

· 生物技术与方法 ·

胰岛素瘤相关蛋白-2在HEK293中的重组生产及抗原性分析

钱静雯¹, 王蓬勃², 张元兴², 刘琴^{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

钱静雯, 王蓬勃, 张元兴, 刘琴. 胰岛素瘤相关蛋白-2在HEK293中的重组生产及抗原性分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4246-4257.

QIAN Jingwen, WANG Pengbo, ZHANG Yuanxing, LIU Qin. Production and antigenicity analysis of a recombinant insulinoma associated protein-2 in HEK293 cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4246-4257.

摘要: 胰岛素瘤相关蛋白-2 (insulinoma-associated protein-2, IA-2), 是属于酪氨酸磷酸酶样蛋白家族的跨膜糖蛋白, 也是诊断1型糖尿病的重要自身抗原, 相关产品已在欧美国家上市。目前, 商业化的IA-2抗原主要为重组IA-2ic结构域, 或从牛胰岛中天然提取的IA-2, 其中重组IA-2抗原在临床上存在弱阳性漏检的问题, 无法完全替代天然提取IA-2抗原。本研究利用HEK293表达系统探究IA-2的重组生产。通过瞬时表达IA-2的第449-979位氨基酸跨膜片段(IA-2 transmembrane fragment, IA-2 TMF)这一天然形式的膜蛋白, 并优化表达条件和膜蛋白溶解条件, 纯化后膜蛋白得率为0.78 mg/L细胞发酵液。随后, 通过酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 对比IA-2 TMF与RSR rhIA-2的抗原活性, 检测了77位1型糖尿病患者血清和32位健康志愿者血清, 测试的结果通过接受者操作特性曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)表征敏感性和特异性。结果表明: IA-2 TMF的敏感性为71.4% (55/77), 而RSR rhIA-2的敏感性为63.6% (49/77), 2种抗原特异性均为100%。2种抗原在特异性上无明显差异, 而IA-2 TMF的敏感性略优于进口金标RSR rhIA-2抗原。综上所述, 本研究基于HEK293重组表达的IA-2 TMF能够作为1型糖尿病体外诊断试剂开发的原料。

关键词: 1型糖尿病; 自身免疫; 胰岛素瘤相关蛋白-2; 膜蛋白纯化

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC3400103); 上海市细胞代谢光遗传学技术前沿科学研究基地(2021 Sci & Tech 03-28)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC3400103) and the Shanghai Frontiers Science Center of Optogenetic Techniques for Cell Metabolism Grant (2021 Sci & Tech 03-28).

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

Received: 2023-02-08; Accepted: 2023-05-24

Production and antigenicity analysis of a recombinant insulinoma associated protein-2 in HEK293 cells

QIAN Jingwen¹, WANG Pengbo², ZHANG Yuanxing², LIU Qin^{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: Insulinoma-associated protein-2 (IA-2) is a transmembrane glycoprotein belonging to the tyrosine phosphatase-like protein family as well as an important autoantigen in the diagnosis of type 1 diabetes. IA-2 products have been marketed in Europe and the United States. At present, commercially available IA-2 antigens are either the recombinant IA-2ic domain or the IA-2 naturally extracted from bovine islets. However, the recombinant IA-2 antigen displays weak positive in clinic practice, which often results in occasional detection failures, thus cannot completely replace the naturally extracted IA-2 antigen. In this study, an HEK293 expression system was used to explore the production of recombinant IA-2. An IA-2 transmembrane fragment (IA-2 TMF) located at amino acid position 449–979, also known as the natural membrane protein form of IA-2, was produced in HEK293 through transfection, and both the expression conditions and dissolution conditions of the membrane protein were also optimized. The purified membrane protein yield was 0.78 mg/L cell culture. Subsequently, the antigen activity of IA-2 TMF was compared with RSR rhIA-2 through enzyme linked immunosorbent assay. The serum of 77 type 1 diabetes patients and 32 healthy volunteers were detected. Receiver operating characteristic curve (ROC) curve was used to characterize the sensitivity and specificity of the test results. The results showed that the sensitivity of IA-2 TMF was 71.4% (55/77), while the sensitivity of RSR rhIA-2 was 63.6% (49/77), and the specificity of both antigens were all 100%. There was no significant difference in specificity between the two antigens, but the sensitivity of IA-2 TMF was appreciably better than that of the imported gold standard RSR rhIA-2 antigen. In conclusion, the recombinant IA-2 TMF produced in HEK293 cells can be used as a raw material to develop *in vitro* diagnostic reagents for type 1 diabetes.

Keywords: type 1 diabetic mellitus; autoimmunity; insulinoma-associated protein-2; purification of membrane protein

由于胰岛 β 细胞被免疫细胞攻击,而导致胰岛素绝对缺乏的自身免疫糖尿病^[1],被称为1型糖尿病(type 1 diabetic mellitus, T1DM)。1996年,Mayrhofer等^[2]首次在T1DM患者血清中发现了胰岛素瘤相关蛋白-2自身抗体(insulinoma-associated protein-2 autoantibody, IA-2 Ab),大约60%–80%的新发T1DM患者血清中能检测

到IA-2 Ab^[3]。

胰岛素瘤相关蛋白-2 (insulinoma-associated protein-2, IA-2), 也称胰岛细胞自身抗原-512 (islet cell autoantigen-512, ICA512), 是一种属于酪氨酸磷酸酶样蛋白家族的跨膜糖蛋白^[4], 共979个氨基酸, 由3个结构域组成, 分别为N端胞外结构域(IA-2 extracellular domain, IA-2 ec)、

跨膜区以及胞内结构域 (IA-2 intracellular domain, IA-2 ic)^[5]。在胰岛 β 细胞中, IA-2 经过类弗林肽链内切酶切割, 形成 N 端片段 (N-terminal fragment, NTF) 和跨膜片段 (transmembrane fragment, TMF) 2 个亚基^[6]。其中, NTF 可能被降解或是分泌到胞外, 而 TMF 定位于细胞膜上, 形成二聚体来调节胰岛素的

