

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2004年3月18日(18.03.2004)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2004/022751 A1

(51) 国际分类号⁷: C12N 15/12, 15/63, A61P 35/00

(21) 国际申请号: PCT/CN2003/000538

(22) 国际申请日: 2003年7月7日(07.07.2003)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
02134651.8 2002年9月3日(03.09.2002) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中山大学(SUN YAT-SEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省广州市新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 徐安龙(XU, Anlong) [CN/CN]; 姜孝玉(JIANG, Xiaoyu) [CN/CN]; 彭立胜(PENG, Lisheng) [CN/CN]; 涂洪斌(TU, Hongbin) [CN/CN]; 陈慧萍(CHEN, Huiping) [CN/CN]; 杨文利(YANG, Wenli) [CN/CN]; 中国广东省广州市新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。

(74) 代理人: 广州粤高专利代理有限公司(GUANGZHOU YUEGAO PATENT AGENT LIMITED CORPORATION); 中国广东省广州市建设大马路3号党校大厦5楼ABC单元, Guangdong 510060(CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: CNIDARIAN CYTOTOXIN GENE AND ITS EXPRESSION AND APPLICATION

(54) 发明名称: 一种海葵细胞毒素基因及其表达、应用

(57) Abstract: The present application disclosed a novel Sargartia rosea cytotoxin gene encoding the precursor protein of cytotoxin of 216 amino acids. The E.coli and Adenovirus recombinant system for expressing the said gene are also disclosed. The cytotoxin of the present invention could be used to screen anti-tumor medicines.

(57) 摘要

本发明公开了一种新克隆的海葵细胞毒素基因 Src I, 该基因编码 216 个氨基酸的毒素前体蛋白。本发明还构建了该基因的大肠杆菌以及腺病毒表达系统。本发明的海葵细胞毒素前体可以用于开发抗肿瘤药物。

一种海葵细胞毒素基因及其表达、应用

(一) 技术领域

本发明涉及一种新基因，特别是一种海葵细胞毒素新基因。本发明还涉及上述基因的表达及其编码的蛋白在制备治疗肿瘤疾病药物中的应用。

(二) 背景技术

海葵 (*anthopleura*) 属于腔肠动物门 (*soelenterata*) 的珊瑚纲 (*anthozoa*)，是海洋中较原始的动物类。在长期的生物进化过程中，为了抵御敌害及捕获食物，海葵触手的刺丝囊能够分泌多种海葵毒素，基本上是多肽类毒素，对人和动物有多种生理活性作用。根据海葵毒素的生理功能将其分为 3 类：海葵神经毒素、海葵溶细胞素及海葵钾离子通道抑制剂。

具有细胞毒作用的海洋生物毒素已作为筛选抗癌及抗病毒制剂的来源之一。在海洋生物中发现多种多肽溶细胞毒素。这些海洋生物包括：海葵、水母、海藻，海胆、海兔、海绵等。海葵溶细胞素可以破坏细胞的结构，主要是作用于细胞膜，与细胞膜的脂类或蛋白质结合，使之穿孔溶解。海葵溶细胞素是一类碱性蛋白，分子量约 20kDa，含有 30 多个强碱性氨基酸，缺乏半胱氨酸，具有溶细胞性、心脏毒性及其他活性。其二级结构含有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和随机卷曲结构；与膜结合后 α 螺旋、 β 折叠则有所增加，随机卷曲结构则减少。海葵溶细胞素至少有两个区域直接参与膜脂（磷脂酰胆碱、鞘氨醇、神经节苷脂）或膜蛋白的结合：N 末端的双亲 α 螺旋（氨基酸残基 13-20）和富含色氨酸区域（氨基酸残基 105-120）；双亲 α 螺旋插入细胞膜，而富含色氨酸区域的亲水区域为反向 β 折叠结构，伸展在细胞膜表面，精氨酸、苏氨酸及附近的氨基酸能与膜脂的极性端作用，这种和膜脂的作用方式与细菌类溶细胞素不同（细菌类溶细胞素的 α 螺旋是与细胞膜中的胆固醇结合，形成大的孔洞，溶解细胞膜）；海葵溶细胞素可作为真核生物溶细胞素的模型。海葵溶细胞素往往形成寡聚体起作用，其作用方式可描述为：溶于水的海葵溶细胞素 $\rightarrow$ 与细胞膜或膜受体结合 $\rightarrow$ 插入细胞膜 $\rightarrow$ 形成寡聚体 $\rightarrow$ 形成膜孔道 $\rightarrow$ 细胞裂解。例如：从海葵 (*Stichodactyla helianthus*) 分离的一种溶细胞素 SticholysinII，形成四聚体，插入细胞膜形成阳离子通道，破坏细胞。

海葵溶细胞素表现出多种生物学活性；溶血活性、细胞毒性、心脏刺激活性、阻断钾离子通道等。从海葵 (*Heteractis magnifica*) 中分离的

HmT 对人红细胞的半溶解浓度为 0.15ug/ml。从海葵 (*Actinia equina*) 分离的 Equinatoxin II 对老鼠的半致死浓度为 35ug/kg, 致死原因是心肌缺血; 实验表明, Equinatoxin II 可直接作用于心脏, 毒性与毒素的浓度相关, 引起心室压降低, 使血液交换减慢的域值为 0.1-1nM。Stichlysin I、Stichlysin II、Equinatoxin II 对病原体 *Giardia* (一种原生动植物) 有杀伤作用, LC₅₀ 分别为 0.5nM、1.6nM、0.8nM。在 Ca⁺⁺存在时, Equinatoxin II (100nM) 可明显使神经细胞瘤 NG108-15 膨大破裂。Cytolysin III 可杀伤体外培养的 Ehrlich ascitic 肿瘤细胞, 对接种于小鼠的该肿瘤也有一定的抑制作用。对海葵新的细胞毒素的进一步的研究, 有望获得某些具有心血管作用的药物或抗癌及抗病毒制剂。

海葵溶细胞素可以在 *E.Coli* 中进行融合表达, 重组蛋白的溶细胞活性和细胞毒活性与天然蛋白活性相当, 但在 N 末端加上额外氨基酸就降低重组蛋白的活性, 额外氨基酸越多重组蛋白活性越低。N 末端加上的额外氨基酸干扰了 α 螺旋与细胞膜的作用, 降低毒素的活性。

目前, 已经测定了一些海葵溶细胞毒素的二级结构, 但是这些毒素的高级结构、分子作用机制、膜插入和寡聚体的形成的具体细节还不清楚。不过, 最近得到了高分辨率的毒素蛋白晶体结构 (包括水溶状态、膜结合状态和膜孔形成状态), 对阐明海葵溶细胞毒素的高级结构、分子作用机制、膜插入和寡聚体的形成是有帮助的。

