



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117736308 A

(43) 申请公布日 2024.03.22

(21) 申请号 202311655903.9

C12N 15/12 (2006.01)

(22) 申请日 2023.12.05

C12N 1/21 (2006.01)

(71) 申请人 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

G01N 33/72 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

地址 518118 广东省深圳市坪山区坑梓街
道金沙社区锦绣东路23号新产业生物
大厦二十一层

(72) 发明人 李康 陈清浦 何海华 熊厅
张琳 张妍 吕漫

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

专利代理师 车美灵

(51) Int. Cl.

C07K 14/805 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

肌红蛋白突变体、试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种肌红蛋白突变体、试剂盒及其应用。该肌红蛋白突变体包括：(a) 以SEQ ID NO:1所示的野生型肌红蛋白为基础发生突变的蛋白，该突变包括G75位点发生的突变；(b) 与(a)中限定的氨基酸序列具有70%以上同源性且具有肌红蛋白活性的蛋白质。能够解决现有技术中肌红蛋白稳定性差的问题，适用于肌红蛋白改造领域。

1. 一种肌红蛋白突变体,其特征在于,包括:
 - (a) 以SEQ ID NO:1所示的野生型肌红蛋白为基础发生突变的蛋白,所述突变包括G75位点发生的突变;
 - (b) 与(a)中限定的氨基酸序列具有70%以上同源性且具有肌红蛋白活性的蛋白质。
2. 根据权利要求1所述的肌红蛋白突变体,其特征在于,所述(a)中,G75位点取代的氨基酸的类型包括G75C;其中,数字前字母代表原始氨基酸,数字后字母代表突变氨基酸。
3. 根据权利要求2所述的肌红蛋白突变体,其特征在于,所述肌红蛋白突变包括如下任意一种氨基酸突变组合:G75C+E86C或G74C+G75C;其中,G75C+E86C为SEQ ID NO:2所示的蛋白,G74C+G75C为SEQ ID NO:3所示的蛋白;所述肌红蛋白突变体包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的蛋白具有70%以上同源性且具有肌红蛋白活性的蛋白质。
4. 根据权利要求1中所述的肌红蛋白突变体,其特征在于,所述肌红蛋白突变体包括与(a)中限定的氨基酸序列具有80%以上、85%以上,更优选95%以上,进一步优选99%以上同源性且具有肌红蛋白活性的蛋白质。
5. 一种DNA分子,其特征在于,所述DNA分子编码权利要求1至4中任一项所述的肌红蛋白突变体。
6. 一种重组质粒,其特征在于,所述重组质粒连接有权利要求5所述的DNA分子。
7. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞内含有权利要求5所述的DNA分子或权利要求6所述的重组质粒。
8. 根据权利要求7所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞包括原核细胞或真核细胞;
 - 优选地,所述原核细胞包括大肠杆菌;
 - 优选地,所述大肠杆菌包括Rosetta菌株。
9. 一种肌红蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述肌红蛋白测定试剂盒包括定标品,所述定标品包括权利要求1至4中任一项所述的肌红蛋白突变体;
 - 所述肌红蛋白测定试剂盒还包括如下至少一种:微球、标记物和缓冲液;
 - 所述微球包括肌红蛋白抗体包被微球;
 - 所述标记物包括肌红蛋白抗体标记物,优选为如下任意一种标记物标记肌红蛋白抗体:发光标记物、亲和标记物、荧光染料或标记酶;
 - 优选地,所述发光标记物包括ABEI;
 - 其中,所述包被微球的肌红蛋白抗体与带有标记物的肌红蛋白抗体不同。
10. 权利要求1至4中任一项所述的肌红蛋白突变体、权利要求5所述的DNA分子、权利要求6所述的重组质粒或权利要求7或8所述的宿主细胞在制备检测心肌损伤的检测产品中的应用。

