

# 人心肌肌钙蛋白 I-C 融合蛋白 在大肠杆菌中的可溶性表达及纯化

闫存玲 徐国宾\* 夏铁安

(北京大学第一医院检验科, 北京 100034)

**摘要** 提取人心肌组织总 RNA, RT-PCR 扩增出人心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, *cTnI*) 和肌钙蛋白 C (*TnC*) 基因, 利用人工合成的可编码 19 个中性氨基酸残基为主的 DNA 序列 (Linker), 将 *cTnI* 和 *TnC* 基因连接, 插入到质粒 pET15b 中, 将鉴定正确的重组 pET15b 质粒转化入大肠杆菌 *BL21 (DE3) pLysS* 中, 用异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白质表达. 结果在大肠杆菌中成功实现了全长 *cTnI*-C 融合蛋白 (*cTnI*-linker-*TnC*) 的稳定可溶性高表达, 在摇瓶中表达量可达 21 mg/L. 利用目的蛋白 N 端的组氨酸“标签” (His-tag), 经一步  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose 柱亲和和层析纯化, 得到了聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 纯蛋白质. 经初步研究, *cTnI*-C 具有较好的免疫原性和稳定性, 有望成为 *cTnI* 测定系统可溯源的候选参考物质, 推进 *cTnI* 检测的标准化进程.

**关键词** 心肌肌钙蛋白 I-C, 融合蛋白, 表达, 纯化

**学科分类号** R446.1

人心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, *cTnI*) 与心肌肌钙蛋白 T (*cTnT*)、肌钙蛋白 C (*TnC*) 形成复合物, 存在于心肌肌原纤维细肌丝上, 是心肌细胞的重要调节蛋白<sup>[1]</sup>. *cTnI* 具有较高的心肌特异性, 已成为诊断心肌损伤的确定性标志物. 到 2000 年为止, 美国国家药品和食品管理局 (FDA) 至少已批准 16 种 *cTnI* 免疫学检测试剂<sup>[2]</sup>, 但不同试剂测定结果间存在显著差异. 由于检测结果缺乏可比性, 给临床应用及评价带来困扰, 进行 *cTnI* 测定的标准化, 以尽量缩小各方法测定结果之间的差异, 受到临床医生和检验工作者的极大关注. 分析引起测定结果差异的原因主要有: *cTnI* 在血清中不稳定易被蛋白酶水解; 不同试剂所用单克隆抗体针对不同的 *cTnI* 表位; *cTnI* 测定方法学不同; 各测定试剂所配套的校准品中游离和复合物形式 *cTnI* 的含量及降解情况不同等<sup>[3]</sup>. 由于目前还没有国际公认的 *cTnI* 参考物质, 校准品量值无处溯源, 因此制备结构稳定、分子均一并能被所有 *cTnI* 单抗试剂识别的溯源参考物质, 用于校准品的量值溯源成为 *cTnI* 测定标准化的关键之一.

本研究根据心肌损伤患者血清中 *cTnI* 多以 *cTnI*-*TnC* 复合物形式存在, 且与 *TnC* 形成复合物后 *cTnI* 稳定性增加, 不易被蛋白酶水解的特点, 用 19 个中性氨基酸为主的短肽将 *cTnI* 和 *TnC* 连接到一起, 构建了全长 *cTnI*-*TnC* 融合蛋白 (*cTnI*-C) 的原核表达系统, 在大肠杆菌中成功实现了全长

*cTnI*-C 的稳定可溶性高表达. 目的蛋白 N 端带有组氨酸“标签” (His-tag), 经一步  $\text{Ni}^{2+}$  金属螯合亲和和层析纯化, 即得到 PAGE 纯、具有较好免疫原性和稳定性的 *cTnI*-C 二元重组蛋白.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

质粒 pET-15b 和菌种 *E. coli BL21 (DE3) pLysS* 购自 Novagen 公司, 质粒 pPIC9 购自 Invitrogen 公司. 逆转录试剂盒购自 GIBCO 公司, *Sna*b I 内切酶购自 Takara 公司, 其他常用内切酶购自 NEB 公司, 兔抗人 *cTnI* 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, DNA 的合成与序列测定由北京奥科公司完成, AKTA-FPLC 蛋白纯化系统为 Amersham Pharmacia 公司产品, Access 微粒子化学发光免疫分析仪及 AccuTn I 试剂盒为 Beckman Coulter 公司生产.

