



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103467604 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201310199128.0

(22)申请日 2013.05.27

(73)专利权人 兰州理工大学

地址 730050 甘肃省兰州市兰工坪287号

(72)发明人 张新国 张春生 李坤

(74)专利代理机构 兰州振华专利代理有限责任公司 62102

代理人 董斌

(51)Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61P 25/20(2006.01)

(56)对比文件

CN 1467224 A, 2004.01.14,

CN 102060913 A, 2011.05.18,

CN 101818167 A, 2010.09.01,

崔小进等. δ -睡眠肽与GFP融合蛋白的表达和纯化.《微生物学杂志》.2012,第32卷(第1期),33-36.

吴开智等.血清白蛋白作为药物载体的研究进展.《安徽医药》.2011,第15卷(第10期),1193-1194.

张兰馨等.穿膜肽TAT的表达与活性的初步研究.《军事医学科学院院刊》.2009,第33卷(第5期),431-437.

周闯等. Delta-诱眠肽的研究进展.《高等学校化学学报》.2004,第23卷(第4期),610-616.

审查员 李翠莹

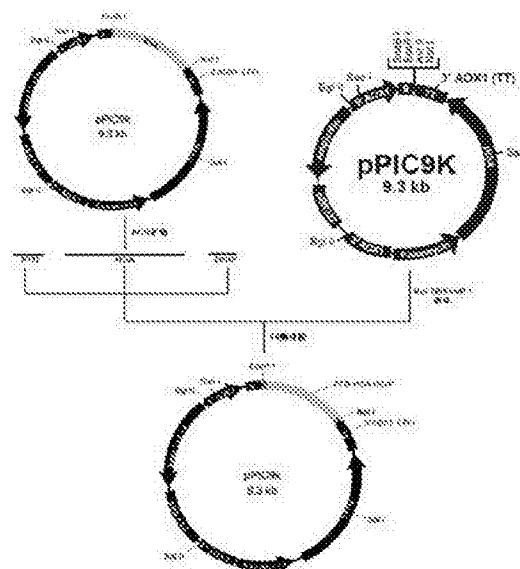
权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种睡眠肽融合蛋白及其应用

(57)摘要

一种睡眠肽融合蛋白及其应用,包括与序列表中SEQ ID No:1血清白蛋白或者与血清白蛋白至少85%序列同源的第一区,连接在血清白蛋白C-末端的与序列表中SEQ ID No:2睡眠肽或者与睡眠肽至少85%序列同源的第三区,和连接在血清白蛋白N-末端的与序列表中SEQ ID No:3传导肽或者与传导肽至少85%序列同源的第三区,所述的睡眠肽融合蛋白可以由上述的第一区,第二区和第三区同时连接构成,也可以由上述的第一区,第二区和第三区同时连接,且第一区与第二区由链接肽连接构成;在睡眠障碍疾病及失眠症治疗中的应用。



1. 一种睡眠肽融合蛋白,包括连接在序列表中SEQ ID No:1血清白蛋白C-末端的序列表中SEQ ID No:2睡眠肽,连接在序列表中SEQ ID No:1血清白蛋白N-末端的序列表中SEQ ID No:3传导肽,所述的睡眠肽融合蛋白由序列表中的SEQ ID No:1血清白蛋白,SEQ ID No:2睡眠肽和SEQ ID No:3传导肽同时连接构成,且SEQ ID No:1血清白蛋白与SEQ ID No:2睡眠肽由连接肽连接构成。

2. 根据权利要求1所述的睡眠肽融合蛋白,其特征是:所述睡眠肽融合蛋白包括与序列表中SEQ ID No:1相同氨基酸序列的血清白蛋白,连接在SEQ ID No:1血清白蛋白C-末端的与序列表中SEQ ID No:2相同氨基酸序列的睡眠肽和连接在SEQ ID No:1血清白蛋白N-末端的与序列表中SEQ ID No:3相同氨基酸序列的传导肽。

3. 根据权利要求1-2中任一权利要求所述的睡眠肽融合蛋白,其特征是:所述睡眠肽融合蛋白包括与序列表中SEQ ID No:1相同氨基酸序列的血清白蛋白,连接在SEQ ID No:1血清白蛋白的C-末端的与序列表中SEQ ID No:2相同氨基酸序列的睡眠肽和连接在SEQ ID No:1血清白蛋白N-末端的与序列表中SEQ ID No:3相同氨基酸序列的传导肽,且SEQ ID No:1相同氨基酸序列的血清白蛋白C-末端与序列表中SEQ ID No:2相同氨基酸序列的睡眠肽之间设有连接肽,连接肽的长度为5-50个氨基酸残基;通式是:[GIyGIyGIyGIySer]_n,n为1-10。

4. 根据权利要求1所述的睡眠肽融合蛋白,其特征是:表达睡眠肽融合蛋白的宿主是细菌、酵母、动物细胞、植物细胞以及含有权利要求1所述的睡眠肽融合蛋白基因序列的转基因动、植物。

5. 权利要求1-4中任一项所述的睡眠肽融合蛋白在制备通过改善睡眠时间治疗失眠症药物中的应用。

一种睡眠肽融合蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及用基因工程技术合成的一种新型的长效PHD/PHLD融合蛋白的制备及其应用,包括含有该基因的重组载体,以及用该载体转化的毕赤酵母宿主。

背景技术

[0002] 失眠是一种常见病,在社会节奏加快及竞争加剧的今天,失眠已经成为一种十分普遍的现象。据国内潘集阳教授的研究资料显示,中国家庭目前失眠症的已高达10%~20%。因此,开发有效、安全的抗失眠药物,已成为一项迫切的医疗和社会问题。

[0003] 临床常用具有镇静催眠作用的化学合成药物治疗失眠。现临床使用较多的是第二代苯二氮卓类和第三代非苯二氮卓类催眠药物,该类药物都不同程度的存在如头晕、头痛、困倦,乏力,呼吸抑制,肝功能损伤等不良反应,甚至较严重的耐药性和依赖性,并伴发反跳失眠现象,临床亟待更换。