肌红蛋白突变体、试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及肌红蛋白改造领域,具体而言,涉及一种肌红蛋白突变体、试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 肌红蛋白是一种氧结合血红蛋白,存在于心肌及骨骼肌细胞质中,该血红蛋白协助氧气进入细胞,并供部分氧气贮存。在急性心肌梗塞(AMI)病人中,肌红蛋白水平在两小时内便会变得异常,6-9小时达到峰值,然后在梗塞后的24-36小时回到正常水平。根据IFCC及NACB标准,肌红蛋白能够作为心肌损伤的早期标志物。现有技术中通常是直接通过天然提取肌红蛋白,或是通过重组表达的方式获取肌红蛋白,但当野生型的肌红蛋白应用于临床中进行检测作为标志物时,稳定性较差,易导致最终的检测结果不准确。

发明内容

[0003] 本发明的主要目的在于提供一种肌红蛋白突变体、试剂盒及其应用,以解决现有技术中肌红蛋白稳定性差的问题。

[0004] 为了实现上述目的,根据本发明的第一个方面,提供了一种肌红蛋白突变体,该突变体包括(a)以SEQ ID NO:1所示的野生型肌红蛋白为基础发生突变的蛋白,突变包括G75位点发生的突变;(b)与(a)中限定的氨基酸序列具有70%以上同源性且具有肌红蛋白活性的蛋白质。

[0005] 进一步地,(a)中,G75位点取代的氨基酸的类型包括G75C;其中,数字前字母代表原始氨基酸,数字后字母代表突变氨基酸。

[0006] 进一步地,肌红蛋白突变包括如下任意一种氨基酸突变组合:G75C+E86C或G74C+G75C;其中,G75C+E86C为SEQ ID NO:2所示的蛋白,G74C+G75C为SEQ ID NO:3所示的蛋白;肌红蛋白突变体包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的蛋白具有70%以上同源性且具有肌红蛋白活性的蛋白质。

[0007] 进一步地,肌红蛋白突变体包括与(a)中限定的氨基酸序列具有80%以上、85%以上,更优选95%以上,进一步优选99%以上同源性且具有肌红蛋白活性的蛋白质。

[0008] 为了实现上述目的,根据本发明的第二个方面,提供了一种DNA分子,该DNA分子编码上述任一种的肌红蛋白突变体。

[0009] 为了实现上述目的,根据本发明的第三个方面,提供了一种重组质粒,该重组质粒连接有上述的DNA分子。

[0010] 为了实现上述目的,根据本发明的第四个方面,提供了一种宿主细胞,该宿主细胞内含有上述的DNA分子或上述的重组质粒。

[0011] 进一步地,上述宿主细胞包括原核细胞或真核细胞;优选地,原核细胞包括大肠杆菌;优选地,大肠杆菌包括Rosetta菌株。

[0012] 为了实现上述目的,根据本发明的第五个方面,提供了一种肌红蛋白测定试剂盒,

该肌红蛋白测定试剂盒包括定标品,定标品包括上述任一种肌红蛋白突变体;该肌红蛋白测定试剂盒还包括如下至少一种:微球、标记物和缓冲液;微球包括肌红蛋白抗体包被微球;标记物包括肌红蛋白抗体标记物,优选为如下任意一种标记物标记肌红蛋白抗体:发光标记物、亲和标记物、荧光染料或标记酶;优选地,发光标记物包括ABEI;其中,包被微球的肌红蛋白抗体与带有标记物的肌红蛋白抗体不同。

[0013] 为了实现上述目的,根据本发明的第六个方面,提供了一种上述任一种肌红蛋白突变体、DNA分子、重组质粒或宿主细胞在制备检测心肌损伤的检测产品中的应用。

[0014] 应用本发明的技术方案,对野生型肌红蛋白的G75位点进行定点突变,获得肌红蛋白突变体,相较于野生型肌红蛋白稳定性更高,能够作为定标品应用于肌红蛋白测定试剂盒中进行检测,提高检测结果的准确性。

