说明书

一种高效表达工程菌重组蛋白的方法及应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，特别是一种高效表达工程菌重组蛋白的方法及其应用。

背景技术

本发明的发明人在前期的研究中，经过创造性的尝试和实验验证，得到了以大肠菌素为攻击端，可操作地连接其它识别靶细胞的识别多肽（天然或人工设计的）得到一系列新型重组多肽，如申请号为 200910092128.4，发明名称为 “一种含抗体模拟物的新型抗生素及其制备方法与应用”中公开的新型抗生素 PMC-AM1 具有广谱抗生性能，对脑膜炎双球菌，多重耐药绿脓杆菌、耐万古霉素肠球菌、耐甲氧西林金葡菌都具有较现有抗生素效果明显的抗菌效果；申请号为 200910157564.5，名称为“一种新型抗生素及其核苷酸序列、制备方法与应用”中公开了一系列抗葡萄球菌新型抗生素，如 PMC-SA1、PMC-SA2、PMC-SA3、PMC-SA4、PMC-SE 以及 PMC-PA 六种新型抗生素。在体外和体内试验中，表现出比现有抗生素、抗真菌抗生素、化疗药物更为优越的靶向性和杀伤效率，这些新型抗生素不仅抗菌效果明显，且具有其它现有抗生素不能比拟的生物安全性和抗耐药性。

由于上述系列重组蛋白是一类以水溶性蛋白，一般由 600 余个氨基酸残基组成，但在该类蛋白的肽链中靠近羧基端有一段 40 个氨基酸残基组成的疏水区段。相较于其他结构单一的水溶性蛋白而言，该蛋白的装配和表达更为困难，不可避免地影响其生产率，改善上述重组蛋白的表达工艺流程，提高蛋白的表达率，就解决了大规模生产以将上述系列重组蛋白推向实际临床应用和实践中存在的技术难题。

发明内容

本发明针对发明人在现有专利申请中公开的重组多肽的结构和性质特点，提供一种高效率表达工程菌蛋白的方法。

一种用于高效表达工程菌重组蛋白的方法，所述工程菌重组蛋白的多肽一端具有亲水性，为大肠菌素多肽端；另一端具有疏水性，为靶标物质识别多肽端，其特征在于，包括如下步骤：

（1）将表达所述工程菌重组蛋白的重组突变质粒转染到大肠杆菌 pET 系统工程菌得到阳性单克隆，

（2）对阳性单克隆进行增菌得到种子菌液，诱导种子菌液大量增菌生长，所得的上清液中含有表达的工程菌重组蛋白，

（3）分离提纯所述上清液中含有的表达的工程菌重组蛋白，所述大肠杆菌 pET 系统工程菌指 E.coli B834(DE3)。

所述大量增菌采用的培养基的配方为：NaCl 6.0~6.7g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 0.6~2.0g/L，$Na_2HPO_4·7H_2O$ 6.8～18.3g/L，KH_2PO_4 3.0～4.3g/L，NH_4Cl 1.0~1.4g/L，$MgSO_4$ 0.2~0.4g/L，$CaCl_2$0.01g/L，甲硫氨酸 0~40mg/L，以水为溶剂。

所述大量增菌采用的培养基配方为：NaCl 6.0g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 2.0g/L，$Na_2HPO_4·7H_2O$ 6.8g/L，$KH_2PO_4$3.0g/L，NH_4Cl 1.0g/L，$MgSO_4$0.2g/L，$CaCl_2$0.01g/L，甲硫氨酸 0~40mg/L，以水为溶剂。在以 *E.*coli B834(DE3)为工程菌的工艺中，甲硫氨酸为 40mg/L。

所述诱导采用热冲击诱导，操作方式如下：种子菌液入罐后，30℃起始生长 2～3 小时，测 OD 值达 0.4-0.6 时，于 42℃ 热冲击 30 分钟，然后将温度下调至 37℃，再生长 1.5-2 小时后收菌。

