



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114644715 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 20

(21) 申请号 202210213262.0

C12N 1/21 (2006.01)

(22) 申请日 2022.03.04

C12R 1/19 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114644715 A

(56) 对比文件
CN 108998463 A, 2018.12.14

(43) 申请公布日 2022.06.21

审查员 刘芳

(73) 专利权人 苏州红冠庄国药股份有限公司
地址 215300 江苏省苏州市昆山市千灯镇
石浦机场路歇马桥

(72) 发明人 周翠霞

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/65 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 1/12 (2006.01)

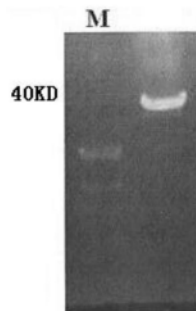
权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一种IGFBP-3和IGF-1的融合蛋白及复合物
制备方法

(57) 摘要

本申请公开了一种IGFBP-3和IGF-1的融合蛋白及复合物制备方法,所述融合蛋白为IGFBP-3-Glu-IGF-1,所述谷氨酸与IGFBP-3和IGF-1形成羟胺裂解的特异性二肽键,在羟胺溶液条件下可释放出IGFBP-3和IGF-1,从而实现IGFBP-3和IGF-1的复合物制备。通过本申请IGFBP-3和IGF-1的融合蛋白可简化其复合物的制备流程,且能保持完整IGFBP-3和IGF-1活性的方法,具有广泛的应用前景。



1. 一种含有IGFBP-3和IGF-1的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白包括IGFBP-3和IGF-1以及谷氨酸,所述的谷氨酸位于IGFBP-3和IGF-1之间形成连接作用的二肽键;

所述IGFBP3、谷氨酸和IGF1依次连接构成所述融合蛋白,所述IGFBP-3的末端氨基酸为赖氨酸,所述IGF-1的首端氨基酸为甘氨酸,所述赖氨酸的侧链结构 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-$ 与谷氨酸侧链结构 $\text{HOO}-(\text{CH}_2)_2-$ 通过缩合形成酰胺键 $-\text{CO}-\text{NH}_2$;所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 一种IGFBP-3和IGF-1复合物的制备方法,其特征在于,将权利要求1所述融合蛋白在羟胺溶液中裂解。

3. 根据权利要求2所述的一种IGFBP-3和IGF-1复合物的制备方法,其特征在于,所述融合蛋白的裂解条件为:羟胺浓度为3M,pH为9.0,反应温度为40°C,反应时间为8h。

4. 一种工程菌,其特征在于,所述工程菌包含权利要求1所述融合蛋白的基因。

一种IGFBP-3和IGF-1的融合蛋白及复合物制备方法

技术领域

[0001] 本申请属于生物医药技术领域,涉及一种IGFBP-3和IGF-1的融合蛋白及复合物制备方法。

背景技术

[0002] 类胰岛素生长因子-1 (IGF-1) 是一种活性蛋白多肽物质,最初于 1976年 Rinderknecht从人的血清中提取得到,因其结构与胰岛素类似而得名,从1976年开始,国内外科研机构均广泛开展了对IGF-1 的研究。目前市场上以IGF-1作为药物被批准的,仅为美国2005年批准上市的美卡舍明-林菲培,其主要成分为重组人胰岛素样生长因子-1 (rh-IGF-1) 与重组人胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (rh-IGFBP-3) 组成的一种二元蛋白复合体,用于治疗严重原发性IGF-1或者生长激素缺乏的患者。

[0003] 众多研究资料表明IGF-1在糖尿病、肌肉萎缩、关节炎,骨质疏松,肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (ALS) 等疾病的治疗中都发挥着重要治疗作用,IGFBP-3是血液中主要的IGF-1载体,离体实验研究发现,IGFBP-3能促进或抑制IGF-1的作用。IGFBP-3与IGF-1的亲合力高于IGF-1受体与IGF-1的亲合力,对IGF-1生物活性具有重要的调控作用,因此胰岛素生长因子-1 (IGF-1) 与胰岛素生长因子结合蛋白-3 (IGFBP-3) 的复合物在医药领域被广泛使用。

