



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104892769 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 09

(21) 申请号 201510268710. 7

C12N 1/21(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 05. 22

G01N 33/53(2006. 01)

(71) 申请人 盐城师范学院

A61K 38/16(2006. 01)

地址 224002 江苏省盐城市开放大道 50 号

A61P 35/00(2006. 01)

C12R 1/19(2006. 01)

(72) 发明人 赵庆新 王建 崔刚 王欢莉

康贻军 沈敏

(74) 专利代理机构 北京爱普纳杰专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11419

代理人 张勇

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

C07K 14/315(2006. 01)

C12N 9/88(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表10页 附图2页

(54) 发明名称

一种溶血素融合蛋白 PeLa-EK-10His-SLO 及其表达质粒与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种溶血素融合蛋白 PeLa-EK-10His-SLO 及其表达质粒与应用,属于医学微生物或生物制药领域。本发明在大肠杆菌中表达了该溶血素融合蛋白 PEHSLO,发现该溶血素融合蛋白 PEHSLO 表达量提高且对宿主细胞毒性低。溶血素融合蛋白 PEHSLO 同时具有果胶酶活性、溶血性和 SLO 抗原性,该工程菌果胶酶产率为 5.6Unit/mL 培养液,溶血酶产率为 400000Unit/mL,可溶性溶血素融合蛋白 PEHSLO 产率为 1.2mg/mL 培养液。在生产监控检测方面,溶血素融合蛋白 PEHSLO 可以用果胶酶活性进行定性和定量分析,避免使用免疫学和溶血法检测,简化了检测方法、缩短了检测时间、节约了检测成本。溶血素融合蛋白 PEHSLO 还可以应用于溶血素蛋白 SLO 生产、SLO 抗体制品生产、SLO 抗体检测试剂生产或抗癌药物生产。

1. 一种溶血素融合蛋白 PEHSLO, 其特征在于, 所述溶血素融合蛋白 PEHSLO 含果胶酸裂解酶和溶血素蛋白序列; 编码所述果胶酸裂解酶和溶血素蛋白的氨基酸序列之间还含有肠激酶酶切位点序列和 10 个组氨酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的溶血素融合蛋白 PEHSLO, 其特征在于, 所述溶血素融合蛋白的氨基酸序列是 SEQ ID NO. 1 所示的序列。
3. 根据权利要求 1 所述的溶血素融合蛋白 PEHSLO, 其特征在于, 编码所述溶血素融合蛋白 PEHSLO 的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。
4. 表达权利要求 1-3 任一所述溶血素融合蛋白 PEHSLO 的质粒。
5. 根据权利要求 4 所述的质粒, 其特征在于, 所述质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示。
6. 表达权利要求 1-3 任一所述溶血素融合蛋白 PEHSLO 的基因工程菌。
7. 表达权利要求 1-3 任一所述溶血素融合蛋白 PEHSLO 的转基因细胞系。
8. 一种检测溶血素融合蛋白的方法, 其特征在于, 所述方法是融合表达果胶酸裂解酶和溶血素蛋白, 通过检测果胶酶活性定性和定量分析溶血素融合蛋白 PEHSLO。
9. 一种提高溶血素 SLO 可溶性表达的方法, 其特征在于, 所述方法是以大肠杆菌 BL21 (DE3) 为宿主, pET-28a (+) 为载体, 表达核苷酸序列为 SEQ ID NO. 2 的溶血素融合基因 npela-ek-10his-slo。
10. 权利要求 1 所述溶血素融合蛋白 PEHSLO 在溶血素蛋白 SLO 生产、SLO 抗体制品生产、SLO 抗体检测试剂生产或抗癌药物生产中的应用。

一种溶血素融合蛋白 PeLa-EK-10His-SLO 及其表达质粒与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种溶血素融合蛋白 PeLa-EK-10His-SLO 及其表达质粒与应用,属于医学微生物或生物制药领域。

背景技术

[0002] 化脓链球菌是一类常见的细菌,可引起皮肤、皮下组织的化脓性炎症、呼吸道感染、流行性咽炎的爆发性流行以及新生儿败血症、细菌性心内膜炎、猩红热和风湿热、肾小球肾炎等变态反应。

[0003] 化脓链球菌的溶血素 (Streptolysin O, SLO) 能够与人及其它动物的细胞膜上的胆固醇相结合,结合到细胞膜上的 SLO 蛋白会形成环状寡聚体,形成大的孔道,导致细胞膜溶解,另外, SLO 具有极强的抗原性且易在体内残留,刺激人体及其它动物产生抗体 (anti-SLO, ASO), ASO 集聚,导致变态反应。

[0004] SLO 作为检测试剂,可以用来检测患者体内的 ASO;其次,可以作为治疗肿瘤和杀死肿瘤细胞的药物,另外, SLO 作为成孔蛋白,在动物基因工程和蛋白工程领域,用作动物细胞转基因和转蛋白工具。

[0005] 目前 SLO 蛋白的基因工程重组技术主要存在以下缺陷: SLO 蛋白对宿主具有毒性,表达量低和生产过程中 SLO 检测方法相对繁琐。

发明内容

[0006] 本发明针对 SLO 重组蛋白对宿主具有毒性,表达量低和 SLO 蛋白检测相对繁琐的问题,提供了一种溶血素融合蛋白 PeLa-EK-10His-SLO 及其表达质粒与应用。

[0007] 本发明的第一个目的是提供了一种溶血素融合蛋白 (PeLa-EK-10His-SLO, PEHSLO),该溶血素融合蛋白 PEHSLO 具有果胶酸裂解酶和溶血素蛋白活性;PEHSLO 内部有肠激酶的酶切位点,可以根据需要切除果胶酸裂解酶;另外,还含有 10 个组氨酸序列,为蛋白纯化提供有效的亲和基团。

[0008] 所述溶血素融合蛋白的氨基酸序列是 SEQ ID NO. 1 所示的序列。

[0009] 编码所述溶血素融合蛋白的溶血素融合基因 npela-ek-10his-slo,可在大肠杆菌中高效表达溶血素融合蛋白 PEHSLO。

[0010] 所述溶血素融合基因 npela-ek-10his-slo 的核苷酸序列,在本发明的一种实施方式中,如 SEQ ID NO. 2 所示。

[0011] 所述 npela-ek-10his-slo 的核苷酸序列,在本发明的一种实施方式中,使用了曲霉果胶酸裂解酶酶活性区 pela 序列、大肠杆菌肠激酶位点序列、10 个组氨酸和化脓链球菌溶血素 slo 活性区与抗原区序列。而且曲霉果胶酸裂解酶酶活性区 pela 序列和化脓链球菌溶血素 slo 活性区与抗原区序列,依据大肠杆菌背景下的密码子优化和增加蛋白表明基团亲水性等原理,进行了优化设计。

