



## (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

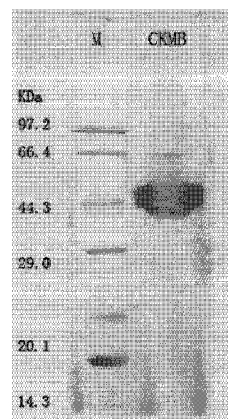
序列表 2 页 附图 1 页

### (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   ATGGGCCCAT TCGGTAACAC CCACAACAAG TTCAAGCTGA ATTACAAGCC TGAGGAGGAG
61  TACCCCGACC TCAGCAAACA TAACAACCAC ATGGCCAAGG TACTGACCCT TGAACCTCTAC
121 AAGAAGCTGC GGGACAAGGA GACTCCATCT GGCTTCACTG TAGACGATGT CATCCAGACA
181 GGAGTGGACA ACCCAGGTCA CCCCTTCATC ATGACCGTGG GCTGCGTGGC TGGTGATGAG
241 GAGTCCTACG AAGTTTTCAA GGAAGTCTTT GACCCCATCA TCTCGGATCG CCACGGGGGC
301 TACAAACCCA CTGACAAGCA CAAGACTGAC CTCAACCATG AAAACCTCAA GGGTGGAGAC
361 GACCTGGACC CTAAGTACGT GCTCAGCAGC CGCGTCCGCA CTGGCCGCAG CATCAAGGGC
421 TACACGTTGC CCCACACTG CTCCCGTGGC GAGCGCCGGG CGGTGGAGAA GCTCTCTGTG
481 GAAGCTCTCA ACAGCCTGAC GGGCGAGTTC AAAGGGAAGT ACTACCCTCT GAAGAGCATG
541 ACGGAGAAGG AGCAGCAGCA GCTCATCGAT GACCACTTCC TGTTCGACAA GCCCGTGTCC
601 CCGCTGCTGC TGGCCTCAGG CATGGCCCGC GACTGGCCCG ACGCCCGTGG CATCTGGCAC
661 AATGACAACA AGAGCTTCCT GGTGTGGGTG AACGAGGAGG ATCACCTCCG GGTCATCTCA
721 ATGGAGAAGG GGGGCAACAT GAAGGAGGTT TTCCGCCGCT TCTGCGTAGG GCTGCAGAAG
781 ATTGAGGAGA TCTTTAAGAA AGCTGGCCAC CCCTTCATGT GGAACCAGCA CCTGGGCTAC
841 GTGCTCACCT GCCCATCCAA CCTGGGCACT GGGCTGCGTG GAGGCGTGCA TGTGAAGCTG
901 GCGCACCTGA GCAAGCACCC CAAGTTCGAG GAGATCCTCA CCCGCCTGCG TCTGCAGAAG
961 AGGGGTACAG GTGGCGTGGA CACAGCTGCC GTGGGCTCAG TATTTGACGT GTCCAACGCT
1021 GATCGGCTGG GCTCGTCCGA AGTAGAACAG GTGCAGCTGG TGGTGGATGG TGTGAAGCTC
1081 ATGGTGAAAA TGGAGAAGAA GTTGAGAAAA 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 TTAGCAATTC TCACAACGCA CTGAAACTGC
GCTTTCCGGC TGAAGATGAG
61  TTCCCGGACC TGTCCGCACA TAACAACCAC ATGGCTAAAG
TTCTGACTCC GGAAGTGTAC
121 GCAGAACTGC GCGCAAAATC TACCCCGAGC GGCTTTACTC
TGGACGACGT AATCCAGACC
181 GCGGTGGATA ACCCGGGTCA CCCATATATC ATGACCGTTG
GTTGTGTTGC CGGCGATGAA
241 GAAAGCTACG AAGTCTTCAA AGACCTGTTC GATCCGATTA
TCGAAGATCG CCACGGCGGT
301 TACAAACCAA GCGATGAACA CAAAACCGAT CTGAATCCAG
ACAACCTGCA GGGTGGCGAC
```

361 GATCTGGATC CGAACTACGT ACTGTCTAGC CGTGTGCGCA  
CCGGCCGTTC TATCCGCGGT  
421 TTCTGTCTGC CACCGCACTG TTCCCGTGGT GAACGTCGTG  
CCATCGAAAA ACTGGCTGTG  
481 GAAGCTCTGT CCAGCCTGGA TGGTGACCTG GCAGGTCGTT  
ATTATGCGCT GAAGAGCATG  
541 ACCGAAGCCG AACAACAACA GCTGATCGAT GATCACTTCC  
TGTTTCGACAA GCCTGTTTCT  
601 CCGCTGCTGC TGGCTTCTGG TATGGCGCGC GACTGGCCGG  
ACGCACGTGG CATTTGGCAT  
661 AACGACAACA AAACGTTTCTT GGTGTGGGTC AACGAAGAAG  
ACCACCTGCG TGTAATTTCT  
721 ATGCAGAAAG GTGGCAACAT GAAAGAAGTT TTCACCCGTT  
TTTGCACCGG CCTGACCCAG  