[0004] 通过基因工程的方法制备IGF-1生物药物技术已经相当成熟,相比从动物体内直接提取具有很大优势,可大批量连续生产、降低生产成本。同时基因工程改造的药物还可以延长药物半衰期,制成长效药物制剂,避免频繁给药,极大的减少患者的痛苦,同时也可克服频繁给药患者依从性差的缺点,更容易被接受。在基因工程中pET系列载体是目前原核表达中,应用较为广泛的表达系统。尽管pET-32a表达产物中含有肠激酶和凝血酶的特异切割位点,但是酶试剂价格昂贵,不利于工业化生产,而且切割后目的蛋白上游会带有十几个到几十个额外的氨基酸序列,对于小分子量蛋白的复性影响很大,直接影响蛋白活性。因此,现有胰岛素生长因子-1 (IGF-1) 与胰岛素生长因子结合蛋白-3 (IGFBP-3) 复合物的生产始终厂家需要解决的难题,需要推进实现流水线加工,因此其制备工艺显得尤为重要。

[0005] 申请内容

[0006] 针对胰岛素生长因子-1 (IGF-1) 与胰岛素生长因子结合蛋白-3 (IGFBP-3) 复合物的生产工艺,本申请的目的旨在提供一种生产流程相对简单,且能保持完整IGFBP-3和IGF-1活性的方法。

[0007] 为了达到上述技术目的和效果,本申请具体通过以下技术方案实现:

[0008] 作为本申请的一个实施方案,提供了一种含有IGFBP-3和IGF-1 的融合蛋白,所述融合蛋白包括IGFBP-3和IGF-1以及谷氨酸 (Glu),所述的谷氨酸位于IGFBP-3和IGF-1之间形成连接作用的二肽键。

[0009] 在本申请实施方案中通过可裂解的二肽键连接将IGFBP-3和 IGF-1连接构成融合蛋白,融合蛋白相比单独的IGFBP-3和IGF-1稳定性较好,并且以有活性和可溶方式进行表达。同时可裂解的二肽键可以在裂解液中裂解,释放出IGFBP-3和IGF-1,制备成含有IGFBP-

3 和IGF-1的复合物溶液。

[0010] 所述二肽键为可羟胺的特异裂解肽键。

[0011] 所述IGFBP-3、谷氨酸和IGF-1依次连接构成所述融合蛋白,即所述融合蛋白的N端为IGFBP-3,C端为IGF-1。

[0012] 所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0013] 在本申请实施方案中IGFBP-3的末端氨基酸为赖氨酸(Lys),赖氨酸为碱性氨基酸,侧链结构为 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-$,谷氨酸为酸性氨基酸,侧链结构为 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-$,侧链结构 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-$ 与 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-$ 可通过缩合形成酰胺键($-\text{CO}-\text{NH}_2$)。同时IGF-1的第一个氨基酸为甘氨酸(Gly),甘氨酸(Gly)为脂肪族类,侧链结构为 $\text{H}-$,可与酰胺键($-\text{CO}-\text{NH}_2$)可形成羟胺的特异裂解肽键。

[0014] 作为本申请的一个实施方案,还提供了所述融合蛋白的构建方法,包括:

[0015] 将所述融合蛋白基因插入表达载体得到的表达质粒;

[0016] 利用感受态细胞转化所述表达质粒得到的工程菌;

[0017] 诱导所述工程菌表达并破解得到的融合蛋白。

[0018] 在本申请的实施方案中,采用基因工程的方法将IGFBP-3与IGF-1基因串联表达并在IGFBP-3与IGF-1之间构建一个可自裂解的连接肽,之后通过大肠杆菌发酵、纯化得到IGFBP-3与IGF-1融合蛋白。由于所述IGFBP-3与IGF-1的第一个氨基酸为甘氨酸,本申请通过引入谷氨酸与甘氨酸和赖氨酸二肽键,形成的二肽键具有羟胺裂解的功能,将IGFBP-3与IGF-1串联表达后,通过裂解得到IGFBP-3与IGF-1的复合物,一步纯化即可实现两种蛋白的制备,而且对IGFBP-3和IGF-1的性质不产生影响,保持了完整IGFBP-3和IGF-1的活性。

[0019] 进一步的,所述表达载体为pET表达系统,优选为载体pET32 α (+)。

[0020] 进一步的,所述感受态细胞为大肠杆菌感受态细胞,优选为大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。