[0012] 本发明的第二个目的是提供一种表达所述溶血素融合蛋白 PEHSLO 或使用所述 npela-ek-10his-slo 融合基因构建的表达质粒。

[0013] 所述质粒,在本发明的一种实施方式中,为 npela-ek-10his-slo-pET-28a(+),其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示。

[0014] 本发明的第三个目的是提供一种表达所述溶血素融合蛋白 PEHSLO 的基因工程菌或转基因细胞系。

[0015] 所述基因工程菌,在本发明的一种实施方式中,以大肠杆菌 BL21 (DE3) 为宿主, pET-28a(+) 为载体,表达核苷酸序列为 SEQ ID NO. 2 的溶血素融合基因 npela-ek-10his-slo。

[0016] 本发明的第四个目的是提供一种检测溶血素 SLO 的方法,所述方法是融合表达果胶裂解酶和溶血素蛋白,通过检测果胶酶活性定性和定量分析溶血素 SLO。所述融合表达是融合表达编码氨基酸序列为 SEQ ID NO. 1 所示的基因。

[0017] 本发明的第五个目的是提供一种提高 SLO 可溶性表达的方法。所述方法是以大肠杆菌 BL21 (DE3) 为宿主, pET-28a(+) 为载体,表达核苷酸序列为 SEQ ID NO. 2 的溶血素融合基因 npela-ek-10his-slo。

[0018] 本发明还要求保护所述溶血素融合蛋白 PEHSLO 在 SLO 蛋白生产、SLO 检测、SLO 抗体制品制备、抗癌药物生产、基因工程或蛋白工程等领域的应用。

[0019] 本发明的有益效果:

[0020] (1) 本发明设计并合成了溶血素融合基因 npela-ek-10his-slo,构建了含该 npela-ek-10his-slo 融合基因的表达质粒和含该表达质粒的工程菌,该工程菌可以表达溶血素融合蛋白 (PeLa-EK-10His-SLO, PEHSLO)。摇瓶发酵表达结果表明,溶血素融合蛋白 PEHSLO 对宿主细胞毒性低,20℃条件下表达 48h 后, npela-ek-10his-slo 工程菌 OD600 可以达到 2.5,高于 slo 独立表达的工程菌 (OD600 :1.60);说明融合表达可以降低 SLO 蛋白对宿主具有毒性。

[0021] (2) 本发明的工程菌表达的溶血素融合蛋白 PEHSLO 同时具有果胶酶活性、溶血性和 SLO 抗原性;该工程菌果胶酶产率为 5.6Unit/mL 培养液,溶血酶产率为 400000Unit/mL,可溶性溶血素融合蛋白 PEHSLO 产率为 1.2mg/mL 培养液,占到细胞总蛋白的 30%,相比 slo 胞内独立表达(可溶性目标蛋白占胞内蛋白的 5%),可溶性目标蛋白产量上升达 400%;说明融合表达可以提高 SLO 蛋白的表达量。

[0022] (3) 在生产监控检测方面,溶血素融合蛋白 PEHSLO 可以用果胶酶活性进行定性和定量分析,一次果胶酶检测所需时间为 0.3h,检测成本为 0.15 元人民币,避免使用免疫学(一次检测所需时间为 10h,检测成本为 500.00 元人民币)和溶血法检测(一次检测所需时间为 1.0h,检测成本为 0.50 元人民币),相对于经测定免疫学和溶血法检测,检测时间分别缩短 9.5h 和 0.5h,检测成本分别节省 499.85 元和 0.35 元人民币,经测定 1Unit 果胶酶活性对应于 0.2mg 左右的蛋白量和 7.0×10^4 Unit 溶血酶活性。本发明的方法可以简便 SLO 的检测,缩短检测时间、降低检测成本。

附图说明

[0023] 图 1:设计的 npela-ek-10his-slo-pET-28a(+) 质粒结构图;

[0024] 图 2: npela-ek-10his-slo/pET-28a(+) 酶切鉴定图; 1. DNA Marker, 2. npela-ek-10his-slo/pET-28a, 3. npela-ek-10his-slo/pET-28a(+) 双酶切;

[0025] 图 3: 重组表达 PelA-EK-10His-SLO 的 SDS-PAGE 图谱; 1. 蛋白 Marker, 2. npela-slo/pET28a(+)/BL21(DE3) 的胞内上清, 3. 纯化的 PelA-EK-10His-SLO。

具体实施方式

[0026] 以下通过实施例来进一步阐明本发明, 下列实施例用于说明目的而非用于限制本发明范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 基本上都按照常见的分子克隆手册所述的条件进行操作。

[0027] 实施例 1 溶血素融合基因 npela-ek-10his-slo 设计与表达质粒设计

[0028] 所述核苷酸序列使用了曲霉果胶酸裂解酶活性区 pela 序列、大肠杆菌肠激酶位点序列、10 个组氨酸和化脓链球菌溶血素 slo 活性区与抗原区序列, 而且曲霉果胶酸裂解酶活性区 pela 序列和化脓链球菌溶血素 slo 活性区与抗原区序列, 依据大肠杆菌背景下的密码子优化和增加蛋白表明基团亲水性等原理, 进行了优化设计。在果胶酸裂解酶 pela 序列的上游添加 Noc I 位点序列, 在果胶酸裂解酶 pela 序列下游加上肠激酶序列、10 个组氨酸序列和 Nde I 位点序列; Nde I 位点序列下游, 连接 slo 基因序列, slo 下游加上 BamH I 序列, 构建的融合基因的具体核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示, 表达质粒 npela-ek-10his-slo-pET-28a(+) 的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 3。npela-ek-10his-slo-pET-28a(+) 质粒结构如图 1 所示。

[0029] 本发明加入果胶酸裂解酶 pela 序列的目的, 是利用该 PelA 蛋白在大肠杆菌中可以高效表达出活性蛋白同时对宿主毒性低的优越性, 提高 SLO 蛋白的可溶性, 降低 SLO 蛋白对宿主的毒性, 同时提供一种低成本和短时间的目标蛋白检测方法; 加肠激酶序列的作用是可以根据应用需要出发, 提供切除果胶酸裂解酶 PelA 的便利; 加入 10 个组氨酸序列, 是为了提供 Ni-亲和层析的亲基团, 由于是加在二个蛋白基团之间, 根据本本发明的需要, 10 个组氨酸, 能保证有效结合, 同时在 40mM 咪唑浓度下可以有效洗脱, 不必使用常规的 500mM 咪唑, 可以减少成本。

