

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510059634.5

[51] Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G12N 15/12 (2006.01)

G12N 15/70 (2006.01)

G12N 15/79 (2006.01)

[43] 公开日 2006年10月4日

[11] 公开号 CN 1840544A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 15/16 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[22] 申请日 2005.3.30

[21] 申请号 200510059634.5

[71] 申请人 李建远

地址 264000 山东省烟台市芝罘区毓璜顶东路20号

[72] 发明人 李建远 王海燕 沈肖方

权利要求书1页 说明书11页

[54] 发明名称

ESC42 蛋白及其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明提供一种新的人附睾特异表达蛋白 ESC42 及编码序列。该蛋白由人附睾特异表达基因 ESC42 所编码。本发明还公开了该蛋白的制备方法，可以用化学方法合成，也可以通过基因工程技术生产；还提供了采用单克隆抗体特异性检测 ESC42 蛋白的方法。另外，这种蛋白不仅可用于制备抗细菌、抗真菌、抗病毒和抗肿瘤药物，还为开发新的避孕药和治疗不育症提供新的靶位点。

1. 一种 ESC42 蛋白，其特征在于，具有序列 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的 ESC42 蛋白，其特征在于，该蛋白还包括 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列中个别氨基酸的缺失、取代或修饰而得到的变异体或功能等同物。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的蛋白，其特征在于，所述的蛋白可采用固相化学法合成。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的蛋白，其特征在于，所述的蛋白可采用基因工程方法合成，利用 SEQ ID NO:1 所述的 DNA 序列所编码。
5. 根据权利要求 4 所述蛋白的制备方法，其特征在于，表达载体是质粒。
6. 根据权利要求 4 所述蛋白的制备方法，其特征在于，重组工程细胞是原核或真核细胞。
7. 根据权利要求 6 所述蛋白的制备方法，其特征在于，所述及的原核细胞主要包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。
8. 根据权利要求 6 所述蛋白的制备方法，其特征在于，所述及的真核细胞是酵母细胞、哺乳动物细胞、植物细胞或昆虫细胞。
9. 一种能与权利要求 1 所述的蛋白特异性结合的单克隆抗体。
10. 根据权利要求 9 所述的单抗，可用于制备酶标、免疫荧光、放射免疫、免疫组化、金标试剂盒或蛋白芯片，检测 ESC42 蛋白的表达差异，可辅助诊断不育症。
11. 根据权利要求 1 或 2 所述的蛋白，是一种药物组合物，以此作为有效活性成分，并混有一种或多种医药上可接受的载体或添加剂，用于生产对抗病原微生物感染或肿瘤性疾病的药物。
12. 一种可作为开发新的避孕药的靶蛋白。
13. 一种作为治疗不育症的药物组合物。

ESC42 蛋白及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及分子生物学、生物信息学、生殖生物学、分子免疫学和医学领域。具体地说，本发明涉及一种新的人附睾特异表达基因 ESC42 编码产生的与男性生育有关的蛋白质的生物学功能及应用。所涉及到的生物技术有：人附睾 cDNA 文库的构建、人附睾特异表达基因 ESC42 的筛选、克隆、表达及单抗的制备，还涉及到该表达蛋白在男性生殖、避孕、抗感染和抗肿瘤等方面的用途。

背景技术

生物技术是 20 世纪末生命科学领域最令人瞩目的高新技术。为人类疾病的防治，解决人口膨胀、能源匮乏、环境污染等问题带来了希望。生物技术和信息技术是 21 世纪关系到国家命运的关键技术，是创新产业的源泉。

从我国人口与健康，特别是男性生殖健康的重大需求出发，以重要的雄性生殖器官——附睾为研究系统，引进先进的生物技术，集中研究附睾中与精子成熟相关的基因及表达蛋白的功能，为雄性生殖调控理论的发展和突破作出原创性贡献，并为男性避孕药的研制、男性不育症的诊断治疗和日趋严重的性传播疾病的防治等提供理论指导，为人类健康作出我们的贡献。

当今人类的发展面临着两个严峻的问题：一方面，全球人口在急速膨胀，预计在 2050 年将达到 90 亿；另一方面，约 15% 的夫妻却不能正常生育。长期以来，避孕和不育治疗是生殖生物学所要解决的两个关系到国计民生的重大问题。虽然现有的人工生育技术能在一定程度上解决某些不育问题，但其花费昂贵，而且其安全性也受到质疑。世界卫生组织预测，随着环境污染和性传播疾病等一系列致病因素的存在和增加，在 21 世纪，不孕症将成为仅次于肿瘤和心脑血管病的第三大疾病。

全世界人口的急剧增长造成了资源耗竭和环境恶化，成为人类健康与生存的严重威胁。目前可供人类选择的避孕措施还很有限，离“高效、安全、可逆”的标准还相差较远。因此，研发新型避孕药物和措施已是当今生殖生物学家所必须面对的问题。上个世纪 70 年代在我国发展起来的通过服用棉酚来达到避孕目的的技术，由于长期服用带来的低血钾和不可逆性不育的毒副作用已从 80 年代终止使用。90 年代我国科学家和国际合作者在临床上尝试用高剂量庚酸睾酮 (TU) 或长效睾酮 (T) 作为男性避孕药，通过抑制垂体促性腺激素释放来降低睾丸内源睾酮的水平从而抑制精子发生。但高剂量和长期使用使志愿受试者出现乳房增大、高密度脂蛋白下降、睾丸萎缩和性功能下降等副作用。生殖学家很早就注意到隐睾症患者不育的现象，从而提出利用升高温度达到避孕目的的设想。近年来有许多来自细胞和分子生物学的证据表明实验性隐睾或短期热休克处理 (43℃, 20min) 能够引起大量精母细胞和圆形精子细胞的凋亡从而减少正常精子的数目。但是目前临床上还没有这类可行的避孕技术。我们认为未来男性避孕有两条路线可循：一是将上面提到的几种已知避孕措施进行不同的组合，并

