

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.14.024

重组 SSB 蛋白表达、鉴定及评价*

杜 琴^{1,2}, 卢小岚^{1,2}, 王 强^{1,2,3}, 汪光蓉^{1,2,3}, 罗文依^{2,3},
王舒琪^{2,3}, 姚丽华¹, 张国元¹, 刘剑平⁴, 王东生^{1,2△}

(1. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院医学检验系, 四川南充 637000; 3. 川北医学院医学转化医学研究中心, 四川南充 637000; 4. 川北医学院附属医院医学风湿免疫科, 四川南充 637000)

[摘要] **目的** 构建 SSB 蛋白原核表达质粒, 在大肠埃希菌中诱导表达后进行纯化。**方法** 以 Hela 细胞提取 RNA 后逆转录的 cDNA 为模板, 利用聚合酶链反应 (PCR) 扩增出带酶切位点 BamH I 和 Xho I 的人 SSB 蛋白基因序列, 经酶切后插入 PET41a 质粒中, 构建成 GST-SSB-6 * His-pet41a 重组表达质粒, 转化入感受态大肠埃希菌 OverExpress C41 (DE3) 中, 经异丙基 β-D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 利用 C 端的 His 标签 (His-tag) 进行 Ni-树脂柱亲和层析纯化, SDS-PAGE 鉴定重组蛋白表达形式, 蛋白印迹法 (WB) 鉴定重组蛋白的免疫原性, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 鉴定其免疫反应性和特异性。**结果** PCR 扩增获得目的基因, 菌落 PCR 示重组表达质粒构建成功, 转化感受态 OverExpress C41 (DE3) 后经诱导有高效表达, SDS-PAGE 显示 GST-SSB-6 * His 重组蛋白为上清可溶性表达, WB 示重组蛋白有足够的免疫原性, 能与外周血中的抗 SSB 抗体发生特异性反应, 特异性达 100%。**结论** 成功构建了 GST-SSB-6 * His-PET41a 重组表达质粒, 经诱导表达后可纯化出目的蛋白, 为进一步建立应用于国产仪器的全自动定量检测抗 SSB 自身抗体的磁微粒化学发光试剂, 奠定了基础。

[关键词] SSB; 重组质粒; 蛋白表达; 蛋白鉴定

[中图分类号] R446.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)14-2438-05

Expression, identification and evaluation of recombinant SSB protein*

DU Qin^{1,2}, LU Xiaolan^{1,2}, WANG Qiang^{1,2,3}, WANG Guangrong^{1,2,3}, LUO Wenyi^{2,3}, WANG Shuqi^{2,3},
YAO Lihua¹, ZHANG Guoyuan¹, LIU Jianping⁴, WANG Dongsheng^{1,2△}

(1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. School of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Center of Translational Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 4. Department of Rheumatology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical college, Nanchong, Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective** Construct the prokaryotic expression plasmid of SSB protein, and purify after induction of expression in Escherichia coli. **Methods** Using reverse-transcribed cDNA from Hela cells as a template, polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify human SSB protein with restriction sites BamH I and Xho I. The gene sequence was digested and inserted into the PET41a plasmid to construct GST-SSB-6 * His-pet41a recombinant expression plasmid, which was transformed into competent Escherichia coli OverExpress C41 (DE3), after isopropyl β-D-galactosin (IPTG) induced, Ni-resin column affinity chromatography purified by His-tag at the C-terminal. The recombinant protein expression was identified by SDS-PAGE, the immunogen of recombinant protein was identified by Western blot (WB), and the enzyme reactivity and specificity were identified by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). **Results** The target gene was obtained by PCR amplification. The colony PCR showed that the recombinant expression plasmid was successfully constructed. After transforming competent overExpress C41 (DE3), it was induced to express efficiently. SDS-PAGE showed that GST-SSB-6 * His recombinant protein was soluble in the supernatant. WB shows that the recombinant protein was sufficiently immunogenic to specifically react with anti-SSB antibodies in peripheral

* 基金项目:“十二五”国家科技支撑计划(2015BAK45B00);四川省科技厅应用基础项目(2016JY0171);川北医学院校级科研发展计划项目(CBY15-A-ZD07)。作者简介:杜琴(1986—),主管技师,硕士,主要从事临床免疫工作。△ 通信作者, E-mail:13990820268@163.com。

blood with a specificity of 100%. **Conclusion** The recombinant expression plasmid of GST-SSB-6 * His-PET41a is successfully constructed, and the target protein is purified after induction, which promotes the magnetic particle chemiluminescence reagent for the automatic detection of anti-SSB autoantibodies in domestic instruments.

