



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116854792 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 26

(21) 申请号 202310474533.2

C12N 15/81 (2006.01)

(22) 申请日 2023.04.28

C07K 16/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 116854792 A

(43) 申请公布日 2023.10.10

(73) 专利权人 优睿赛思(武汉)生物科技有限公司

地址 430075 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物创新园C6栋二楼C6221、C6222室

(72) 发明人 余乐 程威

(74) 专利代理机构 北京金智普华知识产权代理有限公司 11401

专利代理师 杨采良

(51) Int.Cl.

C07K 14/39 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 116082456 A, 2023.05.09

CN 116286419 A, 2023.06.23

Stadelmann, T., 等. “peptidyl-Lys metalloendopeptidase [synthetic construct]”. 《genbank》. 2023, ACCESSION WML73815.

Li, D 等. “signal peptide alphad14, partial [synthetic construct]”. 《genbank》. 2023, ACCESSION WOL43254.

Stadelmann, T. 等. “FAP4 [Aspergillus terreus]”. 《genbank》. 2023, ACCESSION WOF00814.

审查员 蒲恒

权利要求书1页 说明书12页

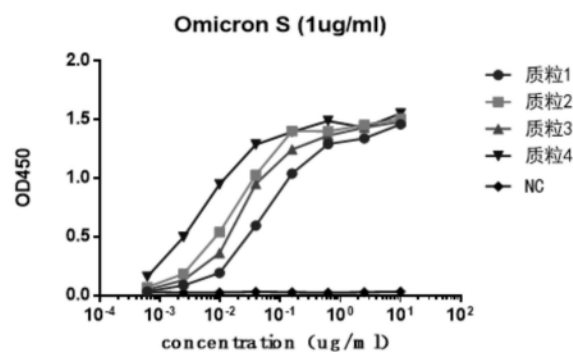
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

突变型 α -factor 信号肽及其编码基因、表达载体和应用

(57) 摘要

本发明属于基因工程技术领域, 尤其涉及一种突变型 α -factor 信号肽及其编码基因、表达载体和应用。所述突变型 α -factor 信号肽选自如SEQ ID NO: 1-3所示氨基酸序列中的至少一种。本发明提供的突变型 α -factor 信号肽通过减少信号肽和外源蛋白在内质网上的聚集, 维持未折叠状态以提高外源蛋白进入内质网的速率, 和/或通过改善外源蛋白从内质网到高尔基体的运输, 进而能够有效引导外源蛋白的分泌, 提高其分泌表达量, 并通过添加间隔肽提高外源成熟蛋白N端残留氨基酸的切割水平, 从而大大提高突变型 α -factor 信号肽引导的外源蛋白的分泌水平, 有利于得到高活性和高表达量的外源蛋白。



1. 一种突变型 α -factor信号肽,其特征在于,所述突变型 α -factor信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。
2. 一种编码基因,其特征在于,所述编码基因包括编码如权利要求1所述的突变型 α -factor信号肽的DNA序列。
3. 根据权利要求2所述的编码基因,其特征在于,编码所述突变型 α -factor信号肽的DNA序列如SEQ ID NO:6所示。
4. 根据权利要求3所述的编码基因,其特征在于,所述编码基因还包括编码外源蛋白的DNA序列,所述外源蛋白包括纳米抗体。
5. 根据权利要求4所述的编码基因,其特征在于,所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,DNA序列如SEQ ID NO:10所示。
6. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体含有如权利要求2-5任一项所述的编码基因。
7. 根据权利要求6所述的表达载体,其特征在于,所述表达载体的出发载体为酵母表达载体,所述酵母表达载体选自pPICZA、pPICZB、pPICZC、pPIC3K或pPIC3.5K中的任意一种。
8. 如权利要求1所述的突变型 α -factor信号肽、如权利要求2-5任一项所述的编码基因或者如权利要求6-7任一项所述的表达载体在制备纳米抗体中的应用,其特征在于,所述突变型 α -factor信号肽用于引导所述纳米抗体在毕赤酵母系统的分泌表达。

突变型 α -factor信号肽及其编码基因、表达载体和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,特别涉及一种突变型 α -factor信号肽及其编码基因、表达载体和应用。

背景技术

[0002] 纳米抗体(Nanobody,Nb)是1989年发现的一种来源于骆驼科动物(包括骆驼、大羊驼、羊驼及其近亲物种)体内天然缺失轻链的重链可变区(VHH)组成的单域抗体,其蛋白质晶体结构长度为4nm,直径为2.5nm,分子量只有15KD,是常规抗体分子质量的1/10,是目前已知分子量最小的活性抗原结合蛋白,因此称之为纳米抗体。相较于常规抗体,纳米抗体在结构上存在较大差异,纳米抗体只含有重链可变区,由四个FR区连接三个CDR环组成,其与抗原之间的相互作用由三个CDR环介导,并由CDR3支配,由于纳米抗体的CDR3长度比常规抗体的CDR3长,在一定的程度上弥补了因轻链缺失而造成的结合力下降,从而使其具有较强的抗原结合能力,表现出更高的亲和力与特异性,而且,由于纳米抗体分子量小,具有免疫原性低、穿透力强等特性;此外,纳米抗体的水溶性更好,表达量通常也较高,易于在原核和真核系统中高表达。纳米抗体独特的结构和优越的特性使其成为生物医药研发(基因工程药物、抗体药物)、临床体外诊断(胶体金法、酶联免疫吸附法、电化学发光法)等众多领域的研究热点。

[0003] 毕赤酵母是一种重要的工业微生物,因其表达量高、细胞培养简单、成本低且具有翻译后修饰而广泛应用于蛋白/抗体表达,特别是重组蛋白的外源分泌表达。由于毕赤酵母自身分泌到胞外的蛋白较少,因此,在毕赤酵母系统中生产的大部分蛋白均以分泌的形式表达达到胞外。利用毕赤酵母表达外源分泌蛋白时,需要信号肽的引导,重组蛋白才能进入内质网进行修饰和成熟,因此信号肽的效率决定了外源蛋白分泌表达的分泌效率。当前,毕赤酵母系统中应用最广泛也最为成功的信号肽是 α -交配因子(α -factor)前导肽序列,但是 α -factor信号肽对于很多蛋白的分泌效果并不十分理想,尤其是针对纳米抗体的表达仍存在分泌水平不高,且存在前导区切割不完全的情况,前导区切割不完全会导致重组蛋白上含有信号肽的氨基酸,其为非目的蛋白,可能会引纳米抗体与抗原的亲合力的降低,尤其是作为药物抗体来说,含有多余的氨基酸是不允许的。因此,开发一条在毕赤酵母中能高效分泌纳米抗体到胞外的信号肽对于纳米抗体的分泌表达至关重要。

