

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410017298.3

C12N 15/61

C12N 15/31

C12N 15/11

C12N 15/63

C12N 1/15

C12P 21/02

C12P 1/02

[43] 公开日 2005 年 10 月 5 日

[11] 公开号 CN 1676609A

[22] 申请日 2004. 3. 30

[21] 申请号 200410017298.3

[71] 申请人 上海人类基因组研究中心

地址 201203 上海市浦东张江高科技园区碧波路 250 号 1 号楼

[72] 发明人 汤生荣 任双喜 卜云萍 严中华
殷世亮 施炜亮 李运千 武金炜
卢凌峰 张丕燕 钱 震

[74] 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司

代理人 丁纪铁

C07K 14/385 C07K 16/40 C12Q 1/68
A61K 38/52A61K 48/00 A61P 37/00 G01N 33/53
G01N 33/543

权利要求书 3 页 说明书 21 页

[54] 发明名称 一种新的马尔尼菲青霉菌 PPIase II、其编码序列及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一种在马尔尼菲青霉菌(Penicillium marneffei)胞浆中表达的新的马尔尼菲青霉菌肽脯氨酰顺反异构酶 II(PPIase II)及其编码序列,本发明还提供了该肽脯氨酰顺反异构酶 II(PPIase II)及其核酸的制备方法及其应用。根据本发明公开的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 及其基因,可以制备相关免疫抑制剂,并可为进一步开发针对该病菌引起的疾病的药物提供重要的参考价值,同时,它们也可以作为这类疾病诊治的潜在药物靶点。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种来自马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffeii*) 的分离的多核苷酸, 其含有编码马尔尼菲青霉菌肽脯氨酰顺反异构酶 II 的多核苷酸序列, 所述多核苷酸选自:

a) 与编码含有 SEQ ID NO. 2 的氨基酸序列的多肽的多核苷酸有至少 70% 同源性的多核苷酸,

b) 编码含有与 SEQ ID NO. 2 的氨基酸序列至少 70% 同源性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸,

c) 与 a) 或 b) 的多核苷酸互补的多核苷酸, 以及

d) 含有 a)、b) 或 c) 的多核苷酸序列的至少 15 个连续碱基的多核苷酸。

2. 如权利要求 1 所述的一种分离的多核苷酸, 其特征在于, 所述的多核苷酸编码一多肽, 该多肽具有 SEQ ID NO. 2 所示的序列。

3. 如权利要求 1 所述的一种分离的多核苷酸, 其特征在于, 所述的多核苷酸含有

(i) 如 SEQ ID NO. 1 中核苷酸 333-1037 位的核苷酸序列, 或

(ii) 在遗传密码简并范围内相应于 (i) 序列的至少一个序列, 或

(iii) 与互补于 (i) 或 (ii) 序列的序列杂交的至少一个序列, 和任选地

(iv) (i) 中中性功能的有义突变。

4. 如权利要求 3 所述的一种分离的多核苷酸, 其特征在于, 所述的多核苷酸含有 SEQ ID NO. 1 中核苷酸 333-1037 位的核苷酸序列。

5. 一种分离的多肽, 其特征在于, 所述多肽具有与 SEQ ID NO. 2 所示氨基酸序列至少 70% 同源性的序列或其片段。

6. 如权利要求 5 所述的一种分离的多肽，其特征在于，所述多肽是含有 SEQ ID NO. 2 所示氨基酸序列的多肽。

7. 一种载体，其特征在于，所述载体含有权利要求 1 所述的分离的多核苷酸。

8. 一种遗传工程宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞是用权利要求 7 所述载体转化的宿主细胞。

9. 一种生产具有肽脯氨酰顺反异构酶 II 活性的多肽的方法，其特征在于，该方法包括如下步骤：

(I) 将编码具有肽脯氨酰顺反异构酶 II 活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列，形成蛋白表达载体，所述的核苷酸序列与 SEQ ID NO. 1 中从核苷酸 333-1037 位的核苷酸序列有至少 70% 同源性；

(II) 将步骤(I)中的表达载体转入宿主细胞，形成肽脯氨酰顺反异构酶 II 重组细胞；

(III) 在适合表达肽脯氨酰顺反异构酶 II 多肽的条件下，培养步骤(II)中的重组细胞；

(IV) 分离出具有肽脯氨酰顺反异构酶 II 活性的多肽。

10. 如权利要求 9 所述的一种生产具有肽脯氨酰顺反异构酶 II 活性的多肽的方法，其特征在于，所述核苷酸序列为 SEQ ID NO. 1 中从核苷酸 333-1037 位的核苷酸序列。

11. 一种抗体，其特征在于，所述抗体是能与权利要求 5 或 6 所述的多肽特异性结合的抗体。

12. 一种探针分子，其特征在于，所述的探针分子含有权利要求 1 所述的多核苷酸中 8-100 个连续的核苷酸。

13. 权利要求 5 或 6 的多肽在制备治疗针对马尔尼菲青霉菌引起的疾病的药物中的应用。

14. 含有权利要求 5 或 6 的多肽的药物组合物。

15. 一种用于诊断和治疗针对马尔尼菲青霉菌引起的疾病的试剂盒，其特征在于：

所述试剂盒包含权利要求 1~4 中任一种多核苷酸序列或其连续片段，或者
所述试剂盒包含权利要求 5 或 6 的多肽或其连续片段，或者
所述试剂盒包含权利要求 11 的抗体。

