

文章编号: 1004-0374(2010)10-0985-06

自组装蛋白质芯片——功能蛋白质组学的新工具

艾润娜, 赵晓航*

(中国医学科学院/北京协和医学院肿瘤医院研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

摘要: 传统的蛋白质芯片制备需要进行繁琐的蛋白质表达与纯化。同时, 由于蛋白质活性不稳定, 蛋白质芯片不宜长期保存。新一代自组装蛋白质芯片, 利用无细胞表达体系和 DNA 固定技术, 能够将蛋白质即时、原位表达并固定在芯片上, 有效地解决了传统蛋白质芯片的制备和保存问题。目前自组装蛋白质芯片已初步用于大规模蛋白-蛋白质相互作用的筛选, 以及鉴定免疫优势抗原等研究。该文介绍了近年自组装蛋白质芯片技术的进展和应用研究。

关键词: 自组装蛋白质芯片; 蛋白-蛋白质相互作用; 无细胞蛋白质合成

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A

Self-assembling protein microarray — a new tool for functional proteomics

AI Run-na, ZHAO Xiao-hang*

(State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chinese Academy of
Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: Traditional protein microarrays require time-consuming processes of protein production and purification since the protein activities are not stable and the array products could not be stored properly for a long time. Self-assembling protein microarrays utilized cell-free expression system and DNA immobilization technique, which allowed multiple-protein expression simultaneously and *in situ* immobilization on the surface of arrays. This technology effectively overcomes the problems of traditional protein microarrays, and provides a useful tool for functional proteomics analysis. Currently, self-assembling protein microarrays are primarily used for screening protein-protein interactions, identifying immunodominant antigens and so on. This review focused on the recent advancement and application research on self-assembling protein microarrays.

Key words: self-assembling protein microarray; protein-protein interaction; cell-free protein synthesis

蛋白质芯片具有微型化、高通量、高效、省时、所需样本量低、可重复性强和数据质量高等诸多优点, 目前已经广泛应用于疾病诊断、药物设计、蛋白质-蛋白质相互作用研究、蛋白质-核酸相互作用研究、蛋白质-脂质体相互作用研究、特异性蛋白质的筛选和功能蛋白质组研究等多个领域。

传统的蛋白质芯片制备技术主要通过表达并纯化蛋白, 将各种纯化蛋白有序地固定于特殊固相片基(滴定板、滤膜和载玻片)上, 然后用标记了特定荧光素的蛋白质配体或其他成分与芯片杂交, 经漂洗去除未能与芯片上蛋白互补结合的成分, 再经荧光扫描仪或激光共聚焦扫描技术测定芯片上各点的

荧光强度, 通过荧光强度分析蛋白与蛋白间的相互作用。但传统蛋白质芯片的制备存在许多问题, 如蛋白质的表达和纯化步骤繁琐, 耗时耗力; 固定在芯片上的蛋白质不易保存, 不能长期保持活性等。与传统的蛋白质芯片制备方法相比, 自组装蛋白质

收稿日期: 2010-04-08; 修回日期: 2010-08-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30721001; 30973373; 30772507); 国家高技术发展计划(“863”计划)(2006AA02A403; 2006AA02A308); 国际科技合作与交流专项(2008DFA31130)

*通讯作者 E-mail: zhaoxh@cicams.ac.cn; Tel: 010-67709015

芯片采用无细胞系统在芯片表面开展蛋白质的即时合成与固定,极大地提高了蛋白质合成、纯化的效率和通量;由于无细胞系统和蛋白质芯片的开放性,增加了实验的可控性;同时原位合成也避免了因保存不当导致蛋白质活性下降的问题。本文综述了自组装蛋白质芯片制备技术及其应用的研究进展。

