

蛋白质芯片技术进展

刘康栋* 赵建龙

(中国科学院上海微系统与信息技术研究所 上海 200050)

摘要 人类基因组测序工作的完成,引起人们对蛋白质组研究的热忱。蛋白质作为生命活动的执行者,种类繁多,结构复杂,并且其活性与空间结构密切相关,需要更为先进的技术去研究和探索。近来出现的蛋白质芯片以并行、高通量检测、分析和处理蛋白质样品,发展迅速,应用前景广泛。介绍蛋白质芯片的种类、蛋白质固定的表面化学以及不同的检测方法,简述蛋白质芯片在不同领域的应用,并讨论蛋白质芯片目前存在的问题。

关键词 蛋白质芯片 蛋白质组

随着人类基因组大规模测序工作的完成,研究者逐渐认识到在核酸水平上检测的 mRNA 表达水平和相应蛋白质的表达水平并不完全相关^[1],而且蛋白质本身在翻译后还有许多修饰过程,因而越来越多的研究者将研究目标转移到蛋白质的结构、功能、表达水平和蛋白质之间的相互作用关系上来。蛋白质的研究并不像核酸的研究那样成果累累,因为蛋白质由 20 多种氨基酸组成,没有核酸研究中 PCR (polymerase chain reaction) 一样的蛋白质扩增技术,也没有 DNA 测序那样成熟的蛋白质测序技术,而且蛋白质的活性和空间结构密切相关,因此呼唤创造并行、快速、高通量的蛋白质研究技术。DNA 芯片的成功先例,给蛋白质的高通量研究提供了榜样,蛋白质芯片应运而生,在生物界的高度关注下,蛋白质芯片快速发展,在蛋白质组的研究中有着广阔的应用前景。

1 蛋白质芯片的概念

现在的蛋白质芯片是指在固相支持物(载体)表面固定大量蛋白探针(可以是抗原、抗体、受体、配体、酶、底物等),形成高密度排列的蛋白质点阵。利用这种芯片和含有未知蛋白质的液体(体液、细胞和组织提取物)进行孵育反应,反应后用相应的检测系统进行检测,最后应用计算机分析和比较相

应蛋白质的表达情况。蛋白质芯片根据相互作用原理可分为抗原-抗体芯片,受体-配体芯片,酶-底物芯片和多肽芯片等。

2 蛋白质芯片的制作

蛋白质芯片的制作比 DNA 芯片的制作更为复杂,蛋白质很难在载体表面合成,合成的序列也很短,而且合成多肽序列的空间结构很难预测,由于蛋白质的活性和其空间结构的关系极为密切,在载体的表面直接固定很容易导致蛋白质空间结构的改变而失去活性,由于蛋白质种类繁多、性质各异,而载体表面只能用一种化学或生物基团修饰,这给探针与载体表面基团的结合带来困难。而且探针在载体的表面固定还要求一定的方向性,这种方向性直接影响其和相应配体的结合效率。

2.1 探针载体的选择和制作

制作蛋白质芯片首先要选择合适的基片作为蛋白质的载体,蛋白质芯片的载体要满足以下几个方面的要求:(1)基片要能够适合高密度点样的要求;(2)探针固定后能够保持蛋白质的活性;(3)不同批次基片之间以及同一基片各点之间均一性好;(4)分析复杂蛋白质混合物时有较好的信噪比;(5)蛋白质探针有较好的保质期^[2]。

早期尝试用蛋白质电泳常用的聚苯乙烯、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜和硝化纤维膜作为蛋白质的载体,但蛋白质易在这些软载体表面扩散,影响到探针的密度,硝化纤维膜还有较高的背景噪音,信噪比较差。也有研究者借用制作 DNA

