

• 论 著 •

重组人降钙素原的制备及发酵优化*

霍景瑞, 孙文杰, 张晶晶, 张国安, 张 艳, 杨晓晖, 刘英富[△]

沧州医学高等专科学校/沧州纳米抗体技术创新中心, 河北沧州 061000

摘要:目的 制备人降钙素原(PCT)蛋白,用于抗体制备及检测试剂盒的研制。方法 通过分子克隆技术构建人PCT重组表达质粒(pET28a-PCT),以大肠杆菌BL21(DE3)为宿主细胞,进行PCT的原核表达,利用发酵罐进行大肠杆菌的高密度培养并优化发酵条件,镍柱纯化重组蛋白。标定重组蛋白水平后,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)验证重组蛋白作为标准蛋白在绘制水平-吸光度标准曲线中的应用价值。结果 培养大肠杆菌BL21(DE3)/pET28a-PCT,经异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导后,重组蛋白主要表达在细菌裂解上清液中。利用发酵罐优化溶氧量、补料及温度等参数,培养温度40℃,溶氧量设定为30%,10×肉汤(LB)浓缩培养基以100 mL/h速度加入补料,以IPTG终浓度0.2 mmol/L诱导4 h,PCT产量为1 405 mg/L,镍柱亲和纯化后,纯度超过90%。用ELISA试剂盒标定重组蛋白。绘制水平-吸光度标准曲线,PCT与试剂盒提供的标准蛋白之间几乎没有差异。结论 该研究通过发酵表达及亲和纯化的方式,制备了高纯度的PCT蛋白,为PCT抗体的制备及PCT检测试剂盒的开发提供了重要原料。

关键词:降钙素原; 脓毒症; 大肠杆菌; 发酵; 亲和纯化; 溶氧

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.007 **中图法分类号:**Q789

文章编号:1673-4130(2022)18-2207-06 **文献标志码:**A

Preparation and fermentation optimization of recombinant human procalcitonin*

HUO Jingrui, SUN Wenjie, ZHANG Jingjing, ZHANG Guoan,

ZHANG Yan, YANG Xiaohui, LIU Yingfu[△]

Cangzhou Medical College/ Cangzhou Nanobody Technology Innovation

Center, Cangzhou, Hebei 061001, China

Abstract: Objective To prepare human procalcitonin (PCT) protein for the antibody preparation and detection kit development. **Methods** The recombinant expression plasmid of human PCT (pET28a-PCT) was constructed by molecular cloning technology, and Escherichia coli (E. coli) BL21 (DE3) served as the host cell for conducting the PCT prokaryotic expression. The E. coli high-density culture was conducted by the fermentation tank, and the fermentation conditions were optimized. The nickel column purified recombinant protein. After calibrating the recombinant protein level, ELISA was used to verify the application value of recombinant protein as standard protein in drawing the horizontal-absorbance standard curve. **Results** The E. coli BL21 (DE3)/pET28a-PCT was cultured. After IPTG induction, recombinant protein was mainly expressed in the supernatant of bacterial lysis. The fermentation tank was used to optimize the parameters such as the dissolved oxygen amount, supplementary material and temperature. The culture temperature was 40 °C, dissolved oxygen amount was set at 30%, 10×LB concentration medium was added with supplementary material at the rate of 100 mL/h. The final concentration of IPTG was 0.2 mmol/L for 4 h induction. The output amount of PCT was about 1 405 mg/L. After nickel column affinity purification, the purity exceeded 90%. The recombinant protein was calibrated by ELISA kit. When drawing the horizontal-absorbance curve, the standard protein provided by PCT and reagent kits almost showed no difference. **Conclusion** High purity PCT protein is prepared by fermentation expression and affinity purification, which provides the important material for the preparation of PCT antibody and the development of reagent kit.

