

Biacore经典应用回顾

肿瘤研究和蛋白质组学

免疫科学和传染性疾病

神经生物学



来自GE医疗集团生命科学部的Biacore系统

藏在DNA里的秘密一步步被揭开，科学家又面临着新的巨大挑战——解读DNA所编码的蛋白质之间相互作用构成的复杂网络。人们越来越清晰地认识到，蛋白质彼此之间高度有序的相互作用，决定了细胞的命运，如增殖、分化或死亡。蛋白质之间的相互作用严格地控制着DNA复制、RNA转录、蛋白质翻译、大分子物质的聚集与降解，以及信号转导过程等。本质上，所有的细胞功能都涉及蛋白质相互作用，可以说蛋白质相互作用是所有生物体保持正常生理功能的基础。许多疾病的发生与蛋白质——蛋白质相互作用的改变密切相关，例如神经退行性疾病、癌症和感染性疾病等。因此，研究蛋白质相互作用的发生条件，发生过程及调控机制，也就是了解各种生物学过程的基础，有助与阐明疾病发生的分子机制并寻找治疗干预的靶点¹。

自1990年第一台Biacore™系统问世以来，基于表面等离子共振原理(SPR)的生物分子相互作用分析系统以其独特的视角揭示了蛋白质、核酸等多种生物分子之间的相互作用。通过实时、全面、无需标记的分析手段对分子结合过程加以研究，Biacore²系统帮助科学家更深刻地理解了生物分子之间的相互作用和这些作用所承载的生物学功能。

Biacore系统能为研究者提供大量宝贵的信息，包括结合动力学，亲和力，特异性，热力学以及核酸活性浓度等，这对很多领域来说都具有重要价值。无论是低分子量的有机化合物还是生物大分子如蛋白等，Biacore在表征其结合特性方面都扮演着无可替代的角色。同时，Biacore还根据不同领域学者的需求，开发出了一系列相应的主机及耗材产品，包括多种芯片和试剂盒。Biacore遵从视数据质量为使命的原则，完全满足用户在基础研究、药物研制、工艺开发、生产以及质控等诸多应用领域对数据质量、产品性能及法规依从的高要求。

了解更多关于Biacore系统及其应用的信息，敬请访问Biacore官方网站<http://www.biacore.com>。

>> 你知道吗……

利用无标记相互作用分析技术发表的应用文献正在持续更新，目前已超过10000篇。登录Biacore官网<http://www.Biacore.com> 即可访问这些内容。

注： 1. 《蛋白质-蛋白质相互作用：方法与应用》，2008，ISBN: 9787811165609。
2. 本手册中Biacore应用仅限于科学研究，而并非作为医院检验科的诊断手段。

肿瘤研究及蛋白质组学

细胞凋亡

细胞凋亡或程序性细胞死亡是组织稳态下的正常生理过程。逃避细胞凋亡是肿瘤细胞的一个特征，它使得肿瘤细胞在转移过程中得以存活下来。因为在转移过程中，肿瘤细胞从原发病灶迁出，随着细胞进入循环系统，细胞与基质之间会出现暂时性的分离。

一些研究机构应用Biacore系统对损害凋亡信号通路以及转化细胞凋亡逃逸机制中的分子相互作用进行了深入的研究。这项工作对于探索新的促凋亡分子这一充满前景的策略是一种有效的策略。

利用动力学信息，优化治疗性凋亡抗体的药效

- 全人源双特异性融合蛋白与其源抗原之间的结合动力学数据表明，融合过程并没有明显的改变其组分蛋白的相互作用模式

全人源的双特异性抗体是通过两条单链Fv分子基因融合得到的。其中一个scFv组分是人从ScFv噬菌体展示库中分离出的人抗CD16的ScFv组分。NM3E2；而另一组分则用作融合伴侣。这里，Biacore系统被用来测定双特异融合蛋白与其源抗原之间的结合动力学(1)。实验结果显示，融合过程并没有对ScFv组分与其源抗原之间的相互作用特征造成明显的改变。“夹心式”Biacore实验表明，通过HER2/neu蛋白捕获于传感芯片表面的双特异融合抗体也可与CD16结合(图1和2)。

在体外实验中，融合蛋白的存在可增强外周血淋巴细胞诱导的裂解过表达HER2/neu蛋白的人卵巢肿瘤细胞的有效性。

由于这种融合蛋白为人源，因此避免了许多鼠源生物制剂所带来的潜在的免疫源性问题。同时，融合蛋白便于生产，具有高度的体外肿瘤细胞毒性，并且对肿瘤具有高度选择性。

Reference

- McCall, A.M. et al. Isolation and characterization of an anti-CD16 single-chain Fv fragment and construction of an anti-HER2/neu/anti-CD16 bispecific scFv that triggers CD16-dependent tumor cytotoxicity. Mol. Immunol. 36, 433-445 (1999).

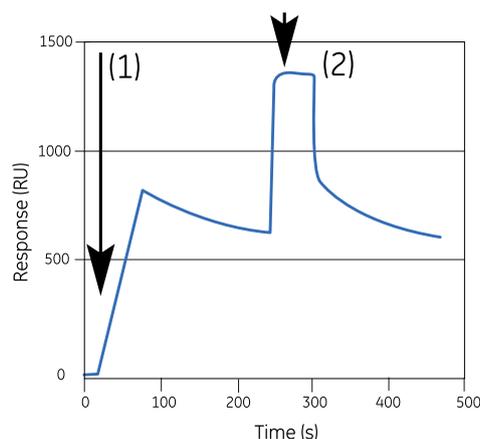


图1.即使是在CD16已与HER/neu (1) 预先结合的情况下，特异性抗体也可与CD16结合。

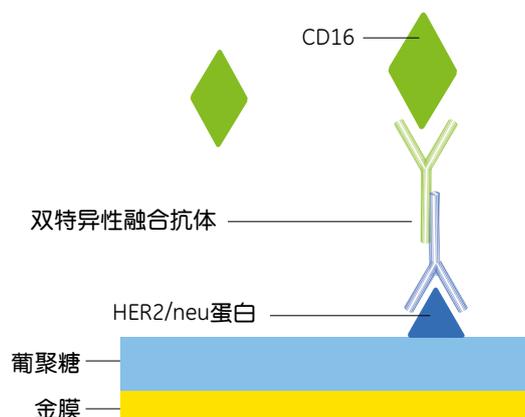


图2. 示意图显示由两个ScFv分子构成的融合蛋白所形成的双特异性抗体能在CD16与HER2/neu预先结合的情况下与CD16分子发生结合。

使用抗癌短肽模拟物抑制肿瘤细胞生长并增加肿瘤细胞的放化疗敏感性

- 短肽模拟物与重组肿瘤标记物之间互作的缓慢的解离速率表明，二者形成了稳定的复合体
- 对肿瘤细胞凋亡的有效诱导提示短肽模拟物对乳腺癌，卵巢癌和结肠癌的治疗可能有效

人类乳腺癌，卵巢癌和结肠癌细胞均表达过量的HER2/neu致癌基因变异体，HER2/neu属于生长因子受体家族的一员，和表皮生长因子（EGF）受体同属这一家族。针对HER2胞外域的单克隆抗体目前已被证实可以逆转肿瘤的恶性表型。然而，由于其对宿主的免疫原性，鼠源抗体的使用一直受限。同时，这些抗体较大的尺寸也限制了其成为生物药剂的可行性。

为了克服这些限制，Park等人通过对抗HER2和HER2之间所形成的复合体的结构分析，设计出一种1.5 K Da大小的短肽模拟物（2）。正如与其对应的免疫球蛋白一样，这种短肽模拟物也能在体内诱导肿瘤细胞发生凋亡，抑制肿瘤细胞增殖，集落形成以及实体瘤的生长。

应用Biacore系统，可对短肽模拟物和固定在传感芯片表面的重组HER2蛋白的胞外域之间的动力学特性进行分析。尽管短肽模拟物对肿瘤标记物的亲和力较其对应的单克隆抗体而言有一定程度的降低，但它们之间的解离速率却非常相似，说明两者可以形成稳定的复合体。因此，这种短肽模拟物可作为肿瘤治疗药物的一种有前景的替换药物。

Reference

2. Park, B. W. et al.
Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables P185HER2/neu tyrosine kinases in vitro and in vivo.
Nat. Biotechnol. 18, 194–198 (2000).

绘制凋亡信号通路

- 通过研究点突变凋亡蛋白和细胞表面受体之间的相互作用可以揭示出细胞内的信号传导通路

研究表明，凋亡蛋白LIGHT可与两种细胞受体：淋巴细胞毒素-β受体（Lymphotoxin-β receptor, LTβR）和疱疹病毒穿入介质（Herpes virus entry mediator, HveA）相结合。通过在可能参与受体结合的肽环处引入点突变，Biacore方法可考查这些突变对LIGHT蛋白结合特性的影响。

实验对野生型和LIGHT突变体与其受体间的相互作用分别进行了研究。通过抗体捕获技术将HveA蛋白和LTβR蛋白固定于传感芯片表面。体外分析发现，其中一种LIGHT突变体可以与HveA蛋白结合，却不能与LTβR蛋白相结合，也没能导致靶细胞的凋亡。这些结果有力的暗示，LIGHT通过与其细胞表面受体相互作用时至少激活了两条不同的信号通路，而且只有其中一条通路会引发凋亡。

Reference

3. Rooney, I. A. et al.
The lymphotoxin-β receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells.
J. Biol. Chem. 275, 14307–14315 (2000).

信号转导

发现并确认众多参与细胞外环境调节以至调控细胞周期，基因转录，细胞分裂和凋亡等生命现象的信号转导途径，将有助于肿瘤研究人员设计有效的肿瘤拮抗剂，从而精确定位并抑制那些在信号级联放大中起关键作用的分子。

应用Biacore无标记相互作用分析可以拓宽我们对信号通路中某些特定分子的认知，无论从结构还是功能上。这让很多新的治疗机会接踵而来，Biacore系统也在下述的各个研究中发挥了重要作用。

在基于Biacore的相互作用分析中引入脂质体，可以帮我们了解脂质微环境对于一个信号蛋白的功能完整性有多重要

- 某些蛋白需要类膜环境（membrane-like environment）才能发挥正常的功能，这些研究可通过在传感芯片表面引入脂双层或脂质体来开展
- 通过抑制Ras蛋白与细胞质膜的融合来指导抗肿瘤生物药物的开发

Ras是信号转导过程中的一种GTP结合蛋白。受体酪氨酸激酶启动了信号转导通路，经由Ras激活MAPK信号通路并将信号转导入核内。Raf蛋白参与了这一苏氨酸激酶级联放大过程，并是这一通路中的第一个酶，可与活化的Ras相结合。Ras在结合GTP后被激活，而在GTP水解成GDP后失活。Ras基因的致癌基因突变可诱导细胞转化或分化，一些细胞系在显微注射癌基因Ras后可发生快速分化。

除了需要保持与GTP的结合状态，Ras蛋白还需要固定在质膜上才能与Raf蛋白发生相互作用。所以，凡能够损害或抑制Ras在质膜上的稳定性的药物都可能是潜在的抗肿瘤药物。在Bader等人的研究中，将Ras与一段合成的脂质相连，并与传感芯片表面的脂双层发生相互作用（4）。

由于合成的脂质更加疏水，因此蛋白插入后的稳定性也得到提升。注入的Raf蛋白只与结合GTP且锚定于脂质上的Ras蛋白相结合（图3）。然而，当将截短的致癌基因Ras（无法与脂质结合）进行显微注射后，发现所注入的大鼠嗜铬细胞瘤无法进行分化；而只有将截短的Ras与脂锚共注入细胞，细胞才能发生转化，这一结果揭示了Ras与Raf之间相互作用的功能意义。

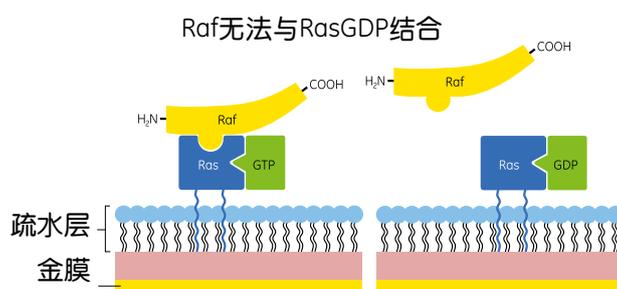
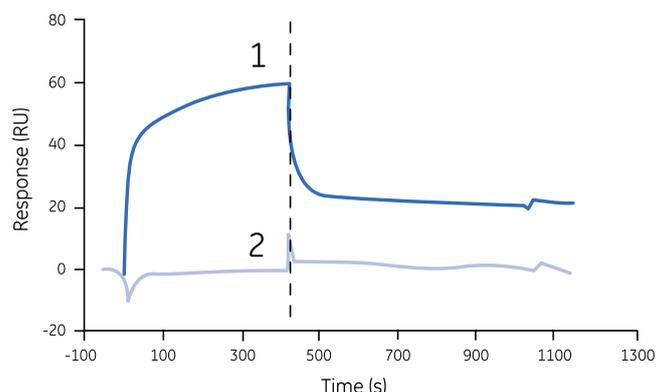


图3. Raf与GTP结合型Ras相互作用(1)，而不与GDP结合型的Ras结合(2)。

Reference

4. Bader, B. et al. Bioorganic synthesis of lipid-modified proteins for the study of signal transduction. Nature 403, 223–226 (2000).

确立支持细胞分裂相关蛋白功能的机制

- 应用Biacore系统确认和量化由酵母双杂交及免疫共沉淀实验中得到的相互作用数据
- Biacore方法对剪接变异体的分析揭示了蛋白中对结合和功能所必需的结构域

结肠腺瘤样息肉（Adenomatous polyposis coli, APC）基因是一种肿瘤抑制基因，参与家族型和散在型结肠癌的发生。虽然APC与包括微管蛋白在内的其他胞内蛋白存在相互作用，但其功能仍然未知。Erdmann等人推测，APC可能形成一个支架，用于组装大量的信号分子，同时还可调节这些互作蛋白的磷酸化状态。

本篇文章主要讲述APC和蛋白酪氨酸磷酸酯酶（Protein tyrosine phosphatase）PTP-BL之间的相互作用。应用Biacore系统的无标记相互作用分析证实APC与PTP-BL的PDZ结构域之间存在相互作用。将APC固定于传感芯片表面，而将两个具有不同PDZ结构域的剪接异构体PDZ2a和PDZ2b流经固定的肽链（5）。结果发现，PDZ2a会与APC结合，而PDZ2b则不与APC结合（图4）。对PDZ2a与APC相互作用进行动力学研究，发现其Biacore测量值与文献中报道的其他PDZ相互作用的测量值接近。

本文显示APC与PTP-BL之间存在相互作用，且APC可能对相互作用蛋白的酪氨酸磷酸化进行调节。这些发现以及其他已知的PTP-BL靶标将有助于指导开发出新的生物制剂，用于调节多种肿瘤相关的细胞功能如迁移，粘附和细胞周期调控等。

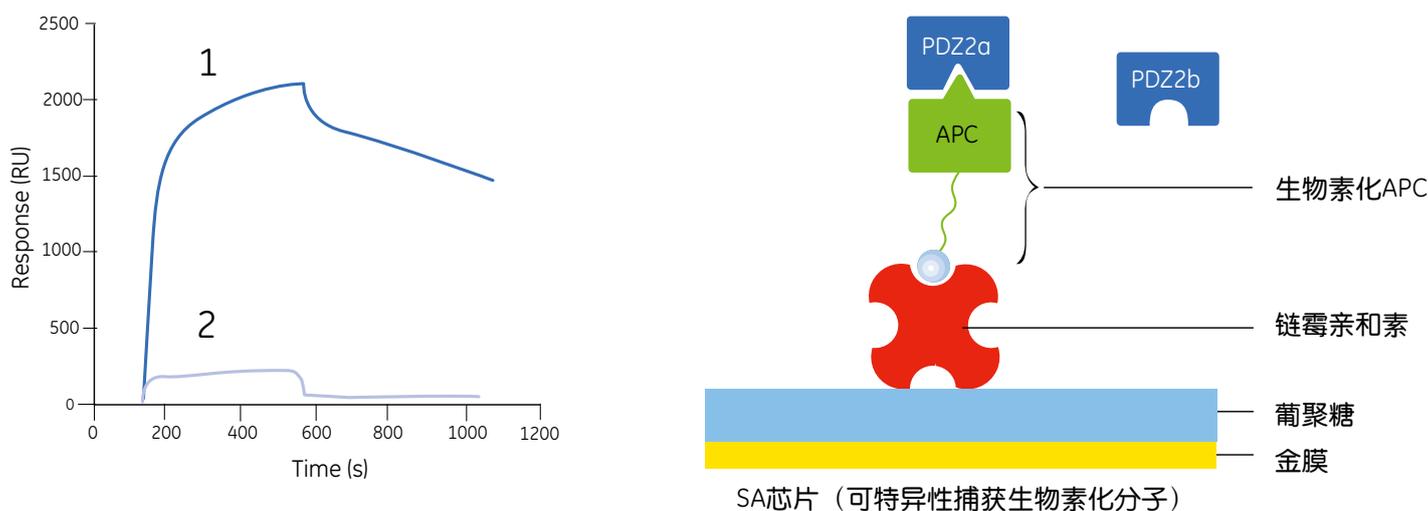


图4. PDZ2a (1)，而非PDZ2b (2) 可与APC特异性结合。

Reference

5. Erdmann, K. S. et al. The Adenomatous Polyposis Coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain. *Oncogene* 19, 3894-3901 (2000).

