



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103014033 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201210567473. 0

(22) 申请日 2012. 12. 25

(71) 申请人 肖飞

地址 100062 北京市崇文区东花市南里东区
本家润园 7 号楼 2 单元 301 室

(72) 发明人 肖飞 黄薇 张传宝 王大光

(51) Int. Cl.

C12N 15/54 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12N 9/10 (2006. 01)

C07K 16/40 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

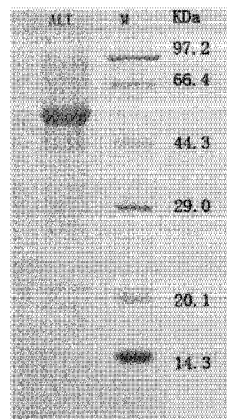
权利要求书 2 页 说明书 5 页
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种制备丙氨酸转氨酶的方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种制备丙氨酸转氨酶的方法,该方法包括:改造全基因合成人源化丙氨酸转氨酶编码基因序列,去除大肠杆菌稀有密码子;将改造后的丙氨酸转氨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;本发明制备丙氨酸转氨酶操作非常简单,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. 一种制备丙氨酸转氨酶的方法,其特征在于,该方法包括:

1) 改造并全基因合成人源化丙氨酸转氨酶编码基因序列,去除大肠杆菌稀有密码子;
2) 将步骤 1) 中改造后的丙氨酸转氨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丙氨酸转氨酶编码基因序列为:

```
ATGGCTTCTT C TACTGGTGA TCGTTCTCAG GCTGTTTCGTC ATGGTCTGCG TGC GAAAGTT
CTGACCCTGG ACGGCATGAA CCCGCGTGTT CGTCGCGTCG AATACGCCGT GCGTGGCCCCG
ATCGTTCAGC GTGCTCTGGA ACTGGAACAA GAACTGCGTC AGGGCGTTAA AAAGCCGTTT
ACCGAGGTTA TCCGCGCCAA CATCGGCGAT GCCCAGGCTA TGGGTCAGCG TCCTATCACC
TTCCTGCGCC AGGTCCTGGC GCTGTGCGTA AACCCAGACC TGCTGAGCTC TCCGAACTTC
CCGGACGACG CTAAGAAACG TGC GGAACGC ATCCTGCAGG CATGCGGTGG CCACAGCCTG
GGCGCTTACA GCGTTTCCTC CGGTATCCAG CTGATTCGTG AAGATGTTGC CCGTTACATC
GAGCGCCGTG ATGGCGGTAT CCCGGCGGAC CCTAACAAACG TATTCCTGTC TACCGGTGCG
TCCGATGCCA TTGTTACCGT TCTGAAGCTG CTGGTGGCTG GCGAGGGTCA CACCCGTACC
GGTGTCTCTGA TTCCGATTCC ACAGTATCCG CTGTATTCTG C TACTCTGGC TGA ACTGGGT
GCGGTGCAGG TAGACTATTA CCTGGATGAG GAGCGCGCTT GGGCGCTGGA CGTCGCAGAG
CTGCACCGCG CACTGGGCCA GGCACGTGAC CACTGCCGTC CGCGTGCGCT GTGCGTGATT
AACCCGGGCA ACCCGACGGG CCAAGTTCAG ACCCGTGAAT GCATCGAAGC TGTGATTTCGT
TTTGCTTTTCG AAGAACGTCT GTTCCTGCTG GCGGACGAAG TTTATCAGGA CAACGTTTAC
GCAGCCGGTA GCCAGTTTCA TTCTTTCAAG AAAGTTCTGA TGGAAATGGG TCCGCCGTAT
GCGGGTCAGC AAGAACTGGC ATCCTTCCAC TCTACCTCCA AAGGTATAT GGGTGAGTGT
GGCTTCCGTG GTGGTTATGT TGAAGTAGTT AATATGGACG CGGCTGTGCA GCAGCAGATG
CTGAAGCTGA TGTCTGTGCG CCTGTGCCCG CCTGTGCCGG GTCAAGCCCT GCTGGATCTG
GTTGTGTCTC CGCCTGCTCC GACTGATCCG TCCTTCGCAC AATTCAGGC TGAGAAACAG
GCCGTTCTGG CGGAACTGGC AGCGAAAGCC AA ACTGACGG AACAAAGTGT CAACGAAGCG
CCGGGTATCT CCTGCAATCC GGTACAAGGC GCGATGTATA GCTTCCCGCG CGTTCAGCTG
CCGCCACGCG CAGTAGAACG TGCACAGGAA CTGGGCCTGG CTCCGGACAT GTTCTTCTGT
CTGCGCCTGC TGAAGAAAC CGGTATTTGC GTTG TACCTG GCAGCGGCTT CGGTCAACGT
GAAGGTA CT ACCACTCCG TATGACCATC CTGCCTCCG TGGAAAAACT GCGTCTGCTG
CTGAAAAAGC TGTCCCGTTT TCACGCGAAA TTCACTCTGG AATATTCTTA G
```

