



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103014028 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201210567475. X

(22) 申请日 2012. 12. 25

(71) 申请人 肖飞

地址 100062 北京市崇文区东花市南里东区
本家润园 7 号楼 2 单元 301 室

(72) 发明人 肖飞 黄薇

(51) Int. Cl.

C12N 15/53 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12N 9/04 (2006. 01)

C07K 16/40 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

序列表 1 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种制备乳酸脱氢酶的方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种制备乳酸脱氢酶的方法及应用,该方法包括:改造全基因合成人源化乳酸脱氢酶编码基因序列,去除大肠杆菌稀有密码子;将改造后的乳酸脱氢酶编码基因序列插入表达载体中,并用大肠杆菌菌株转化表达;将转化表达菌株接种于 LB 培养基, IPTG 诱导;所得菌体破菌,离心分离,过 Ni-NTA 柱纯化;本发明制备乳酸脱氢酶操作非常简单,制备成本低,成品产率高,纯度高而且具有高生物活性,作为抗原物质可进行动物免疫,筛选相关抗体,同时为尽快建立国内临床化学诊断急需的校准品制备平台,研制诊断试剂标准物质和参考品奠定基础。



1. 一种制备乳酸脱氢酶的方法,其特征在于,该方法包括:

1) 改造全基因合成人源化乳酸脱氢酶编码基因序列,去除大肠杆菌稀有密码子;

2) 将步骤 1) 中改造后的乳酸脱氢酶编码基因序列插入表达载体中,并用大肠杆菌菌株转化表达;

3) 将转化表达菌株接种于 LB 培养基, IPTG 诱导;

4) 所得菌体破菌,离心分离,过 Ni-NTA 柱纯化;

其中,步骤 1) 中改造后的全基因合成人源化乳酸脱氢酶编码基因序列为:

```
1   ATGGATCATC ATCATCATCA CCACGAAAAC CTGTATTTTC
    AGGGCGCAAC TCTAAAGGAT
61  CAGCTGATTT ATAATCTTCT AAAGGAAGAA CAGACCCCCC
    AGAATAAGAT TACAGTTGTT
121 GGGGTTGGTG CTGTTGGCAT GGCCTGTGCC ATCAGTATCT
    TAATGAAGGA CTTGGCAGAT
181 GAACTTGCTC TTGTTGATGT CATCGAAGAC AAATTGAAGG
    GAGAGATGAT GGATCTCCAA
241 CATGGCAGCC TTTTCCTTAG AACACCAAAG ATTGTCTCTG
    GCAAAGACTA TAATGTA ACT
301 GCAA ACTCCA AGCTGGTCAT TATCACGGCT GGGGCACGTC
    AGCAAGAGGG AGAAAGCCGT
361 CTTAATTTGG TCCAGCGTAA CGTGAACATC TTAAATTCA
    TCATTCCTAA TGTTGTAAAA
421 TACAGCCCGA ACTGCAAGTT GCTTATTGTT TCAAATCCAG
    TGGATATCTT GACCTACGTG
481 GCTTGGAAGA TAAGTGGTTT TCCCAAAAAC CGTGTTATTG
    GAAGCGGTTG CAATCTGGAT
541 TCAGCCCGAT TCCGTTACCT AATGGGGGAA AGGCTGGGAG
    TTCACCCATT AAGCTGTCAT
601 GGGTGGGTCC TTGGGGAACA TGGAGATTCC AGTGTGCCTG
    TATGGAGTGG AATGAATGTT
661 GCTGGTGTCT CTCTGAAGAC TCTGCACCCA GATTAGGGA
    CTGATAAAGA TAAGGAACAG
721 TGGAAAGAGG TTCACAAGCA GGTGGTTGAG AGTGCTTATG
    AGGTGATCAA ACTCAAAGGC
781 TACACATCCT GGGCTATTGG ACTCTCTGTA GCAGATTTGG
    CAGAGAGTAT AATGAAGAAT
841 CTTAGGCGGG TGCACCCAGT TTCCACCATG ATTAAGGGTC
    TTTACGGAAT AAAGGATGAT
901 GTCTTCCTTA GTGTTCTTG CATTTTGGGA CAGAATGGAA
    TCTCAGACCT TGTGAAGGTG
```