(三) 发明内容

本发明的目的在于提供一种新的海葵细胞毒素基因 Src I。

本发明的另一目的在于提供上述新基因的表达。

本发明的另一目的在于提供上述新基因在制备预防和治疗肿瘤药物中的应用。

本发明所选择的海葵为玫瑰红绿海葵 (*Sagartia rosea*), 采自广西壮族自治区北海市涠洲岛附近海域。

本发明构建了玫瑰红绿海葵毒腺 cDNA 表达文库: 首先分离海葵触手, 提取总 RNA, 然后按 Clontech 公司 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 说明书的操作进行, 获得双链 cDNA, 最后将双链 cDNA 连接到改造的质粒载体 pcDNA3.0 上并转化 *E.coli*, 从而构建成玫瑰红绿海葵毒腺的 cDNA 表达文库。

本发明通过对玫瑰红绿海葵毒腺的 cDNA 文库克隆的序列测定, 从中得到了一个编码玫瑰红绿海葵溶细胞素的 cDNA 克隆, 编号为 Src I。这个 cDNA 序列编码 216 个氨基酸的毒素前体蛋白, 包括 19 个氨基酸的信号肽、19 个氨基酸的 propeptide motif 和 178 个氨基酸的成熟蛋白, 成熟

蛋白的等电点为 4.8，分子量为 19,500 道尔顿，是一种酸性蛋白，这是首次报道的酸性海葵溶细胞素。成熟蛋白的 N 末端具有海葵溶细胞素的典型特征，即具有双亲的 α 螺旋。

本发明通过设计了一对特异引物，将编码玫瑰红绿海葵溶细胞素成熟蛋白的核苷酸序列用 PCR 方法从 pcDNA3.0 载体上扩增出来，克隆到原核表达载体 pBV220 上，构建成表达质粒 pBV220-Src I 并将其转化大肠杆菌 DH5 α 。经过对培养时间、培养温度、诱导时间等条件的摸索和优化，重组蛋白的表达量占菌体总蛋白的 15% 以上，并且基本上处于不溶的包涵体状态。

上述的引物根据 Src I 基因编码的成熟蛋白两端序列和原核表达载体 pBV220 的多酶切位点合成，上游引物含有 EcoR I 酶切序列 (GAATTC) 和起始密码子 (ATG)，下游引物含有 BamH I 酶切序列 (GGATCC) 和终止密码子 (TTA)，序列如下：

上游引物，5' G GAATTC ATG ATC TCG GGT GGT ACT GTT ATT 3'

EcoR I 酶切序列 起始密码子

下游引物，5' TA GGATCC TTA TGG CCA GAC GAC TTC AAT C 3'

BamH I 酶切序列 终止密码子

本发明还摸索和优化了重组 Src I 蛋白的纯化条件，通过包涵体的洗涤、变性、复性和离子交换层析，可得到纯度达 98% 以上的重组 Src I 蛋白。

本发明获得的重组海葵细胞毒素具有生物活性。

本发明获得的重组 Src I 蛋白对体外培养的肝癌细胞 BEL-7401、胃癌细胞 BGC-823、肺癌细胞 Nsc1c 有明显的作用，IC₅₀ 分别为 31.2ug/ml、3.1ug/ml、3.1ug/ml。

本发明获得的重组 Src I 蛋白对 NIH 小鼠进行腹腔注射，对接种于小鼠的肝癌实体瘤和 S-180 实体瘤有明显的抑制作用，抑瘤率分别为 39.5%、26.5%，使用浓度分别为 0.6mg/kg、1.2mg/kg。

本发明构建了 Src I 海葵细胞毒素成熟蛋白编码序列的表达质粒 pBV220-Src I，由该表达质粒载体经 EcoR I / BamH I 双酶切，可得到 534bp 的片段，即为玫瑰红绿海葵细胞毒素 Src I 成熟肽编码序列。

本发明的表达质粒载体的复制方法：参照 Sambrook (Sambrook, et al.1989, Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA) 方法，按 CaCl₂ 法在 E.Coli. DH5 α 或 BL21 (DE3) 菌株中转化质粒，用含氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 培养基转化细菌，碱法提取质粒。

本发明通过设计另一对特异引物，将编码玫瑰红绿海葵溶细胞素的

成熟蛋白核苷酸序列用 PCR 方法从 pcDNA3.0 载体上扩增出来, 克隆到穿梭质粒 pshuttle 上, 构建重组质粒 pshuttle-Src I, 该质粒通过 PI-SceI/I-CeuI 双酶切后与真核表达载体 Adeno-X 相连, 构建成重组腺病毒 Adeno-Src I 质粒, Adeno-Src I 的 DNA 通过 PacI 酶切后在人胚肾细胞 HEK293 包装成病毒粒子。重组腺病毒可在真核细胞中表达, 用于相关疾病的治疗。

上述引物根据 Src I 基因编码的成熟蛋白两端序列和穿梭质粒 pShuttle 的多酶切位点合成, 上游引物含有 Apa I 酶切序列 (GGGCCC) 和起始密码子 (ATG), 下游引物含有 NotI 酶切序列 (GCGGCCGC) 和终止密码子 (TTA), 序列如下:

上游引物, 5' GG GGGCCC ATGATCTCGGGTGGTACTGTTATTG 3'

Apa I 酶切序列 起始密码子

下游引物, 5' GTCAT GCGGCCGC TTATGGCCAGACGACTTCAATC 3'

NotI 酶切序列 终止密码子

(四) 附图说明

图 1 为玫瑰红绿海葵触手总 RNA 电泳结果;

图 2 为玫瑰红绿海葵触手双链 cDNA 电泳结果;

图 3 为玫瑰红绿海葵触手 cDNA 文库总质粒、SfiI 酶切和 PCR 检测电泳结果;

图 4 为玫瑰红绿海葵触手 cDNA 文库重组子的 PCR 检测电泳结果;

图 5 为含基因 Src I 的重组质粒 pBV220-Src I 表达质粒构建;

图 6 为玫瑰红绿海葵 Src I 基因的 PCR 产物电泳结果;

图 7 为含基因 Src I 的 pBV220-Src I 表达质粒酶切和 PCR 鉴定电泳结果;

图 8 为重组 Src I 蛋白的表达、包涵体变性、复性和离子交换层析的 SDS-PAGE;

图 9 为重组 Src I 蛋白等电点图;

图 10 为重组 Src I 蛋白的溶血曲线图;

图 11 为重组 Src I 蛋白作用人肝癌细胞 BEL-7402 的光镜照片;

图 12 为重组 Src I 蛋白作用人肝癌细胞 BEL-7402 的荧光照片;

图 13 为重组 Src I 蛋白作用人胃癌细胞 BGC-823 的光镜照片;

图 14 为重组 Src I 蛋白作用人胃癌细胞 BGC-823 的荧光照片;

图 15 为重组 Src I 蛋白作用人肺癌细胞 Nsclc 的结果;

图 16 为 Adeno-Src I 表达系统的构建;

图 17 为重组腺病毒 Adeno-Src I 的 PI-SceI/I-CeuI 酶切鉴定;

