GE Healthcare

生命科学园

来自GE Healthcare在生命科学上的最新进展

2009年9月　第29期

ÄKTA™ avant 25新一代的ÄKTA

GE医疗与富士胶片达成战略合作

蛋白预分离与分析新工具——微量液相色谱系统

搭建结构与功能的桥梁

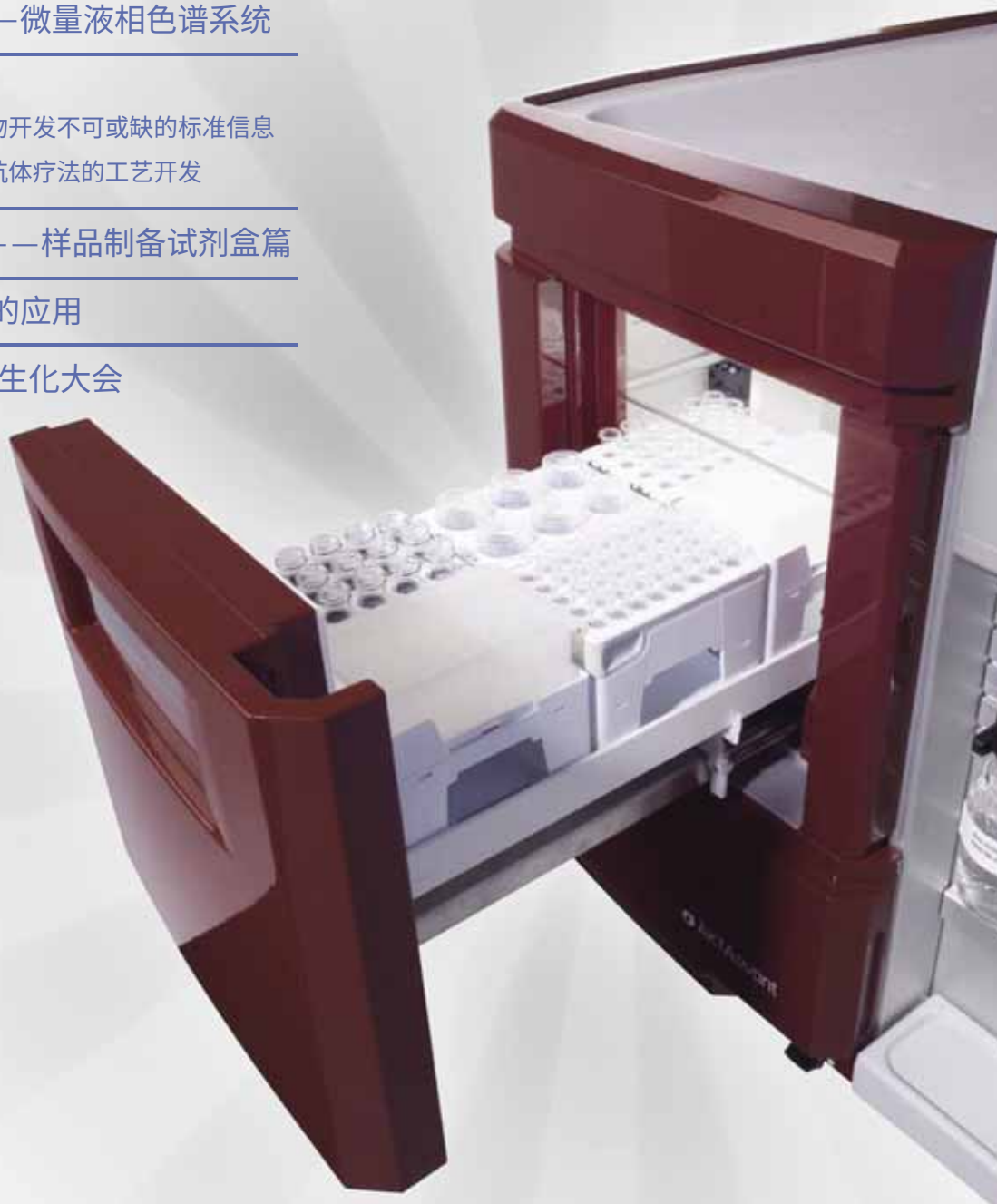
等温滴定量热技术——小分子药物开发不可或缺的标准信息

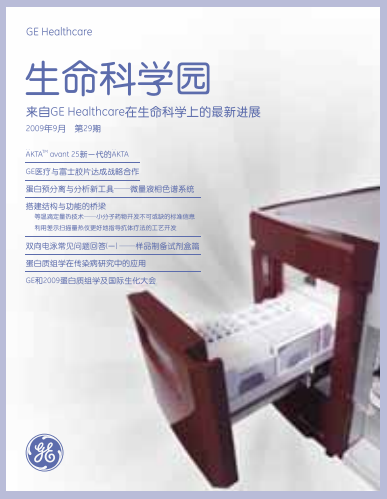
利用差示扫描量热仪更好地指导抗体疗法的工艺开发

双向电泳常见问题回答(一) ——样品制备试剂盒篇

蛋白质组学在传染病研究中的应用

GE和2009蛋白质组学及国际生化大会





Issue 29,Sept. 2009

目 录 CONTENTS

新产品介绍

AKTA™ avant 25新一代的AKTA 3
GE医疗与富士胶片达成战略合作 5
IN Cell Analyzer 2000 —高内涵分析细胞成像系统 5
AKTAmicro™ 微量液相色谱系统 6

应用园地

搭建结构与功能的桥梁 8
- 等温滴定量热技术
  ——小分子药物开发不可或缺的标准信息 8
- 利用差示扫描量热仪更好地指导抗体疗法的工艺开发 11

使用AKTA™ avant25进行MAb纯化的快速工艺过程研发 14
在蛋白表达谱前使用AKTAmicro™进行微量制备型预分离 16
IN Cell Analyzer 2000：让最具挑战性的高内涵分析高效完成 19

实验的原理和方法

使用NTA或者抗组胺抗体捕获组氨酸标记的蛋白质 22

用户园地

MDCK细胞流感疫苗在WAVE波浪生物反应器中生产 25
双向电泳常见问题回答(一) ——样品制备试剂盒篇 26

综述

蛋白质组学在传染病研究中的应用 28

活动花絮

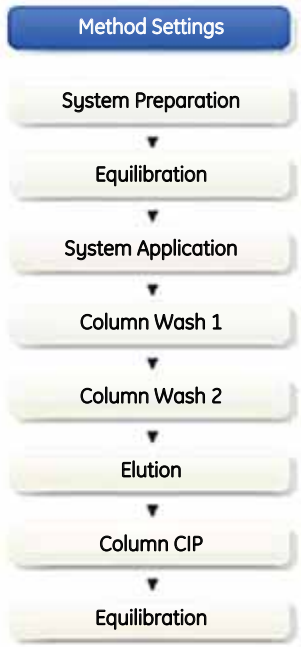
GE和2009蛋白质组学及国际生化大会 34

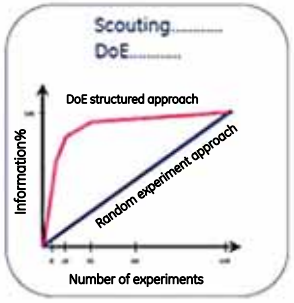
ÄKTA™ avant 25 新一代的ÄKTA
不断超越自我，引领蛋白分离潮流

ÄKTA™ avant 25是GE Healthcare历经数年研制，对欧美及亚洲多家知名生物制药公司如GSK,Amgen, Novo nordisk, Lilly, Wyeth等公司进行调研，开发出的新一代适合现代工艺开发的ÄKTA设备，所以ÄKTA™ avant 25 最突出的优点就是Design of Experiment (DOE)实验条件智能优化，和UNICORN6.0软件配合堪称是现代纯化工艺优化的最佳搭档。



DOE方法编辑





DOE实验设计与随机实验摸索相比，是采用系统的实验设计，同时改变多个变量，用少量的实验次数得到大量的信息用于条件优化。

用户定义

- 实验条件的数目
- 实验条件的水平 (高/低)
- 实验条件性质 (定性/定量)
- 实验目的

软件建议



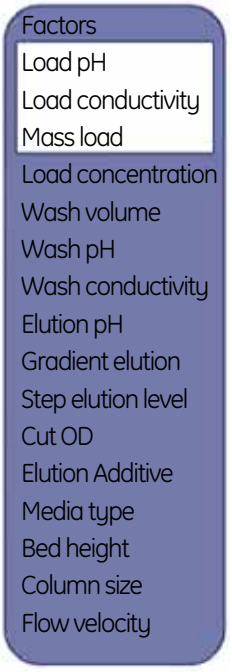
生成实验方案



运行DOE方法

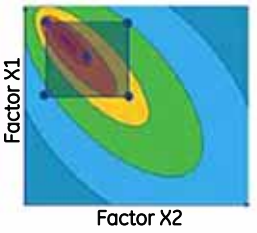


实验条件的筛选



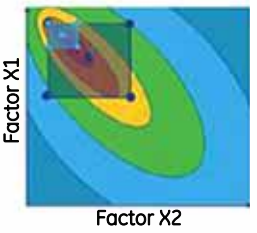
实验条件的优化

Load pH
Load conductivity
Mass load



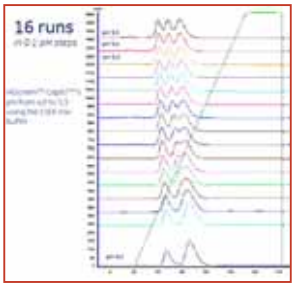
可重复的实验条件

Load pH
Load conductivity
Mass load



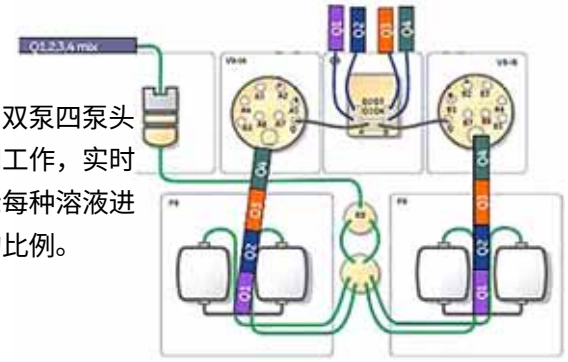
真正的自动在线配置缓冲液（BufferPro)

- 26种缓冲液配方
- 专利改进的配置缓冲液算法，无需补偿离子强度的变化
- 允许手动设置缓冲液浓度
- 全新的四元阀
- 自动温度补偿



真正的四元梯度

双泵四泵头协同工作，实时显示每种溶液进入的比例。



层析柱管理

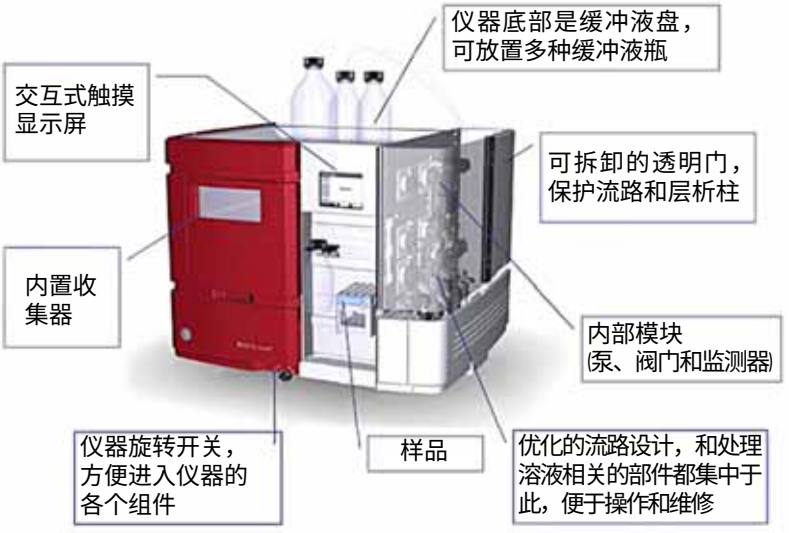
- 读取二维码自动识别层析柱类型、批号和效期
- 自动追踪层析柱的使用次数、最大压力差、在位清洗后运行的次数
- 在位清洗自动提醒
- 用户自行装填的层析柱也可贴二维码进行层析柱的数据追踪



UNICORN 6.0软件

- 采用流程指导的模块设计生成方法，更直观
- 数据库管理，增加了数据的安全性，便于数据检索，分类
- 增加了DOE（Design of Experiment)实验条件智能优化模块分析数据，方便条件优化







仪器硬件

- 系统泵：0.001-25ml/min, 0-20MPa
- 样品泵：0.01-25ml/min,0-10MPa
- 系统泵、样品泵、柱前、柱后各一个压力感应器
- 缓冲液入口18个
- 样品入口7个
- 阀门收集10个组分
- 同时连接5个层析柱
- 流向可控
- 阀门连线方式标识清楚
- 在线pH计储存或校正
- 不同上样方式无需更改连线



内置收集器

- 相对密闭，组分收集更安全可靠
- 可温控保证蛋白活性
- 自动识别收集板
- 卡锁设计防止试管滑落
- 低流速液滴同步（<2ml/min)
- 高流速自动累积液滴避免溢出

GE医疗与富士胶片达成战略合作

通用电气公司（GE）旗下的医疗集团和富士胶片株式会社就生物科学研究领域中应用于基因和蛋白质的检测、解析等成像分析系统产品的开发、制造和销售事宜达成全球战略合作协议。

在合作框架下，GE医疗集团依靠其品牌和渠道资源负责产品的市场和销售，富士胶片公司今后则将凭借其强大的图像研究技术实力负责生物成像分析系统的研发和生产。今年秋天，将推出包括原有Typhoon系列在内的激光扫描成像系统，除原有的Typhoon系列外，新产品包括Typhoon FLA9000；Typhoon FLA7000，为荧光同位素成像提供全方位的解决方法，同时推出的还有IQ LAS 4000及IQ LAS 4000mini数码成像仪，为凝胶成像，化学发光成像提供最佳工具。

GE医疗集团生命科学（原法玛西亚和安玛西亚）为中国生命科研工作提供优秀的产品和技术服务已经超过30年，并且承诺将继续和中国科学家一道，为人类的健康事业做出自己的贡献。今后，GE医疗集团会继续推动生物成像及其相关的荧光试剂和消耗品，并提供全套整合的解决方案。

IN Cell Analyzer 2000
—高内涵分析细胞成像系统

新一代高内涵分析细胞成像系统 — IN Cell Analyzer 2000在4月底法国里尔的生物分子科学学会（SBS）第15届年会上首度亮相。现场的系统演示赢得了众多参访者的肯定及热烈回响。该系统的灵活性让研究人员用单个仪器就能完成过去具挑战性的实验：从显微观察到自动化筛选，以及细胞器、细胞、组织和整个生物体的成像。

IN Cell Analyzer 2000有着硬件和软件的独特组合，能够非常快速地获取图像，是筛选的理想选择。该仪器是利用六西格玛原理来设计的，结构坚固，能确保它在多用户环境中高通量应用的可靠性。

沿袭 IN Cell Analyzer 1000高质量成象，功能完整性及模块化设计，IN Cell Analyzer 2000新增一些新特征包括：

- 全新硬件设计：更稳定,易操作和一体化主机，将CO_2，温控，液体操控和电源/稳压全部集为一体
- 更快的聚焦和成像扫描速度：比IN Cell Analyzer 1000提高约一倍
- 增加予扫描功能：在获取图像之前对样品的选定区域进行快速的预览扫描，使用者可以快速找寻到关键位点并获取图像，大幅提升对于干细胞、神经突生长等非融合性细胞观测的准确度及效能



- 高性能大视野CCD和全孔成像：照相机加上宽视野光源，确保一次完成整孔的成像而无需多次成像后的拼接,在单张图像中捕获整个细胞孔的信息，提高成像能力
- 更宽范围高NA值物镜选择(2×, 4×, 10×, 20×, 40×, 60×, 100×)：满足多种灵敏度和放大倍数的要求
- 全自动物镜，分光器和滤光片切换选择
- 更高图像分辨率和质量：提供多种图像分析处理方式(2D, 2.5D, 3D deconvolution…)
- 三种透视光(白光)成像功能：亮视野，DIC，像差

更多信息，请访问：www.gehealthcare.com/incell

新产品介绍

ÄKTAmicro™ 微量液相色谱系统

ÄKTAmicro™ 液相色谱系统是为微量液相色谱应用而设计，可以从非常小量的启始样品，如完整的蛋白质、蛋白复合物和核酸中可靠、高重复地纯化目标分子。而且 ÄKTAmicro 是鉴定目标分子、方法开拓中快速纯度/ 回收率分析、药物研究应用的理想选择。该系统建立在已经验证的 ÄKTA™ design 平台，由 UNICORN™软件控制。



应用：

- 可靠地微量纯化珍贵样品
- 方法开拓中标准的纯度/回收率分析和药物研发
- 通过连接光散射检测器，在线鉴定目标生物分子

ÄKTAmicro™ 特点

- 整个液流通路在惰性及对生物分子兼容的材料中进行操作，保证了样品的高回收率及稳定性，尤其在翻译后修饰蛋白的富集中优势明显。
- 高灵敏度的电导检测器提供准确的实时在线梯度检测，尤其在RPC梯度中，水相和有机相的电导差很小，电导检测的精度显得尤为重要。
- UV-900检测器同时记录从190nm到700nm之间的三波长，同传统的氘灯相比，氙灯无需预热，可得到更高的灵敏度。
- 分离柱同紫外检测池直接相连，最小化的管道、阀门及流通池中的死体积，保证了最佳分辨率。
- 独特设计的P-905泵系统适用于可变的液流及压力范围，从而使系统适用于高压精细柱及低压软胶的分离纯化。
- “ Flow between run ”选项使得在每次运行之后或之间保持分析柱的压力不变，从而得到高重复性的保留时间。
- 该系统随机加配一套微量收集配件盒，专为微量收集而设计，准确组分收集的最小体积可低至 40 µl。
- ÄKTAmicro 采用系统内标配的管路配件，适合从高压到中压柱以及低压柱 (比如：HiTrap 柱, < 0.3MPa) 。

ÄKTAmicro ™ 匹配的其它组件



- 自动进样器A-905提高系统通量，同时Peltier冷却使得进样过程中的样品分解最小化。可从微孔板、标准瓶中上样，最多384个样品。



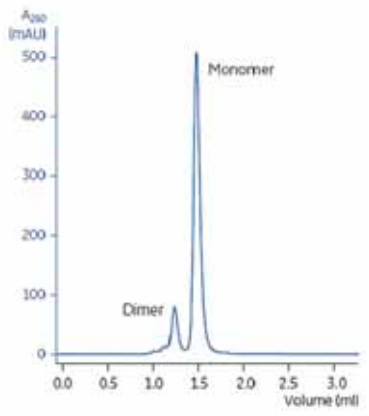
- 结合Frac-950组分收集器，ÄKTAmicro系统可在很宽的流速范围内直接收集组分到微孔板或其它容器里。

ÄKTAmicro系统

ÄKTAmicro系统用于纯度分析及性质研究

ÄKTAmicro系统可进行一系列的性质研究应用，包括蛋白及多肽的纯度分析。在方法建立过程中，纯度评估是很关键的评估步骤。该系统的高灵敏度及精确度可保证获得精确的结果。样品经过抗体纯化后的均一性分析十分关进，特别是当该物质将用于治疗性应用目的时。