调整用药剂量和使用时间,找出一种最佳避孕方案;二是利用当今基因组学时代所有可利用的资源和新技术,研发新一代男性避孕药物。在这一方案中,我们认为附睾特异表达的蛋白质是十分理想的避孕药靶。因为它们不影响精子的发生,药物的作用可逆性好。另外,世界卫生组织预测,在21世纪,不育症将成为仅次于肿瘤和心脑血管病的第三大疾病。目前在我国,约有15%的育龄夫妇存在着生殖障碍,其中男性约占一半。由于精子发育障碍不能自然受精,需要医生通过精子显微注射试管婴儿获取后代。因此,研究避孕和男性不育,应作为我国目前科研的重要研究方向之一。

精子在睾丸中产生后,必需经过附睾孵育后才能成熟具备受精功能。附睾内任何一种蛋白异常,都可能影响精子的发育成熟。目前发现,附睾管腔中大约200余种分泌蛋白,人们对其功能知之甚少。70年代末,人们致力于附睾流体的主要蛋白的纯化。在纯化蛋白产生抗体后,用抗体筛选cDNA表达文库,得到两个大鼠附睾特异性基因:E-RABP(B/C)和AEG(D/E)。澳大利亚Holland实验室运用抗REP38多抗对兔附睾文库进行免疫筛选,得到了REP38-c1克隆。美国的Orgebin-Crist实验室应用2-D电泳技术发现了3个能和精子结合的附睾分泌蛋白,用微量蛋白测序技术测定它们的N端序列,发现其中两个是E-RABP和AEG在小鼠中的同源物,而另一个则是小鼠磷脂结合蛋白(Phospholipid-binding protein)。该领域虽然取得了这些结果,但由于蛋白质分离纯化技术的困难,进一步的研究未能得到展开。绝大部分蛋白的顺序和功能都未能得到鉴定。

90年代以来由于分子生物学技术的日新月异,几个实验室采用了不同的分子克隆技术来研究和克隆附睾特异基因。(1)利用动物同源序列设计探针筛选人附睾cDNA文库,但由于物种间DNA顺序的差异,并非所有基因的筛选工作都能成功;(2)德国的Kirchhoff实验室应用差别筛选(Differential Screening)的方法,克隆人(老年前列腺癌患者)的附睾特异基因,他们用人附睾和人睾丸cDNA探针分别去筛选人附睾cDNA文库,对只和附睾探针杂交的克隆在第二轮用人肝和脑cDNA探针进行筛选,结果选出6个附睾特异性新基因HE1-HE6。其中HE2具有defensin-like结构,研究表明HE2 α 的C端片段具有抗大肠杆菌的活性^[25]。(3)用同样方法又对狗附睾进行了研究,与人相对应的CE1,CE4和CE5被克隆,后来在人附睾未被发现的CE7/GPX5和CE8-CE10也被克隆。(4)Hall实验室用附睾cDNA探针去筛选附睾cDNA文库,选出那些具有很强杂交信号的克隆(也就是具有较高丰度的克隆)。通过进一步分析测序得到4个附睾特异性的基因,其中prE17对应于D/E,prE23对应于B/C,prE15报道并命名为EAP-I。后来该实验室又得到猴CD52/HE5和ESP14.6/HE1。猴cy-ESP13.2在1999年被克隆,利用此克隆筛选猴附睾cDNA文库,分离到12个不同的克隆,其中pcy-ESP13.2-a和pcy-ESP13.2-b序列最长^[32]。由于差别筛选方法中所用cDNA探针的复杂性,只适合于筛选很高丰度的克隆,对中等丰度和低丰度的克隆并不适合;(5)2001年,中科院上海生化研究所张永莲院士实验室与美国北卡大学French实验室合作,采用差减杂交方法,构建了一个猴附睾特异的cDNA文库。用猴睾丸,肝和脑作负对照,进行与Kirchhoff实验室类似的两轮筛选。除了筛选到一些已在人,猴和其它动物被报道的附睾特异基因如HE1,HE3,HE5,HE6,GPX5,EAPI和ARP外,还得到约30个新的猴附睾特异表达的克隆(11个是全长cDNA)。其中ESC-42

