

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02110745.9

[51] Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 1 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1237172C

[51] Int. Cl. (续)

C07K 16/18 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

[22] 申请日 2002.2.1 [21] 申请号 02110745.9

[71] 专利权人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区玉古路 20 号

[72] 发明人 张素方 张传溪 施婉君 程家安
沈立荣

审查员 王亦然

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 张法高

权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

亚非马蜂镇静肽前体基因及其编码的多肽和
制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种亚非马蜂蜂毒镇静肽前体 (Preprosecapin) 基因序列及其编码的多肽和该基因经过翻译后加工产物镇静肽 (Secapin) 的制备方法。该 cDNA 序列编码的蛋白是意大利蜜蜂蜂毒 Preprosecapin 的一个同系物, 它与 SEQ ID No. 5 中从核苷酸 1 ~ 234 位的核苷酸序列有至少 70% 的同源性。所述序列编码一具有 SEQ ID No. 6 所示序列的多肽。此外, 还提出了含亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 基因的载体、宿主细胞, 与亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 基因相关的抗体, 具有蛋白活性亚非马蜂蜂毒 Secapin 的多肽、相关抗体的制备方法。本发明为进一步研究 Secapin 相关的多肽活性分子机理, 开发与 Secapin 相关的生物医药、诊断试剂及生物试剂打下了基础。

1. 一种分离出的亚非马蜂蜂毒镇静肽前体蛋白编码序列，其特征在于，其序列如 SEQ ID No. 5 核苷酸序列所示。

2. 一种分离的亚非马蜂蜂毒镇静肽前体蛋白，其特征在于，它具有 SEQ ID No. 6 氨基酸序列。

3. 一种载体，其特征在于，它含有权利要求 1 所述的 DNA。

4. 一种宿主细胞，其特征在于，它是用权利要求 3 所述载体转化的宿主细胞。

5. 一种如权利要求 2 所述分离的亚非马蜂蜂毒镇静肽前体蛋白的制备方法，其特征在于，该方法包括：

(a) 将权利要求 1 的编码序列可操作地连于表达调控序列，形成亚非一马蜂蜂毒镇静肽前体蛋白的表达载体；

(b) 将步骤(a)中表达的载体转入宿主细胞，形成亚非马蜂蜂毒镇静肽前体蛋白的重组细胞；

(c) 在适合表达亚非马蜂蜂毒镇静肽前体蛋白的条件下，培养步骤(b)中的重组细胞；

(d) 分离出亚非马蜂蜂毒镇静肽前体蛋白。

亚非马蜂镇静肽前体基因及其编码的多肽和制备方法

技术领域

本发明涉及基因工程领域，具体地，本发明涉及一种新的蜂毒基因核苷酸序列。更具体地说，本发明涉及亚非马蜂蜂毒镇静肽前体 (Preprosecapin) 基因的 cDNA 序列，该 cDNA 序列编码的多肽是意大利蜜蜂 Preprosecapin 蛋白的同系物，该多肽经过翻译后加工所得到的多肽 (成熟肽) 是意大利蜜蜂镇静肽 (Secapin) 的同系物。本发明还涉及有该核苷酸序列编码的多肽，这些多核苷酸和多肽的应用，以及所述多核苷酸和所述多肽的制备方法。

背景技术

意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*) 蜂毒镇静肽 (Bee venomous Secapin) 是意大利蜜蜂蜂毒的四个多肽之一，约占蜂毒干重的 1%，由 25 个氨基酸组成 (Eur. J. Biochem. 1978, 83 :405-410; Abstr.15 Eur. Peptide. Symp. 1978, p84)。按来源和生化性质，它属碱性多肽，Secapin 其生物活性与溶血肽相似，具有消炎、抗菌、降压、镇静等作用 (Eur. J. Biochem. 1978, 83 :405-410)。

1984, Vlask 和 Kreil 将意蜂蜂王毒腺 cDNA 插入 pBR322 的 *pst* I 和 *Cla* I 位点，用 ^{32}P 标记的 cDNA 探针筛选出阳性克隆 (PUM9/24, PBMC1)，酶切后再亚克隆到 PUC8，得到了蜂毒 Preprosecapin 基因，对该基因的测序结果进行氨基酸序列推导，获 77 个氨基酸残基，其中最后 25 个氨基酸残基与已知 Secapin 氨基酸序列一致，前 32 个氨基酸残基为信号肽，中间 20 个氨基酸为极性肽前体，Preprosecapin 基因经过翻译后加工，即在蜜蜂的毒囊中经过蜜蜂体内一种水解酶的裂解便得到了活性多肽 Secapin (Eur. J. Biochem. 1984, 145:279~242.)。Secapin 与其他几种蜂毒多肽在医学与生物物理学上有重要的应用价值。

