

(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
2015 年 10 月 22 日 (22.10.2015)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2015/158031 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 38/16 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01) A61P 17/16 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) A61P 39/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/078900

(22) 国际申请日: 2014 年 5 月 30 日 (30.05.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201410153614.3 2014 年 4 月 16 日 (16.04.2014) CN

(71) 申请人: 苏州大学张家港工业技术研究院
(ZHANGJIAGANG INSTITUTE OF INDUSTRIAL
TECHNOLOGIES, SOOCHOW UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国江苏省苏州市张家港市市长泾路 10 号,
Jiangsu 215600 (CN)。

(72) 发明人: 杨占山 (YANG, Zhanshan); 中国江苏省苏
州市张家港市市长泾路 10 号, Jiangsu 215600 (CN)。
吴伟 (WU, Wei); 中国江苏省苏州市张家港市市长泾
路 10 号, Jiangsu 215600 (CN)。 乔惠萍 (QIAO,
Huiping); 中国江苏省苏州市张家港市市长泾路 10 号,
Jiangsu 215600 (CN)。 文玲 (WEN, Ling); 中国江苏
省苏州市张家港市市长泾路 10 号, Jiangsu 215600
(CN)。 施怡 (SHI, Yi); 中国江苏省苏州市张家港
市长泾路 10 号, Jiangsu 215600 (CN)。 任丽丽
(REN, Lili); 中国江苏省苏州市张家港市市长泾路 10
号, Jiangsu 215600 (CN)。 于冬 (YU, Dong); 中国江

苏省苏州市张家港市市长泾路 10 号, Jiangsu 215600
(CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司
(UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝
阳区建国门外大街 22 号赛特广场 7 层, Beijing
100004 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保
护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保
护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,
RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: DNA MOLECULE USED FOR PICHIA PASTORIS RECOMBINANT PLASMID AND PICHIA PASTORIS RECOMBINANT BACTERIUM EXPRESSING PPRI PROTEIN OF DEINOCOCCUS RADIODURANS

(54) 发明名称: 用于毕赤酵母重组质粒和表达耐辐射球菌 PPRI 蛋白的毕赤酵母重组菌的 DNA 分子

(57) Abstract: A DNA molecule comprising a sequence represented by SEQ ID NO:1, a pichia pastoris recombinant plasmid into which the DNA molecule is inserted, and a pichia pastoris recombinant bacterium for converting the pichia pastoris recombinant plasmid into a pichia pastoris competent cell and efficiently expressing the PprI protein of deinococcus radiodurans.

(57) 摘要: 包含 SEQ ID NO: 1 所示序列的 DNA 分子, 及插入所述 DNA 分子的毕赤酵母重组质粒和转化所述毕赤酵母重组质粒到毕赤酵母感受态细胞并高效表达耐辐射球菌 PprI 蛋白的毕赤酵母重组菌。



WO 2015/158031 A1

- 1 -

用于毕赤酵母重组质粒和表达耐辐射球菌PprI蛋白的毕赤酵母重组菌的DNA分子

本申请要求于 2014 年 4 月 16 日提交中国专利局、申请号为 201410153614.3、发明名称为“一种 DNA 分子及毕赤酵母重组质粒和高
5 效表达耐辐射球菌 PprI 蛋白的毕赤酵母重组菌”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

10 本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种DNA分子及毕赤酵母重组质粒和高效表达耐辐射球菌PprI蛋白的毕赤酵母重组菌。

背景技术

在核事故、核恐怖以及核战争等核突发事件中，电离辐射可引起人体严重的急性放射损伤 (acute radiation injury, ARI)。辐射损伤的救治与防护
15 关系到原子能的和平利用与国家核安全，因此，该领域研究已成为世界各国政府和学者高度关注与重点投入的研究领域。

耐辐射球菌 (Deinococcus radiodurans, DR) 是迄今在地球上发现的辐射抗性最强的原核细菌,该菌极强的抗辐射能力与其本身具有完善而高效的DNA 修复系统有关,多种DNA修复基因及其蛋白质对其特异的辐射
20 抗性起着至关重要的作用。White等人于1999年首次公布了DR菌的基因序列, 其中促DNA修复多效蛋白诱导因子(inducer of pleiotropic proteins promoting DNA repair, *pprI*)是耐辐射球菌中一种具有重要调控作用的辐射抗性基因, 它含有987bp, 编码328个AA, 其产物PprI蛋白质是由DR_0167编码, 分子量为37KD。近年研究表明, *pprI*基因是耐辐射球菌控制DNA修复和保护途径的总开关基因,耐辐射球菌受照后PprI蛋白通过多
25 种信号通路调控210多种基因的上调表达,其中包括21中与DNA修复和复制相关的基因【H Lu, H Chen, G Xu, et al. DNA Repair,2012,11(2):139-145】。耐辐射球菌发现50余年来,世界各国学者对

-2-

耐辐射球菌基因、蛋白质功能及其机理开展了深入细致的研究。然而，迄今为止，这些研究只局限于原核细胞内，即耐辐射球菌自身或大肠杆菌。

申请号为200910003512.2的中国专利首次构建了一种耐辐射球菌*pprI*基因的真核表达重组质粒pCMV-HA-*pprI*，将其转入人胚肾293T细胞和受
5 照哺乳动物体内，成功表达了PprI蛋白质，对动物致死性急性放射损伤具有非常显著的防治作用，表明PprI蛋白质有望成为用于急性放射损伤防治的一种新的生物制剂。然而，该专利真核表达重组质粒pCMV-HA-*pprI*通过人体细胞工程目前尚难以获得高效大量表达和纯化的PprI蛋白质。

应用原核表达系统大肠杆菌可高效表达和纯化PprI蛋白【张永芹,周
10 辉,陈洁,杨占山. 辐射研究与辐射工艺学报, 2011, 29(2): 117-122.】，然而，该种技术存在许多缺陷：1. 表达的蛋白质没有经过糖基化等翻译后修饰，导致活性降低；2. 表达的蛋白质以包涵体形式存在，变性提取时也会导致蛋白质活性降低；3. 大肠杆菌本身内毒素和有毒蛋白可混杂在目的蛋白产物中，导致应用受限。

15 酵母是基因工程常用的真核表达系统之一，其中巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）是以甲醇为唯一碳源的酵母工程菌的一种。该酵母具有如下优点，1. 该酵母遗传操作简单，基因组高度稳定，可高水平表达外源基因；2. 能进行蛋白质翻译后的修饰行为，如糖基化，二硫键形成，信号肽切除等；3. 表达载体不含酵母复制原点，外源基因同源重组到酵
20 母细胞染色体中稳定存在，整合后的外源基因随酵母的生长可稳定传代。

如果能够通过真核表达系统毕赤酵母表达纯化耐辐射球菌PprI蛋白，那么现有技术中通过人体细胞或原核表达系统大肠杆菌表达纯化PprI蛋白的缺陷将会得到改善或解决。但是，耐辐射球菌属于原核生物，其与真核生物毕赤酵母在种系进化上存在巨大差异，例如基因和蛋白质组成与功
25 能、蛋白质氨基酸密码子偏爱性等方面显著不同。所以，若直接将耐辐射球菌*pprI*基因通过基因工程构建到毕赤酵母表达系统中，预实验研究证实不可能并且也不利于高效表达耐辐射球菌PprI蛋白，按照本领域一般的基因改造技术很难成功解决这一难题。

-3-

因此,本发明提供一种通过真核表达系统毕赤酵母成功表达纯化耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans* R1) PprI蛋白的技术,为进一步研究该蛋白质的功能、机制和应用奠定了厚实的基础,填补了国际辐射损伤救治和防护领域尚无抗放原核蛋白质药物的空白,在辐射防护剂原创蛋白质药物的研究跻身国际先进行列。

发明内容

有鉴于此,本发明的目的是提供一种新合成的 DNA 分子,使得所述 DNA 分子能够通过巴斯德毕赤酵母成功高效表达和纯化 PprI 蛋白。

此外,本发明还提供同样能够实现发明目的的包含所述 DNA 分子的重组质粒和高效表达耐辐射球菌 PprI 蛋白的毕赤酵母重组菌。

为实现上述发明目的,本发明提供如下技术方案:

一种 DNA 分子,其包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列。

本发明在保持 PprI 蛋白质氨基酸序列不变的前提下,对耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans* R1) *pprI* 基因 (DR_0167, Gene ID: 1798483) 开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 序列进行优化改造,编码合成新的 *pprI* 基因,即 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列,为区别原有 *pprI* 基因,将 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列命名为 *Pi-pprI* 基因。