781 ATTGAAACTC TGTTCAAATC TAAAGACTAT GAATTTATGT  
GGAACCCGCA CCTGGGTTAT  
841 ATTCTGACCT GTCCGTCCAA CCTGGGTACT GGCCTGCGTG  
CGGGTGTGCA CATTAAGCTG  
901 CCGAACCTGG GTAAACATGA AAAGTTCAGC GAGGTCCTGA  
AACGCCTGCG TCTGCAGAAG  
961 CGTGGTACGG GCGGTGTTGA TACTGCAGCC GTTGGTGGTG  
TGTTTCGACGT TAGCAACGCG  
1021 GATCGTCTGG GCTTCTCTGA AGTTGAACTG GTTCAGATGG  
TTGTTGATGG CGTGAAACTG  
1081 CTGATTGAGA TGGAACAGCG TCTGGAACAG GGTCAGGCTA  
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, $\lambda$  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 (Creatinekinase, 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   ATGGGCCCAT TCGGTAACAC CCACAACAAG TTCAAGCTGA ATTACAAGCC TGAGGAGGAG
[0015] 61   TACCCCGACC TCAGCAAACA TAACAACCAC ATGGCCAAGG TACTGACCCT TGAAGTCTAC
[0016] 121  AAGAAGCTGC GGGACAAGGA GACTCCATCT GGCTTCACTG TAGACGATGT CATCCAGACA
[0017] 181  GGAGTGGACA ACCCAGGTCA CCCCTTCATC ATGACCGTGG GCTGCGTGGC TGGTGATGAG
[0018] 241  GAGTCCTACG AAGTTTTCAA GGAAGTCTTT GACCCCATCA TCTCGGATCG CCACGGGGGG
[0019] 301  TACAAACCCA CTGACAAGCA CAAGACTGAC CTCAACCATG AAAACCTCAA GGGTGGAGAC
[0020] 361  GACCTGGACC CTAAGTACGT GCTCAGCAGC CGCGTCCGCA CTGGCCGAG CATCAAGGGC
[0021] 421  TACACGTTGC CCCCACTG CTCCCGTGGC GAGCGCCGGG CGGTGGAGAA GCTCTCTGTG
[0022] 481  GAAGCTCTCA ACAGCCTGAC GGGCGAGTTC AAAGGGAAGT ACTACCCTCT GAAGAGCATG
[0023] 541  ACGGAGAAGG AGCAGCAGCA GCTCATCGAT GACCACTTCC TGTTCGACAA GCCCGTGTCC
[0024] 601  CCGCTGCTGC TGGCCTCAGG CATGGCCCGC GACTGGCCCG ACGCCCGTGG CATCTGGCAC
[0025] 661  AATGACAACA AGAGCTTCCT GGTGTGGGTG AACGAGGAGG ATCACCTCCG GGTCATCTCA
[0026] 721  ATGGAGAAGG GGGGCAACAT GAAGGAGGTT TTCCGCCGCT TCTGCGTAGG GCTGCAGAAG
[0027] 781  ATTGAGGAGA TCTTTAAGAA AGCTGGCCAC CCCTTCATGT GGAACCAGCA CCTGGGCTAC
[0028] 841  GTGCTCACCT GCCCATCCAA CCTGGGCACT GGGCTGCGTG GAGGCGTGCA TGTGAAGCTG
[0029] 901  GCGCACCTGA GCAAGCACCC CAAGTTCGAG GAGATCCTCA CCCGCTGCG TCTGCAGAAG
[0030] 961  AGGGGTACAG GTGGCGTGGA CACAGCTGCC GTGGGCTCAG TATTTGACGT GTCCAACGCT
[0031] 1021 GATCGGCTGG GCTCGTCCGA AGTAGAACAG GTGCAGCTGG TGGTGGATGG TGTGAAGCTC
[0032] 1081 ATGGTGAAA TGGAGAAGAA GTTGAGAAA 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 TTAGCAATTC TCACAACGCA CTGAAACTGC
[0035] GCTTTCCGGC TGAAGATGAG
[0036] 61   TTCCCGGACC TGTCCGCACA TAACAACCAC ATGGCTAAAG
[0037] TTCTGACTCC GGAAGTGTAC
[0038] 121  GCAGAACTGC GCGCAAAATC TACCCGAGC GGCTTTACTC
[0039] TGGACGACGT AATCCAGACC
[0040] 181  GCGGTGGATA ACCCGGTCA 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] CCGGCCGTTT TATCCGCGGT
[0048] 421  TTCTGTCTGC CACCGCACTG TTCCCGTGGT GAACGTCGTG
```

