



## (12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103060284 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201310007468. 9 *C12N 15/70* (2006. 01)  
(22) 申请日 2013. 01. 09 *G01N 33/53* (2006. 01)  
(66) 本国优先权数据 *C12R 1/19* (2006. 01)  
201210427252. 3 2012. 10. 31 CN *C12R 1/46* (2006. 01)

(71) 申请人 内蒙古民族大学  
地址 028005 内蒙古自治区通辽市科尔沁区  
西拉木伦大街西 996 号内蒙古民族大  
学生命科学学院

(72) 发明人 布日额 吴金花 张海宝

(74) 专利代理机构 北京中恒高博知识产权代理  
有限公司 11249

代理人 高松

(51) Int. Cl.  
*C12N 9/12* (2006. 01)  
*C12N 15/54* (2006. 01)  
*C12N 1/21* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页  
序列表5页 附图1页

### (54) 发明名称

一种无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白及其制备方法

### (57) 摘要

本发明提供一种无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白及其制备方法。本发明的重组蛋白为如下 1) 或 2) 所述的蛋白: 1) 由序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质; 2) 将 1) 限定的氨基酸序列经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸且具有与序列表中序列 2 相同活性的由序列表中序列 2 衍生的蛋白质。应用本发明制备的重组蛋白进行检测时无感染、散毒危险; 且本发明的制备免疫制剂的生产工艺先进、生产成本低, 制备的免疫制剂性能稳定、产品附加值高, 适合工厂化生产, 市场应用前景广。

1. 一种无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白,其特征在于:所述重组蛋白为如下 1)或 2)所述的蛋白:

1) 由序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

2) 将 1)限定的氨基酸序列经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸且具有与序列表中序列 2 相同活性的由序列表中序列 2 衍生的蛋白质。

2. 权利要求 1 所述的无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白的编码基因。

3. 根据权利要求 2 所述无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白的编码基因,其特征在于:所述编码基因是序列表中序列 1 所示的核苷酸序列。

4. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的重组菌。

5. 一种高效表达权利要求 1 所述无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白的方法,是将编码重组蛋白的基因导入到大肠杆菌中,表达获得重组蛋白。

6. 权利要求 1 所述的无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白在检测奶牛乳腺炎无乳链球菌感染抗体及疫苗免疫抗体中的应用。

## 一种无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种重组蛋白,尤其是一种无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白。

### 背景技术

[0002] 奶牛乳腺炎(Dairy cow mastitis)是影响世界奶牛业健康、稳定发展的最主要疫病之一。其病原有多种,但是无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 是最主要的致病菌之一,在患乳腺炎牛乳中其检出率达到 70% 左右,主要引起奶牛临床型和隐性乳腺炎。世界各国科学家围绕防制奶牛乳腺炎的疫苗作出了不懈努力,最终得出的结论是传统的全菌体裂解疫苗、灭活疫苗、荚膜多糖混合疫苗对于无乳链球菌性乳腺炎均无明显预防效果,亚单位(包括单亚单位及多亚单位)免疫制剂的研发是寻求有效防控该疾病的最好途径,这是全世界相关领域认可的结论。无乳链球菌是重要的人畜共感染性致病菌,在人类主要在妇女的生殖道内居留。国外在医学领域为了预防胎儿在妊娠期或在分娩过程中婴儿的无乳链球菌感染造成败血症或肺炎,研制的传统疫苗经实践证明均无明显效果,而研制的亚单位疫苗表现良好的免疫保护作用。而奶牛无乳链球菌表面蛋白磷酸甘油酸激酶(Phosphoglycerate kinase, 简称 pgk)是牛乳腺炎无乳链球菌重要的表面抗原性蛋白。因此研究和应用牛源无乳链球菌表面蛋白原核表达产物具有重要的应用价值。

### 发明内容

[0003] 本发明提供了一种重组蛋白,其是奶牛无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白,相应的,本发明还提供该重组蛋白的编码基因和应用。

