



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101921793 A

(43) 申请公布日 2010.12.22

(21) 申请号 201010170319.0

*C12R 1/19*(2006.01)

(22) 申请日 2010.05.07

(71) 申请人 德赛诊断系统(上海)有限公司

地址 201318 上海市浦东新区天雄路 588 弄  
16 号楼

(72) 发明人 吴峻 王荣芳 张艳 钱震斌

(74) 专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务  
所(普通合伙) 31257

代理人 董红曼

(51) Int. Cl.

*C12N 15/63*(2006.01)

*C12N 1/21*(2006.01)

*C12N 15/12*(2006.01)

*C07K 14/775*(2006.01)

*C07K 1/22*(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 序列表 2 页  
附图 6 页

(54) 发明名称

人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法及其表达载体和工程菌

(57) 摘要

本发明提供一种高效可溶性人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法,及其表达载体和工程菌。其中选用含有重组人载脂蛋白 AI 基因序列的质粒 pCold 为融合表达载体, ApoA1 编码序列位于 pCold 载体上 Nde I 和 Hind III 酶切位点之间。所用的基因工程菌为大肠杆菌,并经本发明所述的表达载体质粒 pCold 转化为 pCold-ApoA1/Rosetta-gami,在 10-20℃ 下低温培养即可诱导表达可溶性目的蛋白。本发明并使用了镍交联亲和柱一步法,操作简便、得率高、耗时短,得到的目的蛋白纯度大于 90%,适用于工业化大规模生产。

1. 一种人载脂蛋白 AI (ApoA1) 的基因工程表达载体, 其特征在于, 该载体为含有人载脂蛋白 AI 基因序列的质粒载体 pCold, 并且载脂蛋白 AI 编码序列位于 pCold 载体上 Nde I 和 HindIII 酶切位点之间。

2. 一种基因工程菌, 其特征在于, 该基因工程菌为 pCold-ApoA1/*Escherichia coli*, 宿主菌是大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta-gami、BL21、BL21 (DE3)、BL21 (DE3) PlysS、Rosetta-gami、或 KSi000, 并被权利要求 1 所述的表达载体所转化。

3. 如权利要求 2 所述的基因工程菌, 其特征在于, 所述基因工程菌为 pCold-ApoA1/Rosetta-gami。

4. 一种人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

- (1) 通过 RT-PCR 技术从人肝组织总 RNA 中扩增获得人载脂蛋白 AI 的 cDNA;
- (2) 扩增人载脂蛋白 AI 基因并克隆到 pCold 载体中;
- (3) 培养、表达如权利要求 3 所述的基因工程菌 pCold-ApoA1/Rosetta-gami;
- (4) 离心收集基因工程菌 pCold-ApoA1/Rosetta-gami;
- (5) 人载脂蛋白 AI 融合蛋白的亲和柱纯化;
- (6) 透析除盐, 得到可溶性目的蛋白。

5. 如权利要求 4 所述人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法, 其特征在于, 在步骤 (2) 中自所述人载脂蛋白 AI 基因 cDNA 编码的第一个氨基酸的核苷酸起第 73 个核苷酸的位置起设计引物;

其中, 上游引物: 5' AAT CATATG GATGAACCCCCCAGAGCCCCT,

下游引物为: 5' AT AAGCTT CTGGGTGTTGAGCTTCTTAGTGTA。

6. 如权利要求 4 所述人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法, 其特征在于, 在步骤 (3) 中, 基因工程菌 pCold-ApoA1/Rosetta-gami 在生长到对数期 O. D. 值为 0.4-0.8 左右时加入 IPTG 后, 对宿主菌进行 10-20°C 的低温诱导培养 10-15 小时; 然后收集表达菌。

7. 如权利要求 4 所述人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法, 其特征在于, 在步骤 (5) 中, 所述融合蛋白为无信号肽的人载脂蛋白 AI 在其 N 端加上 6 个多聚组氨酸构成的蛋白。

8. 如权利要求 4 所述人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法, 其特征在于, 在步骤 (5) 中, 所述亲和柱纯化时采用不同梯度咪唑浓度的洗脱方式。

9. 如权利要求 8 所述人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法, 其特征在于, 在步骤 (5) 中, 所述亲和柱纯化时采用的洗涤液为 10mM 咪唑、20mM 咪唑、30mM 咪唑; 洗脱液为 100mM 咪唑、300mM 咪唑。

## 人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法及其表达载体和工程菌

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域的生产蛋白质或多肽的 DNA 重组技术领域,特别是,涉及人载脂蛋白 AI (Apolipoprotein I, ApoAI) 的基因工程制备方法,及其相关的表达载体和工程菌。

### 背景技术

[0002] 随着人民生活水平的提高,冠状动脉粥样疾病的发病率显著增高,目前已成为危害人类健康的三大疾病之一。据联合国卫生组织 2002 年研究报告,全球约三分之一的病人死亡与心血管疾病 (cardiovascular disease) 有关。其中,动脉粥样硬化性心血管病首当其冲。动脉粥样硬化主要损伤动脉内壁,这是由于膜胆固醇酯在中膜脉管壁的大量堆积形成粥样硬化斑块,使血管壁纤维增厚并导致动脉病变。其主要发生于大动脉和中等动脉,如主动脉、冠状动脉和脑动脉,导致某些脏器的局部供血不足,因而出现心脑血管疾患,如冠心病、心肌梗塞、中风等,极易引起致命性损伤。

[0003] 不溶性的脂类在血浆中是作为可溶性的脂蛋白颗粒而运输的。脂蛋白颗粒含有一个疏水性的胆固醇脂和甘油三脂核心,外表面包裹着单层的双性磷脂分子,结合着游离胆固醇和载脂蛋白。载脂蛋白 (apolipoprotein, Apo) 是一类能与血浆脂质 (主要是指胆固醇、甘油三脂和磷脂) 结合的蛋白质,为构成血浆脂蛋白的主要成份。载脂蛋白在肝脏和小肠粘膜细胞中合成。目前已报道的载脂蛋白有二十余种。载脂蛋白在分子结构上具有一定特点,往往含有较多的双性  $\alpha$  -螺旋结构,表现出两面性,螺旋的一侧极性较高可与水溶剂及磷脂或胆固醇极性区结合,构成脂蛋白的亲水面;而另一侧极性较低可与非极性的脂类结合,构成脂蛋白的疏水核心区。载脂蛋白在参与脂类核心代谢反应的酶中充当辅助因子,并且作为识别因子而调控脂蛋白的分泌和摄入。载脂蛋白可分为载脂蛋白 A (ApoA),载脂蛋白 B (ApoB),载脂蛋白 C (ApoC) 和载脂蛋白 E (ApoE)。其中载脂蛋白 A 又可分为载脂蛋白 AI (也称为 ApoAI)、载脂蛋白 AII 和载脂蛋白 AIV。载脂蛋白在脂蛋白代谢中具有重要并且复杂的生理功能,不论是质或量的改变,都会引起脂蛋白代谢异常。国内外大量临床资料显示,心血管患者体内的载脂蛋白水平与病情有很大的相关性。目前临床上主要检测载脂蛋白 AI,载脂蛋白 B 两种,其两者分别被认为是动脉粥样硬化的保护因素和危险因素。因此测定其含量和比值为动脉粥样硬化及心血管疾病的判定、预测提供了有价值的指标,具有重要的诊断和预防意义。

[0004] 载脂蛋白 AI 在肝脏和小肠粘膜细胞中合成。它是高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-CHOL) 的主要结构蛋白,占 HDL-CHOL 总蛋白的 60%~70%,载脂蛋白 AI 的测定可直接反映 HDL-CHOL 的水平。载脂蛋白 B 也由肝脏合成,是低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-CHOL) 的主要结构蛋白,约占 LDL-CHOL 总蛋白含量的 97%,载脂蛋白 B 的测定可直接反映 LDL-CHOL 的水平。即对载脂蛋白 AI 与载脂蛋白 B 的检测可分别直接反映 HDL 与 LDL 的含量与功能。并且它们的比值与动脉粥样硬化有密切关系,可作为判断心血管疾病危险性大小的指标。

