

蛋白质组学 (proteomics) 的相关技术及应用

(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室 北京昌平流字五号 102206)

摘要 当今分子生物学领域内,蛋白质组已成为研究的热点。基因组相对较稳定,而且各种细胞或生物体的基因组结构有许多基本相似的特征;蛋白质组是动态的,随内外界刺激而变化。对蛋白质组的研究可以使我们更容易接近对生命过程的认识。但同时为数千种(甚至更多)蛋白质特性的研究也提出了一个很大的技术挑战。双相凝胶电泳(2DE)、质谱技术、酵母双杂交技术以及生物信息学的发展在一定程度上解决了这一技术难题。本文拟对此类技术及其在各领域的应用作一简要介绍。

关键词 蛋白质组学;双相凝胶电泳(2DE);质谱;酵母双杂交技术;生物信息学;应用

1 概念及相关内容

蛋白质组(proteome)一词是由Wilkins等于1996年提出的,用来描述一个细胞、组织或有机体表达的所有蛋白质^[1,2]。蛋白质组学(proteomics)则是研究特定时间或特定条件下这些蛋白质表达情况的科学^[1,2]。

蛋白质组学从其研究目标方面可分为表达蛋白质组学和结构蛋白质组学。前者主要研究细胞或组织在不同条件如药物或疾病状态下蛋白质的表达和功能,这将有助于识别疾病特异蛋白、药物作用靶点、药物功效和毒性标记等^[3],目前蛋白质组学的研究在这方面开展的最为广泛,其运用技术主要依赖双相凝胶电泳(Two-dimensional gel electrophoresis, 2DE)技术以及图像分析系统,当对感兴趣的蛋白质进行分析时可能用到质谱。由于蛋白质发生修饰后其电泳特性将发生改变,这些技术可以直接测定蛋白质的含量,并有助于发现蛋白质翻译后的修饰,如糖基化和磷酸化等^[1]。

结构蛋白质组学的目标是识别蛋白质的结构并研究蛋白质间的相互作用。蛋白质之间的相互作用与控制细胞生长、复制等的代谢和信号通路有关,蛋白质之间相互作用的改变可能引起人类疾病,因此蛋白质之间的相互作用在识别新的药物干预靶点方面有很大的潜力^[4]。近年来,酵母双杂交系统是研究蛋白质相互作用时常用的方法,同时研究者也将此方法不断改进^[5]。有研究者最近发现在研究蛋白质相互作用时通过纯化蛋白复合物并用质谱进行识别是很有价值的^[1]。

2 目前蛋白质组学研究的相关技术

目前蛋白质组学研究在表达蛋白质组学方面研究的最为广泛,其分析通常有三个步骤:第一步,运用2DE技术分离样品中的蛋白质;第二步,应用质谱技术或N末端测序鉴定2DE分离的蛋白质;第三步,应用生物信息学技术存储、处理、比较获得的数据。现概述如下:

2.1 2DE 以及相关技术

2.1.1 2DE 原理

2DE在1975年出现,是一项广泛应用于分离细胞、组织、或其他生物样品中蛋白质混合物的技术。它根据蛋白质不同的特点分两相分离蛋白质。第一相是等电聚焦(IEF)电泳,根据蛋白质等电点的不同进行分离。蛋白质是两性分子,根据其周围环境pH可以带正电荷、负电荷或静电荷为零。等电点(pI)是蛋白质所带静电荷为零时的pH,周围pH小于其pI时,蛋白质带正电荷,大于其pI时蛋白质带负电荷。IEF时,蛋白质处于一个pH梯度中,在电场的作用下,蛋白质将移向其静电荷为零的点,静电荷为正的蛋白将移向负极,静电荷为负的将移向正极,直到到达其等电点,如果蛋白质在其等电点附近扩散,

收稿日期:

