

- channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina. *Exp Eye Res*, 2000, 70:475-484.
- 27 Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, et al. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem*, 1999, 72:2565-2572.
- 28 Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res*, 2004, 1000:19-31.
- 29 Calapai G, Marciano MC, Corica F, et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol*, 2000, 401:349-356.
- 30 Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:4635-4640.
- 31 Matsushita H, Johnston MV, Lange MS, et al. Protective effect of erythropoietin in neonatal hypoxic ischemia in mice. *Neuroreport*, 2003, 14:1757-1761.
- 32 Morita M, Ohneda O, Yamashita T, et al. HLF/HIF-2 alpha is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J*, 2003, 22:1134-1146.
- 33 Grimm C, Wenzel A, Groszer M, et al. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med*, 2002, 8:718-724.
- 34 Junk AK, Mammis A, Savitz SI, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99:10659-10664.
- 35 Bocker-Meffert S, Rosenstiel P, Rohl C, et al. Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43:2021-2026.
- 36 Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N, et al. Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Curr Hematol Rep*, 2003, 2:465-470.
- 37 Wang CH, Liang CL, Huang LT, et al. Single intravenous injection of naked plasmid DNA encoding erythropoietin provides neuroprotection in hypoxia-ischemia rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314:1064-1071.
- 38 Rex TS, Allocca M, Domenici L, et al. Systemic but not intraocular Epo gene transfer protects the retina from light-and genetic-induced degeneration. *Mol Ther*, 2004, 10:855-861.

(收稿日期:2004-03-19)

(本文编辑:唐健)

## 视网膜疾病的蛋白质组研究

肖迎 唐仕波

**【摘要】** 蛋白质组学是研究细胞内所有蛋白质的组成及其动态变化规律的科学,它是在蛋白质水平定量、动态、整体地研究生物体,并在更深层次上获得对疾病的发病机制、过程以及药物治疗靶点的新的认识,但在眼部尤其是视网膜中的研究尚处于起步阶段。现对蛋白质组学的概念、研究内容、相关技术和在视网膜中的研究现状进行综述。

**【关键词】** 视网膜疾病; 蛋白质类/分析; 研究技术; 综述文献

中图分类号:R774.1 R446

以人类基因组测序完成为标志,生命科学进入了后基因组时代,研究的重心从揭示基因的遗传信息转移到从分子、蛋白质整体水平对功能进行研究,由此产生了一门新兴学科——蛋白质组学(proteomics)<sup>[1]</sup>。

### 1 蛋白质组学的概念和研究内容

蛋白质组的概念首先由澳大利亚的 Wasinger 等<sup>[2]</sup>在 1994 年提出,指在特定的发育阶段,某一细胞或机体中基因组所表达的全部蛋白质的总和,它不仅包括基因转录产物直接翻译的蛋白,还包括转录产物选择性剪接后所编码的蛋白以及翻译后修饰蛋白等。蛋白质组学即是研究某一细胞或机体中全部蛋白质的组成及其动态变化规律的科学<sup>[3]</sup>,它是在蛋白质水平定量、动态、整体地研究生物体,并由此在更深层次上获得对细胞生理和生物化学过程、调控网络、以及疾病过程的广泛而完整的认识。目前蛋白质组学研究的内容和目的主要是比较和分析正常与异常组织细胞、同一疾病不同发展阶段、疾病或治疗等不同条件下蛋白质的表达差异,通过对差异表达蛋白质进行鉴定和定量,寻找与疾病相关的蛋白质和蛋白质药靶,确定在

疾病发生发展过程中起主要作用的蛋白质组群,从而为疾病致病机制的研究和药物治疗提供新的手段和依据。目前已在恶性肿瘤、心血管疾病、感染性疾病等方面取得初步进展<sup>[4]</sup>。

### 2 蛋白质组学研究的相关技术

蛋白质组学的研究程序可概括为:蛋白质制备→等电聚焦→聚丙烯酰胺凝胶电泳→凝胶染色→挖取蛋白质点→胶内酶切→质谱分析确定肽指纹图谱或部分氨基酸序列→数据库确定蛋白。常见的几种研究方法有双向凝胶电泳、多维液相色谱、蛋白芯片以及它们和质谱鉴定的有机结合。其中,双向凝胶电泳和质谱技术是两大支柱技术。

