



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103772509 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201410023632. X

C12N 15/70(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 01. 20

C12N 1/21(2006. 01)

(71) 申请人 山东国际生物科技园发展有限公司

G01N 33/53(2006. 01)

地址 264670 山东省烟台市高新区科技大道
39号

A61K 39/08(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

A61P 1/12(2006. 01)

(72) 发明人 冯东晓 成岩 孙君波 刘枫

杨小平 刘红 王晓玉 张淑敏

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

C07K 16/12(2006. 01)

C07K 1/22(2006. 01)

C12N 15/62(2006. 01)

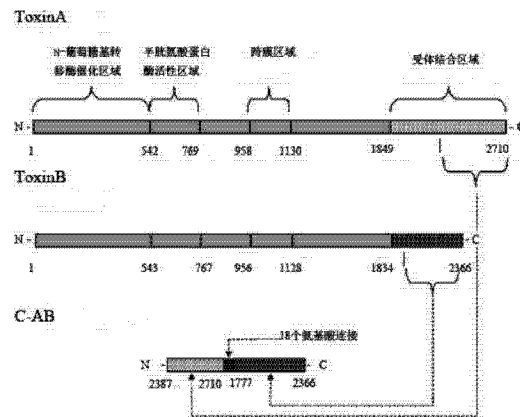
权利要求书1页 说明书26页 附图8页

(54) 发明名称

一种艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白及其编码
基因与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白及其编码基因与应用,其中,艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的序列如 SEQ ID NO :2 所示;编码基因如 SEQ ID NO :1 所示。在本发明中,通过 PCR 扩增分段获得经密码子改造后的艰难梭菌毒素 A 羧基端基因与原核表达载体 pET32b (+) 组成的载体片段、艰难梭菌毒素 B 羧基端结构域与柔性链的融合基因片段,获得的融合片段及获得的载体分别酶切回收连接,获得重组表达质粒 pET32b (+)-ToxA-ToxB,重组质粒转化表达宿主 BL21 (DE3) 菌株后可被 IPTG 诱导表达得到艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白。本发明的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白不仅可以获得同时带有毒素 A 和毒素 B 免疫原性的融合蛋白,而且还减少 CDAD 疫苗研发和生产的难度以及成本。



1. 一种艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白,其特征在于,其氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。
2. 如权利要求 1 所述的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的编码基因,其特征在于,其核苷酸序列如 SEQ ID NO :1 所示。
3. 一种表达载体,其特征在于,由权利要求 2 所述的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的编码基因插入到原核表达载体的多克隆位点构建而成。
4. 如权利要求 3 所述的表达载体,其特征在于,所述原核表达载体为 pET32b。
5. 一种大肠杆菌宿主细胞,其特征在于,包含权利要求 3 或 4 所述的表达载体。
6. 一种权利要求 1 所述的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的纯化方法,其特征在于:将所述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白用 Q 树脂纯化,洗脱的盐浓度为在 350 ~ 550mM。
7. 一种权利要求 1 所述的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的纯化方法,其特征在于,将所述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白与可亲和层析的标签融合表达,利用亲和层析树脂进行第一步纯化,洗脱下的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白切除标签后,再经过第二步亲和层析去除标签。
8. 权利要求 1 所述的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白在制备单克隆抗体、Elisa 诊断检测试剂盒和胶体金检测试剂盒上的应用。
9. 权利要求 1 所述的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白在制备预防艰难梭菌引起的腹泻及其它相关疾病疫苗上的应用。

一种艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物免疫学领域,尤其涉及一种艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 艰难梭菌相关性腹泻(CDAD)的发生率近年来不断升高,成为医院内腹泻的主要原因。目前医院内抗生素相关性腹泻的治疗方法是使用万古霉素或甲硝唑等抗生素,通常情况下抗生素可以有效治疗 CDAD,但约有 20~30%的复发患者因菌株的抗药性而无法得到治疗。随着菌株的毒力不断增强和对抗生素的耐药性,需要发展新的治疗方法,而疫苗和可以中和毒素与干扰艰难梭菌发病机制的抗体药物是 CDAD 预防和治疗的主要发展方向。

[0003] 艰难梭菌产生的毒素 A 与毒素 B 是其主要致病因素,采用纯化的毒素 A 和毒素 B 作为预防 CD 感染疫苗的研究已经进入临床 II 期实验;而用于治疗复发性 CDAD 的针对毒素 A 和毒素 B 的全人单抗药物也已经进入临床研究。毒素 A 被认为在 CDAD 的发病过程中起到主要的作用,研究表明艰难梭菌毒素 A 羧基末端受体结合区是毒素 A 与肠壁细胞结合的关键蛋白区域。毒素 B 可能在 CDAD 的发病过程中仅起到辅助作用。但是近年报道的艰难梭菌临床感染病例,有些菌株只有毒素 B 的表达,没有毒素 A 的表达,而病人也表现出腹泻、巨结肠症等症状。而且在 CDAD 抗体治疗动物实验中,同时使用毒素 A 和毒素 B 的抗体可以大大提高对动物的保护效率。在疫苗的制备过程中也同时使用毒素 A 和毒素 B 作为抗原。

[0004] 利用重组表达的毒素 A 和毒素 B 作为预防 CDAD 疫苗的研究以经有报道,均是单独表达毒素 A 或毒素 B。这样在制备预防 CDAD 疫苗的过程中,就需要两套表达和纯化系统,大大增加了疫苗研发过程中的难度和工作量,在以后的生产过程中也会对场地、设备和质控等提出更高的要求。此外,毒素 A 包含 2700 多个氨基酸残基,毒素 B 包含近 2600 多个氨基酸残基,如果表达完整的毒素 A 和毒素 B 的融合蛋白,则其至少含 4600 个氨基酸残基,分子量接近 500KD,非常困难。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白,旨在解决分别表达和纯化艰难梭菌毒素 A 和艰难梭菌毒素 B 所存在的工作量大、研发难度高的问题。

[0006] 本发明的再一目的在于提供上述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的编码基因。

[0007] 本发明的再一目的在于提供上述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的应用。

[0008] 本发明是这样实现的,一种艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白,其氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[0009] 本发明进一步提供了上述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的编码基因,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0010] 本发明进一步提供了上述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的纯化方法,将所述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白用 Q 树脂纯化,洗脱的盐浓度为在 350~550mM。

[0011] 本发明进一步提供了上述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的纯化方法,将所述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白与可亲和层析的标签融合表达,利用亲和层析树脂进行第一步纯化,洗脱下的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白切除标签后,再经过第二步亲和层析去除标签。

[0012] 本发明进一步提供了一种表达载体,由上述的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的编码基因插入到原核表达载体的多克隆位点构建而成。

[0013] 优选地,所述原核表达载体为 pET32b。

[0014] 本发明进一步提供了一种大肠杆菌宿主细胞,包含上述表达载体,该表达载体由上述的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的编码基因插入到原核表达载体的多克隆位点构建而成。

[0015] 本发明进一步提供了上述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白在制备单克隆抗体、Elisa 诊断检测试剂盒和胶体金检测试剂盒上的应用。

[0016] 本发明进一步提供了上述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白在制备预防艰难梭菌引起的腹泻及其它相关疾病疫苗上的应用。

[0017] 本发明克服现有技术的不足,提供一种艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白,其氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示,该融合蛋白的编码基因序列为 SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :1 序列包括艰难梭菌毒素 A 的羧基端结构域、艰难梭菌毒素 B 的羧基端结构域和编码柔性多肽的核苷酸基因序列,其中,艰难梭菌毒素 A 羧基端结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示,艰难梭菌毒素 B 羧基端结构域的核苷酸序列如 SEQ ID NO:4 所示序列,在序列 SEQ ID NO:1 中,艰难梭菌毒素 A 羧基端结构域序列和艰难梭菌毒素 B 羧基端结构域序列通过柔性多肽相连,柔性多肽基因片段的核苷酸序列如 SEQ ID NO :5 所示,编码为甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸(GGGS)四肽序列的重复,重复次数可以是 0 次到多次,优选为 4 次。

[0018] 在本发明中,所选取的艰难梭菌毒素 A 羧基端和艰难梭菌毒素 B 羧基端核苷酸序列即符合大肠杆菌密码子偏爱性,同时通过同义密码子替换改善了原始序列多重重复区对化学基因合成的影响;并且优化是在保证艰难梭菌外毒素 A 羧基端和艰难梭菌毒素 B 羧基端氨基酸序列不变的情况下,通过密码子改变对羧基端基因重复序列进行调整,充分考虑大肠杆菌密码子利用偏好进行基因序列优化,艰难梭菌外毒素 A 羧基端基因片段和艰难梭菌外毒素 B 羧基端基因片段可分别在大肠杆菌原核系统中高效表达。

[0019] 本发明通过构建艰难梭菌毒素 A 和艰难梭菌毒素 B 的融合基因,可以获得同时带有毒素 A 和毒素 B 免疫原性的融合蛋白,减少 CDAD 疫苗研发和生产的难度以及成本。

附图说明

[0020] 图 1 是本发明实施例 1 中艰难梭菌毒素 A 羧基端和艰难梭菌外毒素 B 羧基端重组基因序列构建示意图;

[0021] 图 2 是本发明实施例 2 中原核表达载体 pET32b 的质粒图谱;

[0022] 图 3 是本发明实施例 2 中表达载体转化子质粒 pET32b(+)-toxA-toxB 的菌落 PCR 电泳结果图;

[0023] 图 4 是本发明实施例 2 中表达载体转化子质粒 pET32b(+)-toxA-toxB 被 XhoI 与 XbaI 双酶切后的电泳结果图;

[0024] 图 5 是本发明实施例 3 中艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白诱导表达后的 SDS-PAGE

电泳结果；

[0025] 图 6 是本发明实施例 4 中艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的金属螯合层析纯化结果图；

[0026] 图 7 是本发明实施例 4 中艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白在凝血酶酶切后电泳结果图；