本发明所述包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的 DNA 分子是指在 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列之外可以增加一些便于分离纯化蛋白诸如 6 × His 标签序列等序列,本领域技术人员能够利用现有技术将这些不影响 *Pi-pprI* 基因正常表达的序列与 *Pi-pprI* 基因序列连接到一起,这对于技术人员来说是能够实现的。

此外,本领域技术人员可以根据实际要插入的质粒的酶切位点在所述 DNA 分子的两端增加相对应的酶切位点,也可以选择其他合适的标签序列,不仅限于本发明提到的 6 × His 标签序列,这些选择在本发明提供了关键的 *Pi-pprI* 基因序列后均可以依靠现有技术实现,同样未超出本发明的核心技术范畴。

作为优选,SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列由 SEQ ID NO:2-41 所示核

-4-

核苷酸序列的引物通过 Overlapping PCR 扩增得到。本发明利用 SEQ ID NO:2-41 所示核苷酸序列的一系列互相重叠 (OVERLAP) 引物 (以下简称 p-1 至 p-40) 的重叠部分进行互补退火形成模板 DNA, 再通过 Overlapping PCR 方法合成得到 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列。

5 Overlapping PCR 扩增示意图参见图 1。

作为优选, 上述制备方法可分别用 SEQ ID NO:2-17 所示核苷酸序列的引物 (p-1 至 p-16)、SEQ ID NO:16-29 所示核苷酸序列的引物 (p-15 至 p-28) 以及 SEQ ID NO:28-41 所示核苷酸序列的引物 (p-27 至 p-40) 合成得到三个片段, 进而再用 SEQ ID NO:2 所示核苷酸序列的引物 (p-1) 和 SEQ ID NO:41 所示核苷酸序列的引物 (p-40) 扩增形成整个 DNA 分子。

作为优选, 所述 Overlapping PCR 方法合成的条件为: 98℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 25 个循环, 最后 72℃ 7 min。反应体系为:

	p-1 (10 μmol/l)	1 μl
15	p-n (10 μmol/l)	1 μl
	p-2 至 p- (n-1)(1 μmol/l)	各 1.5 μl
	5×PrimeSTAR® Buffer	10 μl
	dNTPs (2.5 mmol/l)	4 μl
	PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	0.5 μl
20	ddH ₂ O	加至总体积 50 μl

作为优选, 本发明所述 DNA 分子包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列和 6×His 标签序列, 所述 6×His 标签序列位于 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的 5' 端, 其制备方法如下:

以包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的 DNA 分子为模板, 利用带有 6×His 标签序列的 SEQ ID NO:42 所示核苷酸序列的引物和 SEQ ID NO:41 所示核苷酸序列的引物进行 PCR 扩增, 得到包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列和 6×His 标签序列的 DNA 分子。

所述 PCR 扩增条件为: 95℃ 5 min, 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共进行 30 次循环, 最后 72℃ 10 min, 4℃ 保温。

-5-

同时,本发明还提供一种毕赤酵母重组质粒,由毕赤酵母表达质粒插入包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的 DNA 分子获得。

作为优选,所述毕赤酵母重组质粒由 pHBM-905A 质粒在 *Cpo* I 和 *Not* I 酶切位点间插入包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列和 6×His 标签序列组成的 DNA 分子获得,所述 6×His 标签序列位于 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的 5' 端。本发明所述毕赤酵母重组质粒构建示意图参见图 2。

此外,本发明还提供一种毕赤酵母重组工程菌,由本发明任意一种毕赤酵母重组质粒转化到毕赤酵母感受态细胞中获得。

作为优选,所述毕赤酵母重组工程菌由毕赤酵母重组质粒经 *Sal* I 酶切线性化后,电转化到毕赤酵母 GS115 感受态细胞中获得。

经凝胶电泳检测和测序,本发明所述毕赤酵母重组质粒能够成功扩增出大小和序列与 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列一致的片段,利用 SDS-PAGE 电泳、Western blotting 和质谱检测,证实其编码的氨基酸序列与耐辐射球菌的 PprI 蛋白序列一致,相对分子质量为 43KD。同时,所述毕赤酵母重组工程菌经过甲醇诱导表达,在诱导 24 h 即可检出 PprI 蛋白分泌表达的条带。作为优选,在诱导蛋白表达时甲醇终浓度为 1%,温度 30℃,pH6.0,诱导 120h 时目的蛋白表达量最高,为 0.35mg/ml。以上检测试验结果表明,本发明所提供的 DNA 分子、毕赤酵母重组质粒以及毕赤酵母重组工程菌能够成功地在毕赤酵母中分泌表达 PprI 蛋白,也就证明其能够应用于制备毕赤酵母重组质粒、毕赤酵母重组工程菌以及抗辐射损伤药物中。

由以上技术方案可知,本发明在保持 PprI 蛋白质氨基酸序列不变的前提下,对耐辐射球菌 *pprI* 基因序列进行优化改造,编码合成了新的 *pprI* 基因,能够成功构建毕赤酵母重组质粒和毕赤酵母重组工程菌,并分泌表达 PprI 蛋白,为进一步利用酵母发酵系统大量高效制备抗辐射损伤蛋白质药物奠定了坚实的基础。

附图说明

-6-

图 1 所示为 Overlapping PCR 扩增示意图;

图 2 所示为毕赤酵母重组质粒构建示意图;

图 3 所示为所述 DNA 分子琼脂糖凝胶电泳图, 其中泳道 A-B 为片段 1、片段 2; 泳道 C-J 为片段 3; 泳道 K-O 为全长 *Pi-pprI* 基因, 箭头所指处为 DNA 分子量标准条带的大小 (bp);

图 4 所示为引入 $6 \times \text{His}$ 标签序列的所述 DNA 分子琼脂糖凝胶电泳图, 其中 1 为 PCR 扩增产物, M 为 Maker;

图 5 所示为大肠杆菌重组子 *Pi-pprI* 基因的 PCR 验证琼脂糖凝胶电泳图, 其中泳道 A 为阴性对照, 即不加转化后的大肠杆菌模板; 泳道 B-L 为以转化后的大肠杆菌为模板的 PCR 产物; 泳道 N 为以 *Pi-pprI* 的基因为模板的 PCR 产物 (阳性对照);

图 6 所示为大肠杆菌重组子质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图, 其中泳道 1 为 pHBM905A 质粒 (阴性对照), 该质粒的多克隆位点填充片段为 1200bp; 泳道 2-12 为图 5 中 B-L 对应的单菌落的质粒;

图 7 所示为 pHBM-*Pi-pprI* 及其 *Sal* I 酶切图, 其中泳道 A 为重组质粒 pHBM-*Pi-pprI*; 泳道 B-D 为重组质粒 pHBM-*Pi-pprI* 经 *Sal* I 酶切图;

图 8 所示为 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子 PCR 验证琼脂糖凝胶电泳图, 其中泳道 1 为 pHBM905A 质粒为模板的 PCR 产物 (阴性对照); 泳道 2 为重组质粒 pHBM-*Pi-pprI* 为模板的 PCR 产物 (阳性对照); 泳道 3-16 为 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子为模板的 PCR 产物;

图 9 所示为 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子 PprI 蛋白的诱导表达 SDS-PAGE 图, 其中泳道对照为 pHBM905A 毕赤酵母转化子培养上清液作为阴性对照; 泳道 1-7 为分别诱导 1-7 天的 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子培养上清液, 每个泳道上样量为 30 ul (相当于 24 ul 培养上清液); 泳道 M 为 Maker;

图 10 所示为 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子 Western Blot 检测, 其中 1 为第一个阳性毕赤酵母转化子诱导 2 天的发酵上清; 2 为第二个阳性毕赤酵母转化子诱导 2 天的发酵上清; 3 为第一个阳性毕赤酵母转化子诱导 1 天的发酵上清; M 为 Maker, 上样量为每泳道 16ul 发酵上清;

-7-

图 11 所示为 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子 Ultraflex II TOF/TOF 质谱仪的肽质量指纹图谱 (PMF)。

具体实施方式

5 本发明公开了一种 DNA 分子及毕赤酵母重组质粒和高效表达耐辐射球菌 PprI 蛋白的毕赤酵母重组菌, 本领域技术人员可以借鉴本文内容, 适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是, 所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的, 它们都被视为包括在本发明。本发明的 DNA 分子、赤酵母重组质粒和毕赤酵母重组菌已经通过较佳实施例进行了描述, 相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和

