



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111320684 A

(43)申请公布日 2020.06.23

(21)申请号 201811525532.1

C12N 5/10(2006.01)

(22)申请日 2018.12.13

G01N 33/53(2006.01)

(71)申请人 中国科学院脑科学与智能技术卓越
创新中心

地址 200031 上海市徐汇区岳阳路320号

申请人 复旦大学附属华山医院

(72)发明人 竺淑佳 谢春 张金宝 宋楠
崔恒祥 邓波 陈向军

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陈静

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页

序列表6页 附图3页

(54)发明名称

人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的GluN1/
GluN2A四聚体的表达及其应用

(57)摘要

本发明涉及人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的GluN1/GluN2A四聚体的表达及其应用。本发明揭示了N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位GluN1和GluN2A跨膜及胞外区的一些位点与其重组表达的稳定性、抗原-抗体结合活性密切相关。在进行所述突变的基础上,仅需要获取突变体的跨膜及胞外区进行重组表达,就可以获得稳定表达且空间结构理想的聚合体形式的N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体,本发明解决了此类蛋白不稳定或抗体结合能力差的问题。

1. 人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体,其特征在于,其包括选自下组的亚单位突变体或其聚合体:

(a) 亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体,其对应于SEQ ID N0:1,第612位突变为精氨酸;

(b) 亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体,其对应于SEQ ID N0:2,第656-657位突变为精氨酸;

(c) 包含(a)所述的亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体和(b)所述的亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体的聚合体。

2. 如权利要求1所述的突变体,其特征在于,其还包括选自下组的亚单位突变体或其聚合体:

(d) 将(a)或(b)突变体的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有(a)蛋白功能的由(a)衍生的蛋白,但对应于SEQ ID N0:1的第612位或SEQ ID N0:2的第656-657位的氨基酸为精氨酸;

(e) 与(a)或(b)的突变体的氨基酸序列有80%以上同源性且具有(a)蛋白功能的由(a)衍生的蛋白,但对应于SEQ ID N0:1的第612位或SEQ ID N0:2的第656-657位的氨基酸为精氨酸;

(f) 包含选自(a)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体和(b)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体的聚合体。

3. 如权利要求1所述的突变体,其特征在于,所述的聚合体为四聚体;较佳地为:两个GluN1亚单位突变体、两个GluN2A亚单位突变体构成的四聚体。

4. 分离的多核苷酸,其特征在于,所述的多核苷酸编码权利要求1~3任一所述的突变体。

5. 一种表达构建体或载体,其特征在于,它含有权利要求4所述的多核苷酸。

6. 如权利要求5所述的表达构建体或载体,其特征在于,所述的载体为适合真核细胞表达的杆状病毒载体。

7. 如权利要求5所述的表达构建体或载体,其特征在于,其含有权利要求4所述的多核苷酸,以及与之操作性连接的:3C蛋白酶编码基因,报告基因,和/或纯化标签编码基因;较佳地,所述的3C蛋白酶编码基因位于权利要求3所述的多核苷酸的3'端。

8. 一种遗传工程化的宿主细胞,其特征在于,它含有权利要求5~7任一所述的载体,或基因组中整合有权利要求4所述的多核苷酸。

9. 如权利要求8所述的宿主细胞,其特征在于,所述的细胞为能被杆状病毒感染且表达外源蛋白的细胞。

10. 一种生产权利要求1~3任一所述的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体的方法,其特征在于,包括步骤:

(1) 培养权利要求8或9所述的宿主细胞,获得培养物;和

(2) 从培养物中分离权利要求1~3任一所述的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体。

11. 人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体的用途,用于作为抗原,特异性检测抗人源N-甲基-D-天冬氨酸抗体;或,用于制备诊断抗NMDA受体抗体阳性相关疾病的试剂或试剂盒;其中,该人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体为:包含选自(a)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体和(b)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN2A跨膜及胞外区突

变体的聚合体；较佳地，该聚合体为四聚体。

12. 一种提高重组的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的稳定性及表达量的方法，其特征在于，所述方法包括：获得野生型人源N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位GluN1跨膜及胞外区，将其第612位突变为精氨酸；以及获得野生型人源N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位GluN2A跨膜及胞外区，将其第656-657位突变为精氨酸。

13. 如权利要求12所述的方法，其特征在于，还包括：使该两个亚单位形成聚合体；较佳地，该聚合体为四聚体。

14. 一种用于特异性检测抗人源N-甲基-D-天冬氨酸抗体或用于诊断抗NMDA受体抗体阳性相关疾病的试剂盒，其特征在于，其中包含：

权利要求1~3任一所述的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体；或

权利要求4所述的多核苷酸；或

权利要求5~7任一所述的表达构建体或载体；或

权利要求8或9所述的宿主细胞。

15. 如权利要求14所述的试剂盒，其特征在于，其中还包括：固相载体，用于包被抗原，或该固相载体上已经包被了抗原；其中，该抗原为权利要求1所述的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体，其包含选自(a)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体和(b)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体的聚合体；较佳地，该聚合体为四聚体。

16. 一种特异性检测抗人源N-甲基-D-天冬氨酸抗体的方法，其特征在于，包括：(1) 提供权利要求1所述的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体，其包含选自(a)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体和(b)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体的聚合体；较佳地，该聚合体为四聚体；和

(2) 以(1)的突变体为抗原，对样品中抗人源N-甲基-D-天冬氨酸受体抗体的存在情况进行检测；若发生抗原-抗体特异性结合，则表明样品中存在抗人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的抗体。

17. 如权利要求16所述的方法，其特征在于，所述的方法包括：酶联免疫吸附法，免疫沉淀法，原位杂交法，斑点杂交法，芯片法。

人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的GluN1/GluN2A四聚体的表达 及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,更具体地,本发明涉及膜蛋白N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate,NMDA)受体的GluN1/GluN2A四聚体的重组表达载体构建、表达纯化方法、及其作为抗原应用基于抗原-抗体结合原理,用于抗NMDA抗体检测的应用。

背景技术

[0002] N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate,NMDA)受体是一类广泛存在于大脑兴奋性突触中的离子型谷氨酸受体。NMDA受体对钙离子具有高通透性,并在突触传递及突触可塑性中扮演重要作用,是学习和记忆的重要分子开关。其功能异常可引起一系列中枢神经系统疾病,包括中风、抑郁症、慢性疼痛、精神分裂症及阿尔兹海默症等,因此NMDA受体是药物设计靶点之一。NMDA受体通常组成异源四聚体膜蛋白,由两个必需GluN1和两个可变GluN2(2A到2D四类亚型)亚基组成。每个亚基由胞外的N末端结构域(N-Terminal Domain,简称NTD)和激动剂结合结构域,跨膜结构域,及胞内的C末端结构域构成。

[0003] 国外学者Vitaliani于2005年在年轻女性患者体内发现了一种抗原,主要存在于海马神经元细胞膜中的新型疾病,这部分年轻女性均为良性畸胎瘤,并认为这可能是一种新型的边缘叶副肿瘤性脑炎(Vitaliani R et al., 2005)。这种脑炎的病情紧急,有潜在的致死风险,需要长期接受监护治疗,但是通过肿瘤切除术以及免疫治疗后,大部分患者均康复出院。2007年,国外学者Dalmau同样在良性畸胎瘤患者中发现了海马以及前额叶神经细胞膜的抗N-甲基-D天冬氨酸受体(NMAD)抗体,并将其命名为抗NMDA受体脑炎(Dalmau J et al., 2007)。抗NMDA受体脑炎是一种由针对脑内NMDA受体的自身抗体引起的自身免疫综合征(Dalmau J et al., 2007)。抗NMDA受体脑炎患者的IgGs识别GluN1亚基的细胞外N末端结构域(N-Terminal Domain,简称NTD),而NTD能调节NMDA受体离子通道功能,包括通道开放概率、失活率和变构调节等(Gleichman A et al., 2012; Zhu S et al., 2013)。因此,该类脑炎患者会出现一些精神和神经症状包括记忆力丧失、精神病、幻觉、癫痫、自主神经系统功能障碍等(Armangue T et al., 2013; Dalmau J et al., 2008);同时也有文献报导少量抗NMDA受体脑炎患者的IgGs能识别GluN2A亚基(Dalmau J et al., 2008)。

[0004] 但是,针对抗NMDA受体阳性脑炎患者的诊断,目前还缺乏良好的试剂以及工具,普遍存在检出率低下,检出时间晚的问题,因此,本领域还需在此基础上加以改进。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供GluN1/GluN2A四聚体N-甲基-D-天冬氨酸受体的表达纯化及其应用。

