



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108277226 A

(43)申请公布日 2018.07.13

(21)申请号 201810099637.9

(22)申请日 2018.02.01

(71)申请人 北京市华信行生物科技有限公司
地址 101111 北京市大兴区经济技术开发区
科创十四街99号2幢202室

(72)发明人 陈庆全 封冰 冯婷婷

(51)Int.Cl.

C12N 15/24(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

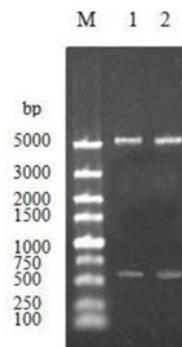
权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

白细胞介素-6的编码基因及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种白细胞介素-6的编码基因。所述编码基因为(a)-(c)中任一种或多种：
(a)由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列；(b)与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列至少具有70%、至少具有75%、至少具有80%、至少具有85%、至少具有90%、至少具有95%、至少具有96%、至少具有97%、至少具有98%或至少具有99%同源性且编码具有相同功能蛋白质的核苷酸序列；(c)在严格条件下与(a)或(b)限定的核苷酸序列杂交且编码具有相同功能蛋白质的核苷酸序列。本发明通过优化IL-6的编码基因，解决了天然IL-6基因序列中局部GC含量过高而出现发卡结构的问题，同时降低了因天然IL-6基因序列中局部AT含量过高而导致的转录提前终止的可能性，并且所有氨基酸的密码子均为大肠杆菌系统中有利于高水平表达的高频密码子，提高了IL-6原核表达量。



1. 一种白细胞介素-6的编码基因,其特征在于,所述编码基因为(a)-(c)中任一种或多种:

(a) 由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列;

(b) 与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列至少具有70%、至少具有75%、至少具有80%、至少具有85%、至少具有90%、至少具有95%、至少具有96%、至少具有97%、至少具有98%或至少具有99%同源性且编码具有相同功能蛋白质的核苷酸序列;

(c) 在严格条件下与(a)或(b)限定的核苷酸序列杂交且编码具有相同功能蛋白质的核苷酸序列。

2. 根据权利要求1所述的编码基因,其特征在于,所述严格条件为 $0.2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, 60°C 杂交。

3. 含有权利要求1所述编码基因的重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒。

4. 根据权利要求3所述的重组载体,其特征在于,所述表达载体为pET-30a(+)

5. 根据权利要求3所述的重组菌,其特征在于,所述重组菌为将权利要求1所述编码基因插入表达载体得到的重组菌。

6. 权利要求1所述编码基因或权利要求3所述的重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒在制备IL-6蛋白中的应用。

7. 一种白细胞介素-6的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 培养权利要求3-5中任一项所述的重组菌,诱导编码白细胞介素-6的基因的表达;

(2) 分离提纯所表达的白细胞介素-6。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述诱导的诱导物为IPTG,所述IPTG诱导的浓度为2mmol/L。

9. 由权利要求7或8所述方法制备的IL-6蛋白。

10. 权利要求1所述编码基因在制备IL-6免疫检测试剂盒中的应用。

白细胞介素-6的编码基因及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及白细胞介素-6的编码基因及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 白细胞介素-6,简称IL-6,一种分子量约为26kD的糖蛋白,其蛋白质前体由212个氨基酸残基组成,其中27个氨基酸是其前导肽。成熟IL-6蛋白由185个氨基酸残基组成,未经糖基化修饰的蛋白分子量约为20kDa。

[0003] IL-6及其受体与炎症性疾病有关,它是多功能炎性细胞因子,是炎性介质网络的关键成份,在炎症反应中起重要作用。IL-6与多种肿瘤发生、发展关系密切,它通过干预细胞的黏附性和活动力、血栓形成、肿瘤特异性抗原的表达及肿瘤细胞的增殖,从而影响肿瘤的进展。IL-6的脐带血是早产儿预测早发性败血症最显著变量,而IL-6在母体血液是表示宫内环境,故可用于识别怀孕。体内IL-6的水平上升,可以导致多种疾病如:甲状腺疾病、免疫异常性疾病、脓毒血症、肾小球肾炎的肾小球增殖,克罗恩病(CD)和Castleman氏病等。