[0021] 进一步的,还包括破解得到的所述融合蛋白纯化的步骤,所述纯化的方法选自盐析与有机溶剂沉淀法、电泳法、透析法、层析法、分子筛或超速离心。

[0022] 作为本申请的一个实施方案,还提供了一种IGFBP-3和IGF-1复合物的制备方法,将所述融合蛋白在羟胺溶液中裂解。

[0023] 所述融合蛋白的裂解条件为:羟胺浓度为3M,pH为9.0,反应温度为40 $^{\circ}\text{C}$,反应时间为8h。

[0024] 在本申请的实施方案中,连接所述IGFBP-3和IGF-1二肽键通过羟胺溶液裂解,从而释放出IGFBP-3和IGF-1,直接得到含有IGFBP-3和IGF-1的复合溶液,通过浓缩干燥即可实现IGFBP-3和IGF-1复合物的制备。

[0025] 作为本申请的另一个实施方案,还提供了一种工程菌,所述工程菌包含所述融合蛋白的基因。

[0026] 设计引物扩增得到所述融合蛋白的基因,将所述融合蛋白的基因插入表达载体,利用大肠杆菌转化。

[0027] 作为本申请的另一个实施方案,还提供了一种表达质粒,所述表达质粒包含所述融合蛋白的基因。

[0028] 优选的,所述表达质粒的载体为pET表达系统,优选为载体pET32 α (+)。

[0029] 本申请的有益效果为:

[0030] 本申请具有较大的应用价值,通过将IGFBP-3和IGF-1之间加入一个特异裂解部位,通过一次纯化得到IGFBP-3和IGF-1的融合蛋白,所述融合蛋白经过裂解释放出IGFBP-3和IGF-1单体,制备成复合物溶液。此方法不仅可以获得较为稳定的产物,而且分离方法简单廉价,降低生产成本,具有广泛的应用前景。

附图说明

[0031] 图1是本申请融合蛋白IGFBP-3-Glu-IGF-1的电泳图。

具体实施方式

[0032] 下面将结合本申请具体的实施例,对本申请技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本申请保护的范围。

[0033] 本申请的主要技术内容为通过重组人IGFBP-3和IGF-1融合蛋白相关基因的设计和合成,构建融合蛋白表达载体,工程菌制备及通过发酵方法制备IGFBP-3和IGF-1融合蛋白。两个融合蛋白为IGFBP-3和IGF-1,两个蛋白之间通过二肽键进行连接,融合蛋白相比单独的IGFBP-3和IGF-1稳定性较好,并且以有活性和可溶方式进行表达;二肽键作为特异性裂解部位可以在生理条件下进行裂解,释放出IGFBP-3和IGF-1,制备成含有IGFBP-3和IGF-1的复合物溶液。

[0034] 本申请中的IGFBP-3和IGF-1可以是天然或野生型蛋白及其突变体和衍生物,优选的,在本申请中IGF-1来源于成熟的天然人胰岛素生长因子-1(IGF-1),其氨基酸序列如SEQIDNO.2所示;IGFBP-3来源于成熟的天然的胰岛素生长因子结合蛋白-3(IGFBP-3),其氨基酸序列如SEQIDNO.3所示。

[0035] 所述FGF21和IGF-1的突变体指成熟的FGF21蛋白或者IGF-1蛋白至少发生一个氨基酸突变。通常而言,突变体拥有相对于野生型蛋白而言经过修饰改造的功能、结构或者特性。例如:突变体在溶液中具有更好的稳定性,不易形成聚集沉淀,同时又维持了其生物活性;或者,突变体能与药物制剂成分更好地相容,利于后期制成各种药物制品,该制品在储存期间能够保持药物生理化学特性及本身的生物学活性;又或者是,突变体糖基化程度减少,在维持其功能活性的同时保证了大规模生产时批次之间的一致性。本申请中的突变体所包含的突变不限于以上述及的各种定义,本申请的突变体指相对于野生型蛋白而言,其性质功能等各方面具有一个以上方面的改变。

[0036] 本申请中作为连接肽的二肽键需要满足以下两个条件:1)各个功能蛋白的多肽链不应相互影响,也不应相互折叠或缠绕在一起而导致彼此的活性丧失;2)各个功能蛋白的活性中心要相互远离,这样不会形成空间位阻而影响了活性的表现。此外,设计连接肽时,应充分考虑蛋白质的表达、纯化、复性效率等要求。一般认为,连接肽能够把两个结构域进行适当地隔开,进而在反应过程中可以避免不同结构域的互相干扰,所以引入连接肽可以实现融合蛋白的成功表达。

