

# 定量蛋白质组学研究中的荧光 差异凝胶电泳技术 (Ettan DIGE)

要开展蛋白质组学研究，双向电泳是你必须了解掌握的最基础的蛋白质分离技术，正如普通凝胶电泳对于核酸纯化。可是一提起双向电泳，多数人还是会直皱眉头——别摇头摆手又叹气啦，今天的双向电泳早已深入改进了，特别是其中最热门的荧光差异凝胶电泳技术 (DIGE)，因为消除了传统双向电泳的一些弊端，已经使得好多实验室对双向电泳重拾信心，并逐渐得到越来越多的科学家的认同。要知道基于双向电泳的蛋白质组分析文献每年都稳步增长，采用 DIGE 技术进行研究的科研论文的比重从 2004 年的不到 2% 猛增到 2008 年的 19.6% 呢。来吧，放下偏见，不要错过，跟着生物通重新认识这功能强大的 DIGE 吧。

## 前尘往事

一直备受争议的双向电泳何以这么不招人待见呢？长话短说。

生物样品中蛋白质的复杂多样性远超核酸，使得单向电泳无法满足蛋白样品分离分析的需求。1975 年 O'Farrell 首次介绍了双向电泳技术，采用等电聚焦和 SDS-PAGE 在等电点和分子量两个方向上对蛋白质进行分离，使得原本密密麻麻都挤在一条泳道上的蛋白质得以在另外一个方向上有效分开。这个在当时极具创意的设计虽然被写进了教科书中成为经典技术，可惜在随后的实际应用中却遇到种种问题。由于当时第一向电泳的基质是采用两性电解质配置 pH 梯度胶，两性电解质的不稳定性导致等电点聚焦结果严重受到实验室条件和操作手法等偶然因素的影响，第二向电泳结果就更不用说了——即使不是差之毫厘缪之千里，这种不确定性也导致了双向电泳结果可重复性差，稳定性差。不单各实验室之间的结果难以比较，即使同一实验室的结果也不怎么确定。我们都知道，实验的可重复性是实验可信度的重要指标，也是同行评议的重要基础。这种不稳定导致的争议可想而知。用不确定的

方法研究不确定的未知，会“负负得正”吗？不可能。再加上操作和结果分析的极其复杂，难怪一提起双向电泳，人人皱眉。

直到上世纪九十年代，安玛西亚公司（通用电气生命科学的前身）推出了商品化的固相 pH 梯度胶条，极大的提高了等电聚焦的可重复性，这才使得国际上不同实验室间双向电泳实验结果比较成为可能。

## 不比不知道

比较，是一种习惯，一种本能，也是一种学问。从学生时代令人翻白眼的“期末考试第几名呀？”，到如今人人热衷的 xxx 排行榜，以及五花八门的比赛，从不间断地彰显人们对比较的热爱。在生命科学研究领域，比较更是一种探索求知的最重要的手段——肿瘤组织和正常组织有什么不同？从同一细胞中分化而来的不同组织有何差异？不比不知道，经过各种比较手段找出差异，再研究这些差异的前因后果，一直是生命科学领域最常用的研究思路。核酸表达差异的研究方法包括差异显示，芯片技术，DD-PCR 等等，但核酸表达差异的研究最终无法替代蛋白质差异研究。比较不同样品间蛋白质的种类和量的差异，依然



是另一个重要的研究方向。由于双向电泳具有其他任何分离技术无法比拟的高分辨率,可以看到相应蛋白质的等电点和分子量信息,对于蛋白质的翻译后修饰和 Isoform 也可以清晰展示。因而成为蛋白质表达差异研究的重要手段。

然而,双向电泳的胶间差异仍然很大,即使应用现在很高级的双向电泳分析软件,仍然有很多蛋白质斑点无法正确匹配。即使那些匹配的蛋白点之间也无法确定其准确的定量关系。较大的系统误差导致该技术无法有效地区分系统误差和样品间的差异,因此需要需要花费大量的时间和劳动运行重复胶以期得到更准确的定量结果。