- [0049] CCATCGAAAA ACTGGCTGTG
- [0050] 481 GAAGCTCTGT CCAGCCTGGA TGGTGACCTG GCAGGTCGTT
- [0051] ATTATGCGCT GAAGAGCATG
- [0052] 541 ACCGAAGCCG AACAACAACA GCTGATCGAT GATCACTTCC
- [0053] TGTTCGACAA GCCTGTTTCT
- [0054] 601 CCGCTGCTGC TGGCTTCTGG TATGGCGCGC GACTGGCCGG
- [0055] ACGCACGTGG CATTTGGCAT
- [0056] 661 AACGACAACA AAACGTTTCCT GGTGTGGGTC AACGAAGAAG
- [0057] ACCACCTGCG TGTAATTTCT
- [0058] 721 ATGCAGAAAG GTGGCAACAT GAAAGAAGTT TTCACCCGTT
- [0059] TTTGCACCGG CCTGACCCAG
- [0060] 781 ATTGAAACTC TGTTCAAATC TAAAGACTAT GAATTTATGT
- [0061] GGAACCCGCA CCTGGGTTAT
- [0062] 841 ATTCTGACCT GTCCGTCCAA CCTGGGTACT GGCCTGCGTG
- [0063] CGGGTGTGCA CATTAAAGCTG
- [0064] 901 CCGAACCTGG GTAAACATGA AAAGTTCAGC GAGGTCCTGA
- [0065] AACGCCTGCG TCTGCAGAAG
- [0066] 961 CGTGGTACGG GCGGTGTTGA TACTGCAGCC GTTGGTGGTG
- [0067] TGTTCGACGT TAGCAACGCG
- [0068] 1021 GATCGTCTGG GCTTCTCTGA AGTTGAACTG GTTCAGATGG
- [0069] TTGTTGATGG CGTGAAACTG
- [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,配制或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NcoR I和EcoR I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NcoR I和EcoR I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-CKBpRSF。