[0037] 连接肽可分为柔性连接肽、刚性连接肽和可裂解连接肽,本申请中作为连接肽的

二肽键属于可裂解连接肽,所述二肽键以IGFBP-3 末端和IGF-1的第一个氨基酸为基础,通过与另一氨基酸构成可裂解二肽键,一方面可实现IGFBP-3和IGF-1的连接,另一方面实现IGFBP-3和IGF-1融合蛋白的裂解分离,在生理条件下实现IGFBP-3 和IGF-1复合液的制备。

[0038] 所述另一氨基酸指广义氨基酸,包含自然或者非自然产生的氨基酸,包含突变体及衍生物。广义氨基酸具体包括,诸如自然产生的 L-氨基酸和D-氨基酸,化学修饰后的氨基酸如突变体及衍生物;自然产生的如非原基因氨基酸,如正亮氨酸、 β -丙氨酸、鸟氨酸等;化学合成的具有氨基酸性质的化合物。非自然产生的氨基酸如: α -甲基化氨基酸,D-氨基酸,类组氨酸氨基酸,侧链包含多余亚甲基的氨基酸,侧链的羧基被磷酸基取代的氨基酸等。

[0039] 在本申请中与甘氨酸形成二肽键的另一氨基酸首选天然产生的氨基酸,优选为谷氨酸。

[0040] 本申请中针对所述融合蛋白的构建,通过限制性内切酶酶切点将 IGFBP-3和IGF-1基因融合。将所述融合蛋白基因和表达载体分别进行双酶切,将酶切后的质粒和基因混合进行连接得到表达质粒,转入含有感受态细胞中培养,收集菌体提取质粒,进行PCR扩增,测序正确的菌种保存。

[0041] 表达载体是基因工程中在克隆载体基本骨架的基础上增加表达元件(如启动子、RBS、终止子等),使目的基因能够表达的载体。pET系统是在大肠杆菌中克隆和表达重组蛋白的最强大系统,在pET 载体中,目标基因克隆到T7噬菌体强转录和翻译信号控制之下,并通过宿主细胞提供T7RAN聚合酶来诱导表达。

[0042] 感受态细胞可通过理化方法诱导细胞,吸收周围环境中的DNA 分子,使其处于最适摄取和容纳外来DNA的生理状态。主要原理为通过处理使细胞的通透性变大,便于外源基因或载体进入感受态细胞,而由于细胞膜的流动性,这种孔洞会被细胞自身所修复。

[0043] 本申请中感受态细胞采用DH5 α 感受态细胞作为表达载体 pET32 α (+)的宿主,其中DH5 α 感受态细胞采用大肠杆菌DH5 α 菌株制备得到。pET32 α (+)载体是利用大肠杆菌DH5 α T7噬菌体转录系统进行表达,T7RNA聚合酶是一种高活性的RNA聚合酶,其合成 mRNA的速度比大肠杆菌RNA聚合酶快5倍左右,在大肠杆菌体内 T7噬菌体转录系统优先表达。

[0044] 具体的,本申请IGFBP-3和IGF-1复合物的制备方法包括以下步骤:

[0045] 1) 融合蛋白的设计

[0046] 在IGFBP-3和IGF-1之间添加一个谷氨酸(Glu)形成融合蛋白。IGFBP-3的末端氨基酸为赖氨酸(Lys),赖氨酸为碱性氨基酸,侧链结构为 $H_2N-(CH_2)_4-$,谷氨酸为酸性氨基酸,侧链结构为 $H_2N-(CH_2)_2-$, $H_2N-(CH_2)_4-$ 与 $H_2N-(CH_2)_2-$ 可通过缩合形成酰胺键(-CO-NH-)。IGF-1的第一个氨基酸为甘氨酸(Gly),甘氨酸(Gly) 为脂肪族类,侧链结构为H-,可与酰胺键可形成羟胺的特异裂解肽键。同时在IGFBP-3和IGF-1中也不存在Lys-Glu-Gly的氨基酸序列,通过羟胺的特异裂解肽键可完美实现IGFBP-3和IGF-1的裂解。

[0047] 2) 融合蛋白的合成

[0048] 根据设计得到的融合蛋白的基因序列设计引物,在引物的5`端和 3`端上分别加上EcoRI和HindIII限制性内切酶位点。

[0049] 采用PCR法扩增目的基因。扩增完成后对PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,电泳后经过胶回收试剂盒对PCR产物进行回收。