在附睾头部高表达，定位在染色体 20q11.1-11.22 上，含半胱氨酸富集区，与三叶草家族同源。猴的与人的 cDNA 有 94% 的同源性，编码的蛋白有 89% 的同源性。ESC-42 的 N 端与靠近 HE2 C 端的 57 个氨基酸有 48% 的同源性，因此，推测其具有抗菌功能。ESC-461 属于 RNaseA 家族，其核糖核酸酶样功能未见报道。同年，Katherine G 等从猕猴附睾中，克隆到 CST11 基因，用其重组蛋白 50ug/ml 与大肠杆菌 37°C 培养 2 小时，可以观察到它的抗菌活性。(6) 何彬等用 DD-PCR 的方法克隆到大鼠两个新基因 Bin1b 和 Bin2a。其中 Bin1b 只在附睾头部表达，同源分析表明，它可能是 β -defensin 家族成员，并通过附睾上皮细胞的体外培养及反义核酸技术证明了它的抗菌活性。2002 年，用同样的方法，LI.Y 等克隆到小鼠 cystatin multigene 家族的两个新成员，其中 cystatin TE-1 在附睾和睾丸中表达，其结构含有高度保守的 4 个半胱氨酸残基，其功能尚不清楚。(7) French 实验室通过 EST 测序发现几个新附睾特异基因。这样随着分子克隆技术的发展，部分附睾特异基因被克隆和发现，使我们对精子在附睾中的成熟过程有了一定的了解。

由于正常人的附睾组织来源困难，限制了对人附睾基因和表达蛋白的研究进展。尽管德国实验室已建立了人的附睾 cDNA 文库，但由于是老年前列腺癌患者的附睾组织，不能代表健康年青人附睾中的基因表达状况。基于以上想法，我们研究室 2002 年利用一个正常青年人外伤死后捐献的附睾组织建立了附睾 cDNA 文库，正在运用大规模测序及生物信息技术筛选新的附睾特异基因。从我们建立的人附睾 cDNA 文库中获得人附睾 ESC-42 的 cDNA 序列。人 ESC-42 蛋白质序列与猴有 90% 的同源性，与小鼠有 28% 的同源。PROSITE 扫描分析显示，转录后加工位点含 1 个天冬酰胺的糖基化位点、4 个 PKC 磷酸化位点以及酪激酶磷酸化位点。目前已利用基因工程的重组技术生产出蛋白，并成功制备出单克隆抗体。经 Genbank 上查询，迄今为止，只有 16 个附睾特异蛋白的全长 cDNA 被克隆。研究这些基因的功能将比获得这些蛋白的 cDNA 序列任务更艰巨。完全弄清楚这种程序化的基因表达和精子成熟过程之间的关系还需要大量的艰苦的工作。

发明内容

本发明的目的是提供一种新的具有多种生物活性的人附睾特异表达蛋白 ESC42 及编码序列。

本发明的另一目的是提供分离纯化、生产 hESC42 蛋白的方法。

本发明的另一目的是提供与 ESC42 蛋白特异性结合的单抗及由此而建立的 ESC42 蛋白的检测方法。

本发明的另一目的是提供 hESC42 蛋白在抗菌、抗病毒、抗真菌、抗肿瘤以及在治疗男性不育症和开发避孕药等方面的用途。

本发明提供一种新的人附睾特异表达蛋白 ESC42 (hESC42 蛋白) 及编码序列。该蛋白是人附睾上皮细胞分泌的一种具有 β -defensin 样结构的抗菌肽。人 ESC42 基因由附睾组织特异表达，其编码基因定位在 20q11 号染色体上，全长 cDNA 由 589 碱基组成 (碱基序列见序列表 SEQ ID NO:1)，编码 123 个氨基酸 (氨基酸序列见序列表 SEQ ID NO:2)，等电点 pI=6.88，

分子量为 11978.12Da。。据 SignalP 分析，其功能区具有 6 个半胱氨酸，与 β -defensin 家族具有相似的结构，提示具有潜在的抗菌功能；ESC42 含有明显的信号肽(1-20aa)，提示其可能为分泌蛋白；29-32 位为 N 端糖基化位点，58-101 位为 2 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点，47-99 位为 3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点，111-116 位为 N 端 *myristoylation* 位点。人 ESC-42 蛋白质序列与猴有 90% 的同源性，与小鼠有 28% 的同源。

本发明还提供生产人 ESC42 蛋白 (*hESC42* 蛋白) 的方法。天然人 ESC42 蛋白存在于人附睾分泌液中，用于科研、药物开发的人 ESC42 蛋白，可以采用下列方法之一制备：

1、根据序列 SEQ ID NO:2 所述 ESC42 蛋白的氨基酸序列，用固相化学方法合成蛋白。

2、基因工程技术生产。根据 GenBank 公布的 *ESC42* cDNA 序列 (No. AF34073) 设计上下游引物，从本室构建的人附睾 cDNA 文库中扩增人 *ESC42* 基因，将基因克隆于重组表达载体，并将重组后的 DNA 转化宿主细胞，通过原核和真核细胞表达蛋白，纯化后的蛋白经过 Western blot、基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱进行肽指纹图谱分析和分子量鉴定。

本发明还提供能与 ESC42 蛋白特异性结合的单克隆抗体和检测 ESC42 蛋白及异常表达的方法。将纯化的 EST42 融合蛋白与等体积的福氏完全佐剂混匀后免疫小鼠，制备、筛选杂交瘤细胞，制备腹水，纯化获得能够与 *hESC42* 特异性结合的单克隆抗体。采用该抗体制备 ELISA 检测试剂盒、免疫荧光检测试剂盒、放射免疫试剂盒、免疫组化试剂盒和蛋白质芯片，可从精子、精浆和细胞培养上清等多种样本中特异性检测 *hESC42* 蛋白的表达水平与差异，在科研和不育症的诊断中有重要应用价值。

本发明还提供了 *rhESC42* 蛋白的多种生物功能，该蛋白可用于治疗人和动物的细菌、真菌、病毒感染和肿瘤等疾病，是一种可供开发和有广泛临床应用前景的药物组合物。其主要用途如下：

