基因序列推断蛋白质氨基酸序列
 - 化学法（手工、自动）
 - 水解法
 - Sanger法、Edman降解法、氨肽酶法
 - 胍解法、羧肽酶法



空间结构分析

- 二级结构
 - 圆二色谱法(CD)
- 三维结构
 - X射线晶体衍射法—蛋白质晶体
 - 核磁共振—溶液中蛋白质的三维结构
 - 电子显微镜

蛋白质组学技术

蛋白质组学是蛋白质（**protein**）和基因组（**genome**）研究在形式和内容两方面的结合，该技术致力于研究某一物种、个体、器官、组织或细胞在特定条件、特定时间所表达的全部蛋白质图谱。

蛋白质组与基因组既相互对应又有显著不同，基因组是确定的，每个个体只有一个基因组，而基因的表达调控水平（蛋白组）却会发生显著的变化。

蛋白质组学 (Proteomics, 1997)



Keith L. Williams, PhD

Chief Executive Chairman and Executive Director of Proteome Systems, was the founder and Director of The Australian Proteome Analysis Facility (APAF),



Marc R. Wilkins, PhD

Executive Vice President and Head of Bioinformatics

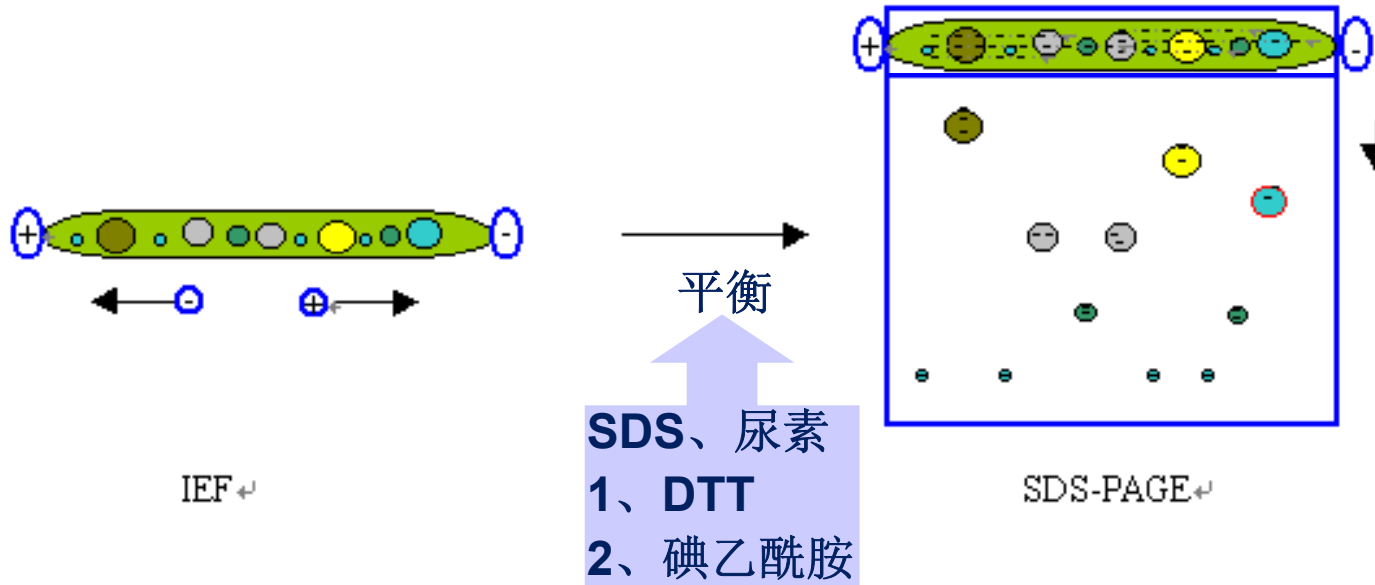
- 1994年，澳大利亚科学家首次提出“蛋白质组” (PROTEOME) 这一概念。
- 蛋白质组的定义：一种细胞或一个组织的基因表达的全部蛋白质。 PROTEins expressed by a genOME or tissue
- 对蛋白质组进行研究，就是要从整体水平上研究细胞及组织内蛋白质的组成及活动规律。