[0050] 扩增程序为:预变性95°C,5min;变性95°C,1min;复性64°C,1min;延伸72°C,1min,共35个循环,最后一次反应延伸时间为10min。

[0051] 3) 目的基因插入表达载体

[0052] 对回收后的PCR产物用EcoRI和HindIII进行双酶切,酶切后通过琼脂糖凝胶电泳回收DNA片段,将pET32 α (+)质粒同样用EcoRI和HindIII进行双酶切,将回收后的DNA片段和酶切后的pET32 α (+)载体混合进行连接。

[0053] 连接反应完成后将重新构建的pET32 α (+)载体加入到制备好的感受态DH5 α 大肠杆菌中,然后接种到含氨苄的琼脂糖平板上进行抗性筛选。挑取单菌落进行发酵,收集菌体提取质粒,采用上述PCR引物进行扩增,扩增产物进行DNA序列测定,测序正确的菌种保存于-80°C甘油管中。

[0054] 4) 工程菌的诱导表达

[0055] 保存于-80°C冰箱的菌种接种于含有Amp⁺的LB培养基中,接种量为一菌环,在37°C、220rpm条件下培养,当菌悬液在OD_{600nm}处的吸光值为0.8左右时,接种于发酵培养基,接种量为5%,37°C、220rpm条件下培养至OD_{600nm}为0.6~0.8左右时,加入IPTG至终浓度为0.5mmol/L,37°C、220rpm诱导培养8h,收集菌体。

[0056] 5) 大肠杆菌的破解

[0057] 取发酵菌液离心后收集的菌体,加入细菌裂解液重悬菌体,使用超声波细胞破碎仪进行破菌处理。破菌时,菌体悬浮液置于冰浴环境中,破菌程序为500W、工作4s、间隙6s,待菌体悬浮液由粘稠变透亮时,停止超声破碎。

[0058] 将超声破碎后的菌体悬浮液离心,收集沉淀,加入变性溶液4°C过夜,包涵体经过变性后,缓慢加入复性溶液,37°C放置2h,10000rpm、4°C离心10min,收集上清,上清液经过滤膜过滤后用于后续纯化。

[0059] 6) 融合蛋白的制备

[0060] 将适量Ni-NTA树脂(每ml树脂上样的融合蛋白小于15mg)置于层析柱内,打开柱下端帽子让液体自然流干,加磷酸缓冲液平衡后将细菌裂解液加入,30min后用不同浓度梯度咪唑的磷酸缓冲液进行阶段洗脱,流速为2ml/min,洗脱液不搜集。最后用含咪唑的缓冲液进行洗脱,流速为1ml/min,收集洗脱液,冷冻干燥,-20°C保存。

[0061] 7) 羟胺裂解反应

[0062] 经过离子交换后得到的融合蛋白加入羟胺裂解液,羟胺浓度为3M,pH为9.0,反应温度为40°C,反应时间为8h。反应结束后在4°C、20Mm、pH8.0的Tris-HCl溶液中进行过夜透析,冷冻干燥,保存于-20°C。

[0063] 实施例1含有IGFBP-3和IGF-1融合蛋白基因的克隆及其重组表达载体的构建

[0064] 1) 设计融合蛋白IGFBP-3-Glu-IGF-1,合成融合蛋白IGFBP-3-Glu-IGF-1基因,整条核酸序列在生工生物工程(上海)有限公司进行全基因合成。

[0065] 2) 去60 μ LPCR产物基因加入5倍体积的TE缓冲液,用移液枪吸打混匀,再加入等体积苯酚,混匀,室温12000r/min离心5min,取上清液,加1/10体积3mol/LCH₃COOK缓冲液(pH5.2)和2.5倍体积冰冷无水乙醇,-20°C放置30min,12000r/min离心5min,弃上清液,加1ml冰冷70%乙醇,12000r/min离心5min,弃上清液,室温干燥,加30 μ LTE缓冲液溶解,获得PCR纯化片段。

[0066] 3) 将纯化的融合基因和穿梭表达载体pET32 α (+)用两个相同的限制酶(EcoRI和HindIII)进行双酶切处理,处理后的片段利用琼脂糖凝胶回收试剂盒对目标基因片段进行回收,最终利用T4DNALigase(购自NEB)进行连接。