将动力学信息解析成信号转导中的功能

- 信号转导通路中特定蛋白互作的动力学表现直接影响细胞有丝分裂的调节

表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)通过与erbB受体家族之一的EGF受体相互作用而发挥其生物效应。erbB致癌基因编码了一种截短的EGF受体, 该受体含有一个持续活化的胞内酪氨酸激酶结构域。表达这一致癌基因的细胞仿佛受到持续不断信号刺激而发生增殖。

在一篇研究报告中, Lenferink等人构建出一种新的嵌合体, 该嵌合体包含EGF和TGF α 成分, 这两种成分均能与erbB结合(6)。该嵌合体较其任何一种野生型都具有高出不止十倍的促有丝分裂活性。将EGF受体的胞外域固定于传感芯片表面, 然后让嵌合体或野生型对照流经传感芯片表面(图5)。与任何一种野生型对照相比, 所有涉及这三种嵌合体的相互作用, 其结合和解离速率均更快。

这些嵌合体增强的诱导MAP激酶磷酸化的能力与它们和受体之间的快速结合强烈相关。作者推测, 这种更强的受体信号响应是被具有快结合与快解离的结合动力学特征的配基所诱导出来的。

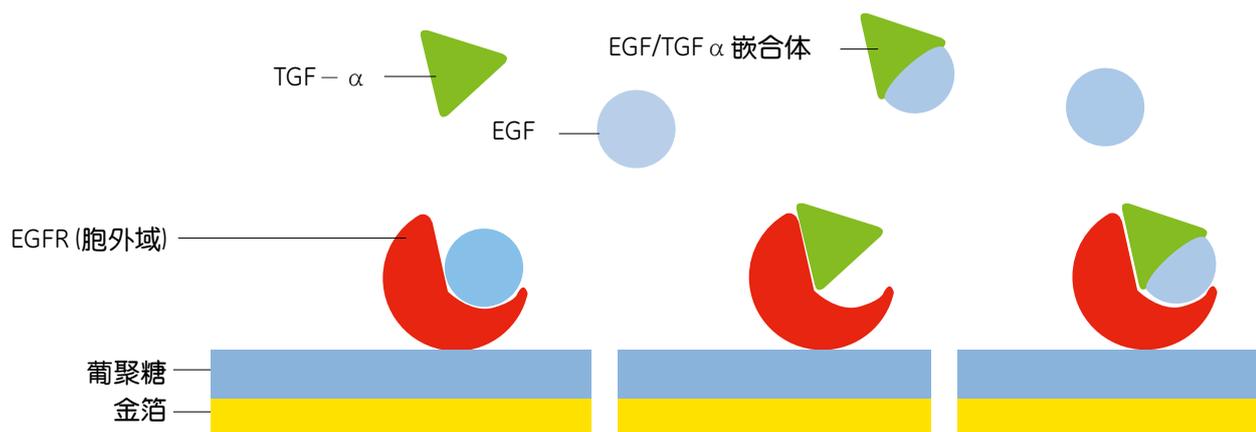


图5. EGF/TGF α 嵌合体与EGF受体结合的亲和力与野生型对照类似, 但却具有更加快的结合和解离速率。

Reference

6. Lenferink, A. E. et al.
Superagonistic activation of ErbB-1 by EGF-related growth factors with enhanced association and dissociation rate constants.
J. Biol. Chem. 275, 26748–26753 (2000).

配体垂钓和生物标记物筛选

对基因组数据库的搜索正让很多新的潜在的细胞表面受体浮出水面，然而，要确认和理解它们的生物学功能，却只有在发现了与之结合的配体时方能实现，这通常限制了对很多新受体生物功能的研究。配体垂钓，也称Ligand Fishing，正是通过对大量化合物或细胞提取物进行筛选，从而来寻找和确认可能与“孤儿”受体相互作用的配体分子。

从细胞条件培养基中鉴定与细胞表面受体相互作用的可能配体

- 在Biacore系统上进行配体垂钓通常是进行生物化学及功能鉴定而大量纯化蛋白前的第一步

将一个含细胞表面受体Flt4胞外域的Fc融合蛋白固定在传感芯片表面（7）。将来自100种不同细胞系的浓缩培养基流经芯片表面（图6）。当把这些培养基用生物学方法检测时，只有在Biacore实验中能与Flt4结合的培养基才能够诱导稳定转染的CHO细胞中的Flt4受体发生酪氨酸磷酸化。

随后，经过亲和层析柱的分离和SDS-PAGE电泳，三种与Flt4结合活性相关的多肽被收集。

由收集到的其中两种肽段中部分氨基酸序列合成变性PCR引物，扩增出一个65 bp的产物。测序结果显示，该产物中含有一段和已知氨基酸序列完全匹配的序列。这段cDNA被用来鉴定Flt4的配体，确认该蛋白在新转染细胞中的生物功能，同时还可以用于发现与其功能相关的生长因子的同源区域，从而研究这些配体的基因表达状态。

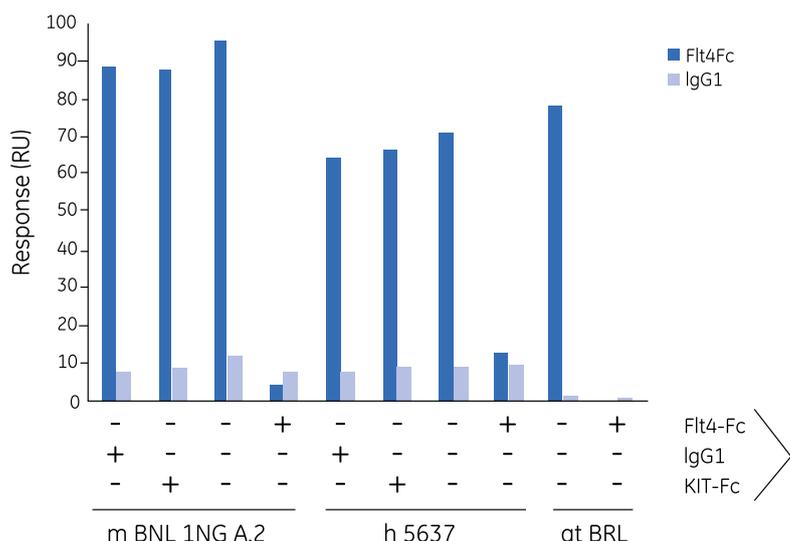


图6. 与Flt4-Fc特异结合的三种细胞条件培养基（CM）。当CM与过量的Flt4-Fc（非人IgG或KIT-Fc）共注射时，该信号被抑制。

Reference

- Fitz, L. J. et al. Characterization of murine Flt4 ligand/VEGF-C. *Oncogene* 15, 613-618 (1997).

从临床样本中筛选生物标志物

- Biacore方法揭示出在ELISA类似应用中出现的假阳性和假阴性结果

反复性动脉或静脉血栓与杂合型先天性蛋白S（Heterozygous congenital Protein S, PS）缺陷有关。据报道，系统性红斑狼疮（Systemic lupus erythematosus, SLE）患者中约有20到30%的病人患有血栓，而血栓的形成又与抗PS自身抗体的存在密切相关。

在一项研究中，Guermazi等人将纯化的PS固定在传感芯片表面（8）。将从SLE病人收集的血浆流经这个表面，然后注入抗人IgG（特异性识别Fc）对血浆中存在的抗PS抗体进行检测（图7）。值得注意的是，Biacore分析能够检测出相同样本在用ELISA检测时存在的假阳性和假阴性结果（图8）。在全部27个样品中，共发现有6个样品呈现抗PS阳性。

本应用展示了如何将配体垂钓原理应用于临床实践。其中，一种已知的自身抗原（纯化的靶标）被作为诱饵，可以从人血清复杂的蛋白混合物中寻找和鉴定出自身反应抗体。

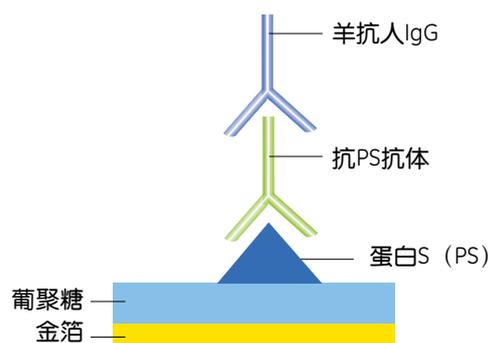


图7.采用Fc特异的羊抗人IgG抗体检测病人血清中的与固定于芯片的PS抗原相结合的抗PS抗体。

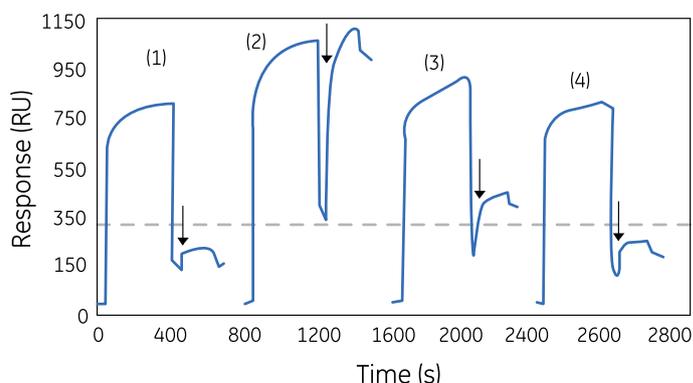
图8.抗PS和PS之间相互作用的实时模型。其中抗PS与PS之间特异相互作用所产生的信号可通过后续注射Fc特异抗人IgG抗体（箭头所示）进行鉴定。

模型1=Biacore阴性

模型2=Biacore阳性

模型3=Biacore阳性（ELISA呈现假阴性结果）

模型4= Biacore阴性（ELISA呈现假阳性结果）



Reference

8. Guermazi, S. et al.

Further evidence for the presence of anti-protein S autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Blood Coagul. Fibrinolysis 11, 491-498 (2000).

蛋白-蛋白相互作用

确定相互作用的稳定性，对一个复合体中各种蛋白的组成结构进行作图，并且弄清楚参与这些相互作用的特定氨基酸残基，这些对于理解结构-功能关系（Structure-Activity Relationship, SAR）是非常重要的。采用Biacore系统进行无标记相互作用分析可以给出从结合位点的信息到多蛋白复合体内的相互作用网络等一系列的蛋白相互作用数据。

根据相互作用特性确定多分子复合体内相互作用蛋白的功能

- 研究多蛋白复合体的构建模式
- 相互作用模型有助于阐述复合体内各种蛋白的功能

氨酰tRNA的合成受到酶复合体的催化，这种酶复合体由三种核心蛋白和其它给与基氨基酸特异性的外周蛋白组成。一项研究中，Robinson等人将其中一个组氨酸标签(His Tag)的核心蛋白P38固定在芯片表面（9），并将不同浓度的外周蛋白流经芯片表面（图9）。在Lysyl-RS形成二聚体的缓冲液环境中，Lysyl-RS能与p38形成稳定的复合体；而在Lysyl-RS以单位形式存在的缓冲液条件下，它与p38复合体的亲和力大幅下降，主要是由于解离速率的增加所致。

与Lysyl-RS不同，外周蛋白aspartyl-RS的两个单体与p38顺序结合。只有当缓冲液成分中添加有ATP和Mg²⁺时，这种与p38的相互作用才能够以简单的动力学模型进行描述（二聚体形式的aspartyl-RS与二聚体形式的p38结合），此时，p38蛋白与aspartyl-RS蛋白可以形成二聚体。

外周蛋白glycyl-RS与p38之间的结合很弱，但当p38稳定的首先与p43和arginyl-RS结合后，这种复合体变得非常稳定，这说明复合体的组成上存在顺序关系。侧向的相互作用可能也会影响到复合体最终的稳定性（图9）。

由于没有哪个与p38核心蛋白互作的外周蛋白分子可以竞争性的替代另一个，这说明：对与p38互作的每个伴侣蛋白而言，p38蛋白分子上都存在着不同的结合位点。作者以Biacore实验中获得的数据为蓝本成功地在体外“重建”了酶复合体。

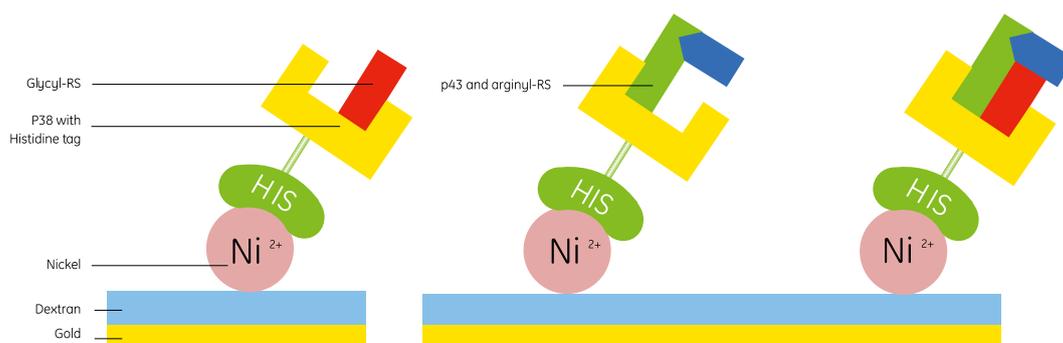


图9.蛋白复合体的侧向相互作用：当p38先与p43和arginyl-RS结合后，p38与glycyl-RS之间的相互作用稳定性得到提升。

Reference

9. Robinson, J. C. et al. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *J. Mol. Biol.* 304, 983–994 (2000).

应用无标记相互作用分析和随机突变库解构蛋白上的结合位点

- 将抗体固定于芯片表面，通过筛选“功能性突变”鉴定结合位点上起决定作用的单个氨基酸残基
- 通过在传感芯片表面顺序注入“抗体1-抗原-抗体2”的模式进行简便的表位作图

鉴定参与蛋白相互作用的特定氨基酸残基对于理解分子结构和功能之间的关系非常重要。利用Biacore系统将四种不同类型的纤溶酶原激活抑制物-1 (PAI-1) 的单克隆抗体固定在芯片表面，并研究其与27个随机选择的噬菌体展示克隆之间的结合 (10)。

尽管所有的突变体在与多至三种抗体的结合能力上会有一些损害，但这已足够筛选出那些数量相对较少、并具有功能性结合的突变体。通过氨基酸序列比对可以发现，那些无结合的克隆上存在的一些氨基酸序列，在那些具有结合能力的突变体上极少出现或者完全找不到。

通过构建和表达含点突变的全PAI-1蛋白可对噬菌体展示突变体功能缺陷进行测试。当分析整个蛋白突变体与抗体的结合时，可以观察到类似的抗体结合障碍存在。

PAI-1的3D作图显示所有已鉴定的表位都分布在蛋白不同的区域。在某个表位作图研究中，单克隆抗PAI-1抗体固定在传感芯片表面，野生型PAI-1被捕获。当另外两种抗体经过复合体时，都与PAI-1产生结合，这说明这两个结合位点没有重叠 (Overlap) (图10和11)。

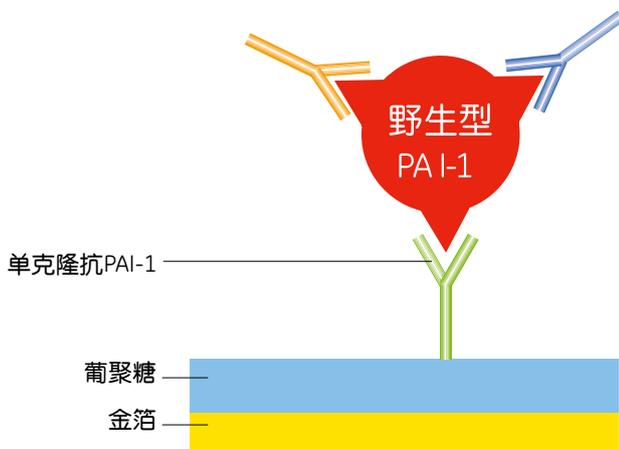


图10. 与单克隆抗PAI-1抗体结合的野生型PAI-1仍可与其他两种依次加入的不同抗体结合，提示这些结合表位没有重叠。

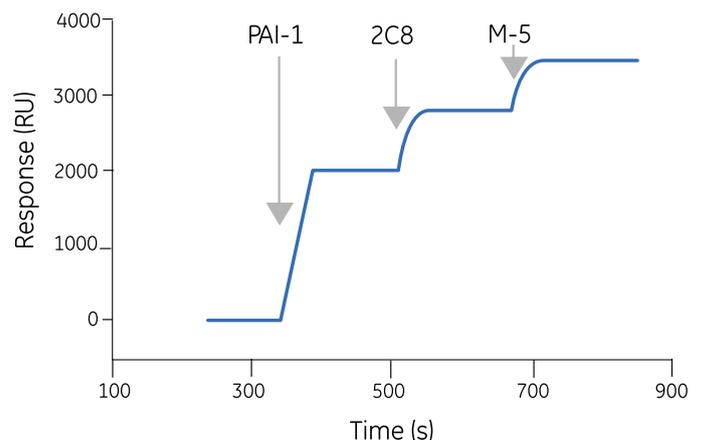


图11. 不同抗体可以同时与PAI-1结合，表示这些结合位点没有重叠。

Reference

10. Stoop, A. A. et al.
High-density mutagenesis by combined DNA shuffling and phage display to assign essential amino acid residues in protein-protein interactions: application to study structure-function of plasminogen activation inhibitor 1 (PAI-I).
J. Mol. Biol. 301, 1135-1147 (2000).

研究多组分蛋白复合体对生物过程的调节

- 多重交互作用分析为理解补体旁路如何识别异己和自身组织提供帮助

补体旁路 (alternative complement) 蛋白C3b部分受到血浆蛋白因子H (fH) 的调节。通过对fH与表面结合蛋白C3b相互作用位点进行鉴定, 有助于理解补体旁路为什么只会被异己组织激活 (11)。

将C3b连同其蛋白水解片段C3c和C3d固定于芯片表面。将8个fH片段通过注射流经芯片表面, 结果发现血浆蛋白因子H (fH) 上存在三种不同的与C3b结合的位点。

每个fH片段都与C3b上不同的位点相互作用。位点1仅与完整的C3b作用, 位点2与C3b和C3c结合, 而位点3与完整C3b和C3d片段结合 (图12)。C3b和fH之间的多重交互作用对于理解补体旁路与异体和宿主结构之间存在的专一反应性提供了分子基础。

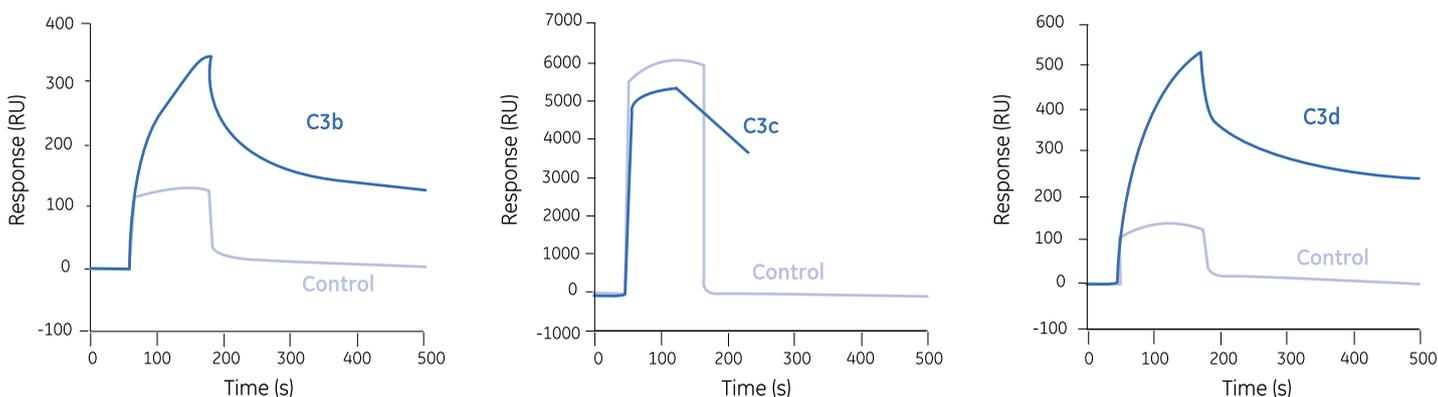


图12. fH位点3仅与完整C3b和其片段C3d相结合。

Reference

11. Jokiranta, T. S. et al.
Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b.
J. Biol. Chem. 275, 27657-27662 (2000).