所述热冲击诱导步骤中，在所述培养基中加入终浓度为 0.5mM 的 PTG。

所述提纯菌体上清液中的重组蛋白，采用 CM 离子交换柱，其中上样量为上清液蛋白质量/凝胶颗粒体积为 2.5mg/ml。

所述提纯菌体上清液中的重组蛋白，采用 CM 离子交换柱，洗脱所用的硼酸缓冲液中 NaCl 浓度为 0.2M。

所述重组突变质粒指 pBHC-SA1、pBHC-SA2、pBHC-SA3 pBHC-SA4、pBHC-SE，pBHC-PA 或 pBHC-PorA1。

上述任一方法在制备重组多肽 PMC- SA1、PMC-SA2、PMC -SA3，PMC -SA4、PMC -SE，PMC –PA 或 PMC-AM 中的应用。

一种用于大肠杆菌 pET 系统工程菌的培养基，其配方为 NaCl 6.0~6.7g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 0.6~2.0g/L，$Na_2HPO_4·7H_2O$ 6.8～18.3g/L，KH_2PO_4 3.0～4.3g/L，NH_4Cl 1.0~1.4g/L，$MgSO_4$ 0.2~0.4g/L，$CaCl_2$0.01g/L，甲硫氨酸 0~40mg/L，以水为溶剂。

所述大肠杆菌 pET 系统工程菌是 *E.*coli B834(DE3)，所述培养基的配方为：NaCl 6.0g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 2.0g/L，$Na_2HPO_4·7H_2O$ 6.8g/L，$KH_2PO_4$3.0g/L，NH_4Cl 1.0g/L，$MgSO_4$0.2g/L，$CaCl_2$0.01g/L, 甲硫氨酸 40mg/L，以水为溶剂。

Novagen 公司的 pET 系统是目前在大肠杆菌中克隆和表达重组蛋白的常用系统。本发明中首先将重组突变质粒转染入一系列 BL-21(DE3) 细胞，得到了比原 TG1 细胞更好的蛋白表达产率。通过实验数据对比，我们发现作为 BL-21（DE3）的母本菌株 B834（DE3）具有比 BL-21（DE3）更理想的表达产率。试验数据证实质粒 B834(DE3)可以达到超过原质粒 TG1 体系数十倍的蛋白表达产率。

培养基为细菌生长繁殖提供所需的碳源、氮源和无机盐, 本发明通过改进培养基的组分提高了工程菌的生长速率，从而提高目的蛋白的表达产率。通过逐步改进、调整培养基中各个成分的含量，找到工程菌发酵生产的最佳培养基配方。本发明中我们改进的 FB-M9 复合培养基适度提高了碳源和氮源的含量，加入了 MgSO4、CaCl2、以及 pET 系统菌生长所需的氨基酸，适度提高了细菌的繁殖速率和蛋白表达效率。 该改进培养基配方所需的成本较为低廉，这就为今后的大规模生产提供了较大的研究空间和开发价值。

本发明中所采用纯化体系中的 CM 离子凝胶颗粒携载率并未达到产品手册中描述的理想水准，这限制了目的蛋白的回收率，本发明通过减少上样量、适度加大凝胶体积等手段，使回收率得到了明显的的改善。 该结果提示仍需寻找效率更高的离子交换凝胶，以便进行更高效的大规模工业化生产。此外，本发明通过优化离子交换步骤中的洗脱液浓度，使得到的重组蛋白杂质更少。

综合而言，本发明通过选择理想的工程菌株、优化培养基组成、改进纯化、回收效率等手段，提供了多种可选择的更优化的大肠杆菌工程菌表达重组蛋白的工艺，这同时也为最终找到高效表达所需融合蛋白的最优组合提供了一个可能的发展方向和技术路线。 与原表达体系相比较，本研究所发展的表达体系将融合蛋白的表达产量提高了数十倍，为继后的大规模工业化生产提供了有益的理论及实践依据。

附图说明

图 1 不同体积凝胶柱的蛋白洗脱过程洗脱液电导值

a. 150ml CM 凝胶柱的蛋白洗脱过程。 b. 600ml CM 凝胶柱的蛋白洗脱过程。

图中箭头所指曲线代表洗脱液的电导值，箭头所示部分即上样过程中流失的 PMC-SA 所造成的电导小峰。加大凝胶体积后，流失 PMC-SA 所造成的电导小峰面积减少了 70%。

