

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810147715.4

[51] Int. Cl.

*G12N 15/12 (2006.01)*  
*G12N 15/70 (2006.01)*  
*G12N 1/21 (2006.01)*  
*C07K 14/47 (2006.01)*  
*C07K 16/18 (2006.01)*  
*G01N 33/577 (2006.01)*

[43] 公开日 2009 年 4 月 22 日

[11] 公开号 CN 101413001A

[51] Int. Cl. (续)

*G01N 33/531 (2006.01)*

[22] 申请日 2008.11.28

[21] 申请号 200810147715.4

[71] 申请人 四川省迈克科技有限责任公司

地址 611731 四川省成都市高新区百川路 16 号

[72] 发明人 喻 堃 王保宁 周文娟 吴 丹  
陈 丹

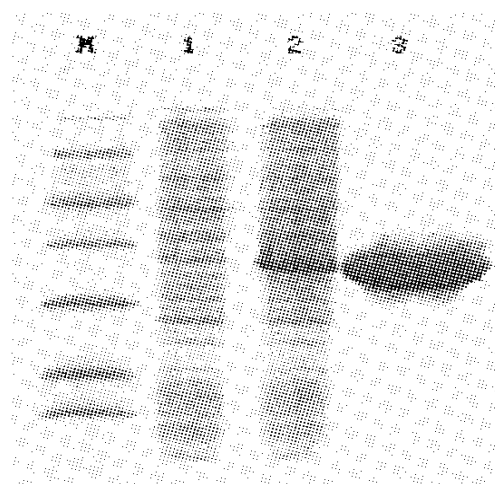
权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称

重组人胰抑素 C 基因及其表达与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种重组人胰抑素 C 基因及其表达与应用。该截短人胰抑素 C 基因具有 SEQ ID NO: 1 所示核酸序列；截短人胰抑素 C 蛋白具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列。本发明运用基因工程技术表达纯化大量稳定的重组可溶胰抑素 C 蛋白并利用该蛋白获得了一对单抗，进而制备了稳定的胰抑素 C 诊断试剂及其质控品。解决了我国人胰抑素测定试剂盒自主研发的瓶颈问题。



- 1、一种具有 SEQ ID NO :1 所示核酸序列的截短人胱抑素 C 基因。
- 2、一种具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的截短人胱抑素 C 蛋白。
- 3、一种根据权利要求 1 所述核酸序列制备重组可溶人胱抑素 C 蛋白的方法，其特征在于，包括下述步骤：
  - (1) 从新鲜人胎盘中获得总 RNA，用 RT-PCR 方法得到 SEQ ID NO :1 所示的截短人胱抑素 C 基因序列；
  - (2) 用步骤 (1) 获得的截短人胱抑素 C 基因序列与表达质粒重组，重组子经过 DNA 测序验证，确定重组表达质粒的序列和阅读框均正确；
  - (3) 用步骤 (2) 所获得的重组表达质粒转化表达宿主细胞；
  - (4) 培养宿主细胞并从细胞胞质中回收和纯化重组可溶性人胱抑素 C 蛋白。
- 4、根据权利要求 3 所述的制备重组可溶人胱抑素 C 蛋白的方法，其特征在于：所述表达载体为原核表达载体，且该原核表达载体的融合蛋白标签可对人胱抑素 C 蛋白的两对二硫键正确配对起到促进作用。
- 5、根据权利要求 4 所述的制备重组可溶人胱抑素 C 蛋白的方法，其特征在于：所述原核表达载体为 PET32a(+)
- 6、根据权利要求 3 所述的制备重组可溶人胱抑素 C 蛋白的方法，其特征在于：所述的表达宿主细胞为能够表达所述重组表达质粒的宿主细胞，且具有校正大肠杆菌密码子偏好性的特征。

7、根据权利要求6所述的制备重组可溶人胱抑素C蛋白的方法，其特征在于：所述的表达宿主细胞为大肠杆菌 *Rosseta gami II* (DE3)。

8、根据权利要求3所述的制备重组可溶人胱抑素C蛋白的方法，其特征在于：所述培养宿主细胞所用的培养基采用含抗生素基础培养基扩增培养宿主细胞，参数为：培养温度 35℃~37℃，培养时间 4~5h；诱导温度 35-37℃，诱导时间 3~5h；诱导物 IPTG 终浓度为 0.2~0.5mM。

