



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102212531 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 201010141209. 1

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 04. 02

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

(72) 发明人 付永锋 程训佳 冯萌

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C12N 15/31(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C07K 14/37(2006. 01)

A61K 38/16(2006. 01)

A61P 37/08(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

序列表 3 页 附图 5 页

(54) 发明名称

一种重组多主枝孢霉变应原 Cl_a h8 蛋白的制备方法及其用途

(57) 摘要

本发明属生物技术领域,涉及一种重组多主枝孢霉变应原 Cl_a h8 蛋白的制备方法及其用途。本发明从培养的多主枝孢霉提取 RNA,通过 PCR 获得多主枝孢霉变应原 Cl_a h8 蛋白的编码基因后,构建变应原 Cl_a h8 蛋白的表达载体 pET19b-Cl_a h8。经表达纯化及鉴定,证实制得的重组多主枝孢霉变应原 Cl_a h8 蛋白可与多主枝孢霉过敏患者的血清中 IgE 和 IgG 抗体特异性结合,具有与天然多主枝孢霉变应原 Cl_a h8 蛋白相同免疫活性。本发明方法制得具有生物学活性的可溶性重组多主枝孢霉变应原 Cl_a h8 蛋白,能避免天然提取物的非单一性及标准化难的障碍。制得重组多主枝孢霉变应原 Cl_a h8 蛋白可制备诊断和治疗多主枝孢霉引起的过敏性疾病的制剂。

1. 一种重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 的制备方法,其特征在于,其包括如下步骤:

1) 从培养的多主枝孢霉菌体中提取总 RNA,通过 RT-PCR 合成 cDNA;

2) 合成引物:

Cla h8-S 5-CCCATATGCCTGGCCAGCAAGCAA-3

Cla h8-as 5-CGGGATCCTTATCTGGTGGTGTAACCA-3

3) 以 cDNA 为模板,通过 PCR 获得多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 编码基因片段;

4) 将编码基因克隆入表达载体中,转化宿主菌,培养所得重组工程菌,然后诱导其表达目的蛋白;

5) 采用缓冲液对 rCla h8 包涵体进行洗涤,将其提纯后,采用谷胱甘肽还原系统对其复性,获得重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8;

6) 免疫学方法鉴定重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 免疫原性。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 中,Cla h8 编码基因如 SEQID No :1 所示;所编码的氨基酸序列如 SEQ ID No :2 所示。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 4) 的表达载体不限于特定的表达载体,只要它能够与所述 cDNA 基因重组,形成适宜表达质粒。

4. 根据权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述的表达载体为原核表达载体。

5. 根据权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述的表达载体为 pET19b。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 4) 的宿主菌不局限于任何特定的宿主细胞,只要它能够表达所述重组表达载体。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述的宿主细胞为大肠杆菌 BL21 Star™(DE3) pLysS。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 4) 中,宿主菌的培养基是 LB 液体培养基,培养温度是 20 ~ 37℃,培养时间 6 ~ 16 小时。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 4) 中,菌体达到合适的浓度后用 IPTG 诱导表达,诱导条件为: IPTG 浓度为 0.1 ~ 1mM,诱导温度为 20 ~ 37℃,诱导时间为 2 ~ 16 小时。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 5) 中的纯化方法为:将多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 表达工程菌在 37℃ 诱导 3 小时后,离心收集菌体,置于冰上超声裂解,然后加入溶菌酶 30℃ 振摇 30 分钟,离心,收集包涵体蛋白沉淀,以 Novagen 公司的 refolding kit 对包涵体蛋白进行提纯与复性后,14000rpm 离心 20 分钟,收集上清,冰箱保存。

11. 权利要求 1 的方法制得的重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 在制备诊断与治疗多主枝孢霉引起的过敏性疾病制剂中的用途。

一种重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白的制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,涉及一种重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白的制备方法及其用途

背景技术

[0002] 过敏性哮喘是危害严重的公共卫生问题,其发病率及死亡率呈持续上升趋势。据 WHO 估计,全世界现有 3 亿的哮喘患者,其中 50% 以上的成人和至少 80% 的儿童患者均由过敏因素诱发,每年有 25 万以上的患者死于哮喘,哮喘已不仅是发达国家的公共卫生问题,几乎所有国家都深受其害。统计报道,我国大陆哮喘的发病率尚较低,为 2.1% (不包括香港 6.2% 和台湾 2.6%), 但我国哮喘患者的死亡率却高达 36.7/10 万,位居全球第一。此外,我国哮喘的发病在各地区之间的差异可达 10 倍,以重庆最高,西藏最低,并且在未来十年内,哮喘的发病将持续上升,由于我国人口基数大,哮喘的发病率上升 2 个百分点,将增加 2 千万以上的发病人数。

[0003] 研究显示,过敏性哮喘可以由多种因素诱发,其中环境中存在的各种变应原是其主要的诱发原因。这些变应原包括尘螨、动物的皮屑、花粉和霉菌等。在温湿环境中,霉菌是引起过敏性疾病的主要诱因。据报道,在美国的南部,30% 的过敏患者对多种霉菌敏感。多主枝孢霉 (*Cladosporium herbarum*) 就是一种主要引起过敏性疾病的霉菌,它不仅是一种主要的室内过敏原,也是夏秋两季的主要室外过敏原。

