



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101935354 A

(43) 申请公布日 2011.01.05

(21) 申请号 201010228835.4

(22) 申请日 2010.07.08

(71) 申请人 温州医学院

地址 325035 浙江省温州市茶山高教园区温州医学院

(72) 发明人 高基民 邹立林 郭芳芳 许晓玲

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

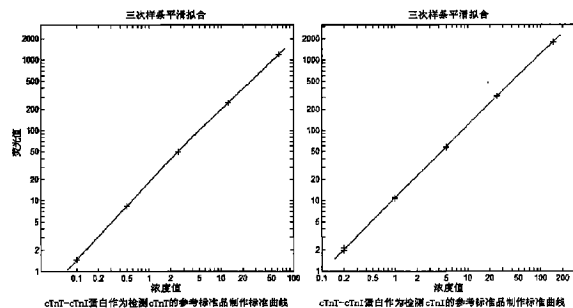
权利要求书 1 页 说明书 4 页 序列表 5 页
附图 2 页

(54) 发明名称

人心肌肌钙蛋白 T/人心肌肌钙蛋白 I 融合蛋白

(57) 摘要

本发明提供了一种融合蛋白,该蛋白由人心肌肌钙蛋白 T 和人心肌肌钙蛋白 I 连接而成。研究证实,该融合蛋白既有人心肌肌钙蛋白 T 的抗原活性,也有人心肌肌钙蛋白 I 的抗原活性。时间分辨荧光免疫分析是一种灵敏度非常高、线性范围宽、定量准确的免疫学方法,本发明融合蛋白拟用作时间分辨荧光免疫分析检测 cTnT 和 cTnI 的通用参考标准品,建立检测 cTnT 和 cTnI 的新方法,从而对心肌损伤进行特异、准确、快速的诊断。



1. 一种融合蛋白,该蛋白由人心肌肌钙蛋白 T 和人心肌肌钙蛋白 I 连接而成。
2. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白,其特征在于所述的人心肌肌钙蛋白 I 的末端连接有纯化标签。
3. 一种基因,该基因编码权利要求 1 或 2 融合蛋白。
4. 一种表达载体,该表达载体含有权利要求 3 所述的基因。
5. 一种工程菌,该工程菌转化了权利要求 4 所述的表达载体。
6. 权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白在时间分辨荧光免疫分析检测 cTnT 和 cTnI 中作为通用参考标准品的应用。

人心肌肌钙蛋白 T/ 人心肌肌钙蛋白 I 融合蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程和蛋白质工程领域,利用基因工程技术生产人心肌肌钙蛋白 T- 人心肌肌钙蛋白 I 双功能融合蛋白。

背景技术

[0002] 肌钙蛋白是肌肉收缩的调节蛋白,包括三种亚型:骨骼肌快肌型、骨骼肌慢肌型和心肌型,由三个亚基组成:肌钙蛋白 C(Troponin C, TnC)、肌钙蛋白 T(Troponin T, TnT) 和肌钙蛋白 I(Troponin I, TnI)。肌钙蛋白 C 在骨骼肌和心肌中是相同的,但心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT) 和心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI) 是心肌特有的,与两种骨骼肌亚型的氨基酸序列不同。cTnT 和 cTnI 以两种形式存在:游离形式存在于胞浆中,结合形式存在于心肌肌纤维上。在心肌细胞膜完整状态下,cTnT 和 cTnI 不能透过细胞膜进入血循环,故健康人血内不含或含极低量的 cTnT 和 cTnI。心脏损伤早期,心肌细胞未坏死,但细胞膜破坏,游离形式的 cTnT 和 cTnI 进入组织间隙,经淋巴回流入血。急性心肌梗死患者发生不可逆性心肌缺血,心肌细胞坏死,肌纤维降解,可导致结合池 cTnT 和 cTnI 释放,血中 cTnT 和 cTnI 可显著升高,并维持很长时间。

[0003] cTnT 和 cTnI 具有心肌特异性,是目前最好的特异性标志物,现已取代 CK-MB 成为心肌损伤的诊断“金标准”。本研究利用基因工程技术生产人心肌肌钙蛋白 T- 人心肌肌钙蛋白 I 融合蛋白,作为检测 cTnI、cTnT 的通用参考标准品。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题:研制时间分辨荧光免疫分析(time-resolved immunofluorometric assay, TRFIA) 检测 cTnT 和 cTnI 试剂盒的参考标准品。