[0030] 实施例 2 溶血素融合基因 npela-ek-10his-slo 中 npela-ek-10his 序列的合成与克隆

[0031] 使用化学合成和 Over-Lap PCR 的方法合成血红素融合基因 npela-ek-10his-slo 的 npela-ek-10his 部分 (SEQ ID NO. 2 的 1-992bp), 合成 npela-ek-10his 片段, 上游加上 Noc I 位点, 下游加上 Nde I 序列将合成的片段与 PMD18T 载体连接, 转化 JM109, 转化产物涂布含 100g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板, 经过 37°C 培养过夜, 得到单克隆转化子 npela-ek-10his/PMD18T/JM109, 经过菌落 PCR 鉴定, 质粒酶切鉴定和测序鉴定, 测定的序列和设计序列完全相同。

[0032] 实施例 3 溶血素融合基因 npela-ek-10his-slo 中 slo 序列的合成与克隆

[0033] 使用化学合成和 Over-Lap PCR 的方法合成血红素融合基因 npela-ek-10his-slo 的 slo 部分 (SEQ ID NO. 2 的 992-2483bp), 上游加上 Nde I 位点, 下游加上 BamH I 序列, 将合成的 slo 基因与 PMD18T 载体连接, 转化 JM109, 转化产物涂布含 100g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板, 经过 37°C 培养过夜, 得到单克隆转化子 slo/PMD18T/JM109, 经过菌落 PCR 鉴定, 质

粒酶切鉴定和测序鉴定,表明新合成的 slo 基因全长为 1485bp,编码 495 氨基酸,测定的序列和设计序列完全相同,提取 slo/PMD18T 备用。

[0034] 实施例 4 npela-ek-10his-slo/pET-28a(+) 表达载体构建

[0035] 用于实现融合基因在大肠杆菌中表达的载体是 pET-28a(+),但对构架有较大改变,不使用 pET-28a(+) 的二个 His-tag 和 Thrombin 序列,将 pET-28a(+) 质粒和 npela-ek-10his/PMD18T 用 *Noc* I 和 *Nde* I 切,酶切产物切胶回收,再用 T4 连接酶连接,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,经过 37℃ 培养过夜,挑选转化子,通过菌落 PCR 鉴定,质粒酶切鉴定(见图 2)和测序鉴定,保存鉴定的 npela-ek-10his/pET-28a(+) *E. coli* JM109 菌,提取 npela-ek-10his/pET-28a(+) 备用。将 npela-ek-10his/pET-28a(+) 质粒和 slo/PMD18T 用 *Nde* I 和 *Bam*H I 切,酶切产物切胶回收,再用 T4 连接酶连接,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,在 100g/mL 卡那霉素的 LB 平板,经过 37℃ 培养过夜,挑选转化子,通过菌落 PCR 鉴定,质粒酶切鉴定(见图 2)和测序鉴定(序列如 SEQ ID NO. 3 所示),保存鉴定的 npela-ek-10his-slo/pET-28a(+) *E. coli* JM109 菌,提取 npela-ek-10his-slo/pET-28a(+) 备用。

[0036] 实施例 5 表达溶血素融合蛋白 PelA-EK-10His-SLO 的工程菌构建

[0037] 将质粒 npela-ek-10his-slo/pET-28a(+) 转化大肠杆菌宿主 BL21(DE3),再在 100g/mL 卡那霉素的 LB 平板,经过 37℃ 培养过夜,经过菌落 PCR 鉴定,得到单克隆转化子 npela-ek-10his-slo/pET-28a(+) /BL21(DE3)。

[0038] 实施例 6 溶血素融合蛋白 PelA-EK-10His-SLO 表达与分离纯化

[0039] 将 npela-ek-10his-slo/pET-28a(+) /BL21(DE3) 接种在 LB 培养基中 37℃ 液体培养过夜,后接入 TB(甘油 5g/L,蛋白胨 12g/L,酵母膏 24g/L, K_2HPO_4 12.54g/L, KH_2PO_4 2.31g/L) 发酵液体培养基,37℃ 培养到细菌 OD_{600} 到 0.8,用 0.5mM IPTG(异丙基硫代 β -D 半乳糖苷)诱导,降温至 20℃ 培养,表达 48h。摇瓶发酵表达结果表明,溶血素融合蛋白 PEHSLO 对宿主细胞毒性低,20℃ 条件下表达 48h 后, npela-ek-10his-slo 工程菌 OD_{600} 可以达到 2.5,高于 slo 独立表达的工程菌 (OD_{600} :1.60);该工程菌表达的溶血素融合蛋白 PEHSLO 同时具有果胶酶活性、溶血性和 SLO 抗原性;该工程菌果胶酶产率为 5.6Unit/mL 培养液,溶血酶产率为 400000Unit/mL,可溶性溶血素融合蛋白 PEHSLO 产率为 1.2mg/mL 培养液,占到细胞总蛋白的 30%,相比 slo 独立表达(占胞内蛋白的 5%),可溶性目标蛋白产量上升达 400%。

[0040] 实施例 7 溶血素融合蛋白 PelA-EK-10His-SLO 的分离纯化

[0041] 将 npela-ek-10his-slo/pET-28a(+) /BL21(DE3) 表达后的培养液离心,得到上清用 0.45m 膜过滤,过滤后的溶液按照 1:1 的比例和 2X Binding buffer(10mM 咪唑, 1M NaCl,40mM Tris-HCL) 混匀备用;His-tag 亲和层析柱用 5 倍柱体积的 1X charging buffer(50mM $NiSO_4$) 处理后,再用倍柱体积 1X Binding buffer(5mM 咪唑,0.5M NaCl,20mM Tris-HCL) 平衡;上样品后用 10 倍柱体积 1X Binding buffer 洗柱,再用 5 倍柱体积 1X Washing buffer(10mM 咪唑,0.5M NaCl,20mM Tris-HCL) 洗柱;用 6 倍柱体积 1X Elution buffer(40mM 咪唑,0.5M NaCl,20mM Tris-HCL) 洗脱。重组表达的溶血素融合蛋白 PEHSLO 的 SDS-PAGE 图谱如图 3 所示。

[0042] 实施例 8 溶血素融合蛋白 PEHSLO 的果胶酶活性测定

[0043] 检测上清的酶活,果胶酸裂解酶活性检测的反应体系为:0.5mL 反应液,内含 25mmol/L Tris/HCl(pH 8.0),0.1% 果胶酸,1mmol/L CaCl_2 和 1 μL 上清,在 50 $^\circ\text{C}$ 反应 10min,反应结束后,加 1ml 0.02mol/L HCl 终止反应,然后在 235nm 检测光吸收值的变化。一个酶活单位定义为每 min 释放的 1 μmol 不饱和半乳糖醛酸(unsaturated galacturonic acid)的酶量。在 235nm,不饱和半乳糖醛酸光吸收系数为 4600/ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

