

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510012414.7

[51] Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年11月15日

[11] 授权公告号 CN 1284797C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

[22] 申请日 2005.3.22

[21] 申请号 200510012414.7

[71] 专利权人 太原博奥特生物技术有限公司

地址 030006 山西省太原市师范街110号

[72] 发明人 焦进安 赵 邑 郝建平 李晋川

谢 红 赵峰梅

审查员 韩世炜

[74] 专利代理机构 山西五维专利事务所有限公司

代理人 李 毅

权利要求书2页 说明书11页 附图3页

[54] 发明名称

人重组组织因子的构建表达、纯化方法及其应用

[57] 摘要

本发明涉及人重组组织因子的构建、表达和纯化方法及应用。从人胎盘中获取到的TF基因片段与phoA质粒重组,构建质粒载体pTF₂₄₃,转化到大肠杆菌MM294中,筛选得到工程菌株,接入培养基直接发酵表达,得到的菌液先使用Q-Sepharose Fast Flow基质离子交换层析,再通过TF单抗免疫亲和层析柱吸附洗脱,得到rhTF₂₄₃蛋白。本发明中TF随培养基中磷的消耗而直接表达,不需增加诱导物和对蛋白质进行变性与复性,简化了发酵工艺,提高了表达率,采用TF单抗纯化rhTF₂₄₃蛋白,不会受到不可逆损伤,获得rhTF₂₄₃纯度95%以上,收率大于60%,制备的PT试剂稳定性和敏感性均得到了提高。

1、一种人重组组织因子，其核苷酸序列如图 1 所示，含有天然人组织因子跨膜部分和膜外部分的 243 个氨基酸残基，为缺失胞内区的截断型人重组组织因子 recombinant human tissue factor，简称 rhTF₂₄₃，具有天然人组织因子的全部凝血活性。

2、权利要求 1 所述人重组组织因子的构建表达方法，其特征是从人胎盘组织中获取总 RNA，设计 PCR 引物，通过 RT-PCR 方法得到目的基因片段；将收集的 TF 基因片段与 phoA 质粒重组，构建 TF 表达质粒载体 pTF₂₄₃，转化到大肠杆菌 MM294 中，筛选得到基因重组工程菌株，接入发酵培养基直接发酵表达，得到含 rhTF₂₄₃ 蛋白的发酵培养菌液。

3、根据权利要求 2 所述的人重组组织因子构建表达方法，其特征是所述的发酵培养基是以 LB 培养基为基础，添加 2%~5%的葡萄糖、1%~5%无机盐溶液和 0.01%~0.05%氨苄青霉素后组成的。

4、根据权利要求 3 所述的人重组组织因子构建表达方法，其特征是所述的无机盐溶液由 0.1%~0.5%磷酸二氢钠、0.5%~1.0%磷酸氢二钾、0.01%~0.05%氯化铁、0.01%~0.03%硫酸锌、0.01%~0.03%氯化钴、0.01%~0.03%硫酸铜、0.5%~1.0%硫酸铵和 0.05%~0.10%硫酸镁组成。

5、根据权利要求 2 所述的人重组组织因子构建表达方法，其特征是 rhTF₂₄₃ 在大肠杆菌中的表达是由发酵培养液中的无机磷浓度控制的，随着大肠杆菌的发酵培养，培养液中的无机磷逐渐消耗，当无机磷浓度低于 0.1mmol/L 时，rhTF₂₄₃ 蛋白被诱导表达。

6、根据权利要求 2 所述的人重组组织因子构建表达方法，其特征是所述的发酵培养在温度 30℃~37℃和 pH6.0~7.5 条件下进行，并保持水溶性氧 > 20%。

7、权利要求 1 所述人重组组织因子的纯化方法，其特征是用高压匀浆机破碎发酵培养菌液释放 rhTF₂₄₃ 蛋白，先用 Q-Sepharose Fast Flow 基质进行离子交换层析，再通过 TF 单抗免疫亲和层析柱，收集得到纯化的 rhTF₂₄₃ 蛋白。

8、根据权利要求 7 所述的人重组组织因子的纯化方法，其特征是依次用 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液、pH 6.0 的磷酸盐缓冲液和 pH 4.0 的醋酸钠缓冲液洗涤吸附在 TF 单抗免疫亲和层析柱上的 rhTF₂₄₃ 蛋白，然后用 pH 3.0 的醋酸缓冲液洗脱 rhTF₂₄₃ 蛋白。

9、根据权利要求 7 所述的人重组组织因子的纯化方法，其特征是所述的 TF 单抗免疫亲和层析柱是由 TF 单克隆抗体与 CNBr-activated Sepharose Fast Flow 偶联后制备得到。

10、权利要求 1 所述的人重组组织因子在制备凝血酶原时间测定试剂盒上的应用。

人重组组织因子的构建表达、纯化方法及其应用

所属技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及人重组组织因子，特别是人重组组织因子的构建表达和纯化方法。本发明还涉及该人重组组织因子的应用。

