



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104911189 B

(45)授权公告日 2016.10.12

(21)申请号 201510415724.7

C12N 1/21(2006.01)

(22)申请日 2015.07.15

G07K 14/47(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 15/14(2006.01)

申请公布号 CN 104911189 A

审查员 李美宣

(43)申请公布日 2015.09.16

(73)专利权人 北京四正柏生物科技有限公司
地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区
区科创六街88号院3号楼801、802室

(72)发明人 杨艳梅

(74)专利代理机构 北京市科名专利代理事务所
(特殊普通合伙) 11468

代理人 陈朝阳

(51)Int.Cl.

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

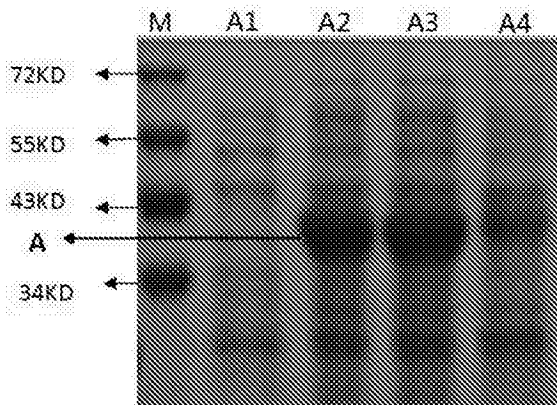
权利要求书1页 说明书4页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

一种人Annexin V基因优化序列及其制作方法和应用

(57)摘要

本发明对人Annexin V基因的核苷酸序列进行了优化,然后利用全基因合成技术获得的人Annexin V的优化基因,并构建了人工合成的人Annexin V基因优化序列原核表达载体,将上述人Annexin V基因优化序列的原核表达载体转化进大肠杆菌进行高效诱导表达,将表达蛋白提取及纯化;对纯化的人Annexin V蛋白FITC标记在细胞凋亡检测试验中进行生物活性验证。该人工合成的人Annexin V基因优化序列在大肠杆菌中表达量达200mg/1L菌液,生物活性达到国际知名品牌同类产品相当效果;本发明中的人Annexin V基因优化序列生产人Annexin V蛋白的工艺简单,表达量高,纯度好,成本低,具有良好的生物功能,可用来生产细胞凋亡检测产品,大大降低对进口原料的需求,具有广阔的市场应用前景。



1. 一种优化的人Annexin V基因,其特征在于,优化的人Annexin V基因的核苷酸序列为SEQ ID NO: 1。
2. 一种优化的人Annexin V基因的制作方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - 步骤一)在基因数据库中获取人Annexin V基因;
 - 步骤二)基因优化:对人Annexin V基因的编码区进行大肠杆菌密码子偏爱性的基因优化得到优化序列;优化序列编码的氨基酸与人Annexin V基因编码形成的氨基酸序列一致;优化序列为SEQ ID NO: 1;
 - 步骤三)添加酶切位点:在优化序列的5'端添加一种内切酶的酶切位点,在优化序列的3'端添加另一种内切酶酶切位点,得到合成序列;
 - 步骤四)基因合成:对得到的合成序列进行全基因合成。
3. 如权利要求2所述的优化的人Annexin V基因的制作方法,其特征在于,所述步骤三)中,优化序列的5'端添加NdeI酶切位点,优化序列的3'端添加XhoI酶切位点。
4. 一种含有SEQ ID NO: 1序列的质粒。
5. 如权利要求4所述的含有SEQ ID NO: 1序列的质粒,其特征在于,所述质粒的起始质粒为pET23a质粒。
6. 如权利要求5所述的含有SEQ ID NO: 1序列的质粒,其特征在于,SEQ ID NO: 1序列插入到pET23a质粒的NdeI酶切位点和XhoI酶切位点之间。
7. 一种含有SEQ ID NO: 1序列的原核生物。
8. 如权利要求7所述的含有SEQ ID NO: 1序列的原核生物,其特征在于,所述原核生物为大肠杆菌。
9. 一种如权利要求1所述的优化的人Annexin V基因的使用方法,其特征在于,SEQ ID NO: 1序列导入大肠杆菌中翻译为重组蛋白,所述重组蛋白用于检测细胞凋亡。

