

NMDAR1 蛋白膜外抗原结构域的重组表达、纯化和免疫反应原性鉴定

包玓¹, 李伟¹, 石乐明², 李全贞¹

1 温州医科大学 检验医学院与生命科学学院, 浙江 温州 325035

2 复旦大学 生命科学学院, 上海 200433

包玓, 李伟, 石乐明, 等. NMDAR1 蛋白膜外抗原结构域的重组表达、纯化和免疫反应原性鉴定. 生物工程学报, 2017, 33(12): 1979-1988.

Bao D, Li W, Shi LM, et al. Expression, purification and immunoreactivity characterization of extracellular antigenic domains of NMDAR1 protein. Chin J Biotech, 2017, 33(12): 1979-1988.

摘要: 构建编码 NMDAR1 蛋白膜外片段的原核表达重组质粒, 在大肠杆菌中诱导表达、纯化并鉴定其免疫反应原性。根据人 NMDAR1 基因序列, 利用 Phyre 2 软件预测蛋白的三级结构并分析其结构域。设计引物用 RT-PCR 方法扩增编码 NMDAR1 膜外蛋白不同结构域的核酸片段, 并插入原核表达载体 pCold-SUMO 构建重组质粒。转化 DH5 α 感受态细胞, 菌落 PCR 鉴定, 阳性单克隆进行测序验证。鉴定正确的重组体转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导目的蛋白的表达和纯化, Ni-NTA 柱亲和层析和凝胶过滤层析纯化蛋白, 酶切切除融合蛋白 6His-SUMO 标签, 用 AKTA Purifier 进行凝胶过滤层析, 收集纯化蛋白。利用 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度, 并用 Western blotting 进行免疫反应性鉴定。克隆获得 NMDAR1 膜外部分的三段 DNA 序列, 分别是 NR1-M1 (编码 19-393 aa)、NR1-S1 (编码 394-544 aa) 和 NR1-S2 (编码 663-800 aa)。其中 NR1-S1 和 NR1-S2 片段之间以 G (甘氨酸) 和 T (苏氨酸) 作为接头连接成为复合片段。经菌落 PCR 筛选和测序鉴定, 成功构建了重组质粒 pCold-SUMO-M1 和 pCold-SUMO-S1-GT-S2。SDS-PAGE 鉴定结果表明重组质粒在大肠杆菌中经诱导可表达可溶性 NR1-M1 及 NR1-S1-GT-S2 蛋白。对表达产物进行亲和层析和凝胶过滤层析获得了高纯度的目标蛋白。Western blotting 证实纯化的目的蛋白能与相应抗体发生特异性结合反应。本研究成功构建了 NMDAR1 蛋白膜外抗原结构域的原核表达系统, 并获得了具有免疫反应性的 NR1-M1 及 NR1-S1-GT-S2 纯化蛋白。该蛋白有望用于 NMDAR1 蛋白的功能研究及自身抗体的检测。

关键词: NMDAR1, 膜外蛋白, 原核表达, 纯化

Received: October 26, 2017; **Accepted:** November 27, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81671621, 81270852).

Corresponding author: Quanzhen Li. E-mail: Quanzhenli@yahoo.com

国家自然科学基金 (Nos. 81671621, 81270852) 资助。

网络出版时间: 2017-11-30

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20171130.1826.001.html>

Expression, purification and immunoreactivity characterization of extracellular antigenic domains of NMDAR1 protein

Ding Bao¹, Wei Li¹, Leming Shi², and Quanzhen Li¹

¹ School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

² School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: This study aimed to construct prokaryotic recombinant plasmids for expression of the extracellular domains of NMDAR1 protein, purify and characterize the immunoreactivity of the recombinant proteins. Based on the mRNA sequence of human NMDAR1 gene, we predicted the structure of the antigenic domains in the extracellular part of the protein using the “phyre2” software. Primers were designed to amplify the nucleic acid fragments encoding the NMDAR1 extracellular antigenic domains by RT-PCR. The amplified gene fragments were cloned into pCold-SUMO vector to construct the recombinant plasmids which were transformed into *Escherichia coli* DH5 α . The positive colonies harboring the recombinant plasmids were picked and verified by PCR and DNA sequencing. Then, the recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21(DE3) strain and induced by IPTG for protein expression. The recombinant proteins were purified by Ni-NTA affinity chromatography. The target proteins were further purified by removing the 6 His-SUMO tag using enzyme excision followed by gel filtration chromatography using AKTA purifier. The purity of the recombinant proteins were evaluated by SDS-PAGE and the immunoreactivity were characterized by Western blotting. Three DNA fragments encoding the extracellular domains of NMDAR1 protein, including NR1-M1 (encoding 19–393 aa), NR1-S1 (encoding 394–544 aa) and NR1-S2 (encoding 663–800 aa), were amplified by RT-PCR. The NR1-S1 and NR1-S2 were linked with G (arginine) and T (threonine) amino acid as a combined fragment. The NR1-M1 and NR1-S1-GT-S2 fragments were cloned into pCold-SUMO vector and two recombinant plasmids, pCold-SUMO-M1 and pCold-SUMO-S1-GT-S2, were generated and expressed in *E. coli*. SDS-PAGE analysis showed that the recombinant plasmids expressed soluble NR1-M1 and NR1-S1-GT-S2 proteins in bacterial. After affinity chromatography and gel filtration chromatography, we obtained high purity target proteins. Western blotting assay showed that the recombinant proteins NR1-M1 and NR1-S1-GT-S2 can bind specially with their corresponding antibodies, suggesting the recombinant proteins retained antigenic reactivity. We constructed a prokaryotic expression system for expressing the NMDAR1 protein extracellular parts that had immunoreactivity successfully, and the purified proteins can be used for studying NMDAR1 function and testing the autoantibodies.