血浆中 HDL 和载脂蛋白 AI 的含量与冠状动脉疾病 (Coronary artery disease, CAD) 的发生呈负相关性,即 HDL 和 ApoA1 含量越高,CAD 的发病率越低。

[0005] 载脂蛋白 AI 是参与细胞胆固醇逆向转运 (RCT) 的重要因素。载脂蛋白 AI 能与磷脂、多种血浆因子及细胞膜受体结合,激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT),促进细胞内胆固醇的移出、酯化、转移从而调节 HDL 的代谢。相较于其他的各种 HDL 亚类,载脂蛋白 AI 空间结构有较大差异,有研究表明这与 HDL 成熟过程及运载胆固醇等生理功能密切相关。

[0006] 人体内的载脂蛋白 AI 蛋白分子为 243 个氨基酸残基组成的肽链,分子质量为 28.3KD,无糖基化修饰,具有较强的疏水性。它主要含有 8 个由 22 个氨基酸构成的重复片段和 2 个由 11 个氨基酸组成的重复片段。这些重复片段形成两性  $\alpha$  螺旋,相互之间被脯氨酸残基间隔。当有磷脂存在时,带电荷的残基面朝水相,非极性残基则面朝磷脂双层链。在许多重复片段的亲水面存在多个影响螺旋结构稳定性的氨基酸 (DERKG),这可能有利于载脂蛋白 AI 在和脂质相互作用过程中产生构象变化。载脂蛋白 AI 相互间容易形成二聚体以利于蛋白的稳定。但是研究发现,当蛋白浓度低于 0.1mg/mL 时,载脂蛋白 AI 均以单体形式存在。与其它形式的载脂蛋白 AI 相比,游离的载脂蛋白 AI 结构相对松散,其螺旋程度只有 40-50%,而当周围有脂质存在时,蛋白暴露的疏水区能迅速与脂类相互作用,螺旋程度可提高到 75%。

[0007] 研究表明载脂蛋白 AI 蛋白还具有抗氧化、抗凝抗炎作用,并能调节细胞粘附分子的表达、介导细胞内信号传导等功能,对保护人体动脉管壁具有十分重要的意义。目前对冠状动脉粥样疾病发生的确切机制虽然还存在争议,但载脂蛋白 AI 能治疗并预防冠状动脉粥样疾病的事实却受到学术界的高度重视。大量的动物和临床试验已证明,目前通过基因工程获得的重组人载脂蛋白 AI 结构与功能和天然载脂蛋白 AI 相似,其不仅能防止动脉粥样硬化的发生和发展,而且能逆转病变,更可贵的是临床研究也未见明显的毒副作用。因此,重组载脂蛋白 AI 有可能成为治疗和预防动脉粥样硬化的理想药物,具有广阔的临床应用前景。因而研发一种适合大规模生产重组 ApoA1 蛋白的方法具有很高的经济和社会价值。

[0008] 虽然制备人载脂蛋白 AI 方法已有报道,但这些方法均有不尽人意之处。如从人血浆中制备载脂蛋白 AI,面临着产量低、步骤多、成本高等缺点。这些缺点限制了其作为靶向药物的规模化生产。因此,研发一种新的、有效的、产量高、适合大规模生产的制备重组人载脂蛋白 AI 蛋白的方法具有很高的迫切性和重要性。在各类通过基因工程表达体外重组蛋白的表达系统中,最常见的是应用大肠杆菌原核表达系统。但是在常用的 37°C 大肠杆菌表达过程中,载脂蛋白 AI 的 mRNA 极不稳定,表达的重组载脂蛋白 AI 成熟蛋白很容易被降解。有报道在用此常规的大肠杆菌表达系统表达载脂蛋白 AI 蛋白时,由于上述原因导致产量较低,只能达到 4mg/L 培养菌液,不适合高效地、大规模地生产重组载脂蛋白 AI 蛋白。而运用其它表达系统如酵母,昆虫细胞及哺乳动物细胞表达系统均存在表达过程较复杂、表达成本高,并且表达量低、纯化步骤繁琐等缺点,同样不利于大规模生产。

[0009] 本发明的人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法克服现有技术的技术缺陷,比如,本发明采用 pCol1d 表达载体,是一种被用来大量表达外源重组蛋白的载体,带有一个 cspA 启动子,在该启动子下游为乳糖操纵子。该载体在多种大肠杆菌宿主菌中经诱导后在 10-20°C 低温下大量表达外源重组蛋白。本发明利用其具有低温诱导表达外源重组蛋白的

特性,有效克服了载脂蛋白 AI 的 mRNA 在大肠杆菌宿主菌中极不稳定、表达的成熟蛋白很容易被降解的技术难题。在特定的大肠杆菌宿主菌 (Rosetta-gami) 中实现了高效表达重组人载脂蛋白 AI 蛋白,在一升培养菌液中人载脂蛋白 AI 蛋白的表达量高达 40mg 以上,与现有技术报道的表达量比较,表达量提高了 10 倍之多。同时,利用本发明的镍交联亲和柱一步法蛋白制备工艺,使得整个过程操作简便、蛋白得率高、耗时短,目的蛋白纯度高,完全适用于工业化大规模生产。

## 发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种可在大肠杆菌中表达,并能通过亲和柱高效制备重组可溶 ApoA1 的方法,及其相关的表达载体和工程菌。

[0011] 本发明提供了一种人载脂蛋白 AI 的基因工程表达载体,该载体构建过程如附图 1 所示。该载体为含有人载脂蛋白 AI 基因序列的质粒载体 pCold,并且载脂蛋白 AI 编码序列位于 pCold 载体上 NdeI 和 HindIII 酶切位点之间。载体 pCold 是一种被用来大量表达外源重组蛋白的载体,其带有一个 cspA 启动子,在该启动子下游为乳糖操纵子,这样的载体可在低温下启动表达外源基因。同时在其 5' 端非转录区还含有翻译增强子 (Translate enhancefactor, TEF)、多聚组氨酸靶标融合位点、凝血因子 X 酶切位点及多克隆位点。因此,该载体可在多种大肠杆菌宿主菌中,在低温条件下,经诱导后大量表达外源重组蛋白。本发明的表达可溶性人载脂蛋白 AI 重组蛋白的表达载体 pCold,以及以 cspA 启动子低温诱导表达可溶性人载脂蛋白 AI 重组蛋白,在 10-20℃ 下进行低温诱导表达,正是本发明的创新所在。

[0012] 本发明还提供了一种基因工程菌,该基因工程菌为 pCold-ApoA1/*Escherichia coli*,该宿主菌被含有人载脂蛋白 AI 基因序列的质粒载体 pCold 所转化。本发明的宿主菌可以是大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Rosetta-gami,该宿主菌还可选用其他各种可被上述载体所转化的大肠杆菌表达宿主 B121、B121 (DE3)、L21 (DE3) PlysS、Rosetta-gami、或 KS1000。

[0013] 本发明所用的 pCold 表达载体具有低温诱导表达特性,见于 TARKAR 公司的 pCold 载体说明书。至目前,尚未有文献公开报道有关任何低温诱导表达重组人载脂蛋白 AI 蛋白的资料。本发明首次创新地提出,可以利用低温诱导表达重组人载脂蛋白 AI 蛋白,利用 pCold 表达载体具有的低温诱导表达特性,突破性地克服了人载脂蛋白 AI 的 mRNA 在大肠杆菌宿主菌中的极不稳定性和表达的成熟蛋白很容易被降解的难题,使得重组人 ApoA1 蛋白产量大大提高。