一种人Annexin V基因优化序列及其制作方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,尤其涉及一种人Annexin V基因优化序列及其制作方法和应用。

背景技术

[0002] 人膜联蛋白V(Annexin V)是钙离子依赖的磷脂结合蛋白--Annexin家庭成员之一。共有320个氨基酸,分子量约35.8 KDa,存在于大多数真核生物细胞内,在多种组织细胞(如心肌细胞、血管内皮、骨骼肌、肝细胞等)中都有表达。在Ca²⁺存在时,对酸性磷脂分子有很高的亲和力,在体内具有多种生理功能,在细胞中参与膜转运及膜表面一系列依赖于钙调蛋白的活动,包括胞吐作用中的膜融合、信号传导和钙离子通道的形成、抗凝、抗炎症反应、细胞分化和细胞骨架蛋白间的相互作用等。

[0003] 目前Annexin V蛋白主要应用在细胞凋亡检测领域。细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是由基因调控的细胞主动的有序性死亡方式,是生物体调节和维持机体相对平衡的重要方式,与多种疾病病理密切相关。细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面,这些细胞膜表面的改变之一是磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl—serine,PS)从细胞膜内转移到细胞膜外,使PS暴露在细胞膜外表面。Annexin V高度特异性亲和PS,将Annexin V进行荧光素(FITC, Alexa Fluor 488,PE等)或生物素标记,可作为一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的PS,利用流式细胞仪或者荧光显微镜观察细胞凋亡现象。这是目前公认的灵敏、高效和特异的凋亡细胞的检测方法[Sgonc R,Gruber J.Aptoptosis detection:An Overview Experimental[J].Exp Gerontol,1998,33:525~533.]。

[0004] 人Annexin V蛋白的应用广泛,但是天然来源的人Annexin V含量低,无法批量提供,商业上需要大量重组表达人Annexin V蛋白,但是人Annexin V在大肠杆菌中用普通方法诱导表达时经常以包涵体形式存在,可溶性蛋白产量较低,不符合实际应用的需求。根据最新研究报道,人Annexin V产量最高的重组表达方法是采用流加发酵的生产方式,在大肠杆菌中产率达到28.5mg/1L培养基[Marder L,S *et al.* BMC Biotechnology 2014,14-33],但对生产设备和工艺要求较高,不容易扩大规模生产。而本专利发明人利用基因工程技术,对人Annexin V编码基因进行优化,在大肠杆菌表达系统中,用最简单的生产方法高效表达可溶性人Annexin V蛋白,一步法纯化,重组蛋白产率达200mg/1L培养基,这一方法可低成本,批量获得高纯度、有生物学功能的人Annexin V纯品,解决了一直以来人Annexin V蛋白难重组表达的问题,大大降低凋亡检测试剂盒生产成本,具有很好的市场应用前景。

发明内容

[0005] 为解决上述问题本发明提供了一种人Annexin V基因优化序列及其制作方法和应用。本发明解决了一直以来人Annexin V蛋白难重组表达的问题,大大降低凋亡检测试剂盒生产成本,具有很好的市场应用前景。为达到上述技术效果,本发明的技术方案是:

[0006] 一种人Annexin V基因优化序列,人Annexin V基因优化序列的核苷酸序列为SEQ

ID NO: 1。

[0007] 一种人Annexin V基因优化序列的制作方法,包括如下步骤:

[0008] 步骤一)在基因数据库中获取人Annexin V基因;

[0009] 步骤二)基因优化:对人Annexin V基因的编码区进行大肠杆菌密码子偏爱性的基因优化得到优化序列;优化序列编码的氨基酸与人Annexin V基因编码形成的氨基酸序列一致;

[0010] 步骤三)添加酶切位点:在优化序列的5'端添加一种内切酶的酶切位点,在优化序列的3'端添加另一种内切酶酶切位点,得到合成序列;

