



军事医学科学院蛋白质组学研究进展

军事医学科学院

收稿日期: 2011-07-20; 接受日期: 2011-08-27

国家科技攻关项目(批准号: 2002BA711A11)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2001CB510200, 2004CB520800, 2005CB522904, 2006CB910800 和 2011CB504900)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02A308, 2006AA02A310 和 2006AA02A312)、国家科技合作计划(批准号: 2004BA711A18 和 2008GR0763)、国家自然科学基金(批准号: 30321003, 30621063 和 20735005)和北京市科技计划重大项目(批准号: H030230280190)资助

doi: 10.1360/052011-644

摘要 蛋白质组学是后基因组时代生命科学研究的热点和前沿领域. 军事医学科学院是国内最早开展蛋白质组研究的单位之一, 其蛋白质组学研究的发展不仅对中国蛋白质组研究起到重要的引领作用, 也对国际蛋白质组学的发展做出了重要贡献. 本文将重点介绍军事医学科学院的科学家在国际人类肝脏蛋白质组计划以及疾病蛋白质组、病原微生物蛋白质组等领域的研究成果.

关键词

蛋白质组学
人类肝脏
表达谱
肝病
蛋白质相互作用
血清多肽
病原微生物

人类基因组计划是 20 世纪的三大重大科学计划之一. 随着该计划的实施与全面完成, 生命科学进入了功能基因组时代. 蛋白质是基因功能的执行体, 蛋白质组学是从整体水平上研究生物体蛋白质组成及其变化规律的科学. 由于蛋白质组学为全面揭示重大疾病发生发展的分子机制和生物体复杂生理生化功能的分子基础提供了全新的思路 and 策略, 所以蛋白质组学在 1995 年在国际上首次报道, 便迅速成为生命科学研究的热点和前沿.

与基因组的研究相比, 由于生物体蛋白质组成的高度复杂性和时空变化特性, 蛋白质组学研究无论从研究思路还是从技术层面上都存在巨大的挑战.

军事医学科学院是国内最早开展蛋白质组研究的单位之一. 军事医学科学院蛋白质组学研究的发展不仅对中国蛋白质组研究起到重要的引领作用, 也对国际蛋白质组学的发展做出了重要贡献.

人类蛋白质组组织(human proteome organisation, HUPO)成立于 2001 年, 并在 2002 年的首届人类蛋白质组大会上启动了国际人类蛋白质组示范计划

(human proteome initiative, HPI). 在先后启动的 10 多个国际性蛋白质组计划中, 由贺福初院士倡导并领衔的国际人类肝脏蛋白质组计划(human liver proteome project, HLPP)是最早启动的计划之一, 也是首个人类组织器官的蛋白质组计划. 这是中国科研工作者在生命科学领域领导的第一个大型国际科技合作计划, 建立了蛋白质组研究框架、模式和标准, 是 HPI 各分计划中成就最为显著的核心计划, 为国际人类蛋白质组计划(human proteome project, HPP)的全面展开和顺利实施发挥了普遍的示范和指导作用. 国际组织以及数位诺贝尔奖得主对中国在 HPI 计划中的贡献予以了充分肯定, *Nature*^[1], *Nature Biotechnology*^[2]和 *Science*^[3]等杂志也先后对此进行了广泛的报道(图 1), 国际核心刊物 *Proteomics* 和 *Journal of Proteome Research* 杂志相继出版了中国蛋白质组研究的专刊, 系统介绍中国科学家的工作和成就.

在牵头 HLPP 计划的同时, 军事医学科学院科学家还广泛参与了 HPI 的其他项目, 如血浆蛋白质组、



图1 中国领导人类肝脏蛋白质组研究计划(Nature, 2003, 425: 441)

疾病标志物、蛋白质组标准化、脑蛋白质组、疾病糖组学和抗体计划等项目。为了应对突发和重大传染病，军事医学科学院科学家还开展了重要致病微生物的蛋白质组研究。一批与重大疾病和重要生物功能相关的蛋白质组研究取得重要进展。国际蛋白质组学顶级刊物 *Molecular & Cellular Proteomics* 曾经单期刊发表军事医学科学院科学家的 3 篇文章，2009 年 HUPPO 组织测评了国际上 27 个代表性实验室的蛋白质鉴定技术，发现其中只有 6 个实验室得到完全正确的实验结果，而军事医学科学院作为国内唯一参与的实验室即在“六甲”之列，表明中国蛋白质组学的技术实力进入国际领先行列。

1 军事医学科学院研究情况

1.1 蛋白质组研究技术体系的创建

1995~1998 年，国际蛋白质组学属于草创阶段，技术水平基本处于小作坊阶段，而国内蛋白质组研究属于空白，没有相应的技术和人才。为了抓住机遇，赶超国际，军事医学科学院科学家迅速组织了一支多学科交叉的队伍，白手起家，迅速建立起蛋白质组研究技术体系并向全国推广。发表了国内最早的蛋

白质组研究系列论文，申报了国内最早的蛋白质组技术发明专利，出版了国内第一部系统介绍蛋白质组理论与方法的专著和译著，并多次印刷^[4,5]，为蛋白质组研究在中国的兴起和蓬勃发展起到了重要的推动作用。