分泌(图 1)。据报道, 从胎牛的胰岛细胞天然提取物中发现, IA-2 大部分是以约 70 kDa 的 TMF 的形式存在^[7]。研究表明, IA-2 蛋白上的自身抗体结合位点主要集中在胞内区, 在 IA-2 抗体呈阳性的 T1DM 患者血清中, 近 61% 的患者可检测到针对蛋白酪氨酸磷酸酶结构域 (protein-tyrosine-phosphatase domain, PTP domain) 的抗体,

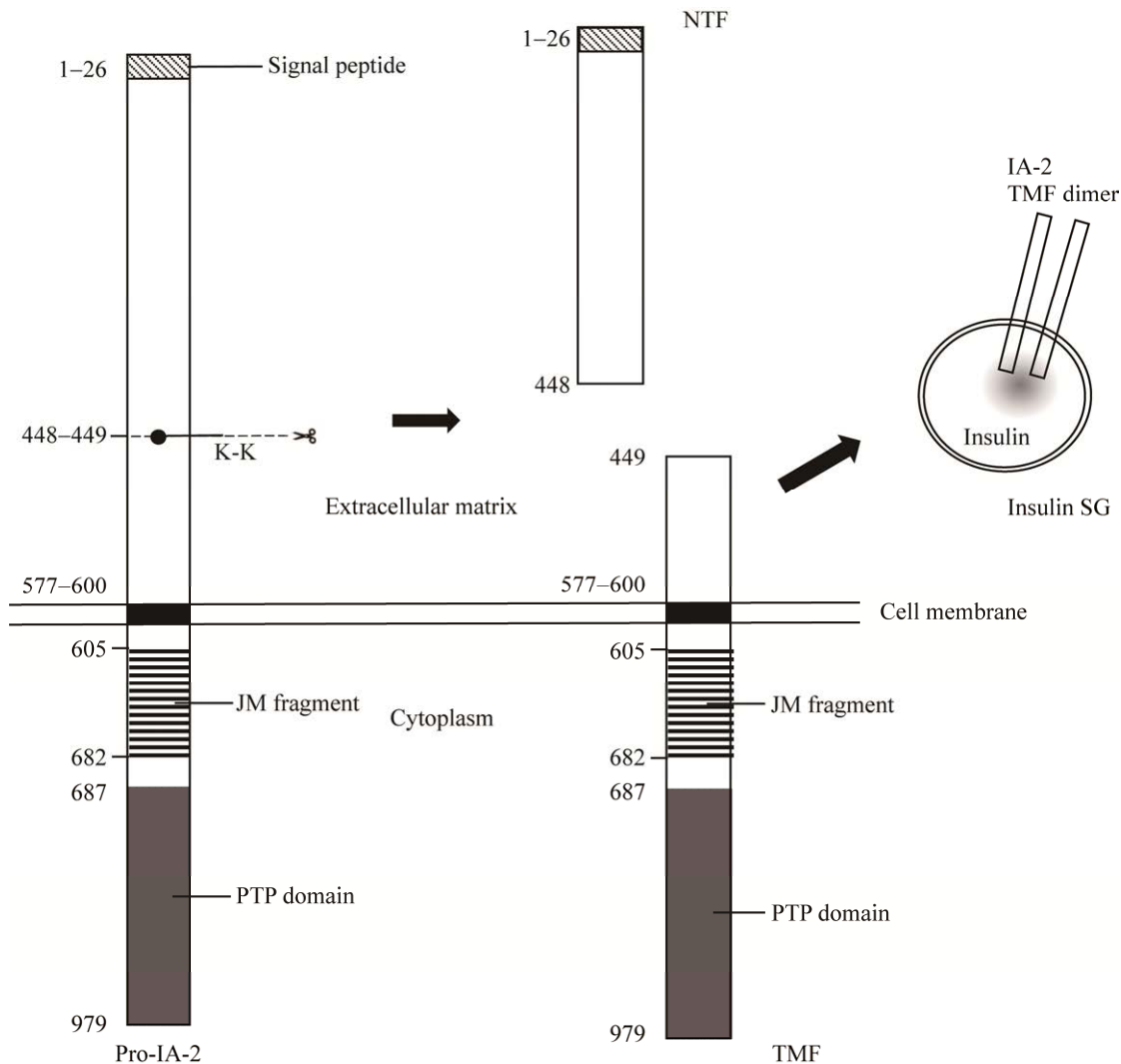


图 1 IA-2 的蛋白结构及在胰岛 β 细胞内的加工

Figure 1 The structure of IA-2 and its processing in insulin β -cell. In endoplasmic reticulum, Pro-IA-2 is cleaved between amino acid 448 and 449. Two fragments, NTF and TMF are subsequently formed. NTF may be secreted into extracellular matrix or degraded by protease, whereas TMF may form dipolymer with insulin in insulin secretory granules.

有 9% 的患者仅产生针对近膜域片段(juxtamembrane fragment, JM fragment)的自身抗体^[8]。仍有 23.7% 的患者体内含有针对 IA-2 ec 的抗体^[9]，也有近 30% 的 T1DM 患者的自身抗体可同时识别 IA-2 ec 与 IA-2 ic^[9-11]。

有研究者尝试在昆虫细胞中进行重组表达 IA-2 全长,发现 IA-2 全长会自发降解成 64 kDa 无抗原性的非天然二联体^[12]，并且, IA-2 全长在真核细胞中的重组表达会严重影响宿主的生长^[13]。Park 等^[14]发现胰岛中含有外显子 13 缺失(第 577–629 位氨基酸缺失)的天然 IA-2 变体,将其命名为 IA-2 bdc,在大肠杆菌中重组表达并纯化得到的该 IA-2 变体的抗原敏感性为 63.2%，有约 3% 的 T1DM 患者血清中的自身抗体仅能识别 IA-2 bdc,而无法识别 IA-2 ic。也有研究者通过将 IA-2 ic 分别与 MBP、GST 和生物素融合表达,获得了成本较低且具有较好抗原性的重组 IA-2 抗原^[15-16]。Sica 等优化了 IA-2 ic 在大肠杆菌中的溶表达,纯化后得到的重组抗原敏感度为 62%^[17]。Morran 等^[9]和 Myers 等^[11]分别重组表达并纯化了 IA-2 ec 和含有第 256–558 位氨基酸的肽段,这 2 种重组抗原的敏感性分别为 23.7% 和 37.0%。而 IA-2 被加工后产生的 TMF 片段是否可进行重组表达及纯化,以及该片段对 T1DM 患者的抗原敏感性如何,至今仍未见报道。

