



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113214410 A

(43) 申请公布日 2021.08.06

(21) 申请号 202110624088.4

C12N 15/66 (2006.01)

(22) 申请日 2017.11.04

C12N 1/21 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

C12P 21/02 (2006.01)

2017111074686.9 2017.11.04

C12R 1/19 (2006.01)

(71) 申请人 海南大学

地址 570208 海南省海口市美兰区人民大道58号海南大学农科主楼817

(72) 发明人 王大勇 黄永林 裴业春

(74) 专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理有限公司 11385

代理人 吕永齐

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

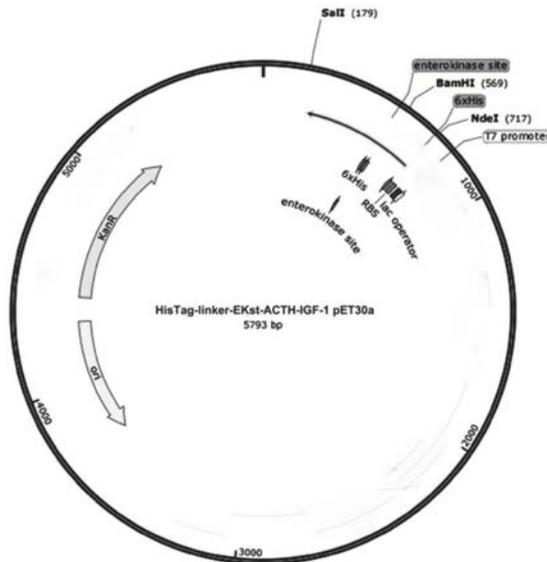
权利要求书1页 说明书4页
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

一种表达促皮质素与胰岛素样生长因子1融合蛋白的重组质粒、重组菌的构建方法

(57) 摘要

本发明涉及一种表达促皮质素与胰岛素样生长因子1融合蛋白的重组质粒、重组菌的构建方法。本发明采用适合在工程菌中表达的优化密码子,构建编码ACTH与IGF-1融合蛋白的表达质粒:HisTag-linker-EKst-ACTHIGF-1pET30a质粒。在大肠杆菌表达菌株BL21-DE3中诱导表达后,用镍柱从破碎溶解的包涵体中分离纯化出HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1多肽链,之后用带有组氨酸标签的肠激酶切下HisTag-linker-EKst片段,然后再用Ni柱除去肠激酶和HisTag-linker-EKst片段,得到ACTH-IGF-1融合蛋白。



1. 一种表达人促皮质素与胰岛素样生长因子1融合蛋白的重组质粒的构建方法,其特征在于,所述重组质粒的核苷酸序列中包含编码人促皮质素与胰岛素样生长因子1的核苷酸序列,包括以下步骤:

1) 使用重叠PCR技术将ACTH与IGF-1相连,构建两端带有内切酶位点的cDNA架构:BamH1-HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1-Sal1;所述酶切位点为BamH1和Sal1;所述cDNA架构中ACTH前插入了编码肠激酶底物EKst的碱基序列,所述EKst的前面插入编码组氨酸标签HisTag的碱基序列所述ACTH与IGF-1之间以柔性连接序列GGGS相连。

2) 双酶切BamH1-HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1-Sal1和载体pET30a,产生粘性末端;

3) 用T4连接酶将切出粘性末端的BamH1-HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1-Sal1以及质粒pET30a连接,构建出表达HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1的重组质粒。

2. 一种表达促皮质素与胰岛素样生长因子1融合蛋白的重组菌的构建方法,包括以下步骤:

将权利要求1构建得到的重组质粒转入大肠杆菌表达菌株BL21-DE3,筛选高表达的重组菌。

3. 一种基于权利要求2所述重组菌制备促皮质素与胰岛素样生长因子1融合蛋白的方法,包括以下步骤:

S1. 诱导所述重组菌表达;

S2. 破碎菌体,收集包涵体并洗涤,再破碎和溶解包涵体,得到富含HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1的溶液;

S3. 利用镍(Ni)柱纯化出所述溶液中的HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1;

S4. 用带有His标签的肠激酶切割所述HisTag-EKst-ACTH-IGF-1,得到ACTH-IGF-1融合蛋白;

