

# 中文摘要

## 早孕因子对红肉 Neu5Gc 诱导的 CMAH<sup>-/-</sup> 小鼠抗体产生的阻断研究

牛、羊和猪等哺乳动物的肉常被称之为红肉，是我们日常生活中必不可少的动物源食品。饮食习惯的不同，使得红肉的摄入与人类各种病症相关联，比如癌症、心血管疾病、II型糖尿病、高脂症和高血压等等。有大量资料证实，长时间大量摄入红肉及其制品可能提高人体患有肿瘤和心血管疾病的危险。近几年研究发现，红肉中存在一种潜在的致癌性物质—N-羟乙酰神经氨酸(N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)，作为一种特殊的抗原物质，能够通过多种途径修饰于人体细胞表面，激活免疫系统而产生抗体。这种抗体与抗原的持续作用，引发慢性炎症反应，进一步导致肿瘤和癌症的发生与发展。由此可见，在 Neu5Gc 诱发慢性炎症的过程中，抗体的产生是引发疾病的关键点，而抗体的产生有赖于 T 细胞的辅助作用，如果 T 细胞活性受到抑制，对 B 细胞的活化及抗体的产生均有一定影响，如果能有阻断抗体产生这一关键致病环节，减少抗原抗体持续作用带来的慢性炎症，有望解决红肉 Neu5Gc 引发的食肉安全难题。

研究发现，早孕因子 (Early pregnancy factor, EPF) 可以减少 CD4<sup>+</sup> T 细胞黏附分子的表达及其分泌量，下调 T 细胞活性，使胎儿在母体内不被当作异物清除，被认为是一种温和的免疫抑制因子。最早是由澳大利亚研究员 Morton 在怀孕小鼠血清中首次发现，是目前最早确认母体妊娠的生化指标之一。现已广泛用于早孕诊断、胎儿检测以及自身免疫疾病的治疗等。

鉴于 EPF 特殊的免疫抑制功能以及抗体生成中 T\B 细胞的相互活化关系，探讨 EPF 通过抑制 Th 细胞活化，能否使 B 细胞抗体合成受阻，从而减弱因抗体和 Neu5Gc 相互作用导致的慢性炎症。本研究首先克隆 EPF 蛋白编码核酸序列，通过原核表达系统，诱导表达 SUMO-EPF 重组蛋白 (srEPF) 和去除抑制区的 EPF (10 kD) 蛋白并进行纯化，制备并纯化 EPF 的抗体；并在细胞水平上通过玫瑰花环抑制试验验证其活性；以 CMAH 基因缺失小鼠作为模拟人体的模型动物，探讨 EPF 对 Neu5Gc 诱发的慢性炎症的作用效果。

结果表明，成功表达并纯化 srEPF 和 EPF (10 kD) 蛋白，获得高纯度、高

特异性的 EPF 抗体，能和 EPF 蛋白发生特异性结合；体外条件下，通过抑制玫瑰花环的形成，表明 EPF 发挥了较好的免疫抑制功能；建立红肉 Neu5Gc 介导的动物模型，经 EPF 干预后可缓解小鼠体重增长缓慢和结肠长度缩短的状况，ELISA 结果显示，注射 EPF 后，显著降低了体内抗 Neu5Gc 抗体的水平，减少了体内炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的含量和 MPO 活性，HE 染色结果显示，EPF 治疗后，肝脏和肠组织的病变情况有所缓解；免疫组化观察小鼠体内 CD4 淋巴细胞发现，与炎症促进组相比，EPF 组 CD4 细胞含量明显降低，且荧光定量结果表明 EPF 处理后小鼠体内 B 细胞活化分子 CD80 和 CD86 分子数量有所下降，表明 EPF 可能通过抑制 CD4 淋巴细胞，干预 B 细胞活化信号的传递，进而影响体内抗 Neu5Gc 抗体的产生，减轻由红肉 Neu5Gc 引起的机体炎症。

综上所述，本实验制备的 EPF 抗原对红肉 Neu5Gc 引起的抗体产生具有抑制作用，可以降低小鼠体内的炎症水平，缓解 Neu5Gc 引起的机体炎症，为探索 and 解决长期食用红肉带来的安全隐患这一难题提供全新的研究思路和有效的解决方式。

**关键词：**

EPF；红肉；Neu5Gc；玫瑰花环抑制实验；CMAH<sup>-/-</sup>小鼠

## **Abstract**

### **Blocking effect of Early Pregnancy Factor on red meat Neu5Gc-induced antibody production in CMAH<sup>-/-</sup> mice**

The meat of mammals such as cows, sheep, and pigs are often referred to as red meat and is an essential animal source food in our daily lives. Different eating habits make red meat intake associated with various human diseases, such as cancer, cardiovascular disease, type II diabetes, hyperlipidemia and hypertension. There is a large amount of evidence to confirm that prolonged consumption of red meat and its products may increase the risk of developing tumors and cardiovascular diseases in the human body. In recent years, studies have found that there is a potential carcinogen in red meat, N-hydroxyacetylneuraminic acid (Neu5Gc). As a special antigen, it can be modified on the surface of human cells through various ways to activate the immune system and produce antibodies. The sustained interaction between this antibody and antigen triggers chronic inflammatory reactions, further leading to the occurrence and development of tumors and cancer. From this, it can be seen that in the process of Neu5Gc inducing chronic inflammation, the production of antibodies is the key point that triggers the disease, and the production of antibodies depends on the auxiliary effect of T cells. If T cell activity is inhibited, it will have a certain impact on the activation of B cells and the production of antibodies. If the key pathogenic link of blocking antibody production can be achieved, reducing the chronic inflammation caused by the continuous action of antigens and antibodies, It is expected to solve the meat safety problem caused by red meat Neu5Gc.

It has been found that early pregnancy factor (EPF) can reduce the expression and secretion of CD4<sup>+</sup> T cell adhesion molecules, down regulate the activity of T cells, and prevent the fetus from being cleared as a foreign body in the mother. It is considered to be a mild immunosuppressive factor. It was first discovered by Australian researcher Morton in the serum of pregnant mice and is currently one of the earliest biochemical indicators to confirm maternal pregnancy. Currently, it has been widely used for early pregnancy diagnosis, fetal testing, and the treatment of autoimmune diseases.

Given the unique immunosuppressive function of EPF and the mutual activation relationship between T/B cells in antibody generation, this study aims to explore

whether EPF can inhibit Th cell activation and hinder B cell antibody synthesis, thereby reducing chronic inflammation caused by the interaction between antibodies and Neu5Gc. This study first cloned the nucleic acid sequence encoding the EPF protein, induced the expression of the sumo EPF recombinant protein (srEPF) and the EPF (10 kD) protein that removed the inhibitory region through a prokaryotic expression system, and purified the EPF antibody; And verify its activity at the cellular level through rosette inhibition test; To investigate the effect of EPF on Neu5Gc induced chronic inflammation in mice with CMAH gene deletion as a simulated human model animal.

The results showed that srEPF and EPF (10 kD) proteins were successfully expressed and purified, and high purity and high specificity of EPF antibodies were obtained. EPF exerted a better immunosuppressive effect by inhibiting the formation rate of rosette and its binding form in vitro. The animal model mediated by Neu5Gc in red meat was established, and EPF intervention could alleviate the slow weight gain and shortening of colon length in mice. ELISA results showed that injection of EPF significantly reduced the level of anti-Neu5Gc antibody, the contents of inflammatory factors IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and MPO activity in vivo. HE staining showed that the pathological changes of liver and intestinal tissues were alleviated after EPF treatment. Immunohistochemical observation of CD4 cells in mice showed that the number of CD4 cells in EPF group was significantly lower than that in inflammation promotion group, and fluorescence quantitative results showed that the number of B cell activation molecules CD80 and CD86 molecules in mice after EPF treatment was decreased, indicating that EPF may inhibit CD4 lymphocytes. Intervention of B cell activation signal transmission, and then affect the production of anti-Neu5Gc antibody in vivo, reduce the body inflammation caused by red meat Neu5Gc.

In summary, the EPF antigen prepared in this experiment has an inhibitory effect on the production of antibodies caused by red meat Neu5Gc, which can reduce the level of inflammation in mice and alleviate the inflammation caused by Neu5Gc. This provides a new research approach and effective solution for exploring and solving the safety hazards caused by long-term consumption of red meat.

**Key words:**

EPF; Red meat; Neu5Gc; Rosette inhibition experiment; CMAH<sup>-/-</sup> mice

# 目 录

引 言 .....	1
第一篇 文献综述 .....	3
第 1 章 红肉中的风险物质 N-羟乙酰神经氨酸 .....	3
1.1 Neu5Gc 概述 .....	3
1.2 人体内 Neu5Gc 抗体的产生及致病机制 .....	6
1.3 Neu5Gc 与疾病的关系 .....	7
第 2 章 早孕因子的研究进展与应用 .....	9
2.1 早孕因子的来源 .....	9
2.2 早孕因子的功能 .....	10
2.3 早孕因子的临床应用 .....	11
2.4 自身免疫病的治疗 .....	13
2.5 本实验研究主要目的及意义 .....	13
第二篇 研究内容 .....	14
第 1 章 EPF 重组蛋白的原核表达及纯化 .....	14
1.1 材料 .....	14
1.2 方法 .....	16
1.3 结果 .....	22
1.4 讨论 .....	30
1.5 小结 .....	30
第 2 章 EPF 抗体的制备与纯化及体外免疫抑制活性分析 .....	31
2.1 材料 .....	32
2.2 方法 .....	33
2.3 结果 .....	37

2.4 讨论 .....	39
2.5 小结 .....	40
第 3 章 早孕因子对红肉 Neu5Gc 诱导的 CMAH <sup>-/-</sup> 小鼠抗体产生的阻 断研究 .....	41
3.1 材料 .....	41
3.2 方法 .....	44
3.3 结果 .....	50
3.4 讨论 .....	59
3.5 小结 .....	61
结 论 .....	62
参考文献 .....	63
导师简介 .....	71
作者简介及科研成果 .....	72
致 谢 .....	73

