

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.21.017

人性激素结合球蛋白的真核表达、纯化鉴定及质控品应用分析

王晓姣,徐延伟,赵巧辉,李 婷,吕 委,李桂林[△]

郑州伊美诺生物技术有限公司,河南郑州 450100

摘 要:**目的** 构建人性激素结合球蛋白(SHBG)的重组真核表达载体,获得高纯度的人 SHBG 重组蛋白。**方法** 根据人 SHBG 基因序列,利用 Primer Premier 6.0 设计引物,扩增获得人 SHBG 基因;构建人 SHBG-pCMV3H 重组真核表达载体;将其转染至 HEK-293F 细胞,提取人 SHBG 重组蛋白,并用 ConA 柱亲和层析法纯化;采用人 SHBG 检测试剂盒对其蛋白浓度进行鉴定。**结果** 人 SHBG 基因产物长度与预期一致,约为 1 200 bp;测序比对分析结果显示人 SHBG 基因成功插入 pCMV3H 载体;电泳结果显示在相对分子质量约为 42×10^3 处有一明显条带,与预期蛋白质位置一致;人 SHBG 检测试剂盒鉴定结果显示人 SHBG 重组蛋白作为质控品与西门子、安图生物、罗氏一致性良好;含钙离子缓冲液中人 SHBG 重组蛋白稳定性优于不含钙离子缓冲液。**结论** 真核表达人 SHBG 重组蛋白能够作为 SHBG 检测试剂的质控品,且各厂家检测一致性良好;钙离子有利于提升人 SHBG 蛋白的稳定性。

关键词:人性激素结合球蛋白; 真核表达; 蛋白质纯化

中图分类号:R444

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)21-3137-04

Eukaryotic expression, purification and identification of human sex hormone binding globulin and application analysis of quality control products

WANG Xiaojiao, XU Yanwei, ZHAO Qiaohui, LI Ting, LYU Wei, LI Guilin[△]

Zhengzhou Imino Biotechnology Co., Ltd., Zhengzhou, Henan 450100, China

Abstract:**Objective** To construct a recombinant eukaryotic expression vector of human sex hormone binding globulin (SHBG) and obtain high-purity recombinant human SHBG protein. **Methods** According to the sequence of human SHBG gene, Primer Premier 6.0 was used to design primers and amplify human SHBG gene. The recombinant eukaryotic expression vector of human SHBG-pCMV3H was constructed, the recombinant human SHBG protein was extracted and purified by ConA column affinity chromatography. The protein concentration was identified by human SHBG detection kit. **Results** The length of human SHBG gene product was consistent with the expectation, about 1 200 bp. Sequencing analysis showed that human SHBG gene was successfully inserted into pCMV3H vector. Electrophoresis showed that there was a clear band at the relative molecular weight of about 42×10^3 , which was consistent with the expected protein position. The identification results of the human SHBG detection kit showed that the recombinant human SHBG protein as a quality control product was in good agreement with Siemens, Antu Biotech, and Roche. The stability of SHBG recombinant protein in buffer containing calcium ion was better than that in buffer without calcium ion. **Conclusion** The eukaryotic expression of human SHBG protein can be applied to the quality control products of SHBG detection reagents, and the detection consistency of each manufacturer is good. Calcium ion help to improve the stability of human SHBG protein.

Key words: human sex hormone binding globulin; eukaryotic expression; protein purification

人性激素结合球蛋白(SHBG),又称睾酮-雌二醇结合球蛋白,为固醇类激素,具有介导性激素运输的功能。SHBG 由肝脏细胞合成并释放到血液中,是一种能结合性激素的血浆 β 球蛋白(糖蛋白),相对分子质量为 95×10^3 ,在血清中以同型二聚体形式存在,由 2 个相同的亚基组成^[1-3]。其性激素结合位点位于 2

个单体之间,呈“三明治”样结构,对于这种二级结构的稳定性,二价阳离子钙是其关键因素^[4]。SHBG 除了具有已知的激素类转运蛋白功能外,还是某些疾病的生物标志物^[5]。有研究显示,SHBG 对于判定男性人类免疫缺陷病毒感染患者性功能是否衰退非常重要^[6];同时可作为监测男性 2 型糖尿病患者骨质疏松

