

• 论 著 •

SLA 和 LKM-1 的表达纯化及其在自身免疫性肝炎中的初步应用

王莹¹, 王懿²

(1. 广东省深圳市第二人民医院 518035; 2. 第三军医大学检验系, 重庆 400038)

摘要:目的 表达 SLA 和 LKM-1 并纯化, 初步应用于自身免疫性肝炎的临床诊断中。方法 在已构建的 CYP11D6、SLA 原核表达载体的基础上表达 SLA 和 LKM-1, 并采用 NI-NTA 琼脂糖珠亲和层析的方法纯化, 并将纯化后蛋白用于临床自身免疫性肝炎的筛查。结果 经 SDS-PAGE 分析后, 将两个重组质粒在大肠杆菌 M15 中表达的产物与控菌比较, 含目的基因的转化菌在相对分子质量约 47.5×10^3 和 50×10^3 处各有一条极浓的蛋白带, 将含有目的基因的阳性大肠杆菌筛出, 并大量培养, 可用 IPTG 诱导表达的即为目的蛋白。表达的融合蛋白需经过鉴定才可继续纯化, 以保证纯化后蛋白的纯度, 纯化产物经免疫印迹法鉴定具有抗原活性, 即可将所得纯化产物用于临床自身免疫性肝炎患者的筛查。结论 表达纯化的 SLA 和 LKM-1 蛋白用于临床自身免疫性肝病, 可以为临床诊断提供更多帮助。

关键词: 肝炎; 抗可溶性肝抗原抗体; 抗肝肾微粒体 I 型抗原抗体; 表达; 纯化; 临床应用

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)07-0757-03

Expression and purification of SLA, LKM-1 and their preliminary application in autoimmune hepatitis

Wang Ying¹, Wang Yi²

(1. The Second People's Hospital of Shenzhen, Guangdong 518035, China; 2. Department of Clinical Laboratory Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** The expression and purification of the SLA and the LKM-1 were implemented for preliminary clinical applications of autoimmune hepatitis diagnosis. **Methods** The expression of SLA and LKM-1 were obtained based on the constructed CYP11D6 and SLA prokaryotic expression vector. They were purified by using NI-NTA agarose beads affinity chromatography. The purified protein was used for clinical screening of autoimmune hepatitis investigation. **Results** The products of two recombinant plasmids that were expressed in E. coli M15 were compared with the air bacteria after the SDS-PAGE analysis. The bacteria with the target gene depicted a very strong protein band in at the molecular weight of about 50×10^3 Department 47.5×10^3 , respectively. The positive E. coli gene with target gene were screened out and cultivated to be a large amount. The target protein can be expressed by IPTG induction of protein were identified by using the IPTG induced expression. The fusion protein was purified after the identification, in order to ensure the purity of the purified protein, Western blot with antigen activity was used to identify the Purified products, which can be used for clinical screening of patients with autoimmune hepatitis. **Conclusion** Expression and purification of SLA and LKM-1 protein are obtained for clinical use in autoimmune liver disease as well as providing more support for clinical diagnosis.

Key words: hepatitis; SLA; LKM-1; expression; purification; clinical application

自身抗体是诊断自身免疫性肝病(AIH)最重要的指标, 随着检测方法的发展, 越来越多的自身抗体陆续被发现, 为对 AIH 发病机制作更为深入的研究并对疗效作进一步观察^[1-2]。国际上通常以特异性的自身抗体为依据, 并根据以下几种不同的主要自身抗体: 抗核抗体/抗平滑肌抗体(ANA/SMA)、抗肝肾微粒体 I 型抗原抗体(抗 LKM-1)、抗可溶性肝抗原抗体(anti-SLA), 将自身免疫性慢性活动性肝炎(AI-CAH)分为 3 型^[3-4]。I 型又称为经典“狼疮样”肝炎, 其特征性抗体为 ANA/SMA; II 型特异性抗体为抗肝肾微粒体细胞色素 P450IID6(LKM-1), 其针对的靶抗原是相对分子质量为 50×10^3 的微粒体细胞色素 P450IID6, 即 CYP11D6; III 型为相关自身抗体, anti-SLA, 但目前尚不清楚有关 SLA 抗体的靶抗原与肝细胞内何种蛋白对应。本组表达和纯化了 SLA 和 LKM-1 并将其用于临床, 为自身免疫性肝病的诊断提供帮助。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 表达部分材料 质粒载体 PQE30(Qiagen 公司); E. Coli M15; LB 培养基: 胰蛋白胨(Tryptone)10 g/L, 酵母浸膏(Yeast extract)5 g/L, NaCl 5 g/L, 5 N NaOH 0.2 ml/L(pH

