

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.02.14

· 研究生园地 ·

# 人可溶性生长刺激表达基因 2 蛋白的真核表达、纯化和鉴定

汪慧, 张天成, 凌薇, 陈盛霞, 姜旭淦(江苏大学医学院, 江苏镇江 212013)

**摘要:**目的 构建人可溶性生长刺激表达基因 2(sST2)蛋白的重组真核表达载体,获得高纯度的人 sST2 重组蛋白。方法 根据人 sST2 基因序列设计引物,利用 RT-PCR 技术获得人 sST2 基因;构建人 sST2-pcDNA3.1-his(-)重组真核表达载体;脂质体法转染 COS7 细胞,表达人 sST2 重组蛋白,并用镍柱亲和层析法纯化;用 western blot 和 ELISA 法对人 sST2 重组蛋白进行鉴定。结果 PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示产物长度与预期一致,约为 1 000 bp;同源性比对分析结果显示,人 sST2 基因成功插入 PGH-T 载体;用 BamH I 和 Hind III 对重组真核表达载体双酶切后凝胶电泳分析,结果显示产物电泳位置与预期一致;表达产物经 SDS-PAGE 电泳结果显示在相对分子质量(Mr)约为 65 000 处有一明显条带,与预期蛋白质位置一致;western blot 鉴定结果显示人 sST2 重组蛋白有 His 标签,ELISA 鉴定结果显示人 sST2 重组蛋白有与抗 sST2 抗体结合的特异性抗原表位。结论 通过重组 DNA 技术成功构建人 sST2 基因重组真核表达载体,通过蛋白质纯化技术成功获得人 sST2 重组蛋白。

**关键词:**人可溶性生长刺激表达基因 2 蛋白;真核表达;蛋白质纯化

**中图分类号:**R446

**文献标志码:**A

## Eukaryotic expression, purification and identification of human soluble growth stimulating expression gene 2 protein

WANG Hui, ZHANG Tiancheng, Ling Wei, CHEN Shengxia, JIANG Xugan (Medical College, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China)

**Abstract: Objective** To construct a recombinant eukaryotic expression vector of human soluble growth stimulating expression gene 2 (sST2) protein to obtain high-purity human sST2 recombinant protein. **Methods** The primers were designed based on the human sST2 gene sequence and human sST2 gene was obtained by RT-PCR technology. Human sST2-pcDNA3.1-his(-) recombinant eukaryotic expression vector was constructed. COS7 cells were transfected with liposome method to express human sST2 recombinant protein which was purified by nickel column affinity chromatography. The recombinant human sST2 protein was identified by western blot and ELISA.

**Results** The PCR amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis, the results of which showed that the length of the products was consistent with the expectation, approximately 1 000 bp. The results of homology analysis showed that human sST2 was successfully inserted into the PGH-T vector. The results of gel electrophoresis analysis after double enzyme digestion of the nuclear expression vector showed that the electrophoresis position of the product was consistent with the expectation. SDS-PAGE electrophoresis results showed that there was a clear band at about (Mr) 65 000, which was consistent with the expected protein position. Western blot identification showed that the recombinant human sST2 protein had a His tag, and ELISA identification showed that the recombinant human sST2 protein had a specific antigenic epitope that bound to the anti-sST2 antibody. **Conclusion** Human sST2 recombinant eukaryotic expression vector was successfully constructed by recombinant DNA technology, and human sST2 recombinant protein was successfully obtained by protein purification technology.

**Key words:** human soluble growth-stimulated expression gene 2 protein; eukaryotic expression; protein purification

人可溶性生长刺激表达基因 2(soluble growth stimulating expression gene 2, sST2)定位于 2 号染色体 2q11.2, sST2 蛋白含有 328 个氨基酸,具有 3 个免疫球蛋白结构域以及 9 个糖基化位点<sup>[1-2]</sup>,可在心脏、肺、肾和小肠等部位以及淋巴细胞、肥大细胞及多种内皮细胞中表达产生<sup>[3-4]</sup>。一些学者研究人 sST2 蛋白的结构、作用机制及其临床应用价值,发现人 sST2 蛋白的检测对于临床诊断心力衰竭、风湿

