



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110305869 A

(43)申请公布日 2019.10.08

(21)申请号 201910484390.7

C12R 1/84(2006.01)

(22)申请日 2019.06.05

(71)申请人 佛山科学技术学院

地址 528000 广东省佛山市南海区狮山镇
广云路33号

(72)发明人 刘燊 陈柏东 张辉华 柴启恩
冯鑫 宫莉 朱翠

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 谢泳祥

(51)Int.Cl.

C12N 15/12(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/81(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

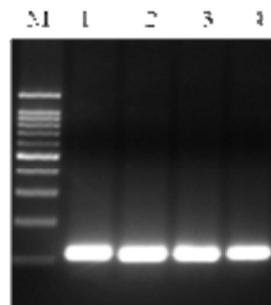
权利要求书1页 说明书9页
序列表5页 附图2页

(54)发明名称

一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因及
酵母表达的方法

(57)摘要

本公开提供了一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因及酵母表达的方法,所述重组鼠源抗菌肽Rattusin基因序列针对毕赤酵母菌密码子优化表达。所述重组鼠源抗菌肽Rattusin基因针对毕赤酵母的密码子进行序列优化表达,使得重组鼠源抗菌肽Rattusin基因在毕赤酵母菌种的表达产出浓度提高,且在表达的重组鼠源抗菌肽Rattusin蛋白上增加6个组氨酸,使得重组菌丝霉素更容易纯化,达到了提高产量和纯度的目的。



1. 一种重组鼠源抗菌肽Rattusin基因片段,其特征在于,所述基因片段序列针对毕赤酵母菌密码子优化表达,具体序列为SEQ ID No.1。

2. 一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因表达载体的方法,其特征在于,所述方法的具体步骤包括:

(1) 将SEQ ID NO.2-5基因片段进行拼接重组得到重组鼠源抗菌肽Rattusin基因,然后再进行PCR扩增;

(2) 将含有编码MBP标签的载体进行线性化;

(3) 利用同源重组法构建重组载体,将重组鼠源抗菌肽Rattusin基因与MBP标签片段进行重组,以得到具有MBP标签的重组鼠源抗菌肽Rattusin基因片段的重组载体;

(4) 然后将重组载体进行转化,最后进行阳性菌落鉴定。

3. 根据权利要求书2中所述的构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因表达载体的方法,其特征在于,所述步骤(1)中PCR扩增的引物序列为SEQ ID NO.6和SEQ ID NO.7。

4. 根据权利要求书2中所述的构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因表达载体的方法,其特征在于,所述步骤(2)中载体线性化的引物序列为SEQ ID NO.8和SEQ ID NO.9。

5. 根据权利要求书2中所述的构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因表达载体的方法,其特征在于,所述MBP的基因序列为SEQ ID NO.10。

6. 一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin酵母表达的方法,其特征在于,所述方法的具体步骤包括:

(a) 将权利要求书2-5中任意一项所述的构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因表达载体的方法所构建的具有MBP标签的重组鼠源抗菌肽Rattusin基因片段的重组载体经限制性内切酶Avr II线性化处理;

(b) 将线性化的重组载体电转化至毕赤酵母菌感受态细胞中,然后在YPD固体培养基上培养,长出菌落,最后进行菌落鉴定;

(c) 将鉴定为阳性的菌落进行重组鼠源抗菌肽Rattusin基因进行蛋白表达,然后将蛋白纯化。

7. 根据权利要求书6中所述的构建重组鼠源抗菌肽Rattusin酵母表达的方法,其特征在于,所述步骤(b)菌落鉴定的方法为PCR鉴定,其中PCR扩增的引物序列分别为SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.11和SEQ ID NO.12。

8. 一种根据权利要求书6或7中所述的构建重组鼠源抗菌肽Rattusin酵母表达的方法所制备的重组鼠源抗菌肽Rattusin,其特征在于,所述重组鼠源抗菌肽Rattusin的氨基酸序列为SEQ ID NO.13。

一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因及酵母表达的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及生物技术领域,具体涉及一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因及酵母表达的方法。

背景技术

[0002] 鼠源抗菌肽Rattusin是大鼠 α -防卫素相关肽,在远端小肠的帕内特细胞中表达,与大多数其他被灭活的 α -防御素和 β -防御素不同,鼠源抗菌肽Rattusin是一种独特的防御素相关肽,具有强大的不依赖盐的杀菌活性,对哺乳动物细胞基本没有毒性。功能和结构上与肠道其他防御素不同,鼠源抗菌肽Rattusin有可能提高宿主防御机制,此外具有很好的抗菌性,可以进一步开发鼠源抗菌肽Rattusin用于治疗囊性纤维化和克罗恩病,由于其低细胞毒性,鼠源抗菌肽Rattusin可能用于局部和全身感染的治疗。