### 1.2 方法

**1.2.1 RNA 提取和逆转录:** 取液氮冻存的心肌组织 100 mg, 在低温下研磨成粉末, 加 1 ml TRIzol 试剂混匀, 采用酚-氯仿抽提、异丙醇沉淀法提取总 RNA, 进行逆转录反应合成 cDNA.

**1.2.2 PCR 引物与 Linker 的设计:** 将 *cTnI* 和

\* 通讯联系人.

Tel: 010-66551122-2042, E-mail: bdyjyjk@sina.com

收稿日期: 2004-03-11, 接受日期: 2004-04-28

*TnC* 基因插入 *pPIC9* 质粒中, 然后用一段可编码短肽的 *Linker* 将 *cTnI* 和 *TnC* 连接在一起. 根据 *cTnI* 与 *TnC* 的基因序列和 *pPIC9* 的多克隆位点设计引物和 *Linker* 序列, *cTnI* PCR 引物: 上游 5' ATTACGTAATGGCGGATGGGAGCAGC 3', 下游 5' CCGAATTCGCTCTCAAACCTT TTTC TTGCGGCC 3', 分别引入 *SnaB* I 和 *EcoR* I 的酶切位点; *TnC* PCR 引物: 上游 5' CCTAGGATGGATGACATCTACA-AGGC 3', 下游 5' ACGTCTAGA CTACTCCACAC CCTTCATG 3', 分别引入 *Avr* II 和 *Not* I 的酶切位点. *Linker* 序列: 正义链 5' ACGAATTCAGTGG-TGGTGGTGGTTCTGGTGGGGGGGGTTCTGGTGGCG-GTGTTT TCCTAGGATCC 3', 反义链 3' TGCTT-AAGTCACCACCACCACCAAGACCACCCCCCCCCAAG-ACCACCGCCACCAAGAGGATCCTAGG 5', 分别引入 *EcoR* I 和 *Avr* II 的酶切位点.

**1.2.3 目的基因的扩增:** 以人心肌组织 cDNA 为模板, PCR 扩增人 *cTnI* 和 *TnC* 基因, 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min. 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 应得到 650 bp 的 *cTnI* 片段和 500 bp 的 *TnC* 片段.

**1.2.4 *cTnI-C* 原核表达载体的构建:** 将纯化后的 *cTnI* PCR 扩增产物和 *pPIC9* 质粒用 *SnaB* I 和 *EcoR* I 进行双酶切, 1% 琼脂糖电泳分离, 玻璃奶纯化, 在 T4 DNA 连接酶的作用下将 *cTnI* 基因插入 *pPIC9* 质粒中, 同样的方法将 *TnC* PCR 产物用 *Avr* II 和 *Not* I 酶切后插入已含有 *cTnI* 的 *pPIC9* 中. 取 *Linker* 正义和反义链等摩尔聚合, *EcoR* I 和 *Avr* II 双酶切后插入含有 *cTnI* 和 *TnC* 的 *pPIC9* 质粒中, 经测序验证全长 *cTnI-C* (*cTnI-Linker-TnC*) 序列是否正确, 测序正确的质粒命名为 *pPIC9-IC*.

利用 *pET15b* 质粒为载体构建原核表达载体, 根据 *pET15b* 质粒的多克隆位点和 *cTnI-C* 序列设计 PCR 引物, 引物序列为: 上游 5' ATCATATGG-CCGATGGTAGCAGC 3', 下游 5' TGGATCCCTAC-TCCACACCCTTCATG 3' 分别引入 *Nde* I 和 *Bam*H I 的酶切位点. 以 *pPIC9-IC* 质粒为模板扩增 *cTnI-C* 基因, 将 PCR 产物插入 *pET15b* 质粒中, 得到原核表达载体 *pET15-IC*, 酶切鉴定正确后测序.