[0006] 在本发明的第一方面,提供人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体,其包括选自下组的亚单位突变体或其聚合体:(a)亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体,其对应于SEQ ID NO:1,第612位突变为精氨酸;(b)亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体,其对应于SEQ ID NO:

2,第656-657位突变为精氨酸; (c) 包含 (a) 所述的亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体和 (b) 所述的亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体的聚合体。

[0007] 在一个优选例中,其还包括选自下组的亚单位突变体或其聚合体: (d) 将 (a) 或 (b) 突变体的氨基酸序列经过一个或多个(如1-20个; 较佳地1-15个; 更佳地1-10个,如5个,3个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有 (a) 蛋白功能的由 (a) 衍生的蛋白,但对应于SEQ ID NO:1的第612位或SEQ ID NO:2的第656-657位的氨基酸为精氨酸; (e) 与 (a) 或 (b) 的突变体的氨基酸序列有80%以上(较佳地85%以上; 更佳地90%以上; 更佳95%以上,如98%,99%)同源性且具有 (a) 蛋白功能的由 (a) 衍生的蛋白,但对应于SEQ ID NO:1的第612位或SEQ ID NO:2的第656-657位的氨基酸为精氨酸; (f) 包含选自 (a)、(d)-(e) 任一所述的亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体和 (b)、(d)-(e) 任一所述的亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体的聚合体。

[0008] 在另一优选例中,所述的聚合体为四聚体; 较佳地为: 两个GluN1亚单位突变体、两个GluN2A亚单位突变体构成的四聚体。

[0009] 在本发明的另一方面,提供分离的多核苷酸,所述的多核苷酸编码所述的突变体。

[0010] 在本发明的另一方面,提供一种表达构建体或载体,它含有所述的多核苷酸。

[0011] 在一个优选例中,所述的载体为适合真核细胞表达的杆状病毒载体。

[0012] 在另一优选例中,所述的表达构建体或载体含有所述的多核苷酸,以及与之操作性连接的: 3C蛋白酶编码基因,报告基因,和/或纯化标签编码基因; 较佳地,所述的3C蛋白酶编码基因位于所述的多核苷酸的3' 端。

[0013] 在另一优选例中,所述的纯化标签为strep标签。

[0014] 在另一优选例中,所述的报告基因为eGFP。

[0015] 在本发明的另一方面,提供一种遗传工程化的宿主细胞,它含有前面任一所述的载体,或基因组中整合有所述的多核苷酸。

[0016] 在一个优选例中,所述的细胞为能被杆状病毒感染且表达外源蛋白的细胞(如HEK293)。

[0017] 在本发明的另一方面,提供一种生产所述的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体的方法,包括步骤: (1) 培养所述的宿主细胞,获得培养物; 和 (2) 从培养物中分离所述的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体。

[0018] 在本发明的另一方面,提供人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体的用途,用于作为抗原,特异性检测抗人源N-甲基-D-天冬氨酸抗体; 或,用于制备诊断抗NMDA受体抗体阳性的相关疾病的试剂或试剂盒; 所述疾病如神经系统疾病; 较佳地为抗NMDA受体抗体阳性的脑炎,如自身免疫性脑炎; 其中,该人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体为: 包含选自 (a)、(d)-(e) 任一所述的亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体和 (b)、(d)-(e) 任一所述的亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体的聚合体; 较佳地,该聚合体为四聚体(较佳地为: 两个GluN1亚单位,两个GluN2A亚单位)。

[0019] 在本发明的另一方面,提供一种提高重组的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的稳定性及表达量的方法,所述方法包括: 获得野生型人源N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位GluN1跨膜及胞外区,将其第612位突变为精氨酸; 以及获得野生型人源N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位GluN2A跨膜及胞外区,将其第656-657位突变为精氨酸。

[0020] 在一个优选例中,所述的方法还包括:使该两个亚单位形成聚合体;较佳地,该聚合体为四聚体;较佳地所述四聚体为:两个GluN1亚单位,两个GluN2A亚单位。

[0021] 在本发明的另一方面,提供一种用于特异性检测抗人源N-甲基-D-天冬氨酸抗体或用于诊断抗NMDA受体抗体阳性相关疾病的试剂盒,其中包含:所述的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体;或所述的多核苷酸;或所述的表达构建体或载体;或所述的宿主细胞。

[0022] 在一个优选例中,其中还包括:固相载体(如载玻片,多孔板,芯片基材等),用于包被抗原,或该固相载体上已经包被了抗原;其中,该抗原为所述的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体,其包含选自(a)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体和(b)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体的聚合体;较佳地,该聚合体为四聚体。

[0023] 在本发明的另一方面,提供一种特异性检测抗人源N-甲基-D-天冬氨酸抗体的方法,包括:(1)提供所述的人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体,其包含选自(a)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN1跨膜及胞外区突变体和(b)、(d)-(e)任一所述的亚单位GluN2A跨膜及胞外区突变体的聚合体;较佳地,该聚合体为四聚体;和(2)以(1)的突变体为抗原,对样品中抗人源N-甲基-D-天冬氨酸受体抗体的存在情况进行检测;若发生抗原-抗体特异性结合,则表明样品中存在抗人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的抗体。

[0024] 在一个优选例中,所述的特异性检测抗人源N-甲基-D-天冬氨酸抗体的方法为非诊断性的方法。

[0025] 在另一优选例中,所述的方法包括但不限于:酶联免疫吸附法,免疫沉淀法,原位杂交法,斑点杂交法,芯片法。

[0026] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0027] 图1、人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的GluN1/GluN2A四聚体NMDA蛋白的可稳定表达的氨基酸编码序列。

[0028] 图2、人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的GluN1/GluN2A四聚体蛋白的纯化、及经过SDS-PAGE电泳后考马斯亮蓝染色的结果,荧光高效液相色谱(FPLC)进行质量控制的结果以及纯化的GluN1/GluN2A四聚体蛋白。左图为GluN1/GluN2A四聚体蛋白经3C蛋白酶酶切后进行分子筛纯化得到的轮廓图,右图显示纯化的NMDA受体经SDS-PAGE后进行考马斯亮蓝的染色结果。

[0029] 图3、人源N-甲基-D-天冬氨酸受体GluN1/GluN2A四聚体NMDA蛋白作为抗原,以抗原-抗体结合为原理,检测抗NMDA抗体。

[0030] 图4、(A)荧光分子筛色谱检测GluN1/GluN2A四聚体蛋白不同突变体的表达量。与野生型(N1/2A)相比,GluN1-G612R,Glu2A-E656R,Glu2A-E657R三个点突变均可以增加蛋白的表达。(B)荧光分子筛色谱检测GluN1/GluN2A四聚体的热稳定性。野生型(N1/2A)经50℃热激10分钟后(N1/2A-Heat)四聚体量明显下降,而突变体热激后下降不明显。

具体实施方式

[0031] 本发明人经过深入的研究,意外地发现N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位GluN1和GluN2A跨膜及胞外区的一些位点与其重组表达的稳定性、表达量、抗原-抗体结合活性密切相关,所述位点是亚单位GluN1的第612位,GluN2A的第656-657位。在进行所述突变的基础上,仅需要获取突变体的跨膜及胞外区进行重组表达,就可以获得稳定表达且空间结构理想的聚合体形式的N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体,解决了此类蛋白不稳定或抗体结合能力差的问题。

[0032] 如本文所用,除非另外说明,所述的“(人源)N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体”也可称为“突变型(人源)N-甲基-D-天冬氨酸受体”或“(人源)N-甲基-D-天冬氨酸受体跨膜及胞外区的突变体”,是指“(人源)N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位GluN1和/或GluN2A的跨膜及胞外区突变体”。

[0033] 若需要表示野生型的(人源)N-甲基-D-天冬氨酸受体,其将被标示为“野生型(人源)N-甲基-D-天冬氨酸受体”,或直接称为“(人源)N-甲基-D-天冬氨酸受体”。

[0034] 如本文所用,“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然的物质,原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和蛋白是没有分离纯化的,但同样的多聚核苷酸或蛋白如从天然状态中同存在的其他物质中分开,则为分离纯化的。

[0035] 如本文所用,“分离的N-甲基-D-天冬氨酸受体跨膜及胞外区突变体”是指所述N-甲基-D-天冬氨酸受体跨膜及胞外区突变体基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化该N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体。基本上纯的蛋白在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。

