

[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 200610095339.X

[51] Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年9月19日

[11] 公开号 CN 101037698A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/06 (2006.01)

[22] 申请日 2006.12.25

[21] 申请号 200610095339.X

[71] 申请人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路1号

[72] 发明人 谢建平 柳云帆 王洪海

[74] 专利代理机构 重庆华科专利事务所

代理人 康海燕

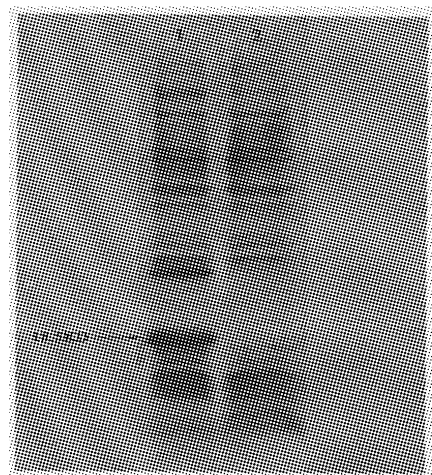
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

[54] 发明名称

结核分枝杆菌 *rpfc* 基因及其用途

[57] 摘要

本发明属于医药生物技术领域，涉及结核分枝杆菌 *rpfc* 基因及其用途，尤其是在 *rpfc* 活性调控分子筛选、利用 *rpfc* 的结核病预防性疫苗和结核病诊断试剂方面的用途。



1. 结核分枝杆菌 rpfC 基因，其特征是表达结核菌 rpfC 的重组工程菌、纯化的重组酶以及利用纯化的酶或工程菌进行结核分枝杆菌 rpfC 调节分子的筛选。
2. 权利要求 1 所述的结核分枝杆菌 rpfC 基因，其特征是 rpfC 包括其活性位点关键残基的不影响活性的变异体，包括 rpfC 的溶菌酶样功能域、糖苷酶功能域的关键残基如色氨酸-天冬氨酸二联体和甘氨酸-甘氨酸-任意氨基酸-丙氨酸-色氨酸-脯氨酸六肽区。
3. 权利要求 1 或 2 所述的结核分枝杆菌 rpfC 基因在结核病诊断和药物治疗效果监控中的用途，其特征是利用重组表达的 rpfC 的抗体或者抗体类似分子进行免疫检测。
4. 权利要求 1 或 2 所述的结核分枝杆菌 rpfC 基因在 DNA 疫苗或者亚单位疫苗中的应用，其特征是利用结核分枝杆菌 rpfC 基因及其产物，作为疫苗组分，预防结核病。

结核分枝杆菌 *rpfC* 基因及其用途

技术领域

本发明属于医药生物技术领域，涉及结核分枝杆菌 *rpfC* 基因及其用途，尤其是在 *rpfC* 活性调控分子筛选、利用 *rpfC* 的结核病预防性疫苗和结核病诊断试剂方面的用途。

背景技术

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 是人类重要的致病菌。据世界卫生组织估计，每年有两百万人死于结核病；每三个人中就有一人被感染；从 2000 年到 2020 年间，将会有近十亿人新感染结核病 (<http://www.theglobalfund.org/en/about/tuberculosis/default.asp>)。特别是近年来，随着多重耐药菌株的出现及增多和艾滋病的流行，结核病的发病率也呈急剧上升趋势。结核分枝杆菌作为一种病原菌，成功之处主要在于能在寄主体内进入休眠状态，并保持持久的活性。当寄主的免疫系统因为某些原因（如衰老，感染 HIV）免疫力下降时，这些休眠期的病原菌将会被重新激活并引发明显的临床症状。

藤黄微球菌的 Rpf 是迄今发现的第一个能使休眠状态的细菌复苏并促进其生长的因子。结核分枝杆菌与 *rpf* 相似的基因共 5 个，分别为 *rpfA* (Rv0867c), *rpfB* (Rv1009), *rpfC* (Rv1884c), *rpfD* (Rv2389c) 和 *rpfE* (Rv2450c)。在这五个基因中，*rpfC* 的表达量最大，活性最高，突变后引起的全基因组表达图谱变化最大。

从 *rpfC* 出发，有可能开发治疗潜伏性结核病的新药，以及以其作为预防性疫苗，或者作为潜伏性结核病的诊断试剂的组分。

发明内容

本发明的目的在于提供，1. 一种重组表达结核菌 *rpfC* 的工程菌；2. 获得大量纯化的 *rpfC*，进行抗体制备；3. 利用含有 *rpfC* 的工程菌作为药物靶标研发新的药物的模型；4. 含有 *rpfC* 的 DNA 疫苗或者亚单位疫苗的构建及其应用。