[0044] 在生产监控检测方面,溶血素融合蛋白 PEHSLO 可以用果胶酶活性进行定性和定量分析,一次果胶酶检测所需时间为 0.5h,检测成本为 0.15 元人民币,避免使用免疫学(一次免疫学检测所需时间为 10h,检测成本为 500.00 元人民币)和溶血法检测(一次溶血酶检测所需时间为 1.0h,检测成本为 0.50 元人民币),相对于经测定免疫学和溶血法检测,检测时间分别缩短 9.5h 和 0.5h,检测成本分别节省 499.85 元和 0.35 元人民币,经测定 1Unit 果胶酶活性对应于 0.2mg 左右的蛋白量和 7.0×10^4 Unit 溶血酶活性。

[0045] 实施例 9 溶血素融合蛋白 PEHSLO 的融血活性测定

[0046] 溶血素融合蛋白样品可用溶液 A(溶液 A:36mM H_3PO_4 ,126mM NaCl,1g/L BSA(bovine serum albumin),pH 7.0)进行系列梯度稀释。将 0.5ml 的 150mM 2-mercaptoethanol 与 1ml 稀释样品混匀,30 $^\circ\text{C}$ 孵育 15min,然后每管加 0.5ml 含绵羊红细胞的 A 溶液(1.58×10^8 cell/ml)30 $^\circ\text{C}$ 下反应 20min,离心后,用 541nm 检测上清中血红蛋白的浓度,1U 定义为在该实验条件下,引起上述反应体系中红细胞溶解的最小酶量,经测定,融合蛋白 PeLa-EK-10His-SLO 具有溶血性,酶活为 4×10^5 Unit/mL 培养基左右。Western 实验结果为阳性,表明融合蛋白 PEHSLO 具有抗原性。

[0047] 实施例 10 溶血素融合蛋白 PEHSLO 在诊断试剂生产中的应用

[0048] 用 npela-ek-10his-slo/pET-28a(+)/BL21(DE3)表达的融合蛋白可以用作临床检测患者体内 ASO(抗 SLO 蛋白的抗体)的重要生物学试剂。利用融合蛋白 PeLa-EK-10His-SLO、偶联辣根过氧化物酶的二抗和邻苯二胺,定量分析患者体内的 SLO 抗体(ASO)的量。

[0049] 实施例 11 溶血素融合蛋白 PEHSLO 在 SLO 抗体制品生产中的应用

[0050] 将融合蛋白用肠激酶消化后,再用亲和层析纯化,得到 SLO 蛋白,用 200 μg SLO 蛋白免疫牛等敏感动物,首次注射后大约 3 周后,用 50 μg SLO 蛋白加强免疫一次,在大约 14 天后左右,抗体的滴度会达到最大值,抽取血样,获得血清,制备成多抗。

[0051] 可参考下列文献:

[0052] 1. Kimoto H, Fujii Y, Hirano S, Yokota Y, Taketo A. Expression of recombinant Streptolysin O and specific antibody production. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2005 ;10(1):64-8.

[0053] 2. Velázquez B, Massaldi H, Battistoni J, Chabalgoity JA. Construction and expression of recombinant streptolysin-o and preevaluation of its use in immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 May ;12(5):683-4.

[0054] 实施例 12 溶血素融合蛋白 PEHSLO 在动物基因工程领域中作为打孔试剂,转移核酸与蛋白

[0055] 将动物细胞悬浮在 Hank 平衡盐溶液中(配方为:8g/L NaCl,0.4g/L KCl,1g/L 葡萄糖,60mg/L KH_2PO_4 ,47.5mg/L Na_2HPO_4 , NaHCO_3 ,0.35g/L,30mM Hepes, pH 至 7.2,定容到

1L),加入一定量的 PEKSLO 蛋白,在 37°C,处理 15min。

[0056] 实施例 13 溶血素融合蛋白 PEHSLO 可以作为药物封闭乳腺癌细胞 EGF 受体蛋白 ErbB1

[0057] 用终浓度为 10unit/ml 的 SLO Hank 平衡盐溶液,处理乳腺癌细胞 1.5h。

[0058] 可参考下列文献:

[0059] Hall EH, Gurel V, Dahlberg AE, McMichael J, Brautigam DL. Inhibition of human breast cancer Matrigel invasion by Streptolysin O activation of the EGF receptor ErbB1. Cell Signal. 2011Dec ;23(12):1972-7.

[0060] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

	115	120	125	
	Asn Val Trp Val Asp His Cys Asp Leu Ser Gly Asp Leu Ser Gly Gly			
	130	135	140	
	Lys Asp Asp Leu Asp Gly Leu Val Asp Ile Ser His Gly Ala Glu Trp			
	145	150	155	160
	Ile Thr Val Ser Asn Thr Tyr Phe His Asp His Trp Lys Gly Ser Leu			
		165	170	175
	Ile Gly His Ser Asp Asn Asn Glu Asp Glu Asp Leu Gly His Leu His			
	180	185	190	
	Val Thr Tyr Ala Asn Asn Tyr Trp Tyr Asn Val Tyr Ser Arg Thr Pro			
	195	200	205	
	Leu Ile Arg Phe Ala Thr Val His Ile Ile Asn Asn Tyr Trp Asp Ser			
	210	215	220	
	Leu Ile Asp Thr Gly Val Asn Trp Arg Met Asp Ala Gln Val Leu Ile			
	225	230	235	240
	Gln Ser Ser Ala Phe His Asn Cys Pro Asp Arg Ala Ile Phe Phe Ala			
		245	250	255
	Asp Ser Asp Tyr Thr Gly Tyr Ala Val Val Asp Asp Val Asp Leu Gly			
	260	265	270	
	Gly Ser Ser Asn Ser Val Pro Glu Gly Thr Leu Thr Pro Ser Ser Leu			
	275	280	285	
	Pro Tyr Ala Ala Ile Thr Ala Leu Gly Ser Gly Gln Val Ala Ser Val			
	290	295	300	
	Ile Pro Gly Thr Ala Gly Gln Lys Leu Asp Asp Asp Asp Lys His His			
	305	310	315	320
	His His His His His His His His His Met Leu Ala Pro Lys Glu Met			
		325	330	335
	Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys			
	340	345	350	
	Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser			
	355	360	365	

[0003]

Leu Asn Tyr Lys Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile
 370 375 380
 Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile
 385 390 395 400
 Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile
 405 410 415
 Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Met Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln
 420 425 430
 Leu Ala Asp Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala Val Val Thr
 435 440 445
 Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp
 450 455 460
 Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr
 465 470 475 480
 Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly
 485 490 495
 Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser
 500 505 510
 Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp
 515 520 525
 Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys
 530 535 540
 Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn
 545 550 555 560
 Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys
 565 570 575
 Asp Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val
 580 585 590
 Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser
 595 600 605
 Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly

[0004]

610	615	620	
Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser			
625	630	635	640
Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu His Asn Lys			
	645	650	655
Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn			
	660	665	670
Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser			
	675	680	685
Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu			
690	695	700	
Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu			
705	710	715	720
Ser His Arg Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu			
	725	730	735
Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp			
	740	745	750
Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro			
	755	760	765
Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr			
	770	775	780
Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu Arg Asp Val			
785	790	795	800
Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser			
	805	810	815
Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys			
	820		