[0011] 步骤四)基因合成:对得到的合成序列进行全基因合成。

[0012] 进一步的改进,所述步骤三)中,优化序列的5'端添加NdeI酶切位点,优化序列的3'端添加XhoI酶切位点。

[0013] 进一步的改进,所述步骤二)中的优化序列为SEQ ID NO: 1。

[0014] 一种含有SEQ ID NO: 1序列的质粒。

[0015] 进一步的改进,所述质粒为pET23a质粒。

[0016] 进一步的改进,SEQ ID NO: 1序列插入到pET23a质粒的NdeI酶切位点和XhoI酶切位点之间。

[0017] 一种含有SEQ ID NO: 1序列的原核生物。

[0018] 进一步的改进,所述原核生物为大肠杆菌。

[0019] 一种上述人Annexin V基因优化序列的使用方法,SEQ ID NO: 1序列导入大肠杆菌中翻译为重组蛋白,所述重组蛋白用于检测细胞凋亡。

[0020] 本发明的优点:

[0021] 本发明通过基因优化,实现了人Annexin V基因在原核中高产量可溶性表达,一步纯化及FITC偶联标记,更验证了优化后的人Annexin V基因序列生产的人Annexin V-FITC完全可以替代进口试剂盒中的人Annexin V-FITC。尤其重要的是,本发明实现了1L培养基诱导菌体可一步法纯化出200mg 人Annexin V蛋白,所需设备和工艺简单,快速,容易大规模生产,极大降低了凋亡试剂盒的生产成本。

附图说明

[0022] 图1人Annexin V重组蛋白诱导表达SDS-PAGE电泳图;

[0023] 图2人Annexin V重组蛋白纯化SDS-PAGE电泳图;

[0024] 图3A 本发明的人Annexin V-FITC检测紫外诱导处理30s的细胞凋亡的检测图;

[0025] 图3B eBioscience 的人Annexin V-FITC检测紫外诱导处理30s的细胞凋亡的检测图;

[0026] 图4A 本发明的人Annexin V-FITC检测紫外诱导处理60s的细胞凋亡的检测图;

[0027] 图4B eBioscience 的人Annexin V-FITC检测紫外诱导处理60s的细胞凋亡的检测图;

[0028] 图5A 本发明的人Annexin V-FITC检测紫外诱导处理90s的细胞凋亡的检测图;

[0029] 图5B eBioscience 的人Annexin V-FITC检测紫外诱导处理90s的细胞凋亡的检测图。

具体实施方式

[0030] 实施例1

[0031] 一种人Annexin V基因的优化的方法:

[0032] 登录GeneBank,查找编码人Annexin V成熟蛋白的基因序列(序列号为GenBank: AK312644.1),其核苷酸长度为963bp,由于人Annexin V为真核生物蛋白,后续研究需要在原核生物中进行表达,因此将上述人Annexin V基因的编码密码子与大肠杆菌偏好密码子进行比对,根据密码子的兼并性,在不改变氨基酸组成的排列顺序的基础上,对已知的编码人Annexin V基因序列进行改造,将大肠杆菌的某些稀有密码子替换为大肠杆菌偏爱密码子,以提高目的基因在大肠杆菌中的表达水平,并进行转基因验证,最后得到的人Annexin V基因优化序列如SEQ ID NO: 1所示。

[0033] 将人Annexin V基因优化序列5'端加上NdeI酶切位点,3'端加上XhoI酶切位点,送北京三博远志生物技术有限责任公司进行全基因合成,并连入原核表达载体pET23a(购自Novagen公司)的NdeI酶切位点和XhoI酶切位点之间,得到重组的原核表达质粒pET23a-ANXV。

[0034] 实施例2

[0035] 2.1 表达菌株的获得

[0036] 将实施例1中得到的原核表达质粒pET23a-ANXV通过热激法转入大肠杆菌BL21(DE3)(购自北京全式金生物技术有限公司)中,LB平板培养基中加入氨苄青霉素至100mg/L进行筛选,挑取单菌落进行测序鉴定。

[0037] 2.2 人Annexin V基因优化序列在大肠杆菌中的诱导表达

[0038] 挑取含有重组阳性质粒的单菌落,接种到含有浓度为100mg/L氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃,220rpm振荡培养过夜,按照1%的比例将过夜培养的菌液接种到含100mg/L氨苄青霉素的新鲜LB液体培养基中,37℃,220rpm振荡培养至菌液浓度OD₆₀₀约为0.6,取出2mL菌液作为未诱导对照,剩余菌体立即加入诱导物IPTG至工作浓度1mM,将未诱导菌体和诱导菌体继续培养4h;4℃,12000rpm,离心10min收集菌体。

