

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410044211.1

[51] Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 1 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 100451114C

[22] 申请日 2004.5.13

[21] 申请号 200410044211.1

[30] 优先权

[32] 2003.9.19 [33] CN [31] 03127172.3

[73] 专利权人 东北师范大学

地址 130024 吉林省长春市人民大街 5268 号

[72] 发明人 王 丽

[56] 参考文献

Multiple Display of Foreign Peptides on a Filamentous Bacteriophage Peptides from Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein as Antigens. Judith Greenwood et al. J. Mol. Biol., Vol. 220 . 1991

白色念珠菌热休克蛋白 90. 王丽, 朱筱娟. 科学通报, 第 44 卷第 23 期. 1999

多肽在丝状噬菌体外壳蛋白上的展示. 王丽. 东北师大学报自然科学版, 第 1 期. 1998

审查员 于 娜

[74] 专利代理机构 长春市东师专利事务所

代理人 赵 军 刘延军

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

一种白色念珠菌热休克蛋白 90 表位与噬菌体外壳蛋白的杂合蛋白及其用途

[57] 摘要

一种白色念珠菌热休克蛋白 90 表位与噬菌体外壳蛋白的杂合蛋白及其用途; 本专利属于生物工程中的 DNA 重组技术领域。利用基因工程技术, 将白色念珠菌热休克蛋白 90 表位基因片段 (LKVIRK) 插入到整合有丝状噬菌体主要外壳蛋白基因的载体中, 构建成新的重组载体。在宿主菌中, 表位基因产物被分泌到细胞外, 并组装于噬菌体外壳蛋白中, 形成杂合蛋白。1) 杂合蛋白可以作为一种抗原与患系统性白色念珠菌感染者血清中的抗体产生免疫应答。2) 杂合蛋白在小鼠体产生了较好的体液免疫和细胞免疫。3) 杂合蛋白在白色念珠菌感染模型鼠的免疫保护和预防实验中表现出保护作用。所以, 这种杂合蛋白可以用来制备诊断、预防和治疗系统性白色念珠菌感染的药品。

1、一种白色念珠菌热休克蛋白 90 C 表位与噬菌体外壳蛋白的杂合蛋白，其特征在于将白色念珠菌热休克蛋白 90 C 表位展示于丝状噬菌体主要外壳蛋白表面，形成杂合蛋白，其中，所述白色念珠菌热休克蛋白 90 C 表位的氨基酸序列为 LKVIRK，所述杂合蛋白的氨基酸序列为：

Met	Lys	Lys	Ser	Leu	Val	Leu	Lys	Ala	Ser	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Leu
1				5				10						15	
Val	Pro	Met	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Glu	Gly	Leu	Lys	Val	Ile	Arg	Lys
			20					25					30		
Ser	Asn	Asp	Pro	Ala	Lys	Ala	Ala	Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Ala	Ser	Ala
			35					40					45		
Thr	Glu	Tyr	Ile	Gly	Tyr	Ala	Trp	Ala	Met	Val	Val	Val	Ile	Val	Gly
			50					55					60		
Ala	Thr	Ile	Gly	Ile	Lys	Leu	Phe	Lys	Lys	Phe	Thr	Ser	Lys	Ala	Ser
65						70				75					80 。

2、如权利要求 1 所述的杂合蛋白，其特征为这种杂合蛋白的核苷酸序列为：

atg aaa aag tct tta gtc ctc aaa gcc tcc gta gcc gtt gct acc ctc	48
gtt ccg atg ctg tct ttc gcc gcg gag ggt ctg aaa gtt atc aga aaa	96
tcg aac gat cct gca aaa gcg gcc ttt gac tcc ctg caa gcc tca gcg	144
acc gaa tat atc ggt tat gcg tgg gcg atg gtt gtt gtc att gtc ggc	192
gca act atc ggt atc aag ctg ttt aag aaa ttc acc tcg aaa gca agc	240 。