[0005] 本发明解决上述技术问题的技术方案是:

[0006] 利用基因工程技术生产人心肌肌钙蛋白 T- 人心肌肌钙蛋白 I 融合蛋白。

[0007] 本发明融合蛋白通过将人心肌肌钙蛋白 T 和人心肌肌钙蛋白 I 通过基因重组、转化构建工程菌表达获得,其中基因重组和转化的方法均为本领域普通技术人员所熟识的技术。人心肌肌钙蛋白 T 和人心肌肌钙蛋白 I 通过 Leu-Asp 进行连接。为了便于融合蛋白的分离纯化,本发明所述的融合蛋白的 C 端连接有组氨酸标签。

[0008] 本发明还提供一种编码本发明融合蛋白的多核苷酸,该多核苷酸由人心肌肌钙蛋白 T cDNA、人心肌肌钙蛋白 I cDNA 通过 CTCGAC 连接而成;该多核苷酸人心肌肌钙蛋白 I cDNA 的末端还可以连接有 CAC CAC CAC CAC CAC CAC。

[0009] 将所述的编码本发明融合蛋白的多核苷酸通过基因重组插入到原核表达载体中,然后转化大肠杆菌可获得高效表达本发明融合蛋白的工程菌;所述的原核表达载体可以是 pET24a 或 pET24b,大肠杆菌为 Rosetta。

[0010] 本发明融合蛋白在上述工程菌中主要以包涵体形式表达,分离纯化后即可获得本发明融合蛋白。

[0011] 本发明融合蛋白同时具有人心肌肌钙蛋白 T 和人心肌肌钙蛋白 I 的抗原活性,可作为时间分辨荧光免疫分析 (time-resolved immunofluorometric assay, TRFIA) 检测 cTnT 和 cTnI 试剂盒的通用参考标准品。

附图说明

[0012] 图 1 是 cTnT-cTnI-6His-pET24 重组质粒的结构图。

[0013] 图 2 是融合蛋白 CFP10-L-SA-6His 的表达 SDS-PAGE 电泳图,其中 1 是分子量标准 (97.2、66.4、44.3、29、20、14.3KD),2 是工程菌诱导前,3 是工程菌诱导后;4 是破菌破上清,5 是包涵体,6 是纯化产物 (66.2KD)

[0014] 图 3 是 cTnT-cTnI 融合蛋白作为时间分辨荧光免疫分析双抗夹心法检测 cTnT、cTnI 的参考标准品制作的标准曲线图。

[0015] 图 4 是时间分辨荧光免疫分析双抗夹心法检测 cTnT、cTnI 的临床应用。

[0016] 下面将通过实施例进一步说明本发明以及本发明具有的技术效果。

具体实施方式

[0017] 下述实施例和实验所用的材料及设备如下:

[0018] 菌株与质粒:大肠杆菌 DH5a 和 Rosetta;原核表达质粒 pET24a(Kana^r, Novagen);原核表达质粒 pET24a-cTnT(本室构建)、原核表达质粒 pET24a-cTnI(Kana^r, Novagen)(本室构建)。

[0019] 主要生化试剂及材料:Trizol, SuperScript II 逆转录酶,寡核苷酸的合成(Sigma),PlatinumPfx DNA 聚合酶,T4 DNA 连接酶(Invitrogen),质粒 DNA 的制备试剂盒(Qiagen),cTnT 标准品(Biodesign),cTnI 标准品(Biodesign),琼脂糖和 SDS-PAGE(Biorad),Ni-NTA(Qiagen) 填料,两株抗 cTnT 单克隆抗体(Biodesign)、两株抗 cTnI 单克隆抗体(Biodesign)。

[0020] DNA 片段的连接、转化及转化子筛选,限制性内切酶分析,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等常规方法均参照文献(Sambrook J,et al.Molecular Cloning-A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Laboratory Press,New York,2nd edition,1989)或厂家提供的产品说明书,DNA 序列分析在大连宝生物工程公司的 DNA 测序服务中心完成。