[0004] 目前国内外有关新一代催眠药物的研究主要集中在第四代内源性催眠物质的研究上。睡眠肽是美国学者Monnier分离的内源性肽类化合物(Trp-Ah-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu),主要是通过体内阿片肽受体发挥催眠效应。由于睡眠肽疗效确切,而且分子量较小,关于人工合成睡眠肽及其更高活性类似物的研究也是目前睡眠肽研究的一个主要的方向。尽管睡眠肽作为一个九肽,其人工合成相对容易,随着现在多肽合成工艺的成熟,甚至进行产业化都不存在问题,但是DSIP作为一种低分子量的小肽,其在体内的半衰期极短,体内清除较快,因此进行人工合成的九肽,并不能从根本上解决睡眠肽在临床的实际应用问题。也有学者将DSIP基因导入大肠杆菌获得表达,然而,小分子量的肽,表达发酵后,产物的分离纯化极其困难。近年也有Tsuzuki等将其与一系列蛋白酶进行融合表达,并用等电点法分离得到纯品,但该方法的成本较高,不仅需要酶切,而且后纯化困难,因而在应用上受到限制,用基因工程的方法并没有解决睡眠肽的实际临床应用问题。

[0005] 采用基因工程方法表达PHD/PHLD是一种简洁有效的途径。生物工程技术的成熟使得PHD/PHLD在不同工程菌中的表达不存在技术障碍,这一点从国内外文献中关于其在不同工程菌中的成功表达的报道中不难发现,但是作为小分子蛋白其表达后往往纯化困难,难以实现产业化,这也是目前该药的临床应用主要来源于固相人工合成的主要原因。但是这种方法表达的融合蛋白应用于工业成本较高。

发明内容

[0006] 本发明目的是提供本发明一种新型睡眠肽PHD/PHLD融合蛋白的蛋白质序列和基因序列。

[0007] 本发明的再一个目的是提供表达本发明一种新型睡眠肽PHD/PHLD蛋白编码基因的宿主。本发明的宿主可以是被重组表达载体或重组表达载体的一部分转化,含有本发明的一种新型睡眠肽PHD/PHLD蛋白编码基因的细菌、酵母、动物细胞或植物细胞以及含有本发明融合蛋白基因序列的转基因动、植物;其中优选的是酵母,更优选的是毕赤酵母,最优

选的是GS115。

[0008] 本发明是一种睡眠肽融合蛋白及其应用,睡眠肽融合蛋白,包括与序列表中SEQ ID No:1血清白蛋白或者与血清白蛋白至少85%序列同源的第一区,连接在血清白蛋白C-末端的与序列表中SEQ ID No:2睡眠肽或者与睡眠肽至少85%序列同源的第三区,和连接在血清白蛋白N-末端的与序列表中SEQ ID No:3传导肽或者与传导肽至少85%序列同源的第三区,所述的睡眠肽融合蛋白可以由上述的第一区,第二区和第三区同时连接构成,也可以由上述的第一区,第二区和第三区同时连接,且第一区与第二区由链接肽连接构成。

[0009] 本发明的睡眠肽融合蛋白,在睡眠障碍疾病及[b1] 治疗中的应用。

[0010] 本发明提供的一种新型睡眠肽PHD/PHLD融合蛋白适用于毕赤酵母中表达,构建的载体整合至毕赤酵母的基因组中,十分稳定,不易丢失。毕赤酵母具有许多高等真菌细胞表达系统所具有的优点,能进行蛋白质的加工和折叠,转录后的修饰,而且易于大规模培养,实现高密度发酵。与其他的表达系统如哺乳动物细胞培养相比具有更简洁、快速表达和产量更高的优点。毕赤酵母能以甲醇为唯一碳源进行代谢,含有是可控的醇氧化酶强启动子,重组蛋白表达高。此外,毕赤酵母表达的重组蛋白高效分泌到细胞外的培养液中,避免了由酵母细胞抽提物中分离纯化蛋白的难题,不但提高表达蛋白的活性,而且非常有利于重组蛋白的纯化,纯化步骤简洁高效,同时酵母分泌的蛋白仅占全部酵母蛋白的很小部分,终产品无毒性,利于临床使用。

[0011] 本发明的一种新型睡眠肽PHD/PHLD蛋白,编码人血清白蛋白、PTD和DSIP的DNA序列可以用PCR,RT-PCR方法、人工合成的方法和构建筛选cDNA文库等本领域周知的方法获得。其中上述方法所采用的的mRNA或cDNA可以来源于任何含有相应mRNA或cDNA的组织(细胞)和文库等。对多聚核苷酸进行的突变、缺失、插入以及其他多聚核苷酸链接,可用本领域公知的方法。可以用PCR等方法,在编码序列的两侧引入限制性内切酶识别位点,进行编码白蛋白和编码PTD和DSIP的多聚核苷酸的融合,通过酶切产生粘性末端用DNA连接酶连接后从而获得编码融合蛋白的基因。

[0012] 本发明的一种新型睡眠肽PHD/PHLD融合蛋白的表达载体和其对应的宿主可以是,如酵母表达载体pPIC9,pPIC9K,pPIC3.5K,pA0815,pPICZ α ,pHIL-S1,pGAPZ,pPICZ等,动物细胞表达载体pSVK3,pMSG等,这些质粒及对应的宿主菌等可以从商业公司购得。其中优选的质粒为带有His4选择性标记的酵母整合型质粒,如pPIC9,pPIC9K等,通过将编码本发明的新型的长效PHD/PHLD蛋白或多肽的核酸克隆到这些酵母表达载体中。优选的启动子为醇氧化酶AOX1。

[0013] 本发明一种新型睡眠肽PHD/PHLD融合蛋白的表达宿主可以是细菌、酵母、动物细胞或植物细胞以及含有本发明融合蛋白基因序列的转基因动、植物等。融合蛋白或多肽的表达可以是胞内,也可以分泌至表达宿主胞外的培养液中。优选的表达方式是分泌至培养液中,形成可溶性的蛋白。