Key words: procalcitonin; sepsis; Escherichia coli; fermentation; affinity purification; dissolved oxygen

* 基金项目:河北省重点研发计划项目(19272404D);河北省沧州市重点研发计划指导项目(172301001)。

作者简介:霍景瑞,男,讲师,主要从事蛋白质体外表达和抗体制备相关研究。 [△] 通信作者,E-mail:50005741@qq.com。

降钙素原(PCT)是由甲状腺滤泡旁细胞合成的一种非激素类蛋白,相对分子质量约为 14×10^3 ^[1-2]。PCT 是降钙素的前体产物,在健康人血清中水平不超过 50 pg/mL。脓毒症、败血症、急性胰腺炎、术后细菌感染等患者的 PCT 水平能达到正常水平的数千至数万倍^[3-4]。PCT 是早期鉴别诊断严重细菌感染、脓毒症较好的观察指标之一,主要用于全身细菌感染诊断及鉴别诊断,还可辅助临床快速鉴别细菌感染和病毒感染,判断感染严重程度,辅助临床开始使用或停用抗菌及抗病毒药物等^[3-5]。床旁 PCT 快速检测在指导非传染性疾病(包括终末期肾病、充血性心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病和肝硬化)患者的诊断、治疗和预后评估中有很好的应用前景^[6-7]。

PCT 检测试剂盒常被用于体外定量检测人血清、血浆或全血中 PCT 的含量。以 PCT 为检测指标的酶联免疫吸附试验(ELISA)、胶体金检测、化学发光检测、时间分辨免疫荧光检测等方法^[5]的检测过程和所需仪器各有不同,但都需要将 PCT 作为标准蛋白进行参比^[8]。本文拟构建 PCT 原核表达质粒,以大肠杆菌为宿主细胞,采用原核表达的方式,通过细菌培养、亲和层析的方式,获得高纯度的 PCT 蛋白,并探讨其在试剂盒检测中的应用。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及仪器 大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)、pET28a 均为 Novagen 公司产品,人胚胎肾细胞 293 由本实验室保存,核酸限制性内切酶 BamH I、Xho I、Nde I 购自 New England Biolabs 公司,质粒提取试剂盒、核酸凝胶纯化试剂盒购自北京康为世纪公司,酵母粉、蛋白胨为英国 Oxoid 公司产品,诱导剂异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、消泡剂 Anti-Form204 均购自德国 Merck 公司,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)相关试剂购自国药集团(北京)化学试剂有限公司,镍柱亲和层析(Ni-NTA)填料购自南京金斯瑞生物科技有限公司,PCT 检测试剂盒分别购自 Sigma(RAB0037-1KT)、碧云天(Beyotime PP790)、天津生物芯片技术有限责任公司(Tianjin Biochip 津械注准 20152400067),其他试剂均为国产分析纯。

BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪、BioFlo 320 发酵罐购自德国 Eppendorf 公司;CR21N 高速冷冻离心机购自日本 Himac 公司;D-5L 高压均质机购自美国 PhD 公司;NGC 蛋白纯化系统购自美国 Bio-Rad 公司;Milli-Q7000 超纯水机购自德国 Merck 公司;蛋白电泳设备购自美国 Bio-Rad 公司;Omega LumC 凝胶成像系统购自美国 Aplegen 公司;Spectramax M4 酶标仪购自美国 MD 公司。

1.2 方法

1.2.1 人 PCT 基因克隆及 pET28a-PCT 表达质粒构建 通过美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库查找人 PCT 蛋白(NP_001365878.1)的氨基酸序列及其核苷酸序列,设计并合成 PCT₂₆₋₁₄₁ 肽段对应核苷酸序列的扩增引物(F:5'-GCATATGGCACCATT-CAGGTCTGCC-3';R:5'-CCTCGAGGTTGGCAT TCTGGGGCAT-3'),以人胚胎肾细胞 293 总 RNA 为模板,扩增目的基因。通过分子生物学方法将酶切后的目的基因与 pET28a 质粒连接,随后导入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞并在肉汤(LB)固体培养基上培养,限制性核酸内切酶(Nde I、Xho I)筛选阳性克隆,委托北京中美泰和生物公司对重组质粒的插入序列进行测序验证;重组质粒导入大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21(DE3)细胞,用含有卡那霉素的 LB 抗性平板培养,分别用于重组质粒的保存和重组蛋白的表达。

