

人C-反应蛋白(CRP)基因的克隆及表达研究

刘端¹, 吴俊², 吴祥甫¹

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 德赛诊断系统(上海)有限公司, 上海 201318)

摘要: 人C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)参与人体炎症反应, 是临床诊断中的重要检测指标。利用家蚕杆状病毒表达系统构建重组人CRP病毒vBmHis-CRP, 接种家蚕五龄幼虫表达重组人CRP蛋白。利用自制抗CRP血清Western Blot检测重组蛋白得到目的条带, 纯化后BCA法测定蛋白含量为30 $\mu\text{g/mL}$, 质谱检测进一步确定该蛋白为目的蛋白。这为家蚕生物反应器规模化制备重组人CRP蛋白打下了基础, 为解决临床CRP相关炎症反应快速诊断试剂盒中标准抗原的来源问题提供了依据。

关键词: C-反应蛋白(CRP); 杆状病毒; 家蚕; Western Blot

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851 (2016) 02-0272-05 **引用页码:** 030701

0 引言

1930年, Frances及Tillet经过研究发现了C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP), 他们从感染肺炎双球菌的严重肺炎病人血清中鉴定出了一种能与肺炎双球菌细胞壁的C多糖结合形成沉淀的物质, 将这种物质称为C-反应蛋白^[1]。后来, 人们发现这个反应不只发生在由肺炎双球菌引发的肺炎中, 在多种急性感染中都有发生, 这是人体对炎症的早期反应, 所以此蛋白又叫“急性时相蛋白”^[2]。人C-反应蛋白由人的肝细胞合成, 是五聚体蛋白, 由5个完全相同的非共价亚基构成, 总分子量接近118 kD。健康人体内水平通常小于10 mg/L, 然而, 在疾病状态, 这一水平在开始的6~8 h快速增加, 大约48 h可以达到峰值, 接近350~400 mg/L^[3]。

与许多急性时相蛋白一样, CRP在血清中通常是痕量级别, 但在很多感染和炎症条件下浓度急剧增长^[4-5]。CRP自从被发现以来就成为一些炎症疾病的筛查因子, 并被作为疾病活动度的标志和诊断工具^[6]。动脉粥样硬化(AS)是一种广义的慢性炎症性血管疾病^[7-8], 导致心肌梗死和中风等疾病的发生。

高水平的巨噬细胞产生炎症细胞因子, 随后诱导肝脏大量产生CRP^[9-10]。CRP水平变化是一种动脉粥样硬化斑块^[11-13]易损性的指标。类风湿性关节炎(RA)是一种由外周关节滑膜炎和关节损伤后的全身炎症性疾病, 也是一种常见的关节自身免疫病^[14]。在类风湿性关节炎的治疗中, 低水平的CRP不仅可以改善疾病活动度, 还可以避免骨损伤^[15]。同时, CRP的测定可作为细菌感染和病毒感染的有效指标^[16]。CRP作为急性时相蛋白广泛应用于临床检测, 其在病理及生理过程中所扮演的角色则成为该领域内研究的热点问题^[17]。更快速和精确的CRP量化方法的发明, 使得人们更加关注其在临床医学的价值^[18]。

人CRP蛋白大多以免疫共沉淀的方式检测, 单克隆抗体在检测中有重要作用。目前国内检测该蛋白大多使用的进口单克隆抗体, 其成本高且大多稳定性较差。获得单克隆抗体首先要有足够量的蛋白作为免疫原, 试剂盒生产中也需要大量标准品, 直接从人血清中纯化CRP蛋白不经济也不实际, 为此获得低成本、高产量、有活性的重组人CRP蛋白成为应该优先解决的问题。大肠杆菌表达重组融合蛋白

收稿日期: 2015-05-19

基金项目: 国家重大新药创制项目(2012ZX09102301-009)

