



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.02.004

## 重组人心肌肌钙蛋白 I 基因工程菌的构建与表达

丁祥瑞<sup>1</sup>, 汪建明<sup>1</sup>, 蔡胜和<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457; 2. 天津石桥生物科技有限责任公司, 天津 300457)

**摘要:** 人心肌肌钙蛋白 I(hcTnI)是临床检测心肌损伤及预后提供诊断的生物学指标,由于来源有限,采用基因重组技术,以期获得高表达量的人心肌肌钙蛋白 I. 人工合成 hcTnI 基因,将其插入 pET-11a 载体中,通过酶切鉴定正确后转入表达宿主菌 BL21(DE3)中,诱导表达目的蛋白. 采用蛋白免疫印迹反应(Western Blot, WB)鉴定表达目的蛋白的免疫特异性. 经 SDS-PAGE 证实重组蛋白的相对分子质量约为  $2.6 \times 10^4$ ,凝胶密度扫描软件检测到目的蛋白占总蛋白比例为 30.1%,WB 实验验证诱导后目的蛋白特异性良好. 成功构建了重组 hcTnI 基因在大肠杆菌表达的工程菌株,并获得表达,为制备高特异性的抗体及临床检测应用和测定标准化奠定了基础.

**关键词:** 重组人心肌肌钙蛋白 I; 基因重组; 诱导表达

中图分类号: Q789

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2014)02-0016-04

## Construction and Expression of the Genetic Engineered Bacteria of Recombined Human Myocardial Troponin I

DING Xiangrui<sup>1</sup>, WANG Jianming<sup>1</sup>, CAI Shenghe<sup>2</sup>

(1. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;  
2. Tianjin Shiqiao Biological Technology Limited Liability Company, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Human cardiac troponin I(hcTnI) is an important biochemical marker for myocardial injury and prognosis of myocardial injury. However, it is hard to prepare it in quantity. In order to obtain unlimited hcTnI protein, we constructed genetic bacteria to produce the protein. In this research, the gene of human cardiac troponin I was synthesized by a biochemical company. Then, the commercial genes were inserted into the vector pET-11a in order to construct a high efficiency expression system in *E. coli* BL21. The recombinant plasmid was identified by the digestion of restriction endonucleases. Finally, the recombinant purpose protein was expressed and identified by the Western Blot Assay. The relative molecular weight of hcTnI was about  $2.6 \times 10^4$  identified by SDS-PAGE, which was the same as the reported data. The expressed active hcTnI protein was obtained and amounted to 30.1% of the total bacterial proteins as detected with the densitometer scan software. The immunological activity of the expressed hcTnI was analyzed by Western Blot Assay after SDS-PAGE, and the result indicated that the recombinant protein has good immunologic affinity. The recombinant human cardiac troponin I was successfully expressed on a large scale. It can be used in producing monoclonal antibody and also contribute to the research of hcTnI diagnosis standardization.

**Key words:** recombinant human cardiac troponin I; gene recombinant; inducing expression

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是临床常见的心血管疾病,据统计在心血管疾病患者中有 40%死于 AMI,所以,对 AMI 诊断的研究一直倍受临床研究的重视. AMI 主要是根据临床症状、心电图和血清心肌酶谱的变化情况来诊断,但

随着科学研究的深入,这些诊断标准越来越受到专家们的质疑. 研究发现,人心肌肌钙蛋白 I(human cardiac troponin I, hcTnI)在心肌受到微小损伤时出现早,持续时间长,且为心肌细胞所特有,因此 hcTnI 正逐步取代其他的生化标志物成为诊断心肌损伤的

收稿日期: 2013-07-01; 修回日期: 2013-12-17

作者简介: 丁祥瑞(1988—),女,河南周口人,硕士研究生; 通信作者: 蔡胜和,讲师, shenghecai@gmail.com.

首选生化指标<sup>[1-2]</sup>,特别是急性心肌梗死的诊断“金标准”<sup>[3-4]</sup>.

