

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/70

C12P 21/00 G01N 33/53

G01N 33/574



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03129310.7

[43] 公开日 2004 年 3 月 3 日

[11] 公开号 CN 1478896A

[22] 申请日 2003.6.12 [21] 申请号 03129310.7

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 陈 智 朱海红 周林福

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 赵杭丽 张法高

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称 大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法

[57] 摘要

本发明提供一种大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法，是用 PCR 法扩增或从基因组中或从其他质粒中得到甲胎蛋白基因，经两端内切酶酶切后克隆至大肠杆菌中稳定表达，其表达甲胎蛋白效率极高，纯化后可作为抗原，用于免疫动物和作为免疫原检测甲胎蛋白抗体。用本发明方法利用大肠杆菌表达量高的特性，可使生产成本大幅度降低，同时，表达的甲胎蛋白具有极好的免疫原性。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法，其特征是：用 PCR 法扩增或从人基因组中或从其他质粒中得到甲胎蛋白基因，经两端内切酶酶切后克隆至大肠杆菌中稳定表达，其表达甲胎蛋白效率极高，纯化后可作为抗原，用于免疫动物和作为免疫原检测甲胎蛋白抗体。
2. 如权利要求 1 所述的大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法，其特征是：该方法包含以下几点：
 - (1) 甲胎蛋白基因的获得；
 - (2) 甲胎蛋白基因经内切酶酶切后，将甲胎蛋白基因克隆至表达载体中，并使其在大肠杆菌内稳定表达。
3. 如权利要求 2 所述的甲胎蛋白基因的获得，其特征是：通过以下 3 种途径获得：①设计引物，用 PCR 法扩增得到甲胎蛋白基因，并在基因两端附加相同或不同的内切酶酶切位点；②从人基因组 DNA 中经内切酶酶切后获得；③从其他质粒中经内切酶酶切后获得。
4. 如权利要求 3 所述的 PCR 法扩增获得甲胎蛋白基因的方法，其特征是：设计的上游引物为甲胎蛋白基因序列中的任意位置的核苷酸序列，下游引物为上游引物下游的任意位置的核苷酸序列，上游引物含 BamH I、EcoR I 或 Hind III 等所有的商品化内切酶中的一种酶的酶切位点，下游引物含与上游相同的或不同的 BamH I、EcoR I 或 Hind III 等各种商品化的内切酶的所有的商品化内切酶中的一种酶的酶切位点。
5. 如权利要求 2 所述的大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法，其特征是：用于表达甲胎蛋白的载体经 BamH I、EcoR I 或 Hind III 等各种商品化的内切酶的所有的商品化内切酶中的一种或两种酶酶切后回收。
6. 如权利要求 2 所述的大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法，其特征是：将双酶切后的甲胎蛋白基因和 pGEMEX-1 或 pET44 等所有商品化的原核表达质粒在 T4 连接酶作用下作连接反应，获得表达产物。
7. 如权利要求 1 所述的大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法，其特征是：用该方法获得的产物纯化后可作为抗原，用于免疫动物和作为免疫原检测甲胎蛋白抗体。

大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法

技术领域

本发明属生物技术，涉及基因工程，尤其是关于大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法，适用于作为抗原，用于免疫动物和作为免疫原检测甲胎蛋白抗体。

背景技术

原发性肝癌是危害人类健康的常见恶性肿瘤。流行病学调查发现原发性肝癌与 HBV、HCV 慢性感染密切相关。我国是病毒性肝炎的高发区，目前已有超过一亿的 HBV 和 HCV 的感染者，因而导致肝癌的发病率居高不下。据卫生部统计，自九十年代起原发性肝癌是所有肿瘤中的第二位致死原因。虽经众多肿瘤学专家努力，实现了手术、化疗、放疗、介入疗法，免疫治疗和中医中药治疗等多种治疗手段，水平已有很大的提高，但是原发性肝细胞癌的临床治疗效果远未达到让人满意，仍有较多患者的存活时间、生存质量并未取得根本性的改变。接受根治手术的原发性肝细胞癌病人，肿瘤年复发率高达 10%~50%，但是患者却需花费昂贵的医疗费用。因此，原发性肝癌严重影响人民的的生活和工作，造成许多家庭的悲剧，也给家庭和社会增加沉重的经济负担。开发有效的抗肝癌新药将造福人民，产生巨大的社会效益和经济效益，为社会作出巨大贡献。

