

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510030586.7

[51] Int. Cl.

C12N 9/00 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年4月25日

[11] 公开号 CN 1952121A

[22] 申请日 2005.10.17

[21] 申请号 200510030586.7

[71] 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市岳阳路 320 号

[72] 发明人 陈江野 逯 杨

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 4 页

[54] 发明名称

白念珠菌 CTD 蛋白激酶基因及其用途

[57] 摘要

本发明提供了一种新的白念珠菌的 CTD 蛋白激酶 CaSrb10 蛋白，编码 CaSrb10 蛋白的多核苷酸和经重组技术产生这种 CaSrb10 蛋白的方法。本发明还公开了编码这种 CaSrb10 蛋白的多核苷酸的用途。CaSrb10 在白念珠菌中是一个重要的毒性因子。在接种 casrb10/casrb10 缺失株后，存活下来的小鼠对野生型白念珠菌有一定的免疫力。

- 1.一种分离的白念珠菌 CaSrb10 多肽，其特征在于，该多肽选自下组：
 - (a)具有 SEQ ID NO:2 氨基酸序列的多肽；
 - (b)将 SEQ ID NO:2 氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的，并且具有调控白念珠菌丝状生长的功能的由(a)衍生的多肽。
- 2.如权利要求 1 所述的多肽，其特征在于，该多肽是具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽。
- 3.一种分离的多核苷酸，其特征在于，它包含一核苷酸序列，该核苷酸序列选自下组：
 - (a)编码如权利要求 1 所述多肽的多核苷酸；
 - (b)与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。
- 4.如权利要求 3 所述的多核苷酸，其特征在于，该多核苷酸编码具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的多肽；
更佳地，该多核苷酸的序列选自下组的一种：
 - (i) 具有 SEQ ID NO: 1 中 1-1824 位的序列；
 - (ii) 具有 SEQ ID NO: 1 中 1-1827 位的序列。
- 5.一种载体，其特征在于，它含有权利要求 3 所述的多核苷酸。
- 6.一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，它含有权利要求 5 所述的载体。
7. 一种多肽的制备方法，其特征在于，该方法包含：
 - (a)在适合表达的条件下，培养权利要求 6 所述的宿主细胞；
 - (b)从培养物中分离出白念珠菌 CaSrb10 蛋白多肽。
- 8.一种能与权利要求 1 所述的白念珠菌 CaSrb10 蛋白特异性结合的抗体。
- 9.一种检测样品中是否存在 CaSrb10 蛋白的方法，其特征在于，包括：
将样品与权利要求 8 所述的抗体接触，
观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在 CaSrb10 蛋白。
- 10.一种 *CaSRB10* 基因的用途，其特征在于，用于制备 *casrb10* / *casrb10* 缺失株。

白念珠菌 CTD 蛋白激酶基因及其用途

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体地说，本发明涉及新的编码白念珠菌 CTD 蛋白激酶基因 *CaSRB10* 的多核苷酸，以及此多核苷酸编码的多肽。本发明还涉及此多核苷酸和多肽的用途和制备。*CaSrb10* 是一种白念珠菌菌丝生长和毒性相关因子。

背景技术

白念珠菌也称为白色念珠菌(*Candida albicans*)，它是一种临床上分离到的一种机会性人体致病真菌，在免疫下调的病人中，如器官移植病人，艾滋病毒感染者等，可以引起广泛的浅部和深部系统感染，感染部位包括口腔，女性阴道等，引起鹅口疮，阴道炎等疾病，也可以侵入表皮和内皮细胞进入血液到达内脏器官，如肾脏，脑部等，导致败血症，严重可以导致死亡(Odds, F.C. 1994. J Am Acad Dermatol. 31: S2-S5.)。

白念珠菌在不同的生长条件下，呈现不同的生长形态，包括菌体(yeast form)，假菌丝(pseudohyphae)和菌丝(hyphae)。各种形态之间的相互转化能力直接影响白念珠菌的致病能力(Odds, F.C. 1985. Crit Rev Microbiol. 12: 45-93; Brown, A.J.P. et al. 1999. Trends Microbiol. 7: 334-338.)，而形态转换缺陷的菌株其系统感染能力下降或消失(Lo, H.J. et al, 1997. Cell. 90: 939-949; Braun, B.R. et al. 2001. EMBO J. 20: 4753-61; Hwang, C.S. et al. 2003. Mol Microbiol. 47: 1029-43)。

最近有些实验室利用减毒菌株作为疫苗来免疫小鼠，取得了比较好的效果，并对其进行了深入的生物化学上的分析，为将来疫苗的发明提供了相应的理论基础(Elena FA et al, Proteomics 2004,4,3007-3020; Elena FA et al, Proteomics 2004,4,1204-1215)。

许多培养条件可以引起白念珠菌的形态转换，包括血清，温度，pH 值，氮源利用以及氧压等等。细胞内调节白念珠菌形态转换的分子机制主要有 MAPK 途径(mitogen-activated protein kinase pathway)和 cAMP/PKA 途径(cAMP-dependent protein kinase A pathway)。同时还发现 Cph2 介导的，Efg1 介导的以及 pH 应答的信号途径也都和白念珠菌的形态发生相关(Lane, S. et al. 2001. Mol Cell Biol. 21: 6418-28; Stoldt, V.R., et al. 1997. EMBO J. 16: 1982-1991; El Barkani, A. et al. 2000. Mol Cell Biol. 20: 4635-4647.)。

在白念珠菌中还存在抑制效应的信号途径，主要是 Tup1 介导的信号途径，依靠特异性 DNA 结合抑制因子 Rfg1, Nrg1 等来发挥作用(Kadosh, D. et al. 2001. Mol Cell Biol. 21: 2496-2505; Braun, B.R. et al. 2001. EMBO J. 20: 4753-4761.)。

由于白念珠菌会严重威胁人们的身体健康，因此，本领域迫切需要开发与白念珠菌的生长、感染过程或毒性有关的各种蛋白或因子，以便更好地防治白念珠菌引起的感染。

发明内容

本发明的目的是提供一种新的与白念珠菌毒性有关的 CTD 蛋白激酶 CaSrb10 蛋白以及其片段、类似物和衍生物。

本发明的另一目的是提供编码这些多肽的多核苷酸。

本发明的另一目的是提供生产这些多肽的方法以及该多肽和编码序列的用途。

在本发明的第一方面，提供了一种新颖的、分离出的白念珠菌 CTD 蛋白激酶 CaSrb10 多肽，它包括：具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。

较佳地，该多肽选自下组：

(a)具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽；

(b)将 SEQ ID NO:2 氨基酸序列经过一个或多个(如 1-50 个，较佳地 1-20 个，更佳地 1-10 个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的，并且具有调控白念珠菌丝状生长的功能的由(a)衍生的多肽。

更佳地，该多肽是具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽。

在本发明的第二方面，提供编码分离的这些多肽的多核苷酸，该多核苷酸包含一核苷酸序列，该核苷酸序列与选自下组的一种核苷酸序列有至少 70%相同性：(a) 编码上述白念珠菌 CaSrb10 多肽的多核苷酸；和(b)与多核苷酸(a)互补的多核苷酸。较佳地，该多核苷酸编码具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的多肽。更佳地，该多核苷酸的序列是选自下组的一种：(i)具有 SEQ ID NO: 1 中 1-1824 位的序列；(ii) 具有 SEQ ID NO: 1 中 1-1827 位的序列。

在本发明的第三方面，提供了含有上述多核苷酸的载体，以及被该载体转化或转导的宿主细胞或者被上述多核苷酸直接转化或转导的宿主细胞。

在本发明的第四方面，提供了制备具有白念珠菌 CaSrb10 蛋白活性的多肽的方法，该方法包含：(a)在适合表达白念珠菌 CaSrb10 蛋白的条件下，培养上述被转化

或转导的宿主细胞；(b)从培养物中分离出具有白念珠菌 CaSrb10 蛋白活性的多肽。

在本发明的第五方面，提供了与上述的白念珠菌 CaSrb10 多肽特异性结合的抗体。

在本发明的第六方面，提供了模拟、促进、拮抗白念珠菌 CaSrb10 多肽活性的化合物，以及抑制白念珠菌 CaSrb10 多肽的表达的化合物。还提供了筛选和/或制备这些化合物的方法。较佳地，该化合物是白念珠菌 CaSrb10 多肽的编码序列或其片段的反义序列。

在本发明的第七方面，提供了检测样品中是否存在 CaSrb10 蛋白的方法，它包括：将样品与 CaSrb10 蛋白的特异性抗体接触，观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在 CaSrb10 蛋白。

在本发明的第八方面，提供了一种检测与白念珠菌 CaSrb10 多肽异常表达相关的疾病或疾病易感性的方法，该方法包括：检测编码所述多肽的核酸序列中是否存在突变。

在本发明的第九方面，提供了本发明多肽和编码序列的用途。本发明多肽可被用于筛选促进白念珠菌 CaSrb10 多肽活性的激动剂，或者筛选抑制白念珠菌 CaSrb10 多肽活性的拮抗剂、或者被用于肽指纹图谱鉴定。本发明的白念珠菌 CaSrb10 蛋白的编码序列或其片段，可被作为引物用于 PCR 扩增反应，或者作为探针用于杂交反应，或者用于制造基因芯片或微阵列。

在一个优选例中，白念珠菌 CaSrb10 多肽或基因被用于制备检测白念珠菌的试剂，或者筛选抑制 CaSrb10 表达或活性的抑制剂或拮抗剂，或作为筛选抑制 CaSrb10 表达或活性的靶点。

在一优选例中，提供了一种 *CaSRB10* 基因的用途，它用于制备 *casrb10* / *casrb10* 缺失株。这种 *casrb10* / *casrb10* 缺失株能使小鼠对野生型的白念珠菌产生免疫力，可在此基础上开发有用的疫苗。

在本发明的第十方面，提供了一种药物组合物，它含有安全有效量(如 0.001-99.99wt%)的本发明的白念珠菌 CaSrb10 多肽的拮抗剂或抑制剂或抗体以及药学上可接受的载体。这些药物组合物可抑制白念珠菌的毒性进而防止白念珠菌的感染。