[0004] 多主枝孢霉含有多种变应原蛋白,其中 Cla h8 变应原蛋白是其主要的变应原蛋白。57% 以上多主枝孢霉过敏患者血清中的 IgE 抗体可以特异性的识别 Cla h8 变应原蛋白。皮肤点刺实验结果显示 Cla h8 可以引起患者出现皮肤的红肿。

[0005] 目前临床上对多主枝孢霉过敏患者的诊断和特异性抗原免疫治疗采用的是传统的多主枝孢霉浸出液,其含有多种抗原成分,且相对效价和特异性抗原水平存在明显的差异,很难进行标准化定量,容易引起患者出现诊断或治疗性过敏反应,因此限制了对其实诊应用。而重组的多主枝孢霉变应原蛋白不仅产量高,生产条件恒定,有利于进行标准化,更适合进行临床诊断与治疗。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对多主枝孢霉变应原浸出液进行过敏性疾病的诊断与治疗中的不足,提供一种重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白的制备方法及其用途。

[0007] 本发明通过基因工程手段,从多主枝孢霉的组织中提取其主要变应原蛋白 Cla h8 的编码基因,构建表达载体,在大肠杆菌中诱导表达重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8,本发明制得的重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 可用于多主枝孢霉引起的过敏性疾病的诊断与治疗。

[0008] 具体而言,本发明提供了重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 的表达方法,其特征

在于,其包括如下步骤:

[0009] (1) 从培养的多主枝孢霉菌体中提取总 RNA,通过 RT-PCR 合成 cDNA;

[0010] (2) 合成引物:

[0011] Cla h8-S 5-CCCATATGCCTGGCCAGCAAGCAA-3

[0012] Cla h8-as 5-CGGGATCCTTATCTGGTGGTGTAACCA-3

[0013] (3) 以 cDNA 为模板,通过 PCR 获得多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 编码基因片段;所述的 Cla h8 编码基因如 SEQ ID No :1 所示,其所编码的氨基酸序列如 SEQ ID No :2 所示;

[0014] (4) 将编码基因克隆入表达载体中,转化宿主菌,培养所得重组工程菌,然后诱导其表达目的蛋白;

[0015] (5) 采用缓冲液对 rCla h8 包涵体进行洗涤,将其提纯后,采用谷胱甘肽还原系统对其复性,从而获得重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8;

[0016] (6) 免疫学方法鉴定重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 免疫原性。

[0017] 本发明中,所述的表达载体不限于特定的表达载体,只要它能够与所述 cDNA 基因重组,形成适宜表达质粒。本发明优选表达载体为原核表达载体;本发明更优选原核表达载体为 pET19b。

[0018] 本发明中,所述的宿主细胞不局限于任何特定的宿主细胞,只要它能够表达所述重组表达载体。本发明优选宿主菌为大肠杆菌 BL21Star™(DE3)pLysS,培养基为 LB 液体培养基,培养温度为 20 ~ 37℃,培养时间 6 ~ 16 小时。

[0019] 本发明中,步骤 (5) 所述诱导剂为 IPTG。培养的菌体达到合适的浓度后以 IPTG 进行诱导表达,诱导条件为: IPTG 浓度为 0.1 ~ 1mM,诱导温度为 20 ~ 37℃,诱导时间为 2 ~ 16 小时。

[0020] 本发明中,步骤 (6) 所述的纯化方法为:将多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 表达工程菌在 37℃ 诱导 3 小时后,离心收集菌体,置于冰上超声裂解,然后加入溶菌酶 30℃ 振摇 30 分钟,离心,收集包涵体蛋白沉淀,以 Novagen 公司的 refolding kit 对包涵体蛋白进行提纯与复性后,14000rpm 离心 20 分钟,收集上清,冰箱保存。

[0021] 本发明中,采用 Dolt bolt 与 Western blot 法检测 rCla h8 的免疫原性。

[0022] 本发明中,采用的表达载体、宿主细胞均为市购。

[0023] 本发明与现有技术相比较,具有如下优点:

[0024] 本发明从培养的多主枝孢霉中提取总 RNA,扩增出多主枝孢霉主要变应原蛋白 Cla h8 的编码基因,从而构建表达载体。转入大肠杆菌诱导后,重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 以包涵体形式在大肠杆菌中高效表达,经过简单的洗涤后,可以获得高纯度的蛋白。以谷胱甘肽还原系统对其进行复性后,可获得具有生物学活性的可溶性重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8,可用于多主枝孢霉引起的过敏性疾病的诊断和治疗,本发明避免了天然提取物的非单一性及标准化难的障碍。

附图说明

[0025] 图 1, PCR 扩增多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白编码基因电泳图。

[0026] 图 2,多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白表达载体 pET19b-cla h8 的 Hind III 单酶切

鉴定电泳图。

[0027] 图 3,多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白表达载体 pET19b-cla h8 的 BamHI 与 NdeI 双酶切鉴定电泳图。

[0028] 图 4,多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白编码基因与 AY191816 序列对比。

[0029] 图 5,多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白氨基酸序列对比。

[0030] 图 6,重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白在大肠杆菌中表达检测 SDS-PAGE 电泳结果,