在此基础上，针对现有蛋白质组关键技术分辨率、灵敏度、通量和生物信息学算法方面的严重不足，为了突破国际上本领域的技术瓶颈，自主研发了系列新技术、新方法和新软件。建立了化学修饰结合生物质谱鉴定的蛋白质/多肽富集、分离与鉴定的新技术、新方法，可使生物样本的复杂程度降低 60%，蛋白质鉴定的可靠程度提高 50%(图 2)。发展了系列基于新型纳米材料结合生物质谱的修饰蛋白质组富集、分离与鉴定的新技术、新方法。其中基于金属离子螯合富集与生物质谱鉴定的磷酸化蛋白质在线分析技术，为磷酸化蛋白质组的高通量在线富集与鉴定提供了新思路。发展了基于化学和同位素标记的定量蛋白质组研究新技术和新方法，避免了现有技术方法的不足，灵敏度达到飞摩尔。发展了基于质谱多反应监测技术的蛋白质定量验证技术，可以实现从差异蛋白质组筛选到定量确证的全方位分析。在生物信息学方面，系统建立了质谱蛋白质鉴定的质量控制体系，包括多元贝叶斯非参统计模型，可以同

时估计出假阳性率和假阴性率, 比经验方法多得到 10%~40% 的高可靠肽段, 有效地提升了蛋白质鉴定

结果的可靠性和数据的标准化水平(图 3). 进行了蛋白质定量相关研究, 探索利用质谱数据进行新蛋

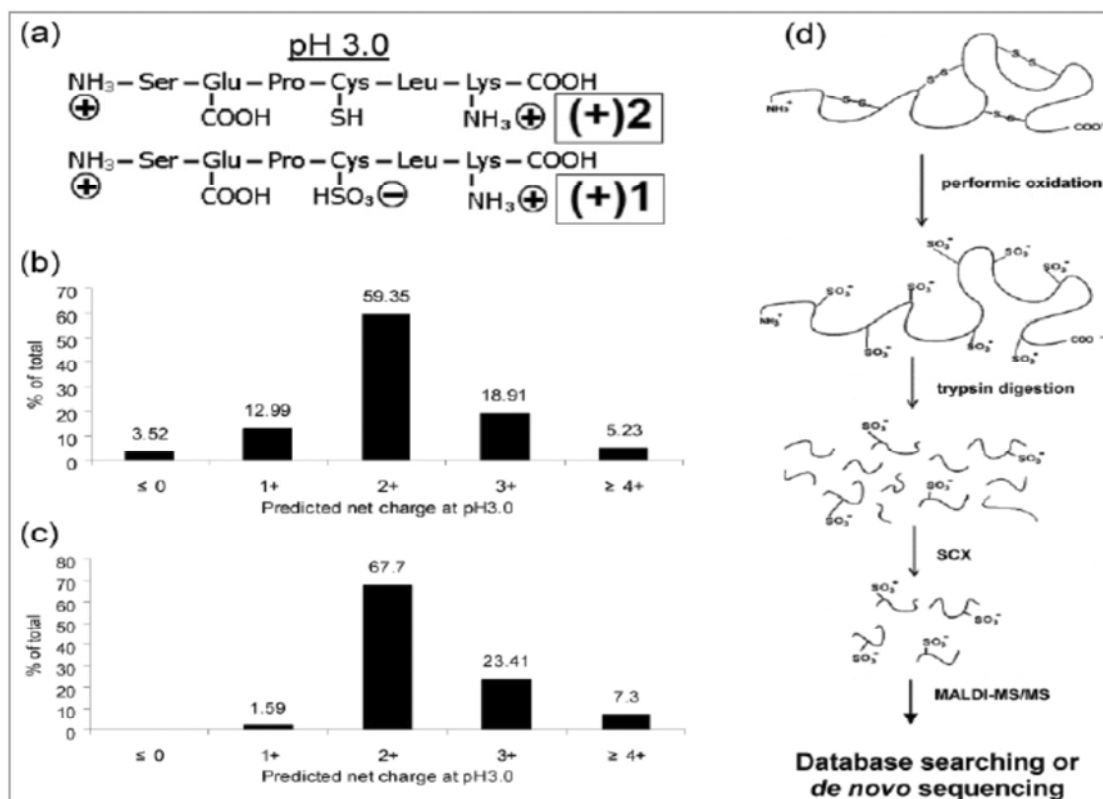


图 2 基于过甲酸氧化的蛋白质/多肽富集鉴定新策略(Anal Chem, 2005, 77: 7594-760)

