(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1839151 B
(45)授权公告日 2011.02.09

(21)申请号 200380110447.4

(22)申请日 2003.11.24

(30)优先权数据
10-2003-0062756 2003.09.08 KR

(85)PCT申请进入国家阶段日
2006.03.08

(86)PCT申请的申请数据
PCT/KR2003/002539 2003.11.24

(87)PCT申请的公布数据
WO2005/023847 EN 2005.03.17

(73)专利权人 韩国科学技术院
地址 韩国大田广域市

(72)发明人 李相烨 韩美正 朴时载

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200
代理人 楼高潮

(51)Int.Cl.
C07K 14/00(2006.01)
G01N 27/447(2006.01)

(56)对比文件
WO 0179250 A1,2001.10.25，实施例 3 和图 3.

SHEARSTONE J R 等 .Biochemical Characterization of the Small Heat Shock ProteinIbpB from Escherichia coli. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY274 15.1999,274(15)，摘要 .

FINNIE C 等 .Proteolysis during the isoelectric focusing step oftwo-dimensionalgel electrophoresis may be a common problem.ANALYTICAL BIOCHEMISTRY311.2002,311 第 182 页左栏第 1 行 - 右栏第 6 行 .

审查员 林峻凯

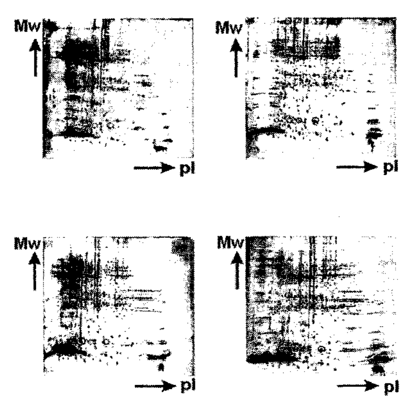
权利要求书 4 页 说明书 9 页 序列表 2 页 附图 11 页

(54)发明名称

包括小分子热休克蛋白(sHSPs)用于防止蛋白质降解的组合物以及利用 sHSPs 的二维凝胶电泳方法

(57)摘要

本发明涉及一种含有 sHSPs 用于防止蛋白质降解的组合物，以及一种用于二维凝胶电泳的组合物。此外，本发明还涉及一种改进的二维凝胶电泳方法，其特征在于使用了 sHSPs。根据本发明，可防止二维凝胶电泳中的蛋白质斑点减少，从而获得具有大量蛋白质斑点的二维凝胶。



CN 1839151 B

1. 含有有效量的小分子热休克蛋白的组合物用于防止蛋白质被蛋白酶降解的应用，其中所述小分子热休克蛋白是一种或多种选自如下的蛋白质：

来源于根癌农杆菌 C58 的 IbpA；

来源于拟南芥的 sHSPs；

来源于慢生型大豆根瘤菌的 HspB，HspH，HspC 和 HspF；

来源于猪布鲁氏杆菌 1330 的 IbpA；

来源于桃蚜专性内共生菌质粒 pBPS1 的 sHSPs；

来源于豌豆蚜的桃蚜专性内共生菌菌株 APS 的 IbpA；

来源于柑桔速衰病病毒的 sHSPs；

来源于大肠杆菌 CFT073 的 IbpA 和 IbpB；

来源于大肠杆菌 K12 的 IbpA 和 IbpB；

来源于大肠杆菌 O157:H7 的 IbpA 和 IbpB；

来源于幽门螺旋杆菌 26695 的 IbpB；

来源于人的 Hsp27 和 α，β-晶体蛋白；

来源于詹氏甲烷球菌的 HSP16.5；

来源于甲烷嗜高热菌 AV19 的 IbpA；

来源于鼠的 Hsp25；

来源于麻风分枝杆菌 TN 菌株的 sHSPs；

来源于结核分枝杆菌的 Hsp16.3；

来源于小梨形菌属的 IbpB；

来源于豌豆的 Hsp18.1；

来源于恶性疟原虫 3D7 的 sHSPs；

来源于铜绿假单胞菌 PA01 的 IbpA；

来源于恶臭假单胞菌 KT2440 的 IbpA；

来源于酿酒酵母菌的 Hsp26；

来源于 Salmonella enterica subsp.enterica serovar Typhi 的 IbpA 和 IbpB；

来源于鼠伤寒沙门菌 LT2 的 IbpA 和 IbpB；

来源于金属离子消耗菌 MR-1 的 IbpA；

来源于弗氏志贺菌 2a str.2457T 的 IbpA 和 IbpB；

来源于弗氏志贺菌 2a str.301 的 IbpA 和 IbpB；

来源于苜蓿根瘤菌 1021 的 IbpA；

来源于苜蓿根瘤菌质粒 pSymA 的 IbpA；

来源于化脓性链球菌的 IbpA；

来源于蓝色链霉菌的 A3(2) 的 sHSPs；

来源于硫叶菌的 sHSPs；

来源于喜热性聚球藻的 Hsp16；

来源于腾冲嗜热杆菌菌株 MB4T 的 IbpA；

来源于嗜酸热原体的 IbpA；

来源于鼠疫耶尔森氏菌 KIM 的 sHSPs，IbpA 和 IbpB；和

来源于鼠疫杆菌菌株 CO92 的 IbpA 和 IbpB。

2. 根据权利要求 1 的应用，其特征在于，上述来源于大肠杆菌 O157:H7 的 IbpA 和 IbpB 是来源于大肠杆菌 O157:H7EDL933 的 IbpA 和 IbpB。

3. 根据权利要求 1 的应用，其特征在于，所述小分子热休克蛋白是一种或多种选自如下的蛋白质：IbpA、IbpB 和 HSP26。

4. 含有有效量的小分子热休克蛋白的组合物在二维凝胶电泳中用于防止蛋白质被蛋白酶降解的应用，其中所述小分子热休克蛋白是一种或多种选自如下的蛋白质：

来源于根癌农杆菌 C58 的 IbpA；

来源于拟南芥的 sHSPs；

来源于慢生型大豆根瘤菌的 HspB，HspH，HspC 和 HspF；

来源于猪布鲁氏杆菌 1330 的 IbpA；

来源于桃蚜专性内共生菌质粒 pBPS1 的 sHSPs；

来源于豌豆蚜的桃蚜专性内共生菌菌株 APS 的 IbpA；

来源于柑桔速衰病病毒的 sHSPs；

来源于大肠杆菌 CFT073 的 IbpA 和 IbpB；

来源于大肠杆菌 K12 的 IbpA 和 IbpB；

来源于大肠杆菌 O157:H7 的 IbpA 和 IbpB；

来源于幽门螺旋杆菌 26695 的 IbpB；

来源于人的 Hsp27 和 α，β－晶体蛋白；

来源于詹氏甲烷球菌的 HSP16.5；

来源于甲烷嗜高热菌 AV19 的 IbpA；

来源于鼠的 Hsp25；

来源于麻风分枝杆菌 TN 菌株的 sHSPs；

来源于结核分枝杆菌的 Hsp16.3；

来源于小梨形菌属的 IbpB；

来源于豌豆的 Hsp18.1；

来源于恶性疟原虫 3D7 的 sHSPs；

来源于铜绿假单胞菌 PA01 的 IbpA；

来源于恶臭假单胞菌 KT2440 的 IbpA；

来源于酿酒酵母菌的 Hsp26；

来源于 Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi 的 IbpA 和 IbpB；

来源于鼠伤寒沙门菌 LT2 的 IbpA 和 IbpB；

来源于金属离子消耗菌 MR-1 的 IbpA；

来源于弗氏志贺菌 2a str. 2457T 的 IbpA 和 IbpB；

来源于弗氏志贺菌 2a str. 301 的 IbpA 和 IbpB；

来源于苜蓿根瘤菌 1021 的 IbpA；

来源于苜蓿根瘤菌质粒 pSymA 的 IbpA；

来源于化脓性链球菌的 IbpA；

来源于蓝色链霉菌的 A3(2) 的 sHSPs；

来源于硫叶菌的 sHSPs；

来源于喜热性聚球藻的 Hsp16；

来源于腾冲嗜热杆菌菌株 MB4T 的 IbpA；

来源于嗜酸热原体的 IbpA；

来源于鼠疫耶尔森氏菌 KIM 的 sHSPs，IbpA 和 IbpB；和

来源于鼠疫杆菌菌株 CO92 的 IbpA 和 IbpB。

5. 根据权利要求 4 的应用，其特征在于，上述来源于大肠杆菌 O157:H7 的 IbpA 和 IbpB 是来源于大肠杆菌 O157:H7EDL933 的 IbpA 和 IbpB。

