

[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 200610095335.1

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 7 月 11 日

[11] 公开号 CN 1995340A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

[22] 申请日 2006.12.25

[21] 申请号 200610095335.1

[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 费良润 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

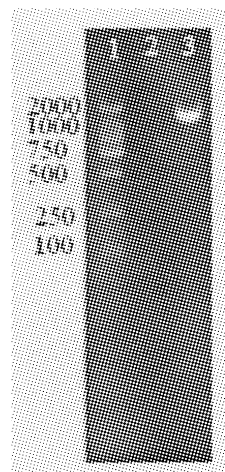
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

结核分枝杆菌葡糖胺-6-磷酸合酶基因及其用途

[57] 摘要

本发明属于医药生物技术领域，涉及结核分枝杆菌葡糖胺-6-磷酸合酶基因及其用途，尤其是在葡糖胺-6-磷酸合酶活性调控分子筛选、利用葡糖胺-6-磷酸合酶的结核病预防性疫苗和结核病诊断试剂方面的用途。



1. 结核分枝杆菌葡糖胺-6-磷酸合酶基因的用途，其特征是表达结核菌葡糖胺-6-磷酸合酶的重组工程菌、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葡糖胺-6-磷酸合酶调节分子的筛选。
2. 结核分枝杆菌葡糖胺-6-磷酸合酶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葡糖胺-6-磷酸合酶的抗体或者抗体类似分子进行免疫检测。
3. 结核分枝杆菌葡糖胺-6-磷酸合酶在 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葡糖胺-6-磷酸合酶及其产物，作为疫苗组分，预防结核病。

结核分枝杆菌葡糖胺-6-磷酸合酶基因及其用途

技术领域

本发明属于医药生物技术领域，涉及结核分枝杆菌葡糖胺-6-磷酸合酶基因及其用途，尤其是在葡糖胺-6-磷酸合酶活性调控分子筛选、利用葡糖胺-6-磷酸合酶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

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 耐药性日趋严重，结核菌和 HIV 病毒联合感染，严重威胁人类健康。因此，开发新的抗结核药物迫在眉睫。结核菌 H37Rv 和 CDC1551 基因组序列的测定和注释工作的完成，加速了结核菌致病机理的研究，由此发现了大量与结核菌致病相关的因子，这为抗结核药物的开发提供了大量的候选药物靶标。本实验室的前期研究，利用双向电泳技术，对猫爪草提取物作用前后的结核分枝杆菌临床分离株的全细胞蛋白表达图谱进行差异比较和分析，结果表明葡糖胺-6-磷酸合酶基因 (Rv0951) 在药物处理前后表达下调，并首次报道了其参与结核分枝杆菌的重要生理活动。

结核分枝杆菌 H37Rv 基因序列中 Rv3436c，即 *glmS* 基因编码葡糖胺-6-磷酸合酶 (Glucosamine 6-phosphate synthetase, GlcN-6-P synthetase)。葡糖胺-6-磷酸合酶参与下面的反应： $\text{L-谷氨酰胺} + \text{D-果糖-6-磷酸} \rightarrow \text{D-葡糖胺-6-磷酸} + \text{L-谷氨酸盐}$ 。该反应是 N-乙酰尿苷二磷酸葡糖胺 (UDP-GlcNAC) 合成途径的第一个反应，是一个不可逆的反应。几乎所有类型的细胞都存在葡糖胺-6-磷酸合酶。UDP-GlcNAC 是 N-乙酰葡糖胺的活化形式，与氨基糖结合产生一系列的生物大分子，包括组成细菌细胞壁的肽聚糖，脂多糖和磷壁酸，组成真菌，昆虫，甲壳类动物细胞壁的几丁质以及哺乳动物的糖蛋白，粘多糖和黏多糖。葡糖胺-6-磷酸合酶就是这样一种参与重要细胞壁成分合成的酶。当 *glmS* 基因缺乏时必须添加相应的物质，如氨或者 IPTG 细菌才能很好的生长。现在用葡糖胺-6-磷酸合酶作为新的药物靶标筛选抗细菌和抗真菌药物的研究已经开始成为热点。此外，葡糖胺-6-磷酸合酶与糖尿病，癌症，炎症，溃疡等疾病相关。因此葡糖胺-6-磷酸合酶可以作为研发抗细菌和抗真菌及其他疾病的新药的理想的靶标。为了建立体外筛选抗细菌和抗真菌药物的分子模型，首先克隆编码 *glmS* 基因，然后利用大肠杆菌高效表达蛋白，为进一步筛选新药提供基础。

