

采用亲和层析结合制备凝胶电泳获得高纯度的重组抗原蛋白用于制备蛋白质芯片*

李江伟¹⁾ 冉宇靓²⁾ 李国惠³⁾ 胡海²⁾ 刘军²⁾

吕芳¹⁾ 苏幼红¹⁾ 孙立新²⁾ 杨治华^{2)**}

¹⁾新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046;

²⁾中国协和医科大学肿瘤研究所, 北京 100027; ³⁾基因有限公司北京分公司, 北京 100010

摘要 为了得到制备抗原芯片所需的高纯度重组抗原蛋白, 需要建立一套适合于多种重组抗原表达和纯化的技术路线. 采用了亲和层析结合制备凝胶电泳的方法, 对 16 种用于构建蛋白质芯片的食管癌相关抗原基因进行了克隆重组并在大肠杆菌中进行了表达. 对高表达的重组蛋白首先制备包涵体, 然后采用 Ni-Sepharose 亲和层析得到初步纯化的蛋白质, 最后使用 SDS-PAGE 制备凝胶电泳作进一步纯化. 经过透析复性后, 用于制备蛋白质芯片. 采用亲和层析纯化重组蛋白, 得率为 71%, 纯度约为 70%; 在 SDS-PAGE 制备凝胶电泳进一步纯化后, 得率为 32%, 纯度为 95%, 经过透析和复性后, 最终得率为 21%, 纯度为 95%. 得到的重组蛋白 RPS4 在 ELISA 检测中可以和血清中识别 RPS4 的自身抗体起反应, 并且, 采用精纯抗原制备的蛋白质芯片, 在检测抗原与抗体这一对反应中也具有较高的敏感性和特异性, 适合大规模血清抗体的检测. 研究表明, 采用亲和层析结合制备凝胶电泳纯化抗原蛋白, 是一条简便快捷, 适合需要量不大, 但对纯度要求比较高的蛋白质芯片制备的技术路线.

关键词 亲和层析, 制备电泳, 肿瘤抗原, 蛋白质芯片

学科分类号 Q784, R730.3

近年来, 越来越多的研究表明, 在肿瘤患者体内存在多种肿瘤相关抗原诱导的自身抗体^[1~3]. 我们通过对食管癌组织的 cDNA 文库进行筛选获得了多个食管癌相关的抗原分子, 采用这些抗原对一定数量的食管癌病例进行检测的结果表明^[4], 这些抗原对于食管癌血清中的自身抗体具有较高的敏感性, 提示这些抗原作为筛查食管癌病例的可能. 但目前采用的常规检测血清中抗体的方法主要有 ELISA、Western blot 等, 这些方法只能检测到单一种类的抗体, 无法用于多个分子标志物的大规模人群检测, 对于同时测定大量样本显得无能为力. 另外, 这些方法还存在敏感性不够, 以及所需样本量过多的缺点. 蛋白质芯片是最近几年发展起来的新技术, 具有高敏感性和高通量以及检测结果的线性范围宽等优点, 可以用于多种抗原的联合检测. 但是, 制作蛋白质芯片需要较高纯度的抗原蛋白, 并且需要同时对多种重组抗原蛋白进行表达和纯

化, 因此需要建立一套适合于多种重组抗原表达和纯化的技术路线, 在较短时间内获得高纯度的重组抗原蛋白用于制备蛋白质芯片.

在本研究中, 我们采用 Ni-NTA His- 结合的层析柱, 初步纯化带有 His 标签的重组表达蛋白, 然后采用制备级 SDS-PAGE 一步纯化获得纯度 > 90% 的重组抗原蛋白, 经过相同的复性和浓缩步骤后, 可得到毫克级的高纯度重组抗原蛋白. 采用亲和层析结合制备凝胶电泳技术可以不必对每种重组抗原的纯化进行条件优化, 非常适合需要量不大, 但对纯度要求比较高的蛋白质芯片的制作.

* “十五”国家科技攻关项目 (2004BA703B05) 及新疆大学博士启动基金 (BS050105) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-87788435, E-mail: yang-zhijia-prof@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-05, 接受日期: 2008-06-02

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种. 带(His)₆标签的原核表达载体 pET-30b⁽⁺⁾为 Novagen 公司产品(卡那霉素抗性).

