

人 SmD1 抗原的酵母真核表达及其初步应用

杨湘越 吴文冰 兰小鹏*

(南京军区福州总医院解放军临床检验医学研究所 福建 福州 350025)

摘要: 通过 PCR 扩增 Sm D1 基因, 与酵母表达载体 pPIC9k 重组, 构建表达质粒 pPIC9k-Sm D1。用电穿孔法转化酵母菌 SMD1168, 在 MD 平板上筛选重组克隆, 用 G418 快速筛选高拷贝转化子, 阳性克隆经甲醇诱导表达后, 培养上清用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和免疫酶斑点法(immunodot)鉴定。结果显示 PCR 产物约为 360 bp, 符合预期, pPIC9k-Sm D1 重组阳性克隆双酶切鉴定正确, 测序结果与 GenBank 核酸数据库报道完全一致。表达产物 Sm D1 的分子量约 16 kD, 高拷贝毕赤酵母转化菌的表达水平明显高于低拷贝的。immunodot 证实表达产物具有天然 Sm D1 分子的免疫原性。阴性对照菌未见目的表达条带。Immunodot 的敏感性为 96%, 特异性为 100%, 与免疫印迹法(immunoblot, IBT)的符合率为 98%。Sm D1 在巴斯德毕赤酵母中获得高效分泌表达, 为下一步研究打下了基础。

关键词: Sm D1 抗原, 克隆表达, 巴斯德毕赤酵母

Eukaryotic Expression and Primarily Application of Human Smith D1 Antigen in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*

YANG Xiang-Yue WU Wen-Bing LAN Xiao-Peng*

(PLA Medical Laboratory Center, Fuzhou General Hospital, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: To clone, express and primarily use human autoantigen Sm D1 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The gene Sm D1 was cloned by PCR. The PCR product was inserted into the vector pPIC9k. The recombinant plasmid pPIC9k-Sm D1 was transformed into yeast SMD1168 by electroporation. The positive clones were screened in MD plates. The high copy number transformants were rapidly selected by using G418 and were induced by methanol. Supernatants after induction were analyzed by SDS-PAGE and immunodot. The PCR product was showed about 360 bp in size which was in accordance with predicted. The pPIC9k-Sm D1 showed the same sequencing result with GenBank's report and restriction enzyme analysis confirmed our prediction. The pPIC9k-Sm D1 positive clone produced an about 16 kD protein which had natural immunogenicity of human autoantigen Sm D1 by SDS-PAGE and immunodot. The sensitivity and specificity of immunodot were 96% and 100%, respectively. The agreement between immunodot and immunoblot was 98%. Successfully cloning and high-level expression of human autoantigen Sm D1 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* laid a foundation for further research work.

Keywords: Sm D1 antigen, Cloning and expression, *Pichia pastoris*

基金项目: 福建省青年人才科技创新基金资助项目(No. 2002J060)

* 通讯作者: ☐ cyyh983@sina.com

收稿日期: 2008-05-28; 接受日期: 2008-09-11

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种自身免疫性疾病,目前其发病率有所上升。患者血清中可检出多种抗Sm(B、B₂和D1)自身抗体,其中抗Sm D1 抗体的诊断价值和特异性较高,被认为是SLE的标志性特异性抗体^[1]。

目前,临床检测抗Sm D1 的常规方法有免疫印迹法(immunoblot, IBT)、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和欧蒙斑点法等,其作为固相包被的自身抗原均来源于小牛和兔胸腺提取物,存在一定的缺陷,如提取困难、纯度不高、有批间差异等。应用基因工程技术克隆表达人源Sm D1 抗原已势在必行,我们在大肠杆菌中成功表达了谷胱甘肽转移酶(GST)-人Sm D1 重组融合蛋白^[2],免疫原性令人满意,但抗原的后续纯化、切割处理过程十分不便。巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)真核表达系统自上世纪后期问世以来发展迅猛,其独特的高表达、高分泌、低背景、低成本及良好的修饰加工能力等特性,成为当今倍受关注和最有价值的表达系统,国内外在疫苗、药品、重组抗原等开发应用方面有不少成功范例,本文尝试利用该系统对人Sm D1 基因进行了分泌表达及初步应用研究。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌JM109、巴斯德毕赤酵母菌SMD1168(*his4pep4*)和酵母分泌型表达载体pPIC9k本室保存,质粒pGEX-5T-Sm D1 由本室构建。各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、聚合酶链反应(PCR)扩增试剂盒、DL2000 DNA标志物购自TaKaRa生物技术有限公司。质粒抽提、DNA回收、酵母DNA抽提试剂盒、G418 和蛋白分子量标准及BSA购自上海华舜生物工程有限公司。生物素、YNB和硝酸纤维素膜购自上海生工公司。自身抗体ENA谱免疫印迹法检测试剂盒(广州万孚生物技术有限公司)。鼠抗人辣根过氧化物酶复合物、DAB、H₂O₂由华美生物技术有限公司提供。抗-Sm D1 阳性病人血清为本室保存。电穿孔仪、紫外分光光度计购自Bio-Rad公司。PE 2400型PCR扩增仪购自ABI公司。GSG-2000 凝胶图像分析系统购自珠海黑马医疗仪器公司。培养基LB(1%蛋白胨、0.5%酵母提取粉、1%氯化钠),LBA(LB加100 μg/mL 氨苄青霉素),YEPD(1%酵母提取粉、2%蛋白胨、2%葡萄糖、2%琼脂),