本文采用基因工程方法利用原核表达系统制备未添加任何序列标签的重组 hcTnI,使其更接近天然蛋白和有更好的抗原性,为进一步制备高质量抗体及开发具有自主知识产权的 hcTnI 诊断试剂盒奠定实验基础,并促进 hcTnI 诊断标准化问题的研究.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 目的基因片段、载体和菌株

hcTnI 全基因合成菌液由北京华大基因公司合成;pET-11a 载体菌液购自北京天恩泽公司;大肠杆菌(*E. coli*)DH5 $\alpha$  克隆菌株和 BL21(DE3)表达菌株均为本实验室保存.

#### 1.1.2 酶和实验试剂

*Nde* I 内切酶、*Bam* HI 内切酶、T4 DNA 连接酶,纽英伦生物技术(北京)有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒,OMEGA 公司;DNA marker,上海纯优生物科技有限公司;hcTnI 抗体,Sigma 公司;其他试剂均为分析纯.

#### 1.1.3 实验仪器

高性能台式离心机,Thermo Scientific;电泳仪,北京市六一仪器厂;恒温摇床,上海智诚分析仪器制造有限公司;超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司.

### 1.2 实验方 法

#### 1.2.1 重组 hcTnI 基因表达序列的设计

NCBI 网站 GeneBank 基因文库<sup>[5]</sup>提供的人心肌肌钙蛋白 I(hcTnI)基因序列号:NM\_000363.4,大小 630 bp. 本实验设计在目的基因的 5'端添加 *Nde* I 限制性内切酶和 3'端添加 *Bam* HI 限制性内切酶位点;并对上游引物的第 2 位和第 4 位密码子的第 3 个碱基简并定点突变,以便在表达过程中可提高表达产量. 确定目的基因设计要求,委托北京华大基因公司进行全基因合成 hcTnI 目的片段.

#### 1.2.2 重组 hcTnI 全长基因克隆获得

将含 hcTnI 全基因序列的大肠杆菌液按 1:100 接种至氨苄抗性(AMP)的 LB 培养基中培养,用质粒回收试剂盒提取菌液质粒,经 *Nde* I 限制性内切酶和 *Bam* HI 限制性内切酶双酶切、1%琼脂糖凝胶电泳,并把酶切的目的片段用凝胶试剂盒回收待用. pET-

11a 载体商品菌液也按 1:100 接种至 AMP 抗性 LB 液体培养基中培养,用质粒提取试剂盒提取载体质粒,经 *Nde* I 酶和 *Bam* HI 酶双酶切,琼脂糖凝胶电泳,切胶回收 pET-11a 大片段质粒. 按物质的量浓度比 1:3 将切胶回收的 pET-11a 大片段质粒和切胶回收的目的基因片段用 T4 DNA 连接酶连接,4℃连接 16 h. 将连接产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态菌株,均匀挑取转化平板中的单克隆,提取质粒. 挑取阳性转化子双酶切鉴定,1%琼脂糖凝胶电泳验证该克隆的正确性.

#### 1.2.3 重组质粒的表达和鉴定

将双酶切鉴定正确的 pET-11a-hcTnI/*E. coli* DH5 $\alpha$  单克隆扩大培养,提取重组质粒,转化 BL21(DE3)感受态细胞于 AMP 抗性的 LB 平板上,过夜培养,均匀挑取阳性单克隆菌落提取质粒,接种到 5 mL 含 1 mg/mL 的 AMP 抗性的 LB 液体培养基中,37℃、200 r/min 过夜培养. 再扩大转接 500 mL AMP 抗性的 LB 液体培养基中,37℃、200 r/min 振荡培养至  $A_{600}$  为 1.0 后,加 1.0 mmol/L 的诱导剂 IPTG 诱导,30℃、200 r/min 振荡 4 h. 4℃、6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,加 20 mL PBS(10 mmol/L, pH 7.4)重悬. 超声破碎,其条件为:功率 285 W,1.5 s 工作,1.5 s 休息,破碎 30 min 至菌液透亮. 取破碎菌液于 4℃、9 000 r/min 离心 30 min,收集离心上清液,沉淀用等体积的 PBS 重悬,分别取 30  $\mu$ L 诱导前菌液、诱导后菌液、破碎离心上清液和破碎沉淀重悬液,进行 12%的 SDS-PAGE 电泳分析.

