

• 短篇论著 •

重组 TRX-BNP 融合蛋白的构建和表达

Construction and expression of a recombinant fusion protein of thioredoxin-B-type natriuretic peptide

游晓华¹, 秦永文¹, 黄盛东², 袁 扬², 龚德军²

(1. 第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433; 2. 长海医院胸心外科)

[摘要] **目的:** 构建人 B 型钠尿肽 (BNP) 表达质粒, 用 pET 原核表达系统制备重组抗原 TRX-BNP 融合蛋白。**方法:** 根据 GenBank 中检索到的人 BNP 成熟蛋白序列编码, 设计合成编码 BNP-32 蛋白的 DNA, 并分别在 5' 端和 3' 端设计 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点, 经聚合酶链反应 (PCR)、构建重组质粒 pET32a. BNP, 并在 BL21(DE3) 经 IPTG 诱导表达, Ni-NTA 亲和层析制备 TRX-BNP。通过 DNA 测序、融合蛋白的相对分子质量分析及 Western 印迹来鉴定 TRX-BNP 质粒及表达的 BNP 抗原的正确性。**结果:** DNA 测序结果表明, 所获得的 BNP 基因编码序列符合序列设计的要求, 正确插入设计位点, 重组质粒 pET32a. BNP 构建成功。IPTG 诱导后 SDS-PAGE 电泳显示有特异性蛋白 TRX-BNP 表达, 蛋白相对分子质量 21 400, Ni-NTA 亲和纯化, 在 UVP 凝胶成像分析系统上作定量分析, BNP 蛋白纯度达到 95%。Western 印迹结果证实 TRX-BNP 蛋白特异性表达。**结论:** 成功制备 TRX-BNP 融合蛋白。

[关键词] B 型钠尿肽; 融合蛋白; 硫氧还蛋白**[中图分类号]** Q 781**[文献标识码]** B**[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0679-03

B 型钠尿肽 (B-type natriuretic peptide, BNP) 是 1988 年由日本学者 Sudoh 等^[1] 最初由猪脑分离出来的一种由 32 个氨基酸构成的多肽类神经激素, 曾被命名为脑钠肽 (brain natriuretic peptide), 但其主要来自于心室。当心室前后负荷加重, 心室壁受牵张时迅速、大量分泌, 具有拮抗肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAS) 和交感神经系统 (SNS) 的作用, 减轻血管阻力, 减轻心脏前后负荷, 增加心输出量, 增加肾小球滤过率并减少集合管钠的重吸收, 从而增加尿液的生成并增加钠的排出等作用^[2,3]。血浆 BNP 浓度与心功能密切相关, 可用于指导心衰的诊断和治疗^[4,5]。本研究拟制备重组 BNP 融合蛋白, 为今后以其作抗原制备 BNP 抗体, 建立一套 BNP 检测方法奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pET32 及大肠杆菌 BL21(DE3) 购自 Novagen 公司; *EcoR* I、*Hind* III、*T*₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司; 质粒纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; DNA 分子量标准品及 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司, IPTG 购自 Amersco 公司; 引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2 BNP 基因获得 在 GenBank 中检索到人 BNP 成熟蛋白序列为: SPK MVQ GSG CFG RKM DRI SSS SGL GCK VLR RH。根据大肠杆菌 (*E. coli*) 的密码子使用偏好, 将蛋白序列转化为 DNA 序列: AGC CCG AAA ATG GTG CAG GGC AGC GGC TGC TTT GGC CGT AAA ATG GAT CGT ATT AGC AGC AGC AGC GGC CTG GGC TGC AAA GTG CTG CGT CGT CAT。设计 Oligo DNA 以及引物, 拼接表达人 BNP 的基因序列。BNP Oligo 1: agc ccg aaa atg gtc cag ggc agc ggc tgc ttt ggc cgt aaa atg gat cgt att agc ag, BNP Oligo 2: gac gac gca gca ctt tgc agc cca ggc cgc tgc tgc taa tac gat cca ttt tac; 正向引物: cgg aat tca gcc cga aaa tgg tgc ag, 反向引物: cca agc ttt taa tga cga cgc agc ac。

