



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103014034 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201210567474. 5

(22) 申请日 2012. 12. 25

(71) 申请人 肖飞

地址 100062 北京市东城区东花市南里东区
本家润园 7 号楼 2 单元 301 室

(72) 发明人 肖飞 黄薇

(51) Int. Cl.

C12N 15/54 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12N 9/12 (2006. 01)

C07K 16/40 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 6 页

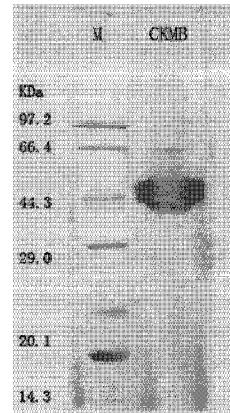
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种制备肌酸激酶同工酶的方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种制备肌酸激酶同工酶的方法及应用,该方法包括:改造全基因合成人源化肌酸激酶同工酶编码基因序列,去除大肠杆菌稀有密码子;将改造后的肌酸激酶同工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;本发明制备肌酸激酶同工酶操作非常简单,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. 一种制备肌酸激酶同工酶的方法，其特征在于，该方法包括：

- 1) 改造全基因合成人源化肌酸激酶同工酶编码基因序列，去除大肠杆菌稀有密码子；
- 2) 将步骤1)中改造后的肌酸激酶同工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肌酸激酶亚单位CKM编码基因序列为：

```

1      ATGGGCCAT TCGGTAAACAC CCACAACAAG TTCAAGCTGA ATTACAAGCC TGAGGAGGAG
61     TACCCCGACC TCAGCAAACA TAACAACCAC ATGGCCAAGG TACTGACCCT TGAACCTCAC
121    AAGAACGCTGC GGGACAAGGA GACTCCATCT GGCTTCAGTG TAGACGATGT CATCCAGACA
181    GGAGTGGACA ACCCAGGTCA CCCCTTCATC ATGACCGTGG GCTGCGTGGC TGGTGATGAG
241    GAGTCCTACG AAGTTTCAA GGAACCTTT GACCCCATCA TCTCGGATCG CCACGGGGC
301    TACAAACCCA CTGACAAGCA CAAGACTGAC CTCAACCATG AAAACCTCAA GGGTGGAGAC
361    GACCTGGACC CTAACCTACGT GCTCAGCAGC CGCGTCCGCA CTGGCCGCAG CATCAAGGGC
421    TACACGTTGC CCCCACACTG CTCCCGTGGC GAGCGCCGGG CGGTGGAGAA GCTCTCTGTG
481    GAAGCTCTCA ACAGCCTGAC GGGCGAGTTC AAAGGGAAGT ACTACCCCTCT GAAGAGCATG
541    ACGGAGAAGG AGCAGCAGCA GCTCATCGAT GACCACTTCC TGTTGACAA GCCCGTGTCC
601    CCGCTGCTGC TGGCCTCAGG CATGGCCCGC GACTGGCCCG ACGCCCGTGG CATCTGGCAC
661    AATGACAACA AGAGCTTCCT GGTGTGGGTG AACGAGGAGG ATCACCTCCG GGTGATCTCA
721    ATGGAGAAGG GGGGCAACAT GAAGGAGGTT TTCCGCCGCT TCTGCGTAGG GCTGAGAAG
781    ATTGAGGAGA TCTTAAGAA AGCTGGCCAC CCCTTCATGT GGAACCAGCA CCTGGGCTAC
841    GTGCTCACCT GCCCATCCAA CCTGGGCACT GGGCTGCGTG GAGGCGTGCA TGTGAAGCTG
901    GCGCACCTGA GCAAGCACCC CAAGTTCGAG GAGATCCTCA CCCGCCTGCG TCTGCAGAAG
961    AGGGGTACAG GTGGCGTGGA CACAGCTGCC GTGGGCTCAG TATTGACGT GTCCAACGCT
1021   GATCGGCTGG GCTCGTCCGA AGTAGAACAG GTGCAGCTGG TGGTGGATGG TGTGAAGCTC
1081   ATGGTGGAAA TGGAGAAGAA GTTGGAGAAA GGCCAGTCCA TTTAG