<210> 2

<211> 2483

[0005]

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

```

ccatgggctc gccctgcccgc gacctcaacg cccgtaacga attgaccgcg cgcagggcct      60
cagaaagctg tccgateggg tactgcaaac agaaccggacg cactaccggg ggtgcggggcg      120
gtgactcect gaccgtgacc aatctggccc accctggctga agccgccgag agcgatgggc      180
cgcctgacaat catcgtgtct gggtccatct cgggcagtac caagatccgc gtggcctcag      240
ataagacgat ctttggagag tcgggtagt ctatccctgg tatcggattc tacattcgcc      300
gcgtccggaa tgcateatg cggaaactga agatcagcaa ggtcgacgea gacaacgccg      360
atgccaatgg cattgatgcc tctccaatg tctgggtgga tctattggac ctctctggag      420
acctcagcgg tgggaaggat gacttggacg gactgggtga tctcagccac ggcgcgggat      480
ggateaccgt ctcgaaact tacttcaacg accattggaa aggttccctt atcggcctact      540
ccgacaacaa tgaagacgag gacctaggcc atctgcacgt cactacgt acaactact      600
ggtacaacgt gtacagccgt acaccctga tccggttcgc cacagtgcac atcatcaaca      660
actattggga cagcctgac gacacggggc tgaactggcg tatggatgca caggtctgga      720
tccagtctc cgcgttccac aactgccccg acagagcgat ctctctcgc gactcagact      780
acaccgggta tgcctctgta gacgatgtg acctggggcg ctcgagtaac tcgggtcccg      840
agggaacct gacgcctagc tcttgcctt atgcggccat tactgctctg gcatctggcc      900
aggttgcaag cgtgatccg ggtacagccg gacagaaatt ggacgacgac gacaagcacc      960
atcatcatca tcatcatcat caccaccata tgcctggccc gaaagaaatg ccgctggaaa     1020
gtgctgaaaa agaagaaaaa aatccgaag acaaaaaaaaa atccgaagaa gaccacacgg     1080
aagaaatcaa cgataaaatc tactctctga actacaaaga actggaagtg ctggcaaaaa     1140
accggcgaaac cattgaaaat ttgtcccga aagaaggcgt gaagaaagcg gataaattca     1200
ttgttatcga acgtaaaaag aaaaacatca acaccacgce ggttgacatc tctattatcg     1260
atagtgtcac cgacatgacc taccggccc cactgcagct ggccgataaa ggttttaccg     1320
aaaacaaacc ggacgccgtg gttacgaaac gcaatccgca aaaaattcat atcgatctgc     1380
cgggcattgg tgacaaagcc accgtggaag ttaacgatcc gacctatgca aatgtgtcaa     1440
cggctattga taacctggtt aatcagtggc acgacaacta ctccggcggt aatacctgc     1500
cggcacgtac ccagltacg gaatcaatg tctactcaaa atcgcaaat gaagcagctc     1560
tgaacgtgaa tagtaaaatc ctggatggca cctggggaat tgacttcaaa agcatcteta     1620

```

[0006]

aaggtgaaaa gaaagtgatg attgcggcct ataaacagat ctctacacc gtctcggcga	1680
acctgcecaa caatccggcc gatgillig acaaaagegt cacgltcaaa gatctgeaac	1740
gtaaaggcgt gtctaacgaa gcaccgecgc igtttgtag taatgtcgt tatggtegca	1800
ccgtcttctg gaaactggaa acgagctcta aatcgaatga tggggaagca gcttttagcg	1860
cggccctgaa aggcaccgat gtlaaaacga acggtaaata tccgacatt ctggaaaata	1920
gttcttttac cgcctgttg ctagggcgggtg atgcagctga acataacaaa gtgtcacga	1980
aagatttfga cgtgatctgt aacgttatca aagataatgc gacctcagc cgcaaaaate	2040
cggcctatcc gattagttac acgtccgtgt ttctgaaaa caataaate gccggcgtca	2100
acaatcgaac cgaatatgtg gaaaccacgt ccaccgaata cacgtcagc aaaatcaacc	2160
tgagccaccg cgggtcgtat gtggcccagt acgaaattct gtgggatgaa atcaactacg	2220
atgacaaggg taaagaagtt atcaccaaac gtcgctggga caacaattgg tactcaaaaa	2280
ctctgccgtt cagcaecgtt atcccgtgg gcgcgaacte tcgtaatatt cgcacatgg	2340
caecgeaatg caccggctg gcttgggaat ggtggcgtaa agtgattgat gaacgcgacg	2400
ttaaactgag taaagaaate aatgtcaaca ttagcggcag caccctgtcc ccgtatgct	2460
caatcaccta caaataagga tcc	2483

<210> 3

<211> 7748

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

laggectata tcaaggagga aagtcgllt ttggggagtt ctgggcaaal ctccgggglt	60
ceccaatacg atcaataacg agtcgccacc gtcgtcgggt gagtcgaagg aaageccgaa	120
acaatcgtcg gcctagagtc accaccacca ccaccacgag ctacgcggcg cgttcgaaca	180
gctgectega geltaagect aggaataaac atccactaac tcgglatgcc cctgccccac	240
gacggcgatt acaactgiaa ctaaagaaat gagtcaaat gcagegcaag tagttagtga	300
aatgcgggtg taagggttcg gtcgtgccac gtaagegcac ggtaactacg ttataatgt	360
ctcaagecgg gctcgccta ttggcaccgac ttgccgtcc aaaaactcat ggtaacaac	420
agggtcgtg caaaccacta ttgaagaaat gggaacagta gatacaacta aagtagggtg	480

[0007]

