

• 基础实验研究论著 •

重组人心肌肌钙蛋白 I 纯化方法的对比^{*}郝庆钦^{1,2}, 周建平³, 许秀丽^{1,2}, 刘培^{1,2}, 温新宇¹, 王玲¹, 田亚平^{1△}

(1. 中国人民解放军总医院生化科, 北京 100853; 2. 南开大学医学院, 天津 300071;

3. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要:目的 对比两种重组人心肌肌钙蛋白 I(rhcTnI)纯化方法, 获取稳定的 rhcTnI, 促进心肌肌钙蛋白(cTnI)诊断标准化的研究。方法 超声破碎工程菌获取 rhcTnI 包涵体, 经 2% Tritonx-100, 2 mol/L 脲洗涤后溶解在 8 mol/L 脲中, 分别经 CM-FF 柱上复性和稀释复性纯化 rhcTnI, 对比两种方法纯化 rhcTnI 的获得率及其产物在 4、-20、-80 ℃ 及冻干条件下的稳定性, 确立高效获取稳定的 cTnI 的纯化方法。结果 0.1 g 湿重包涵体经 CM-FF 柱上复性和稀释复性的获得率分别为 26.8% 和 18.9%。4、-20、-80 ℃ 及冻干条件下, CM-FF 下柱上复性获得的 rhcTnI 稳定, 并且柱上复性纯化周期短, 效率高。结论 CM-FF 柱上复性要比稀释复性纯化 rhcTnI 高效、稳定。

关键词: 心肌肌钙蛋白 I; 稀释复性; 柱上复性; 纯化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)14-1817-03

Comparison in purification methods of the recombinant human cardiac troponin I^{*}Hao Qingqin^{1,2}, Zhou Jianping³, Xu Xiuli^{1,2}, Liu Pei^{1,2}, Wen Xinyu¹, Wang Ling¹, Tian Yaping^{1△}

(1. Department of Clinical Biochemistry, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China;

2. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Research Institute of Pharmacology and

Toxicology, Military Medical Science Academy of PLA, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To compare the two kinds of purification method for purifying recombinant human cardiac troponin I(cTnI) to obtain the stable cTnI and promote the study of cTnI diagnosis standardization. **Methods** The cTnI inclusion body was obtained by the ultrasonic broken engineering, after washing by 2% Tritonx-100, 2M urea, dissolved in 8M urea, then purified by the column refolding on CM-FF and the dilution refolding respectively. The cTnI yields were compared between the two kinds of method and the stability at 4 ℃, 20 ℃, -80 ℃ and on the freeze-dried condition was compared. Then the purification method to efficiently obtain the stable cTnI was established. **Results** The protein about 2 mg and 1.4 mg could be obtained by CM-FF on the column refolding and the dilution refolding from 0.1 g of wet inclusion body, respectively. The former method had the short cycle and high efficiency. The cTnI purified by the column refolding on CM-FF was more stable at 4 ℃, 20 ℃, -80 ℃ and on the freeze-dried condition. **Conclusion** The column refolding on CM-FF is more stable and highly efficient in purification of cTnI than the dilution refolding.

Key words: cardiac troponin I; dilution refolding; column refolding; purification

人心肌肌钙蛋白 I(cTnI)是由基因 *TNNI3* 编码的, *TNNI3* 基因全长 612 kb, 由 8 个外显子构成, 位于 19q13。cTnI 由 210 个氨基酸组成, 相对分子质量为 24×10^3 , 等电点为 9.9^[1]。cTnI 是检测心肌损伤的理想标志物, 具有很高的特异性, 同时也可用于急性冠脉综合征(ACS), 包括稳定型心绞痛、不稳定型心绞痛以及急性心肌梗死等的临床诊断、危险性估计和预后判断^[2]。目前临床使用的检测 cTnI 的试剂盒, 由于抗体针对不同的抗原表位和抗原结合力不同, cTnI 片段具有不同的清除率和降解速度, 以及使用了不同的标准品, 这些因素使检测结果间存在很大差异^[3]。本研究通过对比两种重组人 cTnI(rhcTnI)纯化方法, 建立高效获取稳定的 rhcTnI 的纯化方法。为开发具有自主知识产权、国产化的 cTnI 诊断试剂盒奠定基础, 并促进 cTnI 诊断标准化的研究。

