



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111534495 B

(45) 授权公告日 2022.06.17

(21) 申请号 202010406876.1

审查员 彭海航

(22) 申请日 2020.05.14

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111534495 A

(43) 申请公布日 2020.08.14

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(72) 发明人 高晓冬 项梦海 王宁 陆天天

(74) 专利代理机构 南京禹为知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 32272

专利代理师 吴肖敏

(51) Int. Cl.

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

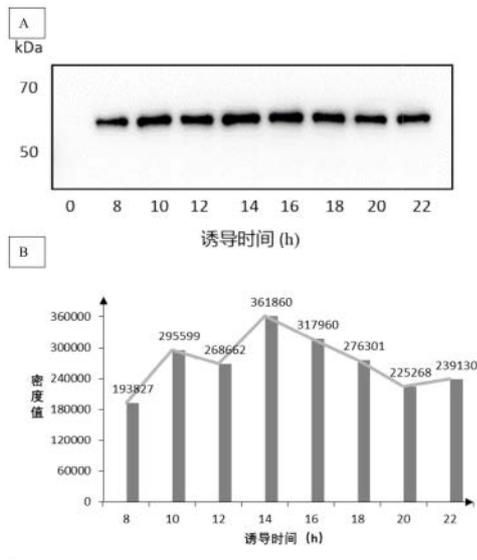
序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

一种提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II可溶性表达的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II可溶性表达的方法,其中,一种提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其包括,构建截短型N-乙酰葡萄糖胺转移酶II,得GnT-II-ΔTM,序列如SEQ ID NO: 1所示;构建重组表达质粒;将所述重组表达质粒转化表达宿主菌,构建重组原核表达菌株;培养所述重组原核表达菌株,诱导表达。本发明在大肠杆菌中成功表达并提高重组人源GnT-II的可溶性表达量,且该酶在体外具有催化活性,解决了哺乳动物膜蛋白GnT-II原核表达极易降解、纯化困难的技术问题,可以大量制备重组GnT-II。



1. 一种提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其特征在于:包括,

构建截短型N-乙酰葡萄糖胺转移酶II,得GnT-II- Δ TM,序列如SEQ ID NO:1所示;

构建重组表达质粒;

将所述重组表达质粒转化表达宿主菌,构建重组原核表达菌株,所述宿主菌包括大肠杆菌Rosetta、Rosetta gami2菌株中的一种或几种;

培养所述重组原核表达菌株,诱导表达。

2. 如权利要求1所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其特征在于:所述N-乙酰葡萄糖胺转移酶II为人源N-乙酰葡萄糖胺转移酶II,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;所述表达质粒为pET28a,所述重组表达质粒为pET28a-GnT-II- Δ TM-Trx,构建所述重组表达质粒使用的引物序列如SEQ ID NO:3~6所示;所述诱导表达的诱导剂为IPTG。

3. 如权利要求2所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其特征在于:所述IPTG的诱导浓度为0~2000 μ M,所述诱导表达的时间为6~24h。

4. 如权利要求3所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其特征在于:所述IPTG的诱导浓度为50~1000 μ M,所述诱导表达的时间为10~16h。

5. 如权利要求1~4任一所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其特征在于:所述培养为将所述重组原核表达菌株接种到液体培养基中,过夜培养活化菌株,再转接到扩大培养基中进行扩大培养。

6. 如权利要求5所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其特征在于:所述液体培养基为卡那霉素+氯霉素或卡那霉素+氯霉素+四环素+链霉素液体培养基,所述扩大培养基包括蛋白胨12g/L、酵母粉24g/L,甘油5g/L、 KH_2PO_4 2.31g/L、 K_2HPO_4 16.8g/L中的一种或几种。

7. 如权利要求6所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其特征在于:所述诱导表达,其为将1%活化的重组大肠杆菌震荡培养至 $\text{OD}_{600}=1$ 时,移至16 $^{\circ}\text{C}$ 降温,加入IPTG,在16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养。

8. 如权利要求1~4、6或7任一所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其特征在于:

所述转化,其过程为:各取1 μ L质粒(100ng/ μ L)分别转入50 μ L的Rosetta (DE3) 和50 μ L的Rosetta gami2 (DE3) 感受态中,冰上孵育30min,42 $^{\circ}\text{C}$ 热激1min,转移至冰上2min,最后涂布于含有需要的抗生素的固体平板上;

所述表达,其为先在37 $^{\circ}\text{C}$ 、200r/min条件下震荡培养所述表达宿主菌,使 OD_{600} 达到1.0,降温至16 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养,加入IPTG,在16 $^{\circ}\text{C}$ 、200r/min诱导培养。

9. 如权利要求8所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其特征在于:获得的N-乙酰葡萄糖胺转移酶II底物的催化底物包括Fmoc-Asn-GlcNAc2Man3GlcNAc,N-乙酰葡萄糖胺转移酶II的寡糖供体为UDP-GlcNAc。

10. 如权利要求7或8所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其特征在于:表达出的GnT-II- Δ TM-Trx蛋白用于催化Fmoc-Asn-GlcNAc2Man3GlcNAc,转化率为100%。

一种提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II可溶性表达的方法

技术领域

[0001] 本发明属于重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II可溶性表达技术领域,具体涉及一种提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II可溶性表达的方法。