[0027] 图 8 是本发明实施例 5 中原核表达载体 pET-N-toxA-toxB 的菌落 PCR 电泳结果图；

[0028] 图 9 是本发明实施例 6 中艰难梭菌毒素 A/B 的非融合蛋白诱导表达后的 SDS-PAGE 电泳结果图；

[0029] 图 10 是本发明实施例 7 中艰难梭菌毒素 A/B 的非融合蛋白经 Q 树脂纯化后的 SDS-PAGE 电泳结果图；

[0030] 图 11 是本发明实施例 8 中艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的凝血活性测定结果图。

具体实施方式

[0031] 本发明的技术方案在于：通过 PCR 扩增分段获得经密码子改造后的艰难梭菌毒素 A 羧基端基因与原核表达载体 pET32b (+) 组成的载体片段、艰难梭菌毒素 B 羧基端结构域与柔性链的融合基因片段，获得的融合片段及获得的载体分别酶切回收后，在 DNALigase 作用下进行连接，获得含艰难梭菌毒素 A 羧基端结构域和艰难梭菌毒素 B 羧基端结构域的融合基因的重组表达质粒 pET32b (+)-ToxA-ToxB。重组质粒转化表达宿主 BL21 (DE3) 菌株后可被 IPTG 诱导表达，融合蛋白经相关鉴定为目的蛋白。另经凝血酶酶切后，可以释放完整的艰难梭菌外毒素 A 羧基端蛋白和毒素 B 羧基端的融合蛋白，凝集试验表明该方法表达的毒素 A 羧基端和毒素 B 羧基端的融合蛋白有凝集活性。

[0032] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所述的“室温”是指进行试验的操作间的温度，一般为 25℃。

[0033] 实施例 1 密码子优化的编码基因序列为 SEQ ID NO:1 的构建

[0034] 如图 1 所示，toxA 羧基端受体结合区域的 792bp 和 toxinB 羧基端的 1770bp 通过 18 个氨基酸的柔性链连接形成 C-AB 的融合蛋白序列，包括以下具体步骤：选取艰难梭菌外毒素 A (ToxinA) 基因羧基端 972 个碱基序列(共编码 324 个氨基酸)，艰难梭菌外毒素 B (ToxinB) 基因羧基端 1770 个碱基序列(共编码 590 个氨基酸)，分析该编码序列，找出影响基因合成的重复序列，如 SEQ ID NO:6 所示。同时分析该序列与大肠杆菌密码子使用偏好不同的位点，用高频密码子替换低频密码子；另外，在兼顾大肠杆菌密码子偏好的基础上，用高频或中频密码子对重复区内的序列进行同义密码子替换，获得新的优化后的艰难梭菌外毒素 A 基因羧基端核苷酸序列 SEQ ID NO:3 以及艰难梭菌外毒素 B 基因羧基端核苷酸序列 SEQ ID NO:4。

[0035] 为了明确显示密码子改造的位点，现将艰难梭菌外毒素 A 羧基端原始序列与改造后序列进行比对，比对结果如以下所示(R2-3 表示重复序列 2 到 3，R4-8 表示重复序列 4 到

8, R9-13 表示重复序列 9 到 13, R14-17 表示重复序列 14 到 17, 其它以此类推):

[0036] R2-3

[0037]

氨基酸	Thr	Asn	Gly	Lys	Tyr	Phe	Lys	Tyr
优化前	ACT	AAT	GGT	AAA	TAT	TTT	AAA	TAT
优化后	ACA	AAC	GGC	AAG	TAC	TTC	AAG	TAC

[0038] R4-8

[0039]

氨基酸	Gln	Ser	Lys	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Lys
优化前	CAA	ACT	AAA	TTA	ACT	TTG	AAT	AAA	AAA
优化后	CAG	AGC	AAG	CTG	ACG	CTG	AAC	AAG	AAG
氨基酸	Tyr	Phe	Asp	Asn	Asn	Ser	Lys	Ala	Lys
优化前	TAT	TTT	GAT	AAT	AAC	TCA	AAA	GCA	AAA
优化后	TAC	TTC	GAC	AAC	AAT	AGC	AAG	GCC	AAG
氨基酸	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Leu	Gln	Ile	Tyr	Asn
优化前	TAT	TAC	TTT	AAT	TTG	GAA	ATT	TAT	AAT
优化后	TAC	TAT	TTC	AAC	CTG	CAG	ATC	TAC	AAC

[0040]

[0041]

[0042]

氨基酸	Thr	Ala	Thr	Gly	Tyr	Phe	Ala	Gly	Tyr
优化前	ACT	GCT	ACT	GGT	TAC	TTT	GCT	GGT	TAT
优化后	ACC	GCC	ACA	GGC	TAT	TTC	GCG	GGC	TAC
氨基酸	Ile	Gly	Lys	Phe	Tyr	Phe	Asp		
优化前	ATT	GGT	AAA	TTT	TAT	TTT	GAT		
优化后	ATC	GGG	AAG	TTC	TAC	TTC	GAC		

[0043] R9-13

[0044]

氨基酸	Leu	Leu
优化前	TTG	TTG
优化后	CTG	CTG

[0045] R14-17

[0046]

氨基酸	Leu	Gln	Phe	Leu	Thr	Leu	Asn	Gly	Lys
优化前	CTT	CAA	TTC	TTA	ACT	TTG	AAT	GGT	AAA
优化后	CTG	CAG	TTT	CTG	ACA	CTG	AAC	GGA	AAG

[0047]

氨基酸	Tyr	Ser	Ala	Val	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0048]

优化前	TAT	TCA	GCA	GTT	GGA	ATT	TAT	TAC	CTA	CTT
优化后	TAC	ACT	GCC	GTG	GGC	ATC	T AC	TAT	CTG	CTG

[0049] R18-22

[0050]

氨基酸	Lys	Leu	Thr	Leu	Asn	Gly	Lys	Lys	Gly	Lys
优化前	AAA	TTA	ACT	TTG	AAT	GGC	AAA	AAA	GGT	AAA
优化后	AAG	CTG	ACG	CTT	AAC	GGT	AAG	AAG	GGC	AAG
氨基酸	Tyr	Phe	Leu	Thr	Ile	Gly	Lys	Tyr	Leu	Asn
优化前	TAC	TTT	CTT	ACT	ATT	GGT	AAA	TAT	CTT	AAC
优化后	TAT	TTC	CTG	ACG	ATC	GGA	AAG	TAC	CTG	AAT

[0051]

[0052]

氨基酸	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr	Ile	Lys	Ser	Thr	Gly
优化前	ACT	GCT	ACT	GGA	ACT	ATT	AAA	TCA	ACT	GGT
优化后	ACA	GCA	ACA	GGC	ACA	ATC	AAG	TCT	ACA	GGA

[0053] R23-26

[0054]

氨基酸	Leu	Leu	Arg
优化前	CTT	CTT	CGA
优化后	CTG	CTG	CGT

[0055] R27-29

[0056]

氨基酸	Gln	Asn	Arg	Phe	Leu	Leu	Ile	Gly	Asn	Asn
优化前	CAA	AAT	AGA	TTC	CTA	CTA	ATA	GGT	AAT	AAT
优化后	CAG	AAC	CGT	TTT	CTG	CTG	ATT	GGC	AAC	AAC
氨基酸	Ser	Thr	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ala			
优化前	TCA	ACT	ACT	GGT	TAT	CCT	GCT			
优化后	TCT	ACA	ACC	GGC	TAC	CCG	GCA			

[0057]

[0058] R30-32

[0059]

氨基酸	Leu	Leu	Leu
优化前	CTA	CTT	CTT
优化后	CTG	CTG	CTG

[0060] 根据上述优化原则,参考大肠杆菌密码子偏爱性设计出相应的核苷酸序列,通过 18 个氨基酸的柔性多肽链的核苷酸序列 SEQ ID NO:5 (C)连接艰难梭菌外毒素 A 核苷酸序列 SEQ ID NO:3 羧基端和艰难梭菌外毒素核苷酸序列 SEQ ID NO:4 羧基端,得到融合蛋白的编码基因序列为 SEQ ID NO:1 (C-AB),编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[0061] 对艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的核苷酸序列 SEQ ID NO:1 进行全基因人工合成并测序正确。

[0062] 实施例 2 原核表达载体构建

[0063] 一、原核表达载体 pET32b (+)-toxA-toxB 的构建与鉴定

[0064] 1、目的基因片段获得：设计一套 PCR 引物扩增合成的 pUCE-toxA-toxB 的艰难梭菌外毒素核苷酸序列 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4, 其中 5' 端为平末端, 3' 端引入 NruI 酶切位点。PCR 产物纯化试剂盒回收 PCR 反应后的产物, 然后经 NruI 酶切后释放 3' 端含有粘性末端的艰难梭菌外毒素 A 羧基端和外毒素 B 羧基端基因片段。扩增艰难梭菌外毒素 A 羧基端和外毒素 B 羧基端基因片段用引物序列如下, 反向引物引入 NruI 酶切位点“TCGCGA”:

[0065] 正向引物 1 :GCCTCTACAGGATATACAAGTA

[0066] 反向引物 1 :GTGTCGCGACTCGAGTCATTATTC

[0067] 2、pET32b (+)载体(如图 2 所示)片段:设计一套 PCR 引物扩增 pET32b (+)的部分序列, 其中 5' 端引入 NruI 酶切位点, 3' 端引入平末端。PCR 产物纯化试剂盒回收 PCR 反应后的产物, 然后经 NruI 酶切后释放 5' 端含有粘性末端的 pET-32b 载体片段。扩增 pET-32b 载体片段用引物序列如下:

[0068] 正向引物 2 :GAGTCGCGACACCACCACCACCACCTGAGAT,

[0069] 反向引物 2 :GATCATACCAGAACCGCGTGGCAC ;

