维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0331-03

Cys C 的原核表达载体构建和鉴定

王 箭,阳 强,陈婷梅,尹一兵

(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)

【摘 要】目的:构建人胱抑素 C(Cys C)的原核表达载体,为进一步表达纯化 Cys C 重组蛋白奠定基础。方法:从 HL-60 细胞中提取总 RNA,RT-PCR 扩增 Cys C 基因,再将目的基因克隆至 PET32a(+)表达载体中,构建人 Cys C 原核表达质粒 PET32a(+)/Cys C;再将此重组子进行双酶切电泳鉴定和测序鉴定。结果:酶切电泳鉴定结果显示 Cys C 基因克隆入载体中,测序结果证实克隆的基因序列与 GeneBank 中的 Cys C 序列相符。结论:获得了人 Cys C 原核表达质粒 PET32a(+)/Cys C,为进一步表达和纯化 Cys C 重组蛋白奠定了工作基础。

【关键词】胱抑素 C;原核表达系统

【中国图书分类法分类号】R320.1160 【文献标识码】A 【收稿时间】2007-09-13

Construction and identification of prokaryotic expression vector of human cystatin C

WANG jian, et al

(*The Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, the Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To Construct a prokaryotic expression vector of cystatin C(Cys C) to provide a basis of purify Cys C protein produced by the expression system. *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 pET32a(+) vector, which was confirmed with sequencing and electrophoresis. *Results*: The result of electrophoresis showed that Cys C had been cloned into pET32a(+) vector, and the result of. DNA sequence analysis also showed the cloned Cys C gene sequence was completely correspondent to GeneBank data. *Conclusion*: The prokaryotic expression vector of cystatin C(Cys C) was obtained, providing a basis of purification of Cys C protein produced by the expression system.

【Key words】 Cystatin C; Prokaryotic expression system

胱抑素 C(Cystatin C,Cys C)是一种含 122 个氨基酸的 13ku 的非糖基化蛋白质,属半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族的基本成员,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)测定方法的首选肾功能评价指标[1,2]。但现有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,本文拟以基因重组策略制备 Cys C 的蛋白抗原,以期为研制开发 Cys C 的免疫学法检测试剂盒提供基础。

1 材料与方法

作者介绍:王 箭(1959-),男,实验师,研究方向:临床检验。

通讯作者:尹一兵,男,教授,E-mail:yibingyin@21cn.com。

1.1 材料

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

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂盒、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ均为 Takara 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞总 RNA 提取 按照试剂盒说明书进行,将从 HL-60 细胞中提取的总 RNA 经过 1%琼脂糖电泳,观察出现条带及各条带亮度;紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280}。

1.2.2 目的片段的扩增 HL-60 细胞中提取总 RNA 为模板,上游引物 5'-GGATCCATGGCCGGGCCCCTGCGC-3'(下划线部分为 *BamH* Ⅰ的酶切位点),下游引物 5'-AAGCTTC-TAGGCGTCCTGACAGGTGGA-3'(下划线部分为 *Hind* Ⅲ的酶切位点),通过 RT-PCR 扩增 Cys C 基因。

1.2.3 产物回收 PCR 产物,按照试剂盒说明书进行回收。

1.2.4 鉴定并测序 用连接酶将回收产物与 PET-32a(+)

维普资讯 http://www.cqvip.com

连接后，转化至 JM109 中，涂布平板过夜培养菌体，挑选菌落，提取质粒后，用 *BamH* Ⅰ/*Hind* Ⅲ进行双酶切鉴定并测序。

1.2.5 蛋白纯化重组 将构建的 PET32a (+)/Cys C 转化 BL21(DE3)，IPTG(终浓度 =1mmol/L)诱导，37℃振摇 4h，离心收集诱导菌，12% SDS-PAGE 分析；将细菌包含体裂解液利用 Ni^{2+}-NTA 树脂纯化重组蛋白。

2 结 果

2.1 琼脂糖电泳

提取的总 RNA 经 1%琼脂糖电泳后，可见 3 种核糖体 RNA 亚基，28S∶18S 约为 2∶1，可见 5S(图 1)。A_{260}/A_{280} 为 1.96，说明提取得总 RNA 质量较好。

2.2 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 400bp(图 2)。

2.3 重组表达质粒 PET32a(+)/Cys C 的鉴定

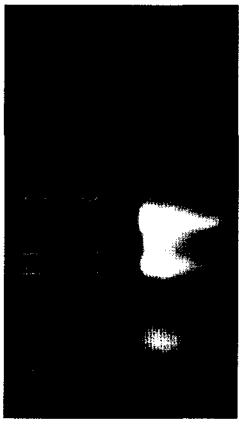
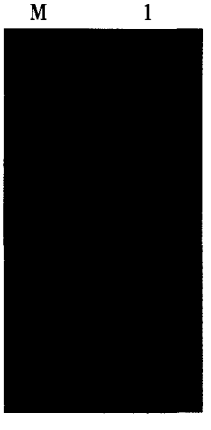
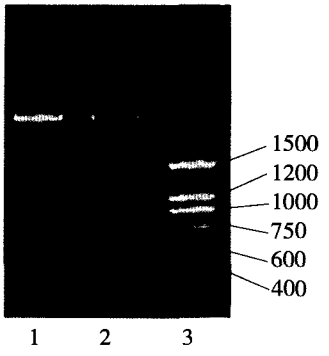


图 1 细胞总 RNA 电泳图



M. DNA marker (DL2000); 1. PCR product of Cys C

图 2 Cys C RT-PCR 产物



1,2. PET-Cys C CDS plasmid digested with *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ; 3. DNA Marker (bp)

