



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108003243 B

(45) 授权公告日 2021.10.12

(21) 申请号 201711492741.6

C07K 1/18 (2006.01)

(22) 申请日 2017.12.30

C07K 1/26 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 15/70 (2006.01)

申请公布号 CN 108003243 A

审查员 王宗岳

(43) 申请公布日 2018.05.08

(73) 专利权人 北京中科唯新生物医学研究所有  
限公司

地址 102206 北京市昌平区科技园区生命  
园路8号院一区9号楼201

(72) 发明人 王天泽 郝淑静

(74) 专利代理机构 北京展翅星辰知识产权代理  
有限公司 11693

代理人 魏威

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

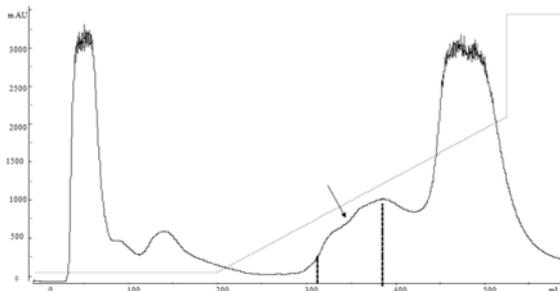
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种纯化蛋白的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种纯化蛋白的方法,上述方法包括如下步骤:1) 选择S100蛋白家族构建待纯化蛋白的重组融合蛋白表达载体;2) 上述重组融合蛋白的表达:得到表达菌体;3) 上述重组融合蛋白的分离纯化:收集上述表达菌体,破碎上述表达菌体的细胞,离心并收集含上述重组融合蛋白的上清液,上述上清液进行阴离子交换柱初步分离,经过上样、洗脱并收集混合在300至400毫升范围内的洗脱液样品,向上述洗脱液样品中加入氯化钙(CaCl<sub>2</sub>),上疏水层析柱,得到上述疏水层析柱纯化后的融合蛋白;4) 电泳鉴定;5) 酶切纯化上述疏水层析柱纯化后的融合蛋白。本发明提出的新的纯化蛋白的方法,操作方便,成本低,纯化效果好。



1. 一种纯化蛋白的方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:

1) 选择S100A1蛋白构建待纯化蛋白的重组融合蛋白表达载体;

2) 所述重组融合蛋白的表达:得到表达菌体;

3) 所述重组融合蛋白的分离纯化:收集所述表达菌体,破碎所述表达菌体的细胞,离心并收集含所述重组融合蛋白的上清液,所述上清液进行阴离子交换柱初步分离,经过上样、洗脱并收集混合在300至400毫升范围内的洗脱液样品,向所述洗脱液样品中加入氯化钙( $\text{CaCl}_2$ ),上疏水层析柱,得到所述疏水层析柱纯化后的融合蛋白;

4) 电泳鉴定;

5) 酶切纯化所述疏水层析柱纯化后的融合蛋白。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:满足下列中的一项或几项:

所述步骤1) 中选择载体pET32a构建所述待纯化蛋白的重组融合蛋白表达载体,所述载体含有NdeI和HindIII酶切识别位点,鉴定所述重组融合蛋白的重组融合基因序列,获得阳性的重组表达载体;和/或

所述步骤3) 中,所述上清液上DEAE-琼脂糖凝胶FF (DEAE-sephrose FF) 阴离子交换柱进行初步的分离,所述上样的缓冲液是25毫摩尔/升三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl), pH为7.5,100毫摩尔/升氯化钠(NaCl),所述洗脱的缓冲液是25毫摩尔/升三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl), pH为7.5,1摩尔/升氯化钠(NaCl);向所述样品中加入5毫摩尔/升氯化钙( $\text{CaCl}_2$ ),水系滤器过滤,过滤后的所述样品上疏水层析柱,加入所述上疏水层析柱的平衡缓冲液三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl),所述上疏水层析柱的洗脱缓冲液是三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)和乙二醇双-2-氨基乙基醚-四乙酸(EGTA);和/或

所述步骤4) 中所述电泳鉴定包括的步骤是电泳凝胶、点样、染色、脱色液脱色、所述脱色期间更换2至4次所述脱色液,得到脱色后的凝胶,最后将所述脱色后的凝胶浸泡于水中;和/或