3、如权利要求 1 所述的杂合蛋白在制备检测系统性白色念珠菌感染者血清中抗体的试剂中的应用。

4、如权利要求 1 所述的杂合蛋白在制备治疗和预防系统性白色念珠菌感染的药物的应用。

一种白色念珠菌热休克蛋白 90 表位与噬菌体外壳蛋白的杂合蛋白及其用途

技术领域

本专利属于生物工程中的 DNA 重组技术领域。

背景技术

白色念珠菌是一种最常见的条件致病菌，其深层(系统)感染，即系统性白色念珠菌感染危及病人的生命，在使用抗真菌药物进行治疗的情况下，死亡率仍很高。白色念珠菌感染近二十多年来一直处于临床真菌感染的第一位。研究报道表明，艾滋病、癌症、肝病晚期和大量应用抗菌素的患者均易感染白色念珠菌，是被称为免疫系统薄弱病人的一个共同致死原因之一。目前，由于缺乏有效的诊断试剂和治疗药物，系统性白色念珠菌感染仍然威胁着人类的健康。

系统性白色念珠菌感染没有明显的临床特征，使临床医生无法在早期发现。目前，主要的诊断方法是利用血培养，这种方法不仅费时，操作繁琐，而且灵敏性低。在治疗方面，主要采用抗真菌药物治疗，抗真菌药物不仅价钱贵，而且具有很大的副作用，如容易引起肾功能衰竭等。免疫疗法被认为是治疗真菌感染的有效途径。

发明内容

本发明的目的是确立一种能够用于制备系统白色念珠菌感染临床检测，治疗和预防的药物的生物制品。

采用噬菌体展示技术，将一种白色念珠菌热休克蛋白 90 的抗原表位基因重组到一种整合有噬菌体主要外壳蛋白基因的表达式中，形成重组载体。利用 CaCl_2 法将重组载体导入大肠杆菌 TG1 宿主细胞中。外源基因在宿主细胞内表达，与噬菌体外壳蛋白一起组装而形成一种杂合蛋白，并随噬菌体分泌到细胞外。利用生物化学方法提取和纯化展示有表位的杂合蛋白。

本发明的杂合蛋白是含有白色念珠菌热休克蛋白 90 表位 (LKVIRK) 的丝状噬菌体基因 8 杂合外壳蛋白。这种杂合蛋白基因的核苷酸序列为：

atg aaa aag tct tta gtc ctc aaa gcc tcc gta gcc gtt gct acc ctc 48

```

gtt ccg atg ctg tct ttc gcc gcg gag ggt ctg aaa gtt atc aga aaa      96

tcg aac gat cct gca aaa gcg gcc ttt gac tcc ctg caa gcc tca gcg      144

acc gaa tat atc ggt tat gcg tgg gcg atg gtt gtt gtc att gtc ggc      192

gca act atc ggt atc aag ctg ttt aag aaa ttc acc tcg aaa gca agc      240

```

这种杂合蛋白的氨基酸序列为：

```

Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu
1           5           10           15
Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Ala Glu Gly Leu Lys Val Ile Arg Lys
          20           25           30
Ser Asn Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asp Ser Leu Gln Ala Ser Ala
          35           40           45
Thr Glu Tyr Ile Gly Tyr Ala Trp Ala Met Val Val Val Ile Val Gly
          50           55           60
Ala Thr Ile Gly Ile Lys Leu Phe Lys Lys Phe Thr Ser Lys Ala Ser
65           70           75           80

```

这种杂合蛋白的制备包括以下步骤：

第一步，合成表位基因

该基因为编码白色念珠菌热休克蛋白 90 的一种表位（IKVIRK）的基因。可以利用商业公司的 DNA 合成仪进行合成。

第二步，构建重组载体

原始质粒为已公开质粒 pfd8SHS（一种整合有丝状噬菌体主要外壳蛋白基因的表达性载体）[分子科学学报，2000：16（3）184—186]。用两种限制性内切酶处理原始质粒，然后将人工合成的寡核苷酸片段插入到经酶处理的质粒载体，获得重组载体 pfd8C。

