



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101481691 B

(45) 授权公告日 2011.01.26

(21) 申请号 200810132791.8	<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
(22) 申请日 2008.07.14	<i>A61K 48/00</i> (2006.01)
(66) 本国优先权数据 200810094427.7 2008.04.30 CN	<i>A61P 33/10</i> (2006.01)
(73) 专利权人 首都医科大学 地址 100069 北京市丰台区右安门外西头条 10号	<i>C12Q 1/68</i> (2006.01)
	<i>G01N 33/68</i> (2006.01)
	<i>G01N 33/53</i> (2006.01)
	<i>C12N 15/11</i> (2006.01)
	<i>C07K 19/00</i> (2006.01)
(72) 发明人 诸欣平 王少华 杨雅平 杨静 郝冉	(56) 对比文件
(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专 利商标事务所 11038 代理人 罗菊华	Yang, Y. P. et al. GenBank:AY046874. 《GenBank》. 2008, 第 1、2 页. 袁金钱等. 本地毛形线虫 HSP70 基因的克隆 与序列分析. 《中国兽医科学》. 2007, 第 37 卷 (第 12 期), 全文. Yang, Y P, et al. Genbank:AAK85149. 《Genbank》. 2008, 第 1 页.
(51) Int. Cl.	审查员 易方方
<i>C12N 15/12</i> (2006.01)	
<i>C07K 14/435</i> (2006.01)	
<i>C12N 15/63</i> (2006.01)	
<i>C12N 5/10</i> (2006.01)	
<i>C12N 1/15</i> (2006.01)	
<i>C12N 1/19</i> (2006.01)	
<i>C12N 1/21</i> (2006.01)	
<i>C12P 21/04</i> (2006.01)	
<i>C07K 16/18</i> (2006.01)	
<i>A61K 31/7088</i> (2006.01)	
<i>A61K 38/17</i> (2006.01)	

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 9 页

(54) 发明名称

旋毛虫 70KDa 热休克蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明涉及旋毛虫新抗原基因 70KDa 热休克蛋白基因, 含有该基因的载体的构建及原核表达载体, 以及所表达的蛋白。本发明还涉及所述基因及编码的蛋白及其应用。旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白免疫动物后产生高滴度的抗体并对攻击感染产生有效的免疫保护性。

CN 101481691 B

1. 一种分离的多核苷酸分子在制备用于预防人畜旋毛虫感染的药物中的用途,其特征
在于所述的多核苷酸分子的核苷酸序列为 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :1 第 208-1881 位的核
苷酸序列。

2. 一种分离的多肽在制备用于预防人畜旋毛虫感染的药物中的用途,其特征
在于,所述多肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO :2 所示。

3. 一种核酸构建体或者重组表达载体在制备用于预防人畜旋毛虫感染的药物中的用
途,其特征
在于,所述核酸构建体或者重组表达载体包含权利要求 1 中所述的多核苷酸分
子。

4. 一种抗体在制备用于预防人畜旋毛虫感染的药物中的用途,其特征
在于,所述抗体
能特异性结合权利要求 2 中所述的多肽。

旋毛虫 70KDa 热休克蛋白及其应用

[0001] 发明领域

[0002] 本发明为一种旋毛虫新抗原基因热休克蛋白基因,含有该基因的载体的构建及原核表达载体,以及所表达的蛋白及由蛋白免疫动物产生的抗体。本发明还涉及所述基因和蛋白的应用。

背景技术

[0003] 旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*, 简称旋毛虫), 可感染人及 150 多种动物, 它所引起的旋毛虫病是一种人畜共患寄生虫病, 呈全球性分布, 严重地威胁了人类健康并对畜牧业造成巨大经济损失。旋毛虫生活史简述如下: 当人或动物宿主生食或半生食含旋毛虫囊包的肉类 (猪肉、狗肉等), 囊包内幼虫在胃液、肠液作用下逸出并在小肠内发育为成虫。雌、雄虫交配后雌虫产新生幼虫。新生幼虫侵入肠粘膜淋巴管或静脉, 随淋巴和血循环到达宿主横纹肌继续发育。旋毛虫的致病过程分为三期: 侵入期、幼虫移行及囊包形成期, 即在该虫生活史的每个环节均可使宿主致病。

[0004] 旋毛虫病临床表现复杂多样, 诊断较困难, 给及时的治疗造成一定难度, 因此该病的免疫诊断及预防成为当务之急。由于病原体不能在体外大量传代培养, 限制了抗原的获取; 加之旋毛虫抗原的复杂性、多样性, 造成目前尚无理想的高敏感度、高特异性的抗原作为诊断候选抗原分子。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于: 寻找和克隆旋毛虫抗原新基因, 对该基因的基因重组蛋白进行免疫学功能的研究, 为旋毛虫病的免疫诊断及免疫预防、治疗提供新的候选抗原分子。

[0006] 本发明提供了分离的多核苷酸分子, 其包含从如下组核苷酸序列中选择的核苷酸序列或者由该核苷酸序列组成:

[0007] (A) 与 SEQ ID NO:1 所示序列或 SEQ ID NO:1 中开放阅读框至少 70%、优选至少 80%、更优选至少 90%、尤其是至少 95% 或 98% 同源的核苷酸序列;

[0008] (B) 与 SEQ ID NO:1 所示序列或 SEQ ID NO:1 中开放阅读框的互补序列在中等严格杂交条件、优选高严格杂交条件下可发生杂交的核苷酸序列;

[0009] (C) 与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:1 中开放阅读框编码相同序列的蛋白质、但因遗传密码的简并性而在序列上有所不同的核苷酸序列;

[0010] (D) 编码如下氨基酸序列的核苷酸序列: SEQ ID NO:2 所示序列, 或者, 由于一或多个 (例如 1-25 个、1-20 个, 1-15 个, 1-10 个, 1-5 个, 1-3 个) 氨基酸残基的替代、缺失和/或插入而与 SEQ ID NO:2 所示序列有所不同的氨基酸序列;

[0011] (E) SEQ ID NO:1 所示序列或 SEQ ID NO:1 中开放阅读框;

[0012] (F) (A)、(B)、(C)、(D) 或 (E) 所述核苷酸序列的片段; 和

[0013] (G) 与 (A)、(B)、(C)、(D)、(E) 或 (F) 所述核苷酸序列互补的核苷酸序列。

[0014] 优选地, 本发明的多核苷酸分子编码具有免疫原性的多肽。

[0015] SEQ ID NO :1 中开放阅读框是指 SEQ ID NO :1 第 208-1881 位核苷酸所示的核苷酸序列。

[0016] 在一个具体实施方案中,所述的多核苷酸分子具有 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列或者 SEQ ID NO :1 第 208-1881 位核苷酸所示开放阅读框序列。

[0017] 本发明还涉及上述多核苷酸分子编码的多肽。

[0018] 本发明还提供了分离的多肽,其包含从如下组氨基酸序列中选择的氨基酸序列或者由该氨基酸序列组成:

[0019] (A) 与 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列至少 70%、优选至少 80%、更优选至少 90%、尤其是至少 95% 或 98% 同源的氨基酸序列;

[0020] (B) 由于一或多个(例如 1-25 个、1-20 个、1-15 个、1-10 个、1-5 个、1-3 个)氨基酸残基的替代、缺失和/或插入而与 SEQ ID NO :2 所示序列有所不同的氨基酸序列;

[0021] (C) SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列;和

[0022] (D) (A) 或 (B) 或 (C) 所述氨基酸序列的免疫原性片段。

[0023] 优选地,本发明的多肽具有免疫原性,特别是能够诱发有效抵抗旋毛虫的免疫应答。在一个实施方案中,本发明多肽来自旋毛虫。

[0024] 本发明还涉及编码该多肽的分离的多核苷酸分子。

[0025] 在一个具体实施方案中,所述多肽包含 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列。

[0026] 本发明的一个方面提供了一种多核苷酸分子,其中包含 SEQ ID NO :1 所示的核苷酸序列或者其高度同源序列。

[0027] 在一个实施方案中,本发明不包括由 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列或者 SEQ ID NO :1 第 208-1881 位核苷酸所示开放阅读框序列组成的多核苷酸分子,及由 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列组成的多肽。

[0028] 在一个实施方案中,本发明不包括由 GenBank 注册号 AY046874 所示核苷酸序列或者其第 208-1881 位核苷酸所示开放阅读框序列组成的多核苷酸分子,及由 AY046874 所示核苷酸序列第 208-1881 位核苷酸编码的氨基酸序列组成的多肽。

[0029] 本发明还提供重组载体,其包含本发明所述多核苷酸分子。优选所述重组载体是表达载体,其包含并能够表达本发明所述多核苷酸分子。

[0030] 本发明还提供含有本发明重组表达载体的宿主细胞,包括原核细胞如大肠杆菌细胞和真核细胞,还包括微生物细胞、植物细胞、动物细胞等,例如常规的克隆和表达用宿主细胞。

[0031] 本发明还提供生产多肽的方法,包括在能使所述多肽表达的条件下培养本发明所述的宿主细胞和回收所表达的多肽。

[0032] 本发明还提供抗体,其可特异性结合本发明所述多肽。所述抗体可以是多克隆或者单克隆抗体。

[0033] 本发明还提供用于预防或治疗动物,尤其是牲畜和人的旋毛虫感染的药物组合物,所述的药物组合物中含有本发明所述多肽或者多核苷酸或者抗体或者载体或者宿主细胞。

[0034] 本发明还提供用于诊断动物,尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的诊断试剂盒,其中含有本发明所述多核苷酸分子、可检测本发明所述多核苷酸分子的核酸探针、可特异性

扩增本发明所述多核苷酸分子的引物、本发明所述多肽、或者本发明所述抗体。

[0035] 本发明提供本发明所述多核苷酸分子、可检测本发明所述多核苷酸分子的核酸探针、可特异性扩增本发明所述多核苷酸分子的引物、本发明所述多肽、或者本发明所述抗体在制备用于诊断动物，尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的诊断试剂中的用途。

[0036] 本发明还提供本发明所述多核苷酸分子或者多肽或者抗体或者载体或者宿主细胞在制备用于预防或治疗人畜旋毛虫感染的药物中的用途。

[0037] 本发明还提供寡核苷酸，其含有 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列或 SEQ ID NO :1 第 208-1881 位核苷酸所示开放阅读框序列或者其互补序列中的至少 15 个、优选至少 25 个、更优选至少 50 个核苷酸或者其相似序列，所述相似序列能够与 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列或者其互补序列在高度严格杂交条件下发生杂交。优选地，所述寡核苷酸是可检测本发明所述多核苷酸分子的核酸探针、或者可特异性扩增本发明所述多核苷酸分子的引物。

[0038] 本发明还提供本发明寡核苷酸用于诊断动物，尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的用途。

[0039] 本发明还提供融合蛋白，其包含本发明所述多肽及另一融合对象（即另一氨基酸序列）。在一个具体实施方案中，所述另一融合对象是 β -半乳糖苷酶，谷胱苷肽-S-转移酶或多组氨酸等。本发明还涉及编码该融合蛋白的多核苷酸。

[0040] 本发明的多核苷酸分子可以用免疫筛选从旋毛虫 cDNA 基因文库中获得。本发明还涉及该序列的变异体，例如一个或多个碱基的缺失、添加或替换，但不改变所编码的蛋白质的功能。变异体可以是天然存在的等效变异体或非天然存在的变异体。

[0041] 本发明的多肽可以通过构建上述基因的原核或真核表达载体，转化到适合的宿主细胞中，从培养物中纯化多肽来制备。本发明的多肽包括序列 2 的多肽，以及具有等效功能的它的衍生物、片段或类似物。

[0042] 作为具体实例，本发明发明人利用分子生物学技术，如：cDNA 文库免疫筛选、分子克隆、聚合酶链式反应 (PCR)、DNA 序列测定、Southern 杂交、Western 印迹杂交法，克隆鉴定了旋毛虫抗原新基因 70KDa 热休克蛋白基因；利用基因表达及免疫学技术获得该基因的重组蛋白及高效价免疫血清；并对该蛋白免疫原性及免疫保护性进行了分析。

[0043] 该基因达到的技术指标为：

[0044] 1. 在本发明中采用 cDNA 文库免疫筛选获得该基因的全长 cDNA 序列。全长 2152bp，起始密码子 ATG 位于序列第 208bp 处，TGA 为终止密码子，编码的蛋白质含 557 个氨基酸。

[0045] 2. 旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因的 557 个氨基酸重组蛋白在大肠杆菌 BL21 株中获得表达并纯化（图 1）。

[0046] 3. 旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白免疫动物获高滴度抗 70KDa 热休克蛋白免疫血清。

[0047] 4. 旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白为抗 His 抗体，感染旋毛虫的病人血清、兔血清、猪血清、小鼠血清所识别，并与 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白人工免疫小鼠血清发生反应（图 2）。

[0048] 5. 旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白免疫动物后对攻击感染产生有效的免疫保护性（表 1）。