背景技术

20 世纪初期，Schmid 与 Moranitz 首次发现了组织中血液凝固的启动因子，并将其命名为组织因子（Tissue factor, TF）。到 20 世纪 80 年代，组织因子被证实是生理性凝血过程中最重要的启动因子。人们借助重组 DNA、人工致突变及基因剔除等现代分子生物学技术，进一步在分子水平和基因水平研究 TF，发现 TF 与全身炎症反应综合症及休克、DIC、血栓性疾病、移植排斥反应、恶性肿瘤等的发生、发展有着密切关系，近年来又研究发现 TF 还具有参与愈伤组织修复、新生血管形成及胚胎发育等多种生理功能。因此，组织因子在生物制药领域有着良好的应用发展前景。

目前，国内外组织因子的研究主要集中在与组织因子有关的生物技术新药的研究开发和凝血酶原时间检测试剂的研制方面。

在生物制药产业上，组织因子的研究主要集中在抗凝药、心血管病方面的药物上，如研究开发的组织因子单克隆抗体、TFPI（TF pathway inhibitor）、失活的因子 VIIa、rNAPc2、抗 TF 或 VIIai 的小分子化合物、靶向免疫络合物等。

组织因子是凝血酶原时间（Prothrombin time, PT）检测试剂的主要活性成分，是影响凝血酶原时间测定的主要因素，高质量的组织因子能够敏感地反应出凝血因子的异常与否。凝血酶原时间测定是血液临床检验的常规项目，用于检测病人凝血机制是否正常，特别是心胸外科、骨科、妇产科等手术前检查病人的凝血功能，同时也是口服抗凝药物治疗监控的重要实验室指标，凝血酶

原时间的延长和缩短与肝病、肿瘤、炎症、糖尿病、心脏病、血液病、高血压、高血脂等多种疾病有密切关系。

长期以来，凝血酶原时间测定试剂的制备都是由从兔脑、牛脑、人脑、胎盘等组织中提取组织因子配制而成，如美国 DadeBehring 公司生产的胎盘凝血活酶、法国 Diagnostia Stago 公司生产的兔脑凝血活酶、我国陕西方舟公司生产的兔脑凝血活酶、上海太阳公司用兔脑制备的含钙冻干组织凝血活酶等。由于这些组织提取物所含的组织因子的浓度不同，尤其是不同种属来源组织中的组织因子对凝血的反应敏感度不同，所以用其生产的凝血酶原时间测定试剂普遍存在产品质量不稳定，敏感性差，检测结果不稳定的问题，不同的临床检验实验室之间得到的检测结果难以比较。尽管采用了 WHO 的标准参照品，但仍然不能把误差降低到可接受的水平。

近年来，随着分子生物学的飞速发展，人们已经克隆出组织因子的基因，清楚了它的结构，并采用基因工程技术合成了重组组织因子。目前，国外有少数几家公司（如 DadeBehring 公司）已经利用兔重组组织因子或人重组组织因子开发出了新型的凝血酶原时间测定试剂。临床应用结果表明，由于重组组织因子分子结构均一、质量稳定，且对凝血因子具有极高的敏感性，使用重组组织因子制成的凝血酶原时间测定试剂提高了 PT 测定的敏感性、精密度和准确度，在临床医学检验上被认为是新一代的标准化凝血酶原时间测定试剂。使用重组组织因子生产的凝血酶原时间测定试剂，已成为相关研究人员的共识和各级医院的首选。

人组织因子是分子量为 47KD 的糖蛋白，含有 263 个氨基酸残基，为跨膜受体蛋白质。TF 是凝血因子 VII 的受体和辅助因子，是外源凝血途径的启动蛋白。TF 蛋白分子分为 3 个部分，胞内区 21 个氨基酸残基，跨膜部分为 23 个氨基酸残基，具有疏水性，膜外部分含 219 个氨基酸残基，为氨基端，带有糖链。研究证实，缺失胞内区的截断型人组织因子（TF₂₄₃，由跨膜部分和膜外部分组

成) 具有全部的凝血活性。

国外利用人重组组织因子制备凝血酶原时间测定试剂的文献以及专利报道基本上集中在了组织因子制备凝血酶原时间测定试剂的脂化、缓冲液组成、稳定剂的加入等工艺上。复旦大学的发明专利申请“重组可溶性组织因子及其制备方法和应用”提供了一种含有部分天然 TF 的氨基酸序列(1~218)及具有启动外源性凝血活性的重组可溶性组织因子 r-sTF。其 r-sTF 的一种具体制备方法是:从胎盘组织中提取总 RNA,运用 RT-PCR、质粒重组和大肠杆菌的阳性克隆筛选,获得 sTF 基因片段,进一步构建表达质粒 r-sTF-pLY-4,并导入大肠杆菌 JF1125 中表达;然后经过离心收集菌体,菌体破碎,包涵体溶解,复性和 Q-Sepharose F.F.层析纯化等步骤,最终得到 r-sTF。上述得到的 r-sTF 经磷脂化处理后,可用于制备凝血酶原时间检测试剂。

