

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/70

C12N 15/12 C12N 1/21

C12P 21/02

//(C12N15/70,C12R1:19)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310115938. X

[43] 公开日 2004 年 11 月 17 日

[11] 公开号 CN 1546671A

[22] 申请日 2003.12.16

[21] 申请号 200310115938. X

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 王 群

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 重组人内皮抑素在大肠杆菌中的高效表达技术

[57] 摘要

本发明属于重组人内皮抑素在大肠杆菌中高效表达的技术领域。将人内皮抑素基因其插入原核表达载体 pET28b 中构建重组表达质粒 pBendo, 然后转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 筛选出阳性重组菌 E. coli BL21 - Endo, 在含卡那霉素的 LB 培养液中振荡培养, 使菌液 OD_{600nm} 在 0.4 ~ 0.6, 加入终浓度为 0.8 ~ 1.0m mol/L 的异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷, 继续振荡培养诱导内皮抑素的表达。重组内皮抑素蛋白表达量提高到菌体总蛋白的 38%。

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

1、一种重组人内皮抑素在大肠杆菌中的高效表达技术，将重组质粒 pBendo 转化表达型宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中，筛选出阳性重组菌 *E. coli* BL21-Endo，接种于 2mL、含 60~90 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养液中，在细菌培养箱中，35~38 $^{\circ}$ C，180~220rpm 振荡培养 12~16h，然后将菌液接种于 200mL、含 60~90 μ g/mL Kan 的 LB 培养液中，36~38 $^{\circ}$ C，200~250rpm 振荡培养 2~3h，使菌液 OD_{600nm} 在 0.4~0.6，向菌液中加入终浓度为 0.8~1.0m mol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷，在 36~37 $^{\circ}$ C 下，180~200rpm 继续振荡培养 3~5h 诱导内皮抑素的表达，表达量达到菌体总蛋白的 38%。

重组人内皮抑素在大肠杆菌中的高效表达技术

技术领域

本发明属于重组人内皮抑素在大肠杆菌中高效表达的技术。

背景技术

内皮抑素是哈佛大学 O'Reilly MS 在 1997 年的 Cell 杂志第 88 卷第 2 期 277~285 页的文章中提出发现的一种新的血管生成抑制因子，与传统抗肿瘤药物相比较，内皮抑素通过抑制肿瘤相关的新血管的生成来阻断肿瘤组织的血液供应，从而发挥抑制肿瘤生长与转移作用。内皮抑素抑制的靶细胞是血管内皮细胞而不是肿瘤细胞本身，所以有广泛的抗癌谱，且反复用药不会引起耐药性的产生。目前内皮抑素的原核表达主要采用大肠杆菌表达系统，曲建在上海大学学报(自然科学版)2000 年第六卷第四期 338-342 页的文章中提出，利用 pSQE 载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行内皮抑素的表达，重组蛋白的表达量达菌体总蛋白的 30%。

应用内皮抑素治疗肿瘤，疗程长且用量大。对于现在采用的内皮抑素蛋白原核表达体系，重组蛋白的表达效率还有待提高，最多不超过菌体总蛋白的 30%，难以满足临床应用的需要。

发明内容

本发明的目的是提供一种重组人内皮抑素在大肠杆菌中的高效表达技术。

本发明通过建立合适的诱导表达条件在较短的周期里表达出大量的重组蛋白质，提高内皮抑素的产量，以利于降低生产成本及产品价格，促进内皮抑素在临床的普遍应用。

本发明选择 IPTG 诱导表达技术实现人内皮抑素基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中的高效表达。从胚肝组织中提取肝细胞总 RNA，通过逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术获得人内皮抑素基因，将其插入原核表达载体 pET28b 中构建重组表达质粒 pBendo，然后转化表达型大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，筛选出阳性重组菌 *E. coli* BL21-Endo，采用新的诱导表达条件进行重组蛋白的表达。

本发明将重组质粒 pBendo 转化表达型宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中，筛选出阳性重组菌 *E. coli* BL21-Endo，接种