本发明的技术方案如下：

采用本领域技术人员熟知的技术，从结核菌基因组扩增 *rpfC* 基因，在大肠杆菌等适宜的宿主表达，纯化表达产物，进行抗体制备，亚单位疫苗制备以及 DNA 疫苗制备并检测效果。

实现上述目的的基本技术路线为：

总体技术方案是克隆包括提取结核菌基因组，利用合适的载体和限制性内切酶片段，构建转化载体，将基因组 DNA 克隆到合适的大肠杆菌宿主细胞。

1. 基因模板提取：将待克隆菌株在LB培养基或YE培养基或者Middlebrook 7H9、sauton等分枝杆菌能够生长的培养基中，培养到合适的菌体浓度，按照本领域一般技术人员熟悉的步骤、试剂和方法提取菌体DNA。

2. 工程菌的构建 按照本领域一般技术人员熟悉的步骤、试剂和方法，将基因组DNA克隆到适当的载体，转化适当的宿主菌，通过一定的选择标记，收集获得的工程菌。

3. 功能基因的筛选 按照本领域一般技术人员熟悉的步骤、试剂、完全可以从商业途径获得的载体、限制性内切酶和方法，将目标基因克隆到载体，转化宿主细胞，筛选转化子。分别根据已知的结核菌入侵人体和动物模型可能遭遇的不利环境，进行人工模拟，从基因组表达文库筛选相应的转化子，并进一步验证。

4. 利用含有功能基因的重组菌，进行功能基因抑制剂或激活剂的筛选。

发明效果

利用本技术方案涉及的方法，得到了 1. 一种重组表达结核菌 *rpfc* 的工程菌；2. 获得大量纯化的 *rpfc*，进行抗体制备；3. 利用含有 *rpfc* 的工程菌作为药物靶标研发新的药物的模型；4. 含有 *rpfc* 的 DNA 疫苗或者亚单位疫苗的构建及其应用。

附图说明

图 1. 结核分枝杆菌 *rpfc* PCR 产物。

图 2. 重组表达的结核分枝杆菌 *rpfc* 产物。

具体实施方式

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基：MTB H37Rv 由重庆市肺科医院提供并灭活。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、质粒pET28a (+)和宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 为本实验室保存。藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus* CNCC(B)28001) 由四川省抗生素研究所王明蓉惠赠。LB培养基，LMM (lactate minimal medium) 含0.5% lithium L-lactate[3]。

1.1.2 主要试剂：限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司；*Pfu* DNA聚合酶、dNTP 和 buffer、IPTG 购自merck；DNA 胶回收试剂盒购自Bioflux；Ni²⁺-Sepharose 和 ÄKTA prime 蛋白纯化系统购自 Amersham Biosciences；低分子量蛋白标准购自上海生化所研究所。

1.2 目的基因PCR扩增和克隆

根据GenBank 中 *mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株 *rpfc* 的基因序列，自行设计一对

扩增该成熟蛋白基因的PCR引物（由Invitrogen公司合成），序列为：cf: 5'-ACAGGATCCACTTCCGGCGATATG-3'; cr: 5' TACTGAATTCTCAGCGCGGAATACTTG-3'（划线序列分别为*Bam*H I 和*Eco*R I 酶切位点）。MTB 基因组 DNA 按文献[4]抽提。以 MTB 基因组 DNA 为模板，以cf, cr为引物进行PCR，反应条件：95℃ 5min; 95℃ 60s, 56.8℃ 30s, 72℃ 90s, 30个循环; 72℃ 10min。纯化后的PCR产物和质粒pET28a (+) 以*Bam*H I 和*Eco*R I 双酶切后，切胶纯化后，以T4 DNA连接酶连接。连接产物转化至感受态*E.coli* BL21 (DE3)，经菌体PCR筛选获得原核表达重组质粒pET28a-rpfc。送Invitrogen公司进行测序。

1.3 目的基因的表达和SDS-PAGE分析

将原核表达重组克隆接种于10ml（含50 μg/ml卡那霉素）的LB培养基中，37℃ 200rpm/min 培养过夜。1%接种到50ml LB（含50 μg/ml卡那霉素）中，37℃ 200rpm/min 培养至OD₆₀₀ 0.5~0.8，加IPTG至1mmol/L 诱导表达，诱导4h。以同样的方法诱导含空质粒pET28a (+) 的*E.coli* BL21 (DE3) 做对照。