10 和应用进行改动或适当变更与组合, 来实现和应用本发明技术。

实施例中所用试验材料如下:

1、菌株与质粒

大肠杆菌菌株 *E. coli* XL10-GOLD 和巴斯德毕赤酵母菌株(*Pichia pastoris*) GS115 购自 Invitrogen 公司, 毕赤酵母表达载体 pHBM-905A(8923 bp) 由湖北大学马立新教授惠赠 (马立新, 赵西选, 陈晚苹, 李晔星, 付玲, 姚永兰。一种离体高效构建多拷贝毕赤酵母表达载体的方法。专利申请号: 201210591987.X), 质粒图谱参见图 2。

15

2、试剂和培养基

20 Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等均为大连宝生物工程公司产品。质粒 DNA 提取试剂盒和 DNA 片段凝胶回收试剂盒均为杭州爱思进生物技术公司产品。DNA 分子量标准购自北京赛百盛公司。蛋白分子量标准购自 Bio-Rad 公司。酵母基础氮源 (YNB) 为 DIFCO 公司产品。鼠源 anti-His tag 抗体为 SIGMA 公司产品。HRP 交联的兔抗鼠抗体为 Invitrogen 公司产品。ECL 化学发光试剂盒购自 Millipore 公司。

25 其他试剂均为国产化学纯或分析纯产品。

大肠杆菌培养基: LB: 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 1% NaCl, pH 7.0。

酵母培养基: YPD 平板 (每 100ml 双蒸水溶液含酵母提取物 1g、蛋

-8-

白肱 2g、葡萄糖 2g、琼脂粉 2g), BMGY (每 100ml 双蒸水溶液含酵母提取物 1g、蛋白胨 2g、YNB 1.34g、甘油 1ml), BMMY (每 100ml 双蒸水溶液含酵母提取物 1g、蛋白胨 2g、葡萄糖 2g、甲醇 1ml), 购自上海根生生物科技公司。

5 下面结合实施例, 进一步阐述本发明。

实施例 1: 本发明所述 DNA 分子的优化和合成

本发明在保持 PprI 蛋白质氨基酸序列不变的前提下, 对耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans* R1) *pprI* 基因 (DR_0167, Gene ID: 1798483) 开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 序列进行优化改造, 编码合成了新的 *pprI* 基因—*Pi-pprI* 基因, 即 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列, 以期高效表达目的蛋白。

1、合成方法

本发明根据人工设计的 *Pi-pprI* 基因, 设计并合成了 SEQ ID NO:2-41 所示核苷酸序列的一系列互相重叠 (OVERLAP) 引物, 通过 Overlapping PCR 合成得到包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列并带有 *Cpo* I 限制性内切酶位点和 *Not* I 限制性内切酶位点 (便于后续重组质粒的构建) 的 DNA 分子。具体方法如下:

分别用 SEQ ID NO:2-17 所述核苷酸序列的引物 (p-1 至 p-16, 404bp)、SEQ ID NO:16-29 所述核苷酸序列的引物 (p-15 至 p-28, 370bp) 以及 SEQ ID NO:28-41 所述核苷酸序列的引物 (p-27 至 p-40, 330bp) 进行 Overlapping PCR 合成得到三个片段, 依次为片段 1、片段 2 和片段 3。

三个片段合成后, 以这三个片段为模板, 用 SEQ ID NO:2 所示核苷酸序列的引物 (p-1) 和 SEQ ID NO:41 所示核苷酸序列的引物 (p-40) 扩增形成整个 DNA 分子。

经琼脂糖凝胶电泳检测, 所述 DNA 分子大小与预期一致, 琼脂糖凝胶电泳图参见图 3。

其中, Overlapping PCR 方法合成的条件为: 98°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 共 25 个循环, 最后 72°C 7 min。反应体系为 (50 μl):

-9-

	p-1 (10 $\mu\text{mol/l}$)	1 μl
	p-n (10 $\mu\text{mol/l}$)	1 μl
	p-2 至 p- (n-1)(1 $\mu\text{mol/l}$)	各 1.5 μl
	5 $\times$ PrimeSTAR® Buffer	10 μl
5	dNTPs (2.5 mmol/l)	4 μl
	PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	0.5 μl
	ddH ₂ O	加至总体积 50 μl

PCR 扩增条件为: 95℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 共进行 30 次循环, 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保温。

10

实施例 2: 本发明所述 DNA 分子 (引入 6 $\times$ His 标签序列) 的合成

以实施例 1 得到的 DNA 分子为模板, 用带有 6 $\times$ His 标签序列 (CATCATCACCACCATCAT) 的 SEQ ID NO:42 所示核苷酸序列的引物和 SEQ ID NO:41 所示核苷酸序列的引物进行 PCR 扩增便得包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列和 6 $\times$ His 标签序列的 DNA 分子 (带有 *Cpo* I 限制性内切酶位点、*Not* I 限制性内切酶位点)。其中, 引物 SEQ ID NO:42 即在引物 p-1 基础上引入 6 $\times$ His 标签序列。

PCR 扩增条件为: 95℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 共进行 30 次循环, 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保温。

20 取 3 μl PCR 扩增产物用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明 PCR 扩增产物的大小(1005 bp)与预期一致, 琼脂糖凝胶电泳图参见图 4。

实施例 3: 毕赤酵母重组质粒的构建

25 将毕赤酵母表达载体 pHBM905A(8923 bp)用 *Cop* I 和 *Not* I 双酶切, 经琼脂糖电泳分离, 割胶回收大片段 (7719 bp)。

将实施例 2 合成的 PCR 产物 (1005 bp) 在有 dTTP 存在条件下用 T4 DNA 聚合酶处理, 然后与割胶回收大片段进行连接, 获得毕赤酵母重组表达质粒 pHBM-905A-*Pi-pprI* (8706 bp), 简称 pHBM-*Pi-pprI*, 构建流程图示于图 2。

实施例 4: 大肠杆菌转化子的鉴定

为了验证所构建的毕赤酵母重组质粒是否成功构建,将其转化至大肠杆菌中,然后进行鉴定。

5 1、煮菌 PCR 鉴定

从大肠杆菌转化平板上随机挑选 11 个转化子菌落,分别转接入装有 20 μ l 无菌水的 1.5 ml Eppendorf 管中,置于沸水浴 3 分钟,冰浴冷却。高速离心 (14,000 rpm) 1 min。取上清 1-2 μ l 为模板,用引物 p-1 和 p-40 进行 PCR 扩增反应。将 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检查,见图 5。

10 结果显示 11 个转化子中有 10 个转化子都能得到实施例 2 所合成的基因。

2、转化子质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

将挑选的 11 个转化子菌落用 AXYGEN 微量质粒抽提试剂盒提取质粒 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳检查,见图 6。结果显示,11 个转化子中有 10 个为分子量大小一致的重组质粒。

15 3、转化子质粒 DNA 的测序鉴定

随机挑取 3 个经菌落 PCR 鉴定和质粒大小比对正确的重组质粒进行测序。结果表明,插入的 *pprI* 基因编码序列与人工设计合成的 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列完全一致。本发明设计合成的 *Pi-pprI* (SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列) 基因编码序列与原有耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans* R1) *pprI* 基因编码序列 (DR_0167, SEQ ID NO:43 所示核苷酸序列) 完全不同。

20 4、生物信息学软件分析结果

利用生物信息学软件 (www.bio-soft.net/sms/index.html) 分析 *Pi-pprI* (SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列) 基因序列,结果表明,其编码的氨基酸序列与耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans* R1) *pprI* 基因编码的 PprI 蛋白 (NP_293891.1) 的氨基酸序列完全一致 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:44 所示)。

由上述检测结果可知,毕赤酵母重组质粒转化大肠杆菌能够提出质粒,条带位置正确、大小正确,且测序结果与 *Pi-pprI* (SEQ ID NO:1 所

-11-

示核苷酸序列)基因序列一致, *Pi-pprI* 基因序列能够正确表达 PprI 蛋白, 说明该质粒已经构建成功。

实施例 5: 毕赤酵母重组工程菌的建立

5 将鉴定正确的毕赤酵母重组质粒 pHBM-*Pi-pprI* 经 *Sal* I 酶切线性化后 (电泳图见图 7), 电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 获得毕赤酵母重组工程菌 (pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子)。毕赤酵母感受态细胞制备方法按照 Invitrogen 公司的操作手册进行 (见 www.pdffactory.com)。