[0014] 本发明的一种新型睡眠肽PHD/PHLD蛋白可以经白蛋白天然信号肽分泌到酵母菌的培养液中。含有人血清白蛋白的融合蛋白的多肽可以由信号肽主导并通过分泌途径而得到加工。分泌所用的信号肽,优选的是天然的人血清白蛋白的信号肽,或酿酒酵母配对因子 α 因子,或这两种信号肽的类似物。融合蛋白也可以不用信号肽,而在酵母中以胞内可溶形式表达。编码融合蛋白的核酸,可以插入至宿主染色体,或以游离质粒形式存在。

[0015] 宿主细胞可以利用周知的方法经遗传工程(转导或转化或转染)将携带由本发明融合蛋白核苷酸序列的质粒载体以侵入方式、病毒感染“噬菌体”等形式转入到宿主中表达。其中转化融合蛋白核苷酸序列至宿主细胞中去可用周知的方法,如:电穿孔,制备感受态的原生质体,化学转化等。成功转化并含有本发明融合蛋白核苷酸序列构建体的细胞,可通过常用的方法进行鉴定,如提取DNA,然后PCR方法鉴定。或者收集细胞破碎液或胞外培养液中的蛋白,用抗白蛋白抗体或抗DSIP抗体进行ELISA检测鉴定。

[0016] 本发明的一种新型睡眠肽PHD/PHLD融合蛋白的生产,可以通过培养含有本发明核苷酸序列构建体的宿主菌体如,重组酵母,细菌,动、植物细胞,转基因动植物等获得。宿主菌体(或细胞)的培养可以是人们熟知的方法,如用摇瓶或生物反应器等,生产时优选的为生物反应器。适合菌体(或细胞)生长和产物表达的培养基,应通过实验获得,应能提供菌体(或细胞)生长表达产物所需的氮源、碳源、pH缓冲成分,无机盐,微量元素等。

[0017] 本发明的一种新型睡眠肽PHD/PHLD融合蛋白的纯化处理,其中包括如盐析、沉淀、液相层析、等技术及这些技术的组合。其中液相层析可以用凝胶排阻、亲和、离子交换、疏水、反相等层析技术。

[0018] 通过本发明获得的一种新型睡眠肽PHD/PHLD融合蛋白。能够使其在不丧失激活受体和刺激机体增强相关应答功能的情况下,血浆中的半衰期将会得到显著的延长。这样就会降低了给药频率和剂量,却发挥出与DSIP相似的药效作用。

[0019] 本发明的一种新型睡眠肽PHD/PHLD融合蛋白及其衍生物可以单独以纯品使用,也可以与一个或多个药学上可以接受的载体一起组成药物制剂的形式使用,其中优选的是组成药物制剂,并可通过任何本领域已知的方法制备。常用的药物载体一般为水、盐水、糖类、醇类或氨基酸。药物制剂可以单位剂量的形式存在,优选的药物制剂包含含水的液体制剂和含水量低于10%或不含水的冻干制剂。这些制剂可以含有缓冲剂,盐类,糖类等,使药物的渗透性与受体血液中的渗透性相等或相似。

[0020] 本发明的一种新型睡眠肽PHD/PHLD融合蛋白及其衍生物或其药物组合物可以用于哺乳动物,优选的是人类,可以通过任何已知的方法,包括但不限于口服、注射、皮下或经非肠胃,腹腔膜内、静脉内、动脉内、静脉输注、舌下、吸入、肌肉、肠内、唾液腺、鼻内、脂质法等方法给药。优选的方法为口服、静脉输注或注射给药。治疗包括在一段时间内使用单一剂量或复合剂量。

[0021] 本发明的一种新型睡眠肽PHD/PHLD融合蛋白及其衍生物或其药物组合物,可作为改善睡眠药物[b2]。

[0022] 人血清白蛋白是机体正常存在的大分子蛋白,不具有酶学和免疫学特性,也是很多药物的理想载体,本发明采用将DSIP与人血清白蛋白融合表达,无需酶切即得到大分子的具有生物活性的重组蛋白,易于纯化,而且DSIP的半衰期得到延长。

附图说明

[0023] 图1 是质粒pPIC9K/PTD-HSA-DSIP的构建过程,图2是质粒pPIC9K/PTD-HSA-(GIy₄Ser)₃-DSIP的构建过程,图3是重组融合蛋白的分离纯化结果,其中泳道1-10分别为:1-牛血清白蛋白;2-PHD发酵上清;3-DEAE分离;4-疏水分离;5-蓝色葡聚糖分离;6-牛血清白蛋白;7-PHLD发酵上清;8-蓝色葡聚糖分离;9-疏水分离;10-DEAE分离。

具体实施方式

[0024] 本发明是一种睡眠肽融合蛋白及其应用,睡眠肽融合蛋白,包括与序列表中SEQ ID No:1血清白蛋白或者与血清白蛋白至少85%序列同源的第一区,连接在血清白蛋白C-末端的与序列表中SEQ ID No:2睡眠肽或者与睡眠肽至少85%序列同源的第三区,和连接在血清白蛋白N-末端的与序列表中SEQ ID No:3传导肽或者与传导肽至少85%序列同源的第三区,所述的睡眠肽融合蛋白可以由上述的第一区,第二区和第三区同时连接构成,也可以由上述的第一区,第二区和第三区同时连接,且第一区与第二区由链接肽连接构成。

[0025] 根据以上所述的睡眠肽融合蛋白,所述睡眠肽融合蛋白包括与序列表中SEQ ID No:1血清白蛋白氨基酸序列相同的第一区,连接在血清白蛋白C-末端的与序列表中SEQ ID No:2睡眠肽氨基酸序列相同的第二区和连接在血清白蛋白N-末端的与序列表中SEQ ID No:3传导肽氨基酸序列相同的第三区,或者上述三区的功能等同物;所述功能等同物是在不改变所述融合蛋白特性的前提下,对融合蛋白个别氨基酸残基的取代、缺失或加入得到的多肽。