6. 根据权利要求 4 的应用，其特征在于，所述小分子热休克蛋白是一种或多种选自如下的蛋白质：IbpA、IbpB 和 HSP26。

7. 一种用于蛋白质混合物的二维凝胶电泳的方法，其包括步骤：

向该蛋白质混合物中加入小分子热休克蛋白，以防止蛋白质被蛋白酶降解并获得具有更多斑点数目的凝胶；以及

将所述含有小分子热休克蛋白的蛋白质混合物进行二维凝胶电泳，

其中所述小分子热休克蛋白是一种或多种选自如下的蛋白质：

来源于根癌农杆菌 C58 的 IbpA；

来源于拟南芥的 sHSPs；

来源于慢生型大豆根瘤菌的 HspB，HspH，HspC 和 HspF；

来源于猪布鲁氏杆菌 1330 的 IbpA；

来源于桃蚜专性内共生菌质粒 pBPS1 的 sHSPs；

来源于豌豆蚜的桃蚜专性内共生菌菌株 APS 的 IbpA；

来源于柑桔速衰病病毒的 sHSPs；

来源于大肠杆菌 CFT073 的 IbpA 和 IbpB；

来源于大肠杆菌 K12 的 IbpA 和 IbpB；

来源于大肠杆菌 O157:H7 的 IbpA 和 IbpB；

来源于幽门螺旋杆菌 26695 的 IbpB；

来源于人的 Hsp27 和 α，β－晶体蛋白；

来源于詹氏甲烷球菌的 HSP16.5；

来源于甲烷嗜高热菌 AV19 的 IbpA；

来源于鼠的 Hsp25；

来源于麻风分枝杆菌 TN 菌株的 sHSPs；

来源于结核分枝杆菌的 Hsp16.3；

来源于小梨形菌属的 IbpB；

来源于豌豆的 Hsp18.1；

来源于恶性疟原虫 3D7 的 sHSPs；

来源于铜绿假单胞菌 PA01 的 IbpA；

来源于恶臭假单胞菌 KT2440 的 IbpA；

来源于酿酒酵母菌的 Hsp26；

来源于 Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi 的 IbpA 和 IbpB；

来源于鼠伤寒沙门菌 LT2 的 IbpA 和 IbpB；

来源于金属离子消耗菌 MR-1 的 IbpA；

来源于弗氏志贺菌 2a str.2457T 的 IbpA 和 IbpB；

来源于弗氏志贺菌 2a str.301 的 IbpA 和 IbpB；

来源于苜蓿根瘤菌 1021 的 IbpA；

来源于苜蓿根瘤菌质粒 pSymA 的 IbpA；

来源于化脓性链球菌的 IbpA；

来源于蓝色链霉菌的 A3(2) 的 sHSPs；

来源于硫叶菌的 sHSPs；

来源于喜热性聚球藻的 Hsp16；

来源于腾冲嗜热杆菌菌株 MB4T 的 IbpA；

来源于嗜酸热原体的 IbpA；

来源于鼠疫耶尔森氏菌 KIM 的 sHSPs，IbpA 和 IbpB；和

来源于鼠疫杆菌菌株 CO92 的 IbpA 和 IbpB。

8. 根据权利要求 7 的方法，其特征在于，上述来源于大肠杆菌 O157:H7 的 IbpA 和 IbpB 是来源于大肠杆菌 O157:H7EDL933 的 IbpA 和 IbpB。

9. 根据权利要求 7 的方法，其特征在于，所述小分子热休克蛋白是一种或多种选自如下的蛋白质：来自大肠杆菌的 IbpA、IbpB，来自假单胞菌的 IbpA，以及来自酿酒酵母的 HSP26。

10. 根据权利要求 7 的方法，其特征在于，所加入的小分子热休克蛋白的量的范围是，相对于 100 份重量的电泳样品总蛋白质来说，其占 0.1 到 50 份的重量。

11. 根据权利要求 10 的方法，其特征在于，所加入的小分子热休克蛋白的量相对于 100 份重量的电泳样品总蛋白质来说，占 0.5 到 20 份的重量。

12. 根据权利要求 7 的方法，其特征在于，所述蛋白质混合物是特定细胞中的总蛋白质。

13. 根据权利要求 12 的方法，其特征在于，所述特定细胞是原核或真核细胞。

14. 根据权利要求 13 的方法，其特征在于，所述原核细胞是大肠杆菌或假单胞菌种的微生物，所述真核细胞是来自于人类的细胞。

包括小分子热休克蛋白（sHSPs）用于防止蛋白质降解的组合物以及利用 sHSPs 的二维凝胶电泳方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于防止蛋白质降解的组合物，其中含有小分子热休克蛋白(sHSPs)，以及一种用于二维凝胶电泳的组合物。此外，本发明还涉及一种改进的二维凝胶电泳方法，其特征在于使用了 sHSPs。

背景技术

[0002] 随着人类基因组碱基序列的揭示以及大量微生物、低等动植物基因组信息的日益增加，蛋白质组学变成了下一代研究的焦点。

[0003] 蛋白质组学是一个系统研究蛋白质组的科学领域，其与基因组学有所不同。蛋白质组学表示的是基因组在特定条件下所表达蛋白质的种类和数量的完整信息。因而，蛋白质组学同时分析和鉴定了生物学现象中所涉及细胞或组织中的各种蛋白质。由于这种蛋白质组分析提供了在基因组计划或 DNA 研究中所不能发现的结果，因此人们进行研究以利用这种分析开发出用于成人疾病的诊断试剂和治疗试剂，这些疾病例如，癌症、糖尿病、痴呆、和心脏和循环系统疾病，以及精神疾病，也进行了研究以将其应用于诸如器官移植之类的领域。

[0004] 蛋白质组学研究中最普遍使用的核心技术是二维凝胶电泳技术。二维凝胶电泳技术是能够分离和定量细胞或组织中总蛋白质的最佳方法。

[0005] 二维凝胶电泳技术是这样一种方法，首先根据各种蛋白质的等电点 (pI) 将蛋白质混合物分离，再根据其分子量将各分离的样品在垂直方向上进一步地分离，使得分离的蛋白质在平面上呈二维分布。也就是说，分别使用了等电聚焦法 (IEF) 和十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE)。

[0006] 近来，开发出了利用 IEF 的二维凝胶，并且商业化的系统一个接一个地出现，大大提高了再现性，这曾是先前二维凝胶技术 (US 6,554,991 ;US2002/157954 ;US2002/133300 ;US6,416,644 ;US6,398,932 ;WO02/25259 ;US2001/032786 ;US2001/023826 ;US2001/015320 ;US6,245,206 ;US6,136,173 ;US6,123,821 ;US5,993,627 ;WO98/59092 ;和 WO02/90996) 中的一个难题。而且，二维凝胶中染色蛋白质和用蛋白酶切割蛋白质的步骤是利用自动化系统和计算机来执行的，这样就可以以方便而简单的方式处理样品。

[0007] 然而，还没有实现第一个步骤，即二维凝胶电泳的自动化。而且，由于在整个二维凝胶电泳过程中有蛋白质的损失，所以不可能完全分析出细胞或组织中的复杂蛋白质组。如果第一步中裂解了细胞，则随着蛋白酶从细胞中释放，会出现蛋白质的降解从而减少了蛋白质的总数量。

[0008] 因此，设计了以下的多种方法来抑制蛋白质分离过程中的蛋白酶攻击 :(1) 向样品中直接添加强变性剂 ;(2) 在低温或碱性条件下 (pH9 以上) 制备样品 ;以及 (3) 使用蛋白酶抑制剂。蛋白酶抑制剂的实例包括苯甲基磺酰氟 (PMSF)、氨乙基苯磺酰氟或 Pefabloc™

SC(AEBSF)、乙二胺四乙酸(EDTA)、苯甲脒、甲苯磺酰-L-赖氨酸氯甲基化酮(TLCK)、以及甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲基酮(TPCK)。然而,在这些方法中,不能够完全抑制蛋白质水解,并且样品的种类和来源十分不同,使得要根据经验来确定制备样品的最佳过程。

[0009] 同时,通过压力,如热激或过量产生某些蛋白质可引发 sHSPs,即具有 15-30kDa 低分子量的热休克蛋白(HSPs),并起到防止蛋白质降解的作用。一种或多种 sHSPs 存在于各种从真核细胞到原核细胞的所有微生物中,到现在为止已知的 sHSPs 在下表 1 中给出:

[0010] 表 1. 已知的 sHSPs

[0011]

来源	SHSPs
根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens str.)C58(U.Washington)	IbpA
拟南芥(Arabidopsis thaliana)	SHSPs
慢生型大豆根瘤菌(Bradyrbizobium japonicum)	HspB,HspH,HspC,HspF
猪布鲁氏杆菌(Brucella suis)1330	IbpA
桃蚜专性内共生菌质粒(Buchnera aphidicola plasmid)pBPS1	sHSPs
桃蚜专性内共生菌(Buchnera aphidicola)菌株 APS(豌豆蚜(Acyrthosiphon pisum)	IbpA
柑桔速衰病病毒(Citrus tristeza virus)	sHSPs
大肠杆菌(Escherichia coli)CFT073	IbpA,IbpB
大肠杆菌 K12	IbpA,IbpB
大肠杆菌 O157:H7EDL933	IbpA,IbpB
大肠杆菌 O157:H7	IbpA,IbpB
幽门螺旋杆菌(Helicobacter pylori)26695	IbpB
人	Hsp27,α,β-晶体蛋白

詹氏甲烷球菌(Methanococcus jannaschii)	HSP16.5
甲烷嗜高热菌(Methanopyrus kandleri)AV19	IbpA
鼠	Hsp25
麻风分枝杆菌(Mycobacterium leprae)TN 菌株	sHSPs
结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)	Hsp16.3
小梨形菌属(Pirellula sp.)	IbpB
豌豆(Pisum sativum)(pea)	Hsp18.1
恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)3D7	sHSPs
铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)PA01	IbpA
恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida)KT2440	IbpA
酿酒酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)	Hsp26
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi	IbpA，IbpB
鼠伤寒沙门菌(Salmonella typhimurium)LT2	IbpA，IbpB
金属离子消耗菌(Shewanella oneidensis)MR-1	IbpA
弗氏志贺菌(Shigella flexneri)2a str.2457T	IbpA，IbpB
弗氏志贺菌 2a str.301	IbpA，IbpB
苜蓿根瘤菌(Sinorhizobium meliloti)1021	IbpA
苜蓿根瘤菌质粒 pSymA	IbpA
化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)	IbpA
蓝色链霉菌(Streptomyces coelicolor)A3(2)	sHSPs

硫叶菌(Sulfolobus solfataricus)	sHSPs
喜热性聚球藻 Synechococcus vulcanus	Hsp16
腾冲嗜热杆菌(Thermoanaerobacter tengcongensis)菌株 MB4T	IbpA
嗜酸热原体(Thermoplasma acidophilum)	IbpA
鼠疫耶尔森氏菌(Yersinia pestis)KIM	sHSPs,IbpA,IbpB
鼠疫杆菌菌株 CO92	IbpA,IbpB