16. 一种生物芯片，其特征在于：

所述生物芯片的载体上含有权利要求 1~4 中任一种多核苷酸序列或其连续片段，或者

所述生物芯片的载体上含有权利要求 5 或 6 的多肽或其连续片段，或者
所述生物芯片的载体上包含权利要求 11 的抗体。

一种新的马尔尼菲青霉菌 PPIase II、其编码序列及其应用

技术领域

本发明涉及分子免疫学、分子生物学、生物信息学和基因工程等领域，具体地，本发明涉及一种马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffeii*) 肽脯氨酰顺反异构酶 II (peptidyl prolyl cis-trans isomerase, PPIase II) 及其编码序列。本发明还提供了该肽脯氨酰顺反异构酶 II 及其核酸序列的制备方法和应用。

背景技术

真菌基因组研究始于二十世纪九十年代，第一个完成全基因组测序的真菌是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, Goffeau et al. 1996)。在过去的几年里，FGI (Fungal Genome Initiative) 委员会从150多万种真菌中，选取了15个在医药和工农业中具有重要价值的物种进行了基因组学的研究。2003年6月，FGI委员会新增了44个物种，其中包括了马尔尼菲青霉菌。

马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffeii*, PM) 是Capponi等首先于1956年在越南从一只中华竹鼠的肝脏分离出来的一种青霉，以其研究所主任 Marneffeii 的名字命名。但此后并没有引起人们的注意。1973年Disalvo在美国南卡首次发现人自然感染的病例，患者是一位曾在东南亚旅行过的传教士。

1964年邓卓霖在广西一土生农民身上发现此菌，但当时全世界都还没有此病报导，故将其认定为荚膜组织胞浆菌。1984年邓卓霖在国内首例报导了一例马尔尼菲青霉病。

从1984年到1987年，广西医科大学病理科收集的19全身播散型病例中，有4

例发现有导致免疫缺陷的疾病，如淋巴瘤，白血病，先天性胸腺发育不良，SLE（系统性红斑狼疮），TB（结核）等。1999年，邓卓霖首先发现了国内第一例合并AIDS的患者。近几年国内新发现的病例中，合并AIDS的患者越来越多。泰国至1998年已有1300例合并AIDS的患者。近年来发现70-80%的AIDS的患者后期感染上马尔尼菲青霉菌。

马尔尼菲青霉菌多呈条件致病菌，25℃呈丝状真菌，为非致病菌；37℃呈酵母形态，为致病菌。它是一种深部致病真菌。它侵犯人体的单核巨噬系统，破坏人的免疫系统，使人体的免疫力下降。由于它在局部的机械破坏作用，以及代谢产物，毒素等作用，产生炎症反应，导致脓肿，肉芽肿等改变。并容易破坏血管进入血液循环，导致败血症。进入人体的途径一般是呼吸道或皮肤。

PPIase II（肽脯氨酰顺反异构酶）广泛分布于各种生物体及各种组织中，多数定位于胞浆，但也存在于大肠杆菌的外周质、红色面包霉的线粒体基质、酵母与果蝇和哺乳动物的内质网。PPIase II在蛋白质折叠、输送和相互作用过程中起着关键作用。PPIase II在细胞中的基本作用是通过非共价键方式，稳定扭曲的酰胺过度态，而催化肽基脯氨酰的顺式与反式旋转体的相互转变。免疫抑制剂环孢霉素A（cyclosporin A, CsA）与FK506及那巴霉素（rapamycin）可与它们结合并抑制其催化活性。根据底物特异性分为两类：环孢霉素亲和蛋白（Cyclosporin）和FK结合蛋白（FKBP）。结构研究表明，FKBP的催化活性位点与药物结合位点是由芳香族氨基酸残基构成的一个大空腔。在T细胞中，PPIase II还起抑制T淋巴细胞功能的生理作用。PPIase II不仅可以起到折叠酶的催化作用，而且具有防止折叠中间体聚集的类似分子伴侣的功能。在碳酸酐酶的折叠中，PPIase II一方面在其早期中间体的形成过程中起分子伴侣的作用，防止不正确的聚集，另一方面在折叠的较晚时期发挥折叠酶的催化活性