与细菌、酵母及昆虫细胞表达系统相比,人胚胎肾细胞 293 (human embryonic kidney cell 293, HEK293)表达系统能为来源于人的膜蛋白提供接近天然的合成与折叠环境和翻译后修饰,以及对人类功能性膜蛋白的生物合成相当重要的磷脂双层^[18]。目前, β_2 肾上腺素受体^[19]、白细胞分化抗原 81^[20]、胰高血糖素受体^[21]等膜蛋白已成功在 HEK293 表达系统表达和纯化。本研究在 HEK293 细胞中建立并优化了 IA-2

TMF 重组膜蛋白的表达及纯化流程,并使用 ELISA 对比了 IA-2 TMF 与商业化 RSR rhIA-2 (重组表达 IA-2 ic)的抗原性,为开发体外诊断试剂盒奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞株

表达载体 pcDNA3.4 购自重庆优宝生物技术有限公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;表达宿主 HEK293 高密度悬浮培养细胞株 Expi293 细胞由上海奥浦迈生物科技股份有限公司提供。

1.2 主要试剂

细胞培养基 OPM-293 CD03 DPM 购自上海奥浦迈生物科技股份有限公司;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;无内毒素质粒抽提试剂盒 NucleoBond Xtra Maxi kit for transfection-grade plasmid DNA 购自 MACHERY-NAGEL 公司;转染试剂聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI) 购自 Sigma-aldrich 公司;重组人 IA-2 抗原购自天津阿斯尔生物科技有限公司;纯化介质 Ni Bestatose Fast Flow 以及 Chromdex 200 prep grade 均购自博格隆(上海)生物技术有限公司;1 mg/mL BSA 标准溶液、DNA marker III 以及可溶性单组分 TMB 底物溶液均购自天根生化科技(北京)有限公司;二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒及辣根过氧化物酶标记 Streptavidin 购自碧云天生物技术有限公司;酶标板(Thermo ScientificTM MaxiSorpTM)及 DSB-XTM 生物素蛋白标记试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Omni-EasyTM 速溶型蛋白上样缓冲液(变性,还原型,5 \times)、考马斯亮蓝快速免脱染色液及三色预染蛋白 Marker 购自上海雅酶生物医药科技有限公司;IA-2 抗体

及羊抗鼠-HRP 抗体购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司。

1.3 血清样品

试验中所使用的血清样品均由上海博岳生物技术有限公司提供。

1.4 重组质粒构建及细胞瞬时表达

通过 <https://www.uniprot.org/> 网站, 查询到人 IA-2 的全长蛋白序列(Entry ID: Q16849), 截取其中 449-979 位氨基酸序列, 交由南京金斯瑞生物科技有限公司进行密码子优化和基因合成。重组蛋白命名为 TMF, 在 TMF 的 N 端加上 IA-2 天然信号肽, C 末端加上 10×His 标签, 分别使用引物 TMF-F、TMF-R 以及 P-F、P-R 进行 TMF 核酸序列的扩增以及 pcDNA3.4 的载体线性化。使用无缝克隆试剂盒将 TMF 核酸序列克隆至载体的线性化位点, 将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 使用含有氨苄抗生素的培养基筛选重组子。重组子用 pcDNA3.4 通用引物 F、R 进行验证。本文使用的所有引物序列如表 1 所示。

将测序正确的重组子保种, 并使用无内毒素质粒大提试剂盒抽提质粒, 稀释质粒 DNA 浓度至 1 mg/mL。

转染前一日, 按照 1×10^6 的密度接种 Expi293 细胞, 37 °C、120 r/min 培养 24 h。1 μ g 质粒 DNA 和 2 μ g PEI 分别在 2 mL 细胞培养基中稀

释, 将质粒 DNA 稀释液与 PEI 的稀释液混合, 室温孵育 10-20 min, 加入 100 mL 细胞液中, 置于摇床培养, 在不同时间点收获, Western blotting 检测重组蛋白表达水平。

调整质粒 DNA 与转染试剂 PEI 的质量比分别为 1:2、1:3 和 1:4, 分别稀释后混合孵育, 加入等量细胞液中, 一定时间后取样, 检测蛋白表达水平, 以确定质粒 DNA 与转染试剂的最佳比例。转染 24 h 后, 加入不同浓度的丁酸钠, 并适当降低培养温度, 以探索 TMF 的最佳表达条件。

1.5 重组膜蛋白的抽提

4 °C、1 000×g 离心 10 min, 收获下层细胞沉淀。按照每 1 g 细胞沉淀加入 5 mL 破碎缓冲液, 振荡以充分悬浮细胞沉淀, 破碎缓冲液配方为: 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PB), 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), 1 mmol/L 二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT), 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF), pH 7.0。按功率 300 W, 超声 4 s, 停止 8 s, 25 个循环的程序进行细胞破碎; 3 000×g 离心 10 min, 沉淀细胞大碎片, 取上清液, 100 000×g 离心 2 h, 所收集到的沉淀即为细胞膜组分。

取湿重为 100 mg 的膜组分, 加入 1 mL 溶膜缓冲液(20 mmol/L PB, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L

表 1 本实验使用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
TMF-F	TTGGTACCGAGCTCGGATCGCCACCATGCGGCGGCCTAGAAGACCTGGA
TMF-R	GTGATGATGGTGTGATGGTGTGCTGAGGCAGGGCCTTCAGGATGGCATTAC
P-F	CCATCACCATCACCATCATCACCATCACTGAGAATTCTGCAGATATCCAGCA
P-R	GGTGGCGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTT
F	GTTTGTGTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCC
R	AAAAGGAGCAACATAGTTAAGAATACCAGTCAATCTTT