具体实施方式

[0015] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

[0016] 如背景技术所提到的,现有技术中提取的野生型肌红蛋白或通过重组表达获得的肌红蛋白稳定性较差,作为标志物应用于肌红蛋白测定试剂盒中时不够灵敏,导致最终的检测结果不准确,因而,在本申请中发明人尝试开发一种肌红蛋白突变体及其应用,将其应用于制备肌红蛋白测定试剂盒中的定标品,使其稳定性更强,在此基础上提出了本申请的一系列保护方案。

[0017] 在本申请第一种典型的实施方式中,提供了一种肌红蛋白突变体,该肌红蛋白突变体包括:(a)以SEQ ID NO:1所示的野生型肌红蛋白为基础发生突变的蛋白,突变包括G75位点发生的突变;(b)与(a)中限定的氨基酸序列具有70%以上同源性且具有肌红蛋白活性的蛋白质。

[0018] 现有技术中通过人工提取或通过重组表达获得的肌红蛋白往往存在着稳定性不佳的缺陷,本发明采用分子模拟及现代基因工程技术,对野生型肌红蛋白氨基酸序列中的G75位点进行突变,突变后的G75位点能够与肌红蛋白上的其他位点形成空间二硫键,提高蛋白整体的空间构象稳定性,进行重组表达后获得突变型的肌红蛋白,相比野生型肌红蛋白具有更好的稳定性。

[0019] SEQ ID NO:1:

[0020] MGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEV LIRLFKGGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMK ASEDLKKHGA TVLTALGGILKKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISECIIQVLQSKHP GDFGADAQGAMNKALELFRKD MASNYKELGFQG。

[0021] 在一种优选的实施例中,上述(a)中,G75位点取代的氨基酸的类型包括G75C;其中,数字前字母代表原始氨基酸,数字后字母代表突变氨基酸。突变后的G75C能够与肌红蛋白上的其他位点的氨基酸,优选地为与距离G75位点10Å内的氨基酸(优选为半胱氨酸),形成二硫键,提高肌红蛋白的稳定性。

[0022] 在一种优选的实施例中,上述突变包括如下任意一种氨基酸突变:G75C+E86C或G74C+G75C;其中,G75C+E86C为SEQ ID NO:2所示的蛋白,G74C+G75C为SEQ ID NO:3所示的蛋白;上述肌红蛋白突变体包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的蛋白具有70%以上同源

性且具有肌红蛋白活性的蛋白质。

[0023] SEQ ID NO:2:

[0024] MGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEVLRIRLFKGGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMK ASEDLKKHGA TVLTALGCILKKKGHHEACIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISECTIIQVLQSKHP GDFGADAQGAMNKALELFRKD MASNYKELGFQG。

[0025] SEQ ID NO:3:

[0026] MGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEVLRIRLFKGGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMK ASEDLKKHGA TVLTALCCILKKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISECTIIQVLQSKHP GDFGADAQGAMNKALELFRKD MASNYKELGFQG。

[0027] 二硫键是一种共价键,由两个半胱氨酸残基连接形成,其连接强度比普通的氢键和范德华力更大,因此能够提供更强的连接力来稳定蛋白的空间结构。半胱氨酸残基通常位于蛋白质的内部,当两个半胱氨酸残基之间形成二硫键时,除了能够增强空间稳定性之外,还能够促进蛋白质的折叠和组装,指导蛋白质正确地折叠成其特定的三维结构。故在本申请中将肌红蛋白氨基酸序列上第75位的甘氨酸,分别与第86位的谷氨酸或第74位的甘氨酸组合,共同进行定点突变为半胱氨酸,而后两个位点之间形成二硫键,即G75C+E86C或G74C+G75C,使得该蛋白的空间构象更为稳定,能够获得稳定性强、不易分解的肌红蛋白突变体。

[0028] 在一种优选的实施例中,上述任一种肌红蛋白突变体包括与(a)中限定的氨基酸序列具有80%以上、85%以上,更优选95%以上,进一步优选99%以上同源性且具有肌红蛋白活性的蛋白质。