[0021] 例 1 融合蛋白 cTnT-cTnI 的制备

[0022] 1、自学校解剖室取人心肌组织一小块,用 Trizol 试剂提取总 RNA,作为模板,用 SuperScript II 逆转录酶进行逆转录,然后通过 Platinum pfx DNA 聚合酶进行 PCR 扩增 cTnTcDNA、cTnI cDNA。

[0023] 扩增 cTnT cDNA 引物:CGCCATATGTCTGACATAGAAGAGGTG 和 CCGCTCGAGTTTCCAGCGCCCGGTGAC。

[0024] 反应条件:变性 94℃,5min,循环(94℃,45s → 60℃,45s → 72℃,60s)25 轮,最后 72℃,5min。

[0025] 扩增 cTnI cDNA 引物:GCCGAATTCATGGCGGATGGGAGCAGC 和 CCGCTCGAGCAGCTCTCAAACCTTTTCTTG。

[0026] 反应条件:变性 94℃,5min,循环(94℃,45s → 58℃,45s → 72℃,50s)25 轮,最后

72°C, 5min。

[0027] 2、构建 pET24a-cTnT 重组质粒

[0028] PCR 扩增制备的 cTnT cDNA (不含终止码, 两端分别含 Nde I 和 Xho I 限制性内切酶位点), 将 cTnT cDNA 基因片段克隆于 pET-24a 载体中, 获得 pET24a-cTnT 重组质粒, 经 DNA 序列分析鉴定, 验证其正确无误。

[0029] 3、构建 pET24a-cTnI 重组质粒

[0030] PCR 扩增制备的 cTnI cDNA (不含终止码, 两端分别含 EcoR I 和 Xho I 限制性内切酶位点), 将 cTnI cDNA 基因片段克隆于 pET-24a 载体中, 获得 pET24a-cTnI 重组质粒, 经 DNA 序列分析鉴定, 验证其正确无误。

[0031] 4、构建 pET24a-cTnT-cTnI 重组质粒

[0032] 重新设计 cTnI 的上游引物, 使其带有 Sal I 限制性内切酶位点 (与 Xho I 为同尾酶), 序列为: ACGCGTCGACATGGCGGATGGGAGCAGCGA, 用此引物与上述 cTnI 下游引物以 pET24a-cTnI 重组质粒为模板重新扩增 cTnI cDNA。

[0033] 反应条件: 变性 94°C, 5min, 循环 (94°C, 45s → 58°C, 45s → 72°C, 60s) 25 轮, 最后 72°C, 5min。

[0034] 将 cTnI PCR 产物用 Sal I 与 Xho I 进行双酶切, 将 pET24a-cTnT 重组质粒用 Xho I 进行酶切, 纯化后用 T4 DNA 连接酶进行连接, 转化 DH5a。根据菌落 PCR (用 cTnT 上游引物和 cTnI 下游引物扩增) 筛选阳性菌落, 经 DNA 序列分析鉴定, 验证其正确无误。

[0035] 5、构建 pET24a-cTnT-cTnI/Rosetta 工程菌

[0036] pET24a-cTnT-cTnI 重组表达质粒转化后 Rosetta 感受态细胞后, 用含卡那霉素的 LB 平皿筛选。挑取转化平皿上的单菌落接种于加有卡那霉素 (20 μg/ml) 的 LB 培养基中。经 37°C 摇床培养扩增至吸光度 A₆₀₀ 为 0.4 ~ 0.5 时, 加入终浓度为 0.1mmol/L 的 IPTG, 37°C 诱导表达 4h, 离心 (8000g × 10min) 收获菌体, 将细胞破碎后用 12% 的 SDS-PAGE 检测分析融合蛋白的表达情况。

[0037] 5、融合蛋白的表达

[0038] 融合蛋白 cTnT-cTnI 在菌体中主要以包涵体的形式存在, 其表达量达 20 ~ 30%。结果如图 2 所示。

[0039] 6、从包涵体中获得融合蛋白 cTnT-cTnI

[0040] a. 制备包涵体: 5 克菌体悬于 100ml 1xPBS 中, 冰浴中超声 (电流 270mA), 30 秒 × 10 次 (每次间隔 30 秒); 接着于 4°C 离心 10 分钟 (8000g), 将沉淀悬浮于 100ml 1xPBS (内含 4mol/L 尿素, 0.5% Triton X-100, 20mmol/L EDTA) 中进行漂洗, 随后离心 (1000g × 10 分钟) 收集沉淀; 漂洗两次后, 溶于 50mmol/L 磷酸钠缓冲液, 8mol/L 尿素 (pH 8.0) 中, 15000g × 15 分钟, 取上清液。

