

人视黄醇结合蛋白 4 在杆状病毒系统中的表达及其多克隆抗体制备

任玉莹, 陈丹, 郭玉争, 史洪娜, 刘娟, 班靖洋, 刘亚宁, 吴晓芳, 王维龙, 程海, 李鼎锋, 刘勇, 王立良

北京安百胜生物科技有限公司, 北京 100176

任玉莹, 陈丹, 郭玉争, 等. 人视黄醇结合蛋白 4 在杆状病毒系统中的表达及其多克隆抗体制备. 生物工程学报, 2013, 29(7): 974-985.

Ren YY, Chen D, Guo YZ, et al. Expression of human retinol-binding protein 4 in insect baculovirus system and preparation of its polyclonal antibody. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 974-985.

摘 要: 旨在利用杆状病毒系统表达、制备人视黄醇结合蛋白 (RBP4) 并检测其免疫原性。将人 *RBP4* 基因片段及信号肽 *SS₆₄* 片段亚克隆到杆状病毒转移载体 pFastBac-dual (pFBd) 中, 获得相应的重组转移质粒; 转化大肠杆菌菌株 DH10bac, 转座后经筛选获得重组穿梭质粒 rbacmid, 将重组穿梭质粒转染孔板培养的 Sf9 细胞, 获得含人 RBP4 表达框的重组杆状病毒, 经过扩增获得毒种。毒种感染对数生长期的 Sf9 细胞并表达人 RBP4 蛋白 (I-RBP4), 通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 对表达蛋白进行检测和鉴定。用毒种感染悬浮培养的 Sf9 细胞制备一批 RBP4 蛋白, 完成 SDS、Western blotting 的检测及少量的多抗制备。纯化重组蛋白并与 *E.coli* 重组人 RBP4 (E-RBP4) 分别免疫家兔。实验结果, 酶切鉴定及测序证实重组转移质粒构建正确; 成功构建重组 RBP4-bacmid; 人 RBP4 蛋白在昆虫细胞获得高效表达。表达的 RBP4 蛋白可以分泌到培养基中, 分子量约为 23 kDa, 经过计算表达量为 100 mg/L; 纯化蛋白免疫兔子制备了多抗血清, 血清滴度为 1:100 000, 高于原核表达的抗体滴度 (1:10 000), 与人体提纯蛋白制备的抗体滴度相近。杆状病毒系统高效表达了人的 RBP4 蛋白, 具有较好的抗原性, 并获得高亲和力的抗血清, 为下一步的人血 RBP4 检测试剂盒的制备打下了坚实的基础。

关键词: 视黄醇结合蛋白 4 (RBP4), 杆状病毒表达系统, 基因表达, 蛋白纯化, 多抗制备

Received: November 5, 2012; **Accepted:** March 29, 2013

Corresponding author: Liliang Wang. Tel: +86-10-67877678; E-mail: wangll@abzymo.com

网络出版时间: 2013-06-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130625.1617.001.html>

Expression of human retinol-binding protein 4 in insect baculovirus system and preparation of its polyclonal antibody

Yuying Ren, Dan Chen, Yuzheng Guo, Hongna Shi, Juan Liu, Jingyang Ban, Yaning Liu, Xiaofang Wu, Weilong Wang, Hai Cheng, Dingfeng Li, Yong Liu, and Liliang Wang

ABZYMO Bioscience, Beijing 100176, China

Abstract: To prepare recombinant human retinol binding protein 4 (RBP4) by using the baculovirus expression system and to detect its immunogenicity, the fusion DNA fragment of secretory signal peptide *SS₆₄* and human *RBP4* gene was subcloned into a baculovirus transfer vector pFastBac-dual(pFBd), and the corresponding recombinant transfer plasmid was transformed into *E. coli* strain DH10bac, after transposition recombinant shuttle bacmid was screened out. The logarithmic phase Sf9 cells were transfected with the recombinant bacmid and then the recombinant baculovirus containing hRBP4 expression box were generated. After amplification of recombinant baculovirus, the recombinant baculovirus seeds were obtained. To express human RBP4, logarithmic phase Sf9 cells were infected with the virus seeds and SDS-PAGE and Western blotting were used to detect and identify the expression. Finally, to prepare a batch of RBP4 protein, logarithmic phase Sf9 cells in suspension culture were infected with recombinant baculovirus seeds and the supernatant was harvested after 120 hours post-infection for purification. Finally for preparation of polyclonal antibody and evaluation of immunogenicity, the recombinant hRBP4 from insect cells and from *E. coli* were immunized rabbits. Restriction enzyme digestion and sequencing confirmed that the recombinant baculovirus transfer plasmid was constructed correctly, and subsequently recombinant RBP4-bacmid was generated successfully. SDS-PAGE and Western blotting analysis suggested that human RBP4 protein was highly expressed in Sf9 cells with the molecular weight of approximately 23 kDa. The recombinant RBP4 protein could be secreted into the medium efficiently, and the expression level was calculated amount of 100 mg/L. Finally the rabbit antiserum was harvested after recombinant RBP4 immunization, therein the titer of antiserum against baculovirus recombinant RBP4 is 1:100 000 whereas the titer of antiserum against *E. coli* recombinant RBP4 is only 1:10 000. Overall, human RBP4 was high efficiently expressed successfully with good antigenicity in baculovirus system, and high affinity antiserum was obtained. A solid foundation was laid for the next step of the preparation of human serum RBP4 detection kit.