#### 1.2.4 表达产物的免疫特性分析

将菌体超声破碎后离心的上清液进行 SDS-PAGE,转硝酸纤维素膜,蛋白免疫印迹反应. 用半干式转移电泳仪电转硝酸纤维素膜 2 h,5%脱脂奶粉封闭液 4℃过夜,1 $\times$  PBS 洗膜,加入鼠抗 hcTnI 单抗(1:1 000),37℃结合 2 h,洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:10 000),37℃结合 2 h,充分洗涤后 ECL 鉴定表达产物.

## 2 结果与分析

### 2.1 设计的目的片段序列

在 hcTnI 基因 5'端铰链区转录成 mRNA 后形成一个稳定的颈-环结构,在翻译时易形成位阻使酶结合能力减低或不能结合,从而造成目的蛋白的表达量低的问题<sup>[6]</sup>. 所以,为了提高目的蛋白 hcTnI 的表达

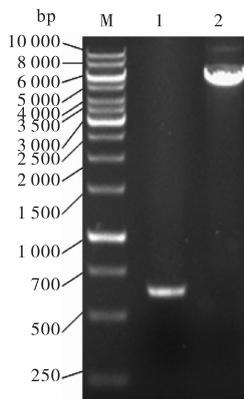
产量,在 hcTnI 基因 5'端第 2 位和第 4 位密码子的第 3 个碱基进行简并碱基突变;在目的基因序列的 5'端添加 *Nde* I 限制性内切酶和 3'端添加 *Bam* HI 限制性内切酶位点.

hcTnI 全基因合成序列(627 bp)如下:

GCGCCATATGGCCGATGGTAGCAGCGATG  
CGGCTAGGGAACCTCGCCCTGCACCAGCCCCAA  
TCAGACGCCGCTCCTCCAACCTACCGCGCTTATG  
CCACGGAGCCGCACGCCAAGAAAAAATCTAAG  
ATCTCCGCCTCGAGAAAATTGCAGCTGAAGACT  
CTGCTGCTGCAGATTGCAAAGCAAGAGCTGGA  
GCGAGAGGCGGAGGAGCGGCGCGGAGAGAAG  
GGGCGCGCTCTGAGCACCCGCTGCCAGCCGCTG  
GAGTTGGCCGGGCTGGGCTTCGCGGAGCTGCA  
GGACTTGTGCCGACAGCTCCACGCCCGTGTGGA  
CAAGGTGGATGAAGAGAGATACGACATAGAGG  
CAAAAGTCACCAAGAACATCACGGAGATTGCA  
GATCTGACTCAGAAGATCTTTGACCTTCGAGGC  
AAGTTTAAGCGGCCACCCTGCGGAGAGTGAG  
GATCTCTGCAGATGCCATGATGCAGGCGCTGCT  
GGGGGCCCGGGCTAAGGAGTCCCTGGACCTGC  
GGGCCACCTCAAGCAGGTGAAGAAGGAGGAC  
ACCGAGAAGGAAAACCGGGAGGTGGGAGACTG  
GCGCAAGAACATCGATGCACTGAGTGGAAATGGA  
GGGCCGCAAGAAAAAGTTTGAGAGCTGAT  
GAGGATCCGCGC

### 2.2 酶切回收目的基因片段和载体 pET-11a 大片段

将全基因合成的含有目的基因片段的菌液和 pET-11a 载体菌液分别接种于 AMP 抗性的 LB 培养基中扩大培养,提取质粒,用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam* HI 进行双酶切,按照凝胶回收试剂盒回收酶切质粒,结果如图 1 所示.