[0014] 通过本发明方法,可以从 1L 培养菌液中获得的最终得到的重组人载脂蛋白 AI 蛋白浓度测定经计算为 3.7mg/ml,透析后得到的总体积为 11ml。故,总蛋白得率约为 40mg/升菌液,而美国专利 US patent 5643757 公开的大肠杆菌生产人重组载脂蛋白 AI 蛋白的方法,所得到的表达量仅为 4mg/升菌液。比较可见,本发明方法的表达量高于其达 10 倍之多。

[0015] 本发明还提供了一种克隆、表达、纯化人载脂蛋白 AI 的基因工程方法,通过基因重组技术体外表达,通过改良的镍亲和柱一步纯化法,纯化获得高纯度的可溶性的目的蛋白载脂蛋白 AI,包括步骤如下:

[0016] (1) 通过 RT-PCR 技术从人肝组织总 RNA 中扩增获得人载脂蛋白 AI 的 cDNA;

[0017] (2) 扩增人载脂蛋白 AI 基因并克隆到 pCold 载体中；

[0018] (3) 培养和表达基因工程菌 pCold-ApoA1/Rosetta-gami；

[0019] (4) 离心收集基因工程菌 pCold-ApoA1/Rosetta-gami；

[0020] (5) 人载脂蛋白 AI 融合蛋白的亲合柱纯化；

[0021] (6) 透析除盐,得到可溶性蛋白,经鉴定为目的蛋白。

[0022] 本发明的人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法,是以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Rosetta-gami 为宿主菌,所述载体选用含有载脂蛋白 AI 基因序列的质粒载体 pCold,且载脂蛋白 AI 编码序列位于 pCold 载体上 NdeI 和 HindIII 酶切位点之间。通过基因人工合成的方法,针对载脂蛋白 AI 的成熟肽进行克隆重组,去除了载脂蛋白 AI 前体蛋白 N-端的信号肽,并在其 N 端加上 6 个多聚组氨酸 (6x His) 亲和多肽标签,构成 ApoA1-6His 融合蛋白,进而用大肠杆菌 Rosetta-gami 作为宿主菌。

[0023] 本发明的人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法,其步骤 (2) 中,自人载脂蛋白 AI 基因 cDNA 的第 73 个核苷酸位置起开始设计以下引物：

[0024] 上游引物 :5' AAT CATATG GATGAACCCCCCAGAGCCCCT,

[0025] 下游引物为 :5' AT AAGCTT CTGGGTGTTGAGCTTCTTAGTGTA。

[0026] 本发明的人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法,其步骤 (3) 中,基因工程菌 pCold-ApoA1/Rosetta-gami 的经诱导后在 10-20℃ 低温继续培养 15 小时。本发明首次揭示采用多聚组氨酸融合低温表达载体 (pCold) 在低温下 (10-20℃) 表达无信号肽 ApoA1 蛋白的技术方案,从而可以在大肠杆菌内稳定高效表达大量可溶的 ApoA1 蛋白,这一创新内容目前在国内外尚未见有其他报道。

[0027] 本发明所述的“载脂蛋白 AI 前体蛋白”,是指由载脂蛋白 AI cDNA 编码,在细胞内合成的,未切除信号肽的 ApoA1 全长蛋白。本发明所述的“载脂蛋白 AI 的成熟肽”,是指在细胞内切除信号肽,及信号肽后 7 个氨基酸的成熟肽,其分泌到血清中,具有生物功能的载脂蛋白 AI 蛋白。

[0028] 本发明的人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法,其步骤 (5) 中,所述融合蛋白为无信号肽的人载脂蛋白 AI 在其 N 端加上 6 个多聚组氨酸构成的蛋白。本发明此创新在于,利用融合蛋白 N 端的 6 个多聚组氨酸多肽标签,简便高效地纯化获得高纯度重组载脂蛋白 AI,以利于后续的大量生产纯化工艺的开展。

[0029] 本发明的人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法,其步骤 (5) 中,所述本发明的自主改良的“镍亲和柱一步纯化法”,是指只通过一根镍亲和柱,运用改良的特定洗脱方式,即,通过对亲和柱多次三种不同浓度咪唑洗涤液的洗涤,及对目的蛋白的两种不同浓度咪唑洗脱液的洗脱。洗脱方式如附图 2 所示。

[0030] 本发明方法不需要依赖其他纯化方法及步骤,也不需要其他试剂再做进一步的纯化,即可直接获得高纯度所需目的蛋白,所获得目的蛋白的纯度 90% 以上。纯化步骤简单,所得目的蛋白纯度很高,纯化全程时间较短,优选的纯化全程时间为 4-6 小时。在实验室规模 (小于 5 升菌液的纯化规模) 下,纯化优化全程时间与纯化的菌液体积关系为:纯化 1 升 (1L) 表达菌液,需 4 小时左右。

[0031] 简要地说:本发明首先通过基因扩增及重组的方法,获得了人载脂蛋白 AI 成熟蛋白的 cDNA 并克隆至 pCold 表达载体上;然后在 N-端加上多聚组氨酸 (6x His) 亲和肽标签

以便镍亲和柱一步法纯化;进而选用大肠杆菌 Rosetta-gami 作为宿主菌,获得可溶的目的蛋白。

[0032] 本发明的有益效果在于:(1) 使用大肠杆菌 Rosetta-gami,可以最大限度地防止重组载脂蛋白 AI 蛋白大量表达对宿主细胞的毒性,从而提高重组蛋白的产量。(2) 本发明采用的 pCold 低温表达载体,避开了载脂蛋白 AI 的 mRNA 在大肠杆菌宿主菌中极不稳定、表达的成熟蛋白很容易被降解的问题,克服了载脂蛋白 AI 在大肠杆菌表达过程中 mRNA 和其表达产物-蛋白质的不稳定性;并且,低温表达的载脂蛋白 AI 蛋白为可溶性成熟蛋白,有利于得到载脂蛋白 AI 的高效表达;(3) 以本发明方法修饰后表达的载脂蛋白 AI 为可溶性成熟蛋白,最大可能性地还原了该蛋白在体内的折叠结构,有利于保持其生物活性;(4) 多聚组氨酸的使用可以简化该蛋白的纯化方法;(5) 发明人自主改良的镍亲和柱一步纯化法工艺的应用,使得纯化方法进一步简化,且纯化得率很高。采用本发明的载脂蛋白 AI 制备方法,可以在 1 升工程菌液中获得高达 40mg 以上的可溶性重组载脂蛋白 AI 蛋白。

### 附图说明

- [0033] 图 1:人载脂蛋白 AI 的基因工程表达载体的构建示意图;
- [0034] 图 2:镍亲和柱一步纯化法的洗脱方式的示意图;
- [0035] 图 3:人载脂蛋白 AI 基因的 RT-PCR 结果图谱;
- [0036] 图 4:pCold-ApoA1 重组表达质粒的酶切鉴定;
- [0037] 图 5A:未经亲和柱纯化的不同表达宿主菌总菌裂解液电泳结果;
- [0038] 图 5B:亲和柱纯化以后产物电泳的结果;
- [0039] 图 6:蛋白印迹试验;
- [0040] 图 7:纯化蛋白分子量的质谱分析。
- [0041] 图 8:纯化蛋白多肽的质谱分析。

### 具体实施方式

[0042] 以下结合实施例和附图,来进一步阐述本发明。以下各实施例是为说明本发明而非为限制本发明范围。

[0043] 实施例 1 人载脂蛋白 AI 的编码基因 PCR 扩增及重组表达质粒 pCold-HuApoA1 的构建:

[0044] 1) 目的基因的 PCR 扩增

[0045] ①抽提总 RNA:取病人新鲜肝脏组织,匀浆器粉碎后用 RNA 抽提试剂盒抽提总 RNA

[0046] ② RT-PCR:以总 RNA 为模版,运用反转录试剂盒,得到人载脂蛋白 AI 的 eDNA.

