

• 基础研究 •

降钙素原的克隆表达及多克隆抗体制备

王春芳^{1,2}, 周新^{2△}, 谢焱², 郑璇²

(1. 右江民族医学院医学附属医院检验科, 广西百色 533000; 2. 武汉大学中南医院基因诊断中心 430071)

摘要:目的 克隆表达与纯化降钙素原(PCT), 制备多克隆抗体, 为其单抗制备及在临床上的应用研究提供有用的实验基础。**方法** 培养人甲状腺髓样癌细胞株(TT 细胞)提取总 RNA 进行 RT-PCR 获取 PCT 的全长基因, 构建 pET-PCT 重组质粒, 转化至 DE3 经 IPTG 诱导表达出融合蛋白, 纯化并进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、质谱测序, 融合蛋白免疫制备多抗, 采用 ELISA 和 Western-blot 进行鉴定。**结果** 成功获得 PCT 全长基因, 10% SDS-PAGE 电泳和质谱测序证明表达的融合蛋白为 PCT, 成功制备了 PCT 多抗。**结论** 成功获得 PCT 的全长基因, 表达出融合蛋白并制备多抗, 为研究 PCT 的病理、生理作用及功能奠定基础, 为 PCT 的单抗制备及在临床应用研究提供了有用的实验材料。

关键词: 降钙素原; 融合蛋白; 多克隆抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.21.020

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)21-2472-03

Cloning, expression and the polyclonal antibody preparation of procalcitonin

Wang Chunfang^{1,2}, Zhou Xin^{2△}, Xie Yan², Zheng Xuan²

(1. Department of Laboratory, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi 533000, China; 2. Center for Gene Diagnosis, Central Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Objective To construct pET-PCT recombinant plasmid which contained the full length sequence of human PCT gene, express fusion protein, and produce polyclonal antibody production of PCT to serve as a useful experimental basis for preparing the procalcitonin monoclonal antibody and clinical application. **Methods** Full length mRNA of PCT was obtained from TT cells through RT-PCR, and inserted into pET-32a(+) expression vector, which was used to transfect E. coli DE3 cells. Transfected DE3 cells were induced by IPTG to produce fusion PCT protein. The fusion protein with His tag was purified by Ni-NTA affinity chromatography column, and verified by multiple techniques such as 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and MALDI-TOF mass spectrometry. The purified protein was used to immunize New Zealand rabbit to produce polyclonal antibody, which was verified by ELISA and Western blot. **Results** Recombinant vectors containing full length PCT mRNA insert were constructed, and were used to transfect the E. coli DE3 cells for producing recombinant PCT protein. SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry results showed the characteristics of the recombinant protein produced identical to PCT, and antibody to this protein was successfully produced. **Conclusion** The recombinant protein lays the foundation for further study on the function and pathophysiological role of procalcitonin, and provides experimental basis for preparing the antibody for procalcitonin for further clinical applications.

Key words: calcitonin; fusion protein; polyclonal antibody

降钙素原(procalcitonin, PCT)是降钙素(calcitonin, CT)的前肽物, 无 CT 激素活性, 由 21 个氨基酸的钙抑肽, 32 个氨基酸的 CT 和 57 个氨基酸的 N₂ 末端碎片组成^[1], 相对分子质量约为 13×10³。PCT 含 6 个外显子和 5 个内含子, 基因全长约 7.6 Kb, 由位于 11 号染色体上(11P15,4)的单拷贝基因编码。PCT 半衰期为 20~24 h, 在体内先降解成 PCT-I 和 PCT-II^[2], 终产物为 CT。1993 年, Assicot 等^[3]发现 PCT 血清浓度增高与感染的发生密切相关。此后, PCT 成为临床感染性疾病诊断的一个重要指标。近年来, 国内外学者对 PCT 进行了大量研究, 其生物学特点及临床作用不断被发现。PCT 作为一项新的实验室指标, 为感染性疾病的诊断、鉴别诊断、疗效和预后提供可靠标准。本研究旨在通过培养人甲状腺髓样癌细胞株(TT 细胞)提取总 RNA 进行 RT-PCR 获取 PCT 的全长基因, 构建重组质粒 pET-PCT 转化至大肠杆菌 DE3, 经 IPTG 诱导进行表达, 获取高产量、低成本的重组 PCT 蛋白以制备多抗, 为 PCT 单抗制备及在临床应用研究提供有用的实验材料^[4]。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 动物和细胞系 新西兰大白兔(武汉大学动物实验中