M. Gene Ruler; 1. 酶切回收的目的片段;  
2. 酶切回收的 pET-11a 载体片段

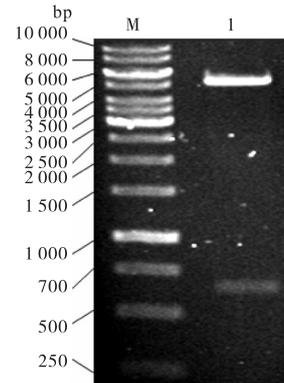
图 1 hcTnI 和 pET-11a 的酶切回收

Fig. 1 Enzyme digestive and recovered product of hcTnI and the vector pET-11a

由图 1 可知:双酶切回收质粒 DNA 条带进行 1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶分析仪下拍照并分析,泳道 1 显示双酶切回收的目的基因条带清晰大小约为 630 bp 的片段,与(GeneBank NM\_000363.4)公布的 hcTnI 条带大小相符;泳道 2 显示只有 1 个条带,条带的位置和载体 pET-11a 质粒理论值一致.

### 2.3 克隆菌株中重组质粒的酶切鉴定

连接产物转化克隆菌株 *E. coli* DH5a 感受态细胞,对重组质粒进行双酶切鉴定,结果如图 2 所示.由图 2 可知:重组质粒大小正确,酶切下的目的片段位置与理论相符,条带清晰,附近无杂带出现.阳性重组子被双酶切成 2 个片段,其中小片段为 630 bp,符合目的片段的大小;大片段和阴性对照一致.以上实验结果表明:目的基因已正确插入载体 pET-11a 中.



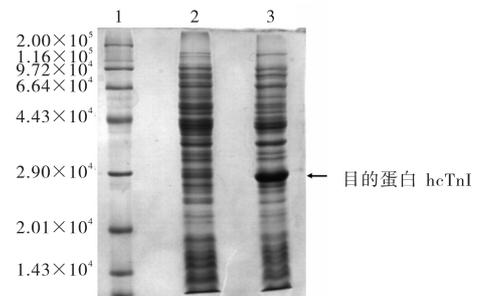
M. Gene Ruler; 1. 重组质粒 pET-11a-hcTnI 酶切

图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme identification of recombined plasmid

### 2.4 重组菌株的诱导表达及鉴定

重组质粒 pET-11a-hcTnI 转化 BL21(DE3). 挑取阳性克隆扩大培养,经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导.诱导前后分别取样并进行 12%的 SDS-PAGE,结果如图 3 所示.

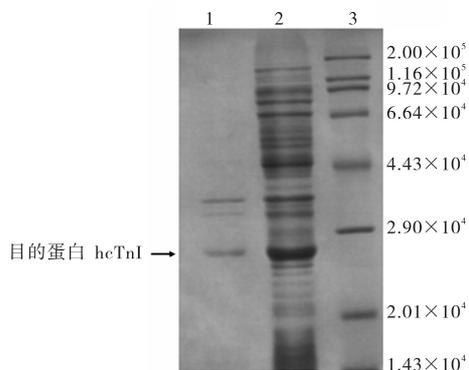


1. Protein Marker; 2. 诱导前; 3. 诱导后

图 3 重组菌株的诱导表达

Fig. 3 Expression states of induced recombined stains

诱导后在相对分子质量约  $2.6 \times 10^4$  处蛋白条带明显,与预期的 hcTnI 蛋白相对分子质量相符合. 用凝胶条带光密度软件 BandScan 扫描显示,所表达的蛋白占总菌体蛋白的 30.1%. 为了进一步确定目的蛋白的表达形式,取破碎离心上清液和相应的 PBS 重悬沉淀液进行 SDS-PAGE. 由图 4 泳道 2 可知:在相对分子质量  $2.6 \times 10^4$  处有显著的条带,与所设计重组菌株表达的目的蛋白 hcTnI 的相对分子质量吻合;此条带大部分存在菌体破碎的上清液中,说明本研究构建的重组菌株在该实验的条件下,目的蛋白主要是以可溶性形式表达而非包涵体形式存在.