[0070] 3、连接反应:上述步骤获得的载体和两段目的基因在 T4DNALigase 作用下, 设计连接体系, 其中体系中片段:载体的质量浓度比设定为 7:1。温度设定为 16℃, 过夜连接, 获得含有目的基因的表达载体;

[0071] 4、转化及鉴定:氯化钙法将获得含有目的基因的表达载体转化大肠杆菌 DH5 α , 均匀涂布于含 Amp 抗性的 LB 琼脂平板, 37℃ 培养过夜。次日挑取 24 个单菌落进行试管培养, 并提取质粒。对转化子质粒进行二种鉴定, 分别为菌落 PCR 鉴定, 结果如图 3 所示, 菌落 PCR 结果应为 3394bp 条带, 图中的 1-4 样品均为阳性, 因此挑取阳性样品进行酶切实验。XhoI 单酶切鉴定、XhoI 和 XbaI 双酶切鉴定, 结果如图 4 所示, 此二酶双酶切后片段大小应分别为 5335bp 与 3246bp, 由图可知 1、2、3、4、号质粒可能为阳性转化子, 选择鉴定均显阳性的转化子 1 号送出测序, 测序正确后正式命名为 pET32b (+)-toxA-toxB。

[0072] 实施例 3 艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的表达

[0073] 1、诱导表达及鉴定:将鉴定后的 pET32b(+)-toxA-toxB 质粒用氯化钙法转化大肠杆菌宿主菌 BL21 (DE3), 从中随机挑选单菌落进行表达。即用无菌枪头挑取单菌落于含有 100 μ g/ml Amp 的 LB 培养基中 37℃ 过夜培养, 转速设定为 220rpm。次日清晨按 1:10 接种于新鲜的 LB 培养基中, 37℃, 220rpm 培养至 OD 值约为 0.6 时加入 IPTG 至终浓度为 0.4mM, 诱导在 22℃ 条件下进行, 诱导时间分别设定为 3h 和 8h, 分别取样进行 8% 的 SDS-PAGE 电泳检测, 结果如图 5 所示, 在图 5 中, 泳道 1~7 为 pET32b (+)-toxA-toxB 在 BL21 (DE3) 菌株的表达情况:1 为 30℃ 诱导 1 小时, 3 为 37℃ 诱导前, 2 为诱导 1 小时, 4 为 30℃ 诱导 3 小时, 5 为 37℃ 诱导 3 小时, 6 为 30℃ 诱导过夜, 7 为 37℃ 诱导过夜;泳道 8~14 为 pET32b (+)-toxA-toxB 在 Rosseta 菌株的表达:8、9 为诱导前, 10 为 30℃ 诱导 1 小时, 11 为 37℃ 诱导 1 小时, 12 为 30℃ 诱导 3 小时, 13 为 37℃ 诱导 3 小时, 14 为 30℃ 诱导过夜;15 为 NEB 公司的 250KD 蛋白质 Marker。

[0074] 因目的蛋白约为 110kD, 电泳显示其在 Marker 第一条带之上, 目的蛋白表达量在 30% 左右。保存菌株, 命名为 pET32b (+)-toxA-toxB/BL21 (DE3)。

[0075] 由于融合蛋白较大, 故在诱导表达时选择低温慢速长时间诱导, 尽可能减少包涵体形成的可能。超声破碎条件选择在功率 200W, 超声 4s, 间歇 8s 的条件下, 超声 20min 可

以多数融合蛋白分布于上清中,便于对融合蛋白进行可溶性蛋白的纯化操作。

[0076] 实施例 4 艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的纯化及酶切释放

[0077] 1、艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的纯化,包括如下具体步骤:

[0078] (1) 200ml 诱导表达培养物离心获得的细胞,用 10mlNTA-0 重悬,置于冰浴中超声波破壁 20min(200W,工作 4s,间歇 8s)。细胞破壁液于 12000rpm,4℃离心 20min,取上清置于烧杯(25ml)中。

[0079] (2)加入 1mlNi-NTA 树脂混悬液(含 50% V/V 树脂,保存于 20% V/V 乙醇溶液中),置于冰上(或在 4℃冰箱中)用脱色摇床 120rpm 振荡 1h。

[0080] (3)装入层析柱,移去层析柱底端的帽子,上清液通过 NTA 柱,收集流出部分,用于电泳分析。

[0081] (4)加 10mlNTA-20 洗涤层析柱,洗去未结合的杂蛋白。

[0082] (5)分别加入 5mlNTA-60、4mlNTA-80 以及 2mlNTA-100 梯度洗涤层析柱,尽可能洗去未结合的杂蛋白。

[0083] (6)用 2mlNTA-200 洗脱目的蛋白,分 4 次洗脱,每次 0.5ml。

[0084] (7)柱子的再生,先用 5mlNTA-500 冲洗柱子,再用 5ml20% V/V 乙醇冲洗柱子,最后盖上柱子底端的帽子,用 0.5ml20% V/V 乙醇溶液重悬树脂,4℃保存。树脂可重复使用 3~5 次。

[0085] 纯化结果如图 5 所示,其中,融合蛋白在 NTA20 溶液开始有洗脱,NTA100 溶液洗脱可以达到纯度约 90%,NTA200 溶液洗脱可以达到 95% 的纯度。

[0086] 2、艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的凝血酶酶切

[0087] 在载体构建时,将(His)₆标签置于毒素 A 羧基端序列之前,方便后续的纯化操作,并在二者之间设有编码凝血酶酶切位点的序列,更方便了后续融合蛋白经凝血酶酶切后释放目的蛋白,即融合蛋白。

[0088] 凝血酶酶切条件为:1mg 融合蛋白中加入凝血酶 125 单位,4℃酶切过夜,次日检测酶切效果,如图 7 所示,在图 7 中,泳道 1、2、3 为凝血酶处理样品;泳道 4、5、6 为未经处理样品;样品 1、2 为超声破碎上清,2、3、4、5 为纯化样品。由图 7 可知,经凝血酶酶切后,艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白可以释放无标签的融合蛋白,该蛋白大小约为 110KD,凝血酶的酶切效率在 95% 左右。

[0089] 实施例 5 原核表达载体 pET-N-toxA-toxB 的构建与鉴定

[0090] 以实例 2 中构建的 pET32b(+)-toxA-toxB 重组质粒为模板,去除标签蛋白和可溶性蛋白片段 399bp,启动密码子 ATG 位于艰难梭菌外毒素 A 羧基端和外毒素 B 羧基端重组编码序列之前,获得艰难梭菌外毒素 A 羧基端和外毒素 B 羧基端非融合蛋白。

[0091] 1、获得无标签的 pET-N-toxA-toxB 片段:设计引物,反向 PCR 方法扩增实例 2 中构建的 pET32b(+)-toxA-toxB 重组质粒,去除 His 和 Trx 标签。扩增用引物序列如下:

[0092] 正向引物 3:GCCTCTACAGGATATACAAG,

[0093] 反向引物 3:CATATGTATATCTCCTTC;

[0094] 2、连接反应:上述步骤获得的片段在 T4DNALigase 作用下,设计连接体系,其中体系中片段为 50ng。温度设定为 16℃,过夜连接,获得表达载体;

[0095] 3、转化及鉴定:氯化钙法将获得含有目的基因的表达载体转化大肠杆菌 DH5 α ,

均匀涂布于含 Amp 抗性的 LB 琼脂平板, 37℃ 培养过夜。次日挑取 24 个单菌落进行试管培养, 并提取质粒。对转化子质粒进行鉴定, 菌落 PCR 鉴定, 结果如图 8 所示, 原核表达载体 pET-N-toxA-toxB 的 PCR 产物应该为三条带, 分别为 822bp、549bp、210bp, 未去除标签和 Trx 的载体 PCR 扩增条带为 1222bp、949bp、610bp, 图中显示的含有 822bp、549bp、210bp 条带的样品为应该阳性; 挑选阳性菌落送测序。选择鉴定显阳性的转化子送出测序, 测序正确后正式命名为 pET-N-toxA-toxB。

[0096] 实施例 6 艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白大肠杆菌表达工程菌的制备

[0097] 1、诱导表达及鉴定: 按照实施例 3 艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白大肠杆菌表达工程菌的获得进行诱导表达及鉴定, 结果如图 9 所示, 其中, 泳道 1 为浓缩后 CAB, 泳道 2 为 NAB 诱导前, 泳道 3 ~ 7 为 NAB20 度 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 诱导 2h; 泳道 8 ~ 12 为 NAB37 度 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 诱导 2h。从图 9 可以看出, 因目的蛋白约为 100kD, 电泳显示其符合大小, 目的蛋白表达量在 30% 左右。保存菌株, 命名为 pET-N-toxA-toxB/BL21 (DE3)。

[0098] 由于非艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白较大, 故在诱导表达时选择低温慢速长时间诱导, 尽可能减少包涵体形成的可能。超声破碎条件选择在功率 200W, 超声 4s, 间歇 8s 的条件下, 超声 20min 可以多数非融合蛋白分布于上清中, 方便于对非融合蛋白进行可溶性蛋白的纯化操作。

[0099] 实施例 7 非艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白纯化

[0100] 1、非艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白纯化

[0101] (1) 接菌种过夜培养, 次日 1:100 比例转接 LB, 37 度培养至 OD600 为 0.8 ~ 1.0 之间, 加终浓度为 0.3mM 的 IPTG, 在 20℃ 诱导 4h, 离心收菌, 按照 400ml 菌液用 100ml 20mM Tris (pH7.5) 重悬, 超声破碎至澄清, 离心分离上清和包涵体。