S5. 用镍柱去除带有His标签的肠激酶以及切下来的HisTag-linker-EKst,得到纯化的ACTH-IGF-1。

一种表达促皮质素与胰岛素样生长因子1融合蛋白的重组质粒、重组菌的构建方法

[0001] 本申请是申请日为2017年11月04日、申请号为201711074686.9、发明名称为《促皮质素与胰岛素样生长因子1融合蛋白及其制备方法》的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于生物制药领域。具体涉及DNA及蛋白质一级结构、表达载体的构建和表达、以及蛋白质的分离和纯化。

背景技术

[0003] 促皮质素(Corticotropin),也称促肾上腺皮质激素(ACTH,adrenocorticotropic hormone),是由垂体的前叶、下丘脑、肾上腺髓质、肠道和胎盘等组织分泌的一种39个氨基酸的多肽类激素,具有调节糖、脂肪、和蛋白质的生物合成和代谢,调节心脑血管功能、提高抵抗力,调控糖皮质激素(GC)的合成与分泌,神经损伤恢复与再生,抗炎,免疫抑制,抗毒素,抗休克等作用。ACTH是临床治疗两岁以下婴儿惊厥症的唯一特效药,该病发病率0.5%~1%,6~33%的婴儿惊厥症患儿在3岁前死亡,70~90%患儿智力发育缓慢,30%发展为自闭症。ACTH也用于红斑狼疮、多发性硬化病急性恶化、肾病综合征、全身性皮炎和结节病的治疗;还用于银屑病关节炎、风湿性关节炎、强直性脊柱炎以及严重眼部过敏和炎症等的辅助治疗。ACTH不稳定,体内半衰期只有15分钟;目前临床应用的ACTH是从动物组织中提取的,生产成本高并且有传播动物病毒和支原体的潜在风险。本发明从工程菌中表达制备基因重组ACTH融合蛋白,生产成本低,基本不会传播动物病毒和支原体。

[0004] 胰岛素样生长因子1(IGF-1,insulin-like growth factor 1),又被称作促生长因子或生长激素介质(Somatomedin),含有70个氨基酸,相对分子量为7649的多肽类激素,其半衰期长达20个小时,其作用与胰岛素类似。IGF-1在人体中的主要作用为调节血糖、促生长、促细胞分化、创伤修复等。IGF-1制剂在临床上已用于治疗糖尿病、胰岛素抵抗综合征、侏儒症及神经系统疾病等多种顽疾,取得了良好的效果。本发明将ACTH与IGF-1融合表达并纯化。得到的融合蛋白不但能够增强ACTH的作用,还具有ACTH与IGF-1的双重药理作用。

[0005] 初始表达架构为HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1。其中HisTag为组氨酸标签,linker为随机连接序列,EKst为肠激酶(Enterokinase)底物序列(氨基酸序列为DDDDK)。肠激酶能够特异性的切割其底物序列氨基酸序列末端,得到不含多余氨基酸的ACTH-IGF-1融合蛋白。

发明内容

[0006] 1.发明的目的

[0007] 利用工程菌中表达并纯化出一种基因重组融合蛋白(ACTH-IGF-1),及其制备和纯化方法。

[0008] 2.发明的技术方案

[0009] 一、使用重叠PCR技术将ACTH与IGF-1相连,构建两端带有内切酶位点(BamH1和Sal1)的cDNA架构:BamH1-HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1-Sal1,此架构中ACTH前插入了编码肠激酶底物(EKst)的碱基序列,EKst前面插入编码组氨酸标签(HisTag)的碱基序列,ACTH与IGF-1之间以柔性连接序列GGGS相连。

[0010] 二、双酶切Bamh1-HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1-Sal1和载体pET30a,产生粘性末端。

[0011] 三、用T4连接酶将切出粘性末端的BamH1-HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1-Sal1以及质粒pET30a连接,构建出表达HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1的pET30a质粒(图1)。

[0012] 四、将构建好的质粒转入大肠杆菌表达菌株BL21-DE3,筛选高表达菌株,诱导表达。

[0013] 五、破碎菌体,收集包涵体并洗涤,再破碎和溶解包涵体,得到富含HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1的溶液。

