

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 19/34

C07H 21/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510016716.1

[43] 公开日 2005 年 11 月 16 日

[11] 公开号 CN 1696303A

[22] 申请日 2005.4.18

[21] 申请号 200510016716.1

[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 曲晓刚 包蕙心

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司
代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 人类细胞周期素 A 基因的提取与纯化方法

[57] 摘要

本发明属于人类细胞周期素 A 基因的制备方法，涉及一种人类细胞周期素 A 基因的提取与纯化的方法。从大肠杆菌中提取含有基因片段的质粒，经过限制性内切酶消化后，通过琼脂糖凝胶电泳分离基因片段与载体，从凝胶中回收细胞周期素 A 基因片段并纯化。这种方法不会对基因产生损伤，而且具有较高的回收率。本发明的方法可以用于提取和纯化人类细胞周期素 A 基因。

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

1、一种人类细胞周期素 A 基因的提取与纯化方法，其步骤包括 (1) 从大肠杆菌中用碱裂解法提取质粒 pGEM-人类细胞周期素 A 基因，其特征在于还包括如下步骤：

(2) 提取的质粒 pGEM-人类细胞周期素 A 基因用限制性内切酶 EcoR I 消化称之为酶切法，具体的酶切方法是采用如下的物质与配比：

限制性酶切酶EcoR I	4~8 μ l
10 \times 缓冲液	5~10 μ l
带有人细胞周期素A基因的质粒	45~50 μ l
灭菌水	80~90 μ l

保持总体积：150 μ l

反应条件：温度为35~40 $^{\circ}$ C，时间为8~24小时

质粒pGEM-人类细胞周期素 A基因浓度为10~15 μ g

(3) 待质粒 pGEM-人类细胞周期素 A 基因消化完全后，用 0.7%的琼脂糖凝胶电泳分离基因片段和载体，在 100V 电压下保持 2.5 小时；人类细胞周期素 A 基因片段与载体经琼脂糖凝胶电泳分离后，在紫外灯下将人类细胞周期素 A 基因条带尽可能窄的切下来，切成小块后装入离心管中，加入 20 $^{\circ}$ C 的纯水中正好将其淹没，放置 12 小时，并振摇数次；然后用最大转速 1200r/min 离心机离心 10 分钟，使琼脂糖胶块沉在离心管底部，吸出的上层水溶液即为回收的人类细胞周期素 A 基因溶液；经过与它的体积比为 1:1 的酚-氯仿抽提去除蛋白后，装入透析袋对水透析 24 小时；透析后的水溶液在真空度为 50×10^{-3} Pa，温度为 -50 $^{\circ}$ C 的条件下，经冻干机冻干成粉末，用缓冲液溶解；沉在离心管底部的凝胶可以再次浸泡，使人类细胞周期素 A 基因全部深出。

2、根据权利要求 1 所述的人类细胞周期素 A 基因的提取与纯化方法,其特征在于所说的 (2) 中，浸泡琼脂糖凝胶块的温度为 37 $^{\circ}$ C，浸泡时间为 8 小时。

人类细胞周期素 A 基因的提取与纯化方法

技术领域

本发明属于人类细胞周期素 A 基因的提取与纯化的方法。

背景技术

人类细胞周期素A在细胞周期调控的过程中起到重要的作用。它与相应的细胞周期素依赖性激酶结合催化相应的底物，从而使细胞周期由G₂期向S期过渡。在临床的一些病例中表明，细胞周期素A与肿瘤发生有关，如乳腺癌、结肠癌、子宫癌、胃癌等肿瘤细胞中细胞周期素A过量表达，现在通过它可以来预测一些肿瘤的发生。因此细胞周期素A 基因的研究对于肿瘤的认识与治疗具有重要意义。目前对与人类细胞周期素 A基因的提取和纯化还没有报导。

发明内容

本发明的目的是提取与纯化人类细胞周期素 A基因来用于研究基因的性质，而且此方法适用于大规模提取、纯化基因片段，而且不损伤基因片段。

提取与纯化步骤：

- (1) 从大肠杆菌中用碱裂解法提取质粒pGEM-人类细胞周期素 A基因；
- (2) 提取的质粒pGEM-人类细胞周期素 A基因用限制性内切酶EcoR I 消化称之为酶切法，具体的酶切方法是采用如下的物质与配比：