BIACORE 系统与质谱

通过固定于传感芯片表面的配体捕获的分子，经酶解（一般是胰酶）形成多肽混合物，回收后再经ESI-MS/MS（Tandem electrospray ion trap MS，电喷雾离子阱串联质谱）分析。Biacore系统与串联质谱联合使用构成一个新的多功能系统，可用于发现和鉴定新的生物分子相互作用。

无标记相互作用分析与质谱技术

- 在一次分析中对捕获的蛋白进行分离和质谱测序

Biacore系统与电喷雾串联质谱技术（ESI-MS/MS）联合为研究者提供一种新的分析方法，用来捕获发生相互作用的蛋白并进行回收与鉴定（12）。该技术提供了一整套包含检测、捕获及回收中低飞摩尔量级蛋白的方法。

这篇文章两个例子中的一个是将三磷酸肌醇（IP3）固定在芯片表面，将转化有IP3结合蛋白的细菌裂解物流经芯片表面。随后，通过空气隔断的方法（air partition method）将微量的胰酶送至结合蛋白处进行消化。酶解的肽段通过反相毛细管柱富集并除去了可能干扰质谱分析的杂质（图13）。从反相上洗脱的肽段混合物通过液质联用串联质谱系统进行分析，最终确定IP3结合蛋白的存在。

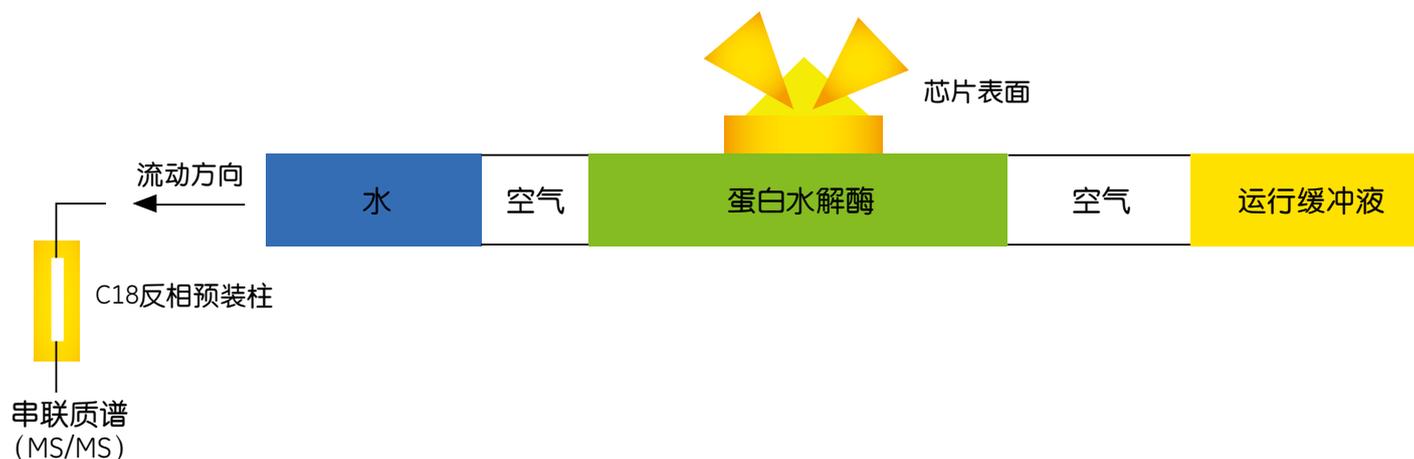


图13. 表面在位消化原理。与芯片表面结合的蛋白质经蛋白酶原位消化和毛细管柱富集后进行串联质谱MS/MS分析。

Reference

- Natsume, T. et al. Combination of biomolecular interaction analysis and mass spectrometric amino acid sequencing. *Anal. Chem.* 72, 4193–4198 (2000).

相关阅读- Cancer & Tumor

Daouti S, et al. 2009. Characterization of a novel mitogenactivated protein kinase kinase 1/2 inhibitor with a unique mechanism of action for cancer therapy. *Cancer Res.* 69: 1924–1932.

Austermann J, et al. 2008. Characterization of the Ca2t-regulated ezrin-S100P interaction and its role in tumor cell migration. *J. Biol. Chem.* 283: 29331–29340.

Jin L, Li Y, et al. 2008. Direct interaction of tumor suppressor CEACAM1 with beta catenin: identification of key residues in the long cytoplasmic domain. *Exp. Biol. Med.* 233: 849–859.

Nazarian SH, et al. 2008. Yaba monkey tumor virus encodes a functional inhibitor of interleukin-18. *J. Virol.* 82: 522–528.

- Ando H, et al. 2008. Mouse-human chimeric anti-TnlgG1 induced anti-tumor activity against Jurkat cells in vitro and in vivo. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 1739–1744.
- Barderas R, et al. 2008. Designing antibodies for the inhibition of gastrin activity intumoral cell lines. *Int. J. Cancer* 122: 2351–2359.
- Martinez-Torrecedrada JL, et al. 2008. Antitumor activity of fibroblast growth factor receptor 3-specific immunotoxins in a xenograft mouse model of bladder carcinoma is mediated by apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 7: 862–873.
- Richards JO, et al. 2008. Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 7: 2517–2527.
- Friedman M, et al. 2008. Directed evolution to low nanomolar affinity of a tumor-targeting epidermal growth factor receptor-binding antibody molecule. *J. Mol. Biol.* 376: 1388–1402.
- Herve M-A, et al. 2008. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. *Am. J. Pathol.* 172: 167–178.
- Mahanta S, et al. 2008. A minimal fragment of MUC1 mediates growth of cancer cells. *PLoS ONE* 3: e2054.
- Jin L, Li Y, et al. 2008. Direct interaction of tumor suppressor CEACAM1 with beta catenin: identification of key residues in the long cytoplasmic domain. *Exp. Biol. Med.* 233: 849–859.

免疫科学及传染性疾病

尽管在当今工业化国家中人们的卫生质量已经得到了前所未有的提升，然而对一些慢性疾病和肿瘤的预防和治疗仍然颇具挑战。对于某些疾病如多发性硬化症（此病病因至今尚有待查清），寻找有效的治疗手段仍然难度很大；另一方面，人免疫缺陷病毒不断地对新的治疗手段产生适应和逃逸，因此依然是21世纪主要存在的健康威胁。

从对发病机制的认识到临床实验中药物和抗体的鉴定，分子相互作用的分析技术贯穿整个临床科学范畴。本章回顾了已发表文献的简短摘要，这些文献主要阐述了无标记相互作用分析在实验室内的广泛应用，其中包括了商业研究机构对新药制剂的探索，也包括了小型医院机构对诊断过程进行改善的尝试。

炎症

炎症生物标记物---急性期蛋白糖基化模式的检测

- 检验应足够稳健，可以对临床粗制样品进行处理
- 信号特异性的反应糖基化水平，与所捕获的总糖蛋白量无关
- 作为化学、酶学和色谱技术以外的一种更加快速的替代方法

众所周知，蛋白的糖基化模式会随着病理过程和损伤所致的炎症进展而发生改变。瑞典Linköping大学的Mathias Lilkeblad和同伴展示如何使用Biacore系统对急性期蛋白 α 1-酸性糖蛋白（ α 1-acid glycoprotein, AGP）——一种重症烧伤病人的炎症标记物（1）的糖基化模式，进行测定。

从病人身上采集血清，用EDTA处理并稀释，流过传感芯片表面。将抗 α 1-酸性糖蛋白（AGP）多克隆抗体固定在传感芯片表面，然后使用凝集素对血清中发生结合反应的分析物进行检测。固定前，将AGP抗体与高碘酸钠孵育，使其末端岩藻糖残基氧化，从而减少非特异结合。

由Lilkeblad等人所开发的检测方法应该具备足够的稳健性以用于检测临床上的粗制样本，并且非常重要的一点是，该方法还必须保证其他血清蛋白不会与传感芯片表面结合，也不会对凝集素：AGP之间的相互作用带来潜在的干扰。因此，在接近“真实”的情况下，对实验方案进行验证显得尤为重要。尤其是当注射样品成分复杂时，比如临床样品或细菌粗制裂解物时，这种验证的重要性更不能被低估。

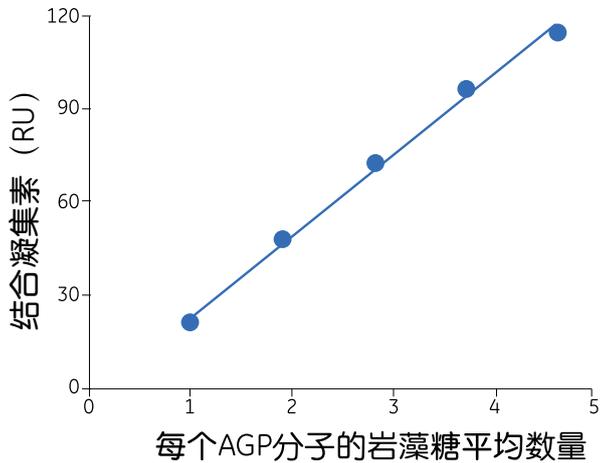


图1.将含不同比例的具有不同岩藻糖化程度的 α -酸性糖蛋白(AGP)的两种样品的混合物捕获在传感芯片表面。将结合的凝集素响应值以每个AGP分子上平均岩藻糖残基数作图。几乎所有的混合物中被捕获的AGP总数目相差无几(图片经Liljeblad等人授权修改, Anal. Biochem. 288,216-224 (2001))

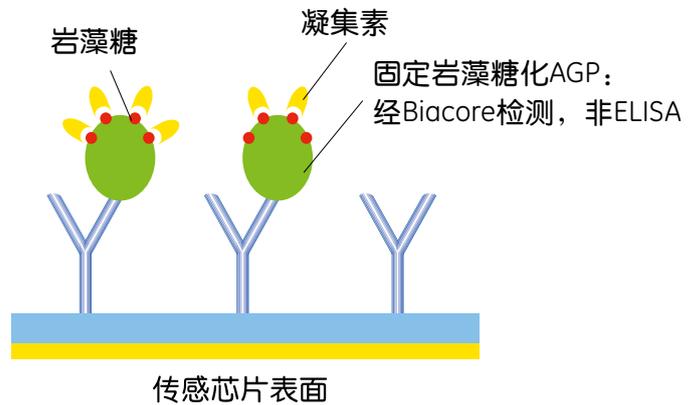


图2. Biacore夹心实验可以测定单个蛋白分子上的糖基化比率, 而与样品中的蛋白总量无关。在非饱和配体浓度下(如文中所示), 很难用ELISA一类的稳态实验对糖基化程度进行检测。

用已知每个AGP分子的岩藻糖数量为1到5间的样品进行检验, 在整个浓度范围内, 岩藻糖化分析物的饱和信号呈线性; 由于每个样品中AGP的总量恒定, 所以响应值仅与岩藻糖化程度有关(图1)。

为了对病人血清样品中AGP的岩藻糖化水平进行鉴定, 将低密度的抗体固定在传感芯片表面, 而通过将加入凝集素后的饱和响应值与加入血清前的捕获AGP响应值相除可得到岩藻糖化比例。通过这种方式, 可以在一种不依赖捕获AGP总数的情况下对岩藻糖程度进行测定。该方法被用于评价重症烧伤病人急性炎症期间AGP岩藻糖化的改变。从Biacore实验中测得的岩藻糖比例与ELISA结果非常吻合。然而, 采用Biacore方法检测有一个优势即可以测定岩藻糖比例, 并且不需要知道捕获AGP的总量(ELISA实验无法检测AGP的总量)。当需要对某些蛋白的翻译后修饰进行检测, 而这些蛋白的总量低于满足固相表面饱和的要求时, 这一优点尤为明显(图2)。Biacore系统可作为临床环境中检测蛋白标记物瞬时糖基修饰所采用的化学, 酶学及色谱技术外的一个可行且快速的替代方法。

Reference

1. Liljeblad, M. et al.
A lectin immunosensor technique for determination of α 1-acid glycoprotein fucosylation.
Anal. Biochem. 288, 216-224 (2001).

痘病毒和疱疹病毒抑制人趋化因子网络的机制研究

- 开发免疫细胞趋化作用抑制剂以抵抗炎症的发生
 - 探索病毒趋化抑制因子与天然趋化因子G蛋白偶联受体（GPCRs）所识别的表位是否存在重叠
 - 测定趋化因子和病毒趋化抑制因子之间相互作用的计量学关系

趋化因子是一类小的分泌蛋白，可以刺激白细胞向炎症发生区域趋化。痘病毒和疱疹病毒通过产生趋化因子结合蛋白，竞争性地抑制趋化因子和天然受体之间的相互作用，从而抑制趋化因子网络。以下工作中，作者通过无标记蛋白相互作用分析来研究这些抑制机制。

痘病毒和疱疹病毒通过产生趋化因子结合蛋白（Chemokine-binding proteins, CKBPs），竞争性地抑制趋化因子和其同源GPCRs之间的典型的高亲和力的相互作用，或竞争性地抑制与葡糖胺聚糖（GAGs）之间的低亲和力的相互作用，从而对趋化因子网络产生抑制。痘病毒CKBP-II可阻止CC型的趋化因子与细胞表面受体结合。在两个相互独立的研究中，伦敦 John P. Roberts研究院Grant McFadden小组以及巴塞尔诺华制药有限公司 (3)的Roman Urfer和Ontario (2)分别采用Biacore系统对CKBP-II和人CC-趋化因子MCP-1的点突变型蛋白之间的相互作用进行检测。

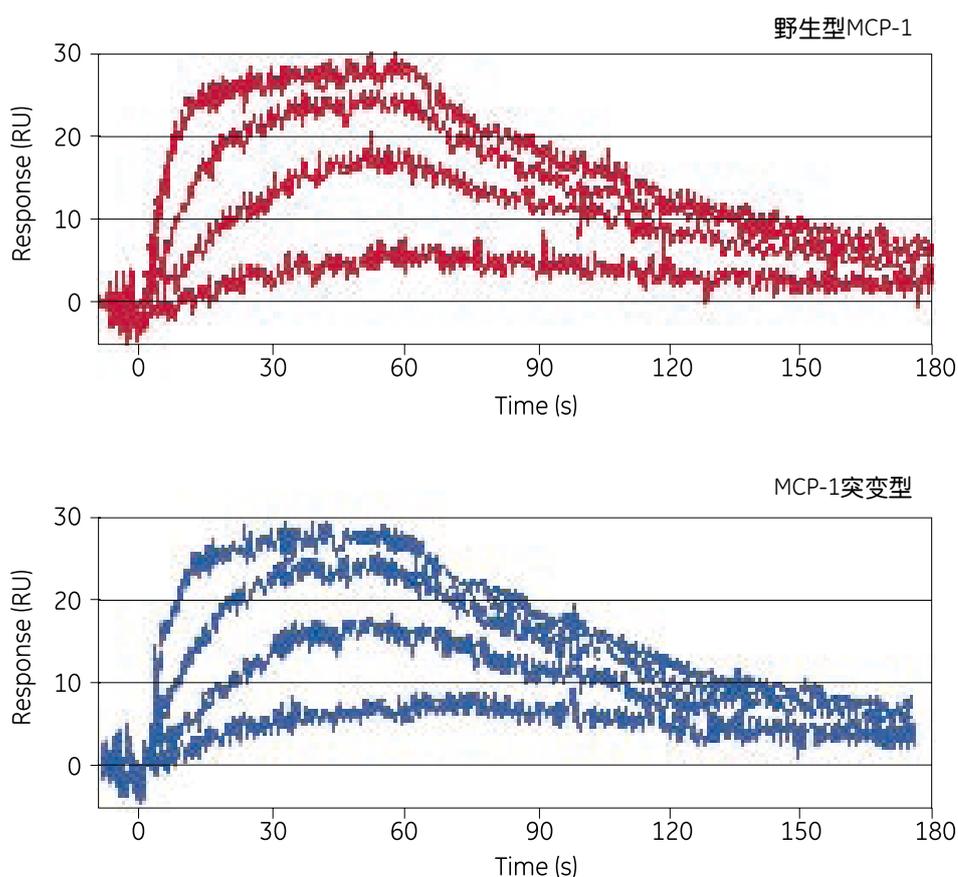


图3.野生型和突变型MCP-1与偶联的CKBP-II蛋白之间的相互作用模式（图片经Seet和McFadden授权修改，J. Leukoc. Biol. 72, 24-34 (2002)）。CKBP-II:Fc融合蛋白被偶联在传感芯片表面，不同浓度的趋化因子以此流经芯片表面。传感图显示结合反应达到饱和时，信号值相近，说明CKBP-II与MCP-1以单体形式结合。

两个研究都表明病毒CKBP-II与野生型趋化因子MCP-1的亲合力与MCP-1和其天然同源的GPCR之间的亲合力类似，这意味着即使低浓度的CKBP-II也可发挥拮抗作用。Biacore系统可以测定MCP-1和CKBP-II之间相互作用的分子比例，通过将CKBP-II固定在传感芯片表面，注入系列浓度的野生型二聚体MCP-1或突变型单体MCP-1（图3），两个传感图结果显示结合反应达到饱和时的数值接近，表明CKBP-II能够与单体形式的MCP-1结合（图3）。这些研究还发现CKBP-II与MCP-1上的结合表位同样可被CCR2B识别，这也从某种意义上说明病毒和宿主在分子水平上存在趋同进化。

已知趋化因子也可引起过度炎症，并指引免疫细胞进入创伤病灶，从而加重疾病病情。病毒CKBPs具有广泛的趋化因子特异性，因此在开发免疫细胞趋化作用拮抗剂的过程中可作为重点关注的候选对象。动物模型实验已经证实，在某些情况下，CKBPs给药确实能阻碍炎症细胞进入特定器官，同时不会对系统免疫反应造成影响。

References

2. Seet, B. T. et al.
Molecular determinants for CC-chemokine recognition by a poxvirus CC-chemokine inhibitor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 9008-9013 (2001).
3. Beck, C. G. et al.
The viral CC-chemokine binding protein vCCI inhibits monocyte chemoattractant protein-1 activity by masking its CCR2B binding site.
J. Biol. Chem. 276, 43270-43276 (2001).