**1.2.5 *E. coli* BL21(DE3)*pLysS* 的转化和融合蛋白的诱导表达:** 将 *pET15-IC* 质粒转化入感受态表达菌 *E. coli* BL21(DE3)*pLysS* 中, 从 37℃ 培养过夜的含抗生素 (100 mg/L 氨苄青霉素和 17 mg/L 氯霉

素) 的 LB 平板上挑取菌落, 转种于含相同抗生素的 LB 液体培养基中进行培养, 细菌生长至  $A_{600} \approx 0.6$  时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 诱导蛋白的表达. 收集细菌沉淀超声破菌, 离心取上清进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定.

**1.2.6 诱导条件的优化:** 在 37℃ 和 25℃ 两个温度条件下, 分别加入 IPTG 0.1、0.2、0.5 和 1.0 mmol/L 进行目的蛋白的诱导表达, 选择最佳诱导条件. 在诱导后 1、2、3、4、5、6 和 7 h 测定 *cTnI* 的表达量, 确定最佳表达时间.

**1.2.7 目的蛋白的纯化:** *pET15b* 作为载体所表达的重组蛋白在其 N 端带有一个由 6 个 His 组成的“标签”, 可用  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose 柱进行亲和层析纯化<sup>[4]</sup>. 用含 50、100、300、500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液 (0.5 mol/L NaCl、50 mmol/L pH 6.8 磷酸钠缓冲液) 进行梯度洗脱, 收集洗脱峰后脱盐 (脱盐缓冲液为 pH 7.4 的 PBS). 对纯化产物进行 12% SDS-PAGE, 并测定 *cTnI* 的免疫学含量, 计算回收率. 纯化后的目的蛋白送北京华大蛋白质研发中心进行质谱分析.

**1.2.8 *cTnI* 免疫学含量测定:** 采用双抗体夹心法, 在 Access 微粒子化学发光免疫分析仪上用 AccuTnI 试剂盒测定 *cTnI* 的免疫学含量. 使用的两株抗体都为鼠抗人 *cTnI* 单抗, 一株包被于磁性微粒子上, 一株用碱性磷酸酶 (ALP) 标记, 化学发光底物为 AMPPD, 该测定系统的线性范围为 0.01 ~ 100  $\mu\text{g/L}$ . 包被于磁性微粒子上的抗体和酶标抗体分别与 *cTnI* 的两个不同抗原决定簇结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体免疫复合物, 发光底物 AMPPD 经免疫复合物中 ALP 水解生成一种不稳定的阴离子, 该阴离子分解时持续发光, 发光强度稳定, 与 ALP 量成正比, 即与待测抗原 *cTnI* 含量成正比.

**1.2.9 *cTnI-C* 稳定性的初步研究:** a. *cTnI-C* 在血清基质中的稳定性. 将纯化后的 *cTnI-C* 加入血清基质中, 观察其对抗蛋白酶降解的能力. 在 4 ml pH 7.4 的 PBS 中加入 0.15  $\mu\text{g}$  纯化的 *cTnI-C*, 然后加入 1 ml 正常人血清混匀 (血清量的选择参照 Liu 等的研究<sup>[5]</sup>), 样本中 *cTnI* 的含量与心肌梗患者血清值接近), 37℃ 水浴放置 1、2、3、4 和 5 天后测定 *cTnI* 含量变化. b. *cTnI-C* 在不同保存体系中的稳定性. 配制含有 10% BSA 的 pH 7.4 PBS 和含有 50% 甘油、10% BSA 的 pH 7.4 PBS (抗冻保存液), 将纯化后的 *cTnI-C* 加入以上保存液中

(cTnI-C 的加入量为 6 mg/L)，分别放置于室温、4℃ 和 -20℃，定期测定 cTnI 的含量变化。同时测定未加保护剂时 cTnI-C 在 pH 7.4 PBS 中的稳定性。

2 结 果

2.1 PCR 扩增目的基因 *cTnI* 和 *TnC*

以人心肌组织 cDNA 为模板经 PCR 扩增出 650 bp 的 *cTnI* 和 500 bp 的 *TnC* 基因片段，与预期一致（图 1）。经测序，DNA 序列完全正确。

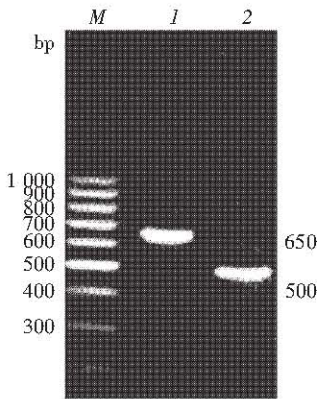


Fig. 1 Identification of PCR product  
M: DNA ladder; 1: *cTnI* PCR product;  
2: *TnC* PCR product.