另外一条曲线：洗脱蛋白 OD 值

图 2.PMC-SA 的 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱

从左到右依次为：

a. 1. Marker、2. TG1 产 PMC-SA1 、3. BL-21 产 PMC-SA1、4. B834 产 PMC-SA1;

b. 1. Marker、2. 0.1M NaCl 硼酸缓冲液洗脱的 PMC-SA1、3. 0.2M NaCl 硼酸缓冲液洗脱的 PMC-SA1、4. 0.3 M NaCl 硼酸缓冲液洗脱的 PMC-SA1。

图 3. PMC-SA 对 MRSA（BAA42）的抑菌曲线

纵坐标为吸光值，横坐标为菌生长时间

Control：对照组；Amp：氨苄西林钠；OXA：苯唑西林；Ia-wt:野生型大肠菌素；PMC-SA1:抗金黄色葡萄球菌多肽；PMC-AM：抗脑膜炎双球菌多肽。

具体实施方式

通过以下实施例说明本发明。本发明采用的实验材和仪器如下：

1.菌株：

E.coli TG1 工程菌(AECOM，K.Jakes 赠与)；

E.coli BL-21(DE3)、B834(DE3)、NovaBlue(DE3)和 618 工程菌均购自 Novagen 公司；

金黄色葡萄球菌 ATCC BAA-42 购自 ATCC(American Type Culture Collection)。

质粒：pBHC-SA1、pBHC-SA2、pBHC-SA3 pBHC-SA4、pBHC-SE，pBHC-PA，pBHC-PorA1（记载于申请号为 200910092128.4，及 200910157564.5 的两个发明申请的说明书中，申请人实验室有保存，可向公众发放用于验证试验）。

2.主要试剂与药品：

酵母粉（OXIOD LP0021），蛋白胨（OXIOD LP0042），及其它化学试剂均为国产分析纯；

透析袋 Snake Skin Dialysis Tubing（Pierce,截留相对分子质量 1×104, Lot#KD32324)；

注射用硫酸链霉素（华北制药)；

注射用氨苄西林钠 AMP（哈尔滨制药)；

阴离子交换柱凝胶（Pharmacia Biotech CM Sepharose Fast Flow LotNo.225016）。

LB 液体培养基：100ml 氯化钠 1g，蛋白胨 1g，酵母 0.5g， 将各种试剂称好后 放入 250ml 烧瓶中，加入 100ml 自来水，使其溶解，在高压灭菌锅内 120℃ 8min 灭菌

LB 固体培养基：100ml 氯化钠 0.5~1.5g，蛋白胨 0.5~2g，酵母 0.3~1g，琼脂 0.8~3g，LB 固体培养基用于菌种复苏后划平板培养单克隆菌落用。将各种试剂称好后 放入 250ml 烧瓶中，加入 100ml 自来水，使其溶解，在高压灭菌锅内 120℃ 8min 灭菌。

FB-M9 复合培养基：NaCl 6.0~6.7g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 0.6~2.0g/L，$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 6.8～18.3g/L，KH_2PO_4 3.0～4.3g/L，NH_4Cl 1.0~1.4g/L，$MgSO_4$ 0.2~0.4g/L，$CaCl_2$0.01g/L，甲硫氨酸 0~40mg/L。

改良的 FB-M9 复合培养基：NaCl 6.0g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 2.0g/L，$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 6.8g/L，$KH_2PO_4$3.0g/L，NH_4Cl 1.0g/L，$MgSO_4$0.2g/L，$CaCl_2$0.01g/L，甲硫氨酸 0~40mg/L。在以 *E.coli* B834(DE3)为工程菌的工艺中，甲硫氨酸为 40mg/L。

3.主要仪器：

Bio-Rad 蛋白质层析纯化系统（BioLogic Duo Flow, BioLogic Maximizer, BioLogic QuadTec UV-Vis Detector, BioLogic Econo Pump）；