[0039] 2.3 人Annexin V可溶性蛋白的提取和鉴定

[0040] 将离心收集的菌体,PBS清洗两遍,加入LB培养基1/10体积的PBS,充分悬浮菌体,加入溶菌酶至工作浓度1mg/mL,PMSF至工作浓度1mM,混匀,室温孵育15min,混匀,于冰上超声破碎,功率200W,超声5s,间隔5s,10min,然后于4℃,12000rpm,离心30min,取含有可溶总蛋白的上清进行纯化。对未诱导菌体和诱导后菌体各样品进行SDS-PAGE分析,结果如图1所示:M为蛋白分子量标准;A1为未诱导菌体的总蛋白;A2为诱导菌体的总蛋白;A3为诱导菌体破碎后的表达上清;A4为诱导菌体破碎后的表达沉淀,A为人Annexin V基因优化序列的重组蛋白。人Annexin V基因优化序列的重组蛋白占菌体总蛋白的40%以上,且从图1可以看出绝大部分以可溶性蛋白形式存在,使得每1L培养基,可用一步法纯化出≥200mg的Annexin V蛋白。

[0041] 采用Ni-NTA琼脂糖层析柱纯化人Annexin V重组蛋白,先用5倍柱床体积平衡缓冲液(20mM NaH₂PO₄,500mM NaCl,20mM咪唑,pH7.4)平衡层析柱,将上述可溶总蛋白以0.8mL/min的速度上柱,收集穿出液以备SDS-PAGE分析,当层析柱中所有穿出液流出介质后,加入

洗脱缓冲液(20mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 500mM咪唑, pH7.4)进行洗脱, 分管收集, SDS-PAGE 鉴定每管目的蛋白的纯度, 收集纯度大于95%的组份。合并含有目的蛋白的各管, 用PBS缓冲液, 截止分子量为12-14KDa的透析袋进行过夜透析, 收集透析后人Annexin V重组蛋白, 用BCA法进行浓度测定, 并进行SDS-PAGE电泳检测, 电泳结果如图2所示: M为蛋白分子量标准; B1为纯化前总蛋白; B2为上柱穿出液; B3为纯化后的人Annexin V基因优化序列重组蛋白。

[0042] 实施例3

[0043] 人Annexin V FITC标记和细胞凋亡检测

[0044] 3.1 人Annexin V FITC标记

[0045] 取5mg 人Annexin V重组蛋白, 用截止分子量为12-14KDa的透析袋进行过夜透析(缓冲液0.1M Na₂CO₃-NaHCO₃, pH9.5)透析, 其间更换3次缓冲液; 4℃, 12000rpm, 离心15min; 取上清测定浓度。DMSO溶解FITC至终浓度5mg/mL; 按照每毫克人Annexin V重组蛋白中加入9μL FITC的比例往蛋白中加入FITC, 旋涡混匀器混匀后包上锡箔纸, 旋转杂交炉中室温避光旋转反应2小时; 5倍柱床体积去离子水平平衡Sephadex G25层析柱; 5倍柱床体积Annexin V-FITC保存缓冲液(50mM Tris, 150mM NaCl, 0.05%NaN₃, pH8.0)平衡Sephadex G25层析柱; 将偶联好的Annexin V-FITC上柱纯化以去除游离的FITC。收集第一个峰为Annexin V-FITC偶联物。

[0046] 3.2 细胞凋亡诱导及检测

[0047] 将jurkat细胞(购自ATCC公司)传代于6孔细胞培养板中, 培养至对数生长期, 调整细胞密度约为10⁶/mL, 3mL/孔。诱导凋亡组用紫外分别照射30s, 60s, 90s作为实验组, 另一组细胞不照射紫外作为空白对照, 37℃培养箱继续培养4h, 1000rpm, 离心10min收集细胞至离心管中, 加入2mL PBS溶液洗涤细胞, 1000rpm, 离心10min收集细胞。对处理后的细胞分别使用上述自制人Annexin V-FITC和eBioscience 人Annexin V-FITC试剂盒, 按照说明书进行人Annexin V-FITC/PI双染色, 用BD Calibur流式细胞仪进行分析。