[0004] 本发明提供的一种重组蛋白,为如下 1) 或 2) 所述的蛋白:

1) 由序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

2) 将 1) 限定的氨基酸序列经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸且具有与序列表中序列 2 相同活性的由序列表中序列 2 衍生的蛋白质。

[0005] 本发明的第二个目的是提供上述重组蛋白的编码基因。

[0006] 优选地,所述编码基因是序列表中序列 1 所示的核苷酸序列。

[0007] 本发明的第三个目的是提供一种无乳链球菌亚单位重组蛋白的方法,是将编码重组蛋白的基因导入到大肠杆菌中,表达获得重组蛋白。

[0008] 优选地,所述大肠杆菌为 BL21-DE3 大肠杆菌。

[0009] 本发明的第四个目的是提供所述的无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白在检测奶牛无乳链球菌性乳腺炎感染抗体和免疫抗体中的应用。

[0010] 本发明的无乳链球菌亚单位重组蛋白具有下述效果:

① 由于本发明的重组蛋白是奶牛无乳链球菌表面蛋白磷酸甘油酸激酶(Phosphoglycerate kinase, pgk)亚单位基因片段重组原核表达蛋白,并非全致病菌细胞,因此应用本发明的重组蛋白进行检测时绝无感染、散毒危险。

[0011] ② 本发明的制备免疫制剂的生产工艺先进、生产成本低,制备的免疫制剂性能

稳定、产品附加值高,适合工厂化生产,市场应用前景广。

## 附图说明

[0012] 图 1 是本发明的纯化后的无乳链球菌亚单位重组蛋白电泳图;  
图 2 是 BALB/c 小鼠免疫抗体检测水平结果。

## 具体实施方式

### [0013] 实施例 1

#### 一、重组蛋白的大肠杆菌体外表达

(1)、设计扩增牛源无乳链球菌表面蛋白亚单位基因 pgk 基因的特异性引物;

利用引物设计软件设计了 1 对扩增 pgk 基因主要抗原优势区序列的引物。上游引物序列为 5'-GGAGGATCCCTAATGGCTAAATTG-3', 下游引物序列为: 5'-GACTAAGCTTTTTCAGTCAATGCTG-3', 划线部分分别为引入的限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点序列。扩增片段长度 984bp。见序列表 1。

[0014] (2)、通过 PCR 扩增获得 pgk 基因片段;

PCR 反应总体系为 50  $\mu$  L, 其中灭菌超纯化水 (ddH<sub>2</sub>O) 14  $\mu$  L、10 $\times$ PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$  L、dNTP mixture 4  $\mu$  L、上游引物 (10pmol/ $\mu$  L) 4  $\mu$  L、下游引物 (10pmol/ $\mu$  L) 4  $\mu$  L、模板 DNA 4  $\mu$  L、Taq DNA 酶 (5U/ $\mu$  l) 1  $\mu$  L、灭菌超纯化水 (ddH<sub>2</sub>O) 14  $\mu$  L。反应条件为预变性 95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 根据相对分子质量 Marker 标示, 从琼脂糖凝胶上切下含目的片段的凝胶, 按 DNA 快速纯化胶回收试剂盒操作步骤, 回收扩增产物。胶回收试剂盒为 TAKARA 产品。

[0015] (3)、对 pgk 基因进行克隆、测序鉴定;

将回收的目的 DNA 片段与 pMD18-T 克隆载体于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 将连接产物转化至 JM109 感受态细胞, 用含 Amp 的 LB 琼脂平板进行筛选, 提取重组质粒 pgk-pMD18-T, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行单、双酶切及 PCR 鉴定。将转入重组质粒 pgk-pMD18-T 的 JM109 感受态细胞送至北京华大基因研究中心进行测序, 测序结果用 DNASTar 生物软件进行分析。

[0016] (4)、将 pgk 基因定向亚克隆至 pET-30a (+) 原核表达载体;

