

· 论 著 ·

## SSA/Ro60 自身抗原的基因克隆与表达纯化\*

牛广华, 张程<sup>△</sup>, 吕丹, 高玉洁

(辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

**摘要:**目的 克隆人 SSA/Ro60 自身抗原并表达纯化, 为辅助诊断自身免疫提供物质基础。方法 采用 RT-PCR 技术扩增 SSA/Ro60 基因, 定向插入 pPICZ 表达载体, 转入毕赤酵母表达系统, 将获得的重组蛋白行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。结果 扩增出约 1.5 kb 的 SSA/Ro60 全长序列, 获得相对分子质量  $60 \times 10^3$  的重组蛋白, 经鉴定具有 SSA/Ro60 抗原性。结论 成功克隆并表达 SSA/Ro60, 为诊断自身免疫疾病奠定基础。

关键词: SSA/Ro60; 基因克隆; 表达纯化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)16-2224-03

## Gene cloning and expression purification of human autoimmune antigen SSA/60\*

NIU Guanghua, ZHANG Cheng<sup>△</sup>, LYU Dan, GAO Yujie

(Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China)

**Abstract:** **Objective** To clone human autoimmune antigen SSA/Ro60 and to purify its expression to provide the material basis for the assisted diagnosis of human autoimmune diseases. **Methods** The SSA/Ro60 gene was cloned by RT-PCR and directionally inserted into expression vector pPICZ. The recombinant plasmid was transformed into Pichia SMD1168. The obtained recombinant protein was identified by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** The amplified full-length sequence was about 1.5 kb in size. The pPICZ-SSA positive clone produced a  $60 \times 10^3$  recombinant protein which had natural immunogenicity of human autoimmune antigen SSA/Ro60 by SDS-PAGE and Western blot. **Conclusion** Human autoimmune antigen SSA/Ro60 is successfully cloned and expressed, which lays a foundation for diagnosing autoimmune diseases.

Key words: SSA/60; gene cloning; expression and purification

干燥综合征(SS)是一种全身外分泌腺的慢性炎性自身免疫反应疾病。研究表明,干燥综合征 A 型抗原(SSA)与 SS、系统性红斑狼疮(SLE)等疾病的发生、发展及预后判断密切相关<sup>[1]</sup>。SSA 抗原是细胞质中一类小核糖核酸与蛋白质结合的复合物,是一种重要的自身抗原<sup>[2]</sup>。近年来越来越多的学者对自身免疫性疾病进行深入研究,对 Ro 抗原的认识也越深, Ro 成为了核糖核蛋白复合物(RNP)抗原中最常见的抗原之一<sup>[3]</sup>。后来发现, Ro 抗原与 SSA 属同一种自身抗原,故命名 SSA/Ro 抗原<sup>[4]</sup>。同时有研究者发现检测 SSA/Ro 抗原在临床上对自身免疫性疾病的诊断有极其重要的意义<sup>[5]</sup>。该抗原原有 52 000 和 60 000 两种相对分子质量的蛋白,分别称为 SSA/Ro52 和 SSA/Ro60。SSA/Ro60 存在于多种自身免疫性疾病患者体内,生理状态下 SSA/Ro60 核蛋白及 hYRNA 共同构成核糖核蛋白复合体 SSA/Ro60 抗原,与多种自身免疫疾病密切相关<sup>[6]</sup>。目前检测 SSA 的免疫双扩散法无法区分 Ro52 和 Ro60,免疫印迹法只能检出 Ro52,常常导致 Ro60 的漏检<sup>[5]</sup>。所以本实验应用基因克隆技术成功表达出 SSA/Ro60,为下一步建立新的 SSA/Ro60 检测方法奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 质粒、菌株、细胞株** PMD18-T 质粒、人白血病 HL-60 细胞株购买自 TAKARA 公司, pPICZ 质粒、大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ 、酵母菌 SMD1168 由大连大学实验室赠送。

**1.2 仪器与试剂** Thermo Hera 生物安全柜; Biorad C1000 PCR 扩增仪; Biorad 稳压稳流水平电泳仪; Biorad 稳压稳流垂直电泳仪; Thermo Heracell 150 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱; Thermo

