

• 医药生物技术 •

锌转运蛋白 8 在酿酒酵母中的重组表达及其抗原性分析

吴诗璟¹, 钱静雯¹, 张元兴¹, 刘琴^{1,2}

1 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2 上海海洋动物疫苗工程技术研究中心, 上海 200237

吴诗璟, 钱静雯, 张元兴, 刘琴. 锌转运蛋白 8 在酿酒酵母中的重组表达及其抗原性分析. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3344-3352.

WU SJ, QIAN JW, ZHANG YX, LIU Q. Expression of zinc transporter 8 in *Saccharomyces cerevisiae* and its antigenicity analysis. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3344-3352.

摘要: 锌转运蛋白 8 (zinc transporter 8, ZnT8) 是 I 型糖尿病的重要候选抗原, 基于 ZnT8 所开发的自身抗体检测试剂盒可用于帮助诊断 I 型糖尿病, 相关产品已在欧美国家上市。目前, 国内正在积极开发 I 型糖尿病检测试剂盒, 由于国内尚未建立活性 ZnT8 的重组生产体系, 因此这一关键原料严重依赖进口。本研究主要利用酿酒酵母系统开展了 ZnT8 的重组表达研究。首先, 设计了 ZnT8 的多种抗原形式, 分别为 C 端单倍体蛋白 (C)、C 端二倍体 (C-C) 以及 N 端和 C 端串联体蛋白 (N-C), 并使用酿酒酵母系统对上述蛋白进行了重组表达与纯化。随后, 通过桥连法 ELISA 对纯化蛋白进行了抗原性测试, 检测 13 位 I 型糖尿病病人血清及 16 位健康志愿者血清后发现: C、N-C、C-C 蛋白具有相似的检出率, 分别为 53.8% (7/13)、61.5% (8/13) 及 53.8% (7/13); 3 组的特异性均为 100% (16/16); N-C 蛋白相对其他 2 个蛋白而言, 其在 P3、P4、P8 阳性样本上的检测值提高 90% 以上, 表明具有更好的血清抗体识别能力。最后, 选取 N-C 蛋白做进一步的血清样本测试, 并将测试结果用 ROC 曲线进行敏感性及特异性表征, 结果表明, 与进口金标抗原相比, 本方法敏感性无明显差异, 特异性有待提高。综上所述, 本研究基于酿酒酵母表达生产的 ZnT8 N-C 串联体蛋白有潜力作为 I 型糖尿病体外诊断试剂开发中的国产替代原料。

关键词: 自身免疫; ELISA; I 型糖尿病; ZnT8

Received: March 9, 2022; Accepted: April 18, 2022

Corresponding author: LIU Qin. E-mail: qinliu@ecust.edu.cn

Expression of zinc transporter 8 in *Saccharomyces cerevisiae* and its antigenicity analysis

WU Shijing¹, QIAN Jingwen¹, ZHANG Yuanxing¹, LIU Qin^{1,2}

1 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Maricultured Animal Vaccines, Shanghai 200237, China

Abstract: Zinc transporter 8 (ZnT8) is an important candidate antigen for type I diabetes. The autoantibody detection kit based on ZnT8 can be used to help diagnose type I diabetes, and the related products have been launched in Europe and the United States. Since the recombinant production system of active ZnT8 has not been established in China, this key raw material is heavily dependent on imports. We used *Saccharomyces cerevisiae* to carry out the recombinant expression of ZnT8. First, multiple antigenic forms of ZnT8 were designed as C-terminal haploid (C), C-terminal diploid (C-C), and N-terminal and C-terminal concatemers (N-C). The proteins were expressed, purified and tested for antigenicity by bridging-type ELISA. The serum of 13 patients with type I diabetes and the serum of 16 healthy volunteers were detected. C, N-C, and C-C proteins had similar detection rates, which were 53.8% (7/13), 61.5% (8/13) and 53.8% (7/13). The specificity of the three groups was 100% (16/16). The detection value on positive samples P3, P4, and P8 increased by more than 90%, indicating better serum antibody recognition ability. Finally, N-C protein was selected for further serum sample testing, and the test results were characterized by receiver operating characteristic (ROC) curve for sensitivity and specificity. Compared with imported gold standard antigen, the sensitivity was 76.9% (10/13) and the specificity was 87.5% (14/16). There was no significant difference in the sensitivity of the method, but the specificity needed to be improved. In conclusion, the ZnT8 N-terminal and C-terminal concatemer protein developed based on *S. cerevisiae* expression system is expected to be a key alternative raw material in the development of *in vitro* diagnostic reagents for type I diabetes.