[0047] ③目的基因的 PCR 扩增:根据基因库中公布的人载脂蛋白 AI 序列设计一对引物,引物为:

[0048] 上游引物:5' AAT CATATG GATGAACCCCCCAGAGCCCCT (NdeI)

[0049] 下游引物:5' AT AAGCTT CTGGGTGTTGAGCTTCTTAGTGTA (HindIII)

[0050] 参考已报道的人载脂蛋白 AI 序列,引物设计时从 cDNA 的第 73 个核苷酸开始,从而人为地去除了载脂蛋白 AI 的信号肽及前体肽部分。

[0051] 采用以下 PCR 反应系统和程序:

[0052] 在一个 200 $\mu$ l 微量 PCR 反应管内加入以下试剂：

[0053] 10XPCR 缓冲液 5  $\mu$  l ；

[0054] 模版 cDNA 库 1  $\mu$  g ；

[0055] dNTP 1mM ；

[0056] 上下游引物各 100pM ；

[0057] Taq 酶 2U ；

[0058] 加入去离子灭菌水至终体积 50 $\mu$ l

[0059] 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 分钟, 然后进入 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 48 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒的 40 个扩增循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

[0060] 琼脂糖电泳结果如图 3 所示, 图 3 为人载脂蛋白 AI 基因的 RT-PCR 结果图谱 ; 其中, Lane1 :RT-PCR 产物 ;M :1kb DNA 标准 DNA 分子量 maker。如图 3 所示, 琼脂糖电泳结果条带在 750-500bp 之间, 可以判断产物的分子量为 720bp 左右, 与预期实验设计相符。

[0061] 2)PCR 产物克隆：

[0062] 扩增得到的 PCR 片段, 用 PCR 产物回收试剂盒回收, 然后用双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳, 用胶回收试剂盒纯化后, 直接定向连接到 pCold 载体上, 将连接产物转化到 DH5a 宿主菌中, 提取质粒, 用 NdeI 和 HindIII 双酶切鉴定。琼脂糖电泳结果如图 4 所示, 酶切片段大小与设计一致的, 约为 700 个核苷酸的酶切片段为阳性克隆。图 4 为 pCold-ApoA1 重组表达质粒的酶切鉴定 ; 其中, M :DNA ladder ;1-14 :双酶切鉴定的不同克隆质粒, 限制性内切酶为 NdeI、HindIII ;酶切片段大小为 700bp, 与从核苷酸序列推断的插入片段大小吻合。(以上常规实验方法, 见 Sambrooks 等编著的《分子克隆实验指南》第二版, 科学出版社 1998 年出版。)

[0063] 3)DNA 序列测定

[0064] ①将阳性克隆进行 DNA 序列测定, 其测序结果如序列 1 :SEQ NO. 1 所示, 该序列已除去信号肽序列部分。

[0065] ②将阳性克隆的 DNA 测序结果, 与其基因库已报道人载脂蛋白 AI 序列的比较 (NM\_000039), 两者是一致的, 如序列 2 :SEQ NO. 2 所示。

[0066] ③根据以上 DNA 测序结果, 重组人载脂蛋白 AI 的氨基酸序列如序列 3 :SEQ NO. 3 所示。

[0067] 实施例 2 基因重组菌的大规模表达及纯化方法

[0068] 1) 重组人 ApoA1- 多聚组氨酸融合蛋白在大肠杆菌宿主中的表达

[0069] ①将 pCold-ApoA1 转化到 Rosetta-gami 大肠杆菌中在带有氨苄霉素抗性 (100ng/ml) 的 LB 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜

[0070] ②挑取一个单菌落在 50ml 含有 100 微克 / 毫升氨苄霉素的 LB 培养中 37 $^{\circ}$ C 250 转 / 分钟, 培养过夜

[0071] ③ 2% 接种培养到 1L 2YT 培养基中 (包括 100ug/ml 氨苄霉素), 37 $^{\circ}$ C to A600, 0. D. 0. 5

[0072] ④将培养温度降至 10-20 $^{\circ}$ C, 让菌液继续培养 30 分钟

[0073] ⑤加入 IPTG 至终浓度 1mM 10 $^{\circ}$ C, 300 转 / 分钟诱导培养 15hours

[0074] ⑥高速离心 4000rpm 20 分钟, 收集沉淀并保存在 -80 $^{\circ}$ C



[0075] 2) 纯化重组人载脂蛋白 AI- 多聚组氨酸融合蛋白的试剂

[0076] A、试剂：

[0077] ①裂解液：50mM Tris-HCl Ph 8.0, 500mM NaCl, 10mM imidazole, 1mM PMSF, 5mM 2-Me

[0078] ②洗涤液 1：50mM Tris-HCl Ph 8.0, 500mM NaCl, 10mM imidazole, 1mM PMSF, 5mM 2-Me

[0079] ③洗涤液 2：50mM Tris-HCl Ph 8.0, 500mM NaCl, 20mM imidazole, 1mM PMSF, 5mM 2-Me

[0080] ④洗涤液 3：50mM Tris-HCl Ph 8.0, 500mM NaCl, 30mM imidazole, 1mM PMSF, 5mM 2-Me

[0081] ⑤洗脱液 1：50mM Tris-HCl Ph 8.0, 150mM NaCl, 100mM imidazole, 1mM PMSF, 5mM 2-Me

[0082] ⑥洗脱液 2：50mM Tris-HCl Ph 8.0, 150mM NaCl, 300mM imidazole, 1mM PMSF, 5mM 2-Me

[0083] B、纯化步骤：

[0084] (1) 将 1 升 2YT 培养基表达人载脂蛋白 AI 重组融合蛋白的大肠杆菌悬浮在 50ml 裂解液中

[0085] (2) 在冰上超声 4-5 次, 30 秒 / 次,

[0086] (3) 10000g 高速离心 15 分钟

[0087] (4) 取上清再 10000g 高速 10 分钟

[0088] (5) 取上清上柱到 5ml 镍柱中

[0089] (6) 用 50ml 洗涤液 1 清洗镍柱

[0090] (7) 用 50ml 洗涤液 2 清洗镍柱

[0091] (8) 用 50ml 洗涤液 3 清洗镍柱

[0092] (9) 用 6ml 洗脱液 1 从镍柱上洗脱目的蛋白, 每 11 滴收集一个试管

[0093] (10) 用 6ml 洗脱液 2 从镍柱上洗脱目的蛋白, 每 11 滴收集一个试管

[0094] (11) 将洗脱的样品混合在一起, 并用 1XPBS, 4℃透析三次过夜

[0095] (12) 将透析好的样品保存在 -80℃

[0096] 实施例 3 重组蛋白的证明 (15% 的 SDS- 丙稀酰胺凝胶电泳和蛋白印迹法)

[0097] 详细步骤：

[0098] 1) 15% 的 SDS- 丙稀酰胺凝胶, 通过 Tris-glycine 缓冲液, 90V 电压, 3 小时电泳, 检测最终获得的重组蛋白。检测结果为该特异条带与人载脂蛋白 AI 分子量相符。