Keywords: retinol binding protein 4 (RBP4), baculovirus expression system, gene expression, protein purification, multiclinal antibody preparation

视黄醇类 (Retinoids) 是维生素 A (VitaminsA, vitA) 在体内各种代谢物的统称, 主要包括视黄醇 (Retinol)、视黄醛 (Retinene) 和视黄酸 (Retinoic acid, RA), 它们是一类疏水性分子, 广泛分布于细胞内、外环境中^[1]。视黄醇结合蛋白 4 (Retinal binding protein4, RBP4) 是一种分泌型的运载蛋白, 属于疏水性的小分子结合蛋白家族, 分子量约 21 kDa, 含有 201 个氨基

酸残基和 3 个二硫键^[2-3], 正常生理情况下主要在肝脏中合成, 释放入血后与视黄醇 (ROH) (维生素 A)、甲状腺素运载蛋白 (TTR) 以 1 : 1 : 1 的比例形成三元复合物, 是体内运送视黄醇至其特定靶组织的运载蛋白^[4]。当 RBP4 与细胞表面的 RBP4 受体结合后, 视黄醇进入细胞内, 复合物解体, 游离的 RBP 从肾小球滤出, 其中绝大部分被近端肾小管上皮细胞重吸收并被分解, 供

组织利用, 仅有少量从尿中排出^[5]。

目前, 临床上用于肾功能损伤早期诊断的尿小分子蛋白主要是 $\beta 2$ 微球蛋白和 RBP4。 $\beta 2$ 微球蛋白在 $\text{pH} < 5.5$ 时很不稳定, 易降解, 取尿液标本后应立即调 pH 至中性。而且 $\beta 2$ 微球蛋白在尿液中的半衰期较短: $\text{pH} 4.0$ 、 4°C 放置 4 h 后有 70% 的降解, 而 RBP4 在相同条件下仅降解 5%^[6]。因此, RBP4 相对于 $\beta 2$ 微球蛋白在肾功能损伤诊断中更稳定、更可靠。

近年来大量研究报道, 血清和尿液中 RBP4 是一个较敏感的指标, 且随着病程发展在反映早期肾损害时优于 $\beta 2$ 微球蛋白和尿微量白蛋白^[7-9], 在糖尿病、肾病早期, 尿 RBP4 排泄增加先于微白蛋白尿出现, 被认为是反映早期肾损害的标志^[10]。

原核表达系统表达蛋白通常作为获得目的蛋白的首选方案, 其表达量高、周期短、成品低, 但绝大多数重组蛋白都以包涵体形式存在且没有活性或者活性很低, 其蛋白构象通常与天然蛋白差异很大, 这些是研究人员考虑的主要问题。本实验室曾用 *E. coli* 系统表达人 RBP4 与其他报道一致, 重组蛋白全部为包涵体, 且复性困难活性低下。因此本文选用昆虫杆状病毒表达系统制备重组人 RBP4, 获得较高的表达量, 并制备高质量的抗体, 为后续的产品开发提供理论依据及实验数据。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌种和质粒

Sf9 昆虫细胞, 大肠杆菌 TOP10、DH10Bac, pFastBac-dual 质粒 (简称 pFBd)。

1.2 主要试剂和仪器

Pyrobest *Taq*、DNA 连接酶、限制性内切酶 (TaKaRa); DNA 凝胶回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒 (OMEGA 公司); BAC/PAC 试剂盒 (Sigma 公司); Grace's Insect Medium (Gibco 公司); GPM-115 培养基 (金普诺安公司); 胎牛血清 (缩写: FBS) (Gibco 公司); L-Glutamine (中文名称: 谷氨酰胺, 缩写 L-Gln) (Hyclone 公司); cellfectin II reagent (Invitrogen 公司); DMSO (Sigma 公司); 山羊抗兔 IgG/辣根酶标记 (中杉金桥); 人源 RBP4 (购自桂林英美特公司); 抗人 RBP4 兔多抗及大肠杆菌重组 RBP4 (E-RBP4) 为实验室自制。

1.3 基因来源

杆状病毒密码子优化的 *bRBP4* 基因由本实验室保存。

1.4 RBP4 重组 bacmid 的构建

1.4.1 信号肽与目的基因连接

pMD18-T-*bRBP4* (实验室保存) PCR 扩增 *bRBP4* 基因, (引物: *bRBP4*-for, *bRBP4*-rev 见表 1) 获得 *bRBP4* 基因。小量提取 bacmid 质粒, 以其为模板, PCR 方法扩增 *SS64* 信号肽片段 (引物: *SS64*-for, *SS64*-rev)。然后以 *bRBP4*、*SS64* PCR 产物为模板, PCR 方法扩增 *SS64-bRBP4* 基因 (引物: *SS64*-for, *bRBP4*-rev) 反应条件: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 90 s, 共 30 个循环; 72°C 10 min。

1.4.2 重组转移质粒的构建

将 pFBd 质粒与 *SS64-bRBP4* 基因分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 并分别胶回收、连接, 转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞并涂布

表 1 构建载体所用的引物

Table 1 Primers used in vector construction

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
SS64-for	CGGGATCCTCCCGTTTTTATAACAGCCA	28
SS64-rev	AGCGGCCGCTGAGCGTGACTGCCGTGTG	28
bRBP4-for	ACGCTCAGCGGCCGCT	16
bRBP4-rev	CGGAATTCTTACAGCAGGTTACGCTC	26
PHsequ-F	GATAACCATCTCGCAAATAAATAAG	25
M13-R	CACCAAACAGCTATCAC	17