单克隆抗体的均一性分析可通过ÄKTAmicro系统上的凝胶排阻层析来进行。在本例中，通过对亲和色谱层析步骤后的样品进行均一性分析，发现了样品中存在污染的抗体二聚体。



凝胶排阻层析

分离柱: Superdex Peptide PC 3.2/30

样品: Mono Q PC 1.6/5 包含有 PEP-19 的组分C2浓缩至10 µl

洗脱缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0

流速: 0.025 ml/min

组分体积: 40 µl

检测波长: UV 215 and 280 nm

系统: ÄKTAmicro

ÄKTAmicro 用于微量分离

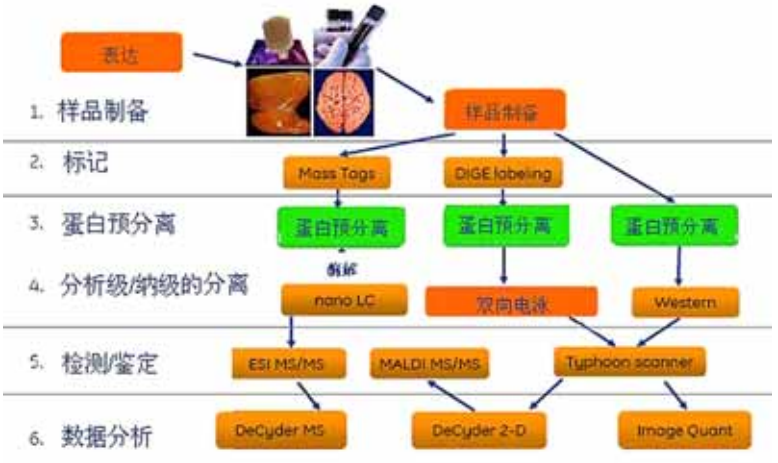
进行微量规模的分离纯化主要理由有三条：

1. 只能获得少量的样品；
2. 样品中目的蛋白丰度低；
3. 将试剂及样品消耗降至最低

微量分离的蛋白可用于后续的结构或功能的研究。



ÄKTAmicro系统用于蛋白预分离的流程图



将复杂蛋白质组样品在双向电泳分离前进行适当的分离，常用的技术包括离子交换、凝胶过滤、金属螯合、亲和层析、反相层析以及以上技术的联合使用，都可起到降低蛋白复杂程度，富集目标蛋白，提高蛋白鉴定的成功率或增加蛋白鉴定数目的作用。

同理，如果通过荧光差异双向电泳技术找到差异蛋白，希望进一步研究功能，也可采用ÄKTAmicro系统微量制备差异蛋白。

搭建结构与功能的桥梁

等温滴定量热技术——小分子药物开发不可或缺的标准信息

微量量热技术介绍

等温滴定量热技术（ITC）是一种监测由结合成分的添加而起始的任何化学反应的热力学技术，它已经成为鉴定生物分子间相互作用的首选方法。

当物质结合，热量要么产生，要么吸收。由于ITC直接测量生物分子结合事件中释放或吸收的热量，它便成为在单个实验中直接测定所有结合参数的唯一技术，如化学计量（n）、亲和力（Kd）、焓（△H）和熵（△S）。这些信息提供了生物分子相互作用的真实写照。

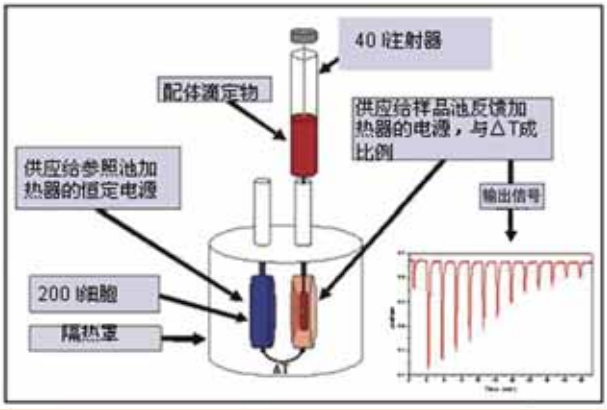


图1：在恒温下，注射器中的“配体”溶液滴定到包含“高分子”溶液的池中。当配体注射到池中，两种物质相互作用，释放或吸收的热量与结合量成正比。当池中的高分子被配体饱和时，热量信号减弱，直到只观察到稀释的背景热量。

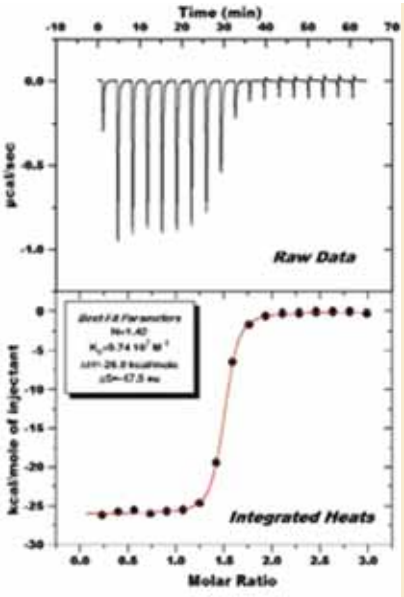


图2：典型的ITC数据。配体溶液20次注射到ITC池的蛋白溶液中。每个注射峰(上图)下方的区域与注射所释放的总热量相等。当这种综合的热量相对添加到池中的配体摩尔比作图时，就获得了相互作用的完整结合等温线(下图)。用单位点模型来验证数据。化学计量、结合常数及焓的数值都显示在框内。

微量量热技术的最新突破-iTC$_{200}$™及Auto-iTC$_{200}$™

等温滴定量热技术在全世界的药物开发实验室已经获得了广泛的认可。大型的制药公司、生物技术公司以及研究机构，都在利用ITC来充分鉴定生物分子间相互作用。ITC所确定的结合参数常常被认为是“金标准”值，并经常作为其它技术的参考。

随着现代ITC仪器的发展，这些仪器变得更加灵敏、快速且易用。MicroCal公司最新的iTC$_{200}$和Auto-iTC$_{200}$使用200µl细胞，将获得完整结合图像所需的样品量降低至10µg蛋白。这种小型化的样品池设计以及超灵敏的电子元件解决了过去限制这种强大技术的样品消耗和时间约束。

iTC$_{200}$提供的平衡时间比传统ITC仪器要快得多，从而将实验通量提高了2-4倍。

对于那些需要更高通量的应用，MicroCal开发出Auto-iTC$_{200}$这种全自动的版本。这个自动化系统利用iTC200作用量热仪的核心，实现了每天多达75个样品的无人值守通量。

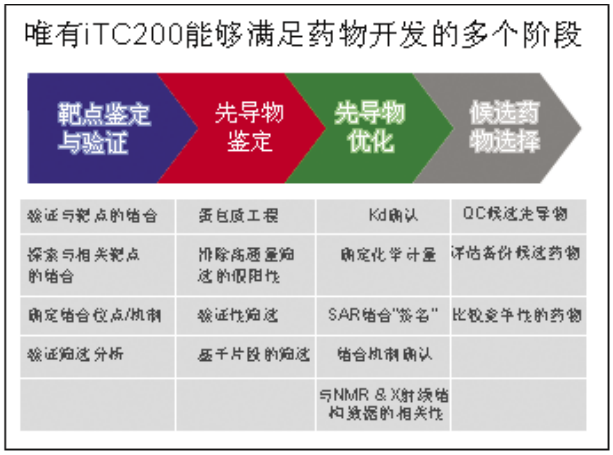


图3：现在，iTC$_{200}$和Auto-iTC$_{200}$让等温滴定量热技术在药物筛选早期阶段的有效利用成为可能。

ITC：用生物相关模型系统架起桥梁

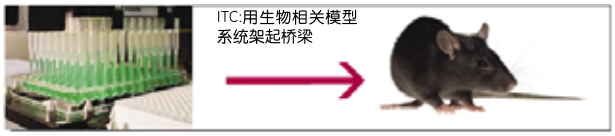


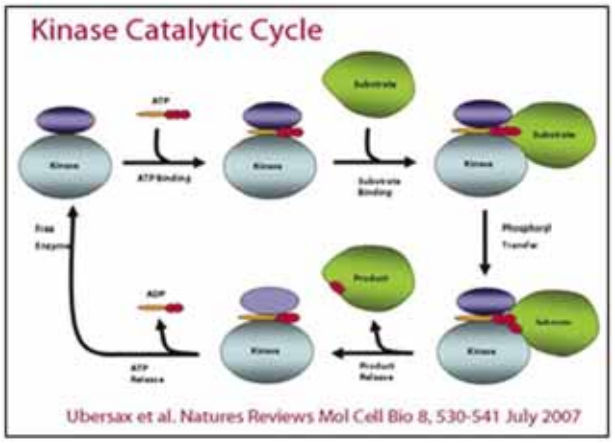
图4：ITC的关键优势之一是创建生物相关实验的独特能力。再没有其他技术能提供完全无标记且液相的分析环境，同时无需靶点高分子或配体的固定。ITC的应用在相关模型生物系统的建立和验证中起了重要的作用。

作用机理研究与分析开发[1-8]

在药物靶点鉴定之后，需要进行严格的评估来证明靶点的调节将有着理想的治疗作用。这包括深入的体外及体内研究，它为药理学干预的效果提供了信息，让人们深入了解小分子生物活性的作用机理。这些努力的结果是建立足够的了解，以便生理学相关模型系统能被开发成下游筛选的分析。这对于降低因临床失败而带来的候选药物损耗率有着重大影响。

等温滴定量热技术在确定具体靶点通路的作用机理（MOA）上扮演着关键的角色。由于ITC直接测量生物分子结合事件中所释放或吸收的热量，那么无需提前了解生物过程，也无需标记。生物分子的相互作用可在天然状态下用内源的酶、底物或配体来监测。这有一个额外的好处，就是显著缩短了分析开发的时间。

ITC已经证明是分析开发的有用工具，即检验所设计分析系统的生物相关性，该系统利用替代



的指标来显示生物活性。这些结果可以与原始的内源机理进行比较，让人相信它们是适当地互相模拟。这包括所有形式的配体和受体复合物，以及酶-底物反应和动力学。整个结合机理都能够系统地鉴定。例如，配体结合的比较可在催化过程的所有阶段进行（图5），用自由的酶、酶-底物复合物或酶产品，也不管酶是否有活性。这能够产生竞争性、非竞争性和无竞争性配体结合的真实图像。

这个ITC数据有助于了解结合机理。焓、熵这些因子能暗示结合的结构机理。此外，结构上相似的抑制剂在热力学图像上的差异则意味着不同的结合模式2,3。在评估表达蛋白的功能百分比上，化学计量是一个有用的工具1。它还有助于更好地了解抑制机理，即0.5的化学计量表明同型二聚体蛋白靶点的半位点反应3。

ITC还能用于研究激动剂相对拮抗剂与核激素受体、G偶联蛋白受体及门控离子通道受体的结合。热力学属性有助于了解共激活或共抑制的作用机理4。结合研究还能与定点突变等技术结合进行，以便确定催化结构域和其他“热点区域”的定位5。

阳性化合物（hit）验证

一般说来，大约有1%的高通量筛选 (HTS) 化合物会在分析运动中表现出拮抗或激动的作用，因此被归为阳性化合物。下一步是通过重复初筛分析来验证它们。这些阳性化合物将进入二次筛选的阳性化合物选择过程，以便选出最好的候选物进入先导物优化。

二次筛选将产生更详细的剂量反应信息，实现化合物与靶点亲和力的比较。这通常表示为IC_{50}数据，好的阳性化合物效价<10 μM。唯有ITC提供了直接的结合亲和力（Kd）测定，此数据与IC_{50}有着很好的相关性（图6）。然而关于哪些阳性化合物能进入下一轮的决策通常只基于总的结合亲和力。

除了总的结合亲和力，单个ITC实验也能了解结合机理；这包括“锁与钥匙”的作用力，如氢键、范德华相互作用（△H）、这些是改善选择性的机会，疏水相互作用（△S）和化学计量（n）。此信息对于排名次序的确定是非常宝贵的，并能排除假阳性，从而为传统的反式筛选技术提供了极佳的补充。Auto-iTC_{200}每天能提供最多75个样品的完整结合图像，为评估先导分子的质量提供了非常瞩目的平台。

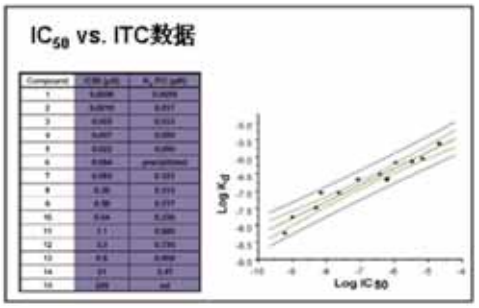


图6：IC_{50}数据与ITC Kd值的相关性良好。数据由美国圣弗朗西斯科Gilead Sciences的StephanieLeavitt博士在2007年微量量热技术当前趋势的会议上展示。

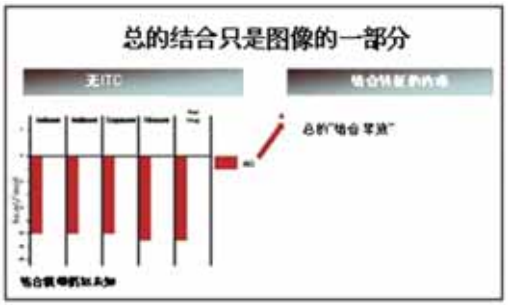


图7：（△G）与总的结合亲和力直接相关，但不能了解结合机理。

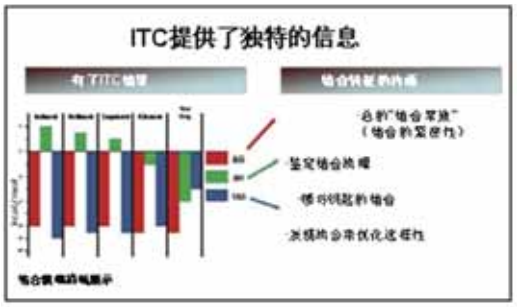


图8：ITC提供了（△G）以及（△H）和（△S），产生了结合机理的真实图像。

基于片段的筛选[9-12]

基于片段筛选背后的策略是用低分子量（< 200道尔顿）的片段来杂交蛋白靶点的配体结合域。目标是鉴定出靶蛋白上经常以小区域存在的结合“热点区域”。将配体分割成更小的片段有助于了解蛋白-配体相互作用中关键功能基团的作用。

与配体结合域表现出最佳结合的的片段仍然有着极低的亲和力（在低mM范围）。选择具有最佳配体效率（分子量/亲和力）的片段随后结合起来，形成高亲和力结合物。原则上，占据受体位点的片段连接起来，将同时产生比它们单个亲和力总和更高的亲和力，即亲和力是协同作用的（图9）。这些更复杂的片段分子随后进入先导化合物优化程序。

Auto-iTC_{200}为筛选片段文库提供了一些优势。由于它直接测量结合相互作用的热量，无需化学修饰或分析设计，因此生理相关的生物模型也能使用。它能够在mM到nM范围测量广泛的亲和力，每天最多产生75个化合物的完整热力学图像。此外，结合焓（△H）在基于片段的筛选上也扮演重要角色，因为它是非常特异的氢键和范德华相互作用的度量。ITC是唯一一种能直接测量此参数的技术。

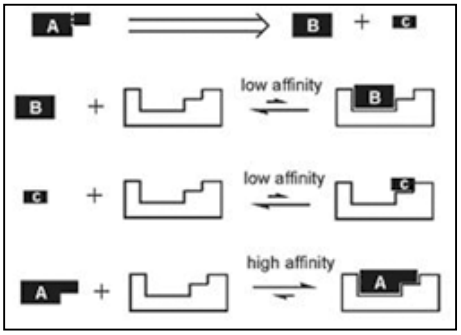


图9：片段与“热点区域”结合的示意图，此处结合亲和力是协同作用的11。

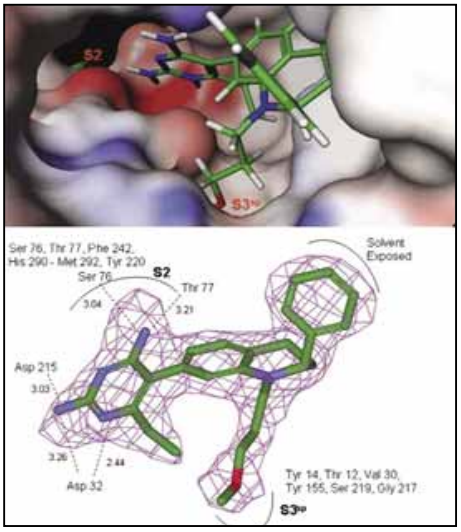


图10：肾素与抑制剂的X-射线晶体结构13。

先导化合物优化[13-19]

从阳性化合物到先导化合物开发中先导物的优化通常始于从二次筛选中选择特异性经过验证，且与目的靶点的结合亲和力最高的先导物。结合亲和力一般从1-10 μM的范围开始，需要将效价提高多达5个数量级，它们才能被看作是可行的候选药物。先导物优化阶段常常伴随着来自配体-靶点的X射线晶体衍射数据的结构信息。

二次筛选中产生的数据如IC_{50}曲线能够将化学结构等同于结合亲和力。此信息能帮助推断有可能改善效价的结构修饰。然而，关于阳性化合物如何以及为什么与靶点结合的信息可能很少。选择最佳的化合物进入先导物优化将显著提高有着理想效价及选择性的候选物的几率。

等温滴定量热技术扮演了非常重要的角色，它提供了配体与它们靶点高分子的结合力信息。这是一种直接的读数技术，单个实验就能产生关于结合的大量数据。其中包括吸引力的定量测定，如氢键和范德华相互作用（△H）、疏水相互作用（△S）和化学计量（n）。来自ITC信息与X射线的结构数据互补，能用于协助指导药物化学过程，最终产生有着最佳效价及选择性的候选药物。

ITC提供了热力学数据，能用于指导先导化合物模板的合成。在这个例子中，肾素抑制剂经历了四回反复合成步骤（图11）。结果是先导化合物在结合亲和力上比最初的阳性化合物提高了45倍。此外，ITC与X-射线数据表明结合主要是由于氢键（△H）。这比单纯的疏水吸引亲和力要理想得多。

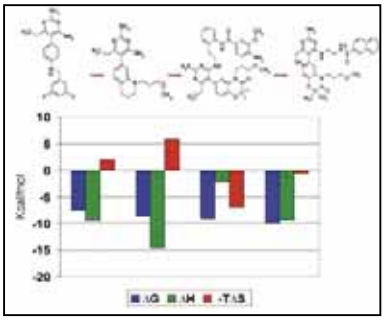


图11：ITC数据能用于指导先导化合物优化的过程。13

订货信息

Article No	Product Name (Description)	Product Group
28428952	SYSTEM, VP-ITC	950
28428955	SYSTEM, iTC200	951
28428983	Auto iTC200 System	952
28428984	Upgrade - iTC200 to AutoiTC200 system	952