[0048] 实验组的结果分别如图3A、图3B、图4A、图4B、图5A和图5B所示, 本发源自制的人Annexin V-FITC在细胞凋亡检测试验中, 取得了和eBioscience相同产品同样的效果, 表明该人Annexin V蛋白具有很好的生物学功能, 可用于细胞凋亡检测试剂盒的开发和应用。

[0049] 本发明通过基因优化, 实现了人Annexin V在原核中高产量可溶性表达, 一步纯化及FITC偶联标记, 更验证了自制的人Annexin V-FITC完全可以替代进口试剂盒中的人Annexin V-FITC。尤其重要的是, 本发明实现了1L培养基诱导菌体可一步法纯化出200mg人Annexin V蛋白, 所需设备和工艺简单, 快速, 容易大规模生产, 极大降低了凋亡试剂盒的生产成本。

[0050] 以上实例的说明只是用于帮助理解本发明的核心思想; 同时, 对于本领域的一般技术人员, 依据本发明的思想, 在具体实施方式及应用范围上均会有改变之处, 综上所述, 本说明书内容不应理解为对本发明的限制。

| | | |
|-------|---|-----|
| <110> | 北京四正柏生物科技有限公司 | |
| <120> | 一种人Annexin V基因优化序列及其制作方法和应用 | |
| <130> | 2015 | |
| <160> | 1 | |
| <170> | PatentIn version 3.3 | |
| <210> | 1 | |
| <211> | 963 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <400> | 1 | |
| | atggcacagg ttctccgtgg caccgtgacc gacttccccg gatttgatga gcgtgctgat | 60 |
| | gcagaaacce ttcgtaagge tatgaaagge ttgggcaccg atgaggagag catcctgacc | 120 |
| | ctgttgacct cccgtagcaa tgctcagcgc caggaaatct ctgcagcttt taagaccctg | 180 |
| | tttggccgtg atcttctgga tgacctgaaa tcagaactta ccgaaaatt tgaaaaatta | 240 |
| | attgtggctc tgatgaaacc gtctcgtctt tatgatgctt atgaactgaa acatgccttg | 300 |
| | aagggagctg gaaccaatga aaaagtactg accgaaatta ttgcttcacg taccgccgaa | 360 |
| | gaactgcgtg ccatcaaaca agtttatgaa gaagaatag gctcaagcct ggaagatgac | 420 |
| | gtggtggggg acacctcagg gtactaccag cgtatgttgg tggttctect tcaggctaac | 480 |
| | cgtgaccgg atgctggaat tgatgaaget caagttgaac aagatgctca ggctttattt | 540 |
| | caggctggag aacttaaatg ggggaccgat gaagaaaagt ttatcacat ctttgaacc | 600 |
| | cgtagcgtgt ctcatgtgcg taagggtgtt gacaagtaca tgaccatttc aggatttcaa | 660 |

| | |
|---|-----|
| attgaggaaa ccattgaccg cgagacctct ggcaatttag agcaacttct cettgctggt | 720 |
| gtgaaatcta ttcgtagcat tccggcctac cttgcagaga ccctctatta tgctatgaag | 780 |
| ggagctggga ccgatgatca taccctcctc cgtgctatgg tttcccgtag cgagattgat | 840 |
| ctgtttaaca tccgtaagga gtttcgtaag aatittgcca cctctcttta ttccatgatt | 900 |
| aaggagata cctctgggga ctataagaaa gctcttctgc tgctctgcgg agaagatgac | 960 |
| taa | 963 |

