

# 凝血因子XIII A亚基 mRNA 大片段缺失所致遗传性凝血因子XIII缺乏症的分子机制研究

马秋玲 金洁 蔡望伟

**【摘要】** 目的 研究凝血因子XIII(FXIII)A亚基 mRNA DelCD11-279大片段缺失引起遗传性FXIII缺乏症的分子致病机制。方法 构建正常人、先证者母亲FXIII A亚基 mRNA表达质粒pET-22b(+)/FXIII A和先证者FXIII A亚基 mRNA DelCD11-279大片段缺失的表达质粒pET-22b(+)/FXIII A-Del,转化大肠杆菌 BL21, SDS-PAGE和 Western blot法检测FXIII A亚基蛋白的表达, Ni-NTA树脂结合柱纯化FXIII A亚基蛋白质, EZ-LinkTM5-(Biotinamido) Pentylamine 掺入法检测纯化FXIII A亚基蛋白质活性。结果 pET-22b(+)/FXIII A和pET-22b(+)/FXIII A-Del经酶切及PCR鉴定构建成功,转化大肠杆菌 BL21,经异丙基硫代-β-D-半乳糖苷诱导后获特异高效表达, SDS-PAGE显示重组蛋白质的相对分子质量分别为83 200和51 900,用Ni-NTA树脂结合柱分离得到纯化蛋白质, Western blot方法分析表明重组的蛋白质是人FXIII A亚基蛋白,先证者及其母亲的纯化FXIII A亚基蛋白质活性分别为正常人的0、95.87%。结论 FXIII A亚基 mRNA DelCD11-279大片段缺失导致编码截短的464个氨基酸的无活性FXIII A亚基蛋白是先证者遗传性FXIII缺乏症的分子机制之一。

**【关键词】** 因子XIII; 因子XIII缺乏; 质粒; 突变

**Study on the molecular mechanisms of a novel large deletion of FXIII A mRNA in a new hereditary factor XIII deficiency** Ma Qiuling, Jin Jie, Cai Wangwei\*. *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hainan Medical College, Haikou 571101, China*

Corresponding author: Cai Wangwei, Email: caiww591020@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the mechanisms of DelCD11-279 of factor XIII subunit A mRNA in the pathogenesis of hereditary factor XIII deficiency. **Methods** The recombinant plasmids containing pET-22b(+)/FXIII A of normal subject and proband's mother and pET-22b(+)/FXIII A-Del of the proband were constructed and transformed into E. coli BL21. Expressing protein was analyzed by the SDS-PAGE and purified by Ni-NTA resin. Purified proteins were detected by the Western-blot. The activity of purified protein was detected by the incorporation test with EZ-LinkTM5-(Biotinamido) Pentylamine. **Results** The recombinant plasmids containing pET-22b(+)/FXIII A and pET-22b(+)/FXIII A-Del which constructed and identified successfully by enzyme digestion and PCR, were transformed into E. coli BL21 and efficiently expressed by IPTG induction. The molecular weights of expressing proteins are 83 200 and 51 900 by the SDS-PAGE. Expressing proteins were purified by Ni-NTA resin, and were proved to be human FXIII A proteins by Western-blot. Purified protein activity of proband's mother and proband was 95.87% and 0 of the purified FXIII A protein activity from the normal subject, respectively. **Conclusions** DelCD11-279 of FXIII A mRNA which encoding a 464 amino acids of inactive FXIII A protein is one of the molecular mechanisms resulting in FXIII deficiency in the patient.

**【Key words】** Factor XIII; Factor XIII deficiency; Plasmids; Mutation

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.02.010

基金项目:国家自然科学基金(30060037);教育部科学技术研究重点项目(03147)

作者单位:450002 郑州,河南中医学院第二附属医院血液科(马秋玲);浙江大学医学院附属第一医院血液科(金洁);海南医学院生物化学教研室(蔡望伟)

通信作者:蔡望伟,Email:caiww591020@163.com

遗传性凝血因子Ⅲ(FⅢ)缺乏症是一种罕见的常染色体隐性遗传出血性疾病,年发病率约为1/200万,其主要临床表现为出生时脐带残端出血、轻微外伤后血肿形成及终生出血倾向,基因突变是发病的分子基础<sup>[1-2]</sup>。我们对一个遗传性FⅢ缺乏症家系进行基因缺陷研究,首次报道了一种新的FⅢA亚基 mRNA 密码子 11 到 279 大片段缺失(DelCD11-279)<sup>[3]</sup>。在后续研究中,我们对该家系遗传性FⅢ缺乏症的分子致病机制进行了探讨。