在复旦大学的发明专利申请中,获得的 r-sTF 只是 TF 的胞外部分,与天然全长型 TF 或 TF₂₄₃截断型(含有跨膜结构)相比,其生物活性较低。此外,r-sTF 在大肠杆菌的表达方式是通过提高发酵温度诱导表达形成包涵体沉淀物,而较高的培养温度常常会降低可溶性蛋白的表达水平,同时包涵体沉淀物需要经过蛋白质变性及复性才能得到有活性的 TF 样品,因此,r-sTF 的纯化过程繁琐,TF 结构和活性的均一性较低。

发明内容

本发明的目的是提供一种新型的人重组组织因子以及构建、表达和纯化该重组组织因子的方法。

本发明的目的还在于应用该重组组织因子,制备高稳定性和高敏感性的凝血酶原时间测定试剂盒。

本发明构建的人重组组织因子 recombinant human tissue factor 简称 rhTF₂₄₃,其核苷酸序列和氨基酸序列见图 1,为由膜外区和跨膜区两部分组成,缺失胞内区的截断型人重组组织因子,即 TF 的 1~243 氨基酸序列部分,具有

和组织因子同样活性的蛋白。

本发明从人胎盘组织中获取总 RNA，根据已知的 TF 核苷酸序列，设计 PCR 引物，并加入酶切位点；以总 RNA 为模板，通过 RT-PCR 方法得到目的基因片段；将收集的 TF 基因片段与 phoA 质粒（由美国血液技术公司焦进安博士提供）重组，构建出 TF 表达质粒载体 pTF₂₄₃。图 2 所示为 TF 表达质粒载体 pTF₂₄₃ 的物理图谱。

进而将 TF 表达质粒载体 pTF₂₄₃ 转化到大肠杆菌 MM294 中，用添加 0.01% 氨苄青霉素的 LB 培养基培养，提取质粒，使用内切酶酶切分析基因片段，筛选确认阳性克隆，得到高效表达的基因重组工程菌株。

取筛选得到的基因重组工程菌株接入到发酵培养基中，在 30℃~37℃ 和 pH6.0~7.2 条件下直接发酵培养表达，得到含有 rhTF₂₄₃ 的发酵培养菌液。

本发明的发酵培养基是以 LB 培养基为基础，添加 2%~5% 的葡萄糖、1%~5% 无机盐溶液和 0.01%~0.05% 氨苄青霉素后组成的。

其中的无机盐溶液由 0.1%~0.5% 磷酸二氢钠、0.5%~1.0% 磷酸氢二钾、0.01%~0.05% 氯化铁、0.01%~0.03% 硫酸锌、0.01%~0.03% 氯化钴、0.01%~0.03% 硫酸铜、0.5%~1.0% 硫酸铵和 0.05%~0.10% 硫酸镁组成。

本发明中，rhTF₂₄₃ 在大肠杆菌 MM294 中的表达是由 phoA 启动子控制的，而 phoA 启动子的抑制与激活又受到发酵培养液中无机磷浓度的控制，当无机磷浓度低于 0.1mmol/L 时，rhTF₂₄₃ 蛋白被诱导表达。

当大肠杆菌在含无机磷浓度高的培养液里生长时，phoA 启动子受到抑制，不能进行 rhTF₂₄₃ 的表达，在发酵培养过程中，随着大肠杆菌的生长，无机磷逐渐消耗，当无机磷浓度降低到一定水平（低于 0.1mmol/L）时，phoA 启动子受到激活，从而诱导 rhTF₂₄₃ 开始表达。表 1、表 2 列出了不同时间和不同无机磷浓度下的 rhTF₂₄₃ 表达情况（活性以凝血酶原时间表示，凝血酶原时间长，活性较低，凝血酶原时间短，活性较高）。

表1 不同无机磷浓度下rhTF₂₄₃的表达活性

样 品	培养时间 (小时)	PT凝血时间 (秒)
高磷浓度(10mmol/L)培养液	8	164.4
低磷浓度(0.1mmol/L)培养液	8	42
高磷浓度(10mmol/L)培养液	24	121.5
低磷浓度(0.1mmol/L)培养液	24	28.9

表2 发酵过程中rhTF₂₄₃活性的表达

发酵时间 (小时)	OD值	磷浓度 (mmol/L)	TF活性 (PT凝血时间, 秒)
5.5	7.0	7.320	131.5
8	13.86	0.392	61.8
9	14.34	0.001	37.2
10	14.30	/	37.2
11	14.36	/	33.7
12	14.5	/	32.0

本发明 rhTF₂₄₃ 的纯化方法是, 取发酵培养菌液溶于 Tris-EDTA 缓冲液中, 用高压匀浆机高压破碎, 释放出 rhTF₂₄₃ 蛋白; 先使用 Q-Sepharose Fast Flow 基质对破碎液进行离子交换层析, 得到 rhTF₂₄₃ 蛋白的粗提液; 再将粗提液通过 TF 单抗免疫亲和层析柱进行吸附和洗脱后, 收集得到纯度 95% 以上的 rhTF₂₄₃ 蛋白。