本发明的其它方面由于本文的技术的公开，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

下列附图用于说明本发明的具体实施方案，而不用于限定由权利要求书所界定

的本发明范围。

图 1A 显示了白念珠菌 *CaSRB10* 基因开放阅读框的脱氧核糖核苷酸序列。

图 1B 显示了白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白的氨基酸序列。

图 1C 显示了白念珠菌 *CaSrb10* 与酿酒酵母 *ScSrb10* 氨基酸序列比较。罗马数字表示的是 11 个保守的激酶亚结构域。

图 2A 显示了在白念珠菌中敲除 *CaSRB10* 基因的策略及其染色体上的酶切位点。

图 2B 显示了在白念珠菌 *CaSRB10* 基因的敲除过程中各种菌株的 Southern 杂交图谱。所用探针为 *CaSRB10* 编码框 3'端的 1.2kb 片段(如图所示)。

图 3A 显示了白念珠菌 *casrb10/casrb10* 缺失株在菌体生长条件下在固体培养基和液体培养基上的形态，培养条件为 SD 固体培养基 30℃ 培养 5 天；YPD 液体培养基，30℃ 培养 12 个小时。

图 3B 显示了白念珠菌 *casrb10/casrb10* 缺失株在菌体生长条件下对菌丝特异性基因表达的影响。YPD 液体培养基，30℃ 培养 12 个小时。

图 4 显示了 *casrb10/casrb10* 缺失株与 *tup1/tup1* 缺失株形态的比较

图 5A 显示了在小鼠系统感染实验中，*CaSRB10* 基因的敲除使白念珠菌毒性降低，注射液浓度为 5×10^7 细胞/毫升，每只小鼠尾静脉注射 100 μ l 菌液，共注射 8 只小鼠。

图 5B 显示了在小鼠系统感染实验中，注射过 *casrb10* 缺失株的小鼠对野生型的白念珠菌产生了一定的免疫力。

具体实施方式

本发明人通过广泛而深入的研究，首次在白念珠菌中克隆了一种 CTD 蛋白激酶。具体地，本发明人利用生物信息学比较分析和 PCR 技术，从白念珠菌的基因组克隆了一个新基因，该基因编码的产物和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的 *SRB10* 基因编码的蛋白具有一定的同源性，同源性达 50%，它们的激酶亚结构域也非常相似，因此命名为 *CaSRB10*。利用同源重组原理，在白念珠菌中敲除 *CaSRB10* 基因，构建了 *casrb10/casrb10* 缺失株，该缺失株在 YPD，30℃ 的培养条件下，生长状态为伸长的假菌丝。同 *tup1/tup1* 缺失株相比，它的这种假菌丝状态不是很均匀，中间混杂了 30%左右的酵母形态的菌体。在 Lee's 培养基,37℃ 菌丝诱导的培养条件下，*casrb10/casrb10* 缺失株可以形成菌丝，而 *tup1/tup1* 缺失株依然以长的假菌丝形态生长。小鼠系统感染实验表明 *casrb10/casrb10* 缺失株相对于野生型来讲毒

性减低。在接种 *casrb10/casrb10* 缺失株后，存活下来的小鼠对野生型白念珠菌有一定的免疫力。这些结果表明，CaSrb10 在白念珠菌中是一个重要的毒性因子。在此基础上完成了本发明。

在本发明中，术语“CaSrb10 蛋白”、“CaSrb10 多肽”或“CTD 蛋白激酶 CaSrb10”可互换使用，都指具有白念珠菌 CTD 蛋白激酶 CaSrb10 氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的蛋白或多肽。它们包括含有或不含起始甲硫氨酸的 CTD 蛋白激酶 CaSrb10。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质，原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开，则为分离纯化的。

如本文所用，“分离的 CaSrb10 蛋白或多肽”是指 CaSrb10 多肽基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化 CaSrb10 蛋白。基本上纯的多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽，优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主(例如，细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。本发明的多肽还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

本发明还包括白念珠菌 CaSrb10 蛋白的片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然白念珠菌 CaSrb10 蛋白相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与抗原 IgG 片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

在本发明中，术语“白念珠菌 CaSrb10 多肽”指具有白念珠菌 CaSrb10 蛋白活性的 SEQ ID NO: 2 序列的多肽。该术语还包括具有与白念珠菌 CaSrb10 蛋白相同

功能的、SEQ ID NO: 2 序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于): 一个或多个(通常为 1-50 个, 较佳地 1-30 个, 更佳地 1-20 个, 最佳地 1-10 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代, 以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 20 个以内, 较佳地为 10 个以内, 更佳地为 5 个以内)氨基酸。例如, 在本领域中, 用性能相近或相似的氨基酸进行取代时, 通常不会改变蛋白质的功能。又比如, 在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括白念珠菌 CaSrb10 蛋白的活性片段和活性衍生物。该术语还包括与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 70%, 较佳地至少 80%, 更佳地至少 90%, 最佳地至少 95% 序列相同性, 并且具有 QQ 功能的多肽。

该多肽的变异形式包括: 同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与白念珠菌 *CaSRB10* DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用抗白念珠菌 CaSrb10 多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽, 如包含白念珠菌 CaSrb10 多肽或其片段的融合蛋白(如与 GST、6His 等形成的融合蛋白)。除了几乎全长的多肽外, 本发明还包括了白念珠菌 CaSrb10 多肽的可溶性片段。通常, 该片段具有白念珠菌 CaSrb10 多肽序列的至少约 10 个连续氨基酸, 通常至少约 30 个连续氨基酸, 较佳地至少约 50 个连续氨基酸, 更佳地至少约 80 个连续氨基酸, 最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

本发明发明还提供白念珠菌 CaSrb10 蛋白或多肽的类似物。这些类似物与天然白念珠菌 CaSrb10 多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异, 也可以是不影响序列的修饰形式上的差异, 或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到, 如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变, 还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然 L-氨基酸的残基(如 D-氨基酸)的类似物, 以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解, 本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括: 体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化, 如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸, 磷酸丝氨酸, 磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

在本发明中, “白念珠菌 CaSrb10 蛋白保守性变异多肽”指与 SEQ ID NO: 2

的氨基酸序列相比，有至多 10 个，较佳地至多 8 个，更佳地至多 5 个，最佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 1 进行氨基酸替换而产生。

表 1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用，“简并的变异体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO:2 的蛋白质，但与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列有差别的核酸序列。

编码 SEQ ID NO:2 的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；

成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的，等位变异体是一个多核苷酸的替换形式，它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入，但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，更佳地至少 70%，更佳地至少 80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 $0.2\times\text{SSC}$, 0.1%SDS, 60°C ；或(2)杂交时加有变性剂，如 50%(v/v)甲酰胺，0.1%小牛血清/0.1% Ficoll, 42°C 等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90%以上,更好是 95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与 SEQ ID NO:2 所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。如本文所用，“核酸片段”的长度至少含 15 个核苷酸，较好是至少 30 个核苷酸，更好是至少 50 个核苷酸，最好是至少 100 个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术(如 PCR)以确定和/或分离编码 CaSrb10 蛋白的多聚核苷酸。

本发明中的多肽和多核苷酸优选以分离的形式提供，更佳地被纯化至均质。

本发明的白念珠菌 *CaSRB10* 核苷酸全长序列或其片段通常可以用 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，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。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。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前, 已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明的 CaSrb10 蛋白(或其片段, 或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外, 还可通过化学合成将突变引入本发明的 CaSrb10 蛋白序列中。

应用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法(Saiki, et al. Science 1985;230: 1350-1354)被优选用于获得本发明的基因。特别是很难从文库中得到全长的 cDNA 时, 可优选使用 RACE 法(RACE-cDNA 末端快速扩增法), 用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择, 并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的 DNA/RNA 片段。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体, 以及用本发明的载体或 CaSrb10 蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞, 以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

通过常规的重组 DNA 技术(Science, 1984; 224: 1431), 可利用本发明的多聚核苷酸序列可用来表达或生产重组的 CaSrb10 多肽。一般来说有以下步骤:

(1).用本发明的编码白念珠菌 CaSrb10 多肽的多核苷酸(或变体), 或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

(2).在合适的培养基中培养的宿主细胞;

(3).从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明中, 白念珠菌 *CaSRB10* 多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。在本发明中适用的载体包括但不限于: 在细菌中表达的基于 T7 的表达载体(Rosenberg, et al. Gene, 1987, 56: 125); 在哺乳动物细胞中表达的 pMSXND 表达载体(Lee and Nathans, J Bio Chem. 263: 3521,1988)和在昆虫细胞中表达的来源于杆状病毒的载体。总之, 只要能在宿主体内复制和稳定, 任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含白念珠菌 *CaSRB10* 编码 DNA 序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等(Sambrook, et al. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989)。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上, 以指导 mRNA 合成。这些启动子的代表性例子有: 大肠杆菌的 lac 或 trp 启动子; λ 噬菌体 PL 启动子; 真核启动子包括 CMV 立即早期

启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、反转录病毒的 LTRs 和其他一些已知的可控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

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，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS、293 细胞、或 Bowes 黑素瘤细胞的动物细胞等。

本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时，如果在载体中插入增强子序列时将会使转录得到增强。增强子是 DNA 的顺式作用因子，通常大约有 10 到 300 个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。可举的例子包括在复制起始点晚期一侧的 100 到 270 个碱基对的 SV40 增强子、在复制起始点晚期一侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl_2 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。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、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其

它各种液相层析技术及这些方法的结合。

重组的白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白或多肽有多方面的用途。这些用途包括(但不限于): 用于筛选促进或对抗 *CaSrb10* 蛋白功能的抗体、多肽或其它配体。用表达的重组白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白筛选多肽库可用于寻找有治疗价值的能抑制白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白功能的多肽分子。

另一方面, 本发明还包括对白念珠菌 *CaSRB10* DNA 或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体, 尤其是单克隆抗体。“特异性”是指抗体能结合于白念珠菌 *CaSRB10* 基因产物或片段。较佳地, 指那些能与白念珠菌 *CaSRB10* 基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白的分子, 也包括那些并不影响白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的白念珠菌 *CaSRB10* 基因产物结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体, 而且还包括具有免疫活性的抗体片段, 如 Fab'或(Fab)₂ 片段; 抗体重链; 抗体轻链; 遗传工程改造的单链 Fv 分子 (Ladner 等人, 美国专利 No. 4,946,778); 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。

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, 纯化的白念珠菌 *CaSRB10* 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。与之相似的, 表达白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白或其具有抗原性的片段的细胞用来免疫动物来生产抗体。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(见 Kohler 等人, *Nature* 256:495, 1975; Kohler 等人, *Eur.J.Immunol.* 6: 511, 1976; Kohler 等人, *Eur.J.Immunol.* 6: 292, 1976; Hammerling 等人, *In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y., 1981)。本发明的抗体包括能阻断白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白功能的抗体以及不影响白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用白念珠菌 *CaSRB10* 基因产物的片段或功能区, 通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与白念珠菌 *CaSRB10* 基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如 *E. Coli*)中生产的基因产物来免疫动物而产生; 与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽), 可用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