搭建结构与功能的桥梁

利用差示扫描量热仪更好地指导抗体疗法的工艺开发

作者：Stephen Demarest博士，Biogen Idec

确定pH和离子强度对蛋白稳定性的影响对于可靠的蛋白质纯化步骤及配方策略的开发很关键。目前毛细管差示扫描量热仪（Capillary DSC）能够提供此类独特的信息，特别适合治疗性蛋白的开发。本文所描述的是DSC对作为药物的IgG1和IgE这两种抗体的pH/离子强度稳定性的研究。只有DSC能够对多结构域蛋白（如抗体）的单独结构域的稳定性进行研究。本文中DSC证明了IgE的恒定结构域片段（Fc）比IgG1 Fc对低pH/高盐条件更为敏感。这些结果表明IgG抗体常用的纯化和配方策略并不适用于IgE。本研究展示了DSC如何用于指导抗体和其他治疗性蛋白的工艺开发方法。

摘要

在目前的诊断或治疗应用中，γ同型免疫球蛋白，特别是人IgG1的生产和纯化是十分常规的。而以免疫球蛋白E（IgE）为基础的治疗只是在最近才显现出一些势头。[1-3] 在工业规模上生产、处理和配制IgE或IgE的恒定区域（Fcε）的标准方法尚未建立。尽管有关IgE生化功能及调控的很多知识都已知晓，但仍不清楚就热稳定性或pH敏感性而言，Fcε与Fcγ是否相似，以及处理IgG的标准方法是否适用于IgE。

IgE对于宿主抵御寄生虫和防御性炎症很重要。IgE介导的经其受体的信号通路还是过敏变态反应的焦点。[4]IgE的恒定区域（Fcε）是同源二聚体，包含三个独特的Ig折叠结构域（Cε2、Cε3和Cε

4）的重复对，并负责结合它的两个受体——FcεRI和CD23（也称为FcεRII）（图1）。

此篇应用指南聚焦在差示扫描量热仪（DSC）在指导IgG和IgE的生物治疗开发工艺的多个方面的应用。特别是，有证据表明DSC有助于了解IgG和IgE药物产品的处理、纯化及配方策略。将圆二色谱（CD）对治疗性蛋白研究的贡献与DSC进行了对比。DSC能够在多结构域蛋白的单个结构域水平上研究蛋白稳定性，在这方面圆二色谱很难获得的有用的数据。

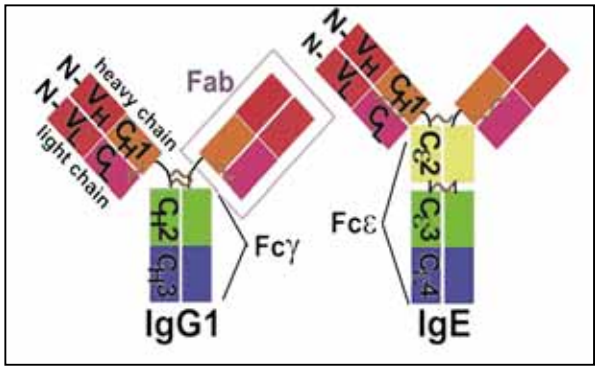


图1. IgG和IgE的示意图

材料与方法

纯化的Fcε、Fcγ和Fcγ-Cε2蛋白是由Biogen Idec生产的，描述见前文。5 圆二色谱（Jasco）实验的细节请看前文。5 整套毛细管DSC实验（在不同pH值下的400多次扫描）在4个月时间内完成，而所花精力很少。准备Fcε和Fcε的实验大约花了3个小时，包括蛋白浓度的测量、稀释和平板的准备；剩余实验都是由毛细管DSC本身自动完成的。完整的细节如参考文献5所描述。

结果

Fcγ和Fcε的pH依赖的去折叠

广泛的pH/盐稳定性是许多在工业环境中进行的亲和蛋白纯化过程的前提条件。对极端的pH或盐条件的耐受性差会产生聚集或无功能的蛋白。Fcε 对不同pH/盐条件的耐受性是确定IgE/ Fcε的适当及可扩展纯化方法的重要信息。为了研究pH对Fcε二级结构的影响，我们获得了蛋白在pH 4.5到7.4的缓冲液条件下的圆二色谱。在pH 5.2到7.4之间，Fcε的光谱是相同的，且在216到217 nm之间包含单个最小值，表明重要的β折叠和典型的Ig结构域。在pH 5，Fcε光谱则以无规卷曲的方向迁移（最小值移向200 nm），而在pH 4.5，光谱显示蛋白以无规卷曲为主。[5] 根据pH依赖的去折叠，我们研究了Fcε 是否在pH 7.0与4.5之间稳定性减弱。

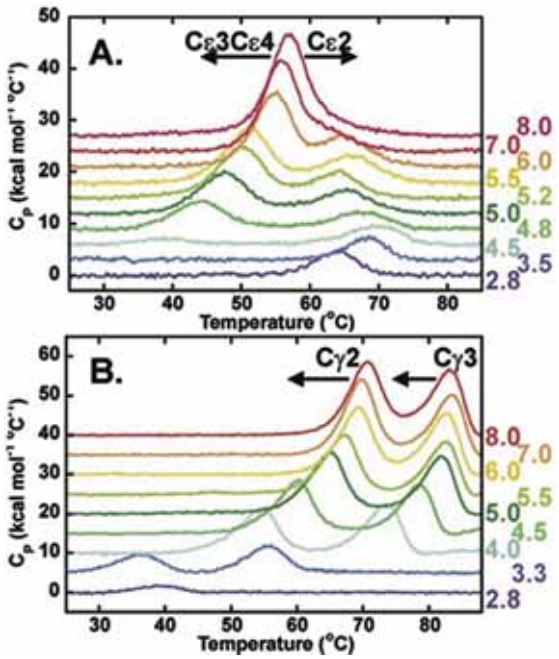


图2. A, B. Fcε (A)和Fcγ (B)在15 mM NaCl中的pH依赖DSC曲线。经过美国生物化学与分子生物学协会的许可，翻印自参考文献5。

Fcε在不同pH下的热变性是由远紫外圆二色谱监测的。在pH 7.0，所有三个结构域（Cε2-4）的去折叠只有一个跃迁。在pH 6.0也观察到相似的跃迁，尽管表面TM降低了1°C。在pH 5.2的Fcε热去折叠产生了更广泛的跃迁，比中性pH下低了6°C。只有在pH 4.8，两种跃迁才清晰可见。[5]

根据最初的圆二色谱结果，利用DSC开始对Fcγ和Fcε的pH依赖的稳定性进行详细研究。结果发现Fcγ 和Fcε的去折叠跃迁是不可逆，且扫描速率影响（数据未显示）表明不可逆的聚集影响了两种蛋白的表面T_{M0}。6, 7 与利用圆二色谱所能确定的不同，在低于8.0的所有pH下，Fcε显示出含有两种独立的去折叠跃迁（图2A）。其中一个跃迁会在低pH和高NaCl下变得不稳定，而另一个不会。

正如利用圆二色谱获得的结构数据，对pH敏感跃迁的结构域在pH 4.5时发生了完全去折叠，证明了DSC不仅对于了解折叠蛋白的稳定性很重要，对于它们的折叠状态也很重要。结果显示Fcε（来自IgG1）通过两种单独的跃迁去折叠；低温度跃迁属于Cγ2结构域，而高温度跃迁属于Cγ3结构域（图2B）。Cγ2跃迁是通过去糖基化在热稳定性上的作用（未发表的结果）来鉴定的，而Cγ3跃迁则是通过它的异常高热稳定性来鉴定。8 两

个Fcε 结构域都表现出对pH和NaCl敏感。与Fcε不同，Fcε 结构域只有在pH降至3.0以下，才变成完全去折叠，表明(1) 为什么在pH值低于3.5时抗体从蛋白A树脂上洗脱，(2) 为什么阳离子交换树脂适于IgG（图3）。

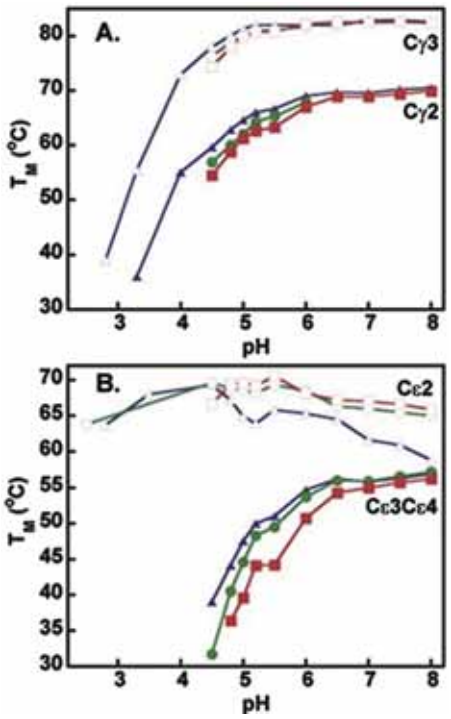


图3. Fcε 和Fcγ 结构域热稳定性的pH依赖性正如它们的TM值所表示的。A. Fcε 结构域T_M：15(▲)、150(●)和750(■)mM NaCl中的Cγ2；15(△)、150(○)和750(□)mM NaCl中的Cγ3。B. Fcε 结构域T_M：15(▲)、150(●)和750(■)mM NaCl中的Cε3Cε4；15(△)、150(○)和750(□)mM NaCl中的Cε2。经过美国生物化学与分子生物学协会的许可，翻印自参考文献5。

离子强度在稳定性上的影响

在高盐存在时，Fcγ 的Cγ2和Cγ3结构域以及Fcε 的Cε3和Cε4 结构域都不稳定。这一点可从在5.0到7.0的pH范围内，它们在150和750 mM NaCl下的T_M值相对于15 mM NaCl的微小改变中得以证明（图3A）。这些小的稳定性差异不可能会对此pH范围内Fcγ 的体外半衰期产生重大影响，因为Cγ2和Cγ3结构域的T_M仍然都在60°C以上。

Fcε的pH敏感结构域为受体结合结构域（Cε3和Cε4），这是通过对Fcγ-Cε2融合蛋白进行DSC实验而鉴定得出的。Fcγ-Cε2和Fcε在pH 2.5下保持稳定折叠（图4）。根据上述实验，我们了解到Fcγ结构域在pH 3.0以下完全去折叠。通过缺省值，鉴定出Fcε的Cε2结构域为pH不敏感结构域。这些结果由pH 4.5下的Fcε有限蛋白水解来证明。5

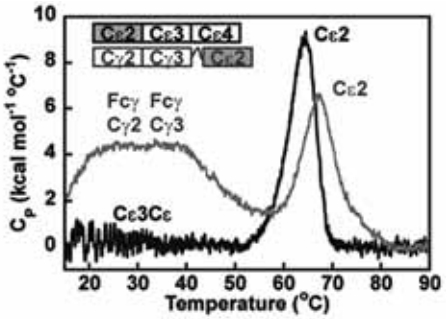


图4. 利用Fcε(黑线)和Fcγ-Cε2(灰线)样品对同一种pH 2.5磷酸缓冲液透析所获得的DSC曲线。Fcε和Fcγ-Cε2蛋白的示意图显示在DSC曲线上方。经过美国生物化学与分子生物学协会的许可，翻印自参考文献5。

在高盐下，Fcε的Cε2结构域的热稳定性略有增加。Cε2在中性pH和750 mM NaCl下特别稳定，其T_M比15 mM NaCl所测得的T_M高出7°C（图3B）。相比之下，在pH 5到6之间，NaCl显著影响了Cε3Cε4结构域的稳定性（图3B）。在pH 5.0的低盐中，Cε3Cε4开始去折叠。在高盐下，去折叠跃迁改变了0.5个pH单位（达pH 5.5），这阻碍了阳离子交换层析用作IgE或Fcε 包含蛋白纯化步骤的可行性。

结论

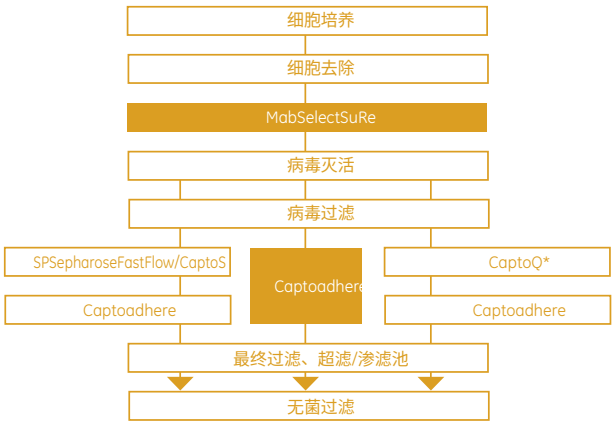
在此项研究中，我们展示了Fcε显现出不同寻常的pH敏感性，这导致其受体结合域在比Fcγ高2个pH单位（即pH 5.0）时去折叠。DSC所测定的Fcε pH/盐敏感性为IgE类蛋白选择纯化策略、操作步骤和配方提供了宝贵的信息，并证明标准的IgG步骤并不适用。Fcγ的pH稳定性数据还表明了在标准的亲和纯化（如最常用的蛋白A树脂）时，IgG时间依赖性聚集的机制中可能包含了低pH洗脱和保留步骤。

订货信息

Article No	Product Name (Description)	Product Group
28428944	SYSTEM, VP-DSC DOMESTIC	953
28428946	SYSTEM, MANUAL VP-Cap. DSC	954
28428948	SYSTEM, VP-Capillary DSC	954
28429058	PPC Accessory	955

使用ÄKTA™avant25进行MAb纯化的快速工艺过程研发

UNICORN™6软件控制的ÄKTA™avant25系统，用于研发单克隆抗体（MAb）纯化的两步色谱工艺过程。MabSelectSuRe™，基于蛋白A的色谱柱料（合成树脂），用来进行初始的捕获步骤；而多模式阴离子交换剂Capto™adhere，用来进行第二步精制步骤，减少不纯物。在精制步骤采用实验设计（DOE）筛选上样条件，变化样品的pH、电导率和上样量。使用1毫升预装的HiTrap™柱子，设计运行时间少于24小时，简化的设计实施确立了工艺过程条件的稳健性。将功能性整合在UNICORN™6软件的实验设计（DoE），与HiScreen™一起使用，在大约一周的时间内将所有的工艺过程进行了优化。尽管料液研究具有挑战性，靶MAb的高产率和纯度都达到了目的。



*WO2004/076485

图2经典的三步抗体纯化策略，应用MabSelect SuRe, SP Sepharose™ Fast Flow,和Capto adhere(左边的箭头)；基于MabSelect SuRe和Capto adhere(中间的箭头)的两步策略；用于精制步骤的另外的Capto柱料三步策略(右边的箭头)。

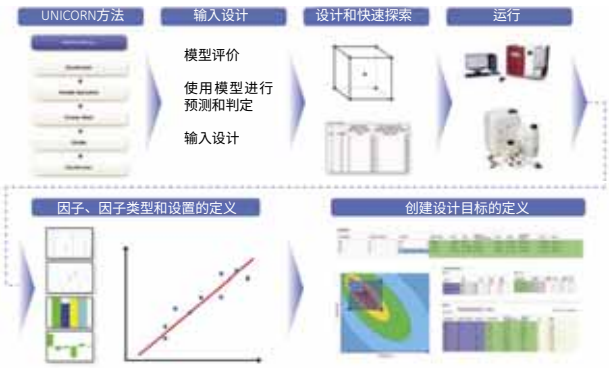


图1嵌入实验设计功能的UNICORN6软件，为简便快速的工艺过程研发而设计。在实验功能设计中，多因子同时变化，结果数据用来生成统计模型。模型经过验证后，用来产生等位图为判定提供帮助。

筛选Capto adhere上样条件的实验设计

已知电导率、pH和样品上样量是Capto adhere样品上样的重要参数（1）。设计一种实验设置可以同时检测许多不同的条件(因子)。使用实验设计(DoE)，可以较好的达到这个目的，实验设计利用统计学辨认和定义对于工艺过程/产品有最重要影响的因子。为了获得最大的信息，认真选择设计数套实验，其中所有的相关因子不同而且同时被评估。在方法优化中，使用实验设计极大的增加了真实的最佳纯化确立的可能性。

在这个研究中，包含在UNICORN6中的完全因子实验设计(DoE)，用来进行Capto adhere样品上样条件的筛选(参见表1步骤6)。该完全因子实验设计含有三个参数(样品上样量、电导率和pH)，就是2^3=8个实验和三个中心点，总共11个实验。

表1不同柱子和使用条件的总结

步骤编号	描述和目的	柱子	缓冲液
1	MabSelect SuRe的洗脱pH的判定	HiScreen MabSelect SuRe	20mM柠檬酸盐，pH6.0到3.0
2	MabSelect SuRe的动态结合载量的判定	HiTrap MabSelect SuRe	PBS，pH7.4和柠檬酸盐，pH3.5
3	MabSelect SuRe的MAb的纯化	HiScreen MabSelect SuRe	PBS，pH7.4和柠檬酸盐，pH3.5
4	Capto adhere精制步骤的材料制备(规模放大)	装有MabSelect SuRe的XK 50/20柱子(柱床高度=8.4厘米,Vc=165毫升)	PBS，pH7.4和柠檬酸盐，pH3.5
5	Capto adhere上样条件的判定	HiScreen Captoadhere	20mM磷酸钠，20mM柠檬酸盐，pH7.8到4.0
6	Capto adhere上样条件筛选的实验设计(DoE)	HiTrap Captoadhere	20mM磷酸钠，20mM柠檬酸盐，pH7.5,6.75,和6.0
7	Capto adhere的稳健性研究	HiTrap Captoadhere	50mM磷酸钠，pH6.95，6.75和6.55

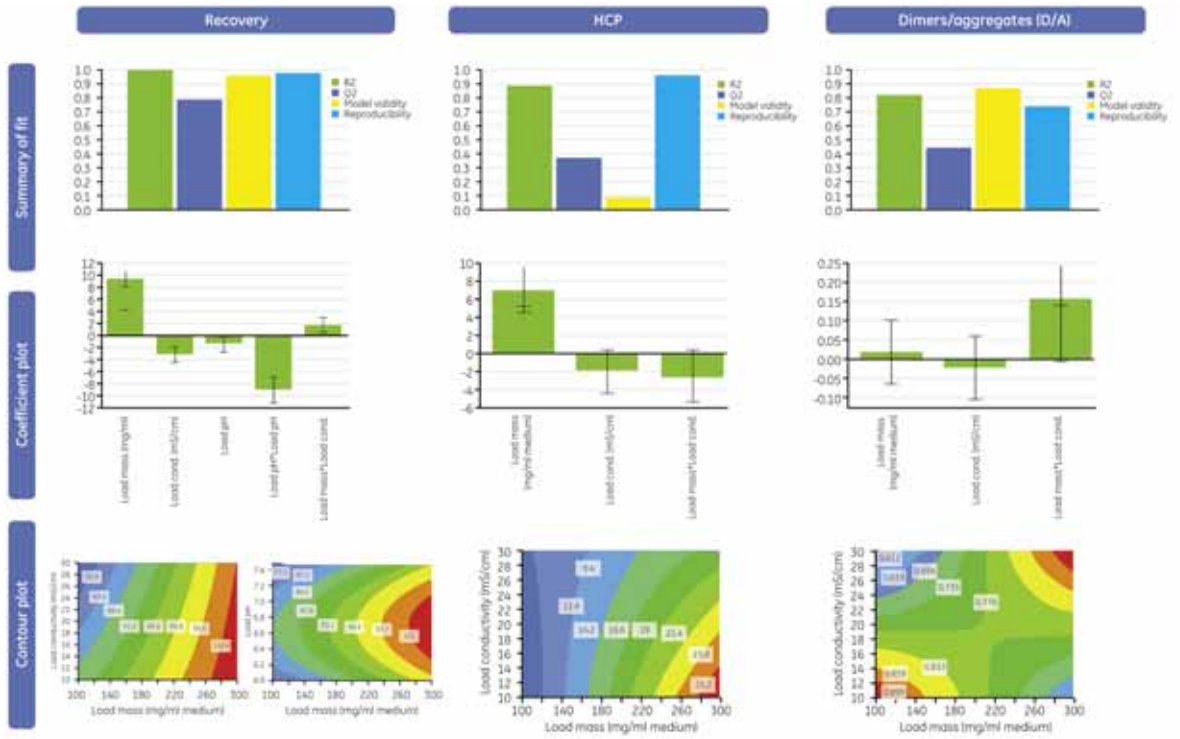


图3 Capto adhere步骤条件筛选的实验设计结果。分析的三个反应分别是回收率、宿主细胞蛋白、二聚体和聚合物。结果以三种不同的方式进行了可视化展示：“数据模型吻合小结（Summaryoffit）”、“系数图（Coefficientplot）”和“等值线图（Contourplots）”。