E. coli DH-5 α 、*E. coli* BL-21(DE3)菌种由中国协和医科大学肿瘤研究所常规保存. DH-5 α 和 BL-21 (DE3)感受态菌由中国协和医科大学肿瘤研究所自制. 含有重组阳性克隆 pBK-CMV 质粒的 DH-5 α 菌种, 共 16 个, 由食管癌组织 cDNA 文库中筛选的阳性克隆质粒转化 DH-5 α 感受态菌获得, 参见文献[4].

1.1.2 血清. 食管癌患者血清标本采集于中国医学科学院协和医科大学肿瘤医院, 正常人血清来自该医院体检健康者. 血清均采集于患者治疗之前, 这些患者均在术后经病理证实. 所有血清采集后分装保存于-80 $^{\circ}$ C, 冻融次数不超过 2 次. 患者血清的采集和使用均征得患者的同意并按中国协和医科大学相关规定执行.

1.2 方法

1.2.1 抗原基因的克隆. 将保存的抗原克隆菌种扩增后, 按照 Promega 公司 DNA 提取试剂盒说明书提取克隆质粒 DNA. 以 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 回收酶切后的插入片段. 用 T4 DNA 连接酶将回收后的插入片段与经同样酶处理的 pET-30b⁽⁺⁾载体片段以 3:1 的摩尔比在 16 $^{\circ}$ C 的条件下连接过夜. 连接产物的转化子采用双脱氧链终止法于 ABI Prism DNA 自动测序仪进行核苷酸序列测定.

1.2.2 抗原基因的 *E. coli* 原核表达. 经测序鉴定序列正确的重组克隆子菌种扩大培养, 提取克隆质粒 DNA, 常规转化 BL21 菌. 分别挑取 BL21 空菌, 含有 pET-30b⁽⁺⁾空载体的 BL21 菌及多个转化有目的基因的 BL21 菌落分别接种于 2 ml 含有卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A₆₀₀ 约为 0.6, 取 1 ml 菌液 4 $^{\circ}$ C 保存. 在余下的菌液中加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 37 $^{\circ}$ C 分别连续振荡培养 3 h、4 h 和 5 h, 分别取诱导表达后的菌液 100 μ l, 12 000 g 离心 30 s, 吸弃上清, 收获沉淀. 进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色. 挑选表达量最高克隆菌种, 4 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.2.3 抗原蛋白的亲和层析初步纯化.

将筛选所得的表达菌种, 接种于 LB 培养基中, 按上述条件大量诱导表达, 4 $^{\circ}$ C 5 000 g 离心 20 min 收获菌液沉淀. 使用 1 \times PBS 洗涤 1 次, 然

后加入超声缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 2 mmol/L EDTA, 0.1 g/L 溶菌酶, 1 g/L Triton X-100). 冰浴中超声破碎细菌, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 30 min, 沉淀包涵体. PBS 洗涤包涵体 3 次. 称重包涵体, -20 $^{\circ}$ C 保存备用.

抗原蛋白的纯化基本按照 Ni-NTA His-Bind Resins 蛋白质纯化说明书进行. 每 100 mg 包涵体中加入 1 ml 6 mol/L 盐酸胍变性液(pH 8.0), 充分重悬后于室温下颠倒混合 30 min. 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 30 min, 收集上清备用. 同时, 取 1 ml Ni-NTA His-Bind Resins 于 5 ml 的重力柱中. 5 ml 去离子水洗涤 3 次, 除去乙醇保存液. 加入 2 ml 的 1 mol/L NiSO₄ 与柱料在室温下轻轻振荡结合 5 min. 然后用 5 ml 去离子水洗涤柱料 3 次, 去除未完全结合的 NiSO₄. 最后加入 3 ml 盐酸胍变性缓冲液平衡柱料. 然后将收集的上清加入到处理完毕的 Ni-NTA His-Bind Resins 中, 室温振荡结合 1 h. 用 5 ml pH 8.0 的脲素变性缓冲液洗涤柱料 2 次, 再用 5 ml pH 6.5 的脲素变性缓冲液洗涤柱料 2 次. 然后分别用 pH 5.9、pH 5.4、pH 4.5 的脲素变性缓冲液洗脱蛋白, 分管收集. 经 SDS-PAGE 鉴定纯度后, 合并纯度大于 70%的蛋白质液.