```

步骤1)中改造后的全基因合成人源化肌酸激酶亚单位CKB编码基因序列为：

```

1      ATGGGTCCAT TTAGCAATT TCACAACGCA CTGAAACTGC
GCTTCCGGC TGAAGATGAG
61     TTCCCGGACC TGTCCGCACA TAACAACCAC ATGGCTAAAG
TTCTGACTCC GGAACCTGTAC
121    GCAGAACTGC GCGAAAAATC TACCCCGAGC GGCTTACTC
TGGACGACGT AATCCAGACC
181    GGCCTGGATA ACCCGGGTCA CCCATATATC ATGACCGTTG
GTTGTGTTGC CGGCGATGAA
241    GAAAGCTACG AAGTCTCAA AGACCTGTTG GATCCGATTA
TCGAAGATCG CCACGGCGGT
301    TACAAACCAA GCGATGAACA CAAAACCGAT CTGAATCCAG
ACAACCTGCA GGGTGGCGAC

```

361 GATCTGGATC CGAACTACGT ACTGTCTAGC CGTGTGCGCA
CCGGCCGTTTC TATCCGCGGT
421 TTCTGTCTGC CACCGCACTG TTCCCGTGGT GAACGTCGTG
CCATCGAAAA ACTGGCTGTG
481 GAAGCTCTGT CCAGCCTGGA TGGTGACCTG GCAGGTCGTT
ATTATGCGCT GAAGAGCATG
541 ACCGAAGCCG ACAACAACA GCTGATCGAT GATCACTTCC
TGTTCGACAA GCCTGTTCT
601 CCGCTGCTGC TGGCTCTGG TATGGCGCGC GACTGGCCGG
ACGCACGTGG CATTGGCAT
661 AACGACAACA AAACGTTCCCT GGTGTGGGT AACGAAGAAG
ACCACCTGCG TGTAATTCT
721 ATGCAGAAAG GTGGCAACAT GAAAGAAGTT TTCACCCGTT
TTTGCACCGG CCTGACCCAG
781 ATTGAAACTC TGTTCAAATC TAAAGACTAT GAATTTATGT
GGAACCCGCA CCTGGGTTAT
841 ATTCTGACCT GTCCGTCCAA CCTGGGTACT GGCCCTGCGTG
CGGGTGTGCA CATTAAGCTG
901 CCGAACCTGG GTAAACATGA AAAGTTCAGC GAGGTCCCTGA
AACGCCTGCG TCTGCAGAAG
961 CGTGGTACGG GCGGTGTTGA TACTGCAGCC GTTGGTGGTG
TGTTCGACGT TAGCAACGCG
1021 GATCGTCTGG GCTTCTCTGA AGTTGAACGT GTTCAGATGG
TTGTTGATGG CGTGAAACTG
1081 CTGATTGAGA TGGAACAGCG TCTGGAACAG GGTCAAGGCTA
TTGATGACCT GATGCCGGCA
1141 CAAAAATAG 。

2. 如权利要求 1 所述制备肌酸激酶同工酶的方法, 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 所述制备肌酸激酶同工酶的方法, 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 所述制备肌酸激酶同工酶的方法, 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 所述制备肌酸激酶同工酶的方法, 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 所述制备肌酸激酶同工酶的方法, 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 所述制备肌酸激酶同工酶的方法在校准品、标准物质和参考品制备中的应用。

8. 如权利要求 7 所述的应用,其特征在于,所述制备肌酸激酶同工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 所述制备肌酸激酶同工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。

一种制备肌酸激酶同工酶的方法及应用

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肌酸激酶同工酶的方法,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] 肌酸激酶 (Creatine kinase, CK) 广泛存在于各种组织中,与三磷酸腺苷 (ATP) 的再生有关,此酶的功能是在生理水平上维持细胞内的三磷酸腺苷浓度。它的催化作用是可逆的,即将高能磷酸键从磷酸肌酸转移至二磷酸腺苷 (ADP) 上或从三磷酸腺苷上将高能磷酸键转移至肌酸,形成磷酸肌酸。

[0003] CK 由 M 和 B 两个亚单位组成,组合成 CK-BB, CK-MM, CK-MB 三种同工酶,在细胞线粒体内还有另一种同工酶,称之为 CK-Mt。CK-BB 主要存在于脑、前列腺等器官,CK-MM 主要存在于骨骼和心肌,CK-MB 则主要存在于心肌,正常人血液中大部分是 CK-MM,少量 CK-MB,而 CK-BB 极少。

[0004] 肌酸激酶的同功酶在临床诊断中有十分重要的意义,在各种病变包括肌肉萎缩和心肌梗塞发生时,人的血清中肌酸激酶水平迅速提高,目前认为在心肌梗塞的诊断中测定肌酸激酶的活性比做心电图更为可靠。心肌梗死时,肌酸激酶在起病 6 小时内升高,24 小时达高峰,3-4 日内恢复正常。其中肌酸激酶的同工酶 CK-MB 诊断的特异性最高。肌酸激酶因其具有重要的生理功能和临床应用价值已引起人们广泛的重视和深入的研究。

