



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101724047 A

(43) 申请公布日 2010.06.09

(21) 申请号 200810305152.7

A61P 15/16(2006.01)

(22) 申请日 2008.10.24

A61P 31/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(71) 申请人 李建远

地址 264000 山东省烟台市毓璜顶东路 20
号

(72) 发明人 李建远

(51) Int. Cl.

C07K 14/435(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 35/12(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

(54) 发明名称

人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 及其编码基因与应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术和医学领域。本发明公开了一种新的人附睾特异表达精子结合蛋白 HEL-190 及其制备和应用。公开了本发明编码 HEL-190 蛋白的氨基酸序列,提供携带编码本发明蛋白的 DNA 序列的重组表达载体。定位于成熟精子头后, RT-PCR 显示主要在附睾、睾丸、肝、脾、肾、胃多种组织均有特异性表达,但在心脏表达呈阴性。Western blot 在附睾检测到一条 21KD 左右条带。HEL-190 蛋白可作为免疫性避孕药的研发,以及男性不育症的临床诊断与治疗的靶蛋白。基于 HEL-190 蛋白开发的相应基因或蛋白检测方法,将广泛用于生殖医学研究领域。

1. 一种人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190, 其特征在于, 它具有序列表中序列 2 的氨基酸序列或将序列 2 的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有与序列 2 的氨基酸残基序列相同活性的序列 2 衍生的蛋白质和通过化学方法合成的蛋白质。

2. 一种人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 的编码基因, 它是下列核苷酸序列之一: 序列表中序列 1 的核苷酸序列;

与序列表中序列 1 限定的 DNA 序列具有 90% 以上同源性, 且编码相同功能蛋白的 DNA 序列。

3. 含有权利要求 2 所述基因的真核和原核表达载体。

4. 含有权利要求 2 所述基因的细胞系。

5. 针对权利要求 1 所述蛋白质所制备的各种抗体以及以该抗体为活性成分的试剂。

6. 针对权利要求 1 所述蛋白质提供的药物组合物, 所述组合物包含本发明所述的蛋白、核苷酸序列、构建物或细胞, 以及药学上可接受的载体。

7. 根据权利要求 1 所述的蛋白在不育症诊断中的应用。

8. 根据权利要求 1 所述的蛋白在不育症治疗中的应用。

9. 根据权利要求 2 所述的基因在开发新的避孕药物中的应用。

10. 根据权利要求 1 所述的蛋白在制备新的抗生素中的应用。

人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术与医学领域。具体地说,本发明涉及一种新的人附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 本世纪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,据世界卫生组织调查,大约 15% 的夫妇存在着不育问题,发达国家不育症的发病率在最近 10 年飚升,欧洲发达国家可高达 30%,其中男性因素约占一半。世界卫生组织预测,随着环境污染和性传播疾病等致病因素的增加,本世纪,不育症将成为仅次于肿瘤和心脑血管病的第三大疾病。但男性不育并未引起社会和医学界的足够重视,因此有关男性生殖健康的研究进展缓慢,明显落后于其它学科。缺少分子生物学层面诊断与治疗不育症的有效方法。由于精子发育障碍不能自然受精,需要医生通过做试管婴儿获取后代。利用此种技术获取后代,不仅耗费了宝贵的时间与资金,而且存在很多影响健康的潜在因素,失去了正常生育过程中精卵天然结合、优势选择遗传后代的机会。给家庭与社会带来了沉重的精神和经济负担。

[0003] 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。当前世界人口已超过 60 亿,据专家估计,中国资源环境能支撑的最大人口容量为 15-16 亿。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。发展安全有效、先进实用的避孕节育新技术、新产品,以满足不同人群、不同层次的避孕用药的个性化要求是近年来国内外避孕节育技术发展的总趋势。

[0004] 附睾是精子成熟的重要器官,睾丸产生的精子需要通过与附睾管腔微环境相互作用才能获得运动、受精、防御和维持正常胚胎发育以及防御等生物学功能。附睾内大约有 200 余种分泌蛋白与精子相互作用,参与精子成熟过程,但是人们对这些蛋白的功能知之甚少。与精子成熟相关的附睾蛋白的研究将有助于推动男性生殖医学的研究进展,为男性不育症的诊断和治疗以及开发新型避孕药物提供候选分子靶标,同时有可能对附睾环节的男性避孕带来新的思路和突破。

发明内容

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种新的人附睾表达精子结合蛋白 HEL-190。

[0006] 一种人附睾表达精子结合蛋白 HEL-190,它具有序列表中序列 2 的氨基酸序列或将序列 2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有与序列 2 的氨基酸残基序列相同活性的由序列 2 衍生的蛋白质或多肽。

[0007] 本发明的人附睾分泌蛋白命名为:HEL-190,由 218 个氨基酸残基组成。HEL-190 蛋白存在有 1 个 Amidation 位点,1 个 N-十四烷酰基化位点和 8 个磷酸化位点,包括 5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点以及 3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点。另外,该蛋白还有 1 个 NADPHoxidase V 功能域,1 个 EF-hand calcium-binding 功能域。

[0008] 本发明的第二个目的是提供编码人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 的基因。它是下列核苷酸序列之一：