TF 单抗免疫亲和层析柱的具体吸附和洗脱方法为: 依次用 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液、pH 6.0 的磷酸盐缓冲液和 pH 4.0 的醋酸钠缓冲液洗涤, 然后用 pH 3.0 的醋酸缓冲液洗脱 rhTF₂₄₃ 蛋白, 并收集。

本发明使用的 TF 单抗免疫亲和层析柱是由 TF 单克隆抗体与 Amersham 公司的 CNBr-activated Sepharose Fast Flow 偶联后制备得到的, 其中的 TF 单克隆抗体由美国血液技术公司焦进安博士提供。本发明制备得到的 TF 单克隆抗体具有很强的专一性, 可以重复多次使用。

通过使用紫外分光光度计测定在 280nm 波长下的吸光度值 A_{280} 和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法鉴定洗脱后的 rhTF₂₄₃ 蛋白纯度。

本发明制备得到的 rhTF₂₄₃ 蛋白主要应用于制备凝血酶原时间检测试剂。

在钙和磷脂存在条件下，TF 具有引起血浆凝固的功能，TF 的血浆凝固功能是通过测定凝血时间进行的。

在进行 PT 测定时，TF、CaCl₂ 和磷脂混合在一起组成 PT 试剂。本发明制备凝血酶原时间检测试剂的具体方法是在 37℃ 条件下将纯化的 rhTF₂₄₃ 蛋白加入溶解有磷脂的 100mmol/L Tris 缓冲液 (pH7.5, 含有 100mmol/L CHAPS) 中得到 rhTF₂₄₃ 磷脂液, 再将 rhTF₂₄₃ 磷脂液与由 100mmol/L HEPES、10mmol/L CaCl₂、1mg/mL BSA 组成的缓冲液 (pH7.0) 混合后, 得到 PT 检测试剂。

其中的磷脂是由 Sigma 公司提供的 PC (产品号 P6354) 与 PS (产品号 P7769) 混合组成。

本发明运用现代分子生物学技术, 构建了新型的人重组组织因子的表达载体 pTF₂₄₃, 改进了 TF 的表达机理, 使其能够在大肠杆菌 MM294 的发酵中, 随着培养基中无机磷的逐渐消耗而直接表达, 不再需要增加诱导物和 (或) 改变发酵条件进行诱导外源蛋白的表达, 简化了发酵生产的工艺, 有效地提高了 rhTF₂₄₃ 蛋白的表达率, 也不需要蛋白质进行变性和复性; 同时在 rhTF₂₄₃ 蛋白的纯化工艺中, 采用了 TF 单抗免疫亲和层析技术, 依据人重组组织因子与 TF 单抗免疫亲和层析柱上的抗体特异性结合, 经过洗涤、洗脱得到纯化的重组组织因子蛋白, 由于人重组组织因子与 TF 单克隆抗体之间结合的特异性和温和性, 人重组组织因子在纯化过程中没有受到不可逆的损伤, 因此获得了高纯度和高活性的 rhTF₂₄₃。纯化的 rhTF₂₄₃ 纯度 95% 以上, 收率大于 60%。

使用本发明纯化的 rhTF₂₄₃ 蛋白制备得到的 PT 试剂, 稳定性和敏感性均得到了提高, PT 测定时间 10s~14s, ISI 值 1.0±0.2。

附图说明

图 1 为人重组组织因子 rhTF₂₄₃ 的 DNA 序列和氨基酸序列;

图 2 为 TF 表达质粒载体 pTF₂₄₃ 的物理图谱;

图 3 为纯化 rhTF₂₄₃ 蛋白的紫外分光光度图;

图 4 为纯化 rhTF₂₄₃ 蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳图。

具体实施方式

实施例 1

rhTF₂₄₃ 表达质粒载体的构建

从人胎盘组织中获取总 RNA，根据已知的 TF 核苷酸序列，设计 PCR 上游引物 P1 和下游引物 P2。

上游引物 P1：5'-ACCAGCCATGGCTCAGGCACTACAAATACTGTGGC-3'

下游引物 P2：5'-GGATCCTCAGTGTAGAGATATAGCCAGGATG-3'

P1 引物含有数个 TF 蛋白 N 端氨基酸及 Nco I 酶切位点，P2 引物含有数个 TF 蛋白 C 端氨基酸、终止码及 BamH I 酶切位点。

以总 RNA 为模板，P1、P2 为引物，通过常规 RT-PCR 方法得到 TF 目的基因片段；将收集的 rhTF₂₄₃ 基因片段用限制性内切酶 Nco I 和 BamH I 处理，与 phoA 质粒重组，构建 TF 表达质粒载体 pTF₂₄₃。