9、根据权利要求3所述的制备重组可溶人胱抑素C蛋白的方法，其特征在于：筛选宿主细胞中高效表达的阳性表达菌株作为工程菌，重组可溶性人胱抑素C蛋白通过工程菌诱导培养后离心收集菌体，超声破碎后离心取上清经过镍柱一步纯化得到。

10、一种制备抗人胱抑素C不同表位的系列单克隆抗体或多克隆抗体的方法，其特征在于：运用按照权利要求3所述制备的重组可溶性人胱抑素C蛋白免疫实验动物获得单克隆抗体或多克隆抗体，通过位点叠加实验确定抗不同抗原表位的系列单克隆抗体；所述系列是指大于等于两株。

11、一种制备测定人体内人胱抑素C蛋白浓度诊断试剂的方法，其特征在于：运用权利要求10所制备的两株单克隆抗体通过化学交联剂分别与胶乳交联后混合于缓冲液中制备成诊断试剂，其中两株单克隆抗体摩尔比为 1:1。

12、根据权利要求11所述制备测定人体内人胱抑素C蛋白浓度

诊断试剂的方法，其特征在于：所述化学交联剂为 Sulfo-NHS, EDC. HCL。

13、一种制备人胱抑素 C 诊断试剂质控品的方法，其特征在于：按照权利要求 3 所述制备的重组可溶性人胱抑素 C 蛋白用保护性缓冲液分别调制到从低到高 5 个固定浓度后冻干制备。

14、根据权利要求 13 所述制备人胱抑素 C 诊断试剂质控品的方法，其特征在于：所述从低到高 5 个固定浓度是指按照权利要求 11 制备的诊断试剂的检测线性范围而定的浓度，所述 5 个固定浓度分别为 0.5ug/ml； 1ug/ml； 2ug/ml； 4ug/ml； 8ug/ml。

## 重组人胱抑素 C 基因及其表达与应用

### 技术领域

本发明属于生物技术领域，具体地，涉及一种重组人胱抑素 C 基因及其表达与应用。

### 背景技术

胱抑素 C (Cystatin C) 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族 2 中的成员之一。它的分子量为 13kD，是由 122 个氨基酸组成的低分子量非糖基化蛋白质 (M Abrahamson, et al. Biochemical Journal, 1990.)，含两对二硫键，且能在所有有核细胞中恒定、持续地转录及表达，可被看做 House keeping 基因 (黄君富等，医学临床生物化学与检验学分册)。近来的研究已经发现胱抑素 C 参与机体许多生理与病理过程，包括肿瘤的浸润性生长及转移、炎症的发生与发展以及组织纤维化 (张耀全，袁发焕等，2003, 23(6)) 等疾病。作为外分泌型蛋白，它广泛的存在于脑脊液、血液、唾液及精液等体液中且浓度较高。因胱抑素 C 是一种低分子量蛋白质，可经肾小球自由滤过，在近曲小管被重吸收并降解，肾脏是清除循环中胱抑素 C 的唯一器官，所以血清胱抑素 C 浓度主要由 GFR 决定，由此可见胱抑素 C 是一种理想的反映 GFR 变化的内源性标志物 (Grubb A, et al, Acta Med Scand, 1985)。同时有研究报道应用兔抗胱抑素 C 抗体建立的 ELISA 技术检测了急性心肌梗塞病人急性期、恢复期及正常对照组的血清胱抑素 C 水平，发现急性期与恢复期的自身对照并无显著性差异，但有意义的是这两者

的胱抑素 C 水平均显著低于正常对照组（冯建芳等，基础医学与临床，1995）。提示胱抑素 C 的血清浓度改变，在一定程度上可以作为急性心肌梗塞诊断的参考指标。

血清胱抑素 C 浓度的测定具有重要的诊断意义，但目前我国还没有自主研发的胱抑素 C 诊断试剂。究其原因制备胱抑素 C 诊断试剂盒需要特异性强和灵敏性高的抗胱抑素 C 单克隆抗体，而要得到该单克隆抗体就必须得到高纯度的胱抑素 C 蛋白，传统的从胎盘、尿液等组织中提取的胱抑素 C 蛋白浓度低，纯度差，批间差大无法用做免疫原制备单抗或制备诊断质控品。