[0041] b. Ni-NTA 柱层析: 将步骤 a 得到的上清液上样于 Ni-NTA 柱 (2.6 × 5cm), 用平衡液 (50mmol/L 磷酸钠缓冲液, 8mol/L 尿素, 0.5mmol/L NaCl, pH8.0) 进行冲洗至样品 A₂₈₀ 恢复至基线; 然后用洗脱液 (50mmol/L 磷酸钠缓冲液, 8mol/L 尿素, 0.5mmol/L NaCl, pH8.0, 其中咪唑分别为 30mmol/L, 50mmol/L, 100mmol/L, 200mmol/L) 进行洗脱, 洗脱液经 SDS-PAGE 鉴定, 收集融合蛋白质峰 (融合蛋白 cTnT-cTnI 的分子量为 66.2KD)。

[0042] c. 透析复性: 将 Ni-NTA 柱层析纯化获得的融合蛋白 cTnT-cTnI 调至 OD₂₈₀ = 0.2,

在大于 20 倍体积的透析液 (50mmol/L 磷酸钠缓冲液, 4.0mol/L 尿素, 0.2mmol/L NaCl, 5% 甘油, pH8.0) 中 4℃ 透析复性 8 小时; 然后在 50mmol/L 磷酸钠缓冲液, 2.0mol/L 尿素, 2.5% 甘油, pH8.0) 中 4℃ 透析复性 8 小时; 再在 50mmol/L 磷酸钠缓冲液, 1.0mol/L 尿素, 1.25% 甘油, pH8.0) 中 4℃ 透析复性 8 小时; 最后在 50mmol/L 磷酸钠缓冲液中继续透析 8 小时; 离心除去不溶物, 收集上清。将收集的融合蛋白质液调至 pH8.0, 并过滤除菌分装, 储存于 -20℃。

[0043] 所得融合蛋白 cTnT-cTnI 用 SDS-PAGE 鉴定, 结果如图 2 所示。

[0044] 例 2 cTnT-cTnI 融合蛋白作为通用参考标准品在时间分辨荧光免疫分析检测 cTnT 和 cTnI 中的应用。

[0045] 1、在时间分辨荧光免疫分析检测 cTnT 中的应用

[0046] 建立时间分辨荧光免疫分析双抗夹心检测 cTnT 的方法, 以 cTnT 标准品 (Biodesign 购买) 建立标准曲线。将 cTnT-cTnI 融合蛋白进行 5 倍系列递比稀释, 用时间分辨荧光免疫分析对 cTnT-cTnI 融合蛋白进行定标 (确认其检测 cTnT 的有效浓度)。定标后作为参考标准品 (取代昂贵进口标准品), 用标准品稀释液将 cTnT-cTnI 融合蛋白分别稀释为 0.1、0.5、2.5、12.5、62.5ng/ml, 两个复孔取平均值, 制作参考标准曲线, $Y = 1.04X + 4.02$, $R = 0.9993$ 。结果如图 3 所示。

[0047] 2、在时间分辨荧光免疫分析检测 cTnI 中的应用

[0048] 建立时间分辨荧光免疫分析双抗夹心检测 cTnI 的方法, 以 cTnI 标准品 (Biodesign 购买) 建立标准曲线。将 cTnT-cTnI 融合蛋白进行 5 倍系列递比稀释, 用时间分辨荧光免疫分析对 cTnT-cTnI 融合蛋白进行定标 (确认其检测 cTnI 的有效浓度)。定标后作为参考标准品 (取代昂贵进口标准品), 用标准品稀释液将 cTnT-cTnI 融合蛋白分别稀释为 0.2、1、5、25、125ng/ml, 两个复孔取平均值, $Y = 1.02X + 3.06$, $R = 0.9998$ 。制作参考标准曲线, 结果如图 4 所示。