1 自组装蛋白质芯片的原理

1.1 DNA/mRNA 模板的制备及固定

蛋白质芯片的合成需要大型的 cDNA 文库。cDNA 文库必须处于适合表达的状态,即与适当的启动子连接,无非翻译序列,以及重组必要的纯化标签。随着测序技术的发展,许多物种的全基因组测序工作已经完成,并在此基础上构建了一些物种的开放阅读框(open reading frame, ORF)克隆文库,如人类^[1]、霍乱弧菌^[2]、兔热病杆菌^[3]等 ORF 克隆文库。此外,近年发展起来的蛋白质表达通用克隆技术,如 Gateway 克隆^[4]和 TA 克隆^[5]能使特定基因的 ORF 根据研究需要方便地重组于不同的表达载体中,便于 ORF 克隆文库的高通量表达。有了 ORF 克隆文库,就可以通过已知的基因组信息,设计引物从 ORF 克隆文库中调取目的 ORFs,将这些 DNA 片段用 DNA 芯片的打印技术固定在芯片的片基上^[6]。

1.2 无细胞蛋白质合成体系

无细胞蛋白质表达系统,即一种模拟体内蛋白质合成与翻译后修饰条件的体外蛋白质表达系统,由含有基因转录、蛋白质合成与翻译后修饰所需主要元件的特定细胞抽提物构成。常用的如兔网织红细胞、大肠杆菌和麦胚抽提物,还包括嗜嗜热菌、杂交瘤、爪蟾卵细胞、昆虫、哺乳动物和人类细胞提取物等^[7-11]。在该系统中,蛋白质可以在不同环境(如原核或真核表达系统)和温度(如嗜嗜热菌表达)条件下合成,将转录和翻译过程偶联,以质粒 DNA 为模板经 PCR 扩增目的基因后在无细胞表达系统中合成蛋白质^[10]。系统中可以加入其他组分,如酶、能量物质等,为蛋白折叠、二硫键形成、修饰或蛋白活性提供适宜的环境。无细胞系统也可以在翻译时直接标记目的蛋白质,将荧光基团、生物素、光敏基团和抗原表位等在蛋白质合成中重组到指定位置以便下游的检测^[12,13]。通过压电灌注,有效地将反应体积降低至纳升级,更加适合芯片上蛋白质的合成^[14]。

1.3 蛋白质捕获和检测技术

固定蛋白质是一件复杂的工作,因为其化学性

质复杂,还要确保其结构的完整性和可接近性。方法之一是采用甲醛、环氧、胺或其他试剂与蛋白质的氨基或羧基结合,将蛋白质以随机的方向固定在芯片表面,充分暴露其潜在的相互作用表面^[15-17]。第二种方法是在蛋白质 N 端或 C 端重组标签蛋白,通过标签蛋白捕获试剂将表达的融合蛋白固定在芯片表面。该方法可以使所有蛋白质以一致的方向固定于芯片表面,而且蛋白质与芯片表面有一定距离,减少了蛋白质相互作用中的空间位阻效应。同时,标签蛋白增加了结合目的蛋白质的选择性,简化了后续蛋白质纯化步骤。

芯片的检测技术可分为基于标记和非标记的两种检测方法。其中,基于荧光标记的技术是将荧光基团直接偶联相互作用的靶蛋白分子,或通过二级试剂连接(如三明治方法),通过检测荧光标签的强度确定蛋白质的相互作用。相反,非标记的检测方法是通过测量相互作用分子的内在特性,如质量或介电常数,来判断相互作用强弱。前者使用商业化的试剂和仪器,但荧光基团的共价引入可能影响蛋白质功能或被监测的表位;而后者避免了外源基团引入对蛋白质功能的影响,并可做到实时监测,但所需的仪器设备复杂。目前基于标记的检测方法其灵敏度高于非标记方法^[18]。

2 无细胞自组装蛋白质合成技术分类

2.1 PISA 技术

蛋白质原位芯片(protein in situ array, PISA)是一种基于特定基因序列的经 PCR 扩增和体外无细胞表达系统表达和原位捕获的蛋白质芯片技术,以阵列的形式将 DNA 直接转化为功能性蛋白,无需进行基因的克隆、表达和纯化,并且避免了蛋白质芯片长期保存的问题^[19]。在此基础上,Angenendt 等^[14]进一步结合多重打点技术(multiple spotting technique, MIST)建立了一种高度微缩的亚纳升级的原位蛋白质合成技术,使芯片上合成蛋白质密度达到每片 13 000 点。

