

• 基础实验研究论著 •

重组人胱抑素 C 及其多克隆抗体的制备*

张宏斌¹, 武 婕², 王雅丽¹, 周 霞¹, 王 捷¹, 杨太成¹

(1. 中国人民解放军广州军区广州总医院医学实验科, 广东广州 510010;

2. 广东省疾病预防控制中心病原微生物检验所, 广东广州 511430)

摘 要:目的 探讨重组人胱抑素 C(Cys C)及其多克隆抗体的制备。方法 根据大肠埃希菌编码蛋白的特性设计 Cys C 编码基因序列, 人工合成目的基因, 并将其在大肠埃希菌中表达, 目的蛋白经亲和层析纯化后免疫新西兰大白兔; 采用 Western blot 和酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测兔血清重组人 Cys C 及其多克隆抗体。结果 制备的重组人 Cys C 纯度达 90% 以上, 抗重组人 Cys C 抗体具有很好的结合效价和特异性。结论 制备的重组人 Cys C 及其抗体可用于进一步的实验研究和临床应用。

关键词:胱抑素 C; 抗体; 制备

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1233-03

A study on preparation of recombinant human cystatin C and its polyclonal antibody*

Zhang Hongbin¹, Wu Jie², Wang Yali¹, Zhou Xia¹, Wang Jie¹, Yang Taicheng¹

(1. Department of Medical Research, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command of

Chinese People's Liberation Army, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 2. Institution of

Pathogenic Microorganisms Inspection, Centre for Disease Control and Prevention of

Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 511430, China)

Abstract: Objective To explore the preparation of recombinant human cystatin C (Cys C) and its polyclonal antibody. **Methods** The gene sequences encoding Cys C were designed according to characteristics of *E. coli* protein-coding, and the target gene was artificially synthesized and expressed in *E. coli*. The target protein was purified by affinity chromatography and was used to immunize the New Zealand white rabbits. Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were adopted to detect the recombinant human Cys C and its polyclonal antibodies in the rabbits serum. **Results** Purity of prepared recombinant human Cys C was more than 90%. Anti-recombinant human Cys C antibody showed good binding activities and specificity. **Conclusion** Prepared recombinant human Cys C and its antibody can be used in further experimental research and clinical application.

Key words: cystatin C; antibodies; preparation

胱抑素 C(cystatin C, Cys C)即半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白, 1983 年首次由鸡蛋清中分离纯化而得, 也被称为 γ -微量蛋白及 γ -后球蛋白, 广泛存在于各种组织的有核细胞和体液中, 是一种相对分子质量较小的碱性非糖化蛋白质, 相对分子质量为 13 300, 可由机体所有有核细胞产生, 产生速率恒定。循环中的 Cys C 仅经肾小球滤过而被清除, 并在近曲小管重吸收, 但重吸收后被完全代谢分解, 不返回血液, 因此, 其血中浓度由肾小球滤过决定, 而不依赖任何外来因素, 是一种反映肾小球滤过率变化的理想同源性标志物, 可作为肾小球滤过功能指标, 较目前常用的血尿素、肌酐和内生肌酐清除率等肾功能检测指标有更好的敏感性和特异性, 其血清浓度测定是首选的评价肾功能的替代指标^[1-2]。但由于 Cys C 及其抗体的来源受限, 现有检测 Cys C 的试剂盒价格昂贵, 妨碍了其在国内推广应用, 为此, 笔者建立了重组 Cys C 蛋白及其抗体的制备体系, 以期解决 Cys C 及其抗体的来源问题, 为 CysC 检测试剂盒的研发提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 菌种及载体 pET-22b(+)为广州军区广州总医院医学实验科保存。质粒提取试剂盒、DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nde* I、*Eco*R I 均为日本 TaKaRa 公司产

品; DNA 及蛋白 Marker 为加拿大 Fermentas 公司产品; 异丙基-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)为美国 Sigma 公司产品; Ni-NTA His-Bind 柱(镍离子金属螯合亲和层析介质)为德国 Novagen 公司产品; 无特定病原(specific pathogen free, SPF)级新西兰大白兔由广州军区广州总医院动物实验中心提供; 完全弗氏佐剂为美国 Sigma 公司产品; 兔抗人 Cys C 多克隆抗体购自 BioVender Laboratory Medicine, Inc.; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔 IgG 二抗为中山生物试剂公司产品。其他试剂均为分析纯。

