

· 综述 ·

亲和层析技术在生物学中的应用及发展

李 杨¹, 韩 梅²

1. 北京师范大学 生命科学学院, 中国北京 100875;
2. 湖南师范大学 生命科学院, 中国湖南 长沙 410081)

摘 要: 近几十年来, 亲和层析技术发展十分迅速, 广泛应用于生物分子 (如结合蛋白、酶、抑制剂、抗原、抗体、激素、激素受体、糖蛋白、核酸及多糖类等) 及组织 (如细胞、细胞器、病毒等) 的分离和纯化, 是蛋白质组学研究中重要的技术之一。介绍了亲和层析的基本类型及配体合成的研究进展, 概述了亲和层析技术在蛋白质组学以及其他方面的应用和发展动态。

关键词: 亲和层析; 基本原理; 类型; 应用

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847 (2006) 01-0012-06

Application and Development of Affinity Chromatography in Biological Science

LI Yang¹, HAN Mei²

1. College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;
2. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: The development of affinity chromatography technique is very fast in recent years, remarkable accomplishments have been achieved in the separation and purification of biomolecules and organisms as well as in studying the interactions between biomolecules. The commonly used different ligand types and recent progress in searching for ligands are demonstrated. The application of affinity chromatography in proteomics and in other areas are outlined.

Key words: affinity chromatograph; basic principle; type; application

(Life Science Research, 2006, 10 (1) : 012 ~ 017)

亲和层析 (affinity chromatography) 是利用偶联亲和配体的亲和吸附介质为固定相亲和吸附目标产物, 使目标产物得到分离纯化的液相层析法。近几十年来, 亲和层析技术发展十分迅速, 并在生物技术产品、生物分子及组织的分离和纯化领域

取得令人瞩目的成就。现已广泛用于分离纯化蛋白质、肽、酶及其底物和抑制剂、抗体及抗原、核酸及其特异性作用物、激素及受体、细胞及细胞表面物等等^[1]。基于此, 本文针对亲和层析的基本类型, 配体的选择和亲和层析在生物学特别是蛋白

收稿日期: 2005-12-25; 修回日期: 2006-02-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270723); 国家自然科学基金资助项目 (30470945)

作者简介: 李杨 (1983-), 男, 湖南长沙市人, 北京师范大学生命科学学院生物技术专业学生, E-mail: leonlee0930@163.com; 韩梅 (1965-), 女, 湖南长沙市人, 湖南师范大学生命科学院副教授, 硕士, 通讯作者, 主要从事生物化学与分子生物学研究, Tel:

质组学中的应用等方面作一介绍。

1 亲和层析的类型

亲和层析柱中被固定的配体是决定亲和层析成功的关键因素。根据配体与生物大分子之间相互作用体系不同,可以把亲和层析分为以下 4 种类型^[9]。

1.1 生物亲和层析(BAFC)

生物亲和层析是利用自然界中存在的生物特异性相互作用物质对的亲和层析。通常具有高的选择性。典型的物质对有酶-底物、酶-抑制剂、激素-受体等。

1.2 免疫亲和层析(IAFC)

利用抗原抗体中的一方为配体,亲和吸附另一方的分离系统,称免疫亲和层析^[9]。免疫亲和层析应用相当广泛。许多典型的亲和层析纯化蛋白质的过程已经使用了单克隆抗体作为亲和配体。目前,利用抗体-抗原模式,有可能得到每一种目标蛋白的单抗,然后以单抗为配基,通过亲和层析技术分离纯化目标蛋白质。此种方法的纯化倍数活性回收率非常高。蛋白 A 和蛋白 G 作为抗体结合蛋白已被应用于免疫亲和层析技术,是分析人类免疫球蛋白,特别是 IgG-类抗体的很好的免疫亲和层析的配体^[9]。用免疫层析柱进行各种类型的免疫检测被称为免疫检测法,特别适用于检测含量低微的样品^[9]。免疫检测法利用被标记的抗体或模拟分析物来进行间接的被分析物的分析。常用标记如酶标记、荧光标记、化学荧光等。

1.3 金属离子亲和层析(IMAC)

