

[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 200610095340.2

[51] Int. Cl.

*C12N 9/00 (2006.01)*

*C12N 1/21 (2006.01)*

*C12N 15/52 (2006.01)*

*C12Q 1/68 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

*A61K 39/04 (2006.01)*

[43] 公开日 2007 年 7 月 11 日

[11] 公开号 CN 1995335A

[51] Int. Cl. (续)

*A61K 48/00 (2006.01)*

*A61P 31/06 (2006.01)*

[22] 申请日 2006.12.25

[21] 申请号 200610095340.2

[71] 申请人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路 1 号

[72] 发明人 谢建平 陈宏玲 王洪海

[74] 专利代理机构 重庆华科专利事务所

代理人 康海燕

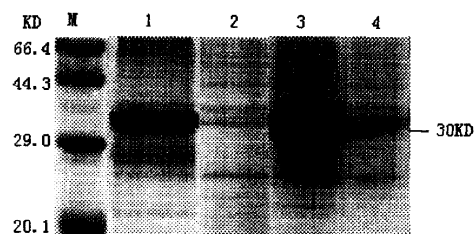
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

结核菌硫氰酸酶及其用途

[57] 摘要

本发明属于医药生物技术和环境生物技术领域,涉及结核菌硫氰酸酶及其用途,尤其是结核菌硫氰酸酶的重组菌,固定化的结核菌硫氰酸酶工程菌或者纯化酶,结核菌硫氰酸酶进行脱毒和生物转化的方法,含有 SseB 的 DNA 疫苗或者亚单位疫苗。



1. 结核菌硫氰酸酶，其特征是含有结核菌硫氰酸酶的重组菌以及纯化的重组酶。
2. 权利要求 1 所述的结核菌硫氰酸酶，其特征在于硫氰酸酶是结核菌的 Rv2291 基因编码的 SseB。
3. 权利要求 1 所述的结核菌硫氰酸酶，其特征在于所述重组菌为大肠杆菌。
4. 权利要求 1 或 2 所述的结核菌硫氰酸酶的用途，其特征是利用固定化的重组菌或者纯化酶进行生物转化或者污染物清除。
5. 权利要求 1 或 2 所述的结核菌硫氰酸酶的用途，其特征是利用重组菌或者纯化酶进行酶调节分子的筛选。
6. 结核分枝杆菌 SseB 基因在结核病诊断和药物治疗效果监控中的用途，其特征是利用重组表达的 SseB 的抗体或者抗体类似分子进行免疫检测。
7. 结核分枝杆菌 SseB 基因在 DNA 疫苗或者亚单位疫苗中的应用，其特征是利用结核分枝杆菌 SseB 基因及其产物，作为疫苗组分，预防结核病。

## 结核菌硫氰酸酶及其用途

### 技术领域

本发明属于医药生物技术和环境生物技术领域，涉及结核菌硫氰酸酶及其用途。

### 背景技术

硫代硫酸硫转移酶 (thiosulfate sulfurtransferase, TST)，是类似硫氰酸生成酶 (rhodanese) 的一种蛋白，广泛存在于各种生物体中，包括细菌、植物以及哺乳动物，一般定位在线粒体上，但在低等脊椎动物如两栖类、爬行类和鱼，也存在于胞液中。含量随种群、组织、性别、年龄而异。其主要功能为催化硫代硫酸盐和氰根离子转化为亚硫酸盐和硫氰酸盐从而达到代谢和解毒的目的，在 Fe-S 中心的 Fe-S 蛋白中作为一个硫插入酶产生氧化还原中心，所以在铁硫蛋白的合成或修复上不可缺少。且已证明 TST 可能与转硫到 tRNA 核苷有关，这一改变可能在翻译过程中是重要的。如今 TST 已被用作研究蛋白稳定性和折叠的模型，研究显示 Cys247 残基是 TST 的一个催化位点，Arg186 和 Lys249 在硫转移功能中也是两个主要的残基，所有催化所需残基在 C 端区域，而 N 端区域似乎与酶稳定和活性结构相关。

随着结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) H37Rv 基因组全序列破译，明确了这一严重威胁人类健康的致病菌基因组共编码了 4 种硫代硫酸硫转移酶 (CysA2[Rv0815c], CysA3[Rv3117], SseA [Rv3283], SseB [Rv2291]), 说明这类蛋白对分枝杆菌非常重要。用中医临床上治疗肺结核的毛茛科植物猫爪草作用 MTB 后 TST 表达下调，表明它可能通过对该酶的抑制，对结核分枝杆菌的氨基酸代谢、转录水平、氰化物的解毒以及硫和铁转移等方面产生影响。结核菌在体内主要宿主是巨噬细胞，低氧条件下，BCG 的 CysA2 和 CysA3 表达明显上调，这说明该酶可能在细菌和人体内持续感染中也有作用。

