

· 基础研究 ·

重组人 C 反应蛋白在甲醇酵母中的分泌表达及鉴定*

李军明¹, 林 衡², 张立超¹, 葛高顺¹, 胡学军^{1△}

(大连大学:1. 医学院;2. 生命科学与技术学院, 辽宁大连 116622)

摘要:目的 构建重组人 C 反应蛋白(rhCRP)甲醇酵母分泌表达菌株,表达、纯化 rhCRP 并鉴定其免疫反应性。方法 将人工设计合成的 rhCRP 基因克隆到甲醇酵母表达载体 pPICZαA 上,经 Sac I 线性化得到重组质粒 pPICZαA/rhCRP 后转化至甲醇酵母 X-33 中,利用甲醇诱导进行分泌表达,并用组氨酸标签进行亲和层析纯化 rhCRP。采用 SDS-PAGE、Western blotting 检测表达、纯化的目的蛋白,通过间接酶联免疫吸附试验(ELISA)鉴定其免疫反应性和稳定性。结果 成功构建人 CRP 的重组甲醇酵母表达载体 pPICZαA/rhCRP,重组酵母菌株成功诱导分泌表达 23×10^3 的 rhCRP;一步纯化即得纯度为 90.42% 的目的蛋白,间接 ELISA 法检测表明,纯化产物 rhCRP 具有特异的免疫反应性和一定的稳定性。结论 利用甲醇酵母表达系统,成功获得了较高纯度的具有免疫反应性的 rhCRP,为下一步制备抗人 CRP 抗体及自主研发人 CRP 检测试剂提供重要的实验基础。

关键词: C 反应蛋白质;甲醇酵母;诱导表达;分泌表达;免疫反应性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)28-3390-03

Expression and identification of recombinant human C-reactive protein in *Pichia pastoris**Li Junming¹, Lin Heng², Zhang Lichao¹, Ge Gaoshun¹, Hu Xuejun^{1△}

(1. Medical School;2. College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: Objective To construct the secretory expression vector of recombinant human C-reactive protein(rhCRP) for its secretory expression in *Pichia pastoris*, rhCRP was expressed as a secretory protein and purified, and the immunity reactivity of the purified protein was identified. **Methods** The DNA fragment of rhCRP which was designed and synthesized was cloned into pPICZαA vector. Recombinant plasmid pPICZαA/rhCRP was linearized by Sac I and transformed into *Pichia pastoris* X-33 by electrotransformation. The rhCRP was secreted into the medium under the methanol induction. RhCRP was purified by Histamine affinity chromatography. The purified rhCRP was identified by SDS-PAGE and Western blotting, and its immunity reactivity and stability was identified by indirect ELISA. **Results** The pPICZαA/rhCRP expression vector was successfully constructed. The rhCRP of 23×10^3 was induced and successfully expressed as a secretory protein by the recombinant *Pichia pastoris* strains. The rhCRP was purified by one step up to 90.42% purity, and it was showed good immunity and stability by indirect ELISA. **Conclusion** The rhCRP with higher purity and immunoreactivity was successfully obtained by using the *Pichia pastoris* expression system, which provided an important experimental basis for producing anti-human CRP antibodies and developing testing CRP reagent.

Key words: C-reactive protein; *pichia pastoris*; induced expression; secretory expression; immunity reactivity

C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是目前发现的重要急性时相反应蛋白之一。其作为灵敏的炎症指标、良好的心血管疾病发病诊断及其发病风险预测指标,对于许多疾病的筛查、监测以及疗效评估具有重要价值^[1-3]。目前商品化的 CRP 及其检测试剂多依赖进口,价格昂贵,阻碍了其临床研究与应用^[4]。因此,本研究旨在探索利用真核甲醇酵母表达系统分泌表达并制备具有免疫反应性的重组人 C-反应蛋白(recombinant human C-reactive protein, rhCRP),为进一步的 rhCRP 基础研究及 CRP 检测试剂的自主研制提供重要的实验材料和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 公司;Zeocin 抗生素、HisTrap HP 纯化柱、羊抗鼠 IgG-HRP 抗体均为 Invitrogen 公司产品;抗 His-Tag-HRP 单克隆抗体、小鼠抗人 CRP 单克隆抗体、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液均购自 Sigma 公司,其它试剂为进口或国产分析纯。