图3总结了实验设计筛选的结果。通过使用“数据模型吻合小结（Summaryoffit）”、“系数图（Coefficientplot）”和“等值线图（Contourplots）”，结果以三种不同的方式进行了可视化展示。分析了三个响应值，回收率、宿主细胞蛋白去除、二聚体和聚合物（D/A）去除。第四种响应值，蛋白A泄露太低，无法进行统计学模型的设计。实际上，在来自HiScreen MabSelect SuRe柱子洗脱组分中观察的蛋白A泄露，也已经太低。

在Summaryoffit中，对于回收率和聚合物模型，响应值的百分比偏差，通过模型（R2）>0.8进行解释，显示为良好的模型吻合。对于两个模型的所有因子，模型（Q2>0.5）达到了高预测能力（根据交互证实的模型，预测响应值的百分比偏差，Q2）。R2大于0.5时，显示为强有力的模型；在大于0.9时，为极佳的模型。对于宿主细胞蛋白去除，获得了中等质量和低有效性的模型。这个模型得到的重复变化测量，重复性是大于0.5，显示实验过程中误差最小和控制良好。

系数图显示回归系数和置信区间。模型中的重要系数都保留了；如果因子间的相互影响发现显著性，一些无关紧要的系数也予以保留。

等值线图显示两个因子对于特定响应值的效应。

正如期望的一样，增加上样量，回收率越高，而污染物清除率在较低上样量时有所改善。

结论

使用ÄKTA avant25色谱系统和UNICORN6软件，结合预装的HiTrap和HiScreen柱子，在大约一周的时间内，进行了两步色谱工艺过程的研发。应用独一无二的选择性和可能适用于ÄKTA avant25,UNICORN6,MabSelect SuRe和Capto adhere预装柱的常见方法条件，完成了简洁的方法优化。ÄKTA avant25色谱系统灵活的设计，允许标准流速配置的修改；在此研究中，两个样品进样阀用来进行自动样品上样和不丢失样品的清洗。使用该系统的新颖的压力/流速调控特性，进行分离过程，确保了上样过程压力增强的最小化。对于Capto adhere的精制步骤的筛选和条件优化，实验设计方法非常有效。UNICORN6软件的实验设计模块有助于分离策略的快速设定，决定最佳和稳健的条件，保证高重复性。

在蛋白表达谱前使用ÄKTAmicro™进行微量制备型预分离

ÄKTAmicro用于从经过血管内皮生长因子（VEGF-A及VEGF-C）处理的人内皮细胞中微量制备型预分离完整蛋白及胰蛋白酶肽。预分离后，通过Ettan™ MDLC与串联质谱（MS/MS）的结合使用来分离鉴定蛋白。DeCyder™MS差异分析软件（DeCyder MS）分析软件可用于无标记定量分析由生长因子处理而形成的蛋白表达的差异。一些VEGF信号通路中以前未知的蛋白被发现，并且其中一些通过Western blot分析进行了验证。

简介

血管内皮生长因子VEGFs为一个生长因子家族，在血管新生的调节，新血管的形成及淋巴管的生成中十分关键。血管新生为一些正常的生理过程所需的，如胚胎发育，伤口愈合以及女性的生殖系统中。而组织排泄以调节细胞间压力，及免疫功能中则需要淋巴管的生成。最近几年，血管及淋巴管的生成在癌症中的关键作用为人们所认识。新生血管生成为肿瘤生长所需，且血管及淋巴管可促进肿瘤细胞的扩散（1）。VEGF家族成员VEGF-A和VEGF-C可分别在血管及淋巴管生长中发挥作用。然而，它们调控这些过程的分子机制很大程度上还未知。

我们通过无标记LC-MS为基础的方法进行全面的蛋白表达谱定量分析从而研究这些过程的效果。实验通过分别使用VEGF-A和VEGF-C刺激人淋巴内皮细胞而完成。

在使用nanoLC-MS/MS对由于响应VEGF刺激而表达量明显改变的蛋白进行分析及软件评估在蛋白表达谱前使用ÄKTAmicro™ 进行微量制备型预分离前，进行总蛋白提取物制备，并利用微量色谱层析设备ÄKTAmicro进行不同步骤的预分离。在图1中，列出了本研究所要使用的两种不同的工作流程。

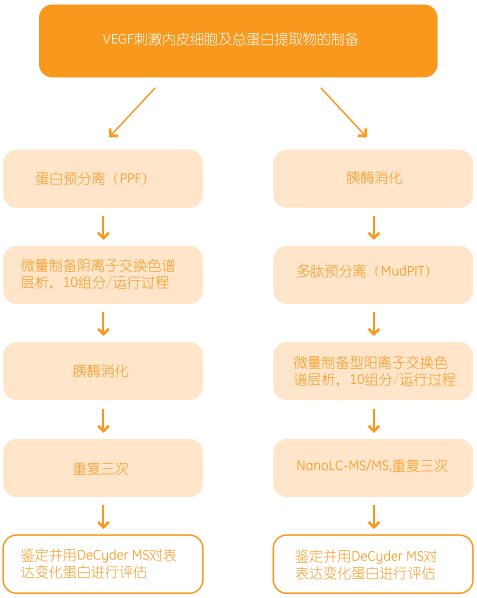


图1，两种不同工作流程概况，用于在使用NanoLCMS/MS分析前对样品预分离以减少样品的复杂性。

在第一个试验流程中，首先通过强阴离子交换色谱层析（SAX）处理完全蛋白样品（蛋白预分离）以减少样品的复杂性，随后进行缓冲液更换，在收集的组分中对蛋白进行胰酶消化以及纳升级别的LC-MS/MS分析。所获得的LCMS/MS数据用于使用DeCyder MS差异分析软件进行蛋白鉴定及无标记的定量分析。

第二个实验流程衍生自经典的MudPIT（多维蛋白鉴定技术，参考文献2），在进行任何分离步骤前，将蛋白进行胰蛋白酶消化。通过强阳离子交换色谱层析（SCX）进行第一步预分离后，收集组分并注入纳升级的LC-MS/MS。这通过经典的MudPIT方法是不可能实现的，因为SCX分离柱及NanoRPC分离柱直接在线偶联在一起。

通过两种基于LC方法鉴定的，在VEGF处理下表达发生显著改变的蛋白，再通过Western blotting进行验证。

材料与方法
细胞培养及总蛋白提取

转化的淋巴内皮细胞使用表皮微管EBM MV2生长培养基培养于涂胶的培养皿中，并加入以下成分：5ng/ml 内皮生长因子，0.2ug/ml的氢化可的松，0.5ng/ml的VEGF-A, 10ng/ml的基础纤维原细胞生长因子，以及20ng/ml的类胰岛素生长因子1。细胞在含有1%血清的EBMM V2培养基中进行过夜饥饿处理，随后分别培养于含血清且VEGF-A和VEGF-C终浓度为50ng/ml的培养基中。最终，使用20 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 8 M urea, 2 mM EDTA, 50 mMNaF, 1 mM Na_3VO_4, 2 μg/ml aprotinine, 1 μg/mlPMSF, 和1 μg/ml leupeptin裂解细胞。

使用微量制备型阴离子交换色谱层析处理完整蛋白提取物（蛋白预分离）

使用20 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, 及6%异丙醇，通过illustra™ NAP™ 5分离柱对内皮细胞蛋白提取物进行缓冲液调整，随后，将样品分装为600ug，每份加载至Mono Q™PC 1.6/5 阴离子交换色谱层析柱中，并使用ÄKTA micro色谱层析系统进行洗脱，详见图2。

在整个纯化过程中，0.4毫升体积的组分会通过Frac-950型组份收集器进行收集。对于每个组分，加入DTT最终浓度为50mM，随后在环境温度条件下孵育60分钟。烷基化步骤通过加入等体积的含有8M尿素，250mM Tris-Cl ,pH8.8及碘代乙酰胺溶液来实现。该过程进行60分钟。随后通过illustra NAP-5分离柱对样品脱盐，除去20mM的碳酸氢铵，并用1.0 ug的胰蛋白酶37 ° C消化2小时。通过加入甲酸至终浓度0.1%来终止消化反应。

对胰蛋白酶消化后的总蛋白提取物进行微量制备型氧离子交换色谱层析分离（多肽的预分离）分装为600ug 的每种蛋白提取物如上所述进行还原，烷基化及胰蛋白酶消化。随后将样品注入Mini S™ PC 3.2/3强阳离子交换层析柱，并使用ÄKTAmicro色谱层析系统进行洗脱（详见图3）。分离过程中，使用frac-950型分步收集器进行组份收集，每份体积为0.8毫升。

反相纳升级色谱层析

在单分离柱反相色谱层析（RPC）中使用Ettan MDLC以使不同样品获得尽量一致的滞留时间，保证定量数据的精确。在该配置中，使用Zorbax™ 300-SB C18 反相色谱柱, 300 μ mi.d. ×5 mm, 3 μ m (Agilent Technologies)进行在线脱盐及样品净化。随后使用Zorbax 300-SB C18nanoscale 反相分析柱, 75 μ m i.d.×150mm进行高分辨率的分离纯化。流动相A：HPLC级别的水，加入.1%甲酸；B：HPLC级别的乙腈，加入1%甲酸。可将大约1ug的材料加载至分离柱中，分离时流速为200nl/min，所用线性梯度为90min内0%至60%。

质谱

使用装配有纳升接口的Finnigan™ LTQ™ 线性离子阱质谱（热电公司）对从反相柱上洗脱下来的多肽进行检测。每个全扫描质谱图含有三个MS/MS谱的样品循环，在profile模式下收集全扫描质谱图；centroid模式下收集MS/MS谱图。

使用DeCyder MS检测显著改变的多肽

使用DeCyder MS的PepDetect模块进行自动多肽检测，带电状态分配及每种LC-MS分析信号密度基础上的定量。PepMatch模块用于将不同运行过程中的不同密度的多肽进行匹配，从而获得包含有统计学评估的相对量的比较。所测得的密度分布用作标准（样品中未加入任何内参）。通过完整质谱图进行多肽的确定，首先将MS/MS文件输入至TurboSEQUEST™蛋白确定软件（热电公司），随后将TurboSEQUEST搜索结果输出至PepMatch模块中。匹配的多肽通过交叉相关性系数（Xcorr）1.5，2及2.5（分别对应于带电荷状态1+, 2+, 及3+,）进行过滤。

免疫共沉淀及Western Blot分析

在低剧烈条件下进行细胞裂解。等量的蛋白通过VEGF4-3抗体进行免疫共沉淀，随后冲洗。免疫复合体用SDS-PAGE进行分离，将蛋白转至Hybond Extras尼龙膜上，并用相应的抗体进行孵育。冲洗后，使用ECL™（增强的化学发光体系）进行检测，后者使用辣根过氧化物酶偶联的抗兔或抗鼠抗体。

预分离方法	鉴定的蛋白数目
使用Mono Q PC 1.6/5，ÄKTA micro系统进行蛋白的预分离	1420
采用改进的MudPIT方法，使用Mini S PC3.2/3,ÄKTA micro系统对多肽进行初步纯化	460

根据这些数据，说明同多肽预分离纯化流程相比，蛋白预分离的工作流程可更好的从复杂蛋白样品中鉴定低丰度蛋白。同消化起始蛋白提取物的方法相比，更高的蛋白鉴定速度将会很好的补偿消化收集组分中蛋白所需的额外时间。

使用强阴离子交换色谱层析对蛋白进行预分离的另一个优点为，该技术可分离蛋白的异构体。这是利用标准的鸟枪法所不能实现的，因为对同一蛋白的各种异构体的消化会导致许多相同氨基酸序列的小肽的产生，对该蛋白差异表达的分析将会变得困难，且结果不可信。然而，如果蛋白异构体在蛋白水平上进行分离，并分开收集，则可实现通过所有可检测的多肽对某一种异构体的差异表达进行分析。

使用纳升级LC-MS/MS对蛋白预分离阶段的组分进行分析所产生的基线峰离子色谱层析曲线可通过DeCyder MS程序进一步处理。LC-MS数据以二维密度图的形式展示，m/z为y轴，滞留时间RT为x轴（图4B）。限定于蓝框内灰色区域模式的密度同某一特定m/z，RT及电荷状态条件下的多肽峰的信号密度成比例，因此对应于全扫描MS数据。红棒表明该位置（扫描编码）的MS/MS数据可用于蛋白的鉴定。

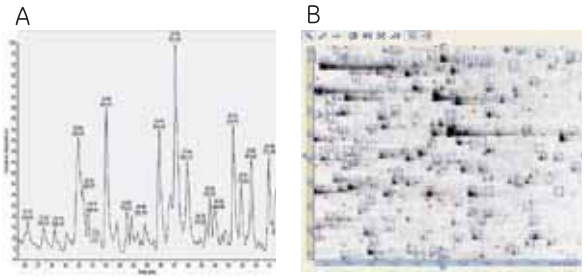


图2. A，部分BIC的结果，来自于对VEGF-A处理细胞的胰蛋白酶消化组分的nanoLC-MS/MS分析。B，由DeCyder MS 产生的信号密度图，数据来源于图A所示的BIC。MS数据现定于蓝框中，而用于蛋白鉴定的MS/MS数据用红棒标注。多肽检测，带电状态分配及无标记定量分析由软件自动进行。

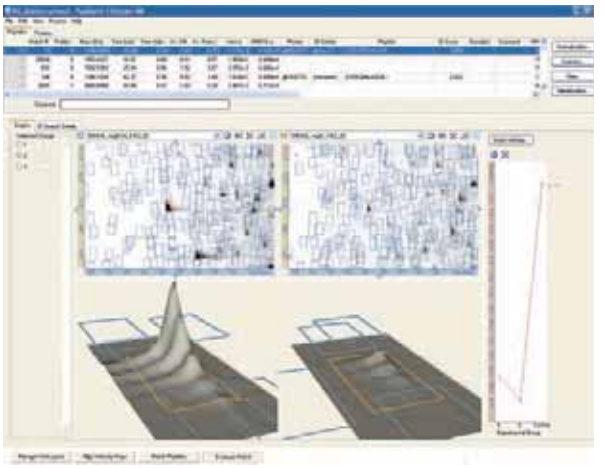
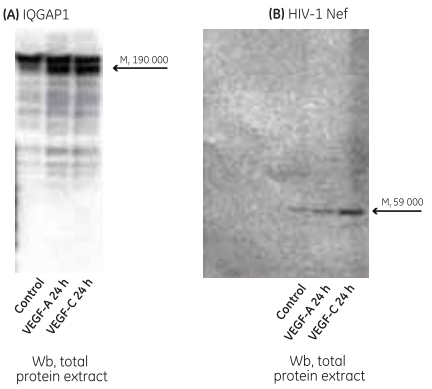


图3. DeCyder MS产生的密度图，表明人WNT8B蛋白的ALQLSSHGGLRSANR多肽在VEGF-A处理组细胞中的表达量约高于对照组三倍。

VEGF处理的细胞总蛋白提取物用SDS-PAGE进行分离，并用western blot进行分析，分别使用IQGAP1,HIV-1,NEF,14-3-3及WNT8B蛋白的抗体。结果同DeCyder MS定量分析结果符合较好。



总结

试验结果表明，相对于在多肽水平进行预分离，使用微量制备型阴离子交换色谱层析及ÄKTAmicro系统对复杂的蛋白样品进行预分离可使鉴定目的蛋白的速度提高三倍。对于两种预分离技术，无论是微量制备型色谱层析中，还是纳升级LC-MS/MS中都需要保留时间的高度可重复性。

通过使用蛋白的预分离，显著改变的蛋白异构体的多肽可被检测并进行定量分析。VEGF处理及对照组细胞中alpha-2-hs糖蛋白表达水平的七倍差异是不可能通过通用的鸟枪法检测到的。

在检测到的表达水平发生显著改变的蛋白中，一些是以前未知其参与到VEGF-A及VEGF-C信号传导通路中的。

IN Cell Analyzer 2000：让最具挑战性的高内涵分析高效完成

Jeanette George, Albie Santos, Angela Williams, Rhian Martin, Val Millar*, Liz Roquemore & Gary Sarkis
英国英格兰白金汉郡安玛西亚镇通用电气医疗集团;电话：+44 (0)29 2052 6445;传真：+44 (0)29 2052 6230;e-mail: val.millar@ge.com

摘要

药物开发的高内涵分析的本质在于：活性化合物在细胞、组织和整个生物体中作用，能够通过高通量荧光成像再加上自动化分析，来检测和定量那些相对于对照样品所发生的强度或者形态上的变化。IN Cell Analyzer平台提供了一整套从自动化图像获取到数据的定量和深度分析以及可视化的强大工具，来协助整个高内涵分析过程。IN Cell Analyzer 2000是一种全新的高性能成像系统，灵活地设计足以应对多种需求----从全自动显微镜到自动化的高内涵筛选。IN Cell Analyzer 2000提供了强大性能，如预览扫描、快速的载玻片成像、大芯片CCD照相机配件、3种透射光模式和高级图像背景噪音去除（去卷积）配件的选择，来确保提供在横向和纵向上定量最准确的图像。

我们展示了IN Cell Analyzer 2000在多个生物应用中的性能评测结果，说明了这个多功能系统产生了高质量的图像，适合于定量分析及提取准确、信息量丰富的数据。

介绍

IN Cell Analyzer 2000是一个模块化的系统，包含了200W 宽视野照明源、8对激发和发射滤光片、一个4方位的自动化物镜转盘、10种可供选择的物镜及自动的校正环调整、3个自动的四波段多色分光器和标准或大的CCD照相机等多项选择。

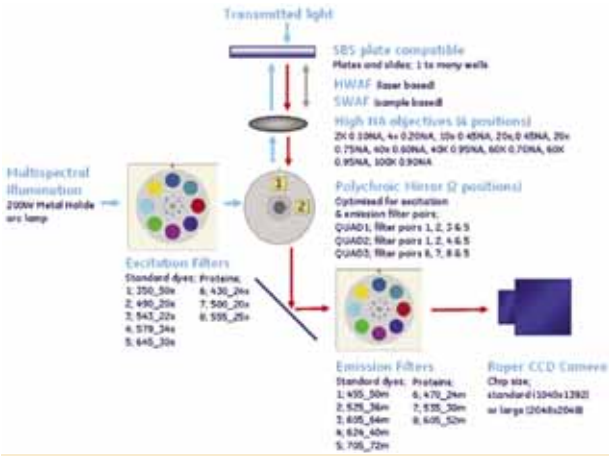


图1. IN Cell Analyzer 2000的光路

实验方法

我们展示了来自四个分析的性能评估的精选数据：(a) 神经生长，(b) GPCR受体内化，(c) 微核形成，(d) AKT_1-EGFP和肌动蛋白成丝的多重分析。分析性能是通过一些指标来评估的，包括EC_{50}或IC_{50}，以及分析质量的指示剂如Z ’ 和严格标准化平均差异（SSMD，）。所得计算值都尽可能和已发表的结果来比对。