超声破碎仪（Soniprep 150），直径 5cm 蛋白纯化离子交换柱（Pharmacia Biotech XK50），直径 11cm 蛋白纯化离子交换柱（上海华美）；

离心机(Beckman Coulter Avanti J-20XP, Beckman Coulter Avanti J-25)；

分光光度计(Bio-Rad Smart Spect Plus spectrophotometer)；

全自动发酵罐（瑞士比欧 LP351-42L）；

细菌高压均质机（意大利 Niro Soavi NS1001L2KSN 6564）。

声明：本发明所采用的生物材料都为申请日前已知的，且本单位已有保存，保证自申请日起二十年内向公众发放用于验证试验。

实施例 1.工程菌菌种的优化选择试验

载有大肠菌素 Ia 及其免疫蛋白基因（GenBank M13819）的经典质粒来自于 Dr. Finkelstein 实验室（Qiu XQ et al. An engineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria. Nat Biotechnol, 2003；21(12)：1480-1485），经本实验室改造后得到 7 种重组突变质粒：pBHC-SA1、pBHC-SA2、pBHC-SA3 pBHC-SA4、pBHC-SE，pBHC-PA，pBHC-PorA1。

步骤 1.转化感受态细胞

将重组突变质粒 pBHC-SA1 100ng 分别转染入 4040 ul Novagen 数种 pET 系统工程菌 BL-21(DE3)、B834(DE3)、Nova Blue(DE3)、618 中，冰孵 5 分钟，42 ℃热冲击 30 秒，再置入冰中 2 分钟，加入 SOC 培养基 160 ul, 220 rpm，37 oC 摇菌 1 小时后铺板（LB 培养基加 1 %琼脂，加 50 ug/ml 氨苄青霉素，37 ℃过夜），挑取单克隆菌落增菌，获得菌种，低温保存菌种；

步骤 2.菌种复苏

1.菌种复苏

取出保存菌种 4℃解冻，取 1.5ml 倒入 10ml LB 培养基中（含 AMP 50μg/ml），220rpm、37℃培养 5—8 小时。

2.接种单克隆菌

复苏后的菌液稀释 10^4 或 10^5 倍，取 10ul 稀释后的菌液加入到制备好的 LB 固体培养基（AMP 50μg/ml）平板上，涂平板。放湿盒中，37℃恒温培养箱培养 10-12 小时，培养基表面长出圆形单菌落。

步骤 3.挑菌和扩菌

（1）用已灭菌牙签或接菌环从长好的平板上挑选规则圆形，边缘光滑的单菌落，放入 1.5mlLB 培养基中，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

（2）1.5mlLB 菌液翻至 100ml LB 培养基中，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

（3）一级扩大培养：将上步的 100ml 菌液加入到 700ml 改良的 FB-M9 复合培养基中培养，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

（4）二级扩大培养：将上步 700ml 菌液分别加入到 6×700ml 改良的 FB-M9 复合培养基中，振荡培养：220rpm、37℃培养 5-8 小时。

（5）三级扩大培养：将上步 6×700ml 菌液加入到 20L 改良的 FB-M9 复合培养基中，在发酵罐中培养：搅拌速度 220rpm、最大通氧量，37℃培养 3—5 小时。

（6）工程菌发酵和诱导表达蛋白：将上步 20L 菌液加入到 200L 改良的 FB-M9 复合培养基中，在发酵罐中培养和诱导表达蛋白：搅拌速度 220 rpm, 最大通氧量，30 ℃，2～4 小时；42℃，0.5 小时；37 ℃，1～2 小时，注：达到 42 ℃时加入终浓度为 0.5mM 的 IPTG。

步骤 4.离心收菌

培养液 6000g，4℃离心 20min。收取离心后的沉淀，放入 50mM 的硼酸缓冲液（pH9.0）中，使菌体重悬浮于硼酸缓冲液中，注：硼酸缓冲液中加入 2mM 的 PMSF（中文名：苯甲基磺酰氟丝氨酸蛋白酶抑制剂，自菌体重悬浮之后的操作须在 4℃进行。