心, 普通级), TT 细胞(中国典型培养物保藏中心, cctcc), pET-32a(+), DH5a, DE3(武汉大学生命科学院)。

1.1.2 主要试剂 F-12K 培养基(Gibco 公司); Trizol(Invitrogen 公司), RevertAidTM 试剂盒(Fermentas 公司); 限制性内切酶 BamH I、Hind III (Takara 公司)、T₄ DNA 连接酶(NEB 公司); Ni-Sepharose 6 fastflow(GE 公司); Ms mAb to Procalcitonin(abcam 公司)。

1.1.3 主要仪器 ABI9700 PCR 仪、CO₂ 细胞培养箱(Heal Force 公司), 蛋白电泳仪(北京六一仪器)、质谱测序仪(美国 ABI 公司)。

1.1.4 PCR 引物 根据基因库(Gene Bank)中人 PCT 基因 mRNA CDS(编码区)全长序列(NM_001033953.1), 用计算机软件 Primer 3.0 设计引物, 上游引物: 5'-CAT TGG ATC CAT GGG CTT CCA AAA GTT CTC C-3', 下游引物: 5'-TGC AAG CTT TTA GTT GGC ATT CTG GGG C-AT-3', 分别引入 Bam H I、Hind III 酶切位点, 引物合成、DNA 序列分析、阳性菌液测序鉴定由 Invitrogen 公司完成。

1.2 方法

1.2.1 获取 PCT 的全长基因

1.2.1.1 细胞培养 10% FBS 的 F-12K 培养基, 37℃、5%

△ 通讯作者, E-mail: zhouxyj@163.com。

CO₂ 常规培养 TT 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.1.2 提取总 RNA 收集细胞加 Trizol 1 mL 混匀静置 15 min, 加 0.2 mL 氯仿, 震荡、静置 10 min, 4 °C、15 000 r/min 离心 10 min, 取上层水相加 0.5 mL 异丙醇, 混匀、静置 10 min, 离心弃上清液, 75% 乙醇漂洗, 干燥 15 min, 加 20 μL 焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解。

1.2.1.3 RT-PCR (1) 逆转录反应: 总 RNA 6 μL (0.5 μg)、Primer Oligo(dT) 1 μL、DEPC 水共 12 μL 于 65 °C 孵化 5 min; 加 M-MLV 缓冲液 4 μL、dNTP 2 μL、RNasin 1 μL、M-MLV 1 μL 共 20 μL, 混匀置室温 2 min; 离心, 42 °C 孵化 60 min; 70 °C 孵化 5 min。(2) PCR 反应: 反应体系 Taq 缓冲液 10 × 5 μL、脱氧核糖核苷酸(dNTP) 5 μL、上游引物(10 pmol/μL) 1 μL、下游引物(10 pmol/μL) 1 μL、cDNA 模板 6 μL、DEPC 水 5 μL、Taq 酶 1 μL。PCR 扩增的条件与参数: 94 °C、5 min 解链; 94 °C、45 s、60 °C、30 s、72 °C、30 s 共 40 个循环; 72 °C、7 min 延伸。反应结束取 5 μL 进行电泳。

1.2.2 pET-PCT 重组质粒的构建和鉴定 Bam H I、Hind III 双酶切提取的 pET-32a(+) 质粒, 同时双酶切 PCR 产物, T₄ DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 转化至 DH5a, Amp^r (50 μg/mL) LB 平板 37 °C 过夜培养, 挑菌落置 Amp^r LB 液体 37 °C、220 r/min 培养过夜, 取菌液鉴定, 余提取 pET-PCT 并转化至 DE3 并鉴定。

1.2.3 重组 PCT 蛋白表达及纯化 取阳性 DE3 5 μL 置 5 mL Amp^r LB 液中, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 取 1 mL 置 100 mL Amp^r LB 液, 37 °C、250 r/min 摇 3 h, 菌液 A₆₀₀ = 0.6 时, 取 1 mL 做阴性对照, 加 IPTG (1 mmol/L) 继续培养, 在 3、4、5、6 h 时各取 1 mL 集菌, 加蛋白上样缓冲液混匀, 超声破碎, 沸水煮沸 10 min, 10% SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝染色及脱色鉴定。以相同条件大量诱导目的蛋白的表达, 集菌, 加结合液混匀, 加溶菌酶作用 0.5 h, 超声破碎 60 s, 离心后用 HIS 标签的 Ni²⁺ 柱纯化, 收集洗脱液, 10% SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.4 融合蛋白的质谱测序 切下 SDS-PAGE 中的蛋白带, 还原和烷基化蛋白带, 加胰酶消化, 抽干, 用缓冲液 A (2% ACN + 0.01% 甲酸) 溶解肽段, 通过反相色谱和质谱联用对多肽进行测序, 结果在本地数据库 (NCBI 的数据库) 中用 ProteinPilot 软件比对。