发明内容

本发明目的之一是提供一种亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 基因的多核苷酸，该多核苷酸编码意大利蜜蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白的一个同系物，该前体蛋白经加工后得到的活性多肽为意大利蜜蜂 Secapin 多肽的一个同系物。

本发明目的之二是提供一种新的意大利蜜蜂 Preprosecapin 蛋白的同系物，该多肽为亚非马蜂 Preprosecapin 蛋白。

本发明目的还提供了这种制备亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 核苷酸探针、含亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 核苷酸的重组载体、含重组载体的宿主细胞，以及

多肽抗体的方法。

在本发明，提供了一种分离出的 DNA 分子，它包括：编码具有亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白的核苷酸序列，所述的核苷酸序列与 SEQ ID No. 5 中从核苷酸 1~234 位的核苷酸序列有至少 70% 同源性，或者所述的核苷酸序列能在中度严谨条件下与 SEQ ID No. 5 中从核苷酸 1~234 位的核苷酸杂交，较佳地，该多肽具有 SEQ ID No. 6 所示的序列。更佳地，该序列具有 SEQ ID No. 5 中从核苷酸 1~234 位的核苷酸序列。

在本发明还提供了一种分离的亚非马蜂蜂毒 Secapin 蛋白活性多肽，它包括：具有 SEQ ID No. 6 中 53~77 氨基酸序列的多肽、或其活性片段，或其活性衍生物。较佳地，该多肽是具有 SEQ ID No. 6 中 53~77 氨基酸序列的多肽。本发明还提供了一种载体，它含有上述分离出的 DNA；一种所述载体转化的宿主细胞。

本发明还提供了一种制备具有亚非马蜂蜂毒 Secapin 活性多肽的方法，该方法包括：

(a) 将编码具有亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 基因的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列，形成亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 表达载体，所述的核苷酸序列与 SEQ ID No. 5 核苷酸 1~234 位的核苷酸序列有至少 70% 的同源性；

(b) 将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞，形成亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白的重组细胞；

(c) 在适合表达亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白多肽的条件下，培养步骤(b)中的重组细胞；

(d) 分离出具有亚非马蜂蜂毒 Secapin 蛋白活性的多肽。

本发明发现了一种编码亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白基因，该基因所编码的 Preprosecapin 多肽（亚非马蜂蜂毒镇静肽前体）经过胡蜂体内一种水解酶的裂解便得到了活性多肽 Secapin，此活性多肽是一种生物活性物质，可应用于医学上的关节炎、神经性疾病、吸毒等的辅助治疗，可作为抗原用于蜂毒免疫制剂的制备，可作为生物研究的工具酶。亚非马蜂 Preprosecapin 基因可为研究亚非马蜂蜂毒免疫的分子机理，为开发利用亚非马蜂蜂毒资源提供新的依据。

具体实施方式

在本发明的一个具体实施方案中，本发明的分离的多核苷酸全长为 234 个核苷酸，其详细序列见 SEQ ID No. 5，开放读框位于 1~234 位核苷酸。

在本发明中，“分离的”、“纯化的”或“基本纯的”DNA是指，该DNA或片段已从天然状态下位于其两侧的序列中分离出来；还指该DNA或片段已经与天然状态下伴随核酸的组份分开，而且已经与在细胞中伴随其的蛋白质分开。

在本发明中，术语“亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白(或多肽)编码序列”指编码具有亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白(或多肽)的核苷酸序列，如 SEQ ID No. 5 中 1~234 位核苷酸序列及其简并序列。该简并序列是指位于 SEQ ID No. 5 序列的编码框 1~234 位核苷酸中，有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后而产生的序列。由于密码子的简并性，所以与 SEQ ID No. 5 中 1~234 位核苷酸序列同源性低至约 70%简并序列也能编码出 SEQ ID No. 6 所述的序列。该术语还包括能在中度严紧条件下，更佳地在高度严紧条件下，与 SEQ ID No. 5 中从核苷酸 1~234 位的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。该术语还包括与 SEQ ID No. 5 中从核苷酸 1~234 位的核苷酸序列的同源性至少 70%，较佳地至少 80%，更佳地至少 90%的核苷酸序列。