免疫病以及过敏性疾病等具有重要价值<sup>[5-6]</sup>。2017 年,美国心脏病学会基金会/美国心脏协会(American College of Cardiology Foundation/American Heart Association, ACCF/AHA)确定将 sST2 蛋白加入到慢性心力衰竭急性期和急性加重期危险分层指南中<sup>[7]</sup>。目前国内可用于临床的人 sST2 蛋白检测试剂盒均采用免疫学方法,且多为进口产品,价格昂贵,限制了其在临床疾病诊断与治疗中的应用与发

**作者简介:**汪慧,1994 年生,女,硕士研究生,研究方向为临床检验诊断学。

**通信作者:**姜旭淦,副教授,博士, E-mail:jiangxugan1962@163.com。

展。因此,需要获得高纯度的人 sST2 蛋白抗原,为建立更多免疫学检测方法提供基础。本研究旨在构建人 sST2 重组真核表达载体,获得高纯度的人 sST2 重组蛋白,为研究人 sST2 蛋白检测方法提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株和细胞** PGH-T 质粒、大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  均由本实验室保存;HUVEC 细胞由 ATCC 细胞库提供;pcDNA3.1-his(-) 质粒、COS7 细胞由丰晖生物公司提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器** ECM 细胞培养液(美国 ScienCell 公司);Trizol、Lipo2000(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);抗 HIS 标签抗体(南京诺唯赞公司);逆转录试剂盒、Tag Mater Mix PCR 预混液(日本 TaKaRa 公司);琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、去内毒素质粒提取试剂盒(北京康为世纪公司);人 sST2 检测 ELISA 试剂盒(杭州联科生物公司);PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);酶联仪、FCQ 凝胶成像仪及垂直电泳仪(美国 BioRad 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 人 sST2 cDNA 的获取** 按照 Aoki 等<sup>[8]</sup>的方法用 ECM 培养基培养 HUVEC 细胞。用 Trizol 法提取细胞总 RNA,采用逆转录试剂盒得到人 sST2 基因 cDNA。

**1.2.2 人 sST2 基因的获取** 根据 NCBI 的人 sST2 基因全长序列(GenBank: D12763.1)<sup>[3]</sup>,用 Primer Premier 6.0 软件设计得到用于扩增产物长度为 1 002 bp 的人 sST2 基因的上游引物(F):GGCGGAT CCTCTTGATTGATAAACAGAATG,下划线为 BamH I 酶切位点,下游引物(R):GGCAAGCTTGAAACACT CCTTACTTGGATT,下划线为 Hind III 酶切位点。引物由上海亦欣生物公司合成。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}$ C 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,29 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定,再用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段,得到人 sST2 基因。

**1.2.3 人 sST2-pcDNA3.1-his(-) 重组真核表达载体的构建与鉴定** 将人 sST2 与 PGH-T 质粒连接构成重组克隆载体,转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态,经过氨苄抗生素筛选,获得阳性克隆后,采用质粒提取试剂盒提取质粒并送上海生工生物公司测序。用 BamH I 和 Hind III 双酶切经测序正确的阳性质粒以

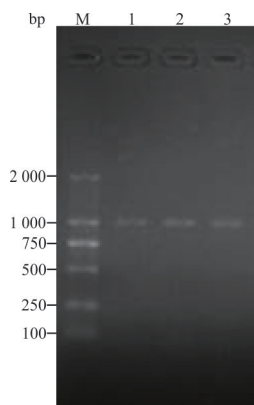
及 pcDNA3.1-his(-) 质粒。采用 T4 连接酶使人 sST2 和 pcDNA3.1-his(-) 质粒连接,得到重组真核表达载体并转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态,氨苄抗生素筛选后,获得阳性克隆,用去内毒素质粒提取试剂盒提取人 sST2-pcDNA3.1-his(-) 重组真核表达载体。用 BamH I 和 Hind III 双酶切重组真核表达载体,酶切产物琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.2.4 人 sST2 蛋白的表达与纯化** 采用 Lipo2000 脂质体转染法,将重组真核表达载体转染 COS7 细胞,6 h 后用 DMEM 高糖完全培养基换液,24 h 后开始收集细胞培养上清液。采用镍柱亲和分析法将细胞培养上清液过柱纯化,得到纯化的人 sST2 蛋白。采用透析袋蔗糖浓缩法,得到浓缩的人 sST2 蛋白,分装入 1.5 mL EP 管中,-20  $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.5 人 sST2 蛋白的鉴定** 用考马斯亮蓝染色法鉴定人 sST2 蛋白的位置大小与纯度。用 western blot 法鉴定人 sST2 蛋白是否含有 His 标签。用人 sST2 检测 ELISA 试剂盒检测纯化的人 sST2 蛋白是否具有与抗人 sST2 抗体特异性结合的抗原表位。

