

[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 200510061471.4

[51] Int. Cl.

G12N 15/09 (2006.01)

G12N 15/12 (2006.01)

G12N 15/70 (2006.01)

G12N 1/21 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 7 月 12 日

[11] 公开号 CN 1800384A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2005.11.8

[21] 申请号 200510061471.4

[71] 申请人 浙江大学

地址 310031 浙江省杭州市下城区延安路 353
号浙江大学医学院

[72] 发明人 陈 智 朱海红 陈 峰 周林福

[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

降钙素原的制备方法

[57] 摘要

降钙素原(PCT)的制备方法属于医药和生物工程技术领域,涉及一种临床上可以快速准确反应炎症指标的多肽 PCT 的制备方法,发明采用 PCT cDNA 以基因工程方法制备含 116 个氨基酸残基的 PCT。用 PCR 技术将表达 PCT 的目的基因扩增,纯化其产物,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 pet41a,获得重组质粒,再将测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3),经培养扩增,抽提纯化,镍柱收集目标峰,真空冷冻干燥。本发明方法获得的降钙素原得率高、成本低,可以为制备临床诊断试剂提供大量的原材料。

1、降钙素原（PCT）的制备方法，其特征在于下述步骤：

- （1）采用经组织培养的人甲状腺滤泡旁细胞（C细胞），经 trizol 裂解、抽提得到 PCT mRNA；
- （2）将 PCTmRNA 逆转录得到 PCT 的 cDNA，也可直接化学合成得到 PCT 的 cDNA；
- （3）采用 PCR 技术将表达 PCT 的目的基因扩增，并纯化其产物；
- （4）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 pet41a，获得重组质粒 Pet41a+PCT；
- （5）将重组质粒 Pet41a+PCT 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；
- （6）将测序正确的重组质粒转化至 BL21（DE3）菌，在 30℃，0.1mM IPTG 条件下表达重组蛋白；
- （7）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；
- （8）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，过镍柱纯化；
- （9）通过免疫测定或生物活性测定检测降钙素原峰部分，得到纯化的降钙素原。

2、按权利要求 1 所述降钙素原的制备方法，其特征在于：依据以上步骤获得的降钙素原应用于制备对各类感染诊断的试剂盒。

降钙素原的制备方法

技术领域

本发明属于医药和生物工程技术领域，涉及一种临床上可以快速准确反应炎症指标的多肽的制备方法，具体为降钙素原（PCT）的制备方法。

背景技术

随着细菌耐药性、重症感染患者的增加，如何快速诊断炎症显得愈发重要。常规用于诊断炎症治疗过程的指标如体温、WBC 计数、血沉或 C 反应蛋白(CRP)等，因其都不是十分可靠的指标，是非特异性参数，临床医生迫切需要一种快速准确反应炎症的指标来确诊。

降钙素原（PCT）是一种无激素活性的 CT 前肽，由 116 个氨基酸组成，分子量为 13kD，由 CALC Ⅰ 基因编码，半衰期为 25~30 小时，在体内外稳定性很好，不会降解为降钙素，亦不受体内激素水平的影响。正常情况下，PCT 有极少量在甲状腺细胞中生成并释放入血循环，健康人血中浓度约 0.0025 ng / mL，一般的方法检测不到。在严重感染时，血 PCT 水平则明显增高，此时 PCT 主要由甲状腺外组织产生。有学者提出神经内分泌细胞、肺、肝脏和血液中的白细胞可能是产生 PCT 的部位，故在严重感染时，即使甲状腺全部切除的病人也不会影响其 PCT 血浓度的升高。PCT 主要是在细菌毒素和炎性细胞因子的刺激下产生，而在非感染性炎症状态下血清 PCT 一般不升高。动物实验提示：PCT 可能是一种次级炎症因子。它本身不能启动炎症反应，但可放大并加重炎症的病理过程。PCT 的生成非常快，对内毒素刺激反应 2~6h 之内即升高。最初升高后，PCT 值的下降取决于其在血浆中的衰减和新生成的 PCT 之间的平衡，由于 PCT 经肾脏清除很少，因此肾功能损伤的病人清除 PCT 半衰期并没有显著延长。

降钙素原(PCT)是一种急性时相反应蛋白，在炎症早期较 CRP 出现要早或同步。在严重全身性细菌、真菌、寄生虫、急性疟疾感染，系统炎性反应综合征(SIRS)，多器官功能衰竭综合征(MODS)的辅助诊断方面，PCT 是一个具有高灵敏度、特异性的新指标，不仅能早期鉴别细菌与非细菌感染，更是败血症的预警和诊断指标，且 PCT 与细菌感染的程度成正相关，