## 英文缩写词表

英文缩写	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
EPF	Early pregnancy factor	早孕因子
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
LB	Lysogeny broth	LB 培养基
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -d-thigalactoside	异丙基- $\beta$ -d-硫代半乳糖苷
Neu5Gc	N-glycolyneuraminic acid	N-羟乙酰神经氨酸
ManNAc	N-acetylmannosamine	N-乙酰甘露糖胺
SA	Sialic acid	唾液酸
PAF	Platelet activating factor	血小板激活因子
HCG	Human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
RIT	Rosette inhibition test	玫瑰花环抑制试验
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
CDS	Coding sequence	蛋白质编码区
qRT-PCR	Real-time quantitative PCR	实时定量 PCR
ALS	Anti-lymphocyte	抗淋巴细胞血清
rpm	Revolution per minute	转/分钟
PVDF	Polyvinylidene Fluride	聚偏氟乙烯
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
PAG	Pregnancy associated glycoproteins	妊娠相关糖蛋白
HE	Hematoxylin-eosin	苏木精-伊红
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$	白细胞介素-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素-6
MPO	Myeloperoxidase	髓过氧化物酶
Tris	Trihydroxy methyl aminomethane	三羟甲基氨基烷

## 引 言

世界卫生组织曾在 2015 年 10 月发表声明，将培根、火腿、香肠等的加工肉产品列为 1 类致癌物（即人类致癌物），将牛、羊、猪肉等红肉列为 2A 类致癌物（即对人类致癌的危险性较高）<sup>[1]</sup>。据估计，全世界一年约有 5 万例患者死于癌症，而文献荟萃分析其原因很可能是与饮食中含有大量红肉相关。N-羟乙酰神经氨酸 (N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc) 是近年来发现的存在于红肉中的一种与致癌有关的物质，近年来引起人们广泛的关注。

Neu5Gc 是哺乳动物体内一种唾液酸成分，主要存在于生物体中细胞表面糖复合物的末端，在体内细胞相互识别、黏附、炎症反应和肿瘤细胞生长与转移中起重要作用。正常情况下，Neu5Gc 的合成是由 CMP-Neu5Ac 羟化酶(CMAH) 催化 Neu5Ac 形成 Neu5Gc<sup>[2, 3]</sup>。在人类进化历程中，因为人体内负责编码催化 Neu5Ac 合成 Neu5Gc 的羟化酶的 CMAH 基因片段缺失，使得羟化酶失去活性，在人体内就不能产生 Neu5Gc，而鸡体内缺少 CMAH 基因，所以一般条件下人和鸡体内是不存在 Neu5Gc 的，而猪、牛、羊等其他哺乳动物细胞中则有 Neu5Gc 表达<sup>[4]</sup>。而人们通过食用含有 Neu5Gc 的物质，如红肉，牛奶等，可将外源的 Neu5Gc 摄入人体中，体内唾液酸生物合成酶并不能区分 Neu5Gc 和 Neu5Ac，外源性的 Neu5Gc 通过这个代谢“漏洞”用于人类细胞的唾液化。虽然人类的唾液酸生物合成酶不能明确区分 Neu5Ac 和 Neu5Gc，人类免疫系统却能将其识别，从而刺激机体产生相应的特异性抗体，并导致慢性炎症的发生，进而促进肿瘤等疾病的发生风险<sup>[5]</sup>。已有实验表明：在一些脏器疾病如肝癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、淋巴瘤和结肠癌等恶性肿瘤的细胞膜上却有 Neu5Gc 的存在且含量显著增加，进一步说明 Neu5Gc 的存在对人体健康有显著危害<sup>[6-9]</sup>。

早孕因子 (Early pregnancy factor, EPF) 是由 Morton 在怀孕鼠血清中检测到的<sup>[10]</sup>，EPF 存在于妊娠血清中，通过抑制 T 淋巴细胞生成，干预其介导的免疫能力，并使胎儿在母体中不被当作异物而排斥<sup>[11]</sup>。学者在皮肤移植实验中，通过向移植处注射 rEPF 后，发现可以显著延长皮肤的存活时间，说明 EPF 具有免疫抑制的功能，抑制了因皮肤移植引起的免疫排斥反应<sup>[12]</sup>。另外，EPF 还



通过抑制体内细胞介导的免疫反应，在治疗关节炎、器官移植和烧伤等方面具有广阔的前景。

虽然人体内不含 Neu5Gc，但可以通过食物以及动物性制品摄入到人体内组织细胞，Neu5Gc 能够被直接提呈给人类免疫系统，进而刺激免疫系统产生相应的抗 Neu5Gc 抗体。长时间的抗体与抗原持续作用，引起慢性炎症的发生，进而增加患有肿瘤等疾病的风险。如果能够人为干预阻断抗体产生这一关键环节，就有希望减少炎症发生以及诱发癌症的可能。本研究中，通过人工表达纯化 EPF 蛋白，体外实验验证其免疫抑制活性，以 CMAH 基因缺失小鼠作为模拟人体的模型动物，探讨 EPF 对 Neu5Gc 诱发的慢性炎症的作用效果，为探索 and 解决长期食用红肉带来的安全隐患这一难题提供全新的研究思路和有效的解决方式。

## 第一篇 文献综述

### 第1章 红肉中的风险物质 N-羟乙酰神经氨酸

#### 1.1 Neu5Gc 概述

##### 1.1.1 人体缺乏的一种唾液酸—Neu5Gc

世界卫生组织(WHO)在 2015 年将红肉列为 2A 类致癌物。大量研究结果表明,长期大量摄入红肉及其制品,会提高因心脏病和癌症导致的死亡风险<sup>[13]</sup>。N-羟乙酰神经氨酸(N-glycolyneuraminic acid, Neu5Gc)是存在于猪肉、牛肉、羊肉等红肉食品中的内源致病因子。Neu5Gc 是九碳氨基糖神经氨酸,是一种唾液酸(Sialic acid, SA)。现已发现的唾液酸共有五十多种,唾液酸的个数、固有的结合方式和空间结构排列的多元化,导致生成糖脂和糖蛋白结构的各种各样,在细胞间的相互识别、炎症的反应以及肿瘤细胞的增殖和扩散方面,具有关键的作用,为发挥各种生理作用提供了物质基础<sup>[14, 15]</sup>。

如图 1.1 所示是唾液酸的结构和主要类型,其中 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)和 N-羟乙酰基神经氨酸(Neu5Gc)是最主要的两种唾液酸。Neu5Ac 在结构上比 Neu5Gc 多了一个氧原子, Neu5Ac 是细胞质中的中性前体 N-乙酰甘露糖胺(N-acetylmannosamine, ManNAc)生成的, Neu5Ac 于细胞核中被激活成 CMP-Neu5Ac,在多种还原酶的作用下,活化 CMP-Neu5Ac 碳原子偶联的乙酰基,致使其发生羟基化生成游离态的 Neu5Gc, Neu5Gc 随后被运输到高尔基体的内膜中,被高尔基体膜表面的唾液酸转移酶催化,最后通过涎基方式连接到糖脂和糖蛋白中生成结合态<sup>[16, 17]</sup>。

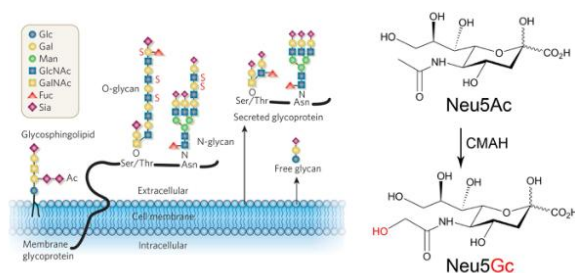


图 1.1 唾液酸的结构及主要类型<sup>[15]</sup>

Fig. 1.1 Structure and major types of sialic acid<sup>[15]</sup>

Neu5Gc 基本存在于所有后口动物，但在人类进化历程中，由于编码 CMP-Neu5Ac 羟化酶基因的外显子 6 中碱基对的缺失进而影响了该基因的活性，人体无法自主产生 Neu5Gc，所以人体正常条件下不含有 Neu5Gc，如图 1.2 所示<sup>[18]</sup>，这种基因差异导致了人类与其他动物很大不同，与我们关系最近的猩猩相比，人体内血液及组织中缺乏 Neu5Gc，但体内含有大量的 Neu5Ac<sup>[19, 20]</sup>；有实验表明大部分动物大脑中 Neu5Gc 的表达量都比较少，这种情况在其他组织中 Neu5Gc 高表达的动物一样，某种意义上说 Neu5Gc 的缺失促进了人体大脑的进化<sup>[21]</sup>。

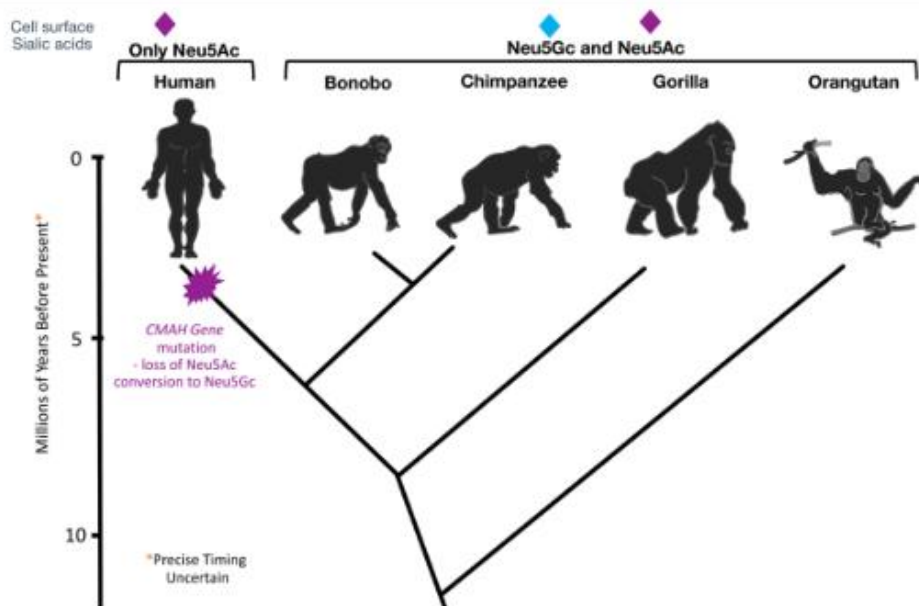


图 1.2 人进化过程中 CMAH 基因的缺失<sup>[18]</sup>

Fig. 1.2 Deletion of the CMAH gene in human evolution<sup>[18]</sup>

### 1.1.2 人体中 Neu5Gc 的来源

正常情况下人体内没有合成 Neu5Gc 的替代途径，但在人体内上皮细胞和内皮细胞表面可以检测到 Neu5Gc 的存在，而且在一些癌症组织中含量更多。Malyk<sup>[18]</sup> 等分析了机体内含 Neu5Gc 的可能原因：一是体内的 Neu5Gc 是 Neu5Ac 在 CMAH 羟化酶的作用下合成，二是体内的 Neu5Gc 可能通过细胞和羟基丙酮酸代谢的中间产物以及乙酰化的方式生成，三是人通过食入外源性物质进入体内，比如摄入富含 Neu5Gc 的动物性食品（如红肉），使得外源 Neu5Gc 在身体积累。