[0102] (2) 用 20mM Tris (pH7.5) 平衡 Q 树脂, 上清用 0.45m 滤膜过滤后上样, 用 20mM Tris (pH7.5) 吸取非特异结合的蛋白, 然后依次用含 100mM、200mM、300mM、400mM、450mM、500mM、1000mM 氯化钠的 20mM Tris (pH7.5) 缓冲液洗脱, 分别取样电泳检测, 结果如图 10 所示, 其中, 泳道 1 为诱导前, 泳道 2 为诱导 4h, 泳道 3 ~ 11 分别为上清、100、200、300、400-1、400-2、450、500、1000mM 氯化钠洗脱样品。由图 10 可知, 用 450mM 氯化钠的 20mM Tris (pH7.5) 洗脱液纯化的条带符合目的条带大小, 并且条带单一。

[0103] 实施例 8 艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白的活性验证

[0104] 1、艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白凝血活性测定实验

[0105] 取 250 μ l 12% 的兔红细胞, 每孔加 25 μ l; 配置外毒素 A 羧基端和外毒素 B 羧基端融合蛋白母液, 浓度为 0.1mg/ml, 各孔加样质量依次为阴性对照、0.05 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g、0.3 μ g、0.4 μ g、0.5 μ g 融合蛋白、阳性对照; 将 96 孔板放于 4℃ 孵育 4h, 观察结果如图 11 所示, 其中, 1 为阴性对照 PBS; 2 ~ 7 分别为 0.05 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g、0.3 μ g、0.4 μ g、0.5 μ g 融合蛋白; 8 为阳性对照。从图中可以看出, 阴性对照和阳性对照结果成立, 融合蛋白在 0.2 μ g 出现明显红细胞凝集, 表明艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白具有凝血活性。

[0106] 2、艰难梭菌外毒素 A 羧基端和外毒素 B 羧基端非融合蛋白凝血活性测定实验

[0107] 按照上述艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白凝血活性测定实验, 测定非融合蛋白凝血活性, 1 为阴性对照 PBS; 2 ~ 7 分别为 0.05 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g、0.3 μ g、0.4 μ g、0.5 μ g 融合蛋白; 8 为阳性对照。试验结果为, 阴性对照和阳性对照结果成立, 融合蛋白在 0.2 μ g 出

现明显红细胞凝集,表明艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白具有凝血活性。

[0108] 3、艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白免疫活性验证

[0109] 取 10 只 6 ~ 8 周龄的 BALB/C 小鼠,分为两组,一组免疫融合蛋白组,二组为对照组;配制艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白母液,加入佐剂,混匀后,肌肉注射免疫组小鼠,对照组注射相应量的 PBS,第 0、1、2、3 周免疫小鼠,每次免疫前和第三周免疫后一周采血;Elisa 方法测定血清中抗体滴度,具体步骤如下:不带 his 标签的重组蛋白浓度为 0.02ug/u1,每孔包被 2ug,37℃ 孵育 1h,洗涤、封闭,加入血清样品,37℃ 孵育 1h,洗涤,加入 1:2000 倍稀释的羊抗鼠 IgG 二抗,37℃ 孵育 1h,洗涤,每孔加入 TMB100u1,室温放置 5-10 分钟,终止液终止反应,450nm 波长测定吸光值,结果如下 1 所示:

[0110]

		第一次 免疫	第一次 免疫	第一次 免疫	第一次 免疫	空白对照	
		2	4	6	8	9	10
100 倍	A	0.751	0.66	0.642	0.726	0.084	0.073
500 倍	B	0.525	0.561	0.694	0.694	0.08	0.059
1000 倍	C	0.418	0.565	0.522	0.522	0.07	0.066
2000 倍	D	0.423	0.439	0.649	0.649	0.066	0.055

[0111]

5000 倍	E	0.343	0.467	0.483	0.483	0.067	0.047
10000 倍	F	0.202	0.316	0.386	0.386	0.067	0.056
20000 倍	G	0.15	0.319	0.298	0.298	0.064	0.054
40000 倍	H	0.12	0.23	0.249	0.249	0.067	0.057

[0112] 表 1

[0113] 从上表 1 可以看出,Elisa 结果显示艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白免疫 BALB/C 小鼠后血清中的抗体滴度很高,毒素 A 羧基端和外毒素 B 羧基端融合蛋白具有较强的抗原性,可以用于艰难梭菌疫苗。

[0114] 相比与现有技术的缺点和不足,本发明具有以下有益效果:本发明的艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白不仅可以获得同时带有毒素 A 和毒素 B 免疫原性的融合蛋白,活性高,而且还减少 CDAD 疫苗研发和生产的难度以及成本。

[0115] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 山东国际生物科技园发展有限公司

<120> 一种艰难梭菌毒素 A/B 的融合蛋白及其编码基因与应用

<130> 1

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2796

<212> DNA

<213> Clostridium difficile

<400> 1

gcctctacag gatatacaag tattaatggt aaacattttt attttaatac tgatggtatt	60
atgcagatag gagggtttta aggacctaata ggatttgaat actttgcacc tgctaatacag	120
gatgctaaca acatagaagg tcaagetata ctgtaccaa ataaattcct aactctgaat	180
ggtaaaaaat attactttgg tagtgactca aaagcagtta ccggactgcg tactattgat	240
ggtaaaaaat attacttta tactaacact gctgttgcag ttactggatg gcaaactatt	300
aatggtaaaa aatactactt taatactaac acttctatag ctcaactgg ttatacaatt	360
attagtggt aacattttta tttaatact gatggtatta tgcagatagg agtgtttaaa	420
ggacctgatg gatttgaata ctttgcacct gctaatacag atgctaacaa tatagaaggt	480

[0117]

caagetatac gttatcagaa cegttttctg tatctgcatg acaatattta ttatttggc	540
aacaacteta aagcggctac aggttgggta accattgatg gcaatagata ctacttcgag	600
ccgaatacag caatgggtgc gaatggttat aaaactattg ataataaaaa ttttacttt	660
agaaatgggt tacctcagat aggagtgttt aaagggtcta atggattga atactttgca	720
cctgctaata cggatgctaa caatatagaa ggcaagcta tacgttatca aaatagattc	780
ctgcatttac tgggaaaaat atattacttt ggtaataatt caaaagcagt tactggatgg	840
caactatta atggtaaagt atattacttt atgcctgata ctgctatggc tgcagctggt	900
ggactgttcg agattgatgg tgttatatat ttcttgggtg ttgatggagt aaaagcccct	960
gggatatatg cgtcgacgg tgggtgggtg agtgggtggg gtggcagtggt tgggtgggtg	1020
agcategcaa ataagetgtc tttaacttt agtgataaac aagatgtacc tgtaagtga	1080
ataatctgt catttacacc ttcatttat gaggatggac tgattggcta tgatctgggt	1140
ctggtttctc tgtataatga gaaatttat attaataact ttggaatgat ggtatctgga	1200
ctgatttata ttaatgattc attatattat tttaaaccac cagtaaataa tctgataact	1260
ggatttgtga ctgtaggega tgataaatac tactttaac caattaatgg tggagctgct	1320
tcaattggag agacaataat tgatgacaaa aattattatt tcaaccaaag tggagtgctg	1380
caaacaggtg tatttagtac agaagatgga tttaaatatt ttgccccagc taataactg	1440
gatgaaaacc tggaaggaga agcaattgat ttactggaa aactgattat tgacgaaaat	1500
atttattatt ttgatgataa ttatcgtgga gctgtagaat ggaaagaact ggatggtgaa	1560
atgcactatt ttageccaga aacaggtaaa gcctttaaag gctcgaatca aataggtgat	1620
tataaatact atttcaattc tgatggagtt atgcaaaaag gatttgttag tataaatgat	1680
aataaacact attttgatga ttctggtgtt atgaaagtag gttacactga aatagatggc	1740
aagcatttet actttgctga aaacggagaa atgcaaatag gagtatttaa tacagaagat	1800

[0118]

ggatftaaat afffftctca tcataatgaa gatctgggaa atgaagaagg tgaagaaate	1860
teatattctg gtatactgaa tffcaataat aaaatttact atfftgatga tteattitaca	1920
gctgtagttg gatggaaaga tctggaggat ggttcaaagt attatffttga tgaagataca	1980
gcagaagcat atataggtct gtcactgata aatgatggte aatattatff taatgatgat	2040
ggaattatgc aagttggatt tctcaactata aatgataaag tcttctactt cctgactct	2100
ggaattatag aatctggagt acaaaacata gatgacaatt atffctatat agatgataat	2160
ggtatagttc aaattgggtg atffgatact tcagatggat ataaatattt tgcacctgct	2220
aatactgtaa atgataatat ttacggacaa gcagttgaat atagtggctt ggffctgtgt	2280
ggggaagatg tatattatff tggagaaaca tatacaattg agactggatg gatatatgat	2340
atggaaaatg aaagtgataa atattatffc aatccagaaa ctaaaaaagc atgcaaaggt	2400
attaatttaa ttgatgatat aaaatattat tffgatgaga agggcataat gcgtacgggt	2460
cttatatcat ttgaaaataa taattattac tttaatgaga atggtgaaat gcaatttgg	2520
tatataaata tagaagataa gatgttctat tffggatgaag atggtgtcat gcagattgga	2580
gtatttaata caccagatgg atffaaatac tffgcacatc aaaatactct ggatgagaat	2640
ttfgaggag aatcaataaa ctatactggt tggctggatc tggatgaaaa gcgttattat	2700
ttfacagatg aatataatgc agcaactggt tcagttatta ttgatggtga ggagtattat	2760
ttfgatcctg atacagctca actggtgatt agtgaa	2796

<210> 2

<211> 932

<212> PRT

[0119]

<213> Clostridium difficile

<400> 2

Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ser Ile Asn Gly Lys His Phe Tyr Phe Asn

1 5 10 15

Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro Asn Gly Phe

20 25 30

Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly Gln

35 40 45

Ala Ile Leu Tyr Gln Asn Lys Phe Leu Thr Leu Asn Gly Lys Lys Tyr

50 55 60

Tyr Phe Gly Ser Asp Ser Lys Ala Val Thr Gly Leu Arg Thr Ile Asp

65 70 75 80

Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ala Val Ala Val Thr Gly

85 90 95

Trp Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Tyr Tyr Phe Asn Thr Asn Thr Ser