(Freskgard, 1989)。

发明内容

本发明的目的在于提供一种新的马尔尼菲青霉菌PPIase II、其编码序列及该蛋白的应用。

本发明的上述目的是通过如下技术方案来实现的：

在本发明的一个方面，提供了一种来自马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffeii*) 的分离的多核苷酸，其含有编码马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的多核苷酸序列，所述多核苷酸选自：

a) 与编码含有 SEQ ID NO. 2 的氨基酸序列的多肽的多核苷酸有至少 70% 同源性的多核苷酸，

b) 编码含有与 SEQ ID NO. 2 的氨基酸序列至少 70% 同源性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸，

c) 与 a) 或 b) 的多核苷酸互补的多核苷酸，以及

d) 含有 a)、b) 或 c) 的多核苷酸序列的至少 15 个连续碱基的多核苷酸。

较佳的，所述的多核苷酸编码一多肽，该多肽具有 SEQ ID NO. 2 所示的序列。

或者较佳的，所述的多核苷酸含有

(i) 如 SEQ ID NO. 1 中核苷酸 333-1037 位的核苷酸序列，或

(ii) 在遗传密码简并范围内相应于 (i) 序列的至少一个序列，或

(iii) 与互补于 (i) 或 (ii) 序列的序列杂交的至少一个序列，和任选地

(iv) (i) 中中性功能的有义突变。

更佳的，所述的多核苷酸含有 SEQ ID NO. 1 中核苷酸 333-1037 位的核苷酸

序列。

在本发明的另一方面，提供了一种分离的多肽，所述多肽具有与 SEQ ID NO. 2 所示氨基酸序列至少 70%同源性的序列或其片段。较佳的，所述多肽是含有 SEQ ID NO. 2 所示氨基酸序列的多肽。

在本发明的再一方面，提供了一种载体，所述载体含上述分离出的多核苷酸。

在本发明的再一方面，提供了一种遗传工程宿主细胞，所述宿主细胞是用上述载体转化的宿主细胞。

本发明还提供了一种生产具有马尔尼菲青霉菌 PPIase II 活性的多肽的方法，该方法包括如下步骤：

(I) 将编码具有马尔尼菲青霉菌 PPIase II 活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列，形成抗原表达载体，所述的核苷酸序列与 SEQ ID NO. 1 中从核苷酸 333-1037 位的核苷酸序列有至少 70%同源性；

(II) 将步骤(I)中的表达载体转入宿主细胞，形成马尔尼菲青霉菌 PPIase II 重组细胞；

(III) 在适合表达马尔尼菲青霉菌 PPIase II 多肽的条件下，培养步骤(II)中的重组细胞；

(IV) 分离出具有马尔尼菲青霉菌 PPIase II 活性的多肽。

较佳的，上述生产具有马尔尼菲青霉菌 PPIase II 活性的多肽的方法中，所述核苷酸序列为 SEQ ID NO. 1 中从核苷酸 333-1037 位的核苷酸序列。

本发明还提供了一种抗体，所述抗体是能与上述马尔尼菲青霉菌 PPIase II 特异性结合的抗体。

本发明还包括一种探针分子，该探针分子通常含有马尔尼菲青霉菌

PPIase II的核苷酸序列的 8-100 个, 较佳地 15-50 个连续核苷酸。该探针分子可用于检测样品中是否存在编码马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的核酸分子。

本发明还提供了含所述的多肽或其连续片段的药物组合物。

本发明还提供了所述的多核苷酸、多肽及抗体在制备诊断和治疗针对马尔尼菲青霉菌引起的疾病的药物及试剂盒中的应用。

本发明还提供了包含所述的多核苷酸、多肽或抗体或它们的连续片断的试剂盒及生物芯片。

本发明还包括检测马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的核苷酸序列的方法, 它包括用上述的探针与样品进行杂交, 然后检测探针是否发生了结合。较佳地, 该样品是 PCR 扩增后的产物, 其中 PCR 扩增引物对应于马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的编码序列, 可位于该编码序列的两侧或中间。引物长度一般为 20-50 个核苷酸。

根据本发明公开的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 及其基因, 可以制备相关免疫抑制剂, 并可为进一步开发针对该病菌引起的疾病的药物提供重要的参考价值, 同时, 它们也可以作为这类疾病诊治的潜在药物靶点。

具体实施方式

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

在本发明中, “分离的”多核苷酸是指, 该多核苷酸或片断已从天然状态下位于其两侧的序列中分离出来, 还指该多核苷酸或片断已经与天然状态下伴随核酸的组份分开, 而且已经与在细胞中伴随其的蛋白质分开。

本发明中, 术语“马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的编码序列”是指编码具有马尔尼菲青霉菌 PPIase II 活性的多肽的核苷酸序列, 如 SEQ ID NO. 1 中 333-1037

位核苷酸序列及其简并序列。该简并序列是指，位于 SEQ ID NO.1 序列的编码框 333-1037 位核苷酸中，有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后产生的序列。由于密码子的简并性，所以与 SEQ ID NO.1 中 333-1037 位核苷酸序列同源性低至约 70% 的简并序列也能编码出 SEQ ID NO.2 所述的序列。该术语还包括在中度严紧条件下，更佳地在高度严紧条件下，与 SEQ ID NO.1 中从核苷酸 333-1037 位的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。此外，该术语还包括与 SEQ ID NO.1 中从核苷酸 333-1037 位的核苷酸序列的同源性至少 70%，更佳地至少 80%，更佳地至少 90% 的核苷酸序列。

该术语还包括能编码具有与马尔尼菲青霉菌 PPIase II 相同功能的蛋白的、SEQ ID NO.1 中开放阅读框序列的变异形式。这些变异形式包括（但并不限于）：若干个（通常为 1-90 个，更佳地 1-60 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个）核苷酸的缺失、插入和/或取代，以及在 5' 和/或 3' 端添加数个（通常为 60 个以内，更佳地为 30 个以内，更佳地为 10 个以内，最佳地为 5 个以内）核苷酸。