### 缤纷荧光照亮双向电泳

多色荧光标记绝对是伟大的技术发明,正是缤纷的荧光世界使得实验不再受困于孤独的单色标记,同时进行“多重 Multiplex”检测成为可能。无论是高通量测序、定量 PCR,芯片,流式,细胞成像,染色体原位杂交等等领域,多色荧光标记都有着极为重要的应用(详细请看生物通新技术专栏)。

1997年,Unlu等发表了第一篇荧光差异凝胶电泳的论文,将不同的样品分别用不同的荧光染料进行标记后混合在同一块凝胶中进行双向电泳,极大地提高了实验结果的重复性和定量的准确性。2001年,Tonge等以小鼠肝脏作为实验材料,评价了该实验方法,并给予了很高评价。安玛西亚公司(现在的通用电气公司)从Carnegie Mellon大学购买了这种多通路荧光技术和双向电泳技术结合的专利后,全面系统地发展改进了荧光差异凝胶电泳技术,一如生物通前面提及,如今的Ettan DIGE使得许多实验室对双向电泳重拾信心,

并受到越来越多科学家认同。相比传统的双向电泳,Ettan DIGE技术究竟有哪些独特的创新和改进使之更胜一筹呢?

### 三色荧光标记

传统的双向电泳胶间差异大,甚至难于区分系统误差还是样品间的表达差异,难以进行蛋白质差异研究。Ettan DIGE荧光差异凝胶电泳技术在传统双向电泳技术的基础上结合了多重荧光分析的方法,可在同一块胶上同时分离多个分别由不同荧光标记的样品。由于不同的荧光标记样品有不同的激发波长,可通过不同的滤光片记录互不干扰的胶图结果。由于有了多色荧光标记,使得在同一块胶中分离并分析多个样本成为可能。这样有效避免了不同胶间的系统误差,特别适合比较不同样本间差异。Ettan DIGE还在双色荧光的基础上增加了第三色荧光标记,作为内标(后面介绍)。

荧光染料种类虽多,但用于蛋白质组样品标记的荧光染料不同于普通荧光染料,标记后的蛋白质不应该有等电点上的改变,分子量上的改变也应该保持最小而且不同荧光染料导致的分子量的改变应该一致。用于蛋白质预先标记的荧光染料分为两类,最小标记和饱和标记。其中最小标记荧光染料包括三种,分别是Cy2, Cy3和Cy5。这三种荧光染料化学结构上相似,分子量接近,带有相同的活化基团—NHS脂,可以特异性的标记在赖氨酸残基的ε氨基上,由于三种染料均带有一个正电荷,这样通过取代反应蛋白质的等电点不会发生改变,保证了不同样品中的相同蛋白质可以泳动到相同的位置。不过要注意,过多的染料标记会导致蛋白质的疏水性增加而不易溶解。保持1~2%的蛋白质的赖氨酸残基被荧光标记修饰,才可以维持被标记的蛋白在电泳时的溶解性,因此,在标记样品时,保证合适的蛋白

质和染料的摩尔数比例至关重要。通过调整合适的 pH 值、合适的染料和蛋白质的摩尔比，可以保证每个蛋白质分子最多只标记上一个染料分子，来保证蛋白质的分子量变化最小。

另外，采用 DIGE 进行蛋白质分离后，如果需要切取蛋白质斑点进行进一步分析，则需要注意，虽然经荧光标记后在电荷上未发生变化，但是由于荧光团的加入(500Da 左右)使得在标记的和未标记蛋白之间产生分子量上的差异，被荧光标记的蛋白质比未标记的蛋白质点在第二向 SDS-PAGE 时会有些许迁移偏差，对于那些小分子蛋白质来说，其荧光显色的中心并非蛋白浓度最高的地方，因此切取点这些蛋白质斑点时需要考虑这个偏差。一般而言，在采用 DIGE 胶分析并得到相关差异蛋白质结果后，需要运行制备胶用来进行斑点切取。

饱和标记的荧光染料包括两种，标记蛋白质上的半胱氨酸残基，主要用于一些来源和珍贵的微量样品的研究中。饱和标记可避免上述问题，但是使用成本较高。在采用饱和标记分析蛋白质组样品时，必须先进行染料量的滴定，以确定合适的还原剂和染料的加量，否则，在 DIGE 胶图上很轻易造成水平链状的点或垂直拖尾。另外，由于被标记了的蛋白质的分子量发生了改变，饱和标记的胶图和银染的胶图有所不同。

