

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810069366.9

[51] Int. Cl.

G12N 15/12 (2006.01)

G12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 7 月 23 日

[11] 公开号 CN 101225391A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2008.2.15

[21] 申请号 200810069366.9

[71] 申请人 中国人民解放军第三军医大学

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号

[72] 发明人 张竹君 胡川闽 李 鹏 陈 安
李淑慧

[74] 专利代理机构 重庆志合专利事务所
代理人 胡荣琿

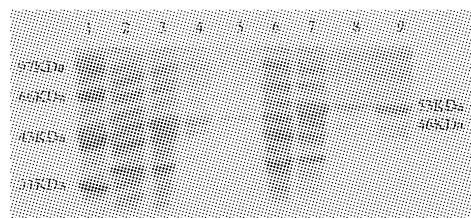
权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 1 页

[54] 发明名称

重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系
及制备方法与应用

[57] 摘要

本发明涉及一种重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系，该表达体系包含表达载体和干扰素调节因子 4 结合蛋白基因片段，其中所述的干扰素调节因子 4 结合蛋白基因片段具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列；本发明还涉及上述的重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系的制备方法；本发明的重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系表达的重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白可用于制备免疫检测用试剂盒或治疗癌症或自身免疫性疾病的药物。利用本发明所述表达体系制备的重组 IBP 为抗原免疫动物制备的抗 IBP 抗体或直接检测 IBP 核酸的试验。



1. 一种重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系，其特征在于该表达体系包含表达载体和干扰素调节因子4结合蛋白基因片段。

2. 根据权利要求1所述的重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系，其特征在于所述的干扰素调节因子4结合蛋白基因片段具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

3. 根据权利要求1所述的重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系，其特征在于所述的表达载体包括pGEX-KG/IBP或pET-32a/IBP。

4. 权利要求1所述的重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系的制备方法，其特征在于包含以下步骤：

1) 干扰素调节因子4结合蛋白基因片段的克隆；

2) 步骤1)获得的干扰素调节因子4结合蛋白基因片段与所述表达载体连接，然后转化受体菌，获得干扰素调节因子4结合蛋白重组质粒；

3) 干扰素调节因子4结合蛋白重组质粒的诱导表达，获得干扰素调节因子4结合蛋白；

4) 干扰素调节因子4结合蛋白的鉴定与纯化；

5) 干扰素调节因子4结合蛋白的浓度的测定。

5. 根据权利要求4所述的重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系的制备方法，其特征在于步骤1)中采用RT-PCR法克隆所述干扰素调节因子4结合蛋白基因片段。

6. 根据权利要求5所述的重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系的制备方法，其特征在于步骤1)中采用的RT-PCR引物为SEQ ID NO:2-3或SEQ ID NO:4-5。

7. 根据权利要求5或6所述的重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系的制备方法，其特征在于步骤1)包括：

a) 人白细胞总RNA的提取；

b) 以 SEQ ID NO: 2-3 或 SEQ ID NO: 4-5 为引物, 以步骤 a) 中获得的人白细胞总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR, 克隆干扰素调节因子 4 结合蛋白基因片段;

c) 步骤 b) 中克隆得到的干扰素调节因子 4 结合蛋白基因片段的回收与纯化。

8. 根据权利要求 4 所述的重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系的制备方法, 其特征在于步骤 4) 中采用阴离子交换层析柱/GST 柱亲和层析或阴离子交换层析柱/镍柱亲和层析纯化所述干扰素调节因子 4 结合蛋白。

9. 根据权利要求 4 所述的重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系的制备方法, 其特征在于步骤 5) 中采用 Lowry 法测定重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白的蛋白质含量。

10. 权利要求 1 所述的重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系表达的重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白用于制备免疫检测用试剂盒或治疗癌症或自身免疫性疾病的药物。

重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系及制备方法与应用

技术领域

本发明涉及一种蛋白表达体系，尤其涉及一种重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系及制备方法与应用。

背景技术

随着分子生物学和分子遗传学理论和技术的发展，基础和临床免疫学的进展迅速，自身免疫性疾病（AID）也有了全新的概念。正常情况下，T淋巴细胞在胸腺内经负性选择（克隆缺失），使进入外周血的成熟T细胞不会排斥自身抗原，只对非自身抗原进行反应，以维持机体的稳定。在某些情况下，上述自身耐受性遭受破坏，免疫系统对自身组织成分产生明显的免疫应答反应，称为自身免疫反应（AIR）。当AIR造成自身组织损伤和相应的功能障碍，导致疾病的发生，称为AID。AIR的发生机制极为复杂，目前对其引发的AID的治疗尚无重大突破。因此，对于AIR发生的分子机制的进一步研究和探索，将能对临床的治疗提供新的思路 and 手段。

目前对自身免疫反应的发生机制已有了一定的认识，越来越多的细胞与分子被证明与自身免疫反应关系密切，在自身免疫病致病机制及治疗过程中发挥重要作用。活化的T细胞及其细胞因子介导的不正常免疫应答在其中扮演重要角色。TH1细胞因子主要参与器官特异性自身免疫性疾病，如类风湿关节炎（RA）、胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）、多发性硬化（MS）及甲状腺疾病等；TH2细胞因子在系统性红斑狼疮（SLE）、哮喘、过敏性疾病，艾滋病中占优势。故对T细胞及其相关分子的作用机制的研究引起了愈来愈多研究者的关注。

2003年，Pernis与Hu CM博士合作，通过酵母双杂交技术，从人淋巴结cDNA文库中筛选出一个IRF-4结合蛋白即人干扰素调节因子4结合蛋白，并将其命名为IBP（IRF-4 binding protein）。序列分析结果显示，IBP的cDNA全长约2.3kb，