DTT, 10%甘油, pH 8.0), 振荡以充分悬浮沉淀。分别加入 Triton X-100、CHAPSO、Tween-80、十二烷基- β -D-麦芽糖苷(dodecyl- β -D-maltoside, DDM)和辛基硫代葡萄糖苷(octylglucosinate, OTG), 使其终浓度均为 1%, 4 °C 孵育 1 h, 100 000 \times g 离心 30 min, 取 40 μ L 上清液与 5 \times 蛋白上样缓冲液混合, 沸水浴 5 min 后, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测目的蛋白含量。

确定最适合溶解膜组分的去污剂后, 分别进行去污剂浓度和 NaCl 浓度梯度膜组分增溶实验, 样品处理及分析同上。

1.6 重组膜蛋白的纯化

取湿重约为 5.2 g 的膜组分, 用 50 mL 含有一定浓度的去污剂和 NaCl 的溶膜缓冲液充分悬浮, 4 °C 孵育 1 h, 100 000 \times g 离心 30 min, 上清液中加入预先平衡好的 10 mL Ni-NTA 介质, 4 °C 共孵育 30 min。将混合物灌入层析柱内, 用平衡缓冲液(20 mmol/L PB, 200 mmol/L NaCl, 10%甘油, 0.2% Triton X-100, pH 8.0)冲洗 10 个柱体积(column volume, cv)。再用洗杂缓冲液(20 mmol/L PB, 200 mmol/L NaCl, 10%甘油, 0.2% Triton X-100, 200 mmol/L 咪唑, pH 8.0)冲洗 10 倍柱床体积, 最后用洗脱缓冲液(20 mmol/L PB, 200 mmol/L NaCl, 10%甘油, 0.2% Triton X-100, 500 mmol/L 咪唑, pH 8.0)冲洗 2 倍柱床体积, 收获含有目的蛋白的洗脱液。

对上一步的蛋白洗脱液进行超滤浓缩, 用 Chromdex 200 prep grade 进一步精制, 分子筛流动相为: 20 mmol/L PB, 200 mmol/L NaCl, 20%甘油, 0.2% Triton X-100, pH 8.0。再次对所收集到的洗脱峰进行超滤浓缩, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度, 分装后于 -80 °C 保存。

1.7 重组蛋白抗原性评价

用分子筛流动相分别稀释纯化后的 TMF 及 RSR rhIA-2 抗原, 按照 50 ng 蛋白/孔的量加入酶标板中, 室温静置 2 h 以包被抗原; 含 Tween-20 的磷酸缓冲液(phosphate buffered solution with Tween-20, PBST)洗涤 3 次后, 加入 5%脱脂奶粉, 室温静置 2 h 封闭酶标板上未结合的位点; 加入稀释后的血清, 静置 2 h, 使抗体和抗原结合, PBST 洗涤 3 次, 除去未完全结合的抗体; 加入生物素标记后的 TMF, 静置 2 h, 使抗体和生物素标记的抗原结合, PBST 洗涤 3 次, 除去未完全结合的抗原; 加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的链霉亲和素, 室温静置 20 min, PBST 洗涤 3 次, 再加入 TMB 底物溶液, 避光静置 20 min, 加入 1 mol/L 硫酸终止反应, 450 nm 波长检测吸光值。

2 结果与分析

2.1 重组子的鉴定

通过 PCR 的方式, 使用通用引物 F、R 对含有重组子的大肠杆菌菌落进行验证, 电泳显示在 1 955 bp 处有明亮条带(图 2), 说明重组子中含有 TMF 基因。

2.2 TMF 的重组表达及表达条件优化

将测序结果正确的阳性重组子扩培并进行抽提质粒, 转化悬浮细胞 Expi293, 分别在瞬转 24、48、72 h 后取细胞沉淀, Western blotting

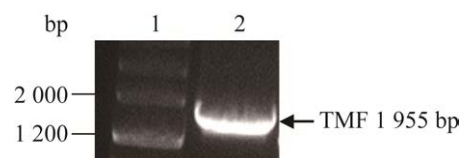


图 2 重组子的菌落 PCR 验证

Figure 2 Validation of recombinant colonies by PCR. 1: DNA marker; 2: TMF.

检测蛋白表达,结果显示在瞬转 48 h 后,蛋白表达量几乎不变(图 3),因此将收获细胞的时间定在瞬转后 48 h。Western blotting 显示 TMF 的分子量比预计分子量(70 kDa)大 2 kDa 左右,可能是蛋白糖基化等翻译后修饰引起的分子量增大。

为探究质粒 DNA 与转染试剂的比例是否会对重组蛋白的表达量产生影响,调整质粒 DNA 与 PEI 的质量比分别为 1:2、1:3 和 1:4,转化悬浮细胞 Expi293,48 h 后收获细胞。Western blotting 显示,当质粒 DNA 与转染试剂 PEI 的质量比为 1:4 时,重组蛋白的表达量最高。转染 5 h 后,加入丁酸钠至工作浓度分别为 2、5、10 mmol/L,结果显示,当丁酸钠浓度为 5 mmol/L 时,足以让 Expi293 细胞表达重组蛋白的效率提高至原来的 1.5 倍左右(图 3,

泳道 9),而更高的丁酸钠浓度,对提高重组蛋白表达量没有明显效果(图 3,泳道 10)。

HEK293 细胞系表达重组蛋白时,适当降低培养温度,可提高重组蛋白表达量。质粒瞬转后,细胞在 37 °C 培养 5 h,随即分别降低温度至 33 °C 和 30 °C,培养 48 h 后收获细胞。Western blotting 显示,细胞培养温度为 33 °C 时,重组蛋白表达量最高(图 3,泳道 12)。通过对比蛋白灰度图(图 3B),表达条件优化后(泳道 12)的蛋白表达量比优化前(泳道 3)提高了约 5 倍。

因此,TMF 的最佳表达条件为:质粒 DNA 与转染试剂 PEI 的质量比为 1:4,转染 5 h 后加入 5 mmol/L 丁酸钠,并将细胞培养温度降低至 33 °C,转染后 48 h 收获。