神经生长分析&预览扫描特征

神经生长在胚胎发育、神经分化和神经系统功能上扮演着重要的角色。高内涵神经生长分析能够直接筛选不同处理的形态结果。为了诱导神经生长，经血清饥饿的N2a细胞与递增浓度的视黄酸共同孵育。细胞固定、透化，并用抗-α-微管蛋白的一抗和荧光染料（FITC、Cy3™、Texas Red™或Cy5™）结合的二抗来染色。细胞核用Hoechst™ 33342来染色。IN Cell Analyzer 2000获取的图像就特征分辨率而言，有着高的图像质量（图2）。

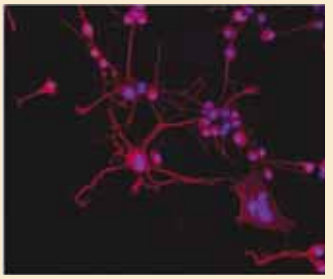


图2. 小鼠视网膜母细胞瘤Neuro-2a细胞用视黄酸处理来诱导神经生长后，利用IN Cell Analyzer 2000所获得的合并彩色图像。细胞体和神经用荧光染料结合的羊抗小鼠IgG标记，图示的例子为Cy5（红色）。细胞核用Hoechst 33342染色（蓝色）。

在更高的药物浓度下，许多细胞逐渐分离，剩余的细胞集中在孔边缘。“预览扫描”特征能够对全孔进行快速预览，并在平板成像之前互动选择所需的成像位置(图3(a))，随后在IN Cell Investigator中以用户定义的步骤来分析图像库， 并对对所有四种标记抗体的研究数据进行了比较(图3(b))。生成的剂量-反应曲线显示了每个实验皆产生了相当的动力范围、曲线形状和X-Y轴偏离位置。

利用CypHer5E™来监测GPCR内化

GPCR代表了新药开发的重大机遇，也是大约三成处方药的主要靶点 [6]。GPCR受体的激动剂活化导致了细胞内从质膜到内体通路的内化。此过程可以通过pH敏感的荧光染料CypHer5E来观察，它在碱性pH下荧光最弱，而酸性pH下荧光最强（图4）。IN Cell Analyzer 2000产生的数据以及IN Cell Investigator中利用多目标分析模块（MTA）进行的分析得到了9.5的SSMD和0.63的Z ’，这表明分析是可靠的，适于高内涵筛选。

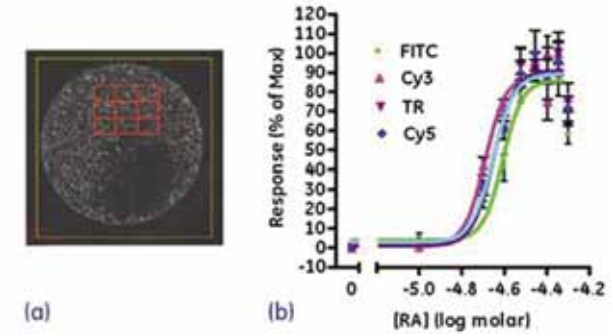


图3. (a) IN Cell Analyzer 2000中预览扫描功能的利用能让用户优化成像位置，预览图像（4×）显示全孔区域的Hoechst染色细胞核，(b) 分析数据的图形一览显示出每个细胞中标准化的平均神经长度对视黄酸 (retinoic acid) 浓度函数的曲线，利用荧光基团结合的羊抗小鼠IgG对处理的N2a细胞中抗-α-微观蛋白单克隆抗体进行染色，数据来自染料标记的羊抗小鼠IgG (a) FITC：峰[RA]=40 uM，SSMD=5.6；(b) Cy3：峰[RA]=30 uM，SSMD=6.9；(c) Texas Red：峰[RA]=30 uM，SSMD=7.6； (d) Cy5：峰[RA]=35 uM; SSMD=4.2。

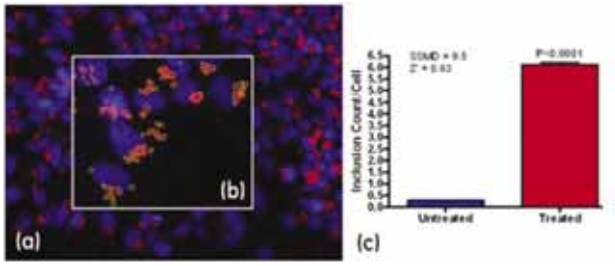


图4. IN Cell Analyzer 2000利用20倍物镜、所获得的图像，显示了异丙肾上腺素激动剂刺激后，VSV-G β-2肾上腺素受体在HEK293细胞中表达。受体内化的合并彩色图像是用CypHer5E标记的抗-VSV-G抗体以红色信号强度的增加来显示的（红色）。细胞核是以Hoechst 33342染色来显示的（蓝色）。(b) 显示了分析后的分段特征。(c) 数据显示；平均内含物计数/细胞 +/-SD，n=48 孔?处理；SSMD=9.5 Z ’=0.63。

微核形成 & 灵敏度提高

微核引入是遗传毒性化合物的关键生物标志物。对DNA链断裂或染色体分离干扰而产生的微核形成的快速自动分析，是候选新药毒理筛选中的重要组成部分。在这个例子中，用依托泊苷(etoposide)和丝裂霉素(mytomycin)来处理CHO-K1细胞以产生微核。固定细胞，用Hoechst 33342染色，并成像。系统的灵敏度让核通道的曝光时间只需18毫秒，在快速获取图像的同时提供宽广的灰度动态范围。两种处理及未处理群体的核图像都有着高的光学质量，显示出极佳的特征分辨率和整个视野中均一的低背景荧光（图5）。利用Investigator软件的微核分析模块来进行分析，报告每个处理组中微核和细胞数的百分比。本实验采用的细胞增殖及微核百分比的多重分析法 将死细胞或垂死细胞中的微核计数降至最低。数据显示了微核形成的药物依赖性增加，并伴随着细胞数的下降（图6）。在50%增殖时的微核百分比与发表的文献值一致。

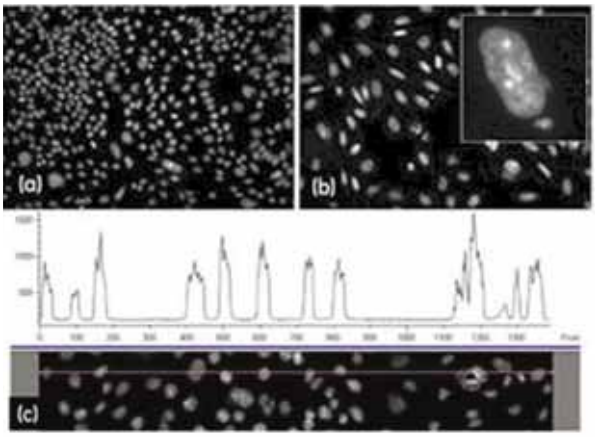


图5. IN Cell Analyzer 2000利用20倍 0.45NA物镜、对依托泊苷处理前(a)后(b) 的CHO-K1细胞所获得的图像，内图显示了微核相对母细胞核的放大图像。(c) 像素的线轮廓 vs视野内的灰度水平值显示了低背景荧光以及光照的均质性。

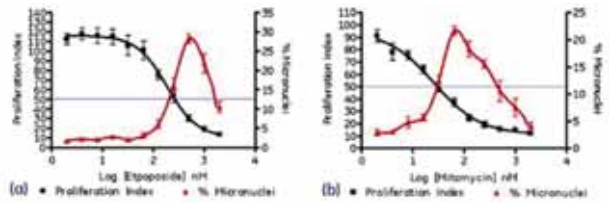


图6. CHO-K1细胞用递增浓度的(a)依托泊苷和(b)丝裂霉素处理，以诱导微核形成；剂量反应数据显示；平均值+/-SD，n = 8孔，每种浓度4个视野。

利用2D去卷积进行AKT1/肌动蛋白多重分析

AKT1-EGFP分析包含了稳定表达AKT1-EGFP融合蛋白的CHO母细胞系。当胰岛素样生长因子-1(IGF-1)刺激内源人胰岛素受体时，AKT1-EGFP发生转位，从细胞质移到质膜上的分散褶皱。PI3K/AKT通路的失调是癌症病理中的普遍现象，因此这条通路是治疗型药物开发的主要靶点。肌动蛋白是AKT的下游信号靶点。为了诱导EGFP-AKT1报告基因从细胞质转到质膜，细胞用IGF-1处理。在固定和用Hoechst 33342对细胞核进行染色之后，分析平板用IN Cell Analyzer 2000成像，并用IN Cell Investigator中的MTA模块进行分析。图像有着高质量，为转位事件发生后有效分离细胞核及细小的褶皱提供了足够的分辨率。激动剂的剂量反应滴定所产生的数据表现出典型的S形反应，而EC_{50}与之前报道的数值相当(图7)。

在进一步的实验中，对照和IGF1处理细胞用Tesxa Red标记的鬼笔环肽(phalloidin)来染色，以鉴定丝状的肌动蛋白（F-actin）。为了提高辨率和对比度，利用“ 2D去卷积获取 ”成像模式进行了高质量的图像还原。IN Cell Analyzer 2000成像平台提供了高级的图像还原配件，以确保获得定量最准确的图像。

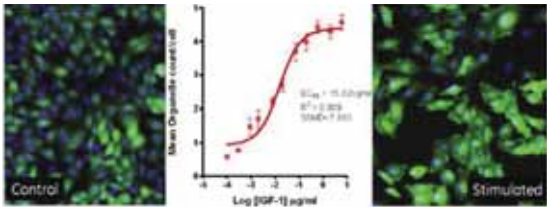


图7. 稳定表达AKT1-EGFP的CHO-hIR细胞单独（对照）或与IGF-1（刺激）孵育在96孔Matriplate中，之后固定并用IN Cell Analyzer 2000在尼康 10×/0.45 NA 物镜、细胞核用Hoechst染色（蓝色通道）；AKT1-EGFP报告基因在绿色通道发荧光。中间的图像，用IGF-1滴定 ；剂量反应曲线；每孔3个视野；平均+/-SD，每个数据点n=8重复。质量度量SSMD是利用最低和最高剂量点的数据计算而出的。

如图8所示，在去卷积图像中，能观察到目标的对比度和分辨率均有所增加，使分段特征增强。

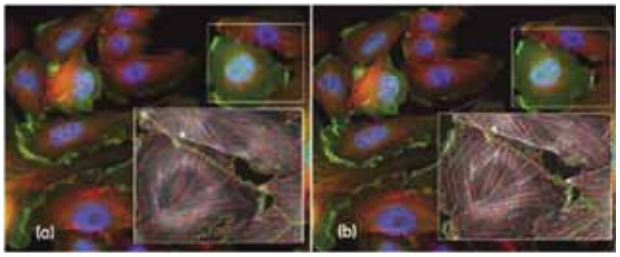


图8. 稳定表达AKT1-EGFP的CHO-hIR细胞与IGF-1共同孵育，并利用40倍物镜、在IN Cell Analyzer 2000上成像。细胞核用Hoechst 33342染色（蓝色通道）；肌动蛋白丝用Texas Red-鬼笔环肽染色（红色通道）；AKT1-EGFP则在绿色通道发荧光。(a) 在标准模式下获得的图像以及 (b) 利用 “ 2D去卷积 ” 模式对同一个目的区域获取的图像，内图对应了高光框的放大，应用用户定义的步骤来测量质膜褶皱和肌动蛋白成丝，强调了与(b) 标准2D成像模式相比，(a) 肌动蛋白丝的有效分段。

总结

一系列富有挑战性的HCA应用都已在IN Cell Analyzer 2000上评估。这其中包括神经生长、GPCR受体内化、微核形成和AKT1-EGFP活化及肌动蛋白成丝的多重分析。

IN Cell Analyzer 2000一系列全新的特征包括：预览扫描、大照相机配件、灵敏度增强和图像背景噪音去除（去卷积）等配置。这些特征使工作流程改善，提高了速度，并获得极佳的图像质量，对于高内涵分析应用可谓非常理想。

使用NTA或者抗组胺抗体捕获组氨酸标记的蛋白质

摘要

Biacore的表面等离子共振技术可以用于研究组氨酸标记的重组蛋白与结合对象的相互作用。蛋白质可以通过两种方式被捕获，一种是与Ni^{2+}活化的次氨基三乙酸（NTA）发生金属螯合作用而被捕获到传感芯片NTA的表面，另一种是蛋白质与传感芯片CM5的羧甲基化的右旋糖苷表面上所偶联的抗组胺酸抗体相结合而被捕获。传感芯片NTA可以直接使用而不需要预先处理，因为其表面不需要事先偶联捕获分子。

两种芯片表面都有很高的结合容量，而且许多种被固定的偶联分子都可以再生。这一方法确保了偶联分子的空间取向能更有利于它来暴露自己的结合点，而且也便于接着使用组胺酸标记为介质的色谱技术。我们将讨论传感芯片NTA和抗组胺酸抗体表面各自的优点。

材料和方法

用于研究的组胺酸标记的蛋白质都列于表 1中。所有试验在Biacore®3000上完成。

次氨基三乙酸表面

在传感芯片NTA的表面上，次氨基三乙酸通过共价键与羧甲基化的右旋糖苷基质相连接，芯片的表面用$NiCl_2$溶液活化，与NTA形成能够结合多聚组氨酸肽的螯合物。芯片表面用EDTA溶液很容易再生， EDTA可以与Ni^{2+}螯合，同时也从NTA表面释放出组氨酸。因此，对于各种组胺酸标记蛋白质的分析，再生方法都是标准的。

在传感芯片NTA上捕获组氨酸蛋白质

流速	20 µl/min
组氨酸标记蛋白的浓度	30 µg/ml
$NiCl_2$的浓度	500 µM
EDTA的浓度	350 mM
EDTA再生溶液	1 min
Ni^{2+}-离子活化溶液	1 min
组氨酸标记蛋白溶液	3 min
EDTA再生溶液	1 min

抗组胺酸抗体表面

抗组胺酸抗体能够通过胺偶联以共价键结合在传感芯片CM5的表面。有几种商业生产的抗组胺酸抗体可以获得，每种抗体的固定参数都需要优化。表2中列出了检测过的七种无BSA的抗组胺酸抗体。抗体冻干后溶解在MilliQ水中。在使用之前，我们推荐先将抗体在0.15 M NaCl中脱盐。最终的样品浓度不能低于100 µg/ml。为了使所有的固定水平都达到8000-11000 RU的范围，抗体的浓度和pH值都需要调节。所研究的抗组胺酸抗体列在表2中。

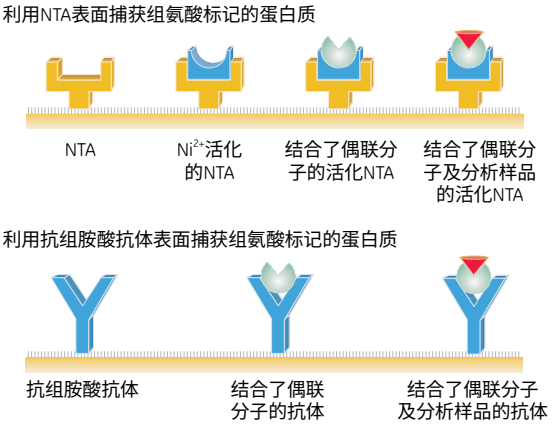


图 1. 两种捕获方法的示意图。

表1． 被研究的组胺酸标记蛋白

蛋白质名称	分子量	标记中的组胺酸标记的数量	组胺酸标记的位置
C3CB	11000	10	N-末端
S3CB	11000	10	N-末端
S3CB-△3	11000	10	N-末端
Ubiquitin（泛素）	8500	6	N-末端
MBP(麦芽糖结合蛋白)	43000	6	N-末端
CYP2C19	55000	6	C-末端
抗CT-17 ScFv 抗体片断	30000	6	C-末端
抗MUC-159 ScFv抗体片断	30000	6	C-末端
抗FITC-8 ScFv抗体片断	30000	6	C-末端
链霉亲和素(SA)	58000	6 (4 标记)	C-末端

在传感芯片CM5上固定抗组胺酸抗体

流速	5 µl/min
抗组胺酸抗体浓度	25 – 30 µg/ml
抗组胺酸抗体溶液pH值	4.5 – 5.5
EDC/NHS	7 min
抗组胺酸抗体溶液	3 min
乙醇胺封闭溶液	7 min

抗组胺酸抗体捕获组氨酸标记蛋白

流速	20 µl/min
组氨酸标记蛋白的浓度	30 µg/ml
组氨酸标记蛋白的溶液	3 min

抗体名称	供应商	网址
PENTA	Qiagen	www.qiagen.com
TETRA	Qiagen	www.qiagen.com
N-70796	Novagen	www.novagen.com
dia 910	Dianova	www.dianova.com
H-3, BSA-free	Santa Cruz	www.scbt.com
Murine Ab 6-His	Covance	www.covance.com
RDI-HISTAGabmX	RDI	www.researchd.com

表 2 所研究的抗组胺酸抗体列表

结果

图2a-c表示了十种组氨酸标记蛋白在三个不同芯片上的结合性质。总体来说，传感芯片NTA的结合容量要高于带有固定的抗组胺酸抗体的传感芯片。然而，抗体表面通常与组氨酸标记蛋白结合得更加稳定。组氨酸标记蛋白的结合曲线不仅仅取决于表面上捕获作用的种类，也取决于蛋白质本身。有的蛋白质（例如，链霉亲和素（SA）和CYP2C19）在这三种芯片表面上都很稳定，而其它的蛋白质，如抗-FITC-8，结合的稳定性则随芯片表面不同而变化。在此项研究中，每个结合位置上组氨酸出现的频率、位置和数量对结合的稳定性没有明显影响。六组氨酸标记连接在C-末端和 N-末端上都能够增加麦芽糖结合蛋白（MBP）结合到NTA表面的稳定性2。

提高组氨酸标记的蛋白质的结合稳定性

- 在有些情况下一个不同的表面能够提高结合稳定性。组氨酸标记的抗-MUC-159就是一个例子，它与PENTA表面结合的稳定性就优于NTA表面（比较图2a 和 c）。在这项研究使用的抗组胺酸抗体中，PENTA，TETRA和N-70796得到的结果最好。
- 降低温度可以增加结合稳定性，在抗体表面和NTA表面都是如此（分别对应图3 a和b）。

再生

在传感芯片表面利用抗组胺酸抗体实现多次检测需要选择适当的再生条件，我们的研究表明这依赖于组胺酸标记蛋白的特性。在多数情况下，用10mM的氨基乙酸冲洗30 秒就足够了，但是对不同的蛋白质都需要检测并且优化溶液的pH值（见表3）。在优化再生条件时，把体系中所有的结合对象都考虑进去是非常重要的，因为被分析样品的特性也是确定最优pH值的因素。组氨酸标记的链霉亲和素(streptavidin)作为偶联分子，生物素标记的碳酸酐酶（biotinylated carbanhydrase）作为被分析样品的体系就是一个例子。不论体系中偶联分子和被分析样品的特性如何，传感芯片NTA的表面用EDTA溶液都可以很容易的再生。