Keywords: NMDAR1, extracellular protein, prokaryotic expression, purification

N-甲基-D-天冬氨酸受体 1 (NMDAR1) 是谷氨酸受体 NMDAR 的 1 型亚基。NMDAR 由不同的亚基构成异四聚体，亚基组成主要包括 NR1 (NMDAR1)、NR2 和 NR3。NMDAR1 是 NMDAR 受体必不可少的组成亚基，可结合甘氨酸，为该受体的功能单位^[1-4]。

人 NMDAR1 基因定位于染色体的 9q34.3，由 938 个氨基酸组成，分子量为 105.5 kDa，总长度为 4 213 bp，开放阅读框为 2 814 bp。1991 年 Moriyoshi 用蟾蜍卵母细胞表达系统结合电生理学的方法首次成功克隆出大鼠 NMDAR1 基因^[5]，人与大鼠 NMDAR1 的氨基酸序列具有 99% 的同

源性。NMDAR1 细胞外区域有两个突出部分，N 末端位于细胞外，C 末端位于细胞内，中间有 3 个跨膜片段 (Transmembrane segments, TM)，细胞外区域包括 N 末端和激动剂结合区^[6]。NMDAR1 主要包括 3 个结构域，分别为氨基末端结构域 (Aminoacid terminal domain, ATD)、激动剂结合结构域 (Ligand binding domain, LBD) 和跨膜结构域 (Transmembrane domain, TMD)^[3]。

NMDAR 是一种兴奋性神经突触受体，是谷氨酸受体的重要亚型，主要存在于哺乳动物神经细胞。它不仅参与正常生理过程如神经元的增殖、迁移和塑造，并在许多神经系统疾病，如中风、癫痫和神经性退变等过程中发挥重要作用^[7-13]。抗 NMDAR 抗体首先发现于脑炎伴卵巢畸胎瘤年轻女性患者的血清和脑脊液中，随后在无潜在肿瘤的脑炎患者中亦证实该抗体的存在^[14-20]。进一步研究发现，NMDAR 也参与一些免疫性疾病，如神经精神性系统性红斑狼疮 (NPSLE)。NPSLE 是 SLE 疾病中最难诊断和高风险的疾病亚型。其最显著的检测指标是患者血清或脑脊液中存在抗 NR2 或 NR1 的自身抗体^[21-28]。另外，抗 NMDAR 脑炎作为一种新型脑炎亚类受到广泛关注，是一种 NMDAR 抗体相关自身免疫性脑炎。鉴于 NMDAR1 自身抗体与包括神经精神性狼疮在内的多种疾病症状密切相关，因此检测病人血和脑脊液中的 NMDAR1 蛋白和抗体对疾病的诊断和鉴别诊断具有重要意义。然而目前市场上尚无具有明确免疫反应性的 NMDAR1 重组蛋白可用于疾病标志物的研究，因此，体外表达 NMDAR 重组蛋白并对其免疫反应性进行鉴定，对研究该蛋白在相关疾病发病机制中的作用及进行疾病的早期诊断和鉴别诊断，具有重要的应用价值。NMDAR1 作为 NMDAR 组成的必要

亚基，膜外部分包含了蛋白主要抗原结构域。对 NMDAR1 蛋白的膜外部分进行表达和纯化，有助于研究该蛋白膜外结构域的功能和免疫反应性，同时探索其用于自身免疫病患者体内 NMDAR1 自身抗体检测的可行性。