## 发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一种重组人胱抑素 C 基因、该基因表达的重组蛋白及其制备方法，以及该蛋白的应用。

本发明解决上述技术问题所采用的技术方案是：一种具有 SEQ ID NO :1 所示核酸序列的截短人胱抑素 C 基因。

一种具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的截短人胱抑素 C 蛋白。

一种根据 SEQ ID NO :1 所示核酸序列制备重组可溶人胱抑素 C 蛋白的方法，包括下述步骤：（1）从新鲜人胎盘中获得总 RNA，用 RT-PCR 方法得到截短人胱抑素 C 的 DNA 序列；（2）用步骤（1）获得的 DNA 序列与表达质粒重组，重组子经过 DNA 测序验证，确定重组表达质粒的序列和阅读框均正确；（3）用步骤（2）所获得的重组表达质粒转化表达宿主细胞；（4）培养宿主细胞并从细胞胞质中回收和纯化重组可溶性人胱抑素 C 蛋白。

所述表达载体为能与人胱抑素蛋白的基因序列重组并形成表达质粒的表达载体，具体地，表达载体为原核表达载体，且该原核表达载体的融合蛋白标签可对人胱抑素 C 蛋白的两对二硫键正确配对起到促进作用，该原核表达载体可选 PET32a(+). 所述的表达宿主细胞为能够表达所述重组表达质粒的宿主细胞，且具有校正大肠杆菌密码子偏好性的特征，可选大肠杆菌 Rosseta gami II (DE3)。

本发明不限于特定的表达载体，在一优选实施方案中，本发明使用原核表达载体，例如：PET32a(+). 本发明不限于特定的宿主细胞，在一优选实施方案中，本发明使用大肠杆菌 Rosseta gami II (DE3)，Rosseta gami II (DE3) 购于 Merck 公司，是 Merck 公司自己对有特殊功能的大肠杆菌产品的命名。

所述培养宿主细胞所用的培养基采用含抗生素基础培养基扩增培养宿主细胞，参数为：培养温度 35℃~37℃，培养时间 4~5h；诱导温度 35~37℃，诱导时间 3~5h；诱导物 IPTG 终浓度为 0.2~0.5mM。

筛选宿主细胞中高效表达的阳性表达菌株作为工程菌，重组可溶性人胱抑素 C 蛋白通过工程菌诱导培养后离心收集菌体，超声破碎后离心取上清经过镍柱一步纯化得到。

一种制备抗人胱抑素 C 不同表位的系列单克隆抗体或多克隆抗体的方法，运用按照上述方法制备的重组可溶性人胱抑素 C 蛋白免疫实验动物获得单克隆抗体或多克隆抗体。通过位点叠加实验确定抗不同抗原表位的系列单克隆抗体；所述系列是指大于等于两株。

一种制备测定人体内人胱抑素 C 蛋白浓度诊断试剂的方法，运用

上述方法制备的两株单克隆抗体通过化学交联剂分别与胶乳交联后混合于缓冲液中制备成诊断试剂，其中两株单克隆抗体摩尔比为 1:

1。

所述化学交联剂为 Sulfo-NHS, EDC. HCL。

一种制备人胱抑素 C 诊断试剂质控品的方法，按照上述方法制备的重组可溶性人胱抑素 C 蛋白用保护性缓冲液分别调制到从低到高 5 个固定浓度后冻干制备。

所述从低到高 5 个固定浓度是指按照上述制备的诊断试剂的检测线性范围而定的浓度。

所述的 5 个固定浓度分别为 0.5ug/ml; 1ug/ml; 2ug/ml; 4ug/ml; 8ug/ml。

综上，本发明的有益效果是：本发明运用基因工程技术表达纯化大量稳定的重组可溶胱抑素 C 蛋白并利用该蛋白获得了一对单抗，进而制备了稳定的胱抑素 C 诊断试剂及其质控品。解决了我国人胱抑素测定试剂盒自主研发的瓶颈问题。

