



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104388504 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 04

(21) 申请号 201410686178. 6

(22) 申请日 2014. 11. 26

(71) 申请人 绍兴康知生物科技有限公司

地址 312099 浙江省绍兴市舜江路 683 号
(科创大厦 9 楼) 913、916 室

(72) 发明人 施戈韬

(51) Int. Cl.

C12P 21/00(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

C12R 1/19(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,包括如下步骤:首先准备原核表达载体,接着将大肠埃希氏菌菌株分离、纯化获得二氢叶酸合成酶,然后以大肠埃希氏菌的基因组为模板调取获得的二氢叶酸合成酶基因片段并克隆到原核表达载体中获得克隆载体,接着将克隆载体与原核表达载体提取重组质粒,然后将重组质粒与大肠杆菌在培养基中培养获得阳性克隆菌种,接着将阳性克隆菌种在培养基中继续培养、离心获得菌体,然后将菌体与聚乙二醇辛基苯基醚浓缩,离心获得蛋白,最后将蛋白纯化。本发明所述一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,在高结合力作用下生产的快速检测产品比同类型的抗体结合原理生产的产品有更高灵敏度。

1. 一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,其特征在于包括如下步骤:首先准备原核表达载体(PET-28a),接着将大肠埃希氏菌(E. Coli)菌株分离、纯化获得二氢叶酸合成酶,然后以大肠埃希氏菌(E. Coli)的基因组为模板调取获得的二氢叶酸合成酶基因片段并克隆到原核表达载体(PET-28a)中获得克隆载体,接着将克隆载体与原核表达载体(PET-28a)提取重组质粒,然后将重组质粒与大肠杆菌(BL21)在培养基中培养获得阳性克隆菌种,接着将阳性克隆菌种在培养基中继续培养、离心获得菌体,然后将菌体与聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)浓缩,离心获得蛋白,最后将蛋白纯化。

2. 根据权利要求1所述的一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,其特征在于:所述克隆载体与原核表达载体(PET-28a)提取重组质粒时首先用内切酶(XhoI 和 EcoRI)对克隆载体与原核表达载体(PET-28a)分别进行双酶切后凝胶电泳后回收片段,接着用连接酶(T4 DNA)将回收片段连接构建含目的基因的原核表达载体,然后将含目的基因的原核表达载体转化大肠杆菌(DH5 α)后提取重组质粒。

3. 根据权利要求1所述的一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,其特征在于:所述重组质粒与大肠杆菌(BL21)在培养基中培养获得阳性克隆菌种时首先在一70 $^{\circ}$ C中取出的含感受态大肠杆菌(BL21)50 μ L放入离心管中插入湿冰溶解15min,接着向离心管中加入5 μ L的重组质粒混合均匀后静置冰上30min,然后将在42 $^{\circ}$ C中水浴加热90s后冰浴静置2min,接着将重组质粒与大肠杆菌(BL21)加入800 μ L的含氨苄青霉素的LB培养基中于37 $^{\circ}$ C时振荡培养1h,然后取50 μ L培养物涂LB琼脂平板上于37 $^{\circ}$ C培养12h后获得单菌落,接着挑落单菌落用LB培养基振荡培养12h后提质粒获得阳性克隆菌种。

4. 根据权利要求1所述的一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,其特征在于:所述阳性克隆菌种在培养基中继续培养、离心获得菌体时首先将阳性克隆菌种接种于LB培养基中,于37 $^{\circ}$ C振荡培养24h后将培养物转接至LB培养基,37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD600为0.8;然后在LB培养基中加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)使其终浓度为1mmol/L,继续培养4h后于4 $^{\circ}$ C、6000rpm离心15min收获菌体。

5. 根据权利要求1所述的一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,其特征在于:将菌体与聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)浓缩,离心获得蛋白时首先菌体重悬于磷酸缓冲液(PBS)中后置于冰浴中超声破碎,接着加入聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)后浓缩至最终浓度为1%,然后将混合物搅拌30min,接着于4 $^{\circ}$ C、12000 rpm离心15 min后收集蛋白。

6. 根据权利要求1所述的一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,其特征在于:所述蛋白用咪唑纯化。

一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法。

背景技术

[0002] 目前检测鲜奶中抗生素的方法多种多样,传统的方法有:微生物检测法、色谱法、免疫学法等。这些传统方法虽然灵敏度较高,但检测步骤繁琐、仪器设备及操作人员要求较高、耗时较长,一般都要两小时以上。而对于企业来说生产效率是第一位的,所以快速检测在企业中备受青睐。但目前快速检测试剂盒为进口试剂盒,成本较高,一个检测 96 个样品的试剂盒价格在 3000 元以上。这使得每年一个中小乳制品企业用在抗生素检测领域的资金至少要几十万。国内快速有效检测产品的缺失及高昂的进口试剂使得国内乳制品抗生素检测市场潜力巨大。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,其所使用的结合蛋白是通过基因技术改造的磺胺嘧啶的天然结合蛋白,在高结合力的作用下生产的快速检测产品比同类型的抗体结合原理生产的产品有更高的灵敏度。

[0004] 为了达到上述目的,本发明的技术方案是:

一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,包括如下步骤:首先准备原核表达载体(PET-28a),接着将大肠埃希氏菌(E. Coli)菌株分离、纯化获得二氢叶酸合成酶,然后以大肠埃希氏菌(E. Coli)的基因组为模板调取获得的二氢叶酸合成酶基因片段并克隆到原核表达载体(PET-28a)中获得克隆载体,接着将克隆载体与原核表达载体(PET-28a)提取重组质粒,然后将重组质粒与大肠杆菌(BL21)在培养基中培养获得阳性克隆菌种,接着将阳性克隆菌种在培养基中继续培养、离心获得菌体,然后将菌体与聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)浓缩,离心获得蛋白,最后将蛋白纯化。