[0031] 其中,M 为低分子蛋白 marker,1 为未诱导的细菌裂解液,2 为经 1mM 的 IPTG 37℃ 诱导 3 小时后,细菌裂解液。

[0032] 图 7,纯化后重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白包涵体蛋白 SDS-PAGE 检测电泳结果。

[0033] 图 8 重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白包涵体蛋白复性重构后 SDS-PAGE 检测电泳结果。

[0034] 图 9,重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白抗原特异性 Dot blotting 检测

[0035] 其中,1 为 CBB 染色,2 为与多主枝孢霉过敏病人血清 IgG 反应结果,3 为多主枝孢霉过敏病人血清 IgE 反应结果。

[0036] 图 10,重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白 western blot 检测,

[0037] 其中,M 为低分子量蛋白 marker,1 为重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白经 CBB 染色,2,3,4 分别为重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白与多主枝孢霉过敏病人血清中 IgE 反应结果。

具体实施方案

[0038] 实施例 1 多主枝孢霉培养

[0039] 将保存的多主枝孢霉 (*Cladosporium herbarum*) 菌株 (ATCC 6056) 接种于 100ml YPD 培养基 (10g/L yeast extract,20g/L peptone,20g/L glucose),pH6.0 ~ 6.5),25 ~ 28℃ 培养 6 天,离心去上清,PBS 缓冲液洗涤菌体三次,-80℃ 保存备用。

[0040] 实施例 2 多主枝孢霉变应原 Cla h8 编码基因获得

[0041] 按照 Rneasy Total RNA 试剂盒的使用说明,提取多主枝孢霉菌体的总 RNA,使用 GeneAmp RNA PCR Kit 进行 RT-PCR,获得 cDNA。根据 GeneBank 公布的多主枝孢霉变应原 Cla h8 的 mRNA 序列 (AY191816),设计引物并加入 NdeI 和 BamHI 酶切位点: Cla h8-S 5-CCCATATGCCTGGCCAGCAAGCAA-3 和 Cla h8-as 5-CGGGATCCTTATCTGGTGGTGTAACCA-3 以 cDNA 为模板,PCR 扩增编码多主枝孢霉变应原 Cla h8 成熟肽段的基因片段,PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,其大小为 804bp (图 1)。

[0042] 实施例 3 重组表达质粒 pET19b-Cla h8 的构建

[0043] 以 QIAquick PCR Purification Kit 提纯 PCR 扩增产物,再以 NdeI 和 BamHI 酶切 PCR 扩增产物插入 pET19b 载体中。转入大肠杆菌 JM109,将菌液涂布于 LB 琼脂板 (含氨苄青 100 μg/ml,氯霉素 34 μg/ml),37℃ 过夜培养后,挑取克隆,抽提重组质粒进行双酶切鉴定,结果显示目标条带与 Cla h8 基因片段的 PCR 产物大小一致,说明成功构建了多主枝孢霉变应原 Cla h8 的重组质粒 pET19b-Cla h8 (图 2,图 3) 由上海英俊生物有限公司对该重

组质粒进行测序鉴定,并采用 Vector NTI 10 软件,推定氨基酸序列,并与 Genbank 中公布的序列 (AY191816) 进行比对。rClah8 的核苷酸序列缺少 N 末端的前序列 (由 51 个核苷酸组成) 和 C 末端非编码区 (由 63 个核苷酸组成),并有 9 个核苷酸位点与 AY191816 不同,但未引起氨基酸残基的改变 (图 4,图 5)。

[0044] 实施例 4 重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白的表达

[0045] 重组质粒 pET19b-Cla h8 转化大肠杆菌 BL21Star (DE3)pLysS 后,涂布于 LB 琼脂板 (含氨苄青 100 μ g/ml,氯霉素 34 μ g/ml),37 $^{\circ}$ C 温箱中培养过夜。挑选单一菌落入 800ml LB 培养液 (含氨苄青 50 μ g/ml,氯霉素 34 μ g/ml) 中,37 $^{\circ}$ C 220rpm 振摇,培养至 OD600 约为 0.5 时,加入 1mM 的 IPTG,37 $^{\circ}$ C 诱导 3 小时,4 $^{\circ}$ C 8000rpm 离心 10 分钟,弃上清,收集细菌沉淀,经 12.5% 的 SDS-PAGE 检测,IPTG 诱导的菌液在分子量大约 37kD 处出现目的蛋白表达条带 (图 6)。

[0046] 实施例 5 重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白的重新折叠

[0047] 本发明的多主枝孢霉变应原 Cla h8 以包涵体的形式表达。细菌沉淀中,加入 40ml IB wash buffer 和 40 μ l 1M PMSF,冰上超声后,加入溶菌酶 (终浓度为 200 μ g/ml) 混匀后,30 $^{\circ}$ C 100rpm 振摇 30 分钟后,再次冰上超声,离心 10000rpm 10 分钟;弃上清,加入 40ml IB wash buffer 重新悬浮后,10000rpm 离心 10 分钟,重复该步骤,直至沉淀的颜色一致。经 12.5% 的 SDS-PAGE 检测,多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白的包涵体纯度可达到 98% 以上 (图 7)。

[0048] 将悬浮后的包涵体转入一个已知重量的 50ml 离心管中,10000rpm 离心 20 分钟;弃上清,并擦净壁上残余的液体,称量后,加入适量的 IB solubilization buffer,使其终浓度为 20mg/ml;用吸管反复吹打直至包涵体蛋白全部溶解后,室温静置 15 分钟;室温 10000rpm 离心 10 分钟;将其上清转入透析袋中,进行透析。