鉴于结核病已成为全球头号传染病杀手，在全球结核病的疫情呈发展中国家居高不下，发达国家上升的严峻形势。深入研究引起该病的结核分枝杆菌的致病机理，了解其生存所需重要蛋白结构和功能，掌握结核菌调控机制，将为今后开发新药，最终消灭这一缠绕人类多个世纪的顽疾打下基础。

### 发明内容

本发明的目的在于提供，1. 结核菌硫氰酸酶的重组菌；2. 固定化的结核菌硫氰酸酶工程菌或者纯化酶；3. 结核菌硫氰酸酶进行脱毒和生物转化的方法。4. 含有 SseB 的 DNA 疫苗或者亚单位疫苗。

本发明的技术方案如下：

本发明包括以下内容：1. 结核菌硫氰酸酶的重组菌；2. 固定化的结核菌硫氰酸酶工程菌或者纯化酶；3. 结核菌硫氰酸酶进行脱毒和生物转化的方法。4. 含有 SseB 的 DNA 疫苗或者亚单位疫苗的构建及其应用。

采用本领域技术人员熟知的技术，从结核菌基因组扩增 SseB 基因，在大肠杆菌等适宜的宿主表达，纯化表达产物，进行抗体制备，亚单位疫苗制备以及 DNA 疫苗制备并检测效果。

1. 基因模板提取：将待克隆菌株在 LB 培养基或 YE 培养基或者 Middlebrook 7H9、sauton 等分枝杆菌能够生长的培养基中，培养到合适的菌体浓度，按照本领域一般技术人员熟悉的步骤、试剂和方法提取菌体 DNA。

2. 工程菌的构建 按照本领域一般技术人员熟悉的步骤、试剂和方法，将基因组 DNA 克隆到适当的载体，转化适当的宿主菌，通过一定的选择标记，收集获得的工程菌。

3. 功能基因的筛选 按照本领域一般技术人员熟悉的步骤、试剂、完全可以从商业途径获得的载体、限制性内切酶和方法，将目标基因克隆到载体，转化宿主细胞，筛选转化子。分别根据已知的结核菌入侵人体和动物模型可能遭遇的不利环境，进行人工模拟，从基因组表达文库筛选相应的转化子，并进一步验证。

4. 利用含有功能基因的重组菌，进行功能基因抑制剂或激活剂的筛选。

## 发明效果

利用本技术方案涉及的方法，构建了结核菌 sseB 基因重组菌，纯化了该蛋白，构建了药物筛选模型，利用纯化的蛋白作为亚单位疫苗组分，免疫了动物，取得了良好效果，采用固定化技术。

## 附图说明

图 1. 结核菌 sseB 基因 PCR 产物。 M DNA 分子量标记；1 PCR 产物。

图 2. SDS-PAGE 分析包涵体和上清中重组蛋白 sseB。1-2 30℃, IPTG: 1.0 mmol/L, 10 h; 包涵体和上清, 3-4. 25℃, IPTG: 1.0 mmol/L, 6 h; 包涵体和上清液, M 小分子量标记。

## 具体实施方式

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌株: MTB H37Rv 基因组 DNA; 克隆宿主 *E. coli* DH5α; 表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3) 由本研究所保存。

1.1.2 载体: pET-28a(+) 为本研究所保存。

1.1.3 主要试剂: 蛋白酶 K 为 Merck 公司产品; Taq DNA 聚合酶、*EcoRI*、*HindIII* 为 TaKaRa 公司产品; 核酸分子量标准为鼎国公司产品; 卡那霉素、IPTG、RNase A 为 Sigma 公司产品;

低分子量蛋白质标准为上海生物化学研究所产品。

## 1.2 目的基因 PCR 扩增和克隆、鉴定

根据GenBank中MTB *sseB*基因序列,自行设计一对PCR引物(由北京赛百盛公司合成),序列为:5'-AGCGAATTCGTGCAAGCCCGT-3'; P2: 5'-GCCAAGCTTCTATGCAGTGCCA-3'(划线序列分别为*EcoRI*和*HindIII*酶切位点)。以MTB H37Rv基因组DNA为模板,P1、P2为引物进行PCR扩增。PCR反应体系(总体积20  $\mu$ l): 10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ l, P1、P2(10pmol /  $\mu$ l)各1  $\mu$ l, dNTP(10mmol / l, 含Mg<sup>2+</sup>)2  $\mu$ l, 模板DNA 1  $\mu$ l (200ng /  $\mu$ l), 灭菌去离子水12.5  $\mu$ l, Taq DNA聚合酶0.5  $\mu$ l (2U /  $\mu$ l)。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58.5 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共35个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸5 min。

以*EcoRI*、*HindIII*双酶切PCR纯化产物和载体pET-28a(+), 经T4 DNA连接酶连接并转化至感受态克隆宿主*E. coli* DH5 $\alpha$ 中 通过质粒大小、酶切分析及PCR扩增鉴定重组克隆, 获得重组质粒pET-28a(+)-*sseB*, 由北京赛百盛公司进行测序。