所述步骤5) 中所述酶切纯化所述融合蛋白的条件为:酶切体系为15至25毫摩尔/升磷酸缓冲液, pH为7至8,酶切温度为35至37摄氏度,酶切时间为15至17小时,以所述融合蛋白3至5毫克/U (mg/U) 肠激酶(EK)为基准做加酶量。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述步骤2) 中所述重组融合蛋白的表达是将所述阳性的重组表达载体转入BL21感受态细胞中,于含氨苄青霉素的液体LB培养基中培养过夜,得到所述表达菌体。

4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述步骤3) 的所述离心步骤中,用pH为7.5的25毫摩尔/升三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)和100毫摩尔/升氯化钠的缓冲液悬浮后,用超声破碎仪破碎所述表达菌体,得到细胞裂解液,所述细胞裂解液用15,000转/分钟(rpm)的转速离心30分钟。

5. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述步骤3) 中所述水系滤器过滤是指16摄氏度放置一小时后用0.22微米( $\mu\text{m}$ )孔径的水系滤器过滤,过滤后的所述样品上柱体积为20毫升疏水层析柱,所述上疏水层析柱的平衡缓冲液是25毫摩尔/升三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl), pH为7.5,所述上疏水层析柱的洗脱缓冲液是25毫摩尔/升三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl), pH 7.5,10毫摩尔/升乙二醇双-2-氨基乙基醚-四乙酸(EGTA),洗脱两个柱体积后出现单一的峰。

6. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述步骤4)中所述电泳鉴定包括的步骤是12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳凝胶,点样10 $\mu$ l,然后用考马斯亮蓝R250染色4小时,然后脱色液脱色4小时,期间更换3次脱色液,最后将脱色后的凝胶浸泡于水中。

7. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述步骤5)中所述酶切纯化所述融合蛋白的条件为:酶切体系为20毫摩尔/升磷酸缓冲液,pH为7.5,酶切温度为35至37摄氏度,酶切时间为16小时,以所述融合蛋白4毫克/U(mg/U)肠激酶(EK)为基准做加酶量。

8. 根据权利要求1至7任一所述的方法,其特征在于:所述待纯化蛋白为分子量小于60千道尔顿(kDa)的蛋白。

## 一种纯化蛋白的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,更具体地,涉及一种纯化蛋白的方法。

### 背景技术

[0002] 对于纯化分子量小于60千道尔顿(kDa)的蛋白,现有技术采用的方法是电泳、离子交换、蛋白沉淀、亲和层析等,但这些纯化方法单一使用各有缺陷,比如蛋白沉淀纯化效果差;电泳的分离效果好,但制备量太低,不适用于大规模制备;离子交换:即便是用最精确控制的条件,仅用离子交换单一的方法也得不到纯的蛋白,还需要其他的纯化步骤;亲和层析:单抗非常昂贵,而且也需先纯化,单抗与目的蛋白结合力太强.要用苛刻的条件来洗脱,这会使得目的蛋白失活并破坏单抗,混合物中的其他蛋白如蛋白酶也可能破坏抗体或与它们非特异结合,某些单抗也会在纯化过程中从树脂上解离下来混入产物中,也需要从终产物中去除.即便是这些方法和其他方法配合使用,也很难得到纯化度很高的蛋白,并且操作复杂,现有技术中纯化蛋白较好的蛋白纯化仪(AKTA)价格太昂贵,故有待提出一个新的操作方便成本低的纯化蛋白的方法。

### 发明内容

[0003] 本发明提供了一种纯化蛋白的方法,以至少解决现有技术中纯化蛋白的方法操作复杂成本高的技术问题。

[0004] 本发明提供了一种纯化蛋白的方法,上述方法包括如下步骤:

[0005] 1) 选择S100蛋白家族构建待纯化蛋白的重组融合蛋白表达载体;

[0006] 2) 上述重组融合蛋白的表达:得到表达菌体;

[0007] 3) 上述重组融合蛋白的分离纯化:收集上述表达菌体,破碎上述表达菌体的细胞,离心并收集含上述重组融合蛋白的上清液,上述上清液进行阴离子交换柱初步分离,经过上样、洗脱并收集混合在300至400毫升范围内的洗脱液样品,向上述洗脱液样品中加入氯化钙( $\text{CaCl}_2$ ),上疏水层析柱,得到上述疏水层析柱纯化后的融合蛋白;

[0008] 4) 电泳鉴定;

[0009] 5) 酶切纯化上述疏水层析柱纯化后的融合蛋白。

[0010] 可选的,上述方法,满足下列中的一项或几项:

