

分类号 _____
U D C _____

学 号 MX120200657
密 级 _____



硕 士 学 位 论 文

(全日制学术学位)

侧链二氧酸脱氢酶 E2 亚基硫辛酰结构域关键氨基酸多位 点突变对蛋白抗线粒体抗体识别与构象完整性影响

学 院： 环境科学与工程学院

专 业： 农业资源与环境

研 究 生： 韦慧仙

指 导 教 师： 王进军 副教授

答辩委员会主席： 殷广德 研究员

答 辩 日 期： 2024 年 6 月 4 日

**Effects of Multisite Mutations of Key Amino Acids in
Lipoyl Domain of E2 Subunit of Side Chain Dioxyate
Dehydrogenase on Anti-mitochondrial Antibody
Recognition and Conformational Integrity of Protein**

A thesis submitted to

Yangzhou University

in partial fulfillment of the requirements

for the degree of

Master of Agriculture

By

Huixian Wei

Supervisor: Prof. Jinjun Wang

Co-supervisor: Prof. Jinjun Wang

Agriculture Resources and Environment

June 2024

侧链二氧酸脱氢酶 E2 亚基硫辛酰结构域关键氨基酸多位点 突变对蛋白抗线粒体抗体识别与构象完整性影响

本论文研究得到国家自然科学基金面上项目（编号：81873877）资助。

目 录

第 1 章 前言.....	1
1.1 原发性胆汁性胆管炎概述	1
1.2 BCOADC-E2 概述	2
1.3 SDSL-EPR 技术概述	3
1.4 研究内容及技术路线.....	5
第 2 章 BCOADC-E2 多位点突变蛋白模型构建.....	7
2.1 材料.....	8
2.1.1 实验仪器	8
2.1.2 实验试剂	8
2.2 方法.....	10
2.2.1 多突变位点设计	10
2.2.2 多突变质粒构建	12
2.2.3 多突变蛋白纯化.....	15
2.3 结果与分析.....	17
2.3.1 多突变质粒测序结果.....	17
2.3.2 多突变蛋白纯化结果.....	18
2.4 小结与讨论.....	20
第 3 章 BCOADC-E2 多位点突变蛋白免疫学反应测定	22
3.1 材料.....	22
3.1.1 实验仪器	22
3.1.2 实验试剂	22
3.2 方法.....	23
3.2.1 酶联免疫吸附分析	23
3.2.2 蛋白免疫印迹检测	24
3.3 结果与分析.....	26
3.3.1 酶联免疫吸附实验结果.....	26
3.3.2 蛋白免疫印迹检测结果.....	27
3.4 小结与讨论.....	29
第 4 章 利用 SDSL-EPR 技术探究 BCOADC-E2 多位点突变蛋白构象	31
4.1 材料.....	31
4.1.1 实验仪器	31
4.1.2 实验试剂	32
4.2 方法.....	32

4.2.1 Cys 突变质粒构建	32
4.2.2 Cys 突变蛋白纯化和标签切除	33
4.2.3 波谱检测	34
4.3 结果与分析	34
4.3.1 Cys 突变质粒测序结果	34
4.3.2 Cys 突变蛋白去标签纯化结果	35
4.3.3 电子顺磁共振波谱图	36
4.4 小结与讨论	37
第 5 章 总结	39
参考文献	41

摘要

抗线粒体抗体（AMA）是原发性胆汁性胆管炎（Primary Biliary Cholangitis, PBC）的血清学标志，其识别的主要自身抗原包括丙酮酸脱氢酶复合物的 E2 亚基（PDC-E2），侧链二氧酸脱氢酶复合物的 E2 亚基（BCOADC-E2）和二氧戊二酸脱氢酶复合物的 E2 亚基（OGDC-E2）。目前检测多采用主要含 PDC-E2 的 M2 抗原制剂，然而，约 4% 至 13% 的 PBC 患者血清只识别 BCOADC-E2，而不识别 PDC-E2，这些患者在检测中极易被遗漏。此外，约 5%-10% 的 PBC 患者 AMA 检测呈现阴性，研究表明检测抗 BCOADC-E2 对于 AMA 阴性 PBC 患者的血清学诊断准确性至关重要。随着研究者们对 PBC 的探索越发深入，目前已有大量针对 PDC-E2 的综合性研究，却缺乏对 BCOADC-E2 蛋白抗原表位硫辛酰结构域的氨基酸残基进行 AMA 特异性的综合分析。已有研究表明位于 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域活性中心附近的氨基酸发生丙氨酸替换后，降低了蛋白与抗线粒体抗体 M2 亚型的特异性反应结合程度，这一发现为 PBC 的早期诊断提供新的思路。在本研究中，假设硫辛酰结构域内的特定残基维持构象完整性对 AMA 识别至关重要。研究将 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域活性中心附近关键氨基酸残基进行多位点组合突变，定义突变蛋白抗 BCOADC-E2 血清学反应性与构象完整性，探索其在 PBC 患者 AMA 检测中的意义。

首先通过 Swiss Model 工具构建了蛋白硫辛酰结构域活性中心附近的同源模型，得到 β 折叠的二级构象，观测到 4 号位谷氨酸、5 号位缬氨酸、12 号位苏氨酸、13 号位异亮氨酸关键氨基酸围绕活性中心呈现近似对称分布。系统地用丙氨酸进行多位点替换，构建具有 2、3、4 个替换位点的突变体。测序结果表明只有设计位点突变为丙氨酸，突变体构建成功。重组质粒转入大肠杆菌中进行原核表达，利用蛋白谷胱甘肽巯基转移酶（GST）标签亲和层析纯化，聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）验证 9 个多突变重组蛋白均于 50KDa 处有较粗条带，与预测的蛋白大小相同。

然后分析突变体重组蛋白对 PBC 患者血清和对照组的免疫学特异性反应程度。将 9 个突变体蛋白分别与 PBC 患者血清与对照组进行酶联免疫吸附分析（ELISA）和蛋白免疫印迹检测（Western Blot），设置 PBC 患者血清与对照组血清稀释比 1: 4000 和 1: 16000 平行对照实验。9 个多突变蛋白与 AMA-M2 特异性反应程度均低于野生型蛋白，说明 4、5、12、13 号氨基酸任意两个及两个以上被丙氨酸取代都将降低蛋白与

AMA-M2 的特异性；特异性反应程度：双突变蛋白>三突变蛋白>四突变蛋白，降低特异性反应程度随四个关键氨基酸突变位点个数呈现正相关性；四突变蛋白几乎不与血清中的 AMA-M2 发生特异性反应。即当 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域内 4、5、12、13 号氨基酸同时被丙氨酸所替代时，将大大降低该蛋白与 AMA-M2 的特异性反应；9 个多突变蛋白降低 AMA-M2 特异性反应程度能力（或不发生反应）由高至低分 5 个梯度，排序如下：pGEX-BCKD-E4A-T12A-I13A、pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A、pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-I13A > pGEX-BCKD-E4A-V5A-I13A > pGEX-BCKD-E4A-I13A、pGEX-BCKD-V5A-I13A、pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A > pGEX-BCKD-V5A-T12A>pGEX-BCKD-E4A-T12；含 13 号位点突变产生的多突变体反应程度均显著下降，表明 13 号异亮氨酸在 BCOADC-E2 识别 AMA-M2 中的重要性。

基于以上数据，再选用反应变化明显的 pGEX-BCKD-E4A-I13A 双突变体进行构象探究。对丙氨酸替换位点一侧引入半胱氨酸，经测序验证突变体 Glu4、Ile13 和 Glu4/Ile13 构建成功。经异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）诱导表达、纯化后获得电泳级纯化蛋白。硫醇特异性自旋标签（MTSSL）与半胱氨酸结合，分别自旋标记在 4 号、13 号和 4/13 双位点上，得到标记后的突变体 Glu4、Ile13 和 Glu4/Ile13，与 PBC 患者血清、对照受试者血清及空白对照反应，电子顺磁共振（EPR）测量光谱，对突变体的取代结构域进行深层探测。EPR 光谱显示，添加 PBC 病人血清后，Glu4、Ile13 光谱均适度增宽，其中 Ile13 的增宽程度更高；Glu4/Ile13 突变体光谱被严重加宽，表明具有强的偶极偶联，即 4 号和 13 号被丙氨酸替代后蛋白二级 β 折叠构象位置上的紧密性保持不变(1-1.5nm)，强调了 13 号位异亮氨酸维持 β 折叠构象在抗 BCOADC-E2 识别中的必要性。

综上，本论文是关于 AMA 识别的 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域内氨基酸残基多突变的首次全面分析，对 AMA 结合程度的研究和 EPR 分析证明了 13 号位异亮氨酸维持 β 折叠构象在抗 BCOADC-E2 识别中的必要性，为 AMA 呈现阴性和不识别 PDC-E2 的 PBC 患者的早期诊断提供参考借鉴。

关键词：侧链二氧酸脱氢酶复合物 E2 亚基；抗线粒体抗体；定点自旋标记-电子顺磁共振；早期诊断

Abstract

Antimitochondrial antibody (AMA) is a serological marker of primary biliary cholangitis (PBC). The main autoantigens recognized by AMA include pyruvate dehydrogenase complex-E2 (PDC-E2), branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex-E2 (BCOADC-E2) and oxo-glutarate dehydrogenase complex-E2 (OGDC-E2). At present, M2 antigen formulations containing mainly PDC-E2 are used. However, about 4% to 13% of serum of PBC patients only recognize BCOADC-E2, but not PDC-E2, and these patients are easily missed in the detection. In addition, about 5%-10% of PBC patients are AMA negative, and studies have shown that detection of anti-BCOADC-E2 is critical for serological diagnostic accuracy in AMA-negative PBC patients. With the deepening of the exploration of PBC, there have been a large number of comprehensive studies on PDC-E2, but there is a lack of AMA-specific comprehensive analysis of amino acid residues in the lipoyl domain of the epitope of BCOADC-E2 protein. Previous studies have shown that the amino acid near the active center of the lipoyl domain of BCOADC-E2 protein is replaced by alanine, which reduces the specific binding degree of the protein to the anti-mitochondrial antibody M2 subtype. This finding provides a new idea for the early diagnosis of PBC. In this study, it is hypothesized that the conformational integrity of specific residues within the lipoyl domain is critical for AMA recognition. In this study, the key amino acid residues near the active center of the lipoyl domain of BCOADC-E2 protein were mutated in a multi-site combination to define the serological reactivity and conformational integrity of the mutant protein against BCOADC-E2, and to explore its significance in AMA detection in PBC patients.

Firstly, the structure of active center in lipoyl domain was predicted by using the Swiss Model tool, and the second-order conformation of β -sheet was obtained. It was observed that the key amino acids at site 4, valine at site 5, threonine at site 12, and isoleucine at site 13 showed approximately symmetric distribution around the active center. The mutants with 2, 3 and 4 replacement sites were constructed by systematic substitution of alanine with multiple sites. The sequencing results showed that only the design site was mutated to alanine, and the mutant was successfully constructed. The recombinant plasmid was transferred to *E.coli* for

prokaryotic expression and purified by glutathione mercaptotransferase (GST) label affinity chromatography. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) verified that all the 9 multi-mutated recombinant proteins had rough bands at 50KDa, the same size as predicted proteins.

Then, the immunological specificity of the mutated body weight histones to the serum of PBC patients and the control group was analyzed. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot were performed on 9 mutant proteins and serum of PBC patients and control group, respectively. Parallel control experiments were set with dilution ratios of 1:400 and 1:16,000 between serum of PBC patients and control group. The specificity of AMA-M2 in 9 multi-mutant proteins was lower than that of wild-type proteins, indicating that alanine substitution of any two or more amino acids of site 4, 5, 12 and 13 would reduce the specificity of AMA-M2. The degree of specificity was double mutant protein > triple mutant protein > quadruple mutant recombinant protein, and the degree of specificity was positively correlated with the number of mutation sites of four key amino acids. The four-mutant recombinant protein hardly reacts specifically with AMA-M2 in serum. In other words, when amino acids at site 4, 5, 12 and 13 in the lipoyl domain of BCOADC-E2 protein are replaced by alanine at the same time, the specific reaction between BCOADC-E2 protein and AMA-M2 is greatly reduced. The ability of 9 multi-mutant recombinant proteins to reduce the degree of AMA-M2 specific response is divided into 5 gradients from high to low as follows: pGEX-BCKD-E4A-T12A-I13A, pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A, pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-I13A > pGEX-BCKD-E4A-V5A-I13A > pGEX-BCKD-E4A-I13A, pGEX-BCKD-V5A-I13A, pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A > pGEX-BCKD-V5A-T12A > pGEX-BCKD-E4A-T12; The degree of response of multiple mutants with site 13 mutation was significantly decreased, indicating the importance of isoleucine at site 13 in BCOADC-E2 recognition of AMA-M2.

Based on the above data, the pGEX-BCKD-E4A-I13A double mutant with obvious reaction changes was selected for conformational exploration. Cysteine was introduced into one side of the alanine replacement site, and the mutant Glu4, Ile13 and Glu4/Ile13 were successfully constructed by sequencing. The protein was induced by isopropyl thiogalactoside (IPTG) and purified by electrophoresis. Thiol-specific spin label (MTSSL) was combined with cysteine, and the labeled mutants Glu4, Ile13 and Glu4/Ile13 were obtained at double sites 4, 13 and 4/13, respectively. The labeled mutants reacted with serum of PBC patients, serum of

control subjects and blank control, and the spectra were measured by electron EPR. The substitution domain of mutant was investigated in depth. EPR spectra showed that Glu4 and Ile13 spectra were moderately widened after the addition of serum from PBC patients, and the widening degree of Ile13 was higher. The spectra of Glu4/Ile13 mutants were severely widened, indicating strong dipole coupling, which means that the conformational position of the protein's secondary β -sheet remained unchanged (1-1.5nm) after glutamate at site 4 and isoleucine at site 13 were replaced by alanine, underlining the necessity of lactone ring structure for anti-BCOADC-E2 recognition.

In summary, this paper is the first comprehensive analysis of amino acid residue mutations in the thioctyl domain of BCOADC-E2 protein recognized by AMA. Studies on the binding degree of AMA and EPR analysis demonstrate the necessity of β -sheet in anti-BCOADC-E2 recognition. To provide reference for the early diagnosis of PBC patients with negative AMA and no recognition of PDC-E2.

Key words: BCOADC-E2 protein; AMA; SDSL-EPR; Early diagnosis

符号说明

中文全称	英文全称	缩写词
千克	Kilogram	kg
克	Gram	g
毫克	Milligram	mg
微克	Microgram	μg
纳克	Nanogram	ng
升	Liter	L
毫升	Milliliter	mL
微升	Microliter	μL
小时	Hour	h
分钟	Minute	min
秒	Second	s
伏特	Volt	V
摄氏度	Degree celsius	$^{\circ}\text{C}$
摩尔	Mole	M
毫摩尔	Millimole	mM
微摩尔	Micromole	μM
解链温度	Melting temperature	T_m
转每分	Revolutions per minute	rpm
微米	Micrometer	μm
单位	Unit	U

中英文对照表

中文名称	英文缩写
原发性胆汁性胆管炎	PBC
抗线粒体抗体	AMA
抗线粒体抗体M2亚型	AMA-M2
熊去氧胆酸	UDCA
二氧酸脱氢酶复合物	2-OADC
丙酮酸脱氢酶复合物的E2亚基	PDC-E2
侧链二氧酸脱氢酶复合体E2 亚基	BCOADC-E2
二氧戊二酸脱氢酶复合物的E2亚基	OGDC-E2
谷胱甘肽巯基转移酶	GST
聚丙烯酰胺凝胶电泳	SDS-PAGE
氨苄青霉素抗性基因	Amp ^R
异丙基硫代半乳糖苷	IPTG
酶联免疫吸附分析	ELISA
蛋白质免疫印迹检测	Western Blot
还原型谷胱甘肽	GSH
二甲基甲酰胺	DMF
硫醇特异性自旋标签	MTSSL

第1章 前言

1.1 原发性胆汁性胆管炎概述

原发性胆汁性胆管炎（PBC）是一类自身免疫性疾病，伴随肝内胆管破坏并有炎症性瘢痕形成，最终导致肝纤维化及肝硬化^[1]。该病曾被命名为原发性胆汁性肝硬化，由于大部分 PBC 病人从临床检验指标和形态学的改变上观察，还未到肝硬化的程度，为减轻患者心理负担，故更名为原发性胆汁性胆管炎^[2]。PBC 在全球范围内发病率高，且发病机制尚未明确^[3-5]。据美国肝病协会统计，PBC 总体患病率约为每十万人中有 1.9~4.2，在我国，这个数值则更加庞大，根据 2022 年我国发布的罕见病发病率报告，PBC 患病率约为 20.5/10 万，位居亚太地区第二，且近年来这个数据还在不断上升^[6-8]。PBC 患病多见于 40~60 岁的女性，女性患病率远高于男性^[9]。研究普遍认为 PBC 的发生与对线粒体抗原免疫耐受的丧失密切相关，包括随之产生的对体液和细胞的关节免疫反应^[10,11]。环境因素和遗传变异都会增加 PBC 的易感性^[12]。胆道上皮细胞常被认为是 PBC 免疫攻击的靶点，胆管细胞分化、衰老、应激和 DNA 损伤在 PBC 的发病机制中起着一定作用^[13-15]。