2. 如权利要求 1 所述制备丙氨酸转氨酶的方法,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 所述制备丙氨酸转氨酶的方法,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 所述制备丙氨酸转氨酶的方法,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 所述制备丙氨酸转氨酶的方法,其特征在于, 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)。

6. 如权利要求 1 所述制备丙氨酸转氨酶的方法,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 所述制备丙氨酸转氨酶的方法在校准品、标准物质和参考品制备中的应用。

8. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述制备丙氨酸转氨酶的纯品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

9. 一种利用权利要求 1 所述制备丙氨酸转氨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。

一种制备丙氨酸转氨酶的方法及应用

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丙氨酸转氨酶的方法,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] 丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT, EC2. 6. 1. 2) 是谷氨酸和丙酮酸之间的转氨酶,又名谷丙转氨酶,简称 GPT、ALT。谷丙转氨酶升高在临床是很常见的现象。肝脏是人体最大的解毒器官,该脏器是不是正常,对人体来说是非常重要的。GPT 升高是肝脏功能出现问题的一个重要指标。在常见的因素里,各类肝炎都可以引起 GPT 升高,这是由于肝脏受到破坏所造成的。一些药物如抗肿瘤药、抗结核药,都会引起肝脏功能损害。大量喝酒、食用某些食物也会引起肝功能短时间损害。

[0003] GPT 主要存在于肝细胞浆内,其细胞内浓度高于血清中 1000-3000 倍。只要有 1% 的肝细胞坏死,就可以使血清酶增高一倍。

[0004] 临床上有很多疾病可引起转氨酶异常:

[0005] 1. 病毒性肝炎这是引起转氨酶增高最常见的疾病,各类急、慢性病毒性肝炎均可导致转氨酶升高。

[0006] 2. 中毒性肝炎多种药物和化学制剂都能引起转氨酶升高,但停药后,转氨酶可恢复正常。

[0007] 3. 大量或长期饮酒者谷丙转氨酶也会升高。

[0008] 4. 肝硬化与肝癌肝硬化活动时,转氨酶都高于正常水平,应该积极治疗。

[0009] 5. 胆道疾病胆囊炎、胆石症急性发作时,常有发热、腹痛、恶心、呕吐、黄疸、血胆红素及转氨酶升高

[0010] 6. 心脏疾病急性心肌梗塞、心肌炎、心力衰竭时,谷丙转氨酶和谷草转氨酶均升高,患者常有胸痛、心悸、气短、浮肿。心脏检查有阳性体征及心电图异常。

[0011] 7. 其他某些感染性疾病,如肺炎、伤寒、结核病、传染性单核细胞增多症等,都有转氨酶升高的现象。

[0012] 因此, GPT 被世界卫生组织推荐为肝功能损害最敏感的检测指标。谷丙转氨酶的正常参考值为 0 ~ 40U/L。

[0013] 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。

[0014] 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

[0015] 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,成功率高的制备丙氨酸转氨酶的方法。

[0016] 1. 为实现上述目的,本发明一种制备丙氨酸转氨酶的方法,该方法包括:

[0017] 1) 改造并全基因合成人源化丙氨酸转氨酶编码基因序列,去除大肠杆菌稀有密码子;

[0018] 2) 将步骤 1) 中改造后的丙氨酸转氨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;