[0003] 鼠源抗菌肽Rattusin的生产方式主要有三种:提取、化学合成和生物合成。鼠尾草中的鼠源抗菌肽Rattusin的含量较少,因此通过提取的方式获得鼠源抗菌肽Rattusin是非常不经济的,化学合成成本太高,步骤繁琐,价格昂贵,不适合大规模生产,生物合成主要通过基因工程手段构建工程菌株异源表达鼠源抗菌肽Rattusin,但现有技术所构建的表达系统的鼠源抗菌肽Rattusin产量都非常低。

发明内容

[0004] 本公开的目的是提供一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因及酵母表达的方法,以提高鼠源抗菌肽Rattusin的产量。

[0005] 为实现上述目的,技术方案如下:

[0006] 一种重组鼠源抗菌肽Rattusin基因片段,所述基因片段序列针对毕赤酵母菌密码子优化表达,具体序列为SEQ ID No.1。

[0007] 一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin表达载体的方法,所述方法的具体步骤包括:

[0008] (1) 将SEQ ID NO.2-5基因片段进行拼接重组得到重组鼠源抗菌肽Rattusin基因,然后再进行PCR扩增;

[0009] (2) 将含有编码MBP标签的载体进行线性化;

[0010] (3) 利用同源重组法构建重组载体,将重组鼠源抗菌肽Rattusin基因与MBP标签片段进行重组,以得到具有MBP标签的重组鼠源抗菌肽Rattusin基因片段的重组载体;

[0011] (4) 然后将重组载体进行转化,最后进行阳性菌落鉴定。

[0012] 所述步骤(1)中PCR扩增的引物序列为SEQ ID NO.6和SEQ ID NO.7。

[0013] 所述步骤(2)中载体线性化的引物序列为SEQ ID NO.8和SEQ ID NO.9。

[0014] 所述MBP的基因序列为SEQ ID NO.10。

[0015] 一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin酵母表达的方法,所述方法的具体步骤包括:

[0016] (a) 将上述所构建的具有MBP标签的重组鼠源抗菌肽Rattusin基因片段的重组载体经限制性内切酶Avr II线性化处理;

[0017] (b) 将线性化的重组载体电转化至毕赤酵母菌感受态细胞中,然后在YPD固体培养基上培养,长出菌落,最后进行菌落鉴定;

[0018] (c) 将鉴定为阳性的菌落进行重组鼠源抗菌肽Rattusin基因进行蛋白表达,然后将蛋白纯化。

[0019] 所述步骤(b) 菌落鉴定的方法为PCR鉴定,其中PCR扩增的引物序列分别为SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.11和SEQ ID NO.12。

[0020] 重组鼠源抗菌肽Rattusin的氨基酸序列为SEQ ID NO.13。

[0021] 本公开的有益效果是:提供了一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因及酵母表达的方法,所述重组鼠源抗菌肽Rattusin基因针对毕赤酵母的密码子进行序列优化表达,使得重组鼠源抗菌肽Rattusin基因在毕赤酵母菌种的表达产出浓度提高,且在表达的重组鼠源抗菌肽Rattusin蛋白上增加6个组氨酸,使得重组菌丝霉素更容易纯化,达到了提高产量和纯度的目的。在重组鼠源抗菌肽Rattusin基因N端增加BMP标签,使得所表达的重组鼠源抗菌肽Rattusin的生物活性增强。

附图说明

[0022] 图1为重组鼠源抗菌肽Rattusin基因PCR产物琼脂糖凝胶电泳图。

[0023] 图2为载体线性化PCR产物琼脂糖凝胶电泳图。

[0024] 图3为重组鼠源抗菌肽Rattusin蛋白Western blot检测图。

[0025] 图4为鼠源抗菌肽Rattusin蛋白蛋白纯化图。

具体实施方式

[0026] 以下各步骤仅用以说明本公开的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各步骤对本公开进行了详细的说明,但本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各步骤所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本公开各步骤技术方案的范围。

[0027] 实施例1重组鼠源抗菌肽Rattusin基因表达载体的构建

[0028] 1. 密码子的优化及基因的拼接重组

[0029] 1.1 密码子的优化

[0030] 根据鼠源抗菌肽Rattusin氨基酸序列,进行密码子优化并确定碱基序列,设计如下6条基因序列:

[0031] Gene1:TTGAGAGTTAGAAGAACTTTGCAAT (SEQ ID NO.2);

