

[文章编号] 1000-2200(2007)01-0014-04

# B型钠尿肽基因的克隆和原核表达载体构建及纯化

李卫鹏, 郑佐娅, 王红, 王从珠, 杭勤, 赵卫国

[摘要]目的: 克隆人B型钠尿肽(脑钠素, B-type natriuretic peptide, BNP)基因, 纯化其表达蛋白并制备多克隆抗体。方法: 用PCR技术从正常成人心脏组织cDNA库中扩增出人BNP基因, 将其克隆进pUCm-T中并测定核苷酸序列。构建大肠埃希菌分泌性表达载体pGXE4T-2/BNP, 用异丙基β-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, GSH-agarose亲和纯化表达蛋白, 用纯化蛋白免疫BALB/c小鼠, 制备多克隆抗体。结果: 经PCR扩增成功获得96 bp的BNP基因, 测序正确, 在大肠埃希菌中融合表达后, 该蛋白的表达量占菌体总蛋白的19%, 用SDS-PAGE和Western blot鉴定大肠埃希菌中的表达产物, 显示其相对分子量29 500。经亲和纯化后GSH-BNP的纯度可以达到95%, 500 ml菌液中得到纯化蛋白9.6 mg。多克隆抗体的效价为1:32 000。结论: BNP基因的克隆、表达和纯化成功以及多抗的获得, 为建立BNP检测方法奠定了基础。

[关键词] 基因文库; 人B型钠尿肽; 克隆; 分子; 构建; 纯化

[中国图书资料分类法分类号] Q 785 [文献标识码] A

## Cloning construction and purification of recombinant human B-type natriuretic peptide

LI Wei peng ZHENG Zuo ya WANG Hong WANG Cong zhuo HANG Qin ZHAO Wei guo

(Shanghai Municipal Research Center of Medical Laboratory Science

Medicine College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200023, China)

[Abstract] **Objective** To clone human B-type natriuretic peptide gene, purify the expressed protein and prepare its polyclonal antibodies. **Methods** By using PCR technique, the gene encoding human B-type natriuretic peptide (BNP) was amplified from the cDNA library of human heart and sequenced. Then this gene was inserted into expression vector pGXE4T-2. The construct pGXE4T-2/BNP was expressed in *E. coli* and the expressed protein was purified by affinity chromatography through GSH-agarose. The purified protein was used to immunize BALB/c mice. **Results** The cloned gene was 96 bp in length and its sequence was correct. The construct was expressed in *E. coli* with a high level of the protein as form soluble, accounting for 19% of the total bacterial proteins. The gene product characterized by SDS-PAGE and Western blot appeared to be a protein with molecular mass of 29 500. The purity of the protein purified by affinity chromatography reached more than 95%. The titer of anti sera was 1:32 000 after the fourth immunization. **Conclusion** The success of gene clone, expression and purification of human BNP lay the foundation for developing a quick diagnostic kit applying to detecting BNP.

[Key words] gene library; human B-type natriuretic peptide; cloning; molecular construction; purification

B型钠尿肽(B-type natriuretic peptide, BNP)作为一种主要由心室肌细胞分泌的多肽类神经激素, 在血容量稳定中起重要作用。血浆中的BNP水平在许多病理生理状态下均有所改变, 尤以心力衰竭为甚。诸多研究表明<sup>[1~4]</sup>, BNP在心力衰竭(heart failure, HF)、急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)等心血管疾病的诊断及预后判断等方面有重要价值。由于BNP的测定简便易行, 准确可靠, 近年来在心血管疾病的诊疗中日益得到广泛应用。目前检测血浆中BNP水平所用的试剂来自

于Biosite公司, 试剂较为昂贵, 难以普及。建立免疫学诊断方法, 首先要得到一定量的高纯度抗原, 然后通过免疫动物制备高效价的多克隆或单克隆抗体。由于人体内该物质含量极低<sup>[5]</sup>(仅为pg水平), 通过组织或血浆提取不可行。本文旨在通过基因工程方法得到BNP, 并通过免疫BALB/c小鼠制备高效价的多克隆抗体, 为制备单克隆抗体并最终建立检测血浆中BNP水平的快速方法奠定基础。

### 1 材料与方法

1.1 菌种、质粒 所用菌株 *E. coli* BL21(DE3)、DH5α 为本实验室保存; pUCm-T购自上海申能博彩生物科技有限公司, pGEX4T-2购自Amersham公司。