[0011] 上述步骤1)中选择载体pET32a构建上述待纯化蛋白的重组融合蛋白表达载体,上述载体含有NdeI和HindIII酶切识别位点,鉴定上述重组融合蛋白的重组融合基因序列,获得阳性的重组表达载体;和/或

[0012] 上述步骤3)中,上述上清液上DEAE-琼脂糖凝胶FF(DEAE-sephrose FF)阴离子交换柱进行初步的分离,上述上样的缓冲液是25毫摩尔/升三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl),pH为7.5,100毫摩尔/升氯化钠(NaCl),上述洗脱的缓冲液是25毫摩尔/升三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl),pH为7.5,1摩尔/升氯化钠(NaCl);;向上述样品中加入5毫摩尔/升氯化钙( $\text{CaCl}_2$ ),水系过滤器过滤,过滤后的上述样品上疏水层析柱,加入上述上疏水层析

柱的平衡缓冲液三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl),上述上疏水层析柱的洗脱缓冲液是三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)和乙二醇双-2-氨基乙基醚-四乙酸(EGTA);和/或

[0013] 上述步骤4)中上述电泳鉴定包括的步骤是电泳凝胶、点样、染色、脱色液脱色、上述脱色期间更换2至4次上述脱色液,得到脱色后的凝胶,最后将上述脱色后的凝胶浸泡于水中;和/或

[0014] 上述步骤5)中上述酶切纯化上述融合蛋白的条件为:酶切体系为15至25毫摩尔/升磷酸缓冲液,pH为7至8,酶切温度为35至37摄氏度,酶切时间为15至17小时,以上述融合蛋白3至5毫克/U(mg/U)肠激酶(EK)为基准做加酶量。

[0015] 可选的,上述步骤2)中上述重组融合蛋白的表达是将上述阳性的重组表达载体转入BL21感受态细胞中,于含氨苄青霉素的液体LB培养基中培养过夜,得到上述表达菌体。

[0016] 可选的,上述步骤3)的上述离心步骤中,用pH为7.5的25毫摩尔/升三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)和100毫摩尔/升氯化钠的缓冲液悬浮后,用超声破碎仪破碎上述表达菌体,得到细胞裂解液,上述细胞裂解液用15,000转/分钟(rpm)的转速离心30分钟。

[0017] 可选的,上述步骤3)中上述水系滤器过滤是指16摄氏度放置一小时后用0.22微米(um)孔径的水系滤器过滤,过滤后的上述样品上柱体积为20毫升疏水层析柱,上述上疏水层析柱的平衡缓冲液是25毫摩尔/升三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl),pH为7.5,上述上疏水层析柱的洗脱缓冲液是25毫摩尔/升三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl),pH 7.5,10毫摩尔/升乙二醇双-2-氨基乙基醚-四乙酸(EGTA),洗脱两个柱体积后出现单一的峰。

[0018] 可选的,上述步骤4)中上述电泳鉴定包括的步骤是12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳凝胶,点样10ul,然后用考马斯亮蓝R250染色4小时,然后脱色液脱色4小时,期间更换3次脱色液,最后将脱色后的凝胶浸泡于水中。

[0019] 可选的,上述步骤5)中上述酶切纯化上述融合蛋白的条件为:酶切体系为20毫摩尔/升磷酸缓冲液,pH为7.5,酶切温度为35至37摄氏度,酶切时间为16小时,以上述融合蛋白4毫克/U(mg/U)肠激酶(EK)为基准做加酶量。

[0020] 可选的,上述S100蛋白家族为S100A蛋白家族、S100B蛋白家族、S100C蛋白家族、S100D蛋白家族、S100E蛋白家族、S100F蛋白家族、S100P蛋白家族、S100G蛋白家族、S100L蛋白家族或S100Z蛋白家族。

[0021] 可选的,上述S100A蛋白家族为S100A1、S100A2、S100A3、S100A4、S100A5、S100A6、S100A7、S100A8、S100A9、S100A10、S100A11、S100A12、S100A13、S100A14、S100A15或S100A16。

[0022] 可选的,上述待纯化蛋白为分子量小于60千道尔顿(kDa)的蛋白。

[0023] 上述待纯化蛋白为目标蛋白,即将目标蛋白纯化为想要的蛋白。

[0024] 本发明技术方案中“DEAE-sephrose FF”为“DEAE-琼脂糖凝胶FF”,“EK酶”为“肠激酶”。

[0025] 本发明提供了一种纯化蛋白的方法,以至少解决现有技术中纯化蛋白的方法操作复杂成本高的技术问题,本发明提出的新的纯化蛋白的方法,操作方便,成本低,纯化效果好。