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3) 感受态细胞、胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒均购自天根生化科技有限公司，pCold-SUMO 质粒为温州医科大学李伟课题组惠赠；限制性核酸内切酶购自 NEB；无缝克隆酶购自诺唯赞生物有限公司；异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自上海生物化工有限公司；ULP 蛋白酶来源于复旦大学麻锦彪课题组；SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天生物公司；抗体购自 Abcam 和 CST 公司；引物合成委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.2 序列的选择

将人和鼠的 NR1 蛋白序列比对，发现具有 99% 的相似性，说明 NR1 蛋白序列高度保守。根据文献^[3]报道的鼠 NMDAR1 三级预测结构 (PDB 4pe5)，利用 phyre2 软件预测人 NMDAR1 蛋白结构。根据预测蛋白结构域对应的氨基酸序列，选取对应膜外片段。N-末端的“19-393 aa”序列属于氨基末端结构域，“394-544 aa”和“663-800 aa”氨基酸序列属于配体结合结构域 (图 1)。NR1-M1 (编码 19-393 aa)、NR1-S1 (编码 394-544 aa) 和 NR1-S2 (编码 663-800 aa) 为选取的 3 个膜外截短蛋白片段。其中 NR1-S1 和 NR1-S2 片段之间以 G (甘氨酸) T (苏氨酸) 作为接头连接成为复合片段 NR1-S1-GT-S2。

1.3 设计引物并合成

设计可扩增 NR1-M1 基因片段的 PCR 上下游引物,并分别在引物的前端加上 pCold-SUMOb 载体的同源序列 (M1-F 和 M1-R 见表 1)。设计 NR1-S1 基因片段的下游引物和 NR1-S2 基因片段的下游引物,并分别在引物的前端加上 pCold-SUMOb 载体的同源序列 (分别为 S1-F 和 S2-R, 见表 1)。设计 NR1-S1 基因片段的下游引物和 NR1-S2 基因片段的下游引物,并在两个引物之间引入编码 GT 氨基酸对应核苷酸序列和 S1S2 的同源序列,以便用于 Overlap-PCR 将 S1 和 S2 两个基因片段连接成复合片段 (分别为 S1-R 和

S2-F, 见表 1)。引物设计完成并送生物公司进行合成。

1.4 目的基因扩增及重组表达载体的构建

RT-PCR 扩增获得 NR1-M1 核酸片段。Overlap-PCR 方法扩增获得 NR1-S1-GT-S2 复合片段,过程示意图见图 2。用 *Nde* I 限制性内切酶切割 pCold-SUMO 载体成线性化载体。运用无缝克隆技术分别将 M1 及 S1-GT-S2 核酸片段与 pCold-SUMO 线性化载体进行重组,重组体分别命名为 pCold-SUMO-M1 及 pCold-SUMO-S1-GT-S2。重组质粒转化 DH5 α 感受态细胞,菌落 PCR 鉴定,阳性单克隆进行测序验证。

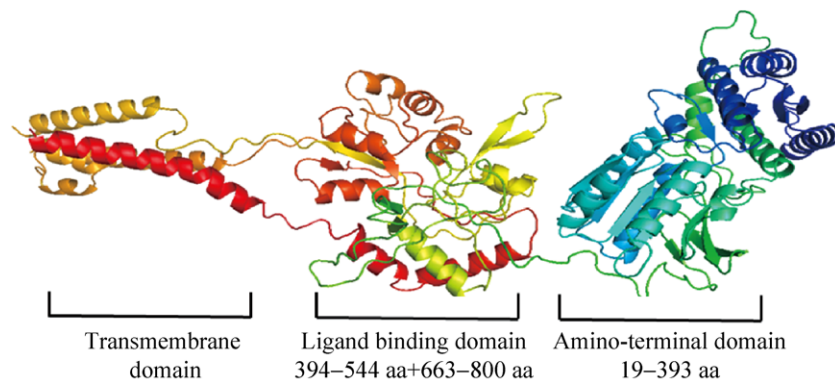


图 1 人 NR1 的三级预测结构及结构域对应膜外氨基酸序列模式图

Fig. 1 The tertiary structure of human NR1 and the amino acid sequences corresponding to the domain. The N-terminal “19–393 aa” sequences belong to amino-terminal domain; The N-terminal “394–544 aa” and “663–800 aa” sequences belong to ligand binding domain.

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of primers

Primer name	Primer sequences (5'-3')
M1-F	<i>CGAACAGATTGGAGGTCGTGCCGCGTGCGACC</i>
M1-R	<i>TCGAGGGTACCGAGCTTACTGGTACCCTCGAGGCTTCTCTGTC</i>
S1-F	<i>CGAACAGATTGGAGGTATGTCCACCAGACTGAAGATTGTGATGTCCACCAGACTGAA</i> <i>GATTGTG</i>
S1-R	<i>ATGCGGGTGCCCTTCTTGACCAGA ATAGTCAGG</i>
S2-F	<i>GTCAAGAAGGGCACCCGCATCACGGGCATCAACGA</i>
S2-R	<i>TCGAGGGTACCGAGCTTACGAGTCACATTCTGATACCGAAC</i>

Note: the sequences marked by italic are the homologous sequences of pCold-SUMO vector.