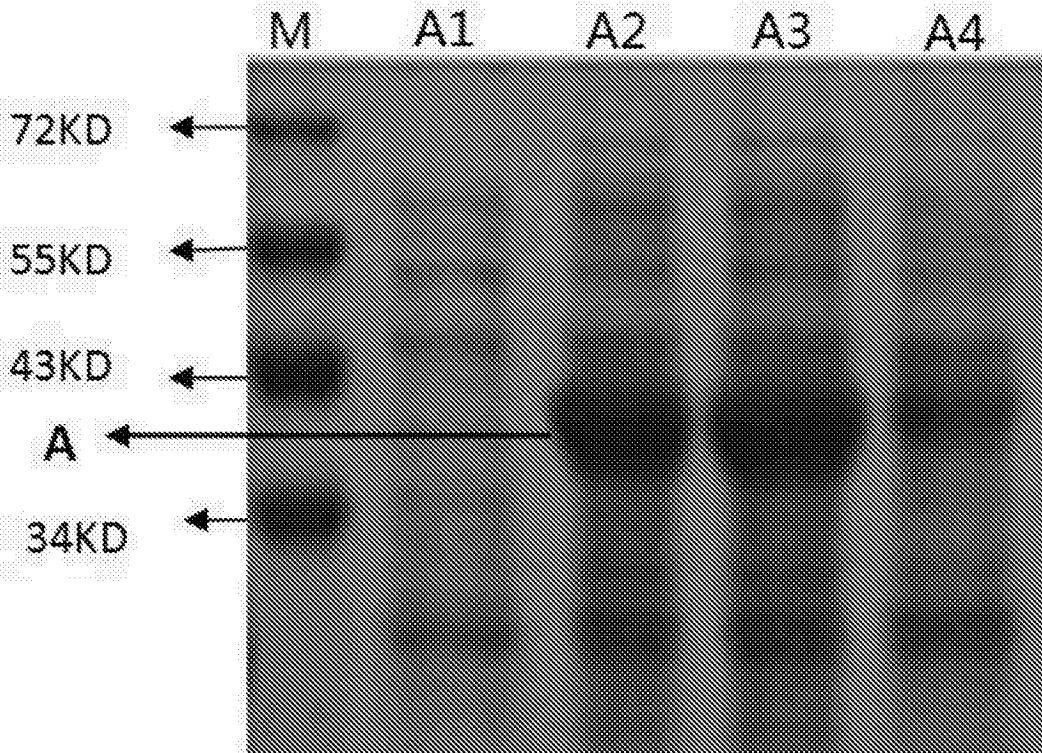


图1

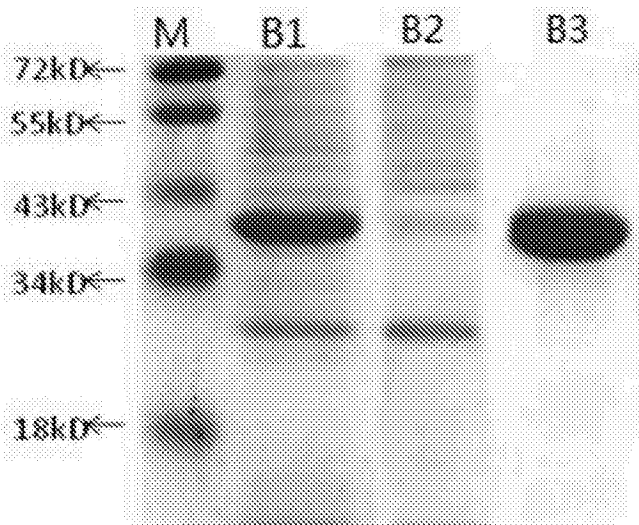


图2

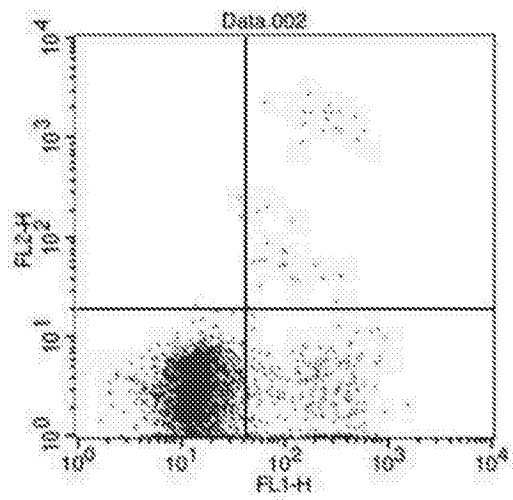


图3A

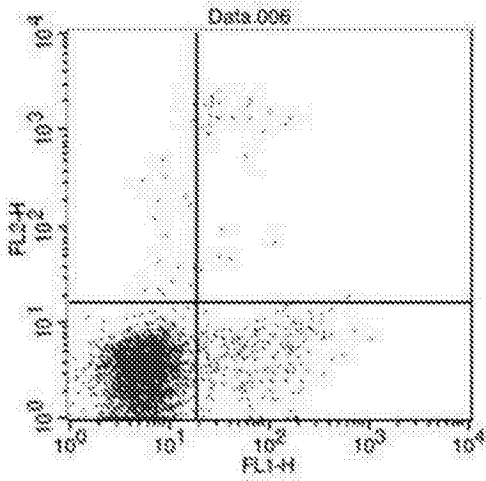


图3B