[0032] Gene2:AAGTGTTTCTACAACTCTACGACAAGAGCATTGCAAAGTTCTTCTAACTCTCA (SEQ ID NO.3);

[0033] Gene3:GTCGTAGAGTTTGTAGAAACACTTGTCTTGTATTAGATTGTCTCGTTCTACATA (SEQ ID NO.4);

[0034] Gene4:AGAAGCGTATGTAGAACGAGACAATCTAATACAA (SEQ ID NO.5);

[0035] Gene-FP:AGGGAAGGTTGAGAGTTAGAAGAACTT (SEQ ID NO.6);

[0036] Gene-RP:TCTAGAAAAGAAGCGTATGTAGAACGAG (SEQ ID NO.7)。

[0037] 1.2 基因的拼接重组

[0038] 1.2.1基因的拼接

[0039] 拼接PCR的反应体系如表1:

[0040] 表1拼接体系

[0041]

2×PfuMax HiFi PCR ProMix	10μL
Gene1~Gene4	各0.4μL
ddH ₂ O	Add to 20μL

[0042] 拼接PCR反应程序如表2:

[0043] 表2反应程序

[0044]	98°C	30s	1 cycle
	98°C	10s	10cycles
	65°C梯度退火-1°C/Cycle	30s	
	72°C	10s	
	72°C	5min	1 cycle

[0045] 1.2.2 PCR扩增重组基因

[0046] PCR反应体系如表3:

[0047] 表3反应体系

[0048]

2×PfuMax HiFi PCR ProMix	25μL
Gene-FP、Gene-RP (10μM)	各1μL
上一步PCR产物	1μL
ddH ₂ O	Add to 50μL

[0049] PCR反应程序如表4:

[0050] 表4反应程序

[0051]	98°C	30s	1 Cycle
--------	------	-----	---------

[0052]	98°C	10s	10 Cycles
	60°C梯度退火 -1°C/Cycle	30s	
	72°C	30s	
	98°C	10s	15cycles
	55°C	30s	
	72°C	15s	
	72°C	5min	

[0053] PCR反应结束后,取PCR产物进行1.5%琼脂糖电泳分析,如图1(泳道M:DNA Marker (100bp~1500bp) 泳道1~4:目的蛋白基因PCR产物)所示,亮带与理论分子量约100bp相符,按照凝胶纯化试剂盒说明书回收PCR产物,超微量紫外分光光度计测定浓度为25ng/ μ L, A260/A280为1.847。

[0054] 2. 重组载体的构建

[0055] 2.1载体线性化

[0056] 将含有编码MBP标签的pGAPZa A重组载体设计如下载体线性化引物:

[0057] Line-RP:ACTCTCAACCTTCCCTCGATCCC (SEQ ID NO.8);

[0058] Line-FP:ATACGCTTCTTTTCTAGAACAAAACTC (SEQ ID NO.9)。

[0059] 线性化PCR反应体系如表5:

[0060] 表5 PCR反应体系

[0061]

2×PfuMax HiFi PCR ProMix	25 μ L
Line-RP、Line-FP (10uM)	各1 μ L
pGAPZa A-MBP质粒	1ng
ddH ₂ O	Add to 50 μ L

[0062] 线性化PCR反应程序如表6:

[0063] 表6 PCR反应程序

[0064]	98°C	30s	1 Cycle
--------	------	-----	---------

[0065]	98°C	10s	10 Cycles
	60°C梯度退火 -1°C/Cycle	30s	
	72°C	2min	
	98°C	10s	15cycles
	55°C	30s	
	72°C	2min	
	72°C	5min	1 Cycle

[0066] PCR反应结束后,取PCR产物进行1.5%琼脂糖电泳分析,如图2(泳道M:DNA Marker (300bp~5000bp) 泳道1~4:载体PCR产物)所示,亮带与理论分子量相符,按照凝胶纯化试剂盒说明书回收PCR产物,超微量紫外分光光度计测定浓度为68.8ng/ μ L,A260/A280为1.825。

[0067] 2.1同源重组

[0068] 利用同源重组的方法构建重组载体,同时使得所表达目的蛋白N端融合MBP标签,使用表7的反应体系,37°C反应30min,冰浴冷却5min。

[0069] 表7同源重组反应体系

[0070]

5×CE Entry Buffer	4 μ L
目的基因胶回收产物	1 μ L
线性化载体胶回收产物	2 μ L
Exnase Entry	2 μ L
ddH ₂ O	Add to20 μ L