MD(1.34%YNB、4×10⁻⁵%生物素、2%葡萄糖、1.5%琼脂), BMGY(1%酵母提取粉、2%蛋白胨、1.34%YNB、1%甘油、100 mmol/L pH6.0 磷酸钾缓冲液、4×10⁻⁵%生物素),BMMY(将BMGY中的1%甘油替换为0.5%甲醇)。引物由上海英骏生物技术公司合成:正向引物 5'-CCTACGTAATGAAGCTCGTGAGATTTTGTG-3' (TACGTA为*Sna*B I限制性酶切位点),反向引物 5'-ACGCGGCCGCTTATCGCCTAGGACCCCTCT-3' (GCGGCCGC为*Not* I限制性酶切位点)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 Sm D1 基因:以质粒 pGEX-5T-Sm D1 为模板扩增 Sm D1 全长编码基因,PCR 循环条件:94℃ 预变性 3 min;94℃ 45 s,58℃ 45 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。取 10 μL 在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。

1.2.2 pPIC9k-Sm D1 的构建:分别将回收、纯化后的PCR产物和酵母分泌型表达质粒pPIC9k,用*Sna*B I和*Not* I双酶切后,电泳回收所需片段,定向连接,重组质粒经CaCl₂法转导入宿主菌*E. coli* JM109,挑取转化子,酶切鉴定并交上海生工公司测序。

1.2.3 pPIC9k-Sm D1 对毕赤酵母的转化及高拷贝阳性转化子的筛选:用*Sal* I线性化 pPIC9k-Sm D1,以线性化 DNA 电穿孔法(1300 V, 25 μF, 200 μs)转化组氨酸合成缺陷型宿主酵母 SMD1168,经组氨酸缺乏的 MD 平板筛选得到数百重组转化子,未重组的组氨酸缺陷型酵母宿主细胞在 MD 平板上不生长。在含 2 mg/mL G418 的 YEPD 平板上点种重组转化子,30℃ 培养 3 d,生长良好的 G418 抗性转化子再点种于含 3 mg/mL G418 的 YEPD 平板上,30℃ 培养 3 d,结果有 17 个 G418 抗性转化子生长,称之为高拷贝转化子。

1.2.4 高拷贝转化子的 PCR 鉴定:将筛选出的 17 株酵母高拷贝转化子用试剂盒抽提 DNA 后,以此为模板,用 Sm D1 引物 PCR 扩增,鉴定 Sm D1 基因是否整合到毕赤酵母染色体 DNA 中。

1.2.5 Sm D1 的诱导表达:将G418 筛选出的高拷贝和低拷贝转化子各 1 株分别接种于 100 mL BMGY 增菌培养基中,30℃振荡过夜至OD₆₀₀为 3~6。菌液 5000 r/min,离心 5 min弃上清。沉淀重悬于 25 mL

BMMY诱导培养基中。30℃振荡培养, 持续 3 d, 每天补加体积百分数为 0.5%的甲醇, 离心弃沉淀, 上清经 80%硫酸铵沉淀后复溶, 置-20℃保存。无外源基因的空白载体pPIC9k转入宿主菌作为阴性对照, 同样条件诱导表达。