发明内容

[0004] 针对现有技术中 α -factor信号肽的分泌水平低和/或前导序列切割不完全的问题,本发明提供了一种突变型 α -factor信号肽,并提供了该突变型 α -factor信号肽的编码基因及用于表达该突变型 α -factor信号肽的表达载体,进一步提供了突变型 α -factor信号肽、其编码基因或者表达载体在制备纳米抗体中的应用。

[0005] 本发明具体通过以下技术方案实现:

[0006] 本发明的第一方面提供了一种突变型 α -factor信号肽,所述突变型 α -factor信号

肽选自如SEQ ID NO:1-3所示氨基酸序列中的至少一种。

[0007] 进一步地,所述突变型 α -factor信号肽选自如SEQ ID NO:2-3所示氨基酸序列中的至少一种。

[0008] 更进一步地,所述突变型 α -factor信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0009] 本发明的第二方面提供了一种编码基因,所述编码基因用于编码如上所述的突变型 α -factor信号肽。

[0010] 进一步地,SEQ ID NO:1-3所示氨基酸序列的编码基因的DNA序列如SEQ ID NO:4-6所示。

[0011] 进一步地,所述编码基因还包括用于编码外源蛋白的DNA序列,所述外源蛋白包括纳米抗体。

[0012] 进一步地,所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,DNA序列如SEQ ID NO:10所示。

[0013] 本发明的第三方面提供了一种表达载体,所述表达载体含有如上所述的编码基因。

[0014] 进一步地,所述表达载体的出发载体为酵母表达载体,所述酵母表达载体选自pPICZA、pPICZB、pPICZC、pPIC3K、pPIC3.5K中的任意一种。

[0015] 本发明第四方面提供了如上所述的突变型 α -factor信号肽、编码基因或者表达载体在制备纳米抗体中的应用,所述突变型 α -factor信号肽用于引导所述纳米抗体的分泌表达。

[0016] 本发明的优点及积极效果为:

[0017] 本发明提供的突变型 α -factor信号肽通过减少信号肽和外源蛋白在内质网上的聚集,维持未折叠状态以提高外源蛋白进入内质网的速率,和/或通过改善外源蛋白从内质网到高尔基体的运输,进而能够有效引导外源蛋白的分泌,提高其分泌表达量,并通过添加间隔肽提高外源成熟蛋白N端残留氨基酸的切割水平,从而大大提高突变型 α -factor信号肽引导的外源蛋白的分泌水平,有利于得到高活性和高表达量的外源蛋白。

附图说明

[0018] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单的介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0019] 图1为本发明实施例SEQ ID NO:1所示的 α -factor信号肽的二级结构;

[0020] 图2为本发明实施例SEQ ID NO:2所示的 α -factor信号肽的二级结构;

[0021] 图3为本发明实施例SEQ ID NO:3所示的 α -factor信号肽的二级结构;

[0022] 图4为本发明实施例质粒1诱导分泌表达的细胞上清的聚丙烯酰胺凝胶电泳图;

[0023] 图5为本发明实施例质粒1诱导分泌表达的纯化纳米抗体的聚丙烯酰胺凝胶电泳图;

[0024] 图6为本发明实施例质粒2诱导分泌表达的细胞上清的聚丙烯酰胺凝胶电泳图;

[0025] 图7为本发明实施例质粒2诱导分泌表达的纯化纳米抗体的聚丙烯酰胺凝胶电泳

图;

[0026] 图8为本发明实施例质粒3诱导分泌表达的细胞上清的聚丙烯酰胺凝胶电泳图;

[0027] 图9为本发明实施例质粒3诱导分泌表达的纯化纳米抗体的聚丙烯酰胺凝胶电泳图;

[0028] 图10为本发明实施例质粒4诱导分泌表达的细胞上清的聚丙烯酰胺凝胶电泳图;

[0029] 图11为本发明实施例质粒4诱导分泌表达的纯化纳米抗体的聚丙烯酰胺凝胶电泳图;

[0030] 图12为本发明实施例质粒1-4诱导分泌表达的纯化纳米抗体与抗原结合活性的ELISA检测结果图。

具体实施方式

[0031] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例对本发明进行进一步详细说明。此处所描述的实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0032] 根据本发明包含的信息,对于本领域技术人员来说可以轻而易举地对本发明的精确描述进行各种改变,而不会偏离所附权利要求的精神和范围。应该理解,本发明的范围不局限于所限定的过程、性质或组分,因为这些实施方案以及其他的描述仅仅是为了示意性说明本发明的特定方面。实际上,本领域或相关领域的技术人员明显能够对本发明实施方式作出的各种改变都涵盖在所附权利要求的范围内。

[0033] 为了更好地理解本发明而不是限制本发明的范围,在本发明中所用的表示用量、百分比的所有数字以及其他数值,在所有情况下都应理解为以词语“大约”所修饰。因此,除非特别说明,否则在说明书和所附权利要求书中所列出的数字参数都是近似值,其可能会根据试图获得的理想性质的不同而加以改变。各个数字参数至少应被看作是根据所报告的有效数字和通过常规的四舍五入方法而获得的。另外,术语“包括”、“包含”、“含有”、“具有”等类似词语的含义是非限制性的,即可加入不影响结果的其它步骤和其它成分。

[0034] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更为明显易懂,下面结合附图对本发明的具体实施例做详细说明。

[0035] α -factor信号肽是酵母 α 细胞分泌的 α 交配因子(mating factor 1, MF1)N端一段前导肽。 α -factor信号肽由87个氨基酸(aa)组成,包含前肽(Pre-sequence)和前导区(Pro-region),1-19aa为前肽序列,20-87aa为前导区序列,其中,前肽又分为N-region(1-6aa)、H-region(7-15aa)和C-region(16-19aa)等3个不同的功能区。前导区是目前研究较多的部分,且因为其长达66个氨基酸,使其具有一定的结构和功能。 α -factor信号肽引导的外源蛋白在毕赤酵母中分泌要经过一系列加工过程。