电转化实验的相关参数分别为: Voltage Booster: 4 k Ω , Capacitance: 50
10 μ F, DC VOLTS: 410, Charge Rate: Fast。

将电转化后的毕赤酵母细胞涂布 MD 平板 (MD: 1.34% YNB;;
4 $\times$ 10⁻⁵% 生物素; 2%葡萄糖), 28 $^{\circ}$ C 培养 2-3 天后, 随机挑取 MD 平板
上的酵母转化子菌落进行煮菌 PCR 鉴定。煮菌 PCR 采用的引物为 p-1 和
p-40。PCR 结果显示 14 个毕赤酵母转化子中都能扩增出 987 bp 的 *Pi-pprI*
15 (SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列) 基因序列 (电泳图见图 8), 表明转化成功。

实施例 6: 毕赤酵母重组工程菌 (pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子) PprI 蛋白的诱导表达

20 挑取经鉴定为阳性的 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子, 进行摇瓶培养诱导表达。阴性对照菌株为空载体质粒 pHBM-905A 经 *Sal* I 酶切线性化后转化毕赤酵母 GS115 菌株获得的转化子。方法如下:

(1) 挑取一个 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子单菌落, 接种至 50 ml BMGY 液体培养基中 (按 10% 装瓶, 即 50 ml 培养基装在 500 ml 培养瓶中),
25 在 28 -30 $^{\circ}$ C 摇床中培养, 摇床转速为 250-300 rpm, 当菌体生长至 OD₆₀₀=20-30 时收获;

(2) 室温离心 5,000 rpm, 5 min, 去除上清, 收集细胞, 用 50 ml BMMY (BMMY : 2% 蛋白胨, 1% 酵母提取物, 1% 硫酸铵, 0.34% YNB, 100 mmol/L PBS pH 6.0;)

-12-

重新悬浮细胞,在 28-30℃摇床中继续培养,摇床转速为 250-300 rpm;

(3) 每隔 24 h, 向摇瓶中加入甲醇至终浓度为 1%进行诱导表达;

(4) 在下列的各个时间点(24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168h) 取 1 ml 培养液至 1.5 ml 离心管, 室温离心 5,000 rpm, 5 min, 收集上清液保存 4℃冰箱备用。

(5) 待连续培养 7 天的样品都收齐之后, 将每个时间点的样品各取 40 ul 培养上清液分别转入新的 1.5 ml Eppendorf 管中, 各加入 10 ul 蛋白样品处理液 (5×SDS-PAGE Loading buffer 100ml: 1mol/L Tris·HCl pH 6.8 : 25 ml; 甘油: 50 ml; SDS: 10 g ; 溴酚蓝: 0.5 g; 巯基乙醇: 5.0 ml ; 双蒸水: 定容至 100ml), 混匀后置于沸水浴中变性 10 min。每个样品各取用 30 ul 上样进行 SDS-PAGE 电泳观察表达情况。

(6) 电泳条件: 浓缩胶 4%, 分离胶 12%, 电泳液为 Tris-Glycine Buffer (5×TGB 1L: Tris base 15.1 g, Glycine 94 g, SDS 5 g, 溶于 800 ml ddH₂O, 再定容至 1L)。染色液为考马斯亮蓝, 脱色液为 95%乙醇:冰乙酸:水 = 4.5:0.5:5(V:V:V)。

结果显示, 诱导 24 h 即可检出 PprI 蛋白分泌表达的条带, 随着诱导时间的延长, PprI 蛋白表达量也逐渐增加, 至诱导到 120 h 时表达量达到最高, 之后趋于稳定(电泳图见图 9)。图中 PprI 蛋白的分子量约为 43kD, 提示该蛋白可能存在糖基化修饰。

实施例 7: 毕赤酵母重组工程菌 (pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子) 表达产物的 Western Blot 检测

为了判断毕赤酵母重组工程菌 (pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子) 培养上清液中的特异性表达蛋白是否确实为 6×His-PprI 融合蛋白, 本发明随机选取其中 2 个阳性 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子的甲醇诱导培养上清液进行 Western Blot 检测, 见图 10。结果显示, 抗 6×His 的标签抗体能与这 2 个阳性 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子培养清液中 43 kDa 位置附近的蛋白条带发生特异性结合反应, 而且反应强度随甲醇诱导时间的增加而相应增强, 表明 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子培养上清液中的特异

性蛋白为 6×His-PprI 融合蛋白。

实施例 8: 毕赤酵母重组工程菌 (pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子) 表达产物的质谱鉴定

5 为了进一步验证 pHBM-*Pi-pprI* 毕赤酵母转化子表达上清液中的蛋白是否为耐辐射球菌的 PprI 蛋白, 本发明割取了实施例 6 中的 SDS-PAGE 电泳胶上分离的目的蛋白条带, 用 Ultraflex II TOF/TOF 质谱仪进行了肽质量指纹图谱 (Peptide Mass Fingerprinting, PMF) 的检测, 并将检测结果输入美国国家生物技术信息中心(The National Center for Biotechnology Information, NCBI)的 OMOSSA 数据库进行分析。

目的蛋白的处理方法:

- 1) 用切胶笔切下目的条带, 置于离心管中。
- 2) 用 50 μ l 双蒸水洗两次, 每次 10 min。
- 3) 加 50 μ l 脱色液(50mM NH_4HCO_3 : CH_3CN = 1:1), 37 $^\circ\text{C}$ 脱色 20
15 min。
- 4) 重复步骤 3, 直至蓝色褪去。
- 5) 加 50 μ l CH_3CN 使胶条脱水至白色, 真空干燥 10 min。
- 6) 加 10 mM DTT (13 用 25mM NH_4HCO_3 配制)50 μ l, 56 $^\circ\text{C}$ 水浴 1 h。
- 7) 样品冷至室温, 去除溶液, 快速加 30-40 mM IAA(用 25 mM
20 NH_4HCO_3 配制)50 μ l, 置于暗室 45 min。

8) 依次用 25 mM NH_4HCO_3 , 25 mM NH_4HCO_3 +50% CH_3CN 各清洗胶条两次, 每次 10 min, 再用 CH_3CN 脱水至胶条变白, 真空干燥 10 min。

9) 将 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Trypsin 液用 25 mM NH_4HCO_3 稀释 10-20 倍, 每管加 2-3 μl , 短暂离心, 让酶液与胶条充分接触, 4 $^\circ\text{C}$ 放置 30 min。待酶解液
25 被完全吸收, 加 25 mM NH_4HCO_3 至总体积 10-15 μl , 37 $^\circ\text{C}$ 过夜。

10) 加入 2 μl 0.1%TFA 终止反应, 振荡混匀, 离心收集酶解液, 点靶。

11) 用美国 Bruker Daltonics 公司的 Ultraflex II TOF/TOF 质谱仪进行肽质量指纹图谱(Peptide Mass Fingerprinting, PMF)分析, 检测肽段的分

—14—

子量 (m/z , z 为一个单位正电荷) 范围在 900-4000 范围内(见图 11)。

登陆美国国家生物信息中心网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 的 NCBI nr 数据库, 选择物种为 *bacteria*, 对质谱测得的 PMF 结果进行搜索分析。

结果显示, 该蛋白序列确实是来源于耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的蛋白(NP_293891.1)。表明含有 *Pi-pprI* 基因序列的毕赤酵母重组工程菌成功分泌表达了耐辐射球菌 PprI 蛋白。