1.2 主要试剂及酶类 XhoI, BamHI、T4DNA连接酶、Taq DNA聚合酶、100 bp ladder购自Takara

[收稿日期] 2005-11-23

[作者单位] 上海交通大学医学院 上海市医学检验重点实验室, 上海 200023

[作者简介] 李卫鹏(1973-), 男, 博士研究生。

[通讯作者] 郑佐娅, 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 免疫学测定。

宝生物工程有限公司; IPTG、250 bp ladder DNA 胶回收试剂盒 3S DNA Gel Purification Kit V3 1及质粒抽提试剂盒 3S Plasmid Miniprep kit V3 1购自上海申能博彩生物科技有限公司; 羊抗人 BNP 购自 Santa Cruz 公司, 硝酸纤维膜购自 BD-RAD 公司; 蛋白质 BCA 法定量检测试剂购自 PIERCE 公司。PMSF 购自 Sigma 公司。低相对分子量标准蛋白质为中国科学院上海生物制品研究所产品。正常成人心脏 cDNA 购自美国 Clontech 公司。GSH-agarose 亲和层析柱购自 Amersham 公司; SDS-PAGE 电泳仪和电转移装置为 BD-RAD 公司产品。6~8 周龄 BALB/c 小鼠, 为本实验室饲养。

1.3 PCR 扩增及产物纯化 根据 GENE BANK 中人 BNP 序列设计特异性引物 P1、P2 P1 引物 5' 端引入了 *Bam*HI 酶切位点, P2 引物 5' 端引入了 *Xho*I 酶切位点, 引物由上海申能博彩生物科技有限公司合成。

P1: 5'-CCGGATCCAGCCCCAAGATGGTGCAA-3'  
P2: 5'-CCCTCGAGAATGCCGCCCTCAGCACTF-3'

在 50  $\mu$ l PCR 反应体系中, 分别加入 1  $\mu$ l dNTP, dDNA 模板 3  $\mu$ l P1 和 P2 各 1.5  $\mu$ l 5 u $\mu$ l 的 Taq DNA 聚合酶 1  $\mu$ l 按照以下条件进行 PCR 扩增: 94  $^{\circ}$ C 变性 5 min 然后 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s 56  $^{\circ}$ C 退火 30 s 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min 循环 35 次, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min 所得 PCR 产物进行 20 mg/ml 琼脂糖凝胶电泳, 同时用 DNA 胶回收试剂盒纯化。

1.4 重组测序质粒的构建与鉴定 按照 TA 克隆试剂盒说明, 将纯化的 PCR 产物连至 pUCm-T 载体中, 用常规氯化钙转化法转化 DH5 $\alpha$  感受态中, 扩增后接种至含 Amp 与半乳糖苷指示剂的 LB 平板用 PCR 的方法鉴定重组子。

1.5 质粒抽提及克隆测序 用试剂盒 3S Plasmid Miniprep kit V3 1 抽提质粒, 由上海申能博彩生物科技有限公司提供测序服务。

1.6 原核重组表达质粒 pGEX-4T2-BNP 的构建、鉴定和表达 经测序验证的 pUCm-T-BNP 质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切后与表达载体 pGEX-4T2 连接, 转化入表达宿主 BL21 (DE3), 在含 Amp 的 LB 平板上培养, 挑选阳性菌落在液体培养基中摇长。PCR 和酶切鉴定。37  $^{\circ}$ C 培养至细菌培养液  $A_{600}$  为 0.5~0.8 时, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L, 诱导表达 4 h。6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 经裂解后用 Amersham 的 GSH-agarose 亲和

层析柱纯化表达产物。用 BCA 法进行蛋白定量测定。

1.7 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 鉴定 纯化产物经 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶浓度为 4%, 电流强度为 15 mA; 分离胶浓度为 12.5%, 电流强度为 25 mA。电泳结束后, 以 0.8 mA/cm<sup>2</sup> 恒流, 室温下 1 h 将蛋白质电转移至 NC 膜上。NC 膜以 10% 小牛血清封闭过夜。经 pH 7.4 0.02 mol/L PB 漂洗 3 次后, 加入 1:100 稀释的羊抗人 BNP 多抗, 室温反应 1 h (或 4  $^{\circ}$ C 过夜), PB 漂洗 3 次, 再与抗羊的二抗反应 1 h 充分洗涤, ECL 试剂盒显色 (Amersham)。