将 TF 表达质粒载体 pTF₂₄₃ 转化到大肠杆菌 MM294 中，用添加 0.01% 氨苄青霉素的 LB 培养基培养，提取质粒，使用内切酶酶切分析基因片段，并测定 TF 基因的 DNA 序列，筛选确认阳性克隆，使用 PT 测定方法（检测 TF 凝血活性）筛选得到高效表达的基因重组工程菌株。

实施例 2

rhTF₂₄₃ 的发酵表达

1、发酵培养基的制备

组成：LB 培养基 1000mL、葡萄糖 50g、无机盐溶液 10mL、0.01% 氨苄青霉素。其中无机盐溶液由 0.1% 磷酸二氢钠、0.5% 磷酸氢二钾、0.01% 氯化铁、0.03% 硫酸锌、0.01% 氯化钴、0.03% 硫酸铜、0.5% 硫酸铵和 0.05% 硫酸镁组成。

将 LB 培养基、葡萄糖、无机盐的混合溶液在 121℃ 条件下灭菌 20~30min

后，加入氨苄青霉素制成发酵培养基。

2、摇瓶发酵培养

取 2mL 筛选得到的基因重组工程菌菌液加入到含有 1000mL 发酵培养基的三角瓶中，放入 30℃ 恒温摇床内，以 200r/min 转速培养 16h~20h，至测定 600nm 处的 OD 值在 1.5~2.5 之间。

3、高密度发酵培养

在 30L 发酵罐中加入 6L 发酵培养液，加入摇瓶培养的发醇液，开始高密度发酵培养，温度 35℃，搅拌速度 400r/min，保持水溶性氧(dissolved oxygen) >20%，用 25%氨水维持 pH 值在 6.0~7.5 之间，发酵 6h、8h 时分别补加 1L 的发醇培养基，发酵 18h，培养至测定 600nm 处的 OD 值 10.0 以上，得到发醇培养液。

测定表达 rhTF₂₄₃ 蛋白的活性为 20s~30s（以凝血酶原时间计）。

4、rhTF₂₄₃ 蛋白活性的测定方法

取纯化的 rhTF₂₄₃ 蛋白 30μL (含量为 30μg/ml)、30μL 磷脂混合物 (含量为 1mg/mL)、240μL TBSA 缓冲液，振荡混匀，37℃ 水浴中保温 30min，得到脂化的 rhTF₂₄₃。取 0.5mL 脂化的 rhTF₂₄₃、0.5mL 0.1mol/L CaCl₂、4mL TBSA 混合，在 37℃ 水浴中保温 10min，按照血凝仪使用说明进行凝血酶原时间的测定。

磷脂混合物由 Sigma 公司的 PC (产品号为 P6354) 和 PS (产品号为 P7769) 按 7: 3 组成。

实施例 3

rhTF₂₄₃ 蛋白的纯化

1、制备 TP 单抗免疫亲和层析柱

称取 15mg 纯化的 TF 单抗、1g CNBr-活化的 Sepharose 基质、100 mL 0.4mol/L NaHCO₃ 偶联缓冲液 (pH8.3)、11.7 克 NaCl，在温度 25℃ 下混合装

柱, 缓慢振荡 2h, 排出液体; 再用 0.1mol/L Tris 缓冲液 (pH 8.2) 封闭 2h, 25℃静置, 排出液体; 依次用 pH3.0 的 0.1mol/L 乙酸钠溶液和 pH8.3 的 0.1mol/L Tris 缓冲液洗涤, 最后用 5 倍柱体积的 PBS 缓冲液 4℃保存, 制备成 TP 单抗免疫亲和层析柱。

2、rhTF₂₄₃ 蛋白的纯化

1) 菌体破碎

将得到的发酵菌体 20g 溶于 2℃~8℃ 20mmol/L Tris-EDTA 缓冲液 100mL 中, 加 1% Triton X-100, 振荡混匀, 用高压匀浆机以 60Mpa~100Mpa 的高压进行细胞破碎, 连续三次破碎后, 在 4℃~8℃ 条件下以 20000g 离心力离心 30min, 收集上清液, 得到释放 rhTF₂₄₃ 蛋白的破碎液。

2) Q-Sepharose Fast Flow 基质层析

将破碎液与 Q-Sepharose Fast Flow 基质等比例充分混合, 静置 5min, 过滤除去基质, 清液在 4℃~8℃ 条件下以 20000g 离心力离心 30min, 收集上清液, 得到粗提液。

3) TP 单抗免疫亲和柱层析

将粗提液在 4℃~8℃ 条件下加入 TP 单抗免疫亲和层析柱, 依次用 5 倍柱体积的 pH8.0 Tris-HCl 缓冲液、pH6.0 磷酸钠缓冲液、pH4.0 醋酸钠缓冲液, 以 240mL/h 流速洗涤亲和层析柱, 再用 pH3.0 的醋酸缓冲液洗脱 rhTF₂₄₃ 蛋白, 收集洗脱液, 用 MILIPORE ULTRA-15 型 10KB 超滤管离心浓缩, 收集得到纯化的 rhTF₂₄₃ 蛋白, -70℃保存。