蛋白质组学类型

- 蛋白质表达谱——全谱
- 蛋白质差异表达谱——差异谱
- 蛋白质翻译后修饰——修饰谱
- 蛋白质相互作用——功能谱
- 蛋白质结构——结构谱

双向电泳技术

Two-Dimensional Electrophoresis, 2-D



- 等电聚焦
- 平衡
- **SDS-PAGE**电泳
- 技术成熟，容量、灵敏度、分辨率都较佳，应用广

双向电泳技术的优点和缺点

技术最成熟

容量大

灵敏度高

分辨率高

可同时获得等电点和分子量

定量效果较好

重复性较好

可比较差异

直观

设备便宜

蛋白质有偏好性

胶内蛋白质后处理复杂

总灵敏度不高

动态范围不宽

劳动强大

注意问题

➤ 制样

- 1) 尽量少的处理步骤，以免影响重复性，并减少可能的污染
- 2) 细胞、组织、动植物等不同来源的样品应有不同的处理方式（细胞裂解、TCA/丙酮沉淀）

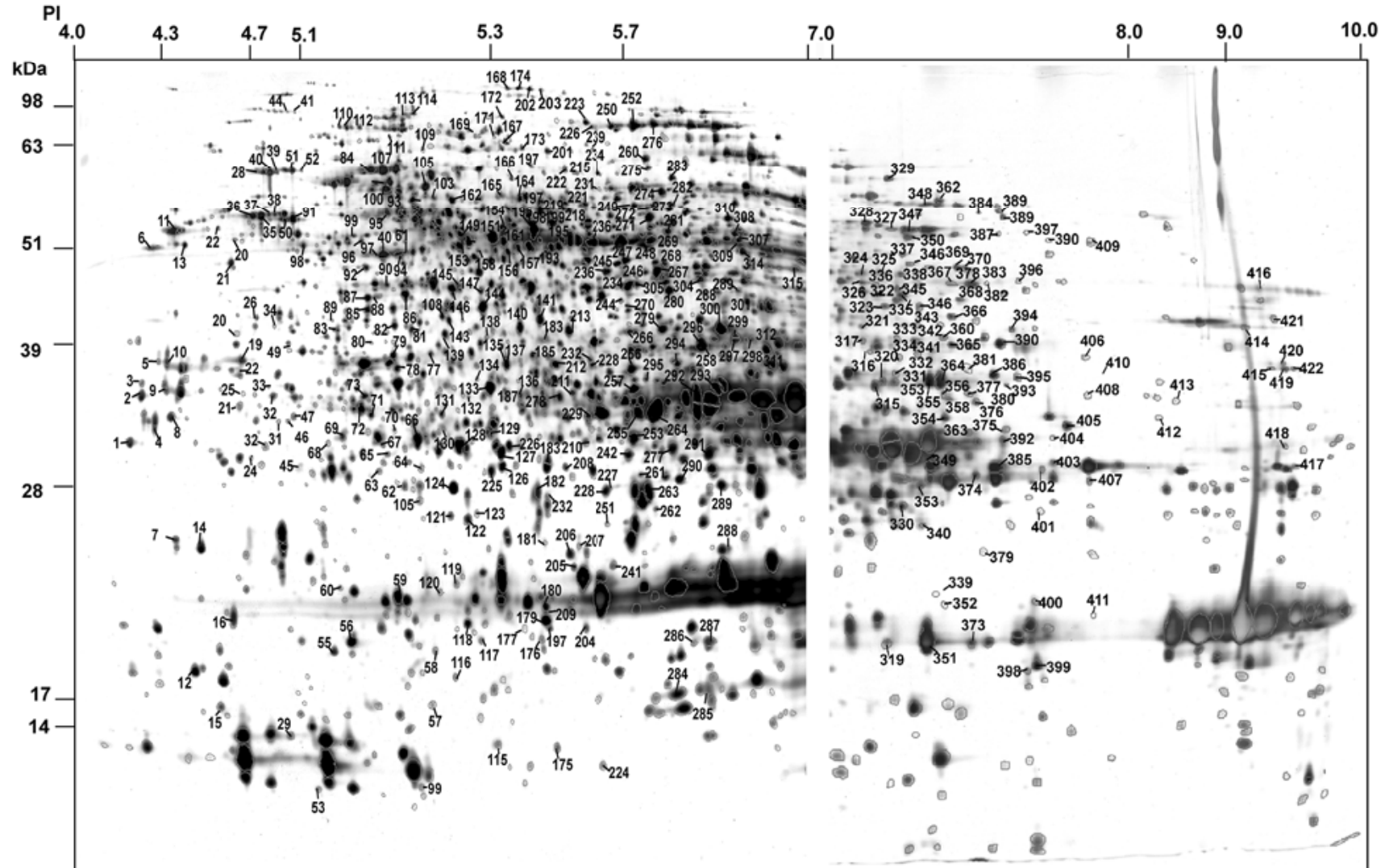
➤ 重复性

IPG胶的批次重复性、一向到二向的转移、二向胶的配制、染色条件控制

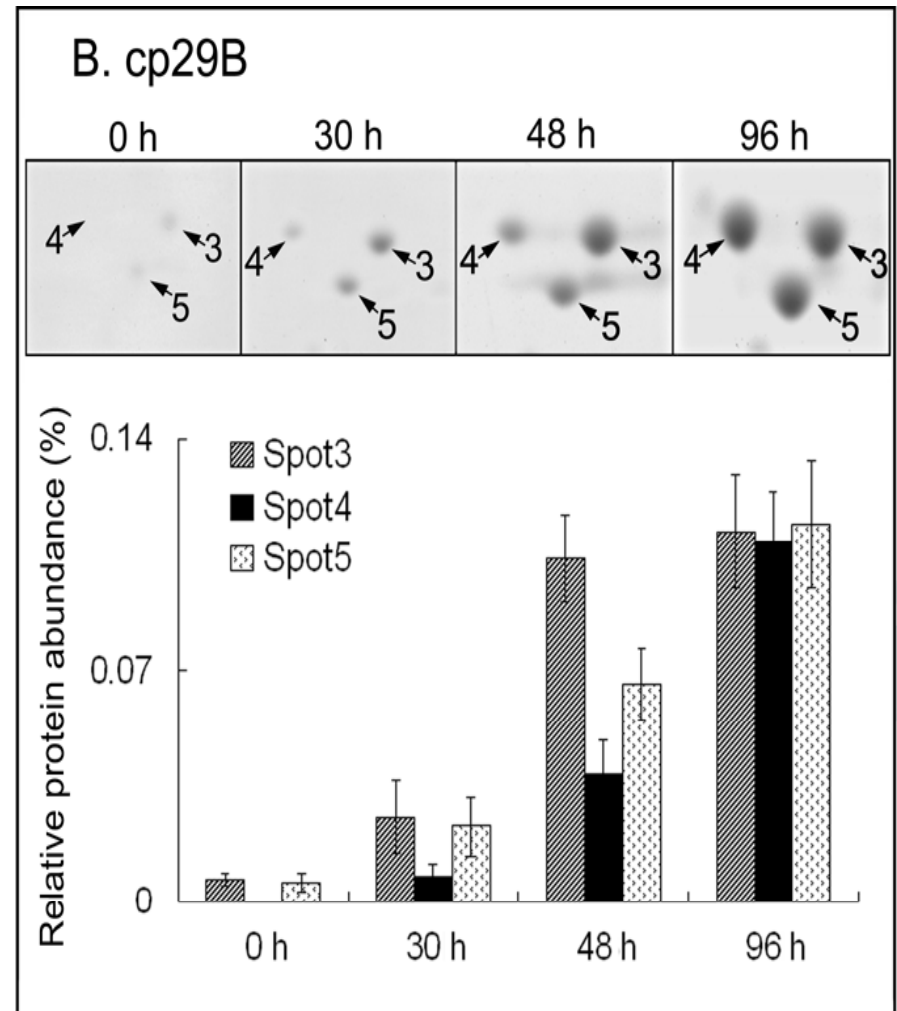
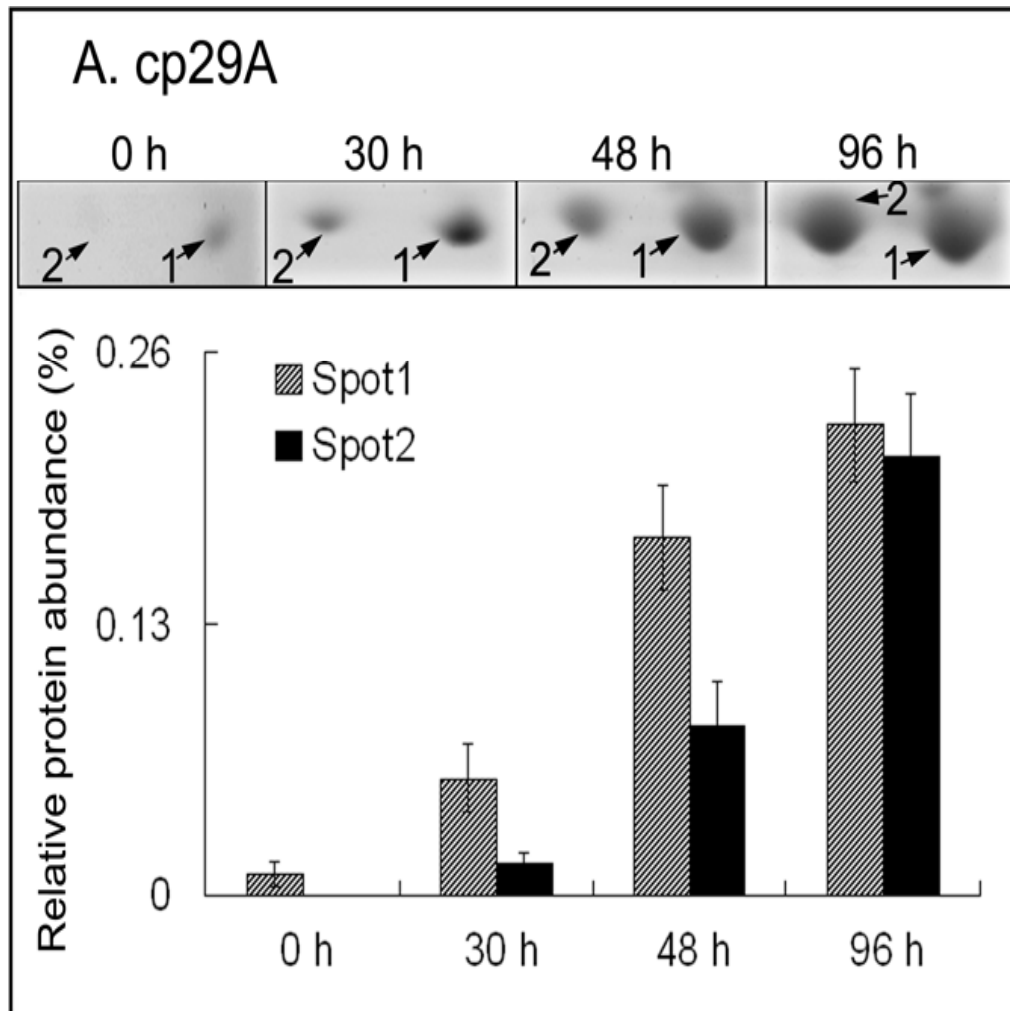
➤ 角蛋白污染