961 ACTCTGACTT CTGAGGAAGA GGCCCGTTTG AAGAAGAGTG
CAGATACACT TTGGGGGATC
1021 CAAAAGGAGC TGCAATTTTA A

2. 如权利要求 1 所述制备乳酸脱氢酶的方法,其特征在于,步骤 2) 中所述表达载体为 : pRSF Duet, pET 表达系列。

3. 如权利要求 1 所述制备乳酸脱氢酶的方法,其特征在于,步骤 2) 中所述大肠杆菌菌株为 :BL21 (DE3), Rosetta (DE3)。

4. 如权利要求 3 所述制备乳酸脱氢酶的方法,其特征在于,所述 BL21 (DE3) 菌株用于高效表达克隆于含有噬菌体 T7 启动子的表达载体的基因。

5. 如权利要求 4 所述制备乳酸脱氢酶的方法,其特征在于,λ 噬菌体 DE3 区含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶,该区整合于 BL21 的染色体上形成所述 BL21 (DE3)。

6. 如权利要求 1 所述制备乳酸脱氢酶的方法,其特征在于,步骤 4) 中所述破菌方法为高压破碎、超声或者溶菌酶酶解。

7. 一种如权利要求 1 所述制备乳酸脱氢酶的方法在校准品、标准物质和参考品制备中的应用。

8. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述制备乳酸脱氢酶的纯品添加入人源或动物源的血清,配制成指定浓度的标准品或校准品。

9. 一种利用权利要求 1 所述制备乳酸脱氢酶的方法制成的产物作为免疫用的抗原物质,来筛选相关抗体。

一种制备乳酸脱氢酶的方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程和蛋白表达领域,涉及一种用生物工程技术高效制备乳酸脱氢酶的方法,产物可作为抗原物质进行动物免疫,筛选相关抗体,同时为临床化学诊断所需校准品、标准物质和参考品的制备开发奠定基础。

背景技术

[0002] 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是一种糖酵解酶,催化乳酸与丙酮酸之间可逆反应的一种脱氢酶。乳酸脱氢酶广泛存在于各种组织中,以心肌、肝、骨骼肌、肺含量最多,其活力约为血清的500~1000倍。若器官或组织损伤,可释放此酶至血液中,血清此酶含量即见增高,但由于其分布广泛而缺乏特异性。血清此酶含量升高主要见于急性心肌梗塞、病毒性心肌炎、肝硬化、肺梗塞、恶性肿瘤及白血病等。在急性心肌梗塞患者,血清此酶水平于发作后12~24小时开始增高,48~72小时达高峰,升高可持续10天。与肌酸激酶相比该酶升高出现较晚,阳性率低,但维持时间长。该酶和谷-草转氨酶联合检测有助于鉴别心肌梗塞,两者均升高多见于心肌梗塞;乳酸脱氢酶和胆红素升高,而谷-草转氨酶正常多见于肺梗塞。

[0003] LDH是由H(心肌型)和M(骨骼肌型)两类亚基组成,其同功酶有五种形式,即LDH-1(H₄)、LDH-2(H₃M)、LDH-3(H₂M₂)、LDH-4(HM₃)及LDH-5(M₄),LDH同功酶的分布有明显的组织特异性,所以可以根据其组织特异性来协助诊断疾病。正常人血清中LDH₂含量大于LDH₁,如有心肌酶释放入血则LDH₁含量大于LDH₂,利用此指标可以观察诊断心肌疾病。

[0004] LDH正常范围:血清100~300U/L;尿560~2050UL;脑脊液含量为血清的1/10。

[0005] 临床意义:

[0006] (1) 急性心肌梗塞发作后,早期血清中LDH₁和LDH₂活性均升高,但LDH₁增高更早,更明显,导致LDH₁/LDH₂的比值升高。

[0007] (2) 肝炎、急性肝细胞损伤及骨骼肌损伤时LDH₅都会升高。

[0008] (3) 患活动性风湿性心脏病、急性病毒性心肌炎、溶血性贫血、肾坏死等病LDH₁也可升高。

[0009] 我国幅员辽阔,人口众多,临床诊断试剂市场巨大,前景广阔。就国内的现状来说,我国的诊断试剂行业仍处于成长初期,即产品研发与生产的投入初期,成长期还没有真正到来,而我国诊断试剂市场规模约为全球市场的1/14,有较大的成长空间。研制价廉物美的诊断试剂产品无疑是非常必要且具重要意义的。

[0010] 目前国外的产品通常是把试剂、参考品(校准品、质控品)、仪器作为一个系统(封闭系统)推入市场,在检测重复性、准确性上有很大的优势,并且具有市场垄断性。国内主要的诊断试剂生产厂家几乎都没有生产相应质控品的经验和实力,市场上认可的国产产品寥寥无几。

发明内容

[0011] 针对现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种操作简单、制备成本低廉,成功率高的制备乳酸脱氢酶的方法。

[0012] 为实现上述目的,本发明一种制备乳酸脱氢酶的方法,该方法包括:

[0013] 1) 改造并全基因合成人源化乳酸脱氢酶编码基因序列,去除大肠杆菌稀有密码子;

[0014] 2) 将步骤 1) 中改造后的乳酸脱氢酶编码基因序列插入表达载体中,并用大肠杆菌菌株转化表达;

[0015] 3) 将转化表达菌株接种于 LB 培养基, IPTG 诱导;

[0016] 4) 所得菌体破菌,离心分离,过 Ni-NTA 柱纯化;

[0017] 其中,步骤 1) 中改造后的全基因合成人源化乳酸脱氢酶编码基因序列为:

[0018] 1 ATGGATCATC ATCATCATCA CCACGAAAAC CTGTATTTTC

[0019] AGGGCGCAAC TCTAAAGGAT

[0020] 61 CAGCTGATTT ATAATCTTCT AAAGGAAGAA CAGACCCCCC

[0021] AGAATAAGAT TACAGTTGTT

[0022] 121 GGGGTTGGTG CTGTTGGCAT GGCCTGTGCC ATCAGTATCT

[0023] TAATGAAGGA CTTGGCAGAT

[0024] 181 GAACTTGCTC TTGTTGATGT CATCGAAGAC AAATTGAAGG

[0025] GAGAGATGAT GGATCTCCAA

[0026] 241 CATGGCAGCC TTTTCCTTAG AACACCAAAG ATTGTCTCTG

[0027] GCAAAGACTA TAATGTAAC

[0028] 301 GCAAACCTCA AGCTGGTCAT TATCACGGCT GGGGCACGTC

[0029] AGCAAGAGGG AGAAAGCCGT

[0030] 361 CTTAATTTGG TCCAGCGTAA CGTGAACATC TTAAATTCA

[0031] TCATTCCTAA TGTTGTAAAA

[0032] 421 TACAGCCCGA ACTGCAAGTT GCTTATTGTT TCAAATCCAG

[0033] TGGATATCTT GACCTACGTG

[0034] 481 GCTTGGAAGA TAAGTGGTTT TCCAAAAAAC CGTGTATTG

[0035] GAAGCGGTTG CAATCTGGAT

[0036] 541 TCAGCCCGAT TCCGTTACCT AATGGGGGAA AGGCTGGGAG

[0037] TTCACCCATT AAGCTGTCAT

[0038] 601 GGGTGGGTCC TTGGGGAACA TGGAGATTCC AGTGTGCCTG

[0039] TATGGAGTGG AATGAATGTT

[0040] 661 GCTGGTGTCT CTCTGAAGAC TCTGCACCCA GATTAGGGA

[0041] CTGATAAAGA TAAGGAACAG

[0042] 721 TGGAAAGAGG TTCACAAGCA GGTGGTTGAG AGTGCTTATG

[0043] AGGTGATCAA ACTCAAAGGC

[0044] 781 TACACATCCT GGGCTATTGG ACTCTCTGTA GCAGATTTGG

[0045] CAGAGAGTAT AATGAAGAAT

[0046] 841 CTTAGGCGGG TGCACCCAGT TTCCACCATG ATTAAGGGTC

- [0047] TTTACGGAAT AAAGGATGAT
- [0048] 901 GTCTTCCTTA GTGTTCTTG CATTTTGGGA CAGAATGGAA
- [0049] TCTCAGACCT TGTGAAGGTG
- [0050] 961 ACTCTGACTT CTGAGGAAGA GGCCCGTTTG AAGAAGAGTG
- [0051] CAGATACACT TTGGGGGATC
- [0052] 1021 CAAAAGGAGC TGCAATTTTA A
- [0053] 进一步,步骤 2) 中所述表达载体为 :pRSF Duet, pET 表达系列。
- [0054] 进一步,步骤 2) 中所述大肠杆菌菌株为 :BL21 (DE3), Rosetta (DE3)。
- [0055] 进一步,所述 BL21 (DE3) 菌株用于高效表达克隆于含有噬菌体 T7 启动子的表达载体的基因。
- [0056] 进一步,λ 噬菌体 DE3 区含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶,该区整合于 BL21 的染色体上形成所述 BL21 (DE3)。
- [0057] 进一步,步骤 4) 中所述破菌方法为高压破碎、超声或者溶菌酶酶解。
- [0058] 一种如权利要求 1 所述制备乳酸脱氢酶的方法在校准品、标准物质和参考品制备中的应用。
- [0059] 进一步,所述制备乳酸脱氢酶的纯品添加入人源或动物源的血清,配制成指定浓度的标准品或校准品。
- [0060] 一种利用权利要求 1 所述制备乳酸脱氢酶的方法制成的产物作为免疫用的抗原物质,来筛选相关抗体。
- [0061] 本发明的有益效果在于:本发明制备乳酸脱氢酶操作非常简单,制备成本低,成品产率高,纯度高而且具有高生物活性,可作为抗原物质进行动物免疫,筛选相关抗体,为尽快建立国内临床化学诊断急需的校准品制备平台,研制诊断试剂标准物质和参考品奠定基础。

附图说明

- [0062] 图 1 为构建的 6His-LDH pRSF 用 Nco I 和 EcoR I 酶切,得到约 1kb 的插入片段,表明目的基因已插入载体,构建成功;
- [0063] 图 2 为纯化的 LDH 成品的 SDS-PAGE 电泳图,产品纯度可达 90% 以上。

具体实施方式

- [0064] 下面,参考附图,对本发明进行更全面的说明,附图中示出了本发明的示例性实施例。然而,本发明可以体现为多种不同形式,并不应理解为局限于这里叙述的示例性实施例。而是,提供这些实施例,从而使本发明全面和完整,并将本发明的范围完全地传达给本领域的普通技术人员。
- [0065] 本发明建立了操作简单、迅速、成本较低的一种制备乳酸脱氢酶的方法。这种方法的主要原理在于:将优化后的乳酸脱氢酶编码基因插入构建好的表达载体,在大肠杆菌中诱导其高效表达,该方法具体为:
- [0066] 1. 乳酸脱氢酶表达载体的构建:
- [0067] 改造人源化乳酸脱氢酶编码基因序列,去除大肠杆菌稀有密码子,从北京

invitrogen 公司全基因合成改造后的 LDH 编码序列；

[0068] 利用 <http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm> 网页分析,在原始 LDH 编码基因序列中,大肠杆菌中密码子使用频率在 10%以内占 20%;改造后的基因序列完全去除大肠杆菌稀有密码子,大肠杆菌密码子完全被激活。