2.2 NAPPA 技术

核酸程序化蛋白质芯片(nucleic acid programmable protein array, NAPPA)技术是在固定的 DNA 模板上原位合成蛋白质的芯片技术。将质粒 DNA 和标签蛋白捕获抗体共同固定于玻片上,然后用兔网织红细胞裂解液覆盖玻片,新合成的蛋白质被每个点上的抗体原位捕获^[6]。通过优化模板 DNA 的合成得到高质量的 DNA,并改进打印方法(如使用牛血清白蛋白大大提高模板 DNA 的结合效率),在表

达1 000个人类蛋白质的第二代NAPPA芯片中, 转录因子和激酶表达的成功率分别为86%和98%, 那些通常在异源系统中难以表达的膜蛋白的表达信号也达到93%。Ramachandran等^[20]在一张含有647个独特基因的NAPPA芯片上验证了这种高密度芯片表达蛋白质的功能。用那些功能明确的已知二元相互作用蛋白, 如Jun-Fos和p53-MDM2等作为阳性对照或查询蛋白, 发现NAPPA芯片表达的蛋白质能够选择性地正确结合其相互作用配体分子。

和PISA一样, NAPPA芯片不需要纯化蛋白质。同时与PISA相比, NAPPA芯片的优点是, 具有固定的DNA模板, 芯片比较稳定, 便于存储和分发, 在需要时可迅速翻译为蛋白质芯片。NAPPA技术的不足之处主要为, 需要将每个目的基因与GST标签序列重组, 构建重组克隆表达质粒; 需要将固定的质粒生物素化, 以便使表达质粒固定到亲和素的表面, 还要避免这一过程对转录的干扰。另外, 这一技术并不能合成“纯”蛋白质芯片, 合成的芯片中, 每个点上既有蛋白质, 也有编码蛋白质的质粒DNA(可以用DNase去除)和捕获抗体。与PISA一样, 每张DNA芯片只能合成一张蛋白质芯片^[21]。

2.3 DAPA技术

He等^[22]研发了从DNA芯片到蛋白质芯片(DNA array to protein array, DAPA)的技术。含标签蛋白和编码蛋白的DNA克隆被固定在一块玻片上, 而在另一块玻片上包被特异标签蛋白的捕获试剂, 在两张玻片间的滤膜上进行无细胞蛋白质合成。芯片上的DNA模板可以反复使用, 所合成的蛋白质经滤膜扩散被捕获和固定在第二张玻片上, 形成与DNA芯片对应的蛋白质芯片。DAPA芯片上蛋白质点的阵列密度符合高斯分布, DNA模板可以重复使用, 同一张DNA芯片可以制备多张蛋白质芯片(至少可以制作20个拷贝的蛋白质芯片)。该技术对那些不配备芯片点样机的实验室特别适用。DAPA可以展示大量不同的蛋白质, 包括抗体片段, 绿色荧光蛋白和转录因子等。与NAPPA相比, DAPA技术在另一平面上合成由单一纯化蛋白构成的蛋白质芯片, 避免了在下游应用时可能存在共定位蛋白质的干扰^[22, 23]。

2.4 ISPCFmA技术

Tao和Zhu^[24]在mRNA展示技术基础上, 建立了基于mRNA芯片的原位嘌呤捕获技术(*In situ* puromycin capture from mRNA array, ISPCFmA), 采用嘌呤霉素捕获新合成的多肽, 原位制备蛋白质芯