[0005] 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。

[0006] 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

[0007] 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,成功率高的制备肌酸激酶同工酶的方法。

[0008] 为实现上述目的,本发明一种制备肌酸激酶同工酶的方法,该方法包括:

[0009] 1) 改造并全基因合成人源化肌酸激酶两个亚单位编码基因序列,去除大肠杆菌稀有密码子;

[0010] 2) 将步骤 1) 中改造后的肌酸激酶两个亚单位编码基因序列分别插入表达载体中,并用大肠杆菌菌株转化表达;

- [0011] 3) 将转化表达菌株接种于 LB 培养基, IPTG 诱导 ;
[0012] 4) 所得菌体破菌, 离心分离, 过 Ni-NTA 柱纯化 ;
[0013] 其中, 步骤 1) 中改造后的全基因合成人源化肌酸激酶亚单位 CKM 编码基因序列为 :
[0014] 1 ATGGGCCAT TCGGTAAACAC CCACAACAAG TTCAAGCTGA ATTACAAGCC TGAGGAGGAG
[0015] 61 TACCCCGACC TCAGCAAACA TAACAACCAC ATGGCCAAGG TACTGACCCT TGAACCTCAC
[0016] 121 AAGAACGCTGC GGGACAAGGA GACTCCATCT GGCTTCACTG TAGACGATGT CATCCAGACA
[0017] 181 GGAGTGGACA ACCCAGGTCA CCCCTTCATC ATGACCGTGG GCTGCGTGGC TGGTGATGAG
[0018] 241 GAGTCCTACG AAGTTTCAA GGAACCTCTT GACCCCATCA TCTCGGATCG CCACGGGGC
[0019] 301 TACAAACCCA CTGACAAGCA CAAGACTGAC CTCAACCATG AAAACCTCAA GGGTGGAGAC
[0020] 361 GACCTGGACC CTAACACTACGT GCTCAGCAGC CGCGTCCGCA CTGGCCGCAG CATCAAGGGC
[0021] 421 TACACGTTGC CCCCCACACTG CTCCCGTGGC GAGCGCCGGG CGGTGGAGAA GCTCTCTGTG
[0022] 481 GAAGCTCTCA ACAGCCTGAC GGGCGAGTTC AAAGGGAAAGT ACTACCCCTCT GAAGAGCATG
[0023] 541 ACGGAGAAGG AGCAGCAGCA GCTCATCGAT GACCACTTCC TGTCGACAA GCCCGTGTCC
[0024] 601 CCGCTGCTGC TGGCCTCAGG CATGGCCCGC GACTGGCCCG ACGCCCGTGG CATCTGGCAC
[0025] 661 AATGACAACA AGAGCTTCCT GGTGTGGGTG AACGAGGAGG ATCACCTCCG GGTCACTCTCA
[0026] 721 ATGGAGAAGG GGGGCAACAT GAAGGAGGTT TTCCGCGCT TCTCGTAGG GCTGCAGAAG
[0027] 781 ATTGAGGAGA TCTTTAAGAA AGCTGGCCAC CCCTTCATGT GGAACCAGCA CCTGGGCTAC
[0028] 841 GTGCTCACCT GCCCATCCAA CCTGGGCACT GGGCTGCGTG GAGGCGTGCA TGTGAAGCTG
[0029] 901 GCGCACCTGA GCAAGCACCC CAAGTTCGAG GAGATCCTCA CCCGCCTGCG TCTGCAGAAG
[0030] 961 AGGGGTACAG GTGGCGTGGC CACAGCTGCC GTGGGCTCAG TATTTGACGT GTCCAACGCT
[0031] 1021 GATCGGCTGG GCTCGTCCGA AGTAGAACAG GTGCAGCTGG TGGTGGATGG TGTGAAGCTC
[0032] 1081 ATGGTGGAAA TGGAGAACAA GTTGGAGAAA GGCCAGTCCA TTTAG
[0033] 步骤 1) 中改造后的全基因合成人源化肌酸激酶亚单位 CKB 编码基因序列为 :
[0034] 1 ATGGGTCCAT TTAGCAATTG TCACAACGCA CTGAAACTGC
[0035] GCTTTCCGGC TGAAGATGAG
[0036] 61 TTCCCGGACC TGTCCGCACA TAACAACCAC ATGGCTAAAG
[0037] TTCTGACTCC GGAACATGTAC
[0038] 121 GCAGAACTGC GCGCAAAATC TACCCCGAGC GGCTTACTC
[0039] TGGACGACGT AATCCAGACC
[0040] 181 GGCGTGGATA ACCCGGGTCA CCCATATATC ATGACCGTTG
[0041] GTTGTGTTGC CGGCGATGAA
[0042] 241 GAAAGCTACG AAGTCTTCAA AGACCTGTTC GATCCGATTA
[0043] TCGAAGATCG CCACGGCGGT
[0044] 301 TACAAACCAA GCGATGAACA CAAAACCGAT CTGAATCCAG
[0045] ACAACCTGCA GGGTGGCGAC
[0046] 361 GATCTGGATC CGAACTACGT ACTGTCTAGC CGTGTGCGCA
[0047] CCGGCCGTTC TATCCCGGGT
[0048] 421 TTCTGTCTGC CACCGCACTG TTCCCGTGGT GAACGTCGTG