[0099] 图 5A 是亲和柱纯化以前不同表达宿主菌的总菌裂解液电泳的结果。如电泳结果所示, 经含有人载脂蛋白 AI 基因序列的质粒载体 pCol1d 所转化的宿主菌 BL21 (DE3) P1ysS, Roesetta-gami, KS1000, 分别经 IPTG 诱导后, 与 IPTG 诱导前的样品相比, 在 30KD 左右可见一条明显的诱导蛋白差异条带, 与预期人重组 ApoA1 蛋白分子量相符。如图 5A 所示, E. coli 该类宿主菌种均可成功表达重组人 ApoA1 蛋白。图 5A 为未经亲和柱纯化的不同表达宿主菌总菌裂解液电泳结果; 15% SDS-PAGE 检测最终获得的重组蛋白; 其中, M: 标准蛋白; 1: IPTG 诱导前 BL21 (DE3) P1ysS 总菌裂解液; 2: IPTG 诱导后 BL21 (DE3) P1ysS 总菌裂解液; 3,

IPTG 诱导前 Roesetta-gami 总菌裂解液 ;4 :IPTG 诱导后 Roesetta-gami 总菌裂解液 ;5, IPTG 诱导前 KS1000 总菌裂解液 ;6 :IPTG 诱导后 KS1000 总菌裂解液。(不同宿主菌中重组质粒转化方法均相同,详细见 Sambrooks 等编著的《分子克隆实验指南》第二版,科学出版社 1998 年出版)。

[0100] 图 5B 是经含有人载脂蛋白 AI 基因序列的质粒载体 pCold 所转化的宿主菌 Roesetta-gami 经 IPTG 诱导后的菌液,经继续纯化后所获得人载脂蛋白 A 的蛋白条带,该蛋白分子量大小约为 30kD,电泳结果表明该纯化产物纯度很高,与预期的蛋白分子量大小相符。因此,从分子大小上判断该纯化产物为人载脂蛋白 AI 蛋白。图 5B 为亲和柱纯化以后产物电泳的结果 ;其中,1 :为亲和柱纯化产物 ;M :标准蛋白。

[0101] 2) 在 15% 丙稀酰胺胶,90V,3 小时电泳后,通过 Tris-glycine 缓冲液将丙稀酰胺上的蛋白片段电转到 PVDF 膜上,条件为 1Xtris-glycine 缓冲液,20% 甲醇,70V 电压下,室温转移 3 小时。

[0102] ①将电转后的 PVDF 膜取出,用 1X PBST 清洗 30 分钟

[0103] ②用含有 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭 45 分钟

[0104] ③用 1X PBST 漂洗 PVDF 膜 3 次,10 分钟 / 次

[0105] ④加入含 1 : 2000 稀释的抗人 ApoA1 抗体的 PBST 8mL,室温反应 1 小时

[0106] ⑤用 1X PBST 洗涤 PVDF 膜三次,15 分钟 / 次

[0107] ⑥加入含 1 :1000 稀释的抗小鼠的抗体,室温反应 40 分钟

[0108] ⑦用 1X PBST 洗涤 PVDF 膜三次,15 分钟 / 次

[0109] ⑧用含 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 6mg 二氨基联苯胺的显色液,显色 1 分钟。

[0110] 实验结果如图 6 所示,经蛋白印迹法验证所得蛋白与已知抗人载脂蛋白 AI 商业化抗体呈特异性反应,因而,判断所得蛋白为人载脂蛋白 AI。图 6 为蛋白印迹试验 ;其中, Lane 1 :IPTG 诱导以前总菌裂解液 ;Lane 2 :IPTG 诱导以后总菌裂解液 ;Lane 3 :镍柱纯化后的产物 ;Lane M :标准蛋白。

[0111] 实施例 4 纯化蛋白分子量的质谱分析

[0112] 该实验委托浙江理工大学完成,具体实验方法见仪器操作手册。人载脂蛋白 AI 分子量为 28KD,本发明的重组人载脂蛋白 AI-his tag 蛋白分子量大小约为 30KD,图 7 所示的大峰为单一的重载脂蛋白 AI,小峰为重组载脂蛋白 AI 二聚体。实验结果如图 7 所示,表明所得目的蛋白的分子量除去 his-tag 后与人载脂蛋白 AI 分子量一致,可以判断所得目的蛋白为人载脂蛋白 AI-his。

[0113] 实施例 5 纯化蛋白多肽的质谱分析

[0114] 该实验委托浙江理工大学完成,详细操作步骤见质谱仪器说明书。通过对纯化产物的肽段分子量及氨基酸组成分析,并与已知的多肽数据库进行比较 ;得出的结论为该纯化产物是人载脂蛋白 AI 蛋白。实验结果如图 8 所示,经多肽的氨基酸分析确认所得蛋白为人载脂蛋白 AI。

序列表

- <110> 德赛诊断系统（上海）有限公司
- <120> 人载脂蛋白 AI 的基因工程制备方法及其表达载体和工程菌
- <160>3

- <210>1
- <211>735
- <212>DNA
- <213> 人工序列

<400>1  
 ATGGATGAACCCCCCAGAGCCCCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGATGTGC  
 TCAAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCCAGTTTGAAGGCTCCGCCTTGGGAAAACAGCTAAACCTA  
 AAGCTCCTTGACAACTGGGACAGCGTGACCTCCACCTTCCAGCAAGCTGCGCGAACAGCTCGGCCCTGT  
 GACCCAGGAGTTCTGGGATAACCTGGAAAAGGAGACAGAGGGCCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGAT  
 CTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTACCTGGACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGA  
 TGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTCCAAGAGGGCGCGCCAGAAGC  
 TGCACGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCCACTGGGCGAGGAGATGCGCGACCGCGCGCGCCCATG  
 TGGACGCGCTGCGCACGCATCTGGCCCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCC  
 TTGAGGCTCTCAAGGAGAACGGCGGCGCCAGACTGGCCGAGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCATCT  
 GAGCACGCTCAGCGAGAAGGCCAAGCCCGCGCTCGAGGACCTCCGCCAAGGCTGCTGCCCGTGTCT  
 GGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCTGAGCGCTCTCGAGGAGTACACTAAGAAGCTCAACACCCAGTGA

- <210>2
- <211>731
- <212>DNA
- <213> 人工序列

<400>2  
 扩增序列 4GATGAACCCCCCAGAGCCCCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGAT 63  
 |||  
 报道序列 111GATGAACCCCCCAGAGCCCCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGAT 170  
 扩增序列 64 GTGCTCAAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCCAGTTTGAAGGCTCCGCCTTGGGAAAA 123  
 |||  
 报道序列 171GTGCTCAAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCCAGTTTGAAGGCTCCGCCTTGGGAAAA 230  
 扩增序列 124CAGCTAAACCTAAAGCTCCTTGACAACTGGGACAGCGTGACCTCCACCTCAGCAAGCTG 183  
 |||  
 报道序列 231CAGCTAAACCTAAAGCTCCTTGACAACTGGGACAGCGTGACCTCCACCTCAGCAAGCTG 290  
 扩增序列 184CGCGAACAGCTCGGCCCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCTGGAAAAGGAGACAGAG 243  
 |||

报道序列 291CGCGAACAGCTCGGCCCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCTGGAAAAGGAGACAGAG 350  
 扩增序列 244GGCCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTAC 303  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 报道序列 351GGCCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTAC 410  
 扩增序列 304CTGGACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGGAG 363  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 报道序列 411CTGGACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGGAG 470  
 扩增序列 364CCGCTGCGCGCAGAGCTCCAAGAGGGCGCGCCAGAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAG 423  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 报道序列 471CCGCTGCGCGCAGAGCTCCAAGAGGGCGCGCCAGAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAG 530  
 扩增序列 424CTGAGCCCACTGGGCGAGGAGATGCGCGACCGCGCGCGCCCATGTGGACGCGCTGCGC 483  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 报道序列 531CTGAGCCCACTGGGCGAGGAGATGCGCGACCGCGCGCGCCCATGTGGACGCGCTGCGC 590  
 扩增序列 484ACGCATCTGGCCCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCT 543  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 报道序列 591ACGCATCTGGCCCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCT 650  
 扩增序列 544CTCAAGGAGAACGGCGGCGCCAGACTGGCCGAGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTG 603  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 报道序列 651CTCAAGGAGAACGGCGGCGCCAGACTGGCCGAGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTG 710  
 扩增序列 604AGCACGCTCAGCGAGAAGGCCAAGCCCGCGCTCGAGGACCTCCGCCAAGGCCTGCTGCCC 663  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 报道序列 711AGCACGCTCAGCGAGAAGGCCAAGCCCGCGCTCGAGGACCTCCGCCAAGGCCTGCTGCCC 770  
 扩增序列 664GTGCTGGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCTGAGCGCTCTCGAGGAGTACACTAAGAAGCTC 723  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 报道序列 771GTGCTGGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCTGAGCGCTCTCGAGGAGTACACTAAGAAGCTC 830  
 扩增序列 724AACACCCAGTGA 735  
 |||||||||||||  
 报道序列 831AACACCCAGTGA 842