图 18 为重组腺病毒 Adeno-Src I 的 PacI 酶切。

图 1 中, 1: RNA ladder (Promega 公司); 2: 玫瑰红绿海葵触手总 RNA。

图 2 中, 1: 1 kb DNA ladder (Promega 公司); 2: 玫瑰红绿海葵触手 dsDNA。

图 3 中, 1: 1 kb DNA ladder (Promega 公司); 2: 文库总质粒的 PCR 结果; 3: 文库总质粒; 4: 文库总质粒的 SfiI 酶切结果。

图 4 中, M: 1 kb DNA ladder (Promega 公司); 1-21: 文库重组子的 PCR 检测。

图 6 中, 1: 1 kb DNA marker (NEB 公司); 2: 玫瑰红绿海葵 Src I 基因的 PCR 产物。

图 7 中, 1: 1 kb DNA marker (NEB 公司); 2: pBV220-Src I 的 EcoRI/BamHI 双酶切; 3: pBV220-Src I 的 PCR 鉴定。

图 8 中, 1: marker; 2: 未诱导的总菌体; 3: 42℃ 诱导的总菌体; 4: 超声上清; 5: 超声沉淀; 6: 包涵体经洗涤的上清; 7: 复性后的 Src I 经离子交换层析的 0.3 M NaCl 洗脱峰; 8: 复性后的 Src I 经离子交换层析的 0.8 M NaCl 洗脱峰。

图 9 中, 1: marker; 2: Src I 重组蛋白。

图 17 中, 1: Adeno-Src I 的 PI-SceI/I-CeuI 酶切; 2: 1 kb DNA marker (NEB 公司)。

图 18 中, 1: Adeno-Src I 的 PacI 酶切; 2: 1 kb DNA marker (NEB 公司)。

(五)具体实施方式

下面结合附图对本发明作进一步说明, 将有助于本领域的普通技术人员理解本发明, 但不以任何形式限制本发明。

实施例一 玫瑰红绿海葵毒腺 cDNA 文库的构建

玫瑰红绿海葵毒腺总 RNA 的提取参考《现代分子生物学实验技术》的一步快速热酚抽提法进行; cDNA 的合成按 Clontech 公司 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 说明书操作。

采用异硫氰酸胍一步法提取的毒腺总 RNA 经 1% 甲醛变性胶电泳检测可见清晰的 28S、18S 两条 rRNA 条带, 如图 1, 表明总 RNA 完整性良好。采用 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 合成的 cDNA 在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 结果呈现均匀的 smear, 如图 2, 大小在 200bp 到 8kb 的范围内, 主要是在 3kb 以下的区域, 在 500bp 附近更为集中, 表明 cDNA 的完整性良好。将 cDNA 插入质粒载体 pcDNA3.0 上构建成 cDNA 表达文库, 文库克隆数为 2.4×10^5 。提取总文库质粒进行酶切和 PCR 分析, 如图 3, 结果表明 cDNA 插入片段大小落在 300bp-8kb 的范围内, 挑取 172 个克隆提取质粒, 酶切和 PCR 鉴定表明超过 95% 的克隆为重组子, 如图 4,

表明该 cDNA 表达文库具有较好的质量。

实施例二 玫瑰红绿海葵触手 cDNA 文库的克隆、序列测定和分析

挑选玫瑰红绿海葵触手 cDNA 文库的克隆,按 Omega Biotek Plasmid Miniprep Kit 的方法提取质粒 DNA。随机测定了 150 个 cDNA 序列。使用 ABI PRISM 377 DNA Analyzer (Applied Biosystems),采用 T7 和 SP6 通用引物为测序引物,进行正反向序列测定,对 cDNA 片段超过 1000bp 的序列,根据已测得的序列设计引物,继续测通 cDNA。测序工作由广州市中山大学生命科学学院中心实验室完成。所得序列经 BlastX 初步分析。结果表明玫瑰红绿海葵毒腺 cDNA 文库包含的基因多种多样,其中毒素基因的丰度较高,有三个编码海葵神经毒素的 cDNA 序列和一个编码海葵溶细胞素的 cDNA 序列,其中编码溶细胞素的 cDNA 编号为 Src I,如序列表所示,它编码 216 个氨基酸的蛋白,其中包括 19 个氨基酸残基的信号肽、19 个氨基酸残基的 propart motif 和 178 个氨基酸残基的成熟蛋白,成熟蛋白的 N 末端具有海葵溶细胞素特征性 α 螺旋。成熟蛋白的分子量为 19,500 道尔顿,蛋白的等电点为 4.8,是酸性溶细胞素。目前,所有报道的海葵溶细胞素为强碱性蛋白,等电点在 9.0 以上,在海葵中发现酸性溶细胞素尚属首次。

Src I 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列见序列表。以玫瑰红绿海葵触手总 RNA 为出发材料,根据已获得的溶细胞素 cDNA 序列设计 3'端引物,以 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 的文库构建引物为 5'端引物,进行 RT-PCR,在 800bp 处出现预期的特异扩增带,回收此带。将回收的 PCR 产物连接到 pGEM-T Easy Vector,转化 DH5 α 大肠杆菌,挑选阳性克隆测序。经测序分析证实,是我们所希望得到的目的基因,测定的 8 个克隆,为同一 cDNA 序列。

实施例三 重组玫瑰红绿海葵溶细胞素表达质粒的构建

根据 Src I 基因编码的成熟蛋白两端序列和原核表达载体 pBV220 的多酶切位点,合成一对引物,序列如下:

上游引物, 5' G GAATTC ATG ATC TCG GGT GGT ACT GTT ATT 3'

单下划线部分为 EcoR I 酶切序列,双下划线为起始密码子

下游引物, 5' TA GGATCC TTA TGG CCA GAC GAC TTC AAT C 3'

单下划线部分为 BamH I 酶切序列,双下划线为终止密码子

PCR 扩增、基因克隆皆按常规方法进行。PCR 产物约 600bp,编码 178 个氨基酸残基,如图 6。将目的基因克隆到原核表达载体 pBV220 上,构建成表达质粒 pBV220-Src I。构建过程见图 5。经酶切鉴定和测序分析表明克隆的基因为目的基因如图 7。

原核表达载体 pBV220 含 P_{RPL} 启动子, 同时含有 cI 调控基因, 带有起始密码子的外源基因可插入启动子下游的多酶切位点, 表达非融合蛋白, 产品可供临床使用。

实施例四 重组玫瑰红绿海葵溶细胞素蛋白的表达

将表达质粒 pBV220-Src I 转化大肠杆菌 DH5 α 。含目的基因的工程菌在 30℃ 生长到 $OD_{600}=0.5$ 时, 立即在 42℃ 诱导 4 小时。收集菌体, 经 SDS-PAGE 电泳分析表明: 基因工程菌经诱导后有明显的特异表达产物带, 分子量与预测值 20kD 相符, 如图 8。薄层扫描分析表明: 在此条件下重组蛋白的表达量占菌体总蛋白的 17% 以上, 基本上处于不可溶的包涵体状态。

