论著

文章编号:1000-5404(2010)11-1162-03

人锌转运体8强免疫原性片段的预测及原核表达鉴定

吴 玥,刘宝英,徐 静,姜友昭,陈 兵 (400038 重庆,第三军医大学西南医院内分泌科)

[摘要] **目的** 筛选人锌转运体8(Zinc transporter 8,ZnT8)中强免疫原性片段,并对其进行克隆表达及鉴定。**方法** 采用生物信息学软件预测ZnT8结构特征,筛选出具有强免疫原性的N末端片段ZnT8(N),经PCR(Polymerase Chain Reaction)技术扩增,构建表达质粒pET32a-ZnT8(N),转化入*E. coli* BL21(DE3)中,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导目的蛋白的表达,并对表达产物进行SDS-PAGE分析及Western blot鉴定。**结果** 从ZnT8分子中筛选出具有140个氨基酸的肽段ZnT8(N),重组质粒pET32a-ZnT8(N)经酶切和测序鉴定证实构建成功。转入大肠杆菌进行表达,表达产物相对分子质量(Mr)约32 000,与预期值相符,并经免疫印迹检测鉴定为阳性,融合蛋白的表达量约占菌体蛋白总量45%。**结论** 筛选获得了人胰岛细胞来源的ZnT8强免疫原性片段,并在原核系统中成功表达。

[关键词] ZnT8;原核表达;免疫原性
[中图法分类号] R392-33; R392.2; R341 [文献标志码] A

Prediction of highly immunogenic fragment of human zinc transporter 8 and identification of its expression in prokaryotic system

Wu Yue, Liu Baoying, Xu Jing, Jiang Youzhao, Chen Bing (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400083, China)

[**Abstract**] **Objective** To screen highly immunogenic fragment of human zinc transporter 8 (ZnT8) and to identify its expression in prokaryotic system. **Methods** Characteristics of ZnT8 structure were detected using bioinformatics software. A highly immunogenic fragment of ZnT8 was screened at the N-terminal and amplified by polymerase chain reaction (PCR). Expression plasmid pET32a-ZnT8(N) was constructed and transformed to *E. coli* BL21(DE3). Expression of target protein was induced by isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside(IPTG). Expressed products were analyzed using SDS-PAGE and identified by Western blotting. **Results** The screened ZnT8 (N) fragment had 140 amino acids. Recombinant pET32a-ZnT8 (N) was successfully constructed, which was confirmed by restriction analysis. The relative molecular weight of expressed products was about 32×10^3 after transformed into *E. coli*, which was consistent with the expected value. Western blot analysis showed that the positively expressed products contained over 45% of the total fused protein. **Conclusion** A highly immunogenic fragment of ZnT8 can be screened from human islet cells, which is expressed in the prokaryotic system.

[**Key words**] ZnT8;prokaryote expression;immunogenicity

Supported by Clinical Research Foundation of Third Military Medical University (2008XG20). Corresponding author:Chen Bing, Tel:86-23-68754138,E-mail:chenbing3@medmail.com.cn

1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus,T1DM)又名胰岛素依赖型糖尿病,临床主要类型为自身免疫紊乱导致的胰岛β细胞慢性损伤所致的1A型。发病需要经过一段较长时间的糖尿病前期,因此早期筛选T1DM的高危人群,及时进行免疫干预治疗是预防T1DM的关键。T1DM患者的血液中多数可查出多种自身免疫抗体,如胰岛细胞抗体(islet cell antibody,ICA)、谷氨酸脱羧酶抗体(glutamic acid decarboxylase antibody,GADA)、胰岛素自身抗体(insulin autoantibody,IAA)、蛋白酪氨酸磷酸酶自身抗体(islet antigen-2 antibody,IA-2A)等,但其诊断特异性和灵敏性并不令人满意[1,2]。

锌转运蛋白8(Zinc transporter 8,ZnT8)是胰岛细胞特异性膜蛋白,2006年Chimienti等[3]首次描述了这种特异性胰岛锌转运子ZnT8的功能和特性。2007年Wenzlau等[4]对ZnT8自身抗体进行了血清学检测,证明其在T1DM检测中的特异性高达98%。并且在目前糖尿病诊断指标阴性的样本中仍有37.5%阳性率,从而有效避免了漏诊的发生。目前认为,将ZnT8