[0049] 将透析袋放入含有 0.1mM DTT 的 Dialysis buffer 中,4 $^{\circ}$ C 透析 3 小时后,重复该透析过程一次;更换不含 DTT 的 Dialysis buffer,4 $^{\circ}$ C 透析 3 小时后,更换 Dialysis buffer 后,4 $^{\circ}$ C 透析过夜;将透析袋放入 Redox refolding buffer 中,继续 4 $^{\circ}$ C 透析 8 小时以上,室温再透析 1 小时后,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。经 12.5% 的 SDS-PAGE 检测,复性重构的多主枝孢霉变应原 Clah8 蛋白分子量为 37KDa,纯度可达到 98% 以上 (图 8)。

[0050] 实施例 6 重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白含量的测定

[0051] 使用 DC Protein Assay 试剂盒检测重组蛋白含量。牛血清白蛋白 (BSA) 为标准蛋白,以 PBS 分别配制不同浓度 BSA 标准液 (1.5mg/ml,1mg/ml,0.5mg/ml,0.25mg/ml,0mg/ml),建立 BSA 蛋白浓度标准曲线。根据标准曲线,计算重组蛋白浓度为 1.8mg/ml。每升细菌可制备 22.5mg 多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白。

[0052] 实施例 7 重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白抗原特异性 Dot blotting 检测

[0053] 分别将多主枝孢霉浸提物 2 μ g 和重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白 2 μ g 加样于硝酸纤维素膜上,室温干燥后,加含 3% BSA 的 PBS,湿盒内室温封闭 1 小时;吸弃封闭液,分别加对多主枝孢霉过敏的哮喘病人血清 (1 : 2 稀释和 1 : 100 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBST 洗膜,30 分钟;分别加 HRP-Mouse Anti-Human IgE 抗体 (1 : 250 稀释) 和 HRP-Mouse Anti-Human IgG 抗体 (1 : 250 稀释),室温孵育 1 小时;PBST 洗膜,30 分钟,以 Konica Immunostaining HRP-100 显色,20min 后终止反应。Dot blotting 结果显示多主枝孢霉过

敏的哮喘病人血清中的 IgE 抗体和 IgG 抗体可以与多主枝孢霉浸提物和重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白发生特异性结合,说明重组多主枝孢霉变应原 Clah8 蛋白与天然蛋白具有相同的免疫活性(图 9)。

[0054] 实施例 8 重组多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白抗原特异性 Western blotting 检测

[0055] 取 6 μ g 多主枝孢霉变应原 Cla h8 蛋白,加等体积样品缓冲液、1/10 体积 β -巯基乙醇,混匀后 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟,14000rpm 离心 10 分钟,上清用于 SDS-PAGE 上样。电泳结束后,将蛋白电转到 PVDF 膜上。电转结束后,PBST 洗膜 30 分钟后,加含 5%脱脂奶的 PBS,湿盒内室温封闭 1 小时;吸弃封闭液,加对多主枝孢霉过敏的哮喘病人血清(1 : 2 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBST 洗膜,30 分钟;加 HRP-Mouse Anti-Human IgE 抗体(1 : 250 稀释),室温孵育 1 小时;PBST 洗膜,30 分钟,以 Konica Immunostaining HRP-100 显色,20min 后终止反应。Westernblot 结果显示 3 个对多主枝孢霉过敏的哮喘病人血清中的 IgE 抗体都与多主枝孢霉变应原 Clah8 蛋白发生不同程度的反应,其中 2 号病人反应性最强(图 10)。

SEQUENCE LISTING

<110> 复旦大学

<120> 一种重组多主枝孢霉变应原蛋白 Cla h8 的制备方法及其用途

<130>

<160>2

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>804

<212>DNA

<213> 多主枝孢霉 (Cladosporium herbarum)

<220>

<221>CDS

<222>(1)..(804)

<400>1

```

atg cct ggc cag caa gca acc aag cat gag tcc ctt ttg gac cag ctc      48
Met Pro Gly Gln Gln Ala Thr Lys His Glu Ser Leu Leu Asp Gln Leu
1         5         10        15
tcc ctg aag ggc aag gtc gtc gtc gtc acc ggc gct tcc ggc ccc aag      96
Ser Leu Lys Gly Lys Val Val Val Val Thr Gly Ala Ser Gly Pro Lys
        20        25        30
ggc atg ggt att gag gcc gct cgc ggc tgc gcc gag atg ggc gcc gct      144
Gly Met Gly Ile Glu Ala Ala Arg Gly Cys Ala Glu Met Gly Ala Ala
        35        40        45
gtt gcc atc acc tac gct tcc cgc gcc cag ggt gct gag gag aac gtc      192
Val Ala Ile Thr Tyr Ala Ser Arg Ala Gln Gly Ala Glu Glu Asn Val
        50        55        60
aag gag ctc gag aag acc tac ggc atc aag gcc aag gcc tac aag tgc
240
Lys Glu Leu Glu Lys Thr Tyr Gly Ile Lys Ala Lys Ala Tyr Lys Cys
65        70        75        80
cag gtc gac agc tac gag tcc tgt gag aag ctc gtc aag gac gtc gtt      288