[0036] 如本文所用,“重组的”是指借助基因工程手段来获得(或大量制备)的蛋白、基因工程载体或细胞等。

[0037] 本发明的蛋白可以是重组蛋白、天然蛋白、合成蛋白,优选重组蛋白。本发明的蛋白可以是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。

[0038] 本发明还包括所述N-甲基-D-天冬氨酸受体跨膜及胞外区突变体的片段、衍生物和类似物。如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的N-甲基-D-天冬氨酸受体跨膜及胞外区突变体相同的生物学功能或活性的蛋白。本发明的蛋白片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的蛋白,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的蛋白,或(iii)附加的氨基酸序列融合到此蛋白序列而形成的蛋白(如前导序列或分泌序列或用来纯化此蛋白的序列或蛋白原序列,或融合蛋白)。根据本文的定义这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。然而,所述的N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体及其片段、衍生物和类似物的氨基酸序列中,对应于SEQ ID NO:1的第612位或SEQ ID NO:2的第656-657位的氨基酸为精氨酸。

[0039] 在本发明中,“N-甲基-D-天冬氨酸受体跨膜及胞外区突变体”还包括(但并不限于):若干个(通常为1-20个,更佳地1-10个,还更佳如1-8个、1-5个、1-3个、或1-2个)氨基酸

的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加或缺失一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体的活性片段和活性衍生物。但是在这些变异形式中,对应于SEQ ID NO:1的第612位或SEQ ID NO:2的第656-657位的氨基酸为精氨酸。

[0040] 本发明还提供了编码本发明N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体或其保守性变异蛋白的多核苷酸序列。

[0041] 本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

[0042] 编码所述突变体的成熟蛋白的多核苷酸包括:只编码成熟蛋白的编码序列;成熟蛋白的编码序列和各种附加编码序列;成熟蛋白的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0043] 术语“编码蛋白的多核苷酸”可以是包括编码此蛋白的多核苷酸,也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0044] 本发明还涉及上述多核苷酸的变异体,其编码与本发明有相同的氨基酸序列的蛋白或蛋白的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的,等位变异体是一个多核苷酸的替换形式,它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入,但不会从实质上改变其编码的蛋白的功能。

[0045] 本发明的N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据本发明所公开的有关核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有关序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

[0046] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0047] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

[0048] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0049] 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体,以及用本发明的载体或N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体编码序列经基因工程产生的宿主细胞,以及经重组技术产生本发明所述蛋白的方法。

[0050] 通过常规的重组DNA技术(Science, 1984; 224: 1431),可利用本发明的多聚核苷酸序列来表达或生产重组的N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体。一般来说有以下步骤:

[0051] (1). 用本发明的编码N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体的多核苷酸(或变异体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0052] (2) . 在合适的培养基中培养的宿主细胞；

[0053] (3) . 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

[0054] 本发明中, N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒或其他载体。总之,只要能在宿主体内复制和稳定,任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

[0055] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体编码DNA序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导mRNA合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。此外,表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状。

[0056] 包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如植物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属、农杆菌;真菌细胞如酵母;植物细胞等。用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。可以对获得的转化子进行培养,表达本发明的突变体蛋白;较佳地,所述的突变体蛋白为聚合体形式的蛋白。

[0057] 作为本发明的优选方式,采用基于病毒的表达系统进行真核表达和纯化。较佳地,所述的病毒为杆状病毒。在本发明的优选实施例中,采用 Bac-to-Bac® TOPO® Expression System提供的方法制作杆状病毒;将该重组制备的杆状病毒转染真核细胞进行表达。较佳地,所述的真核细胞为HEK293细胞,例如HEK293S细胞。

[0058] 还可以在进行蛋白重组表达的时候,在蛋白末端加上蛋白标签,从而有利于进一步的纯化,纯化标签的选择可以根据本领域技术人员已知的技术,常用的例如Flag标签、Myc标签、HA标签、GST标签等。作为本发明的优选方式,所述的纯化标签为strep标签,在本发明的较佳实施例中,利用该标签,获得了纯化程序理想的目的蛋白。

[0059] 此外,还可以在目的蛋白的编码基因的末端加上3C蛋白酶编码基因,这样有利于纯化四聚体蛋白后切除eGFP,以减小后续非特异性的抗原/抗体结合。

[0060] 本发明也涉及用于特异性检测抗N-甲基-D-天冬氨酸抗体或用于诊断抗NMDA受体抗体阳性的脑炎的试剂盒,所述的试剂盒中包含:本发明所述的N-甲基-D-天冬氨酸受体的突变体,编码该突变体的所述的多核苷酸,或所述的表达构建体或载体,或所述的宿主细胞。

[0061] 其它常用于进行转基因操作、重组表达的试剂,以及处理样品的试剂如DNA提取试剂等也可被包含在所述的试剂盒中,以方便本领域技术人员使用。此外,所述试剂盒中还可包含有指导本领域技术人员操作的使用说明书。

[0062] 本发明设计的突变体蛋白,可以实现稳定的表达纯化,获得具有理想的空间构型的蛋白,较佳地为聚合体(四聚体)蛋白,从而用于建立基于抗原抗体反应原理的抗N-甲基-D-天冬氨酸抗体的检测。对于来自生物体(人体)的样品,本发明的抗原可以与样品中的抗N-甲基-D-天冬氨酸抗体有效地结合,从而检测出抗体阳性的样品,这对于临床抗NMDA受体抗体阳性相关的神经系统疾病检测是特别有用的,尤其是自身免疫性抗NMDA受体脑炎的检

测。

[0063] 本发明的检测方法基于抗原-抗体反应,以此为基础的各种检测方法均可被应用于本发明中。例如但不限于:酶联免疫吸附法,免疫沉淀法,原位杂交法,斑点杂交法,芯片法,等等。

[0064] 在本发明的较佳实施例中,采用了基于抗原-抗体反应原理的酶联免疫吸附法,对于本发明表达获得的突变体蛋白聚合体、野生型蛋白聚合体以及阳性对照(欧蒙公司)进行了针对人体来源的样品的检测,结果发现,本发明的突变体蛋白聚合体,能够被体内抗体良好地识别,从而能够大大地提高基于酶联免疫方法的检测阳性率。

[0065] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如J.萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0066] 实施例1、人源N-甲基-D-天冬氨酸受体GluN1/GluN2A四聚体蛋白的氨基酸编码序列的选择和重组表达载体的构建

[0067] 野生型GluN1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;野生型GluN2A的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0068] 野生型GluN1的氨基酸序列(SEQ ID NO:1):

[0069]

MSTMRLLTALLFSCSVARAACDPKIVNIGAVLSTRKHEQMFREAVNQAN
KRHGSWKIQLNATSVTHKPNAIQMALSVCEDLISSQVYAILVSHPPTPNDH
FTPTPVSYTAGFYRIPVLGLTRMSIYSDKSIHLSFLRTVPPYSHQSSVWFEM
MRVYSWNHIILLVSDDHEGRAAQKRLETLLEERESKAEKVLQFDPGTKNV
TALLMEAKELEARVIILSASEDDAATVYRAAAMLNMTGSGYVWLVGEREI
SGNALRYAPDGILGLQLINGKNESAHSIDAVGVVAQAVHELLEKENITDPP
RGCVGNTNIWKTGPLFKRVLMSKYADGVTGRVEFNGDRKFANYSIM
NLQNRKLVQVGIYNGTHVIPNDRKIIWPGGETEKPRGYQMSTRLKIVTIHQ
EPFVYVKPTLSDGTCKEEFTVNGDPVKVICTGPNDTSPGSPRHTVPQCCY
GFCIDLKLARTMNFTYEVHLVADGKFGTQERVNNSNKEWNGMMGEL
LSGQADMIVAPLTINNERAQYIEFSKPKYQGLTILVKKEIPRSTLDSFMQPF
QSTLWLLVGLSVHVVAVMLYLLDRFSPFGRFKVNSEEEEDALTSSAMW
FSWGVLLNSGIGEGAPRSFSARILGMVWAGFAMIIVASYTANLAAFLVLD
PEERITGINDPRLRNPSDKFIYATVKQSSVDIYFRRQVELSTMYRHMEKHNY
ESAAEAIQAVRDNKLHAFIWDSAFLFEASQKCDLVTTGELFFRSGFGIGM
RKDSPWKQNVSLSLKSHENGFMEDLDKTWVRYQECDRSNAPATLTFEN