1.2.2 PCT 的摇瓶表达 取出一 80 °C 保存的重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a-PCT,用接种环涂布在含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基(LBK 培养基)平板上,37 °C 培养过夜;从平板上挑取形态饱满、边缘清晰的细菌克隆,接种于 LBK 培养基(卡那霉素为 50 μ g/mL)中,37 °C 230 r/min 振荡培养 6 h。将活化的细菌以 1:10 的体积比接种于液体 LBK 培养基中,37 °C 230 r/min 继续培养并监测培养液在 600 nm 处的吸光度(A_{600})。当 A_{600} 在 0.5~0.6 时,加入诱导剂 IPTG 至终浓度 0.1~1.0 mmol/L,继续培养 4 h。取 0.5 mL 诱导后的培养液,离心收集细菌沉淀,用 40 μ L 无菌水重悬,加入 10 μ L 样品处理液(5 倍浓度)煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 1 min,配制聚丙烯酰胺凝胶(12%分离胶和 5%浓缩胶),进行 SDS-PAGE 分析(230 V,400 mA,20 min)。用凝胶快速染色液染色,观察目的蛋白表达情况,筛选表达量高的细菌克隆。

1.2.3 重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a-PCT 高密度培养 取出一 80 °C 保存的表达量高的细菌,按 0.1%的比例接种于 LBK 培养基中,37 °C 220 r/min 过夜培养。次日,按 5%的比例将种子液接入发酵罐(内含预先灭菌的 2 \times YT 基础培养基),初始转速 200 r/min,37 °C 培养,用 3 mol/L NaOH 调节维持培养液 pH 值在 7.2;监测培养液 A_{600} ,当 A_{600} 达到(或超过)8.5,加入 IPTG 使其终浓度为 0.2 mmol/L,诱导(4 h)目的蛋白表达。

1.2.3.1 发酵温度对目的蛋白表达的影响 细菌培养温度会影响细菌生长速度及目的蛋白的表达量,因此摇瓶培养的最适条件不适用于发酵培养。在发酵

过程中,尝试将细菌培养阶段的温度控制在 30、37、40、42 °C,研究温度对发酵时间及目的蛋白表达量的影响。每隔 1 小时取样测定培养液 A_{600} ,以 A_{600} 达到(或超过)8.5 作为加入诱导剂的时间点,诱导 4 h 后,取样并进行 SDS-PAGE,分析目的蛋白表达情况,离心收集细菌,称质量记录湿菌量。

1.2.3.2 补料速度对目的蛋白表达量的影响 采用优化后的培养温度进行细菌培养,监测细菌生长密度。自 $A_{600} = 1.0$ 起,连续加入预先灭菌的补料培养基(0.1 g/mL 胰蛋白胨、0.05 g/mL 酵母粉、0.01 g/mL 氯化钠、20% 甘油),补料速度控制为 50、100、150、200 mL/h, IPTG 加入时间点及诱导条件同前,筛选适宜的补料速度。

1.2.3.3 溶氧量对目的蛋白表达的影响 大肠杆菌为好氧菌,溶氧量直接影响细菌生长速度。采用选定的发酵温度和补料速度进行细菌培养,采用搅拌转速-溶氧联动的方式,将溶氧量分别设置为 20%、30%、40%、50%, IPTG 加入时间点及诱导条件同前,筛选适宜的溶氧量。

1.2.4 重组 PCT 蛋白的纯化

1.2.4.1 细菌破碎 发酵结束后,离心收集细菌(16 °C, 8 000 r/min, 10 min),菌体用 20 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)洗涤后,按质量体积比 1:10 的比例重悬,利用高压均质机低温下破碎细菌。离心(16 °C, 13 000 r/min, 20 min)收集上清液,0.45 μ m 滤膜过滤除去杂质后,滤液即可用于目的蛋白纯化。

1.2.4.2 镍柱亲和纯化 采 Bio-Rad 公司的 NGC 蛋白纯化系统,以 Ni-NTA 预装柱进行蛋白纯化。配制缓冲液 A:50 mmol/L Tris-HCl(内含 0.15 mol/L NaCl),pH8.0;配制缓冲液 B:50 mmol/L Tris-HCl(内含 0.15 mol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑),pH8.0。向过滤后的上清液中加入咪唑至其终浓度为 10 mmol/L。缓冲液 A 冲洗预装柱 5 个柱体积后,将上清液以 2 mL/min 的流速流过纯化柱,2% 缓冲液 B 冲洗 10 个柱体积,依次用 10%、20%、40%、100% 缓冲液 B 进行洗脱。收集各洗脱峰,进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.5 重组 PCT 蛋白的定量分析

1.2.5.1 根据 BCA 法原理测定 PCT 蛋白水平 按照蛋白定量试剂盒(Pierce # 23225)说明书,配制不同水平的蛋白标准品溶液,配制所需体积的蛋白测定工作液。按说明书操作,根据标准品水平和 A 值绘制标准曲线,根据公式计算蛋白水平。

