

论著·基础研究

# 腺苷脱氨酶三种原核表达载体的构建及蛋白表达<sup>\*</sup>

韩丽乔,张 露,林海标,黄小亭,吴新忠,黄宪章,庄俊华<sup>△</sup>

(广州中医药大学第二附属医院,广东广州 510120)

**摘 要:****目的** 利用分子克隆技术表达腺苷脱氨酶蛋白。**方法** 从人白细胞中提取总 RNA,逆转录为 cDNA,再以其为模板,采用聚合酶链式反应(PCR)技术扩增腺苷脱氨酶基因,然后将目的基因连接到 3 种原核质粒 pET-28b、pET-32a(+)和 pHSIE 中,再将测序完全正确的克隆质粒用 CaCl<sub>2</sub> 法转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中进行蛋白表达,并筛选最优表达条件,经 Western-blot 和 SDS-PAGE 鉴定蛋白表达情况。**结果** 3 种质粒载体携带的目的基因 DNA 测序结果证实其很好地连接入载体质粒,表达的 ADA 蛋白经 Western-blot 和 SDS-PAGE 鉴定符合,最优表达条件为诱导剂 IPTG 浓度 0.4 mmol/L,表达温度为 16 ℃,表达时间为 24 h。**结论** 该实验成功构建了腺苷脱氨酶的 3 个原核载体(BL21+pET-28b+ADA,BL21+pET-32a+ADA,BL21+pHSIE+ADA),且 3 个载体均成功高效表达了腺苷脱氨酶蛋白。

**关键词:**腺苷脱氨酶; ADA; 原核载体; pET-28b; pET-32a; pHSIE; 蛋白表达

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.03.007 **中图法分类号:**R34

**文章编号:**1673-4130(2019)03-0281-05 **文献标识码:**A

## A study to construct three prokaryotic expression vectors and its expression in adenosine deaminase<sup>\*</sup>

HAN Liqiao,ZHANG Lu,LIN Haibiao,HUANG Xiaoting,WU Xinzhong,

HUANG Xianzhang,ZHUANG Junhua<sup>△</sup>

(The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine,Guangzhou,Guangdong 510120,China)

**Abstract: Objective** To express adenosine deaminase protein by molecular cloning technique. **Methods** Total RNA was extracted from human leukocytes and the cDNA was obtained by reverse transcription. Whereupon the cDNA was used as a template to amplify adenosine deaminase gene by polymerase chain reaction (PCR) and then integrated it into three prokaryotic plasmids pET-28b, pET-32a(+) and pHSIE. The plasmid with the correct sequencing was transformed into E. coli BL21 (DE3) by CaCl<sub>2</sub> method for the protein expression. The expression activity of these fusion proteins were detected by Western-blot and SDS-PAGE, with the optimized expression conditions. **Results** Complete fusion of target gene and three prokaryotic plasmids was observed through sequencing. The expressed and accurate ADA protein was identified by Western-blot and SDS-PAGE. The optimal expression conditions were observed: the protein expression would be induced with 0.4 mmol/L IPTG and incubated at 16 ℃ for 24 hours. **Conclusion** The prokaryotic vectors of adenosine deaminase (BL21+pET-28b+ADA, BL21+pET-32a+ADA, BL21+pHSIE+ADA) were successfully constructed and efficiently expressed.

**Key words:**adenosine deaminase; ADA; prokaryotic vector; pET-28b; pET-32a; pHSIE; protein expression

腺苷脱氨酶(ADA)是机体一种重要的核酸代谢关键酶,在体内催化腺嘌呤核苷(脱氧腺嘌呤核苷)不可逆的脱氨,最终生成尿酸的反应<sup>[1]</sup>。ADA 还可参与机体的免疫应答,诱导 T 细胞依赖的单核细胞分化

为巨噬细胞并刺激其增殖,缺乏将导致重症联合免疫缺陷等<sup>[2-3]</sup>。ADA 在临床多种疾病的诊断和鉴别诊断中具有重要应用价值,如结核性、化脓性、病毒性胸腹水、脑脊液的鉴别诊断等<sup>[4-8]</sup>。因此,腺苷脱氨酶的