Maxq 6000 恒温培养摇床; BIO-RAD 凝胶成像分析系统; BIO-RAD 电穿孔仪; 电转化杯。PCR 试剂盒、DNA 连接酶试剂盒、限制性内切酶、切胶纯化试剂盒、质粒抽提纯化试剂盒均购买自 TAKARA 公司。cDNA 合成试剂盒来自 Transgen Biotech。抗 SSA 抗体、生物素标记的羊抗鼠 IgG、亲和素标记的 HRP 购买自 ABCAM 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 SSA 基因的扩增** HL-60 细胞株经 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养收获,用 TRIZOL 方法提取 RNA 后反转录成 cDNA。利用 GeneBank 数据库确定 SSA 在基因组的位置,设计其两端的引物,并引入限制性内切酶位点, HIS 标签位点等为后续的克隆及蛋白纯化提供便利。上游引物: SAP3 5'-CCG GAA TTC AAA AGA ATG GAG GAA TCT GTA AAC CAA ATG CAG CCA CTG AAT GAG AAG CAG ATA-3', 下游引物: SAP4 5'-GCC TCG AGT TAT CAT TAT CAA TGA TGA TGA TGA TGG GAA CCA CCA CCA CCT TAA ATC ATA TCT AAT GTG AAA TTT CGA ATT ACA T-3'。反应条件: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s 共 30 个循环, 72 °C 10 min。扩增片段应为 1 511 bp。

**1.3.2 PCR 产物纯化, TA 克隆及测序** 将 PCR 产物切胶纯化后测量浓度,经合适的酶切后连接于 PMD18-T 载体构建重组质粒,通过蓝白斑筛选方法,挑出白色斑点的重组质粒进行 LB 培养,培养后送至上海生工测序。

**1.3.3 定向克隆** 将测序鉴定好的质粒和 PICZ 质粒进行双酶切,经切胶纯化后按合适浓度进行定向连接,转化至 DH5 $\alpha$

\* 基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(02014010058-301)。

作者简介:牛广华,男,主任技师,主要研究方向是风湿免疫分子生物。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: cecillia-85414@163.com。

后过夜培养,提取质粒,酶切鉴定。

**1.3.4 重组子线性化、导入表达系统及筛选** 挑选正确的转化菌,增殖后抽提质粒,用 Sac I 行单酶切,生成线性 pPICZ-SSA 重组子。采用电穿孔方法,将线性重组子导入毕赤酵母菌 SMD1168 中。用 G418 筛选高表达重组菌。

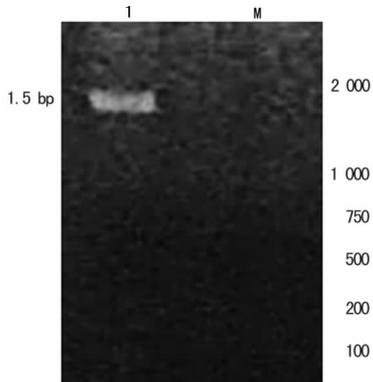
**1.3.5 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析** 在上述重组菌上清液 1 mL 加入 0.4 g 无菌的硫酸铵充分混匀,4 °C 条件下放置 2 h,期间约 10 min 混匀一次,在 4 °C 条件下,15 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 15 μL pH 7.4 PBS 彻底混匀,再加入上样缓冲液 15 μL 混匀,置 100 °C 煮沸 5 min(Marker 煮 1 min),然后 4 °C,15 000 r/min 离心 5 min。取 25 μL 样品加样后进行电泳(4 °C,120 V),考马斯亮蓝染色。

**1.3.6 重组蛋白的 Western blotting 鉴定** 利用电转仪将重组蛋白转至 PVDF 膜上,BSA-TBST 为封闭液,一抗是鼠抗人 SSA 抗体,二抗是生物素标记的羊抗鼠 IgG 抗体,在亲和素标记的 HRP、TMB 显色液共同作用下完成。

**1.3.7 蛋白纯化** 将离心过滤后的碎菌上清液加入准备好的 His Bind column 柱中,经过一系列的洗柱平衡后收集滤液。

## 2 结果

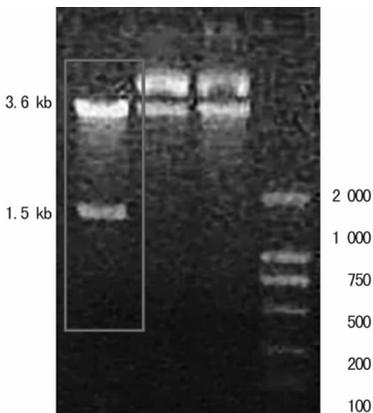
**2.1 SSA 基因扩增及 SSA-TA 克隆测序** 琼脂糖凝胶电泳结果显示约一条 1.5 kb 的特异性条带,片段大小与预计的 1 511 bp 相符(图 1)。且重组质粒测序结果显示与 GeneBank 报道的一致。



注:1 为 SSA PCR 产物;M 为 DL2000 Marker。

图 1 SSA 片段凝胶电泳图

**2.2 SSA-PICZ 双酶切鉴定** 将 SSA-PICZ 重组质粒用 Xho I 与 EcoR I 双酶切后电泳鉴定,得到两条清晰条带,片段大小分别为 3.6 kbp 和 1.5 kbp,与预期结果一致(图 2 方框内)。



注:方框内为双酶切后基因片段,上面约 3.6 kb 为质粒,下面约 1.5 kb 为 SSA;最右侧为 DL2000 Marker。

图 2 SSA-PICZ 重组质粒酶切图

**2.3 重组蛋白 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定** 本实验成功表达出 SSA/Ro60 重组蛋白,经 SDS-PAGE 电泳分析,在 60 000 左右的位置出现一条较浓的蛋白区带(图 3)。且该重组蛋白可与鼠抗人 SSA 结合,WB 实验中可被特异性抗体识别,显示其有良好的特异性(图 4)。