[0004] 随着对IL-6作用机制及临床应用研究的不断深入,IL-6作为抗原和药物筛选的重要标记,其需求量也大大增加。目前,市场上主要利用大肠杆菌进行表达,由于天然IL-6DNA序列存在较多的大肠杆菌稀有密码子和二硫键等原因,表达量较低,且存在发卡结构和转录提前终止等现象。

发明内容

[0005] 本发明目的在于提供一种白细胞介素-6的编码基因,该编码基因解决了天然IL-6基因序列中局部GC含量过高而出现发卡结构的问题,同时降低了因局部AT含量过高而导致的转录提前终止的可能性,并且所有氨基酸的密码子均为大肠杆菌系统中有利于高水平表达的高频密码子。

[0006] 本发明提供了一种白细胞介素-6的编码基因,所述编码基因为(a)-(c)中任一种或多种:

[0007] (a)由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列;

[0008] (b)与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列至少具有70%、至少具有75%、至少具有80%、至少具有85%、至少具有90%、至少具有95%、至少具有96%、至少具有97%、至少具有98%或至少具有99%同源性且编码具有相同功能蛋白质的核苷酸序列;

[0009] (c)在严格条件下与(a)或(b)限定的核苷酸序列杂交且编码具有相同功能蛋白质的核苷酸序列。

[0010] 优选情况下,所述严格条件为 $0.2 \times \text{SSC}$, $0.1\% \text{SDS}$, 60°C 杂交。

[0011] 本发明还提供了含有上述编码基因的重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒。

[0012] 优选情况下,所述表达载体为pET-30a(+)

[0013] 优选情况下,所述重组菌为将权利要求1所述编码基因插入表达载体得到的重组菌。

[0014] 本发明还提供了上述编码基因或上述的重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒在制备IL-6蛋白中的应用。

[0015] 本发明还提供了一种白细胞介素-6的制备方法,包括以下步骤:

[0016] (1) 培养上述的重组菌,诱导编码白细胞介素-6的基因的表达

[0017] (2) 分离提纯所表达的白细胞介素-6。

[0018] 优选情况下,所述诱导的诱导物为IPTG,所述IPTG诱导的浓度为0.2mmol/L。

[0019] 本发明还提供了上述方法制备的IL-6蛋白。

[0020] 本发明还提供了上述编码基因在制备IL-6免疫检测试剂盒中的应用。

[0021] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于,本发明通过优化IL-6的编码基因,解决了天然IL-6基因序列中局部GC含量过高而出现发卡结构的问题,同时降低了因天然IL-6基因序列中局部AT含量过高而导致的转录提前终止的可能性,并且所有氨基酸的密码子均为大肠杆菌系统中有利于高水平表达的高频密码子,提高了IL-6原核表达量。

附图说明

[0022] 图1为阳性克隆鉴定结果的核酸电泳图;

[0023] 图2为超声后上清的SDS-PAGE电泳图;

[0024] 图3为纯化产物的SDS-PAGE电泳图。

具体实施方式

[0025] 以下本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0026] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0027] 实施例1IL-6编码基因的优化

[0028] IL-6的编码基因的天然序列存在以下不利于蛋白表达的缺陷:1、有较多的局部AT丰富区域,在所需要表达蛋白的编码区内出现潜在的转录起始、提前终止(转录起始和提前终止会导致mRNA长度变短或出现不需要的RNA片段,不利于目标蛋白的完整表达)的可能性非常大。2、局部GC含量偏高(>70%),易于形成局部发卡结构,不利于复制、转录、翻译等遗传信息传递过程的顺利进行。3、个别氨基酸的密码子属于大肠杆菌表达系统的低频密码子,比如R(AGA、AGG)、P(CCC)、I(ATA)、L(CTA)、G(GGA)等,不利于蛋白的高效表达。因此,对天然IL-6核苷酸序列进行了全面优化,以实现IL-6基因在大肠杆菌系统中的高效表达。