1.2.4 制备级 SDS-PAGE 对抗原蛋白的进一步纯化. 使用 SDS-PAGE 制备胶电泳分离经 Ni-NTA His-Bind Resins 纯化的抗原蛋白. 当指示剂距离凝胶前沿约 5 cm 时, 终止电泳. 用 0.1 mol/L 的 KCl 溶液对凝胶染色 5 min, 可见蛋白质带呈白色, 切下目的条带. 装入至已处理好的透析袋中. 将透析袋放入电洗脱槽内, 50 V 恒压洗脱过夜. 收集洗脱后的蛋白质液. 将洗脱后的蛋白质液置于 200 倍体积的 1 \times PBS 缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 透析复性, 每 6 h 换液 1 次, 共 4 次. 复性后的蛋白质液 4 $^{\circ}$ C 风吹浓缩. 收集复性后的蛋白质液, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 30 min, 将上清转移至新的 Eppendorf 管内, 4 $^{\circ}$ C 保存.

1.2.5 ELISA 检测血清抗体与重组抗原 RPS4 的反应. 以包被液稀释抗原至 1 mg/L, 在 96 孔酶标板中以 50 μ l/孔包被抗原, 4 $^{\circ}$ C 过夜. 次日, 经过含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗板后, 1% BSA 封闭过夜. 弃封闭液, 每孔加入 100 μ l 稀释至 1:100 的血清, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 h, 洗涤后, 加入过氧化物酶偶联的鼠抗人 IgG 二抗, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 h. 经过 0.05% Tween-20 的 PBS 充分洗涤后, 加入 TMB 显色底物, 37 $^{\circ}$ C 显色 30 min. 显色完成后加入硫酸中止反

应, 在酶标仪上测定各孔 A_{450} 的吸收值. 以 $A_{450} >$ 正常血清 A_{450} 平均值 $+3 \times S$ 判断为阳性反应^[5]. 所有样品均平行测定 2 次.

1.2.6 蛋白质芯片的制备. 抗原蛋白用 PBS 稀释至 1 g/L. 然后将一定比例的生物素化的 BSA 加入到每种抗原蛋白中, 最后加入终浓度为 0.05 % 的 Tween-20, 充分混匀后用于芯片的制备. 采用醛基化处理的玻璃片基来制作抗原芯片. 将上述步骤准备好的抗原蛋白转移到一个 384 孔的加样板中, 使用 Cartesian Pixsys 3000 接触式芯片点样仪, 在由聚苯乙烯塑料薄膜形成的孔内按 6×7 的蛋白质矩阵点样. 每个点约 20 nl, 直径 300 μm . 每个矩阵中包含有 16 个抗原蛋白(包括 RPS4)和 IgG 标准品、空载表达蛋白的阴性对照, 以及羊抗人 IgG. 每个样品重复点 2 次. 蛋白质与片基在点样仪的孵育室中室温孵育结合 4 h 以上. 芯片于 4°C 干燥保存.

1.2.7 抗原芯片对血清样品的检测. 在芯片的每孔内加入 20 μl 含有牛血清白蛋白的封闭液, 4°C 封闭过夜. 用 PBST 缓冲液洗涤 3 次, 在 37°C 再次封闭 1 h. 然后每孔内加入 Cy3 或者 Cy5 标记的链霉亲和素, 37°C 反应 1 h. PBST 缓冲液洗涤 3 次. 然后用含有牛血清白蛋白的稀释液 1:10 稀释被检血清, 取 20 μl 加在各孔的点样区, 37°C 保湿孵育 1 h. 用 PBST 洗涤芯片 3 次, 然后在与 Cy3-链霉亲和素反应后的孔内加入 1:200 稀释的羊抗人 IgG-Cy5 二抗, 而在与 Cy5-链霉亲和素反应后的孔内加入 1:200 稀释的羊抗人 IgM-Cy3 二抗, 37°C 孵育 1 h. PBST 洗涤 3 次, 最后 1 次用 PBS 洗涤. 然后于去离子水中浸泡 10 s. 片基室温干燥后以 532 nm 及 635 nm 波长在激光共聚焦芯片读片机上进行扫描, 用 genepix pro 4.0 软件对抗原点的荧光强度进行分析.