芯片的方法, 将蛋白质、抗原或抗体等样品直接点在修饰过的载玻片表面, 在样品缓冲液中加入高比例的甘氨酸以保持蛋白质活性^[3]。

为了防止蛋白质在点样过程中相互扩散污染, 同时保持蛋白质的活性, 又发展了三维基质芯片, 是在玻璃表面形成微小点状的聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶, 它们都是有孔的亲水性基质, 捕获的蛋白质和抗体易扩散到它们的孔里, 并被固定在基质中, 并能够有效保持蛋白质活性, 固定的蛋白质的量也较大^[4,5]。Zhou 等^[6]在玻璃片表面铺一层羧甲基右旋糖苷水凝胶, 在水凝胶表面又印刷一层网格状、疏水的四正辛基溴化铵, 将蛋白质探针点在网格内, 四正辛基溴化铵成为阻挡层, 防止探针的相互扩散, 待探针固定后, 用叔丁基醇去除四正辛基溴化铵, 该法成功制备高密度的探针。

利用微加工技术将玻璃片上的聚二烷基硅氧烷膜 (polydimethylsiloxane PDMS) 制造成微孔结构, 在微孔内固定探针, 用来制备蛋白质芯片。这种方法材料价格低、加工简单、便于自动化, 有一定的应用前景^[7]。

2.2 芯片载体的表面修饰

蛋白质在载体表面的固定较 DNA 的固定更为复杂。因为不同的蛋白质物理和化学性质千差万别, 其活性和空间结构密切相关, 因而发展一种稳定、通用且不改变蛋白质空间结构的固定方法是蛋白质芯片的难点之一。

有多种不同的方法用于蛋白质在固相支持物表面的固定。如非共价键的吸附、共价键结合及用链亲和素的亲和捕获等^[8,9]。这些蛋白质固定技术各有优缺点, 非共价键的吸附具有高吸附容量, 较好地保持蛋白质的空间结构, 较低的非特异性吸附等优点, 但是物理的非共价吸附无法控制蛋白质吸附的数量以及蛋白质吸附的方向性, 因而芯片的反应效率、反应的准确性和反应的重现性等方面都受到影响。

共价键的结合是在载体表面衍生活泼的化学基团, 如醛基、环氧基、氨基、活化酯^[10,11]以及镍-氮川三乙酸钠螯合物^[12]等, 用来固定蛋白质。短链两端各有一个功能基团的硅烷可以用于蛋白质分子在固相表面的固定, 它的一个功能基团可以和玻璃表面的羟基反应, 而另外一个功能基团(醛基或环氧基)可与蛋白质的氨基反应, 还可以对该功

能基团进一步化学修饰以达到反应的特异性^[13]。Yoonsuk 等^[14]应用杯芳冠醚 5 的衍生物作为蛋白质分子在固相载体上的连接分子, 作用的原理类似于自组装单分子层, 固定的蛋白质分子有很好的方向性和生物活性。源于胶原、糖苷和纤维素等的高分子聚合物也被用来作为载体和蛋白质分子间的偶联^[14-16]。这种固定方式对蛋白质结合力强, 广泛适用各种蛋白质, 有很好的重现性, 但是化学基团对蛋白质的修饰往往会改变蛋白质的活性, 使其与相应配体的结合能力下降。

链亲和和素和生物素之间的亲和作用也被用于蛋白质芯片的固定^[8,9], 但主要问题是生物素化的抗体在结合的特异性和亲和能力发生了改变。蛋白质标签也被用来作为捕获蛋白质, 在需要固定的蛋白质上用生物工程技术融合一个蛋白质标签, 用这个融合的蛋白质标签和相应的支持物结合来固定蛋白质, 但是这种方法需要对所有需要固定的蛋白质加上一个相应的标签, 导致操作上更为复杂, 还可能使需要固定蛋白质的空间结构发生变化, 从而导致实验的重复性差。