实验人员利用 CMAH 基因敲除的小鼠做动物模型, 这种小鼠以基因编辑的手段敲除体内 CMAH 基因的表达, 所以其体内不含 Neu5Gc, 此时的小鼠与人体是相似的。在一段时间内, 饲喂 CMAH 基因敲除小鼠不含 Neu5Gc 的食物和含 Neu5Gc 的食物, 结果发现摄入不含 Neu5Gc 鼠粮的实验小鼠体内依然没有 Neu5Gc 的表达, 而食入含 Neu5Gc 食物的小鼠体内检测到 Neu5Gc 及相应 anti-Neu5Gc 抗体的存在, 结果说明人体内不存在其他 Neu5Gc 生物合成途径, 人体不能自发的生成 Neu5Gc, 只能合成 Neu5Ac, 人体内的 Neu5Gc 存在只能是外源性的, 且人体中 Neu5Gc 的唯一来源也只有红肉、乳制品以及动物性食品的摄入, 而红肉是主要来源<sup>[22]</sup>。

### 1.1.3 人体内 Neu5Gc 的代谢方式

饮食摄入的外源性 Neu5Gc 可以通过两种途径整合到人体细胞中。(1) 细胞摄取的糖蛋白转运到溶酶体室后, 释放 Neu5Gc, 在胞质再利用 Neu5Gc。Muriel Bardor 在体外条件下培养人上皮细胞<sup>[23]</sup>, 并向培养基中加入 Neu5Gc, 检测后发现上皮细胞表面有 Neu5Gc 聚集, 他分析 Neu5Gc 通过胞饮运输到溶酶体后, 将糖蛋白或糖脂溶解并释放 Neu5Gc, 与受体接触后进入细胞液中。(2) 外源性食物通过消化道进入肠道, 在肠道中分解食物生成的中性前体 N-羟乙酰甘露糖胺, 之后利用被动扩散的方式进入细胞, 将其转化为 Neu5Gc<sup>[24]</sup>。这两种途径都可以有效地避免人类的羟化酶缺陷。

饲喂 CMAH<sup>-/-</sup>小鼠含放射性元素标记的游离 Neu5Ac 和 Neu5Gc, 结果显示游离唾液酸大多通过尿液排泄, 仅在敲除小鼠体内组织检测出少量由放射性元素标记的唾液酸。Kalyan Banda 等<sup>[25]</sup>对 Neu5Gc 缺陷型小鼠分别饲喂游离的 Neu5Gc 和含 Neu5Gc 的糖蛋白, 实验结果表明游离态 Neu5Gc 快速被吸收到血液循环中, 在摄入后 1-2 小时达到最高值, 之后快速被肾脏代谢, 由尿液排泄; Neu5Gc 糖蛋白被吸收至血液后, 小鼠体内 Neu5Gc 与周围组织细胞中的糖蛋白和糖脂结合, 其含量在体内长时间保持稳定。这都表明食物中的 Neu5Gc 能够被人体吸收和代谢<sup>[26]</sup>。该学者研究也证实了食物中的 Neu5Gc 糖蛋白以胞饮方法进入溶酶体, 从其中释放出游离的 Neu5Gc, 在细胞质中将 Neu5Gc 催化成 Neu5Gc-CMP 后运输到高尔基体, 通过唾液酸转移酶与新生成的糖复合物结合, 稳定存在于人体内组织器官以及血液中<sup>[27]</sup>, 此外, 相比于身体健康人群来

说，营养不良患者更容易聚集 Neu5Gc<sup>[28]</sup>。

## 1.2 人体内 Neu5Gc 抗体的产生及致病机制

Neu5Gc 是一种特殊抗原，能以许多形式修饰于细胞表面。由于正常人体内不含有 Neu5Gc，所以人体内不存在 Neu5Gc 抗体<sup>[29]</sup>。Neu5Gc 与 Neu5Ac 结构只差一个氧原子，体内生化机制无法有效识别这两种抗原，但免疫系统将 Neu5Gc 视为“异种外来抗原”，将其特异性的抗 Neu5Gc 抗体视为“异种外来抗体”。如图 1.3 所示，因为人体内 CMAH<sup>-/-</sup>基因的缺失，人体内无法自主生成 Neu5Gc，摄入红肉和奶制品等饮食后在体内积累了大量 Neu5Gc，而体内唾液酸酶无法识别摄入的 Neu5Gc，使其附着在人内皮细胞表面，人体免疫系统识别外来抗原并产生其抗体，抗原抗体的特异性结合引起机体慢性炎症，称为唾液酸炎<sup>[30]</sup>。

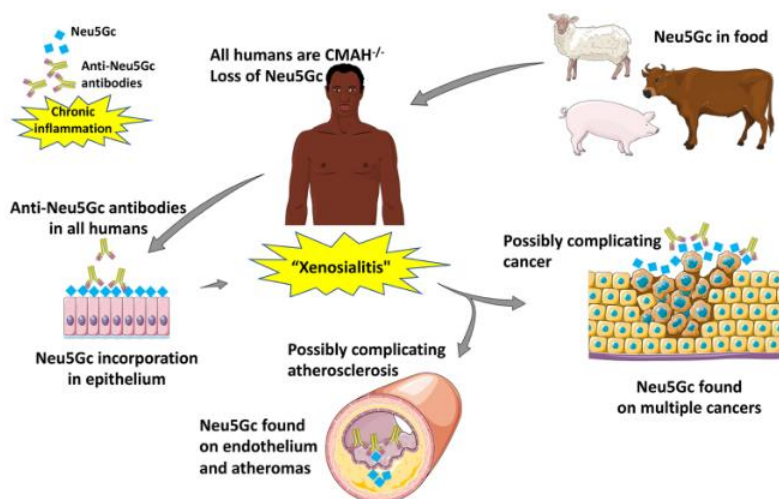


图 1.3 抗 Neu5Gc 抗体与疾病的关系<sup>[30]</sup>

Figure 1.3 Association of Anti-Neu5Gc antibodies with diseases<sup>[30]</sup>

通过实验发现人体血液中抗 Neu5Gc 抗体多为 IgM、IgA、IgG，其中 IgG 型含量较多<sup>[31]</sup>。Taylor 等<sup>[32]</sup>检测新生婴儿的血清发现，刚出生的婴儿体内含有抗 Neu5Gc IgG 抗体，母体的 IgG 型抗体能够通过胎盘，但该抗体在婴儿出生三个月左右消失，和怀孕母亲体内 IgG 的半衰期相同；之后婴儿逐渐食用红肉和奶制品等含 Neu5Gc 的饮食，体内的抗 Neu5Gc 抗体水平逐渐提高，12 个月与正常成人抗体水平相似，这也间接说明人体内抗 Neu5Gc 抗体的生成需要

外源性 Neu5Gc 持续刺激<sup>[33]</sup>。有研究显示,在一定浓度下,红肉及奶制品的过多摄入时 Neu5Gc 摄入量越高, anti-Neu5Gc 抗体滴度越大<sup>[34]</sup>。后来该学者通过实验发现人体内抗 Neu5Gc 抗体的生成还需要非分型流感嗜血杆菌(NTHi)的存在, NTHi 在鼻咽部以及上呼吸道定植,唾液酸合成酶摄取食物中外源性 Neu5Gc, 干预脂寡糖后将 Neu5Gc 修饰为有免疫原性表位的抗原,从而引起体内抗 Neu5Gc 抗体的产生<sup>[35]</sup>。

### 1.3 Neu5Gc 与疾病的关系

2015 年世界卫生组织下属的国际癌症研究机构将红肉列为大概率致癌的物质,将加工的肉制品列为致癌物,随后引起了学者的广泛关注。Bouvard 研究表明,红肉的食用量与直肠结肠癌的患病率呈现明显正相关<sup>[36]</sup>。有研究通过数据分析欧洲的部分国家红肉消费程度与结直肠癌的关系发现,红肉消费量与患直肠结肠癌风险存在正相关关系<sup>[37, 38]</sup>。Bouvard 在对欧美及日本所调查的加工肉消费与结肠癌的关系中得到同样结果。利用 Meta 分析红肉的摄入量与患乳腺癌之间的联系,结果发现大量食用红肉的人患有乳腺癌的概率高于摄入少量红肉的人群;女性绝经后食用大量红肉会增加患乳腺癌的风险<sup>[39]</sup>。Bonequi 通过数据分析的方法探究饮食习惯与胃癌之间的关系,表明大量食用红肉后,患胃癌的几率也随之增加<sup>[40]</sup>。Zhu 等的荟萃分析表明,摄入大量红肉会增加患胃癌风险<sup>[41]</sup>。Song 的荟萃分析也证明了之前的结果<sup>[42]</sup>。再次突出了哺乳动物的红肉中特异性存在的 Neu5Gc 可能是导致红肉致癌的根本原因。

对 CMAH<sup>-/-</sup>小鼠饲喂含有 Neu5Gc 的鼠粮 12 周后测定血清中炎症指标,发现与对照组的正常饮食相比,饲喂 Neu5Gc 糖蛋白的敲除小鼠体内的炎症指标(IL-6、SAA、急性时相反应物)均显著高于对照组,同时其炎症程度与抗 Neu5Gc 抗体水平显著相关,患肝细胞癌的小鼠结果更为明显<sup>[43]</sup>,表明长时间抗 Neu5Gc 抗体与 Neu5Gc 结合引起机体炎症反应,炎症因子生成增多,促进癌症与肿瘤的发生发展。Hedlund<sup>[44]</sup>研究表明 Neu5Gc 广泛分布于人体肿瘤细胞表面,当 CMAH<sup>-/-</sup>小鼠体内 Neu5Gc 含量与人体内 Neu5Gc 含量相近时,促进了小鼠体内肿瘤的生长,肿瘤组织 Neu5Gc 的抗体水平增加,但是用于降低人类患癌风险的环氧合酶-2 可以降低其水平<sup>[45, 46]</sup>。一般情况下人体不含 Neu5Gc 且未接种过含 Neu5Gc 的血清,但是癌症患者血清中 Neu5Gc 含量很高。虽然高水平