## 2 结果

**2.1 RT-PCR 法扩增人 sST2 基因** 逆转录法得到基因组 cDNA 后,利用特异性 PCR 引物,扩增人 sST2 目的基因,产物经琼脂糖凝胶电泳,在约 1 000 bp 处出现目的条带(见图 1),与理论 PCR 产物大小(1 002 bp)一致。



注:M,DL 2 000 DNA marker;1~3,人 sST2 基因 PCR 扩增产物。

图 1 人 sST2 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳分析

**2.2 人 sST2-PGH-T 重组载体鉴定** 人 sST2-PGH-T 重组载体转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态后,经菌落 PCR 鉴定,琼脂糖凝胶电泳出现阳性条带。同源比对分析结果显示人 sST2 成功插入 T 载体(只出现 1 个碱基突变)(见图 2)。

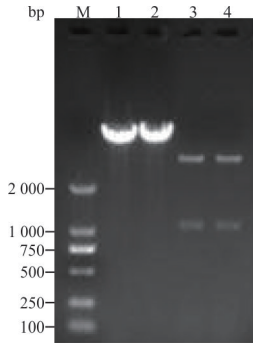
Query	1	TCTTGATTGATAAACAGAAATGGGTTTTGGATCTTAGCAATTCTCACAATTCTCATGTAT	60
Sbjct	68	TCTTGATTGATAAACAGAAATGGGTTTTGGATCTTAGCAATTCTCACAATTCTCATGTAT	127
Query	61	TCCACAGCAGCAAAAGTTTAGTAAACAATCA TGGGGCTGGAAAAATGAGGCTTTAAATTGTA	120
Sbjct	128	TCCACAGCAGCAAAAGTTTAGTAAACAATCA TGGGGCTGGAAAAATGAGGCTTTAAATTGTA	187
Query	121	AGATGTCCTAGACAAGGAAAAOCTAGTTACACCGTGGATTGGTATTACTCACAACAAAC	180
Sbjct	188	AGATGTCCTAGACAAGGAAAAOCTAGTTACACCGTGGATTGGTATTACTCACAACAAAC	247
Query	181	AAAAGTATTCCOACTCAGGAAAGAAAATCGTGTGTTGCCTCAGGCCAACTTCTGAAGTTT	240
Sbjct	248	AAAAGTATTCCOACTCAGGAAAGAAAATCGTGTGTTGCCTCAGGCCAACTTCTGAAGTTT	307
Query	241	CTACCAGCTGAAGTTGCTGATTCTGGTATTTATACCTGTATTGTCAGAAGTCCCACATTC	300
Sbjct	308	CTACCAGCTGCAGTTGCTGATTCTGGTATTTATACCTGTATTGTCAGAAGTCCCACATTC	367
Query	301	AATAGGACTGGATATGCGAATGTCACCATA TATAAAAAACAATCAGATTGCAATGTTCCA	360
Sbjct	368	AATAGGACTGGATATGCGAATGTCACCATA TATAAAAAACAATCAGATTGCAATGTTCCA	427
Query	361	GATTATTGATGTATTCAACAGTATCTGGATCAGAAAAAATCCAAAAATTTATTGTCTCT	420
Sbjct	428	GATTATTGATGTATTCAACAGTATCTGGATCAGAAAAAATCCAAAAATTTATTGTCTCT	487
Query	421	ACCATTGACCTCTACAACCTGGACAGCAOCTCTTGAGTGGTTTAAAGAAITGTCAGGCTCTT	480
Sbjct	488	ACCATTGACCTCTACAACCTGGACAGCAOCTCTTGAGTGGTTTAAAGAAITGTCAGGCTCTT	547
