



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1995343 B

(45) 授权公告日 2010.12.22

(21) 申请号 200610168056.3

(22) 申请日 2006.12.25

(73) 专利权人 山西晶炜科技有限公司

地址 030012 太原市平阳路西二巷 12 号

(72) 发明人 李慧洁 杨秀桃

(74) 专利代理机构 太原市科瑞达专利代理有限公司 14101

代理人 刘宝贤

(51) Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1814746 A, 2006.08.09, 全文.

CN 1266097 A, 2000.09.13, 全文.

彭勇 等. 枯草杆菌 DC-2 纳豆激酶基因的克隆及其融合蛋白在 E. coli 中的表达. 中国生物化学与分子生物学报 15 (5), 559-563.

审查员 罗霄

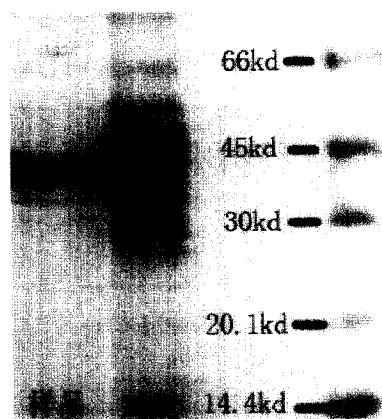
权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 3 页

(54) 发明名称

制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法

(57) 摘要

一种制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法,特别是涉及纳豆激酶表达载体的构建、表达和纯化工工艺,解决了一般的基因工程重组表达的方法导致纳豆激酶以包涵体的形式出现在表达产物当中的问题。本发明方法包括表达全长的带有前导肽的纳豆激酶基因以提高活性,加入重要的分子伴侣 PDI 帮助蛋白正确折叠、利用 GST 标签提高蛋白可溶性、利用硫酸铵沉淀法快速提纯产品、加入 HIS 蛋白标签帮助产物进一步纯化等等。这样的纳豆激酶产品纯度高,产量高,活性高,成本低,生产工艺简单,产品质量稳定。产物可以制作药物或者口服保健品,利于向大众推广,成为新一代的溶栓产品。



1. 一种制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法,其特征在于:

构建含有前导肽序列的纳豆激酶基因克隆,加入 GST 蛋白标签和 PDI 的分子伴侣帮助目的基因在大肠杆菌中高效表达,在序列中内嵌入 HIS 标签和蛋白酶切位点帮助目的蛋白高效提纯,以及生物活性的鉴定,具体方法为:

1) 以 *Bacillus Subtilis* Natto 菌体为模板,根据纳豆激酶 Nattokinase,简称 NK,全长序列设计引物,通过 PCR 的方法获得包含前导肽的全长纳豆激酶基因,称为 proNK;在 proNK 基因的 3' 末端增加 HIS 标签序列,六个连续的组氨酸, HIS6,再将 proNK 加 HIS 标签的基因克隆进入 pGEX-6P 载体;接着利用 PCR 将分子伴侣 PDI 的全长基因克隆出来接到 proNK 基因的 3' 末端;在 PDI 基因的前端加入 Prescission Protease,简称 PPase,蛋白酶切位点序列,序列用 pp 表示,这样组装成为高效表达载体 pGEX-6p-proNK-HIS6-pp-PDI,简称 6pNHP;相应表达出的重组蛋白为 GST-pp-proNK-HIS6-pp-PDI;

2) 6pNHP 转化大肠杆菌 Rosseta,用 IPTG 诱导重组基因的表达;同时将含有 PPase 的质粒转入 Rosseta 菌株,一起诱导表达;然后将两种菌体按比例收集在一起;

3) 用含有 10%甘油的 Tris 缓冲液重悬细菌,超声破碎,离心收集上清液;调整 PH 值,低温振荡使 PPase 将重组蛋白酶切完全,释放出 proNK 蛋白,从而得到含有纳豆激酶的溶液;进行蛋白定量分析和活性测定;

4) 将含有纳豆激酶的溶液进行纯化处理。

2. 如权利要求 1 所述的制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法,其特征在于:

在含有纳豆激酶的溶液中,逐滴加入饱和硫酸铵溶液至终浓度为 30%,静置盐析 4 小时或过夜,12000 转/分离心 20 分钟;取沉淀,用 10 倍沉淀体积的含有 10%甘油的 Tris 缓冲液将沉淀溶解;12000 转/分离心 20 分钟;取上清;透析过夜,即得到纳豆激酶粗品,可进行 SDS-PAGE 分析后进行活性测定。

3. 如权利要求 1 所述的制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法,其特征在于:

在含有纳豆激酶的溶液中,调整 PH 值到 10,然后上镍离子亲和柱 Ni-NTA His-Bind Resin,用 10%甘油的缓冲溶液上柱,25mM 咪唑洗脱杂蛋白,100mM 咪唑洗脱目的蛋白;透析过夜,即得到纳豆激酶的精品;进行 SDS-PAGE 分析和活性测定。

4. 如权利要求 1 所述的制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法,其特征在于:

最终的重组蛋白包含 GST-proNK-PDI, GST-PDI-proNK, HIS6-proNK-PDI, HIS6-PDI-proNK,以及非重组蛋白的状态,PDI 与 proNK 或 NK 同时混合于溶液中,均可以提高纳豆激酶的可溶性表达。

5. 如权利要求 1 所述的制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法,其特征在于:最终的重组蛋白包含 GST-proNK-PDI, GST-PDI-proNK, proNK-GST-PDI, proNK-PDI-GST, PDI-GST-proNK, PDI-proNK-GST 以及非重组蛋白的状态, GST 以及 PDI 与 proNK 或 NK 三者同时混合于溶液中,均可以提高纳豆激酶的可溶性表达。

制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法,包括它的表达载体的构建、原核表达和纯化工艺。

背景技术

[0002] 心脑血管疾病是严重危害人类健康的重要疾病之一,全世界每天超过一千万人死于心脑血管疾病,我国每年大约有二百六十万人死于心脑血管疾病,而且一般集中在大城市。血栓性的疾病是中老年人的高发病,今后我国将进入老龄化社会,必须对心脑血管疾病的防治提起足够的重视。全世界所需的溶栓药物的潜在市场约为 20 亿美元。我国国内市场上使用的溶栓药物如链激酶 (SK)、尿激酶 (UK)、组织性纤维溶酶原激活剂 (tPA) 等都存在明显不足,例如临床中会产生抗再灌注,再次出现栓塞、出血、过敏等反应。