Keywords: autoimmunity; ELISA; T1DM; ZnT8

I 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 是一种自身免疫性疾病, 胰岛遭免疫系统攻击后, 外周血中产生针对胰岛 β 细胞的多重抗体, 导致胰岛细胞功能受损胰岛素分泌不足^[1]。在 I 型糖尿病病人血清中已经鉴定发现锌转运蛋白 8 (zinc transporter 8, ZnT8) 为 T1DM 的自身抗原候选蛋白^[2]。60%–80% 的新发 T1DM 患者呈 ZnT8 自身免疫抗体 (ZnT8 autoantibody, ZnT8A) 阳性, 4% 的病例呈 ZnT8A 阳性^[3]。2014 年美国食品药品监督管理局批

准了首个 ZnT8 自身抗体的酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒, 可用于帮助诊断 I 型糖尿病。该试剂盒的关键原料为具有抗原活性的重组 ZnT8 蛋白。

ZnT8 蛋白全长包含 369 个氨基酸, 由 6 个跨膜结构域以及氨基和羧基末端区域组成, 能在细胞膜上形成二聚体^[4]。由于 ZnT8 蛋白近一半区域为跨膜结构, 因此表达其全长蛋白较为困难。Wan 等利用哺乳动物细胞 HEK293 尝试

进行了第 50–369 位氨基酸表达,主要通过把多种脂质与 ZnT8 共孵育、干燥、超声的方法使 ZnT8 形成脂蛋白复合体,并应用于等离子体金芯片 (plasmonic gold chip) 检测^[5]。不过,上述路线存在产量低、成本高等问题,尚未实现产业化应用。

抗原表位分析表明,ZnT8 蛋白的抗原表位主要分布在 N 端 (第 1–74 位氨基酸) 和 C 端 (第 268–369 位氨基酸),仅少量分布在跨膜区或位于细胞质及腔的短连接肽^[2],因此,很多研究者尝试表达除跨膜区和连接肽外的 N 端和 C 端区域以制备抗原原料。据报道,ZnT8 主要的表达形式有 N 端、C 端、N-C 融合体及 C-C 二倍体。N 端可以在大肠杆菌中以包涵体形式表达^[6],C 端能在大肠杆菌中可溶表达^[7]或在 HEK293 中表达^[5],N-C 可以在大肠杆菌中以包涵体形式表达^[6],C-C 可以在大肠杆菌^[8]或昆虫细胞^[9]中可溶表达以及可以在哺乳动物细胞^[10]中表达。此外,在 ZnT8 后 100 位氨基酸中,第 325 位氨基酸的风险等位基因 (rs13266634) 具有非同义单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP),3 种突变体的第 325 位氨基酸分别有精氨酸、色氨酸及谷氨酰胺 (较低概率突变)^[11],且 SNP 会影响 ZnT8 抗体与抗原的特异性反应^[12]。尽管研究者进行了多种尝试,但由上述表达系统所生产的 ZnT8 抗原蛋白不能有效检出血清抗体,无法满足诊断试剂开发的需求。

酿酒酵母通常用于表达在大肠杆菌中不能很好生产、具有折叠问题或需要翻译后修饰的重组蛋白^[13],与昆虫或哺乳动物细胞相比,酿酒酵母更易于培养且成本更低,也易于规模放大,市场上利用酿酒酵母制成的产品有胰岛素、乙型肝炎表面抗原、尿酸氧化酶及胰高血糖素等^[14]。在酿酒酵母中已经成功表达了一些自身免疫相关抗原,如用于检测 I 型糖尿病的蛋白

酪氨酸磷酸酶相关分子 (ICA512) 在酿酒酵母 YRD-15 中成功表达^[15],Bauer 等克隆了与红斑狼疮相关的增殖细胞核 (PCNA) 抗原基因,用酵母菌 NCYC239 成功表达了该基因编码的蛋白^[16]。据调研,ZnT8 尚未在酿酒酵母中进行重组表达,故本研究尝试使用酿酒酵母生产表达 ZnT8 重组蛋白。

本研究在酿酒酵母中建立了 ZnT8 重组蛋白的表达、纯化流程及其抗原性评价方法,为后续体外诊断试剂盒的开发打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

化学感受态细胞 Fast T1 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;酿酒酵母 INVSc1、载体 pYES2 为本实验室保存。

酿酒酵母 INVSc1 是一种理想的蛋白表达双倍体菌株,基因型为 MATa *his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52/MATa his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52*,表型为 Leu⁻、His⁻、Ura⁻、Trp⁻,它在缺少尿嘧啶、亮氨酸、组氨酸的 SC 基础培养基中无法生长。与其适配的 pYES2 载体是一种高拷贝的酿酒酵母表达载体,可以利用载体上的 *URA3* 基因通过尿嘧啶原养法在 INVSc1 中筛选转化子,添加半乳糖可以诱导重组蛋白表达,该载体包含 *GAL1* 启动子、*CYC1* 转录终止子、*URA3* 基因、多克隆位点及氨苄青霉素抗性基因^[17]。

