

日本鳗鲡 UNAG 蛋白的克隆及其在非结合胆红素检测中的应用

刘晋强, 李增鹏, 陈建明

(国家海洋局第三海洋研究所、国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要:血清中非结合胆红素含量升高与新生儿脑损伤的发展相关,但目前临床上没有方法可以直接测定非结合胆红素的血清水平.从日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)中成功克隆了其 UNAG 基因,在原核细胞中成功表达 UNAG 重组蛋白,并通过 Ni^{2+} -NTA 进行纯化得到含量为 1.8 mg/cm^3 的 UNAG 目的蛋白,银染检测说明其纯度较高.利用该基因可以与非结合胆红素结合并发光的特异性,设计了一种新型的非结合胆红素检测方法,结果表明 UNAG 发光值与胆红素浓度呈良好的线性关系,回归方程为 $Y = 17.96 X + 4.3333 (R = 0.9949)$. 该法可用于胆红素浓度的测定.

关键词:海洋生物学;胆红素;日本鳗鲡;UNAG 基因;分子克隆;检测

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 03. 014

中图分类号:P735

文献标识码:B

文章编号:2095-4972(2018)03-0413-05

胆红素是由四个吡咯环通过分子中央的 2-次甲基桥相连而成的复杂线形有机化合物,是血红素的代谢产物.在血液中,胆红素的存在有结合胆红素和非结合胆红素两种形式,结合胆红素的紫外吸收峰为 422 nm,非结合胆红素的紫外吸收峰为 459 nm.正常生理条件下,结合胆红素与白蛋白形成非共价的可逆结合,但在部分肝脏病人血液中,胆红素与白蛋白以共价键结合,形成紫外吸收峰为 433 nm 的中间物质^[1-3].总胆红素是结合胆红素与非结合胆红素的总和,主要经肝脏代谢,其测定在科学实验和临床上都有着重要的意义,是一项重要的常规肝功能测定指标^[4].胆红素生理性降低常见于孕妇,也与冠心病危险增加密切相关.其监测对于新生儿,尤其是早产儿极为重要.此时肝细胞内胆红素代谢常常不成熟,由于非结合胆红素上升而引起的黄疸在临床上很常见.非结合胆红素如未能与白蛋白结合,则极易通过血脑屏障,增加脑损伤的危险^[5].

目前临床常用测定胆红素的方法有重氮试剂法、化学氧化法、胆红素氧化酶终点法等.重氮试剂法应用最早,但线性关系较差,质量不好控制,结果重复性差.化学氧化法近年来发展比较迅速,但实验

结果易受干扰,常出现负值.酶法测定是现今最先进的办法,呈良好的线性关系,近几年备受业界推崇.然而,目前常用的胆红素氧化酶终点法计算公式繁琐,反应时间长,也易受血清本底干扰,只在高端市场使用,并未大面积推广.以上方法均为终点法测定,虽广泛应用,但有一个共同的缺点,即易受血清本底干扰,大大影响了结果的准确性^[6-10].最近有文献报道日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)的 UNAG 基因可以与胆红素结合并发光^[11],鉴于此我们从日本鳗鲡中成功克隆了其 UNAG 基因,并利用该基因可以与胆红素结合并发光的特性设计了一种新型的非结合胆红素检测方法.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 日本鳗鲡(俗名风鳗、白鳗、青鳗)为脊索动物门、硬骨鱼纲、鳗鲡目、鳗鲡亚目、鳗鲡科的一种中小型鱼类.广布于日本北海道至菲律宾间的西太平洋水域,主要在越南、菲律宾、中国、朝鲜半岛和日本列岛.本实验所用日本鳗鲡购自厦门第八市场.

