

M2 型抗线粒体抗体的靶抗原三联体克隆表达技术改良*

张婕婕¹, 杨自华^{2△}

(深圳市人民医院:1. 医务科;2. 检验科, 广东深圳 518000)

摘要:目的 改良构建 M2 型抗线粒体抗体(AMA-M2)靶基因三联体重组表达载体技术,建立检测 AMA-M2 的酶联免疫吸附法(ELISA)并进行评价。方法 通过聚合酶链反应(PCR)扩增基因三联体 BPO,构建表达载体 pGEX-4T-1-BPO,转入大肠杆菌 BL21 表达,经异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导得到重组蛋白,并通过亲和层析纯化得到目的蛋白,建立 ELISA 检测 AMA-M2。结果 获得纯度大于 95% 的重组蛋白;检测 326 例临床样本,43 例原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者中有 41 例呈 AMA-M2 阳性,灵敏度为 95.3%(41/43),特异度为 98.2%(278/283),PBC 组与非 PBC 组的 AMA-M2 检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 该改良技术获取的目的蛋白可以用于 AMA-M2 检测,AMA-M2 对 PBC 的临床诊断具有较高的灵敏度和特异度。

关键词:抗线粒体抗体; 肝硬化; 自身免疫

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.10.006

中图法分类号:R575.2+2

文章编号:1673-4130(2018)10-1176-04

文献标识码:A

A novel strategy for cloning and expression of Auto-antigen trimer of M2 Anti-mitochondrial antibody*

ZHANG Jiejie¹, YANG Zihua^{2△}

(1. Department of medical services; 2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: Objective To modify recombinant plasmid construction of BPO trimer, and establish the detection of M2 type anti-mitochondrial antibody (AMA-M2) using ELISA. To modify the recombinant expression vector of the target gene triplet of AMA-M2, and to establish and evaluate an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of AMA-M2. **Methods** The expression vector pGEX 4T 1 BPO was constructed through the gene amplification of triplet BPO by polymerase chain reaction (PCR), and expressed in *E. coli* BL21, and the recombinant protein was induced by isopropyl Thiogluconide (IPTG). The target protein was purified by affinity chromatography, and ELISA was established to detect AMA-M2. **Results** The recombinant protein with a purity greater than 95% was obtained. 326 cases of clinical samples was examined, and in 43 cases of primary biliary cirrhosis (PBC), 41 cases showed AMA-M2 positive, the sensitivity was 95.3% (41/43), the specificity was 98.2% (278/283), and the difference of AMA-M2 detection rate between PBC group and non PBC group was statistically significant. **Conclusion** The target protein obtained by the improved technology can be used for AMA-M2 detection. AMA-M2 has high sensitivity and specificity for the clinical diagnosis of PBC.

Key words: anti-mitochondrial antibody; cirrhosis; autoimmunity

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种原因不明的慢性胆汁淤积性自身免疫性疾病,好发于成年女性,确诊时往往已经发展到较严重的阶段。抗线粒体抗体(AMA)是诊断 PBC 的主要血清指标,有 M1~M9 共 9 个亚型,其中 M2 型 AMA 是 PBC 的特异性抗体^[1],M2 型抗体的靶抗原为线粒体上的 2-氧酸脱氢酶复合体(2-OADC)的一些组分,2-OADC 主要包括侧链二氧酸脱氢酶复合体 E2 亚基(BCOADC-E2)、丙酮酸脱氢酶复合体 E2 亚基(PDC-E2)和 2-氧戊二酸

脱氢酶复合体 E2 亚基(OGDC-E2)。JIANG 等^[2]已成功应用基因工程的方法把 3 个线粒体表位共同表达,建立了检测 AMA-M2 的新方法。本实验采用另一种构建三联体表达载体的方法,不仅简化了操作步骤,而且达到预期的应用效果,有较好的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集深圳市第一人民医院确诊 PBC 患者的血清 43 例,其中男 4 例、女 39 例,年龄 20~80

* 基金项目:深圳市科技计划资助项目(JCYJ20170307095922553)。

作者简介:张婕婕,女,副主任检验技师,主要从事医学免疫学研究。△ 通信作者,E-mail:603007600@qq.com。

本文引用格式:张婕婕,杨自华.M2 型抗线粒体抗体的靶抗原三联体克隆表达技术改良[J].国际检验医学杂志,2018,39(10):1176-1179.

