论著

文章编号:1000-5404(2007)10-0938-03

人胱抑素C的原核表达纯化鉴定及抗血清的制备

陈婷梅,俸家富,曹 炬,文阳安,涂植光 (重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 构建人胱抑素C(cystatin C, Cys C)的原核表达载体,并用纯化的Cys C重组蛋白免疫家兔,制备Cys C抗血清。**方法** 从HL-60细胞中提取总RNA,RT-PCR扩增Cys C基因,将测序正确的目的基因克隆至pET32(a)表达载体中,并诱导其在大肠杆菌BL21(DE3)中表达;所获得的包涵体蛋白经亲和层析纯化、透析复性、Western blot鉴定后,免疫家兔制备抗血清,抗体效价和特异性分别采用ELISA、Western blot进行检测。**结果** 测序证实克隆的基因序列与GeneBank中的Cys C序列相符;SDS-PAGE、Western blot结果证实获得相对分子质量为35×10^3的Cys C融合蛋白,其表达形式为不溶性包涵体;此包涵体蛋白经Ni^{2+}亲和层析能有效纯化,以该蛋白免疫家兔制备抗血清,抗体效价为1:8 000,Western blot检测证实该抗体能与目的蛋白发生特异性结合。**结论** 获得了Cys C重组蛋白及特异性多克隆抗体。

关键词: 胱抑素C;原核表达系统;蛋白纯化;抗血清

中图法分类号: R341;R392-33;R392.7 **文献标识码:** A

Prokaryotic expression, purification, identification of human cystatin C and preparation of its antiserum

CHEN Ting-mei, FENG Jia-fu, CAO Ju, WEN Yang-an, TU Zhi-guang (Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct a prokaryotic expression vector of cystatin C (Cys C), purify Cys C protein produced by the expression system, and prepare its antiserum. **Methods** Total RNA was isolated from HL-60 cells, and human Cys C gene was amplified with RT-PCR. The cDNA fragment was cloned into pMD18-T vector and which was confirmed by sequencing. The enzyme-digested target fragment was cloned into PET-32(a) expression vector and transfected into *E. coli.* BL 21(DE3), in which Cys C expression was induced. After the inclusion body protein was purified through Ni^{2+} affinity chromatography, processed by dialysis, identified by Western blotting, a rabbit was immunized with the fusion protein, and the antiserum was obtained. **Results** The result of DNA sequence analysis showed that the cloned Cys C gene sequence was completely corresponding to GenBank data. SDS-PAGE and Western blotting showed that the expressed Cys C fusion protein was about 35×10^3, mainly existing in the inclusion body of *E. coli.*, that could be purified through Ni^{2+} affinity chromatography. The titer of the antiserum to the purified protein was 1:8 000 by ELISA, and Western blotting confirmed that the antiserum reacted specifically to the Cys C protein. **Conclusion** A recombinant Cys C protein and the specific polyclonal antibody have been obtained, which provides a basis for establishment of immunoassays of human Cys C.

Key words: cystatin C; prokaryotic expression system; protein purification; antiserum

胱抑素C(cystatin C, Cys C)即半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白,其血清浓度测定是替代传统的血尿素、肌酐(Cr)和内生肌酐清除率(Ccr)测定的首选肾功能评价指标[1]。但现有检测Cys C的进口试剂盒价格昂贵,妨碍了其在国内推广应用,为此我们欲开发定量检测Cys C的免疫学法试剂盒,Cys C蛋白抗原及其相应抗体的制备,是建立此测定方法的基本条件。本研究拟以基因重组策略制备Cys C的蛋白抗原,并以此蛋白免疫动物制备相应的抗体,以期为研制开发Cys C

作者简介:陈婷梅(1969-),女,重庆市人,博士研究生,副教授,主要从事临床免疫学诊断方面的研究。电话:(023)68485725, E-mail: chentingmei@sohu.com

通讯作者:涂植光,电话:(023)68485759,E-mail: tuzhiguang@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-06-28;修回日期:2006-11-28

的检测试剂盒提供基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞、菌种和质粒　　HL-60 细胞、BL21（DE3）、PET-32(a)为本室保存；质粒 PMD18-T 载体、JM109 为 TaKaRa 产品。

1.1.2　实验动物　　新西兰大白兔 2 只，体质量 1.5 ~ 2.0 kg，由我校实验动物中心提供。

1.1.3　试剂　　RNA 提取试剂盒、DNA 聚合酶、T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ均为 TaKaRa 公司产品；IPTG 为 Sigma 产品；丙烯酰胺，双丙烯酰胺为 Sigma 产品；His Bind Column（Ni-NTA）柱为 Novagen 公司产品；咪唑、尿素、Nacl 和 Tris 碱为 BBI 产品，均为分析纯；兔抗人 Cys C 多克隆抗体、人 Cys C 购自 BioVender Laboratory Medicine, Inc，HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗为中山生物试剂公司产品。