MAGV FML VAGGIVAGI FLIFIEIA YKR HKDARRKQ

[0070] 野生型GluN2A的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) :

[0071]

MGRV GYWT LLV LP ALLV WR GPAPS AAA EKG PPA L NIA VML GH SH DV TER
EL RTL WGPE QAAGL PLDV NVV ALLM NRT DP KSL ITHV CDL MSGARI HGLV
FG DDT DQE AVA QML DFI SSHTF VPI LGI HGG ASMIM ADK DPT STFF QFG ASI
QQQ ATV MLK IM QDY DW HV FSL VTT IF PGY REF ISF VKT TVD NSF VG WDM Q
NV ITL DT SF EDA KTQ VQL KKI HSS VIL LYCS KDE A VL L SEAR SL GLT GY DFF
WIV PSL VSG NTEL I PKE F PSL ISV SY DDW DYSLEAR VRD GIG I LTTA A SML
E KFS YI P EAK A SCY GQ MER P EVM H TLH P FMV N V TWD GKD LS FTE EGY QV
H PRL VV VLN KDR EWE KVG K WEN H TSL RHA V W P RY KSF SD CEP DDN HL
SIV TLEE APF VIV EID P L TET C VRN T VPC RKF V KIN N ST N EGM NVK CCK G
FCID ILKKL SRTV KFTY DLY L VTNG K HGK KV NN VNG MIGEV VY QRA VM
AVG SLT I NEE RSE VV D FSVP F VET G ISV M VSR SNG T VSP S AFLE PFS A SVW V
MMF VML LIV SAI A VF V FEY FSP V GY NR NLAK GKA PHG PSFT I G KAI W LL WG
LV FNN SVP V QNPK GTT SKIM VSV WAFFA VIF L ASY TAN LAA FMI Q EEF VD Q
VTG L S DKK FQR PHD Y SPP F RFG T V P N G S T E R N I R N N Y P Y M H Q Y M T K F N Q K
G VED ALV S L KTG K L D AFI Y D A A V L NY K AGR D E G C K L V T I G S G Y I F A T T G Y
G I A L Q K G S P W K R Q I D L A L L Q F V G D G E M E E L T L W L T G I C H N E K N E V M S S Q
L D I D N M A G V F Y M L A A A M A L S L I T F I W E H L F

[0072] 在进行重组构建和表达前,先对GluN1、GluN2A受体蛋白进行序列改造,将其胞内段序列去除;同时,将GluN1亚基612位的甘氨酸突变成精氨酸,GluN2A亚基656、657位的两个谷氨酸突变成精氨酸。至此,人源化GluN1/GluN2A四聚体蛋白的氨基酸编码序列如图1所示。

[0073] 用同源重组的方法将GluN1和GluN2A的cDNA的末端 (3'末端) 加入3C蛋白酶、eGFP以及strep标签的编码序列,然后克隆到pEG-Bacmam表达载体。

[0074] 按照Invitrogen公司Bac-to-Bac® TOPO® Expression System提供的方法制作杆状病毒。

[0075] 实施例2、人源N-甲基-D-天冬氨酸受体GluN1/GluN2A四聚体蛋白的真核表达和纯化

[0076] 将悬浮的HEK293S GnTI-细胞在37℃含5%二氧化碳的培养箱中培养至密度为 3.0×10^6 个/毫升后,加入杆状病毒。感染12小时后,加入终浓度为10毫摩尔的丁酸钠,将细胞转移至30℃含5%二氧化碳的培养箱,继续培养48小时后收取细胞。

[0077] 用TBS缓冲液(含NaCl,Tris-C1 pH 8.0)将细胞重悬,加入蛋白酶抑制剂后超声破

碎,4℃旋转1.5小时后40000g转速离心1小时,收取上清。将上清与Strep-tactin亲和珠子混匀后4℃旋转半小时,用TBS缓冲液洗涤珠子,然后用洗脱液洗脱蛋白。4℃下利用3C蛋白酶酶切过夜,之后用GE公司的Superose 6 10/300GL分子筛进一步纯化GluN1/GluN2A四聚体蛋白。

[0078] 四聚体蛋白经过3C蛋白酶酶切后进行分子筛纯化,轮廓图显示蛋白的280nm吸收峰有两个,按分子量大小对应的出峰位置可判断第一个峰为四聚体NMDA受体(分子量大小为380kD)的吸收峰,第二个为eGFP及3C蛋白酶(分子量大小分别为27kD和21kD)吸收峰。如图2的左图所示。

[0079] 纯化的NMDA受体经SDS-Page后进行考马斯亮蓝的染色。将收集了纯化后的四聚体NMDA受体,蛋白变性后实施SDS-page电泳,将各组分经凝胶分离后,实施考马斯亮蓝染色,染色结果显示为清晰的两条带,条带位置分别对应GluN1和GluN2A的分子量大小,表明纯化后的蛋白中没有其他的杂蛋白。如图2的右图所示。

[0080] 最后,通过荧光高效液相色谱(FPLC)检测蛋白和自身抗体之间的结合。结果表明纯化后的蛋白峰值单一,表明蛋白纯度较高,而与自身抗体孵育以后的蛋白峰值反映的洗脱时间缩短,表明孵育后的NMDA受体分子量变大,说明蛋白与自身抗体在体外可以结合。结合后出现前后两个峰,可能因为蛋白与自身抗体的结合的比例有不同的组合形式。

[0081] 本发明人利用荧光分子筛色谱检测GluN1/GluN2A四聚体蛋白不同突变体的表达量。结果如图4A所示,与野生型(N1/2A)相比,GluN1-G612R,Glu2A-E656R,Glu2A-E657R三个点突变均可以增加蛋白的表达。

[0082] 本发明人利用荧光分子筛色谱检测GluN1/GluN2A四聚体的热稳定性。结果如图4B所示,野生型(N1/2A)经50℃热激10分钟后(N1/2A-Heat)四聚体量明显下降,而突变体热激后下降不明显,说明突变体蛋白的热稳定性较好。

[0083] 实施例3、人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的GluN1/GluN2A四聚体NMDA蛋白作为抗原,应用于抗NMDA抗体的检测

[0084] 基于抗原抗体结合的免疫学原理,采用全长膜蛋白GluN1/GluN2A亚型四聚体NMDA蛋白包被酶标板,采用酶联免疫吸附法检测自身免疫性脑炎患者脑脊液中是否含有抗NMDA受体的抗体,具体如下:

[0085] (1) GluN1/GluN2A四聚体蛋白作为抗原包被于酶标板

[0086] GluN1/GluN2A四聚体蛋白以1.25μg/mL或者2.5μg/mL的浓度,每孔加入100μL,4℃过夜包被后,洗涤(包被液、封闭液与洗涤液GluN1/GluN2A蛋白均需额外加入去垢剂(含MNG,以下均同);1%牛血清蛋白BSA 300μL/孔室温封闭1h,洗涤;商业化阳性和阴性对照NMDA抗体以1:50稀释度,每孔加入100μL,室温孵育1h,TBST洗涤;二抗HRP-Goat Anti-Human IgG (H+L) (proteintech, SA00001-17) 1:6000稀释后,每孔加入100μL,室温孵育1h,TBST洗涤;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液每孔加入100μL,室温显色15min;最后加入50μL的2mol/L硫酸终止显色;酶标仪450nm波长下测定吸光度(OD值)。

[0087] (2) 自身免疫性脑炎患者脑脊液样品的酶联免疫吸附检测结果

[0088] 随机挑选57例确诊为自身免疫性脑炎患者脑脊液样品,将GluN1/GluN2A四聚体蛋白作为抗原,采用基于抗原抗体结合的经典免疫学方法即酶联免疫吸附法检测57例自身免疫性脑炎患者脑脊液样品中的抗NMDA抗体;同样地,该57例确诊为自身免疫性脑炎患者脑

脊液样品用参考检测试剂(欧蒙公司,自身免疫性脑炎马赛克1检测试剂盒,LOT CF160828LC)做比较。

[0089] 第一批脑脊液样品检测加样方式如表1所示。

[0090] 表1

	1	2	3	4	5	6
[0091]	A M180	M705	M724	M753	Z2013	PC 1:50
	B M371	M706	M728	M761	Z1446	PC 1:50
	C M696	M711	M730	M765	OB1665	NC 1:50
	D M699	M713	M736	M766	Z1751	NC 1:50
[0092]	E M700	M714	M739	M767	Z2192	仅 2nd Ab
	F M701	M715	M744	M769	Z2291	仅 2nd Ab
	G M702	M719	M746	M776	170313-6	仅 2nd Ab
	H M704	M721	M752	M780	仅 2nd Ab	仅 2nd Ab