岁,平均(44±15)岁,PBC 诊断标准采用 2000 年美国肝病学会 PBC 指导建议^[3]。收集同期自身免疫性肝炎(AIH)患者 15 例,乙型病毒性肝炎患者 30 例,丙型病毒性肝炎患者 30 例,类风湿关节炎(RA)患者 33 例,系统性红斑狼疮患者(SLE)32 例,以及 100 例健康体检者的血清标本。

1.2 材料与试剂 将 BCOADC-E2、PDC-E2 和 OG-DC-E2 的基因拼接成三联体 BPO,在 5'端添加 GST 标签,由上海旭冠生物合成;限制性内切酶(EcoRI/XhoI)等主要工具酶及标记物购自于大连宝生物;表达载体 pGEX-4T-1、DH5 α 和 BL21 由科室自存;小量胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、GST 柱和 Ni-NAT 树脂柱购自于上海生工;抗 M2-3E 抗体检测试剂盒(ELISA)购自德国 Euroimmun 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 购自 Sigma 公司;化学试剂均为分析纯,购自深圳化试科技有限公司。

1.3 仪器与设备 T100 PCR 仪、Imark 酶标仪、蛋白电泳仪和凝胶成像系统均购自美国 BIO-RAD 公司;DYY-8C 核酸电泳仪由北京六一公司生产;Avanti J-E 高速冷冻离心机由美国 Beckman 公司生产;ZH-WY-211B 全温型多振幅轨道摇床由上海智诚公司生产;VC505-750 超声波细胞破碎仪由 SONICS 公司生产。

1.4 方法

1.4.1 引物的设计与合成 根据上海旭冠提供的含有目的基因的 pUC19 质粒,用 Primer6.0 软件设计用于大量扩增目的基因的引物。上游引物 P1:5'-CCG GAA TTC GGT CAG GTT GT T CAG TTT-3';下游引物 P2:5'-CCG CTC GAG TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TGC TGC ACC GGT TTT ACG-3';上述引物由上海生工合成。

1.4.2 目的基因的扩增与纯化 以含有目的基因的 pUC19 质粒为模板,扩增目的基因;PCR 扩增体系为 50 μ L,含有上、下游引物终浓度各 0.2 μ mol/L,dNTPs 终浓度 200 μ mol/L,10 \times Buffer For Ex Taq 5 μ L,模板 2 μ L,Ex Taq 酶 1.25 U,灭菌去离子水补足 50 μ L;按照 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,63 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 的程序扩增 30 个循环;用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物,凝胶成像系统观测并记录结果;在紫外灯下切下目的条带,用胶回收试剂盒提纯目的 DNA。

1.4.3 重组质粒的构建和转化 对纯化回收的 PCR 产物进行双酶切并与同样双酶切的载体 pGEX-4T-1 进行连接,37 $^{\circ}$ C 双酶切 4 h,酶切后的目的基因和载体分别经琼脂糖凝胶电泳后切胶纯化回收;将回收的目的基因与载体以摩尔比 5:1 的比例混合,16 $^{\circ}$ C 连接过夜,构建含有目的基因的重组质粒 pGEX-4T-1-BPO;将重组质粒再转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞;阳性克隆裂解后经 PCR 电泳鉴定,同时提取阳性

克隆的质粒,进行双酶切验证。

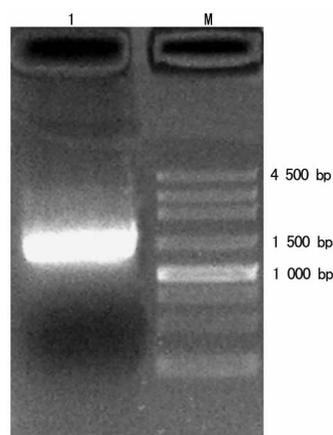
1.4.4 蛋白表达及纯化 阳性重组菌大量培养后,加异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,IPTG 终浓度为 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 通气培养 4 h,4 $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 15 min 收集细菌,将细菌悬浮于 20 mL 蛋白质结合缓冲液;反复冻融数次,超声破碎菌体,4 $^{\circ}$ C 14 000 r/min 超速离心 20 min 收集上清液,以获得表达菌液;带 GST 和 HIS 标签的表达蛋白溶液先后经 GST 柱和 Ni-NAT 树脂柱进行亲和层析纯化。