1.2.5.2 用人 PCT ELISA 检测试剂盒测定纯化的 PCT 水平 根据试剂盒说明书,稀释不同水平的 PCT 标准品蛋白,夹心法检测由步骤 1.2.3 得到的纯

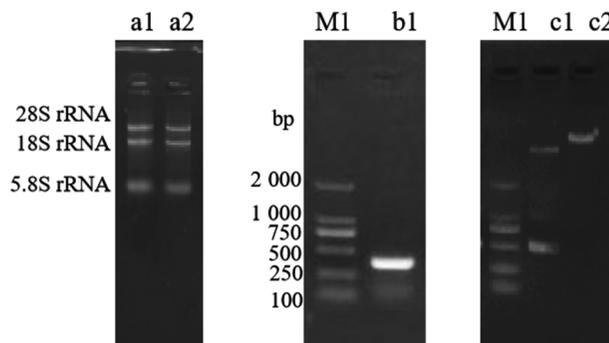
蛋白水平。用酶标仪在 450 nm 波长下测定 A 值,通过标准曲线计算标定纯化样品中人 PCT 水平。

1.2.5.3 重组 PCT 蛋白在 ELISA 试剂盒组成中的应用 用蠕动泵配合超滤膜包(赛多利斯 Vivoflow50)将标定后的重组蛋白水平调整至 2 mg/mL,分装于样品管中。以商品化的 PCT ELISA 检测试剂盒为基础,用重组 PCT 蛋白替代试剂盒中的标准品蛋白,将重组 PCT 蛋白用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液分别稀释为以下几个水平:4 000.00、2 000.00、1 000.00、500.00、250.00、125.00、62.50、31.25 μ g/mL,进行 ELISA,绘制水平-吸光度曲线,分析重组蛋白作为标准品应用的可能性^[9]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 分析软件进行数据统计,应用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制图表。除特别说明外,每个实验均进行 3 次重复。

2 结果

2.1 重组人 PCT 基因克隆和表达质粒的构建 从人胚胎肾细胞 293 基因组 DNA 中扩增除信号肽序列外的 PCT 编码基因。琼脂糖凝胶电泳结果显示,PCR 产物条带为 250~500 bp,与预期大小(348 bp)相符。回收 PCR 产物并将其插入 pET28a 的多克隆位点;转化 DH5 α 后,经测序筛选符合预期的细菌克隆,即为携带 PCT 表达质粒的细菌,结果见图 1。经测序证实重组质粒中目的基因序列正确。

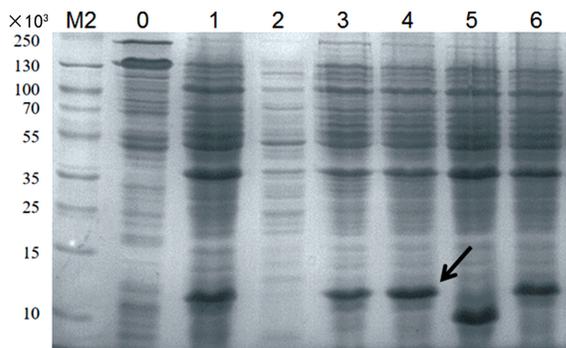


注:a1、a2 为人胚胎肾细胞 293 总 RNA;M1 为 DL 2 000 DNA Marker;b1 为扩增的 PCT 基因;c1 为 pET28a-PCT 质粒双酶切产物;c2 为 pET28a-PCT 质粒。

图 1 pET28a-PCT 重组质粒的构建

2.2 表达菌株的筛选 将重组质粒 pET28a-PCT 导入大肠杆菌 BL21(DE3)中,于摇床培养, IPTG 诱导目的蛋白表达。经 ExPASy 软件预测, PCT₂₆₋₁₄₁ 的相对分子质量约为 12.8×10^3 。图 2 的蛋白电泳染色结果可见,与未加诱导剂的样品相比,诱导后的细菌裂解液在对应位置均有明显的蛋白条带(黑色箭头指示)。对比各个细菌克隆的目的蛋白表达情况,克隆 2 没有表达,克隆 5 表达的相对分子质量不正确,最终筛选出 4 号克隆作为表达菌株,将其扩增后,以甘油为保护剂,进行一、二级种子的菌种保存,将种子液冻