1.1.2 菌株和载体 毕赤酵母 X-33、表达载体 pPICZαA 均

为本实验室保存,大肠杆菌(E. coli) JM109 购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pPICZαA/rhCRP 的构建 参照 GenBank 中检索到的编码人 CRP 的基因序列及表达载体的多克隆位点的特点,设计 rhCRP 基因并委托 GenScript 公司进行人工合成后,经 Xho I、Xba I 双酶切并插入到载体 pPICZαA 中后转化至 E. coli JM109;通过含 Zeocin(25 μg/mL)的 LS-LB 平板筛选阳性克隆,接种并提取重组质粒 pPICZαA/rhCRP,然后进行双酶切鉴定及测序鉴定。

1.2.2 重组质粒的酵母转化及筛选 将 Sac I 线性化的 pPICZαA/rhCRP 及空载体 pPICZαA 各 10 μg,分别加入到 80 μL 新制备的酵母感受态细胞中,通过电转化的方式,将它们分别转化入酵母 X-33 中,于含 Zeocin(100 μg/mL)的 YPDS 平板上、30℃温箱中培养 2~3 d 并将长出的单个菌落于含 Zeocin(100 μg/mL)的新鲜 YPDS 平板上再次筛选。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达、纯化及鉴定 将筛出的 7 个单克隆及阴性对照分别接种到含 10 mL BMGY 培养基的 50 mL 离心管中开始表达,方法参照 Invitrogen 公司提供的酵母表达

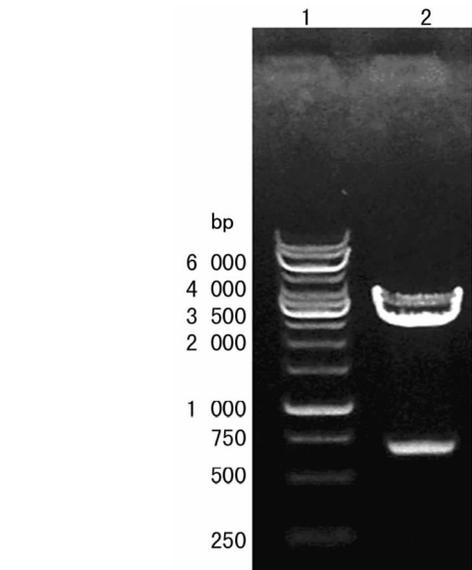
手册;经浓度为 0.5% 的甲醇诱导表达 120 h 后,收集样品并取上清进行 Western blotting 鉴定分析。然后,进行摇瓶发酵。表达 120 h 并收集全部上清后经 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液透析,用 HisTrap HP 柱纯化 rhCRP。采用 SDS-PAGE、Western blotting 及 Gel DocTM EZ 凝胶成像系统检测分析表达纯化产物。

1.2.4 重组蛋白的免疫反应性及稳定性鉴定 纯化蛋白通过间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测其免疫反应性。将纯化的 rhCRP 稀释到适当浓度后,各取 100 μ L 稀释液包被酶标板,同时做空白对照;采用 1 : 6 000 稀释的鼠抗人 CRP 单克隆抗体作一抗,1 : 5 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 抗体作二抗;用 TMB 显色后测定其吸光度值。将纯化的 rhCRP 样品保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 4、8 周后,分别重复上述的间接 ELISA 检测。每次检测各重复 3 次,取平均值进行比较分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒 pPICZ α A/rhCRP 的构建 重组质粒 pPICZ α A/rhCRP 经 Xho I、Xba I 双酶切鉴定,可见约为 681 bp 的目的条带和 3 491 bp 的载体条带,片段大小与预期一致,见图 1;其测序结果经 Vector NTI、Sequencher 软件分析显示与设计的基因序列完全一致,表明重组表达载体构建正确。见图 1。



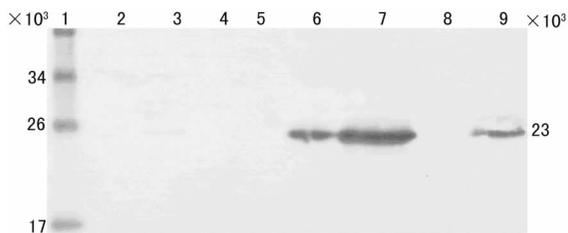
1:DNA KB Ladder ;2:pPICZ α A/rhCRP/Xba I +Xho I 双酶切产物。

图 1 重组质粒 pPICZ α A/rhCRP 的酶切鉴定

2.2 重组蛋白的诱导表达 筛选的 7 个单克隆酵母菌株,经 0.5% 的甲醇诱导表达 120 h 后,取培养液上清进行 Western blotting 分析,结果显示,其中 3 个单克隆在相对分子质量约 23×10^3 处出现明显特异性条带,且大小与预期结果一致,而空载体酵母母株未显现出目的条带,见图 2。