[0003] 纳豆是日本的传统食品,食用已经超过千年。纳豆激酶 (Nattokinase,简称 NK) 是 1987 年日本学者须见洋行博士首先从纳豆中分离纯化出来的。纳豆激酶是纳豆菌发酵过程中产生的一种丝氨酸蛋白酶,等电点为 8.7,由 275 个氨基酸组成,单链、不含二硫键,分子量为 27kD。纳豆激酶在肠道中活性相当稳定,与其它溶栓药相比,除具有较强的溶栓作用外,还具有体内作用时间长、无毒副作用等优点,已经被用作溶栓药物。纳豆激酶能够专一溶解血栓,对纤维蛋白原没有降解活性,大量使用不会引起出血,可以预防和辅助治疗以下病症:脑血栓、脑梗塞、心肌梗塞、血栓后遗症、血栓静脉炎、脉管炎等。服用纳豆激酶后,血中优球蛋白溶解时间 (ELT) 显著延长,纤维蛋白 (原) 降解产物 (FDP) 和组织型纤溶酶原激活因子 (TPA) 明显增加。在急性心肌梗塞患者抢救过程中,采用静脉滴注纳豆激酶,可以迅速溶解血栓,基本没有出血危险性。

[0004] 目前以纳豆激酶为主要成分作为药品、功能性食品和食品添加剂或者保健品的研发工作进展的非常迅速。但是国际上主要的已经投入生产的纳豆激酶相关产品 (日本大和制药“NKCP”,过敏症研究集团“纳豆激酶”,韩国维寿酶公司“维寿酶”等) 都是从野生菌或者改良的野生菌发酵液中提取纯化而来的,但是其中天然 NK 含量非常低 (一般小于 10%),使得纯化工艺复杂,产量不高,活性也很低,而且野生菌发酵过程中也容易发生突变,难以持续生产。而利用一般的基因工程的方法重组表达 NK 基因,会导致 NK 以包涵体的形式出现在表达产物当中,变性复性又会大幅度提高成本和降低 NK 的酶活性。所以这类生产工艺导致纳豆激酶产品很难大幅度推广。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供了一种制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法,包括构建含有前导肽序列的纳豆激酶基因 (proNK) 克隆,加入 GST (谷胱甘肽-S-转移酶) 蛋白标签和 PDI (蛋白质二硫键异构酶) 的分子伴侣 (包括人与鼠等各种来源的同源蛋白),从而帮助目的基因在大肠杆菌中高效表达,在序列中内嵌入 HIS 标签 (六个连续的组氨酸, HIS_6) 和蛋白酶切位点帮助目的蛋白高效提纯。

[0006] 本发明的纳豆激酶可溶性重组表达工艺是通过如下技术方案实现的：

[0007] 1) 以 *Bacillus Subtilis Natto* (纳豆枯草杆菌) 菌体为模板, 根据纳豆激酶全长序列设计引, 通过 PCR (聚合酶链反应) 的方法获得包含前导肽的全长纳豆激酶基因, 称为 proNK; 在 proNK 基因的 3' 末端增加 HIS 标签序列 (六个连续的组氨酸, HIS₆), 再将 proNK 加 HIS 标签的基因克隆进入 pGEX-6P 载体 (已商业化的原核表达载体); 接着利用 PCR 将分子伴侣 PDI 的全长基因克隆出来接到 proNK 基因的 3' 末端; 在 PDI 基因的前端加入 Prescission Protease 蛋白酶 (一种序列特异性的蛋白酶, 简称 PPase) 的酶切位点序列 (序列为 Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, 用 pp 表示); 这样组装成为高效表达载体 pGEX-6p-proNK-HIS₆-pp-PDI, 简称 6pNHP; 相应表达出的重组蛋白为 GST-pp-proNK-HIS₆-pp-PDI;

[0008] 2) 6pNHP 转化大肠杆菌 Rosseta (一种表达菌种), 用 IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷) 诱导重组基因的表达; 同时将含有 PPase 的质粒转入 Rosseta 菌株, 一起诱导表达; 然后将两种菌体按比例收集在一起;

[0009] 3) 用含有 10% 甘油的 Tris (三羟甲基氨基甲烷) 缓冲液重悬细菌, 超声破碎, 离心收集上清液; 调整 PH 值, 低温振荡使 PPase 将重组蛋白酶切完全, 释放出 proNK 蛋白, 从而得到高浓度的含有纳豆激酶的溶液; 进行蛋白定量分析和活性测定;

[0010] 4) 将含有纳豆激酶的溶液进行纯化处理。

[0011] 本发明的纳豆激酶的粗纯化的工艺是通过如下技术方案实现的：

[0012] 在高浓度的含有纳豆激酶的溶液中, 逐滴加入饱和硫酸铵溶液至终浓度为 30%, 静置盐析 4 小时或过夜, 12000 转 / 分离心 20 分钟; 取沉淀, 用 10 倍沉淀体积的含有 10% 甘油的 Tris 缓冲液将沉淀溶解; 12000 转 / 分离心 20 分钟; 取上清。透析过夜, 即得到高浓度的纳豆激酶粗品, 可进行 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠变性聚丙烯酰胺凝胶电泳) 分析后进行活性测定。

[0013] 本发明的纳豆激酶的精纯化的工艺是通过如下技术方案实现的：

[0014] 在高浓度的含有纳豆激酶的溶液中, 直接调整 PH 值到 10, 上镍离子亲和柱 (Ni-NTAHis-Bind Resin), 用 10% 甘油的缓冲溶液上柱, 25mM 咪唑洗脱杂蛋白, 100mM 咪唑洗脱目的蛋白。透析过夜, 即得到高纯度高活性纳豆激酶的精品。进行 SDS-PAGE 分析和活性测定。

[0015] 本发明的纳豆激酶的简化重组表达载体的制备工艺是通过如下技术方案实现的：

[0016] 1) 以 *Bacillus Subtilis Natto* 菌体为模板, 根据纳豆激酶全长序列设计引物, 通过 PCR 的方法获得包含前导肽的全长纳豆激酶基因, 称为 proNK; 将 proNK 的基因克隆进入 pGEX-6P 载体; 接着利用 PCR 将分子伴侣 PDI 的全长基因克隆出来接到 proNK 基因的 3' 末端; 在 PDI 基因的前端加入 Prescission Protease 蛋白酶切位点序列, 这样组装成为高效表达载体 pGEX-6p-proNK-pp-PDI, 简称 6pNP; 相应表达出的重组蛋白为 GST-pp-proNK-pp-PDI;

[0017] 2) 6pNP 转化大肠杆菌 Rosseta, 用 IPTG 诱导重组基因的表达; 同时将含有 PPase 的质粒转入 Rosseta 菌株, 一起诱导表达; 然后将两种菌体按比例收集在一起;

[0018] 3) 用含有 10% 甘油 (注: 原文为目油) 的 Tris 缓冲液重悬细菌, 超声破碎, 离心收集上清液; 调整 PH

值,低温振荡使 PPase 将重组蛋白酶切完全,释放出 proNK 蛋白,从而得到高浓度的含有纳豆激酶的溶液;进行蛋白定量分析和活性测定;

[0019] 4) 在高浓度的含有纳豆激酶的溶液中,逐滴加入饱和硫酸铵溶液至终浓度为 30%,静置盐析 4 小时或过夜,12000 转/分离心 20 分钟;取沉淀,用 10 倍沉淀体积的含有 10%甘油的 Tris 缓冲液将沉淀溶解;12000 转/分离心 20 分钟;取上清;透析过夜,即得到高浓度的纳豆激酶粗品,可进行 SDS-PAGE 分析后进行活性测定。