1、抗菌作用。纯化的 *rhESC42* 蛋白在体外实验研究证明能够抑制 G+菌和 G-菌的生长，对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌以及临床分离耐药菌株大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、霉菌都有抑菌作用，其最低 MIC₅₀ 的药物浓度为 25 μ g/ml。

2、抑瘤作用。将肿瘤细胞株与纯化的 *rhESC42* 蛋白共同孵育，肿瘤细胞生长受到明显的抑制作用。随着蛋白浓度的增加其杀伤效率逐渐上升，其 MIC₅₀ 最低抑制浓度为 25ug/ml。

3、*rhESC42* 蛋白可能为开发男性避孕方法提供新的途径。该蛋白与精子运动和精卵结合有关，封闭该蛋白或敲除其编码基因，可能达到避孕的目的。

4、*rhESC42* 蛋白可能作为治疗男性不育症的有效药物成分。通过抗 ESC42 抗体进行免疫定位，发现了 ESC42 在精子头颈部有明显的表达。说明精子在通过附睾的过程中与该蛋白结合，从而获得运动和受精能力。如果病人该蛋白未正常表达，受精能力减弱。将弱精子与 *hESC42* 蛋白共同孵育，可改善受精能力，治疗不育症。

本发明中所指的多肽与 ESC42 蛋白、ESC42 多肽和抗菌肽可互换使用。

具体实施方式

实施例一：构建健康年轻人附睾组织 cDNA 文库

1、总 RNA 的提取

取意外事故死亡者捐献的人附睾组织，提取总 RNA、纯化与鉴定。取一完整附睾组织，称重，迅速加入 Trizol，剪碎，电动匀浆，室温放置，参照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA，采用紫外分光光度计在 260nm 和 280nm 波长下比色鉴定其浓度和纯度，用 1.1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳确定其完整性。总 RNA 提取后， $A_{260}/A_{280}=1.85$ ，1.1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳可见 28S 和 18S 及 5S 三条亮带，其中 28S: 18S 亮度比值约为 2: 1，清晰无降解（图 1）。

2、cDNA 第一链合成：0.5ml 离心管中依次加入人附睾组织中 RNA 1ug，SMART IV 寡核苷酸，CDS III 3' 引物，灭菌水，混匀，72℃ 2min，置冰上 2min，终止反应。再依次加入：5× 第一链缓冲液，DTT，dNTP 混合物，逆转录酶，混合，42℃ 孵育 1 小时后置冰上终止反应。

3、LD-PCR 方法合成双链 cDNA：在 PCR 反应管中依次加入下列物质：双链 cDNA 灭菌去离子水，10×PCR 缓冲液，50×dNTPs，5' PCR 引物，CDS III 3' 引物，50×多聚酶混合物，总体积 100ul，混匀，PCR 循环。用 1.1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定双链 cDNA 分布范围为 200bp~4kb，呈涂布状（图 2），没有特异带型，完全符合哺乳动物细胞 mRNA 分布规律，其中 <500bp 的片段在随后的步骤中除去。

4、PCR 产物的抽提纯化和分级分离：取 50ul 双链 cDNA，用蛋白酶 K 灭活 DNA 聚合酶，用酚：氯仿：异戊醇对 PCR 产物进行抽提纯化，用 *Sfi* I 酶进行酶切。酶切产物用 CHROMASPIN-400 柱子进行分级分离，并收集单滴组分，连续收集 16 管，每管分别取 3ul 进行 1.1% 琼脂糖凝胶电泳，收集前 4 个含有 cDNA 的组分，将 4 管纯化产物并在一个灭菌的离心管中，进行乙醇沉淀回收。

5、cDNA 与载体 pDNR-LIB 连接：按照 cDNA：载体=1：1 的比例进行连接，孵育过夜。向反应体系内加入灭菌水，糖原，冰冷的 95% 乙醇，混匀后，-70℃ 放置 1 小时，离心，弃上清后用 5ul 灭菌水重悬连接产物。

6、电转化与滴度测定：取 5ul 连接产物与 25ul 电转化感受态细胞进行电转化，宿主菌为大肠杆菌 XL1-Blue，电击后立即加入 1ml LB 培养基，37℃ 摇床培养，连续稀释法滴定细菌培养液，取 1μl 菌液，用 1ml LB 培养基稀释后，取 100ul 铺到氯霉素抗性的 LB 平板上，倒置，37℃ 过夜培养，记数平板上菌落数，文库滴度 (cfu/ml) 为： 2×10^7 cfu/ml。

根据所检测的文库滴度来计算需要的 150mm 平板数，LB 培养基稀释文库菌液后涂氯霉素抗性的 LB 平板，倒置，37℃ 过夜培养。随机挑取 14 个克隆至灭菌水中，煮沸，各取 1ul 加入含有：10×PCR 缓冲液，dNTPs，M13 上游引物，M13 下游引物，50×多聚酶混合物的 PCR 反应体系中。反应结束后，用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行 cDNA 文库的鉴定，其中有 13 个克隆含有插入子，扩增片段中 >700bp 的有 3 个，>1 kb 的有 2 个（图 3、4），表明已经成功获得了人附睾组织 cDNA 的重组质粒，转化效率较高 92.8%。