[基金项目] 第三军医大学临床科研基金(2008XG20)
[通信作者] 陈 兵,电话:(023)68754138, E-mail:chenbing3@medmail.com.cn

特异性抗体联合已有的 T1DM 自身免疫抗体检测指标将极大地提高 T1DM 的早期检出率,对 T1DM 鉴别诊断、治疗监控和预测都有着重要的临床意义。但天然 ZnT8 蛋白相对分子质量大,为 6 次跨膜蛋白,结构复杂,难于直接异源表达。为此,我们通过对 ZnT8 蛋白结构的分析,从中筛选出免疫原性强且能够高效表达的片段,构建原核表达载体并在大肠杆菌中表达并鉴定表达产物,为进一步深入研究其功能特点及在临床诊断中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

包含 ZnT8 基因序列的质粒 pZnT-8-EGFP 由法国 Fabrice Chimienti 教授惠赠,原核表达载体 pET32a,*E. coli* DH5α 和 BL21(DE3) 均为我医院中心实验室保存。限制性内切酶、*Ex-Taq* 酶、T_4DNA 连接酶和核酸回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒为 Omega 产品;PCR 引物合成及重组质粒测序由上海生工生物技术公司完成;其余常用试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 ZnT8 中强免疫原性片段的预测及筛选 通过生物信息学手段,采用 DNAstar 软件对 ZnT8 蛋白的二级结构、亲水性、柔韧性、表面可及性以及抗原性作综合预测,从预测结果中筛选出具有强免疫原性的 N 末端片段 ZnT8(N)。

1.2.2 ZnT8 基因的扩增 根据 GenBank 中 ZnT8 基因的编码序列设计带 *Nco* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切位点的上下游引物,上游引物 5′-CATGCCATGGAGTTTCTTGAAAGAACGTATCT-3′(含 *Nco* Ⅰ 酶切位点),下游引物 5′ -CCGCTCGAGCTCTGCTCGGTGCCATCCA-3′(含 *Xho* Ⅰ 酶切位点),窗体底端以 pZnT-8-EGFP 质粒为模板,进行 PCR 扩增反应。PCR 扩增体系为:上下游引物各 1 μl,*Ex-Taq* 酶 0.25 μl,$MgCl_2$ 5 μl,10 × PCR buffer 5 μl,dNTPs 4 μl,模板 1 μl,ddH_2O 32.75 μl;反应条件为:98 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环,最后 72 ℃ 充分延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后胶回收。

1.2.3 表达载体 pET32a-ZnT8(N)的构建及鉴定 将凝胶回收产物 ZnT8(N)和原核表达载体 pET32a 均用 *Nco* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 进行双酶切,酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶回收纯化。分别取回收后的目的片段及载体片段,于 T_4DNA 连接酶中 22 ℃ 连接过夜。连接产物转化入 *E. coli* DH5α 中。随机挑取阳性克隆扩增,提取质粒后用 *Nco* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切,电泳鉴定正确后送上海生工公司测序。

1.2.4 ZnT8(N)融合蛋白诱导表达 挑选构建成功的重组质粒 pET32a-ZnT8(N)和空质粒 pET32a 转化入宿主菌 *E. coli* BL21(DE3),挑取含重组表达质粒的单菌落于 5 ml Amp 的 LB 培养基中,37 ℃ 过夜培养;次日以 1% 接种量接种到 5 ml 新鲜的 Amp LB 培养基中,37 ℃ 继续培养至 *D*(600)为 0.6,加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L,37 ℃ 诱导表达 6 h,分别于诱导 0、2、4 和 6 h 取样,测定 *D*(600)值,同时作空载体菌及 BL21(DE3)空菌诱导对照。煮沸 10 min,提取全菌蛋白,SDS-PAGE 分析目的蛋白条带的相对含量。

1.2.5 ZnT8(N)融合蛋白的 Western blot 鉴定 将 0.8 mmol/L 诱导 4 h 表达产物及相应的对照蛋白产物,SDS-PAGE 电泳后,半干法(1 mA/cm^2,60 min)电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 ~ 2 h,加入 His-Tag 单克隆抗体 (1∶5 000 稀释),4 ℃ 过夜,1‰TBST 洗膜,37 ℃ 孵育 1 h,1‰ TBST 洗膜,最后加入化学发光试剂显色,于 Bio-Rad 凝胶成像仪显影。