作者简介: 刘端(1988-), 男, 河北大城人, 硕士研究生, 主要从事生物工程制药方面的研究。

通信作者: 吴祥甫, E-mail: liuduansan@163.com

包涵体和内毒素一直是其不可忽视的缺点。家蚕杆状病毒表达系统是应用广泛的一种表达载体,其特点是生产成本低、安全性好、表达效率高、翻译后修饰程度高,这些优点使其成为药用蛋白理想的表达体系。将人CRP基因插入到重组杆状病毒中,感染家蚕,来获得大量重组人CRP蛋白,此方法将为家蚕生物反应器规模化制备重组人CRP蛋白奠定基础,为临床CRP相关炎症反应快速诊断试剂盒中标准抗原的来源提供更好的选择。

1 实验

1.1 实验材料

E. coli BmDH10Bac菌株、*E. coli* TG1菌株、pFast Bac™ HTB载体均由德赛诊断系统(上海)有限公司研发部提供;家蚕BmN细胞为本实验室保存培养;家蚕为两广二号反交,购自浙江金华桑蚕基地。

限制性内切酶和连接酶:购自Takara公司;抗生素:购自上海生工生物;DAB:购自北京康为世纪生物科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒购自Biomiga公司;佐剂购自Sigma-Aldrich;Goatanti-rabbit IgG(H+L)-HRP购自Abcom公司;引物由上海生工生物合成,Ni-NTA亲和层析柱相关试剂:见HaiGene的Ni-NTA说明书;其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 CRP片段的PCR扩增

引物为:

P1:5'-GCGGATCCAGACAGACATGTCGAGGAAGG-3';
P2:5'-ATAAGCTTTCAGGGCCACAGCTGGGGTTTG-3';
P3:5'-GCGGATCCATGGAGAAGCTGTTGTGTTTCTT-3';
P4:5'-ATAAGCTTTCAGGGCCACAGCTGGGGTT-3'。

酶切位点为:上下游引物酶切位点分别为BamH I和Hind III。

以人肝组织cDNA为模板,PCR扩增CRP目的基因。P1、P2引物扩增无信号肽序列;P3、P4引物扩增有信号肽序列。

1.2.2 重组vBmHis-CRP的构建和鉴定

利用BamH I和Hind III限制性内切酶对目的基因和pFastBac™ HTB进行双酶切。割胶回收,16℃连接过夜。重组质粒转化至*E. coli* TG1,上海华大基因测序正确后提取重组质粒转化至*E. coli* BmDH10Bac,经过蓝白斑筛选,提取重组Bacmid-CRP,转染家蚕BmN细胞。收集发病细胞,提取重组杆状病毒,PCR鉴定。获得的重组杆状病毒vBmHis-CRP接种前于家蚕BmN细胞中活化扩增。

1.2.3 重组病毒感染家蚕五龄幼虫

a)四龄蚕蜕皮后一天,得到适合感染病毒的五龄蚕;

b)将重组病毒vBmHis-CRP在五龄幼虫腹部从下向上3~4节处穿刺接种,人工气候箱中27℃饲养,喂食新鲜桑叶;

c)病毒接种5d左右,收集血淋巴,-80℃保存;

d)五龄幼虫蚕体同样-80℃冰箱冻存。

1.2.4 重组蛋白样品制备并鉴定

a)取出适量冷冻保存的家蚕五龄幼虫血淋巴,冰上解冻;

b)按1:1的比例加入PBS缓冲液稀释,低温离心30 min,速度为15000 r/min;

c)用9层纱布滤除油脂,重复3次;

d)上清和沉淀分别制备蛋白样品,以正常蚕血淋巴作对照;

e)称取50 g发病五龄幼虫蚕体,加入100 mL PBS缓冲液;

f)匀浆机破碎:破碎30 s,冰上放置30 s,共30 min,15000 r/min低温离心20 min,纱布滤油脂,重复3次;

g)以正常五龄蚕做阴性对照,SDS-PAGE与Western Blot同时鉴定(一抗为原核表达的人CRP蛋白免疫新西兰大耳兔获得的多克隆抗体血清)。

1.2.5 五龄蚕体内重组人CRP蛋白的纯化

从上述步骤得知,重组人CRP蛋白不可溶,且滞留在五龄蚕体内,对蚕体预处理,方法同1.2.4的e)、f)两步骤。

1.2.6 蚕体沉淀的溶解

a)用1×PBS洗涤沉淀,重悬后5000 r/min离心20 min,重复两次;

b)加入50 mL GuNTA-0 Buffer和1 mM PMSF重悬细胞,冰上超声裂解40%功率,工作3 s停3 s,共30 min,降低粘稠度。

c)离心条件同上,分别取上清和沉淀到新管中,上清液过0.45 μm滤膜;