[Key words] SSB; recombinant plasmid; protein expression; protein identification

干燥综合征(SS)是临床常见的一种自身免疫性疾病,其血清中可检出多种自身抗体,以抗 SSA 抗体和抗 SSB 抗体最为常见,而抗 SSB 抗体较抗 SSA 抗体更为特异,是 SS 的血清特异性抗体,在原发性 SS 中阳性率可高达 65%~85%。除此之外,抗 SSB 抗体亦可出现在其他自身免疫性疾病中,与血管炎^[1]、高球蛋白血症^[2]、肾脏受累和肺病变^[1]、腮腺肿大^[3]、冷球蛋白血症^[4]等相关。目前抗 SSB 抗体的检测主要采用免疫印迹法(IG)和酶联免疫吸附试验(ELISA)进行检测^[5],但与国外免疫微球技术的检测结果相距甚远^[6]。随着我国自动化程度的不断提高,自身抗体的全自动定量检测是未来的必然趋势。因此本文通过基因克隆和重组 DNA 技术将 SSB 基因克隆至 PET41a 载体,构建原核表达质粒,表达并纯化出 SSB 蛋白,为进一步建立抗 SSB 抗体的全自动定量检测磁微粒化学发光试剂提供实验基础,现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 一般资料 收集川北医学院附属医院 2016 年 1 月至 2017 年 12 月经欧蒙免疫印迹法检出的抗 SSB 抗体阳性患者的血清 115 例。

1.2 试剂 PET41a 质粒购自德国 Novagen 公司,异丙基-β-D- 硫代半乳糖苷(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)购自美国 Sigma 公司;限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 及 T4 DNA 连接酶和高保真聚合酶均购自日本 TaKaRa 公司;大肠埃希菌 DH5α、DNA ladder、质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;胰蛋白胨和酵母粉购自美国 Sigma 公司;卡那霉素和氯霉素购自美国 Gibco 公司;Ni²⁺-树脂填料购自美国 Millipore 有限公司;WB 所用重组 SSB 蛋白购自德国 Diarect 公司;其余试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.3 方 法

1.3.1 引物设计、合成与 PCR 扩增 根据 Genbank 中 SSB 基因编码序列(NM_003142),设计 PCR 引物,并在引物的 5' 端分别引入 BamH I 和 Xho I 的酶切位点,由上海生工生物有限公司合成。引物序列见表 1(下划线部分为酶切位点)。以 HeLa 细胞提取总 RNA 后逆转录制备的 cDNA 为模板,用合成的引物进行扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并切胶回收,获得目的基因片段 SSB-flag。

1.3.2 重组质粒的构建 将 SSB-flag 和 PET41a 质粒用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳后切胶分别回收,再将两者以 T4 DNA 连接酶 4 °C 连接过夜。连接产物转化感受态大肠埃希菌 DH5α,在 LB 平板(卡那霉素 50 μg/mL,氯霉素 34 μg/mL)上进行初步筛选,对平板上长可生长的单个菌落进行菌落 PCR 和测序鉴定,鉴定正确的阳性克隆提取质粒,命名为 GST-SSB-6 * His-PET41a。

1.3.3 SSB 重组蛋白的表达形式 将 GST-SSB-6 * His-PET41a 重组质粒转化入感受态大肠埃希菌 OverExpress C41(DE3)中,涂布于 LB 平板(含抗生素,浓度同上)上,37 °C 培养过夜,待长出单个菌落后进行菌落 PCR 鉴定,阳性克隆接种于 5 mL 的 LB 液体培养基中(抗生素浓度同上),37 °C 培养 12~14 h,加入甘油保存菌种。次日将菌种以 1:100 接入 5 mL 的液体培养基中(抗生素浓度同上),37 °C 培养至 OD 为 0.6 时,加入 0.1 mmol/L IPTG,16 °C 诱导表达 6 h 后,8 000 r/min、4 °C 离心 1 min,收集菌体。加入 1 mL 破碎液进行超声波裂解。裂解条件:温度-冰浴、功率 20%、超声 2 s、间隔 6 s、时间 5 min。12 000 r/min、4 °C 离心 1 min,收集上清液和沉淀。SDS-PAGE 鉴定蛋白表达形式。