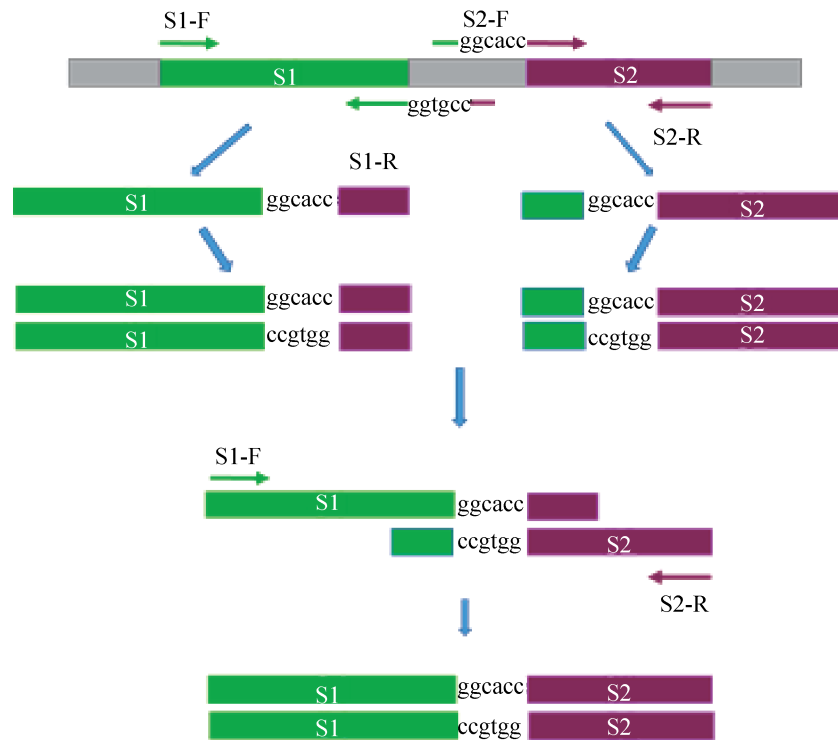


图 2 Over-lap PCR 扩增 S1-GT-S2 核酸片段原理过程示意图

Fig. 2 The schematic diagram of the over-lap PCR amplification of S1-GT-S2 fragment.

1.5 蛋白的诱导表达

构建成功的 pCold-SUMOb-M1 及 pCold-SUMOb-S1-GT-S2 重组质粒转化 BL21(DE3) 细胞,涂 LB 平板,37 °C 培养箱培养过夜,菌落 PCR 鉴定,鉴定成功的单菌落转接至 10 mL 的 LB 培养基,37 °C、250 r/min 摇床培养,至培养基浑浊 转接至 1 L 的 LB 培养基。首先,在 37 °C、220 r/min 条件下培养,待细菌生长至对数生长期 ($A_{600}=0.6-0.8$) 时,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,18 °C 继续培养 15-18 h,4 °C 离心收集细菌。按照体积比,菌液沉淀和 buffer1 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 25 mmol/L 咪唑) 1:5-1:7 重悬混匀,利用高压破菌机 4 °C 进行破菌。裂解菌液 17 000 r/min 离心 1 h,收集上清进行下一步蛋白的纯化。

1.6 蛋白的纯化

菌液上清过 Ni-NTA 柱,融合蛋白结合于镍柱上,之后将镍柱接入到 AKTA purifier 系统装置上,进行洗脱和收集。ULP1 蛋白酶加入收集的洗脱液中,并在透析液(透析液成分 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl) 中透析 4 h。酶切过后的收集液过 Ni-NTA 柱,融合标签结合于镍柱上,收集流穿液体。收集的流穿液体运用凝胶过滤层析进一步纯化,AKTA purifier 进行洗脱和收集。最后用超滤管将收集的纯化蛋白进行浓缩。

1.7 Western blotting 进行重组蛋白免疫反应原性鉴定

Western blotting 实验检测纯化蛋白的免疫反应性。首先用 SDS-PAGE 分离纯化蛋白,湿转至

PVDF膜上,经封闭液(5% BSA, 0.1% TBST)封闭1 h,加入对应的小鼠抗人NMDAR1抗体(抗人NR1-M1抗体, Ab134308, 美国Abcam公司)和兔抗人NMDAR1多肽(GluN1)抗体(GluN1 Rabbit mAb, CST 5704S, 美国Cell Signaling公司)4 °C孵育过夜。阴性对照分别采用无关抗体(小鼠IgG和兔IgG)。TBST洗涤3次,10 min/次,加入对应二抗孵育1 h, TBST洗涤3次, ECL化学发光显影。