[0012] 这些 sHSPs 在进化过程中具有保守的区域,因而执行基本上类似的功能。然而,还不知道这些 sHSPs 能防止蛋白质的降解。

[0013] 因此,本发明者们进行了深入的研究,从而开发出一种防止蛋白质在二维凝胶电泳中降解的方法,并因而首次发现了 sHSPs 具有防止蛋白质降解的功效,而且如果利用这种 sHSPs 来进行二维凝胶电泳的话,可获得具有大大增加数目的蛋白质斑点的凝胶,从而实现本发明。

发明内容

[0014] 因此,本发明的一个主要目的是提供一种防止蛋白质降解的组合物。

[0015] 本发明的另一个目的是提供一种用在二维凝胶电泳中的组合物,通过它可以防止蛋白质降解并获得具有增多斑点的凝胶。

[0016] 本发明还有一个目的是提供一种二维凝胶电泳的方法,其中可防止蛋白质降解并获得具有更多斑点的凝胶。

[0017] 为达到上述目的,在一个实施例中,本发明提供了一种防止蛋白质降解的组合物,其中含有有效量的小分子热休克蛋白(sHSPs)。

[0018] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用在二维凝胶电泳中的组合物,其中含有有效量的 sHSPs。

[0019] 还有另一个实施例中,本发明提供了一种用于蛋白质混合物的二维凝胶电泳的方法,其包括步骤:向该蛋白质混合物中加入 sHSPs,以防止蛋白质降解并获得具有更多斑点数目的凝胶;将含有 sHSPs 的所述蛋白质混合物进行二维凝胶电泳。

[0020] 在另一个进一步的实施例中,本发明提供了一种通过二维凝胶电泳进行蛋白质组分析的方法,其特征在于使用了本发明的组合物。

[0021] 在本发明中,sHSPs 优选一种或多种选自表 1 中所列出的蛋白质,更优选一种或多种选自以下物质构成的组:包涵体相关蛋白 A(IbpA)、IbpB、IbpAB 和 HSP26。

[0022] 在本发明中,用在二维凝胶电泳方法中的蛋白质混合物优选是某些细胞的总蛋白质。所述某些细胞优选是原核或真核细胞。原核细胞优选是 E.coli 或假单胞菌种的微生物,真核细胞优选来自于人类的细胞。

[0023] 在本发明中，用以防止蛋白质降解所加入的 sHSPs 的量优选范围是，相对于 100 份重量的电泳样品总蛋白质来说，其占 0.1 到 50 份的重量，更优选在 0.5 到 20 份的重量。如果 sHSPs 以小于 0.1 份重量的量加入的话，则绝对不足以防止蛋白质降解，而如果其以大于 20 份重量的量加入的话，则过量的 sHSPs 要么会干扰一些被分离细胞的蛋白质分离，要么会对 sHSPs 的纯化成本造成不利的影响。

附图说明

[0024] 图 1 是质粒 pTac99IbpAH 的基因图谱。

[0025] 图 2 是质粒 pTac99IbpBH 的基因图谱。

[0026] 图 3 是质粒 pTac99$_{pp}$IbpAH 的基因图谱。

[0027] 图 4 是质粒 pTac99HSP26H 的基因图谱。

[0028] 图 5 是表示由重组质粒 pTac99IbpAH、pTac99IbpBH、pTac99$_{pp}$IbpAH 或 pTac99HSP26H 转化的重组 E.coli XL1-Blue 所表达的蛋白质 IbpA、IbpB、或 HSP26 的纯化结果。在 (A) 中，泳道 M 表示分子质量标准，泳道 1 和 2 表示纯化的 IbpA，泳道 3 和 4 表示纯化的 IbpB，泳道 5 和 6 表示纯化的 $_{pp}$IbpA。在 (B) 中，泳道 M 表示分子质量标准，泳道 1 到 3 表示纯化的 HSP26。

[0029] 图 6 表示转化的 E.coli WIB101 的二维凝胶电泳图，其中 IbpA 和 / 或 IbpB 在体内过表达。(A) 表示 E.coli WIB101(p184ΔCm)，(B) 表示 E.coli WIB101(pACTacIbpA)，(C) 表示 E.coli WIB101(pACTacIbpB) 以及 (D) 表示 E.coliWIB101(pACTacIbpAB)。

[0030] 图 7 表示纯化的 IbpA 和 IbpB 蛋白的二维凝胶电泳图。(A) 和 (B) 分别表示 IbpB 和 IbpA。

[0031] 图 8 表示在体外加入 IbpA、IbpB、或 HSP26 的 E.coli W3110 的二维凝胶电泳图。(A) 表示作为对照的 E.coli W3110，(B) 是向 E.coli W3110 加入 10μg IbpB 蛋白的情况，(C) 是向 E.coli W3110 加入 10μg IbpA 蛋白的情况，(D) 是向 E.coli W3110 加入 10μg 来自假单胞菌的 IbpA 蛋白的情况，以及 (E) 是向 E.coli W3110 加入 10μg 来自酿酒酵母的 HSP26 蛋白的情况。

[0032] 图 9 表示在体外加入 IbpA 的恶臭假单胞菌 KT2440 的二维凝胶电泳图。(A) 表示作为对照的恶臭假单胞菌 KT2440，以及 (B) 表示向恶臭假单胞菌 KT2440 加入 10μgIbpA 蛋白的情况。

[0033] 图 10 表示在体外加入 IbpA 的人血清的二维凝胶电泳图。(A) 表示作为对照的人血清，以及 (B) 表示向人血清加入 10μg IbpA 蛋白的情况。

具体实施方式

[0034] 在下文中将通过实施例进一步详细地说明本发明。然而对于本领域技术人员来说显然本发明并不仅限于这些实施例。

[0035] 特别地，这里的实施例意在说明来自 E.coli 的 IbpA 或 IbpB，来自假单胞菌的 IbpA，以及来自酿酒酵母的 HSP26 的 sHSPs，然而其应当记住的是表 1 中的 sHSPs 都可以无限制地用于本发明。

[0036] <u>实施例 1：制备含有 ibpA、ibpB 或 HSP26 基因的重组质粒</u>

[0037] 根据Sambrook等人的方法(Molecular Cloning，第二版，Cold Spring HarborLaboratory Press，NY,1989)分离并纯化E.coli W3110(ATCC 39936)、恶臭假单胞菌KT2440(ATCC 47054)和酿酒酵母的染色体DNA。

[0038] 在500mL LB(Luria-Bertani)介质中分别培养E.coli W3110、恶臭假单胞菌KT2440和酿酒酵母24小时。离心收集早期对数期的菌株，然后悬浮于50ml含有10mg/ml溶菌酶(Sigma Co.USA)的TE溶液中(10mM Tris,1mMEDTA,pH7.6)。将该菌株悬浮液在室温下缓慢震荡培养24小时。

[0039] 为了破碎菌株并去除蛋白质，向培养液中加入16ml10％的SDS(十二烷基磺酸钠)溶液和570μl 20mg/ml的蛋白酶K(Sigma Co.USA)，然后在37℃下反应一小时。

[0040] 接着，加入溶解于0.7M NaCl溶液中的14ml 5M的NaCl溶液和10.66ml10％的CTAB(十六烷基三甲基溴化铵，Sigma Co.USA)，然后在65℃下反应10分钟。之后，将与反应溶液相同体积的氯仿-异戊乙醇(24 ∶ 1)加入到反应溶液中，并在室温下小心混合2小时。将混合溶液在6000rpm下离心10分钟，将上清液转移到破碎仪中，向其中缓缓加入比上清液体积多两倍的冷却乙醇以沉淀染色体DNA。将沉淀的DNA缠绕在玻棒上。将该玻棒吹干以去除乙醇，并将染色体DNA溶解于1ml的TE溶液中。

[0041] 向DNA溶液加入RNase(Sigma Co.USA)至终浓度50μg/ml，然后在37℃下反应一小时。反应之后，将与反应溶液相同体积的氯仿-异戊乙醇(24 ∶ 1)加入到反应溶液中，并在室温下小心混合2小时。

[0042] 将混合溶液在6000rpm下离心10分钟，将上清液转移到破碎仪中，向其中缓缓加入比上清液体积多两倍的冷却乙醇以沉淀染色体DNA。将沉淀的DNA缠绕在玻棒上。将该玻棒吹干以去除乙醇，最后，将纯化的E.coli W3110、恶臭假单胞菌KT2440和酿酒酵母的染色体DNA分别溶解于1ml的TE溶液中。

[0043] 为了简易表达和纯化IbpA、IbpB、或HSP26蛋白，重组质粒pTac99IbpAH、pTac99IbpBH、pTac99$_{pp}$IbpAH和pTac99HSP26H构建如下。

[0044] 用E.coli W3110的染色体DNA作为模板，用SEQ ID NOs:1和2的引物和SEQ ID NOs:3和4的引物进行PCR，从而分别获得来自E.coli的ibpA-6his和ibpB-6his基因。

[0045] 此外，用恶臭假单胞菌KT2440的染色体DNA作为模板，用SEQ ID NOs:5和6的引物进行PCR，从而获得来自假单胞菌的$_{pp}$ibpA-6his基因。在恶臭假单胞菌KT2440的基因组中，ibpB基因还未知。

[0046] 用酿酒酵母的染色体DNA作为模板，用SEQ ID NOs:7和8的引物进行PCR，从而分别获得来自酿酒酵母的HSP26-6his基因。

[0047] 所有的PCR以下列条件进行:在95℃下初始变性5分钟;95℃下变性50秒、55℃退火一分钟、和72℃下延伸一分30秒，循环30次;最后在72℃下延伸5分钟。

[0048] 每个所获得的ibpA-6his、ibpB-6his、$_{pp}$ibpA-6his和HSP26-6his基因被插入到用EcoRI和HindIII切割的重组质粒pTac99A中，从而分别构建出质粒pTac99IbpAH、pTac99IbpBH、pTac99$_{pp}$IbpAH和pTac99HSP26H(图1、图2、图3&和图4)。