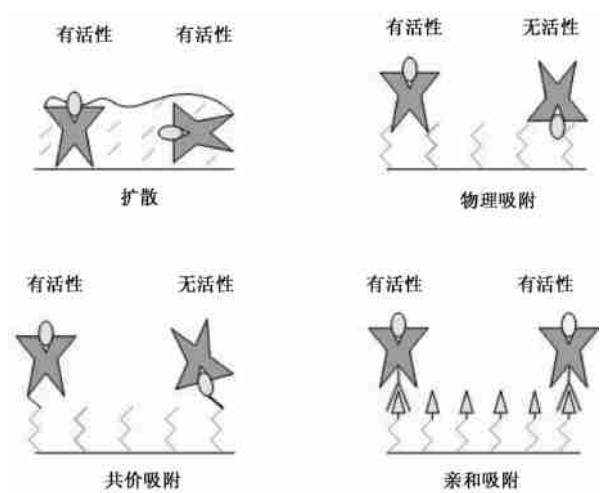


图 1 不同的固定方法对固定后蛋白质活性的影响

Fig. 1 The influence of different attachment methods to protein activity

金膜也用于载体表面的修饰, 这是应用微加工技术, 在载体表面固定一层金膜, 表面的金粒子能够和硫代烷基或蛋白质中 SH 基团结合, 可以用于含有相应基团的探针的固定。

3 蛋白质芯片的检测方法

目前在蛋白质芯片检测中应用最广的是荧光

染料标记, 原理较为简单、使用安全、敏感性高, 且有很好的分辨率^[17]。用荧光染料 Cy3 或 Cy5 直接标记待检测的蛋白质, 或用荧光染料标记该蛋白质的二抗, 和芯片上的蛋白质结合后, 用激光扫描和 CCD 照相技术对激发的荧光信号检测, 用计算机和相应的软件系统进行分析。对于低丰度的蛋白质样品来说, 荧光和化学发光的检测方法的灵敏度低, 近年来出现的滚环扩增 (rolling circle amplification, RCA) 方法对捕获的蛋白质的检测达到了飞摩尔的量级, 有望改善荧光检测的灵敏度^[18, 19]。RCA 的原理是将一段寡核苷酸序列作为引物固定在待检测蛋白质的二抗上, 然后用环状 DNA 分子和寡核苷酸进行杂交, 杂交后用 DNA 聚合酶扩增信号, 直接检测荧光信号, 也可用荧光标记的寡核苷酸和扩增的单链核苷酸杂交, 实现对低丰度蛋白质的检测。

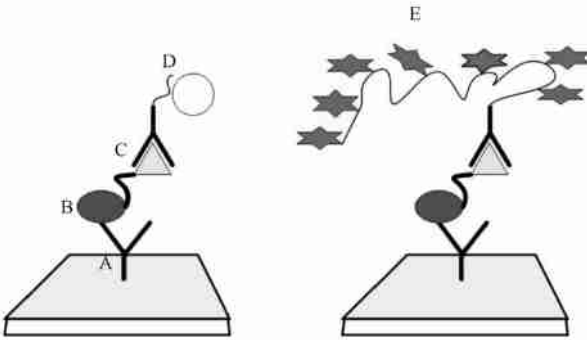


图 2 RCA 检测原理

A: 捕获探针; B: 被捕获的标记蛋白; C: 标记蛋白的二抗 (结合引物); D: 复制环; E: 扩增的带有荧光的核酸链

Fig. 2 Schematic show RCA detection

A: capturing probe B: detected protein labeled with hapten
C: antibody labeled with primer D: rolling cycle
E: amplified DNA with fluorescence

蛋白质芯片联合表面加强激光解吸/电离-飞行质谱检测法^[20]。表面加强激光解吸/电离-飞行质谱仪 (surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS) 具有分析速度快、简便易行、样品用量少和高通量等特点, 可直接检测各种体液如尿液、血液、脑脊液、关节腔液、支气管洗脱液、细胞裂解液和各种分泌物等。其原理是用化学或生物学的方法将生物制剂或探针固定在载体表面上, 形成一个个点状芯池矩阵。根据芯片表面的不同生化反应, 可将其分为化学表