实施例二：从文库中钓取人附睾特异性表达基因 ESC42

根据 GenBank 中报道的基因的 mRNA 序列设计两对引物，ESC42 上游引物：

5' -CGGAATTCTACAGCGGTGAAAAAATGC-3' , 下 游 引 物 :
5' -TCCCCCGGGAAGTCATGAGCTATGGTGAAC-3' , 取人附睾 cDNA 文库 1 μ l 作为模板, 在 ESC42 引物参与下行 PCR 扩增, 成功扩增出目的片段 (图 5), 扩增产物用 2.0%的琼脂糖电泳胶鉴定其长度为 333bp。

实施例三: 原核表达载体重组表达 hESC42 蛋白

1. ESC42 原核表达质粒的构建: 根据人 ESC42 的序列设计去信号肽上、下游引物

5-GGAATTCATATGTACAGCGGTGAAAAAATGC-3; 5CGGAATTCAAGTCATGAGCTATGGTGAAC-3。分别含有 EcoRI 和 NdeI 酶切位点 (横线表示)。

2. pET-ESC42 质粒的重组和筛选: 取文库 1 μ l 进行 PCR, 同时设 β -actin 为阳性对照。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 68 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环, 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将扩增的产物先用 NdeI 酶切过夜, 再用 EcoRI 37 $^{\circ}$ C 酶切 1h, 电泳回收大片段; 载体 pET-25b(+) 用 NdeI 和 EcoRI 进行双酶切, 回收大片段, 二者按 3:1 摩尔比混匀, 以 T4 连接酶连接后转化大肠杆菌 BL21, 定向连接, 命名为 pET-ESC42。用 PCR 方法筛选阳性克隆。从人附睾 cDNA 文库中, 先扩增含信号肽序列 391 bp, 再扩增去信号肽片段, 目的片段预期长度为 333 bp, β -actin 内参 323bp 片段。

3、重组质粒的酶切鉴定和测序鉴定: 挑选阳性克隆进行质粒提取, 方法参照 Qiagen 质粒提取试剂盒。用 EcoRI 和 NdeI 进行酶切鉴定; 最后用 DNA 序列测序鉴定。测序引物为 T7 通用引物。DNA 测序表明, 所获克隆序列与理论序列完全一致, 证明连入的片段是正确的

4. ESC42 蛋白的表达与纯化: 我们从诱导温度、IPTG 的诱导浓度、诱导时间等几个方面做了优化表达条件的尝试, 最终选择 IPTG 的终浓度为 0.5 mmol/L, 温度为 35 $^{\circ}$ C, 诱导 3 h 表达量最高。经反复冻融并在冰浴中超声裂解, 功率 300W, 时间 10 秒, 间隔 30 秒, 共 5 次。

10000r/min 离心 10 分钟, 分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。用 120 型凝胶成像分析系统分析蛋白表达情况 (美国, Kodak 公司), 表达量可达 30%。诱导后的蛋白大部分表达在上清, 将大部分表达在上清的蛋白用 0.45 μ m 滤膜过滤, 过 CM 阳离子柱, 用醋酸盐缓冲液平衡 2 个柱体积, 于 0.1mo/L Nacl 浓度下洗脱目的蛋白, 透析后定量, 冷冻抽干。

5. Western blot 鉴定: 分别将纯化的 ESC42 蛋白进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 随后与特异性抗体进行 Western blot, 方法参考分子克隆。实验中所用小鼠抗 ESC42 单抗 (稀释度分别为 1:500), 二抗分别为兔抗羊、羊抗鼠 IgG/HRP (稀释度为 1:10 000), 最后利用 DAB 进行显色, PBS 终止显色。Anti-ESC42 抗体能够特异性与纯化的 ESC42 蛋白 5ng、10 ng、100 ng、200ng 结合, 且最低检测到 5 ng, 表明此抗体灵敏度很高。

6. 质谱鉴定: ①分子量: 分别取 1mg/ml 的蛋白 1 μ l 和基质 B (芥子酸) 9 μ l, 彻底混匀, 于上样板上点样, 干燥 5 min 后上 Voyage-DETM STR 质谱仪 (美国, Applied Biosystems 公司), 用来鉴定 hESC42 的分子量为 11978.12Da, 与预算的理论值 11961.24 Da 基本相符, 误差在 0.01%。②测定的肽质量指纹图谱: 从考马斯亮蓝染色、脱色后的胶中回收 ESC42 蛋白质, 空气干燥后加入 10 μ l 胰酶液吸胀, 37 $^{\circ}$ C 过夜。50 μ l 萃取液 (50%乙腈, 5%三氟乙酸) 室温放

置 1 h, 重复 2 次, 合并上清, 真空干燥。取样品和基质各 1 μ l 混合后上质谱, 得到肽指纹图谱 (见附图 1)。^③经质谱检测出的 ESC42 的氨基酸覆盖率为:

mkllllalpm lvllpqvipa ysgekkcwnr sghcrkqckd geavkdtckn lraccipsne dhrrypatsp tplsdstpgi iddiltvr ftdyfevsskk dmveeseagr gtetslpnvh hss 其覆盖率为 48%

7、生物信息学分析: 通过功能区分析显示 ESC42 具有 6 个半胱氨酸 (C-X6-C-X3-C-X9-C-X5-CC), 与 β -defensin 家族 (C-X6-C-X4-C-X9-C-X6-CC) 具有相似的结构, 提示具有潜在的抗菌功能。其序列如下:

β -defensin 氨基酸序列: VS C RRNGGI C VPIR C PGHMRQIGT C FGPRVK CC

ESC42 氨基酸序列 (6 个半胱氨酸阵列): KK C WNRSGH C RKQ C KDGEAVKDT C KNLRA CC

实施例四: 利用真核表达系统生产 rhESC42 蛋白

1、hESC42 基因的扩增: 根据 GenBank (AL031650) 中人 ESC42 的序列设计两对引物。含信号肽序列上游引物分别为 5' CGGAATTCATGAACTCCTGCTGCTGCT-3'

下游引物 5' GGGTACCCCTGAGCTATGGTGAACATTTGG-3'; 分别含有 EcoRI 和 KpnI 酶切位点。从人附睾 cDNA 文库中进行扩增, 先扩增含信号肽序列, 再扩增去信号肽片段。反应条件为: 95°C 变性 45 s, 60 °C 退火 45s, 68°C 延伸 1 min, 共进行 30 个循环。同时设 β -actin 为阳性对照。可得到预期长度为 333bp 的目的片段。

2、pEGFP-N1-ESC42 真核表达质粒的构建: 将纯化的 PCR 产物用 EcoRI 和 KpnI 酶切, 回收大片段。载体 pEGFP-N1 用同样的酶进行双酶切, 回收大片段, 二者按 1:3 比例混匀, 以 T4 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 用 PCR 方法筛选阳性克隆。命名为 pEGFP-N1-ESC42。

3、pCDN3.1-ESC42 真核表达质粒的构建: 将纯化的 pEGFP-N1-ESC42 质粒用 EcoRI 和 KpnI 酶切, 回收小片段。载体 pCDN3.1 用同样的酶进行双酶切, 回收大片段, 二者按 1:3 比例混匀, 以 T4 连接酶连接后转化大肠杆菌 XLI blue, 用 PCR 方法筛选阳性克隆。命名为 pCDN3.1-ESC42。

4、重组 DNA 的酶切鉴定和测序鉴定: 将阳性克隆用 Qiagen 质粒提取试剂盒提取, 方法参照试剂说明。将 pEGFP-N1-ESC42 和 pCDN3.1-ESC42 质粒进行定量后, 分别用于 EcoRI 和 KpnI 酶切和 DNA 序列测序鉴定, 分别用 GFP N 端引物 5' CGTCGCCGTCCAGCTCGACCA-3', T7 通用引物 (5' TAATACGACTCACTATAGGG-3') 进行测序。

5、pEGFP-ESC42 在亚细胞中的定位: 将上述构建成功的 pEGFP-ESC42、pEGFP-N1 载体、pCDN3.1 和 pCDN3.1-ESC42 分别转染 HEK-293 细胞, 转染方法按 Invitrogen 公司的产品说明进行。48h 后在共聚焦显微镜下观察发现在转染空载体 pEGFP-N1 的细胞中, 荧光呈弥漫性分布; 而重组质粒转染的 293 细胞, 荧光位于细胞的一侧, 呈指环状分布, 为典型的分泌型表达模式。

6、RT-PCR 鉴定 ESC42 的表达: 应用 Trizol 一步法分别提取转染后细胞的总 RNA, 经 DNase I 处理后, 经逆转录和 PCR 反应扩增目的片段。反应条件为: 95°C 变性 45 s, 60 °C 退火 45s, 68°C 延伸 1 min, 共进行 30 个循环。以 β -actin 为内参照同时进行 PCR 扩增。扩增产物用 10g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定显示, 转染 pEGFP-ESC42 质粒组有扩增的条带, 而空载体对照组没

有条带,说明质粒已进入细胞并进行目的基因的转录。

7、ESC42 蛋白的纯化:收集 pCDN3.1-Esc42 转染的培养上清,纯化过程按照 ProBond Purification System 系统操作手册进行。

实施例五: ESC42 蛋白单克隆抗体的制备及应用

一、ESC42 单克隆抗体 (mAb) 的制备

1. 免疫方案: 40ug EST-ESC42 融合蛋白与等体积的福氏完全佐剂完全混匀, 小鼠多点皮下注射, 3 周后, 再次多点皮下注射。3 周后, 20ug EST-ESC42 融合蛋白腹腔注射。3 周后间接 ELISA 检测小鼠血清效价, 大于 10^{-4} 以上方可用于融合。融合前 72 小时腹腔注射融合蛋白加强免疫。
2. 效价检测: 包被 ESC42, 以正常小鼠血清为阴性对照。
3. 制备饲养细胞: 融合前一天, 取 6-10 周龄的小鼠的腹腔巨嗜细胞 (10^6 /ml), 96 孔板 100 ul/孔。
4. 细胞融合: 收集对数生长期的 Sp2/0 细胞, 离心洗涤后与免疫小鼠的脾细胞混合, 45% PEG 作用 90 秒后, 800rpm 离心 6 分钟, 用 20% FCS RPMI 1640 重悬细胞, 加入 96 孔板, 100ul/孔, 37°C, 5% CO₂ 孵箱中培养。
5. 杂交瘤的选择培养: 用 HAT 选择培养基维持两周后改用 HT 培养基, 再维持 2 周后改用一般培养液。
6. 阳性杂交瘤的筛选: 融合后第 10-14 天, 以 MS2-ESC42 包被, 用 ELISA 间接筛选阳性杂交瘤。
7. 杂交瘤的克隆化, 以有限稀释法进行克隆化, 一般克隆化检测两次以上 100%阳性后, 扩增培养阳性杂交瘤, 收集细胞培养上清, 制备腹水。
8. 腹水的制备: 小鼠腹腔注射降植烷, 1-2 周腹腔注射杂交瘤细胞, 7-14 天可产生腹水, 取腹水, 2000rpm 离心 20min, 收集上清