1.2.7 层析

蛋白层析方法及试剂配制见HaiGene公司的Ni-NTA使用说明。

1.2.8 蛋白复性

复性液:pH 8.5的Tris-HCl 50 mM,1 mM还原型谷胱甘肽,0.1 mM氧化型谷胱甘肽,0.5 M精氨酸,0.15 M NaCl,ddH₂O定容至1 L。

包涵体溶液与复性液等体积混合于透析袋,4℃

放置 2 h, 然后用 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液 4°C 透析, 每 3 h 换一次液, 换液 3 次。BCA 法测定蛋白含量。

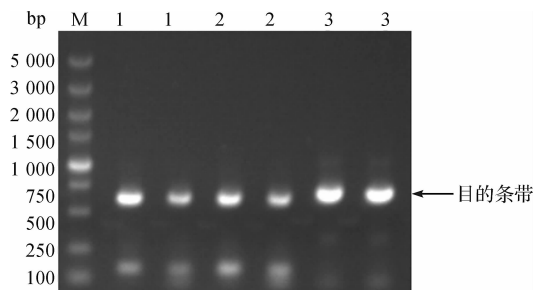
1.2.9 重组 CRP 的质谱检测

纯化的 CRP 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 割下目的条带送苏州普泰生物技术有限公司进行质谱鉴定。

2 结果与讨论

2.1 扩增 CRP 基因片段结果

以人肝组织 cDNA 为模板, 用 P1、P2 和 P3、P4 两对引物分别扩增人 CRP 基因, 第一条没有信号肽序列, 长度加上两端酶切位点和保护碱基为 637 bp, 第二条有信号肽, 序列长度加上两端酶切位点和保护碱基为 691 bp, 电泳结果(图 1)显示分别在 500 至 700 bp 之间有目的条带, 与预期相符。

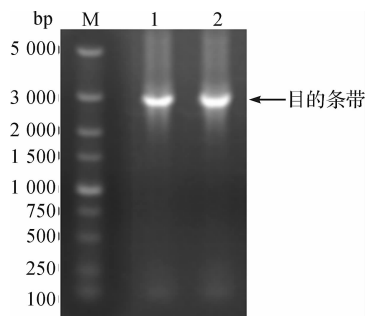


M: DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 无信号肽的目的条带; 3: 有信号肽的目的条带

图 1 CRP 基因的 PCR 扩增结果

2.2 重组病毒 vBmHis-CRP 鉴定结果

以提取的重组病毒基因为模板, pUC/M13 上下游做引物进行 PCR 鉴定, 如图 2, 在 3000 bp 附近有特异条带。(Marker 与目的条带之间有其他泳道, 为便于观察将其切除)



M: DNA marker; 1: 无信号肽重组病毒 PCR 鉴定; 2: 有信号肽重组病毒 PCR 鉴定

图 2 重组病毒 PCR 鉴定

2.3 家蚕 BmN 细胞感染后形态

活化后的家蚕重组病毒 vBmHis-CRP 转染家蚕 BmN 细胞约 120 h 后, 出现病毒感染症状, 细胞变大变圆, 并悬浮起来, 呈饱满透明状, 见图 3。