面芯片和生物表面芯片。其中化学表面芯片又可分为疏水、亲水、阳离子、阴离子和金属离子螯合等五种芯池。生物表面芯片分为抗体-抗原、受体-配体和 DNA-蛋白质芯片等种类。检测时将生物样品直接点到各芯池内, 其中不同性质的蛋白质通过亲和作用被吸附到不同的芯池中, 洗去其它未结合的物质, 将吸附的蛋白质固定, 经室温干燥后, 加入能量吸收分子使其与蛋白质结成混合晶体, 以促进蛋白质在飞行时间质谱检测中的解吸附和离子化, 利用激光脉冲辐射使芯池中的分析物解吸并离子化形成荷电离子, 根据不同质荷比这些离子在仪器场中飞行的时间长短不一, 通过飞行时间质谱仪精确地测定出蛋白质的质量, 并由此绘制出质谱图来, 整个测定过程一般在几分钟内完成。这种检测方法只能分析待测蛋白质的质量, 但不能测定蛋白质的空间构象。应用该技术在前列腺癌样品中发现一个 50.8 kDa 大小的蛋白, 该蛋白存在于全部患者的血清或尿液中, 而在健康对照者中没有^[21]。肖雪媛等^[22]用 SELDI-TOF-MS 技术从肺癌病人的血清中快速筛选出肺癌标志蛋白, 证实 SELDI-TOF-MS 是发现和筛选肿瘤蛋白的有力工具。

靳刚 (Jin G) 等^[23]将高分辨率的生物光学显微成像技术和集成化多元蛋白质芯片技术相结合, 发展了新型的并行、快速生物分子识别和检测技术。它通过固体基底表面的微格式化, 表面改性和生物配基固定等技术, 制备多元生物活性感应表面。该技术利用生物分子操作, 蛋白质的特异结合性和高分辨率的生物光学椭圆偏振显微成像技术, 达到识别、检测和纯化蛋白质的目的。它不需要任何添加剂, 对生物活性无影响, 还能够对蛋白质之间的相互作用过程进行定时测量, 获得反应速率及反应条件等生物分子反应的动力学参数。

表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 也用于蛋白质芯片的检测^[24]。表面等离子共振技术是近年来迅速发展起来的用于分析生物分子相互作用的一项技术, 它利用全反射时入射光可以和金属表面的等离子发生共振的原理, 当受体与相应的配体结合或解离时, 相应的共振信号发生改变, 用来探测生物分子之间是否发生作用以及反应的动力学参数。SPR 技术已被广泛地用于研究蛋白质-蛋白质、核酸-蛋白质、核酸-核酸以及药物-蛋白质之间相互作用的反应动力学、亲和力等关系, 如酶联免疫标记 (ELISA) 等。SPR 主要有两

大优点: (1) 实时监测生物分子的相互作用; (2) 待检测的生物样品不需要进行标记。

4 蛋白质芯片的应用

近来在蛋白质的固定、反应和检测等方面的研究进展为蛋白质芯片的走向成熟铺平了道路, 许多研究者已经采用蛋白质芯片作为他们研究的工具。

4.1 蛋白质芯片与疾病的诊断

微阵列的 ELISAs 在疾病的诊断中有广泛的应用前景, 可以同时检测生物样本中的多个指标, 敏感度高且需要的样本量少, 试剂的消耗量少。在聚苯乙烯的 96 孔板上固定细胞因子抗体, 在 5~50 μ l 样本中可一次检测 9 种细胞因子, 检测的灵敏度达到 1~10 μ g/ml, 目前已有类似的细胞因子抗体芯片出现, 一次可以检测 50 种细胞因子的表达, 可以用于观测用药后病人对治疗药物的反应^[25]。Schweitzer 等^[26]应用细胞因子的抗体芯片和 RCA 信号放大技术成功检测到皮摩尔和亚皮摩尔浓度的细胞因子, 为研究细胞因子对细胞的生长和调控打下了很好的基础。朱兰芸等^[27]用多种肿瘤标志物芯片检测原发性肝癌患者的肿瘤标志物, 这种方法的灵敏度比原来的单指标检测方法高。