Amp-LB 平板, 37 °C 温箱培养过夜。次日从平板上挑取单菌落培养, 提取质粒经双酶切 (*Bam*H I + *Eco*R I) 初步鉴定并送检测序。

1.4.3 重组杆状病毒构建

将已鉴定的重组转移质粒 pFBd-SShRBP4 和空白载体 pFBd 质粒分别转化到 DH10bac 感受态细胞, 37 °C 摇床培养 4 h 后涂三抗平板 (卡那霉素、四环素、庆大霉素、X-gal、IPTG), 于 37 °C 孵箱培养 48 h。挑取阳性单菌落 LB 扩增, 按 BAC/PAC 试剂盒方法提取 bacmid 质粒。PCR 扩增初步鉴定 (引物: PHsequ-F, M13-R) 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将鉴定正确的重组质粒命名为 rbacmid-RBP4, 于 -20 °C 冰箱冻存储用。

1.5 细胞培养

Sf9 细胞于 Grace 培养基 (10% 胎牛血清、1% GLN) 中培养, 培养温度 27 °C, 细胞调整到对数生长期。

1.6 转染表达

将 Sf9 细胞接种到六孔板, 接种量为 9×10^5 cells/孔, 贴壁 15~30 min 备用, 余下细胞

扩增维持培养。各取 rbacmid-RBP4、rbacmid-pFBd 1~2 μ g 按说明书 (Bac-to-Bac expression manual, Invitrogen) 分别进行转染。转染混合物加入细胞后, 27 °C 孵育 5 h, 然后换液继续培养, 逐日观察细胞病变。27 °C 培养 72 h 或出现明显病变时结束培养。收集六孔板内上清液作为 P1 代病毒进行转接扩增, P1 毒种取 5 μ L 接种到 T25 细胞瓶, 继续培养至出现明显病变, 无菌收集上清记为 P2 代毒种。按试剂盒说明书进行滴定。

表达与鉴定: 取 5 瓶对数期 Sf9 细胞 (T75 培养瓶, 密度 70%), 将 P2 代毒种以 MOI=1 接种, 继续培养至出现明显病变后逐日收集样品, 1000 r/min 离心 5 min, 分离细胞及上清。用适量 PBS 重悬细胞, 按 1×10^5 cells 量通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行检测和鉴定。抗 RBP4 的兔多抗和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 被用于 Western blotting 来检测目的蛋白。

悬浮培养表达: 将 rbacmid-RBP4 P2 代毒种接种到 300 mL 悬浮的培养细胞中, 扩增培养, 逐日取样 (1 mL) 分离上清、细胞进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测和鉴定, 其余

按 1.7 操作。取表达样品 (上清、细胞裂解液) 做 2^n ($n=0, 1, 2$) 倍比稀释并进行 SDS-PAGE 检测, 用标准品 500 ng 估测目的蛋白表达量。

1.7 纯化

细胞培养上清经 0.45 μm 滤膜过滤后, 上样于金属 (Ni^{2+}) 螯合琼脂糖凝胶层析柱 (26 mm \times 20 cm), 流速 8 mL/min。上样结束后, 用平衡液 (50 mmol/L PB+0.5 mol/L NaCl+ 20 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 充分洗平层析柱, 依次用不同咪唑浓度的缓冲液洗脱 (50 mmol/L PB+0.5 mol/L NaCl+100 mmol/L 咪唑, 50 mmol/L PB+0.5 mol/L NaCl+500 mmol/L 咪唑), 收集 A_{280} 吸收峰。SDS-PAGE 检测纯化过程中 RBP4 的纯度, 凝胶成像扫描分析蛋白纯度。

1.8 多克隆抗体的制备

选择 2 月龄健康新西兰大白兔制备多克隆抗体, 抗原为杆状病毒系统表达并纯化的 RBP4 蛋白 (I-RBP4), 同时将原核表达系统获得的同种蛋白 (E-RBP4, 实验室保存)、购进的人尿液提纯的 RBP4 蛋白 (H-RBP4) 进行免疫, 对比免疫效果, 每个实验组 5 只兔。

初免用抗原 0.25 mg/只 (0.25 mL) 与等体积弗氏完全佐剂混合, 乳化 1 h 以混合物滴到液面不扩散为乳化完全, 免疫时脊柱两侧皮下多点注射 0.05 mL/点。并于第 2 周、4 周用不完全佐剂加强免疫, 第 6 周颈动脉取血, 分离抗血清检测待用。

1.9 抗体效价及特异性测定

天然的人 RBP4 (0.4 $\mu\text{g/mL}$) 包板检测血清效价, 将血清样品以 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 三个稀释度稀释, 100 μL /孔 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后洗板 5

次, 加入山羊抗兔 IgG/辣根酶标记 (1 : 3 000 稀释) 100 μL /孔 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后洗板 5 次, 室温显色 10 min 后终止。Thermo 酶标仪检测 450 nm 及 630 nm 的吸光度值。