片。芯片上固定的DNA模板经PCR扩增, 体外转录为mRNA, mRNA的3'端与一段被生物素(biotin)和嘌呤霉素修饰的ssDNA退火, 再通过生物素-亲和素的相互作用, 将mRNAs固定在包被亲和素(avidin)的玻片上, 并在无细胞抽提物中原位翻译成蛋白质。翻译中的核糖体在到达RNA/DNA杂交区域时发生阻滞, 新生蛋白质释放减缓。接着与DNA结合的嘌呤霉素捕获新生蛋白并将其固定在玻片表面。翻译结束后, 经RNase消化去除剩余的mRNA, 获得蛋白质芯片。由于嘌呤霉素与mRNA的精确定位, mRNA与合成蛋白呈现1:1的数量关系, 因而该方法限制了蛋白质点的扩散。但在打印前需要额外的操作——转录并修饰mRNA分子。通常mRNA不稳定, 所合成的蛋白质含量受打印的mRNA含量的限制。

2.5 其他支持物

除了传统的玻片支持物外, 研究者还开发了其他材料的支持物, 使蛋白质芯片的应用更加灵活、广泛。Oleinikov等^[25]用自组装蛋白质合成技术将靶蛋白合成并固定在CombiMatrix半导体寡核苷酸芯片上, 成功地展示了荧光素酶和绿色荧光蛋白, 展示的蛋白质具有正确的折叠和活性, 检测灵敏度高。Wong等^[26]根据NAPPA原理, 将无细胞系统合成的蛋白质用抗体偶联的磁珠捕获, 建立了磁珠-酶联免疫吸附法(bead enzyme-linked immunosorbent assay, bead ELISA), 可以用来筛选含有自身抗体的血清, 检测的灵敏度和特异度与传统ELISA相似。

3 自组装蛋白质合成技术的应用

3.1 研究蛋白质-蛋白质相互作用

利用NAPPA芯片, Ramachandran等^[6]研究了29个已知参与DNA合成起始过程的蛋白质之间的相互作用。分别用单个蛋白与表达这29个候选蛋白的芯片共孵育, 最终发现了110个相互作用关系。其中49个为已知相互作用, 它们曾分别经遗传学、酵母双杂交(yeast two hybrid system, Y2H)、生化等传统方法所鉴定; 同时, 发现了63个未曾报道的相互作用。NAPPA与传统相互作用金标准的结果相比, 其重叠率为85%(17/20); 用免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, co-IP)方法验证相互作用, NAPPA检出率为52.8%(19/36); 与Y2H结果重叠率最低, 只有42%。此外, 发现了一些间接相互作用的证据, 例如, 只有共表达Cdc6时, MCM2才能与Cdt1结合, 因此Cdc6可能作为一种中介蛋白, 介导MCM2与Cdt1

的结合。并且,该研究小组还利用 NAPPA,将 Cdt1 与 geminin 发生相互作用的结构域从相对较大的区域(177~380aa)定位到了较小的一段区域(198~212aa)。

Gerber 等^[27]利用芯片上自组装蛋白质合成技术和原位微流亲和实验技术,以及该实验室建立的机械捕获分子相互作用(mechanical trapping of molecular interactions, MITOMI)方法^[28],建立了一种体外高通量筛选蛋白质相互作用的微流实验平台,即蛋白质相互作用网络生成器(protein interaction network generator, PING)。在这种装置中,蛋白质原位表达并固定于独立的小室内,小室与微流仪器连通,可以同时检测流经小室的成百上千个蛋白质间的相互作用(二元或多元相互作用),利用荧光标记抗体和 MITOMI 确定分子间的相互作用。由于每个反应都发生在独立的小室中,避免了交叉污染。作者用该装置构建了肺炎链球菌 43 个蛋白质的相互作用网络,该网络包括 43 个节点和 157 个相互作用链条。所鉴定的相互作用中,63% (24/38) 已在 Swissprot 数据库中有注释。最大的节点是 4 个热休克蛋白质,从中引发出 61 个相互作用链条。其中最大的节点 GroEL 热休克蛋白质复合物,是一种非常复杂的蛋白质复合物,也包含 96 个非热休克蛋白质的特异相互作用,平均每个蛋白质发生 3.6 个相互作用。值得注意的是,该研究发现了一些位于同一条生化通路上的新的蛋白质相互作用,提示该通路可能存在某些反馈机制。