的抗体水平会发生细胞毒性，但 Neu5Gc 和抗 Neu5Gc 抗体反应引起的弱炎症反应可能会加速癌变或肿瘤进展<sup>[47]</sup>。

## 第2章 早孕因子的研究进展与应用

### 2.1 早孕因子的来源

1974年 Morton 在孕鼠血清中发现了一种免疫抑制物质，它可以干预 T 淋巴细胞介导的免疫反应，因为在小鼠交配 6 h 后就可检测到其存在，被称作早孕因子（Early pregnancy factor, EPF）<sup>[48]</sup>。EPF 是一种由 102 个氨基酸组成的妊娠相关蛋白，存在于受精后的母体血清中，不同动物的分子量与等电点不同。人和牛的氨基酸序列一致性为 100%，分子量约 11 kD，等电点约为 6.5<sup>[49]</sup>，温度低于 56 °C 时稳定存在，高于 72 °C 则失活。

自从 Morton 应用 RIT 实验从孕鼠血清中检测到 EPF 活性后，研究学者对其来源展开大量的研究。Morton H 研究表明 EPF 与热休克蛋白家族中的伴侣蛋白 10（Cpn10）高度同源，是 Cpn10 的同系物<sup>[50-52]</sup>。Somodevilla-Torres 认为（Cpn10）和 EPF 是相同的基因在不同的位置表达的结果，二者虽基因序列相同但位置存在差异，所以他们的功能存在差异<sup>[53, 54]</sup>。

Morton 等通过检测孕妇的子宫颈黏液测定，发现子宫颈黏液存在具有活性的 EPF。Ito 等在怀孕妇女的尿液、羊胎盘提取物、输卵管培养基及鼠卵巢等也检测到活性 EPF<sup>[55]</sup>。

由于怀孕母体多个组织器官中均可检测到 EPF 活性，研究者对 EPF 的产生部位引起了广泛关注。Lash<sup>[56]</sup>等对发情小鼠的卵巢和输卵管在不同刺激下检测 EPF 活性，结果表明，不同的体外刺激均能检测到 EPF 活性，而血小板激活因子拮抗剂 BN52021 能阻断这一作用，因此认为受精卵释放的血小板激活因子可以促进 EPF 的合成；卵巢对不同刺激具有明显反应，而输卵管却没有，所以卵巢是最先产生早孕因子的部位<sup>[57]</sup>。Cavangh 等<sup>[58]</sup>指出，早孕因子有 2 种形式，分别是 EPF-A 和 EPF-B。早期的 EPF 是怀孕母体在着床前和着床期间分泌的，受精卵产生；后期的 EPF 是着床后由卵巢分泌的，具有妊娠依赖性，学者对着床前 EPF 的来源分析，但目前仍未达成共识，大部分学者认为 EPF 的生成需要合适的环境<sup>[59, 60]</sup>。



## 2.2 早孕因子的功能

### 2.2.1 免疫抑制作用

早孕因子是在孕妇早期妊娠血清中发现的一种具有免疫抑制功能的蛋白<sup>[61]</sup>。EPF 对胚胎植入前和植入中均有着重要意义<sup>[62, 63]</sup>，胚胎在怀孕母体中被视为外源物质，但母体却不会像对其他外源物一样排斥胚胎，正是由于 EPF 的免疫抑制功能，影响机体免疫系统对胚胎的排斥，所以对 EPF 研究也成为免疫学中的一项热门话题<sup>[64]</sup>。

Noonan 对小鼠体内实验，发现 EPF 能够抑制 T 淋巴细胞介导的迟发型超敏反应(DTH)，因此推测 EPF 通过干预 CD4<sup>+</sup> T 细胞发挥抑制功能。邓松华教授等在体外试验中，探讨 EPF 活性物质对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响，结果表明 EPF 可呈剂量依赖的干预淋巴细胞生成<sup>[65]</sup>。纯化孕妇血清所得 EPF 活性物，将血清中 HCG 和糖蛋白析出后，对其进行玫瑰花环抑制实验，发现 EPF 活性物 G3 仅在高浓度情况下对淋巴细胞有抑制作用，而 EPF 活性物 G4 无论在高浓度还是低浓度均能抑制淋巴细胞增殖，说明该抑制程度与剂量相关，推测可能与 EPF 活性分子的剂量和其结构的空间排布有关<sup>[66]</sup>。Igarashi 等认为 EPF 免疫抑制作用不受限于主要组织相容性复合体，早孕因子可以诱导产生非黏附 Thy12<sup>+</sup> 和 Lyl1-调节细胞发挥抑制功能<sup>[67]</sup>。

在研究异体皮肤移植实验中，向移植部位皮下注射 rEPF 后，可以显著延长移植皮肤的存活时间，证明了 EPF 免疫抑制的调节能力，抑制了机体的免疫排斥反应。Zhang 等<sup>[68]</sup>用表达的重组 EPF 干预脑脊髓炎(EAE)的小鼠，实验表明 EPF 降低了神经系统的淋巴细胞和巨噬细胞含量，EPF 可呈剂量依赖性地抑制混合淋巴细胞反应的识别相，且重组 EPF 与 Vehicle 治疗相比，重组 EPF 治疗后淋巴细胞的增殖和活化相关分子的表达受到抑制<sup>[69, 70]</sup>。

### 2.2.2 生长调节作用

研究发现肿瘤细胞能分泌 EPF。对肿瘤细胞系体外培养时检测到 EPF 的存在，当细胞增殖停止进入分化阶段时，EPF 含量显著下降，因此推测 EPF 可能与肿瘤细胞的生长繁殖有关。随后把 EPF 单抗体外加入到肿瘤细胞液时，肿瘤细胞的生长快慢随着 EPF 抗体含量的增加而下降，表明 EPF 一定程度上促进了

肿瘤细胞生长<sup>[71]</sup>。

Quinn K A 切除小鼠部分肝脏后 8 h, 检测其血清发现早孕因子的存在, 随着时间推移其含量逐步增加, 到 48 h 时达到最高点。如果术后用 EPF 特异性抗体作用实验小鼠, 则小鼠肝脏组织对于胸苷的摄取量明显降低, 可见 EPF 在肝细胞的增值阶段促进了 DNA 合成和细胞分裂<sup>[72]</sup>。

## 2.3 早孕因子的临床应用

### 2.3.1 妊娠超早期诊断

目前, EPF 可作为最早确认妊娠的生化指标之一。研究证实, 小鼠交配后 6 小时, 牛、大鼠、绵羊、猪<sup>[73, 74]</sup>24 小时能够检测出 EPF 活性, 人受精后 48 小时即可测出 EPF, 可持续 6 个月存在于血液循环中, 但如果妊娠停止或者流产, 体内 EPF 活性快速下降<sup>[75]</sup>。因其可以在怀孕母体内最早检测到, 而且具备高度的特异性, 与 HCG 相比, 检测到 EPF 的时间更早, 因此可以更早更精确的判定母体妊娠状态, 相对于 B 超, B 超需要一个月的时间才可判断母体怀孕情况, 所以通过 EPF 对人和家畜超早孕检测可以极大程度缩短妊娠的判定时间。

张慧茹通过玫瑰花环抑制试验, 对孕牛和孕羊进行早期妊娠诊断, 结果发现, 怀孕 20 天内孕羊和孕牛血清存在 EPF 活性, 而且 EPF 活性相对稳定, 与未孕组差异显著, 准确率很高<sup>[76]</sup>。Fan 等<sup>[77]</sup>将 EPF 作为超早孕检测的指标, 孕妇血清的准确率为 88.6%, 但经典的玫瑰花环抑制试验存在实验操作复杂、重复性差、判断客观性差等问题, 因此该方法难以推广。

基于抗原抗体特异性反应的免疫学技术检测血清中 EPF 的方法已有研究报道。易传祝等筛选了分泌 EPF 蛋白的腹水型的单抗细胞株, 建立双抗体夹心 ELISA 与传统的玫瑰花环抑制试验对比检测 EPF 活性, ELISA 检测的阳性检出率显著高于 RIT 实验, 且具有很高的灵敏度和特异性。2005 年, 周泉等人利用纯化的早孕因子蛋白制备的单克隆抗体建立了双单抗夹心 ELISA 方法也表现出高而稳定的阳性检出率。ELISA 方法是以抗原抗体定向结合作为基础, 将客观条件下的酶标反应作为实验依据, 对样品中的待检物质进行定性和定量分析的方法, 且不需要尖端设备仪器的同时依然具有耗时短、易操作、高灵敏度和特

异性等特点，便于实际应用。通过 EPF 检测技术可以检测早期交配血清中的 EPF，也能根据 EPF 在动物体内含量的变化，判定胚胎的存活情况，对人与动物妊娠早期诊断具有重要意义。

### 2.3.2 胚胎的监测

EPF 对胚胎的持续存活具有重要作用<sup>[78]</sup>，Cheng<sup>[79]</sup>对孕妇血清进行 EPF 检测，发现胚胎死亡后 EPF 含量显著减少，随着时间的推移 EPF 含量与对照组相近。他指出 EPF 水平与母体胎儿的情况密切相关，受精卵成熟后开始分泌 EPF 释放因子，EPF 的分泌量直接影响胚胎在子宫内的生长情况。体外试验表明，胚胎移植后通过 RIT 测定 EPF 活性可判断是否移植成功，并及时掌握胚胎的存活情况<sup>[80]</sup>。

Athanasas-Platsis 通过玫瑰花环实验发现胚胎移植 12 h 后血清中可检测到 EPF 活性；胚胎死亡或流产时 EPF 活性逐渐减弱至消失。对已怀孕女性、未怀孕女性和流产后的女性进行 EPF 活性测定，结果表明 EPF 活力可以作为胚胎的丢失的标准，且流产前 5 d EPF 的活性发生变化<sup>[81]</sup>，说明 EPF 也可用作先兆流产和过期流产的生化指标；Shahani 等检测了阴道疾病母亲的血清，并根据 RIT 估计胎儿的存活率，结果发现其灵敏度与特异度均在 90%，阳性与阴性存活率都预测准确，因此通过测定血清中 EPF 的变化，可以判断妊娠母体胚胎是否缺失、是否流产以及胚胎移植是否成功<sup>[82]</sup>。

### 2.3.3 肿瘤的诊断

早期研究学者把 EPF 应用于妊娠的检测与流产的评估，随后 Morton 在辜丸母细胞瘤患者的血清中利用 RIT 实验提取到活性 EPF，Bojahr B 在绒毛膜癌症病人血清中也同样提取到早孕因子，手术之后早孕因子也随之消失，所以有人把早孕因子作为诊断绒毛膜癌的重要指标之一。Fan X 等人通过玫瑰花环抑制试验检测恶性滋养细胞肿瘤患者的血清，结果显示运用 RIT 法检测恶性滋养细胞瘤的正确率达到 90%。张冬云等人<sup>[83]</sup>指出目前通过测定 EPF 的 RIT 值有助于监测膀胱癌、恶性葡萄胎瘤、黑色素瘤以及绒毛癌的风险，同时表明良性葡萄胎、肝癌、胃癌等分泌的 EPF 并没有活性，认为 EPF 作为肿瘤细胞的一种分泌物，能通过检测 EPF 判断特定疾病的发生与发展。从孕妇血清中分离纯化的天然 EPF 抗原并制备特异性抗体，利用 EPF 与其抗体发生特异性结合，通过抗体