[0020] PDI 伴侣分子对于纳豆激酶的可溶性表达具有关键的辅助作用,而它们和 proNK 的相对位置是可变的;最终的重组蛋白包含 GST-proNK-PDI, GST-PDI-proNK, HIS₆-proNK-PDI, HIS₆-PDI-proNK,以及非重组蛋白的状态(PDI 与 proNK 或 NK 同时混合于溶液中)均可以提高纳豆激酶的可溶性表达。

[0021] GST 与 PDI 伴侣分子的同时存在对于纳豆激酶的可溶性表达具有关键的辅助作用,而它们和 proNK 的相对位置是可变的;最终的重组蛋白包含 GST-proNK-PDI, GST-PDI-proNK, proNK-GST-PDI, proNK-PDI-GST, PDI-GST-proNK, PDI-proNK-GST 以及非重组蛋白的状态(GST 以及 PDI 与 proNK 或 NK 三者同时混合于溶液中)均可以提高纳豆激酶的可溶性表达。

[0022] 利用本发明的重组表达方案使得纳豆激酶保持可溶解的状态,比包涵体的形式更保持了蛋白酶的活性,也大幅度简化了纯化的步骤,而采用包含有前导肽的纳豆激酶形式更保持了蛋白的稳定性。这样制得的纳豆激酶纯度高,产量高,活性高,成本低,生产工艺简单,产品质量稳定。产物可以制作药物或者口服保健品,利于向大众推广。

附图说明

[0023] 图 1:纳豆激酶基因 pGEX-6p-proNK-HIS-pp-PDI 的质粒构建图谱。

[0024] 图 2:纳豆激酶基因 pGEX-6p-proNK-pp-PDI 的质粒构建图谱。

[0025] 图 3:6pNHP 酶切鉴定电泳图(HindIII 和 XhoI 双酶切)。

[0026] 图 4:显示粗提纯产物中纳豆激酶含量和纯度的 SDS-PAGE 结果。

[0027] 图 5:显示精提纯产物中纳豆激酶含量和纯度的 SDS-PAGE 结果。

[0028] 图 6:显示提纯产物活性的纤维蛋白平板溶圈。

[0029] 图 1、图 2 中,质粒 pGEX-6p 的图谱来自商业化的试剂盒,扩增的序列插入其中。

[0030] 图 3 中,左边为碱基长度对照,右边为酶切产物的条带。在构建好的载体中间,原有的 XhoI 酶切位点被 SalI 中和掉。这样 HindIII 是 proNK 的独有酶切位点, XhoI 是 PDI 的独有酶切位点(而且有两个)。所以用这两个酶鉴定构建载体时会放出三条带。1 为载体片断,2 为 proNK 基因位于 HindIII 位点之后的序列和 PDI 第一个 XhoI 位点之前的序列总长,3 是 PDI 两个 XhoI 位点之间的序列。

[0031] 图 4 中,从左至右依次是:粗提纯纳豆激酶溶液;蛋白质分子量对照。

[0032] 图 5 中,从左至右依次是:精提纯纳豆激酶溶液;全菌裂解液对照;蛋白质分子量对照。

[0033] 图 6 中,各个序号所加样品和对应溶圈面积为:

[0034]

序号	1	2	3	4	5	6	7	8
样品	尿激酶	纳豆激酶粗提纯产物	精提纯产物	对照*				
含量	45u	75u	3u1	10u1	5u1	5u1	8u1	10u1
溶圈面积	1944	3066	6351	22716	17246	7151	7824	32

[0035] * 其中对照为 Tris 缓冲液对照

具体实施方式

[0036] 实施例一：纳豆激酶基因表达载体的构建及表达：

[0037] 1) 取 *Bacillus Subtilis Natto* 的冻存菌株 1ul 接种于 5mlLB 培养基中, 37℃,

250rpm/min 摇动培养基 16 小时（不可过长,防止形成芽孢）。菌液 1 : 20 稀释,然后取 1ul 作为 PCR 模板。设计合成 PCR 引物,用于扩增 proNK 基因,PCR 引物的 5',3' 末端含有限制性内切酶位点:

[0038] 上游引物:NKs:5'-3' CAT AGATCT GCCGAAAAAGGAG

[0039] 下游引物:NKHISa:5'-3' AGA GAATTC GTGATGATGATGATGATG TAAT

[0040] TGTG CAGCTGC

[0041] 引物稀释成 50pmol/ul 待用。然后利用热启动 PCR 的方法将 proNK-HIS₆ 基因克隆出来:

[0042] PCR 反应体系 50ul:

[0043] ddH₂O: 40ul

[0044] 10*PCR BUFFER 5ul

[0045] dNTP 1ul

[0046] 模板: 1ul

[0047] 上/下游引物: 1ul

[0048] pfu 酶 1ul

[0049] PCR 反应条件:

[0050] 94°C 8min

[0051] 94°C 30s

[0052] 65°C 30s

[0053] 72°C 2min40s 20 循环

[0054] 94°C 30s

[0055] 55°C 30s

[0056] 72°C 2min40s 20 循环

[0057] 72°C 10min

[0058] 反应结束之后,取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外检测为与 1.1kb 左右位置处的一条亮带即为目的基因 (proNK-HIS₆) 的大小。

[0059] 2) 凝胶回收目的基因,用限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 将其切成粘性末端,同样处理 pGEX-6p 载体,加入 T4DNA 连接酶,4°C 连接 12 小时,转化大肠杆菌 DH5 α。用氨苄青霉素钠 -LB 平板筛选挑出白斑克隆,利用分子克隆的碱裂解法或者煮沸法提取质粒,利用酶切和 PCR 的方法鉴定正确,然后核苷酸序列分析含有正确的基因序列阅读框架,构建成功 pGEX-6p-proNK-HIS₆ 载体。

[0060] 设计 PDI 的引物,包含酶切位点:

[0061] 上游引物:PDI-PPs:5'-3' TA GAATTC CTGGAAGTTCTGTTCC

[0062] AGGGGCCC ATGCTGCGCCGCGC

[0063] 下游引物:PDI-PPa:5'-3' CT GTCGAC CAGTTCATCTTTACAG

[0064] PCR 反应条件 (Tag 酶):

[0065] 94°C 8min

[0066] 94°C 30s

[0067] 65°C 30s

[0068] 72℃ 1min 30 循环

[0069] 72℃ 10min

[0070] 琼脂糖凝胶电泳检测 PDI 条带位于 700bp 左右,胶回收目的基因,用 EcoRI 和 SalI 将基因酶切成粘性末端,接入用 EcoRI 和 XhoI 酶切后的 pGEX-6p-proNK-HIS₆ 载体,加入 T4DNA 连接酶,4℃ 连接 12 小时,转化大肠杆菌 DH5 α 。用氨苄青霉素钠-LB 平板筛选挑出白斑克隆,利用分子克隆的碱裂解法或者煮沸法提取质粒,利用酶切和 PCR 的方法鉴定正确,然后核苷酸序列分析含有正确的基因序列阅读框架,构建成功 pGEX-6p-proNK-HIS₆-pp-PDI 高效表达载体(简称为 6pNHP)。