### 材料和方法

1. 家系资料:先证者:女,17岁,海南人,出生时脐带出血,幼年起反复轻微外伤后出血不止,在海南医学院附属医院确诊为FⅢ缺乏症。其弟弟也有轻微出血倾向。其父母和妹妹均正常。

2. 菌株与质粒载体:大肠杆菌 BL21 和原核表达载体 pET-22b(+)由中国热带农业科学院热带生物技术研究所徐立新博士惠赠。

3. 主要试剂:限制性内切酶 Xho I、Nco I、PCR Marker 购自日本 TaKaRa 公司;T4-DNA 连接酶、DNA 回收试剂盒、Wizard DNA clean-up Kit、pGEM-T Vecetor Kit、纤维蛋白原、 $\alpha$ -凝血酶购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;蛋白质纯化试剂盒购自德国 Qiagen 公司;异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、5,6-二氯-1- $\beta$ -D-呋喃糖苯并咪唑(DRB)为美国 Cal2 biochem 公司产品;FⅢA Ab-1 为法国 Diagnostica Stago 公司产品; Peroxidase-labeled Antibody to mouse IgG 购自深圳晶美生物工程有限公司;EZ-Link 5-(Biotinamido)pentylamine 购自美国 PIERCE 公司。

4. 构建正常人、先证者母亲 FⅢA 亚基基因表达载体 pET-22b(+)/FⅢA 和先证者 FⅢA 亚基基因 mRNA DelCD11-279 表达载体 pET-22b(+)/FⅢA-Del:FⅢA 亚基 cDNA 的克隆与测序方法见本研究组前期报道<sup>[3]</sup>。本研究使用的是原核表达载体 pET-22b(+),用 Sac I 与 Noc I 分别酶切 pGEM-T-easy-FⅢA 和 pET-22b(+)载体,回收后连接、转化、重组质粒的筛选和酶切鉴定,按常规的分子克隆方法进行。鉴定的阳性菌落由上海联合基因公司进行目的基因测序。

5. 原核表达:将测序验证后的 pET-22b(+)/FⅢA 和 pET-22b(+)/FⅢA-Del 转化表达菌 BL 21,当 595 nm 处吸光度值为 0.6 时,加 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)诱导表达,6 h 后收获细菌,洗涤称湿重。

6. 正常人、先证者母亲和先证者 FⅢA 亚基表达菌的提取:以每克(湿重)菌体沉淀加入 5 ml 裂解液(100 mmol/L 磷酸二氢钠、10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液、8 mmol/L 尿素,pH 8.0)充分混匀后于冰上超声破碎, DNase I 水解 DNA,4 ℃离心 20~30 min (20 000 $\times$ g),弃沉淀,获得的上清作为分离纯化的蛋白样品。

7. 提取蛋白质 SDS-PAGE 分析:按 Laemmli 方法制备 0.75 mm 厚 100 g/L 聚丙烯酰胺分离胶和 50 g/L 浓缩胶,采用美国 Bio-Rad 公司的电泳仪进行垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。用微量进样器按预定的次序加入适量的样品,将电泳槽置于冰盒中,先以 80 V 的电压进行电泳,待溴酚蓝前沿进入到分离胶后,再把电压提高到 100 V,直至溴酚蓝到达分离胶底部,停止电泳,进行考马斯亮蓝 R250 染色。