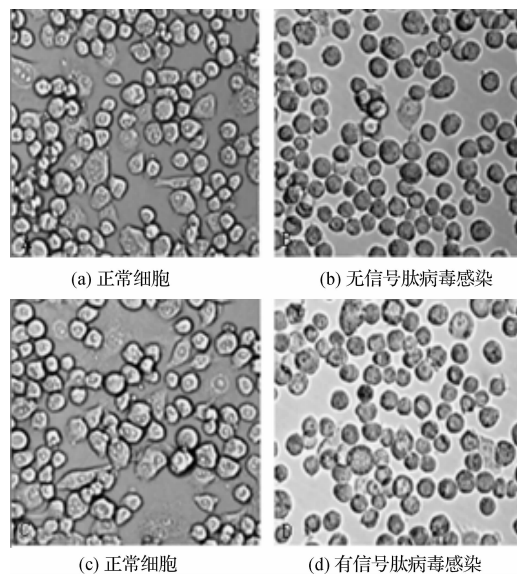
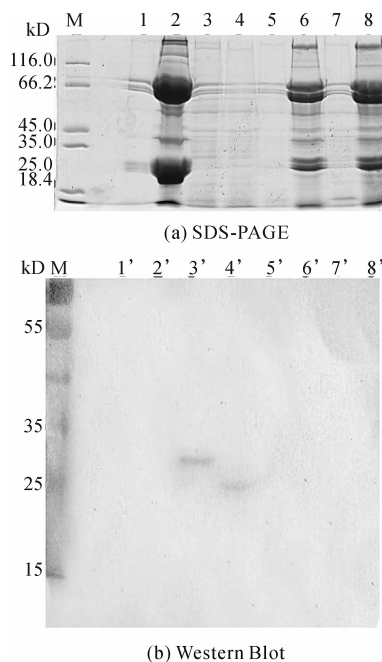


图 3 正常细胞与发病细胞显微镜观察结果(10×10)

2.4 家蚕蚕体中 CRP 蛋白的鉴定结果

从家蚕蚕体中 CRP 蛋白 SDS-PAGE 以及 Western Blot 鉴定的结果(图 4)可以看出: 无信号肽的重组病毒感染的蚕体内检测出 CRP 蛋白, 有信号肽的重组病毒感染的家蚕体内有隐约的条带, 故应纯化无信号肽的重组病毒感染的家蚕体内的 CRP 蛋白。



(b) Western Blot

M: 蛋白 marker; 1: 正常血淋巴沉淀; 2: 正常血淋巴上清; 3: 无信号肽重组病毒感染的蚕体; 4: 有信号肽重组病毒感染的蚕体; 5: 无信号肽重组病毒感染的血淋巴沉淀; 6: 无信号肽重组病毒感染的血淋巴上清; 7: 有信号肽重组病毒感染的血淋巴沉淀; 8: 有信号肽重组病毒感染的血淋巴上清; 1'~8'对应图 4(a)的 1~8。

图 4 发病蚕体中表达目的蛋白的 SDS-PAGE(a)和 Western Blot(b)分析

2.5 家蚕体内重组人CRP蛋白的纯化

由于重组病毒表达的CRP蛋白主要集中在蚕体内,推断为包涵体,利用细菌包涵体纯化方法得到重组人CRP蛋白,并复性,25 kD附近有目的条带。但是由于纯化手段等原因,得到的蛋白有一些杂蛋白。目的蛋白检测结果如图5。BCA法测定的蛋白量约为:30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 纯化的重组蛋白质谱检测分析

经 NanoLC-ESI-MS/MS 分析(图6), protein score C. I. %大于95%,序列覆盖率:31.6%,可基本判断表达的蛋白为重组人CRP蛋白。

序列覆盖率:31.6%,匹配肽段下划线表示:

1	<u>QTDMSRKAFV</u>	<u>FPKESDTSYV</u>	<u>SLKAPLTKPL</u>	<u>KAFTVCLHFY</u>	<u>TELSSTRGYS</u>
51	<u>IFSyatKRQD</u>	<u>NEILFWskD</u>	<u>IGYSFTVgGS</u>	<u>EILFEVPEVT</u>	<u>VAPVHICTSW</u>
101	<u>ESASGIVEFW</u>	<u>VDGKPRVRKS</u>	<u>LKKGYTVGAE</u>	<u>ASILGQEQD</u>	<u>SFGGNFEGSQ</u>
151	<u>SLVGDIGNVN</u>	<u>MWDFVLSPE</u>	<u>INTIYLGGPF</u>	<u>SPNVLNWRAL</u>	<u>KYEVQGEVFT</u>
201	<u>KPQLWP</u>				