同时将 Sf9 细胞的培养上清、Sf9 细胞破碎液 (超声破碎离心的上清液) 分别包板, 检测血清样品, 并确定其特异性。

1.10 RBP4 抗原抗体亲和力试验

取 80 nm 微球 8 mL 活化 30 min, pH 7.2 MES 过柱, 按 20 : 3 的量分别偶联硫铵初纯后抗体 (E-RBP4 PcAb、I-RBP4 PcAb、H-RBP4 PcAb) (PcAb, polyclonal antibody 即多克隆抗体), 室温混匀过夜, 甘氨酸封闭 1 h。用 0.05% SDS 洗涤微球 3 次, 最后重悬于储存液中备用。测定前微球超声 5 S : 3 S, 4 次使其具有良好的分散度。将偶联抗体配入 R2 试剂。

参照安徽大千视黄醇结合蛋白白检测试剂盒的检测方法, 顺序加入 S (S 为安徽大千 RBP4 标准品), R1 试剂 (Tris 50 mmol/L+NaCl 1 mol/L+BSA 0.1% pH 7.2), R2 试剂 (偶联抗体+表面活性剂+稳定剂), R2 加入后迅速混匀, 测定 A_{546} , 5 min 后再次测定。

2 结果

2.1 重组转移质粒的鉴定

随机挑选 3~5 个阳性克隆经 LB (100 $\mu\text{g/mL}$ Amp) 过夜培养, 提取重组质粒、经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切、1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 有一条 800 bp 左右的片段产生, 表明 RBP4 基因已经成功克隆至 pFBd 载体中, 随后的测序结果显示目的基因 RBP4 序列与预期完全一致, 命名为 pFBd-SShRBP4。

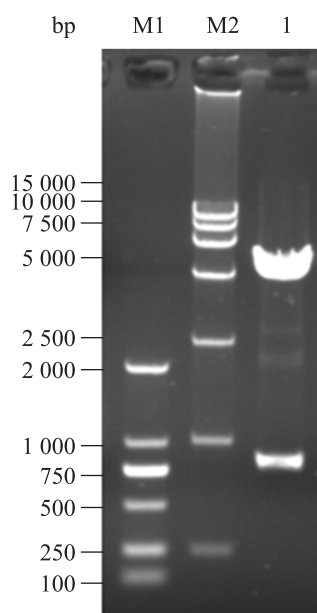


图 1 重组转移质粒 pFBd-SShRBP4 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant pFBd-SShRBP4 by restriction endonuclease digestion. M1: DNA marker DL2 000; M2: DNA marker DL15 000; 1: pFBd-SShRBP4 digested with *Bam*H I and *Eco*R I.

2.2 重组 RBP4-bacmid 的鉴定

挑选 3~5 个纯白色阳性克隆经 LB (含 50 μ g/mL 卡那霉素、10 μ g/mL 四环素、7 μ g/mL 庆大霉素) 过夜培养并提取 bacmid DNA, 以引物 (PHsequ-F、M13R) 进行 PCR 进一步筛选鉴定, PCR 产物的经 1% 琼脂糖凝胶检测, 结果如图 2 所示, 重组 bacmid PCR 产物在 1 600 bp 左右出现特异性条带 (而阴性对照 rbacmid-pFBd 在 800 bp 处扩出单一条带, 未附图), 表明 bacmid 构建成功, 命名 rbacmid-RBP4。

2.3 细胞转染及鉴定

提取 rbacmid-RBP4 DNA 转染单孔细胞, 逐日观察病变情况, 结果见图 3, 细胞生长停止, 肿胀、变圆, 折光性增强, 细胞核呈充满状态。

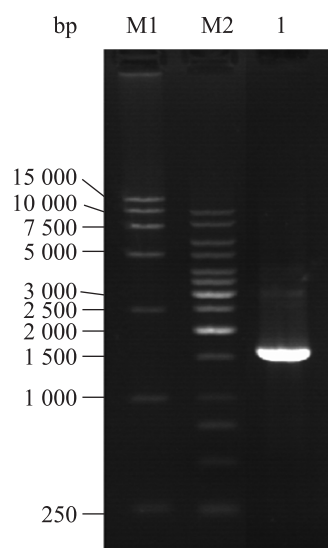


图 2 重组 rbacmid-RBP4 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant rbacmid-RBP4 by PCR. M1: DNA marker DL 15 000; M2: DNA marker DL1 kb; 1: PCR production from rbacmid-RBP4.

部分细胞逐渐坏死、脱落, 与正常细胞形成明显对比, 表明转染成功 (图 3)。

2.4 蛋白表达量测定

按实验要求留取细胞悬液, 离心, 上清细胞分离, SDS-PAGE 或 Western blotting 检测如下。

2.4.1 方瓶胞内表达

以 rbacmid-RBP4 P2 代毒种接种 T75 细胞, 从细胞出现明显病变起开始收集样品, 每天收集 1 瓶感染细胞, 分离细胞、上清, 分别电泳检测。结果见图 4, 在 23 kDa 处可看到清晰的特异性条带, 与预测蛋白的分子量大小一致, 表明 RBP4 蛋白在 Sf9 细胞中成功表达。

2.4.2 悬浮扩增培养

以 rbacmid-RBP4 P2 代毒种感染悬浮培养细胞, 感染 4 d 后取 1 mL 细胞悬液, 1 000 r/min 离心 10 min, 取 10 μ L 上清液加入等量缓冲液混匀,