- [0049] CCATCGAAAA ACTGGCTGTG
[0050] 481 GAAGCTCTGT CCAGCCTGGA TGGTGACCTG GCAGGTCGTT
[0051] ATTATGCGCT GAAGAGCATG
[0052] 541 ACCGAAGCCG ACAACAACA GCTGATCGAT GATCACTTCC
[0053] TGTCGACAA GCCTGTTCT
[0054] 601 CCGCTGCTGC TGGCTTCTGG TATGGCGCGC GACTGGCCGG
[0055] ACGCACGTGG CATTGGCAT
[0056] 661 AACGACAACA AAACGTTCCCT GGTGTGGGTC AACGAAGAAG
[0057] ACCACCTGCG TGTAATTTCT
[0058] 721 ATGCAGAAAG GTGGCAACAT GAAAGAAGTT TTCACCCGTT
[0059] TTTGCACCGG CCTGACCCAG
[0060] 781 ATTGAAACTC TGTTCAAATC TAAAGACTAT GAATTATGT
[0061] GGAACCCGCA CCTGGGTTAT
[0062] 841 ATTCTGACCT GTCCGTCCAA CCTGGGTACT GGCCTGCGTG
[0063] CGGGTGTGCA CATTAAGCTG
[0064] 901 CCGAACCTGG GTAAACATGA AAAGTTCAGC GAGGTCCCTGA
[0065] AACGCCTGCG TCTGCAGAAG
[0066] 961 CGTGGTACGG GCGGTGTTGA TACTGCAGCC GTTGGTGGTG
[0067] TGTCGACGT TAGCAACGCG
[0068] 1021 GATCGTCTGG GCTTCTCTGA AGTTGAACGT GTTCAGATGG
[0069] TTGTTGATGG CGTAAACTG
[0070] 1081 CTGATTGAGA TGGAACAGCG TCTGGAACAG GGTCAGGCTA
[0071] TTGATGACCT GATGCCGGCA
[0072] 1141 CAAAAATAG
[0073] 进一步,步骤 2) 中所述表达载体为 :pRSF Duet, pET 表达系列。
[0074] 进一步,步骤 2) 中所述大肠杆菌菌株为 :BL21 (DE3), Rosetta (DE3)。
[0075] 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。
[0076] 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)。
[0077] 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。
[0078] 一种如权利要求 1 所述制备肌酸激酶同工酶 CKMB 的方法在校准品、标准物质和参考品制备中的应用。
[0079] 进一步,所述制备肌酸激酶同工酶 CKMB 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。
[0080] 一种利用权利要求 1 所述制备肌酸激酶同工酶 CKMB 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。
[0081] 本发明的有益效果在于:本发明制备肌酸激酶同工酶操作非常简单,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

[0082] 图 1 为构建的 CKM-CKB pRSF 用 NcoI 和 EcoI 酶切,得到约 1.2kb 的插入片段,用 NdeI 和 XhoI 酶切,得到约 1.2kb 的插入片段表明目的基因已插入载体,构建成功;

[0083] 图 2 为纯化的 CKMB 成品的 SDS-PAGE 电泳图,产品纯度可达 90% 以上。

具体实施方式

[0084] 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。

[0085] 本发明建立了操作简单、迅速、成本较低的一种制备肌酸激酶同工酶的方法。这种方法的原理主要在于:将优化后的肌酸激酶两个亚单位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:

[0086] 1. 肌酸激酶同工酶表达载体的构建:

[0087] 改造人源化肌酸激酶同工酶编码基因序列,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 CKM 和 CKB 编码序列;

[0088] 利用 <http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm> 网页分析,在原始 CKM 和 CKB 编码基因序列中,大肠杆菌中密码子使用频率在 10% 以内均占 12%;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。