#### 2.1 双向凝胶电泳法(2-DE)

利用蛋白质的不同性质可分离复杂的蛋白质样品,目前多利用蛋白质某两个性质的不同进行二维分离。双向电泳法是二维分离的经典技术,其基本原理是利用蛋白质分子的等电点和相对分子质量的不同进行分离。其双向电泳体系包括:第一向等电聚焦,以两性电解质载体形成一个连续而稳定的固相化 pH 梯度,由于蛋白质分子等电点不同,在偏离其等电点的位置带有电荷而在电场中移动<sup>[5]</sup>。第二向为十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳电泳,利用阴离子去垢剂 SDS 掩盖蛋白分子

间的电荷差异,蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶区带电泳中的迁移率将取决于其相对分子量的不同而进行分离<sup>[6]</sup>。分离后的蛋白质用考马斯亮蓝染色、银染色、荧光染色或放射性标记等方法显示。其中银染色是一种灵敏度较高的染色方法,可检出 0.1~0.5 ng 的蛋白质样品,较普通考马斯亮蓝染色灵敏 50~100 倍。2-DE 是目前使用最广泛的分离复杂蛋白质混合物的技术,一般来说可以从单个蛋白质样品中解析到 2 000~3 000 个蛋白质点,或可以从高通量凝胶中解析多达 10 000 个蛋白质。其他一些蛋白质分离方法包括离子交换、分子筛法、高效液相色谱法、毛细管等电聚焦(IEF)以及毛细管电泳、亲和层析色谱法等技术<sup>[7-9]</sup>。

## 2.2 质谱技术(MS)

经 2-DE 分离后切下凝胶上差异表达的蛋白质,经酶解消化后形成小的肽片段,得到肽片段质量图谱,称为肽质量指纹谱(peptide mass fingerprinting),再进行分析鉴定。蛋白质组学的一个重大突破便是在蛋白质鉴定中应用质谱技术。MS 无需纯化蛋白,可同时鉴定多个蛋白质,具有灵敏度高、准确度高、易自动化的特点,已逐步取代了传统的 Edman 降解测序与氨基酸组成分析法,是目前蛋白质组鉴定的核心技术。质谱技术的基本原理是使样品分子离子化后,根据不同离子间的质荷比( $m/z$ )的差异来分离并确定蛋白质的相对分子量,按照样品分子离子化的方式分为电喷雾离子化质谱(electrospray ionization mass spectrometry)和基质辅助的激光解吸质谱(matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry)<sup>[10]</sup>。电喷雾离子化质谱是以高电场连续离子化的方式使样品电离形成非常细小的喷雾状带电液滴,测定相对分子量数万的蛋白质准确度可达万分之一。激光解吸质谱常与飞行时间质谱(time of flight-MS)联用,称为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS),是目前肽质量指纹谱测定最常使用的方法。其原理是将样品与小分子基质混合,用紫外激光以脉冲辐射离子化方式使基质分子吸收能量,与样品解吸并电离形成荷电离子,这些离子在仪器场中飞行的时间长短与  $m/z$  成正比,由此绘制出一张质谱图,显示样品中各种蛋白质的分子量、含量等信息。该法精确度高,可达 0.1 个质量单位;灵敏度高,可分解亚 pmol 量的蛋白质;分析时间短,同时不会破坏所测定的蛋白质,目前已经实现了高度的自动化<sup>[11]</sup>。

## 2.3 蛋白质芯片技术

为适应大规模的筛查和临床检测,近年来产生了蛋白质芯片,即把探针蛋白高密度排列在固相支持物表面,通过探针特异性地捕获样品中的靶蛋白并进行定性、定量分析,具有高通量、微型化及自动化操作、结果重复性好等优点<sup>[12]</sup>。目前蛋白质芯片其芯池数目可高达 1 600 个/cm<sup>2</sup>,样品量只要 2~10  $\mu$ l 即可,可同时检测数千个样品<sup>[13]</sup>。蛋白质芯片按其形式一般分为 3 种:普通玻璃载玻片芯片、多孔凝胶覆盖芯片、微孔芯片。根据制作方法和应用的不同,分为二种:一种是蛋白质功能芯片,用于检测天然蛋白质活性;另一种是蛋白质检测芯片,能够高度并行的检测给定生物样品中的蛋白质<sup>[11]</sup>。目前,蛋白质芯片在一些遗传性疾病、新药开发、肿瘤以及微生物感染的生物学