[0067] 目的基因以及表达载体质粒均按以下酶切体系进行:

	目的片段/空载	2 μ g
[0068]	EcoRI	1 μ L
	HindIII	1 μ L
	10XFastDigestBuffer	3 μ L
[0069]	ddH ₂ O	30 μ L

[0070] 在37 $^{\circ}$ C温育1h。

[0071] 目的基因与表达载体的连接体系如下:

	目的片段酶切产物	3 μ L
	空载体酶切产物	5 μ L
[0072]	10XT4DNALigaseBuffer	1 μ L
	T4DNALigase	1 μ L

[0073] 4 $^{\circ}$ C过夜连接。

[0074] 4) 将10 μ L连接产物加入到200 μ L感受态细胞E.coli(DH5 α)中,冰上放置30min,42 $^{\circ}$ C热激90s,迅速取出冰浴1~2min,向离心管中加入800 μ LLB培养基,37 $^{\circ}$ C200rpm振荡培养1~1.5h,7000rpm离心1min,吸除700 μ L上清,用微量移液枪将剩余的转化产物吹打均匀,将转化产物涂布含有氨苄的琼脂糖平板上进行抗性筛选,室温放置3~5min,待液体吸收后,37 $^{\circ}$ C倒置培养至可见单菌落。

[0075] 挑取单菌落进行发酵,收集菌体提取质粒,PCR进行扩增,扩增产物进行测定,测序正确的菌种保存于-80 $^{\circ}$ C甘油管中。SEQ ID NO.1所示,本实施例合成的融合基因成功嵌入到表达载体pET32 α (+)中,DNA测序结果表明重组质pET32 α (+)/IGFBP-3-Glu-IGF-1构建成功。

[0076] 实施例2工程菌的构建及融合蛋白IGFBP-3-Glu-IGF-1的表达

[0077] 将实施例1中测序结果正确的重组载体转化到表达宿主大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,挑取阳性克隆于含有氨苄的琼脂糖固体培养基中过夜培养得到重组菌株。具体步骤如下:

- [0078] 1) 从-80 $^{\circ}$ C冰箱中取出大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,置于冰上融化;
- [0079] 2) 无菌状态下取50 μ L的感受态细胞置于灭菌后的1.5mL的离心管中;
- [0080] 3) 加入10 μ L连接产物,冰中放置30分钟;
- [0081] 4) 42 $^{\circ}$ C下静置30秒(热休克);

[0082] 5) 快速转移离心管于冰中放置2~3min;

[0083] 6) 涂布于含氨苄的琼脂糖平板培养基上,37°C倒置培养12~16h 得到重组菌株。

[0084] 将得到的重组菌株接种于含有Amp⁺的LB培养基中,接种量为一菌环,在37°C、220rpm条件下培养,当菌悬液在OD_{600nm}处的吸光值为0.8左右时,接种于发酵培养基,接种量为5%,37°C、220rpm 条件下培养至OD_{600nm}为0.6~0.8左右时,加入IPTG至终浓度为0.5mmol/L,37°C、220rpm诱导培养8h。

[0085] 诱导结束后取培养上清进行SDS-PAGE电泳检测,具体过程如下:

[0086] 1) 实验材料

[0087] IPTG诱导前和诱导后的蛋白样品。

[0088] 2) 试剂与配制

[0089] 30%的丙烯酰胺母液、1.5mol/LTris-HCl (pH8.8)、1.0mol/LTris -HCl (pH6.8)、1×Tris-Gly电泳缓冲液 (pH8.3)、脱色液、染色液、10%SDS 10mL、10%过硫酸铵、TEMED、4×蛋白上样缓冲液 (loadingbuffer)、蛋白质marker (蛋白质分子量标准)、异丙醇、二硫苏糖醇 (DTT)、去离子水、溴酚蓝指示剂。