实施例五 重组玫瑰红绿海葵溶细胞素蛋白的纯化

诱导后的菌体通过超声破菌, 离心取沉淀, 沉淀通过不同的缓冲溶液洗涤, 去除杂蛋白, 洗涤后的包涵体纯度为 80%。在包涵体洗涤中用到的溶液有: 超声 buffer (10mM Tris-HCl, pH7.0, 1mM EDTA)、buffer 1 (0.1M Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 0.5% Triton X 100)、buffer 2 (50mM PB, 0.5M NaCl, 3M 尿素) 和 buffer 3 (0.1M Tris-HCl, pH8.5, 10mM EDTA, 3M 尿素)。

洗涤后的包涵体在变性液 (8M 尿素, 10mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM DTT) 中溶解。将变性蛋白在复性液 (3M 尿素, 20mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM 氧化型谷胱甘肽, 0.9mM 还原型谷胱甘肽) 中通过透析复性。

复性蛋白通过离子交换层析和疏水层析可获得纯度在 99% 以上的重组蛋白, 如图 8。

实施例六 重组玫瑰红绿海葵溶细胞素蛋白等电点的测定

通过平板电泳测定重组蛋白的等电点, 等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳按常规方法进行。测定的结果为: pH 4.81, 如图 9。与预测的等电点基本相符。

实施例七 重组海葵溶细胞素蛋白的溶血活性鉴定

取人血 5ml, 加入 3.8% 的柠檬酸钠 (柠檬酸钠: 血液为 1: 9), 室温, 3000rpm, 离心 5 分钟。去上清, 用 Hank's 液洗涤红细胞, 直到上清清亮 (约需用 Hank's 洗涤 2-3 次), 用 Hank's 将红细胞配成 0.5% 或 1% (v/v) 的细胞悬液, 将样品加入到 2ml 的红细胞悬液中, 37℃ 温育 20 分钟, 室温, 3000rpm, 离心 5 分钟, 取上清, 测定 OD_{540} 。以 Hank's 为阴性对照, 用终浓度 0.1mg/ml 皂苷使红细胞 100% 溶血。每个浓度的样品做三个平行实验。结果如图 10。

实施例八 重组海葵溶细胞素蛋白对体外培养的肿瘤细胞的作用

将肿瘤细胞按 1.0×10^6 cell/ml 接种于 24 孔板，当细胞生长到 60%-70% 汇合度时加入样品，每个样品浓度做 4 个平行实验，以 Hank's 作为阴性对照。

细胞凋亡的荧光检测（Hoeches 55258 染色法）：用 4% 的多聚甲醛在 4℃ 将细胞固定 20 分钟，用 Hank's 洗涤 2 次，加入 Hoeches 55258 染液，终浓度为 5-10ug/ml，在室温染色 10 分钟，用 Hank's 洗涤 2 次，在荧光显微镜下观察。

将不同浓度的重组蛋白（0.31 ug/ml、3.1 ug/ml、7.8 ug/ml、15.6 ug/ml、31.2 ug/ml、72.1 ug/ml）加入到人肝癌细胞 BEL-7402 中，在 0-36 小时内观察，0.31-15.6 ug/ml 浓度的样品对细胞没有影响，在 31.2 ug/ml 的浓度时能引起细胞形态明显的改变，如图 11，细胞明显拉长，此现象在加入蛋白 8 小时后就比较明显，一直维持到 36 小时（36 小时后没有观察），光镜观察没有坏死现象，通过 Hoeches 55258 染色法染色没有观察到细胞凋亡的现象，如图 12。从重组蛋白的溶血现象看，重组蛋白应能与细胞膜作用，从重组蛋白作用肝癌细胞 BEL-7402 的现象来看，重组蛋白不仅与细胞膜作用，还可能与膜上的蛋白作用，引起信号的改变，导致微管、微丝等的变化，引起细胞形态的改变。

将不同浓度的重组蛋白（0.31 ug/ml、3.1 ug/ml、7.8 ug/ml、15.6 ug/ml、31.2 ug/ml、72.1 ug/ml）加入到人低分化胃癌细胞 BGC-823 中，加入样品后进行观察，6 小时后，3.1 ug/ml 的样品浓度就可使细胞变圆变小，如图 13，经荧光染色，可见细胞核明显变小，胞质仅剩包裹在核外的一薄层，如图 14。

将不同浓度的重组蛋白（0.31 ug/ml、3.1 ug/ml、7.8 ug/ml、15.6 ug/ml、31.2 ug/ml、72.1 ug/ml）加入到人非小细胞肺癌 Nsclc 中，加入样品后进行观察，6 小时后，3.1 ug/ml 的样品浓度就可使细胞膨大、破裂，如图 15，经 Hoeches 55258 染色可知，细胞并非凋亡，绝大多数细胞坏死。

实施例九 重组海葵溶细胞素蛋白对小鼠肝癌（Heps）和肉瘤 S-180 的抗肿瘤试验

重组蛋白的抑瘤试验按常规方法进行；动物为 NIH 小鼠，由第一军医大学试验动物中心提供（2000A037）；给药方法为腹腔注射；阴性对照为生理盐水，阳性对照为环磷酰胺；试验由广东省职业卫生检验中心完成；试验结果见表 1-2。

纯化的重组蛋白对 NIH 小鼠进行腹腔注射，对接种于小鼠的肝癌实体瘤和 S-180 实体瘤均有抑制作用，对肝癌实体瘤的抑瘤率为 39.1%，作用浓度为 0.6mg/kg；对 S-180 实体瘤的抑瘤率为 26.9%，作用浓度为

1.16mg/kg。

表 1 重组 Src I 蛋白对于小鼠肝癌实体瘤(Heps)的抑制作用

剂量组 (mg/ml)	动物数		体重		瘤重 (Mean±Sd)	抑瘤率 (%)	P 值
	开始	结束	开始	结束			
0	9	9	18.2	22.4	1.89±0.65	—	—
0.065	9	9	18.0	21.6	1.15±0.56	39.15	<0.05
Cp, 20	10	10	18.5	19.4	0.72±0.27	61.90	<0.01

P 值：与对照组比较，方差分析。

表 2 重组 Src I 蛋白对小鼠肉瘤 (S-180) 的抑制作用

剂量组 (mg/ml)	动物数		增加体重 (g)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)	胸腺指数 (1/1000)	脾指数 (1/1000)	肝指数 (1/100)
	开始	结束						
0	10	10	2.58±2.24	1.53±0.44	—	3.28±0.85	4.93±1.62	5.35±0.62
Cp, 20	10	10	1.23±1.29	0.64±0.25	58.33 ^{▲▲}	2.16±0.40 ^{▲▲}	4.07±1.02	5.80±0.56
0.116	10	10	3.26±1.07	1.12±0.58	26.87 [▲]	3.41±0.78	6.54±1.76 [▲]	5.54±0.55
0.031	10	10	3.49±1.14	1.19±0.47	15.56	3.29±0.60	5.79±0.78	5.26±0.52

P 值：与对照组比较，方差分析。[▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01

实施例十 重组腺病毒 Adeno-Src I 的构建

操作方法按Clontech公司的Adeno-XTM Expression System User Manual进行。根据Src I基因编码的成熟蛋白两端序列和穿梭质粒pShuttle的多酶切位点，合成一对引物，序列如下：