背景技术

[0002] 糖基化是指对蛋白质或脂质进行糖(寡糖)的修饰形成糖复合物的过程,是真核细胞翻译后修饰的主要形式之一。蛋白质的N-糖基化修饰直接影响蛋白的结构和功能,具有重要的生理意义。N-寡糖具有多种形式,其生物合成路径由多种糖基转移酶的参与,故糖基转移酶的制备和性质研究是糖科学领域的重要方向之一。N-乙酰葡萄糖胺转移酶II(即GnT-II)是高等真核生物细胞糖蛋白N-糖链加工的关键酶之一,催化复合型N-糖链的形成。

[0003] 目前人源N-乙酰葡萄糖胺转移酶II的表达只在昆虫细胞、动物细胞及酵母细胞表达体系中成功实现,其中昆虫细胞与动物细胞表达的蛋白完成了纯化,然而其产量很低且耗资较大,即GnT-II蛋白的体外大量活性表达至今尚未实现。原核表达系统,如大肠杆菌,具有产量高、干扰蛋白少等优点,是理想的体外大量表达重组GnT-II蛋白的体系。然而至今还未曾有大肠杆菌表达人源GnT-II的报道,主要原因是GnT-II为高尔基体驻留的膜蛋白,在原核体系中易降解;同时人源蛋白原核表达也常因表达量高、二硫键不能正确形成等原因产生大量无活性的包涵体。针对这些问题,通常是将包涵体用尿素溶解变性后进行复性。但此过程步骤繁琐,成功率低。目前重组截短型人源GnT-II(GnT-II- Δ TM)已在大肠杆菌中成功表达且具有活性,但生产的大部分蛋白为包涵体,如何提高其可溶性表达量是本领域的难点。

发明内容

[0004] 本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。在本部分以及本申请的说明书摘要和发明名称中可能会做些简化或省略以避免使本部分、说明书摘要和发明名称的目的模糊,而这种简化或省略不能用于限制本发明的范围。

[0005] 鉴于上述的技术缺陷,提出了本发明。本发明通过利用不同的大肠杆菌菌株、采用不同的诱导时间以及改变诱导剂IPTG的浓度等方法,显著提高了重组人源GnT-II蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达量。

[0006] 因此,作为本发明其中一个方面,本发明克服现有技术中存在的不足,提供一种提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II可溶性表达的方法。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明提供了如下技术方案:一种提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法,其包括,构建截短型N-乙酰葡萄糖胺转移酶II,得GnT-II- Δ TM,序列如SEQ ID NO:1所示;构建重组表达质粒;将所述重组表达质粒转化表达宿主菌,构建重组原核表达菌株;培养所述重组原核表达菌株,诱导表达。

[0008] 作为本发明所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法的优选方案,其中:所述N-乙酰葡萄糖胺转移酶II为人源N-乙酰葡萄糖胺转移酶II,其氨

基酸序列如SEQ ID NO:2所示;所述表达质粒为pET28a,所述重组表达质粒为pET28a-GnT-II- Δ TM-Trx,构建所述重组表达质粒使用的引物序列如SEQ ID NO:3~6所示;所述表达宿主菌包括大肠杆菌Rosetta、Rosetta gami2菌株中的一种或几种;所述诱导表达的诱导剂为IPTG。

[0009] 作为本发明所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法的优选方案,其中:所述IPTG的诱导浓度为0~2000 μ M,所述诱导表达的时间为6~24h。

[0010] 作为本发明所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法的优选方案,其中:所述IPTG的诱导浓度为50~1000 μ M,所述诱导表达的时间为10~16h。

[0011] 作为本发明所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法的优选方案,其中:所述培养为将所述重组原核表达菌株接种到液体培养基中,过夜培养活化菌株,再转接到扩大培养基中进行扩大培养。

[0012] 作为本发明所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法的优选方案,其中:所述液体培养基为卡那霉素+氯霉素或卡那霉素+氯霉素+四环素+链霉素液体培养基,所述扩大培养基包括蛋白胨12g/L、酵母粉24g/L,甘油5g/L、 KH_2PO_4 2.31g/L、 K_2HPO_4 16.8g/L中的一种或几种。

[0013] 作为本发明所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法的优选方案,其中:所述诱导表达,其为将1%活化的重组大肠杆菌震荡培养至 $\text{OD}_{600}=1$ 时,移至16 $^{\circ}\text{C}$ 降温,加入IPTG,在16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养。

[0014] 作为本发明所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法的优选方案,其中:所述转化,其过程为:各取1 μ L质粒(100ng/ μ L)分别转入50 μ L的Rosetta和50 μ L的Rosetta gami2感受态中,冰上孵育30min,42 $^{\circ}\text{C}$ 热激1min,转移至冰上2min,最后涂布于含有需要的抗生素的固体平板上;所述表达,其为先在37 $^{\circ}\text{C}$ 、200r/min条件下震荡培养所述表达宿主菌,使 OD_{600} 达到1.0,降温至16 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养,加入IPTG,在16 $^{\circ}\text{C}$ 、200r/min诱导培养。

[0015] 作为本发明所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法的优选方案,其中:获得的N-乙酰葡萄糖胺转移酶II底物的催化底物包括Fmoc-Asn-GlcNAc2Man3GlcNAc,N-乙酰葡萄糖胺转移酶II的寡糖供体为UDP-GlcNAc。

[0016] 作为本发明所述的提高重组N-乙酰葡萄糖胺转移酶II在大肠杆菌中可溶性表达量的方法的优选方案,其中:表达出的GnT-II- Δ TM-Trx蛋白用于催化Fmoc-Asn-GlcNAc2Man3GlcNAc,转化率为100%。

[0017] 本发明的有益效果:

