

# 蛋白质组研究中细胞质膜的纯化和纯度鉴定研究进展

王细娥, 张丽军, 谢锦云, 陈平, 梁宋平

(湖南师范大学 生命科学学院 蛋白质化学研究室, 中国湖南 长沙 410081)

**摘要** 细胞质膜是构成细胞对外界环境的屏障和细胞内外环境交流的界面, 镶嵌或连接于其中的蛋白质参与细胞/细胞以及细胞/细胞外基质的识别、信号的接受和跨膜传导、细胞内外物质的转运;此外,质膜蛋白质在药物研发中也起着非常重要的作用,在现有的药靶中质膜蛋白质占70%。因此质膜蛋白质组学研究成为亚细胞蛋白质组学研究的热点。然而在质膜蛋白质组学的研究中,由于很难获得高纯度的质膜样品,因此这一领域的研究具有很大的挑战性。现主要对质膜及其微区结构的纯化方法和质膜纯度的评价标准作扼要的介绍。

**关键词** 细胞质膜; 纯化; 纯度鉴定

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)S0-0015-06

## Progress of the Purification and Evaluation of Plasma Membrane in Proteome Study

WANG Xi-e, ZHANG Li-jun, XIE Jin-yun, CHEN Ping, LIANG Song-ping

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

**Abstract:** Plasma membrane(PM) is an organized system serving as a structural and communication interface with the extracellular environment for exchanges of information and substances. Consequently the functions of proteins embedded in this membrane include cell/cell and cell/extracellular matrix recognition, the reception and transduction of extracellular signals and the transport of solutes and water molecules into and out of the cell. Moreover, the plasma membrane proteins account for 70% of all known drug targets. For these reasons, proteomic analysis of plasma membrane is one of the focuses of subcellular proteome research. However, the plasma membrane proteomics is much challenged mainly due to the difficulty to obtain the purified plasma membrane. The progress of plasma membrane proteomics including the purification of plasma membrane and its microdomains, and the purification evaluation methods are summarized.

**Key words:** plasma membrane; purification; evaluation

(Life Science Research, 2006, 10(2): 015 ~ 020)

生物膜最基本的功能是维持细胞内微环境的相对稳定, 并与外界环境不断进行物质交换, 能量和信息的传递, 对细胞的生存、生长、分裂和分化都至关重要。此外, 生物膜的选择通透性、能

收稿日期: 2005-12-28; 修回日期: 2006-05-08

基金项目: 国家 973 基金资助项目 (2001 CB5102)

作者简介: 王细娥 (1980-), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 从事蛋白质组学研究, Tel: 0731-8872930, E-mail: leewxe@126.com; 梁宋平 (1946-), 男, 湖南安化人, 湖南师范大学教授, 博士, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事蜘蛛毒素与蛋白质组学研究。

量传导和信号传递等的基本机制也为仿生学的研究提供了基础和原型。质膜蛋白质组的研究具有很重要的意义,因为它不仅有助于对细胞信号传导、细胞与细胞间的相互作用、离子以及溶液的传递的研究,同时也为疫苗研究、病理研究提供了新的方法与手段。质膜蛋白质在药物研究中起着相当重要的作用,是广泛的药物设计靶标。细胞质膜蛋白质占整个已知药物靶标的70%。细胞质膜的功能基本上都是由占细胞总蛋白质的20%~25%的质膜蛋白质执行的<sup>[1]</sup>。

近年来的研究肯定了大多数哺乳动物细胞质膜有微区结构存在,称为脂筏(lipid raft)和质膜微囊(caveolae)。脂筏和微囊都是质膜上富含胆固醇和鞘磷脂的微结构域(microdomains),在低温下这些区域能抵抗非离子去垢剂的抽提,所以又称为抗去垢剂膜(detergent-resistant membranes, DRMs)。它们在转运、体内胆固醇平衡和信号传导,及在各种疾病,包括动脉粥样硬化等方面有很重要的作用。