```

Gln Val Asp Ser Tyr Glu Ser Cys Glu Lys Leu Val Lys Asp Val Val	
85	90
95	
gcc gac ttc ggc cag atc gat gcc ttt att gcc aac gcc ggt gcc acc	336
Ala Asp Phe Gly Gln Ile Asp Ala Phe Ile Ala Asn Ala Gly Ala Thr	
100	105
110	
gcc gac tct ggc atc ctc gac ggc tcc gtc gag gcc tgg aac cac gtc	384
Ala Asp Ser Gly Ile Leu Asp Gly Ser Val Glu Ala Trp Asn His Val	
115	120
125	
gtc cag gtc gac ctg aac ggt acc ttc cac tgc gcc aag gca gtt ggc	432
Val Gln Val Asp Leu Asn Gly Thr Phe His Cys Ala Lys Ala Val Gly	
130	135
140	
cac cac ttc aag gag cgt gga acc ggt tcc ctc gtc atc acc gct tcc	480
His His Phe Lys Glu Arg Gly Thr Gly Ser Leu Val Ile Thr Ala Ser	
145	150
155	160
atg tcc ggc cac atc gcc aac ttc ccc cag gag cag acc tcc tac aac	528
Met Ser Gly His Ile Ala Asn Phe Pro Gln Glu Gln Thr Ser Tyr Asn	
165	170
175	
gtc gcc aag gct ggc tgc atc cac atg gct cgc tcc ctc gcc aac gag	576
Val Ala Lys Ala Gly Cys Ile His Met Ala Arg Ser Leu Ala Asn Glu	
180	185
190	
tgg cgc gac ttc gcc cgt gtc aac tcc atc tcc ccc ggt tac att gac	624
Trp Arg Asp Phe Ala Arg Val Asn Ser Ile Ser Pro Gly Tyr Ile Asp	
195	200
205	
act ggt ctc tcc gac ttc gtc ccc aag gag acc cag cag ctc tgg cac	672
Thr Gly Leu Ser Asp Phe Val Pro Lys Glu Thr Gln Gln Leu Trp His	
210	215
220	
tcc atg atc ccc atg ggc cgt gac ggt ctc gcc aag gag ctc aag ggc	720
Ser Met Ile Pro Met Gly Arg Asp Gly Leu Ala Lys Glu Leu Lys Gly	
225	230
235	240
gcc tac gtc tac ttc gcc tcc gac gcc tcc acc tac acc acc ggt gcc	768
Ala Tyr Val Tyr Phe Ala Ser Asp Ala Ser Thr Tyr Thr Thr Gly Ala	
245	250
255	
gat ctc ctc att gac ggt ggt tac acc acc aga taa	804
Asp Leu Leu Ile Asp Gly Gly Tyr Thr Thr Arg	
260	265

<210>2

<211>267

<212>PRT

<213> 多主枝孢霉 (*Cladosporium herbarum*)

<400>2

Met Pro Gly Gln Gln Ala Thr Lys His Glu Ser Leu Leu Asp Gln Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Gly Lys Val Val Val Val Thr Gly Ala Ser Gly Pro Lys
 20 25 30
 Gly Met Gly Ile Glu Ala Ala Arg Gly Cys Ala Glu Met Gly Ala Ala
 35 40 45
 Val Ala Ile Thr Tyr Ala Ser Arg Ala Gln Gly Ala Glu Glu Asn Val
 50 55 60
 Lys Glu Leu Glu Lys Thr Tyr Gly Ile Lys Ala Lys Ala Tyr Lys Cys
 65 70 75 80
 Gln Val Asp Ser Tyr Glu Ser Cys Glu Lys Leu Val Lys Asp Val Val
 85 90 95
 Ala Asp Phe Gly Gln Ile Asp Ala Phe Ile Ala Asn Ala Gly Ala Thr
 100 105 110
 Ala Asp Ser Gly Ile Leu Asp Gly Ser Val Glu Ala Trp Asn His Val
 115 120 125
 Val Gln Val Asp Leu Asn Gly Thr Phe His Cys Ala Lys Ala Val Gly
 130 135 140
 His His Phe Lys Glu Arg Gly Thr Gly Ser Leu Val Ile Thr Ala Ser
 145 150 155 160
 Met Ser Gly His Ile Ala Asn Phe Pro Gln Glu Gln Thr Ser Tyr Asn
 165 170 175
 Val Ala Lys Ala Gly Cys Ile His Met Ala Arg Ser Leu Ala Asn Glu
 180 185 190
 Trp Arg Asp Phe Ala Arg Val Asn Ser Ile Ser Pro Gly Tyr Ile Asp
 195 200 205
 Thr Gly Leu Ser Asp Phe Val Pro Lys Glu Thr Gln Gln Leu Trp His
 210 215 220
 Ser Met Ile Pro Met Gly Arg Asp Gly Leu Ala Lys Glu Leu Lys Gly
 225 230 235 240
 Ala Tyr Val Tyr Phe Ala Ser Asp Ala Ser Thr Tyr Thr Thr Gly Ala
 245 250 255
 Asp Leu Leu Ile Asp Gly Gly Tyr Thr Thr Arg
 260 265