[0049] 本发明发现了旋毛虫 70KDa 热休克蛋白抗原基因全长 cDNA ;获得了纯化的 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白及进行了免疫学功能的研究,为旋毛虫病的免疫预防提供了新的保护性候选抗原分子,并且也可以用于制备诊断试剂。

附图说明

[0050] 图 1 SDS-PAGE 电泳 :旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白在大肠杆菌中的表达及其纯化

[0051] 1. 蛋白分子量标准

[0052] 2. 未经 IPTG 诱导的全菌蛋白

[0053] 3. IPTG 诱导 8 小时的全菌蛋白

[0054] 4. 纯化的 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白

[0055] 箭头所指为重组蛋白带

[0056] 图 2 Western 免疫印迹鉴定旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白的免疫特性

[0057] 1. 纯化的 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白与抗 His 抗体反应

[0058] 2. 纯化的 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白与旋毛虫病人血清反应

[0059] 3. 纯化的 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白与感染旋毛虫的兔血清反应

[0060] 4. 纯化的 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白与感染旋毛虫的猪血清反应

[0061] 5. 纯化的 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白与感染旋毛虫的小鼠血清反应

[0062] 6. 纯化的 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白与该重组蛋白免疫小鼠血清反应

[0063] 图 3 不同刺激物刺激后 BMDC 表面 CD86 表达情况

[0064] 同型抗体对照 :A. 阴性对照组 DC ;C. LPS 阳性对照组 DC ;E. r Ts-Hsp70 实验组 DC ;G. 变性 r Ts-Hsp70 组 DC

[0065] CD11c⁺、CD86⁺ 双阳性细胞百分数 :B. 阴性对照组 DC ;D. LPS 阳性对照组 DC ;F. r Ts-Hsp70 实验组 DC ;H. 变性 r Ts-Hsp70 组 DC

[0066] 图 4 不同组细胞中 CD11c⁺、CD86⁺ 双阳性细胞数

[0067] 图 5 不同刺激物培养 24 小时的 DC 培养上清中 IL-12P70 水平

[0068] 注 :* 与不加刺激物 (control) 组 DC 比较, $P < 0.01$;* 与 LPS 刺激物组 DC 和 r Ts-Hs p70 刺激物组 DC 比较, $P < 0.05$

[0069] 图 6 不同刺激物培养 24 小时的 BMDC 培养上清中 TNF- α 水平

[0070] 注 :* 与不加刺激物 (control) 组 BMDC 比较, $P < 0.05$

[0071] 图 7 扫描电镜下不同刺激物培养 24 小时的 BMDC 形态 (放大倍数 1500 \times)。A. 阴性对照组 DC ;B. LPS 阳性对照组 DC ;C. r Ts-Hsp70 实验组 DC ;D. 变性 r Ts-Hs p70 组 DC。

[0072] 图 8 透射电镜下不同刺激物培养 1 天的 DC 形态 (5000 \times)

[0073] A. 阴性对照组 DC ;B. LPS 阳性对照组 DC ;C. r Ts-Hsp70 实验组 DC ;D. 变性 r Ts-Hsp70 组 DC

具体实施方式

[0074] 本文所用的术语“多核苷酸分子”、“多核苷酸序列”、“编码序列”、“开放阅读框 (ORF)”等包括单链或双链的 DNA 和 RNA 分子,可包含一个或多个原核序列, cDNA 序列,包

含外显子和内含子的基因组 DNA 序列,化学合成的 DNA 和 RNA 序列,以及有义和相应的反义链。

[0075] 生产和操作本文公开的多核苷酸分子及寡核苷酸分子的方法是本领域技术人员已知的,并可按照已描述的重组技术(参见 Maniatis 等,1989, 分子克隆,实验室手册,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约;Ausubel 等,1989, 分子生物学当前技术, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrook 等,1989, 分子克隆,实验室手册,第 2 版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约;Innis 等(编),1995, PCR 策略, Academic Press, Inc., San Diego;和 Erlich(编),1992, PCR 技术, 牛津大学出版社, New York) 完成。

[0076] 本发明提供了包含编码旋毛虫 70KDa 热休克蛋白的核苷酸序列的一种分离多核苷酸分子。该多核苷酸分子可用于实施本发明。在进一步的优选实施方案中,本发明分离的多核苷酸分子包含选自下列成员的核苷酸序列:(1) SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列;(2) 与 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列至少 70% 相同、优选至少 80% 相同、更优选至少 90% 相同、最优选 95% 或 98% 相同的核苷酸序列;(3) 在中等严谨杂交条件下(即在 0.5M NaHPO₄、7% 十二烷基硫酸钠(SDS)、1mM EDTA 中于 65°C 与结合于滤膜的 DNA 杂交,并在 0.2xSSC/0.1% SDS 中于 42°C 洗涤的条件;参见 Ausubel 等(编),1989, 分子生物学当前技术,第 1 卷, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., NY, P. 2. 10. 3)、优选高度严谨杂交条件(即在 0.5M NaHPO₄、7% SDS、1mM EDTA 中于 65°C 与结合于滤膜的 DNA 杂交,并在 0.1xSSC/0.1% SDS 中于 68°C 洗涤条件;参阅 Ausubel 等,1989, 上述文献)下与具有 SEQ ID NO:1 或其互补序列的多核苷酸分子能杂交的核苷酸序列;(4) 与 SEQ ID NO:1 编码相同序列的蛋白质、但因遗传密码的简并性而在序列上有所不同的核苷酸序列;或者(5) 与(1)-(4) 中任一核苷酸序列互补的核苷酸序列。

[0077] 在一个实施方案中,本发明多核苷酸分子包含编码旋毛虫 70KDa 热休克蛋白的核苷酸序列。

[0078] 在一个实施方案中,本发明多核苷酸分子可用于以标准扩增技术扩增旋毛虫特异性多核苷酸分子,或作为诊断试剂用以检测被旋毛虫感染的动物体液或组织样品中旋毛虫特异性多核苷酸的存在。

[0079] 本发明进一步提供包含编码同源于旋毛虫 70KDa 热休克蛋白或免疫原性多肽之多肽的核苷酸序列的一种分离多核苷酸分子。本文中提到的同源于旋毛虫 70KDa 热休克蛋白或免疫原性多肽的多肽时所使用的术语“同源”是指多肽本来具有旋毛虫 70KDa 热休克蛋白或免疫原性多肽的氨基酸序列,但其中一个或多个氨基酸残基已被不同的氨基酸残基保守地取代(例如 1-25 个、1-20 个、1-15 个、1-10 个、1-5 个),并且所得到的多肽可用于实施本发明。保守氨基酸取代是本领域已知的。造成这样的取代的规则包含由 Dayhof, M. D. (1978, 国家生物医学研究基金, Washington, D. C., 第 5 卷, 增刊 3) 等所述的取代规则。更具体地说,保守氨基酸取代发生在与其酸性、极性 or 侧链大小相关联的氨基酸家族内。一般可将遗传编码的氨基酸分为四组:(1) 酸性氨基酸=天冬氨酸、谷氨酸;(2) 碱性氨基酸=赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3) 非极性氨基酸=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸;(4) 不带电的极性氨基酸=甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸也共同分类为芳香氨基

酸。任何特定组内的一个或多个取代,例如用异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸、或用谷氨酸取代天冬氨酸、或用丝氨酸取代苏氨酸,或任何其他氨基酸残基结构上相关的氨基酸残基,例如有相似酸性、极性、侧链大小的,或在某些组合方面有相似性的氨基酸残基取代,一般对多肽的功能或免疫原性不会有太大影响。

[0080] 基本同源的蛋白质和多肽其特征在于具有一个或多个氨基酸取代(例如1-25个、1-20个,1-15个,1-10个,1-5个)、删除或添加。这些改变优选影响较小的变换,即保守氨基酸取代(见表2)及其它不会严重影响蛋白质或多肽的折叠和活性的取代;小的删除,通常是1-约30个氨基酸的小删除;及小的氨基或羧基末端延伸,诸如氨基末端甲硫氨酸残基,长达约20-25个残基的小连接肽,或便于纯化的小延伸(亲和标记),如多组氨酸束、蛋白A(Nilsson等,EMBO J. 4:1075,1985;Nilsson等,酶学方法,198:3,1991)。编码亲和标记的DNA可从产品供应商处购买到。

[0081] 本文中所述的多肽“可用于实施本发明”是指该多肽可用作诊断试剂,以检测新近被旋毛虫感染的、或已被旋毛虫感染的动物血液或血清样品中旋毛虫特异性抗体的存在;或者可用作抗原产生旋毛虫特异性抗体(例如特异结合的抗体、中和性抗体、治疗性抗体);或者可作为免疫原对动物进行预防性免疫或者治疗性免疫,或者本文提到的该多肽的任何用途。

[0082] 本发明进一步提供与本发明上述多核苷酸分子能杂交,或与具有作为本发明上述多核苷酸分子之互补物的核苷酸序列的多核苷酸分子能杂交的多核苷酸分子。这样的寡核苷酸分子较好是至少长约15nt,更好是长约25nt,尤其是至少50nt,并可在高度严谨条件下与一种或多种上述多核苷酸分子杂交。所说的高度严谨条件是在6XSSC/0.5%焦磷酸钠中洗膜,并且洗膜温度对于长约14碱基者为大约37°C,长约17碱基者为大约48°C,长约20碱基者为大约55°C,长约23碱基者为大约60°C。本发明的较长寡核苷酸分子的其他杂交条件可由本领域技术人员按照标准技术来确定。在一优选实施方案中,本发明的寡核苷酸分子互补于本发明上述多核苷酸分子至少之一的一部分。

[0083] 本发明的寡核苷酸分子可用于多种目的,其中包括作为扩增旋毛虫特异性多核苷酸分子的引物以用于诸如疾病鉴别诊断,或者编码或用作基因调节的反义分子。就诊断方面来说,可使用适当设计的引物检测动物组织或体液等样品中旋毛虫特异性多核苷酸分子的存在。特异性扩增产物的产生可支持旋毛虫感染的诊断,而缺少扩增的产物则可能指示没有感染。例如Innis等人(1995,出处同前)和Erlicch(1992,出处同前)编辑的前述文献中描述了进行扩增的方法,例如聚合酶链反应(PCR)方法。本领域已知的其他扩增技术也可使用,例如连接酶链反应法。也可使用本文公开的多核苷酸分子的序列设计用于从旋毛虫的其他种或株系中分离同源基因的引物。

[0084] 本发明进一步提供包含本发明多核苷酸分子的克隆载体、表达载体、包含任何所说载体的被转化宿主细胞,以及由其衍生的新的株系或细胞系。在一优选实施方案中,本发明提供包含一种多核苷酸分子的重组载体,所说多核苷酸分子具有编码旋毛虫70KDa热休克蛋白或免疫原性多肽的核苷酸序列。

[0085] 优选地,本发明的重组载体,特别是表达载体的构建方式能使得本发明多核苷酸分子的编码序列与转录和翻译编码序列所需的一个或多个调节元件可操作性地连接,以产生多肽。本文中使用的术语“调节元件”包括但不只限于编码诱导型和非诱导型启动子、增

强子、操纵子及本领域已知的可用于驱动和 / 或调节多核苷酸编码序列表达的其它元件的核苷酸序列。另外,本文所说的编码序列与一个或多个调节元件“可操作性地连接”是指调节元件可有效地调节并允许转录编码序列或翻译其 mRNA,或发挥两方面的功能。

[0086] 构建包含与适当的调节元件可操作性地连接的特定编码序列的重组载体的方法是已知的,并可使用这些方法实现本发明。这些方法包括体外重组技术、合成技术和体内遗传重组(如参见 Maniatis 等人(1989)的上述文献)。

[0087] 可用于表达本发明的旋毛虫 70KDa 热休克蛋白编码序列的各种载体是本领域已知的,其中包括含有特定编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 和粘粒 DNA 表达载体。可经加工而含有本发明的多核苷酸分子的质粒包括 pUC8、pUC9、pBR 322 和 pBR 329(Biorad Laboratories, Richmond, CA)、pPL 和 pKK223(Pharmacia, Piscataway, NJ)、pQE50(Qiagen, Chatsworth, CA) 和 pGEM-T EASY(Promega, Madison, WI) 等。可经加工而含有本发明的多核苷酸分子的典型真核表达载体包括蜕皮激素诱导型哺乳动物表达系统(Invitrogen, Carlsbad, CA)、基于巨细胞病毒启动子-增强子的系统(Promega, Madison, WI;Stratagene, La Jolla, CA;Invitrogen),和基于杆状病毒的表达系统(Promega) 等。