于 2mL、含 60~90 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素 (Kan) 的 LB 培养液中, LB 培养液的组分是 1%胰化蛋白胨、0.5%酵母提取物和 1%NaCl。在细菌培养箱中, 35~38 $^{\circ}\text{C}$, 180~220rpm 振荡培养 12~16h, 然后将菌液接种于 200mL、含 60~90 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 培养液中, 36~38 $^{\circ}\text{C}$, 200~250rpm 振荡培养 2~3h, 使菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 在 0.4~0.6, 向菌液中加入终浓度为 0.8~1.0 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 在 36~37 $^{\circ}\text{C}$ 下, 180~200rpm 继续振荡培养 3~5h 诱导内皮抑素的表达, 表达量达到菌体总蛋白的 38%。

采用新的大肠杆菌表达条件, 实现重组蛋白表达量达到菌体总蛋白的 38%, 高于已报道的方法。

具体实施方式

实施例 1: 将重组质粒 pBendo 转化表达型宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 筛选出阳性重组菌 *E. coli* BL21-Endo, 接种于 2mL、含 90 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 培养液中, 在细菌培养箱中, 38 $^{\circ}\text{C}$, 220rpm 振荡培养 14h, 然后将菌液接种于 200mL、含 90 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 培养液中, 38 $^{\circ}\text{C}$, 250rpm 振荡培养 2.5h, 使菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 在 0.6。向菌液中加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下, 200rpm 继续振荡培养 5h 诱导内皮抑素的表达。

实施例 2：将重组质粒 pBendo 转化表达型宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中，筛选出阳性重组菌 *E. coli* BL21-Endo，接种于 2mL、含 60 μ g/mL Kan 的 LB 培养液中，在细菌培养箱中，35 $^{\circ}$ C，180rpm 振荡培养 16h，然后将菌液接种于 200mL、含 60 μ g/mL Kan 的 LB 培养液中，36 $^{\circ}$ C，200rpm 振荡培养 2h，使菌液 OD_{600nm} 在 0.4。向菌液中加入终浓度为 0.8mmol/L 的 IPTG，在 36 $^{\circ}$ C 下，180rpm 继续振荡培养 3h 诱导内皮抑素的表达。

实施例 3：将重组质粒 pBendo 转化表达型宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中，筛选出阳性重组菌 *E. coli* BL21-Endo，接种于 2mL、含 70 μ g/mL Kan 的 LB 培养液中，在细菌培养箱中，37 $^{\circ}$ C，200rpm 振荡培养 12h，然后将菌液接种于 200mL、含 70 μ g/mL Kan 的 LB 培养液中，37 $^{\circ}$ C，220rpm 振荡培养 2.5h，使菌液 OD_{600nm} 在 0.5。向菌液中加入终浓度为 0.9mmol/L 的 IPTG，在 36.5 $^{\circ}$ C 下，190rpm 继续振荡培养 4h 诱导内皮抑素的表达。

实施例 4：将重组质粒 pBendo 转化表达型宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中，筛选出阳性重组菌 *E. coli* BL21-Endo，接种于 2mL、含 70 μ g/mL Kan 的 LB 培养液中，在细菌培养箱中，37 $^{\circ}$ C，220rpm 振荡培养 14h，然后将菌液接种于 200mL、含 70

$\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 培养液中， 36°C ， 250rpm 振荡培养 3h，使菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 在 0.6。向菌液中加入终浓度为 0.8mmol/L 的 IPTG，在 37°C 下， 200rpm 继续振荡培养 4h 诱导内皮抑素的表达。

实施例 5：将重组质粒 pBendo 转化表达型宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中，筛选出阳性重组菌 *E. coli* BL21-Endo，接种于 2mL、含 $80\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 培养液中，在细菌培养箱中， 38°C ， 180rpm 振荡培养 12h，然后将菌液接种于 200mL、含 $80\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 培养液中， 37°C ， 220rpm 振荡培养 3h，使菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 在 0.6。向菌液中加入终浓度为 1.0mmol/L 的 IPTG，在 36°C 下， 190rpm 继续振荡培养 5h 诱导内皮抑素的表达。

实施例 6：将重组质粒 pBendo 转化表达型宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中，筛选出阳性重组菌 *E. coli* BL21-Endo，接种于 2mL、含 $70\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 培养液中，在细菌培养箱中， 37°C ， 200rpm 振荡培养 16h，然后将菌液接种于 200mL、含 $70\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 培养液中， 38°C ， 200rpm 振荡培养 2.5h，使菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 在 0.5。向菌液中加入终浓度为 0.9mmol/L 的 IPTG，在 37°C 下， 200rpm 继续振荡培养 3h 诱导内皮抑素表达。