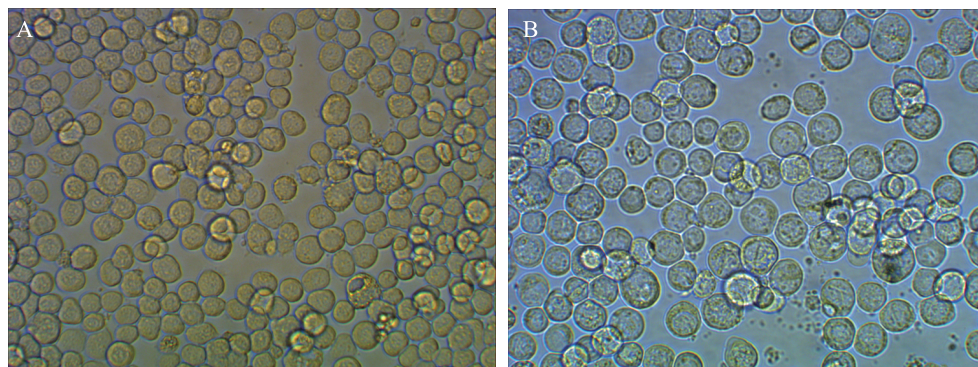


图3 正常 Sf9 细胞与转染 Sf9 细胞的形态对比 (400×)

Fig. 3 Morphological comparison of the normal and transfected Sf9 cells (400×). (A) Normal Sf9 cells. (B) Transfected Sf9 cells.

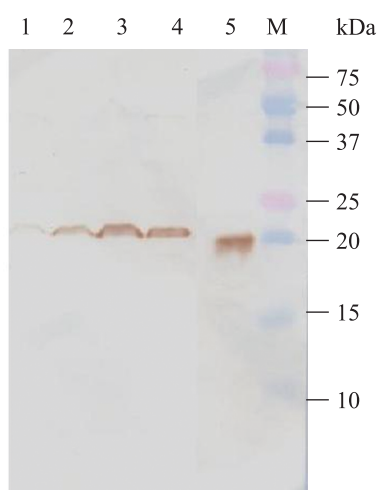


图4 Western blotting 鉴定 RBP4 在 Sf9 细胞内的表达

Fig. 4 Western blotting analysis of recombinant RBP4 protein in Sf9 cells. M: protein marker; 1-4: infected cells at 3rd/4th/5th/6th day post-infection; 5: RBP4 positive control.

煮沸 3 min, 10 μ L 点样检测目的蛋白分泌表达量。结果见图 5, 表明 RBP4 在悬浮培养的 Sf9 细胞中得到高效表达。经与标准品对照计算表达水平不低于 100 mg/L。

2.5 目标蛋白的纯化

目标蛋白经金属 (Ni^{2+}) 螯合层析柱纯化, 产物 SDS-PAGE 分析, 在分子量约 23 kDa 可见单一条带 (图 6)。纯化后 I-RBP4 含量为 36.5 mg/L, 收获率为 37%。

2.6 抗体制备

分别用杆状病毒系统表达的 I-RBP4、原核表达的 E-RBP4、人源 H-RBP4 抗原免疫新西兰白兔, 三针免疫获得高效价抗血清, I-RBP4 三免后 1: 10^5 稀释度的血清 $OD_{450-630}$ 平均值为 0.8850, 而 E-RBP4 三免后 1: 10^5 稀释度的 $OD_{450-630}$ 平均值为 0.1575 低于临界点, 其抗体水平低于真核表达的, H-RBP4 三免后 1: 10^5 稀释度的 $OD_{450-630}$ 平均值为 1.2604 (图 7)。NC (兔阴性血清 1: 100 稀释) $OD_{450-630}$ 平均值为 0.047, BC (空白对照) $OD_{450-630}$ 平均值为 0.009, 血清无非特异性结合, 实验成立。从图上可以看出, 杆状病毒系统表达的 I-RBP4 抗原的免疫原性与人源 H-RBP4 抗原免疫原性接近, 而远好于原核表达的 E-RBP4 抗原的免疫原性, 提示杆状病毒系统

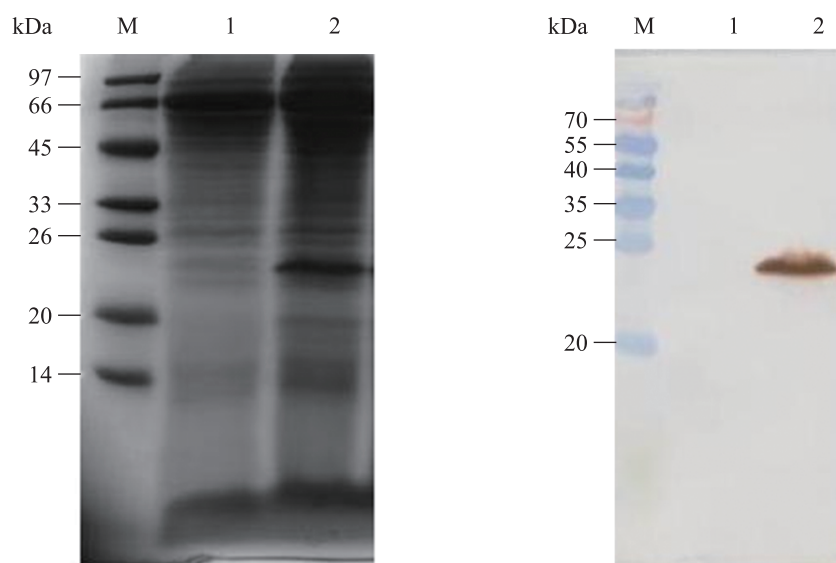


图 5 悬浮培养 Sf9 细胞表达 RBP4 的 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blotting analysis of recombinant RBP4 secreted by suspension cultured Sf9 cells. M: protein marker; 1: the supernatant from rbacmid-pFBd infected Sf9 cells at 72 h post-infection; 2: the supernatant from rbacmid-RBP4 infected Sf9 cells at 72 h post-infection.