PBC 最常见的症状是疲劳与瘙痒，其诊断基于胆汁淤积的实验室特征或线粒体抗体阳性，需依据生化、免疫学、影像学及组织学检查综合评估，大多数患者在诊断时无明显症状^[6]。根据 2022 版亚太肝脏研究协会《PBC 临床诊疗指南》^[16]推荐，当满足以下三条标准中的两条或两条以上时，即可确诊为 PBC：（1）反映胆汁淤积的生化指标升高，并且影像学检查排除了肝内外胆道梗阻；（2）AMA 阳性，或其他 PBC 特异性抗核抗体阳性；（3）肝组织活检提示主要累及小叶间胆管的非化脓性破坏性胆管炎。需要注意的是，临床上对 PBC 的诊断主要依赖于血清 AMA，抗体可以穿过细胞膜并与细胞内蛋白质相互作用，随后诱导细胞凋亡。在 PBC 患者中，检测 AMA 阳性率达到 95%，AMA 被认为是 PBC 的标志^[17,18]。但仅凭 AMAs/AMA-M2 阳性并不能诊断 PBC。有研究表明，多种肝内及肝外疾病均可发生 AMAs/AMA-M2 阳性，而 AMA-M2 滴度在其他疾病中的水平低于 PBC^[19]。此外，AMA/AMA-M2 阳性并不是一定会进展为 PBC，其 3、5 和 10 年发展的总体累积发病率分别仅为 1.63%、4.2%和 7.5%。最近

研究发现, AMA 阳性即使伴碱性磷酸酶和谷氨酰转肽酶升高也不一定是 PBC, 该症状也可见于多种肝内及肝外疾病, 经过积极治疗原发疾病, 其碱性磷酸酶和谷氨酰转肽酶也可得到改善, 甚至完全恢复正常。据统计, 仍有约 5%-10% 的 PBC 患者具有 PBC 的临床、生化和组织学特征, 同时在目前任何方法的检测中 AMA 都呈现阴性。对这类 PBC 患者的研究表明, 免疫荧光检测到的抗核抗体明显比 AMA 阳性患者更常见, 因此有人建议将这种免疫学上不同的综合征称为“免疫性胆管炎”或“自身免疫性胆管病”。然而, AMA 阴性 PBC 和自身免疫性胆管病是否相同仍然存在争议。此外, 对抗细胞内蛋白的自身抗体可能通过形成免疫复合物的方式而导致组织损伤, 该复合物含有从垂死细胞释放的细胞内蛋白。尽管有报道称 PBC 患者体内存在高浓度的循环免疫复合物, 但迄今为止, 还没有报道由 AMA 及其抗原所形成的免疫复合物的存在^[20, 21]。基于以上种种原因, PBC 至今难以被准确诊断。

PBC 患者中位生存期约为 9 年, 美国肝病研究协会和欧洲肝脏研究协会均推荐应用吗替考酚酯联合熊去氧胆酸 (UDCA) 作为 PBC 的首选治疗方法^[22-25]。过去的研究表明, 肝纤维化程度是对 UDCA 反应不足的预测指标。然而, 研究发现 UDCA 仅可延缓病情, 在中后期治疗中作用效果并不明显, 并未降低 PBC 患者的总体死亡率, 也并未存在肝移植、皮肤瘙痒或疲劳方面的益处^[26-33]。高达 40% 的 PBC 患者对 UDCA 治疗应答不佳, 急需寻找新的药物靶点, 开发新型治疗药物。胆汁酸代谢在体内存在多个关键调节靶点, 如法尼酯衍生物 X 受体 (FXR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 和回肠胆汁酸转运体 (IBAT) 等, 这些靶点可通过不同途径达到治疗或改善 PBC 的作用, 是目前最有潜力的药物靶点, 目前仍在进行临床试验阶段^[34-37]。因此, 早期诊断对原发性胆汁性胆管炎依旧非常重要。

1.2 BCOADC-E2 概述

血清抗线粒体抗体 AMA 共有 M1~M9 九种亚型, 在 PBC 患者血清中, M2 亚型为主要的反应成分, 其识别的自身抗原被鉴定为 2-OADC 的 E2 亚基^[38-46]。随着对 PBC 的研究深入发展, 越来越多的证据表明, 对 2-OADC 的 E2 亚基的免疫应答失常是 PBC 发生的关键^[13, 47-49]。这些自身抗原主要包括 PDC-E2、BCOADC-E2, OGDC-E2^[50, 51]。在这些酶组分中, PBC 患者血清中 PDC-E2 和 BCOADC-E2 与 AMA 的反应频率高于其他 M2 抗原。PDC-E2 是 PBC 的主要自身抗原, 约 80%-90% 患者的血清样本中含有

PDC-E2 特异性 AMA。只有少数 PBC 患者血清仅对 PDC-E2 有反应,绝大部分患者对 OGDC-E2 (39-88%) 或 BCOADC-E2 (53-55%) 也发生特异性反应。然而,在临床中发现约 4%至 13%的 PBC 患者的血清只识别 BCOADC-E2,而不识别 PDC-E2,这些患者在主要含 PDC-E2 的 M2 抗原制剂检测中极易被遗漏。Hiroshi Miyakawa 等人的研究采用免疫印迹法和 ELISA 法检测了两种主要的抗 M2 抗体(抗 PDC-E2 和抗 BCOADC-E2),并比较了 38 例免疫荧光抗线粒体抗体 (AMA) 阴性的 PBC 患者和 39 例抗线粒体抗体强烈阳性的 PBC 患者的结果。以牛心脏线粒体部分为抗原,在 AMA 阴性 PBC 患者和典型的高滴度 AMA 阳性 PBC 患者之间进行比较,得出结论显示检测抗 BCOADC-E2 对于准确诊断 AMA 呈现阴性的 PBC 患者至关重要^[52]。

BCOADC 围绕一个包含 E2 亚基的结构核心组成, E1、E3 和特异性激酶与 E2 亚基相连,这种结构与 2-OADC 的其他组分非常相似^[53, 54]。哺乳动物 BCOADC 蛋白的 E2 亚基包含三个折叠结构域:一个脂酰结合域,一个 E3 结合域和一个内核域。含有脂酰结合位点的硫辛酰结构域参与转酰基化反应和活性位点偶联,并含有可被 PBC 患者血清识别的自身表位。Patrick Leung 等^[41]通过来自于牛的 BCOADC-E2 互补 DNA (cDNA),在 PBC 患者中定位了 BCOADC-E2 特异性识别 AMA 的表位在硫辛酰结构域内,与 PDC-E2 识别表位区域相同。对 BCOADC-E2 的化学修饰将会产生新的抗原,我们假设在 BCOADC-E2 中,在硫辛酰结构域区域进行丙氨酸诱变扫描来化学修饰将改变其 AMA 特异性。

1.3 SDSL-EPR 技术概述

电子顺磁共振技术 (Electron Paramagnetic Resonance, EPR),也称电子自旋共振 (Electron Spin Resonance, ESR),应用于直接检测生物体中存在的各种顺磁性物质,如金属辅酶因子、活性氧及其他结构中含未成对电子的分子^[55-57]。通过定点自旋标记 (Site-Directed Spin Label, SDSL),EPR 的应用可扩展到天然抗磁性样品的检测^[58-60]。SDSL-EPR 法最初于 1965 年由 McConnell H.M.发现,并在 Hubbell 的研究下进一步发展^[60-62]。其基于一个顺磁标签在生物分子特定位置上的共价附着来进行连续波 EPR 或脉冲 EPR^[58, 59, 63, 64]。目前已研究出多种自旋标签:过渡金属离子、氮氧化物、三烷基自由基^[65-67]。其中氮氧化物标签是杂环自由基,具有高度稳定性和独特的检测局部结构的能力,是 SDSL-EPR 用于生物分子结构研究中最常见的一类自旋标签。

氮氧化物标签可通过特定的反应连接物增加功能团来共价附着在氨基酸的侧链上,如硫代磺酸盐、马来酰亚胺或碘乙酰胺基团。这些基团在合成过程中被引入到氮氧化物的杂环上,与半胱氨酸残基的巯基选择性反应,形成共价 S-S 或 C-S 键^[58]。随着 EPR 研究的发展,使用不同标记位点的各类型 SDSL-EPR 方法已被开发出来以扩大该方法的适用性,如酪氨酸^[68]、非天然氨基酸^[69-71]或肽合成^[72, 73]。

氨基自旋标签连续波 EPR 光谱的一般原理为: EPR 光谱学是基于放置在外部磁场中的顺磁物质对电磁波谱微波区辐射的吸收。以 $S = 1/2$ 的单个自由电子为例,在没有外场的情况下自由电子自旋的两个方向(分别为 $M_s = +1/2$ 和 $M_s = -1/2$)表现出相同的能量。在静磁场存在的条件下,磁性组分与磁场平行或反平行排列,导致自旋能态不再简并(塞曼效应)。两个能级之间的能量差(ΔE)可以表示为: $\Delta E = g \beta B$, 其中 β 是玻尔磁子($9.24 \times 10^{-24} \text{J T}^{-1}$), B 是外部磁场。 g 因子决定了共振场的位置,它描述了顺磁系统在外部磁场中的电子构型和方向(对于自由电子 $g \approx 2.0023$)。在连续波 EPR 实验中,样品被连续微波照射后,通过线性改变外磁场,并记录下电磁波的吸收。共振现象发生时,发射的能量正好符合两个能级之间的能量差(ΔE),产生了方程: $\Delta E = h \nu = g \beta B$, 其中 h 是普朗克常数, ν 微波频率,例如 9.8GHz 为 X 波段, 34GHz 为 Q 波段和 95GHz 为 W 波段。

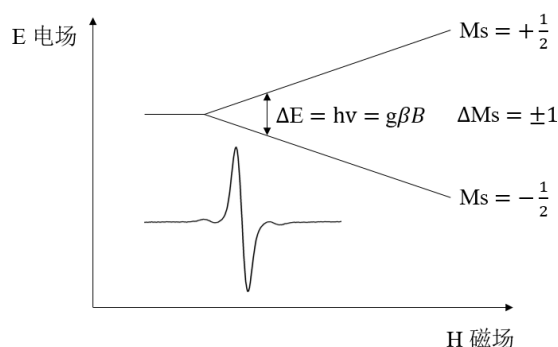


图 1-1 EPR 原理图

目前 SDSL-EPR 光谱在表征蛋白质其他生物大分子的相互作用中已被广泛运用^[74-77]。以 EPR 光谱分析 T7 内切酶 I 的 N 端区域与 DNA 的相互作用^[78]。该酶与四方向交叉 DNA 结合,在双链断裂修复中起核心作用。由于 N 端区域的灵活性,过去 X 射线晶体学研究未能完全定义内切酶 I 与核苷酸的相互作用。通过在 N 端结构域的 10 个位点上引入 MTSSL 自旋标签,研究溶液中带和不带 DNA 的标记突变体的 EPR 光谱。在

没有核苷酸的情况下,光谱是清晰的,表明具有很大的灵活性,而 DNA 的加入使光谱在 7 和 14 号位置之间变宽。利用 EPR 实验能够识别 DNA 结合时内切酶 IN 端区域的无序到有序过渡,揭示其在修复过程中的作用。

1.4 研究内容及技术路线

针对缺乏 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域 β 折叠区的氨基酸残基对 AMA 特异性的综合分析问题,本研究假设硫辛酰结构域内的特定残基通过维持构象完整性对 AMA 识别至关重要,首先利用 Swiss Model 对 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域活性中心附近进行同源建模,观测关键氨基酸在蛋白空间结构上的分布特点,以此为依据用丙氨酸替换硫辛酰结构域的 4 个关键氨基酸,构建具有 2 个、3 个和 4 个替换的突变体,并分析这些多位点突变体对 PBC 患者血清和对照血清的反应特性。利用硫醇特异性自旋标记和电子顺磁共振(EPR)对 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域进行探测。研究内容共分为三个部分,具体如下:

(1) BCOADC-E2 多位点突变蛋白模型构建:选用 Swiss Model 工具对 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域活动中心赖氨酸前后氨基酸进行同源建模,观测 4 号位谷氨酸、5 号位缬氨酸、12 号位苏氨酸、13 号位异亮氨酸在整个蛋白的空间构象分布情况,设计多突变组合。利用 PCR 技术进行定点突变,获得多位点突变质粒。测序验证突变产物正确性。将含有点突变质粒转入大肠杆菌,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)对目的蛋白进行诱导表达。目的蛋白在菌体内的表达形式为带有 GST 标签的融合蛋白,利用 GST 蛋白的特异性结合纯化蛋白。

(2) BCOADC-E2 多位点突变蛋白免疫学反应测定:将多突变重组蛋白分别进行一抗血清为 1:4000 和 1:16000 稀释度的间接 ELISA 测定和 Western Blot 检验,根据多突变重组蛋白对 9 个 PBC 患者和对照组的血清学反应,检测不同组合的多位点突变对 BCOADC-E2 蛋白与 AMA-M2 特异性结合的影响。

(3) 利用 SDSL-EPR 探究 BCOADC-E2 多位点突变蛋白构象:围绕 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域关键氨基酸,选取免疫特异性结合显著降低的突变体,在其突变位点一侧引入半胱氨酸,使自旋标记物 MTSSL 定位至重组蛋白被丙氨酸替换的位点上,设置 PBC 患者血清、对照受试者血清样本和空白对照处理,通过电子顺磁共振 EPR 技术分析不同重组蛋白突变体硫辛酰结构域波谱,探究蛋白构象完整性对 AMA 识别重

要性。

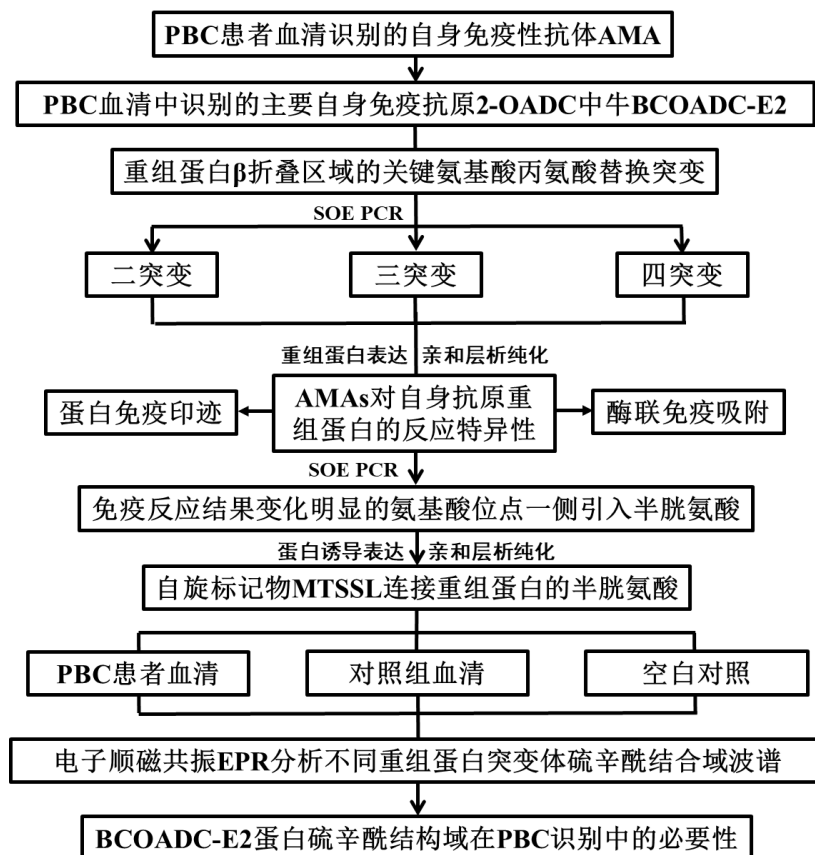


图 1-2 技术路线

第2章 BCOADC-E2 多位点突变蛋白模型构建

利用丙氨酸扫描进行定点突变来开展分子生物学研究已成为研究热点。李梦等^[79]利用丙氨酸扫描发现镇痛多肽 CPR 第 5 位谷氨酸突变成丙氨酸将提高多肽约 20% 的镇痛活性,同时第 8 号位谷氨酰胺突变则降低 17% 的镇痛活性,从而推断第 5 位谷氨酸和第 8 位谷氨酰胺为该多肽关键氨基酸,这一结果与 Konno 等^[80]的研究一致。有研究对与 ATP 磷酸盐和金属辅因子结合的活性位点成分进行了丙氨酸扫描突变,发现 K170A、E227A、K326A 和 R149A 触发了活性位点的不良变化,包括 ATP 磷酸盐的位错,与 ATP 的接触改变,以及金属离子的数量和位置的变化,使活性位点扭曲到与赖氨酸腺苷化不匹配的非通路状态^[81]。每一种丙氨酸突变都会引起连接酶活性位点的独特通路外畸变,阐明了连接酶活性位点在与 ATP 和金属相互作用中的巨大可塑性。研究利用丙氨酸扫描技术,将 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域活性中心赖氨酸(K)前后 4 位关键氨基酸进一步多突变为中性的丙氨酸,观察蛋白功能与结构是否因多突变而改变或者失去。