将测序正确的重组克隆载体 pgk-pMD-18 与表达载体 pET30a(+) 用 *Bam*H I、*Hind* III 进行双酶切后胶回收, 构建重组表达载体 pgk-pET30a(+), 再将酶切及 PCR 鉴定正确的重组质粒 pgk-pET30a(+) 按常规方法转化至宿主菌大肠杆菌 BL21 (DE3), 得到重组菌。

[0017] (5)、pgk 基因在大肠杆菌的诱导表达:

将重组菌在 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 下培养 3h, 至 OD<sub>600nm</sub> 达到 0.65 左右时, 加入浓度 1.00 mM/L 的 IPTG, 在 37 $^{\circ}$ C 下进行诱导 5h, 其表达量最大。其表达蛋白约占菌体总蛋白的 43.2%, 可溶性表达量占菌体上清总蛋白的 46.5%。

[0018] 二、重组蛋白的亲层析纯化

#### (1) 待纯化样的制备

离心收集表达细菌: 将上述步骤一中得到的诱导表达蛋白于 10000 rpm 条件下离心

10min,取沉淀,用PBS(1mol/L,pH7.4)洗涤3次,细菌沉淀被PBS溶液溶解。

[0019] 裂解菌体获取上清可溶性蛋白:加入溶菌酶至终浓度为1%(1mg/ml),冰浴30min,然后进行超声处理,以悬液趋于透明、用移液枪吸吹时无明显凝块为度。离心取上清(即为可溶性蛋白)并加入1%的TritonX-100(聚乙二醇辛基苯基醚)及1mmol/L的DTT(二硫苏糖醇)至终浓度为1mmol/L后于-20℃保存,以备纯化。

[0020] (2)表达蛋白的亲合层析纯化流程

参照Ni-NTA His band Resin (His Trap™ FF crude, GE Healthcare 产品)操作程序进行,然后进行SDS-PAGE和Western Blot,检测蛋白纯度,如图1所示,经检测,纯度在95%以上。

[0021] Western Blot 鉴定使用的一抗为兔抗牛乳腺炎无乳链球菌抗体,二抗为羊抗兔IgG HRP 标记抗体。

[0022] (3)表达蛋白含量的测定

采用紫外线吸收法定量蛋白质。将待检样品适当稀释后,同时测定该蛋白质溶液在 $\lambda$  260nm 和  $\lambda$  280nm 处的OD值,同时用稀释液作为空白对照,按下列公式计算蛋白含量:

$$(1.46 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}) \times \text{稀释倍数} = \text{mg/ml 蛋白含量}$$

纯化的pgk蛋白的质量浓度为 $\geq 5.03\text{mg/mL}$ 。

[0023] 实施例2

应用本发明的重组蛋白作为检测抗原检测免疫小鼠免疫抗体的实验效果如下:

将本发明实施例1中制备的重组蛋白与弗氏完全佐剂(Freund complete adjuvant, FCA)与弗氏不完全佐剂(Freund incomplete adjuvant, FIA)按1:1等体积进行乳化,乳化用一次性无菌注射器取稀释后的抗原,另一支注射器取福氏完全佐剂或福氏不完全佐剂,排除注射器内空气后用灭菌乳胶管连接接头连接(防止压力过大时乳胶管与注射器滑脱,乳化前用细铁丝拧紧接头),首先将稀释抗原快速推入佐剂,形成油包水,然后反复快速推拉混合约10~30分钟。当乳化剂呈乳白色、放蒸馏水中水乳相不分离、5000rpm/min离心5min不分层时结束乳化,制备得到牛乳腺炎无乳链球菌的免疫疫苗。利用制备的无乳链球菌pgk重组蛋白抗原检测该免疫疫苗免疫产生的抗体情况。

[0024] 本发明的pgk重组蛋白抗原检测免疫疫苗抗体效果如下:

将该免疫疫苗对BALB/c小鼠免疫三次(间隔7d)后,第一次免疫用福氏完全佐剂乳化重组抗原,剂量为1mL/只,背部皮下分3点接种;第二次用福氏不完全佐剂乳化重组抗原,剂量为1mL/只,背部皮下分3点接种;第三次免疫用非乳化重组蛋白抗原进行免疫,剂量为1mL/只,背部皮下分3点接种。第三次免疫后35天其抗体滴度达到1:4000。见图2(抗体检测水平效果)。

[0025] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

## 序列表

<110> 内蒙古民族大学

<120> 一种无乳链球菌 pgk 亚单位重组蛋白及其制备方法

<160> 2

<210> 1

<211> 984

<212> DNA

<213> 人工重组基因

<400> 1

atg gct aaa ttg act gtt aaa gac gtt gat ttg aaa ggt aaa aaa gtc 48

Met Ala Lys Leu Thr Val Lys Asp Val Asp Leu Lys Gly Lys Lys Val

1 5 10 15

ctc gtt cgt gtt gac ttt aat gtg cct ttg aaa gac ggc gtt atc act 96

Leu Val Arg Val Asp Phe Asn Val Pro Leu Lys Asp Gly Val Ile Thr

20 25 30

aac gac aac cgt atc act gcg gct ctt cca aca atc aag tat atc atc 144

Asn Asp Asn Arg Ile Thr Ala Ala Leu Pro Thr Ile Lys Tyr Ile Ile

35 40 45

gaa caa ggt ggt cgt gct atc ctc ttc tct cac ctt gga cgt gtt aaa 192

Glu Gln Gly Gly Arg Ala Ile Leu Phe Ser His Leu Gly Arg Val Lys

50 55 60

gaa gaa gct gac aaa gaa gga aaa tca ctt gca ccg gta gct gct gat 240

Glu Glu Ala Asp Lys Glu Gly Lys Ser Leu Ala Pro Val Ala Ala Asp

65 70 75 80

tta gct gct aaa ctt ggt caa gat gtt gta ttc cca ggt gtt act cgt 288

Leu Ala Ala Lys Leu Gly Gln Asp Val Val Phe Pro Gly Val Thr Arg

85 90 95

ggt gca aaa tta gaa gaa gta atc aat gct ttg gaa gat gga caa gtt 336

Gly Ala Lys Leu Glu Glu Val Ile Asn Ala Leu Glu Asp Gly Gln Val	
100	105
110	
ctt ttg gtt gaa aac act cgt ttt gaa gat gtt gac ggt aag aaa gaa	384
Leu Leu Val Glu Asn Thr Arg Phe Glu Asp Val Asp Gly Lys Lys Glu	
115	120
125	
tct aag aat gac gaa gaa ctt ggt aaa tac tgg gct tca ctt gga gat	432
Ser Lys Asn Asp Glu Glu Leu Gly Lys Tyr Trp Ala Ser Leu Gly Asp	
130	135
140	
gga atc ttc gtt aac gat gca ttt ggt aca gca cac cgt gct cat gca	480
Gly Ile Phe Val Asn Asp Ala Phe Gly Thr Ala His Arg Ala His Ala	
145	150
155	160
tca aac gta ggt att tca gca aac gtt gaa aaa gct gta gct ggt ttc	528
Ser Asn Val Gly Ile Ser Ala Asn Val Glu Lys Ala Val Ala Gly Phe	
165	170
175	
ctt ctt gaa aac gaa att gct tac atc caa gaa gca gtt gaa act cca	576
Leu Leu Glu Asn Glu Ile Ala Tyr Ile Gln Glu Ala Val Glu Thr Pro	
180	185
190	
gaa cgc cca ttc gta gct att ctt ggt ggc tca aaa gtt tct gat aag	624
Glu Arg Pro Phe Val Ala Ile Leu Gly Gly Ser Lys Val Ser Asp Lys	
195	200
205	
att ggt gtt atc gaa aac ctt ctt gaa aaa gct gat aaa gtt ctt atc	672
Ile Gly Val Ile Glu Asn Leu Leu Glu Lys Ala Asp Lys Val Leu Ile	
210	215
220	
ggt ggt ggt atg act tac aca ttc tac aaa gct caa ggt atc gag atc	720
Gly Gly Gly Met Thr Tyr Thr Phe Tyr Lys Ala Gln Gly Ile Glu Ile	
225	230
235	240
ggt aac tca ctt gta gaa gaa gac aaa ttg gat gtt gct aaa gac ctc	768
Gly Asn Ser Leu Val Glu Glu Asp Lys Leu Asp Val Ala Lys Asp Leu	
245	250
255	