[0009] 序列表中序列 1 的 DNA 序列, GenBank 注册号为 :EU668337 ;

[0010] 编码序列表中 SEQ ID No. 2 蛋白质序列的多核苷酸 ;

[0011] 与序列表中序列 1 限定的 DNA 序列具有 90% 以上同源性, 且编码相同功能蛋白质的 DNA 序列。

[0012] 序列表中的 SEQID No. 1, 全长 cDNA 序列为 4732bp, 定位于人 12 号染色体上, 编码 218 个氨基酸, 编码蛋白为 HEL-190, 含有信号肽, 其开放阅读框为 657bp, 是一个完整的读码框。

[0013] 本发明的第三方面, 提供了采用基因工程技术制备具有人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 活性多肽的方法, 它包括含有上述多核苷酸序列的载体, 以及被该载体转化或转导的宿主细胞。

[0014] 本发明的第四方面, 提供了与上述人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 特异性结合的抗体, 以及由此开发的用于附睾功能异常所致的不育症的辅助诊断。

[0015] 本发明的第五方面, 提供了检测样本中是否存在人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 的方法, 它包括 : 将待测样品与分泌蛋白的特异性抗体在一定条件下共同作用, 观察是否形成抗原抗体复合物, 有抗原抗体复合物形成就提示样品中存在分泌蛋白。

[0016] 本发明的第六方面, 提供了本发明蛋白和其编码序列的用途。例如本发明蛋白可被作为诊断不育症的分子靶点, 或作为有效药物成分用于治疗不育症, 或作为开发新型避孕药物的靶分子, 或被用于筛选促进人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 活性的激动剂, 或被用于筛选抑制人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 活性的拮抗剂, 或被用于肽指纹图谱鉴定。根据人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 的编码序列或其片段, 可设计引物或探针用于 PCR 或核酸杂交, 或者用于制备基因芯片。本发明蛋白还可用于药物组合物, 以此作为有效活性成分, 用于生产一种对抗病原微生物感染以及肿瘤等疾病的药物。

[0017] 本发明的第七方面, 提供了一种药物组合物, 所述组合物包含本发明所述的蛋白、核苷酸序列、构建物或细胞, 以及药学上可接受的载体。

[0018] 本发明的蛋白能够在附睾内特异性表达, 定位于精子头后区域, 因此可能与运动有关。因为它是一种天然的蛋白多肽, 可以预见可能具有较少的副作用, 本发明的其他优点可从以下的详细描述获知。

附图说明

[0019] 图 1. HEL-190 蛋白在人精子上的免疫荧光定位

[0020] 红色荧光显示精子核 ; 绿色荧光显示 HEL-190 蛋白在精子上的定位 ;

[0021] A 组 : 阳性对照, A3 显示 HEL-75 蛋白结合于整个精子 (文章已发表) ;

[0022] B 组 : 阴性对照。

[0023] C 组 : HEL-190 蛋白定位, C3. 显示 HEL-190 蛋白结合在精子头后区域。

[0024] 比例尺 : 5mm。

[0025] 图 2HEL-190 基因组织表达图谱

[0026] 1 附睾头 2 附睾体 3 附睾尾 4 睾丸 5 心 6 肝 7 脾 8 肾 9 胃 10 阴性对照

[0027] 图 3. HEL-190 蛋白在附睾液表达的 western blot 结果

[0028] M:Marker ;1:阳性对照, HEL-75 蛋白 ;2:阴性对照, 小鼠血清 ;3:HEL-190 蛋白

[0029] 本发明的蛋白包括了所述蛋白多肽的具有相同或相似性生物活性或功能的变异形式, 这些变异形式包括 (但并不限于): 相对于天然蛋白的氨基酸序列有若干个 (通常为 1-50 个, 较佳地 1-30 个, 更佳地 1-20 个, 最佳的 1-10 个) 氨基酸的缺失、插入和取代。另外, 所述缺失或插入 (增加) 也可发生在 C 末端和 / 或 N 末端 (通常有 20 个以内, 较佳地为 10 个以内, 更佳地为 5 个以内的氨基酸缺失或增加), 在本领域中, 用性能相近或相似的氨基酸进行取代时, 通常不会改变氨基酸的功能, 提供功能相似氨基酸的保守性置换表是本领域所熟知的。下列 5 组各自含有能相互保守置换的氨基酸; 脂族: 甘氨酸 (G)、丙氨酸 (A)、缬氨酸 (V)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I); 芳族: 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W); 含硫: 甲硫氨酸 (M)、半胱氨酸 (C); 碱性: 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K)、组氨酸 (H); 酸性: 天冬氨酸 (D)、谷氨酰胺 (Q)。另外, 该术语还包括了蛋白的片段或衍生物, 条件是该片段或衍生物保留了所希望的蛋白生物活性。

[0030] 本发明的核苷酸序列通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法, 可根据本发明所公开的有关核苷酸序列, 尤其是开放阅读框序列来设计引物, 用本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 文库作为模板, 扩增而得有关序列。这通常是将其克隆入载体, 再转入细胞, 然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0031] 本发明中, 使用本领域技术人员已知的常规方法将包含编码本发明的蛋白的核苷酸序列插入到载体中, 这些方法包括但不限于体外重组 DNA 技术, 体内重组技术等。