与药物偶联形成复合物，将药物靶向运送到肿瘤细胞大量增生的位置，杀掉坏死灶中恶性细胞，达到治疗的目的，但实际应用方面还需进一步实验证实。

## 2.4 自身免疫病的治疗

EPF 是一种温和的免疫抑制蛋白，可干预由 T 细胞介导的免疫功能。实验性自身免疫性脑脊髓炎（EAE）是一类自身免疫病，是由 CD4<sup>+</sup>T 细胞介导的神经系统炎症，也是对多发性硬化症（MS）研究的重要模型，研究者通过腹腔注射和口服的方式给予 EPF，结果表明 EPF 对急、慢性 EAE 的临床表现均有缓解的功能，并且连续的腹腔注射 50 μg 早孕因子后，能延迟急性多发性硬化的发病，一个月内也不会有复发情况；在慢性 MS 动物试验中，隔天腹腔注射 10 μg 的 EPF 蛋白，发现 3 周后实验动物的症状显著减轻；与β干扰素联用治疗后，MS 患者治疗效果远好于两者单独给药<sup>[84]</sup>。

## 2.5 本实验研究主要目的及意义

为了消除红肉固有成分 Neu5Gc 给机体带来的可能危害，人们通过多种手段探讨降低红肉中的 Neu5Gc 含量的方法，但行之有效的方法有待探究。在 Neu5Gc 诱发慢性炎症的过程中，抗体的产生是引发疾病的关键点，而抗体的产生有赖于 Th 细胞的辅助。作为温和的，天然的免疫抑制因子——早孕因子（EPF），能够有效抑制 T 细胞的活化，进而干预 B 细胞产生抗体这一关键环节，有望解决红肉 Neu5Gc 引发的食肉安全难题。

本项目依据传统的淋巴细胞活化理论、聚焦食品安全的热点，通过人工表达纯化获得具有免疫抑制活性的重组 EPF，在细胞水平探究其免疫抑制功能后，以 CMAH 基因缺失小鼠作为模拟人体的模型动物，探讨 EPF 对 Neu5Gc 诱发的慢性炎症的作用效果，为探索和解决长期食用红肉带来的安全隐患这一难题提供全新的研究思路和有效的解决方式。

## 第二篇 研究内容

### 第1章 EPF 重组蛋白的原核表达及纯化

为初步探究早孕因子 EPF 对红肉 Neu5Gc 引起的 CMAH<sup>-/-</sup> 小鼠抗体产生的阻断研究，本章利用分子克隆技术原核表达 EPF 重组蛋白，酶切后获得无标签的 EPF 抗原。先对人 EPF 编码区（CDS）进行生物信息学分析，在原序列基础上 N 端加入 SUMO 促溶标签和 His 标签，将 EPF 基因与原核表达载体 pET-28a 连接，以构建重组质粒，再将其转化到大肠杆菌中诱导表达，通过亲和层析柱纯化表达的蛋白 srEPF，最后 SUMO 酶切获得目的蛋白 EPF。另外，为了获得大量的 EPF 抗体，我们在 EPF 编码区序列基础上，去掉了编码免疫抑制功能的基因序列，再通过分子克隆的方法构建原核表达载体，获得 EPF 融合蛋白，为下一步研究其免疫抑制活性及特异性抗体的研发提供必备的材料。

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 引物

通过 NCBI 网站获取人源性的 EPF 基因序列（序列号：NM002157.3），以 CDS 区序列作为目的基因，基因序列的 N 端加入多聚组氨酸(6×His) 和 SUMO 促溶标签，重组蛋白命名为 srEPF。用 Primer Premier5.0 软件设计上下游引物，分别加入 *Nco*I 和 *Xho*I 两个酶切位点，引物由库美生物合成，具体序列如下。

表 1.1 引物具体序列

Table 1.1 Specific sequence of primers

引物名称	酶切位点	序列 5'-3'
srEPF-F	<i>Nco</i> I	CATGCCATGGGCCATCACCATCATC
srEPF-R	<i>Xho</i> I	CGGCTCGAGTCAGTCGACATATTTCCAAAGAA

### 1.1.2 菌株和质粒

*E. coli DH5 $\alpha$* 、*E. coli BL21(DE3)* 以及 pET-28a 表达质粒为本实验室留存。

### 1.1.3 主要试剂

具体试剂见表 1.2。

表 1.2 主要试剂名称

Table1.2 Name of main reagent

试剂	源自
<i>Nco</i> I 和 <i>Xho</i> I 酶	日本 TaKaRa 公司
DNA 连接酶	日本 TaKaRa 公司
胶回收纯化试剂盒	天根生化有限公司
异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 IPTG	Sigma 公司
Protein Marker	美国 Thermo scientific
DNA Marker	北京索莱宝生物科技有限公司
BCA 蛋白浓度检测试剂盒	北京碧云天生物技术研究所
Ni-NTA 填料	美国 Qiagen 公司
抗性	北京索莱宝生物科技有限公司
其他常见试剂	北京索莱宝、天根生化等

### 1.1.4 主要仪器

主要仪器见表 1.3。

表 1.3 主要仪器名称

Table1.3 Name of main instrument

仪器名称	生产厂家
普通 PCR 仪	北京 Eastwin 公司
低转速离心机	美国 Beckman Coulter 公司
电子精密天平	美国 DENVER INSTRUMENT 公司
蛋白成像仪	法国 Vilber lourmat 公司
超净工作台	天津市生物洁净公司

---

高温高压灭菌锅	日本 SANYO 公司
水平摇床	北京市六一仪器公司
H-S 化学发光成像系统	美国 DNR 公司
37 °C 恒温培养箱	上海市实验仪器厂
多功能酶标仪	美国 Tecn 公司
瞬时离心机	美国 Backman Coulter 公司

---

### 1.1.5 主要试剂配制

1) 50×TAE: 取 12.1 g Tris 固体, 1.88 g 的  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  溶解后, 加入 2.35 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  液体, 定容至 50 mL, 使用时稀释成 1×TAE。

2) LB 液体的培养基: 称取 0.5 g Yeast 固体, 1 g 的 NaCl, 1 g 的 Tryptone, 加入 100 mL  $\text{ddH}_2\text{O}$  后高压灭菌。固体培养基在液体培养基中加入琼脂。

3) SDS 电泳缓冲液: 先称 15.1 g Tris, 5 g SDS 和 94 g Glycine, 加入 800 mL  $\text{ddH}_2\text{O}$  完全溶解, 最后定容至 1 L。

4) 1 mmol/L IPTG 诱导剂: 将 2.38 g IPTG 固体溶于  $\text{ddH}_2\text{O}$  中, 充分溶解后滤器除菌, 分装后冻存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱。

5) PAGE 染色液: 将 1 g 的 R-251 固体加入到  $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$  中加热使其溶解, 加入  $\text{CH}_3\text{COOH}$  后定容至 1 L。

6) 脱色液: 取 10 mL  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  与 20 mL 乙酸混合, 向其中加 170 mL 的  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容。

## 1.2 方法

### 1.2.1 EPF 的生物信息学分析

利用 Prot Param、Prot Scale、Signal P 4.1Server、Net Phos3.1 Server、TMHMM Server v.2.0 等软件对 EPF 蛋白的生物信息进行系统全面的分析与研究。

## 1.2.2 重组早孕因子 srEPF 蛋白的原核表达

### 1.2.2.2 目的基因的扩增

以 EPF 目的基因为模板，通过 PCR 的方法扩增序列。PCR 体系如表 1.4。扩增后依照 DNA 凝胶回收试剂盒中的说明将目的条带胶回收。将纯化后的 EPF 目的片段与 pMD-18T 克隆载体连接，转化至 DH5 $\alpha$ 感受态，接于含氨苄的 LB 平板上，37 °C 条件下培养 8 h-12 h，选取生长情况好的单一菌落进行 PCR 鉴定，鉴定成功后命名为 pMD-18T-srEPF。

表 1.4 PCR 反应的体系与条件

Table1.4 The system and conditions of PCR reaction

组分	体系 ( $\mu\text{L}$ )
cDNA	1.5
引物 (上)	1.0
引物 (下)	1.0
2 $\times$ Es Taq Master Mix	10.0
ddH <sub>2</sub> O	6.5
Total	20.0

表 1.5 克隆载体的连接体系

Table1.5 Ligation system for cloning vectors

成分	连接体系 ( $\mu\text{L}$ )
Solution I	5.0
胶回收物质	2.0
载体	3.0
Total	10.0

### 1.2.2.3 pET-28a-EPF 表达质粒的构建

(1) 取 5 mL 含抗性的 LB 培养基，分别接种 pET-28a(+)质粒和 pMD-18T-srEPF 菌株 50  $\mu\text{L}$ ，37 °C 条件下培养 12 h，依照质粒提取试剂盒操作后，酶标仪测定浓度大小。

(2) 将 pMD-18T-srEPF 质粒和空质粒用 *Nco*I 和 *Xho*I 双酶切，体系如下：



表 1.6 双酶切的反应体系

Table 1.6 The restriction enzyme reaction system

反应成分	用量 ( $\mu\text{L}$ )
<i>Nco</i> I	3.0
<i>Xho</i> I	3.0
10×Single Buffer	5.0
Vector	39.0
Total	50.0

(3) 37 °C 恒温金属浴条件下酶切 5 h;

(4) 将双酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收 srEPF 目的片段和 pET-28a。

(5) 将胶回收产物用 Solution I 于 16 °C 连接过夜, 构建 pET-28a-srEPF 载体, 体系如表 1.7:

表 1.7 连接的反应体系

Table 1.7 The ligation reaction system

反应成分	用量 ( $\mu\text{L}$ )
Solution I	5.0
pET-28a	0.5
srEPF	4.5
Total	10.0

(6) 将实验室留有的 BL21(DE3) 感受态从 -80 °C 冰箱中轻轻取出, 置于冰上活化 5 min。

(7) 取 10  $\mu\text{L}$  连接后产物温柔地加至 600  $\mu\text{L}$  BL21 感受态中, 混匀后冰浴 30 min;

(8) 事先调整水浴锅于 42 °C, 水浴 90 s, 取出后立刻冰浴 3 min;