二、ESC42 单克隆抗体的鉴定

1. 间接 ELISA 鉴定 mAb 的特异性及腹水的效价, 腹水梯度稀释后, 间接 ELISA 检测效价。
2. MAb 类和亚类的鉴定, 按照试剂盒说明书进行。
3. 辛酸硫酸铵沉淀法和离子交换层析法从腹水中纯化 mAb。
4. Western blot 鉴定 mAb 与 SDS-PAGE 蛋白的反应性。
5. 酶标抗体竞争结合实验检测 mAb 识别 ESC42 的表位。
6. 免疫组织化学的方法对 mAb 进行鉴定。
7. 免疫荧光染色法鉴定 mAb 与 ESC42 天然分子的反应性。

三、建立双 mAb 夹心 ELISA 方法, 用于检测细胞培养上清、正常人和患者精浆可溶型 ESC42 的水平并分析与疾病的关系。

四、建立免疫荧光检测法, 检测正常人和不育症精子 ESC42 蛋白的表达差异。

取正常人的精子液化后, 经生理盐水洗涤 2 遍, 取 10ul 进行涂片, 4%的多聚甲醛固定 2

0分钟。封闭液封闭10分钟，加ESC42单抗(1:1000)37°C 1小时，PBS洗涤3遍，加FITC标记的羊抗鼠-IgG(1:50)，37°C 1小时，PBS洗涤3遍，封片后在共聚焦显微镜下观察ESC42蛋白主要在精子头部和颈部表达。ESC42是分泌蛋白，我们通过抗ESC42抗体进行免疫定位，发现了ESC42在精子头颈部有明显的表达。说明精子在通过附睾的过程中与该蛋白结合。

实施例六：rhESC42蛋白的抗菌活性

1、微量稀释法细菌敏感试验：将标准菌株大肠埃希氏菌 ATCC25922，金黄色葡萄球菌 ATCC29213，铜绿假单胞菌 ATCC17853 以及临床分离耐药菌株大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌分别用生理盐水调整浓度为0.5号麦氏管浊度(10^8 CFU/ml)，再将菌液用LB培养基稀释成 10^5 CFU/ml，各取100 μ l于96孔板中；将蛋白浓度用LB培养基进行倍比稀释使每孔终浓度为100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 6 μ g/ml, 阴性对照为不加蛋白组。阳性对照为庆大霉素(4万u/ml)溶液。37°C过夜培养，次日，测OD490值显示，应用不同的蛋白浓度作用细菌，随着时间延长和蛋白浓度的增加其抑制率逐渐增加。

2、抑菌活性：将大肠杆菌 XL1-Blue 生长至对数期(OD=0.4)。用0.01mol PBS pH7.4稀释到工作浓度。与100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 10 μ g/ml, 5 μ g/ml 终浓度的分泌上清37°C 孵育过夜，PBS为阴性对照。分别将混合液铺于LB板上。37°C倒置过夜，次日早晨数克隆数。其抑制率按公式：

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{对照组克隆数} - \text{实验组克隆数}}{\text{对照组克隆数}} \times 100\%$$

通过计算发现，蛋白作用组的细菌克隆数为随着蛋白浓度的增高而减少，其抑制率与蛋白浓度成正相关。

3、电镜观察ESC42蛋白对细菌的作用：将 10^8 CFU/ml 大肠杆菌用10mM PBS pH7.4洗三遍，用50 μ g/ml ESC42蛋白37°C作用120分钟，孵育后，用10mM PBS pH7.4洗三遍，用等量的4%戊二醛固定，样本用0.1mol PB缓冲液洗一次；1%锇酸固定30分钟。常规电镜样品制备程序脱水、渗透、包埋、超薄切片，铀铅染色。透射电镜观察。ESC42蛋白作用的细菌形态变化呈时间依赖性，30分钟后，细菌表面发生皱褶，120分钟后细菌膜表面变的粗糙和肿胀。这些结构的变化进一步证明蛋白对细菌胞膜产生作用，使其渗透性发生改变。

实施例七：rhESC42蛋白的抗肿瘤活性

1、肿瘤细胞药物敏感实验(MTT法)：将标准肿瘤细胞株K562/S、K562/R、NB4分别进行复苏，传代，按 10^5 /ml细胞密度接种于96孔板中。次日，将蛋白浓度倍比稀释使每孔终浓度为100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 6 μ g/ml。65小时后加噻唑蓝(MTT)溶液，20 μ l/孔。继续孵育6小时，2000rpm/min 10分钟，去上清，加100 μ l/孔DMSO，振荡混匀。测OD490。计算杀伤率： $[1 - (\text{处理孔 AOD490} \div \text{对照孔 AOD490})] \times 100\%$ 。随着蛋白浓度的增加其杀伤效率逐渐上升，其MIC50最低抑制浓度为25 μ g/ml。