[0014] 六、利用镍(Ni)柱纯化出HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1。

[0015] 七、用带有His标签的肠激酶切割HisTag-EKst-ACTH-IGF-1,得到ACTH-IGF-1融合蛋白。

[0016] 八、用镍柱去除带有His标签的肠激酶以及切下来的HisTag-linker-EKst,得到纯化的ACTH-IGF-1。

[0017] 3.发明的有益效果

[0018] 本发明可以获得具有ACTH和IGF-1双重功效的融合蛋白IGF-1-ACTH,可以增强ACTH的作用。

附图说明

[0019] 图1.HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1pET30a质粒图谱。

[0020] 图2.HisTag-EKst-linker-ACTH-IGF-1-pET30a表达质粒的构建结果验证。a.片段BamH1-HisTag-linker-EKst-ACTH的PCR扩增。M:marker;泳道1:空泳道,泳道2:BamH1-HisTag-linker-EKst-ACTH的PCR扩增产物。b.片段IGF-1-Sal1的PCR扩增。M:marker;泳道1:空泳道,泳道2:IGF-1-Sal1的PCR扩增产物。c.片段BamH1-HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1-Sal1的PCR扩增。M:marker;泳道1:空泳道,泳道2:Bamh1-HisTaglinker--EKst-site-ACTH-IGF-1-Sal1的PCR扩增产物。d.载体pET30a的酶切。M:marker;泳道1:pET30a载体,泳道2:Bamh1、Sal1双酶切载体pET30a。e.促皮质激素-胰岛素样生长因子1融合蛋白表达载体HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1-pET30a的酶切鉴定。M:marker;泳道1:pET30a空载体,泳道2、3:Bamh1、Sal1双酶切已插入HisTag-EKst-linker-ACTH-IGF-1-pET30a序列的质粒。

[0021] 图3.HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1测序图。

[0022] 图4.重组融合蛋白HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1表达后用镍柱纯化结果图。HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1-pET30a质粒在BL21-DE3工程菌中表达后,经超声破碎,上清液用镍柱纯化后,经SDS-PAGE(15%Tris-Glycine聚丙烯酰胺凝胶)分离后,考马斯亮

蓝R-250原位染色。M:分子量标记。泳道1-14: Ni柱纯化后的HisTag-linker-EKst-*ACTH-IGF-1*融合蛋白的分离组分,组分4-13中为Ni柱纯化得到的融合蛋白HisTag-linker-EKst-*ACTH-IGF-1*。

[0023] 图5.纯化后的*ACTH-IGF-1*的Western blot检测图。*ACTH-IGF-1*用SDS-PAGE(10% Tris-tricine胶)分离后,转印到低荧光背景PVDF膜检测,一抗为鼠抗人*ACTH*(Santa Cruz)特异性抗体,二抗为Alexa488荧光标记羊抗鼠抗体(Abcam)么,用TyphoonFLA 9500(GE Healthcare)检测荧光条带。

具体实施方式

[0024] 具体实施方式一:本实施方式表达并分离纯化基因重组*ACTH-IGF-1*融合蛋白,按以下步骤进行:

[0025] 一、根据原核表达体系中的密码子偏好性优化设计*ACTH* CDs序列,以适于在大肠杆菌表达菌株BL21-DE3中高效表达。以BamH1和Sal1作为融合表达蛋白CDs序列的上下游两端的酶切位点,构建带有His标签和肠激酶酶切位点的融合蛋白原核表达序列HisTag-linker-EKst-*ACTH-IGF-1-Sal1*,核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,带有His标签和肠激酶酶切位点的融合蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。具体步骤如下:

[0026] 引物设计:设计扩增BamH1-HisTag-linker-EKst-*ACTH*的上游引物BamH1-HisTag-linker-EKst-*ACTH-F*,下游引物*ACTH-R*;设计扩增*IGF-1*的上游引物*IGF-1-F*,下游引物*IGF-1-Sal1-R*。引物序列见核苷酸序列表。