上游引物，5' GG GGGCCC ATGATCTCGGGTGGTACTGTTATTG 3'

单下划线部分为 Apa I 酶切序列，双下划线为起始密码子

下游引物，5' GTCAT GCGGCCG C TTATGGCCAGACGACTTCAATC 3'

单下划线部分为 NotI 酶切序列，双下划线为终止密码子

PCR 扩增、基因克隆、质粒提取等按常规方法进行。将 PCR 产物克隆到穿梭质粒 pShuttle 上，构建成 pShuttle-Src I 质粒；pShuttle-Src I 通过 PI-SceI/I-CeuI 双酶切后与腺病毒载体连接，构建成重组腺病毒 Adeno-Src I；重组腺病毒 Adeno-Src I 经过 PacI 酶切，如图 18，后转染人胚肾 HEK293 细胞，在 HEK293 细胞中包装成病毒粒子，提取的重组腺病毒可用于体外细胞和体内试验，产品可供临床使用。重组腺病毒的构建详细过程见图 16。经酶切鉴定和测序分析表明克隆的基因为目的基因，如图 17。

权 利 要 求

1、一种海葵细胞毒素基因 Src I，来源于玫瑰红绿海葵毒腺 cDNA 文库，核苷酸序列如序列表所示。

2、如权利要求 1 所述的基因，其特征在于编码 216 个氨基酸的毒素前体蛋白，包括 19 个氨基酸的信号肽、19 个氨基酸的 propart motif 和 178 个氨基酸的成熟蛋白，成熟蛋白的等电点为 4.8，分子量为 19,500 道尔顿，是一种酸性蛋白，成熟蛋白的 N 末端具有海葵溶细胞素的典型特征，即具有双亲的 α 螺旋，氨基酸序列如序列表所示。

3、一种重组原核表达载体，其特征在于含权利要求 1 所述的基因 Src I，是将 Src I 基因克隆到原核表达载体 pBV220 上构建成的非融合表达载体 pBV220-Src I。

4、如权利要求 3 所述的重组原核表达载体，其特征在于 Src I 基因在大肠杆菌中以包涵体的形式表达。

6、一种重组真核表达载体，其特征在于含有如权利要求 1 所述的基因 Src I，是可在哺乳动物细胞表达的 Adeno-Src I。

7、一种用作引物的 DNA 片段，其特征在于由权利要求 1 所述核苷酸序列的一部分序列组成，上游引物含有 EcoR I 酶切序列 (GAATTC) 和起始密码子 (ATG)，下游引物含有 BamH I 酶切序列 (GGATCC) 和终止密码子 (TTA)，序列如下：

上游引物，5' G GAATTC ATGATC TCG GGT GGT ACT GTT ATT 3'

EcoR I 酶切序列 起始密码子

下游引物，5' TA GGATCC TTATGG CCA GAC GAC TTC AAT C 3'

BamH I 酶切序列 终止密码子

8、一种用作引物的 DNA 片段，其特征在于由权利要求 1 所述核苷酸序列的一部分序列组成，上游引物含有 Apa I 酶切序列 (GGGCCC) 和起始密码子 (ATG)，下游引物含有 NotI 酶切序列 (GCGGCCGC) 和终止密码子 (TTA)，序列如下：

上游引物，5' GG GGGCCC ATGATCTCGGGTGGTACTGTTATTG 3'

Apa I 酶切序列 起始密码子

下游引物，5' GTCAT GCGGCCGC C TTATGGCCAGACGACTTCAATC 3'