作者简介:邹清华(1975-)女(汉族),硕士研究生。电话:010-61739456 E-mail:zouqinghua2002@yahoo.com.cn

通讯作者:张建中 E-mail:helico99@sina.com

那么它将带上电荷重新移回等电点。这就是 IEF 的聚焦效应，它可以在等电点附近浓集蛋白，从而分离电荷差别极微的蛋白。

pH 梯度的形成最初是在一个细的包含两性电解质的聚丙烯酰胺凝胶管中进行。在电流的作用下，两性电解质可形成一个 pH 梯度。但由于两性电解质形成的 pH 梯度不稳定、易漂移、重复性差，80 年代以后，研究人员研制了固定 pH 梯度的胶条（IPG）。此种胶条的形成需要一些能与丙烯酰胺单体结合的分子，每个含有一种酸性或碱性缓冲基团。制作时，将一种含有不同酸性基团的此分子溶液和一种含有不同碱性基团的此分子溶液混合，两种溶液中均含有丙烯酰胺单体和催化剂，不同分子的浓度决定 pH 的范围。聚合时丙烯酰胺成分与双丙烯酰胺聚合形成聚丙烯酰胺凝胶。

第二相是 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，根据蛋白质的分子量不同进行分离。此相是在包含 SDS 的聚丙烯酰胺凝胶中进行。SDS 是一种阴离子去污剂，它能缠绕在多肽骨架上使蛋白质带负电，所带电荷与蛋白质的分子量成正比，在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中蛋白质分子量的对数与它在胶中移动的距离基本成线性关系。SDS-PAGE 装置有水平和垂直两种形式，垂直装置可同时跑多块胶，如 Amersham pharmacia Biotech 的 Ettan DALT II 系统可同时跑 12 块胶，提高了操作的平行性。

经过 2DE 以后，二维平面上每一个点一般代表了一种蛋白，这样成千种不同的蛋白即可被分离，有关蛋白质的等电点、分子量及每种蛋白的数量信息也可以得到。

2.1.2 检测技术

蛋白质组学分析对 2DE 后的染色技术要求很高，除了标准的敏感性要求外，还要求染色技术的线性和均一性^[6]。目前有多种染色方法，如考马斯亮蓝染色、银染色、及荧光染色等。银染比考马斯亮蓝染色灵敏度高，已有学者对这两种方法进行了比较，如 PhillipCash 等在检测肺炎链球菌红霉素敏感株和抵抗株表达的蛋白时，用考马斯亮蓝 G-250 染色，发现了 200 多种蛋白，PI 4-7，分子量 15000-110000，在相同的 PI 和分子量范围下用银染检测到 360 多种蛋白^[7]。但是银染的线性效果并不是很好，并且对质谱分析干扰大。考马斯亮蓝染色线性、均一性较高，对质谱干扰较小，但其敏感性较低。较理想的是荧光染色，Thierry Rabilloud 等比较了两种荧光剂 RuBps 和 Sypro Ruby 的效果，发现其敏感性、线性都很好，对质谱干扰小^[6]，但其成本较高。实验时，可以根据不同的目的选用不同的方法。

2.1.3 分析技术

2DE 图像所产生的大量蛋白质点是单纯用肉眼分析无法完成。目前有多种图像分析软件可用于胶的图像分析，如 Melaniell (BioRad)，PD Quest (BioRad)，Phoretix 2D Full，又称 2D Image Master Elite (Amersham Pharmacia Biotech) 等，这些软件可以完成蛋白质点的识别、匹配等，具有很强的分析功能，但其缺点是需要很多的图像手工校对，一般分析一个图像需要 8-10h。

2.1.4 评价

2DE 是目前唯一的一种能溶解大量蛋白质并进行定量的方法，具有高通量、重复性好、敏感性较高等优点^[8]。它能同时分离和定量数千种甚至上万种蛋白^[9]。它的分辨率极高，等电聚焦相可以区分 PI 相差 0.1 的蛋白质，SDS-PAGE 相可以区分分子量相差 1kD 的蛋白质^[9]。