[0036] 首先, α -factor信号肽引导外源蛋白进入内质网,在细胞质上的核糖体翻译出包含 α -factor信号肽和外源蛋白在内的全长未成熟蛋白。伴侣蛋白Hsp40和Hsp70阻止核糖体翻译完成的多肽的广泛折叠,以维持 α -factor信号肽序列的未折叠状态,使蛋白能够顺利靶向内质网并进入Sec复合物通道。Sec复合物中主要相关的亚基有Sec61/62/63,Sec61作为多肽穿过内质网的通道,Sec63作为撑开该通道的支架,Sec62起到锚定作用。细胞质中翻译完成的多肽被转运到Sec复合物中, α -factor信号肽Pre-sequence会被内质网膜上的信号肽酶复合物(signal peptidase complex, SPC)中的I型信号肽酶(Spase I)切割。蛋白进

入内质网腔后,被内质网腔内热激蛋白家族成员Bip/Kar2p辅助初步折叠。

[0037] 第二步,进入内质网腔的初步折叠Pro-region和未成熟蛋白的早期N-糖基化,在这个位置错误折叠蛋白的累积容易引起未折叠蛋白响应(unfoldprotein response,UPR)的上调,然后错误折叠蛋白会通过ERAD途径被运往溶酶体进行降解。

[0038] 第三步,Pro-region和外源蛋白通过COP II 囊泡转运到高尔基体,在高尔基体中进行进一步的N糖基化修饰和折叠。在此期间,信号肽的Pro-region与外源蛋白连接处的2个碱性氨基酸残基KR被位于高尔基体上Kex2基因编码的类枯草菌素蛋白酶(subtilisin-like protease,一种钙离子依赖性丝氨酸蛋白酶)剪切。该酶所识别的基序为KR/RR-X,这个切割过程需要钙离子作为辅助因子进行。随后N端携带4个氨基酸残基(EAEA)的成熟蛋白随着分泌小泡向胞外前行,4个氨基酸残基就在此过程中被位于液泡的STE13基因所编码的二肽蛋白酶氨基肽酶A(dipeptidylaminopeptidase A)所切割,它所识别的基序是EA。这个切割过程是非常迅速的,因而不能保证百分之百的切割效率。因此,分泌的外源蛋白上可能会残留2个氨基酸残基。

[0039] 最后,成熟的外源蛋白通过胞吐方式分泌到胞外。

[0040] 基于 α -factor信号肽引导的外源蛋白的分泌过程结合 α -factor信号肽的结构和氨基酸性质,本发明对原始 α -factor信号肽进行了改造和优化,并将突变型信号肽与原始信号肽进行表达对比,得到在分泌水平和蛋白质切割水平均提高的改造信号肽,用于纳米抗体的表达。

[0041] 原始 α -factor信号肽的氨基酸序列(见SEQ ID NO:7)为:

[0042] MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDVAVL PFSNSTNGLLFINT
TIASIAAKEEGVSLEKREA;注,阴影所示为本发明选择的突变位点,下划线所示为本发明选择的缺失位点。

[0043] 本发明实施例提供了一种突变型 α -factor信号肽,所述突变型 α -factor信号肽选自如SEQ ID NO:1-3所示氨基酸序列中的至少一种,SEQ ID NO:1-3所示氨基酸序列(为描述方便,以下简称突变1-3)如下:

[0044] SEQ ID NO:1(突变1):

[0045] MRFPSIFLAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNSTNGLLFINT
TIASIAAKEEGVSLEKREA;

[0046] SEQ ID NO:2(突变2):

[0047] MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDVAVL PFSASIAAKEEGVSL
EKREAEAEAEPK;

[0048] SEQ ID NO:3(突变3):

[0049] MRFPSIFLAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSASIAAKEEGVSL
EKREAEAEAEPK。

[0050] 本发明基于 α -factor信号肽引导的外源蛋白的分泌过程结合 α -factor信号肽的结构和氨基酸性质,在原始 α -factor信号肽的基础上,进行了三种突变改造,其中:突变1将第8位苏氨酸T突变为亮氨酸L(T8L)以增强N端疏水性,该区域位于信号肽前肽的H区,H区与细胞膜相互作用并在蛋白质跨细胞质膜中起重要作用,外源蛋白的分泌能力一定程度上随着H区的疏水性增强而增强,同时将前导区的第42位亮氨酸L突变为丝氨酸S(L42S),有利于

使 α -factor信号肽维持未折叠状态,以使蛋白能够顺利靶向内质网并进入Sec复合物通道,提高外源蛋白进入内质网的速率,减少其在内质网上的聚集,突变1的信号肽二级结构如图1所示。突变2将第57位N(含)到70位I(含)删除,并在信号肽C端和外源蛋白之间插入间隔肽(EAEAEPK),结合突变1的信号肽二级结构图看,绿色的 β 折叠部分为缺失的部分,突变2的信号肽二级结构如图2所示,缺失的 β 折叠部分后面部分为 α 螺旋,是信号识别颗粒(SRP)和新生肽链相互识别和结合的关键区域,前导区的部分缺失可以改善外源蛋白从内质网到高尔基体的运输。突变3将第8位苏氨酸突变为亮氨酸(T8L)、第42位亮氨酸突变为丝氨酸(L42S)、删除57N-70I和增加间隔肽(EAEAEPK),突变3的信号肽二级结构如图3所示。本发明通过前述改造,突变型 α -factor信号肽通过减少信号肽和外源蛋白在内质网上的聚集,维持未折叠状态以提高外源蛋白进入内质网的速率,和/或通过改善外源蛋白从内质网到高尔基体的运输,有效引导外源蛋白的分泌,进而提高其分泌表达量,并通过添加间隔肽提高外源成熟蛋白N端残留氨基酸的切割水平,从而大大提高突变型 α -factor信号肽引导的外源蛋白的分泌水平,有利于得到高活性和高表达量的外源蛋白,为开发高效的 α -factor信号肽提供了新的思路。

[0051] 通过实验发现,突变2-3的外源蛋白分泌水平和蛋白质切割水平较高,且突变3最优,因此,在优选地实施方式中,所述突变型 α -factor信号肽选自如SEQ ID NO:2-3所示氨基酸序列中的至少一种,更有选地,所述突变型 α -factor信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0052] 本发明又一实施例提供了一种编码基因,所述编码基因用于编码如上所述的突变型 α -factor信号肽。

[0053] 编码基因包括DNA分子(例如基因组DNA或cDNA)和/或RNA分子(例如mRNA),分子可以是单链或双链的。

[0054] 示例性地,SEQ ID NO:1-3所示氨基酸序列(突变1-3)的编码基因的DNA序列如SEQ ID NO:4-6所示。

[0055] 可选地,所述编码基因还包括用于编码外源蛋白的DNA序列,所述外源蛋白包括纳米抗体。纳米抗体的序列对蛋白分泌的影响较小,因此,所述的纳米抗体可以为任意的纳米抗体。