[0049] 重组质粒pTac99A获得如下:将pTrc99A(Pharmacia Biotech.,Uppsala,Sweden)的trc启动子转化到pKK223-3(Pharmacia Biotech.,Uppsala,Sweden)的tac启动子中。用限制酶PvuII和EcoRI切割pKK223-3的tac启动子，然后将tac启动子的基因片段插入

用相同限制酶切割的 pTrc99A 中。

[0050] SEQ ID NO :1 :5’-ggaattcatgcgtaactttg atttatccccg-3’

[0051] SEQ ID NO :2 :5’-cccaagcttt taatggtgatgatggtgatggttgatttcgatacggcgcgg-3’

[0052] SEQ ID NO :3 :5’-ggaattcatgcgtaacttcgatttatccccactg-3’

[0053] SEQ ID NO :4 :5’-ccaagcttttaatggtgatgatggtgatggctatttaacgcgggacgttcgct-3’

[0054] SEQ ID NO :5 :5’-ggaattcatgaccatgactactgctttc-3’

[0055] SEQ ID NO :6 :5’-cccaagcttttaatggtgatgatggtgatggttcagcgctggttttt-3’

[0056] SEQ ID NO :7 :5’-ggaattcatgtcatttaacagtccatttt-3’

[0057] SEQ ID NO :8 :5’-cccaagcttttaatggtgatgatggtgatggttaccccacgattcttgaga-3’

[0058] 实施例 2 :IbpA、IbpB、或 HSP26 蛋白的纯化

[0059] 将实施例 1 中制备的含有基因编码 IbpA、IbpB、或 HSP26 的重组质粒 pTac99IbpAH、pTac99IbpBH、pTac99$_{pp}$IbpAH 或 pTac99HSP26H 转化的重组 E.coli XL1-Blue(Stratagene,USA) 分别在含有 50mg/L amplicillin 的 LB 介质 (酵母提取物 5g/L,色氨酸 10g/L,NaCl 10g/L) 中培养。

[0060] 在 600nm 处的光密度 (OD) 为 0.7 的条件下加入 1mM IPTG(异丙基 -β- 硫代半乳糖苷) 来诱导 IbpA、IbpB、或 HSP26 蛋白的表达。诱导 4 小时后,取各培养溶液 1ml 并在 4℃和 6000rpm 下离心 5 分钟,用 0.5ml TE 溶液洗涤所获得的沉淀物一遍并在 4℃和 6000rpm 下离心 5 分钟以获得沉淀物。将沉淀物悬浮于 0.2ml 的平衡溶液 (尿素 8M,$NaH_2PO_4$100mM,Tris 10mM,pH8.0) 中,并进行超声波均质和分级。

[0061] 将上述上清液在 4℃和 10000rpm 下离心 10 分钟,收集上清液并通过用平衡溶液预先平衡过的 Ni-NTA 旋柱 (Qiagen,USA)。然后,将该溶液在 2000rpm 下离心 2 分钟。将 600μl 洗涤溶液 (尿素 8M,$NaH_2PO_4$100mM,Tris 10mM,pH6.3) 通过柱两遍。将 200μl 洗脱液 (尿素 8M,$NaH_2PO_4$100mM,Tris 10mM,pH4.5) 注入柱中以纯化 IbpA、IbpB、和 HSP26 蛋白。

[0062] 各取含有纯化的 IbpA、IbpB、或 HSP26 蛋白的溶液 200μl,与 50μlSDS-PAGE 样品溶液 (25%甘油、2% SDS、14.4mM 2- 巯基乙醇、0.1%溴酚蓝、60mM Tris-HCl) 混合。加热混合溶液 10 分钟并在 12%的分离胶中进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。接着,将凝胶浸泡在染色液 (40%甲醇、10%醋酸,0.25g/L 考马斯亮蓝 R) 中 2 小时以染色,并在脱色液 (40%甲醇、7%醋酸) 中浸泡两次,每次 2 小时以上,以进行脱色 (图 5)。

[0063] 图 5 是表示由重组质粒 pTac99IbpAH、pTac99IbpBH、pTac99$_{pp}$IbpAH 或 pTac99HSP26H 转化的重组 E.coli XL1-Blue 所表达的蛋白质 IbpA、IbpB、或 HSP26 的纯化结果。在图 5(A) 中,泳道 M 表示分子质量标准,泳道 1 和 2 表示纯化的 IbpA,泳道 3 和 4 表示纯化的 IbpB,泳道 5 和 6 表示纯化的 $_{pp}$IbpA。在图 5(B) 中,泳道 M 表示分子质量标准,泳道 1 到 3 表示纯化的 HSP26。如图 5 所示,纯化的 IbpA、IbpB、和 HSP26 蛋白的纯度几乎为 100%。

[0064] 实施例 3 :IbpA 和 / 或 IbpB 对用于蛋白质组研究的二维凝胶电泳的效果

[0065] 将已知的 IbpA 和 / 或 IbpB 表达质粒 pACTacIbpA、pACTacIbpB 或 pACTacIbpAB

和作为对照的质粒p184ΔCm分别引入到ibpAB基因缺失的突变体E.coli WIB101(PCT/KR03/01371)中,然后根据实施例2中描述的方法进行细胞培养。在600nm处的光密度(OD)为0.7的条件下加入1mM IPTG(异丙基-β-硫代半乳糖苷)来诱导IbpA和/或IbpB蛋白的表达。诱导4小时后,取各培养溶液1ml并在4℃和6000rpm下离心5分钟,将获得的沉淀物保存在-20℃下。

[0066] 用于各转化的E.coli的二维凝胶电泳实施如下。二维凝胶电泳是利用蛋白质的特性,即分子量和电荷差异来扩散细胞中的全部蛋白质的方法(Hochstrasser等,Anal. Biochm.,173:424-35,1988;Han等,J.Bacteriol.,183:301-8,2001)。

[0067] 这里的实施例是利用PROTEAN IEF细胞和PROTEAN II xi细胞(Bio-RadLaboratories Inc.,Herculules CA)进行的二维凝胶电泳。

[0068] 用于二维凝胶电泳的样品经以下方法的处理来制备。将培养液在4℃和6000rpm下离心5分钟,倒出上清液。然后将沉淀物的剩余介质用500μl的低钠缓冲液(KCl 3mM,$KH_2PO_4$1.5mM,NaCl 68mM,$NaH_2PO_4$9mM)洗涤。将沉淀物悬浮在100μl的细胞裂解缓冲液(尿素8M,CHAPS 4%(w/v),DTT65mM,Tris 40mM)中,在4℃和12000rpm下离心10分钟,从而获得全部蛋白质。

[0069] 用Bradford方法(Bradford MM,Anal.Biochem.,72:248-54,1976)将蛋白质称重。将200μg蛋白质溶解在340μl IEF变性溶液中(尿素8M,CHAPS0.5%(w/v),DTT 10mM,Bio-lyte pH 3-100.2%(w/v),溴酚蓝0.001%(w/v))并插入17cm的ReadyStrip™ IPG试纸条pH3-10(Bio-Rad Laboratories Inc.,Herculules CA)在20℃下水解12小时,然后进行等电聚焦。

[0070] 将试纸条在平衡缓冲液I(尿素6M,SDS 2%(w/v),Tris-HCl(pH8.8)0.375M,甘油20%(v/v),DTT 130mM)中摇晃大约15分钟,并再次在平衡缓冲液II(尿素6M,SDS 2%(w/v),Tris-HCl(pH8.8)0.375M,甘油20%(v/v),碘乙酰胺135mM,溴酚蓝3.5M)中摇晃15分钟。然后,根据分子量将该试纸条在聚丙烯酰胺凝胶上分离。

[0071] 通过银染试剂盒(Amersham Biosciences Uppsala,Sweden)染色蛋白质,并通过GS710Calibrated Imaging Densitometer(Bio-Rad Laboratories Inc.,Herculules CA)扫描二维凝胶。用Melanie软件(Bio-Rad Laboratories Inc.,Herculules CA)测定凝胶上蛋白质或斑点的数目(图6)。

[0072] 图6是转化的E.coliWIB101的二维凝胶电泳图,其中IbpA和/或IbpB在体内过表达。在图6中,(A)表示E.coli WIB101(p184ΔCm),(B)表示E.coli WIB101(pACTacIbpA),(C)表示E.coli WIB101(pACTacIbpB)以及(D)表示E.coli WIB101(pACTacIbpAB)。二维凝胶上的圆圈表示IbpA和/或IbpB蛋白。

[0073] 如图6所示,与从作为对照的E.coli WIB101(p184ΔCm)获得的凝胶相比,从转化的E.coliWIB101(pACTacIbpA)、WIB101(pACTacIbpB)或WIB101(pACTacIbpAB)获得了具有许多蛋白质斑点的二维凝胶。

[0074] 实施例4:IbpA、IbpB和HSP26对E.coli W3110二维凝胶电泳的效果

[0075] 根据实施例3中描述的方法进行E.coli W3110的二维凝胶电泳。首先,进行二维凝胶电泳以观察10μg纯化IbpA或IbpB蛋白的纯度(图7)。

[0076] 图7表示了纯化的IbpA或IbpB蛋白的二维凝胶电泳图。在图7中,(A)和(B)分

别表示 IbpB 和 IbpA。如图 7 所示，二维凝胶电泳的结果是，除了 IbpA 和 IbpB 蛋白之外没有其它的蛋白质存在。因此，说明 IbpA 和 IbpB 的纯度几乎为 100％。

[0077] 向 200μg 定量的 E.coli W3110 蛋白加入 IbpA、IbpB 和 HSP26 蛋白各 10μg，来进行二维凝胶电泳以观察 sHSPs 的效果（图 8）。用 200μg 定量的 E.coli W3110 作为对照。