转移因子是存在于白细胞中一种可透析的免疫小分子肽和多核苷酸，能将供体的某种抗原特异性迟发超敏反应转移给受体。转移因子是细胞免疫激活剂，能特异性和非特异性地提高受体的免疫功能。转移因子介导淋巴细胞对肿瘤细胞的细胞毒作用，可抑制或破坏肿瘤细胞的生长。

转移因子依据其来源和免疫活性的不同，可以分成非特异性转移因子(NTF)和特异性转移因子(STF)。STF 来源于用抗原物质免疫过的人或动物的白细胞、脾脏及淋巴组织。肿瘤特异性转移因子作为一种细胞免疫因子，成功地成为一些肿瘤免疫治疗的有效制剂。临床前动物实验及临床资料表明，STF 具有抑制杀伤癌细胞作用，可用于肿瘤辅助治疗。对于早期肿瘤术后病人，可以阻止肿瘤复发及转移；对已有转移的病人，可抑制肿瘤生长速度，延长患者生存期，是高新生物技术治疗肿瘤的比较成熟的项目。

甲胎蛋白（AFP）是原发性肝癌的特异性肿瘤标志物。在制备甲胎蛋白特异性转移因子的过程中，需要大量的甲胎蛋白免疫动物。但是商品化的甲胎蛋白价格比较昂贵，使最终产物成本高。

发明内容

本发明的一个目的是采用大肠杆菌表达系统进行表达，以降低成本。并且可以用于免疫动物，制备抗甲胎蛋白的多克隆抗体和单克隆抗体，用于临床诊断或科学研究。

实现本发明的目的是提供一种用大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法，是通过PCR法扩增或从人基因组中或从其他质粒中得到甲胎蛋白基因，经两端内切酶酶切后克隆至大肠杆菌中稳定表达，其表达甲胎蛋白效率极高，纯化后可作为抗原，用于免疫动物和作为免疫原检测甲胎蛋白抗体。

本发明方法包含以下几个步骤：

（1）甲胎蛋白基因的获得，通过以下3种途径：①设计引物，用PCR法扩增得到甲胎蛋白基因，并在基因两端附加相同或不同的内切酶酶切位点；②从人基因组DNA中经内切酶酶切后获得；③从其他质粒中经内切酶酶切后获得；

（2）甲胎蛋白基因经内切酶酶切后，将甲胎蛋白基因克隆至表达载体中，并使其在大肠杆菌内稳定表达。

本发明方法设计的上游引物为甲胎蛋白基因序列中的任意位置的核苷酸序列，下游引物为上游引物下游的任意位置的核苷酸序列，上游引物含BamH I、EcoR I或HindIII等所有的商品化内切酶中的一种酶的酶切位点，下游引物含与上游相同的或不同的BamH I、EcoR I或HindIII等各种商品化的内切酶的所有商品化内切酶中的一种酶的酶切位点。

本发明方法的表达载体是pGEMEX-1或pET44等的所有商品化的原核表达质粒，经BamH I、EcoR I或HindIII等各种商品化的内切酶的所有商品化内切酶中的一种或两种酶酶切后回收。