[0090] 3) 实验仪器

[0091] 垂直板电泳槽、稳压稳流电泳仪、恒温水浴锅、凝胶成像系统、微量移液器 (20μL, 1000μL)。

[0092] 4) 实验方法

[0093] 制备SDS-PAGE凝胶:先将电泳玻璃板用水洗净,后用酒精擦拭,晾干。按说明安装玻璃板,并用去离子水检查玻璃板三边是否漏液。如漏液,则重新安装玻璃板再次试漏。按照表1所示配制分离胶,最后加入TEMED,迅速向一个方向旋转混合物 (防止气泡的产生),用1000μL微量移液器将其注入两块玻璃板之间的间隙中 (灌至红色板的上边缘),然后在胶面上小心地覆盖一层异丙醇,进行封闭。室温放置约40min至分离胶聚合,倒掉异丙醇覆盖液,用去离子水冲洗分离胶表面3~4次,以洗净未聚合的聚丙烯酰胺凝胶。倒掉去离子水,并用吸水纸吸干残留的水分。按照表1所示配制浓缩胶,最后加入TEMED,迅速旋转混合。缓慢注满玻璃板间隙,插入样品梳 (写有1cm的一侧向里,先插入一侧,再从一侧向另一侧压着插入,以排出气泡),垂直放置于室温。约30min聚合完成,平行拔出梳子,取出玻璃板,撕去封玻璃夹板的橡胶条。将玻璃夹板“凹”面贴紧电泳槽,并用夹子进行固定。

[0094] 表1分离胶与浓缩胶配制方法

组分	10%分离胶	5%浓缩胶
H2O	4.0mL	2.7mL
30%丙烯酰胺	3.3mL	0.67mL
1.5mol/L Tris-HCl (pH8.8)	2.5mL	
[0095] 1.0mol/L Tris-HCl (pH6.8)		0.5mL
10% SDS	0.1mL	0.04mL
10%过硫酸铵	0.1mL	0.04mL
TEMED (最后加)	10 μ L	10 μ L
总体积	10mL	3.96mL

[0096] SDS-PAGE电泳:向电泳槽中加入300mL电泳缓冲液,从上样孔依次加入10μL IPTG诱导上清液、5μL蛋白质marker。盖好盖子连接电源 (红接红,黑接黑),慢慢调节电压为80V,

进行电泳。等溴酚蓝指示剂到达分离胶时,把电压加大到150V,至指示剂的蓝色条带迁移到凝胶的底部边缘时即可停止电泳。

[0097] 考马斯亮蓝染色、脱色:将玻璃板从电泳槽中卸下,将其撬开,取出凝胶,去除浓缩胶,将胶放入培养皿中,加入约40mL染色液,在脱色摇床上染色50min。染色后,将染色液进行回收,先用水冲洗胶2~3次,再加入脱色液进行脱色,直至看到清晰的蛋白质带为止。

[0098] 结果如图1所示,可以清楚显示得到了融合蛋白 IGFBP-3-Glu-IGF-1。

[0099] 实施例3IGFBP-3和IGF-1复合溶液的制备

[0100] 1) 取600ml实施例2发酵菌液离心后收集的菌体,加入30mL 细菌裂解液重悬菌体,使用超声波细胞破碎仪进行破菌处理。破菌时,菌体悬浮液置于冰浴环境中,破菌程序为500W、工作4s、间隙6s,待菌体悬浮液由粘稠变透亮时,停止超声破碎。

[0101] 2) 将超声破碎后的菌体悬浮液离心,收集沉淀,加入5mL变性溶液4°C过夜,包涵体经过变性后,缓慢加入复性溶液,37°C放置2h, 10000rpm、4°C离心10min,收集上清,上清液经过0.45μm滤膜过滤后用于后续纯化。

[0102] 3) 将适量Ni-NTA树脂(每ml树脂上样的融合蛋白小于15mg)置于层析柱内,打开柱下端帽子让液体自然流干,加磷酸缓冲液平衡后将细菌裂解液加入,30min后用30ml分别含0、10、20、50、100mM 咪唑的磷酸缓冲液进行阶段洗脱,流速为2ml/min,洗脱液不收集。最后用含400mM咪唑的缓冲液进行洗脱,流速为1ml/min,收集洗脱液,置于浓缩管中,离心浓缩,冷冻干燥,-20°C保存。

[0103] 4) 经过离子交换后得到的融合蛋白加入羟胺裂解液,羟胺浓度为3M,pH为9.0,反应温度为40°C,反应时间为8h。反应结束后在4°C、20mM、pH8.0的Tris-HCl溶液中进行过夜透析,冷冻干燥,保存于-20°C。