[0026] 根据以上任何一项所述的睡眠肽融合蛋白,所述与序列表中SEQ ID No:1血清白蛋白氨基酸序列相同的第一区,与连接在血清白蛋白的C-末端的与序列表中SEQ ID No:2睡眠肽同源的第三区,和连接在血清白蛋白N-末端的与序列表中SEQ ID No:3传导肽氨基酸序列相同的第三区,血清白蛋白同源的第一区与连接在血清白蛋白C-末端的序列表中SEQ ID No:2睡眠肽同源的第三区之间设有连接肽,连接肽的较优选的长度为2-100个氨基酸残基,更优选的连接肽的长度为5-50个氨基酸残基;其中优选的连接肽的通式是: [GIyGIyGIyGIySer]_n, n为1-10的整数,更优选的是1-5。

[0027] 根据以上所述的新型长效睡眠肽,表达融合蛋白的宿主是细菌、酵母、动物细胞、植物细胞以及含有本发明融合蛋白基因序列的转基因动、植物;优选的是酵母,更优选的是毕赤酵母,最优选的是GS115。

[0028] 根据以上任何一项所述的睡眠肽融合蛋白,在睡眠障碍疾病及失眠症治疗中的应用。

[0029] SEQ ID NO:1 为PHD融合蛋白的基因序列,SEQ ID NO:2 为PHLD融合蛋白的基因序列,SEQ ID NO:3为连接肽序列。

[0030] 下面用实施例进一步展开本发明。

[0031] 实施例1:HSA cDNA的克隆构建:

[0032] 提取的人肝脏组织mRNA,将100mg人肝脏组织直接放入研钵中,加入少许液氮,迅速研磨,待组织变软,再加少量液氮,再研磨,如此三次,加TRIzol试剂1ml,转入离心管,室温放置5min。4℃(12000g)离心10min,取上清。加入0.2ml氯仿,盖紧离心管盖,手摇剧烈震荡15s,然后冰浴放置15min,于4℃(12000g)离心15min,RNA存于上层水相中。转移水相至另一个干净的离心管中,加异丙醇0.5ml,混匀,室温放置10min以沉淀RNA,然后于4℃(12000g)离心10min。移去上清液,加75%乙醇1ml洗涤沉淀,经漩涡振荡,然后于4℃(7500g)离心5min,回收RNA沉淀。移去上清液,将离心管置空气中干燥,挥去乙醇,沉淀用50μl无核糖核酸酶(Rnase)的水(焦碳酸二乙酯处理)溶解,65℃放置15min使变性,立即置冰上备用或冻于-70℃冰箱中保存。肝组织总RNA2μl,水4μl,随机引物4μl,总体积20μl振荡混匀,在

反转录酶的作用下合成相应的DNA。

[0033] 按照GENBANK中的人血清白蛋白成熟肽序列合成引物,上下游引物分别引入HindIII和XhoI的酶切位点和保护碱基。

[0034] 上游引物序列:5'-ATGCGAATTCGATGCACAAGAGTGAGGTT-3'

[0035] 下游引物序列:5'-ATGCCTTAAGTAAGCCTAAGGCAGCTTGACT-3'

[0036] 引物委托上海生工生物公司合成。PCR方法为:100 μ I反应体系中加入 1.5 μ I的肝组织cDNA, 20 μ mol/L的上下游引物各 1.5 μ I, 2mmol/L的dNTP, 10 μ I, 10 $\times$ 反应缓冲液10 μ I, TaqDNA聚合酶 5U, (dNTP、反应缓冲液、Taq DNA聚合酶均为上海生工生物科技有限公司产品)。用Bio-Rad公司的PCR仪, PCR条件为94 $^{\circ}$ C预变性5分钟, 94 $^{\circ}$ C变性40秒, 54 $^{\circ}$ C退火45秒, 72 $^{\circ}$ C延伸3分钟, 循环30次。通过凝胶电泳分析反应物显出预期大小(约1.8kb)的条带, PCR产物用PCR产物回收纯化试剂盒纯化回收。取纯化的HSA cDNA 3 μ I, 加入1 MPUCM-T载体, 5 μ I 2 $\times$ 反应缓冲液, 1 μ I T4 DNA连接酶催化连接, 连接产物转化大肠杆菌DH5 α 后, 辅于x-gal、IPTG和氨苄青霉素(100 μ g/ μ L)的LB琼脂平板, 挑选阳性克隆, 抽提质粒, 酶切鉴定, 所得阳性克隆委托上海生工生物公司测序, 测序结果与已公布的序列一致。

[0037] 实施例2:PTD-HAS-DSIP(PHD)目的基因的构建:

[0038] 以实施例1中获得的质粒为模板, 引物可用

[0039] P上:5'-GAATTCTACGGTCGTAAGAAAAGAAGACAACGTAGACGTGATGC

[0040] ACACAAGAGTGAG -3'

[0041] P下: 5'- GCGGCCGCTTATTCTCCAGAAGCATCACCAACAGCCCATTAAGCCT

[0042] AAGGCAGCTTG-3'

[0043] 引物委托上海生工生物公司合成。PCR方法为:在100 μ I反应体系中加入 2 μ I的pPIC9K/H-T重组质粒, 20 μ mol/L的P上、P下引物各 3 μ I, 2mmol/L的dNTP, 10 μ I, 10 $\times$ 反应缓冲液10 μ I, pfu DNA聚合酶 5U, (dNTP、反应缓冲液、pfu DNA聚合酶均为takara公司产品)。PCR条件为94 $^{\circ}$ C变性30秒, 50 $^{\circ}$ C退火30秒, 72 $^{\circ}$ C延伸3分钟, 循环30次。通过凝胶电泳分析反应物显出一预期大小(约2kb)的条带, PCR产物PHD用PCR产物回收纯化试剂盒纯化回收, 4 $^{\circ}$ C保存。

[0044] 为避免PHD基因扩增时由DNA聚合酶引入的随机突变, 所以使用的是高保真的DNA聚合酶Pfu。由它扩增得到的PCR产物为平头末端, 与T载体连接时需要在突变基因3'端添加单个碱基A, DNA回收试剂盒直接回收加A产物, 用于与T载体的连接。