BNP Oligo 1 和 BNP Oligo 2 用 ddH₂O 溶解, 浓度均为 100 μmol/L; 配置聚合酶链反应 (PCR) 反应体系, 作 PCR 扩增, 条件为: 94℃ 1 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 68℃ 1 min; 加 BNP 正向引物和反向引物各 1 μl (浓度为 1 μmol/L); 重复上述步骤, 28 个循环。PCR 产物用 QIAGEN PCR 产物纯化试剂盒纯化洗脱液。

1.3 重组质粒 pET32. BNP 构建 以 pET32a 质粒、BNP 基因 PCR 产物、*EcoR* I、*Hind* III 配置酶切反应体系, 制备 BNP 基因和 pET32a 质粒 *EcoR* I / *Hind* III 双酶切产物; 配置连接反应体系, 连接过夜; 连接产物转入 DH5α 感受态细胞; 接种 6 个单菌落, 37℃ 过夜培养; 用 QIAGEN Plasmid spin kit 抽提质粒, 用 QIAGEN 质粒纯化试剂盒纯化重组质粒, 进行 PCR 扩增, 条件为: 94℃ 1 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析; 取阳性质粒测序验证克隆基因序列的正确性。

1.4 重组蛋白 TRX-BNP 的诱导表达与纯化 按 Novagen 公司 pET 原核表达系统的操作规程将重组质粒 pET32. BNP 转入 BL21(DE3) 感受态细胞培养, 培养至 *D*₆₀₀ 值约为 0.4; 加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导表达, 收获菌体; 15% SDS-PAGE 电泳分析诱导前后总菌体蛋白, 观察表达水平; 离心收集诱导表达菌体; 冰浴超声破菌; 破菌液 4℃, 12 000 r/min 转速离心 10 min, 收集上清; SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定; 用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化重组 BNP 蛋白; 收集洗脱液, SDS-PAGE 蛋白电泳, 确定纯化效率。

1.5 重组蛋白 TRX-BNP Western 印迹鉴定 取细菌诱导前后总蛋白和纯化后 TRX-BNP 蛋白样品, SDS-PAGE 凝胶电泳, 转印至硝酸纤维素膜上, 3% BSA 溶液封闭过夜; 加羊抗人 BNP 多克隆抗体 (sc-18813, 美国 Santa Cruz 公司), 室

[作者简介] 游晓华, 博士生, 讲师、主治医师。

E-mail: youxiaohua@medmail.com.cn

温反应 1 h;洗膜后加 HRP 标记的兔抗羊二抗 (sc-2768, 美国 Santa Cruz 公司),室温反应 1 h;洗膜后,加入 ECL 化学发光试剂盒中的 A 和 B 液,振荡温育 1 min,立即将膜片转入暗室中,X 线片曝光。

2 结果

2.1 BNP 基因拼接结果 根据 GenBank 检索结果,BNP 成熟蛋白由 32 个氨基酸残基构成,其 DNA 序列为 96 bp,加上中止密码子和酶切识别位点,拼接的 BNP 基因约 120 bp。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,可见在略大于 100 bp 处有高度特异的 DNA 条带,所得基因片段与预计大小一致。见图 1。

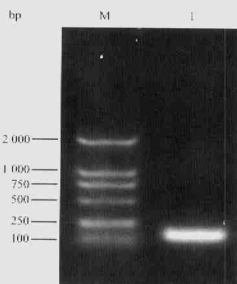


图 1 BNP 基因 PCR 电泳图

M: DL2000 DNA marker; 1: 拼接扩增 BNP 基因

2.2 pET32a₊BNP 重组质粒的鉴定结果 由电泳图可以看到,6 个转化子中有 5 个转化子都扩增获得约 120 bp 条带,结果显示为含 pET32a₊BNP 重组质粒 (图 2)。对目的基因进行 DNA 测序,所获碱基序列与设计 BNP 碱基序列完全一致。