[0071] 3) 将正确的 6pNHP 质粒转化大肠杆菌 Rosseta,用氨苄青霉素钠-LB 平板筛选出单斑克隆,在 5mlLB 培养基中培养过夜,按照 1 : 100 转接,在摇瓶中 37℃ 培养至 OD600 为 0.4-0.6,按照 1 : 5000 加入 IPTG 储液,30℃ 培养 4-6 小时(时间延长会显著提高产量),离心收集菌体,保存于 -20℃ 或者立即进入下步纯化。

[0072] 同时将含有 PPase 的质粒转入 Rosseta 菌株,同样操作挑选单斑克隆,在 5mlLB 培养基培养过夜,然后 1 : 100 转接,摇瓶培养 37℃ 至 OD 为 0.6,按照 1 : 1000 加入 IPTG 储液,30℃ 培养 6 小时,离心收集菌体,取适当与 6pNHP 菌体混合(菌体质量比值约为 1 : 50)。

[0073] 4) 配制适合保存酶活的缓冲体系:

[0074] Tris : 6.057g/L

[0075] NaCl : 2.925g/L

[0076] EDTA : 0.186g/L

[0077] 甘油 : 50ml/L

[0078] 用缓冲液洗涤混合后的菌体沉淀,用 20-40ml 体积重悬约 500ml 菌液沉淀,用溶菌酶配合 Triton X-100 帮助裂解细菌(可选),用冰水混合物环境下超声破菌(2s 超声,5s 间歇,全长 45min,保护温度 44℃),12000rpm/min 离心 20min,收集上清液。再次调整 PH 为 7.0 左右,振荡反应约 4h(冰上操作有助于提高产物活性,需要延长作用时间至 10h 左右,加入 DTT 有助于优化反应)。这样重组蛋白基本被 PPase 酶切完全,释放出 proNK 蛋白。ProNK 蛋白自剪切释放出高活性的 NK 蛋白。此时所得溶液为高浓度的含有纳豆激酶的溶液。

[0079] 5) 表达产物的鉴定:

[0080] 首先利用 SDS-PAGE 鉴定表达产物的浓度:

[0081] 样品处理液:SDS1g, Glycerol5mL, 溴酚蓝(BPB)固体痕量,二硫苏糖醇(DTT)2.5mL, B 液 25mL,加去离子水至 50mL

[0082] 取酶切后纳豆激酶溶液 10ul,加入 2ul 样品处理液,至沸水浴 5 分钟。点样量为 5ul/孔。标准蛋白分子量同样处理。用考马氏亮蓝 R-250 染色。

[0083] 表达产物的纤溶活性鉴定:

[0084] 配制含有纤维蛋白原和凝血酶原的侧活平板,以及用作参比的尿激酶活性梯度溶液(100u, 200u, 300u, 400u, 500u)。通过测量溶圈直径可知表达产物活性。

[0085] 实施例二:纳豆激酶原液制备纳豆激酶粗品

[0086] 在含有高浓度纳豆激酶的溶液中,在搅拌的过程中逐滴缓慢加入饱和硫酸铵溶液至终浓度为 30%,静置盐析 4 小时或冰浴中过夜,12000 转/分离心 20 分钟;取沉淀,用 10 倍沉淀体积的含有 10%甘油的 Tris 缓冲液将沉淀溶解;12000 转/分离心 20 分钟;取上

清。在 Tris 缓冲液中透析过夜,即得到高浓度的纳豆激酶粗品,可进行 SDS-PAGE 分析后进行活性测定,活性约为 62000u/ml。

[0087] 实施例三:纳豆激酶原液制备纳豆溶液精品

[0088] 在高浓度的含有纳豆激酶的溶液中,迅速调整其 PH 值到 10(注意防止纳豆激酶在其等电点 8.7 附近聚沉)。配上柱缓冲液:

[0089] MCAC-0 MCAC-1000

[0090] 20mM Tris 盐酸 PH10.0 20mMTris 盐酸 PH10.0

[0091] 05M NaCl 0.5M NaCl

[0092] 10% (v/v) 甘油(可调整至 20%) 10% (v/v) 甘油

[0093] 1M 咪唑

[0094] 用 MCAC-0 溶液清洗镍离子亲和柱(Ni-NTA His-Bind Resin)柱材,然后把柱材和纳豆激酶溶液共育,室温(冰上更佳)轻摇 30min。然后上柱,分别用 MCAC-0 和 MCAC-50 洗脱杂蛋白,最后用 MCAC150 洗脱目的蛋白。将所得产物透析过夜,即得到高纯度的纳豆激酶精品。进行 SDS-PAGE 分析和活性检测,活性约为 39000u/ml。产物可以用于进一步制作成成品。

[0095] 实施例四:简化重组表达载体制备纳豆激酶粗品

[0096] 按照实施例一和例二的方法制备纳豆激酶粗品,区别在于设计 proNK 的引物时,在下游引物末端去掉 HIS 标签序列,具体流程为:

[0097] 1) 取 Bacillus Subtiis Natto 的冻存菌株 1ul 接种于 5mlLB 培养基中,37℃,250rpm/min 摇动培养基 16 小时(不可过长,防止形成芽孢)。菌液 1:20 稀释,然后取 1ul 作为 PCR 模板。设计合成 PCR 引物,用于扩增 proNK 基因,PCR 引物的 5'、3' 末端含有限制性内切酶位点:

[0098] 上游引物:NKs:5'-3' CAT AGATCT GCCGAAAAAGCAG

[0099] 下游引物:NKa:5'-3' TGA GAATTC TAATTGTGCAGCTGCTTGTAC

[0100] 引物稀释成 50pmol/ul 待用。然后利用热启动 PCR 的方法将 proNK 基因克隆出来:

[0101] PCR 反应体系 50ul

[0102] ddH₂O: 40ul

[0103] 10*PCR BUFFER 5ul

[0104] dNTP 1ul

[0105] 模板: 1ul

[0106] 上/下游引物: 1ul

[0107] pfu 酶 1ul

[0108] PCR 反应条件:

[0109] 94℃ 8min

[0110] 94℃ 30s

[0111] 65℃ 30s

[0112] 72℃ 2min40s 20 循环

[0113] 94℃ 30s

[0114] 55℃ 30s

[0115] 72℃ 2min40s 20 循环

[0116] 72℃ 10min

[0117] 反应结束之后,取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外检测为与 1.1kb 左右位置处的一条亮带即为目的基因 (proNK) 的大小。

[0118] 2) 凝胶回收目的基因,用限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 将其切成粘性末端,同样处理 pGEX-6p 载体,加入 T4DNA 连接酶,4℃ 连接 12 小时,转化大肠杆菌 DH5 α。用氨苄青霉素钠 -LB 平板筛选挑出白斑克隆,利用分子克隆的碱裂解法或者煮沸法提取质粒,利用酶切和 PCR 的方法鉴定正确,然后核苷酸序列分析含有正确的基因序列阅读框架,构建成功 pGEX-6p-proNK 载体。