7.4); 抗生素: 氨苄青霉素(Amp) 100 mg/mL, 卡那霉素(Kana)25 mg/mL, 应用时 1:1 000 倍稀释。SDS-PAGE 凝胶: 十二烷基磺酸钠(华舜公司)0.1 mL/10 mL, 聚丙烯酰胺(华舜公司)4 mL/10 mL, 过硫酸胺 0.1 mL/10 mL, 1.5 mol/L pH 8.8 Tris Cl 2.5 mL/10 mL, 四甲基乙二胺 0.012 mL/10 mL, 电泳缓冲液: Tris 15.1 g/L, SDS 5 g/L, 甘氨酸 94 g/L, 脱色液: 甲醇 50 mL/L, 冰乙酸 75 mL/L, 转印液: 甘氨酸 2.9 g/L, Tris 5.8 g/L, 甲醇 200 mL/L, 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG), 终浓度为 1 mmol/L; AP-羊抗人 IgG; 样品缓冲液(0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 1 mL; 甘油 0.8 mL; 10% SDS 1.6 mL; β-巯基乙醇 0.4 mL; 1% 溴酚蓝 0.4 mL; 加双蒸水至 8 mL; 电泳仪(Bio-rad); 转印槽(Bio-rad); 摇床(华利达 HZ-9201K 型台式恒温振荡仪); 低温离心机(BROMMA LKB-2161); 比色仪(Beckman DU 640 Nucleic Acid and Protein Analyzer)。

1.1.2 纯化部分材料 阳性大肠杆菌、LB 培养基、抗生素、凝胶、样品缓冲液、电泳缓冲液、转印液、脱色液、IPTG、AP-羊抗人 IgG、硝酸纤维素膜(Biolab), 以上部分用到过的试剂配方同上; 缓冲液 B: 100 mmol/L [NaH₂PO₄ 13.8 g/L; 10 mmol/L Tris Cl 1.2 g/L; 8 mol/L Urea(尿素)480.5 g/L; pH 8.0]; 缓

冲液 C 同 B 的配方,但 pH 值为 6.3;同样,缓冲液 D pH 值为 5.9;缓冲液 E pH 值为 4.5;50% 的 Ni-NTA 悬浮液;层析柱;滤膜;仪器同上。

1.2 方法

1.2.1 带目的基因的阳性菌的筛选 (1)取转入目的基因的单个菌落于 2 mL 的无菌试管中,加入 1 000 倍稀释的抗生素 Amp 和 Kana(1 μL/mL),于 37 °C 摇床中震荡 2~3 h 后加 IPTG(1 μL/mL)过夜,之后加入 LB 将其倍比稀释同时补加抗生素,再摇 2 h。(2)高速离心菌液 15 min,弃上清液。(3)加入样品缓冲液(含巯基乙醇)400 μL 混匀,彻底裂解细菌,转入 eppendorf 管中,90~95 °C 裂解 5 min,高速离心 5 min,取上清液电泳(电泳两块板)。(4)一块凝胶考马斯亮蓝染色,另一块做 Western Blot 染色 1 h 后用脱色液脱色,观察是否有 47.5×10³(SLA)或 50×10³(CYPIID6)的蛋白条带;将凝胶按常规方法转印至硝酸纤维素膜上(Biolab),含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭过夜,用 SLA 阳性血清(德国欧蒙公司惠赠)、LKM-1(Chemicon)室温反应 1 h,洗膜后用碱性磷酸酶标记的抗人 IgG 反应 1 h,底物显色。(5)挑选表达了目的蛋白的阳性菌。

1.2.2 CYPIID6 和 SLA 融合蛋白的表达 先将阳性菌小样培养,验证同上,再大量培养,以提取表达的目的蛋白。将表达的大样取小部分菌液做 SDS-PAGE 验证,证实有目的蛋白后,低温离心,弃上清液,用缓冲液 B 溶菌(4 mL/100 mL 菌液),