抗白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中, 检测活检标本中的白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白。

本发明中的抗体可用于治疗或预防与白念珠菌 CaSrb10 蛋白相关的疾病。给予适当剂量的抗体可以刺激或阻断白念珠菌 CaSrb10 蛋白的产生或活性。

抗体也可用于设计成针对体内某一特殊部位的免疫毒素。如白念珠菌 CaSrb10 蛋白高亲和性的单克隆抗体可与细菌或植物毒素(如白喉毒素, 蓖麻蛋白, 红豆碱等)共价结合。一种通常的方法是用巯基交联剂如 SPDP, 攻击抗体的氨基, 通过二硫键的交换, 将毒素结合于抗体上, 这种杂交抗体可用于杀灭表达 CaSrb10 蛋白的白念珠菌。

多克隆抗体的生产可用白念珠菌 CaSrb10 蛋白或多肽免疫动物, 如家兔, 小鼠, 大鼠等。多种佐剂可用于增强免疫反应, 包括但不限于弗氏佐剂等。

利用本发明的 CaSrb10 蛋白, 通过各种常规筛选方法, 可筛选出与 CaSrb10 蛋白发生相互作用的物质, 如抗体、抑制剂、激动剂或拮抗剂等。

本发明的 CaSrb10 蛋白的抗体、抑制剂、或拮抗剂等, 当在治疗上进行施用(给药)时, 可提供不同的效果。通常, 可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中, 其中 pH 通常约为 5-8, 较佳地 pH 约为 6-8, 尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药, 其中包括(但不限于): 口腔内、阴道内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。

例如, 本发明的 CaSrb10 蛋白的抗体、抑制剂、或拮抗剂可直接用于疾病治疗, 例如, 用于抑制白念珠菌的正常生长, 进而减轻白念珠菌造成的感染。在使用本发明 CaSrb10 蛋白时, 还可同时使用其他治疗剂, 如其他抗真菌剂氟康唑等。

本发明还提供了一种药物组合物, 它含有安全有效量的抗 CaSrb10 多肽的抗体或其拮抗剂以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式, 例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物, 可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量, 例如每天约 1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外, 本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时, 是将安全有效量的 CaSrb10 蛋白的拮抗剂或抗体施用于哺乳动物, 其中该安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重, 而且在大多数情况下不超过约 8 毫克/千克体重, 较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 1 毫克/千克体重。当然, 具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素, 这些都是熟练医师技能

范围内的。

能与白念珠菌 CaSrb10 蛋白结合的多肽分子可通过筛选由各种可能组合的氨基酸结合于固相物组成的随机多肽库而获得。筛选时，宜对白念珠菌 CaSrb10 蛋白分子进行标记。

本发明还涉及定量和定位检测白念珠菌 CaSrb10 蛋白水平的诊断试验方法。这些试验是本领域所熟知的，且包括 FISH 测定和放射免疫测定。试验中所检测的白念珠菌 CaSrb10 蛋白水平，可以用作判断白念珠菌是否会造成严重的感染。

一种检测检测样品中是否存在 CaSrb10 蛋白的方法是利用 CaSrb10 蛋白的特异性抗体进行检测，它包括：将样品与 CaSrb10 蛋白特异性抗体接触；观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在 CaSrb10 蛋白。

CaSrb10 蛋白的多聚核苷酸可用于 CaSrb10 蛋白相关疾病的诊断。在诊断方面，CaSrb10 蛋白的多聚核苷酸可用于检测 CaSrb10 蛋白的表达与否。如 *CaSRB10* DNA 序列可用于对活检标本的杂交以判断 CaSrb10 蛋白的表达异常。杂交技术包括 Southern 印迹法, Northern 印迹法、原位杂交等。这些技术方法都是公开的成熟技术，相关的试剂盒都可从商业途径得到。本发明的多核苷酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列(microarray)或 DNA 芯片(又称为“基因芯片”)上，用于分析组织中基因的差异表达分析和基因诊断。用 CaSrb10 蛋白特异的引物进行 RNA-聚合酶链反应(RT-PCR)体外扩增也可检测 CaSrb10 蛋白的转录产物。

检测 *CaSRB10* 基因的突变也可用于诊断 CaSrb10 蛋白相关的疾病。CaSrb10 蛋白突变的形式包括与正常野生型 *CaSRB10* DNA 序列相比的点突变、易位、缺失、重组和其它任何异常等。可用已有的技术如 Southern 印迹法、DNA 序列分析、PCR 和原位杂交检测突变。另外，突变有可能影响蛋白的表达，因此用 Northern 印迹法、Western 印迹法可间接判断基因有无突变。

在本发明的一个实例中，提供了一种分离的多核苷酸，它编码具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的多肽。本发明的多核苷酸是从白念珠菌基因组文库中分离出的。其序列如 SEQ ID NO:1 所示，它包含的多核苷酸序列全长为 1827 个碱基，其开放读框位于 1-1824 位，编码全长为 608 个氨基酸的白念珠菌 CaSrb10 蛋白(SEQ ID NO: 2)。CaSrb10 蛋白为预防和治疗白念珠菌感染提供新的治疗途径，具有潜在的应用前景。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本

发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例

材料

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、探针标记试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司；消解酶(Zymolyase 100T)购自日本 Seikagaku 公司；用于 PCR 扩增的 KOD plus 购自日本的 Toyobo 公司。

通用方法：

(1)白念珠菌基因组 DNA 抽提

白念珠菌培养过夜用 ddH₂O 洗 1 次，悬浮在 500 μ l 溶液 A 中(1M 山梨醇, 100mM EDTA pH8.0)，加入 5 μ l 20mg/ml 的消解酶(Zymolase)，37 $^{\circ}$ C 放置 1 小时后，高速离心去上清，细胞用 500 μ l TE 缓冲液(20mM Tris·HCl pH7.5, 1mM EDTA)洗一次，悬浮在 350 μ l TE 缓冲液中，并加入 90 μ l 溶液 B(250mM EDTA pH8.0, 400mM Tris·HCl pH8.0, 2% SDS), 65 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟，加入 80 μ l 15M KAc，冰上放置 1 小时，高速离心 5 分钟，吸取上清并加入 1ml 的无水乙醇，-20 $^{\circ}$ C 放置 20 分钟，高速离心 5 分钟，沉淀用 70%乙醇洗一次，离心后烘干。

(2)Southern 分析

白念珠菌基因组 DNA 抽提后，基因组 DNA 用 BamHI 和 SstI 完全酶切，电泳完成后的琼脂糖胶分别用变性液和中和液浸泡 45 min，尼龙膜用双蒸水或 10xSSC 浸透，搭好转膜平台，胶与膜间用 Parafilm 封闭，加一个 500g 砝码。以 10xSSC 为转膜液转移过夜，第二天漂洗晾干交联。交联后的膜装入杂交管，加入 10ml 预杂交液(6xSSC, 5xdenhardt's Reagent, 0.5%SDS, 100 μ g/ml 鱼精 DNA 于 42 $^{\circ}$ C 预杂交 12h，探针在 100 $^{\circ}$ C 变性 5min，加入 150 μ l(约 1 / 3 所标记的探例)42 $^{\circ}$ C 杂交 10-16h。0.1xSSC, 0.1%SDS 洗两到三次，每次 40min，取出膜，晾干，室温或-70 $^{\circ}$ C 压片。探针标记用 Invitrogene 公司的随机引物标记试剂盒，照其说明操作。将含 25ng DNA 的溶液于 100 $^{\circ}$ C 加热变性 5-10min，置于冰浴中，再依次加入随机引物缓冲液混合物(Random Primers Buffer Mixture)，2 μ l dCTP，2 μ l dGTP，2 μ l dTTP，3 μ l [α -³²P]-dATP (10 μ Ci/ μ l)，混匀后加入 1 μ l Klenow 酶，于 25 $^{\circ}$ C 保温 1h，以 Sephadex G-

25 柱以 3000rpm 离心 4min，收集离心液，即为纯化后的探针溶液。探针于 100°C 变性 5min 冰上冷却后加入杂交体系中。

(3) Northern 分析

用热酚法抽提白念珠菌总 RNA，以及 Northern 杂交分析方法按以下方式进行：各菌株在 YPD，30°C 中培养至对数生长期后期，再转接至 YPD 培养基，起始 OD = 0.05，并在相应温度下培养指定时间，用热酚法抽提白念珠菌总 RNA。20μl 上样量包括 RNA 样品 12μl(25μg)，4μl 甲醛，2μl 10xMOPS，2μl 上样缓冲液、65°C 加热 10min，0°C 冷却 2min，离心 5s，上样。电泳在含甲醛的变性胶上进行(1g 琼脂糖，10ml 10xMOPS，87ml DEPC 处理水，加热融化稍冷后加入 2.7ml 37% 甲醛)。电泳条件为 100mA，50-70V，5-7h 电泳完成后同样用毛细法转膜，转膜液用 5xSSC。转膜过夜后，取出膜，不能使膜干透，用 Bio-Ra GS Gene Linker C3 protocol 紫外交联，加入 10 ml 预杂交液，65°C，2h 后更换为 10ml 杂交液，加入探针 65°C 杂交过夜，用 2xSSC，0.1%SDS，65°C 洗膜两次，每次 30min。杂交好的膜不要晾干，用保鲜膜包好后-70°C 压片。重杂交洗膜用 0.5%SDS，90-100°C 加热 5-10min，或按照 Clontech 推荐用 0.5%SDS，90-100°C 加热 10min 后让其自然冷却 10min 后取出备用，若不立即使用，用保鲜膜包好后置于-20°C 保存。

(4) 白念珠菌和酿酒酵母的转化

准备 PEG / LiAc 溶液(pH 7.5)10ml；在 1.5ml Eppendorf 管中依次加入质粒(如果转酿酒酵母，质粒 0.1 μg，如果转白念珠菌，线形化质粒大约 5μg)，10μl 10mg/ml 鱼精 DNA，混匀；加入 0.1ml 感受态细胞和 0.6ml PEG / LiAc，vortex 混匀；30°C 200rpm 培养 30min；加入 70μl DMSO，轻轻混匀；42°C 热冲击 15min，期间不时轻轻摇匀；冰浴~2min；高速离心 15s，吸掉上清，用 0.2ml TE 重悬细胞；涂布于适当的营养筛选 SD 平板上。

(5) 小鼠系统感染实验。

以体重在 16-18g ICR 雄性小鼠为实验对象，通过尾静脉注射 100μl 白念珠菌各菌株，并培养观测 25 天。各个菌株注射浓度为 5×10^7 细胞 / 毫升。

