

重组人源甲胎蛋白在毕赤酵母中的高效表达及纯化^{*}

严子琴¹, 刘 丽¹, 刘 俊¹, 施 思¹, 李海龙¹, 蒋 哲¹, 孟凡国¹, 周海梦¹, 徐 蓓², 丁先锋³, 胡卫江¹, 欧文斌^{1△} (1. 浙江清华长三角研究院/浙江省应用酶学重点实验室/生物分析技术实验室, 浙江嘉兴 314006; 2. 中国计量科学研究院, 北京 100013; 3. 浙江理工大学生命科学学院, 浙江杭州 310018)

【摘要】 目的 从毕赤酵母 GS115 蛋白表达体系入手, 实现人源甲胎蛋白(AFP)的重组克隆、异源高效表达、蛋白纯化并得到具有临床免疫原性的高纯度 AFP。**方法** 通过聚合酶链反应(PCR)从重组质粒 pReceiver-AFP 扩增到目的基因片段, 构建酵母重组表达质 pPICZαA-AFP, 经测序比对与 GenBank 公开的 AFP 序列一致。将重组质粒 pPICZαA-AFP 转入毕赤酵母 GS115, 通过甲醇诱导表达目的蛋白 AFP。收集蛋白后用硫酸铵分级沉淀法对 AFP 进行纯化, 高效液相色谱法(HPLC)检测纯度, 在临床医院通过电化学发光法对其蛋白含量定值。**结果** 研究发现 AFP 在酵母 GS115 中经甲醇诱导表达主要分泌到胞外培养基上清, 免疫印迹试验能够检测到 AFP 蛋白条带, 经硫酸铵分级沉淀, 87% AFP 目的蛋白存在于 55% 硫酸铵沉淀集份, HPLC 检测其纯度为 98.844%, 电化学发光法检测其水平为 3 473 ng/mL。最后与临床肝癌患者血清标本比对, 蛋白的相对分子质量大小一致, 表明其糖基化水平与临床标本相当。**结论** 通过毕赤酵母甲醇诱导表达系统可以制备高纯度的、具有生物活性的、可用于肿瘤临床检测的 AFP 标准物质及其可以溯源的校准品、质控品和相关诊断试剂。

【关键词】 甲胎蛋白; 毕赤酵母; 蛋白表达; 蛋白纯化

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.22.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)22-3094-03

High-efficiency expression and purification of recombination human-source AFP in Pichia^{*} YAN Zi-qin¹, LIU Li¹, LIU Jun¹, SHI Si¹, LI Hai-long¹, JIANG Zhe¹, MENG Fan-guo¹, ZHOU Hai-meng¹, XU Bei², DING Xian-feng³, HU Wei-jiang¹, OU Wen-bin^{1△} (1. Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University/Zhejiang Provincial Key Laboratory of Applied Enzymology/Laboratory of Bioanalytics, Jiaxing, Zhejiang 314006, China; 2. National Institute of Metrology, Beijing 100013, China; 3. College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

【Abstract】 Objective To realize the recombination clone, heterologic high-efficiency expression and protein purification of human-source alpha-fetoprotein(AFP) and to obtain the high purity of AFP with clinical bioactivity by the pPICZαA pichia expression systems. **Methods** The human recombinant expression plasmid pPICZαA-AFP was generated by PCR from pReceiver-AFP, which AFP sequence was in accordance with GenBank. The AFP protein was expressed by methanol induction in pichia GS115, and purified by ammonium sulfate precipitation. The expression and purification of AFP was evaluated by SDS-PAGE, western blotting and HPLC, and the value of AFP was quantified by chemiluminescence immunoassay in clinical hospital. **Results** Recombinant human AFP expressed in the pichia GS115 was mainly secreted into the extracellular medium supernatant, and also contained the immunogenicity. 87% of AFP was in 55% ammonium sulfate precipitate after ammonium sulfate fractionation, which purity was 98.844% and value was 3.473 ng/mL. Recombinant human AFP showed the same size of the protein molecular weight as the clinical hepatocellular carcinoma(HCC) serum samples, indicating that the glycosylation level of recombinant AFP was comparable with clinical samples. **Conclusion** The high purified recombinant human-source AFP with biological activity could be used to prepare AFP reference materials, traceable calibrator, controls and related diagnostic reagents by Pichia expression system, which could be used for clinical tumor diagnosis and therapeutic detection.