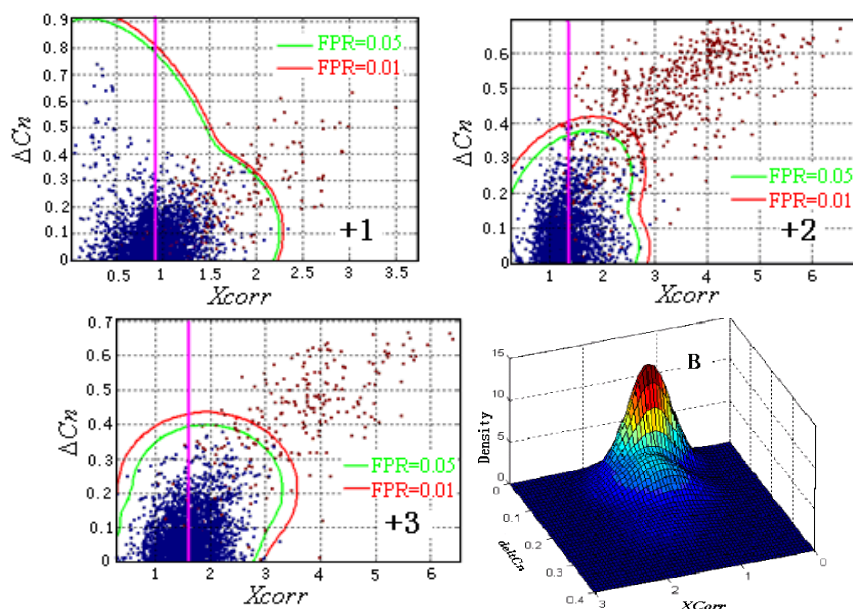


图 3 标准蛋白质数据集+1~+3 电荷 FDR=0.05 和 0.01 时的过滤边界(BMC Bioinformatics, 2008, 9: 29)

白和个体差异信息挖掘,建立了蛋白质表达、修饰、定位、相互作用等系列数据库,其中肝脏蛋白质组数据库是人体重要组织器官-肝脏的规模最大、内容最丰富的数据库,为全面解读人类基因组,揭示生命信息从基因组到蛋白质组的调控规律提供了重要基础.上述数据库已经通过 <http://hlpic.hupo.org.cn> 网站实现了数据共享,部分内容已经与欧洲生物信息学研究所(EBI)PRIDE 数据库、美国系统生物研究所(ISB)PeptideAtlas 数据库、约翰·霍普金斯大学 ProteinPedia 数据库及美国标准技术局(NIST)实现了数据交换.

基于上述自主研发的新技术、新方法和新软件,构建了具有国际先进水平的高通量、规模化蛋白质组表达、修饰、定量研究的技术体系,和全方位的数据采集、评价、挖掘与共享的生物信息学平台,并对人类肝脏为代表的重要生理功能的蛋白质组研究和肝病为代表的重要病理功能的蛋白质组研究提供了重要的技术支撑.在国际 HUPO 组织的 27 个实验室参与的国际样本比对实验中,成为一次分析 100%正确的 6 个实验室之一(图 4).将上述技术体系向国内外

推广应用,为国内 30 个省市、自治区逾千家单位提供蛋白质组技术服务 20000 余次,生物信息学软件系统为包括美国、加拿大在内的 10 个国家的大学和研究所提供近 4000 次,举办蛋白质组学习班并培训人员 600 余名,成为本领域国内外具有重要影响力的团队之一.

1.2 人类肝脏蛋白质组研究

人类肝脏蛋白质组计划是由军事医学科学院贺福初院士倡导并牵头实施的首个人体组织/器官的蛋白质组国际合作计划.中国科学家团队于 2002 年在国际上率先提出了“人类肝脏蛋白质组计划”(human liver proteome project, HLPP),并提出蛋白质组“两谱(表达谱和修饰谱)、两图(连锁图和定位图)、三库(样本库、抗体库和数据库)、两出口(生理组和病理组)”的科学目标,获得国际学术同行的认同与响应.参与该研究计划的国家有中国、美国、法国、加拿大等 18 个国家和地区的 100 多家实验室. *Nature*, *Science* 和 *Nature Biotechnology* 等杂志相继对此计划给予了高度评价.随着该计划研究的不断深入,研究的重心

Protein #	MW (kDa)	Group #																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
		CORRECT					NAMING ISSUES																	
							NO EXTRAS					EXTRAS					AC		MISSED					
1	112	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	112	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n	✓	m	✓	✓	m
3	106	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	m	m	✓	✓	✓
4	106	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	m	✓	✓	✓
5	101	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	101	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	m
7	74	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n	n	n	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	m
8	73	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n	n	✓	✓	n	✓	n	✓	✓	✓	✓	n	✓	✓	✓
9	73	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	70	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n	✓	✓	✓	✓	a	✓	✓	m	m	m
11	50	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	m	✓	m
12	51	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	m	✓	m
13	51	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n	✓	✓	✓	✓	m
14	50	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
15	36	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n	n	n	n	✓	n	✓	n	n	✓	✓	✓	✓	✓	m
16	35	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n	✓	✓	✓	✓	n	✓	✓	✓	m
17	35	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	m
18	33	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	m	✓	✓	✓
19	33	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	n	✓	✓
20	33	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	m	✓	✓	✓
# reported		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	21	22	25	30	24	22	22	21	21	18	18
naming								1	1	2	2	2	3	2	2	8	12	2	5					
redundant																3	8		1		1	1		2
errors														1	2	2	2	4	1	3	2	4	3	5
# missed																			1	2	3	3	5	7

Results for the HUPO-Invitrogen 20 Protein Equimolar Test Sample: Reporting of the analysis of the 20 protein Test Sample by 23 groups is summarized. The sample contains 20 proteins that range in MW from 33 – 112 kDa (calculated MW), with 6, 4, 4 and 6 proteins in the 35, 50, 70 and 110 kDa ranges, respectively. The results summarize: the number of proteins reported (# reported); correct reporting (correct protein identification with descriptive names); naming (n) issues (reporting of non-descriptive names, e.g. KIAA####, ORF, hypothetical protein, etc.); extra identifications (including redundant reporting of the same protein with different identifiers and errors that correspond to the reporting of proteins not added to the sample); acrylamide (AC) complications resulting from purification of the component proteins by preparative gel electrophoresis (modified database search to include variable acrylamide alkylation revealed assignment of the 70 kDa protein (a) in 1 data set); and missed proteins (proteins that were not identified).