包含一个1893bp的开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码631个氨基酸, 分子量约75KD, 其编码基因位于人染色体6p21.31。分析还发现IBP与Borggreffe报告的在B细胞的激活信号传导及Ig亚类转换有重要作用的SWAP-70分子结构很相似, 从N端到C端依次为EF-hand、PH (pleckstrin-homology)、DH (Db1-homology) 结构域。进一步组织学分布和功能研究发现IBP主要表达于T淋巴细胞。同年, Altman课题组在体外分化的鼠源性Th1和Th2细胞中, 利用差异显示分析技术分离出一段选择性表达于Th2细胞的基因片断, 由于与SWAP-70有同源性, 命名为SLAT (SWAP-70 Like Adapter of T cells), 实际SLAT即为鼠源性IBP。

为进一步研究IBP在T细胞中的功能, 申请人所在实验室与Pernis研究组合作, 利用gene trapping技术使IBP表达缺失, 成功建立了IBP^{trap/trap}小鼠模型。长期观察发现IBP缺失小鼠有系统性自身免疫反应的发生, 特征为效应/记忆T细胞和IgG⁺ B细胞的积聚, 高r球蛋白血症及产生自身抗体。且IBP^{trap/trap} T细胞在体内外均有抗凋亡现象, 亦表现出某些效应功能的选择性缺陷。而有效的免疫应答需要外周T细胞适度的活化和分化及随后的适度凋亡, 以达到免疫自稳, 对T细胞功能和存活的调节受损后将会导致自身免疫反应发生。这些结果有力说明IBP的缺失在诱发自身免疫反应中起着重要的作用。

从整体水平看, 年幼的 IBP^{trap/trap} 小鼠表型正常, 5 个月时 60%雌性小鼠出现多发淋巴结肿大及脾肿大, 蛋白尿, 肾小球肾炎, 其血清 IgG 水平明显升高, IgG1 和 IgG2a 均升高, 但前者升高幅度更大。大多数大龄 (>5 个月) IBP^{trap/trap} 雌鼠还有高效价的抗核抗体 (ANAs) 及抗-dsDNA 及抗-Sm 抗体。这些血清学改变在肉眼可见的淋巴病变之前就已出现。雄性 IBP^{trap/trap} 小鼠只有很少部分出现病变, 且远不如雌鼠明显。这与多发于女性的人系统性红斑狼疮 (SLE) 症候群表现很相似。从细胞水平看, IBP^{trap/trap} 小鼠中分离纯化的 T 细胞在 TCR 刺激下, 增殖反应有适度损伤, 而用能绕开 TCR 早期信号事件的 PMA 和 ionomycin 培养的 IBP^{trap/trap} T 细胞增生正常, 提示 IBP 对能获得最佳增殖的早期 TCR 信号事件有作用。单个 T 细胞增殖反应受损, 体内却有效应/记忆 T 细胞的累积, 说明 IBP 缺失影响 T 细胞的存活。随后 Jessica C 等证实在体内外活化的 IBP^{trap/trap} T 细胞凋亡能力明显受损。因此 IBP 服务于活化 T 细胞的有效消除, IBP 的缺失可诱发自身免疫反应。

IBP^{trap/trap}小鼠中终末分化B细胞增加,出现异常的抗体反应,血清IgG1和IgE基础水平比对照小鼠有统计学意义上的显著升高,但体外试验中,B细胞刺激后的增殖和功能与对照小鼠无区别,且IBP^{trap/trap}小鼠对T-非依赖性抗原Np-Ficol1所引发的NP-特异抗体应答反应甚微,对T-依赖(TD)抗原NP-KLH的免疫应答却产生大量的IgE。说明缺陷鼠中表现出的异常抗体反应本质上不是源于B细胞,而是源于T细胞缺陷的后续效应,这种Ig同种型产量的增加是TH2依赖性的。这与Altman所研究的通过逆转录病毒表达SLAT可增加TH2型细胞因子产生是不同的。尽管这种偏差产生原因尚不清楚,我们不排除这个新分子在TH分化中起着复杂作用的可能性,而在IBP^{trap/trap}小鼠模型中,IBP在介导活化诱导的凋亡过程中起的作用似乎大于其在T细胞分化中的作用。

TCR细胞骨架重塑对于受体和信号分子大规模重塑是至关重要的,这是免疫突触(Immunological Synapse, IS)形成的基础,且持续的突触形成是IL-2正常生成和T细胞完全发挥效应功能所必需的。IBP分子中DH结构域具有鸟核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF),能够活化Rho GTP酶,包括RhoA, Rac1和Cdc42,使其在肌动蛋白细胞骨架的重建和细胞增殖的调节及其他多种生物学过程中发挥广泛作用。IBP分子上第210位的酪氨酸残基能被LCK磷酸化,磷酸化后的IBP与PIP₃结合,参与激活T细胞和抗原提呈细胞相互接触处的免疫突触形成。研究发现IBP^{trap/trap}T细胞中肌动蛋白聚合受损,IS的稳定组建也不能持续,这个现象可部分解释其受损的T细胞效应反应。由于Rho GTP酶在细胞骨架重塑中起重要作用而IBP在TCR依赖模式下能活化GTP酶,我们用逆转录病毒系统证实了IBP缺失时所致的肌动蛋白聚合缺陷与其活化PhoGTP酶的能力相关。有趣的是,T细胞缺少GEFs家族中另一成员Vav时亦能表现出细胞骨架动力学的缺陷。说明这些不同类型的Pho GTP酶激活器的活性均被这些过程所必需,但此复杂的级联过程中,IBP与Vav是共同作用于某特殊的调节步骤还是作用于不同阶段还未可知。T细胞最佳功能严格依赖于IS形成及细胞骨架重建,可以肯定的是,IBP缺失所致的自身免疫反应与其导致的肌动蛋白聚合及IS持续中的缺陷是相关的,但致使这种缺陷形成的具体步骤未明。

IBP是一个与SWAP-70和显著同源的新型Rac-GEF,在T细胞中高表达。IBP在TCR活化时被迅速磷酸化并募集到IS,此过程依赖于Lck和PI3K的活化,这些TCR