用紫外分光光度计测定收集液的 A₂₈₀ 值, 计算蛋白含量 1.15mg/mL, 体积为 2.8 mL, SDS-PAGE 凝胶电泳分析结果见图 4。

实施例 4

制备凝血酶原时间测定试剂

1、rhTF₂₄₃ 蛋白的磷脂化

称取 PC (产品号 P6354, Sigma 公司提供) 28mg, PS (产品号 P7769, Sigma 公司提供) 12mg, 溶解于 18.8mL 含有 100mmol/L CHAPS 的 Tris 缓冲液 (pH7.5, 100mmol/L) 中, 37°C 水浴保温 2h, 加入纯化的 rhTF₂₄₃ 蛋白 1.2mL (含量为 1.15mg/mL), 室温静置 2h, 得到 rhTF₂₄₃ 磷脂液。

2、配制 PT 测定试剂

取 rhTF₂₄₃ 磷脂液 20mL 与 1980mL 缓冲液 (100mmol/L HEPES pH7.0、10mmol/L CaCl₂、1mg/mL BSA) 混合, 振荡混匀, 得到 PT 测定试剂。

3、试剂测定结果

使用上述 PT 测定试剂, 按照血凝仪使用说明, 可以进行凝血酶原时间的测定。

1) 室温 (20°C~25°C) 放置的重组 PT 试剂正常人血浆凝血酶原时间测定结果

时间 (h)	凝血酶原时间 (s)			
	德灵试剂	上海太阳	四川迈克	本发明
0	13.3	12.8	14.4	12.6
0.5	12.7	11.9	13.5	12.2
1.5	11.9	12.1	13.8	12.5
2.5	12.6	12.6	13.6	12.3
6	12.6	12.8	14.2	12.0
7	12.6	12.9	14.2	12.4
8	12.8	13.0	14.5	12.2
24	13.7	13.4	14.5	12.5

2) 37°C 放置的重组 PT 试剂正常人血浆凝血酶原时间测定结果

时间 (h)	凝血酶原时间 (s)		
	德灵试剂	上海太阳	本发明
0	13.3	12.1	12.4
2	14.3	12.1	12.1
6	14.2	12.5	12.3
7	13.0	12.2	12.5
8	13.6	12.8	12.3
24	13.1	13.2	12.1
56	13.8	15.4	11.9
72	13.7	14.1	11.9
120	13.5	15.9	12.2

3) 试剂的灵敏性

与用兔脑组织因子制备的 PT 试剂进行比较, 本发明制备的 PT 试剂具有明显的高敏感性和稳定性, 与 Recombiplastin(另一用人重组组织因子制备的 PT 试剂)产品拥有相同的敏感性和稳定性。

PT 试剂名称	生产厂家	组织因子来源	国际敏感性指数(ISI)*	稳定性 4~8℃
PT	迈克	兔脑		1d
ThromboplaStinPlus	Dade	兔脑	2.0	3d
Recombiplasrin	Ortho	人重组组织因子 (含有 263 个氨基酸, 在动物细胞表达)	1.0	14d
本发明		人重组组织因子 (含有 243 个氨基酸, 在细菌表达)	1.0	14d

敏感性的测定

样 品	生产厂家	凝血酶原时间 (s)		
		正常血浆*	80%血浆 (ratio**)	40%血浆 (ratio)
本发明		11.1	12.7 (1.14)	23.1 (2.08)
Thromborel [®] S	Dade	12.9	14.3 (1.11)	23.1 (1.79)