图 3 PET-Cys C CDS 片段酶切鉴定

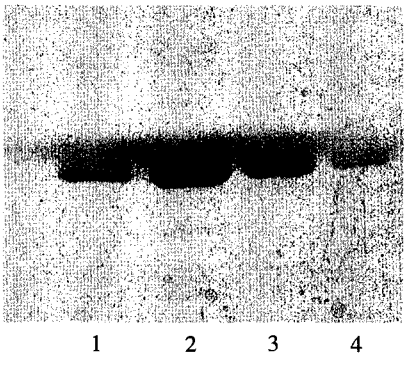
目的片段克隆至 PET32a(+)载体中，经转化，质粒抽提和双酶切，1%琼脂糖凝胶电泳，于期望位置上出现目的条带(图 3)，证明 Cys C 基因正确克隆入 PET-32(a)载体。

2.4 测序结果

重组质粒 PET32a(+)/Cys C 测序结果显示与 Gene Bank 公布 Cys C 的 mRNA 序列完全一致。

2.5 Cys C 蛋白的表达和纯化

转化菌包含体裂解液经用 Ni^{2+}-NTA 树脂纯化重组蛋白，SDS-PAGE 和图像分析，纯化的目的蛋白主要存在于 E2~E5 管中，其纯度可达 90%以上(图 4)，经 Bradford 法测得纯化透析后蛋白浓度为 0.5mg/ml。



1. Elute solution E2; 2. Elute solution E3; 3. Elute solution E4; 4. Elute solution E5

图 4 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

3 讨 论

长期以来，血浆尿素氮、Cr、尿酸及 Ccr 是反映

维普资讯 http://www.cqvip.com

肾小球滤过功能的常用指标，具有简便易行的优点，但 Cr 是肌肉中磷酸肌酸的代谢产物，它受病人性别、年龄、肌肉量及外源性 Cr 摄入等多种因素的影响，并且随着肾小管排泌或重吸收 Cr 的程度不同，肾脏处理 Cr 的速度也不同，尤其是在肾病状态下。因此，Cr 作为 GFR 测定物，影响因素多，特异性不高，灵敏度也较差。近年来对“早期肾病变”(Incipient nephropathy)的报道越来越多，这就要求相应的肾脏疾病的实验室检测方法更为敏感和特异，以有利于临床的早期诊断和治疗。Cys C 是新近发展起来的 1 个评价肾功能早期损害的灵敏指标[3-6]，2002 年，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。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、适宜临床常规操作的特点，试剂盒国产化将大大降低成本，从而促进 Cys C 测定的普及率，提高肾脏疾病的临床检验诊断水平。

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。在本文中我们选用了经济、高效、来源方便稳定的基因重组策略来制备 Cys C 的蛋白抗原，成功构建了人 Cys C 原核表达载体并转化大肠杆菌，制备了纯化的目的蛋白，由于制得的蛋白仅用于免疫动物制备抗血清，对表达的蛋白活性要求不高，所以我们未进一步对表达蛋白的生物活性作鉴定。

参 考 文 献

[1] Gokkusu CA,Ozden TA,Gul H,et al. Relationship between plasma cystatin C and creatinine in chronic renal diseases and Tx-transplant parients[J]. Clin Biochem,2004;37(2):94-97.

[2] Laterza OF,Price CP,Scott MG. 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 AL,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 LH,Bing XG,An XT.Serum cystatin C assay for the detection of early renal impairment in diabetic patients[J]. J Clin Lab Anal,2004;18(1):31-35.

(责任编辑：关蕴良)

(上接第 296 页)

究最多的与细胞凋亡关系密切的基因，它的作用主要是抑制凋亡的发生，是目前公认的细胞凋亡拮抗基因。流式细胞仪证实尼美舒利作用于胃癌 SGC7901 后能诱导细胞凋亡，可见 Bcl-2 蛋白表达下调与其引起凋亡的情况相符合。表明尼美舒利抑制 P-STAT3 及下游靶基因蛋白 Bcl-2 的表达从而诱导细胞凋亡。

本研究结果提示尼美舒利抑制胃癌 SGC7901 细胞增殖和诱导胃癌细胞凋亡的机制可能是通过 STAT3 信号途径，抑制了癌基因 STAT3 的表达，使其不能激活它的靶基因所诱导某些关键性基因产物的表达(如 CyclinD1 蛋白、Bcl-2 蛋白)，从而影响肿瘤的发生所致，表明该信号通路能介导选择性 COX-2 抑制剂的抗胃癌作用，以 STAT3 为靶点对胃癌进行干预治疗具有可行性。

参 考 文 献

1] Hussain SS, zabo IL,pai R,et al. MAPK(ERK2) kinase-a key target for NSAIDS -induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth[J]. Life Sci,2001;69(3):3045-3054.

[2] 俞丽芬，朱延波，乔敏敏，等. Stat3 在人胃癌细胞株和组织中的组成性激活及其临床意义[J]. 中华医学杂志，2004;84(24):2064-2069.

[3] Schindler CW. JAK-STAT signaling in human disease[J]. J Clin Invest,2002;109(9):1133-1137.

[4] O'Shea JJ,Gadina M,Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002:New surprises in the Jak/Stat pathway[J]. Cell,2002;109(suppl 1):121-131.

[5] Buettner R,Mora LB,Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention[J]. Clin Cancer Res,2002;8(4):945-954.

[6] BrombergJ.STAT proteins and oncogenesis[J]. J clin Invest,2002;109(6):1139-1142.

[7] Muthian G,Raikwar HP,Johnson C,et al. COX-2 inhibitors modulate IL-12 signaling through JAK-STAT pathway leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis[J]. J Clin Immunol,2006;26(1):73-85.

(责任编辑：冉明会)