正是由于细胞膜及其微区具有如此重要的功能,细胞质膜的蛋白质组学分析引起了研究者的广泛兴趣。但进行质膜蛋白质组的研究,获得一定量高纯度的质膜及其微区结构是非常重要的。而膜蛋白质特点之一是丰度低,所以必须进行细胞质膜的富集,尤其是微区结构,在整个细胞蛋白质中仅占0.5%,在质膜蛋白质中也只占2%<sup>[2]</sup>。因此,质膜蛋白质组的研究在低丰度膜蛋白质的分离上遇到了方法学上的挑战。

## 1 细胞膜纯化方法

进行质膜蛋白质组研究的首要条件是获得高纯的膜片段。常用的细胞质膜纯化方法有离心法(包括差速离心法和密度梯度离心法)、两相分配法、硅珠结合法、自由流电泳法(FFE)以及亲和分离法(包括生物素亲和纯化和凝集素亲和纯化)。

### 1.1 离心法

最早最经典的细胞膜提取就是根据不同膜结构的沉降系数分离的差速离心法和利用各成分密度不同而分离的密度梯度离心法。直到现在离心技术还是亚细胞提取最常用的方法。尽管其它技术 FFE 和亲和免疫分离等已经发展用来分离细胞膜,但是在这些方法中或多或少还是要用到离心法。

#### 1.1.1 差速离心

差速离心<sup>[3]</sup>指在密度均一的介质中不同大小

的颗粒通过在不同的离心力场的作用下沉降速度不同而分离。通过不断增加相对离心力,使一个非均匀混合液内的大小、形状不同的粒子分部沉淀。理论上沉降快的颗粒首先到达管底,而沉降慢的颗粒仍留在悬液中。

但实际上由于各种颗粒在离心沉降前在介质中是均匀分布的,沉淀系数在同一个数量级内的各种粒子不容易分开,而使分离不够完全,因而差速离心的分辨率不高,较难得到很纯的质膜。因此,差速离心法常用于其他分离手段之前的粗制品提取。

#### 1.1.2 密度梯度离心

对于组织样品最经典的还是密度梯度离心法。它是基于形成密度梯度溶液的密度及不同膜的密度之间的差异来分离质膜。密度梯度可以是非连续的或连续的。

虽然不同的亚细胞器的组成决定了其相对的密度,但分离的程度还取决于密度介质的性质。最常用的密度介质是蔗糖,比较新的介质包括 Nycodenz<sup>[4]</sup>、Percoll<sup>[5]</sup>等。蔗糖性能稳定,价格便宜,是理想的梯度介质。Blonder<sup>[6]</sup>等用蔗糖密度梯度提取质膜,得到了很好的质膜样品,鉴定了1306种蛋白质,其中57.3%为已知的整合膜蛋白质或者膜结合蛋白质,同时有121种微区蛋白质。与蔗糖相比,Nycodenz在相同密度下有小得多的渗透压。Percoll梯度可预先形成,也可在离心过程中形成,梯度十分稳定。此外,它也不穿透细胞膜。Chen<sup>[5]</sup>等用 Percoll 梯度分离胰腺细胞质膜,经电镜和酶活性分析,得到了高度纯化的质膜样品。

与差速离心相比,密度梯度离心可以得到较纯的膜,但因为许多亚细胞结构的密度不是定值,而是一个范围,而且几个细胞器如细胞质膜、轻线粒体、高尔基体等密度很接近,各膜体系之间很容易发生粘连,用离心的方法很难达到理想的纯度。所以后来也发展出了其它一些有效的分离方法,如双相系统法、免疫亲和法等。

#### 1.2 液态两相系统分离

两相分配法的基本原理是在一定浓度范围内两种高分子的亲水聚合物聚乙二醇 PEG3350 和葡聚糖 DextranT-500 等质量比混合后不能充分溶合而形成悬浮的两相。PEG3350 位于上相,DextranT-500 位于下相。当物质进入双水相体系后,由于表面性质、电荷作用和各种力(疏水键、氢键