介导的信号还能调控IBP活化Rac和Cdc42的能力，使这些Rho GTP酶在肌动蛋白细胞骨架重塑和T细胞的适度发育和功能中起作用。IBP缺失小鼠中出现明显的自身免疫反应，表现为效应/记忆T细胞和IgG⁺ B细胞的积聚，高r球蛋白血症、产生自身抗体，T细胞凋亡障碍等，但诱发过程的分子机制未明。免疫稳态与肿瘤的发生发展关系密切。研究IBP在自身免疫稳态的和肿瘤发生中分子机制并结合临床自身免疫性疾病与肿瘤患者体内IBP表达水平与病程的关系，有望为自身免疫性疾病和肿瘤的诊断与治疗提供新的靶点。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系，利用本发明所述表达体系制备的重组IBP为抗原免疫动物制备的抗IBP抗体或直接检测IBP核酸的试验。

本发明所述表达体系包含表达载体和干扰素调节因子4结合蛋白基因片段。其中上述的干扰素调节因子4结合蛋白基因片段具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列，上述的表达载体包括pGEX-KG/IBP或pET-32a/IBP。

本发明的另外一个目的是提供上述的重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系的制备方法，其主要包含以下步骤：

- 1) 干扰素调节因子4结合蛋白基因片段的克隆；
- 2) 步骤1)获得的干扰素调节因子4结合蛋白基因片段与所述表达载体连接，然后转化受体菌，获得干扰素调节因子4结合蛋白重组质粒；
- 3) 干扰素调节因子4结合蛋白重组质粒的诱导表达，获得干扰素调节因子4结合蛋白；
- 4) 干扰素调节因子4结合蛋白的鉴定与纯化
- 5) 干扰素调节因子4结合蛋白的浓度的测定。

其中步骤1)中可以采用RT-PCR法克隆所述干扰素调节因子4结合蛋白基因片段，所采用的RT-PCR引物优选为SEQ ID NO:2-3或SEQ ID NO:4-5，其步骤1)可具体包括：

a) 人白细胞总 RNA 的提取;

b) 以 SEQ ID NO: 2-3 或 SEQ ID NO: 4-5 为引物, 以步骤 a) 中获得的人白细胞总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR, 克隆干扰素调节因子 4 结合蛋白基因片段;

c) 步骤 b) 中克隆得到的干扰素调节因子 4 结合蛋白基因片段的回收与纯化。

上述重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系的制备方法的步骤 4) 中优选为采用阴离子交换层析柱/GST 柱亲和层析或阴离子交换层析柱/镍柱亲和层析纯化所述干扰素调节因子 4 结合蛋白; 步骤 5) 中可采用 Lowry 法测定重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白的蛋白质含量。

本发明还有一个目的是提供上述的重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系表达的重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白的应用, 其可用于制备免疫检测用试剂盒或治疗癌症或自身免疫性疾病的药物。

本领域技术人员也应当知道, 本发明采用的表达体系的思想不局限于所述的重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系, 任何采用上述表达体系的思想所表达的人干扰素调节因子 4 结合蛋白也同样可用于制备免疫检测用试剂盒或治疗癌症或自身免疫性疾病的药物。

本领域技术人员显然知道, 检测 IBP (蛋白或核酸, 包括与其序列同源性大于 85% 的同源性分子) 或其与某些细胞成分相互作用的物质或其与某些细胞成分相互作用产生的物质的任何方法都可用作诊断不希望有的细胞生长或不希望有的物质成分产生的疾病, 包括癌症, 自身免疫性疾病的方法。这类方法包括基于利用本发明所述表达体系制备的重组 IBP 为抗原免疫动物制备的抗 IBP 抗体或直接检测 IBP 核酸的试验。

本领域技术人员显然知道, 当本发明所述 IBP (蛋白或核酸, 包括与其序列同源性大于 85% 的同源性分子) 或其与某些细胞成分相互作用的物质或其与某些细胞成分相互作用产生的物质作为治疗靶点的时候, 能够激动或者抑制 IBP (蛋白或核酸, 包括与其序列同源性大于 85% 的同源性分子) 或其与某些细胞成分相互作用的物质或其与某些细胞成分相互作用产生的物质的天然配体或者是人工合成配体都可用作治疗不希望有的细胞生长或不希望有的物质成分产生

的疾病，包括癌症，自身免疫性疾病。这些天然配体或者是人工配体可以是肽，抗体及其片段，脂质，糖和其它有机或无机化合物。这些分子能够进入适当的细胞并影响 IBP（蛋白或核酸，包括与其序列同源性大于 85 % 的同源性分子）或其与某些细胞成分相互作用的物质或其与某些细胞成分相互作用产生的物质的表达或者其它一些基因的表达。计算机模型制作和检索技术可以鉴定化合物，或改良已鉴定的化合物，所述化合物可以影响 IBP 的表达或活性。所述化合物的有效剂量可通过细胞培养或实验动物中的标准药学方法测定这类化合物的毒性和治疗效力，例如测定 LD50（是 50 % 群体致死的剂量）和 ED50（对 50 % 群体治疗有效的剂量）。毒性和治疗效果之间的剂量比例是治疗指数，可将该指数表示为 LD50/ ED50 的比值。优选出高治疗指数的化合物。尽管可使用表现出毒副作用的化合物，但应精心设计出可将这类化合物靶向受影响的组织位点的传递系统，以使其对未受影响的细胞的潜在损害最小化，从而降低副作用。对于本发明中提及的 IBP（蛋白或核酸，包括与其序列同源性大于 85 % 的同源性分子）或其与某些细胞成分相互作用的物质或其与某些细胞成分相互作用产生的物质而言，最初可从细胞培养试验中估计治疗有效剂量。可在动物模型中配制剂量以达到包括在细胞培养中测定的 IC50（即使一半的症状达到最大抑制的受试化合物浓度）的循环血浆浓度范围。该信息可被用于更精确的测定人的有用剂量。通过例如高效液相层析可测定血浆中的水平。化合物的配制和使用可按一种或多种生理可接受的载体或赋形剂，按常规方法配制本发明所用的药物组合物。因此，化合物及其生理可接受的盐和溶剂化物可被配制成经吸入或吹入（通过口或鼻）给药，或口，颊，非肠道或直肠给药。为了口服给药，药物组合物可采取例如使用药物可接受的赋形剂通过常规方法制备得到的片剂或胶囊的形式。所述赋形剂如结合剂、填充剂、润滑剂、崩解剂、湿润剂，可通过本领域熟知的方法包被片剂。口服的液体制剂可采取例如溶液，糖浆或悬液的形式，或以干产物的形式提供，使用前再用水或其它适当载体配制。使用药物可接受的添加剂，通过常规方法可制备这种液体制剂，所述添加剂如悬浮剂（如山梨糖醇糖浆，纤维素衍生物或氢化食用脂肪）；乳化剂（如卵磷脂或阿拉伯胶）；不含水的载体（如杏仁油，油状酯，乙基醇或分级分离的植物油）；和防腐剂（如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或山梨酸）。适当时，制剂中也可含有缓冲的盐，调味