2.2 PCR 扩增 *cTnI-C* 基因

以 pPIC9-IC 质粒为模板，扩增出约 1 200 bp 的 *cTnI-C* 基因片段，与预期一致（图 2）。

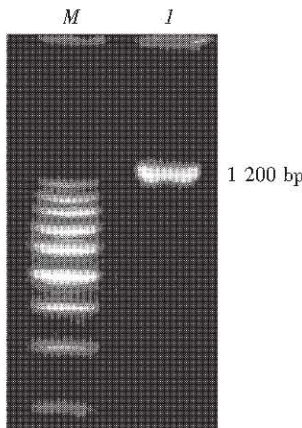


Fig. 2 Identification of *cTnI-C* PCR product  
M: DNA ladder; 1: *cTnI-C* PCR product.

2.3 cTnI-C 在大肠杆菌中的诱导表达

经 IPTG 诱导后，取细菌裂解液上清进行 SDS-PAGE 鉴定（图 3），45ku 附近可见外源蛋白表达条带。取细菌裂解液上清用抗 cTnI 多抗进行蛋白质印迹分析（图 4），显示为单一印迹，无降解条带，说明在大肠杆菌中得到了 cTnI-C 的可溶性表达，目的蛋白在表达过程中稳定无降解。

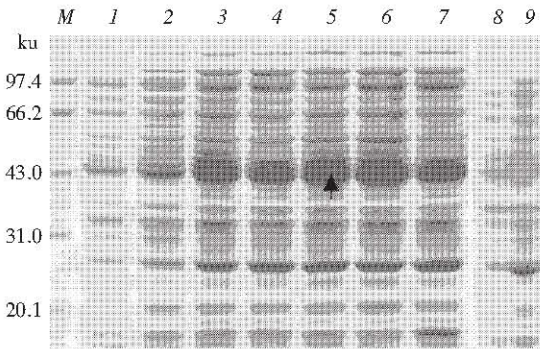


Fig. 3 Overexpression of cTnI-C in the host bacteria of *E. coli* BL21(DE3) *pLysS*  
M: Low protein molecular mass marker; 1 ~ 7: Cell lysate supernatant of the host bacteria containing recombinant plasmids 1 ~ 7 h of IPTG induction (the arrowhead pointed the target protein); 8: Cell lysate supernatant of the host bacteria containing plasmids pET-15b without IPTG induction; 9: Cell lysate supernatant of the host bacteria containing plasmids pET-15b with IPTG induction.

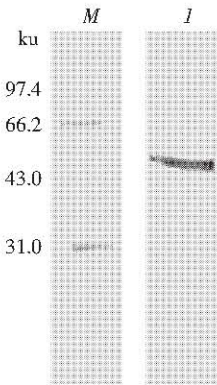


Fig. 4 Result of Western blot  
M: Low protein molecular mass marker;  
1: cell lysate supernatant.

2.4 诱导条件的优化

选用不同温度 and 不同诱导剂浓度进行目的蛋白的诱导表达，结果在 25℃、0.5 mmol/L IPTG 条件

下,目的蛋白表达量最高(图5),诱导5h后目的蛋白表达量基本接近峰值,cTnI表达量达11.3 mg/L,按融合蛋白中cTnI的相对含量计算,cTnI-C表达量为21 mg/L.

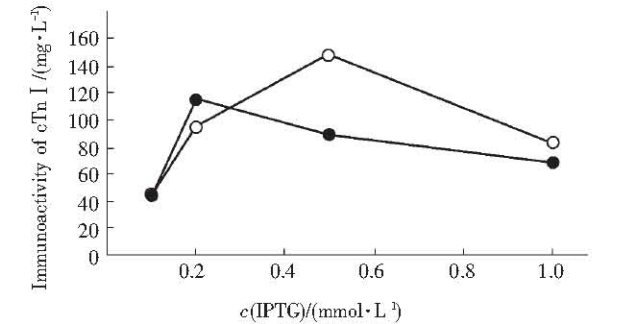


Fig. 5 Optimized induced condition  
●—●: Induced at 37°C; ○—○: Induced at 25°C.