<sup>\*</sup> 基金项目:国家自然科学基金青年基金(81601861);中国博士后科学基金(2016M602452);广东省中医院院内专项(2016KT1435)。

作者简介:韩丽乔,女,博士后,主要从事临床生化检验检测标准化研究。 <sup>△</sup> 通信作者,E-mail:zjh2208@163.com。

本文引用格式:韩丽乔,张露,林海标,等.腺苷脱氨酶三种原核表达载体的构建及蛋白表达[J].国际检验医学杂志,2019,40(3):281-284.

准确定量在临床检验中较为重要。目前关于酶的定量都是基于酶在单位时间内催化  $1\ \mu\text{mol}$  底物的转化速率来评估其活性,但影响其测量因素较多,如检测温度、底物浓度、反应体系 pH 等,而且目前国内尚无 ADA 的参考物质,国外 BOTA 等<sup>[9]</sup>报道的参考物质从红细胞中提取获得,需要耗费大量的原材料,且过程复杂,价格昂贵,因此本课题组利用成熟的分子生物学技术,同时构建了 3 种 ADA 原核载体(pET-28b + ADA, pET-32a + ADA, pHSIE + ADA)分别在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行腺苷脱氨酶蛋白的诱导表达,选择最优,进而用于 ADA 参考物质的研究。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 逆转录试剂盒(Fermentas 公司),质粒小提试剂盒(北京康为世纪公司),DNA 回收试剂盒(OMEGA 公司),KOD-Plus 高保真聚合酶试剂盒(TOYOBO 公司),限制性内切酶 Ecor 1、Nco1、Xho1、Hind III 及 T4 DNA 连接酶(Takara 公司),氨苄霉素、卡那霉素(北京鼎国),IPTG、 $\text{CaCl}_2$ 、Tris、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、KCl、NaCl、EDTA、硼酸(sigma),酵母提取物和胰蛋白胨(OXOID 公司),琼脂粉(上海生工),琼脂糖(invitrogen 公司),以及 Western-blot 相关试剂及设备(Bio-Rad)。3 种原核质粒分别是 pET-28b, pHSIE 和 pET-32a,前两种由清华大学深圳研究生院生命科学院馈赠, pET-32a、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  克隆菌株和 BL21(DE3)表达菌株,为本实验室保存。

## 1.2 方法

**1.2.1 目的基因序列获取与引物合成** 从 pubmed 基因库查得人腺苷脱氨酶基因序列[*Homo sapiens adenosine deaminase (ADA), mRNA*]<sup>[10]</sup>。根据目的基因和 3 种原核克隆载体(pET-28b, pET-32a, pHSIE)的序列及插入位点信息,每个载体合成一对引物,分别为:P1:5'-CCA TGG CCC AGA CGC CCG CCT TCG AC -3' (Nco1 酶切位点) P2:5'- CTC GAG GAG GTT CTG CCC TGC AGA -3' (Xho I 酶切位点); P1:5'- GAA TTC GCC CAG ACG CCC GCC TTC GAC -3' (Ecor 1 酶切位点) P2:5'- AAG CTT TCA GAG GTT CTG CCC TGC AGA -3' (Hind III 酶切位点); P1:5'- GAA TTC GCC CAG ACG CCC GCC TTC GAC -3' (Ecor 1 酶切位点) P2:5'- AAG CTT TCA GAG GTT CTG CCC TGC AGA -3' (Hind III 酶切位点),加粗部分为内切酶序列,引物由 Invitrogen 公司合成。

**1.2.2 基因提取及目的基因扩增** 用 Trizol 方法从健康成年人的白细胞中提取总 mRNA,进一步逆转录合成 cDNA。再以 cDNA 为模板,分别大量扩增设有

不同内切酶位点的目的基因,聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定扩增结果并分别切胶回收,纯化 PCR 产物并用紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度。