作者简介:王晓姣,女,主要从事诊断原材料研究。 [△] **通信作者,** E-mail: liguilin. @autobio. com. cn。

本文引用格式:王晓姣,徐延伟,赵巧辉,等. 人性激素结合球蛋白的真核表达、纯化鉴定及质控品应用分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(21):

程度的指标^[7]。SHBG 对多囊卵巢综合征患者体外助孕治疗的促排卵效果及妊娠结局具有预测价值^[8], 可作为早期诊断妊娠期糖尿病的重要生化指标^[9], 也有助于预测绝经后女性骨质丢失的严重程度^[10]。利用血清蛋白组学技术发现 SHBG 可为肺结核的临床诊断提供辅助依据^[11], 在毒性弥漫性甲状腺肿临床筛查工作中也可作为关键生物标志物^[12]。临床中对于 SHBG 的检测方法包括放射免疫技术、酶免疫技术及电化学发光技术。本研究旨在构建人 SHBG 重组真核表达载体, 获得高纯度的人 SHBG 重组蛋白, 探究钙离子对于人 SHBG 重组蛋白的稳定性效果, 为研究人 SHBG 重组蛋白检测方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 pCMV3H 质粒(本实验室改造 pCMV 质粒)、大肠埃希菌 DH5 α 、HEK-293F 细胞均由本实验室保存。

1.2 仪器与试剂 SMS 293-SUPI 细胞培养液购自美国 ScienCell 公司; Lipo2000 试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Tag Mater Mix PCR 预混液购自日本 TaKaRa 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、去内毒素质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; SHBG 试剂购自印度 Yashraj Biotechnology Limited 公司; PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司; 酶联仪、凝胶成像仪及垂直电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; 1260 Infinity II 液相色谱系统购自美国安捷伦公司; A009 GE Superdex200 increase 5/150 GL 色谱柱购自美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 人 SHBG 基因的获取 根据美国国家生物技术信息中心的人 SHBG 基因全长序列(GenBank: M31651.1)委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行全基因合成。利用 Primer Premier 6.0 软件设计得到用于扩增产物长度为 1 209 bp 的人 SHBG 基因的上游引物(F): AAGCTTCTGAGACCTGT-TCTCC, 下划线为 Hind III 酶切位点, 下游引物(R): TCTAGATTAATGGAAGCGTCAGT, 下划线为 Xba I 酶切位点。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 再用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段, 得到人 SHBG 基因。

1.3.2 人 SHBG-pCMV3H 重组真核表达载体的构建与鉴定 用 Xba I 和 Hind III 双酶切人 SHBG 基因及 pCMV3H 质粒。采用 T4 连接酶使人 SHBG 和 pCMV3H 质粒连接, 得到重组真核表达载体并转化至大肠埃希菌 DH5 α 感受态, 卡那抗菌药物筛选后, 获得阳性克隆, 采用去内毒素质粒提取试剂盒提取人 SHBG-pCMV3H 重组真核表达载体。用 Xba I 和

Hind III 双酶切重组真核表达载体, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.3 人 SHBG 重组蛋白的表达与纯化 采用 PEI 转染法, 将重组真核表达载体转染至 HEK-293F 细胞, 6 h 后用 SMS 293-SUPI 完全培养基换液, 72 h 后开始收集细胞培养上清液。采用中空纤维浓缩洗滤, 置换缓冲液; 进行 ConA 柱亲和分析法将细胞培养上清液过柱纯化, 得到纯化的人 SHBG 重组蛋白。分装入 1.5 mL 小型离心管中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3.4 人 SHBG 重组蛋白的鉴定 用考马斯亮蓝染色法鉴定人 SHBG 重组蛋白的位置大小与纯度, 利用高效液相色谱分析重组蛋白批间差异。分别使用安图生物、西门子及罗氏这 3 个厂家 SHBG 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒, 检测纯化后的人 SHBG 重组蛋白是否具有的一致性。

1.3.5 钙离子对于人 SHBG 重组蛋白稳定性的影响 分别将纯化后的人 SHBG 重组蛋白储存于含钙离子缓冲液和不含钙离子缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 加速 3, 7 d, 使用安图生物 SHBG 检测试剂盒, 检测人 SHBG 重组蛋白活性是否存在差异。

