



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1986814 B

(45) 授权公告日 2010.05.05

(21) 申请号 200510122594.4

CN 1397642 A, 2003.02.19, 说明书第1页第18行至第25行、第5页第8行至第18行.

(22) 申请日 2005.12.23

Frank A. Scappaticci et al.. Statin-AE: Anovel angiostatin-endostatin fusion protein withenhanced antiangiogenic and anti tumor activity. Angiogenesis4. 2001, 4263-268.

(73) 专利权人 王卫星

地址 300191 天津市南开区水上公园路49号6栋1门

(72) 发明人 王卫星

(74) 专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有限公司 12103

代理人 董光仁

毛晓燕, 李仁德, 梁国栋. 血管抑制素和内皮抑制素的协同作用. 医学分子生物学杂志 21. 2005, 2(1), 49-52.

审查员 刘红霞

(51) Int. Cl.

C12N 15/62(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

C12P 21/02(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

(56) 对比文件

US 20050175591 A1, 2005.08.11, 全文.

CN 1224758 A, 1999.08.04, 全文.

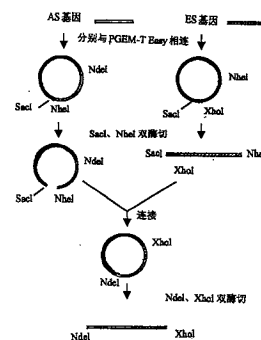
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

(54) 发明名称

血管抑制素与内皮抑制素在大肠杆菌中的融合表达产物及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种血管抑制素与内皮抑制素在大肠杆菌中的融合表达产物及其制备方法,属于遗传工程,或含肽的医药配制品。本发明是从动物肝组织中提取RNA,并进行RNA的反转录,经ES、AS片段PCR扩增和ES、AS片段回收;通过pGEM-T Easy载体上SacI酶切位点和引物上引入的NdeI、NheI、XhoII酶切位点的连接反应,将血管抑制素和内皮抑制素基因连接起来,使其在大肠杆菌中的融合表达产物,不仅具有血管抑制素与内皮抑制素单体的功能,而且具有抗血管生成和抗肿瘤的协同作用。



内皮抑制素基因
血管抑制素基因
pGEM-T Easy 载体

图 1

1. 一种血管抑制素与内皮抑制素在大肠杆菌中的融合表达产物的制备方法,其特征在于:

a. 从动物肝组织中提取 RNA,并进行 RNA 的反转录,分别调取血管抑制素和内皮抑制素全基因序列,进行血管抑制素、内皮抑制素片段 PCR 扩增和血管抑制素、内皮抑制素片段回收;

b. 分别在血管抑制素上游引物中引入 NdeI 酶切位点,内皮抑制素下游引物中引入 XhoI 酶切位点,通过 pGEM-T Easy 载体上 SacI 酶切位点和引物上引入的 NdeI、NheI、XhoI 酶切位点的连接反应,将血管抑制素和内皮抑制素基因连接起来,形成融合基因;

c. 通过感受态细胞的制备,质粒、连接产物的转化,完成重组表达质粒 pET-42(b)/AS-ES 的构建,并在大肠杆菌 BL21 中表达;

d. 表达菌体加入变性液后的变性蛋白按倍比稀释逐步缓慢的加入复性液,经过透析、浓缩后上 5 倍体积平衡缓冲液平衡肝素亲和柱,用洗脱缓冲液洗脱,收集蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述融合表达产物的制备方法,其特征在于:

a. PCR 扩增内皮抑制素片段的扩增条件是:

① 95 °C 5min, ② 94 °C 30sec 降至 55 °C 反应 30sec, 延伸至 72 °C 2min, 循环 30 次, ③ 72 °C 10min; 完成加 A 的过程;

b. PCR 扩增血管抑制素片段的扩增条件是:

① 95 °C 5min, ② 94 °C 30sec 降至 50 °C 反应 30sec 延伸至 72 °C 4min, 循环 30 次, ③ 72 °C 10min。

3. 根据权利要求 1 所述融合表达产物的制备方法,其特征在于:血管抑制素和内皮抑制素基因分别与 pGEM-T Easy 载体连接的方向是血管抑制素基因在 5' 端,内皮抑制素基因在 3' 端。

4. 根据权利要求 1 所述融合表达产物的制备方法,其特征在于感受态细胞的制备是取少量菌液,在无抗生素琼脂平板上划线培养;单菌落接种于无抗生素 LB 培养液试管中,按 1 : 100 吸取菌液接种于 100ml 无抗生素 LB 培养液中,振摇,待菌液呈云雾状时将菌液离心,弃上清,无菌 CaCl₂ 溶液重复洗涤沉淀,冰浴,离心,弃上清,分装后 4 °C 过夜备用。