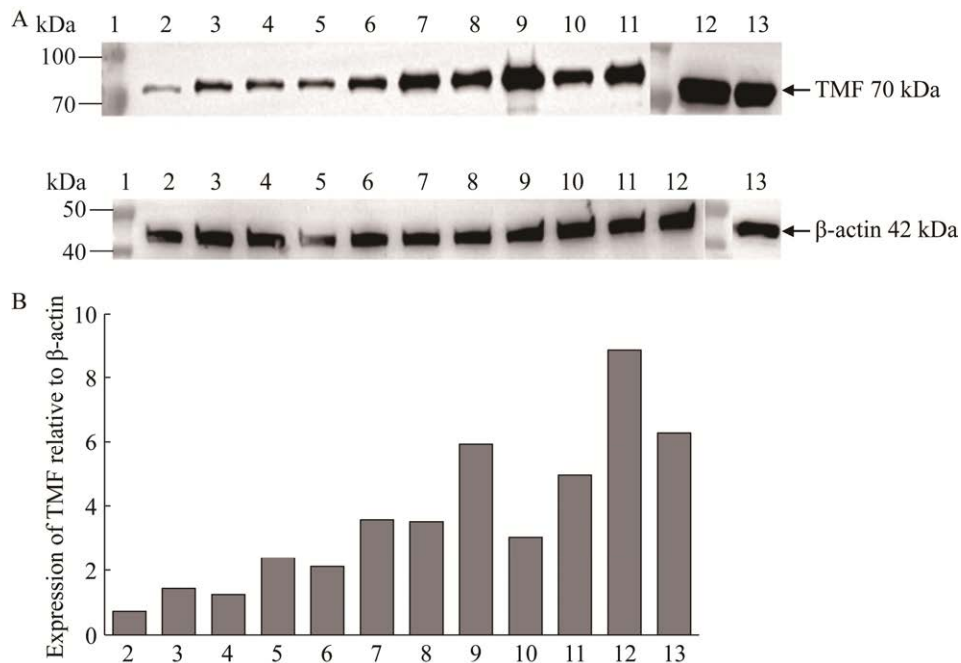


图 3 Western blotting 检测重组蛋白的表达

Figure 3 Western blotting analysis for the expression of recombinant protein. A: Western blotting analysis for the expression of TMF. β -actin was used as an internal control. 1: Protein marker; 2–4: Harvest in 24, 48 and 72 h after transfection; 5–7: The mass ratio of plasmid DNA and PEI being 1:2, 1:3 and 1:4; 8–10: Cell cultured in 37, 33 and 30 °C; 11–13: Cell culture supplemented with 2, 5 and 10 mmol/L sodium butyrate in 5 h after transfection. B: The grayscale of the expression of TMF.

2.3 TMF 膜组分溶解条件优化

将收获的细胞重悬后超声破碎, Western blotting 分别检测全细胞、破碎上清和膜组分沉淀。结果显示, 全细胞和膜组分沉淀中可在 70 kDa 附近检测到明显条带, 说明 TMF 主要表达在膜组分沉淀中, 而细胞上清液中也隐约检测到了条带, 可能是未分泌到膜上的 TMF 蛋白(图 4)。

为筛选最合适的去污剂, 用含有不同去污剂的溶膜缓冲液分别溶解湿重相等的膜沉淀, 去污剂的工作浓度均为 1% (质量体积分数), SDS-PAGE 和 Western blotting 检测结果显示, TMF 蛋白在膜蛋白溶液中的含量大于 70%, 且对于相同湿重的膜组分, Triton X-100 的溶解效果最好, 其次是 DDM 和 OG, 吐温-80 和 CHAPSO 完全无法溶解 TMF (图 5)。由此可确定, 溶解 TMF 的最佳去污剂为 Triton X-100。

分别调整去污剂浓度和缓冲液中的盐浓度, 以探索 TMF 的最佳溶解条件, SDS-PAGE 检测溶解结果(图 6)。结果显示, 当缓冲液中去污剂的质量体积分数达到 1.5% 时, 继续提高去污剂浓度对膜蛋白水溶性的增加没有明显助益(图 6A)。在去污剂 Triton X-100 的质量体积分数为 1.5% 的情况下, NaCl 浓度为 200 mmol/L 时(图 6B), TMF 溶解效率最高。通过对比考染显示的蛋白量, 溶解条件优化后, 溶液中可溶 TMF 的浓度(图 6B, 泳道 3)约是优化前(图 6A, 泳道 2)的 3 倍。

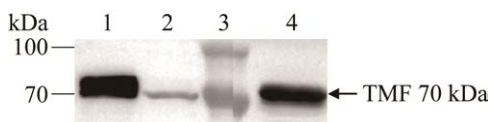


图 4 Western blotting 检测细胞裂解产物

Figure 4 Western blotting analysis for cell lysis product. 1: Whole cell; 2: Ultracentrifugation supernatant; 3: Protein marker; 4: Cell membrane pellet.

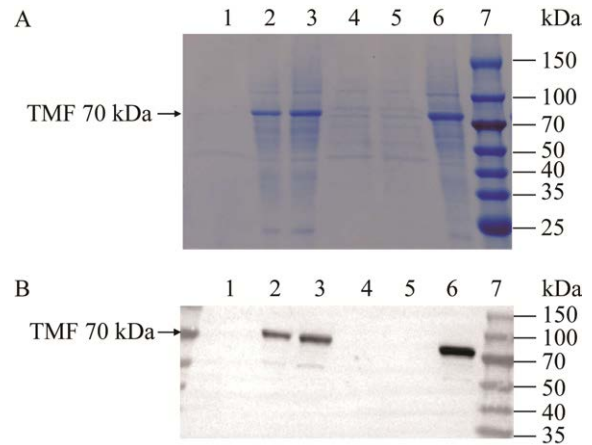


图 5 SDS-PAGE (A) 和 Western blotting (B) 检测不同去污剂溶解膜组分的效果

Figure 5 SDS-PAGE (A) and Western blotting analysis (B) for membrane fraction dissolved in different detergents. 1: Mock; 2-6: Membrane dissolved in 1% OTG solution, 1% DDM solution, 1% Tween-80 solution, 1% CHAPSO solution and 1% Triton X-100 solution; 7: Protein marker.