等)的存在和环境因素的影响,使其在上、下相中分配的浓度不同。质膜倾向于分配上相,而其他内膜倾向于分配下相或界面,从而达到分离的目的。近年来此法已广泛应用于各种组织和细胞质膜的纯化。Alexandersson 等<sup>[7]</sup>用两相法分离的拟南芥质膜纯度为 95% 且含胞质侧的膜泡,所鉴定的整合膜蛋白质中的 2/3 是以前文献没证实的。

两相法系统最常用的是聚乙二醇和葡聚糖系统,其它也有盐和多聚物系统、PEG/硫酸盐系统、PEG/磷酸盐系统<sup>[8]</sup>。

两相法系统每相中含有 70% ~ 90% 的水,为质膜的分离提供了温和的环境。与蔗糖密度梯度离心相比,两相法分离质膜不需要高速离心,是一种快速、简便和有效的方法,所得质膜纯度较高,产率稳定,还有数据表明两相法获得的质膜还保持了功能活性(如受体结合等)和未修饰的酶活性<sup>[9]</sup>。

影响两相分配效果的因素是多样和复杂的。膜在传统两相法中的分离要考虑膜表面的性质、电荷情况,但聚合物的浓度、分子质量大小和盐度是主要的影响因素。

此外 Anders Persson<sup>[10]</sup>等提出了亲和两相分离法,可很好地分离低丰度的膜蛋白质。常用的亲和两相试剂: PEG- 抗体、PEG- 胶衍生物和葡聚糖-wheat germ agglutinin 等。Persso A 等<sup>[11]</sup>利用亲和两相法提纯了质膜。它将 lectin wheat-germ agglutinin(WGA) 共轭结合到葡聚糖上,利用 WGA 能识别质膜表面的糖链,结合糖蛋白质和糖脂,和质膜外表面的唾液酸和 N- 乙酰氨基葡萄糖结合的性质将质膜从其它膜中纯化出来。

### 1.3 阳离子硅胶法

阳离子硅胶分离细胞膜<sup>[12]</sup>的方案在 20 多年前就被提出来了。它是通过阳离子硅胶与细胞膜结合来增加细胞膜的密度(大于细胞核),从而与其它细胞器分离。这种方法主要用来富集细胞质膜。Rahbar<sup>[13]</sup>等运用 LUDOX-CL 阳离子硅胶法结合质谱和生物信息学的蛋白质组学技术分离贴壁培养的人乳腺癌细胞系 MCF-7 和悬浮培养的人复合骨髓瘤细胞系 RPMI8226 的细胞膜。RPMI8226 质膜富集了 18 倍。分离的 MCF-7 细胞质膜,在鉴定的 366 种蛋白质中,50% 为质膜蛋白质。该方法也可以用于活组织样品的质膜提取。Schnitzer<sup>[14]</sup>等将硅胶溶液灌流到大鼠肺组织中,然后匀浆组织分离细胞膜,得到了富集 20 倍的质膜样品。

与梯度离心法相比,此法操作简单,得率也

较高,同时可使膜片外表面免受化学和酶的破坏。Cezanne<sup>[15]</sup>发现用 percoll 梯度离心得到的质膜易受到溶酶体等的污染,且无法从纯化的质膜中去除 percoll,影响了下一步的纯化和分析。但用硅胶法分离质膜时,质膜得到了很好的富集,得率为 65%,且硅胶能大量地去除。不过硅胶法不能用于组织匀浆样品,对原材料需求大,且存在内质网的污染。同时硅胶和细胞表面的结合受到 pH, 渗透压和反应溶液中离子条件的影响。同时细胞全部破碎是很关键的,因为未破碎的细胞会与硅胶包裹的膜片段发生共沉淀,造成对膜分离的影响。但细胞不能破碎过度,因为它会破坏硅胶层,减少质膜的得率。