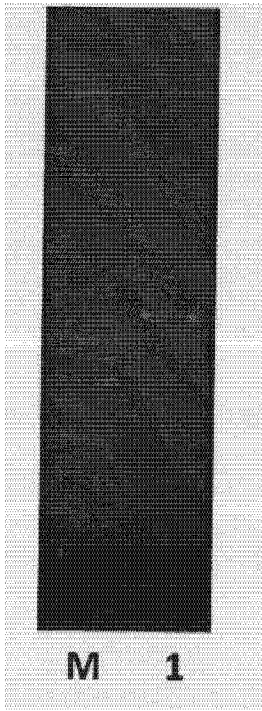


图 1

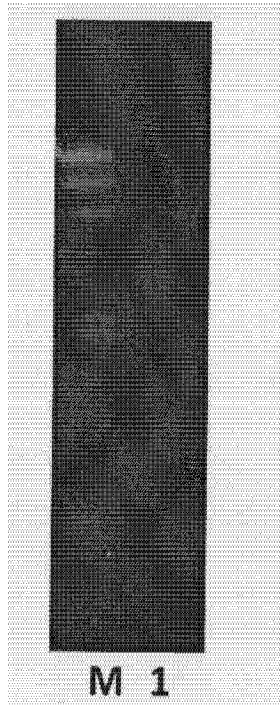


图 2

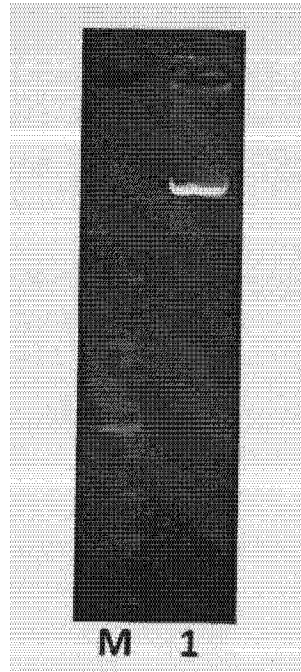


图 3

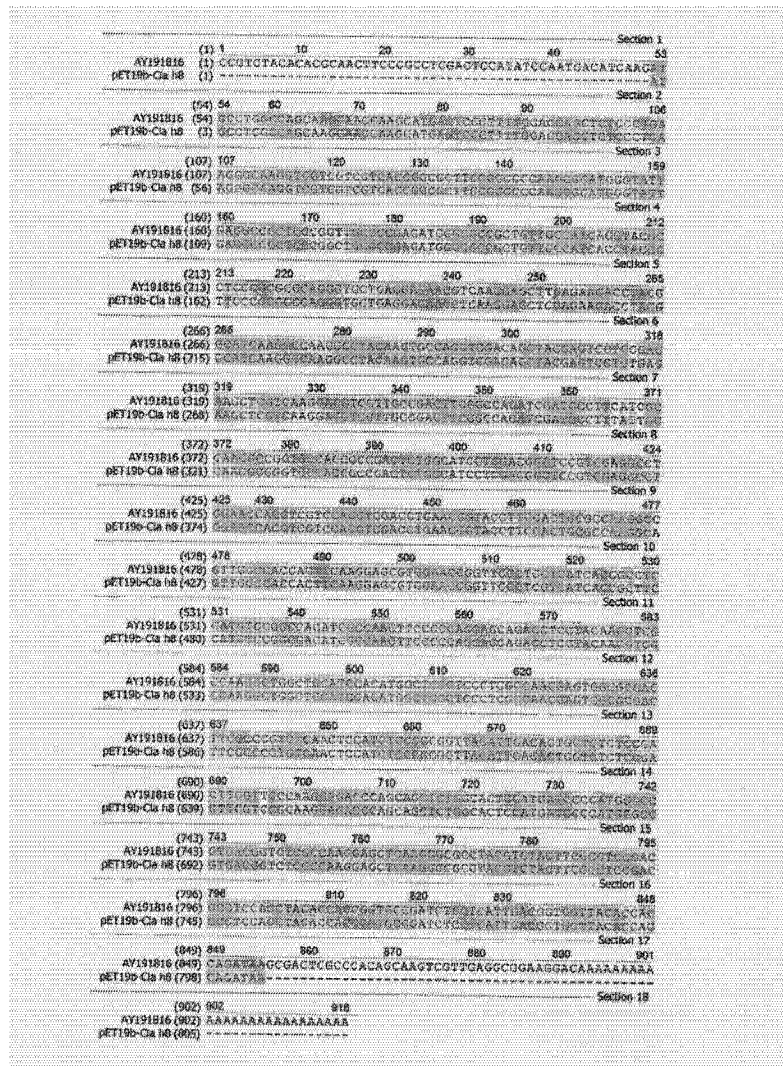


图 4

		Section 1																																											
		(1) 1	10	20	30	45																																							
Translation of AY191816	(1)	M	P	G	Q	A	T	K	H	E	S	L	L	D	Q	L	S	L	K	G	K	V	V	V	V	T	G	A	E	C	P	K	M	G	I	E	A	A	R	G	C	A	E	M	
Translation of pET19b-Cla h8	(1)	M	P	G	Q	A	T	K	H	E	S	L	L	D	Q	L	S	L	K	G	K	V	V	V	V	T	G	A	S	G	P	K	M	G	I	E	A	A	R	G	C	A	E	M	
		Section 2																																											
		(46) 46	60	70	80	90																																							
Translation of AY191816	(46)	G	A	A	V	A	I	T	Y	A	S	R	A	Q	G	A	E	N	V	K	E	L	K	T	Y	G	I	K	A	K	A	Y	K	C	Q	V	D	S	Y	E	S	C	E	K	
Translation of pET19b-Cla h8	(46)	G	A	A	V	A	I	T	Y	A	S	R	A	Q	G	A	E	N	V	K	E	L	K	T	Y	G	I	K	A	K	A	Y	K	C	Q	V	D	S	Y	E	S	C	E	K	
		Section 3																																											
		(91) 91	100	110	120	135																																							
Translation of AY191816	(91)	L	V	K	D	V	A	D	E	F	G	I	D	A	F	I	A	N	A	G	A	T	A	D	S	G	I	L	D	G	S	V	E	A	W	N	H	V	V	Q	V	D	L	N	G