1.4.5 间接 ELISA 方法建立及临床血清检测 纯化的重组蛋白用 0.5 mol/L 的碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释后包被酶标板,终浓度为 10 μ g/mL;4 $^{\circ}$ C 过夜,PBST 洗涤 3 次后,加 2%牛血清清蛋白(BSA)室温封闭 16 h,洗涤后加入 1:100 待检血清室温孵育 60 min,洗涤后加 1:10 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG,室温孵育 30 min,然后洗涤 3 次,TMB 避光室温显色 10 min,终止后于 450 nm 读取光密度(OD)值;临界值为阴性对照 OD 平均值+3 倍标准差。

1.5 统计学处理 使用 SPSS17.0 分析软件;计数资料用例数和百分率表示,检出率差异比较采用 χ^2 检验;采用 ROC 曲线计算三联体 AMA-M2 诊断 PBC 的最佳 Cut-off 值,并确定曲线下面积(AUC)、诊断特异度和敏感度。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

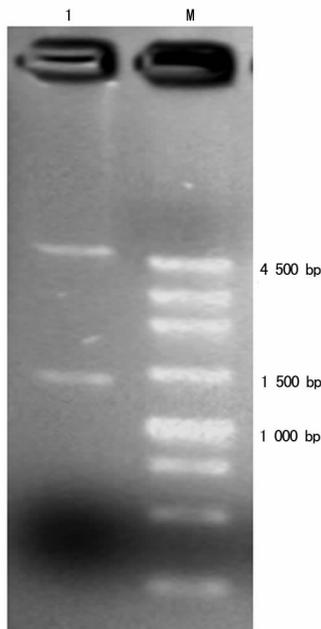
2.1 目的基因的扩增 对含有目的基因的 pUC19 质粒进行 PCR 扩增。扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶电泳结果显示,扩增出的 DNA 片段在约 1 500 bp 处形成 1 条明亮的条带,与预期目的片段大小相符(图 1)。



注:1 为 BPO 三联体 PCR 产物;M 为 DNA 相对分子质量标志物

图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

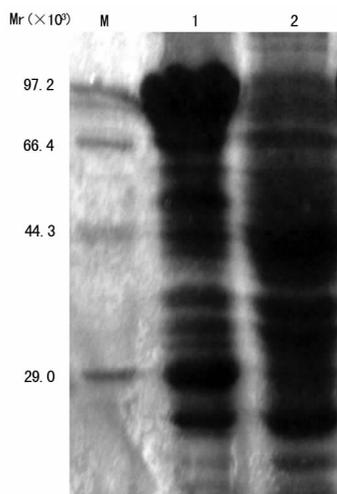
2.2 重组表达质粒构建鉴定 构建好的重组质粒经 EcoRI/XhoI 双酶切,得到与外源目的片段和 pGEX-4T-1 酶切片大小相同的 2 条特异性条带(图 2)。



注:1 为双酶切鉴定结果;M 为 DNA 相对分子质量标志物

图 2 重组表达载体双酶切鉴定图

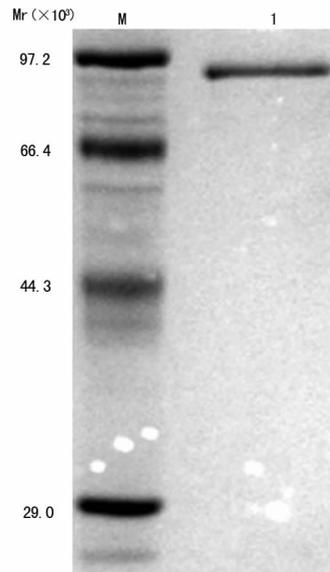
2.3 蛋白表达及纯化 SDS-PAGE 结果表明,在蛋白质相对分子质量约为 80×10^3 处可见 1 条诱导表达的条带,与预期的相对分子质量一致(图 3);表达的目的蛋白占全菌蛋白的 10% 左右,亲和层析纯化后的蛋白质上清液在电泳凝胶上只显示融合蛋白的单一一条带(图 4);经薄层扫描分析,纯化后的蛋白质纯度达 95% 以上。