收稿日期:2017-11-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(41606160);国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费资助项目(2015011)

作者简介:刘晋强(1992—),男,大专;E-mail:ljqxj@163.com

通讯作者:李增鹏(1984—),男,博士;E-mail:lizengpeng@tio.org.cn

1.1.2 酶、生化试剂、药品和试剂盒 海洋动物组织基因组 RNA 提取试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自北京天根公司,分子克隆所用到的限制性内切酶、cDNA 合成试剂盒、DNA 标准分子量 Marker Primer STAR HS DNA Mix、Exonuclease III 购自大连宝生 (Takara) 生物工程公司. 蛋白分析相关试剂 BAC Protein Assay Kit、Stained Protein Molecular Weight Marker 购自 Thermo 公司. pET-28a 载体购自北京索来宝科技有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 日本鳗鲡总 RNA 提取 日本鳗鲡鱼肌肉剪成小块,在装有液氮的研钵中研磨成粉末,取 100 mg 肌肉组织粉末放入 RNase-free 的离心管中,加入 1 cm³ Trizol,充分混匀;室温放置 5 min,加入 200 mm³ 氯仿,剧烈振荡 15 s 左右以充分混匀;离心 10 min (4℃, 12 000 r/min),取上清到新的 RNase-free 离心管里,切忌不能取到沉淀物;加入等体积的异丙

醇,混匀,室温放置 10 min;再次离心 10 min (4℃, 12 000 r/min),小心地弃去上清;加入 1 cm³ 75% 乙醇,涡旋振荡使沉淀均匀,将其中杂质溶解于乙醇,室温放置 10 min. 离心 5 min (4℃, 12 000 r/min),去上清;重复操作一次,弃去上清,室温倒扣管子或真空中干燥 5 ~ 10 min (干燥时间不宜过长,容易影响 RNA 的浓度);用 30 mm³ DEPC H₂O (55 ~ 60℃) 溶解 RNA,快速分装 RNA 到 RNase-free 离心管里,提取的总 RNA 通过逆转录试剂盒反转录成 cDNA.

1.2.2 UNAG 基因扩增 在 NCBI 上找到 UNAG 的基因序列,如图 1 所示,并据此设计了特异性扩增 UNAG 的引物 (UNAG-F/UNAG-R),在上下游引物 5' 端添加了 EcoRI 和 XhoI 这两个酶切位点. 上游引物 UNAG-F: CGC GGA TCC GAA TTC ATGGTTCGAGAAA TTTGTTGGCACCT,下游引物 UNAG-R: TGG TGG TGC TCG AGT TCATTCCGTCGCCCTCCGGTAGCTG. 引物合成由厦门生光生物技术公司完成.

```
ATGGTTCGAGAAATTTGTTGGCACCTGGAAGATCGCAGACAGCCATAATTTTGGTGAATACCTGAAAGCTATCGGAGCCC
CAAAGGAATTAAGCGATGGTGGGGATGCCACGACGCCGACATTGTACATCTCCAGAAGGACGGAGACAAAATGACAGT
GAAAATAGAGAATGGACCTCCTACGTTCTTGACACTCAAGTAAAGTTCAAATTAGGGGAGGAGTTCGACGAATTTCTT
TCTGATCGAAGAAAAGGCGTAAATCTGTCGTGAACCTGGTGGGAGAGAAGCTGGTGTACGTACAAAAGTGGGACGGCA
AGGAGACGACGTATGTCCGAGAGATAAAGGACGGTAAACTGGTCTGACACTTACGATGGGAGACGTCGTGGCTGTGCC
CAGCTACCGGAGGGCGACGGAATGA
```

图 1 UNAG 的基因序列

Fig. 1 Gene sequence of UNAG

用高保真 DNA 聚合酶 Primer STAR 进行 PCR,产物经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测条带正确后,按照 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (北京天根) 的说明书回收产物,并 NanoDrop 测定回收载体的浓度并标记日期,4℃ 存放备用.

