

应用基因密码子优化技术建立高效人降钙素原的原核表达方法及产品纯化和鉴定

罗玄梅^a, 黄薇^a, 孙高远^b, 汤小琨^b, 王璐瑶^b, 邹丽辉^a

(北京医院 a. 国家老年医学中心; b. 临床生物样本管理中心, 北京 100730)

摘要: **目的** 建立人降钙素原 (procalcitonin, PCT) 表达体系, 高效表达可溶性 PCT 蛋白。**方法** 合成 PCT 蛋白密码子优化序列, 克隆至带麦芽糖结合蛋白 (maltose-binding protein, MBP) 标签的 pRSF-Duet 载体以构建 pMBP-PCT-pRSF 原核表达质粒。在 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 菌株中诱导表达, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 鉴定蛋白分子量及纯度, 生物梅里埃 VIDAS 全自动荧光免疫分析仪检测蛋白浓度、稳定性及均匀性。**结果** pMBP-PCT-pRSF 质粒成功构建及表达, 浓度达 168 (168.00 ± 2.65) mg/L, 纯度达 95%。在 4 °C 及 -20 °C 储存, PCT 蛋白具有良好的稳定性 ($F=2.016, 2.620$, 均 $P > 0.05$) 和均匀性 ($F=0.727\ 3, 0.973\ 9$, 均 $P > 0.05$)。**结论** 利用密码子优化, 成功构建可溶性 PCT 蛋白的高效原核表达体系, 可充分满足临床实验室参考物质的需求。

关键词: 降钙素原; 参考物质; 重组蛋白质类

中图分类号: Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 03-149-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.03.031

High-efficiency Expression of Human Procalcitonin in *Escherichia coli* Based on Codon Optimization Technology and Purification and Identification of the Expressed Product

LUO Xuan-mei^a, HUANG Wei^a, SUN Gao-yuan^b, TANG Xiao-kun^b, WANG Lu-yao^b, ZOU Li-hui^a

(a. National Center of Gerontology; b. Clinical Biobank, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To establish a prokaryotic expression system for human procalcitonin (PCT), and efficiently express and purify soluble PCT protein. **Methods** The optimized PCT gene was synthesized and cloned into pRSF-Duet vector reside with maltose-binding protein (MBP) to generate pMBP-PCT-pRSF prokaryotic expression vector. Recombinant PCT was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. The molecular weight and purity of the protein were identified by SDS-PAGE, and the concentration and stability were analyzed by BioMerieux VIDAS automatic fluorescence immunoassay analyzer. **Results** The vector pMBP-PCT-pRSF was successfully constructed. When expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, the concentration of soluble PCT protein reached 168 (168.00 ± 2.65) mg/L, and the purity reached 95%. Besides, recombinant PCT protein showed good stability ($F=2.016, 2.620$, all $P > 0.05$) and homogeneity ($F=0.727\ 3, 0.973\ 9$, all $P > 0.05$) when stored at 4 °C and -20 °C. **Conclusion** By using codon optimization technology, the recombinant PCT protein was highly expressed in prokaryotes, which can fully meet the needs of clinical laboratory reference materials.

Keywords: procalcitonin; reference material; recombinant protein expression

降钙素原 (procalcitonin, PCT) 是降钙素的无激素活性前体, 大小约 13 kDa^[1]。PCT 浓度可反映炎症的类型及严重程度, 在疾病早期诊断及指导抗生素治疗等方面发挥重大作用^[2-3]。临床上, PCT 检测方法的建立及质量控制均依赖 PCT 蛋白参考品。然而其多购于国外公司, 价格昂贵, 且国内外少有报道关于高效制备 PCT 蛋白参考物质的方法。为此, 本文基于密码子优化技术在原核表达系统中高效表

达可溶性 PCT 蛋白, 旨在为临床检测提供优质价廉的参考品。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 恒温摇床 (苏州培英实验设备有限公司); 电泳仪 (Bio-Rad 公司); 超声细胞粉碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 生物梅里埃 VIDAS 全自动荧光免疫分析仪 (法国生物梅里埃公司); *E. coli* DH5 及 *E. coli* BL21(DE3) pLysS

基金项目: 国家自然科学基金 (项目编号 81871107)。

作者简介: 罗玄梅 (1997-), 女, 硕士在读, 研究方向: 老年退行性疾病的血管损伤修复与重构, E-mail: a1851590995@163.com。

通讯作者: 邹丽辉 (1982-), 女, 博士, E-mail: zouhui4371@hmoh.cn。

菌株(Takara公司); pRSF-Duet为笔者实验室保存; BamHI, XhoI 和 T4 DNA 连接酶(Thermo Fisher Scientific公司); 质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒(Axygen Scientific公司); 琼脂粉, 卡那霉素抗生素, 咪唑, Ni-NTA 镍离子亲和树脂及亲和层析柱, IPTG(生工生物工程股份有限公司); EK 酶及卡那霉素抗性的 LB 培养液为实验室自制。

