

[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 200710039980.6

[51] Int. Cl.

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12R 1/84 (2006.01)

[43] 公开日 2008年10月29日

[11] 公开号 CN 101294184A

[22] 申请日 2007.4.25

[21] 申请号 200710039980.6

[71] 申请人 中国农业科学院上海兽医研究所

地址 200232 上海市徐汇区石龙路 345 弄 3 号

[72] 发明人 何国声 高兴春 徐梅倩 郭敏
曹杰 朱顺海 赵其平 黄燕
庞程 李家诚

[74] 专利代理机构 上海世贸专利代理有限责任公司

代理人 严新德

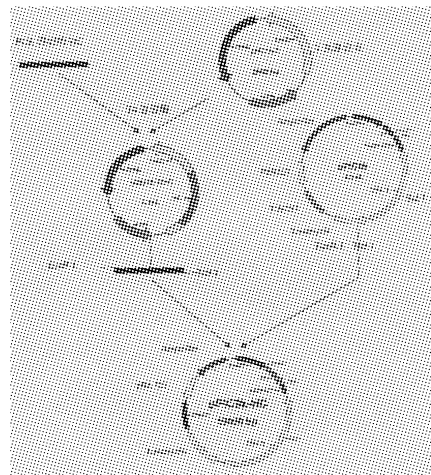
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 3 页

[54] 发明名称

一种利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法

[57] 摘要

本发明公开一种利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法,包括如下步骤:首先用 PCR 扩增 HC 基因,酶切重组载体和片段 HC,用连接酶连接后形成含有 HC 的重组质粒,将重组产物转入大肠杆菌,然后将含有 HC 的重组质粒酶切,线性化后通过电击转化入制备好的酵母感受态细胞中进行培养,筛选出多拷贝质粒菌株,对筛选出的细胞进行培养,离心收集细胞,进行诱导表达,最后将收集的上清液浓缩后,于缓冲液中透析、过滤,用阴离子交换层析柱纯化透析蛋白,收集含目的蛋白的洗脱液。本发明是一种低廉且产量高的表达 HC 的方法,毕赤酵母具有原核表达系统快速、简单、低廉的优点,其最大的优点是它自身分泌的蛋白很少,有利于纯化。



1.一种利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法，其特征在于：所述的方法包括如下步骤：

(1) 根据皮蝇素 C 基因全长 cDNA 序列，设计含 EcoR I 和 Not I 酶切位点的特异性引物，用 PCR 扩增出如 SEQ ID NO:1 所示的皮蝇素 C 基因，用 EcoR I 和 Not I 分别酶切重组载体和片段皮蝇素 C 基因，并用连接酶将其连接，形成含有皮蝇素 C 基因的重组质粒，将重组产物转入大肠杆菌，酶切、PCR 鉴定、测序确认；

(2) 将含有皮蝇素 C 基因的重组质粒以 Sal I 进行酶切，线性化后的重组质粒通过电击转化入制备好的酵母感受态细胞中进行培养，筛选出多拷贝质粒菌株；

(3) 对筛选出的细胞进行培养，待菌液 OD600 值达 2—6 时离心收集细胞，然后进行诱导表达；

(4) 将收集的上清液浓缩后，于缓冲液中透析、过滤，用阴离子交换层析柱纯化透析蛋白，收集含目的蛋白的洗脱液。

2. 如权利要求 1 所述的利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法，其特征在于，所述的重组载体 pPIC9k。

3. 如权利要求 1 所述的利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法，其特征在于，所述的酵母感受态细胞为 GS115。

4. 如权利要求 1 所述的利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法，其特征在于，在步骤 3 中采用 BMGY 培养基对筛选出的 GS115 细胞进行培养。

5. 如权利要求 1 所述的利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法，其特征在于，在步骤 3 中，用含 1.0% 甲醇的 BMMY 培养基在 30℃ 对 GS115 细胞进行诱导表达，每天添加甲醇至 1.0%，甘油至 0.25%，60 小时后收集上清。