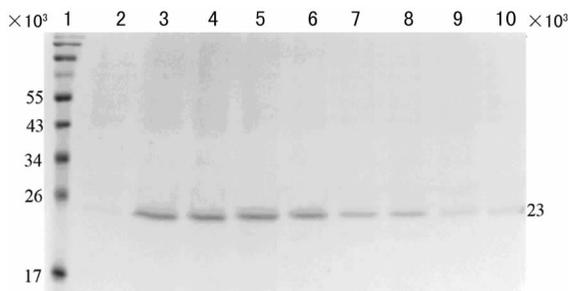
2.3 重组蛋白的分离纯化及鉴定 纯化的蛋白经 SDS-PAGE 检测分析显示,在相对分子质量为 23×10^3 处成功分离出单一蛋白条带,相对分子质量符合预期大小且蛋白的洗脱峰集中在 2~7 管的 300 mmol/L 咪唑洗脱液中,见图 3;纯化蛋白经 Western blotting 检测证实为目的蛋白,见图 4;经 Gel DocTM EZ 凝胶成像系统检测分析表明,一步纯化即获得纯度达

90.42% 的 rhCRP。



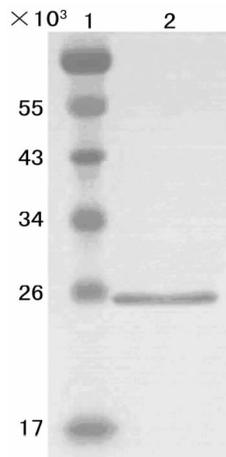
1:标准蛋白;2:空载体酵母母株经甲醇诱导表达 120 h 的菌液上清;3~9:分别为 1~7 号单克隆菌株经甲醇诱导表达 120 h 的菌液上清。

图 2 目的蛋白 rhCRP 的诱导表达



1:标准蛋白;2~10:分别为 300 mmol/L 咪唑洗脱的第 1~9 管蛋白样品。

图 3 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 分析



1:标准蛋白;2:纯化的 rhCRP。

图 4 纯化重组蛋白的 Western blotting 分析

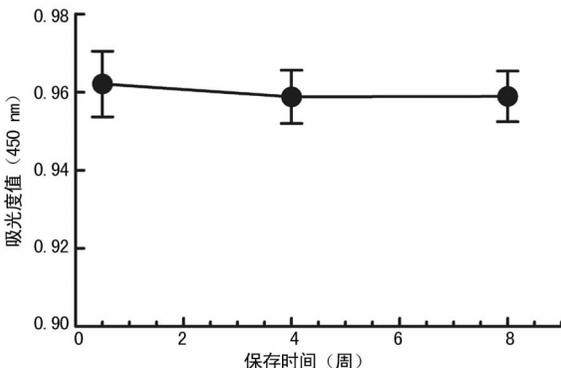


图 5 重组蛋白的免疫反应性及稳定性鉴定分析

2.4 重组蛋白的免疫反应性及稳定性鉴定 经间接 ELISA 法将新制备的及于 4 $^{\circ}$ C 保存 4、8 周后的 rhCRP 样品进行其免疫反应性和稳定性的鉴定。结果显示,其吸光度 A_{450} 平均值分

别为 0.962 1、0.958 8 和 0.958 9, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。

3 讨 论

传统获得人 CRP 的方法主要是从患者血清或腹水中直接分离纯化得到。由于人血清或腹水成分复杂, 故纯化时难度大、操作复杂, 而且材料来源困难, 产量低^[4-5]。随着生命科学的不断发展, 通过基因重组技术生产医用蛋白是当今生物及医学研究的热点。目前, 国内外利用基因工程的方法获得重组人 CRP 的研究已有报道^[6-9], 但都存在一定的弊端, 本实验在前人研究的基础之上, 进一步探究更经济、更高效的制备 rhCRP 的途径。

本研究选用了近年来发展非常迅速的一个真核表达系统—甲醇酵母表达系统, 其表达外源蛋白具有众多优势^[10]。酵母为简单的单细胞真核生物, 既具有原核细胞的生长快, 可进行细胞高密度培养的特点, 又具有类似真核细胞的翻译后加工修饰功能^[11]; 既避免了大肠杆菌细胞^[8]表达 rhCRP 时易形成包涵体、纯化复杂等问题, 又比哺乳动物细胞^[7]和昆虫细胞^[6]生产 rhCRP 的成本低; 而且该系统可分泌表达目的蛋白, 易于目的蛋白的分离纯化^[10-11]。