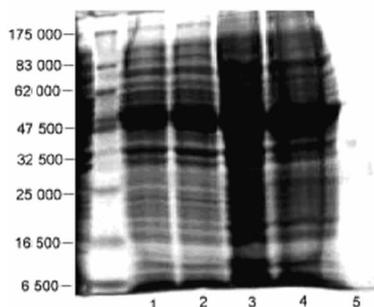
振摇 1 h,取 eppendorf 管高速离心 15 min,收集上清液,取 1 mL 50% 的 Ni-NTA 悬浮液,加入到溶菌液中,振摇 1 h(NI-NTA 树脂的蛋白吸附范围是 5~10 mg/mL)。装柱:取分离层析柱加入混有 NI-NTA 琼脂糖珠(agarose)的溶菌液,反复滴加至无 agarose 渗漏,方可将层析柱下端的导管接入废液缸。待溶菌液全部过完柱,用缓冲液 C 即 pH 为 6.3 的缓冲液反复洗涤柱子 3 遍,换 pH 为 5.9 的缓冲液缓冲液 D 开始收集蛋白,每次滴加 0.5 mL 的缓冲液洗脱,一次一管,约 8 管后换 pH 为 4.5 的缓冲液缓冲液 E,同上洗脱 8~10 管。检测洗脱下来的蛋白的含量,挑选蛋白含量比较高的管,取少量做蛋白电泳。SDS-PAGE 的方法同上,取样品用缓冲液倍比稀释,一块凝胶染色检测蛋白的相对分子质量,一块凝胶做免疫印迹检测其免疫活性。经验证后的蛋白,可冷冻保存,直接用于临床检测患者血清中的自身抗体。

2 结 果

2.1 SLA、CYPIID6 基因在大肠杆菌中表达的鉴定 两个重组质粒在大肠杆菌 M15 中表达的产物经 SDS-PAGE 分析,与控菌比较,含目的基因的转化菌在相对分子质量约 47.5×10³和 50×10³ 处各有一条极浓的蛋白带。将表达载体转化菌体蛋白转移至硝酸纤维素膜上,用 SLA 和 LKM-1 阳性血清进行蛋白印迹分析,在相对分子质量处出现一条阳性条带,而控菌菌体蛋白则为阴性。见图 1。

表 1 纯化后蛋白的含量(μg/mL)

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
SLA	42	51	37	59	507	40	38	33	31	106	749	358	203	174	159	158
CYP2D6	28	26	236	170	59	24	18	32	81	332	276	251	53	29	26	12