[0078] 图 8 表示了 E.coli W3110 的二维凝胶电泳图。在图 8 中，(A) 表示作为对照的 E.coli W3110，(B) 是向 E.coli W3110 加入 10μg IbpB 蛋白的情况，(C) 是向 E.coli W3110 加入 10μg IbpA 蛋白的情况，(D) 是向 E.coli W3110 加入 10μg 来自假单胞菌的 IbpA 蛋白的情况，以及 (E) 是向 E.coli W3110 加入 10μg 来自酿酒酵母的 HSP26 蛋白的情况。如图 8 所示，观察到加了 IbpA、IbpB 和 HSP26 蛋白的二维凝胶电泳与已知的方法相比具有许多蛋白质斑点。

[0079] <u>实施例 5：IbpA 对假单胞菌的二维凝胶电泳的效果</u>

[0080] 根据实施例 3 中所述的方法对恶臭假单胞菌 KT2440 进行二维凝胶电泳。通过向 200μg 定量的恶臭假单胞菌 KT2440 蛋白加入 10μgIbpA 蛋白来进行二维凝胶电泳以观察 IbpA 的效果（图 9）。用 200μg 定量的恶臭假单胞菌 KT2440 蛋白作为对照。

[0081] 图 9 表示了恶臭假单胞菌 KT2440 的二维凝胶电泳图。在图 9 中，(A) 表示作为对照的恶臭假单胞菌 KT2440，以及 (B) 表示向恶臭假单胞菌 KT2440 加入 10μg IbpA 蛋白的情况。如图 9 所示，观察到加入 IbpA 蛋白的二位凝胶电泳具有许多蛋白质斑点。

[0082] <u>实施例 6：IbpA 对人血清的二维凝胶电泳的效果</u>

[0083] 根据实施例 3 中所述的方法对人血清进行二维凝胶电泳。通过向 200μg 定量的人血清蛋白加入 10μgIbpA 蛋白来进行二维凝胶电泳以观察 IbpA 的效果（图 10）。用 200μg 定量的人血清蛋白作为对照。

[0084] 图 10 表示了人血清的二维凝胶电泳图。在图 10 中，(A) 表示作为对照的人血清，以及 (B) 表示向人血清加入 10μg IbpA 蛋白的情况。如图 10 所示，观察到加入 IbpA 蛋白的二位凝胶电泳具有许多蛋白质斑点。

[0085] 工业实用性

[0086] 如上所述，本发明具有提供一种含有 sHSPs、可用于防止蛋白质降解的创造性组合物以及一种用于二维凝胶电泳的组合物的效果。而且，利用 sHSPs 如 IbpA、IbpB、IbpAB、HSP26 等，可防止二维凝胶电泳中蛋白质斑点的减少，从而获得具有大量蛋白质斑点的二维凝胶。因此，预计本发明可改进有关细胞中的蛋白质组的研究。

[0001]

PF-B0260.ST25

SEQUENCE LISTING

<110> 韩国科学技术院(KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> 包括小分子热休克蛋白（sHSPs）用于防止蛋白质降解的组合物以及利用sHSPs的二维凝胶电泳方法

<130> FP06KR096

<140> PCT/KR2003/002539
<141> 2003-11-24

<150> KR10-2003-0062756
<151> 2003-09-08

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 1
ggaattcatg cgtaactttg atttatcccc g 31

<210> 2
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 2
cccaagcttt taatggtgat gatggtgatg gttgatttcg atacggcgcg g 51

<210> 3
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 3
ggaattcatg cgtaacttcg atttatcccc actg 34

<210> 4
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 4
ccaagctttt aatggtgatg atggtgatgg ctatttaacg cgggacgttc gct 53

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

[0002]

PF-B0260.ST25

<400> 5
ggaattcatg accatgacta ctgctttc 28

<210> 6
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 6
cccaagcttt taatggtgat gatggtgatg gttcagcgct ggttttt 47

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 7
ggaattcatg tcatttaaca gtccatttt 29

<210> 8
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 8
cccaagcttt taatggtgat gatggtgatg gttaccccac gattcttgag a 51