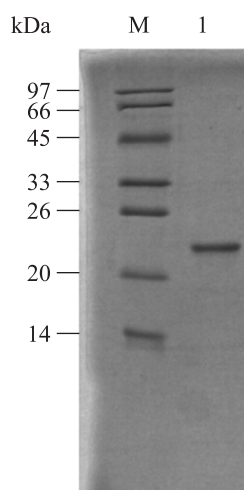


图 6 Sf9 细胞表达 RBP4 蛋白的纯化鉴定

Fig. 6 Purification of protein secreted by Sf9 cells. M: protein marker; 1: after purification.

表达的 I-RBP4 蛋白具有类似人源 H-RBP4 抗原的活性，而原核表达的 E-RBP4 蛋白与人源

H-RBP4 抗原的活性相差很大。抗血清特异性检测结果表明：RBP4 兔抗血清与 Sf9 细胞（培养基、细胞代谢物、细胞成分）无交叉反应，验证其专属性。

2.7 抗原抗体亲和力试验

利用抗原（RBP4 标准品）与特异性抗体

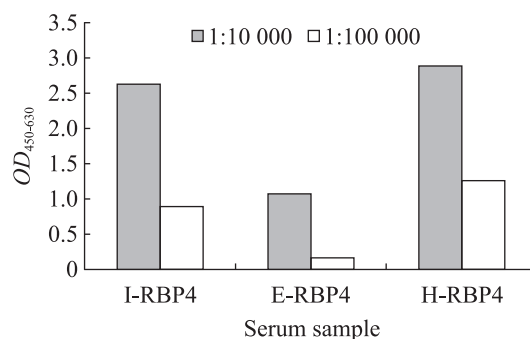


图 7 RBP4 兔抗血清 ELISA 效价测定

Fig. 7 ELISA analysis of RBP4 rabbit antiserum.

(兔抗人视黄醇结合蛋白抗血清) 相结合, 形成不溶性免疫复合物, 使反应液产生混浊, 其浊度即反应样品中视黄醇结合蛋白的浓度。

试验中将不同来源的多克隆抗体与微球偶联, 放大信号更有效地检测血清中低浓度的蛋白, 紫外分光光度检测确定抗原抗体的结合率。由表 2 可见, I-RBP4 多抗与 H-RBP4 结合效果相

近, 远高于 E-RBP4 多抗的效果。这提示本研究杆状病毒系统表达生产的重组蛋白 I-RBP4 具有和人源 H-RBP4 相似的生物学特性 (活性、高级结构), 而这些生物学特性为大肠杆菌生产的重组蛋白 E-RBP4 所不具备; 这也验证了杆状病毒表达系统具有的优越性之一, 即其重组产品绝大多数具有很好的活性。

表 2 抗原抗体亲和力试验

Table 2 Antigen-antibody affinity test

Antibody	A1	A2	A2-A1	(A2-A1)/A1
H-RBP4 PcAb 0 $\mu\text{g/mL}$	0.38486	0.42397	0.03911	0.101621369
H-RBP4 PcAb 100 $\mu\text{g/mL}$	0.38346	0.82083	0.43737	1.140588327
E-RBP4 PcAb 0 $\mu\text{g/mL}$	0.26911	0.27209	0.00298	0.011073539
E-RBP4 PcAb 100 $\mu\text{g/mL}$	0.26509	0.43419	0.16910	0.637896563
I-RBP4 PcAb 0 $\mu\text{g/mL}$	0.36900	0.39445	0.02545	0.06897019
I-RBP4 PcAb 100 $\mu\text{g/mL}$	0.37184	0.75827	0.38643	1.039237306

H-RBP4 PcAb: purified polyclonal rabbit anti-H-RBP4 (purified by ammonium sulfate precipitation); I-RBP4 PcAb: purified polyclonal rabbit anti-I-RBP4 (insect cells-expressed); E-RBP4 PcAb: purified polyclonal rabbit anti-E-RBP4 (*E. coli*-expressed); A1: instant A_{546} measurement value after S, R1 and R2 were mixed. A2: the A_{546} measurement value after 5 min reaction. A2-A1: changed absorbance value after adequate response. R2 reagent contains antibody coupled microspheres. OD value increases with elevation of the sedimentation rate of microspheres followed the antigen-antibody binding.