存于-80℃冰箱。



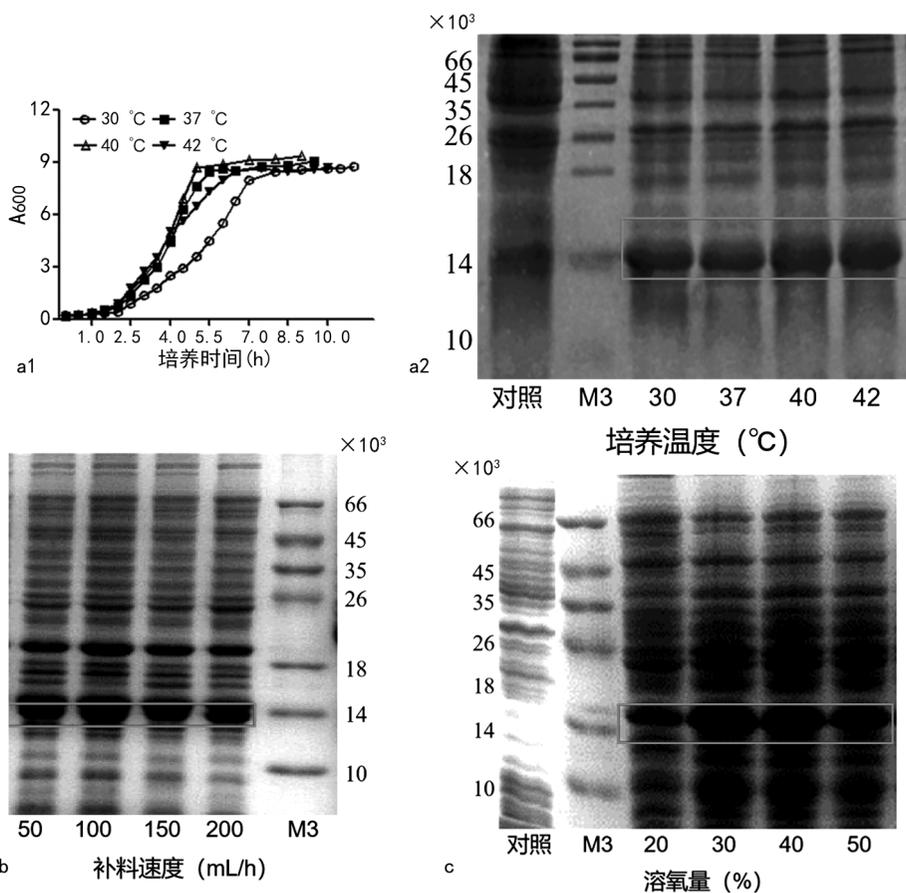
注: M2 为蛋白相对分子质量标准 (#26616); 0 为未加 IPTG 的重组菌; 1~6 为 6 个重组菌克隆, 黑色箭头所指为表达量高的目的蛋白。

图 2 筛选表达量高的重组细菌

2.3 重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a-PCT 发酵条件的优化 为提高 PCT 蛋白的产量并降低成本, 对表达菌株 BL21(DE3)/pET28a-PCT 的发酵条件进行了下述优化。首先, 研究发酵过程中培养温度对发酵周期和蛋白产量的影响。图 3a1、a2 可以看出, 随着培养温度的升高, 细菌生长速度加快。目的蛋白在细菌裂解液中的占比在 40℃ 时最优(灰度分析结果受限于篇幅, 本文未列出图片及数据)。图 3b 结果可

见, 随补料速度的加快, 外源蛋白在细胞裂解液中的占比升高, 补料速度超过 100 mL/h 后趋于稳定。因此, 本研究选择在细菌生长阶段将补料速度维持在 100 mL/h。图 3c 分析了溶氧量对目的蛋白表达的影响, 结果表明溶氧量的增加能缩短细菌的发酵周期, 但目的蛋白的表达没有明显变化。鉴于高搅拌转速不仅功率消耗变大, 而且搅拌产生的剪切力会影响菌体的生长, 本研究选择了 30% 作为搅拌-溶氧联动的控制参数。