本研究利用真核甲醇酵母表达系统, 成功构建了 rhCRP 的毕赤甲醇酵母表达菌株, 在强启动子 AOX1 的调控下, 成功分泌表达了 rhCRP; 经一步分离纯化即分离出纯度较高的 rhCRP, 并经间接 ELISA 检测证实其具有良好的免疫反应性和稳定性, 为下一步 rhCRP 的优化表达研究、抗人 CRP 抗体制备以及人 CRP 检测试剂的自主研发, 提供了重要的实验基础。

参考文献:

- [1] Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function[J]. *Mol Immunol*, 2001, 38(2/3):189-197.
- [2] Martinez VB, Gonzalez-Juanatey JR. Markers of inflammation and cardiovascular disease; clinical applications of C-reactive protein determination[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2009, 9(Suppl 1):S3-7.
- [3] Manace LC, Babyatsky MW. Putting genome analysis to

good use; lessons from C-reactive protein and cardiovascular disease[J]. *Cleve Clin J Med*, 2012, 79(3):182-191.

- [4] 刘平果, 李国强, 陈毅歆, 等. 一种定量检测人血清高敏 C 反应蛋白的化学发光免疫方法[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(8):1150-1156.
- [5] 黄国团, 王丽兰, 蔡豪斌, 等. 人 C-反应蛋白的分离纯化及初步应用[J]. *中国民族民间医药*, 2010, 19(15):11, 14.
- [6] Marnell L, Mold C, Volzer MA, et al. Expression and Radiolabeling of Human C-Reactive Protein in Baculovirus-Infected Cell Lines and Trichoplusia ni Larvae[J]. *Protein Expr Purif*, 1995, 6(4):439-446.
- [7] Agrawal A, Simpson M, Black S. A C-reactive protein mutant that does not bind to phosphocholine and pneumococcal C-polysaccharide[J]. *J Immunol*, 2002, 169(6):3217-3222.
- [8] Dortay H, Schmockel SM, Fettke J, et al. Expression of human c-reactive protein in different systems and its purification from *Leishmania tarentolae*[J]. *Protein Expr Purif*, 2011, 78(1):55-60.
- [9] Kilpatrick EL, Liao WL, Camara JE, et al. Expression and characterization of 15N-labeled human C-reactive protein in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* for use in isotope dilution mass spectrometry[J]. *Protein Expr Purif*, 2012, 85(1):94-99.
- [10] Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway [J]. *Microb Cell Fact*, 2012, 11, 22.
- [11] Lei J, Guan B, Li B, et al. Expression, purification and characterization of recombinant human interleukin-2-serum albumin(rhIL-2-HSA) fusion protein in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expr Purif*, 2012, 84(1):154-160.

(收稿日期:2013-05-14 修回日期:2013-06-06)

(上接第 3389 页)

- [5] Park JW, Kim WH, Shin SH, et al. Visfatin exerts angiogenic effects on human umbilical vein endothelial cells through the mTOR signaling pathway[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(5):763-771.
- [6] 明广峰. PBEF 在重症急性胰腺炎并发急性肺损伤中的作用机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2012.
- [7] 毕静. 梓醇和前 B 细胞克隆增强因子的神经保护作用[D]. 大连:大连理工大学, 2011.
- [8] 李斌, 董啸, 徐建军, 等. 无血预充大鼠深低温停循环模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(1):129.
- [9] 郑伟浩, 赵英萍, 莫红缨, 等. 辛伐他汀对脂多糖诱导肺损伤大鼠的肺血管通透性的影响[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5(21):6451-6453.
- [10] Eyileten T, Sonmez A, Saglam M, et al. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system(RAAS) blockade on visfatin levels in diabetic nephropathy[J]. *Nephrology(Carlton)*, 2010, 15(2):225-229.
- [11] 李洁. 前 B 细胞克隆增强因子(PBEF)在急性胰腺炎肺损

伤大鼠肺组织中的表达与功能及清胰汤干预的实验研究[D]. 大连:大连医科大学, 2010.

- [12] 李戩. VEGF 介导的血管内皮通透性增高的分子机制及其在肾综合征出血热发病中的作用[D]. 西安:第四军医大学, 2011.
- [13] Kincer JF, Uittenbogaard A, Dressman J, et al. Retraction; hypercholesterolemia promotes a CD36-dependent and endothelial nitric-oxide synthase-mediated vascular dysfunction[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(9):6584.
- [14] Wang A, Li C, Liao J, et al. Ceramide mediates inhibition of the Akt/eNOS pathway by high levels of glucose in human vascular endothelial cells[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2013, 26(1/2):31-38.
- [15] Hagberg C, Mehlem A, Falkevall A, et al. Endothelial fatty acid transport; role of vascular endothelial growth factor B[J]. *Physiology(Bethesda)*, 2013, 28(2):125-134.

(收稿日期:2013-05-17 修回日期:2013-06-29)