金属离子亲和层析是利用金属离子的络合物或形成螯合物的能力吸附蛋白质的分离系统。目的蛋白质表面暴露的供电子氨基酸残基,如组氨酸的咪唑基,半胱氨酸的巯基和色氨酸的吡啶基,十分有利于蛋白质与固定化金属离子结合,这是 IMAC 用于蛋白质分离纯化的根据^[9,6]。金属离子如锌和铜,已发现能很好地与组氨酸的咪唑基及半胱氨酸的巯基结合。含有不同数量的这些基团的蛋白质可以通过金属离子亲和层析得到分离。

1.4 拟生物亲和层析(Biomimetic AFC)

拟生物亲和层析是利用部分分子相互作用,模拟生物分子结构或某特定部位。以人工合成的配基为固定相吸附目的蛋白质的亲和层析,如以染料亲和层析(DAFC)和氨基酸(包括多肽亲和层析(AALA))染料配基。例如三嗪(triazine)或三

苯甲烷化合物^[9],能通过共价键牢固地结合到亲和载体上。染料配体与很多蛋白以及酶的活性位点相互作用,以模仿这些生物分子的底物、辅助因子或结合剂的形式进行。

2 亲和层析配体的设计以及应用组合方法筛选配体

亲和层析是一种非常有效的大规模纯化生物技术产品的分级分离技术并已广泛应用于蛋白质组学和其他领域的研究。尽管其具有很大潜力,但针对每个目标是否能得到适当的配体,亲和层析方法的利用是受到限制的。近年来发展的利用分子模型对配体进行设计和组合化学相结合已经成为一种为特定生物技术需求产生新颖而特异性强的配体的创新方法。

2.1 亲和层析配体的设计

依据蛋白结构设计配体:理性设计配体的策略包括从合适的数据库获取关于目标蛋白结构信息并确定蛋白上可能的结合位点。目标位点可能是一活性位点、裸露于溶剂的区域或是参与同一中性互补配体相结合的部位^[9]。依据蛋白结构设计配体要考虑两个重要因素:第一,正确地预计被设计的配体构像的能力;第二,正确预计配体的亲和力的能力^[9,10]。一些成功地利用蛋白设计配体的方法已报道^[11-13]。例如,针对 L-乳酸脱氢酶而设计的葱醌模仿生物的染料-配体^[12]。

依据蛋白功能设计配体:当目标蛋白的三维结构未知的时候,可依据蛋白的功能对配体进行设计,并依赖于考虑配体一定的结构特征。归纳如下:

1) 符合一定要求的分子的形状。例如,线形带负电荷的分子肝磷脂对于纯化 DNA-结合酶是一种常规方法^[14]。另外纯化核苷酸结合酶的配体三嗪染料 Cibacron Blue 3GA^[15]具备能与一些酶的核苷酸结合位点形成合适的相互作用所需的几何结构以及离子和疏水性的基团^[15]。

2) 配体具特异功能团。例如苯甲脒作为胰蛋白酶类蛋白酶的配体,羟氨基酸作为与金属结合的蛋白的配体^[16,17]。

3) 两个或数个已知的底物、抑制剂、效应体或辅助因子这样的结构模体的结合体衍生的结构模型。例如酮-羧基仿生物嵌合染料-配体被设计作为纯化识别(酮)羧基的酶的配体^[11]。

2.2 组合方法筛选配体

应用组合化学的方法建立多肽文库,然后利

用多肽文库来筛选与目的蛋白特异性结合的多肽配基。这一观点的提出大大促进了亲和层析筛选及合成配基技术的发展。过去的十几年中已出现了允许产生多达 10^{15} 种不同的蛋白, 肽链或核酸文库的方法。这样的大文库使选择高亲和性和特异性的分子成为可能。在寻找配体时可应用两个策略。首先, 筛选能与各种类型大文库中的生物分子相结合的目标物, 然后引进一个设计的方法来缩小被引导的文库的大小规模。这个被采纳的方法主要取决于一开始时我们有什么信息。如果有被分析物的结构的信息, 设计配体就有可能; 然而如果没有这样的信息, 组合方法来筛选配体可能是唯一的途径。从第一代文库获得的结合分子能被用做母体支架产生另外的新文库, 从这种新的文库中可筛选出更高活性的结合物配体¹⁸。已有报道从(多)肽, 多核苷酸以及替代的三嗪类化合物文库中筛选亲和配体的组合方法的应用¹⁸⁻²¹。