### 神奇的内标

可能是出于节约的考虑，一些实验“老手”常常忽略实验参照。其实是很不好的实验习惯。实验设计中的参照对于实验来说非常重要。内标是参照体系中的一个重要概念。

Alban 等首次详细的阐述了内标的概念和意义。

Etan DIGE 技术第一次在双向电泳中引入了内标。DIGE 的内标是将试验中所有样品取等量混合，单独用一种荧光染料（在最小标记染料中通常是 Cy2）标记，和所有样品一起电泳。这意味着所有样品中的蛋白质点都会有对应的内标。通过内标可以方便的对胶内不同荧光染料标记的样品和胶间样品进行归一化定量，而且不同凝胶之间的匹配变得异常轻松。

传统双向电泳技术可分别在等电点和分子量两个方向上对蛋白质组进行分离，然而在第三个方向即定量准确性上并不尽如人意。内标在双向电泳中的引入，极大地提高了结果的定量准确性，可靠性和重复性，有效降低了系统误差，给双向电泳增加了第三个方向，确保了实验结果的高可信度。

### 实验流程

DIGE 的基本实验线路是电泳前以 Cy2、Cy3 和 Cy5 三种荧光染料分别标记蛋白质样品（其中包括一个蛋白质内标）。然后将标记好的蛋白质样品混合，在同一块胶上进行双向电泳。电泳结果分别用 3 种不同的激发波长得到不同颜色的荧光信号，根据这些信号的比例来判定样品之间蛋白质的差异。由于每个蛋白点都有它自己的内标，可避免在匹配时出现的误差。进行定量分析时也不再需要依靠于胶与胶之间的重复性，可用以比较数据库中各个胶之间的蛋白质的量的差异。专用软件可全自动根据每个蛋白点的内标对其表达量进行校准，保证所检测到的蛋白丰度变化是真实的。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。

Friedman 等通过采用内标的 DIGE 实验设计对人直肠癌样品进行了系统研究，发现

52 个差异蛋白质中,有 42 个是在有内标的实验设计中才可能被发现,这些差异蛋白质都是用来诊断直肠癌的潜在的生物标记物,也可能成为治疗的药物靶标。由于荧光标记灵敏度很高,DIGE 的灵敏度可与银染和 SYPRO Ruby 相媲美,可检测到 100~200pg 的蛋白质,而其线性动态范围在 5 个数量级左右。即使少至 5 $\mu$ g 的微量样本也可以用 Ettan DIGE 进行蛋白质组学分析。

### 同样准确的结果,只要跑更少的胶

跑双向胶始终是体力和耐力活儿,需要花费大量时间和精力。相比传统 2D, DIGE 可以让你跑更少的凝胶而获得同样高质量的准确结果。

这首先归功于多色荧光标记。因为多色荧光标记可以在同一次检测中分析同一胶上的不同标记样品的荧光信息,因而可同时在一块胶上、在相同电泳条件下同时分离 2 个样品,提高了电泳胶的“利用率”,减少了实验需要的胶的总数,也节省了操作时间和成本。由于并行电泳减少胶间差异,使得分析结果的过程也大大简化;还可避免由于实验方法造成的蛋白质斑点强度的差异,比如样品在进入胶条时会有不同程度的样品损失等。

其次,在进行传统双向电泳实验时,通常需要运行生物学重复和技术重复(即重复胶)以排除样品的个体差异和实验的系统误差。由于 DIGE 技术将系统误差降至最低,又增加了内标对不同凝胶之间进行定量的归一化,因此采用 DIGE 技术,无需运行重复胶。