[0045] 16 $^{\circ}$ C连接过夜, 用连接液转化DH5 α 大肠杆菌, 进行蓝白筛选, 阳性克隆菌株分别用PCR求证、酶切验证, 得到阳性菌株。

[0046] pPIC9K载体和pUCm-T/PHD质粒分别用EcoRI/NotI进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C酶切5h, DNA回收试剂盒直接回收酶切产物, -20 $^{\circ}$ C备用。

[0047] 将线性化pPIC9K与PHD目的片段用T4 DNA Ligase进行连接, 16 $^{\circ}$ C连接24h, 连接液直接用于转化。将所得的转化子进行PCR鉴定和酶切鉴定, 得到阳性转化子进行测序, 测序委托上海生工生物工程技术有限公司进行测序, 测序结果与预设相符。

[0048] 基因序列详见附图说明中SEQ ID NO:1-3。质粒构建过程见附图1。

[0049] 实施例3:PTD-HAS-(GIy₄Ser)₃-DSIP(PHLD)目的基因的构建:

[0050] 以实施例1中获得的质粒为模板, 引物可用

- [0051] P上:5'-GAATTCTACGGTCGTAAGAAAAGAAGACAACGTAGACGTGATG
- [0052] CACACAAGAGTGAG -3'
- [0053] P下:5'-GCGGCCGCTTATTCTCCAGAAGCATCACCACCAGCCCAAGAACC
- [0054] TCCACCAGAACCTCCACCAGAACCTCCACCTAAGCCTAAGGCAGCTTG-3'
- [0055] 引物委托上海生工生物公司合成。PCR扩增,具体操作方法参见实例2。
- [0056] 基因序列详见附图说明中SEQ ID NO:2。质粒构建过程见附图2。
- [0057] 实施例4:PTD-HSA-DSIP(PHD)融合蛋白的构建:
- [0058] 将实施例2中所得pPIC9K/PHD质粒线性化,线性化所用酶为SaII酶切体系参考SaII产品使用说明书。
- [0059] 线性化质粒电泳验证并回收,同时切胶回收线性化的pPIC9K/PHD质粒用于酵母菌GS115的转化。
- [0060] GS115酵母菌感受态细胞的制备:
- [0061] (1)将过夜培养的5mI新鲜酵母培养基接种于50mI 的三角烧瓶中。30℃振荡培养至毕赤酵母达到其对数生长期。
- [0062] (2)将上述细胞转接到含有新鲜酵母培养基的500mI三角瓶中,30℃振荡培养至OD=1.3。
- [0063] (3)把细胞倒入50mI无菌离心管中,4℃3000×g离心5分钟沉淀细胞。
- [0064] (4)弃去上清液。
- [0065] (5)每管加10mI无菌YPD/HEPES,漩涡振荡重悬细胞;加250μI的1M DTT,轻轻混合。30℃培养细胞15分钟,不晃动。
- [0066] (6)用无菌的,冰冷的去离子水将体系补充到50mI。3000×g,4℃离心5分钟来沉淀细胞,弃上清。
- [0067] (7)加5mI无菌,冰冷的去离子水,漩涡振荡重悬细胞;用无菌,冰冷的1M山梨醇将体积补充至50mI。3000×g,4℃离心5分钟来沉淀细胞,弃上清。
- [0068] (8)用2.5mI无菌,冰冷的1M山梨醇重悬细胞,然后转移到一个预冷的5mI的离心管中。3000×g,4℃离心5分钟来沉淀细胞,弃上清。
- [0069] (9)用0.5mI无菌,预冷的1M山梨醇重悬细胞;将细胞放在冰上并且尽快做电转。
- [0070] (10)为每个用来电转的样品准备一个装有1.0mI的1M山梨醇的无菌的1.5mI离心管放在冰上;并且将0.2cm的电击管放在冰上。
- [0071] (11)用移液枪将待电转的DNA样品转移到无菌的1.5mI离心管中。
- [0072] (12)每个DNA样品中加40μI的感受态细胞,轻轻混匀。
- [0073] (13)将DNA-ceIIIs样品转移到预冷的0.2cm的点击杯中,轻弹使悬浮液到达电击管的底部。置电转仪上,选择酵母参数(电击参数:1500V,200V,25μF)电转化。
- [0074] (14)将电击杯取出,立即加入1.0mI预冷的1M的山梨醇;轻轻地将稀释细胞加入点击杯中;轻轻将稀释细胞转移到一个无菌的离心管。
- [0075] 本实验筛选与营养缺陷型互补的突变菌株,所以将细胞立刻涂布MD琼脂平板上。将平板在30℃下培养72-96小时。
- [0076] GS115菌株为his⁻,在不含组氨酸的培养基上无法生长,所以能在MD平板上长出的克隆即为his⁺阳性克隆,30℃培养3~6天。

[0077] 将获得的his⁺转化子分别用牙签点种于不同浓度的G418平板,G418浓度分别为0mg/ml、0.25mg/ml、1.0mg/ml、2.0mg/ml、4.0mg/ml,30℃培养3~6天。根据各克隆耐受G418的情况,筛选出含有不同拷贝数的转化子。

[0078] 实施例5:PTD-HSA-(GIy4Ser)3-DSIP(PHLD)融合蛋白的构建:

[0079] 将实施例3中所得pPIC9K/PHLD质粒线性化,线性化所用酶为SaII酶切体系参考SaII产品使用说明书,线性化质粒电泳验证并回收,同时切胶回收线性化的pPIC9K/PHLD质粒用于酵母菌GS115的转化。