Query	481	CAAGGATCAAGGTACAGGGCGCACAAAGTCA TTTTGGTCAATTGATAATGTGATGACTGAG	540
Sbjct	548	CAAGGATCAAGGTACAGGGCGCACAAAGTCA TTTTGGTCAATTGATAATGTGATGACTGAG	607
Query	541	GACGCAGGTGATTACACCTGTAAATTTATACACAATGAAAAATGGAGCCAATTATAGTGTG	600
Sbjct	608	GACGCAGGTGATTACACCTGTAAATTTATACACAATGAAAAATGGAGCCAATTATAGTGTG	667
Query	601	ACGGGACOCAGGTOCTTCACGGTCAAGGATGAGCAAGGCTTTTCTCTGTTCCAGTAATC	660
Sbjct	668	ACGGGACOCAGGTOCTTCACGGTCAAGGATGAGCAAGGCTTTTCTCTGTTCCAGTAATC	727
Query	661	GGAGOCCCTGCACAAAAATGAAATAAAGGAAGTGAAAAATGGAAAAAOCGAAAACCTAACT	720
Sbjct	728	GGAGOCCCTGCACAAAAATGAAATAAAGGAAGTGAAAAATGGAAAAAOCGAAAACCTAACT	787
Query	721	TGCTCTGCTTGTGTTTGGAAAAGGCACTCAGTTCTTGGCTGCCGTCTGTGGCAGCTTAAAT	780
Sbjct	788	TGCTCTGCTTGTGTTTGGAAAAGGCACTCAGTTCTTGGCTGCCGTCTGTGGCAGCTTAAAT	847
Query	781	GGAAACAAAAATTACAGACTTTGGTGAOCCAAGAATTAACAAGAGGAAGGGCAAAATCAA	840
Sbjct	848	GGAAACAAAAATTACAGACTTTGGTGAOCCAAGAATTAACAAGAGGAAGGGCAAAATCAA	907
Query	841	AGTTTCAGCAATGGGCTGGCTTGTCTAGACATGGTTTTAAGAATAGCTGACGTGAAGGAA	900
Sbjct	908	AGTTTCAGCAATGGGCTGGCTTGTCTAGACATGGTTTTAAGAATAGCTGACGTGAAGGAA	967
Query	901	GAGGATTTATTGCTGCAGTACGACTGTCTGGCCCTGAATTTGCATGGCTTGAGAAAGGCAC	960
Sbjct	968	GAGGATTTATTGCTGCAGTACGACTGTCTGGCCCTGAATTTGCATGGCTTGAGAAAGGCAC	1027
Query	961	ACCGTAAGACTAAGTAGGAAAAATCCAAGTAAGGAGTGTTTC	1002
Sbjct	1028	ACCGTAAGACTAAGTAGGAAAAATCCAAGTAAGGAGTGTTTC	1069

注:Query 为人 *sST2* 目的基因序列,Sbjct 为测序所得基因序列(1 个基因突变)

图 2 人 *sST2*-PGH-T 载体同源性比对分析

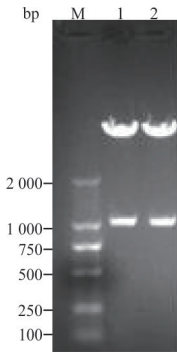
**2.3 人 *sST2*-pcDNA3.1-his(-) 重组真核表达载体鉴定** 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切人 *sST2*-PGH-T 重组载体和 pcDNA3.1-his(-) 质粒后琼脂糖凝胶电泳显示产物电泳位置与预期一致(见图 3),目的片

段胶回收后 T4 酶连接获得人 *sST2*-pcDNA3.1-his(-) 重组真核表达载体并再次 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。琼脂糖凝胶电泳结果显示产物电泳位置与预期一致(见图 4)。