6. 如权利要求 1 所述的利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法，其特征在于，

在步骤 4 中，将收集的上清液浓缩后，于缓冲液中透析，2—5 小时换液一次，透析过液，滤膜过滤，然后用阴离子交换层析柱纯化透析蛋白，收集含目的蛋白的洗脱液。

7. 如权利要求 6 所述的利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法，其特征在于，在用阴离子交换层析柱纯化透析蛋白的过程中，洗脱程序为：5CV 洗脱液洗脱杂蛋白，进样量 2ml，梯度洗脱采取 7%B 液洗杂蛋白，17%B 液洗脱目的蛋白，流速 1.0ml/min.，280nmUV 检测。

8. 如权利要求 1 所述的利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法，其特征在于，阴离子交换层析柱采用 Mono Q HR5/5。

9. 皮蝇素 C 在制备用于皮蝇蛆病的免疫诊断的药物或者试剂中的应用。

10. 一种含有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的毕赤酵母表达载体 pPIC9k- HC。

11. 一种含有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的毕赤酵母毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9k- HC。

一种利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，尤其涉及皮蝇素 C，具体的是一种利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法。

背景技术

皮蝇蛆病 (*Hypodermosis*) 是由双翅目、皮蝇科、皮蝇属的牛皮蝇 (*Hypoderm bovis*) 和纹皮蝇 (*Hypoderm lineatum*) 的幼虫寄生于牛的背部皮下组织引起的人畜共患寄生虫病，该病给畜牧业造成严重经济损失，在欧洲、北美、亚洲等地广泛流行，在我国甘肃、西藏、新疆、青海、内蒙古等五大牧区流行甚为严重。皮蝇主要寄生在牛科、鹿科和麝科动物体内。每年皮蝇蛆病都给畜牧业和皮革业生产带来了巨大的经济损失。

对于皮蝇蛆病的诊断除了临床诊断以外最常用的就是 ELISA，包被抗原采用的是皮蝇一期幼虫的可溶性抗原，这种抗原的主要成分是皮蝇素 A、B 和 C；ELISA 方法中主要针对的就是皮蝇素 C 的抗体。皮蝇素 C 只在一期幼虫中表达，能在牛背上形成瘤包的二期和三期幼虫不表达，有很高的抗原性和特异性。用 HC 做抗原、以 ELISA 为基础的免疫学诊断方法对评价欧洲皮蝇蛆病的流行情况及检测包括法国、希腊、摩洛哥、波兰、葡萄牙、西班牙和英国等在内的许多国家对该病的控制是具有重要意义的。

随着皮蝇蛆病控制工作的开展，获得天然可溶性抗原越来越困难，评价皮蝇蛆病的感染和复发越来越困难。

发明内容

本发明的目的在于提供一种利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法，所

述的方法要解决现有技术中的皮蝇素 C 难以获得的技术问题。

本发明一种利用毕赤酵母生产皮蝇素 C 的方法，包括如下步骤：

(1) 根据皮蝇素 C 基因全长 cDNA 序列，设计含 EcoR I 和 Not I 酶切位点的特异性引物，用 PCR 扩增出如 SEQ ID NO:1 所示 HC 基因，用 EcoR I 和 Not I 分别酶切重组载体和片段 HC，并用连接酶将其连接，形成含有 HC 的重组质粒，将重组产物转入大肠杆菌，酶切、PCR 鉴定、测序确认；

(2) 将含有 HC 的重组质粒以 Sal I 进行酶切，线性化后的重组质粒通过电击转化入制备好的酵母感受态细胞中进行培养，筛选出多拷贝质粒菌株；

(3) 对筛选出的细胞进行培养，待菌液 OD600 值达 2—6 时离心收集细胞，然后进行诱导表达；

(4) 将收集的上清液浓缩后，于缓冲液中透析、过滤，用阴离子交换层析柱纯化透析蛋白，收集含目的蛋白的洗脱液。

进一步的，所述的重组载体 pPIC9k。

进一步的，所述的酵母感受态细胞 GS115。

进一步的，在步骤 3 中采用 BMGY 培养基对筛选出的 GS115 细胞进行培养。

进一步的，在步骤 3 中，用含 1.0% 甲醇的 BMMY 培养基在 30℃ 对 GS115 细胞进行诱导表达，每天添加甲醇至 1.0%，甘油至 0.25%，60 小时后收集上清。