[0069] 通过基因工程手段利用 Nco I 和 EcoRI 位点将其克隆至 PRSF Duet 载体内,并转化大肠杆菌 TOP10 菌株,挑取数个转化克隆提取质粒,通过限制性内切酶酶切鉴定目的基因是否插入载体(如图 1 所示),选取插入目的基因的质粒进行 DNA 序列测定,结果表明乳酸脱氢酶基因成功克隆至 pRSF Duet 载体内,我们将其命名为 6His-LDH pRSF。

[0070] 改造后的全基因合成人源化乳酸脱氢酶编码基因序列为：

[0071] 1 ATGGATCATC ATCATCATCA CCACGAAAAC CTGTATTTTC

[0072] AGGGCGCAAC TCTAAAGGAT

[0073] 61 CAGCTGATTT ATAATCTTCT AAAGGAAGAA CAGACCCCCC

[0074] AGAATAAGAT TACAGTTGTT

[0075] 121 GGGGTTGGTG CTGTTGGCAT GGCCTGTGCC ATCAGTATCT

[0076] TAATGAAGGA CTTGGCAGAT

[0077] 181 GAACTTGCTC TTGTTGATGT CATCGAAGAC AAATTGAAGG

[0078] GAGAGATGAT GGATCTCCAA

[0079] 241 CATGGCAGCC TTTTCCTTAG AACACCAAAG ATTGTCTCTG

[0080] GCAAAGACTA TAATGTAAC

[0081] 301 GCAAAGACTA AGCTGGTCAT TATCACGGCT GGGGCACGTC

[0082] AGCAAGAGGG AGAAAGCCGT

[0083] 361 CTTAATTTGG TCCAGCGTAA CGTGAACATC TTAAATTTCA

[0084] TCATTCTCTA TGTTGTAAAA

[0085] 421 TACAGCCCGA ACTGCAAGTT GCTTATTGTT TCAAATCCAG

[0086] TGGATATCTT GACCTACGTG

[0087] 481 GCTTGGAAGA TAAGTGGTTT TCCCAAAAAC CGTGTTATTG

[0088] GAAGCGGTTG CAATCTGGAT

[0089] 541 TCAGCCCGAT TCCGTTACCT AATGGGGGAA AGGCTGGGAG

[0090] TTCACCCATT AAGCTGTCAT

[0091] 601 GGGTGGGTCC TTGGGGAACA TGGAGATTCC AGTGTGCCTG

[0092] TATGGAGTGG AATGAATGTT

[0093] 661 GCTGGTGTCT CTCTGAAGAC TCTGCACCCA GATTAGGGA

[0094] CTGATAAAGA TAAGGAACAG

[0095] 721 TGGAAAGAGG TTCACAAGCA GGTGGTTGAG AGTGCTTATG

[0096] AGGTGATCAA ACTCAAAGGC

[0097] 781 TACACATCCT GGGCTATTGG ACTCTCTGTA GCAGATTTGG

[0098] CAGAGAGTAT AATGAAGAAT

[0099] 841 CTTAGGCGGG TGCACCCAGT TTCCACCATG ATTAAGGGTC

[0100] TTTACGGAAT AAAGGATGAT

[0101] 901 GTCTTCCTTA GTGTTCTTG CATTTTGGGA CAGAATGGAA

[0102] TCTCAGACCT TGTGAAGGTG

[0103] 961 ACTCTGACTT CTGAGGAAGA GGCCCGTTTG AAGAAGAGTG

[0104] CAGATACACT TTGGGGGATC

[0105] 1021 CAAAAGGAGC TGCAATTTTA A

[0106] 2. 乳酸脱氢酶的表达：

[0107] 1) 以 BL21 (DE3) 为宿主菌, 将 6His-LDH pRSF 进行转化, 挑取单菌落于 3ml LB 培养基培养过夜；

[0108] 2) 以 1 : 500 比例将菌液转接至 400ml LB 培养基, 恒温在 37℃, 230rpm 培养至 OD₆₀₀ = 0.4-0.6；

[0109] 3) 加 IPTG 诱导, IPTG 诱导终浓度为 0.5mM, 保持 25℃ 条件下表达 8 小时后收菌。

[0110] BL21 (DE3) 菌株用于高效表达克隆于含有噬菌体 T7 启动子的表达载体 (如 pET 系列) 的基因。普通大肠杆菌没有 t7RNA 聚合酶, 所以不能表达那些载体上的基因。λ 噬菌体 DE3 区含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶,