5. 根据权利要求 1 所述融合表达产物的制备方法,其特征在于:质粒、连接产物的转化是将感受态细胞化冻后冰浴,加入质粒或连接产物,混匀,冰浴、水浴、冰浴,加入无抗生素 LB,振摇使细菌复苏,离心,去上清,新鲜 LB 重悬后,移液至含抗生素的 LB 平板,培养至菌落出现,再做蓝白斑筛选。

6. 根据权利要求 1 所述融合表达产物的制备方法,其特征在于重组表达质粒 pET-42(b)/AS-ES 是用 Nde I+XhoI 双酶切载体 pET-42(b) 和中间克隆质粒 pGEM-T Easy/AS-ES,通过低熔点琼脂糖回收酶切载体及融合基因片段 AS-ES,用 T4 连接酶将融合基因片段 AS-ES 与酶切载体片段连接。

7. 根据权利要求 1 所述融合表达产物的制备方法,其特征在于将重组表达质粒 pET-42(b)/AS-ES 转化大肠杆菌 BL21,挑取阳性单菌落,接种于 3ml 带卡那霉素抗性的 LB 培养液中,37 °C 培养至 OD₆₀₀ = 0.6 时,按 1 : 100 比例接种至 10ml 新鲜带抗性 LB 培养液中,37 °C 220rpm 振摇至 OD₆₀₀ = 0.5 时,加入终浓度为 1mMIPTG 继续振摇 4h。

血管抑制素与内皮抑制素在大肠杆菌中的融合表达产物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及遗传工程技术,或含肽的医药配制品,具体是一种血管抑制素与内皮抑制素在大肠杆菌中的融合表达产物及其制备方法。

背景技术

[0002] 肿瘤是当今世界最难攻克疾病之一。传统药物治疗主要针对异常增殖的肿瘤细胞,但传统的抗肿瘤药物在杀死肿瘤细胞的同时,使正常细胞也不可避免受到损伤,带来严重的毒副作用。抗肿瘤基因工程新药,内源性血管抑制因子血管抑制素(AS)和内皮抑制素(ES)因为其作用特异、无毒副作用,因此,它在肿瘤治疗中越来越受到重视。近来的研究更表明,两者的联合使用具有协同的抗血管生成和抗肿瘤作用。

[0003] 中国专利 1324818 公开了一种“生产内皮抑制素的方法”,其是在编码带有 N 末端附加氨基酸序列的人内皮抑制素的核苷酸序列,其特征是如果不考虑密码子的简并性,其中所说的核苷酸序列,其中所示的 XXX 代表编码中性氨基酸的密码子或不存在。因此,该发明在提高表达产率的基础上大大提高了人内皮抑制素蛋白的产率,同时简化了表达产物的纯化步骤集复性后蛋白质活性的保留。从而大大降低了大批量生产用于临床前检验集临床试用所需的人内皮抑制素的生产成本。

[0004] 中国专利 1195375 公开了一种“血管抑制素片段和集合血管抑制素及其使用方法”,本发明提供了内皮细胞增殖抑制剂的片段和集合形式及使用它们的方法。内皮细胞增殖抑制剂是源于纤溶酶原的蛋白质,具体说是一种血管抑制素片段。血管抑制素片段通常相应与内皮细胞增殖一只剂内的 Krinkle 结构。血管抑制素也以集合形式制备。血管抑制素片段和血管集合抑制素的内皮细胞抑制活性给出了抑制肿瘤的血管生成和治疗血管生成接到的疾病的方法。

发明内容

[0005] 本发明就是为了解决目前临床分别单独使用血管抑制素和内皮抑制素单体的问题,而提供一种血管抑制素和内皮抑制素的融合基因,使其在大肠杆菌中成功表达,并具有在抗血管生成和抗肿瘤作用中发挥协同作用的血管抑制素与内皮抑制素在大肠杆菌中的融合表达产物及其制备方法。为肿瘤的治疗提供了一条新的途径。

[0006] 本发明采用以下技术方案实现的。

[0007] 一种血管抑制素与内皮抑制素在大肠杆菌中的融合表达产物,该表达产物不仅具有血管抑制素与内皮抑制素单体的功能,而且具有抗血管生成和抗肿瘤的协同作用,其核苷酸序列如图 6 所示。

[0008] 一种血管抑制素与内皮抑制素在大肠杆菌中的融合表达产物的制备方法,

[0009] a. 从动物肝组织中提取 RNA,并进行 RNA 的反转录,分别调取血管抑制素和内皮抑制素全基因序列,进行 ES、AS 片段 PCR 扩增和 ES、AS 片段回收;