鉴定“先导基因”

检测大规模筛出的蛋白相互作用的亲合力

AGT生物科学公司为澳大利亚一家生物技术公司，建立起一套先进技术即使用GE Healthcare的Biacore系统对糖尿病，肥胖和抑郁症领域的先导基因进行鉴定（4）。

AGT生物科学公司的Greg Collier教授小组利用差异PCR技术揭示了能自发形成类2型糖尿病疾病的肥胖大鼠肝脏中所存在的一种新基因的表达。序列分析证实这种基因编码一种膜嵌入蛋白Tanis。Tanis表达与甘油三酯循环，血糖和胰岛素水平之间存在正相关关系，这意味着tanis可能在2型糖尿病的发病过程中具有重要的作用。当培养基中添加葡萄糖后培养的肝细胞中的tanis表达下降，这一事实进一步支持了假说的成立。

Walder等人采用酵母双杂交的方法从人肝cDNA表达库中寻找与Tanis存在相互作用的蛋白。找到三个克隆，它们都编码血清淀粉样蛋白A（Serum amyloid A, SAA）的选择性转录剪接本，SAA是一种急性期炎症反应蛋白，主要在肝脏中表达。血液循环中高水平的SAA可作为2型糖尿病的预兆性指标，其与HDL胆固醇形成复合体一起释放入血液循环。作者揭示出2型糖尿病和炎症在功能上的关联。

为了能确认酵母双杂交数据，并找出人血浆中提取的天然SAA是否也能与Tanis结合，作者使用Biacore系统对天然和重组SAA与Tanis蛋白的结合模式进行测定。实验证实，无论血浆纯化得到的SAA还是重组获得的SAA均能与重组tanis结合。当重组Tanis蛋白的跨膜域和整个近N端氨基酸序列缺失时，这种结合仍然可见，这表明SAA的结合位点位于C端区域。

这些数据支持了一个观点，即Tanis对糖尿病的发展有重要的作用，可作为未来治疗的靶标。在人肝细胞上进行的研究表明Tanis的表达增加可以使细胞产生对胰岛素的抵抗作用，而这种对胰岛素的抵抗反应在糖尿病中常能见到。

Reference

4. Walder, K. et al.
Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation?
Diabetes 51, 1859-1866 (2002).

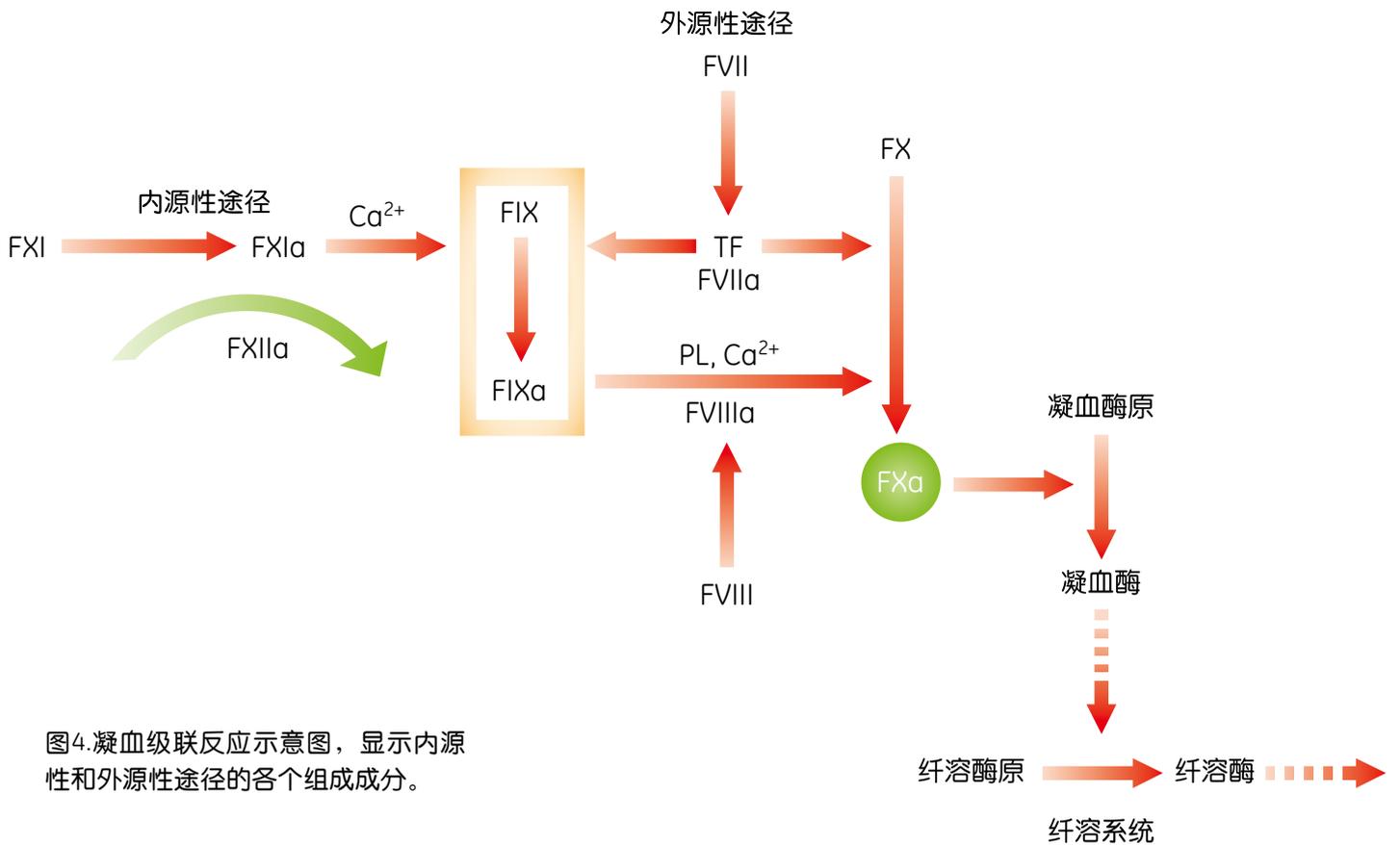
寄生虫病

理解昆虫媒介如何抑制宿主凝血系统以便寄生虫传播

Biacore分析表明，昆虫唾液蛋白通过与因子IX的 γ -羧基谷氨酸（Gla）结构域结合抑制外源性凝血途径。利用脂质单层传感芯片发现昆虫唾液蛋白通过抑制因子IX和因子XIa之间的相互作用或抑制因子IXa进入质膜来抑制内源性凝血途径。

吸血蝽是一种吸血昆虫，又叫猎蝽，是枯氏锥虫生活史的一种虫媒。美洲锥虫病是一种危害健康和生命的疾病，在美国南部和中部地区流行，而枯氏锥虫正是美洲锥虫病的病原体。一旦进入机体，枯氏锥虫便在心肌细胞中大量增殖，从而引起严重的心脏衰竭。Tus的Mie大学的Masao Yuda小组利用无标记蛋白相互作用分析对枯氏锥虫如何通过抑制机体凝血，延长昆虫注入时间从而有效传播寄生虫（5）。

Prolixin-S是一种从昆虫唾液腺分离的血红素结合蛋白，分子量20 kDa，已经证实这种蛋白具有抗凝作用，这一功能使得血红素基团不能发挥任何作用。那么，致病时Prolixin-S是如何发挥了它的抗凝血功能呢？Isawa等人对Prolixin-S与凝血级联系统中不同组分的结合进行了检测。因子IX是最感兴趣的部分，因为因子IX从酶原形式到活化形式（因子IXa）的转变是内源性（外源物表面诱导）和外源性凝血级联反应共同交叉的部分（图4）。



将因子IX和因子IXa固定在传感芯片表面，将不同浓度的重组Prolixin-S蛋白注入芯片表面。实验中得到的动力学和亲和力数据总结在表1中，结果显示Prolixin-S与酶原形式和活化形式的因子IX均有结合，且亲和力和动力学特征相近。从Biacore实验可以得到的一个重要结论是：如果用胰凝乳蛋白酶消化掉Prolixin-S的Gla结构域，Prolixin-S与因子IXa就不能结合，提示Gla结构域可能是Prolixin-S与因子IXa的结合位点。

表1.prolixin-s和因子IX/IXa之间相互作用的速率和亲和力常数测定

固定的结合成分	结合速率常数 k_a	解离速率常数 k_d	亲和力解离常数 K_D
因子IX	$5.0 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$6.5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$	13.0nM
因子IXa	$3.1 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$4.1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$	13.2nM

外源性凝血途径的传导需要因子IXa、因子VIIIa和 Ca^{2+} 的参与，三者膜表面形成复合体Xase，这是一种多组分酶，可激活因子X，最终导致凝血块的形成。欲评估Prolixin-S对因子IXa结合脂膜的相互作用的影响，可通过向脂单层传感芯片表面注入Prolixin-S和因子IXa混合物来完成，结果显示增加Prolixin-S的浓度可抑制因子IXa与脂单层的结合。

Reference

- Isawa, H. et al. The insect salivary protein, prolixin-S, inhibits factor IXa generation and Xase complex formation in the blood coagulation pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 6636-6641 (2000).

了解寡糖的调控表达如何帮助寄生虫逃避宿主免疫系统

- 依照与寄生虫抗原的亲合力水平高低对抗体进行评级，从而筛选出有前景的诊断试剂
- 检测寄生虫感染人类过程中，人体免疫球蛋白亚型的转换
——将不同亚型抗体的产生与病人状态进行关联，以诊断感染阶段

血吸虫病流行于南美，撒哈拉沙漠以南非洲以及远东的大部分区域。该疾病由寄生虫引起，在世界范围感染人群约2亿。在寄生虫生活史中，人和一种特殊的新鲜水蜗牛分别在不同阶段承担宿主的角色。Leiden大学医学中心和Vrije Universiteit的Alexandra van Remoortere以及同事对日本血吸虫不同成熟阶段岩藻糖化寡糖的表达进行研究，以便了解寄生虫是如何逃避两种机体的免疫系统的。

当血吸虫感染发生之初，体液免疫反应急剧上升以抵制肠道相关的抗原，这种抗原表达含岩藻糖的三糖重复单位，Lewisx (Lex) can Remoortere等人采用ELISA的方法，通过对单克隆抗体库进行初步筛选，以检测日本血吸虫不同成熟阶段岩藻糖化寡糖的表达和特异性。然后通过无标记蛋白相互作用分析对结合抗体进行亲和力评级并筛选出最具潜力的诊断试剂（6）。

Leiden大学医学中心的Andre Deelder小组已经对血吸虫病流行的两个国家，肯尼亚和菲律宾感染人群血清中免疫反应的不同类型抗体进行研究（7）。将合成糖蛋白偶联到芯片表面，注入从病人身上采集的血清，再依次注入两种亚型特异性抗体，从而测定出免疫反应中抗体的亚型（图5）。

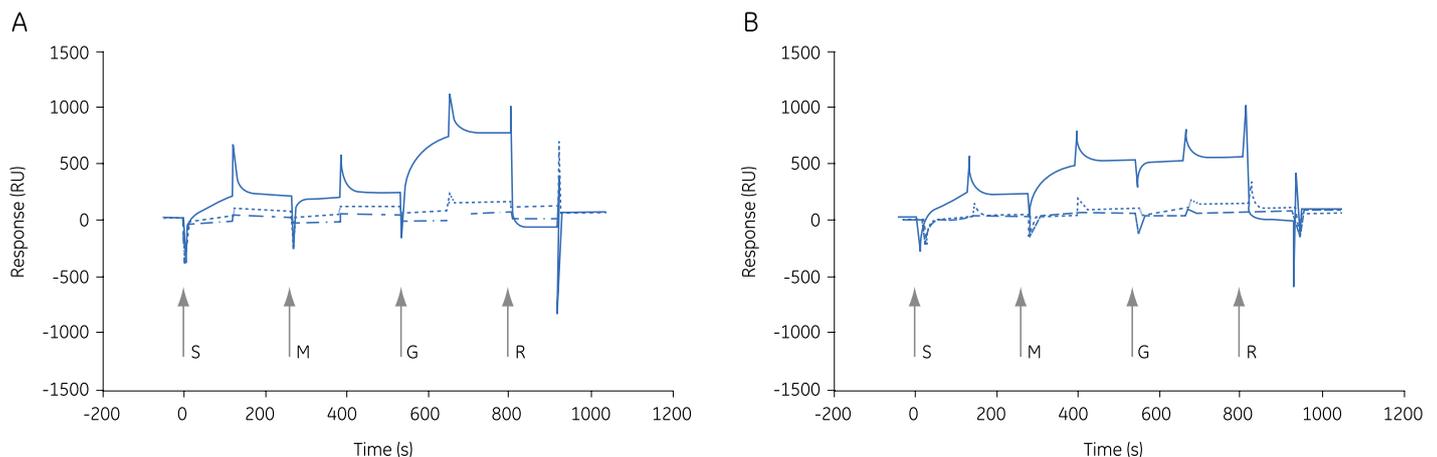


图5.相互作用分析表明感染日本血吸虫(A)、曼氏迭宫绦虫(B)的病人体内的血清抗体与GalNAc β 1-4GlcNAc (LDN), Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc (Lex)或岩藻糖化LDN之间存在相互作用。血清的初始注射时间(S)，anti-human IgM(M)、anti-human IgG(G)、100 mM HCl(R)再生，均以箭头标出(图片经van Remoortere等人授权修改，Infect. Immun. 69, 2396–2401(2001))。两种相互作用的方式有明显的不同，其中曼氏迭宫绦虫感染时IgG反应占主要地位，而日本血吸虫感染时IgM反应则更重要。这表明Biacore可用来区分相似的寄生虫所造成的不同感染。

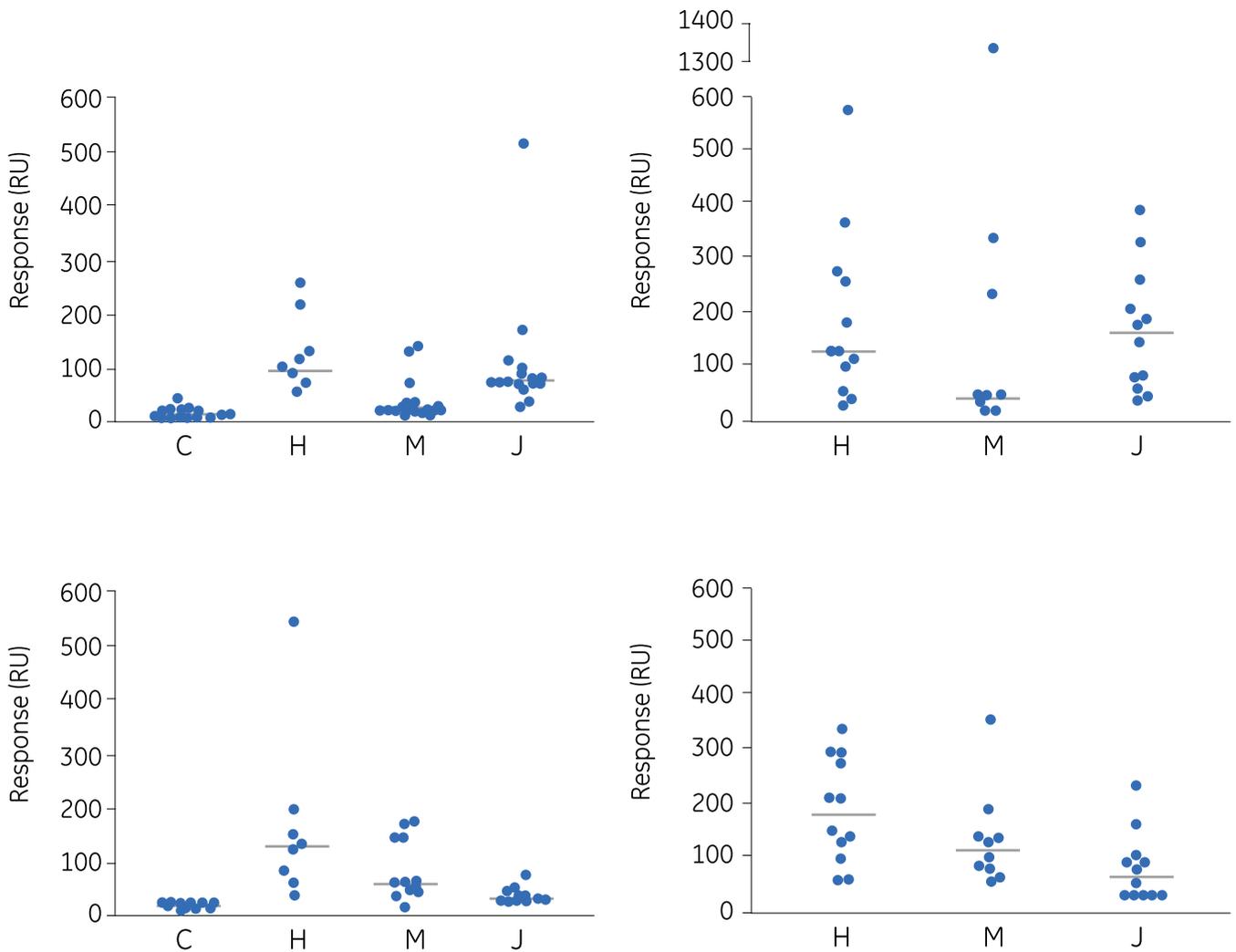


图6.感染曼氏迭宫绦虫 (M)，日本血吸虫 (J) 或埃及血吸虫 (H) 病人以及未感染个体 (C) 中与岩藻糖化LDN结合的IgG和IgM水平 (图片经vanRemoortere等人授权修改, *Infect. Immun.* 69, 2396–2401 (2001)).

不论感染哪种血吸虫，病人血清内有一种抗体量都会很高，这种抗体被特异性表位激起，即GalNAc β 1-4(Fuc α 1-2Fuc α 1-3)GlcNAc (LDN-DF)---寄生虫特有的岩藻糖化结构。为了能区分LDN-DF激起的不同抗体反应模式，需要结合抗体亚型、病人年龄和血吸虫物种数据进行分类，分类后反应类型一目了然，这说明Biacore对于诊断血吸虫感染疾病非常有用 (图6)。

References

6. van Remoortere, A. et al.
Various stages of schistosoma express Lewisx, LacdiNAc, GalNAc β 1-4 (Fuc α 1-3)GlcNAc and GalNAc β 1-4(Fuc α 1-2Fuc α 1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. *Glycobiology* 10, 601-609 (2000).
7. van Remoortere, A. et al.
Profiles of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against defined carbohydrate epitopes in sera of schistosoma-infected individuals determined by surface plasmon resonance. *Infect. Immun.* 69, 2396–2401 (2001).