2 结 果

2.1 从 λ 噬菌体克隆中亚克隆获得 16 种抗原的基因片段

提取选择的 16 个阳性抗原克隆的质粒 DNA, 分别以 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后回收插入片段, 与经同样酶切回收的 pET30b⁽⁺⁾ 载体相连. 连接产物转化大肠杆菌 DH-5 α 后, 随机挑取 10 个菌落扩增培养, 碱裂解法提取质粒 DNA, 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切初步筛选出含有目的基因的阳性克隆菌株. 图 1 显示的是其中的 RPS4 (ribosomal protein S4) 重组克隆(786 bp)的酶切鉴定结果.

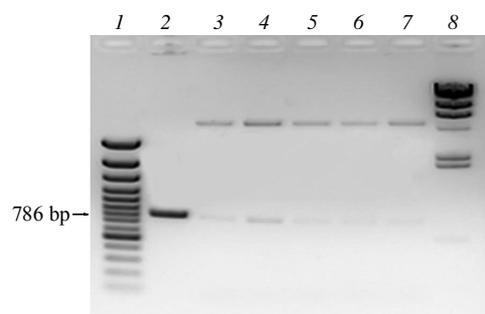


Fig. 1 The double digestion of RPS4-pET30b⁽⁺⁾ transformation of DH5 α with *EcoR* I and *Xho* I

1: DNA 100 bp ladder; 2: Inserts DNA fragment; 3~7: RPS4-pET-30b⁽⁺⁾ digested with *EcoR* I and *Xho* I; 8: λ DNA /*Hind* III marker.

2.2 抗原基因的原核表达

采用 1 mmol/L IPTG 对转化有抗原基因片段的 BL21 菌进行了诱导表达. 图 2 显示 RPS4 抗原克隆的诱导表达图. 其中 2、3 分别为未加 IPTG 诱导, 转化 RPS4-pET30b⁽⁺⁾ 的 BL21 菌和加 IPTG 诱导后, 含空载体 pET30b⁽⁺⁾ 的 BL21 菌表达对照. 4~10 是 IPTG 诱导不同时间 BL21 转化菌的表达图. 从图 2 中可以看出, 与未诱导和含空载体的 BL21 菌相比, 4~10 的重组克隆经诱导后在 19 ku 处均有一新的蛋白质条带, 即为重组表达的目的蛋白. 在不同的处理时间下, 诱导表达量没有显著差异, 因此选择了表达量较高的 5 h 诱导菌株作为最终表达的菌种. 16 个克隆均筛选到了较高表达目的基因的表达菌种.

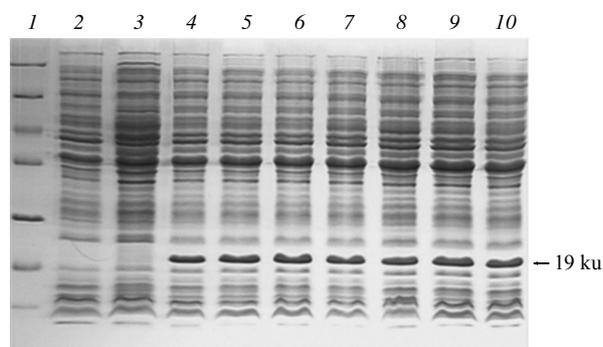


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant RPS4 fusion proteins expressed in the *E. coli* BL21(DE3)

1: Protein molecular mass marker; 2: Total protein of BL21 containing RPS4-pET30b⁽⁺⁾ without IPTG induction; 3: Total protein of BL21 containing pET30b⁽⁺⁾ with IPTG induction; 4~10: Total protein of BL21 containing RPS4 on 3 h, 4 h, and 5 h after induction with IPTG, respectively. IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactoside.