[0088] 这些和其他载体的调节元件可在其强度和特异性方面各不相同。基于所利用的宿主 / 载体系统,可以使用多种适当的转录和翻译元件中的任一种。例如,当在哺乳动物细胞系统中克隆时,可使用从哺乳动物细胞基因组中分离的启动子,如小鼠金属硫蛋白启动子,或从生长于这些细胞内的病毒中分离的启动子,如痘苗病毒 7.5K 启动子或莫洛尼鼠类肉瘤病毒长末端重复序列。可使用以重组 DNA 或合成技术得到的启动子以转录被插入的序列。另外,在特定诱导子,例如适于金属硫蛋白启动子的锌和镉离子的存在下,由某些启动子启动的表达可以被增强。转录调节区或启动子的非限制性例子包括用于细菌的 β -gal 启动子、T7 启动子、TAC 启动子、trp 和 lac 启动子、trp-lac 融合启动子等;用于酵母的糖酵解酶启动子,如 ADH-I 和 ADH-II 启动子、GPK 启动子、PGI 启动子、TRP 启动子等;以及用于哺乳动物细胞的 SV40 早期和晚期启动子、腺病毒主要晚期启动子等。本发明进一步提供包含旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因之启动子的核苷酸序列的多核苷酸分子,其可用于在旋毛虫中表达本发明的编码序列。

[0089] 为充分地翻译被插入的编码序列,还需要特异性起始信号。这些信号一般包括 ATG 起始密码子及相邻序列。在将包含其自身的起始密码子和相邻序列的本发明的多核苷酸分子插入到适当的表达载体中的情况下,可能不必加入另外的翻译控制信号。然而,当只插入一部分编码序列时,可能需要包括 ATG 起始密码子等的外源翻译控制信号。可从各种来源,即天然和合成来源,得到这些外源翻译控制信号和起始密码子。再者,起始密码子必须与编码区的读框一致,以确保整个插入片段符合读框地翻译。

[0090] 也可构建将表达包含本发明蛋白质或多肽和融合对象的融合蛋白质的表达载体。这样的融合蛋白质例如可用于产生抗旋毛虫蛋白的抗血清、研究旋毛虫蛋白的生化性质、工程化修饰表现有不同免疫学或功能性质的旋毛虫蛋白、帮助鉴定或纯化重组表达的旋毛虫蛋白或改善其稳定性。可能的融合蛋白表达载体包括但不只限于插入了编码 β 半乳糖苷酶和 trpE 融合体、麦芽糖结合蛋白融合体、谷胱甘肽-S-转移酶融合体及多组氨酸融合体(载体区域)之序列的载体。可用于构建编码这些和其他融合蛋白的表达载体的方法是本领域已知的。

[0091] 可用融合蛋白质帮助纯化已表达的蛋白质。在一非限制性实施方案中,可使用直链淀粉树脂纯化热休克蛋白 70-麦芽糖结合性融合蛋白,可使用谷胱甘肽琼脂糖小球纯化热休克蛋白 70-谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白质,可使用二价镍树脂纯化热休克蛋白 70-多组氨酸融合蛋白质。或者,也可使用抗载体蛋白质或肽的抗体对融合蛋白质进行亲和层析纯化。例如,可将编码单克隆抗体之靶表位的核苷酸序列工程化转移到与调节元件可操作性地连接的表达载体中,并限定其位置以使所表达的表位融合到本发明的旋毛虫蛋白上。在一非限制性实施方案中,可用标准技术在相当于热休克蛋白 70 蛋白之氨基或羧基末端的某个点上插入编码 FLAG™ 表位标记(其为亲水性标记肽)(Znternational Biotechnologies Inc.)的核苷酸序列中,然后可使用市售的抗 FLAG™ 抗体检测并亲和纯化所表达的热休克蛋白 70-FLAG™ 表位融合体产物。

[0092] 也可以修饰表达载体使之含有编码特定蛋白酶切割位点的多接头序列,从而可经特定蛋白酶处理而从载体区域或融合对象释放出已表达的旋毛虫蛋白。例如,融合蛋白载体可包含编码凝血酶或因子 Xa 裂解位点的核苷酸序列。

[0093] 可使用已知方法将位于旋毛虫蛋白编码序列上游且读框一致的信号序列加工到表达载体中,以指导所表达之蛋白质的运输和分泌。信号序列的非限制性实例包括 α 因子、免疫球蛋白、外膜蛋白质、青霉素酶及 T 细胞受体等的信号序列。

[0094] 为了有助于筛选出经本发明重组载体转化或转染的宿主细胞,可以工程化修饰载体使之进一步包含报道基因产物或其他选择标志的编码序列。这样的编码序列较好是与上述调节元件可操作性地连接的。用于实施本发明的报道基因是本领域熟知的,包括编码氯霉素乙酰转移酶(CAT)、绿色荧光蛋白、萤火虫荧光素酶和人生长激素等的基因。编码选择标志的核苷酸序列是本领域已知的,包括编码赋予抗生素抗性 or 抗代谢物抗性,或提供营养缺陷型需要等的基因产物的那些核苷酸序列。这些序列的例子包括编码胸苷激酶活性,或抗氨甲喋呤、氨基青霉素、卡那霉素、氯霉素、氨基糖苷或潮霉素等的那些序列。

[0095] 本发明进一步提供包含本发明的多核苷酸分子或重组载体的已转化宿主细胞,以及由之衍生的细胞系。可用于实施本发明的宿主细胞可以是真核或原核细胞。这样的已转化宿主细胞包括但不只限于微生物,例如用重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 载体转化的细菌,或者用重组载体转化的酵母,或者是动物细胞,如用重组病毒载体如杆状病毒感染的昆虫细胞,或用重组病毒载体如腺病毒或痘苗病毒感染的哺乳动物细胞等。例如,可使用大肠杆菌菌株,如 DH5 α 菌株。真核宿主细胞包括酵母细胞,但也可有效地利用小鼠、仓鼠、牛、猴或人细胞系等哺乳动物细胞。可用于表达本发明的重组蛋白质的真核宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NIH/3T3 等。

[0096] 较好是将本发明的重组载体转化或转染到细胞的基本均一培养物的一个或多个宿主细胞中。一般可按照已知技术,例如原生质体转化、磷酸钙沉淀、氯化钙处理、微量注射、电穿孔、经与重组的病毒接触进行感染、脂质体介导的转染、DEAE-葡聚糖转染、转导、接合或微粒轰击等技术将载体导入宿主细胞内。可使用标准方法选择转化体,例如通过选择表达与重组表达载体相关的可选择标志如抗生素抗性的细胞的方法。

[0097] 一旦将表达载体导入宿主细胞后,即可使用 Southern 杂交分析、限制性酶切分析、包括反转录酶 PCR(rt-PCR)的 PCR 分析等标准技术证实本发明的多核苷酸分子是否整合并保留在宿主细胞基因组中或以附加体形式存在,或者用免疫学检测法检测预期的蛋白

质产物。可用本领域已知的至少下列四种一般性方法中的一种鉴定含有和 / 或表达本发明的多核苷酸分子的宿主细胞 : (i) DNA-DNA、DNA-RNA、或 RNA- 反义 RNA 杂交 ; (ii) 检测“标志”基因功能的存在 ; (iii) 检测特异性 mRNA 转录本在宿主细胞中的表达, 以估计转录水平 ; 或 (iv) 以本领域已知的免疫检测法检测成熟多肽产物的存在。

[0098] 一旦已将本发明的多核苷酸分子稳定导入到适当的宿主细胞中之后, 即可克隆增殖已转化的宿主细胞, 并在有助于最大量产生所编码的多肽的条件下培养所得到的细胞。这样的条件一般包括培养已转化的细胞达到高密度。当表达载体含有诱导型启动子时, 可根据需要, 利用温度改变、营养素耗尽、加入义务诱导剂 (如糖类类似物, 例如异丙基 β -D- 硫代半乳糖苷 (IPTG)、过量代谢产物积聚等适当诱导条件以诱导表达。

[0099] 当多肽保留在宿主细胞内时, 应收获并裂解细胞, 并在本领域已知的尽可能减少蛋白质降解的提取条件下, 例如于 4°C 和 / 或有蛋白酶抑制剂存在条件下, 从裂解物中基本上纯化或分离产物。如多肽能从宿主细胞中分泌出来, 则可简单地收集已耗尽的营养素培养基, 并从中基本上纯化或分离多肽。

[0100] 必要时, 可使用标准方法, 包括但不只限于硫酸铵沉淀, 大小分级分离、离子交换层析、HPLC、密度梯度离心及亲和层析法, 从细胞裂解物或培养基中基本上纯化或分离多肽。如果多肽缺乏生物学活性, 则可作根据分子大小、或与多肽特异性抗体的反应性, 或根据融合体标记的存在检测之。用于实施本发明时, 多肽可以是已分泌到培养液中或存在于细胞裂解物中的未纯化状态, 但较好是已从中得到基本纯化或分离。本文中所述的多肽“基本上已纯化”, 是指该多肽构成特定制剂中蛋白质的至少约 20% (重量)。另外, 本文中所述的多肽“已分离”, 指的是该多肽构成特定制剂中蛋白质的至少约 80% (重量)。

[0101] 因此, 本发明提供由本发明多核苷酸编码的基本上已纯化或分离的旋毛虫 70KDa 热休克蛋白。在一优选实施方案中, 旋毛虫 70KDa 热休克蛋白具有 SEQ ID NO : 2 的氨基酸序列。

[0102] 本发明进一步提供同源于所述旋毛虫 70KDa 热休克蛋白的多肽, 其中术语“同源”具有上文就多肽所限定的含义。

[0103] 本发明进一步提供由本发明任何一种上述多肽的基本部分组成的多肽。本文使用的术语 - 本发明多肽的“基本部分”或“肽片段”意指组成上小于相应全长度多肽之完整氨基酸序列、但包含其氨基酸序列的至少约 10%、较好至少约 20%、并可用于实施本发明的多肽 (“可用于”具有上文就多肽所限定的含义)。特别优选的是具有免疫原性 (即能够诱导免疫反应而产生特异地抗相应的全长度旋毛虫多肽的抗体) 的肽片段。

[0104] 本发明进一步提供包含与本领域已知的载体或融合对象融合的任一种上述多肽的融合蛋白质。

[0105] 本发明的多肽可用于多种目的, 包括作为诊断试剂, 例如以 ELISA 检测等标准检测法筛选动物血液或血清样品中的旋毛虫特异性抗体 ; 或如下所述用作产生多克隆或单克隆抗体的抗原, 其中可以使用所述抗体作为诊断试剂, 例如以 Western 印迹检测法等标准技术筛选动物细胞、组织或体液样品中的旋毛虫特异性蛋白质。

[0106] 可以在蛋白质水平上修饰本发明的任何多肽, 以改善或改变其生物学或免疫学特征。可使用已知技术对多肽进行一种或多种化学修饰, 以制备其类似物。

[0107] 可以在分子上连接一个或多个化学基团或另一种蛋白质如血清白蛋白、匙孔虫威

血兰蛋白或 BSA, 或者多聚氨基酸 (如多聚赖氨酸), 或多糖 (如 Sepharose, 琼脂糖, 或经过修饰或未经修饰的纤维素) 上等, 以制备本发明多肽的衍生物。进行这些连接反应的方法是蛋白质化学领域中已知的。

[0108] 本发明进一步提供抗本发明多肽的分离抗体。在一优选实施方案中, 可使用已知方法产生抗旋毛虫 70KDa 热休克蛋白的抗体。可用部分或基本上纯化或分离的旋毛虫 70KDa 热休克蛋白重组蛋白, 或其如上文描述的同系物、融合蛋白、基本部分、类似物或衍生物免疫选自猪、牛、马、兔、山羊、绵羊或小鼠等各种宿主动物。可使用下文描述的佐剂提高抗体产生量。

[0109] 可从被免疫动物的血清中得到和分离多克隆抗体, 并使用常规方法试验其对抗原的特异性。或者, 也可使用由培养连续细胞系生产抗体分子的任何技术制备并分离单克隆抗体。这些技术包括但不只限于原先由 Kohler 和 Milstein (自然, 1975, 256 :495-497) 描述的杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术 (Kosbor 等, 1983, 今日免疫学, 4 :72 ;Cote 等, 1983, 美国国家科学院院报, 80 :2026-2030), 以及 EBV 杂交瘤技术 (Cole 等, 1985, 单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-86)。或者, 可采用已述的生产单链抗体的技术 (如参见美国专利 4, 946, 778) 生产旋毛虫抗原特异性单链抗体。

[0110] 含有本发明多肽的特异性结合位点的抗体片段也包括在本发明范围内, 并可用已知技术制备。这样的片段包括但不只限于可由胃蛋白酶消化完整抗体分子而产生的 $F(ab')_2$ 片段, 和可经还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫桥而产生的 Fab 片段。或者, 也可构建 Fab 表达文库 (Huse 等, 1989, 科学, 246 :1275-1281), 以迅速鉴定对旋毛虫蛋白有所需特异性的 Fab 片段。

[0111] 生产和分离单克隆抗体及抗体片段的技术是本领域已知的, 并在例如下列文献中给出了更详细的描述: Harlow 和 Lane, 1988, 抗体: 实验室手册, 冷泉港实验室和 J. W. Cooding, 1986, 单克隆抗体: 原理与实践, Academic Press, London (其列为本文参考文献)。