1.2.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE): 取-20℃保存的表达产物 20 μL 与 2×上样缓冲液等体积混合后上样, 电泳后考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.7 Sm D1 蛋白的分离纯化: 将 SDS-PAGE 中的 Sm D1 目的条带切割入透析袋, 水平电泳后置 pH 7.4 的 PBS 中 4℃透析过夜, 透析袋内 Sm D1 蛋白液体浓缩后-80℃保存备用。

1.2.8 免疫酶斑点法(immunodot)^[3]: 分别取 1 μL、0.5 μL纯化的Sm D1 蛋白及 0.5 μL的BSA阴性对照点样于硝酸纤维素膜上, 一抗为抗-Sm D1 阳性病人血清, 二抗为鼠抗人的辣根过氧化物酶复合物, 在 DAB、H₂O₂下显色。

1.2.9 immunodot 与免疫印迹法(immunoblot, IBT)的对比分析: 用这两种方法检测 50 例经 IBT 检测为抗-Sm D1 阳性的 SLE 患者和 50 例健康人血清, 根据检测结果进行方法学评价。

2 结果

2.1 人 Sm D1 抗原基因的扩增

PCR 产物经琼脂糖电泳时, 出现一条特异性区带, 位于分子质量标准为 250 bp 和 500 bp 间, 与预期的片段大小(360 bp)一致(见图 1)。

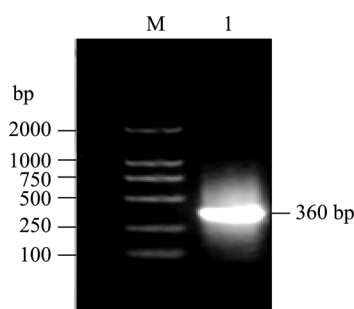


图 1 人 Sm D1 抗原基因 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of Sm D1
M: DNA marker; I: PCR 扩增产物。

M: DNA marker (DL2000); I: PCR product of Sm D1.

2.2 重组质粒的鉴定

挑取阳性克隆, 提取重组质粒。重组质粒经 *Sna*B 和 *Not* 双酶切后, 可见 360 bp 左右的插入

片段, 提示重组质粒含有 Sm D1 基因(见图 2), 测序结果说明插入片段阅读框和方向正确(见图 3)。

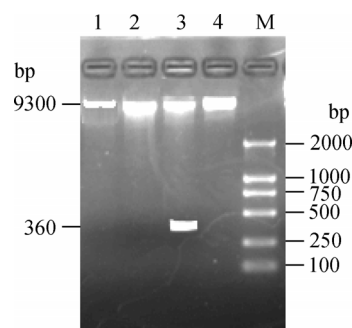


图 2 重组质粒双酶切电泳图

Fig. 2 Restrictive digestion analysis of recombinant plasmid

1: 空质粒双酶切前; 2: 空质粒双酶切后; 3: 重组质粒双酶切后; 4: 重组质粒双酶切前; M: DNA marker.

1: Void plasmid before digestion; 2: Void plasmid after digestion; 3: Recombinant plasmid after digestion; 4: Recombinant plasmid before digestion; M: DNA marker(DL2000).

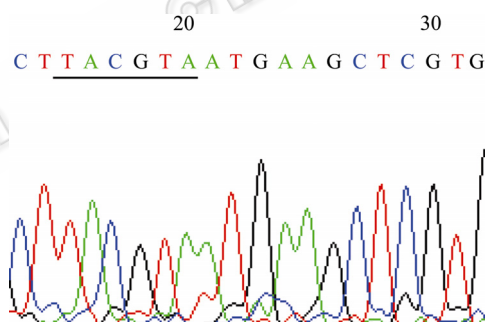


图 3 重组质粒 5'端测序图(划线处为 *Sna*B I 酶切位点)

Fig. 3 The 5' sequencing of recombinant vector (*Sna*B site is underlined)

2.3 高表达重组酵母菌的 PCR 鉴定

17 株高表达重组子的 PCR 产物经琼脂糖电泳时, 出现一条特异性区带, 位于分子质量标准为 250 bp 和 500 bp 间, 与预期的片段大小(360 bp)一致(见图 4)。

2.4 SDS-PAGE 分析

阳性表达菌在约 16 kD 处有一条带, 空载体阴性对照菌未见该条带, 表达水平与拷贝数呈正比, 即高拷贝高表达(见图 5)。

2.5 immunodot 分析

与 BSA 阴性对照比较, 高拷贝阳性菌表达产物的 2 个斑点均显棕色结果, 证明表达产物具有天然 Sm D1 蛋白的免疫原性, 能被抗-Sm D1 阳性病人的血清所识别(见图 6)。