蛋白质	PENTA 抗体
C3CB	1.5
S3CB	2.5
MBP	2.5
抗-MUC-159 ScFv ab 片段	2.5
SA	2.5
SA+样品	2.0

表 3．用10mM 甘氨酸再生PENTA 抗体表面的组氨酸标记蛋白时所用的pH值。

非特异结合

除了特异性的组胺酸标记，NTA也会结合蛋白质中残余的单组氨酸。因此某些不含有组胺酸标记的天然蛋白质也会有信号响应。为了确定不含组胺酸标记的蛋白质与NTA表面结合的程度，我们研究了9种不含组胺酸标记的蛋白质。其中3种蛋白质结合到NTA-表面但是并不与抗体表面结合（表 4）。血清同样会出现人们不期望的信号响应，但是它与未活化的NTA表面的结合并不显著。在选择参比表面时这是需要考虑的重要问题。

被分析样品与捕获的组胺酸标记的蛋白质结合

选取组氨酸标记的链霉亲和素作为偶联分子，生物素标记的碳酸酐酶作为分析样品，来比较两种抗体表面与传感芯片NTA表面（图 4）。

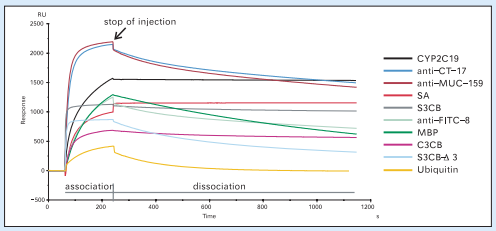


图 2a. 固定PENYA抗组胺酸抗体的芯片与不同的组胺酸标记蛋白结合。

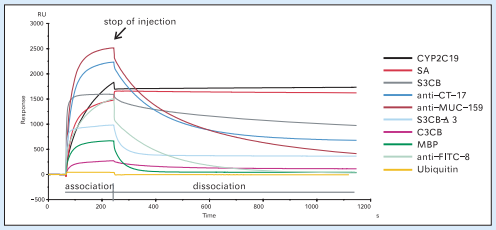


图 2b. 固定dia-910 抗组胺酸抗体的芯片与不同的组胺酸标记蛋白结合。

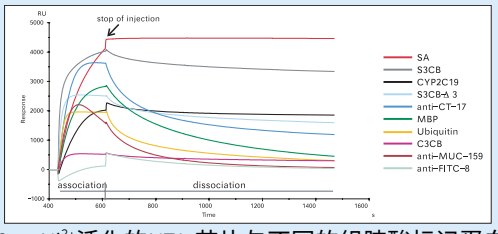


图 2c. Ni^{2+}活化的NTA 芯片与不同的组胺酸标记蛋白结合。

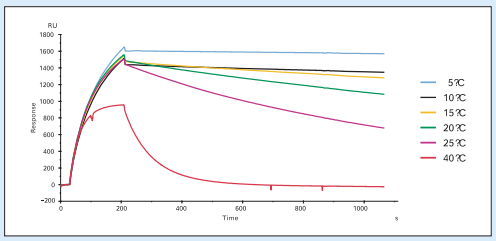


图 3a. 在不同温度被PENTA 抗组胺酸抗体表面捕获的MBP。

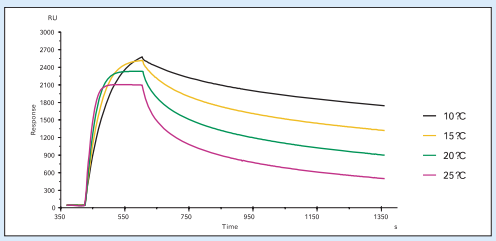


图 3b. 在不同温度被Ni^{2+}活化的NTA 捕获的泛素。

结论

虽然抗体表面比活化的NTA表面更稳定，但是准备这种抗体表面需要花费更多的时间，而且它的再生条件需要优化。因此，为了节省时间，推荐首先尝试NTA表面：再生方法很常规，而且NTA表面的也足够稳定。如果被分析的溶液中包含其它含组氨酸的蛋白质，这种非特异的结合可能会带来一定的问题。比较结果见表 5。

表面	血清(RU)	结合到表面的蛋白质数量*
N70796 Ab	307	0
PENTA Ab	440	0
TETRA Ab	198	0
Ni^{2+}-活化的NTA	2915	3
未活化的NTA	162	0

表 4 不含组胺酸标记的蛋白质与不同表面的非特意结合。
* 200-300 RU 视为阳性响应。

性质	Ni^{2+}-活化的 NTA	抗体
容量	高	中等
偶联分子结合稳定性	中低	中等
再生	常规	必须优化
非特意结合	高	低

表 5 抗体表面与NTA表面对比。

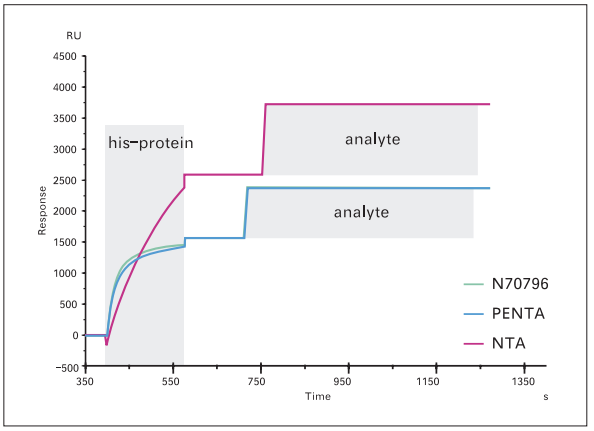


图 4 注射链霉亲和素（SA），紧接着注射生物素标记的碳酸酐酶（biotinylated-CA）。 在这些表面 分析样品/组氨酸蛋白 比率是50–55%。这样，样品与组氨酸标记蛋白在所有表面上的结合都是一样的。

MDCK细胞流感疫苗
在WAVE波浪生物反应器中生产

近年来波浪生物反应器在众多生物技术领域成功应用，但微载体细胞制作疫苗的技术尚未普及。疫苗生产多使用MDCK、VERO等贴壁细胞，急需微载体大规模培养技术突破。

墙报描述了MDCK细胞贴附CYTODEX™微载体在WAVE波浪生物反应器中悬浮培养流感病毒。WAVE生物反应器使用预消毒的塑料细胞袋CELLBAG™和集成控制器WAVEPOD™，全自动控制细胞培养的溶氧、温度、CO2浓度、pH及传质混合。

Preparation
· 3 g Cytodex 3 / L

Equilibration
· 37°C in WAVE
· aeration 250 mL/min

Inoculation
· 0.3·10^6 cells/mL

Cell attachment
· Cytodex 3
· intermittent rocking
· 4 hours

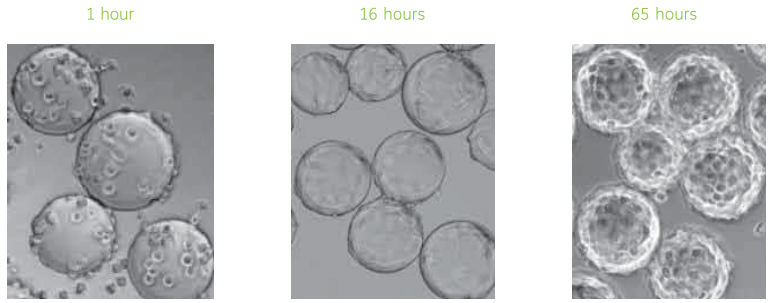
Cell growth
· 3 days, 37°C

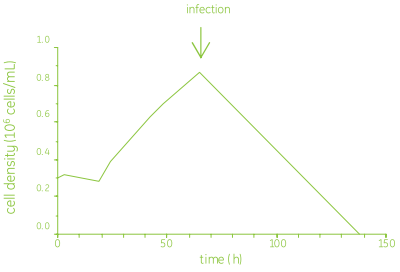
Virus infection
· A/PR/8/34/H1N1
· 3 days, 33°C
· MOI 0.01

Harvest
· 2.6 µg HA/mL
· $10^{7.2}$ ivp/mL

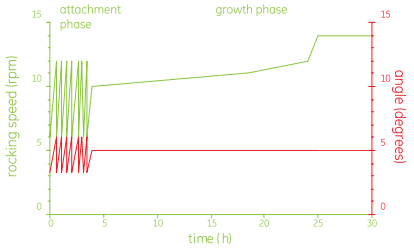
Downstream processing

Microscope pictures of microcarrier cell culture





Cell growth by crystal violet staining of the nuclei, counted in Bürker chamber.



Mixing during the WAVE cultivation. The rock and angle were constant from 30 to 140 hours (not shown).

WAVE BIOREACTOR with WAVEPOD controlling unit



结论

- MDCK微载体工艺生产流感疫苗中，WAVE波浪生物反应器证明了其方便多用性
- 预先消毒的细胞袋使生产批次中间转换时间缩短，操作方便并且病毒生产废弃物处理简单
- 细胞贴附微载体效果优异，在对数生长期后的平台期，细胞生长良好
- 延长的生长期以及可以加入更多的微载体CYTODEX3生产细胞更多，导致巨大的病毒产量

双向电泳常见问题回答(一)

——样品制备试剂盒篇

双向电泳，作为蛋白质组学研究的经典手段，已经得到非常广泛的应用。然而双向电泳不是一件简单的差事，太多的不确定性困挠大家，我们近期将推出系列双向电泳常见问题回答，内容涵盖样品制备，一向等电聚焦，到二向SDS电泳等，希望能给大家的实验提供参考。

众所周知，要得到良好的双向电泳结果，其技术的核心就是样品制备，这一步处理的好坏将直接影响2-D 结果。在最初的样品制备中丢失的关键蛋白永远不能失而复得，GE Healthcare Ettan系列的样品制备试剂盒为双向电泳的样品制备提供了方便、可重复的、一致的解决方案。以下我们总结分析了大家在使用样品制备试剂盒时常见的问题及可能原因，便于参考。

Sample Grinding kit 样品研磨试剂盒

应用：样品研磨试剂盒是即用型裂解少量组织和细胞样品以提取蛋白的试剂盒

Q：树脂干了，是否还能再用？

A：可以，树脂是惰性的材料，没有影响

Q：是否研磨树脂会破坏高分子的蛋白或DNA？是否会结合蛋白和核酸吗？

A：不同于其他的研磨材料，我们的研磨树脂很不会破坏gDNA或高分子量的蛋白，也不会结合蛋白和核酸。

2-D Protein Extraction Buffer蛋白抽提缓冲液

应用： 2-D蛋白抽提缓冲液为制备高质量的蛋白裂解液提供了一种便利的方法。目前有6种蛋白抽提缓冲液可供选择，便于用户筛选最合适的缓冲液。这6种蛋白抽提缓冲液皆源自对可靠而有效的蛋白抽提缓冲液的升级改良，以求进一步提高2D凝胶分析中的点分辨率。

Q：一个包装的抽提缓冲液可以用来处理多少样品？

A： 对于Trial Kit，处理10-20个样品（100mg组织），常规包装的缓冲液可以处理50-100个样品。

Vivaspin sample concentrators Vivaspin超滤浓缩管

应用：Vivaspin Sample Concentrators适用于以膜超滤的方式对生物样品进行快速非变性的浓缩。样品能浓缩至30倍，得率一般在95%以上。且不会出现样品被甩干的现象。



Q：超滤浓缩时，哪些因素会影响我样品的回收率？

A：样品的回收率和以下因素有关：

- 目标蛋白分子量/膜的MWCO的比例，为了达到好的回收率，选择膜的MWCO至少是小于目标蛋白分子量的1/2。
- 样品起始的浓度－低于0.1mg/ml的浓度将会导致低的回收率。
- 浓缩因子－浓缩倍数越高回收率越低
- 如果追求最高的回收率，选择适合样品体积的最小的超滤管和适合此应用的最低的膜的MWCO。另外，水平转头的离心机优于固定角度转子的离心机。

2-D clean up kit 2-D去除杂质试剂盒

应用：2-D 去除杂质试剂盒专为制备2-D 电泳样品而设计。此试剂可以定量沉淀蛋白质，而去污剂、盐、脂质、酚类化合物以及核酸等干扰物质则保留于溶液中。采用2-D 去除杂质试剂盒处理样品可以改善2-D 电泳结果的质量，减少拖尾、降低背景着色以及其它由于存在具有干扰作用的污染物而导致的假象。

Q：为什么用了2-D cleanup kit之后，在等点聚焦的时候电压仍然上不去？

A：首先检查以下现象：

1，聚焦结束之后检查IPG胶条－观察IPG胶条的边缘，是不是出现阴极端较厚和粗糙，而阳极末端比较薄？

2，在一向等电聚焦时电压一直都低？8000V一直没有到过？（注意：7cm的胶条最大的电压只能到3000-5000V，这是正常的）

如果确实是以上的情况，就表示在等电聚焦的步骤中仍然有离子的污染，考虑以下可能原因：

1，2-D cleanup kit 有可能wash的不够充分导致，a，确保沉淀彻底的打散悬浮，在wash buffer孵育的时候频繁振荡。(注意你只是在样品中加了一些酸性的沉淀剂去沉淀蛋白，酸是带电荷的，必须小心的从沉淀上去除所有的液体，此外，在这个过程中固体沉淀比较容易会“锁住”不太容易被wash buffer洗掉的酸，盐离子和离子去垢剂，所以在wash buffer中打散这些沉淀可以帮助蛋白洗涤

比较彻底，如果有必要，也可以使用Sample Grinding Kit来处理沉淀。)b，可选方案二，在步骤6，7步骤之间再增加一步沉淀洗涤的步骤，在沉淀中加40ul的共沉淀剂 (对于更大的样品，加入沉淀体积的3-4倍的共沉淀剂) 然后离心5分钟，去除上清液。

2，用完2-D Clean-Up Kit之后，使用推荐的水化液来溶解蛋白，不推荐盐类，酸类，碱类以及其他缓冲液的加入，对于含有尿素的溶液不要加热，防止其水解。

3，添加剂的污染 检查所使用的添加剂的质量，例如劣质的尿素或其他变性剂会造成导电性的升高。

Q：此kit有什么不兼容的试剂？

A：样品中尽量避免超过2%的SDS或1M盐酸胍，或者用kit之前将其稀释到更低浓度。

Albumin and IgG Removal kit白蛋白和IgG清除试剂盒

应用：白蛋白和IgG 去除试剂盒用于同时去除两大高丰度蛋白—白蛋白和IgG，节约时间，可以改善低丰度蛋白的分辨率，处理后样品蛋白质点的数量增加。

很高兴的告诉大家，我们刚推出白蛋白和IgG去除的新产品 Hitrap Albumin &IgG Depletion, Albumin & IgG Depletion SpinTrap,详细资料请登录 www.gelifesciences.com/sampleprepare

Q：用完kit之后，为何白蛋白和IgG的去除效率比较低？

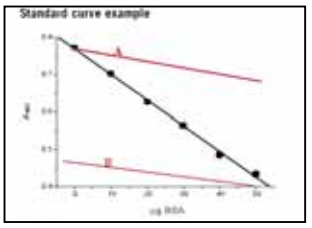
A： 出现这个问题的原因比较多，我们需要一一去分析：

- 此kit的适用范围是人的血清，不适用于大鼠，兔子，牛，鸡等
- 使用kit之前血清样品是否被稀释过，稀释buffer中含有高盐或低PH会影响白蛋白和IgG结合到树脂上。推荐使用未被稀释的干净血清样品。
- 介质储存的温度是否正确，应该储存在2-8度，如果树脂被冻干会被破坏性能，树脂如果储存在室温下也会加速配体的降解。
- 树脂是否过期了。
- 树脂是否被蛋白酶或者微生物污染，保持树脂处于无菌状态，将树脂保存在起始的buffer里面（里面包含叠氮化钠和抗菌剂）
- 树脂是否被重复利用了，去除白蛋白和IgG需要极端的PH或变性的条件会导致树脂配体的脱落，所以不能重复利用。
- 确保在样品和树脂孵育步骤样品充分混匀
- 你是如何测量和分析白蛋白和IgG的去除？是否正确的鉴定了白蛋白和IgG的条带？对于1D分析推荐跑白蛋白和IgG样品来作为marker,或者跑一般分子量marker来正确鉴定条带。
- 在使用这个kit之前样品用了TCA-丙酮沉淀过。任何除杂的步骤在用来这个kit之后再进行，这样是为了防止样品和树脂上抗原抗体结合位点的减少。

2-D Quant Kit 2-D 定量试剂盒

应用：专门用于准确定量电泳技术中所使用的样品蛋白浓度而设计，比如用于2-D电泳，SDS-PAGE 或者IEF 样品。

Q： 我的BSA标准曲线的斜率这么低，怎么回事？



首先我们来看你们所出现的情况是否如A,B所示：

A：若是A图所示 Y轴截距正常但是斜率较低

可能原因：

1，工作比色剂没有加入或者没有立即混匀。切记工作比色剂应以最快的速度加入，使之与样本立即混合。

2，BSA标准品加少了，出现这种情况可能和以下操作有关：a，BSA标准品沉淀和复溶效果不好。出现这种情况的话在制作BSA标准曲线时可以跳过加入沉淀和共沉淀剂的步骤，不去沉淀BSA。b，BSA有可能降解了，确保储存得当不被污染。

若是B图所示 Y轴截距和斜率都很低

可能原因：

1，铜溶液可能加少了 确保量取准确每管加入100ul铜溶液。

2，BSA标准品加多了 注意准确的量取，保证检测离心管和工作比色剂不被污染。

3，加入铜溶液的水不纯有干扰物质，至少应该用蒸馏水或去离子水。

4，分光光度计使用错误 确保设定波长是480nm，若不是，读数不在最大吸收波长范围，肯定会导致读数偏低。

Q：怎么480nm处的读数是负的？

A：切记480nm下读取吸光度值，是以水做对照。若是用铜溶液作为对照的话，读数肯定是负数的。

以上的一些前车之鉴希望能给大家的实验一些提醒，也许大家还有很多其他问题，欢迎及时和我们联系，或者登录GE Healthcare蛋白质组学论坛 http://amersham.zeroforum.com/ 和GE总部专家一起进行及时的在线交流。

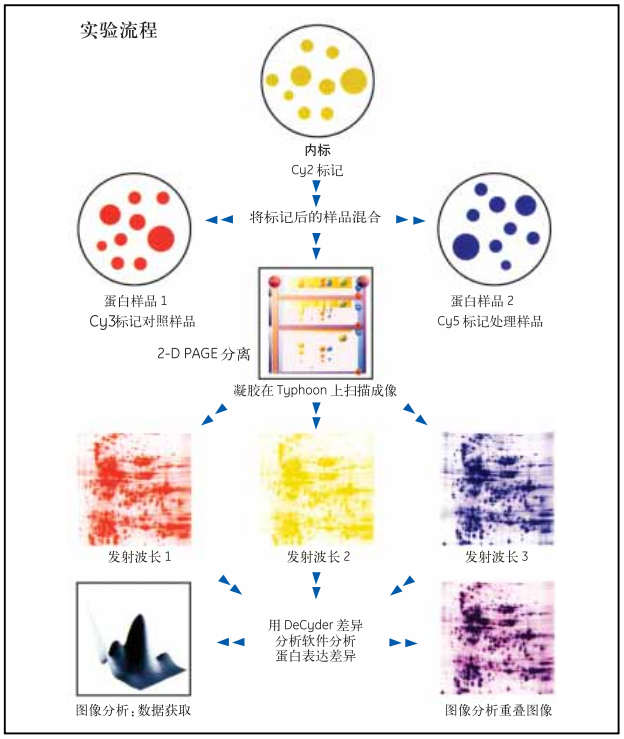
蛋白质组学在传染病研究中的应用

引言

蛋白质组就是基因组所表达的所有蛋白质，即一种细胞、组织或生物体所拥有的全部蛋白质。它的研究内容应该包括：(1)针对已有基因组或转录组数据库的生物体、组织或细胞，建立相应蛋白质组或亚蛋白质组数据库(蛋白质表达谱)及其蛋白质组连锁群，即结构蛋白质组学；识别执行关键生命功能的多蛋白质复合物并分析控制这些多蛋白质复合物的基因调控网络的特征；(2)以重要的生命过程或人类一些重大疾病为对象，进行重要的生理和病理体系或过程的研究，即比较蛋白质组学研究；(3)蛋白质组学支撑技术平台和生物信息学的研究。