该术语还包括能编码具有与亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 相同功能的蛋白的、SEQ ID No. 6 序列的变异形式。这些变异形式包括(但不限于)：若干个核苷酸的缺失、插入和或取代，以及在 5' 和/或 3' 端添加数个核苷酸。

在本发明中，“基本纯的”蛋白质或多肽是指其占样品总物质的至少 20%，较佳地至少 50%，更佳地至少 80%，最佳地至少 90%(按干重或湿重计)。纯度可以用任何合适的方法进行测量，如用柱层析、PAGE 或 HPLC 法测量多肽的纯度。基本纯的多肽基本上不含天然状态下的伴随其的组分。

在本发明中，术语“亚非马蜂蜂毒 Secapin 蛋白多肽”指具有亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白活性的 SEQ ID No. 6 序列 53-77 的多肽。该术语还包括具有与亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白相同功能的、SEQ ID No. 6 序列的变异形式。这些变异形式包括(但不限于)：若干个氨基酸的缺失、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。该术语还包括亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括：同源序列、等位变异体、天然突变体，诱导突变体，在高或低的严谨度条件下能与亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用抗亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 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，如包含亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 多肽或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本发明还包括了亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 多肽的可溶性片段。

发明还提供亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白或多肽的类似物，这些类似物与天然亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 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列举的代表性的多肽。

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。

本发明还包括亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 多肽编码序列及其片段的反义序列，这种反义序列可用于抑制细胞内亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 的表达。

本发明还包括一种探针分子，该分子通常具有亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 多肽编码序列的 8~100 个，较佳地 1~50 个连续核苷酸。该探针可用于检测样品中是否存在编码亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 核苷酸分子。

本发明还包括检测亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 核苷酸序列的方法，它包括用上述的探针与样品进行杂交，然后检测探针是否发生了结合，较佳地，该样品是 PCR 扩增后的产物，其中 PCR 扩增引物对应于亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 多肽的编码序列，并可位于该编码序列的两侧或中间，引物长度一般为 15—50 个核苷酸。

在本发明中，可选用本领域已知的各种载体，如市售的载体。

在本发明中，术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌，枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞，昆虫细胞、和哺乳动物细胞，较佳地，该宿主细胞是真核细胞，如 Tn 细胞、CHO 细胞、COS 细胞等。

另一方面，本发明还包括对亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 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。这里，“特异性”是指抗体能结合于亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 基因产物或片段。较佳地，指那些能与亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 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亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白的分子，也包括那些并不影响亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 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亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 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亚非马蜂的抗体部分的抗体。

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，纯化的亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 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，表达亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来制备抗体。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亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 功能的抗体以及不影响亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 基因产物的片段或功能区，通过常规免疫技术而获得。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。与亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 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*) 中制备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)，可以用真核细胞(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。

在本发明的一个实施例中，亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 基因的 cDNA 核苷酸序列是如此获得的，以亚非马蜂毒腺和毒囊总 RNA 反转录的 cDNA 为模板，用一对寡核苷酸为引物 —A : 5' - GCTCGAGATGAAGAACTATTCAAAAAATGCA-3' 为正向引物，寡核苷酸

B: 5' -GAAGCTTTTAAGGCACTATGACTCTACTACA-3' 为反向引物, 进行 PCR。对扩增产物进行测序后得到 SEQ ID No. 5 的全长 cDNA 序列。

亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 为亚非马蜂毒腺表达的蛋白, 本发明的亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 为研究亚非马蜂蜂毒相关的分子机理提供了基础。

下面结合具体实例, 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范围。

实施例 1, 亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 的 cDNA 的克隆和测定

1. 引物扩增

以亚非马蜂毒腺、毒囊总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 用一对寡核苷酸为引物—A: 5' -GCTCGAGATGAAGAACTATTCAAAAAATGCA-3' (SEQ ID No. 1) 为正向引物, 寡核苷酸 B: 5' -GAAGCTTTTAAGGCACTATGACTCTACTACA-3' (SEQ ID No. 2) 为反向引物, 进行 PCR。A/B 的 PCR 条件为 94℃ 1 分钟, 随之以 94℃ 40 秒钟, 54℃ 40 秒钟和 72℃ 60 秒钟进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 分钟, 电泳检测得到约 250 bp 的目的片段。

2. PCR 产物的测序

将上述 PCR 扩增产物 A/B 与 pGEM®-T Easy 载体 (Promega) 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 用碱法提取质粒, 用 BigDye terminator v2.0。测序试剂盒 (Epicentre Technologies) 对抽提的质粒进行测序, 获得 cDNA 序列, 全长共 234 bp, 详细序列见 SEQ ID No. 5, 其中开放读框位于 1~234 位核苷酸。