[0032] 上述载体可用于转化或转染适当的原核和真核细胞, 以使其能够表达所编码的本发明的蛋白, 宿主细胞可以是原核细胞, 如细菌细胞, 或是低等真核细胞, 如酵母细胞; 或是高等真核细胞, 如昆虫细胞等。可采用的转化、转染方法包括但不限于: 磷酸钙共沉淀法、显微注射、电穿孔、脂质体介导等。

[0033] 本发明的蛋白在细胞内表达, 如果需要, 可利用其物理的、化学的和其他特性通过各种方法分离和纯化表达产物, 这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于: 常规的复性处理、用常规的蛋白沉淀剂处理 (盐析方法)、离心、渗透破菌、声波破菌、超离心、分子筛层析、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析和其它各种层析技术及这些方法的结合。

[0034] 本发明还包括对蛋白或其片段具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体, 还包括具有免疫活性的抗体片段或嵌合抗体, 如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

[0035] 本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如, 纯化的基因产物或者其具有抗原性的片段, 可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生, 本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备。

[0036] 发明人通过研究进一步发现, 该蛋白定位于成熟精子头后区域 (图 1), RT-PCR 结果显示该基因主要在附睾、睾丸、肝、脾、肾、胃多种组织均有特异性表达, 但在心脏表达呈阴性 (图 2)。发明人在大肠杆菌中表达了人 HEL-190 蛋白, 用其免疫小鼠, 获得了其多抗血清。发明人用 Western blot 在附睾体部检测到一条 21KD 左右条带 (图 3)。

[0037] 本发明的药物组合可根据各种需要制成各种剂型,通常可将药物组合物制成可注射剂,例如液体溶液或悬浮液;还可制成在注射前适合配入溶液或悬液中、溶液载体的固体形式,脂质体也包括在药学上可接受的载体的定义中,本发明的药物组合物可由医师根据患者种类、年龄、体重和大致疾病状况、给药方式等因素确定对病人有益的剂量进行施用,为了提高用药效果,本发明的蛋白也可以与其他药物共同使用。

[0038] 下面结合具体实例,进一步阐述本发明,应理解这些实例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围,除非另有描述,本发明的实施将采用分子生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术,这些均是本领域技术人员所知的。这些技术在下面文献中有完整的描述:例如 Sambrook 《分子克隆实验指南》第二版(1989);《DNA 克隆》第 I 和第 II 卷(D. N. Glover 编辑,1985);《寡核苷酸合成》(M. J. Gait 编辑,1984);《核酸杂交》(B. D. Hames 和 S. J. Higgins 编辑,1984);《蛋白质纯化:原理和实践》第 2 版(Spring-Verlag, N. Y.), 以及《实验免疫学手册》I-IV 卷(D. C. Weir 和 C. C. Blackwell 编辑 1986) 或者,可以按照试剂生产商所提供的说明书进行。

具体实施方式

[0039] 实施例 1. 采用基因工程技术制备人类附睾表达蛋白 HEL-190

[0040] 基因克隆及序列分析

[0041] 对本实验室构建的人附睾 cDNA 文库进行大规模测序筛选,获取表达序列标签(EST),利用 Unigene 数据库进行电子克隆,获得人 HEL-190 全长 cDNA。使用 ExPASy Translate tool(<http://us.expasy.org>), InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/Tools>) 和 Protein 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 等预测 HEL-190 肽序列及假定功能。SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk>), PSORTII 和 WoLFPSORT(<http://psort.nibb.ac.jp>) 等软件分析预测该蛋白的信号肽及胞内定位。ProfileScan(<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) 预测 N 端糖基化和磷酸化位点。

[0042] 对获得的人 HEL-190 全长 cDNA,根据生物信息学预测 HEL-190 编码区,设计一对特异引物:F01:5'-TTGGTACCGACGACGACACAAG GAGCTGTCCCCCGCAG-3',F02:5'-GCGGCGAATTCGAACAGGCATGAGAGG-3',,上下游引物两端分别引进限制性内切酶位点 KpnI 和 EcoRI。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。以本实验室构建的人附睾 cDNA 文库为模板,PCR 扩增 HEL-190 基因片段。PCR 反应条件:94℃ 预变性 10min,(94℃,40s;55℃,45s;70℃,30s)30 个循环,70℃延伸 10min,4℃保存。反应结束后,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测并分离回收目的片段,插入克隆载体 pMD-18T 中进行测序鉴定。

[0043] 重组 HEL-190 蛋白表达及纯化

[0044] 测序鉴定后 HEL-190 基因通过 KpnI 和 EcoRI 位点克隆至表达载体 pET-32b(+) 中,使其与融合标签阅读框一致。重组表达载体 pET32b(+)-HEL-190 转入 E. coli BL21(DE3) 感受态细胞,利用菌落 PCR 筛选阳性克隆,工程菌株在 1mM IPTG,32℃ 条件下诱导 4h 后,N 端带有 His-tag 的重组蛋白通过“两步镍亲和层析法”对重组 HEL-190 蛋白进行分离纯化。简单地说,“第一步亲和层析”用于纯化重组 Trx-HEL-190 融合蛋白。然后融合蛋白用重组