野生型重组质粒 pGEX-BCKD 在前期实验中已构建完成,其中 BCKD 为人 BCOADC-E2 的牛的同源基因,与 pGEX-4T1 组合成 pGEX-BCKD。同时包含了融合蛋白标签 GST 和氨苄青霉素抗性基因 Amp^R, GST 标签利于分离纯化蛋白,含 Amp^R 重组质粒的大肠杆菌可在含氨苄青霉素的培养基上生长,既能具有一定的筛选转化成功的感受态细胞作用,且能够防止培养基被杂菌污染。野生型蛋白 pGEX-BCKD 的氨基酸序列见表 2-1。

表 2-1 野生型蛋白 pGEX-BCKD 氨基酸序列

蛋白名称	氨基酸序列
野生型蛋白	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFEL GLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEG AVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNG DHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYL
pGEX-BCKD	KSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSGQIVQFKLSDIGEGIR EVTVKEWYVKEGDTVQSQFDSICEVQSDKASVTITSRYDGVIKKLYYNL DDTAYVGKPLVDIETEALKDSEEDVVETPAVSHDEHTHQEIKGQKTLAT PAVRRGSPEFPGRLERPHRD

2.1 材料

2.1.1 实验仪器

表 2-2 实验仪器

实验仪器	仪器公司	实验仪器	仪器公司
T100 梯度 PCR 仪	美国 Bio-Rad	超高速离心机	德国 Eppendorf
紫外分光光度计	苏州岛津仪器	漩涡震荡仪	奥然科技
迷你离心机	其林贝尔	单人超净工作台	上海苏净实业
电热恒温培养箱	上海三发科学仪器	紫外凝胶成像仪	上海培清科技
恒温摇床	一恒科学仪器	高压蒸汽灭菌锅	日本 Tomy Kogyo
超纯水仪	四川优普超纯科技	电热恒温水浴锅	国华电器
垂直电泳仪	美国 Bio-Rad	制冰机	意大利 Scotsman
电转槽	美国 Bio-Rad	OD-1000 超微量分光光度计	美国 Thermo Fisher
落地离心机	日本 HITACHI	超声波细胞破碎仪	宁波新芝
pH 检测仪	上海梅特勒-托利多仪器	金属浴锅	美国 Thermo Fisher
移液枪	德国 Eppendorf	- 80℃ 冰箱	美国 Thermo Fisher

2.1.2 实验试剂

表 2-3 实验材料与试剂

试剂与材料	来源/配制
SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、引物缓冲溶液 Elution Buffer (2.5mM Tris-HCL, pH 8.5)、2×SDS-PAGE 上样缓冲液、TureColor 双色预染蛋白 Marker、GST 琼脂糖纯化树脂	上海生工生物股份有限公司

续上表

试剂与材料	来源/配制
感受态细胞、无核酸酶水、2×TransStart FastPfu Fly PCR SuperMix 突变预混液、限制性 DpnI 酶	北京全式金生物技术有限公司
氨苄青霉素溶液 (100mg/mL)	称取 1.00g 氨苄青霉素粉末充分溶解于 8mL 超纯水中，定容至 10mL，混匀
50mg/mL 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 溶液	称取 0.5040g IPTG，去离子水定容至 10mL，0.22μm 过滤器过滤除菌，-20℃保存
0.5M Tris-HCl	称取 6.05g 三羟甲基氨基甲烷，去离子水定容至 100mL，用盐酸调 pH 至 8.0，4℃保存
10%十二烷基硫酸钠	称取 10.00g 十二烷基硫酸钠，溶于 90mL 超纯水中，4℃保存
10%过硫酸铵	称取 1.00g 过硫酸铵，去离子水定容至 10mL，-20℃保存
SDS-PAGE 电泳液	称取 14.40g 甘氨酸，3.00g Tris-Base，1.00g SDS，去离子水定容至 1000mL
脱色液	量取 100mL 冰醋酸和 100mL 甲醇，混合后去离子水定容至 1000mL
磷酸盐缓冲液	称取 8.00g 氯化钠，0.20g 氯化钾，1.15g 磷酸氢二钠，0.24g 磷酸二氢钾，去离子水定容至 990mL，4℃保存
Binding Buffer (结合缓冲液)	量取 100mL 磷酸盐缓冲液，加入 1mL 曲拉通 X-100，混合，4℃保存
Elution Buffer (洗脱缓冲液)	称取 0.30733g 还原型谷胱甘肽，溶解于 50mL 50mM Tris-HCl (pH8.0) 中。谷胱甘肽容易被氧化，现用现配
TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10%制胶试剂盒	美国伯乐生命医学产品有限公司 (Bio-Rad)
考马斯亮蓝 R250 染色液	南京恩晶生物科技有限公司

2.2 方法

2.2.1 多突变位点设计

将二氧酸脱氢酶复合体 E2 (BCOADC-E2) 蛋白硫辛酰结构域的活性中心赖氨酸前面 8 个氨基酸、后面 7 个氨基酸分别突变为丙氨酸，将改变 E2 蛋白与 AMA-M2 的特异性结合程度。以丝氨酸标号为 1，按次序标至第 16 号位精氨酸，本实验室前期实验已证实该区域第 4 号位氨基酸谷氨酸、5 号位氨基酸缬氨酸、12 号位氨基酸苏氨酸、13 号位氨基酸异亮氨酸单突变为丙氨酸显著降低了 BCOADC-E2 蛋白与 AMA-M2 的特异性结合程度，其四位氨基酸为 E2 蛋白的关键性氨基酸^[82]。在 Swiss model 工具中创建 Project，输入 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域活性中心赖氨酸 (K) 前后氨基酸序列，运行后等待数分钟，将搜索出数据库中与输入序列具有相似性的已知蛋白质序列，同时显示参数 GMQE 和 QMEAN，GMQE 参数可信度范围为 0-1，值越大表明质量越好，而 QMEAN 区间为-4~0，数值越接近 0，评估待测蛋白与模板蛋白的匹配度越高。硫辛酰结构域氨基酸序列在数据库中匹配的蛋白模型见图 2-1，根据图 2-1 显示该同源模型 GMQE 参数为 0.86，QMEAN 参数为 0.86 ± 0.12 ，符合可信度区间，且序列识别率达到 100%，同源建模成功。模型显示 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域第 4 号位、5 号位、12 号位、13 号位氨基酸围绕活性中心 K 赖氨酸呈现两两近似对称分布，见图 2-2。



图 2-1 Swiss Model 同源建模匹配模型

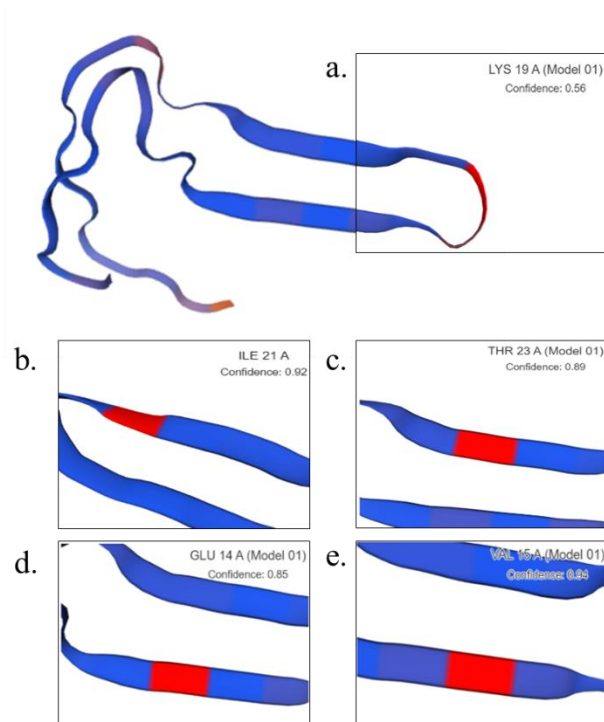


图 2-2 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域活性中心同源建模图

注：a. 活性中心赖氨酸 Lys；b. 13 号异亮氨酸 Ile；
c. 12 号苏氨酸 Thr；d. 4 号谷氨酸 Glu；e. 5 号缬氨酸 Val

在此基础上，将四位关键性氨基酸进行双突变、三突变和四突变组合，分别为：双突变 4-12、5-12、4-13、5-13，三突变 4-5-12、4-5-13、4-12-13、5-12-13，四突变 4-5-12-13，构建的 9 个多位点突变质粒分别命名为：pGEX-BCKD-E4A-T12A，pGEX-BCKD-E4A-I13A，pGEX-BCKD-V5A-T12A，pGEX-BCKD-V5A-I13A，pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A，pGEX-BCKD-E4A-V5A-I13A，pGEX-BCKD-E4A-T12A-I13A，pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A，pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-I13A。

在 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域内，被编号区域的野生型蛋白氨基酸序列为 SICEVQSDKASVTITSR，按单突变→双突变→三突变→四突变的顺序循序渐进，每次只需进行一个位点的丙氨酸突变，成功率更高，且突变可选择种类多，进一步提高了突变成功率。突变基因序列信息见表 2-4。

表 2-4 氨基酸突变前后对照表

突变类型	突变位点	编号	终序列
双突变	4、12	pGEX-BCKD-E4A-T12A	SIC <u>A</u> VQSDKASV <u>A</u> ITSR
	4、13	pGEX-BCKD-E4A-I13A	SIC <u>A</u> VQSDKASVT <u>A</u> TSR
	5、12	pGEX-BCKD-V5A-T12A	SICE <u>A</u> QSDKASV <u>A</u> ITSR
	5、13	pGEX-BCKD-V5A-I13A	SICE <u>A</u> QSDKASVT <u>A</u> TSR
三突变	4、5、12	pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A	SIC <u>AA</u> QSDKASV <u>A</u> ITSR
	4、5、13	pGEX-BCKD-E4A-V5A-I13A	SIC <u>AA</u> QSDKASVT <u>A</u> TSR
	4、12、13	pGEX-BCKD-E4A-T12A-I13A	SIC <u>A</u> VQSDKASV <u>A</u> <u>A</u> TSR
	5、12、13	pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A	SICE <u>A</u> QSDKASV <u>A</u> <u>A</u> TSR
四突变	4、5、12、13	pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-I13A	SIC <u>AA</u> QSDKASV <u>A</u> <u>A</u> TSR

2.2.2 多突变质粒构建

2.2.2.1 突变引物设计

以甲基化的质粒为 PCR 的模板，采用部分重叠引物设计，突变点位于两条引物上。引物与模板退火后合成突变链，体外限制性内切酶和体内感受态细胞消解甲基化质粒模板，从而有效筛选突变克隆，见图 2-3。研究使用 Quick Change 引物设计工具（<https://agilent.com.cn>），构建突变体所用的诱变引物序列见表 2-5。

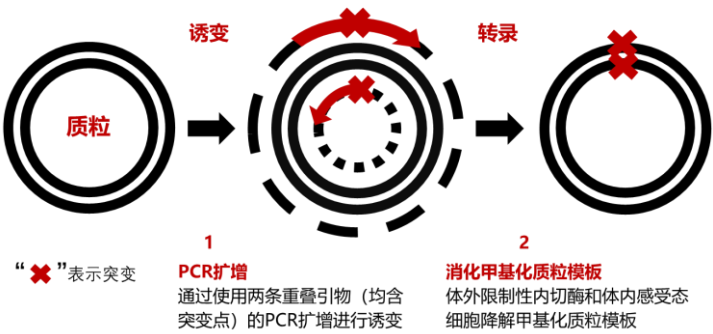


图 2-3 突变原理图

表 2-5 诱变引物序列

突变类型	编号	引物序列 (5' to 3')
双突变	pGEX-E4A-T12A	F 5'-ccatcataacgactagtgatagcaacagaagctttatcactttga-3'
		R 5'-tcaaagtgataaagcttctgttgctatcactagtcggtatgatgg-3'
	pGEX-E4A-I13A	F 5'-atgactccatcataacgactagtgagcagtaacagaagctttatcactttg-3'
		R 5'-caaagtgataaagcttctgttgctatcactagtcggtatgatggagtc-3'
	pGEX-V5A-T12A	F 5'-ccatcataacgactagtgatagcaacagaagctttatcactttga-3'
		R 5'-tcaaagtgataaagcttctgttgctatcactagtcggtatgatgg-3'
三突变	pGEX-E4A-V5A-T12A	F 5'-atgactccatcataacgactagtgagcagtaacagaagctttatcactttg-3'
		R 5'-caaagtgataaagcttctgttgctatcactagtcggtatgatggagtc-3'
	pGEX-E4A-V5A-I13A	F 5'-gaagctttatcactttgagctgcacagatgctatcaaactgag-3'
		R 5'-ctcagtttgatagcatctgtgcagctcaaagtgataaagcttc-3'
	pGEX-E4A-T12A-I13A	F 5'-gaagctttatcactttgagctgcacagatgctatcaaactgag-3'
		R 5'-ctcagtttgatagcatctgtgcagctcaaagtgataaagcttc-3'
四突变	pGEX-E4A-T12A-I13A	F 5'-cgactagtgagcagcaacagaagctttatcactttgaac-3'
		R 5'-gttcaaagtgataaagcttctgttgctgccactagtcg-3'
	pGEX-V5A-T12A-I13A	F 5'-cgactagtgagcagcaacagaagctttatcactttgagc-3'
		R 5'-gctcaaagtgataaagcttctgttgctgccactagtcg-3'
四突变	pGEX-E4A-V5A-T12A-I13A	F 5'-gactccatcataacgactagtgagcagcaacagaagctttatcactt-3'
		R 5'-aagtgataaagcttctgttgctgccactagtcggtatgatggagtc-3'

2.2.2.2 复苏菌种

从超低温冰箱中取出单突变菌液置于冰面上解冻,吸取 50 μ L 菌液至含氨苄青霉素 (100mg/mL) 的 LB 平板,涂布接种,37 $^{\circ}$ C 恒温过夜培养。接种单菌落至 5mL 含氨苄青霉素 (100mg/mL) 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C, 150rpm 摇培扩大培养。

观察扩大培养后的菌液浊度,参照 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒说明书,并根据实验室实际情况依照步骤提取质粒,具体流程见表 2-6。

表 2-6 质粒提取步骤

流程	操作步骤
菌体收集	a. 取 4mL 过夜培养的菌液,于室温,8000X g 离心 2min 收集菌体,倒尽培养基。
裂解	a. 在菌体沉淀中加入 250 μ L Buffer P1,吸打至彻底悬浮菌体。 b. 加入 250 μ L Buffer P2,立即温和颠倒离心管 5-10 次混匀,室温静置 2-4min。

续上表

流程	操作步骤
	c. 加入 350 μ L Buffer P3, 立即温和颠倒离心管 5-10 次充分混匀, 室温静置 2min 以彻底去除 RNA。
离心	a. 于离心机最大转速 20000X g 离心 5-10min。
取上清	a. 将上清液全部小心移入吸附柱, 9000X g 离心 30s, 倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。
洗涤	a. 向吸附柱中加入 500 μ L 去蛋白液 Buffer DW1, 9000X g 离心 30s, 倒掉收集管中液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。 b. 向吸附柱中加入 500 μ L Wash Solution, 9000X g 离心 30s, 倒掉收集管中液体, 将吸附柱放入同一个收集管中。 c. 加入 500 μ L Wash Solution, 9000X g 离心 30s, 倒掉收集管中液体 (重复)。
洗脱	a. 将空吸附柱和收集管放入离心机中, 于 9000X g 离心 1min。 b. 将吸附柱放入一个干净的 1.5mL 离心管中, 在吸附膜中央加入 20 μ L Elution Buffer, 室温静置 1min 后, 9000X g 离心 1min。再次加入 20 μ L Elution Buffer, 9000X g 离心 1min。保存管中 DNA 溶液。

2.2.2.3 PCR 反应体系

干粉状引物置于桌面超高速离心机中 12000X g 离心 2min, 参见 DNA 合成报告加入对应量缓冲溶液溶解引物, 加入底部后移液枪吸取并冲洗数次管内壁和边缘, 漩涡震荡仪充分混匀。参考 Fast Mutagenesis System 试剂盒 (购自北京全氏金生物有限公司) 说明书, 在无菌操作台中用无核酸酶水稀释正、反引物与质粒。PCR 反应体系如表 2-7。