### 1.4 连续自由流电泳

连续自由流电泳(CFEE)是由连续流动的支持流动相缓冲液携带样品相在电场的作用下实现分离的一种电泳分离技术,也被称为 Hanning 型自由流电泳,简称自由流电泳(FFE)<sup>[16]</sup>。FFE 是一种基于液相的等电聚焦的方法,根据等电点、分子质量大小、分子形状等不同,样品的泳动能力不同,因而被分离成多个组分并收集。自由流电泳能有效分离低丰度的膜蛋白质,广泛地用于分离细胞膜,因为在生理条件下,细胞膜的表面带有大量的负电荷。Cutillas 等<sup>[17]</sup>用 FFE 法提取质膜,根据标志酶活分析,质膜得到了很好地富集,且所鉴定的含有一个至多个跨膜结构域的质膜蛋白质比例高。

由于 FFE 是一种基于液体的样品分离/制备技术,它同所有下游分离技术(如 2-DE 或 LC-MS)相容。它可以在非常温和的环境(低密度和低粘度的等渗介质)中进行,纯化的速度快,可以连续进样、连续分离和被分离组分的连续收集,因此样品的上载量没有限制,有利于发现低丰度的膜蛋白质。液相分离保证初始样品具非常高的回收率。

然而因自由流电泳是完全无载体的液相电泳,导致稳定性、分辨率都不易控制。且大部分的细胞器,由于具有相似的表面电荷密度,所以很难用这种方法分离。因此现在单纯通过 FFE 分离膜蛋白质的文章不多,通常与其他方法结合纯化质膜<sup>[18]</sup>。

### 1.5 亲和纯化

#### 1.5.1 生物素亲和纯化

最近很多研究报道用生物素-亲和素亲和纯化法提取细胞质膜,明显降低了其他亚细胞结构

蛋白质的污染. 亲和素 (avidin) 又称抗生物素 (biotin) 蛋白质, 每个亲和素分子有生物素结合的 4 个位点, 二者可牢固结合成不可逆的复合物. 现在使用更多的是从链霉菌中提取的链霉亲和素 (streptavidin), 是理想的与生物素结合的试剂. 生物素-亲和素纯化质膜的原理是水溶性生物素可以标记活细胞的细胞表面蛋白质, 通常与质膜表面的赖氨酸  $\epsilon$ -氨基共价结合, 而不会穿过质膜标记细胞内的蛋白质, 然后利用亲和素亲和纯化标记了生物素的细胞质膜, 能很好地富集低丰度的质膜表面蛋白质. Zhao<sup>[19]</sup> 等用生物素标记亲和纯化人肺癌细胞质膜, 然后用 SDS-PAGE 和 LC-MS/MS 对质膜蛋白质进行分析, 最后鉴定出了 898 个蛋白质, 其中 781 种为已知的定位在质膜上的蛋白质, 且其中的 526 (67.3%) 为整合膜蛋白质. 这样可以将质膜富集 400 倍而污染很少, 尤其是经高盐 (1 mol/L KCl) 和高 pH (0.1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 洗涤后, 可以得到很纯的整合质膜蛋白质.

为了研究细胞表面蛋白质, 必须避免对胞内蛋白质的标记, 因此防止细胞的破裂十分重要. Hurley<sup>[20]</sup> 等发现这种方法能保持被标记细胞的活性, 被标记的细胞还能做功能和其它方面的研究, 如检测细胞表面受体和配体的相互作用, 检测细胞表面蛋白质的更新.

生物素亲和法需要大量的细胞样品, 因此对体内样品的标记受到限制. 但可以很好地应用于样品丰富的癌细胞系及其它培养细胞系的质膜蛋白质组表达谱研究<sup>[21]</sup>.