标志方面已取得一定的成果。

## 2.4 生物信息学(bioinformatics)

生物信息学是以计算机和计算机网络为工具,用数学和信息学的理论和方法对生物信息进行收集、整理、储存和分析的科学,它由数据库、计算机网络和应用软件组成。生物信息学在蛋白质组学研究中具有 2 个重要应用:一是数据库的构建与搜索,二是分析双向电泳凝胶图谱。蛋白质组数据库储存了有机体、组织或细胞所表达的全部蛋白质信息,相应的软件可分析双向凝胶电泳和质谱得到的数据,以识别蛋白质并描述其基本理化性质,预测潜在的翻译后调节方式和三维结构。其软件有:Peptide Search、Make2ddb、TagIdent 等。网址有 <http://www.expasy.ch/ch2d/2DHunt>; <http://www.ypd.com>; <http://www.expasy.ch> 等<sup>[15]</sup>。

## 3 蛋白质组在视网膜中的研究进展

目前蛋白质组在眼科的应用尚处于起步阶段,尤其在视网膜方面的研究较少,主要集中于常见视网膜变性及其增生性病变中,但对今后视网膜疾病的深入研究起到很好的探索作用。

### 3.1 老年性黄斑变性(AMD)

玻璃疣是位于视网膜色素上皮(RPE)和 Bruch 膜之间的一种细胞外沉淀物,是 AMD 进展的危险因素。为了从分子角度理解玻璃疣的产生和组成,Crabb 等<sup>[16]</sup>建立了一套分离微克级玻璃疣和 Bruch 膜蛋白的方法,并用蛋白质组学进行分析。从 18 名正常人和 5 例 AMD 患者尸体眼的视网膜中分离玻璃疣,用液相色谱串联质谱法共分析出 129 种蛋白质。正常对照组的周边部视网膜玻璃疣样物质中,最常见的蛋白质为基质金属蛋白酶抑制剂-3、clusterin、玻璃体结合蛋白(vitronectin, 识别凋亡细胞的物质)和血清白蛋白,而在 AMD 患者的玻璃疣中,晶体蛋白则更常见。同时在 AMD 患者中,可见到很多蛋白质氧化修饰现象,如基质金属蛋白酶抑制剂-3、玻璃体结合蛋白和羧乙基化的吡咯蛋白螯合物明显的共价交联。羧乙基化的吡咯蛋白螯合物是由 Bruch 膜中含二十二碳六烯酸盐的脂质氧化而来,AMD 患者的 Bruch 膜及玻璃疣内该蛋白含量较正常人明显增高,可能是随年龄增长,视网膜抗氧化损伤的自身防御机制减弱,多种蛋白在氧化作用的刺激下,与 Bruch 膜中的脂质成分交联、结合并难于正常分离、代谢而逐渐形成沉淀。另一种蛋白质的氧化修饰是糖基化终末产物在玻璃疣中的堆积,可能直接刺激血管内皮生长因子(VEGF)产生并促进脉络膜新生血管的生成。这些结果强烈支持在 AMD 的发病过程中氧化损伤所占据的重要地位,同时也提示:蛋白质的氧化修饰在玻璃疣的形成中举足轻重。玻璃疣蛋白质组分析成为探讨 AMD 病因学及其发病机制的一种新方法。Schutt 等<sup>[17]</sup>还提取了 AMD 患者 RPE 细胞中的脂褐素颗粒对其进行蛋白质组的研究,用电喷雾离子化质谱发现了包括细胞骨架蛋白、离子通道蛋白、光传导蛋白在内的 70 余种蛋白质和 4 种未知蛋白。总之,AMD 患者视网膜的蛋白组成和含量均与正常人有明显差异,蛋白的异常导致视网膜的各种病理变化和视功能异常。

### 3.2 视网膜变性疾病

早在 1989 年和 1991 年,就有国外的学者应用 2-DE 的方法证实视网膜变性的鸡和猫视网膜中,均有不同程度的蛋白质异常<sup>[18, 19]</sup>。RCS(Royal College of Surgeons)鼠是视网膜色素变性的经典动物模型,其基因突变的结果导致 RPE 对视杆细胞外节(ROS)脱落膜盘的碎片吞噬不良,盘膜碎片在光感受器和 RPE 之间异常堆积并最终导致感光细胞变性。1992 年 Heth 等<sup>[20]</sup>在实验中发现,与正常的 Long-Evans 大鼠相比, RCS 鼠的 ROS 蛋白质中,有 13 种发生含量变化,其中 6 种蛋白的磷酸化明显下降,影响跨膜信号的传递,因此他认为蛋白激酶的功能失调和蛋白质磷酸化作用的减弱导致了视杆细胞外段吞噬作用的减弱。RCS 鼠中还有一系列蛋白质的异常,如视蛋白 opsin、arrestin、热休克蛋白-70、包括碱性成纤维细胞生长因子在内的神经营养因子、磷脂和 ROS 中部分蛋白质磷酸化水平异常等,但不清楚这些蛋白质的变化是视网膜变性的原因还是结果。