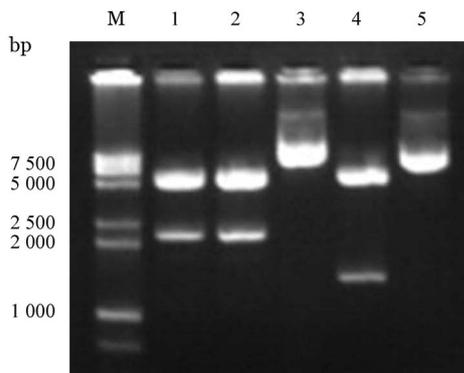
8. 应用 Ni-NTA 树脂结合柱纯化正常人、先证者及其母亲 FⅢA 亚基蛋白:提取的上清转移到新试管中,每 4 ml 的裂解液加入 1 ml 50% Ni-NTA 树脂,室温下 200 r/min 轻轻摇动 40~60 min;将裂解液-树脂混合液装入底部盖紧的空柱内,静置 5~10 min,使裂解液-树脂沉淀形成水平液面;用 2 ml 洗涤缓冲液(100 mmol/L 磷酸二氢钠、10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液、8 mol/L 尿素,pH 6.3)洗涤柱子 2 次,收集洗提的液体用于 SDS-PAGE 分析;用 0.5 ml 洗提缓冲液(50 mmol/L 磷酸二氢钠、300 mmol/L 氯化钠、20 mmol/L 咪唑,pH 8.0)洗涤柱子 4 次,收集洗提的缓冲液,分别标注为洗提液 1、洗提液 2、洗提液 3 和洗提液 4,用于 SDS-PAGE 和 Western blot 分析及活性测定。

9. 纯化目的蛋白质的 Western blot 分析及活性测定:纯化蛋白质的 Western blot 分析按小鼠抗人 FⅢA Ab-1 产品说明书和 DAB 检测试剂盒说明书进行,硝酸纤维素膜用含 50 g/L 脱脂奶粉封闭液封闭,然后依次与小鼠抗人 FⅢA Ab-1(一抗)、Peroxidase-labeled Antibody to mouse IgG(二抗)和 TMP ligud substrate systems 晃动染色至条带清楚;将膜放蒸馏水中终止显色后照相。应用 EZ-Link<sup>TM</sup>5-(Biotinamido)Pentylamine 掺入法<sup>[4]</sup>检测纯化 FⅢA 亚基蛋白质活性。

### 结 果

1. 表达载体 pET-22b- FⅢA 的酶切鉴定和测序验证:选择 PCR 阳性的重组质粒做 Sac I 和 Noc I 酶切鉴定(图 1),先证者未酶切重组质粒在 7 086 bp

处有 1 个目的条带,而先证者酶切重组质粒在 5 458 bp 和 1 359 bp 处各有 1 个目的条带;正常对照及先证者母亲未酶切重组质粒在 7 692 bp 处有 1 个目的条带,而酶切重组质粒在 5 458 bp 和 2 199 bp 处各有 1 个目的条带,与 pET-22b(+)-FⅢA 和 pET-22b(+)/FⅢA-Del 构建成功。克隆测序结果表明:先证者母亲及正常人 pET-22b(+)/FⅢA 和先证者 pET-22b(+)/FⅢA-Del 的序列完全正确。



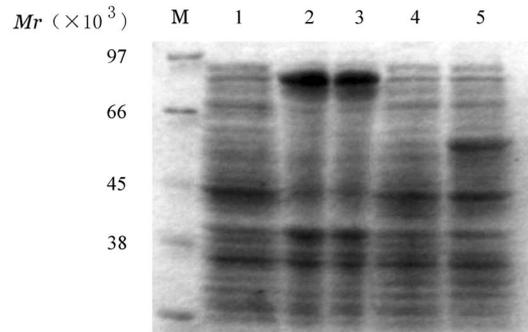
M: Marker; 1: 先证者母亲样本表达载体酶切产物; 2: 正常对照样本表达载体酶切产物; 3: 正常对照样本酶切表达载体; 4: 先证者样本表达载体酶切产物; 5: 先证者样本未酶切表达载体

图 1 表达载体 pET-22b(+)/FⅢA 和 pET-22b(+)/FⅢA-Del 的酶切结果

2. SDS-PAGE 检测人 FⅢA 亚基在大肠杆菌中的表达:选择酶切及测序鉴定正确的菌株,大量制备及纯化表达载体 pET-22b(+)/FⅢA 和 pET-22b(+)/FⅢA-Del 后转化宿主菌大肠杆菌 BL21,挑选单菌落小量摇活进行菌体 PCR,用空载体作为空白对照,再次验证正确后摇菌,提取蛋白。提取上清经 SDS-PAGE 分析:与空载体相比,3 个重组表达载体导入宿主菌,经 IPTG 诱导后均比空载体多出 1 个目的条带,正常人及先证者母亲样本在相对分子质量 83 200 处有 1 个目的条带,先证者样本在相对分子质量 51 900 处有 1 个目的条带(图 2),与预期结果一致,表明 FⅢA 基因转化宿主菌表达成功。

