

[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 200610095337.0

[51] Int. Cl.

*G12N 15/31 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

*A61K 39/04 (2006.01)*

*A61K 48/00 (2006.01)*

*A61P 31/06 (2006.01)*

[43] 公开日 2007 年 7 月 11 日

[11] 公开号 CN 1995352A

[22] 申请日 2006.12.25

[21] 申请号 200610095337.0

[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 陈长恒 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

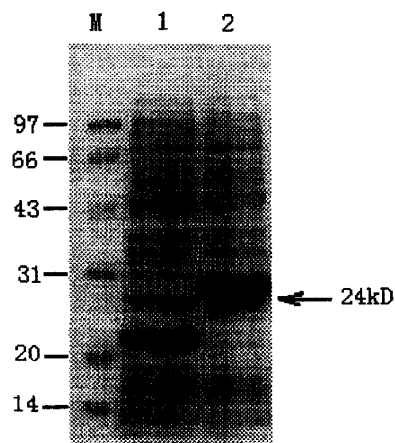
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

## [54] 发明名称

结核分枝杆菌冷休克蛋白及其用途

## [57] 摘要

本发明属于医药生物技术领域，涉及结核分枝杆菌冷休克蛋白基因及其用途，尤其是在冷休克蛋白活性调控分子筛选、利用冷休克蛋白的结核病预防性疫苗和结核病诊断试剂方面的用途。



- 
1. 结核分枝杆菌冷休克蛋白基因，其特征是表达结核菌冷休克蛋白的重组工程菌、纯化的重组酶以及利用纯化的酶或工程菌进行结核分枝杆菌冷休克蛋白调节分子的筛选。
  2. 结核分枝杆菌冷休克蛋白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冷休克蛋白的抗体或者抗体类似分子进行免疫检测。
  3. 结核分枝杆菌冷休克蛋白在 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冷休克蛋白及其产物，作为疫苗组分，预防结核病。

## 结核分枝杆菌冷休克蛋白及其用途

### 技术领域

本发明属于医药生物技术领域，涉及结核分枝杆菌冷休克蛋白基因及其用途，尤其是在冷休克蛋白活性调控分子筛选、利用冷休克蛋白的结核病预防性疫苗和结核病诊断试剂方面的用途。

### 背景技术

全球结核病仍然是传染病首位杀手，全球结核病流行日益加剧，世界卫生组织（WHO）于1993年史无前例地宣布“全球结核病紧急状态”，1998年又重申遏制结核病的行动刻不容缓。2004年有900万新发结核病例，另有约200万结核病患者死亡[6]。全球耐多药结核病的发生率上升和广泛传播给结核病控制工作带来了严重威胁，为了开发新的药物用于结核病的治疗，寻找其病原菌——结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*，以下简称MTB）中的抗原蛋白作为药物治疗的靶标将会是今后抗结核药物研发的一个重要方向。

冷休克蛋白(cold shock protein，以下简称CSP)是与热休克蛋白(heat shock protein，以下简称HSP)相对的另一类分子伴侣。它们是高度保守并且几乎存在于所有物种。根据它们序列的同源性和分子量而分为几个家族，如hsp110，hsp100，hsp90，hsp60，hsp40，hsp10等。HSP最初是在热刺激和其他压力作用时发现的，接着发现其陪伴的许多蛋白都是具有各种功能的，它们即使在非压力存在中，在蛋白成功折叠，组装，胞内定位，分泌，调节和降解方面都有重要作用。HSP可以识别和结合其他蛋白，从而防止后者与另外的蛋白分子不适宜的错误作用。对蛋白的折叠结合和释放通常是由核酸的结合或水解来实现的。伴侣的活性丧失许多严重的人类疾病的发生，如在癌症中其表达水平就有明显变化。HSP的研究已经较为涉及各个领域，如水生和陆上环境压力，环境变化的生物指示剂，生物与宿主的寄生以及共生关系，衰老和凋亡等[29]。而在进化方面，HSP被认为是潜在的基因突变的缓冲剂(buffering agent)，在缓冲外界环境压力变化引起的基因改变，并且适时释放这些变化来使得物种适应环境变化的需要，因而“缓冲剂”的缺失或突变等都会造成适应力的下降[31]。近来分枝杆菌研究最多则是在于分枝杆菌的HSP与癌症的关系，在抗原呈递方面的作用[30]，以及其与自身免疫系统疾病的联系，还有就是利用HSP亚结构域来改造卡介苗(BCG)。然而关于分子伴侣的研究仍然存在许多问题无法解释，通过研究CSP可以有助于我们对这两类分子伴侣进行对比和深入研究。