1.3.4 GST-SSB-6 * His 重组蛋白的纯化

1.3.4.1 菌种扩大培养及诱导表达 菌种活化后,按 1:100 的接入 500 mL LB 液体培养基(卡那浓度 50 μg/mL,氯霉素浓度 34 μg/mL),37 °C 培养至 OD=0.4-0.6,加入浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,16 °C 诱导表达 12 h,12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,收集菌体。加入 200 mL 20 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,pH8.0,10%甘油溶液重悬菌体,超声波裂解菌体,4 °C 13 000 r/min 离心 15 min 收集裂解上清。

1.3.4.2 上清纯化用高亲和性 Ni 树脂,先以 20 mmol/L Tris,500 mmol/L NaCl,pH8.0,10%甘油溶液平衡(平衡溶液),再将裂解上清上样至 Ni 树脂。上样后,用平衡溶液洗涤至 OD280 到 0.100 以下,分别用含不同浓度咪唑(20、60 mmol/L)的平衡溶液洗脱目的蛋白。

1.3.5 GST-SSB-6 * His 重组蛋白免疫原性验证 用纯化的 GST-SSB-6 * His 蛋白免疫 BALB/c 雌性小鼠,每只每次 60 μg,腹腔注射。第 1 次免疫使用弗氏完全佐剂,第 2 次和第 3 次免疫使用弗氏不完全佐

表 1 SSB 重组蛋白基因扩增引物序列(下划线为酶切位点)

目的基因名称	片段长度(bp)	引物名称	引物序列
SSB-flag	1 221	SSB-F	5'-ATGTCG <u>GGATCC</u> GCTGAAAAATGGTGATAATG-3'
		SSB-R	5'-ATTGCG <u>CTCGAG</u> CTGGTCTCCAGCACCATT-3'

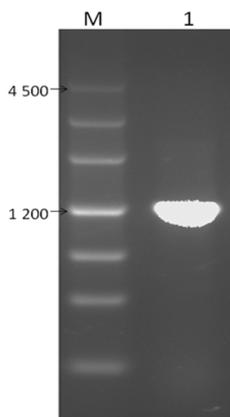
剂。第 3 次免疫后第 7 天采集小鼠血清, WB 检测 Diarect 公司的重组 SSB 蛋白, 分别上样 5、10、20 ng。小鼠血清为一抗, 羊抗鼠-HRP 为二抗, 参照文献方法^[7]。

1.3.6 GST-SSB-6 * His 重组蛋白用于 ELISA 检测抗 SSB 抗体 使用 GST-SSB-6 * His 蛋白包被酶标板, 孵育不同效价的抗 SSB 蛋白自身抗体人血清样品。以 diarect 公司的重组 SSB 蛋白作为对照, 包被酶标板, 检测相同的人血清样品, 将两种蛋白检测的 OD 值绘制相关性曲线。

1.3.7 重组蛋白特异性验证 收集经免疫印迹法(LIA)检测抗 U1-nRNP、SmD1、SS-A、Scl-70、PM-Scl、Jo-1、CENP-B、PCNA、dsDNA、NUC、Rib-P 和 AMA M2 等不同自身抗体阳性的血清标本各 6 份, 采用 1.2.6 方法建立的 ELISA 反应体系检测上述血清标本, 以标本 $OD_{450nm} / (0.10 + \text{阴性对照 } OD_{450nm}) < 1.00$, 即 $S/CO < 1.00$ 作为阴性判读标准。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 1 200 bp 左右的目的条带, 与预期大小一致, 见图 1。