步骤 5.破碎菌体

待菌体完全悬浮于 pH9.0 硼酸缓冲液后，用高压匀质机 500～600bar 高压破碎菌体，反复破碎 7 次，每次破菌间隔 3～5 分钟。

步骤 6.沉淀菌体 DNA

将破碎后的菌液，55000g，4℃离心 40min。取上清液，加入硫酸链霉素（每 200ml 液体加入 16 瓶 100 万单位的硫酸链霉素），在磁力搅拌器上搅拌 1h。

步骤 7.透析

将上步的菌液 55000g，4℃离心 20min，取上清液，装入透析袋中，置硼酸缓冲液中透析 8h~12 小时，每 4h 换透析液一次。

步骤 8.蛋白药物纯化得到抗菌工程多肽药物

将透析后的菌液 55000g，4℃离心 20min，取上清液放入烧杯中，采用离子交换法纯化蛋白。取上清上样于 CM 离子交换柱，测蛋白浓度计算单位体积中蛋白质含量， 上样量与 CM 离子凝胶颗粒的比例按操作手册，充分冲洗后，用含 0.2 M NaCl 的 50 mM 硼酸缓冲液洗脱得到新型抗菌工程多。

结果如表 1 所示，*E.coli* B834(DE3）对于 PMC-SA 的表达效率是最高的。

表 1 菌株表达效率比较（平均单位产量=提取的 PMC-SA1 的总产量/菌液体积）

工程菌种	TG1	BL-21	618	NavaBlue	B834
平均单位产量（mg/L）	0.8	10	5.8	8.1	24.4

对于其余 6 种重组突变质粒进行相同操作和比较，结果均与表 1 表示的结果出现相同的趋势，即相较于其余的工程菌，*E.coli* B834（DE3)对于这 7 种重组突变质粒的表达效率都是最高的。

本实施例中，采用的与过去不同的生长诱导方法为热冲击诱导：即种子菌液入罐后，大规模增菌的起始温度为 30℃，待菌液生长 2 小时左右，OD 值达到 0.4-0.6 时，42℃ 热冲击 30 分钟，热冲击结束后，将温度下调至 37℃，再生长 1.5-2 小时后即可收菌，此时增殖菌液 OD 值可达 1-3 甚至更高。时还加入了 IPTG 来诱导 pET 系列工程菌，加入量为 0.5mM。

在本申请之前，常用的生产制备上述重组多肽的方法如下：

将突变质粒 100 ng 与制备的 BL-21 工程菌感受态细胞 40 ul 冰孵 5 分钟，热冲击 42℃，30 秒，再置入冰中 2 分钟，加入 SOC 培基 160 ul, 220 rpm, 37 ℃摇菌 1 小时后铺板（LB 培基加 1％琼脂，加 50 ug/ml 氨苄青霉素，37 ℃过夜），挑取单克隆菌落大量增菌；

大量增菌：8－10 升 FB 培养基，250 rpm, 37 °C，3－4 小时；加入 IPTG , 250 rpm, 28 °C 再生长 4 小时；4 °C，6000g，20 分钟离心沉淀菌体，取 4 °C，50 mM 硼酸缓冲液（pH 9.0, 2 mM EDTA）80-100 ml 悬浮菌体，加入 PMSF 50 ug 后超声破碎菌体（4 °C，400W, 1 分钟，重复 4－5 次，间歇 2－3 分钟确保菌液温度），高速离心沉淀破碎的菌体（4 °C，75,000g，90 分钟），取上清加入硫酸链霉素 500 万单位沉淀 DNA (4 °C 搅拌 1 小时)，10,000g, 4 °C，10 分钟离心沉淀后，取上清装入分子量 15,000 透析袋于 4 °C，50 mM 硼酸缓冲液 10 升透析过夜后，再次 10,000g, 4 °C，10 分钟离心沉淀，取上清上样于 CM 离子交换柱，充分冲洗后，0.3 M NaCl + 50 mM 硼酸缓冲液洗脱即可得到所制备的新型抗生素。