100 105 110

Ile Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ile Ile Ser Gly Lys His Phe Tyr Phe

115 120 125

Asn Thr Asp Gly Ile Met Gln Ile Gly Val Phe Lys Gly Pro Asp Gly

130 135 140

Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Asp Ala Asn Asn Ile Glu Gly

[0120]

325 330 335
Gly Gly Gly Gly Ser Ile Ala Asn Lys Leu Ser Phe Asn Phe Ser Asp
340 345 350
Lys Gln Asp Val Pro Val Ser Glu Ile Ile Leu Ser Phe Thr Pro Ser
355 360 365
Tyr Tyr Glu Asp Gly Leu Ile Gly Tyr Asp Leu Gly Leu Val Ser Leu
370 375 380
Tyr Asn Glu Lys Phe Tyr Ile Asn Asn Phe Gly Met Met Val Ser Gly
385 390 395 400
Leu Ile Tyr Ile Asn Asp Ser Leu Tyr Tyr Phe Lys Pro Pro Val Asn
405 410 415
Asn Leu Ile Thr Gly Phe Val Thr Val Gly Asp Asp Lys Tyr Tyr Phe
420 425 430
Asn Pro Ile Asn Gly Gly Ala Ala Ser Ile Gly Glu Thr Ile Ile Asp
435 440 445
Asp Lys Asn Tyr Tyr Phe Asn Gln Ser Gly Val Leu Gln Thr Gly Val
450 455 460
Phe Ser Thr Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala Pro Ala Asn Thr Leu
465 470 475 480
Asp Glu Asn Leu Glu Gly Glu Ala Ile Asp Phe Thr Gly Lys Leu Ile
485 490 495
Ile Asp Glu Asn Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Asn Tyr Arg Gly Ala Val

[0122]

500 505 510
Glu Trp Lys Glu Leu Asp Gly Glu Met His Tyr Phe Ser Pro Glu Thr
515 520 525
Gly Lys Ala Phe Lys Gly Leu Asn Gln Ile Gly Asp Tyr Lys Tyr Tyr
530 535 540
Phe Asn Ser Asp Gly Val Met Gln Lys Gly Phe Val Ser Ile Asn Asp
545 550 555 560
Asn Lys His Tyr Phe Asp Asp Ser Gly Val Met Lys Val Gly Tyr Thr
565 570 575
Glu Ile Asp Gly Lys His Phe Tyr Phe Ala Glu Asn Gly Glu Met Gln
580 585 590
Ile Gly Val Phe Asn Thr Glu Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His His
595 600 605
Asn Glu Asp Leu Gly Asn Glu Glu Gly Glu Glu Ile Ser Tyr Ser Gly
610 615 620
Ile Leu Asn Phe Asn Asn Lys Ile Tyr Tyr Phe Asp Asp Ser Phe Thr
625 630 635 640
Ala Val Val Gly Trp Lys Asp Leu Glu Asp Gly Ser Lys Tyr Tyr Phe
645 650 655
Asp Glu Asp Thr Ala Glu Ala Tyr Ile Gly Leu Ser Leu Ile Asn Asp
660 665 670
Gly Gln Tyr Tyr Phe Asn Asp Asp Gly Ile Met Gln Val Gly Phe Val

[0123]

675 680 685
Thr Ile Asn Asp Lys Val Phe Tyr Phe Ser Asp Ser Gly Ile Ile Glu
690 695 700
Ser Gly Val Gln Asn Ile Asp Asp Asn Tyr Phe Tyr Ile Asp Asp Asn
705 710 715 720
Gly Ile Val Gln Ile Gly Val Phe Asp Thr Ser Asp Gly Tyr Lys Tyr
725 730 735
Phe Ala Pro Ala Asn Thr Val Asn Asp Asn Ile Tyr Gly Gln Ala Val
740 745 750
Glu Tyr Ser Gly Leu Val Arg Val Gly Glu Asp Val Tyr Tyr Phe Gly
755 760 765
Glu Thr Tyr Thr Ile Glu Thr Gly Trp Ile Tyr Asp Met Glu Asn Glu
770 775 780
Ser Asp Lys Tyr Tyr Phe Asn Pro Glu Thr Lys Lys Ala Cys Lys Gly
785 790 795 800
Ile Asn Leu Ile Asp Asp Ile Lys Tyr Tyr Phe Asp Glu Lys Gly Ile
805 810 815
Met Arg Thr Gly Leu Ile Ser Phe Glu Asn Asn Asn Tyr Tyr Phe Asn
820 825 830
Glu Asn Gly Glu Met Gln Phe Gly Tyr Ile Asn Ile Glu Asp Lys Met
835 840 845
Phe Tyr Phe Gly Glu Asp Gly Val Met Gln Ile Gly Val Phe Asn Thr

[0124]

850 855 860
 Pro Asp Gly Phe Lys Tyr Phe Ala His Gln Asn Thr Leu Asp Glu Asn
 865 870 875 880
 Phe Glu Gly Glu Ser Ile Asn Tyr Thr Gly Trp Leu Asp Leu Asp Glu
 885 890 895
 Lys Arg Tyr Tyr Phe Thr Asp Glu Tyr Ile Ala Ala Thr Gly Ser Val
 900 905 910
 Ile Ile Asp Gly Glu Glu Tyr Tyr Phe Asp Pro Asp Thr Ala Gln Leu
 915 920 925
 Val Ile Ser Glu
 930

<210> 3

<211> 972

<212> DNA

<213> Clostridium difficile

<400> 3

gcctctacag gatatacaag tattaatggg aaacattttt attttaatac tgatgggtatt 60
 atgcagatag gagtggttaa aggacctaata ggatttgaat acittgcacc tgctaatacgc 120
 gatgctaaca acatagaagg tcaagctata ctgtaccaaa ataaattctt aactctgaat 180
 ggtaaaaaat attactttgg tagtgactca aaagcagtta ccggactgcg tactattgat 240
 ggtaaaaaat attactttaa tactaacact gctgttgcag ttactggatg gcaaactatt 300

[0125]

aatggtaaaa aatactactt taatactaac acctctatag cttcaactgg ttatacaatt	360
atfagtggta aacattttta tttaatact gatgggtatta tgcagatagg agtgtttaa	420
ggacctgatg gatttgaata ctttgcacct gctaatacag atgctaacaa tatagaaggt	480
caagctatac gttatcagaa cegttttctg tatctgcatg acaatatitaa ttattttgge	540
aacaacteta aagecggtac aggttgggta accattgatg gcaatagata ctacttcag	600
ccgaatacag caatgggtgc gaatgggtat aaaactattg ataataaaaa tttttacttt	660
agaaatgggt tacctcagat aggagtgttt aaagggcteta atggatttga atactttgca	720
cctgctaata cggatgctaa caatatagaa ggtcaagcta tacgttatca aaatagatte	780
ctgcatttac tgggaaaaat atattacttt ggtaataatt caaaagcagt tactggatgg	840
caaactatta atggtaaagt atattacttt atgectgata ctgetatggc tgcagctggt	900
ggactgttcg agattgatgg tgttatatat ttctttgggt ttgatggagt aaaageccct	960
gggatatatg gc	972

<210> 4

<211> 1770

<212> DNA

<213> Clostridium difficile

<400> 4

gcaaataage tgtcttttaa ctttagtgat aaacaagatg tacctgtaag tgaataate	60
ctgtcattta cacctcata ttatgaggat ggactgattg gctatgatct gggctctggt	120
tctctgtata atgagaaatt ttatattaat aactttggaa tgatggatc tggactgatt	180
tatattaatg atcattata ttattttaaa ccaccagtaa ataactgat aactggattt	240

[0126]

gtgactgtag gcgatgataa atactacttt aatccaatta atgggtggagc tgcttcaatt	300
ggagagacaa taattgatga caaaaattat tatttcaacc aaagtggagt gctgcaaaca	360
ggtgtattta gtacagaaga tggatttaa tttttgcc cagctaatac actggatgaa	420
aacctggaag gagaagcaat tgattttact ggaaaactga ttattgacga aatatattat	480
tattttgatg ataattatcg tggagctgta gaatggaaag aactggatgg tgaaatgcac	540
tattttagcc cagaaacagg taaagctttt aaaggtctga atcaaatagg tgattataaa	600
tactatttca attctgatgg agttatgcaa aaaggatttg ttagtataaa tgataataaa	660
cactattttg atgattctgg tgttatgaaa gtaggtfaca ctgaaataga tggcaagcat	720
ttctactttg ctgaaaacgg agaaatgcaa ataggagtat tfaatacaga agatggattt	780
aaatattttg ctcatcataa tgaagatctg ggaaatgaag aaggtgaaga aatctcatat	840
tctggatatac tgaatttcaa taataaaatt tactattttg atgattcatt tacagctgta	900
gttggatgga aagatctgga ggatggttca aagtattatt ttgatgaaga tacagcagaa	960
gcatatatag gtctgtcact gataaatgat ggtcaatatt attttaatga tgatggaatt	1020
atgcaagttg gatttgcac tataaatgat aaagtcttct acttctctga ctctggaatt	1080
atagaatctg gagtacaaaa catagatgac aattatttct atatagatga taatggata	1140
gttcaaattg gtgtatttga tacttcagat ggatataaat atttgcacc tgctaatac	1200
gtaaatagata atatttacgg acaagcagtt gaatatagtg gtctggttcg tgttggggaa	1260
gatgtatatt attttgaga aacatataca attgagactg gatggatata tgatatggaa	1320
aatgaaagtg ataaatatta tttcaatcca gaaactaaaa aagcatgcaa aggtattaat	1380
ttaattgatg atataaaata ttattttgat gagaaggcca taatgcgtac ggtcttata	1440
tcatttgaaa ataataatta ttactttaat gagaatggtg aaatgcaatt tggttatata	1500
aatatagaag ataagatggt ctattttggt gaagatggtg tcatgcagat tggagtattt	1560