1.4 统计学处理 所有数据均用 EXCEL2010 分析处理, 计算平均值、降幅。

2 结果

2.1 人 SHBG 目的片段获得 利用特异性 PCR 引物, 扩增人 SHBG 目的基因, 产物经琼脂糖凝胶电泳, 在约 1 200 bp 处出现目的条带, 与理论 PCR 产物大小(1 209 bp)一致。见图 1。

2.2 人 SHBG 重组载体鉴定 人 SHBG 重组载体转化至大肠埃希菌 DH5 α 感受态后, 经菌落 PCR 鉴定, 琼脂糖凝胶电泳出现阳性条带。见图 2。

2.3 人 SHBG-pCMV3H 重组真核表达载体鉴定 用 Xba I 和 Hind III 双酶切人 SHBG-pCMV3H 重组载体和 pCMV3H 质粒后, 琼脂糖凝胶电泳显示产物电泳位置与预期一致, 目的片段胶回收后经 T4 连接酶处理获得人 SHBG-pCMV3H 重组真核表达载体, 并再次进行 Xba I 和 Hind III 双酶切、鉴定, 琼脂糖凝胶电泳结果显示产物电泳位置与预期一致。见图 3。

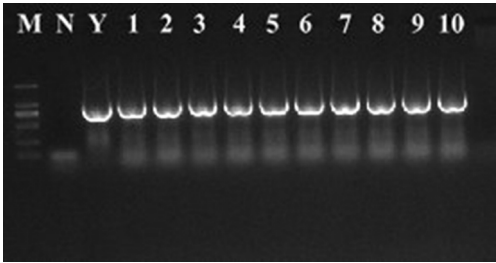


注: M 为 DNA marker; 1~2 为人 SHBG 基因 PCR 扩增产物。

图 1 人 SHBG 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳分析

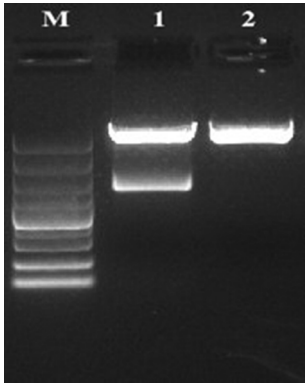
2.4 人 SHBG 重组蛋白表达与纯化 将人 SHBG-pCMV3H 重组真核表达载体转染至 HEK-293F 细

胞,考马斯亮蓝染色法鉴定纯化人 SHBG 重组蛋白的相对分子质量约为 42×10^3 。利用 ConA 柱,进行人 SHBG 重组蛋白纯化,再对样品进行分析,样品的峰型和各色谱峰水平均基本一致,批间差异较小。见图 4。



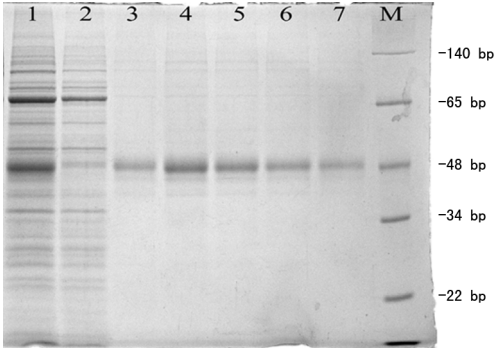
注:M 为 DNA marker;Y 为阳性对照;N 为阴性对照;1~10 为筛选克隆号。

图 2 人 SHBG-pCMV3H 阳性克隆筛选



注:M 为 DNA marker;1 为 SHBG-pCMV3H 重组载体双酶切产物;2 为 pCMV3H 质粒双酶切产物。

图 3 人 SHBG-pCMV3H 重组载体双酶切产物鉴定



注:M 为蛋白质 marker;1 为未纯化的细胞培养上清液;2 为 ConA 柱流穿样品;3~7 为纯化后的人 SHBG 重组蛋白。

图 4 人 SHBG 重组蛋白纯度的鉴定

2.5 人 SHBG 重组蛋白鉴定 分别将 SHBG 和纯化后 SHBG 重组蛋白稀释成高、中、低 3 个浓度,同时用安图生物、西门子和罗氏试剂盒检测,一致性良好,见表 1。