进一步的，在步骤 4 中，将收集的上清液浓缩后，于缓冲液中透析，2—5 小时换液一次，透析过液，滤膜过滤，然后用阴离子交换层析柱纯化透析蛋白，收集含目的蛋白的洗脱液。

进一步的，在用阴离子交换层析柱纯化透析蛋白的过程中，洗脱程

序为：5CV 洗脱液洗脱杂蛋白，进样量 2ml，梯度洗脱采取 7%B 液洗杂蛋白，17%B 液洗脱目的蛋白，流速 1.0ml/min.，280nmUV 检测。

进一步的，阴离子交换层析柱采用 Mono Q HR5/5。

本发明的目的还在于提供皮蝇素 C 在制备用于皮蝇蛆病的免疫诊断的药物或者试剂中的应用。

本发明的目的还在于提供一种含有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的毕赤酵母表达载体 pPIC9k-HC。

本发明的目的还在于提供一种含有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的毕赤酵母毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9k-HC。

本发明由于 HC 基因是插入到毕赤酵母基因组 DNA 中去得，所以能够在高密度连续培养的情况下稳定表达。酵母表达所使用的培养基由酵母提取物、蛋白胨、葡萄糖、甘油等低廉原料组成，成本低。60 h 为一个培养周期，每升可获得约 121mg 蛋白。阴离子交换层析分离纯化 HC 蛋白操作简单，易用推广应用。

本发明和已有技术相比，利用毕赤酵母表达皮蝇素 C，并用阴离子交换层析柱分离纯化 HC。这是一种低廉且高产的表达 HC 的方法，为产业化生产奠定了基础。并且毕赤酵母可快速利用培养基中的碳源，稳定复制基因组中的 DNA，采用高密度连续培养，蛋白产量高，它除含有真核表达系统共有的翻译后修饰功能等优点外，同时也具有原核表达系统操作简单、成本低廉等优点。

附图说明

图 1 为本发明 pPIC9k-HC 构建示意图。

图 2 为本发明重组 PCR 和酶切鉴定图 (其中 M 为 3000bp DNA marker, 1 为 pPIC9k-HC 经 EcoR I 和 Not I 酶切产物, 2 为 PCR 重组质粒 pPIC9k-HC 扩增产物, 3 为 PCR 阴性对照)。

图 3 为本发明细胞培养上清液 SDS-PAGE 电泳图 (M 为蛋白 Marker, 1-4 为经 TCA 浓缩后重组菌上清, 5 为空载体阴性对照, 6 为法国农科院馈赠的 HC 阳性对照)。

图 4 为本发明纯化后皮蝇素 C SDS-PAGE 电泳图(1 为纯化后的 HC, 2 为纯化前 HC 细胞培养上清液, M 为蛋白 Marker)。

图 5 为本发明纯化蛋白 Western-blot 图 (M 为蛋白 Marker, 1 为 HC 阳性对照, 2,4 为空载体阴性对照, 3 为重组菌表达上清 5 为纯化的 HC)。

图 6 为本发明纯化蛋白明胶电泳图 (1 为纯化后 HC, 2 为未纯化的表达上清, 3 为空载体对照)。

具体实施方式

下面通过具体的实施例进一步说明本发明是如何实现的:

实施例 1 重组质粒的构建

1.1 皮蝇素 C 基因的扩增

如图 1 所示, 根据已报道的 HC 序列 (Moire, N 1994, GeneBank ID: X74306 如 SEQ ID NO: 1 所示), 设计一对含 EcoR I 和 Not I 酶切位点的引物:

hp1: GCAGAATTCATAATCAATGGATACGAAG

hp2: -GCAAGCGGCCGCTTAAAATATTATACCAG

按常规方法进行 PCR 扩增 pGEM-T/HC 上的 HC 基因。PCR 参数: 94°C 5min, 94°C 45s, 50°C 45s, 72°C 1min, 共 30 个循环; 72°C 延伸 10min。将 PCR 产物通过 TA 克隆连接到 pMD18-T Vector 上, PCR 鉴定正确后测序。