发明内容

本发明的目的在于提供，1. 一种重组表达结核菌葡糖胺-6-磷酸合酶的工程菌；2. 获得大

量纯化的葡糖胺-6-磷酸合酶，进行抗体制备；3.利用含有葡糖胺-6-磷酸合酶的工程菌作为药物靶标研发新的药物的模型；4.含有葡糖胺-6-磷酸合酶的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葡糖胺-6-磷酸合酶基因，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。

附图说明

图1. glmS 基因 PCR 扩增产物。1: Marker: DL2000, 2: 阴性对照, 3: glmS 基因 PCR 扩增产物。

图2. glmS融合表达蛋白的SDS-PAGE。从左到右依次是：1: 未经IPTG诱导的携带空PET32的BL21, 2: 未经IPTG诱导的重组BL21, 3: 经IPTG诱导的携带PET32的BL21, 4: 蛋白Marker, 5: 经IPTG诱导的携带重组质粒的BL21。

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葡糖胺-6-磷酸合酶的工程菌；2.获得大量纯化的葡糖胺-6-磷酸合酶，进行抗体制备；3.利用含有葡糖胺-6-磷酸合酶的工程菌作为药物靶标研发新的药物的模型；4.含有葡糖胺-6-磷酸合酶的DNA疫苗或者亚单位

疫苗的构建及其应用。

具体实施方式

1 材料与方法

1.1材料

大肠杆菌DH5 α ，大肠杆菌BL21及表达载体PET32（含有IPTG诱导的启动子）为本实验室保存。

限制性内切酶，Taq DNA聚合酶，T4 DNA连接酶，PCR反应液，dNTP等购自TakaRa公司。

胶回收试剂盒购自bioer technology公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 结核分枝杆菌H37Rv基因组和质粒载体pET32的提取

取少量灭活的分枝杆菌H37Rv菌体用1mL GTE重悬，混匀，9000rpm 10min，用450uL GTE(全称?)沉淀重悬并加入50uL10mg/mL溶菌酶37℃过夜，加入100uL 10% SDS轻微混匀加入10mg/mL蛋白酶K，65℃水浴10min。加入250uL氯仿和酚，冰浴5min。14000rpm 离心2min。取上清再用酚-氯仿抽提至蛋白除净，无水乙醇沉淀，溶于50uL TE (pH8.0)，加入2uL RNase A 65℃以除去RNA，-20℃保存备用。

用碱裂解法从含质粒载体pET32的大肠杆菌DH5 α 中提取质粒载体pET32。

1.3 引物的设计与合成

根据PubMed基因序列数据库中提供的序列数据（登陆号：NP_217953.1），设计了一对引物，上游引物为5' -GGAATTCCTACCCTGGTCTGCTGTG-3'，下游引物为5' -CCAAGCTTCGTACCGTGAGCCA-3'，在上、下游引物5'端分别引入EcoR I、Hind III酶切位点和保护碱基(带下划线的是酶切位点)，以便于酶切和克隆。引物由上海英骏生物工程有限公司合成。

1.4 glmS基因的PCR扩增

以结核分枝杆菌H37Rv基因组为模板进行基因扩增。反应体系为25 μ L，基因组DNA 2 μ L，dNTP混合物2 μ L，DNA Taq酶(5U/uL)0.5 μ L，上下游引物各1.5 μ L，10xPCR buffer(含mg⁺)2.5 μ L，ddH₂O 15 μ L。扩增条件为：95℃预变性5min，95℃变性1min，58℃退火1min，72℃延伸2.5min，循环30次，扩增结束后72℃延伸10min，4℃保存。用1.0%的琼脂糖凝胶电泳分析实验结果，并将各管产物合并后用酚-氯仿抽提纯化，并通过1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.5 大肠杆菌DH5 α 和大肠杆菌BL21感受态细胞的制备