[0111] 该区整合于 BL21 的染色体上, 就叫 BL21 (DE3)。

[0112] 3. 乳酸脱氢酶的纯化：

[0113] 1) 取 400ml 培养液 3000rpm 离心分离 10 分钟后收集菌体, 菌体重悬于 10ml 蛋白提取缓冲液中 (50mM Na-PO₄, pH8.0, 500mM NaCl, 10mM Imidazole), 15MPa 高压破菌, 12,000rpm, 4℃ 离心 10min, 上清液与 Ni-NTA 冰上孵育 1 小时；

[0114] 2) 过 Ni-NTA 亲和层析柱, 用蛋白提取 buffer 洗涤, 最后用 250mM Imidazole 洗脱, 收集洗脱液。

[0115] 3) 蛋白洗脱液过 G50 柱去除 Imidazole, 这样可以得到 90% 以上纯度的 LDH (如图 2 所示)。

[0116] 4. 乳酸脱氢酶活性测定：

[0117] 制备乳酸脱氢酶的纯品用奥林巴斯 AU5400 生化仪测定活性, 酶活可达 20000U/L, 且 -20℃ 甘油冻存 6 个月, 酶活基本保持不变。该纯品可添加入人源或动物源的血清, 配制成指定浓度的标准品或校准品。

[0118] 上述制备乳酸脱氢酶的方法可以作为抗原物质进行动物免疫, 筛选相关抗体, 以及在校准品、标准物质和参考品制备中应用, 不是以诊断为目的, 不属于疾病的诊断方法。

[0119] 除非特殊定义, 本发明描述所用的术语是在有关技术领域中公知的术语。标准的化学符号及缩写符号可以与其全名互换使用。

[0120] 除非特殊指明, 本发明所用但并未明确阐述或简单阐述的技术和方法是指本技术领域通常使用的技术和方法, 可按照本领域公知的技术和方法进行。试剂盒的使用是根据制造商或供应商提供的说明书进行。

[0001]

说 明 书

LDH 核苷酸及其氨基酸序列

1 ATGGATCATC ATCATCATCA CCACGAAAAC CTGTATTTTC AGGGCGCAAC TCTAAAGGAT
61 CAGCTGATTT ATAATCTTCT AAAGGAAGAA CAGACCCCCC AGAATAAGAT TACAGTTGTT
121 GGGGTTGGTG CTGTTGGCAT GGCCTGTGCC ATCAGTATCT TAATGAAGGA CTTGGCAGAT
181 GAACTTGCTC TTGTTGATGT CATCGAAGAC AAATTGAAGG GAGAGATGAT GGATCTCCAA
241 CATGGCAGCC TTTTCCTTAG AACACCAAAG ATTGTCTCTG GCAAAGACTA TAATGTAAC
301 GCAAACCTCA AGCTGGTCAT TATCACGGCT GGGGCACGTC AGCAAGAGGG AGAAAGCCGT
361 CTTAATTTGG TCCAGCGTAA CGTGAACATC TTAAATTCA TCATTCCTAA TGTGTAAAA
421 TACAGCCCGA ACTGCAAGTT GCTTATTGTT TCAAATCCAG TGGATATCTT GACCTACGTG
481 GCTTGAAGA TAAGTGGTTT TCCAAAAAAC CGTGTTATTG GAAGCGGTG CAATCTGGAT
541 TCAGCCCGAT TCCGTTACCT AATGGGGGAA AGGCTGGGAG TTCACCCATT AAGCTGTCAT
601 GGGTGGGTCC TTGGGGAACA TGGAGATTCC AGTGTGCCTG TATGGAGTGG AATGAATGTT
661 GCTGGTGTCT CTCTGAAGAC TCTGCACCCA GATTTAGGGA CTGATAAAGA TAAGGAACAG
721 TGGAAAGAGG TTCACAAGCA GGTGGTTGAG AGTGCTTATG AGGTGATCAA ACTCAAAGGC
781 TACACATCCT GGGCTATTGG ACTCTCTGTA GCAGATTTGG CAGAGAGTAT AATGAAGAAT
841 CTTAGGCGGG TGCACCCAGT TTCCACCATG ATTAAGGGTC TTTACGGAAT AAAGGATGAT
901 GTCTTCCTTA GTGTTCTTG CATTTTGGGA CAGAATGGAA TCTCAGACCT TGTGAAGGTG
961 ACTCTGACTT CTGAGGAAGA GGCCCGTTTG AAGAAGAGTG CAGATACACT TTGGGGGATC
1021 CAAAAGGAGC TGCAATTTTA A