1 材料与方法

1.1 材料 cTnI 基因工程菌本实验室制备, 微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂), 5×10^3 超滤管(MILLIPORE), 5 mL CM-FF 预装柱(GE), 磁力搅拌器, cTnI 免疫定量试剂盒(雅培), 其他

生化试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 包涵体的制备 将发酵所得到的菌体经过 20 mmol/L Tris-HCl(含 NaCl: 500 mmol/L, EDTA: 1 mmol/L, 5% 甘油, DTT: 1 mmol/L, pH 7.4)重新悬浮后, 冰浴超声波破碎, 超声 3 s, 间隔 5 s, 功率 400 W, 20 min, 然后经 6 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 即得 rhcTnI 包涵体粗品。

1.2.2 包涵体的洗涤 将 rhcTnI 包涵体粗品依次重悬在洗涤液 A(20 mmol/L Tris-HCl+2% Tritonx-100, pH 7.4), 洗涤液 B(20 mmol/L Tris-HCl+2 mol/L 脲, pH 7.4)中, 分别搅拌洗涤 1.0 h 和 0.5 h。6 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液。

1.2.3 包涵体的溶解 将洗涤后的包涵体加入到变性液(20 mmol/L Tris-HCl+8 mol/L 脲, pH 7.4)中, 4 ℃ 过夜。

1.2.4 包涵体的稀释复性 将含有 0.1 g 湿重包涵体变性液脉冲加入到 1 L 复性缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl+10 mmol/L NaCl+1 mmol/L DTT, pH 7.4)中, 冰浴复性 18~24 h, 过 0.22 μm 滤膜, 经 5 KD 超滤膜包浓缩后过 CM-FF 柱, 用

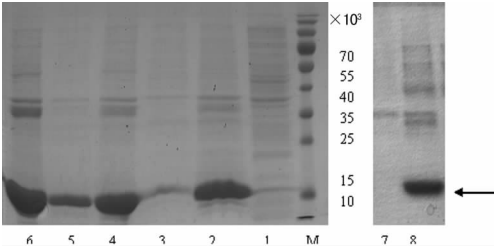
缓冲液 A(20 mmol/L Tris-HCl, pH=7.4)平衡, 上样后用缓冲液 A 冲洗, 然后用缓冲液 B(20 mmol/L Tris-HCl+1 mol/L NaCl, pH 7.4)洗脱。

1.2.5 包涵体的阳离子柱上复性 用缓冲液 A(20 mmol/L Tris-HCl+6 mol/L 脲, pH 7.4)平衡柱子, 将含有 0.1 g 包涵体变性液 45 mL 过 0.22 μm 微孔滤膜后上样, 缓冲液 B(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4), 逐渐增大缓冲液 B/缓冲液 A 的比例, 形成尿素浓度线性梯度, 变性蛋白质随着尿素浓度的降低而逐渐复性。然后通过增加盐离子的浓度洗脱目的蛋白。

1.2.6 rhcTnI 的稳定性测定 用 cTnI 免疫定量试剂盒测定在 4、-20、-80 ℃ 和冻干条件保存在健康人血清中 (NaN₃: 0.002%; EDTA-Na₂: 1 mmol/L) 的 cTnI 蛋白活性。

2 结 果

2.1 包涵体的制备和变性 SDS-PAGE 分析显示, 在相对分子质量约为 15×10³ 处出现 1 条明显的条带, 同预期的 rhcTnI 蛋白的相对分子质量相符合, 见图 1。包涵体经 Tritonx-100、脲洗涤后并不是特别纯, 但经后期实验发现不会为纯化带来很大问题。



M: 蛋白质标记物; 1: 诱导后全菌裂解物上清液; 2: 诱导后全菌裂解物沉淀; 3: Tritonx-100 洗涤后上清液; 4: Tritonx-100 洗涤后沉淀; 5: 脲洗涤后上清液; 6: 脲洗涤后沉淀; 7: 离心后变性液中沉淀; 8: 离心后变性液中上清液。箭头所指为 rhcTnI 蛋白。