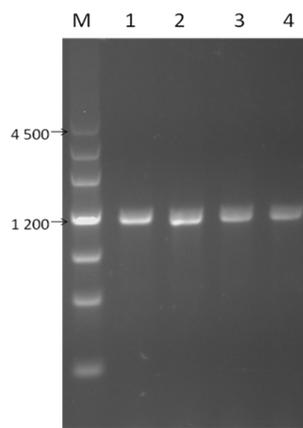
M: DNA marker(bp); 1: SSB 目的基因

图 1 SSB 目的基因 PCR 扩增产物电泳图

2.2 重组质粒的菌落 PCR 及测序鉴定结果 SSB 目的基因与 PET41a 质粒均经双酶切、胶回收后, 用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 连接产物转化感受态大肠埃希菌 DH5 α , 对 LB 平板(含抗生素)上生长的单个菌落进行菌落 PCR, 均扩增出 1 200 bp 左右的目的条带, 测序结果显示与 Genbank 中 SSB 基因编码序列(NM_003142)一致, 表明 GST-SSB-6 * His-PET41a 重组质粒构建正确。菌落 PCR 结果见图 2。

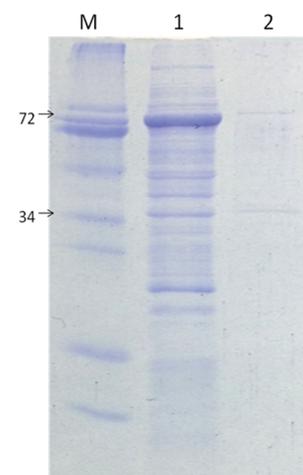
2.3 诱导表达和纯化

2.3.1 重组蛋白表达形式鉴定 将正确构建的重组质粒 GST-SSB-6 * His-PET41a 转化入 OverExpress C41(DE3)中, 16 $^{\circ}$ C IPTG 诱导表达 6 h, 收集菌体经超声破碎后分别收集上清液和沉淀, SDS-PAGE 鉴定, 结果示 GST-SSB-6 * His 重组蛋白是上清液可溶性表达, 相对分子质量为 72×10^3 , 见图 3。



M: DNA marker(bp); 1~4: 挑取的单克隆菌落

图 2 GST-SSB-6 * His-PET41a 的菌落 PCR 检测结果电泳图



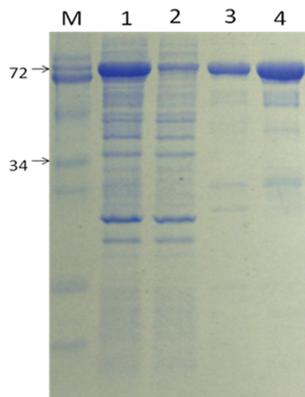
M: 预染蛋白 marker(KDa); 1: IPTG 诱导后裂解上清液; 2: IPTG 诱导后裂解沉淀

图 3 重组蛋白可溶性鉴定的 SDS-PAGE 电泳图

2.3.2 重组蛋白大量表达后纯化 将含有重组质粒 GST-SSB-6 * His 的 OverExpress C41(DE3)菌种扩大培养, IPTG 诱导表达后收集菌体, 超声破碎, 取上清过 Ni^{2+} 树脂柱。用平衡溶液洗涤至 OD280 到 0.100 以下, 分别用含不同浓度咪唑的平衡溶液(20、60 mmol/L)洗脱目的蛋白。目的蛋白在两个浓度咪

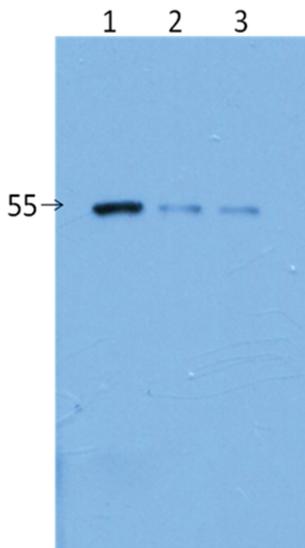
唑下均有洗脱蛋白,电泳结果示:蛋白主带清楚,总体纯度大于 90%。60 mmol/L 组分产量更高,作为优选组分(图 4)。

2.3.3 重组蛋白免疫原性鉴定 用纯化的 GST-SSB-6 * His 蛋白免疫 BALB/c 小鼠,采集小鼠血清, WB 检测 Diarect 公司的重组 SSB 蛋白,分别上样 5、10、20 ng。检测结果显示:GST-SSB-6 * His 重组蛋白免疫小鼠制备的抗血清能够与 Diarect 公司的重组 SSB 蛋白反应,表明融合蛋白具有足够的免疫原性(图 5)。