1.2.5 多克隆抗体的制备及鉴定

1.2.5.1 多克隆抗体的制备 将纯化蛋白免疫重约 1.5 kg 的新西兰大白兔, 第 1 次基础免疫, 10 d 后第 2 次免疫, 以后每周 1 次, 共 5 次, 每次蛋白剂量约 900 μg, 第 1 次加弗氏完全佐剂 1 mL, 余 4 次加弗氏不完全佐剂 1 mL。第 5 次免疫 10 d 后采血测抗体效价。

1.2.5.2 ELISA 法检测抗血清效价 PCT 蛋白作抗原包被, 4 °C 过夜, 每孔 100 μL (约 100 μg), 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加待检样本 (稀释比例均分别为 1:100, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200)、阳性孔和阴性对照, 1 h 后加二抗作用 1 h。DAB 法显色, 5~10 min 内观察结果。

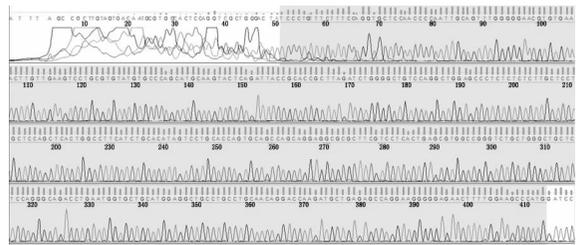
1.2.5.3 Western Blot 验证抗血清效价 将重组蛋白常规 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后, 过夜转移至 PVDF 膜, 封闭液封闭 1 h, 加抗 His-tag mAb 进行抗原-抗体反应 2 h, 用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 进行检测, ECL 显色, 目的条带清晰时终止反应。

2 结果

2.1 RT-PCR 产物测序结果 RT-PCR 产物送公司测序, 测序结果与数据库中序列完全吻合 (图 1), 结果证实所得 PCR 产物就是 PCT。

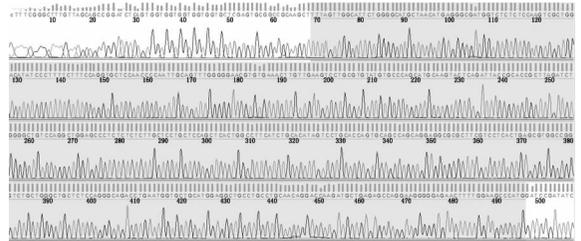
2.2 重组质粒结果 重组质粒 pET-PCT 转化至 DE3, 挑选阳性菌液送测序, 所得序列为 PCT 与 PET-32a(+) 重组的序

列, 与预期的结果一致 (图 2)。



阴影部分为 PCR 产物的 PCT 基因序列。

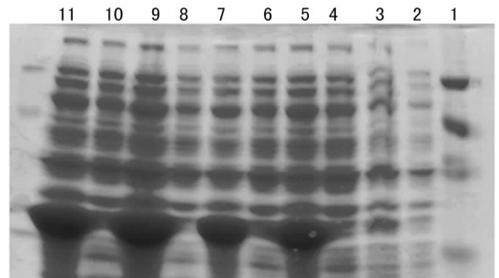
图 1 扩增产物测序结果图



阴影部分为 PCT 在 DE3 阳性菌中的序列。

图 2 DE3 阳性菌液测序结果图

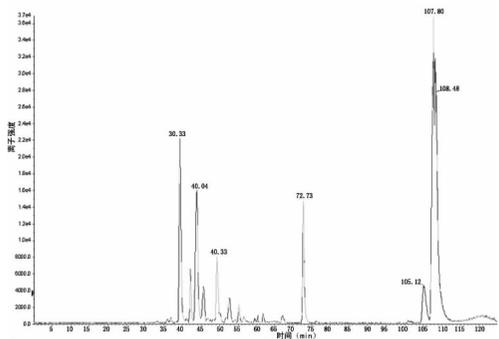
2.3 表达目的蛋白鉴定结果 10% SDS-PAGE 电泳显示, 加 IPTG 前阳性菌液和空载菌液均无目的蛋白表达, 诱导后阳性菌液在 3、4、5、6 h 在相对分子质量为 30 × 10³ 处有大量目的蛋白出现, 且在 5、6 h 的表达量最高, 质量与理论推算值相符 (图 3)。