风湿病学

相互作用动力学分析解释为什么风湿病症状通常在温度较低时更为严重

- 理解温度是如何影响蛋白之间的相互作用以及对风湿性关节炎症状的影响

风湿因子(Rheumatoid Factor, RF)是一种自身免疫抗体，作用于风湿性关节炎病人机体的IgG。风湿性关节炎症状通常在寒冷气候下频繁加剧。风湿因子形成的免疫复合物在病人关节的滑膜液中广泛存在，并通常伴随风湿性滑膜慢性组织损伤。神奈川东海大学的Naoya Kojima小组采用无标记蛋白相互作用分析方法，对不同温度下风湿因子相关的相互作用动力学进行研究(8)，研究结果解释了为什么风湿性关节炎症状往往在低温时变得异常严重。

Matsumoto等人从风湿性关节炎病人的混合血清中提取了不同类型的风湿因子。在进行Biacore检测时，将IgG固定在传感芯片表面，然后将不同类型的RF在不同温度条件下注入芯片表面，随后注入抗亚型(anti-isotope)的抗体来检测RF类型。动力学分析表明，IgG-RF(IgG类RF)与RF-其他Ig亚型结合方式非常不同。比如，当温度从6°C上升至30°C时，RF与IgG的相互作用受到明显的影响，其结合速率常数在6°C时为 $10.7 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，而到30°C时几乎没有结合。而RF(风湿因子)与其他Ig亚型的结合速率在这个温度波动范围内仅出现轻微的改变。IgG-RF的解离比IgM-RF或IgA-RF更快，但当温度高于25°C时解离迅速变慢。作者认为，IgG-RF免疫复合物一旦在低温时形成就会变得非常稳定且解离缓慢，并且在滑膜液中存留相当长的一段时间，并可能导致滑膜损伤(图7和表2)。

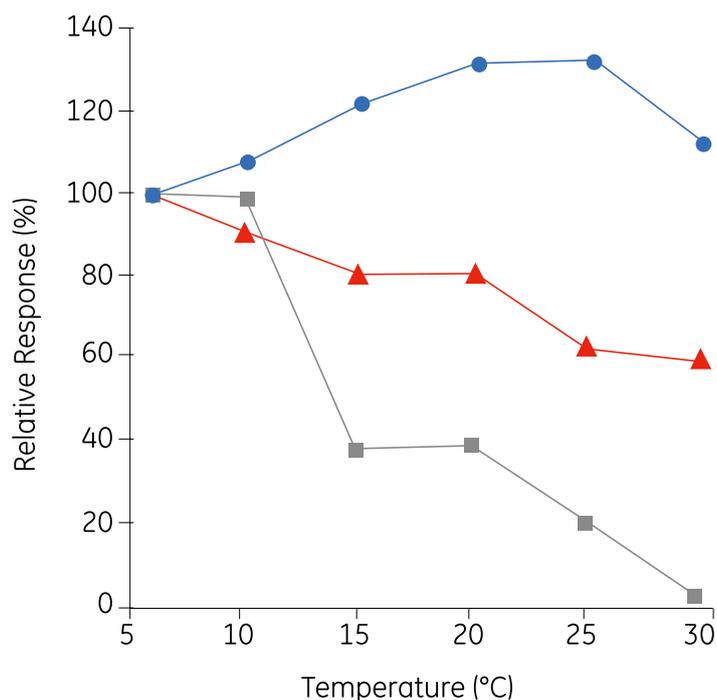


图7. 由纯化的风湿因子(每个温度下的RF-IgG (■), RF-IgM (●) or RF-IgA (▲)与固定IgG之间发生相互作用时所产生的饱和响应值与温度之间的关系(图片经Matsumoto等人授权修改, J. Biochem. 128, 1009-1016 (2000)。

Reference

8. Matsumoto, A. et al. Kinetic analysis of interaction of different types of rheumatoid factors with immobilized IgG using surface plasmon resonance. J. Biochem. (Tokyo) 128, 1009-1016 (2000).

表2. 不同温度下RFs与IgG的动力学参数。NC：无法计算

温度 (°C)	IgG-RF		IgM-RF		IgA-RF	
	Ro ($\times 10^4 M^{-1} s^{-1}$)	Ro ($\times 10^{-4} s^{-1}$)	Ro ($\times 10^4 M^{-1} s^{-1}$)	Ro ($10^{-4} s^{-1}$)	Ro ($\times 10^4 M^{-1} s^{-1}$)	Ro ($\times 10^{-4} s^{-1}$)
6	10.70	23.3	51.5	1.59	26.3	6.58
10	8.08	21.2	57.7	1.59	23.5	7.79
15	2.36	21.1	67.3	2.01	19.5	8.44
20	1.88	23.8	73.7	2.37	21.1	9.49
25	0.95	0.95	77.0	3.41	14.6	8.73
30	NC	NC	63.1	4.95	12.9	10.50

了解自身免疫疾病中自身抗体特异性的来源

- 检测由不连续抗原联合所形成的新的表位引起的自身免疫反应

Ro是一种RNA相关A的核糖核蛋白，在患有系统性红斑狼疮（Systemic lupus erythematosus, SLE）病人的血清中Ro是自身抗体的众多靶标中的一个。从血清中亲和纯化得到针对Ro蛋白的抗体，这种抗体可与分子量为52 kDa和60 kDa的两种Ro蛋白的转录剪接体结合。抗体与60 kDa Ro结合可受到52 kDa或60 kDa任一形式的抑制，表明两种Ro蛋白有共同的表位都能与抗体结合。

俄克拉荷马医学研究机构和俄克拉荷马大学医学科学中心的Hal Scofield小组筛选出anti-52 kDa Ro的抗体，这种抗体在ELISA实验中可与一系列60 kDa Ro重叠肽段发生反应(9,10)。首先，合成四种已经被鉴定过的表位，并将之固定在传感芯片表面，然后从病人血清中纯化抗体，用抗体识别每个表位，并测定亲和力最高的相互作用。

SLE病人的血清可与60 kDa Ro上的11个表位发生结合，而纯化得到的anti-52 kDa Ro仅能结合一个表位。为了证实是否60 kDa Ro上的一个表位因为与另一52 kDa Ro结合而形成新的结合位点，作者对52 kDa Ro中197到207之间的氨基酸与60 kDa Ro中已经鉴定好的肽段之间的相互作用进行筛选。利用抗52 kDa Ro抗体进行鉴定发现这段肽段序列可与60 kDa Ro中四个肽段中三个发生相互作用。作者认为两种Ro形式结合后产生了一种构象表位。这也可以揭示为什么SLE病人体内抗52 kDa Ro抗体总是与抗60 kDa Ro抗体一起被发现。

References

9. Scofield, R. H. et al. Protein-protein interaction of the Ro-ribonucleoprotein particle using multiple antigenic peptides. *Mol. Immunol.* 36, 1093-1106 (1999).
10. Kurien, B. T. et al. Autoantibody to the leucine zipper region of 52 kDa Ro/SSA binds native 60 kDa Ro/SSA: Identification of a tertiary epitope with components from 60 kDa Ro/SSA and 52 kDa Ro/SSA. *Scand. J. Immunol.* 53,268-276 (2001).

利用无标记相互作用分析建立自身免疫性疾病中自身抗体产生的模型

- 鉴定和描述自身免疫性疾病中抗原/抗体/抗独特型 (anti-idiotypic) 网络
- 通过抗体特异性研究数据, 帮助了解自身抗体在疾病病理发生中的作用

虽然在SLE病人体内已经发现有抗DNA抗体的抗独特型抗体, 然而这些抗独特型抗体的意义尚未可知。通过模拟抗DNA抗体的骨架区和CDR区构建“独特型肽”, 并用它免疫小鼠发现其可诱导小鼠出现类SLE症状。伦敦国王大学的合作小组-Elvira Eivazova, Brian Sutton, Jim McDonnell和Norman Staines等人猜想抗DNA抗体可能受到DNA和抗独特型抗体的双重诱导 (11,12), 而后者使得抗DNA抗体的产生形成一个反馈回路 (图8)。

在自发产生SLE的小鼠模型身上发现一个非常有趣的现象即两种自身抗体群体之间存在协调的现象; 其中一个为双链DNA的抗体, 而另一个则为独特型表位抗体, 其中独特型表位暴露出这些抗体的CDR和骨架区结构。为了弄清楚DNA, 抗DNA和抗独特型网络在SLE模型的相互关系, Eivazova等人从双链 (ds) DNA单克隆抗体中合成“独特肽”。这些肽免疫小鼠不仅产生抗独特肽抗体 (见表3), 而且还有抗dsDNA的抗体。

值得一提的是虽然这些由不同独特肽诱导产生的抗体可与源抗体结合, 然而它们对初始免疫源同样具有高度特异性。抗独特肽抗体与dsDNA的之间的交叉反应实验进一步证实了这一观点。交叉反应实验是通过无标记蛋白相互作用分析完成的, 实验中将亲和纯化得到的抗独特肽抗体与dsDNA先进行孵育, 随后注入预先固定有独特肽的传感芯片表面。结果表明抗体与其“自然”靶标的结合受到DNA分子的剂量依赖抑制 (图9)。

人SLE的两个小鼠模型随着年龄增大都产生出抗DNA抗体。通过将合成的双链或单链寡核苷酸固定在传感芯片表面对自身抗原的特异性进行鉴定。从滑膜浆中纯化单克隆抗体 (其中一个来自原发性SLE株, 获得anti-ssDNA和anti-dsDNA的单克隆抗体; 另一个仅产生anti-ssDNA抗体), 并通过蛋白G进行纯化。至于优先产生何种核苷酸的抗体需视dsDNA或ssDNA环境而定。其中一个鉴定得到的抗体专一识别ssDNA, 而另一抗体则较polyG或polyC而言与polyGC之间具有更快的结合和更缓慢的解离 (表4)。这些结果揭示了自身抗体在SLE病理中可能扮演的角色: anti-dsDNA抗体与疾病发展密切相关, 而anti-ssDNA抗体则产生凋亡, 并随着DNA从细胞释放, 使DNA产生降解 (链分离)。

References

11. Eivazova, E. R. et al. Cross-reactivity of antiidiotypic antibodies with DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 43, 429-439 (2000).
12. Eivazova, E. R. et al. Specificity and binding kinetics of murine lupus anti-DNA monoclonal antibodies implicate different stimuli for their production. *Immunology* 101, 371-377 (2000).

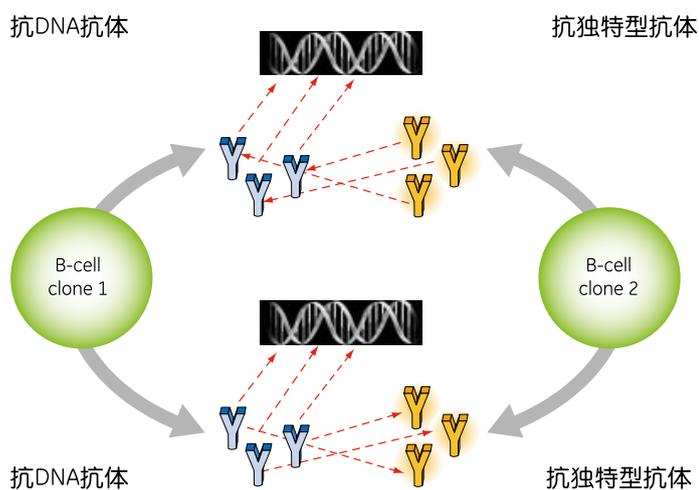


图8.持续刺激B细胞株产生自身抗DNA抗体的可能反馈机制。

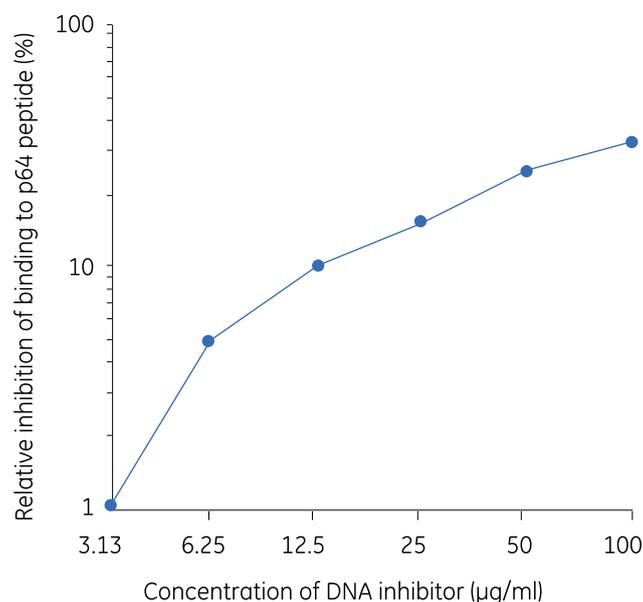


图9.dsDNA抑制抗p64抗体与固定肽之间的结合。亲和纯化得到的抗p64抗体与图中所示浓度的dsDNA共孵育5个小时。随后将混合物注入固定好的p64。结果显示为与不加DNA相比，抗体结合下降的百分数。dsDNA本身并不与固定p64结合（图片经Eivazova等人授权修改, Arthritis Rheumatism 43, 429-439(2000)）。经John Wiley & Sons公司下属Wiley-Liss公司授权进行再版。

表3.亲和纯化抗体与抗DNA抗体衍生独特型（独特肽）或与源抗DNA抗体结合的动力学和亲和力数据总结。

固定结合分子	溶液中的结合分子	结合速率常数 (k_o)	解离速率常 (k_d)	亲和力解离常数 (K_D)
Idiotope p64	a.p.anti-p64	$1.1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$1.5 \times 10^{-4} s^{-1}$	13.6nM
Anti-DNA	a.p.anti-p64	$5.9 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$8.4 \times 10^{-4} s^{-1}$	142nM
Anti-DNA	Serum anti-92	$3.1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$1.3 \times 10^{-4} s^{-1}$	420nM

表4.亲和纯化抗体v-88（SLE易感小鼠自发产生的抗体）与DNA之间结合的动力学和亲和力数据总结。

固定结合 (DNA)	结合速率常数 (k_o)	解离速率常数 (k_d)	亲和力解离常数 (K_D)
GC25	$2.9 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$5.3 \times 10^{-4} s^{-1}$	18nM
C25	$1.1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$1.3 \times 10^{-4} s^{-1}$	118 nM
G25	$1.1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$1.2 \times 10^{-4} s^{-1}$	109 nM

无标记相互作用分析在基础临床研究中的应用： 揭秘背后的故事

发现与环境毒素摄取有关的受体

- 采用无标记相互作用分析区分在细胞依赖研究中具有相似功能的受体所扮演的角色

Cubilin和megalin具有广谱配体的特异性，并且一直以来被认为是清道夫受体。它们近来被鉴定确认为Clara细胞分泌蛋白（Clara Cell Secretory Protein, CCSP）的受体。CCSP因为能与多氯联苯代谢物（Polychlorinated biphenyl metabolites, PCBs）结合，因此其病理意义受到广泛关注。多氯联苯是工业上使用的化学制剂，虽然已被禁用多年，但至今仍可在人体组织中检测到。因此，Cubilin和megalin有可能在摄入CCSP结合的PCBs方面起作用。

柏林分子医学Max-Delbrueck中心的Thomas Willnow和同事所组成的小组利用无标记相互作用分析技术发现cubilin与CCSP之间存在高亲和力结合，而一旦将cubilin与受体拮抗剂RAP（13）进行预先孵育，这种结合则受到阻滞（13）。然而，CCSP并不能与megalin结合，尽管功能研究数据显示抗megalin抗体也能阻断CCSP的内化。结合功能研究和Biacore检测的数据可以推测一个双受体系统模型，其中CCSP与cubilin结合，而其摄取则受到megalin的调节。作者猜想PCBs的组织摄取和毒性可能部分因为PCBs能将生理配体从CCSP上取代下来，从而进入表达有内源性CCSP受体的cubilin和megalin的细胞体内。

Reference

13. Burmeister, R. et al. A two-receptor pathway for catabolism of Clara Cell Secretory Protein in the kidney. *J. Biol. Chem.* 276, 13295-13301 (2001).

治疗方案和临床实验

优化融合药物的性能

- 选择融合伴侣，构建候选药物共轭物：根据临床效果优化载体相互作用的模式

药物治疗效果会受到机体清除功能的影响。对抗肾脏快速清除的一种有效办法是将药物与大分子如白蛋白进行偶联。虽然共轭连接使药物存留在血液循环中的时间得到延长，但是值得重视的另外一点是，一旦药物与血浆蛋白结合，势必可能会阻碍其与靶标分子的相互作用。因此，延长清除时间和将药物从被占据的载体上以合理的速度解离两者之间存在平衡。

南三藩市Genentech的Mark Dennis和同事利用无标记蛋白相互作用分析，根据肽链与白蛋白亲和力的大小对肽链进行评级（14）。具有高亲和力的肽链与Fab蛋白融合形成复合体，该复合体能与白蛋白结合而不会影响Fab的抗原结合特性。Dennis等人的研究表明Biacore系统在肿瘤靶标和影像制剂的开发中可用来筛选融合伴侣，使其能充分吸收入肿瘤组织中，从而使曝光时间更加充分。

Reference

14. Dennis, M. S. et al. Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 35035-35043 (2002).

检测临床实验中治疗抗体的免疫源性

- 来自临床实验过程中使用Biacore系统的经验

- 抗体响应模式可预测不良反应的发生频率
- 检测方法需足够的稳健，从而能应付未经处理的人血清样本
- 与ELISA不同，当病人对两种治疗试剂产生的免疫应答都是免疫球蛋白，且来源于同一物种时，该检测方法不会受到限制，还能正常开展

作为治疗药物，小鼠抗体由于会激起机体免疫应答而受到限制。纽约Ludwig肿瘤研究中心的研究人员构建出一个人源化的鼠单克隆抗体药物，该药物将CDR区域嫁接进入IgG骨架，能识别人结肠上皮和结肠癌中特异表达的一种标记物。这种嵌合抗体在患有结肠癌的病人身上进行I期和II期临床检测，其免疫源性通过无标记蛋白相互作用分析进行监控（15）。

将人源化抗体（huAb A33）固定在传感芯片表面，并在制备好的芯片表面注入病人的血清。反应人群被大体划分为两大类。I型反应人群的特点是在2周时间内血清中出现有抗huAb A33的抗体，尽管病人持续接受huAb A33治疗，但抗huAb A33抗体的滴度开始不断下降。而另一边，II型反应人群的免疫应答反应较缓慢，但随着治疗的继续，抗体滴度持续增加。在后一组中，生理性不良反应比I型更加频繁，因此，最终停止了使用huAb A33对这些病人进行治疗。

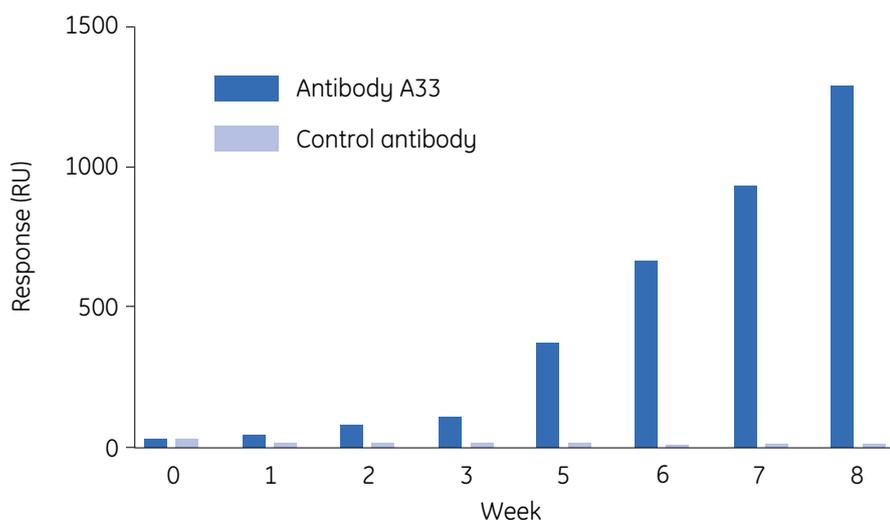


图10.II型病人体内抗人源化抗体的应答水平与单个病人所发生的临床免疫化学参数改变和不良反应之间的关联（图片经Ritter等人授权修改, Cancer Research 61, 6851-6859 (2001)）

尿酸 (mg/dl)	66			6.5	8.9			22.6
乳酸脱氢酶 (U/ml)	290							3210
癌胚抗原 (ng/ml)	21.7			13.1				42
肌酐 (mg/dl)	1.4			1.3	16			2
发热					+	+	+	+
寒战					+	+	+	+
恶心					+	+	+	+
呕吐					+	+	+	+
关节痛								+

此外，病人抗体响应的亚类也可通过Biacore夹心检测进行鉴定。简言：所有病人样品当预先将蛋白G加入稀释血清后（去除IgG）其抗huAb A33反应几近消失，而有一些病人采用正辛酸处理（沉淀所有的非IgG蛋白）则没有太大的影响。极少的病人在用蛋白G处理血清后仍有残留的活性存在，这些信号可通过向传感芯片表面注入抗IgM抗体检测到。

具有II型反应的病人数周内都没有出现不良生理症状，直到几周后，用Biacore检测到抗huAb A33抗体水平持续增加。因此研究人员可以采用无标记蛋白相互作用分析对可能出现的不良反应进行预测（图10）。

Reference

15. Ritter, G. et al. Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res.* 61, 6851-6859 (2001).

相关阅读- Immunology

Adams E, et al. 2008. An autonomous CDR3d is sufficient for recognition of the nonclassical MHC class I molecules T10 and T22 by gd T cells. *Nat. Immunol.* 9:777-784.