2.2.1 合成的肽文库

合成的肽文库是随机肽分子的集合体, 包含给定肽链长度所有可能的顺序^{22, 23}。用固相肽合成方法化学合成肽分子。合成好的肽可从可溶性的肽文库断裂开或者保留在一个小珠一种结构的肽文库的树脂上。一个基本的体外筛选组合化学文库方法是让文库中的混物流经一待测定蛋白已被固定在其表面的通路。具备与固定在表面的蛋白分子有亲和性的配体是那些在它们通道上受到阻力的肽, 它们通常是亲和层析配体很好的候选物。用这样的方法, 具备 F-L-L-V-P-L 顺序的肽配体已被合成并用于人类纤维蛋白原的纯化¹⁹。

2.2.2 噬菌体展示(phage display)

噬菌体展示已经迅速成熟并演变成为亲和层析发现高亲和性配体的工具。这一技术是在一称为生物淘洗的筛选过程中依据利用噬菌体展示文库来快速鉴定高选择性的配体。以噬菌体展示得出的肽用亲和方法选择可用两种方式进行。文库可直接用被固定的目标培养或者在被固定到固体支撑物以前用目标预培养。如同亲和层析一样, 相互作用的肽或蛋白特异地或非特异地洗脱出。这些相互作用的噬菌体可用细菌感染来放大以增加它们的拷贝数。这个筛选/放大过程可多次重复以获得较高亲和性的噬菌体展示肽。期望的顺序可通过对被分离出的噬菌体 DNA 顺序测序获得。噬菌体展示文库已经成功应用于抗原决定基定位、发展疫苗²⁴、鉴定蛋白激酶底物、具生物活

性的肽以及非肽配体的肽模拟²⁵。并且很适合作为色谱分析的亲和配体来源²⁶。蛋白 A 的免疫球蛋白结合的结构域已被展示在噬菌体的表面, 使筛选具改进的特异性或温和的洗脱条件的蛋白 A 变异体亲和层析条件成为可能^{27, 28}。Gaskin 等人描述了利用展示在细丝状噬菌体 M13 表面的 7 氨基酸肽文库作为根毛霉脂肪酶(Rhizomucor miehei lipase)可能的亲和配体来源¹⁸。

2.2.3 核糖体展示和 SELEX 进行的亲和选择

核糖体展示特别适合于扫描和筛选折叠的蛋白, 原理总结如下: 首先—DNA 文库被转录成 mRNA, 该 mRNA 在体外被翻译, 由于缺乏一休止符, 阻止了 mRNA 和肽从核糖体中释放出来, 在适当的条件下形成一稳定的三元体复合物。该复合物然后暴露于固定在一表面的目标分子。如果肽与目标以充分的亲和力相结合, 复合物就保留了, 低亲和性的肽被洗脱掉。粘附着的核糖体三元复合物可被 EDTA 解离, mRNA 再反转录成 cDNA 并可由 PCR 扩增强度。指数浓缩法系统发展配体(SELEX)被广泛应用于筛选核酸配体。体外筛选已被用来针对目标确定核酸配体, 这些目标覆盖广泛的体积大小, 并包含简单离子, 肽链, 蛋白, 细胞器官, 病毒, 甚至整个细胞²⁹。

合成的化学配体在蛋白层析中的作用在过去的几十年的应用中已经非常实在。离子交换, 疏水性的和金属螯合的吸附剂一起构成一种固定在基质骨架上的确定的、超级稳定和没有毒性的人工合成功能体, 并与蛋白表面带电荷、非极性 or 金属结合的群体发生亲和作用。例如, 组合化学技术正开始对发现和设计新的融合肽金属配体发生较大影响^{30, 31}。