本发明方法是将双酶切后的甲胎蛋白基因和pGEMEX-1或pET44等原核表达的所有商品化的质粒在T4连接酶作用下作连接反应，获得表达产物。

本发明方法获得的产物纯化后可作为抗原，用于免疫动物和作为免疫原检

测甲胎蛋白抗体。

用本发明方法生产大肠杆菌表达的甲胎蛋白可使生产成本大幅度降低。

本发明的两个显著特点：

- (1) 大肠杆菌表达的甲胎蛋白具有极好的免疫原性；
- (2) 利用大肠杆菌表达量高的特性，该产品生产成本极低。

附图说明

图 1 为甲胎蛋白基因的 PCR 产物电泳图。

图 2 为重组质粒 (pGEMEX-1/Afp1) 大肠杆菌表达产物的 SDS-PAGE 电泳图。

具体实施方式

本发明将结合具体实施例作进一步说明，这些实例仅用于说明目的，而不用限制本发明范围。

实施例一 大肠杆菌表达全长甲胎蛋白的方法：

1. 人甲胎蛋白基因 cDNA 的获取

取人胎肝组织,运用 Trizol 试剂(购自 Gibco BRL 公司)提取组织总 RNA. 以 Oligo dT(15)为引物逆转录成 cDNA(逆转录酶购自罗氏公司)

2. 人甲胎蛋白 DNA 片断的准备

合成全长人甲胎蛋白基因的引物,扩增全长 AFP 基因。引物两端设计与载体匹配的酶切位点，上游含 BamH I 酶切位点，下游含 Hind III 酶切位点。

AFP upstream 5' GC GGA TTC AGA ACA CTG CAT AGA AAT G 3'

AFP downstream 5' A TAA GCT TTA AAC TCC CAA AGC AGC ACG 3'

高保真 PCR 合成 AFP cDNA。取 2ug 作 PCR 产物纯化后用 BamH I 和 Hind III 37 度水浴双酶切 2 小时。再用纯化试剂盒纯化。获得了含有 BamH I 内切酶和 HindIII内切酶粘末端的 AFP 片断。参见图 1，其中条带 1, 2, 4 为 AFP 基因的 PCR 产物；条带 3 为 100bp DNA Ladder (Promega)。

3. 载体的准备

取 1ug 质粒 pGEMEX-1(美国 Promega 公司产品)用 BamH I 和 Hind III 37 度水浴双酶切 2 小时。再用纯化试剂盒纯化获得含有 BamH I 内切酶和 HindIII内切酶粘末端的质粒片断。

4. 连接反应

将含有 HindIII 内切酶和 BamH I 内切酶粘末端 AFP 片断和质粒片断用 T4 DNA 连接酶在室温下连接 5 分钟。

5. 转化感受态细胞

氯化钙法制备 DH5α 感受态细胞, 转化 10ul 连接产物后涂于氨苄阳性的固体 LB 平板过夜。

6. 阳性克隆鉴定

用上述引物对所挑选的各克隆的细菌裂解液分别进行 PCR 扩增, 凝胶电泳观察 PCR 结果; 小量碱裂解法抽提上述 PCR 阳性克隆的质粒, 溶于双蒸水后, 用 HindIII 内切酶和 BamH I 内切酶进行酶切, 凝胶电泳观察酶切结果。