抗原和抗体的相互作用可以用来发现食物中的变应原, 将已知的多种变应原制成芯片, 然后用病人的血清和芯片反应, 可以及时找到变应原。通过和正常人血清反应芯片的比较, 还可以更进一步研究过敏反应的机理, 以及为什么不同个体对同种变应原有不同的反应^[28, 29]。

4.2 蛋白质芯片与新药筛选

蛋白质表达谱是蛋白质芯片应用的另一重要领域。Miller 等^[30]用 186 种抗体制成的芯片分别和健康人及前列腺癌患者的血清进行反应, 筛选出 5 种健康人和前列腺癌患者表达水平有明显差异的蛋白质。将大量纯化的蛋白质在载体表面高密度固定, 可以制成功能蛋白质组芯片和膜蛋白质组芯片, 用来进行药物和药靶的高通量筛选^[31]。G 蛋白激酶受体是药物治疗的药靶, 将不同种类的 G 蛋白激酶受体的蛋白质芯片和荧光标记的配体以及未标记抑制剂同时反应, 监测不同亚型 G 蛋白激酶受体与化合物结合的选择性和反应剂量关系^[32]。蛋白激酶芯片用来研究不同小分子和抑制剂对蛋白激酶的结合, 从而筛选蛋白激酶抑制剂,

研究分子之间的作用机理, 发展新的药物^[33, 34]。

4.3 蛋白质芯片和蛋白质组学

蛋白质芯片有研究整个细胞内蛋白质通路的能力, 这对了解机体的生理和病理过程都很重要。可以通过比较生理和病理状态下机体蛋白质表达谱的不同, 研究疾病发生和发展的机制。Haab 等^[35]用血清表达谱蛋白质芯片研究了卵巢癌发生过程中蛋白质变化的特征。蛋白质组学还可阐明肝脏和血清中不同蛋白质在药物代谢中的作用, 了解不同药物的代谢谱及其毒副作用, 蛋白质芯片在这些蛋白质谱研究中将发挥重要作用。

5 前景及存在问题

蛋白质芯片的发展迅速, 受到了广泛的关注, 但蛋白质芯片技术的发展还面临一些挑战。(1) 蛋白质本身的复杂性。蛋白质种类繁多, 理化性质不一, 还有许多糖基、巯基、磷酸基等基团修饰, 具有和自身活性密切相关的空间结构。用单一的蛋白质处理方法有局限性。(2) 需要大量的蛋白质探针, 这也受到目前研究方法的限制。(3) 检测的稳定性和质量稳定性。作为探针的蛋白质空间结构和活性决定蛋白质芯片的稳定性和保质期。(4) 蛋白质芯片的特异性。蛋白质是依靠空间结构来相互识别, 有相同结构的不同蛋白质容易交叉配对, 影响检测的特异性。(5) 检测数据的标准化。由于存在影响蛋白质芯片检测结果的诸多因素, 因而需要对检测结果进行标准化才能确认结果的有效性。

蛋白质作为生命活动的执行者, 有巨大潜在研究和应用价值。微型化、高通量、自动化的蛋白质研究技术是蛋白质组学研究的重要条件, 蛋白质芯片技术应运而生, 其有许多传统蛋白质研究方法无法比拟的优势, 尽管还有芯片稳定性及操作复杂等因素的限制, 但快速的研究进展将会不断推进蛋白质芯片技术的完善, 推进生命科学的前进。为人类揭开生命奥秘建功立业。

参考文献

- [1] Griffin T J, Gygi S P, Ideker T, et al. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(4): 323~333
- [2] Kumble K D. Protein microarrays: new tools for pharmaceutical development. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377: 812~819
- [3] Heng Z, Michael S. Protein chip technology. *Current Opinion in*