[0056] 示例性地,所述纳米抗体的氨基酸序列(见SEQ ID NO:9)为:

[0057] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAADRRPIYHGALTDGSEYEWGQGTQVTVSS。

[0058] 所述纳米抗体的DNA序列(见SEQ ID NO:10)为:

[0059] CAAGTACAATTAGTAGAATCAGGTGGTGGACTAGTTCAGGCAGGTGGTTCCTTGAGATTAAGTTGTGCTGCATCCGGCAGAACTTTTTCTTCCTATGCCATGGGATGGTTTAGACAAGCTCCTGGTAAGGAAAGGGAGTTTGTGCGAGCTATAAGTTGGTCTGGTGGATCAACATATTACGCCGACTCTGTTAAGGGTAGGTTACCATCTCCAGAGATAATGCCAAAAACACAGTTTACCTTCAGATGAACAGTTTGAAGCCCGAAGACACTGCTGTGTACTACTGTGCAGCTGATAGGAGACCTATCTACCATGGAGCTCTTACAGATGGATCCGAGTATGAGTATTGGGGTCAGGGTACACAGGTAACAGTGTCTAGT。

[0060] 需要注意的是,所述编码基因的序列依据氨基酸序列通过常规手段如密码子编码规则推导即可得到。本领域技术应当理解,由于遗传密码的简并性,不同于本发明所示例的

编码基因的DNA序列同样可以编码得到本发明的突变型 α -factor信号肽和/或外源蛋白,因此,本发明提供的用于编码如上所述的突变型 α -factor信号肽和/或外源蛋白的DNA序列不作为对本发明保护范围的限定。

[0061] 本发明另一实施例提供了一种表达载体,所述表达载体含有如上所述的编码基因。

[0062] 将本发明的编码基因可操作地连接至少一个表达调控元件,编码基因位于表达调控元件如启动子、增强子的下游,形成表达载体,之后通过将表达载体导入宿主细胞内,在获得转化表达载体的宿主细胞后,在适合条件下培养该细胞,即可在细胞培养液中获得相应的外源蛋白(如纳米抗体),之后通过常规手段分离得到纯化的外源蛋白。表达载体/表达调控元件的选择为本领域的公知技术,在此不再详细介绍。

[0063] 所述表达载体相对于现有技术的优势与如上所述的突变型 α -factor信号肽相对于现有技术所具有的优势相同,在此不再赘述。

[0064] 可选地,所述表达载体包括原核表达载体(如大肠杆菌表达载体、枯草杆菌表达载体)、真核表达载体(如酵母表达载体)或病毒表达载体(如慢病毒、腺病毒)。对应地,宿主细胞包括原核细胞和真核细胞,根据表达载体的类型选择,例如,当为原核表达载体时,宿主细胞选用原核细胞,常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等;当为真核表达载体时,宿主细胞选用真核细胞,常用的真核宿主细胞的例子包括酿酒酵母、啤酒酵母等。

[0065] 在一些具体的实施方式中,所述表达载体的出发载体为酵母表达载体,所述宿主细胞为酵母细胞。具体地,所述酵母表达载体为pPICZA、pPICZB、pPICZC、pPIC3.5、pPIC3.5K中的任意一种。pPICZA、pPICZB、pPICZC质粒仅为多克隆位点不同,其余骨架完全一致,而pPIC3.5和pPIC3.5K与pPICZ系列质粒仅为所带抗性和筛选标记基因不用,启动子等原件均一致,均可以作为本发明的出发质粒。

[0066] 更具体而言,构建所述表达载体所用的出发载体为pPICZA。通过将突变型 α -factor信号肽的编码基因(例如SEQ ID NO:4-6所示)与纳米抗体的编码基因(例如SEQ ID NO:10所示)连接到出发载体pPICZA中,如通过全基因合成或者PCR扩增合成突变型 α -factor信号肽和纳米抗体的编码基因,得到融合基因,将融合基因连接到线性化的出发载体pPICZA的多克隆位点,且融合基因位于启动子下游,构建得到本发明如上所述的表达载体。将表达载体转化进酵母细胞,培养一段之后,收获转染后的真核细胞并收集细胞培养液,进行分离纯化,即可得到分泌表达的外源蛋白。突变型 α -factor信号肽在蛋白分泌过程中会被剪切掉,其不会参与蛋白质的功能。

[0067] 本发明通过上述所述的表达载体实现了SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的纳米抗体的高分泌表达,得到的纳米抗体表达水平高、活性好,但需要说明的是,本发明的突变型 α -factor信号肽和表达载体不局限于该一种抗体或蛋白。

[0068] 本发明还提供了如上所述的突变型 α -factor信号肽、编码基因或者表达载体在制备纳米抗体中的应用,所述突变型 α -factor信号肽用于引导所述纳米抗体的分泌表达。

[0069] 所述突变型 α -factor信号肽、编码基因或者表达载体在制备纳米抗体中的应用优势与如上所述的突变型 α -factor信号肽相对于现有技术的优势相同,在此不再赘述。

[0070] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。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,例如冷泉港实验室出版的《分子克隆实验指南(第四版)》中所述

的条件,或者通常按照制造厂商所建议的条件。

[0071] 实施例

[0072] 本实施例构建的表达载体和所涉及的序列信息如表1-2所示:

[0073] 表1本实施例构建的表达载体汇总

编号	信号肽序列	外源蛋白序列
质粒 1	原始信号肽, 氨基酸序列见 SEQ ID NO: 7, DNA 序列见 SEQ ID NO: 8	氨基酸序列见 SEQ ID NO: 9, DNA 序列见 SEQ ID NO: 10
质粒 2	突变 1, 氨基酸序列见 SEQ ID NO: 1, DNA 序列见 SEQ ID NO: 4	
质粒 3	突变 2, 氨基酸序列见 SEQ ID NO: 2, DNA 序列见 SEQ ID NO: 5	
质粒 4	突变 3, 氨基酸序列见 SEQ ID NO: 3, DNA 序列见 SEQ ID NO: 6	