1.2 主要试剂及药品

无缝克隆试剂盒 (ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Bradford 蛋白质定量试剂盒及可溶型单组分 TMB 底物溶液购自天根生化科技 (北京) 有限公司;酶标板 (Thermo Scientific™ MaxiSorp™) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;考马斯亮蓝快速染液购自上海雅酶生

物医药科技有限公司; ZnT8 抗体购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司; Ni-TED Purose 6 Fast Flow 购自嘉兴千纯生物科技有限公司; DEAE Bestarose Fast Flow 购自博格隆(上海)生物技术有限公司; 三色预染蛋白质分子量标准(10–180 kDa)及 GoldBand 5 000 DNA marker 均购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; YNB 培养基购自 Invitrogen 公司(SC 及 SC-U 培养基的具体配方参见 Invitrogen 手册)。

1.3 血清样品

所有血清样品均由上海博岳生物技术有限公司提供。

1.4 重组子的构建

在 <https://www.uniprot.org/> 网站上查找到人源 ZnT8 蛋白全长序列(Entry ID: Q8IWM4), 交由南京金斯瑞生物科技有限公司根据表达宿主酿酒酵母进行密码子优化并合成相应的基因序列。随后设计了 3 种 ZnT8 抗原形式, 分别选取 ZnT8 第 268–369 氨基酸命名为 C, 第 1–74 氨基酸及第 268–369 氨基酸(325Arg)的串联体命名为 N-C, 第 268–369 氨基酸(第 325 位氨基酸为精氨酸)及第 268–369 氨基酸(第 325 位氨基酸为色氨酸)的串联体命名为 C-C, 将 6×His 标签添加于 3 种抗原形式的 C 端, 其中 N-C、C-C 中间设计了两种连接铰链, 由 RoseTTAFold 预测蛋白结构后选择最优结果进行构建。使用引物 F_N、R_N 和 F_C、R_C

(表 1) 将 N、C 的核酸序列分别扩增, 并将 N、C 序列通过重叠 PCR 连接, 再利用无缝克隆试剂盒克隆至 pYES2 表达载体的多克隆位点上。之后将连接产物转化至 Fast T1 感受态细胞, 由于载体上含有氨苄抗性基因, 可使用氨苄抗性培养基筛选, 挑取抗性平板上单克隆进行 PCR 验证并测序, 将测序正确的菌株保种并提取质粒, 最后将质粒电转入酿酒酵母 INVSc1 感受态, 涂布 SC-U 平板, 因为 SC-U 培养基不含尿嘧啶, 只有含 pYES2 质粒的重组子才能在该培养基中生长, 故经 SC-U 平板筛选后, 理论上长出的转化子都含有重组质粒, 最后挑取平板上的单克隆抽提质粒测序, 将测序正确的菌株保种, 获得酿酒酵母表达菌株。

1.5 重组表达与纯化

将酿酒酵母表达菌株在 SC-U 平板上划线活化, 于 28 °C 培养箱静置培养 2–3 d, 挑取 3–5 个单克隆接种至 50 mL SC-U 液体培养基, 28 °C、200 r/min 培养过夜, 次日按 2% 接种量接种于含 2% 半乳糖的 300 mL SC-U 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 26 h 诱导表达, 最后以 4 °C、12 000×g 离心 3 min 收获菌体。菌体称重后按照 50% 浓度进行高压匀浆破碎, 破碎压力为 100 MPa, 破碎 2 min, 停 2 min, 进行 3 个循环。将破碎液以 4 °C、12 000×g 离心 20 min 分离上清及沉淀, 上清用 0.45 μm 滤膜过滤等待纯化上样。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
F_N	ATGGAATTCCTGGAGCGTACGTACTION	28
R_N	CAACTTCCACTTTGCATAGGCTGA	24
F_C	AAGGACTTCTCTATCTTGTTGATGG	25
R_C	ATCACATGGGTCTTCACAGAACAAAC	26
F_V	GTAATACGACTCACTATAGG	20
R_V	GTGAATGTAAGCGTGACATAAC	22

首先采用 Ni-TED 介质进行目的蛋白初步捕获。将 A 相缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, pH 7.4) 以 200 cm/h 流速平衡介质, 以 100 cm/h 上样, 上样完毕后使用洗杂缓冲液 (N-C、C-C、C 的洗杂液分别为含 20、50、10 mmol/L 咪唑的 A 相缓冲液) 以 200 cm/h 流速洗脱杂质, 随后使用含 100 mmol/L 咪唑的 A 相缓冲液以 200 cm/h 流速洗脱目的蛋白, 收集洗脱峰后, 使用 B 相缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 以 200 cm/h 流速冲洗介质。将各步纯化样品取样进行 SDS-PAGE, 用考马斯亮蓝染色法检测亲和纯化效果。