1.1.4　主要仪器设备　　紫外分光光度仪（UV-1800, HITACHI），蛋白电泳仪、电转移仪为 Bio-Rad 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　目的片段的扩增与克隆　　HL-60 细胞提取总 RNA 为模板，以上游引物 5′- GGATCCATGGCCGGGCCCCTGCGC-3′，下游引物 5′- AAGCTTCTAGGCGTCCTGACAGGTGGA-3′，通过 RT-PCR 扩增 Cys C 基因；回收 PCR 产物，用连接酶将回收产物与 pMD18-T 连接，转化 JM109，提取质粒，用 *Bam*H Ⅰ/*Hind* Ⅲ进行双酶切鉴定并测序。

1.2.2　目的基因的克隆　　克隆载体用 *Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切，回收纯化目的片段。PET-32(a)表达载体经相同酶切处理，回收大片段，T_4 DNA 连接酶连接，转化感受态细胞 JM109，提取质粒双酶切，琼脂糖凝胶电泳鉴定。重组质粒转化感受态表达菌株 BL21（DE3），涂布于氨苄青霉素平板上，37 ℃培养 24 ~ 48 h。

1.2.3　PET-Cys C 重组载体的诱导表达　　将转化 BL21（DE3）的单个菌落接种入 LB 培养液（含 100 mg/L 氨苄青霉素）中，37 ℃振摇过夜，待 D(600)为 0.6 ~ 1.0 时加 IPTG（终浓度 = 1 mmol/L）诱导，37 ℃振摇 4 h，离心收集诱导菌，12% SDS-PAGE 分析。

1.2.4　表达产物分离和纯化　　4 ℃离心收获细菌，以 Binding Buffer 洗涤 1 次，冰上超声破菌；将细菌超声破碎液低温离心，收集上清液，SDS-PAGE 分析。

将洗涤后的超声破菌沉淀冰浴 1 h，充分溶解包涵体，离心后上清滤液转入镍层析柱内，依次加入 Binding Buffer, Wash Buffer，最后 Elute Buffer 进行目的蛋白洗脱，测定各洗脱管的 D(600)值。收集 Elute Buffer 洗脱蛋白，进行透析，Bradford 法蛋白定量，12% SDS-PAGE 检测目的蛋白纯化情况。

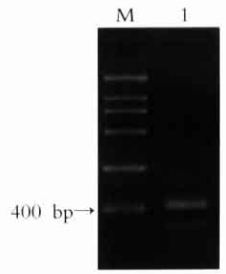
1.2.5　Western blot 测定　　取纯化的目的蛋白经 SDS-PAGE 后，用电转移仪 6 mA，转移 1.5 h。脱脂奶粉封闭，一抗为兔抗人 Cys C 多克隆抗体（1∶1 000），二抗为羊抗兔 HRP-IgG，(1∶3 000)，DAB 为呈色底物，作 Western blot 测定。

1.2.6　Cys C 抗血清的制备和鉴定　　选 2 只 1.5 ~ 2.0 kg 健康雄性大白兔，取 1 mg 纯化蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合，于背部、足垫皮下多点注射；14 d 后以同样量蛋白与弗氏不完全佐剂混合，加强免疫；在 21、28 d 再用纯蛋白于兔腹股沟肌肉加强免疫；33 d 经兔耳缘静脉取血，试血符合要求后，心脏采血，分离血清；用 ELISA 法测定抗血清效价，取人 Cys C 标准品纯化蛋白经 SDS-PAGE 后，电转移到 PVDF 膜，兔抗血清为一抗，二抗为羊抗兔 HRP-IgG，Western blot 分析其特异性。

2　结果

2.1　目的基因的扩增

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见清晰的扩增条带，分子大小约 400 bp（图 1）。

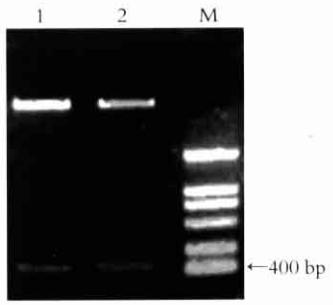


M：标准；1：Cys C 的 PCR 产物

图 1　Cys C RT-PCR 产物

2.2　重组表达质粒 PET-Cys C 的鉴定

将测序正确的目的片段亚克隆至 PET 载体中，经转化，质粒抽提和双酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳，于期望位置上出现目的条带（图 2），证明 Cys C 基因正确克隆入 PET-32(a)载体。

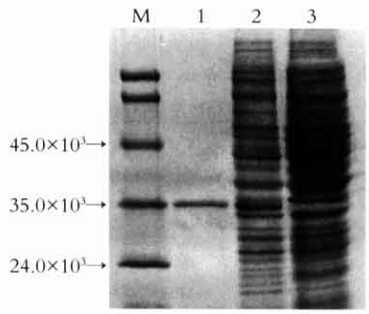


1,2：阳性克隆的双酶切（*Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ）目的片段；M：标准

图 2　PET-Cys C CDS 片段酶切鉴定

2.3　Cys C 基因融合蛋白的表达与纯化

SDS-PAGE 结果显示，转化菌经诱导后，较未诱导菌有 1 条明显增粗的蛋白条带，其相对分子质量为 35×10^3 左右，与期望值相符合（Cys C 蛋白为 12×10^3，再加上 20×10^3 左右的硫氧还蛋白）。考马斯亮蓝 R-250 染色后，经过 Bio-Rad 扫描仪扫描，目的蛋白占全菌蛋白的 15% 左右。该目的蛋白以包涵体形式存在为主，经亲和层析和透析复性，SDS-PAGE 证明纯化产物为单一蛋白，目的蛋白经凝胶扫描显示纯度达 90%（图 3）。