根据得到的全长 cDNA 序列推导出亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白的氨基酸序列, 共 77 个氨基酸残基 (包括 25 个氨基酸的成熟肽、32 个氨基酸的信号肽和 20 个氨基酸的前体肽), 其氨基酸序列详见 SEQ ID No. 6。

实施例 2, 同源比较

用本发明的亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 的全长 cDNA 序列及其编码蛋白, 在 Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 数据库及 Non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+Spupdate+PIR 数据库中, 用 Blast 程序进行核酸和蛋白同源检索。结果发现, 它与意大利蜜蜂蜂毒 Preprosecapin 有显著的同源性。用 Blast 软件分析可以看出, 它们蛋白的同源性为 93% (见附表 1)。因此, 可以推测本发明的亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白为意大利蜜蜂蜂毒 Preprosecapin 的同系物, 并具有类似的功能。

1984, Vlask 和 Kreil 将意蜂蜂王毒腺 cDNA 插入 pBR322 的 *pst* I 和 *Cla* I

位点, 用 ^{32}P 标记的 cDNA 探针筛选出阳性克隆 (PUM9/24, PBMC1), 酶切后再亚隆到 PUC8, 对测序结果进行氨基酸序列推导, 获得了编码意大利蜜蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白的新基因。该 cDNA 所编码的 Preprosecapin 成熟肽 Secapin、信号肽和前原肽为 77 个氨基酸残基。Secapin 和另外的几种蜂毒肽混合物, 目前在医学上应用于心血管、支气管、肿瘤等辅助治疗的生物活性物质, 也是一类抗菌抗辐射生物活性物质。另外 Secapin 和另外的几种蜂毒肽还是一类提高人免疫功能的生物活性物质。本发明人的亚非马蜂 Preprosecapin 基因为研究亚非马蜂蜂毒过敏、免疫的分子机理, 为开发利用亚非马蜂蜂毒资源提供了新的依据。

实施例 3, 亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 成熟肽 Secapin 在真核细胞(Tn 细胞株, 即粉纹野蛾细胞株)中的表达

在该实施例中, 以实施例 1 中 PCR 扩增产物作为插入片段。

PCR 反应中使用的 5' 寡核苷酸引物序列为:

5' -GCTCGAGATGAAGAACTATTCAAAAAATGCA-3' (SEQ ID No. 1), 该引物含有 *Xho*I 限制性内切酶的酶切位点, 在该酶切位点之后是起始密码子开始的亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 编码序列的 24 个核苷酸;

3' 端引物序列为:

5' -GAAGCTTTTAAGGCACTATGACTCTACTACA-3' (SEQ ID No. 2), 该引物含有 *Hind* III 限制性内切酶的酶切位点, 翻译终止子和亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 的部分编码序列。

引物上限制性内切酶酶切位点对应于 Tn 细胞表达载体 pBacFastHTb 上的限制性内切酶酶切位点, 该质粒载体编码抗生素抗性(Amp^r 和 Gm^r), 一个噬菌体复制起点(ori)、一个病毒复制起点(SV40)、一个 T7 启动子、一个病毒启动子 (P-CMV), 一个 SV40 启动子、一个 SV40 加尾信号和相应的 polyA 顺序、一个 BGH 加尾信号和相应的 polyA 顺序。

用 *Xho*I 和 *Hind* III 消化 pBacFastHTa 载体及插入片段, 随后用连结混合物转化 *E. coli* TG I 菌株, 在含有 Amp^r 和 Gm^r 的 LB 培养皿上筛选转化子, 补加 Amp^r 和 Gm^r 的 LB 液体培养基中培养 (O/N) 含所需构建物的克隆, 抽提质粒, 测序验证亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 的 cDNA 片段已正确插入了载体。随后用重组质粒转化 *E. coli* DH10Bac 菌株, 在含有 Amp^r、Gm^r、四环素的 LB 培养皿上筛选转化子, 在补加 Amp^r、Gm^r、四环素的 LB 液体培养基中培养 (O/N) 含所需构建物的克隆, 抽提质粒, 经 Sepharose 2B 柱纯化, 回收质粒-70℃保存。