[0089] 通过基因工程手段利用 NcoI 和 EcoI 位点将 CKM 克隆至 PRSF Duet 载体内,构建成为 CKM PRSF,再利用 NdeI 和 XhoI 位点将 CKB 克隆至 CKM PRSF 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,结果表明肌酸激酶两个亚单位成功克隆至 pRSF Duet 载体内,我们将其命名为 CKM-CKB pRSF。

[0090] 改造后的全基因合成人源化肌酸激酶亚单位 CKM 编码基因序列为:

[0091] 1 ATGGGCCAT TCGGTAACAC CCACAACAAG TTCAAGCTGA ATTACAAGCC TGAGGAGGAG

[0092] 61 TACCCCGACC TCAGCAAACA TAACAACCAC ATGGCCAAGG TACTGACCCCT TGAACCTCTAC

[0093] 121 AAGAAGCTGC GGGACAAGGA GACTCCATCT GGCTTCACTG TAGACGATGT CATCCAGACA

[0094] 181 GGAGTGGACA ACCCAGGTCA CCCCTTCATC ATGACCGTGG GCTGCGTGGC TGGTGATGAG

[0095] 241 GAGTCCTACG AAGTTTCAA GGAACCTCTT GACCCCATCA TCTCGGATCG CCACGGGGGC

[0096] 301 TACAAACCCA CTGACAAGCA CAAGACTGAC CTCACCAGT AAAACCTCAA GGGTGGAGAC

[0097] 361 GACCTGGACC CTAACCTACGT GCTCAGCAGC CGCGTCCGCA CTGGCCGCAG CATCAAGGGC

[0098] 421 TACACGTTGC CCCCCACACTG CTCCCGTGGC GAGCGCCGGG CGGTGGAGAA GCTCTCTGTG

[0099] 481 GAAGCTCTCA ACAGCCTGAC GGGCGAGTTC AAAGGGAAAGT ACTACCCCTCT GAAGAGCATG

[0100] 541 ACGGAGAAGG AGCAGCAGCA GCTCATCGAT GACCACTTCC TGTTCGACAA GCCCGTGTCC

[0101] 601 CCGCTGCTGC TGGCCTCAGG CATGGCCCGC GACTGGCCCG ACGCCCGTGG CATCTGGCAC

[0102] 661 AATGACAACA AGAGCTTCCT GGTGTGGGTG AACGAGGAGG ATCACCTCCG GGTCATCTCA
 [0103] 721 ATGGAGAAGG GGGGCAACAT GAAGGAGGTT TTCCGCCGCT TCTGCGTAGG GCTGCAGAAG
 [0104] 781 ATTGAGGAGA TCTTTAAGAA AGCTGGCCAC CCCTTCATGT GGAACCAGCA CCTGGGCTAC
 [0105] 841 GTGCTCACCT GCCCATCCAA CCTGGCACT GGGCTGCGTG GAGGCGTGCA TGTGAAGCTG
 [0106] 901 GCGCACCTGA GCAAGCACCC CAAGTTCGAG GAGATCCTCA CCCGCCTGCG TCTGCAGAAG
 [0107] 961 AGGGGTACAG GTGGCGTGG A CACAGCTGCC GTGGGCTCAG TATTGACGT GTCCAACGCT
 [0108] 1021 GATCGGCTGG GCTCGTCCGA AGTAGAACAG GTGCAGCTGG TGGTGGATGG TGTGAAGCTC
 [0109] 1081 ATGGTGGAAA TGGAGAACAGA GTTGGAGAAA GGCCAGTCCA TTTAG
 [0110] 改造后的全基因合成人源化肌酸激酶亚单位 CKB 编码基因序列为：
 [0111] 1 ATGGGTCCAT TTAGCAATT TCACAAACGCA CTGAAACTGC
 [0112] GCTTCCGGC TGAAGATGAG
 [0113] 61 TTCCCGGACC TGTCCGCACA TAACAACCAC ATGGCTAAAG
 [0114] TTCTGACTCC GGAACGTGAC
 [0115] 121 GCAGAACTGC GCGCAAAATC TACCCCGAGC GGCTTTACTC
 [0116] TGGACGACGT AATCCAGACC
 [0117] 181 GCGGTGGATA ACCCGGGTCA CCCATATATC ATGACCGTTG
 [0118] GTTGTGTTGC CGGCGATGAA
 [0119] 241 GAAAGCTACG AAGTCTTCAA AGACCTGTTC GATCCGATTA
 [0120] TCGAAGATCG CCACGGCGGT
 [0121] 301 TACAAACCAA GCGATGAACA CAAAACCGAT CTGAATCCAG
 [0122] ACAACCTGCA GGGTGGCGAC
 [0123] 361 GATCTGGATC CGAACTACGT ACTGTCTAGC CGTGTGCGCA
 [0124] CCGGCCGTTC TATCCGCGGT
 [0125] 421 TTCTGTCTGC CACCGCACTG TTCCCGTGGT GAACGTCGTG
 [0126] CCATCGAAAA ACTGGCTGTG
 [0127] 481 GAAGCTCTGT CCAGCCTGGA TGGTGACCTG GCAGGTCGTT
 [0128] ATTATGCGCT GAAGAGCATG
 [0129] 541 ACCGAAGCCG AACACAACA GCTGATCGAT GATCACTTCC
 [0130] TGTCGACAA GCCTGTTCT
 [0131] 601 CCGCTGCTGC TGGCTTCTGG TATGGCCGCG GACTGGCCGG
 [0132] ACGCACGTGG CATTGGCAT
 [0133] 661 AACGACAACA AAACGTTCCCT GGTGTGGGTG AACGAAGAAG
 [0134] ACCACCTGCG TGTAATTCT
 [0135] 721 ATGCAGAAAG GTGGCAACAT GAAAGAAGTT TTCACCCGTT
 [0136] TTTGCACCGG CCTGACCCAG
 [0137] 781 ATTGAAACTC TGTTCAAATC TAAAGACTAT GAATTATGT
 [0138] GGAACCCGCA CCTGGGTTAT
 [0139] 841 ATTCTGACCT GTCCGTCCAA CCTGGGTACT GGCCTGCGTG
 [0140] CGGGTGTGCA CATTAAGCTG