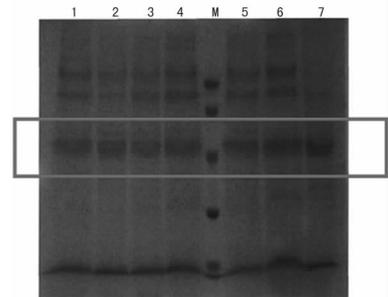


图 3 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

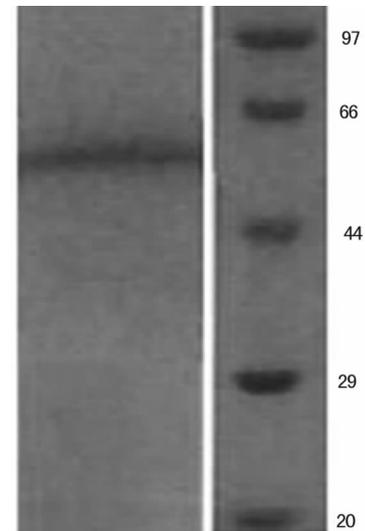


图 4 重组蛋白 Western blotting 图谱

## 3 讨论

Ro 抗原根据其蛋白成分相对分子质量的大小分为两种类型:Ro52 和 Ro60 抗原<sup>[7]</sup>。Ro 抗原大部分存在于细胞质内,少部分存在于核周质及核内。Ro 抗原在细胞内以低含量的 RNP 形式存在,是与细胞角蛋白相似的一种纤维网络,所以对该抗原的提取具有一定的难度<sup>[8]</sup>。

由于自身抗原本身的特点为低含量、种类多,所以提取自身抗原的难度较大,要获得均一的自身抗原更为困难。本实验从人白血病淋巴细胞 HL-60 株提取 RNA,通过反转录技术得到 cDNA,再以 cDNA 为模板成功扩增出了 SSA 基因。将 SSA 基因转入 pPICZ 载体构建 pPICZ-SSA 重组质粒,并将重组质粒导入毕赤酵母菌 SMD1168 真核表达系统进行诱导表达,最终获得纯度较高的重组蛋白,经过对重组蛋白的纯化鉴定后,证明其具有一定的特异性。

本实验对靶基因 SSA/Ro60 的核苷酸序列进行 cDNA 合成中,采取反转录 PCR 这一途径代替用合成寡核苷酸探针筛选 cDNA 文库的繁琐基因克隆途径,可以方便、简捷地合成出目的基因 SSA/Ro60。

毕赤酵母真核表达系统是蛋白表达研究中比较常用的表达系统。与原核表达系统相比,毕赤酵母基因系统具有许多优点<sup>[9-12]</sup>。(1)具有强大的启动子:毕赤酵母载体具有最强的醇氧化酶基因启动子,使得该表达系统对外源蛋白表达的调控相当严格。(2)表达量高:宿主菌株在毕赤酵母(下转第 2228 页)