2 结果

2.1 目的基因扩增及重组体的鉴定

RT-PCR扩增目的核酸片段,琼脂糖凝胶电泳鉴定显示在对应大小的位置有目的条带存在, NR1-M1核酸片段大小为1 125 bp(图3,泳道1), NR1-S1-GT-S2核酸片段大小为873 bp(图3,泳道2)。胶回收NR1-M1和NR1-S1-GT-S2核酸片段,和pCold-SUMOb载体重组获得重组体。重组质粒转化DH5 α 细胞,挑取单克隆菌落进行菌

落PCR(载体通用引物)鉴定,琼脂糖凝胶电泳结果显示载体有对应大小的核酸片段插入, pCold-SUMOb-M1大小为1 500 bp左右(图4,泳道1-6), pCold-SUMOb-S1-GT-S2大小为1 200 bp左右(图4,泳道8-13)。阳性单克隆菌落进行Sanger测序,测序结果进行Blast比对发现序列完全正确,重组体构建成功。

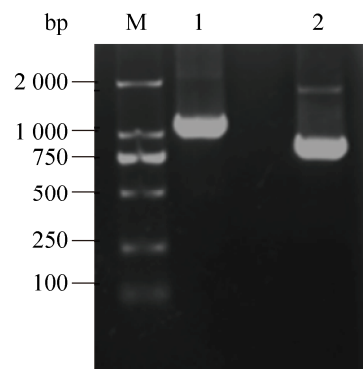


图3 M1和S1-GT-S2的PCR扩增琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of the amplified M1 and S1-GT-S2 by PCR. M: DL2000 DNA marker; 1: M1 (1 125 bp); 2: S1-GT-S2 (873 bp).

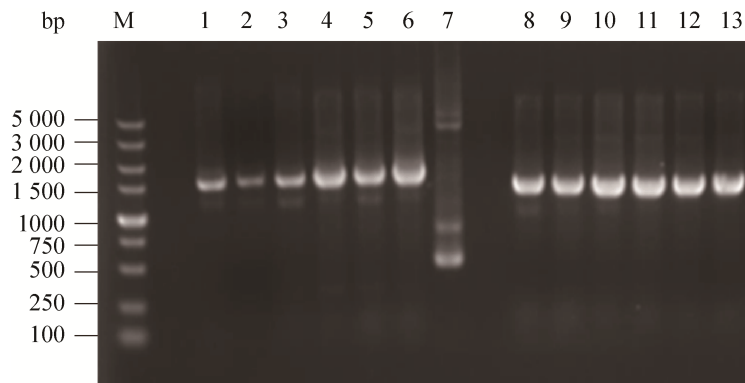


图4 菌落PCR鉴定重组质粒pCold-SUMOb-M1及pCold-SUMOb-S1-GT-S2

Fig. 4 Identification of recombinant plasmids pCold-SUMOb-M1 and pCold-SUMOb-S1-GT-S2 by colony PCR. M: DL5000 DNA marker; 1-6: the monoclonal colonies of pCold-SUMOb-M1; 7: pCold-SUMOb vector; 8-13: the monoclonal colonies of pCold-SUMOb-S1-GT-S2.

2.2 蛋白的诱导表达和纯化

重组质粒 pCold-SUMO-M1 和 pCold-SUMO-S1-GT-S2 转化 BL21 感受态细胞, IPTG 诱导目的蛋白表达。收集菌液经高压破菌之后, SDS-PAGE 显示在相应分子量位置有明显的重组蛋白表达条带 (图 5, 泳道 1 和图 6, 泳道 1), 而含载体的对照菌株则无蛋白表达条带 (图 5, 泳道 2 和图 6, 泳道 2)。对破菌后的沉淀和上清进行蛋白电泳分析, 发现重组蛋白虽然在沉淀部分有少量表达, 但主要存在于上清部分 (图 5, 泳道 3、4 和图 6, 泳道 3、4), 说明重组蛋白主要以可溶性蛋白的形式表达。蛋白经 Ni-NTA 柱亲和层析纯化, 由 AKTA purifier 洗脱, 得到了纯度较高的融合蛋白 6 His-SUMO-NR1-M1 (分子量约 57 kDa) (图 5 泳道 7、8) 和 6 His-SUMO-NR1-S1-GT-S2 (分子量约 47 kDa) (图 6, 泳道 7、8)。纯化的融合蛋白经 ULP1 蛋白酶切割, 去除标签 6 His-SUMO 融合标签。去除标签的目的蛋白通过凝胶过滤层析进行进一步纯化, 得到高纯度的目的蛋白 NR1-M1 (分子量约 42 kDa) (图 5, 泳道 9、10) 和 NR1-S1-GT-S2 (分子量约 32 kDa) (图 6, 泳道 9、10)。