[0119] 设计 PDI 的引物,包含酶切位点:

[0120] 上游引物:PDI-PPs:5'-3' TA GAATTC CTGGAAGTTCTGTTCC

[0121] AGGGGCCC ATGCTGCGCCGCGC

[0122] 下游引物:PDI-PPa:5'-3' CT GTCGAC CAGTTCATCTTTACAG

[0123] PCR 反应条件 (Tag 酶):

[0124] 94℃ 8min

[0125] 94℃ 30s

[0126] 65℃ 30s

[0127] 72℃ 1min 30 循环

[0128] 72℃ 10min

[0129] 琼脂糖凝胶电泳检测 PDI 条带位于 700bp 左右,胶回收目的基因,用 EcoRI 和 SalI 将基因酶切成粘性末端,接入用 EcoRI 和 XhoI 酶切后的 pGEX-6p-proNK 载体,加入 T4DNA 连接酶,4℃ 连接 12 小时,转化大肠杆菌 DH5 α。用氨苄青霉素钠 -LB 平板筛选挑出白斑克隆,利用分子克隆的碱裂解法或者煮沸法提取质粒,利用酶切和 PCR 的方法鉴定正确,然后核苷酸序列分析含有正确的基因序列阅读框架,构建成功 pGEX-6p-proNK-pp-PDI 高效表达载体 (简称为 6pNP)。

[0130] 3) 将正确的 6pNP 质粒转化大肠杆菌 Rosseta,用氨苄青霉素钠 -LB 平板筛选出单斑克隆,在 5mlLB 培养基中培养过夜,按照 1 : 100 转接,在摇瓶中 37℃ 培养至 OD600 为 0.4-0.6,按照 1 : 5000 加入 IPTG 储液,30℃ 培养 4-6 小时 (时间延长会显著提高产量),离心收集菌体,保存于 -20℃ 或者立即进入下步纯化。

[0131] 同时将含有 PPase 的质粒转入 Rosseta 菌株,同样操作挑选单斑克隆,在 5mlLB 培养基培养过夜,然后 1 : 100 转接,摇瓶培养 37℃ 至 OD 为 0.6,按照 1 : 1000 加入 IPTG 储液,30℃ 培养 6 小时,离心收集菌体,取适当与 6pNP 菌体混合 (菌体质量比值约为 1 : 50)。

[0132] 4) 配制适合保存酶活的缓冲体系:

[0133] Tris: 6.057g/L

[0134] NaCl: 2.925g/L

[0135] EDTA: 0.186g/L

[0136] 甘油: 50ml/L

[0137] 用缓冲液洗涤混合后的菌体沉淀,用 20-40ml 体积重悬约 500ml 菌液沉淀,用溶菌

酶配合 Triton X-100 帮助裂解细菌 (可选), 用冰水混合物环境下超声破菌 (2s 超声, 5s 间歇, 全长 45min, 保护温度 44℃), 12000rpm/min 离心 20min, 收集上清液。再次调整 PH 为 7.0 左右, 振荡反应约 4h (冰上操作有助于提高产物活性, 需要延长作用时间至 10h 左右, 加入 DTT 有助于优化反应)。这样重组蛋白基本被 PPase 酶切完全, 释放出 proNK 蛋白。ProNK 蛋白自剪切释放出高活性的 NK 蛋白。此时所得溶液为高浓度的含有纳豆激酶的溶液。

[0138] 5) 在含有高浓度纳豆激酶的溶液中, 在搅拌的过程中逐滴缓慢加入饱和硫酸铵溶液至终浓度为 30%, 静置盐析 4 小时或冰浴中过夜, 12000 转 / 分离心 20 分钟; 取沉淀, 用 10 倍沉淀体积的含有 10% 甘油的 Tris 缓冲液将沉淀溶解; 12000 转 / 分离心 20 分钟; 取上清。在 Tris 缓冲液中透析过夜, 即得到高浓度的纳豆激酶粗品, 可进行 SDS-PAGE 分析后进行活性测定, 活性约为 60000u/ml。

[0139] 核苷酸或氨基酸序列 • 表

[0140] Individual Applicant

[0141] -----

[0142] Street : 涧西区安徽路 1 号院 1 栋 1 门 301

[0143] City : 洛阳市

[0144] State : 河南省

[0145] Country : 中国

[0146] PostalCode : 471003

[0147] PhoneNumber : 13523581028

[0148] <110>LastName : 李

[0149] <110>FirstName : 慧洁

[0150] Individual Applicant

[0151] -----

[0152] Street : 双塔东街 56 号省人民医院宿舍 9 号楼 306

[0153] City : 太原市

[0154] State : 山西省

[0155] Country : 中国

[0156] PostalCode : 030012

[0157] PhoneNumber : 03518918295

[0158] FaxNumber :

[0159] EmailAddress :

[0160] <110>LastName : 杨

[0161] <110>FirstName : 秀桃

[0162] Application Project

[0163] -----

[0164] <120>Title : 制备可溶高活性重组纳豆激酶的方法

[0165] <140>CurrentAppNumber : 200610168056.3

[0166] <141>CurrentFilingDate : 2006-12-25

[0167] <160>2

[0168] <170>PatentIn Version 3.2

[0169] Sequence

[0170] -----

[0171] <210>1

[0172] <213>OrganismName :Bacillus Subtilis Natto

[0173] <400>PreSequenceString :

[0174]	gccggaaaaa gcagtacaga aaagaaatac attgtcggat ttaagcagac aatgagtgcc	60
[0175]	atgagttccg ccaagaaaaa ggatgttatt tctgaaaaag gcggaaggt tcaaaagcaa	120
[0176]	tttaagtatg ttaacgcggc cgcagcaaca ttggatgaaa aagctgtaaa agaattgaaa	180
[0177]	aaagatccga gcgttgcata tgtggaagaa gatcatattg cacatgaata tgcgcaatct	240
[0178]	gttccttatg gcatttctca aattaaagcg ccggctcttc actctcaagg ctacacaggc	300
[0179]	tctaacgtaa aagtagctgt tatcgacagc ggaattgact cttctcatcc tgacttaaac	360
[0180]	gtcagaggcg gagcaagctt cgttccttct gaaacaaacc cataccagga cggcagttct	420
[0181]	cacggtacgc atgtcgccgg tacgattgcc gctcttaata actcaatcgg tgttctgggc	480
[0182]	gtagcgccaa gcgcatcatt atatgcagta aaagtgcttg attcaacagg aagcggccaa	540
[0183]	tatagctgga ttattaacgg cattgagtgg gccatttcca acaatatgga tgttatcaac	600
[0184]	atgagccttg gcggacctac tggttctaca gcgtgaaaa cagtagttga taaagcgggt	660
[0185]	tccagcggta tcgtcgttgc tgccgcagcc ggaacgaag gttcatccgg aagcacaagc	720
[0186]	acagtcggct accctgcaaa atatccttct actattgcag taggtgcggt aaacagcagc	780
[0187]	gaccaaagag cttcattctc cagcgtaggt tctgagcttg atgtaatggc ccctggcgtg	840
[0188]	tccatccaaa gcacacttcc tggaggcact tacggcgctt ataacggaac gtccatggcg	900
[0189]	actcctcacg ttgccggagc agcagcgcta attctttcta agcacccgac ttggacaaac	960
[0190]	gcgcaagtcc gtgatcgttt agaaagcact gcaacatata ttggaaactc tttctactat	1020
[0191]	ggaaaagggt taatcaacgt acaagcagct gcacaataa	1059