1.2 方法

1.2.1 优化密码子和合成新基因: 从 NCBI 数据库检索 PCT 基因的全长 CDS 序列, 使用 *E.coli* Codon Usage Analyzer 2.1 软件分析密码子使用情况, 用大肠埃希菌偏好密码子替换稀有密码子, 添加 6His 标签, 委托华大基因公司合成。

1.2.2 构建高效表达菌株: 将合成序列的 BamHI 和 XhoI 双酶切片段插入含麦芽糖结合蛋白(maltose-binding protein, MBP) 标签的 pRSF-Duet 载体。连接产物转入 *E.coli* DH5, 接种于卡那霉素抗性的 LB 培养液。挑选阳性单克隆菌株并提取质粒, 经 Sanger 测序鉴定插入序列及位置。

1.2.3 表达及纯化 PCT 蛋白: 将构建的 pMBP-PCT-pRSF 质粒转入 *E.coli* BL21(DE3) pLysS。取单菌落于 LB 培养液中 37℃ 200r/min 过夜培养, 按 1:500 比例接种至 500 ml LB 培养液, 37℃ 200 r/min 培养至 $A_{600nm}=0.4 \sim 0.6$ 。加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 20℃ 200 r/min 培养 16h, 诱导目的蛋白表达。离心收集菌体沉淀, 重悬于蛋白提取缓冲液(50 mmol/L Na_3PO_4 , pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑), 加入终浓度为 1% 的

Triton-100, 冰浴 30 min, 转移至超声细胞粉碎仪冰浴超声 5 min, 离心留上清。上清与 Ni-NTA 4℃ 孵育 1h, 用咪唑洗脱液(50 mmol/L Na_3PO_4 , pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑)洗脱, 流出液即为 PCT 融合蛋白。EK 酶去除 MBP 标签, 酶切产物与 Ni-NTA 4℃ 孵育 1h, 咪唑洗脱液洗脱, 流出液即为 PCT 蛋白。

1.2.4 PCT 蛋白浓度检测、稳定性及均匀性评价: 采用全自动荧光免疫分析仪及配套试剂检测 PCT 蛋白浓度。参考 CNAS-GL003-2018《能力验证样本均匀性和稳定性评价指南》, 于 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 周, 在 4℃ 和 -20℃ 储存的样品总体中随机抽取 3 份样品检测浓度, 评价稳定性。在储存 80 周的样本总体中, 随机抽取 10 个样品, 每个样品平行测定 3 次, 评价均匀性。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 25.0 进行统计分析, 符合正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。均匀性评价和稳定性评价采用单因素方差分析, 计算 F 统计量, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCT 蛋白基因的密码子优化 见图 1。用 *E.coli* Codon Usage Analyzer 2.1 软件分析发现, 在编码 PCT 蛋白的氨基酸中, 24 个氨基酸由大肠埃希菌的稀有密码子编码。鉴于稀有密码子会显著降低目的蛋白的表达, 故使用偏好密码子替换频率较低的密码子, 优化后氨基酸序列与 GenBank 报道完全一致。

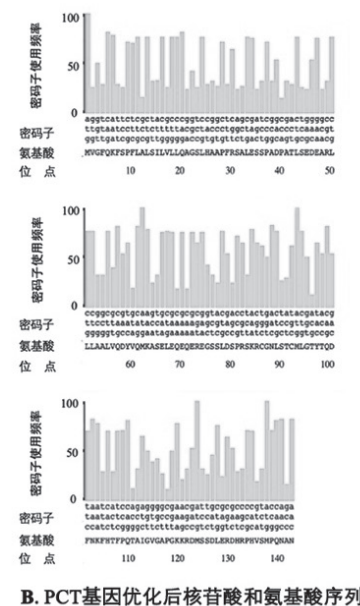
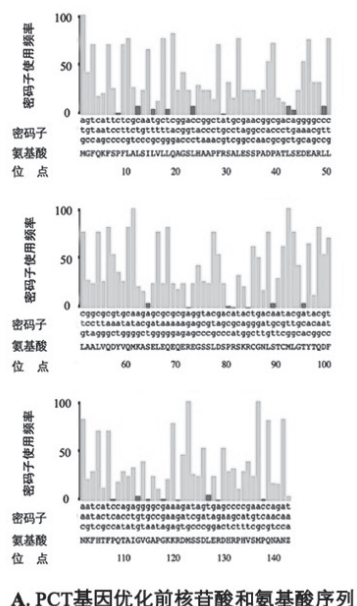