2.3 纯化目的蛋白的 Western blotting 鉴定

取 NR1-M1 纯化蛋白, NR1-S1-GT-S2 纯化蛋白, 空载体 pCold-SUMO 转化 DH5 α 并经 IPTG 诱导的菌液进行 Western blotting 鉴定。结果显示重组蛋白 NR1-M1 (分子量约 42 kDa) 和 NR1-S1-GT-S2 (分子量约 32 kDa) 均可以和对应抗体发生特异性免疫反应 (图 7, M1-1 和 S1-GT-S2-1), 而空载体对照与相应抗体无反应 (图 7, M1-2 和 S1-GT-S2-2)。另外, 重组蛋白 NR1-M1 和 NR1-S1-GT-S2 与无关抗体 (小鼠

IgG 和兔 IgG) 无免疫反应 (图 7, M1-3 和 S1-GT-S2-3)。说明我们表达的重组 NR1-M1 和 NR1-S1-GT-S2 为具有免疫反应性的可溶性蛋白。

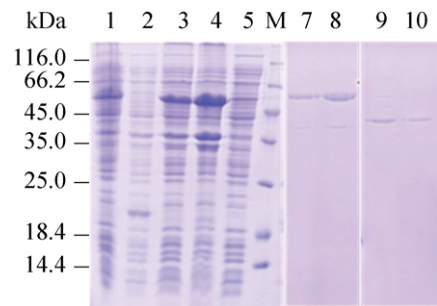


图 5 SDS-PAGE 鉴定 NR1-M1 蛋白表达及纯化结果
Fig. 5 Identification of the expression and purification of NR1-M1 protein by SDS-PAGE. 1: the whole bacterial of BL21 cells transformed by pCold-SUMO-M1; 2: the whole bacterial of BL21 cells transformed by pCold-SUMO vector; 3: the precipitation of induced bacteria after lysis; 4: the supernatant of induced bacteria after lysis; 5: the eluate from Ni-NTA purification of supernatant; M: protein marker; 7-8: purified protein; 9-10: purified protein (no SUMO tag).

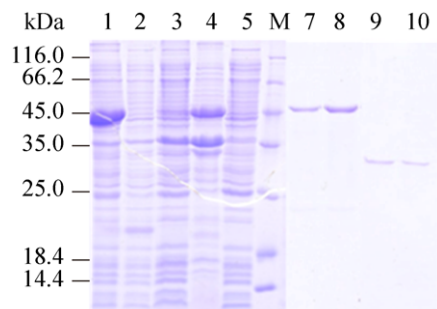


图 6 SDS-PAGE 鉴定 S1-GT-S2 蛋白表达及纯化结果
Fig. 6 Identification of the expression and purification of S1-GT-S2 protein by SDS-PAGE. 1: the whole BL21 bacterial transformed by pCold-SUMO-S1-GT-S2; 2: the whole bacterial of BL21 cells transformed by pCold-SUMO vector; 3: the precipitation of induced bacteria after lysis; 4: the supernatant of induced bacteria after lysis; 5: the eluate after Ni-NTA purification of supernatant; M: Protein marker; 7-8: purified protein; 9-10: purified protein (no SUMO tag).