剂，着色剂和甜味剂。

口服制剂可适当的配制成控释形式的活性化合物。

颊内施用的组合物可采取以常规方法配制的片剂或锭剂形式。

为了通过吸入给药，可以用适当的推进剂，如二氯二氟甲烷，三氯氟甲烷，二氯四氟乙烷，二氧化碳或其它适当气体，由加压的容器或喷雾器以气溶胶喷雾形式方便的传递根据本发明使用的化合物。对加压气溶胶而言，通过提供阀来传递按规定供给的量可以测定剂量单位，可配制用于吸入剂或吹入剂的例如明胶胶囊和药筒配，它们含有化合物和适当粉末主剂（如乳糖或淀粉）的粉末混和物。

可以配制通过注射而非肠道给药的化合物，如巨丸剂注射或连续灌注。可以单位剂量形式提供注射用的试剂。组合物可采用例如油状或含水载体中的悬浮液，溶液或乳剂的形式，可含有配剂，如悬浮剂，稳定剂和/或分散剂。或者，活性成分可以是使用前用例如无菌无热原水这样的适当载体配制的粉末形式。

也可将化合物配置成直肠用组合物，如含有常规栓剂主剂（如可可酯或其它甘油酯）的栓剂或保留灌肠剂。

除了上述制剂外，也可将化合物配制成缓释制剂，因此，例如，可用适当的聚合物或疏水性物质配制化合物（例如配置成可接受油中的乳剂），或用离子交换树脂配制化合物，或将化合物配制成稍溶性衍生物，例如稍溶性盐的形式。

必要时，可以用可含有一个或多个含活性成分的单位剂量形式的包装或分配器装置来提供组合物。例如，包装可含有金属或塑料箔，如泡罩包装。包装或分配器装置中附有给药说明。

通过阅读本发明各个方面的描述，本发明的这些和其它目的对于本领域技术人员而言是显而易见的。

为了让本发明的上述和其它目的、特征和优点能更明显易懂，下文特举较佳实施例，并配合附图，作详细说明如下。

附图说明

图1为RT-PCR克隆得到的IBP基因片段的琼脂糖凝胶电泳图谱, 其中M为DNA Marker DL2000, 泳道1~4为PCR扩增的IBP基因片段。

图2A为pGEX-KG/IBP质粒双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳的图谱, 其中M为DNA Marker III, 泳道1~3为pGEX-KG/IBP质粒双酶切, 泳道4为pGEX-KG/IBP质粒。

图2B为pET-32a/IBP质粒双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳的图谱, 其中M为DNA Marker DL2000, 泳道1~2为pET-32a/IBP质粒双酶切, 泳道3为pET-32a/IBP质粒。和pET-32a/IBP。

图3为重组蛋白pGEX-KG/IBP和pET-32a/IBP SDS-PAGE电泳鉴定图谱, 其中泳道1为中科院预染蛋白Marker, 泳道2为pET-32a/IBP/BL21未诱导, 泳道3为pET-32a/IBP/BL21诱导, 泳道4为His/IBP阴离子层析纯化, 泳道5为His/IBP His亲和层析纯化, 泳道6为pGEX-KG/IBP/BL21未诱导, 泳道7为pGEX-KG/IBP/BL21诱导, 泳道8为GST/IBP阴离子层析纯化, 泳道9为GST/IBP GST亲和层析纯化。

具体实施方式

定义: 本发明中, 除非另有定义, 所用的所有科技术语的含义与本发明所属领域的技术人员通常所理解的含义相同。

本申请所用的命名和下述的实验方法是本领域所众所周知的和常用的。

重组核酸方法, 微生物培养及转化中使用的是标准技术, 一般根据厂商的具体说明进行。一般根据本领域的常规方法和贯穿本文提供的一般性的参考文献(参见 Sambrook 等, 分子克隆: 实验指南, 第三版(2001), 冷泉港)进行技术和方法。

本发明中所用的命名和下述的分析化学、有机物合成化学和药液配制实验室方法是本领域众所周知和常用的。

化学合成、化学分析、药液配制和传递以及患者的诊断和治疗使用的是标准技术。

本发明中所用术语“序列同源性”描述了两个核酸之间碱基配对的比例或

两个氨基酸序列之间的氨基酸配对的比例。当序列同源性以百分比，如 85% 表示时，百分比表示与一些其它序列相比，IBP 序列整个长度配对的比例。

缺口（两个序列中的任一个中）是允许的，这样可使配对最大化；本发明所述“基本上纯的”指的使所需的物质种类是存在的占优势的种类（即在分子基础上，它的组合物中任何其它大分子的单个种类更丰富），优选基本上纯的组分是其中所需物质种类占存在的所有大分子种类的至少 50%（在分子基础上）的成分。一般而言，基本上纯的成分占组合物中存在的所有大分子种类的约 80% 以上，更优选为 85%，90% 或 90% 以上。