在本发明中，术语“马尔尼菲青霉菌 PPIase II”是指具有马尔尼菲青霉菌 PPIase II 蛋白活性的 SEQ ID NO.2 序列的多肽。该术语还包括具有与马尔尼菲青霉菌 PPIase II 相同功能的、SEQ ID NO.2 序列的变异形式。这些变异形式包括（但不限于）：若干个（通常为 1-50 个，更佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个）氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个（通常为 20 个以内，更佳地 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。该术语还包括马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的活性片断

和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括：同源序列、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用抗马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽，如包含马尔尼菲青霉菌 PPIase II 或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本发明还提供了马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的可溶性片段。通常，该片段具有马尔尼菲青霉菌 PPIase II 多肽序列的至少约 10 个连续氨基酸，通常至少约 30 个连续氨基酸，较佳地至少约 50 个连续氨基酸，更佳地至少约 80 个连续氨基酸。

发明还提供马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的类似物。这些类似物与天然多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异，也可以是不影响序列的修饰形式上的差异，或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到，如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变，还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还可以包括具有不同于天然 L-氨基酸的残基(如 D-氨基酸)的类似物，以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解，本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括：体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化，如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸、磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

在本发明中，可选用本领域已知的各种载体，如市售的载体。

在本发明中，术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞。

另一方面，本发明还包括对马尔尼菲青霉菌 PPIase II 具有特异性的抗体，尤其是单克隆抗体。这里“特异性”是指抗体能结合于马尔尼菲青霉菌 PPIase II 或片段。较佳地，指那些能与马尔尼菲青霉菌 PPIase II 或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的分子，也包括那些并不影响 PPIase II 蛋白功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的 PPIase II 结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如 Fab' 或 (Fab)₂ 片段；抗体重链；抗体轻链；遗传工程改造的单链 Fv 分子 (Ladner 等人，美国专利 NO. 4, 946, 778)；或嵌合抗体，如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达马尔尼菲青霉菌 PPIase II 或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人，Nature 256:495, 1975; Kohler 等人，Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人，Eur. J. Immunol. 6:292, 1976; Hammerling 等人，In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981)。本发明的抗体包括能阻断马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的抗体以及不影响其功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的片段或功能区，通过免疫技术获得，这些片段

或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如 *E. Coli*)中生产的基因产物来免疫动物而产生;与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽),可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

本发明的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 核苷酸序列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 库或按已知方法制备的 cDNA 库作为模板,扩增而得有关序列。

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。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。当然,也可通过先合成多个小片段,然后再进行连接而获得序列很长的片段。

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 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1

马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因的克隆

1. 总 RNA 分离(Total RNA isolation)

将马尔尼菲青霉菌,在 37°C 或 25°C 培养后,离心弃上清取菌体,加入 TRIzol

Reagents 抽提其总 RNA (TRIzol Reagents, Gibco, NY, USA)。用甲醛变性胶电泳鉴定总 RNA 质量。

2. mRNA 的分离(mRNA isolation)

用带 Oligo d(T) 的纤维素柱分离总 RNA 中的 mRNA (Invitrogen, Carlsbad, CA), 定量。

3. cDNA 文库的构建(Construction of cDNA library)

以 mRNA 为模板, 反转录酶作用下合成双链 cDNA。过柱筛选长度 >500bp 的片段, 用酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀, 无菌水溶解, 连接至 pDONR™222 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 载体, 以 CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行包装, 电击转化, 宿主菌使用 DH10B (Invitrogen, Carlsbad, CA) 细菌。涂板并测定滴度。

4. 测序及数据库建立(Sequencing and Database Constructing)

挑选文库中有外源片段插入的克隆, 扩增后抽提质粒 (Qiagen, Germany), 用 T3 和 T7 作为 3' 端和 5' 端的通用引物, 采用终止物荧光标记 (Big-Dye, Perkin-Elmer, USA) 的方法, 在 ABI 377 测序仪 (Perkin-Elmer, USA) 上进行 EST 大规模测序。测序结果用 FACTURA 软件去除载体序列, 传输到 SUN Ultra 450 Server 上进行下一步的处理。所有的序列信息再用 GCG 软件包 (Wisconsin group, USA) 中的 BLAST 和 FASTA 软件搜索已有的数据库 (Genebank+EMBL), 将无同源性或同源性低于 95% 的序列视为新基因建立数据库。

5. 基因的全长克隆(Cloning of Full-length cDNA)

在得到的新基因片段序列信息基础上, 进行 cDNA 全长克隆, 分两阶段进行:

(1) “电子克隆” (Electronic Cloning)

以新基因片段序列作为探针搜寻 dbEST 数据库, 将重叠序列 >50bp, 同源性

在 98%以上的表达序列标签(Expressed Sequence Tag, 简称“EST”)序列认为同一序列(consensus sequence), 取出并用 AUTOASSEMBLER 软件进行拼接, 部分 EST 可以延伸探针序列。再用 STRIDER 软件分析被延伸的序列是否具有完整的开放阅读框架(Open Reading Frame, ORF), 用 BLAST 搜寻 Genbank 或 SwissProt 以确定该序列在核苷酸和氨基酸水平上是否与其他物种有同源性, 以帮助判别所得到的基因全长完整性如何。通过电子克隆的方法, 通常可获取马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因的全长序列。