2.3 重组抗原的纯化和复性

为了避免对每一种表达的重组抗原都进行纯化条件的优化, 我们在此采用了一条简捷的纯化路线, 即首先制备包涵体, 然后采用 Ni-NTA His-Bind Resins 初步纯化、进而直接在制备 SDS-PAGE 中精纯。结果, 在表达的 16 种抗原中, 大部分抗原的纯化(13 种)在 Ni-NTA His-Bind Resins 初纯时, 纯度仅有 70%~80%, 不能满足制备蛋白质芯片的要求。而通过制备 SDS-PAGE 后, 全部 16 种抗原蛋白的纯度都达到了 90%以上。图 3 是其中的 RPS4 抗原蛋白的纯化结果, 由于篇幅所限, 这里仅以 RPS4 抗原蛋白的纯化结果为示例。

采用亲和层析结合制备凝胶电泳, 从 1 L 细菌培养液中, 可以得到 RPS4 抗原蛋白包涵体 380 mg, 经过 Ni²⁺ 亲和层析得到初步纯化的 RPS4 抗原蛋白 270 mg, 经过制备电泳得到精纯的 RPS4 抗原蛋白 120 mg, 最后经过透析和复性后, 得到 80 mg, 最终得率为 21%, 结果见表 1。

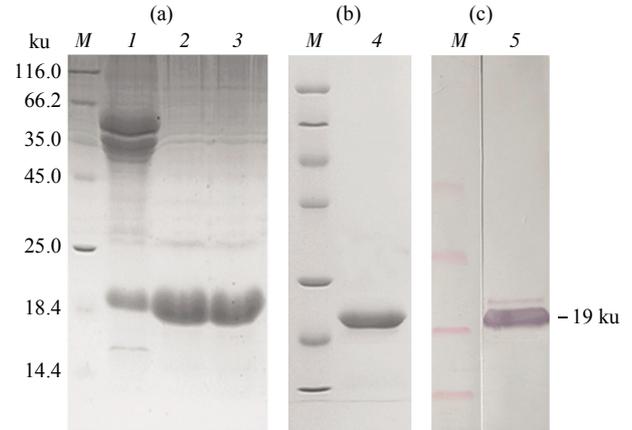


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified recombinant RPS4 fusion proteins expressed in the *E. coli* BL21(DE3)

(a) Purification of recombinant RPS4 fusion proteins with Ni-NTA His-Bind Resins affinity chromatography. M: Protein molecular mass marker; I: Inclusion body of RPS4 fusion proteins; 2,3: Eluted purified protein of RPS4 after induction with IPTG from Ni-NTA His-Bind Resins at pH 4.5. (b) Purification of recombinant RPS4 fusion proteins with preparation scaled SDS-PAGE. 4: Recovered purified and folded protein of RPS4 from SDS-PAGE. (c) Western blot of gel purified protein of RPS4 by anti-His mAb. Indicated at 5.

Table 1 Approximately yield of total and target proteins after purification with affinity chromatography and preparation scaled SDS-PAGE (from 1 L *E. coli* culture)

Purification step ¹⁾	Total protein/mg ²⁾	Total RPS4/mg ²⁾	Yield /%	Approximate purity/%
Inclusion body of fusion proteins	380	ND	100	ND
Ni ²⁺ Sepharose	380	270	71	~ 70
Preparation scaled SDS-PAGE	270	120	32	~ 95
Dialysis and folding	120	80	31	~ 95

¹⁾The purification start from 1 L bacteria culture and induced following the method described in the text.

²⁾Protein concentration was determined using Bradford's method. ND, not determined.