[0019] 3) 将转化表达菌株接种于 LB 培养基, IPTG 诱导;

[0020] 4) 所得菌体破菌,离心分离,过 Ni-NTA 柱纯化;

[0021] 其中,步骤 1) 中改造后的全基因合成人源化丙氨酸转氨酶编码基因序列为:

[0022] ATGGCTTCTT C TACTGGTGA TCGTTCTCAG GCTGTTCGTC ATGGTCTGCG TGC GAAAAGTT

[0023] CTGACCCTGG ACGGCATGAA CCCGCGTGTT CGTCGCGTCG AATACGCCGT GCGTGGCCCCG

[0024] ATCGTTCAGC GTGCTCTGGA ACTGGAACAA GAACTGCGTC AGGGCGTTAA AAAGCCGTTC

[0025] ACCGAGGTTA TCCGCGCCAA CATCGGCGAT GCCCAGGCTA TGGGTCAGCG TCCTATCACC

[0026] TTCCTGCGCC AGGTCTGGC GCTGTGCGTA AACCAGACC TGCTGAGCTC TCCGAACTTC

[0027] CCGGACGACG CTAAGAAACG TGCGGAACGC ATCCTGCAGG CATGCGGTGG CCACAGCCTG

[0028] GGCCTTACA GCGTTTCCTC CGGTATCCAG CTGATTCGTG AAGATGTTGC CCGTTACATC

[0029] GAGCGCCGTG ATGGCGGTAT CCCGGCGGAC CCTAACACG TATTCTGTG TACCGGTGCG

[0030] TCCGATGCCA TTGTTACCGT TCTGAAGCTG CTGGTGGCTG GCGAGGGTCA CACCCGTACC

[0031] GGTGTCTCTGA TTCCGATTCC ACAGTATCCG CTGTATTCTG C TACTCTGGC TGA ACTGGGT

[0032] GCGGTGCAGG TAGACTATTA CCTGGATGAG GAGCGCGCTT GGGCGCTGGA CGTCGCAGAG

[0033] CTGCACCGCG CACTGGGCCA GGCACGTGAC CACTGCCGTC CGCGTGCGCT GTGCGTGATT

[0034] AACC CGGGCA ACCCGACGGG CCAAGTTCAG ACCCGTGAAT GCATCGAAGC TGTGATTTCGT

[0035] TTTGCTTTTCG AAGAACGTCT GTTCTGCTG GCGGACGAAG TTTATCAGGA CAACGTTTAC

[0036] GCAGCCGGTA GCCAGTTTCA TTCTTTCAAG AAAGTTCTGA TGGAAATGGG TCCGCCGTAT

[0037] GCGGGTCAGC AAGAACTGGC ATCCTTCCAC TCTACCTCCA AAGGTTATAT GGGTGAGTGT

[0038] GGCTTCCGTG GTGGTTATGT TGAAGTAGTT AATATGGACG CGGCTGTGCA GCAGCAGATG

[0039] CTGAAGCTGA TGTCTGTGCG CCTGTGCCCG CCTGTGCCGG GTCAAAGCCCT GCTGGATCTG

[0040] GTTGTGTCTC CGCCTGCTCC GACTGATCCG TCCTTCGCAC AATTCCAGGC TGAGAAAACAG

[0041] GCCGTTCTGG CGGAACTGGC AGCGAAAGCC AAAGTACGG AACAAAGTGT CAACGAAGCG

[0042] CCGGGTATCT CCTGCAATCC GGTACAAGGC GCGATGTATA GCTTCCCGCG CGTTCAGCTG

[0043] CCGCCACGCG CAGTAGAACG TGCACAGGAA CTGGGCCTGG CTCCGGACAT GTTCTTCTGT