[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 ATGGGCCCAT TCGGTAACAC CCACAACAAG TTCAAGCTGA ATTACAAGCC TGAGGAGGAG

[0092] 61 TACCCCGACC TCAGCAAACA TAACAACCAC ATGGCCAAGG TACTGACCCT TGAAGTCTAC

[0093] 121 AAGAAGCTGC GGGACAAGGA GACTCCATCT GGCTTCACTG TAGACGATGT CATCCAGACA

[0094] 181 GGAGTGGACA ACCCAGGTCA CCCCTTCATC ATGACCGTGG GCTGCGTGGC TGGTGATGAG

[0095] 241 GAGTCCTACG AAGTTTTCAA GGAAGTCTTT GACCCCATCA TCTCGGATCG CCACGGGGGC

[0096] 301 TACAAACCCA CTGACAAGCA CAAGACTGAC CTCAACCATG AAAACCTCAA GGGTGGAGAC

[0097] 361 GACCTGGACC CTAAGTACGT GCTCAGCAGC CGCGTCCGCA CTGGCCGAG CATCAAGGGC

[0098] 421 TACACGTTGC CCCCACTG CTCCCGTGGC GAGCGCCGGG CGGTGGAGAA GCTCTCTGTG

[0099] 481 GAAGCTCTCA ACAGCCTGAC GGGCGAGTTC AAAGGGAAGT ACTACCCTCT GAAGAGCATG

[0100] 541 ACGGAGAAGG AGCAGCAGCA GCTCATCGAT GACCACTTCC TGTTCGACAA GCCCGTGTCC

[0101] 601 CCGCTGCTGC TGGCCTCAGG CATGGCCCGC GACTGGCCCG ACGCCCGTGG CATCTGGCAC



[0102] 661 AATGACAACA AGAGCTTCCT GGTGTGGGTG AACGAGGAGG ATCACCTCCG GGTCACTCTCA  
[0103] 721 ATGGAGAAGG GGGGCAACAT GAAGGAGGTT TTCCGCCGCT TCTGCGTAGG GCTGCAGAAG  
[0104] 781 ATTGAGGAGA TCTTTAAGAA AGCTGGCCAC CCCTTCATGT GGAACCAGCA CCTGGGCTAC  
[0105] 841 GTGCTCACCT GCCCATCCAA CCTGGGCACT GGGCTGCGTG GAGGCGTGCA TGTGAAGCTG  
[0106] 901 GCGCACCTGA GCAAGCACCC CAAGTTCGAG GAGATCCTCA CCCGCCTGCG TCTGCAGAAG  
[0107] 961 AGGGGTACAG GTGGCGTGGA CACAGCTGCC GTGGGCTCAG TATTTGACGT GTCCAACGCT  
[0108] 1021 GATCGGCTGG GCTCGTCCGA AGTAGAACAG GTGCAGCTGG TGGTGGATGG TGTGAAGCTC  
[0109] 1081 ATGGTGAAAA TGGAGAAGAA GTTGAGAAA 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 TTAGCAATTC TCACAACGCA CTGAAACTGC  
[0112] GCTTTCCGGC TGAAGATGAG  
[0113] 61 TTCCCGGACC TGTCCGCACA TAACAACCAC ATGGCTAAAG  
[0114] TTCTGACTCC GGAAGTGTAC  
[0115] 121 GCAGAACTGC GCGCAAAATC TACCCCGAGC GGCTTTACTC  
[0116] TGGACGACGT AATCCAGACC  
[0117] 181 GGCGTGGATA 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] CCGGCCGTTT TATCCGCGGT  
[0125] 421 TTCTGTCTGC CACCGCACTG TTCCCGTGGT GAACGTCGTG  
[0126] CCATCGAAAA ACTGGCTGTG  
[0127] 481 GAAGCTCTGT CCAGCCTGGA TGGTGACCTG GCAGGTCGTT  
[0128] ATTATGCGCT GAAGAGCATG  
[0129] 541 ACCGAAGCCG AACAACAACA GCTGATCGAT GATCACTTCC  
[0130] TGTTCGACAA GCCTGTTTCT  
[0131] 601 CCGCTGCTGC TGGCTTCTGG TATGGCGCGC GACTGGCCGG  
[0132] ACGCACGTGG CATTTGGCAT  
[0133] 661 AACGACAACA AAACGTTTCCT GGTGTGGGTC AACGAAGAAG  
[0134] ACCACCTGCG TGTAATTTCT  
[0135] 721 ATGCAGAAAG GTGGCAACAT GAAAGAAGTT TTCACCCGTT  
[0136] TTTGCACCGG CCTGACCCAG  
[0137] 781 ATTGAAACTC TGTTCAAAATC TAAAGACTAT GAATTTATGT  
[0138] GGAACCCGCA CCTGGGTTAT  
[0139] 841 ATTCTGACCT GTCCGTCCAA CCTGGGTACT GGCCTGCGTG  
[0140] CGGGTGTGCA CATTAAGCTG

[0141] 901 CCGAACCTGG GTAAACATGA AAAGTTCAGC GAGGTCCTGA  
[0142] AACGCCTGCG TCTGCAGAAG  
[0143] 961 CGTGGTACGG GCGGTGTTGA TACTGCAGCC GTTGGTGGTG  
[0144] TGTTCGACGT TAGCAACGCG  
[0145] 1021 GATCGTCTGG GCTTCTCTGA AGTTGAACTG 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-PO<sub>4</sub>, 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；