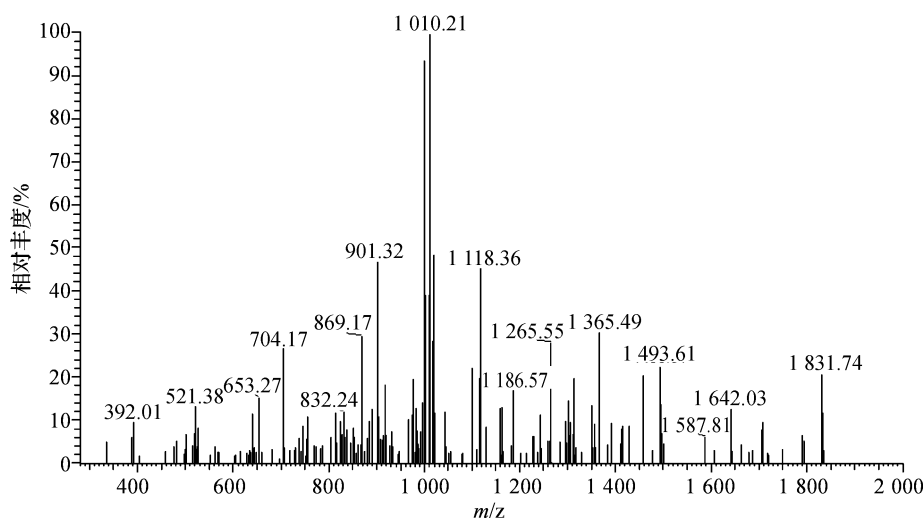
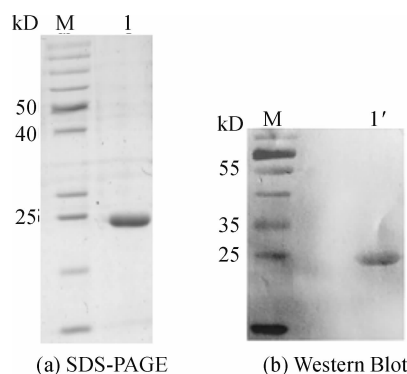


图6 CRP蛋白质谱图

3 结论

人CRP蛋白在大肠杆菌中表达技术较为成熟,但其天然活性差和含有内毒素的缺点不容忽视。以人CRP基因cDNA为模板,酶切连接到pFactBacTM HTB载体上,得到pFactBacTM HTB-CRP质粒,转化到*E. coli* BmDH10Bac中,同源重组,蓝白斑筛选获得Bacmid-CRP,转染到BmN细胞中,获得vBmHis-CRP重组病毒。接种vBmHis-CRP感染家蚕BmN细胞,能够产生重组人CRP蛋白。利用活化后vBmHis-CRP穿刺感染家蚕五龄幼虫大量表达重组人CRP蛋白。CRP蛋白能以包涵体的形式积累在家蚕体内组织中。参照细菌包涵



M:蛋白 Marker;1:纯化后的重组蛋白;1'对应1.

图5 纯化的目的蛋白 SDS-PAGE(a)和 Western Blot(b)检测

体纯化方法,使用Ni-NTA柱层析,洗脱后蛋白复性,SDS-PAGE电泳结果发现25 kD附近有单一条带,与预期一致,BCA定量为30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。所得重组人CRP蛋白超滤浓缩后SDS-PAGE电泳后切胶进行质谱鉴定,可以确定纯化的蛋白为重组人CRP蛋白。家蚕饲养简单、成本低廉,这为家蚕生物反应器规模化制备重组人CRP蛋白打下了基础,探索出了一条解决临床CRP相关炎症反应快速诊断试剂盒中标准抗原来源问题的路径。