[0029] 根据NCBI公布IL-6蛋白的氨基酸序列,如SEQ ID NO.2所示,研发人员通过密码子的简并性等特点优化的得到如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列。

[0030] IL-6的编码基因的天然序列,如SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。

[0031] 实施例2IL-6蛋白的制备

[0032] 1、表达载体的构建

[0033] 将实施例1中人工合成的优化后IL-6编码基因序列SEQ ID NO.1用Xho I和Nhe I双酶切后替换原核表达载体pET-30a(+)(Merck Millipore公司,目录号69909)的Xho I/Nhe I之间的片段,得到pET-30a(+)-IL-6(优化后)。

[0034] 将实施例1中人工合成的优化前IL-6编码基因序列SEQ ID NO.3用Xho I和Nhe I双酶切后替换原核表达载体pET-30a(+)(Merck Millipore公司,目录号69909)的Xho I/Nhe I之间的片段,得到pET-30a(+)-IL-6(优化前)。

[0035] 对重组质粒pET-30a(+)-IL-6(优化后)、pET-30a(+)-IL-6(优化前)分别进行Xho I和Nhe I双酶切鉴定,结果如图1所示,其中M:DL5000Marker;1:pET-30a(+)-IL-6(优化后)重组质粒双酶切;2:pET-30a(+)-IL-6(优化前)重组质粒双酶切。由图1可以看出,重组质粒经Xho I和Nhe I双酶切后,电泳均可见到两条与预期分子量大小一致条带,与pET-30a(+)(Merck Millipore公司,目录号69909)和优化后IL-6编码基因(或优化前IL-6编码基因)的大小相符。

[0036] 2、重组菌的构建

[0037] 1) 从-80℃低温冰箱中取出大肠杆菌感受态细胞BL-21(100μL/支),迅速冰浴化开;

[0038] 2) 分别取10μL上述重组载体pET-30a(+)-IL-6(优化后)和重组质粒pET-30a(+)-IL-6(优化前)加入100μL感受态细胞内,轻轻混匀,冰浴30分钟;

[0039] 3) 于42℃下热激90秒;

[0040] 4) 迅速冰浴5分钟;

[0041] 5) 加入1mL LB培养基,混匀,160rpm,37℃下复苏培养1h;

[0042] 6) 取100μL震荡培养物涂布于含卡那霉素的LB平板上,于37℃培养16小时,挑选单克隆菌落,二次划线后于37℃培养16小时,挑取单菌落160rpm,37℃培养6小时左右至对数期,IPTG诱导过夜后SDS-PAGE电泳,选取表达目的蛋白量高的菌种进行测序,测序结果正确,此即为成功转化的宿主细胞,命名为BL21/pET-30a(+)-IL-6(优化前)和BL21/pET-30a(+)-IL-6(优化后)。

[0043] 3、诱导表达纯化IL-6蛋白

[0044] 1) 将所得阳性克隆BL21/pET-30a(+)-IL-6(优化前)和BL21/pET-30a(+)-IL-6(优化后)分别接种于含有卡那青霉素的LB培养基中,于37℃,150rpm下培养8~12小时,得到第一菌液;将第一菌液接种于LB培养基中,于37℃,150rpm下培养至OD600达到0.6,得到第二菌液;于第二菌液中添加终浓度为2mmol/L的IPTG,于37℃,150rpm下培养6小时,得到第三菌液;

[0045] 2) 将所得第三菌液离心洗涤一遍菌体后(洗涤液为25mM PH 8.5Tris-HCl),对菌体进行超声破碎,然后离心弃沉淀留上清;