[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 ATGGGCCCAT TCGGTAACAC CCACAACAAG TTCAAGCTGA ATTACAAGCC TGAGGAGGAG  
61 TACCCCGACC TCAGCAAACA TAACAACCAC ATGGCCAAGG TACTGACCCT TGAAGTCTAC  
121 AAGAAGCTGC GGGACAAGGA GACTCCATCT GGCTTCACTG TAGACGATGT CATCCAGACA  
181 GGAGTGGACA ACCCAGGTCA CCCCTTCATC ATGACCGTGG GCTGCGTGGC TGGTGATGAG  
241 GAGTCTACG AAGTTTCAA GGAAGTCTTT GACCCCATCA TCTCGGATCG CCACGGGGGC  
301 TACAAACCCA CTGACAAGCA CAAGACTGAC CTCAACCATG AAAACCTCAA GGGTGGAGAC  
361 GACCTGGACC CTAAGTACGT GCTCAGCAGC CGCGTCCGCA CTGGCCGCAG CATCAAGGGC  
421 TACACGTTGC CCCACACTG CTCCCGTGGC GAGCGCCGGG CCGTGGAGAA GCTCTCTGTG  
481 GAAGCTCTCA ACAGCCTGAC GGGCGAGTTC AAAGGGAAGT ACTACCCTCT GAAGAGCATG  
541 ACGGAGAAGG AGCAGCAGCA GCTCATCGAT GACCACTTCC TGTTGACAA GCCCGTGTCC  
601 CCGCTGCTGC TGGCCTCAGG CATGGCCCGC GACTGGCCCG ACGCCCGTGG CATCTGGCAC  
661 AATGACAACA AGAGCTTCTT GGTGTGGGTG AACGAGGAGG ATCACCTCCG GGTATCTCA  
721 ATGGAGAAGG GGGGCAACAT GAAGGAGGTT TTCCGCCGCT TCTGCGTAGG GCTGCAGAA  
781 ATTGAGGAGA TCTTTAAGAA AGCTGGCCAC CCCTTCATGT GGAACCAGCA CCTGGGCTAC  
841 GTGCTCACCT GCCCATCCAA CCTGGGCACT GGGCTGCGTG GAGGCGTGCA TGTGAAGCTG  
901 GCGCACCTGA GCAAGCACCC CAAGTTCGAG GAGATCCTCA CCCGCTGCG TCTGCAGAA  
961 AGGGGTACAG GTGGCGTGA CACAGCTGCC GTGGGCTCAG TATTGACGT GTCCAACGCT  
1021 GATCGGCTGG GCTCGTCCGA AGTAGAACAG GTGCAGCTGG TGGTGGATGG TGTGAAGCTC  
1081 ATGGTGGAAA TGGAGAAGAA GTTGGAGAAA GGCCAGTCCA TTTAG

MGPFGNTHNKFKLNYKPEEEYPDLSKHNNHMAKVLTLLEYKKLR  
DKETPSGFTVDDVIQTGVNDNPGHPFIMTVGCVAGDEESYEVFKEL  
FDPIISDRHGGYKPTDKHKTDLNHENLKGGDDLDPNYVLSSRVRT  
GRSIKGYTLPPHCSRGERRAVEKLSVEALNSLTGEFKGKYYPLKS  
MTEKEQQQLIDHFLFDKPVSPLLLASGMARDWPDARGIWHNDN  
KSFLVWVNEEDHLRVISMEKGGNMKEVFRRFCVGLQKIEEIFKKA  
GHPFMWNQHLGYVLTCPNLGTGLRGGVHVKLAHLSKHPKFEEI  
LTRLRLQKRGTGGVDTAAVGSVFDVSNADRLGSSEVEQVQLVVD  
GVKLMVEMEKKLEKGQSI\*

[0002]