[0049] 例 3 时间分辨荧光免疫分析检测 cTnT、cTnI 的临床应用:

[0050] 对照组: 120 名健康体检者, 无特殊临床表现, 男性 68 名, 女性 52 名, 年龄 30 ~ 80 岁。

[0051] 疾病组: 96 例内科住院心血管病患者或既往有过典型或隐匿型心绞痛史的患者, 男性 62 例, 女性 34 例, 年龄 45 ~ 85 岁, 其中 AMI 患者 29 例, 典型心绞痛史患者 35 例, 隐匿型心绞痛史患者 32 例。

[0052] 对以上样本, 利用我们建立的时间分辨免疫分析法来检测 cTnI。

[0053] 统计分析: 各疾病组和健康对照组检测 cTnT、cTnI 的结果分析采用 t 检验。结果如表 1 所示, $P < 0.01$ 。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 温州医学院
 <120> 人心肌肌钙蛋白 T/人心肌肌钙蛋白 I 融合蛋白
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> CHAIN
 <222> (1)..(288)
 <223> 人心肌肌钙蛋白 T

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (289)..(290)
 <223> 人心肌肌钙蛋白 T 和人心肌肌钙蛋白 I 通过 Leu-Asp 连接, 人心肌肌钙蛋白 T 基因 3' 端和人心肌肌钙蛋白 I 基因 5' 端通过 Xho I / Sal I 同尾酶酶切后进行连接。

<220>
 <221> CHAIN
 <222> (291)..(500)
 <223> 人心肌肌钙蛋白 I

<400> 1

Met Ser Asp Ile Glu Glu Val Val Glu Glu Tyr Glu Glu Glu Glu Gln
 1 5 10 15
 Glu Glu Ala Ala Val Glu Glu Gln Glu Glu Ala Ala Glu Glu Asp Ala
 20 25 30
 Glu Ala Glu Ala Glu Thr Glu Glu Thr Arg Ala Glu Glu Asp Glu Glu
 35 40 45
 Glu Glu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asp Gly Pro Met Glu Glu Ser Lys

[0002]

<222> (291)..(502)

<223> 人心肌肌钙蛋白 I, 在其基因的 3' 端含有 XhoI 的酶切位点。

<220>

<221> CHAIN

<222> (503)..(508)

<223> 组氨酸标签

<400> 2

```

Met Ser Asp Ile Glu Glu Val Val Glu Glu Tyr Glu Glu Glu Glu Gln
1           5           10           15
Glu Glu Ala Ala Val Glu Glu Gln Glu Glu Ala Ala Glu Glu Asp Ala
           20           25           30
Glu Ala Glu Ala Glu Thr Glu Glu Thr Arg Ala Glu Glu Asp Glu Glu
           35           40           45
Glu Glu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asp Gly Pro Met Glu Glu Ser Lys
           50           55           60
Pro Lys Pro Arg Ser Phe Met Pro Asn Leu Val Pro Pro Lys Ile Pro
65           70           75           80
Asp Gly Glu Arg Val Asp Phe Asp Asp Ile His Arg Lys Arg Met Glu
           85           90           95
Lys Asp Leu Asn Glu Leu Gln Ala Leu Ile Glu Ala His Phe Glu Asn
           100          105          110
Arg Lys Lys Glu Glu Glu Glu Leu Val Ser Leu Lys Asp Arg Ile Glu
           115          120          125
Arg Arg Arg Ala Glu Arg Ala Glu Gln Gln Arg Ile Arg Asn Glu Arg
           130          135          140
Glu Lys Glu Arg Gln Asn Arg Leu Ala Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu
145          150          155          160
Glu Glu Glu Asn Arg Arg Lys Ala Glu Asp Glu Ala Arg Lys Lys Lys
           165          170          175
Ala Leu Ser Asn Met Met His Phe Gly Gly Tyr Ile Gln Glu Gln Ala
           180          185          190
Gln Thr Glu Arg Lys Ser Gly Lys Arg Gln Thr Glu Arg Glu Lys Lys
           195          200          205
Lys Lys Ile Leu Ala Glu Arg Arg Lys Val Leu Ala Ile Asp His Leu
210          215          220