[0046] 3) 将上清进行SDS-PAGE电泳检测,结果如图2所示,M:Marker;1:pET-30a(+)-IL-6(优化前)上清;3.pET-30a(+)-IL-6(优化后)上清,可以看出pET-30a(+)-IL-6(优化前)上清和pET-30a(+)-IL-6(优化后)上清中均含有约分子量大小约为22KD目标蛋白。

[0047] 4) 用博格隆10mL Ni柱对所得上清液进行纯化,平衡液为25mM PH 8.5Tris-HCl,分别收集穿过峰,30mM咪唑洗脱液(配方25mM PH 8.5Tris-HCl+30mM咪唑)进洗脱峰,60mM咪唑洗脱液进洗脱峰,120mM咪唑洗脱液进洗脱峰,240mM咪唑洗脱液进洗脱峰,300mM咪唑洗脱液进洗脱峰。300mM咪唑洗脱峰含有目的蛋白,25mM PH 8.5Tris-HCl透析后分装保存

(收集原则为紫外检测仪数值上升开始收集,数值出现下降趋势停止收集)。

[0048] 分别取20 μ L300mM咪唑洗脱峰液体进行SDS-PAGE电泳检测,结果如图3所示,M:Marker;1:pET-30a(+)-IL-6(优化前);2:pET-30a(+)-IL-6(优化后),从图3可知蛋白分子量大小与理论大小一致。

[0049] 实施例3比较IL-6基因序列优化前后制备的IL-6蛋白的差异

[0050] 1、蛋白表达量

[0051] 采用紫外分光光度法检测蛋白浓度,检测IL-6蛋白在280nm处的OD值,结合IL-6蛋白的消光系数计算IL-6的浓度。测定200mL LB培养基中IL-6蛋白表达量,其中IL-6蛋白(DNA优化后)的蛋白浓度为2.3mg/mL,体积为7.9mL,总计18.17mg;IL-6蛋白(DNA优化前)的蛋白浓度约为1.9mg/mL,体积为7.8mL,总计14.82mg。可以看出,DNA优化后IL-6蛋白表达量远高于DNA优化前IL-6蛋白表达量。

[0052] 2、天然IL-6基因序列中局部GC含量过高而出现发卡结构的问题

[0053] IL-6天然序列中GCCCCAGTACCCCCAGGAG、GCCGCCCCACACAGACAGCC、CCACCCCTGACCC和CCAGCCTGAGGGCTCTTCGGC等局部序列的GC含量高于70%,高于50%的GC含量的序列,在DNA复制时双链打开需要更高的能量,所以高GC含量会导致复制效率底下。而经过修饰后的序列分别为GCTCCGGTTCGCCGGG TG、GC TGCTCCGCACCGTCAGCC、CCACCCCGGACCC和CTTCTCTGCGTGCTC TG CGTC,降低了局部GC含量,减少发卡结构的出现概率。

[0054] 3、降低了因天然IL-6基因序列中局部AT含量过高而导致的转录提前终止的可能性

[0055] 由图2可知,优化前的DNA序列表达中除了目标蛋白外,还存在比目标蛋白要小的一种蛋白,而优化后的DNA序列中这种非目标蛋白表达量就很低,甚至没有,同时天然IL-6基因序列中局部AT含量过高而导致目标蛋白表达量要低于优化后的DNA序列蛋白表达量,因此通过优化IL-6基因序列中局部AT含量过高可以减少转录提前终止的可能性。

[0056] 4、抗原性鉴定

[0057] 采用ELISA双抗体夹心法检测优化前和优化后DNA序列表达IL-6蛋白的抗原性,将两者分别作为样本进行检测。将本发明所述的优化前和优化后DNA序列表达的IL-6蛋白分别与IL-6单克隆抗体以及HRP标记的IL-6单克隆抗体进行孵育,形成抗原抗体夹心复合物,再添加AB液进行显色进行孵育,最后添加终止液,450nm波长下读数,结果如表1所示:

[0058] 表1优化前后DNA序列表达IL-6蛋白抗原性检测

OD ₄₅₀	浓度(ng/mL)							
	0	2	4	8	16	32	64	128
IL-6(优化前)	0.022	0.079	0.140	0.268	0.641	1.399	1.995	2.439
IL-6(优化后)	0.020	0.094	0.162	0.299	0.703	1.562	2.104	2.687

[0060] 从ELISA结果可以看出,优化后DNA序列表达IL-6蛋白活性和灵敏度都要比优化前DNA序列表达IL-6蛋白好,而且线性符合率也较好。

[0061] 5、稳定性鉴定

[0062] 采用ELISA双抗体夹心法检测优化前和优化后DNA序列表达的IL-6蛋白的稳定性,将两者分别作为样本进行检测。将本发明所述的优化前和优化后DNA序列表达的IL-6蛋白

与IL-6单克隆抗体以及HRP标记的IL-6单克隆抗体进行孵育,形成抗原抗体夹心复合物,再添加AB液进行显色进行孵育,最后添加终止液,450nm波长下读数,即为检测结果。为了便于分析,稳定性实验中本发明优化前和优化后DNA序列表达的IL-6蛋白各采用3个浓度梯度进行检测,结果分别如表2、3所示。

[0063] 表2 IL-6(优化前)稳定性

[0064]

破坏时间(天)	IL-6(优化前)浓度(稳定率)		
	100ng/mL	20ng/mL	4 ng/mL
0	2.089 (100%)	1.497 (100%)	0.752 (100%)
3	1.871 (89.6%)	1.363 (91.0%)	0.676 (89.9%)
7	1.551 (74.2%)	1.055 (70.5%)	0.549 (73.0%)

[0065] 表3 IL-6(优化后)稳定性

[0066]

破坏时间(天)	IL-6(优化前)浓度(稳定率)		
	100ng/mL	20ng/mL	4ng/mL
0	2.109 (100%)	1.542 (100%)	0.801 (100%)
3	1.950 (92.5%)	1.399 (90.7%)	0.751 (93.8%)
7	1.776 (84.2%)	1.279 (83.0%)	0.658 (82.1%)

[0067] 由表2和3可知:以0d抗原浓度为参照,37℃破坏3d后,IL-6(优化后)和IL-6(优化前)的稳定率分别为92%左右和90%左右;37℃破坏7d后,两者的稳定率分别为83%左右和72%左右;IL-6(优化后)的稳定性显著高于IL-6(优化前)的稳定性。

[0068] 以上所述本发明的具体实施方式,并不构成对本发明保护范围的限定。任何根据本发明的技术构思所做出的各种其他相应的改变与变形,均应包含在本发明权利要求的保护范围内。

序列表

<110> 北京市华信行生物科技有限公司

<120> 白细胞介素-6 的编码基因及其制备方法和应用

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 579

<212> DNA

<213> 人类 (human)

<400> 1

gctagcgggtg gtggtgctcc ggttccgccg ggtgaagact ctaaagacgt tgctgctccg 60

caccgtcagc cgctgacctc ttctgaacgt atcgacaaac agatccgtta catcctggac 120

[0069]

ggtatctctg ctctgcgtaa agaaacctgc aacaaatcta acatgtgcga atctttctaaa 180

gaagctctgg ctgaaaacaa cctgaacctg ccgaaaatgg ctgaaaaaga cggttgcttc 240

cagtctggtt tcaacgaaga aacctgcctg gttaaaatca tcaccggtct gctggaattc 300

gaagtttacc tgaataacct gcagaacctt ttcgaatctt ctgaagaaca ggctcgtgct 360

gttcagatgt ctaccaaagt tctgatccag ttctctgcaga aaaaagctaa aaacctggac 420

gctatcacca ccccgaccac gaccaccaac gcttctctgc tgaccaaaact gcaggctcag 480

aaccagtggc tgcaggacat gaccaccac ctgatcctgc gttctttcaa agaattcctg 540

cagtcttctc tgcgtgctct gcgtcagatg taactcgag 579

<210> 2

<211> 190

<212> PRT

<213> 人类 (human)

