

权 利 要 求 书

1、一种利用 HU 蛋白带动乳铁蛋白肽的表达以及纯化的方法，其特征在于，包括以下步骤：

1) 构建重组表达载体 pET-22b-HU β -Lfb ；

5 2) 构建重组表达载体 pET-22b-HU β '-Lfb ；

3) 将构建好的重组载体 pET-22b-HU β -Lfb 和 pET-22b-HU β '-Lfb 分别转化到大肠杆菌感受态细胞 BL21 中，之后取含重组质粒的阳性菌株并加入 LB 液体培养基中过夜培养，接着菌液按 1% 比例接种到 50 ml 的 LB 培养液中，放入 37℃ 摇床培养至其 OD 值为 0.6 ~ 0.8，然后加入异丙基硫代半乳糖苷，
10 并放入 37℃ 摇床中诱导表达 5 小时，摇床转速为 180rpm ；

4) 取诱导表达后的菌液经 3000×g 离心 15min 得到菌体，裂解，释放蛋白质，并通过 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达情况，从而筛选到所释放的蛋白具有水溶性且大小正确的阳性菌株即所需阳性菌株；

5) 将获得的阳性菌液经 3000×g 离心 15min，收集大肠杆菌菌体，于 -70℃
15 C 冷冻放置过夜，备用；将收集到的大肠杆菌菌体悬浮在裂解缓冲液 B-PER 中，冰上超声裂解菌体，裂解液经 27000×g 离心 15min，于上清液中加入体积比 10% 的 PEI 至终浓度为体积浓度 0.35% 和终浓度 0.75 M 的 NaCl，4℃ 放置至核酸沉淀，之后 17000×g 离心 20min，于上清液中添加饱和硫酸铵至其体积分数为 50%，在 4℃ 放置 1h，接着 17000×g 离心 15min，去沉淀，
20 上清液中加入硫酸铵至完全饱和，然后 17000×g 离心 30min，取硫酸铵沉淀溶解在缓冲液 A，透析 36h，换液三次；透析后的溶液上样至强阳离子交换柱，用透析缓冲液 NaCl 梯度洗脱，收集 0.2 M 和 0.25 M 的 NaCl 洗脱峰，并以弱阳离子交换柱及 0.25 M NaCl 梯度洗脱该洗脱峰，得到 HU 蛋白原液，将原液进行 90℃ 加热 20min 后以转速 14000×g，4℃ 下离心 20min 取上清液
25 即得融合蛋白溶液；加入甘油至其体积分数为 50%，-70℃ 保存待用。

~~2、根据权利要求1所述的利用HU蛋白带动乳铁蛋白肽的表达以及纯化的方法，其特征在于，所述步骤1)中构建重组表达载体pET-22b-HU β -Lfb具体为：取来源于大肠杆菌U93的HU的1个亚基的基因片段即HU β 亚基~~

和乳铁蛋白肽的基因片段,其核苷酸序列分别如 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO : 2 所示,将乳铁蛋白肽基因片段直接连接于 HU 基因片段,使用 PCR 方法对目的片段扩增,并使用小量质粒提取试剂盒提取质粒 Pet22b,对目的片段和质粒进行 Ned I 和 EcoR I 的双酶切,通过 T4 连接酶连接,热激法转化并用菌落 PCR、酶切鉴定及测序验证,即得到重组表达载体 pET-22b-HU β -Lfb~~o~~;

~~3、根据权利要求 1 所述的利用 HU 蛋白带动乳铁蛋白肽的表达以及纯化的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中的构建重组表达载体 pET-22b-HU β '-Lfb 具体为:取来源于大肠杆菌 U93 的 HU 的 1 个亚基的基因片段即 HU β 亚基和乳铁蛋白肽的基因片段,将 HU β 基因片段苯丙氨酸与亮氨酸替换为丙氨酸,其核苷酸序列如 SEQ ID NO : 3 所示;将乳铁蛋白肽序列与修改后 Hu β 序列连接,使用 PCR 方法对目的片段扩增,并使用小量质粒提取试剂盒提取质粒 Pet22b;对目的片段和质粒进行 Ned I 和 EcoR I 的双酶切,通过 T4 连接酶连接,热激法转化并用菌落 PCR、酶切鉴定及测序验证,即可得到重组表达载体 pET-22b-HU β '-Lfb~~o~~;~~

~~4、根据权利要求 1 所述的利用 HU 蛋白带动乳铁蛋白肽的表达以及纯化的方法,其特征在于,所述步骤 5) 中,裂解缓冲液 B-PER 的组分为: 0.05 M Tris、0.2 M 氯化钠、0.01 M EDTA、10% v / v 甘油、pH 7.5。~~

~~52、根据权利要求 1 所述的利用 HU 蛋白带动乳铁蛋白肽的表达以及纯化的方法,其特征在于,所述缓冲液的组分: 0.02 M Tris、0.001 M EDTA、0.1 M NaCl、10% v / v 甘油、pH 7.5。~~

~~63、根据权利要求 1 所述的利用 HU 蛋白带动乳铁蛋白肽的表达以及纯化的方法,其特征在于,所述步骤 5) 中强阳离子交换柱采用 SP 琼脂糖凝胶柱,弱阳离子交换柱采用 ICM-琼脂糖柱。~~