(2) cDNA 末端快速扩增(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)

如果通过“电子克隆”方法仍未得到完整的 cDNA 全长, 则在已有序列的 5' 或 3' 端设计引物, 在马尔尼菲青霉菌 cDNA 文库中进行长距离 PCR 反应。然后对 PCR 产物克隆、测序。用 AUTOASSEMBLER 及 STRIDER 软件分析被延长的序列有无完整的 ORF, 如无, 重复上述过程直至获得全长。

(3) RT-PCR

对于 5' 和 3' 端已知的序列, 如果中间尚有一段间隙(gap)无法从已有的公共数据库或自身数据库获得, 可考虑采用 RT-PCR 的方法。在序列 5' 端设计引物, 3' 端引物采用 Oligo-dT, 在马尔尼菲青霉总 RNA 库中进行扩增。然后对产物进行克隆、测序。最后拼接并获得全长。

通过组合使用上述 3 种方法, 获得了候选的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的全长编码序列, 即获得 SEQ ID NO. 1 所示的序列。

根据得到的全长 cDNA 序列推导出 PPIase II 的氨基酸序列, 共 234 个氨基酸, 其氨基酸序列详见 SEQ ID NO. 2。

实施例 2

马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因的序列信息与同源性分析:

本发明新的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因的全长 cDNA 为 1217bp, 详细序列见 SEQ ID NO. 1, 其中开放读框位于 333-1037 位核苷酸。根据全长 cDNA 推导出马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的氨基酸序列, 共 234 个氨基酸残基。详细序列见 SEQ ID NO. 2。

将马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的全长 cDNA 序列及其编码蛋白质用 BLAST 程序在 Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 和 Non-redundant GenBank CDS translations +PDB+ SwissProt+Superdate+PIR 数据库中进行核苷酸和蛋白质同源性检索, 结果发现: 在氨基酸水平上, 它与红色面包霉肽酰脯氨酰顺反异构酶(PPIase II, SwissProt Accession No. Q8X191) 的第 31-222 位氨基酸残基有 57% 的相同性和 70% 的相似性。由上可见, 马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因与红色面包 PPIase II 基因在蛋白水平上存在较高的同源性, 属于同一家族并且两者在功能上也有很高相似性。

本发明的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 除了可作为该家族一员用于进一步的功能研究, 还可用于与其他蛋白一起产生融合蛋白, 比如与免疫球蛋白一起产生融合蛋白。此外, 本发明的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 还可以与该家族的其他成员进行融合或交换片段, 以产生新的蛋白。例如将本发明的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 蛋白的 N 端与 MP1 蛋白的 N 端进行交换, 以产生新的活性更高或具有新特性的蛋白。

针对本发明马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的抗体, 用于筛选该家族的其他成员, 或者用于亲和纯化相关蛋白(如该家族的其他成员)。

实施例 3

马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的结构和功能研究:

将马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的氨基酸序列在 PROSITE 数据库(网址为:

<http://expasy.hcuge.ch/sprot/scnpsit1.html>)中检索基序(motif), 得到以下结果:

在氨基酸序列中, 存在以下功能基序:

- (i) 蛋白激酶 C 磷酸化位点(Protein kinase C phosphorylation site):
8-10, 40-42, 53-55, 79-81, 82-84, 97-99, 112-114, 117-119, 221-223
- (ii) 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site): 190-193
- (iii) N-豆蔻酰化位点(N-myristoylation site): 78-83, 134-139, 140-145, 216-221, 220-225
- (iv) N 糖基化位点 (N-glycosylation site): 51-54, 141-144, 178-181
- (v) 肽脯氨酰顺反异构酶位点 1 (CSA_PPIASE_1 Cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase signature): 118-135
- (vi) 肽脯氨酰顺反异构酶位点 2 (CSA_PPIASE_2 Cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase domain): 72-234

而蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、N-豆蔻酰化位点和 N 糖基化位点均与翻译后修饰(post-translational modifications)有关, 并且这些位点和肽脯氨酰顺反异构酶位点 1、2 在药物开发过程中起着关键作用, 可作为治疗由马尔尼菲青霉菌引起的疾病的药物的作用靶点。

实施例 4

马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因的生长发育表达谱

电子 Northern 表达谱。按 Ton C. 等人的方法(Ton C et al., Biochem Biophys

Res Commun 1997 Dec 18; 241(2): 589-594; Hwang DM, et al., Circulation 1997 Dec 16; 96(12): 4146-4203), 将马尔尼菲青霉菌 PPIase II cDNA 序列在 GCG 软件包中的 dbEST 数据库中做 BLAST 检索, 在得到的 EST 中, 概率值 $<10e^{-10}$ 、相同性 $>95\%$ 的 EST, 可视为该基因在不同生长发育过程中的转录表达本, 由此得出表达该基因的生长发育谱, 揭示它在马尔尼菲青霉菌不同发育阶段中都发挥着重要作用。