**1.2.3 目的基因和质粒的剪接** 分别将目的基因和空载质粒于内切酶的酶切条件下水浴双酶切,经凝胶电泳鉴定后切胶回收。将酶切好的目的基因和 3 种质粒分别用 T4 连接酶于  $16\ ^\circ\text{C}$  过夜连接。

**1.2.4 构建重组克隆载体并进行阳性菌落鉴定** 用  $\text{CaCl}_2$  法制备 DH5 $\alpha$  感受态,将重组质粒加入含有 DH5 $\alpha$  感受态的溶液中,于冰上 30 min,随后  $42\ ^\circ\text{C}$  水浴锅中准确热击 90 s,立即于冰上 2 min,再加入  $37\ ^\circ\text{C}$  预热的无抗菌药物的 LB 培养基,于  $37\ ^\circ\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养约 1 h,均匀涂于含抗菌药物的 LB 培养皿中,倒置于  $37\ ^\circ\text{C}$ ,培养过夜。根据各自抗性,筛选阳性克隆菌,并进行菌落 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定阳性单菌落接种于含相应抗菌药物的 LB 培养基,  $37\ ^\circ\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养过夜,进行小量扩增。第二天提取质粒,将质粒溶液收集到离心管中,取少量进行酶切验证。

**1.2.5 构建重组表达载体** 将酶切验证阳性的克隆质粒(pET-28b + ADA, pET-32a + ADA, pHSIE + ADA)分别转化入 BL21(DE3)表达菌,抗菌药物初步筛选,挑取阳性菌落培养扩增后送测序鉴定。

**1.2.6 目的蛋白诱导表达及鉴定** 将测序正确的阳性克隆菌株  $5\ \mu\text{L}$  接种到含相应抗菌药物的 LB 培养基 5 mL 中,  $37\ ^\circ\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养过夜。培养过夜的阳性克隆菌株 1 mL 接种到含相应抗菌药物的 99 mL LB 培养基中,培养 2.0~2.5 h,至  $\text{OD}_{600} = 0.6\sim 0.8$ ,加入不同浓度 IPTG (0.4、0.8、1.0 mmol/L),分别于诱导 0、3、6、12、24 h 后取样,加入 SDS 蛋白电泳上样缓冲液,煮沸 10 min,使蛋白充分变性后于  $-80\ ^\circ\text{C}$  冻存待测。Western-blot 或 SDS-PAGE 对蛋白进行定性和半定量分析。

**1.2.7 目的蛋白活性初步鉴定** 按照筛选的 ADA 蛋白表达条件,小量表达目的蛋白。将表达菌液、菌液超声破坏菌体后液体,在罗氏生化分析仪初步检测目的蛋白的活性。

## 2 结果

**2.1 目的基因扩增结果** 目的基因(约 1 100 bp)扩增后分别经琼脂糖凝胶电泳检测,在 1 000 bp 上方有清晰条带,与预期相符,见图 1A、B。

**2.2 阳性克隆菌落鉴定结果** 挑选不同载体的阳性菌落,进行菌落 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳结果显示,在 1 000 bp 上方有明显清晰条带,与目的条带(1 100 bp)相符,见图 2。

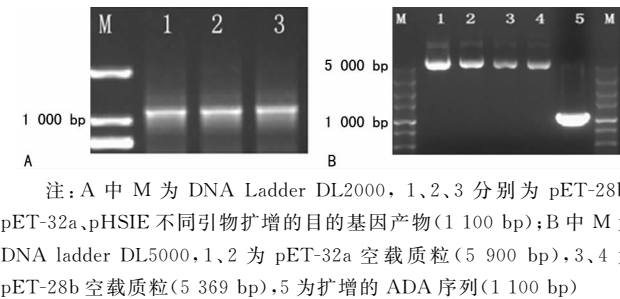
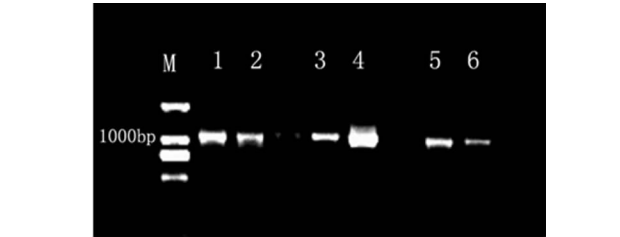


