



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103819550 B

(45) 授权公告日 2016.05.11

(21) 申请号 201410074589.X

(22) 申请日 2014.03.03

(73) 专利权人 中国科学院南海海洋研究所
地址 510301 广东省广州市新港西路 164 号

(72) 发明人 张扬 徐凤姣 张跃环 李军
喻子牛

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 刘明星

(51) Int. Cl.

C07K 14/435(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

(56) 对比文件

Genoscope. Accession

ID:FP004354.1. 《NCBI GenBank》. 2009, 1.

曲莉等. 调理素 (opsonin). 《日本医学介绍》. 2000, 第 21 卷 (第 11 期), 527.

Zhang G., et al.. Accession ID:EKC36293.1. 《NCBI GenBank》. 2012, 1.

Genoscope. Accession ID:CU998710.1. 《NCBI GenBank》. 2009, 1.

审查员 廖文勇

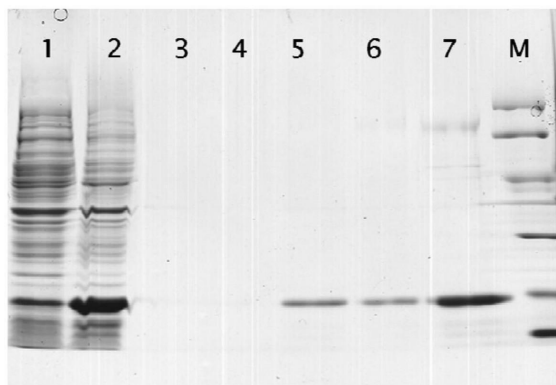
权利要求书1页 说明书3页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素 DCP

(57) 摘要

本发明公开了一种新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素 DCP。调理素 DCP 其氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。本发明首次从太平洋牡蛎中分离一种包含 DM9 结构域的蛋白 (DM9domain-containing protein, DCP), 通过功能分析和鉴定, 发现牡蛎的 DCP 可以同弧菌表面分子结合, 极大的促进血淋巴细胞的对弧菌吞噬作用, 是一种新型的贝类调理素。本发明中的 DCP 具有强烈促进血淋巴细胞的吞噬作用, 为贝类的抗病防治提供了重要的理论与实践依据。



1. 一种贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。
2. 一种编码权利要求1所述的贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP的基因,其特征在于,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。
3. 一种含有权利要求2所述基因的原核表达载体。
4. 根据权利要求3所述的原核表达载体,其特征在于,所述的原核表达载体为在原核表达载体pET-28a中插入了权利要求2所述基因的表达载体。
5. 一种含有权利要求3所述原核表达载体的细菌。
6. 根据权利要求5所述的细菌,其特征在于,所述的细菌为大肠杆菌BL21(DE3)。
7. 权利要求1所述的贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP在制备促进血淋巴细胞对弧菌吞噬作用药物中的应用。

一种新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP

技术领域：

[0001] 本发明属于应用海洋生物技术领域，具体涉及一种新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP。

背景技术：

[0002] 贝类是我国最重要经济类群之一，在沿海经济社会发展中举足轻重。太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)属于软体动物门、双壳纲、珍珠贝目、牡蛎科动物，为全球性分布的经济贝类。然而，随着近年来大规模的养殖，其免疫能力低下，导致的疾病爆发，已经严重的制约了产业的发展。

[0003] 血淋巴细胞是贝类的核心免疫器官，其吞噬能力的强弱直接决定了其抗病能力的高低。在牡蛎体内，有一类蛋白可以促进血淋巴细胞的吞噬作用，被称为调理素(opsonin)。

发明内容：

[0004] 本发明的目的是提供一种新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP。

[0005] 本发明的新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP，其特征在于，其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0006] 本发明还提供了一种编码上述新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP的基因，其特征在于，其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0007] 一种含有新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP的基因的原核表达载体。

[0008] 所述的原核表达载体可以为表达载体pET-28a。

[0009] 一种含有含有新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP的基因的原核表达载体的细菌。

[0010] 所述的细菌可以为大肠杆菌BL21(DE3)。

[0011] 本发明还提供了新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素DCP在制备促进血淋巴细胞对弧菌吞噬作用药物中的应用。

[0012] 本发明首次从太平洋牡蛎中分离一种包含DM9结构域的蛋白(DM9 domain-containing protein, DCP)，通过功能分析和鉴定，发现牡蛎的DCP可以同弧菌表面分子结合，极大的促进血淋巴细胞的对弧菌吞噬作用，是一种新型的贝类调理素。本发明中的DCP具有强烈促进血淋巴细胞的吞噬作用，为贝类的抗病防治提供了重要的理论与实践依据。

附图说明：

[0013] 图1.表达和纯化贝类调理素DCP重组蛋白；

[0014] (M)蛋白Marker；(1)诱导前和(2)诱导后贝类调理素DCP-His重组蛋白；(3-7)纯化后的贝类调理素DCP-His重组蛋白，不同的洗脱条件。