以上所述仅是本发明的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

-15-

序 列 表

<110> 苏州大学张家港工业技术研究院

<120> 一种 DNA 分子及毕赤酵母重组质粒和高效表达耐辐射球菌 PprI

5 蛋白的毕赤酵母重组菌

<130> OP140354

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

10 <210> 1

<211> 987

<212> DNA

<213> 人工合成

15 <400> 1

atgccatctg ctaacgtttc tccacatgt ccaagtgggtg ttagaggcgg tggcatgggt 60

cctaaagcta aggcagaggc ttctaagcca catcctcaga taccagtaaa gttgccattt 120

gttactgcac cagatgcttt ggccgctgct aaagccagaa tgcgtgattt ggctgccgct 180

tatgtagcag cattgccagg tagagatact cattctttga tggctgggtg gccaggagtt 240

20 gatttgaagt ttatgccatt gggttggagg gatggtgcat ttgatccaga acataacgta 300

attctgatta acagtgcagc tagacctgaa agacaaagat ttacattggc tcatgaaatc 360

ggacatgcta tttgttggg tgatgatgat ttgtgtccg atattcatga tgcttacgaa 420

—16—

ggtgagagat tggaacaagt tattgaaact ttgtgtaatg ttgccgcagc agccatactg 480
 atgccagaac cagttatagc cgaaatgttg gaaagattcg gtccaactgg tagagcattg 540
 gcagaattgg ctaagagagc agaagttagt gcttctctg cttgtacgc ttgactgaa 600
 caaacaccag tacctgttat ctacgtgtt tgtgtccag gtaagcctcc aagagaacaa 660
 5 gcagcttcg acgaagatgc cggccatct actgaaaagg tttaactgt tagggcctct 720
 tcttccacta gaggtgttaa gtacactctt gcttctgta ctccagtcc agctgatcat 780
 cctgcagcct tggcattagc tacgggtatg gaagtcagag aagagtctta cgttccattt 840
 agatctggta ggaaaatgaa ggctgaagtt gatgcatacc catctagagg aattgttgca 900
 gtttctttg aattgaccc agccagattg ggtagaaagg attctgagca ggctgataga 960
 10 gatgaaccac aagatgctgc ccaataa
 987

<210> 2

<211> 30

15 <212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

gtcagttcca tctgctaacg tttctccacc

20 30

<210> 3

—17—

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

5 <400> 3

cctetaacac cacttggaca tgggtggagaa acgttagcag atggaa
46

<210> 4

10 <211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 4

15 atgtccaagt ggtgttagag gcggtggcat gggtcctaaa gctaag
46

<210> 5

<211> 46

20 <212> DNA

<213> 人工合成

—18—

<400> 5

tgaggatgtg gcttagaagc ctctgcctta gctttaggac ccatgc 46

<210> 6

5 <211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 6

10 gcttctaagc cacatcctca gataccagta aagttgccat ttgtta 46

<210> 7

<211> 46

<212> DNA

15 <213> 人工合成

<400> 7

agcggccaaa gcatctgggtg cagtaacaaa tggcaacttt actggt 46

20 <210> 8

<211> 46

<212> DNA

—19—

<213> 人工合成

<400> 8

cagatgcttt ggccgctgct aaagccagaa tgcgtgatt ggctgc 46

5

<210> 9

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

10

<400> 9

tctacctggc aatgctgcta cataagcggc agccaaatca cgcatt 46

<210> 10

15 <211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 10

20 gcagcattgc caggtagaga tactcattct ttgatggctg gtgtgc 46

<210> 11

—20—

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

5 <400> 11

aatggcataa acttcaaatac aactcctggc acaccagcca tcaaag 46

<210> 12

<211> 46

10 <212> DNA

<213> 人工合成

<400> 12

agttgatttg aagtttatgc cattgggttg gagggatggt gcattt 46

15

<210> 13

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

20

<400> 13

aatcagaatt acgttatggt ctggatcaaa tgcaccatcc ctccaa 46

—21—

<210> 14

<211> 46

<212> DNA

5 <213> 人工合成

<400> 14

tccagaacat aacgtaattc tgattaacag tgcagctaga cctgaa 46

10 <210> 15

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

15 <400> 15

ttcatgagcc aatgtaaadc ttgtctttc aggtctagct gcactg 46

<210> 16

<211> 46

20 <212> DNA

<213> 人工合成

—22—

<400> 16

caaagattta cattggetca tgaaatcgga catgctattt tgttgg

46

<210> 17

5 <211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 17

10 atatcggaca acaaatcatc atcacccaac aaaatagcat gtccga

46

<210> 18

<211> 46

<212> DNA

15 <213> 人工合成

<400> 18

gtgatgatga ttgtgtgcc gatattcatg atgcttacga aggtga

46

20 <210> 19

<211> 46

<212> DNA

—23—

<213> 人工合成

<400> 19

agtttcaata acttggtcca atctctcacc ttcgtaagca tcatga

46

5

<210> 20

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

10

<400> 20

gagattggaa caagttattg aaactttgtg taatgttgcc gcagca

46

<210> 21

15 <211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 21

20 ctataactgg ttctggcatc agtatggctg ctgcggcaac attaca

46

<210> 22

—24—

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

5 <400> 22

ctgatgccag aaccagttat agccgaaatg ttggaaagat tcggtc 46

<210> 23

<211> 46

10 <212> DNA

<213> 人工合成

<400> 23

attctgccaa tgctctacca gttggaccga atctttccaa catttc 46

15

<210> 24

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

20

<400> 24

tggtagagca ttggcagaat tggctaagag agcagaagtt agtgct 46

—25—

<210> 25

<211> 46

<212> DNA

5 <213> 人工合成

<400> 25

cagtcaaagc gtacaaagca gaggaagcac taacttctgc tctctt 46

10 <210> 26

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

15 <400> 26

tgctttgtac gctttgactg aacaaacacc agtacctgtt atctac 46

<210> 27

<211> 46

20 <212> DNA

<213> 人工合成

—26—

<400> 27

ggcttacctg gaggacaaac agcgtagata acaggtactg gtgttt 46

<210> 28

5 <211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 28

10 ttgtgctcca ggtaagcctc caagagaaca agcagcttcc gacgaa
46

<210> 29

<211> 46

15 <212> DNA

<213> 人工合成

<400> 29

aaaccttttc agtagatgga ccggcatctt cgtcggaagc tgcttg 46

20

<210> 30

<211> 46

—27—

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 30

5 ggtccatcta ctgaaaaggt tttactgtt agggcctctt ctcca

46

<210> 31

<211> 46

<212> DNA

10 <213> 人工合成

<400> 31

aagcaagagt gtacttaaca cctctagtgg aagaagaggc cctaac

46

15

<210> 32

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

20

<400> 32

ggtgttaagt acactcttgc ttctgttact ccagttccag ctgatc

46

—28—

<210> 33

<211> 46

<212> DNA

5 <213> 人工合成

<400> 33

cgtagctaat gcccaaggctg caggatgatc agctggaact ggagta

46

10

<210> 34

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

15

<400> 34

agccttggca ttagctacgg gtatggaagt cagagaagag tcttac 46

<210> 35

20 <211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

—29—

<400> 35

ttcctaccag atctaaatgg aacgtaagac tcttctctga ctcca

46

5 <210> 36

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

10 <400> 36

gttcattta gatctggtag gaaaatgaag gctgaagttg atgcat

46

<210> 37

<211> 46

15 <212> DNA

<213> 人工合成

<400> 37

aactgcaaca attcctctag atgggtatgc atcaacttca gccttc

46

20

<210> 38

<211> 46

—30—

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 38

5 catctagagg aattgttgca gtttcttttg aatttgaccc agccag

46

<210> 39

<211> 46

<212> DNA

10 <213> 人工合成

<400> 39

ctgctcagaa tcctttctac ccaatctggc tgggtcaaatt tcaaaa

46

15 <210> 40

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成

20 <400> 40

ggtagaaagg

attctgagca

ggctgataga

gatgaaccac

aagatg

46

—31—

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

5 <213> 人工合成

<400> 41

ggccattatt

gggcagcatc

ttgtggttca

30

10

<210> 42

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工合成

15

<400> 42

gtcacatcat

caccaccatc

atgttccatc

tgctaacgtt

tctccac

47

20

-32-

权 利 要 求

1、一种 DNA 分子，其包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列。

2、根据权利要求 1 所述 DNA 分子，其特征在于，SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列由 SEQ ID NO:2-41 所示核苷酸序列的引物通过 Overlapping PCR 扩增得到。

3、根据权利要求 1 所述 DNA 分子，其特征在于，包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列和 6×His 标签序列，所述 6×His 标签序列位于 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的 5'端。

4、权利要求 1-3 任意一项所述 DNA 分子在制备毕赤酵母重组质粒、毕赤酵母重组工程菌以及抗辐射损伤药物中的应用。

5、一种毕赤酵母重组质粒，其特征在于，由毕赤酵母表达质粒插入包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的 DNA 分子获得。

6、根据权利要求 5 所述毕赤酵母重组质粒，其特征在于，由 pHBM-905A 质粒在 *Cpo* I 和 *Not* I 酶切位点间插入包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列和 6×His 标签序列组成的 DNA 分子获得，所述 6×His 标签序列位于 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的 5'端。