2.5 目的蛋白的纯化

在 Amersham Pharmacia AKTA 蛋白纯化系统上用Ni<sup>2+</sup>-Sephrose柱对细菌裂解上清进行亲和层析

纯化,收集洗脱峰后脱盐.经12% SDS-PAGE 鉴定,目的蛋白呈单一条带(图6),回收率达70%(表1).

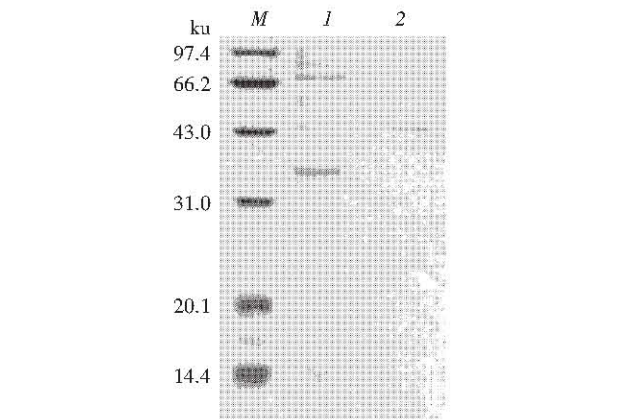


Fig. 6 Purification of the fusion protein cTnI-C  
M: Low protein molecular mass marker; I: flowthrough fraction;  
2: cTnI-C with His tag eluted from nickel-Sephrose column.

Table 1 Score table of cTnI-C purification

| Step                    | V/ml | m (cTnI) /mg | ρ (cTnI) / (mg · L <sup>-1</sup> ) | Recovery rate/% |
|-------------------------|------|--------------|------------------------------------|-----------------|
| Original fluid          | 8    | 4.4          | 550                                |                 |
| Affinity chromatography | 21   | 3.6          | 171                                | 82              |
| Desalting               | 30   | 3.1          | 103.3                              | 85              |
| Total recovery rate     |      |              |                                    | 70              |

2.6 质谱分析结果

经高效液相色谱-电喷雾-质谱法(HPLC-ESI-MS)分析,cTnI-C得分173(>63分有意义),融合蛋白的分子质量为46.1 ku,pI为5.36,与预期一致.

2.7 cTnI-C 稳定性初步观察

2.7.1 cTnI-C 在 37°C 血清基质中的稳定性:将纯化后的 cTnI-C 放于血清基质中,37°C 孵育.检测孵育不同时间后的 cTnI 免疫学含量,计算相对剩余量.结果孵育 2 天内 cTnI 较稳定,其含量仅下降 8% (图7).

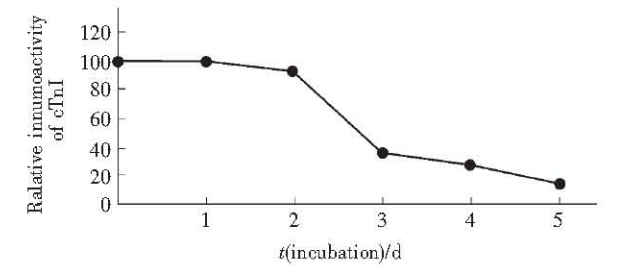


Fig. 7 Stability study of cTnI-C in serum matrix at 37°C

2.7.2 不同保存体系中 cTnI-C 的稳定性:不同温度、不同保存体系对 cTnI-C 稳定性影响较大.cTnI-C 在 pH7.4 的 PBS 中,4°C 保存只能稳定

2 周,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存 3 周后含量有明显下降. 在含有 10% BSA 和 50% 甘油的 PBS 中, 室温保存 3 周 cTnI 含量下降 20%;  $4^{\circ}\text{C}$  保存稳定 2 个月, 4 个月含量下降 12%;  $-20^{\circ}\text{C}$  保存 6 个月含量无明显变化. 在含有 10% BSA 的 PBS 中, 室温保存 2 周

cTnI 含量下降 30%;  $4^{\circ}\text{C}$  保存 2 个月 cTnI 含量下降 25%;  $-20^{\circ}\text{C}$  保存 6 个月含量无明显下降 (图 8). 可见 cTnI-C 在含有甘油和 BSA 的保存液中稳定性较理想.