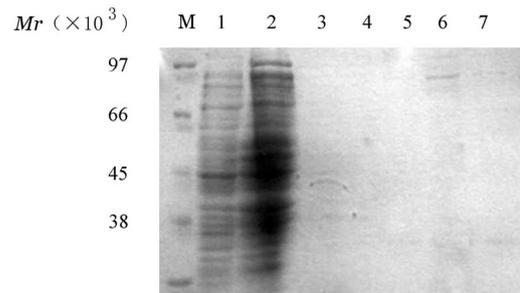
3. 纯化目的蛋白质 SDS-PAGE 和 Western blot 分析:目的蛋白质为不溶性的包涵体,用含 8 mol/L 尿素的变性裂解液在超声破碎情况下裂解细胞,与 Ni-NTA 树脂结合装柱后,先用变性洗涤缓冲液 (pH 6.3) 冲洗柱子 2 次,再用非变性的洗提缓冲液 (20 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗提,这样有利于蛋白质的复性。SDS-PAGE 结果表明,在第 3 次洗提时回收的洗提液 (洗提液 3) 中纯化蛋白质含量最高(图

3),表明蛋白质纯化成功。纯化蛋白质 Western blot 结果:正常人及先证者母亲样本在相对分子质量 83 200 处有 1 个条带,先证者样本在相对分子质量 51 900 处有 1 个条带(图 4),证实了人 FⅢA 亚基蛋白质的表达。



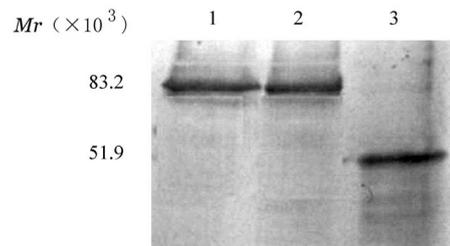
M: Marker; 1: 空白对照; 2: 先证者母亲; 3: 正常对照; 4: 空载体; 5: 先证者

图 2 pET-22b(+)/FⅢA 转化宿主菌后表达凝血因子ⅢA 亚基蛋白质的 SDS-PAGE 分析结果



M: Marker; 1: 空白对照; 2: 细胞裂解液; 3: 8 mol/L 尿素洗涤液; 4~7: 洗提液 1~4

图 3 纯化凝血因子ⅢA 亚基蛋白质的 SDS-PAGE 分析结果



1: 先证者母亲; 2: 正常对照; 3: 先证者

图 4 纯化凝血因子ⅢA 亚基蛋白质 Western blot 分析结果

4. EZ-LinkTM5-(Biotinamido)Pentylamine 掺入法测定纯化蛋白质活性:各取 7 μg 的纯化蛋白质,活性测定参照 Ariens 方法<sup>[4]</sup>,以正常人纯化蛋白质活性为 100%,先证者母亲和先证者纯化蛋白质活性分别为正常人纯化蛋白质活性的 95.87% 和 0,与先证者家系血浆 FⅢ活性测定结果<sup>[3]</sup>相符,表明先证者 FⅢA 亚基外显子 2 到外显子 7 大片段缺失

导致FⅢA亚基蛋白质活性丧失。

## 讨 论

血浆中的FⅢ由2个A亚基和2个B亚基组成异源四聚体(A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>)。A亚基为催化亚基,B亚基为A亚基载体,保护其免受蛋白酶降解<sup>[5]</sup>。X线衍射发现,A亚基折叠成五个结构区域:从氨基端开始分别是活性肽区、β-夹层区、催化中心区、β筒区-1和β筒区-2。基因突变引起不同程度的FⅢ缺乏,目前已发现104种基因突变与之有关。其中FⅢA亚基基因突变88种、B亚基基因突变16种,基因突变包括错义突变、同义突变、缺失突变、插入突变、缺失/插入突变。这些突变可以改变剪接位点、阅读框架及蛋白质的空间构象,影响FⅢ mRNA和蛋白质的表达、稳定性及蛋白质活性,引起FⅢ活性缺乏<sup>[6]</sup>。