为进一步探讨 RCS 鼠发病的分子病理机制,1999 年 Maeda 等<sup>[21]</sup>对 RCS 和正常对照鼠的视网膜蛋白质和 ROS 中的蛋白质分别进行了分析。研究显示:3~8 周 RCS 鼠的全视网膜膜蛋白质较正常鼠有减少趋势,且随鼠龄的增长愈加明显。出生 3 周,视网膜未见明显病变时,ROS 蛋白量正常,出生 6 周时,视网膜出现显著的萎缩病变,蛋白含量下降,尤其是相对分子质量  $20 \times 10^3$ 、 $23 \times 10^3$  和  $67 \times 10^3$  三种蛋白,以  $20 \times 10^3$  蛋白减少最明显,高效液相色谱法(HPLC)纯化后再进行序列分析证实这种蛋白为 alphaA-晶体蛋白,相对分子质量  $23 \times 10^3$  和  $67 \times 10^3$  则分别对应 recoverin 和视紫红质激酶(rhodopsin kinase)。其中在视网膜萎缩的早期 ROS 受到破坏前,就有视紫红质激酶和 alphaA-晶体蛋白的表达下降。视紫红质激酶是 G-蛋白偶联受体激酶家族的成员之一,同 recoverin 类似,均通过钙离子依赖的方式对视紫红质磷酸化过程进行调节,其异常引发电传导过程的障碍。alphaA-晶体蛋白属于热休克蛋白超家族成员,作为分子伴侣介导应激反应下抑制蛋白凝集、变性和异常折叠而发挥保护作用,并参与新合成的视紫红质的运输和光感受器外段的正常更新,其异常直接影响 RPE 对感光细胞代谢产物的吞噬作用。由于这两种蛋白在光感受器破坏之前就产生异常,因此作者认为二者的缺乏是直接导致视网膜的萎缩原因之一,但其生物过程仍须进一步的深入研究。

### 3.3 糖尿病视网膜病变(DR)

1994 年 Bresgen 等<sup>[22]</sup>就开始用 2-DE 分析增生性糖尿病视网膜病变(PDR)患者玻璃体蛋白成分与正常人玻璃体和血清蛋白的不同。正常的玻璃体内最常见的蛋白质为白蛋白、转铁蛋白、 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶、IgG 和前清蛋白,PDR 玻璃体样本中,转铁蛋白、 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶和前清蛋白的含量下降,但 IgG 水平升高,类似于血清蛋白的组成,说明了血视网膜屏障的破坏。另外,在 PDR 玻璃体蛋白质中,发现 3 种在正常玻璃体和血清内未发现的低分子量蛋白[相对分子质量(5~10) $\times 10^3$ ],可能是病理状态下局部异常蛋白质的额外合成,推测可能与玻璃体视网膜的增生反应有关。

2002 年日本学者 Nakanishi 等<sup>[23]</sup>又用 2-DE 和 MS 分析探

讨、比较 DR 和黄斑裂孔患者玻璃体内可溶性蛋白的不同。两种病变的玻璃体内共检测出 52 种不同的蛋白,其中 35 种是未知蛋白。DR 患者玻璃体内的免疫球蛋白、 $\alpha$ -胰蛋白酶、 $\alpha_2$ -硫酸肝素糖蛋白和补体 C4 蛋白电泳条带明显深于黄斑裂孔者。令人感到惊奇的是,色素上皮源性因子这种强有力的新生血管抑制剂,可在 DR 者的玻璃体可溶性蛋白内测出。在伴有增生性新生血管存在的 DR 患者玻璃体腔内,这种新生血管抑制因子的出现,是否为玻璃体腔内微环境的平衡被打破后一种自身的代偿和恢复机制尚不肯定。而能否将其作为对增生性 DR 治疗的一个突破口,也尚待进一步对 DR 患者各种眼内蛋白含量和功能变化的研究。