Translation of pET19b-Cla h8	(91)	L	V	K	D	V	A	D	E	F	G	I	D	A	F	I	A	N	A	G	A	T	A	D	S	G	I	L	D	G	S	V	E	A	W	N	H	V	V	Q	V	D	L	N	G
		Section 4																																											
		(136) 136	150	160	170	180																																							
Translation of AY191816	(136)	T	F	H	C	A	K	A	V	G	H	H	F	K	E	R	G	T	S	L	V	I	T	A	S	M	S	G	H	I	A	N	F	P	G	E	Q	T	S	Y	N	V	A	K	A
Translation of pET19b-Cla h8	(136)	T	F	H	C	A	K	A	V	G	H	H	F	K	E	R	G	T	S	L	V	I	T	A	S	M	S	G	H	I	A	N	F	P	G	E	Q	T	S	Y	N	V	A	K	A
		Section 5																																											
		(181) 181	190	200	210	225																																							
Translation of AY191816	(181)	G	C	I	H	M	A	R	S	L	A	N	E	N	R	D	F	A	R	V	N	S	I	S	P	G	Y	I	D	T	G	L	S	D	F	V	P	K	E	T	Q	L	N	H	S
Translation of pET19b-Cla h8	(181)	G	C	I	H	M	A	R	S	L	A	N	E	N	R	D	F	A	R	V	N	S	I	S	P	G	Y	I	D	T	G	L	S	D	F	V	P	K	E	T	Q	L	N	H	S
		Section 6																																											
		(226) 226	240	250	268																																								
Translation of AY191816	(226)	M	I	P	M	R	D	G	L	A	K	E	L	K	G	A	V	V	F	A	S	D	A	S	T	Y	T	T	G	A	D	L	L	D	G	G	Y	T	T	R	-				
Translation of pET19b-Cla h8	(226)	M	I	P	M	R	D	G	L	A	K	E	L	K	G	A	V	V	F	A	S	D	A	S	T	Y	T	T	G	A	D	L	L	D	G	G	Y	T	T	R	-				