- Chemical Biology, 2003, 7: 55~ 63
- [4] Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, et al. Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchip. Anal Biochem, 1997, 250(2): 203~ 11
- [5] Afanassiev V, Hanemann V, Wolf S. Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E66
- [6] Zhou Y, Andersson O, Lindberg P, et al. Protein Microarrays on Carboxymethylated Dextran Hydrogels: Immobilization, Characterization and Application. Microchim Acta, 2004, 147(1- 2): 21~ 30
- [7] Zhu H, Klemic J F, Chang S, et al. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. Nat Genet, 2000, 26: 283~ 289
- [8] Hoyer-Hansen G, Hamers M J, Pedersen A N, et al. Loss of ELISA specificity due to biotinylation of monoclonal antibodies. J Immunol Methods, 2000, 235(1- 2): 91~ 99
- [9] Rowe C A, Tender L M, Feldstein M J, et al. Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes. Anal Chem, 1999, 71: 3846~ 3852
- [10] MacBeath G, Schreiber S L. Printing proteins as microarrays for high throughput function determination. Science, 2000, 289: 1760~ 1763
- [11] Ziauddin M, Sahatini D M. Microarrays of cell expressing defined cDNAs. Nature, 2001, 411: 107~ 110
- [12] Templin M F, Stoll D, Schrenk M, et al. Protein microarray technology. Trends Biotechnol, 2002, 20: 160~ 166
- [13] MacBeath G, Koehler A N, Schreiber S L. Printing small molecules as microarrays and detecting protein ligand interactions en masse. J Am Chem Soc, 1999, 121: 7967~ 7968
- [14] Yoonsuk L, Eun Kyoung L, Yong W C, et al. ProteoChip: A highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies. Proteomics, 2003, 3: 2289~ 2304
- [15] Howard J C, Heinemann C, Thatcher B J, et al. Identification of collagen binding proteins in *Lactobacillus* spp. with surface enhanced laser desorption/ionization time of flight ProteinChip. App Environ Microbiol, 2000, 66: 4396~ 4400
- [16] Muchova L, Jirsa M, Kuroki M, et al. Immunoaffinity isolation of CEACAM1 on hydrazide derivatized cellulose with immobilized monoclonal anti-CEA antibody. Biomed Chromatogr, 2001, 15: 418 ~ 422
- [17] Haab B B. Advances in protein microarray technology for protein expression and interaction profiling. Curr Opin Drug Discov Devel, 2001, 4(1): 116~ 123
- [18] Lizardi P M, Huang X, Zhu Z, et al. Mutation detection and single molecule counting using isothermal rolling circle amplification. Nat Genet, 1998, 19: 225~ 232
- [19] Zhou H, Bouwman K, Schotanus M, et al. Two color, rolling circle amplification on antibody microarrays for sensitive, multiplexed serum protein measurements. Genome Biology, 2004, 5: R28
- [20] Merchant M, Weinberger S R. Recent advancements in surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1164~ 1177
- [21] Hominger W, Reissigl A, Rogatsch H, et al. Prostate cancer screening in the Tyrol, Austria. Experience and Experiments, 2000, 36(10): 1322~ 1335
- [22] 肖雪媛, 卫秀平, 何大澄. 应用蛋白质芯片技术从血清中筛选肺癌标志蛋白. 中国科学 C 辑, 2003, 33(4): 323~ 328
- [23] Jin G, Zhao Z Y, Wang ZH, et al. IEEE Conference ISIK2000 Workshop on Biomedical Information Engineering. 2000 Istanbul Turkey: 173~ 140
- [24] McDonnell J M. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. Curr Opin Chem Biol, 2001, 5: 572~ 577
- [25] Moody M D, Van Andell S W, Murphy K P, et al. Array based ELISAs for high throughput analysis of human cytokines. BioTechniques, 2001, 31: 186~ 194
- [26] Schweitzer B, Roberts S, Grimwade B, et al. Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling circle amplification. Nat Biotechnol, 2002, 20: 359~ 365
- [27] 朱兰芸, 胡庚熙, 李芙蓉, 等. 多种肿瘤标志物蛋白质芯片在原发性肝癌检测中的应用. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(1): 74 ~ 76
- [28] Kraska R, Welzig E, Baumgartner S. Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. Anal Bioanal Chem, 2004, 378(1): 63 ~ 65
- [29] Robinson W H, DiGennaro C, Hueber W, et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. Nat Med, 2002, 8(3): 295~ 301
- [30] Miller J C, Zhou H, Kwekel J, et al. Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. Proteomics, 2003, 3: 56~ 63
- [31] Kraska R, Janotta M. Technology and applications of protein microarrays. Anal Bioanal Chem, 2004, 379: 338~ 340
- [32] Fang Y, Frutos A G, Lahiri J. G protein coupled receptor microarrays. Chem BioChem, 2002, 3: 987~ 991
- [33] MacBeath G, Schreiber S S. Printing proteins as microarrays for high throughput function determination. Science, 2000, 289: 1760~ 1763
- [34] Houseman B T, Huh J H, Kron S J, et al. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. Nature Biotechnol, 2002, 20: 270~ 274
- [35] Haab B B, Dunham M J, Brown P O. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. Genome Biol, 2001, 2(2): RESEARCH 0004.1~ 0004.13

