

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510060786.7

[51] Int. Cl.

*C12N 15/09 (2006.01)*

*C12N 15/16 (2006.01)*

*C12N 15/70 (2006.01)*

*C12P 21/02 (2006.01)*

*C07K 1/14 (2006.01)*

*A61K 38/22 (2006.01)*

[43] 公开日 2006年5月3日

[11] 公开号 CN 1766106A

[51] Int. Cl. (续)

*G01N 33/53 (2006.01)*

[22] 申请日 2005.9.15

[21] 申请号 200510060786.7

[71] 申请人 浙江大学

地址 310029 浙江省杭州市西湖区延安路浙  
大湖滨校区医学院

[72] 发明人 周林福 陈峰 朱海红 陈智

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司  
代理人 冯子玲

权利要求书1页 说明书4页

[54] 发明名称

脑钠肽 (BNP) 制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种脑钠肽 (BNP) 的制备方法, 为克服传统提取 BNP 方法成本高、收率低, 目的蛋白容易变性, 材料来源有限等诸多缺陷, 本发明在制备 BNP 过程中, 用 PCR 技术扩增目的基因, 以 Pet32a 作为载体质粒, 酶切定向插入 BNP 目的基因后形成重组质粒, 以大肠杆菌 DH5  $\alpha$ , BL21 (DE3) 作为表达菌株, 以 His 柱作为纯化柱子分离纯化目的蛋白。这种制备方法既可方便检测, 又可增强重组蛋白的稳定性。运用本发明技术获得的 BNP 通过免疫学方法制成诊断试剂盒, 可快速、准确、特异地诊断和鉴别诊断许多心血管疾病。

1. 脑钠肽（BNP）的制备方法，其特征在于以下步骤：

- (1) 采用 PCR 技术将表达 BNP 的目的基因扩增，并纯化其产物；
- (2) 将纯化的 PCR 产物于 BamH I 与 Hind III 双酶切后定向插入经同样双酶切的 pet32a，获得重组质粒 Pet32a+BNP；
- (3) 将重组质粒 Pet32a+BNP 转化至大肠杆菌 DH5a，经培养扩增，抽提纯化，测序分析，获测序正确的重组质粒；
- (4) 将测序正确的重组质粒转化至 BL21DE30 菌，在 30℃，0.1mM IPTG 条件下表达重组蛋白；
- (5) 将表达重组蛋白的活化菌株接种到 2—YT 培养基恒温振荡培养，进行摇瓶实验，工程菌在发酵罐中高密度发酵，种子菌按 5% 比例接种，在低溶氧条件下诱导，放罐，离心得菌体；
- (6) 将离心得到的菌体沉淀进行细胞裂解，洗涤出包涵体，溶解包涵体，His 柱过柱纯化。

2、按权利要求 1 所述脑钠肽（BNP）的制备方法，其特征在于：一种使用上述方法获得的脑钠肽（BNP）作为抗原制备应用于心血管疾病的特异性诊断试剂盒。

## 脑钠肽 (BNP) 制备方法

### 技术领域

本发明属于生物医学技术领域，涉及一种心血管肽类激素——脑钠肽 (BNP) 的制备方法。

### 背景技术

目前，心血管疾病已成为全球公共卫生的一大威胁，全球每年死于心血管疾病的人数高达 1 7 0 0 万，发病年龄呈年轻化趋势，处于工作年龄段的人群心脏病发病率已越来越高。心血管疾病目前比较常见的有心力衰竭、冠心病、风心病、高心病等，而对其中有些疾病的诊断仍缺乏特异性的量化指标。如对冠心病的诊断，长期以来一直缺乏有效的量化生化指标。患者早期常出现呼吸困难，但其症状、体征缺乏特异性，与肺部疾病引起的呼吸困难鉴别比较困难，而快速、准确地确定呼吸困难的病因对疾病的有效治疗又非常重要。又如对心力衰竭的诊断通常亦较难，在早期，如呼吸困难、腿部肿胀及运动后易疲劳等也只是一些非特异的症状，常规的诊断依赖于超声心动图，但因费用昂贵而不能普及，应用受到限制，且超声心动图上出现的异常往往迟于生化指标的改变。因而，寻找一种快速、准确、有效的诊断心血管疾病的特异性指标已成为亟待解决的一大重点。