[0127]

aatacaccag atggatttaa atactttgca catcaaaata ctctggatga gaattttgag	1620
ggagaatcaa taaactatac tggftggctg gatctggatg aaaagcgta ttattttaca	1680
gatgaatata ttcagcaac tggftcagtt attattgatg gtgaggagta ttattttgat	1740
cctgatacag ctcaactggg gattagttaa	1770

<210> 5

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 柔性多肽链

<400> 5

gtcgacggtg gtggtag tagtggtggg ggcagtggtg gtggtag catc	54
---	----

<210> 6

<211> 375

<212> DNA

<213> Clostridium difficile

<400> 6

acaaacggca agtacttcaa gtaccagagc aagctgacgc tgaacaagaa gtacttegac	60
---	----

aacaatagca aggccaagta ctatttcaac ctgcagatct acaacaccgc cacaggctat	120
---	-----

ttecgggget acatcgggaa gttctacttc gacctgctgc tgcagtttct gacctgaac	180
--	-----

[0128]

ggaaagtaca ctgcegtggg catctactat ctgctgaagc tgacgcttaa cggtaagaag 240
 ggcaagtatt tectgacgat cggaaagtac ctgaatacag caacaggeac aatcaagtct 300
 acaggactgc tgcgtcagaa ccgttttctg ctgattggca acaactctac aaccggetac 360
 ccggcactg tgcctg 375

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 正向引物 1

<400> 7

gcctctacag gatatacaag ta 22

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 反向引物 1

<400> 8

gtgctcggac tcgagtcatt attc 24

[0129]

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 正向引物 2

<400> 9

gagtegcgac accaccacca ceaccactga gat

33

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 反向引物 2

<400> 10

gatcatacca gaaccgcgtg gcac

24

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

[0130]