#### 附图说明

图 1 是本发明制备的人胱抑素 C 诊断试剂的测定结果示意图，其中横轴表示进口试剂 1 测定进口试剂 2 校准品的校准值 (ug/ml)，纵轴表示自制试剂测定进口试剂 2 校准品的校准值 (ug/ml)；

图2是重组人胱抑素C蛋白诱导纯化电泳图，其中，M：中分子量蛋白Marker；1：IPTG诱导前全菌裂解液；2：IPTG诱导3h后全菌裂解液；3：Ni柱纯化后重组蛋白；

图3是cystatin C重组蛋白Western Blot分析的示意图,其中, M: 预染蛋白 Marker; 1: cystatin C重组蛋白, 一抗为抗人胱抑素多抗; 2: cystatin C重组蛋白, 一抗为抗人血红蛋白多抗。

### 具体实施方式

#### 实施例 1:

#### 制备重组可溶人胱抑素 C 蛋白

##### (1)克隆截短胱抑素 C 基因、构建表达质粒

按照胱抑素 C 基因 DNA 序列设计引物, RT-PCR 扩增该基因并与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 a, PCR 鉴定单克隆确定可能的阳性质粒, 再提取质粒双酶切鉴定。经过 DNA 测序证明碱基及开放阅读框正确的阳性质粒用适宜的酶切出与同样双酶切的 PET32a(+) 连接, 构建原核表达质粒, 转化表达宿主菌 Rosseta gami II。PCR 鉴定阳性宿主菌。上述实验用质粒载体均为本实验室保存, 表达菌 Rosseta gami II 购于 Merck 公司, 总 RNA 提取试剂盒购于 Fermentas 公司, 反转录试剂盒、限制性内切酶、连接试剂盒购于大连 Takara 公司。

##### (2)筛选高效表达的阳性表达菌株

接种 10 株上述阳性菌株与 5ml LB+amp 中, 37°C, 220rpm 培养过夜, 第二日按 1%接种量接种于新鲜的 LB+amp 培养基中, 37°C, 220rpm 培养 4-5 小时, 取 1ml 菌液做未诱导条件下的菌体蛋白对照, 余下菌液加入终浓度 0.5mM 的 IPTG, 25°C, 170rpm 诱导培养过夜, 取 1ml 菌液做为诱导后的菌体蛋白对照。

诱导前后的细菌菌液离心去上清，菌体分别用 100ul 的 TE 缓冲液重悬，煮沸 5min 后，SDS-PAGE 电泳。考马斯亮兰染色，BandScan 分析电泳条带。诱导后的菌在预测的分子量处有一条浓集的蛋白条带，诱导前的菌在相同的分子量处没有蛋白条带。经 BandScan 软件分析该目的蛋白占总蛋白量的 20% 以上。选表达水平高的菌株为工程菌株。

诱导后的细菌超声破碎后离心取上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳分析，结果表明重组蛋白是以可溶形式存在于上清中。

### (3) 工程菌的扩大培养及目的蛋白的纯化

按照小量培养的条件扩大培养量，1% 的甘油菌接种于 20ml LB + amp 培养基中 37℃, 220rpm 过夜培养，第二日 2% 接种量接种于 1LB + amp 培养基中 37℃, 220rpm 培养 4-5h 至  $OD_{600}$  至 0.5-1.0，加入 IPTG 至终浓度为 0.5mM，37℃, 220rpm 诱导培养 3-5h，离心收集菌体按 1G 菌体加入 10ml Loading Buffer (20mM PBS, 0.5M NaCl, 30mM 咪唑, PH7.4) 的比例加入 Loading Buffer，超声破碎再次离心取上清，用 0.45μM 的滤膜过滤以备纯化。

HisTRAP II.P (GE company) 柱，用 10 倍柱体积 Loading Buffer 平衡柱子，上述过滤上清直接上柱，上样后用 Loading Buffer 洗柱至  $OD_{280}$  吸收值至基线，用 Elution Buffer (20mM PBS, 0.5M NaCl, 300mM 咪唑, PH7.4) 洗脱，收集洗脱峰，进行 SDS PAGE 分析纯度，结果显示纯度达到 90% 以上，蛋白浓度 2-3mg/ml。6L 培养液可得到 140-200mg 蛋白。