图 1 腺苷脱氨酶 PCR 扩增基因序列及空载质粒电泳图



注: M 为 DNA Ladder DL2000, 1、2 为 DH5α + pET-28b + ADA 菌落扩增结果, 3、4 为 DH5α + pET-32a + ADA 扩增结果, 5、6 为 DH5α + pHSIE + ADA 菌落扩增结果

图 2 阳性菌落 PCR 扩增 ADA 基因序列

(A) 人源ADA, mRNA  
序列 ID: ref|NM\_000022.2| 长度: 1566, 匹配数: 1  
范围: 126 到 1217 基因库图谱

| 分值           | 随机搜索概率                                                      | 匹配率             | 断裂         | 互补链匹配     |
|--------------|-------------------------------------------------------------|-----------------|------------|-----------|
| 2017 位(1092) | 0.0                                                         | 1092/1092(100%) | 0/1092(0%) | Plus/Plus |
| Query 60     | ACCATGGCCAGACGCCCGCTTCGACAAGCCAAAGTAGAACTGCATGTCCACCTAGAC   |                 |            | 119       |
| Sbjct 126    | ACCATGGCCAGACGCCCGCTTCGACAAGCCAAAGTAGAACTGCATGTCCACCTAGAC   |                 |            | 185       |
| Query 120    | GGATCCATCAAGCCTGAACCATCTTATCTACTATGCGAGGAGGAGGGATCGCCCTCCCA |                 |            | 179       |
| Sbjct 186    | GGATCCATCAAGCCTGAACCATCTTATCTACTATGCGAGGAGGAGGGATCGCCCTCCCA |                 |            | 245       |
| Query 180    | GCTAACACGACGAGGGGCTGCTGAACGTCATTGGCATGGACAAGCCGCTCAACCTTCCA |                 |            | 239       |
| Sbjct 246    | GCTAACACGACGAGGGGCTGCTGAACGTCATTGGCATGGACAAGCCGCTCAACCTTCCA |                 |            | 305       |

(B) 人源ADA, mRNA  
序列 ID: ref|NM\_000022.2| 长度: 1566, 匹配数: 1  
范围: 132 到 1221 基因库图谱

| 分值              | 随机搜索概率                                                       | 匹配率             | 断裂         | 互补链匹配     |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----------------|------------|-----------|
| 2013 bits(1090) | 0.0                                                          | 1090/1090(100%) | 0/1090(0%) | Plus/Plus |
| Query 564       | GCCCGAGCGCCGCTTCGACAAGCCAAAGTAGAACTGCATGTCCACCTAGACGGATCC    |                 |            | 623       |
| Sbjct 132       | GCCCGAGCGCCGCTTCGACAAGCCAAAGTAGAACTGCATGTCCACCTAGACGGATCC    |                 |            | 191       |
| Query 624       | ATCAAGCCTGAACCATCTTATCTACTATGCGAGGAGGAGGGATCGCCCTCCAGCTAAC   |                 |            | 683       |
| Sbjct 192       | ATCAAGCCTGAACCATCTTATCTACTATGCGAGGAGGAGGGATCGCCCTCCAGCTAAC   |                 |            | 251       |
| Query 684       | ACAGCAGAGGGGCTGCTGAACGTCATTGGCATGGACAAGCCGCTCAACCTTCCAGATTTC |                 |            | 743       |
| Sbjct 252       | ACAGCAGAGGGGCTGCTGAACGTCATTGGCATGGACAAGCCGCTCAACCTTCCAGATTTC |                 |            | 311       |

(C) 人源ADA, mRNA  
序列 ID: ref|NM\_000022.2| 长度: 1566, 匹配数: 1  
范围: 132 到 1218 基因库图谱