通过上述单因素实验优化发酵参数, 最终确定大肠杆菌 BL21(DE3)/pET28a-PCT 发酵生产 PCT 蛋白(10 L 发酵罐)的适宜条件为 5.5 L 基础培养基, 接种量 10%, 温度维持 40℃, 10×LB 作为补料培养基, 以 100 mL/h 等速流加(根据 1.2.3 摸索得到), 用 3 mol/L NaOH 维持培养液 pH 值为 7.2, 采用搅拌-溶氧联动方式将溶氧量恒定在 30%, 0.2 mmol/L IPTG 诱导目的蛋白表达。在上述适宜条件下, 连续进行 3 批发酵, 收获的湿菌量为(430±14)g, 目的蛋白占比为(45.2±8.7)%。

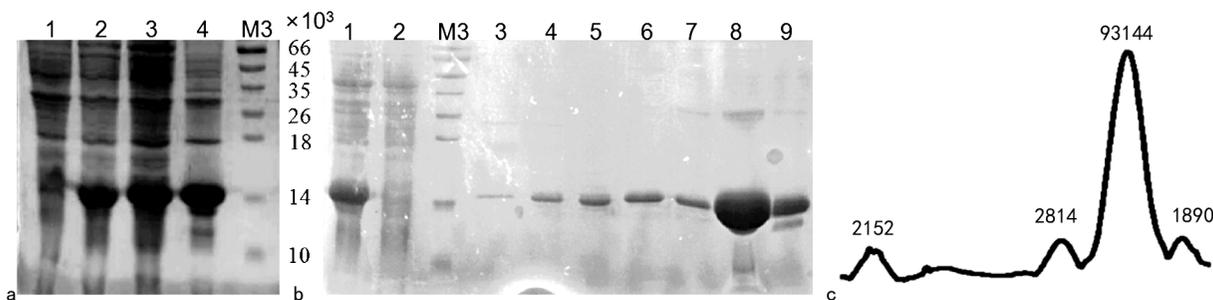


注: a1 为不同培养温度下重组菌生长曲线; a2 为不同培养温度下目的蛋白的表达; b 为不同补料速度下目的蛋白的表达; c 为不同溶氧量下目的蛋白的表达; 对照为未诱导的重组菌; M3 为自制蛋白相对分子质量标准; 实线所指为目的蛋白。

图 3 不同培养条件下重组蛋白的表达

2.4 重组 PCT 蛋白的纯化 采用高压匀浆的方法对发酵收获的大肠杆菌(50 g 湿菌)进行破碎,分析目的蛋白在菌体破碎上清液和沉淀中的比例,结果见图 4a,细菌破碎上清液中有明显的目的蛋白。用镍柱纯化目的蛋白,20%缓冲液 B(200 mmol/L 咪唑洗脱)

的洗脱峰 SDS-PAGE 染色结果显示有单一的蛋白条带,相对分子质量略小于 18.4×10^3 ,与研究预期的重组蛋白相对分子质量相符(图 4b)。利用 Image J 软件对泳道 8 目的蛋白进行灰度分析(图 4c),结果显示目的蛋白纯度为 93.14%。



注:a 为收获的大肠杆菌目的蛋白的表达分析,其中 1 为未诱导的重组菌,2 为诱导后的重组菌,3 为裂解后的上清液,4 为裂解后的沉淀,M3 为蛋白相对分子质量标准(A11911);b 为从收获的大肠杆菌中纯化目的蛋白的情况,其中 1 为裂解后的上清液,2 为纯化流穿液,3 为 10 mmol/L 咪唑冲洗液,4~6 为 50 mmol/L 咪唑洗脱液,7~9 为 200 mmol/L 咪唑洗脱液,M3 为蛋白相对分子质量标准(A11911);c 为 b 图泳道 8 得到的 Image J 灰度分析结果。