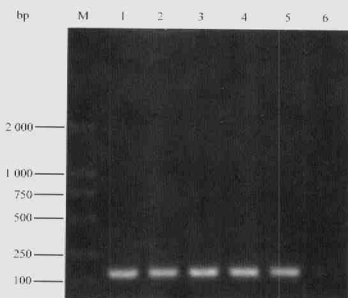


图 2 pET32a₊BNP 转化子 PCR 鉴定电泳结果

M: DL2000 DNA marker; 1-5: 转化子 PCR 鉴定; 6: 阴性对照

2.3 TRX-BNP 蛋白诱导表达纯化的结果 载体编码蛋白相对分子质量 18 000,蛋白序列如下:MSD KII HLT DDS FDT DVLK ADG AIL VDF WAE WCG PCK MIA PIL DEI ADE YQG KLT VAK LNI DQN PGT APK YGI RGI PTL LLF KNG EVA ATK VGA LSK GQL KEF LDA NLA GSG SGH MHH HHH HSS GLV PRG SGM KET AAA KFE RQH MDS PDL GTD DDD KAM ADI GSE F。BNP 蛋白相对分子质量 3 400,蛋白序列如下:SPK MVQ GSG CFG RKM DRI SSS SGL GCK VLR RH。经 IPTG 诱导,pET32a₊BNP 15% SDS-PAGE 电泳 (图 3) 显示有特异性蛋白表达 (泳道 2),蛋白相对分子质量 21 400,诱导前 (泳道 1) 未见此条带,表明 TRX-BNP 融合蛋白表达成功。Ni-NTA 亲和纯化,确定 BNP 蛋白电泳图在 UVP 凝胶成像分析系统上作定量分析,BNP 蛋白纯度达到 95%,目的蛋白表达占菌体总蛋白的 30%。计算每升诱导菌可获得的 TRX-BNP 融合蛋白为 10.1 mg。

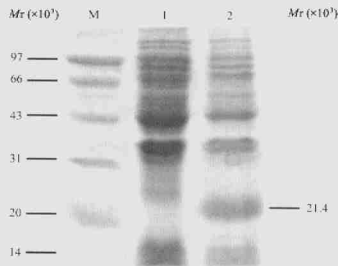


图 3 TRX-BNP 蛋白的诱导表达

M: Marker; 1: 诱导前细菌总蛋白; 2: 诱导后细菌总蛋白

2.4 重组蛋白 TRX-BNP Western 印迹鉴定 Western 印迹显示在相对分子质量约 21 400 处,诱导后和纯化后样品出现特异性显色条带,而诱导前细菌总蛋白未见相应的表达条带 (图 4)。