[0071] 2.2转化

[0072] 取10 μ L重组产物加到100 μ L DH5 α 感受态细胞中混匀,冰浴30分钟;将上述转化液置于42°C水浴60秒,取出后立即置于冰浴中放置5分钟;向其中加入500 μ L 37°C预热的Low Salt LB(不含抗生素)培养液,150rpm、37°C振荡培养45分钟;2500rpm离心5分钟,将上清液吸走,留100 μ L混匀菌液,加到含Low Salt LB固体琼脂培养基上(Zeocin浓度25 μ g/mL),用无菌的玻璃珠轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后,倒置平板,37°C培养12-16小时。

[0073] 2.3阳性菌落鉴定

[0074] 挑取上述平板上的单菌落10个,分别溶到500 μ l含25 μ g/mL Zeocin的Low Salt LB培养液,37°C、180rpm/min震荡培养4h。每管取0.5 μ L菌液做模板,进行PCR。反应体系设计为10 μ L总体系如表8:

[0075] 表8反应体系

[0076]

2×Hotstart Taq PCR ProMix	5 μ L
菌液	0.5 μ L

Gene-RP (10 μ M)	0.5 μ L
Gene-FP (10 μ M)	0.5 μ L
H ₂ O	3.5 μ L

[0077] 反应程序如表9:

[0078] 表9 PCR反应程序

[0079]	95 $^{\circ}$ C	10min	1 Cycle
	95 $^{\circ}$ C	30s	35 Cycles
	55 $^{\circ}$ C	30s	
	72 $^{\circ}$ C	10s	
	72 $^{\circ}$ C	5min	1 Cycle
	4 $^{\circ}$ C	59min	1 Cycle

[0080] PCR反应完取5 μ L PCR产物进行1.5.0%琼脂糖电泳分析,用特异性上游和下游引物扩增的条带理论大小为100bp左右。挑选阳性的克隆送测序公司测序进一步鉴定,测序结果为SEQ N0.14。

[0081] 2.4重组质粒的提取

[0082] 将阳性单克隆接种于含25 μ g/mL Zeocin的Low Salt LB培养液(16-20 μ L)中,于37 $^{\circ}$ C、200r/min的摇床中培养16h;按照质粒提取试剂盒提取质粒,用微量分光光度计进行质粒浓度测定,浓度为224ng/ μ L,A260/A280为1.924,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0083] 实施例2重组鼠源抗菌肽Rattusin酵母表达的构建

[0084] 1.重组质粒的线性化及纯化

[0085] 根据质粒pGAPZa A中可选择的线性化位点以及插入基因的碱基序列,最终选取限制性内切酶Avr II对实施例1所制备的重组载体进行线性化处理。线性化体系如下表10所示:

[0086] 表10线性化体系

[0087]

成分	添加量
10 \times Cutsmart Buffer	15 μ L
重组质粒	15 μ g
Avr II 内切酶	3 μ L
补充无菌水至	150 μ L

[0088] 将线性化溶液混匀后置于恒温水浴槽中,37 $^{\circ}$ C酶切2h后,取2 μ L酶切后的产物用1.5% (v/v)的琼脂糖凝胶检测,确定重组质粒线性化完全。剩余线性化产物用有机酚/氯仿/异戊醇回收,具体步骤如下:

[0089] (1) 加入等体积的有机酚/氯仿/异戊醇,震荡混匀2min;

[0090] (2) 加入1/10体积的3M醋酸钠及3倍体积的乙醇并混匀,置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中2h以上;

[0091] (3) 13000rpm/min离心10min回收DNA沉淀,用500 μ L80%乙醇洗净2遍;

[0092] (4) 加入30 μ L的Nuclease-free H₂O溶解;

[0093] 用微量分光光度计测定回收的线性化产物的浓度,浓度为245ng/ μ L,A260/A280为1.858,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0094] 2.表达酵母的制备及筛选

[0095] 2.1毕赤酵母GS115感受态细胞的制备

[0096] (1) 将毕赤酵母GS115菌液用无菌接种环划线接种至YPD固体培养基上,用封口膜将平板封口后,于30℃恒温培养箱中倒置平板培养至有单菌落长出;

[0097] (2) 挑取纯化后的GS115单菌落接种至5mLYPD液体培养基中,于30℃、250r/min条件下过夜培养;

[0098] (3) 按1:1000的比例将上述酵母菌液接种至100mLYPD液体培养基中,于30℃、250r/min条件下培养至OD值达1.3-1.5;

[0099] (4) 将上述菌液分装至两个50mL无菌离心管中,4℃条件下1500g/min离心5min后,去除培养基;