<400> 2

Ala Ser Gly Gly Gly Ala Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp
1 5 10 15

Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp
20 25 30

Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu
35 40 45

Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala
50 55 60

Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe
65 70 75 80

[0070]

Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly
85 90 95

Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu
100 105 110

Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu
115 120 125

Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr
130 135 140

Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln
145 150 155 160

Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe
165 170 175

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 180 185 190

<210> 3

<211> 579

<212> DNA

<213> 人类 (human)

<400> 3

gctagcgggtg gtggtgcccc agtacccecca ggagaagatt ccaaagatgt agccgcecca 60

cacagacagc cactcacctc ttcagaacga attgacaaac aaattcggtg catcctcgac 120

[0071] ggcattctcag ccctgagaaa ggagacatgt aacaagagta acatgtgtga aagcagcaaa 180

gaggcactgg cagaaaacaa cctgaacctt ccaaagatgg ctgaaaaaga tggatgcttc 240

caatctggat tcaatgagga gacttgccctg gtgaaaatca tcaactggtct tttggagttt 300

gaggtatacc tagagtacct ccagaacaga tttgagagta gtgaggaaca agccagagct 360

gtgcagatga gtacaaaagt cctgatccag ttctgcaga aaaaggcaaa gaatctagat 420

gcaataacca cccctgacct aaccacaaat gccagcctgc tgacgaagct gcaggcacag 480

aaccagtggc tgcaggacat gacaactcat ctcaattctgc gcagctttaa ggagttctctg 540

cagtccagcc tgagggtctt tcggcaaatg tagctcgag 579

序列表

- <110> 北京市华信行生物科技有限公司
 <120> 白细胞介素-6的编码基因及其制备方法和应用
 <160> 3
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 579
 <212> DNA
 <213> 人类(human)
 <400> 1

```

gctagcgggtg gtggtgctcc ggttccgccc ggtgaagact ctaaagacgt tgctgctccg 60
caccgtcagc cgctgacctc ttctgaacgt atcgacaaac agatccgtta catcctggac 120
ggatctctctg ctctgcgtaa agaaacctgc acaaatcta acatgtgcga atcttctaaa 180
gaagctctgg ctgaaaacaa cctgaacctg ccgaaaatgg ctgaaaaaga cggttgcttc 240
cagtctgggtt tcaacgaaga aacctgctg gttaaatca tcaccggtct gctggaattc 300
gaagtttacc tggaatacct gcagaacctt ttcgaatctt ctgaagaaca ggctcgtgct 360
gttcagatgt ctaccaaagt tctgatccag ttctgcaga aaaaagctaa aaacctggac 420
gctatcacca ccccggacct gaccaccaac gttctctgc tgaccaaact gcaggctcag 480
aaccagtggc tgcaggacat gaccaccac ctgatcctgc gttctttcaa agaattcctg 540
cagtcttctc tgcgtgctct gcgtcagatg taactcgag 579

```

<210> 2

<211> 190

<212> PRT

<213> 人类(huamn)

<400> 2

```

Ala Ser Gly Gly Gly Ala Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp
1           5           10           15
Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp
          20           25           30
Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu
          35           40           45
Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala
          50           55           60
Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe
65           70           75           80
Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly
          85           90           95
Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu

```

	100		105		110
Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu					
	115		120		125
Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr					
	130		135		140
Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln					
145		150		155	160
Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe					
	165		170		175
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met					
	180		185		190

<210> 3

<211> 579

<212> DNA

<213> 人类 (human)