2.4 重组抗原 RPS4 可以识别阳性血清中的抗 RPS4 抗体

为了考察采用本文中纯化路线获得的重组抗原蛋白能否与食管癌患者血清肿瘤抗原相关的自身抗体起反应, 选择了在文库筛选时, 已被证实与 RPS4 抗原克隆反应的 4 例食管癌患者血清和与 RPS4 抗原克隆反应的 6 例食管癌患者血清, 以及 10 例健康对照血清对 RPS4 进行了 ELISA 检测。10 例健康人血清(control) A_{450} 均值为 0.306, s 值为 0.065, 因此, RPS4 与食管癌患者血清(ECS)反应的阳性判定值(cutoff)=健康血清 $A_{450} + 3 \times s = 0.501$ 。ELISA 结果见图 4, 结果表明, 重组抗原 RPS4 与这 4 例食管癌患者血清的反应均为阳性, 而与其他血清以及健康对照血清反应为阴性。

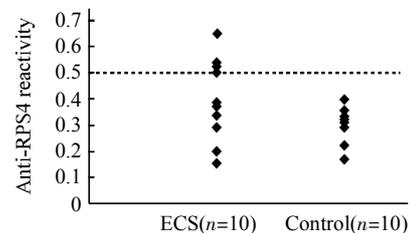


Fig. 4 Anti-RPS4 antibody reaction in sera between esophageal cancer patients and healthy control with ELISA
ECS: Sera in esophageal cancer patient; Control: Control sera of healthy people, n is the number of sera sample tested in ELISA. The dashed line in the figure is the cutoff value of the positive reaction.

2.5 抗原蛋白芯片对血清抗体的检测

抗原芯片经过与血清孵育和分别与 Cy-5 标记

的抗人 IgG 和 Cy-3 标记的抗人 IgM 反应后, 分别在 635 nm 和 532 nm 下扫描, 其中 635 nm 代表了 IgG 的荧光信号, 532 nm 代表了 IgM 的荧光信号. 为了与 ELISA 结果比较, 采用 ELISA 检测中所用的 10 例食管癌患者和 10 例正常人血清对蛋白质芯片与血清抗体的反应进行了检测. 结果, RPS4 抗原在芯片中与血清抗体的反应与 ELISA 中的结果相同, 即只与已知的 4 例食管癌患者血清反应, 而不与 10 例健康人血清和其他 6 例患者血清反应, 表现出很高的特异性和一致性. 图 5 是蛋白质芯片与一例正常人对照血清(a)及一例食管癌患者血清(b)反应的荧光信号扫描代表图. 从图 5 中可以看出, 采用纯化的抗原制作的蛋白质芯片在检测抗原与抗体这一对反应中具有较高的敏感性和特异性, 且背景无干扰信号, 各点之间荧光信号稳定, 无交叉反应, 完全可以用于大规模的血清抗体检测.

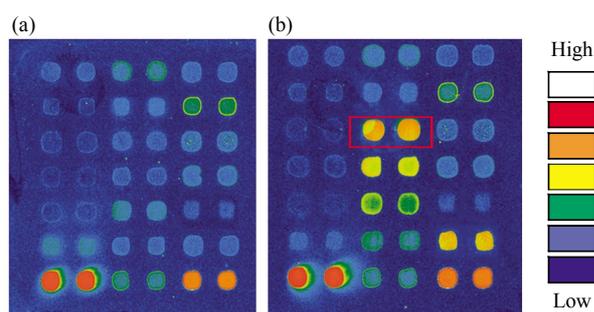


Fig. 5 The fluorescent signal of sera antigen-antibody reaction in proteinchip after reaction between esophageal cancer patients(b) and healthy controls(a)

The fluorescent signal at the lowest lane in the chip represent the IgG reaction signal (the left two dots) and anti-IgG signals (the right two dots) respectively. The dots in the frame represent positive reaction of RPS4 against esophageal cancer patients sera. The color in the chip from deep blue, blue, green, yellow, brown, red and white represent the increased signal intensity. The color bar at the right of figure is a schematic representation of fluorescent signal intensity from upper high to down low.

3 讨 论

本文采用亲和层析结合制备凝胶电泳技术, 获得了高纯度的重组抗原蛋白, 并且采用这些蛋白质制备了用于检测肿瘤患者血清抗体的蛋白质芯片. 结果表明, 纯化的重组蛋白与血清中的肿瘤自身抗体可以很好地结合, 并且芯片中的抗原蛋白与血清中的抗体蛋白无交叉反应, 获得的荧光信号

良好, 适合蛋白质芯片的制备.