[0192] <212>Type :DNA

[0193] <211>Length :1059

[0194] SequenceName :proNK

[0195] Sequence

[0196] -----

[0197] <210>2

[0198] <213>OrganismName :Homo sapiens

[0199] <400>PreSequenceString :

[0200]	atgtgcgcc gcgtctgtgt gtgcctgccg tggcccgccc tgggtgcgcgc cgacgcccc	60
[0201]	gaggaggagg accacgtctt ggtgctgcgg aaaagcaact tcgcggaggc gctggcggcc	120
[0202]	cacaagtacc cgccggtgga gttccatgcc cctgggtgtg gccactgcaa ggctctggcc	180
[0203]	cctgagtatg ccaaagccgc tgggaagctg aaggcagaag gttccgagat caggttggcc	240
[0204]	aaggtggacg ccacggagga gtctgacctt gccagcagt acggcgtgcg cggttatccc	300
[0205]	accatcaagt tcttcaggaa tggagacacg gttccccca aggaatatac agctggcaga	360
[0206]	gaggctgatg acatcgtaga ctggctgaag aagcgcacgg gcccggtgc caccaccctg	420

[0207]	cctgacggcg cagctgcaga gtccttggtg gagtccagcg aggtggccgt catcggttc	480
[0208]	ttcaaggacg tggagtcgga ctctgccaaag cagtttttgc aggcagcaga ggccatcgat	540
[0209]	gacataccat ttgggatcac ttccaacagt gacgtgttct ccaaatacca gctcgacaaa	600
[0210]	gatggggttg tctcttttaa gaagtttgat gaaggccgga acaactttga aggggaggtc	660
[0211]	accaaggaga acctgctgga ctttatcaaa cacaaccagc tgccccttgt catcgagttc	720
[0212]	accgagcaga cagccccgaa gatttttggga ggtgaaatca agactcacat cctgctgttc	780
[0213]	ttgcccaaga gtgtgtctga ctatgacggc aaactgagca acttcaaaac agcagccgag	840
[0214]	agcttcaagg gcaagatcct gttcatcttc atcgacagcg accacaccga caaccagcgc	900
[0215]	atcctcgagt tctttggcct gaagaaggaa gagtgcccg gctgctgcct catcaccttg	960
[0216]	gaggaggaga tgaccaagta caagccccgaa tcggaggagc tgacggcaga gaggatcaca	1020
[0217]	gagttctgcc accgcttcct ggagggcaaa atcaagcccc acctgatgag ccaggagctg	1080
[0218]	ccggaggact gggacaagca gcctgtcaag gtgcttgttg ggaagaactt tgaagacgtg	1140
[0219]	gcttttgatg agaaaaaaaa cgtctttgtg gagttctatg ccccatgggtg tggtcactgc	1200
[0220]	aaacagttgg ctcccatttg ggataaactg ggagagacgt acaaggacca tgagaacatc	1260
[0221]	gtcatcgcca agatggactc gactgccaac gaggtggagg ccgtcaaagt gcacggcttc	1320
[0222]	cccacactcg ggttctttcc tgccagtgcc gacaggacgg tcattgatta caacggggaa	1380
[0223]	cgcacgctgg atggttttaa gaaattccta gagagcgggtg gccaagatgg ggcaggggat	1440
[0224]	gttgacgacc tcgaggacct cgaagaagca gaggagccag acatggagga agacgatgac	1500
[0225]	cagaaagctg tgaaagatga actgtaa	1527
[0226]	<212>Type :DNA	
[0227]	<211>Length :1527	
[0228]	SequenceName :PDI	
[0229]	核苷酸或氨基酸序列表	
[0230]	proNK 基因的核苷酸序列 :	
[0231]	gccggaaaaagcagttacagaaaaaatacattgtcggatttaagcagacaatgagtgccatgagttcc gccaagaaaaaggatgt	
[0232]	tatttctgaaaaaggcggaagggttcaaaagcaatttaagtatgttaacgcggccgcagcaacattgga tgaaaaagctgtaaaagaattg	
[0233]	aaaaaagatccgagcgttgcatatgtggaagaagatcatattgcacatgaatatgcgcaatctgttcct tatggcattttctcaaattaaagcg	
[0234]	ccggctcttcactctcaaggctacacaggtctaacgtaaaagtagctgttatcgacagcggaattgac tcttctcactctgacttaaagctca	
[0235]	gaggcggagca agcttcgttccttctgaaacaa acccataccaggacggcagttctcacggtacgca tgtcgccggtacgattgccgctctta	
[0236]	ataactcaatcggtgttctgggcgtagcgccaagcgcatcattatatgcagtaaaagtgttgattcaa caggaagcggccaatatagctgga	
[0237]	ttattaacggcattgagtgggccatttccaacaatatggatgttatcaacatgagccttggcggaccta ctggttctacagcgctgaaaacagt	
[0238]	agttgataaagcgggtttccagcggatatcgctgttgctgccgcagccggaaacgaaggttcacccggaag	

cacaagcacagtcggctaccctg

[0239] caaaatataccttctactattgcagtaggtgcggtaaacagcagcgaccaaagagcttcattctccagcg
taggttctgagcttgatgtaattggc

[0240] ccctggcgtgtccatccaaagcacacttcctggaggcacttacggcgcttataacggaacgtccatggc
gactcctcacgttgccggagcage

[0241] agcgctaattcttttctaagcaccgcgacttgacaaaacgcgcaagtccgtgatcgtttagaaagcactgc
aacatatcttgaaactctttctac

[0242] tatggaaaagggttaatcaacgtacaagcagctgcacaataa

[0243] PDI 基因的核苷酸序列：

[0244] atgctgcgcgcgctctgctgtgcctgccgtggcccgccctgggtgcgcgccgacgccccgaggaggag
gaccacgtcttggtgctgcg

[0245] gaaaagcaacttcgcggaggcgctggcggcccacaagtaccgcccgggtggagttccatgccccctgggtg
tgccactgcaaggctctggccc

[0246] ctgagtatgccaaagccgctgggaagctgaaggcagaaggttccgagatcaggttgccaaggtggacg
ccacggaggagtctgacctagc

[0247] ccagcagtacggcgtgcgcggctatcccaccatcaagtcttcaggaatggagacacggcttccccaa
ggaatatacagctggcagagag

[0248] gctgatgacatcgtgaactggctgaagaagcgcacgggcccggctgccaccaccctgcctgacggcgca
gctgcagagtccttggtggagtc

[0249] cagcgaggtggcgcgtcatcggttcttcaaggacgtggagtcggactctgccaaagcagttttgcaggc
agcagaggccatcgatgacatac