[0112] 下列实施例只是举例描述, 而不用来限制本发明的范围。

[0113] 实施例

[0114] 实施例 1 旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因的克隆及序列分析

[0115] 1. 筛选血清 (人工免疫兔血清) 的制备

[0116] 收集分离自猪体的黑龙江株旋毛虫 (国际标准虫株编码 ISS533) 成虫, 将成虫虫体放于研磨器中, 冰浴下快速研磨 15 分钟。将研磨后的液体移入 10ml 离心管, 超声 (于冰上) 3 次, 3 分钟 / 次, 中间休息 1 分钟。反复冻融数次, 离心取上清即得全虫可溶性抗原。免疫日本大耳白兔 (1.6mg / 只), 每周加强 1 次, 加强 4 次, 获得人工免疫兔血清。经 ELISA 测定, 人工免疫兔血清滴度达 1 : 4000 以上。

[0117] 2. 免疫筛选表达文库

[0118] 旋毛虫成虫 λ ZAP II cDNA 表达文库购自刘明远 (参考文献《中国旋毛虫分离株成虫和新生幼虫基因文库的构建和筛选》, 中国兽医学报, 1998, 18(2) :147-150.)。

[0119] 1 μ l 旋毛虫成虫 λ ZAP H cDNA 表达文库稀释液加入 600 μ l 宿主菌 XL1-Blue 中, 37°C, 吸附 20 分钟加入顶层琼脂, 倒置于 42°C 温箱中培养至有针尖大小的噬菌斑长出。把硝酸纤维素膜 (Gelman 公司) 铺在平板上, 放在 37°C 温箱培养过夜。第二天在室温下

将膜做好标记,从平板上揭下,浸入一抗工作液(人工免疫兔血清用 TBST 以 1 : 1000 稀释)30 分钟,血清中加入了大肠杆菌噬菌体裂解液(STRTAGENE 公司)。把膜浸入二抗工作液-1 : 7500 碱性磷酸酶-羊抗兔 IgG(Promega 公司),30 分钟。浸入显色液 NBT/BCIP 中(Promega 公司),显色充分后,加入 ddH₂O 终止。用 1 : 1000 人工免疫兔血清筛选文库共获得 9 个阳性克隆,经 PCR 及 Southern Blot 鉴定后,选取 4 号克隆进行 DNA 序列测定。

[0120] 3. 4 号克隆核苷酸序列与编码的氨基酸分析

[0121] 4 号克隆核苷酸序列全长 2152bp(见 SEQ ID NO :1),开放阅读框(第 208-1881 位,共 1674bp),编码 557 个氨基酸(见 SEQ ID NO :2),其理论分子量为 64.05KDa。同源性分析结果显示:4 号克隆编码的蛋白质与秀丽隐杆线虫、班氏丝虫、日本血吸虫、刚地弓形虫、恶性疟原虫的 70KDa 热休克蛋白分别具有 82%,73%,70%,67%和 61%的同源性。我们推断 4 号克隆是一个旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因。

[0122] 实施例 2 制备 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白及人工免疫小鼠血清

[0123] 1. 70KDa 热休克蛋白基因原核表达及纯化

[0124] 根据 4 号克隆核苷酸序列,设计一对引物,上游引物为 5'-CGCAGGATCCATGGTCGGT CGAGAATG-3'(共 27bp,含一个 BamH I 酶切位点),下游引物为 5'-GATACTCGAGACAGTTCATCT TTTTCTTCA-3'(共 30bp,含一个 Xho I 酶切位点)。以免疫筛库得到的 4 号克隆为模板,进行 PCR,产物经 BamH I 和 Xho I 双酶切后,亚克隆于原核表达载体 pET-28a(+)(Novagen 公司)。正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 株(Novagen 公司),经 37℃、150 转/分、1.0mM IPTG 诱导 8 小时,获得 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白(全部开放阅读框共编码 557 个氨基酸),重组蛋白经 His-binding 亲和层析柱(Novagen 公司)纯化后获得较高纯度(图 1)。

[0125] 2. 纯化的 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白经皮肤多点注射免疫 BALB/c 小鼠(20 μg/只),以后每隔 14 天以相同剂量抗原加等量不完全弗氏佐剂,加强 2 次。5 周后摘眼球取血。ELISA 测定抗体效价高达 1 : 128000 以上。

[0126] 实施例 3 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白的免疫特性

[0127] 1. 酶联免疫吸附(ELISA)检测

[0128] 以 1 μg 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白(实施例 2 制备)为抗原包被 96 孔酶标板,一抗为抗 His 抗体和待检血清,二抗为辣根过氧化物酶标记的相应(羊抗人、羊抗兔、羊抗猪或羊抗小鼠)二抗,正常人血清、正常兔血清、正常猪血清、正常小鼠血清分别作为阴性对照。根据待测血清样本 OD 值大于阴性对照 2.1 倍者为阳性判断结果。经 ELISA 检测,旋毛虫病人血清(8 份)阳性率为 90%、旋毛虫病兔血清(2 份)、旋毛虫病猪血清(3 份)及旋毛虫感染的小鼠血清(2 份)均为阳性,说明该 70KDa 热休克蛋白基因的重组蛋白具有特异的抗原性,是具有应用潜力的诊断试剂。

[0129] 2. Western 印迹分析

[0130] 纯化的 70KDa 热休克蛋白基因表达蛋白(实施例 2 制备)(200ng)经 SDS-PAGE 电泳后,转移至 PVDF 膜,用 ECL 化学发光试剂盒(Amersham 公司)检测,分别以病人血清 1 : 100、感染兔血清 1 : 100、感染猪血清 1 : 1000、感染小鼠血清 1 : 100、70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白人工免疫小鼠血清(实施例 2 制备)1 : 20000 作为第一抗体。结果显示约 70KDa 处均呈现一明显的蛋白印迹带(图 2),表明 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白可为抗 His 抗体、感染旋毛虫的病人血清、感染旋毛虫的兔血清、感染旋毛虫的猪血清、感染

旋毛虫的小鼠血清及 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白人工免疫小鼠血清所识别。

[0131] 实施例 4 动物体内保护性实验

[0132] BALB/c 小鼠 20 只,随机分为 2 组,每组 10 只。70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白免疫组以 20 μ g/ 只的抗原(实施例 2 制备)加等量的弗氏完全佐剂(FCA)皮下注射。以后每隔 14 天以相同剂量抗原加等量不完全弗氏佐剂,加强 2 次。末次注射后 10 天,每只鼠用 400 条旋毛虫感染性幼虫进行攻击感染。对照组注射相同剂量的 PBS,与免疫组同时接受 400 条旋毛虫感染性幼虫攻击。于攻击 46 天后将小鼠处死,取全部肌肉用胃蛋白酶消化收集幼虫,计数。经单因素方差分析,70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白免疫组减虫率(肌幼虫减虫率% = 对照组肌幼虫数 - 免疫组肌幼虫数) / 对照组肌幼虫数 \times 100%) 为 37%,与对照组比较,有显著性差异 ($P < 0.01$) (表 1)。

[0133] 由于本实验 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白在动物体内产生有效的减虫率,据此可作为保护性候选抗原,应用于旋毛虫病的免疫预防。

[0134] 表 1 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠的保护性结果

[0135]

组别	BALB/c 的数目	平均肌幼虫数 $\bar{X} \pm SD$	肌幼虫减虫率 %	P 值
免疫组	10	4440 \pm 278.217	37	<0.01
对照组	10	7072 \pm 410.433	-	

[0136] 实施例 5 旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白(r Ts-Hsp70)对体外培养的小鼠骨髓源树突状细胞(BMDC)的促成熟作用实验

[0137] 1. 小鼠骨髓源树突状细胞(BMDC)的分离和培养

[0138] 取 4-6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,断颈处死,95%酒精消毒。无菌条件下分离并培养小鼠骨髓树突状细胞(BMDC)。将加入完全培养基进行细胞培养的这一天定义为 BMDC 培养的第 1 天。然后每隔 1 天(即 BMDC 培养第 2 天、第 4 天、第 6 天,以此类推)对培养细胞进行半量换液:小心将每孔内液体弃去 1ml,再补入 37 $^{\circ}$ C 预温的 RPMI1640 完全培养基 1ml,使培养体系中各成分维持原有浓度不变,然后置于培养箱中继续培养。当细胞培养至第 6 天时,分组加入不同的刺激物,即 6 μ g/ml r Ts-Hsp70(旋毛虫 70KDa 热休克蛋白基因重组蛋白按照实施例 2 所述进行表达及纯化)、1 μ g/ml LPS(细菌脂多糖, Sigma 公司,货号:L6529)和 6 μ g/ml 煮沸变性的 r Ts-Hsp70,另外不加刺激物的 BMDC 为对照组。分别于细胞培养的第 7 天,通过反复吹吸收集疏松粘附细胞及悬浮细胞用于下一步实验。

[0139] 2. 小鼠 BMDC 表面标志分子的流式细胞仪检测

[0140] 上述加入刺激物的 BMDC,继续培养 24 小时后,用 RPMI1640 液(Hyclone 公司,货号:SH30809.01B)反复吹吸,收集疏松粘附和悬浮生长的细胞至 50ml 离心管中,1200rpm 离心 10min。弃上清,用 DPBS 将细胞漂洗 2 次,1000rpm 离心 10min。弃上清,定容至 1 或 2ml,将细胞沉淀混匀后计数,调整细胞浓度,将细胞分装转入 1.5ml Eppendorf 管,使每管

细胞数量为 1×10^6 个。每份标本分装 2 管,即待检管和对照管。1000rpm 离心 10min。弃上清,向待检管细胞沉淀中加入 100ul 已用 DPBS 稀释好的 PE 标记的仓鼠抗小鼠 CD11c 单克隆抗体 (BD Pharmingen 公司,货号 :553802) 和 FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD86 单克隆抗体 (BD Pharmingen 公司,货号 :553691),同时另取对照管细胞沉淀加入单抗的同型对照 (即 PE 标记的仓鼠抗小鼠 IgG 和 FITC 标记的大鼠抗小鼠 IgG (BD Pharmingen 公司,货号分别是 :553954 ;553929) 100ul,单抗和其同型对照的应用浓度均为 0.25ug/100ul 体系。以上各管混匀后 4℃ 避光静置 30min。各管细胞再用 DPBS 漂洗 2 遍后将细胞悬浮于 0.5ml DPBS 液中。通过流式细胞仪检测细胞表面 CD11c 分子及 CD86 的表达情况。结果显示不加刺激物组 DC, LPS 刺激 24 小时培养组 DC, r Ts-Hs p70 刺激 24 小时培养组 DC 以及变性 r Ts-Hs p70 刺激 24 小时培养组 DC 的同型抗体对照,发生非特异结合的细胞数都很少。不加刺激物组 DC :CD11c⁺、CD86⁺ 双阳性细胞占培养细胞总数的 15.0% ;LPS 刺激 24 小时培养组 DC :CD11c⁺、CD86⁺ 双阳性细胞占培养细胞总数的 28.6% ;r Ts-Hsp70 刺激 24 小时培养组 DC :CD11c⁺、CD86⁺ 双阳性细胞占培养细胞总数的 27% ;变性 r Ts-Hsp70 刺激 24 小时培养组 DC :CD11c⁺、CD86⁺ 双阳性细胞占培养细胞总数的 18.7% (图 3 和图 4)。

[0141] 3. ELISA 测定小鼠 BMDC 培养上清中细胞因子含量的测定

[0142] 为了检测不同组 BMDC 培养上清中 IL-12P70 和 TNF- α 细胞因子含量,我们采用了 IL-12P70 ELISA SET (BD Pharmingen 公司,货号 :555256) 和 TNF- α ELISA SET (BD Pharmingen 公司,货号 :555268) 进行了双夹心 ELISA 实验,方法如下:

[0143] 3.1 标准品的准备

[0144] 取小鼠细胞因子 IL-12P70 和 TNF α 标准品各一瓶,加 1ml 无菌水,充分混匀溶解,放置至少 15min,分装后放入 -80℃ 备用。取 7 个 1.5ml 管顺序标记:最高浓度标准品、1 : 2 稀释、1 : 4 稀释、1 : 8 稀释、1 : 16 稀释、1 : 32 稀释、1 : 64 稀释;在最高浓度的标准品管内加入稀释液,使其与标准品最终总体积为 500 μ l;在其余管内分别加入 300 μ l 稀释液;倍比稀释:取原倍标准品 300 μ l,加入到 1 : 2 稀释管中,充分混匀;取 1 : 2 稀释液 300 μ l,加入到 1 : 4 稀释管中,充分混匀,依此类推,稀释液作为 0 对照。

[0145] 3.2 实验步骤

[0146] 包被:每孔加入 100 μ l 用包被液稀释的捕获抗体 (抗小鼠各细胞因子单克隆抗体 (1 : 250), 4℃ 包被过夜;弃去孔中液体, PBST 洗涤 3 次;每孔加入 200 μ l 封闭液, 25℃ 孵育 1h;弃去孔中液体, PBST 洗涤 3 次;