[0010] b. 分别在AS上游引物中引入NdeI酶切位点,ES下游引物中引入XhoI酶切位点,通过pGEM-T Easy载体上SacI酶切位点和引物上引入的NdeI、NheI、XhoI酶切位点的连接反应,将血管抑制素和内皮抑制素基因连接起来,形成融合基因;

[0011] c. 通过感受态细胞的制备,质粒、连接产物的转化,完成重组表达质粒pET-42(b)/AS-ES的构建,并在大肠杆菌BL21中表达;

[0012] d. 表达菌体加入变性液后的变性蛋白按倍比稀释逐步缓慢的加入复性液,经过透析、浓缩后上5倍体积平衡缓冲液平衡肝素亲和柱,用洗脱缓冲液洗脱,收集蛋白。

[0013] 所述融合表达产物的制备方法,

[0014] a. PCR扩增ES片段的扩增条件是:

[0015] ① 95℃ 5min, ② 94℃ 30sec 降至 55℃ 反应 30sec, 72℃ 延伸 2min, 循环 30 次, ③ 72℃ 10min; 完成加A的过程;

[0016] b. PCR扩增AS片段的扩增条件是:

[0017] ① 95℃ 5min, ② 94℃ 30sec 降至 50℃ 反应 30sec, 72℃ 延伸 4min, 循环 30 次, ③ 72℃ 10min。

[0018] 所述融合表达产物的制备方法,其血管抑制素和内皮抑制素基因分别与pGEM-T Easy载体连接的方向是血管抑制素基因在5'端,内皮抑制素基因在3'端。

[0019] 所述融合表达产物的制备方法,其感受态细胞的制备是取少量菌液,在无抗生素琼脂平板上划线培养;单菌落接种于无抗生素LB培养液试管中,按1:100吸取菌液接种于100ml无抗生素LB培养液中,振荡,待菌液呈云雾状时将菌液离心,弃上清,无菌CaCl₂溶液重复洗涤沉淀,冰浴,离心,弃上清,分装后4℃过夜备用。

[0020] 所述融合表达产物的制备方法,其质粒、连接产物的转化是将感受态细胞化冻后冰浴,加入质粒或连接产物,混匀,冰浴、水浴再冰浴,加入无抗生素LB,振荡使细菌复苏,离心,去上清,新鲜LB重悬后,移液至含抗生素的LB平板,培养至菌落出现,再做蓝白斑筛选。

[0021] 所述融合表达产物的制备方法,其重组表达质粒pET-42(b)/AS-ES是用NdeI+XhoI双酶切载体pET-42(b)和中间克隆质粒pGEM-TEasy/AS-ES,通过低熔点琼脂糖回收酶切载体及融合基因片段AS-ES,用T4连接酶将融合基因片段AS-ES与酶切载体片段连接。

[0022] 所述融合表达产物的制备方法,将重组表达质粒pET-42(b)/AS-ES转化大肠杆菌BL21,挑取阳性单菌落,接种于3ml带卡那霉素抗性的LB培养液中,37℃培养至OD₆₀₀ = 0.6时,按1:100比例接种至10ml新鲜带抗性LB培养液中,37℃ 220rpm振荡至OD₆₀₀ = 0.5时,加入终浓度为1mM IPTG继续振荡4h。

[0023] 本发明的优点在于将血管抑制素和内皮抑制素的基因通过一段Linker连接起来,在大肠杆菌中表达的目的蛋白是血管抑制素和内皮抑制素的融合蛋白。该蛋白在肿瘤治疗的过程中兼具血管抑制素和内皮抑制素的作用,无需同时使用血管抑制素和内皮抑制素单体,就可以表现出两者之间的协同作用,在肿瘤治疗方面具有更好的前景。

附图说明

[0024] 图1是基因融合示意图;

[0025] 图2是转化宿主菌BL21(DE3)后提取质粒鉴定结果;

- [0026] 图 3 是 SDS-PAGE 电泳观察蛋白表达情况；
 [0027] 图 4-1 是重组表达蛋白与 AS 抗体的免疫印记分析；
 [0028] 图 4-2 是重组表达蛋白与 ES 抗体的免疫印记分析；
 [0029] 图 5-1 是对照组；
 [0030] 图 5-2 给药组 (AS-ES)；
 [0031] 图 6 是核苷酸序列。
 [0032] 图 4-1 中：1. 标准分子量, 2. 包含体 3. IPTG 诱导表达前, 4. p IPTG 诱导表达前；
 [0033] 图 4-2 中：1. 标准分子量, 2. IPTG 诱导表达, 3. IPTG 诱导表达前, 4. IPTG 诱导的 pET-42(b) 表达。