实施例 2. 改进培养基

经典的大肠菌素 Ia 生长培养基为 FB 培养基（Qiu XQ et al. An engineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria. Nat Biotechnol, 2003；21(12)：1480-1485 /Karen Jakes, Charles Abrams, Alan Finkelstein, et al. Alteration of the pH-dependent Ion Selectivity of the Colicin E1 Channel by Site-directed Mutagenesis.JBC, 1990; 265(12): 6984-6991）。其配方如下：25g/L 蛋白胨，7.5g/L 酵母粉，6g/L NaCl，1g/L 葡萄糖。

在本发明中，我们采了不含葡萄糖的 FB 培养基，配方为：蛋白胨 25.0g/L,酵母粉 7.5g/L，NaCl 6.0g/L, 并将上述无糖配方的 FB 培养液与 M9 培养液以一定体积例复合配置，从而得到了本发明的 FB-M9 复合培养基。

M9 培养基母液为 5×M9，其配方为：$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$64.0g/L, $KH_2PO_4$15.0g/L, NH_4Cl 5.0g/L, NaCl 2.5g/L, $MgSO_4$1.5g/L, $CaCl_2$0.05g/L, 2%葡萄糖。

初步尝试两种培养基的复合：

FB-M9：FB:M9 的体积比 = 7：10，配方为：NaCl 6.7g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，Na2HPO4·7H2O18.3g/L，KH2PO44.3g/L，NH4Cl1.4g/L， MgSO40.4g/L，CaCl20.01g/L，葡萄糖 0.6g/L。

本发明中用此配方进行发酵生产，发酵步骤同实施例 1 步骤 3，结果显示如表 2，每升培养液所得到的湿菌重量显著高于仅用 FB 培养基所得到的湿菌重量，所回收的蛋白产量明显提高，平均产量可达到 30 mg/L。

表 2 所试培养基目的蛋白产量对比(PMC-SA1/BL-21 工程菌)

	用 FB 培养基发酵		用 FB-M9（7：10）培养基发酵	
	菌重 g	蛋白含量 mg	菌重 g	蛋白含量 mg
1	255.07	280.8	349.82	847.82

2	246.3	519.94	343.47	643.71
3	302.28	461.965	366	779.3
4	276.67	465.179	388.44	946.34
平均值	270.8	431.971	361.9325	804.2925

本发明进一步通过反复对比，得到最终改良的 FB-M9 培养基，在如实施例 1 的发酵条件下，可达到目的蛋白产率 34 mg/L，如表 3。

该改良的 FB-M9 配方为：NaCl 6.0g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 2.0g/L，$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$6.8g/L， $KH_2PO_4$3.0g/L， NH_4Cl 1.0g/L， $MgSO_4$0.2g/L， $CaCl_2$0.01g/L，由于 B834 工程菌生长中需要甲硫氨酸，因此在以 B834 为工程菌的工艺中，FB-M9 培养基中还加入了甲硫氨酸 （40mg/L）。

表 3 改良 FB-M9 培养基与其他培养基产率比较

工程菌种及采用的培养基	BL-21			B834		
	FB	FB-M9（7：10）	改良 FB-M9	FB	FB-M9（7：10）	改良 FB-M9
平均单位产量（mg/L）	10	24	25	22.3	30	34

实施例 3. 优化蛋白纯化条件

本发明中制备的重组多肽（PMC- SA1、PMC-SA2、PMC -SA3，PMC -SA4、PMC -SE，PMC -PA，PMC-AM）之基本结构为大肠菌素 Ia，而大肠菌素 Ia 的等电点约为 9.15，因此其经典纯化方式采用了离子亲和层析交换法（ Qiu XQ et al. An engineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria. Nat Biotechnol, 2003；21(12)：1480-1485）。

其工作原理为：在 pH9.0 的硼酸缓冲液体系中，绝大部分的 PMC-SA 分子都以正电荷离子的形式存在，在层析柱中流经带负电荷的 CM 凝胶颗粒时，带正电荷的上述重组蛋白分子即因电荷间的吸引力而挂在了带负电荷的 CM 凝胶颗粒上。其他杂蛋白则被次第冲出凝胶柱。