注:M 为蛋白相对分子质量标准;1 为经 IPTG 诱导重组质粒转化菌;2 为未经诱导重组质粒转化菌

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

2.4 临床样本检测 ELISA 方法检测 326 例临床血清 AMA-M2,最佳 Cut-off 的 OD 值为 0.52,样本的 OD 值与 Cut-off 的 OD 值比值大于 1 为阳性,比值小于 1 为阴性。其中 43 例 PBC 患者血清中,41 例呈阳性;283 例非 PBC 患者中,5 例呈阳性;PBC 组与非 PBC 组的 AMA-M2 检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。ROC 曲线下面积 0.93,见图 5,95% CI 为 (0.861,0.999)。



注:M 为蛋白相对分子质量标准;1 为纯化的 BPO 蛋白

图 4 重组 BPO 蛋白的纯化

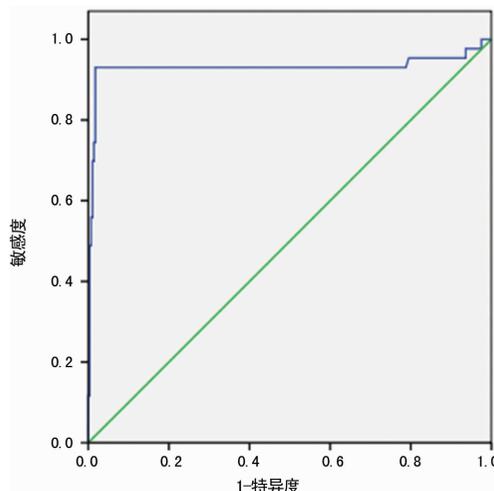


图 5 三联体 AMA-M2 诊断 PBC 的 ROC 曲线

3 讨论

原发性胆汁性肝硬化是一种免疫介导的慢性炎症性胆汁性肝病,是最常见的自身免疫性肝病,患病率是自身免疫性肝炎和原发性硬化性胆管炎患病率总和的两倍以上^[4],并且逐年递增,2010 年我国广州学者的研究显示,中国南部地区人群 PBC 患病率为 492/100 000,多为女性,目前研究认为每 1 000 位 40 岁以上女性中就有 1 位是 PBC 患者^[5]。

AMA 是 PBC 的血清标志物,95% 的 PBC 患者可检测出 AMA,10%~20% 的自身免疫性肝炎患者呈 AMA 阳性,只有 0.5% 的健康人群有 AMA^[6]。有研究表明^[7],M2 型 AMA 是检测 PBC 灵敏度最高的抗体,诊断灵敏度达 94%,诊断特异度达 95% 以上。本实验结果显示,AMA-M2 对 PBC 的诊断灵敏度和特异度略高于上述研究,分别为 95.3%、98.2%,这主要与样本的选取有关。

美国加利福尼亚大学 GERSHWIN 等^[8]于 1987 年鉴定出 M2 型抗体的靶抗原主要包括 BCOADC-

E2、PDC-E2 和 OGDC-E2;本实验基于化学拼接法原理获得三联体基因,将多拷贝的基因片段一次性合成,形成一个完整的多拷贝基因片段,然后再以此为扩增模板,构建表达载体。JIANG 等^[2]使用的随机定向串联法,利用合成 PCR 引物,通过 PCR 获得 1 个拷贝的基因片段,通过限制性内切酶的黏性末端,将单拷贝基因经酶切后进行自身随机串联,该法只有将自身串联物克隆于载体后,经筛选来确定串联体中单体数目,而且除形成期望的串联体外,单体或串联体也可利用黏性末端自身环化,导致后续克隆失败,最终得不到串联体;两法相比较,本实验方法虽然基因合成的成本较高,但既简化了操作步骤,又可以避免三联体表达载体构建出错,因此更有优势。

部分商业化的 ELISA 试剂盒只是基于 PDC-E2 这个靶抗原设计的^[9-10],因此会导致 PBC 患者的漏检或者误诊。本实验应用三联体作为靶抗原,成功建立 ELISA 检测方法,对 PBC 均有较高的灵敏度和特异度,在保证特异度的同时也能有效地降低漏检率;据文献报道^[11-12],AMA 对 PBC 的特异度并非 100%,AIH、特发性血小板减少性紫癜和系统性硬化症等患者偶见 AMA 阳性,所以临床除了参考 AMA-M2 的结果外,还须结合生化指标进一步明确诊断。

参考文献

[1] METCALF J V, MITCHISON H C, PALMER J M, et al. Natural history of early primary biliary cirrhosis[J]. *Lancet*, 1996, 348(9039): 1399-1402.