tcttaaagca tgaccegggtg tatgcgtggc gccaccgagt ccaactaaaa cggactgcac	540
alaagecacc lgcaccaaaag gtlalaagc caagctaaca acfgeggecg ctaaaataac	600
aaaaagtctt lgtgectgca cattgattag cclatecggc claaaaacgc egacttccag	660
cgtaatagaa actattgcaa tgettagtgc agtttagaa agcactgttg aaacaataca	720
agtcgacgta gtggggggtc gtgttgccgc catttcttg ataaaaggtc ttacagcctt	780
ataaatggca agcaaaattg tagccacgga aagtcceggc gcgattttcg acgaagggtg	840
agtaagctaa atctcgagca aaggtaaaag tctttctgcc acgctgggat tcgctgfaat	900
gattgtttgt cggccgacg aagcaatctg tgcggaaatg caacgtctag aaacttgeac	960
tgcgaaaaca gttttgtag cggcctaac aaccctcca agcggctctg ccacatctt	1020
tagacaaata tccggcgta gtagtgaaag aaaagtggaa atctctacga aaacttcagt	1080
taagggtccc acggtagtc ctaaaatgat aagtgcagt ctcgacgaag ttaaagcta	1140
aaactctct gglaactaag gcataagacc catgcacggc cgtccataa tggcggcctc	1200
atcaacagca cggtgactaa ttggccaat agttatcggc aactgtgta acgtatccag	1260
cctagcaatt gaaggtgcca ccgaaacagt gggtacgggc cgtctagcta tacttaaaaa	1320
acgcctaacg caaagcattg gtgccgagg ccaaacaaaa gccattttgg aaatagccgg	1380
tcgacgtcac gccggcctat ccagtacagc cactgtgata gtattatct ctacagtfg	1440
ccgcaccaca actacaaaaa gaaaaatgca agctattgtt actfaaatag gcgaaagaag	1500
tgcggaagaa agecctgttt taaaagttae caaagcggca aaaaaeggtc gtgaaggtea	1560
agaaacatea agtctctcat ctaaaatage aactaaagaa ggcaacaccag aagaagceta	1620
aaaaaaaaaca gaagcctaaa aaaaagaaga aaaagtcgtg aaaggctgcc gtaaagaag	1680
ccccggctgt ataccactac tactactact actactacta ctacgaacag cagcagcagg	1740
ttaaagacag gccgacatgg gccttagtgc gaacgttggc cgggtctagg gtcgcgtcat	1800
taccggcgta tccgttctt cgatecgcag tccaaggga gccctggct caatgagctc	1860
ggcgggtcca gttgtagcag atgtgtgt atgggccaaca tcagactcag ccgttctt	1920
tagcgagaca gccccgctaa caccttgcgc ctctgacct agtcgtggac acgtaggtat	1980
gcggtcaagt gcgggcacag ctagtccgac agggttatca acaactacta cacgtgacac	2040
cccttggcct agtccccaca tcccgacatg tgcaacatgg tcaatcaaaa tgcacccac	2100
tgcacgtcta ccggtaccag gacgagaagt acaacagcc tcaccggcta ttcccttga	2160
aaggttacca gcaccttcat tcaaaagctc tgccactagg taaggcggc caccgactat	2220
aggtggctcag gcaggctcag taggaagggt ggcgactcca gaggctctc cagcgttact	2280
agctgggtct gtaacctct ccttagttac ggtaaccgta gccgcaacag accgagctgg	2340

[0008]

aacgactaga agttcaaggc gtactactgt aaggcctgcg ccgcttacat cftaggctat	2400
ggiccctaic ttgatgggct gagaggttic tagcagaala gaciccgggtg cgcctagaac	2460
catgacgggc tetacctggg tctgtctac taacagtcgc cgggtagcga gageccgcga	2520
agtcgggtcca gccgggtctaa ccagtgccag tccctcagtg gcgggcgtgg tggeccateac	2580
gcaggcaaga cacacgtcat gggctagcct gtcgaaagac tccggacegc cgeccaglla	2640
agcaactgcc gcaactccag gccgcgtccg ctccgggtacc atatagagga agaatttcaa	2700
tttgtttaaa taaagatctc cccftaacia taggcgagtg ttaaggggat atcaactcagc	2760
ataattaaag cgccttagct ctagagctag gagatgcggc ctgcctagca ccggccgtag	2820
tgcccgcggg gtccacgcca acgaccgcgg atatagcggc tctagtggct accccttcta	2880
gcccagagcgg tgaagcccga gtactcgcga acaaagecgc acccatacca ccgtccgggg	2940
caccggcccc ctgacaacct gcggtagagg aacgtacgtg gtaaggaacg ccgccgccac	3000
gagttgccgg agttggatga tgaccgcagc aaggattacg tctcagcgt attccctctc	3060
gcagctctag gccctgtggt agcttaccgc gttttgaaa gcgccatacc gtactategc	3120
gggccctctc tcagttaagt cccaccactt acactttggt cattgcaata tgctacagcg	3180
tctcatacgg ccacagagaa tagtctggca aagggcgcac cacttggctc ggtcgggtca	3240
aagaacgttt tgcgcccttt tcaaccttcg ccgctaccgc ctgacttaa tgtaagggtt	3300
ggcgcaccgt gttgttgacc gcccgttgt cagcaacgac taaccgcaac ggtggaggtc	3360
agaccgggac gtgcgcgcca gcctttaaca gcgccgctaa ttagagcgc ggetagtga	3420
cccacggctc caccaccaca gctaccatct tcttcgcgc cagcttcgga catttcgcg	3480
ccacgtgtta gaagagcgcg ttgcgcagtc acccgactag taattgatag gcgacctact	3540
ggtcctacgg taacgacacc ttcgacggac gtgattaaa ggccgcaata aagaactaca	3600
gagactggtc tgtgggtagt tgctafaata aaagagggtc ctctgcctat gcgctgacce	3660
gcacctegta gaccagegta acccagtgtt cgtttagegc gacaategcc cgggtaatte	3720
aagacagagc cgcgcagacg cagaccgacc gaccgtattt atagagtgag cgttagttaa	3780
agtcggctat cgccttgcgc ttcgctgac ctcaaggtae aggccaaaag ttgtttggtc	3840
cgtttacgac ttactcccgt agcaagggtg acgctacgac caacggttgc tagtctaccg	3900
cgaccgcgt tacgcgcggg aatggctcag gcccgacgcg caaccacgcc talagagcca	3960
tcacctatg ctgctatggc tctgtcagac taacaatag ggcggcaatt ggtggtagtt	4020
tgctctaaaa gcggacgacc ccgtttggtc gcacctggcg aacgacgtt agagagtcgc	4080
ggtcgcgcac tcccgttag tcgacaacgg gcagagtgac cactttctt tttggtggga	4140
ccgcgggtta tgcgtttgce ggagaggggc gcgcaaccgg ctaagtaatt acgtcgaccg	4200