[0147] 每孔加入 100 μ l 脾细胞培养上清 (1 : 1 稀释) 以及梯度稀释的标准品, 25℃ 孵育 2h;每个样本设 1 个复孔;弃去孔中液体, PBST 洗涤 3 次;每孔加 100 μ l 用封闭液稀释的检测抗体 (生物素化的抗小鼠各细胞因子单克隆抗体和链霉素-HRP 亲和素混合物, 25℃ 孵育 1h;弃去孔中液体, PBST 洗 5 次,每次至少持续 30 秒;每孔加入 100 μ l TMB 显色液,室温避光反应 30min;每孔加 50 μ l 2M H₂SO₄ 终止反应。酶标仪 450nm 读数,与阴性对照比较 OD 值 ≥ 2.1 即判断为测定样品的 OD 值。结果显示:LPS 组 BMDC 的细胞因子 IL-12P70 含量较不加刺激物组 BMDC 明显升高,具有统计学意义 ($P < 0.01$);较煮沸变性的 r Ts-Hsp70 刺激组 BMDC 有所升高,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。LPS 组的细胞因子 TNF- α 含量较不加刺激物组 BMDC 有所升高,具有统计学意义 ($P < 0.05$);较煮沸变性的 r Ts-Hsp70 刺激组 BMDC 有所升高,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。r Ts-Hsp70 组的细胞因子 IL-12P70 及 TNF- α 含量较

不加刺激物组有所升高,具有统计学意义(P值分别为: $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);r Ts-Hsp70 刺激组 BMDC 的细胞因子 IL-12P70 的含量较煮沸变性的 r Ts-Hsp70 刺激组 BMDC 有所升高,具有统计学意义($P < 0.05$);r Ts-Hsp70 组的细胞因子 IL-12P70 及 TNF- α 含量与 LPS 组比较无统计学差异(图 5 和图 6)。

[0148] 4. BMDC 的形态观察

[0149] 分别用扫描电镜和透射电镜观察同一方法培养的各組 BMDC 细胞的形态。扫描电镜下可以清晰地看到各組培养 DC 的表面形态。未加任何刺激物而继续培养 1 天的 BMDC,表型上看胞体体积较大,细胞表面粗糙、凹凸不平并有大量微小片状的突起,细胞表面呈现密集的绒毛状;LPS 刺激培养 24 小时的 BMDC 呈现出典型的成熟 DC 形态,即胞体变小,向周围伸出浓密的大量树枝状突起,很多突起有分叉出现,并且细胞之间的突起有的已形成连接;r Ts-Hsp70 刺激培养 24 小时的 BMDC 也呈现出成熟 DC 的典型形态;变性 r Ts-Hsp70 刺激培养 2 4 小时 BMDC 细胞突起则相对少些,说明 r Ts-Hsp70 煮沸 10min 后已部分变性,影响了其对 DC 的刺激作用(图 7)。透射电镜下可以更清晰地看到各組培养 BMDC 的内部典型形态,比如细胞核、线粒体等细胞器,而且成熟 DC 的树枝状突起更为清晰,并且相邻的成熟 DC 之间的突起已经形成了连接(图 8)。

[0150] 以上实验结果提示:r Ts-Hsp70 刺激了体外培养的小鼠 BMDC 分化成熟。r Ts-Hsp70 可能通过诱导 BMDC 的成熟,从而激活了小鼠产生抗击旋毛虫感染的免疫保护作用,其可以作为抗旋毛虫感染的疫苗候选分子。

[0151] 上文列出的所有专利、专利申请和出版物均全文引入本文作为参考文献。

[0152] 本发明的范围不只限于所述的特定实施方案,这些方案只是作为本发明个别方面的单一举例说明给出的。功能等同的组合物和方法均在本发明的范围之内。确实,除了本文所示的和描述的内容外,对本发明各种改动对于阅读了上述内容的本领域技术人员来说都是显而易见的。这些改动将落入本发明待批权利要求的范围之内。

[0153] 核苷酸序列 (SEQ ID NO :1) (加下划线的碱基说明开放阅读框 (SEQID NO :1 第 208-1881 位) 的起始密码子、终止密码子位置) :

[0154] GGCACGAGCGGTATTGACCTTGAACAACATATTCTGTGTTGGGGTTTTCAAAAATGGTCGTGTTGAA
ATTATTGCCAATGATCAGGGCAATCGAATCACCCCGTCGTATGTAGCTTTTACGCCGGAAGGGGAGCGTCTGATCGG
CGACGCCGCAAAAATCAGTTGACCACCAATCCTGAGAATACGGTATTCGACGCAAAGCGTATGGTTCGGTTCGAGAAT
GGTCGGATAAGAGTCTTCAAGCGGATCGTAAAAATGTGGCCATTTGCGGTAGTTGAAAAATCGAGCAAACCGAACGTT
CAGCTTACTGTTAGCGGTGAAAAGAAAATTGTTCACTCCCGAAGAAATTTTCAGCGATGGTTTTGTTGAAAATGAAAGA
AATTGCCGAAGCTTATTTGGGCAAAAGAGTGA AAAAATGCCGTCGTCACGGTTCGCGCTTATTTCAACGATGCGCAAC
GTCAAGCTACCAAAGATGCAGGCACCAATTGCTGGTCTTAATGTTGTTTCGAATCATCAACGAACCAACTGCTGCTGCA
ATTGCATACGGTCTGGACAAAAAGGAGGGTGAAAAAATAATTTAGTTTACGATCTTGGAGGTGGAACGTTTCGACGT
TACTTTGCTTACTATTGACAATGGTGTTCGAAAGTGCTGTCTACTAATGGTGATACTCATTTGGGTGGTGAAGATT
TCGATCAACGTGTTATGGAATATTTTCATGAAATGTATAAGAAGAAAAGTGGAAAAGATATTCGAAAAGACAATCGA
GCTGTGCAGAAATTCGACGCGAAGTTGAAAAAGGCAACGTTACTGAGTACGCAGCATCAGACGAAAATTGAGAT
TGAATCCTTTTTTCGATGGGGAAGATTTTCAGCGAAAACGCTCACGCGCGCAAAAATTCGAAGAGCTCAATATGGATTTGT
TCCGTTCAACTTTATCACCAAGTGAACAAGTGTCTGACGATGCCGGTTTGAAGAAGGATGACGTGCACGAAGTTGTA
CTGGTCGGCGGTAGCACGCGCATTCCTAAAAGTCCAACAATTGCTGAAGGAATTTTTCAACGAAAAGAGCCCAGTTCG

GGGTATCAATCCAGACGAAAGCTGTCGCCTACGGTGCTGCGGTCCAGGCTGGCGTTATTTCCGGTGAAGAAGACACTG
 GTGATCTTGTGCTGTTGGACGTCAATCCGTTGACTTTGGGAATTGAAACTGTCGGCGGAGTGATGACGAAGCTGATT
 CCCAGGAATACGGTAGTGCCGACCAAGAAATCCCAGATATTCAGCACCGCTGCCGACAATCAGCCCACGGTCACTAT
 TCAAGTTTTCGAAGGCGAACGACCAATGACCAAAGACAACCATCTTCTTGGGAAATTTCGATCTGACCGGCATACCTC
 CGGCTCCGCGTGGGGTACCACAAATTGAAGTTACATTCGATATCGACGTGAACGGCATTTCGACGTCACCGCCGAA
 GACAAAGGTACCGGCAACAAGAACAAGATCACCATACCAATGACCACAATCGTCTGTCGCCGGAAGATATTGACCG
 CATGATCAACGATGCCGAAAAATATGCGGAAGAGGACAAAAAGTTGAAAGAGCGTGTGGACGCGAAAAATGAACTCG
 AAGCGCTTGCTATTCGTTGAAGAGTCAAATTGGGGATAGTGAAAAATTGGGCGGCAAATTGTCTGCCGACGAGAAG
 AGCAAAGTTGAAGAAGCTGTGGAAGAGAAAAATCAAATGGTTGAAAGCAACGCCGAAGCGTCGACGGATGATTTCAA
 GCAGCAGAAGAAAGAATTGGAAGATATTGTCCAGCCGATTATTGGGAAATTGTACAAGAACGCCGGCGAAGGTGCTC
 CGCCGCCCCCACCAGTGTGAAGAAAAAGTGAAGTGTGATTTTTTTTTTCAACCTCTCCTTATCCTGTGTGCTTTC
 TTCGGTTCATGTGTGTATATACATCATTCAATTCATTTATTATTATGCATTGTTTTAAAGAGAATAGTTGTTATT
 ATTGTTCCGACTTTTCTCCATTTGATCAACCTTTACATCGGATATCAATGTTCTTGTGTTTTCTCGACTTCGATGTATA
 TTTCAAGGCACAGTCAAGCTGGAGAATTCTATTATTAATAATAATTTTTTTTGAAGAAAAAGAAAAAAGAAAAA
 AAAAA

[0155] 开放阅读框内的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2) :

[0156] MVGREWSDKSLQADRKMWPFVVEKSSKPNVQLTVSGEKKLFTPEEISAMVLLKMKELAEAYLGKEVKN
 AVVTVPAYFNDAQRQATKDAGTIAGLNVVRIINEPTAAAIAYGLDKKEGEKNILVYDLGGGTFDVTLLTIDNGVFEV
 LSTNGDTHLGGEDFDQRVMEYFMKLYKKKTGKDIRKDNRAVQKLREVEKGRVLSQHQTKIEIESFFDGEDFSET
 LTRAKFEELNMDLFRSTLSPVKQVLDDAGLKKDDVHEVVLVGGSTRIPKVQQLLKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGA
 AVQAGVISGEEDTGDLVLLDVNPLTLGIETVGGVMTKLIPRNTVVPTKKSQIFSTAADNQPTVTIQVFEGERPMTKD
 NHLLGKFDLTGIPPAPRGVPQIEVTFDIDVNGILHVTAEDKGTGNKNKITITNDHNRLSPEDIDRMINDAEKYAEED
 KKLKERVDAKNELEALAYSLKSQIGDSEKLGKLSADEKSKVEEAVEEKIKWLESNAEASTDDFKQQKKELEDIVQP
 IIGKLYKNAGEGAPPPPPDAEEKDEL

[0157] 序列表

[0158] <110> 首都医科大学

[0159] <120> 旋毛虫 70KDa 热休克蛋白及其应用

[0160] <130> IDC080057

[0161] <160>2

[0162] <170> PatentIn version 3.3

[0163] <210>1

[0164] <211>2152

[0165] <212>DNA

[0166] <213> 旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*)

[0167] <400>1

[0168]	ggcagcagcg gtattgacct tggacaaca tattcttgtg ttggggtttt caaaaatggt	60
[0169]	cgtgttgaaa ttattgcaa tgatcagggc aatcgaatea ccccgtcgta ttagctttt	120
[0170]	acgccggaag gggagcgtct gatcggcgac gcccgcaaaa atcagttgac caccaatcct	180
[0171]	gagaatacgg tattegacgc aaagcgtatg gtcggtcgag aatggtcgga taagagtctt	240

[0211] Met Trp Pro Phe Ala Val Val Glu Lys Ser Ser Lys Pro Asn Val Gln
 [0212] 20 25 30
 [0213] Leu Thr Val Ser Gly Glu Lys Lys Leu Phe Thr Pro Glu Glu Ile Ser
 [0214] 35 40 45
 [0215] Ala Met Val Leu Leu Lys Met Lys Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly
 [0216] 50 55 60
 [0217] Lys Glu Val Lys Asn Ala Val Val Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp
 [0218] 65 70 75 80
 [0219] Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly Leu Asn
 [0220] 85 90 95
 [0221] Val Val Arg Ile Ile A sn Glu Pro Thr Al a Ala Ala Ile Ala Tyr Gly
 [0222] 100 105 110
 [0223] Leu Asp Lys Lys Glu Gly Glu Lys Asn Ile Leu Val Tyr Asp Leu Gly
 [0224] 115 120 125
 [0225] Gly Gly Thr Phe Asp Val Thr Leu Leu Thr Ile Asp Asn Gly Val Phe
 [0226] 130 135 140
 [0227] Glu Val Leu Ser Thr Asn Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe
 [0228] 145 150 155 160
 [0229] A sp Gln Arg Val Met Glu Tyr Phe Met Lys Leu Tyr Ly s Lys Lys Thr
 [0230] 165 170 175
 [0231] Gly Lys A sp Ile Arg Ly s Asp Asn Arg Ala Val Gln Lys Leu Arg Arg
 [0232] 180 185 190
 [0233] Glu Val Glu Lys Gly Lys Arg Val Leu Ser Thr Gln His Gln Thr Lys
 [0234] 195 200 205
 [0235] Ile Glu Ile Glu Ser Phe Phe Asp Gly Glu Asp Phe Ser Glu Thr Leu
 [0236] 210 215 220
 [0237] Thr Arg Ala Lys Phe Glu Glu Leu Asn Met Asp Leu Phe Arg Ser Thr
 [0238] 225 230 235 240
 [0239] Leu Ser Pro Val Lys Gln Val Leu Asp Asp Ala Gly Leu Lys Lys Asp
 [0240] 245 250 255
 [0241] Asp Val His Glu Val Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys
 [0242] 260 265 270
 [0243] Val Gln Gln Leu Leu Lys Glu Phe Phe Asn Gly Lys Glu Pro Ser Arg
 [0244] 275 280 285
 [0245] Gly Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala
 [0246] 290 295 300
 [0247] Gly Val Ile Ser Gly Glu Glu Asp Thr Gly Asp Leu Val Leu Leu Asp
 [0248] 305 310 315 320
 [0249] Val Asn Pro Leu Thr Leu Gly Ile Glu Thr Val Gly Gly Val Met Thr