[0044] CTGCGCCTGC TGAAGAAAAC CGGTATTTGC GTTGTACCTG GCAGCGGCTT CGGTCAACGT

[0045] GAAGGTA CTT ACCACTCCG TATGACCATC CTGCCTCCG TGGAAAAACT GCGTCTGCTG

[0046] CTGAAAAAGC TGTCCCGTTT TCACGCGAAA TTCACTCTGG AATATTCTTA G

[0047] 进一步,步骤 2) 中所述表达载体为:pRSF Duet, pET 表达系列。

- [0048] 进一步,步骤 2) 中所述大肠杆菌菌株为:BL21 (DE3), Rosetta (DE3)。
- [0049] 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。
- [0050] 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)。
- [0051] 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。
- [0052] 一种如权利要求 1 所述制备丙氨酸转氨酶的方法在校准品、标准物质和参考品制备中的应用。
- [0053] 进一步,所述制备丙氨酸转氨酶的纯品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。
- [0054] 一种利用权利要求 1 所述制备丙氨酸转氨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。
- [0055] 本发明的有益效果在于:本发明制备丙氨酸转氨酶操作非常简单,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

- [0056] 图 1 示出构建的 6His-ALT pRSF 用 BamH I 和 EcoR I 酶切,得到约 1.5kb 的插入片段,表明目的基因已插入载体,构建成功。
- [0057] 图 2 示出纯化的 ALT 成品的 SDS-PAGE 电泳图,产品纯度可达 90% 以上。

具体实施方式

- [0058] 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。
- [0059] 本发明建立了操作简单、迅速、成本较低的一种制备丙氨酸转氨酶的方法。这种方法的原理主要在于:将优化后的丙氨酸转氨酶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:
- [0060] 1. 丙氨酸转氨酶表达载体的构建:
- [0061] 改造人源化丙氨酸转氨酶编码基因序列,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 ALT 编码序列;
- [0062] 利用 <http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm> 网页分析,在原始 ALT 编码基因序列中,大肠杆菌中密码子使用频率在 10% 以内占 14%;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。
- [0063] 通过基因工程手段利用 BamH I 和 EcoRI 位点将其克隆至 pRSF Duet 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(图 1 所示),选取插入目的基因的质粒进行 DNA 序列测定,结果表明丙氨

酸转氨酶基因成功克隆至 pRSF Duet 载体内,我们将其命名为 6His-ALT pRSF。

[0064] 改造后的全基因合成人源化丙氨酸转氨酶编码基因序列为:

[0065] ATGGCTTCTT CTA CTGTTCTCAG GCTGTTCGTC ATGGTCTGCG TGC GAAAAGTT