实施例 5

马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的制备和提纯

在该实施例中, 将全长的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 编码序列或片断构建入商品化的蛋白质融合表达载体之中, 以表达和提纯重组蛋白。

(1) 原核表达载体的构建, 以及转化大肠杆菌

根据马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的全长编码序列 (SEQ ID NO. 1), 设计扩增出完整编码阅读框的引物 (分别对应于编码序列 5' 和 3' 端的约 20 个以上核苷酸), 并在正反引物上分别引入限制性内切酶位点 (这根据选用的 pDEST™17 载体而定), 以便构建表达载体。将马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因在保证阅读框正确的前提下克隆至 pDEST™17 载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。鉴定好的表达载体利用电击转化方法转入大肠杆菌 BL21, 筛选鉴定得到含有 pDEST™17-PPIase II 表达载体的工程菌 BL21-pDEST™17-PPIase II。

(2) 表达 GST-PPIase II 重组蛋白的工程菌的分离鉴定

挑取单菌落的 BL21-pDEST™17-PPIase II 工程菌于 3ml 含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中振荡培养过夜, 按 1: 100 的浓度吸取培养液于新的 LB 培养基 (含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素) 中培养约 3 小时, 至 OD_{600} 达 0.5 后, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 继续于 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别培养 0, 1, 2, 3 小时。取培养时间不同

的 1ml 菌液离心，在细菌沉淀物中加入裂解液(2×SDS 上样缓冲液 50 μl，蒸馏水 45μl，二巯基乙醇 5μl)，混悬细菌沉淀，沸水浴中煮 5 分钟，10000rpm 离心 1 分钟，上清加入 12%SDS-PAGE 胶中电泳。染色后观察预期分子量大小的蛋白量随 IPTG 诱导时间增加而增加的菌株即为表达 GST-PPIase II 融合蛋白的工程菌。

(3) GST-PPIase II 融合蛋白的提取纯化

按上述方法诱导表达 GST-PPIase II 融合表达蛋白的工程菌 BL21-pDEST™17-PPIase II。诱导后的细菌离心沉淀，按每 400ml 菌加入 20ml PBS 重悬细菌，超声破碎细菌。破菌完全的超声液按每毫升加入 20 微升的量加入 PBS 饱和的 50%谷胱苷肽 Sepharose 4B，37 °C 振荡结合 30 分钟，10000 rpm 离心 10 分钟沉淀结合了 GST-PPIase II 的谷胱苷肽 Sepharose 4B，弃上清。按每毫升超声液所得沉淀加入 100 μl PBS 的量清洗两次，而后按每毫升超声液所得沉淀加入 10 μl 还原型谷胱苷肽洗脱液，室温置 10 分钟，10000 rpm 离心 10 分钟，上清即为洗脱的融合蛋白。重复洗脱两次。洗脱的上清保存于-80℃，并进行 SDS-PAGE 电泳，检测纯化效果。在 26kDa 处的蛋白质条带即为马尔尼菲青霉菌 PPIase II 蛋白。

实施例 6

马尔尼菲青霉菌 PPIase II 在酵母中进行真核细胞表达

1. 马尔尼菲青霉菌 PPIase II 酵母表达载体的构建及转化

根据马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的全长编码序列(SEQ ID NO. 1)，设计扩增出完整编码阅读框的引物，并在正反引物上分别引入限制性内切酶位点(这可视选用的载体而定)，以便构建表达载体。将马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的 cDNA 在保证阅读框架的前提下克隆至 pYES2-DEST52 载体(Invitrogen, Carlsbad, CA)。鉴定好的表达载体利用电击转化方法转入酵母细胞 DB3.1 中，利用氨苄青霉素

筛选鉴定得到含有 pYES2-DEST52-PPIase II 表达载体的工程菌 DB3.1-pYES2-DEST52-PPIase II。

2. 表达 PPIase II 重组蛋白的工程菌的分离鉴定

挑取单菌落的 DB3.1-pYES2-DEST52-PPIase II 工程菌于 3ml 含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中振荡培养过夜，按 1:100 的浓度吸取培养液于新的 YPD 培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素)中培养至 OD_{600} 达 0.5。取 1ml 菌液离心，在菌体沉淀物中加入裂解液(2 \times SDS 上样缓冲液 50 μl ，蒸馏水 45 μl ，二巯基乙醇 5 μl)，混悬菌体沉淀，沸水浴中煮 5 分钟，10000rpm 离心 1 分钟，上清加入 12%SDS-PAGE 胶中电泳。染色后观察预期分子量大小的蛋白量的菌株即为表达马尔尼菲青霉菌 PPIase II 融合蛋白的工程菌。

收集转化的细胞进行 Western 鉴定。将菌体裂解后进行 SDS-PAGE 电泳，电泳后的胶于 Pharmacia 的 Multiphor II 半干电转移仪中将蛋白质转印到硝酸纤维素膜上，将硝酸纤维素膜置于封闭液中封闭 1 小时，而后于抗马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的抗体溶液中封闭 1 小时，TBS 液振荡清洗 5 分钟共 2 次，而后将膜置于生物素标记的抗马尔尼菲青霉菌 PPIase II 一抗的第二抗体溶液中振荡 1 小时，TBS 清洗，加入亲和素-碱性磷酸酶复合物反应 30 分钟，TBS 清洗 2 次，加入新鲜配制的显色液显色观察蛋白条带。