具体实施方式

[0034] 以下结合附图及实施例对本发明作进一步说明：

[0035] 1. RNA 的提取：

[0036] 在 50g-100g 的肝组织中加 1ml TRIZOL。4℃ 12000rpm 离心 10 分钟收上清。室温孵育样品 5 分钟, 每 1ml TRIZOL 加 0. 2ml 氯仿, 摇 15 秒, 室温孵育 3 分钟, 4℃ 12000rpm 离心 15 分钟收上清。每 1ml TRIZOL 加 0. 5ml 异丙醇室温孵育 10 分钟, 4℃ 12000rpm 离心 10 分钟弃上清。用 75% 乙醇洗沉淀, 混匀沉淀, 4℃ 8000rpm 离心 5 分钟。晾干沉淀, 将其溶于 DEPC 水中, -20℃ 保存。

[0037] 2. RNA 的反转录

[0038] 按照 Invitrogen 的反转录试剂盒说明书进行。取 3 μl 肝脏总 RNA, 2 μl 下游引物, 1 μl 10mM dNTP, 加 DEPC 水至 12 μl, 于 65℃ 孵育 5 分钟后, 在冰上迅速冷却, 离心甩一下后再加 4 μl 5×buffer, 2 μl, 0. 1M DTT, 1 μl RNase OUTTM, 轻微混匀, 37℃ 放置 2 分钟后, 加 1 μl M-MLVRT α, 混匀, 37℃ 放置 50 分钟, 70℃ 15 分钟终止反应。最后加 1 μl RNaseH 37℃ 放置 20 分钟以消化 RNA。

[0039] 3. 血管抑制素和内皮抑制素全基因序列扩增引物设计与合成

[0040] 从 Genbank 中分别调取血管抑制素和内皮抑制素全基因序列, 通过 Primer 5. 0 辅助设计其引物。在 AS 上游引物中引入 NdeI 酶切位点, ES 下游引物中引入 XhoII 酶切位点, 用一段 Linker 将它们连接起来, Linker 中含有一个 NheI 酶切位点。在 AS 上游引物、ES 下游引物设计中分别含有一段 Linker, 并都包含有 NheI 酶切位点, 最终通过在该位点的连接反应进行基因拼接, 达到基因融合的目的。最终合成的引物见下表：

[0041]

引物名称	序列	酶切位点
AS 上游引物	5' ----gcaattccatagaggaagtccataatcatt---3'	Nde I
AS 下游引物	5' ----cagctagccatgtggacaacaggcggaggtgetac---3'	Nhe I
ES 上游引物	5' ----cagctagccacatgcacagccaccgacttc ---3'	Nhe I
ES 下游引物	5' ----cgctcgagtacttgaggcagtcagtcgaag ---3'	Xho I

[0042] 4. 血管抑制素和内皮抑制素基因分别进行 PCR 扩增

[0043] (1)PCR 扩增 ES 片段

[0044] 40 μ l 反应体系中含 Pfu DNA 聚合酶混合物 20 μ l, cDNA 2 μ l, ES 上游引物 1 μ l, ES 下游引物 1 μ l, ddH₂O 16 μ l。扩增条件是 a) 95 $^{\circ}$ C 5min, b) 94 $^{\circ}$ C 30sec 降至 55 $^{\circ}$ C 反应 30sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 循环 30 次, c) 72 $^{\circ}$ C 10min。反应结束后在反应体系中加入 1 μ l Taq DNA 聚合酶, 继续 70 $^{\circ}$ C 30min, 则完成加 A 的过程。

[0045] (2)PCR 扩增 AS 片段

[0046] 40 μ l 反应体系中含 Pfu DNA 聚合酶混合物 20 μ l, cDNA 2 μ l, AS 上游引物 1 μ l, AS 下游引物 1 μ l, ddH₂O 16 μ l。扩增条件是 a) 95 $^{\circ}$ C 5min, b) 94 $^{\circ}$ C 30sec 降至 50 $^{\circ}$ C 反应 30sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 4min, 循环 30 次, c) 72 $^{\circ}$ C 10min。

[0047] 反应结束后在反应体系中加入 1 μ l Taq DNA 聚合酶, 继续 70 $^{\circ}$ C 30min。

[0048] 5. 血管抑制素和内皮抑制素基因片段的回收

[0049] 按照 QIAGEN 玻璃奶回收试剂盒的说明操作。进行 1% 琼脂糖电泳, 切下目的条带放入 EP 管中, 加 3 倍体积的溶胶缓冲液, 56 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟使胶溶解。再加入 10 μ l 玻璃奶, 室温下放置 5 分钟, 期间每隔 1 分钟弹拨一下, 使玻璃粉保持悬浮状态。10000rpm 离心 30 秒, 弃上清, 再加入 150 μ l 洗液悬起玻璃粉, 吸去管内残余液体, 室温干燥。加入 20 μ l Elution buffer 悬起玻璃粉, 室温下放置 5 分钟。10000rpm 离心 1 分钟, 移上清至一新离心管中, 此为回收的 PCR 产物。