肠激酶裂解,释放融合标签。最后,运用“第二步亲和层析”回收重组 HEL-190 蛋白。纯化后的重组蛋白用 Bradford(Bradford 1976) 法进行定量,然后用冷冻干燥进行保存。

[0045] 实施例 2. 抗 HEL-190 多克隆抗血清的制备

[0046] 用重组 HEL-190 蛋白免疫 BALB/C 小鼠制备多抗。简单地说,每只老鼠于第 1 天注射 50 μ g 重组蛋白与等量的完全福氏佐剂(CFA)。然后在第 15, 30 和 45 天注射 25 μ g 重组蛋白和等量的不完全福氏佐剂(IFA) 加强免疫。第 60 天从眼球取血,分离血清后用 ELISA 和 western blot 分析抗体的效价和特异性。ELISA 分析表明抗体效价达到 1 : 10000。Westernblot 显示对重组蛋白和从人附睾液中抽取的天然 HEL-190 都具有良好的特异性。

[0047] 实施例 3. 人 HEL-190mRNA 组织表达谱研究

[0048] 为了确定 HEL-190 的表达模式,采用半定量 RT-PCR 分析 HEL-190 基因在人附睾头、体、尾,睾丸,心,肝,脾,肺,肾,胃等组织中的表达差异。用 TRIzol(Tiagen, Beijing, China) 抽提总 RNA,1 μ g 总 RNA 用 20UAMV 逆转录酶(Promega) 和 0.3 μ g oligod_T18(Promega) 反转录成 cDNA。然后,2 μ l 合成的 cDNA 利用基因特异引物进行 PCR 扩增。20 μ l 反应体系含有:2 μ l 10 $\times$ PCR buffer(with MgCl₂),2 μ l dNTP Mix(10mmol/L),1 μ l 每个引物(25 μ mol/L),1 μ l Taq DNA 聚合酶(2.5U/ μ l),2 μ lcDNA 模板以及 11 μ l ddH₂O。PCR 反应的程序为:94 $^{\circ}$ C, 10min;94 $^{\circ}$ C, 1min;54 $^{\circ}$ C (对 HEL-190)/49 $^{\circ}$ C (β actin) 30s;72 $^{\circ}$ C, 1min(35 循环);72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。 β -actin 的表达作为内参。所有 PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖电泳分析。RT-PCR 结果显示该基因主要在附睾、睾丸、肝、脾、肾、胃多种组织均有特异性表达,但在心脏表达呈阴性。

[0049] 实施例 4. 人 HEL-190 蛋白在组织的免疫荧光定位

[0050] 取人睾丸、附睾组织冰冻切片,进行免疫荧光染色,其中一抗为鼠抗 rHEL-190 多抗(1 : 400),二抗为 FITC- 标记羊抗鼠 IgG(1 : 200),细胞核用 PI 染色。染色后所有的切片用 80% 甘油封片,然后用共聚焦显微镜(Leica TCS SP2A0BS) 观察结果。实验同时以小鼠免疫前血清替代一抗作为阴性对照。

[0051] 实施例 5. 人附睾蛋白提取物与 Western blot

[0052] 将从人附睾液中提取的总蛋白抽提物 20 μ g,用 15% SDS-PAGE 分离,然后湿转到 PVDF 膜上进行 western blot。鼠抗人 HEL-190 多抗为一抗(1 : 5000),二抗为 HRP- 标记羊抗鼠 IgG(1 : 500)。辣根过氧化酶的活性用增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒分析 Western blot 显示抗人 HEL-190 多抗对重组蛋白和从人附睾液中抽取的天然 HEL-190 都具有良好的特异性。

[0053] 实施例 6. 人 HEL-190 蛋白在精子的免疫荧光定位

[0054] 收集精子用 PBS 洗涤后涂布于 1% 明胶包被的载玻片上,自然晾干,然后用甲醇固定 10 分钟。含有精子的载玻片用 3% BSA 在室温下封闭 1 小时,然后添加鼠抗 rhBD32 多抗(1 : 200),4 $^{\circ}$ C 过夜。免疫前小鼠血清做阴性对照。用 PBST(PBS containing 0.1% Tween-20) 洗涤三次,加入对应的 FITC- 标记羊抗鼠 IgG 二抗(1 : 200)。载玻片用 PBST 洗涤三次,然后用 80% 甘油封片。用 Olympus BX-52 显微镜观察,HEL-190 蛋白结合在精子头后区。

[0055] 实施例 7. HEL-190 重组蛋白的抗菌活性

[0056] 运用克隆菌落形成单位(CFU) 分析抗菌活性。简单地说,过夜培养的 E. coli

XL-1blue 生长到对数期 ($OD_{600} = 0.4-0.5$) 后用 10mM PBS (pH 7.4) 稀释。大约 2×10^6 CFU/ml 细菌在与 12.5 ~ 100ug/ml 的 HEL-190 混合, 37℃ 培养。在开始培养后的 15, 30, 60 and 120min 分别在取样。将样品用 10mM PBS (pH 7.4) 做系列稀释, 每个稀释度取 100ul 涂布于 LB 琼脂平板, 37℃ 培养过夜至形成单菌落。统计菌落个数, 抗菌活性用细菌存活的百分数表示, 公式为: %存活 = (蛋白处理后存活克隆数 / 未经蛋白处理后存活的克隆数) $\times 100$ 。实验以 10mM PBS (pH 7.4) 代替蛋白处理细菌作为阴性对照。