ctt gaa aaa tca aac ggt aaa ttg atc ttg cca gtt gac tca aaa gaa 816  
 Leu Glu Lys Ser Asn Gly Lys Leu Ile Leu Pro Val Asp Ser Lys Glu  
                   260                                  265                                  270

gca aac gca ttt gct ggt tat act gaa gtt cgc gac act gaa ggt gaa 864  
 Ala Asn Ala Phe Ala Gly Tyr Thr Glu Val Arg Asp Thr Glu Gly Glu  
                   275                                  280                                  285

gca gtt tca gaa ggg ttc ctt ggt ctt gac atc ggt cct aaa tca atc 912  
 Ala Val Ser Glu Gly Phe Leu Gly Leu Asp Ile Gly Pro Lys Ser Ile  
                   290                                  295                                  300

gct aaa ttt gat gaa gca ctt act ggt gct aaa aca gtt gta tgg aac 960  
 Ala Lys Phe Asp Glu Ala Leu Thr Gly Ala Lys Thr Val Val Trp Asn  
 305                                  310                                  315                                  320

gga cct atg ggt gtc ttt gaa aac 984  
 Gly Pro Met Gly Val Phe Glu Asn  
                                   325

<210> 2

<211> 328

<212> PRT

<213> 人工重组蛋白

<400> 2

Met Ala Lys Leu Thr Val Lys Asp Val Asp Leu Lys Gly Lys Lys Val  
 1                                  5                                  10                                  15

Leu Val Arg Val Asp Phe Asn Val Pro Leu Lys Asp Gly Val Ile Thr  
                   20                                  25                                  30

Asn Asp Asn Arg Ile Thr Ala Ala Leu Pro Thr Ile Lys Tyr Ile Ile  
                   35                                  40                                  45

Glu Gln Gly Gly Arg Ala Ile Leu Phe Ser His Leu Gly Arg Val Lys  
50 55 60

Glu Glu Ala Asp Lys Glu Gly Lys Ser Leu Ala Pro Val Ala Ala Asp  
65 70 75 80

Leu Ala Ala Lys Leu Gly Gln Asp Val Val Phe Pro Gly Val Thr Arg  
85 90 95

Gly Ala Lys Leu Glu Glu Val Ile Asn Ala Leu Glu Asp Gly Gln Val  
100 105 110

Leu Leu Val Glu Asn Thr Arg Phe Glu Asp Val Asp Gly Lys Lys Glu  
115 120 125

Ser Lys Asn Asp Glu Glu Leu Gly Lys Tyr Trp Ala Ser Leu Gly Asp  
130 135 140

Gly Ile Phe Val Asn Asp Ala Phe Gly Thr Ala His Arg Ala His Ala  
145 150 155 160

Ser Asn Val Gly Ile Ser Ala Asn Val Glu Lys Ala Val Ala Gly Phe  
165 170 175

Leu Leu Glu Asn Glu Ile Ala Tyr Ile Gln Glu Ala Val Glu Thr Pro  
180 185 190

Glu Arg Pro Phe Val Ala Ile Leu Gly Gly Ser Lys Val Ser Asp Lys  
195 200 205

Ile Gly Val Ile Glu Asn Leu Leu Glu Lys Ala Asp Lys Val Leu Ile  
210 215 220

Gly Gly Gly Met Thr Tyr Thr Phe Tyr Lys Ala Gln Gly Ile Glu Ile  
225 230 235 240