【Key words】 alpha-fetoprotein; Pichia; expression; purification

人源甲胎蛋白(AFP)是一种肿瘤相关的单链糖蛋白, 其糖链部分具有癌胚性变化的特征。AFP 为胎儿时期肝脏合成的一种胚胎蛋白, 出生 1 周后表达消失, 以后完全被清蛋白所替代^[1-3]。健康人不表达 AFP, 当患肝细胞癌、卵黄囊和胚胎样肿瘤及部分肝外肿瘤时机体可重新合成 AFP, 因此临床上

AFP 被当成一种肝癌及生殖细胞肿瘤的经典血清标志物来使用, 且对良恶性肿瘤的诊断、肿瘤治疗的疗效监测及肿瘤预后都具有重要临床意义^[4-5]。本文从真核(毕赤酵母 GS115)蛋白表达体系入手, 研究人源 AFP 的重组克隆、异源高效表达、蛋白纯化及临床活性分析, 为研制 AFP 标准物质及其可溯源校

^{*} 基金项目: 国家科技部科技支撑项目(2011BAI02B05); 浙江省重大科技专项(2012C03007-4)。

作者简介: 严子琴, 女, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学。 △ 通讯作者, E-mail: ouwenbin@tsinghua.org.cn。

准品、质控品和体外诊断试剂奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 质粒、菌种和培养基 质粒 pReceiver-AFP 由复能基因合成。质粒 pPICZαA 购自 Invitrogen。DH5α、BL21 (DE3) 和 GS115 均为本实验室保存。LB 培养基:胰蛋白胨 1%,酵母提取物 0.5%,氯化钠 1%,pH 7.0,固体培养基加 2%琼脂。BMGY 培养基:1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0) 10%,10×酵母无氨基氮源 (YNB) 10%,10×甘油 10%,酵母提取物 1%,蛋白胨 2%,500×生物素 0.02%。BMMY 培养基:1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0) 10%,10×YNB 10%,10×甲醇 10%,酵母提取物 1%,蛋白胨 2%,500×生物素 0.02%。

1.2 肝癌血清标本 选择 3 例临床肝癌患者血清标本,标为 1、2、3 号。1 号标本为女患者的血清,年龄 50 岁,AFP 为 281 661.00 ng/mL,治疗期给予的抗病毒药物为阿德福韦酯;2 号标本为男患者的血清,年龄 28 岁,AFP 为 80 200.45 ng/mL,治疗期间未给予抗病毒药物治疗;3 号标本为女患者的血清,年龄 44 岁,AFP 为 2 013.18 ng/mL,治疗期给予的抗病毒药物为阿德福韦酯。3 例患者的肝癌类型均为巨块型。

1.3 仪器与试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司;DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京天根公司;增强化学发光法 (ECL) 免疫印迹试验 (WB) 检测试剂盒购自 Millipore 公司;抗 His 兔多抗与抗 AFP 鼠单抗购自 Santa Cruz Biotechnology;抗兔与抗鼠二抗均购自 GE Healthcare。

1.4 构建重组人源 AFP 酵母表达载体 以质粒 pReceiver-AFP 为模板,上游引物 CGC CGG AAT TCA TGA AGT GGG TGG AAT CAA T (含 EcoR I 酶切识别位点),下游引物 CTA GTC TAG AAA CTC CCA AAG CAG CAC GAG (含 Xba I 酶切识别位点),聚合酶链反应 (PCR) 扩增带双酶切识别位点的 afp 目的基因片段,再将毕赤酵母表达载体 pPICZαA 和 afp PCR 扩增基因片段同时用 EcoR I 和 Xba I 双酶切后经 T4 DNA 连接酶连接,得到重组表达质粒 pPICZαA-AFP。测序结果与 GeneBank 公布的 AFP 序列完全一致。