## 附图说明

[0026] 图1为本发明实施例的一种可选的融合蛋白的分离纯化步骤中阴离子交换柱进行初步分离的结果；

[0027] 图2为本发明实施例的一种可选的融合蛋白的疏水层析图；

[0028] 图3为本发明实施例的一种可选的电泳鉴定结果图；

[0029] 图4为本发明实施例的一种可选的EK酶切试验的结果示意图。

[0030] 下面具体实施方式用于进一步说明但不限于本发明，下面实施例仅为本发明一种优选地实施方式。

## 具体实施方式

[0031] 实施例1

[0032] 步骤：

[0033] 1、构建重组融合蛋白表达载体

[0034] (1) 合成序列表中表1的S100A1-D4K-hGH的DNA序列，将该序列插入到pET32a (NdeI/HindIII) 载体中。

[0035] (2) 鉴定重组融合基因序列

[0036] 构建的pET32a-S100A1-D4K-hGH重组表达载体，经测序，结果再经DNASTAR软件分析鉴定序列。

[0037] 2、重组融合蛋白的表达

[0038] 将经测序鉴定为阳性的重组表达载体转入BL21感受态细胞中，于含氨苄青霉素的液体LB培养基中37℃培养过夜。

[0039] 重组表达的融合蛋白序列如序列表中表2所示。

[0040] 重组表达的融合蛋白分子量如下：

[0041] 理论等电点/分子量 (pI/MW) :4.65/33521.67。

[0042] 3、融合蛋白的分离纯化

[0043] 离心收集菌体，用缓冲液 (25mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100mmol/L NaCl) 悬浮后，用超声破碎仪破碎细胞，细胞裂解液用15,000rpm的转速离心30min，离心后的上清液上DEAE-sephrose FF阴离子交换柱进行初步的分离，上样缓冲液是25mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100mmol/L NaCl，洗脱缓冲液是25mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1mol/L NaCl。

[0044] 离心后的上清液经过DEAE-sephrose FF阴离子交换柱进行初步的分离的结果见图1所示，DEAE阴离子层析柱分离融合蛋白，图1中介于300至400毫升之间的蛋白峰为目的蛋白峰，即图中箭头所指为目的蛋白峰。

[0045] 收集并混合在300-400ml范围内洗脱的样品，直接加入5mmol/L的CaCl<sub>2</sub>，16℃放置约一小时后用0.22μm孔径的水系滤器过滤。过滤后的样品上柱体积为20ml疏水层析柱 (HiPrep phenyl, high sub)，平衡缓冲液是25mmol/L Tris-HCl, pH 7.5，洗脱缓冲液是25mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10mmol/L EGTA，洗脱两个柱体积后出现单一的峰，根据SDS-PAGE检测结果，纯度可达90%以上。

[0046] SDS-PAGE检测结果见图2所示，即融合蛋白的疏水层析图，图中箭头所指为目的蛋白。

[0047] 4、电泳鉴定

[0048] 12% SDS-PAGE电泳凝胶,点样10 $\mu$ l。然后用考马斯亮蓝R250染色4小时,然后脱色液脱色4小时,期间更换3次脱色液,最后将脱色后的凝胶浸泡于水中。

[0049] 电泳鉴定结果见图3,泳道1、2、3为hGH蛋白对照,泳道4、5为DEAE柱纯化后,泳道6、7、8、9为疏水柱纯化后的融合蛋白。

[0050] 5、酶切纯化融合蛋白

[0051] 酶切体系:20mmol/L磷酸缓冲液 (pH7.5)

[0052] 酶切温度:35—37摄氏度

[0053] 酶切时间:16小时

[0054] 加酶量:以融合蛋白4mg/U EK为基准

[0055] EK酶切试验的结果见图4,泳道1为蛋白质标记 (Marker),泳道2为疏水柱纯化后的融合蛋白,泳道3,4,5,6为EK酶切割后的产物。

[0056] 本实施例证明使用本发明方法纯化的蛋白纯度可达90%以上。

[0001] 序列表

[0002] <110> 北京中科唯新生物医学研究所有限公司

[0003] <120> 纯化蛋白的方法

[0004] <130> ZW17004-I

[0005] <141> 2017-12-30

[0006] <160> 2

[0007] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0008] <210> 1

[0009] <211> 879

[0010] <212> DNA

[0011] <213> 智人(Homo sapiens)