图 4 重组蛋白 PCT 的表达和纯化

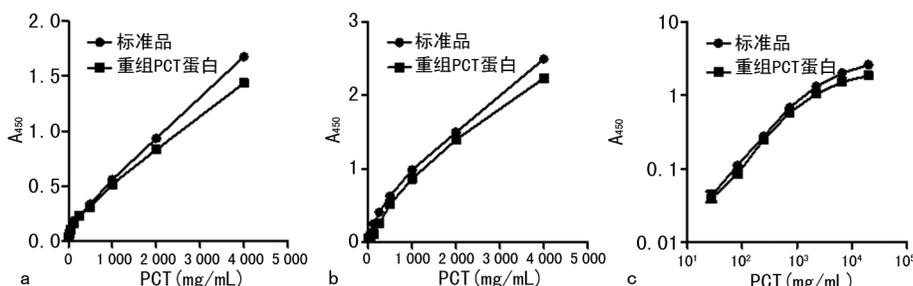
2.5 重组 PCT 蛋白的检测

2.5.1 BCA 法测定重组蛋白纯度 50 g 湿菌体,经上述镍柱纯化后,泳道 8 的洗脱产物(共 402 mL)用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液透析,采用 BCA 法定量试剂盒进行蛋白水平测定。根据标准曲线计算待测蛋白的水平,纯化的 PCT 水平为 2.24 mg/mL。综合 5.5 L 发酵培养所得菌体质量(430 g),经计算,PCT 产量为 1 405 mg/L。

2.5.2 以 PCT 标准品原液绘制标准曲线对纯化的 PCT 重组蛋白进行含量赋值 利用商品化的 PCT 检测试剂盒,标定纯化得到的 PCT 蛋白水平。Sigma 公司试剂盒测得的 PCT 水平为 (1.89 ± 0.26) mg/mL,

碧云天公司试剂盒测得的 PCT 水平为 (1.64 ± 0.47) mg/mL,天津生物芯片公司的试剂盒测得的 PCT 水平为 (2.25 ± 0.31) mg/mL。综合 3 种试剂盒的检测结果,计算均值,纯化的 PCT 蛋白水平标定值为 1.93 mg/mL。

2.5.3 重组 PCT 蛋白在 ELISA 试剂盒组成中的应用 以重组蛋白为标准品绘制的标准曲线与各试剂盒提供的标准曲线相比,在 100~1 000 pg/mL 范围内重组蛋白 PCT 水平与 A 值呈线性相关,提示本研究制备的重组 PCT 蛋白可以用作标准蛋白以组装检测试剂盒,但其检测范围略窄,而且各水平样品的检测数值偏低,导致曲线的斜率均偏低(图 5)。



注:a 为 Sigma 公司试剂盒检测结果;b 为碧云天公司试剂盒检测结果;c 为天津生物芯片公司试剂盒检测结果。

图 5 以 PCT 蛋白替代试剂盒中的标准品并绘制标准曲线

3 讨论

原核表达系统是目前研究最清楚、最为经济的表达系统,以大肠杆菌为代表的原核表达系统是研究外源基因表达的首选^[10-11]。大肠杆菌共有 4 405 个开放型阅读框架,遗传稳定,被美国食品药品监督管理局(FDA)批准为安全的基因工程表达系统。大肠杆菌

不仅遗传背景清楚、生长繁殖快、转化效率高、成本低廉,还可以用于快速、大规模地生产目的蛋白^[9]。

细菌培养常见的方法为摇瓶培养和发酵罐高密度培养。细菌培养过程中,培养温度、培养基组分、溶解氧含量、pH 值等都会影响细菌生长繁殖速度及重组蛋白的产量^[12]。在利用大肠杆菌作为宿主、通过发

酵培养以期收获目标蛋白的发酵过程中,通过调节温度、补料速度、搅拌转速等参数,可以实现目标蛋白在细菌中的高占比。发酵罐培养可以便捷地调节培养温度、通过增加搅拌转速或者从外部注入氧气的方式调节溶氧量、通过外接蠕动泵的方式补充营养成分及调节培养液 pH 值,实现细菌的高密度培养,进而获得高产量的重组蛋白。

大肠杆菌最适宜生长的温度为 37 ℃。本研究结果显示,随着温度的升高,细菌繁殖速度加快,到平台期所用的时间明显缩短。但是温度的升高可能会影响大肠杆菌细胞内各种蛋白酶的表达速度,也将会加速细菌的衰老和死亡。本研究推测,在细菌生长过程中,过快的营养消耗亟须外源碳源、氮源等营养的补充,而在目的蛋白表达阶段,诱导剂抑制了细菌繁殖,细菌状态由分裂繁殖转变为生产目的蛋白,维持这个阶段需要的营养消耗降低,因此补料速度的持续增加对目标蛋白的表达没有明显影响。此外,培养液中的溶氧量直接关系细菌的繁殖速度,溶氧量是影响发酵周期、蛋白产量的重要参数^[10]。通过提高搅拌速度或者直接接入纯氧,能够提高溶氧量。采用搅拌-溶氧联动的方式使溶氧量维持在一个动态平衡的状态,可提供细菌繁殖所需的氧气。