诱导收获的菌液1ml，离心收集菌体。加入100 μl 2×SDS 凝胶上样缓冲液，振荡混匀，沸水煮沸5min，12000rpm/min 离心10min，取上清15 μl进行15%SDS-PAGE。

1.4 重组 Rpfc 蛋白的纯化及浓度测定

按上面的方法诱导1L 重组菌。菌液4℃ 离心30min。用20ml 1×Ni²⁺-Sepharose Binding buffer (20 mmol/L NaH₂PO₄, 500mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 重悬细胞，再加入PMSF 至终浓度1mmol/L。冰上超声破碎菌体，4℃离心，弃沉淀，上清 0.45 μm 的滤膜过滤，然后用Ni²⁺-Sepharose亲和柱对蛋白进行纯化。10倍柱体积Binding buffer, 10倍柱体积的 Wash buffer (20 mmol/L NaH₂PO₄, 500mmol/L NaCl, 80 mmol/L 咪唑, pH 7.4), 10倍柱体积的 Elution buffer (20 mmol/L NaH₂PO₄, 500mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4)。收集洗脱峰，进行SDS-PAGE分析。洗脱的重组蛋白4℃透析过夜，透析缓冲液含tris 50mmol/L pH 7.9, EDTA 0.5 mmol/L, NaCl 50mmol/L, 甘油5% (V/V)。蛋白浓度采用Bradford法进行测定。

1.5 重组蛋白活性测定

Rpfc 样蛋白能促进休眠期的结核分枝杆菌的复苏，且能缩短在基本培养基上的延滞期。同时，由于Rpfc 蛋白有种间活性，因此可以通过测定重组Rpfc 能否缩短藤黄微球菌低密度 (1: 10³) 在基本培养基 LMM 来检测其活性。

藤黄微球菌在营养琼脂培养基上传代。接少量菌体至LMM培养基中37℃振荡培养过夜，离心，上清0.22 μ m滤膜过滤除菌后立即使用作为阳性对照，透析buffer作为阴性对照，以及透析出盐后的重组Rpfc，各加40 μ l 至30ml的LMM培养基中（调整RPF终浓度为pmol水平），37℃，200rpm/min振荡培养，每4h观测一次OD₆₀₀ 值（取200 μ l样品，在96孔板上，Molecular Devices Spectra MAX 190读数）。

1.6 Rpfc的生物信息学分析

使用Vector NT I Suite9 对蛋白氨基酸组成进行分析。使用在线软件SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对蛋白信号肽进行预测。使用NCBI 的RPS-BLAST对氨基酸一级结构保守域进行比对。

2 结果

2.1 Rpfc 基因的扩增和克隆

以 MTB 基因组 DNA 为模板，以 cf, cr 为引物进行 PCR 扩增。扩增产物。扩增产物经 1.5%琼脂糖电泳分析，可见 1 条约 450bp 的 DNA 片断，与预期 DNA 片断大小一致。纯化的 Rpfc PCR 产物与 pET28a (+) 连接，构建的重组质粒通过菌体 PCR 检测，再通过测序鉴定，该序列和 GenBank 中 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *rpfc* 除信号肽段部分的基因序列完全一致。

2.2 重组 RPFc 的表达与纯化

经过 IPTG 诱导，目的蛋白主要以包涵体形式表达。经凝胶扫描分析，目的蛋白占总蛋白的%。上清中的可溶重组蛋白经亲和层析后在考马斯亮兰染色的 SDS-PAGE 上只有单一的条带。