[0075] 表2本实施例构建的表达载体涉及的序列信息汇总

名称	序列类型	信号肽序列
突变 1	氨基酸	MRFPSIFLAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYS DLEGDFDVA VLPFS NSTNNGLLFINTTIA SIAAKEEGVSLEKREA (见 SEQ ID NO: 1), 将原始 α -factor 信号肽第 8 位苏氨酸突变为亮氨酸(T8L)、将第 42 位亮氨酸突变为丝氨酸(L42S)
	DNA	atgagatttcttcaatttttagctgtttatttcgcagcatcctccgattagctgctccagtc aactacaacagaagatgaaa cggcacaattccgctgaagctgtcatcgggtactcagatttagaaggggatttcgatgttgctgtttgccattttccaacagc acaataacgggtattgtttataataactactattgccagcatgtctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaagagag gct (见 SEQ ID NO: 4)
突变 2	氨基酸	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDVA VLPFS ASIAAKEEGVSLEKREAEAEAPK (见 SEQ ID NO: 2), 将原始 α -factor 信号肽 第 57N-70I 删除, 并在信号肽 C 端和外源蛋白之间插入间隔肽(EAEAPK)
	DNA	atgagatttcttcaatttttactgctgtttatttcgcagcatcctccgattagctgctccagtc aactacaacagaagatgaaa cggcacaattccgctgaagctgtcatcgggtacttagatttagaaggggatttcgatgttgctgtttgccattttccgccagc

[0077]		attgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaagagaggctgaagctgagggctgagccaaaa (见 SEQ ID NO: 5)
	突变 3	氨基酸 MRFPSIFLAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFS ASIAAKEEGVSLEKREAEAEAEPEK (见 SEQ ID NO: 3), 将原始 α -factor 信号肽 第 8 位苏氨酸为亮氨酸 (T8L)、第 42 位亮氨酸为丝氨酸 (L42S)、将第 57N-70I 删除, 并在信号肽 C 端和外源蛋白之间插入间隔肽 (EAEAEPEK)
		DNA atgagatttcttcaatttttagctgttttattcgcagcatcctccgattagctgctccagtcacactacaacagaagatgaaa cggcacaaattccggctgaagctgtcatcgggtactcagatttagaaggggatttcgatgtgtgtttgccattttccgccagc attgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaagagaggctgaagctgaagctgagccaaaa (见 SEQ ID NO: 6)
	原始 信号 肽	氨基酸 MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDVAVL PFS NSTNNGLLFINTTASIAAKEEGVSLEKREA (见 SEQ ID NO: 7), 阴影所示为 本发明上述选择的突变位点, 下划线所示为本发明上述所述的缺失位点。
		DNA atgagatttcttcaatttttactgctgttttattcgcagcatcctccgattagctgctccagtcacactacaacagaagatgaaa cggcacaaattccggctgaagctgtcatcgggtacttagatttagaaggggatttcgatgtgtgtttgccattttccaacagca caaataacgggtattgtttataataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaagagagg ct (见 SEQ ID NO: 8)
	纳米 抗体	氨基酸 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISW SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAADRRPIYHG ALTDGSEYEWGQGTQVTVSS (见 SEQ ID NO: 9)
		DNA CAAGTACAATTAGTAGAATCAGGTGGTGGACTAGTTCAGGCAGGTGGTTCTT TGAGATTAAAGTTGTGCTGCATCCGGCAGAACTTTTCTTCCTATGCCATGGGA TGGTTTAGACAAGCTCCTGGTAAGGAAAGGGAGTTTGTGGCAGCTATAAGTT GGTCTGGTGGATCAACATATTACGCCGACTCTGTTAAGGGTAGGTTACCAT CTCCAGAGATAATGCCAAAAACACAGTTTACCTTCAGATGAACAGTTTGAAG CCCGAAGACACTGCTGTGTACTACTGTGCAGCTGATAGGAGACCTATCTACC ATGGAGCTCTTACAGATGGATCCGAGTATGAGTATTGGGGTCAGGGTACACA GGTAACAGTGTCTAGT (见 SEQ ID NO: 10)

[0078] 一、表达载体构建及外源蛋白分泌表达

[0079] 1.1、质粒1构建及纳米抗体分泌表达

[0080] 克隆构建:以全基因合成的方式将原始 α -factor信号肽编码基因和纳米抗体编码基因克隆到酵母表达载体pPICZA,并进行质粒抽提,得到质粒1,采用SacI (购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号RK21126)进行线性化,并将线性化产物进行乙醇沉淀得到浓度大于1 μ g/ μ L的线性化质粒。

[0081] 电转:通过电转化的方式将总质量为2 μ g的线性化质粒与100 μ L酵母GS115感受态细胞混合,转移到已预冷的0.2cm电转杯中,冰上孵育5min,擦干电转杯,放入电转仪电转(1500V、5msec),之后加入100 μ L YPDS液体培养基混匀并全部转移至1.5mL无菌EP管中,30 $^{\circ}$ C复苏2h,然后吸取50 μ L菌液均匀涂布在含有100 μ g/mL博来霉素(zeocin)的YPD固体培养基平板上,平板倒置30 $^{\circ}$ C培养箱,培养2-3天。

[0082] 小试培养:提前准备已灭菌的24孔深孔板,每孔分别接入4mL BMGY培养基,挑取单一菌落分别接入孔内,做好标记,在220rpm、30 $^{\circ}$ C摇床中,培养36h,离心去上清,再加入2mL BMMY培养基,悬浮菌体,并每隔24h加入1%的甲醇进行诱导表达,共诱导3次,72h后离心收集上清进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-sds-page),结果见图4,其中,泳道BSA表示牛血清白蛋白,以其作为对照,泳道MK表示maker,泳道1-12表示挑取的12个单克隆。

[0083] 扩大培养:选择泳道1的阳性单克隆接种到含10mL YPD液体培养基的50mL三角瓶

中,220rpm、30℃过夜培养,18h后取1mL菌液接入200mL BMGY培养基中,220rpm、30℃培养48h,离心换液到100mL BMMY培养基,悬浮菌体,并每隔24h加入1%的甲醇进行诱导表达,共诱导3次,72h后离心收集上清进行镍离子亲和层析,收集洗脱液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果如图5所示,其中,泳道BSA表示牛血清白蛋白,泳道上清表示细胞培养上清,泳道beads表示磁珠,泳道MK表示maker,泳道125表示125mM咪唑洗脱液(50mM tris、250mM NaCl、125mM Imidazole),泳道250表示250mM咪唑洗脱液(50mM tris、250mM NaCl、250mM Imidazole),泳道500表示500mM咪唑洗脱液(50mM tris、250mM NaCl、500mM Imidazole)。下述电泳图中,仅标明咪唑浓度表示洗脱液咪唑浓度不同,但均含有50mM tris、250mM NaCl。