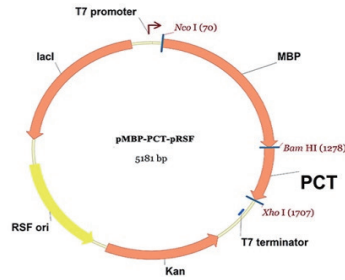
图1 PCT 基因密码子优化

2.2 pMBP-PCT-pRSF 高效表达载体的构建 见图 2。T7 启动子控制 PCT 基因转录, 6His 及 MBP

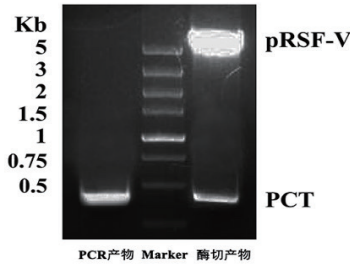
标签分别用于纯化及增强目的蛋白可溶性。阳性单克隆质粒经 BamHI 和 XhoI 双酶切, 获得大小约

450bp 的酶切产物,与合成序列的 PCR 产物大小一致。经 NCBI Blastn 软件比对,测序结果与预期质

粒图谱完全一致,表明 pMBP-PCT-pRSF 载体构建成功。



A. pMBP-PCT-pRSF 载体结构图



B. DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

图 2 构建和验证重组表达载体 pMBP-PCT-pRSF

2.3 PCT 蛋白的表达分析及纯化鉴定 见图 3。第一次亲和纯化产物 15g/dl SDS-PAGE 电泳图可见大小约 60 kDa 的蛋白条带,与预期融合蛋白大小一致,条带单一,纯度达 95% 以上,表明目标 MBP-PCT 融合蛋白获得了高效表达。使用 EK 酶处理后,可见 MBP 标签被高效切除,获得 PCT 蛋白。

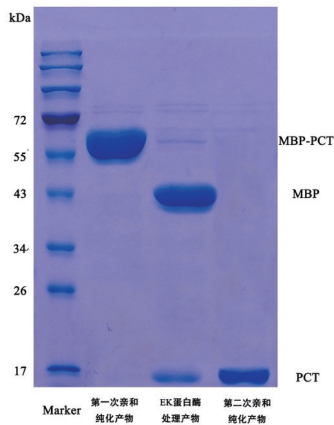


图 3 MBP-PCT 蛋白 SDS-PAGE 电泳图

2.4 PCT 蛋白稳定性评价 见表 1。纯化所得 PCT 蛋白浓度达 168 (168.00 ± 2.65) mg/L。在 4 °C

($F=2.016$, $P=0.1164$) 和 -20°C ($F=2.620$, $P=0.0525$) 储存期间,组间差异均无统计学意义,表明 PCT 蛋白适合低温长时间保存。

2.5 PCT 蛋白均匀性评价 见表 2。分别从 4°C ($F=0.7273$, $P=0.6796$) 和 -20°C ($F=0.9739$, $P=0.4893$) 储存的样品总体中随机多次取样检测, PCT 蛋白浓度的组间差异无统计学意义,表明均匀性检测合格。

3 讨论

近年来, PCT 作为炎症反应的血清学标志物被广泛应用于临床检测^[4]。相较于其他炎症因子, PCT 具有较高的特异度和敏感度,在败血症及感染性休克等细菌感染疾病的早期诊断中具有重大意义。PCT 蛋白纯品不仅可用作临床检测的参考品,还可用于 PCT 的实验室相关研究^[5]。虽然真核表达系统具有翻译后加工修饰能力,其表达蛋白更接近天然构象,但是成本高和产量低的不足大大限制了该系统的广泛应用。相对而言,本研究采用的原核表达系统成本低廉、操作流程简便快捷,是目前最为广泛应用的蛋白表达体系。

表 1 PCT 蛋白不同储存时间稳定性测定结果 ($\bar{x} \pm s$, mg/L)

储存温度 (°C)	0 周	1 周	2 周	4 周	8 周	16 周	32 周	64 周
4	168.00 ± 2.65	167.67 ± 2.52	166.67 ± 2.52	166.33 ± 1.53	165.00 ± 2.00	164.67 ± 2.08	163.67 ± 3.79	161.00 ± 4.36
-20	168.00 ± 2.65	167.67 ± 1.15	167.00 ± 1.00	166.33 ± 0.58	165.67 ± 0.58	165.00 ± 1.00	164.33 ± 1.53	162.67 ± 4.04

表 2 PCT 蛋白均匀性测定结果 (mg/L)

储存温度 (°C)	测定次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4	1	161	160	161	161	160	162	159	162	162	161
	2	162	161	161	161	160	161	160	161	162	161
	3	160	160	161	162	162	160	161	160	160	161
-20	1	162	163	163	162	161	163	163	163	161	163
	2	163	162	163	162	163	162	162	163	162	163
	3	162	161	161	161	163	163	162	163	162	162

(下转第 190 页)