图 4 国际 HUPO 标准蛋白质比对实验结果(Nat Methods, 2009, 6: 423–430)

也逐步从最初以建立技术平台,开展技术方法的研究、整合为主,发展到以高通量蛋白质组学研究技术平台为基础,深入研究关系中国人民健康的重大疾病问题和重要生命科学问题。

针对肝脏重要的生理和病理过程,我们利用蛋白质组技术,全景式地揭示肝脏中重要的功能蛋白质群,重点开展了人肝脏蛋白质组表达谱构建及重大肝病的比较蛋白质组研究。

1.2.1 人肝脏蛋白质组表达谱研究

在系统构建的蛋白质组技术体系的基础上,建立了国际上首个人体器官-人胎肝及成人健康肝脏蛋白质组表达谱。系统的人胎肝蛋白质组研究,揭示了人胎肝所特有的造血发育和肝脏代谢双重生理功能的蛋白质组特征,为人类肝脏蛋白质组计划的提出和顺利实施进行了成功的预演。构建了健康成人肝脏蛋白质表达谱及转录组参考谱图。鉴定的高质量人肝脏蛋白质达到 6788 个(迄今为止人类器官组织最大的蛋白质表达谱),其中 3721 个蛋白质是在肝脏中首次鉴定到。在新鉴定蛋白中,82.5%是低丰度蛋白。以上研究结果通过 Liverbase 网站向全球公开,并以专刊形式在国际蛋白质组核心期刊 *Journal of Proteome Research* 发表(图 5)。国际著名专业网站 ProteoMonitor 于第一时间报道了中国团队在人类肝脏蛋白质组研究中作出的巨大贡献,同时美国化学学会(American Chemical Society)在其网站发布新闻评述并予以高度评价。相关数据集已被国际顶级期

刊 *Nature Biotechnology* 的“人类蛋白质百科全书”及 *Nature Methods* 引用。

1.2.2 肝病相关的蛋白质组研究

在重大肝病的蛋白质组研究中,发现脂肪肝、肝细胞病毒感染、癌变以及转移相关的蛋白质组基础、蛋白质标志物群及潜在治疗靶标,结果发表于 *Hepatology* 及 *Molecular & Cellular Proteomics* 等国际著名专业刊物,其在认识肝癌发生发展、转移机制及早期诊断中具有指导意义。

近年来随着中国膳食结构的改变,非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)已成为导致慢性肝病的重要原因之一。目前 NAFLD 发生发展的分子机制尚未完全明确。军事医学科学院与浙江大学合作发现并证实了参与线粒体脂肪酸 β 氧化的酶 ECHS1 在 NAFLD 患者的肝组织中表达下调,并进一步证实 ECHS1 表达下调能加重高脂饮食导致的肝细胞脂肪变,此结果为揭示肝脏脂肪变的分子机制,发现潜在的药物靶标提供了依据。上述研究结果为进一步阐明 NAFLD 发生发展的分子机制,发现分期分型诊断标志物和潜在的药物靶点奠定了基础(图 6)。

对于 HBV 研究的瓶颈是缺乏 HBV 复制的体外细胞培养体系, HepG2.2.15 细胞在 HepG2 细胞中整合了 HBV 基因组,是进行病毒-宿主关系研究的理想材料。通过 2D BN/SDS-PAGE 分析,鉴定了在 HepG2.2.15 中特异表达的蛋白复合体,并通过超迁移和 Co-IP 实验证明了 HSP60 和 HSP90, 以及 HSP70



图 5 国际首个人体器官(肝脏)蛋白质组参考图谱及公众共享的数据资源(J Proteome Res, 2010, 9: 79–94; J Proteome Res, 2010, 9: 50–58)