[0050] 6. 血管抑制素和内皮抑制素基因分别与 pGEM-T Easy 载体连接

[0051] 将目的基因片段与 pGEM-T Easy 按 3 : 1 的比例加入 10 \times T4 DNA 连接酶 Buffer 1 μ l, T4 DNA 连接酶 1 μ l, 适量去离子水, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

[0052] 7. 血管抑制素和内皮抑制素的基因融合

[0053] 利用 pGEM-T Easy 载体上 SacI 酶切位点和引物上引入的 NdeI、NheI、XhoI 酶切位点将血管抑制素和内皮抑制素基因连接起来, 形成融合基因, 连接方向是血管抑制素基因在 5' 端, 内皮抑制素基因在 3' 端。基因融合的同时也完成了中间克隆载体的构建。基因融合示意图见图 1。

[0054] 8. 感受态细胞的制备

[0055] 以无菌铂丝蘸取少量菌液 (DH-5 α 或 BL21), 在琼脂平板 (无抗生素) 上划线, 37 $^{\circ}$ C 培养 16h。挑取单菌落接种于无抗生素 LB 培养液试管中, 37 $^{\circ}$ C 220rpm 振摇 14h。按 1 : 100 吸取菌液接种于 100ml 无抗生素 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 220rpm 振摇 1-2h, 待菌液呈云雾状时将菌液 5000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 弃上清。用 10ml 预冷的 0.1M 无菌 CaCl₂ 溶液洗沉淀, 冰浴 20-30min, 5000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 弃上清。用约 2.8ml 0.1M 无菌 CaCl₂ 溶液重悬沉淀, 分装后 4 $^{\circ}$ C 过夜备用。

[0056] 9. 质粒、连接产物的转化

[0057] 取一管感受态细胞, 化冻后置于冰浴, 加入 1 μ l 质粒或 5 μ l 连接产物, 轻轻旋转以混匀, 冰浴 30-50min 后, 42 $^{\circ}$ C 水浴 90 秒, 再次冰浴 3min, 加入 800 μ l 无抗生素 LB, 120rpm 振摇 45min 使细菌复苏, 4000rpm 离心 10min, 去上清, 以 200 μ l 新鲜 LB 重悬后, 以微量移液器吸取混和物至含抗生素的 LB 平板, 玻棒轻轻涂匀, 室温下待液体吸收后, 倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养 12h 以上至菌落出现。

[0058] 在做蓝白斑筛选时复苏后涂板的菌液中要加入 40 μ l 20mg/ml 的 X-Gal 和 4 μ l

200mg/ml 的 IPTG,其它步骤同上。

[0059] 10. 质粒的提取及序列测定

[0060] 从新鲜转化的 LB 平板上挑选经过酶切鉴定正确的单菌落,接种于含抗性的 LB 中,37℃ 培养 10h 以上。取 1ml 菌液于 EP 管中,12000rpm 离心 30 秒,弃上清并晾干沉淀。加入 100 μ l 溶液 I 混匀沉淀,再加入 200 μ l 溶液 II,颠倒混匀,冰浴 5 分钟后加入溶液 III 混匀,冰浴 10 分钟。12000rpm 离心 10 分钟收取上清。分别加入等量的酚:氯仿和等量氯仿进行抽提,12000rpm 离心 5 分钟收取上清。加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA,颠倒混匀,-20℃ 沉淀 30 分钟。4℃ 10000rpm 离心 10 分钟,弃上清,用 70% 乙醇洗沉淀,弃上清,晾干沉淀,加 1 μ l 的 RNase 和 20 μ l TE 溶解 DNA,37℃ 孵育 30 分钟后保存。提取的质粒采用 T7 和 SP6 通用引物从正反方向测定核苷酸序列如图 6。

[0061] 11. 重组表达质粒 pET-42(b)/AS-ES 的构建

[0062] 用 Nde I+Xho I 双酶切载体 pET-42(b) 和中间克隆质粒 pGEM-TEasy/AS-ES,通过低熔点琼脂糖回收酶切载体及融合基因片段 AS-ES,用 T4 连接酶将融合基因片段 AS-ES 与酶切载体片段连接(方法见前),得到重组表达质粒 pET-42(b)/AS-ES。

[0063] 重组表达质粒在转化宿主菌 BL21(DE3) 后提取质粒,进行 Nde I+Xho I 双酶切,可以鉴定目的基因是否插入。鉴定结果见图 2:

[0064] 12. 目的蛋白在大肠杆菌 BL21 中的表达

[0065] 重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21,挑取阳性单菌落,接种于 3ml 带卡那霉素抗性的 LB 培养液中,37℃ 培养至 $OD_{600} = 0.6$ 时,按 1:100 比例接种至 10ml 新鲜带抗性 LB 培养液中,37℃ 220rpm 振摇至 $OD_{600} = 0.5$ 时,加入终浓度为 1mM IPTG 继续振摇 4h。

[0066] 表达菌体进行超声波破碎,12000rpm 离心 10 分钟,收集菌体沉淀和上清,分别加入等量 1 \times 与 2 \times 样品缓冲液,进行 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳(浓缩胶 80V,分离胶 100V),经考马斯亮蓝 R250 染色、脱色后,分析目的蛋白的表达形式。SDS-PAGE 电泳观察蛋白表达情况见图 3:

[0067] 13. 包涵体的洗涤

[0068] 将包涵体以 TE 重悬,振摇洗涤 4h,12000rpm 离心 10 分钟弃上清,沉淀再以 2% Triton-x100 重悬,静置 2h,12000rpm 离心 10 分钟弃上清,沉淀再以 4M 尿素重悬,静置 2h,12000rpm 离心 10 分钟弃上清。

[0069] 14. 包涵体的变、复性

[0070] 称量包涵体质量,按 1g:10ml 加入变性液(8M 尿素+5mM EDTA+100mM 2-巯基乙醇+500mM NaCl+50mM TrisCl),混匀后,室温静置 2-3h,12000rpm 4℃ 离心 15min,弃沉淀。用变性剂将变性蛋白的浓度调至 0.3mg/ml 以下,按倍比稀释逐步缓慢的加入复性液,直至溶液中尿素浓度为 1M。

[0071] 15. 肝素亲和层析

[0072] 复性后的样品经过透析、浓缩后可以上柱。用 5 倍体积平衡缓冲液平衡肝素亲和柱。将制备好的样品上柱。用 10mM TrisCl 洗柱直至 A_{280} 不再检测出蛋白。用洗脱缓冲液洗脱,收集蛋白峰。

[0073] 16. 重组表达蛋白的免疫印迹分析

[0074] 诱导后的全菌体进行 12% SDS-PAGE 电泳,恒流 80mA 转膜 3h,通过预染 Marker 观

察是否转膜完全。电转后的硝酸纤维素滤膜 4℃封闭过夜,加入 I 抗,室温下孵育 2h, PBST 洗 3 遍,每次 10min,加入 II 抗,室温下孵育 2h, PBST 洗 5 遍,每次 10min。在 10ml 的 10mM Tris-Cl 溶液中溶解 6mg 的二氨基联苯胺,加入 100 μ l 3% NiCl 和 10 μ l H₂O₂,混匀后立即使用,于室温轻轻摇动,至蛋白带颜色明显终止反应。结果见图 4-1,4-2。

[0075] 17. 重组表达蛋白的生物学活性检测

[0076] 应用鸡胚尿囊膜对重组蛋白生物学活性进行检测。选 4 日龄鸡胚,照检后划出气室、胎位,于鸡胚胎面之卵壳上划一三角形,碘酒消毒卵壳,用蛋钻于壳上开一三角形裂痕,不可损伤壳膜,并于气室中央开一小孔。用针头去除卵壳,造成卵窗,勿损及壳膜。在卵窗处壳膜中央滴一滴灭菌生理盐水,然后用针尖循卵壳膜纤维方向划破一隙,不可损伤下面的绒毛尿囊膜。然后以吸耳球紧按气室小孔向外吸气,使造成负压,盐水小滴即自裂隙沿绒毛尿囊膜及壳膜之间渗入,从而使绒毛尿囊膜下陷,因此在绒毛尿囊膜上造成人工气室,加入接种物,将鸡胚轻轻地旋转使接种物扩散到人工气室之下的整个绒毛尿囊膜,用消毒胶布封窗口,然后将接种鸡胚放置于水平位置使人工气室朝上,于 37℃温箱培养。结果见图 5-1、5-2。