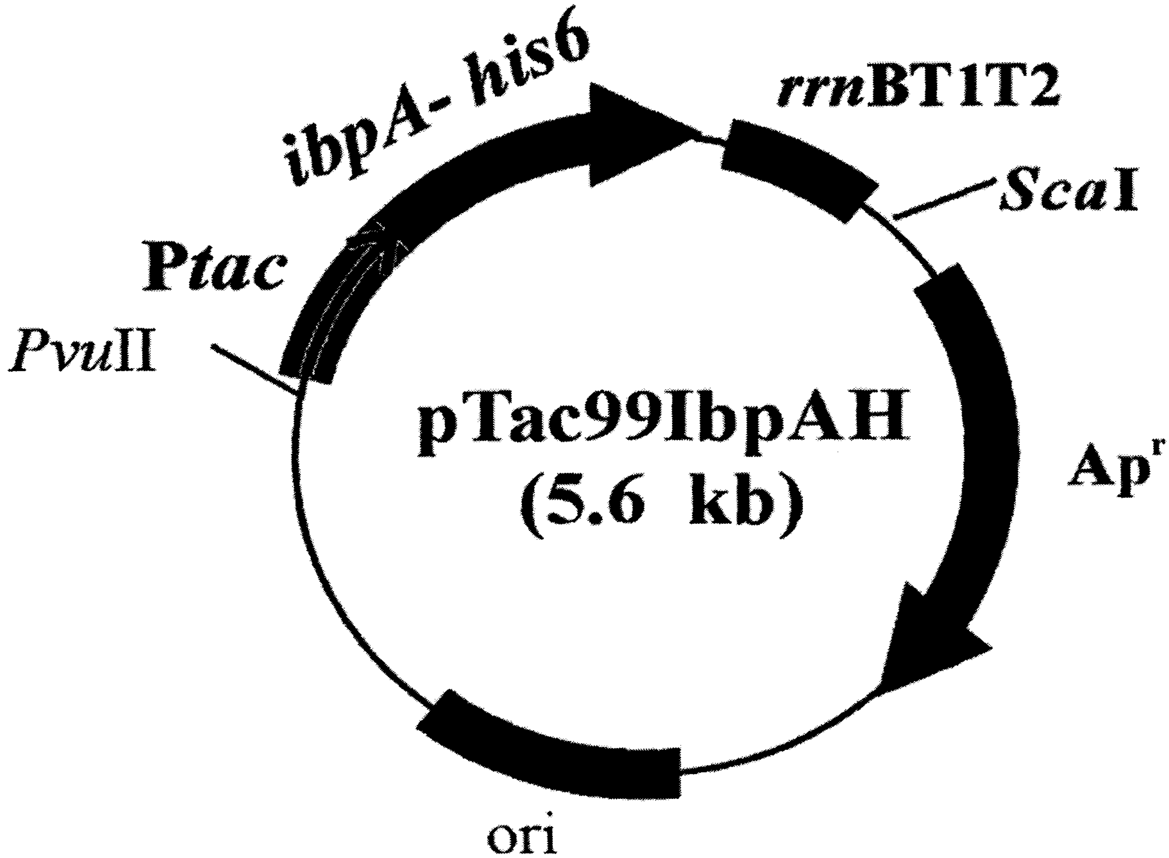

ibpA- his6
rrnBT1T2
ScaI
Ptac
PvuII
pTac99IbpAH
(5.6 kb)
Apr
ori

图 1

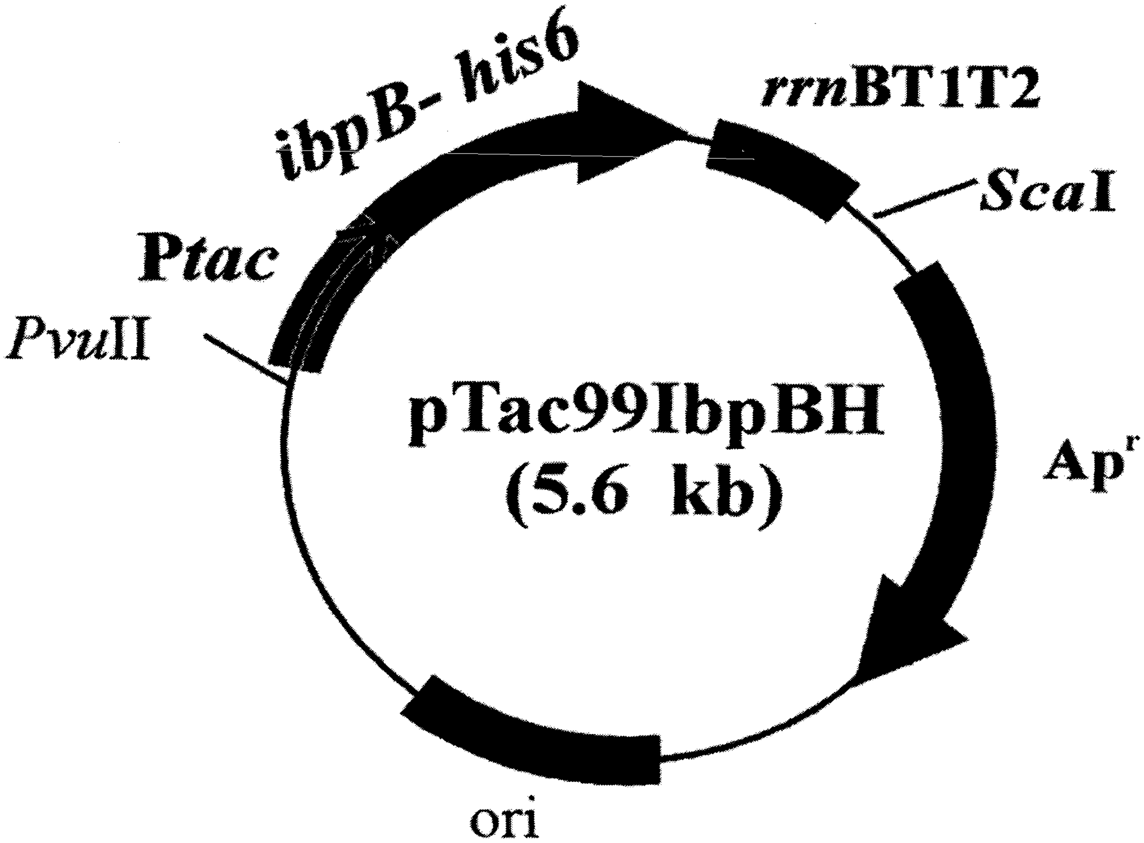

ibpB- his6
rrnBT1T2
ScaI
Ptac
PvuII
pTac99IbpBH
(5.6 kb)
Apr
ori

图 2

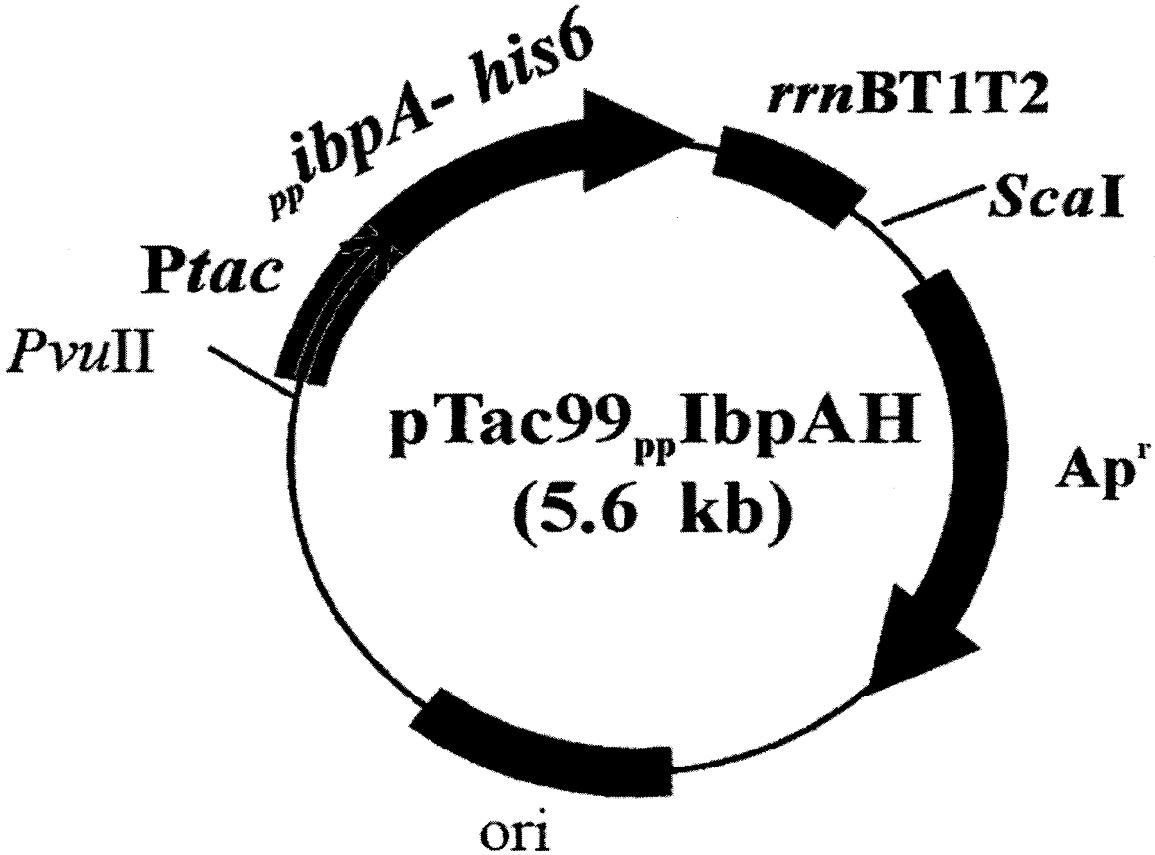

ppibpA- his6
rrnBT1T2
ScaI
Ptac
PvuII
pTac99ppIbpAH
(5.6 kb)
Apr
ori

图 3

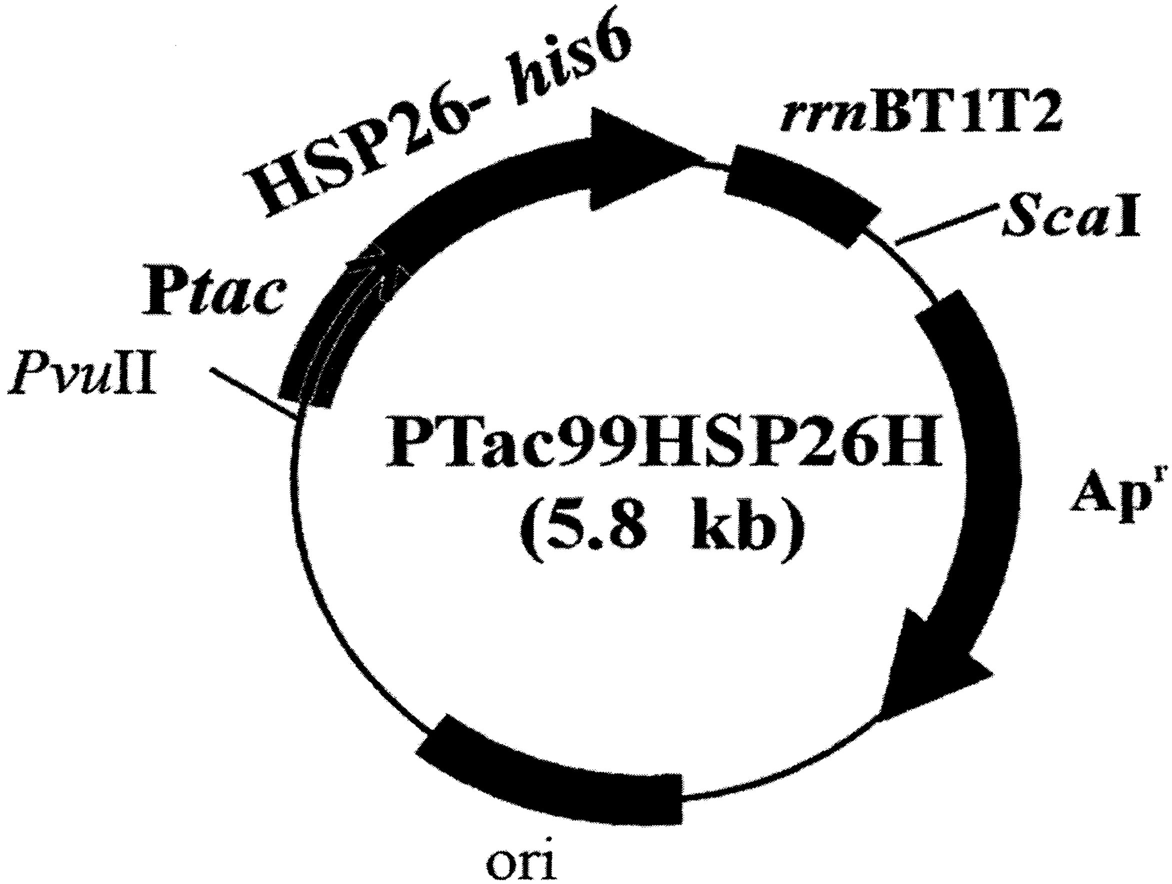

HSP26- his6
rrnBT1T2