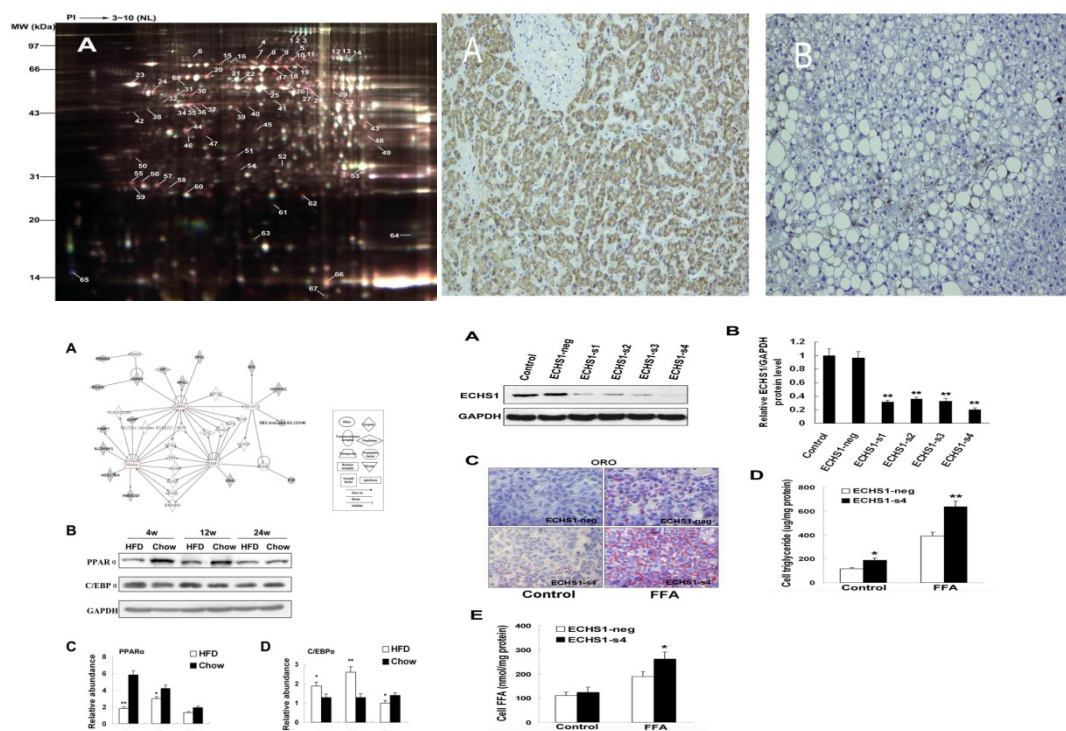


图6 非酒精性脂肪性肝病的蛋白质组学研究: ECHS1 表达下调促进肝脏脂肪变(Hepatology, 2010, 51: 1190–1199)

和 HSP90 蛋白在 HepG2.2.15 细胞而非 HepG2 细胞中发生物理关联。进一步的研究表明, siRNA 下调 HSP90 或 HSP70 表达可抑制胞外有衣壳 HBV, HBsAg 和 HBeAg 的分泌; HSP90 抑制剂(17-AAG)处理 HepG2.2.15 细胞可降低胞外病毒含量。实验表明 HSP70 或 HSP90 的下调可抑制 HBV 在 HepG2.2.15 细胞中的复制, HSP90 和 HSP70 可能为 HBV 相关疾病的靶标。

1.3 蛋白质相互作用研究

大规模蛋白质相互作用连锁图研究是蛋白质组学重要的研究内容, 目标是利用高通量的蛋白质相互作用研究技术全面揭示特定的生物系统内所有的蛋白质间的相互作用。高通量、大规模的蛋白质相互作用研究技术(如酵母双杂交技术和蛋白质复合体亲和纯化与质谱鉴定技术)已经成功地用于从低等生物(大肠杆菌、酵母菌、果蝇、线虫)到高等真核生物(小鼠、拟南芥、人)的蛋白质相互作用组(Interactome)的研究。但是, 整体的蛋白质相互作用组的覆盖率和精确度仍然不足。据估算, 人类蛋白质有 13 万对相互作用, 当前所有的已知数据仅鉴定了不到 8%。高通

量、全局性研究特定生物系统所有蛋白质的连锁图是国内外研究的热点和难点。欧盟、美国 and 加拿大先后启动了针对不同物种的蛋白质相互作用组的研究计划。2002 年, 中国科学家在国际上率先提出了“人类肝脏蛋白质组计划”, 肝脏蛋白质相互作用连锁图是重要的研究内容之一。

军事医学科学院是国内最早开展蛋白质组相互作用的研究单位。2002 年, 研究肝脏发育相关的蛋白质谱与功能连锁群, 以人胎肝中 44 种重要信号转导蛋白质(Ras-MAPK/PI3K 通路)为诱饵筛选人胎肝基因文库, 得到了包含 200 对蛋白质相互作用的网络。为深入研究有关蛋白质的功能提供了线索, 例如发现了抑癌分子 p53 的调控分子 Apak。2004 年, 作为人类肝脏蛋白质组计划的重要研究内容之一, 军事医学科学院建立了基因高效克隆技术和规模化、高通量酵母双杂交技术平台。选取 5000 多个人类肝脏重要功能分子, 构建了 9600 多个酵母双杂交质粒载体。高通量酵母双杂交文库筛选技术平台达到每天筛选 30 个诱饵的通量; 高通量酵母双杂交微阵列(96 孔板)筛选技术平台, 每天可完成 384×384 个随机组合的相互作用筛选。采用此技术平台构建了国际上最

大规模的肝脏蛋白质相互作用网络, 得到了包含 3400 多对人类肝脏蛋白质相互作用的大规模数据集 (图 7). 此外, 军事医学科学院与国内外几十家科研单位有广泛的科研合作, 已经完成了病毒、细菌、真菌、水稻、拟南芥、小鼠和人等多物种的特定蛋白质群的相互作用筛选, 提供了大量的功能研究线索和药物开发潜在位点. 例如, 在人肝脏蛋白质相互作用网络筛选中, 发现了核糖体分子 L26 通过负调控泛素连接酶 HDM2 增强抑癌蛋白 p53 的降解, 细胞周期激酶 PLK1 通过与支架分子 TANK 相互作用抑制免疫分子 NF- κ B 活性. 对人泛素连接酶 NEDD4 家族分子进行筛选, 发现了其成员 Smurf1 调控 Wolfram 综合症蛋白的降解, FBXL15 靶向 Smurf1 的降解调控发育有关的 BMP 信号通路.