3.2 抗原芯片

体液免疫是机体应对外来抗原和自身抗原产生的特异性保护机制,当受到外来刺激后血清中产生特异性抗体。传统的抗体/抗原蛋白质芯片需要生产并纯化大量的抗体或抗原蛋白用于芯片制备,工作量大,抗原数量有限。Ramachandran 等^[29]用自组装蛋白质合成技术,可以快速高效地将各种待测抗原展示到芯片或磁珠上,有利于全面了解疾病和健康状态下的机体的体液免疫反应。同时,用患者血清与不同抗原表位蛋白阵列杂交,可以鉴定免疫优势抗原,有助于研制预防疾病的疫苗^[21]。

Montor 等^[30]用改进的 NAPPA 芯片研究了绿脓假单胞菌的 262 个外膜蛋白,鉴定了在囊性纤维病和急性感染患者中激发适应性免疫反应的 12 个抗原,为了解哪些蛋白质在自然感染过程中被免疫系统有效识别提供了有价值的信息。这些蛋白质在患者与对照人群间的差异检出率具有显著性意义($P < 0.01$)。该研究为血清诊断和疫苗研制提供了一系列候选分子。

此外,Rolfs 等^[2]选择性合成了霍乱弧菌基因组中约 15% 表达蛋白的基因序列,用 NAPPA 技术将其原位转录、翻译并捕获到芯片表面,抗原制备成功率达到 92%。进而检测了这些体外合成蛋白激活 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)的能力,鉴定到已知靶蛋白 FlaC,并且发现了一种新的 TLR5 的激活剂。

Anderson 等^[31]对比了 NAPPA 与标准 ELISA 试剂盒检测 p53 阳性和阴性血清肿瘤自身抗体的效率。在筛选 p53 阳性和阴性血清方面,NAPPA 原位合成抗原与标准 ELISA 方法相似;用同样的抗体进行的滴定实验发现,NAPPA 和商业化 ELISA 的检测灵敏度相似;用针对 p53 不同表位的抗体的实验发现,NAPPA 展示抗原的方法并不影响抗原表位的可接近性,并且两种方法的信号具有较高的一致性。不同之处在于 NAPPA 可以方便地进行多重化实验,不会影响其性能。对于大规模研究来说,可以随时表达大量的抗原,而且成功率很高。

将 NAPPA 技术与磁珠结合,Wong 等^[26]建立了磁珠 ELISA 方法,用来筛查肿瘤患者血清中的自抗体,磁珠 ELISA 表达并特异检测 GST 标签蛋白的成功率为 98.6% (71/72)。在检测 p53 肿瘤抗原时,磁珠 ELISA 的特异性和灵敏度与标准 ELISA 试剂盒、基于微孔板的程序化(rapid antigenic protein in situ display, RAPID)ELISA 相当。

3.3 检验抗体的特异性

He 等^[32]用 PISA 标签捕获方法在镍-氨基三乙酸(Nickel-nitrilotriacetic acid, Ni-NTA)包被的微孔板上合成了一张迷你抗体芯片,用来分析人单链黄体激素抗体的结合特异性。镍离子可与 6×His 螯合,从而固定带有 His 标签的蛋白质,用克隆的人抗黄体激素 VH/K 片段的基因在芯片上原位合成抗体,这些抗体基因的片段是该实验室之前用抗体-核糖体-mRNA(antibody-ribosome-mRNA complex, ARM)核糖体展示在转基因小鼠中筛选出来的。用黄体激素-BSA 特异性抗原和非特异对照蛋白分别与芯片孵育,只能检测到与抗原的结合反应,验证了抗体结合位点的特异性,也说明芯片上的抗体处于正确折叠状态^[19,33]。

3.4 筛查蛋白质表达

用小型化(亚纳升级)蛋白质原位表达和固定技术合成了一张含有 384 个人类胎脑 cDNA 文库中克隆的蛋白质芯片,检测这些 cDNA 在芯片上的表达水平,验证原位合成蛋白质的方法是否能够扩展到整