表 2-7 PCR 反应体系

成分	体积	终浓度
质粒	1 μ L	0.2 μ M
正向引物	1 μ L	0.2 μ M
反向引物	1 μ L	0.2 μ M
2 $\times$ TransStart FastPfu Fly PCR SuperMix	25 μ L	1 $\times$
无核酸酶水	22 μ L	无

2.2.2.4 PCR 反应条件

参考诱变引物合成报告单和 Fast Mutagenesis System 试剂盒说明书, 设定退火温度为 60 $^{\circ}$ C, 具体反应程序见表 2-8。

表 2-8 PCR 反应程序

程序	反应温度	反应时间
预变性	94°C	5min
变性	94°C	20s
退火	60°C	20s
延伸	72°C	2min
延伸	72°C	10min
保存	4°C	∞

2.2.2.5 PCR 产物消化

于无菌操作台中吸取 10 μ L PCR 产物至一新离心管, 加入 1 μ L DpnI 酶, 吸打混匀, 迷你离心机离心数秒消气泡, 37°C 孵育 1h, 酶解模板质粒。

2.2.2.6 PCR 产物转化及菌种保存

从超低温冰箱取出 50 μ L 感受态细胞菌液, 置于冰面上解冻。在感受态细胞刚刚化冻时加入 5 μ L 突变质粒, 轻摇混匀。置于冰水中冰浴 30min, 令 DNA 吸附至细胞表面。42°C 水浴锅热激 45s, 使细胞膜释放脂质, 形成孔隙, 质粒进入细胞内部。热激结束立即置于冰面孵育 2min, 感受态细胞的孔洞消失。加入 250 μ L 已平衡至室温的 SOC 培养基 (不含氨苄青霉素), 37°C、150rpm 震荡摇培 40min, 复苏细胞。吸取 50 μ L 菌液均匀地涂布至含氨苄青霉素 (100mg/mL) 的 LB 固体培养基, 37°C 扩大培养。

观察 LB 平板菌落长势, 当形成肉眼可见单菌落时, 挑取较大单菌落接入 5mL 含氨苄青霉素 (100mg/mL) LB 液体培养基, 37°C, 150rpm 震荡摇培。吸取 400 μ L 对数生长期菌液至 200 μ L 80%甘油, -80°C 超低温保存菌种。参照 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒说明书, 并根据实验室实际情况依照步骤提取质粒, 步骤同 2.2.2.2, 送由上海生工生物有限公司测序。

2.2.3 多突变蛋白纯化

2.2.3.1 原核蛋白可溶性表达鉴定

质粒测序成功后, 从超低温冰箱中取出甘油冻存菌液, 置于冰面上解冻。在其刚刚解冻完全时, 吸取 50 μ L 菌液至含氨苄青霉素 (100mg/mL) 的 LB 平板, 涂布接种, 37°C 恒温培养。取单菌落接入 5mL 含氨苄青霉素 (100mg/mL) 的 LB 液体培养基, 37°C, 150rpm 摇培扩大培养。吸取 5mL 种子液接入 250mL 含氨苄青霉素 (100mg/mL)

的 LB 液体培养基, 37°C, 150rpm 摇培。约 5-6h 后使用紫外分光光度计测量波长 600nm 处细胞丰度, 当 OD₆₀₀ 为 0.6-0.8 时加入 0.595mL IPTG 诱导剂 (50mg/mL), IPTG 终浓度 0.5mM。设置恒温摇床 24°C, 150rpm 过夜摇培。

2.2.3.2 蛋白亲和层析纯化

5000 rpm, 4°C 离心菌液 10min。倒尽培养基, 吸取 15mL Binding Buffer 于沉淀中, 吸打数次彻底悬浮菌体沉淀, 将混合物转移至一新的 50mL 离心管中。设置细胞破碎参数为: 破碎 3s, 停 2s, 功率 25%, 总时长 30min。破碎细胞裂解液呈澄清液状。20000rpm, 4°C 离心 10min, 吸取上清液移至新的离心管, 标记为 1 号离心管备用。

使用重力纯化柱管纯化 GST 标签蛋白。将圆形筛网水平安装在柱底端, GST 琼脂糖纯化树脂完全悬浮后吸取 2mL 至重力流柱, 垂直静置待树脂沉降, 排出储存缓冲液。安装另一圆形筛网于树脂顶端, 注意圆形筛网应与树脂水平紧密接触, 旋紧底部阀门和顶部控制流速阀备用。

重力纯化柱垂直固定, 加入十倍柱体积 Binding Buffer 平衡柱子, 控制流速为 0.5-1mL/min。加入 1 号离心管中的上清液, 流速 0.5-1mL/min, 取新的离心管收集流穿液, 标记为 2 号离心管。

加入 5-10 倍柱体积 (15mL) 的 Binding Buffer 冲洗树脂, 取新的离心管收集前 1mL 流出液和最后 1mL 流出液, 分别标记为 3 号和 4 号离心管。

1.5mL Elution Buffer 洗脱 GST 标签蛋白, 控制流速 0.5-1mL/min, 重复三次, 每次用新的离心管收集洗脱液, 三次洗脱液分别标记为 5 号、6 号、7 号离心管。

3 倍柱体积 Elution Buffer 和 5 倍柱体积去离子水平衡 GST 琼脂糖纯化树脂, 再加入 5 倍柱体积的 20%乙醇平衡, 4°C 保存在等体积 20%乙醇中。

2.2.3.3 SDS-PAGE 检测

选取两块洁净干燥的制胶玻璃板, 短板、长板各一块, 参照 Bio Rad 凝胶模具说明书, 将两块玻璃板夹在制胶架上, 装配好凝胶模具。插入配套梳子, 标记梳子底端在玻璃板中的位置然后拔出。用纯水润洗小烧杯后甩干, 参照 Bio Rad TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10%试剂盒说明书配制分离胶。吸取对应 A、B 液于小烧杯中, 吸打几次混匀, 快速加入玻璃板中, 加入位置至标记点下方 0~1cm 为宜。轻轻拍动凝胶模具去除气泡, 使液面平齐。待灌胶完成, 均匀加入去离子水至玻璃板最上端, 压平分离胶。等待 30min, 观察到凝胶与纯水之间有一条分层, 则分离胶凝固完成。倒掉上层去离子水, 用吸水纸沿边缘吸干去离子水。

参照 Bio Rad TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10%试剂盒说明书配制浓缩胶, 吸打几次混匀, 用移液枪快速打入玻璃板中, 垂直、缓慢地插入梳子, 注意避免气泡产生。等待 30min。待浓缩胶凝固后, 去除制胶槽, 将玻璃板正确装载于电泳仪上, 往电泳槽内缓慢倒入 1×SDS-PAGE 电泳液, 垂直、缓慢地拔出梳子, 凝胶泡于电泳液中备用。

取出冻存的纯化蛋白, 置于冰面上解冻。在蛋白刚刚化冻完全时吸取 15μL 的 1 号~7 号管收集液至新离心管中, 加入等体积 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (2×), 振荡混匀。将蛋白与 2×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合物置于 100℃金属浴高温加热 10min, 使蛋白变性, 待其冷却至室温备用。

吸取 3-5μL 双色预染蛋白 Marker 加样于第一泳道, 吸取 10μL 处理后的蛋白样品, 依次上样至 SDS-PAGE 凝胶孔中, 每孔的蛋白上样量保持等量。电泳仪黑红极对应安装, 60V, 25min 跑胶。待样品在凝胶中被压缩成一条直线时, 调整电泳条件为 90V, 85min, 至溴酚蓝指示剂跑至凝胶底部。

取出凝胶置于考马斯亮蓝 R-250 溶液中, 脱色摇床常温缓慢摇动染色 30min。回收染液, 轻轻冲洗凝胶三遍。将凝胶浸泡于脱色液中, 摇动脱色 1h。换脱色液, 再次摇动脱色 2h。重复换脱色液步骤, 常温过夜脱色。

2.3 结果与分析

2.3.1 多突变质粒测序结果

将多突变质粒转化菌株培养后, 提取了 pGEX-BCKD-E4A-T12A, pGEX-BCKD-E4A-I13A, pGEX-BCKD-V5A-T12A, pGEX-BCKD-V5A-I13A, pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A, pGEX-BCKD-E4A-V5A-I13A, pGEX-BCKD-E4A-T12A-I13A, pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A, pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-I13A, 共 9 个多突变质粒, 送由上海生工生物股份有限公司测序, 测序结果如下 (以四突变为例)。

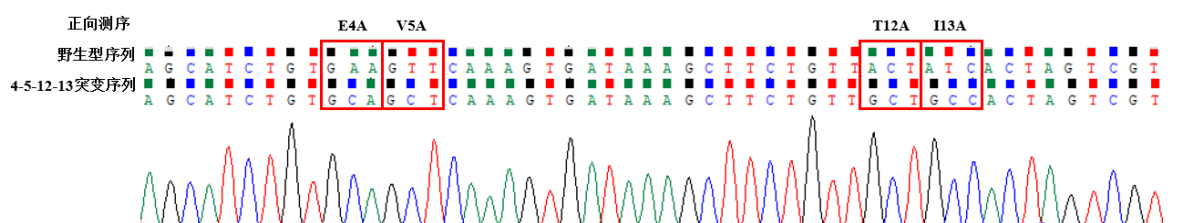


图 2-4 四突变质粒 pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-I13A 的 DNA 测序峰形图

截取四突变质粒测序峰形图从 1 号位丝氨酸 AGC 至第 16 号位精氨酸 CGT 部分。由图 2-4 可知：经 PCR 定点突变后，四突变质粒设计位点 4、5、12、13 号的碱基以最少的序列变换成功突变成丙氨酸；突变质粒有且仅有设计位点碱基发生变换，其余氨基酸保持序列数目完整且碱基不发生改变，表明四突变重组质粒构建成功；DNA 峰形图峰值明显，单一、清晰且明确，表明测序结果良好，测序结果具有说服力。

2.3.2 多突变蛋白纯化结果

根据 2.2.3.1 操作内容将测序成功的质粒转入大肠杆菌感受态细胞中，对其进行扩大培养，在菌液中加入 IPTG 诱导 GST 标签的表达，后破碎细胞，结果如图 2-5。

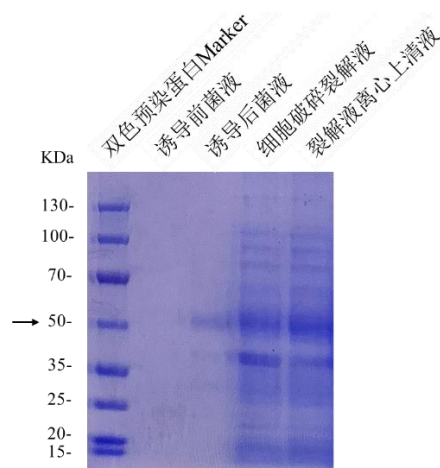


图 2-5 多突变重组蛋白表达示意图

从图 2-5 中可以看到，以 pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A 为例，诱导后细胞相比于诱导前在 50 kDa 处有增粗的条带，该条带出现的位置与目的蛋白的大小相吻合，说明该蛋白已表达。破碎后裂解液及离心后上清液中该条带依然存在并且相比于诱导后细胞，量并没有减少，说明该蛋白是可溶性表达。

根据 2.2.3.2 蛋白纯化流程，取手动纯化过柱中的 1 号至 7 号离心管收集液，变性处理后进行 SDS-PAGE 电泳。对凝胶进行考马斯亮蓝 R250 染色、脱色，所获蛋白胶结果见图 2-6。

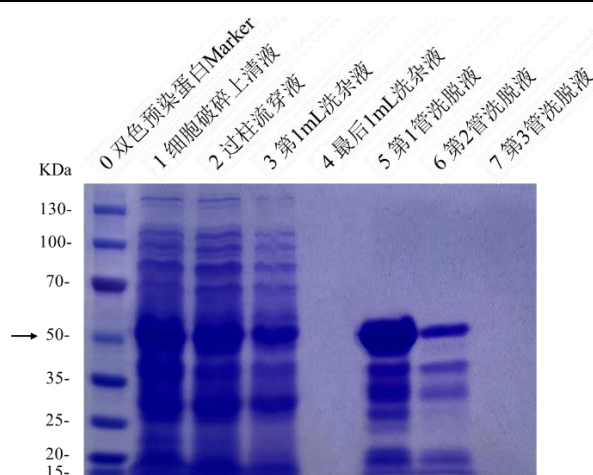


图 2-6 突变体蛋白 pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A 纯化过程收集液 SDS-PAGE 电泳图

从图 2-6 中可以看出：

(1) 泳道 1 蛋白条带杂乱且分布广泛，其中 50KDa 处条带颜色最深，符合含 GST 标签的目的蛋白大小，证明在流穿 GST 琼脂糖纯化树脂亲和层析柱之前，破碎细胞上清液中包含较多胞内杂蛋白和目的蛋白，且目的蛋白表达量显著高于其他蛋白；

(2) 从泳道 2 可以看出，缓慢控制流速后，收集液中含众多不能被 GST 树脂亲和的杂蛋白，且 50KDa 处能明显看见含有 GST 标签蛋白，证明此时 GST 亲和树脂中所结合的目的蛋白已经达到最大载量；

(3) 从泳道 3 可以看出，Binding Buffer 经纯化柱后，树脂中未能被亲和的残留蛋白被带入了穿流组分洗脱下来；

(4) 泳道 4 显示 Binding Buffer 最后 1mL 洗脱液中已不含任何蛋白，表明残留在树脂中的蛋白已被洗净，只余被 GST 琼脂糖树脂亲和的目的蛋白留存在柱中待洗脱；

(5) 从泳道 5 可以看出，被 GST 亲和树脂特异性结合的 GST 标签蛋白，经含还原型谷胱甘肽（GSH）的洗脱溶液 Elution Buffer 流穿后被带出，5 号管收集液获得了浓度较高的含 GST 标签的目的蛋白；

(6) 泳道 6 表示，Elution Buffer 第二次洗脱收集液中仍旧含有浓度较为可观的 GST 标签蛋白，但相较之下，其浓度不如 5 号收集管；

(7) 泳道 7 中已无蛋白条带，表明含 GST 标签的目的蛋白已全部被前两次 Elution Buffer 洗脱，至此 GST 亲和层析柱内蛋白洗脱完全。

2.4 小结与讨论

本章针对 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域关键氨基酸多突变蛋白 pGEX-E4A-T12A, pGEX-E4A-I13A, pGEX-V5A-T12A, pGEX-V5A-I13A, pGEX-E4A-V5A-T12A, pGEX-E4A-V5A-I13A, pGEX-E4A-T12A-I13A, pGEX-V5A-T12A-I13A, pGEX-E4A-V5A-T12A-I13A 展开了研究。通过将带有 BCOADC-E2 同源序列 BCKD 基因的重组质粒转化至大肠杆菌培养, 诱导表达并纯化得到了 9 个多突变蛋白。

目前有研究已证实在蛋白纯化的众多方法中, 利用亲和纯化技术获得高纯度重组蛋白被公认为鉴定和纯化重组蛋白的不可或缺的工具^[83]。融合的标签不会影响标记蛋白的折叠或生物功能, 并且在大多情况下, 它在纯化后具有可移除性, 因此研究选用 GST 标签亲和反应纯化蛋白。焦凤娟等^[84]曾证实 IPTG 诱导剂浓度在 0.5mM 时能够获得可溶性蛋白的最适浓度。IPTG 竞争性地与阻遏蛋白结合从而启动目的蛋白的转录, 若浓度过低则达不到与阻遏蛋白结合的饱和浓度; 而浓度过高则会促进包涵体的形成。包涵体是指由于细菌内蛋白量太高, 部分折叠与未折叠的蛋白分子聚集成团, 很难溶解, 影响蛋白质量。一旦蛋白形成包涵体, 就很难获得具有活性的可溶性蛋白。此外, 蛋白表达同样受诱导温度的影响。加入 IPTG 后, 诱导温度与细菌生长速率也呈现相关性, 高温促进细菌生长, 导致生长过程中代谢物大量积累, 对细菌的生长与目的蛋白表达产生抑制, 故实验采用 0.5mM 作为 IPTG 诱导剂终浓度, 24℃ 低温诱导, 有利于降低蛋白表达速度和表达量, 防止蛋白因为过快过量地表达而产生错误折叠。

纯化后的 5 号收集管蛋白经过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后发现, 除了 50KDa 处目的蛋白的条带, 还含有分子量较小的蛋白条带, 在严格控制流速的前提下, 初步分析是纯化蛋白置于冰箱 4℃ 保存后再电泳, 受蛋白酶的作用发生了一定降解。鉴于 6 号管蛋白中仍含部分分子量较小的条带, 印证了前面的分析。BCOADC-E2 蛋白利用 GST 纯化产生分子量较小的杂条带已非首次, Lee 等^[85]人在利用杆状病毒表达系统于昆虫细胞中表达重组牛 BCOADC-E2 融合蛋白, 分析 PBC 和 IDC 患者血清中抗 BCOADC-E2 的反应性的研究中, 就曾在采用 GST 亲和层析法对 BCOADC-E2 蛋白纯化过程中产生不知名 26KDa 大小杂带, 而当换为重组 TGF- β 融合蛋白在 GST 亲和纯化后也具有相同的 26KDa 额外蛋白带, 金属结合树脂进行亲和纯化则条带消失, 表明条带为外源污染物质, 假设它可能是碳酸酐酶同工酶 III, 可通过形成二硫键特异性地与谷胱甘肽结合。在本实验中条带将在后续蛋白免疫学检测中进一步确认: 若分子量