在基于生物信息学的蛋白质组功能(蛋白质相互作用网络)研究中, 整合了多种蛋白质相互作用证据并进而对高通量蛋白质相互作用数据的可靠性进行了分析, 发展的贝叶斯方法具有比其他方法更高的特异性和覆盖率. 在蛋白质网络中信号转导知识的发现上, 发展了一种新的算法通过比对生物学通路和蛋白质网络进行信号转导子网的发现. 进而建立了一种高准确率的预测方法推测相互作用蛋白质间的方向性. 该方法应用于人蛋白质相互作用网络后, 首次得到了一个人蛋白有向网络, 并据此推测出了大量潜在的信号通路. 该有向网络中相互作用的方向性得到了现有的信号转导网络数据库的很好的支持. 在蛋白质网络的理论研究方面, 对蛋白质网络的

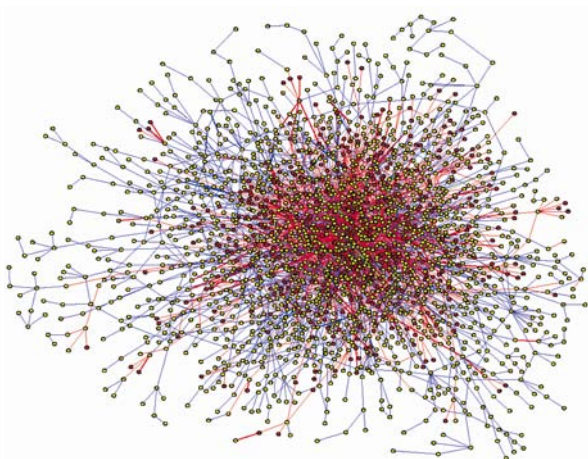


图 7 人类肝脏蛋白质相互作用网络(Mol Syst Biol, 2011, In press)

拓扑结构进行了分析, 发现了蛋白质网络的保守直径现象. 通过分析蛋白质网络中蛋白质的起源年代, 为蛋白质相互作用网络进化过程中模块的成簇添加的假设找到了新的证据.

1.4 血清多肽谱研究

军事医学科学院自 2004 年启动血清多肽谱研究以来, 在血清多肽富集、质谱多肽谱、血清多肽鉴定、数据分析、多肽抗体与产业化等方面开展了一系列高水平工作, 处于国内领先地位. 开发了具有自主知识产权的多肽富集金属螯合磁珠, 通过 MALDI-TOF-MS 进行了数千例血清多肽谱检测, 建立了非磁珠血清处理体系, 与质谱高度兼容. 上述两类血清前处理技术是疾病多肽组学研究的基础和关键, 对中国血清多肽组研究起到了重要的普及和推动作用. 利用上述技术, 完成了 1000 例健康人群和 2000 多例肺癌、肝癌、乳腺癌、直肠癌、前列腺癌和白血病等患者的血清多肽谱分析. 在乳腺癌血清多肽谱研究中发现 FPA 的两个降解片段和抗糜蛋白酶具有显著意义, 敏感性 93.2%, 特异性 95.4%(图 8). 在非小细胞肺癌血清多肽谱研究中, 用 15 个显著差异峰建立 AUC, 面积大于 0.7. 敏感性 94.3%, 特异性 93.5%. 8 对样本进行了 1 年跟踪检测, 分类有效性 67%.

在肝癌血清多肽标志物发掘、验证和产业化转化方面进行了创新性研究. 筛选了多个肝癌早期预警候选标志物, 进行了化学合成. 探讨了多肽抗体制备的多项关键技术, 完成 3 种 13 株 115 管杂交瘤细胞的转移、传代、保存、复苏、鉴定. 建立了基于多肽抗体和 MALDI-TOF 质谱临床诊断技术.

血液中的多肽源自生物组织, 确认候选标志物的组织来源是一项不可缺少的研究. 军事医学科学院在国内建立了组织多肽原位分析技术(质谱成像, imaging mass spectrometry). 该技术能提供组织中特征多肽的分布, 在疗效评价和药物筛选方面具有独特价值. 研究证实, 组织多肽的分布与疾病有显著关系, 不同组织中的多肽分布显著不同.