Arthos J, et al. 2008. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4\beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat. Immunol.* 9: 301-309.

Deban L, et al. 2008. Binding of the long pentraxin PTX3 to Factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. *J. Immunol.* 181:8433-8440.

Eshel D, et al. 2008. Characterization of natural human antagonistic soluble CD40 isoforms produced through alternative splicing. *Mol. Immunol.* 46: 250-257.

Fredslund F, et al. 2008. Structure of and influence of a tick complement inhibitor on human complement component 5. *Nat. Immunol.* 9: 753-760.

Hepburn NJ, et al. 2008. Prevention of experimental autoimmune myasthenia gravis by rat Crry-Ig: a model agent for long-term complement inhibition in vivo. *Mol. Immunol.* 45: 395-405.

Lindwasser OW, et al. 2008. A diacidic motif in human immunodeficiency virus type 1 Nef is a novel determinant of binding to AP-2. *J. Virol.* 82: 1166-1174.

Schmidt CQ, et al. 2008. A new map of glycosaminoglycan and C3b binding sites on Factor H. *J. Immunol.* 181: 2610-2619.

Batova I, et al., 2008. Human recombinant Fab fragments with sub-nanomolar affinities for acetylated histones. *J. Immunol. Methods* 329: 1-10.

Denkberg G, et al. 2008. Phage display-derived recombinant antibodies with TCR-like specificity against α -galactosylceramide and its analogues in complex with human CD1d molecules. *Eur. J. Immunol.* 38: 829-840.

Lacy SE, et al. 2008. The potency of erythropoietin-mimic antibodies correlates inversely with affinity. *J. Immunol.* 181: 1282-1287.

Steidl S, et al. 2008. In vitro affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification. *Mol. Immunol.* 46: 135-144.

神经生物学

无标记互作分析在神经生物学中的应用

Biacore在神经生物学研究中已经获得了广泛应用。本章回顾了一些利用Biacore系统进行神经生物学研究的发表文献。在临床实验室中，研究者使用Biacore寻找复杂生物基质中与神经疾病相关的标记物，而基础研究机构则利用Biacore深入剖析神经病变背后隐藏的分子机制。

阿尔茨海默病

寻找 β -淀粉样蛋白毒性的抑制剂

鉴定阿尔茨海默病中能与 β -淀粉样蛋白结合并抑制其神经毒性的多肽；

规避了基于溶液的检测方法中常见的靶标聚集的问题：通过将靶标固定在传感器芯片表面，用户可对其密度和取向进行有效的控制；

通过实时观察传感芯片上的聚合过程，Biacore可帮助用户理解为什么 $A\beta$ 只能在中枢神经系统组织中形成聚合物

鉴定用于筛选神经存活因子（neuronal survival factors）类似物的靶标

鉴定参与蛋白相互作用的辅助因子

鉴定神经毒性蛋白的多肽类抑制物

阿尔茨海默病人大脑神经毒性损伤中常见 β -淀粉样蛋白（ $A\beta$ ）的聚集。威斯康辛大学麦迪逊分校的Laura Kisessling和同事（1）为了找出能与 $A\beta$ 紧密结合并且能抑制其神经退行性毒性的多肽，采用Biacore系统开展了相关研究工作。他们合成了一系列针对 $A\beta$ 中自身识别结构域的短肽，并通过无标记蛋白相互作用分析对这些相互作用的亲和力进行了筛选。

基于溶液的分析方法在筛选 $A\beta$ 抑制剂时会消耗大量的靶标蛋白，而且由于 $A\beta$ 在溶液中易自发聚集，所以靶标蛋白会存在多种形态。这些问题可以通过Biacore技术解决，因为在使用Biacore分析时，研究者是将靶标以一定的密度和取向固定于传感器芯片表面，从而可以对靶标分子的状态实现有效地控制。将 $A\beta$ 中一段含26个氨基酸残基的片段（C-端为半胱氨酸残基）以较低的密度固定在传感芯片表面，形成均一的反应表面。由于该表面可以再生，所以同一张传感芯片表面可以反复使用多次，这样带来的好处就是实验间的差异非常小。已知 $A\beta$ 的中心疏水结构域主要负责 $A\beta$ 的自身结合，研究者针对该结构域设计了含5个氨基酸残基的多肽，并对序列进行重新组合从而生成一系列的多肽。让这些不同的多肽流经制备好的芯片表面，同时记录其响应信号。

实验证实了一种结合模式：即多肽与 $A\beta$ 的亲和力主要受到其带正电的赖氨酸残基所在位置的影响。如果三个这种残基与其他碱性序列之间由三个带负电的残基分隔开， $A\beta$ 的亲和力将下降14倍；而同样长度的肽段如果存在有三个相邻的赖氨酸残基，则亲和力几乎不发生改变。

通过这些肽段和A β 与神经母细胞瘤细胞共同孵育，再进行微孔板实验来检测这些多肽对A β 细胞毒性的抑制作用。细胞活性检测表明能够与A β 结合的多肽可以有效地抑制A β 的细胞毒性，并且随着亲和力的下降，多肽的这种细胞保护作用逐渐减弱（表1）。这些多肽在研究淀粉样斑块形成机制以及设计治疗阿尔茨海默病药物时有希望成为有用的探针分子。

表1.A β 蛋白中心疏水域多肽与全蛋白之间的亲和力

多肽序列 ¹	K ₀ (mM)	活率 (%) ²
KLVFFRRRRRR	40	>90
KLVFFKKKKKK	40	80-90
KLVWWKKKKKK	40	80-90
KLVFFKKKK	37	70-80
KLVFFKKKKKK	65	70-80
KLVFFKK	80	70-80
KLVFFKKKEEE	90	60-70 ³
KKKKLVFF	180	60-70 ³
KLVFFEKEKEK	300	60-70 ³
KKKKKK	400	60-70 ³
KLVFFEEEKKK	1300	60-70 ³

- 1 K=赖氨酸 L=亮氨酸 V=缬氨酸 F=苯丙氨酸 R=精氨酸 W=色氨酸 E=谷氨酸
- 2 通过MTT活性检测方法，在微孔板上检测人神经母细胞瘤细胞的细胞活率，其中细胞在使用或不使用多肽处理的情况下与抗体接触
- 3 阴性对照处理后活性水平相似

白蛋白：A β 聚合过程的天然抑制物？

虽然A β 在几乎所有的有核细胞中都有表达，但尚不清楚的是为什么这种蛋白只在中枢神经系统造成组织损伤？血浆中最常见到的蛋白成分在脑脊液（CSF）中同样存在，但浓度极低。一项研究采用Biacore系统进行筛选，以找到血浆和脑脊液中共有的，能与A β 结合的蛋白，从而抑制A β 沉积的发生（2）。

将A β 蛋白作为模板固定在芯片表面，额外的A β 与血浆和CSF中的待测蛋白一起流过芯片表面，以检测这些待测蛋白是否具备抑制A β 聚合的能力。研究结果显示最有效抑制聚合作用的成分为白蛋白， α 1-抗胰蛋白酶，IgA和IgG，而这几种蛋白成分在CSF中的含量都极低。作者还指出血浆中的白蛋白，在其生理正常浓度的情况下，可以结合并抑制聚合的A β 发生沉积。

凋亡抑制剂

布里斯托尔大学Dave Dawbarn小组的研究成果有助于加快细胞存活因子 (cell survival factor) 类似物的发现 (3)。TrkB (Tyrosine kinase receptor) 是一些神经因子的酪氨酸激酶受体, 已有报道称阿尔茨海默病中TrkB发生选择性丢失。TrkB的其中一个结合配体: 脑源神经存活因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是一种常见的神经生存因子。Naylor等人采用无标记蛋白相互作用分析技术来确定TrkB蛋白上与神经存活因子结合的胞外位点。特别一提的是, 作者对TrkB上类Ig结构域的作用也进行了研究。重组的类Ig结构域片段被固定在传感芯片表面。一系列浓度的BDNF通过自动上样流经制备好的芯片表面以计算两者之间的亲和力。作者发现TrkB通过其上的类Ig家族结构域与BDNF发生紧密结合, 因此, 该结构域可被用来筛选治疗神经退行性疾病的类似物。

除了A β , 淀粉样沉积中还发现血清淀粉样P成分 (Serum amyloid P component, SAP), 这种成分可以在钙离子存在的情况下形成聚集物。Vorun等人的研究展示了如何利用Biacore系统来确定SAP与钙腔蛋白发生结合的必需溶液环境 (钙腔蛋白可辅助维持SAP的结构完整性, 图1到图3) (4)。

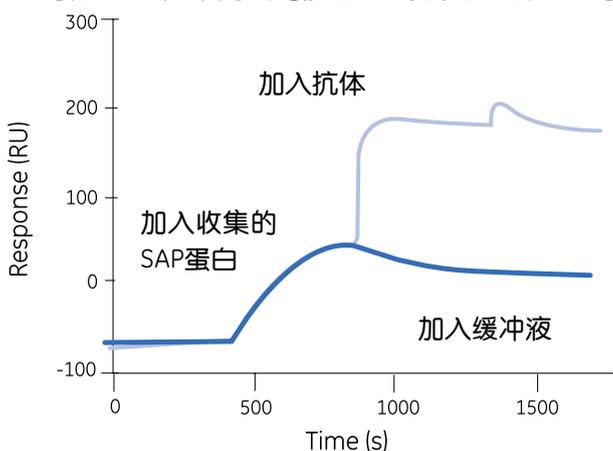


图1.通过加入抗SAP抗体对SAP蛋白与偶联的钙腔蛋白之间的相互作用进行鉴定。

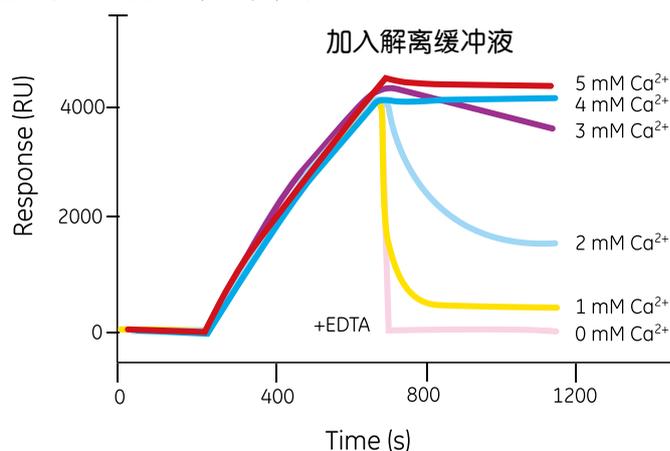


图3.随着解离缓冲液中钙离子浓度的下降, 钙腔蛋白-SAP复合体的解离速率不断增高。可见在复合体形成后, 钙离子对于维持复合体的存在十分必要。

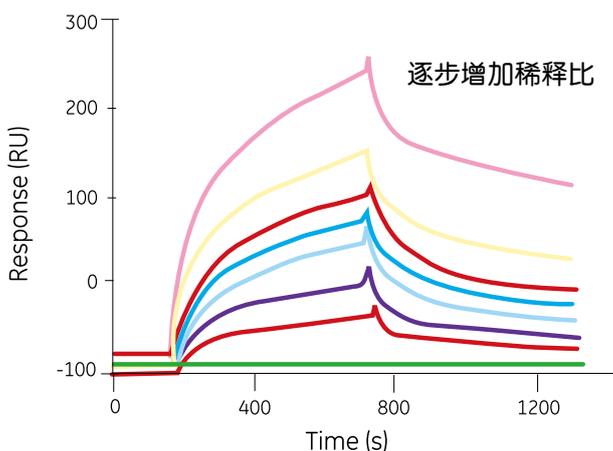


图2.SAP蛋白与偶联的钙腔蛋白结合。

钙腔蛋白被偶联在传感芯片表面，再让SAP流经此芯片表面。分析结果显示二元复合体的形成和稳定性维持都需要钙离子的存在。考虑到SAP和钙腔蛋白易形成不溶性的二元复合体，钙腔蛋白有可能参与了淀粉样变性的形成。该病变过程同时伴随有前文所述A β 在阿尔茨海默病人中枢神经系统的沉积。

References

1. Cairo, C. W. et al.
Affinity-based inhibition of beta-amyloid toxicity.
Biochemistry 41, 8620-8629 (2002).
2. Bohrmann, B. et al.
Endogenous proteins controlling amyloid beta-peptide polymerization. Possible implications for beta-amyloid formation in the central nervous system and in peripheral tissues.
J. Biol. Chem. 274, 15990-15995 (1999).
3. Naylor, R. L. et al.
A discrete domain of the human TrkB receptor defines the binding sites for BDNF and NT-4.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 291, 501-507 (2002).
4. Vorum, H. et al.
Calumenin interacts with serum amyloid P component.
FEBS Lett. 465, 129-134 (2000).

探究A β 纤块沉积诱发神经毒性的病理

- 实时跟踪传感芯片表面上多肽的聚合过程
- 揭示神经元质膜上的脂类分子在引起A β 毒性聚集物积累过程中的重要作用。

1999年，Myszka等人发表了他们基于Biacore技术的芯片分析结果，数据显示A β 多肽聚集物依靠一种“锁锚” (lock and dock) 机制进一步形成毒性纤块 (5)。自此，福井医科大学的长谷川等人使用Biacore系统对A β 聚集过程进行了动力学和热动力学分析 (6)。他们通过设计实验来模拟阿尔茨海默病人大脑内毒性斑块沉积前或沉积发生时A β 纤块的聚合过程。

长谷川等人通过让溶液中游离的A β 自发地聚集制备了A β 纤块。然后对预先形成的纤块进行超声处理，并加入单体A β 。放置24小时后，将制备好的样品固定于传感芯片表面。被固定的纤块像“种子”一样得以不断延长，同时纤块的延长过程被实时监控。

上样过程Biacore信号呈线性增加，证明A β 单体与不断生长的多聚物发生结合。结合速率随配体密度和待测物浓度呈线性递增，这与延长反应的一级动力学模型相一致，表明A β 单体不断结合到多聚物的末端上。然而，解离过程则呈现两步特征，首先是快速解离过程，随后为缓慢线性解离。作者认为这种快速和缓慢两步解离可能分别反映了纤块延长过程中“锚定”和“锁定”两个过程的逆向反应（见 (5) 中锚与锁延长动力学假说）。线性缓慢解离过程的动力学常数也符合一级动力学模型，说明在缓慢解离过程中“锁定”的A β 由纤块末端连续解离。

虽然已经知道聚集形式的A β 具有神经毒性，但是这些聚集物如何造成神经变性效应仍未知。最近威斯康星大学麦迪逊分校的Kremer和Murphy（2003）建立了一种基于Biacore的检测方法揭示了这些聚集物和脂质成分是如何调控A β 与神经元细胞膜之间的相互作用（7）。实验将特别制备的脂质体固定在专用的传感芯片表面。这些芯片被设计用以捕获脂膜囊泡，使得这些囊泡维持与细胞膜一致的脂质双层结构。

与兼性磷脂（POPC）脂质体相比，A β 更易与阴离子型（POPG）脂质体结合。经过一段相似的解离时间，大约50%的A β 由POPC脂质体上解离出来，而未解离的部分成为潜在聚合反应模板。尽管在清洗阶段只有微量的A β 聚集体解离下来，但成熟（聚集形式）的A β 和脂质体之间的结合则更加缓慢并且很难达到平衡。这些结果也得到其他实验的验证，例如，通过磁珠偶联的脂质体将同位素碘-125标记的单体或成熟A β 蛋白从溶液中提取出来。

与此类似的研究中，墨尔本大学的David Small小组利用Biacore系统分析膜上结合的胆固醇是如何调节A β 与神经元之间的相互作用（8）。为了实现这一目标，他们在传感芯片上固定了合成的脂质双层（SUV）或由血管平滑肌细胞（SMC）制备得到的膜富集组分，然后将A β 流经芯片表面。通过改变流动缓冲液中的NaCl浓度，分析了离子强度对A β 与SUV或SMC制备物之间相互作用的影响。

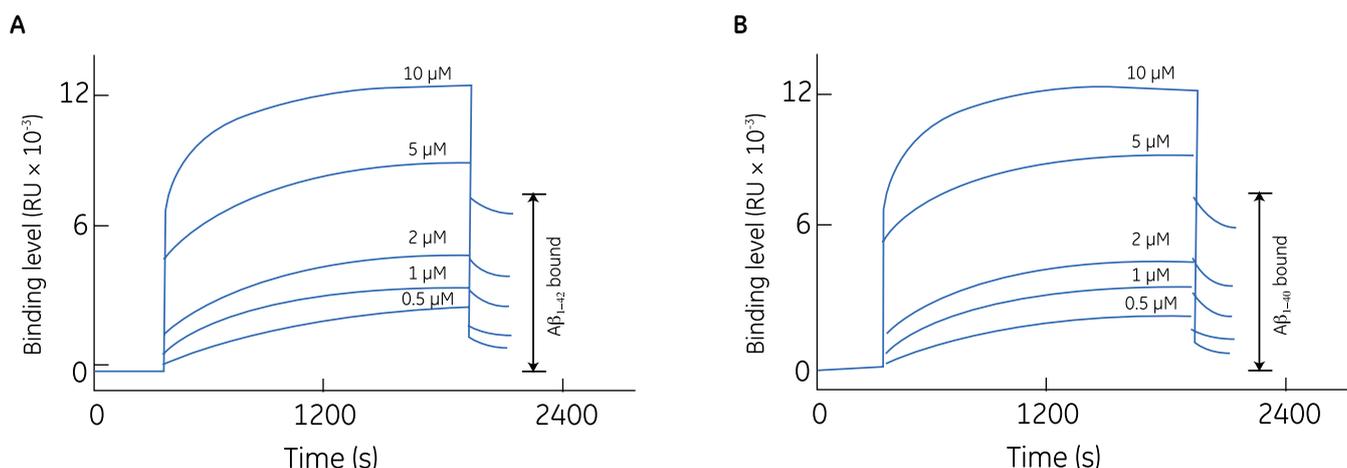


图4.非成熟A β_{1-42} (A) 和A β_{1-40} 与含胆固醇和磷脂的SUV之间的相互作用传感图。该相互作用结果同时演示了如何计算结合的多肽的量（多肽开始解离后20s的结合水平（RU值）与多肽上样前的RU值之间的差异）图片经Subasinghe等人授权修改, J. Neurochem. 84, 471-479 (2003).