[2] JIANG X H, ZHONG R Q, WANG X P, et al. Development of enzyme immune assay for detecting M2 autoantibody specific for primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Pnt*, 2003, 2(2): 290-294.

[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] CAREY E J, ALI A H, LINDOR K D. Primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2015, 50(1): 291-308.

[5] POUPON R. Primary biliary cirrhosis: a 2010 update[J]. *J Hepatol*, 2010, 52(5): 745-758.

[6] BOGDANOS D P, INVERNIZZI P, MACKAY I R. Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(21): 3374-3387.

[7] KAPLAN M M, GERSHWIN M E. Primary biliary cirrhosis[J]. *N Engl J Med*, 2006, 353(3): 313.

[8] GERSHWIN M, MACKAY I R, STURGESS A, et al. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kD mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis[J]. *J Immunol*, 1987, 138(10): 3525-3531.

[9] INVERNIZZI P, LLEO A, PODDA M. Interpreting serological tests in diagnosing autoimmune liver diseases[J]. *Semin Liver Dis*, 2007, 27(2): 161-172.

[10] MURATORI L, GRANITO A, MURATORI P, et al. Antimitochondrial antibodies and other antibodies in primary biliary cirrhosis: diagnostic and prognostic value[J]. *Clin Liver Dis*, 2008, 12(2): 261-276.

[11] PREUSS B, BERG C, DENGJEL J, et al. Relevance of the inner mitochondrial membrane enzyme F1F0-ATPase as an autoantigen in autoimmune liver disorders[J]. *Liver International*, 2012, 32(2): 249-257.

[12] ZOGRAFOS T, GATSELIS N, ZACHOU K, et al. Primary biliary cirrhosis specific auto-antibodies in first degree relatives of Greek primary biliary cirrhosis patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(34): 4721-4728.

(收稿日期: 2017-09-12 修回日期: 2017-11-02)

(上接第 1175 页)

[16] ZENG C, XU Y, XU L, et al. Inhibition of long non-coding RNA NEAT1 impairs myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia cells[J]. *BMC Cancer*, 2014, 23(14): 693.

[17] WU S, ZHENG C, CHEN S, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts a poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(4): 2410-2414.

[18] DE CLARA E, GOURVEST M, MA H, et al. Long non-coding RNA expression profile in cytogenetically normal acute myeloid leukemia identifies a distinct signature and a new biomarker in NPM1-mutated patients[J]. *Haematologica*, 2017, 102(10): 1718-1726.

[19] CHEN L, WANG W, CAO L, et al. Long Non-Coding RNA CCAT1 Acts as a competing endogenous RNA to regulate cell growth and differentiation in acute myeloid leukemia[J]. *Mol Cells*, 2016, 39(4): 330-336.

[20] FU L, FU H, QIAO J, et al. High expression of CPNE3 predicts adverse prognosis in acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(9): 1850-1857.

[21] PAPAIOANNOU D, SHEN C, NICOLET D, et al. Prog-

nostic and biological significance of the proangiogenic factor EGFL7 in acute myeloid leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(23): 4641-4647.

[22] 罗代平. 血清可溶性 CD44 检测对急性髓系白血病的诊断分型价值研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(13): 1790-1792.

[23] MA X J, ZHANG F H, SU L. HSP90 and HSP90alpha in Serum of Patients with Acute Leukemia [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2017, 25(5): 1384-1389.

[24] RAZA S K, SALEEM M, SHAMSI T, et al. 5D proteomic approach for the biomarker search in plasma: Acute myeloid leukaemia as a case study[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16440.

[25] 王爱萍. 血清 IL-10、IL-12 和 IFN- γ 水平对急性白血病的诊断价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(16): 2290-2292.

[26] ANAGNOSTOPOULOU E, PAPANASTASOPOULOU C, PAPANASTAMATAKI M, et al. Serum hyaluronic acid levels are altered in acute leukemia patients: potential prognostic implications [J]. *Acta Haematol*, 2017, 138(1): 44-51.

(收稿日期: 2017-11-28 修回日期: 2018-01-08)