[0250]		325	330	335
[0251]	Lys Leu Ile Pro Arg Asn Thr Val Val Pro Thr Lys Lys Ser Gln Ile			
[0252]		340	345	350
[0253]	Phe Ser Thr Ala Ala Asp Asn Gln Pro Thr Val Thr Ile Gln Val Phe			
[0254]		355	360	365
[0255]	Glu Gly Glu Arg Pro Met Thr Lys Asp Asn His Leu Leu Gly Lys Phe			
[0256]		370	375	380
[0257]	Asp Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu			
[0258]	385	390	395	400
[0259]	Val Thr Phe Asp Ile Asp Val Asn Gly Ile Leu His Val Thr Ala Glu			
[0260]		405	410	415
[0261]	Asp Lys Gly Thr Gly Asn Lys Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp His			
[0262]		420	425	430
[0263]	Asn Arg Leu Ser Pro Glu Asp Ile Asp Arg Met Ile Asn Asp Ala Glu			
[0264]		435	440	445
[0265]	Lys Tyr Ala Glu Glu Asp Lys Lys Leu Lys Glu Arg Val Asp Ala Lys			
[0266]		450	455	460
[0267]	Asn Glu Leu Glu Ala Leu Ala Tyr Ser Leu Lys Ser Gln Ile Gly Asp			
[0268]	465	470	475	480
[0269]	Ser Glu Lys Leu Gly Gly Lys Leu Ser Ala Asp Glu Lys Ser Lys Val			
[0270]		485	490	495
[0271]	Glu Glu Ala Val Glu Glu Lys Ile Lys Trp Leu Glu Ser Asn Ala Glu			
[0272]		500	505	510
[0273]	Ala Ser Thr Asp Asp Phe Lys Gln Gln Lys Lys Glu Leu Glu Asp Ile			
[0274]		515	520	525
[0275]	Val Gln Pro Ile Ile Gly Lys Leu Tyr Lys Asn Ala Gly Glu Gly Ala			
[0276]		530	535	540
[0277]	Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Glu Glu Lys Asp Glu Leu			
[0278]	545	550	555	

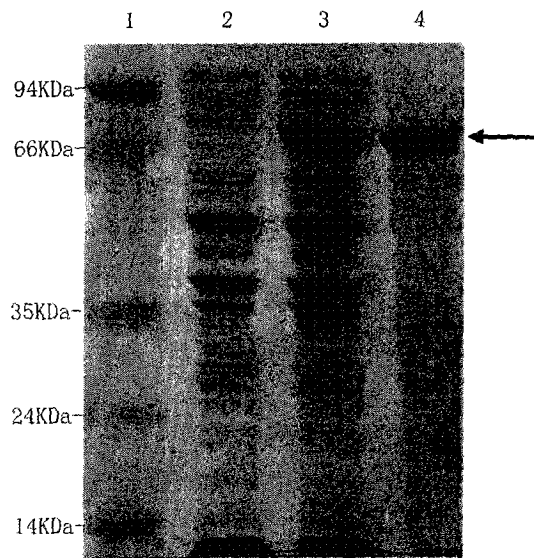


图 1

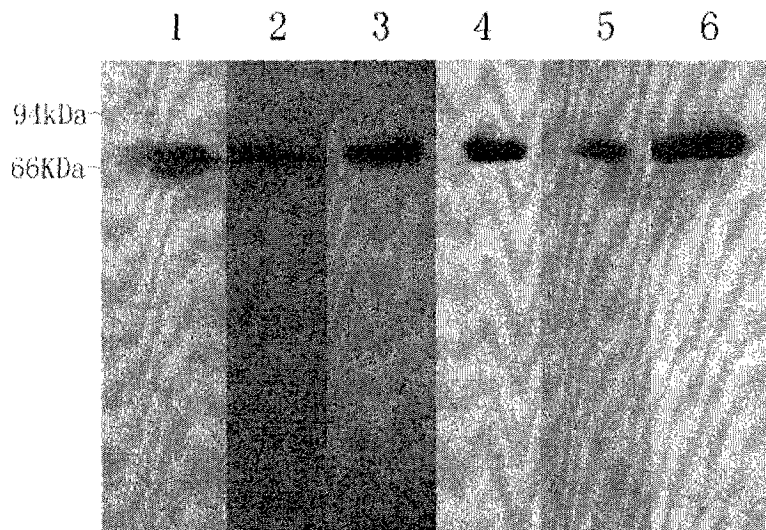
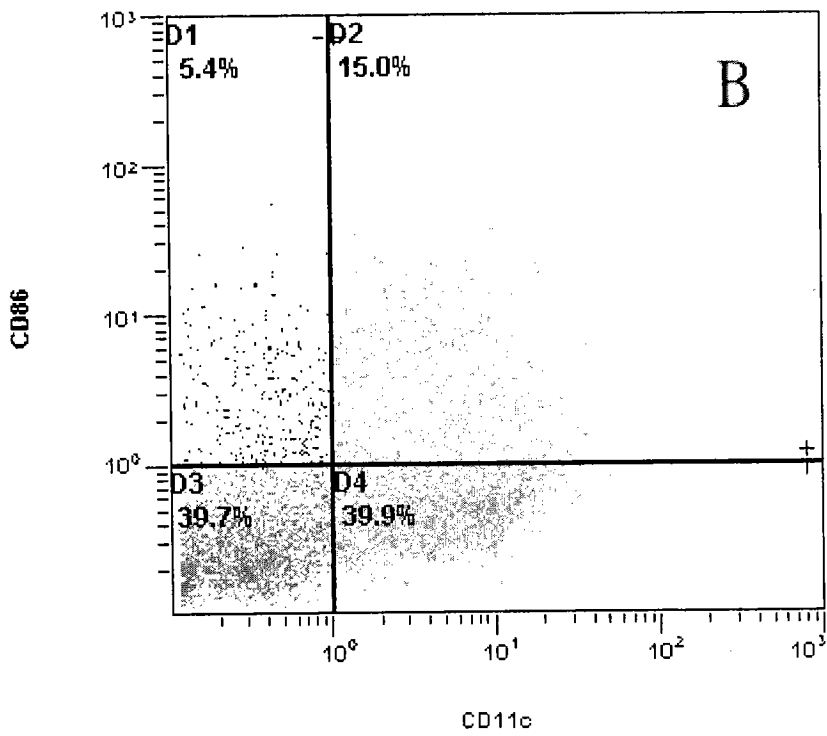
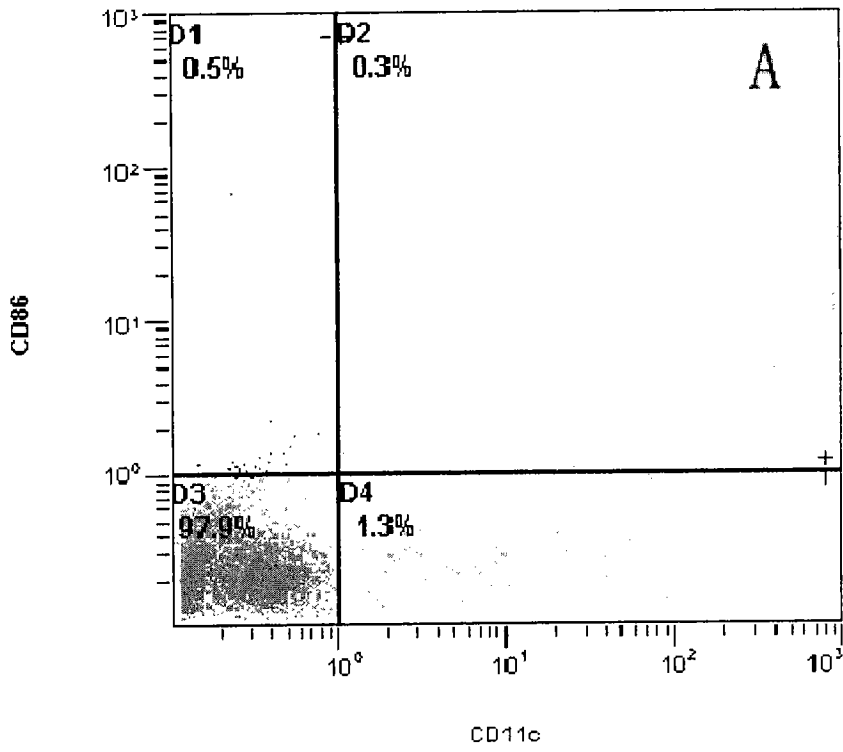
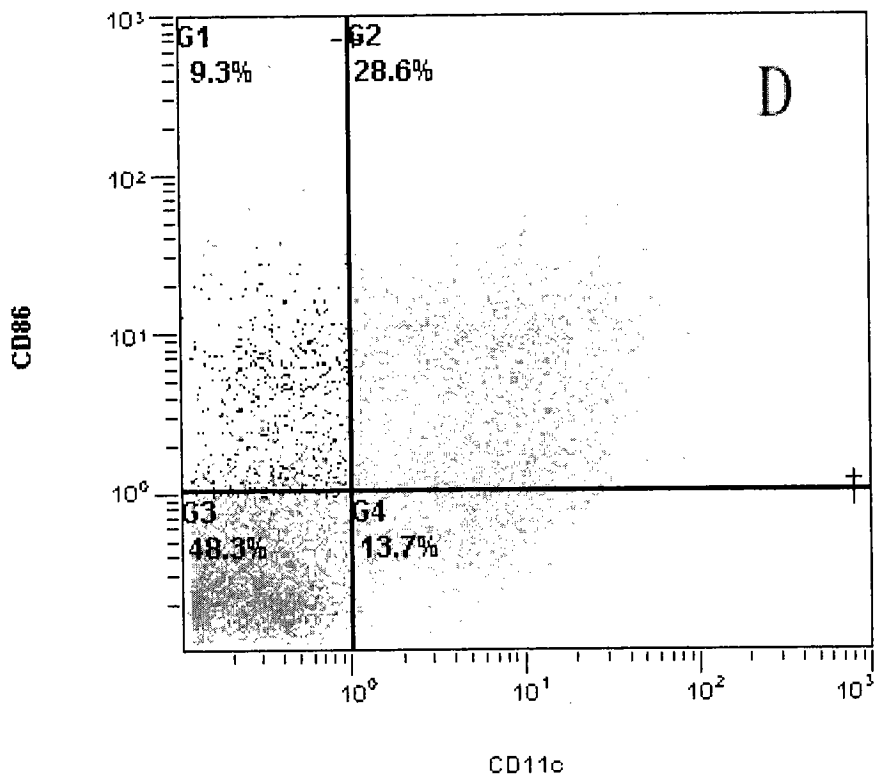
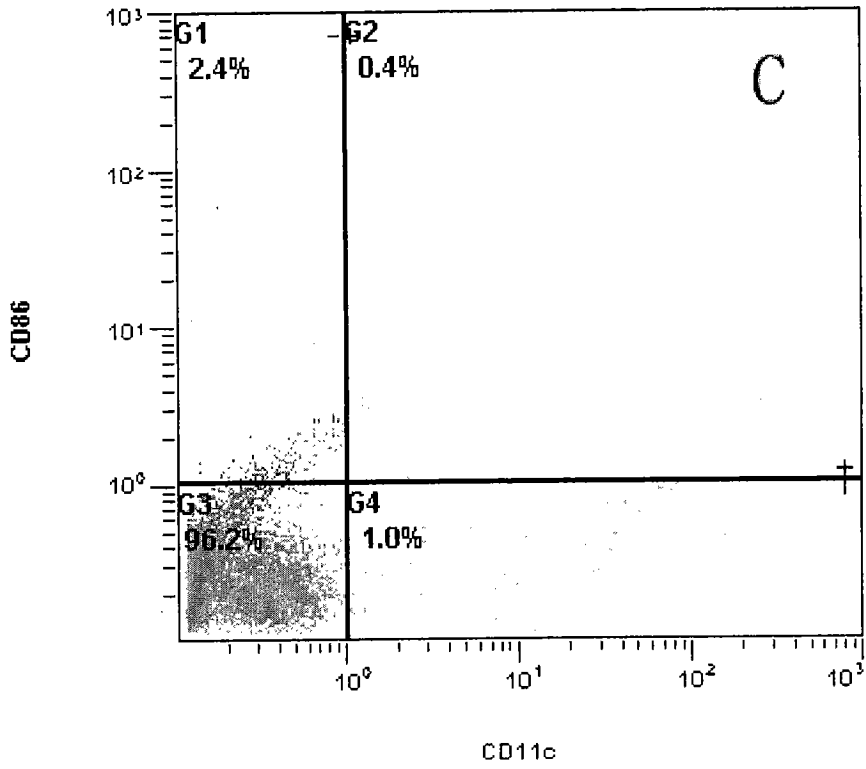
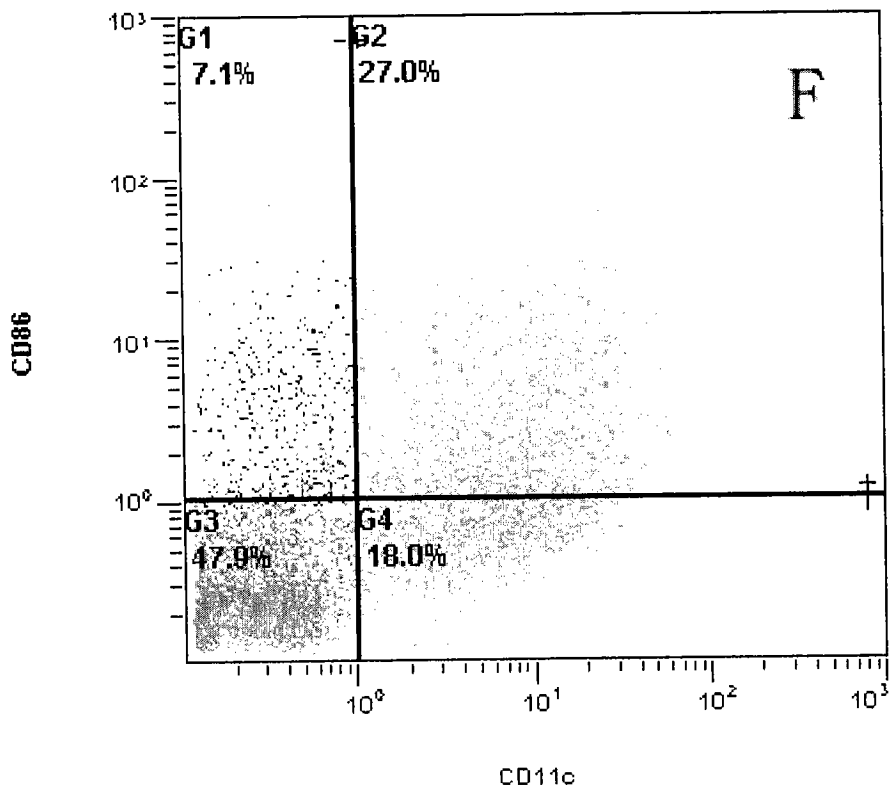
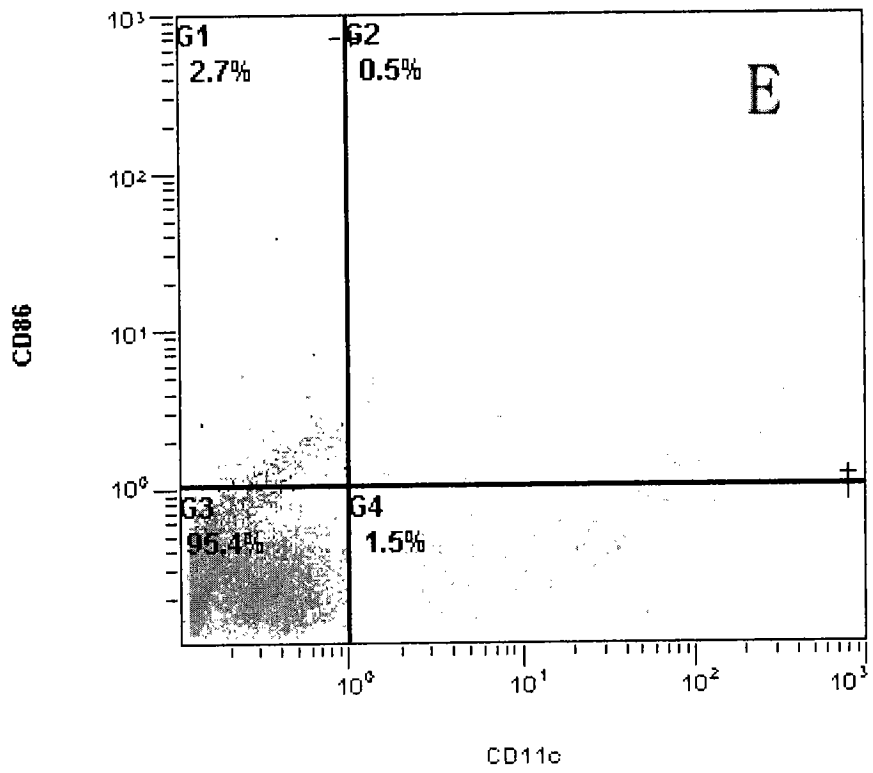