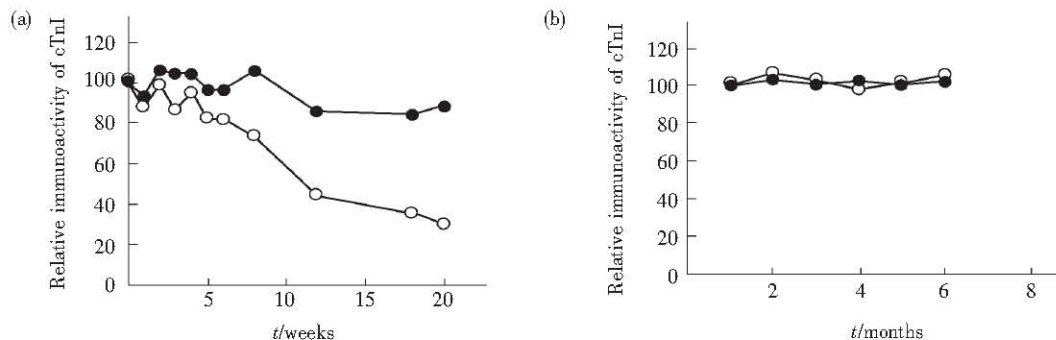


Fig. 8 Stability study of cTnI-C in different preserve systems

(a)  $4^{\circ}\text{C}$ , (b)  $-20^{\circ}\text{C}$ . ●—●: 10% BSA 50% glycerol; ○—○: 10% BSA.

### 3 讨 论

不同 cTnI 测定系统间测定结果存在较大差异, 使得不同方法的参考值范围、分析变异、诊断和预后的临界值等都出现不同程度的差别, 检测结果的不同也将直接影响对众多临床问题的解释, 如急性心肌梗死 (AMI) 的发作时间、梗死面积、再灌注的评估以及心肌损伤危险性分层等, 给临床应用和评价带来困扰. 为保证实验室间测定结果的可比性, cTnI 测定的标准化包括方法学的标准化和校准品的量值溯源受到极大关注, 其中制备理想的溯源参考物质是标准化的关键. 加拿大学者 Liu 等<sup>[5]</sup>在此方面做了有益的尝试, 在大肠杆菌中表达得到了两种含有 cTnI 和 TnC 的融合蛋白 ScTnI-C 和 ScTnI-C-2. ScTnI-C 含全长 cTnI (210 个氨基酸残基) 和 TnC, 但以包涵体形式存在, 变性复性及纯化困难, 且蛋白质变性后能否重新正确折叠受到许多因素的影响; ScTnI-C-2 含 cTnI 稳定片段 (第 28 ~ 110 个氨基酸残基) 和全长 TnC, 在表达菌中是可溶性表达, 蛋白质稳定性较好, 但由于只含 cTnI 稳定区片段, 存在不能被针对 cTnI 的 N 端和 C 端表位单抗检测试剂识别的不足.

由于许多学者用原核系统表达含全长 cTnI 的重组蛋白, 多是以包涵体形式存在<sup>[5,6]</sup>, 我们在研究中首先构建了以带有分泌信号肽序列的 pPIC9 质粒为载体, 甲醇诱导的毕氏酵母 GS115 为表达菌