3 讨论

目前获得 RBP4 蛋白的方法主要有两个: 其一, 天然提纯化。正常人体液中, RBP4 含量甚微, 血液中, RBP4 浓度维持在 25~70 mg/L; 尿液中含量为 0.7 mg/L^[11]。在肾功能损伤病人中, 尿液含量仍然较低, 约 1~3 mg/24 h 尿, 且尿液中的 RBP4 以多聚物形式存在, 蛋白纯化繁琐, 成本较高, 得率较低^[12], 不利于大量提取。其二, DNA 重组技术制备。利用原核系统、真核系统

表达目的蛋白。

原核系统表达目的产物主要为包涵体形式, 多为错误折叠的 RBP4 和一些菌体蛋白以及核酸和一些脂类物质, 需要复性才能得到具有活性及实际的应用价值, 操作繁琐、难度大、收率低、成本高, 在结构与功能上与天然蛋白有一定的差距; 即使是在 *E. coli* 细胞内直接表达的可溶性蛋白, 在与特异性抗体的识别上也有明显的差异。我们的动物免疫结果也证明了这点。

真核表达首选 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系

统。此系统利用昆虫细胞高效表达多种重组蛋白,在生物制品的研发与生产中有很大的应用潜力^[13-14],并且有各种优化方案可供选择^[15-17]。采用该系统重组病毒 DNA 不含有亲代病毒,免除空斑纯化,节省成本提高效率。高滴度的病毒通过初步的转染而获得,这一特性将鉴定纯化重组病毒的时间从 4~6 周缩减到 7~9 d^[18],同时阳性克隆的转化率从 0.1%~1% 提高到接近 30%^[19-20]。对脊椎动物而言意味着较好的生物安全性^[21]。杆状病毒系统还具有其他表达系统不具有的特性,如容纳较大的外源 DNA (10 kb) 而不影响病毒的复制和装配;适合表达细胞毒性蛋白^[22];可同时表达多种蛋白并完成病毒样颗粒的构建^[23-24];利用生物反应器进行大规模的扩增培养^[25];可以在虫体内表达生产蛋白,大大节约成本^[26]等。

实验中利用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 两个酶切位点将 RBP4 片段亚克隆到 pFBd 供体质粒中,重组病毒的构建在 DH10Bac 感受态细胞中完成,通过 pFBd 供体质粒上的 mini-Tn7 序列与 bacmid 上的 mini-attTn7 序列进行转座,获得重组 rbacmid-RBP4,并转染到 Sf9 细胞而获得重组的 RBP4 蛋白。

实验初期,采用 Grace (含 FBS 10%) 培养基进行贴壁培养的 Sf9 细胞表达目的蛋白,自感染第 3 天起收集细胞和上清检测,上清中表达量低未能检出目的蛋白,而胞内的表达从第 3 天起逐步加大,第 5 天达到最高。由上述摸索实验得出如下结论: Grace 培养基能够支持目的蛋白的表达,但不是最佳的选择。在此基础上,逐步更换培养体系,用 GPM-115 (含 FBS 3%) 培养基逐步取代 Grace 培养基,实现细胞的悬浮培养,

驯化后细胞从扩增速度、感染速度以及分泌表达上都有了一定的提高,当采用 Grace 培养基贴壁培养时,目的蛋白最大表达量出现在 5~6 d,且仅为胞内表达;而优化条件后,细胞第 3 天即分泌大量目的蛋白并可持续到第 5 天,在无补料添加的条件下,表达量达 100 mg/L 以上。

真核细胞重组蛋白的优点通过家兔免疫实验得以证实。杆状病毒系统表达的 RBP4 蛋白,其免疫原接近人源的 RBP4,而优于 *E. coli* 表达的 RBP4。这也从另一个角度证明了杆状病毒表达系统生产的蛋白具有天然免疫原性。

REFERENCES

- [1] Chen J, Zhou DJ. The classification, structure and function of retinol-binding proteins. *Chem Life*, 2004, 24(2): 112-115 (in Chinese).
陈健,周度金. 视黄醇类结合蛋白的分类、结构及功能. *生命的化学*, 2004, 24(2): 112-115.
- [2] Wang SS, Xu QS. Studies on retinol-binding proteins. *Chem Life*, 2000, 20(4): 165-167 (in Chinese).
王世春,徐琪寿. 视黄醇结合蛋白研究. *生命的化学*, 2000, 20(4): 165-167.
- [3] Lin WP, Li SG, Xu QS. Molecular mechanism and clinical application of retinol-binding protein. *Bull Acad Milit: Med Sci*, 2005, 29(5): 492-495 (in Chinese).
林维平,李思光,徐琪寿. 视黄醇结合蛋白的分子机制及临床应用. *军事医学科学院院刊*, 2005, 29(5): 492-495.
- [4] Smith CW, Patton JG, Nadal-Ginard B. Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu Rev Genet*, 1989, 23: 527-577.
- [5] Monaco HL, Rizzi M, Coda A. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science*, 1995, 268(5213):