(9) 于 37 °C 恒温培养箱中预热 LB 液体培养基, 吸取 500  $\mu\text{L}$  LB 液体缓慢加入 (8) 中, 37 °C 孵育, 先 75 rpm 培养 15 min, 90 rpm 培养 15 min, 再 120 rpm 培养 15 min; 最终 150 rpm 培养至起烟状态;

(10) 取 100  $\mu\text{L}$  起烟的菌液均匀涂于 LB 固体平板, 37 °C 倒置培养 10 h;

(11) 挑取在固体平板单个菌落，培养后送至公司测序；

(12) 将结果在线比对，正确的菌株冻存保种于-80 °C冰箱，并命名 pET-28a-srEPF。

#### 1.2.2.4 srEPF 蛋白的表达及可溶性分析

1) 取冻存的菌液 50  $\mu$ L 接种于 2 管加入卡那抗性的 LB 液体培养基中，180 rpm，37 °C 培养 2 h，取 1 mL 菌液作为未诱导组对照；

2) 按照 1:1000 的比例加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 在 37 °C 下 140 rpm 诱导 8 h，取 1 mL 菌液作为诱导组备用。

3) 制样：取 pET-28a-srEPF 空质粒、等量的未诱导菌液和诱导菌液，20  $\mu$ L PBS 将其重悬后加入 80  $\mu$ L 5 $\times$ SDS 上样缓冲液混匀，沸水煮 10 min；

4) 配制蛋白胶：固定仪器，配制 15% 蛋白胶，体系如表 1.8，分离胶配好后迅速加入胶板中，上方再加 1 mL 异丙醇去除气泡，静置于平整台面 45 min 凝固；分离胶凝固后，倒出异丙醇，去离子水清洗 2 次，加入积层胶并插入梳子，室温静置 60 min 等待凝固；

表 1.8 15%分离胶的成分

成分	用量 (mL)
蒸馏水	2.300
30%丙烯酰胺同液	5.000
1.5 M Tris-HCL (pH=8.8)	2.500
10%SDS 溶液	0.100
10%过硫酸铵溶液	0.100
TEMED 溶液	0.004
Total	10.000

表 1.9 5%积层胶的成分

Table1.9 The preparation of 5% concentrated gum

成分	用量 (mL)
蒸馏水	2.100
30%丙烯酰胺溶液	0.500
1.5 M Tris-HCL (pH=6.8)	0.380
10%SDS 溶液	0.030
10%过硫酸铵溶液	0.030
TEMED 溶液	0.003
Total	3.000

7) 加样: 像孔中加入 Marker 6  $\mu\text{L}$ , 样品 10  $\mu\text{L}$ ;

8) 染色和脱色: 截取含有蛋白条带的分离胶, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 置于水平摇床染色过夜; 使用煮沸脱色法脱色, 10 min/次, 约 3-4 次, 直至看到明显蛋白条带, 最后用凝胶成像系统采集图像。

### 1.2.3 重组早孕因子 srEPF 蛋白的纯化与酶切

#### 1.2.3.1 srEPF 重组蛋白的纯化

1) 扩大培养: 取冻存的菌液 100  $\mu\text{L}$  接种于 5 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。

2) 诱导: 取 1 mL 菌液于 1 L LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 180 rpm 2 h, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 继续培养 8 h。

3) 收菌: 将诱导后菌液 8000 rpm 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min, 弃上清, 收集菌体沉淀, 加入 PBS 缓冲液重悬再次离心, 如此反复洗涤菌体沉淀 2-3 遍;

4) 超声破碎: 用结合 Buffer 重悬 3) 中的菌体, 将其超声破碎 30 min, 直至溶液澄清透亮;

5) 分离包涵体: 将 4) 中溶液于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8000 rpm 离心 50 min, 收集上清和沉淀, 沉淀即为包涵体;

6) 平衡镍柱: 在 4  $^{\circ}\text{C}$  层析柜中进行 6) -8) 步, 向镍柱内加入 3 mL 50%

Ni-NTA 填料，待填料完全沉于底部时打开底部胶塞，流出缓冲液，再加入 10 mL Buffer A 洗柱，洗 2 遍；

7) 结合：将 5) 收集的上清加入平衡过的镍柱中，层析柜中上下颠倒混匀 1 h，使蛋白与镍柱介质充分混合；

8) 洗脱：打开镍柱两端，使上清液流出，并收集两滴流穿液制样；加入 10 mL Buffer A，洗 2 遍；加入 10 mL Buffer B，待 Buffer B 流出后；由低到高依次加入不同浓度洗脱液，每次都需混匀后静置，待填料完全沉底时打开底部胶塞，收集洗脱液；

9) SDS-PAGE：取 80  $\mu$ L 8) 中所得的不同梯度的洗脱液，加 20  $\mu$ L SDS 上样缓冲液，煮沸 10 min 后电泳；

10) 透析：收集 8) 中仅含有目的条带的洗脱液，缓慢加入到煮过的透析袋中，放入到含 PBS 液体中透析，每 3 h 更换 PBS，透析 5 次；

11) 浓缩：将含洗脱液的透析袋放入 PEG 20000 中浓缩，浓缩后通过 BCA 蛋白定量检测试剂盒测蛋白含量。

#### 1.2.3.2 srEPF 重组蛋白的酶切

1) 将上述得到的蛋白液按照蛋白总量加入相应的 SUMO 蛋白酶，4  $^{\circ}$ C 旋转酶切 18 h，酶切体系如表 1.10 所示。

表 1.10 SUMO 酶切体系

Table1.10 SUMO digestion system

组分	体积 ( $\mu$ L)
融合蛋白	1000 $\mu$ g
SUMO Protease buffer	20
SUMO 蛋白酶	2
ddH <sub>2</sub> O	补至 1000

2) 收集酶切后的蛋白液，过镍柱，步骤如 1.2.3.1。

3) 剪裁大小合适的透析袋，用去离子水煮沸 30 min 保存，将 2 中得到的目的蛋白缓慢放入透析袋中，两头用夹子封口，置于 PBS 缓冲液中透析。

4) 透析后，缓慢打开一端夹子，小心吸取蛋白液，通过 BCA 蛋白定量检

测试试剂盒测蛋白浓度。

### 1.2.4 EPF (11 kD) 和 EPF (10 kD) 蛋白的原核表达

由于 EPF 编码区序列中含有编码免疫抑制功能的序列，我们为了获得 EPF 大量的 EPF 抗体，在原序列的基础上将此部分序列去掉，再通过分子克隆的方法构建原核表达载体 pET-22b-EPF（未去除抑制区序列，表达后的蛋白记为 EPF (11 kD)）和 pET-22b-EPF（去除抑制区序列，表达后的蛋白记为 EPF (10 kD)）。

#### 1.2.4.1 引物设计

步骤同第 1 章 1.2.2.1。

#### 1.2.4.2 目的基因的扩增

步骤同第 1 章 1.2.2.2。

#### 1.2.4.3 pET-22b-EPF (11 kD) 和 pET-22b-EPF (10 kD) 重组质粒的构建

步骤同第 1 章 1.2.2.3

#### 1.2.4.4 EPF (11 kD) 和 EPF (10 kD) 重组蛋白的诱导表达

步骤同第 1 章 1.2.2.4

## 1.3 结果

### 1.3.1 EPF 蛋白的理化分析

通过蛋白的理化性质分析软件 Prot Param (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 EPF 的消光系数、不稳定系数、半衰期和平均亲水系数等进行分析。结果表明，人源 EPF 蛋白由 102 个种氨基酸组成，各氨基酸含量见表 1.11。含负电荷氨基酸 (Asp + Glu) 13 个，其中 Asp 8 个，Glu 5 个；含正电荷氨基酸 (Arg + Lys) 15 个，其中 Lys 11 个，Arg 4 个。含量最高的是 Val 和 Gly (13.7%)，其次是为 Lys (10.8%)。分子式为  $C_{494}H_{801}N_{1294}O_{145}S_2$ ，原子总数为 1571，分子量为 10.9 kD，理论等电点 5.87，偏酸性，消光系数为  $4470 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，半衰期为 30 h，脂溶系数为 95.39，平均亲水系数为 -0.041，不稳定系数为 23.75，为稳定蛋白。

表 1.11 人源 EPF 蛋白的氨基酸组成

Table 1.11 Amino acid composition of human EPF protein

Amino acids	Number	Frequency (%)	Amino acids	Number	Frequency (%)
Ala (A)	6	5.9	Lys (K)	11	10.8
Arg (R)	4	3.9	Met (M)	2	2.0
Asp (D)	8	7.8	Phe (F)	5	4.9
Gln (Q)	4	3.9	Pro (P)	4	3.9
Glu (E)	5	4.9	Ser (S)	5	4.9
Gly (G)	14	13.7	Thr (T)	4	3.9
Ile (I)	3	2.9	Tyr (Y)	3	2.9
Leu (L)	10	9.8	Val (V)	14	13.7

### 1.3.2 EPF 蛋白的亲/疏水性及跨膜区分析

利用 Prot Scale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 对 EPF 蛋白的亲/疏水性分析；利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 探讨 EPF 蛋白是否存在跨膜区。结果显示，EPF 蛋白总平均亲水性为-0.041，氨基酸得分最大值为 2.22，最小值为-1.611，为亲水性蛋白，亲水氨基酸数量多于疏水氨基酸（图 1.1）。EPF 蛋白无信号肽和跨膜区（图 1.2、1.3），不属于跨膜蛋白，且亚细胞定位分析显示，主要分布于宿主的细胞质（56.5%）、细胞核（17.4%）和线粒体（8.7%）。