CSP是广泛存在于革兰氏阳性菌和阴性菌中的应激蛋白,在保护机体帮助细胞适应低

温环境方面起着重要的作用。通过与特异序列结合,调控基因的转录和翻译,克服低温的毒害效应。大多数 CSP 是在温度降低的起始阶段合成,其基本功能在于 DNA 的包装、转录、RNA 的降解、翻译以及核糖体组装等[22],它与细菌的多个生理过程有着密切的联系,如:对低温的适应、细胞生长的控制、营养胁迫。曾有文献报道的研究过 CSP 的微生物主要是嗜温菌如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、耶耳辛氏肠炎杆菌(*Yersinia enterocolitica*)[16]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [25]、乳酸杆菌(*Lactobacillus casei*) [15]、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*) [14] 等,嗜冷菌如 *Methanogenium frigidum* 和 *Methanococcoides burtonii*[17]等,嗜热菌如嗜热杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) [18]和热容芽孢杆菌(*Bacillus caldolyticus*) [19]等。CspA 家族是研究最多的冷激蛋白家族,1987 年首次从大肠杆菌(*Escherichia coli*)中分离的 CspA[1],是大肠杆菌中最主要的冷休克蛋白之一,它与真核生物的 Y-box 结合蛋白具有极高的同源性[2],但其结合序列的特异性较低;在大肠杆菌中已对其进行克隆、测序,功能、结构、调控的研究也已取得一定进展,随后从枯草芽孢杆菌中分离出主要冷休克蛋白 CspB,并对该蛋白进行异源过量表达,结晶和 X-ray 分析[3],发现 CspB 作为分子伴侣,与单链核酸中的 ATTGG 序列和 CCAAT 序列具有较高的亲合性[4]。而在结核分枝杆菌中的 CspA 是培养上清中滤液蛋白(culture filtrate protein,以下简称 CFP)的一种,但是它并不含典型的信号肽序列,其外排机制尚不清楚,推测可能除了信号肽,脂质对于结核菌细胞蛋白的定位也极其重要[12]。CFP 在抗结核疫苗的开发中,对于寻找特异的 T 细胞抗原方面发挥着重要作用。CspA 作为 CFP,研究其在结核分枝杆菌中的性质、功能,及其与致病的关系等可以作为寻求小分子化合物用于治疗结核病的依据。

## 发明内容

本发明的目的在于提供,1. 一种重组表达结核菌冷休克蛋白的工程菌;2. 获得大量纯化的冷休克蛋白,进行抗体制备;3. 利用含有冷休克蛋白的工程菌作为药物靶标研发新的药物的模型;4. 含有冷休克蛋白的 DNA 疫苗或者亚单位疫苗的构建及其应用。

## 本发明的技术方案如下:

采用本领域技术人员熟知的技术,从结核菌基因组扩增冷休克蛋白基因,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。

## 实现上述目的的基本技术路线为:

总体技术方案是克隆包括提取结核菌基因组,利用合适的载体和限制性内切酶片段,构建转化载体,将基因组 DNA 克隆到合适的大肠杆菌宿主细胞。

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，得到了 1. 一种重组表达结核菌冷休克蛋白的工程菌；2. 获得大量纯化的冷休克蛋白，进行抗体制备；3.利用含有冷休克蛋白的工程菌作为药物靶标研发新的药物的模型；4. 含有冷休克蛋白的 DNA 疫苗或者亚单位疫苗的构建及其应用。