全程戴手套操作，尽量避免样品在空气中暴露

2D-E map of protein from Arabidopsis seeds 30 h after germination



Quantitative analysis of cp29A and cp29B from seeds at 0-96 h after germination



双向电泳的关键指标

➤ 重复性

样本来源；批量同步处理、运行及实验操作

➤ 分辨率

容量和展示的斑点数；染色方法，电泳条件

如何提高双向电泳分辨率

➤ 样品分步提取和预分级

➤ 加长一向胶的长度

7、11、13、18、24 cm

➤ 窄区带pH梯度IPG

pH3-10, pH4-7, pH6-11, pH5-6.....

➤ 新型电泳体系

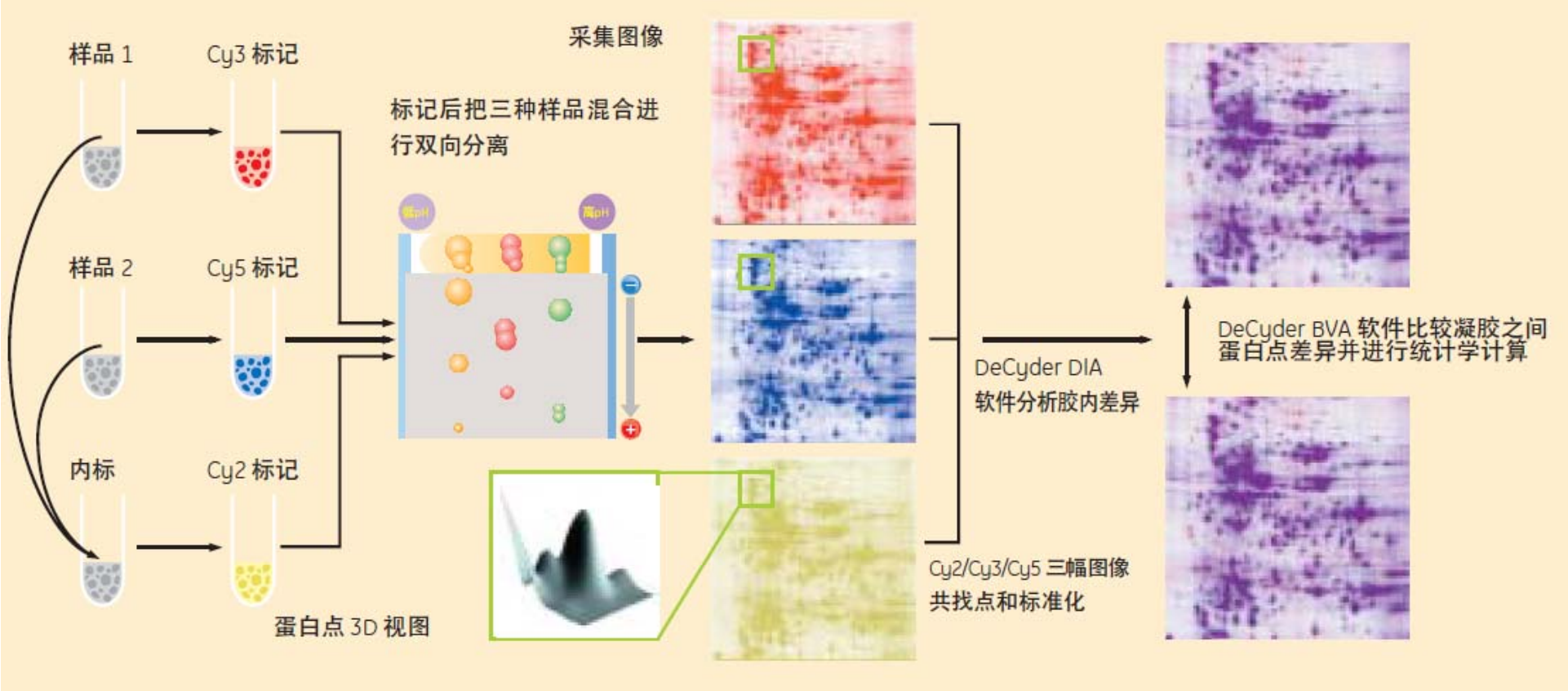
荧光差异显示双向电泳技术

早期的蛋白质组学研究内容主要是蛋白质组的表达模式，即利用常规2-DE技术鉴定并建立某一生物体在特定时期的全部蛋白表达谱。

然而，蛋白质组在不同生命进程中是动态变化的，不同生物的个体、组织或细胞在不同发育时期，分化阶段，以及不同的生理，病理条件下基因表达是不一致的，所对应的蛋白质组具有特异性。

比较蛋白质组学（**comparative proteomics**）应运而生，成为后基因组学时代重要学科。

2-D DIGE技术原理



2D-DIGE 双向荧光差异凝胶电泳

极大地提高了结果的准确性、可靠性和重复性。DIGE技术可检测到样品间小于10%的蛋白表达差异，统计学可信度达到95%以上。

缺点：

1. 标记过程中的共价修饰和荧光探针淬灭作用可能改变样品中蛋白的某些性质
2. 标记蛋白间的轻微相对分子质量的差异，会导致分离后蛋白质的后续分析出现偏差。
3. 需特别的扫描仪和荧光染料，染色成本较高。