1.2.3 pET28a 质粒双酶切及纯化 用 pET-28a 载体研究 UNAG 蛋白的功能,该载体大肠杆菌表达,其大小为 5 369 bp,带有 His-Tag 融合蛋白标签,在克隆 UNAG 基因时,选择了 EcoR I 和 Xho I 这两个酶切位点. 对 pET28a 质粒 37℃ 双酶切 3 ~ 4 h,将上述混合物用 1% 琼脂糖电泳,电泳结束后,胶回收目的片段;用 NanoDrop 测定回收载体的浓度并标记日期,存放 4℃ 备用.

1.2.4 Exonuclease III 介导的 LIC 高效克隆 设计引物时,目的基因引物两端添加 15 bp 与线性化载体两端互补的同源序列,包含酶切位点序列. Exonuclease III 其中有 3' 到 5' 的外切酶活性. 载体和目的片段间,只要带有足够长的同源粘性末端 (> 8 bp),经退火,转化 *E. coli*,即可获得完整的质粒

DNA.

选取 Exonuclease III 及其缓冲液,建立连接体系 (10 mm³);在离心管内,加入 50 ng 酶切后载体,100 ng 两端带有载体匹配序列 PCR 产物 (空白对照只加酶切后载体,不加 PCR 产物),1 mm³ 的 10 × Exonuclease III Buffer,补水至 10 mm³,用移液枪轻轻吹打混匀,冰浴 5 min;加入 1 mm³ Exonuclease III 外切酶 (20 U/mm³),移液枪轻轻吹打混匀,冰浴 60 min;加入 1 mm³ 0.5 mol/dm³ EDTA (pH 值为 8.0),混匀后 60℃ 水浴 5 min 终止反应;将全部反应液加入 100 mm³ DH5a 感受态细胞中,冰浴放置 30 min;42℃ 热激 45 ~ 90 s 后,在冰上放置 3 min;加入 1 cm³ 无菌的 LB 液体培养基 37℃ 摇床活化 60 min;低速离心,小心移除上清,将下来的菌体均匀涂布在含有 50 μg/cm³ 卡那霉素 (Kanamycin) 抗性的 LB 平板上,37℃ 倒置培养 12 ~ 16 h.

1.2.5 重组质粒鉴定 ① 菌落 PCR 鉴定,UNAG 重组板中挑取 5 个单克隆菌落于 10 mm³ 水中,吹打混匀,以 1 mm³ 重组质粒为模板,用引物 UNAG-F/R

进行反应. PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测条带正确后,均是正确的阳性单克隆,将剩余 9 mm^3 菌液接入 5 cm^3 含有 Kan 的 LB 培养基中, 37°C 摇床培养过夜,第二天早上取出培养基,抽提重组质粒. ② 双酶切鉴定,对重组质粒进行双酶切鉴定,确认目的片段是否已被酶切以确保重组质粒的正确性,由上海美吉生物医药科技有限公司进行测序.

1.2.6 pET28-UNAG 自诱导表达 将重组质粒 pET28-UNAG 转化大肠杆菌 BL21, 37°C 倒置培养 12 ~ 16 h;挑一单菌落,置于 5 cm^3 LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养 12 ~ 16 h;第二天,初始培养物以 1:100 的比例接种于含所需抗性 (Kan⁺) 的盛有 100 cm^3 AIM 液体培养基的 250 cm^3 三角瓶中, 37°C 、250 r/min 下培养 6 h,再转移到 28°C 进行自诱导培养至 OD_{600} 达到 10;取 1 cm^3 初始培养物和自诱导培养物,离心 1 min (12 000 r/min),弃去上清,加入 100 mm^3 SDS buffer 混匀,沸水反应 10 min;取 10 mm^3 用 SDS-PAGE 鉴定;诱导的菌体离心 10 min (4°C , 5 000 r/min),弃去上清,菌体用于下一步纯化.