1.5 病原微生物蛋白质组研究

进入 21 世纪后, 各种新发和重大传染病频发. 2001 年的炭疽恐怖事件、2003 年的 SARS 疫情、2004 年的禽流感危机、2009 年的甲型流感流行以及 2010

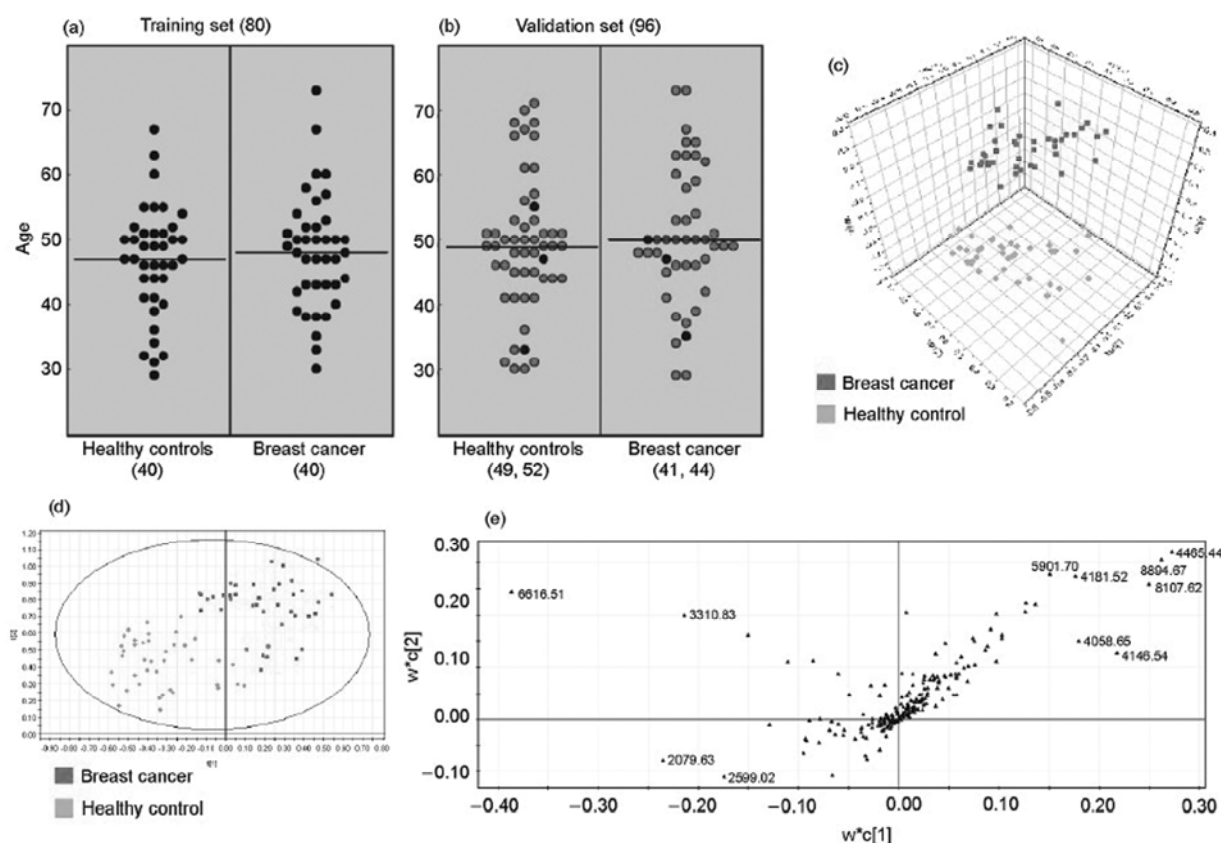


图8 偏最小二乘回归法分析乳腺癌血清多肽谱的年龄相关的变异性(Chin Sci Bull, 2009, 54: 421–429)

年出现的“超级细菌”——多重耐药肠杆菌科细菌，不断地警醒我们：传染病的爆发不仅严重威胁着人民的生命安全，而且还造成了国内公众的大范围恐慌，传染病的防控关系着一个国家稳定、国防安全与经济的可持续性发展。生命科学已经步入后基因组时代，应运而生的蛋白质组学研究能够最大限度地揭示生命的动态变化。病原微生物蛋白质组学的研究，能够为传染病诊断、药物和疫苗的研发提供靶标，为探索传染病防控战略提供新思路和新方案。同时，病原微生物代谢途径、分子作用机理的解析也将为人类生命科学研究提供重要的参考。

1.5.1 志贺氏菌蛋白质组学研究

以志贺氏菌作为革兰氏阴性致病菌的代表，利用比较蛋白质组学技术对其致病机理进行了初步分析。通过对比福氏志贺氏菌在毒力(37℃)和非毒力(30℃)条件下蛋白表达谱的变化，发现除一些已知的毒力蛋白或毒力相关蛋白的表达差异外，还发现一

个全新的抗毒力基因 *argT*，其编码产物的表达模式与毒力蛋白截然不同——在非毒力状态下呈现高丰度。随后的一系列实验较为详尽地阐述了 *argT* 在毒力状态下的被降解调控方式，而这种调控方式的存在由于单个碱基的突变造成，并经细胞和动物模型证明 *argT* 若在志贺氏菌中不被降解，将会降低其毒力，揭示了 *argT* 是一类新的抗毒力基因(图9)。

1.5.2 猪链球菌蛋白质组学研究

以猪链球菌作为革兰氏阳性致病菌的代表，利用免疫蛋白质组学技术对猪链球菌表面抗原和分泌抗原进行了筛选。我们利用动物免疫血清进行猪链球菌细胞壁和培养上清的免疫蛋白质组学研究，经质谱鉴定获得 32 种免疫原性蛋白，其中 22 种为猪链球菌新免疫原性蛋白。对上述蛋白进行克隆表达并制备相应抗体，用 Western blot 检测了它们在 16 种不同猪链球菌菌株中的表达水平，有的抗原在不同菌株间高度保守，有的在不同菌株之间表达有较大差异。随