1.2 pPIC9k-HC 的构建

用 EcoR I 和 Not I (购自 TaKaRa) 分别酶切重组载体 pMD18-T/HC 和表达载体 pPIC9k(上海农科院生物技术中心提供), 37°C 水浴过夜后终

止反应，用 DNA 胶回收试剂盒（购自上海申能博采公司）回收 HC 相应片段和 pPIC9k，T₄ 连接酶 16℃ 连接过夜。

1.3 重组质粒的鉴定

将重组产物转化入感受态大肠杆菌 DH5 α （本实验室保存）中，挑取氨苄抗性克隆（100mg/ml），接种于 LB 培养基，37℃ 振荡培养过夜，提取重组质粒，经酶切和 PCR 鉴定正确后测序。

如图 2 所示，重组质粒经 PCR 及酶切均证实了片段的正确插入，测序结果（如 SEQ ID NO: 2 所示）表明未有发生碱基移码、丢失和增加。

实施例 2 重组质粒的转化和筛选

2.1 重组质粒的转化

重组质粒经 Sal I 酶切（37℃ 5h）使之线性化，1.5kv,200K Ω ,25 μ F 电击转化入制备好的感受态酵母细胞 GS115(上海农科院生物技术中心提供)中。

2.2 多拷贝重组质粒的筛选

电击转化后的菌液涂布于组氨酸缺陷培养基 MD 平板，30℃ 培养，2~5 天后出现菌落。长出的各个菌落连续通过 3 块 96 孔细胞培养板培养使菌液具有相同的细胞密度，将菌液分别滴加于含 1mg/mlG418 的 YPD 平板上，30℃ 培养，待菌落生长后用 PCR 鉴定。

实施例 3 细胞培养与蛋白诱导分泌

将筛选得到的含多拷贝 pPIC9k- HC 质粒的 GS115 用以甘油为碳源的 BMGY 培养基 30℃ 培养，当 OD₆₀₀ 值为 2-6 时，4000rpm 离心 10min 收集细胞沉淀，改用含 1.0% 甲醇的 BMMY 培养基 30℃ 诱导表达，每天添加甲醇至 1.0%，甘油至 0.25%，60 h 后收集上清。

如图 3 所示，诱导表达后蛋白电泳表明，分泌蛋白中含有 28KD 蛋白

实施例 4 分离纯化

将收集的上清液浓缩至 1/5 体积后，于 25mM Tris-HCl pH8.0 缓冲液中透析，2 小时换液一次，透析过液，0.22 μ m 滤膜过滤。用阴离子交换层析柱纯化透析蛋白，洗脱液为 2M NaCl 25mM Tris-HCl pH8.0，洗脱程序为：5CV 洗脱液洗脱杂蛋白，进样量 2ml，梯度洗脱采取 7% B 液洗杂蛋白，17%B 液洗脱目的蛋白，流速 1.0ml/min.，280nmUV 检测，收集含目的蛋白的洗脱液。

实施例 5 表达产物的生物特性鉴定

5.1 分子量测定

将收集的上清及收集到的蛋白峰进行 SDS-PAGE 电泳.分离胶和积层胶的浓度分别为 12%和 5%，加样 20 μ L，电压条件分别为 130V 和 80V，以低分子量标准蛋白作对照，考马斯亮兰染色。如图 4 所示，蛋白质的大小为 28KD。

5.2 抗原性检测

将收集的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后，100V 1h 转移至硝酸纤维素膜（NC）上，1%明胶封闭液中温育 1.5 小时；与 1: 500 兔抗 HC 血清作用 1 h，PBST 洗脱三次，每次 5min；再与羊抗兔 IgG-HRP（购自华美生物工程公司）1:2000 室温作用 1h，PBST 洗涤三次后，置于底物溶液中显色。如图 5 所示，Western-blot 显示了此峰蛋白能与兔抗 HC 血清特异性结合。