2.3 从头设计配体

由于能将 X 射线晶体学, NMR 或同源结构的知识与限定的或组合化学合成以及先进的计算机技术相结合, 合理设计亲和配体变得更切实可行, 有效, 符合逻辑且更快。这种方法依赖于利用目标蛋白的结构信息有目的地集中引导配体的合成并使合成的努力限定朝向已经过实验评价能结合到被检测目标或预计能结合到目标的方向^{10, 32-34}。该方法包括以下的步骤: 选择目标蛋白上合适的位点, 设计与该位点的三维结构相配伍的配体, 合成一个结构上相关联的固相的组合配体文库, 并针对目标蛋白扫描这个文库³⁵。

针对 IgG 的非肽仿生配体已经建立, 它是

依据蛋白 A 的 B 结构域和 IgG 的 Fc 片段组成的复合物的 X 射线晶体学结构³⁴获得的。利用计算机协助的分子模型,一系列围绕蛋白 A 双肽 Phe132-Tyr133 的仿生物分子被设计出。其中一个这样的配体能与人类 IgG 结合,该配体在三嗪环上带有 3-氨基苯酚和 4-氨基-1-萘酚部分。当这个仿生物配体被固定到琼脂糖上被成功地用于纯化人类血浆的 IgG。为重组胰岛素前体 MI3³⁵以及重组人类凝固因子 VIIa³⁵等而设计的仿生物学配体的类似方法也已建立。

3 亲和层析的应用

3.1 亲和层析在蛋白质组学中的应用

蛋白质组学最常用的实验技术是用于分离蛋白的双相电泳(2-DE)和用于鉴定被分离蛋白的质谱(MS)技术。然而亲和层析也是起很大作用的分离方法。蛋白被 2-DE 分离之前,亲和层析主要被用作选择性地预先浓缩和预处理样品。其应用包括去除一种或一类会干扰 2-DE 的分辨率的蛋白,一个典型的例子是血清及脑脊髓液样品的白蛋白和免疫球蛋白 IgG 的去除,是通过吸附在亲和树脂上的方法^{35,36}进行的,这样可显著提高 2-DE 胶上蛋白斑点的分辨率。另外,亲和层析可浓缩低丰度的蛋白,这样它们就可在 2-DE 胶上看到³⁷;还可将所有蛋白分类成两组或几组以便进一步分析³⁸。

很多情况下对那些还没有进行 2-DE 分离的样品进行质谱测定,测定前可借助亲和层析进行分离而减轻样品的复杂程度。对非 2-DE 基础上的研究,亲和层析能被用在蛋白水解消化之前或之后的蛋白以及肽链的分离。例如凝集素亲和层析已被用来在蛋白水解消化之后分离提取一类特异的糖蛋白,并浓缩糖肽³⁹。这种方法对研究转录后修饰蛋白特别有用。亲和层析也被用来研究转录后修饰的位点。亲和层析分析糖蛋白是利用目标聚糖甚至在蛋白质水解以后都能被凝集素识别而进行的。利用抗体和某些 IMAC 的亲和层析可用来分离并浓缩糖肽。

对于细胞是怎样作为系统而运行的理解取决于测定细胞蛋白-蛋白间相互作用的复杂网络。蛋白复合物的亲和纯化后进行蛋白质谱鉴定已作为产生蛋白-蛋白间相互作用图谱和复合物在细胞中位置图谱的有力工具。所有鉴定蛋白复合物的亲和纯化方法都是利用给蛋白加标签进行的。在

遗传水平上或是在从细胞中提取蛋白的水平上⁴⁰!蛋白亲和层析方法可能比酵母双杂交方法更优越,因为它产生较少的假阳性结果并且是更适用于高通量(高数量被检测的样品)的操作⁴¹!亲和层析能纯化细胞中形成复合物的蛋白,目标蛋白能与那些相关联的蛋白一起从例如细胞溶解产物中被纯化。重组 DNA 技术用例如 GST、抗原决定基或 TAP 这样的肽链片段标记物来给“诱饵”蛋白上标签。一种大规模的方法可用这些商品肽段标记所有诱饵蛋白。利用 TAP 的方法经过 IgG 小珠和钙调蛋白小珠两个相连续的亲和步骤来纯化含有 TAP 标记蛋白的蛋白复合物⁴²!