### 1.5.2 凝集素亲和纯化

凝集素亲和标记法<sup>[22, 23]</sup>是采用凝集素与细胞膜表面的糖脂化合物决定簇反应, 结合超速离心来分离质膜的方法, 此方法同样会有不同程度的内质网等污染.

凝集素 (Lectin) 是指一种从各种植物, 无脊椎动物和高等动物中提纯的糖蛋白质或结合糖的蛋白质. 已知哺乳动物的质膜有占蛋白质总量 1% ~ 10% 的碳水化合物, 并主要以糖蛋白质的形式存在. 凝集素最大的特点在于它们能识别糖蛋白质和糖肽中, 特别是细胞膜中复杂的碳水化合物结构, 即细胞膜表面的糖脂化合物决定簇. 一种凝集素具有对某一种特异性糖基专一性结合的能力, 如刀豆素与  $\alpha$ -D-吡喃糖基甘露糖 ( $\alpha$ -D-Mannopyranosyl) 结合, 麦芽素与 N-乙酰糖胺 (N-acetylglucosamine) 结合. 因此, 凝集素可以作

为一种探针来研究细胞膜上特定的糖基.

由于大量的膜蛋白质外表面高度糖基化, Springer<sup>[24]</sup> 用凝集素亲和法选择性地富集培养的卵巢瘤细胞的糖基化蛋白, 成功地鉴定了大量的整合膜蛋白质, 包括受体 (酪氨酸激酶受体, 多跨膜结构域受体)、膜结合受体、蛋白酶、膜结构蛋白和黏附因子等.

每种方法都有自己的优点, 然而单一的方法常常并不能达到很好的效果, 研究者往往是将两种或两种以上的方法组合使用<sup>[25, 26]</sup>. Norling<sup>[25]</sup> 等第一次用两相法结合蔗糖密度离心的二维分离方法从蓝藻菌属 6803 中纯化了质膜和类囊体膜, 得到的膜纯度高, 其他细胞器的污染少.

### 1.6 细胞膜微区结构分离

目前的研究表明膜上受体在介导跨膜信号传导时, 通常是在细胞质膜上的质膜微囊和脂筏结构中进行的, 与微囊不同的是, 脂筏这类特殊的微区, 其尺寸大多数在纳米量级上 (数十个到上百个纳米), 由于太小而无法用光学显微镜观测到, 故而长期徘徊在我们的视野之外. 因此膜微区的蛋白质组学研究正成为生物学研究的一个热点. 目前已经从各种哺乳动物的细胞中纯化到微区结构, 包括上皮细胞、内皮细胞、肌肉、神经和肿瘤细胞等.

目前已报道从组织或组织培养的细胞中纯化膜穴的方法大致可分为以下 5 类:

1) 早期微区样品的制备一般是利用它们在不溶于非离子去垢剂 Triton X-100 的特点, 经 1% Triton X-100 处理后通过 5% 至 30% 的蔗糖密度离心收集低密度去垢剂不溶的微区<sup>[27]</sup>. 这是现在分离质膜微区成分最常用的方法, 随后也发展了其他去垢剂, 包括 Lubrol WX、Brij 58、NP40、CHAPS 和 octylglucoside 等. 但还是会有去垢剂可溶的高丰度蛋白质的污染.

2) 另一个有效地从组织和组织培养的细胞中纯化微区的方法是根据微区轻的浮力密度. 相对其他可溶性的膜, 微区结构高的脂/蛋白质比例使其密度较低, 故通过离心分离得到微区结构. Smart<sup>[28]</sup> 等首先用 Percoll 梯度分离到质膜, 接着将膜超声至小的片段后经过两步 OptiPrep 密度梯度离心, 收集样品经免疫印迹分析, 微区成分相对于粗质膜富集了 2 200 倍, 微区受体相对于粗质膜富集了 100 倍, 且微区含有所有膜胆固醇的 4%. 但是这种方法费时且得率也较低.