[0057] 实施例 8HEL-190 与精子运动性以及体外受精的关系研究

[0058] 利用 HEL-190 多抗封闭正常人精子, 然后进行精子运动性和体外受精分析。实验按照 vitro life 标准试剂盒提供的方法进行。简单地说, 精子先用 SpermRinse-30 于 37℃、5% CO₂ 培养 1 小时获能。然后按照 1 : 200 加入鼠抗 rHEL-190 多抗, 于 37℃、6% CO₂ 培养 2 小时进行封闭。封闭后的精子分成两部分, 一部分直接利用计算机辅助系统分析精子的运动性。另一部分用 G-Fert 洗涤 2 次, 并调整至终浓度为 1.0×10^7 cells/ml。加入 100ug 精子样品于 35mm 的培养皿中, 然后覆盖石蜡油放入 37℃、6% CO₂ 和饱和湿度培养箱内待用。经 G-MOPS 处理后成熟卵母细胞加入预先准备好的受精滴中, 在 37℃、6% CO₂ 和饱和湿度培养箱中培养观察受精情况, 每日记录胚胎发育情况。以上所有实验同时用免疫前小鼠血清作为阴性对照。

[0059] 序列表

[0060] <110> 李建远

[0061] <120> 人类附睾表达精子结合蛋白 HEL-190 及其编码基因与应用

 $[0062] \quad \langle 160 \rangle_2$

[0063] <170>PatentIn version 3.5

[0064] $\langle 210 \rangle_1$

[0065] <211>4732

[0066] <212>DNA

[0067] <213> 人属人种 (homo sapiens)

[0068] $\langle 220 \rangle$

[0069] <221>CDS

[0070] $\langle 222 \rangle$ (163).. (819)

[0071] <400>1

[0072] gcggcagcag cagcgggcggt gcggagagct tggactggga gcccaaagct cggctgggca 60

[0073] gcgggagagg aggagccgca ggagctgcag ctctgccagc ttgggcccag cctagagaca 120

[0074] ccggcctggc tggtcacgc cagccgcaga ccgtggctga gc atg gag ctg tcc 174

Met Glu Leu Ser

[0076] 1

[0077] ccc cgc agt cct ccg gag atg ctg gag gag tcg gat tgc ccg tea ccc 222

[0078] Pro Arg Ser Pro Pro Glu Met Leu Glu Glu Ser Asp Cys Pro Ser Pro

[0079] 5 10 15 20

[0080] ctg gag ctg aag tca gcc ccc agc aag aag atg tgg att aag ctt cgg 270

[0081] Leu Glu Leu Lys Ser Ala Pro Ser Lys Lys Met Trp Ile Lys Leu Arg

[0082]	25	30	35	
[0083]	tct ctg ctg cgc tac atg gtg aag cag ttg gag aat ggg gag ata aac			318
[0084]	Ser Leu Leu Arg Tyr Met Val Lys Gln Leu Glu Asn Gly Glu Ile Asn			
[0085]	40	45	50	
[0086]	att gag gag ctg aag aaa aat ctg gag tac aca gct tct ctg ctg gaa			366
[0087]	Ile Glu Glu Leu Lys Lys Asn Leu Glu Tyr Thr Ala Ser Leu Leu Glu			
[0088]	55	60	65	
[0089]	gcc gtc tac ata gat gag aca cgg caa atc ttg gac acg gag gac gag			414
[0090]	Ala Val Tyr Ile Asp Glu Thr Arg Gln Ile Leu Asp Thr Glu Asp Glu			
[0091]	70	75	80	
[0092]	ctg cag gag ctg cgg tca gat gcc gtg cct tcg gag gtg cgg gac tgg			462
[0093]	Leu Gln Glu Leu Arg Ser Asp Ala Val Pro Ser Glu Val Arg Asp Trp			
[0094]	85	90	95	100
[0095]	ctg gcc tcc acc ttc acc cag cag gcc cgg gcc aaa ggc cgc cga gca			510
[0096]	Leu Ala Ser Thr Phe Thr Gln Gln Ala Arg Ala Lys Gly Arg Arg Ala			
[0097]	105	110	115	
[0098]	gag gag aag ccc aag ttc cga agc att gtg cac gct gtg cag gct ggg			558
[0099]	Glu Glu Lys Pro Lys Phe Arg Ser Ile Val His Ala Val Gln Ala Gly			
[0100]	120	125	130	
[0101]	atc ttc gtg gaa cgg atg ttc cgg aga aca tac acc tct gtg ggc ccc			606
[0102]	Ile Phe Val Glu Arg Met Phe Arg Arg Thr Tyr Thr Ser Val Gly Pro			
[0103]	135	140	145	
[0104]	act tac tct act gcg gtt ctc aac tgt ctc aag aac ctg gat ctc tgg			654
[0105]	Thr Tyr Ser Thr Ala Val Leu Asn Cys Leu Lys Asn Leu Asp Leu Trp			
[0106]	150	155	160	
[0107]	tgc ttt gat gtc ttt tcc ttg aac cag gca gca gat gac cat gcc ctg			702
[0108]	Cys Phe Asp Val Phe Ser Leu Asn Gln Ala Ala Asp Asp His Ala Leu			
[0109]	165	170	175	180
[0110]	agg acc att gtt ttt gag ttg ctg act cgg cat aac ctc atc agc cgc			750
[0111]	Arg Thr Ile Val Phe Glu Leu Leu Thr Arg His Asn Leu Ile Ser Arg			
[0112]	185	190	195	
[0113]	ttc aag gtt ggg cag cat cct acc tct acc tcc agg cag gat tct cca			798
[0114]	Phe Lys Val Gly Gln His Pro Thr Ser Thr Ser Arg Gln Asp Ser Pro			
[0115]	200	205	210	
[0116]	ctc ctc tea tgc ctg ttc taa aagcctccca acaaacagat tccatagatc			849
[0117]	Leu Leu Ser Cys Leu Phe			
[0118]	215			
[0119]	ccctcactca gtetcaacat cagggaagtc tccccatgcc cacgcccagc ctagecctttc			909
[0120]	tttcacttgc tgcagtctta gtccagact tcattaattg atttctaggg ggagattctc			969