7. 测序鉴定

将酶切阳性的克隆的质粒纯化后, 用 SP6, T7T 通用引物进行测序鉴定。

其 AFP 基因序列如下:

```

agaacactgc atagaaatga atatggaata gcttccatat tggattctta ccaatgtact 60
gcagagataa gtttagctga cctggctacc atatTTTTTg ccagtttgt tcaagaagcc 120
acttacaagg aagtaagcaa aatggtgaaa gatgcattga ctgcaattga gaaaccact 180
ggagatgaac agtcttcagg gtgttttagaa aaccagctac ctgcctttct ggaagaactt 240
tgccatgaga aagaaatttt ggagaagtac ggacattcag actgctgcag ccaaagtga 300
gagggaagac ataactgttt tcttgacac aaaaagccca ctccagcatc gatcccactt 360
ttccaagttc cagaacctgt cacaagctgt gaagcatatg aagaagacag ggagacattc 420
atgaacaaat tcatttatga gatagcaaga aggcatccct tcctgtatgc acctacaatt 480
cttctttggg ctgctcgcta tgacaaaata attccatctt gctgcaaagc tgaaaatgca 540
gttgaatgct tccaaacaaa ggcagcaaca gttacaaaag aattaagaga aagcagcttg 600
ttaaatcaac atgcatgtgc agtaatgaaa aattttggga cccgaacttt ccaagccata 660
actgttacta aactgagtca gaagtttacc aaagttaatt ttactgaaat ccagaaacta 720
gtcctggatg tggcccatgt acatgagcac tgttcagag gagatgtgct ggattgtctg 780
caggatgggg aaaaaatcat gtcctacata tgttctcaac aagacactct gtcaacaaaa 840
ataacagaat gctgcaaact gaccacgctg gaacgtggtc aatgtataat tcatgcagaa 900
aatgatgaaa aacctgaagg tctatctcca aatctaaaca ggTTTTTtagg agatagagat 960
tttaaccaat tttcttcagg ggaaaaaaat atcttcttgg caagttttgt tcatgaatat 1020
tcaagaagac atcctcagct tgctgtctca gtaattctaa gagttgctaa aggataccag 1080
gagttattgg agaagtgttt ccagactgaa aaccctcttg aatgccaaga taaaggagaa 1140
gaagaattac agaatacat ccaggagagc caagcattgg caaagcgaag ctgcggcctc 1200
ttccagaaac taggagaata ttacttacaa aatgcgtttc tcgttgctta cacaagaaa 1260
gccccccagc tgacctcgtc ggagctgatg gccatcacca gaaaaatggc agccacagca 1320
gccacttggt gccaaactcag tgaggacaaa ctattggcct gtggcgaggg agcggctgac 1380
attattatcg gacacttatg tatcagacat gaaatgactc cagtaaacc tgggtgttggc 1440
cagtgtgca cttcttcata tgccaacagg aggccatgct tcagcagctt ggtggtggat 1500

```

```

gaaacatatg tccctcctgc attctctgat gacaagttca tttccataa ggatctgtgc 1560
caagctcagg gtgtagcgct gcaaacgatg aagcaagagt ttctcattaa ccttgtgaag 1620
caaaagccac aaataacaga ggaacaactt gaggctgtca ttgcagattt ctcaggcctg 1680
ttggagaaat gctgccaagg ccaggaacag gaagtctgct ttgctgaaga gggacaaaaa 1740
ctgatttcaa aaactcgtgc tgctttggga gtta 1775

```

8. 重组质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3) 的表达

将测序序列正确的重组质粒转化氯化钙法制备的 BL21 (DE3) 细菌, 涂于氨苄阳性的 LB 平板过夜。挑克隆 37 度摇细菌至 OD 值 0.6, 加入 ITPG 至 1mmol/L 摇 4 小时收集细菌。

9. SDS-PAGE

样品加于 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 60V 电泳 30 分钟, 再 120V 90 分钟。

10. 考马斯亮兰染色

凝胶室温摇床染色 4 小时, 再脱色 4 小时, 结果参见图 2, 其中条带 1 为重组质粒 (pGEMEX-1/Afp1) 大肠杆菌表达产物; 条带 2 为蛋白 Marker。

11. Western blot

将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶转膜至硝酸纤维素膜, 封闭后加入兔抗 AFP 多克隆抗体(购自 DAKO 公司)4 度过夜。洗膜后加入 HRP 标记的鼠抗兔二抗, 室温一小时即显色反应。诱导前可见少量 AFP 表达, 诱导后可见有明显的 AFP 表达。空 pGEMEX-1 质粒没有检出阳性条带。

实施例二 大肠杆菌表达片段甲胎蛋白的方法:

1. 人甲胎蛋白基因 cDNA 的获取

取人胎肝组织, 运用 Trizol 试剂(购自 Gibco BRL 公司)提取组织总 RNA。以 Oligo dT(15)为引物逆转录成 cDNA。

2. 人甲胎蛋白 DNA 片断的准备

合成甲胎蛋白基因的引物, 共 3 对, 分别扩增 AFP 基因上中下三个片断(下文简称 AFP1, AFP2, AFP3)。引物两端设计与载体匹配的酶切位点, 上游含 BamH I 酶切位点, 下游含 Hind III 酶切位点。

Afp1 up 5' > GCGGATCCAGAACACTGCATAGAAATG <3

Afp1Down 5' > CGCAAGCTTTGTTGCTGCCTTTGTTTGG <3

AFP2UP 5'>TGTGGATCCCTGTATGCACCTACAATTC<3'

Afp2down 5> GCGAAGCTTTTCAAGAGGGTTTTTCAGTC <3

AFP3up 5>GCAGGATCCAGAGTTGCTAAAGGATACC<3

Afp3down 5> ATAAGCTTTAAACTCCCAAAGCAGCAC<3

高保真 PCR 合成各片断。取 2ug 作 PCR 产物纯化后用 BamH I 和 Hind III 37 度水浴双酶切 2 小时。再用纯化试剂盒纯化。获得了含有 BamH I 内切酶和 Hind III 内切酶粘末端的 AFP 片断。

3.载体的准备

取 1ug 质粒 pGEMEX-1(美国 Promega 公司产品)用 BamH I 和 Hind III 37 度水浴双酶切 2 小时。再用纯化试剂盒纯化获得含有 BamH I 内切酶和 HindIII 内切酶粘末端的质粒片断。

4.连接反应

将含有 HindIII 内切酶和 BamH I 内切酶粘末端 AFP 片断和质粒片断用 T4 DNA 连接酶在室温下连接 5 分钟。

5.转化感受态细胞

氯化钙法制备 DH5α 感受态细胞,转化 10ul 连接产物后涂于氨苄阳性的固体 LB 平板过夜。

6.阳性克隆鉴定

用上述引物对所挑选的各克隆的细菌裂解液分别进行 PCR 扩增,凝胶电泳观察 PCR 结果;小量碱裂解法抽提上述 PCR 阳性克隆的质粒,溶于双蒸水后,用 HindIII 内切酶和 BamH I 内切酶进行酶切,凝胶电泳观察酶切结果。

7.测序鉴定

将酶切阳性的克隆的质粒纯化后,用 SP6,T7T 通用引物进行测序鉴定。

8.重组质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3) 的表达

将测序序列正确的重组质粒转化氯化钙法制备的 BL21 (DE3) 细菌,涂于氨苄阳性的 LB 平板过夜。挑克隆 37 度摇细菌至 OD 值 0.6,加入 IPTG 至 1mmol/L 摇 4 小时收集细菌。

9.SDS-PAGE

样品加于 12%聚丙烯酰胺凝胶,60V 电泳 30 分钟,再 120V 90 分钟。

10.考马斯亮兰染色

凝胶室温摇床染色 4 小时，再脱色 4 小时。

11.Western blot

将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶转膜至硝酸纤维素膜,封闭后加入兔抗 AFP 多克隆抗体(购自 DAKO 公司)4 度过夜。洗膜后加入 HRP 标记的鼠抗兔二抗，室温一小时即显色反应。诱导前可见少量 AFP1,AFP2,AFP3 表达，诱导后可见有明显的 AFP1,AFP2,AFP3 表达。空 pGEMEX-1 质粒没有检出阳性条带。参见图 2。