材料和来源

菌株和质粒：大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 和大肠杆菌表达菌株 BL21 均为申请人实验室保存，pGEX-KG 购自 Pharmacia 公司，pET-32a 购自 Novagen 公司。

酶及试剂盒：RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司，胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司，Trizol 试剂购自 Gibco/BRL，限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Sal* I 购自 Toyobo 公司，质粒抽提试剂盒购自 Promega 公司。

PCR 引物：由上海英俊公司合成。

亲和层析柱购自 Pharmacia 公司。

实施例 1 表达并分离纯化得到重组人 IBP 片段

1. RT-PCR 法获得 IBP 基因

(1) 引物设计与合成

根据 GenBank 中已发表的 IBP cDNA 序列 (SEQ ID NO: 6)：设计了两对特异引物。

设计针对 pGEX-KG 的 IBP 相对特异序列 (AA410~631) 上游引物为

SEQ ID NO: 2-5' -CGGAATTCATATGCAGGCAGATGGAG-3' (含 *EcoR* I 位点)；

下游引物为

SEQ ID NO: 3-5' -CCCAAGCTTATTTTCTGGTGCTGGATC -3' (含 *Hind* III 位点)；

针对 pET-32a 的 IBP 相对特异序列 (AA410~631) 上游引物为

SEQ ID NO: 4-5' -CGGAATTCATGCAGGCTGAGATGGA-3' (含 *EcoR* I 位点);

下游引物为

SEQ ID NO: 5-5' - GACGTCGACTATTTTCTGGTGGTGGATC-3' (含 *Sal* I 位点)。

将上述引物委托上海英俊公司进行合成。

(2) 人白细胞总 RNA 提取

淋巴细胞分离; 1. 在试管中加入适量淋巴细胞分离液。取肝素抗凝静脉血与等量 Hank's 液充分混匀, 用滴管沿管壁缓慢叠加于分层液面上。水平离心 2000rpm × 20 分钟。离心后管内分为三层, 上层为血浆和 Hank's 液, 下层主要为红细胞和粒细胞。中层为淋巴细胞分离液, 在上、中层界面处有一以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带, 用毛细血管插到云雾层, 吸取单个核细胞。置入另试管中, 加入 5 倍体积的 Hank's 液, 1500rpm × 10 分钟, 洗涤细胞两次。加入适量 Trizol 试剂, RNA 提取参见 Trizol 试剂操作手册。

(3) RT-PCR

RT-PCR 按 Promega 公司的试剂盒说明进行: 将 1 μg 外周血白细胞总 RNA 和 1 μl Oligo(dT) 引物加入到 14.2 μl DEPC 处理的水中, 70℃ 加热 5 分钟后, 冰浴 5 分钟, 再依次加入 5 μl 5× 反应缓冲液、1.25 μl dNTP、1 μl M-MLV 反转录酶、0.55 μl RNA 酶抑制剂, 终体积为 25 μl, 42℃ 2 小时, 95℃ 变性 5 分钟, -20℃ 保存。取上述 RT 产物 1 μl, 10× 反应缓冲液 5 μl, 上下游引物各 1 μl (终浓度为 50 pmol), dNTP 2 μl, Taq 酶 1 μl (2U), 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μl, ddH₂O 36.5 μl, 总体积为 50 μl。94℃ 预变性 4 分钟, 然后 94℃ 1 分钟, 55℃ 1 分钟, 72℃ 1 分钟, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 分钟, 反应结束后取 PCR 产物 10 μl 做 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 证实得到大小约为 670bp 的特异性片段 (图 1) (SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列)。

(4) IBP 目的基因的回收

紫外灯下切下含特异 PCR 产物的胶条, 放入 EP 管中称重, 加入 3 倍体积的缓冲液 QG, 50℃ 水浴 10 分钟直至胶条完全融化, 并检查颜色是否是黄色, 如为紫色或橙色, 加 10 μl 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.0), 混匀直至颜色恢复, 加入等胶条

体积的100%异丙醇（如1mg胶加1 μ l），颠倒混匀，将1个MinElute柱放入提供的2 ml收集管中，并放于架子上，将全部样品移入柱内，离心1分钟，倒出流过柱子的液体，将MinElute柱放回同一收集管中，加500 μ l缓冲液 QG于MinElute柱内，离心1分钟，倒出流过柱子的液体，将MinElute柱放回同一收集管中，加750 μ l缓冲液PE于MinElute柱内洗涤，放置5分钟后离心1分钟，倒出流过柱子的液体，离心1分钟，将MinElute柱放入1个干净的1.5 ml离心管，加10 μ l缓冲液EB于MinElute柱上的膜中心，洗脱DNA，柱子放置1分钟后离心1分钟，收集洗脱的DNA。

2. IBP重组质粒构建

将pGEX-KG载体用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切消化3小时后与回收并双酶切PCR产物用T₄ DNA连接酶4℃过夜连接，将pET-32a载体用 *SaI* I 和 *Nde* I 双酶切消化3小时后，与回收并双酶切的PCR产物用T₄ DNA连接酶4℃过夜连接。取一无菌离心管，加入已制备好的感受态DH5 α 菌200 μ l，冰浴，吸取20 μ l连接产物加入管中，转化DH5 α 菌，轻拍管壁混匀，冰浴30分钟，42℃水浴90秒，取出离心管再冰浴2分钟，加入800 μ l室温的LB培养液混匀，37℃摇床220 rpm振荡培养1小时，将菌液离心后涂于2个含氨苄青霉素抗性的LB培养板上，37℃恒温培养箱过夜培养，次日挑取白色菌落接种于了氨苄青霉素(100 μ g/ml) LB培养基扩大培养。