1: 蛋白标记; 2、3: 未加 IPTG 的阳性菌液和空载菌液; 4、6、8、10: 加 IPTG 在 3、4、5、6 h 的空载菌液无蛋白表达; 5、7、9、11: 加 IPTG 在 3、4、5、6 h 的阳性菌液有大量蛋白表达。

图 3 目的基因蛋白表达 10% SDS-PAGE 电泳图

2.4 融合蛋白的质谱测序结果 色谱和质谱联用检测重组蛋白, 结果在 NCBI 数据库中用 ProteinPilot 软件比对, 根据变异系数、蛋白编号、序列覆盖范围、肽段贡献度和可信度等, 得其质谱图和氨基酸序列 (图 4、5), 结果为 PCT 蛋白。



横坐标是代表离子的出峰时间, 纵坐标是被检测到的离子强度, 峰上的数字是出峰的时间。

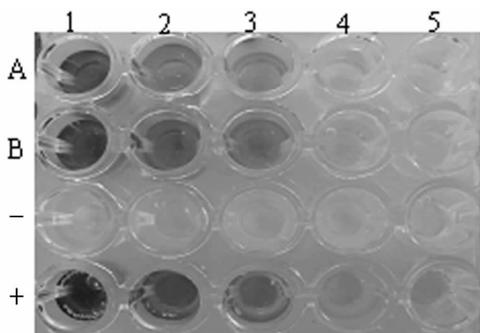
图 4 为质谱前高效液相色谱峰图

2.5 ELISA 法检测抗血清效价结果 用 ELISA 法检测重组蛋白免疫 A、B 兔子的抗血清效价,并作阳性对照和空白对照,结果显示 A、B 兔的血清均出现抗-血清,效价达 1 : 800(图 6),说明抗体制备成功。



斜体加粗氨基酸部分为可信度大于 95% 的肽段。

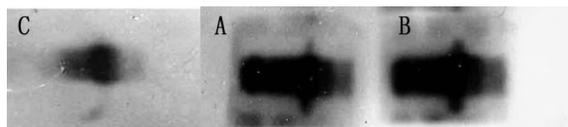
图 5 序列为 ProteinPilot 软件对质谱结果分析所得的序列图



A、B:免疫兔子后的血清标本;-:空白对照;+: Ms mAb to Procalcitonin(abcam);1、2、3、4、5:血清及 Ms mAb to Procalcitonin 的稀释比为 1 : 100,1 : 400,1 : 800,1 : 1 600,1 : 3 200。

图 6 ELISA 间接法检测抗血清效价结果

2.6 Western Blot 法检测抗血清效价结果 用 Western Blot 法检测重组蛋白免疫 A、B 兔子的抗血清效价,血清稀释 1 : 1 000,得到清晰的目的条带(图 7)。说明制备的多克隆抗体能够有效识别重组蛋白。



C、A、B:PCT 融合蛋白与 Ms mAb to Procalcitonin、免疫 A 兔、免疫 B 兔血清的 Western Blot 分析,ECL 方法显色。