5.3 酶活性检测

除在分离胶中含 0.1%明胶外其他与 SDS-PAGE 胶相同，样品不经变性处理。电泳后用 2.5%TritonX-100 溶液 4℃洗涤，在 0.1 mM Tris-HCl pH7.5，1 mM CaCl₂ 溶液中 37℃温浴 60 min，考马斯亮兰染色。如图 6 所示，明胶电泳显示目的蛋白对明胶有水解作用，具有水解酶活性。

序列表

<110> 中国农业科学院上海兽医研究所
 <120> 皮蝇素 C 在毕赤酵母系统中的表达及其应用
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 860
 <212> DNA
 <213> HC
 <400> 1

```

atgaaattct tacttgtggt cgctttggct ttggctacta cttcagcctt ccaacatcct      60
gcttcgattt ttgaattaag agaaggacgc ataatcaatg gatacgaagc ctatactggt      120
ctatttcctt accaagctgg tctagacatt actctacaag atcagagaag ggtatggtgc      180
ggtggttcct tgategacaa taaatggatt ttgactgctg cccactgtgt acatgatgca      240
gtttcgggtg ttgtttactt aggttctgcc gtccaatatg aaggtgaagc cgttgtgaac      300
tcagaaagga tcatctctca ttccatgttt aatccagaca cttacttgaa tgatgtgccc      360
ttgatcaaaa ttctcactgt cgaatacacc gacaatatcc aacctataag attaccttcc      420
ggagaagaat taaataacaa atttgaaaat atttgggcta cagtttctgg ttgggggtcaa      480
agcaatactg ataccgtgat ttgcaatat acttataatc tcgtcatcga taacgatcga      540
tgtgcacaag aatatectcc gggtattata gtcgagtcta caatatgcgg tgacacatgt      600
gatggcaaat caccctgctt cggagattct ggtggcccat ttgtcttgag tgataaaaat      660
ttgtaattg gtgtggtttc ttcgtatct ggagccggct gtgaatccgg caagcctggt      720
ggcttctcac gtgtgaccag ttacatggat tggattcagc aaaatactgg tataatattt      780
taaccgaatc agtaaacctc catgaaataa caattaaata aatttaaaat cttttataat      840
cagacaaaaa aaaaaaaaaa

```

<210> 2

<211> 693

<212> DNA

<213> 重组后皮蝇素 C

<400> 2

```

ataatcaatg gatacgaagc ctatactggg ctatttcctt accaagctgg tctagacatt      60
acactacaag atcagagaag ggtatgggtgc ggtgggtcct tgatcgacaa taaatggatt 120
ttgactgctg cccactgtgt acatgatgca gtttcgggtg ttgtttactt aggtttctgcc    180
gtccaatatg aggggtgaagc cgttgtgaac tcagaaagga tcattctctca ttccatgttt    240
aatccagaca ctacttgaa tgatgttgcc ttgatcaaaa ttcttcacgt cgaatacacc    300
gacaatatcc aacctataag attaccttcc ggagaagaat taaataacaa atttgaaaat    360
atttgggcta cagtttctgg ttgggggtcaa tgcaatactg ataccgtgat ttgcaatat    420
acttataatc tcgtcatcga taacgatcga tgtgcacaag aatatcctcc ggggtattatc    480
gtcgagtcta caatatgcgg tgacactagt gatggcaaat caccctgctt cggagattct    540
ggtggcccat ttgtcttgag tgataaaaaat ttgttaattg gtgtggttcc ttctgtatct    600
ggagccggct gtgaatccgg caagcctgtt ggcttctcac gtgtgaccag ttacatggat 660
tggattcagc aaaatactgg tataatattt taa                                     693