[0121]	ggtctgcaac catctagcct gggattctgc tctctcccgc tttgcttttt tcccccaact	1029
[0122]	tgctctctct aggcctgactt gcagtggtga cactggaggc ctggagttca gatgctgtca	1089
[0123]	gccagtgccc tttgggacta gaaaccatgt ttcttgata aaattggcca ctccctcccc	1149
[0124]	cgtcccccag ttctggctct tgtgcaagga attatataga gaaggtcagc tcttgacagg	1209
[0125]	gctcggggcg ggggcttgta tgacaggggg acggtgtgtg aacttcattt gctcttcagc	1269
[0126]	ttgtctggat gggaagaatt atatgagatt aagtccttcc tagatcctgt accaggagg	1329
[0127]	agcatctttt gggaggga aaagtccagg aaaaaaaca aacactttca catggacaaa	1389
[0128]	tcacatttgg aagtagaggg tgaggagggt tgaagagccg taatggggat attgggtcag	1449
[0129]	cactttgggg agcagtagat gttaaagggt aagggaacg tggatgatct gaagggccat	1509
[0130]	agagaggggc ggtcaaagga gtccagggtg agggctcccct cccaggccgg cttcgggagg	1569
[0131]	tcattccatc catcctctgc ctccacttca ctagaacaaa ttatctgtgc atgtaagccc	1629
[0132]	ttccttcacc ctgactcct ccttttaca caactcccta gggagtctcc aaaactttcc	1689
[0133]	tgagatgctc agctgaaatt ttcttaagt cctccggaa gcctgttctg caattttact	1749
[0134]	ttcttcttcc caatcctgcc ctctccagga cagagaatag tagggctctc tttttcctaa	1809
[0135]	gacttttccc agctcatgtt tccccaaact ggctctcaga cttcagtcac tagattctcc	1869
[0136]	taaactctgc ctcttacct ggaaggactg ggtctggggg acctcaagag tagctgtttt	1929
[0137]	gggttaggtt tggcccagtc ccagctctgt ttgtccaag gcagttagag gaaggagggg	1989
[0138]	gtgcttcttg ttttagtttt ctctgatgat agggccagca gcagctgccc ttctcaaact	2049
[0139]	ccacattctt ttcttgggca cctagcccct cccctactcc tccctttttc ttcccttccc	2109
[0140]	tccagggacg ccatggcaac gcaaaagcaa gggcagttgt catggaaaca gtcctttaa	2169
[0141]	atttctgaa tttggggcac agccctccag ggggtcgggt ggggatgtt agggctctgac	2229
[0142]	tgactagtgg tgcttcttct gtgtctctgt cactatattg ctcatctcta cagaaacctc	2289
[0143]	ccgagtctg aaccttcgtc cctctctagc ctcaagagat tcaggacag atcaccagtc	2349
[0144]	ctgtcctctg ggagccttga gccttttgaa ggaggcagac atacctaag ggcgtacaca	2409
[0145]	gagacagggc ccgattcag agtagctgga cagagctctg gctgctgggtg cttttgtgtg	2469
[0146]	tgttctgtgg gactgagggc gcgggtactg gtgcatgtag agggtaagt gtcaggagg	2529
[0147]	gcaaccacaa tctggctgga agagtctct ctaggtcctc ttcttcattc ccttacttcc	2589
[0148]	gagcccttct tcatggtttt ggatgtgggg atggagtggg atgttttgaa ggtaggagg	2649
[0149]	aagctttctt tcattttctt tgaaatctcc agggaaataa taataattat agctattctt	2709
[0150]	tagagagcat ttactaaatg ccttgtactt atctcattaa ttccaggta ggtggtatta	2769
[0151]	tctttcattc tgcaattaag tatctgagc acagagaggc atgtgactta cccaaggttg	2829
[0152]	cacagccagc aggtggtaga ggcaggatat gagccagggt cacctaacta ggttctgtgc	2889
[0153]	tctctcccta tgcacactg ccttctaaag aaagtgttg atctcggtcc gtaatcacca	2949
[0154]	ccattcctgt ggatccttga tatactcca tttcccctaa cteccgcag attccactg	3009
[0155]	tgtttttgat gagtttctg gatgccttgg agacaggcta tgggaagtac aagaatcctt	3069
[0156]	accacaacca gatccacgca gccgatgtta ccagacagc ccatgtcttc ttgctccgca	3129
[0157]	cagggatggt gcactgcctg tcggagattg agtctctggc catcatcttt gctgcagcta	3189
[0158]	tccatgatta tgagcacacg ggcactacca acagcttcca catccagacc aagtcagaat	3249
[0159]	gtgccatcgt gtacaatgat cgttcagtgc tggagaatca ccacatcagc tctgttttcc	3309