MDHHHHHHENLYFQGATLKDQLIYNLLKEEQTPQNKITVVGVGAVGMACAISILMKDLA
DELALVDVIEDKLKGEMMDLQHGSFLRTPKIVSGKDYNVTANSKLVIITAGARQQEGE
SRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPNCKLLIVSNPVDILTYVAWKISGFPKNRVIGSGC
NLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWVLGEHGDSSVPVWSGMNVAGVSLKTLHPDLGTDK
DKEQWKEVHKQVVESAYEVIKLGYSWAIGLSVADLAESIMKNLRRVHPVSTMIKGLY
GIKDDVFLSVPCILGQNGISDLVKVTLTSEEEARLKKSADTLWGIQKELQF*

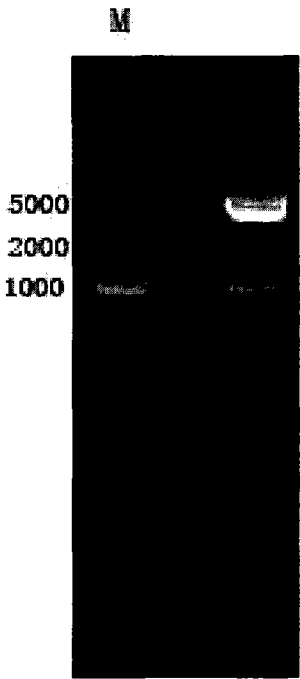


图 1

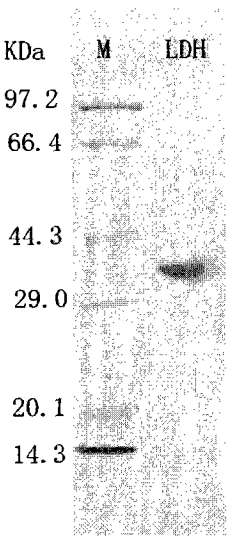


图 2

专利名称(译)	一种制备乳酸脱氢酶的方法及应用		
公开(公告)号	CN103014028A	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201210567475.X	申请日	2012-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	肖飞		
申请(专利权)人(译)	肖飞		
当前申请(专利权)人(译)	肖飞		
[标]发明人	肖飞 黄薇		
发明人	肖飞 黄薇		
IPC分类号	C12N15/53 C12N15/70 C12N9/04 C07K16/40 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种制备乳酸脱氢酶的方法及应用，该方法包括：改造全基因合成人源化乳酸脱氢酶编码基因序列，去除大肠杆菌稀有密码子；将改造后的乳酸脱氢酶编码基因序列插入表达载体中，并用大肠杆菌菌株转化表达；将转化表达菌株接种于LB培养基，IPTG诱导；所得菌体破菌，离心分离，过Ni-NTA柱纯化；本发明制备乳酸脱氢酶操作非常简单，制备成本低，成品产率高，纯度高而且具有高生物活性，作为抗原物质可进行动物免疫，筛选相关抗体，同时为尽快建立国内临床化学诊断急需的校准品制备平台，研制诊断试剂标准物质和参考品奠定基础。