[0018] 本发明为使该GnT-II- Δ TM-Trx大量可溶性蛋白,构建N-乙酰葡萄糖胺转移酶II基因得原核表达载体,并针对蛋白表达条件进行一系列优化,发现当诱导时间为14h,其表达量最佳;随着IPTG浓度得增加,蛋白表达量逐渐增加,最佳诱导浓度为100 μ M;在16 $^{\circ}\text{C}$,IPTG浓度为100 μ M诱导14h时,表达量最佳。经Westren blot检测,得到为58kDa的目的条带,为GnT-II- Δ TM-Trx蛋白预期大小。最终得到GnT-II- Δ TM-Trx可溶性蛋白。该结果解决了寡糖结构GlcNAc2Man3GlcNAc2的酶法合成瓶颈以及为研究复合型糖链的生理特性奠定基础,

推动糖化学与糖生物学的发展,也为医药糖蛋白的研制提供思路。

附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。其中:

[0020] 图1为GnT-II- Δ TM-Trx蛋白免疫印迹(Western blot)检测,1:诱导前细胞裂解液,2:诱导后细胞裂解液,抗体:anti-His;

[0021] 图2为GnT-II蛋白在体内反应过程(图2A)和GnT-II- Δ TM-Trx蛋白活性HPLC检测图(图2B) 1:GnT-II- Δ TM-Trx反应体系和底物Fmoc-Asn-GlcNAc2Man3GlcNAc标准样品混合物,2:GnT-II- Δ TM-Trx反应体系,3:底物Fmoc-Asn-GlcNAc2Man3GlcNAc标准样品;进样量分别为15 μ L,45 μ L;

[0022] 图3为Western blot检测最佳表达菌株的结果图;

[0023] 图4为Western blot检测最佳IPTG诱导浓度的结果图;

[0024] 图5为Western blot检测最佳诱导时间的结果图(图5A)及其定量分析数据图(图5B)。

具体实施方式

[0025] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

[0026] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明,但是本发明还可以采用其他不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似推广,因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

[0027] 其次,此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个实施例中”并非均指同一个实施例,也不是单独的或选择性的与其他实施例互相排斥的实施例。

[0028] 实施例中所涉及的试剂:限制性内切酶、TaqDNA聚合酶、连接酶购自日本TaKaRa公司,寡糖底物Fmoc-Asn-GlcNAc2Man3GlcNAc来自日本产业技术综合研究所馈赠,胶回收、PCR产物纯化和质粒提取试剂盒及IPTG购于上海生工生物工程公司,UDP-GlcNAc购于青岛曙格公司,其余试剂购于国药。引物合成及测序均在天霖生物科技。

[0029] 本发明在前期摸索中,尝试表达过全长的,但没有任何活性。

[0030] 检测体系:

[0031] 第一步是将预先连接在固相载体CPG上的活性基团被保护的核苷酸与三氯乙酸反应,脱去其5'-羟基的保护基团DMT,获得游离的5'-羟基。

[0032] 第二步,合成DNA的原料,亚磷酰胺保护核苷酸单体,与活化剂四氮唑混合,得到核苷亚磷酸活化中间体,它的3'端被活化,5'-羟基仍然被DMT保护,与溶液中游离的5'-羟基发生缩合反应。

[0033] 第三步,带帽反应,缩合反应中可能有极少数5'-羟基没有参加反应(少于2%),用

乙酸酐和1-甲基咪唑终止其后继续发生反应,这种短片段可以在纯化时分离掉。

[0034] 第四步,在氧化剂碘的作用下,亚磷酸形式转变为更稳定的磷酸三酯。

[0035] 经过以上四个步骤,一个脱氧核苷酸被连接到固相载体的核苷酸上。再以三氯乙酸脱去它的5'-羟基上的保护基团DMT,重复以上步骤,直到所有要求合成的碱基被接上去。

[0036] 通过氨水高温处理,连接在CPG上的引物被切下来,通过OPC、PAGE等手段纯化引物,成品引物用C18浓缩、脱盐,沉淀。沉淀后的引物用水悬浮,测定OD₂₆₀定量,根据定单要求分装。

[0037] 运行体系:取0.2-0.50D的引物,用尿素饱和液溶解或引物溶液中加入尿素干粉直到饱和,上样前加热变性(95℃,2mins)。600V电压进行电泳,一定时间后(约2-3小时),剥胶,用荧光TLC板在紫外灯下检测带型。

[0038] 表1引物序列信息

名称	序列信息	编号
Trx-Fw	aaaaaagccttatgagcgataaaattattcacctgactgac	SEQ ID NO:3
Trx-Rv	aaaactcgagggccaggttagcgctcgaggaactcttt	SEQ ID NO:4
GnT-II-ΔTM-Fw	aaaaggatcccgacaagaagaacgaggccc	SEQ ID NO:5
GnT-II-ΔTM-Rv	aaaaaagccttctgcagctctctataacttttacagag	SEQ ID NO:6

[0040] 实施例1:GnT-II-ΔTM-Trx蛋白的诱导表达

[0041] 1、获得GnT-II-ΔTM-Trx的重组原核表达菌株

[0042] 挑选测序成功的单菌落接种到50μg/mL卡那霉素液体培养基中,37℃,200rpm过夜培养,按照生工质粒小量提取试剂盒将pET28a-GnT-II-ΔTM-Trx重组表达载体提取出来,取重组表达载体转化到大肠杆菌Rosetta (DE3)、Rosetta gami2 (DE3) 菌株,检测GnT-II-ΔTM-Trx蛋白的表达。转化过程:各取1uL质粒(100ng/uL)分别转入50μL的Rosetta (DE3)和50μL的Rosetta gami2 (DE3)感受态中,冰上孵育30min,42℃热激1min,转移至冰上2min,最后涂布于含有需要的抗生素的固体平板上。