[0027] 用重叠PCR法用引物BamH1-HisTag-linker-EKst-*ACTH-F*(核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示)和*ACTH-R*(核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示),以人工合成的*ACTH*序列为模板,扩增出BamH1-HisTag-linker-EKst-*ACTH*(见图2a);以含*IGF-1*基因的质粒为模板,再用引物*IGF-1-F*(核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示)和引物*IGF-1-Sal1-R*(核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示)扩增出*IGF-1-Sal1*(见图2b);最后用扩增的这两个片段(BamH1-HisTag-EKst-*ACTH*和*IGF-1-Sal1*)为模板,用引物BamH1-HisTag-EKst-*ACTH-F*(核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示)和*IGF-1-Sal1-R*(核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示)扩增出目的片段:BamH1-HisTag-EKst-*ACTH-IGF-1-Sal1*(见图2c),*ACTH*与*IGF-1*之间的核苷酸序列编码氨基酸柔性连接片段GGGS。

[0028] 二、用BamH1和Sal1分别酶切片段BamH1-HisTag-EKst-*ACTH-IGF-1-Sal1*和空白载体pET30a(见图2d)。

[0029] 三、用T4DNA连接酶连接片段和载体,构建质粒HisTag-Linker-EKst-*ACTH-IGF-1-pET30a*。酶切鉴定(见图2e),绘制融合蛋白表达质粒图谱(见图1),测序结果见图3。

[0030] 四、40℃,30秒钟将质粒HisTag-linker-EKst-*ACTH-IGF-1-pET30a*转入大肠杆菌表达菌株BL21-DE3中,37℃恢复菌体1小时,取50uL涂含有卡那霉素的LB固体培养板,37℃倒置培养16h。挑选板上的单菌落,转入加有50mL液体LB培养基的锥形瓶中,培养基中加有卡那霉素,37℃摇菌至OD₆₀₀为0.6时,加入浓度为0.05mM IPTG于180rpm 37℃表达5h。

[0031] 五、将上述工程菌收集在离心管中,以12,000rpm,在4℃条件下,离心15min,弃掉上清。加入非变性裂解液(50mM Tris-HCl,300mM NaCl,10mM咪唑,pH 8.0)柔和洗涤菌体,12,000rpm,4℃离心10min收集沉淀,洗涤3次,每次15min。每克湿重加入8mL非变性裂解液,

用旋转混合仪分散菌体。将菌液置于冰上,用超声波破碎仪破碎菌体,破碎功率为400W,破碎3s停5s共破碎200次。12,000rpm,4℃离心20min。在冰浴条件下,将离心沉淀悬浮于9倍体积的包涵体洗涤液I(50mM Tris-HCl、100mM NaCl、2mM EDTA、1mM DTT、0.5% (v/v) TritonX-100,pH 8.0),超声3×10秒,室温放置10min,在4℃,以12,000rpm离心20min,分别收集上清及沉淀。将沉淀悬浮于9倍体积的包涵体洗涤液II(50mM Tris-HCl、100mM NaCl、2mM EDTA、1mM DTT,pH 8.0),混匀后室温放置10min,同上条件再次离心20min后,收集合并上清液用于纯化蛋白质。

[0032] 六、再生好的Ni柱用2倍体积20%乙醇洗过后,用2V的去离子水过一遍。更换流动相为平衡缓冲液(50mM Tris-cl,300mM Nacl,10mM咪唑,pH 8.0),平衡5个柱体积。上样,更换流动相为漂洗液(50mM Tris-cl,300mM Nacl,100mM咪唑,pH 8.0),漂洗40个柱体积。洗脱,更换流动相为洗脱液(50mM Tris-cl,300mM Nacl,250mM咪唑,pH 8.0),收集洗脱液组分,用15%SDS-PAGE电泳后,R-250染色(见图4)。

[0033] 七、在洗脱液中组分中分别加入带有His标签的肠激酶,终浓度为1mM,在37℃温育1小时以切割样品中的HisTag-linker-EKst-ACTH-IGF-1多肽链,得到游离的ACTH-IGF-1以及His-Tag-linker-EKst。

[0034] 八、采用步骤六的方法平衡Ni柱,将肠激酶切后的洗脱液组分加至Ni柱,4℃静置30-60min以去除酶切洗脱液中连有His标签的肠激酶以及HisTag-linker-EKst多肽。Western blot鉴定各洗脱液组分中ACTH-IGF-1结果如图5所示。