<400> 3

```

gctagcgggtg gtgggtcccc agtaccceca ggagaagatt ccaaagatgt agccgcccc 60
cacagacagc cactcacctc ttcagaacga attgacaaac aaattcggta catcctcgac 120
ggcatctcag ccctgagaaa ggagacatgt aacaagagta acatgtgtga aagcagcaaa 180
gaggcactgg cagaaaacaa cctgaacctt ccaaagatgg ctgaaaaaga tggatgcttc 240
caatctggat tcaatgagga gacttgccctg gtgaaaatca tcaactgtct tttggagttt 300
gaggatatacc tagagtacct ccagaacaga tttgagagta gtgaggaaca agccagagct 360
gtgcagatga gtacaaaagt cctgatccag ttctgcaga aaaaggcaaa gaatctagat 420
gcaataacca cccctgacct aaccacaaat gccagcctgc tgacgaagct gcaggcacag 480
aaccagtggc tgcaggacat gacaactcat ctattctgc gcagctttaa ggagttcctg 540
cagtcagcc tgagggtctt tcggcaaatg tagctcgag 579

```

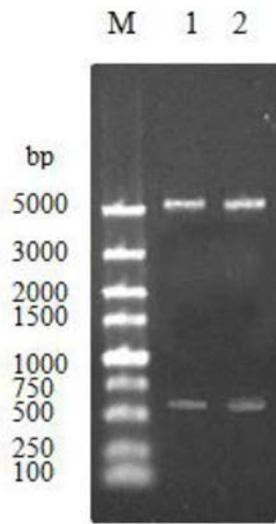


图1

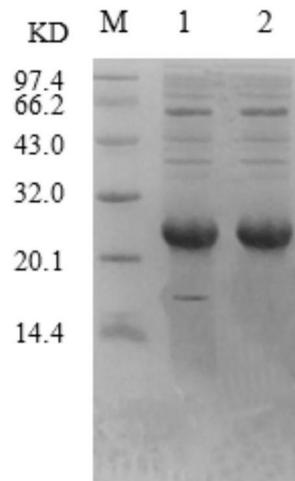


图2

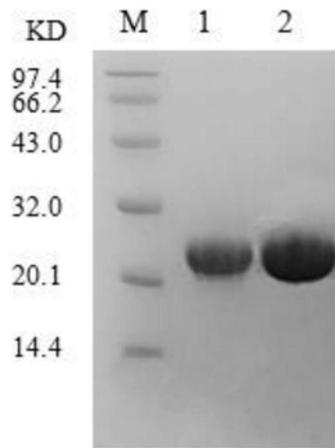


图3

专利名称(译)	白细胞介素-6的编码基因及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108277226A	公开(公告)日	2018-07-13
申请号	CN201810099637.9	申请日	2018-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	北京市华信行生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京市华信行生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京市华信行生物科技有限公司		
[标]发明人	陈庆全 封冰 冯婷婷		
发明人	陈庆全 封冰 冯婷婷		
IPC分类号	C12N15/24 C12N15/70 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/5412 C12N15/70 C12N2800/22 G01N33/53 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种白细胞介素-6的编码基因。所述编码基因为(a)-(c)中任一种或多种:(a)由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列;(b)与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列至少具有70%、至少具有75%、至少具有80%、至少具有85%、至少具有90%、至少具有95%、至少具有96%、至少具有97%、至少具有98%或至少具有99%同源性且编码具有相同功能蛋白质的核苷酸序列;(c)在严格条件下与(a)或(b)限定的核苷酸序列杂交且编码具有相同功能蛋白质的核苷酸序列。本发明通过优化IL-6的编码基因,解决了天然IL-6基因序列中局部GC含量过高而出现发卡结构的问题,同时降低了因天然IL-6基因序列中局部AT含量过高而导致的转录提前终止的可能性,并且所有氨基酸的密码子均为大肠杆菌系统中有利于高水平表达的高频密码子,提高了IL-6原核表达量。