* 正常血浆是指德灵 DADE Ci-Trol 1; 80%、40%为正常血浆用生理盐水稀释样

** ratio 指稀释血浆和正常血浆的比值, 比值越大, 敏感性越高

TCA	GGC	ACT	ACA	AAT	ACT	GTG	GCA	GCA	TAT	AAT	TTA	ACT
Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr
TGG	AAA	TCA	ACT	AAT	TTC	AAG	ACA	ATT	TTG	GAG	TGG	GAA
Trp	Lys	Ser	Thr	Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu
CCC	AAA	CCC	GTC	AAT	CAA	GTC	TAC	ACT	GTT	CAA	ATA	AGC
Pro	Lys	Pro	Val	Asn	Gln	Val	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser
ACT	AAG	TCA	GGA	GAT	TGG	AAA	AGC	AAA	TGC	TTT	TAC	ACA
Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	Cys	Phe	Tyr	Thr
ACA	GAC	ACA	GAG	TGT	GAC	CTC	ACC	GAC	GAG	ATT	GTG	AAG
Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys
GAT	GTG	AAG	CAG	ACG	TAC	TTG	GCA	CGG	GTC	TTC	TCC	TAC
Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr
CCG	GCA	GGG	AAT	GTG	GAG	AGC	ACC	GGT	TCT	GCT	GGG	GAG
Pro	Ala	Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu
CCT	CTG	TAT	GAG	AAC	TCC	CCA	GAG	TTC	ACA	CCT	TAC	CTG
Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu
GAG	ACA	AAC	CTC	GGA	CAG	CCA	ACA	ATT	CAG	AGT	TTT	GAA
Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	Ser	Phe	Glu
CAG	GTG	GGA	ACA	AAA	GTG	AAT	GTG	ACC	GTA	GAA	GAT	GAA
Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Glu
CGG	ACT	TTA	GTC	AGA	AGG	AAC	AAC	ACT	TTC	CTA	AGC	CTC
Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu
CGG	GAT	GTT	TTT	GGC	AAG	GAC	TTA	ATT	TAT	ACA	CTT	TAT
Arg	Asp	Val	Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr
TAT	TGG	AAA	TCT	TCA	AGT	TCA	GGA	AAG	AAA	ACA	GCC	AAA
Tyr	Trp	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Lys
ACA	AAC	ACT	AAT	GAG	TTT	TTG	ATT	GAT	GTG	GAT	AAA	GGA
Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu	Ile	Asp	Val	Asp	Lys	Gly
GAA	AAC	TAC	TGT	TTC	AGT	GTT	CAA	GCA	GTG	ATT	CCC	TCC
Glu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Val	Ile	Pro	Ser
CGA	ACA	GTT	AAC	CGG	AAG	AGT	ACA	GAC	AGC	CCG	GTA	GAG
Arg	Thr	Val	Asn	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Val	Glu
TGT	ATG	GGC	CAG	GAG	AAA	GGG	GAA	TTC	AGA	GAA	ATA	TTC
Cys	Met	Gly	Gln	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Arg	Glu	Ile	Phe
TAC	ATC	ATT	GGA	GCT	GTG	GTA	TTT	GTG	GTC	ATC	ATC	CTT
Tyr	Ile	Ile	Gly	Ala	Val	Val	Phe	Val	Val	Ile	Ile	Leu
GTC	ATC	ATC	CTG	GCT	ATA	TCT	CTA	CAC				
Val	Ile	Ile	Leu	Ala	Ile	Ser	Leu	His				