较小的条带为外源污染，则在免疫印迹中应不能被抗 BCOADC-E2 单克隆抗体识别，不与 PBC 病人血清反应产生条带；反之，则小分子条带为蛋白降解产生。电泳结果图 2-5 显示 Elution Buffer 第二次洗脱收集液中仍旧含有较纯的 GST 标签蛋白，经 OD-1000 超微量分光光度计测量后发现，以双突变重组蛋白 pGEX-BCKD-E4A-T12A 为例，6 号管蛋白浓度在 A280 处吸光度读数为 1.99, A260/A280 为 1.729, 经公式 $C(\text{mg/mL}) = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$ 计算得出 6 号管的蛋白浓度为 0.470mg/mL，无法用作后续特异性检测，因此舍弃。

第3章 BCOADC-E2 多位点突变蛋白免疫学反应测定

3.1 材料

3.1.1 实验仪器

表 3-1 实验仪器

实验仪器	仪器公司	实验仪器	仪器公司
WB 海绵垫	上海 Beyotime	转膜槽	上海 Tanon
酶标仪	赛默飞世尔科技	WB 转膜仪	上海 Tanon

注：其余实验仪器同 2.1.1

3.1.2 实验试剂

表 3-2 实验材料与试剂

试剂与材料	来源/配制
印迹膜专印缓冲液	称取 Tris-Base 3.00g, Glycine 14.40g, 200mL 甲醇, 去离子水定容至 1000mL
ELISA 二抗	兔抗人 Rabbit Anti-Human IgG H&L (HRP), 购自北京博奥森生物技术有限公司, 4℃保存
ELISA 包被缓冲液 (10×浓缩)、封闭液 (10×浓缩)、洗涤缓冲液 (20×浓缩)、抗体稀释液、显色液、终止液	北京博奥龙免疫技术有限公司
WB 二抗 HRP-山羊抗人 IgG (H+L)	北京博奥龙免疫技术有限公司
TBST 漂洗液 (20×)	北京索莱宝科技有限公司, 4℃保存
WB 封闭液	含 5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液
硝酸纤维素膜、极超敏 ECL 化学发光试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
丽春红染色液	南京恩晶生物科技有限公司

注：其余实验试剂同 2.1.2

3.2 方法

3.2.1 酶联免疫吸附分析

以 pGEX-E4A-T12A 等 9 个多突变纯化蛋白和野生型蛋白 PGEX-BCKD 为抗原，9 个 PBC 血清样品为一抗，兔抗人 Rabbit Anti-Human IgG H&L (HRP) 为二抗，建立间接 ELISA 实验。设置仅不加抗原的本底对照和一抗为稀释液的对照组，以帮助分析非特异性本底的原因，进行一抗血清稀释比 1: 4000 与 1: 16000 的两组实验，三次平行，两次重复，具体步骤如下^[86]。

3.2.1.1 抗原制备

纯化蛋白置于冰面上解冻，使用 OD-1000 超微量分光光度计测量蛋白浓度，加入 1×包被液将蛋白稀释成统一浓度 100μg/mL。

3.2.1.2 包被

在酶标板中每孔加入 100μL 稀释后的抗原包被液，置于冰箱 4℃过夜包被抗原，将待测抗体连接在抗原包被的微量滴定板上。

3.2.1.3 封闭

取出酶标板，翻转甩干板中液体并于吸水纸上轻轻拍净残液。每孔加入已平衡至室温的 1×洗涤液，放置 5min 后拍干残液，以上洗涤步骤重复 3 次。注意加洗涤液应孔与孔之间均匀一致，并且避免液体的相互污染。每孔加入 200μL 已平衡至室温的 1×封闭液，置于 37℃中反应 90min。封闭未反应的部位减少非特异性结合，并保护包被上的蛋白活性。将酶标板翻转，拍干板中液体，加入 1×洗涤液洗涤 3 次并拍净残液。

3.2.1.4 抗原抗体反应

用已平衡至室温的抗体稀释液将 9 个一抗血清 (PBC) 分别稀释 4000 倍，酶标板不同列中加入 100μL 稀释后的一抗，置于 37℃反应 1h。翻转酶标板，甩干板中液体并洗涤 3-5 次。

3.2.1.5 酶促反应

加抗体稀释液将二抗血清 (HRP) 进行 100000 倍稀释，混匀后每孔加入 100μL，置于 37℃中孵育 1h。翻转酶标板，甩干板中液体并洗涤 3-5 次。

3.2.1.6 显色反应

每孔加入 100μL ELISA 显色液，于室温避光反应 15min。

3.2.1.7 终止反应

加 50 μ L 终止液停止显色反应，将板置于酶标仪上，设置波长为 450nm，中速震动 5s，测量每孔吸光度。

3.2.2 蛋白免疫印迹检测

3.2.2.1 SDS-PAGE 凝胶电泳

制胶和跑胶方法参考章节 2.2.3.3，其中蛋白样品在变性之前需根据浓度进行稀释，稀释用量见表 3-3。

表 3-3 Western Blot 蛋白稀释用量表

蛋白编号	蛋白浓度 (mg/mL)	蛋白用量 / μ L	稀释液用量 / μ L	终浓度 (mg/mL)
pGEX-BCKD	6.59	15.00	0.00	6.59
pGEX-BCKD-E4A-T12	25.80	11.05	3.95	19.00
pGEX-BCKD-E4A-I13A	28.75	9.91	5.09	19.00
pGEX-BCKD-V5A-T12A	29.73	9.58	5.42	19.00
pGEX-BCKD-V5A-I13A	21.33	13.36	1.64	19.00
pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A	19.18	14.86	0.14	19.00
pGEX-BCKD-E4A-V5A-I13A	21.59	13.20	1.80	19.00
pGEX-BCKD-E4A-T12A-I13A	18.99	15.00	0.00	19.00
pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A	19.27	14.79	0.21	19.00
pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-	19.42	14.67	0.33	19.00

3.2.2.2 转膜

剪裁滤纸和硝酸纤维素膜至合适大小，固定夹、泡沫垫、滤纸和硝酸纤维素膜、蛋白凝胶浸泡于 1 $\times$ 转膜液中 3-5min 充分湿润。按照从正极至负极为泡沫垫、滤纸、NC 膜、凝胶、滤纸、泡沫垫的顺序，用镊子夹取对应材料装载湿转系统。每装载一层需轻轻擀压去除气泡，令其紧密排列，注意硝酸纤维素膜与凝胶对齐。该操作过程需全程佩戴手套，手指上的油脂与蛋白会封闭转膜效率并易产生背景污斑。将装载好的固定架置于电转仪正负极之间，黑极对应放置，倒入 1 $\times$ 转膜液没过凝胶，设置电转条件为 90V，30min。整个转膜过程电转槽需置于冰水中，以防电转过程发热温度过高。

3.2.2.3 丽春红染色与脱色

用镊子取出夹板中的硝酸纤维素膜，观察双色预染蛋白 Marker 是否已完整转移至硝酸纤维素膜上。标记膜的正反面，浸没在丽春红染色液中，室温下于摇床摇动 3~10min，直至出现清晰条带，观察并记录结果。

回收丽春红染液，漂洗 3 次，每次 5min，去除硝酸纤维素膜上的丽春红染液，进行后续 Western Blot 检测。

3.2.2.4 封闭

漂洗完成的硝酸纤维素膜置于 Western Blot 封闭液中（含 5%脱脂奶粉的 TBST），使封闭液没过膜，室温封闭 1h 阻断硝酸纤维素膜上未结合的区域，防止抗体的非特异性结合。

3.2.2.5 孵育一抗

倒尽或吸干封闭液，加入 1×TBST 溶液稀释一抗血清 1000 倍。将膜均匀浸润于一抗血清中，4℃过夜孵育。倒尽或吸干一抗，加入 1×TBST 溶液浸润硝酸纤维素膜，置于脱色摇床摇动清洗 10min，倒尽或吸干 TBST 溶液，清洗步骤重复 3 次，以去除残留的一抗。

3.2.2.6 孵育二抗

Western Blot 二抗（HRP-山羊抗人 IgG）中加入 1×封闭液稀释 10000 倍，硝酸纤维素膜均匀浸润二抗，置于 37℃孵育 90min。倒尽或吸干二抗，加入 1×TBST 溶液，清洗步骤重复 3 次。

3.2.2.7 ECL 显影

参照极超敏 ECL 化学发光试剂盒说明书，等体积混合 A 液与 B 液，约每张膜总体积 1mL，室温放置备用。由于 B 液含有氧化剂，显色剂应现配现用。用镊子轻轻取出硝酸纤维素膜平铺于暗板上，吸水纸吸去多余液体，注意避免膜与板之间产生气泡。逐滴加 ECL 发光液，轻轻晃动板使发光液完全均匀覆盖硝酸纤维素膜，放置 1~2min，置于化学发光成像仪内，利用暗室显影技术采集化学发光图像。

3.3 结果与分析

3.3.1 酶联免疫吸附实验结果

测定多突变纯化蛋白和野生型蛋白共 10 个蛋白对 9 份血清的特异性反应, 在同一环境下、同一实验人员进行两次实验, 设置每组 3 个平行。以野生型蛋白 pGEX-BCKD 读数为标准值 1.000, 一抗血清稀释比 1: 4000、1: 16000 的各突变蛋白相对于野生型蛋白的平均相对结合比见表 3-4。

表 3-4: ELISA 多突变蛋白相对于野生型蛋白 OD₄₅₀ 值

编号	一抗稀释比 1: 4000	一抗稀释比 1: 16000
pGEX-BCKD	1.000±0.000	1.000±0.000
pGEX-BCKD-E4A-T12A	0.621±0.210	0.556±0.111
pGEX-BCKD-E4A-I13A	0.447±0.182	0.426±0.091
pGEX-BCKD-V5A-T12A	0.579±0.119	0.479±0.088
pGEX-BCKD-V5A-I13A	0.494±0.163	0.328±0.064
pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A	0.378±0.083	0.351±0.079
pGEX-BCKD-E4A-V5A-I13A	0.332±0.108	0.269±0.138
pGEX-BCKD-E4A-T12A-I13A	0.191±0.100	0.139±0.054
pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A	0.186±0.163	0.187±0.107
pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-I13A	0.180±0.171	0.096±0.109

根据表 3-4 作图如下:

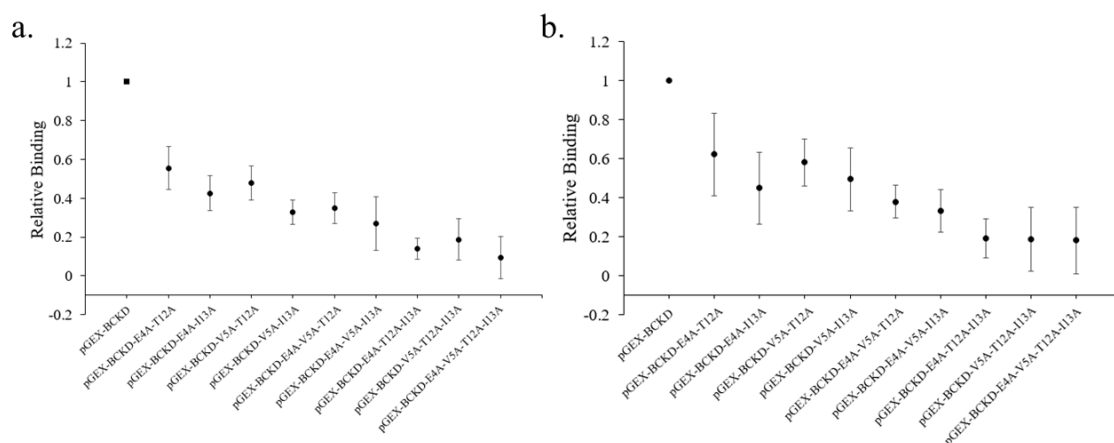


图 3-1: 多突变蛋白相对于野生型蛋白 pGEX-BCKD 的平均相对结合比

注: a: 一抗稀释比 1: 4000; b: 一抗稀释比 1: 16000

在两次 ELISA 测定结果中, 9 个多突变蛋白的相对结合比均低于 1.000, 说明多突变蛋白与血清特异性反应程度均低于野生型蛋白。具体来看, 多突变蛋白平均 OD₄₅₀ 值

对野生型蛋白的倍数依次为: 1: 4000: 0.556、0.426、0.479、0.328、0.351、0.269、0.139、0.187、0.096; 1: 16000: 0.621、0.447、0.579、0.494、0.378、0.332、0.191、0.186、0.180。按突变位点个数, 多突变蛋白特异性反应程度由高至低依次为: 双突变蛋白>三突变蛋白>四突变蛋白, 特异性反应降低程度与四位关键氨基酸突变位点个数呈现正相关性。此外, 三突变蛋白 pGEX-BCKD-E4A-T12A-I13A、pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A 和四突变蛋白 pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-I13A 相对野生型蛋白的平均相对结合比均非常微弱, 其中四突变蛋白整体活性约降至野生型的 9.6%, 考虑该蛋白几乎不与血清中的 AMA-M2 发生特异性反应。即当 BCOADC-E2 蛋白疏辛酰结构域内 4 号位谷氨酸、5 号位缬氨酸、12 号位苏氨酸、13 号位异亮氨酸同时被丙氨酸所替代时, 将大大降低 BCOADC-E2 蛋白与 AMA-M2 的特异性反应, 甚至不产生反应。总体而言, 两种稀释比所呈现的结果趋势一致。

3.3.2 蛋白免疫印迹检测结果

3.3.2.1 丽春红染色结果与分析

采用湿转系统的电转移法将聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白在 90V 条件下转移至硝酸纤维素膜上, 转膜完成后进行丽春红染色 10min 观察, 染色结果如图 3-2 所示。

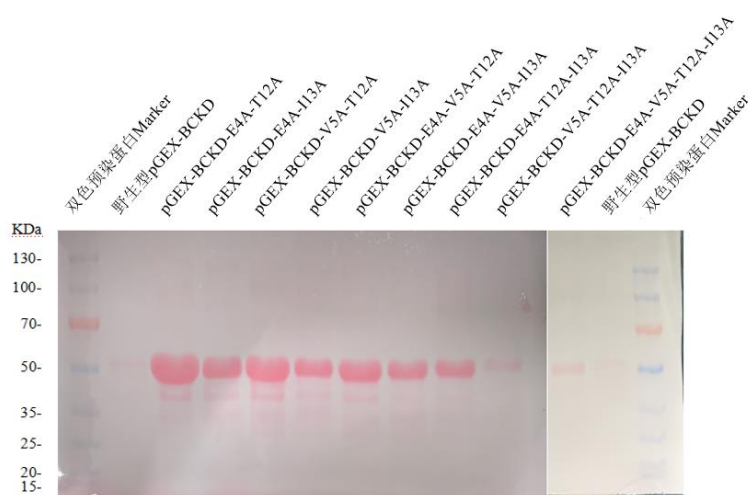


图 3-2 丽春红染色结果图

从图中可以看出, 泳道 1 至泳道 13 在 50KDa 附近均含有明显的目的蛋白条带, 表明聚丙烯酰胺凝胶至硝酸纤维素膜转膜过程成功, 蛋白均已转移至硝酸纤维素膜上。

3.3.2.2 显影结果与分析

对 9 个多突变重组蛋白进行免疫印迹实验, 观察重组蛋白与 PBC 血清的特异性反

应情况。于条带两端各设置一组标准蛋白分子量 Marker 和野生型蛋白 pGEX-BCKD, 以便更好观察结果, 进行对比。利用 ECL 显影技术, 于暗室中化学成像发光系统采集图像, Western Blot 反应结果如图 3-3 所示。