1.2 表达质粒 pET-Cys C 的构建 根据 GeneBank 中人 Cys C 功能区的氨基酸序列, 选择大肠埃希菌喜好的编码密码子设计编码基因序列, 合成的目的基因与表达载体 pET-22b(+)经相同的酶切处理, 回收载体大片段与回收纯化的目的基因片段用 T₄ DNA 连接酶连接构建重组质粒 pET-Cys C, 转化感受态表达菌株 BL21(DE3), 涂布于氨苄西林平板上, 37℃培养 16~24 h, 抽提质粒进行酶切及测序鉴定。

1.3 重组质粒 pET-Cys C 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 氨苄西林)中, 37℃振荡过夜, 按 1:10 比例扩大培养待处于对数生长期波

* 基金项目:广东省科技计划项目(2012B032000011)。 作者简介:张宏斌,男,副教授、副主任技师,主要从事分子检测与临床诊断的研究工作。

长为 600 nm 处的光密度(optical density, OD)值为 0.6~1.0 时,加 IPTG(终浓度 1 mmol/L)诱导,37 ℃ 振荡 4 h,4 ℃ 离心留取诱导上清液待用,收获诱导表达后的菌体,以 Binding Buffer 洗涤 1 次,加缓冲液重悬菌体,冰上超声破菌,冰浴搅拌 1 h,充分溶解包涵体,离心收集上清液,将其与诱导上清液合并,过滤后转入 Ni-NTA His-Bind 柱内,依次加入 Binding Buffer, Wash Buffer,最后用 Elute Buffer 进行目的蛋白洗脱,收集 Elute Buffer 洗脱蛋白。

1.4 抗重组人 Cys C 抗体的制备及检测 将上述制备的重组人 Cys C 与完全弗氏佐剂等体积充分混合,新西兰大白兔按每只 100 μg 抗原于足垫及皮下多点注射免疫,隔 2 周加强 1 次,第 2 次免疫后第 3 天,采集静脉血测定抗体效价,符合要求时立刻于心脏取血分离血清,分装保存于-80 ℃ 待用。

1.5 自制重组人 Cys C 及其抗体与商品化标准品的比较 采用常规酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)及 Western blot 进行检测。以 100 ng(A1-6)、10 ng(B1-6)、1 ng(C1-6、E1-6、F1-6、G1-6、H1-6)和 100 pg(D1-6)的重组人 Cys C 及空白(A7-12)、10 ng(B7-12)、1 ng(C7-12、E7-12、F7-12、G7-12、H7-12)和 100 pg(D7-12)的标准品分别包被酶标板,牛血清清蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭后,分别加自制或商品化兔抗人 Cys C 多克隆抗体,其中 1:5 000 倍稀释自制抗体(A1-3、B1-3、C1-3、D1-3、A7-9、B7-9、C7-9、D7-9)或商品化抗体(A4-6、B4-6、C4-6、D4-6、A10-12、B10-12、C10-12、D10-12)、1:10 000 倍稀释自制抗体(E1-3、E7-9)或商品化抗体(E4-6、E10-12)、1:20 000 倍稀释自制抗体(F1-3、F7-9)或商品化抗体(F4-6、F10-12)、1:40 000 倍稀释自制抗体(G1-3、G7-9)或商品化抗体(G4-6、G10-12)、1:80 000 倍稀释自制抗体(H1-3、H7-9)或商品化抗体(H4-6、H10-12),随后加入 HRP-羊抗兔 IgG,最后加底物四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, TMB)显色,测定 OD₄₅₀ 值,取平均数。

2 结 果

2.1 重组人 Cys C 的制备^[3] 将测序正确的目的片段亚克隆至 pET-22b(+)载体中,抽提质粒并双酶切,目的条带大小正确,证明 Cys C 基因正确克隆入 pET-22b(+)载体。重组质粒测序结果经基本的局部对比排列搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)序列比对,所编码蛋白的氨基酸序列与人 Cys C 成熟肽完全一致。诱导表达后,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)结果显示转化菌经诱导后较对照菌有一条明显增粗的蛋白条带,其相对分子质量为 16 000 左右。经 Western blot 检测,诱导表达的目的蛋白能与相应抗 Cys C 抗体形成特异蛋白条带,证明诱导表达的蛋白是 Cys C 蛋白。目的蛋白以包涵体形式存在为主,经亲和层析纯化,SDS-PAGE 电泳检测显示纯化产物为单一蛋白,目的蛋白经凝胶成像仪扫描,结果显示纯度达 90% 以上。