2.6 钙离子对于人 SHBG 重组蛋白稳定性的影响 分别将纯化后 SHBG 重组蛋白储存于含钙离子缓冲液和不含钙离子缓冲液中。在含钙离子缓冲液中,人 SHBG 重组蛋白 37℃ 加速 3、7 d 活性变幅 < 10%;在不含钙离子缓冲液中,人 SHBG 重组蛋白

37℃ 加速 7 d 活性降低 47%。见表 2。

表 1 ELISA 试剂盒鉴定人 SHBG 重组蛋白

抗原	浓度	SHBG	本研究纯化 SHBG		
			安图生物	西门子	罗氏
SHBG(nmol/L)	低	24.84	26.28	28.10	25.00
	中	66.74	67.25	67.70	65.30
	高	102.95	99.64	113.00	100.30

表 2 钙离子对于人 SHBG 重组蛋白稳定性的影响

体系	37℃ 加速 天数(d)	浓度 (nmol/L)	浓度平均值 (nmol/L)	降幅 (%)
不含钙离子缓冲液	0	44.864	45.676	0
		46.488		
		34.575	35.365	23
	7	36.155		
		24.918	24.421	47
		23.923		
含钙离子缓冲液	0	40.879	40.221	0
		39.57		
		37.577	38.126	5
	7	38.675		
		39.920	39.675	1
		39.430		

3 讨 论

SHBG 是一种糖基化二聚体转运蛋白,主要在肝脏中合成,因此会受到某些代谢因子和激素的影响,如高血糖、高胰岛素、碳水化合物摄入过多等原因均可影响和调节肝脏内 SHBG 的合成^[13]。血液中的 SHBG 可以结合、转运留体激素,进而作用于游离血液中的留体激素,并进行调节,对雄激素水平亦有着明显的调节作用,因此是 2 型糖尿病、糖耐量受损及胰岛素抵抗等的危险因素之一^[14],也是高胰岛素血症性胰岛素抵抗的一个重要标志^[15]。SHBG 既可调节体内性激素水平,同时亦可影响体内的胰岛素水平,二者呈负相关关系,在机体代谢、诱发代谢性疾病等方面有着不可忽视的作用^[16-17]。上述研究均说明了在临床开展血清人 SHBG 检测的重要性和必要性。

本研究通过全基因合成获得 SHBG 目的基因片段,通过 PCR 扩增及双酶切获得待连接转化目的基因。本研究所用的 pCMV3H 质粒作为真核表达载体,在基因高效表达的同时,其真核表达系统具有翻译后的加工修饰体系,表达的外源蛋白更接近天然蛋白。根据氨基酸序列分析,SHBG 属于球蛋白,二价阳离子是该类蛋白活性所必需的,很可能作用于球蛋白的巯基从而发挥作用;本研究验证发现钙离子对稳定保存 SHBG 较为关键,长期储存过程中可考虑添加

钙离子,增加稳定性。综上所述,本研究采用真核表达系统,成功地构建了人 SHBG-pCMV3H 重组真核表达载体,又利用 PEI 转染法在 HEK-293F 细胞中过表达产生大量人 SHBG 重组蛋白。

目前,临床上血清人 SHBG 的定量检测 ELISA 试剂盒来源渠道较少,国内外关于研究制备可靠的人 SHBG 重组蛋白标准品及其检测抗体的报道较少。本研究成功获得具有免疫学活性的人 SHBG 重组蛋白,为后续动物免疫制备人 SHBG 单克隆抗体及开发可靠的人 SHBG 重组蛋白检测试剂盒提供了基础。

参考文献

- [1] JOSEPH D R. Structure, function, and regulation of androgen binding protein/sex hormone-binding globulin [J]. Vitam Horm, 1994, 49:197-280.
- [2] WU T S, HAMMOND G L. Naturally occurring mutants inform SHBG structure and function[J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(7):1026-1038.
- [3] SUI L M, HUGHES W, HOPPE A, et al. Direct evidence for the localization of the steroid-binding site of the plasma sex steroid-binding protein (SBP or SHBG) at the interface between the subunits[J]. Protein Sci, 1996, 5(12): 2514-2520.
- [4] BOCCHINFUSO W P, HAMMOND G L. Steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin partially overlap: steroids and Ca^{2+} stabilize dimer formation [J]. Biochemistry, 1994, 33 (35): 10622-10629.
- [5] DIETRICH R, DHAYANA D, MICHAEL D D, et al. Physical activity and sex hormone-binding globulin in older adults[J]. J Aging Phys Act, 2019, 27(5):621-624.
- [6] PEZZAIOLI L C, QUIROS-ROLDAN E, PAGHERA S, et al. The importance of SHBG and calculated free testosterone for the diagnosis of symptomatic hypogonadism in

HIV-infected men: a single-centre real-life experience[J]. Infection, 2020, 49(2):295-303.