蛋白质质谱分析技术

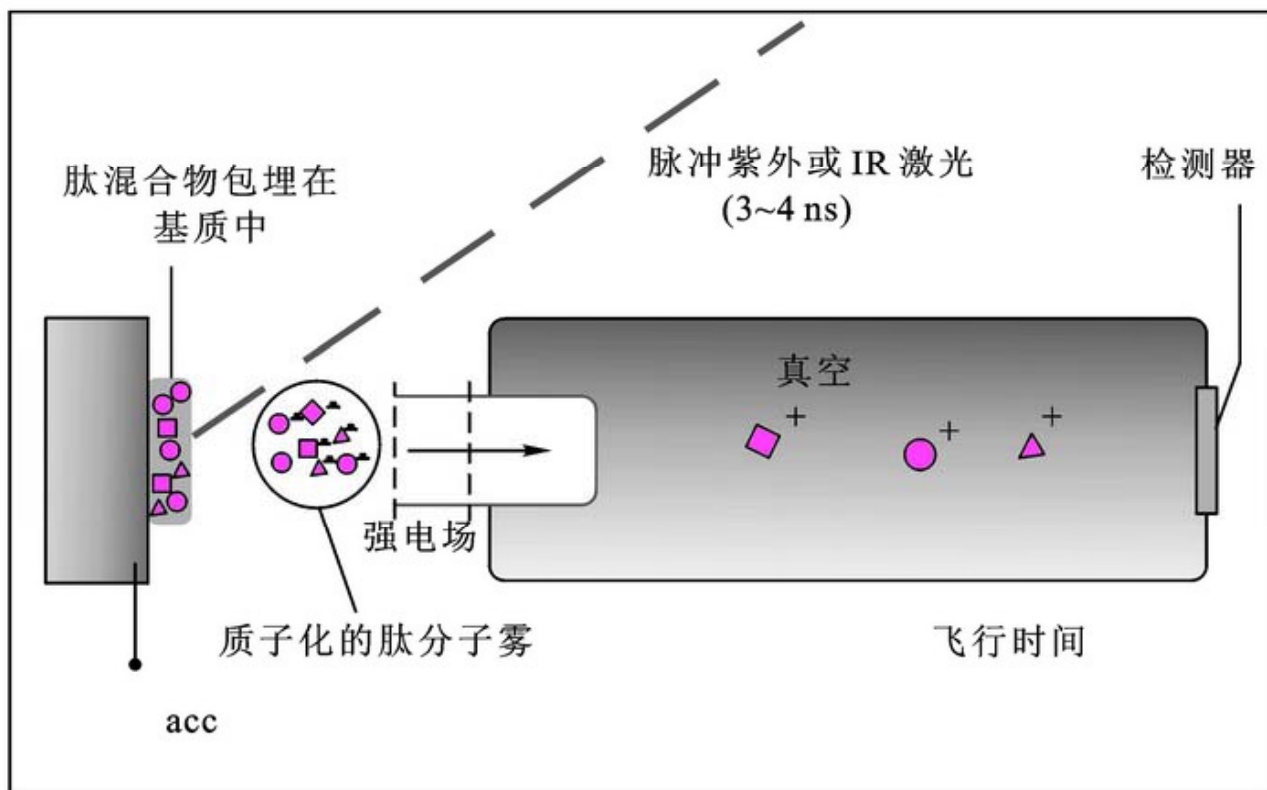
现行质谱仪主要有三个连续的组成部分，即离子源，离子分离区和检测器。

较常用的有基质辅助的激光解析电离-飞行时间质谱

（**Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight spectrometry, MALDI-TOF**）和电喷雾质谱（**Electrospray ionization, ESI-MS**）。