其缺点是由于蛋白表达水平的差异较大，一些低丰度的蛋白不易检测^[8,10]。另外某些基因的表达产物在 2D 胶中呈多点或不同基因的表达产物共点，使 2D 胶数据的比较、定量更加复杂^[8]。2DE 分离的蛋白数量受诸多因素影响，疏水性的膜蛋白（往往是药物设计最好的靶点）很难用此法分离，同时染色技术的灵敏度和线性范围不足以呈现所有分离的蛋白质。目前，人们采用多种方法来减少这些缺点，如通过增加上样量分离低丰度蛋白，应用窄范围固定 pH 梯度胶条、蛋白层析等技术提高分离的蛋白数目，应用荧光染色提高检测灵敏度等。

2.2 质谱技术

2.2.1 原理

对 2DE 所产生的上千个蛋白用传统的方法如 Edman 降解法等进行分析将是一个很艰巨的任务。质谱技术的发展解决了这一难题。它需要三个步骤，首先通过离子化装置将分子转化为气态离子，接着通过质谱分析器按照质荷比 (m/z) 的不同进行分离，最后转化到离子

检测装置^[4]。目前,用来分析蛋白质和肽的样品离子化技术主要包括基质辅助激光解吸离子化质谱(MALDI)和电子喷射离子化质谱(ESI)。MALDI通常与飞行时间质谱(TOF)相结合。TOF主要用来测量分析物飞过固定的路径所需的时间。另一种鉴别蛋白质的方法是串联质谱(MS/MS)。在这种情况下,经质谱分析的肽段进一步断裂并再次进行质谱分析,这样可得到肽序列的部分信息。

2.2.2 评价

质谱技术能清楚地鉴定蛋白质并能准确地测量肽和蛋白质的分子量、氨基酸序列及翻译后的修饰。目前MS/MS是唯一能够迅速测序N末端封闭或共价修饰肽段的方法^[11]。质谱技术很灵活,能与多种蛋白分离、捕获技术联用,对普通的缓冲液成分相对耐受^[11],能快速鉴定大量蛋白质点,而且很灵敏^[10],在一些情况下,仅需 10-15 fmol的蛋白^[10,12,9],这在只能得到极少量蛋白的情况下鉴别蛋白是很有用的。在实际工作中可将几种技术结合应用,如串联质谱与Edman微测序技术相结合^[11],MALDI质谱与纳米电子喷射质谱相结合^[22],这些技术相互互补,为分析2DE所分离的大量蛋白质提供了有效的手段。

质谱技术是一项强大的分离分析技术,但它只能分离气体状态的带电分子,而且,一次只能分析带正电或带负电的分析物。质谱分析很难区分两种同源性极高的蛋白。由于质谱分析只是描述蛋白的少量多肽,因此可能把删节的蛋白当成是原来的蛋白。通常只适用于象酵母等基因组序列已知的个体。

2.3 酵母双杂交系统

酵母双杂交系统的建立得力于对真核生物调控转录起始过程的认识。细胞起始基因转录需要有反式转录激活因子的参与。转录激活因子在结构上是组件式的(modular),即这些因子往往由两个或两个以上相互独立的结构域构成,其中有DNA结合结构域(DNA binding domain, 简称为DB)和转录激活结构域(activation domain, 简称为AD),它们是转录激活因子发挥功能所必需的。单独的DB虽然能和启动子结合,但是不能激活转录,而不同转录激活因子的DB和AD形成的杂合蛋白具有激活转录的功能。DB与AB分别能与多肽X和Y结合,由DB和AD形成的融合蛋白现在一般分别称之为“诱饵”(bait)和“猎物”或靶蛋白(preym or target protein)。如果在X和Y之间存在相互作用,那么分别位于这两个融合蛋白上的DB和AD就能形成有活性的转录激活因子,从而激活相应基因的转录与表达。这个被激活的、能显示“诱饵”和“猎物”相互作用的基因称之为报道基因(reporter gene)。通过对报道基因表达产物的检测,反过来可判别作为“诱饵”和“猎物”的两个蛋白质之间是否存在相互作用^[14]。用酵母双杂交系统检测蛋白质之间的相互作用通常会存在假阳性或假阴性的问题,已有许多学者对此系统进行了改进,并且将其扩展到检测DNA-蛋白质, RNA-蛋白质,小分子-蛋白质之间的相互作用上^[15]。