随着蛋白质组学研究的蓬勃兴起，已经在各个方面取得了很多重要进展：如蛋白质和肽的分离方法研究；对蛋白质和肽进行定量的选择标记方法研究；翻译后蛋白质修饰的表征和相应的快速、准确分析仪器的研制；疾病诊断的生物标志物及其治疗药靶的选择；药物开发及代谢机理的研究；生理病理研究；环境对蛋白质修饰的影响和疫苗的筛选等等。

蛋白质组学研究平台简介



由于蛋白质组组分复杂，动态范围宽，因此在分析并鉴定相关蛋白质之前，需要对蛋白质组进行有效地分离。目前，有多种不同的分离技术应用到了蛋白质组中，例如液相色谱技术，蛋白质芯片技术，而电泳，尤其是双向电泳技术则是最广泛用于蛋白质组学研究方法之一。双向凝胶电泳技术是基于蛋白质两个独立的特性：等电点和分子量对蛋白质进行分离，它能够有效地从一个复杂蛋白质混合物中分辨出上万种蛋白质。双向电泳的第一向是等电聚焦电泳，根据蛋白质的等电点进行分离，通过蛋白质样品在固相pH梯度胶条上被聚焦在等电点位置上实现；在等电聚焦完成后，胶条被放置在均一或梯度SDS-PAGE凝胶的阴极端，根据蛋白质的分子量进行分离。当然，还有如蓝染非变性凝胶电泳等用于分离蛋白质聚合体等其他技术应用于第二向分离中。最后，凝胶上的蛋白点可以通过放射性标记或各种染色方法染色而被检测到，通过专业的扫描仪扫描成数字图像，再使用专业分析软件，如ImageMaster Platinum双向电泳分析软件等，来进行分析、寻找有意义的蛋白质斑点。

事实上，双向电泳技术是上世纪70年代发展起来的，蛋白质组学一出现就利用其极高的分辨率来解析复杂的蛋白质组，因此也积累了大量的相关文献。对双向电泳的优势和劣势也进行了大量的研究，结果发现双向电泳技术虽然有极高的分辨率，但是由于其重复性难以很好控制，灵敏度也不是很高，科学家就对此技术进行了多方面的改进，如发展了固相pH梯度胶条、提高运行通量和增加温度控制等。另外，科学家们也试图寻找其他的互补技术，如液相色谱技术等来弥补双向电泳技术无法分离一些极端pI值和疏水性较强的蛋白质。同时，还有科学家在双向电泳前利用其他的分离技术，如超速离心等以期提高对特异蛋白质组分的灵敏度。

而在双向电泳技术的基础上发展出了新的荧光差异凝胶电泳技术（2D DIGE），则克服了普通双向电泳技术的一些瓶颈，为科学家解析复杂蛋白质组提供了准确率极高的解决方案。2D DIGE是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，在同一块胶上共同分离多个分别由不同荧光标

记的样品，并第一次引入了内标的概念，极大地提高了结果的准确性、可靠性和重复性。2D DIGE技术可检测到样品间小于10%的蛋白表达差异，而统计学可信度达到95%以上。

采用2D DIGE技术，科学家对不同类型，不同个体的细胞、组织、或经过不同处理和不同生长条件下蛋白质表达差异分析，在研究疾病的分子机理、分子诊断、药物作用机理、毒理学等方面都积累了广泛的应用。尤其是通过对各种疾病组织和正常组织进行比较，可以得到针对特定疾病的一些标记蛋白质，得到的这些蛋白质可以用来作为潜在的疾病分子诊断标记物，为进一步的疾病治疗以及药物研究提供有价值的信息。

蛋白质组学在乙肝研究中的应用

乙型肝炎病毒是一种属Hepadnaviridae科的双链、带包膜的病毒，其基因组只有3200个碱基对，是已知的DNA病毒中最小的。病毒颗粒为直径42nm的圆球形。在病毒感染者的外周血中还有直径22nm 的圆形和管形颗粒。这种颗粒为乙型肝炎表面抗原，没有核酸，无传染性。乙型肝炎病毒基因组有四个基因翻译产物，分别为乙型肝炎表面抗原（HBsAg），核心抗原（HBcAg），X抗原（HBxAg）和DNA多聚酶。HBsAg为病毒的外膜蛋白，HBcAg为病毒的核心蛋白，x蛋白为基因调节蛋白，具有增强基因表达的功能，是乙肝病毒导致肝癌的主要原因。P蛋白是病毒复制酶，该酶具有反转录酶活性，通过与人肝细胞染色体相互作用，将乙肝基因整合于人染色体。

慢性病毒性肝炎与其引起的肝硬化、肝癌等一系列肝病关系密切。在一些发展中国家如中国、东南亚、非洲的塞内加尔等，肝癌发病率较高，并且与乙型肝炎病毒感染关系密切，约有80%的肝癌患者在其血清中可检出乙型肝炎病毒感染的标志物；而在日本、美国等一些发达国家，肝癌的发生主要与丙型肝炎病毒感染有关，在日本，肝癌患者血清中丙型肝炎病毒阳性率高达70%。目前应用蛋白质组学技术对两种病毒发病机制的研究还不是很多。

为探求高特异性和高灵敏度的乙型肝炎血清标志物，He等[1]用蛋白质组学方法比较了乙型肝炎病毒阳性患者和乙型肝炎病毒阴性正常人的血清，发现结合珠蛋白β和α-2链、载脂蛋白A-Ⅰ和A-Ⅳ、α-抗胰蛋白酶、转甲状腺素蛋白和DNA拓扑异构酶Ⅱβ等7种蛋白有明显改变。它们在表达量和表达模式上的变化与炎症坏死程度相关。

丙型肝炎病毒非结构蛋白和宿主细胞因子在丙型肝炎病毒复制中具有始动作用和调节作用。Fang等[2]研究发现在丙型肝炎病毒阳性的Huh7细胞系中，HSP27、α-肌动蛋白、nucleolin和真核启动子4A-I等一些蛋白质的表达显著高于丙型肝炎病毒阴性组。

肝细胞肝癌是世界上发生率最高的恶性肿瘤之一，多因素多阶段的发病机制最终导致细胞内环境失去动态平衡。肝细胞肝癌通常是长期炎症和纤维化的结果，多发生在肝硬化患者。缺乏可靠的早期诊断指标是其预后较差的主要原因，因此，探索和建立一种简单、快速、敏感性高和特异性强的早期诊断方法已经成了临床医学上的迫切需要。任何疾病在出现病理变化之前，细胞内的蛋白质在成分和数量上都会有相应的改变，所以，通过对蛋白质的动态观察可以筛选出疾病早期的指标和征兆。肝细胞肝癌的蛋白质生物标记研究有多种不同的策略。

体外肝细胞蛋白质组学研究

体外培养的肿瘤细胞株是国内外生物学和医学研究者常用的实验模型。利用体外培养的肿瘤细胞研究原癌基因和抑癌基因，肿瘤的发生机制，转移途径和信号转导等都取得了非常有意义的实验结果。体外培养的肿瘤细胞还具有细胞成分单一、均质性好和实验条件容易控制等优点。目前Liang等[3]已经建立了肝癌细胞系HCC-M的蛋白质双向电泳数据库（http://proteome.btc.nus.edu.sg/hccm/），为进一步研究奠定了基础。

Seow等[4]通过2-DE和MALDI-TOF-MS分析，在肝癌细胞系中发现了大约400个蛋白质点，其中大多是管家蛋白，例如乙醇脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶等。除此之外，还鉴定出一些与肝癌发生、发展过程有关的蛋白质，包括14-3-3蛋白、膜联蛋白，抑制素和硫氧化还原蛋白过氧化物酶等。Yu等[5]以人肝癌细胞系BEL-7404和正常肝细胞系L-02为实验材料，凝胶配比和质谱鉴定揭示肿瘤抑制蛋白(maspin)在肝癌细胞中表达量显著下降；凝胶上有两个斑点为HSP27，它们在肝癌细胞中的量高于肝细胞，且HSP27的变化与它不同的化学修饰有关，显示蛋白质翻译后修饰的动态变化对癌细胞生长有潜在影响。

血清蛋白质组学研究理想的生物标志物应具

有以下特点：特异、敏感、有预见性、高浓度、在临床前和临床阶段之间起桥梁作用、可经非侵入性操作测定等。由于体液(血液、精液、唾液等)中的蛋白质易能反复获得，且血液中包含众多未知的生物标志物，这可能是因为疾病早期就可在蛋白质水平出现细微但重要的改变，因此利用血清等体液进行其蛋白质的分析以获得生物标志物是较好的选择[6-7]。分析蛋白质的改变不仅可直接获得功能相关的标志物，而且更适于标准化和临床应用。因为血清的复杂性和特殊的变化范围（如血清中白蛋白和甲胎蛋白的浓度相差7个数量级），蛋白质图谱的描绘具有很大的挑战性。

王征等[8]比较观察肝癌患者与正常人血清蛋白质表达的差异，发现在淋巴细胞中表达并与机体免疫功能有关的淋巴组织样限制性膜蛋白在肝癌患者血清中表达明显下调，提示与肝癌患者免疫功能低下有关。而在肝癌患者血清中表达上调及单独表达的蛋白质大多是与细胞增殖、分化有关的生长因子或肿瘤相关基因的蛋白，如转化生长因子β III受体、尿激酶纤维蛋白酶原激活因子受体以及转录起始因子4D等。

冯钜涛等[9]在肝癌、乙型肝炎和正常人共3组各20例血清的蛋白质组分析中，鉴定出7种差异蛋白。与正常组比较，转铁蛋白、甲状腺素运载蛋白在肝炎和肝癌组低表达，α-1抗胰蛋白酶、凝聚素、铜蓝蛋白、触珠蛋白在肝炎和肝癌组均高表达。α-1抗胰蛋白酶在肝癌组较肝炎组高表达，而HSP27只在肝癌组表达。7种差异蛋白质中除HSP27外，均是肝脏合成的急性反应蛋白，其中α-1抗胰蛋白酶和凝聚素被认为是肝癌的潜在标记物。HSP27也是一种在多种组织中表达的应激蛋白，可能参与细胞增生与凋亡、信号转导、雌激素反应和分子伴侣等多种生物过程。Schwegler等[10]对健康人、丙型肝炎病患者、丙型肝炎合并肝硬化患者及丙型肝炎合并肝细胞癌患者血清样本进行研究，用所发现的38个差异蛋白建立分类树，预测疾病状态，对慢性丙型肝炎、丙型肝炎肝硬化、丙型肝炎相关的肝细胞癌预测的敏感性和特异性可以达到74%~95%。

肝组织蛋白质组学分析　肝组织曾经是研究肝细胞肝癌最早的办法。发生病理改变时，细胞内改变的成分包括肽类、蛋白质、酶类和代谢产物等可分泌到血液中，比如大部分肝癌患者可在血清中检测出高表达的甲胎蛋白。细胞内发生改变的蛋白有的可释放进入血液作为临床诊断的标志蛋白，但血清中蛋白质并不能完全反应组织细胞的变化。很显然，许多蛋白只存在于细胞内并不分泌到细胞外，这部分蛋白可能是与癌症的发病密切相关的功能蛋白,这些关键蛋白质若是结构蛋白或非分泌性蛋白，不被细胞分泌到血液中以至不能被检测出来。癌变组织和正常组织的差异在很大程度上是由功能基因及其所合成的蛋白质的不同来决定的，因此癌变组织与正常组织蛋白质组间差异的研究是寻找癌变机制相关蛋白的有效途径。

应用2-DE和ESI-MS/MS技术对乙型肝炎相关的肝癌和癌旁组织进行蛋白质组学研究，发现有11个蛋白质点在肝细胞肝癌组织和癌旁组织中存在显著差异，其中Peroxiredoxin 2、载脂蛋白A-I前体、3-羟酰辅酶A脱氢酶II型在肝癌组织中表达显著下降[11]。Yokoyama等[12]分析了丙型肝炎相关的肝癌和癌旁组织的蛋白质组成，也发现了11个差异蛋白质，鉴定出肝型醛缩酶、原肌球蛋白β链、果糖激酶、烯酰辅酶A水化酶、转铁蛋白轻链和精氨酸酶I等8个蛋白质在肝癌组织中表达显著降低。这些蛋白大都与肝细胞功能缺失以及肝癌形成有关。Lim等[13]通过对比肝细胞肝癌患者自身的相对正常肝组织、肝硬化组织和肝癌组织的2-DE结果，发现了21个显著变化的蛋白质点，其中肌氨酸脱氢酶、肝羧酸酯酶、肽基-脯氨酸异构酶和核纤素B1在有望作为肝细胞肝癌的候选生物标记。核纤素B1在肝硬化和肝癌组织中的表达量最高。

肝细胞癌转移与复发的蛋白质组学研究　对于控制肿瘤发展来说，很重要的一点就是及早发现致死的危险因素。许多因素与肝细胞肝癌扩散有关，并具有潜在的预兆作用。近来一个重要的发展趋势是用基因组学和蛋白组学方法，广泛的描绘涉及肿瘤转移、复发、分级的生物标记。生物标记可以为肝细胞肝癌的转移和复发提供除了传统组织病理学特点以外的更多信息。

目前已经发现大量具有潜在预测重要性的生物标记。一个重要的方面是分析细胞表型恶性程度的分子标记，包括DNA倍体型、细胞增殖指数、细胞周期调控因子、癌基因、肿瘤抑制基因(尤其是p53基因)和端粒末端转移酶活性。参与肝细胞癌入侵和转移的分子包括黏附分子(E-钙粘连素、细胞间黏附分子1、层粘连蛋白5、CD44变异体、骨桥蛋白等)、细胞外基质降解相关的蛋白酶(基质金属蛋白酶、尿

激酶纤溶酶原激活系统)、血管生成调节因子(血管内皮生长因子、肿瘤内微血管密度)等。另一个重要的方面是检测肿瘤相关抗原(如甲胎蛋白、黑色素瘤相关抗原、细胞角蛋白19等)的转录，它们对肝癌细胞播散到循环中和肿瘤的转移复发都具有预测作用。Ding等[14-15]认为肝癌的浸润和转移与其分泌一些特殊的蛋白质有关。他们应用蛋白质组学技术发现细胞角蛋白19在MHCC97H(高转移肝癌细胞系)中高表达而在MHCC97L(低转移肝癌细胞系）中低表达，通过放射免疫技术对小鼠肝细胞癌的研究还发现细胞角蛋白19的水平随着肿瘤的进展有所增加并且在肝癌发生转移后显著增加。免疫组化证实了102例有明显肝内转移的肝癌患者血清中出现了细胞角蛋白19阳性表达。这些蛋白在肝细胞癌转移复发中都是潜在的预测标记。

蛋白质组学在艾滋病研究中的应用

蛋白质组在HIV诊断与治疗中的应用　HIV进入人体后要经过数年，甚至10年或更长的潜伏期以后才发病。HIV严重破坏人体免疫功能，病人因抵抗疾病的能力极度下降而重复感染多种疾病，如带状疱疹、结核、痴呆、肿瘤等。寻找HIV感染的标记性蛋白质对疾病的诊断与治疗具有非常重要的意义。Luo X等[16]利用SELDI-TOF分析HIV-1感染引起的痴呆病人巨噬细胞中蛋白质指纹的变化，发现分子量为5 028和4 320 D的两个峰为HIV-1感染病人所特有。对31个病人标本进行分析，发现其灵敏度为100%，特异性为80%。类似地Sun B[17]等使用SELDI技术分离鉴定HIV-1引起的老年痴呆病人外周血单核细胞/巨噬细胞中分泌蛋白质的变化，发现在痴呆病人中分子量为14.6kD的溶菌酶明显减少。这些蛋白质有望为HIV引起的痴呆的预诊提供帮助。

艾滋病的死亡率相当高，HAART是目前治疗艾滋病最成功的方法，然而其毒副作用非常大。研究HAART治疗过程中宿主蛋白质的变化，将有利于治疗机理的理解与新药的开发。Relucio KI等[18]用蛋白质阵列技术研究了HAART治疗前后病人血清中IL-1R等28种蛋白质的变化情况，发现经HAART治疗24周后，Monokine induced by c-interferon(MIG)和interferoninducible protein-10(IP-10)的表达水平显著降低。Arnaud MC等[19]用多肽阵列的方法研究gp41优势免疫表位的18个多肽在HAART治疗前后的变化，研究显示它与ELISA相比具有所需样品较少且较灵敏的特点。Wojna V等[20]使用蛋白质芯片技术鉴定HAART治疗前后MDM细胞中蛋白质组成的变化，研究发现在HAART治疗前痴呆病人的质谱图中分子量为3.0~20.0kD范围里有7个独有的峰，而HAART治疗后这些峰都消失了。此外，研究者还用生物信息学手段来大规模地寻找HAART治疗的耐药位点和应答位点。

HIV感染机理研究　人类同HIV的斗争已经进行了近30年，对它的结构和功能有了初步的了解，获得了很多实验数据。Ryan SD[21]等将这些数据收集与整理，建立了一个在线HIV蛋白质组数据库(网址为http://bioafrica.mrc.ac.za/proteomics/index.html)，其中包括最新的HIV-1蛋白质结构、基因表达、转录/翻译后修饰、功能活性以及蛋白质与大分子间相互作用的信息，为HIV的深入研究提供了便利。

HIV表达gp120、gp41以及Tat等一些具有重要功能的蛋白质。为了了解Tat的功能，Pocernich CB等[22]用mito-chondrial complex II inhibitor 3-NP处理表达了Tat的人类星状胶质细胞和带有空载体的细胞，用蛋白质组手段(2DE-MS)研究蛋白质表达水平的变化，结果显示肌动蛋白(actin)、热休克蛋白90(heat shock protein 90)以及线粒体单链DNA结合蛋白(mitochondrial single-stranded DNA binding protein)在表达了Tat的细胞中上调。Coiras M等[23]应用DIGE结合质谱的蛋白质组学方法研究了T细胞转HIV tat基因后的蛋白质组变化，发现几个细胞骨架蛋白质下调。这些研究为了解tat对T细胞的影响提供了实验数据。