- 的临床对比研究[J]. 上海医学, 2012, 35(4): 284-286.
- [5] 陈熹, 张建忠. 中心静脉-动脉血二氧化碳分压差联合中心静脉血氧饱和度监测下液体容量调控对严重烧伤患者术中组织氧合灌注的影响[J]. 中华烧伤杂志, 2015, 31(4): 267-270.
- [6] 伍陈海, 谢海, 陈勇. 血栓弹力图指导合理输血的有效性以及对患者结局的影响 Meta 分析[J]. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(4): 321-326.
- [7] 文爱清, 蒋建新. “严重创伤输血专家共识”解读[J]. 中华创伤杂志, 2013, 29(8): 711-714.
- [8] 黄永新, 詹新华, 郑静伟, 等. 严重延迟复苏烧伤休克患者血浆脑钠肽的变化[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(6): 354-357.
- [9] Mair J, Hammerer-Lercher A, Puschendorf B. The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure [J]. Clin Chem Lab Med, 2001, 39(7): 571-588.
- [10] Yeo KT, Wu AH, Apple FS, et al. Multicenter evaluation of the Roche NT-proBNP assay and comparison to the Biosite Triage BNP assay [J]. Clin Chim Acta, 2003, 338(1/2): 107-115.
- [11] Mueller C, Laule-Kilian K, Frana B, et al. Use of B-type natriuretic peptide in the management of acute dyspnea in patients with pulmonary disease [J]. Am Heart J, 2006, 151(2): 471-477.
- [12] Macabasco-O'Connell A, Meymandi S, Bryg R. B-type Natriuretic Peptide (BNP) is useful in detecting asymptomatic left ventricular dysfunction in low-income, uninsured patients [J]. Biol Res Nurs, 2010, 11(3): 280-287.
- [13] 袁慧. 关注 BNP 与 NT-proBNP 的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(10): 870-873.
- [14] Wu AH, Smith A, Apple FS. Optimum blood collection intervals for B-type natriuretic peptide testing in patients with heart failure [J]. Am J Cardiol, 2004, 93(12): 1562-1563.
- [15] Kulla M, Maier J, Bieler D, et al. Civilian blast injuries: an underestimated problem: Results of a retrospective analysis of the TraumaRegister DGU? [J]. Unfallchirurg, 2015. [Epub ahead of print].
- [16] 朱俊, 黄掣掣, 叶海亮, 等. N 末端脑钠肽前体对慢性肾衰竭患者合并早期心衰的诊断价值[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(11): 989-991.
- [17] 张国安. 烧伤科诊疗常规 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012.
- [18] 陈碧华, 李永勤, 罗奇志, 等. 临床决策支持系统应用于重度烧伤液体复苏的研究进展[J]. 中华烧伤杂志, 2013, 29(1): 59-61.
- [19] Fowler AJ, Ahmad T, Phull MK, et al. Meta-analysis of the association between preoperative anaemia and mortality after surgery [J]. Br J Surg, 2015, 102(11): 1314-1324.
- [20] 宋茂林. 特重度烧伤病人血小板变化的临床研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2011.

(收稿日期: 2016-01-23 修回日期: 2016-05-27)

(上接第 2225 页)

菌中易于进行高密度连续发酵培养, 外源蛋白表达量高。(3) 稳定性高: 重组质粒能在毕赤酵母体系中的特定位点以单/多拷贝的形式稳定整合, 使外源基因在宿主细胞中稳定存在。

重组 SSA/Ro60 抗原能特异识别患者体内抗 SSA 血清, 因而可用重组抗原作为诊断抗原来检测自身免疫病, 也可分析其片段的抗原性以了解其抗原表位, 为探索自身免疫病的发生、发展提供辅助依据。下一步的研究中, 笔者将对重组蛋白进行理化分析, 希望通过对 SSA/Ro60 重组抗原的透彻分析, 从分子免疫学角度为某些自身免疫病的临床诊断提供依据, 为制备重组抗原用于临床检测奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 蔡逸婷, 刘庆中, 赵超, 等. 联合检测抗  $\alpha$ -胞衬蛋白、抗 SSA 和抗 SSB 抗体在干燥综合征诊断中的应用 [J]. 现代免疫学, 2012, 32(2): 152-155.
- [2] 彭勇, 谭立明, 李华, 等. ANA、SSA、SSB、RO-52 在干燥综合征诊断中的临床意义 [J]. 实验与检验医学, 2013, 31(3): 229-247.
- [3] 郑宗富. SSA 抗原的克隆表达及其抗体检测方法的建立 [D]. 福州: 福建医科大学学报, 2007.
- [4] 魏权, 杨湘越, 兰小鹏. 人自身抗原 SSA/Ro60 的基因克隆和原核表达 [J]. 实用医技杂志, 2005, 12(23): 3393-3394.
- [5] 徐泉. 60kd SSA/Ro 抗原的提取、纯化及蛋白质组学鉴定 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004.
- [6] 李洁. 抗 SSA/RO60kDa 抗原表位特异性单克隆抗体的表达和致病机制的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [7] 吕良敬, 陈顺乐, 顾越英, 等. R060/SSA 基因转染 HEp-2 细胞作为间接免疫荧光检测底物及其应用 [J]. 标记免疫分析与临床, 2006, 13(1): 31-34.
- [8] 朱涛. 人自身抗原 Ro52 的酵母重组表达及其抗体检测斑点免疫金渗滤法的建立 [D]. 福州: 福建医科大学, 2011.
- [9] 张义浜, 施立楠, 唱韶红, 等. 人 sTNFR II-IgG Fc 融合蛋白在毕赤酵母菌中的表达及其产物分析 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(6): 515-519.
- [10] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1): 45-66.
- [11] Thongekkaew J, Boonchird C. Molecular cloning and functional expression of a Novel extracellular lipase from the thermotolerant yeast *Candida thermoPhila* [J]. FEMS Yeast Res, 2007, 7(2): 232-243.
- [12] Lin Cereghino GP, Sunga AJ, Lin Cereghino J, et al. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia Pastoris* [J]. Genet Eng (N Y), 2001, 23: 157-169.

(收稿日期: 2016-01-29 修回日期: 2016-06-03)