[0141] 901 CCGAACCTGG GTAAACATGA AAAGTTCA GC GAGGTCCCTGA

[0142] AACGCCCTGCG TCTGCAGAAG

[0143] 961 CGTGGTACGG GCGGTGTTGA TACTGCAGCC GTTGGTGGTG

[0144] TGTCGACGT TAGCAACGCG

[0145] 1021 GATCGTCTGG GCTTCTCTGA AGTTGAAC TG GTTCAGATGG

[0146] TTGTTGATGG CGTGAAACTG

[0147] 1081 CTGATTGAGA TGGAACAGCG TCTGGAACAG GGTCAGGCTA

[0148] TTGATGACCT GATGCCGGCA

[0149] 1141 CAAAAATAG

[0150] 2. 肌酸激酶同工酶的表达：

[0151] 1) 以 BL21 (DE3) 为宿主菌, 将 CKM-CKB pRSF 进行转化, 挑取单菌落于 3ml LB 培养基培养过夜；

[0152] 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；

[0153] 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。

[0154] 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 t7 RNA 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, 该区整合于 BL21 的染色体上, 就叫 BL21 (DE3)。

[0155] 3. 肌酸激酶同工酶的纯化：

[0156] 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, pH 8.0, 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；

[0157] 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。

[0158] 3) 蛋白洗脱液过 G50 柱去除 Imidazole, 这样可以得到 85% 以上纯度的 CKM-CKB (如图 2 所示)。

[0159] 4. 肌酸激酶同工酶质量和活性测定：

[0160] 制备肌酸激酶同工酶的纯品用罗氏 E601 电化学发光法测定, 质量可达 10000ug/L, 迈瑞 BS2000 测定活性, 酶活可达 5000U/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。