<213> Artificial

<220>

<223> 正向引物 3

<400> 11

gcctctacag gatatacaag

20

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 反向引物 3

<400> 12

catatgtata tctccttc

18

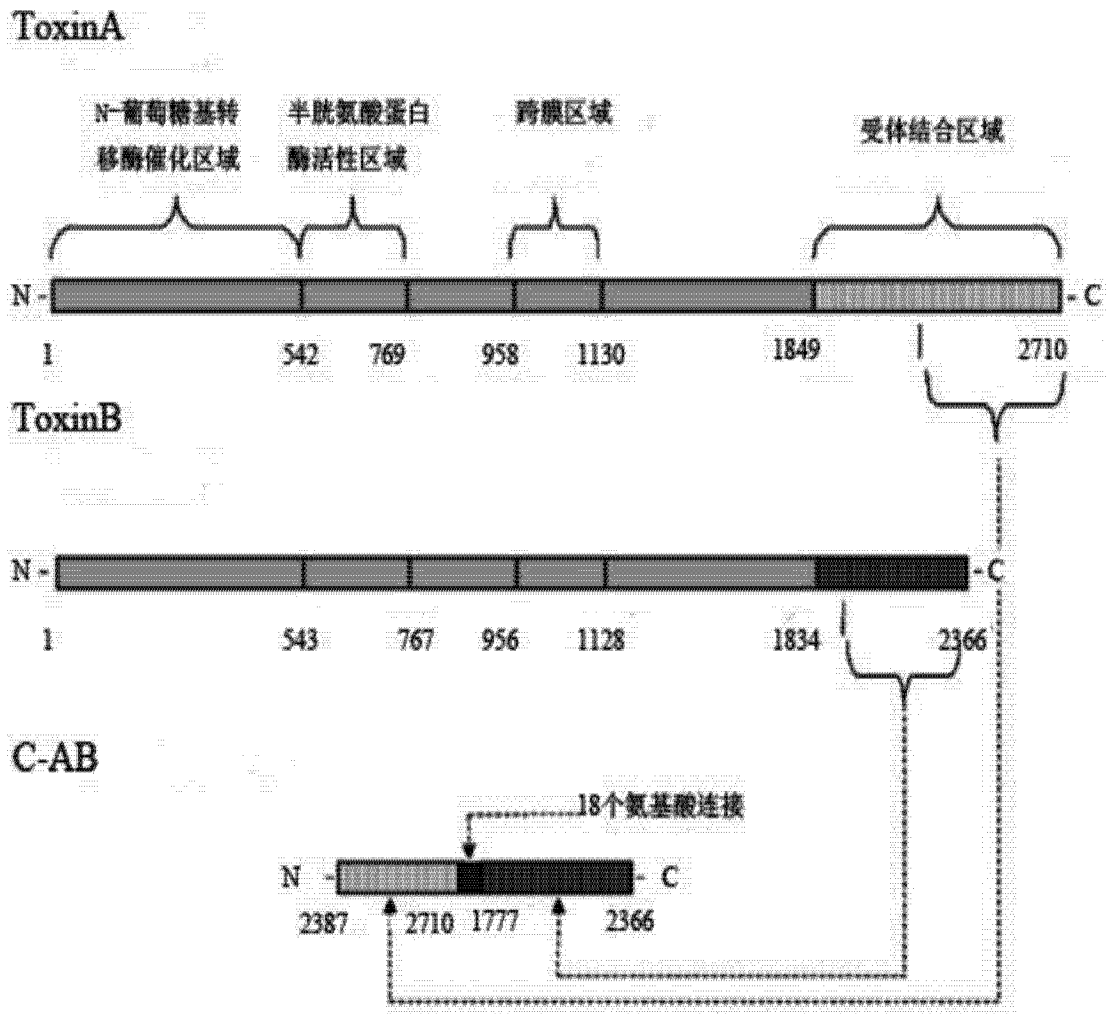


图 1

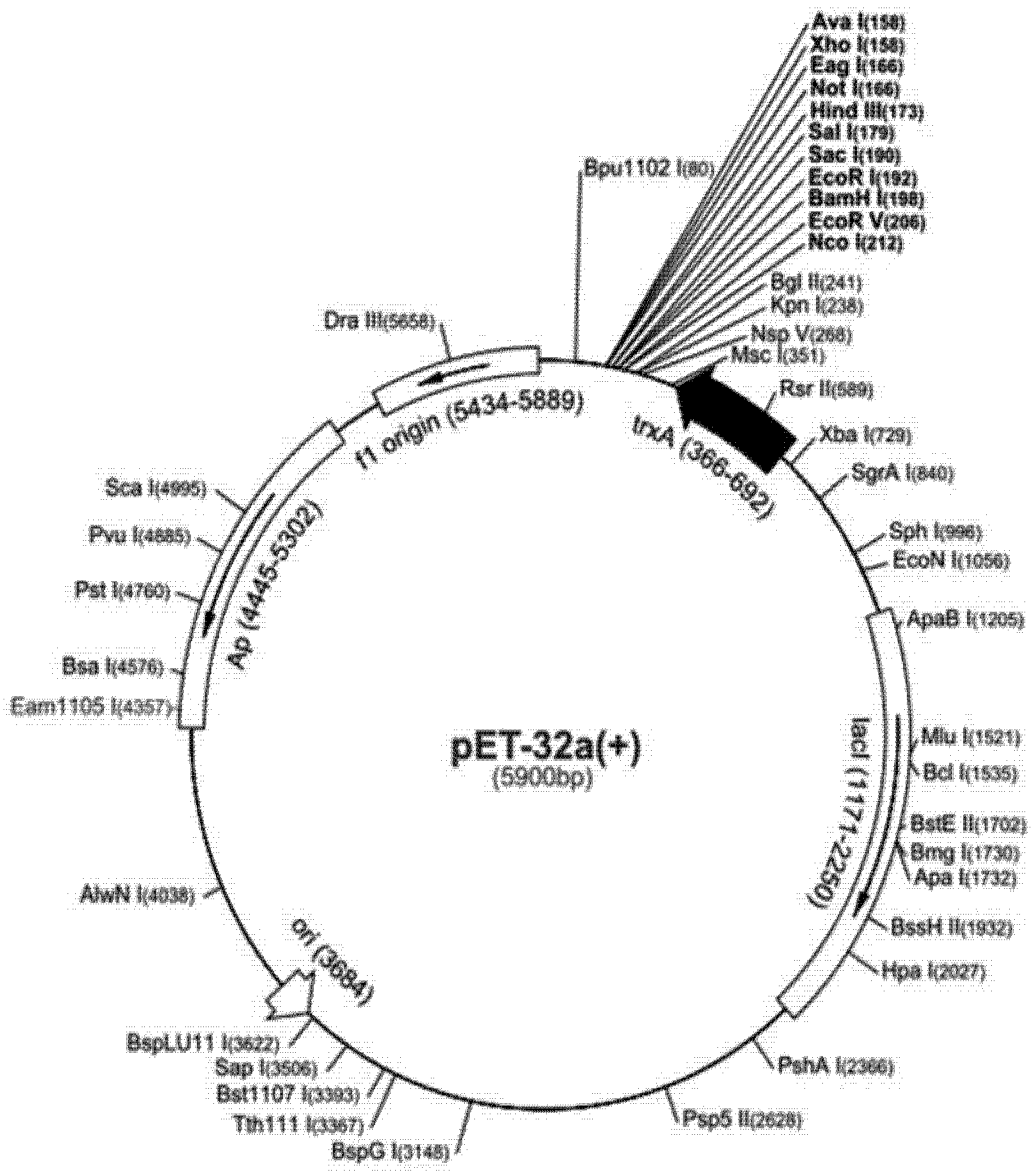


图 2

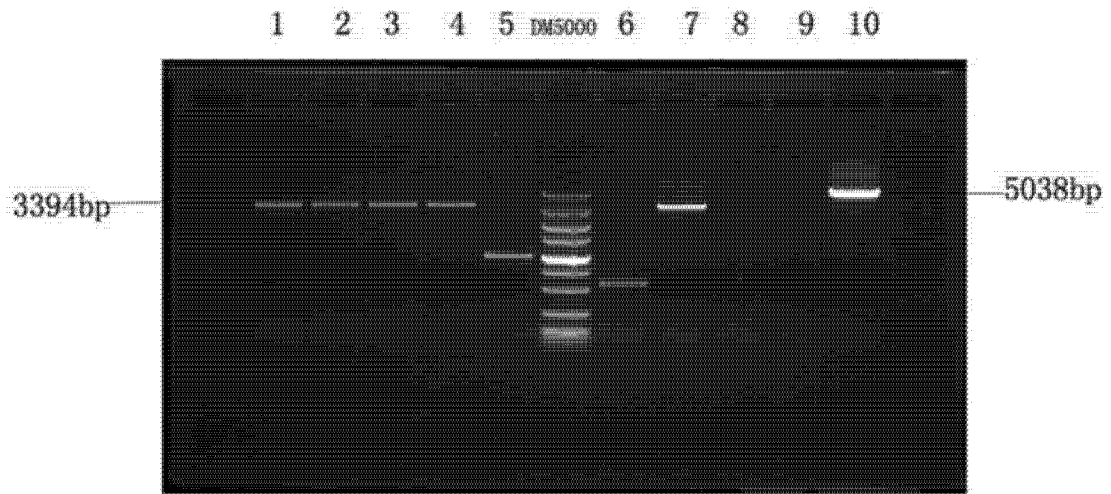


图 3

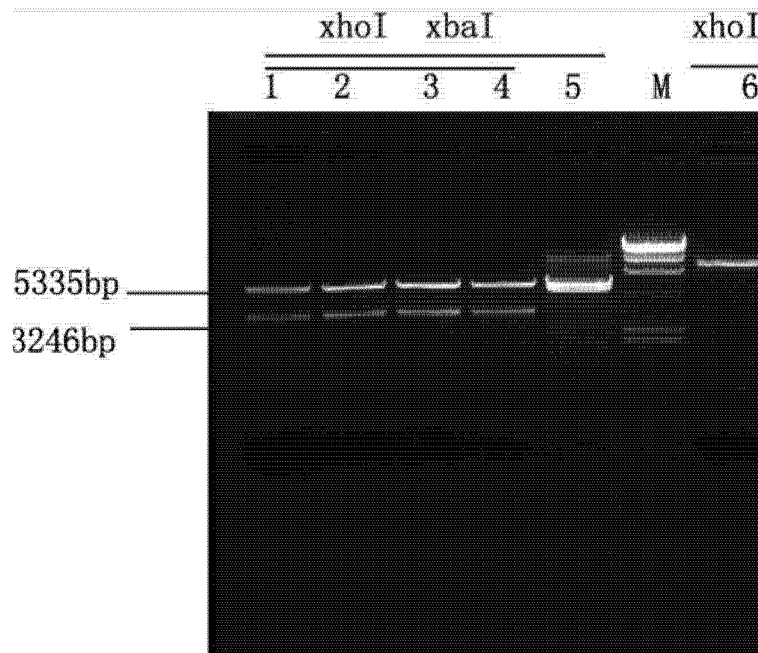


图 4

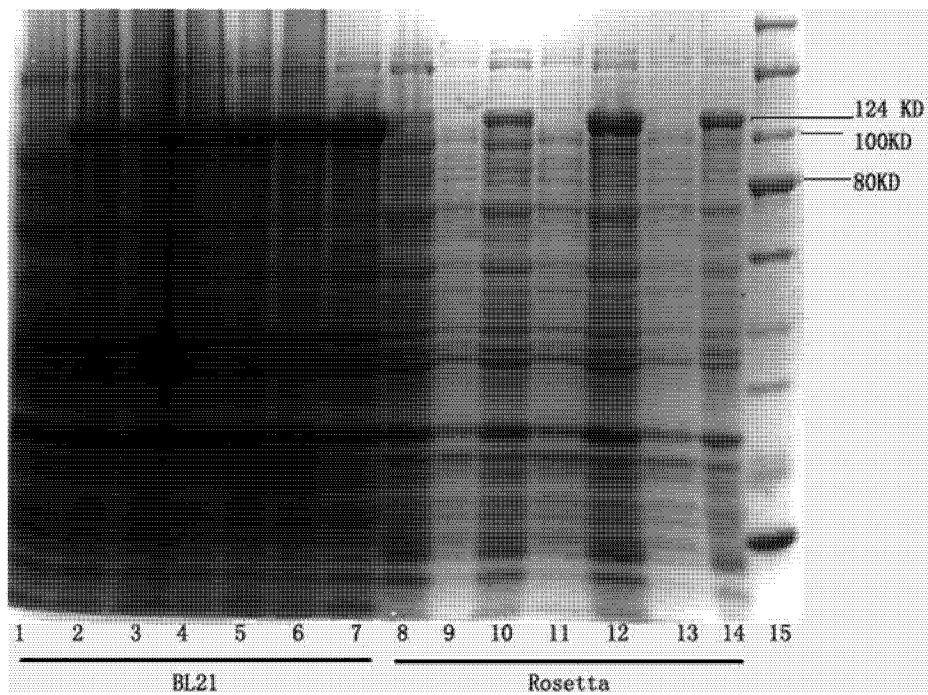


图 5

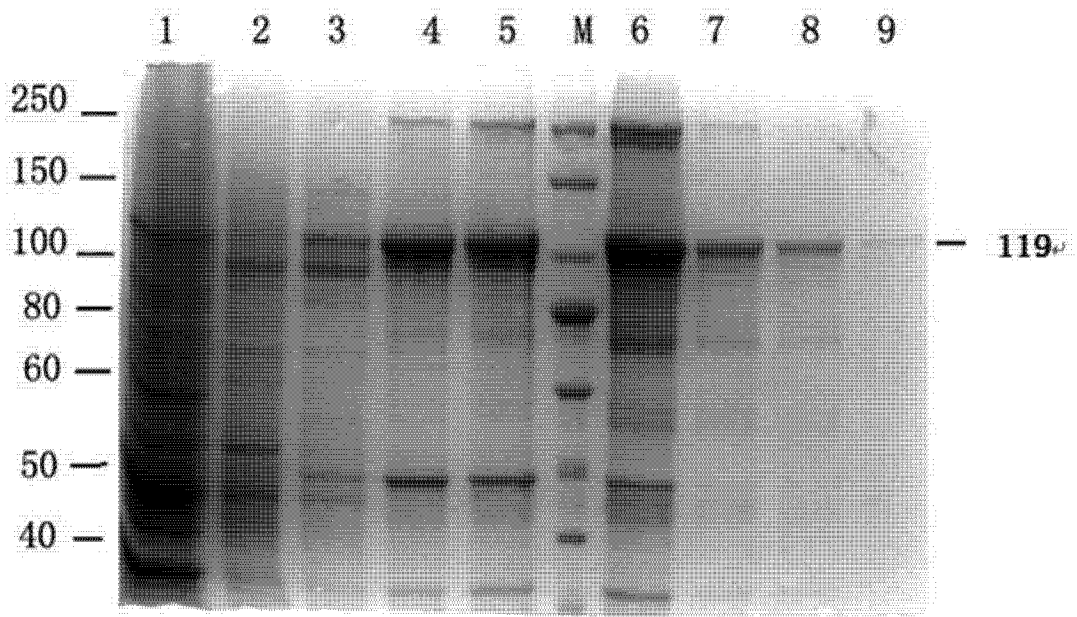


图 6

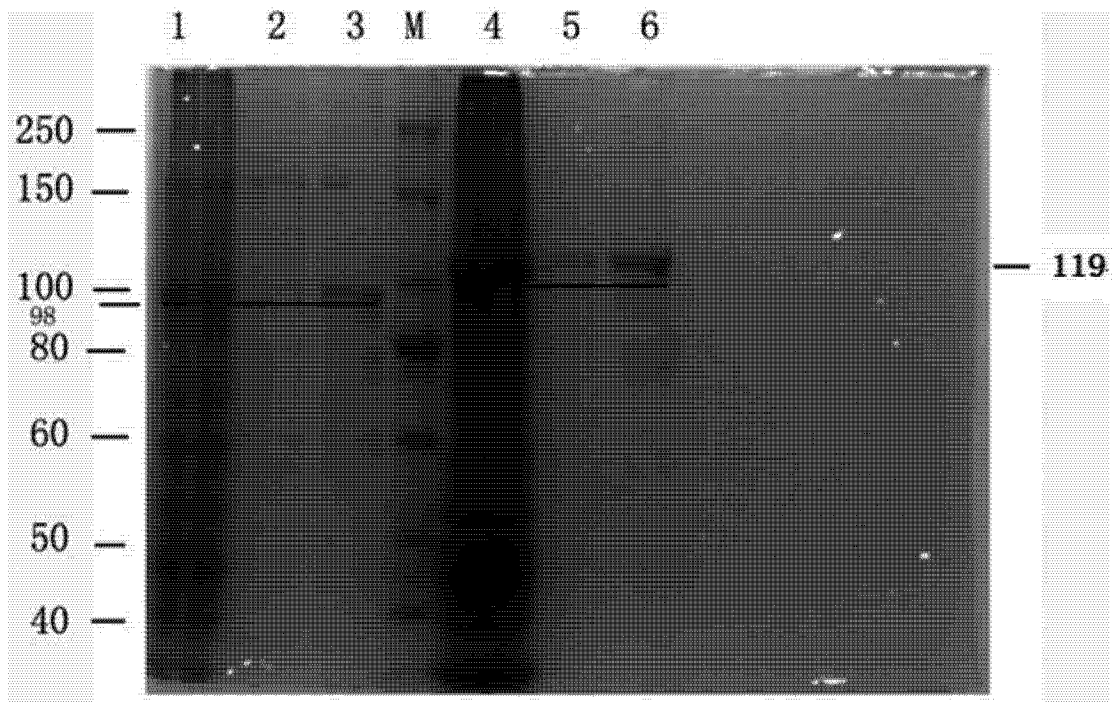


图 7

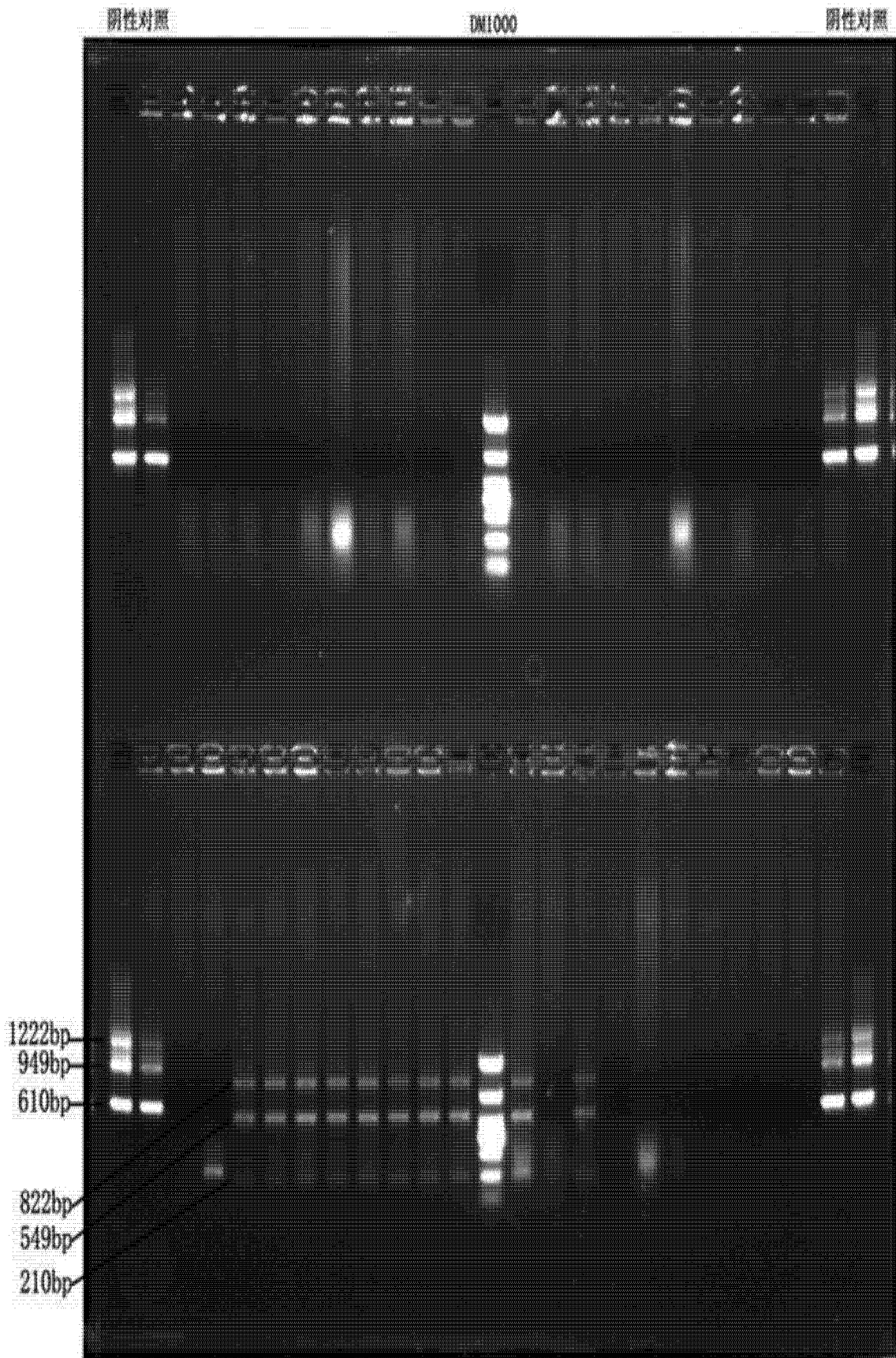


图 8

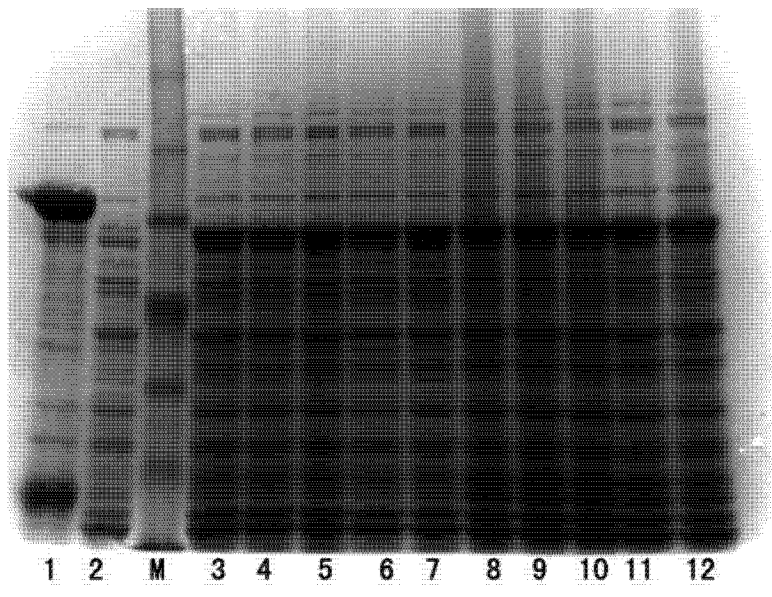


图 9

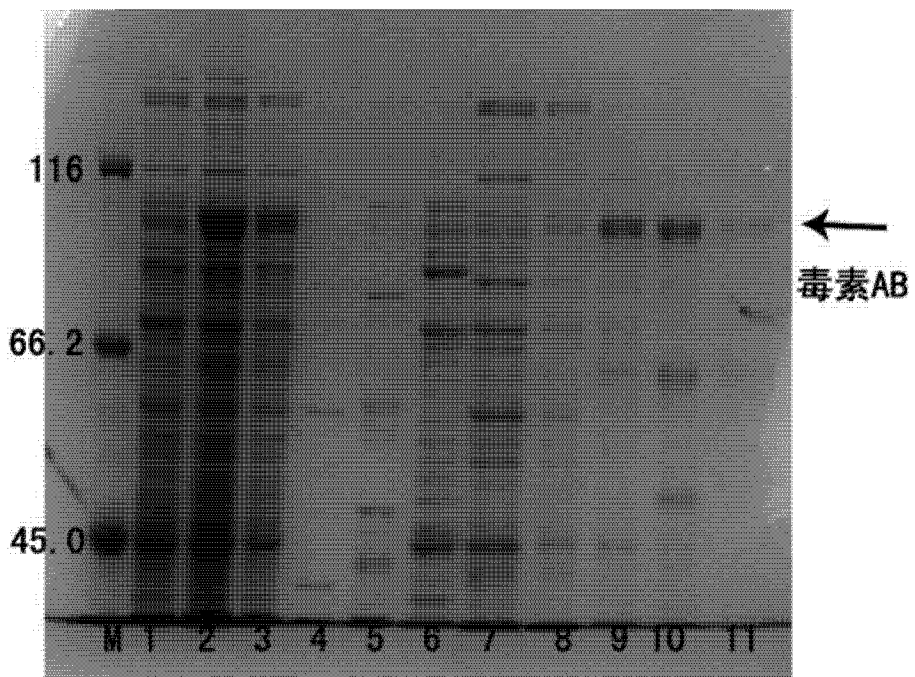


图 10

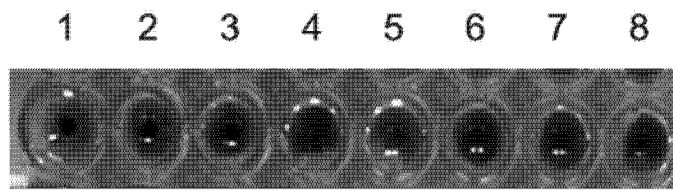


图 11

专利名称(译)	一种艰难梭菌毒素A/B的融合蛋白及其编码基因与应用		