M: 预染蛋白 marker(KDa); 1: IPTG 诱导后裂解上清; 2: 经 Ni 树脂柱的流穿液; 3: 20 mmol/L 咪唑洗脱组分; 4: 60 mmol/L 咪唑洗脱组分

图 4 扩大培养后重组蛋白洗脱条件的 SDS-PAGE 电泳图



1: 20 ng; 2: 10 ng; 3: 5 ng

图 5 重组蛋白免疫原性的 WB 鉴定结果

2.3.4 重组蛋白用于 ELISA 检测抗 SSB 抗体 用 GST-SSB-6 * His 蛋白和 diarect 公司的重组 SSB 蛋白,分别包被酶标板,检测相同的人血清样品 (115 例)。将两种蛋白检测的 OD 值做相关性曲线,表明 GST-SSB-6 * His 蛋白检测人血清样品的临床相关性与美国 Diarect 公司的重组 SSB 蛋白一致, $R^2 = 0.932$ (图 6)。

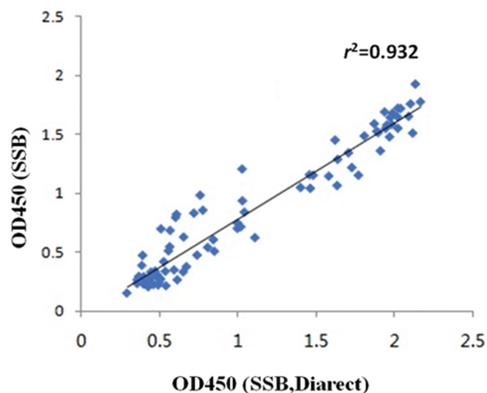


图 6 GST-SSB-6 * His 蛋白和 diarect 公司的重组 SSB 蛋白检测人抗 SSB 抗体的相关性分析

2.3.5 特异性鉴定 用 GST-SSB-6 * His 蛋白包被建立的 ELISA 反应体系检测抗 U1-nRNP、SmD1、SS-A、Scl-70、PM-Scl、Jo-1、CENP-B、PCNA、dsDNA、NUC、和 AMA M2 等常见自身抗体阳性血清标本,结果均为阴性。见表 2。

表 2 GST-SSB-6 * His 蛋白与常见自身抗体交叉反应情况

自身抗体	n	LIA	ELISA(S/CO*)
U1-nRNP	6	3+	0.61
SmD1	6	3+	0.53
SS-A	6	3+	0.51
Scl-70	6	3+	0.26
PM-Scl	6	3+	0.49
Jo-1	6	3+	0.53
CENP-B	6	3+	0.43
PCNA	6	1+~2+	0.55
dsDNA	6	2+~3+	0.61
NUC	6	3+	0.38
AMA M2	6	3+	0.39

* S/CO 为样本检测结果均值

3 讨论

SSB 抗原是原发性干燥综合征 (pSS) 的特异性自身抗原之一,是 ALSPAUGH 等^[8]在 1975 年用人淋巴细胞提取物检测 pSS 患者的血清时发现并命名的,后经证实与 1974 年发现的胞浆抗原 La 是同一种物质,故称之为 SSB/La 抗原。

SSB 抗原是 RNA 聚合酶 III 的辅助蛋白,参与基因的转录终止^[9],帮助 pre-tRNA 的正确折叠和加工成熟^[10]。SSB 抗原主要定位于细胞核,在紫外线照射等异常情况下,SSB 抗原会发生突变,且细胞内定位亦发生改变,进而刺激机体产生抗 SSB 抗体,引起自身免疫性疾病的发生^[11]。

目前,抗 SSB 抗体的检测主要采用 IB 和 ELISA

进行检测^[5]。IB 法虽操作简单,无需特殊仪器,但其检测结果完全定性,且易受主观因素影响,难于质量控制^[12]。而 ELISA 操作繁琐,重复性差,干扰因素较多。故建立一种全自动、高灵敏的定量方法才能更好满足临床需要。本研究构建了 GST-SSB-6 * His-PET41a 原核表达载体,诱导纯化出有活性的 GST-SSB-6 * His 蛋白。GST-SSB-6 * His-PET41a 重组质粒带有 6×His 和 GST 标签;6×His 用于目的蛋白的亲纯化,且能增加目的蛋白在体外的稳定性^[13];来源于日本血吸虫的谷胱甘肽巯基转移酶(GST)标签,是目前应用最为广泛的融合标签之一^[14],可提高目的蛋白的表达量和可溶性。