3. IBP重组质粒酶切鉴定

沉淀菌体，12000 rpm，离心1分钟，弃上清，尽量吸干，用150 μ l预冷的溶液 I 将上述细菌沉淀重悬，剧烈振荡，新鲜配制的溶液 II 300 μ l轻轻颠倒混匀5次，冰浴3-5分钟，使其澄清，加入预冷的溶液 III 150 μ l，轻轻混匀后冰浴10分钟，使蛋白质均匀分布于水相中，加入预冷的溶液 IV 150 μ l，轻轻混匀，12000 rpm离心10分钟。小心吸取水相（约400 μ l）移于另一1.5 ml离心管中，加入2 μ l RNaseA (10 μ g/ml)，55℃水浴10分钟。再加400 μ l Tris-酚及400 μ l 氯仿，涡振混匀，12000 rpm离心10分钟。取上清至另一装有600 μ l 异丙醇的1.5 ml离心管中，来回颠倒几次，4℃ 12000 rpm离心10分钟，弃上清。用70%乙醇1 ml洗涤DNA 2次，12000 rpm离心3分钟，弃上清，室温干燥10-20分钟，

加入TE 20 μ l溶解质粒DNA, -20°C 保存。

取pGEX-KG/IBP和pET-32a/IBP 10 μ l质粒双酶切后跑1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 均可见切下的一个大小约为670bp的特异片段, 表明质粒中已插入大小约为670 bp的片段(图2)。

4. IBP重组质粒插入片断测序

将两个重组质粒送往上海英俊公司测序, 并应用Blast软件将测序结果与GenBank的IBP cDNA进行同源性分析。测序的结果显示, 插入片段与GenBank中报道的IBP cDNA序列完全一致。

5. IBP片段的诱导表达及鉴定

(1) 转化BL21菌

取上次提取的重组质粒转化BL21菌, 涂布于含氨苄青霉素抗性的LB固体培养基, 37°C 培养箱过夜培养, 次日挑取白色菌落接种于LB培养基扩大培养。

(2) IBP片段的诱导表达

将扩大培养的转pGEX-KG/IBP和pET-32a/IBP重组质粒的BL21菌, 用LB固体培养基筛选单克隆菌落, 将转化菌扩大培养, 测细菌OD值达0.6-0.8时加入终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导, 按时间点2、4、6、8、10、12小时收集诱导的细菌。结果表明, IPTG诱导的细菌出现分子量约为53kD和46kD的特异性蛋白条带, 与预期重组IBP的分子量值相符, 且6小时时IBP表达量最高, 约占细菌总蛋白的30%。再将IPTG诱导6小时的BL21重组菌用裂菌液破菌, 离心后分别取上清和沉淀电泳, 未诱导的菌液和诱导6小时的菌液分别做阴性和阳性对照, 结果在上清中与阳性对照IBP片段条带相对应的位置发现特异蛋白条带, 而沉淀无此蛋白条带, 证实IBP片段为可溶性表达。

6. IBP重组蛋白的纯化

1) 诱导表达转化有 pGEX-KG/IBP 重组质粒的 BL21。 4°C 离心收集细菌。以阴离子交换层析A液重悬沉淀, 冰浴超声破碎后 4°C 离心, 用0.45 μm 滤膜过滤后留待上柱。

结合缓冲液(A液): 20mmol/L Tris-HCl, pH8.0。

洗脱缓冲液 (B 液): 20mmol/L Tris-HCl, 1.0mol/L NaCl, pH8.0。

将阴离子交换层析柱 HiTrap Q 接入 AKTA Explorer, 以 100ml 洗脱缓冲液冲洗 B 道, 再以 100ml 结合缓冲液平衡 A 道, 流速 5.0ml/分钟, 至 UV280 曲线呈水平即可上样; 将上一步制备好的样品用系统泵上样, 流速 5.0ml/分钟; 上样完全后以结合缓冲液平衡至监测曲线呈水平; 随后进行梯度洗脱: 20 个柱体积内 B 液由 0% 升至 100%, 流速为 5.0ml/分钟, 收集流穿峰和洗脱峰, 将收集的产物取样进行 SDS-PAGE 电泳。选择目的条带较纯的洗脱液进行下一步纯化。

pGEX-KG/IBP 重组蛋白阴离子纯化产物再进行 GST 柱亲和层析: 配置 GST 柱所需缓冲液:

结合缓冲液 (A 液): 20mmol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, pH7.3。

洗脱缓冲液 (B 液): 50mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L 谷胱甘肽, pH8.0。

测 pGEX-KG/IBP 重组蛋白阴离子洗脱液离子强度, 根据所测值用 NaCl 调其离子强度与 GST 结合缓冲液同, 再将 pH 值调至 7.3 左右。

接入 GST 亲和层析柱 GSTrap FF, 以 A、B 液平衡各自管道, 上样, 梯度洗脱, 方法同前。

纯化产物于 12.5% SDS-PAGE 电泳鉴定。

2) 诱导表达转化有 pET-32a/IBP 重组质粒的 BL 21。4℃ 离心收集细菌。处理方式及阴离子交换层析过程同前。

将 pET-32a/IBP 重组蛋白阴离子纯化产物进行镍柱亲和层析, 配置所需缓冲液:

结合缓冲液 (A 液): 20mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, pH8.0。

洗脱缓冲液 (B 液): 20mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 0.5 mol/L 咪唑, pH8.0。

测 pET-32a/IBP 重组蛋白阴离子洗脱液离子强度, 根据所测值用 NaCl 调其离子强度与镍柱结合缓冲液同。

接入硫酸镍处理后的 his 亲和层析柱 HiTrap chelating HP, 以 A、B 液平

衡各自管道，将调整好的阴离子纯化产物上样，梯度洗脱。12.5% SDS-PAGE 电泳鉴定。（图3）

7. IBP重组蛋白浓度。

(1) Lowry法(Folin酚法)测定IBP片段质含量

制备标准曲线:

	空白管	标准管 1	标准管 2	标准管 3	标准管 4	标准管 5
标准蛋白液 (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 (ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
试剂甲 (ml)	5.0 (室温放置 10 分钟)					
试剂乙 (ml)	0.5 (迅速混匀, 反应 30 分钟)					

在 650 nm 波长下，以空白管为对照调零，分别测定各管的吸光度，以蛋白浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，只作标准曲线。

将待测蛋白稀释后，紫外分光光度计测定 A_{260} 值和 A_{280} 值。根据公式，蛋白浓度 $C = (1.45 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}) \times \text{稀释倍数}$ ，计算出待测蛋白的粗略浓度，然后将蛋白样品用蒸馏水稀释至25-250 μg 范围，按照上表的操作程序反应，测定出650 nm吸光度值，然后在标准曲线上查出相应的浓度，在乘以稀释倍数计为待测蛋白的浓度，多管计算平均值，测得pGEX-KG/IBP浓度为1.0 mg/ml，pET-32a/IBP为0.6 mg/ml。

虽然本发明已以较佳实施例披露如上，然其并非用以限定本发明，任何所属技术领域的技术人员，在不脱离本发明的精神和范围内，当可作些许的更动与改进，因此本发明的保护范围当视权利要求所界定者为准。

序列表

<110> 中国人民解放军第三军医大学

<120> 重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白表达体系及制备方法与应用

<130> 8P99015-CN

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 666

<212> DNA

<213> 重组人干扰素调节因子 4 结合蛋白基因片段序列

<400> 1

```
atgcaggctg agatggagct gaaggaggag gaggtgccc ggcagcggca gcgcatcaag      60
gagctggagg agatgcagca gcggttgtag gaggccctgc aactagaggt gaaagctcgg      120
cgagatgaag aatctgtgcg aatcgctcag accagactgc tggaagagga ggaagagaag      180
ctgaagcagt tgatgcagct gaaggaggag caggagcgtg acatcgaacg ggcgcagcag      240
gagaaggaag agctgcagca ggagatggca cagcagagcc gtcacctgca gcaggcccag      300
cagcagctgg aggaggtgcg gcagaaccgg cagagggctg acgaggatgt ggaggctgcc      360
cagagaaaac tgcgccaggc cagcaccaac gtgaaacact ggaatgtcca gatgaaccgg      420
ctgatgcata caattgagcc tggagataag cgtccgggtca ccagcagctc cttctcaggc      480
ttccagcccc ctctgcttgc ccaccgtgac tcctccctaa agcgcctgac ccgctgggga      540
tcccagggca acaggacccc ctgcccacac agcaatgagc agcagaagtc cctcaatggt      600
ggggatgagg ctcttgcacc ggcttccacc cctcaggaag ataaactgga tccagcacca      660
gaaaat
```

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 针对 pGEX-KG 的干扰素调节因子 4 结合蛋白相对特异序列 (AA410~631) 上游引物序列

<400> 2

```
cggaattcat atgcaggcag atggag      26
```

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 针对 pGEX-KG 的干扰素调节因子 4 结合蛋白相对特异序列 (AA410~631) 下游引物序列

<400> 3

cccaagctta ttttctggtg ctggatc

27

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 针对 pET-32a 的干扰素调节因子 4 结合蛋白相对特异序列 (AA410~631) 上游引物序列

<400> 4

cggaattcat gcaggctgag atgga

25

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> 针对 pET-32a 的干扰素调节因子 4 结合蛋白相对特异序列 (AA410~631) 下游引物序列

<400> 5

gacgtcgact attttctggt gctggatc

28

<210> 6

<211> 2280

<212> DNA

<213> GenBank 中已发表的干扰素调节因子 4 结合蛋白 cDNA 序列

<400> 6

tggccctgcg caaggaactg ctcaagtcca tctggtacgc ctttaccgcg ctggacgtgg	60
agaagagtgg caaagtctcc aagtcaccagc tcaaggtgct gtcccacaac ctgtacacgg	120
tcctgcacat ccccatgac cccgtggccc tggaggaaca cttccgagat gatgatgacg	180
gccctgtgtc cagccaggga tacatgccct acctcaacaa gtacatcctg gacaaggtgg	240
aggagggggc ttttgttaaa gagcactttg atgagctgtg ctggacgctg acggccaaga	300
agaactatcg ggcagatagc aacgggaaca gtatgctctc caatcaggat gccttcgcgc	360
tctggtgcct cttcaacttc ctgtctgagg acaagtaccc tctgatcatg gttcctgatg	420
aggtggaata cctgctgaaa aaggtactca gcagcatgag cttggaggtg agcttgggtg	480
agctggagga gcttctggcc caggaggccc aggtggccca gaccaccggg gggctcagcg	540
tctggcagtt cctggagctc ttcaattcgg gccgctgcct gcggggcgtg ggccgggaca	600
ccctcagcat ggccatccac gaggtctacc aggagctcat ccaagatgtc ctgaagcagg	660