[0161] 上述制备肌酸激酶同工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。

[0162] 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。

[0163] 除非特殊指明, 本发明所用到但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

CKM 核苷酸及编码的氨基酸序列：

1 ATGGGCCAT TCGTAACAC CCACAACAAG TTCAAGCTGA ATTACAAGCC TGAGGAGGAG
 61 TACCCCGACC TCAGCAAACA TAACAACCA ATGCCAAGG TACTGACCCCT TGAACTCTAC
 121 AAGAACGCTGC GGGACAAGGA GACTCCATCT GGCTTCACTG TAGACGATGT CATCCAGACA
 181 GGAGTGGACA ACCCAGGTCA CCCCTTCATC ATGACCGTGG GCTGCGTGGC TGGTGATGAG
 241 GAGTCCTACG AAGTTTCAA GGAACCTTT GACCCCATCA TCTCGGATCG CCACGGGGC
 301 TACAAACCCA CTGACAAGCA CAAGACTGAC CTCAACCATG AAAACCTCAA GGGTGGAGAC
 361 GACCTGGACC CTAACACTACGT GCTCAGCAGC CGCGTCCGCA CTGGCCGAG CATCAAGGGC
 421 TACACGTTGC CCCCCACACTG CTCCCGTGGC GAGCGCCGGG CGGTGGAGAA GCTCTCTGTG
 481 GAAGCTCTCA ACAGCCTGAC GGGCGAGTTC AAAGGGAAGT ACTACCCCTCT GAAGAGCATG
 541 ACGGAGAAGG AGCAGCAGCA GCTCATCGAT GACCACTTCC TTGTCGACAA GCCCGTGTCC
 601 CCGCTGCTGC TGGCCTCAGG CATGGCCCG GACTGGCCCG ACAGCCCGTGG CATCTGGCAC
 661 AATGACAACA AGAGCTTCCT GGTGTGGGTG AACGAGGAGG ATCACCTCCG GGTCATCTCA
 721 ATGGAGAAGG GGGGCAACAT GAAGGAGGTT TTCCGCGCCT TCTCGTAGG GCTGCAGAAG
 781 ATTGAGGAGA TCTTAAGAA AGCTGCCAC CCCTTCATGT GGAACCCAGCA CCTGGGCTAC
 841 GTGCTCACCT GCCCCATCCAA CCTGGGCACG GGGCTGCGTG GAGGCCTGCA TGTGAAGCTG
 901 GCGCACCTGA GCAAGCACCC CAAGTCGAG GAGATCCTCA CCCGCCTGCG TCTGCAGAAG
 961 AGGGGTACAG GTGGCGTGG A CACAGCTGCC GTGGGCTCAG TATTGACGT GTCCAACGCT
 1021 GATCGGCTGG GCTCGTCCGA AGTAGAACAG GTGCAGCTGG TGGTGGATGG TGTGAAGCTC
 1081 ATGGTGGAAA TGGAGAAGAA GTTGGAGAAA GGCCAGTCCA TTTAG

MGPGNTHNKFNLNYKPEEEYPDLSKHNNHMAKVLTLELYKKLR
 DKETPSGFTVDDVIQTGVVDNPNGHPFIMTVGCVAGDEESYEVFKEI
 FDPIISDRHGGYKPTDKHKTDLNHENLKGGDDLDPNYVLSSRVRT
 GRSIKGYTLPPHCSRGERRAVEKLSVEALNSLTGEFKGKYYPLKS
 MTEKEQQQLIDDHFLFDKPVSPLLASGMARDWPDARGIWHNDN
 KSFLVVWVNEEDHLRVisMEKGGMKEVFRFCVGLQKIEEIFKKA
 GHFMWNQHLGYVLTCPNSLGTGLRGGVHVVKLAHLSKHPKFEI
 LTRLRLQKRGTEGVDTAAVGVDVSNAADRLGSSEVEQVQLVVD
 GVKLMEKMEKLEKGQSI*

[0002]

CKB 核苷酸及编码的氨基酸序列：

1 ATGGGTCCAT TTAGCAATT TCACAACGCA CTGAAACTGC GCTTTCCGGC TGAAGATGAG
 61 TTCCCGGACC TGTCCGCACA TAACAACAC ATGGCTAAAG TTCTGACTCC GGAACTGTAC
 121 GCAGAACTGC GCGCAAATC TACCCCGAGC GGCTTTACTC TGGACGACGT AATCCAGACC
 181 GGC GTGGATA ACCCGGGTCA CCCATATATC ATGACCGTTG GTTGTGTTGC CGGCGATGAA
 241 GAAAGCTACG AAGTCTTCAA AGACCTGTT GATCCGATT TCGAAGATCG CCACGGCGGT
 301 TACAAACCAA GCGATGAACA CAAAACCGAT CTGAATCCAG ACAACCTGCA GGGTGGCGAC
 361 GATCTGGATC CGAACTACGT ACTGTCTAGC CGTGTGCGCA CCGGCCGTT TATCCCGGGT
 421 TTCTGTCCTGC CACCGCACTG TTCCCGTGGT GAACGTCGTG CCATCGAAAA ACTGGCTGTG
 481 GAAGCTCTGT CCAGCCTGGA TGGTGACCTG GCAGGTCGTT ATTATGCGCT GAAGAGCATG
 541 ACCGAAGCCG AACAAACAACA GCTGATCGAT GATCACTTCC TGTTGACAAA GCCTGTTCT
 601 CCGCTGCTGC TGGCTTCTGG TATGGCGCGC GACTGGCCGG ACGCACGTGG CATTGGCAT
 661 AACGACAACA AAACGTTCCCT GGTGTGGGTC AACGAAGAAG ACCACCTGCG TGTAATTCT
 721 ATGCAGAAAG GTGGCAACAT GAAAGAAGTT TTCACCCGTT TTTGCACCGG CCTGACCCAG
 781 ATTGAAACTC TGTTCAAATC TAAAGACTAT GAATTATGT GGAACCCGCA CCTGGTTAT
 841 ATTCTGACCT GTCCGTCCAA CCTGGGTACT GGCCTGCGT CGGGTGTGCA CATTAAGCTG
 901 CCGAACCTGG GTAAACATGA AAAGTTCAAGC GAGGTCTGA AACGCCCTGCG TCTGCAGAAG
 961 CGTGGTACGG GCGGTGTTGA TACTGCAGCC GTTGGTGGTG TGTTGACGT TAGCAACGCG
 1021 GATCGTCTGG GCTTCTCTGA AGTTGAACGTG GTTCAGATGG TTGTTGATGG CGTGAAACTG
 1081 CTGATTGAGA TGGAACAGCG TCTGGAACAG GGTCAAGCTA TTGATGACCT GATGCCGGCA
 1141 CAAAAATAG