 [0066] CTGACCCTGG ACGGCATGAA CCCGCGTGTT CGTCGCGTCG AATACGCCGT GCGTGGCCCCG
 [0067] ATCGTTCAGC GTGCTCTGGA ACTGGAACAA GAACTGCGTC AGGGCGTTAA AAAGCCGTTC
 [0068] ACCGAGGTTA TCCGCGCCAA CATCGGCGAT GCCCAGGCTA TGGGTCAGCG TCCTATCACC
 [0069] TTCCTGCGCC AGGTCCTGGC GCTGTGCGTA AACCCAGACC TGCTGAGCTC TCCGAACTTC
 [0070] CCGGACGACG CTAAGAAACG TGC GGAACGC ATCCTGCAGG CATGCGGTGG CCACAGCCTG
 [0071] GCGGCTTACA GCGTTTCTC CGGTATCCAG CTGATTCGTG AAGATGTTGC CCGTTACATC
 [0072] GAGCGCCGTG ATGGCGGTAT CCCGGCGGAC CCTAACAAACG TATTCCTGTC TACCGGTGCG
 [0073] TCCGATGCCA TTGTTACCGT TCTGAAGCTG CTGGTGGCTG GCGAGGGTCA CACCCGTACC
 [0074] GGTGTCCTGA TTCCGATTCC ACAGTATCCG CTGTATTCTG CTA CTCTGGC TGA ACTGGGT
 [0075] GCGGTGCAGG TAGACTATTA CCTGGATGAG GAGCGCGCTT GGGCGCTGGA CGTCGCAGAG
 [0076] CTGCACCGCG CACTGGGCCA GGCACGTGAC CACTGCCGTC CGCGTGCGCT GTGCGTGATT
 [0077] AACCCGGGCA ACCCGACGGG CCAAGTTCAG ACCCGTGAAT GCATCGAAGC TGTGATTTCGT
 [0078] TTTGCTTTCG AAGAACGTCT GTTCCTGCTG GCGGACGAAG TTTATCAGGA CAACGTTTAC
 [0079] GCAGCCGGTA GCCAGTTTCA TTCTTTCAAG AAAGTCTGA TGGAAATGGG TCCGCCGTAT
 [0080] GCGGGTCAGC AAGAACTGGC ATCCTTCCAC TCTACCTCCA AAGGTATAT GGGTGAGTGT
 [0081] GGCTTCCGTG GTGGTTATGT TGAAGTAGTT AATATGGACG CGGCTGTGCA GCAGCAGATG
 [0082] CTGAAGCTGA TGTCTGTGCG CCTGTGCCCG CCTGTGCCGG GTCAAGCCCT GCTGGATCTG
 [0083] GTTGTGTCTC CGCCTGCTCC GACTGATCCG TCCTTCGCAC AATTCAGGC TGAGAAACAG
 [0084] GCCGTTCTGG CGGAACTGGC AGCGAAAGCC AA ACTGACGG AACAAAGTGT CAACGAAGCG
 [0085] CCGGGTATCT CCTGCAATCC GGTACAAGGC GCGATGTATA GCTTCCCGCG CGTTCAGCTG
 [0086] CCGCCACGCG CAGTAGAACG TGCACAGGAA CTGGGCCTGG CTCCGGACAT GTTCTTCTGT
 [0087] CTGCGCCTGC TGAAGAAAC CGGTATTTGC GTTGTACCTG GCAGCGGCTT CCGTCAACGT
 [0088] GAAGGTA CT ACCACTCCG TATGACCATC CTGCCTCCG TGGAAAACT GCGTCTGCTG
 [0089] CTGGA AAAAGC TGTCCCGTTT TCACGCGAAA TTC ACTCTGG AATATTCTTA G