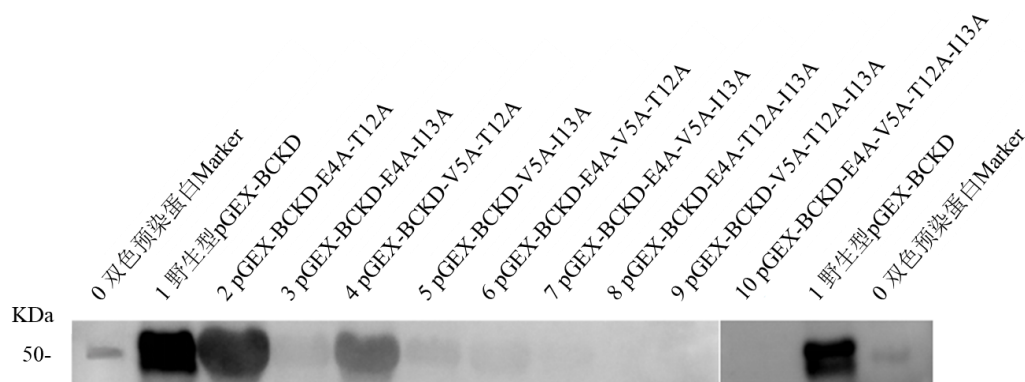


图 3-3 Western Blot 显影图

分析图 3-3 可得：

- (1) 多突变蛋白特异性反应条带均位于 50KDa 处，蛋白大小正确；
- (2) 实验组各泳道条带颜色深浅存在明显差异甚至没有条带，说明了蛋白质免疫印迹检测的反应特异性；
- (3) 泳道 2~泳道 10 条带颜色均比 1 号浅，说明 9 个多突变蛋白与 AMA-M2 特异性反应程度较野生型蛋白 pGEX-BCKD 均有所降低，即 4、5、12、13 号位任意氨基酸多突变组合均降低了 BCOADC-E2 蛋白特异性识别 AMA-M2 的能力；
- (4) 双突变中，pGEX-BCKD-E4A-T12A（泳道 2）特异性反应程度最高，pGEX-BCKD-V5A-T12A（泳道 4）次之，pGEX-BCKD-E4A-I13A（泳道 3）和 pGEX-BCKD-V5A-I13A（泳道 5）蛋白特异性反应程度较弱；三突变中，pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A 特异性反应程度较高，其余三突变蛋白条带颜色均呈现极弱；9 个突变蛋白中四突变蛋白反应性最低；将 9 个多突变重组蛋白降低 AMA-M2 特异性反应程度能力由高至低排序如表 3-5。
- (5) 观测突变位点，13 号位异亮氨酸被丙氨酸替代产生的突变蛋白与血清特异性反应程度均大幅下降，说明 13 号位异亮氨酸残基对于 BCOADC-E2 蛋白识别 AMA-M2 的重要性。

表 3-5 Western Blot 各蛋白特异性反应程度排序表

降低特异性反应程度 (由高至低)	突变类型	编号	对应泳道
---------------------	------	----	------

几乎不发生	三突变	pGEX-BCKD-E4A-T12A-I13A	泳道 9
	三突变	pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A	泳道 10
	四突变	pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-I13A	泳道 11
高	三突变	pGEX-BCKD-E4A-V5A-I13A	泳道 8
较高	双突变	pGEX-BCKD-E4A-I13A	泳道 4
	双突变	pGEX-BCKD-V5A-I13A	泳道 6
	三突变	pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A	泳道 7
较低	双突变	pGEX-BCKD-V5A-T12A	泳道 5
低	双突变	pGEX-BCKD-E4A-T12	泳道 3

3.4 小结与讨论

本章采用稀释比 1: 4000 和 1: 16000 间接 ELISA 与 Western Blot 实验对 9 个多突变蛋白与 PBC 患者血清反应性进行了检测, 定义多突变组合抗 BCOADC-E2 程度。Elisa 实验结果与 Western Blot 结果趋势一致, 实验结论严谨可信。与野生型蛋白相比, 9 个多突变组合均降低了特异性反应程度, 特异性反应降低程度与四位关键氨基酸突变位点个数呈现正相关性。在 ELISA 与 Western Blot 图中均观察到 13 号位异亮氨酸被丙氨酸替代产生的突变蛋白与血清特异性反应程度大幅下降, 说明 13 号位异亮氨酸残基对于 BCOADC-E2 蛋白特异性识别 AMA-M2 的重要性。

Western Blot 通过凝胶电泳, 按照分子量大小分离蛋白, 利用特异性抗体识别蛋白, 是分子生物学中常用的实验方法, 可用于检测单克隆或多克隆抗体识别的特异性抗原^[87-89]。免疫检测转移采用的膜主要有硝酸纤维素滤膜和聚偏二氟乙烯膜, 前者因其高蛋白质亲和力、蛋白质区分力、蛋白质和糖蛋白固定力而被广泛使用。后者具有更好的机械强度, 可重复使用, 但将产生更高的背景值^[90]。Western Blot 的转膜方法有虹吸法、电转移法、真空转移法三种, 其中电转移法由于速度快、转移完全而成为最普遍采用的方法^[87]。实验室常用的转膜方式一般有半干转和湿转两种方式, 两种转移系统的原理相同, 但操作上湿转系统更为方便和常用, 且成功率更高^[91, 92]。综合考虑研究采用硝酸纤维素滤膜进行湿转系统的电转移法。

Western Blot 图 3-3 ECL 显影图像中泳道 8-10 条带极弱, 而转膜后经丽春红染色 (图 3-2) 显示 9 个纯化蛋白已顺利转至硝酸纤维素膜上, 说明三突变蛋白 pGEX-

BCKD-E4A-T12A-I13A、pGEX-BCKD-V5A-T12A-I13A 和四突变蛋白 pGEX-BCKD-E4A-V5A-T12A-I13A 蛋白未丢失，与 AMA-M2 特异性反应微弱。

蛋白质的稳定性在很大程度上取决于具体的蛋白质本身、样品的成分、以及存储条件^[93, 94]。对于 BCOADC-E2 蛋白而言，样品主要需注意存储条件，不可在室温下放置过久，在分离和纯化后应立即冷冻并在 - 80℃ 下保存，或者加入适当的稳定剂或抗蛋白酶剂混合物，并在 4℃ 下短时间储存。在论文 2.4 章节我们讨论了 GST 亲和层析法纯化 BCOADC-E2 重组蛋白产生分子量较小的杂条带问题，根据 Western Blot 预实验中的全图像（图 3-4）分析，在 50KDa 左右目的条带以下，仍然有分子量较小的杂条带，说明低分子量的纯化蛋白带在 Western Blot 中与 PBC 患者血清发生了免疫学特异性反应，能够被抗 BCOADC-E2 单克隆抗体识别，因此这些额外的蛋白带是 BCOADC-E2 重组蛋白降解产生。

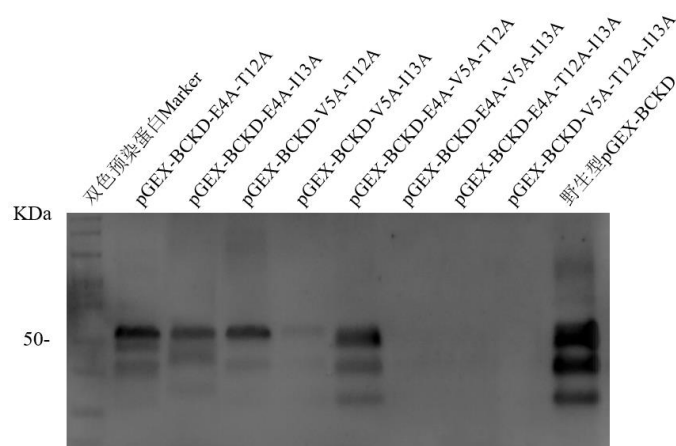


图 3-4 Western Blot 预实验全图像

第4章 利用 SDSL-EPR 技术探究 BCOADC-E2 多位点突变蛋白构象

研究应用 SDSL-EPR 来探测丙氨酸扫描后硫辛酰区域的结构。通过 PCR 介导的定点突变,用半胱氨酸残基取代 BCOADC-E2 硫辛酰区特定位点的氨基酸来产生自旋标记突变体。研究选择了双突变体 pGEX-BCKD-E4A-I13A,因为与野生型 pGEX-BCKD 相比,其 AMA 反应性显著降低,且 Western Blot 结果显示其降低 AMA 特异性反应程度高于其余三个双突变体。已知 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域 3 号位氨基酸为一个天然半胱氨酸,在 SDSL-EPR 中已将 MTSSL 定位至 4 号位氨基酸,为了尽可能避免其对蛋白质功能与结构研究的影响,保证后续 pGEX-BCKD-I13A 单突变体能将 MTSSL 只标记在 13 号位点上,需将 3 号位的半胱氨酸突变成与其结构相似的丝氨酸。此外,通过在 pGEX-BCKD-E4A-I13A 双突变体的第 14 号位置上引入单个半胱氨酸替代苏氨酸,将 MTSSL 结合到该位置上。由此设计产生的 Cys 替换将 MTSSL 定位到双突变体中的第 4 号、第 13 号位及 4 和 13 双位点位置。为进行区分,将 Cys 替换构建的突变体分别命名为 Glu4、Ile13 和 Glu4/Ile13,见表 4-1。对四种突变体进行纯化,用 MTSSL 自旋标记反应,并用 EPR 光谱分析。

表 4-1 Cys 突变体序列表

名称	序列
Glu4	SICAVQSDKASVTATSR
Ile13	SISAVQSDKASVTACSR
Glu4/Ile13	SICAVQSDKASVTACSR

4.1 材料

4.1.1 实验仪器

表 4-2 实验仪器

实验仪器	仪器公司
顺磁共振波谱仪	德国 Bruker

注：其余实验仪器同 2.1.1

4.1.2 实验试剂

表 4-3 实验材料与试剂

试剂与材料	来源/配制
盐酸胍（6M）	称取盐酸胍 57.3g，加蒸馏水定容至 100ml，70℃水浴搅拌溶解
HiTrap Benzamidine FF(high sub) 预装柱, 1mL 规格、GSTrap HP 预装柱, 1mL 规格	思拓凡生物科技有限公司
凝血酶（Thrombin）	上海皓元生物医药科技有限公司
1/16”-Luer 转接头	扬州扬泰医疗器械有限公司

注：其余实验试剂同 2.1.2

4.2 方法

4.2.1 Cys 突变质粒构建

4.2.1.1 Cys 点突变

使用 Quick Change 引物设计工具 (<https://agilent.com.cn>)，由于 3 号位为一个天然半胱氨酸，Glu4 突变体即为 pGEX-BCKD-E4A-I13A，无需突变。Glu4/Ile13 基于 Glu4、Ile13 基于 Glu4/Ile13 设计引物，进行 PCR。构建 Cys 替代突变体所用的诱变引物序列见表 4-4。

表 4-4 诱变引物序列

突变体		碱基序列 (5' to 3')
Ile13	F	5'-ctttatcactttgaactgcactgatgctatcaaactgagacac-3'
	R	5'-gtgtctcagtttgatagcatcagtcagttcaaagtataaag-3'
Glu4/Ile13	F	5'-atgactccatcataacgactacaggcagtaacagaagctttatc-3'
	R	5'-gataaagcttctgttactgcctgtagtcgttatgatggagtcac-3'

具体步骤同 2.2.2。

4.2.1.2 PCR 产物转化及菌种保存

具体步骤同 2.2.2.6。

4.2.2 Cys 突变蛋白纯化和标签切除

4.2.2.1 Cys 突变蛋白表达

具体步骤同 2.2.3.1。

4.2.2.2 Cys 点突变蛋白标签切除及亲和层析纯化

取表达菌液 12000rpm, 4℃离心 20min。倒去上层培养基, 向沉淀中加入 30mL Binding Buffer 重悬菌体, 吸打震荡混匀。超声破碎细胞至菌液透亮, 12000rpm, 4℃, 离心 20min, 上清即为蛋白溶液。掰去 GSTrap™ 柱子底部的密封塑料片, 层析柱底部用堵头密封。取注射器连接 1/16"-Luer 转接头吸取 5mL 纯水, 打开层析柱上端堵头, 以液滴对液滴的方式连接层析柱, 打开层析柱底端的堵头, 后续以同样的方式连接注射器与层析柱。手动推注射器运行 GSTrap™ 预装柱, 保持流速 1mL/min。待流经层析柱的液体达到所需体积后, 为避免层析柱流干、进气, 用堵头密封层析柱底端。断开层析柱顶端连接后, 向接口内补加少量液体, 后续以同样方式断开注射器与层析柱的连接。取新注射器连接 1/16"-Luer 转接头, 吸取 5mL Binding Buffer, 连接层析柱平衡, 流速 1mL/min。取制备好的样品, 新注射器连接 1/16"-Luer 转接头吸取样品, 连接层析柱上样, 流速 0.2-1mL/min, 用空收集管在层析柱下方收集流穿的样品。5-10mL Binding Buffer 流穿层析柱进行洗杂, 对洗杂样品进行收集。此时 GST 标签蛋白已结合至 GSTrap™ 层析柱上。向 1000U 凝血酶粉末中加入 1mL Binding Buffer 充分溶解, 吸取 80μL 与 920μL Binding Buffer 混合稀释, 注射至 GSTrap™ 层析柱, 密封层析柱, 25℃孵育。

HiTrap™ Benzamidine FF 预装柱采用同样方式进行预处理。5mL 纯水洗涤去除存储缓冲液 (0.05M 醋酸缓冲液), 5mL Binding Buffer 平衡, 流速 1mL/min。将 HiTrap™

Benzamidine FF 柱顶端与带 GST 标签蛋白的 GSTrapTM 柱底端串联, Binding Buffer 洗脱无标签纯化蛋白, 流速 0.2-1mL/min, 分管收集流出液。依次加入 5mL Elution Buffer、纯水和 20%乙醇清洗 GSTrapTM 层析柱, 2mL Binding Buffer、5mL 纯水清洗 HiTrapTM Benzamidine FF 柱, 流速 1mL/min。

4.2.3 波谱检测

4.2.3.1 MTSSL 标记

用 DMF 充分溶解 MTSSL 粉末, 向纯化蛋白中加入 MTSSL 溶液, 4℃过夜孵育, MTSSL 终浓度为约 500mM。标记完成后, 使用 10KDa MWCO Amicon Ultra 超滤管, 5000×g, 15min, 将蛋白液浓缩至约 1mg/ml 浓度。

4.2.3.2 波谱上样检测

取 25μL 浓缩蛋白液分别与 25μL 正常人血清、PBC 患者血清混合进行反应, 将毛细管伸入样品中, 吸取适量样品后橡皮泥封底密封, 置于顺磁共振波谱仪中进行 EPR 测量。在室温下, 于 100G 电场, 在 20mW 的微波频率下, 进行总时间 80s 的单次扫描, 中心磁场 3503.37G, 调制波幅 1G, 获得光谱。

4.3 结果与分析

4.3.1 Cys 突变质粒测序结果

按表 4-1 所示, 利用 PCR 引入半胱氨酸替换突变, 经表达和纯化后送测, 结果如图 4-1 所示。

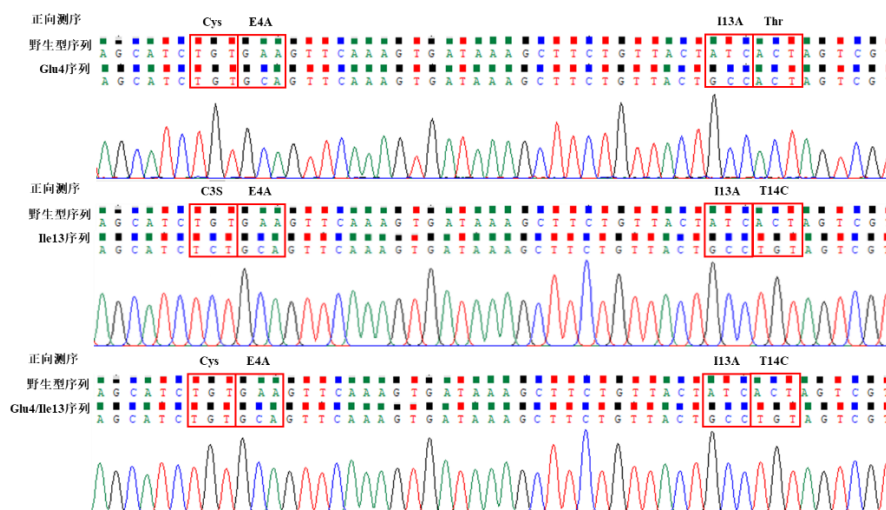


图 4-1 Cys 突变体测序结果

测序结果显示，在 pGEX-BCKD-E4A-I13A 的基础上，有且仅有表 4-1 中所标示氨基酸位点突变成所需氨基酸，其他氨基酸保持不变，Glu4、Ile13、Glu4/Ile13 突变体构建成功。

4.3.2 Cys 突变蛋白去标签纯化结果

IPTG 诱导表达的全部蛋白经 GSTrapTM 层析柱洗杂、Thrombin 酶柱上酶切 GST 标签蛋白和 HiTrapTM Benzamidine FF 过柱后，获得无标签的纯化蛋白。取 Glu4、Ile13 和 Glu4/Ile13 突变体进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳，跑胶图结果如下。