[0093] 注:PC为阳性对照(欧蒙);NC为阴性对照(无关抗体,获自欧蒙公司);“仅2nd Ab”表示不加一抗、只加二抗的对照。M180等表示样品编号。

[0094] 第二批脑脊液样品检测加样方式如表2所示。

[0095] 表2

	1	2	3
[0096]	A M700C	Z1436C	Z2016C
	B M704C	Z1510C	Z2053C
	C M769C	Z1525C	PC 1:50
	D M785C	Z1735C	NC 1:50
	E M826C	Z1751C	仅 2nd Ab
	F M827C	Z1944C	仅 2nd Ab
	G M844C	Z2005C	
	H Z1930C	Z2013C	

[0097] 注:PC为阳性对照(欧蒙);NC为阴性对照(无关抗体,获自欧蒙公司);仅2nd Ab表示不加一抗、只加二抗的对照。M700C等表示样品编号。

[0098] GluN1/GluN2A四聚体包被浓度1.25 μ g/mL,第一批脑脊液样品酶联免疫吸附检测结果(OD450nm)如表3。第一批39例样品阳性和阴性结果的判定结果如表4。欧蒙试剂盒检测结果如表5。

[0099] 表3

	1	2	3	4	5	6
A	0.193	0.218	0.374	0.481	0.082	0.683
B	0.379	0.154	0.371	0.147	0.294	0.568
C	0.517	0.48	0.162	0.542	0.674	0.059
D	0.094	0.218	0.34	0.242	0.63	0.045
E	0.521	0.18	0.127	2.195	0.061	0.058
F	0.241	1.041	0.214	0.12	0.563	0.061
G	0.196	0.121	0.197	0.105	0.16	0.052
H	0.284	2.075	0.571	0.092	0.053	0.055

[0102] 表4

	1	2	3	4	5
A	-	-	+	++	-
B	+	-	+	-	+
C	++	+	-	++	++
D	-	-	+	+	++
E	+	-	-	+++	-
F	-	+++	-	-	++
G	-	-	-	-	-
H	+	+++	++	-	

[0104] 表5

	1	2	3	4	5
A	+	-	-	-	++++
B	+++	-	-	-	-
C	-	-	-	-	++
D	-	-	-	-	+
E	++	-	-	-	++
F	-	-	-	-	+++
G	-	-	-	-	+
H	+++	-	-	-	

[0106] GluN1/GluN2A四聚体包被浓度2.5μg/mL,第二批自身免疫性脑炎患者脑脊液样品酶联免疫吸附法检测结果(OD450nm)如表6。第二批18例样品阳性和阴性结果的判定结果如

表7. 欧蒙试剂盒检测结果如表8。

[0107] 表6

	1	2	3	
A	0.689	0.794	2.013	
B	0.527	0.579	2.148	
C	0.179	0.876	1.895	
[0108]	D	0.684	1.189	0.06
	E	0.202	2.1	0.053
	F	2.162	0.258	0.05
	G	1.932	2.126	
	H	2.046	0.465	

[0109] 表7

	1	2	3
A	+	+	+++
B	+	+	+++
C	-	+	
[0110]	D	+	++
	E	-	+++
	F	+++	-
	G	+++	+++
	H	+++	+

[0111] 表8

	1	2	3
A	++	+++	+++
B	+++	+	++
C	-	++	
[0112]	D	+++	+
	E	+	+
	F	+++	+++
	G	-	+++
	H	++++	++++

[0113] 结果发现,现有技术的试剂盒(欧蒙公司,自身免疫性脑炎马赛克1检测试剂盒,LOT CF160828LC)对患者脑脊液中抗NMDA抗体检测的阳性率为45.6% (57例中26例阳性),GluN1/GluN2A作为抗原对患者脑脊液的检测的阳性率为59.6% (57例中34例阳性)。

[0114] 该结果说明,本发明的重组表达方法获得的GluN1/GluN2A四聚体蛋白,其具有与体内抗原相同或非常接近的空间结构,能够被体内抗体良好地识别,从而能够大大地提高基于酶联免疫方法的检测阳性率。

[0115] 通过荧光高效液相色谱(FPLC)检测蛋白和自身抗体之间的结合。如图2所示,纯化后的蛋白峰值单一,表明蛋白纯度较高(右侧峰),而与自身抗体孵育以后的蛋白峰值洗脱时间缩短(左侧峰),表明孵育后的NMDA受体分子量变大,说明纯化的GluN1/GluN2A四聚体蛋白与自身抗体在体外可以结合。结合后出现前后两个峰,提示这是由于蛋白与自身抗体的结合的比例有不同的组合形式,如图3所示。

[0116] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院;
复旦大学附属华山医院
<120> 人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的GluN1/GluN2A四聚体的表达及其应用
<130> 184688
<160> 2
<170> SIPOSequenceListing 1.0
<210> 1
<211> 847
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 1

Met Ser Thr Met Arg Leu Leu Thr Leu Ala Leu Leu Phe Ser Cys Ser
1 5 10 15
Val Ala Arg Ala Ala Cys Asp Pro Lys Ile Val Asn Ile Gly Ala Val
20 25 30
Leu Ser Thr Arg Lys His Glu Gln Met Phe Arg Glu Ala Val Asn Gln
35 40 45
Ala Asn Lys Arg His Gly Ser Trp Lys Ile Gln Leu Asn Ala Thr Ser
50 55 60
Val Thr His Lys Pro Asn Ala Ile Gln Met Ala Leu Ser Val Cys Glu
65 70 75 80
Asp Leu Ile Ser Ser Gln Val Tyr Ala Ile Leu Val Ser His Pro Pro
85 90 95
Thr Pro Asn Asp His Phe Thr Pro Thr Pro Val Ser Tyr Thr Ala Gly
100 105 110
Phe Tyr Arg Ile Pro Val Leu Gly Leu Thr Thr Arg Met Ser Ile Tyr
115 120 125
Ser Asp Lys Ser Ile His Leu Ser Phe Leu Arg Thr Val Pro Pro Tyr
130 135 140
Ser His Gln Ser Ser Val Trp Phe Glu Met Met Arg Val Tyr Ser Trp
145 150 155 160
Asn His Ile Ile Leu Leu Val Ser Asp Asp His Glu Gly Arg Ala Ala
165 170 175
Gln Lys Arg Leu Glu Thr Leu Leu Glu Arg Glu Ser Lys Ala Glu
180 185 190
Lys Val Leu Gln Phe Asp Pro Gly Thr Lys Asn Val Thr Ala Leu Leu
195 200 205

Met Glu Ala Lys Glu Leu Glu Ala Arg Val Ile Ile Leu Ser Ala Ser
 210 215 220
 Glu Asp Asp Ala Ala Thr Val Tyr Arg Ala Ala Ala Met Leu Asn Met
 225 230 235 240
 Thr Gly Ser Gly Tyr Val Trp Leu Val Gly Glu Arg Glu Ile Ser Gly
 245 250 255
 Asn Ala Leu Arg Tyr Ala Pro Asp Gly Ile Leu Gly Leu Gln Leu Ile
 260 265 270
 Asn Gly Lys Asn Glu Ser Ala His Ile Ser Asp Ala Val Gly Val Val
 275 280 285
 Ala Gln Ala Val His Glu Leu Leu Glu Lys Glu Asn Ile Thr Asp Pro
 290 295 300
 Pro Arg Gly Cys Val Gly Asn Thr Asn Ile Trp Lys Thr Gly Pro Leu
 305 310 315 320
 Phe Lys Arg Val Leu Met Ser Ser Lys Tyr Ala Asp Gly Val Thr Gly
 325 330 335
 Arg Val Glu Phe Asn Glu Asp Gly Asp Arg Lys Phe Ala Asn Tyr Ser
 340 345 350
 Ile Met Asn Leu Gln Asn Arg Lys Leu Val Gln Val Gly Ile Tyr Asn
 355 360 365
 Gly Thr His Val Ile Pro Asn Asp Arg Lys Ile Ile Trp Pro Gly Gly
 370 375 380
 Glu Thr Glu Lys Pro Arg Gly Tyr Gln Met Ser Thr Arg Leu Lys Ile
 385 390 395 400
 Val Thr Ile His Gln Glu Pro Phe Val Tyr Val Lys Pro Thr Leu Ser
 405 410 415
 Asp Gly Thr Cys Lys Glu Glu Phe Thr Val Asn Gly Asp Pro Val Lys
 420 425 430
 Lys Val Ile Cys Thr Gly Pro Asn Asp Thr Ser Pro Gly Ser Pro Arg
 435 440 445
 His Thr Val Pro Gln Cys Cys Tyr Gly Phe Cys Ile Asp Leu Leu Ile
 450 455 460
 Lys Leu Ala Arg Thr Met Asn Phe Thr Tyr Glu Val His Leu Val Ala
 465 470 475 480
 Asp Gly Lys Phe Gly Thr Gln Glu Arg Val Asn Asn Ser Asn Lys Lys
 485 490 495
 Glu Trp Asn Gly Met Met Gly Glu Leu Leu Ser Gly Gln Ala Asp Met
 500 505 510
 Ile Val Ala Pro Leu Thr Ile Asn Asn Glu Arg Ala Gln Tyr Ile Glu