1.8 动物免疫 取 6~8 周龄、体重 20 g 左右的 BALB/c 小鼠 3 只, 于第 1、15 日分别腹腔接种上述自制备的原核表达蛋白, 每只 100  $\mu$ g 于第 35、50 日分别尾静脉注射上述自制备的原核表达蛋白每只 50  $\mu$ g 第 1 次接种时抗原溶于福氏完全佐剂, 第 2 次溶于福氏不完全佐剂, 第 3、第 4 次溶于生理盐水。在第 3 次免疫 1 周后, 取小鼠眼眶血以间接 ELISA 法测定抗体效价。

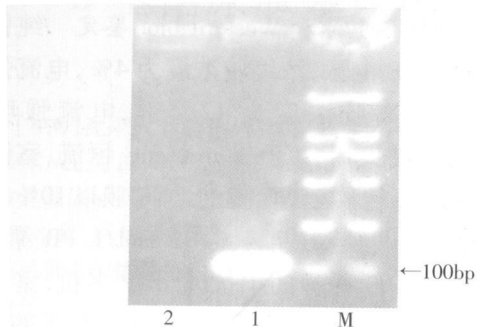
1.9 抗体滴度检测 以 pH 8.0 0.02 mol/L Tris HCl 缓冲液将 BNP 原核表达蛋白稀释至 10  $\mu$ g/ml 包被聚氯乙烯酶标板, 每孔 100  $\mu$ l 置 4  $^{\circ}$ C 24 h。取出, 拍干, 以 0.5% 牛血清白蛋白的 0.02 mol/L, pH 7.2 PB 液封闭过夜。取出甩干液体, 吹干, 4  $^{\circ}$ C 干燥贮存备用。临用时以 pH 7.2, 0.02 mol/L PB 缓冲液洗 3 次, 每次 3 min 拍干。每孔加入 100  $\mu$ l 待测抗血清, 37  $^{\circ}$ C 温育 1 h 取出, 洗 3 次, 每次 3 min 每孔加入 1:1 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 100  $\mu$ l 37  $^{\circ}$ C 温育 45 min 取出, 洗 4 次, 每次 3 min 每孔加入 100  $\mu$ l 邻苯二胺底物液, 37  $^{\circ}$ C 避光反应 10 min 加 25  $\mu$ l 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 置酶标仪上波长 490 nm 比色测定。实验时设阴性、试剂空白对照。

## 2 结果

2.1 BNP 特异性扩增产物基因片段结果 以购自 Clontech 公司的正常成人心脏组织 cDNA 为模板, 经特异性引物扩增得到约 96 bp 的基因条带, 与预期的目的基因条带大小相符 (见图 1)。

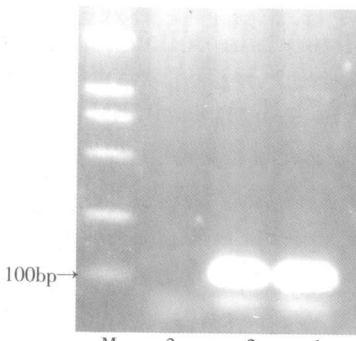
2.2 测序载体构建与鉴定 将 BNP 特异性 PCR 扩增产物连接到 pUCm-T 载体, 并转化入 DH5 $\alpha$  中, 通过蓝白筛选、增菌及抽提质粒后, 重组质粒 pUCm-T-BNP 经 PCR 扩增, 经 20 mg/ml 琼脂糖凝胶电泳, 可见约 100 bp 左右的条带; 而空质粒 pUCm-T (对照)

经 PCR 扩增未见该条带;表明目的片段已插入测序载体(见图 2)。



M.DNA 标准 Marker;1.扩增产物;2.对照(反应体系中不加入模板 cDNA)

图 1 BNP 扩增产物电泳结果



M.DNA 标准 Marker;1.2.扩增产物;  
3.对照(空质粒 pUCm-T)

图 2 重组质粒扩增产物电泳结果

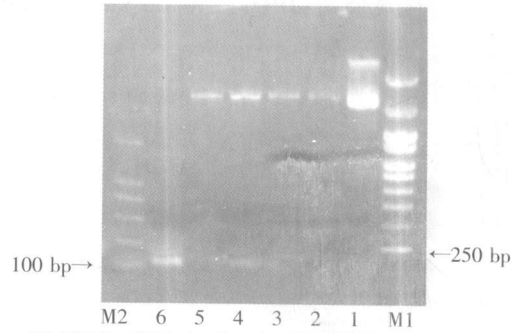
2.3 核苷酸序列测定 经对阳性克隆测序发现:已插入测序载体的目的片段基因序列与 Genebank 报道完全一致,表明得到了预期的目的片段。