```

[0005]

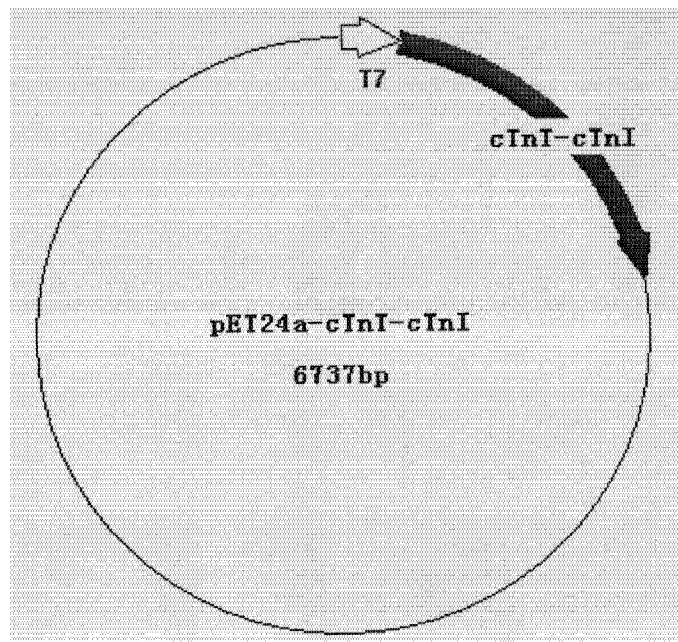


图 1

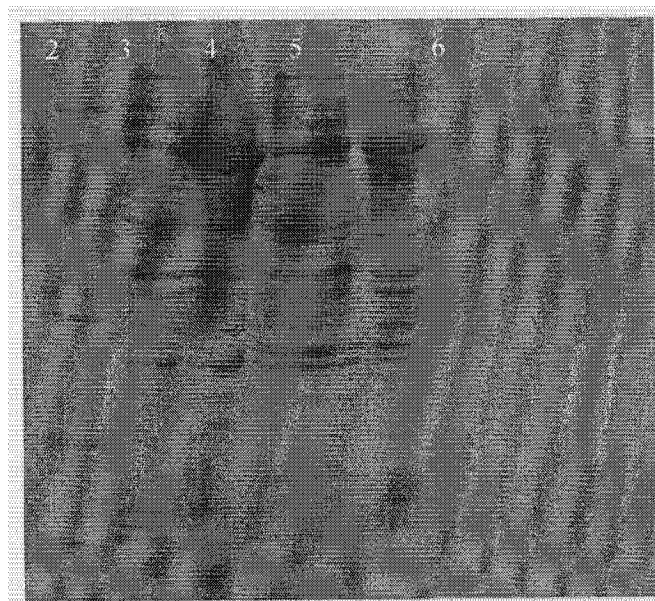


图 2

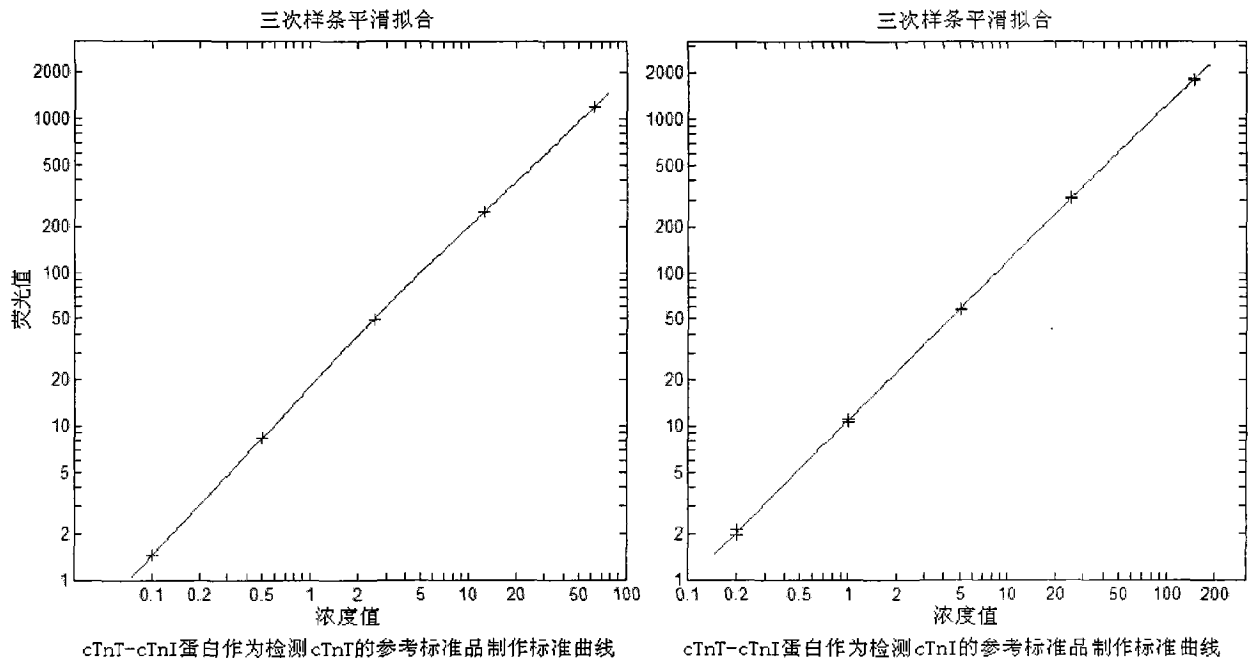


图 3

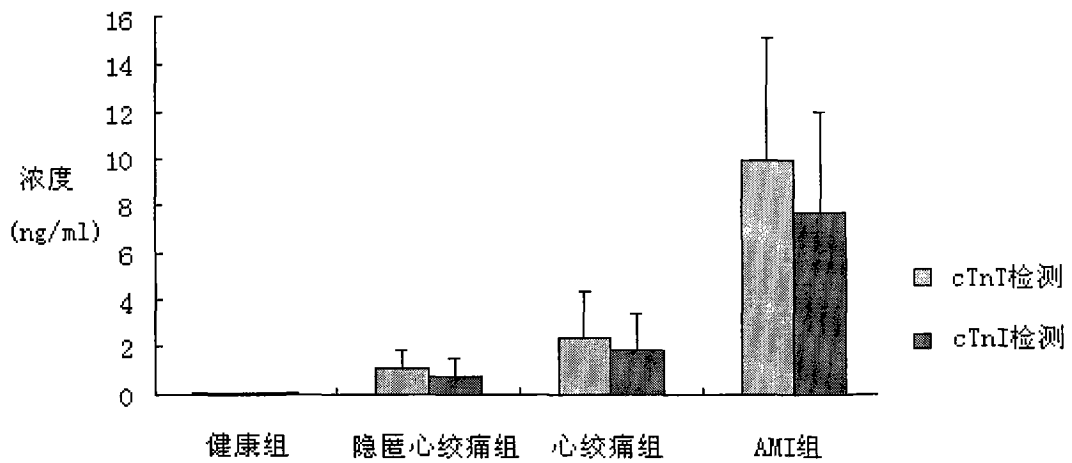


图 4

专利名称(译)	人心肌肌钙蛋白T/人心肌肌钙蛋白I融合蛋白		
公开(公告)号	CN101935354A	公开(公告)日	2011-01-05
申请号	CN201010228835.4	申请日	2010-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	温州医科大学		
申请(专利权)人(译)	温州医学院		
当前申请(专利权)人(译)	温州医学院		
[标]发明人	高基民 邹立林 郭芳芳 许晓玲		
发明人	高基民 邹立林 郭芳芳 许晓玲		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/62 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53 G01N21/64		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种融合蛋白，该蛋白由人心肌肌钙蛋白T和人心肌肌钙蛋白I连接而成。研究证实，该融合蛋白既有人心肌肌钙蛋白T的抗原活性，也有人心肌肌钙蛋白I的抗原活性。时间分辨荧光免疫分析是一种灵敏度非常高、线性范围宽、定量准确的免疫学方法，本发明融合蛋白拟用作时间分辨荧光免疫分析检测cTnT和cTnI的通用参考标准品，建立检测cTnT和cTnI的新方法，从而对心肌损伤进行特异、准确、快速的诊断。