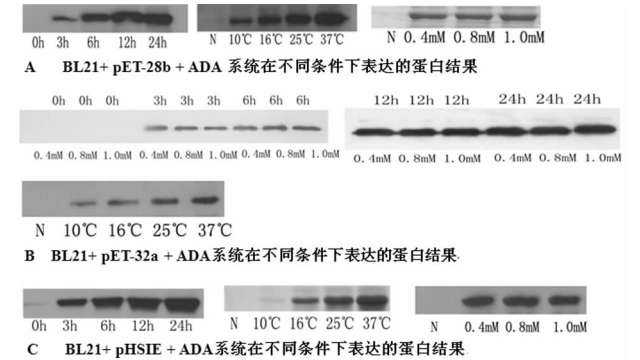
| 分值             | 随机搜索概率                                                       | 匹配率             | 断裂         | 互补链匹配     |
|----------------|--------------------------------------------------------------|-----------------|------------|-----------|
| 2008 bit(1087) | 0.0                                                          | 1087/1087(100%) | 0/1087(0%) | Plus/Plus |
| Query 330      | GCCCGAGCGCCGCTTCGACAAGCCAAAGTAGAACTGCATGTCCACCTAGACGGATCC    |                 |            | 389       |
| Sbjct 132      | GCCCGAGCGCCGCTTCGACAAGCCAAAGTAGAACTGCATGTCCACCTAGACGGATCC    |                 |            | 191       |
| Query 390      | ATCAAGCCTGAACCATCTTATCTACTATGCGAGGAGGAGGGATCGCCCTCCAGCTAAC   |                 |            | 449       |
| Sbjct 192      | ATCAAGCCTGAACCATCTTATCTACTATGCGAGGAGGAGGGATCGCCCTCCAGCTAAC   |                 |            | 251       |
| Query 450      | ACAGCAGAGGGGCTGCTGAACGTCATTGGCATGGACAAGCCGCTCAACCTTCCAGATTTC |                 |            | 509       |
| Sbjct 252      | ACAGCAGAGGGGCTGCTGAACGTCATTGGCATGGACAAGCCGCTCAACCTTCCAGATTTC |                 |            | 311       |

注: A 表达菌落 BL21 提取的 pET-28b + ADA 测序结果比对部分图; B 表达菌落 BL21 提取的 pET-32a + ADA 测序结果部分图; C 表达菌落 BL21 提取的 pHSIE + ADA 测序结果部分图

图 3 阳性表达菌落测序比对结果(部分)图

2.3 阳性表达菌落测序结果 挑选 BL21 + pET-28b + ADA, BL21 + pET-32a + ADA, BL21 + pHSIE + ADA 阳性菌落少量培养后提取质粒, 送 Invitrogen 公司测序。测序结果与 NCBI 网站基因信息比对, 结果显示, 3 种融合质粒中 ADA 编码序列全部完整无突变(比对结果 Identities 100%, Gaps 0%), 见图 3。

2.4 3 种载体蛋白的表达及条件优化 3 个表达系统分别在不同的表达时间(3、6、12、24 h), 表达温度(10、16、25、37 °C)和诱导剂浓度(IPTG: 0.4、0.8、1.0 mmol/L)下进行蛋白表达, 通过 Western-blot 定性及 PAGE 半定量, 选择各载体最优表达条件。结果见图 4。



注: N 为阴性对照  
图 4 3 种原核表达载体在不同条件下的蛋白表达

结果显示, 随诱导时间和诱导温度的增加, 3 种原核表达系统的蛋白表达量增多, 考虑到时间成本和原核载体在较高温度下容易形成包涵体等问题, 最终采取的表达温度为 16 °C, 诱导蛋白表达 24 h。诱导剂 IPTG 的浓度 0.4、0.8、1.0 mmol/L 诱导蛋白表达量相差不大, 所以最终选择 IPTG 的诱导浓度为 0.4 mmol/L。