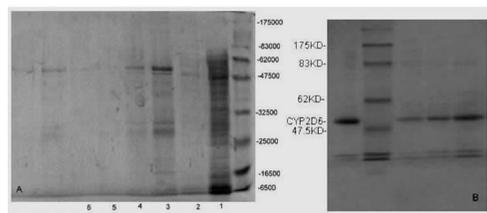


1,2:融合载体 PQZ-30/CYP2D6 表达的蛋白;3,4:融合载体 PQZ-30/SLA 表达的蛋白;5:控菌 E. Coli M15 做阴性对照。

图 1 PQZ-30/SLA、PQZ-30/CYP2D6 表达产物 SDS-PAGE 结果

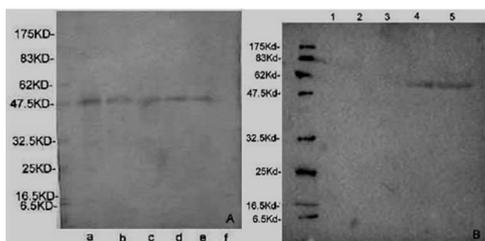
光光度仪 280 nm 波长比色,初步测定蛋白的含量,见表 1。

2.3 SLA、CYPIID6 纯化后的验证 经 NI-NTA 金属亲和层析一步法获得的蛋白在 SDS-PAGE 中为一条蛋白带,纯化产物经免疫印迹法鉴定具有抗原活性。见图 2~3。



A:SLA;B:CYP2D6。

图 3 SLA、CYP2D6 经纯化后 SDS-PAGE 结果



A a、b、c、d、e:SLA 表达的蛋白,f:控菌;B 1、2、3:控菌,4、5:CYPIID6 表达的蛋白。

图 2 PQZ-30/SLA、PQZ-30/CYP2D6 表达产物免疫印迹结果

2.4 初步临床应用 经检测 49 例被高度怀疑 AIH 的患者中 31 例 ANA 阳性、4 例 SLA 阳性、2 例 LKM-1 阳性、3 例抗平滑肌抗体阳性。46 例高度怀疑 PBC 的患者中 41 例 AMA 阳性,其中 35 例为 M2 亚型,22 例 ANA 阳性血清中有 5 例为核膜型。

3 讨 论

2000 年有研究者等首次从人肝组织中成功地克隆出 SLA 全长 DNA 序列,并检测 2 000 例各种慢性肝病患者,结果发现 SLA 并非是肝细胞角蛋白 8/18 和谷胱甘肽-S-转移酶,而是肝细胞质一种可溶性蛋白,并进一步证实 SLA 抗体是 AIH 高度特异性自身抗体,且多出现在 ANA、SMA、LKM-1 阴性的 AIH 中^[5]。LKM-1 是 II 型 AIH 的标志性抗体,其靶抗原为 CYPIID6。为建立一套完善的 AIH 诊断指标,在表达 SLA 的

2.2 SLA、CYPIID6 的纯化及测定 纯化所得三十二管经分

同时也成功表达了 CYP11D6^[6]。

质粒载体 PQE30 的应用,其优势:能将目的基因定向克隆导入大肠杆菌表达,产生 SLA 与 6 个组氨酸的融合蛋白,不仅能高效表达,且分离纯化方便。6 个组氨酸短肽抗原性极弱,可直接用亲和纯化的融合蛋白制备 SLA 和 CYP11D6 的抗体。经 SDS-PAGE 和蛋白印迹技术验证,大肠杆菌 M15 表达的 SLA、CYP11D6 产量高,具有抗原活性^[7-9]。

经 NI-NTA 金属层析一步法分离提纯的蛋白,测定其含量约为 0.7 mg/200 mL LB,这样高的提纯量与其载体质粒 PQE30 的高效表达有着密不可分的关系。本组在用 NI-NTA 亲和层析时采用的是在变性条件下蛋白的提纯,这样选择是因为:其一,变性条件下对细菌的裂解更彻底,可以提取更多的目的蛋白;其二,所要提取的目的蛋白是一种线形抗原。只要其蛋白的一级结构不被破坏,那么它依旧具有抗原性,但如果提取的目的蛋白是抗体,则不能用变性的条件,蛋白在变性时会破坏抗体的结构而使其不再有抗原性,此时应选用非变性条件提纯^[10-12]。本组所选用的亲和层析法中有一个重要的成份,即融合蛋白上的 6 个组氨酸的尾巴,它是由 PQE30 载体上的特定序列编码的,它能与 NI-NTA 的带有金属离子的 agarose 在碱性条件下相结合,而在酸性条件下重新游离分开,由于它的特性使得一部分游离蛋白有了前提条件。而由于这个组氨酸尾巴的抗原性极弱,这使本组分离出的抗原可以直接用于临床患者血清的检测^[13]。

目前 AIH 的发病机制尚未阐明,因此克隆、表达出 SLA、CYP11D6 的意义不仅在于临床诊断,而且为研究这两种抗原诱导的自身免疫紊乱在 AIH 中的作用提供了极其重要物质基础。

参考文献

[1] Czaja AJ, Dickson ER. Chronic active hepatitis; the mayo clinic ex-

perience(gastroenterology series)[M]. New York, USA; Marcel Dekker, 1986:105-126.