图 1

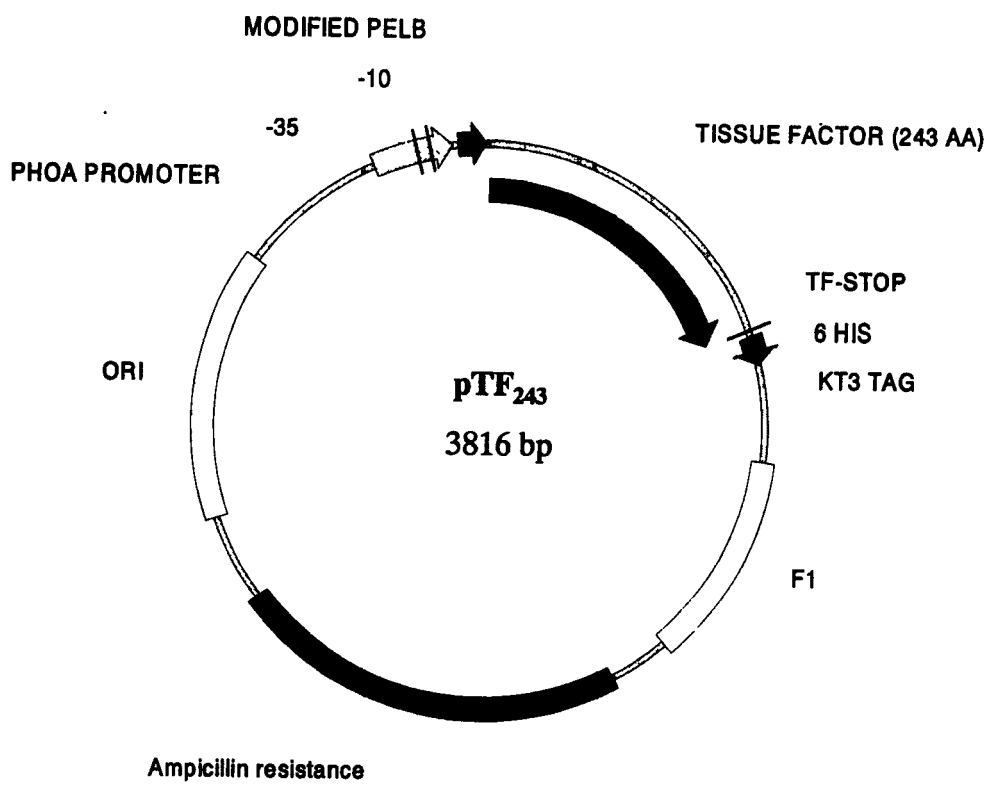


图 2

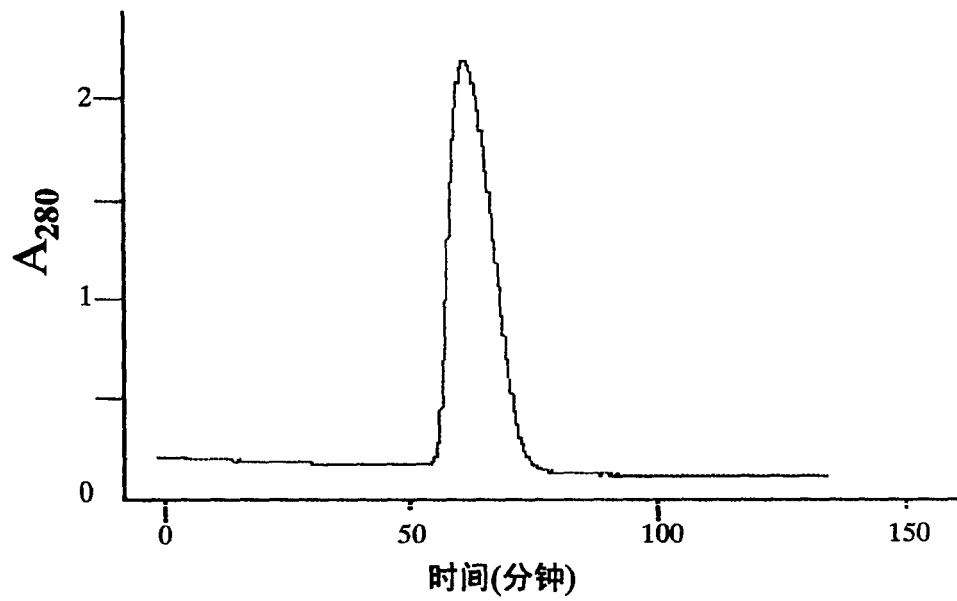
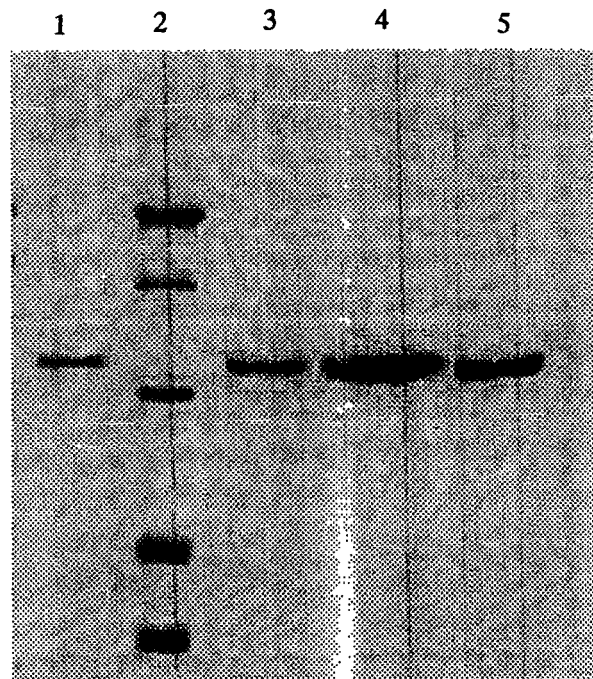


图 3



1、3、4、5 为纯化的人重组组织因子蛋白
2 为标准蛋白质分子量

图 4

专利名称(译)	人重组组织因子的构建表达、纯化方法及其应用		
公开(公告)号	CN1284797C	公开(公告)日	2006-11-15
申请号	CN200510012414.7	申请日	2005-03-22
[标]发明人	焦进安 赵邑 郝建平 李晋川 谢红 赵峰梅		
发明人	焦进安 赵邑 郝建平 李晋川 谢红 赵峰梅		
IPC分类号	C07K14/435 C07K14/475 C12N15/70 C12N15/10 C12N15/12 C12P21/02 G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/56 C07K14/43		
代理人(译)	李毅		
其他公开文献	CN1687125A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及人重组组织因子的构建、表达和纯化方法及应用。从人胎盘中获取到的TF基因片段与phoA质粒重组，构建质粒载体pTF243，转化到大肠杆菌MM294中，筛选得到工程菌株，接入培养基直接发酵表达，得到的菌液先使用Q-Sepharose Fast Flow基质离子交换层析，再通过TF单抗免疫亲和层析柱吸附洗脱，得到rhTF243蛋白。本发明中TF随培养基中磷的消耗而直接表达，不需增加诱导物和对蛋白质进行变性与复性，简化了发酵工艺，提高了表达率，采用TF单抗纯化rhTF243蛋白，不会受到不可逆损伤，获得rhTF243纯度95%以上，收率大于60%，制备的PT试剂稳定性和敏感性均得到了提高。

样 品	生产厂家	凝血酶原时间 (s)		
		正常血浆*	80%血浆 (ratio ^{***})	40%血浆 (ratio)
本发明		11.1	12.7 (1.14)	23.1 (2.08)
Thromborel®S	Dade	12.9	14.3 (1.11)	23.1 (1.79)