2.4 TMF 的纯化

取约 5.2 g 湿重的膜组分, 在去污剂中溶解后, 依次通过 Ni-NTA 亲和色谱和 Chromdex 200 prep grade 分子排阻色谱, SDS-PAGE 检测蛋白纯度(图 7), 电泳结果显示, 经过分子筛纯化后, TMF 的纯度大于 95%。纯化后的 TMF, 经超滤浓缩后, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量, 测得蛋白浓度为 0.78 mg/mL。

2.5 IA-2 TMF 的抗原性评价

为了检测纯化后的重组膜蛋白抗原的活性, 将纯化后的 TMF 包被于酶标板, ELISA 检测重组 TMF 与血清的免疫反应活性, 以 RSR rhIA-2 抗原(重组表达 IA-2 ic, 第 604-979 位氨基酸)作为对比, ROC 曲线分析 2 种抗原对 77 位 T1DM 患者血清和 32 位健康志愿者血清的敏感性和特异性, 以 2 种抗原各自的最大约登指数所对应的值作为 2 种抗原各自的诊断分界点。通过 RSR rhIA-2 的 ROC 曲线可得到 RSR rhIA-2 的

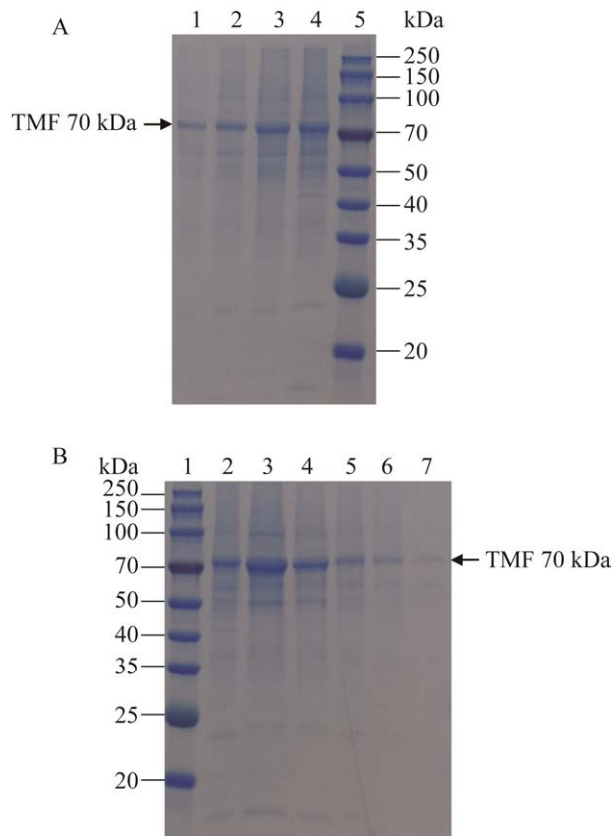


图 6 SDS-PAGE 检测不同去污剂浓度及盐浓度对膜蛋白溶解的促进效果

Figure 6 The effect of different concentrations of detergent and salt on the dissolution of membrane proteins as analyzed by SDS-PAGE. A: SDS-PAGE analysis for membrane dissolved in different concentrations of detergents. 1-4: Membrane dissolved in 0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0% Triton X-100; 5: Protein marker. B: SDS-PAGE analysis for membrane dissolved in 1.5% Triton X-100 and different concentrations of sodium chloride. 1: Protein marker; 2-7: Membrane dissolved in 0, 200, 400, 600, 800 and 1 000 mmol/L NaCl.

最大约登指数为 0.636, 所对应诊断分界点为 0.399, RSR rhIA-2 抗原对阳性样品的检出率为 63.6% (49/77), 特异性为 100% (32/32) (图 8B)。通过 TMF 的 ROC 曲线求得最大约登指数为 0.714, 所对应的诊断分界点为 0.312, TMF 重组抗原对阳性样品的检出率为 71.4% (55/77), 特异

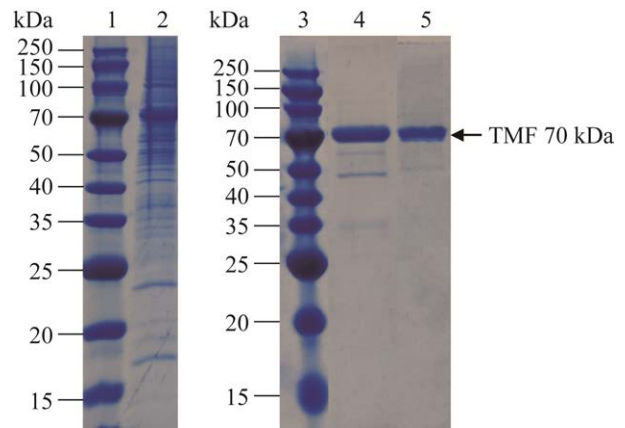


图 7 SDS-PAGE 检测 TMF 的纯化

Figure 7 Analysis of purified TMF by SDS-PAGE. 1: Protein marker; 2: Dissolved membrane protein TMF; 3: Protein marker; 4: Membrane protein TMF purified by Ni affinity chromatography; 5: Membrane protein TMF purified by size exclusion chromatography.