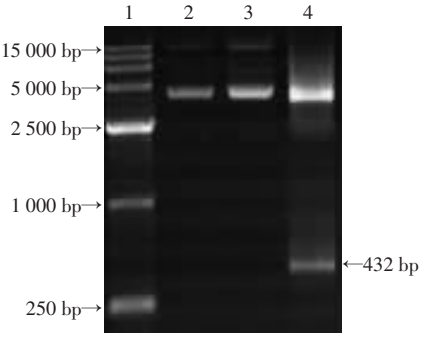
2 结果

2.1 ZnT8 中强免疫原性片段的预测及筛选

通过 DNAstar 软件进行预测,发现 ZnT8 第 N 末端 140 位之前的氨基酸富含 α 螺旋,亲水性、柔韧性以及表面可及性均较高,大部分为外膜区,且抗原性分析明显高于其他片段。表明该片段(含 140 个氨基酸,ZnT8)抗原性强,因此选取该片段进行克隆表达。

2.2 pET32a-ZnT8(N)载体的构建结果

pET32a-ZnT8(N)经双酶切后,可见大小约 432 bp 的目的片段(图 1),经测序证实结果正确,表明原核表达载体构建成功。

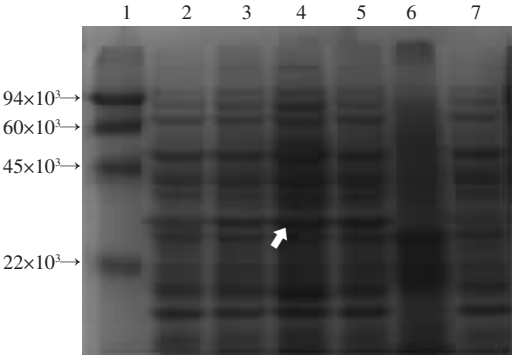


1:核酸 marker;2:pET32a 载体;3:pET32a 双酶切;4:pET32a-ZnT8(N)双酶切

图 1 pET32a-ZnT8(N)双酶切琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 重组蛋白的诱导表达

分别用 0.8 mmol/L IPTG 对带有 pET32a-ZnT8(N)重组载体,pET32a 空载体及 BL21(DE3)空菌进行以诱导,12 % SDS-PAGE 分析,经快速考马斯亮蓝染色 5 min 后脱色,发现目的条带大约在 31×10^3 左右(图 2),和预计的相对分子质量大小相符。由图 2 可见,在诱导 4 h 后蛋白表达量即达到最高。

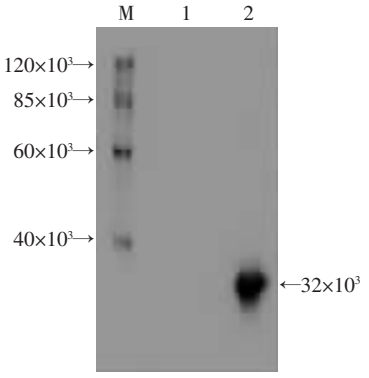


1:蛋白标准;2 ~ 5:IPTG(0.8 mmol/L)诱导 pET32a-ZnT8(N)后 0、2、4、6 h;6:IPTG(0.8 mmol/L) 诱导 BL21(DE3)空菌;7: IPTG(0.8 mmol/L)诱导 pET32a;↑:目的蛋白条带