1.2.7 Ni²⁺-NTA 亲和层析纯化重组蛋白 100 cm^3 菌液收集的菌体与 8 cm^3 NPI-10 裂解液 (8%, 体积占比),加入溶解酶终浓度 $1 \sim 2 \text{ mg/cm}^3$,在振荡器上重悬,冰上放置 30 min;加入终浓度 100 mg/mm^3 的 PMSF, 1% β -巯基乙醇, 10% 甘油,振荡器上重悬;在冰上超声波破碎裂解菌体,超声条件:功率 50%, 超声 5 s 间歇 5 s, 定时 15 ~ 30 min;待菌液变澄清透明后,离心 30 min (4°C , 18 000 r/min),收集上清;活化 Ni-NTA 树脂:取 1 cm^3 亲和层析树脂,用缓冲液 NPI-10 在 4°C 下平衡 60 min 后,让缓冲液流干;将超声的上清加入预先平衡的 Ni-NTA 树脂柱中于 4°C 摇动 (160 r/min) 反应 1 h;用 5 倍体积的洗涤缓冲液 NPI-20 洗脱 Ni-NTA 树脂,弃去流出液. 用 NPI-20 脱洗 2 遍,去除非结合的蛋白;用 5 倍体积的洗脱缓冲液 NPI-50 洗脱 Ni-NTA 树脂,弃去流出液. 用 NPI-50 脱洗 2 遍,去除杂蛋白;用 500 mm^3 洗脱缓冲液 NPI-250 洗脱 Ni-NTA 树脂,收集目的蛋白,储存于 -80°C 冰箱.

1.2.8 银盐染检测 UNAG 目的蛋白 取 20 mm^3 经 Ni-NTA 树脂纯化的 UNAG 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后,将凝胶取出放在固定液中,室温下置摇床上轻轻摇动 15 min,使蛋白固定;弃去固定液,加入 30% 乙醇 100 cm^3 ,轻摇 15 min;弃去乙醇,加入双蒸水 150 cm^3 ,轻摇 15 min,水洗 2 次;弃去清水,加入银染增敏液 100 cm^3 ,轻

摇 15 min;弃去银染增敏液,加入双蒸水 150 cm^3 ,清洗 2 次;弃去清水,加入银染液 100 cm^3 ,轻摇 15 min;再用双蒸水清洗 2 次;弃水,加入的银染显色液 100 cm^3 ,轻摇 5 min;待出现明显的目的条带,立即加入终止液 10 cm^3 ,摇动 5 min;弃去终止液,加入双蒸水 100 cm^3 ,摇动 15 min,存于双蒸水里或制成干胶保存.

1.2.9 UNAG 发光值与胆红素浓度之间的关系检测 根据 UNAG 能与胆红素结合并发光的特点检测二者相关性,首先取 30 cm^3 浓度分别为 0、5、10、15、20、25 g/dm^3 的胆红素作为反应溶液,平行 3 份;分别加入含有 2 nmol/dm^3 的 UNAG 蛋白稀释液 597 cm^3 混匀后,室温避光孵育 10 min;反应结束后取 200 mm^3 到 96 孔酶标板对其进行荧光检测;最后将测量出的数据进行处理,得出 UNAG 发光值与胆红素浓度呈现良好的线性关系,在 UNAG 蛋白浓度不变的情况下 UNAG 发光值与间红素浓度升高而升高,可以用于胆红素浓度测定.

2 结果与讨论

2.1 UNAG 目的蛋白的检测

用 BAC Protein Assay Kit 检测经 Ni²⁺-NTA 亲和层析纯化的重组蛋白,测得蛋白质量浓度为 1.8 mg/cm^3 . 银染结果如图 2 所示,背景干扰较少,UNAG 蛋白条带清晰、大小正确,没有出现非特异性的杂带,说明经 Ni²⁺-NTA 纯化得到了含量与纯度均较高的目的蛋白.