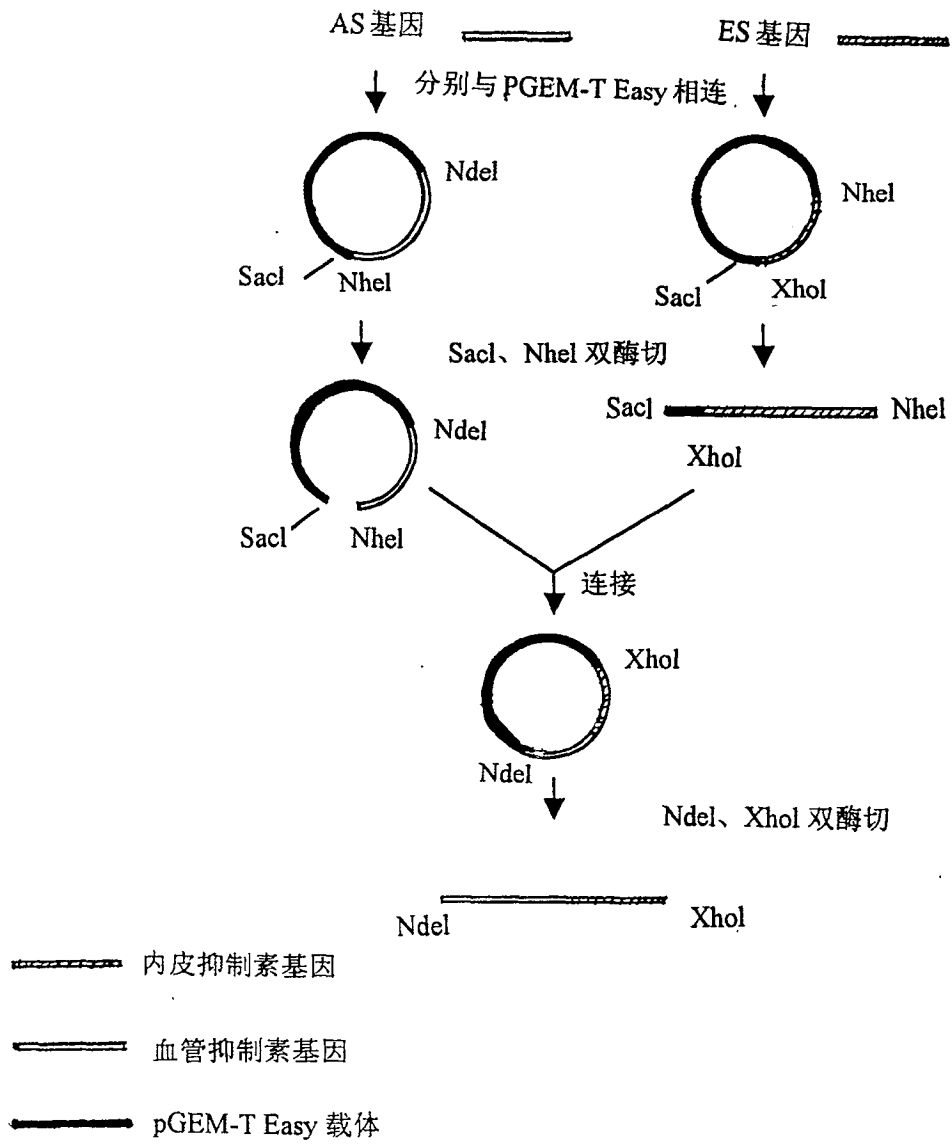


图 1

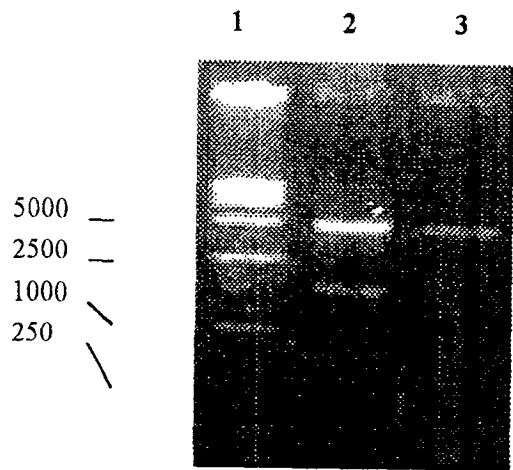


图 2

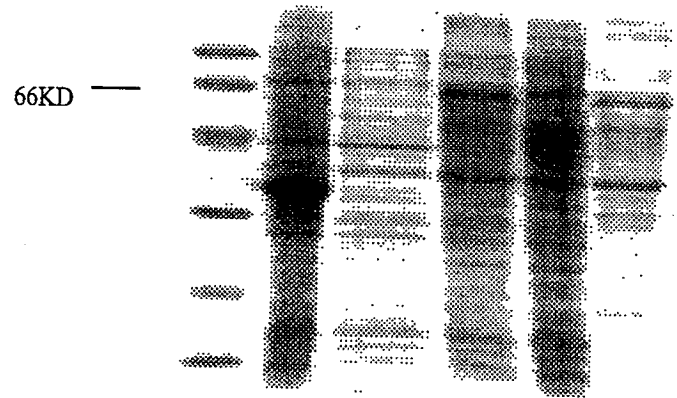


图 3

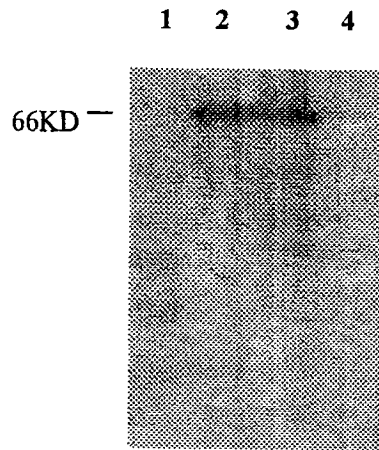


图 4-1

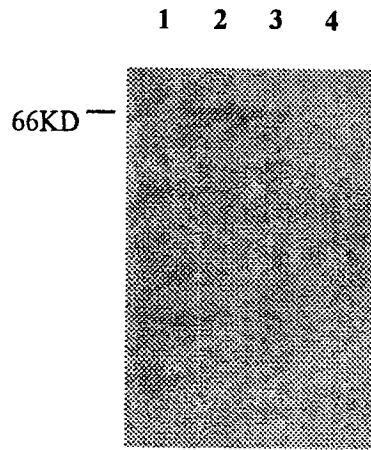


图 4-2

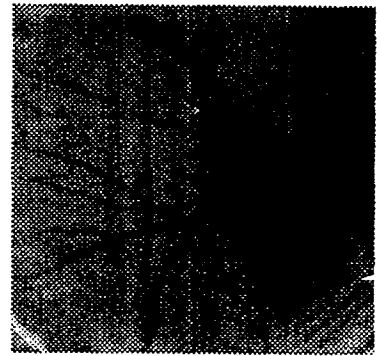


图 5-1



图 5-2

ctagaaataa ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca tatgaggaag tcctccataa	60
tcattaggat gagagatgta gttttatgtg aaaagaaagt gtatctctca gagtgcaga	120
ctgggaatgg aaagaactac agagggacga tgtccaaaac aaaaaatgga atcacctgtc	180
aaaaatggag ttccacttct cccacagac ctagattctc acctgctaca caccctcag	240
agggactgga ggagaactac tgcaggaate cagacaacga tccgcagggg ccctggtgct	300
atactactga tccagaaaag agatatgact actgogacat tcttgagtgt gaagaggaat	360
gtatgcattg cagtggagaa aactatgacg gcaaaatttc caagaccatg tctggactgg	420
aatgccaggc ctgggactct cagagcccac acgctcatgg atacattcct tccaaatttc	480
caacaagaa cctgaagaag aattactgtc gtaacccga tagggagctg cggccttgg	540
gtttcaccac cgaccccaac aagcctggg aactttgca catccccgc tgcacaacac	600
ctccaccatc ttctggtccc acctaccagt gtctgaaggg aacaggtgaa aactatcgcg	660
ggaatgtggc tgttaccgtg tccgggcaca cctgtcagca ctggagtgca cagaccctc	720
acacacataa caggacacca gaaaactttc cctgcaaaaa tttgatgaa aactactgcc	780
