论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0668-03

丙酮酸脱氢酶复合物X蛋白的原核表达与血清学鉴定

舒翠莉,赵 军,雷 历,李 靖,高 蓉,程 云 (解放军302医院传染病研究所免疫室,北京 100039)

提 要:目的 获得丙酮酸脱氢酶复合物的X蛋白(Pro-X)的原核表达蛋白。**方法** 采用RT-PCR技术从人淋巴细胞RNA中扩增出Pro-X的基因片段,克隆至pET28a(+)表达载体进行诱导表达,并对表达产物进行Western blot和ELISA鉴定。**结果** 成功构建了表达载体pET28a(+)/Pro-X;表达产物能特异性的被原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis,PBC)患者血清中的抗线粒体抗体识别。**结论** 获得Pro-X蛋白的原核高效表达,为利用原核表达的丙酮酸复合物对PBC患者进行血清学检测进一步奠定了基础。

关键词: 丙酮酸脱氢酶复合物的X蛋白;克隆表达;酶联免疫吸附试验

中图法分类号: R394-33; R446.11; R575.22 **文献标识码:** A

Prokaryotic expression and serum identification of X protein of dihydrolipoamide acetyltransferase compounds

SHU Cui-li, ZHAO Jun, LEI Li, LI Jing, GAO Rong, CHENG Yun (Department of Immunology, Institute of Infectious Diseases, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To acquire the X protein of dihydrolipoamide acetyltransferase gene (Pro-X) through prokaryotic expression. Methods The Pro-X gene was amplified from human lymphocytes with RT-PCR method, and was cloned into pET28a(+) vector to induce the Pro-X expression. The expressed product was evaluated by Western blotting and enzyme linked immunoabsorbent assay. Results The expression vector pET28a(+)/Pro-X was successfully constructed. The expressed product could be identified by the specific self-antibodies in the serum of primary biliary cirrhosis (PBC) patients. Conclusion High efficient expression of Pro-X lays the foundation for serum assay of PBC patient by prokaryotic expression of dihydrolipoamide acetyltransferase compounds.

Key words: X protein of dihydrolipoamide acetyltransferase compounds; cloning and expression; ELISA

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis,PBC)主要发病于女性,主要病理变化为肝内小胆管慢性渐进性损伤伴有肝门炎症,最终发展为肝纤维化[1]。PBC发病具有潜袭性,其病程可以在几十年内仅有微小的进展,也可在数年内迅速恶化,以至需要进行肝移植。PBC的特异性血清学标志是抗线粒体抗体的出现,该抗体是针对位于线粒体内膜上的2-酮酸脱氢酶复合物(2-OADC),且抗体的主要识别位点为丙酮酸脱氢酶复合物的E2亚单位(PDC-E2)(95%的患者中检出其自身抗体)和X蛋白(功能上作为E3结合蛋白,PDC-E3bp)(90%~95%的患者中检出其自身抗体)[2]。目前对PBC的诊断常基于免疫荧光(大鼠肝肾冰冻切片)或酶联免疫吸附试验(以牛或猪心线粒体提取物为抗原)的检测结果,但存在对非PBC患者血清有非特异性反应,并且费用昂贵。本实验室应用基因工程技术扩增表达了PDC-E2,并且其可特异性的被PBC患者血清中的自身抗体识别。为了进一步增加对PBC患者的检测范围和进一步研究PBC的发病机制和构建动物模型,我们同时克隆表达了X蛋白,并对PBC患者进行了血清学鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli BL21(DE3)plysE,基因型为hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1);pET28a(+)质粒;RNA提取试剂盒(Trizol Reagent)为Promega公司产品。MLV酶、oligod(T)、RNase Inhibitor、dNTP及*Taq*酶,购于Promega公司。PCR引物由上海生工公司合成。PCR纯化试剂盒为博大公司产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG,淋巴细胞分层液购自北京经科公司。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300320)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300320)

作者简介: 舒翠莉(1971-),女,黑龙江省哈尔滨市人,博士,助理研究员,主要从事分子生物学、细胞生物学方面的研究,发表论文16篇。电话:(010)66933313