3) Katsumata<sup>[29]</sup> 等首先用蔗糖梯度离心得到低密度的 DRM<sub>s</sub> 成分,由于脂肪、蛋白质等的复杂成分及其相互作用或翻译后修饰使得 DRM<sub>s</sub> 不均一,为了有效地分离 DRM<sub>s</sub> 各组分,他们进一步通过 FFE,根据各个 DRM<sub>s</sub> 成分电荷的不同很好地分离了密度相同的 DRM<sub>s</sub>。

4) 组织匀浆后经常规的分级分离,首先去除外周膜蛋白质,接着将质膜经蔗糖梯度离心富集轻密度的质膜后,进一步用 TritonX-100 处理,蔗糖离心,最后经碳酸钠处理得到所需的微区样品<sup>[30]</sup>。

5) 通过离心或免疫吸附从阳离子硅胶纯化的细胞质膜中回收膜穴, Schnitzer<sup>[31]</sup> 等将阳离子硅胶灌注到大鼠肺血管中, Nycodenz 梯度离心和蔗糖梯度离心得到所需的微区结构。经 caveolin 等标志蛋白质定量免疫印迹分析,发现质膜成份相对于起始匀浆物富集了 30 倍,而分离到的微区成分中的 caveolin 等相对于开始质膜成分富集了 13 倍,且分离到 80% ~ 95% 的信号分子。Stan<sup>[32]</sup> 等用阳离子硅胶包裹内皮细胞后超声和蔗糖梯度分离粗质膜,接着用 anti-caveolin-coated 微磁珠免疫吸附分离微区结构,此法富集到 90% 的 Caveolin。

## 2 质膜纯度判断标准

提取的质膜一般都需要进行纯度评价。到目前为止,实际上多数关于膜蛋白质的研究在进行样品制备时或多或少地含有其他细胞器的污染。

纯度评价一般从 4 个方面进行:形态学观察、特异酶活测定、免疫印迹和膜组分分析法。

### 2.1 形态学方法

形态学方法:形态学观察主要是通过显微镜来直接观察膜结构,看是否有其它组分的存在,常规透射电子显微镜观察纯的细胞膜成空的膜泡或片状的结构。扫描电镜观察质膜的外表面可能存在一些细胞包被(糖萼)物质。电镜是纯度鉴定的强有力的手段。

### 2.2 酶活测定法

特异酶活测定是比较经典的亚细胞结构纯度评价方法,原理是每种细胞器都有特定的标志酶,通过测定提取的膜组分和匀浆液中目标膜组分和其他细胞器标志酶的特异酶活并进行排除,就可以计算出提取的细胞器相对于匀浆液的富集度和其他细胞器的污染程度。由于培养细胞的酶浓度会发生改变,用标志酶活作为测定质膜的产率和纯度的唯一标准是不够的。

质膜常用标记酶:Alkaline phosphatase (AP), Alkaline phosphodiesterase I (APD),  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 以及 5'-Nucleotidase<sup>[15]</sup>。其它细胞器的标记酶:苹果酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶(线粒体);半乳糖苷转移酶和 N-乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶(高尔基体膜);酸性磷酸酶,  $\beta$ -半乳糖苷酶和  $\beta$ -氨基葡萄糖苷酶(溶酶体);过氧化氢酶(过氧化物酶体);葡萄糖-6-磷酸酶或 NADPH-细胞色素 c 还原酶(内质网)<sup>[15]</sup>。

### 2.3 免疫印迹法 (Western 印迹法)

免疫印迹法主要利用细胞器上特定蛋白质的抗体通过免疫印迹来评价纯度和污染情况。

纵观这几年的关于质膜蛋白质组研究的文献,常用的质膜 western blot marker 有:Anti-caveolin 1, Anti-H-ATPase (P-type), Anti-Flotillin, Anti- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase<sup>[13]</sup>, anti-5'-Nucleotidase 等,且可用其它细胞器的标记蛋白质来检测污染<sup>[9]</sup>。