实施例 1

白念珠菌 *CaSRB10* 基因的获得及序列分析

利用同源序列搜索的方法，在白念珠菌(*Candida albicans*)基因组序列中(<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>)进行搜索。

根据搜索结果，合成以下引物：

上游引物：ATGAGTTATAGTTCAGCTTC(SEQ ID NO: 3)

下游引物：CTACCCACGTTTCTTTCTAAT (SEQ ID NO: 4)

以野生型白念珠菌基因组 DNA 为模板，通过常规的 PCR 反应获得长度约 2.0Kb 的扩增产物。

通过合成一系列引物对扩增产物所含的 DNA 序列进行双向测定。计算机分析表明，该扩增产物所含的全长 DNA 是一个新的 DNA 序列(如 SEQ ID NO: 1 和图 1A 所示)，编码一个新的 608 个氨基酸的蛋白质(如 SEQ ID NO: 2 和图 1B 所示)。

利用 BLAST 结构域搜索和同源性比较分析，发现该基因编码产物和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 *SRB10* 基因编码产物具有一定的同源性，同源性达 50%，因此把这个基因命名为 *CaSRB10*，其对应的编码蛋白产物为 CaSrb10。

结构域分析表明 CaSrb10 和 ScSrb10 的激酶亚结构域非常相似(图 1C)。从序列比较分析得知，白念珠菌 *CaSRB10* 基因是酿酒酵母 *ScSRB10* 基因的同源基因，白念珠菌 CaSrb10 是酿酒酵母 ScSrb10 的同源蛋白。

白念珠菌 *CaSRB10* 基因的核苷酸序列已送 GenBank 登录，在本申请之前尚未公开。

实施例 2

白念珠菌基因 *CaSRB10* 的敲除

为了研究 *CaSRB10* 基因在白念珠菌形态发生中的功能和作用，本实施例首先在白念珠菌中敲除 *CaSRB10* 基因。敲除策略见图 2A：体外构建了 *CaSRB10* 基因敲除质粒，把 *CaSRB10* 开放阅读框(open reading frame, ORF)中约 1.7 kb DNA 片段用 *HisG-URA3-HisG* 替代，通过同源重组的方法，可以把染色体上的 *CaSRB10* 基因中的 1.7kb DNA 同源片段用 *HisG-URA3-HisG* 给替换掉，从而敲除染色体上的 *CaSRB10* 基因。筛选标志 *URA3* 和一个拷贝 *HisG* 序列可以在含 5-氟乳清酸(5-fluoro-orotic acid, 5-FOA)平板上通过两个同向 *HisG* 同源序列在同一条染色体上的重组而环出，丢失了 *URA3* 筛选标志的重组子可以在 5-FOA 平板上通过负向筛选得到(Boeke et al. 1984. Mol Gen Genet. 197: 345–346.)，从而可以进行下一轮的转化进而敲除另一条染色体上的 *CaSRB10* 基因。

具体方法如下：

利用 5'引物:

CGGAATTCTTGGTGCTGGTAATAACGACAAGGA (SEQ ID NO: 5)

和 3'引物:

CGAGATCTCCATAAGTACCAGCAGCAATATATC (SEQ ID NO: 6)

从野生型白念珠菌株基因组 DNA 中用 PCR 的方法扩增大约 0.8kb 的片段, 连接到质粒 pCUB6(Praveen Singh 等人, *Infect Immun.* 2001 December; 69(12): 7898–7903) 的 EcoRI-BglII 位点,

利用 5'引物: CAGGATCCGACAATGATATAATGACCACTGCA (SEQ ID NO: 7)

和 3'引物: ACGCATGCTGGAAGACTGAAATCTTCATCAAC (SEQ ID NO: 8)

从野生型白念珠菌株基因组 DNA 中用 PCR 的方法扩增大约 0.6kb 的片段, 继续连接到质粒 pCUB6 的 BamHI-SphI 位点, 从而体外构建了 *CaSRB10* 基因敲除质粒 p*CaSRB10*-KO, 在此质粒中 *CaSRB10* 开放阅读框(open reading frame, ORF)中约 1.7 kb DNA 片段被 *HisG-URA3-HisG* 替代。质粒 p*CaSRB10*-KO 用 PstI 和 SphI 酶切并转化白念珠菌 *ura*⁻营养缺陷型菌株, 在缺少尿嘧啶的合成培养基上可以筛选到转入质粒的转化子。通过 0.8kb 和 0.6kb 两个同源片段和基因组上的 *CaSRB10* 同源片段重组, 可以把染色体上的 *CaSRB10* 基因中的 1.7 kb DNA 同源片段用 *HisG-URA3-HisG* 给替换掉, 从而破坏染色体上的 *CaSRB10* 基因, 正确插入的转化子通过 Southern 杂交分析确定。然后将正确插入的转化子涂在含 5-氟乳清酸(5-fluoro-orotic acid, 5-FOA)平板上, 由于 5-氟乳清酸对含有 *URA3* 的菌株来说是具有毒性的, 所以可以通过两个同向 *HisG* 同源序列在同一条染色体上的重组而将 *URA3* 环出, 那么在含 5-氟乳清酸(5-fluoro-orotic acid, 5-FOA)平板上长出的都是丢失了 *URA3* 筛选标记的重组菌。利用丢失了 *URA3* 筛选标记的重组菌可以进行下一轮的转化进而敲除另一条染色体上的 *CaSRB10* 基因。

CaSRB10 基因的敲除结果用 Southern 杂交技术进行检测与鉴定, 用 BamHI 和 SstI 酶切各个菌株基因组 DNA, 用 1.2kb 片段作探针杂交。根据白念珠菌基因组序列(<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>), 发现 CAI4 显示一条杂交条带, 单拷贝缺失株显示两条杂交条带, 在 5-FOA 平板上将一份拷贝的 *HisG* 和 *URA3* 环出后, 又出现了一条较小的杂交条带, 通过第二轮的转化, 可以将染色体上第二拷贝的 *CaSRB10* 基因敲除。图 2B 显示了 *CaSRB10* 基因敲除过程中各个菌株的 Southern 杂交分析图谱。

结果表明经过两轮的敲除, 两个拷贝的 *CaSRB10* 基因分别被敲除, 得到 *casrb10/casrb10* 缺失株(图 2B)。

实施例 3

CaSRB10 基因的敲除对白念珠菌形态的影响

在实施例 2 中, 通过同源重组的方法在白念珠菌中敲除了 *CaSRB10* 基因, Southern 杂交分析确证这个敲除是成功的, 得到了 *CaSRB10* 缺失株。对该 *CaSRB10* 缺失株进行观察, 结果发现, *CaSRB10* 基因的敲除, 引起了白念珠菌一系列细胞和菌落形态的变化。在 SD 固体培养基 30℃ 培养 5 天之后, 缺失株的菌落表面有很多褶皱, 而且菌落扁平, 贴在琼脂表面, 只剩下一个拷贝的 *CaSRB10* 基因的菌株菌落表面也略微有些褶皱。而野生型, 回复菌株都呈现出半球形, 平滑的菌落(图 3A)。在 YPD 液体培养基培养 12 个小时之后, 缺失株的生长状态为伸长的假菌丝, 只有一个拷贝 *CaSRB10* 基因的菌株, 有些细胞也略有伸长, 说明 *CaSRB10* 在胞内发挥作用也受其剂量的影响(图 3B)。

另外, 还用常规方法, 检测了 *CaSRB10* 基因的缺失对菌丝特异性基因表达的影响, 在 30℃, YPD 培养条件下, 缺失株中菌丝特异性基因也有一定的表达, 结果与缺失株在此条件下的形态相吻合。

实施例 4

casrb10/casrb10 缺失株与 *tup1/tup1* 缺失株形态的比较

CaSrb10 和 *Tup1* 都是白念珠菌丝状生长的负调控因子, 但是它们缺失株的形态却不完全相同。在 YPD, 30℃ 的培养条件下, *casrb10/casrb10* 缺失株和 *tup1/tup1* 缺失株都能生长为伸长的假菌丝, 但是同 *tup1/tup1* 缺失株相比, *casrb10/casrb10* 缺失株的假菌丝状态不均匀, 中间混杂了 30% 左右的菌体。在 Lee's, 37℃ 菌丝诱导的培养条件下, *casrb10/casrb10* 缺失株可以形成菌丝, 而 *tup1/tup1* 缺失株依然以假菌丝的形态存在(图 4)。说明 *tup1/tup1* 缺失株丧失了形态转变的能力, 只是以单一的假菌丝形态生长, 而 *casrb10/casrb10* 缺失株形态转变的能力并没有完全丧失, 能够以酵母态, 菌丝态和假菌丝形态生长, 但是形态之间的转换能力下降。这表明, *CaSRB10* 具有调控白念珠菌丝状生长的功能。

实施例 5

CaSRB10 基因的敲除对白念珠菌毒性的影响

CaSRB10 基因的敲除影响了白念珠菌的形态, 本实施例中, 通过小鼠尾静脉注射野生型菌株和缺失株进行小鼠系统感染实验来检测 *CaSRB10* 基因的破坏是否导致了菌株毒性下降。

结果:

(a) CaSrb10 在白念珠菌中是一个重要的毒性因子

野生型菌株有较强的毒性,小鼠在注射了 5×10^6 野生型细胞后于 14 天后全部死亡;同样条件下,小鼠注射了 5×10^6 *casrb10* / *casrb10* 缺失株细胞后,25 天之后仍有 6 只小鼠存活,而注射了 5×10^6 *tup1/tup1* 缺失株的小鼠都可以存活 25 天以上。这证明 *casrb10* / *casrb10* 缺失株相对于野生型菌株毒性减低(图 5A),而 *tup1/tup1* 缺失株则没有毒性,这与白念珠菌形态转变能力与其毒性直接相关相一致。因此, CaSrb10 在白念珠菌中是一个重要的毒性因子,而 *casrb10* 缺失株是一个重要的遗传背景清楚的减毒株。

(b) *casrb10* / *casrb10* 缺失株能使小鼠对野生型的白念珠菌产生免疫力

最近有些实验室利用减毒菌株作为疫苗来免疫小鼠,取得了比较好的效果(Elena FA et al, Proteomics 2004,4,3007-3020; Elena FA et al, Proteomics 2004,4,1204-1215)。因此,本实施例中,还检测 *casrb10* / *casrb10* 缺失株作为减毒菌株能否可以使小鼠产生免疫力。方法如下:

采用注射过 *casrb10* / *casrb10* 缺失株 25 天后仍然存活的小鼠(共 6 只),再一次向其体内注射 5×10^6 野生型的白念珠菌,再过 25 天后,发现 6 只小鼠有两只依然存活。而没有注射过 *casrb10* / *casrb10* 缺失株的小鼠,注射 5×10^6 野生型的白念珠菌后,6 天之后 8 只小鼠全部死亡(图 5B)。这说明先注射 *casrb10* / *casrb10* 缺失株能使小鼠对野生型的白念珠菌产生免疫力。因此,可以在此基础上发展潜在的有用的疫苗。

实施例 6

CaSrb10 蛋白重组表达和纯化

在该实施例中,以实施例 1 中的 PCR 扩增产物为模板,用序列如下的 5' 和 3' 端的 PCR 寡核苷酸引物进行扩增,获得白念珠菌 *CaSRB10* DNA 作为插入片段。

PCR 反应中使用的 5' 端寡核苷酸引物序列为:

5'-CGGGATCCATGAGTTATAGTTCAGCTTC - 3' (SEQ ID NO: 9)

该引物含有 BamHI 限制性内切酶的酶切位点,在该酶切位点之后是由起始密码子开始的部分编码序列;

3' 端引物序列为:

5'-CGGGATCCCTACCCACGTTTCTTTCTAAT -3' (SEQ ID NO: 10)

该引物含有 BamHI 限制性内切酶的酶切位点、翻译终止子和白念珠菌 *CaSRB10* 的部分编码序列。

白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白 cDNA PCR 产物纯化后经 BamHI 酶切再与质粒 pGEX-2T(购于美国 Invitrogen 公司)按常规方法重组形成载体 pGEX-2T-*CaSRB10* 并转化至感受态大肠杆菌 DH5 α ，挑取阳性克隆用 EcoRI 酶切鉴定插入方向，酶切产物在 0.8%琼脂糖凝胶电泳分析。鉴定后纯化并测序(ABI 公司的 377 型测序仪，BigDye Terminator 试剂盒，PE 公司)。经测序证实，已插入了完整的 *CaSRB10* 编码序列。

挑表达 *CaSRB10* 的阳性 DH5 α 克隆接种于 100ml 2 \times YTA 培养基中，37 $^{\circ}$ C 300rpm 振荡培养 12-15hr，1:10 稀释于预热的 2 \times YTA 培养基继续振荡培养 1.5hr，加 100mM IPTG 至 0.1mM 后 30 $^{\circ}$ C 诱导 2-6hr，5,000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min 去上清，置冰上用 50ml 1 \times PBS (0.14M NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH7.3) 重悬，超声(B. Braun Labsonic U)破碎后再加入 20% Triton X-100 至 1%轻摇 30min，然后 12,000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min，上清用 0.8 μ m 滤膜过滤后，过 1ml 50%谷胱甘肽 Sepharose 4B 层析柱，1 \times PBS 充分洗涤后，加入 500ul 谷胱甘肽洗脱缓冲液 (10 mM 谷胱甘肽, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)室温静置 30 分钟后收集洗脱液，重复洗脱 2-3 次，得到白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白。

实施例 7

抗 *CaSrb10* 蛋白抗体的产生

将实施例 6 中获得的重组白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白用来免疫动物以产生抗体，具体方法如下。重组分子用层析法进行分离后备用。也可用 SDS-PAGE 凝胶电泳法进行分离，将电泳条带从凝胶中切下，并用等体积的完全 Freund's 佐剂乳化。用 50-100 μ g/0.2ml 乳化过的蛋白，对小鼠进行腹膜内注射。14 天后，用非完全 Freund's 佐剂乳化的同样抗原，对小鼠以 50-100 μ g/0.2ml 的剂量进行腹膜内注射以加强免疫。每隔 14 天进行一次加强免疫，至少进行三次。获得的抗血清的特异反应活性用它在体外沉淀白念珠菌 *CaSrb10* 蛋白基因翻译产物的能力加以评估。结果发现，抗体可特异性地与本发明的 *CaSrb10* 蛋白发生结合。

讨论

白念珠菌(*Candida albicans*)是一种人体机会性致病真菌,能引起广泛的深部和浅部感染,但是其真正的致病因子和致病机理没有完全研究清楚。

近年的研究表明, Cdc2 相关的蛋白激酶, 细胞周期因子依赖的蛋白激酶, 以及 G1 期细胞因子也在调控白念珠菌的菌丝发育以及毒性发挥过程中起着非常重要的作用(Chen J et al. Mol Cell Biol. 2000 Dec;20(23):8696-708;Zheng X et al EMBO J. 2004 Apr 21;23(8):1845-56)。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, Srb10 是一个 CTD 蛋白激酶。它能在转录起始复合物形成以前, 磷酸化 RNA 聚合酶 II 大亚基的 CTD, 使 RNA 聚合酶 II 同与基本转录因子脱离, 从而抑制特定基因的转录(Hengartner CJ et al Mol Cell. 1998 Jul;2(1):43-53.)。在氮源充足的条件下, 它也能够直接磷酸化转录因子 Ste12, 把它送入泛素-蛋白酶体降解途径, 降低它在胞内的水平, 从而抑制酿酒酵母假菌丝的形成(Nelson C et al Nature. 2003 Jan 9;421(6919):187-90)。

本发明人利用生物信息学比较分析和 PCR 技术, 从白念珠菌的基因组克隆了一个新基因, 该基因编码的产物和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的 *SRB10* 基因编码的蛋白具有最高的同源性, 同源性达 50%, 它们的激酶亚结构域也非常相似, 因此命名为 *CaSRB10*。利用同源重组原理, 在白念珠菌中敲除 *CaSRB10* 基因, 构建了 *casrb10/casrb10* 缺失株, 该缺失株在 YPD, 30℃ 的培养条件下, 生长状态为伸长的假菌丝。同 *tup1/tup1* 缺失株相比, 它的这种假菌丝状态不是很均匀, 中间混杂了 30% 左右的酵母形态的菌体。在 Lee's 培养基, 37℃ 菌丝诱导的培养条件下, *casrb10/casrb10* 缺失株可以形成菌丝, 而 *tup1/tup1* 缺失株依然以长的假菌丝形态生长。小鼠系统感染实验表明 *casrb10/casrb10* 缺失株相对于野生型来讲毒性减低。在接种 *casrb10/casrb10* 缺失株后, 存活下来的小鼠对野生型白念珠菌有一定的免疫力。

这些结果表明, CaSrb10 在白念珠菌中是一个重要的毒性因子。先注射 *casrb10/casrb10* 缺失株能使小鼠对野生型的白念珠菌产生免疫力。因此, 可以在此基因的基础上发展有用的疫苗。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院

<120> 白念珠菌 CTD 蛋白激酶基因及其用途

<130> 058174

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1827

<212> DNA

<213> 白念珠菌(Candida albicans)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1824)

<400> 1

```

atg agt tat agt tca gct tca ttt aga aaa ctt aat aat gtt ggg ata      48
Met Ser Tyr Ser Ser Ala Ser Phe Arg Lys Leu Asn Asn Val Gly Ile
1          5          10          15
tct caa cca tca caa aca aca aca aca acc tcg gcg aat caa cct      96
Ser Gln Pro Ser Gln Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ala Asn Gln Pro
20          25          30
caa ctg caa ctg caa caa cag cct tta caa caa ctg caa caa cag cat      144
Gln Leu Gln Leu Gln Gln Gln Pro Leu Gln Gln Leu Gln Gln Gln His
35          40          45
tta cat atg aaa cca aat cct cat att cca cat cat caa ttg cca gga      192
Leu His Met Lys Pro Asn Pro His Ile Pro His His Gln Leu Pro Gly
50          55          60
act gtt ggc act aga gct tcg att cct caa cca gca tta atg gca ctg      240
Thr Val Gly Thr Arg Ala Ser Ile Pro Gln Pro Ala Leu Met Ala Leu
65          70          75          80
aat tca att ttg act ttg ggt cct ttt aaa cat cgt aaa gat ttg aca      288
Asn Ser Ile Leu Thr Leu Gly Pro Phe Lys His Arg Lys Asp Leu Thr
85          90          95
cga gag tca gtt tta tca acc tat caa att atg gga tat att gct gct      336
Arg Glu Ser Val Leu Ser Thr Tyr Gln Ile Met Gly Tyr Ile Ala Ala
100         105         110
ggt act tat ggg aaa gtc tat aag gct aaa ttg aaa agt aat aaa ctt      384
Gly Thr Tyr Gly Lys Val Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Ser Asn Lys Leu
115         120         125
aat aaa act gac gat gat agt ggt att gat ggc att aat aat aaa gat      432
Asn Lys Thr Asp Asp Asp Ser Gly Ile Asp Gly Ile Asn Asn Lys Asp
130         135         140
att ttt tca gaa tca atg aat gat ctt cat cat gat aat agt ccc agc      480
Ile Phe Ser Glu Ser Met Asn Asp Leu His His Asp Asn Ser Pro Ser
145         150         155         160
atc atg atc aac acc act act aac atc act atc aat aat agt ctt ccg      528
Ile Met Ile Asn Thr Thr Thr Asn Ile Thr Ile Asn Asn Ser Leu Pro
165         170         175
caa ttt ttt gct ata aaa aaa ttt aaa agt gac aat cat cat cat cat      576
Gln Phe Phe Ala Ile Lys Lys Phe Lys Ser Asp Asn His His His His
180         185         190