合并纯化效果较好的样品后采用 DEAE 介质进一步除杂。将 C 相缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 以 200 cm/h 流速平衡介质, 以 100 cm/h 上样, 上样完毕后使用洗杂缓冲液 (N-C、C-C、C 的洗杂液分别为含 50、100、200 mmol/L NaCl 的 C 相缓冲液) 以 200 cm/h 流速洗脱杂质, 随后使用洗脱缓冲液 (N-C、C-C、C 的洗脱液分别为含 100、200、300 mmol/L NaCl 的 C 相缓冲液) 以 200 cm/h 流速洗脱目的蛋白, 收集洗脱峰后, 使用 D 相缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8.0) 以 200 cm/h 流速冲洗介质。将各步纯化样品取样进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色法检测最终纯化效果。

1.6 重组蛋白活性评价

本实验使用桥连法 ELISA^[18]进行蛋白活性评价。ELISA 方法如下: (1) 包板: 将每种纯化后的抗原蛋白稀释至 2 $\mu\text{g/mL}$, 每孔加入 100 μL , 室温静置包被 2 h, 弃上清, 用 PBST 洗板 5 次, 每次 5 min。(2) 封闭: 每孔加入 5% BSA(溶于 PBST) 200 μL , 室温静置 2 h, 弃上清, 用 PBST 洗板 5 次, 每次 5 min。(3) 孵育抗体: 每孔加入血清 25 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育过

夜, 弃上清, 用 PBST 洗板 5 次, 每次 5 min。(4) 捕获标记抗原: 每孔加入生物素标记抗原 100 μL (2 $\mu\text{g/mL}$ 稀释于 5% BSA), 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育 2 h, 弃上清用 PBST 洗板 5 次, 每次 5 min。(5) 结合酶标亲和素: 每孔加入链霉亲和素-HRP 100 μL (1:500 稀释于 5% BSA), 室温振荡孵育 20 min, 弃上清, 用 PBST 洗板 5 次, 每次 5 min。(6) 显色: 每孔加入 TMB 100 μL , 孵育 20 min, 最后每孔加入 100 μL 2 mol/L 硫酸终止反应, 于 450 nm 波长处读数。

2 结果与分析

2.1 串联体连接铰链设计

连接串联体 C-C 及 N-C 时设计了两种连接铰链, 分别为柔性铰链 (GGGS)₃ (L1) 及刚性铰链 PKPSTPPGSSGGGS (L2)。将两种铰链连接于 C-C 之间, 提交至 RoseTTAFold 上进行结构预测, 分别得图 1A、1B, 两种模型可信度分别为 0.71、0.67, 从整体上看, 两种连接方式中的两段 C 端结构都与原始序列结构相似, 由 L1 连接的两段序列间结构相对离散, 符合柔性铰链连接的预期, 理论上更适合抗原抗体靠近, 故选择 L1 连接方式。同样地, 将两种铰链连接于 N-C 之间, 提交至 RoseTTAFold 进行结构预测, 分别得图 1C、1D, 两种模型可信度都为 0.58, 从整体上看, 两种连接方式中的两段 C 端结构都与原始序列结构相似, 而 L1 连接的 N 端多为螺旋状, L2 连接的 N 端无特定二级结构, 参考 Daniels 等^[19]序列分析结果, N 端 73 个氨基酸末端结构域具有显著的 α -螺旋含量, 但整体主要是无序的, 特别是在 28Gln 和 63Gly 之间的区域, 这可能是模型整体可信度低的原因, 而 AlphaFold 预测全长 (第 1-369 位氨基酸) 结构显示第 62-74 位氨基酸部分为螺旋且可信度 $90 > \text{pLDDT} > 70$, 故从已知可靠结果

选择 L1 连接方式, 即靠近第 74 位氨基酸的末端为螺旋的预测结构, 更贴合蛋白原始构象。

2.2 重组子鉴定

含有重组子 C、N-C、C-C 大肠杆菌菌落经引物 F_V、R_V(表 1) PCR 验证后, 电泳显示分别在 370 bp、590 bp、660 bp 处有 1 条带(图 2), 与预期大小一致, 经过测序与模板序列完全一致。