#### (4) Elisa 及 Western 鉴定重组蛋白抗原性

纯化的重组胱抑素 C 稀释至 10ug/ml 后按照 Elisa 标准操作规程包板, 分别使用抗胱抑素 C 多克隆抗体及抗人血红蛋白多克隆抗体为一抗, 使用辣根过氧化物酶标记兔抗人 IgG 为二抗, 结果显示抗胱抑素 C 多抗为一抗的孔板为阳性而抗人血红蛋白多抗为一抗的孔板为阴性。证明重组胱抑素 C 免疫特异性高。Western 实验结果与 Elisa 结果相同。

#### 实施例 2:

##### 制备人胱抑素 C 诊断试剂

##### (1) 一对抗不同表位单克隆抗体的制备

纯化重组胱抑素 C 蛋白按照单克隆抗体制备标准操作规程制备多株抗克隆抗体。通过位点叠加实验筛选一对抗不同位点的单抗。具体步骤如下: 取纯化的重组人胱抑素 C 蛋白稀释至 10ug/ml 按照 Elisa 标准操作规程包数个板 (1-N, N 为待测单克隆株数), 封闭洗板后加入第一株单抗至此单抗所对应的抗原位点饱和的浓度 (至位点饱和所需单抗浓度是通过预实验完成的), 37℃ 孵育。第 1 板按普通程序加入二抗并显色, 记录下板孔 OD 值  $OD_1$ 。同时第 2 板洗涤后加入第二株单抗, 第 3 板洗涤后加入第三株单抗... 第 N 板洗涤后加入第 N 株单抗, 再次 37℃ 孵育, 按程序加入二抗后显色, 板孔  $OD_n$  值与  $OD_1$  进行比较, OD 值差别超过临界点的单抗确定为与第一株单抗抗不同抗原位点者。按照上述方法筛选获得了两株抗不同位点的单抗, 分别命名为  $C_1, C_2$ 。

##### (2) 单克隆抗体致敏胶乳

胶乳与 EDC.HCL、Sulfo-NHS 按照一定比例混合于活化缓冲液 (0.1M MES, 0.15M NaCl, PH5.0) 中, 15min 后加入淬灭剂离心收集胶乳, 重悬于致敏缓冲液 (0.1M pBS, 0.5M NaCl, PH 7.2) 中加入适量混合单抗 (单抗一与单抗二按摩尔比 1: 1 混合) 反应 1h. 反应液加入终浓度 1%BSA 封闭过夜。离心收集致敏好的胶乳重悬于反应缓冲液 (0.2M NH<sub>4</sub>Cl, 0.1M NaCl, 0.2%PEG20000, PH8.4) 中即为人脐抑素 C 诊断试剂 R2。

### (3)试剂测定结果

通过自制试剂, 进口试剂 1 分别测定进口试剂 2 配套校准品得到校准值。结果显示: 自制试剂与进口试剂 1 校准值相关系数达到 0.9997, 参见图 1 所示。

### 实施例 3:

#### 制备人脐抑素 C 诊断质控品

取浓缩重组人脐抑素蛋白用保护缓冲液 (0.02M 碳酸盐缓冲液, 20%丙三醇, 0.8%蔗糖, 0.5%BSA, 0.2%NaN<sub>3</sub>) 稀释成 8ug/ml, 4 ug/ml, 2 ug/ml, 1 ug/ml, 0.5 ug/ml 等五个浓度, 冻干后即制成人脐抑素 C 诊断质控品。

## 序列表

<110> 四川省迈克科技有限责任公司  
 <120> 重组人胰抑素C基因及其表达与应用  
 <130> 重组人胰抑素C基因及其表达与应用  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 394  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 1

```

ggatcctcca gtcccgcaa gcgcgcgcgc ctggtgggag gcccctgga cgcagcgtg      60
gaggagagg gtgtgcggcg tgcactggac ttgcccgtcg gcgagtaca caaagccagc     120
aacgacatgt accacagccg cgcgctgcag gtgggtgcgc ccgcaagca galcgtagct     180
ggggtgaact actcttggg cgtggagctg ggccgaacca cgtgtacca gaccagccc     240
aacttggaca actgcccctt ccatgaccag ccacatctga aaaggaaagc attctgtctt     300
ttcagatct acgtgtgcc ttggcagggc acaatgaact tctegaaatc cactgtcag     360
gacgcctagg ggtctgtacc ggctggcct gtgc                                     394