```

ata aat aac aac aat aat gga gga aat cat tta tcc aag ggg aac aat Ile Asn Asn Asn Asn Asn Gly Gly Asn His Leu Ser Lys Gly Asn Asn 195 200 205	624
agt att cat caa gat gaa gtt ttg cat tat acg ggg att tca caa tct Ser Ile His Gln Asp Glu Val Leu His Tyr Thr Gly Ile Ser Gln Ser 210 215 220	672
gct att aga gaa atg tca tta tgt cga gaa tta aac aat aaa aat atc Ala Ile Arg Glu Met Ser Leu Cys Arg Glu Leu Asn Asn Lys Asn Ile 225 230 235 240	720
act aaa tta gtt gat att ata cta gaa aat aaa tcc att tat atg gtt Thr Lys Leu Val Asp Ile Ile Leu Glu Asn Lys Ser Ile Tyr Met Val 245 250 255	768
ttt gag ttt tgt gaa cat gat tta tta caa att att cat tat caa ctg Phe Glu Phe Cys Glu His Asp Leu Leu Gln Ile Ile His Tyr Gln Leu 260 265 270	816
cat cct gat ttt aaa cca att cca tgt cct acc atc aaa tca tta att His Pro Asp Phe Lys Pro Ile Pro Cys Pro Thr Ile Lys Ser Leu Ile 275 280 285	864
tgg caa att tta aat gga gtg aca ttt tta cat aaa aat tgg ata ctt Trp Gln Ile Leu Asn Gly Val Thr Phe Leu His Lys Asn Trp Ile Leu 290 295 300	912
cat aga gat tta aaa cca gct aat ata atg gta tca tca caa gga gtt His Arg Asp Leu Lys Pro Ala Asn Ile Met Val Ser Ser Gln Gly Val 305 310 315 320	960
gtt aaa att gga gat ttg gga tta gca aga aaa ttc aaa agt cca tta Val Lys Ile Gly Asp Leu Gly Leu Ala Arg Lys Phe Lys Ser Pro Leu 325 330 335	1008
caa agt tta tat act ggt gat aaa gtt gtg gtt act ata tgg tat cga Gln Ser Leu Tyr Thr Gly Asp Lys Val Val Val Thr Ile Trp Tyr Arg 340 345 350	1056
gct cca gaa tta tta ttg ggc aca aga cat tat acc cca gca gtt gat Ala Pro Glu Leu Leu Leu Gly Thr Arg His Tyr Thr Pro Ala Val Asp 355 360 365	1104
tta tgg gcg gtt gga tgt ata tta gcg gaa tta tta tct cta cga cca Leu Trp Ala Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Leu Leu Ser Leu Arg Pro 370 375 380	1152
att ttc aaa ggt gaa gaa gcg aaa atc gat tta aat aat aag aaa tcg Ile Phe Lys Gly Glu Glu Ala Lys Ile Asp Leu Asn Asn Lys Lys Ser 385 390 395 400	1200
gtt cca ttt caa aaa aat caa tta caa aaa att ata gaa atc ttg ggg Val Pro Phe Gln Lys Asn Gln Leu Gln Lys Ile Ile Glu Ile Leu Gly 405 410 415	1248
aca cca aca act gat att tgg aat aat ttg aat aaa tat cca gaa tat Thr Pro Thr Thr Asp Ile Trp Asn Asn Leu Asn Lys Tyr Pro Glu Tyr 420 425 430	1296
tta tca ttt act caa cat ttt aat caa aat tat cct aat aat tta tct Leu Ser Phe Thr Gln His Phe Asn Gln Asn Tyr Pro Asn Asn Leu Ser 435 440 445	1344
aat tgg ttt aaa ttg att aat ggt ggt aac aat caa aat tca gaa aaa Asn Trp Phe Lys Leu Ile Asn Gly Gly Asn Asn Gln Asn Ser Glu Lys 450 455 460	1392
tgt ctt gaa tta tta tca gga tta tta aaa tat gat cct gaa ttg aga Cys Leu Glu Leu Leu Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asp Pro Glu Leu Arg 465 470 475 480	1440
tta act gca gat caa gcg tta tta cat cca tat ttt ttg gaa cta cct Leu Thr Ala Asp Gln Ala Leu Leu His Pro Tyr Phe Leu Glu Leu Pro 485 490 495	1488
aaa gtc aat gaa aat gct ttt gaa ggt ttg aat tat aaa tat cca aac Lys Val Asn Glu Asn Ala Phe Glu Gly Leu Asn Tyr Lys Tyr Pro Asn	1536

	500	505	510	
aga aag att tat act gat gac aat gat ata atg acc act gca gca aat				1584
Arg Lys Ile Tyr Thr Asp Asp Asn Asp Ile Met Thr Thr Ala Ala Asn				
	515	520	525	
aac aac aac aat aat aat aat aac aac aat aac aat aac aac aat				1632
Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn				
	530	535	540	
aac aac aat aac aac aat aac aac aat agt ggc cat caa ttg ctg				1680
Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Gly His Gln Leu Leu				
545	550	555	560	
caa caa caa aat gtt caa atc caa caa gtt cat caa atg caa caa caa				1728
Gln Gln Gln Asn Val Gln Ile Gln Gln Val His Gln Met Gln Gln Gln				
	565	570	575	
ata cat ctg caa caa tta caa ctg cat ggt gca aac agt aca tat aag				1776
Ile His Leu Gln Gln Leu Gln Leu His Gly Ala Asn Ser Thr Tyr Lys				
	580	585	590	
cga agt ggt att gat gat tta cct ggt gga att aga aag aaa cgt ggg				1824
Arg Ser Gly Ile Asp Asp Leu Pro Gly Gly Ile Arg Lys Lys Arg Gly				
	595	600	605	
tag				1827

<210> 2

<211> 608

<212> PRT

<213> 白念珠菌(Candida albicans)

<400> 2

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

245 250 255
 Phe Glu Phe Cys Glu His Asp Leu Leu Gln Ile Ile His Tyr Gln Leu
 260 265 270
 His Pro Asp Phe Lys Pro Ile Pro Cys Pro Thr Ile Lys Ser Leu Ile
 275 280 285
 Trp Gln Ile Leu Asn Gly Val Thr Phe Leu His Lys Asn Trp Ile Leu
 290 295 300
 His Arg Asp Leu Lys Pro Ala Asn Ile Met Val Ser Ser Gln Gly Val
 305 310 315 320
 Val Lys Ile Gly Asp Leu Gly Leu Ala Arg Lys Phe Lys Ser Pro Leu
 325 330 335
 Gln Ser Leu Tyr Thr Gly Asp Lys Val Val Val Thr Ile Trp Tyr Arg
 340 345 350
 Ala Pro Glu Leu Leu Leu Gly Thr Arg His Tyr Thr Pro Ala Val Asp
 355 360 365
 Leu Trp Ala Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Leu Leu Ser Leu Arg Pro
 370 375 380
 Ile Phe Lys Gly Glu Glu Ala Lys Ile Asp Leu Asn Asn Lys Lys Ser
 385 390 395 400
 Val Pro Phe Gln Lys Asn Gln Leu Gln Lys Ile Ile Glu Ile Leu Gly
 405 410 415
 Thr Pro Thr Thr Asp Ile Trp Asn Asn Leu Asn Lys Tyr Pro Glu Tyr
 420 425 430
 Leu Ser Phe Thr Gln His Phe Asn Gln Asn Tyr Pro Asn Asn Leu Ser
 435 440 445
 Asn Trp Phe Lys Leu Ile Asn Gly Gly Asn Asn Gln Asn Ser Glu Lys
 450 455 460
 Cys Leu Glu Leu Leu Ser Gly Leu Leu Lys Tyr Asp Pro Glu Leu Arg
 465 470 475 480
 Leu Thr Ala Asp Gln Ala Leu Leu His Pro Tyr Phe Leu Glu Leu Pro
 485 490 495
 Lys Val Asn Glu Asn Ala Phe Glu Gly Leu Asn Tyr Lys Tyr Pro Asn
 500 505 510
 Arg Lys Ile Tyr Thr Asp Asp Asn Asp Ile Met Thr Thr Ala Ala Asn
 515 520 525
 Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn
 530 535 540
 Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Gly His Gln Leu Leu
 545 550 555 560
 Gln Gln Gln Asn Val Gln Ile Gln Gln Val His Gln Met Gln Gln Gln
 565 570 575
 Ile His Leu Gln Gln Leu Gln Leu His Gly Ala Asn Ser Thr Tyr Lys
 580 585 590
 Arg Ser Gly Ile Asp Asp Leu Pro Gly Gly Ile Arg Lys Lys Arg Gly
 595 600 605

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸

<400> 3
 atgagttata gttcagcttc

20

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸

<400> 4 ctacccacgt ttctttctaa t	21
<210> 5 <211> 33 <212> DNA <213> 寡核苷酸	
<400> 5 cggaattcct ggtgctggta ataacgacaa gga	33
<210> 6 <211> 33 <212> DNA <213> 寡核苷酸	
<400> 6 cgagatctcc ataagtacca gcagcaatat atc	33
<210> 7 <211> 32 <212> DNA <213> 寡核苷酸	
<400> 7 caggatccga caatgatata atgaccactg ca	32
<210> 8 <211> 32 <212> DNA <213> 寡核苷酸	
<400> 8 acgcatgctg gaagactgaa atcttcatca ac	32
<210> 9 <211> 28 <212> DNA <213> 寡核苷酸	
<400> 9 cgggatccat gagttatagt tcagcttc	28
<210> 10 <211> 29 <212> DNA <213> 寡核苷酸	
<400> 10 cgggatccct acccacgttt ctttcta	29

atgagttata gttcagcttc atttagaaaa ctttaataatg ttgggatatc tcaaccatca	60
caaacaacaa caacaacaac ctgggcgaat caacctcaac tgcaactgca acaacagcct	120
ttacaacaac tgcaacaaca gcatttacat atgaaaccaa atcctcatat tccacatcat	180
caattgccag gaactgttgg cactagagct tggattcctc aaccagcatt aatggcactg	240
aattcaattt tgactttggg tccttttaaa catcgtaaag atttgacacg agagtcagtt	300
ttatcaacct atcaaatat gggatatatt gctgctggta cttatgggaa agtctataag	360
gctaaattga aaagtaataa acttaataaa actgacgatg atagtggatg tgatggcatt	420
aataataaag atattttttc agaatcaatg aatgatcttc atcatgataa tagtcccagc	480
atcatgatca acaccactac taacatcact atcaataata gtcttccgca attttttgc	540
ataaaaaaat ttaaagtga caatcatcat catcatataa ataacaaca taatggagga	600
aatcatttat ccaaggggaa caatagtatt catcaagatg aagttttgca ttatacgggg	660
atcacaat ctgctattag agaaatgtca ttatgtcgag aattaaaca taaaaatc	720
actaaattag ttgatattat actagaaaaa aaatccattt atatggtttt tgagttttgt	780
gaacatgatt tattacaaat tattcattat caactgcac ctgattttta accaattcca	840
tgtctacca tcaaatcatt aatttgcaa attttaaatg gagtgacatt tttacataaa	900
aattggatac ttcatagaga tttaaaacca gctaataataa tggatcatc acaaggagtt	960
gttaaaattg gagatttggg atttagcaaga aaattcaaaa gtccattaca aagtttat	1020
actggtgata aagttgtggt tactatatgg tctcgagctc cagaattatt attgggcaca	1080
agacattata ccccagcagt tgatttatgg gcggttggat gtatattagc ggaattatta	1140
tctctacgac caattttcaa aggtgaagaa gcgaaaatcg atttaataa taagaaatcg	1200
gttccatttc aaaaaatca attacaaaaa attatagaaa tcttggggac accaacaact	1260
gatatttggg ataattttaa taaatatcca gaatatttat cattactca acattttaat	1320
caaaattatc ctaataattt atctaattg ttaaatgga ttaatggtg taacaatcaa	1380
aattcagaaa aatgtcttga attattatca ggattattaa aatatgatcc tgaattgaga	1440
ttaactgcag atcaagegtt attacatcca tattttttgg aactaccta agtcaatgaa	1500
aatgcttttg aaggtttgaa ttataaatat ccaaacagaa agatttatac tgatgacaat	1560
gatataatga ccaactgcagc aaataacaac aacaataata ataataataa caacaataac	1620
aataacaaca ataacaaca taacaacaat aacaacaaca atagtggcca tcaattgctg	1680
caacaacaaa atgttcaaat ccaacaagtt catcaaatgc aacaacaat acatctgcaa	1740
caattacaac tgcatgggtgc aaacagtaca tataagcgaa gtggtattga tgattacct	1800
ggtggaatta gaaagaaacg tgggtag	1827