近年来, 蛋白质芯片技术正在被越来越多地应用于血清中抗原抗体的免疫学诊断中, 如 Mezzasoma 等^[6,7]采用 5 种微生物抗原制作的蛋白质芯片用于病原菌感染的诊断, Robinson^[8]和 Feng^[9]等采用抗原蛋白质芯片对自发免疫疾病的诊断. 而在肿瘤血清学诊断中, 人们也逐渐意识到, 采用单一或少数几个抗原对肿瘤患者的血清诊断敏感性低, 没有实际应用价值, 而以蛋白质芯片为主的高通量检测技术正在被愈来愈多的研究和临床试验所采纳. 但如何同时获得高纯度的抗原蛋白是制约蛋白质芯片应用的一个瓶颈. 蛋白质芯片中往往含有多种抗原, 如 Haab 等^[10]构建的蛋白质芯片包含 115 个蛋白质, 由于不同的抗原蛋白在表达和纯化过程中, 需要分别进行条件的优化, 以获得高表达、高纯度以及正确折叠的抗原蛋白, 这一过程往往费时费力. 尤其是在构建高密度芯片时, 对每个重组抗原都进行表达和纯化条件的优化是不现实的. 因此, 探索一条适合大多数重组蛋白表达纯化的技术路线对于制备蛋白质芯片具有重要意义. 传统上, 在对原核表达的融合蛋白进行诱导表达时, 为了获得折叠正确的蛋白质, 人们往往以可溶性的方式进行诱导表达. 但这会造成表达量的低下, 再经过进一步的纯化步骤后, 往往最终纯化的重组蛋白得率很低. 然而, 如果以包涵体的形式表达, 虽然可以得到大量的表达蛋白, 但在随后的复性过程中, 最终纯化的蛋白质也会有不小的损失. 所以, 采用何种方式进行诱导表达, 主要取决于抗原蛋白的应用目的. 作为制备蛋白质芯片的重组抗原, 其需要量并不是很高, 但其纯度却要求较高. 因此, 为了获得高纯度的重组抗原, 我们在本研究中, 采用了一条比较简便, 却被证明是可行的诱导表达和纯化路线. 这就是, 首先对所有需要表达的抗原基因在最佳条件下经 IPTG 诱导大量获得包涵体, 这避免了为得到可溶性表达蛋白而采取的对每种蛋白质表达条件的优化; 然后溶解包涵体, 根据融合蛋白所带标签的不同, 选择不同的亲和纯化方式, 本文融合蛋白均含 (His)₆ 标签, 因此采用 Ni²⁺-Sepharose 亲和层析进行初步纯化. 一般单纯经过亲和层析得到的目的蛋白纯度往往不是很高, 本文中, 经过 Ni²⁺-Sepharose 亲和层析得到 RPS4 重组蛋白纯度仅为 70%, 因此进一步纯化是必需的. 对于蛋白质的精纯, 有多种方法可选, 常用的如分子排阻层析、离子交换层析和疏水层析等, 但

这些方法对每种蛋白质纯化的最佳条件都需要经过优化后确定, 因此也不适合多种蛋白质的同时纯化。为此, 本研究中在精纯步骤中采用了制备级的 SDS- 凝胶电泳, 一步获得纯度约为 90% 的抗原蛋白。采用该技术的优点是无需对每种蛋白质的精纯步骤进行优化, 可以采用同一条件对所有获得的初纯蛋白质进行进一步纯化, 最后再经过透析和复性。所获得的抗原在 ELISA 检测中, 可以与该抗原自身抗体阳性的食管癌患者血清反应, 而不与正常人血清反应, 说明采用本文中的纯化步骤获得的抗原能够很好地与被检抗体起反应, 完全能够用于构建蛋白质芯片, 对大规模患者血清的抗原抗体检测。当然, 本研究采用的重组抗原的表达纯化路线也有一定局限性, 主要表现在采用该路线获得的重组蛋白的最终得率偏低, 这主要是因为复性过程中的较大损失造成的。因此, 欲获得大量纯化蛋白质时, 该方法并不适用。不过考虑到某些情况下对纯度的要求更高时, 如制备蛋白质芯片时, 采用该技术路线可以快速同时获得多种所需高纯度蛋白质, 因此, 该技术路线还是有一定的应用和实际意义的。