515	520	525
Phe Ser Lys Pro Phe Lys Tyr Gln Gly Leu Thr Ile Leu Val Lys Lys		
530	535	540
Glu Ile Pro Arg Ser Thr Leu Asp Ser Phe Met Gln Pro Phe Gln Ser		
545	550	555
Thr Leu Trp Leu Leu Val Gly Leu Ser Val His Val Val Ala Val Met		
565	570	575
Leu Tyr Leu Leu Asp Arg Phe Ser Pro Phe Gly Arg Phe Lys Val Asn		
580	585	590
Ser Glu Glu Glu Glu Asp Ala Leu Thr Leu Ser Ser Ala Met Trp		
595	600	605
Phe Ser Trp Gly Val Leu Leu Asn Ser Gly Ile Gly Glu Gly Ala Pro		
610	615	620
Arg Ser Phe Ser Ala Arg Ile Leu Gly Met Val Trp Ala Gly Phe Ala		
625	630	635
Met Ile Ile Val Ala Ser Tyr Thr Ala Asn Leu Ala Ala Phe Leu Val		
645	650	655
Leu Asp Arg Pro Glu Glu Arg Ile Thr Gly Ile Asn Asp Pro Arg Leu		
660	665	670
Arg Asn Pro Ser Asp Lys Phe Ile Tyr Ala Thr Val Lys Gln Ser Ser		
675	680	685
Val Asp Ile Tyr Phe Arg Arg Gln Val Glu Leu Ser Thr Met Tyr Arg		
690	695	700
His Met Glu Lys His Asn Tyr Glu Ser Ala Ala Glu Ala Ile Gln Ala		
705	710	715
720		
Val Arg Asp Asn Lys Leu His Ala Phe Ile Trp Asp Ser Ala Val Leu		
725	730	735
Glu Phe Glu Ala Ser Gln Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Gly Glu Leu		
740	745	750
Phe Phe Arg Ser Gly Phe Gly Ile Gly Met Arg Lys Asp Ser Pro Trp		
755	760	765
Lys Gln Asn Val Ser Leu Ser Ile Leu Lys Ser His Glu Asn Gly Phe		
770	775	780
Met Glu Asp Leu Asp Lys Thr Trp Val Arg Tyr Gln Glu Cys Asp Ser		
785	790	795
800		
Arg Ser Asn Ala Pro Ala Thr Leu Thr Phe Glu Asn Met Ala Gly Val		
805	810	815
Phe Met Leu Val Ala Gly Gly Ile Val Ala Gly Ile Phe Leu Ile Phe		
820	825	830

Ile Glu Ile Ala Tyr Lys Arg His Lys Asp Ala Arg Arg Lys Gln
 835 840 845

<210> 2
 <211> 841
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 2

Met Gly Arg Val Gly Tyr Trp Thr Leu Leu Val Leu Pro Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Val Trp Arg Gly Pro Ala Pro Ser Ala Ala Ala Glu Lys Gly Pro Pro
 20 25 30

Ala Leu Asn Ile Ala Val Met Leu Gly His Ser His Asp Val Thr Glu
 35 40 45

Arg Glu Leu Arg Thr Leu Trp Gly Pro Glu Gln Ala Ala Gly Leu Pro
 50 55 60

Leu Asp Val Asn Val Val Ala Leu Leu Met Asn Arg Thr Asp Pro Lys
 65 70 75 80

Ser Leu Ile Thr His Val Cys Asp Leu Met Ser Gly Ala Arg Ile His
 85 90 95

Gly Leu Val Phe Gly Asp Asp Thr Asp Gln Glu Ala Val Ala Gln Met
 100 105 110

Leu Asp Phe Ile Ser Ser His Thr Phe Val Pro Ile Leu Gly Ile His
 115 120 125

Gly Gly Ala Ser Met Ile Met Ala Asp Lys Asp Pro Thr Ser Thr Phe
 130 135 140

Phe Gln Phe Gly Ala Ser Ile Gln Gln Gln Ala Thr Val Met Leu Lys
 145 150 155 160

Ile Met Gln Asp Tyr Asp Trp His Val Phe Ser Leu Val Thr Thr Ile
 165 170 175

Phe Pro Gly Tyr Arg Glu Phe Ile Ser Phe Val Lys Thr Thr Val Asp
 180 185 190

Asn Ser Phe Val Gly Trp Asp Met Gln Asn Val Ile Thr Leu Asp Thr
 195 200 205

Ser Phe Glu Asp Ala Lys Thr Gln Val Gln Leu Lys Lys Ile His Ser
 210 215 220

Ser Val Ile Leu Leu Tyr Cys Ser Lys Asp Glu Ala Val Leu Ile Leu
 225 230 235 240

Ser Glu Ala Arg Ser Leu Gly Leu Thr Gly Tyr Asp Phe Phe Trp Ile
 245 250 255

Val Pro Ser Leu Val Ser Gly Asn Thr Glu Leu Ile Pro Lys Glu Phe			
260	265	270	
Pro Ser Gly Leu Ile Ser Val Ser Tyr Asp Asp Trp Asp Tyr Ser Leu			
275	280	285	
Glu Ala Arg Val Arg Asp Gly Ile Gly Ile Leu Thr Thr Ala Ala Ser			
290	295	300	
Ser Met Leu Glu Lys Phe Ser Tyr Ile Pro Glu Ala Lys Ala Ser Cys			
305	310	315	320
Tyr Gly Gln Met Glu Arg Pro Glu Val Pro Met His Thr Leu His Pro			
325	330	335	
Phe Met Val Asn Val Thr Trp Asp Gly Lys Asp Leu Ser Phe Thr Glu			
340	345	350	
Glu Gly Tyr Gln Val His Pro Arg Leu Val Val Ile Val Leu Asn Lys			
355	360	365	
Asp Arg Glu Trp Glu Lys Val Gly Lys Trp Glu Asn His Thr Leu Ser			
370	375	380	
Leu Arg His Ala Val Trp Pro Arg Tyr Lys Ser Phe Ser Asp Cys Glu			
385	390	395	400
Pro Asp Asp Asn His Leu Ser Ile Val Thr Leu Glu Glu Ala Pro Phe			
405	410	415	
Val Ile Val Glu Asp Ile Asp Pro Leu Thr Glu Thr Cys Val Arg Asn			
420	425	430	
Thr Val Pro Cys Arg Lys Phe Val Lys Ile Asn Asn Ser Thr Asn Glu			
435	440	445	
Gly Met Asn Val Lys Lys Cys Cys Lys Gly Phe Cys Ile Asp Ile Leu			
450	455	460	
Lys Lys Leu Ser Arg Thr Val Lys Phe Thr Tyr Asp Leu Tyr Leu Val			
465	470	475	480
Thr Asn Gly Lys His Gly Lys Lys Val Asn Asn Val Trp Asn Gly Met			
485	490	495	
Ile Gly Glu Val Val Tyr Gln Arg Ala Val Met Ala Val Gly Ser Leu			
500	505	510	
Thr Ile Asn Glu Glu Arg Ser Glu Val Val Asp Phe Ser Val Pro Phe			
515	520	525	
Val Glu Thr Gly Ile Ser Val Met Val Ser Arg Ser Asn Gly Thr Val			
530	535	540	
Ser Pro Ser Ala Phe Leu Glu Pro Phe Ser Ala Ser Val Trp Val Met			
545	550	555	560
Met Phe Val Met Leu Leu Ile Val Ser Ala Ile Ala Val Phe Val Phe			