[0009]

tgctgtccaa agggctgacc tttegcccgf cactcgcggt gcgtaatta cattcaatcg	4260
agtgagliaal cegtggcect agagctggct acgggaactc teggaagtig ggicaglegc	4320
ggaaggccac ccgcgccccg tactgatagc agcggcggtga atactgacag aagaaatagt	4380
acgttgagca tctgtccac ggccgtcgcg agaccagta aaagccgctc ctggcgaaag	4440
cgacctcgcg ctgctaclag ceggacagcg aacgccataa gccllagaac gtgcgggagc	4500
gagttcggaa gcagigacca gggcgggtgt ttgcaaagcc gctcttcgtc cggtaatagc	4560
ggccgtaccg ccgggggtgcc cacgcgtact agcacgagga cagcaactcc tgggccgac	4620
cgaccgcccc aacggaatga ccaatcgtct tacttagtgg ctatgcgctc gcttgcactt	4680
cgctgacgac gacgtttgc agacgttggc ctggtgttg tacttaccag aagccaaagg	4740
cacaaagcat tteagacctt tgcgecttca gtcgcgggac gtggtatac aaggcctaga	4800
cgtagcgtcc tacgacgacc gatgggacac ctgtgtgatg tagacataat tcttcgca	4860
ccgtaactgg gactcactaa aaagagacca gggcggcgta ggtatggcgg tcaacaaatg	4920
ggagtgttgc aaggctattg gcccgtacaa gtagtagtca ttgggcatag cactcgtagg	4980
agagagcaaa gtagccatag taatgggggt acttgtcttt agggggaatg tgcctcgta	5040
gtcactgggt tgccttttt tggcgggaat tgiaccgggc gaaatagtct tcggtctgta	5100
attgcgaaga cctctttgag ttgctcgacc tgcgctact tctcctctg tagacactta	5160
gcgaagtgtt ggtgcgacta ctgaaatgg cgtcgacgga gcgcgcaaag cactactgc	5220
cacttttggc gactgtgtac gtcgagggcc tctgccagtg tcgaacagac attgcctac	5280
ggccctcgtc tcttcgggca gtcgcgcgca gtcgcccaca accgcccaca gccccgctc	5340
ggtactgggt cagtgcctc ctatgcctc acatagacc gaattgatac gccgtagtct	5400
cgtctaacat gactctcag tggatatac gccacacttt atggcgtgtc taegcattcc	5460
tcctttatgg cgtagtcgc gagaaggcga aggagcaggt gactgagcga cgcgagccag	5520
caagccgacg ccgctcgcca tagtcgagtg agttccgcc attatgcca taggtgtctt	5580
agtcctctat tgcgtcttt ctgttacct cgtttccgg tcttttcg gtccttggca	5640
ttttccggc gcaacgaccg caaaaaggta tccgagggcg ggggactgt ctagtgttt	5700
ttagctgcga gttcagctc caccgcttt ggctgtctg atattctat ggtccgcaaa	5760
gggggacctt cgagggagca cgcgagagga caaggctggg accgcaatg gccatggac	5820
aggcggaaa aggggaagccc ttcgcaccgc gaaagagtat cgagtgcgac atccatagag	5880
tcaagccaca tccagcaagc gaggttcgac ccgacacacg tctttgggg gcaagtggg	5940
ctggcgacgc ggaataggcc attgatagca gaactcaggt tgggccattc tctgtgaat	6000
agcggtgacc gtcgtcgggt accattgtcc taatcgtctc gctccataca tccgccaaga	6060

[0010]

tgtctcaaga acttcaccac cggattgatg ccgatgtgat ctctctgtca taaaccatag	6120
acgcgagacg actteggtea atggaagect tttctcaac catcgagaac taggcegttt	6180
gtttgggtggc gaccategcc accaaaaaaaa caaacgttcg tegtctaatg cgcgtctttt	6240
ttctctagag ttctcttagg aaactagaaa agatgcecca gactgcegagt caccttgctt	6300
ttgagtgcaa ttccctaaaa ccagtacttg ttatittgac agacgaatgt atttgcatt	6360
atgttcccca caatactegg tataagtgc ccttgcaga acgagatecg gegetaattt	6420
aaggftgtac ctacgactaa atatacccat atttaccga gcgctattac agcccgttag	6480
tccacgctgt tagatagcta acataccctt cgggctacgc ggtctcaaca aagaacttft	6540
accgtttcca tcgcaacggg tactacaatg tctactctac cagtctgatt tgaccgactg	6600
ccttaataac ggagaaggct ggtagtctgt aaaataggca tgaggactac tacgtaccaa	6660
tgagtgggtga cgttaggggc cctttgtcg taaggctcat aatcttetta taggactaag	6720
tccactttta taacaactac gcgaccgtea caaggacgcg gccaacgtaa getaaggaca	6780
aacattaca ggaaaattgt cgttagcgca taaagcagag cgagtcgcgc ttagtctta	6840
cttattgcca aaccaactac gctcactaaa actactgctc gcattaccga ccggacaact	6900
tgttcagacc ttctttacg tatttgaaaa cggtaagagt ggcctaagtc agcagtgagt	6960
accaataag agigaactat tggaataaaa actgcctccc ttaattatc caacataact	7020
acaactgct cagccttagc gctggtctat ggtctagaa cggtaggata ccttgacgga	7080
gccactcaaa agaggaagta atgtcttgc cgaaaaagtt ttataccat aactattagg	7140
actatactta titaacgtea aagtaaacfa cgagctactc aaaaagatte ttaattagt	7200
actgcctat gtataaactt acataaatct tttatttgt ttatcccaa ggccgctgta	7260
aaggggcttt tcacgggtgga cttaacatt tgcaattata aaacaatttt aagegcaatt	7320
taaaaacaat ttagtcgagt aaaaaattgg ttatccgct ttagecgttt tagggaatat	7380
ttagttttct tctcggctc tateccaact cacaacaagg tcaaaccttg ttctcagggt	7440
ataatttctt gaacctgagg ttgcagttc ccgcttttg gcagatagtc ccctaccgg	7500
gtgatgcact tggtagtggg attagttaa aaaaccccag ctccacggca ttctgtgatt	7560
tagccttggg atttccctcg ggggctaaat ctgaactgc cctttcggc cgttgcacc	7620
gctcttctt tcccttttt cgtttctc gcccgcgate ccgcgacct teacategcc	7680
agtgcgacgc gcattgggtg tgtggggcgc gcgaattac cggcgaatgc ccgcgcaggg	7740
taagcggg	7748