NotI 酶切序列 终止密码子

9、含有如权利要求 2 所述蛋白在制备预防和治疗肿瘤的药物中的应用。

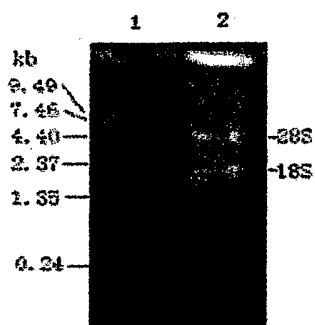


图 1

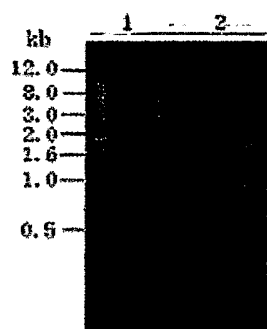


图 2

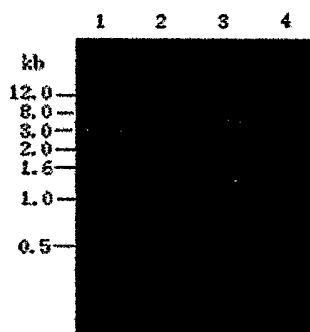


图3

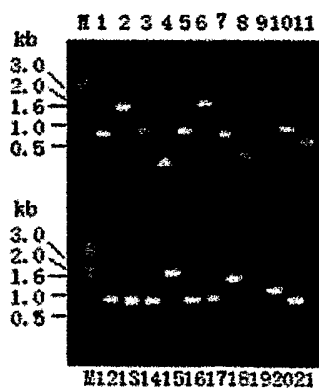


图4

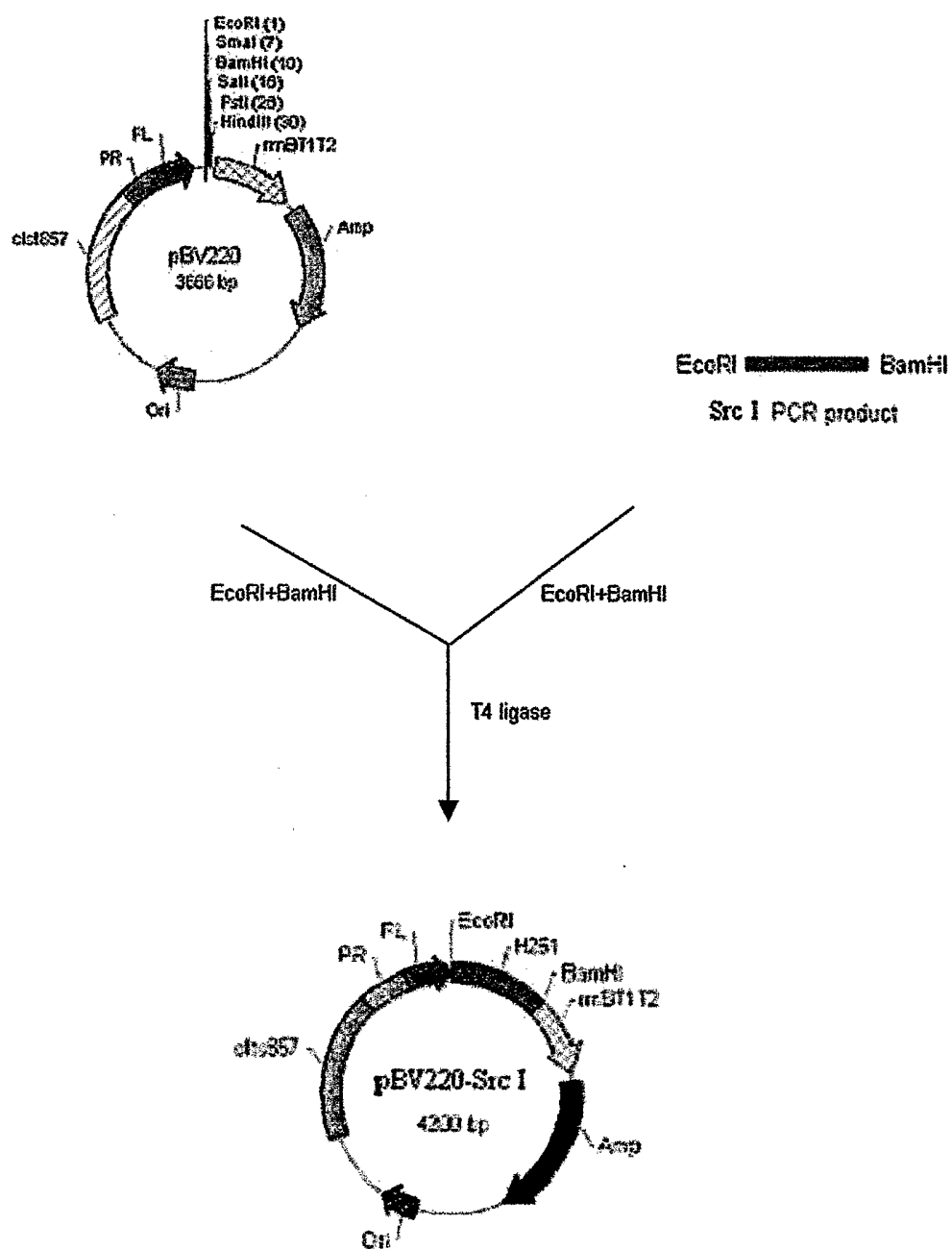


图 5

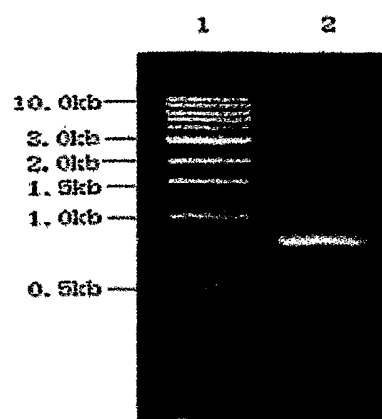


图6

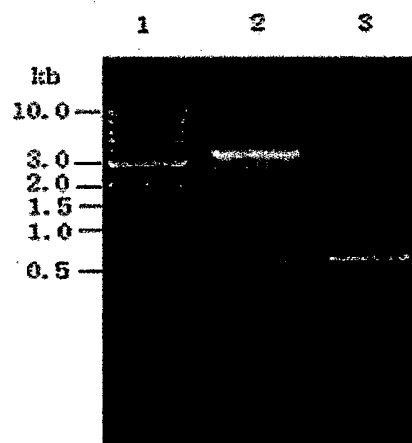


图7

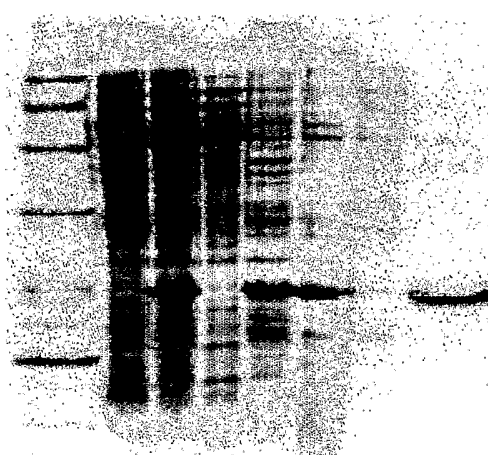


图8

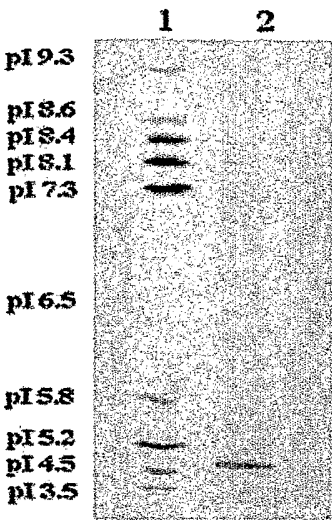


图9

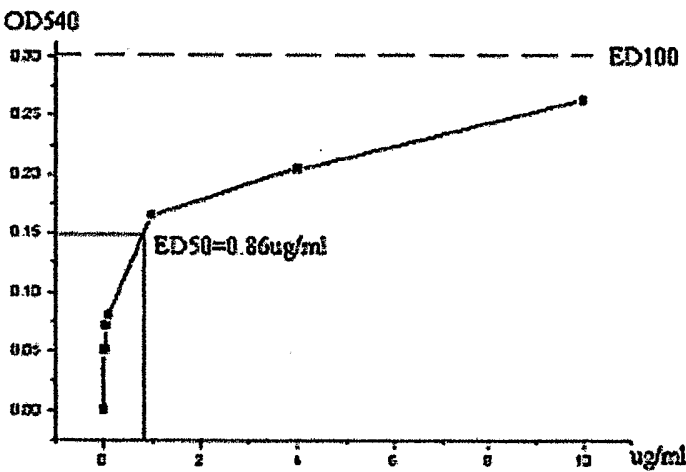
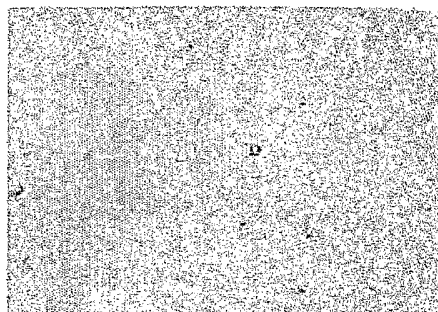


图10



对 照 组



样 品 组

图 11

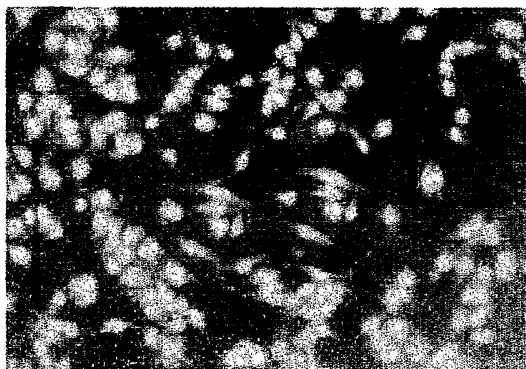
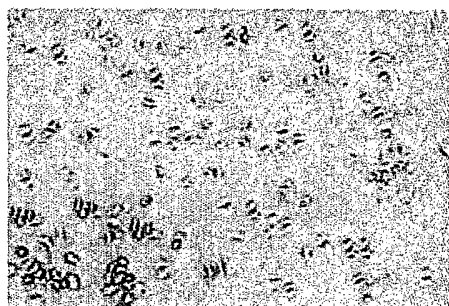
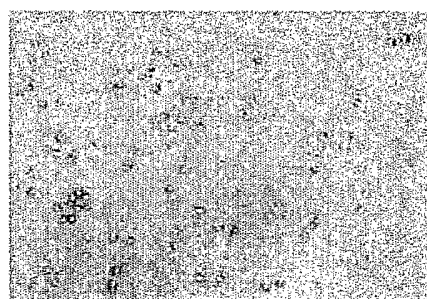