[0084] 从图4-5中可以看出,纳米抗体表达结果均呈现双带,经A280/A260光吸收法检测得到125mM咪唑洗脱液和250mM咪唑洗脱液纳米抗体分泌量7.91mg,纯度接近100%。

[0085] 1.2、质粒2构建及纳米抗体分泌表达

[0086] 以质粒1为模板,使用F1、R1进行扩增,PCR扩增体系(50μL)包括Gloria High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer(购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号RK20705) 25μL、质粒1(模板) 1.5μL、上/下游引物2.5+2.5μL、ddH₂O 17μL、DMSO 1.5μL。PCR扩增反应程序设置:98℃变性(高温破碎菌液) 5min, (98℃变性解链20s、60℃退火引物和模板结合30s、72℃延伸1min) × 30cycLe, 72℃延伸10min, →16∞。

[0087] 将得到的产物进行同源重组转化,挑选单克隆测序正确后,以此为模板使用F2、R2反向扩增全长,PCR扩增体系(50μL)包括PrimeSTAR®Max DNA Polymerase(购自Takara,货号R045B(A×4)) 25μL、模板1μL、上/下游引物1+1μL、ddH₂O 22μL。PCR扩增反应程序设置:98℃变性(高温破碎菌液) 4min, (94℃变性解链40s、58℃退火引物和模板结合30s、72℃延伸1min) × 35cycLe, 72℃延伸10min, →16∞。

[0088] 上述所述的引物序列如表3所示:

[0089] 表3用于构建质粒2的引物序列

[0090]	名称	引物序列
	突变 1-F1	ACTAATTATTCGAAACGATGAGATTCCTTCAATTTTTTAGCTGTTTTATTCGC AG (见 SEQ ID NO: 11)
	突变 1-R1	GATGATGATGATGGTCGACACTAGACACTGTTACCTG (见 SEQ ID NO: 12)
	突变 1-F2	GCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTC (见 SEQ ID NO: 13)
	突变 1-R2	CCCTTCTAAATCTGAGTAACCGATGACAGCTTC (见 SEQ ID NO: 14)

[0091] 注,突变1-F1和突变1-R1用于使第8位苏氨酸T突变为亮氨酸L,突变1-F2和突变1-R2用于使第42位亮氨酸突变为丝氨酸,阴影所示为突变位点。

[0092] PCR反应完成后,采用琼脂糖凝胶电泳进行验证,将目的条带大小正确的PCR产物用DpnI酶(购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号RK21109)进行消化,以50μL体系为例如下:10×Buffer CutS 5μL、PCR产物1μg、DpnI酶0.5-1μL、ddH₂O补足至50μL。37℃孵育5-15min后转化到DH5α感受态细胞进行阳性克隆筛选,并采用通用引物5' AOX1: GACTGGTTCCAATTGACAAGC进行测序,将测序正确的质粒2进行如“1.1、质粒1构建及纳米抗体分泌表达”中所述的质粒线性化、电转、小试及扩大培养,结果如图6-7所示,图6中泳道BSA表示牛血清白蛋白,泳道MK表示maker,泳道1-12表示挑取的12个单克隆。

[0093] 从图6-7可以看出,纳米抗体分泌水平提高,双带减弱,但仍有部分双带,经检测得到50-500mM咪唑洗脱液纳米抗体分泌量10.47mg,纯度接近100%,纳米抗体分泌量相较于原始 α -factor信号肽提高了2.56mg,表达量提高了32.36%。

[0094] 1.3、质粒3构建及纳米抗体分泌表达

[0095] 按照“1.2、质粒2构建及纳米抗体分泌表达”的构建方式,以质粒1为模板,采用下述引物扩增,将测序正确的质粒3进行线性化,经过电转、小试及扩大培养,结果如图8-9所示,图8中泳道BSA表示牛血清白蛋白,泳道MK表示maker,泳道1-12表示挑取的12个单克隆。

[0096] 表4用于构建质粒3的引物序列

名称	引物序列
突变 2-F1	GTTTTGCCATTTTCCGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAG (见 SEQ ID NO: 15)
突变 2-R1	AGCAGCAATGCTGGCGGAAAATGGCAAAACAGCAACATCG (见 SEQ ID NO: 16)
突变 2-F2	GAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAGGCTGAGCCAAAAGAATTCACGTGGCCCAG (见 SEQ ID NO: 17)
突变 2-R2	ACGTGAATTCTTTTGGCTCAGCCTCAGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCGAGAG (见 SEQ ID NO: 18)

[0098] 从图8-9可以看出,纳米抗体分泌水平显著提高,且无双带,经检测得到50-500mM咪唑洗脱液纳米抗体分泌量10.2mg,纯度接近100%,纳米抗体分泌量相较于原始 α -factor信号肽提高了2.29mg,表达量提高了28.95%。

[0099] 1.4、质粒4构建及纳米抗体分泌表达

[0100] 按照“1.2、质粒2构建及纳米抗体分泌表达”的构建方式,以质粒1为模板,采用下述引物扩增,并将测序正确的质粒4进行线性化,经过电转、小试及扩大培养,结果如图10-11所示,图10中泳道BSA表示牛血清白蛋白,泳道MK表示maker,泳道1-12表示挑取的12个单克隆。

[0101] 表5用于构建质粒4的引物序列

名称	引物序列
突变 3-F1	ACTAATTATTCGAAACGATGAGATTCCTTCAATTTTTTAGCTGTTTTATTTCGAG (见 SEQ ID NO: 11)
突变 3-R1	TGATGATGATGATGGTCGACACTAGACACTGTTACCTG (见 SEQ ID NO: 19)
突变 3-F2	GCTGTCATCGGTTACTCAGATTAGAAAGGGGATTTC (见 SEQ ID NO: 13)
突变 3-R2	CCCTTCTAAATCTGAGTAACCGATGACAGCTTC (见 SEQ ID NO: 14)

[0103] 从图10-11可以看出,纳米抗体分泌水平显著提高,且无双带,经检测得到50-500mM咪唑洗脱液纳米抗体分泌量18.92mg,纯度接近100%,纳米抗体分泌量相较于原始 α -factor信号肽提高了11.01mg,表达量提高了139.19%。