1.5 重组蛋白的诱导表达 重组质粒 pPICZαA-AFP 经电转化法 (Bio-Rad 电转仪) 转入毕赤酵母 GS115。选取经 PCR 鉴定为阳性单克隆的 4 株重组菌株即 UNT-AFP-1、UNT-AFP-4、UNT-AFP-5 和 UNT-AFP-6,接种于 15 mL BMGY 培养基中,30 ℃振荡培养至 OD600 达到 2~6,2 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 20 mL BMMY 培养基重悬细胞,30 ℃振荡培养甲醇 (0.5%) 诱导蛋白表达。诱导开始后每隔 24 h 取样,标本经 8 000 r/min 离心 1 min,将上清液和细胞沉淀分离并放置在 4 ℃下。同时,补加无菌的 100% 甲醇至终浓度为 0.5% 以维持诱导。

1.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 及 WB 将经过处理后的蛋白进行 10% SDS-PAGE,电泳完毕后 1 块胶考马斯亮蓝染色,蛋白条带通过全自动凝胶成像系统进行扫描分析。另 1 块胶电转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,抗 AFP 鼠单克隆一抗 4 ℃孵育过夜,磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 冲洗后加抗鼠二抗室温孵育 1 h,通过 ECL 用 Quant LAS 4000 mini 进行曝光成像^[7]。将 AFP 高表达菌株即 UNT-AFP-4 接于 2 L 的摇瓶中进行诱导表达。每间隔 24 h 取样并补加甲醇,持续诱导表达 4 d,将样本处理后进行 Western blot 检测分析及蛋白量测定。将第 4 天的发酵液离心后收

集上清液,硫酸铵分级沉淀纯化蛋白,HPLC 分析其纯度、Western blot 和电化学发光法分别检测其免疫反应性和水平。

1.7 重组蛋白 AFP 的纯化及测定

1.7.1 重组蛋白 AFP 的纯化 毕赤酵母 GS115 分泌表达的 AFP 不带 His 标签,用硫酸铵分级沉淀 (30%、55%、75%) 进行纯化。

1.7.2 AFP 蛋白纯度水平测定 纯化的 AFP 纯度用安捷伦 1200 HPLC 仪测定。蛋白水平定值由嘉兴市第一医院罗氏 E601 电化学发光免疫分析仪分析测定,试剂为罗氏原装进口。

2 结果

2.1 重组人源 AFP 在毕赤酵母 GS115 中的高表达株筛选 甲醇诱导目的蛋白 AFP 在 GS115 中表达,筛选 UNT-AFP (即不带 His 和 c-myc 标签的 AFP) 的高表达株。挑取 4 株经 PCR 鉴定为阳性克隆菌株,即 UNT-AFP-1、UNT-AFP-4、UNT-AFP-5 和 UNT-AFP-6 分别用 15 mL BMMY 培养基进行小量摇瓶诱导表达。Western blot 检测 AFP 表达情况,并用电化学发光法检测 AFP 水平。在 70×10³ 附近有特异性蛋白条带,而 pPICZαA/GS115 阴性对照在此位置没有条带。进一步对重组表达的 AFP 进行定量检测,AFP 在 UNT-AFP-1 中水平为 316.7 ng/mL;在 UNT-AFP-4 中为 402.1 ng/mL;在 UNT-AFP-5 中为 334.6 ng/mL;在 UNT-AFP-6 中为 259.7 ng/mL。其中 UNT-AFP-4 的表达量相对最高,因此选此菌株进行后续蛋白表达纯化。

2.2 重组人源 UNT-AFP-4 在毕赤酵母 GS115 中的大摇瓶表达及纯化 结果 AFP 能在酵母 GS115 中稳定表达,发酵第 4 天 AFP 的特异性条带最亮,检测其 AFP 水平为 102.9 ng/mL。