[0035] 具体实施方式二:本实施方式与具体实施方式一不同的是不采用pET30a质粒,而是用pET21a作为表达载体。

[0036] 具体实施方式三:本实施方式与具体实施方式一或二不同的是不采用pET30a或pET21a质粒,而是用pET28a作为表达载体。

[0037] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 海南大学

<120> 一种表达促皮质素与胰岛素样生长因子1融合蛋白的重组质粒、重组菌的构建方法

<150> 201711074686.9

<151> 2017-11-04

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

atgcaccatc atcatcatca ttcttctggt ctggtgccac gcggttctgg tatgaaagaa 60
accgctgctg ctaaattcga acgccagcac atggacagcc cagatctggg taccgacgac 120
gacgacaagg ccatggctga tatcggatcc atgcatcacc atcaccatca cgacgacgac 180
gacaaatctt actctatgga acacttccgt tggggtaaac cggttggtaa aaaacgtcgt 240
ccggttaaag ttaccggaa cgggtctgaa gacgaatctg ctgaagcttt cccgctggaa 300
ttcggtggtg gttctggacc ggagacgctc tgcggggctg agctggtgga tgctcttcag 360
ttcgtgtgtg gagacagggg cttttatttc aacaagccca cagggtatgg ctccagcagt 420
cggagggcgc ctgagacagg catcgtggat gactgctgct tccggagctg tgatctaagg 480
aggctggaga tgtattgccc acccctcaag cctgccaagt cagcttaata ataa 534

```

<210> 2

<211> 175

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```

Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
1           5           10           15
Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp
          20           25           30
Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met Ala Asp Ile
          35           40           45
Gly Ser Met His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Ser Tyr
          50           55           60
Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val Gly Lys Lys Arg Arg
65           70           75           80
Pro Val Lys Val Tyr Pro Asn Gly Ala Glu Asp Glu Ser Ala Glu Ala

```

	85	90	95
Phe Pro Leu Glu Phe Gly Gly Gly Ser Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly			
	100	105	110
Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe			
	115	120	125
Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro			
	130	135	140
Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg			
145	150	155	160
Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala			
	165	170	175