图 2







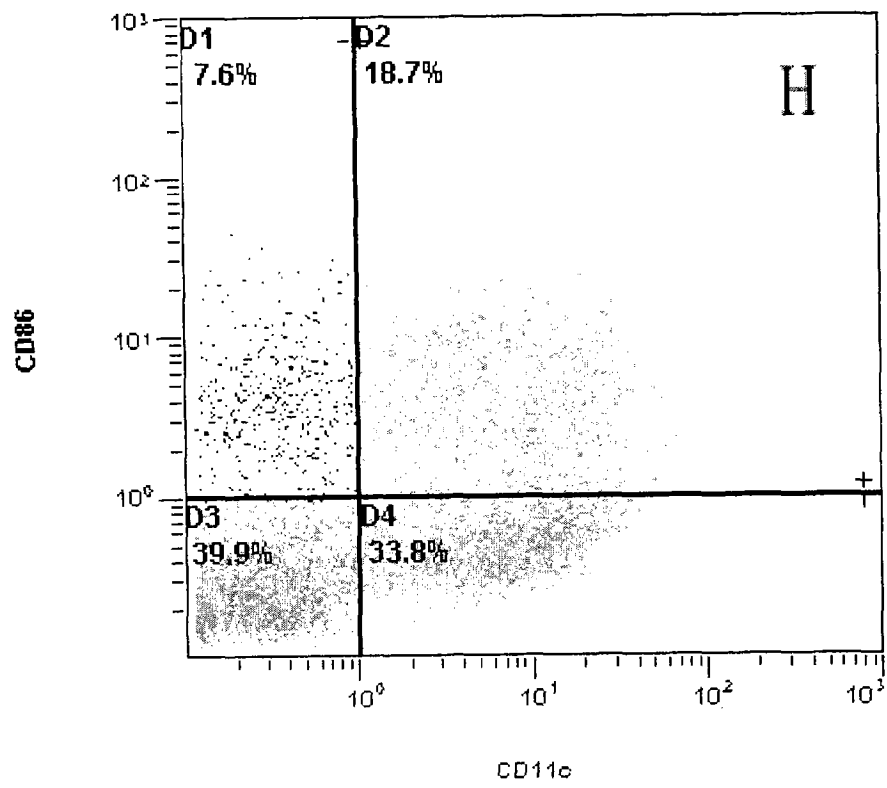
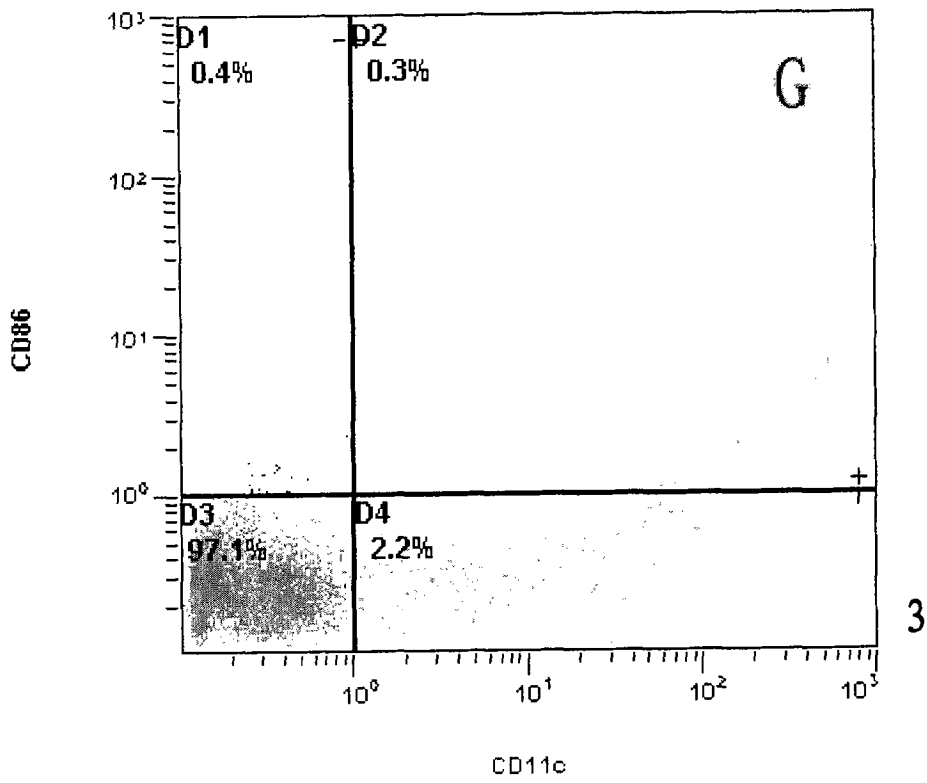