[0012] <400> 1

[0013] atgggctctg agctggagac ggcgatggag accctcatca acgtgttcca cgcccactcg 60

[0014] ggcaaagagg gggacaagta caagctgagc aagaaggagc tgaaagagct gctgcagacg 120

[0015] gagctctctg gcttctctgga tgcccagaag gatgtggatg ctgtggacaa ggtgatgaag 180

[0016] gagctagacg agaatggaga cggggaggtg gacttccagg agtatgtggt gcttgtggct 240

[0017] gctctcacag tggcctgtaa caatttcttc tgggagaaca gtgaattcga cgacgacgac 300

[0018] aaattcccga ccatcccgct gagtcgactt tttgacaacg ctatgctccg cgcccatcgt 360

[0019] ctgcaccagc tggcctttga cacctaccag gagtttgaag aagcctatat cccaaaggaa 420

[0020] cagaagtatt cattcctgca gaacccccag acctccctct gtttctcaga gtctattccg 480

[0021] acaccctcca acagggagga aacacaacag aatccaacc tagagctgct ccgcatctcc 540

[0022] ctgctgctca tccagtcgtg gctggagccc gtgcagttcc tcaggagtgt cttcgccaac 600

[0023] agcctggtgt acggcgcctc tgacagcaac gtctatgacc tcctaaagga cctagaggaa 660

[0024] ggcatccaaa cgctgatggg gaggctggaa gatggcagcc cccggactgg gcagatcttc 720

[0025] aagcagacct acagcaagtt cgacacaaac tcacacaacg atgacgcact actcaagaac 780

[0026] tacgggctgc tctactgctt caggaaggac atggacaagg tcgagacatt cctgcgcatc 840

[0027] gtgcagtgcc gctctgtgga gggcagctgt ggcttctag 879

[0028] <210> 2

[0029] <211> 292

[0030] <212> PRT

[0031] <213> 智人(Homo sapiens)

[0032] <400> 2

[0033] Met Gly Ser Glu Leu Glu Thr Ala Met Glu Thr Leu Ile Asn Val Phe

[0034] 1 5 10 15

[0035] His Ala His Ser Gly Lys Glu Gly Asp Lys Tyr Lys Leu Ser Lys Lys

[0036] 20 25 30

[0037] Glu Leu Lys Glu Leu Leu Gln Thr Glu Leu Ser Gly Phe Leu Asp Ala

[0038] 35 40 45

[0039]	Gln Lys Asp Val Asp Ala Val Asp Lys Val Met Lys Glu Leu Asp Glu
[0040]	50 55 60
[0041]	Asn Gly Asp Gly Glu Val Asp Phe Gln Glu Tyr Val Val Leu Val Ala
[0042]	65 70 75 80
[0043]	Ala Leu Thr Val Ala Cys Asn Asn Phe Phe Trp Glu Asn Ser Glu Phe
[0044]	85 90 95
[0045]	Asp Asp Asp Asp Lys Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp
[0046]	100 105 110
[0047]	Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr
[0048]	115 120 125
[0049]	Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser
[0050]	130 135 140
[0051]	Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro
[0052]	145 150 155 160
[0053]	Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu
[0054]	165 170 175
[0055]	Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln
[0056]	180 185 190
[0057]	Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp
[0058]	195 200 205
[0059]	Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr
[0060]	210 215 220
[0061]	Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe
[0062]	225 230 235 240
[0063]	Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala
[0064]	245 250 255
[0065]	Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp
[0066]	260 265 270
[0067]	Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly
[0068]	275 280 285
[0069]	Ser Cys Gly Phe
[0070]	290