[0100] (5) 加入40ml新配(2h内)的LDST溶液(100mM LiAc,10mM dithiothreitol,0.6M sorbitol and 10mM Tris-Hcl pH 7.5,现用现配不能保存),30℃孵育30min;

[0101] (6) 室温6000rpm离心5min。弃上清,用1mL冰浴1M山梨醇重悬菌体,转至1.5ml EP管;

[0102] (7) 用1ml冰浴1M山梨醇洗涤菌体3次(应快速,菌脆弱)最后用400μL冰浴1M山梨醇重悬菌体,分装80μL/管(现配现用)。

[0103] 2.2重组质粒电转入毕赤酵母GS115感受态细胞

[0104] (1) 打开电转化仪,预热30min;

[0105] (2) 设置电穿孔转化电击条件:电压1500V,电阻200Ω,电容2.5mF,5ms;

[0106] (3) 将5-10μg纯化后的线性化重组质粒加入到新鲜制备的GS115感受态细胞中,轻轻旋转离心管,使重组质粒和感受态细胞完全混匀后,将其全部转移至冰预冷处理的0.2cm无菌电转杯中;

[0107] (4) 将电转杯继续冰浴5min后,放入电击槽,开始电击;

[0108] (5) 电击结束后,立即向电转杯中加入1mL冰预冷的1M山梨醇,用移液枪轻轻吹打混匀后,将其全部转移至无菌的1.5mL离心管中;

[0109] (6) 将上述离心管置于30℃恒温培养箱中静置孵育1-2h;

[0110] (7) 分别吸取10、25、50、100、200u1菌液涂布在含100μg/mL Zeocin的YPD固体培养基上;

[0111] (8) 30℃恒温倒置平板2-3天,至长出单菌落。

[0112] 2.3重组毕赤酵母基因组PCR鉴定

[0113] (1) 将筛选出的三个耐Zeocin的转化子接种于5mL含100μg/ml Zeocin的YPD液体培养基中,于30℃、250r/min条件下培养16-18h;

[0114] (2) 取酵母裂解液50u1加入1μL的过夜培养的酵母菌液,85℃孵育30min,12000r/min离心2min,取1μL上清进行PCR扩增;

[0115] (3) 采用载体通用引物、目的蛋白基因特异性引物分别对酵母基因组DNA进行PCR扩增。

[0116] 载体通用引物:

[0117] pGAP Forward:GTCCCTATTTCAATCAATTGAA (SEQ ID NO.11);

[0118] 3' AOX1:GCAAATGGCATTCTGACATCC (SEQ ID NO.12)

[0119] 目的蛋白基因特异性引物:

- [0120] Gene-FP:AGGGAAGGTTGAGAGTTAGAAGAACTT (SEQ ID NO.6);
 [0121] Gene-RP:TCTAGAAAAGAAGCGTATGTAGAACGAG (SEQ ID NO.7)。
 [0122] 反应体系如表11:
 [0123] 表11反应体系
 [0124]

2×Hotstart Taq PCR ProMix	5μL
酵母细胞裂解液上清	1μL
pGAP Forward/Gene-FP	0.5μL
3' AOX1/Gene-RP	0.5μL
H ₂ O	3μL

- [0125] 反应体系如表12:
 [0126] 表12反应体系

[0127]	95℃	10min	1 Cycles
	95℃	10s	35 Cycles
	60℃	30s	
	72℃	1min	
	72℃	5min	1 Cycles
	4℃	59min	1 Cycles

[0128] PCR反应完取5μL PCR产物进行1.5%琼脂糖电泳分析,挑选阳性单克隆进行蛋白表达。

[0129] 3. 重组鼠源抗菌肽Rattusin蛋白的表达及纯化

[0130] 3.1 重组鼠源抗菌肽Rattusin蛋白在毕赤酵母菌中的表达

[0131] 取阳性单克隆过夜培养液0.1mL接种到50mL (250mL摇瓶) 的YPD培养基中,于30℃、250r/min条件下摇瓶表达;分别在培养24h、48h、72h后用15mL离心管取10mL培养液,于8000r/min离心5min,将上清转至另一15mL离心管,后将上清和菌沉淀,并放入-80℃保存,直至检测蛋白表达时取出。

[0132] 将表达时间为24h、48h、72h的培养液上清经超滤浓缩、硫酸铵沉淀并复溶后进行Western blot检测,结果图3 (M为Mark;1泳道为24h;2泳道为48h;3泳道为72h) 所示,带组氨酸标签的目的蛋白获得可溶表达,并且在48h培养后目的蛋白的表达量最佳,因此确定表达培养时间为48h较好。