2B 柱纯化，回收质粒-70℃保存。

质粒转染 Tn 细胞是采用脂转染法，用 Lipofectin(GiBco Life)进行的。转染 48 小时后，收集细胞及细胞上清，含重组病毒粒子的细胞上清用于下一轮感染。经 2-3 周的 TC-100 连续传代培养，收集细胞，用超声裂解法破碎细胞，以含 NaCl 0.5mM、imidazole 5mM、PMSF 1mM 的 20mM Tris-Cl(PH8.0)溶液为平衡液及洗脱液，蛋白液用经预平衡的 Ni^{2+} Sepharose 6B 柱过柱；再用含 imidazole 50mM、NaCl 0.5mM、PMSF 1mM 的 20mM Tris-Cl(PH8.0)的溶液，洗去杂蛋白，专一性的吸附的 6×His 的融合蛋白，再用含 imidazole 500mM、NaCl 0.5mM、PMSF 1mM 的 20mM Tris-Cl(PH8.0) 的溶液进行洗脱。然后以 PBS(PH7.4)为透析液对表达蛋白溶液进行透析。最后冻干保存。

用 10% 的 SDS-PAGE 胶进行电泳，鉴定表达蛋白的分子量大小约为 2.8 KDa。

此外，用常规方法对表达蛋白的氨基酸进行测序，发现与 SEQ ID No. 6 序列的 53~77（成熟肽）一致。

实施例 4，亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白的成熟肽 Secapin 在大肠杆菌中的表达

在该实施例中，以 SEQ ID No. 5 中的核苷酸 1~234 位的核苷酸杂交 PCR 反应中使用的 5' 寡核苷酸引物序列为：

5' -GGATCCTTACATTATTGATGTTTCCT -3' (SEQ ID No. 5)，该引物含有 *BamH* I 限制性内切酶的酶切位点，亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 编码的成熟肽序列的 18 个核苷酸；

3' 端引物序列为：

5' -CGGGAATTAAGGCACTATGACTCT-3' (SEQ ID No. 6) 该引物含有 *EcoR* I 限制性内切酶的酶切位点，翻译终止子和亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 的部分编码序列。

引物上的限制性内切酶的酶切位点对应于细菌表达载体 pGEX-4T-3 上的限制性内切酶的酶切位点，该质粒载体编码抗生素抗性(Amp^r)、一个细菌复制起点(Ori)、一个 IPTG 可调启动子/操纵子(P / O)，一个凝血酶识别位点，一个谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 融合蛋白标记物以及限制性内切酶克隆位点。

用 *BamH* I 和 *EcoR* I 消化 pGEX-4T-3 载体及插入片段，随后将插入片段连接到 pGEX-4T-3 载体并保持开放读框在凝血酶识别位点起始。随后用连接混合物转化商品名为 JM105 的 *E. coli* 菌株，JM105 含有多拷贝的重组质粒，其表达

lacI^q阻遏物并携带抗性(Amp^r), 在含有 Amp^r 的 LB 培养皿上筛选转化子, 抽提质粒, 测序验证亚非马蜂蜂毒 Secapin 的 cDNA 片段, 该序列为 SEQ ID No. 5 序列的 160~234, 与已正确插入了载体。

在补加 Amp^r (100 μ g/ml)的 LB 液体培养基中过夜培养(O / N)含所需构建物的阳性转化子克隆。过夜(O / N)培养物以 1: 10 的稀释率稀释, 然后接种到大体积 LB 液体培养基中, 培养细胞生长至 600 光密度(OD₆₀₀)为 0.6-1.0 时, 加 IPTG(“异丙基硫代- β -D 半乳糖苷”)至终浓度为 1.0 mM。通过使 lacI 阻遏物失活, IPTG 诱导启动 P/O 导致基因表达水平提高。继续培养细胞 3-5 小时, 离心收集细胞沉淀, 重悬于 1/20 体积比的 PBS 中, 通过超声波裂解细胞, 加入 TritonX-100 到终浓度 1% 30min 溶解蛋白。低温离心粗提物 (10000g) 5 min, 上清物用谷光甘肽 S 转移酶 (GST) 纯化单元从溶液中纯化溶解的谷光甘肽-亚非马蜂蜂毒 Secapin 融合蛋白, 并将亚非马蜂蜂毒 Secapin 从融和蛋白上切割下来。亚非马蜂蜂毒 Secapin 蛋白用 15% 的 SDS-PAGE 胶进行电泳, 鉴定表达该蛋白的分子量大小为约 2.8KDa。