HIV在感染过程中不仅通过病毒基因表达相应的蛋白质来完成自身再生，而且要从宿主中获得蛋白质，鉴定这些为病毒所用的蛋白质将有利于了解病毒的感染过程。Chertova E等[24]从人体MDM中分离出HIV，用液相色谱串联质谱对其进行蛋白质组分析，发现了一批具有重要意义的蛋白质，其中包括33个已知的HIV蛋白质及一些新发现的HIV蛋白质(如annexins、annexin-bingding proteins等)，它们参与膜组装、小泡运输以及内涵体形成。还发现在感染了MDM的HIV中含有26~37个在外来体中发现的蛋白质。这结果验证了公认的观点：HIV病毒在从巨噬细胞中出芽时使用内涵体(endosome)/多泡体(multivesicular body)途径。

HIV感染宿主细胞时会导致宿主细胞蛋白质的

变化，研究病毒感染后宿主细胞基因与蛋白质结构和功能的改变，不但有助于理解HIV的生理活性，而且可以鉴定一些新的抗病毒的靶标。Berro R[25]等以HIV-1感染的潜伏期T淋巴细胞系ACH2、未感染的T淋巴细胞系CEM(12D7)和对HAART敏感的CEM衍生细胞系A3.01为材料，通过质膜蛋白质组研究，发现了BTK和XIAP两个蛋白质只在ACH2中高表达，且用抑制剂抑制这两个蛋白质的功能后，ACH2细胞系对抑制剂的反应最强烈，从而确定这两个蛋白质与HIV-1感染的潜伏状态有关。Kimberly A Carlson[26]利用蛋白质组学的方法研究HIV对宿主细胞———人类单核巨噬细胞的影响，发现58个蛋白质出现了上调或下调，其中包括cathepsin D precursor、S100 calcium-binding protein A7等上调蛋白质。Ciborowski P[27]等还发现，HIV感染MDM后通过连续调节宿主的cofilin-1、cystatin B等蛋白质的变化来实现其生理增殖过程。HIV感染不仅改变了MDM的结构蛋白质，而且导致其分泌蛋白质的表达变化，如matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)等在HIV-1引起的痴呆(HIV-1-associated dementia，HAD)病人中明显下调。此外HIV还能通过MDM诱导人脑毛细血管上皮细胞(HBMEC)上调，包括离子通道、细胞骨架在内的200多个蛋白质的表达，从而损伤大脑，引起痴呆。

以上这些研究说明蛋白质组技术能够为HIV感染机理的研究提供新思路,为较好地了解病毒的侵入、感染进程以及人体免疫反应的情况提供新的理论根据。

蛋白质组学在结核病及其他传染病研究中的应用

结核病是对人类威胁最大的传染病之一，尽管牛型结核分枝杆菌疫苗（BCG）和各种抗结核药物在全球范围内得到了广泛应用，但近年来，随着人口流动及密度的增高，结核杆菌多重耐药菌株及同人体免疫缺陷病毒（HIV）双重感染的出现，结核病已在发达国家和发展中国家呈再度肆虐态势。目前对结核杆菌的致病机理研究包括哪些基因参与了致病过程，寻找特异抗原，分型抗原 （根据强毒，弱毒，无毒菌株比较），免疫反应机理研究，哪些细胞因子和信号传导通路中蛋白与蛋白相互作用导致疾病的发生，结核的耐药机理等等。

感染机制研究　结核杆菌进入人体后，会依其毒力的大小及宿主抗感染能力的强弱而在宿主巨噬细胞内被消灭或长期处于休眠状态，当条件改变时，处于休眠状态的结核杆菌可恢复致病性，因此研究结核杆菌的潜在感染机制非常重要。营养缺乏，pH降低，活性氮和低氧等因素都与结核杆菌的潜在感染机制有关。GAZDIK等[28]用双向电泳(2-D GE)和液相层析结合串联质谱(LC-MS/MS)技术比较了在有外源性环腺甘酸(cAMP)存在的条件下，低氧(1. 3% O2、5% CO2)摇动环境和高氧(20% O2、0% CO2)静置环境中BCG的蛋白质的差异表达。在低氧摇动环境中至少15种蛋白表达增加，包括Rv1265、Rv2971、GroEL2、PE-PGRS6α和苹果酸脱氢酶(MDH)等五种蛋白，远高于在高氧静置环境下的蛋白表达变化。结核杆菌感染巨噬细胞后，在宿主细胞内繁殖、裂解细胞或处于潜伏状态。在感染过程中，结核杆菌与巨噬细胞之间进行着相互适应与相互作用，一些相关蛋白的表达会发生变化。利用双向电泳及质谱技术对感染结核杆菌H37Rv株前后的巨噬细胞U937株的蛋白质组进行分离和比较分析后发现，蛋白质DEAD/H Box Polypeptide 18表达明显上调，可能与巨噬细胞防御系统有关[29]。

诊断和疫苗开发的研究　运用蛋白质组学技术研究正常人、结核杆菌感染者和结核病人的血清蛋白质组学，可以找到一些特异性蛋白分子，主要是结核杆菌分泌蛋白，它们具有的特异免疫原性使其在结核的诊断和疫苗开发等方面有广阔的发展前景。5%到10%的结核杆菌感染者最后会发展成结核病人，但从结核杆菌感染者到结核病人要经过潜伏期、早期、亚临床期、临床期等不同时期。处于潜伏期、早期和亚临床期的病人几乎没有临床症状，用现有的检测方法也不能很好的区分，这给结核病人的诊断和治疗带来很大困难。SINGH等[30]比较了HIV-TB+病人，HIV+TB+病人和结核杆菌纯蛋白衍生物(PPD)阳性的健康对照组血清蛋白差异，在97%的HIV-TB+和71%的HIV+TB+病人血清中检测到了分泌蛋白Rv3347c，而在PPD阳性的健康对照组中没有检测到，在81%的HIV+TB+病人确诊为临床结核病人之前几个月的血清中也检测到了Rv3347c。这提示Rv3347c可以用于诊断潜伏期、早期和亚临床期结核病人。SABLE等[31]在研究比较感染结核杆菌H37Rv的病人外周血和胸水中的巨噬细胞蛋白差异中新发现了可作为T细胞抗原的四种分泌性蛋白Rv0496c、Rv2433c、Rv2445c、Rv0831c。BCG是目前唯一预防

结核病的减毒活疫苗，然而实验结果显示BCG对肺结核的免疫保护力为0% ~80%。非结核分枝杆菌的干扰，外源性结核分枝杆菌感染，BCG菌株本身的毒力差异等原因导致BCG的免疫效果很不稳定，因此，新疫苗的研究和开发势在必行。MOLLENKOPF等[32]通过比较结核杆菌和BCG的蛋白差异找到了36种DNA疫苗候选抗原。其中的一种保护性抗原Rv3407具有与BCG相似的免疫保护力，如果和BCG联用比单独使用BCG有更好的免疫效果。

耐药机制研究　目前由于不规范的治疗和原发性耐药结核杆菌的增加，耐药结核杆菌的发病率急剧上升，而对其耐药机理却并不清楚，其中可能是一些相关的基因的表达发生变化，找出这些相关的基因将会有利于阐明结核杆菌与耐药相关的机制，也为防止结核病开辟新途径。但从基因表达的mRNA水平到最终合成的蛋白质水平，这其中包含着蛋白质翻译的调控、糖基化、磷酸化等诸多因素的影响，这些因素都有可能改变作为直接作用因子的蛋白质的功能，因而直接研究蛋白质的变化具有不可替代的意义。抗结核治疗主要依靠异烟肼、利福平和吡嗪酰胺这三种药物的联合化疗方案。异烟肼是特异性的抗结核分枝杆菌的杀菌剂，但在过去的十年中，随着INH耐药性的广泛蔓延，该一线药物治疗效果的下降，对于全球现有的结核病防治规划构成严重威胁。刘丽蓉等[33]利用双向电泳(2-DE)结合基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF)，研究异烟肼耐药结核杆菌感染U937细胞后引起的差异表达蛋白，找到了8个差异表达蛋白。这有助于分析解释临床中观察到的受INH耐药株感染的病例出现毒力下降、致病性下降、传染性降低以及潜伏期延长的现象。北京菌株是一种典型耐药菌株，常常引起广泛耐药和结核病爆发。以往的研究表明这与其有强致病基因有关，相关蛋白可能会有差异。PHEIFFER等[34]比较了北京菌株、临床菌株F23和H37Rv的蛋白差异，实验结果发现和F23，H37Rv相比，北京菌株表达α-crystallin明显增加，Hsp65、PstS1和47kDa protein表达明显减少。此实验能从蛋白质水平进一步阐明北京菌株的耐药机制。对结核杆菌耐药机制的研究有助于发现特异性的基因和蛋白，为针对耐药株进行的新疫苗的设计提供了探索方向。

亚细胞蛋白质组学研究　结核杆菌的蛋白组成非常复杂，直接对其进行蛋白质组学分析，往往会丢掉很多蛋白质组学信息，因此近年来结核杆菌的亚细胞蛋白质组学研究逐渐成为重点。亚细胞蛋白质组就是利用蛋白质组学技术来分析一种组织或细胞的某一亚细胞结构的蛋白质组成。它一方面降低样品的复杂度，使分析简单化；另一方面可以相对富集相应亚细胞结构的低丰度蛋白，而且可以部分提示蛋白质的定位和功能信息。MAWUE-NYEGA等[34]运用LC-MS/MS对结核杆菌H37Rv的细胞壁、细胞膜和细胞浆的蛋白进行了全面分析，确认了1044种蛋白和它们在这三种亚细胞结构中的定位。结核杆菌的细胞膜蛋白因为具有酶、受体和载体等各种功能，因而在结核的诊断和致病性研究方面有重要意义，GU等[35]运用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(1D SDS)联合LC-MS/MS对H37Rv的膜蛋白进行了全面分析，新确认了79种膜蛋白和大约100种膜相关蛋白。SINHA等[36]发现结核杆菌的膜相关蛋白是重要的T细胞抗原，如Rv1397c、Rv3547、Rv2054等。YERU-VA等[37]运用SDS-PAGE联合LC-MS/MS对结核杆菌的细胞壁和细胞膜蛋白进行了分析，证实了一种主要的细胞壁相关铁调节外膜蛋白Irep-28(Iron-Regulated Envelope Protein)是HupB蛋白，此蛋白可作为有效的药物靶点，从而在结核病的治疗方面具有重要作用。

蛋白质组学在疟疾、下呼吸道感染、真菌感染、百日咳、麻疹、破伤风等其他传染病研究中也有广泛的应用[38]。

结论与展望

可以看出蛋白质组学技术，尤其是双向电泳技术及在此基础上发展起来的2D DIGE技术，为传染病的预防、诊断、治疗以及疾病机理的研究提供了一整套新的有力的研究方法。相信这些相关的研究方法和技术平台可以在重大传染病的研究中发挥无可比拟的作用。

参考文献：略

蛋白质组学解决方案与第六届中国蛋白质组学大会

由中国生物化学与分子生物学会蛋白质组学专业委员会(CNHUPO) 主办，北京蛋白质组研究中心和复旦大学共同承办的第六届中国蛋白质组学大会于2009年7月28～31日在江苏省泰州市圆满举行。包括军事医学科学院院长贺福初院士，复旦大学杨芃原教授，国家自然科学基金委员会副主任沈岩院士，南开大学校长饶子和院士等来自全国高等院校、科研机构、企事业单位的600余名从事蛋白质组学及其相关研究的专家学者出席了本次会议。会议的主题为：“蛋白质组学、注释基因组、发现疾病标志物”。

通用电气医疗集团生命科学部（GE Healthcare Life Sciences）是此次HUPO大会的金牌赞助商。作为蛋白质研究领域的专业供应商和行业领跑者，通用电气为蛋白质研究提供从双向电泳、荧光差异双向电泳技术平台，到蛋白质分离纯化、蛋白质相互作用分析及功能研究的全套解决方案。

通用电气一直致力于蛋白质研究领域，除了提供相关研究技术及支持，也在新的技术应用方面不断开发和推广。本届学术会议设有大会报告、分会(专题)报告和墙报三种形式, 其中北京蛋白质组研究中心姜颖教授、通用电气医疗集团齐连权博士等介绍的荧光差异凝胶电泳技术（2D DIGE）的原理及应用引起了与会代表的广泛关注。另外由通用电气医疗集团特邀的日本学者Kondo Nishida博士也分别在疾病蛋白质组分会和通用电气的技术推广会上报告了应用2D DIGE技术进行肿瘤蛋白质组研究的最新进展，利用2D DIGE技术该研究组成功地找到了多个生物标志物并已经应用于临床，该报告也被会议主席称赞为该日程中最激动人心的报告之一。墙报也是本次会议的亮点之一，集中展示了采用多种技术手段对蛋白质组进行解析的成果。在会议的闭幕式上，由我公司的市场总监沈平博士为青年学者颁发优秀墙报奖。表彰其在113篇墙报中脱颖而出，并鼓励其在蛋白质研究领域做出的贡献。



通用电气鼎力支持第21届国际生化大会

第21届国际生物化学与分子生物学联盟学术大会于8月2－7日在上海国际会议中心隆重召开，这是中国首次主办该学术盛会，共吸引世界32个国家和地区的3000余人参与。大会共邀请到来自世界各地的160余位科学家，包括4位诺贝尔奖得主和外宾700余人。

通用电气医疗集团生命科学部（GE Healthcare Life Sciences）鼎力支持了本届国际生化大会，位于大会主会场外的公司展台尤为醒目，会议期间吸引了1000多名参会观众的咨询洽谈。作为生命科学领域的领导者，我们的产品一直倍受业内人士的注目。在会上展示了其在蛋白质组学、蛋白质纯化，

以及蛋白功能研究互作分析领域的最新技术和产品，切合大会主题。并现场展示了双向电泳、蛋白纯化仪ÄKTA、等温滴定量热仪ITC、差式扫描量热仪DSC、生物分子相互仪Biacore等仪器，参会代表们现场感受到了新产品和新技术完美融合的体验。

为了满足更多参会者对相关技术的了解需求，在会议期间特地安排了展台内的小型技术讲座。每天下午的讲座将定量荧光蛋白印记技术、2D-DIGE新应用、新一代高内涵活细胞图像分析平台展示给各位参会者，并将“分离条件优化的实验设计”、“将ÄKTA的专业纯化支持运用于微量制备”、“应用非标记技术研究生物分子的稳定性和相互作用”等技术专题与参会代表进行分享，得到了代表的广泛好评。小小的讲座交流区总是座无虚席。

公司还在展台内设立了免费咖啡机，在会场外为参会代表提供了另一个互动和交流的平台，体现了GE一贯的细致入微的服务理念。加上GE小熊的号召力，使其成为参展商中一大亮点。





GE和2009中国新药创制关键技术国际研讨会

2009年6月4日-5日，由中国医药科技成果转化中心、中国医药产业技术联盟、《中国医药技术经济与管理》杂志主办，我公司协办并独家赞助的“2009中国新药创制关键技术国际研讨会”，在北京隆重召开。新药创制关键技术是制约我国新药研发和产业化发展的重要因素，也是实现我国新药研发技术赶超国际标准、推动我国医药产业技术升级和实现国际化的重要环节，大力推动新药创制关键技术的开发和利用已成为各相关部门共同面临的重大课题。

本次研讨会邀请了来自美国诺华、哈佛医学院、麻省理工学院、葛兰素史克以及中国医学科学院、军事医学科学院、中国科学院等中外机构及我公司权威专家，围绕着生物药、中药研发和产业化关键技术发展趋势，进行19场主题演讲，共有来自全国各地制药企业、新药研发企业、科研院所、大专院校等中、高层技术骨干和管理人员近200人参加本次研讨会，科技部生物技术发展中心肖诗鹰处长进行了简短致辞。国家食品药品监督管理局药品注册司张伟司长在开幕式上表示：“该会议具有前瞻性、重要性、指导性，我代表我们单位对此次会议的召开表示支持，同时也表达我们对新药创制工作的支持。”卫生部科教司何维副司长在开幕式讲话中，说明了我国在新药研发上与发达国家的差距，并指出：“必须依靠自主研发、自主创新以掌握关键技术。”在关键技术方面，我公司邀请了来自学术界、工业以及总公司研发部多位学者专家介绍了 Biacore 分子相互作用分析技术，MicroCal ITC 及DSC 量热技术，ÄKTA 分离纯化，以及PCI 小动物分子影像等技术在新药创制与开发流程中的应用实例，并阐明各技术在提高新药安全性和有效性所带来的效益。



“2009中国新药创制关键技术国际研讨会”现场

通用电气（中国）医疗集团

网址：www.gelifesciences.com.cn
邮箱：lifesciences@ge.com
免费咨询电话：800-810-9118

如需更多产品信息，请致电：

香港
香港九龙旺角亚皆老街 8 号
朗豪坊办公大楼 12 楼
电话：(852)2100 6314
传真：(852)2100 6338

北京
北京经济技术开发区永昌北路 1 号
电话：(010)5806 8888 转69417
传真：(010)6787 1162
邮编：100176

上海
上海市浦东新区张江高科技园区华佗路 1 号
电话：(021)3877 7888 转60276
传真：(021)3877 7449
邮编：201203

广州
广州市建设六马路 33 号
宜安广场 1212 室
电话：(020)8363 3828 转67961
传真：(020)8363 3291
邮编：510060

成都
四川省成都市新华大道文武路 42 号
新时代广场 12 层 A-C 座
电话：(028)86782581
传真：(028)86782582
邮编：610017

西安
西安市南大街 30 号
中大国际商务会馆 606 号
电话：(029)87203288
传真：(029)87203289
邮编：710002

哈尔滨
哈尔滨市南岗区红军街 15 号
奥威斯发展大厦 25 层 A 座
电话：(0451)5300 9566 转72300
邮编：150001

沈阳
沈阳市和平区和平北大街 69 号
总统大厦 C 座 907 室
电话：(024)22812468
传真：(024)22812121
邮编：110003

青岛
青岛市香港中路 61 号
阳光大厦 2208 室
电话：(0532)85729111
传真：(0532)85719153
邮编：266071

南京
南京市汉中路 2 号
金陵饭店世界贸易中心 1258/1259 室
电话：(025)84509386
传真：(025)84723600
邮编：210005

济南
济南市乐源大街 150 号
中信广场 618 房间
电话：(0531)86116900 转67565
传真：(0531)86907134
邮编：250011

杭州
浙江省杭州市曙光路 122 号
世界贸易中心世贸大厦 906 室
电话：(0571)87970862
传真：(0571)87970860
邮编：310007

重庆
重庆市渝中区民生路 235 号
阳光商务大厦 23 层 C 座
电话：(023)6374 9388
传真：(023)6374 9398
邮编：400010

厦门
厦门市厦禾路 189 号
银行中心 1815-1816 室
电话：(0592)2681280
传真：(0592)2681283
邮编：361003

昆明
昆明市三市街 6 号
柏联广场写字楼 1005 室
电话：(0871)3157017
传真：(0871)3157289
邮编：650021

南宁
广西省南宁市桃园路 67 号
石油大厦 1508 室
电话：(0771)2521666 转115
传真：(0771)2521555
邮编：530022

武汉
武汉市建设大道 568 号
新世界国贸大厦 1 座 3115、3116 室
电话：(027)6885 5731
传真：(027)8577 4677
邮编：430022

长沙
长沙市韶山北路 139 号
湖南文化大厦 1905 室
电话：(0731)412 9178-72427
传真：(0731)413 4257
邮编：410011

天津
天津市河西区马场道 59 号增 1 号
平安大厦 B 座 16 层 A
电话：(022)5819 2830
传真：(022)8558 9982
邮编：300203

GE imagination at work

2009 年 9 月印刷于北京