图 5

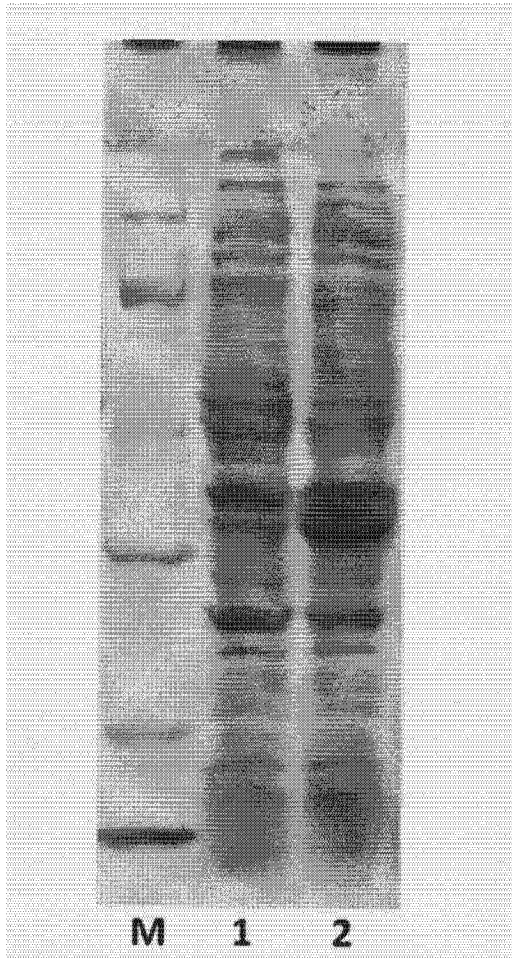


图6

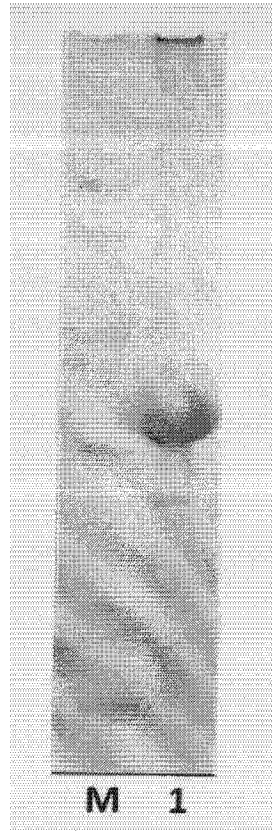


图7

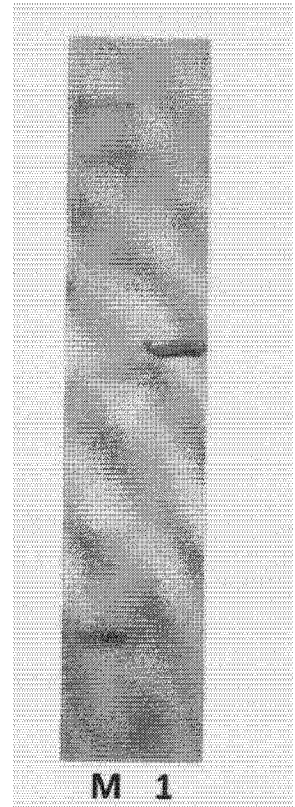


图8

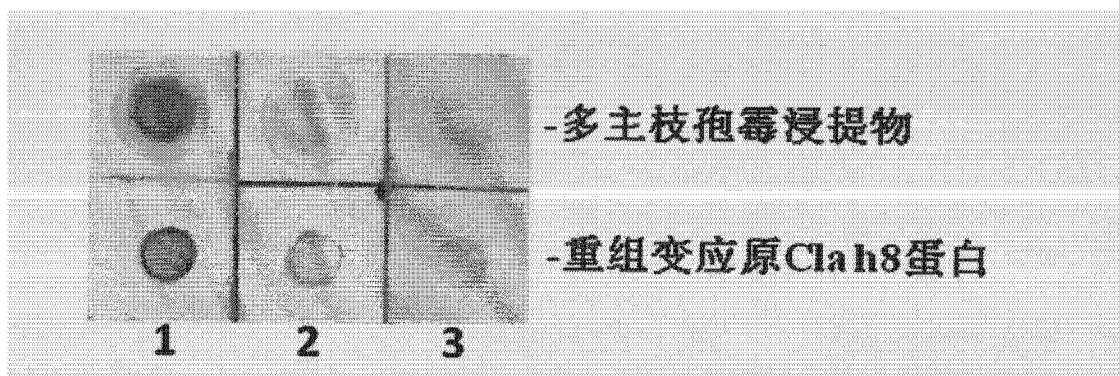


图9

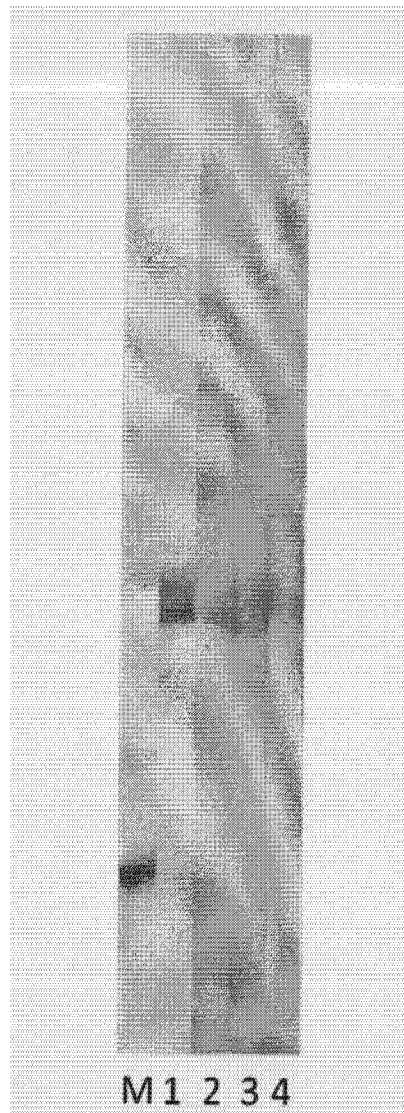


图 10

专利名称(译)	一种重组多主枝孢霉变应原Cla h8蛋白的制备方法及其用途		
公开(公告)号	CN102212531A	公开(公告)日	2011-10-12
申请号	CN201010141209.1	申请日	2010-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	付永锋 程训佳 冯萌		
发明人	付永锋 程训佳 冯萌		
IPC分类号	C12N15/31 C12N15/63 C07K14/37 A61K38/16 A61P37/08 G01N33/53		
代理人(译)	吴桂琴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属生物技术领域，涉及一种重组多主枝孢霉变应原Cla h8蛋白的制备方法及其用途。本发明从培养的多主枝孢霉提取RNA，通过PCR获得多主枝孢霉变应原Cla h8蛋白的编码基因后，构建变应原Cla h8蛋白的表达载体pET19b-Cla h8。经表达纯化及鉴定，证实制得的重组多主枝孢霉变应原Cla h8蛋白可与多主枝孢霉过敏患者的血清中IgE和IgG抗体特异性结合，具有与天然多主枝孢霉变应原Cla h8蛋白相同免疫活性。本发明方法制得具有生物学活性的可溶性重组多主枝孢霉变应原Cla h8蛋白，能避免天然提取物的非单一性及标准化难的障碍。制得重组多主枝孢霉变应原Cla h8蛋白可制备诊断和治疗多主枝孢霉引起的过敏性疾病的制剂。