2.3 HPLC 分析经硫酸铵沉淀后的 AFP HPLC 图谱上出现两个峰,出现时间分别是 2.078、2.752 min,峰面积分别是 34 923.9 和 408.5,AFP 的峰面积占总峰面积的 98.844%,即经 55% 硫酸铵沉淀后的 AFP 纯度为 98.844%。Western blot 检测到 AFP 特异性免疫反应条带。电化学发光法检测 AFP 含量分别是 3 473 ng/mL (55% 硫酸铵集份) 和 76.7 ng/mL (75% 硫酸铵集份)。据此计算,55% 硫酸铵集份含有 87% 的 AFP 蛋白。

2.4 Western blot 分析经硫酸铵沉淀后的 AFP 将 55% 硫酸铵沉淀后收集的 AFP 与临床肝癌血清标本进行 Western blot 比对分析,结果发现制备的 AFP 与临床肝癌血清标本的分子大小相当,表明二者糖基化水平相近。

3 讨论

目前,肝癌检查主要包括血清 AFP 和肝脏影像学检查^[6-8]。检测 AFP 是当前诊断肝癌最简便、灵敏、快捷的方法,在临床上被认为是肝癌的经典肿瘤标记物,因而被当作诊断肝癌的金标准^[9]。

最近研究表明,AFP 有其复杂的生物学功能。文献^[6]报道发现 AFP 与肿瘤细胞的恶性生长、转移和侵袭密切相关,并且认为 AFP 是肝癌细胞耐药的关键性细胞因子,研究结果显示 AFP 具有潜在的抗凋亡诱导作用的生物学性质。最新的一项研究中发现 AFP 具有抑制抑癌基因的生物学功能,导致肝癌细胞耐受全反式维 A 酸诱导的凋亡。

在此研究中,作者前期也研究了 AFP 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达,与刘继洪^[4]发现 AFP 在大肠杆菌中能表达的结果相符。但在研究重组 AFP 表达的过程中,重组人源

AFP 在 BL21(DE3)中的表达主要存在于包涵体中,必须通过变、复性才能获得有免疫原性的目的蛋白,且经纯化得到的 AFP 水平只有 360.2 ng/mL,因此结果没有在本文中列出。此外,原核表达获得的 AFP 与人源 AFP 相比相对分子质量较小,分析其原因可能与其无糖基化和蛋白折叠的差异有关。相较于此,在 GS115 中表达的 AFP 均能分泌到胞外易于目的蛋白的收集,且经硫酸铵的初步纯化后纯度就可达 90%以上,活力是 BL21(DE3)中表达的 AFP 的 10 倍之多。此外,将 GS115 中表达纯化后获得的 AFP 与临床肝癌血清标本进行相对分子质量的比较,发现在 GS115 中异源表达的人源 AFP 相对分子质量与肝癌血清标本相近,其糖基化水平可能相近,但确切的结论还需要进一步的研究论证。

目前,AFP 主要是从啮齿类动物胚胎和人胚胎血清中提取获得,通过此方法获得的 AFP 量少,而通过酵母表达和纯化可获得大量的且具有免疫原性的高纯度 AFP。当前临床 AFP 检测上,仍然呈现外国诊断试剂盒独当一面的趋势,国内相应的体外诊断试剂盒和校准品、质控品还相对空白。本研究可为将来制备体外诊断试剂盒、可溯源的 AFP 校准品、质控品以及更多 AFP 新功能的进一步研究奠定基础。

参考文献

[1] Wang S,Jiang W,Chen X,et al. Alpha-fetoprotein acts as a novel signal molecule and mediates transcription of Fn14 in human hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol,2012,57(2):322-329.
[2] Mizejewskia GJ,Butterstein G. Survey of functional activ-