ScaI
Ptac
PvuII
PTac99HSP26H
(5.8 kb)
Ap^r
ori

图 4

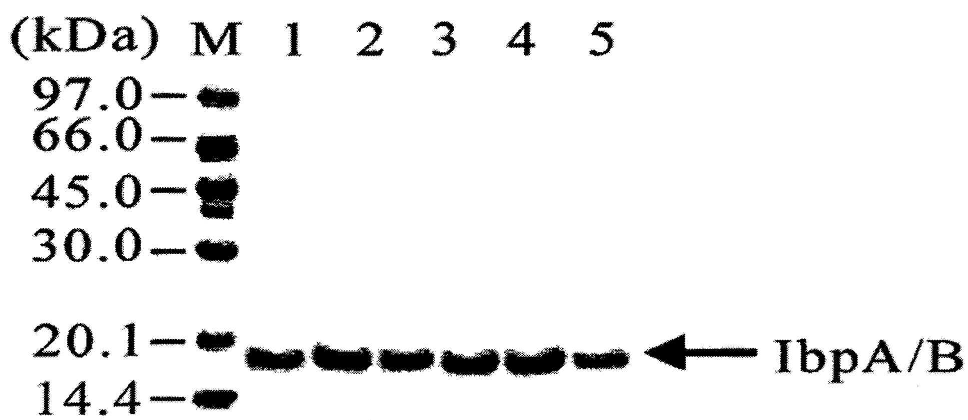

(kDa) M 1 2 3 4 5
97.0
66.0
45.0
30.0
20.1
14.4
IbpA/B

图 5A

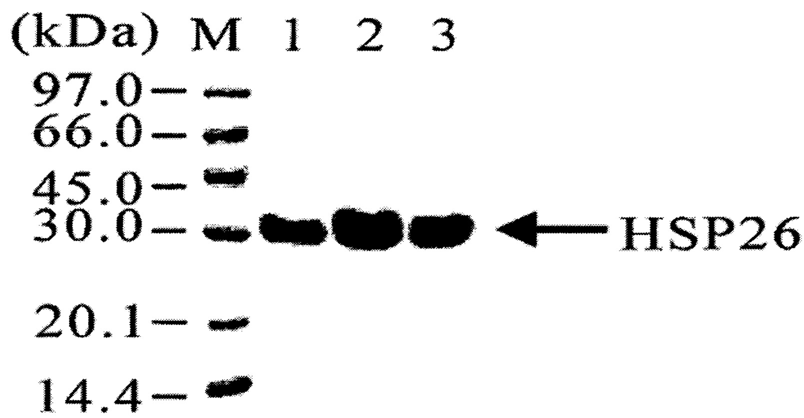


图 5B

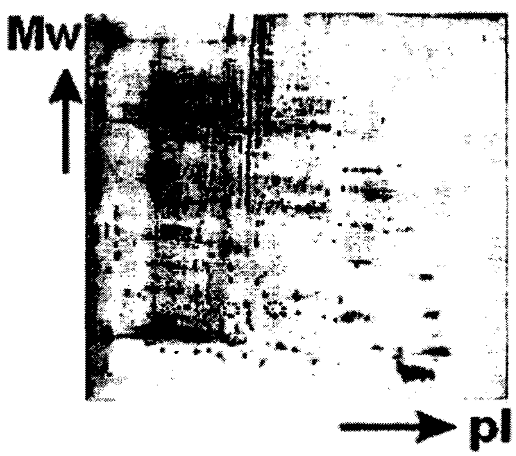


图 6A

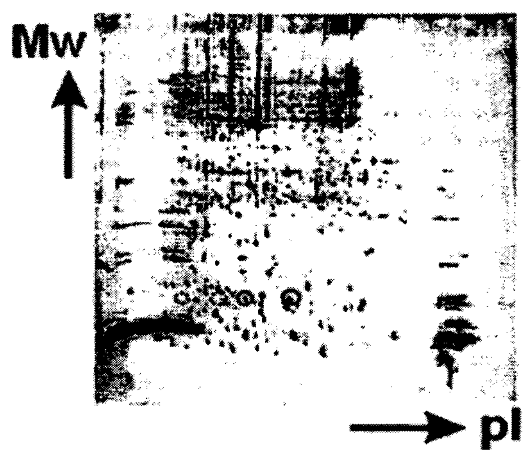


图 6B

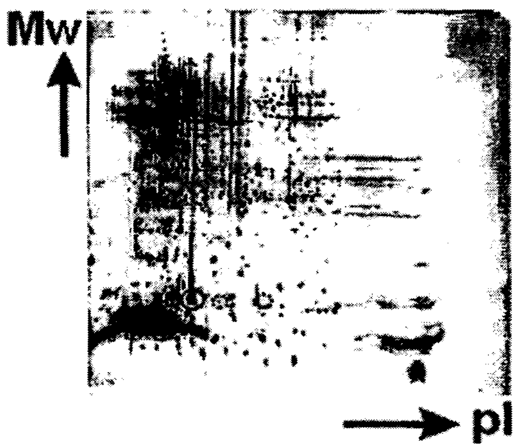


图 6C

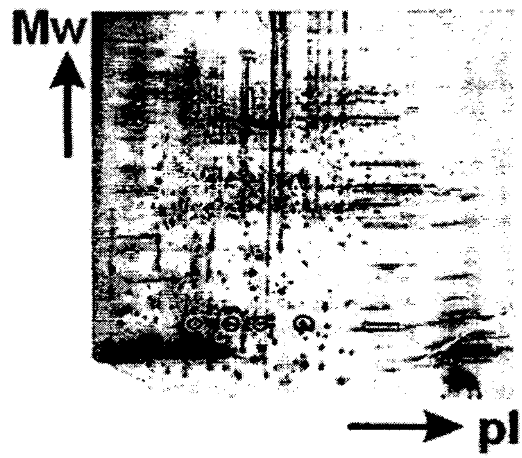


图 6D