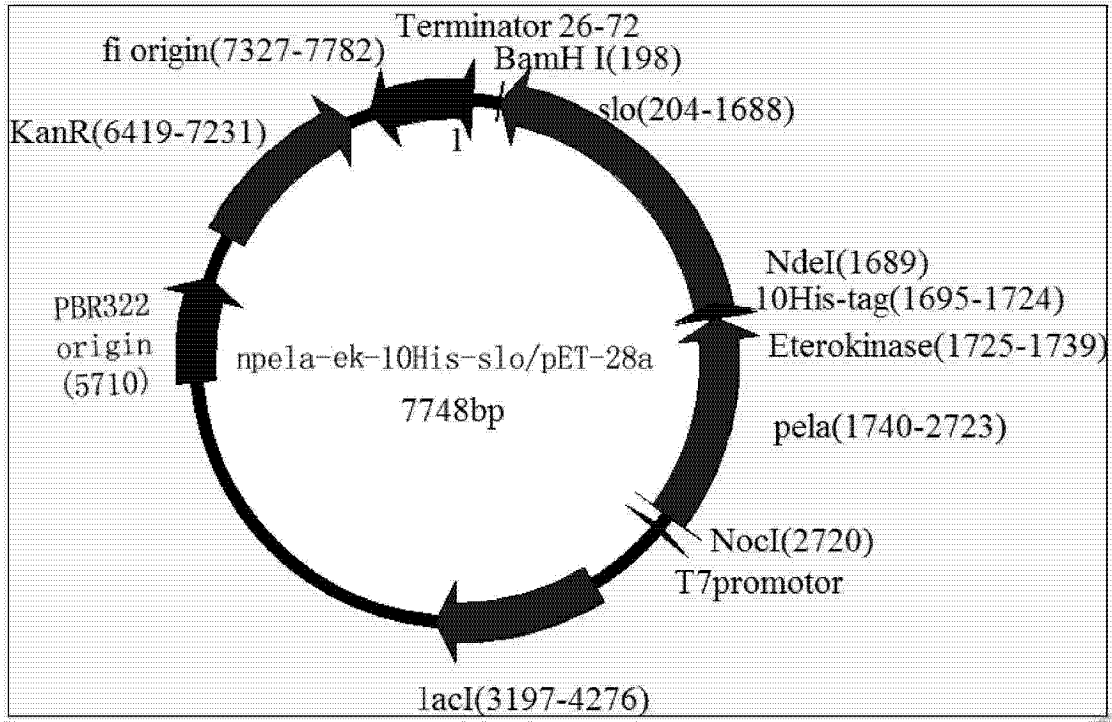


图 1

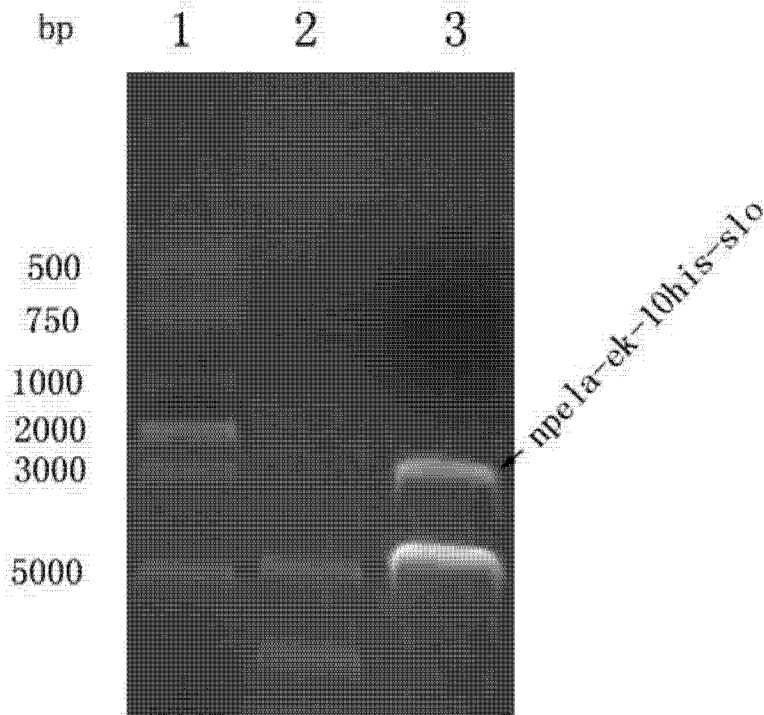


图 2

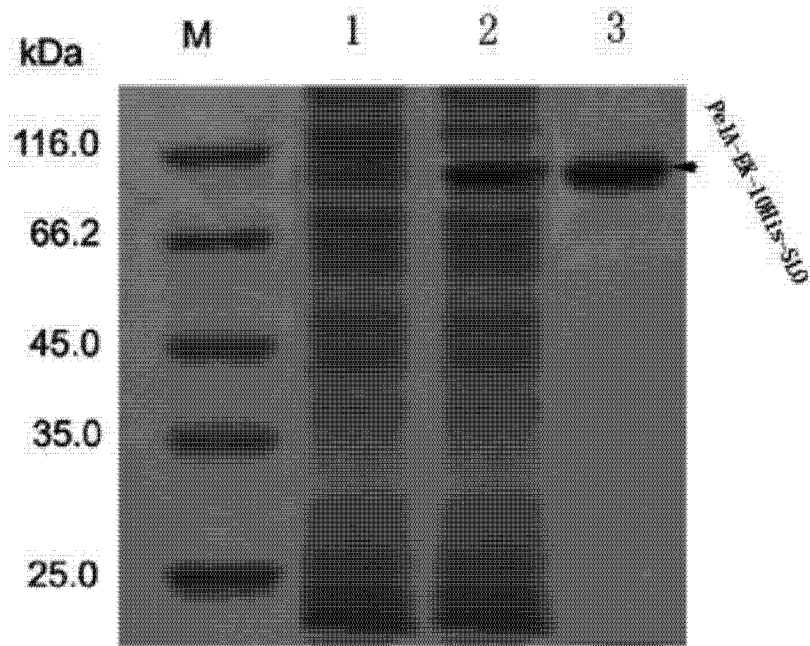


图 3

专利名称(译)	一种溶血素融合蛋白PeLa-EK-10His-SLO及其表达质粒与应用		
公开(公告)号	CN104892769A	公开(公告)日	2015-09-09
申请号	CN201510268710.7	申请日	2015-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	盐城师范学院		
申请(专利权)人(译)	盐城师范学院		
当前申请(专利权)人(译)	盐城师范学院		
[标]发明人	赵庆新 王建 崔刚 王欢莉 康贻军 沈敏		
发明人	赵庆新 王建 崔刚 王欢莉 康贻军 沈敏		
IPC分类号	C07K19/00 C07K14/315 C12N9/88 C12N15/70 C12N1/21 G01N33/53 A61K38/16 A61P35/00 C12R1/19		
代理人(译)	张勇		
其他公开文献	CN104892769B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种溶血素融合蛋白PeLa-EK-10His-SLO及其表达质粒与应用，属于医学微生物或生物制药领域。本发明在大肠杆菌中表达了该溶血素融合蛋白PEHSLO，发现该溶血素融合蛋白PEHSLO表达量提高且对宿主细胞毒性低。溶血素融合蛋白PEHSLO同时具有果胶酶活性、溶血性和SLO抗原性，该工程菌果胶酶产率为5.6Unit/mL培养液，溶血酶产率为400000Unit/mL，可溶性溶血素融合蛋白PEHSLO产率为1.2mg/mL培养液。在生产监控检测方面，溶血素融合蛋白PEHSLO可以用果胶酶活性进行定性和定量分析，避免使用免疫学和溶血法检测，简化了检测方法、缩短了检测时间、节约了检测成本。溶血素融合蛋白PEHSLO还可以应用于溶血素蛋白SLO生产、SLO抗体制品生产、SLO抗体检测试剂生产或抗癌药物生产。