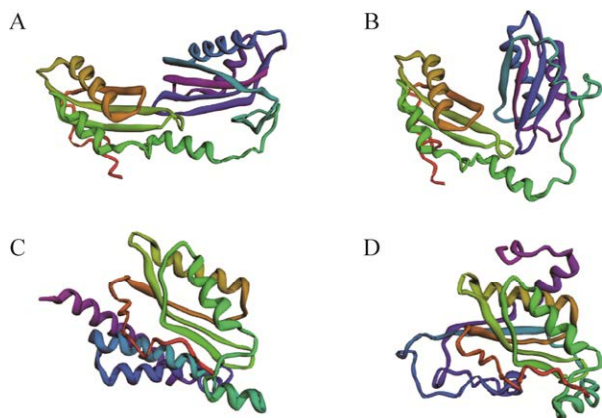


图 1 不同连接铰链的蛋白结构预测模型

Figure 1 Structure prediction of C-C and N-C with two linkers. Structure prediction of C-C with L1(A), L2(B) and N-C with L1(C), L2(D) by RoseTTAFold. NTD starts in purple, CTD ends in red.

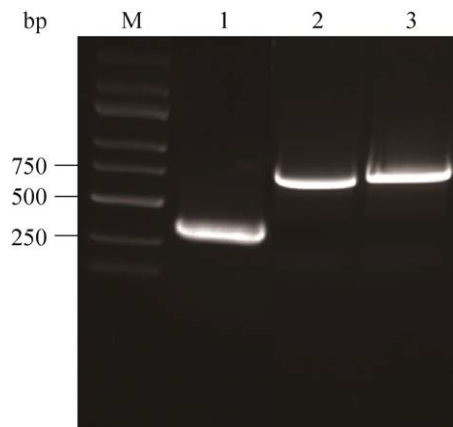


图 2 含有重组子 C、N-C、C-C 菌落的 PCR 验证
Figure 2 PCR validation of recombinant colonies with constructs. M: marker; 1: C; 2: N-C; 3: C-C.

2.3 重组蛋白表达及纯化

Western blotting 检测结果表明, 含有重组子的酿酒酵母经半乳糖诱导后, 3 种蛋白均在理论大小处有特异性条带(图 3)。SDS-PAGE 显示, 目的蛋白 C 主要存在于破碎上清中, 大小为 10 kDa 左右, 取破碎上清纯化, 最终得到理想纯度蛋白 C(图 4A); 同样地, 在诱导表达重组蛋白 C-C 后, 破碎上清中 35 kDa 附近有一明显条带, 纯化后最终得到理想纯度蛋白 C-C(图 4B), 这与理论大小 24 kDa 相差较大, 猜测可能是因为酿酒酵母特有的超糖基化修饰引起的分子量变大, 而蛋白 C 未发现分子量明显变大, 这可能是由于 C-C 比 C 多出的柔性铰链可以灵活转动且暴露, 其中 3 个丝氨酸的羟基

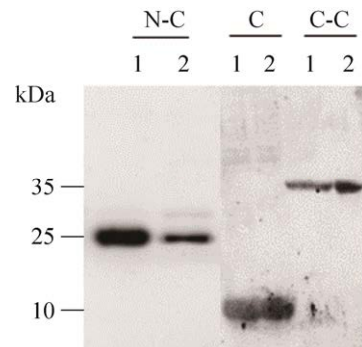


图 3 Western blotting 验证蛋白表达

Figure 3 Western blotting analysis. 1, 2: the pellets and the supernatants after expression.

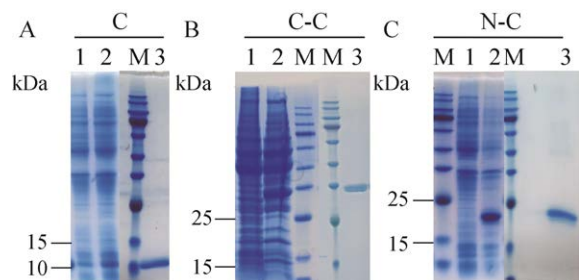


图 4 SDS-PAGE 检测蛋白表达及纯化效果

Figure 4 SDS-PAGE analysis. (A) C. (B) C-C. (C) N-C. M: protein marker; 1: before expression; 2: after expression; 3: after purification.