(下转第 58 页)

Heparin Enhances the Expansion of Cord Blood Megakaryocyte Progenitor Cells *in vitro*

FENG Yi¹ FENG Si-zhou¹ ZHANG Lei¹ LIU Bin¹ FAN Cui-gang² REN He¹ HAN Zhong-chao

(1 Institute of Hematology, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China)

(2 The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract Objective: To explore the effect of heparin in the expansion of cord blood megakaryocyte progenitor cells *in vitro*. Methods: we added heparin to the TPO, IL-11 system to expand the megakaryocyte progenitor after selected CD34⁺ cells of cord blood, to calculate the expanded fold by CFU-MK analysis, to examine the specific CDs of megakaryocyte differentiation by FACS (CD41a⁺, CD61⁺, CD41a⁺CD61⁺, CD34⁺CD41a⁺), to mark the specific antibody (CD41a⁺) by histochemistry, to observe the ultrastructure of MK by Electron microscopy, to examine the megakaryocyte function by the activation *in vitro* and transplantation *in vivo*. Results: When TPO combined with IL-11, CFU-MK colony was 83.17 ± 39.41 fold at 7day and 205.06 ± 74.26 fold at 10day, The number of CD34⁺CD41a⁺ cells was expanded 10.51 ± 4.79 folds on day 7 by FACS, when heparin was added to the system at 0 day, the fold of CFU-MK colony was 108.25 ± 32.67 and 333.06 ± 27.54 at 7 or 10 day respectively, the number of CD34⁺CD41a⁺ cells was expanded 29.93 ± 6.39 fold, was significantly difference than that in TPO and IL-11 group ($p < 0.01$) and no significantly difference when heparin was added to at 5 day or 7 day; The megakaryocyte which been infused to the radiated NOD/SCID mice by expanding with TPO, rhIL-11, heparin 7 days *in vitro* would help mice recovery the platelet and white blood cell and raise the survival. Megakaryocyte had the normal function by activation *in vitro*. Conclusion: The fold was further raised when Heparin was added to the TPO and rhIL-11 expansion system and heparin may optimize the expansion system.

Key words CD34⁺ cells Megakaryocyte progenitor cell Expansion Heparin

(上接第 52 页)

Progress of Protein Chip Technology

LIU Kang-dong ZHAO Jiar-long

(Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 20005, China)

Abstract After the sequence of the Human Genome is completed, more and more attention focuses on proteome. As executor of biological activities, proteins are more complex than DNA, requiring more advance technology to unravel the structure and biological function of proteins. Protein chip as a new technology is established to investigate proteins in a massively parallel way, which develop rapidly and have promising future. Many new developments in manufacture, detection methods and applications of protein chip are reviewed here and existing problems of protein chip are discussed.

Key words Protein chip Proteome