第三步，将重组载体转入宿主细胞。宿主细胞为带有 F 因子的大肠菌株 TG1 菌株。获得的转化体为新的工程菌株，TG1C。

第四步，制备杂合蛋白。培养工程菌株，经过离心、沉淀等步骤可获得该发明的杂合蛋白。

1. 作为制备检测系统性白色念珠菌感染的新生物制品

酶联免疫检测表明，杂合蛋白可以作为一种抗原与患系统性白色念珠菌感染者血清中的抗体产生免疫应答。检测阳性率达到90%以上。

2. 作为制备治疗和预防系统性白色念珠菌感染药物的新生物制品，用于系统性白色念珠菌感染的免疫治疗。

杂合蛋白在小鼠体产生了较好的体液免疫和细胞免疫：

1] 用 ELISA 和 Western blot 方法检测了免疫后小鼠血清中抗体的变化和特异性。结果表明：杂合蛋白刺激小鼠产生了抗白色念珠菌热休克蛋白 90 表位的特异性抗体。

2] 用 ^3H -TdR 掺入法和流式细胞仪检测表明杂合蛋白免疫小鼠体内的细胞免疫变化。结果表明，NK 细胞的杀伤活性、胸腺细胞自然增生能力和淋巴细胞转化能力均得到明显增强，并增强了胸腺、脾和外周血中 CD3^+ 、 CD4^+ 和 CD8^+ 淋巴细胞的表达。

3] 杂合蛋白在白色念珠菌模型鼠的免疫预防和治疗试验中表现出较好的作用：实验表明：杂合蛋白能够推迟感染的发生时间，推迟时间达 5—7 天。提高了小鼠的存活率，存活率提高了约 30%

具体实施方式：

1. 表位基因的合成：

利用商业生物公司的 DNA 合成仪进行表位基因片段。该基因的核苷酸序列为：

5' — CTG AAA GTT ATC AGA AAA — 3'

2. 重组载体的构建

利用质粒 pfd8SHS 为原始质粒，进行重组载体的构建。

1) 利用限制性内切酶处理原始质粒 pfd8SHS。

2) 将酶切后的载体与人工合成的外源 DNA 片段按摩尔浓度 1：3 混合。

3) 10 μL 混合液加入 0.5 μL T_4 DNA 连接酶和 1 μL 缓冲液。在 15-20℃ 条件下过夜，获得重组载体 (pfd8C)。

3. 制备感受态细胞

将 TG1 细胞培养于 LB 培养基上, 37℃ 培养 16-20 小时。挑选单菌落接种于 2ml LB 液培养基中, 37℃ 培养过夜。培养液转入 100ml 新鲜 LB 培养液中, 37℃ 培养 5 小时。5000rpm 离心 15 分钟, 放入 42—43℃ 水浴中 90 秒, 然后迅速转入冰水浴中 10 分钟。用 8ml 预冷的 0.1 mol/L CaCl_2 悬浮沉淀, 获感受态细胞。

4. 重组载体转化宿主细胞

取浓度约为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的重组载体 DNA 溶液 1.25 μL ; 加入 100 μL 的感受态细胞, 置于碎冰中 15 分钟; 加入 600 μL LB 培养液, 置于 37℃ 恒温条件培养 1 小时; 10000rpm 离心 5 分钟; 弃上清, 将剩余部分涂于含氨苄青霉素的 LB 培养基表面, 37℃ 恒温箱中培养过夜。选在培养平面生长的单菌落, 进行扩大培养和低温保存 (-70℃)。