[0160]	gattgatgca ggatgatgag atgaacattt tcatcaacct caccaaggat gagttttag	3369
[0161]	aactccgagc cctggtcatt gagatggtgt tggccacaga catgtcctgc catttcagc	3429
[0162]	aagtgaagac catgaagaca gccttgcaac agctggagag gtggcatctg gtggggtgtg	3489
[0163]	gctggggcca ggccagaggg aggggtgtgt gaactggggg ggtatacaca agggtagttg	3549
[0164]	gtgtgccagg tctttacctc gctgtagaga ctccactggc ttcaggtatc agactgcatc	3609
[0165]	tctatgtgag agagagagag agagagtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg	3669
[0166]	tccttacgtt tactcacagc cttggcagct gatccactgg agagtgcctt gggctgggaa	3729
[0167]	tctaagatgg gggttctcat cgtagctctg ggacaggctt actctggaat gttggaaaat	3789
[0168]	tcattcaacc cttctgcccc agttttatta cctctgaaat ggtgaaaatg atacgcctcc	3849
[0169]	ccccacaaca gcttccccct agttcctagt ctcatagggc tattgggaga gtcatacag	3909
[0170]	gtttaaaaaa atgcatagaa caaatgccat aattacatct aatgttgctt agaagtgagt	3969
[0171]	gggaatgtat aaatgtgtgt gagagtggac tgtgtgtgtg tgtgtcctga aggtgtgtgt	4029
[0172]	taatctctgt gtaagggtgt tatgtgtggg atgcagtgtc acagcgggtc attgttgagg	4089
[0173]	gtataataat aattattact attctagata atatctactg agcacttatt atgtgctaga	4149
[0174]	cactctcctg aatacttatt tgttgtttgt cacttaattc tcagaaccac tcgatatgtg	4209
[0175]	gtagggttgt tatttccatt ttagagttga agaaaatgaa atatggaaat ttaaagtaac	4269
[0176]	ttgctcagtg tcacgcggct aacatgtggt aggtatagac gtgaaccag gccctttgat	4329
[0177]	tctaagagcc tgggctctca gctactaacc cgtgctgcta cctaaacata tataagtgtg	4389
[0178]	tgtgtgtctg tgtgtgggt gtgtgtgtg ctttgagggt tgtttgaagt tatgtgaggc	4449
[0179]	cgggcgtggt ggctcatgcc tataattcca gcactttggg aggccgaggc aggtggatag	4509
[0180]	cttgaggtea ggaatttgag accagcctgg ccaacacggt gaaacactgt ctctacaaa	4569
[0181]	aaaatacaaa aattagctgg gtgtggtggc atgcacgcct gtagtcccag ctattcggga	4629
[0182]	ggctgagggt ggagaatcac ttgaaccag gtgacagagg ttgcagtgtg ctgagattgt	4689
[0183]	gccactgcac tccagcccgg gcaacagagt gagaccctgt etc	4732
[0184]	<210>2	
[0185]	<211>218	
[0186]	<212>PRT	
[0187]	<213> 人属人种 (homo sapiens)	
[0188]	<400>2	
[0189]	Met Glu Leu Ser Pro Arg Ser Pro Pro Glu Met Leu Glu Glu Ser Asp	
[0190]	1 5 10 15	
[0191]	Cys Pro Ser Pro Leu Glu Leu Lys Ser Ala Pro Ser Lys Lys Met Trp	
[0192]	20 25 30	
[0193]	Ile Lys Leu Arg Ser Leu Leu Arg Tyr Met Val Lys Gln Leu Glu Asn	
[0194]	35 40 45	
[0195]	Gly Glu Ile Asn Ile Glu Glu Leu Lys Lys Asn Leu Glu Tyr Thr Ala	
[0196]	50 55 60	
[0197]	Ser Leu Leu Glu Ala Val Tyr Ile Asp Glu Thr Arg Gln Ile Leu Asp	
[0198]	65 70 75 80	