[0133] 3.2 重组鼠源抗菌肽Rattusin蛋白的纯化

[0134] 3.2.1 硫酸氨沉淀

[0135] (1) 称取硫酸铵:按照每升上清加361g硫酸氨的比例称取硫酸氨粉末;

[0136] (2) 硫酸的添加:在0℃的条件下,并边搅拌边将硫酸粉末慢慢敲入发酵液上清;

[0137] (3) 静置沉淀:4℃冰箱静置4h,12000r/min离心30min,弃上清;

[0138] (4) 蛋白复溶:按每1L发酵液上清所得到的沉淀蛋白中加入20mL组氨酸标签-亲和层析柱结合缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0、50mM氯化钠、5%甘油) 计算加入适当的缓冲液,并涡旋直至所有蛋白复溶;

[0139] (5) 过膜转移:将复溶后所得溶液过0.22μm过滤头,转移到新的无菌瓶中。

[0140] 3.2.2 亲和层析

- [0141] (1) 选用1ml组氨酸标签-亲和层析柱,纯化系统GE Healthcare AKTA pure;
- [0142] (2) 洗泵:用蒸馏水洗A1、B1泵后,再分别用结合缓冲液Buffer A (50mMTris-HCl, pH 8.0、50mM氯化钠、5%甘油)、洗脱缓冲液Buffer B (50mMTris-HCl, pH 8.0、50mM氯化钠、500mM咪唑、5%甘油) 分别洗A1、B1泵,流速75mL/min;
- [0143] (3) 平衡柱子:将A1泵放入Buffer A (50mMTris-HCl, pH 8.0、50mM氯化钠、5%甘油) 中,平衡10个柱体积结合缓冲液Buffer A (50mMTris-HCl, pH 8.0、50mM氯化钠、5%甘油),流速1mL/min;
- [0144] (4) 上样:用A1泵上样,流速为0.5mL/min;
- [0145] (5) 洗脱:按0%Buffer B、5%Buffer B、60%Buffer B、100%Buffer B进行梯度洗脱,每个梯度洗脱10个柱体积;
- [0146] (6) 收集:按峰收集,并超滤浓缩;
- [0147] (7) 电泳检测:将收集到的目的蛋白进行SDS-PAGE电泳检测,结果如图4,其中泳道M:蛋白Marker;泳道1:48h培养液上清浓缩液;泳道2:硫酸铵沉淀复溶;泳道3:亲和层析穿透液;泳道4:0%Buffer B洗脱收集液;泳道5:5%Buffer B洗脱收集液;泳道6:60%Buffer B洗脱收集液;泳道7:100%Buffer B洗脱收集液。

SEQUENCE LISTING

<110> 佛山科学技术学院

<120> 一种构建重组鼠源抗菌肽Rattusin基因及酵母表达的方法

<130> 2019.05.22

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 93

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

ttgagagtta gaagaacttt gcaatgctct tgcgtagag ttgtagaaa cacttgttct 60
tgtattagat tgcctcgttc tacatacgtc tct 93

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

ttgagagtta gaagaacttt gcaat 25

<210> 3

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

aagtgtttct acaaactcta cgacaagagc attgcaaagt tcttctaact ctca 54

<210> 4

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 4

gtcgtagagt ttgtagaaac acttgttctt gtattagatt gtctcgttct acata 55

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 5

agaagcgtat gtagaacgag acaatctaata acaa 34

<210> 6

<211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <400> 6
 aggggaagggtt gagagttaga agaactt 27
 <210> 7
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <400> 7
 tctagaaaag aagcgtatgt agaacgag 28
 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <400> 8
 actctcaacc ttccctcgat ccc 23
 <210> 9
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <400> 9
 atacgcttct tttctagaac aaaaactc 28
 <210> 10
 <211> 1161
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <400> 10
 atgaaaatcg aagaaggtaa actggtaatc tggattaacg gcgataaagg ctataacggt 60
 ctcgctgaag tccgtaagaa attcgagaaa gataccggaa ttaaagtcac cgttgagtat 120
 ccggataaac tggaaagaaa attcccacag gttgcggcaa ctggcgatgg ccctgacatt 180
 atcttctggg cacacgaccg ctttggtggc tacgctcaat ctggcctggt ggctgaaatc 240
 accccggaca aagcgttcca ggacaagctg tatecgttta cctgggatgc cgtacgttac 300
 aacggcaagc tgattgetta cccgatcget gttgaagcgt tatecgtgat ttataacaaa 360
 gatctgctgc cgaaccgcc aaaaacctgg gaagagatcc cggcgtgga taaagaactg 420
 aaagcgaaaag gtaagagcgc gctgatgttc aacctgcaag aaccgtactt cacctggccg 480
 ctgattgctg ctgacggggg ttatgcgttc aagtatgaaa acggcaagta cgacattaaa 540
 gacgtgggcg tggataacgc tggcgcgaaa gcgggtctga ccttctggt tgacctgatt 600
 aaaaacaaac acatgaatgc agacaccgat tactccatcg cagaagctgc cttaataaa 660