尽管 2-DE 与 MS/MS 并联的方法已经能对双向电泳中的蛋白进行相对定量,但利用稳定同位素标记而使蛋白质组学的定量分析更能够实现⁴³!一类小分子试剂,同位素编码的亲和标记物已被用来进行蛋白质组学的定量分析⁴⁴!一种方法是借助 MALDI-TOF 质谱仪和 ICAT 标记物试剂对复杂的蛋白混合物进行分析⁴⁵!

3.2 分离纯化目的蛋白、定量测定

近年来,高速发展的生物制药工业已广泛应用亲和层析技术作为其重要的分离纯化和定量测定用于临床药物的工具。亲和层析最常用于靶标蛋白尤其是疫苗分离纯化上。特别在融合蛋白的分离纯化上,亲和层析更是起到举足轻重的作用,因为融合蛋白具有特异性结合能力。亲和层析在基因工程亚单位疫苗的分离纯化中应用相当广泛,其中,以对分别带有(His)₆和 GST 亲和标记的融合蛋白的抗原 Ni²⁺-NAT 和 GST 亲和层析应用相当广泛^{46,47}!金属螯合层析与免疫亲和层析也得到一定的应用。

近年来,将亲和层析原理用于定量分析主要与免疫技术相结合,对抗原和抗体进行微量分析,并发展出了放射免疫、酶标免疫及荧光抗体等技术。另外,亲和层析技术被广泛应用于与生物大分子与其特异性作用物的结合常数的测定以及复合物的定量分析⁴⁸!亲和层析技术在临床上已有了较多的应用,例如对糖基化蛋白的定量分析技术。另外,固定有抗人类转铁蛋白的免疫亲和层析柱被应用于对稀释的血清转铁蛋白异构体的纯化和鉴定⁴⁹!

3.3 生物分子间相互作用的鉴定

亲和层析也被用来研究生物系统中生物分子间发生的相互作用⁵⁰!该领域已被用来检验各种

生物系统, 包括凝集素 lectin 糖, 酶 抑制剂, 蛋白 蛋白, 以及 DNA 蛋白间的相互作用. 临床上主要将该技术用于研究药物或激素与血清蛋白间的结合. 两种层析方法可用来研究生物间相互作用^[9]. 一种是 zonal 洗脱研究, 另一种是前沿 frontal 分析研究.

3.4 亲和层析与其他分析技术相结合

近年来的另一发展趋势是寻求更加优化的系统设计和安排形式, 从而获得快速、优良的选择性以及很大数量被检测的样品. 亲和层析与其他分析技术串联合即可很好地达到这一目的. 目前已经有很多成功运用亲和层析 (AFC) -MS、AFC -HPLC、AFC -HPLC-MS、AFC -CE (毛细管电泳) 等串联合的应用. 这种结合因其不可替代的优点, 仍将继续发展.

4 结语

在发现和生产治疗疾病的蛋白方面的挑战已经使人们有必要重新考虑设计和进行纯化的过程, 这种选择主要是由方法的引进速度, 有效性, 稳定性和经济承受能力决定的. 传统的纯化规程正被高度选择性和成熟的以亲和层析为基础的策略所代替. 这种技术对于纯化提供一种理性的设计并刺激和探索选择性纯化目标蛋白的分子识别的自然生物过程. 亲和层析可能是现行仅有的着重于高通量和扩大规模蛋白质组学关键问题的分离技术. 主要的问题是设计新的技术来确定与假设目标相结合的高选择性的亲和配体. 利用理性和组合的方法设计具高选择性和稳定性的配体对于亲和层析未来的应用会有巨大的影响.

致谢: 特别感谢梁宋平教授、张健教授和曾雄智博士对本文所提出的宝贵意见!

参考文献 (References):

- 1] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用 [M] 北京: 科学出版社 ZHAO Y F. Biochemistry Techniques, Principles and Applications [M] Beijing: Science Press 2002. 7-82.
- 2] 陈勇, 徐, 应汉杰. 亲和层析研究进展 [J]. 离子交换吸附 CHEN Y, XU Y, YING H J, et al. Reasarches and development of affinity chromatography [J]. Ion Exchange and Adsorption 2001, 17(3): 278-280.
- 3] HAGE D S. A survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography [J]. J Chromatogr, 1998, 715: 3-28.