挑取高表达马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的克隆。

3. 马尔尼菲青霉菌 PPIase II 的提取纯化

按上述方法诱导表达 PPIase II 的工程菌 DB3.1-pYES2-DEST52-PPIase II。收集菌体沉淀，菌体沉淀加入 PBS 重悬菌体，超声破碎菌体，离心，清洗几次，进行 SDS-PAGE 电泳，检测纯化效果。在 26kDa 处的蛋白质条带即为马尔尼菲青霉菌 PPIase II。

实施例 7

抗马尔尼菲青霉菌 PPIase II 抗体的制备

将实施例 5 和实施例 6 中获得的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 用层析法进行分离后备用,也可以用 SDS-PAGE 凝胶电泳法进行分离,将电泳条带从凝胶中割下,并用等体积的完全 Freund's 佐剂乳化。取 6-8 周龄 Balb/C 雌鼠,用 50-100 μ g/0.2ml 乳化过的蛋白,对小鼠进行腹膜内注射。14 天后,用非完全 Freund's 佐剂乳化的同样抗原对小鼠以 50-100 μ g/0.2ml 的剂量再加强免疫一次,3-5 天后用于融合。然后制备饲养细胞,再进行细胞融合。

在细胞融合 10-15 天后,需逐孔进行检查,一旦发现旺盛的杂交细胞集落生长,就应用马尔尼菲青霉菌 PPIase II 做抗体活性的初步筛选,常用的方法有:免疫荧光试验、发射免疫试验(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)。检查出抗体活性的孔后,立刻进行克隆培养,并分离出抗体。

实施例 8

马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因用于制备生物芯片

用获取的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因的核苷酸序列设计引物,扩增出全长的马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因或该基因的部分片断,用作生物芯片点样的样品。

用英国的 BioRobotics 自动点膜仪将样品点在 8 \times 12cm 尼龙膜上,每一标本点 4 个点,每点的 DNA 量约为 10ng。阳性对照是重复 4 次点样的人 β -actin 基因,阴性对照是重复 4 次点样的 λ 噬菌体 DNA。

含有马尔尼菲青霉菌 PPIase II 基因的芯片可用于感染马尔尼菲青霉菌疾病的诊断和药物筛选。

序 列 表

- <110> 上海人类基因组研究中心
 <120> 一种新的马尔尼菲青霉菌 PPIase II、其编码序列及其应用
 <130> NP-1253
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 1217
 <212> DNA
 <213> 马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffei*)

<220>

<221> CDS

<222> (333)..(1037)

<400> 1

tatcaatcga ggttaccatc tgaataacta tttcattggt ttgcttctga agtgtattac	60
tcttttgtct acctttttta atcgcgtttc cttgctcttg cgtgacgctg ttggtgctgt	120
atatttattc atcaccaagc cccccggcat aaaagtttct ctgaaacgct gtictattca	180
gcgccgattg aattgittca attggctggt tgactgtcct cgtcaataat acggctcgaa	240
atctttcgta ccgaaccctt cattctgccc ctgcgccgtg acttgcgctg cccctccaga	300
acagctttgc ttttcttaga ttctaaggca aa atg gca aca atg ttc acc cga	353
	Met Ala Thr Met Phe Thr Arg
	1 5
agc ctc aga gga tca ctg acc acc cca cct tct gct ttt cgc tcg gtc	401
Ser Leu Arg Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Ser Ala Phe Arg Ser Val	
10 15 20	
tcc tcc ttc att agt act tca tct cct gcc act tca gct ttt gct tcc	449
Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Ser Pro Ala Thr Ser Ala Phe Ala Ser	
25 30 35	
tcc ctc cgt cat cct act ttc tct cca ggt ttc aat tgc tct tct cgt	497
Ser Leu Arg His Pro Thr Phe Ser Pro Gly Phe Asn Cys Ser Ser Arg	
40 45 50 55	
gca ttc tct caa tca tct gca atc atg tct act gcc tgg ttt gac att	545