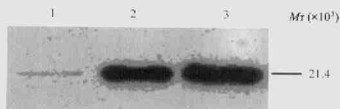


图 4 TRX-BNP western 印迹

1: 诱导前阳性条带; 2, 3: 诱导后和纯化后阳性条带

3 讨论

人 BNP 由 32 个氨基酸组成,相对分子质量为 3 400,等电点 10.9。BNP 基因位于人染色体 1p36.2,此基因为一断

裂基因,包含 3 个外显子和 2 个内含子。采用基因工程方法,将目的片段克隆到表达载体从而获得重组蛋白是常用的制备目的蛋白的方法。目前有原核和真核两类表达系统。其中原核表达系统表达相对简单,具有产量高、易操作、稳定性好等优点,另外,它也是目前了解最深入全面的基因工程表达系统,所以我们决定选用原核系统制备 BNP 蛋白。现在应用十分广泛的 pET 系统,是由 Studier 等利用与启动子配套能高效转录特定基因的外源 RNA 聚合酶构建的 T₇ RNA 聚合酶/启动子系统。与其他 *E. coli* 启动子系统(Lac, Tac, PL)不同,由于 *E. coli* 的 RNA 聚合酶不能识别 T₇ 启动子,当没有 T₇ RNA 聚合酶时,则不存在基础转录,从而使克隆与表达两步很好的分离。许多难用其他 *E. coli* 表达系统表达的基因可在 pET 系统中高效稳定地克隆和表达。正是基于上述原因,我们选择 pET32 作为 BNP 基因的表达载体。pET-32 系列是用于克隆和高水平表达融合了硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)的载体质粒,采用蛋白质工程改造的硫氧还蛋白即将其中 2 个氨基酸突变成 His,在空间立体结构上形成 3 个组氨酸位点(His-patch),其克隆位点包含 His. Taq 和 S. Taq™ 序列^[6],该两个序列具有识别和纯化作用,从而产生融合蛋白。硫氧还蛋白作为分子内伴侣可以帮助许多基因在 *E. coli* 细胞内正确折叠。宿主菌我们选择了具有较低蛋白酶活性的大肠杆菌 BL21(DE3)。从本实验诱导后菌体蛋白电泳的结果来看,在目的融合蛋白 TRX-BNP 相对分子质量相近的位置(21 000),诱导后菌液较诱导前出现明显的新增的特异性蛋白条带,提示目的蛋白在 IPTG 诱导下已经得到表达。而表达必须有较高水平才能满足下一步研究的需要,从 UVP 凝胶成像系统分析结果来看,本研究的表达水平超过 30%(目的蛋白/菌体总蛋白),达到了研究的预期目的。采取了镍(Ni)亲和柱层析法,BNP 得到较高度度的纯化,薄层扫描分析表明,纯度达 95%。综上所述,以原核表达系统 pET32 制备 BNP 是获取该蛋白稳定、可靠、实用的方法。采用镍(Ni)亲和柱层析法提取和纯化蛋白获得了高纯度的 BNP 蛋白。

人血浆 BNP 浓度随着心功能衰竭程度加重而逐渐升高,通过检测血浆 BNP 水平可以判断心衰程度及预后,尤其在心衰的临床表现尚未出现时,BNP 浓度的升高可先于目前其他检测手段预测心功能,以利于心衰的早期治疗^[7,8]。近来研究者们对 BNP 在高血压病、急性冠脉综合征、心律失常等心血管病中的诊治价值也越来越关注^[9,10]。由于各种

BNP 试剂尚未标准化,国内检测 BNP 浓度均依赖各种国外的试剂盒,参考范围和 cut off 值在不同测定方法不同,测得的结果亦不同,而且检测费用昂贵,在一定程度上限制了临床对 BNP 检测的广泛开展。鉴于 BNP 在心血管领域的重要作用,结合国内检测 BNP 不尽人意的现状,本研究通过基因工程技术合成重组 BNP 蛋白,准备制备 BNP 的单克隆抗体,拟自行研制 BNP 单抗检测试剂盒,为临床提供有效、快速、经济的 BNP 检测方法。

[参考文献]

- [1] Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al. A new natriuretic peptide in porcine brain[J]. *Nature*, 1988, 332: 78-81.
- [2] Lim PO, Donnan PT, Struthers AD, et al. Exercise capacity and brain natriuretic peptide in hypertension [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 40: 519-527.
- [3] Moe GW. BNP in the diagnosis and risk stratification of heart failure[J]. *Heart Fail Monit*, 2005, 4: 116-122.
- [4] Peacock WF. The B-type natriuretic peptide assay: a rapid test for heart failure[J]. *Cleve Clin J Med*, 2002, 69: 243-251.
- [5] Kjear A, Hesse B. Heart failure and neuroendocrine activation: diagnostic, prognostic and therapeutic perspectives [J]. *Clin Physiol*, 2001, 21: 661.
- [6] La Vallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm[J]. *Biotechnology*, 1993, 11: 187-193.
- [7] Mc Grath MF, de Bold ML, de Bold AJ. The endocrine function of the heart[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2005, 16: 469-477.
- [8] Hobbs RE. Using BNP to diagnose, manage, and treat heart failure[J]. *Chvee Clin J Med*, 2003, 70: 333-336.
- [9] Wu AH, Packer M, Smith A, et al. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study [J]. *Clin Chem*, 2004, 50: 867-873.
- [10] McCord J, Nowak RM, Jacobsen G, et al. B-type natriuretic peptide levels in patients in the emergency department with possible heart failure and previous stable angina pectoris and/or healed myocardial infarction[J]. *Am J Cardiol*, 2005, 96: 1370-1373.

[收稿日期] 2006-03-23

[修回日期] 2006-05-18

[本文编辑] 曹 静