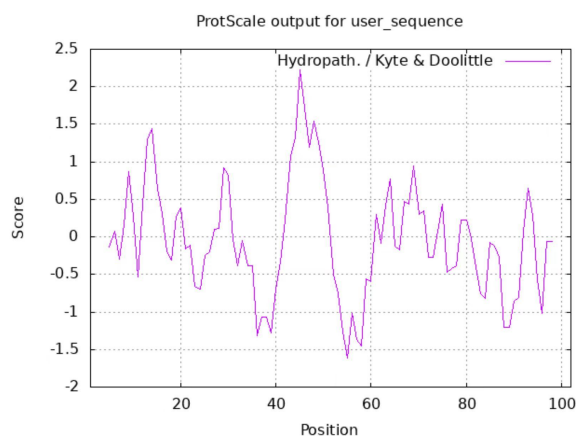


图 1.1 EPF 蛋白的亲/疏水性分析

Figure 1.1 Analysis of hydrophilicity/hydrophobicity of EPF protein

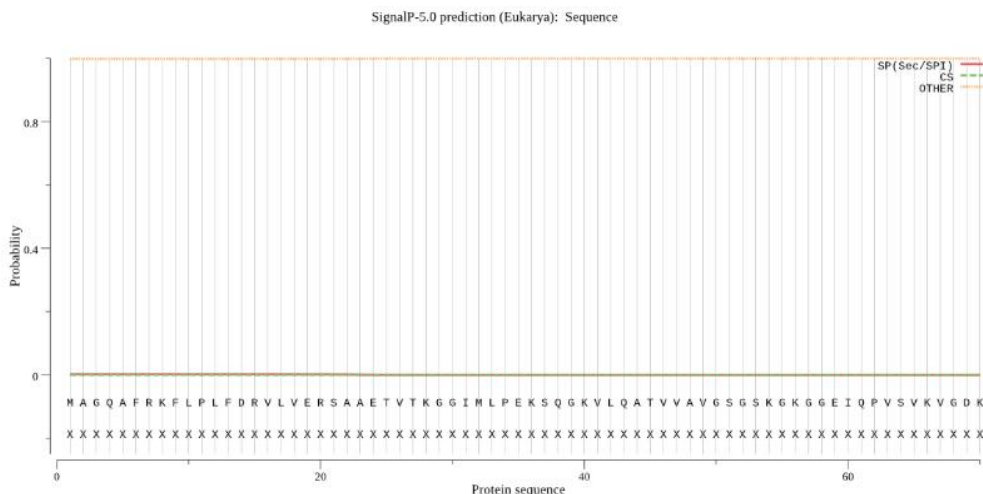


图 1.2 EPF 蛋白的跨膜结构预测

Figure 1.2 Transmembrane structure prediction of EPF protein

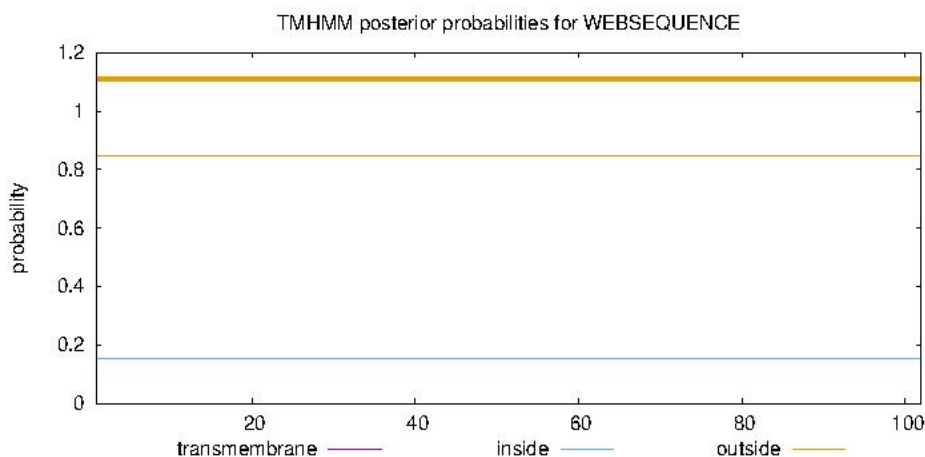


图 1.3 EPF 蛋白的信号肽预测

Figure 1.3 Signal peptide prediction of EPF protein

### 1.3.3 EPF 蛋白的二级结构预测和三维结构预测

通过 SOPMA 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 分析 EPF 蛋白的二级、三级结构。二级结构分析显示，EPF 蛋白含有 $\alpha$ -螺旋 (Hh) 30 个，占比 29.41%， $\alpha$ -螺旋是一种稳定的二级结构，由此推测 EPF 蛋白结构稳定；含有 $\beta$ 转角 (Tt) 13 个，占比 12.75%；延长链 (Ee) 26 个，占比 25.49%；无规则卷曲 (Cc) 33 个，占比 32.35% (图 1.4)， $\alpha$ -螺旋正常情况下较为稳定，一般在蛋白结构的内部，不形成抗原表位；而 $\beta$ 转角与无规则卷曲能量较低，不

稳定且常处在蛋白质结构的外部，容易形成抗原表位，其三级结构的预测结果如图 1.5。

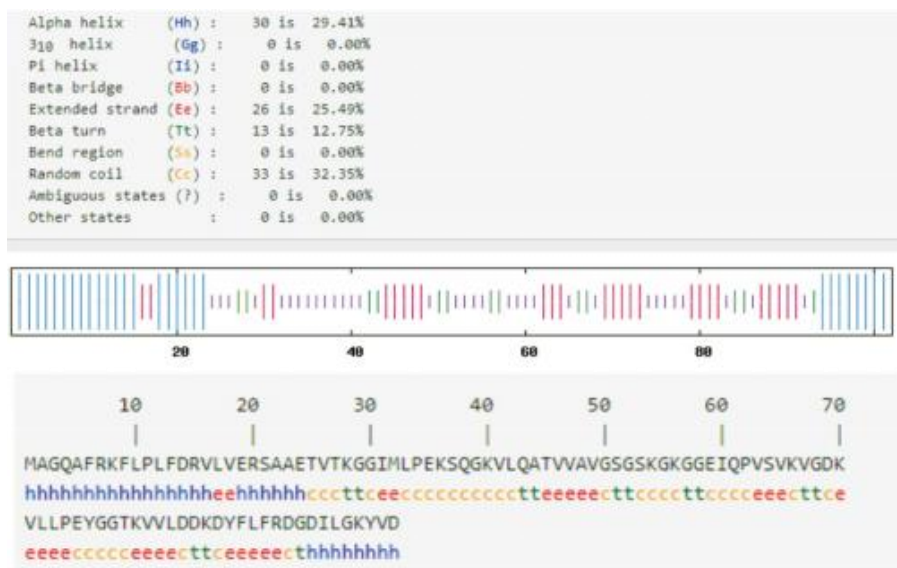


图 1.4 EPF 蛋白的二级结构预测

Figure 1.4 Secondary structure prediction of EPF protein



图 1.5 EPF 蛋白的三级结构预测

Figure 1.5 Tertiary structure prediction of EPF protein

### 1.3.4 pET-28a-srEPF 重组质粒的构建

对重组质粒通过 *NcoI* 和 *XhoI* 双酶切鉴定后，将其转化到 BL21 (DE3) 中，进行菌液 PCR 鉴定 (图 1.6)，在 641 bp 处有明亮的条带，与预期大小相符，表明 pET-28a-srEPF 重组质粒成功构建。



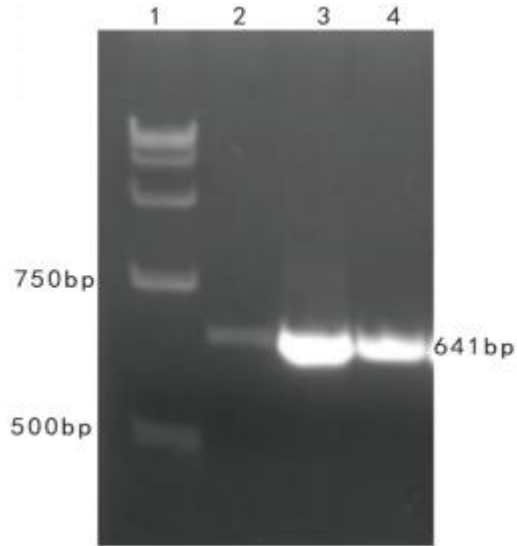


图 1.6 菌液 PCR 鉴定转化结果

Fig. 1.6 PCR identification of transformation results

1.蛋白 Marker 2.阴性对照 3.质粒 4.菌液

### 1.3.5 srEPF 重组蛋白的诱导表达

将 pET-28a-srEPF 重组质粒转 *E.coli BL21(DE3)* 感受态细胞后原核表达。表达菌在 37 °C 经 IPTG 诱导后 8 h，收集未诱导菌液和诱导菌液，15%的 SDS-PAGE 分析结果如图 1.7 所示，经 IPTG 诱导后，pET-28a 转化后的菌株在 26 kD 处出现蛋白带，与预期结果相符，说明 srEPF 蛋白已成功地在大肠杆菌中表达。

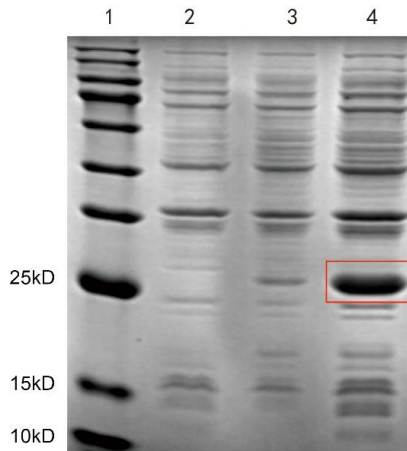


图 1.7 SDS-PAGE 鉴定 srEPF 的诱导表达

Figure 1.7 SDS-PAGE identified the induced expression of srEPF

1.蛋白 Marker 2.pET28a-EPF 空质粒 3.未用 IPTG 诱导 4.用 IPTG 诱导

### 1.3.6 srEPF 重组蛋白的可溶性表达

为确定重组蛋白表达形式，方便后续纯化，取上述表达菌，采用超声破碎的方法破碎菌体蛋白，菌体用 PBS 洗三次后，超声破碎进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 1.8 所示，重组蛋白上清表达量高于包涵体，表明重组蛋白为上清表达，分子量为 26 kD，由于重组蛋白含 his 标签，可用重力柱亲和层析纯化。

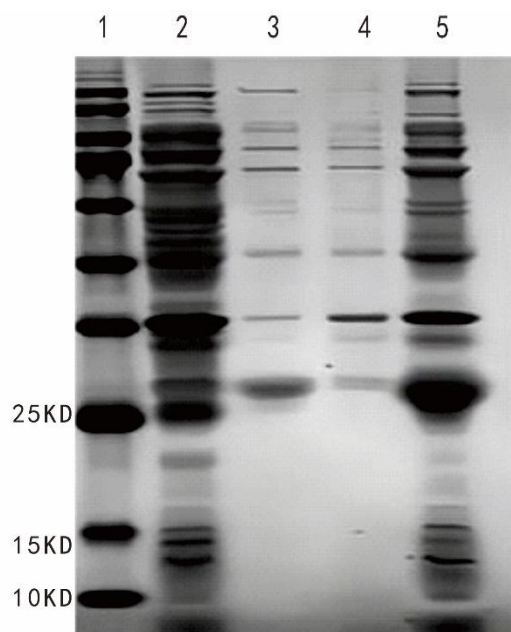


图 1.8 srEPF 蛋白的可溶性表达

Figure 1.8 Soluble expression of srEPF protein

1.蛋白 Marker 2.未用 IPTG 诱导 3.破碎后上清  
4.破碎后包涵体 5.未破碎

### 1.3.7 srEPF 重组蛋白的纯化与酶切

将目的蛋白纯化，超声后上清液约在咪唑浓度为 220 mmol/L 完全被洗脱（图 1.9）。将蛋白完全洗脱后根据浓度和酶切体系进行酶切，获得无标签的 EPF 蛋白，酶切后蛋白大小约为 11 kD，符合预期（图 1.10），通过 BCA 试剂盒检测酶切后 EPF 蛋白浓度为 1.1 mg/mL。