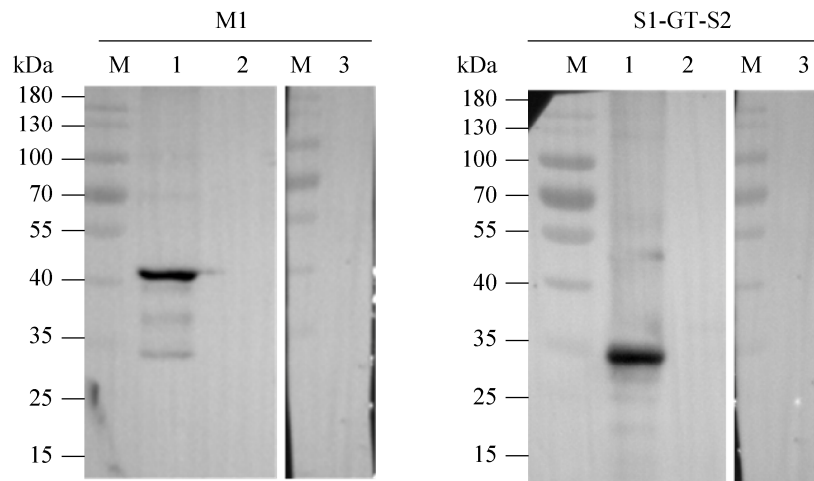


图 7 纯化蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 7 Analysis of the purified protein by Western blotting. M1-1: 0.5 μ g NR1-M1 purified protein, incubated with mouse anti-NMDAR1 monoclonal antibody; M1-2: pCold-SUMO vector control, incubated with mouse anti-NMDAR1 monoclonal antibody; M1-3: 0.5 μ g NR1-M1 purified protein incubated with mouse IgG; S1-GT-S2-1: 0.5 μ g NR1-S1-GT-S2 purified protein, incubated with rabbit anti-NMDAR mAb; S1-GT-S2-2: pCold-SUMO vector control, incubated with rabbit anti-NMDAR mAb; S1-GT-S2-3: 0.5 μ g S1-GT-S2 purified protein incubated with rabbit IgG; M: protein marker.

3 讨论

NMDAR 受体是由多个亚基紧密结合形成的复合体,主要分布于中枢神经系统中,是神经系统信号传递的重要介质。其中 NMDAR1 是 NMDAR 复合体的主要组成成分。NMDAR1 是一种膜蛋白,含有多次跨膜结构。其膜外部分可能是自身抗体作用的主要靶标,但目前有关该蛋白膜外结构域抗原决定簇及其免疫反应性尚无可靠的研究证据。因为 NMDAR1 是一种膜蛋白,其分子量较大,且结构复杂,因此体外表达具有一定难度。目前市场上仅有一种 Abcam 公司的 NMDAR1 重组蛋白可用于科研,但该蛋白仅包含 NMDAR1 蛋白的部分胞内片段 (1-122 位氨基酸),且免疫反应性较弱,难以满足科研需要,因此急需开发一种含有 NMDAR1 全长或主要抗

原决定簇 (尤其是胞外部分) 的重组蛋白。本研究首先根据曾经报导的鼠 NMDAR1 三级结构分析结果,利用 Pymol 软件对人 NMDAR1 膜外结构域进行分析并预测其抗原结构域。然后用 PCR 对抗原结构域进行分段扩增并利用原核表达系统快速纯化出 NMDAR1 的可溶性膜外蛋白片段,是 NMDAR1 抗原表达的一种新的尝试。

由于 NMDAR1 蛋白结构复杂且含有多次跨膜结构,因此对该蛋白的表达和纯化有较大的难度。Karakas 等利用昆虫表达系统表达鼠源蛋白用于晶体结构的分析^[3],但此表达系统成本高、表达周期长且表达量低,难以用于规模生产。虽然利用固相合成技术可以合成 NMDAR1 多肽片段^[24] (20 个氨基酸左右),但合成的多肽受到氨基酸长度的限制,不一定包含 NMDAR1 蛋白中功能性的抗原结构域。以前也有利用原核表达系

统获得 NMDAR1 截短蛋白的报道^[29], 但所表达的蛋白为不溶性的包涵体。因包涵体内的蛋白质是处于非折叠状态的聚集体, 因此其免疫活性较低。本研究根据 NMDAR1 蛋白结构特征, 选择性地表达其膜外结构域中含重要抗原决定簇的蛋白。根据结构预测结果, 本研究表达的蛋白片段 M1、S1 和 S2 几乎包含了 NMDAR1 蛋白所有的膜外部分。另外, 我们利用 pCold-SUMO_b 表达载体, 该表达系统含有 CSPA 启动子, 在低温下可以启动蛋白的表达, 使细菌生长缓慢, 蛋白合成速度缓慢, 从而最大限度地保证了蛋白正确折叠的几率, 提高了蛋白可溶性, 增强了活性蛋白的几率。该载体的另一个重要特征是同时具有 SUMO-tag 和 His-tag。SUMO-tag 可以显著提高小分子蛋白的表达量和可溶性, 而 His-tag 则用于蛋白的镍亲和层析纯化。载体上的“SUMO”蛋白酶切除位点可用于标签的切除, 从而保证目的蛋白的纯度。细菌表达产物经 Ni-NTA 亲和层析、标签切除及凝胶过滤层析, 得到了较纯的可溶性蛋白。经 Western blotting 证实纯化的目的蛋白能与相应抗体发生特异性结合反应。

本研究为制备 NMDAR1 重组蛋白并进行活性鉴定的初步研究, 所获得的 NR-M1 和 NR-S1-GT-S2 重组蛋白因包含了 NMDAR1 蛋白主要的抗原结构域, 可望用于自身免疫病患者体内 NMDAR1 自身抗体的检测。NMDAR 自身抗体是神经精神性狼疮 (NPSLE) 重要的标志性抗体^[21-28], 另外最近发现在脑炎患者和脑炎伴卵巢畸胎瘤年轻女性患者的血清和脑脊液中也有 NMDAR 自身抗体存在^[14-20]。下一步我们将利用 NR-M1 和 NR-S1-GT-S2 重组蛋白检测患者血清和脑脊液中的 NMDAR 自身抗体, 探索该重组蛋白片段在疾病诊断中的应用价值。