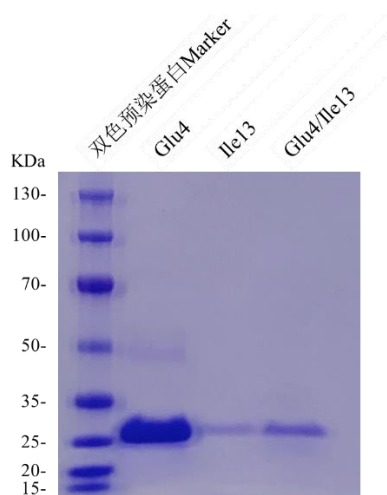


图 4-2 无标签蛋白纯化电泳图

从图中可以看到，四条泳道均只有 25~30KDa 处出现单条带。由 2.3.2 中图 2-6 可知，含 GST 标签纯化蛋白大小约为 52~55KDa，GST 标签为 26KDa，切除标签后的纯

化蛋白大小约为 26~29KDa, 与图 4-2 条带大小相符, 且收集到的组分中只有纯化蛋白, 说明我们得到了较纯的无标签重组蛋白。

4.3.3 电子顺磁共振波谱图

为了探究丙氨酸扫描的硫辛酰区域结构, 对第 3 号、14 号位点的半胱氨酸进行自旋标记后, 采用 SDSL-EPR 技术进行 X 波段扫描, 检测分别与健康对照者血清 (未患病)、PBC 患者血清处理下的反应波谱图, 如图 4-3 所示。

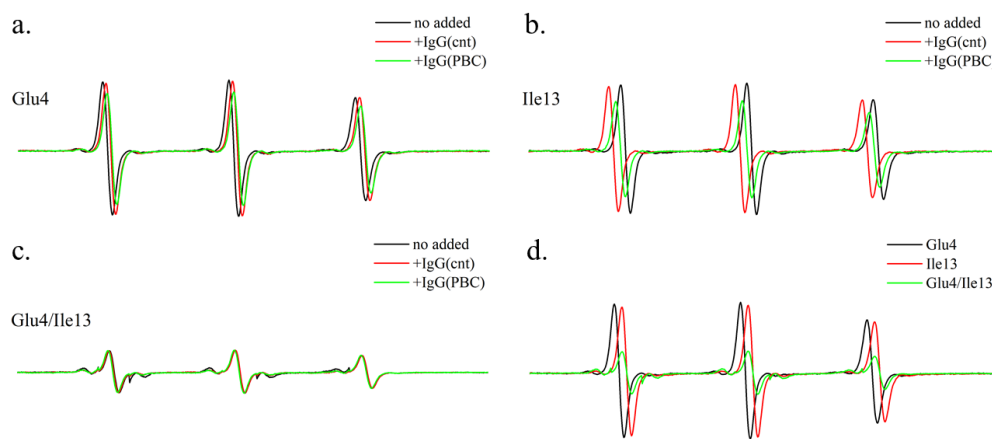


图 4-3 含自旋标记 Cys 替换突变体硫辛酰结构域的 X 波段光谱图

注: a. Glu4 突变体与空白、正常人血清、PBC 血清反应波谱;
b. Ile13 突变体与空白、正常人血清、PBC 血清反应波谱;
c. Glu4/Ile13 突变体与空白、正常人血清、PBC 血清反应波谱;
d. Glu4, Ile13, Glu4/Ile13 突变体波谱

先前的研究表明, 内脂酰结构域呈现如文章 2.2.1 图 2-2 所示的环状结构。在这个模型中, Glu4 和 Ile13 位置应呈现大致相反, 且距离较近。为了测试这种接近性是否在 Glu4/Ile13 突变体中得到延续, 进行 EPR 实验以寻找位于 BCOADC-E2 脂酰基结构域的 4 号位和 13 号位的氮氧化物自旋标签之间会产生偶极偶联的佐证。当自旋标签彼此距离在 2nm 以内时, 可以检测到显著的偶极偶联, 从而导致光谱展宽。因此, 研究分别构建了 Cys 替换突变体, 在 3 号位和 14 号位分别放置自旋标记, 并用 EPR 检测 MTSSL 标记的蛋白。如图 4-3, Glu4/Ile13 突变体测得的光谱被严重加宽, 表明具有强的偶极偶联。即在 Glu4/Ile13 双突变体的背景下, 4 号和 13 号氨基酸蛋白二级 β 折叠区构象位置上的紧密性保持不变 (1-1.5nm)。和预期一致, PBC 病人血清与该突变体结合的程度较低, 将该抗体添加到双自旋标记的蛋白质中并没有显著改变复合光谱。

由于血清分子较大, 预计高亲和力结合将显著降低附着自旋标签的局部和全局旋

转扩散,从而产生更宽的 EPR 谱。然而,添加 PBC 病人血清后, Glu4、Ile13 均观察到适度的增宽,其中 Ile13 的增宽程度更高。对照血清无显著影响。PBC 患者血清中的免疫球蛋白对自旋标记动力学产生的一定影响与 pGEX-BCKD-E4A-I13A 突变体的抗体结合下降程度一致。

4.4 小结与讨论

在本章中,为了探究丙氨酸取代的硫辛酰的结构,我们选择 pGEX-BCKD-E4A-I13A 双突变体进行 SDSL-EPR 实验。利用 PCR 技术对双突变体的 4 号位和 13 号位相邻氨基酸残基分别进行定点突变和 Cys 替换,使得在硫辛酰结构域中该肽链 4 和 13 号位相邻位置分别各为一个半胱氨酸。在完成了 Glu4、Ile13 及 Glu4/Ile13 的原核表达和亲和层析纯化,得到无标签纯化重组蛋白。将 MTSSL 自旋标记定位在第 4 号、13 号及 4 和 13 双位点上的 Glu4、Ile13 及 Glu4/Ile13 突变体与 PBC 患者和对照受试者血清样本进行反应,并用 EPR 光谱分析。测得 pGEX-BCKD-E4A-I13A 双突变体 EPR 光谱数据验证了 4 号位谷氨酸和 13 号位异亮氨酸残基的重要性及硫辛酰区蛋白 β 折叠构象得到保持,进一步重申了 β 折叠构象在抗 BCOADC-E2 识别中的必要性。

EPR 波谱图中脂酰结构域 4 和 13 位的自旋标签显示出类似的弱固定化光谱,表明在双丙氨酸突变的情况下存在相对无序的环结构。从结构上看,异亮氨酸残基(位置 2 和 13)在脂酰 β 折叠中斜相对,而残基 14-16(苏氨酸、丝氨酸、精氨酸)是距离 13 号位异亮氨酸残基最近的氨基酸,异亮氨酸残基 2 和 13 的疏水臂与这些邻近残基的相互作用对于维持该结构的 β 折叠构象非常重要。关于硫辛酰结构域 β 折叠构象对蛋白的重要性在 PDC-E2 蛋白的研究中同样得到了论证。有研究表明通过 AMA 结合研究和 SDSL-EPR 分析揭示了 5 号和 12 号异亮氨酸同时被丙氨酸取代所形成的双突变体中高度灵活的结构,自反应性主要集中在 PDC-E2 脂酰结构域的特定残基。他们将 5 和 12 号异亮氨酸被丙氨酸取代的双突变体中相邻 4 号和 13 号引入 Cys 替换,自旋标记 MTSL 和 EPR 光谱的数据不仅验证了异亮氨酸残基的重要性,同样证明了脂酰 β 折叠结构构象在抗 PDC-E2 识别中的必要性^[95]。

AMA-M2 识别的自身抗原 2-OADC 主要包括 PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2。目前众多研究已知 PDC-E2 和 BCOADC-E2 两者的抗原表位均定位在蛋白硫辛酰结构域内,其构象具有一定相似性。通过在大肠杆菌中表达 PDC-E2 蛋白表达硫辛酰结构

域，纯化后利用核磁共振波谱对其结构进行分析来探索人体内 PDC-E2 亚基的三维结构的研究^[53]，发现来自人类的 PDC-E2 脂酰基结构域与来自嗜热脂肪芽孢杆菌、大肠杆菌和葡萄酒固氮菌的 E2 亚基肽链脂酰基结构类似，同样具有 β 折叠构成的桶状结构，包括了两个反平行式 β 折叠，每个 β 折叠包含三条主链和一条副链。而有不同细菌之间关于硫辛酰结构域赖氨酸残基周围序列的比较研究表明，在 PDC-E2 通过交叉反应识别 AMA 的实验中，不同细菌之间异亮氨酸残基表现出显著的差异性^[96-100]。因此，异亮氨酸残基的疏水臂于维持硫辛酰结构域 β 折叠构象发挥出极大的重要性。

第5章 总结

AMA 是 PBC 的血清学标志，其中主要反应成分 M2 亚型（AMA-M2）识别的自身抗原直接定位至 BCOADC-E2 的硫辛酰结构域。然而，目前缺乏对 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域 β 折叠区的氨基酸残基与 AMA 特异性的综合分析。鉴于 AMA 独特的表位特异性，以及与氧化磷酸化过程中酰基转移的生化功能有关的 BCOADC-E2 表面硫辛酰环状 β 折叠区结构的构象意义，研究探索负责 AMA-M2 识别的关键氨基酸多突变组合对蛋白与 AMA 特异性结合程度及环状构象的影响。已知 BCOADC-E2 脂酰结构域活性中心赖氨酸的前后 9 个氨基酸进行丙氨酸扫描后得到的单突变体中，4 号、5 号、12 号和 13 号突变体显著降低了蛋白与 AMA-M2 特异性反应程度，其为 BCOADC-E2 蛋白表面硫辛酰结构域负责 AMA-M2 识别的关键氨基酸。利用 PCR 构建了 BCOADC-E2 蛋白 9 个多突变体，将重组质粒转化到 E.coli 细胞表达基因，IPTG 诱导蛋白表达并纯化，通过 ELISA 和 Western Blot，定性定量检测纯化的重组蛋白对 AMA-M2 的特异性反应程度。同时为探究 BCOADC-E2 蛋白表位硫辛酰结构域中呈现的环状 β 折叠构象的切实证据及其在突变体中是否得到延续，选择 pGEX-BCKD-E4A-I3A 双突变体的 Glu4 和 Gly13 号位相邻位点引入半胱氨酸产生的 MTSSL 自旋标记定位，经 SDSL-EPR 电子顺磁共振检测得到光谱数据。本论文结论如下：

（1）以野生型 pGEX-BCKD 为模板对 BCOADC-E2 蛋白的结构进行了同源建模，BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域呈现 β 折叠构象；BCOADC-E2 蛋白为可溶性表达；

（2）BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域 4 号谷氨酸、5 号缬氨酸、12 号苏氨酸、13 号异亮氨酸任意组合多突变均降低 BCOADC-E2 蛋白与 AMA-M2 特异性反应程度；BCOADC-E2 特异性反应降低程度与四位关键氨基酸突变位点个数呈现正相关性；4、5、12、13 号位氨基酸同时被丙氨酸所替代，BCOADC-E2 蛋白与 AMA-M2 反应特异性微弱；13 号位异亮氨酸残基对于 BCOADC-E2 蛋白识别具有 AMA-M2 重要性；

（3）4 号位谷氨酸与 13 号位异亮氨酸存在 2nm 以内的偶极偶联，4、13 号氨基酸被丙氨酸替代后蛋白二级 β 折叠区构象位置上的紧密性保持不变（1-1.5nm），13 号异亮氨酸维持 β 折叠构象在抗 BCOADC-E2 识别中具有必要性；

本文通过突变与功能验证揭示了 BCOADC-E2 蛋白硫辛酰结构域四位关键氨基酸的化学修饰对蛋白特异性反应的降低作用,为 PBC 的早期精确诊断提供了借鉴与参考。SDSL-EPR 的波谱图结果,结合双突变体 pGEX-BCKD-E4A-I13A 与 PBC 血清的反应数据,进一步重申了硫辛酰区 13 号位异亮氨酸维持 β 折叠构象在抗 BCOADC-E2 识别中的必要性。

参考文献

- [1] LINDOR K D, BOWLUS C L, BOYER J, et al. Primary biliary cholangitis: 2018 practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases [J]. *Hepatology*, 2019, 69(1): 394-419.
- [2] BEUERS U, GERSHWIN M E, GISH R G, et al. Changing nomenclature for PBC: From 'cirrhosis' to 'cholangitis' [J]. *Clinics And Research In Hepatology And Gastroenterology*, 2015, 39(5): E57-E59.
- [3] 来小红, 郭卉. 自身抗体谱检测在自身免疫性肝病中的临床意义 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2023, 33(03): 284-288.
- [4] 李卫昆, 李惠敏, 常丽仙, 等. 血清特异抗体阴性的原发性胆汁性胆管炎的临床研究 [J]. *肝脏*, 2022, 27(07): 795-799.
- [5] 叶梓婕, 李建英. 原发性胆汁性胆管炎患者的临床特征和治疗情况分析 [J]. *肝脏*, 2022, 27(04): 478-80+501.
- [6] 连敏, 马雄. 原发性胆汁性胆管炎的诊治进展与难点 [J]. *中华消化杂志*, 2023, 43(04): 253-256.
- [7] LV T, CHEN S, LI M, et al. Regional variation and temporal trend of primary biliary cholangitis epidemiology: A systematic review and meta-analysis. [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2021, 36(6): 1423-1434.
- [8] ZENG N, DUAN W, CHEN S, et al. Epidemiology and clinical course of primary biliary cholangitis in the Asia-Pacific region: a systematic review and meta-analysis. [J]. *Hepatology International*, 2019, 13(6): 788-799.
- [9] GERUSSI A, CRISTOFERI L, CARBONE M, et al. The immunobiology of female predominance in primary biliary cholangitis [J]. *Journal Of Autoimmunity*, 2018, 95: 124-132.
- [10] GERSHWIN M E, MACKAY I R. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths [J]. *Hepatology*, 2007, 47(2): 737-745.
- [11] TANAKA A, LEUNG P S C, GERSHWIN M E. Pathogen infections and primary biliary cholangitis [J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2019, 195(1): 25-34.
- [12] 赵春梅, 马狄, 邵文琳. 原发性胆汁性胆管炎遗传易感性的研究现状 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(03): 606-610.
- [13] LLEO A, LEUNG P S C, HIRSCHFIELD G M, et al. The Pathogenesis of Primary Biliary Cholangitis:

- A Comprehensive Review [J]. *Seminars In Liver Disease*, 2020, 40(1): 34-48.
- [14] KLOSE G, NITSCHMANN S. Bezafibrate for primary biliary Cholangitis "Bezafibrate in combination with ursodeoxycholic acid in primary biliary cholangitis (BEZURSO) trial" [J]. *Internist*, 2018, 59(12): 1344-1356.
- [15] LEVY C, MANNS M, HIRSCHFIELD G. New treatment paradigms in primary biliary cholangitis [J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2023, 21(8): 2076-2087.
- [16] YOU H, MA X, EFE C, et al. APASL clinical practice guidance: the diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis [J]. *Hepatology International*, 2022, 16(1): 1-23.
- [17] VAN DE WATER J, MALMBORG A C, SHULTZ D B, et al. Penetration and co-localization in MDCK cell mitochondria of IGA derived from patients with primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology*, 1998, 28(4 PART 2): 402A.
- [18] PARK J-W, KIM J-H, KIM S-E, et al. Primary Biliary Cholangitis and Primary Sclerosing Cholangitis: Current Knowledge of Pathogenesis and Therapeutics [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(6): 1288.
- [19] DUAN W, CHEN S, LI S, et al. The future risk of primary biliary cholangitis (PBC) is low among patients with incidental anti - mitochondrial antibodies but without baseline PBC [J]. *Hepatology Communications*, 2022, 6(11): 3112-3119.
- [20] AIBARA N, OHYAMA K, NAKAMURA M, et al. Investigation of immune complexes formed by mitochondrial antigens containing a new lipoylated site in sera of primary biliary cholangitis patients [J]. *Clinical And Experimental Immunology*, 2021, 204(3): 335-343.
- [21] AMOROSO P, VERGANI D, WOJCICKA B M, et al. Identification of biliary antigens in circulating immune complexes in primary biliary cirrhosis [J]. *Clinical and experimental immunology*, 1980, 42(1): 95-98.
- [22] DING D, XUAN G, HU Y, et al. Immunoglobulin M: A Neglected Serum Biomarker in Treatment-Naive Primary Biliary Cholangitis With Normal Alkaline Phosphatase [J]. *Hepatology Communications*, 2022, 6(6): 1403-1412.
- [23] 方洒, 尚玉龙, 韩霜, 等. 原发性胆汁性胆管炎合并胆结石的临床特征及熊去氧胆酸治疗应答情况 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2023, 32(12): 1381-1384.
- [24] KOWDLEY K V, BOWLUS C L, LEVY C, et al. Efficacy and Safety of Elafibranor in Primary Biliary Cholangitis [J]. *New England Journal Of Medicine*, 2024, 390(9): 795-805.
- [25] 马晓阳, 朱海林, 侯龙辉. 丁二磺酸腺苷蛋氨酸联合熊去氧胆酸治疗原发性胆汁性胆管炎的效