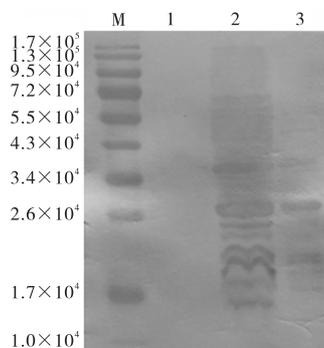
1. 包涵体; 2. 破碎离心上清液; 3. Protein Marker

图 4 目的蛋白 hcTnI 在上清液和包涵体中的分布

Fig. 4 Distribution of hcTnI protein in the supernatant and inclusion body

## 2.5 目的蛋白的免疫学分析

在目的蛋白的最佳表达条件下,用 DEAE-Sephrose 离子交换层析柱、硫酸铵处理和苯基疏水柱纯化得到纯度为 76% 的目的蛋白. 分别取蛋白 Marker 和重组菌株诱导前、诱导后、纯化后的目的蛋白,经 12% 的 SDS-PAGE 胶分离后,小心取胶转膜,进行免疫印迹实验,结果如图 5 所示.



M. Protein Marker; 1. 诱导前; 2. 诱导后; 3. 目的蛋白 hcTnI

图 5 hcTnI 的免疫印迹鉴定

Fig. 5 Identification of the purpose protein (hcTnI) by Western Blot

由图 5 可知,在相对分子质量  $2.6 \times 10^4$  处,泳道 2 和泳道 3 有明显条带,说明重组菌经诱导后表达的目的蛋白与 hcTnI 抗体是特异性反应的. 由于纯化的目的蛋白的纯度达到 72%,其他地方的显色条带有可能是降解的目的蛋白的某个抗原决定簇与抗体反应所致.

## 3 讨论

肌钙蛋白是心肌横纹肌的结构调节蛋白<sup>[7]</sup>,是 3 个亚单位构成的复合体,分别为肌钙蛋白 C (calcium-binding component, TnC)、肌钙蛋白 I (inhibitory component, TnI) 和肌钙蛋白 T (tropomyosin-binding component, TnT). TnI 是 ATP 酶的抑制性亚单位,可抑制肌球蛋白与肌动蛋白结合,阻止肌肉收缩. 人心肌肌钙蛋白 I 只存在心肌组织中,含量(湿质量)为  $(5.7 \pm 0.6) \text{ mg/g}$ , hcTnI 的相对分子质量为  $2.6 \times 10^4$ . 天然来源的 hcTnI 直接从心肌组织中通过生化方法提取,由于人心肌组织来源十分困难,要直接从心肌组织中大量纯化抗原就十分困难和不经济;因此,利用基因工程的方法构建 hcTnI 的原核高效表达重组体就显得十分重要<sup>[8]</sup>.

在构建重组工程菌时,本实验选用的表达载体是 pET-11a,在此系列的载体中,外源基因的表达受 T7 噬菌体 RNA 聚合酶调控,可用 IPTG 诱导外源基因的表达. 本研究构建的重组体在诱导表达条件下以可溶性形式存在,不同于目前的 hcTnI 基因重组表达菌体目的蛋白以包涵体形式存在的报道<sup>[9]</sup>. 这可能是由于选取表达载体和菌体的表达条件的差异所致,这样不仅简化后续的纯化操作,也增加 hcTnI 稳定性和抗原性.

本研究采用基因工程等技术设计和鉴定后,成功构建了表达重组 hcTnI 的基因工程菌菌株. 这解决了当前研制 hcTnI 诊断试剂盒的过程中 hcTnI 来源不足的问题,为进一步制备高特异性的抗体和推进 hcTnI 诊断标准化奠定基础.

## 参考文献:

- [1] Mair J. Cardiac troponin I and troponin T: Are enzymes still relevant as cardiac markers[J]. Clinica Chimica Acta, 1997, 257(1): 99-115.
- [2] Wu A, Apple F, Gibler W, et al. National academy of clinical biochemistry standards of laboratory practice:

(下转第 24 页)