图 1A

MSYSSASFRK LNVGISQPS QTTTTTTSAN QPQSQQQP LQSQQQHLH MKPNPHIPHH	60
QLPGTVGTRA SIPQPALMAS NSILTLGPFK HRKDLTRESV LSTYQIMGYI AAGTYGKVKYK	120
AKLKSNNLKN TDDSDGIDGI NNDIFSESM NDLHHDNSPS IMINTTNTIT INNSLPQFFA	180
IKKFKSDNHH HHINNNNGG NHLKGNNSI HQDEVLYHTG ISQSAIREMS LCRELNKNKI	240
TKLVDIILEN KSIYMFVFC EHDLLQIIHY QSHPDFKPIP CPTIKSLIQ ILNGVTLHK	300
NWILHRDLKP ANIMVSSQGV VKIGDLGLAR KFKSPLQSLY TGDKVVVTIW YRAPELLGT	360
RHYTPAVDLW AVGCILAELL SLRPIFKGEE AKIDLNNKKS VPFQKNQLQK IIEILGTPTT	420
DIWNNLNKYP EYLSFTQHFN QNYPNLSNW FKLINGGNNQ NSEKCLELLS GLLKYDPELR	480
LTADQALLHP YFLELPKVE NAFEGLNYKY PNRKIYDDN DIMTTAANN NNNNNNNNN	540
NNNNNNNNN NNNNSGQLS QQNVQIQV HQMQQIHSQ QLQSHGANST YKRSGIDDL	600
GGIRKKRG	608

图 1B

```

casrb10 : MSYSSASFRKLNNVGISQPSITTTTTTSANQPSISLSDQQLQQSQQQHLHMKFNPHIPHHQLPSTVVG : 67
scsrb10 : M-YNG-----KDRANVYQPMYQRPMLVVGQQA-----QSFVGGKNTIISVH : 42

casrb10 : TRASIQQALMASMSLITLIGFPHHRFLTRESVISTDTLIGFAAGTNGIVKAKHLKSKLKNKIDDD : 134
scsrb10 : GKA---EMLMANNDFITLGFTHARKLRMVEVLEKTEVIGTAAZSTGGVQDARRQINSGTNSAUG : 105

casrb10 : SGIDGIINNDIFSESMNDLHHDNSPSTMTNTTITITINSIPQFFATKKFISDNHHHHINNNNGGN : 201
scsrb10 : SSLNGTNAK---IPQFESTQPKSSSEMDIQANTIALRRLLKDE-GVTPGRIIRTREDVSPHYNSQK : 168

casrb10 : H-----LSKGNNSIHQDEVLHTTMSISASAIENSSDFELNINNTKLVDIILENNSHYMV : 256
scsrb10 : QTLIKKPLTVFYAIAKFKTEKDGVEQLHTTMSISASACLEMAAIEIHHHHTITLVEIFLRRCHVMV : 235

casrb10 : FEFCEHDLQLIHTQSHEDFPTICPTIFSLIWFILNGVTEFLHKIMILHFDIPFANIMVSSQGVVKI : 323
scsrb10 : YEYAEDHDLQIHTQSHEDFPTICPTIFSLIWFILNGVTEFLHKIMILHFDIPFANIMVSSQGVVKI : 302

casrb10 : GDLGLARFKKSPDQSLFTGFKVVVTFMVFAPFELLLETTHHTPAVDLWAGGTLAELLSLRPIFRGEE : 390
scsrb10 : GDLGLARKKHNMQDTLFTGFEVVVTFMVFAPFELLLETTHHTPAVDLWAGGTLAELLSLRPIFRGEE : 369

casrb10 : AKIDLNNKKSVPFCKKIQQLPIIEILGPTTDLWNNLNKVFELLSFTQHFNQNPNNISNWFKLINGG : 457
scsrb10 : AK--LESEKTVFQVHQLKILLEVLSFDQKIMLPYLEKVIEMDQITKF--PKRDIILATVH-SAEG : 431

casrb10 : NNQNSEKCEELISGLLKIDFELFITADQALLPYFLELP-KVNEAFEGNPKYFNKPIYTDNDIM : 523
scsrb10 : RDKHA---LSLLYHLINDEIKIIDAFNALEKQFTESDIPVSEIVVEGSLTKYFARRIHTNDNDIM : 495

casrb10 : TTAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNSGHQLSQQQNVQIQQVHQMQQQLHSQQQLSHGANST : 590
scsrb10 : NLGSRTKNNTQASGITAGAAAALGGLG-----VNRRIIAAAAAAAA : 537

casrb10 : YKRSIDDLPGGIRKKG : 608
scsrb10 : AVSGNNASDEPSRKNER : 555
    
```

图 1C

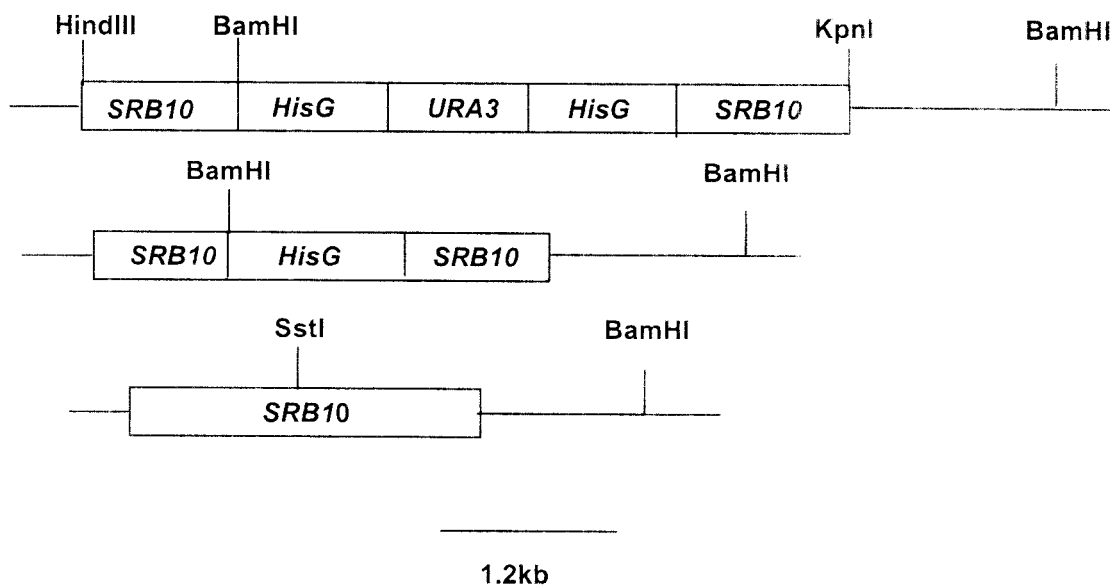


图 2A

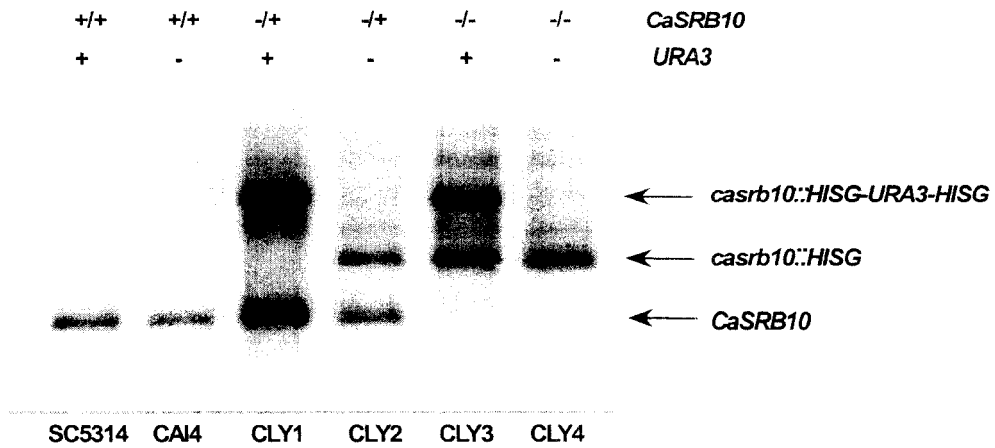
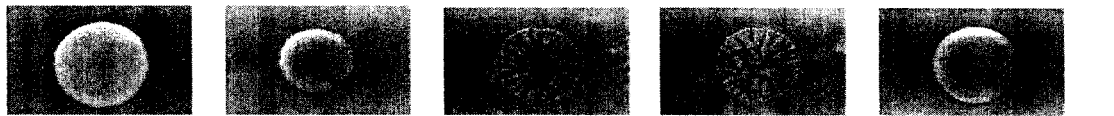


图 2B

SD, 30°C
5 天



SC5314 *CaSRB10/casrb10* *casrb10/casrb10* *casrb10/casrb10+V* *casrb10/casrb10+CaSRB10*

YPD,
30°C 12h



SC5314 *CaSRB10/casrb10* *casrb10/casrb10* *casrb10/casrb10+V* *casrb10/casrb10+CaSRB10*