MALDI-TOF的工作原理

MALDI-TOF MS



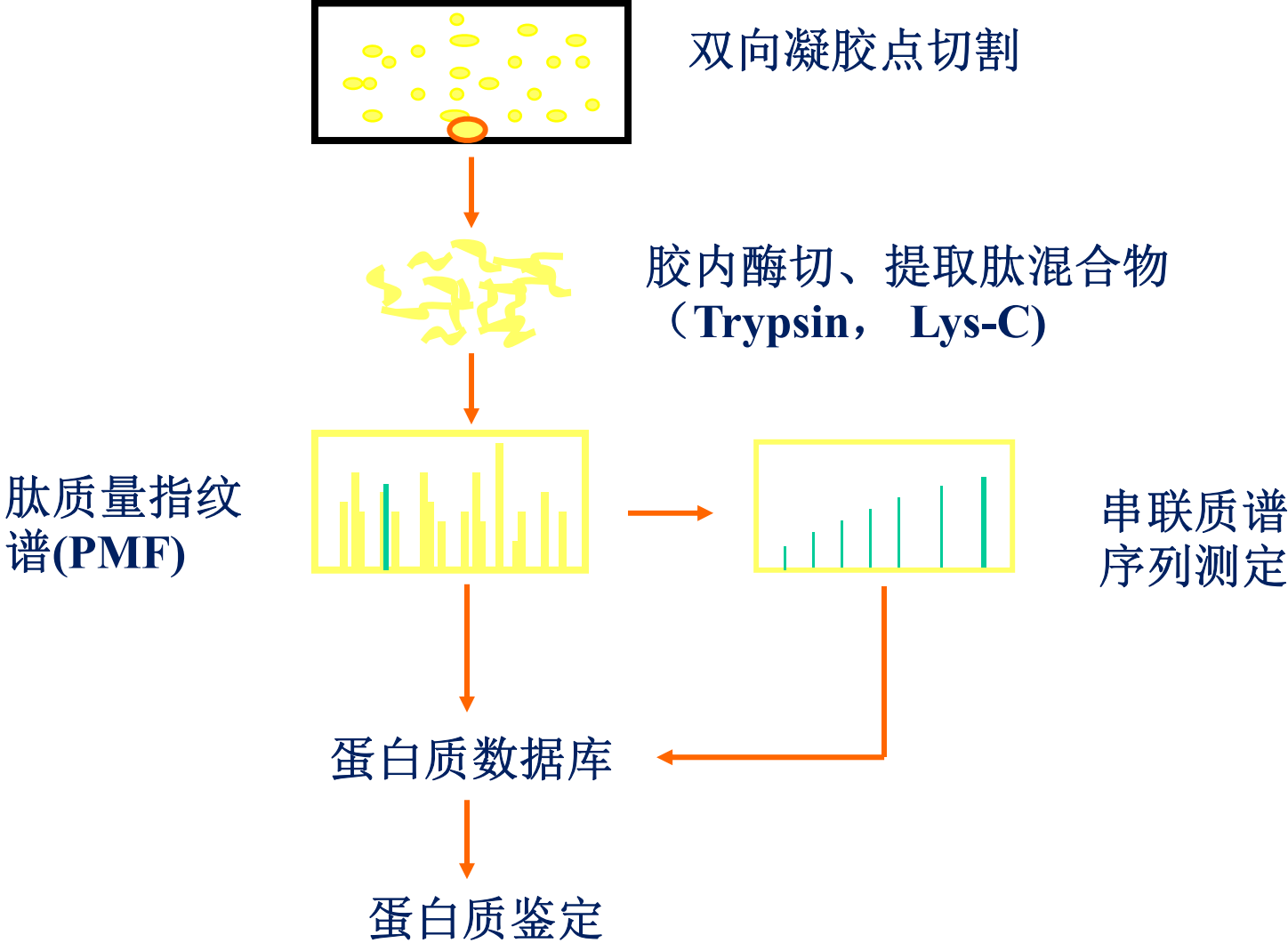
将蛋白质酶解成小肽段后与基质（主要是有机酸）混合，将样品混合物点到金属靶表面上并使之干燥结晶，然后用激光轰击，将呈离子化气体状态的待分析物从靶表面喷射出去。离子化气体肽段在电场中被加速后到达检测器的时间由肽段的质量和其所带电荷数的比值（ m/z ）决定。