gcaatcctga cggaaaaagg gccccatggt gccatacaac caacagccaa gtgcggtggg	840
agtactgtaa gataccgtcc tgtgactcct cccagtate caoggaaca ttggetcca	900
cagcaccacc tgagctaacc cctgtggtcc aggactgcta ccatggtgat ggacagagct	960
accgaggcac atcctccacc accaccacag gaaagaagtg tcagtcttgg tcatctatga	1020
caccacaccg gcaccagaag accccagaaa actacccaaa tgctggcctg acaatgaact	1080
actgcaggaa tccagatgcc gataaaggcc cctggtgttt taccacagac cccagctca	1140
ggtgggagta ctgcaacctg aaaaaatgct caggaacaga agcgagtgtt gtagcacctc	1200
cgctgttgt ccacatggt agccacatgc acagccaccg cgacttcag ccggtgctcc	1260
acctggttgc gctcaacagc cccctgtcag gcggcatgcg gggcatccgc gggccgact	1320
tccagtgtt ccagcaggcg cgggcctggt ggtgtggcgg caccttcgc gccttctgt	1380
ctcgcgct gcaggacctg tacagcatcg tgcgcctgc cgaccgcga gccgtgcca	1440
tgtcaacct caaggacgag ctgctgttcc ccagctggga ggctctgttc tcaggtctg	1500
agggtccgct gaagcccggg gcacgcatct tctccttga cggcaaggac gtcctgaggc	1560
acccacctg gcccagaag agcgtgtggc atggtcggga cccaacggg cgcaggetga	1620
ccgagagcta ctgtgagacg tggcggacgg aggtccctc ggccacgggc caggcctct	1680
cgctgctggg gggcaggctc ctgggcaga gtgcccgag ctgccatcac gectacatcg	1740
tgtctgcat tgagaacagc ttcattgactg cctccaagta actogagcac caccaccacc	1800
accaccacca ctaattgatt aatacctagg ctgctaaaca aagc	1844

图 6