2.4 原核重组表达质粒载体构建与鉴定 将上述经测序验证的含有目的片段 pUCm-T-BNP 质粒和空 pGEX-4T-2 用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切后,把 BNP 连至 pGEX-4T-2 上,转化入宿主菌 BL21。在含有抗生素 Amp 的平板上,筛选几个阳性克隆,扩增,抽提质粒 DNA,鉴定采用 PCR、双酶切法,表明含目的片段。

2.4.1 PCR 初步鉴定 以构建好的重组表达质粒载体(同时设空质粒 pGEX-4T-2 作为对照)为模板进行 PCR,电泳后可见在 100 bp 处有明显条带;而对照则无(见图 3)。

2.4.2 双酶切鉴定 重组表达质粒 pGEX-4T-2-BNP 用 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切。20 mg/L 琼脂糖胶电泳,结果表明含有目的片段(见图 3)。

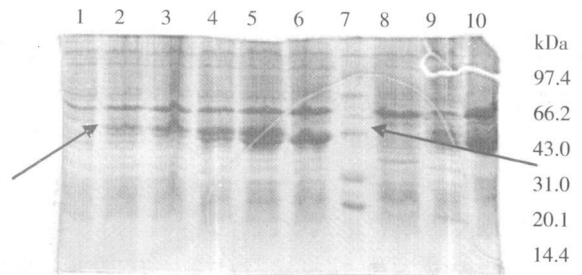
2.5 SDS-PAGE 检测表达及诱导表达结果 将含有原核表达重组质粒的单克隆细菌进行扩增,当细菌培养液 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6 时,加入 IPTG 至其终浓



M1.250 bp DNA Marker;1.重组质粒 pGEX-4T-2-BNP;2.重组质粒用 *Xho*I 单切;3.重组质粒用 *Bam*HI 单切;4.重组质粒用 *Xho*I,*Bam*HI 双切;5.质粒 pGEX-4T-2 用 *Xho*I,*Bam*HI 双切;6.重组质粒特异性扩增片段;M2.100 bp DNA Marker

图 3 原核重组表达质粒载体鉴定

度为 1.0 mmol/L,诱导表达 4 h 离心沉淀细菌培养液、裂解后,12.5% SDS-PAGE 电泳, pGEX-4T-2-BNP 诱导前后蛋白电泳差别明显,诱导后在相对分子质量为 31 000 处附近均有一条明显条带(见图 4)。目的蛋白表达量随着诱导时间延长而增加, IPTG 诱导表达 4 h 时表达量最大。表达的目的蛋白大部分以可溶形式存在。



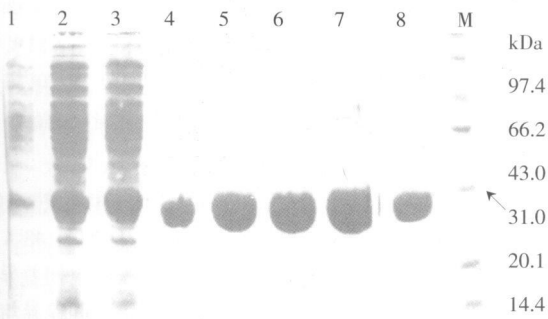
1.pGEX-4T-2-BNP 加 IPTG 诱导之前;2,3,4,5 分别为 pGEX-4T-2-BNP 加 IPTG 诱导 1 h,2 h,3 h,4 h 后;6. pGEX-4T-2 在 1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后;7.M 标准蛋白分子;8.不含质粒的 BL21(DE3) 在 1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后;9.pGEX-4T-2-BNP 诱导 4 h 后细菌裂解液上清;10.pGEX-4T-2-BNP 诱导 4 h 后细菌裂解液沉淀

图 4 pGEX-4T-2-BNP 诱导前后蛋白电泳图谱

2.6 诱导蛋白的纯化 pGEX-4T-2-BNP 诱导后的融合蛋白 BNP-GST,通过 GSTH-Agarose 柱层析,得到比较纯的目的蛋白 95%以上(见图 5),经过蛋白定量(采用 BCA 法),500 ml 菌液得到纯化的融合蛋白为 9.6 mg