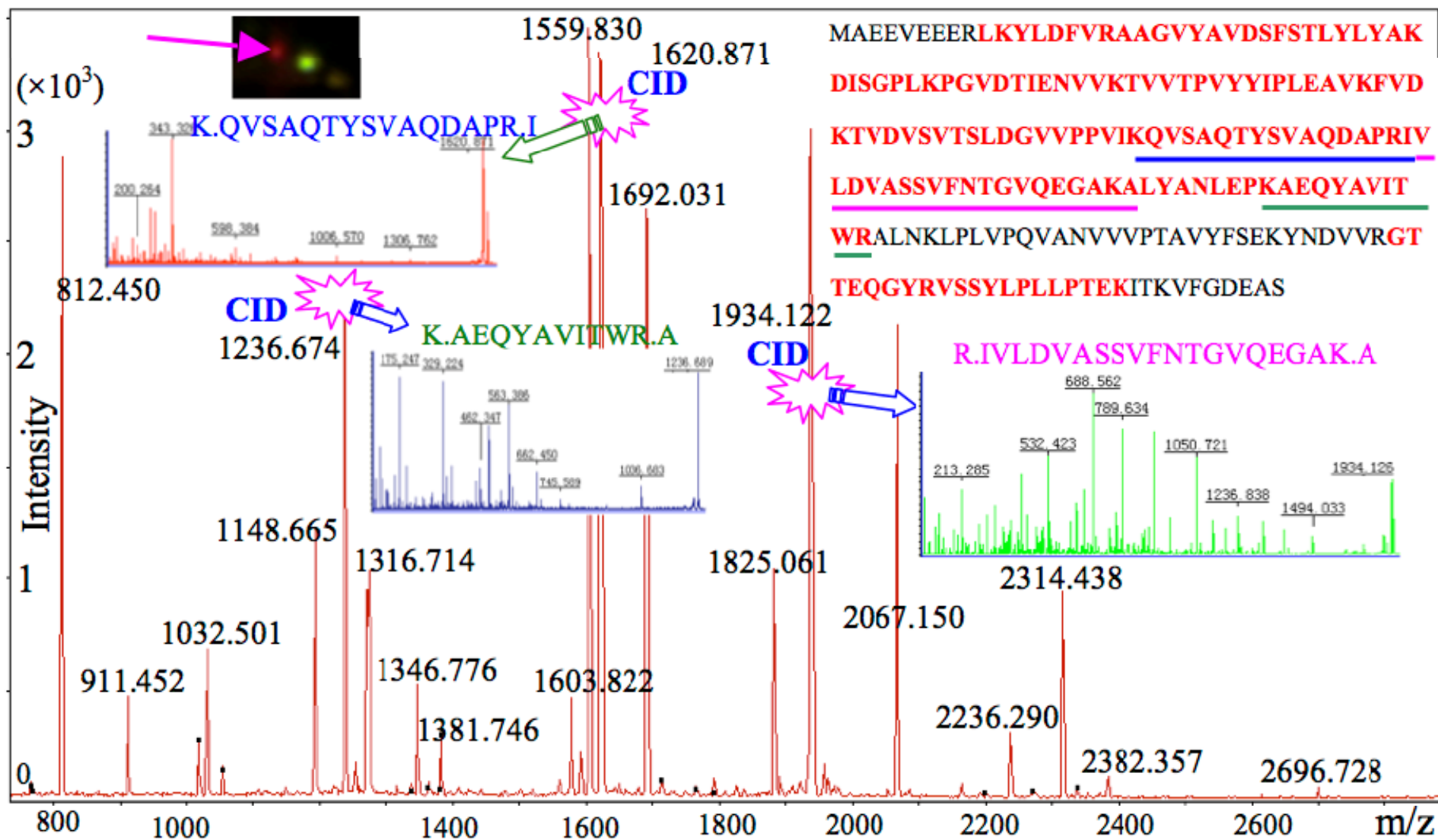
将感兴趣的蛋白点回收后，进行胰蛋白酶胶内酶解，收集酶解肽段。

一级质谱将经蛋白酶降解后的肽段按照质荷比（**m/z**）及强度（**intensity**）进行解析，形成肽指纹图谱（**PMF**），每个母离子峰代表一种肽段，其强度代表了肽段多少。

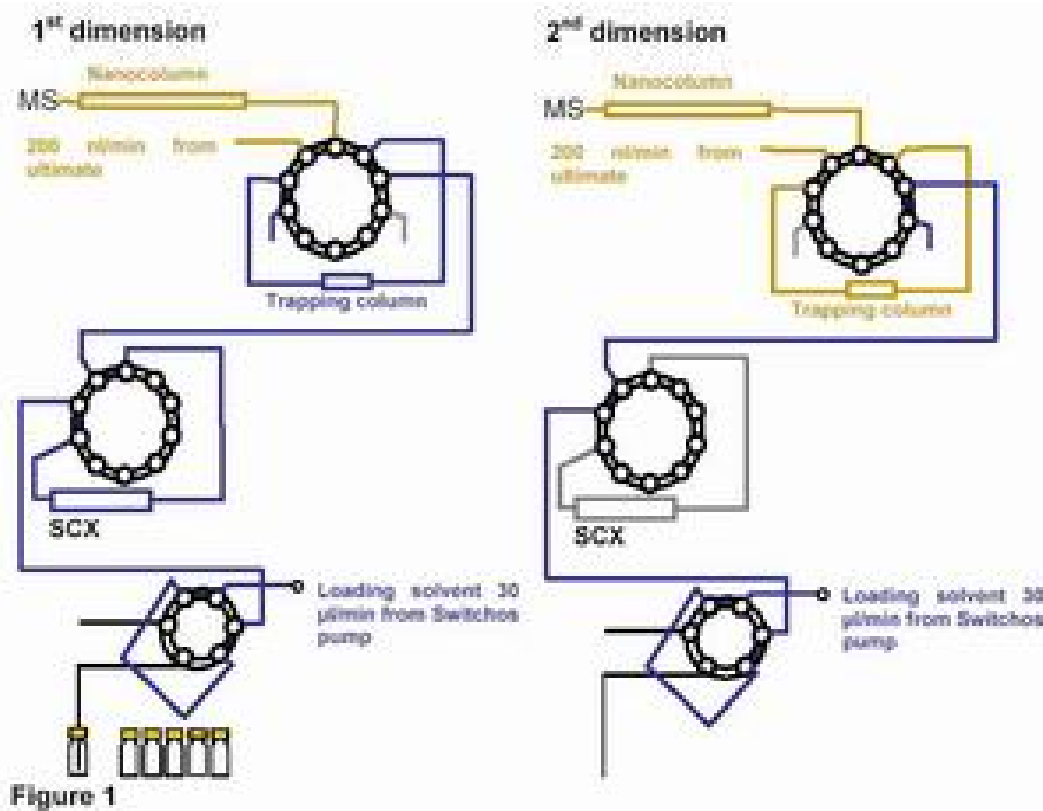
二级质谱是挑选一级质谱中有代表性的母离子峰以诱导碰撞解离（**collision-induced dissociation, CID**）方式打碎，形成肽段碎片指纹图谱（**PFF**）。然后，结合一级**PMF**和二级**PFF**数据，进行数据库搜索，获得蛋白质的具体鉴定信息。