参考文献:

- [1] TILLET W S, FRANCIS T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of

- pneumococcus [J]. The Journal of Experimental Medicine, 1930, 52(4): 561-571.
- [2] MACLEOD C M, AVERY O T. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood : ii. isolation and properties of the reactive protein [J]. The Journal of Experimental Medicine, 1941, 73 (2): 183-190.
- [3] CLYNE B, OLSHAKER J S. The C-reactive protein [J]. The Journal of Emergency Medicine, 1999, 17(6): 1019-1025.
- [4] KOLB-BACHOFEN V. A review on the biological properties of C-reactive protein [J]. Immunobiology, 1991, 183(1-2): 133-145.
- [5] GEWURZ H, MOLD C, SIEGEL J, et al. C-reactive protein and the acute phase response[J]. Advances in Internal Medicine, 1982, 27: 345-372.
- [6] PEPYS M B. C-reactive protein fifty years on [J]. Lancet, 1981, 317(8221): 653-657.
- [7] VILES-GONZALEZ J, BADIMON J J, FUSTER V. Pathogenesis of atherosclerosis [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2006, 47 (Sup): C7-C12.
- [8] HANSSON G K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. The New England Journal of Medicine, 2005, 352(16): 1685-1695.
- [9] ROSS R. Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. The New England Journal of Medicine, 1999, 340(2): 115-126.
- [10] IKONOMIDIS I, ANDREOTTI F, ECONOMOU E, et al. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin[J]. Circulation, 1999, 100(8): 793-798.
- [11] ARROYO-ESPLIGUERO R, AVANZAS P, COSINSALES J, et al. C-reactive protein elevation and disease activity in patients with coronary artery disease [J]. European Heart Journal, 2004, 25(5): 401-408.
- [12] BLAKE G J, RIDKER P M. Novel clinical markers of vascular wall inflammation[J]. Circulation Research, 2001, 89(9): 763-771.
- [13] BURKE A P, TRACY R P, KOLODIE F, et al. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies[J]. Circulation, 2002, 105(17): 2019-2023.
- [14] KIM K W, KIM B M, MOON H W, et al. Role of C-reactive protein in osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Research & Therapy, 2015, 17 (1): 41-52.
- [15] SINGH H V, SHRIVASTAVA A K, RAIZADA A, et al. Atherogenic lipid profile and high sensitive C-reactive protein in patients with rheumatoid arthritis [J]. Clinical Biochemistry, 2013, 46(12): 1007-1012.
- [16] 李萍, 武入英. C-反应蛋白与白细胞检测在幼儿早期感染中的意义[J]. 中国民康医学, 2015 (7): 37-38.
- [17] 白彩娟, 吉尚戎. C-反应蛋白研究进展及热点争议[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2013 (3): 361-369, 376.
- [18] PALOSUO T, HUSMAN T, KOISTINEN J, et al. C-reactive protein in population samples[J]. Acta Medica Scandinavica, 1986, 220(2): 175-179.

Cloning and Expression of C-reactive Protein (CRP) Gene

LIU Duan¹, WU Jun², WU Xiangfu¹

(1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. DiaSys Diagnostic Systems (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201318, China)

Abstract: C-reactive protein (CRP), which involves in human inflammatory response, is an important clinical diagnosis index. In this study, we used silkworm baculovirus expression system to construct recombinant vBmHis-CRP virus, which was then inoculated to fifth instar silkworm express recombinant CRP protein. The target band was obtained by using self-made CRP resistance Western Blot to detect recombinant protein. The content of the purified protein measured by BCA method was 30 μg / mL, and the target protein was further identified through mass spectrometric detection. The present work laid a foundation for the large-scale preparation of recombinant CRP protein by silkworm bioreactor, and provided a basis for solving the source problem of standard antigens in the clinical CRP-related inflammatory response rapid diagnostic kits.

Key words: C-reactive protein(CRP); baculovirus; Bombyx mori; Western Blot

(责任编辑: 许惠儿)