### 2.4 膜组分分析

在各亚细胞器中,脂质与蛋白质的比例是各不相同的。在细胞膜中分析脂质与蛋白质的比例可作为质膜纯度评价的标准之一。Cezanne<sup>[24]</sup> 等发现提取的质膜相对于整个细胞匀浆物,磷脂成分相对减少,而胆固醇相对增高,进一步验证了所提质膜的纯度提高。

目前,很多文章同时用了两种或多种方法检测质膜纯度,如电镜和酶活<sup>[15]</sup>。

### 2.5 微区结构的纯度判断

微区结构纯度的检验同样有电镜法<sup>[29]</sup>(微区成直径为 70 nm 左右的空膜泡结构),免疫印迹法<sup>[28]</sup>,以及膜组分分析法<sup>[27]</sup>。有时两种方法同时使用,如 Western 印迹法和组分分析法<sup>[28]</sup>。Caveolin-1 是破碎细胞分离膜穴的标记蛋白,但它并不是评价纯度的理想分子,因为它在膜穴中的浓度是变化的。此外纯化中所用的物理手段(如阳离子硅胶、超声、TritonX-100 等)可以改变膜穴的分子组成,使各个实验室做出的结果对比困难。另外一个有效的膜穴确认方法是它们相对大多数质膜有较小的浮力密度,不管是否用 TritonX-100 处理过,它们都可漂浮在较小的密度梯度层中。

## 3 小结与展望

在提取细胞质膜时,由于细胞膜和其他内膜系统在结构和功能上都联系紧密,因此现有的分离方法都不可避免地存在内膜系统的污染,区别

只在于污染程度的轻重。

目前没有一种单一的方法能达到很好的效果,研究者往往是将两种或两种以上的方法组合使用,如一般先用经典的离心方法分离得到粗膜样品,然后再利用以上介绍的替代方法进一步纯化。

鉴于脂筏和质膜微囊含有较多信号分子,因而对它们与信号转导的关系比较关注。然而脂筏和质膜微囊都很小,不易在位研究,又难以分离纯化,这就需要引进与创立新的方法才能将这方面的研究引向深入。