- 4] HAGE D S. Affinity chromatography: a review of clinical applications [J]. Clinical Chemistry, 1999, 45 5: 593-615.
- 5] LOPATIN S, VARLAMOV V. New trends in immobilized metal affinity chromatography of proteins [J]. Appl Biochem Microbiol, 1995, 31: 221-227.
- 6] PORATH J. Immobilized metal ion affinity chromatography [J]. Protein Expr Purif, 1992, 3: 263-281.
- 7] KELLEY G B D, BOOTH J, TANNATT M. Isolation of a peptide ligand for affinity purification of factor VIII using phage display [J]. J Chromatogr A, 2004, 1038 1-2: 121-130.
- 8] HAGE D, KATZ E, EKSTEEN R. Affinity chromatography. Handbook of HPLC [M]. New York: Marcel Dekker, 1998. 483-498.
- 9] CARLSON H A. Protein flexibility and drug design: how to hit a moving target [J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6: 447-452.
- 10] LOWE C R, LOWE A R, GUPTA G. New developments of affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals [J]. J Biochem Biophys Methods, 2001, 49: 561-574.
- 11] CLONIS Y D, LABROU N E, KOTSIRA V, et al. Biomimetic dyes as chromatographic tools in enzyme purification [J]. J Chromatogr A, 2000, 891: 33-34.
- 12] LABROU N E, ELIOPOULOS E, CLONIS Y D. Molecular modeling for the design of a biomimetic chimeric ligand. Application to the purification of bovine heart L-lactate dehydrogenase [J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 63: 322-332.
- 13] VELLEMAN M, PARBUS S. Purification of the C1 repressor of bacteriophage P1 by fast protein liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1992, 625: 3-41.
- 14] GADGIL H, OAK S A, JARRETT H W. Affinity purification of DNA-binding proteins [J]. J Biochem Biophys Methods, 2001, 49: 607-624.
- 15] LABROU N E, CLONIS N D. Theory and Practice of Biochromatography [M]. London: Taylor and Francis, 2002. 335-351.
- 16] CLONIS Y D, STEAD C V, LOWE C R. Novel cationic triazine dyes for protein purification [J]. Biotechnol Bioeng, 1987, 30: 621-627.
- 17] BURTON N P, LOWE C R. Design of novel affinity adsorbents for the purification of trypsin-like proteases [J]. J Mol Recognit, 1992, 5: 55-68.
- 18] GASKIN D J, STARCK K, TURNER N A, et al. Phage display combinatorial libraries of short peptides: ligand selection for protein purification [J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 28: 766-772.
- 19] KAUFMAN D B, HENTSCH M E, BAUMBACH G A, et al. Affinity purification of fibrinogen using a ligand from a peptide library [J]. Biotechnol Bioeng, 2002, 77: 278-289.
- 20] ROMING T S, BELL C, DROLET D W. Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification [J]. J Chromatogr B, 1999, 731: 275-284.
- 21] MORRILL P R, GUPTA G, SPROULE K, et al. Rational combinatorial chemistry-based selection, synthesis and evaluation