2.4 生物信息学分析

分子生物学的发展把生命活动的物质基础追溯到核酸和蛋白质两大类生物大分子,它们构成了生物数据的主要部分。关于这些生物大分子的结构、相互作用和功能的研究,也产生着大量数据。生物信息学是在计算机和网络大发展、各种生物数据迅猛增长的形势下组织数据并从数据中提取生物学新知识的一门科学^[16]。目前生物信息学已广泛渗透到各个领域,例如2DE及质谱分析后对蛋白质描述的一种方法是肽质量指纹图谱,这种方法需要精确地确定多肽经过蛋白酶消化后少数几个肽的分子量,然后搜索Genebank、PIR蛋白质数据库、SWISS-PROT Database及EMBL(TrEMBL)等数据库。下面对几种重要的蛋白质序列数据库进行大体介绍:

SWISS-PROT是对数据人工审读很严格的库。可以说,只有实际存在的蛋白质才被收入。每一条数据都有详细注释,包括功能、结构域、翻译后的修饰等,以及齐全的引文和到许多其他数据库的链接。一般说,任何蛋白质序列数据的搜寻和比较都应当从SWISS-PROT开始。其网址是:<http://www.expasy.ch/sprot/>

TrEMBL是从EMBL库中的核酸序列翻译出来的氨基酸序列,已经完成了自动注释。它又分成两部分:SP-TrEMBL的条目已由专家人工分类并且赋予了SWISS-PROT库的索取号,但还没有通过人工审读被最终收入SWISS-PROT;REM-TrEMBL包含由于某种原因还没有被收入SWISS-PROT的条目。其网址是:[ftp://ftp.ebi.ac.uk\(/pub/databases/tremble/\)](ftp://ftp.ebi.ac.uk(/pub/databases/tremble/))如果想取得SWISS-PROT和TrEMBL中全部条目的清单,可访问:<http://www.expasy.ch/sprot/sprot-retrieve-list.html>

PIR是蛋白质信息资源 (Protein Information Resource) 的缩写。这是一个国际蛋白质序列数据库, 它包含所有序列已知的自然界中野生型蛋白质的信息。此库主要目的是提供按同源性和分类学组织的综合的非冗余的数据库。其网址是: <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/> ^[16]

此外, 网上还有许多关于 2DE 二维胶的数据库, 如:

Caulobacter Crescentus: <http://www.pans.org> ;

Wormpepdatabase: <http://www.proteome.com/database>;

Yeast protein database: <http://www.proteome.com/YPDhome.html/> 等。

3 蛋白质组学的应用

3.1 蛋白质组学在原核生物、真核生物以及多细胞生物体研究中的应用

3.1.1 蛋白质组学在细菌研究中的应用

蛋白质组学方法已广泛用于研究细菌在外界环境变化时其表达蛋白的变化情况。如对霍乱弧菌^[17]以及大肠杆菌^[18]在不同酸碱条件下蛋白表达的变化的研究, 表明这些病原菌会随环境的改变而调节蛋白表达以使其达到最大的致病能力。离子是细菌生存和生长所需的一个重要成分, 离子缺少时会促进细菌铁载体合成增加或产生多种毒力因子, 有学者用蛋白质组学方法研究了霍乱弧菌在Fur基因调节下蛋白表达的改变^[19], 进一步分析了其机制。

蛋白质组学可以与基因组学互补, 它能识别某些基因的预测产物, 尤其是膜蛋白, 这些膜蛋白往往是疫苗的有效成分, 如Deb N. Chakravarti 等研究了Hp疫苗的相关组分^[20], 加速了疫苗的开发。