大肠杆菌作为最常用的宿主细胞,能够对多数以 pET 质粒为载体携带的目标基因进行高水平表达。本研究利用大肠杆菌 BL21(DE3)作为宿主,采用发酵培养并亲和纯化的方式获得重组人 PCT 蛋白。构建的 pET28a-PCT 重组质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3)后,以 IPTG 为诱导剂进行 PCT 蛋白的表达。pET28a 携带的 6×His 标签使得表达的重组蛋白能够采用亲和层析的方式进行纯化,经过一步层析即可获得较高纯度的蛋白,而且 6×His 标签很小,不会影响蛋白的表达、折叠及其与抗体的结合活性^[13]。

本研究构建的工程菌,在摸索建立的适宜发酵条件下,发酵周期 10 h 内,1 L 发酵液即可获得 78 g 湿菌,1 L 发酵液收获的细菌经亲和层析后能获得 1 405 mg 的重组 PCT 蛋白。经市售的 PCT 检测试剂盒标定后的重组 PCT 蛋白,在 100~1 000 ng/L,其水平与 A 值有较好的线性关系,提示获得的重组蛋白经标定后,能够作为标准蛋白用于 PCT 检测,也可以作为抗原免疫动物以获得针对 PCT 的多克隆抗体或者单克隆抗体。后续工作:笔者还需要考察 PCT 蛋白的稳定性及储存条件对蛋白稳定性的影响,而且在装配试剂盒时,还需要对 PCT 水平进行标定。本研究为 PCT 检测试剂盒的研发提供了重要的原料。

参考文献

- [1] FOUSHEE J A, HOPE N H, GRACE E E. Applying biomarkers to clinical practice: a guide for utilizing procalcitonin assays[J]. *Antimicrob Chemother*, 2012, 67(11): 2560-2569.
- [2] KETTNER J, HOLEK M, FRANEKOVA J, et al. Procalcitonin dynamics after long-term ventricular assist device implantation[J]. *Heart Lung Circ*, 2017, 26(6): 599-603.
- [3] KIP M M, KUSTERS R, IJZERMAN M J, et al. A PCT algorithm for discontinuation of antibiotic therapy is a cost-effective way to reduce antibiotic exposure in adult intensive care patients with sepsis[J]. *Med Econ*, 2015, 18(11): 944-953.
- [4] NISHIKAWA H, SHIRANO M, KASAMATSU Y, et al. Comparison between procalcitonin and C-reactive protein in predicting bacteremias and confounding factors: a case-control study[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(7): 1043-1052.
- [5] MEISNER M. Update on procalcitonin measurements [J]. *Ann Lab Med*, 2014, 34(4): 263-273.
- [6] 李莉. 降钙素原对全身炎症反应综合征患者病情预后的判断价值分析[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(88): 60-62.
- [7] LEE H. Procalcitonin as a biomarker of infectious diseases[J]. *Korean J Intern Med*, 2013, 28(3): 285-291.
- [8] YAN S T, SUN L C, JIA H B, et al. Procalcitonin levels in bloodstream infections caused by different sources and species of bacteria[J]. *Am J Emerg Med*, 2017, 35(4): 579-583.
- [9] 孙彬裕, 曲守方, 于婷, 等. 甲胎蛋白免疫测定用国家标准品的建立[J]. *中国医药生物技术*, 2019, 14(2): 185-188.
- [10] SU L, JIANG Q, YU L, et al. Enhanced extracellular production of recombinant proteins in *Escherichia coli* by co-expression with *Bacillus cereus* phospholipase C[J]. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 24.
- [11] RUAN A, REN C, QUAN S. Conversion of the molecular chaperone spy into a novel fusion tag to enhance recombinant protein expression[J]. *J Biotechnol*, 2020, 307: 131-138.
- [12] ZHANG H C, YANG J, YANG G W, et al. Production of recombinant protein G through high-density fermentation of engineered bacteria as well as purification[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 3132-3138.
- [13] SPRIESTERSBACH A, KUBICEK J, SCHAFFER F, et al. Purification of His-tagged proteins[J]. *Methods Enzymol*, 2015, 559: 1-15.