[0090] 2. 丙氨酸转氨酶的表达:

[0091] 1) 以 BL21 (DE3) 为宿主菌,将 6His-ALT pRSF 进行转化,挑取单菌落于 3ml LB 培养基培养过夜;

[0092] 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;

[0093] 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。

[0094] 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

[0095] 染色体上,就叫 BL21 (DE3)。

[0096] 3. 丙氨酸转氨酶的纯化:

[0097] 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-PO₄, 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;

[0098] 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。

[0099] 3) 蛋白洗脱液过 G50 柱去除 Imidazole, 这样可以得到 90% 以上纯度的 ALT (图 2 所示)。

[0100] 4. 丙氨酸转氨酶活性测定:

[0101] 制备丙氨酸转氨酶的纯品用奥林巴斯 AU5400 生化仪测定活性, 酶活可达 50000U/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。

[0102] 上述制备丙氨酸转氨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。

[0103] 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。

[0104] 除非特殊指明, 本发明所用但并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]

ALT 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列:

ATGGCTTCTT CTACTGGTGA TCGTTCTCAG GCTGTTCGTC ATGGTCTGCG TGCGAAAGTT
 CTGACCCTGG ACGGCATGAA CCCGCGTGTT CGTCGCGTCG AATACGCCGT GCGTGGCCCG
 ATCGTTCAGC GTGCTCTGGA ACTGGAACAA GAACTGCGTC AGGGCGTTAA AAAGCCGTTT
 ACCGAGGTTA TCCGCGCCAA CATCGGCGAT GCCCAGGCTA TGGGTCAGCG TCCTATCACC
 TTCCTGCGCC AGGTCCTGGC GCTGTGCGTA AACCCAGACC TGCTGAGCTC TCCGAAGTTC
 CCGGACGACG CTAAGAAACG TGCAGAACGC ATCCTGCAGG CATGCGGTGG CCACAGCCTG
 GCGCCTTACA GCGTTTCCTC CGGTATCCAG CTGATTCGTG AAGATGTTGC CCGTTACATC
 GAGCGCCGTG ATGGCGGTAT CCCGGCGGAC CCTAACAAACG TATTCCTGTC TACCGGTGCG
 TCCGATGCCA TTGTTACCGT TCTGAAGCTG CTGGTGGCTG GCGAGGGTCA CACCCGTACC
 GGTGTCCTGA TTCCGATTCC ACAGTATCCG CTGTATTCTG CTAAGTGGGT TGAAGTGGGT
 GCGGTGCAGG TAGACTATTA CCTGGATGAG GAGCGCGCTT GGGCGCTGGA CGTCGCAGAG
 CTGCACCGCG CACTGGGCCA GGCACGTGAC CACTGCCGTC CGCGTGCCT GTGCGTGATT
 AACCCGGGCA ACCCGACGGG CCAAGTTCAG ACCCGTGAAT GCATCGAAGC TGTGATTTCGT
 TTTGCTTTTCG AAGAACGTCT GTTCCTGCTG GCGGACGAAG TTTATCAGGA CAACGTTTAC
 GCAGCCGGTA GCCAGTTTCA TTCTTTCAAG AAAGTTCCTGA TGGAAATGGG TCCGCCGTAT
 GCGGGTCAGC AAGAACTGGC ATCCTTCCAC TCTACCTCCA AAGGTTATAT GGGTGAGTGT
 GGCTTCCGTG GTGTTATGT TGAAGTAGTT AATATGGACG CGGCTGTGCA GCAGCAGATG
 CTGAAGCTGA TGTCTGTGCG CCTGTGCCCCG CCTGTGCCGG GTCAAGCCCT GCTGGATCTG
 GTTGTGTCTC CGCCTGCTCC GACTGATCCG TCCTTCGCAC AATTCCAGGC TGAGAAACAG
 GCCGTTCTGG CGGAACTGGC AGCGAAAGCC AACTGACGG AACAAGTGT CAACGAAGCG
 CCGGGTATCT CCTGCAATCC GGTACAAGGC GCGATGTATA GCTTCCCGCG CGTTCAGCTG
 CCGCCACGCG CAGTAGAACG TGCACAGGAA CTGGGCCTGG CTCCGACAT GTTCTTCTGT
 CTGCGCCTGC TGGAAGAAAC CGGTATTTGC GTTGTACCTG GCAGCGGCTT CCGTCAACGT
 GAAGGTACTT ACCACTCCG TATGACCATC CTGCCCTCCG TGAAAAACT GCGTCTGCTG
 CTGAAAAAGC TGCCCGTTT TCACCGGAAA TTCACTCTGG AATATTCTTA G

MASSTGDRSQAVRHGLRAKVLTLDGMPVRRVVEYAVRGPIVQRALELEQELRQGVKKP
 FTEVIRANIGDAQAMGQRPITFLRQVLALCVNPDLLSSPNFPDDAKKRAERILQACGGH
 SLGAYSVSSGIQLIREDVARYIERRDGGIPADPNVFLSTGASDAIVTVLKLLVAGEGH

[0002]

TRTGVLIPIPQYPLYSATLAELGAVQVDYYLDEERAWALDVAELHRALGQARDHCRPRA
LCVINPGNPTGQVQTRECI EAVIRFAFEERLFLLADEVYQDNVYAAGSQFHSFKKVLME
MGPPYAGQQELASFHSTSKGYMGECGFRGGYVEVVNMDAAVQQQMLKLMSVRLCPPVPG
QALLDLVVSPPAPTDP SFAQFQA EKQAVLAELA AKALTEQVFNEAPGIS CNP VQGAMY
SFPRVQLPPRAVERAQELGLAPDMFFCLRLLEETGICVVP GSGFGQREGTYHFRMTILP
PLEKLRLLEKLSRFHAKFTLEYS*