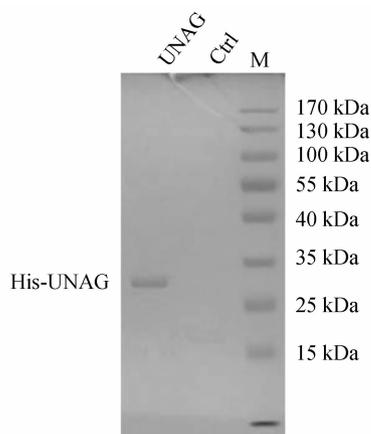


图 2 His-UNAG 融合蛋白纯化后的银染检测结果

Fig. 2 Silver staining result of His-UNAG fused with protein
M: 蛋白质电泳的标准蛋白 Marker, Ctrl: 阴性对照,
UNAG: 纯化后的 His-UNAG 融合蛋白

2.2 UNAG 发光值与胆红素浓度的线性关系

UNAG 发光值与胆红素浓度呈现良好的线性关系 (图 3), 回归方程为 $Y = 17.96 X + 4.333 3$ ($R =$

0.994 9). 当 UNAG 蛋白浓度不变时, UNAG 发光值随间红素浓度升高而升高, 该法可用于胆红素浓度的测定.

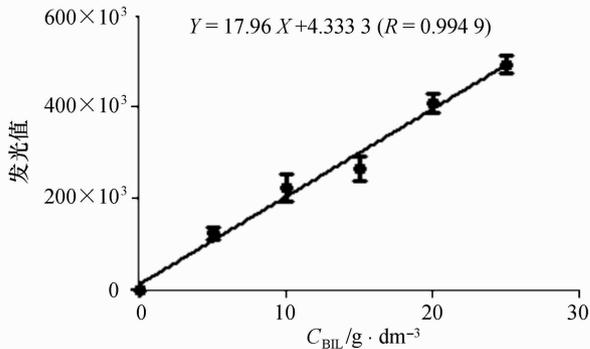


图3 UNAG 发光值与胆红素浓度(C_{BIL})的线性关系

Fig. 3 Linear relationship between the concentration of bilirubin and the fluorescence intensity of UNAG

2.3 讨论

人们从日本鳗鱼肌肉里发现了 UNAG, 这是首个从脊索动物门中已知的荧光蛋白, 同低等生荧光蛋白, 可与胆红素结合. UNAG 特性使其可用作 EGFP 的发光检测, 本实验成功诱导物和医疗应用程序相比, 其具有明显的实验优势. 同时, UNAG 蛋白也是首个被天然配体激活的了荧光蛋白编码基因的表达. 我们首先从日本鳗鲡中成功克隆了其 UNAG 基因, 在原核细胞中成功表达 UNAG 重组蛋白, 并通过 Ni^{2+} -NTA 进行纯化, 最后利用 UNAG 可以与胆红素结合并发光的特异, 提供了设计一种新型的胆红素检测试剂盒的方法, 为胆红素检测提供了一种新方法.

参考文献:

- [1] 宋克征, 沈瑛. 胆红素及检测方法研究的进展[J]. 国外医学(临床生物化学与检验学分册), 2002, 23(5): 283-284.
- [2] 杨昌国, 许叶, 张抗. 线性评价和干扰试验中 NCCLS 评价方案的应用[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(3): 184-186.
- [3] AMIN S B. Clinical assessment of bilirubin-induced neurotoxicity in premature infants[J]. Seminars in Perinatology, 2004, 28(5): 340-347.
- [4] TOKUDA K, TANIMOTO K. A new method of measuring bilirubin in serum by vanadic acid[J]. Japanese Journal of Clinical Chemistry, 1993, 22(2): 116-122.
- [5] 彭梅, 舒宇, 廖秋兰, 等. 5 种总胆红素测定试剂盒的比较分析[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(23): 1449-1450.
- [6] 张勇, 马莉. 钒酸盐氧化法和亚硝酸钠氧化法测定血清总胆红素的方法比较[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(7): 995-996.
- [7] 李巍, 于飞, 宋克征, 等. 胆红素测定若干问题的讨论[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(4): 53-54.
- [8] 陈兴明, 王颖, 李祖兰. 血清胆红素三种测定方法对比分析[J]. 解放军医药杂志, 2005, 17(1): 47-48.
- [9] 王念跃, 张永臣. 血清总胆红素测定方法的比较[J]. 临床检验杂志, 2003, 21(1): 36.
- [10] 陈薇, 胡汉宁, 贺小玲. 血清胆红素 3 种测定方法的比较[J]. 医学新知杂志, 2003, 13(2): 83-85.
- [11] KUMAGAI A, ANDO R, MIYATAKE H. A bilirubin-inducibile fluorescent protein from eel muscle[J]. Cell, 2013, 153(7): 1602-1611.