Ala Phe Ser Gln Ser Ser Ala Ile Met Ser Thr Ala Trp Phe Asp Ile	
60 65 70	
gag tac ggc ccc aat gct ggt tcc acc aag acc ggc cgt gtc gaa ttc	593
Glu Tyr Gly Pro Asn Ala Gly Ser Thr Lys Thr Gly Arg Val Glu Phe	
75 80 85	
aag ctc tac gac gat gtc gtc ccc agg acc gcc aag aac ttt gct gag	641
Lys Leu Tyr Asp Asp Val Val Pro Arg Thr Ala Lys Asn Phe Ala Glu	
90 95 100	
ctc tgc aag ggt ttc acc gac gag act ggc aag ctc ttg acc tac aag	689
Leu Cys Lys Gly Phe Thr Asp Glu Thr Gly Lys Leu Leu Thr Tyr Lys	
105 110 115	
ggc tct tct ttc cac cgt gtc att ccc cag ttc atg ctt cag ggt ggt	737
Gly Ser Ser Phe His Arg Val Ile Pro Gln Phe Met Leu Gln Gly Gly	
120 125 130 135	
gac ttc acc cgt ggc aac ggt acc ggt gga aag tcc atc tac ggt gag	785
Asp Phe Thr Arg Gly Asn Gly Thr Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Glu	
140 145 150	
aag ttt gcc gac gag aac ttc aag atc cgc cac gag cgc cct ggt ctc	833
Lys Phe Ala Asp Glu Asn Phe Lys Ile Arg His Glu Arg Pro Gly Leu	
155 160 165	
ctc tcc atg gcc aac gct ggt ccc aac act aac ggc tcc caa ttc ttc	881
Leu Ser Met Ala Asn Ala Gly Pro Asn Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe	
170 175 180	
atc acc acc gtc acg acc agc tgg ctc gat ggc aag cac gtc gtc ttc	929
Ile Thr Thr Val Thr Thr Ser Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe	
185 190 195	
ggc gag gtt gtc aag gga tac gac atc gtc gag gcc atc gag aag ctc	977
Gly Glu Val Val Lys Gly Tyr Asp Ile Val Glu Ala Ile Glu Lys Leu	
200 205 210 215	
ggt acc tcc agc ggc tct gtc aag gga gtc gct aag atc gtc gac tct	1025
Gly Thr Ser Ser Gly Ser Val Lys Gly Val Ala Lys Ile Val Asp Ser	
220 225 230	
ggc gct gct taa aatgtttcca taacttcctt aaaatgtgtt actgcatag	1077
Gly Ala Ala	
atgcattcta ctagacaact ttgaatggta gattgggtgc tatttttctt tgccattagc	1137
ttacaagtca gtcctttgaa gaaatgcaat gattgtattt ctgaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1197

aaaaaaaaa aaaaaaaccc

1217

<210> 2

<211> 234

<212> PRT

<213> 马尔尼菲青霉菌 (Penicillium marneffeii)

<400> 2

Met Ala Thr Met Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Leu Thr Thr Pro
 1 5 10 15

Pro Ser Ala Phe Arg Ser Val Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Ser Pro
 20 25 30

Ala Thr Ser Ala Phe Ala Ser Ser Leu Arg His Pro Thr Phe Ser Pro
 35 40 45

Gly Phe Asn Cys Ser Ser Arg Ala Phe Ser Gln Ser Ser Ala Ile Met
 50 55 60

Ser Thr Ala Trp Phe Asp Ile Glu Tyr Gly Pro Asn Ala Gly Ser Thr
 65 70 75 80

Lys Thr Gly Arg Val Glu Phe Lys Leu Tyr Asp Asp Val Val Pro Arg
 85 90 95

Thr Ala Lys Asn Phe Ala Glu Leu Cys Lys Gly Phe Thr Asp Glu Thr
 100 105 110

Gly Lys Leu Leu Thr Tyr Lys Gly Ser Ser Phe His Arg Val Ile Pro
 115 120 125

Gln Phe Met Leu Gln Gly Gly Asp Phe Thr Arg Gly Asn Gly Thr Gly
 130 135 140

Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Glu Lys Phe Ala Asp Glu Asn Phe Lys Ile
 145 150 155 160

Arg His Glu Arg Pro Gly Leu Leu Ser Met Ala Asn Ala Gly Pro Asn
165 170 175

Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val Thr Thr Ser Trp Leu
180 185 190

Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly Glu Val Val Lys Gly Tyr Asp Ile
195 200 205

Val Glu Ala Ile Glu Lys Leu Gly Thr Ser Ser Gly Ser Val Lys Gly
210 215 220

Val Ala Lys Ile Val Asp Ser Gly Ala Ala
225 230

专利名称(译)	一种新的马尔尼菲青霉菌PPIase II、其编码序列及其应用		
公开(公告)号	CN1676609A	公开(公告)日	2005-10-05
申请号	CN200410017298.3	申请日	2004-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	上海人类基因组研究中心		
申请(专利权)人(译)	上海人类基因组研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	上海人类基因组研究中心		
[标]发明人	汤生荣 任双喜 卜云萍 严中华 殷世亮 施炜亮 李运千 武金炜 卢凌峰 张丕燕 钱震		
发明人	汤生荣 任双喜 卜云萍 严中华 殷世亮 施炜亮 李运千 武金炜 卢凌峰 张丕燕 钱震		
IPC分类号	A61K38/52 A61K48/00 A61P37/00 C07K14/385 C07K16/40 C12N1/15 C12N15/11 C12N15/31 C12N15/61 C12N15/63 C12P1/02 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种在马尔尼菲青霉菌(*Penicillium marneffeii*)胞浆中表达的新的马尔尼菲青霉菌肽脯氨酸顺反异构酶II(PPIase II)及其编码序列, 本发明还提供了该肽脯氨酸顺反异构酶II(PPIase II)及其核酸的制备方法及其应用。根据本发明公开的马尔尼菲青霉菌PPIase II及其基因, 可以制备相关免疫抑制剂, 并可为进一步开发针对该病菌引起的疾病的药物提供重要的参考价值, 同时, 它们也可以作为这类疾病诊治的潜在药物靶点。