2.2 抗重组人 Cys C 抗体的制备及检测 大白兔经免疫后,ELISA 检测血清抗体的 OD₄₅₀ 值见表 1,结果显示经二次免疫后血清的抗体效价已经达到了 10⁷,可以满足研究需要。

2.3 自制重组人 Cys C 及其抗体与商品化标准品的比较 当抗体用量固定检测抗原,抗原在相同的包被量(1 ng)情况下,以自制抗体检测时,自制重组人 Cys C 的 OD₄₅₀ 值(2.481±0.179)大于对照品(1.045±0.005);以商品化对照抗体检测时,自制重组人 Cys C 的 OD₄₅₀ 值(3.303±0.036)也超过对照

品(2.269±0.569)。抗原用量固定(1 ng)检测抗体,自制抗体的效价超过了 1:40 000 倍。

表 1 ELISA 检测抗重组人 Cys C 抗体的 OD₄₅₀ 值结果

稀释倍数	OD ₄₅₀ 值	
	编号 1	编号 2
1 000	3.910 5	3.494 5
10 000	3.566 0	2.400 3
100 000	2.806 6	0.712 0
1 000 000	0.960 9	0.214 9
10 000 000	0.612 0	0.161 6
空白	0.175 9	0.288 6

3 讨 论

长期以来,血尿素氮、肌酐、尿酸及肌酐清除率是反映肾小球滤过功能的常用指标,但肌酐作为肾小球滤过率测定物,影响因素多,特异性不高,敏感性也较差。Cys C 是新近发展起来的一个评价肾功能的灵敏指标^[4]。几乎所有机体的有核细胞均可产生 Cys C,它是管家基因的表达产物,产生速率相对恒定,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。在评价肾脏疾病、肝硬化、糖尿病、肾移植患者的肾功能损害中,血 Cys C 比血肌酐更为敏感、特异和可靠^[5-7]。Cys C 还是 2002 年美国食品药品监督管理局网上公布的 26 个在检验医学有重大突破的全新检测项目。近年的研究表明,Cys C 还是冠心病监护病房患者急性肾损伤发生的最好的预测指标^[8],也是 2 型糖尿病,急、慢性肝功能衰竭及心脏手术相关肾损伤的重要标志物^[9-11],同时还与急性冠状动脉综合征患者的发病和死亡风险相关^[12-14]。

制备重组人 Cys C 一直是本研究的一个难点^[15],本研究利用基因工程技术制备 Cys C 蛋白,采用人工调整的原核生物偏好密码子来提高重组蛋白的表达产量,同时也解决了天然编码序列不易克隆的操作困难。选用 PET-22a(+)原核表达系统,在目的蛋白之前融合 His 标签,目的是为了便于亲和纯化。研究中 Cys C 目的蛋白以包涵体的形式为主,笔者对培养基及诱导条件进行了优化,提高了目的蛋白的表达量,对于包涵体蛋白的纯化,笔者采用亲和层析,为下一步重组人 Cys C 的批量制备做好了准备。

Cys C 及其抗体的特异性和免疫结合活性是进行实验研究和临床应用的重要保证,因此,笔者对自制重组人 Cys C 及其抗体进行了相关指标的鉴定,并与商品化的标准品进行了比较、分析,结果达到了预期的目的。值得提出的是,国外商品化的 Cys C 及其抗体售价极高,极大地阻碍了国内相关研究的开展。通过与商品化产品的比较,证明自制的重组人 Cys C 及其抗体具有较强的特异性及良好的免疫结合活性,为进一步开展相关研究提供了条件。

参考文献

[1] Lisowska-Myjak BL. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury[J]. Blood Purif, 2010, 29(4): 357-365.
[2] Gökküoğlu CA, Özden TA, Gül 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.
[3] 张宏斌, 武婕, 赵华福, 等. 重组人胱抑素 C 的原(下转第 1237 页)