注:DL 2 000 DNA marker; 1、2, pcDNA3.1-his(-)质粒双酶切产物; 3、4, 人 sST2-PGH-T 载体双酶切产物。

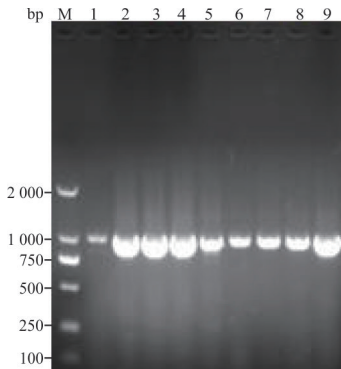
图 3 pcDNA3.1-his(-)质粒及人 sST2-PGH-T 载体双酶切产物鉴定



注: M, DL 2 000 DNA marker; 1、2, 重组表达载体双酶切产物。

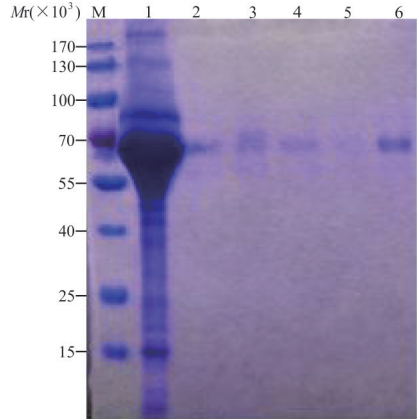
图 4 人 sST2-pcDNA3.1-his(-)重组表达载体双酶切产物鉴定

**2.4 人 sST2 蛋白表达与纯化** 将人 sST2-pcDNA 3.1-his(-)重组真核表达载体转染 COS7 细胞,对转染试剂的用量及转染时间进行优化,用 RT-PCR 法分析转染效率(见图 5)。考马斯亮蓝染色法鉴定纯化人 sST2 蛋白的相对分子质量( $M_r$ )约在 65 000(见图 6)。



注: M, DL 2 000 DNA marker; 1, 阴性对照(加入重组表达载体但未添加转染试剂); 2~5(转染细胞 24 h 后的 RT-PCR), 转染试剂依次为 1、1.5、2、2.5  $\mu$ L Lipo2000/孔; 6~9(转染细胞 48 h 后的 RT-PCR), 转染试剂依次为 1、1.5、2、2.5  $\mu$ L Lipo2000/孔。

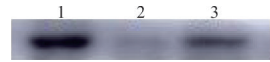
图 5 人 sST2-pcDNA3.1-his(-)重组表达载体转染 COS7 细胞后 RT-PCR 凝胶电泳分析



注: M, 蛋白质 marker; 1, 未纯化的细胞培养上清液; 2~6, 纯化后的人 sST2 重组蛋白。

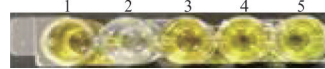
图 6 SDS-PAGE 电泳鉴定人 sST2 重组蛋白纯度

**2.5 人 sST2 蛋白鉴定** western blot 法显示人 sST2 蛋白有可与抗 His 标签抗体发生特异性结合的 His 标签(见图 7)。ELISA 试剂盒显示人 sST2 蛋白有可与抗人 sST2 蛋白抗体发生特异性结合的抗原表位(见图 8)。



注: 1, 未纯化的人 sST2 重组蛋白; 2、3, 镍柱亲和层析纯化的人 sST2 重组蛋白。

图 7 western blot 法鉴定人 sST2 重组蛋白



注: 1, 阳性对照; 2, 空白对照; 3~5, 人 sST2 重组蛋白。

图 8 ELISA 试剂盒鉴定人 sST2 重组蛋白

### 3 讨论

人 sST2 蛋白与 IL-33 结合,抑制 Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子,调节机体的免疫应答,使心肌纤维化及心肌肥厚加重,最终发生心力衰竭<sup>[9]</sup>。Yucel 等<sup>[10]</sup>研究显示心力衰竭患者血清 sST2 蛋白水平明显升高。2014 年中国心力衰竭指南推荐认为 sST2 蛋白等指标在急性或慢性心力衰竭的危险分层中可能提供额外信息<sup>[11]</sup>。对于 SLE<sup>[12]</sup>、类风湿性关节炎<sup>[13]</sup>以及过敏性哮喘<sup>[14]</sup>等免疫调节异常所致疾病患者,血清 sST2 蛋白水平也较健康人对照组明显升高。这些研究结果说明了在临床开展血清人 sST2 蛋白检测的重要性和必要性。