本实验重组质粒中插入目的蛋白序列长度为 1 221 bp,测序结果与 Genbank 中 SSB 基因编码序列完全一致,其翻译的目的蛋白理论相对分子质量应为 44.77×10^3 ;C 端 6×His 标签相对分子质量约为 0.66×10^3 ;N 端 GST 标签蛋白的相对分子质量约为 26×10^3 ,故本研究诱导纯化出的目的蛋白相对分子质量大约为 72×10^3 ,与 SDS-PAGE 鉴定结果一致,因此本实验设计的重组蛋白制备路线正确。

本研究将 GST-SSB-6 * His 重组蛋白免疫小鼠,所得到的小鼠抗血清能与德国 Diarect 公司的重组 SSB 蛋白发生反应,并且 GST-SSB-6 * His 重组蛋白亦能与自身免疫性疾病患者血清中的抗 SSB 抗体结合,说明 GST-SSB-6 * His 重组蛋白具有很好的免疫原性和免疫反应性,同时重组蛋白与其他常见的自身抗体之间不存在交叉反应,具有很好的特异性,其所携带的 26×10^3 GST 标签未对重组蛋白的蛋白活性、生物学功能等产生影响,因而重组蛋白无需切除 GST 标签,直接作为抗原,为进一步建立应用于国产仪器的全自动定量检测抗 SSB 自身抗体的磁微粒化学发光试剂奠定基础。

参考文献

- MARTEL C, GONDRAN G, LAUNAY D, et al. Active immunological profile is associated with systemic sjogren's syndrome[J]. *J Clin Immunol*, 2011, 31(5): 840-847.
- MOUTSOPOULOS H M, TZIOUFAS A G, BAI M K, et al. Association of serum Ig M kappa monoclonicity in patients with Sjögren's syndrome with an increased proportion of kappa positive plasma cells infiltrating the labial minor salivary glands[J]. *Ann Rheum Dis*, 1990, 49(11): 929-931.
- TERBORG E J, RISSELADA A P, KELDER J C. Relation of systemic autoantibodies to the number of extraglandular manifestations in primary sjogren's syndrome: a retrospective analysis of 65 patients in the Netherlands[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2011, 40(6): 547-551.
- QUARTUCCIO L, ISOLA M, BALDINI C, et al. Clinical and biological differences between cryoglobulinaemic and hypergammaglobulinaemic purpura in primary Sjögren's syndrome: results of a large multicentre study[J]. *Scand J Rheumatol*, 2015, 44(1): 36-41.
- 胡朝军, 张蜀澜, 邓垂文, 等. 2015 年全国多中心自身抗体检测质量调查评价[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2016, 10(2): 137-143.
- 胡朝军, 李永哲. 重视自身抗体检测质量管理和临床应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(8): 673-676.
- 奥斯伯, 金斯顿, 赛德曼, 等. 分子生物学指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 366-371.
- ALSPAUGH M, MADDISON P. Resolution of the identity of certain antigen-antibody system in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an interlaboratory collaboration[J]. *Arthritis Rheum*, 1979, 22(7): 796-798.
- MARAIA R J. Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(8): 3383-3387.
- CHAKSHUSMATHI G, KIM S D, RUBINSON D A, et al. A la protein requirement for efficient pre-tRNA folding[J]. *EMBO J*, 2003, 22(24): 6562-6572.
- HUANG M, KAMACHI M, IWANAGA N, et al. Detection of apoptosis-specific autoantibodies directed against granzyme B-induced cleavage fragments of the SS-B(La) autoantigen in sera from patients with primary Sjögren's syndrome[J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 142(1): 148-154.
- GHIRARDELLO A, BENDO R, RAMPUDDA M E, et al. Commercial blot assays in the diagnosis of systemic rheumatic diseases[J]. *Autoimmun Rev*, 2009, 8(8): 645-649.
- FRIMPONG K, DARNAY B G, RODWELL V W. Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase expressed in Escherichia coli: production of homogeneous protein[J]. *Protein Expr Purif*, 1993, 4(4): 337-381.
- TUDYKA T, SKERRA A. Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal, enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of Escherichia coli [J]. *Protein Sci*, 1997, 6(10): 2180-2187.