IMP^[11]、NDM^[12]、SPM^[13]等,而相对于临床金属酶型碳青霉烯酶,KPC 等非金属酶的报道至今仍较少。近年来,国外关于耐碳青霉烯类抗菌药的铜绿假单胞菌分离株的报道日益增多^[14],并且在巴西等国家相继出现了产 KPC 铜绿假单胞菌^[15],本研究发现 2 株产 KPC 铜绿假单胞菌,表明这种耐药机制正在由肠杆菌科细菌向非发酵菌进行扩散,提示人们在临床微生物实验室工作中应引起足够的重视,同时临床工作者在合理使用抗菌药的同时,医院也应采取相应的有效措施来控制其发生与发展。另外,关于 KPC 由肠杆菌科细菌向非发酵菌扩散的分子机制,也已纳入本课题组的研究计划。

参考文献

- [1] Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams[J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(5): 381-393.
- [2] Li B, Sun JY, Liu QZ, et al. First report of Klebsiella oxytoca strain coproducing KPC-2 and IMP-8 carbapenemases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6): 2937-2941.
- [3] Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, et al. Carbapenemases in klebsiella pneumoniae and other enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(4): 682-707.
- [4] Goldfarb D, Harvey SB, Jessamine K, et al. Detection of plasmid-mediated KPC-producing Klebsiella pneumoniae in Ottawa, Canada: evidence of intrahospital transmission[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(6): 1920-1922.
- [5] Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms[J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(4): 582-610.
- [6] Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al. Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(1): 147-151.

- [7] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(7): 1584-1590.
- [8] Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(11): 4485-4491.
- [9] Rieber H, Frontzek A, Pfeifer Y. Emergence of metallo- β -lactamase GIM-1 in a clinical isolate of Serratia marcescens[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(9): 4945-4947.
- [10] Poirel L, Rodríguez-Martínez JM, Al Naiemi N, et al. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a Pseudomonas stutzeri clinical isolate in the Netherlands[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(6): 2420-2424.
- [11] Hupková M, Blahová J, Babalova M, et al. Transferable resistance to imipenem in hospital isolates of Pseudomonas aeruginosa[J]. J Chemother, 1993, 5(1): 14-16.
- [12] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5046-5054.
- [13] Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme[J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 50(5): 673-679.
- [14] 李艳华, 刘文恩, 简子娟, 等. 铜绿假单胞菌耐药性分析及金属酶基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(1): 43-47.
- [15] Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, et al. First report of KPC-producing Pseudomonas aeruginosa in Brazil[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(9): 4990.

(收稿日期: 2014-01-24)

(上接第 1234 页)

核表达及鉴定[J]. 医学分子生物学杂志, 2012, 9(3): 204-207.

- [4] Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate[J]. Clin Chem, 2002, 48(5): 699-707.
- [5] Gerbes AL, Gülberg 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] 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, 2003, 94(2): 19-27.
- [7] Zhang XB, Lin QC, Deng CS, et al. Elevated serum cystatin C in severe OSA younger men without complications[J]. Sleep Breath, 2013, 17(1): 235-241.
- [8] Chen TH, Chang CH, Lin CY, et al. Acute kidney injury biomarkers for patients in a coronary care unit: a prospective cohort study[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32328.
- [9] Jeon YL, Kim MH, Lee WI, et al. Cystatin C as an early marker of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes[J]. Clin Lab, 2013, 59(11/12): 1221-1229.
- [10] Wan ZH, Wang JJ, You SL, et al. Cystatin C is a biomarker for

predicting acute kidney injury in patients with acute-on-chronic liver failure[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(48): 9432-9438.

- [11] Wyckoff T, Augoustides JG. Advances in acute kidney injury associated with cardiac surgery: the unfolding revolution in early detection[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2012, 26(2): 340-345.
- [12] Ristiniemi N, Lund J, Tertti R, et al. Cystatin C as a predictor of all-cause mortality and myocardial infarction in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome[J]. Clin Biochem, 2012, 45(7/8): 535-540.
- [13] Li H, Kuipers A, Kammerer CM, et al. The association between renal function biomarkers and subclinical cardiovascular measures in African Caribbean families[J]. Ethn Dis, 2013, 23(4): 492-498.
- [14] Manocha A, Gupta F, Jain R, et al. The potential of Cystatin C and small dense LDL as biomarkers of coronary artery disease risk in a young Indian population[J]. Mol Cell Biochem, 2013 Dec 20. [Epub ahead of print].
- [15] Hayashi M, Iwamoto S, Sato S, et al. Efficient production of recombinant cystatin C using a peptide-tag, 4AaCter, that facilitates formation of insoluble protein inclusion bodies in Escherichia coli[J]. Protein Expr Purif, 2013, 88(2): 230-234.

(收稿日期: 2014-01-13)