公开(公告)号	CN103772509A	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	CN201410023632.X	申请日	2014-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	山东国际生物科技园发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东国际生物科技园发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东国际生物科技园发展有限公司		
[标]发明人	冯东晓 成岩 孙君波 刘枫 杨小平 刘红 王晓玉 张淑敏		
发明人	冯东晓 成岩 孙君波 刘枫 杨小平 刘红 王晓玉 张淑敏		
IPC分类号	C07K19/00 C07K16/12 C07K1/22 C12N15/62 C12N15/70 C12N1/21 G01N33/53 A61K39/08 A61P31/04 A61P1/12		
其他公开文献	CN103772509B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种艰难梭菌毒素A/B的融合蛋白及其编码基因与应用，其中，艰难梭菌毒素A/B的融合蛋白的序列如SEQ ID NO：2所示；编码基因如SEQ ID NO：1所示。在本发明中，通过PCR扩增分段获得经密码子改造后的艰难梭菌毒素A羧基端基因与原核表达载体pET32b (+)组成的载体片段、艰难梭菌毒素B羧基端结构域与柔性链的融合基因片段，获得的融合片段及获得的载体分别酶切回收连接，获得重组表达质粒pET32b (+)-ToxA-ToxB，重组质粒转化表达宿主BL21 (DE3)菌株后可被IPTG诱导表达得到艰难梭菌毒素A/B的融合蛋白。本发明的艰难梭菌毒素A/B的融合蛋白不仅可以获得同时带有毒素A和毒素B免疫原性的融合蛋白，而且还减少CDAD疫苗研发和生产的难度以及成本。