通讯作者: 程 云,电话:(010)66933311

收稿日期: 2005-03-07;**修回日期:** 2005-07-09

1.2　方法

1.2.1　RT-PCR 扩增 cDNA　　取正常人血 10 ml，淋巴细胞分层液分离单核细胞后，用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，以提取的总 RNA 为模板，以 oligodT 为下游引物，参照 M-MLV 反转录酶产品说明书进行反转录。以反转录产物为模板，按 GenBank 中 Pro-X 的 cDNA 序列设计引物。上游引物 P1 为：5′- ATG-GTTTCACAGCACGCAGT-3′；下游引物 P2 为：5′- CTAG-GCAAGTCGGATAGGATTCT-3′；按下列条件进行 PCR 扩增：95 ℃ 5 min、94 ℃变性 30 s、55 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，共 35 个循环。最后于 72 ℃延伸 10 min。

1.2.2　表达载体的构建及测序　　PCR 产物经纯化后，连接到 pGEM-T easy 载体上，送上海生工公司测序。同时，以其作模板经上游引物 P3：5′- CAG *CCA TGG* GGT GAT CCC ATT AAG ATA CT-3′（包含 *Nco* Ⅰ识别位点），和下游引物 P4：（5′- CTC *GAA TTC* ATC CTA TCC GAC TTG CCT AG-3′包含 *Eco*R Ⅰ识别位点）进行第 2 轮 PCR 扩增，条件为：95 ℃ 5 min、94 ℃变性 30 s、54 ℃退火1 min，72 ℃延伸 1 min，共 30 个循环。最后于 72 ℃延伸 10 min。第 2 轮 PCR 产物经纯化后，连接到pGEM-T easy 载体上，送上海生工公司测序。同时用 *Nco* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ将产物片断切下装入相应酶切后载体 pET28a（+），转化感受态菌 *E. coli* BL21（DE3）。经涂板、挑克隆及小量扩增后，提质粒，酶切鉴定，送上海生工公司测序。

1.2.3　目的基因的表达　　以阳性重组表达载体 pET28a（+）/Pro-X 转化 *E. coli* BL21（DE3），挑取阳性克隆，于含 80 μg/ml卡那霉素 LB 活化过夜后，经 0.1 mmol/L IPTG 于 37 ℃诱导 5 h，收集菌体，超声裂解，离心收集上清，进行 SDS-PAGE（浓缩胶浓度 5%，分离胶浓度 12%），经 0.25% 考马斯亮蓝室温染色 2 h，脱色过夜后观察。

1.2.4　表达产物的 Western blot 鉴定　　将菌体上清经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸素纤维膜上，1% 酪蛋白封闭 1 h 后，1∶5 000稀释的临床确诊的 PBC 患者血清于 4 ℃孵育过夜，PBS-T 洗膜后，1∶2 000 稀释的 HRP-羊抗人 IgG 于 37 ℃孵育 30 min，PBS-T 洗膜后，DAB 显色。

1.2.5　ELISA 检测　　将表达产物 1∶800 稀释后于碱性包被液中，4 ℃过夜，包被 96 孔酶联板，PBS-T 洗板后，0.05% 的酪蛋白 37 ℃封闭 1 h，挑选临床确诊的 PBC 患者 123 例，400 份血清（为本院 2001 年 11 月至 2004 年 12 月住院患者，诊断参照 2000 年美国肝病学会 PBC 指导建议[3]）；酒精性肝硬化患者 219 例，277 份血清；药物性肝硬化患者 177 例，228 份血清；脂肪性肝硬化患者 350 例，350 份血清（患者血清均来自本院血清库）和正常健康人 400 例，400 份血清（来自解放军 307 医院血站），1∶500 稀释后加样，于 37 ℃孵育 40 min，PBS-T 洗板后，1∶10 000稀释的 HRP-羊抗人 IgG 于 37 ℃孵育 20 min，PBS-T 洗板后，显色。