图 12

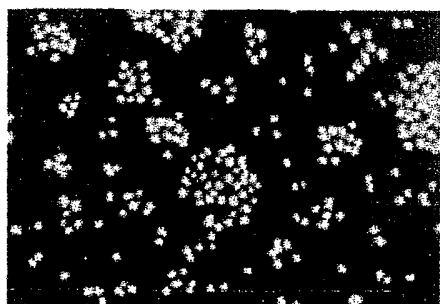


对 照 组

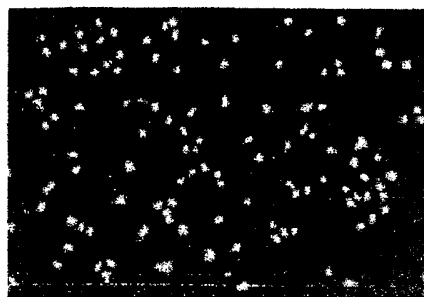


实 验 组

图 13

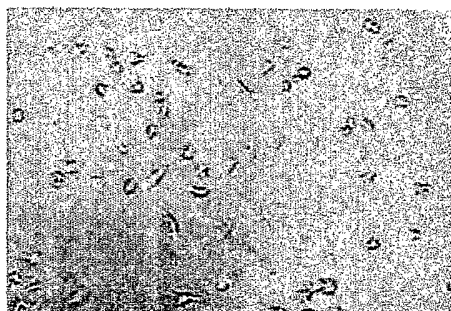


对 照 组

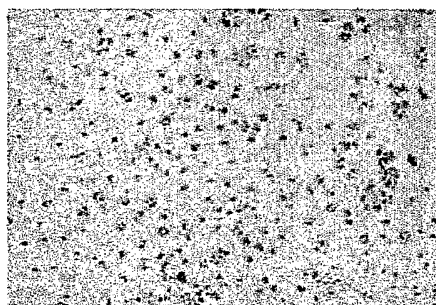


实 验 组

图 14



对 照 组



实 验 组

图 15

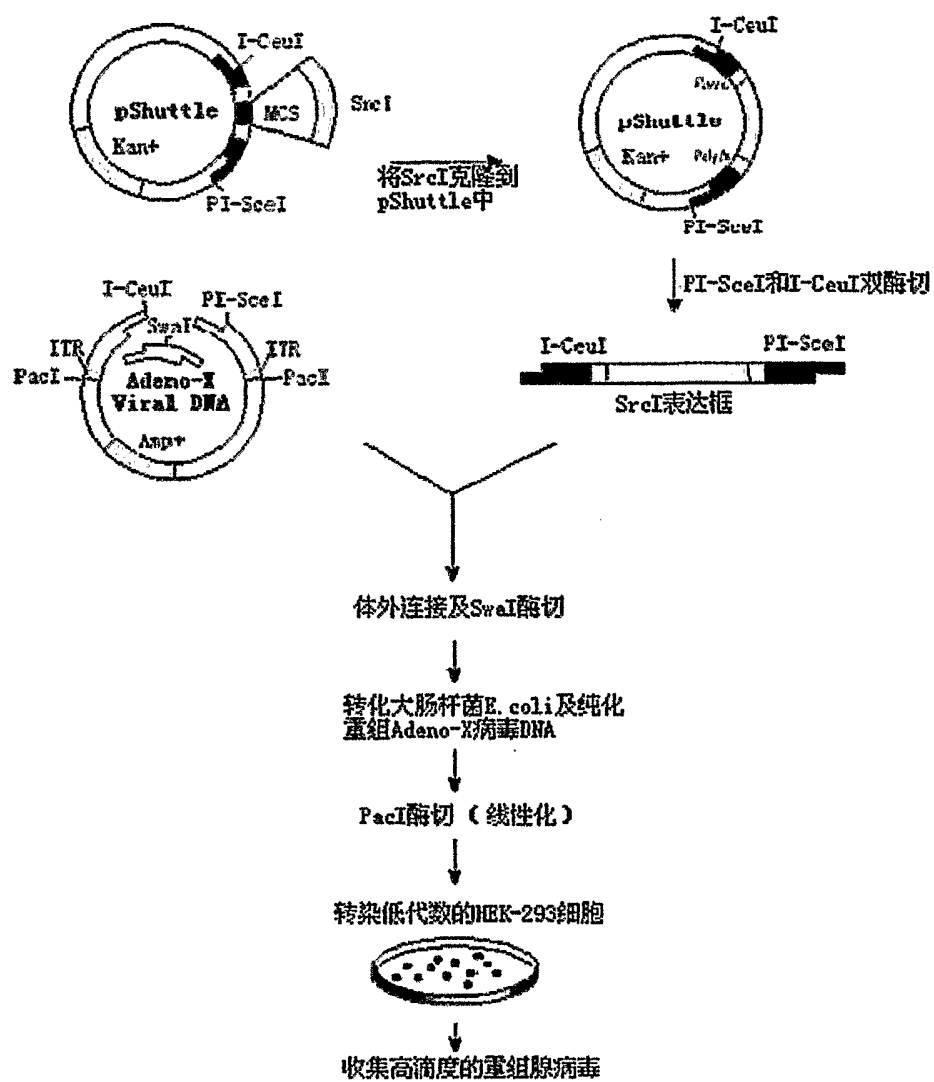


图 16

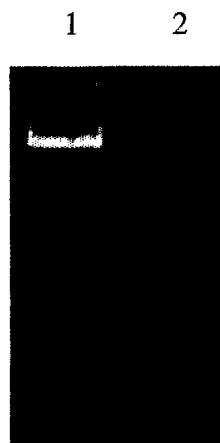


图 17

1 2

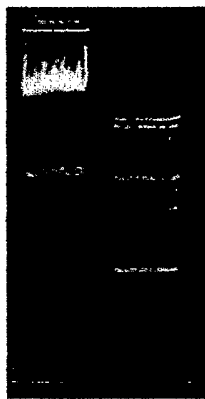


图-18

序 列 表

<110> 中山大学

<120> 一种海葵细胞毒素基因及其表达、应用

<130>

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 749

<212> DNA

<213> 玫瑰红绿海葵 (*Sagartia rosea* sp)

<220>

<221> CDS

<222> (54)..(701)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (54)..(110)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (168)..(701)

<220>

<221> precursor_RNA

<222> (110)..(167)