我们前期对一个遗传性FⅢ缺乏症家系的研究显示:先证者及其弟弟尿素溶解试验阳性,FⅢA亚基存在外显子V AAGA杂合子缺失和Int1(+12) C>A纯合子突变<sup>[7]</sup>。FⅢA亚基的Int1调节FⅢA亚基基因的表达,Int1(+12) C>A纯合子突导致FⅢA亚基表达减低。外显子V AAGA杂合子缺失导致编码1条204个氨基酸截短的FⅢA亚基蛋白,缺乏催化中心区和整个β筒区,不具备转谷氨酰胺酶活性。先证者及其弟弟同时存在上述基因改变,但先证者血浆FⅢA亚基抗原水平低、活性丧失,临床症状较其弟弟严重。进一步对此家系FⅢA亚基mRNA全序列扩增时发现,先证者出现一个短的扩增片段,测序结果显示该片段是由于FⅢA亚基mRNA外显子2第11个密码子到外显子7第279个密码子大片段框内缺失所致,编码1条464个氨基酸截短的FⅢA蛋白。其序列经SWISS-MODEL分析及三维结构模型显示:截短的FⅢA亚基蛋白缺乏活性肽、β-夹层区和部分催化中心区,不能形成正常的催化中心,缺乏转谷氨酰胺酶活性<sup>[3]</sup>。为进一步证实上述理论结果,我们将先证者2号外显子第11个密码子到7号外显子第279个密码子缺失的FⅢA亚基基因、先证者母亲和正常对照的FⅢA亚基基因与表达载体pET-22b(+)-1连接后转入大肠杆菌BL21中表达。表达蛋白质经Ni-NTA树脂纯化

后Western blot显示先证者样本在相对分子质量51 900处有1个条带,先证者母亲和正常对照样本在相对分子质量83 200处有1个条带。用EZ-Link-TM5-(Biotinamido)Pentylamine掺入法测定纯化的FⅢ蛋白活性,结果为截短FⅢA亚基蛋白质的活性为正常FⅢA亚基蛋白质的0,先证者母亲FⅢA亚基蛋白活性为正常FⅢA亚基蛋白质的95.87%。以上的结果表明,先证者FⅢA亚基基因外显子2第11个密码子到外显子7第279个密码子缺失导致编码1条464个氨基酸截短的FⅢA亚基蛋白,完全丧失了FⅢ的活性,进一步证明此截短的FⅢA亚基蛋白所形成的空间结构不具有催化活性,与先证者的临床表现和SWISS-MODEL对截短的FⅢA亚基蛋白进行三维结构分析结果相符,证实先证者FⅢA亚基mRNA DelCD11-279大片段缺失导致编码一条截短的464个氨基酸的无活性FⅢA亚基蛋白是先证者遗传性FⅢ缺乏症的分子致病机制之一。

## 参 考 文 献

- [1] Karimi M, Berczky Z, Cohan N, et al. Factor XIII Deficiency [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2009, 35(4):426-438.
- [2] 段宝华,王鸿利,王学峰,等. 遗传性凝血因子XIII缺陷症分子机制的研究[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(24): 2158-2161.
- [3] 马秋玲,周克元,周鹏,等. 一种新的遗传性凝血因子XIII缺乏症XIII A亚基mRNA大片段缺失的鉴定[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(4):299-302.
- [4] Ariëns RA, Kohler HP, Mansfield MW, et al. Subunit antigen and activity levels of blood coagulation factor XIII in healthy individuals. Relation to sex, age, smoking, and hypertension [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(8):2012-2016.
- [5] Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, et al. Human Factor XIII from plasma and platelets. Molecular weights, subunit structures, proteolytic activation, and cross-linking of fibrinogen and fibrin [J]. *J Biol Chem*, 1973, 248(4):1395-1407.
- [6] Biswas A, Ivaskevicius V, Seitz R, et al. An update of the mutation profile of Factor 13 A and B genes [J]. *Blood Rev*, 2011, 25(5):193-204.
- [7] Wang W, Huang L, Ma Q, et al. Homozygous intronic mutation leading to inefficient transcription combined with a novel frameshift mutation in F13A1 gene causes FXIII deficiency [J]. *J Hum Genet*, 2011, 56(6):460-463.

(收稿日期:2014-07-10)

(本文编辑:徐茂强)