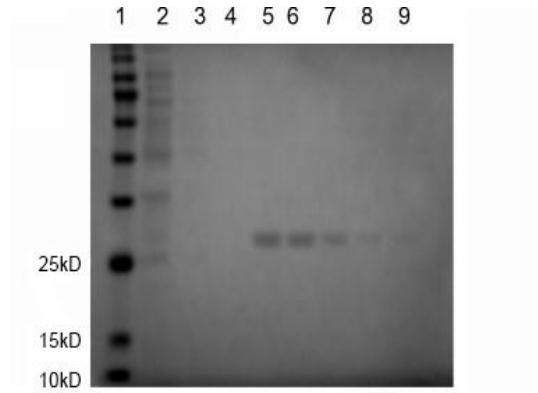


图 1.9 重组蛋白镍柱纯化的 SDS-PAGE 结果

Fig. 1.9 SDS-PAGE results of recombinant protein purified by nickel column

1. 蛋白 Marker 2. 流穿液 3. 4.0 mmol/L 4. 4.80 mmol/L 5. 150 mmol/L  
6. 200 mmol/L 7. 220 mmol/L 8. 250 mmol/L 9. 300 mmol/L

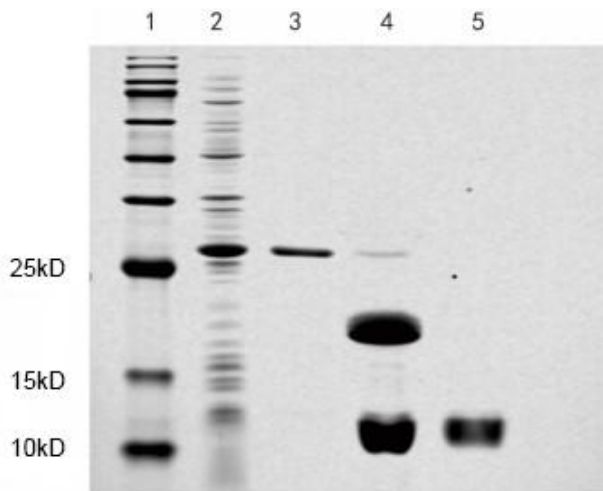


图 1.10 纯化酶切后蛋白的结果

Fig. 1.10 The result of purified digested protein

1. 蛋白 Marker 2. 未纯化 3. 纯化后 4. 酶切后 5. 酶切后过柱

### 1.3.8 pET-22b-EPF (11 kD) 和 pET-22b-EPF (10 kD) 双酶切鉴定

对克隆载体双酶切鉴定，通过核酸电泳的结果可以说明，酶切后连接片段的大小和扩增产物相符（图 1.11），证实目的序列准确，EPF 的克隆载体构建成功。

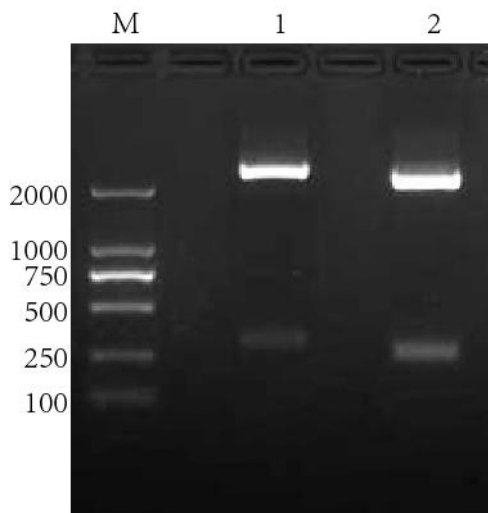


图 1.11 双酶切后连接的结果

Fig. 1.11 The result of double enzyme digestion

M.Marker 1.酶切 pMD-18T-EPF (11 kD) 用于连接 pET-22b

2.酶切 pMD-18T-EPF (10 kD) 用于连接 pET-22b

### 1.3.9 EPF (11 kD) 和 EPF (10 kD) 蛋白的诱导表达

将构建成功的表达菌株，经 IPTG 37 °C 诱导后分析。结果表明，成功表达 EPF (11 kD) 和 EPF (10 kD) 重组蛋白，并在 10 kD 处有明显的条带（见图 1.12），与理论值大小相同。

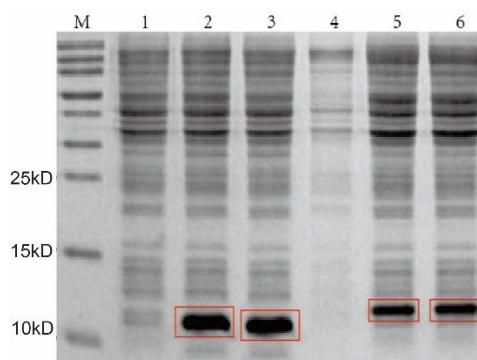


图 1.12 重组蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig. 1.12 SDS-PAGE results of recombinant protein

EPF (11 kD) 和 EPF (10 kD) 的诱导表达：M.Marker；1：EPF (10 kD) 未诱导；2.3：EPF (10 kD) 诱导；4：EPF (11 kD) 未诱导；5.6：EPF (11 kD) 诱导

## 1.4 讨论

为了探究 EPF 的生物学特性, 获得可溶、稳定的含有生物活性的 EPF 蛋白是本研究的重中之重, 传统的 EPF 获取主要是从怀孕母体血清中提取, 但 EPF 在怀孕母体血清中含量极低, 是一种微量蛋白。若从血清中提取大量的 EPF 蛋白则工作量较大, 且提取的蛋白活性较差。因此我们通过原核表达技术获得 EPF 重组蛋白, 并在构建表达载体中插入小分子泛素样修饰蛋白 (SUMO) 促溶标签来提高重组蛋白的活性和表达量。促溶标签有很多种, 谷胱甘肽巯基转移酶 GST 是一个常用的可溶性亲和纯化标签, 它具有防止蛋白质降解过多, 提高表达蛋白稳定性的功能, 其弊端是促溶能力不强且容易生成二聚体; 硫氧还蛋白 A (Trx A) 具有极好的促溶效率, 表达的目的蛋白也能有很好的生物活性, 但其需要与亲和标签联用且切除 Trx A 标签以后, 蛋白末端还会留有多余的氨基酸序列, 进而影响蛋白质的结构及功能。SUMO 蛋白作为蛋白表达的融合标签与分子伴侣, 可以通过与目标蛋白 N 端结合来促进其正确的转运和折叠, 它也可以提高蛋白的可溶性, 极大程度的增加蛋白表达量, 且 SUMO 蛋白酶能够特异地识别 SUMO 的三级结构并在 SUMO 的 C 端 Gly - Gly 序列后进行切除, 标签移除简单高效。

本研究通过人 EPF 的 CDS 区序列构建了含 SUMO 标签的重组表达质粒, 经转化、诱导表达、镍柱亲和层析纯化后, 获得表达量较高的 srEPF、EPF (11 kD) 和 EPF (10 kD) 蛋白, 为进一步研究 EPF 对红肉 Neu5Gc 介导的 CMAH<sup>-/-</sup> 小鼠抗体产生的影响提供了良好的实验材料。

## 1.5 小结

(1) 对人 EPF 编码区序列进行生物信息学的分析, 并预测其理化性质及二、三级结构。

(2) 采用原核表达技术成功制备 srEPF 和 EPF (10 kD) 蛋白, 为下一步试验提供基础。

## 第2章 EPF 抗体的制备与纯化及体外免疫抑制活性分析

EPF 是一种妊娠依赖性复合物，是早期妊娠母体中最早出现的免疫抑制因子，而且 EPF 的活性在妊娠期存在时间较长，人 EPF 可在体内持续 6 个月，羊、猪等家畜则几乎持续整个孕期，人与动物受精后短时间内可从怀孕母体血清中检测到 EPF 的活性，可较早确定母体妊娠状态，另外，早孕因子在检测胚胎的成活情况、判断妊娠是否停止、分析不孕原因、肿瘤早期诊断与治疗等方面具有广泛的应用前景，因此对于 EPF 检测方法的探究具有重要意义。

ELISA 是一种将抗原或者抗体附着在固相载体的表面，在固相载体上进行酶染色的现代免疫学检测技术，有容易操作、实验周期短、判定结果客观等许多优点。通过 ELISA 试剂盒可以检测早期交配血清中的 EPF，也能根据 EPF 在动物体内含量的变化，判定胚胎的存活情况。目前，国内市场自主研发的 EPF 相关检测试剂盒有限，而 EPF 蛋白及其特异性抗体是 ELISA 检测方法建立的重要组成部分，所以获得 EPF 蛋白及其抗体并研制 EPF 检测试剂盒成为 EPF 早孕检测技术探究所需解决的重大问题。

另外，在体外条件下对 EPF 免疫抑制作用的分析是探究 EPF 对红肉 Neu5Gc 介导的 CMAH<sup>-/-</sup> 小鼠抗体产生的必要环节。玫瑰花环实验是体外检测动物免疫功能的重要方法。动物 T 淋巴细胞表面具有结合异种动物红细胞的受体，在体外条件下，能形成以 T 淋巴细胞为中心，红细胞环绕在周围，形成宛似一朵玫瑰花瓣的花环，而 EPF 是妊娠相关的免疫抑制因子，它影响了 T 淋巴细胞介导的相关免疫功能，刺激 T 淋巴细胞释放可溶性的抑制因子，抑制 T 淋巴细胞 DNA 的合成，进而干预玫瑰花环的形成。

综上所述，利用第一章表达纯化后的去除抑制区的 EPF (10 kD) 蛋白作为免疫原，免疫新西兰大白兔，制备 EPF 抗体，并对其进行纯化，再对其特异性和适用性进行分析。之后通过玫瑰花环抑制试验，在细胞水平上探究 EPF 蛋白的免疫抑制功能，为后续进一步探讨 EPF 对 Neu5Gc 介导的 CMAH<sup>-/-</sup> 小鼠慢性炎症提供实验基础和实验材料，同时也为进一步开发 EPF 早孕检测技术提供抗体资源。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/485110204004011112>