MGPFNSHNALKLRFPAEDEFPDLSAHNNHMAKVLTPELYAELRA
 KSTPSGFTLDDVIQTGVVDNPGLPYIMTVGCVAGDEESYEVFKDLF
 DPIIEDRHGGYKPSDEHKTDLNPDNLQGGDDLDPNYVLSSRVRTG
 RSIRGFCLPPHCSRGERRAIEKLAVEALSSLDGDLAGRYYALKSMT
 EAEQQQLIDDHFDFDKPVSPLLLASGMARDWPDARGIWHNDNKT
 FLVWWVNEEDHLRVISMQKGGNMKEVFTRFCGLTQIELFKSKDY
 EFMWNPHLGYILTCPSNLGTGLRAGVHIKLPNLGKHEKFSEVLKR
 LRLQKRGTEGVDTAAVGGVFDVSNADRLGFSEVELVQMVVVDGV
 KLLIEMEQRLEQGQAIDDLMPAQK

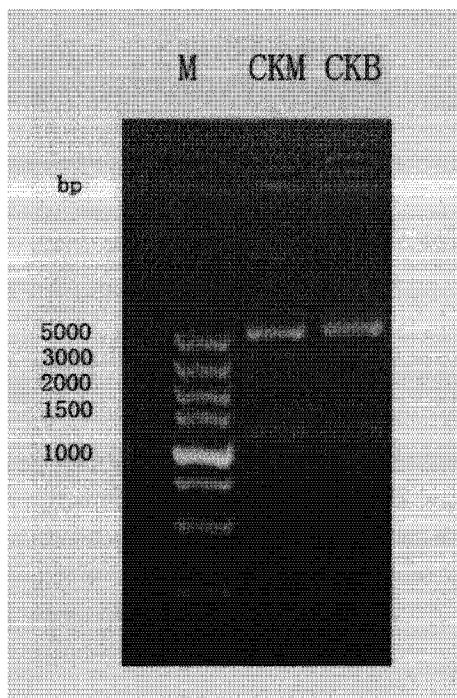


图 1

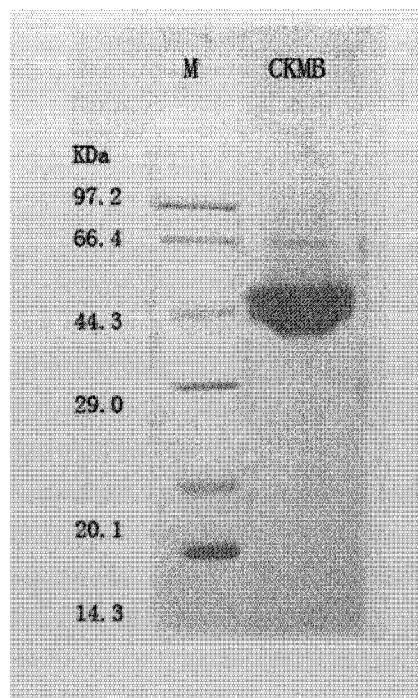


图 2

专利名称(译)	一种制备肌酸激酶同工酶的方法及应用		
公开(公告)号	CN103014034A	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201210567474.5	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	C12N15/54 C12N15/70 C12N9/12 C07K16/40 G01N33/53		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种制备肌酸激酶同工酶的方法及应用，该方法包括：改造全基因合成人源化肌酸激酶同工酶编码基因序列，去除大肠杆菌稀有密码子；将改造后的肌酸激酶同工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；本发明制备肌酸激酶同工酶操作非常简单，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。