ggcgaaacag cgatgacat caacggccc tgggcatggt ccaacatcga caccagcaaa 720
 gtgaattatg gtgtaacggt actgccgacc ttcaagggtc aaccatccaa accgttcggt 780
 ggcgtgctga ggcaggtat taacgccgcc agtccgaaca aagagctggc aaaagagttc 840
 ctcgaaaact atctgctgac tgatgaaggt ctggaagcgg ttaataaaga caaaccgctg 900
 ggtgccgtag cgctgaagtc ttacgaggaa gagttggtga aagatccgcg tattgccgcc 960
 actatggaaa acgcccagaa aggtgaaatc atgccgaaca tcccgcagat gtccgctttc 1020
 tggtatgccg tgcgtactgc ggtgatcaac gccgccagcg gtcgtcagac tgtcgatgaa 1080
 gccctgaaaag acgcgagac taattcgagc tcgaacaaca acaacaataa caataacaac 1140
 aacctcgga tcgaggaag g 1161

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 11

gtccctattd caatcaattg aa 22

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 12

gcaaatggca ttctgacatc c 21

<210> 13

<211> 441

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 13

Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys
 1 5 10 15
 Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr
 20 25 30
 Gly Ile Lys Val Thr Val Glu Tyr Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe
 35 40 45
 Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala
 50 55 60
 His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile
 65 70 75 80
 Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp
 85 90 95
 Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu

	100		105		110										
Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	Pro	Lys
	115		120		125										
Thr	Trp	Glu	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Lys	Glu	Leu	Lys	Ala	Lys	Gly
	130		135		140										
Lys	Ser	Ala	Leu	Met	Phe	Asn	Leu	Gln	Glu	Pro	Tyr	Phe	Thr	Trp	Pro
145			150		155										160
Leu	Ile	Ala	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ala	Phe	Lys	Tyr	Glu	Asn	Gly	Lys
			165		170										175
Tyr	Asp	Ile	Lys	Asp	Val	Gly	Val	Asp	Asn	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Gly
	180		185		190										
Leu	Thr	Phe	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Lys	Asn	Lys	His	Met	Asn	Ala	Asp
	195		200		205										
Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ala	Glu	Ala	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Glu	Thr	Ala
	210		215		220										
Met	Thr	Ile	Asn	Gly	Pro	Trp	Ala	Trp	Ser	Asn	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys
225			230		235										240
Val	Asn	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Pro	Thr	Phe	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser
			245		250										255
Lys	Pro	Phe	Val	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Gly	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Pro
	260		265		270										
Asn	Lys	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	Leu	Thr	Asp
	275		280		285										
Glu	Gly	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Ala
	290		295		300										
Leu	Lys	Ser	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Val	Lys	Asp	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala
305			310		315										320
Thr	Met	Glu	Asn	Ala	Gln	Lys	Gly	Glu	Ile	Met	Pro	Asn	Ile	Pro	Gln
			325		330										335
Met	Ser	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ala	Val	Arg	Thr	Ala	Val	Ile	Asn	Ala	Ala
	340		345		350										
Ser	Gly	Arg	Gln	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	Thr	Asn
	355		360		365										
Ser	Ser	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile									
	370		375		380										
Glu	Gly	Arg	Leu	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Gln	Cys	Ser	Cys	Arg	Arg
385			390		395										400
Val	Cys	Arg	Asn	Thr	Cys	Ser	Cys	Ile	Arg	Leu	Ser	Arg	Ser	Thr	Tyr
			405		410										415