### 附图说明

图 1. 重组表达的结核分枝杆菌冷休克蛋白产物。

### 具体实施方式

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和培养：MTB H37Rv 由重庆市肺科医院提供并灭活。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α、质粒pET32a和宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3) 为本实验室保存。

1.1.2 试剂：限制性内切酶 *Nco* I 和 *Eco*R I、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司，*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 和 buffer、IPTG 购自北京鼎国生物技术有限责任公司，Biospin 胶回收试剂盒购自博日科技有限公司，Ni<sup>2+</sup>-Sepharose 和 ÄKTA prime 蛋白纯化系统购自 Amersham Biosciences。

### 1.2 PCR 扩增

根据 *cspA* 基因序列设计一对引物，P1: 5'-CATGCCATGGGAATGCCACAGG-3' (划线碱基为 *Nco* I 酶切位点)；P2: 5'-CGGAATTCTCAGAGCGAGCGGAC-3' (划线碱基为 *Eco*R I 酶切位点)。MTB 基因组 DNA 按文献[5]抽提。以 MTB 基因组 DNA 为模板，进行 PCR 反应，反应条件：96℃ 5min；96℃ 45s，60.4℃ 45s，72℃ 1min 30s，30个循环；72℃ 10min。DNA测序由赛百盛公司进行。PCR产物按照文献[7] 稍作修改进行纯化。

### 1.3 *cspA*基因的克隆和表达

扩增的片段纯化后经 *Nco* I 和 *Eco* R I 双酶切后克隆至同样酶切的 pET32a 质粒, 转化至 *E.coli* DH5 $\alpha$ 。对重组质粒进行PCR验证后, 再转化至 *E.coli* BL21 (DE3), 重组质粒进行 DNA 测序分析。将*E.coli* BL21 (DE3) /pET32a-CspA 及 *E.coli* BL21 (DE3) /pET32a接种于含有 100  $\mu$ g/mL 氨卞青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养。当  $OD_{600}$  达到 0.6 左右时, 加入 IPTG (终浓度为1mmol/ml), 培养 4h, 收集菌体, 用原菌液体积 1/10 的  $1\times Ni^{2+}$ -Sepharose 结合缓冲液 (50 mmol/L  $NaH_2PO_4$ , 300mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 2 mmol/L DTT, 5%的甘油, pH 8.0) 重悬细胞, 超声破碎。离心收集上清。

### 1.4 重组 CspA 蛋白的纯化

将裂解物过滤后上清首先用 80 $^{\circ}$ C 热处理初次纯化<sup>[27]</sup>。将上清在 80 $^{\circ}$ C 温育 3min 后, 取出置于冰浴。与 4 $^{\circ}$ C 以最大转速离心 10min, 取上清, 用 Benzonase 核酸酶处理, 去处蛋白中的核酸。经 0.45  $\mu$ m 的滤器过滤, 用  $Ni^{2+}$ -Sepharose 亲和柱对蛋白进行再次纯化。用 5 倍体积的  $1\times Ni^{2+}$ -Sepharose 洗涤缓冲液 (50 mmol/L  $NaH_2PO_4$ , 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 2 mmol/L DTT, 5%的甘油, pH 8.0) 洗柱。然后用洗涤缓冲液和洗脱缓冲液 (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 500 mM 咪唑, 2 mmol/L DTT, 5%的甘油, pH 8.0) 进行梯度洗脱, 洗脱液总体积设为 200 ml, 并收集洗脱峰, 进行 SDS-PAGE 检测。含有高纯度 CspA 重组蛋白的洗脱液以 二次蒸馏水在 4 $^{\circ}$ C 进行透析过夜, 冷干后于-20 $^{\circ}$ C 保藏。

### 1.5 蛋白质浓度测定

SDS-PAGE 凝胶染色后, 利用凝胶图像分析系统成像, 然后通过分析软件对蛋白质条带进行定量分析, 确定 CspA 重组蛋白占菌体总蛋白的百分含量为。蛋白质浓度采用 Bradford 等<sup>[28]</sup>的方法进行测定。