[0080] GS115酵母菌感受态细胞的制备与电击转化及阳性重组子的筛选参见实例4。

[0081] 实施例6 工程酵母的发酵

[0082] 以实施例4、5构建的PHD/PHLD表达融合蛋白的工程酵母发酵为例,其他工程酵母的发酵可用相同或相似的方法。

[0083] 方案1: 从平板上挑取单菌落接入4瓶30ml/250ml三角烧瓶的YPD培养基(酵母提取物10g/L,胰蛋白胨20g/L,葡萄糖10g/L)中,30℃,250r/min振荡培养18-24小时(至OD约为10);按1%接种量将上述种子液接入20瓶50ml/500ml三角烧瓶的BSM培养基中(85%的磷酸3.7ml/L,CaSO₄ 0.16g/L, K₂SO₄ 2.6g/L, MgSO₄·7H₂O 1.95g/L,KOH 0.68g/L,30ml/L的甘油,121℃高压灭菌20分钟,1ml/LPTM(包括CuSO₄·5H₂O 6.0g/L,CocI₂·2H₂O 3.0g/L, MnSO₄·H₂O 3.0g/L,H₃BO₄ 0.02g/L, FeSO₄·7H₂O 65.0g/L, NaMoO₄·2H₂O 0.2g/L,ZnSO₄·7H₂O 20.0g/L,KI 0.1g/L,浓H₂SO₄ 5ml/L, 0.5ml/L 0.02%生物素,过滤除菌),接种前用浓氨水将培养基pH调至5.8-6.0,30℃,250r/min振荡培养48小时,至甘油耗尽,开始补加甲醇至终浓度1.0%,每24小时补加一次,诱导表达5天,8000r/min离心收集上清,得大约1L的发酵液。

[0084] 方案2: 工程酵母接种100mlYPD培养基(酵母提取物10g/L,胰蛋白胨20g/L,葡萄糖10g/L)摇床30℃,250转/分培养30小时。接种至装有15L基础培养基的30L发酵罐,其中BSM基础培养基的配制方法(同上)。发酵过程控制温度为30℃,控制溶氧(大于20%饱和度),pH控制在5.8-6.0(20%氨水),至溶氧陡然上升说明培养甘油耗尽,开始流加甘油(55%的甘油含12ml/L的PTM),继续培养,至菌体密度OD₆₀₀值约为100时,开始补加甲醇(分析纯甲醇含12ml/L的PTM)诱导。诱导培养96-120小时,8000r/min离心收集上清,得大约16L的发酵液。

[0085] 实施例7 融合蛋白的纯化:

[0086] 以实施例4、5构建的PHD/PHLD表达融合蛋白的工程酵母发酵所得发酵液为样本进行纯化,其他工程酵母的发酵后纯化可用相同或相似的方法。

[0087] 取上述发酵所得的上清液。样品超滤浓缩后,用DEAE Sepharose(Amersham 产品)阴离子交换色谱进行分离,上样缓冲液为pH为6.0-8.0的缓冲液,上样平衡后用0-2.0 M的NaCl进行梯度吸脱,收集目的峰;用Phenyl Sepharose 6 F. F(Amersham产品)疏水填料进行柱层析分离,为6.0-8.0的缓冲液,上样平衡后用0-1.5 M的缓冲液进行梯度吸脱,收集目的峰吸脱液;用buIe-sepharose(Amersham产品)亲和色谱进行分离,上样缓冲液为pH为6.0-8.0缓冲液,上样平衡后用2.0 M的NaCl进行吸脱,收集含有目的蛋白的洗脱峰;如图3所示,脱盐后即为纯化的融合蛋白,SDS-PAGE分析呈电泳纯为均一条带。

[0088] 实施例8生物活性及非临床药动学评价:

[0089] 融合蛋白与戊巴比妥钠的睡眠协同活性的研究：参照文献报道的方法，将30只昆明小鼠随机分成三组，每组10只。其中实验组皮下注射1.3mg/kg剂量的有本实验室构建而得到的PHD、PHLD融合蛋白；对照组皮下注射等量的无菌生理盐水，并于给药后30min，同时对各组腹腔注射35mg/kg的戊巴比妥钠，观察并判断小鼠睡眠情况，记录睡眠潜伏时间和睡眠时间。具体指标：将小鼠背向下放置在一温暖的底面，翻正反射消失时间大于1min判断为入睡，小于1min不判断为入睡。睡眠潜伏期计为从腹腔注射戊巴比妥钠到出现翻正反射消失1min所需时间，睡眠时间计为翻正反射消失1min到翻正反射恢复为止，观察受试样品能否延长戊巴比妥钠诱导的睡眠时间。实验数据见表1、表2所示。结果提示本发明提供的融合蛋白PHD/PHLD能明显的延长小鼠的睡眠时间，其中PHD与PHLD之间没有显著性差异。

[0090] 大鼠皮下注射给予重组PHD、PHLD融合蛋白，分别于0.016, 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 120小时的不同的时间采样，用酶联免疫法(ELISA)测定血中睡眠肽浓度，采用3P97药动学软件分析，结果睡眠肽融合PHD、PHLD显示了改善的更长的半衰期，其中PHD、PHLD二者的半衰期达到了7.8小时和8.5小时，明显比九肽睡眠肽的半衰期有明显的延长。

[0091] 表1重组融合蛋白PHD的活性分析

[0092]

组别	PHD 融合蛋白 剂量 (mg/kg)	n	睡眠潜伏期 (min)	睡眠时间 (min)	睡眠时间延 长 百分率 (%)
生理盐水组	0	10	3.1±0.6	49±11.2	
给药组	1.3	10	3.3±1.7 *	85±31.7 * *	73.4

[0093] 表2重组融合蛋白PHLD的活性分析

[0094]

组别	PHLD 融合 蛋白 剂量 (mg/kg)	n	睡眠潜伏期 (min)	睡眠时间 (min)	睡眠时 间延长 百分率 (%)
生理盐水组	0	10	2.3±0.8	54±18.6	
给药组	1.3	10	2.8±1.2 *	97±28.7 * *	79.6