限制性酶切酶EcoR I	4~8μl
10×缓冲液	5~10μl
含有人细胞周期素A基因的质粒	45~50μl
灭菌水	80~90μl

保持总体积：150μl

反应条件： 温度为35~40℃，时间为8~24小时

(3) 待质粒pGEM-人类细胞周期素 A基因消化完全后,用0.7%的琼脂糖凝胶电泳分离基因片段和载体,在100V电压下保持2.5小时。人类细胞周期素A基因片段与载体经琼脂糖凝胶电泳分离后,在紫外灯下将人类细胞周期素A基因条带尽可能窄的切下来,切成小块后装入离心管中,加入的纯水正好将其淹没,放置12小时,并振摇数次。然后用离心机最大转速(1200r/min)离心10分钟,使琼脂糖胶块沉在离心管底部,吸出的上层水溶液(即为回收的人类细胞周期素A基因溶液)经过与它的体积比为1:1的酚-氯仿抽提去除蛋白后,装入透析袋对水透析24小时。透析后的水溶液经冻干机冻干(50×10^{-3} Pa, -50°C)成粉末,用缓冲液溶解。沉在离心管底部的凝胶可以再次浸泡,使人类细胞周期素A基因全部深出。

本发明的方法可以用来大规模提取与纯化人类细胞周期素A基因,而人类细胞周期素A基因的研究对肿瘤认识与治疗有重要意义。

具体实施方式

实施例 1

人类细胞周期素 A 基因已预先定向克隆到载体 pGEM 上,基因片段两端均为 EcoR I 酶切位点。首先从大肠杆菌中用碱裂解法大量提取质粒 pGEM-人类细胞周期素 A 基因,提出的质粒用限制性内切酶 EcoR I 消化。为了提高回收人类细胞周期素 A 基因片段的效率,在酶反应体系中质粒 pGEM-人类细胞周期素 A 基因的浓度为 $10 \mu\text{g}$, 36°C 时反应。

酶切方法如下:

限制性内切酶 EcoR I	8 μl
10 \times 缓冲液	10 μl
带有细胞周期素 cyclin A 基因的质粒	50 μl
灭菌水	82 μl
保持总体积:	150 μl
反应条件: 36°C 下放置 24 小时	

实施例 2

从大肠杆菌中用碱裂解法大量提取质粒 pGEM-人类细胞周期素 A 基因，提出的质粒 pGEM-人类细胞周期素 A 基因用限制性内切酶 EcoR I 消化。在酶反应体系中质粒 pGEM-人类细胞周期素 A 基因的浓度为 $13 \mu\text{g}$ ， 37°C 进行反应。同时改变了限制性内切酶的用量和反应时间。

酶切方法如下：

限制性内切酶 EcoR I	$4 \mu\text{l}$
10×缓冲液	$6 \mu\text{l}$
带有细胞周期素 cyclin A 基因的质粒	$50 \mu\text{l}$
灭菌水	$90 \mu\text{l}$
保持总体积： $150 \mu\text{l}$	

反应条件： 37°C 下放置 24 小时

实施例 3

从大肠杆菌中用碱裂解法大量提取质粒 pGEM-人类细胞周期素 A 基因，提出的质粒用限制性内切酶 EcoR I 消化。在酶反应体系中质粒的浓度为 $15 \mu\text{g}$ ， 38°C 进行反应。限制性内切酶的用量和反应时间发生改变。

酶切方法如下：

限制性内切酶 EcoR I	$6 \mu\text{l}$
10×缓冲液	$8 \mu\text{l}$
带有细胞周期素 cyclin A 基因的 质粒	$50 \mu\text{l}$
灭菌水	$86 \mu\text{l}$
保持总体积： $150 \mu\text{l}$	

反应条件： 38°C 下放置 24 小时

实施例 4

待质粒 pGEM-人类细胞周期素 A 基因消化完全后，用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳分离基因片段和载体，在 100V 电压下保持 2.5 小时。人类细胞周

期素 A 基因片段与载体经琼脂糖凝胶电泳分离后，在紫外灯下将人类细胞周期素 A 基因条带尽可能窄的切下来，切成小块后装入离心管中，加入的纯水正好将其淹没，放置十二小时，并振摇数次。然后用离心机最大转速（12000r/min）离心 10 分钟，使琼脂糖胶块沉在离心管底部，吸出的上层水溶液（即为回收的人类细胞周期素 A 基因溶液）经过 1:1 酚-氯仿抽提去除蛋白后，装入透析袋对水透析 24 小时；透析后的水溶液经冻干机冻干（ 50×10^{-3} Pa, -50°C ）成粉末，用缓冲液溶解。沉在离心管底部的凝胶可以再次浸泡，使人类细胞周期素 A 基因全部溶出。

实施例 5

在实施例 4 中同样的操作下，改变浸泡琼脂糖凝胶块的温度，将温度提高到 37°C ，可以将浸泡时间缩减到 8 小时，而且可以提高溶出的效率。离心后，将上清液经 1:1 酚-氯仿抽提后对水透析 24 小时，冻干机冻干（ 50×10^{-3} Pa, -50°C ）后溶解，即得到了人类细胞周期素 A 基因溶液。