7、权利要求 5 或 6 所述毕赤酵母重组质粒在制备毕赤酵母重组工程菌以及抗辐射损伤药物中的应用。

8、一种毕赤酵母重组工程菌，其特征在于，由权利要求 5 或 6 所述毕赤酵母重组质粒转化到毕赤酵母感受态细胞中获得。

9、根据权利要求 8 所述毕赤酵母重组工程菌，其特征在于，由权利要求 5 或 6 所述毕赤酵母重组质粒经 *Sal* I 酶切线性化后，电转化到毕赤酵母 GS115 感受态细胞中获得。

10、权利要求 8 或 9 所述毕赤酵母重组工程菌在制备抗辐射损伤药物中的应用。

-1/6-

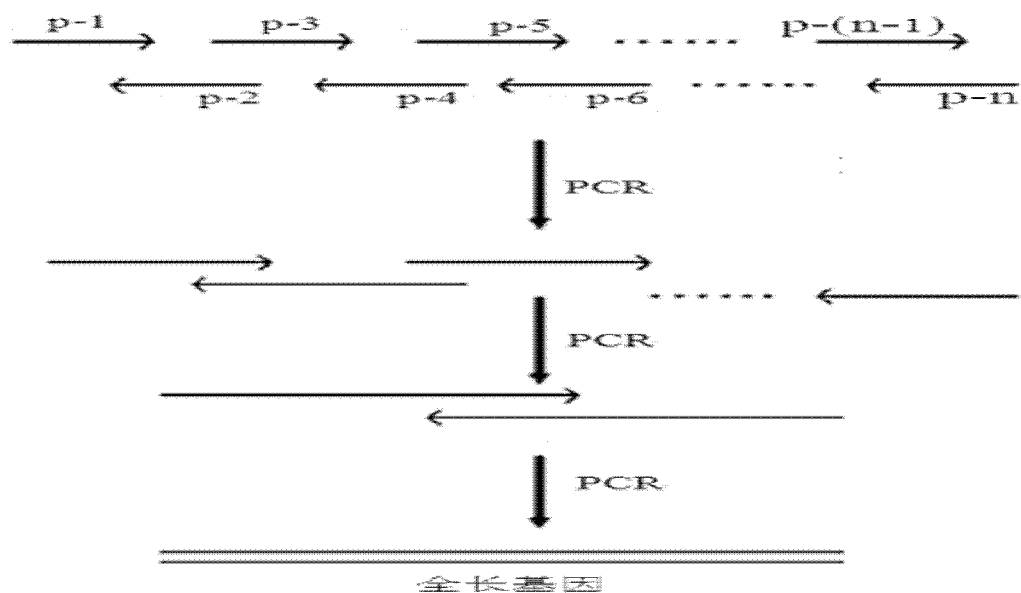


图 1

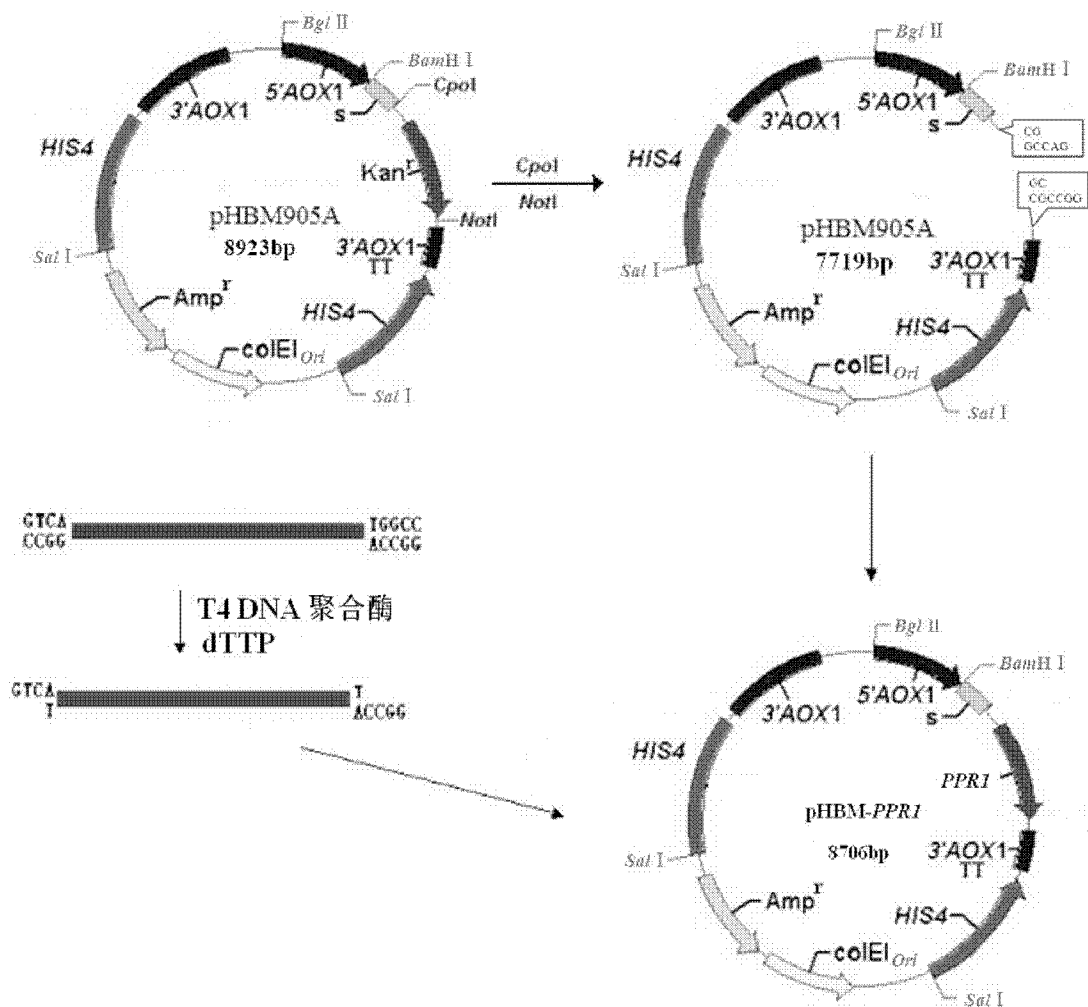


图 2

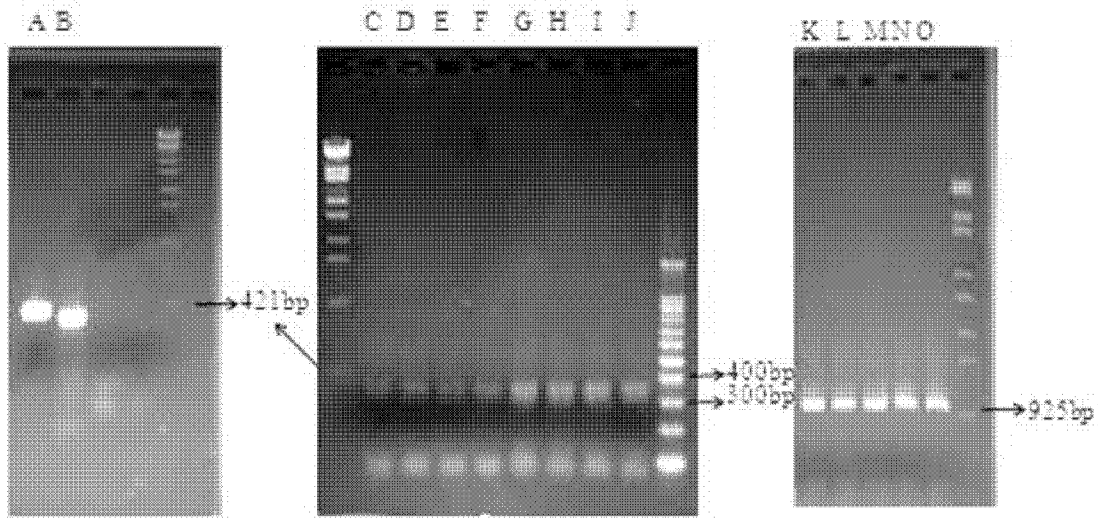


图 3

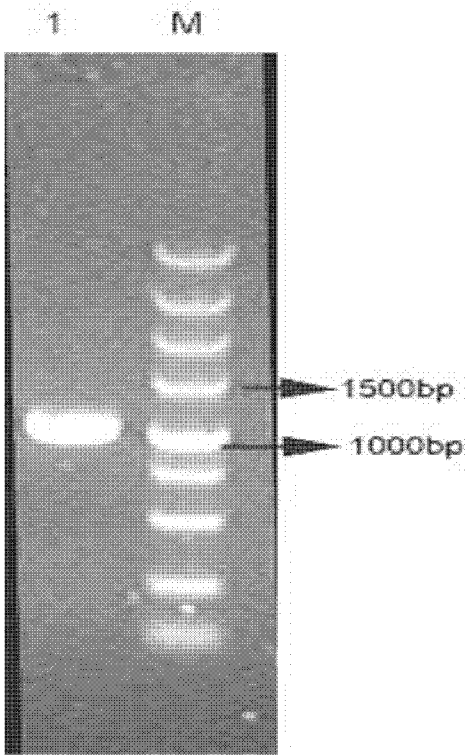


图 4

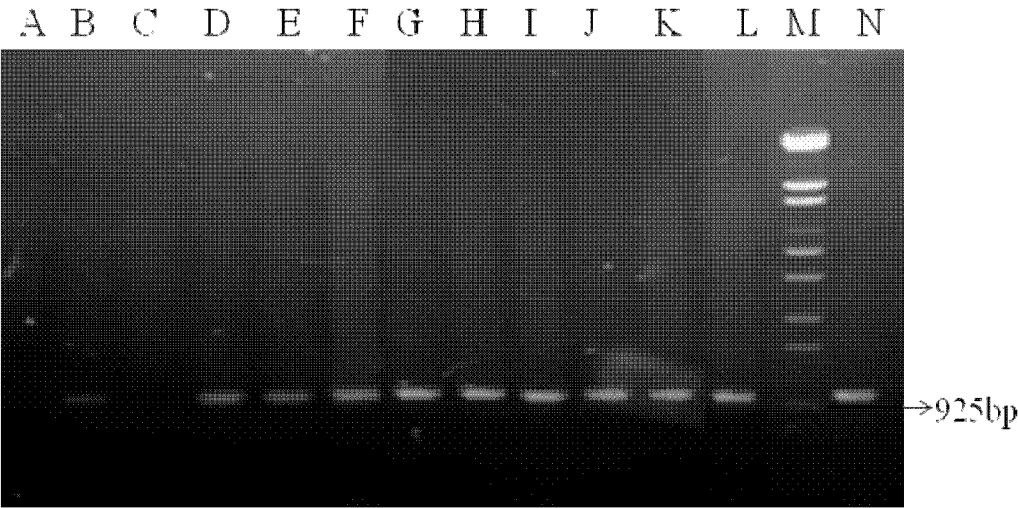


图 5

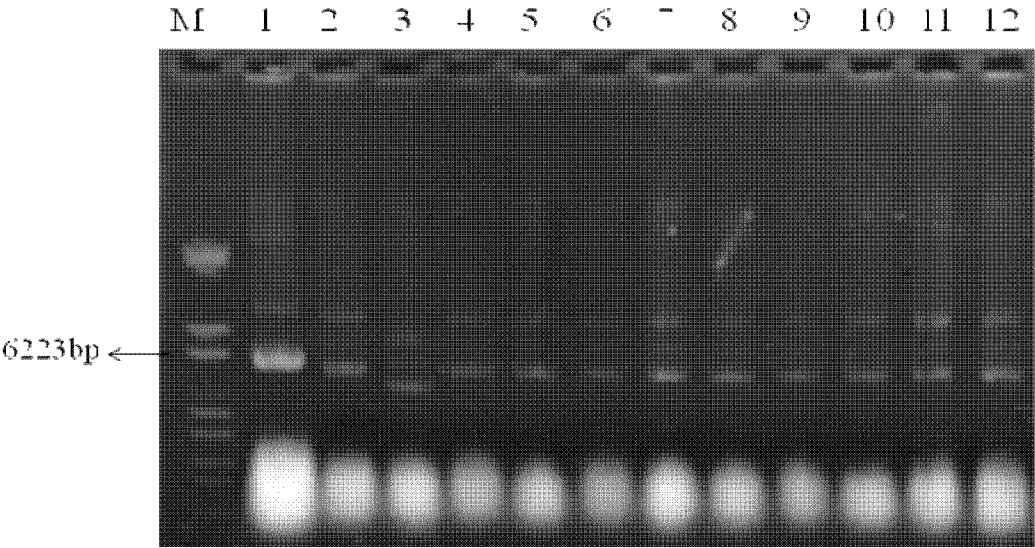


图 6

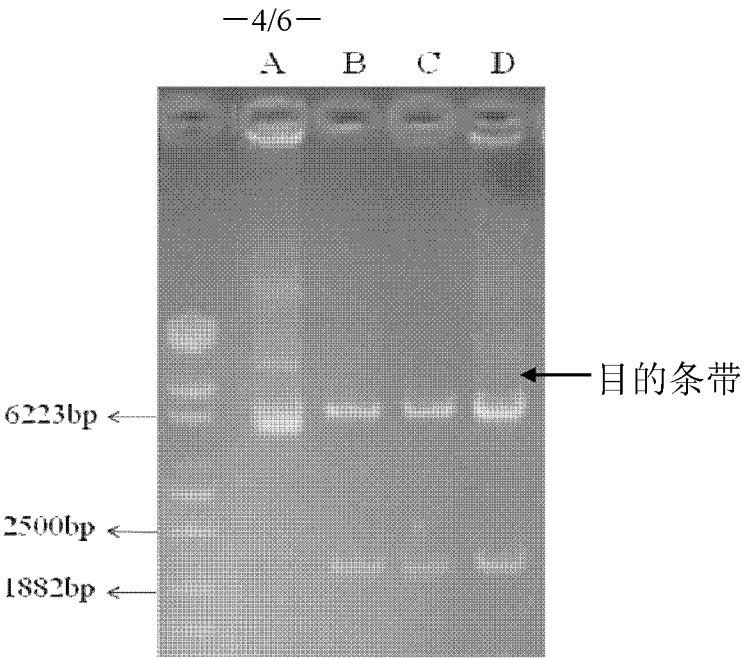


图 7

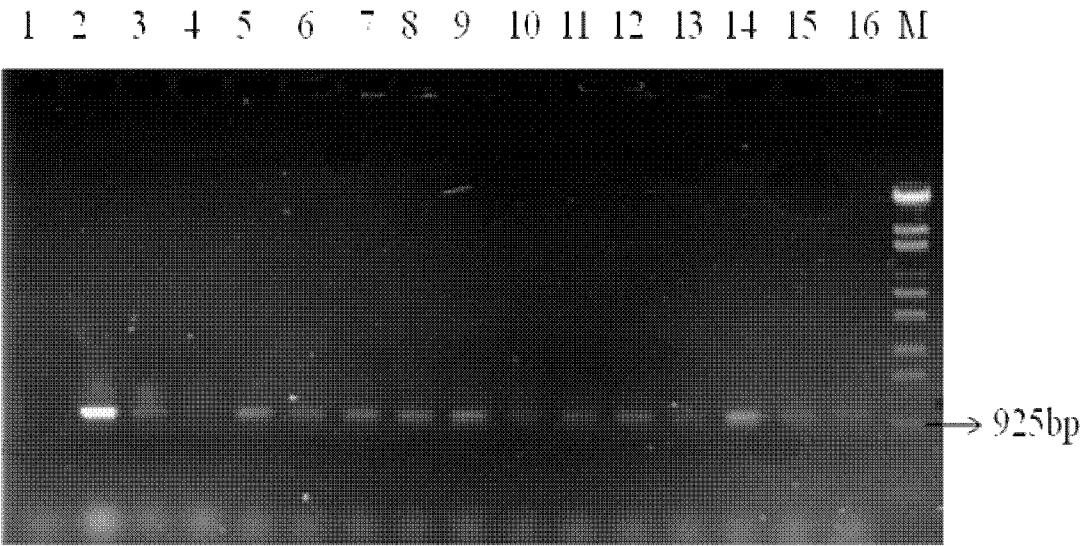


图 8

—5/6—

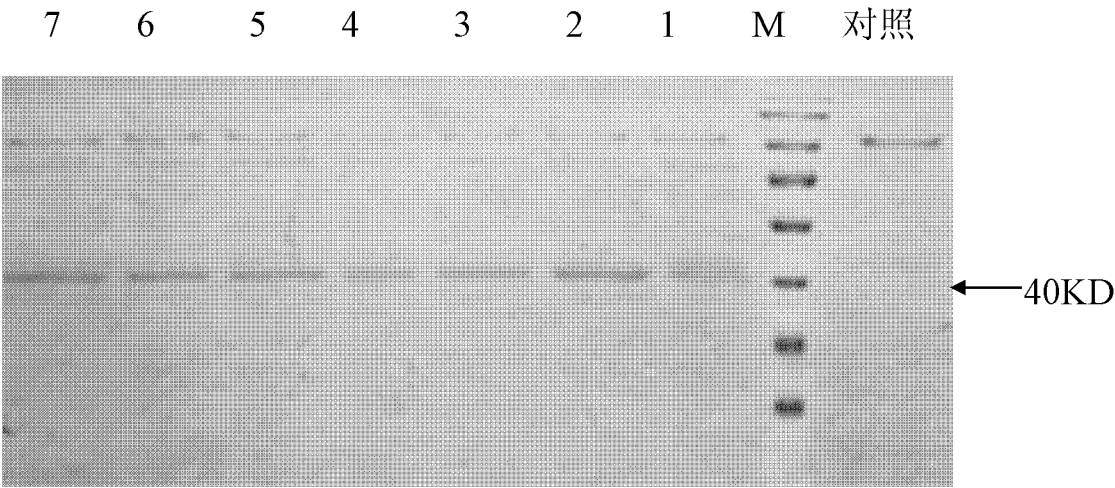


图 9

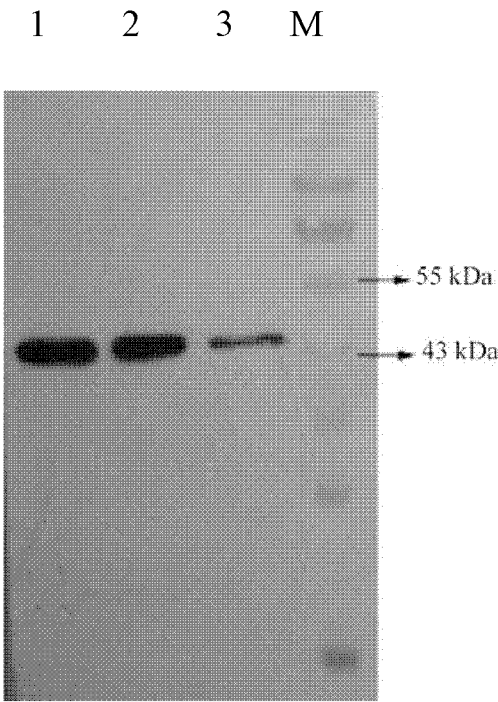


图 10

—6/6—

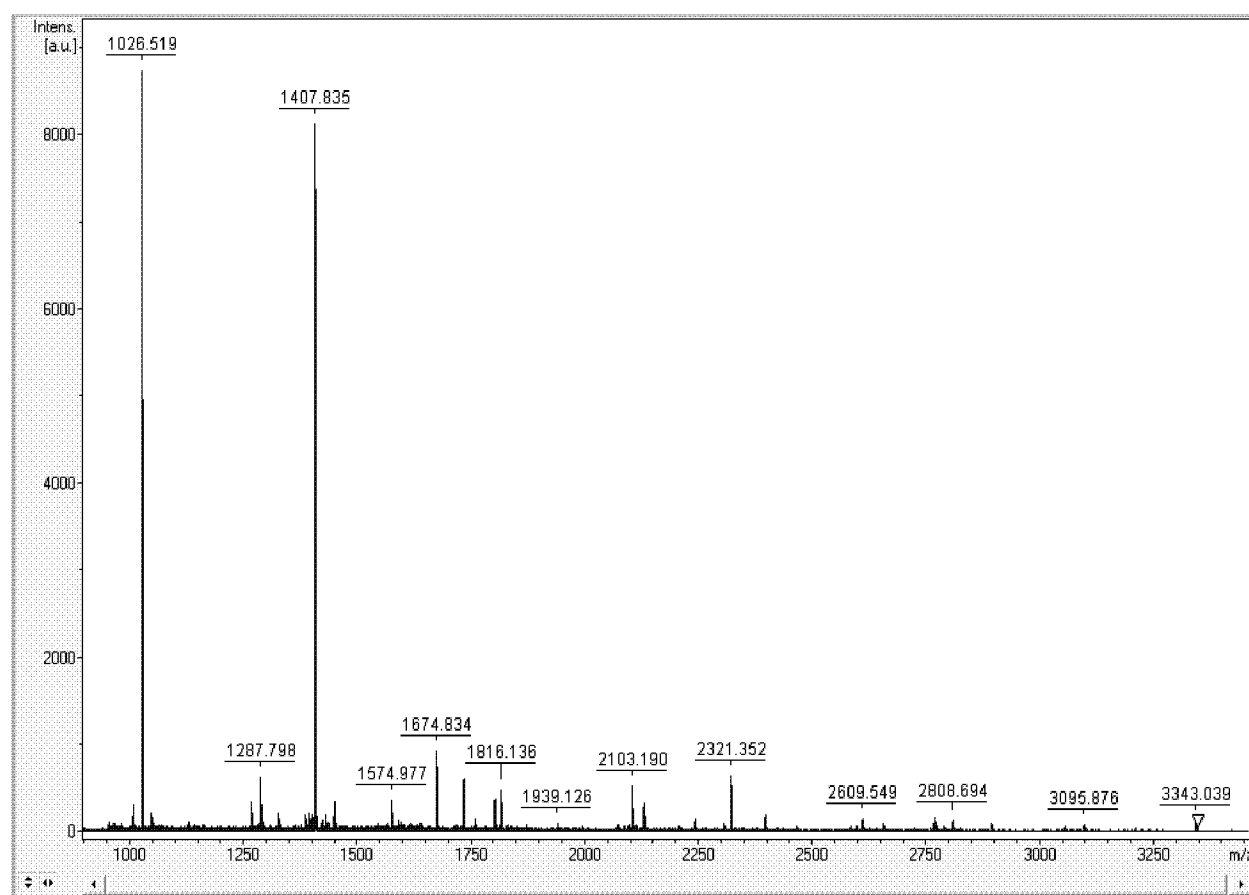


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/078900

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16 (2006.01) i; C12N 15/31 (2006.01) i; C12N 15/81 (2006.01) i; C12N 1/19 (2006.01) i; A61P 17/16 (2006.01) i;
A61P 39/00 (2006.01) i

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)

C12N; A61K; A61P