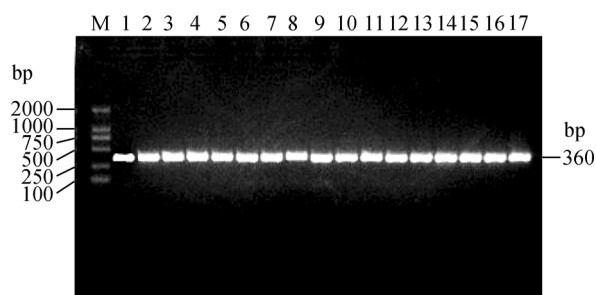


图4 高表达重组酵母菌 PCR 电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR analyzing of recombinant yeast

M: DNA marker; 1~17: 重组酵母菌 PCR 扩增产物.

M: DNA marker; 1~17: Recombinant yeast.

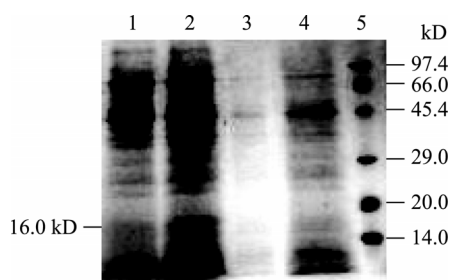


图5 表达产物的 15% SDS-PAGE 图

Fig. 5 15% SDS-PAGE of the culture supernatant

1: 低拷贝转化菌表达产物; 2: 高拷贝转化菌表达产物; 3: 未浓缩的高拷贝转化菌上清; 4: pPIC9k 空载体阴性对照; 5: 标准蛋白质相对分子质量.

1: Expression product of low copy number transformant; 2: Expression product of high copy transformant; 3: Supernatant of high copy transformant before $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation; 4: Negative control of pPIC9k; 5: Protein marker.

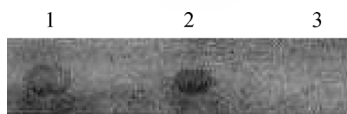


图6 表达产物的 immunodot 图

Fig. 6 Immunodot of the expression product

1: 1 μL 阳性点样; 2: 0.5 μL 阳性点样; 3: BSA 阴性对照.

1: Positive dot of 1 μL; 2: Positive dot of 0.5 μL; 3: BSA negative control.

2.6 两种方法检测抗-Sm D1 抗体结果比较

50 例 IBT 检测为抗-Sm D1 阳性的 SLE 标本, immunodot 有 48 例阳性; 50 例健康人血清, 两法均为阴性。immunodot 的敏感性为 96%(48/50), 特异性为 100%(50/50), 两种方法的符合率为 98% (98/100)。上述结果显示, 毕赤酵母系统表达的 Sm D1 与动物胸腺提取的 Sm D1 在抗原性方面几乎没有差别。由于组织提取法存在许多不足, 采用酵母重组法可能是今后的一个发展方向。

3 讨论

由于原核表达产量低, 常以包涵体形式存在, 需经复杂繁琐的变复性处理, 纯化困难, 融合蛋白还需切割处理, 尤其对真核蛋白不能翻译后加工修饰, 影响蛋白的抗原性及生物活性。巴斯德毕赤酵母表达系统是近年来十分流行的生产制备型系统, 它具有高表达(强启动子)、高稳定(非质粒的整合型)、高分泌(突破克级水平)和一定的蛋白质修饰加工、自身分泌蛋白少、易于纯化且不含内毒素等显著特性, 同时也具有原核表达系统的方便, 简单和成本低等优点^[4]。这对于生产低成本、高抗原性、无内毒素污染的基因工程重组抗原是非常有利的^[5]。

pPIC9k 为整合型分泌表达载体, 能使多拷贝目的基因以同源重组的方式整合入毕赤酵母染色体, 产生多个串联表达单元, 可形成高产菌株。pPIC9k 含有抗 G418 药物的卡那霉素基因(*kan* gene), G418 抗性的强弱与重组转化子的拷贝数之间呈正相关^[6]。因此, 可直接用高浓度药物 G418 方便快捷筛选含 pPIC9k-Sm D1 多拷贝载体的转化菌株。研究表明, 多拷贝转化子可提高蛋白表达量^[7], 但高拷贝数不一定就能高表达, 原因可能是外源 mRNA 的翻译效率或蛋白通过内质网中不能正确折叠造成的^[4]。外源基因在毕赤酵母中能否表达及是否高表达, 受很多因素的影响, 如基因剂量、甲醇利用试验(methanol utilization test, Mut)表型、信号肽、外源基因碱基序列、宿主菌类型、培养条件等^[8]。本研究发现 Sm D1 在毕赤酵母中的表达量与基因剂量有关, 拷贝数越高表达量也越高。