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

cgcgatcca tgcacacca tcaccatcac gacgacgacg acaa 45

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

ctggaattcg gtggtggttc tggaccggag a 31

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

tagcgtcgac ttattattaa gctgacttgg ca 32

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

gcgtcgactt attattagaa ttccagcggg 30

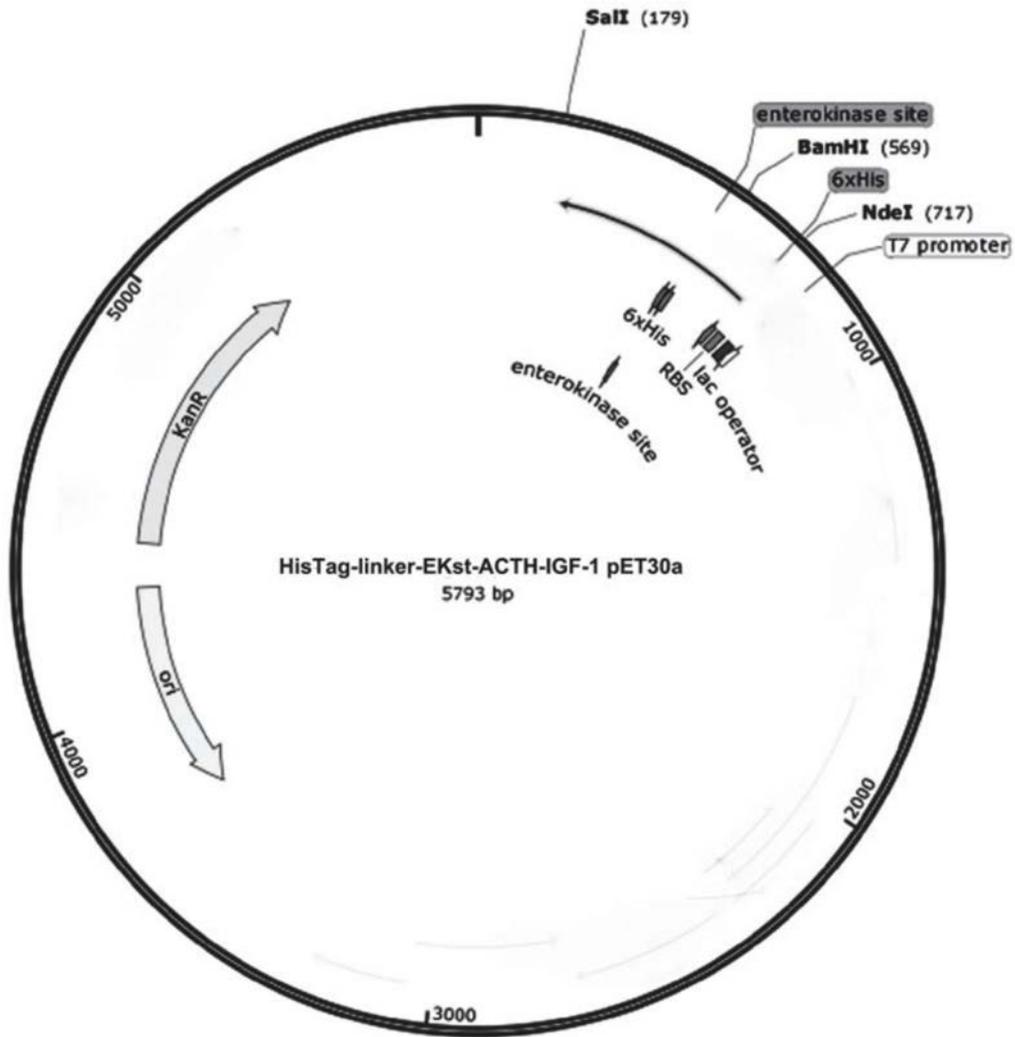