[0029] 上述氨基酸突变均在本申请实施例中进行试验探究,相较于具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的母本,均具有肌红蛋白的活性。上述突变位点均为在氨基酸活性位点周围进行的突变,此种突变能够改善蛋白空间构象的稳定性。而对于远离活性位点的突变,对增强蛋白稳定性的影响较小,因此能够获得与上述氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%或以上同源性、且具有相同增强稳定性作用能力的蛋白质。

[0030] 本说明书中的同源性 (Identity) 是指氨基酸序列之间的“同一性”,即氨基酸序列中的种类相同的氨基酸残基的比率的总计。氨基酸序列的同源性可以利用BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)、FASTA等比对程序来确定。

[0031] 上述与(a)序列提供的蛋白具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%以上(比如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%以上,甚至99.9%以上)同源性且具有相同功能的蛋白质,其活性位点、活性口袋、活性机制、蛋白结构等均和(a)序列提供的蛋白质大概率相同,为通过氨基酸突变获得的同源蛋白。

[0032] 具有上述同源性序列的获得,可以通过氨基酸的取代、替换等来实现。取代、替换等规则,一般情况下,性质类似的氨基酸之间相互替换后的效果也类似。为方便描述,此处先将氨基酸残基缩写罗列如下:丙氨酸 (Ala;A)、天冬酰胺 (Asn;N)、天冬氨酸 (Asp;D)、精氨酸 (Arg;R)、半胱氨酸 (Cys;C)、谷氨酸 (Glu;E)、谷氨酰胺 (Gln;Q)、甘氨酸 (Gly;G)、组氨酸 (His;H)、异亮氨酸 (Ile;I)、亮氨酸 (Leu;L)、赖氨酸 (Lys;K)、蛋氨酸 (Met;M)、苯丙氨酸

(Phe;F)、脯氨酸(Pro;P)、丝氨酸(Ser;S)、苏氨酸(Thr;T)、色氨酸(Trp;W)、酪氨酸(Tyr;Y)和缬氨酸(Val;V)。

[0033] 氨基酸的取代或替换,例如,在上述同源蛋白中,可发生保守的氨基酸替换。“保守的氨基酸替换”包括但不限于:

[0034] 疏水性氨基酸(Ala、Cys、Gly、Pro、Met、Val、Ile、Leu)被其他疏水性氨基酸取代;

[0035] 侧链粗大的疏水性氨基酸(Phe、Tyr、Trp)被其他侧链粗大的疏水性氨基酸取代;

[0036] 侧链带正电的氨基酸(Arg、His、Lys)被其他侧链带正电的氨基酸取代;

[0037] 侧链有极性不带电的氨基酸(Ser、Thr、Asn、Gln)被其他侧链有极性不带电的氨基酸取代。

[0038] 本领域技术人员也可以根据现有技术中的“blosum62评分矩阵”等本领域技术人员熟知的氨基酸替换规则对氨基酸进行保守替换。

[0039] 在本申请第二种典型的实施方式中,提供了一种DNA分子,该DNA分子编码上述任一种肌红蛋白突变体。

[0040] 上述DNA能够编码上述肌红蛋白突变体,并能够连接在重组质粒上形成环状DNA。上述DNA和重组质粒均能在RNA聚合酶、核糖体、tRNA等的作用下,进行转录、翻译,获得上述肌红蛋白突变体。

[0041] 在本申请第三种典型的实施方式中,提供了一种重组质粒,该重组质粒连接上述DNA分子。

[0042] 在本申请第四种典型的实施方式中,提供了一种宿主细胞,该宿主细胞内含有上述DNA分子或上述重组质粒。

[0043] 在一种优选的实施例中,上述宿主细胞包括原核细胞;优选地,上述原核细胞包括大肠杆菌;优选地,上述大肠杆菌包括Rosetta菌株。

[0044] 利用上述宿主细胞,能够在宿主细胞中进行重组质粒的复制,也能够将重组质粒上携带的DNA分子进行转录、翻译,获得大量肌红蛋白突变体。利用现有技术,对宿主细胞进行破碎、破碎后蛋白纯化或其他方式,能够获得肌红蛋白突变体。该宿主细胞为非植物来源的宿主细胞。