图 2 不同诱导时相点 SDS-PAGE 电泳结果

2.4 重组蛋白 Western blot 鉴定

结果表明:大肠杆菌 BL21(DE3)菌体裂解物经过诱导的阴性对照无表达,而经过诱导的 pET32a-ZnT8(N)则显示明显的条带(图3)。



M:预染蛋白相对分子质量标准;1:BL21(DE3);2:IPTG 诱导(0.8 mmol/L)pET32a-ZnT8(N)后 4 h

图3 pET32a-ZnT8(N)的 Western blot 鉴定

3 讨论

锌是人体内许多蛋白的重要组成成分,直接参与了核酸、蛋白质的合成,细胞的分化和增殖及许多重要的代谢途径[5,6]。但锌离子不能自由通过细胞膜,必须通过特定的转运蛋白和膜通道才能进入胞内,到目前为止,已经鉴定并克隆出9个锌转运体家族成员,即 ZnT1-8 和 ZnT10。而每个成员都有其组织特异性,并且定位于细胞内特定部位[3]。ZnT8 是该家族中新近发现的重要成员之一,定位于胰岛 β 细胞和少量 α 细胞中,为胰岛特异性的锌转运蛋白,在胰岛素的分泌、合成及储存过程中发挥着不可或缺的作用[7]。目前认为,深入研究其功能特征可能对糖尿病的基础和临床都有着重要意义[8,9]。

同其他锌转运蛋白结构一样,ZnT8 分子结构中含有一段富含组氨酸区域,即锌离子的结合位点,包含了6个跨膜区和一个在Ⅳ和Ⅴ区域间的组氨酸环。其编码基因 SLC30A8 全长 1 100 bp,蛋白相对分子量 40 753 道尔顿,由 369 个氨基酸组成,其中 50% 的分子嵌埋于磷脂双分子层中。2004 年 Chimienti 首次从人胰岛细胞中克隆获得了 SLC30A8 基因,并在 HeLa 细胞中表达了 ZnT8 蛋白[10]。但由于 ZnT8 分子结构复杂,难以在原核系统大量表达,严重限制了其研究和临床应用的可能。为解决此问题,我们采用了 DNAstar 软件筛选预测了 ZnT8 结构特点及免疫学特征,选取了该蛋白 N 端的强抗原性区域,同时结合亲水性及表面可及性特点,成功克隆获得了 ZnT8 基因 N 末端胞外区片段 ZnT8(N),构建了 ZnT8(N)的原核表达载体并在 *E. coli* BL21(DE3)中成功表达。本实验中使用的 pET32a 载体的多克隆位点上游 N 端包含了一个 Trx·Tag 标签,进行基因表达时,表达产物与硫氧还蛋白(Trx)相连形成融合体,很大程度上增强了目的蛋白在宿主菌中的溶解度从而能获得理想的表达。载体自带的 His 标签利于亲和层析纯化目的蛋白,而载体中包含的肠激酶切割位点可以轻松的从融合蛋白中切下目的蛋白或多肽。同时,在实验中我们还对诱导剂 IPTG 的浓度和表达时间进行了探究,结果表明终浓度为 0.8 mmol/L IPTG 诱导 4 h 时蛋白表达到峰值,延长诱导时间表达量没有很大变化。实现了 ZnT8(N)在原核系统中表达成功,为进一步相关研究和临床应用奠定了坚实基础。

参考文献:

[1] Wenzlau J M, Moua O, Sarkar, -S-A, *et al*. SlC30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes[J]. Ann NY Acad Sci, 2008, 1150: 256-259.

[2] 张丽, 程慧玲, 索翠萍. 糖尿病相关抗原及其抗体的研究进展和临床应用[J]. 医学检验与临床, 2006, 17(6): 72-73.

[3] Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, *et al*. *In vivo* expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 20): 4199-4206.

[4] Wenzlau J M, Juhl K, Yu L, *et al*. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(43): 17040-17045.

[5] Beyersmann D, Haase H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells[J]. Biometals, 2001, 14(3/4): 331-341.

[6] Aydemir T B, Blanchard R K, Cousins R J. Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(6): 1699-1704.

[7] Chimienti F, Favier A, Seve M. ZnT-8, a pancreatic beta-cell-specific zinc transporter[J]. Biometals, 2005, 18(4): 313-317.

[8] Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, *et al*. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk [J]. Diabetologia, 2009, 52(9): 1881-1888.

[9] Wenzlau J M, Frisch L M, Gardner T J, *et al*. Novel antigens in type 1 diabetes: the importance of ZnT8[J]. Curr Diab Rep, 2009, 9(2): 105-112.

[10] Chimienti F, Devergnas S, Favier A, *et al*. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules[J]. Diabetes, 2004, 53(9): 2330-2337.

(**收稿**:2010-02-10;**修回**:2010-03-15)

(编辑 栗 嘉)