个表达文库。与传统的表达方法比较后, 揭示了可表达克隆和不能表达克隆的相似分布规律。这说明蛋白质原位芯片是一种可以在无细胞系统中大规模筛查蛋白质表达的快速、经济、可靠的方法^[14]。无细胞蛋白原位表达和固定也被用于分离重组蛋白^[34]。

4 展望

自组装蛋白质芯片具备传统蛋白质芯片的优点, 如所需样本量低、高通量、可重复性好等, 同时还简化了蛋白质表达纯化的过程, 避免了蛋白质长期存储的稳定性问题。因此, 可以预见, 这种蛋白质芯片技术的应用范围会快速扩展到功能蛋白质组研究的领域, 如检测蛋白质与蛋白质、蛋白质与其他生物分子的相互作用, 发现蛋白质的翻译后修饰^[35-37], 检测信号通路分子的活性^[38, 39], 检测复杂样品中各类蛋白质的表达情况^[40, 41], 鉴定传染性疾病的优势抗原以辅助疫苗的研制^[42]等等。此外, 自组装蛋白质合成技术与纳米技术结合, 使蛋白质芯片进一步向小型化高通量方向发展^[29]。

【参 考 文 献】

- [1] Cusick ME, Yu H, Smolyar A, et al. Literature-curated protein interaction datasets. *Nat Methods*, 2009, 6(1): 39-46
- [2] Rolfs A, Montor WR, Yoon SS, et al. Production and sequence validation of a complete full length ORF collection for the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(11): 4364-9
- [3] Murthy T, Rolfs A, Hu Y, et al. A full-genomic sequence-verified protein-coding gene collection for *Francisella tularensis*. *PLoS One*, 2007, 2(6): e577
- [4] Walhout AJ, Temple GF, Brasch MA, et al. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFs. *Methods Enzymol*, 2000, 328: 575-92
- [5] Chen S, Songkumarn P, Liu J, et al. A versatile zero background T-vector system for gene cloning and functional genomics. *Plant Physiol*, 2009, 150(3): 1111-21
- [6] Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, et al. Self-assembling protein microarrays. *Science*, 2004, 305(5680): 86-90
- [7] Endoh T, Kanai T, Sato YI, et al. Cell-free protein synthesis at high temperatures using the lysate of a hyperthermophile. *J Biotechnol*, 2006, 126(2): 186-95
- [8] Keller C, Hyrien O, Knippers R, et al. Site-specific and temporally controlled initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(10): 2114-23
- [9] Landsverk HB, Hakelien AM, Kuntziger T, et al. Reprogrammed gene expression in a somatic cell-free extract. *EMBO Rep*, 2002, 3(4): 384-9
- [10] Langlais C, Guillaume B, Wermke N, et al. A systematic approach for testing expression of human full-length proteins in cell-free expression systems. *BMC Biotechnol*, 2007, 7: 64
- [11] Mikami S, Kobayashi T, Yokoyama S, et al. A hybridoma-based in vitro translation system that efficiently synthesizes glycoproteins. *J Biotechnol*, 2006, 127(1): 65-78
- [12] Oyama R, Takashima H, Yonezawa M, et al. Protein-protein interaction analysis by C-terminally specific fluorescence labeling and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(14): e102
- [13] Ozawa K, Wu PS, Dixon NE, et al. N-Labelled proteins by cell-free protein synthesis. Strategies for high-throughput NMR studies of proteins and protein-ligand complexes. *Febs J*, 2006, 273(18): 4154-9
- [14] Angenendt P, Kreutzberger J, Glokler J, et al. Generation of high density protein microarrays by cell-free in situ expression of unpurified PCR products. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(9): 1658-66
- [15] LaBaer J, Ramachandran N. Protein microarrays as tools for functional proteomics. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, 9(1): 14-9
- [16] MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 2000, 289(5485): 1760-3
- [17] Zhu H, Bilgin M, Bangham R, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, 2001, 293(5537): 2101-5
- [18] Ramachandran N, Larson DN, Stark PR, et al. Emerging tools for real-time label-free detection of interactions on functional protein microarrays. *Febs J*, 2005, 272(21): 5412-25
- [19] He M, Taussig MJ. Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and in situ immobilisation (PISA method). *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(15): E73-3
- [20] Ramachandran N, Raphael JV, Hainsworth E, et al. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nat Methods*, 2008, 5(6): 535-8
- [21] He M, Wang MW. Arraying proteins by cell-free synthesis. *Biomol Eng*, 2007, 24(4): 375-80
- [22] He M, Stoevesandt O, Palmer EA, et al. Printing protein arrays from DNA arrays. *Nat Methods*, 2008, 5(2): 175-7
- [23] Stoevesandt O, Taussig MJ, He M. Protein microarrays: high-throughput tools for proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2009, 6(2): 145-57
- [24] Tao SC, Zhu H. Protein chip fabrication by capture of nascent polypeptides. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(10): 1253-4
- [25] Oleinikov AV, Gray MD, Zhao J, et al. Self-assembling protein arrays using electronic semiconductor microchips and *in vitro* translation. *J Proteome Res*, 2003, 2(3): 313-9
- [26] Wong J, Sibani S, Lokko NN, et al. Rapid detection of antibodies in sera using multiplexed self-assembling bead arrays. *J Immunol Methods*, 2009, 350(1-2): 171-82
- [27] Gerber D, Maerkl SJ, Quake SR. An *in vitro* microfluidic approach to generating protein-interaction networks. *Nat Methods*, 2009, 6(1): 71-4
- [28] Maerkl SJ, Quake SR. A systems approach to measuring the binding energy landscapes of transcription factors. *Science*, 2007, 315(5809): 233-7
- [29] Ramachandran N, Anderson KS, Raphael JV, et al. Tracking humoral responses using self-assembling protein microarrays. *Proteomics Clin Appl*, 2008, 2(10-11): 1518-27
- [30] Montor WR, Huang J, Hu Y, et al. Genome-wide study of

- Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein immunogenicity using self-assembling protein microarrays. *Infect Immun*, 2009, 77(11): 4877-86
- [31] Anderson KS, Ramachandran N, Wong J, et al. Application of protein microarrays for multiplexed detection of antibodies to tumor antigens in breast cancer. *J Proteome Res*, 2008, 7(4): 1490-9
- [32] He M, Menges M, Groves MA, et al. Selection of a human anti-progesterone antibody fragment from a transgenic mouse library by ARM ribosome display. *J Immunol Methods*, 1999, 231(1-2): 105-17
- [33] He M, Taussig MJ. DiscernArray technology: a cell-free method for the generation of protein arrays from PCR DNA. *J Immunol Methods*, 2003, 274(1-2): 265-70
- [34] Kim TW, Oh IS, Ahn JH, et al. Cell-free synthesis and in situ isolation of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, 2006, 45(2): 249-54
- [35] Zhao J, Patwa TH, Qiu W, et al. Glycoprotein microarrays with multi-lectin detection: unique lectin binding patterns as a tool for classifying normal, chronic pancreatitis and pancreatic cancer sera. *J Proteome Res*, 2007, 6(5): 1864-74
- [36] Ptacek J, Devgan G, Michaud G, et al. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*, 2005, 438(7068): 679-84
- [37] Chandra H, Srivastava S. Cell-free synthesis-based protein microarrays and their applications. *Proteomics*, 2010, 10(4): 717-30
- [38] Kopf E, Shnitzer D, Zharhary D, et al. Microarray Cell Signaling kit: a unique tool for protein expression analysis. *Proteomics*, 2005, 5(9): 2412-6
- [39] Nielsen UB, Cardone MH, Sinskey AJ, et al. Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(16): 9330-5
- [40] Ingvarsson J, Wingren C, Carlsson A, et al. Detection of pancreatic cancer using antibody microarray-based serum protein profiling. *Proteomics*, 2008, 8(11): 2211-9
- [41] Bartling B, Hofmann HS, Boettger T, et al. Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 2005, 49(2): 145-54
- [42] Lu DD, Chen SH, Zhang SM, et al. Screening of specific antigens for SARS clinical diagnosis using a protein microarray. *Analyst*, 2005, 130(4): 474-82