脑钠素 (BNP)，又名脑利尿肽，最初是 1988 年由日本学者 sodoh 从猪脑内分离出来的一种心血管肽类激素，属利钠多肽家族成员之一。主要在心室肌中合成并分泌，具有扩张血管、拮抗肾素—血管紧张素—醛固酮系统 (RAAS)、抑制交感神经活性、促进尿钠排泄、减少水钠潴留等作用。BNP 还特异地调节心室的收缩功能和压力负荷，对抗冠状动脉痉挛及肺动脉高压，防止心肌纤维化和血管平滑肌细胞增生以及内皮细胞纤溶酶原激活物抑制物 (PAI) 表达。在临床应用中，可用于对心力衰竭 (HF)、左心室收缩功能混乱及冠心病等的诊断，这些患者血浆 BNP 水平明显上升 (正常人外周血中 BNP 水平很低，仅为 pg 水平)，且其升高程度与疾病的严重程度呈正相关。也可用于对众多疾病预后的评估，诸如心力衰竭 (HF)、急性心肌梗死 (AMI)、原发性肺源性高血压、肺栓塞，甚至是普通人群的预后评估，其 BNP 水平越

高，其预后就越差，其病死率亦越高。也有助于某些疾病的鉴别诊断，如对肺源性和心源性急性呼吸困难的鉴别，前者 BNP 浓度正常，而后者则明显升高。还可用于对心衰，尤急性心衰的治疗，因为 BNP 可协调动静脉的扩张，增加每搏输出量，在不改变心率的情况下增加心输出量；因左室收缩功能紊乱而导致的心衰患者，使用 BNP 治疗，可降低肺毛细血管楔压；并降低醛固酮和儿茶酚胺的水平，进而利尿利钠。鉴于它的明显疗效，美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 早在 2001 年就批准 BNP 为治疗急性失代偿性心衰患者的临床用药。

尿钠肽由三种肽组成：心钠肽 (atrialnatriuretic peptide, ANP)、脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 和 C—型尿钠肽 (c—type natriuretic peptide, CNP)，由独立的基因分别编码三种激素前体，三者具有其独特的组织分布和调节机制。其中 BNP 主要在人脑和心室表达。人类 BNP 前体 (Pro—BNP) 由 108 个氨基酸组成，再裂解产生一个成熟的 32 个氨基酸的成份，即 BNP，和一个 N 末端片段，二者均存在于血浆中。BNP 分子量为 3500，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 的功能域。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。同心钠肽相比，脑钠肽在体内作用时间更长，药效更好，在生物组织中含量更高，且易于提取，因而具有潜在的市场价值和广泛的应用前景。

为了克服传统提取 BNP 方法成本高、收率低，目的蛋白容易变性，材料来源有限等诸多缺陷，本发明为 BNP 的大规模制备提供了切实可行的技术路线。按本法制成的 BNP 主要用于制备诊断试剂盒供临床疾病诊断之用。

## 发明内容

本发明脑钠肽 (BNP) 的制备方法包括以下步骤：

- (1) 采用 PCR 技术将表达 BNP 的目的基因扩增，并纯化其产物；
- (2) 将纯化的 PCR 产物于 BamH I 与 Hind III 双酶切后定向插入经同样双酶切的 pet32a，获得重组质粒 Pet32a+BNP；
- (3) 将重组质粒 Pet32a+BNP 转化至大肠杆菌 DH5a，经培养扩增，抽提纯化，测序分

析，获测序正确的重组质粒；

- (4) 将测序正确的重组质粒转化至 BL21DE30 菌，在 30℃，0.1mM IPTG 条件下表达重组蛋白；
- (5) 将表达重组蛋白的活化菌株接种到 2—YT 培养基恒温振荡培养，进行摇瓶实验，工程菌在发酵罐中高密度发酵，种子菌按 5%比例接种，在低溶氧条件下诱导，放罐，离心得菌体；
- (6) 将离心得到的菌体沉淀进行细胞裂解，洗涤出包涵体，溶解包涵体，His 柱过柱纯化。