2.5 目的蛋白活性初步鉴定结果 经检测, 菌液中 ADA 活性较低, 菌液超声破碎后 ADA 活性较高, 具体数据见表 1。

| 表 1 超声前后菌液的 ADA 活性(U/L) |     |     |
|-------------------------|-----|-----|
| 菌液                      | 超声前 | 超声后 |
| BL21                    | 5   | 46  |
| BL21+ pET-28b + ADA     | 24  | 304 |
| BL21+ pET-32a + ADA     | 32  | 385 |
| BL21+ pHSIE + ADA       | 38  | 319 |

3 讨 论

参考物质从 1906 年美国标准局(现为国家标准技术研究院, NIST)制备和颁布了第一批冶金参考物质以来经历了 100 多年的发展, 在化学、生物、工程、物理等领域都发挥了巨大的作用, 我国自 1994 年以

来参照国际标准和相关导则也逐步制定了自己的标准和技术规范<sup>[11]</sup>,经过 20 多年的发展,我国已研制了千余种参考物质,虽然参考物质的研究取得了很大的成效,但其种类数量还远远不能满足各个领域的需要,参考物质研制的任务依然艰巨。目前国内尚无 ADA 的参考物质,国际 ADA 参考物质来源于红细胞<sup>[9]</sup>,从 7 L 压缩红细胞中经历洗涤、裂解、层析等复杂步骤最终获得了 0.7 mg 的 ADA 纯物质,原材料不易获得,操作过程繁杂,价格昂贵。分子克隆技术近年来已发展成熟稳定和可靠,在诸多领域都有出色的应用,如谷草转氨酶、谷丙转氨酶、乳酸脱氢酶等多项酶学参考物质的原材料均来源于原核菌株克隆蛋白的表达<sup>[12-14]</sup>,因此本实验利用分子克隆技术构建了 3 种 ADA 的原核表达载体,并成功表达了 ADA 蛋白。

原核表达系统培养设备及操作简单,生长条件要求不高,营养物质价格低廉,具有增殖速度快,转化效率高,表达周期短和表达量高的优点,适于大规模批量蛋白生产,是目前应用最为广泛的蛋白表达系统<sup>[15]</sup>。本实验选用较为常用的大肠杆菌表达系统 BL21(DE3),这种表达体系是发展最早也是最成熟的外源蛋白表达系统,其具有遗传背景清楚,表达水平稳定,易操作,有许多菌株突变体和含强启动子的载体可供选择,并且成本低、蛋白表达量高、容易纯化等优点。在实验中笔者构建的 3 种原核表达体系:BL21+pET-28b+ADA, BL21+pET-32a+ADA, BL21+pHSIE+ADA,所用到的 3 种质粒载体各有特色, pET-28b 质粒,经过插入位点设计,只带有 1 个很小的多聚组氨酸(His)标签,使得表达的蛋白分子大小与天然的蛋白分子量相差不大,且 His 标签便于后续的蛋白纯化;pET-32a 质粒载体,除带有 His 标签外,还带有 1 个促进表达蛋白可溶的基团,可增加蛋白的可溶性,但是也会使表达蛋白的分子量增大;pHSIE 质粒<sup>[16]</sup>除带有 His 标签,促表达蛋白可溶基团外,还带有 1 个断裂位点,该位点可通过蛋白纯化过程中调节洗脱液的 pH 来使得促表达蛋白的可溶基团断裂,可使得表达蛋白与天然蛋白保持一致性。

本实验笔者成功将 ADA 序列连接入相应的质粒载体,但在进行过程中也遇到了一些小问题:如(1)引物的设计,需根据扩增目的(检测引物,扩增引物等)按照引物设计原则和质粒载体序列设计合适的引物,加入合适的内切酶位点,同时要确认目的片段中无该酶切位点,这直接关系着酶切及连接等操作的成败;(2)目的基因的 PCR 扩增,应使用具有高保真性能和扩增范围内的高保真扩增酶,优化扩增条件,方能保证扩增所需序列的正确性;(3)感受态菌的制备,需熟练轻柔操作,并一定保证在低温冰浴条件进行,另外