蛋白组学研究也应用在细胞周期研究中, 如Bjorn等对柄细菌Caulobacter crescentus生长周期蛋白图谱比较, 发现一个细胞周期中有 48 种蛋白降解, 同时有 26 种生成^[21]。细菌在繁殖周期的每个阶段合成大量蛋白, 表明周期性的蛋白表达有助于细菌充分利用能源, 保持合适的细菌数量, 对机体产生一定的作用。这种对细菌细胞周期调控蛋白表达和降解的研究有助于抗感染措施的制定。

对细菌某些特异抗原的识别可以为一些疾病提供诊断标记。Ronald 等应用 2DE、Western blot以及串联质谱分离并鉴别了结核杆菌的一种Mtb81 蛋白, 通过酶联免疫吸附试验 27 例HIV阳性的结核病患者中 25 例相应抗体阳性, 在 67 例HIV阴性的结核病患者中 38 例此抗体阳性, 而在 11 例仅HIV阳性的患者中无反应, 因此, Mtb81 蛋白有望成为血清学诊断结核尤其是同时感染HIV的患者的有效抗原^[9]。

3.1.2 蛋白质组学在真核生物研究中的应用

蛋白质组学研究已广泛应用于真核生物的研究中。Michel Perrot等用 2DE及质谱、免疫杂交、微量测序等方法分离和鉴定了酿酒酵母的 401 种蛋白, 309 种以前曾报道过, 剩余的 92 种是新发现的, 从而拓展了酵母参考图谱, 为研究细胞功能、酵母翻译因子靶点提供了条件^[10]。

3.1.3 蛋白质组学研究在多细胞生物体研究中的应用

克氏病 (Caenorhabditis elegans) 线虫是第一个基因被完全测序的多细胞生物体。它是基因组学研究中的一个重要的典型, 因为人类的同源基因可以在这种生物中鉴别。与基因组不同, 蛋白质组在不同的条件下有变化, 要了解基因的功能, 除了了解其序列, 也要了解实际表达的蛋白量。Sabine P.Schrimpf等用蛋白组学方法研究了克氏病线虫的蛋白图谱, 大部分鉴定的已知细胞功能的蛋白与碳水化合物及脂类代谢有关, 或是在胞质、线粒体、细胞骨架等亚细胞定位的结构蛋白^[22]。

3.2 蛋白质组学在植物研究中的应用

植物蛋白质组学虽然刚刚起步, 但它的发展将对植物界有很大的冲击。H型硫氧还蛋白能减少靶蛋白的二硫键, 促使种子发芽。为了更好地了解硫氧还蛋白在种子中的作用, 应先了解其作用的靶蛋白。Hiroyuki Yano等运用蛋白组学方法分离了 20 多种靶蛋白, 并鉴定了其中的 5 种, 其中 3 种是变态反应原, 2 种与落叶及种子成熟有关^[23]。海松是欧洲西南部最重要的松树品种, 当树木因风、雪等原因引起树干垂直方向发生变化时, 树的底部会产生压缩木(compression wood, CW)以使树重新回到垂直方向。与CW相关的细胞壁结构和化学改变是引起木质和纤维制品缺陷的主要原因。Christophe Plomion等用 2DE方法研究了正常木与压缩木反应蛋白的区别, 为及早发现CW并采取预防措施提供了诊断标记^[24]。

3.3 蛋白质组学方法在动物模型中的应用

Michael Fountoulakis等研究了新生小鼠和成年小鼠脑组织中蛋白的变化。发现随年龄变化最大的是a-胎蛋白，它只在新生小鼠脑中有。22种蛋白，包括二氢嘧啶酶相关蛋白1, 3, 4及14-3-3蛋白，在新生小鼠脑中含量高，而28种蛋白，包括二氢嘧啶相关蛋白-2、动力蛋白-1及其他一些酶在成年小鼠脑中含量高。这些研究对研究神经系统紊乱性疾病如Down氏综合征、Alzheimer疾病、精神分裂症及缺血、焦虑等将有重大意义^[25]。由于人类疟疾的寄生虫疟原虫的生命周期必须在生物体内完成，这增加了实验室研究的难度。目前已有学者成功地建立了疟疾的啮齿动物模型，Laurence Florens等应用动物模型分离了不同生长阶段的疟原虫，并对不同阶段的蛋白质组进行了分析，为发现新的抗疟疾疫苗或药物提供了依据^[26]。