3 结论

(1) 本研究通过从日本鳗鲡中成功克隆了其 UNAG 基因, 在原核细胞中成功表达 UNAG 重组蛋白, 并用银染技术检测了通过 Ni^{2+} -NTA 纯化后的 UNAG 目的蛋白, 从实验结果可以看出其浓度和纯度均较高.

(2) 总胆红素是结合胆红素与非结合胆红素的总和, 主要经肝脏代谢, 其测定在科学实验和临床上都有着极其重要的意义. 因为血清中非结合胆红素含量升高与新生儿脑损伤的发展相关, 但目前临床上没有方法可以直接测定非结合胆红素的血清水平. 胆红素生理性降低常见于孕妇, 其监测对于新生儿, 尤其是早产儿极为重要. 利用该基因可以与非结合胆红素结合并发光的特异性, 设计了一种新型的非结合胆红素检测方法, 结果表明 UNAG 发光值与胆红素浓度呈良好的线性关系, 在 UNAG 蛋白浓度不变的情况下 UNAG 发光值与间红素浓度升高而升高, 回归方程为 $Y = 17.96 X + 4.333 3 (R = 0.994 9)$. 该法说明了表达纯化后的 UNAG 蛋白有较好的活性, 很好的验证了 UNAG 蛋白与胆红素的相关性, 也可用于胆红素浓度的测定.

(3) 本研究成功诱导物和医疗应用程序相比, 其具有明显的实验优势. 同时, UNAG 蛋白也是首个被天然配体激活的了荧光蛋白编码基因的表达. 与目前临床常用测定胆红素的方法相比, 凭借着操作简便、不易受血清干扰、重复性好的优点, UNAG 有望在临床上推广和使用, 可作为胆红素的定量及快速诊断化验, 成为新的临床检测方法.

UNAG cloning of *Anguilla japonica* and its application in the unconjugated bilirubin detection

LIU Jin-qiang, LI Zeng-peng, CHEN Jian-ming

(Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract: Increased serum levels of unconjugated bilirubin have been associated with the brain damage of newborns. However, there are no methods to directly determine the serum levels of unconjugated bilirubin in clinical. In this study, we cloned the UNAG from *Anguilla japonica*, which was then expressed in prokaryotic cell. The recombinant protein was purified by Ni^{2+} -NTA, and the concentration reached 1.8 mg/cm^3 with high purity confirmed by silver staining method. Based on the characters that UNAG can be conjugated with unconjugated bilirubin and glow, a method for the detection of unconjugated bilirubin was established. Linear relationship was fine between the concentration of UC-BR and the fluorescence intensity of UNAG and the regression equation was established as $Y = 17.96 X + 4.333 3$ ($R = 0.994 9$). The method can be applied for the detection of unconjugated bilirubin in clinic.

Key words: marine biology; bilirubin; *Anguilla japonica*; UNAG gene; molecular cloning; detection

DOI:10.3969/J. ISSN.2095-4972.2018.03.014

(责任编辑:杜俊民)