Ala Ser Phe Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser
 420 425 430

Ala Val Asp His His His His His His
 435 440

<210> 14

<211> 1323

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 14

atgaaaatcg aagaaggtaa actggtaatc tggattaacg gcgataaagg ctataacggt 60
 ctcgctgaag tcgtaagaa attcgagaaa gataccggaa ttaaagtcac cgttgagtat 120
 ccggataaac tggaagagaa attcccacag gttgcggcaa ctggcgatgg ccctgacatt 180
 atcttctggg cacacgaccg ctttggtggc tacgctcaat ctggcctggt ggctgaaatc 240
 accccggaca aagcgttcca ggacaagctg tatccgttta cctgggatgc cgtacgttac 300
 aacggcaagc tgattgctta cccgatcgct gttgaagcgt tatcgctgat ttataacaaa 360
 gatctgctgc cgaaccgcc aaaaacctgg gaagagatcc cggcgctgga taaagaactg 420
 aaagcgaaaag gtaagagcgc gctgatgttc aacctgcaag aaccgtactt cacctggccg 480
 ctgattgctg ctgacggggg ttatgcgttc aagtatgaaa acggcaagta cgacattaaa 540
 gacgtgggcg tggataacgc tggcgcgaaa gcgggtctga ctttctggt tgacctgatt 600
 aaaaacaaac acatgaatgc agacaccgat tactccatcg cagaagctgc ctttaataaa 660
 ggcgaaacag cgatgaccat caacggcccg tggcatggt ccaacatcga caccagcaaa 720
 gtgaattatg gtgtaacggt actgccgacc ttcaagggtc aaccatcaa accgttcggt 780
 ggcgtgctga gcgcaggtat taacgccgc agtccgaaca aagagctggc aaaagagttc 840
 ctcgaaaact atctgctgac tgatgaaggt ctggaagcgg ttaataaaga caaacgctg 900
 ggtgccgtag cgctgaagtc ttacgaggaa gagttggtga aagatccgcg tattgccgcc 960
 actatggaaa acgcccagaa aggtgaaatc atgccgaaca tcccgcagat gtccgctttc 1020
 tggtatgccg tgcgtactgc ggtgatcaac gccgccagcg gtcgtcagac tgctgatgaa 1080
 gccctgaaaag acgcgcagac taattcgagc tcgaacaaca acaacaataa caataacaac 1140
 aacctcggga tcgaggggaag gttgagagtt agaagaactt tgcaatgctc ttgtcgtaga 1200
 gttttagaaa acaattgttc ttgtattaga ttgtctcgtt ctacatacgc ttcttttcta 1260
 gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg aatagcgcgc tcgaccatca tcatcatcat 1320
 cat 1323

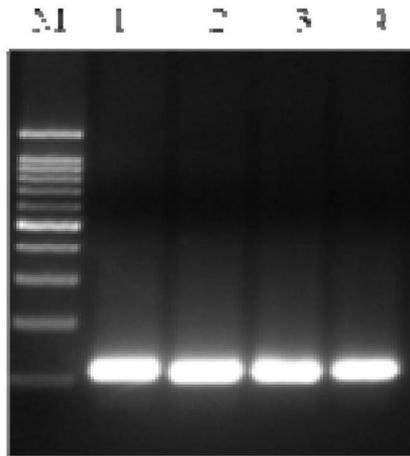


图1

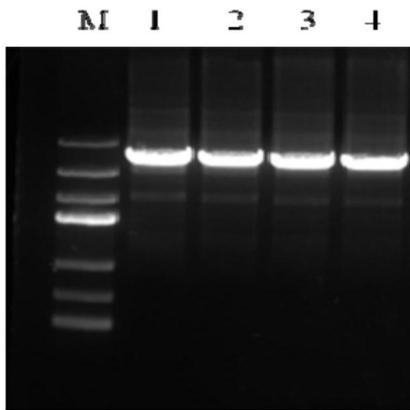


图2

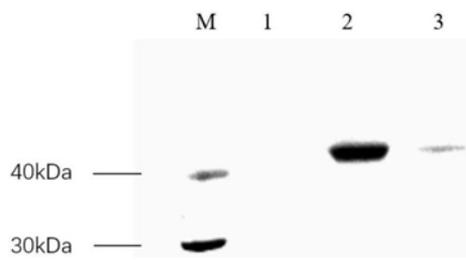


图3

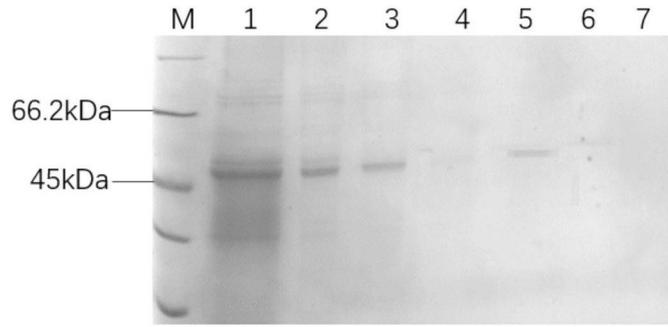


图4