用于制备感受态的菌液浓度要合适,才能保证制备的感受态菌具有较高的转化效率;(4)对于蛋白诱导表达,诱导剂 IPTG 的浓度对于蛋白表达量影响不大,虽然随时间和温度增加,3 种载体的蛋白表达量均升高,但原核蛋白在较低温度表达时速度减慢,有利于蛋白折叠,形成有活性的蛋白,所以最终确定的 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L,诱导温度均为 16 ℃,诱导时间为 24 h。

本实验构建的 3 种原核载体表达的 ADA 蛋白,经活性检测发现菌液超声后活性较高,说明 3 种原核载体均非分泌表达。后期实验将利用 3 个原核载体的特点,使用 His-Ni 柱或 pH 变化进行蛋白纯化,而如何获得高纯度高活性的 ADA 蛋白是后续研究的重点问题。

#### 4 结 论

本实验成功构建了腺苷脱氨酶的 3 个原核表达体系(BL21+pET-28b+ADA, BL21+pET-32a+ADA, BL21+pHSIE+ADA)且 3 个体系均成功表达了有活性的 ADA 蛋白,表达量可观,可满足后续 ADA 标准物质研制的原材料需求,且操作简单,经济实用。

#### 参考文献

- [1] LEAL C A, LEAL D B, ADEFEGHA S A, et al. Platelet aggregation and serum adenosine deaminase (ADA) activity in pregnancy associated with diabetes, hypertension and HIV[J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(5):343-350.
- [2] ZAVIALOV A V, GRACIA E, GLAICHENHAUS N, et al. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages[J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 88(2):279-290.
- [3] SHAW K L, GARABEDIAN E, MISHRA S, et al. Clinical efficacy of gene- modified stem cells in adenosine deaminase-deficient immunodeficiency [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(5):1689-1699.
- [4] EKERMANS P, DUSE A, GEORGE J. The dubious value of cerebrospinal fluid adenosine deaminase measurement for the diagnosis of tuberculous meningitis[J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1):104.
- [5] ABRAO F C, BRUNO DE ABREU I, MIYAKI D H, et al. Role of adenosine deaminase and the influence of age on the diagnosis of pleural tuberculosis[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2014, 18(11):1363-1369.
- [6] AGARWAL A K, BANSAL S, NAND V. A hospital based study on estimation of adenosine deaminase activity (ADA) in cerebrospinal fluid (CSF) in various types of meningitis[J]. *J Clin Diagn Res*, 2014, 8(2):73-76.
- [7] SHIBEESH A P, KADEEJA B B, VALLIYOT B, et al. Analysis of cerebrospinal fluid adenosine(下转第 289 页)

- [7] WORLD HEALTH ORGANIZATION. GLOBOCAN 2012; Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012[R]. Geneva: WHO, 2012.
- [8] WEI K, LI Y, ZHEN R, et al. Ovary cancer incidence and mortality in China, 2011[J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 38-43.
- [9] SOLETORMOS G, DUFFY M J, ABU HASSAN S O, et al. Clinical use of cancer biomarkers in epithelial ovarian cancer updated guidelines from the European group on tumor markers[J]. Int J Gynecol Cancer, 2016, 26(1): 43-51.
- [10] FERRARO S, SCHIUMARINI D, PANTEGHINI M. Human epididymis protein 4: Factors of variation[J]. Clin Chim Acta, 2015, 438(1): 171-177.
- [11] ZENG Q, LIU M, ZHOU N, et al. Serum human epididymis protein 4 (HE4) May be a better tumor marker in early lung cancer[J]. Clin Chim Acta, 2016, 455(4): 102-106.
- [12] HELLSTRÖM I, RAYCRAFT J, HAYDEN-LEDBETTER M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(13): 3695-3700.
- [13] GALGANO M T, HAMPTON G M, FRIERSON H F. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues[J]. Mod Pathol, 2006, 19(6): 847-853.
- [14] 徐小娜. 人附睾上皮分泌蛋白 4 联合其他肿瘤标志物对卵巢癌的早期诊断价值[J]. 临床医学, 2017, 37(11): 93-94.
- [15] ZHENG X, CHEN S, LI L, et al. Evaluation of HE4 and TTR for diagnosis of ovarian cancer: Comparison with CA-125[J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2018, 47(6): 227-230.
- [16] 陈燕, 林莺莺, 郑瑜宏, 等. 血清 HE4、CA125 和 ROMA 指数评估卵巢癌风险性的初步评价[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(2): 168-174.
- [17] MOORE R G, MCMEEKIN D S, BROWN A K, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(1): 40-46.
- [18] LO C W, CHEN M W, HSIAO M, et al. IL-6 Trans-Signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(2): 424-434.
- [19] GOPINATHAN G, MILAGRE C, PEARCE O M, et al. Interleukin-6 stimulates defective angiogenesis[J]. Cancer Res, 2015, 75(15): 3098-3107.