## 1.3 SseB基因序列识别和功能预测

目的基因序列在线递交到DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/tmdas.cgi>)、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TargetP进行在线蛋白质跨膜区、信号肽和剪切位点及亚细胞定位。并用生物软件DNASTAR中MegAlign进行基因序列比对及进化树绘制, 在线用SWISSMODEL软件进行目的蛋白活性区域和三维模建预测。

## 1.4 原核表达重组质粒的构建和蛋白表达可溶性分析

将重组质粒pET-28a(+)-*sseB*转化至感受态表达宿主*E. coli* BL21(DE3)中, 经筛选获得原核表达重组菌pET-32a(+)-*sseB*1。将原核表达重组克隆接种于7mL(含卡那霉素50  $\mu$ g / mL)的LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C 200r / min培养过夜, 次日取2mL接种于50mL(含卡那霉素50  $\mu$ g / mL) LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C 220r / min培养至OD<sub>600</sub>为0.8, 加1mmol/mL IPTG诱导, 分别取30 $^{\circ}$ C、10h 和25 $^{\circ}$ C 6h 两条件下菌液超声波破碎, 4 $^{\circ}$ C、15000g 离心10 min, 取上清和沉淀分别进行15%的SDS-PAGE 分析, 检测目的蛋白的存在形式, 以确定纯化方案。

## 2 结果和分析

### 2.1 PCR扩增、重组子的鉴定及序列分析

以结核分枝杆菌染色体DNA为模板, 以*sseA*基因特异性引物进行PCR扩增, 扩增产物经1.3%琼脂糖凝胶电泳分析, 可见1条约830bp的DNA片段, 与预期DNA片段大小一致(图1)。*sseB*纯化的PCR产物与pET-28a(+)连接, 构建重组质粒, 通过质粒大小、酶切分析、PCR扩增及序列分析鉴定重组质粒。以*EcoRI*、*HindIII*双酶切重组质粒, 得到约5300 bp的pET-28a(+)线性片段

和约830bp的插入片段（图2）。序列分析结果与GenBank MTB *sseA*基因序列对比完全吻合，表明成功地构建出*sseB*基因的原核表达重组质粒。

## 2. 2 蛋白表达可溶性分析

IPTG 诱导重组质粒的表达情况如图 5 所示。在分子量约为 30 KD 处包涵体和上清都出现蛋白，与目的蛋白分子量一致，可见这一蛋白在包涵体和上清中都存在，且 25℃时仅诱导 6 小时上清中目的蛋白就已比 30℃10h 的多。

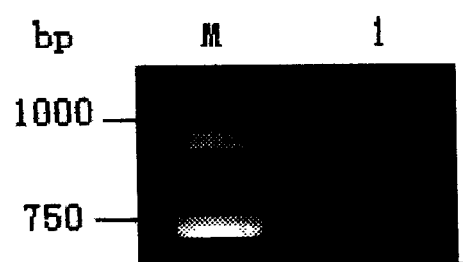


图 1

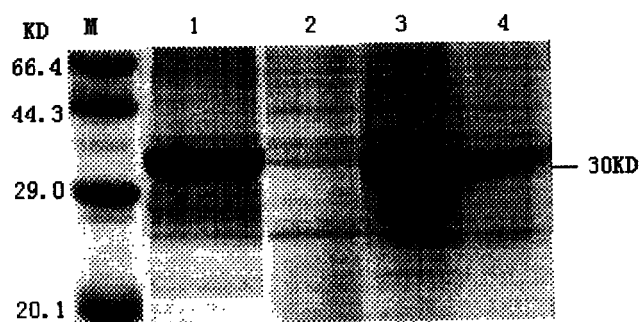


图 2

|                |                                                                              |         |            |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 结核菌硫氰酸酶及其用途                                                                  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1995335A</a>                                                   | 公开(公告)日 | 2007-07-11 |
| 申请号            | CN200610095340.2                                                             | 申请日     | 2006-12-25 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 西南大学                                                                         |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 西南大学                                                                         |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 西南大学                                                                         |         |            |
| [标]发明人         | 谢建平<br>陈宏玲<br>王洪海                                                            |         |            |
| 发明人            | 谢建平<br>陈宏玲<br>王洪海                                                            |         |            |
| IPC分类号         | C12N9/00 C12N1/21 C12N15/52 C12Q1/68 G01N33/53 A61K39/04 A61K48/00 A61P31/06 |         |            |
| 代理人(译)         | 康海燕                                                                          |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                               |         |            |

#### 摘要(译)

本发明属于医药生物技术和环境生物技术领域，涉及结核菌硫氰酸酶及其用途，尤其是结核菌硫氰酸酶的重组菌，固定化的结核菌硫氰酸酶工程菌或者纯化酶，结核菌硫氰酸酶进行脱毒和生物转化的方法，含有SseB的DNA疫苗或者亚单位疫苗。