[0045] 大肠杆菌表达系统是一种原核表达系统,能够在大肠杆菌细胞中表达多种外源基因,包括真菌,植物,细菌以及病毒的基因等。

[0046] 大肠杆菌表达系统的优点包括:

[0047] (1)、与其他表达系统相比,大肠杆菌生长快速,表达周期更短;

[0048] (2)、大肠杆菌细胞易于生长,容易扩大培养,产量高,有利于大规模表达重组蛋白;

[0049] (3)、大肠杆菌表达条件简单,成本低廉易于规模化生产。

[0050] 本申请中所用的Rosetta菌株,属于大肠杆菌表达系统的宿主细胞之一。Rosetta来源于Origami系列宿主菌,该系列菌株含有Origami菌株原有的TrxB和Gor突变基因,以及Rosetta系列菌株中的真核细胞稀有密码子,此特性能够提高细胞中二硫键的正确折叠率,使得蛋白高效表达;当其应用于蛋白的表达与制备纯化时,有着经济、快速、产量高、安全性更高以及应用广泛的优点。

[0051] 在本申请第五种典型的实施方式中,提供了一种肌红蛋白测定试剂盒,该肌红蛋

白测定试剂盒包括定标品,该定标品选自上述任一种肌红蛋白突变体;优选地,该肌红蛋白测定试剂盒还包括如下至少之一:微球、标记物和缓冲液;该微球包括肌红蛋白抗体包被微球;该标记物包括肌红蛋白抗体标记物,优选为如下任意一种标记物标记肌红蛋白抗体:该标记物包括发光标记物、亲和标记物、荧光染料或标记酶;优选地,发光标记物包括ABEI;其中,上述包被微球的肌红蛋白抗体与带有标记物的肌红蛋白抗体不同。

[0052] 发光标记物指的是一种通过发光反应来标记生物分子的物质。ABEI (Aminobenzyl-EDTA-Isoluminol) 是一种异鲁米诺衍生物,可以用于标记肌红蛋白抗体。当发光标记物标记的抗体与肌红蛋白结合后,可以通过化学发光免疫法检测肌红蛋白的存在。

[0053] 亲和标记物是一种与生物分子结合的标记物,能够与特定的生物分子结合并用于其检测和定量,这些亲和标记物可以与肌红蛋白抗体结合,或是可以与与其结合的酶(如辣根过氧化物酶)或荧光染料形成复合物,从而可以通过酶标记法或荧光染料标记法检测肌红蛋白。常见的亲和标记物包括TM05(Tumor marker)或生物素等。

[0054] 荧光染料是一类具有荧光性质的化合物,可以与生物分子结合并通过荧光显微镜或流式细胞仪等方法来检测和定量标记的生物分子。将荧光染料作为肌红蛋白抗体标记物,可以通过荧光标记法检测肌红蛋白,荧光染料标记的抗体还可以在荧光显微镜或流式细胞仪中观察到肌红蛋白的分布和表达水平。常用的荧光染料包括FITC、Cy3和Cy5等。

[0055] 标记酶是一种酶类分子,可以与特定的抗体或亲和小分子结合,用于检测和定量目标分子。将肌红蛋白抗体标记为酶可以通过酶标记法检测肌红蛋白。常用的酶包括辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(AP),它们可以与底物反应产生显色或荧光信号,用于定量或定性检测肌红蛋白的存在。

[0056] 本申请中肌红蛋白测定试剂盒测定的方法优选为化学发光免疫法(Chemiluminescent Immunoassay),其是一种常用的免疫分析方法,其原理基于化学发光反应和化学免疫反应。化学发光反应指的是化学物质在一定条件下产生可见光的过程,化学发光免疫法主要包含以下步骤:

[0057] 1. 靶分子的捕获:在试验管内或固相载体表面固定抗体,如磁性微球,使其能够特异性地结合待检测的靶分子,如抗原。

[0058] 2. 夹心反应:加入待检测的样品,其中可能含有靶分子。如果样品中存在靶分子,它们将与固定在固相载体上的抗体发生特异性结合,形成抗原-抗体复合物。

[0059] 3. 标记物的结合:加入携带化学发光标记的二抗(或亲和小分子化合物),这些标记物能够与复合物中的抗原或抗体结合。标记物可以是化学发光物质(如ABEI或TM50等)或其他物质(如亲和标记物、标记酶或荧光染料等)。

[0060] 4. 清洗:通过洗涤步骤去除未结合的物质,使得只有特异性结合的复合物保留在固相载体上。

[0061] 5. 发光检测:在适当的条件下,加入化学发光底物,使其与标记物发生化学反应,并产生发光。发光的强度与待检测的靶分子的浓度相关。

[0062] 在本发明优选的实施例中,肌红蛋白测定试剂盒包括上述肌红蛋白突变体、肌红蛋白抗体A标记物ABEI以及肌红蛋白抗体B蛋白包被磁性微球。在上述试剂盒中,肌红蛋白突变体即为定标品,肌红蛋白抗体A标记物ABEI即为标记物,肌红蛋白抗体B蛋白包被磁性

微球即为微球。在实际检测中,在37℃下,样品中的肌红蛋白、ABEI标记的肌红蛋白抗体A与包被在磁性微球上的肌红蛋白抗体B蛋白发生免疫反应,形成“夹心三明治”免疫复合物。

[0063] 连接有ABEI的肌红蛋白抗体A和连接有磁性微球的肌红蛋白抗体B分别与肌红蛋白特异性结合,形成三明治式复合物。通过磁性分离和洗涤步骤,能够去除未结合的抗体、残留的样本等杂质,获得纯化后的结合物。进一步地,通过检测结合物的化学发光,能够实现对上述结合物进行定性或定量的检测,以确定肌红蛋白的存在和浓度。在本申请中即检测上述三者形成的“夹心三明治”免疫复合物,获得相对光强度RLU后,利用本申请中的肌红蛋白突变体作为定标品制定检测曲线,与样品测定得到的相对光强度进行比对,进而分析得到最终的检测结果。

[0064] 在本申请第六种典型的实施方式中,提供了一种上述任一项肌红蛋白突变体、DNA分子、重组质粒或任一种宿主细胞在制备检测心肌损伤的检测产品中的应用。

[0065] 下面将结合具体的实施例来进一步详细解释本申请的有益效果。需要说明的是,以下实施例中所有试剂及耗材,若无特殊说明,均购自全式金厂家,具体型号见实施例。

[0066] 实施例1

[0067] 1、肌红蛋白的定点突变

[0068] 突变位点:G75C+E86C。

[0069] 设计并合成包含有突变位点的正反向突变引物:

[0070] 正向引物:引物1(SEQ ID NO:4):CGCCATATGATGGGGCTATCAGATGGAGAATG GCAA。

[0071] 反向引物:引物2(SEQ ID NO:5):CCGCTCGAGGCCCTGAAAACCCAGTTCTTTAT AATTGC。

[0072] 利用含有野生型肌红蛋白基因的质粒(金斯瑞合成)进行PCR扩增。Pfu聚合酶(全式金、AP221-13)扩增体系如表1所示:

[0073] 表1

组分	体积	终浓度
模板 DNA	1μL	10ng/μL
引物 1	1μL	0.2~0.4μM
引物 2	1μL	0.2~0.4μM
5×TransStart® FastPfu 缓冲液(全式金, AP221-13)	1μL	1×
dNTPs(全式金, AP221-13)	5μL	0.25mM
TransStart® FastPfu DNA 聚合酶(全式金, AP221-13)	1μL	2.5 units
无菌水	补充至 50μL	
总体积	50μL	