[0043] 2、过夜培养活化菌株

[0044] 过夜培养活化上述的重组原核表达菌株。例如,将Rosetta (DE3) 菌株转接到50μg/mL卡那霉素+34μg/mL氯霉素液体培养基,将Rosetta gami2 (DE3) 菌株转接到50μg/mL卡那霉素+34μg/mL氯霉素+50μg/mL四环素+50μg/mL链霉素液体培养基中,37℃、200rpm过夜培养活化菌株。

[0045] 3、诱导培养

[0046] 将活化的重组原核表达菌株转接到含相应抗生素的液体培养基,例如,将活化的Rosetta (DE3) 菌株转接到50μg/mL卡那霉素+34μg/mL氯霉素液体培养基中,将Rosetta gami2 (DE3) 菌株转接到50μg/mL卡那霉素+34μg/mL氯霉素+50μg/mL四环素+50μg/mL链霉素液体培养基中,37℃震荡培养至OD₆₀₀=1时,加入终浓度100μM的IPTG,在16℃诱导培养14h,获得GnT-II-ΔTM-Trx的重组蛋白。

[0047] 实例2:GnT-II-ΔTM-Trx的体外活性检测

[0048] 标准的酶活性检测体系如下(50μL):100mM MES/NaOH(pH 6.0),10mM MnCl₂,0.2μM Fmoc-GlcNAc2Man3,0.2mM UDP-GlcNAc,20μg/mL GnT-I-ΔTM,200μg/mL GnT-II-ΔTM,反应体系在37℃下孵育大于5h。反应结束后将反应体系18,000g离心5min,取上清通过高效

液相色谱检测并将反应体系与标准样品对比。

[0049] 高效液相色谱检测条件如下:采用仪器为高效液相色谱仪Alliance e2695HPLC (Waters),所用荧光检测器为2475FLR Detector (Waters),所用液相色谱柱为氨基柱 (TOSHO TSKgel Amide-80 3 μ m 4.6 \times 150mm),其中检测Fmoc标签糖链,荧光检测器所用激发波长260nm,检测波长为315nm;洗脱条件为乙腈(CH₃CN)-醋酸铵(NH₄OAc)线性梯度洗脱(溶液A:CH₃CN;溶液B:0.2M NH₄OAc pH 5.0;洗脱条件:0-35min,85%-55%A;35min-40min,55%-20%A;40-45min,20%-84%A;45-50min,85%A;流速:1mL/min)分离底物和产物。活性检测结果在图2B,line2为体外活性检测体系的HPLC,结果显示底物完全转化为产物。

[0050] 实例3:GnT-II- Δ TM-Trx蛋白诱导表达条件的优化

[0051] 1、获得GnT-II- Δ TM-Trx的重组表达菌株

[0052] 挑选实施例1中测序成功的单克隆接种到50 μ g/mL卡那霉素液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200rpm过夜培养,按照生工质粒小量提取试剂盒pET28a-GnT-II- Δ TM-Trx重组表达载体提取出来,取重组表达载体转化大肠杆菌Rosetta (DE3)、Rosetta gami2 (DE3) 菌株,涂布于含50 μ g/mL卡那霉素+34 μ g/mL氯霉素 (Rosetta gami2 (DE3) 补加50 μ g/mL四环素+50 μ g/mL链霉素) 平板上进行过夜培养,挑取单菌落接种到含50 μ g/mL卡那霉素+34 μ g/mL氯霉素 (Rosetta gami2 (DE3) 补加50 μ g/mL四环素+50 μ g/mL链霉素) 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200rpm过夜培养,在菌液中加入,灭菌的50%甘油,混匀后冻存于-80 $^{\circ}$ C冰箱,得到表达的GnT-II- Δ TM-Trx的原核表达菌株。

[0053] 2、GnT-II- Δ TM-Trx蛋白诱导表达最佳菌株的确定

[0054] 分别接种上述的重组原核表达菌株Rosetta (DE3)、Rosetta gami2 (DE3) 菌株,到含50 μ g/mL卡那霉素+34 μ g/mL氯霉素 (Rosetta gami2 (DE3) 补加50 μ g/mL四环素+50 μ g/mL链霉素) 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C震荡培养OD₆₀₀=1,加入终浓度100 μ M的IPTG,在16 $^{\circ}$ C诱导培养14h(取未诱导的菌做阴性对照)。诱导完成后4 $^{\circ}$ C,9000g离心1min,分离可溶性蛋白和包涵体。收集菌体,细菌沉淀于阴性对照用1.5mL预冷buffer悬浮,用超声破碎仪进行细胞破碎,每次2s,每次间隔2s,共90s;9000g离心30min,取上清,Western blot检测,测试最佳表达菌株,结果如图3所示,GnT-II- Δ TM-Trx蛋白诱导表达的最佳菌株是Rosetta gami2 (DE3)。