[0104] 二、外源蛋白理化性质分析

[0105] 2.1、蛋白热稳定性测试

[0106] 采用Protein Thermal ShiftTM染料试剂盒(购自Thermo Fisher,货号4461146)进行热飘移实验,具体操作如下:

[0107] 1、准备一份新鲜的蛋白质热转移染色液稀释8倍;

[0108] 2、将相应的反应板或管放在冰上,然后准备表达的抗体进行融化反应,需确保反应板中的反应布置与实验文件中的孔分配完全一致,将反应组分和抗体按照列出的顺序添加到板上,反应组分见表6,蛋白样品一般为1 μ g;

[0109] 表6蛋白热稳定性测试反应组分即添加顺序

[0110]	反应组分	添加量
	Protein Thermal Shift™ Buffer	5 μ L
	Water+protein+buffer and/or buffer components	12.5 μ L
	Diluted Protein Thermal Shift™ Dye (8 $\times$)	2.5 μ L
	Total volume for each control reaction	20 μ L

[0111] 3、上下移液10次,使每个反应混合均匀;

[0112] 4、用MicroAmp“光学胶膜”密封,以1000转/分旋转1分钟,然后放在冰上;

[0113] 5、使用实时PCR仪软件,打开并建立实验运行文件,

[0114] • Reaction Volume Per Well:20 μ L

[0115] • Thermal profile:

[0116] -Step 1,Temp:25°C,Time:2minutes

[0117] -Step 2,Temp:99°C,Time:2minutes

[0118] • Ramp mode:Continuous

[0119] • Ramp rate:

[0120] -ViiATM 7System:Step 1:1.6°C/s,Step 2:0.05C/s

[0121] -StepOne™ Real-Time PCR System,StepOnePlus™ Real-Time PCR System, 7500 Real-Time PCR System,and 7500Fast Real-Time PCR System:1%

[0122] 质粒1-4的表达的蛋白热稳定性测试结果见表7。

[0123] 表7质粒1-4表达的纳米抗体热稳定性测试结果

[0124]	蛋白	缓冲液	蛋白浓度	Thermal Shift™ Dye	Thermal Shift™ Buffer	T _m (°C)
	质粒 1	PBS	1 μ g	2.5 μ L	5 μ L	52.58°C
	质粒 2	PBS	1 μ g	2.5 μ L	5 μ L	59.97°C
	质粒 3	PBS	1 μ g	2.5 μ L	5 μ L	58.58°C
	质粒 4	PBS	1 μ g	2.5 μ L	5 μ L	66.67°C

[0125] 对上述中质粒1-4分泌表达的纳米抗体进行热稳定性测试,得出其对应的解链温度(T_m)值,抗体的热稳定性可使用“解链温度(T_m)”来表征,T_m值越高,表明抗体的热稳定性越强。从表7可以看出,四个质粒所表达出的纳米抗体T_m值相差不大,质粒4相较于未突变的质粒1,T_m值提高14°C,表示抗体稳定性并没有因改变了信号肽序列而发生改变,反而有所提升。

[0126] 2.2、ELISA检测测试蛋白活性

[0127] a) 以Omicron S蛋白作为抗原,将Active Recombinant SARS-CoV Spike RBD Protein(购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号RP01299)用1 $\times$ PBS溶解,按1 μ g/mL, 100 μ L/well的量4°C过夜包被;

[0128] b) 取出已包被好蛋白的ELISA酶标板,去除孔内液体,向每孔中加入300 μ L TBST

(购自Monad, 货号CR10701S) 至其装满但不溢出, 整板加完静置3min后, 将TBST甩出, 甩3次, 再置于干净的吸水毛巾上排干, 每板拍6次(至无明显液体残留);

[0129] c) 以TBST为缓冲体系, 配制质量体积比为3%的脱脂牛奶(完达山脱脂牛奶, 作为封闭液及一抗稀释液), 向每孔加入200 μ L已配置好的封闭液(3%脱脂牛奶), 盖上铝箔纸, 室温静置1h;

[0130] d) 一抗添加, 将上述表达的纳米抗体以10 μ g/mL开始1:4稀释, 稀释8个梯度, 100 μ L/well, 室温静置1h;

[0131] e) 洗板, 同操作b);

[0132] f) 二抗孵育, 将二抗(MonoRabTMRabbit Anti-Camelid VHH Cocktail[Biotin](购自金斯瑞, 货号Cat:A02015)用TBST按1:1000稀释, 然后用排枪每孔加100 μ L, 室温静置孵育1h;

[0133] g) 洗板后, 按1:10000加入Neutravidin-HRP(购自Thermo, 货号Cat:31001), 100 μ L/well, 室温静置1h;

[0134] h) 显色, 洗板后, 向ELISA酶标板中每孔加入TMB 100 μ L, 加盖, 室温避光静置反应5min;

[0135] i) 终止, 显色5min后, 每孔中加入终止液(700mM草酸溶液) 100 μ L用于终止反应。

[0136] 反应终止后, 拍照记录ELISA酶标板颜色结果, 然后将ELISA酶标板放入酶标仪中, 测定450nm的OD值, 结果见表8, 对应结果绘制曲线图, 如图12所示。

[0137] 表8质粒1-4表达的纳米抗体与Omicron S蛋白结合活性检测结果

纳米抗体浓度 (μ g/mL)	Omicron S (1 μ g/mL)				
	质粒 1	质粒 2	质粒 3	质粒 4	NC
10	1.46	1.507	1.482	1.553	0.034
2.5	1.341	1.456	1.433	1.432	0.029
0.625	1.293	1.401	1.364	1.489	0.025
0.15625	1.041	1.403	1.246	1.396	0.029
0.0390625	0.598	1.03	0.952	1.287	0.032
0.009765625	0.195	0.54	0.363	0.95	0.027
0.002441406	0.087	0.186	0.133	0.499	0.028
0.000610352	0.035	0.072	0.051	0.161	0.03

[0139] 为了验证突变型 α -factor信号肽引导表达的纳米抗体活性有无影响, 进行了间接ELISA检测, 从表8和图7中可以看出, 质粒1-4表达的纳米抗体均具有活性, 其质粒2-4表达的纳米抗体活性相较原始 α -factor信号肽有所提升。