565	570	575
Glu Tyr Phe Ser Pro Val Gly Tyr Asn Arg Asn Leu Ala Lys Gly Lys		
580	585	590
Ala Pro His Gly Pro Ser Phe Thr Ile Gly Lys Ala Ile Trp Leu Leu		
595	600	605
Trp Gly Leu Val Phe Asn Asn Ser Val Pro Val Gln Asn Pro Lys Gly		
610	615	620
Thr Thr Ser Lys Ile Met Val Ser Val Trp Ala Phe Phe Ala Val Ile		
625	630	635
Phe Leu Ala Ser Tyr Thr Ala Asn Leu Ala Ala Phe Met Ile Gln Glu		
645	650	655
Glu Phe Val Asp Gln Val Thr Gly Leu Ser Asp Lys Lys Phe Gln Arg		
660	665	670
Pro His Asp Tyr Ser Pro Pro Phe Arg Phe Gly Thr Val Pro Asn Gly		
675	680	685
Ser Thr Glu Arg Asn Ile Arg Asn Asn Tyr Pro Tyr Met His Gln Tyr		
690	695	700
Met Thr Lys Phe Asn Gln Lys Gly Val Glu Asp Ala Leu Val Ser Leu		
705	710	715
Lys Thr Gly Lys Leu Asp Ala Phe Ile Tyr Asp Ala Ala Val Leu Asn		
725	730	735
Tyr Lys Ala Gly Arg Asp Glu Gly Cys Lys Leu Val Thr Ile Gly Ser		
740	745	750
Gly Tyr Ile Phe Ala Thr Thr Gly Tyr Gly Ile Ala Leu Gln Lys Gly		
755	760	765
Ser Pro Trp Lys Arg Gln Ile Asp Leu Ala Leu Gln Phe Val Gly		
770	775	780
Asp Gly Glu Met Glu Glu Leu Glu Thr Leu Trp Leu Thr Gly Ile Cys		
785	790	795
His Asn Glu Lys Asn Glu Val Met Ser Ser Gln Leu Asp Ile Asp Asn		
805	810	815
Met Ala Gly Val Phe Tyr Met Leu Ala Ala Ala Met Ala Leu Ser Leu		
820	825	830
Ile Thr Phe Ile Trp Glu His Leu Phe		
835	840	

GIuN1 的氨基酸序列：

MSTMRLLTALLFSCSVARAACDPKIVNIGAVLSTRKHEQMREAVNQANKRHGSWKIQLNATSVTHKPNAIQMALSVCEDLISIQVYALVSHPPTPNDHFTPTPVSYTAGFYRIPVLGLTRMSIYSDKSIHLSFLRTVPPYSHQSSWFEMMRVYSWNHILLVSDDHEGRAAQKRLETLLEERESKAEKVLQFDPGTKNVTALLMEAKELEARVILSASEDDAATVYRAAAMLNTGSGYVWLVEGERISGNALRYAPDGILGLQLINGKNESAHSDAVGVVAQAVHELLEKENITDPPRGCVGNTNIWKTGPLFKRVLMSKYADGVTGRVEFNEDGDRKFANYSIMNLQNRKLVQVGINYNGTHVIPNDRKIWPGGETEKPRGYQMSTRLKIVTIHQEPFVYVKPTLSDGTCKEEFTVNGDPVKVICTGPNDTSPGSPRHTVPQCCYFCIDLLIKLARTMNFTYEVHLVADGKFGTQERVNNSNKKEWNGMMGELLSGQADMIVAPLTINNERAQYIEFSKPKYQGLTILVKKEIPRSTLDSFMQPFQS
 ↓
 TLWLLVGLSVHVVAVMLYLLDRFSPFGRFKVNSEEEEDALTLSAMWFSWRVLNSGIGEGAPRSFSARILGMVWAGFAMIIVASYTANLAFLVLDRPEERTGINDPRLRNPSDKFIYATVKQSSVDIYFRRQVELSTMYRHMEKHNYESAAEAIAQAVRDNLKHAFIWDSAVERFEASQKCDLVTTGELFFRSGFGIGMRKDSPWKQNVSLSLKSHENGFMEDLDKTWVRYQECDSRSNAPATLTFENMAGVFMLVAGGIWAGIFLIFIEIAYKRHKDARRKQ

GIuN2A 的氨基酸序列：

MGRVGYWTLLVLPALLVWRGPAPSAAAEGPPALNIAVMLGHSHDVTERELRTLWGPEQAAGLPLDVNVVALLMNRTDPKSLITHVCDLMSGARIHGLVFGDDTDQEAVAQMLDFISSHTFVPLGIHGGASIMADKDPTSTFFQFGASIQQQATVMLKIMQDYDWHVFLVTTIFPGYREFISFKTTVDNSFVGWDMQNVITLDTSFEDAKTQVQLKIHSSVILLYCSKDEAVLILSEARSLGLTGYDFFWIVPSLVSQNTELIPKEFPSGLISVSYDDWDYSLARVRDGIGILTTAASSMLEKFSYIPEAKASCYGQMERPEVPMHTLHPFMVNVTWDGKDLSTEETYQVHPRLVIVLNKDREWEVKWENHTLSRHAWPRTYKSFSDCEPDDNHLISIVTLEEAPFIVEDIDPLTETCVRNTVPCRKFKVINKSTNEGMMVKKCCKGFCIDILKKLSRTVKFTYDLYLV
 ↓
 TNGKHGKKVNNVWNGMIGEVVYQRAVMAGSLTINEERSEVVDFSVFVETGISMVRSRSGTVSPSAFLEPFSASVWVM
 MFVMLIIVSAIAVFVFEYFSPVGYNRNLAKGKAPHGPSFTIGKAIWLLWGLVFNNNSPVQNPKGTTSKIMVSVWAFFAVI
 ↓
 FLASYTANLAAMFIQRRFVDQVTGLSDKKQRPHDYSPPFRFGTVPNGSTERNIRNNYPYMHQYMTKFNQKGVEDALVSL
 KTGKLDIFYDAAVLNYKAGRDEGCKLVTIGSGYIFATTGYGIALQKGSPWKRQIDLALLQFVGDGEMEELETWLWTGIC
 HNEKNEVMSSQLIDNMAGVFYMLAAAMALSLITFIWEHLF