[0250] catttgggatcacttccaacagtgacgtgttctccaaataccagctcgacaaagatggggttgtcctct
ttaagaagtttgatgaaggccggaa

[0251] caactttgaaggggaggtcaccaaggagaacctgctggactttatcaaacacaaccagctgccccctgt
catcgagttcacggagcagacag

[0252] ccccgaaagatttttggaggtgaaatcaagactcacatcctgctgttcttgcccaagagtgtgtctgact
atgacggcaaactgagcaacttcaa

[0253] aacagcagccgagagcttcaagggaagatcctgttcattcttcga cagcgaccacaccgacaacc
agcgatcctcgagttctttggcct

[0254] gaagaaggaagagtgcggcgctgcgcctcatcaccttgaggaggagatgaccaagtacaagccga
atcgaggagctgacggcag

[0255] agaggatcacagagtcttgccaccgcttcctggaggggcaaatcaagccccacctgatgagccaggagc
tgccggaggactgggacaagc

[0256] agcctgtcaaggtgcttggttggaagaactttgaagacgtggcttttgatgagaaaaaacgtctttg
tgagttctatgccccatgggtgtgg

[0257] tcaactgaaacagttggctcccatttgggataaactgggagagacgtacaaggaccatgagaacatcgt
catgccaaagatggactcgactg

[0258] ccaacgaggtggaggccgtcaaagtgcacggcttccccacactegggttctttcctgccagtgccgaca
ggacggctcattgattacaacgggg

[0259] aacgcacgctggatgggttttaagaaattcctagagagcggtaggccaagatggggcaggggatgttgacg
acctcgaggacctcgaagaagc