胶内蛋白鉴定技术





二（多）维色谱质谱技术 (2DLC-MS/MS, MDLC-MS/MS)

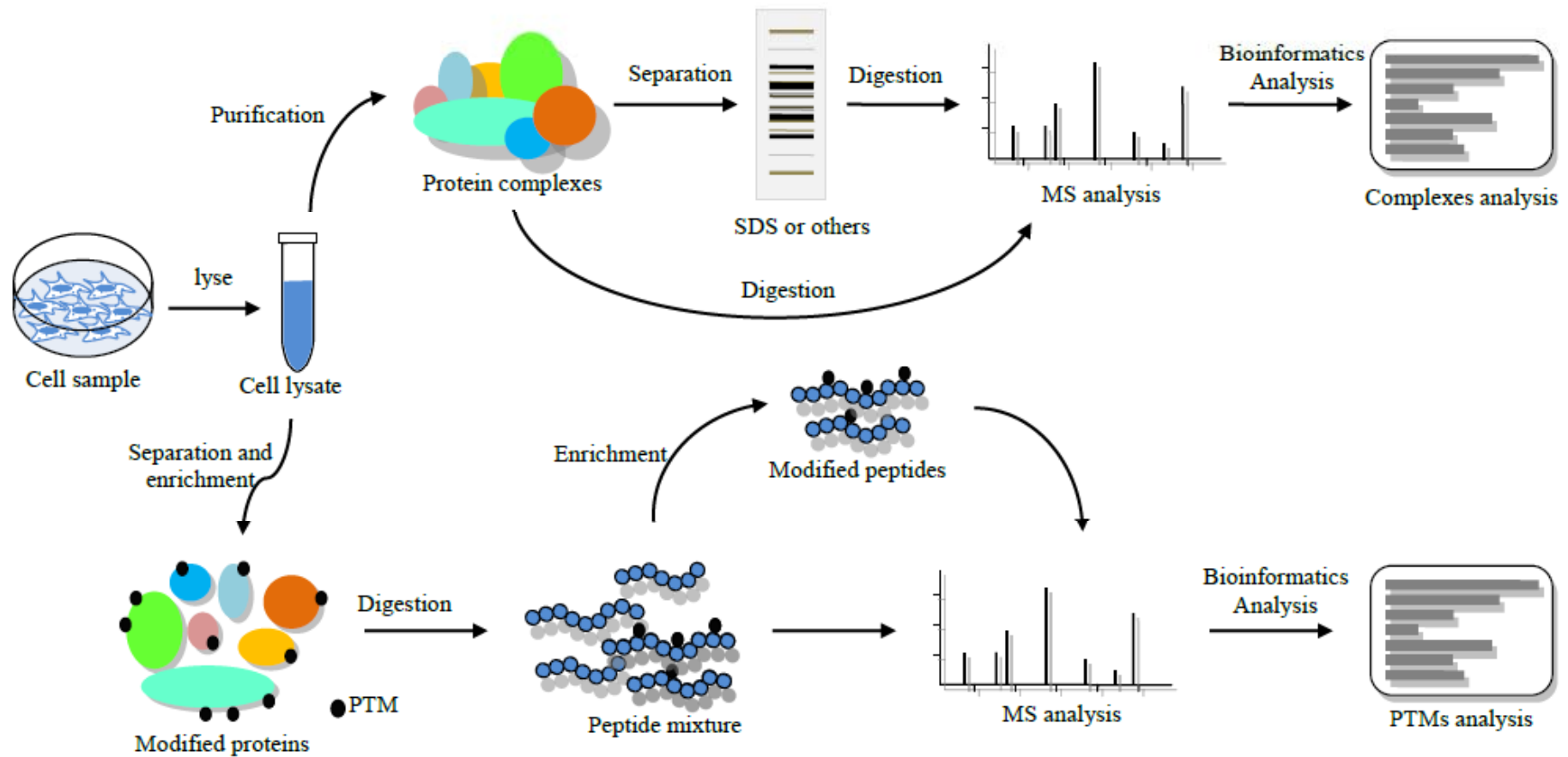


- 高通量;
- 可全自动化;
- 灵敏度较高;
- 基本无蛋白质偏好性;
- 适合功能蛋白质组学;
- 做比较蛋白质组学较难;
- 难以获得等电点;
- 仪器成本较高;
- 存在假阳性;

蛋白质翻译后修饰位点分析

1. 磷酸化— TiO_2 、IMAC 富集，特异性抗体
2. 泛素化— 样品富集有一定难度
3. 甲基化、乙酰化— 特异性抗体
4. 糖基化— 单个糖蛋白的N糖基化修饰的位点分析

蛋白质复合物及翻译后修饰分析策略



蛋白质组学热点研究

- (1). 基因组的诠释
- (2). 蛋白质表达与信号通路的研究
- (3). 蛋白质翻译后修饰与基因调控
- (4). 蛋白质结构、功能、定位及病理机制研究
- (5). 蛋白质-蛋白质相互作用与药物设计
- (6). 候选生物标志物发现与新药研发
- (7). 临床早期诊断和治疗及愈后评价
- (8). 疾病蛋白质组学与生物芯片

谢谢！