[0199] Thr Glu Asp Glu Leu Gln Glu Leu Arg Ser Asp Ala Val Pro Ser Glu
[0200] 85 90 95
[0201] Val Arg Asp Trp Leu Ala Ser Thr Phe Thr Gln Gln Ala Arg Ala Lys
[0202] 100 105 110
[0203] Gly Arg Arg Ala Glu Glu Lys Pro Lys Phe Arg Ser Ile Val His Ala
[0204] 115 120 125
[0205] Val Gln Ala Gly Ile Phe Val Glu Arg Met Phe Arg Arg Thr Tyr Thr
[0206] 130 135 140
[0207] Ser Val Gly Pro Thr Tyr Ser Thr Ala Val Leu Asn Cys Leu Lys Asn
[0208] 145 150 155 160
[0209] Leu Asp Leu Trp Cys Phe Asp Val Phe Ser Leu Asn Gln Ala Ala Asp
[0210] 165 170 175
[0211] Asp His Ala Leu Arg Thr Ile Val Phe Glu Leu Leu Thr Arg His Asn
[0212] 180 185 190
[0213] Leu Ile Ser Arg Phe Lys Val Gly Gln His Pro Thr Ser Thr Ser Arg
[0214] 195 200 205
[0215] Gln Asp Ser Pro Leu Leu Ser Cys Leu Phe
[0216] 210 215

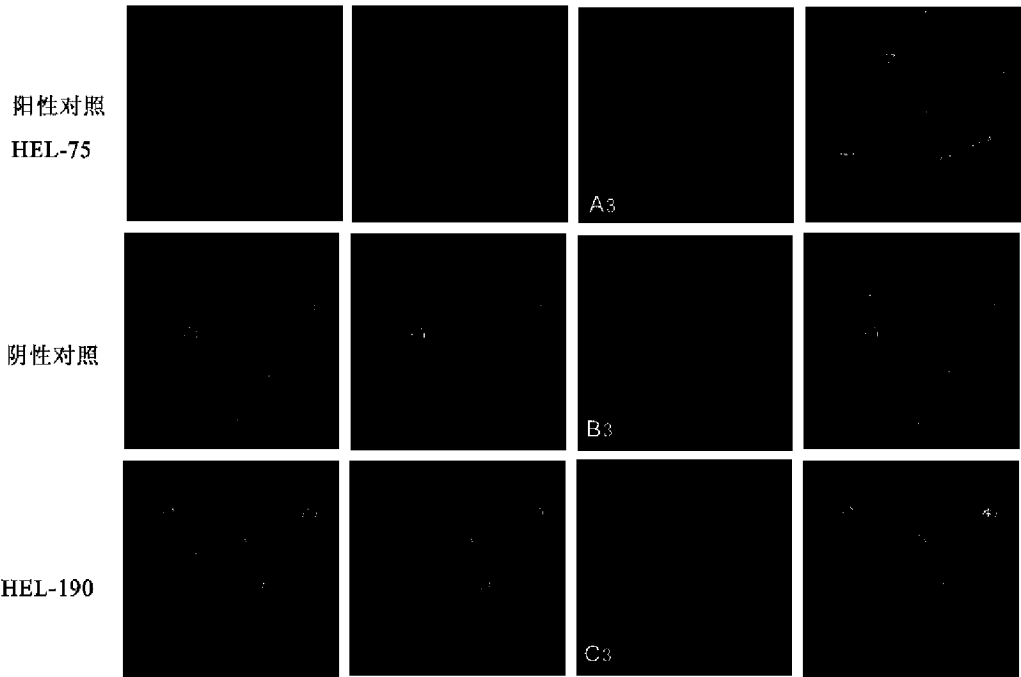


图 1



图 2

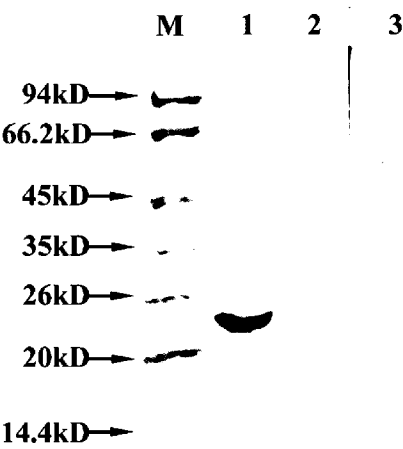


图 3

专利名称(译)	人类附睾表达精子结合蛋白HEL-190及其编码基因与应用		
公开(公告)号	CN101724047A	公开(公告)日	2010-06-09
申请号	CN200810305152.7	申请日	2008-10-24
[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		
发明人	李建远		
IPC分类号	C07K14/435 C12N15/12 C12N15/63 C12N5/10 C07K16/18 A61K38/17 A61K31/7088 A61K48/00 A61K35/12 A61P15/16 A61P31/00 G01N33/53 A61K35/48		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术和医学领域。本发明公开了一种新的人附睾特异表达精子结合蛋白HEL-190及其制备和应用。公开了本发明编码HEL-190蛋白的氨基酸序列，提供携带编码本发明蛋白的DNA序列的重组表达载体。定位于成熟精子头后，RT-PCR显示主要在附睾、睾丸、肝、脾、肾、胃多种组织均有特异性表达，但在心脏表达呈阴性。Western blot在附睾检测到一条21KD左右条带。HEL-190蛋白可作为免疫性避孕药的研发，以及男性不育症的临床诊断与治疗的靶蛋白。基于HEL-190蛋白开发的相应基因或蛋白检测方法，将广泛用于生殖医学研究领域。