由60%胆固醇和40%混合磷脂构成的脂质体与高浓度多肽 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 之间的结合为可逆反应，并且其传感图基线在解离发生后仍有显著地上升（图4）。为了理解这种相互作用的物理本质，研究人员将 $A\beta$ 在低离子强度缓冲液条件下（为保持 $A\beta$ 为聚集状态）与被固定的脂质体进行结合，通过逐次提高解离缓冲液中NaCl浓度来研究解离过程。当提高NaCl浓度时，解离速度显著增加（图5），这表明 $A\beta$ 脂膜结合主要是通过静电作用，而非疏水力，同时也暗示了带的负电荷的膜脂质头部的重要性。Subasinghe等人提出的这一假设得到了另外一项实验数据有力支持：Subasinghe等人测试了琥珀酰化 $A\beta$ （带正电的氨基酸残基被中和）的结合情况，发现其结合能力被大大的削弱（图6）。此外，细胞学实验也显示琥珀酰化 $A\beta$ 具有更低的细胞毒性。

图5. NaCl对合成脂膜上 $A\beta_{1-40}$ （实点）和 $A\beta_{1-42}$ （方块）解离的影响。 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 溶解在不含NaCl的磷酸缓冲液中，随后立即流经胆固醇：磷脂的表面。在多肽加入20分钟后，注入含不同浓度NaCl的磷酸盐缓冲液。实验统计了在注射结束时由膜上释放出的多肽百分比。图片经Subasinghe等人授权修改, J. Neurochem. 84, 471-479 (2003)。

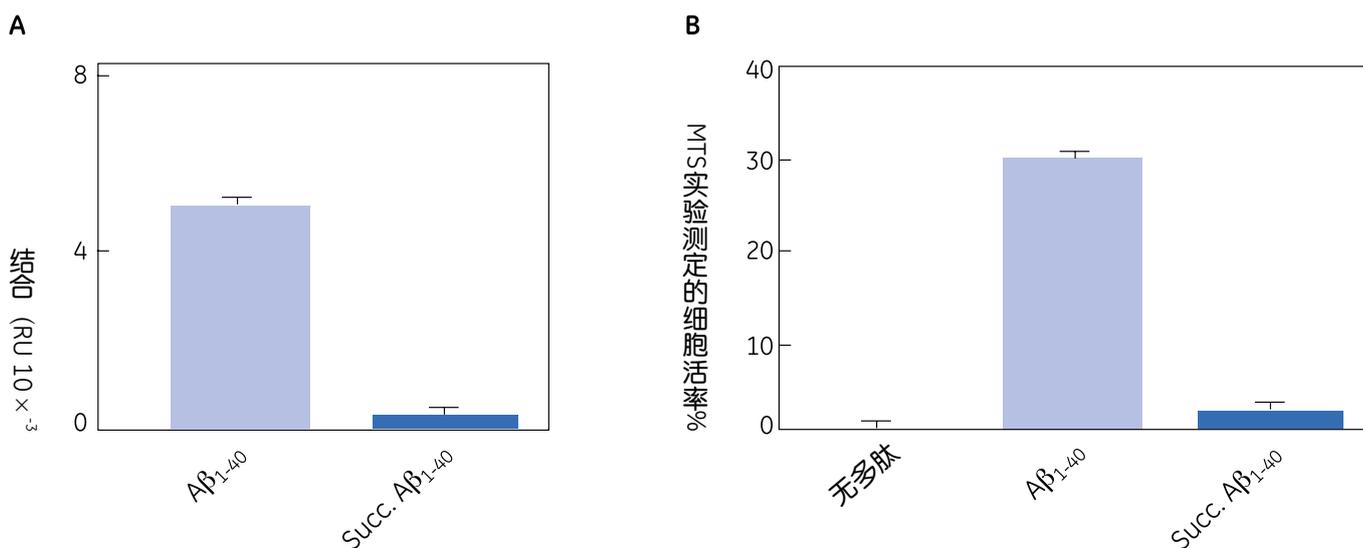
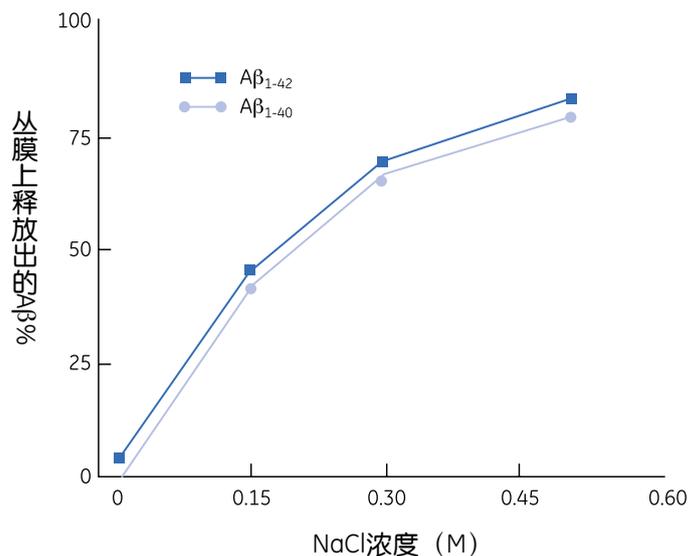


图6. $A\beta_{1-40}$ 和琥珀酰化 $A\beta_{1-40}$ 与含胆固醇和磷脂的SUV之间的结合 (A) 情况，以及 $A\beta_{1-40}$ 和琥珀酰化 $A\beta_{1-40}$ 对血管SMC细胞存活率的影响 (B)。图片经Subasinghe等人授权修改, J. Neurochem. 84, 471-479 (2003)。

Aβ与被固定的SMC细胞的膜富集组分也发生结合。然而，如果在细胞收集和膜制备前加入洛伐他丁（胆固醇合成抑制剂），Aβ与膜富集组分的结合水平相比未处理组下降10%。进一步细胞实验表明，洛伐他丁处理过细胞对于Aβ的毒性具有更强的抵抗力。

在这整个工作中，Subasinghe等人结合细胞学实验和无标记相互作用分析技术，证明了Aβ与膜的相互作用对其细胞毒性的重要性，并揭示出这一相互作用主要来源于静电力。这些信息为阻止神经毒性损伤的形成和遏制阿尔茨海默病发展提供了崭新的思路。

References

5. Myszka, D. G. et al.
Analysis of fibril elongation using surface plasmon resonance biosensors
Methods Enzymol. 309, 386–402 (1999).
6. Hasegawa, K. et al.
Kinetic modeling and determination of reaction constants of Alzheimer's β-amyloid fibril extension and dissociation using surface plasmon resonance.
Biochemistry 41, 13489–13498 (2002).
7. Kremer, J. J. and Murphy, R. M.
Kinetics of adsorption of β-amyloid peptide Aβ (1–40) to lipid bilayers.
J. Biochem. Biophys. Methods. 57, 159–169 (2003).
8. Subasinghe, S. et al.
Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Aβ peptides on vascular smooth muscle cells and for Aβ binding to vascular smooth muscle cell membranes.
J. Neurochem. 84, 471–479 (2003).

脊髓性肌萎缩

探索运动神经元死亡的分子机制

- 在顺序结合实验中采用无标记相互作用分析来替代免疫沉淀
- 传感芯片表面重建顺序结合可帮助了解蛋白功能背后的分子机制

Biacore检测：替代免疫沉淀的快捷方法

脊髓性肌肉萎缩（SMA）是儿童脊髓神经元疾病中最常见的一类。该疾病与SMN1（Survival Motor Neuron 1，运动神经元生存蛋白1）基因的突变关系密切。

亚利桑那州立大学的Philip Young和同事的研究结果表明该疾病的临床症状可能与突变的SMN蛋白无法形成二聚体而导致运动神经元死亡增加有关，因而使得肿瘤抑制蛋白p53的促凋亡功能受到限制和阻断（9）。

“这比传统技术更为直接，而且明显更快”

亚利桑那州立大学 Christian Lorson博士

顺序结合实验显示了无标记蛋白相互作用分析是如何成功地取代免疫沉淀技术，且在全细胞提取物的分子相互作用分析中可以更具优势（图7）。简言之，首先将抗p53的抗体固定在传感芯片表面，随后，将来自转染SMN基因的细胞的全细胞提取物流经芯片表面，最后注入抗SMN抗体。不含p53的细胞提取物被作为空白对照，用来评估相互作用的特异性。

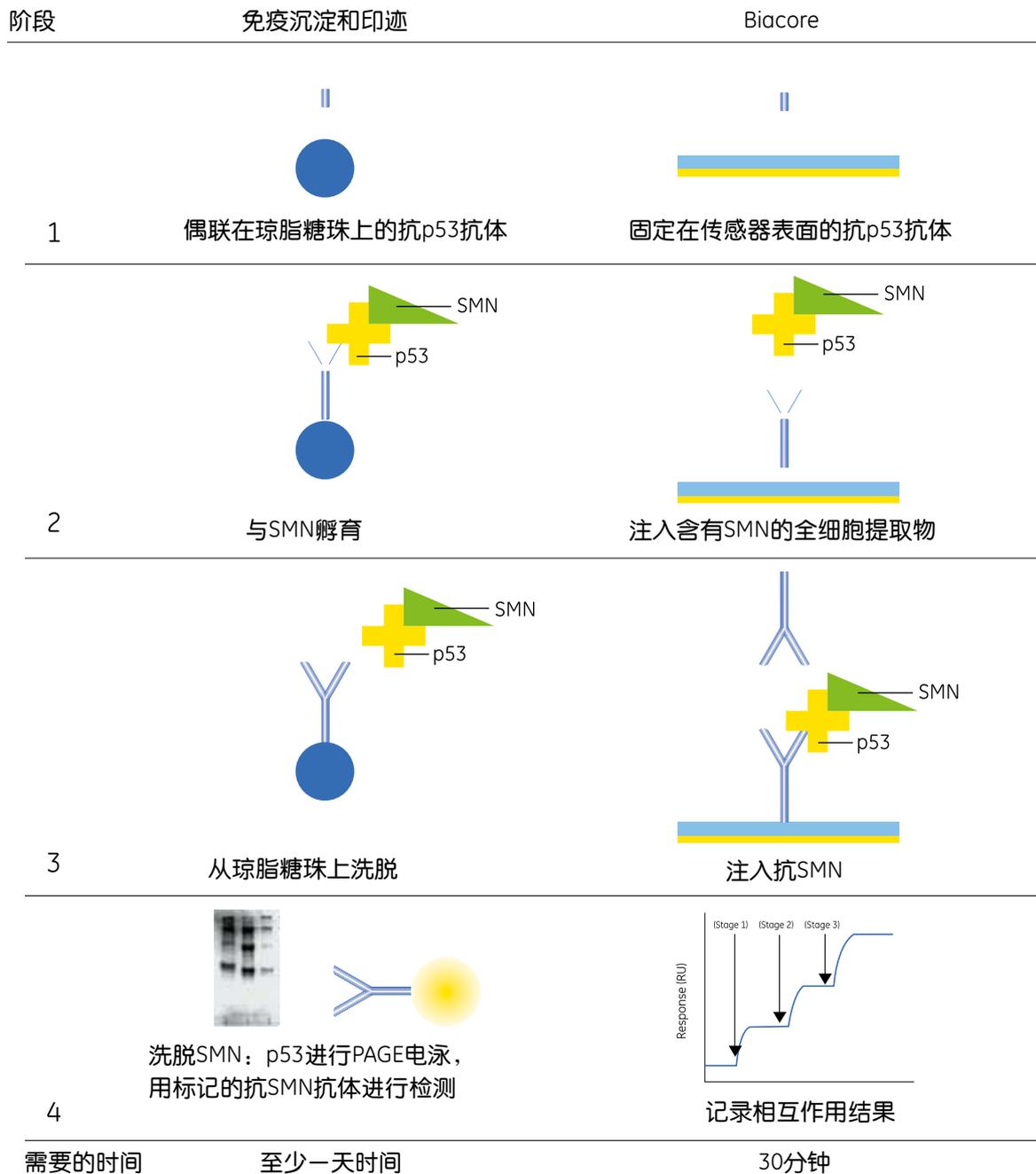


图7. 免疫沉淀/印迹和基于Biacore系统分析方法在检测分子复合体时的比较。两种方法均显示全细胞提取物中的SMN蛋白与细胞中的p53成分之间存在相互作用。获得免疫沉淀结果需要一天，而Biacore分析只需要几十分钟。

疾病所致突变的分子水平效应

研究人员分析了由病人身上获得的几种SMN突变蛋白与p53的结合情况。在严重的I型SMA病人身上共发现两种SMN蛋白突变，而在一个症状相对较轻的II型SMA病人身上找到一种突变。将这些突变蛋白固定在传感芯片上，并与p53进行结合反应。SMN蛋白结合的减弱程度与临床亚型密切关联。SMN蛋白与p53蛋白结合能力的减弱可能与SMN突变蛋白无法实现自身结合有关。Young等人运用Biacore顺序分析的方法证实了正是这种自身结合能力的丧失使得SMN蛋白无法限制和阻断p53发挥凋亡功能。在这些实验中，p53无法与固定的单体SMN发生结合，只有同一传感芯片表面上固定了额外的SMN二聚体后这种结合才显现出来。（表2和图8）。

图8.非自身结合形式的SMN无法限制p53。Biacore检测表明p53与单体形式的SMN仅存在微弱结合（A），而这种单体这种构象的SMN蛋白在不同严重程度的SMA病人身上都占有主导地位（见表2）。当二聚化的SMN被固定在传感器表面时（B），其与p53的结合明显增加。

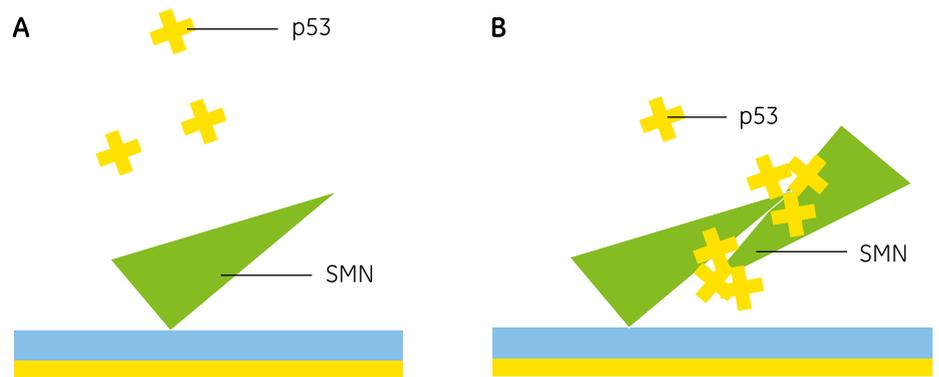


表2.利用Biacore分析SMN蛋白的自身结合能力

SMN蛋白形态	与野生型SMN的结合（%野生型）
野生型	100%
截短型的SMN ¹	33%
两种I型突变 ²	20%和31%
II型突变 ³	57%

- 截短型的SMN是SMA病人中SMN2等位基因的主要产物
- I型突变来自严重SMA病人
- II型突变来自轻度SMA病人

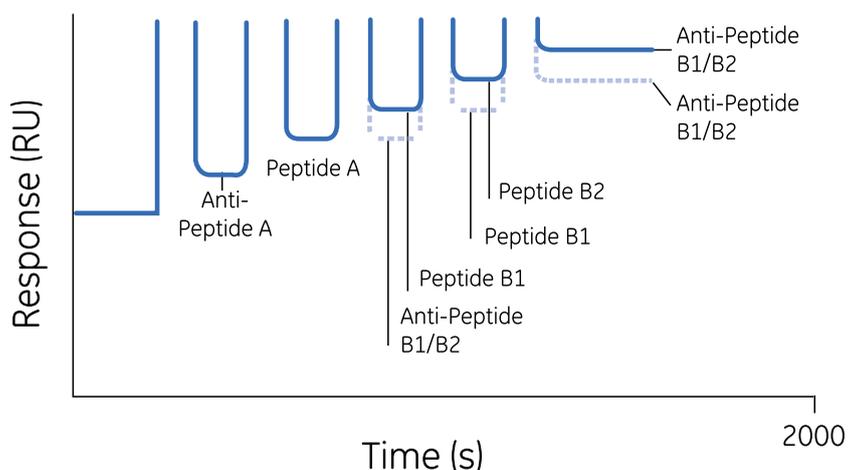
以上发现得到间接共聚焦免疫荧光显微镜实验结果的支持，该结果表明SMN和p53共定位于正常成纤维细胞的卡侯氏体（Cajal body，小核糖核蛋白颗粒所在位置，与RNA剪切相关）中，而在SMA病人的细胞中则没有发现。在病人成纤维细胞中，SMN水平严重下降；并且激活的p53也可以在核内发现，说明SMN在p53定位于卡侯氏体的过程中扮演了非常重要的角色。

筛选作为分子探针的抗体

为揭示SMN错义突变是如何造成蛋白功能的缺失并引发疾病，研究人员采用无标记蛋白相互作用分析技术研究SMN野生蛋白片段之间是如何发生相互作用的（10）。针对全长SMN蛋白共生产出22种单克隆抗体，通过Biacore系统对这些抗体分别与SMN基因中每个外显子所编码的蛋白片段进行免疫反应测试。将抗体固定在传感芯片表面，然后让蛋白片段分别流过以进行筛选。能特异识别蛋白中某个片段的抗体被筛选出来，并被用来研究肽链内的相互作用，而这些肽链内相互作用有可能决定着完整蛋白是否能够实现一些具有重要功能意义构象。通过将多肽片段固定，并对其他外显子编码的多肽进行筛选，作者得以鉴定SMN蛋白上能够发生自身相互作用的片段。

图9为这一实验的传感图，其中包含大量的决定蛋白功能的分子互作的相关信息。特异识别外显子A片段的单克隆抗体被单独地固定在传感芯片表面，通过顺序注入不同的多肽可以看到同一实验中在片段A被捕获后B1和B2也能依次结合上去。这些结果不仅显示了A是B1和B2组装的平台，而且揭示了由B1和B2结合所形成的新表位导致了功能性蛋白的产生。

图9.相互作用传感图显示Biacore实验是通过使用特异的单克隆抗体和重组蛋白片段，提供了一种研究蛋白结构组装顺序的强有力的手段。



References

9. Young, P. J. et al.
A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy.
J. Biol. Chem. 277, 2852–2859 (2002).
10. Young, P. J. et al.
The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding.
Hum. Mol. Genet. 9, 2869–2877 (2000).