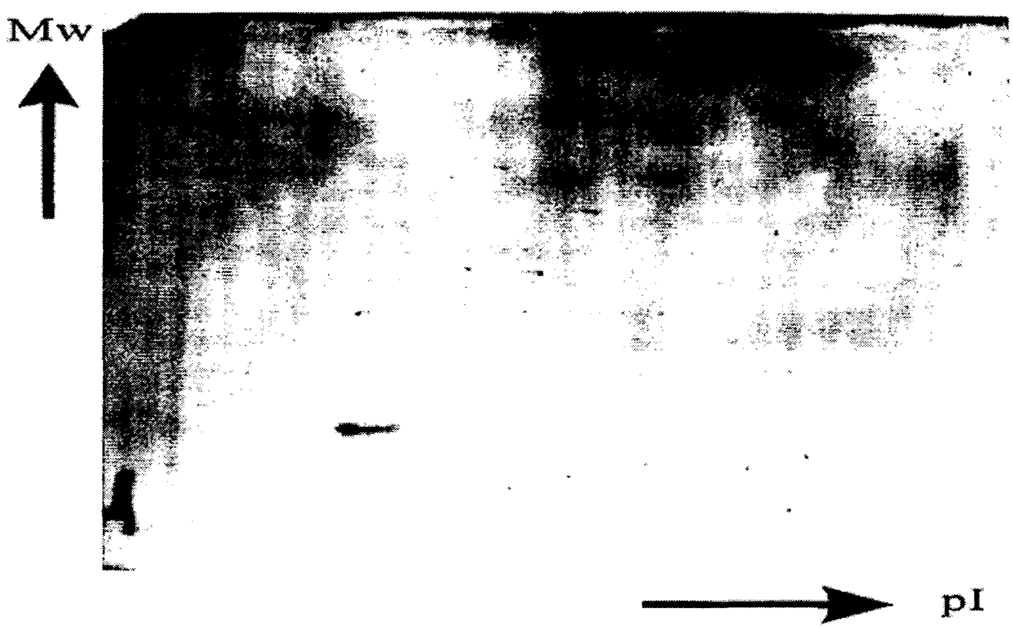


图 7A

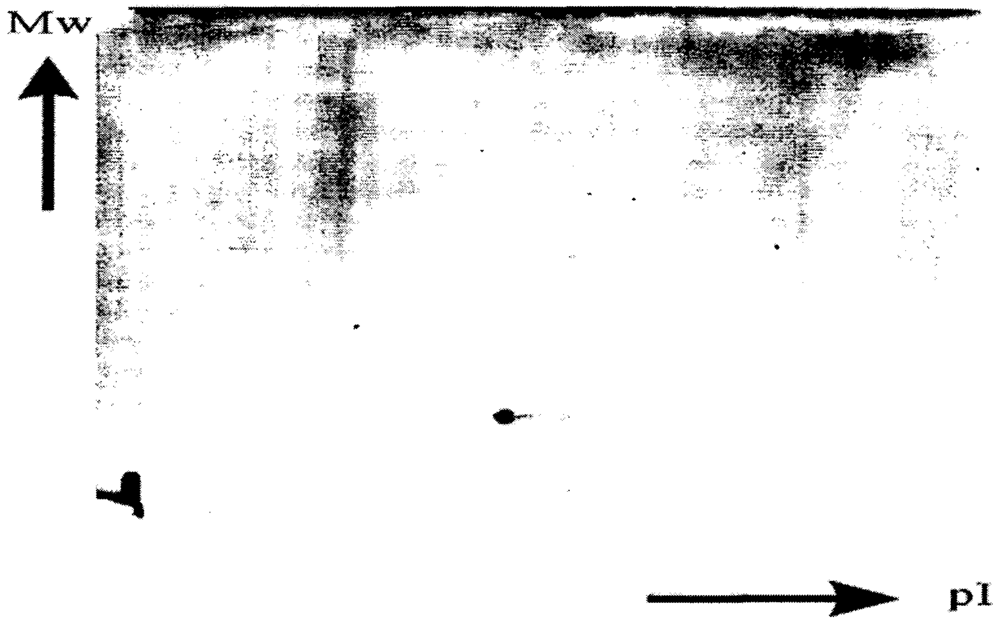


图 7B

图 8A

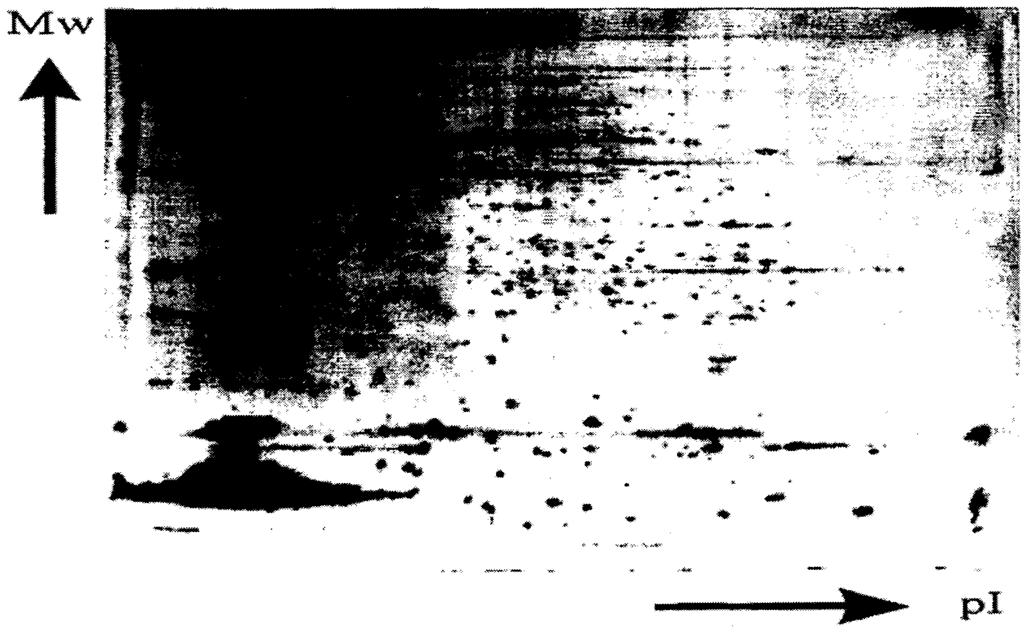


图 8B

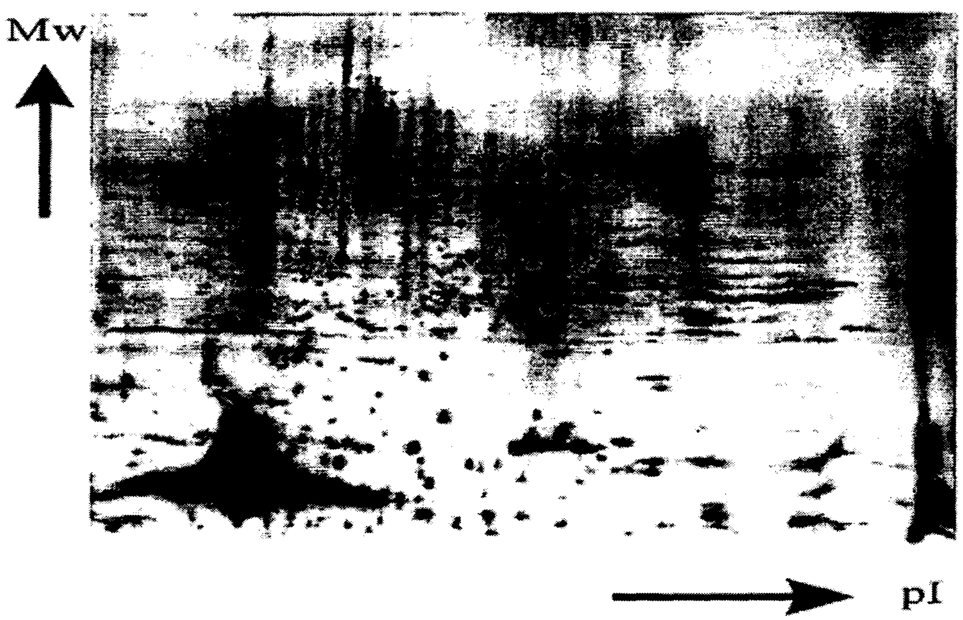


图 8C

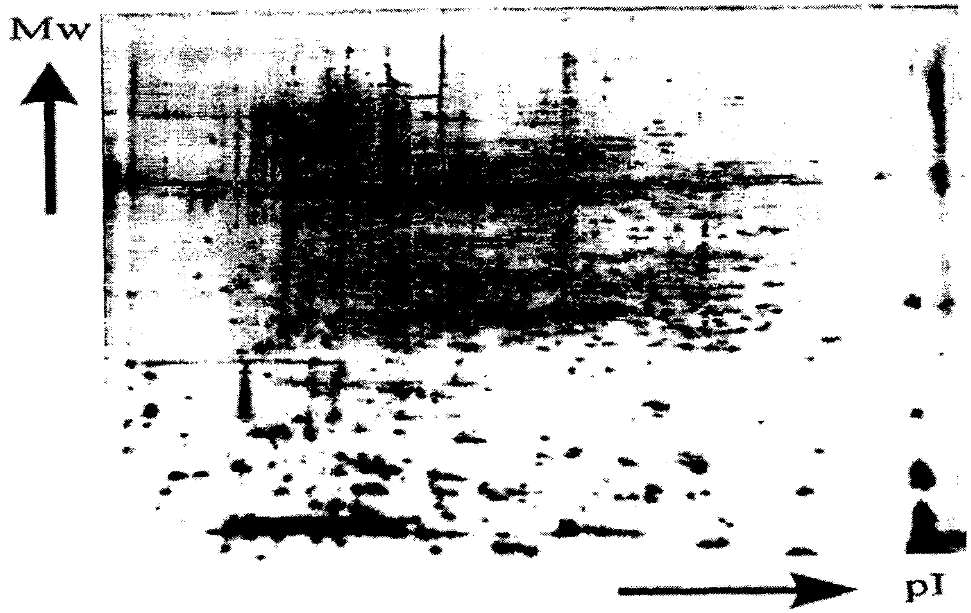


图 8D

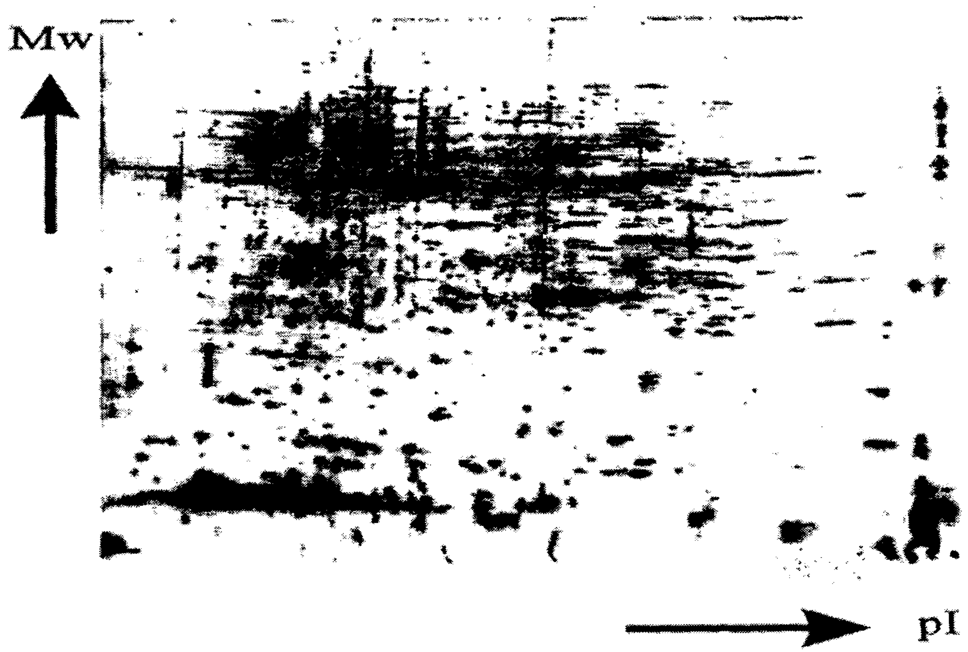


图 8E

图 9A

图 9B

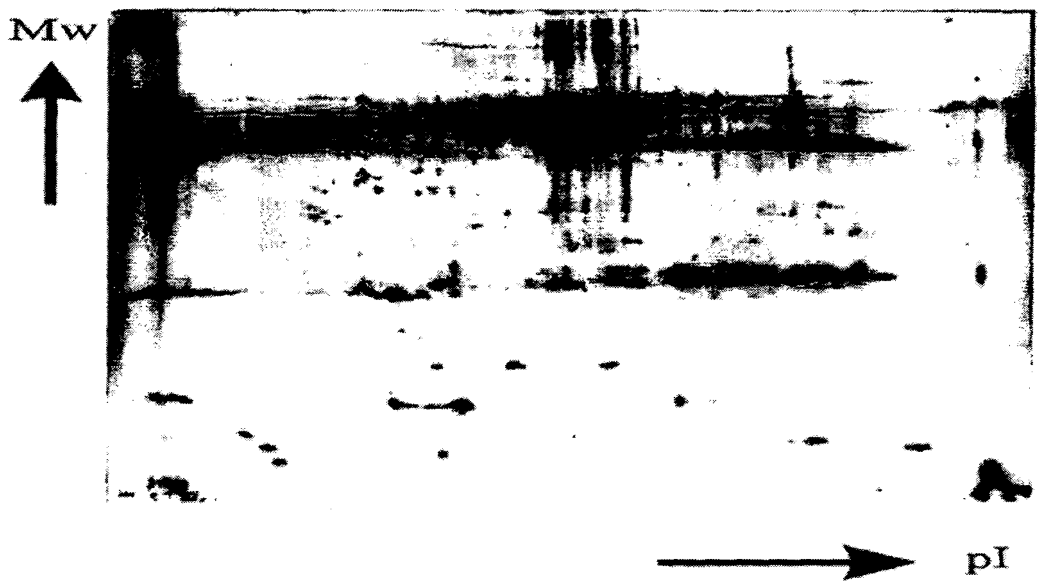


图 10A

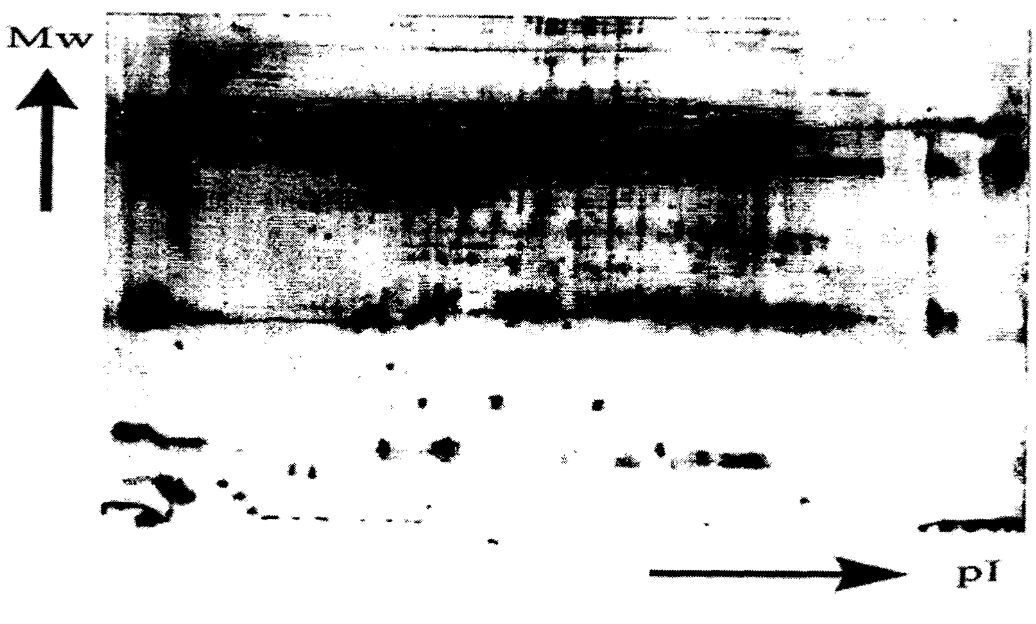


图 10B