[0074] PCR反应条件如表2所示。

[0075] 表2

温度	时间	循环数
95℃	3min	1
95℃	30s	30
60℃	30s	
72℃	30s	
72℃	5min	1

[0076] PCR反应结束后将全部PCR产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳,切下含有目的片段的胶块并用切胶回收试剂盒(天根生物, MAT:4994007)回收目的片段,分别用NdeI/XhoI

(Thermo Fisher, ER1701) 双酶切后纯化回收体系如表3所示。

[0079] 表3

组分	体积
载体	2 μ g
NdeI内切酶	1 μ L
XhoI内切酶	1 μ L
10 \times 缓冲液	5 μ L
无菌水	补充至50 μ L
总体积	50 μ L

[0081] 制备原核表达载体pET28a(+)载体(优宝生物, VT1207), 酶切体系如表4所示。

[0082] 表4

组分	体积
目的基因	根据回收情况决定
NdeI内切酶(Thermo Fisher, ER1701)	1 μ L
XhoI内切酶(Thermo Fisher, ER1701)	1 μ L
10 \times buffer(Thermo Fisher, ER1701)	5 μ L
无菌水	补充至50 μ L
总体积	50 μ L

[0084] 利用T4 DNA连接酶将目标片段的回收产物与原核表达载体pET28a(+)载体(优宝生物, VT1207)连接, 体系如表5所示。

[0085] 表5

组分	体积
基因片段	1 μ L
pET28a(+)载体(优宝生物, VT1207)	3 μ L
5 \times T4 DNA连接酶缓冲液(Thermo Scientific TM , EL0011)	2 μ L
T4 DNA连接酶(Thermo Scientific TM , EL0011)	1 μ L
无菌水	3 μ L
总体积	10 μ L

[0087] 连接后转化至JM109菌株(唯地生物, CAT#: EC1070)中, 进行扩增培养。提取质粒, 将质粒转化至Rosetta菌株(Novagen/Millipore, ST1011)中进行低温诱导表达。

[0088] 2、定点突变的肌红蛋白在肌红蛋白测定试剂盒中的应用

[0089] (1) 实验仪器

[0090] 深圳市新产业生物医学工程公司, 全自动化学分光分析仪MAGLUMI X3 SN: 0101010033012200180。

[0091] (2) 将制备获得的定点突变的肌红蛋白以及野生型肌红蛋白作为该试剂盒的定标品制定检测曲线

[0092] 将野生型以及突变型肌红蛋白均稀释到0.1mg/mL, 进行10倍、20倍、40倍、80倍、160倍、320倍、640倍、1280倍、12800倍的梯度稀释, 每个值检测三次取平均值。

[0093] (3) 加样连接有ABEI的肌红蛋白抗体A和连接有磁性微球的肌红蛋白抗体B

[0094] 10 μ L样本+100 μ L Buffer (Snibe, PBS-97)+100 μ L连接有肌红蛋白抗体A的ABEI (Medix、7001)+20 μ L连接有肌红蛋白抗体B的磁性微球 (Snibe, 6643-1), 37 $^{\circ}$ C温育5min, 清洗, 测量, 得出相应的相对光强度RLU。

[0095] 结果显示该突变体的效价与野生型相比偏差均在10%以内, 蛋白的灵敏度分析相当, 满足使用需求。

[0096] 3、稳定性实验验证

[0097] 将野生型和突变型肌红蛋白用同一种稀释液稀释到相同的浓度进行稳定性实验, 于2-8 $^{\circ}$ C冰箱以及40 $^{\circ}$ C烘箱分别放置稀释好的肌红蛋白样品, 在第零天、第一天、第三天、第七天分别进行稳定性检测。

[0098] 检测标准:

[0099] 1) 降幅 = (第N天光强值/第零天光强值 - 1) \times 100%

[0100] 2) 2-8 $^{\circ}$ C和40 $^{\circ}$ C的7天内的降幅偏差均在10%以内。

[0101] 结果:

[0102] 1) 突变型肌红蛋白方案7天2-8 $^{\circ}$ C和40 $^{\circ}$ C加速热稳效果降幅均在10%以内, 明显优于野生型肌红蛋白的稳定性。

[0103] 2) 通过定点突变技术, 重组表达得到了稳定性更好的肌红蛋白。

[0104] 结果如表6所示。

[0105] 表6

样本编号	0天	1天				3天			
	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C	40 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C偏差	40 $^{\circ}$ C偏差	2-8 $^{\circ}$ C	40 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C偏差	40 $^{\circ}$ C偏差
野生型	48552	45894	40794	-5%	-11%	45175	36784	-7%	-19%
突变株一	48398	47451	50268	-2%	6%	50721	50809	5%	0%
样本编号	0天	5天				7天			
	2-8 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C	40 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C偏差	40 $^{\circ}$ C偏差	2-8 $^{\circ}$ C	40 $^{\circ}$ C	2-8 $^{\circ}$ C偏差	40 $^{\circ}$ C偏差
野生型	48552	41522	34933	-14%	-16%	41539	31655	-14%	-24%
突变株一	48398	48767	51218	1%	5%	47812	48075	-1%	1%

[0107] 实施例2

[0108] 1、肌红蛋白的定点突变

[0109] 与实施例1的区别在于, 本实施例中的突变位点: G74C+G75C。

[0110] 设计并合成包含有突变位点的正反向突变引物:

[0111] 正向引物: 引物3 (SEQ ID NO: 6): ACCGTTTTGACCGCACTGTGCTGCATTTTGAA GAAGGG。

[0112] 反向引物: 引物4 (SEQ ID NO: 7): CCCTTCTTCTTCAAAATGCAGCACAGTGCGGT CAAAACGGT。

[0113] 其余步骤与实施例1一致。

[0114] 2、定点突变的肌红蛋白在肌红蛋白测定试剂盒中的应用

[0115] 实验步骤与实施例1一致。

[0116] 结果显示该突变体的效价与野生型相比偏差均在10%以内, 蛋白的灵敏度分析相当, 满足使用需求。

[0117] 3、稳定性实验验证

[0118] 实验步骤与实施例1一致。

[0119] 结果:

[0120] 1) 突变型肌红蛋白方案7天2-8℃和40℃加速热稳效果降幅均在10%以内,明显由于野生型的稳定性。

[0121] 2) 通过定点突变技术,重组表达得到了稳定性更好的肌红蛋白。

[0122] 结果如表7所示。

[0123] 表7

样本编号	0天		1天				3天			
	2-8℃	40℃	2-8℃	40℃	2-8℃偏差	40℃偏差	2-8℃	40℃	2-8℃偏差	40℃偏差
野生型	42982	42061	38599	38599	-2%	-8%	40403	35212	-6%	-13%
突变株二	46232	48035	47838	47838	4%	0%	47789	47489	3%	-1%
样本编号	0天		5天				7天			
	2-8℃	40℃	2-8℃	40℃	2-8℃偏差	40℃偏差	2-8℃	40℃	2-8℃偏差	40℃偏差
野生型	42982	38837	31585	31585	-10%	-19%	38339	30092	-11%	-22%
突变株二	46232	47635	45416	45416	3%	-5%	42796	40683	-7%	-5%

[0125] 从以上的描述中,可以看出,本发明上述的实施例实现了如下技术效果:本发明通过对野生型肌红蛋白的G75位点与E86或G74进行定点突变,即G75C+E86C或G74C+G75C,促使其内形成空间二硫键,提高蛋白整体的空间构象稳定性,获得稳定性更强的肌红蛋白突变体。当本申请中的肌红蛋白突变体应用于肌红蛋白测定试剂盒中作为定标品时,相较于野生型肌红蛋白的稳定性更高,且灵敏性相当,既满足检测的需求,提高了检测结果的准确性,还延长了试剂盒的使用时限。

[0126] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。