[0055] 3、GnT-II- Δ TM-Trx蛋白诱导表达最佳IPTG浓度的确定

[0056] 接种上述的重组原核表达菌株Rosetta gami2 (DE3) 菌株,到含50 μ g/mL卡那霉素+34 μ g/mL氯霉素+50 μ g/mL四环素+50 μ g/mL链霉素液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200rpm过夜培养活化菌株。将活化的重组原核表达菌株转接到含50 μ g/mL卡那霉素+34 μ g/mL氯霉素+50 μ g/mL四环素+50 μ g/mL链霉素液体培养基中,37 $^{\circ}$ C震荡培养至OD₆₀₀=1时,分别加入终浓度为0 μ M,10 μ M,25 μ M,50 μ M,75 μ M,100 μ M,500 μ M,1000 μ M,2000 μ M的IPTG,在16 $^{\circ}$ C诱导培养12-16h(取未诱导的菌做阴性对照)。诱导完成后4 $^{\circ}$ C,9000g离心1min,收集菌体,细菌沉淀与阴性对照1.5mL遇冷buffer悬浮,用超声破碎仪进行细胞破碎,每次2s,每次间隔2s,共90s;9000g离心30min,取上清,Western blot检测,测试最佳表达IPTG诱导浓度,结果如图4所示,GnT-II- Δ TM-Trx蛋白诱导表达最佳IPTG浓度是100 μ M。肉眼可见100和500的表达量无明显差异,为了节约诱导剂,因此选择了100 μ M。

[0057] 4、GnT-II- Δ TM-Trx蛋白诱导表达最佳时间的确定

[0058] 接种上述的重组原核表达菌株Rosetta gami2 (DE3) 菌株,到含50 μ g/mL卡那霉素+

34 μ g/mL氯霉素+50 μ g/mL四环素+50 μ g/mL链霉素液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200rpm过夜培养活化菌株。将活化的重组原核表达菌株转接到含50 μ g/mL卡那霉素+34 μ g/mL氯霉素+50 μ g/mL四环素+50 μ g/mL链霉素液体培养基中,37 $^{\circ}$ C震荡培养至OD₆₀₀=1时,加入终浓度为100 μ M的IPTG,分别诱导8h,10h,12h,14h,16h,18h,20h,22h(取pET28a-Trx菌作阴性对照)。诱导完成后4 $^{\circ}$ C,9000g离心1min,收集菌体,细菌沉淀与阴性对照1.5mL遇冷buffer悬浮,用超声破碎机进行细胞破碎,每次2s,每次间隔2s,共90s;9000g离心30min,取上清,Western blot检测,测试最佳表达诱导时间,结果见图5A,图5B为Western blot的定量数据图,可确定GnT-II- Δ TM-Trx蛋白诱导表达最佳诱导时间是14h。

[0059] 实例4:GnT-II- Δ TM-Trx重组蛋白的Western blot检测

[0060] (一)提取诱导后的GnT-II- Δ TM-Trx重组蛋白

[0061] 1.培养含有pET28a-GnT-II- Δ TM-Trx质粒的大肠杆菌表达菌株,IPTG诱导表达;

[0062] 2.加入蛋白裂解液(25mM Tris-HCl pH 8.0,0.3M NaCl),用超声波破碎细胞后,加1%TritonX-100,冰上放置30min;

[0063] 3. 9000g,4 $^{\circ}$ C离心30min;

[0064] 4.取40 μ L上清加入5 \times Loading Buffer,震荡混匀,沉淀加入同样体积的buffer悬浮,取40 μ L加入5 \times Loading Buffer,震荡混匀;

[0065] 5.沸水煮沸5min,18000g离心5min,吸取上清8 μ L进行蛋白电泳,剩余样品-20 $^{\circ}$ C冻存;

[0066] 6.制备SDS-PAGE胶,先用90V进行电泳20min,待样品进入分离胶时,用180V电压进行电泳,至溴酚蓝跑出分离胶时停止电泳。

[0067] (二)转膜

[0068] 用裁纸刀裁出比胶稍大一些的PVDF膜和滤纸,PVDF膜先用甲醇浸泡5min,然后放入转膜buffer中,两份6张叠加好的滤纸浸泡在转膜buffer中,将一份6张滤纸放入转移膜槽中,再放入PVDF膜、蛋白胶,最后叠加另一份滤纸,赶走气泡,将转膜槽放入仪器中进行转膜。

[0069] (三)封闭

[0070] 转膜完成后,取出PVDF膜,放于5%脱脂奶粉的PBST溶液中,摇床上封闭1h。

[0071] (四)一抗孵育

[0072] 弃去封闭液,加入Anti-His抗体(1:5000),摇床孵育1h。

[0073] (五)二抗孵育

[0074] 倒掉一抗,用1 \times PBST洗涤PVDF膜3次,每次10min;加入对应的二抗(羊抗小鼠),摇床孵育1h。

[0075] (六)ECL曝光

[0076] 弃掉二抗,用1 \times PBST洗涤PVDF膜3次,每次10min;在PVDF膜上加入HRP化学发光底物液,在天能化学发光检测仪上检测蛋白表达信号(如图1所示),从结果可以看出成功表达出GnT-II- Δ TM-Trx蛋白。获得具有体外活性的重组人源GnT-II解决了重要寡糖结构GlcNAc2Man3GlcNAc2的酶法合成问题,推动糖化学与糖生物学的发展。