使用上述本发明方法获得的脑钠肽（BNP）可作为抗原制成诊断试剂盒，应用于心血管疾病的特异性诊断。

### 具体实施方式

结合实施例对本发明作进一步说明。

实施例技术路线如下：

1、BNP 目的基因扩增，重组质粒构建及重组蛋白的表达：BNP 目的基因序列依据美国国立卫生图书馆的基因库。

用PCR技术将表达BNP的目的基因扩增，并纯化其产物。再将纯化的PCR产物予BamH I与Hind III双酶切后定向插入经同样双酶切的pet32a，获得重组质粒。然后将上述质粒转化至大肠杆菌DH5 α，经培养扩增，抽提纯化，并用全自动测序仪进行序列分析。将测序正确的重组质粒转化至BL21DE3菌，在30℃，0.1mM IPTG的条件下进行培养。培养后裂解菌液，用SDS-PAGE分离各蛋白条带，并用Western Blot仪检测。

2、表达菌株的发酵：

将活化的菌株按5%的接种量接入到2—YT培养基(含有ampicillin100 μg/ml)中，37℃，300r/min，恒温振荡培养，进行摇瓶实验。工程菌高密度发酵在B. BROUN(德国)15L发酵罐中进行。种子菌按5%比例接种，37℃，300r/min，ampicillin100 μg/ml。高溶氧培养4小时。在1mmol/L IPTG，低溶氧条件下诱导4小时，放罐，离心得到菌体。

### 3、BNP 的蛋白纯化:

3.1 细胞的裂解: 将离心得到的大肠杆菌沉淀加裂解缓冲液进行细胞裂解, 裂解缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)、1mmol/L EDTA、100mmol/L NaCl。

3.2 包涵体的洗涤: 用微量离心机于 4℃以 12000g 将细胞裂解液反复进行离心沉淀, 并用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析沉淀重悬液以确定是否大多数目的蛋白均在沉淀中。

3.3 包涵体的溶解:

将洗过的沉淀悬浮在含 0.1 mmol/L PMSF (现加现用)、8 mol/L (去离子的) 尿素的裂解缓冲液中, 在室温及一定 PH 值下, 再加 SDS 凝胶加样缓冲液对其进行溶解, 并测其溶解度。

3.4 过柱纯化: His 柱收集目标峰, 再过反相柱收集目标峰, 真空冷冻干燥。SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度。

在制备 BNP 过程中, 用 PCR 技术扩增目的基因, 以 Pet32a 作为载体质粒, 酶切定向插入 BNP 目的基因后形成重组质粒, 以大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , BL21 (DE3) 作为表达菌株, 以 His 柱作为纯化柱子分离纯化目的蛋白。这种制备方法既可方便检测, 又可增强重组蛋白的稳定性。

运用该发明技术获得的 BNP 通过免疫学方法制成诊断试剂盒, 可快速、准确、特异地诊断和鉴别诊断许多心血管疾病, 具有较大的社会效益和经济效益。

无需进一步详细阐述, 相信采用前面所公开的内容, 本领域技术人员可最大限度地应用本发明。因此, 前面的优选具体实施方案应理解为仅是举例说明, 而非以任何方式限制本发明的范围。

专利名称(译)	脑钠肽 ( BNP ) 制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1766106A</a>	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200510060786.7	申请日	2005-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	周林福 陈峰 朱海红 陈智		
发明人	周林福 陈峰 朱海红 陈智		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/22 C07K11/14 C12N15/16 C12N15/70 C12P21/02 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种脑钠肽(BNP)的制备方法，为克服传统提取BNP方法成本高、收率低，目的蛋白容易变性，材料来源有限等诸多缺陷，本发明在制备BNP过程中，用PCR技术扩增目的基因，以Pet32a作为载体质粒，酶切定向插入BNP目的基因后形成重组质粒，以大肠杆菌DH5α，BL21(DE3)作为表达菌株，以His柱作为纯化柱子分离纯化目的蛋白。这种制备方法既可方便检测，又可增强重组蛋白的稳定性。运用本发明技术获得的BNP通过免疫学方法制成诊断试剂盒，可快速、准确、特异地诊断和鉴别诊断许多心血管疾病。