Sm 抗原由至少 9 种成分组成共同核心(common core), 其中以 Sm B/B' 和 Sm D 临床意义最大, 但 Sm B/B' 可以不同程度的与抗 U1-RNP 血清反应, 而混合结缔组织病(mixed connective tissue disease, MCTD)的病人血清中总有抗 U1-RNP 抗体, 降低了其特异性, 故抗 Sm D 抗体被认为是 SLE 的特异性抗体。Sm D 又可以分为 3 个亚型: Sm D1、Sm D2 及 Sm D3, 其中最重要的免疫活性蛋白是 Sm D1^[1]。目前临床测定抗 Sm D1 的方法不仅操作繁琐费时, 而且结果与临床诊断有时不吻合。例如, 用 IBT 检测可提取性核抗原抗体谱(ENA 谱)时, 因采用牛或兔胸腺丙酮粉粗提物作抗原, 电泳后转印于硝酸纤维素膜上, 由

于抗原不纯, 分子量不同的蛋白质因所带电荷不同, 在电场中泳动速度仍可相同, 故分子量相同的条带并不一定是单一的蛋白质组分, 由此检测到的自身抗体就不一定是特异性的; 另一方面, IBT 中的抗原是变性蛋白, 使得针对空间构象表位的抗体无法识别。因此, IBT 在实际运用中既可能产生假阳性也可产生假阴性结果^[9-11]。

本研究用巴斯德毕赤酵母真核表达系统高效表达重组自身抗原 Sm D1, 既可以解决传统提取法中抗原不纯的关键问题, 又可低成本大量制备均一的自身抗原。除 Sm D1 外, 我们准备用同样的方法克隆表达一系列其它人自身抗原。可以预期, 采用多种高纯度的基因重组自身抗原作成的蛋白芯片或胶体金试剂盒, 将会比 IBT 法更准确、快速、敏感和特异, 以便能较好的解决困扰临床医生的自身免疫病诊断难、易误诊和漏诊的问题。

参 考 文 献

- [1] Hoch SO, Elsenberg RA, Sharp GC. Diverse antibody recognition patterns of the multiple Sm-D antigen polypeptides. *Clin Immunol*, 1999, **92**(2): 203-208.
- [2] 吴文冰, 兰小鹏, 杨湘越. 人 Smith D1 抗原在原核细胞中的表达与纯化及临床应用. *中华检验医学杂志*, 2007, **30**(6): 655-658.
- [3] 朱忠勇. 实用医学检验学. 第一版. 北京: 人民军医出版社, 1992, pp.792-793.
- [4] 章如安, 杨 晟, 邱荣德, 等. 巴斯德毕赤酵母表达体系研究及进展. *微生物学通报*, 2000, **27**: 371-373.
- [5] 杨湘越, 兰小鹏, 颜宏利, 等. 毕赤酵母重组猪囊尾蚴抗原 cC1 的特征研究. *中国人兽共患病杂志*, 2004, **20**: 241-243.
- [6] Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, *et al.* Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology(N Y)*, 1994, **12**: 181-184.
- [7] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology(N Y)*, 1993, **11**: 905-910.
- [8] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, **190**: 55-62.
- [9] 唐福林. 慎重看待 ENA 多肽抗体的临床意义. *中华风湿病学杂志*, 1999, **3**: 201-202.
- [10] 李新蕊, 杜 华, 王丹念, 等. 免疫印迹技术检测 ENA 实验中常见问题及注意事项. *中国误诊学杂志*, 2003, **3**: 1423-1423.
- [11] 朱钰钰, 甘小丹. 免疫印迹法检测可提取核抗原多肽抗体的评价. *现代检验医学杂志*, 2005, **20**: 26-27.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(h)$ (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格 (和 % 除外), 例如: $20\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$, 不能写成 $20 \times 0.3\text{ cm}$; $3 \sim 5$ 不可写成 $3 \sim 5$; $3\% \sim 6\%$ 不可写成 $3 \sim 6\%$ 等。