- [2] Johnson PJ, Mcfarlane IG. Meeting Report: International Autoimmune Hepatitis Group[J]. Hepatology, 1993, 18(9):998-1005.
- [3] 仲人前,孔宪涛.肝病免疫学[M].上海:上海科学技术文献出版社,1997:84-89.
- [4] Stephan K, Carolyn W, Guido G, et al. Lohse Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis[J]. Journal of Hepatology, 1999, 31(21):635-640.
- [5] 范列英,仲人前,屠小卿,等.自身免疫性肝炎特异性靶抗原的制备及临床应用[J].中国免疫学杂志,2002,18(2):67.
- [6] 张利方,付丽萍,徐娟,等.自身抗体在肝病患者诊断中的意义[J].现代检验医学杂志,2006,21(2):70-72.
- [7] 李白顺,纪官治.抗核抗体谱在 96 例自身免疫疾病中的应用探讨[J].福建医学杂志,2006,2(2):134-135.
- [8] 张铁汉,赵永新.免疫印迹法与间接免疫荧光法检测抗核抗体对照分析[J].中国热带医学,2008,8(4):568-570.
- [9] 闻亚峰.抗核抗体在内身免疫性肝病诊断中的应用[J].检验医学与临床,2008,12(5):949-950.
- [10] 李朴,孔飞飞,余雪梅,等.人 YB21 蛋白的高效原核表达、纯化及其多抗的制备[J].第三军医大学学报,2010,32(14):1579-1581.
- [11] 李海,贾继东.自身免疫性肝病的发病机制[J].临床消化病杂志,2008,20(6):327-329.
- [12] 马作新,廉娜,郑立.3 种检测方法在诊断自身免疫性肝病中的价值[J].国际检验医学杂志,2010,31(6):540-543.
- [13] 高玉洁,郭鹤,赵高阳,等.免疫印迹法检测 ENA 及其在自身免疫性肝病中的诊断价值分析[J].国际检验医学杂志,2010,31(5):427-429.

(收稿日期:2010-07-08)

(上接第 756 页)

肝脏疾病的严重程度呈正相关,既往感染 C 基因型的患者发生 MBP 突变较高,而且发展至重症肝病者也显著多于 B 基因型感染者,提示 HBV 感染者尤其是 C 基因型的 MBP 突变者应积极采取抗病毒治疗。同时也表明 MBP 密码子 54 突变与 HBV 感染的慢性化无相关性,但与慢性 HBV 感染者的疾病进展相关。其原因可能为中国人群 HBV 感染慢性化的最重要因素在于胎儿期或儿童早期的病毒感染,在获得母体经胎盘分泌 HBeAg 后,诱导了 T 细胞耐受,且感染的概率较大,在此机制下,婴幼儿的感染就成为了持续性感染;而 MBP 密码子 54 突变,使其氨基酸残基发生改变,破坏了 MBP 胶原样区结构,基因结构单位不能寡聚化,从而不能形成完整性、功能性的蛋白质,使血清 MBP 水平低下和调理缺陷,不能有效地清除 HBV 及循环免疫复合物,较高的病毒负荷加重肝脏的免疫损害且大量的免疫复合物沉积在肝脏,引起更严重的肝细胞炎症,造成肝细胞大量水肿坏死,最终导致更严重的后果。研究也表明,HBV 感染者中,低水平 MBP 与肝硬化的发生有关。

综上所述,MBP 密码子 54 突变和 HBV 基因型是决定 HBV 感染者临床预后的一个重要因素。与 C 基因型及 MBP 突变者相比,B 基因型及未发生 MBP 突变的 HBV 感染者肝脏病变进展较慢且严重程度较低。由于研究的标本和方法不

尽相同,不同地域、环境及不同种族的 MBP 突变和 HBV 基因型的关系结论可能不同。因此,建立本民族和同地域相同遗传背景的、与 HBV 感染者有关的基因数据对探讨乙型肝炎的发病机制具有十分重要的临床意义。

参考文献

- [1] Chong WP, To YF, Ip WK, et al. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2005, 42(5):1037-1045.
- [2] Thio CL, Mosbrugger T, Astembomki J, et al. Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virusinfection[J]. J Virol, 2005, 79(14):8846-8847.
- [3] Chloe L, Timothy M, J acquie A, et al. Mannose binding lecting genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection[J]. J Virol, 2005, 79(14):9192-9196.
- [4] 童福易,甘建,陆芹,等.甘露糖结合蛋白基因突变与乙型肝炎的相关性研究[J].中华医学遗传学杂志,2008,25(3):331-333.
- [5] 周彬,黄月华,单光华,等.乙型肝炎病毒基因型及病毒变异对慢性肝病进展的影响[J].热带医学杂志,2008,8(4):302-305.

(收稿日期:2011-01-03)