参 考 文 献

- 1 Fernandez-Madrid F, Tang N, Alansari H, *et al.* Autoantibodies to annexin XI-A and other autoantigens in the diagnosis of breast cancer. *Cancer Res*, 2004, **64**(15): 5089~5096
- 2 Tang R, Ko M C, Wang J Y, *et al.* Humoral response to p53 in human colorectal tumors: a prospective study of 1 209 patients. *Int J Cancer*, 2001, **94**(6): 859~863
- 3 Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, *et al.* Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature Med*, 1995, **1**(7): 701~702
- 4 遇 珑, 胡 海, 冉宇靓, 等. SEREX 技术筛选及鉴定食管癌肿瘤抗原. *癌症*, 2007, **26**(1): 100~105
Yu L, Hu H, Ran Y L, *et al.* *Chin J Cancer*, 2007, **26**(1): 100~105
- 5 Zhang J Y, Casiano C A, Peng X X, *et al.* Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, **12**(2): 136~143
- 6 Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Di Cristina M, *et al.* Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin Chem*, 2002, **48**(1): 121~130
- 7 Bacarese-Hamilton T, Mezzasoma L, Ardizzoni A, *et al.* Serodiagnosis of infectious diseases with antigen microarrays. *J Appl Microbiol*, 2004, **96**(1): 10~17
- 8 Robinson W H, DiGennaro C, Hueber W, *et al.* Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med*, 2002, **8**(3): 295~301
- 9 Feng X, Ke R, Ma Y, *et al.* Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases. *Clin Chem*, 2004, **50**(2): 416~422
- 10 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**(1): 1~13

Efficient Purification of Tumor Antigen Proteins by Affinity Chromatograph and Prepared Gel Electrophoresis for Construction of Tumor Antigen Microarray*

LI Jiang-Wei¹⁾, RAN Yu-Liang²⁾, LI Guo-Hui³⁾, HU Hai²⁾, LIU Jun²⁾, LÜ Fang¹⁾,

SU You-Hong¹⁾, SUN Li-Xin²⁾, YANG Zhi-Hua^{2)**}

¹⁾College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;

²⁾Cancer Institute, Peking Union Medical College, Beijing 100027, China; ³⁾Gene Company Limited Beijing Branch, Beijing 100010, China)

Abstract A paralleled purification procedure suitable for acquiring high purified multiple recombinant antigen proteins should be established for construction of antigen protein microarray. An efficient approach for purification of tumor antigen proteins by affinity chromatograph and prepared gel electrophoresis for construction of tumor antigen microarray was established and evaluated. In the procedure, the inclusion bodies were prepared firstly. Then, a Ni-NTA His-bind resins was applied to all dissolved inclusions. The yield and purity of the affinity purified step were 71% and 70% respectively. After the initiative affinity chromatograph purification, the eluted purified recombinant antigen proteins were runned on the prepared scaled SDS-PAGE, and the purified recombinant antigen protein bands were indicated by KCl solution and cutted out. Furthermore, a common dialysis and refolding procedure were applied to the electro-eluted purified recombinant antigen protein solutions. The yield and purity of this further purified step were 32% and 95% respectively. Furthermore, the reaction of purified recombinant RPS4 antigen against the anti-RPS4 autoantibody in esophageal cancer patients' sera was confirmed by ELISA. The 16 purified antigen proteins were pin-printed on the aldehyde glass slides for construction a protein microarray. The reaction of the RPS4 antigen in the microarray against the anti-RPS4 autoantibody in esophageal cancer patients' sera was the same as that assayed in ELISA. The research suggests that affinity chromatograph combining prepared gel electrophoresis was an efficient paralleled purification approach for tumor antigens in construction of microarray.

Key words prepared gel electrophoresis, affinity chromatograph, tumor antigen, protein microarray

*This work was supported by grants from National Key Science and Technology Projects (2004BA703B05) and Scientific Research Foundation for Doctor Degree Winner in Xinjiang University(BS050105).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-87788435, E-mail: yang-zhijia-prof@yahoo.com.cn

Received: April 6, 2008 Accepted: June 2, 2008