```

<210> 2  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 2

```

Gly Ser Ser Ser Pro Gly Lys Pro Pro Arg Leu Val Gly Gly Pro Met
1           5           10           15
Asp Ala Ser Val Glu Glu Glu Gly Val Arg Arg Ala Leu Asp Phe Ala
           20           25           30
Val Gly Glu Tyr Asn Lys Ala Ser Asn Asp Met Tyr His Ser Arg Ala
           35           40           45

```

---

Leu Gln Val Val Arg Ala Arg Lys Gln Ile Val Ala Gly Val Asn Tyr  
50 55 60  
Phe Leu Asp Val Glu Leu Gly Arg Thr Thr Cys Thr Lys Thr Gln Pro  
65 70 75 80  
Asn Leu Asp Asn Cys Pro Phe His Asp Gln Pro His Leu Lys Arg Lys  
85 90 95  
Ala Phe Cys Ser Phe Gln Ile Tyr Ala Val Pro Trp Gln Gly Thr Met  
100 105 110  
Thr Leu Ser Lys Ser Thr Cys Gln Asp Ala  
115 120

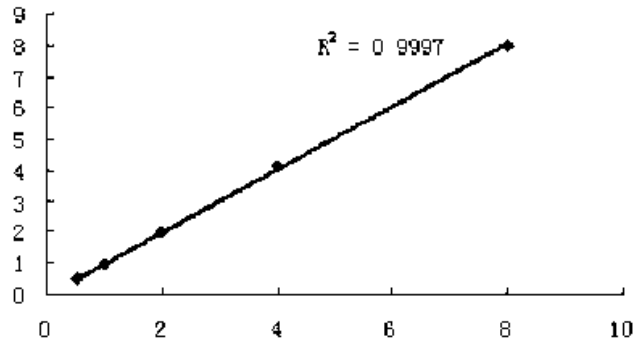


图 1

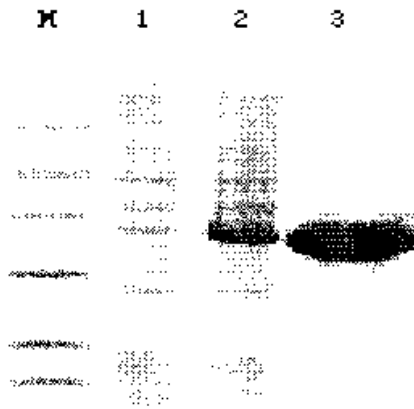


图 2

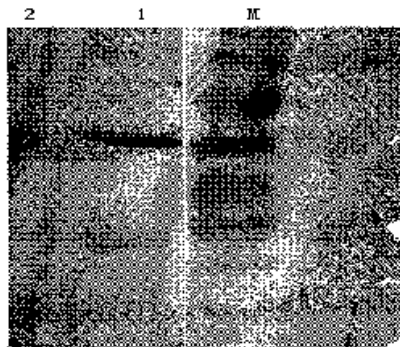


图 3

专利名称(译)	重组人胰抑素C基因及其表达与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101413001A</a>	公开(公告)日	2009-04-22
申请号	CN200810147715.4	申请日	2008-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	四川省迈克科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	四川省迈克科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	四川省迈克科技有限责任公司		
[标]发明人	喻堃 王保宁 周文娟 吴丹 陈丹		
发明人	喻堃 王保宁 周文娟 吴丹 陈丹		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/70 C12N1/21 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种重组人胰抑素C基因及其表达与应用。该截短人胰抑素C基因具有SEQ ID NO：1所示核酸序列；截短人胰抑素C蛋白具有SEQ ID NO：2所示氨基酸序列。本发明运用基因工程技术表达纯化大量稳定的重组可溶胰抑素C蛋白并利用该蛋白获得了一对单抗，进而制备了稳定的胰抑素C诊断试剂及其质控品。解决了我国人胰抑素测定试剂盒自主研发的瓶颈问题。