```

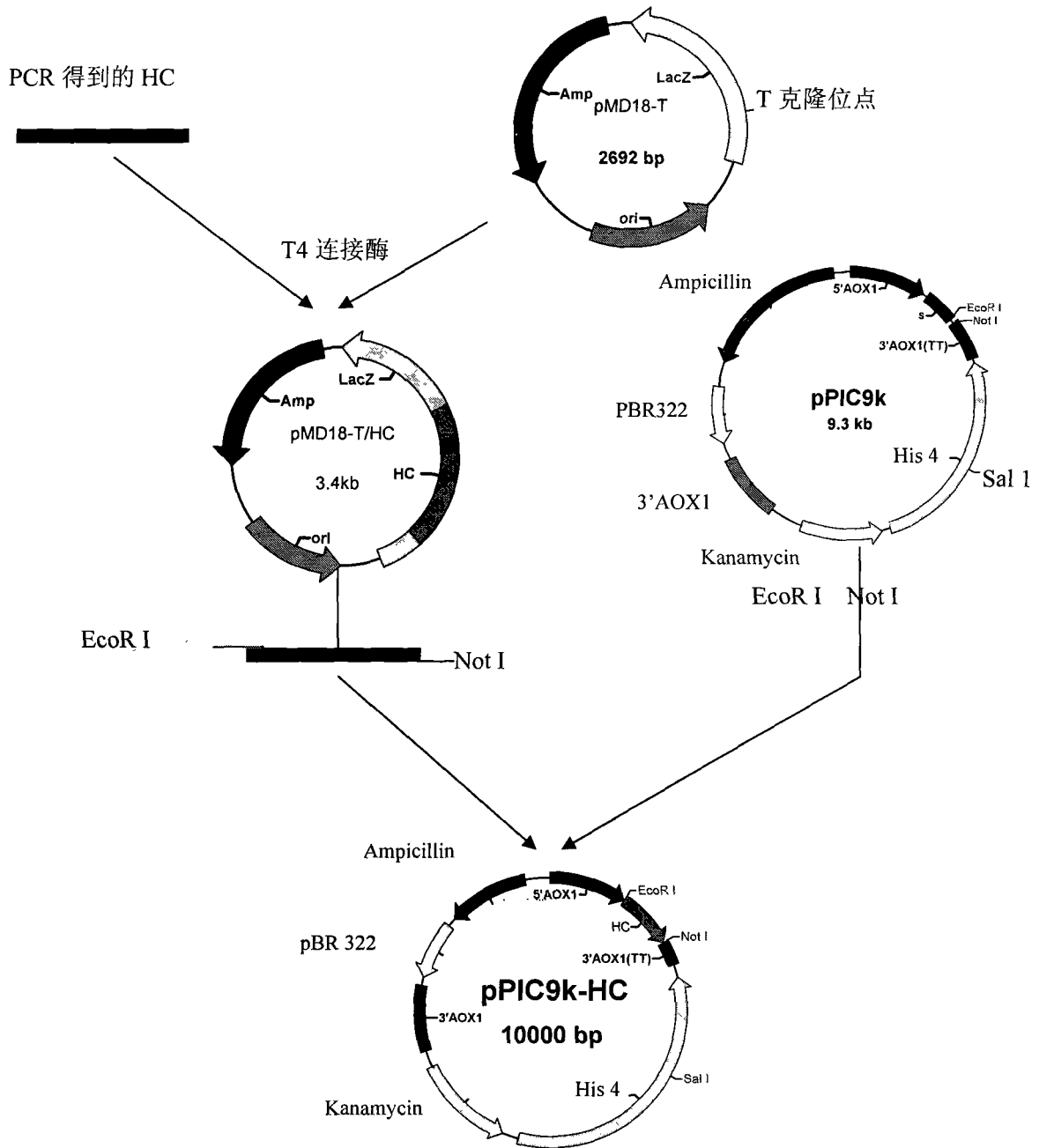


图 1

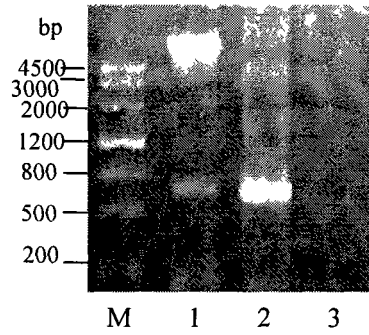


图 2

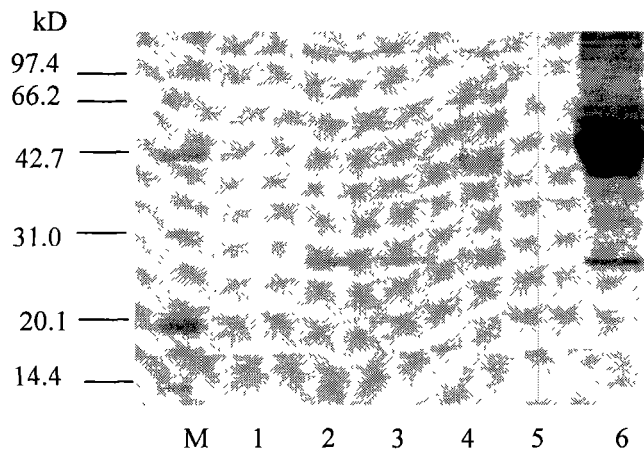


图 3

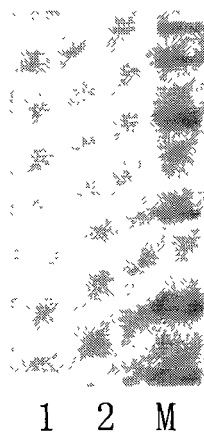


图 4

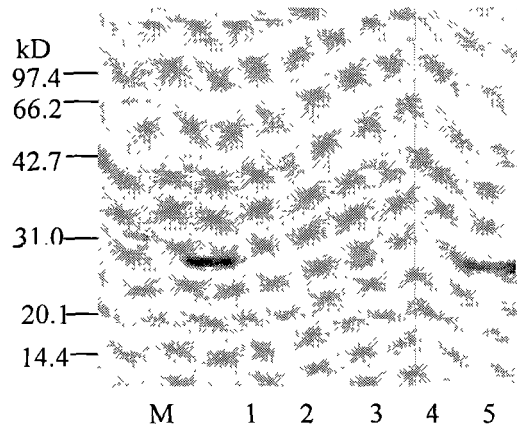


图 5

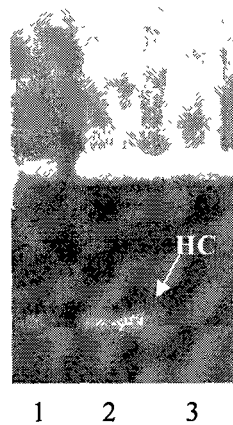


图 6

专利名称(译)	一种利用毕赤酵母生产皮蝇素C的方法		
公开(公告)号	CN101294184A	公开(公告)日	2008-10-29
申请号	CN200710039980.6	申请日	2007-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院上海兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院上海兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院上海兽医研究所		
[标]发明人	何国声 高兴春 徐梅倩 郭敏 曹杰 朱顺海 赵其平 黄燕 庞程 李家诚		
发明人	何国声 高兴春 徐梅倩 郭敏 曹杰 朱顺海 赵其平 黄燕 庞程 李家诚		
IPC分类号	C12P21/02 C12N15/63 C12N5/00 C12N1/16 G01N33/53 C12R1/84		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种利用毕赤酵母生产皮蝇素C的方法，包括如下步骤：首先用PCR扩增HC基因，酶切重组载体和片段HC，用连接酶连接后形成含有HC的重组质粒，将重组产物转入大肠杆菌，然后将含有HC的重组质粒酶切，线性化后通过电击转化入制备好的酵母感受态细胞中进行培养，筛选出多拷贝质粒菌株，对筛选出的细胞进行培养，离心收集细胞，进行诱导表达，最后将收集的上清液浓缩后，于缓冲液中透析、过滤，用阴离子交换层析柱纯化透析蛋白，收集含目的蛋白的洗脱液。本发明是一种低廉且产量高的表达HC的方法，毕赤酵母具有原核表达系统快速、简单、低廉的优点，其最大的优点是它自身分泌的蛋白很少，有利于纯化。