开发治疗神经母细胞瘤的人源化抗体

抗体鉴定研究中控制抗原的取向

- 通过在传感芯片表面将抗原以一定密度和取向进行控制，对抗体进行可靠地表征
- 快速发现由于分子结构上微小的改造产生的不可预期的结合性质改变

神经节苷脂是一类富含于神经元的跨膜糖脂。神经节苷脂的表达与包括人神经外胚层瘤和阿尔茨海默病在内的某些神经病变有关联。研究人员基于Biacore系统开发了一套简捷的检测抗神经节苷脂抗体的方法（11）。该技术的一个前提是神经节苷脂分子必须采取一致、正确地取向，以便对抗体进行表征。为了达到这一目的，将神经节苷脂通过脂质尾部进行固定。作者提供一套简单快捷的操作方案，可以制备出稳定的传感芯片表面，且容易进行再生和重复使用。

I期临床实验中，在患神经母细胞瘤的儿童患者中测试了人源化的抗神经节苷脂单克隆抗体。结果发现，机体针对抗体中鼠源成分产生了明显的宿主免疫原性反应。因此，开发出全人源化的抗体迫在眉睫，这不但需要保留小鼠的抗体特异性决定域，而且侧翼可变区序列要完全使用人源的对应序列进行替代（12）。Nakamura等人根据Catimel等人提供的方法（11）对这些人源化抗体和固定的神经节苷脂GD2和GD3之间的相互作用进行鉴定。无标记相互作用分析结果表明，人源化改造工程出乎意料地改变了抗体的结合和解离速率，同时还提供了人源化抗体功能改变所蕴含的分子机制相关信息。

References

11. Catimel, B. et al.
Direct immobilization of gangliosides onto gold-carboxymethyl dextran sensor surfaces by hydrophobic interaction: applications to antibody characterization.
Glycobiology 8, 927-938 (1998).
12. Nakamura, K. et al.
Construction of humanized anti-ganglioside monoclonal antibodies with potent immune effector functions.
Cancer Immunol. Immunother. 50, 275-284 (2001).

神经递质释放

利用无标记相互作用分析获得的相互作用数据解释细胞学实验中的功能发现

- 利用Biacore技术研究神经元上涉及突触囊泡与细胞膜融合过程的蛋白相互作用

从Biacore系统上所获得的简捷的亲和力数据能够有效地解释细胞学实验中重要发现。Quetglas等人运用Biacore系统测得的定量的亲和力数据有力地支持了他所深信的关于神经递质释放调节方面的假说（13）。

研究人员利用Biacore系统揭示了驱使神经元突触囊泡和细胞膜融合从而释放神经递质的分子机制。囊泡相关膜蛋白（VAMP-2或小突触泡蛋白）锚定在囊泡膜上，能够与细胞膜上两种蛋白SNAP-25和syntaxin-1相结合。当 Ca^{2+} 存在时，两种膜相互拉近从而促使脂质界面发生相互融合。钙调蛋白是一种细胞质内的钙离子感应蛋白，以往研究表明钙调蛋白参与其他哺乳动物或酵母中的一部分膜融合过程。特别指出的是，来自INSERM Unit 464研究机构的Stephaine Quetglas和同事与来自马赛市地中海大学的IFR Jean Roche研究机构的Raymond Miquelis（UMIM）一起合作，发现钙调蛋白结合于VAMP-2蛋白C-端的靠近囊泡膜锚定位点的序列。他们采用细胞学实验和Biacore实验对这一进程中的若干步骤逐一进行了分子水平的分析。他们在蛋白：蛋白相互作用和蛋白：脂质相互作用方面的研究工作展示了无标记分子相互作用分析技术广阔的应用空间。

钙调蛋白与VAMP相互作用时 Ca^{2+} 的作用

在逐次提高 Ca^{2+} 浓度的情况下，让钙调蛋白流经固定了VAMP蛋白的传感芯片表面，从而确定 Ca^{2+} 是否为钙调蛋白与VAMP相互结合所必需的。结果发现，仅当 Ca^{2+} 浓度超过0.3 μ M时有明显的结合产生。根据其他与钙调蛋白结合的蛋白的共同序列设计出一系列突变体，利用Biacore检验这些突变体是否具有抑制钙调蛋白结合的能力。与野生型蛋白相比，这些突变体在去除共同序列中的正电荷或改变疏水特性后，其与钙调蛋白的亲和力都发生了严重减弱（分别下降了10倍和300倍）。在进一步的Biacore实验中发现，VAMP衍生的蛋白能与固定在传感芯片表面上的脂质体发生结合；而其突变体，尤其是疏水性受到削弱的突变体与脂质的结合非常微弱。最后，在竞争性实验中，将VAMP与琼脂糖珠相偶联，在 Ca^{2+} 存在时提高钙调蛋白的浓度可去除VAMP上结合的带标记的脂质体。总而言之，无标记蛋白相互作用分析的结果表明，脂质和钙调蛋白共享VAMP蛋白上的同一个结合基序（binding motif）。

囊泡融合和胞吐过程

在两个细胞学实验中对不同突变体的生理功能进行研究。首先，用100 mM的KCl快速处理神经内分泌细胞，并测定其释放的神经递质-儿茶酚胺的量。当结合野生型钙调蛋白的多肽存在时，儿茶酚胺的释放减少了80%，这表明VAMP多肽可以限制内源钙调蛋白并阻断胞吐过程。与之相比，突变的VAMP多肽（与钙调蛋白不发生结合）对胞吐的影响十分微弱。

此外，破伤风毒素可以在VAMP蛋白上的钙调蛋白结合位点的N端附近将VAMP蛋白“剪断”。向PC12细胞中加入破伤风毒素，能够抑制囊泡融合以及随后的胞吐过程。当细胞转染表达不受毒素切割、依然能够与钙调蛋白结合的VAMP突变体时，膜融合和胞吐过程得到恢复。然而，引入的其他突变（比如在Biacore实验中表现出能抑制钙调蛋白和脂质结合的突变体）则会阻断Ca²⁺依赖型的胞吐过程。

Reference

13. Quetglas, S. et al.
Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis.
EMBO J. 21, 3970–3979 (2002).

受体-配体相互作用与信号传导

利用从无标记蛋白相互作用分析得到的动力学数据解读神经网络调控

- 利用动力学信息研究神经元处理庞大信息荷载的机制
- 通过改变流动缓冲液中的pH值，模拟体内酸性环境或大脑酸中毒环境

尽管信号传导路径中的信号分子载体在所有类型细胞中都高度保守，并且都通过类似的机制如酪氨酸磷酸化和去磷酸化来运行，但哺乳动物神经系统中神经元内部和神经元之间的信号传导所处理的信息量已经上升至几乎难以想象的水平，与此同时，还必须保证高精度的调控。下面的报道揭示了如何利用通过无标记蛋白相互作用分析所获得的精准动力学数据，来帮助科学家从根本上认识复杂的神经网络调节的分子机制。

Shh和megalin之间相互作用的动力学分析

多效性信号分子“音猬因子”（sonic hedgehog, Shh）参与包括腹侧神经细胞发育以及腹侧神经管形成在内的一些神经发育过程。Shh发挥作用需要结合一个内嵌在神经细胞细胞膜内的称为Ptc的受体。Ptc受体原本与另外一个信号传导辅助受体Smo紧密结合，使Smo处于休眠状态。当Ptc受体与Shh结合后，Ptc-Smo复合体发生解离，使得Smo解离为单体并进入活化状态。

Megalin是一种低密度脂蛋白（LDL）受体家族的成员之一，在神经发育过程中具有重要的作用。Megalin缺陷会造成诸如神经表皮细胞凋亡的表型，这与小鼠中Shh或Smo缺陷相似。查尔斯顿南卡罗莱纳医科大学的Scott Argraves和同事发现megalin蛋白在神经发育过程中与Shh蛋白或已知的Shh受体共表达，这提示Shh和megalin之间可能存在功能上的联系（14）。

Argraves小组采用Biacore系统对具有生物活性的Shh的N端片段和megalin蛋白之间的相互作用进行了动力学分析。先将megalin固定在传感芯片表面，然后让一系列浓度的Shh分子流经固定有megalin的芯片表面。通过改变解离缓冲液中的酸碱度来研究pH对复合体解离速率的影响。研究发现，酸性pH值对于解离速率的影响甚微，说明复合物在内涵体（endosome）的酸性环境下依然可以维持相对稳定。因此，Shh-megalin复合物有可能在内涵体介导的细胞摄入作用（transcytosis）中发挥远程信号传递的作用。依赖Shh介导的信号传导和megalin蛋白的表达可能正是神经发育中，比如神经管腹侧区域细胞分化成熟为腹侧神经的细胞分化过程的机制。

浦肯野细胞(Purkinje Cell)功能

构造独特的浦肯野细胞是哺乳动物神经系统中组织最为复杂的神经元细胞，而谷氨酸受体 $\delta 2$ (GluR $\delta 2$) 仅在浦肯野细胞的树突中表达。尽管这类细胞接受了来自脊髓和其他部位数量庞大的数据，这些细胞却有将这些数据转化为可解读的信息，并成为大脑皮层唯一的信号输出通路。GluR $\delta 2$ 只在这些细胞上表达暗示了该受体可能在这个“艰巨的”信息处理工作中发挥着重要作用。横滨市立大学医学院的Susumu Kawamoto和它的研究团队发现了一种叫delphilin的胞内蛋白与GluR $\delta 2$ 共存于平行纤维（信号输入）-浦肯野细胞（信号输出）突触（15）。无标记蛋白相互作用分析发现，重组表达的delphilin的PDZ结构域与GluR $\delta 2$ 的C-端存在中等亲和力的结合。他们还发现，delphilin与一种肌动蛋白结合蛋白profilin存在结合，且两者之间的解离速率极慢。因此，Delphilin有看可能充当一种分子桥的角色，它通过profilin将GluR $\delta 2$ 与肌动蛋白细胞骨架连接在一起。同时，GluR $\delta 2$ 与delphilin之间快速的不断结合与解离赋予了浦肯野细胞惊人的、处理庞大数据输入的能力。

神经生长因子的生理功能

配体与受体结合位点附近微环境的“物理-化学”构成（“化学空间”）对这两者之间的相互作用影响巨大。例如，离子强度和pH值可以影响非共价键的结合。因此，通过改变缓冲液的组成成份，可以帮助研究者辨别出相互作用发生的本质。

无标记相互作用分析被用来探索局部pH值变化是否会改变 Zn^{2+} 离子和 Cu^{2+} 离子对神经生长因子（NGF）与其受体TrkA结合的调节能力（16）。为了达到这一目的，研究者在流动缓冲液中分别加入 Zn^{2+} 离子和 Cu^{2+} 离子，同时测试了从pH 5.5到pH 7.4范围内不同的pH值，来模拟大脑酸中毒（经常发生于休克或创伤损害时）下的局部微环境。选取的pH范围还跨越了组氨酸的pKa值，而组氨酸的位置和带电状态会影响阳离子型的结合。

作者将重组的受体TrkA固定在传感芯片表面，在跨越组氨酸pKa值的pH范围内对NGF和TrkA之间相互作用的亲和力进行了测量。结果表明，在酸性环境下， Zn^{2+} 离子，而非 Cu^{2+} 离子会丧失与NGF结合以及抑制NGF与TrkA相互结合的能力。这种变化所产生的生理效果取决于细胞类型和具体环境：如果表达TrkA的细胞处于酸性环境，并需要神经生长因子（NGF）维持生存时则会受益于 Zn^{2+} 离子的失效；反之，当NGF在启动细胞死亡通路时， Zn^{2+} 离子的失效会对细胞本身产生极其不利的影晌。

References

14. McCarthy, R. A. et al.
Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor.
J. Biol. Chem. 277, 25660–25667 (2002).
15. Miyagi, Y. et al.
Delphilin: a novel PDZ and formin homology domain-containing protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor delta 2 subunit.
J. Neurosci. 22, 803–814 (2002).
16. Ross, G. M. et al.
The binding of zinc and copper ions to nerve growth factor is differentially affected by pH: implications for cerebral acidosis.
J. Neurochem. 78, 515–523 (2001).

相关阅读 – Neurosciences

Chollangi S, et al. 2009. Preconditioning - induced protection from oxidative injury is mediated by leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) and its ligands in the retina. *Neurobiol. Dis.* 34: 535–544.

Koehnke J, et al., 2008. Crystal structures of b-neurexin 1 and b-neurexin 2 ectodomains and dynamics of splice insertion sequence 4. *Structure* 16: 410–421.

Gong Y, et al. 2008. Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex. *Nature* 454: 789–793.

Hsieh SH, et al. 2008. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* 27: 3746–3753.

Kulahin N, et al. 2008. Fibronectin type III (FN3) modules of the neuronal cell adhesion molecule L1 interact directly with the fibroblast growth factor (FGF) receptor. *Mol. Cell. Neurosci.* 37: 528–536.

Du H, et al., 2008. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer' s disease. *Nat. Med.* 14: 1097–1105.

Landgraf P, et al., 2008. The survival-promoting peptide Y-P30 enhances binding of pleiotrophin to syndecan-2 and -3 and supports its neuritogenic activity. *J. Biol. Chem.* 283: 25036–25045.

Sheng Z, et al., 2008. N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by an apolipoprotein E-derived peptide relies on low-density lipoprotein receptor-associated protein. *Neuropharmacology* 55: 204–214.

Narazaki M, et al., 2008. Sulfated polysaccharides identified as inducers of neuropilin-1 internalization and functional inhibition of VEGF165 and semaphorin3A. *Blood* 111: 4126–4136.

Venkataraman V, et al., 2008. Neurocalcin d modulation of ROS-GC1, a new model of Ca²⁺ Signaling. *Biochemistry* 47: 6590–6601.

Zeller J, et al., 2008. CGRP function-blocking antibodies inhibit neurogenic vasodilatation without affecting heart rate or arterial blood pressure in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 155: 1093–1103.

Carafoli F, et al., 2008. Structure of the tandem fibronectin type 3 domains of neural cell adhesion molecule. *J. Mol. Biol.* 377: 524–534.

Biacore产品全家福

Biacore 4000

(Biacore A100的全新升级)

无可比拟的生产力



- 小分子药物与生物技术药物的研发航母；
- 无需牺牲数据质量的高通量分析；
- 60小时无人值守作业，温控样品舱支持10块96/384孔板；
- 24小时内完成多达4800个相互作用；
- 1小时内估计多达6000个传感图；
- 基于稳定的Oracle数据库，为实验室信息管理系统（LIMS）提供接口；
- 为FBDD，表位作图和大规模抗体筛选表征提供扩展升级包；

Biacore T200

(Biacore T100的全新升级)

独一无二的性能



- 基础科研与新药研发中相互作用分析的高端平台；
- 卓越的信噪比为研究提供高质量的动力学与热力学信息；
- 对小分子有机化合物不再有分子量限制；
- 为抗体分析提供无亲合效应（avidity）的环境；
- 更宽的动力学参数范围允许研究更快的结合与更慢的解离；
- 无人值守的完成多达384个样品的分析；
- 内置创新软件模块和数据评价工具等让您快速获取最终结论；
- 为可靠的免疫原性分析整合专用的工具；
- 为后续质谱分析进行微量样品回收；

Biacore X100 & X100 plus

(全新升级)

智能人性的体验



- 每个功能研究实验室都应拥有的智能SPR仪；
- 小贴士助您快速开展无需标记的生物分子互作研究；
- 对Biacore芯片与试剂盒的无缝整合；
- 自信的开展涉及小分子有机化合物的互作研究；
- 创新的单循环动力学与传感图质控模块；
- 选配的扩展包为变温分析、在线脱气、有机溶剂校正和活性浓度分析等提供支持；

Biacore 3000

样品回收与质谱联用



- 迄今为止全球装机量和文献量最多的Biacore经典机型；
- 适合对分子互作分析质量和方法灵活性有较高要求的研究者；
- 基于向导的软件设计满足初学者和高级使用者的多层次要求；
- 分析物回收以及在位点靶与酶解为后续质谱分析提供支持；
- 自定义编程语言为研究者提供最高的操控性和灵活性；

Biacore 官方网站 (www.biacore.com)
(专业、丰富、及时、清晰)

1
一切从这里开始!
免费注册, 畅享
资源!



You are here: Biacore Life Sciences

Choose your destination > Language > Login

Interaction Analysis

- > Introduction
- > LMW Drug discovery
- > Biotherapeutics
- > Research

About Biacore Systems

- > Introduction
- > Product Range
- > Technology
- > History

Events & Press Room

- > Events
- > Webinar Recordings
- > Press Room

Support & Training

- > Application Support
- > Training
- > Product Support & Service

Web Services

- > On-line Purchasing
- > Contact & Ordering
- > Request Information

My Account

Website Destinations

- > High Content Analysis

2
互动分析
深入理解

5
最新活动
尽在掌握

Biacore

label-free interaction analysis –
from research through drug discovery
and development to QC

3
机型选择
自信清晰

- >> Events
- Apr. 6-7, 2011
BioProcess International European
Conference 2011
 - Apr. 6, 2011
Webinar - Residence time and
recognition time
 - Apr. 11-14, 2011
World Vaccine Congress 2011
 - May. 2-3, 2011
Etude des Interactions
Biomoléculaires par Résonance
Plasmonique de Surface (SPR):
Technologie Biacore
 - May. 3, 2011
Biacore Webinar: Studies of
membrane protein interactions

Biacore™ 4000

Throughput
without
compromise

>>> MORE INFORMATION

DiPIA SAVE THE DATE!
November 12-15, 2011
Boston, Massachusetts, USA

Now Available! Biacore™ T200

When quality
comes first...

>>> MORE INFORMATION

Changes to Biacore consumables
GE Healthcare will make changes for
some products in 2011 - Read more!

>>> MORE INFORMATION

4
文献查询
手册下载
技巧窍门
学习培训

>> Login

Get access to valuable additional
material, such as detailed
product information, support
tools and more.

- > Sign-up
- > Benefits of signing-up
- > Login

详细信息请与GE Healthcare China各办事处联系：

网址：www.gelifesciences.com.cn

邮箱：lifesciences@ge.com

咨询热线：800-810-9118 400-810-9118

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

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

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

北京

北京经济技术开发区永昌北路1号
电话：(010)5806 8888
传真：(010)6787 3597
邮编：100176

青岛

青岛市香港中路9号
香格里拉中心办公楼2202室
电话：(0532)85729111转64300
传真：(0532)85719153
邮编：266071

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

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
传真：(021)3877-7449
邮编：201203

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

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

广州

广州市天河区珠江新城花城大道87号
通用电气大厦10楼
电话：(8620)-38157777
传真：(8620)-38157797
邮编：510623

长春

吉林省长春市西安大路727号
中银大厦A座1605室
电话：(0431)8860 3166转67400
传真：(0431)8860 3167
邮编：130061

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 9060
邮编：300302

成都

成都市世纪城南路216号
天府软件园区D7号5层
电话：(028)62350500
传真：(028)85113284
邮编：610041

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

重庆

重庆市渝中区青年路38号
国贸中心28楼2809室
电话：(8623)6310 7006-72750
传真：(8623)6374 9398
邮编：400010

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

昆明

昆明市三市街6号
柏联广场写字楼1005室
电话：(86871)3157017
传真：(86871)3157289
邮编：650021

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)53009566转72300
邮编：150001

济南

济南市乐源大街150号
中信广场618房间
电话：(0531)86116900转67555
传真：(0531)86907134
邮编：250011

南宁

南宁市青秀区金湖路59号
地王国际商会中心47楼F-G
电话：(86771) 5593978
传真：(86771) 5592978
邮编：530022



imagination at work