以一个简单的例子,如果现在要研究某种药物对小鼠肝脏蛋白质组的影响,需要 2 组各 4 只小鼠(生物学重复),分别注射药物及安慰剂,然后在某一时间点取肝脏抽提蛋白

质组样品进行分析。传统 2D 电泳需跑 4 块重复胶(技术重复),总共需要跑 32 块 2D 凝胶。采用 DIGE 技术无需运行重复胶,8 只小鼠的肝脏蛋白质可以分别运行在 4 块凝胶上即可以得到高质量的实验结果。凝胶数量减少至 8 分之 1,不单所费时间和成本大大减少,胶间差异得到了有效控制,找到真实的生物学差异的可能性也大大的提高了!实验结果的准确性大幅提高,在确定的差异蛋白斑点中,假阳性结果降至最低,相关的质谱鉴定成本也大幅降低!最关键的是,得出错误结论的可能性也降至最低!(把药物组设为 A,安慰剂组设为 B,小鼠的编号为 1-4 的话,考虑样品的随机化原则,正确的实验设计应该是如下:你算得出为什么吗?)

|       | Cy2 | Cy3 | Cy5 |
|-------|-----|-----|-----|
| Gel 1 | 内标  | A1  | B1  |
| Gel 2 | 内标  | B2  | A2  |
| Gel 3 | 内标  | A3  | B3  |
| Gel 4 | 内标  | B4  | A4  |

### 整体化解决方案

谁都知道配套的产品最好用,不用考虑产品之间的兼容问题。对于种类繁多,样品制备复杂的蛋白质组研究,完善配套的工具可以使工作事半功倍。全力开发并推广 DIGE 的 GE 公司深谙此道。在双向电泳设备的基础上,GE 提供全部的 DIGE 系统组件:专门用于 DIGE 的荧光染料,用于 DIGE 凝胶成像的扫描系统,著名的 Typhoon 系列激光共聚焦扫描成像系统,用于 DIGE 图像自动分析的 DeCyder 软件。由于 GE 公司已经购买相应荧光染料的专利,你不用担心专利的问题。

用于 DIGE 胶成像的设备包括专门用于 Ettan DIGE 成像的 EDI 成像仪和多功能激光共聚焦扫描成像仪 Typhoon。荧光染料在激发和发射图谱中有小部分重叠,可能会出现信号的相互干扰,因而选择合适的扫描仪器及正确的参数设定至关重要。EDI 成像仪专门用于 DIGE 胶成像,操作简单,无需过多的参数设置。如果你正好有 Typhoon 系列扫描仪,那就不需配置 EDI 了, Typhoon 扫描成像系统专门为 DIGE 胶扫描进行了优化,扫描得到的胶图可以被相应的分析软件直接读取,其灵敏度可以达到银染灵敏度的十倍,而极高的动态范围和定量的准确性也为 DIGE 系统能够精确定量提供了硬件支持和保证。

DeCyder 软件是整个 DIGE 平台的重要组成部分,共找点的专利设计,高效的胶间匹配,采用多种统计学分析方法令结果分析变得简单快速。虽然目前市场上有多种双向电泳分析软件宣传可以分析 DIGE 凝胶,然而 DeCyder 软件始终是那些期望精确定量和准确分析的科学家的首选。DeCyder 软件目前已经更新到 6.5 版,相比之下,其他的分析软件都是在 DeCyder 分析软件推出后,在学习和消化后更新自己的版本。正版价格贵,那也

是众所周知的。不过对于精密严谨的实验,还是提倡正版的。

作为一个新的技术平台, Ettan DIGE 技术正逐渐被广大科学家认可, 2007 年 Frost&Sullivan 将 2007 年技术创新奖授予了通用电气医疗集团,以表彰其将荧光差异凝胶电泳技术引进美国蛋白电泳市场。2008 年,包括 DIGE 平台在内的通用电气的蛋白质和蛋白质组分离分析技术荣获了生命科学工业成就奖。DIGE 技术也不断被应用到很多研究领域,到 2008 年 5 月份, DIGE 技术的应用文献已经多达 1100 余篇,平均影响因子为 5.5。包括用于鉴定新药蛋白靶点,开发新的治疗策略;可靠监测疾病的发生过程和治疗过程;鉴定生物标记物用于早期诊断;药物分子机理或毒性研究;理解发育过程;植物蛋白质组学,环境蛋白质组学等都有很多文献。已经成功分析的样品包括细胞培养物,植物,真菌,细菌,海洋生物,动物模型样品,体液,如血液、脑脊液和唾液等,人的组织样品,病理切片,激光捕获显微切割(LCM)的组织 and 细胞等。

怎么样? 现在对 DIGE 感觉不一样了吧!  
(生物通撰稿)