图1

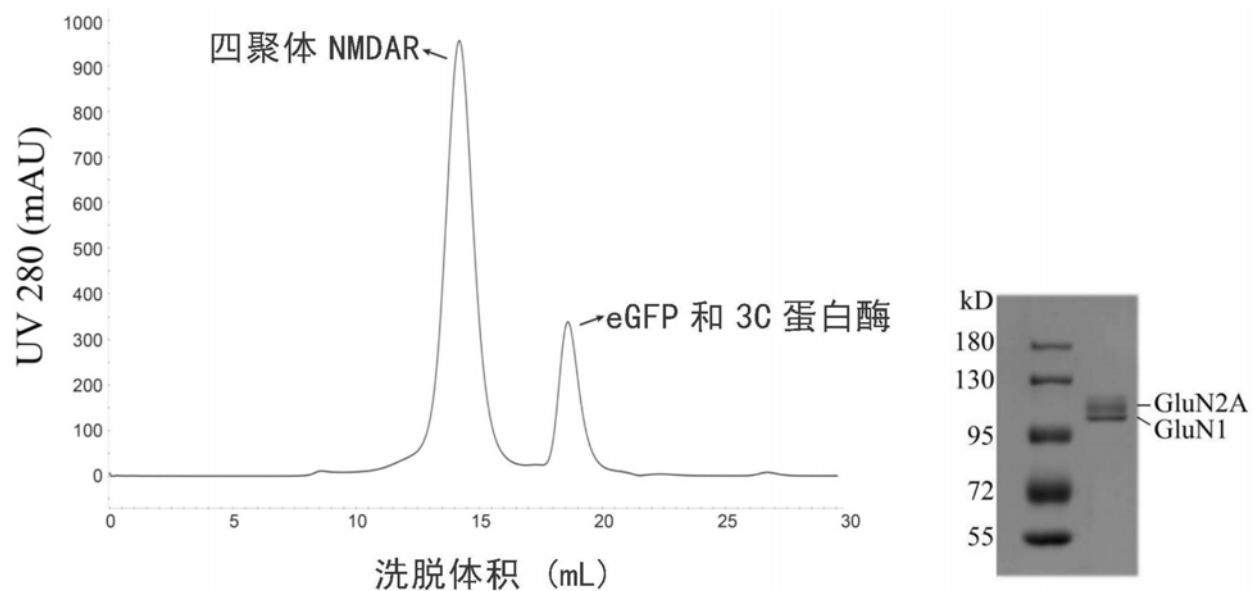


图2

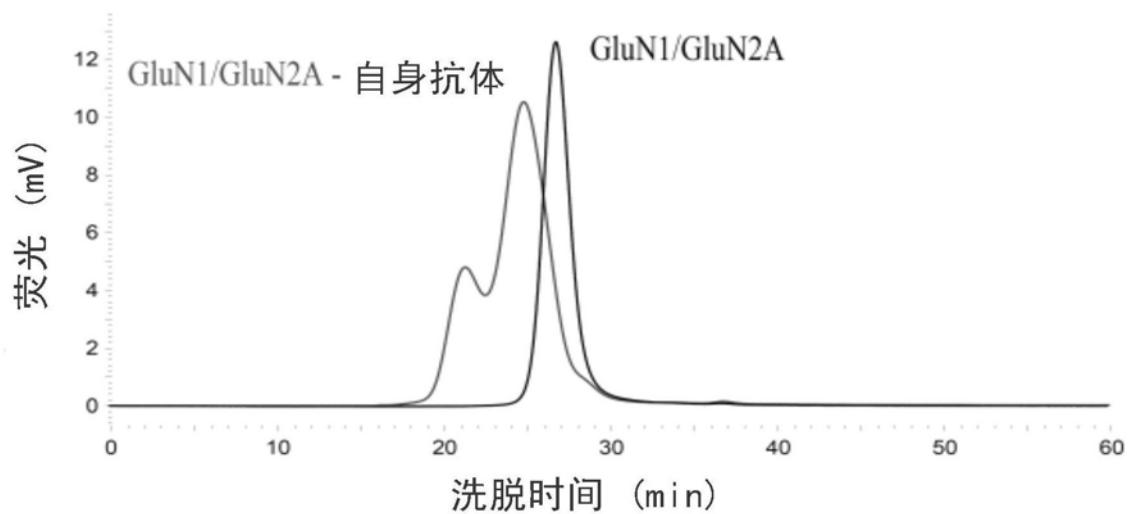


图3

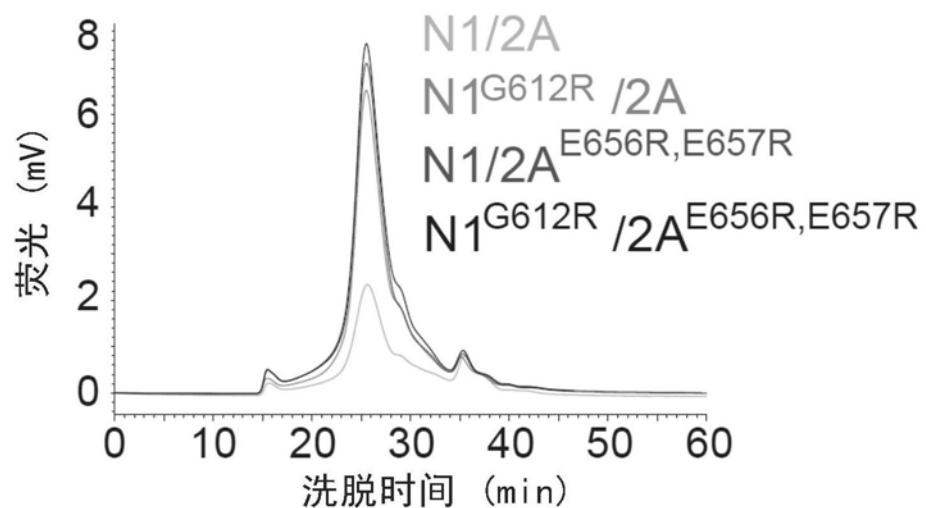
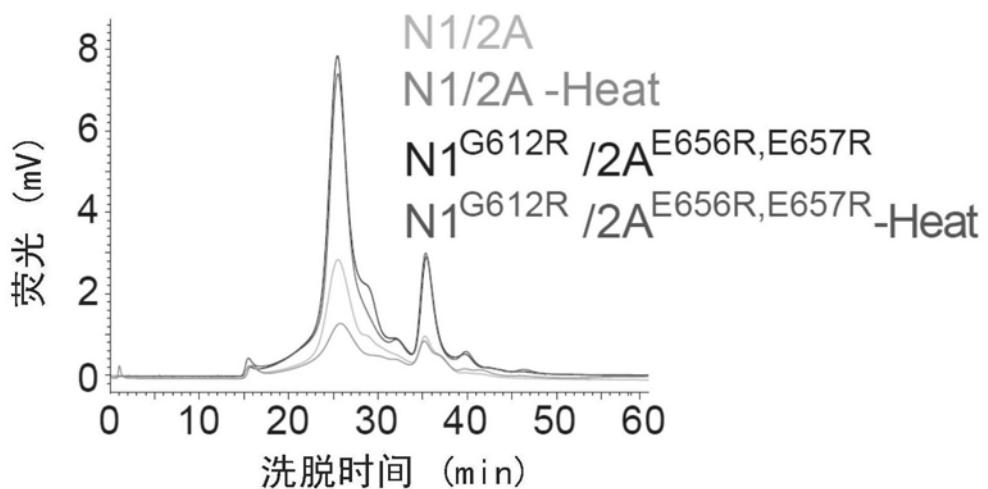
A**B**

图4

专利名称(译)	人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的GluN1/GluN2A四聚体的表达及其应用		
公开(公告)号	CN111320684A	公开(公告)日	2020-06-23
申请号	CN201811525532.1	申请日	2018-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
[标]发明人	谢春 张金宝 宋楠 崔恒祥 邓波 陈向军		
发明人	竺淑佳 谢春 张金宝 宋楠 崔恒祥 邓波 陈向军		
IPC分类号	C07K14/705 C12N15/12 C12N15/85 C12N5/10 G01N33/53		
代理人(译)	陈静		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及人源N-甲基-D-天冬氨酸受体的GluN1/GluN2A四聚体的表达及其应用。本发明揭示了N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位GluN1和GluN2A跨膜及胞外区的一些位点与其重组表达的稳定性、抗原-抗体结合活性密切相关。在进行所述突变的基础上，仅需要获取突变体的跨膜及胞外区进行重组表达，就可以获得稳定表达且空间结构理想的聚合体形式的N-甲基-D-天冬氨酸受体突变体，本发明解决了此类蛋白不稳定或抗体结合能力差的问题。

MGRVGYWTLLVLPALLVWRGPAPSAAEKGPPALNIAVMLGHSHDVTER
ELRTLWGPEQAAGLPLDVNVALLMNRTDPKSLITHVCDLMSGARIHGLV
FGDDTDQEAVAQMDFISSHTFVPILGIHGGASMIMADKDPTSTFFQFGASI
QQQATVMLKIMQDYDWHVFSLVTTIFPGYREFISFVKTTVDNSFVGWDMQ
NVITLDTSFEDAKTVQLKKIHSSVILLYCSKDEAVLILSEARSLGLTGYDFF
WIVPSLVSNTLEIPKEFPSGLISVSYDDWDYSLEARVRDGIGILTTAASSML
EKFSYIPEAKASCYQGMERPEVPMHTLHPFMVNVTWDGKDLTSFTEEGYQV
HPRLLVVILNLDREWEVKVGKWEHHTLSLRHAWWPRYKSFSDCEPDDNHIL
SIVTLEEAPFVIVEDIDPLTETCRNTVPCRKFVKNINSTNEGMMNVKKCCKG
FCIDILKKLSRTVKFTYDLYLVTNGKHGKKVNNVVWNGMIGEVVYQRAVM
AVGSLTINEERSEVVDFSVFVETGISVMVSRSGNTVSPSALEPFSASVWW
MMFVMLLIVSAIAVFVFEYFSPVGYNRNLAKGKAPHGPSFTIGKAIWLLWG
LVFNNNSVPVQNPKGITTSKIMSVWAffAVIFLASYTANLAFAFMQEFVHQ
VTGLSDKKFQRPHDYSPPFRFTVPGNGSTERNIRNNYPYMHQYMTKFNQK
GVEDALVSLKTGKLDIFIYDAAVLNYKAGRDEGCKLVTIGSGYIFATTGY
GIALQKGSPWKRQIDALLQFVGDGEMEELETLWLTGICHNEKNEVMSSQ
LDIDNMAGVFYMLAAAMALSLITFIWEHLF