Gly Asn Ser Leu Val Glu Glu Asp Lys Leu Asp Val Ala Lys Asp Leu  
245 250 255

Leu Glu Lys Ser Asn Gly Lys Leu Ile Leu Pro Val Asp Ser Lys Glu  
260 265 270

Ala Asn Ala Phe Ala Gly Tyr Thr Glu Val Arg Asp Thr Glu Gly Glu  
275 280 285

Ala Val Ser Glu Gly Phe Leu Gly Leu Asp Ile Gly Pro Lys Ser Ile  
290 295 300

Ala Lys Phe Asp Glu Ala Leu Thr Gly Ala Lys Thr Val Val Trp Asn  
305 310 315 320

Gly Pro Met Gly Val Phe Glu Asn  
325



图 1

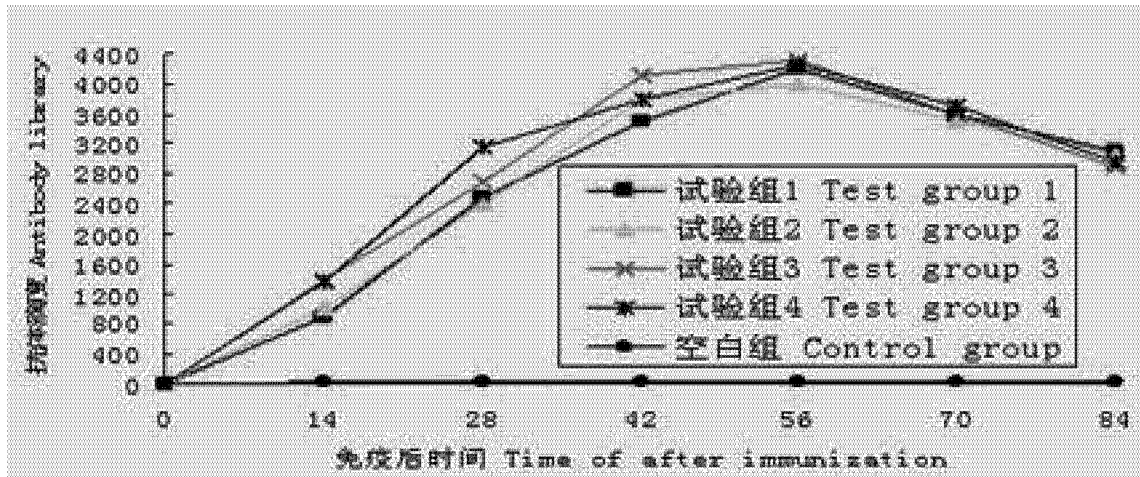


图 2

专利名称(译)	一种无乳链球菌pgk亚单位重组蛋白及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103060284A</a>	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN201310007468.9	申请日	2013-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	内蒙古民族大学		
申请(专利权)人(译)	内蒙古民族大学		
当前申请(专利权)人(译)	内蒙古民族大学		
[标]发明人	布日额 吴金花 张海宝		
发明人	布日额 吴金花 张海宝		
IPC分类号	C12N9/12 C12N15/54 C12N1/21 C12N15/70 G01N33/53 C12R1/19 C12R1/46		
代理人(译)	高松		
优先权	201210427252.3 2012-10-31 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种无乳链球菌pgk亚单位重组蛋白及其制备方法。本发明的重组蛋白为如下1)或2)所述的蛋白: 1)由序列表中序列2所示的氨基酸序列组成的蛋白质; 2)将1)限定的氨基酸序列经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸且具有与序列表中序列2相同活性的由序列表中序列2衍生的蛋白质。应用本发明制备的重组蛋白进行检测时无感染、散毒危险; 且本发明的制备免疫制剂的生产工艺先进、生产成本低, 制备的免疫制剂性能稳定、产品附加值高, 适合工厂化生产, 市场应用前景广。