3.4 蛋白质组学与肿瘤研究

肿瘤涉及到控制正常细胞增殖机制的破坏。对原癌基因的鉴定和描述已通过分子生物学方法完成。然而有些基因并不是自己单独作用，也不是典型地破坏正常细胞增殖机制。用传统的生物化学方法、基因、药理学方法都不能分析。蛋白质组学技术可以比较正常组织与癌组织的变化，这种肿瘤相关的变化可以为医疗干预提供新的标记和位点。Martin J. Page等用蛋白质组学技术分离和研究了乳腺癌相关蛋白^[27]。对肿瘤抗原或与其相关抗体的分离和鉴定给肿瘤的早期诊断和治疗提供了一种新的方案。Franck M. Brichery等运用蛋白质组学方法研究了肺癌组织中引起体液免疫应答的蛋白及自身抗体。他们所研究的肺癌病人中多于一半的人血清中有针对Annexin I或/和II的IgG1和IgM自身抗体，Annexin II自身抗体仅在肺癌病人血清中出现，而Annexin I自身抗体也在其他类型病人血清中出现。这些研究有助于推动针对肿瘤中某种蛋白的自身抗体的发展^[28]。Shugo Nawata等用2DE及免疫杂交法研究了鳞状细胞癌肿瘤组织抗原-1、抗原-2，发现了鳞状细胞癌抗原新的酸性蛋白，有助于开发一种检测此蛋白的系统，为鉴别诊断提供依据^[29]。

3.5 蛋白质组学与药物研发

蛋白质组学最大的应用前景在药物研发领域。对细胞、组织、体液中蛋白质的研究在药物研发中有重要作用。蛋白质组学不但能证实已有的药物靶点进一步阐明药物作用的机制，并能发现新的药物作用位点，还可用来分析分子信号传播过程的应答和调节^[30]。

4 展望

目前有约60种微生物的全基因组序列已经测出，DNA序列信息仅提供了细胞运用其基因的所有可能方式的一种静态瞬间快照，蛋白质组学则研究基因编码的活动怎样发生和什么时候发生(如蛋白翻译)，以及非基因编码的活动之间的关系(如蛋白质翻译后的修饰或蛋白质、核酸、脂类、糖类之间的相互作用)。因为实际蛋白数量反映了翻译的能力和效率、翻译后的修饰和每个蛋白的转化比率，蛋白质组学分析给基因表达最终产物的研究提供了信息。因此它是对翻译水平研究的一种补充，是全面了解基因组表达必不可少的一种手段，它的发展将给分子生物学领域带来革命性变化。

参考文献：

1. Walter P., Blackstock, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Tibtech*, March, 1999, 17:121-127.
2. Klaas J. van Wijk. Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology*, June, 2001, 126: 501-508
3. Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Current Opinion in Biology*, 2000, 11:408-412.
4. Figey D, McBroom LD, Moran MF. Mass Spectry for the Study of Protein-Protein Interactions. *Methods*, 2001, 24: 230-239
5. Cenciarelli C, Chiaur DS, Guardavaccaro D, et al. Identification of a family of human F-box proteins. *Current Biology* 1999, 9:1177-1179.
6. Rabilloud T, Strub JM, Luche S, et al. A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris(bathophanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 2001, 1: 699-704
7. Cash P, Argo E, Ford L, et al. A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis* 1999, 20: 2259-2268
8. Gygi SP., Corthals GL, Zhang Y, et al. Evaluation of two-dimensional electrophoresis-based proteome analysis technology. *PNAS*, August 15, 2000, 97(17): 9390-9395.
9. Hendrickson RC, Douglass JF, Reynolds LD, et al. Mass spectrometric identification of Mtb82, a