图 7 Western Blot 检测抗血清效价结果图

3 讨论

PCT 主要来源甲状腺 C 细胞,肝脏、肺、肾脏等器官也有表达。正常情况下,PCT 血清浓度极低(10~50 pg/mL),常规方法检测不到。病理情况下,PCT 浓度会成千万倍升高,有时可大于 10 ng/mL。研究证明,PCT 的生成受细菌毒素(LPS)及多种炎性细胞因子的调节,LPS 是诱导 PCT 产生的最主要的刺激因子。研究证明静脉注射小剂量 LPS 2 h 后血浆中可检测到 PCT,6~8 h 迅速升高,12~48 h 达峰值[5]。研究发现,在系统炎症反应综合征(SIRS)、败血症、脓毒症等患者血清中 PCT 浓度显著升高,尤其是 SIRS 和败血症,PCT 是一个非常敏感特异的血清学标志,可作为诊断指标,并可反映脓毒血症的严重程度[3,6-7];在感染性疾病鉴别诊断中具有重要作用,如 SIRS 与败血症鉴别,鉴别细菌性和病毒性感染疾病及严重创伤和器官移植是否合并感染等[8-10],及对确诊感染的患者可作为临床监控及疗效判断的指标[11]。其他如甲状腺髓样癌、真菌或寄生虫感染后 PCT 值也升高,但病毒感染 PCT 轻微升高或不升高。近年来,还有大量的研究比较了 PCT 与 WBC、CRP、IL-6、IL-8、等在感染性疾病中的作用,基本认为,PCT 在评价感染严重程度、治疗效果和估计预后更具灵敏性和特异性高[12]。目前,PCT 的检测已有相关实验室方法如凝胶层析法、高效液相色谱法等[13],但因试剂需进口,价格较昂

贵或有放射性元素的污染,使用受限。PCT 作为一项重要的检验指标,在临床上应该得到广泛应用。研制国产试剂可大大降低成本,以便在临床推广。本研究的目的即是为此试剂的研发做前期工作。

本研究设计的引物覆盖 PCT 编码区全长,避免蛋白氨基酸信息丢失;选用培养 TT 细胞提取总 RNA 进行 RT-PCR 是为了获得完整的 PCT 全长基因,结果也证明这一点。pET-32a (+)具有可剪裁性、稳定性好、表达量高、成本低等优点,作为本研究的表达载体,表达出了大量的重组蛋白。PCR 鉴定和测序分析说明表达载体 pET-PCT 构建正确。本研究采用的质谱测序鉴定方法灵敏度高、可靠性好,检测结果证实了表达蛋白就是 PCT 蛋白。用 ELISA 和 Western Blot 鉴定抗血清,效价分别达 1 : 800 和 1 : 1 000。本研究通过简单、有效的蛋白质工程方法获得了重组人 PCT 蛋白,成功制备出多抗,为进一步制备抗体提供了经济实用的实验材料,为在临床上的应用提供必要的条件。

参考文献

[1] Slavakis A, Papadimas J. Procalcitonin: does it play a role in male reproduction[J]. Fertility and Sterility, 2000, 74(6): 1227-1228.
[2] Meidner M. Pathobiochemistry and clinical use of Procalcitonin [J]. Clinical Chimica Acta, 2002, 323(1/2): 17-29.
[3] Assicot M, Gendrel D, Carsin H, et al. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection[J]. Lancet, 1993, 341(8844): 515-518.
[4] Wang C, Zhou X. Prokaryotic expression and purification of procalcitonin[J]. Clinical Chemistry, 2010, 56(s6): A137-138.
[5] Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects [J]. J Chin Endocrinol Metab, 1994, 79: 1605-1608.
[6] Enguix A, Rey C, Concha A, et al. Comparison of procalcitonin with C-reactive protein and serum amyloid for the early diagnosis of bacterial sepsis in critically ill neonates and children[J]. Intensive Care Med, 2001, 27(1): 211-215.
[7] 黄彩芝, 莫丽亚, 李先斌, 等. 不同细菌感染所致脓毒症患儿血清降钙素原水平的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1110-1111.
[8] Tseng JS, Chan MC, Hsu JY, et al. Procalcitonin is a valuable prognostic marker in ARDS caused by community-acquired pneumonia[J]. Respirology, 2008, 13(4): 505-509.
[9] Kafkas N, Venetsanou K, Patsilina S, et al. Procalcitonin in acute myocardial infarction[J]. Acute Card Care, 2008, 10(1): 30-36.
[10] 张林, 赵蕊, 胡建芬, 等. 降钙素原半定量对新生儿脓毒症早期诊断作用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1173-1175.
[11] Nobre V, Harbarth S, Graf JD, et al. Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment duration in septic patients: a randomized trial[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 177(5): 498-505.
[12] Kocabas E, Sarikecioglu A, Aksaray N, et al. Role of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor-necrosis factor-alpha in the diagnosis of neonatal sepsis[J]. Turkish Journal of Pediatrics, 2007, 49(1): 7-20.
[13] Morgenthaler NG, Seruck J, Fischer-Schulz C, et al. Sensitive immunoluminometric assay for the detection of procalcitonin[J]. Clin Chem, 2002, 48(5): 788-790.

(收稿日期: 2011-06-28)