可能被超糖基化修饰,形成超长 O-糖链;同样地,经半乳糖诱导后,重组蛋白 N-C 在 25 kDa 附近有一明显条带,且主要表达于上清中,纯化后最终得到理想纯度蛋白 N-C (图 4C)。

2.4 重组蛋白抗原活性评价

为筛选抗原性最佳的表达形式,使用 ELISA 测定 3 种抗原的血清反应性。取 13 位 I 型糖尿病病人血清作为阳性血清 (P),取 16 位健康志愿者血清作为阴性血清 (N),3 种蛋白 C、N-C、C-C 的 ELISA 结果显示 (图 5),16 个阴性样品的测定值没有明显差异,13 个阳性样品的检出率 (以 2 倍阴性样本平均值作为 cut-off 值) 分别为 53.8% (7/13)、61.5% (8/13)、53.8% (7/13),3 组特异性均为 100% (16/16)。虽然 3 种蛋白具有相似检出率,但 N-C 蛋白相对其他 2 个蛋白在样本 P3、P4、P8 测试值上有

明显差异,分别提升了 105.7%、100.4%、163.8%、194.7% 及 93.7%、96.0%。因此,决定将蛋白 N-C 进行下一步测试。

将 N-C 包被酶标板,梯度稀释血清,ELISA 结果显示, OD_{450} 值随着血清稀释倍数的变化呈线性关系 ($y = 1.1695x^{0.6663}$, $R^2 = 0.995$) (图 6)。将测试值作 ROC 曲线,曲线下面积 AUC 为 0.851 (图 7 B),AUC 越接近 1,表明该方法的诊断价值越高,使用最大约登指数 (0.644) 处对应的阈值作为诊断分界点具有最佳准确度,此时 cut-off 值为 0.142 (图 7 A),检出率为 76.9% ($n=13$),特异性为 87.5% ($n=16$),对比“金标”RSR 公司的 Fast Zinc Transporter 8 (ZnT8) Autoantibody ELISA Kit 敏感性为 72% ($n=50$),特异性为 97% ($n=90$),本实验的检测方法在敏感性上无明显差异,特异性有待提高。

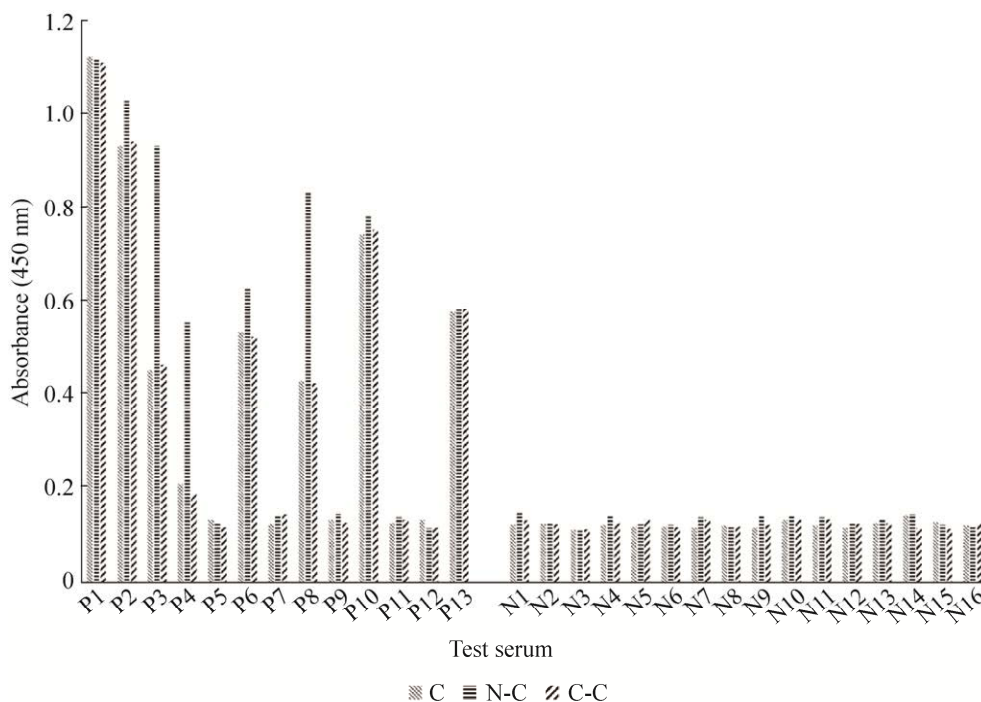


图 5 ELISA 检测重组抗原活性

Figure 5 ELISA for detecting the immunogenicity of recombinant proteins. Thirteen positive serum for T1DM and 16 healthy human serum were tested for antigen C, N-C and C-C by ELISA. P: positive sera; N: negative sera.

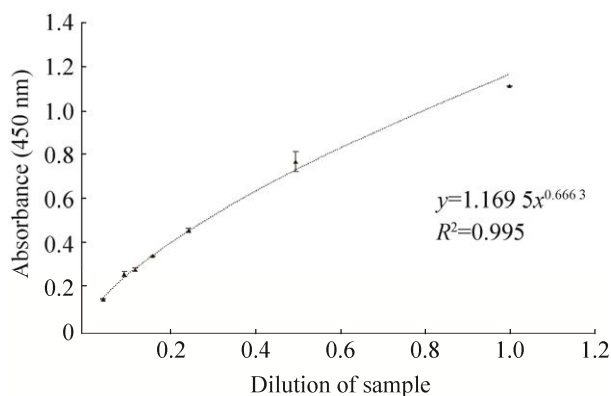


图 6 血清稀释度与检测值的标准曲线

Figure 6 Standard curve of diluted serum and detected value. Bridging-type ELISA was performed with diluted serum. The fitting curve and equation were showed.