- 果及对氧化应激指标的影响 [J]. 临床医学研究与实践, 2024, 9(11): 21-24.
- [26] FEJFAR T, VANASEK T, HULEK P. Chronic cholestatic liver diseases - Primary biliary cholangitis and Primary sclerosing cholangitis [J]. Vnitřní lékařství, 2020, 66(5): 287-300.
- [27] 王楠, 胡蓉, 卞石惠, 等. 熊去氧胆酸治疗 1 个月后的碱性磷酸酶水平和基线红细胞分布宽度对原发性胆汁性胆管炎治疗应答的预测价值 [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(03): 496-501.
- [28] ABBAS N, CULVER E L, THORBURN D, et al. UK-Wide Multicenter Evaluation of Second-line Therapies in Primary Biliary Cholangitis [J]. Clinical Gastroenterology And Hepatology, 2023, 21(6): 1561-1570. e13.
- [29] 王媛媛, 张福民. 原发性胆汁性肝硬化临床特征分析 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(15): 52.
- [30] CHANG M L, CHEN W T, CHAN T M, et al. Anti-Mitochondrial Antibody Titers Decrease Over Time in Primary Biliary Cholangitis Patients With Ursodeoxycholic Acid Therapeutic Response: A Cohort Study Followed Up to 28 Years [J]. Frontiers In Immunology, 2022, 13: 869018.
- [31] HUANG L X, WANG Z L, JIN R, et al. Incomplete response to ursodeoxycholic acid in primary biliary cholangitis: criteria, epidemiology, and possible mechanisms [J]. Expert Review Of Gastroenterology & Hepatology, 2022, 16(11-12): 1065-1078.
- [32] HIRSCHFIELD G M, SHIFFMAN M L, GULAMHUSEIN A, et al. Seladelpar efficacy and safety at 3 months in patients with primary biliary cholangitis: ENHANCE, a phase 3, randomized, placebo-controlled study [J]. Hepatology, 2023, 78(2): 397-415.
- [33] CORPECHOT C, LEMOINNE S, SORET P-A, et al. Adequate versus deep response to ursodeoxycholic acid in primary biliary cholangitis: To what extent and under what conditions is normal alkaline phosphatase level associated with complication-free survival gain? [J]. Hepatology, 2024, 79(1): 39-48.
- [34] Two randomized, double-blind, active-controlled, phase 2 trials (studies 213 and 214) assessed the effects of combination OCA/BZF vs BZF monotherapy on safety and tolerability, as well as on serum biomarker levels and rates of biochemical remission. [J]. AALSD 2023 Poster.
- [35] MAYO M J, VIERLING J M, BOWLUS C L, et al. Open - label, clinical trial extension: Two - year safety and efficacy results of seladelpar in patients with primary biliary cholangitis [J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2024, 59(2): 186-200.
- [36] VUPPALANCHI R, CALDWELL S H, PYRSOPOULOS N, et al. Proof-of-concept study to evaluate

the safety and efficacy of saroglitazar in patients with primary biliary cholangitis [J]. *Journal Of Hepatology*, 2022, 76(1): 75-85.

[37] INVERNIZZI P, CARBONE M, JONES D, et al. Setanaxib, a first-in-class selective NADPH oxidase 1/4 inhibitor for primary biliary cholangitis: A randomized, placebo-controlled, phase 2 trial [J]. *Liver International*, 2023, 43(7): 1507-1522.

[38] GERSHWIN M E, MACKAY I R. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths [J]. *Hepatology*, 2008, 47(2): 737-745.

[39] GERSHWIN M E, 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]. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 1987, 138(10): 3525-3531.

[40] CHEN R L, TANG R Q, MA X, et al. Immunologic Responses and the Pathophysiology of Primary Biliary Cholangitis [J]. *Clinics In Liver Disease*, 2022, 26(4): 583-611.

[41] LEUNG P S C, CHUANG D T, WYNN R M, et al. Autoantibodies to BCOADC-E2 in Patients With Primary Biliary Cirrhosis Recognize a Conformational Epitope [J]. *Hepatology*, 1995, 22(2): 505-513.

[42] MOTEKI S, LEUNG P S C, DICKSON E R, et al. Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex [J]. *Hepatology*, 1996, 23(3): 436-444.

[43] 周晔, 姚定康, 陈燕, 等. 自身抗原 BCOADC-E2 融合蛋白的重组表达和鉴定 [J]. *肝脏*, 2006, (05): 343-345.

[44] LEUNG P S C, CHOI J, YANG G X, et al. A contemporary perspective on the molecular characteristics of mitochondrial autoantigens and diagnosis in primary biliary cholangitis [J]. *Expert Review Of Molecular Diagnostics*, 2016, 16(6): 697-705.

[45] LEUNG P S C, WANG J J, NAIYANETR P, et al. Environment and primary biliary cirrhosis: Electrophilic drugs and the induction of AMA [J]. *Journal Of Autoimmunity*, 2013, 41: 79-86.

[46] NISHIO A, VAN DE WATER J, LEUNG P S, et al. Comparative studies of antimitochondrial autoantibodies in sera and bile in primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology*, 1997, 25(5): 1085-1089.

[47] HIRSCHFIELD G M, GERSHWIN M E. The Immunobiology and Pathophysiology of Primary Biliary Cirrhosis [M]//ABBAS A K, GALLI S J, HOWLEY P M. *Annual Review Of Pathology: Mechanisms Of Disease*, Vol 8. 2013: 303-330.

[48] BENSON G D, KIKUCHI K, MIYAKAWA H, et al. Serial analysis of antimitochondrial antibody in

- patients with primary biliary cirrhosis [J]. *Clinical & developmental immunology*, 2004, 11(2): 129-133.
- [49] FREGEAU D R, DAVIS P A, DANNER D J, et al. Antimitochondrial antibodies of primary biliary cirrhosis recognize dihydrolipoamide acyltransferase and inhibit enzyme function of the branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex [J]. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 1989, 142(11): 3815-3820.
- [50] 郭婧婧, 金燕, 张运丽. 原发性胆汁性肝硬化患者血清相关自身抗体检测及其临床意义 [J]. *医学临床研究*, 2006, 23(9): 3.
- [51] HARADA K, SUDO Y, KONO N, et al. In situ nucleic acid detection of PDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2, PDC-E1 α , BCOADC-E1 α , OGDC-E1, and the E3 binding protein (protein X) in primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology*, 1999, 30(1): 36-45.
- [52] MIYAKAWA H, KITAZAWA E, FUJIKAWA H, et al. Analysis of two major anti-M2 antibodies (anti-PDC-E2/anti-BCOADC-E2) in primary biliary cirrhosis: relationship to titers of immunofluorescent anti-mitochondrial antibody [J]. *Hepatology Research*, 2000, 18(1): 1-9.
- [53] HOWARD M J, FULLER C, BROADHURT R W, et al. Three-dimensional structure of the major autoantigen in primary biliary cirrhosis [J]. *Gastroenterology*, 1998, 115(1): 139-146.
- [54] MIYAKAWA H, KAWAGUCHI N, KATAYAMA K, et al. cDNA sequencing of branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex (BCOADC)-E2 in Japanese patients with primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology Research*, 1999, 14(1): 70-77.
- [55] SUZEN S, GURER-ORHAN H, SASO L. Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Technique [J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 181.
- [56] ROESSLER M M, SALVADORI E. Principles and applications of EPR spectroscopy in the chemical sciences [J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(8): 2534-2553.
- [57] HAGEN W R. EPR spectroscopy as a probe of metal centres in biological systems [J]. *Dalton Transactions*, 2006, (37): 4415-4434.
- [58] KLARE J P. Site-directed spin labeling EPR spectroscopy in protein research [J]. *Biological Chemistry*, 2013, 394(10): 1281-1300.
- [59] HUBBELL W L, MCHAOUB H S, ALTENBACH C, et al. Watching proteins move using site-directed spin labeling [J]. *Structure (London)*, 1996, 4(7): 779-783.
- [60] GRIFFITH O H, MCCONNELL H M. A nitroxide-maleimide spin label [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1966, 55(1): 8-11.

- [61] SUNDBERG S A, HUBBELL W L. Investigation of surface potential asymmetry in phospholipid vesicles by a spin label relaxation method [J]. Biophysical journal, 1986, 49(2): 553-562.
- [62] ALTENBACH C, FRONCISZ W, HYDE J S, et al. Conformation of spin-labeled melittin at membrane surfaces investigated by pulse saturation recovery and continuous wave power saturation electron paramagnetic resonance [J]. Biophysical journal, 1989, 56(6): 1183-1191.
- [63] KLUG C S, FEIX J B. Methods and applications of site-directed spin Labeling EPR Spectroscopy [M]//CORREIA J J, DETRICH H W. Biophysical Tools for Biologists: Vol 1 In Vitro Techniques. 2008: 617-658.
- [64] SUBCZYNSKI W K, RAGUZ M, WIDOMSKA J. Studying Lipid Organization in Biological Membranes Using Liposomes and EPR Spin Labeling [M]//WEISSIG V. Liposomes: Methods and Protocols, Vol 2:BIOLOGICAL MEMBRANE MODELS. 2010: 247-269.
- [65] GOLDFARB D. Gd³⁺ spin labeling for distance measurements by pulse EPR spectroscopy [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014, 16(21): 9685-9699.
- [66] YANG Y, GONG Y-J, LITVINOV A, et al. Generic tags for Mn(II) and Gd(III) spin labels for distance measurements in proteins [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2017, 19(39): 26944-26956.
- [67] JASSOY J J, HEUBACH C A, HETT T, et al. Site Selective and Efficient Spin Labeling of Proteins with a Maleimide-Functionalized Trityl Radical for Pulsed Dipolar EPR Spectroscopy [J]. Molecules, 2019, 24(15): 2735.
- [68] MILEO E, ETIENNE E, MARTINHO M, et al. Enlarging the Panoply of Site-Directed Spin Labeling Electron Paramagnetic Resonance (SDSL-EPR): Sensitive and Selective Spin-Labeling of Tyrosine Using an Isoindoline-Based Nitroxide [J]. Bioconjugate Chemistry, 2013, 24(6): 1110-1117.
- [69] FLEISSNER M R, BRUSTAD E M, KALAI T, et al. Site-directed spin labeling of a genetically encoded unnatural amino acid [J]. Proceedings Of the National Academy Of Sciences Of the United States Of America, 2009, 106(51): 21637-21642.
- [70] SCHMIDT M J, BORBAS J, DRESCHER M, et al. A Genetically Encoded Spin Label for Electron Paramagnetic Resonance Distance Measurements [J]. Journal Of the American Chemical Society, 2014, 136(4): 1238-1241.
- [71] KUGELE A, SILKENATH B, LANGER J, et al. Protein Spin Labeling with a Photocaged Nitroxide Using Diels-Alder Chemistry [J]. Chembiochem, 2019, 20(19): 2479-2484.
- [72] SCHREIER S, BOZELLI J C, JR., MARIN N, et al. The spin label amino acid TOAC and its uses in

studies of peptides: chemical, physicochemical, spectroscopic, and conformational aspects [J]. *Biophysical reviews*, 2012, 4(1): 45-66.

[73] STOLLER S, SICOLI G, BARANOVA T Y, et al. TOPP: A Novel Nitroxide-Labeled Amino Acid for EPR Distance Measurements [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011, 50(41): 9743-9746.

[74] SAREWICZ M, SZYTULA S, DUTKA M, et al. Estimation of binding parameters for the protein-protein interaction using a site-directed spin labeling and EPR spectroscopy [J]. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2008, 37(4): 483-493.

[75] MALYGIN A A, KRUMKACHEVA O A, GRAIFER D M, et al. Exploring the interactions of short RNAs with the human 40S ribosomal subunit near the mRNA entry site by EPR spectroscopy [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(22): 11850-11860.

[76] DUSS O, YULIKOV M, ALLAIN F H T, et al. Combining NMR and EPR to Determine Structures of Large RNAs and Protein-RNA Complexes in Solution [M]//WOODSON S A, ALLAIN F H T. *Structures Of Large Rna Molecules And Their Complexes*. 2015: 279-331.

[77] BONUCCIA, CALDARONI E, BALDUCCI E, et al. A Spectroscopic Study of the Aggregation State of the Human Antimicrobial Peptide LL-37 in Bacterial versus Host Cell Model Membranes [J]. *Biochemistry*, 2015, 54(45): 6760-6768.

[78] FREEMAN A D J, STEVENS M, DECLAIS A-C, et al. Analysis of the Intrinsically Disordered N-Terminus of the DNA Junction-Resolving Enzyme T7 Endonuclease I: Identification of Structure Formed upon DNA Binding [J]. *Biochemistry*, 2016, 55(30): 4166-4172.

[79] 李梦, 刘艳丽, 王真, 等. 利用丙氨酸扫描突变探究 crotalphine 结构与镇痛活性的关系 [J]. *生物技术通讯*, 2020, 31(06): 710-713.

[80] KONNO K, PICCOLO G, GUTIERREZ V P, et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* [J]. *Peptides*, 2008, 29(8): 1293-1304.

[81] UNCIULEAC M C, GOLDGUR Y, SHUMAN S. Caveat mutator: alanine substitutions for conserved amino acids in RNA ligase elicit unexpected rearrangements of the active site for lysine adenylation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(10): 5603-5615.

[82] 沈谦. 重组侧链二氧酸脱氢酶复合体 E2 蛋白关键性氨基酸的功能研究 [D]; 扬州大学, 2021.

[83] MAHMOODI S, POURHASSAN-MOGHADDAM M, WOOD D W, et al. Current affinity approaches for purification of recombinant proteins [J]. *Cogent Biology*, 2019, 5(1): 1665406.

- [84] 焦凤娟, 刘俊杰, 卢思维, 等. 重叠延伸 PCR 技术定点突变 TFEB 原核表达载体的构建及体外诱导表达和纯化 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(05): 1109-1115.
- [85] LEE S-M, KO S-H, PARK J-E, et al. Expression of a recombinant branched chain alpha-oxo acid dehydrogenase complex E2 (BCOADC-E2) in insect cells and its immunoreactivity to autoimmune sera [J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 1998, 30(2): 65-71.
- [86] 周广青, 刘晓庆, 史喜娟, 等. 口蹄疫病毒抗体 SA-ELISA 快速检测方法的建立 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(05): 2020-2029.
- [87] MISHRA M, TIWARI S, GOMES A V. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques [J]. *Expert Review Of Proteomics*, 2017, 14(11): 1037-1053.
- [88] SINGH K K, GUPTA A, BHARTI C, et al. Emerging techniques of western blotting for purification and analysis of protein [J]. *Future Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 7(1): 1-14.
- [89] MAHMOOD T, YANG P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting [J]. *North American journal of medical sciences*, 2012, 4(9): 429-434.
- [90] SULE R, RIVERA G, GOMES A V. Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems [J]. *Biotechniques*, 2023, 75(3): 99-114.
- [91] LIU Z-Q, MAHMOOD T, YANG P-C. Western blot: technique, theory and trouble shooting [J]. *North American journal of medical sciences*, 2014, 6(3): 160.
- [92] KROON C, BREUER L, JONES L, et al. Blind spots on western blots: Assessment of common problems in western blot figures and methods reporting with recommendations to improve them [J]. *Plos Biology*, 2022, 20(9): e3001783.
- [93] 姚梦瑶, 李娟, 刘志刚, 等. 植物蛋白酶抑制剂研究进展 [J]. 分子植物育种, 2024: 1-16.
- [94] 冯玮. 植物蛋白酶抑制剂研究进展概述 [J]. 生物学教学, 2020, 45(12): 61-63.
- [95] WANG J J, BUDAMAGUNTA M S, VOSS J C, et al. Antimitochondrial Antibody Recognition and Structural Integrity of the Inner Lipoyl Domain of the E2 Subunit of Pyruvate Dehydrogenase Complex [J]. *Journal Of Immunology*, 2013, 191(5): 2126-2133.
- [96] BOGDANOS D, PUSL T, RUST C, et al. Primary biliary cirrhosis following lactobacillus vaccination for recurrent vaginitis [J]. *Journal Of Hepatology*, 2008, 49(3): 466-473.
- [97] BOGDANOS D P, LEONI S, BAUM H, et al. Primary biliary cirrhosis is characterized by IgG3 antibodies cross-reactive with the major mitochondrial autoepitope and its Lactobacillus mimic [J]. *Journal Of Hepatology*, 2005, 42: 232.

- [98] BOGDANOS D P, BAUM H, VERGANI D, et al. The role of E.coli infection in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis [J]. Disease Markers, 2010, 29(6): 301-311.
- [99] PADGETT K A, SELMI C, KENNY T P, et al. Phylogenetic and immunological definition of four lipoylated proteins from *Novosphingobium aromaticivorans*, implications for primary biliary cirrhosis [J]. Journal Of Autoimmunity, 2005, 24(3): 209-219.
- [100] LEUNG P S, PARK O, GERSHWIN M E. Is there a relation between chlamydia infection and primary biliary cirrhosis? [J]. Hepatology, 2002, 36(4): 388A.