此外, 用常规方法对表达蛋白的氨基酸进行测序, 发现与 SEQ ID No. 6 序列的 53~77 (成熟肽) 一致。

实施例 5, 制备抗体

将实施例 3 和 4 中获得的重组蛋白用来免疫动物以产生抗体, 具体方法如下。重组分子用亲和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 200-300 μ g/头乳化过的蛋白, 对 12 周龄的家兔皮下注射。21 天后, 用非完全 Freund's 佐剂乳化的同样抗原, 以 100-200 μ g/头的剂量进行皮下多点及腿部肌肉注射以加强免疫。21 天后再进行一次臀部肌肉注射加强免疫。抗血清的特异性反应活性用它在体内沉淀亚非马蜂蜂毒 Preprosecapin 基因翻译经加工后产物的能力来评估。

SEQ ID No. 1~6 的说明,

SEQ ID NO. 1 的信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 31 碱基

(B) 类型: 核酸

(C) 链性: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii)分子型：寡核苷酸

(xi)序列描述：SEQ ID NO. 1

GCTCGAGATGAAGAPHTATTCAAAAAATGCA

SEQ ID NO. 2 的信息

(i)序列特征

(A) 长度：31 碱基

(B) 类型：核酸、(C) 链性：单链

(D)拓扑：线性

(ii)分子型：寡核苷酸

(xi)序列描述：SEQ ID NO. 2

GAAGCTTTTAAGGCPHTATGPHTCTPHTPHA

SEQ ID NO. 3 的信息

(i)序列特征

CA)长度：31 碱基

CB)类型：核酸

(C)链性：单链

(D)拓扑：线性

(ii)分子型：寡核苷酸

(xi)序列描述：SEQ ID NO. 3

5' -GGATCCTTPHATTATTGATGTTTCCT -3'

SEQ ID NO. 4 的信息

(i)序列特征

CA)长度：31 碱基

CB)类型：核酸

(C)链性：单链

(D)拓扑：线性

(ii)分子型：寡核苷酸

(xi)序列描述：SEQ ID NO. 4

5' -CGGGAATTAAGGCPHTATGPHTCT-3'

SEQ ID NO. 5 的信息：

(i)序列特征

(A) 长度：234 bp

(B) 类型：核酸

(C) 链性：单链

(D) 拓扑：线性

(ii)分子型：cDNA

(xii)(xi)序列描述：SEQ ID NO. 5

```
1  ATGAAGAACT ATTCAAAAAA TGCAACACAG TTAATTACTG TTCTTCTATT CAGCTTTGTT
61  GTTATACTTT TAATTATTCC ATCAAAATGT GAAGCCGTTA GCAATAATAT GCAACCATTG
121 GAAGCACGAT CTGCTGATTT AGTCCAGGAA CCAAGATACA TTATTAATGT TCCTCCTAGA
181 TGTCTCCAG GTTCTAAATT CATTAAGAAC AGATGTAGAG TCATAGTGCC TTAA
```

SEQ ID NO. 6 的信息：

(i) 序列特征

(A) 长度：77 个氨基酸

(B) 类型：氨基酸

(C) 拓扑结构：线性

(ii) 分子型：多肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO. 6

```
1   Met Lys Asn Tyr Ser Lys Asn Ala Thr His Leu Ile Thr Val Leu Leu Phe Ser Phe Val
21  Val Ile Leu Leu Ile Ile Pro Ser Lys Cys Glu Ala Val Ser Asn Asn Met Gln Pro Leu
41  Glu Ala Arg Ser Ala Asp Leu Val Gln Gln Pro Arg Tyr Ile Ile Asn Val Pro Pro Arg
61  Cys Pro Pro Gly Ser Lys Phe Ile Lys Asn Arg Cys Arg Val Ile Val Pro
```

表 I 亚非马蜂蜂毒 Preproecapin 与意大利蜜蜂蜂毒 Preprosecapin 蛋白的比较
进行同源比较的两个序列是：

Preproecapin

残基总数：77

Preprosecapin 残基总数：77

表示一致残基的符号为 “*”

意大利蜜蜂 1:MKNYSKNATHLITVLLFSFVILLIIPSKCEAVSNDRQSLEARSA DLVPEPRYIIDVPPR 60

亚非马蜂 1:MKNYSKNATHLITVLLFSFVILLIIPSKCEAVSNMQPLEARSADLVQEPRYIINVPPR 60

***** * *****

意大利蜜蜂 61:CPPGSKFIKNRCRVIVP

77

亚非马蜂 61:CPPGSKFIKNRCRVIVP

77

同源性：93%