### 1.6 重组蛋白活性测定

按文献[8]中采用胰蛋白酶消化法进行活性鉴定其结合单链核酸的性质<sup>[13]</sup>。在 Tris-MgCl<sub>2</sub>-NaCl 缓冲液 (20 mM 的 Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, pH 8.6) 加入 61mg/mL 的 CspA 和 23 $\mu$ mol/L 的 35bp 的单链 DNA, 反应体系中加入 15mg/mL 的胰蛋白酶, 30 $^{\circ}$ C 反应, 不同时间 (2min, 4min, 6min, 10min, 15min, 30min, 60min, 120min, 180min, 240min, 300min 和 360min) 取等量进行 SDS-PAGE 检测。以 BL21 (pET32a) 空质粒转化菌株纯化所得蛋白作为对照。

## 结果

### 2.1 *cspA* 基因序列分析及其同源性比较

克隆的*cspA*基因序列与NCBI公布的序列一致, 基因bank中的登陆号为NC000962。该基

因具有较高的GC含量(59.4%)。将该基因序列与分枝杆菌中其他CSPs进行序列比对。已经发现结核分枝杆菌,牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*),鸟分枝杆菌副结核亚型(*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*),麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)和耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)等分枝杆菌中存在冷休克蛋白。除了耻垢分枝杆菌为快生型,而其他几类都属于慢生型分枝杆菌。图1中显示分枝杆菌中的CspA的基因系统进化树,可以看出cspA是高度保守的,在牛型和人型结核分枝杆菌中cspA都是一样的,而麻风分枝杆菌也只有少许变化。鸟分枝杆菌副结核亚型中的cspA在NCBI中检索到两类。人型和牛型结核分枝杆菌的cspB序列也完全一样。cspA基因起始密码子的43位到102位具有 'Cold-shock' DNA结合结构域的特点。分析蛋白序列,发现它*M.leprae*中的CSP有97.0%的同源性,与*M.smegmatis* 92.55% 同源性。在蛋白的N-末端包含 'Cold-shock' 结构域(CSD),因而属于 'Cold-shock' 蛋白家族。

## 2.2 cspA 基因的克隆与表达

经过 IPTG 诱导, *E.coli* BL21 (DE3) /pET32a-CspA 及 *E.coli* BL21 (DE3) /pET32a 主要以可溶形式表达 CspA, 经凝胶扫描分析确定约占总蛋白的 70% (图 2)。分子量与预期的大小基本一致, 约为 24kD。

## 2.3 重组 CspA 蛋白的纯化

重组蛋白的质粒部分含有硫氧还蛋白, 可以在 80℃ 热处理时保持一定的热稳定性, 经过一次处理可以去掉大量的杂蛋白。再经过  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose 亲和柱可有效结合带有 His-tag 的重组蛋白。经过分离,  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose 洗脱部分就含有较纯的重组蛋白。

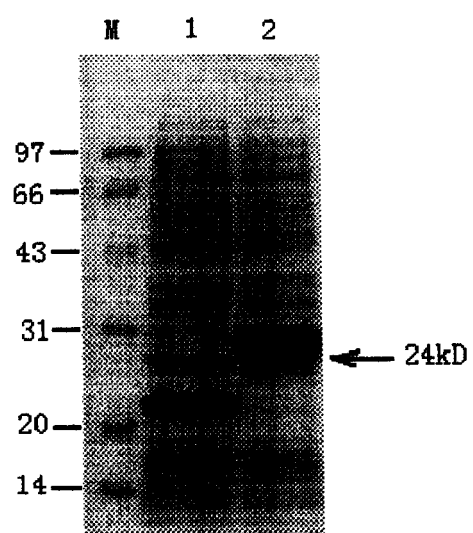


图 1



专利名称(译)	结核分枝杆菌冷休克蛋白及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN1995352A</a>	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	CN200610095337.0	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 陈长恒 王洪海		
发明人	谢建平 陈长恒 王洪海		
IPC分类号	C12N15/31 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领域，涉及结核分枝杆菌冷休克蛋白基因及其用途，尤其是在冷休克蛋白活性调控分子筛选、利用冷休克蛋白的结核病预防性疫苗和结核病诊断试剂方面的用途。