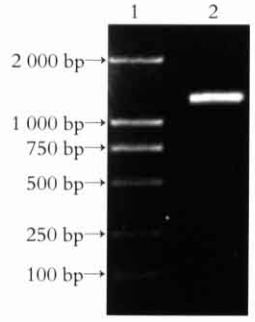
1.3　统计学方法

采用 SPSS 软件进行 t 检验。

2　结果

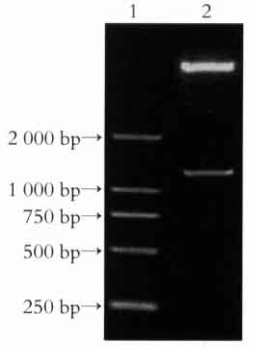
2.1　重组表达载体的构建、鉴定及测序分析

从淋巴细胞中提取的总 RNA，反转录为 cDNA 后，经第 1 轮 PCR 扩增出 1.37 kb 的 DNA 片段（图 1）。PCR 产物回收纯化后连接到 T 载体上，以其作模板再经第 2 轮 PCR 扩增出 Pro-X 成熟片段全长 cDNA（图 2）。第 2 轮 PCR 产物回收纯化后连接到 T 载体上，测序分析表明其与 GenBank 登录的 Pro-X 序列相符。同时经 *Nco* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切，所得 1.35 kb 的片段与同样酶切的 pET28a（+）质粒连接，转化 *E. coli* BL21（DE3），挑取阳性克隆，测序分析表明其与 GenBank 登录的 Pro-X 序列相符。



1：DL2000 标准；2：X 蛋白 PCR 结果

图 1　PCR 扩增出全长 X 蛋白片段

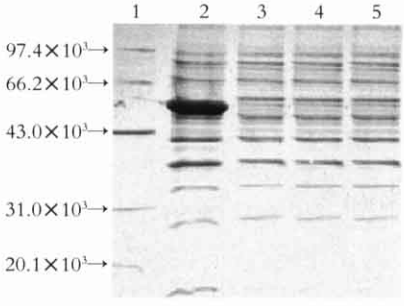


1：DL2000 标准；2：*Nco* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ双酶切鉴定

图 2　重组体 pET28/ X 蛋白酶切鉴定

2.2　目的基因的诱导表达

表达菌株 *E. coli* BL21（DE3）经 IPTG 诱导后，以超声裂解细菌，离心后，分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析，发现表达产物基本在上清中，在相对分子量为 50 000 处有 1 条明显的深染新生蛋白条带（图 3）。

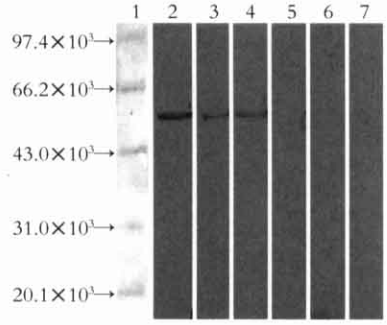


1：低分子蛋白标准；2：pET28/X 蛋白的诱导细菌；3：pET28/X 蛋白的未诱导细菌；4：pET28 未诱导细菌；5：pET28 诱导细菌

图 3　pET28/ X 蛋白的表达

2.3 表达产物的 Western blot 鉴定

Western blot 结果显示，用 3 份临床确诊的 PBC 患者血清染色后，在 NC 膜上表达产物位置处有 1 条强杂交信号条带，而正常人血清染色、未诱导菌及其他重组表达蛋白均无此阳性信号(图 4)。



1：低分子蛋白标准；2－4：分别用 3 位不同 PBC 患者血清培养的诱导 pET28/PDC-E3bp 表达产物；5：用 PBC 患者血清培养的未诱导 pET28/X 蛋白表达产物；6：用健康人血清培养的诱导 pET28/X 蛋白表达产物；7：用 PBC 患者血清培养的诱导 pGEX-2T/TRAIL 表达产物

图 4 pET28/ X 蛋白表达产物的 Western blot 鉴定

2.4 表达产物的 ELISA 鉴定

用 Pro-X 原核表达产物包被 96 孔酶联板，用 400 份临床确诊的 PBC 患者、277 份酒精性肝硬化、228 份药物性肝硬化、350 份脂肪性肝硬化和 400 份健康献血者血清进行酶联免疫吸附试验，结果显示表达产物能与 PBC 患者血清中特异性自身抗体反应，却与药物性肝硬化，脂肪性肝硬化和正常人血清无反应(表 1)。