<210>3

<211>255

<212> 氨基酸序列

<213> 人工序列

<400>3

MNHKVHHHHHHMDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVVKDSGRDYVSQFEGSALGKQLN  
 LKLLDNWDSVTSTFSKLRQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQP  
 YLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARA  
 HVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPAL  
 EDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

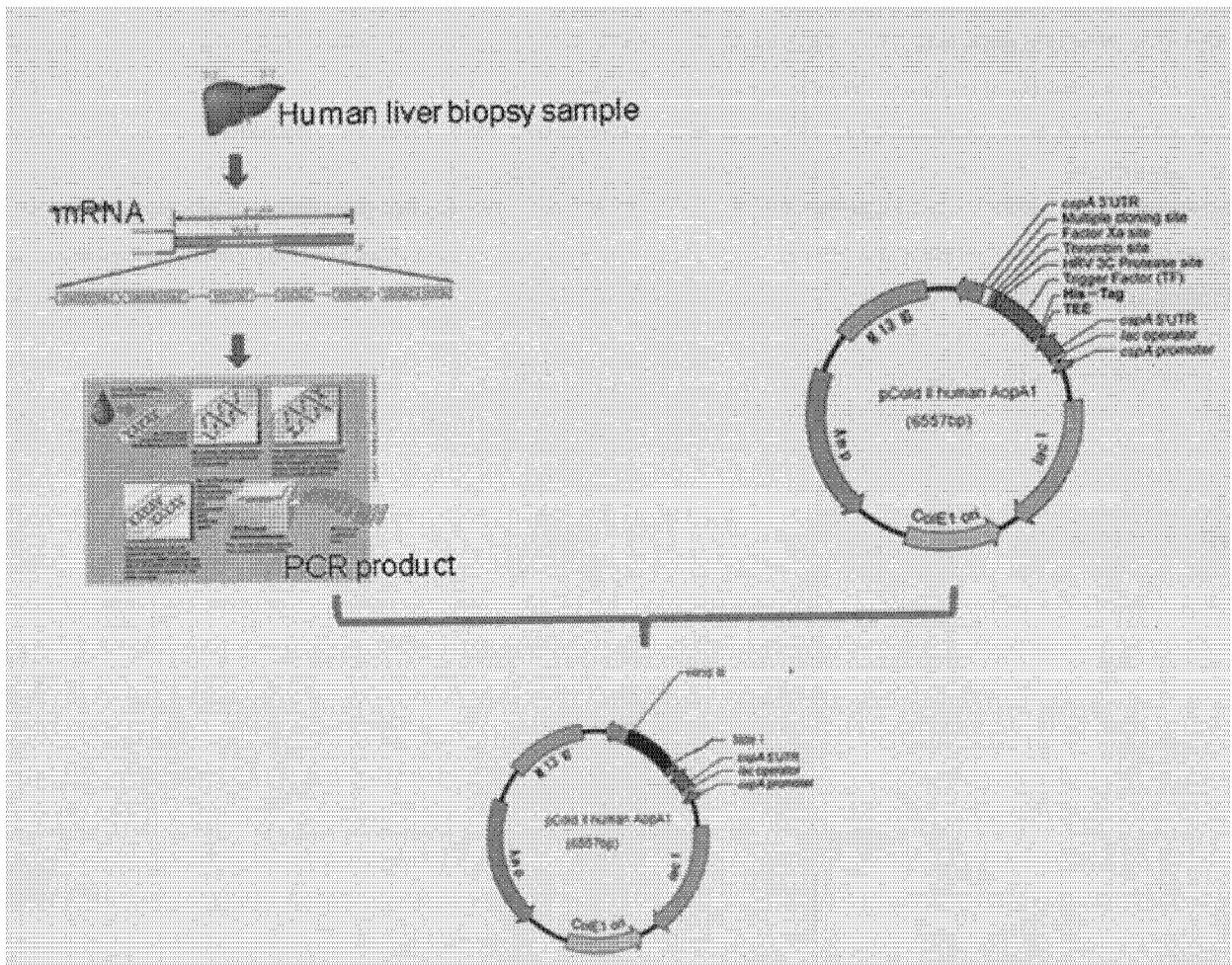


图 1

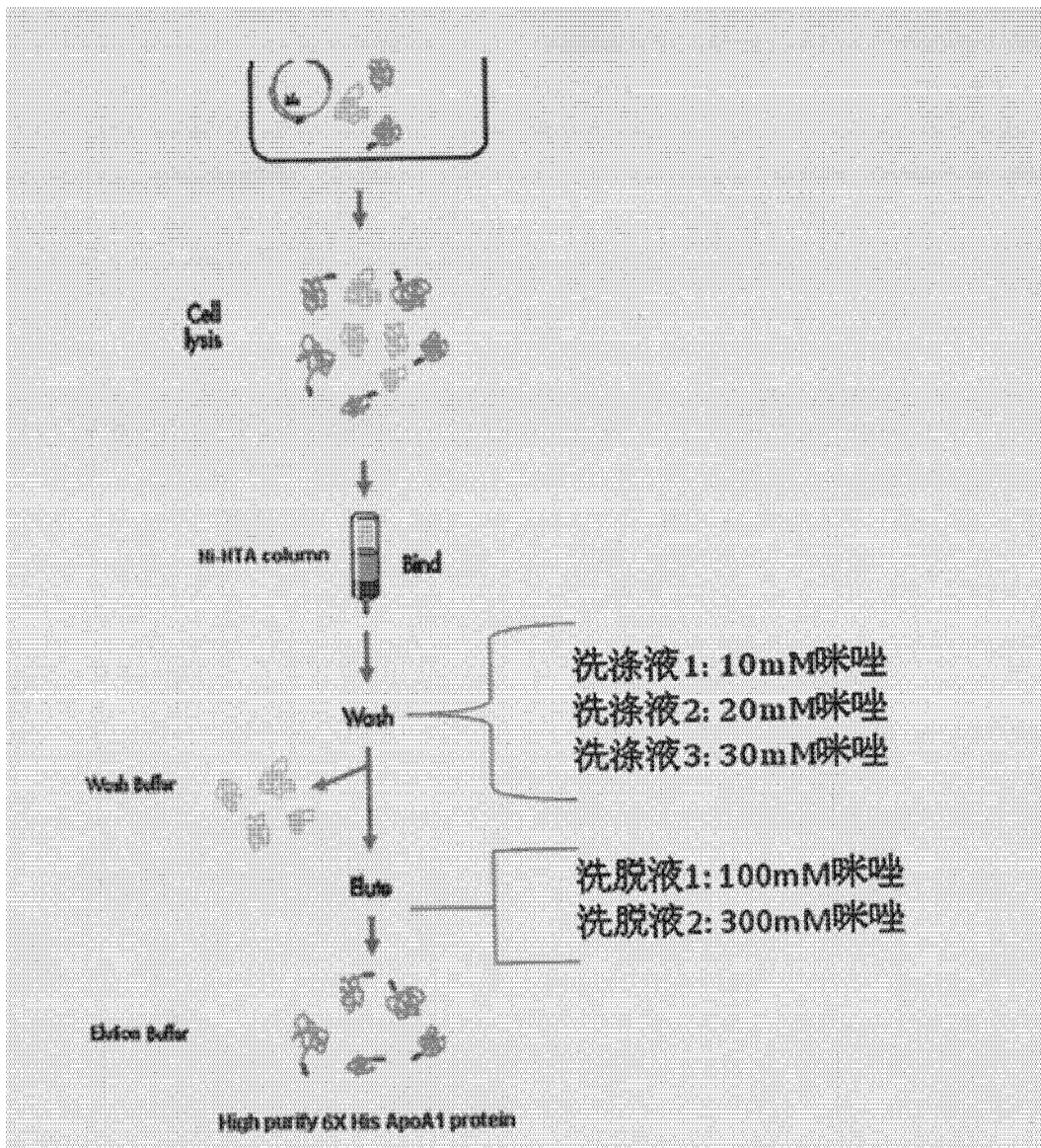


图 2

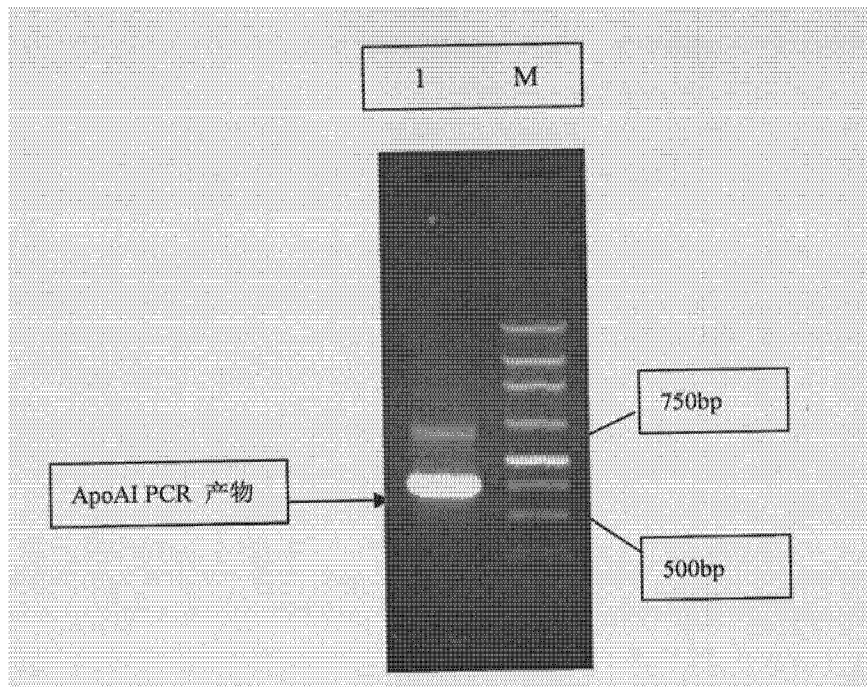


图 3

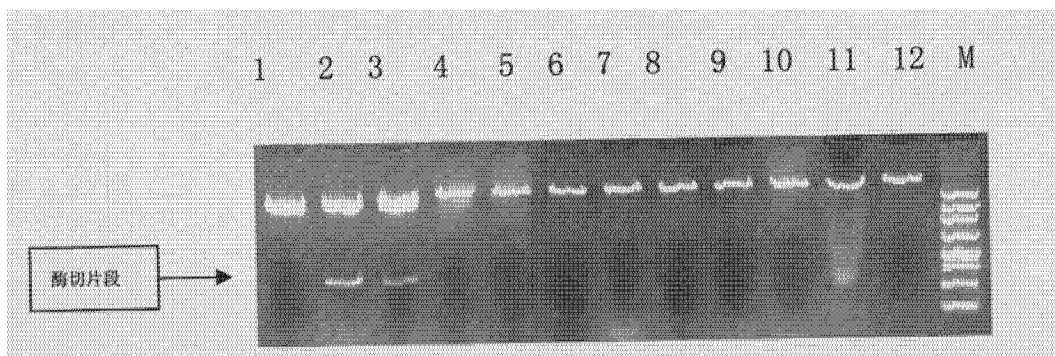


图 4

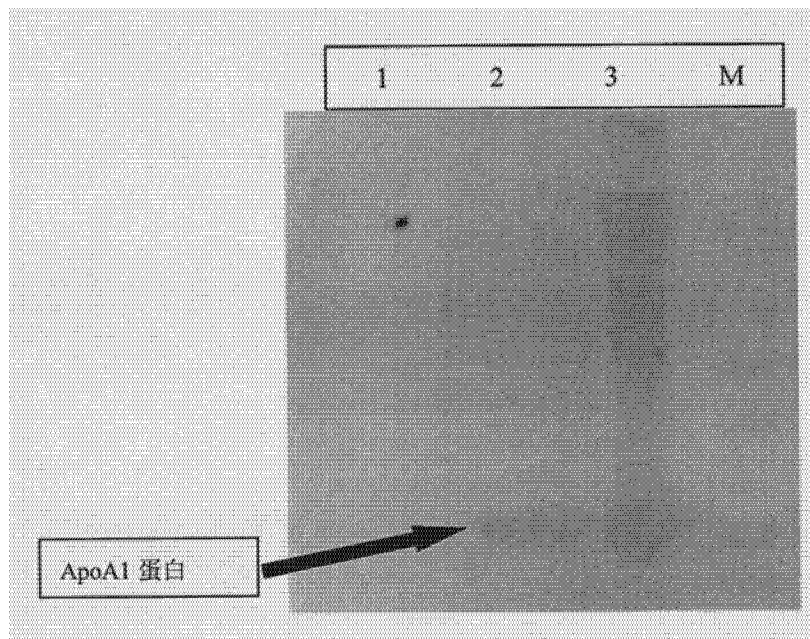
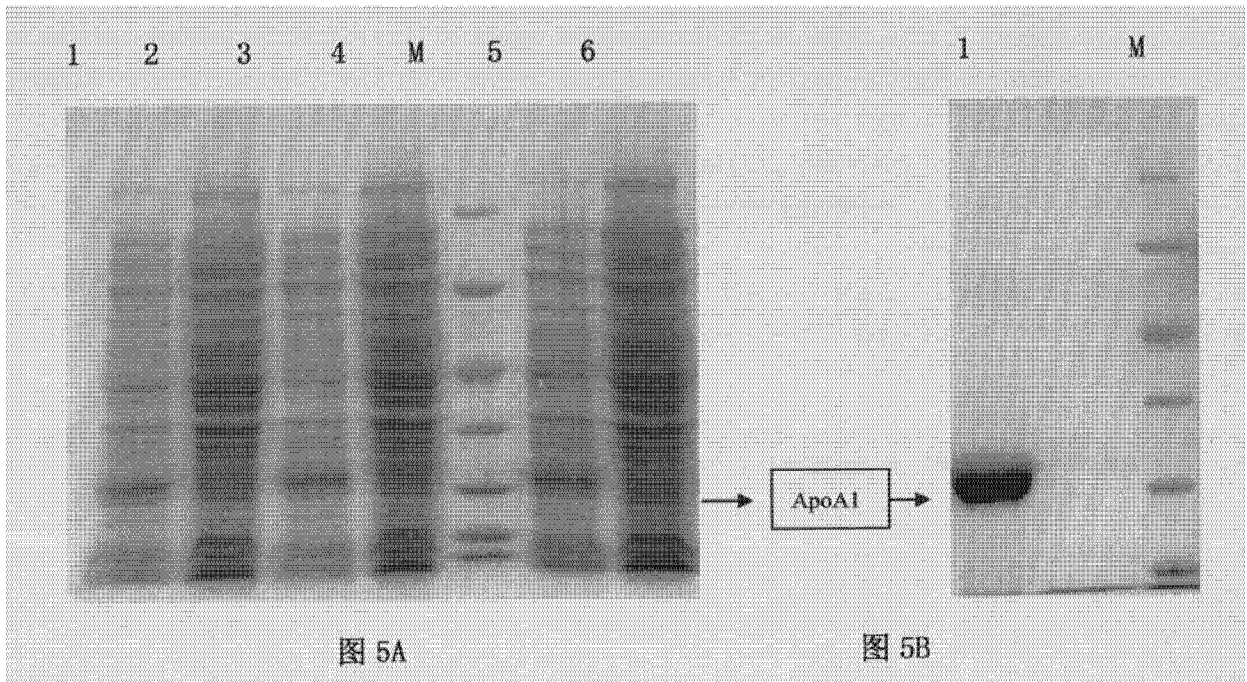