### 3.4 其他

Müller 细胞近年来被认为与光感受器的存活、结构和正常功能的维持密切相关。为了探讨体外培养的 Müller 细胞是否与在体内的 Müller 细胞具有相同的特征和功能,2003 年 Hauck 等<sup>[24]</sup>对从新鲜猪眼分离出的原代 Müller 细胞和条件培养液中培养不同时间后的 Müller 细胞进行了蛋白质组学的分析比较。结果显示:与新鲜分离的 Müller 细胞相比,体外培养 3 d 以内的细胞蛋白质组成相对比较稳定,但 3 d 后就开始出现明显的变化,很多与 Müller 细胞生理功能密切相关的重要蛋白质表达明显下降甚至消失,如参与糖酵解、视紫红质光化学循环、解毒作用等的一系列蛋白质显著减少。与之相反的是与细胞移行和增生有关的细胞骨架蛋白在培养过程中逐渐增多。他们的研究首次揭示了在体外培养过程中,Müller 细胞是由一种高度特异性、多功能的胶质细胞状态而去分化为一种纤维母细胞样的细胞,因此体外培养的 Müller 细胞不能完全代表其体内的正常状态和功能,可能需要进一步改进培养方法以利于人们对 Müller 细胞的研究。

在肿瘤相关视网膜病变(cancer-associated retinopathy)中,Ohguro 等<sup>[25]</sup>应用 2-DE、Edman 序列分析、高效液相色谱法(HPLC)等方法,发现有两种大小分别为相对分子质量  $23 \times 10^3$  和  $65 \times 10^3$  的蛋白在 4 例肿瘤患者相关视网膜病变患者的血清蛋白中表达异常。其中相对分子质量  $23 \times 10^3$  的自身抗原蛋白经确认为 recoverin,相对分子质量  $65 \times 10^3$  的蛋白被认为是热休克蛋白-70,可作为分子伴侣参与各种蛋白质的新陈代谢。这种针对 recoverin 和热休克蛋白-70 的自身体液免疫反应可能参与肿瘤相关视网膜病变的发病。

在对视网膜解剖、生理等基础研究方面,也有涉及蛋白质组的一些报道。例如:2004 年 McKay 等<sup>[26]</sup>利用水平分层组织冰冻切片、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质组学的方法,对猪视网膜不同层次的细胞进行了研究。结果发现不同层次的视网膜细胞有独特的基因和蛋白表达。通过液相色谱串联质谱法的分析,他们共发现了 44 种不同的肽和 12 种蛋白分布在视网膜的不同部位,例如:胶质纤维酸性蛋白(GFAP)分布于节细胞层,而 S-抗原则集中于内核层和光感受器层。Matsumoto, Komori<sup>[27]</sup>运用 2-DE 和 MS 对牛视网膜光感受器蛋白质进行分析,识别出 9 种蛋白。West 等<sup>[28]</sup>发现 RPE 细胞在由增生向分化的过程中转变时有 11 种蛋白上调或下调,这

些变化与一些应激反应基因有关。蛋白质组学的方法还可以用于研究鱿鱼的眼叶突触小体中蛋白质的合成<sup>[29]</sup>。鱿鱼的眼叶突触小体主要由视网膜光感受器神经元的突触前膜末端组成, 2-DE 发现了大约 80 种新合成的蛋白质, 质谱技术分析发现多种类型的蛋白如: 细胞质内的酶类, 细胞骨架蛋白, 分子伴侣, 核内编码的线粒体蛋白质和一些数据库内未命名的新蛋白质。结果显示, 鱿鱼光感受器神经元的突触前膜末端可以活跃的合成一系列的蛋白质, 与突触小泡的循环利用、能量的供应及突触结构的维持密切相关。Morel 等<sup>[30]</sup>用蛋白质组学的技术和方法研究了视杆细胞内节盘膜附近高尔基复合体的蛋白组成, 发现有 29 种蛋白优先在高尔基体和其后的盘膜质膜表达, 他认为这些蛋白可能与盘膜的新生、视紫红质的极向排列和代谢有关, 但这些蛋白的具体组成和功能尚待研究。

#### 4 问题和展望

相对于基因组研究, 蛋白质组学还处于起步阶段, 最主要的问题是蛋白质组技术上的不足, 目前正致力于发展高分辨率、高敏感性和高通量自动化的分离和分离后鉴定技术。其次蛋白质组分析难以覆盖所有基因表达产物, 因此, 人们开始以功能为纽带, 注重于从局部入手, 以明确蛋白质群体的功能, 这为未来的蛋白质组研究提供了更为可行的着眼点。

在眼部蛋白质组学的应用还较少, 但对多种变性性眼病来讲, 研究蛋白质组质的异常, 将对明确病因、寻找新的药物治疗方法提供有效和可靠的途径。因此, 蛋白质组在视网膜疾病中的研究有重大的意义和广阔的前景。随着技术和方法的不断创新与发展, 它将成为揭示眼部疾病规律、疾病机制和诊断、防治的有力武器。