[0077] 应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术

方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

[0039]	Met Trp Lys Leu Lys Gln Gln Glu Cys Pro Glu Cys Asp Val Leu Ser
[0040]	225 230 235 240
[0041]	Leu Gly Thr Tyr Ser Ala Ser Arg Ser Phe Tyr Gly Met Ala Asp Lys
[0042]	245 250 255
[0043]	Val Asp Val Lys Thr Trp Lys Ser Thr Glu His Asn Met Gly Leu Ala
[0044]	260 265 270
[0045]	Leu Thr Arg Asn Ala Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Cys Thr Asp Thr Phe
[0046]	275 280 285
[0047]	Cys Thr Tyr Asp Asp Tyr Asn Trp Asp Trp Thr Leu Gln Tyr Leu Thr
[0048]	290 295 300
[0049]	Val Ser Cys Leu Pro Lys Phe Trp Lys Val Leu Val Pro Gln Ile Pro
[0050]	305 310 315 320
[0051]	Arg Ile Phe His Ala Gly Asp Cys Gly Met His His Lys Lys Thr Cys
[0052]	325 330 335
[0053]	Arg Pro Ser Thr Gln Ser Ala Gln Ile Glu Ser Leu Leu Asn Asn Asn
[0054]	340 345 350
[0055]	Lys Gln Tyr Met Phe Pro Glu Thr Leu Thr Ile Ser Glu Lys Phe Thr
[0056]	355 360 365
[0057]	Val Val Ala Ile Ser Pro Pro Arg Lys Asn Gly Gly Trp Gly Asp Ile
[0058]	370 375 380
[0059]	Arg Asp His Glu Leu Cys Lys Ser Tyr Arg Arg Leu
[0060]	385 390 395
[0061]	<210> 2
[0062]	<211> 446
[0063]	<212> PRT
[0064]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0065]	<400> 2
[0066]	Met Arg Phe Arg Ile Tyr Lys Arg Lys Val Leu Ile Leu Thr Leu Val
[0067]	1 5 10 15
[0068]	Val Ala Ala Cys Gly Phe Val Leu Trp Ser Ser Asn Gly Arg Gln Arg
[0069]	20 25 30
[0070]	Lys Asn Glu Ala Leu Ala Pro Pro Leu Leu Asp Ala Glu Pro Ala Arg
[0071]	35 40 45
[0072]	Gly Ala Gly Gly Arg Gly Gly Asp His Pro Ser Val Ala Val Gly Ile
[0073]	50 55 60
[0074]	Arg Arg Val Ser Asn Val Ser Ala Ala Ser Leu Val Pro Ala Val Pro
[0075]	65 70 75 80
[0076]	Gln Pro Glu Ala Asp Asn Leu Thr Leu Arg Tyr Arg Ser Leu Val Tyr
[0077]	85 90 95

[0078]	Gln Leu Asn Phe Asp Gln Thr Leu Arg Asn Val Asp Lys Ala Gly Thr
[0079]	100 105 110
[0080]	Trp Ala Pro Arg Glu Leu Val Leu Val Val Gln Val His Asn Arg Pro
[0081]	115 120 125
[0082]	Glu Tyr Leu Arg Leu Leu Leu Asp Ser Leu Arg Lys Ala Gln Gly Ile
[0083]	130 135 140
[0084]	Asp Asn Val Leu Val Ile Phe Ser His Asp Phe Trp Ser Thr Glu Ile
[0085]	145 150 155 160
[0086]	Asn Gln Leu Ile Ala Gly Val Asn Phe Cys Pro Val Leu Gln Val Phe
[0087]	165 170 175
[0088]	Phe Pro Phe Ser Ile Gln Leu Tyr Pro Asn Glu Phe Pro Gly Ser Asp
[0089]	180 185 190
[0090]	Pro Arg Asp Cys Pro Arg Asp Leu Pro Lys Asn Ala Ala Leu Lys Leu
[0091]	195 200 205
[0092]	Gly Cys Ile Asn Ala Glu Tyr Pro Asp Ser Phe Gly His Tyr Arg Glu
[0093]	210 215 220
[0094]	Ala Lys Phe Ser Gln Thr Lys His His Trp Trp Trp Lys Leu His Phe
[0095]	225 230 235 240
[0096]	Val Trp Glu Arg Val Lys Ile Leu Arg Asp Tyr Ala Gly Leu Ile Leu
[0097]	245 250 255
[0098]	Phe Leu Glu Glu Asp His Tyr Leu Ala Pro Asp Phe Tyr His Val Phe
[0099]	260 265 270
[0100]	Lys Lys Met Trp Lys Leu Lys Gln Gln Glu Cys Pro Glu Cys Asp Val
[0101]	275 280 285
[0102]	Leu Ser Leu Gly Thr Tyr Ser Ala Ser Arg Ser Phe Tyr Gly Met Ala
[0103]	290 295 300
[0104]	Asp Lys Val Asp Val Lys Thr Trp Lys Ser Thr Glu His Asn Met Gly
[0105]	305 310 315 320
[0106]	Leu Ala Leu Thr Arg Asn Ala Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Cys Thr Asp
[0107]	325 330 335
[0108]	Thr Phe Cys Thr Tyr Asp Asp Tyr Asn Trp Asp Trp Thr Leu Gln Tyr
[0109]	340 345 350
[0110]	Leu Thr Val Ser Cys Leu Pro Lys Phe Trp Lys Val Leu Val Pro Gln
[0111]	355 360 365
[0112]	Ile Pro Arg Ile Phe His Ala Gly Asp Cys Gly Met His His Lys Lys
[0113]	370 375 380
[0114]	Thr Cys Arg Pro Ser Thr Gln Ser Ala Gln Ile Glu Ser Leu Leu Asn
[0115]	385 390 395 400
[0116]	Asn Asn Lys Gln Tyr Met Phe Pro Glu Thr Leu Thr Ile Ser Glu Lys