<400> 1

```
agttcaagtc aaaagatacc cctttcattg ctggaaagat tgaacgtcaa atc atg      56
                                                    Met
```

```
agt cgc ctg atc gtc gtt tgc att gtc att tcg atg ata tgc gga gcc      104
Ser Arg Leu Ile Val Val Cys Ile Val Ile Ser Met Ile Cys Gly Ala
      -35              -30              -25
```

ctt tcc ttg tcg tca acc aag atg gct gat gaa aaa aaa gaa aaa gat 152
 Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Met Ala Asp Glu Lys Lys Glu Lys Asp
 -20 -15 -10

gaa gac gag aaa ccc aaa atc tcg ggt ggt act gtt att gca gct ggg 200
 Glu Asp Glu Lys Pro Lys Ile Ser Gly Gly Thr Val Ile Ala Ala Gly
 -5 -1 1 5 10

aga ttg acc ctg gat ctc ttg aaa acg ttg ctc ggt aca ctt ggt agt 248
 Arg Leu Thr Leu Asp Leu Leu Lys Thr Leu Leu Gly Thr Leu Gly Ser
 15 20 25

atc tct aga aag att gca att ggt gtt gac aac gag acg ggt ggg cta 296
 Ile Ser Arg Lys Ile Ala Ile Gly Val Asp Asn Glu Thr Gly Gly Leu
 30 35 40

att aca gga aat aac gta tat ttc cgt tcc ggg acc tct gat gac atc 344
 Ile Thr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Arg Ser Gly Thr Ser Asp Asp Ile
 45 50 55

ctc cct cat cgt gtg gaa act ggt gaa gcg ctt ctc tat aca gct cgc 392
 Leu Pro His Arg Val Glu Thr Gly Glu Ala Leu Leu Tyr Thr Ala Arg
 60 65 70 75

aaa act aaa ggc cca gtc gca aca ggt gcc gtt gga gta ttt act tat 440
 Lys Thr Lys Gly Pro Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Val Phe Thr Tyr
 80 85 90

tac ttg agc gat gga aac aca ctg gca gtg tta ttc agc gtc ccc ttt 488
 Tyr Leu Ser Asp Gly Asn Thr Leu Ala Val Leu Phe Ser Val Pro Phe
 95 100 105

gat tat aac ttc tac agc aac tgg tgg aat gtc aag atc tat tca gga 536
 Asp Tyr Asn Phe Tyr Ser Asn Trp Trp Asn Val Lys Ile Tyr Ser Gly
 110 115 120

aaa cgg aat gcg gac tat gat atg tac cat gag ctg tac tat gat gcg 584
 Lys Arg Asn Ala Asp Tyr Asp Met Tyr His Glu Leu Tyr Tyr Asp Ala
 125 130 135

aat cca ttc gag ggg gac gat acc tgg gag tat aga tac ctt gga tat 632
 Asn Pro Phe Glu Gly Asp Asp Thr Trp Glu Tyr Arg Tyr Leu Gly Tyr
 140 145 150 155

gga atg agg atg gaa ggt tac atg aac agc ccc gga gaa gcg att ctt 680
 Gly Met Arg Met Glu Gly Tyr Met Asn Ser Pro Gly Glu Ala Ile Leu
 160 165 170

aag atc acg gtg atg ccc gat tgaagtcgtc tggccaaagc aaaaaaaaaa 731
 Lys Ile Thr Val Met Pro Asp
 175

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 749

<210> 2

<211> 216

<212> PRT

<213> 玫瑰红绿海葵 (*Sagartia rosea* sp)

<400> 2

Met Ser Arg Leu Ile Val Val Cys Ile Val Ile Ser Met Ile Cys Gly
 -35 -30 -25

Ala Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Met Ala Asp Glu Lys Lys Glu Lys
 -20 -15 -10

Asp Glu Asp Glu Lys Pro Lys Ile Ser Gly Gly Thr Val Ile Ala Ala
 -5 -1 1 5 10

Gly Arg Leu Thr Leu Asp Leu Leu Lys Thr Leu Leu Gly Thr Leu Gly
 15 20 25

Ser Ile Ser Arg Lys Ile Ala Ile Gly Val Asp Asn Glu Thr Gly Gly
 30 35 40

Leu Ile Thr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Arg Ser Gly Thr Ser Asp Asp
 45 50 55

Ile Leu Pro His Arg Val Glu Thr Gly Glu Ala Leu Leu Tyr Thr Ala
 60 65 70

Arg Lys Thr Lys Gly Pro Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Val Phe Thr
 75 80 85 90

Tyr Tyr Leu Ser Asp Gly Asn Thr Leu Ala Val Leu Phe Ser Val Pro
 95 100 105

Phe Asp Tyr Asn Phe Tyr Ser Asn Trp Trp Asn Val Lys Ile Tyr Ser
110 115 120

Gly Lys Arg Asn Ala Asp Tyr Asp Met Tyr His Glu Leu Tyr Tyr Asp
125 130 135

Ala Asn Pro Phe Glu Gly Asp Asp Thr Trp Glu Tyr Arg Tyr Leu Gly
140 145 150

Tyr Gly Met Arg Met Glu Gly Tyr Met Asn Ser Pro Gly Glu Ala Ile
155 160 165 170

Leu Lys Ile Thr Val Met Pro Asp
175

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/00538

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ : C12N15/12, 15/63, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 9913895 (UNIVERSITY OF FLORIDA [US/US] et al) 25 March 1999, See claims and the sequence listing.	1-9
A	WO, A, 9823639 (UNIVERSITY OF FLORIDA[US/US] et al) 4 June 1998, See claims and the abstract.	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

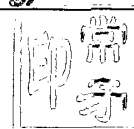
Date of the actual completion of the international search 18 September 2003	Date of mailing of the international search report 16 OCT 2003 (16.10.03)
--	--

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

CHANG, mao

Telephone No. 86-10-62093906



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN03/00538

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO9913895A	1999-03-25	AU8052798A	1999-04-05
WO9823639A	1998-06-04	AU5369798A US6077680A	1998-06-22 2000-06-22

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN03/00538

A. 主题的分类

IPC⁷: C12N15/12, 15/63, A61P35/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	WO, A, 9913895 (佛罗里达大学 等 [美国/美国]) 1999 年 3 月 25 日, 见权利要求和序列表。	1-9
A	WO, A, 9823639 (佛罗里达大学 等 [美国/美国]) 1998 年 6 月 4 日, 见权利要求以及摘要。	1-9

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

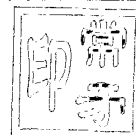
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期
18.9 月 2003 (18.09.03)国际检索报告邮寄日期
16.10月 2003 16.10.03国际检索单位名称和邮寄地址
ISA/CN
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)
传真号: 86-10-62019451受权官员
常 矛
电话号码: 86-10-62093906

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/00538

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO9913895A	1999-03-25	AU8052798A	1999-04-05
WO9823639A	1998-06-04	AU5369798A	1998-06-22
		US6077680A	2000-06-20