图 1 SDS-PAGE 分析包涵体的制备和变性

2.2 包涵体的两种复性 0.1 g 湿重包涵体溶解在 50 mL 8 mol/L 脲中, 经稀释后用 BCA 方法测得浓度为 0.15 mg/mL, 分别经两种方法复性。经 CM-FF 柱上复性得到 rhcTnI 蛋白 15 mL, 浓度为 0.134 mg/mL, 获得率为 26.8%。经稀释复性后上 CM-FF 柱得到 rhcTnI 蛋白 10 mL, 浓度为 0.142 mg/mL, 得率为 18.9%。获得率明显小于前者。纯化结果理想, 纯度较高, SDS-PAGE 图通过软件分析可达 90% 以上, 见图 2~4。

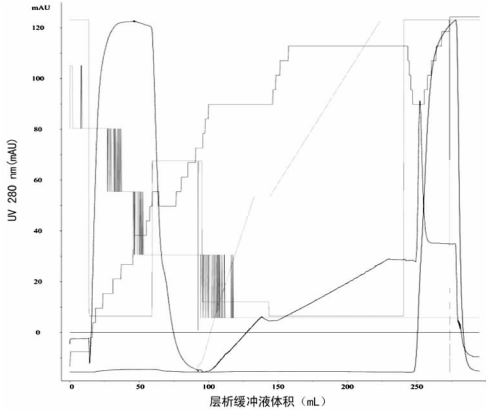


图 2 包涵体 CM-FF 柱上复性纯化 cTnI 层析图

2.4 rhcTnI 的稳定性测定结果 两种复性方式得到的蛋白在 4 ℃ 均能保存 1 周以上, 但经稀释复性得到的 rhcTnI 降解较迅速, 在 -20 ℃、-80 ℃ 和冻干条件下无明显差异, 每周降解率为 3%~8%, 见图 5~6。

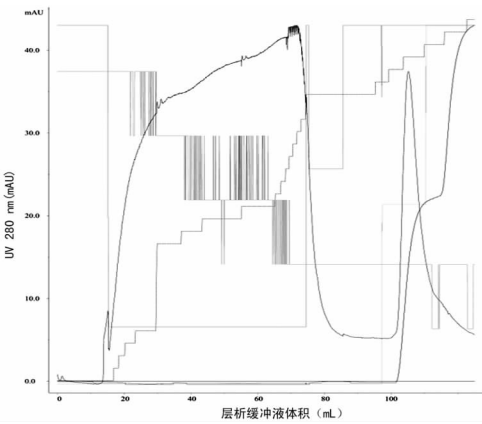
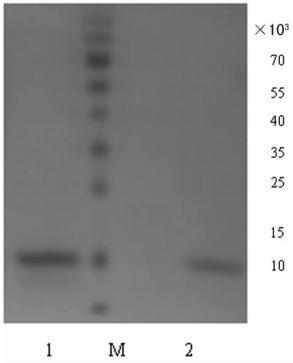