图 3

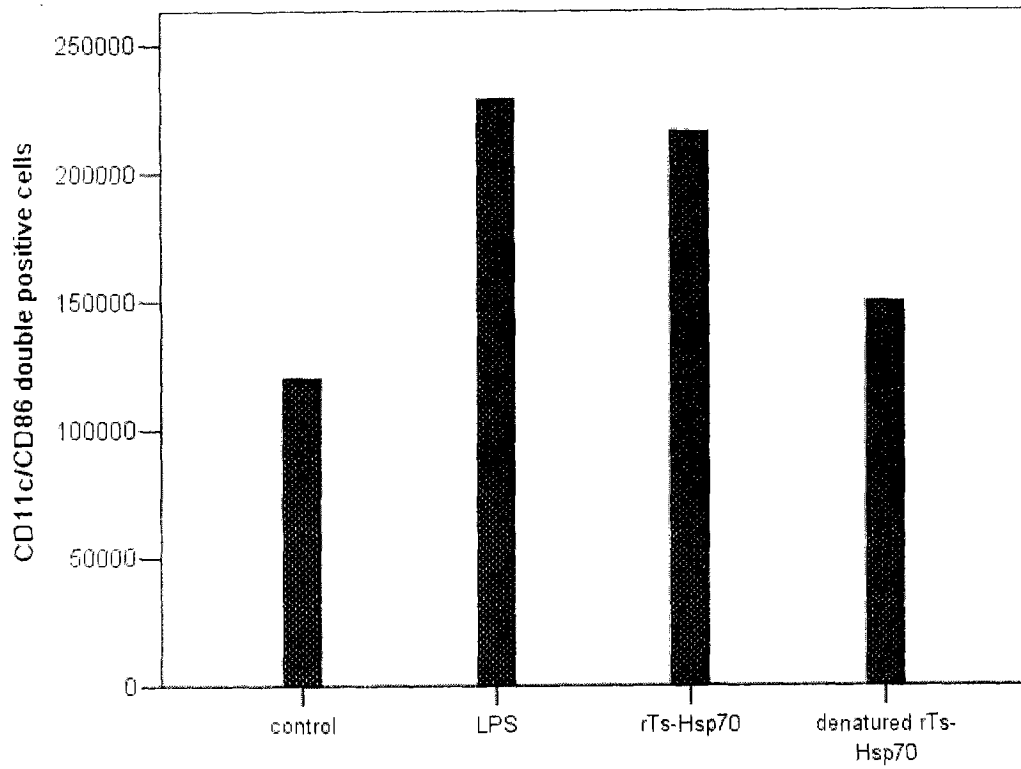


图 4

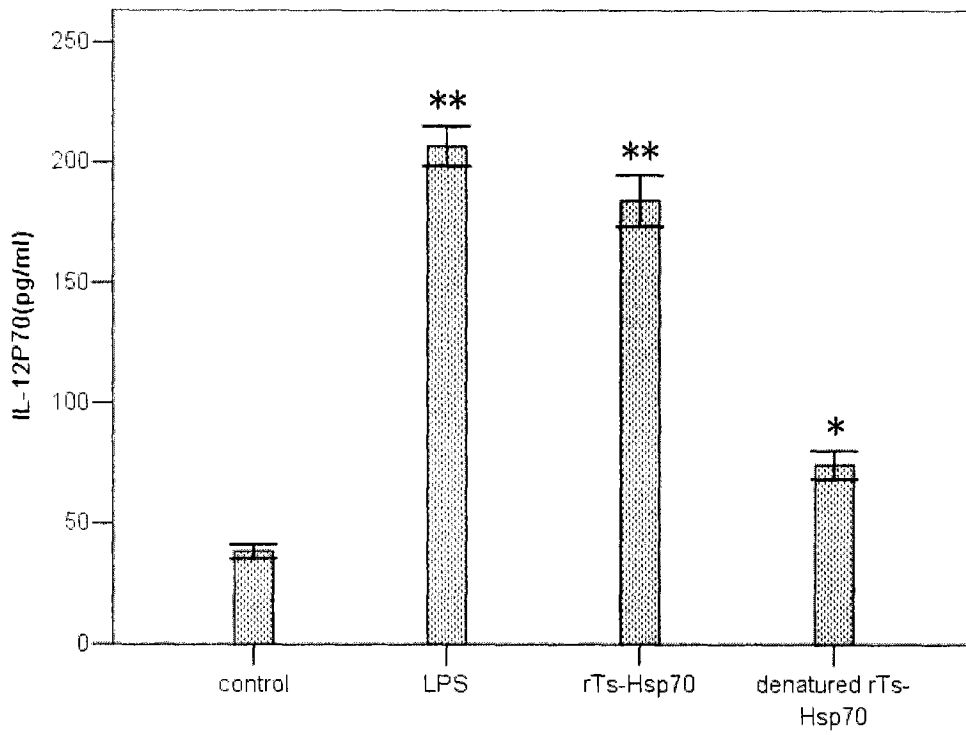


图 5

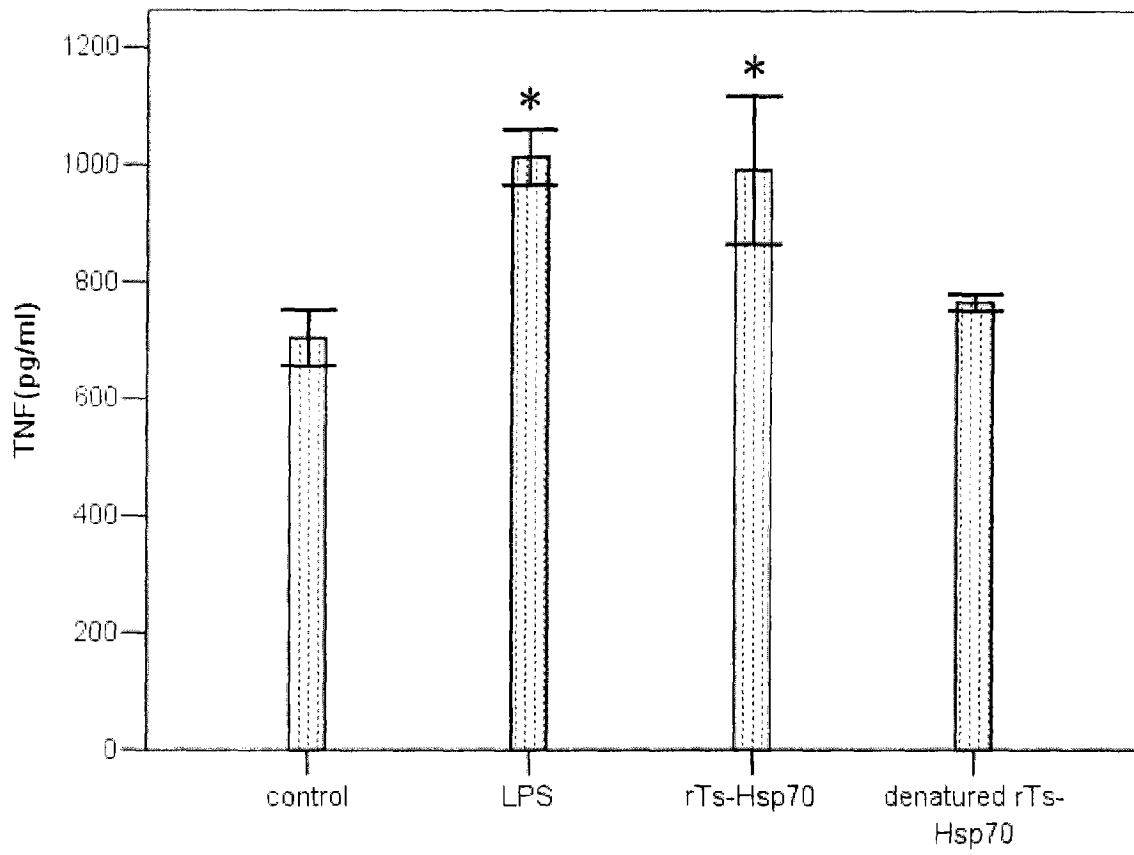


图 6

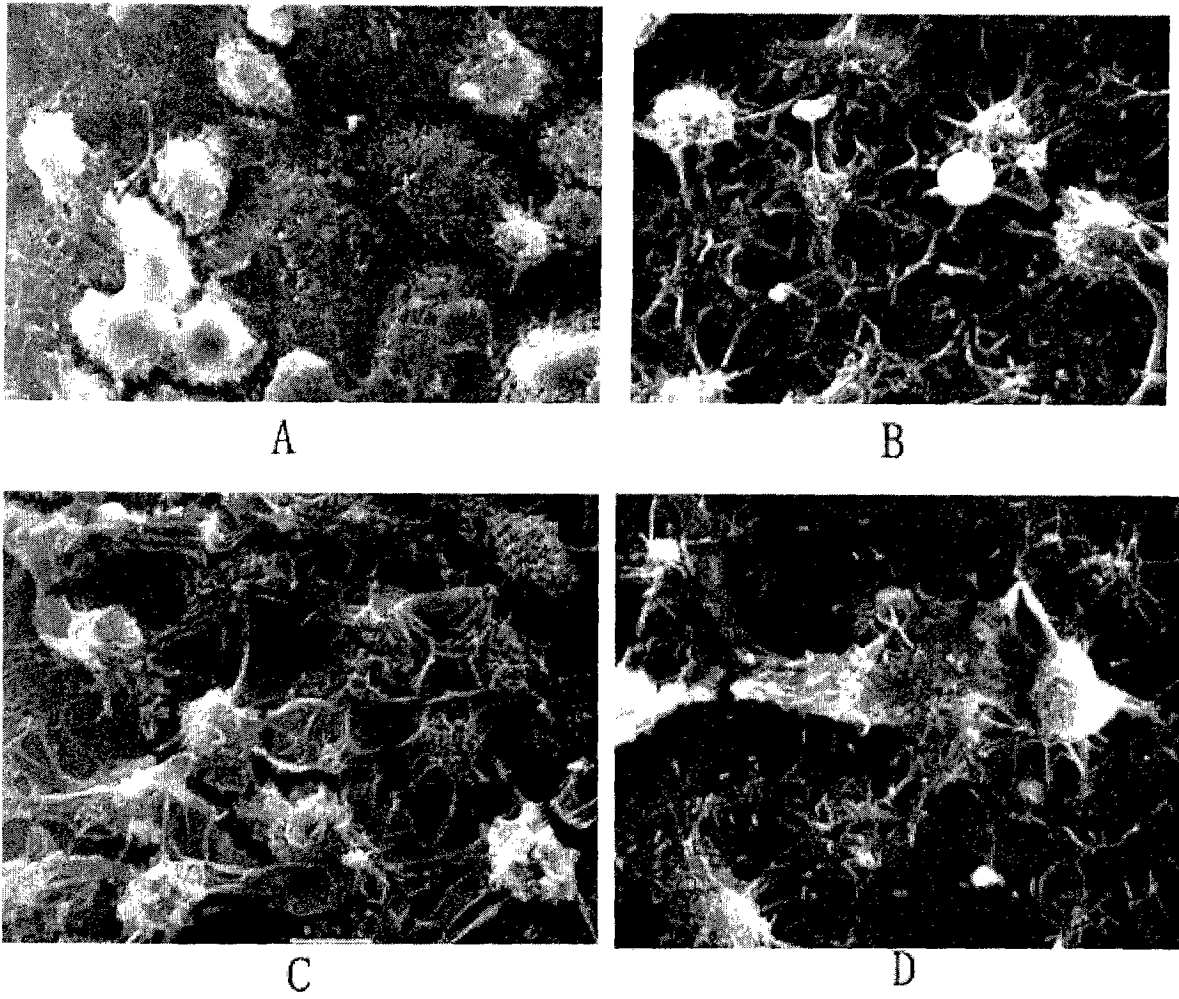


图7

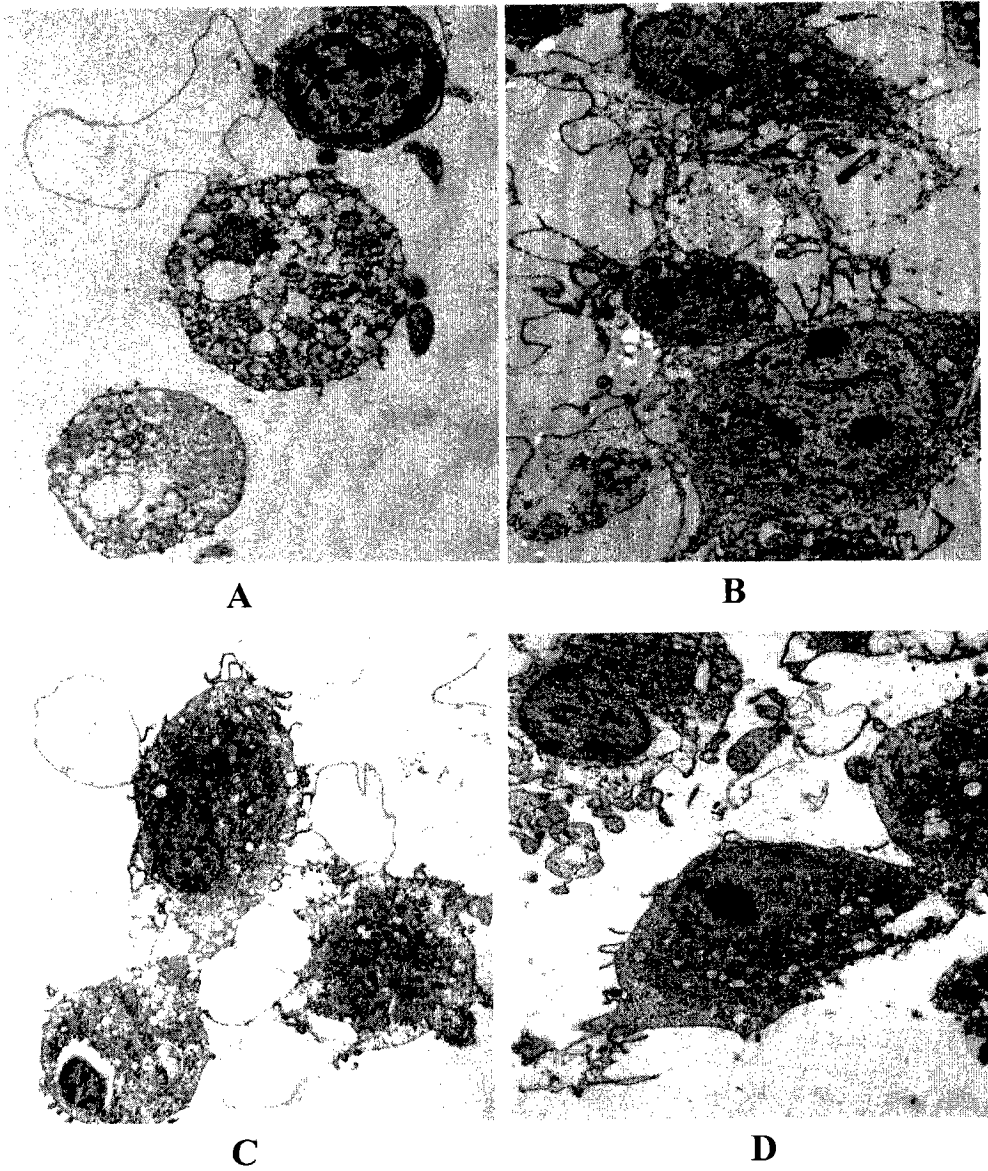


图 8

专利名称(译)	旋毛虫70KDa热休克蛋白及其应用		
公开(公告)号	CN101481691B	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	CN200810132791.8	申请日	2008-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
[标]发明人	诸欣平 王少华 杨雅平 杨静 郝冉		
发明人	诸欣平 王少华 杨雅平 杨静 郝冉		
IPC分类号	C12N15/12 C07K14/435 C12N15/63 C12N5/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/04 C07K16/18 A61K31/7088 A61K38/17 A61K39/395 A61K48/00 A61P33/10 C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53 C12N15/11 C07K19/00		
优先权	200810094427.7 2008-04-30 CN		
其他公开文献	CN101481691A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及旋毛虫新抗原基因70KDa热休克蛋白基因，含有该基因的载体的构建及原核表达载体，以及所表达的蛋白。本发明还涉及所述基因及编码的蛋白及其应用。旋毛虫70KDa热休克蛋白基因重组蛋白免疫动物后产生高滴度的抗体并对攻击感染产生有效的免疫保护性。