gctacctgtg	gaagcgaggg	cacctgagaa	ggaactgggc	cgaacgctgg	ttccagctgc	720
agcccagctg	cctctgctac	tttgggagtg	aagagtgcaa	agagaaaagg	ggcattatcc	780
cgctggatgc	acactgctgc	gtggaggtgc	tgccagaccg	cgacggaaag	cgctgcatgt	840
tctgtgtgaa	gacagccacc	cgcacgtatg	agatgagcgc	ctcagacacg	cgccagcgcc	900
aggagtggac	agctgccatc	cagatggcga	tccggctgca	ggccgagggg	aagacgtccc	960
tacacaagga	cctgaagcag	aaacggcgcg	agcagcggga	gcagcgggag	cggcgccggg	1020
cggccaagga	agaggagctg	ctgcggctgc	agcagctgca	ggaggagaag	gagcgggaagc	1080
tgcaggagct	ggagctgctg	caggaggcgc	agcggcaggc	cgagcggctg	ctgcaggagg	1140
aggaggaacg	gcgccgcagc	cagcaccgcg	agctgcagca	ggcgctcgag	ggccaactgc	1200
gcgaggcgga	gcaggcccgg	gcctccatgc	aggctgagat	ggagctgaag	gaggaggagg	1260
ctgcccggca	gcggcagcgc	atcaaggagc	tggaggagat	gcagcagcgg	ttgcaggagg	1320
ccctgcaact	agaggtgaaa	gctcggcgag	atgaagaatc	tgtgcgaatc	gctcagacca	1380
gactgctgga	agaggaggaa	gagaagctga	agcagttgat	gcagctgaag	gaggagcagg	1440
agcgcctacat	cgaacgggcg	cagcaggaga	aggaagagct	gcagcaggag	atggcacagc	1500
agagccgctc	cctgcagcag	gcccagcagc	agctggagga	ggtgcggcag	aaccggcaga	1560
gggctgacga	ggatgtggag	gctgcccaga	gaaaactgcg	ccaggccagc	accaacgtga	1620
aacactggaa	tgtccagatg	aaccggctga	tgcatccaat	tgagcctgga	gataagegtc	1680
cggtcaccag	cagctccttc	tcaggettcc	agccccctct	gcttgcccac	cgtgactcct	1740
ccctaaagcg	cctgaccgcg	tggggatccc	agggcaacag	gacccccctg	cccaacagca	1800
atgagcagca	gaagtccctc	aatggtgggg	atgaggctcc	tgccccggct	tccacccctc	1860
aggaagataa	actggatcca	gcaccagaaa	attagcctct	cttagccccct	tgttcttccc	1920
aatgtcatat	ccaccaggac	ctggccacag	ctggcctgtg	ggtgatccca	gctcttacta	1980
ggagaggggag	ctgaggtcct	ggtgccaggg	gcccaggccc	tccaaccata	aacagtccag	2040
gatggaacct	ggttcaccct	tcataccagc	tccaagcccc	agaccatggg	agctgtcttg	2100
gatgttgatc	cttgagaact	tggccctgtg	ctttagacct	aaggaccgga	ttcctgggct	2160
aggaaagaga	gaacaagcaa	gccggggcta	cctgccccca	ggtggccacc	aagttgtgga	2220
agcacatttc	taaataaaaa	ctgctcttag	aatgaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	2280

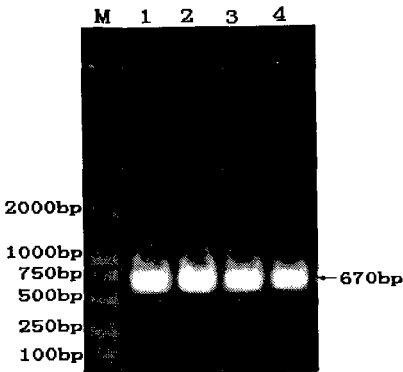


图 1

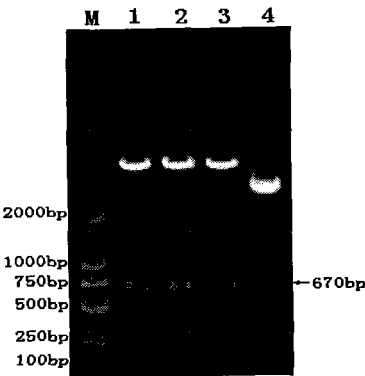


图 2A

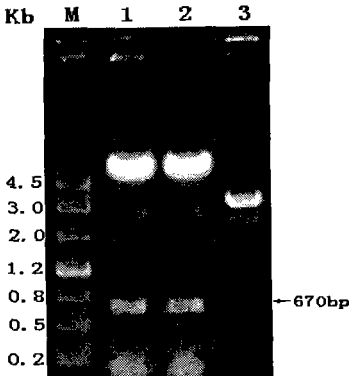


图 2B

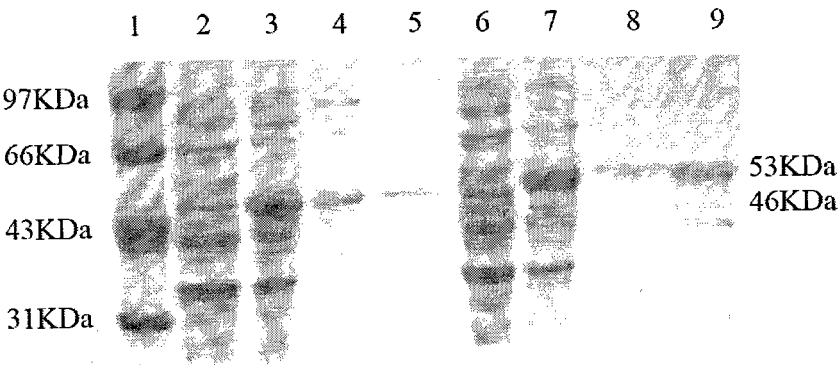


图 3

专利名称(译)	重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系及制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101225391A	公开(公告)日	2008-07-23
申请号	CN200810069366.9	申请日	2008-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
[标]发明人	张竹君 胡川闽 李鹏 陈安 李淑慧		
发明人	张竹君 胡川闽 李鹏 陈安 李淑慧		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/63 C07K14/435 A61K38/17 A61P37/00 A61P35/00 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系，该表达体系包含表达载体和干扰素调节因子4结合蛋白基因片段，其中所述的干扰素调节因子4结合蛋白基因片段具有SEQ ID NO：1所示的核苷酸序列；本发明还涉及上述的重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系的制备方法；本发明的重组人干扰素调节因子4结合蛋白表达体系表达的重组人干扰素调节因子4结合蛋白可用于制备免疫检测用试剂盒或治疗癌症或自身免疫性疾病的药物。利用本发明所述表达体系制备的重组IBP为抗原免疫动物制备的抗IBP抗体或直接检测IBP核酸的试验。