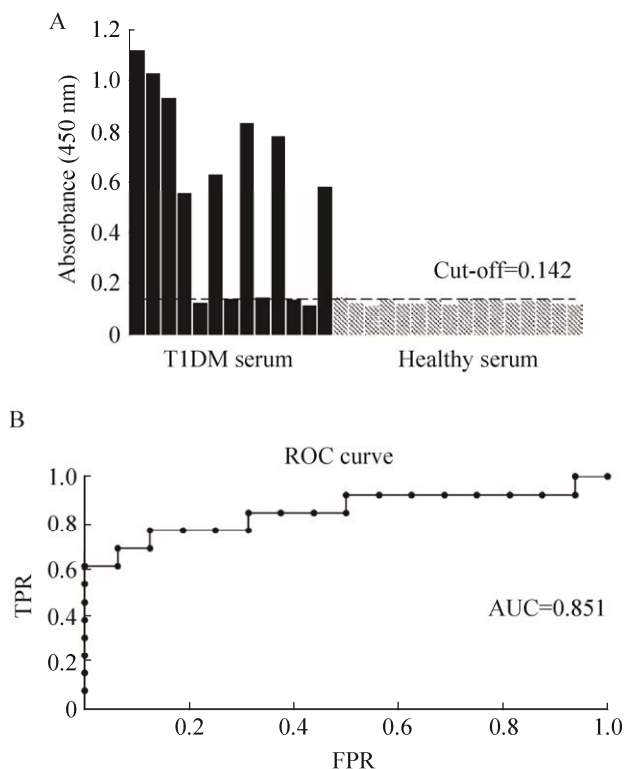


图 7 ROC 曲线评价重组蛋白 N-C 抗原性检测方法
Figure 7 The evaluation for detecting recombinant protein N-C antigenicity with ROC curve method. (A) ELISA for detecting the immunogenicity of recombinant protein N-C with cut-off value determined by ROC curve. (B) ROC analysis of ELISA. AUC was included.

3 讨论

ZnT8 是 I 型糖尿病的重要候选抗原, 基于 ZnT8 所开发的自身抗体检测试剂盒可用于帮助诊断 I 型糖尿病, 由于国内尚未建立活性 ZnT8 的重组生产体系, 因此急需实现原料国产化。本研究使用酿酒酵母系统表达了 ZnT8 的不同形式抗原, 分别为 C、N-C 及 C-C 表达纯化后进行 ELISA 检测血清抗体识别能力, 结果显示检出率分别为 53.8% (7/13)、61.5% (8/13) 及 53.8% (7/13), 此结果与 IAA、IA-2A、GADA 在糖尿病人中检出率^[20]有可比性。3 种蛋白虽具有相似检出率, 但在其中 3 个阳性样本中, N-C 蛋白相对 C、C-C 蛋白在样本 P3、P4、P8 测试值上提升了约 1 倍, 可能是因为 ZnT8 的 N 端对于这 3 种测试血清中相应抗体也有识别能力, 推测在这些抗体中, 除去 C 端, N 端也存在对应抗原表位, 与文献报道相符^[3,10]。而在所有测试血清中, C 与 C-C 的测试值没有明显差异, 但有研究指出使用 TaqMan 探针对 224 名 T1DM 患者血清测试发现, 60 名患者血清仅对 325Arg 的构建体有反应, 31 名患者血清仅对 325Trp 的构建体有反应^[12], 本实验结果未体现出 SNP 在 325R 及 325W 对抗原表位产生的影响, 可能是测试样本量过少, 或者是本实验的检测方法无法检测到这种细微差异。

故基于本实验 N-C 蛋白能更好地识别血清中的抗体。将 N-C ELISA 测试结果用 ROC 曲线表征方法敏感性及特异性, 检出率与 RSR 相应产品对比, 敏感性无明显差异、特异性有待提高。除去样本量原因或由于方法学引起的偏差, 从蛋白本身考虑, N-C 蛋白中 N 端结构本是无序的, 无序蛋白虽然自身不一定能折叠成有序的结构, 但其通常具有重要生物学功能, 且大多为具有蛋白质-蛋白质相互作用的高亲和力蛋白^[21], 这意味