- 1039–1041.
- [6] Blumsohn A, Morris BW, Griffiths H, et al. Stability of beta 2-microglobulin and retinol binding protein at different values of pH and temperature in normal and pathological urine. *Clin Chim Acta*, 1991, 195(3): 133–137.
- [7] Xing JH, Wu K, Gao L. Diagnostic values of CysC, RBP, MA, NAG and β 2-MG during early renal damage in type 2 diabetes. *Exper Lab Med*, 2010, 28(3): 243–244 (in Chinese).
熊建辉, 吴凯, 高龙. 辨析 CysC、RBP、MA、NAG、 β 2-MG 对 2 型糖尿病肾脏早期损害的诊断价值. *实验与检验医学*, 2010, 28(3): 243–244.
- [8] Wei YP, Zhang J, Yang JP. Diagnostic values of combined detection of serum cystatin C and four classes of urine proteins in early diabetic nephropathy. *Chin J Clin Res*, 2011, 24(8): 722 (in Chinese).
魏宇鹏, 张季, 杨金萍. 血胱抑素 C 和尿中 4 种蛋白联合检测对早期糖尿病肾病的诊断价值. *中国临床研究*, 2011, 24(8): 722.
- [9] Liu N, Wang XZ. Early diagnostic markers of acute renal failure. *Exper Lab Med*, 2009, 27(1): 72–74 (in Chinese).
刘宁, 王小中. 急性肾衰竭的早期诊断标志物. *实验与检验医学*, 2009, 27(1): 72–74.
- [10] Koch A, Weiskirchen R, Sanson E, et al. Circulating retinol binding protein 4 in critically ill patients before specific treatment: prognostic impact and correlation with organ function, metabolism and inflammation. *Crit Care*, 2010, 14(5): R179.
- [11] Deng RC, Shi QF. Progresses in clinical application of retinol-binding protein. *Exper Lab Med*, 2012, 30(1): 40–43 (in Chinese).
邓荣春, 施桥发. 视黄醇结合蛋白临床应用进展. *实验与检验医学*, 2012, 30(1): 40–43.
- [12] Jin H, Gao LX, Wang ZY, et al. Purification of retinol-binding protein and preparation of its antiserum. *Progr Biochem Biophys*, 1993, 20(6): 460–463 (in Chinese).
金宏, 高兰兴, 王宗印, 等. 视黄醇结合蛋白的分离纯化及其抗血清的制备. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20(6): 460–463.
- [13] Cox MM. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, 2012, 30(10): 1759–1766.
- [14] Vicente T, Roldão A, Peixoto C, et al. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *J Invertebr Pathol*, 2011, 107(Suppl): S42–S48.
- [15] Hitchman RB, Locanto E, Possee RD, et al. Optimizing the baculovirus expression vector system. *Methods*, 2011, 55(1): 52–57.
- [16] Li SF, Wang HL, Hu ZH, et al. Genetic modification of baculovirus expression vectors. *Virol Sin*, 2012, 27(2): 71–82.
- [17] Aucoin MG, Mena JA, Kamen AA. Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. *Curr Gene Ther*, 2010, 10(3): 174–186.
- [18] Zhang WY, Yang XN, Jin DZ, et al. Expression and enzyme activity determination of human cyclooxygenase-1 and -2 in a baculovirus-insect cell system. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(8): 1000–1006.
- [19] Hartig PC, Cardon MC. Rapid efficient production of baculovirus expression vectors. *J Virol Methods*, 1992, 38(1): 61–70.
- [20] Kitts PA, Ayres MD, Possee RD. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(19): 5667–5672.
- [21] Van Oers MM. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol*, 2011, 107 (suppl): S3–S15.
- [22] Bel Haj Rhouma R, Cérutti-Duonor M, Benkhadir K, et al. Insecticidal effects of *Buthus occitanus tunetanus* BotIT6 toxin expressed in *Escherichia coli* and baculovirus/insect cells. *J Insect Physiol*, 2005, 51(12): 1376–1383.

- [23] Chung CY, Chen CY, Lin SY, et al. Enterovirus 71 virus-like particle vaccine: improved production conditions for enhanced yield. *Vaccine*, 2010, 28(43): 6951–6957.
- [24] Palomares LA, Mena JA, Ramírez OT. Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: production of virus-like particles. *Methods*, 2012, 56(3): 389–395.
- [25] Maranga L, Cunha A, Clemente J, et al. Scale-up of virus-like particles production: effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity. *J Biotechnol*, 2004, 107(1): 55–64.
- [26] Wu TY, Chen HA, Li FY, et al. High-level expression, purification and production of the fungal immunomodulatory protein-gts in baculovirus-infected insect larva. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(3): 976–989.

(本文责编 郝丽芳)

第七届中国生物产业大会举行

专家预计生物产业将继续领跑新兴产业

2013年6月20日至23日,主题为“生物资源、产业机遇”的第七届中国生物产业大会在云南昆明举行。本次会议共组织高层论坛及相关活动20余项,吸引了多家国内外科科研机构及700余家企业参展参会。

第十一届全国人大常委会副委员长、中国工程院院士桑国卫出席大会,并在高层论坛上作题为《我国创新药物研发与生物药的安全性》的专题报告。国家发展改革委副主任张晓强、中国科学院副院长张亚平、云南省政府副省长沈培平等也在大会上作专题报告。

有关专家判断,未来几年,在创新驱动、供求互动、政策带动下,预计生物产业将继续领跑新兴产业,成为投资最为活跃、增长最为快速、需求最为旺盛的领域之一。

专家分析,进入新世纪以来,以分子设计和基因操作为核心的技术突破推动了生物产业内的深刻变革,全球生物产业进入了一个加速发展的新时期。与此同时,中国生物产业持续多年快速发展,在外需下滑、经济增速下降的背景下,总体实现逆势增长,已成为稳增长、调结构的重要力量。据测算,2012年,在全球经济不景气的背景下,中国生物产业规模仍保持了约20%的增速,总产值达到2.4万亿元。

据悉,中国生物产业大会自2007年起在中国国家级生物产业基地所在地每年举办一次,由中国生物工程学会等19家学会和中国科学报社共同主办。此前,该大会已在河北石家庄、湖南长沙、吉林长春、山东济南、广东深圳和江苏泰州成功举办了六届。

(来源 《中国科学报》 2013-06-24 第1版 要闻)