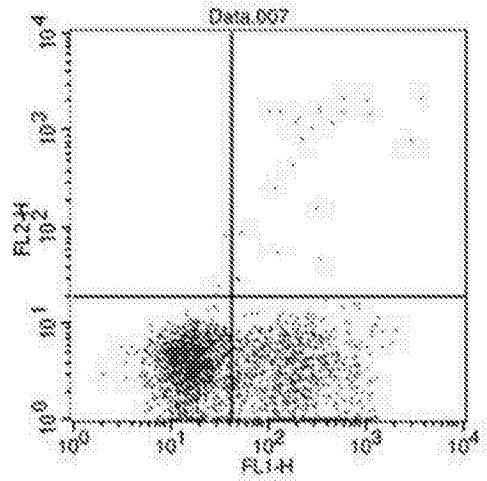


图4A

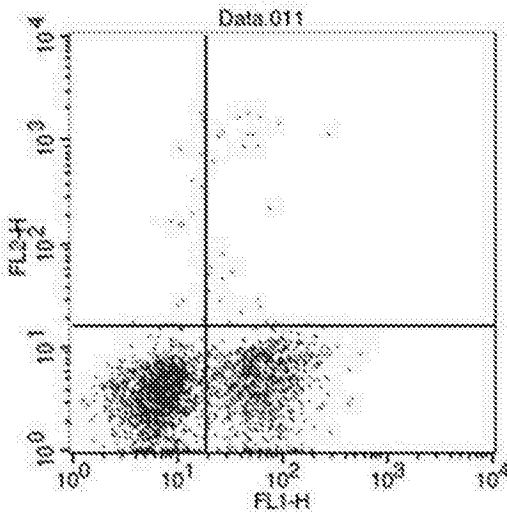


图4B

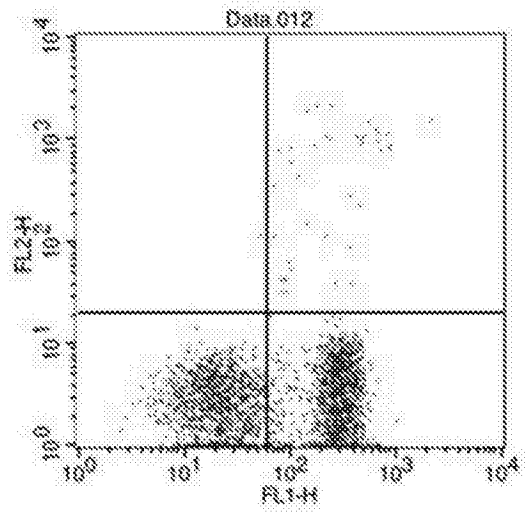


图5A

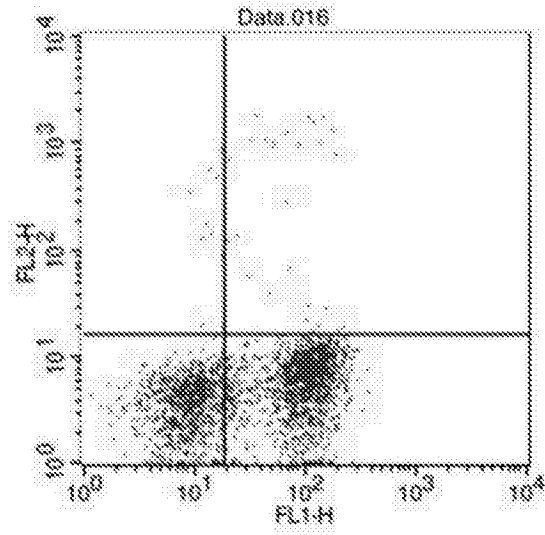


图5B