的 cTnI-C 真核表达系统, 得到了目的蛋白的分泌型表达. 但在诱导过程中目的蛋白发生了降解, 可能是由于酵母菌表达蛋白周期较长 (约 72 h) 和未受保护的 cTnI 游离 N 端易被蛋白酶降解两方面原因造成的. 尝试了改变培养基配方和诱导条件、加入蛋白酶抑制剂等方法, 效果都不理想. 真核表达系统大多存在诱导周期长, 蛋白质易被降解的问题, 所以我们选择了原核表达, 先后构建了几个原核表达系统, 最终在以 pET15b 质粒为载体, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 为宿主菌的表达系统中, 成功得到了稳定、可溶、高效表达全长的 cTnI-C 融合蛋白, 其在摇瓶中表达量达 21 mg/L. 目的蛋白 N 端带有 His-tag, 经一步  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose 亲和层析即得到了 PAGE 纯的全长 cTnI-C, 实现了常规纯化方法难以达到的高速度和高效率, 减少或避免了纯化过程中目的蛋白降解及修饰的发生. 我们对 cTnI-C 的稳定性进行了初步观察, 在含有甘油和 BSA 的保存液中  $4^{\circ}\text{C}$  保存稳定 2 个月, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存 6 个月含量无明显变化, 与 Liu 等<sup>[5]</sup>在大肠杆菌中得到的 ScTnI-C-2 稳定性基本一致; cTnI-C 在血清基质中  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 48 h 后, 含量仅下降 8%, 稳定性明显好于 ScTnI-C-2, 在同样条件下 ScTnI-C-2 含量下降了 50%. cTnI-C 所具有较好的稳定性, 可能与其 N 端受到 His-tag 融合序列的保护有关. 作为 cTnI 测定系统的候选参考物质, 今后还要对 cTnI-C 在不同 cTnI 检测系统中的免疫学行为、基

质效应及更长时间的稳定性等方面作更深入地研究。

### 参 考 文 献

- 1 Farah C S, Reinach F C. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J*, 1995, **9** (9): 755 ~ 767
- 2 Ravkilde J. Risk stratification in acute coronary syndrome using cardiac troponin I. *Clin Chem*, 2000, **46** (6): 443 ~ 444
- 3 靳彩宁, 徐国宾, 朱立华, 等. 人心肌 TnI 的生物学特性及其在临床诊断中的应用. *临床检验杂志*, 2002, **20** (2): 118 ~ 120  
Jin C N, Xu G B, Zhu L H, *et al.* *Chin J Clin Lab Sci*, 2002, **20** (2): 118 ~ 120
- 4 张国华, 徐国宾, 刘英民, 等. 羧基假单胞菌 3 $\alpha$ -羟类固醇脱氢酶基因的质粒载体构建及表达. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (6): 966 ~ 969  
Zhang G H, Xu G B, Liu Y M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (6): 966 ~ 969
- 5 Liu S G, Zhang M Y, Gong Q, *et al.* Recombinant single chain cardiac troponin I-C polypeptides: superior calibration and control materials for cardiac troponin I immunoassays. *Clin Lab*, 2001, **47** (1 ~ 2): 19 ~ 27
- 6 狄春辉, 钟英成, 施 群. 人心肌钙蛋白 I 在大肠杆菌中的高效表达及纯化. *北京大学学报 (医学版)*, 2000, **32** (4): 351 ~ 353  
Di C H, Zhong Y C, Shi Q. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2000, **32** (4): 351 ~ 353

## Expression of Human Cardiac Troponin I-C in *E. coli* and Its Purification

YAN Cun-Ling, XU Guo-Bin\*, XIA Tie-An

(Department of Laboratory Medical Science, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

**Abstract** In order to clone and express human cardiac troponin I-C fusion protein in application to the quality control for cTnI detection system, human cardiac troponin I and troponin C cDNAs were amplified from human cardiac using gene-specific primers designed from the published cDNA sequences by the polymerase chain reaction. The full-length of *cTnI* was linked with *TnC* by a short DNA sequence coding for 19 neutral amino acid residues. An expression construct for *cTnI-C* was engineered by inserting the corresponding cDNA into a pET15b plasmid. Then recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3)pLysS cells, and protein expression was induced by isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Soluble expression of cTnI-C in prokaryotic system was successfully obtained. Fusion protein had an N-terminal His-tag sequence which could be purified by affinity chromatography on a Ni<sup>2+</sup>-Sephrose column. After one step affinity chromatography the fusion protein shows homogeneity as judged by SDS-PAGE. The fusion protein was stable and easy to be purified, could be used as candidate reference material for cTnI detection systems.

**Key words** cardiac troponin I-C, fusion protein, expression, purification

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66551122-2042, E-mail: bdyjyk@sina.com

Received: March 11, 2004 Accepted: April 28, 2004