- novel serological marker for Tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, June 2000, 2354-2361
10. Perrot M, Saglicocco F, Mini T, et al. Two-dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae*(update 1999). *Electrophoresis*, August;1999 ,20(11):2280-98.
 11. Hall SC, Smith DM, Masiarz FR, et al. Mass spectrometric and Edman sequencing of lipocortin I isolated by two-dimensional SDS/PAGE of human melanoma lysates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. March1993 ,1;90(5):1927-1931
 12. Clauser KR, Hall SC, Smith DM, et al. Rapid mass spectrometric peptide sequencing and mass mathing for characterization of human melanoma proteins isolated by two-dimensional PAGE. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 1995, 23;92(11):5072-5076.
 13. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejniko AV, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* December 1996, 93:14440-1445,
 14. Legrain P, Selig L. Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS letters* 2000, 480:32-36.
 15. Vidal M , Legrain P. Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucleic Acids Research*, 1999,.,27(4): 919-929
 16. 郝柏林 , 张淑誉. *生物信息学手册*. 上海:上海科学技术出版社, 2000. 1, 128
 17. Hommais F, Winter CL, Labas V, et al. Effect of mild acid pH on the functioning of bacterial membranes in *Vibrio cholerae*. *Proteomics* , 2002, 2:571-579
 18. Blankenhorn D, phillips J, Slonczewski JL. Acid-and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of bacteriology*, Apral. 1999, 2209-2216.
 19. Litwin CM, Calserswood SB. Analysis of the complexity of gene regulation by Fur in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*, January. 1994, 240-248.
 20. Chakravarti DN, Fiske MJ, Fletcher LD, et al. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. *Vaccine* , 2001, 19: 601-602.
 21. Grunenfelder B, Rummel G, VohradskyJ, et al. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *PNAS*, 2001, 98(8):4681-4686.
 22. Schrimpf SP, Langen H, Gomes AV, et al. A two-dimensional protein map of *Caenorhabditis elegans*. *Electrophoresis*, 2001, 22:1224-1232.
 23. Yano H, WongJH, Lee M, et al. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. April 2001, 10;98(8):4794-4799.
 24. Plomion C, Pionneau C, Brach J, et al. Compression Wood-Responsive Proteins in Developing Xylem of Maritime Pine. *Plant Physiol* , 2000; 123 (3): 959-970.
 25. Fountoulakis M, Hardmaier R, Schuller E, et al. Differences in protein level between neonatal and adult brain. *Electrophoresis* 2000, 21: 673-678
 26. Florens L,. Washburn MP, Raine JD, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*. October 2002, 3;419 (6906):520-6.
 27. Page MJ, Amess B, Toensend RR, et al. Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from redu ction mammoplasties. *PNAS*,1999, 96 (22):12589-12594.
 28. Brichory FM,., MisekDE, Yim AM, et al. An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98 (17):9824-9829.
 29. Nawata S, Murakami A, Hirabayashi K, et al. Identification of squamous cell carcinoma antigen-2 in tumor tissue by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1999, 20: 614-617.
 30. Cutler P, Birrell H, Haran M, et al. Proteomics in pharmaceutical research and development. *Biochemical Society Transactions* ,1999, 27, part 4.

Techniques of proteomics and their applications

(Diagnosis department of Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention NO.5, chang ping liu zi , Beijing 102206)

Abstract To date, proteomics has caused much interest in molecular biology. The genome of an organism is relatively stable, and there are many similarities between the genome of different cells or organisms. However, the proteome of an organism is dynamic. It changes with the intro and outer stimulus. The study on proteomics can make us easily know how the vital

process goes. But how to deal with thousands of (or even more) proteins at a time gives us a great challenge on techniques. The development of two-dimensional electrophoresis (2DE), mass spectrometry, Yeast two-hybrid system and bioinformatics has resolved the problem in some degree. This article will introduce these techniques and their applications in molecular biology.

Key words Proteomics; two-dimensional electrophoresis(2DE); mass spectrometry; yeast two-hybrid system; bioinformatics; applications

生物技术通讯 volume 14 Number 3, May 2003