2.3 重组 Rpfc 蛋白活性的测定

从表一可以看出，Rpfc 能显著缩短藤黄微球菌低密度接种到 LMM 培养基上的延滞期。

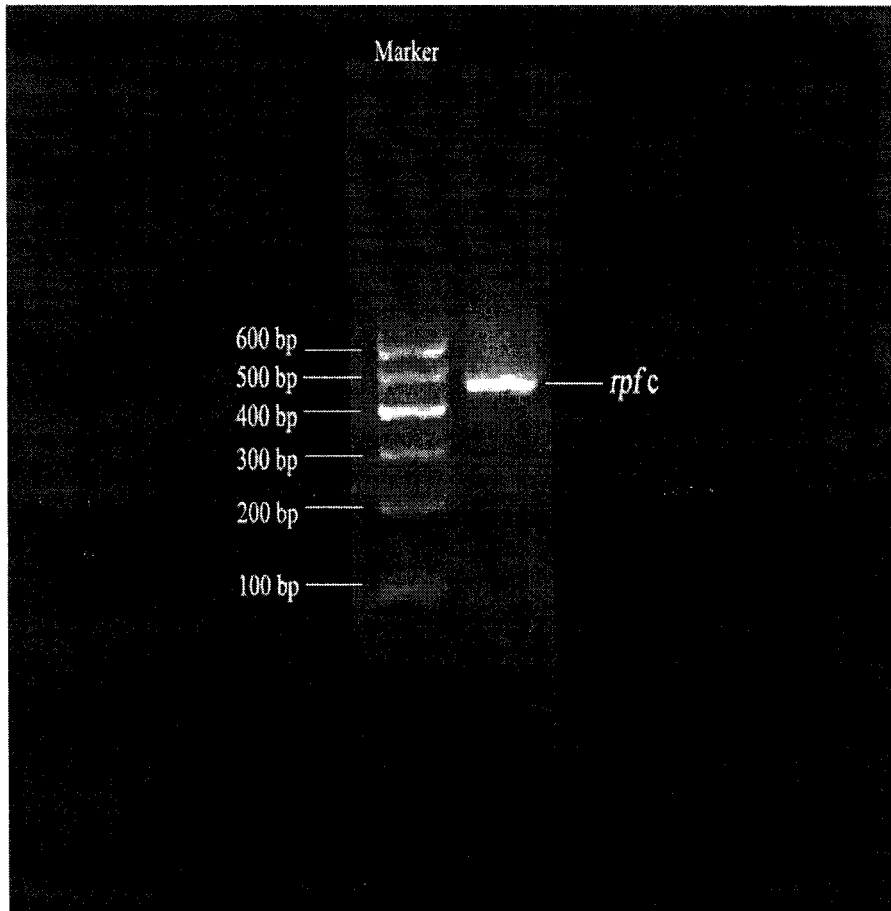


图 1

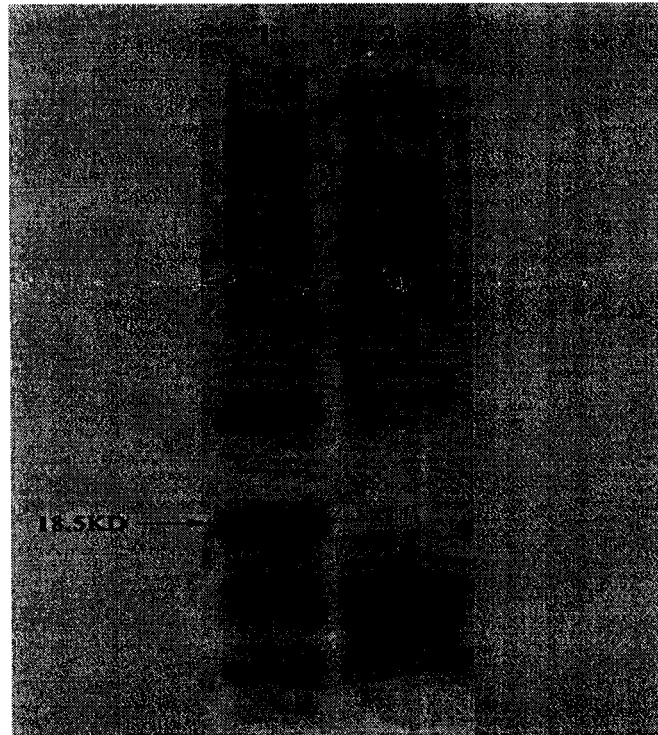


图 2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 结核分枝杆菌rpfC基因及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | CN101037698A | 公开(公告)日 | 2007-09-19 |
| 申请号 | CN200610095339.X | 申请日 | 2006-12-25 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 西南大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 西南大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 西南大学 | | |
| [标]发明人 | 谢建平 柳云帆 王洪海 | | |
| 发明人 | 谢建平 柳云帆 王洪海 | | |
| IPC分类号 | C12N15/31 C12N1/21 C12N9/00 C12Q1/68 A61K48/00 G01N33/53 A61P31/06 | | |
| 代理人(译) | 康海燕 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明属于医药生物技术领域，涉及结核分枝杆菌rpfC基因及其用途，尤其是在rpfC活性调控分子筛选、利用rpfC的结核病预防性疫苗和结核病诊断试剂方面的用途。