- of an affinity adsorbent for recombinant human clotting factor VII β *J J Chromatogr B*, 2002, 774: 1-15.
- β 2 *J* BATRA S, SRINIVASAN T, RASTOGI S K, et al. Identification of enzyme inhibitors using combinatorial libraries β *J Curr Med Chem*, 2002, 9: 307-319.
- β 3 *J* DANI M J, RECEPT J. Peptide display libraries: design and construction β *J Signal Transduct Res*, 2001, 21: 469-488.
- β 4 *J* SCALA G, CHEN X N, LIU W M, et al. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1 positive sera β *J J Immunol*, 1999, 162: 6155-6161.
- β 5 *J* BOLLE D X, LAURENT T., TIBOR A, et al. Antigenic properties of peptidic mimics for epitopes of the lipopolysaccharide from Brucella β *J J Mol Biol*, 1999, 294: 181-191.
- β 6 *J* GOLDMAN E R, PAZIRANDEH M P, MAURO J M, et al. Phage-displayed peptides as biosensor reagents β *J J Mol Recog*, 2000, 13: 382-387.
- β 7 *J* EHRLICH G K, BAILON P. Identification of model peptides as affinity ligands for the purification of humanized monoclonal antibodies by means of phage display β *J J Biochem Biophys Methods*, 2001, 49: 443-454.
- β 8 *J* EHRLICH G K, BAILON P. Identification of peptides that bind to the constant region of a humanized IgG1 monoclonal antibody using phage display β *J J Mol Recog*, 1998, 11: 121-125.
- β 9 *J* WILSON D S, SZOSTAK J W. In vitro selection of functional nucleic acids β *J Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 611-647.
- β 0 *J* ENZELBERGER M M, MINNING S, SCHMID R D. Designing new metal affinity peptides by random mutagenesis of a natural metalbinding site β *J J Chromatogr A*, 2000, 898: 83-94.
- β 1 *J* SZURDOKI F, REN D, WALT D R. A combinatorial approach to discover new chelators for optical metal ion sensing β *J Anal Chem*, 2000, 72: 5250-5257.
- β 2 *J* LOWE C R. Combinatorial approaches to affinity chromatography β *J Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5: 248-256.
- β 3 *J* SPROULE K, MORRILL P, PEARSON J C. New strategy for the design of ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography β *J J Chromatogr B*, 2000, 740: 17-33.
- β 4 *J* TENG S F, SPROULE K, HUSAIN A. Affinity chromatography on immobilized "biomimetic" ligands β *J J Chromatogr B*, 2000, 740: 1-15.
- β 5 *J* BURGESS-CASSLER A, JOHANSEN J J, KENDRICK N. Immunodepletion of albumin from human serum samples β *J Clin Chim Acta*, 1989, 183: 359-365.
- β 6 *J* RENGARAJAN K, SMET M D D E, WIGGERT B. Removal of albumin from multiple human serum samples β *J Biotechniques*, 1996, 20: 30-32.
- β 7 *J* PANDEY A, MANN M. Proteomics to study genes and genomes β *J Nature*, 2000, 405: 837-846.
- β 8 *J* JUNGBLUT P, BAUMEISTER H, KLOSE J. Classification of mouse liver proteins by immobilized metal affinity chromatography and two dimensional electrophoresis β *J Electrophoresis*, 1993, 14: 638-643.
- β 9 *J* HIRABAYASHI J, ARATA Y, KASAI K I. Glycome project: Concept, strategy and preliminary application to Caenorhabditis elegans β *J Proteomics*, 2001, 1: 295-303.
- β 0 *J* BLACKSTOCK W P, WEIR M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins β *J Trends Biotechnol*, 1999, 17: 121-127.
- β 1 *J* EDWARDS A M, ARROWSMITH C H, PALLIERES B D. Proteomics: New tools for a new era β *J Modern Drug Discovery*, 2005: 35-44.
- β 2 *J* SHEVCHENKO A, SCHAFT D, ROGUEV A, et al. Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry: analytical perspective β *J Mol Cell Proteomics*, 2002, 1: 204-212.
- β 3 *J* GYGI S P, BEATE R, AEBERSOLD R. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis β *J Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11: 396-401.
- β 4 *J* GYGI S P, RIST B, GERBER S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags β *J Nature Biotechnol*, 1999, 17: 994-999.
- β 5 *J* GRIFFIN T J, GYGI S P, RIST B, et al. Quantitative proteomic analysis using a MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometer β *J Anal Chem*, 2001, 73: 978-986.
- β 6 *J* 周卫斌, 苏志国. 疫苗分离纯化研究进展 β *J 生物加工过程* ZHOU W B, SU Z G. Development in research of isolation and purification of vaccine β *J Chinese Journal of Bioprocess Engineering* 2003, 1 2 6-12.
- β 7 *J* ROBB V A, LI W, GUTMANN D H. Disruption of 14-3-3 binding does not impair Protein 4.1B growth suppression β *J Oncogene*, 2004, 23 20 3589-3596.