本实施例中，其它步骤同实施例 1，待杂蛋白冲洗干净后，分别以带有 0.1-0.3 M NaCl 的硼酸缓冲液对凝胶柱进行梯度洗脱。

由于 Na^+ 离子较重组蛋白分子离子的正电荷性更强，于是重组蛋白离子被 Na^+ 离子自 CM 凝胶颗粒上置换下来。在离子交换纯化中有两个变量可以操纵，从而得到更好的目的蛋白回

收率：①.可以在 0.05-1M 范围内选择不同浓度的 NaCl，分别洗脱 CM 凝胶颗粒上挂载的、带有不同正电荷强度的蛋白分子。②所用 CM 凝胶颗粒的量可以进一步优化：在一定的离子强度环境中，每个 CM 凝胶颗粒携载的蛋白数量是相对恒定的，要想加大凝胶柱对蛋白的携载量，则必需加大凝胶柱的体积。

CM Sepharose Fast Flow 是 GE 公司生产的阴离子交换柱凝胶，根据其使用手册可知每 100ml 凝胶最多可结合 9 mM 阳离子。动态结合过程中实际可用的结合容量随样品的性质变化，分子量与结合容量呈反比关系。其标准样品中与本发明中制备的重组多肽的分子量较接近的是 Bovine COHb-(Mr69kD)。其理论动态结合容量为 30mg/ml。即用 100ml 容量的 CM Sepharose Fast Flow 胶回收重组蛋白分子样品时，理论上其最高回收率大约 300mg（0.004 mM），按其使用手册操作，本发明中 CM 凝胶颗粒与重组蛋白分子之间的实际动态结合容量是 3mg/ml，只达到理论值的 10%。

在试验中，我们发现在杂蛋白冲洗过程的后半期中，电导曲线会出现一过性的小上升峰（如图 1a 所示）。根据此现象我们推测，当样品中重组蛋白量较大时，由于 CM 凝胶颗粒与目的蛋白结合容量有限，即只能回收样品中重组蛋白分子的一部分。未能挂载在 CM 凝胶颗粒上的重组蛋白随杂蛋白一并被冲洗出凝胶柱。由于重组蛋白带正电荷， 所以出现了电导曲线的短暂上升峰。

本发明的优化方案中：为减少目的重组蛋白流失，我们将每批上样量减为使用手册规定的 1/3，同时加大所用凝胶的体积，胶体积由 150ml 增加到 600ml，即上清液中蛋白质量：凝胶颗粒体积=2.5mg/ml，洗脱过程中流失的重组蛋白减少，实验数据显示重组蛋白的回收率提高了 3.5 倍，结果由图 1b 所示。

此外，我们将洗脱所用硼酸缓冲液中的 NaCl 梯度设为 0.1M-0.2M-0.3 M, 0.2M 的洗脱效率和蛋白纯度最高，由图 2b 所示。

实施例 4. 蛋白纯度及活性检测

步骤 1.SDS-PAGE 电泳

对实施例 4 优化方法提取的融合蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳，硝酸银染染色。如图 2 所示，电泳图谱 a 中，在相对分子质量约为 70kD 处有一清晰的蛋白印记条带，即为本发明制备的 PMC-SA1。图谱 b 显示通过实施例 4 中改进的梯度洗脱方法收到的蛋白消除了杂带，纯度提高。本发明的优化方法制备得到其余六种重组蛋白在纯度上显示出同样的提高。

步骤 2.抑菌活性检测

经实施例 1、2、3 改进制备方法后制备得到的重组蛋白 PMC-SA1 和 PMC-AM，我们进行了以下抗菌活性测试。

在 10 ml BM 培养基中接种耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA, ATCC BAA-42）菌液 10 ul（10^5CFU/ml），加入抗菌药物，根据抗菌药物分为 6 个平行组：氨苄西林钠 2ug/ml，苯唑西林 4 ug/ml，野生型大肠菌素 Ia，PMC-SA 和 Ph-NM（4ug/ml），空白对照组。37℃，210 rpm 振荡培养，每小时测定菌液光密度值 (595 nm)，绘制生长曲线图，如图 3。