图 3A

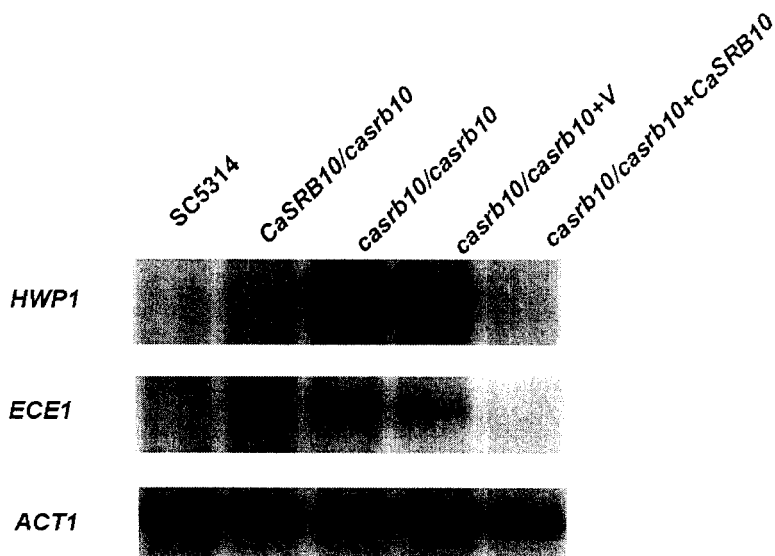


图 3B

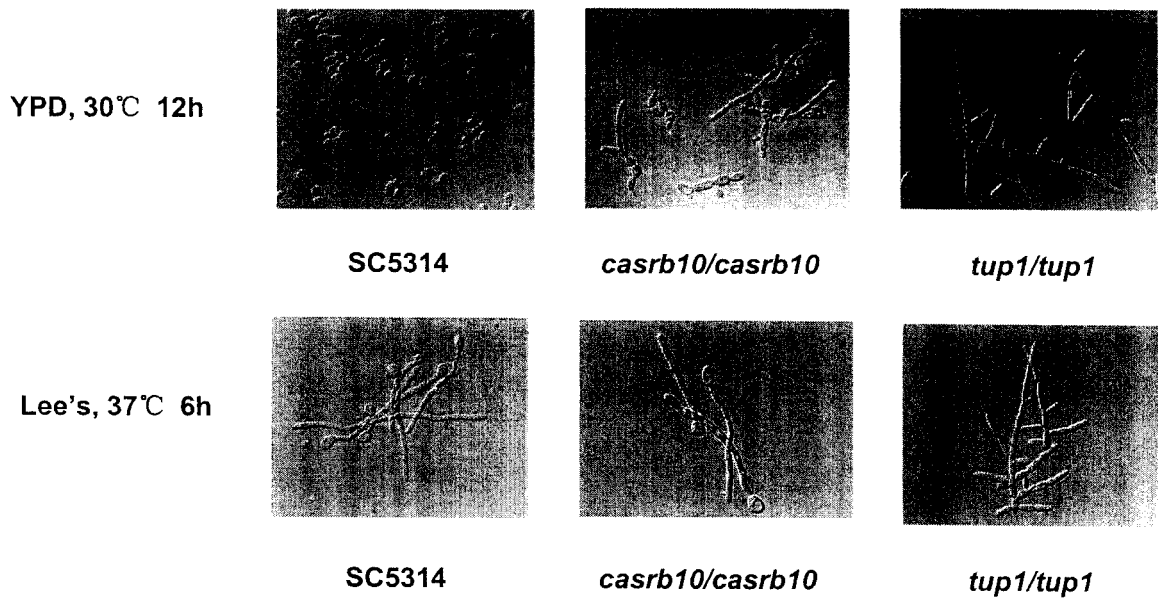


图 4

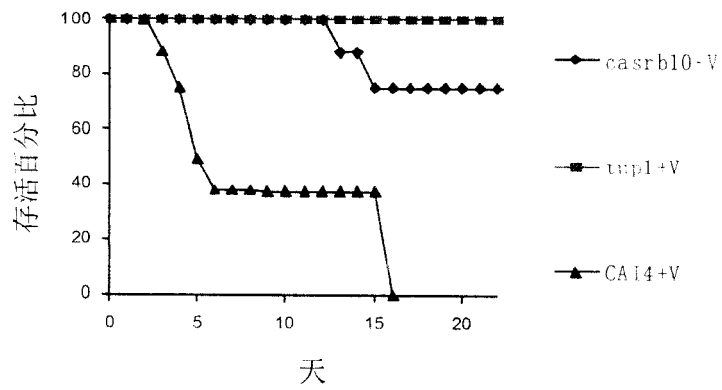


图 5A

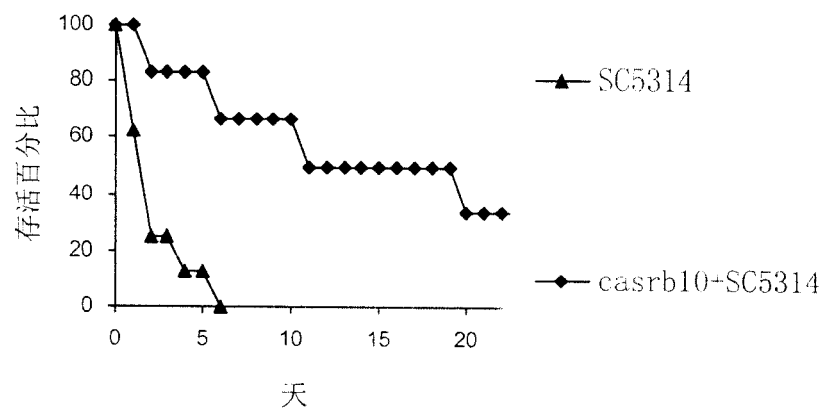


图 5B

专利名称(译)	白念珠菌CTD蛋白激酶基因及其用途		
公开(公告)号	CN1952121A	公开(公告)日	2007-04-25
申请号	CN200510030586.7	申请日	2005-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	陈江野 遼杨		
发明人	陈江野 遼杨		
IPC分类号	C12N9/00 C12N15/52 C12N15/63 C07K16/40 G01N33/53		
代理人(译)	徐迅		
其他公开文献	CN100480379C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种新的白念珠菌的CTD蛋白激酶CaSrb10蛋白，编码CaSrb10蛋白的多核苷酸和经重组技术产生这种CaSrb10蛋白的方法。本发明还公开了编码这种CaSrb10蛋白的多核苷酸的用途。CaSrb10在白念珠菌中是一个重要的毒性因子。在接种casrb10/casrb10缺失株后，存活下来的小鼠对野生型白念珠菌有一定的免疫力。

```

atgggttata gttcagcttc atttagaana cttataaatg ttggatatac tcaaccatca 60
caaacacaaa caaacacac ctcgcgcaat caaccctcaac tgcacacgca acaaacacct 120
ttcaaacacac tgcacacaaa gcaattccat atgcaaacaaa atgcctcat atccacatca 180
caattccag gaactcttg cactagagct tgcattcctc aaccagcatt aatgacactc 240
aattcaattt tggccttggg tccctttaaa cctcgttaaa atttcaacag agactcaagt 300
ttcagacct atcaattt gggatataat cctcgttggta cttaagggaa gactctatag 360
gcataattga aagtaataa acttaataaa actgcagatg atagtgatc tgaatgcaat 420
aataaagag atatttttc agatcaatg atgactcttc atcaagata tggctccacg 480
atcagatga acaccactc taacatcacl atcaataata gcttccgca atttttact 540
ataaaaaat ttaaaagtga caatcactca catcatalaa ataacacaa taatggggaa 600
aattcattat ccaggggaa caatagattt catcaagatg aagtcttga ttttccgggg 660
attcacaat ctgctattag aaaaagtca ttatgtcag aatatacaa taanaatct 720
actaatatag tgcataat acatagaaat aaatccattt atatgcttt tgaattttgt 780
gaacagatg ttttcaaat tctctatca caatgcgctc ctgattttaa accaatctca 840
gtcccacca tcaaatcatt aatttgcna atttcaatg gactgcaatt ttacataaa 900
ggttggatcc tctatagaa tttaaacca gctaatataa tctatcacc acaggagtt 960
gttcaattg gaaatttggg attagcaga aattcaaaa gctcattaca agtttatat 1020
actggata aagtctggt tactatctg tatcgagctc cagaattatt attgccca 1080
agcattata cccagcaat tgaattatg gggcttgat ctatctagc gaaattata 1140
tctctagac caatttca oartganea gcaaaatgc atttaataa taagaaatc 1200
gtccattc aaaaaatca ataacaaaa atatagaaa tcttgggac accaacact 1260
gattttgaa ataattga taataatcca gaaatttca ctttactca acctttat 1320
caaatatc ctataattt atctaatg tttaattga ttaatgctg taacataca 1380
aattcagaa atgctctga attatata gactattaa aatataacc tgnatgaa 1440
ttaacgcaa atcagcctt attacatca tatttttgg aactaccaa agctcaaga 1500
aatgctttg aaggtttgaa ttataaat ccaaacgaa agattatac tgatgcaat 1560
gataataga ccactgcag caatnacac accaataa atataatca caacataac 1620
ataaacaga ataacagaa laaacacat accaacaga atgctgcca tcaatgctg 1680
caaacaaa atttcaat ccacaaagt cataaatgc acaacaaat acatctcaa 1740
caattacac tgcctgctc aacaaatca tataagcaa gctgattga tgaattcaat 1800
gtggatta gaaagaaag tggctag
    
```

图 1A

```

MSYSSASFRK LNNVGTSGPS QTTTTTTSAN QPQSQSQQP LQSQQQQLH MKPNPHPHH 60
LPGVTGTRA SIPQALMAS NSILTLGPFK HRKDLTRESV LSTYQIMGYI AAGTYGVVVK 120
ARKLSNKLNR TDDSGIDGI NNKDIPESEM NDLHHDSFSP IMINTTNTIT INNSLPQFFA 180
IKFKSDNHII HINNNNGG NLSKGNNSI HDDEVLYTG TSQATREMS LCRELNKNI 240
TKLVDIILEN KSIYMPFEP EHDLLQIHY QSHDPFKPIP CPTIKSLIW ILNGVTFPIK 300
NWLHRDLKP ANIMVSSGV VKIGDLGLR KFKSPQLSLY TGDKVVVTIW YRAPELLLGT 360
RHYFPVLDLW AVGILAEIL SLRPFKGEI AKIDLANKKS VPKGNLQK IELLGTFPT 420
DIWNNLKYF EYLSFTQHFN QNYPNLSNW PKLINGGNNQ NSEKCLELS GLKYDEPLR 480
LTADQALLHP YLELFPKVN E NAFEGLNKY PNRKIYTDN DIMTTAANN NNNNNNNNN 540
NNNNNNNNN NNNNSGQLS GQNVQIQV HMQQQIHSQ QLQSHGANST YKRCGIDLLP 600
GCIRKRRG
    
```

图 1B