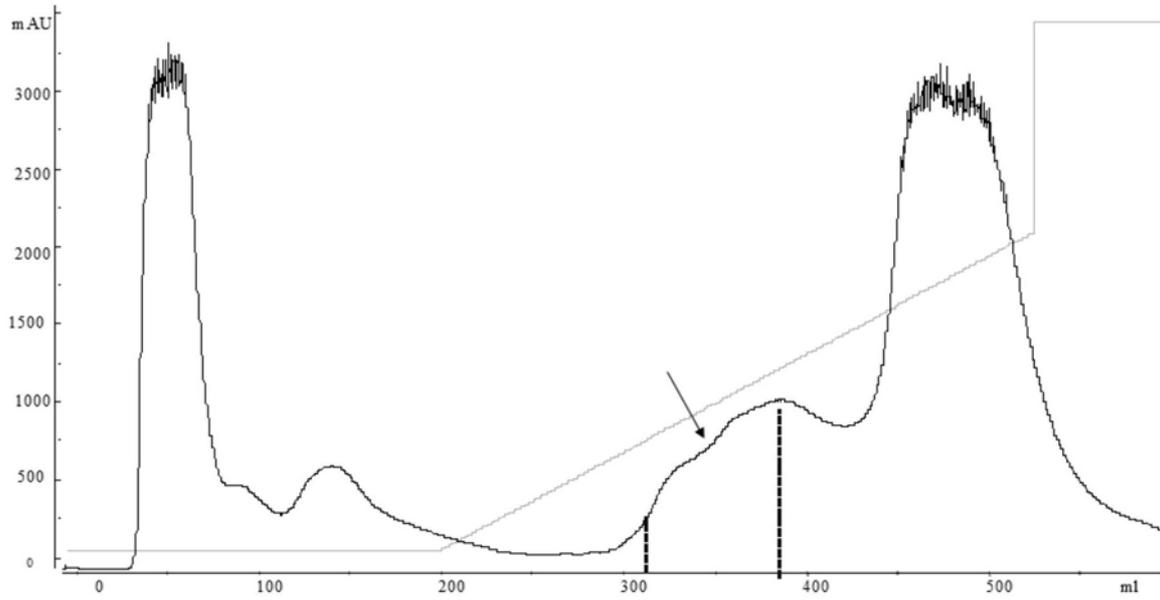


图1

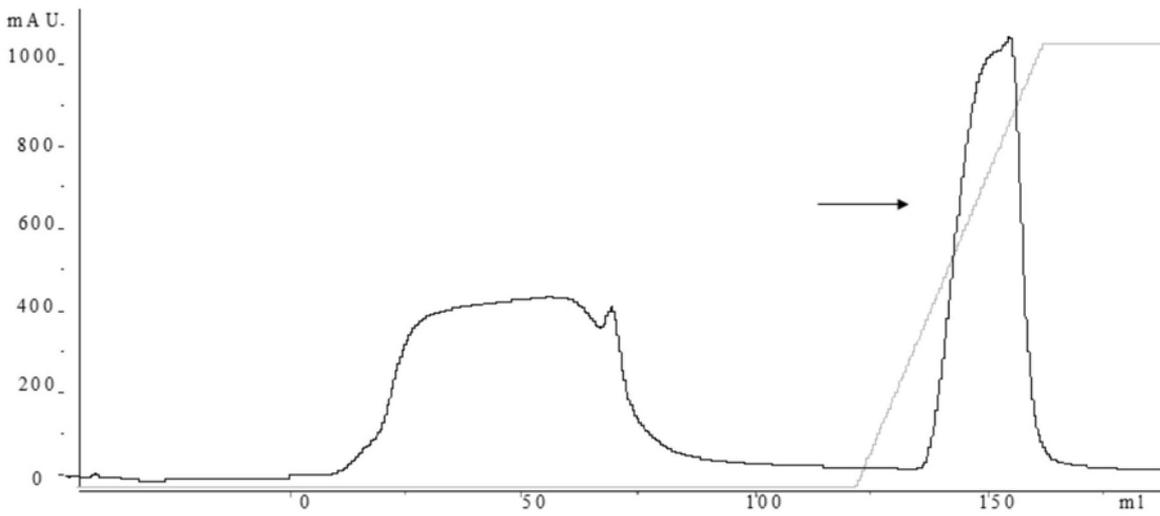


图2