[0005] 所述克隆载体与原核表达载体(PET-28a)提取重组质粒时首先用内切酶(XhoI和EcoRI)对克隆载体与原核表达载体(PET-28a)分别进行双酶切后凝胶电泳后回收片段,接着用连接酶(T4 DNA)将回收片段连接构建含目的基因的原核表达载体,然后将含目的基因的原核表达载体转化大肠杆菌(DH5 α)后提取重组质粒。

[0006] 所述重组质粒与大肠杆菌(BL21)在培养基中培养获得阳性克隆菌种时首先在一70 $^{\circ}$ C中取出的含感受态大肠杆菌(BL21)50 μ L放入离心管中插入湿冰溶解15min,接着向离心管中加入5 μ L的重组质粒混合均匀后静置冰上30min,然后将在42 $^{\circ}$ C中水浴加热90s后冰浴静置2min,接着将重组质粒与大肠杆菌(BL21)加入800 μ L的含氨苄青霉素的LB培养基中于37 $^{\circ}$ C时振荡培养1h,然后取50 μ L培养物涂LB琼脂平板上于37 $^{\circ}$ C培养12h后获得单菌落,接着挑落单菌落用LB培养基振荡培养12h后提质粒获得阳性克隆菌种。

[0007] 所述阳性克隆菌种在培养基中继续培养、离心获得菌体时首先将阳性克隆菌种接种于LB培养基中,于37 $^{\circ}$ C振荡培养24h后将培养物转接至LB培养基,37 $^{\circ}$ C振荡培养至

OD600 为 0.8 ;然后在 LB 培养基中加入异丙基 - β -D- 硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 使其终浓度为 1mmol/L,继续培养 4h 后于 4°C、6000rpm 离心 15min 收获菌体。

[0008] 将菌体与聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100) 浓缩,离心获得蛋白时首先菌体重悬于磷酸缓冲液 (PBS) 中后置于冰浴中超声破碎,接着加入聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100) 后浓缩至最终浓度为 1%,然后将混合物搅拌 30min,接着于 4°C、12000 rpm 离心 15 min 后收集蛋白。

[0009] 所述蛋白用咪唑纯化。

[0010] 本发明的有益效果是:一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,其所使用的结合蛋白是通过基因技术改造的磺胺嘧啶的天然结合蛋白,在高结合力的作用下生产的快速检测产品比同类型的抗体结合原理生产的产品有更高的灵敏度。

具体实施方式

[0011] 实施例 1

一种受体配体结合的磺胺类抗生素蛋白的制备方法,包括如下步骤:首先准备原核表达载体 (PET-28a),接着将大肠埃希氏菌 (E. Coli) 菌株分离、纯化获得二氢叶酸合成酶,然后以大肠埃希氏菌 (E. Coli) 的基因组为模板调取获得的二氢叶酸合成酶基因片段并克隆到原核表达载体 (PET-28a) 中获得克隆载体,接着将克隆载体与原核表达载体 (PET-28a) 提取重组质粒,然后将重组质粒与大肠杆菌 (BL21) 在培养基中培养获得阳性克隆菌种,接着将阳性克隆菌种在培养基中继续培养、离心获得菌体,然后将菌体与聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100) 浓缩,离心获得蛋白,最后将蛋白纯化。

[0012] 所述克隆载体与原核表达载体 (PET-28a) 提取重组质粒时首先用内切酶 (XhoI 和 EcoRI) 对克隆载体与原核表达载体 (PET-28a) 分别进行双酶切后凝胶电泳后回收片段,接着用连接酶 (T4 DNA) 将回收片段连接构建含目的基因的原核表达载体,然后将含目的基因的原核表达载体转化大肠杆菌 (DH5 α) 后提取重组质粒。

[0013] 所述重组质粒与大肠杆菌 (BL21) 在培养基中培养获得阳性克隆菌种时首先在一 70°C 中取出的含感受态大肠杆菌 (BL21) 50 μ L 放入离心管中插入湿冰溶解 15min,接着向离心管中加入 5 μ L 的重组质粒混合均匀后静置冰上 30min,然后将在 42°C 中水浴加热 90s 后冰浴静置 2min,接着将重组质粒与大肠杆菌 (BL21) 加入 800 μ L 的含氨苄青霉素的 LB 培养基中于 37°C 时振荡培养 1h,然后取 50 μ L 培养物涂 LB 琼脂平板上于 37°C 培养 12h 后获得单菌落,接着挑落单菌落用 LB 培养基振荡培养 12h 后提质粒获得阳性克隆菌种。

[0014] 所述阳性克隆菌种在培养基中继续培养、离心获得菌体时首先将阳性克隆菌种接种于 LB 培养基中,于 37°C 振荡培养 24h 后将培养物转接至 LB 培养基,37°C 振荡培养至 OD600 为 0.8 ;然后在 LB 培养基中加入异丙基 - β -D- 硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 使其终浓度为 1mmol/L,继续培养 4h 后于 4°C、6000rpm 离心 15min 收获菌体。

[0015] 将菌体与聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100) 浓缩,离心获得蛋白时首先菌体重悬于磷酸缓冲液 (PBS) 中后置于冰浴中超声破碎,接着加入聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100) 后浓缩至最终浓度为 1%,然后将混合物搅拌 30min,接着于 4°C、12000 rpm 离心 15 min 后收集蛋白。

[0016] 所述蛋白用咪唑纯化。

[0017] 本实施例的一种膜片式单向阀,其结构简单,使用方便,提高单向密封性的同时提高了单向阀的使用寿命。