图1

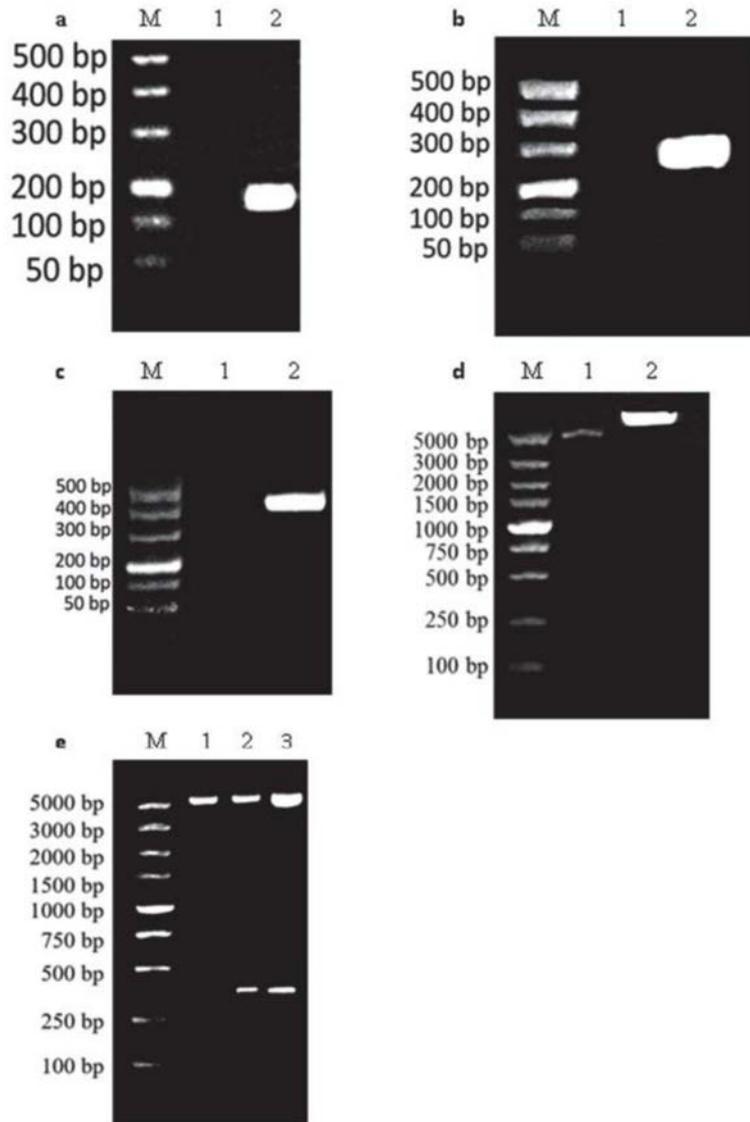


图2

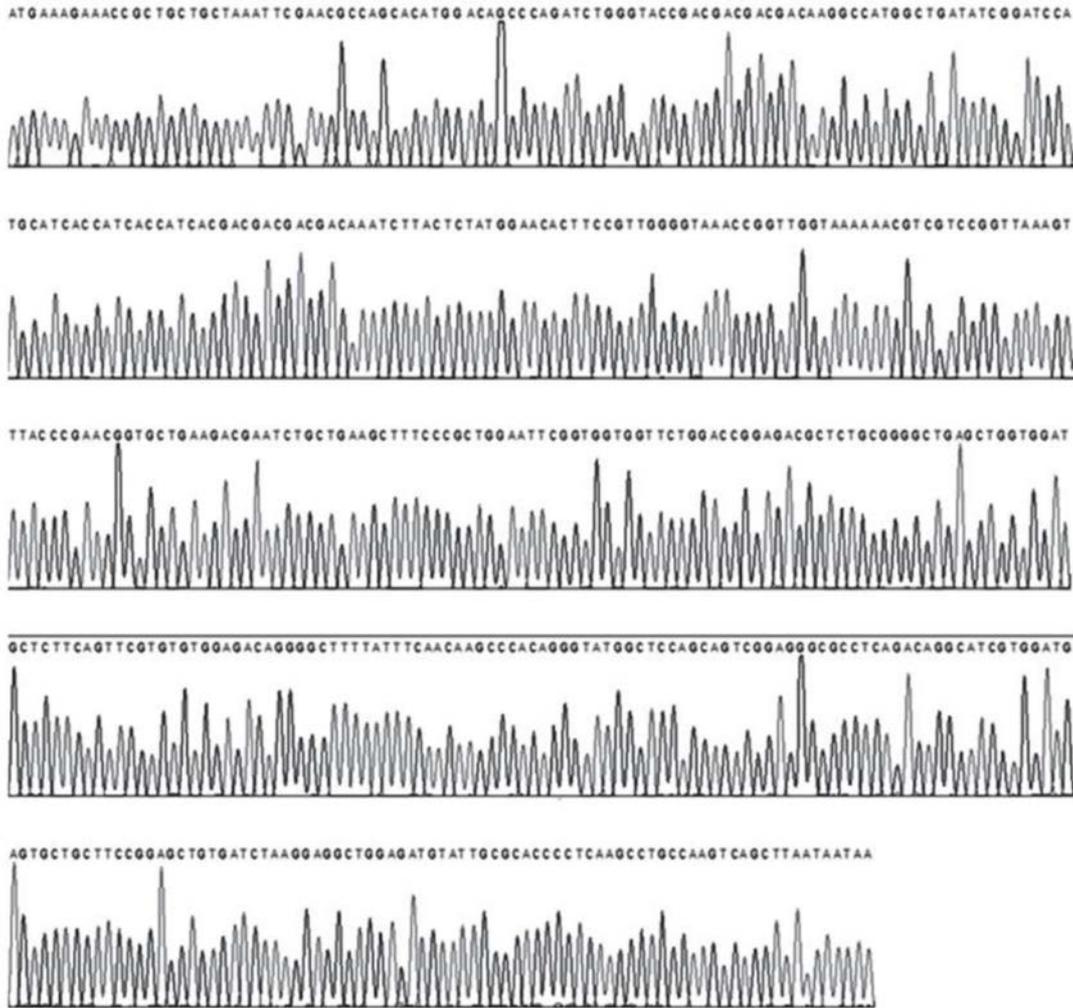


图3

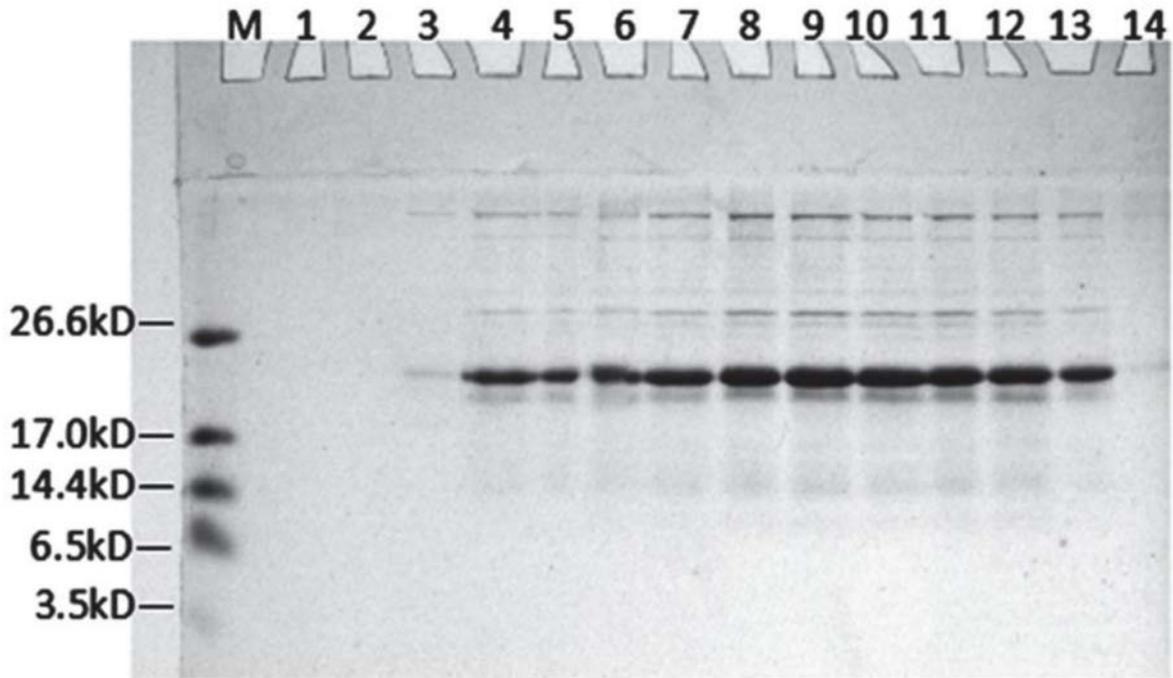


图4

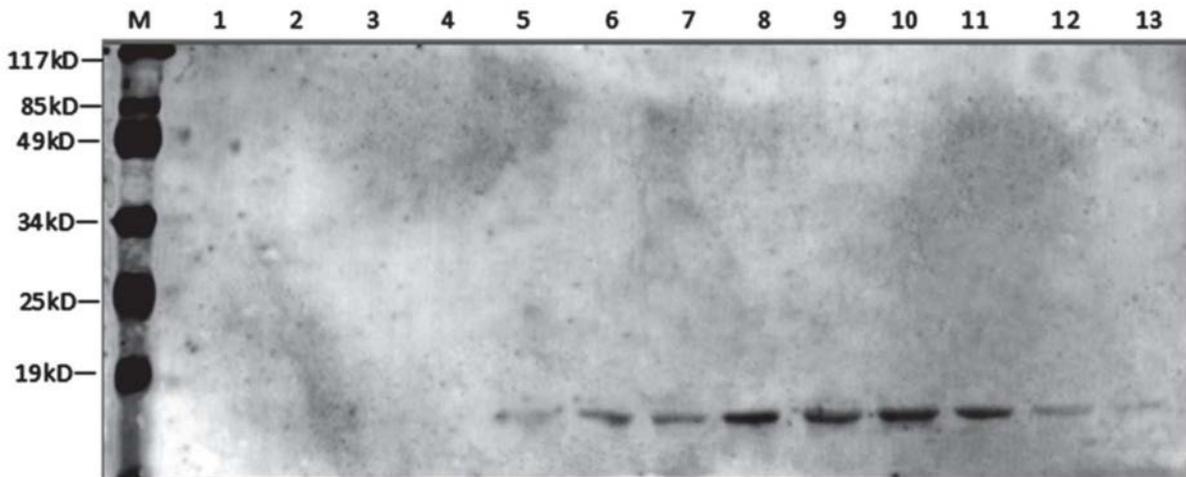


图5