(收稿日期: 2018-08-10 修回日期: 2018-10-27)

(上接第 284 页)

- deaminase level in tuberculous meningitis and validation of sensitivity and specificity[J]. Int J Res Med Sci, 2018, 6(2): 438-442.
- [8] LEE J, YOO S S, LEE S Y, et al. Pleural fluid adenosine deaminase/serum C- reactive protein ratio for the differentiation of tuberculous and parapneumonic effusions with neutrophilic predominance and high adenosine deaminase levels[J]. Infection, 2017, 45(1): 59-65.
- [9] BOTA A, GELLA F J, CANALIAS F. Purification of human adenosine deaminase for the preparation of a reference material[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000, 737(1/2): 237-244.
- [10] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION(NCBI). NCBI reference sequence: Homo sapiens adenosine deaminase (ADA), mRNA[EB/OL]. (2018-12-15). [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_000022.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000022.2)
- [11] 中国标准化协会全国标准样品技术委员会. 标准样品实用手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [12] JOINT RESEARCH CENTER (JRC). ERM-AD457\_IFCC ASPARTATE TRANSAMINASE (AST) Certificate ERM-AD457 certificate. pdf[EB/OL]. (2018-12-15). [https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/AST/ERM-AD457-IFCC-ASPARTATE-TRANSAMINASE-AST-catalytic-activity-concentration/ERM-AD457\\_IFCC](https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/AST/ERM-AD457-IFCC-ASPARTATE-TRANSAMINASE-AST-catalytic-activity-concentration/ERM-AD457_IFCC)
- [13] JOINT RESEARCH CENTER (JRC). ERM-AD454k\_IFCC ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT). Certificate ERM-AD454k certificate. pdf[EB/OL]. (2018-12-15). [https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/ALT/ERM-AD454k-IFCC-ALANINE-AMINOTRANSFERASE-ALT-catalytic-activity-concentration/ERM-AD454k\\_IFCC](https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/ALT/ERM-AD454k-IFCC-ALANINE-AMINOTRANSFERASE-ALT-catalytic-activity-concentration/ERM-AD454k_IFCC)
- [14] JOINT RESEARCH CENTER (JRC). ERM-AD453k\_IFCC LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYME1 (LD1). Certificate ERM-AD453k certificate. pdf[EB/OL]. (2018-12-15). [https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/AD453K/ERM-AD453k-IFCC-LACTATE-DEHYDROGENASE-ISOENZYME-1-LD1-catalytic-activity-concentration/ERM-AD453k\\_IFCC](https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/AD453K/ERM-AD453k-IFCC-LACTATE-DEHYDROGENASE-ISOENZYME-1-LD1-catalytic-activity-concentration/ERM-AD453k_IFCC)
- [15] GOPAL G J, KUMAR A. Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli[J]. Protein J, 2013, 32(6): 419-425.
- [16] WANG Z, LI N, WANG Y, et al. Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification[J]. Protein Expr Purif, 2012, 82(1): 174-178.

(收稿日期: 2018-08-21 修回日期: 2018-10-21)