SEQ ID NO:1

1 atgaagtggg taacctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccaggggt
61 gtgtttcgtc gagatgcaca caagagtga gttgctcatc ggtttaaaga tttgggagaa
121 gaaaatttca aagccttagt gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt
181 gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat
241 gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca
301 gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct
361 gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattgggtg
421 agaccagagg ttgatgtgat gtgcactgct tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa
481 aaatacttat atgaaattgc cagaagacat cttacttct atgccccgga actccttttc
541 tttgctaaaa ggtataaaagc tgcttttaca gaatgttgcc aagctgctga taaggctgcc
601 tgcctgttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag
661 aggetcaagt gtgccagtct ccaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta
721 gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgag aagtttccaa gttagtgaca
781 gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac
841 agggcggacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag
901 gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat
961 gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc
1021 aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgatga atatgcaaga
1081 aggcatectg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata taaaaccact
1141 ctagagaagt gctgtgccgc tgcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa
1201 tttaaaccctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag
1261 cagcttgag agtacaaatt ccagaatgcg ctattagttc gttacaccaa gaaagtaccc
1321 caagtgtcaa ctccaactct ttagaggtc tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa
1381 tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggtc
1441 ctgaaccagt tatgtgtgtt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc
1501 tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca
1561 tacgttccca aagagtttaa tgctgaaaca ttcaccttc atgcagatat atgcacactt
1621 tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagcttgt gaaacacaag
1681 cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc tttttagag
1741 aagtgtgca aggtgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttgtt
1801 gctgcaagtc gagctgcctt aggetta