2、显微镜观察ESC42蛋白对肿瘤细胞的作用：收集经ESC42蛋白作用的肿瘤细胞，置离

心管中离心, 800-1000/min, 10 分钟; 用 0.01molPBS5ml 重悬细胞; 将细胞悬液吸入有琼脂空槽的离心管中; 800r/min, 10 min. 取出离心管内的琼脂块用戊二醛固定; 用 0.1mol PB 缓冲液洗一次; 1%锇酸固定 30 分钟。常规电镜样品制备程序脱水、渗透、包埋、超薄切片, 铀铅染色。透射电镜观察发现 ESC42 蛋白作用于靶细胞, 使胞膜通透性改变, 最终导致靶细胞死亡。光学显微镜观察, 未经 ESC42 蛋白作用的细胞生长旺盛, 细胞圆润; 经 ESC42 蛋白作用的细胞大部分损伤破裂。

3、流式细胞仪分析细胞周期: 分别取常规条件培养的和经 ESC42 蛋白 ($50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 4h 的 NB4 细胞, 经 PBS 洗涤、离心后, 将细胞注入振荡的 -20°C , $700\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙醇中固定, 制成单细胞悬液, 取该悬液 $100\mu\text{L}$, 加入碘化丙啶-DNA 荧光染液 $500\mu\text{L}$, 4°C 避光静置 30min, 进行 DNA 荧光染色, 经滤网过滤去除细胞团后上流式细胞仪, 进行细胞周期分析发现 NB4 细胞在经过 ESC42 作用后, 对细胞 S 期过程具有延迟或阻抑作用, 其 S 期细胞比例有所减少, 分析认为可能处于 DNA 合成期的细胞对 ESC42 更敏感。

表 1 ESC42 作用于 NB4 细胞的流式细胞仪分析 ($n=3, x\pm s, \%$)

分组	G ₁ 期	G ₂ 期	S 期
实验组	63.6±1.1	16.6±0.8	19.9±0.6 ^a
对照组	62.7±3.0	14.9±1.8	22.4±1.3

^a $P < 0.05$, vs 对照组.

4、rhESC42 蛋白的溶血实验: 取家兔血 2ml, 肝素抗凝, 用 2ml 生理盐水, 洗 3 遍, 2500rpm, 5 min. 将所得红细胞按其容积, 用生理盐水稀释成 5% 混悬液。加 $100\mu\text{l}$ /孔于 96 孔板中, 蛋白浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{g}/\text{ml}$, $2\mu\text{g}/\text{ml}$, $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$, $6\mu\text{g}/\text{ml}$, 阴性对照为生理盐水, 阳性对照为 1% triton X-100, 设三个重复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 次日, 测 OD490 值。10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白浓度作用 1h 后没有引起红细胞的裂解。阳性对照 1% triton X-100 导致红细胞完全裂解, 阴性对照生理盐水对红细胞无裂解作用。说明 rhESC42 蛋白对正常细胞无损伤作用。

序列表

1、一般信息

(i) 发明名称: ESC42 基因表达蛋白其制备方法和用途

(ii) 序列数目: 2

2、SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 589bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链性: 双链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

```

ctaccacctc ctgcttccca aggacatga aactcctgct gctggetctt cctatgettg 60
tgctcctacc ccaagtgate ccagcctata gtggtgaaaa aaaatgctgg aacagatcag 120
ggcactgcag gaaacaatgc aaagatggag aagcagtga agatacatgc aaaaatcttc 180
gagcttgctg cattccatcc aatgaagacc acaggcgagt tcctgcgaca tctcccacac 240
ccttgagtga ctcaacacca ggaattattg atgatatttt aacagtaagg ttcacgacag 300
actactttga agtaagcagc aagaaagata tggttgaaga gtctgaggcg ggaaggggaa 360
ctgagacctc tcttccaaat gttcaccata gctcatgact tcctctcggc tatcactcac 420
ccctgtcctc agagtgataa actaagtcac atacagataa agcactgaaa acaccacagt 480
gaccctccca cccccacca atatgtaatt ctattaatag aacagctgt gtaaagaagt 540
ctaaaatfff cactatttcc aatgataaac tcttcagtgc tcttcttga 589

```

3、SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 123aa

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 多肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

```

MKLLLLALPMLVLLPQVIPAYSGEKKCWNRSGHCRKQCKDGEAVKDTCKN 50
LRACCIPSNE DHRRVPATSP TPLSDSTPGIIDDILTVRFTTDYFEVSSKK 100
DMVEESEAGRG TETSLPNVHSS 123

```

专利名称(译)	ESC42蛋白及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN1840544A	公开(公告)日	2006-10-04
申请号	CN200510059634.5	申请日	2005-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	李建远		
申请(专利权)人(译)	李建远		
当前申请(专利权)人(译)	李建远		
[标]发明人	李建远 王海燕 沈肖方		
发明人	李建远 王海燕 沈肖方		
IPC分类号	C07K14/435 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/12 C12N15/70 C12N15/79 A61K38/17 A61P31/00 A61P35/00 A61P15/16 G01N33/53 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种新的人附睾特异表达蛋白ESC42及编码序列。该蛋白由人附睾特异表达基因ESC42所编码。本发明还公开了该蛋白的制备方法，可以用化学方法合成，也可以通过基因工程技术生产；还提供了采用单克隆抗体特异性检测ESC42蛋白的方法。另外，这种蛋白不仅可用于制备抗细菌、抗真菌、抗病毒和抗肿瘤药物，还为开发新的避孕药和治疗不育症提供新的靶位点。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{对照组克隆数} - \text{实验组克隆数}}{\text{对照组克隆数}} \times 100\%$$