本研究通过富含生长因子的内皮细胞专用营养培养基 ECM 培养 HUVEC 细胞,设计合成一对引物,成功通过 RT-PCR 的方法扩增得到人 sST2 目的基因片段。Yoshida 等<sup>[15]</sup>研究发现原核表达的 sST2

蛋白,其免疫产生的抗 sST2 抗体可能因为缺乏转录及翻译后的加工机制而不适用于临床检测。本研究所用的 pcDNA3.1-his(-) 质粒优势考虑以下两点:(1)作为真核表达载体,其基因高效表达的同时,真核表达系统具有翻译后的加工修饰体系,其表达的外源蛋白更接近天然蛋白。(2)在其氨基末端设计加有 6 个 His 标签,通过该标签与镍柱颗粒的结合来实现亲和层析法纯化目的蛋白,同时,由于 His 标签相对分子量小,免疫原性相对较低,一般不影响目的蛋白的功能,实验后期无需切除标签,也利于直接免疫动物制备抗体。故本实验采用真核表达系统,成功构建了人 sST2-pcDNA3.1-his(-) 重组真核表达载体,又利用脂质体转染法在 COS7 细胞中过表达产生大量人 sST2 蛋白。

目前临床上血清人 sST2 蛋白的定量检测 ELISA 试剂盒来源渠道较少,国内外少见关于研究制备可靠的人 sST2 蛋白标准品及其检测抗体甚至检测试剂盒方法的报道。本研究成功获得具有免疫学活性的人 sST2 重组蛋白,为后续动物免疫制备人 sST2 蛋白单克隆抗体及开发可靠的人 sST2 蛋白检测试剂盒提供了实验基础。

#### 4 参考文献

[1] Tominaga S, Yokota T, Yanagisawa K, *et al.* Nucleotide sequence of a complementary DNA for human ST2 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1171(2): 215-218.

[2] Tominaga S, Inazawa J, Tsuji S. Assignment of the human ST2 gene to chromosome 2 at q11. 2 [J]. *Hum Genet*, 1996, 97(5): 561-563.

[3] Mildner M, Storka A, Lichtenauer M, *et al.* Primary sources and immunological prerequisites for sST2 secretion in humans [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87(4): 769-777.

[4] Zhang J, Ramadan AM, Griesenauer B, *et al.* ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7

(308): 308ra160.

[5] McCarthy CP, Januzzi JL. Soluble ST2 in heart failure [J]. *Heart Fail Clin*, 2018, 14(1): 41-48.

[6] 王运红, 周琼, 安涛, 等. 中国社区人群可溶性 ST2 血浆水平的参考值范围及影响因素 [J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(10): 900-903.

[7] Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, *et al.* 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70(6): 776-803.

[8] Aoki S, Hayakawa M, Ozaki H, *et al.* ST2 gene expression is proliferation-dependent and its ligand, IL-33, induces inflammatory reaction in endothelial cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 335(1-2): 75-81.

[9] Mueller T, Jaffe AS. Soluble ST2-- analytical considerations [J]. *Am J Cardiol*, 2015, 115(7): 8B-21B.

[10] Yucel O, Gul I, Zararsiz A, *et al.* Association of soluble ST2 with functional capacity in outpatients with heart failure [J]. *Herz*, 2018, 43(5): 455-460.

[11] 黄峻. 2014 年中国心力衰竭指南基本特点和内容要点 [J]. *中国实用内科杂志*, 2014, 34(7): 662-665.

[12] 霍永宝, 陶怡, 陈斯玲, 等. IL-33/ST2 比值与红斑狼疮肾脏慢性损伤严重程度相关性研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(9): 1696-1702.

[13] Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, *et al.* Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(5): 1104-1108.

[14] 柴强, 宋红玉, 李朝品. 白细胞介素-33 在过敏性哮喘小鼠体内的变化及作用 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2018, 36(2): 124-128.

[15] Yoshida K, Arai T, Yocota T, *et al.* Studies on natural ST2 gene products in the human leukemic cell line UT-7 using monoclonal anti-human ST2 antibodies [J]. *Hybridoma*, 1995, 14(5): 419-427.

(收稿日期:2019-10-13)

(本文编辑:王海燕)