性为 100% (32/32) (图 8A)。2 种抗原特异性相似, 但 TMF 的敏感性优于 RSR rhIA-2 抗原。ROC 曲线分析结果显示(图 8C), RSR rhIA-2 抗原的曲线下面积(area under curve, AUC)为 0.765, 而 TMF 重组抗原的 AUC 值为 0.870, TMF 重组抗原的 AUC 值更接近 1, 说明比起 RSR rhIA-2 抗原, TMF 重组抗原具有更高的诊断价值。其中, 相对于 RSR rhIA-2 抗原, TMF 检测健康人血清的阴性平均值较低, 可能是由于 2 种抗原的表达宿主不同。在 HEK293 表达系统表达的 TMF 中不含有能与人血清产生非特异性免疫反应的杂质, 而由大肠杆菌表达系统表达的 RSR rhIA-2 抗原中, 可能有微量来源于细菌的杂质, 影响了抗原与阴性血清的免疫反应。

3 讨论与结论

IA-2 是诊断 1 型糖尿病的重要抗原, 也是研发 1 型糖尿病体外诊断试剂盒重要原料, 目前, 通过重组生产得到的 IA-2 抗原多为 ic 结构

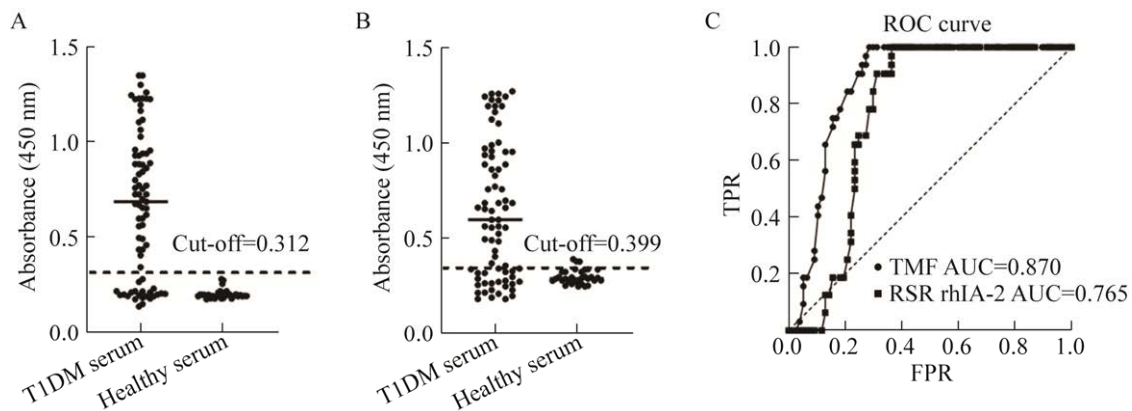


图8 ELISA检测RSR rhIA-2抗原与TMF的抗原活性

Figure 8 Detecting the immunogenicity of recombinant protein TMF (A) and RSR rhIA-2 (B) by ELISA. C: ROC curve analysis of ELISA; AUC values were included.

域,对成熟形式跨膜蛋白 TMF 的重组表达研究尚且不足。并且,有研究表明 IA-2 的表位存在异质性,不同抗原表位组合在临床检测上的表现不同^[22],因此,新型 IA-2 抗原的重组生产研究对于 T1DM 的临床诊断而言是必要的。

本研究利用 HEK293 表达系统重组表达了 IA-2 的 TMF 形式,为新型 IA-2 抗原的研发提供了研究基础,也为 T1DM 新型诊断技术的发展提供了理论依据。通过对表达条件进行优化,将 TMF 的表达量提高了近 5 倍;同时对膜蛋白的增溶条件进行优化,让 TMF 在去污剂溶液中的溶解度也提高了 3 倍。通过亲和纯化及分子筛纯化后,得到的 TMF 抗原产量仅为 0.78 mg/L 细胞发酵液,抗原产量较低。此外,本文对于蛋白表达条件的优化仅停留于培养条件优化方面,若想进一步提高蛋白产量,仍需从表达宿主改造、表达载体优化和膜蛋白人工设计三方面入手。例如,共表达分子伴侣来促进宿主细胞的分泌途径,如 Bip、Hsp90 等^[23];或敲除细胞凋亡途径相关蛋白来遏制凋亡途径,如 CASP3、CASP7 等,降低膜蛋白过表达对细胞存活的面效果,以延长宿主细胞的寿命,减少蛋白酶

对重组蛋白的降解^[24]。此外,还可以使用 QTY code 对 TMF 的跨膜区进行人工设计^[25],将疏水的膜蛋白转变为亲水的胞内蛋白或分泌蛋白,以降低膜蛋白表达和纯化的难度。

使用 ELISA 检测,并通过 ROC 曲线得到重组 IA-2 TMF 对 T1DM 患者血清的检出率为 71.4% (55/77),此数据与 GADA、IAA、ICA 等 T1DM 自身抗体的检出率具有可比性^[26]。通过与商业化 IA-2 重组抗原的对比,发现 TMF 的特异性与 RSR rhIA-2 一致,但敏感性优于 RSR rhIA-2,可能的原因是有一部分新发的 T1DM 患者的血清内仅含有针对 IA-2 第 449–576 位胞外区域的抗体,与文献报道相符^[10–11]。为了最终实现 IA-2 自身抗体检测试剂盒的开发,仍需以不同的检测方法检测 TMF 的抗原性,并进一步扩大临床样本数量来验证该抗原的特异性和敏感性,同时根据实际情况调整 cut-off 值,优化诊断方法,提高其准确性,从而全面评价 TMF 对于 T1DM 诊断试剂开发的意义。