SEQ ID NO:2

TGGGCTGGTGGTGATGCTTCTGGAGAATAA

SEQ ID NO:3

TACGGTCGTAAGAAAAGAAGACAACGTAGACGT

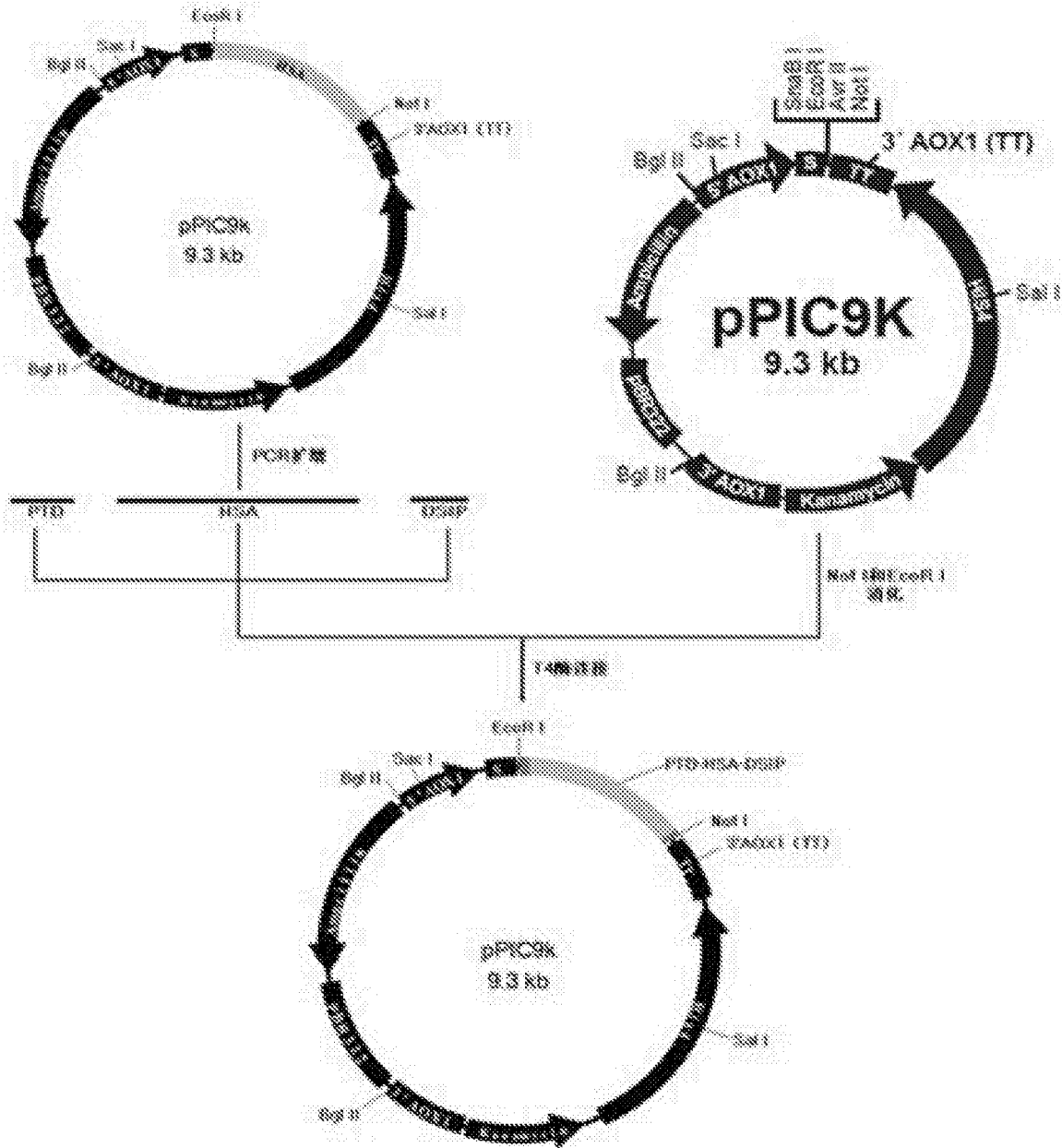


图1

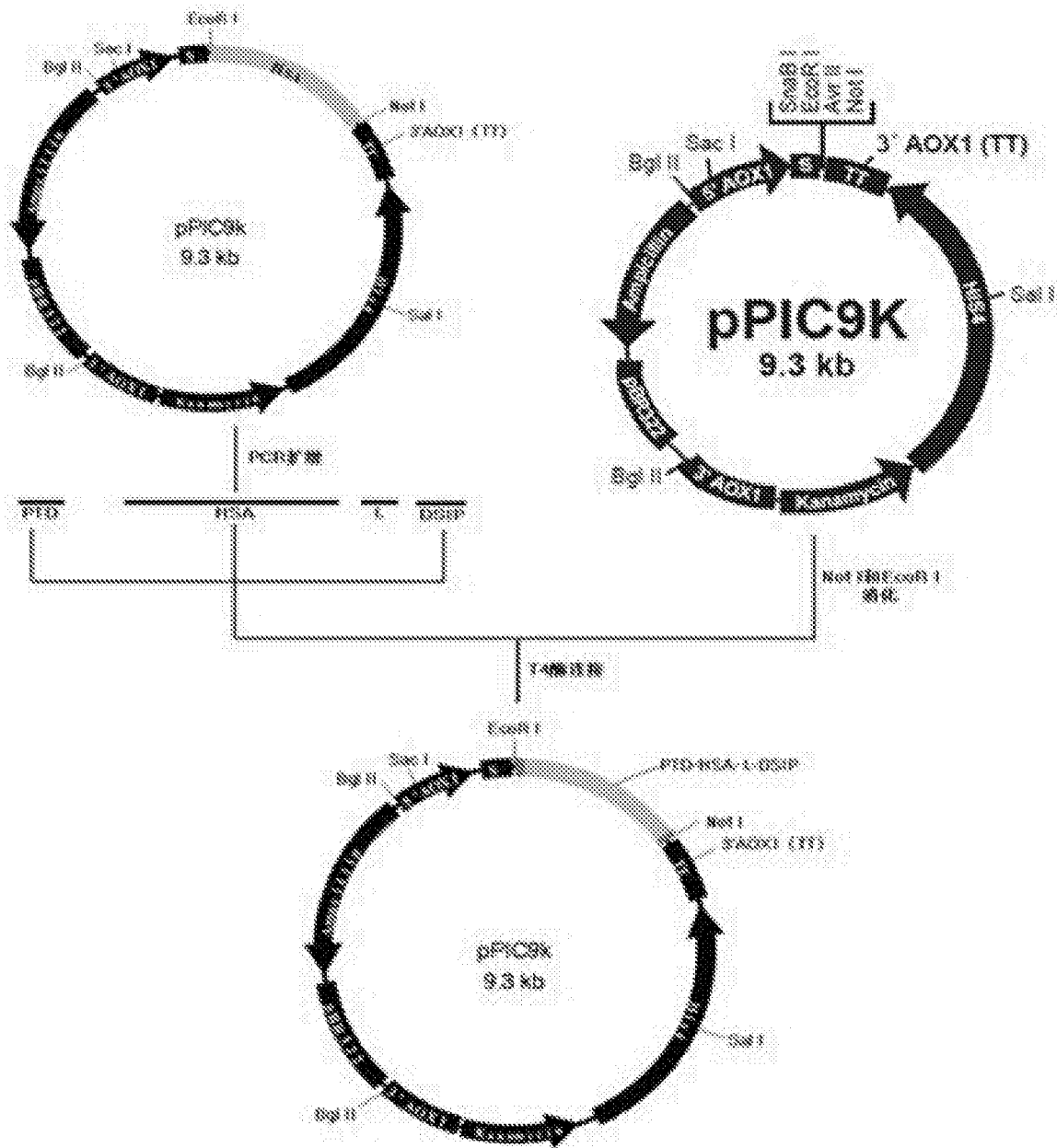


图2

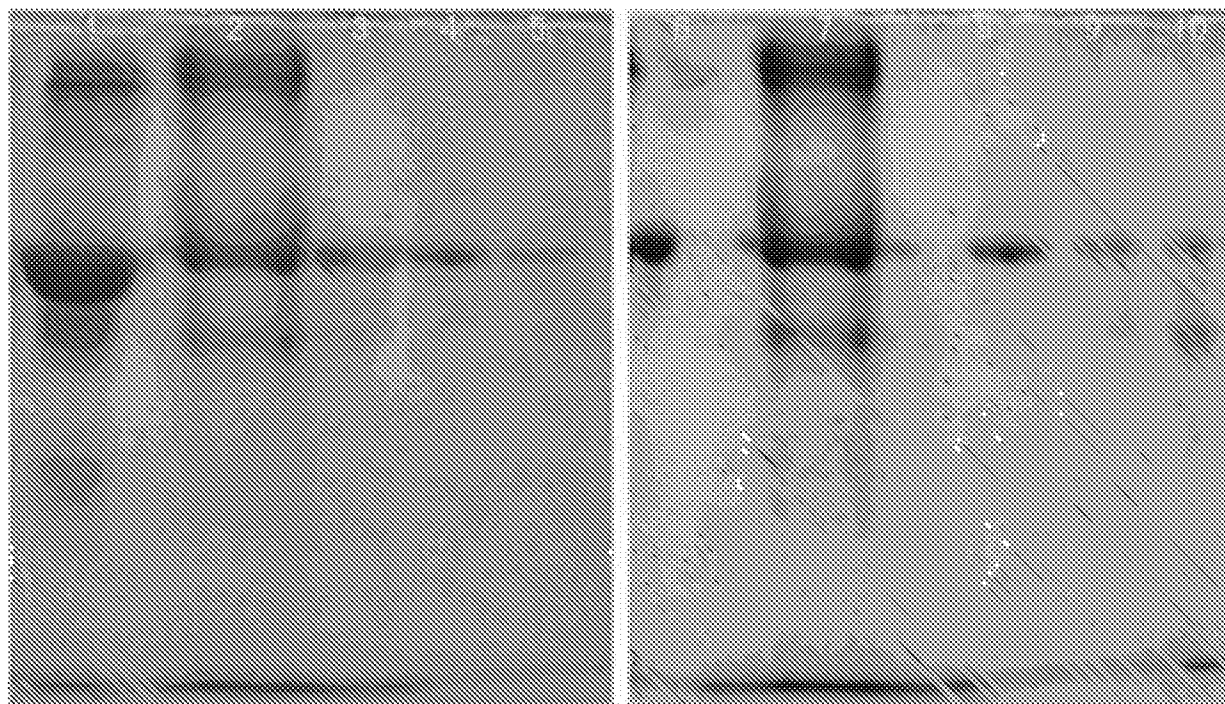


图3