- [7] 高艳超,王岩,张海光. 成年男性 2 型糖尿病患者骨代谢指标、骨密度及其相关因素分析[J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(5):44-45.
- [8] 何均,熊万字,张昌军,等. 性激素结合球蛋白对多囊卵巢综合征患者行 IVF-ET 促排卵效果及妊娠结局的预测[J]. 大连医科大学学报, 2020, 42(2):32-37.
- [9] 刘芳,牛亚丹,李冬梅,等. 绝经后女性血清性激素结合蛋白水平与骨质疏松症的相关性研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2019, 32(3):99-103.
- [10] 张艳,高慧,苏妍. HbA1c, TAC, FRU 及 SHBG 联合诊断对妊娠期糖尿病早诊断的临床价值[J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(11):1456-1458.
- [11] 温莎. 结核血清标志物 SHBG 检测试剂盒的构建及相关蛋白多克隆抗体的制备[D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
- [12] 郭艳英,李素丽,韩莉,等. 基于 iTRAQ 技术蛋白组学分析 Graves 病血清蛋白新生标志物[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(8):1287-1292.
- [13] 庞晓娜,胡予. 性激素结合球蛋白在代谢综合征中的作用[J]. 中国临床医学, 2013, 20(1):108-110.
- [14] 牟蓉,李绪飞. 血清性激素及其结合蛋白水平对初诊男性 2 型糖尿病患者的诊断意义[J]. 海南医学, 2019, 30(6): 710-712.
- [15] 战思恩,于朝. 性激素结合球蛋白与多囊卵巢综合征患者肥胖、血糖、胰岛素及性激素的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(10):2229-2231.
- [16] 卢俊光. 探讨性激素结合球蛋白在妇产科疾病临床检验中的应用价值[J/CD]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(34):136-144.
- [17] 张爱伦,吴炯,郭玮,等. 性激素结合球蛋白与代谢性疾病相关性的研究进展[J]. 中国临床医学, 2016, 23(5):696-699.

(收稿日期:2021-02-25 修回日期:2021-07-11)

(上接第 3136 页)

- [6] 韦柳华,李梦薇,罗国兰. 327 例患儿肺炎链球菌感染分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(10): 1238-1240.
- [7] 黄莲芬,解锐历,彭丽兰,等. 广州地区肺炎链球菌儿童分离株临床分布及药敏特征[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(9):1044-1047.
- [8] MIAO Z, LI S, WANG L, et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from outpatients in town hospitals of Shandong province, China[J]. Front Microbiol, 2017, 24 (8):63.
- [9] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2015 年 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(6):685-694.
- [10] 王爱华,徐安,肖书念,等. 广东省细菌耐药监测网 2014 年细菌耐药性监测[J]. 中国抗菌药物杂志, 2016, 41(4): 289-295.

- [11] 李晓雨,马明葱,谭云芳,等. 广东省 2016 年细菌耐药性监测及动态分析[J]. 中国抗菌药物杂志, 2018, 43(10): 1263-1270.
- [12] 郭主声,张莉,林偲思,等. 2015 年广东省东莞市细菌耐药性监测结果[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(3): 303-313.
- [13] 施倩妮,王喆,黄磊,等. 2010—2014 年耐碳青霉烯类肠杆菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, (12):2657-2659.
- [14] 梁碧珊,陈琪,李丽冰,等. 老年住院患者铜绿假单胞菌感染及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(9): 1129-1131.
- [15] 钱耀先,李连凤,陈俊,等. 本地区 1 462 株鲍曼不动杆菌的分布情况和耐药性分析[J]. 贵州医药, 2020, 44(8): 1274-1276.

(收稿日期:2021-03-18 修回日期:2021-07-03)