M:标准;1:纯化的 Cys C 目的蛋白;2:IPTG 诱导后的全菌蛋白;3:IPTG 诱导前的全菌蛋白

图3 Cys C 基因表达鉴定与纯化

2.4 Western blot 测定

纯化的目的蛋白经 SDS-PAGE,转移至 PVDF 膜上,能与相应 Cys C 抗体形成单一蛋白条带,证明表达纯化的蛋白是 Cys C 蛋白(图4)。



图4 Cys C 表达蛋白鉴定

2.5 Cys C 抗血清效价和特异性鉴定

ELISA 间接法测定抗血清效价为 1∶8 000;Western blot 测定显示抗血清能与 Cys C 标准品发生免疫反应(图5)。

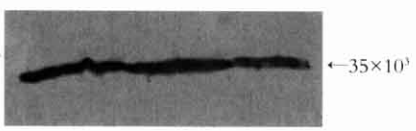


图5 Cys C 抗血清鉴定

3 讨论

长期以来,血浆尿素氮、Cr、尿酸及 Ccr 是反映肾小球滤过功能的常用指标,但肌酐作为 GFR 测定物,影响因素多,特异性不高,灵敏度也较差。Cys C 是新近发展起来的一个评价肾功能的灵敏指标[2]。几乎所有的机体有核细胞均可产生 Cys C,它是管家(house-keeping)基因的表达产物,产率相对恒定,其浓度与肾小球滤过率呈良好的线性关系,而且 Cys C 在血清血浆中较为稳定,测定干扰因素少,因此 Cys C 适用于临床的常规使用。近年来研究证实,Cys C 在评价肾脏疾病、肝硬化、糖尿病、肾移植等疾病患者的肾功能损害中,比血肌酐更敏感特异和可靠[3-6]。2002年,美国食品药品管理局(food and drug administration,FDA)网上公布了26个在检验医学有重大突破的全新检测项目,Cys C 便是其中之一。我们欲建立定量检测 Cys C 的乳胶颗粒增强免疫浊度法,此法具有快速、准确、自动化、检测通量高的特点,可提高 Cys C 测定的普及率。

免疫浊度法测定 Cys C 的首要条件是 Cys C 蛋白抗原的制备纯化。蛋白抗原可从人或动物的组织、细胞、体液和组织间液中分离纯化,也可采用基因工程重组策略进行克隆和表达,此外通过抗原肽的人工合成策略也可获得肽抗原蛋白。本研究选用基因工程策略制备 Cys C 蛋白抗原,采用的是 PET-32a(+)原核表达系统,它会在目的蛋白之前融合一个硫氧环蛋白,目的是增加目标蛋白的可溶性,其抗原性很小,因此表达后可不经蛋白酶切割去除而直接用于免疫动物制备抗血清;研究中 Cys C 目的蛋白以可溶性部分和不可溶性部分两种形式存在,并且以包涵体的形式为主。我们曾经尝试改变细菌的生长条件和使用不同的 IPTG 浓度来诱导,但是均未避免包涵体的形成。对于包涵体蛋白的纯化,我们采用亲和层析,再通过透析获取较纯的蛋白,为下一步的动物实验作好了准备。另外,本研究中重组载体表达的目的蛋白产量一般(大概占菌体蛋白的15%),可能是由于原核生物密码子偏性,导致了真核基因在原核表达载体表达率较低。为进一步建立人 Cys C 高效稳定的原核表达载体,可通过对目的基因上游引物序列的稀有密码子进行同义突变,以解决表达效率低的问题,目前此项研究正在进行中。

参考文献:

[1] Gokkusu C A, Ozden T A, Gul H, *et al*. Relationship between plasma Cystatin C and creatinine in chronic renal diseases and Tx-transplant patients[J]. Clin Biochem, 2004, 37(2): 94-97.

[2] Laterza O F, Price C P, Scott M G. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? [J]. Clin Chem, 2002, 48(5): 699-707.

[3] Fliser D, Ritz E. Serum cystatin C concentration as a marker of renal dysfunction in the elderly[J]. Am J Kidney Dis, 2001, 37(1): 79-83.

[4] Christensson A, Ekberg J, Grubb A, *et al*. Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation[J]. Nephron Physiol, 2004, 94(2): 19-27.

[5] Gerbes A L, Gulberg V, Bilzer M, *et al*. Evaluation of serum cystatin C concentration as a marker of renal function in patients with cirrhosis of the liver[J]. Gut, 2002, 50(1): 106-110.

[6] Xia L H, Bing X G, An X T. Serum cystatin C assay for the detection of early renal impairment in diabetic patients [J]. J Clin Lab Anal, 2004, 18(1): 31-35.

(编辑 邓强庭)