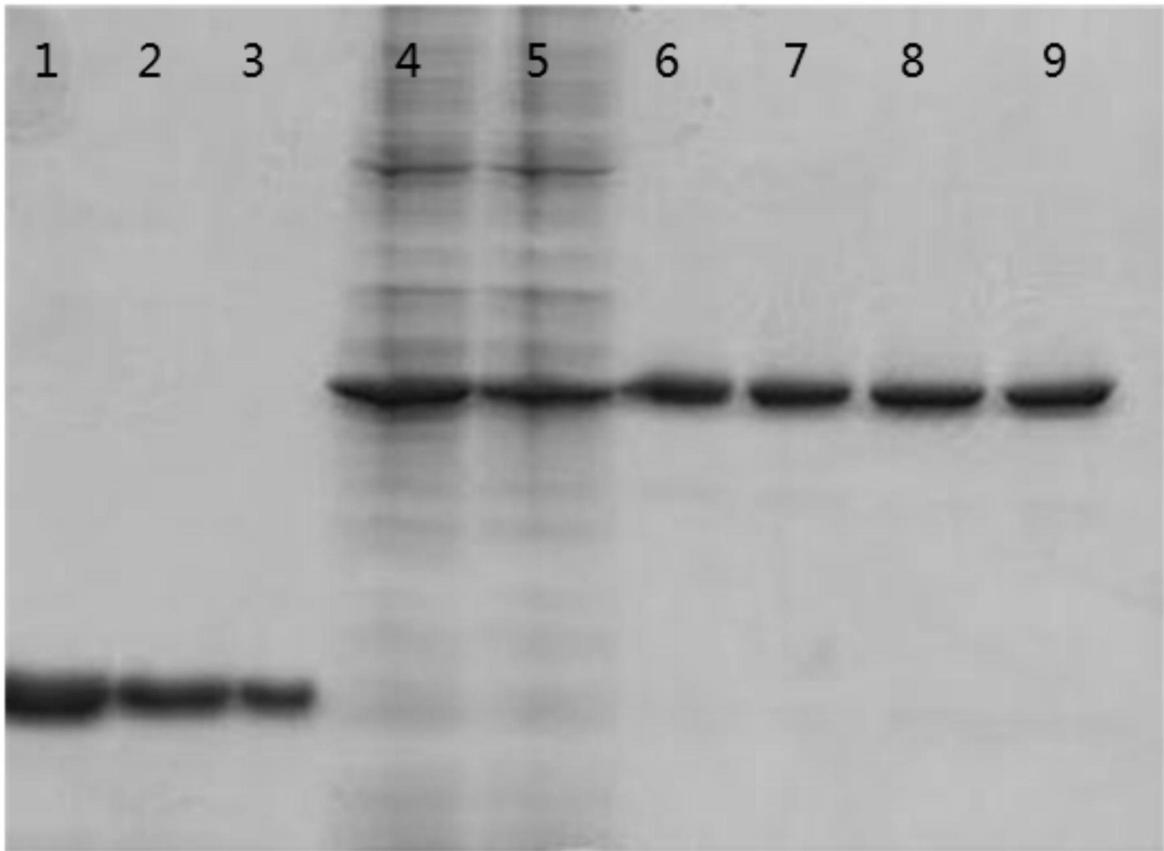


图3

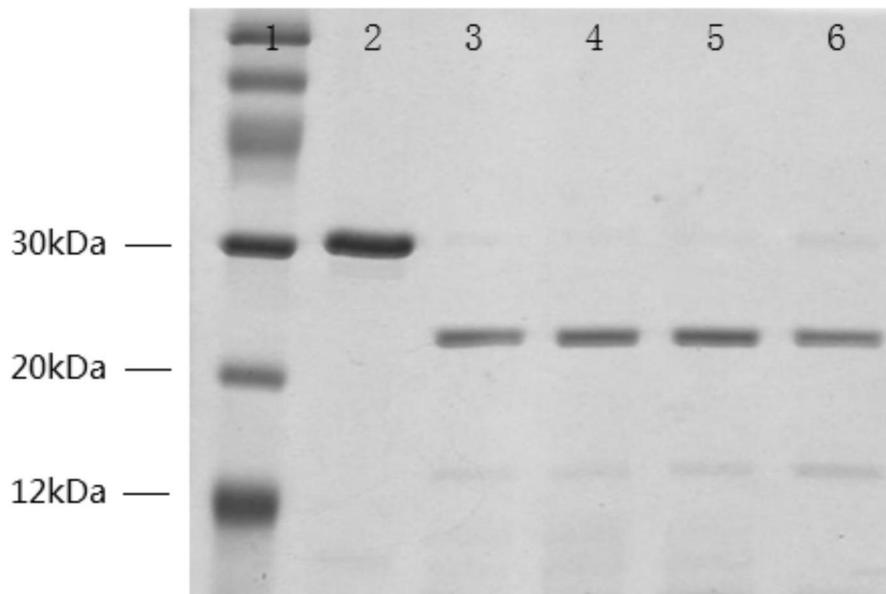


图4