5. 杂合蛋白的制备

取冻存的转化细胞在 LB 平板上划线培养, 过夜; 选单菌落接种于含氨苄青霉素的 3ml LB 培养液中, 37℃ 培养过夜; 将培养液转入 80-100ml LB 培养液中继续培养, 37℃ 培养 30 分钟; 离心 10 分钟; 沉淀用培养液重新悬浮, 37℃ 培养数小时; 离心 20 分钟, 弃上清, 用 TE 液悬浮沉淀; 离心 20 分钟, 取上清, 并加入 20% 聚乙二醇和 2.5mol/L 氯化钠。冷环境中放置数小时, 离心 10 分钟; 弃上清, 用 TE 液悬浮沉淀, 获得有外源多肽展示的丝状噬菌体杂合外壳蛋白。

7. 制备的杂合蛋白的检测

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行蛋白的纯度检测

将待测蛋白样品在沸水中处理 3-5 分钟。按常规方法进行电泳。电泳后, 用硝酸银染色法对胶板进行染色。如果杂合蛋白表达成功, 胶板上出现两条带。上方带为杂合蛋白带, 下方为野生型丝状噬菌体外壳蛋白带。

8. 免疫学实验

1) 抗体检测试验

利用酶联免疫方法, 以杂合蛋白作为抗原进行患系统性白色念珠菌感染者血清中的抗体的检测。

酶标板以每孔 0.5-1 μg 包被抗原。酶标二抗使用辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG。按常规方法进行抗体检测。

2) 动物体的体液免疫和细胞免疫试验

选择 18—20 克 C57BL/6J 小鼠数十只, 雌雄各半, 随机分组(实验组及对照组), 进行腹

腔注射给药（杂合蛋白）。各组均免疫三次，第一次和第二次免疫间隔时间为 14 天，第二次和第三次免疫间隔时间为 10 天，分别在第一次免疫后的 2、4、6、8 周进行尾部采血，用 ELISA 方法检测小鼠体内抗体的变化。另一部分实验是在免疫小鼠 4 周后处死小鼠，利用 ^3H -TdR 掺入法和流式细胞仪检测进行各项免疫指标的测定。

3) 动物免疫预防试验

用杂合蛋白免疫小鼠后，于右后肢外侧皮下接种白色念珠菌细胞。在接种后的第 10 天开始观察，并且每隔 3 天测量肿瘤体积，计算存活率。

4) 动物免疫治疗试验

于右后肢外侧皮下接种白色念珠菌细胞，用杂合蛋白免疫小鼠，共 3 次。观测各组小鼠的存活率。

专利名称(译)	一种白色念珠菌热休克蛋白90表位与噬菌体外壳蛋白的杂合蛋白及其用途		
公开(公告)号	CN100451114C	公开(公告)日	2009-01-14
申请号	CN200410044211.1	申请日	2004-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	东北师范大学		
申请(专利权)人(译)	东北师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北师范大学		
[标]发明人	王丽		
发明人	王丽		
IPC分类号	C12N15/11 C12N15/62 G01N33/53 A61K38/16 C07K19/00		
代理人(译)	赵军 刘延军		
审查员(译)	于娜		
优先权	03127172.3 2003-09-19 CN		
其他公开文献	CN1570104A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种白色念珠菌热休克蛋白90表位与噬菌体外壳蛋白的杂合蛋白及其用途；本专利属于生物工程中的DNA重组技术领域。利用基因工程技术，将白色念珠菌热休克蛋白90表位基因片段(LKVIRK)插入到整合有丝状噬菌体主要外壳蛋白基因的载体中，构建成新的重组载体。在宿主菌中，表位基因产物被分泌到细胞外，并组装于噬菌体外壳蛋白中，形成杂合蛋白。1) 杂合蛋白可以作为一种抗原与患系统性白色念珠菌感染者血清中的抗体产生免疫应答。2) 杂合蛋白在小鼠体产生了较好的体液免疫和细胞免疫。3) 杂合蛋白在白色念珠菌感染模型鼠的免疫保护和预防实验中表现出保护作用。所以，这种杂合蛋白可以用来制备诊断、预防和治疗系统性白色念珠菌感染的药品。