REFERENCES

- [1] Ulbrich MH, Isacoff EY. Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37): 14163–14168.
- [2] Laube B, Kuhse J, Betz H. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *Neuroscience*, 1998, 18(8): 2954–2961.
- [3] Karakas E, Furukawa H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science*, 2014, 344(6187): 992–997.
- [4] Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, et al. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 2005, 438:185–192.
- [5] Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, et al. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 1991, 354(6348): 31–37.
- [6] Hollmann M, Maron C, Heinemann S. N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron*, 1994, 13(6): 1331–1343.
- [7] Husi H, Ward MA, Choudhary JS, et al. Proteomic analysis of NMDAR-adhesion protein signaling complexes. *Nature Neurosci*, 2000, 3(7): 661–669.
- [8] Coyle JT. Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell Mol Neurobiol*, 2006, 26(4/6): 363–382.
- [9] Waxman EA, Lynch DR. N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist*, 2005, 11(1): 37–49.
- [10] Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(6): 413–426.
- [11] Morris RG, Anderson E, Lynch GS, et al. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 1986, 319(6056): 774–776.
- [12] Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*, 1990, 13: 71–82.

- [13] Mattson MP, LaFerla FM, Chan SL, et al. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, 2000, 23: 222–229.
- [14] Dalmau J, Tüzün E, Wu HY, et al. Paraneoplastic anti-*N*-methyl-*D*-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol*, 2007, 61(1): 25–36.
- [15] Sansing LH, Tüzün E, Ko MW, et al. A patient with encephalitis associated with NMDA receptor antibodies. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007, 3(5): 291–296.
- [16] Iizuka T, Sakai F. Anti-nMDA receptor encephalitis--clinical manifestations and pathophysiology. *Brain Nerve*, 2008, 60(9): 1047–1060 (in Japanese).
- [17] Dalmau J, Lancaster E, Martinezhernandez E, et al. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol*, 2011, 10(1): 63–74.
- [18] Bayreuther C, Bourg V, Dellamonica J, et al. Complex partial status epilepticus revealing anti-NM DA receptor encephalitis. *Epileptic Disord*, 2009, 11(3): 261–265.
- [19] Florance NR, Davis RL, Lam C, et al. Anti-*N*-methyl-*D*-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. *Ann Neurol*, 2009, 66(1): 11–18.
- [20] Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, et al. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci*, 2010, 30(17): 5866–5875.
- [21] Gono T, Kawaguchi Y, Kaneko H, et al. Anti-NR2A antibody as a predictor for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 2011, 50(9): 1578–1585.
- [22] de Giorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, et al. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med*, 2001, 7(11): 1189–1193.
- [23] Arinuma Y, Yanagida T, Hirohata S. Association of cerebrospinal fluid anti-NR2 glutamate receptor antibodies with diffuse neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(4): 1130–1135.
- [24] Ogawa E, Nagai T, Sakuma Y, et al. Association of antibodies to the NR1 subunit of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol*, 2016, 26(3): 377–383.
- [25] Husebye ES, Stoeber ZM, Dayan M, et al. Autoantibodies to a NR2A peptide of the glutamate/NMDA receptor in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Anna Rheum Dis*, 2005, 64: 1210–1213.
- [26] Tay SH, Fairhurst AM, Mak A. Clinical utility of circulating anti-*N*-methyl-*D*-aspartate receptor subunits NR2A/B antibody for the diagnosis of neuropsychiatric syndromes in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an updated meta-analysis. *Autoimmunity Rev*, 2017, 16(2): 114–122.
- [27] Lauvsnes MB, Omdal R. Systemic lupus erythematosus, the brain, and anti-NR2 antibodies. *J Neurol*, 2012, 259(4): 622–629.
- [28] Omdal R, Brokstad K, Waterloo K, et al. Neuropsychiatric disturbances in SLE are associated with antibodies against NMDA receptors. *Eur J Neurol*, 2005, 12: 392–398.
- [29] Zhang YM, Sun CK, Fan M, et al. High expression, purification and characterization of cDNA encoding M3-M4 loop in the essential subunit of hNMDA. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2003, 19(5): 588–593 (in Chinese).
张玉梅, 孙长凯, 范明, 等. 人 NMDA 受体主亚基 M3-M4 环基因片段的高效表达、纯化与鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19(5): 588–593.

(本文责编 郝丽芳)