ities of alpha-fetoprotein derived growth inhibitory peptides;review and prospects[J]. Curr Protein Pept Sci, 2006,7(1):73-100.
[3] Mizejewski GJ. Therapeutic use of human alpha-fetoprotein in clinical patients:is a cancer risk involved[J]. Int J Cancer,2011,128(1):239-242.
[4] 刘继洪. 人甲胎蛋白基因原核克隆和表达[D]. 杭州:浙江大学,2004.
[5] Johnson PJ. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma[J]. Clin Liver Dis,2001,5(1):145-159.
[6] Li M,Li H,Li C,et al. Alpha-fetoprotein;a new member of intracellular signal molecules in regulation of the PI3K/AKT signaling in human hepatoma cell lines[J]. Int J Cancer,2011,128(3):524-532.
[7] 陈石根,周润琦. 酶学[M]. 上海:复旦大学出版社,2001.
[8] Li M,Li H,Li C,et al. Alpha fetoprotein is a novel protein-binding partner for caspase-3 and blocks the apoptotic signaling pathway in human hepatoma cells[J]. Int J Cancer,2009,124(12):2845-2854.
[9] Li M,Zhou S,Liu X,et al. alpha-Fetoprotein shields hepatocellular carcinoma cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand[J]. Cancer Lett,2007,249(2):227-234.

(收稿日期:2014-02-10 修回日期:2014-04-12)

(上接第 3093 页)

本研究中 51 例 IFE 阳性 MM 患者 IgG 型最常见,与文献[9-10]报道相符,有 24 例,占 47.06%;IgA 型 15 例,占 29.41%;轻链型 11 例,占 21.57%,其中游离轻链 κ 型 7 例,占 13.73%;游离轻链 λ 型 4 例,占 7.84%,而 IgM 型 λ 只有 1 例,占 1.96%。各型别的 $\kappa:\lambda$ 比例不同,IgG 中 $\kappa:\lambda$ 为 1:1.4,IgA 型中 $\kappa:\lambda$ 为 1.5:1,轻链型中 $\kappa:\lambda$ 为 1.75:1。在 16 例 IFE 阳性的非 MM 患者中 IgM 4 例,占 25.00%;IgG 3 例,占 18.75%;IgA 4 例,占 25.00%;游离轻链 λ 型 5 例,占 31.25%。4 例 IgM 为巨球蛋白血症或淋巴系统瘤。在 MM 患者中,IgM 型所占比例很小,因此,当 IFE 检测结果出现 IgM 时,要特别注意 MM 与其他浆细胞病如巨球蛋白血症和淋巴系统瘤的鉴别,减少误诊率。

综上所述,IFE 是一种特异性、灵敏度及准确度很高的能快速分离及鉴别单克隆 M 蛋白的方法。在 MM 的鉴别诊断、指导治疗、疗效监测、预后判断都有重要的临床意义。随着 MM 发病率的提高,临床表现的多样化,IFE 已成为诊断 MM 必不可少的实验室常规检查项目,为临床医生的诊断、治疗提供可靠的依据。另外,还应加强多学科、多领域的合作研究,寻找新的快速准确诊断 MM 的方法,进一步提高对 MM 的诊断正确率。

参考文献

[1] 田永芳,贾海英,田洪燕. 47 例多发性骨髓瘤综合分析[J]. 临床血液学杂志:输血与检验版,2010,23(4):473-474,478.

[2] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:32-234.
[3] 罗琳,罗军,赖颖晖,等. 33 例多发性骨髓瘤患者血清免疫学特征[J]. 临床血液学杂志,2006,19(1):39-40.
[4] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1998:373-380.
[5] 张磊,高秀登,刘树业. 免疫固定电泳在多发性骨髓瘤中的诊断价值[J]. 中国实验诊断学,2011,15(3):517-519.
[6] International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies,multiple myeloma and related disorders;a report of the International Myeloma Working Group[J]. Br J Haematol,2003,121(5):749-757.
[7] 孟秀琴,艾工文. 18 例多发性骨髓瘤临床分析[J]. 临床血液学杂志,2005,18(1):40-41.
[8] 卢娉霞,陈莺,张敬喜. 免疫固定电泳在多发性骨髓瘤免疫分型中的应用[J]. 实验与检验医学,2009,27(3):267-268.
[9] 乔永红,保方,陈莲英,等. 免疫固定电泳技术在多发性骨髓瘤 31 例中的诊断价值[J]. 交通医学,2011,24(5):477-478.
[10] 刘玉梅,黄琳琳,赵有利,等. 296 例血清免疫固定电泳检测结果分析[J]. 微循环学杂志,2012,22(2):45-46.

(收稿日期:2014-02-10 修回日期:2014-04-12)