## CKB 核苷酸及编码的氨基酸序列:

1 ATGGGTCCAT TTAGCAATTC TCACAACGCA CTGAAACTGC GCTTTCGGC TGAAGATGAG  
61 TTCCCGGACC TGTCCGCACA TAACAACCAC ATGGCTAAAG TTCTGACTCC GGAAGTGTAC  
121 GCAGAACTGC GCGCAAAATC TACCCCGAGC GGCTTTACTC TGGACGACGT AATCCAGACC  
181 GCGGTGGATA ACCCGGGTCA CCCATATATC ATGACCGTTG GTTGTGTTGC CGGCGATGAA  
241 GAAAGCTACG AAGTCTTCAA AGACCTGTTT GATCCGATTA TCGAAGATCG CCACGGCGGT  
301 TACAAACCAA GCGATGAACA CAAAACCGAT CTGAATCCAG ACAACCTGCA GGGTGGCGAC  
361 GATCTGGATC CGAACTACGT ACTGTCTAGC CGTGTGCGCA CCGGCCGTTT TATCCGCGGT  
421 TTCTGTCTGC CACCGCACTG TTCCCGTGGT GAACGTCGTG CCATCGAAAA ACTGGCTGTG  
481 GAAGCTCTGT CCAGCCTGGA TGGTGACCTG GCAGGTCGTT ATTATGCGCT GAAGAGCATG  
541 ACCGAAGCCG AACACAACA GCTGATCGAT GATCACTTCC TGTTGACAAA GCCTGTTTCT  
601 CCGCTGCTGC TGGCTTCTGG TATGGCGCGC GACTGGCCGG ACGCACGTGG CATTTGGCAT  
661 AACGACAACA AAACGTTTCT GGTGTGGGTC AACGAAGAAG ACCACCTGCG TGTAATTTCT  
721 ATGCAGAAAG GTGGCAACAT GAAAGAAGTT TTCACCCGTT TTTGCACCGG CCTGACCCAG  
781 ATTGAAACTC TGTTCAAATC TAAAGACTAT GAATTTATGT GGAACCCGCA CCTGGGTTAT  
841 ATTCTGACCT GTCCGTCCAA CCTGGGTACT GGCCTGCGTG CGGGTGTGCA CATTAGCTG  
901 CCGAACCTGG GTAAACATGA AAAGTTCAGC GAGGTCCTGA AACGCCTGCG TCTGCAGAAG  
961 CGTGGTACGG GCGGTGTTGA TACTGCAGCC GTTGGTGGTG TGTTGACGCT TAGCAACCGC  
1021 GATCGTCTGG GCTTCTCTGA AGTTGAACTG GTTCAGATGG TTGTTGATGG CGTGAAACTG  
1081 CTGATTGAGA TGAACAGCG TCTGGAACAG GGTGAGGCTA TTGATGACCT GATGCCGGCA  
1141 CAAAAATAG

MGPFSNSHNALKLRFPAEDEFPDLSAHNNHMAKVLTPELYAELRA  
KSTPSGFTLDDVIQTGVDPNGHPYIMTVGCVAGDEESYEVFKDLF  
DPIIEDRHGGYKPSDEHKTDLNPDNLQGGDDLDPNYVLSSRVRTG  
RSIRGFCLPPHCSRGERRAIEKLAVEALSSLDGDLAGRYYALKSMT  
EAEQQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMARDWPDARGIWHNDNKT  
FLVWVNEEDHLRVISMQKGGNMKEVFTRFCTGLTQIETLFKSKDY  
EFMWNPHLGYILTCPSNLGTGLRAGVHIKLPNLGKHEKFSEVLKR  
LRLQKRGTGGVDTAAVGGVFDVSNADRLGFSEVELVQMVDGV  
KLLIEMEQRLEQGQAIDDLMPAQK

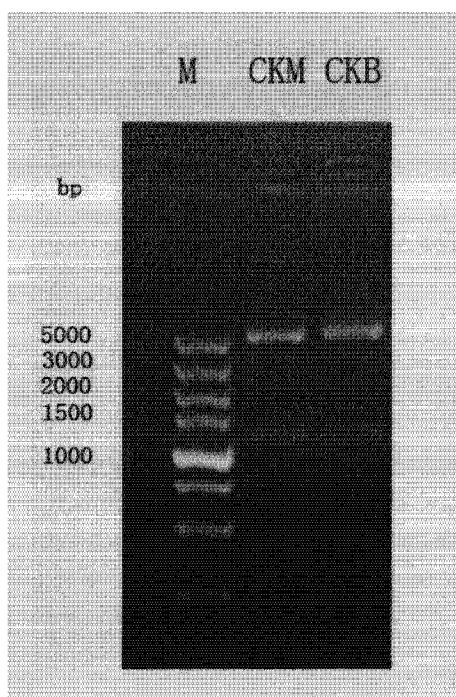


图 1

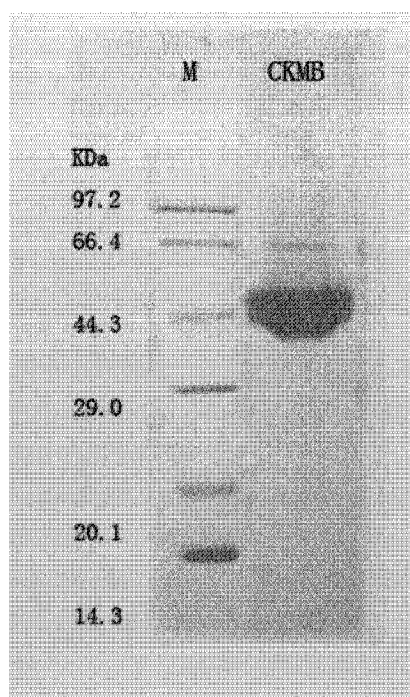


图 2

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	<a href="#">CN103014034A</a>	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	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 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。