它的上升或下降直接反应疾病恶化或好转的趋势，因此，PCT 的检测在细菌性与非细菌性感染、败血症、MODS 的鉴别诊断、预后判断、疗效观察及术后细菌感染并发症监测等方面具有极大的临床应用价值。如用 PCT 快速半定量检测盒(PCT-Q)测定脓毒性休克患者血浆 PCT 水平，从而作出休克的病因诊断并指导临床用药，其他还有如半自动定量法(LUMITest/免疫发光技术)、全自动快速定量法(KRYPTOR/时间分辨荧光增强发射分析技术)等。

现有技术对降钙素原(PCT)的制备方法是直接从组织细胞提取，得率低、成本高。不能大量应用于临床。

发明内容

为了提高降钙素原(PCT)的得率，降低成本，为制备临床诊断试剂提供大量的原材料，本发明采用 PCT cDNA 以基因工程方法制备含 116 个氨基酸残基的 PCT。

本发明降钙素原(PCT)的制备方法为下述步骤：

- (1) 采用经组织培养的人甲状腺滤泡旁细胞(C 细胞)，经 trizol 裂解、抽提得到 PCT mRNA；
- (2) 将 PCTmRNA 逆转录得到 PCT 的 cDNA，也可直接化学合成得到 PCT 的 cDNA；
- (3) 采用 PCR 技术将表达 PCT 的目的基因扩增，并纯化其产物；
- (4) 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 pet41a，获得重组质粒 Pet41a+PCT；
- (5) 将重组质粒 Pet41a+PCT 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；
- (6) 将测序正确的重组质粒转化至 BL21(DE3) 菌，在 30℃，0.1mM IPTG 条件下表达重组蛋白；
- (7) 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；
- (8) 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，过镍柱纯化；
- (9) 通过免疫测定或生物活性测定检测降钙素原峰部分，得到纯化的降钙素原。

依据以上步骤获得的降钙素原可以应用于制备对各类感染诊断的试剂盒。

具体实施方式

本发明结合实施例作进一步说明。

实施例1 降钙素原的制备

1、前降钙素原(PCT)的cDNA制备:

可由PCTmRNA逆转录而来,也可直接化学合成。

PCT cDNA序列依据:美国国立卫生图书馆,序列编号:[gi:22557434]。

2、克隆制备:

用经典的方法分、切、接、转、筛制备PCT的表达克隆。

用PCR技术将表达PCT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pet41a,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BL21(DE3)菌,在30 $^{\circ}$ C, 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。

3、PCT的表达、纯化:

将表达克隆转化至表达宿主,表达后纯化。通过亲和层析分离含降钙素原达到95%以上的纯品,并通过免疫测定或生物活性测定检测降钙素原峰部分,得到纯化的降钙素原。

3.1 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kanamycin 50 μ g/ml)中,37 $^{\circ}$ C, 300r/min,恒温振荡培养,进行摇瓶实验。工程菌高密度发酵在15L发酵罐中进行。种子菌按5%比例接种,37 $^{\circ}$ C, 300r/min, kanamycin 50 μ g/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。

3.2 PCT纯化:

3.2.1 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 $\cdot$ Cl(pH8.0)、1mmol/L EDTA、100mmol/L NaCl。

3.2.2 包涵体的洗涤:用微量离心机于4 $^{\circ}$ C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。

3.2.3 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。

3.2.4 过柱纯化：镍柱收集目标峰，真空冷冻干燥。SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度。

纯化后的降钙素原的氨基酸序列符合：美国国立卫生图书馆，序列编号：[gi:22557434]。

实施例 2 降钙素原的应用 1

应用本发明方法获得的降钙素原，是一个具有高灵敏度、高特异性的新指标，能早期鉴别细菌与非细菌感染，也有助于败血症、MODS 的鉴别诊断，同时对对这些疾病预后的判断、疗效的观察及术后细菌感染并发症的监测亦具有极大的临床应用价值。

运用该发明技术获得的降钙素原免疫动物制备抗体，可以制成诊断试剂盒，用于对上述疾病的诊断、鉴别诊断及预后与疗效的观察。

实施例 3 降钙素原的应用 2

运用本发明的制成成品的降钙素原可用于临床药物的制备。

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)	降钙素原的制备方法		
公开(公告)号	CN1800384A	公开(公告)日	2006-07-12
申请号	CN200510061471.4	申请日	2005-11-08
[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	陈智 朱海红 陈峰 周林福		
发明人	陈智 朱海红 陈峰 周林福		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/12 C12N15/70 C12N1/21 C07K14/435 C07K1/14 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

降钙素原(PCT)的制备方法属于医药和生物工程技术领域，涉及一种临床上可以快速准确反应炎症指标的多肽PCT的制备方法，发明采用PCT cDNA以基因工程方法制备含116个氨基酸残基的PCT。用PCR技术将表达PCT的目的基因扩增，纯化其产物，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pet41a，获得重组质粒，再将测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌BL21(DE3)，经培养扩增，抽提纯化，镍柱收集目标峰，真空冷冻干燥。本发明方法获得的降钙素原得率高、成本低，可以为制备临床诊断试剂提供大量的原材料。