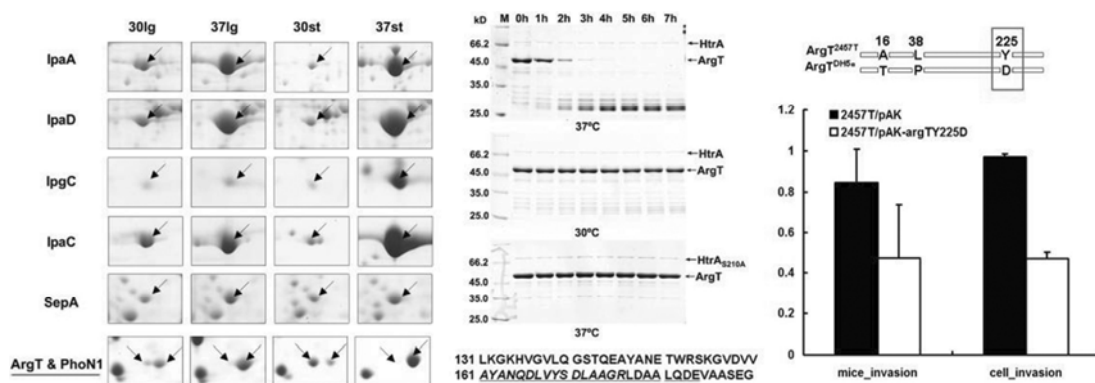


图9 *argT* 是一个新的抗毒力基因(Mol Cell Proteomics, 2010, 9: 1209–1220; Proteome Sci, 2010, 8: 30)

后,对上述蛋白在小猪感染动物模型和病人恢复期血清中的抗体水平进行评价,发现4个蛋白的抗体水平较高.进一步用体外免疫调理杀菌实验和小鼠攻毒保护实验证实其中3种蛋白具有较好的免疫保护效果.

1.5.3 双歧杆菌蛋白质组学研究

双歧杆菌被认为是理想的、安全有效的疫苗抗原递送载体及治疗药物.为了有效地防治病原菌的危害,军事医学科学院开展了益生菌——双歧杆菌的蛋白质组学研究.首先利用重叠窄梯度双向电泳技术与串联质谱技术联用的策略,在国际上率先构建了长双歧杆菌 NCC2705 株的蛋白质组学参考图谱.在此基础上,对双歧杆菌表达的蛋白质的表达丰度和密码子使用偏好性进行了分析,这些表达丰度数据对于双歧杆菌的进一步人工改造具有非常重要的参考价值.最后,通过对比双歧杆菌在不同碳源条件下蛋白表达谱的变化发现,细菌代谢葡萄糖和果糖是通过同样的降解途径;不同的是,果糖的吸收和同化可能是通过果糖特异性糖-结合蛋白(BL0033)和一个 ABC 转运系统的 ATP 结合蛋白(BL0034)共同组成的一个特殊的转运系统.这些结果对揭示双歧杆菌果糖转运和同化的分子机制,从而解释双歧杆菌在肠道环境中的适应性具有重要的意义.

2 结语

作为 21 世纪生命科学领域最宏大的科学计划之一,人类蛋白质组计划正处在蓬勃发展并孕育重大突破的关键时期.蛋白质组研究技术的发展日新月异,高精度的质谱技术、大规模抗体制备技术和生物信息学技术将成为蛋白质组研究的核心支撑技术.全基因组编码的所有蛋白质相互作用研究已成为一个新兴的前沿领域.国际人类蛋白质组计划已经启动,并以全面注释人类基因组为最终目标.

中国蛋白质组学的研究将从关系国计民生的重大疾病防、诊、治需求出发,以人体和模式生物重要器官、组织、细胞及体液等为对象,全面系统地开展蛋白质组学研究.力争实现对人类基因组的全面注释以及人类基因组、转录组和蛋白质组数据的对接.发现一批重要功能基因和蛋白质并阐明其调控网络,揭示人类基因组序列的变异与人类多基因疾病和其他生物学性状的蛋白质组学基础,发展基于分子机制的疾病预防、诊断和治疗的新途径、新方法.全面推动中国生命科学与生物技术的整体水平迈入国际领先行列,显著提升中国的国际竞争力.

回顾过去,硕果累累,展望未来,任重道远,我们将抓住机遇,奋勇拼搏,为蛋白质科学事业的发展 and 改善人类的健康做出贡献.

撰稿人: 钱小红, 姜颖, 王建, 朱云平, 李栋, 魏开华, 王恒梁

参考文献

- 1 Cyranoski D. China takes centre stage for liver proteome. *Nature*, 2003, 425: 441
- 2 Jia H. China pushes liver proteomics. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 136
- 3 Service R F. Public projects gear up to chart the protein landscape. *Science*, 2003, 302: 1316
- 4 钱小红, 贺福初. 蛋白质组学: 理论与方法. 北京: 科学出版社, 2003
- 5 钱小红, 贺福初. 蛋白质组学-从蛋白质序列到功能. 北京: 科学出版社, 2002