图 6



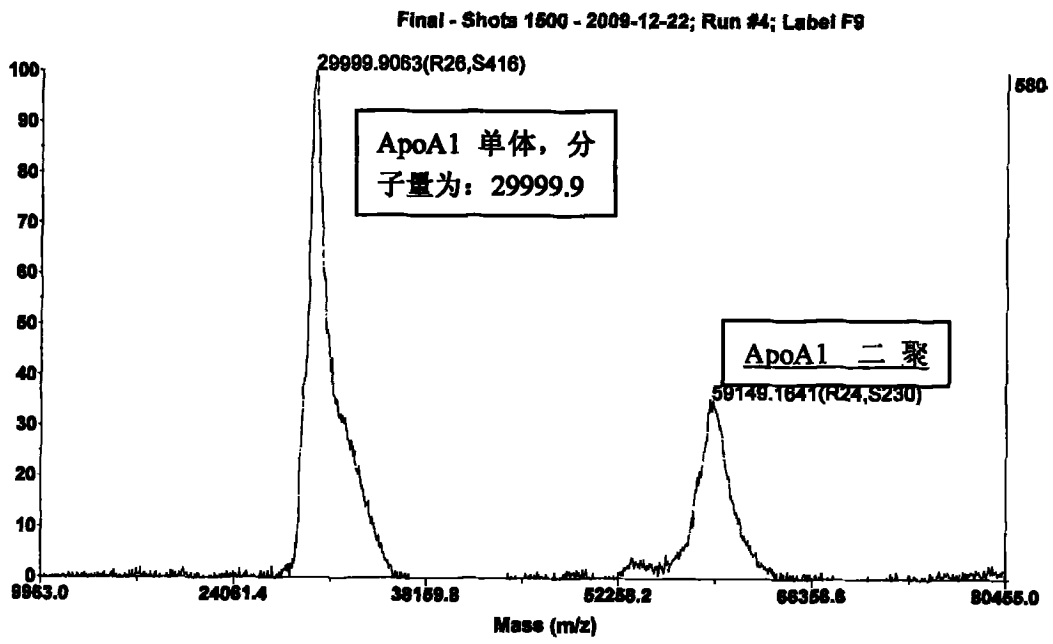


图 7



**Analysis Information**

Report Type	Protein-Peptide Summary by Spot	Analysis Type	Combined (MS-MS/MS)
Sample Set Name	2009-12-23	Database	nr09
Analysis Name	100ppm-ncbi-human	Creation Date	12/23/2009 16:16:50
Reported By	12/23/2009 16:26:34 - pany	Last Modified	12/23/2009 16:24:19
MS Acq. / Proc. Method	(Unspecified) / (Unspecified)		
Interpretation Method	(Unspecified)		

Sample Name	Protein Name	Accession No.	Protein MW (kDa)	PI	Protein Count	Protein Score	Protein Score C.I. %	Intensity Matched	Total Ion Score	Sum Ion Score	Total Ion Rank C.I. %	Molecular Function
panPany12009-12-23	apolipoprotein A-I	g117972	286.73	4.43	13	222	100	61.301	58	41	99.94	1

Peptide Information	Calc. Mass	Obsv. Mass	± de	± ppm	Start Seq.	End Sequence	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
199-199	194.467	194.479	0.012	73	123	120 QIVSEPLR					Missed
176-201	174.155	174.16	0.005	82	159	197 AALQSDLR					Missed
132-157	182.837	182.874	0.037	76	213	221 AAFALDGLR					Missed
103-119	103.827	103.827	0.000	61	67	198 LSPLEETMR					Missed
132-157	182.837	182.837	0.000	66	129	112 VQPIIDKDFQ					Missed
197-197	198.879	198.879	0.000	61	14	129 WQSEMSLYR	41	97.44			Missed
124-157	124.879	124.879	0.000	61	114	128 WQSEMSLYR					Missed
158-164	161.713	161.713	0.000	79	97	177 TMLAPVSELR					Missed
100-102	100.704	100.704	0.000	71	24	48 DVVQDFEGLR					Missed
141-147	141.718	141.718	0.000	63	112	128 WQSEMSLYR					Missed
142-147	142.718	142.718	0.000	77	26	55 EQLSPYVQSPFVDELR					Missed
130-149	130.829	130.829	0.000	77	65	69 EQLSPYVQSPFVDELR					Missed
132-146	132.844	132.844	0.000	61	49	62 EQLSPYVQSPFVDELR					Missed
132-146	132.844	132.844	0.000	61	62	69 EQLSPYVQSPFVDELR	68	0			Missed
204-27	204.27	204.27	0.000	1	2-2	247 AAFALDGLRQVLPVLR					Missed

ApoA1

Sample Name	Protein Name	Accession No.	Protein MW (kDa)	PI	Protein Count	Protein Score	Protein Score C.I. %	Intensity Matched	Total Ion Score	Sum Ion Score	Total Ion Rank C.I. %	Molecular Function
panPany12009-12-23	apolipoprotein A-I (apoA1)	g117972	286.73	4.43	13	222	100	61.301	58	41	99.94	1

Peptide Information	Calc. Mass	Obsv. Mass	± de	± ppm	Start Seq.	End Sequence	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
186-203	186.874	186.874	0.000	75	51	147 QIVSEPLR					Missed
673-6424	673.819	673.819	0.000	62	148	164 AALQSDLR					Missed
112-178	112.829	112.829	0.000	76	231	238 AAFALDGLR					Missed
103-119	103.827	103.827	0.000	61	105	73 LSPLEETMR					Missed
132-157	132.837	132.837	0.000	66	127	159 VQPIIDKDFQ					Missed
158-164	158.879	158.879	0.000	61	122	146 WQSEMSLYR	41	97.44			Missed
124-157	124.879	124.879	0.000	61	136	148 WQSEMSLYR					Missed
158-164	158.879	158.879	0.000	79	185	166 TMLAPVSELR					Missed
140-163	140.713	140.713	0.000	71	33	84 DVVQDFEGLR					Missed
141-147	141.718	141.718	0.000	63	121	140 WQSEMSLYR					Missed
142-147	142.718	142.718	0.000	77	68	104 EQLSPYVQSPFVDELR					Missed
132-146	132.844	132.844	0.000	77	66	104 EQLSPYVQSPFVDELR					Missed
132-146	132.844	132.844	0.000	61	34	121 EQLSPYVQSPFVDELR	68	0			Missed
204-27	204.27	204.27	0.000	1	231	258 AAFALDGLRQVLPVLR					Missed
186-203	186.874	186.874	0.000	61	25	107 EQLSPYVQSPFVDELR					Missed

图 8