着 ZnT8 的 N 端很可能会与血清中一部分蛋白发生非特异性结合,产生假阳性,导致特异性降低,之后可以通过蛋白质工程改变个别氨基酸序列减少非特异性结合。为了最终实现诊断试剂中 ZnT8 抗原蛋白的开发,仍需扩大临床样本量,先判定是否是由 N-C 蛋白本身引起的特异性偏低,再继续考察方法的特异性及敏感性,根据具体情况完善 cut-off 值,提升诊断准确性,进而评价 ZnT8 抗原蛋白在 I 型糖尿病中的体外诊断意义,实现国产替代原料的开发。

REFERENCES

- [1] Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, et al. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes*, 2005, 54(suppl_2): S25-S31.
- [2] Wenzlau JM, Juhl K, Yu LP, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *PNAS*, 2007, 104(43): 17040-17045.
- [3] Howson JMM, Krause S, Stevens H, et al. Genetic association of zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibodies in type 1 diabetes cases. *Diabetologia*, 2012, 55(7): 1978-1984.
- [4] Wenzlau JM, Moua O, Liu Y, et al. Identification of a major humoral epitope in Slc30A8 (ZnT8). *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1150: 252-255.
- [5] Wan H, Merriman C, Atkinson MA, et al. Proteoliposome-based full-length ZnT8 self-antigen for type 1 diabetes diagnosis on a plasmonic platform. *PNAS*, 2017, 114(38): 10196-10201.
- [6] 冯晓燕, 宋晓国, 王国华, 等. 人 ZnT8 抗原在 1 型糖尿病诊断中的初步应用. *中国实验诊断学*, 2011, 15(1): 102-106.
Feng XY, Song XG, Wang GH, et al. The application for type 1 diabetes mellitus of human zinc transporter ZnT8 antigen. *Chin J Lab Diagn*, 2011, 15(1): 102-106 (in Chinese).
- [7] Cheng LQ, Li T, Zhang DM, et al. Prokaryotic expression of bioactive zinc transporter 8 antigens and detection of diabetes specific autoantibodies in a single dot immunogold filtration assay. *Clin Lab*, 2015, 61(10): 1445-1452.
- [8] Faccinetti NI, Guerra LL, Sabljic AV, et al. Prokaryotic expression and characterization of the heterodimeric construction of ZnT8 and its application for autoantibodies detection in diabetes mellitus. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 196.
- [9] Ustinova J, Zusinaite E, Utt M, et al. Development of a luciferase-based system for the detection of ZnT8 autoantibodies. *J Immunol Methods*, 2014, 405: 67-73.
- [10] Kawasaki E, Uga M, Nakamura K, et al. Association between anti-ZnT8 autoantibody specificities and SLC30A8 Arg325Trp variant in Japanese patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2008, 51(12): 2299-2302.
- [11] Han SH, Donelan W, Wang H, et al. Novel autoantigens in type 1 diabetes. *Am J Transl Res*, 2013, 5(4): 379-392.
- [12] Wenzlau JM, Liu Y, Yu LP, et al. A common nonsynonymous single nucleotide polymorphism in the SLC30A8 gene determines ZnT8 autoantibody specificity in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2693-2697.
- [13] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(5): 411-421.
- [14] Dever TE, Kinzy TG, Pavitt GD. Mechanism and regulation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2016, 203(1): 65-107.
- [15] Papakonstantinou T, Myers MA, Jois J, et al. Expression of protein tyrosine phosphatase-like molecule ICA512/IA-2 induces growth arrest in yeast cells and transfected mammalian cell lines. *J Autoimmun*, 2001, 17(1): 51-61.
- [16] Bauer GA, Burgers PM. Molecular cloning, structure and expression of the yeast proliferating cell nuclear antigen gene. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(2): 261-265.
- [17] Kingsman SM, Kingsman AJ, Dobson MJ, et al. Heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1985, 3: 377-416.
- [18] Dunseath G, Ananieva-Jordanova R, Coles R, et al. Bridging-type enzyme-linked immunoassay for zinc transporter 8 autoantibody measurements in adult patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*, 2015, 447: 90-95.
- [19] Daniels MJ, Jagielnicki M, Yeager M. Structure/function analysis of human ZnT8 (SLC30A8): a diabetes risk factor and zinc transporter. *Curr Res Struct Biol*, 2020, 2: 144-155.
- [20] Amoroso M, Achenbach P, Powell M, et al. 3 screen islet cell autoantibody ELISA: a sensitive and specific ELISA for the combined measurement of autoantibodies to GAD₆₅, to IA-2 and to ZnT8. *Clin Chim Acta*, 2016, 462: 60-64.
- [21] He B, Wang KJ, Liu YL, et al. Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview. *Cell Res*, 2009, 19(8): 929-949.

(本文责编 郝丽芳)