图 3 包涵体稀释复性后上 CM-FF 纯化 cTnI 层析图



M: 蛋白质标记物; 1: CM-FF 柱上复性纯化获取的 rhcTnI; 2: 稀释复性后上 CM-FF 纯化获取的 rhcTnI。

图 4 SDS-PAGE 分析包涵体的复性

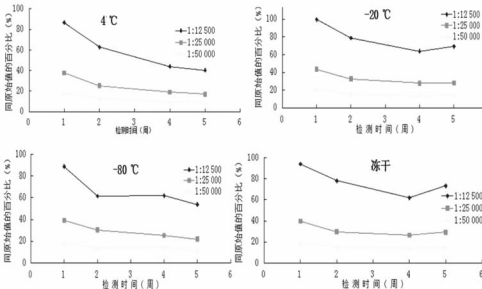


图 5 经稀释复性后上 CM-FF 柱获取的 rhcTnI 在血清中保存的稳定性

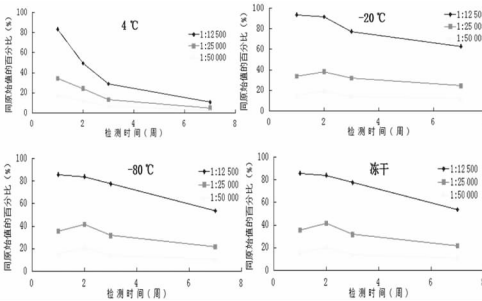
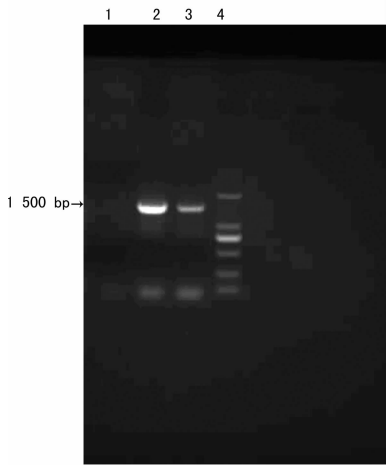


图 6 经 CM-FF 柱上复性获取的 rhcTnI 在血清中保存的稳定性

3 讨 论

cTnI 因其高度的心肌特异性、敏感性及较长的诊断窗口期, 成为了最近十余年临床快速诊断急性心肌梗死的最有价值的指标, 具有广阔的发展前景, 并越来越多地受到临床医生和临化学家的关注和青睐。国际临床化学联盟(下转第 1820 页)

之间的 780 bp 序列,进行 BLAST 比对。结果显示,所比对的 800 bp 目标片段与人苍白杆菌的 16S rRNA 基因核酸序列完全匹配,100%同源。



1:阴性对照;2:待检菌;3:阳性对照(E. coli);4:DL2000 Marker。

图 1 细菌的 16S rRNA 基因扩增产物的凝胶电泳结果

2.3 梅里埃细菌检测仪器鉴定结果 用 API 的 NP20 细菌检测板条鉴定,结果显示与人苍白杆菌的吻合度达 99%以上,为极好的鉴定。

3 讨 论

临床标本检测技术的研究,目的是使其操作更加简单、快速、结果更加准确、投入更加低廉,已达到更高效更经济的诊治需求。本研究针对未知病原的临床标本检测,采用了一种尽可能简单的 PCR 检测方法,以直接煮沸裂解的菌落上清为 PCR 模板,省略了普遍应用的细菌 DNA 提取步骤。同时应用细菌的 16S rRNA 基因序列鉴定技术,采用常见的通用引物,也是目前基于 16S rRNA 基因序列分析法常用的引物序列,进行简单 PCR,产物直接测序分析。结果显示,和梅里埃细菌自动鉴定分析仪检测结果一致,但明显比后者更为经济易行。说