2.7 Western blot 鉴定结果 结果表明所表达的蛋白为人 BNP 蛋白(见图 6)。

2.8 抗体滴度 BALB/c 小鼠免疫 3 次后,眶静脉采血,测得的滴度为 1:16 000 第 4 次免疫后达到 1:32 000



1,2,3为 pGEX-4T-2-BNP 在 IPTG 诱导后的菌体蛋白电泳;4,5,6,7,8 为纯化蛋白;M.标准蛋白分子

图 5 纯化蛋白电泳图谱



1.纯化蛋白;2.对照(不加一抗)

图 6 Western blot 鉴定结果

### 3 讨论

BNP 是一个由 32 个氨基酸残基构成的多肽类神经激素, 分子量为 3 500。其氨基端第 7 位和第 23 位氨基酸残基(半胱氨酸)通过二硫键形成一个环型结构, 此即为 BNP 功能域。BNP 通过此构象与其相应的受体结合, 在诸多病理生理过程中发挥作用。血浆中的 BNP 水平在许多病理生理状态下均有所改变。研究表明, BNP 在心力衰竭、急性心肌梗死等心血管疾病的诊断及预后判断等方面有重要价值。由于 BNP 的测定简便易行, 准确可靠, 近年来在心血管疾病的诊疗中日益得到广泛应用。

由于 BNP 的分子量较小, 而具有较好免疫原性的蛋白质的分子量宜在 10 000 以上<sup>[6]</sup>。本文对 BNP 进行了与谷胱甘肽转硫酶 (glutathione S transferase GST) 的融合表达, GST 的分子量为 26 000, 因而融合蛋白的分子量在 29 500 左右, 较为理想。选用能表达 GST 的 pGEX-4T-2 作为原核表达质粒。

以成人心脏组织 cDNA 为模板, 根据文献<sup>[7]</sup>设计一对引物, 并在上下游引物中分别设计限制性内切酶 *Bam*HI、*Xho*I 的识别位点。经过 PCR 得到目的片段。随后构建测序载体, 经测定碱基序列, 并与 Genebank 比对, 完全一致。之后构建原核表达载体, 经过 PCR、酶切鉴定以及测序证实成功构建后, 对融合蛋白进行诱导表达。实验发现: 在 37 °C、

1 mmol/L IPTG 诱导下, 随着时间推移, 蛋白的表达量增加, 4 h 达到最大, 时间再延长, 表达量几乎不再增加。经过 SDS-PAGE 证实, 融合蛋白大部分以可溶性形式存在。这给纯化蛋白质带来了方便, 即不再需要进行复杂变性、复性处理。通过灰度扫描, 融合蛋白约占菌体总蛋白的 19%。本文从 500 ml 菌液纯化得到了 9.6 mg 的融合蛋白。蛋白的纯度在 95% 以上。融合蛋白经过鉴定, 证实其有一定的活性。

在对 BALB/c 小鼠进行 3 次免疫后, 测得的多抗效价为 1:16 000。经加强免疫后, 小鼠抗血清滴度达 1:32 000 为制备单克隆抗体奠定了基础。由于本文采用的是融合表达技术, 在单克隆抗体制备过程中的工作量会比较大, 即在筛选时, 只有那些只与 BNP-GST 反应而不与 GST 反应而且与 BNP-GST 具有高效价的细胞株才是有价值的细胞株。

本研究表达了 BNP, 解决了 BNP 的来源问题, 在表达的同时采用了融合技术, 克服了 BNP 因为分子量小而免疫原性的不足之处。得到了较高效价的多抗, 为最终建立检测方法奠定了基础。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Wieczorek SJ, Wu AH, Christenson R, et al. A rapid B-type natriuretic peptide assay accurately diagnoses left ventricular dysfunction and heart failure [J]. *Am Heart J* 2002; 144(5): 834-839.
- [2] Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, et al. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent care setting [J]. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(2): 379-385.
- [3] Selvais PL, Donckier JE, Robert A, et al. Cardiac natriuretic peptides for diagnosis and risk stratification in heart failure [J]. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(8): 636-642.
- [4] Klinge R, Hystad M, Kjekshus J, et al. An experimental study of cardiac natriuretic peptides as markers of development of congestive heart failure [J]. *Scand J Clin Lab Invest* 1998; 58(8): 683-692.
- [5] Clerico A, Iervasi G, Mariani G. Pathophysiologic relevance of measuring the plasma levels of cardiac natriuretic peptide hormones in humans [J]. *Hum Metab Res* 1999; 31(9): 487-498.
- [6] 周光炎主编. 免疫学原理 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000: 3.
- [7] Sudoh T, Maekawa K, Kojima M, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human brain natriuretic peptide [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159(3): 1427-1434.