表 1 用 PBC、其他肝病患者及正常人血清对表达产物的血清学鉴定结果

	例数	$D(450)$	阳性检出率(%)
正常人	400	0.020 ± 0.023^a	0.25
PBC 患者	400	0.762 ± 0.318	93.30
酒精性肝硬化	277	0.074 ± 0.075^a	0
药物性肝硬化	228	0.053 ± 0.058^a	0
脂肪性肝硬化	350	0.041 ± 0.053^a	0

a：$P<0.01$，与 PBC 患者比较

3 讨论

原发性胆汁性肝硬化(PBC)的历史可以追溯到几个世纪前，但直到 1948 年才有了现在这个不甚确切的病名，并在 1951 年通过明确的临床描述确定下来[1]。PBC 是一种原因不明的慢性炎症性和胆汁淤积性的肝脏疾病，以小叶内和间隔的小胆管受到渐进性的和不可逆转的损伤为特征，并可进一步导致进展性肝硬化和肝功能衰竭。PBC 占各种肝硬化死亡原因的 1%～2%，列成人常见的需进行肝脏移植疾病的第 3 位，因此 PBC 的早期诊断是十分必要。PBC 目前主要分为Ⅰ～Ⅳ期[2,3]，其中Ⅰ期改变对 PBC 特异，其余各期改变都是非特异性的，在其他慢性肝病中也可见到。患者血液中 AMA 的检测是 PBC 的诊断中最为重要的血清学试验，特别是在这种胆汁淤积性疾病的临床、生化、病理表现以及胆管损伤的证据尚未出现之时[4]。临床上对 PBC 的怀疑或者其诊断的建立，常常(特别是在疾病的早期)是建立在 AMA 作为唯一检测发现的基础上。AMA 的靶抗原位于线粒体内膜，最初命名为 M2，为分子量为(36～74)×10^3的一系列分子，其中 PBC 的主要靶抗原是丙酮酸脱氢酶复合物的 E2 亚单位和 X 蛋白[5]。

本实验选用 T7 噬菌体启动子的表达载体 pET28a(+)构建了表达载体 pET28a(+)/Pro-X，并转化 *E. coli* BL21(DE3)，经 IPTG 诱导成功表达了丙酮酸脱氢酶复合物 E3bp，经 Western blot 鉴定，表达产物能特异性的被 PBC 患者血清中的自身抗体识别，而与正常人血清无非特异性的交叉反应。以 PBC 患者及药物性肝硬化、酒精性肝硬化、脂肪性肝硬化和 400 份健康献血者血清，进行大样本检测所表达抗原的抗体识别特异性，发现只有 PBC 患者血清才能特异性的识别表达抗原，PBC 患者血清检出阳性率达 93.3% 以上，而健康人、酒精性肝硬化、脂肪性肝硬化患者和正常人血清均不能与表达抗原反应，说明我们的原核表达产物能特异性的被 PBC 患者血清中的自身抗体识别，从而为进一步利用原核表达的丙酮酸脱氢酶复合物对 PBC 患者进行血清学检测奠定了基础。

参考文献：

[1] PRINCE M I, JAMES O F. The epidemiology of primary biliary cirrhosis [J]. Clin Liver Dis, 2003, 7(4): 795－819.

[2] NEUBERGER J. Recurrent primary biliary cirrhosis[J]. Liver Transpl, 2003, 9(6): 539－546.

[3] HEATHCOTE E J. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines [J]. Hepatology, 2000, 31(4): 1005－1013.

[4] CARPENTER H A, CZAJA A J. The role of histologic evaluation in the diagnosis and management of autoimmune hepatitis and its variants [J]. Clin Liver Dis, 2002, 6(3): 397－417.

[5] LEUSCHNER U. Primary biliary cirrhosis—presentation and diagnosis [J]. Clin Liver Dis, 2003, 7(4): 741－758.

[6] Bogdanos D P, Baum H, Vergani D. Antimitochondrial and other autoantibodies[J]. Clin Liver Dis, 2003, 7(4): 759－777.

(编辑 汪勤俭)