[0260] agaggagccagacatggaggaagacgatgaccagaaagctgtgaaagatgaactgtaa

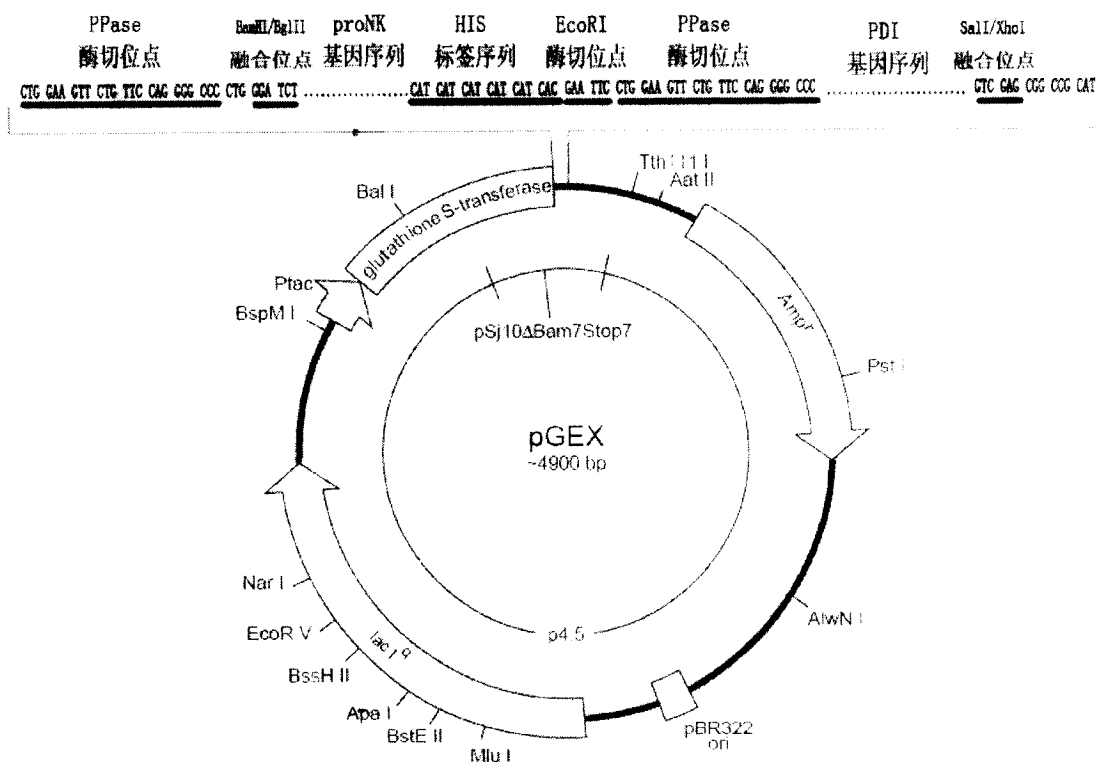


图 1

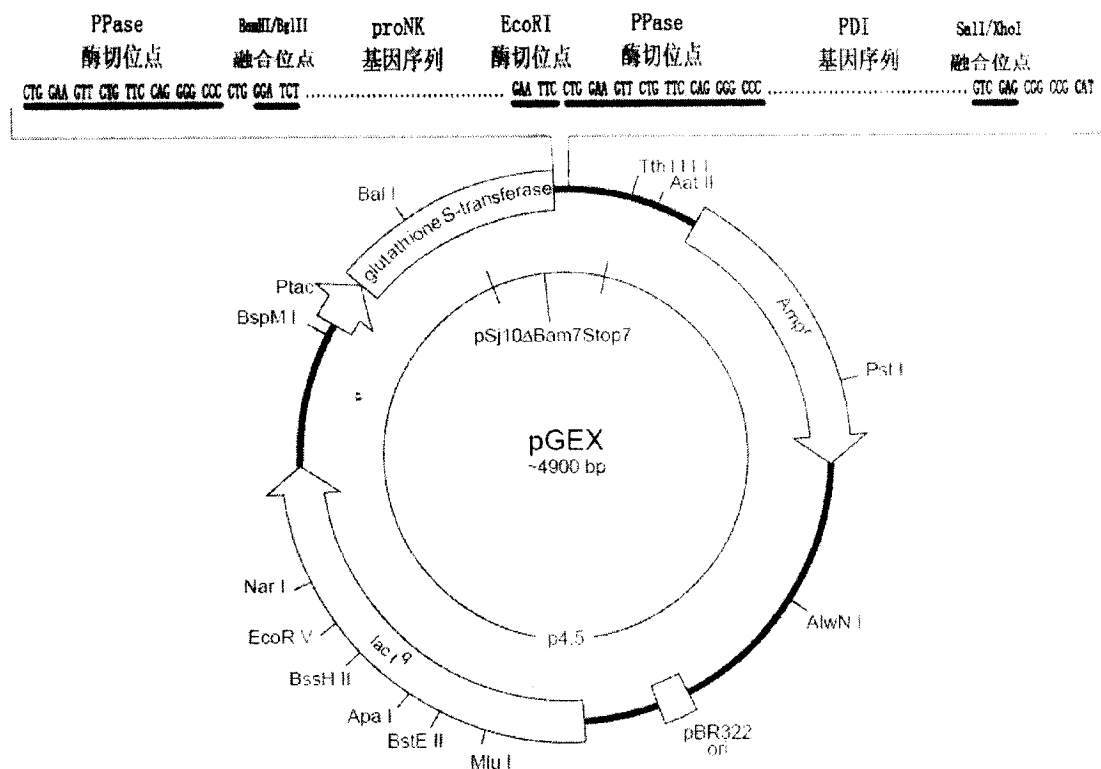


图 2

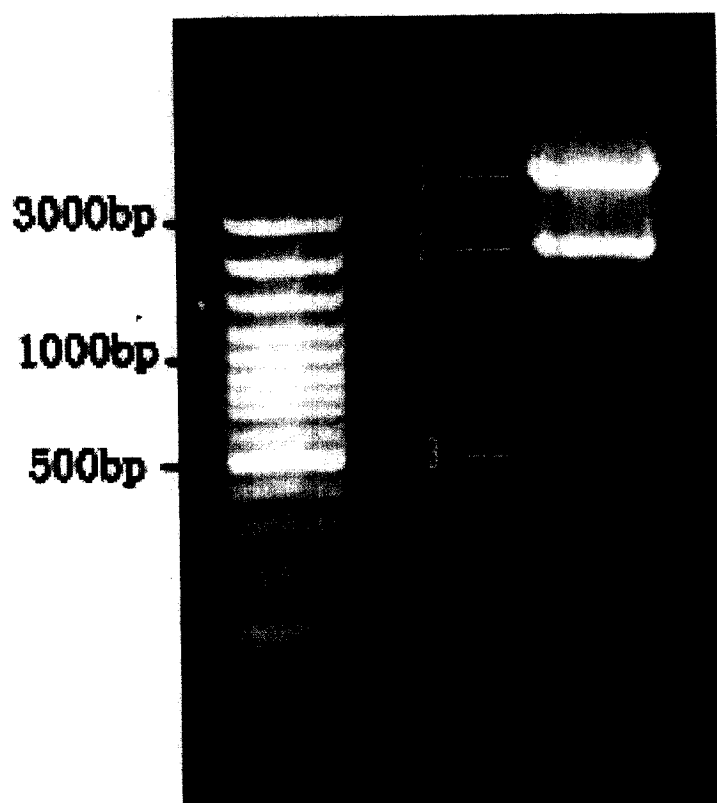


图 3

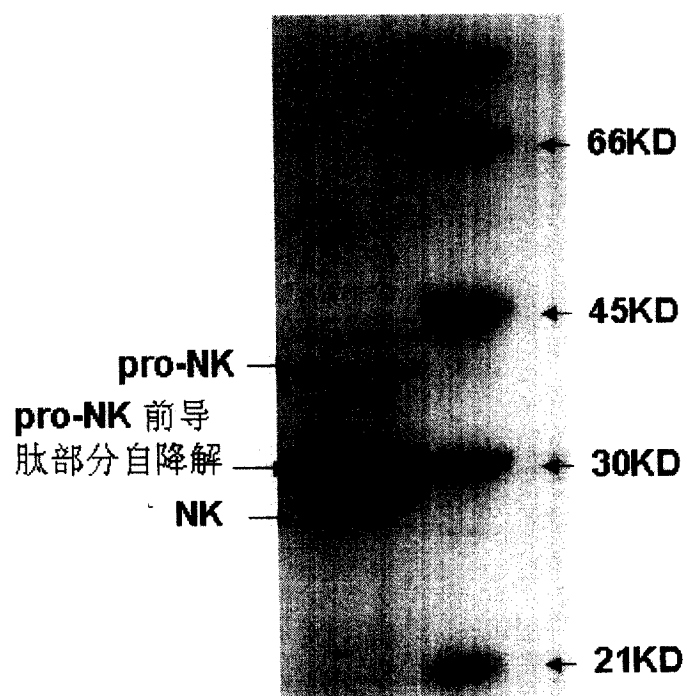


图 4

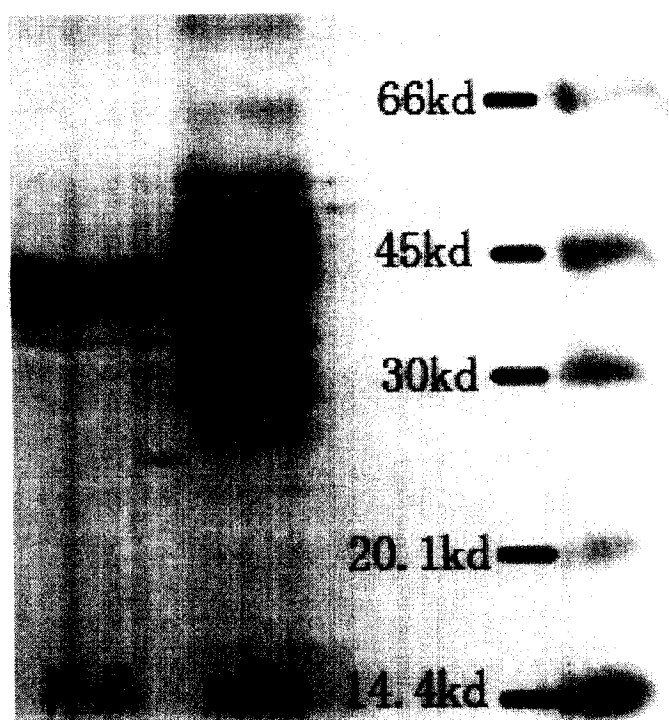


图 5

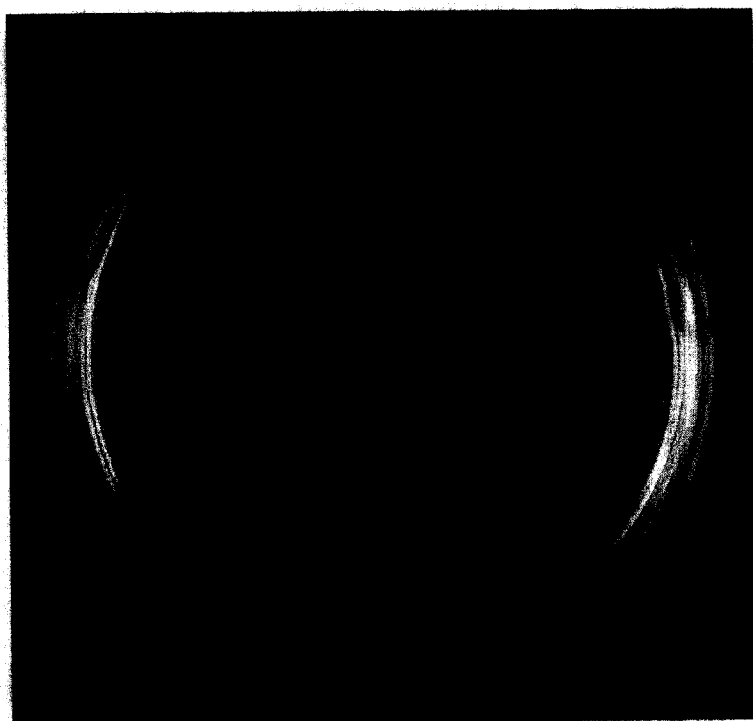


图 6