[0117]		405		410		415
[0118]	Phe Thr Val Val Ala Ile Ser Pro Pro Arg Lys Asn Gly Gly Trp Gly					
[0119]		420		425		430
[0120]	Asp Ile Arg Asp His Glu Leu Cys Lys Ser Tyr Arg Arg Leu					
[0121]		435		440		445
[0122]	<210> 3					
[0123]	<211> 40					
[0124]	<212> DNA/RNA					
[0125]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0126]	<400> 3					
[0127]	aaaaaagctt atgagcgata aaattattca cctgactgac 40					
[0128]	<210> 4					
[0129]	<211> 37					
[0130]	<212> DNA/RNA					
[0131]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0132]	<400> 4					
[0133]	aaaactcgag ggccaggtta gcgtcgagga actcttt 37					
[0134]	<210> 5					
[0135]	<211> 32					
[0136]	<212> DNA/RNA					
[0137]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0138]	<400> 5					
[0139]	aaaagatcc cgacaaagga agaacgaggc cc 32					
[0140]	<210> 6					
[0141]	<211> 37					
[0142]	<212> DNA/RNA					
[0143]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0144]	<400> 6					
[0145]	aaaaaagctt ctgcagtctt ctataacttt tacagag 37					

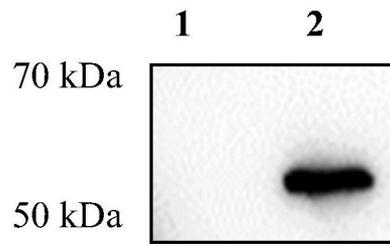


图1

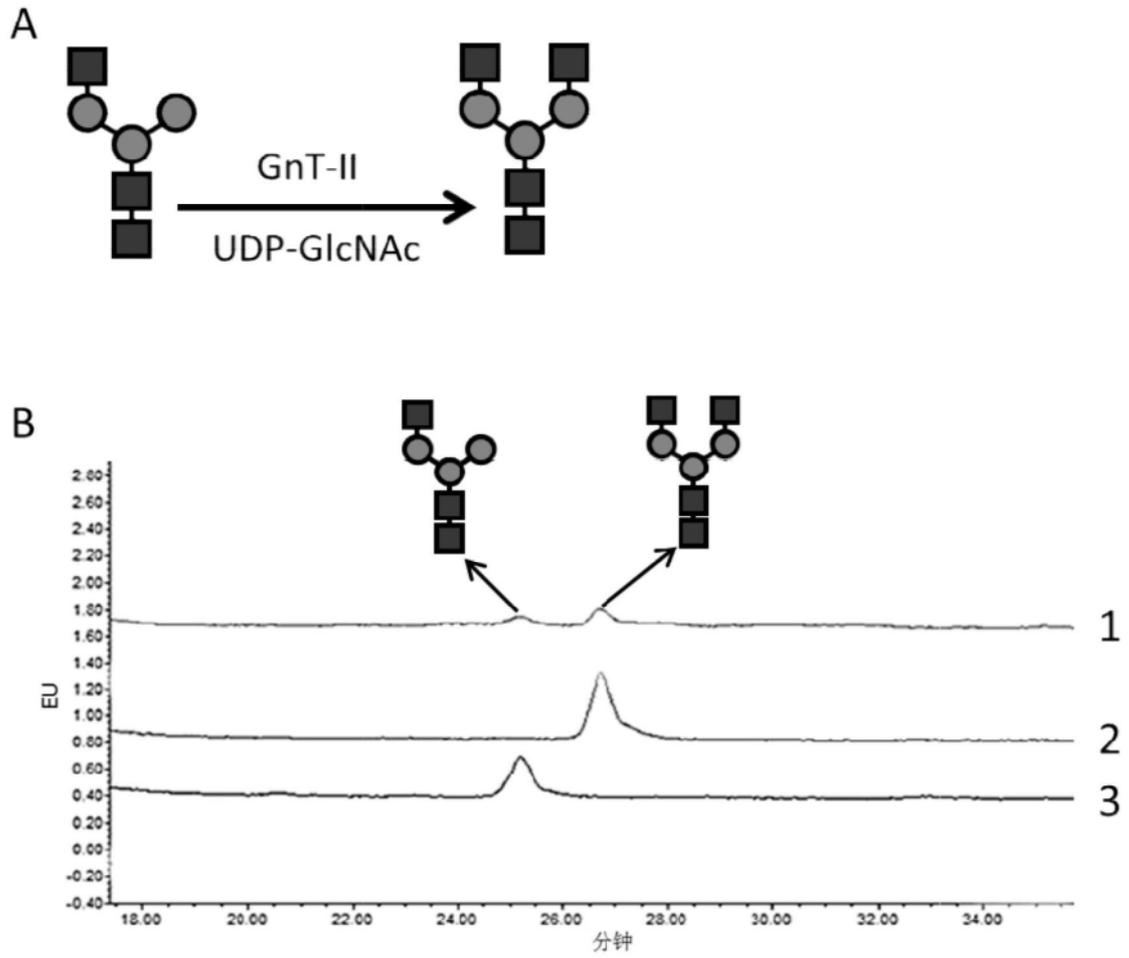


图2

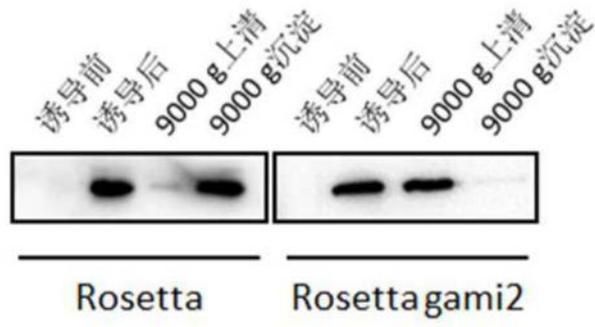


图3

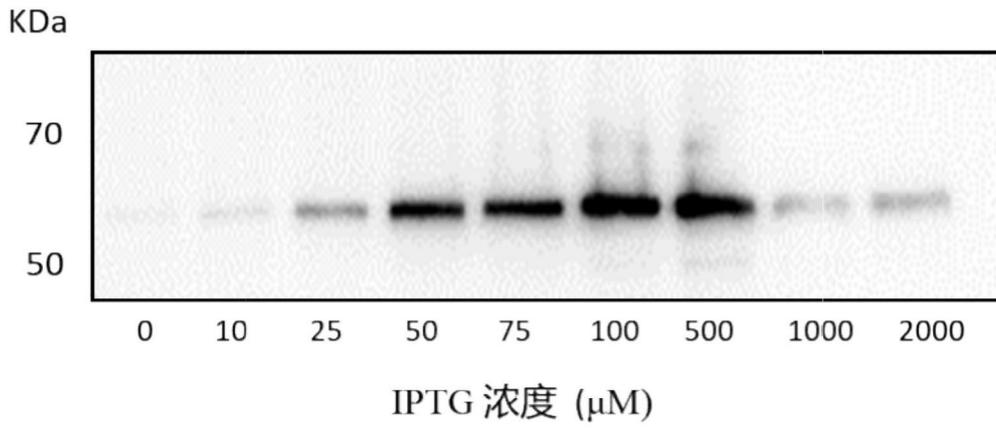


图4

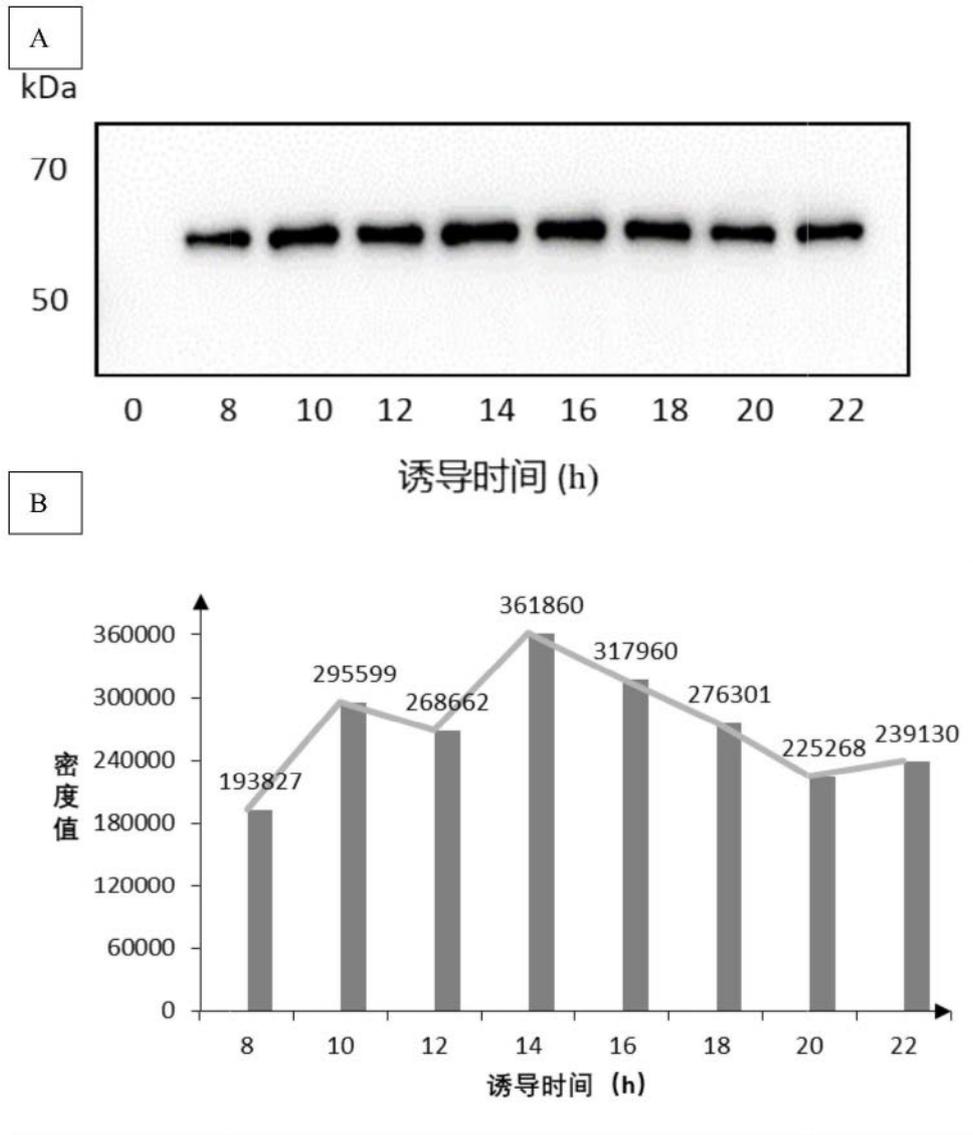


图5