#### 5 参考文献

- Fields S. Proteomics. *Proteomics in genomeland*. Science, 2001, 291:1221-1224.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the mollicutes; mycoplasma genitalium. *Electrophoresis*, 1995, 16:1090-1094.
- Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, et al. Proteomics; new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*, 2000, 356:1749-1756.
- Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, et al. Proteomics in human disease; cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis*, 1999, 20:2100-2110.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients; principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*, 1982, 6:317-339.
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, 21:1037-1053.
- Jensen PK, Pasa-Tolic L, Peden KK, et al. Mass spectrometric detection for capillary isoelectric focusing separations of complex protein mixtures. *Electrophoresis*, 2000, 21:1372-1380.
- Shen Y, Berger SJ, Anderson GA, et al. High-efficiency capillary isoelectric focusing of peptides. *Anal Chem*, 2000, 72:2154-2159.
- Patton WF. A thousand points of light; the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*, 2000, 21:1123-1144.
- Keough T, Youngquist RS, Lacey MP. A method for high-sensitivity peptide sequencing using postsourc decay matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:7131-7136.
- Traini M, Gooley AA, Ou K, et al. Towards an automated approach for protein identification in proteome projects. *Electrophoresis*, 1998, 19:1941-1949.
- MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 2000, 289:1760-1763.
- Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, 21:1164-1177.
- Kodadek T. Protein microarrays; prospects and problems. *Chem Biol*, 2001, 8:105-115.
- Haynes PA, Gygi SP, Figeys D, et al. Proteome analysis; biological assay or data archive? *Electrophoresis*, 1998, 19:1862-1871.
- Crabb JW, Miyagi M, Gu X, et al. Drusen proteome analysis; an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:14682-14687.
- Schutt F, Ueberle B, Schnolzer M, et al. Proteome analysis of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells. *FEBS Lett*, 2002, 528:217-221.
- Semple-Rowland SL, Ulshafer RJ. Analysis of proteins in developing rd (retinal degeneration) chick retina using two-dimensional gel electrophoresis. *Exp Eye Res*, 1989, 49:665-675.
- Holmes NG, Curtis R. Changes in a photoreceptor polypeptide correlating with an early-onset retinal dystrophy in the cat. *Mol Cell Biochem*, 1991, 107:111-117.
- Heth CA, Schmidt SY. Protein phosphorylation in retinal pigment epithelium of Long-Evans and Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, 33:2839-2847.
- Maeda A, Ohguro H, Maeda T, et al. Low expression of alphaA-crystallins and rhodopsin kinase of photoreceptors in retinal dystrophy rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40:2788-2794.
- Bresgen M, Baum U, Esser P, et al. Protein composition of the vitreous body in proliferative diabetic retinopathy. An analysis with 2-D-electrophoresis. *Ophthalmologe*, 1994, 91:758-762.
- Nakanishi T, Koyama R, Ikeda T, et al. Catalogue of soluble proteins in the human vitreous humor; comparison between diabetic retinopathy and macular hole. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 776:89-100.
- Hauck SM, Suppmann S, Ueffing M. Proteomic profiling of primary retinal Muller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions. *Glia*, 2003, 44:251-263.
- Ohguro H, Ogawa K, Nakagawa T. Recoverin and Hsc 70 are found as autoantigens in patients with cancer-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40:82-89.
- McKay GJ, Campbell L, Oliver M, et al. Preparation of planar retinal specimens; verification by histology, mRNA profiling, and proteome analysis. *Mol Vis*, 2004, 10:240-247.
- Matsumoto H, Komori N. Ocular proteomics; cataloging photoreceptor proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Methods Enzymol*, 2000, 316:492-511.
- West KA, Yan L, Miyagi M, et al. Proteome survey of proliferating and differentiating rat RPE-J cells. *Exp Eye Res*, 2001, 73:479-491.
- Jimenez CR, Eyman M, Lavina ZS, et al. Protein synthesis in synaptosomes; a proteomics analysis. *J Neurochem*, 2002, 81:735-744.
- Morel V, Poschet R, Traverso V, et al. Towards the proteome of the rhodopsin-bearing post-Golgi compartment of retinal photoreceptor cells. *Electrophoresis*, 2000, 21:3460-3469.

(收稿日期:2004-09-20))

(本文编辑:韦纯义)