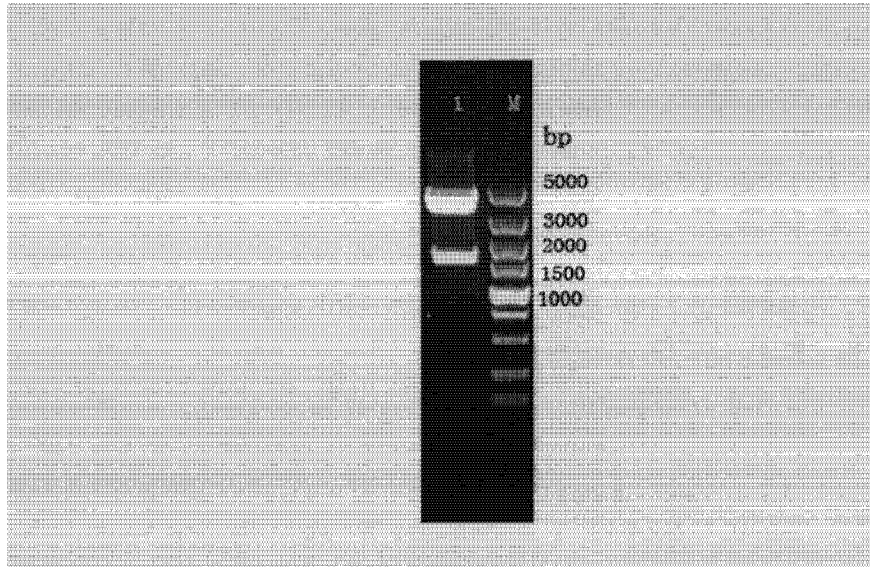


图 1

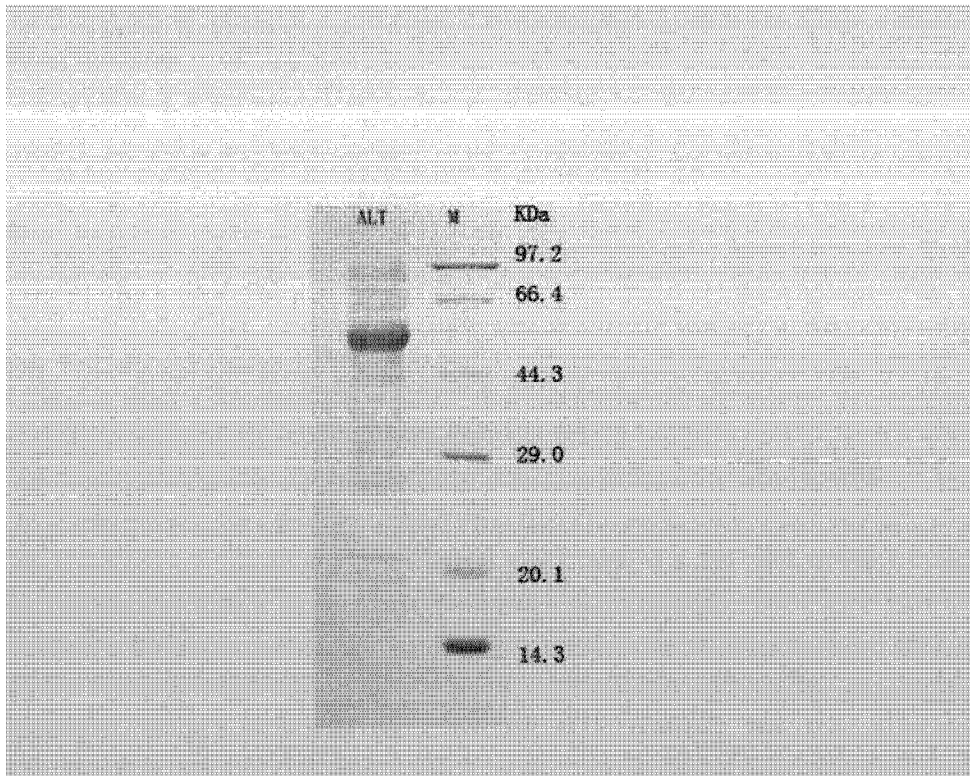


图 2

专利名称(译)	一种制备丙氨酸转氨酶的方法及应用		
公开(公告)号	CN103014033A	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201210567473.0	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 张传宝 王大光		
发明人	肖飞 黄薇 张传宝 王大光		
IPC分类号	C12N15/54 C12N15/70 C12N9/10 C07K16/40 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种制备丙氨酸转氨酶的方法，该方法包括：改造全基因合成人源化丙氨酸转氨酶编码基因序列，去除大肠杆菌稀有密码子；将改造后的丙氨酸转氨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；本发明制备丙氨酸转氨酶操作非常简单，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。