### 参考文献 (References)

- [1] WALLIN E, VON H G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms[J]. *Prot Sci*, 1998, 7: 1029-1038.
- [2] LISANTI M P, SCHERER P E, VIDUGIRIENE J, *et al.* Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease[J]. *J Cell Biol*, 1994, 126: 111-126.
- [3] RICHARD J, SIMPSON, LISA M C, *et al.* Proteomic analysis of the human colon carcinoma cell line(LIM1215): development of a membrane database[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1707-1732.
- [4] SPRENGER R R, SPEIJER D, BACK J W, *et al.* Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25: 156-172.
- [5] CHEN X, WALKER A K, STRAHLER J R, *et al.* Organellar proteomics: analysis of pancreatic zymogen granule membranes [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(2): 306-312.
- [6] BLONDER J, TERUNUMA A, CONRADS T P, *et al.* A proteomic characterization of the plasma membrane of human epidermis by high-throughput mass spectrometry[J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(4): 691-699.
- [7] ALEXANDERSSON E, LARSSON C, KJELLBOM P, *et al.* Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking[J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(11): 1543-1556.
- [8] MARMAGNE A, ROUET M A, FERRO M, *et al.* Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(7): 675-691.
- [9] MORRE D J, MORRE D M. Preparation of mammalian plasma membranes by aqueous two-phase partitioning[J]. *BioTechniques*, 1989, 7(9): 946-958.
- [10] PERSSON A, JERGIL B. The purification of membranes by affinity partitioning[J]. *FASEB J*, 1995, 9(13): 1304-1310.
- [11] PERSSO A, JERGIL B. Purification of plasma membranes by aqueous two-phase affinity partitioning[J]. *Anal Biochem*, 1992, 204(1): 131-136.
- [12] CHANEY L K, JACOBSON B S. Coating cells with colloidal silica for high yield isolation of plasma membrane sheets and identification of transmembrane proteins[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258(16): 10062-10072.
- [13] RAHBAR A M, FENSELAU C. Integration of Jacobson's pellicle method into proteomic strategies for plasma membrane proteins[J]. *J Proteome Res*, 2004, 3(6): 1267-1277.
- [14] OH P, LI Y, SCHNITZER J E, *et al.* Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy[J]. *Nature*, 2004, 429(6992): 629-635.
- [15] CEZANNE L, NAVARRO L, TOCANNE J F. Isolation of the plasma membrane and organelles from Chinese hamster ovary cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1112(2): 205-214.
- [16] MORITZ R L, JI H, SIMPSON R J, *et al.* Proteomic analysis of colorectal cancer: prefractionation strategies using two dimensional free-flow electrophoresis[J]. *Comp Funct Genom*, 2005, 6: 236-243.
- [17] CUTILLAS P R, BIBER J, MARKS J, *et al.* Proteomic analysis of plasma membrane vesicles isolated from the rat renal cortex[J]. *Proteomics*, 2005, 5(1): 101-112.
- [18] CUPPOLETTI J. Continuous flow electrophoresis for study of membrane protein compartments. Focus on "More than apical: distribution of SGLT1 in Caco-2 cells"[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 285(4): C735-736.
- [19] ZHAO Y, ZHANG W, KHO Y, *et al.* Proteomic analysis of integral plasma membrane proteins[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(7): 1817-1823.
- [20] HURLEY W L, FINKELSTEIN E, HOLST B D. Identification of surface proteins on bovine leukocytes by a biotin-avidin protein blotting technique[J]. *J Immunol Methods*, 1985, 85(1): 195-202.
- [21] PEIRCE M J, WAIT R, BEGUM S, *et al.* Expression profiling of lymphocyte plasma membrane proteins[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(1): 56-65.
- [22] GHOSH D, KROKHIN O, ANTONOVICI M, *et al.* Lectin affinity as an approach to the proteomic analysis of membrane glycoproteins[J]. *J Proteome Res*, 2004, 3(4): 841-850.
- [23] LIN G, JUNE R, EISENMAN, *et al.* A Proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1: 30-36.
- [24] SPRINGER D L, AUBERRY D L, AHAM M, *et al.* Characterization of plasma membrane proteins from ovarian cancer cells using mass spectrometry[J]. *Dis Markers*, 2003-2004, 19(4-5): 219-228.
- [25] ZAK E, ANDERSSON B, PAKRASI H. 2D-isolation of pure plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *FEBS Lett*, 1998, 436(2): 189-192.
- [26] VOGELMANN R, NELSON W J. Fractionation of the epithelial apical junctional complex: reassessment of protein distributions in different substructures[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(2): 701-716.
- [27] BORNER G H, SHERRIER D J, WEIMAR T, *et al.* Analysis of detergent-resistant membranes in arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts[J]. *Plant Physiol*, 2005, 137(1): 104-116.
- [28] SMART E J, YING Y S, MINEO C, *et al.* A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92(22): 10104-10108.
- [29] KATSUMATA O, KIMURA T, NAGATSUKA Y, *et al.* Charge-based separation of detergent-resistant membranes of mouse splenic B cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319(3): 826-831.
- [30] CHANG W J, YING Y S, ROTHBERG K G, *et al.* Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae[J]. *J Cell Biol*, 1994, 126(1): 127-138.
- [31] SCHNITZER J E, OH P, JACOBSON B S, *et al.* Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: Microdomains enriched in caveolin, Ca<sup>2+</sup>-ATPase, and inositol trisphosphate receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92(5): 1759-1763.
- [32] STAN R V, ROBERTS W G, PREDESCU D, *et al.* Immunolocalization and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles(caveolae) [J]. *Mol Biol Cell*, 1997, 8(4): 595-605.