[0104] 5) 取2mL复合液,用放射免疫法检测IGF-1和IGFBP-3。

[0105] 结果显示复合液中IGF-1浓度为536.45mg/ml,IGFBP-3浓度为 158.36mg/ml。

[0106] 实施例4复合液中IGF-1生物活性检测

[0107] 用含10%小牛血清的DMEM培养基培养复苏后的NIH3T3细胞,待生长到80%后,传于6孔板中,继续培养24h。用含2%小牛血清的DMEM培养基饥饿培养NIH3T3细胞24h后,加入IGF-1重组蛋白,使其终浓度分别为0、100、200、400ng/ml。继续培养24h,48h,72h后,MTT法检测细胞的增殖情况。

[0108] MTT法检测分析显示,加入不同浓度IGF-1后,NIH3T3细胞增殖速度有所增加。流式细胞仪检测细胞周期结果表明,IGF-1(浓度为 200ng/ml)处理NIH3T3细胞48h后,与未经IGF-1处理的对照组比较,G1和G0期细胞百分比由79.0%减少至51.4%($P<0.05$),而S期细胞百分比由14.1%增加至36.7%($P<0.05$)。

[0109] 尽管已经示出和描述了本申请的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本申请的原理和精神的情况下可以对这些实例进行多种变化、修改、替换和变型,本申请的范围由所附权利要求及其等同物限定。

[0001]	序列表															
[0002]	<110>	苏州红冠庄国药股份有限公司														
[0003]	<120>	一种IGFBP-3和IGF-1的融合蛋白及复合物制备方法														
[0004]	<160>	1														
[0005]	<170>	SIPOSequenceListing 1.0														
[0006]	<210>	1														
[0007]	<211>	335														
[0008]	<212>	PRT														
[0009]	<213>	融合蛋白(IGFBP-3-Glu-IGF-1)														
[0010]	<400>	1														
[0011]	Gly	Ala	Ser	Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Pro	Val	Val	Arg	Cys	Glu	Pro	Cys
[0012]	1				5					10					15	
[0013]	Asp	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	Gln	Cys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Val	Cys	Ala
[0014]				20					25					30		
[0015]	Glu	Leu	Val	Arg	Glu	Pro	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Leu	Thr	Cys	Ala	Leu
[0016]			35					40						45		
[0017]	Ser	Glu	Gly	Gln	Pro	Cys	Gly	Ile	Tyr	Thr	Glu	Arg	Cys	Gly	Ser	Gly
[0018]		50					55					60				
[0019]	Leu	Arg	Cys	Gln	Pro	Ser	Pro	Asp	Glu	Ala	Arg	Pro	Leu	Gln	Ala	Leu
[0020]	65			70							75			80		
[0021]	Leu	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Cys	Val	Asn	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Arg	Leu
[0022]				85						90				95		
[0023]	Arg	Ala	Tyr	Leu	Leu	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser	Glu
[0024]				100						105				110		
[0025]	Ser	Glu	Glu	Asp	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Val	Glu	Ser	Pro	Ser	Val	Ser
[0026]			115					120						125		
[0027]	Ser	Thr	His	Arg	Val	Ser	Asp	Pro	Lys	Phe	His	Pro	Leu	His	Ser	Lys
[0028]		130						135						140		
[0029]	Ile	Ile	Ile	Ile	Lys	Lys	Gly	His	Ala	Lys	Asp	Ser	Gln	Arg	Tyr	Lys
[0030]	145				150						155			160		
[0031]	Val	Asp	Tyr	Glu	Ser	Gln	Ser	Thr	Asp	Thr	Gln	Asn	Phe	Ser	Ser	Glu
[0032]				165						170				175		
[0033]	Ser	Lys	Arg	Glu	Thr	Glu	Tyr	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Glu	Met	Glu	Asp
[0034]				180						185				190		
[0035]	Thr	Leu	Asn	His	Leu	Lys	Phe	Leu	Asn	Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Val
[0036]			195							200				205		
[0037]	His	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp	Lys	Lys	Gly	Phe	Tyr	Lys	Lys	Lys	Gln	Cys
[0038]		210								215				220		

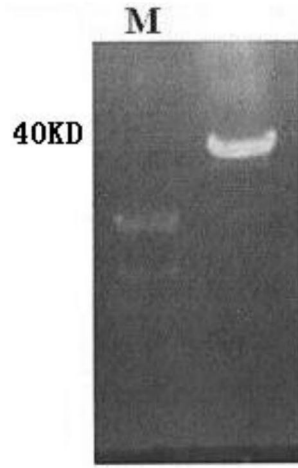


图1