抑菌试验曲线显示经本发明的改进方法所制备的重组多肽具有良好的抗菌活性。

权利要求书

1．一种用于高效表达工程菌重组蛋白的方法，所述工程菌重组蛋白的多肽一端具有亲水性，为大肠菌素多肽端；另一端具有疏水性，为靶标物质识别多肽端，其特征在于，包括如下步骤：

（1）将表达所述工程菌重组蛋白的重组突变质粒转染到大肠杆菌 pET 系统工程菌得到阳性单克隆，

（2）对阳性单克隆进行增菌得到种子菌液，诱导种子菌液大量增菌生长，所得的上清液中含有表达的工程菌重组蛋白，

（3）分离提纯所述上清液中含有的表达的工程菌重组蛋白，所述大肠杆菌 pET 系统工程菌指 E.coli B834(DE3)。

2．根据权利要求 1 所述的方法，所述大量增菌采用的培养基的配方为：NaCl 6.0~6.7g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 0.6~2.0g/L，$Na_2HPO_4{\cdot}7H_2O$ 6.8～18.3g/L，KH_2PO_4 3.0～4.3g/L，NH_4Cl 1.0~1.4g/L，$MgSO_4$ 0.2~0.4g/L，$CaCl_2$0.01g/L，甲硫氨酸 0~40mg/L，以水为溶剂。

3．根据权利要求 2 所述的方法，所述大量增菌采用的培养基配方为：NaCl 6.0g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 2.0g/L，$Na_2HPO_4{\cdot}7H_2O$ 6.8g/L，$KH_2PO_4$3.0g/L，NH_4Cl 1.0g/L，$MgSO_4$0.2g/L，$CaCl_2$0.01g/L, 甲硫氨酸 0~40mg/L，以水为溶剂。

4．根据权利要求 1~3 任一所述的方法，所述诱导采用热冲击诱导，操作方式如下：种子菌液入罐后，30℃起始生长 2～3 小时，测 OD 值达 0.4-0.6 时，于 42℃ 热冲击 30 分钟，然后将温度下调至 37℃，再生长 1.5-2 小时后收菌。

5．根据权利要求 4 所述的方法，所述热冲击诱导步骤中，在所述培养基中加入终浓度为 0.5mM 的 PTG。

6．根据权利要求 1 所述的方法，所述分离提纯所述上清液中含有的表达的工程菌重组蛋白，采用 CM 离子交换柱，其中上样量根据上清液蛋白质量比凝胶颗粒体积为 2.5mg/ml 来确定。

7．根据权利要求 6 所述的方法，所述分离提纯所述上清液中含有的表达的工程菌重组蛋白，采用 CM 离子交换柱，洗脱所用的硼酸缓冲液中 NaCl 浓度为 0.2M。

8．根据权利要求 1 所述的方法，所述重组突变质粒指 pBHC-SA1、pBHC-SA2、pBHC-SA3 pBHC-SA4、pBHC-SE，pBHC-PA 或 pBHC-PorA1。

9．权利要求 1~8 任一所述方法在制备重组多肽 PMC- SA1、PMC-SA2、PMC -SA3，PMC

-SA4、PMC -SE，PMC –PA 或 PMC-AM 中的应用。

10．一种用于大肠杆菌 pET 系统工程菌的培养基，其配方为 NaCl 6.0~6.7g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 0.6~2.0g/L，$Na_2HPO_4·7H_2O$ 6.8～18.3g/L，KH_2PO_4 3.0～4.3g/L，NH_4Cl 1.0~1.4g/L，$MgSO_4$ 0.2~0.4g/L，$CaCl_2$0.01g/L，甲硫氨酸 0~40mg/L，以水为溶剂。

11．根据权利要求 10 所述的培养基，所述大肠杆菌 pET 系统工程菌是 *E*.coli B834(DE3)，所述培养基的配方为：NaCl 6.0g/L，蛋白胨 25.0g/L，酵母粉 7.5g/L，葡萄糖 2.0g/L，$Na_2HPO_4·7H_2O$ 6.8g/L，$KH_2PO_4$3.0g/L，NH_4Cl 1.0g/L，$MgSO_4$0.2g/L，$CaCl_2$0.01g/L，甲硫氨酸 40mg/L，以水为溶剂。