REFERENCES

- [1] KATSAROU A, GUDBJÖRNSDOTTIR S, RAWSHANI A, DABELEA D, BONIFACIO E, ANDERSON BJ,

- JACOBSEN LM, SCHATZ DA, LERNMARK Å. Type 1 diabetes mellitus[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2017, 3: 17016.
- [2] MAYRHOFER M, RABIN DU, MESSENGER L, STANDL E, ZIEGLER AG. Value of ICA512 antibodies for prediction and diagnosis of type 1 diabetes[J]. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 2009, 104(3): 228-234.
- [3] NOTKINSAL, LAN MS, LESLIE RD. IA-2 and IA-2 β : the immune response in IDDM[J]. Diabetes/Metabolism Reviews, 1998, 14(1): 85-93.
- [4] HALIM A, RÜETSCHI U, LARSON G, NILSSON J. LC-MS/MS characterization of O-glycosylation sites and glycan structures of human cerebrospinal fluid glycoproteins[J]. Journal of Proteome Research, 2013, 12(2): 573-584.
- [5] TORII S. Expression and function of IA-2 family proteins, unique neuroendocrine-specific protein-tyrosine phosphatases[J]. Endocrine Journal, 2009, 56(5): 639-648.
- [6] HERMEL JM, DIRKX JR R, SOLIMENA M. Post-translational modifications of ICA512, a receptor tyrosine phosphatase-like protein of secretory granules[J]. European Journal of Neuroscience, 1999, 11(8): 2609-2620.
- [7] DIRK R JR, HERMEL JM, RABIN DU, SOLIMENA M. ICA 512, a receptor tyrosine phosphatase-like protein, is concentrated in neurosecretory granule membranes[M]//Advances in Pharmacology. Amsterdam: Elsevier, 1997: 243-246.
- [8] LAMPASONA V, BEARZATTO M, GENOVESE S, BOSI E, FERRARI M, BONIFACIO E. Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen[J]. The Journal of Immunology, 1996, 157(6): 2707-2711.
- [9] MORRAN MP, CASU AN, ARENA VC, PIETROPAOLO S, ZHANG YJ, SATIN LS, NELSON P, OMENN GS, TRUCCO M, BECKER DJ, PIETROPAOLO M. Humoral autoimmunity against the extracellular domain of the neuroendocrine autoantigen IA-2 heightens the risk of type 1 diabetes[J]. Endocrinology, 2010, 151(6): 2528-2537.
- [10] MIAO DM, YU LP, TIBERTI C, CUTHBERTSON DD, REWERS M, DI MARIO U, EISENBARTH GS, DOTTA F. ICA512(IA-2) epitope specific assays distinguish transient from diabetes associated autoantibodies[J]. Journal of Autoimmunity, 2002, 18(2): 191-196.
- [11] MYERS MA, RABIN DU, ROWLEY MJ. Pancreatic islet cell cytoplasmic antibody in diabetes is represented by antibodies to islet cell antigen 512 and glutamic acid decarboxylase[J]. Diabetes, 1995, 44(11): 1290-1295.
- [12] XIE H, DENG YJ, NOTKINS AL, LAN MS. Expression, characterization, processing and immunogenicity of an insulin-dependent diabetes mellitus autoantigen, IA-2, in Sf-9 cells[J]. Clinical & Experimental Immunology, 1998, 113(3): 367-372.
- [13] PAPAKONSTANTINOUS T, MYERS MA, JOIS J, ROUCOU X, PRESCOTT M, ROWLEY MJ, MACKAY IR. Expression of protein tyrosine phosphatase-like molecule ICA512/IA-2 induces growth arrest in yeast cells and transfected mammalian cell lines[J]. Journal of Autoimmunity, 2001, 17(1): 51-61.
- [14] PARK YS, KAWASAKI E, KELEMEN K, YU L, SCHILLER MR, REWERS M, MIZUTA M, EISENBARTH GS, HUTTON JC. Humoral autoreactivity to an alternatively spliced variant of ICA512/IA-2 in type I diabetes[J]. Diabetologia, 2000, 43(10): 1293-1301.
- [15] 潘晓平, 陆俊茜, 林晓. ICA512 的表达及人抗 ICA512 抗体测定方法的建立[J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(3): 248-251.
PAN XP, LU JX, LIN X. The cloning and protein expression of ICA512 gene and its clinical application[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2006, 22(3): 248-251 (in Chinese).
- [16] 罗敏. 重组人 IA-2 抗原的制备方法: CN1490332. X[P]. 2004-04-21.
LUO M. Recombinant human IA-2 antigen preparing method: CN1490332. X[P]. 2004-04-21 (in Chinese).
- [17] SICA MP, PRIMO ME, ERMÁCORA MR, POSKUS E. High-yield expression of properly folded insulinoma-associated protein intracellular domain (IA-2ic) in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2003, 37(3): 301-309.
- [18] CHAUDHARY S, PAK JE, PEDERSEN BP, BANG LJ, ZHANG LB, NGAW SMM, GREEN RG, SHARMA V, STROUD RM. Efficient expression screening of human membrane proteins in transiently transfected human embryonic kidney 293S cells[J]. Methods, 2011, 55(4): 273-280.
- [19] CHELIKANI P, REEVES PJ, RAJBHANDARY UL, KHORANA HG. The synthesis and high-level

- expression of a β 2-adrenergic receptor gene in a tetracycline-inducible stable mammalian cell line[J]. *Protein Science*, 2006, 15(6): 1433-1440.
- [20] TAKAYAMA H, CHELIKANI P, REEVES PJ, ZHANG SG, KHORANA HG. High-level expression, single-step immunoaffinity purification and characterization of human tetraspanin membrane protein CD81[J]. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2314.
- [21] UNSON CG. Expression of glucagon receptors in tetracycline-inducible HEK293S GnT1-stable cell lines: an approach toward purification of receptor protein for structural studies[J]. *Peptide Science*, 2008, 90(3): 287-296.
- [22] TIBERTI C, D'ONOFRIO L, PANIMOLLE F, ZAMPETTI S, MADDALONI E, BUZZETTI R. Immunoreactivities against different tyrosine-phosphatase 2 (IA-2) (256-760) protein domains characterize distinct phenotypes in subjects with LADA[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 13: 921886.
- [23] FORMAS AS, BASÍLIO JS, RODRIGUES AF, COROADINHA AS. Overexpression of ER protein processing and apoptosis regulator genes in human embryonic kidney 293 cells improves gene therapy vectors production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 15(9): e1900562.
- [24] ZHANG W, XIAO D, SHAN L, ZHAO J, MAO Q, XIA H. Generation of apoptosis-resistant HEK293 cells with CRISPR/Cas mediated quadruple gene knockout for improved protein and virus production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(11): 2539-2549.
- [25] QING R, HAN Q, SKUHERSKY M, CHUNG H, BADR M, SCHUBERT T, ZHANG S. QTY code designed thermostable and water-soluble chimeric chemokine receptors with tunable ligand affinity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116(51): 25668-25676.
- [26] BINGLEY PJ, BONIFACIO E, WILLIAMS AJ, GENOVESE S, BOTTAZZO GF, GALE EA. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers[J]. *Diabetes*, 1997, 46(11): 1701-1710.

(本文责编 陈宏宇)