用CaCl₂法制备感受态细胞。（参考文献）

1.6 构建表达glmS的重组质粒pET32-glmS

用EcoR I和Hind III分别对PCR产物和pET32质粒进行置于37℃ 水浴中进行双酶切，用1.0%的琼脂糖凝胶进行胶回收，回收后用T4 DNA连接酶16℃过夜连接，将重组的克隆载体转化到E.coli DH5 α 感受态细胞中，随机挑取几个克隆振荡培养几小时进行菌落PCR得到阳性克隆并用碱裂解法提取重组质粒。然后对重组质粒进行PCR扩增检测和酶切检测。PCR扩增条带与目的条带基本一致，但是酶切条带相差约1500bp。对重组质粒进行测序（序列由上海英骏生物工程有限公司测定）。

1.7 glmS的诱导表达

用pET32-glmS质粒转化表达宿主BL21，挑取单菌落接种于含AMP的5mL LB液体培养集中，37℃，200rpm振荡培养过夜以制备一级种。将一级种按2%的接种量接入含AMP的LB中，37℃，200rpm振荡培养2h，以终浓度1mmol/L的IPTG于30℃，200rpm振荡培养4h，离心收集菌体。将收集的菌体进行15% SDS-PAGE，电泳结束后用考马斯亮兰R—250染液(45%甲醇、45%水、10%冰乙酸、0.25%考马斯亮兰R—2的)染色，在脱色液(45%甲醇、45%水、10%冰乙酸)中脱色后观察分析结果。

2 结果

2.1 PCR产物的鉴定

以结核分枝杆菌H37Rv基因组DNA为模版进行PCR扩增。扩增产物为2000bp左右的单一条带（图1），与目的基因序列的大小相符，约相差1000bp。

2.2 重组质粒pET32-glmS的鉴定

随机挑取转化后的重组克隆进行PCR扩增，能扩增出约2000bp的条带。并提取质粒用EcoR I和Hind III进行双酶切，经琼脂糖凝胶电泳分析，但是切出的条带与目的条带不符。对阳性克隆进行测序，由于目的条带约1.9kKb，因此用自己的引物正反向测两个反应也未能说明插入的序列是否数据库中的数据一致。

2.3 glmS的诱导表达

以终浓度1mmol/L的IPTG诱导glmS的过量表达，表达产物的相对分子质量约为60.0kKDa。

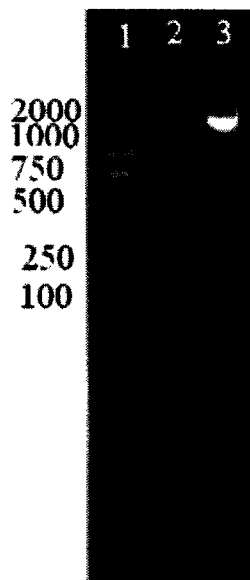


图 1

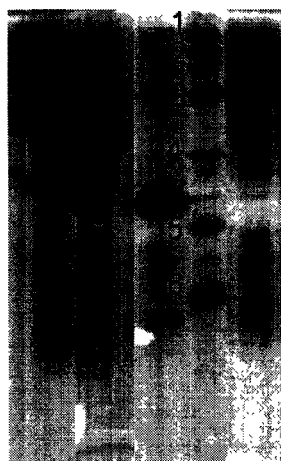


图2

本发明属于医药生物技术领域，涉及结核分枝杆菌葡糖胺-6-磷酸合酶基因及其用途，尤其是在葡糖胺-6-磷酸合酶活性调控分子筛选、利用葡糖胺-6-磷酸合酶的结核病预防性疫苗和结核病诊断试剂方面的用途。

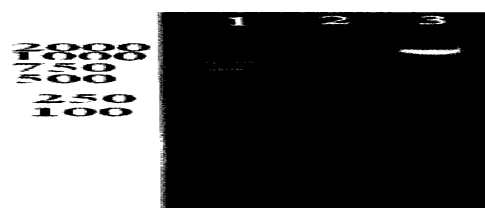


图 2