明本研究方法操作简单,结果可靠。

当然,受所检测标本数量的限制,结果尚待继续研究,该方法能否基本通用,即对大多数常见病原菌都能进行准确鉴定,是未来研究的重点。

参考文献

[1] 常玉梅,刘海燕. 16S rRNA 基因文库方法在标本感染菌群分析中的应用[J]. 解放军医药杂志,2013,25(1):57-59.
[2] 陈茶,屈平华,顾全,等. 基于细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与测序分析在临床不常见菌鉴定中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(7):612-619.
[3] 沈亚娟,夏云. 16S rRNA 基因序列分析鉴定非典型细菌的实验研究[J]. 重庆医学,2013,42(1):46-48.
[4] 付晓艳. 分析 16S rRNA 基因部分序列鉴定一株乳酸菌[J]. 哈尔滨医科大学学报,2008,42(3):265-267.
[5] 干咏华,李爱红,安东善,等. 6 种常见呼吸道感染细菌 16S rRNA 基因的克隆与鉴定[J]. 中国免疫学杂志,2007,23(7):641-647.
[6] 王佃鹏,董瑞玲,张艳芳,等. 细菌直接 PCR 和双引物策略鉴定 16S rRNA 基因技术的建立[J]. 热带医学杂志,2012,12(2):181-183.
[7] 金中淦,葛平,徐蓉,等. 16S rRNA、16S~23S rRNA 基因测序分析检测主要血流感染病原菌比较[J]. 分子诊断与治疗杂志,2012,4(3):181-185.
[8] 王艳萍. 16S rRNA 基因及 16S~23S rRNA 基因间区在微生物鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(8):994-996.
[9] 朱飞舟,陈利玉,陈汉春 M 等. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J]. 中南大学学报:医学版,2013,(10):1035-1041.
[10] 刘明春,刘耀川,赵敬翠,等. 奶牛子宫内膜炎化脓隐秘杆菌 16S rRNA 基因的鉴定与分析[J]. 中国兽医学报,2009,29(3):343-345.
[11] 葛淑敏,钱爱东,王铁风,等. 10 株牛源非结核分枝杆菌 16S rRNA 基因序列分析[J]. 中国预防兽医学报,2010,32(11):895-897.
[12] 程金平,王亚宾,刘磊,等. 应用 16S rRNA 基因序列分析鉴定猪源肠球菌[J]. 江西农业学报,2008,20(11):1-4.

(收稿日期:2014-01-11)

(上接第 1818 页)

(IFCC)的心肌标志物标准化委员会(CSCM)、美国临床生化学会(NACB)、欧洲心脏病学会以及中华医学会临床检验学分会等组织最近建议在临床工作中将 cTnI 作为急性心肌梗死诊断的“金标准”^[6]。临床应用发现,cTnI 测定存在标准化问题,导致同一患者的血标本在不同实验室采用不同厂家的商品化试剂盒,甚至不同实验室采用同一厂家的试剂盒进行检测,检测的结果可相差 20~30 倍,导致不同实验室之间的结果不具有可比性^[3]。血清中的存在形式绝大部分是 cTnI-TnC 复合物,而游离的 cTnI 及 cTnI-TnC-TnT 复合物只有很小一部分。血清中 cTnI 的 N-端和 C-端均易被蛋白酶水解,稳定性差,而 30~110 间肽段稳定性好,现在新一代的 cTnI 检测系统多针对此肽段^[7]。本研究通过选取此片段对比不同的纯化方法,获取稳定的 rhcTnI,促进 cTnI 诊断标准化的研究。

本文对两种复性方法进行了初步摸索,稀释法是小规模包涵体复性最常用的方法,这种方法操作简单,但包涵体要在极低的浓度下复性,复性液用量大,并且复性后需要对样品进行超滤浓缩,无法扩大工业化生产;柱上复性可以通过变性蛋白在层析柱中与层析介质的相互作用抑制蛋白质的聚集,从而达到提高蛋白质获得率的目的,同时还能将蛋白质提纯,并且纯化时间短,是近期包涵体复性的研究热点^[4-5]。通过对比,CM-FF 柱上复性要比稀释复性方法纯化 rhcTnI 高效、稳定。

参考文献

[1] Reiffert S,Jaquet K,Helimeyer L,et al. Stepwise subunit interaction changes by mono and bisphosphorylation of cardiac troponin I [J]. Biochemistry,1998,37(29):13516-13525.
[2] Thygesen K,Alpert JS,White HD,et al. Universal definition of myocardial infarction[J]. Circulation,2007,116(22):2634-2653.
[3] 韩雪松,李强,丛进阳. 心肌肌钙蛋白 I 检测及临床诊断标准化进展[J]. 中华检验医学杂志,2004,27(3):197-200.
[4] Clark ED. Protein refolding for industrial processes[J]. Curr Opin Biotechnol,2001,12(1):202-207.
[5] Jungbauer A et al. Folding and refolding of prvteins in chromatographic beds[J]. Curr Opin Biotechnol,2004,15(1):487-494.
[6] Anderson JL,Adams CD,Antman EM,et al. 2011 ACCF/AHA focused update incorporated into the ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction;a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. Circulation,2011,123(4):426-579.
[7] Apple FS,Collinson PO. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays[J]. Clin Chem,2012,58(1):54-61.

(收稿日期:2014-01-01)