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)

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed; PPRI, radiation, yeast, Pichia pastoris, Deinococcus radiodurans, DRGenBank; EMBL: sequence search on SEQ ID no.: 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101671679 A (UNIV ZHEJIANG) 17 March 2010 (17.03.2010) see the whole document	1-10
A	CN 101492651 A (UNIV SUZHOU) 29 July 2009 (29.07.2009) see the whole document	1-10

☐ 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 17 December 2014	Date of mailing of the international search report 24 December 2014
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHAO, Yanhao Telephone No. (86-10) 62411043

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/078900

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101671679 A	17 March 2010	CN 101671679 B	18 September 2013
CN 101492651 A	29 July 2009	CN 101492651 B	06 April 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/078900

A. 主题的分类

A61K 38/16(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; A61P 17/16(2006.01)i; A61P 39/00(2006.01)i

按照国际专利分类(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(标明分类系统和分类号)

C12N, A61K, A61P

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, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed; PPRI, 辐射, 酵母, radiation, yeast, Pichia pastoris, Deinococcus radiodurans, DR GenBank; EMBL: 基于SEQ ID NO: 1的序列检索

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
A	CN 101671679 A (浙江大学) 2010年 3月 17日 (2010 - 03 - 17) 参见全文	1-10
A	CN 101492651 A (苏州大学) 2009年 7月 29日 (2009 - 07 - 29) 参见全文	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或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(如具体说明的)

“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, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“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, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2014年 12月 17日

国际检索报告邮寄日期

2014年 12月 24日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

赵彦豪

电话号码 (86-10)62411043

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/078900

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101671679	A	2010年 3月 17日	CN	101671679	B	2013年 9月 18日
CN	101492651	A	2009年 7月 29日	CN	101492651	B	2011年 4月 06日