实施例三 大肠杆菌表达甲胎蛋白的应用

应用本发明方法获得的大肠杆菌表达的甲胎蛋白，按程序免疫猪，制备甲胎蛋白特异性的转移因子，能显著缩小荷肝癌小鼠的肿瘤大小，延长动物模型的生存时间。

实施例四 大肠杆菌表达甲胎蛋白的应用

应用本发明方法获得的大肠杆菌表达的甲胎蛋白，按程序免疫山羊，制备多克隆抗体，可用于甲胎蛋白的检测。

实施例五 大肠杆菌表达甲胎蛋白的应用

应用本发明方法获得的大肠杆菌表达的甲胎蛋白，按程序免疫小鼠，制备单克隆抗体，可用于甲胎蛋白的检测。

无需进一步详细阐述，相信采用前面所公开的内容，本领域技术人员可最大限度地应用本发明。因此，前面的优选具体实施方案应理解为仅是举例说明，而非以任何方式限制本发明的范围。

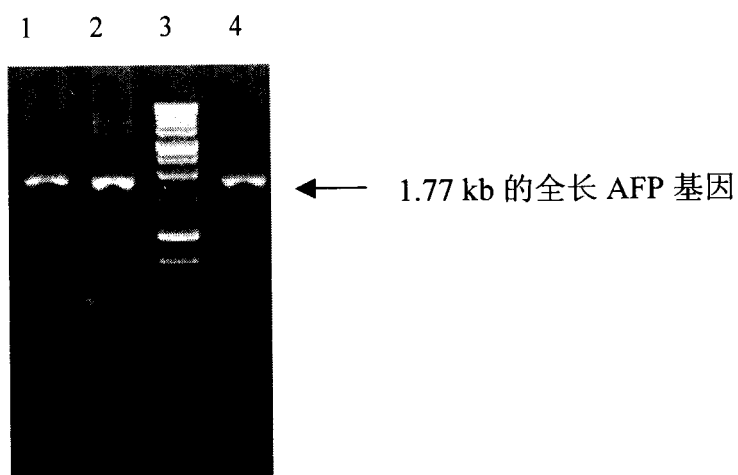


图 1

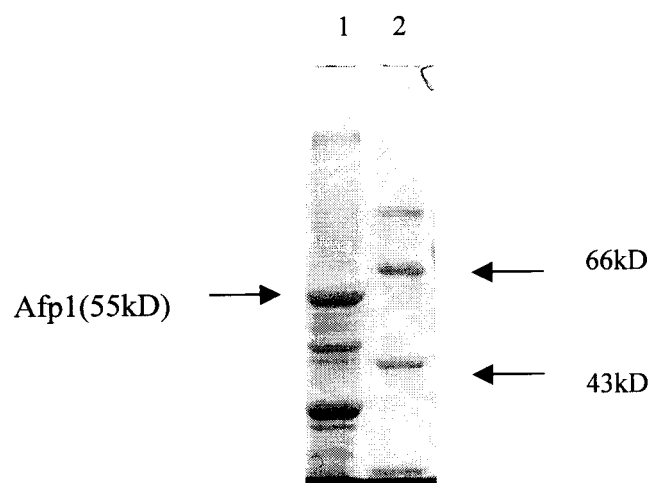


图 2

专利名称(译)	大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法		
公开(公告)号	CN1478896A	公开(公告)日	2004-03-03
申请号	CN03129310.7	申请日	2003-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	陈智 朱海红 周林福		
发明人	陈智 朱海红 周林福		
IPC分类号	C12N15/70 C12P21/00 G01N33/53 G01N33/574		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种大肠杆菌表达甲胎蛋白的方法，是用PCR法扩增或人基因组中或从其他质粒中得到甲胎蛋白基因，经两端内切酶酶切后克隆至大肠杆菌中稳定表达，其表达甲胎蛋白效率极高，纯化后可作为抗原，用于免疫动物和作为免疫原检测甲胎蛋白抗体。用本发明方法利用大肠杆菌表达量高的特性，可使生产成本大幅度降低，同时，表达的甲胎蛋白具有极好的免疫原性。