[0140] 以上结果说明本发明针对酵母表达纳米抗体改造信号肽的操作方式, 可以更好地指导纳米抗体表达, 并且有助于提升分泌表达得到的纳米抗体的品质。

[0141] 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。



图1



图2

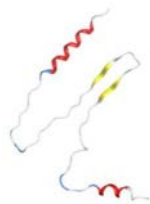


图3

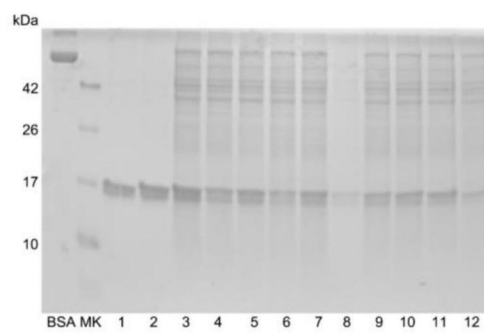


图4

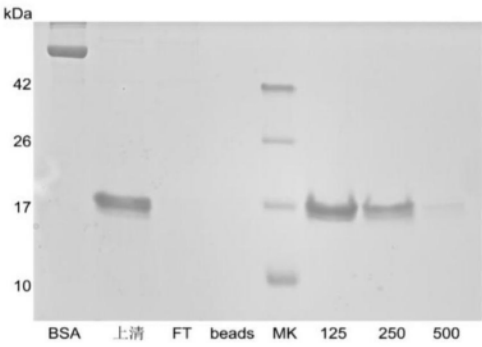


图5

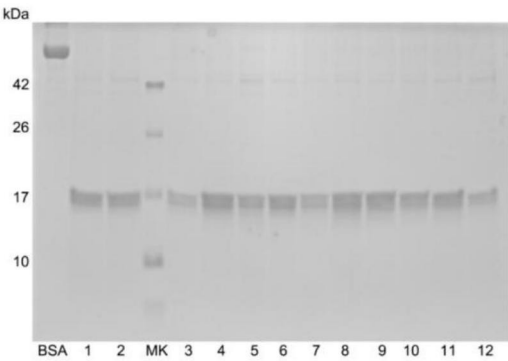


图6

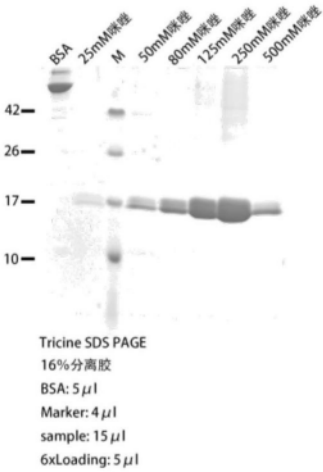


图7

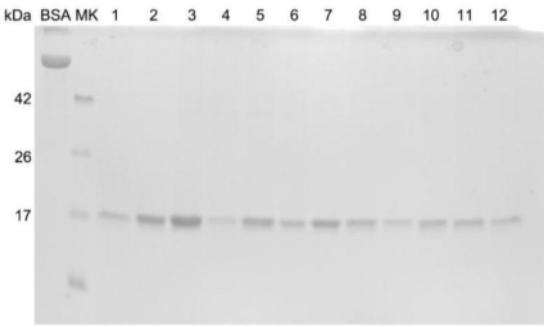


图8

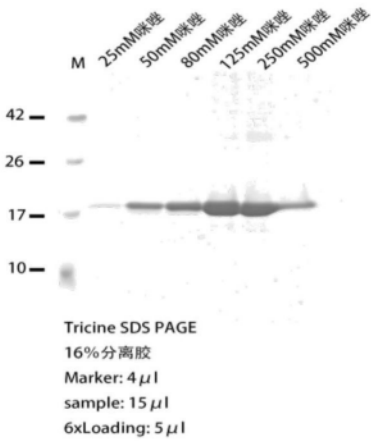


图9

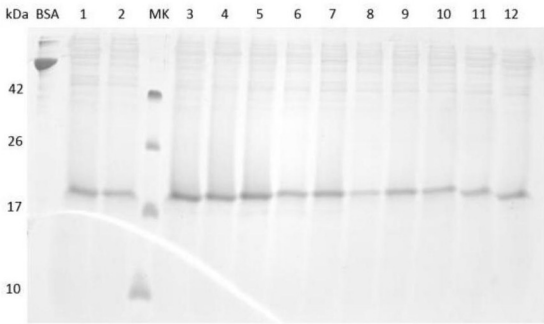


图10

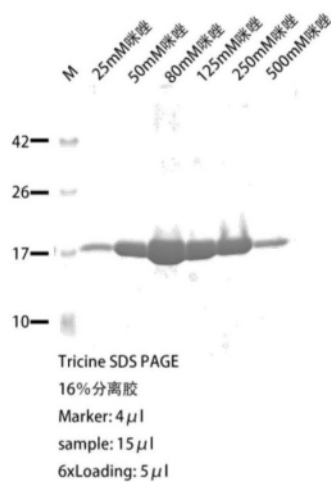


图11

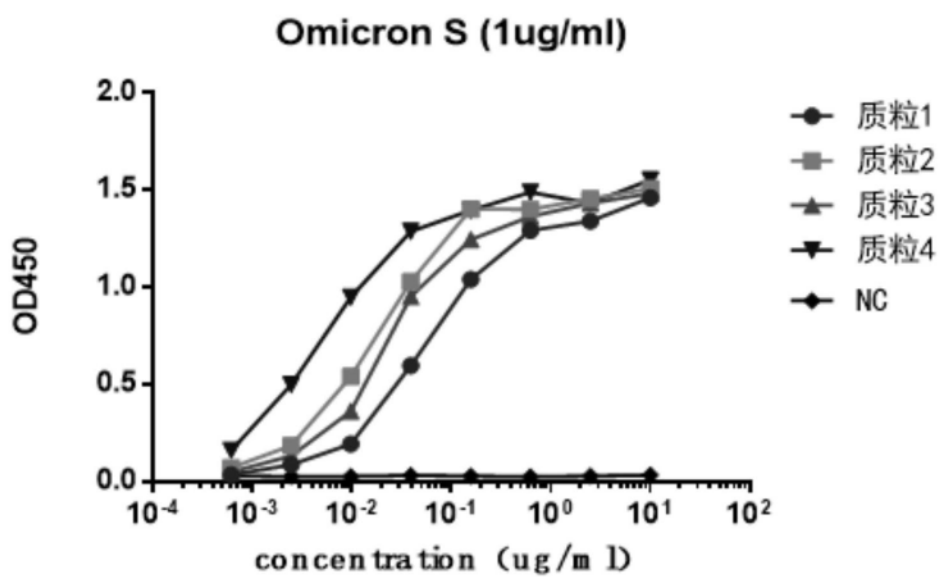


图12