[0015] 图2.免疫荧光显示贝类调理素DCP-His重组蛋白可以结合至副溶血弧菌Vibrio

parahaemolyticus表面;(A)光镜下和(B)荧光显微镜下贝类调理素DCP-His同弧菌的结合;

[0016] (C)光镜下和(D)荧光显微镜下BSA(阴性对照)同弧菌的结合。

[0017] 图3.流式细胞术分析贝类调理素DCP-His重组蛋白对*V. parahaemolyticus*的调理作用。

[0018] (A)不同蛋白孵育后,血淋巴细胞的荧光累计图,红色为对照BSA,绿色为贝类调理素DCP-His;(B)柱状图统计荧光强度,**表示极显著差异,荧光值越高,代表吞噬能力越强,即贝类调理素DCP-His的调理作用越大。

具体实施方式

[0019] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0020] 实施例1:

[0021] 1、RNA提取

[0022] 总RNA的提取使用Trizol(Invitrogen)提取,具体步骤如下:(1)取50mg太平洋牡蛎于液氮预冷的研钵中,将组织磨成粉末之后,转移到装有1ml Trizol的离心管中,吹打、混匀;(2)加入200 μ L氯仿,剧烈震荡40s,室温放置5min;(3)4 $^{\circ}$ C,12,000 \times g离心10min,吸取上清转移至新管;(4)加入0.5ml的异丙醇,混匀,-80 $^{\circ}$ C沉淀过夜;(5)4 $^{\circ}$ C,12,000 \times g离心10min,弃上清;(6)75%乙醇wash两次沉淀;(7)弃上清,加入100 μ L DEPC水溶解RNA。

[0023] 2.RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)和cDNA全长的获得

[0024] (1)利用提取的RNA和GeneRacerTM kit(Invitrogen),构建太平洋牡蛎RACE cDNA文库;(2)从牡蛎转录组获得DCP的EST序列;(3)根据EST序列,设计用于RACE扩增的引物(DCP-5' race1:5'-GAACCCGTCCTATGTAGATGCCGCTG-3'

[0025] DCP-5' race2:5'-GTCATTTGCCCCGAGACTACAGCCC-3'

[0026] DCP-3' race1:5'-GGTTCTTAGACTGGCAACAGGCATCC-3'

[0027] DCP-3' race2:5'-ACAGCCAGCGGCATCTACATAGGACG-3'),并进行3' race和5' race反应;(4)再克隆至pGEM-T Easy载体(promega),进行测序;(5)拼接RACE和EST序列,获取全长cDNA序列,该全长cDNA序列含有一个开放阅读框,该开放阅读框的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,含有432个碱基,其编码的蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,含有112个氨基酸,命名为贝类调理素DCP的基因。

[0028] 3.原核表达载体构建

[0029] (1)设计一对涵盖贝类调理素DCP ORF的引物(DCP-F1:5'-CG GAATTCATGGCAG AGTGGGTATCA-3';DCP-R1:5'-GCCTCGAGCTAAATGACTTTATACAGAGC-3'),引物的两端分别加入EcoR-I和Xho-I位点和保护碱基;(2)使用这对引物进行PCR扩增(总PCR反应体系为50 μ l,其中包括H₂O38.5 μ L,10 \times buffer(含Mg²⁺)5 μ L,dNTP(10mM/L)1 μ L,上下游引物(10 μ M)各2 μ L,模板cDNA1 μ L,ExTaq酶0.5 μ L;反应条件为:94 $^{\circ}$ C2min,(94 $^{\circ}$ C30sec,55 $^{\circ}$ C30sec,72 $^{\circ}$ C60sec)35个循环,72 $^{\circ}$ C10min);(3)PCR产物和pET-28a载体分别使用EcoR-I和Xho-I进行双酶切,并回收纯化酶切产物;(4)连接酶切后的PCR片段和pET-28a载体;(5)将连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 中,挑取阳性克隆,测序验证载体正确无误,测序结果表明如SEQ ID NO.1所示的序列(贝类调理素DCP的基因)插入了pET-28a载体中,进行后续试验,由此得到含有贝类调理素DCP的基因的pET-28a载体。

[0030] 4. 重组蛋白的原核表达和纯化

[0031] (1)提取步骤3的大肠杆菌DH5 α 中的含有贝类调理素DCP的基因的pET-28a载体,转化至大肠杆菌BL21(DE3);(2)挑选单克隆并培养至OD=0.6,加入IPTG至终浓度为0.1mM,22 $^{\circ}$ C,180rpm的条件下诱导表达;(3)4h后收集菌液,4 $^{\circ}$ C,12,000 \times g离心10min;(4)加入Lysozyme至终浓度2mg/ml,然后超声破碎;(5)使用TALON Superflow纯化重组蛋白,在12% SDS-PAGE胶分析纯化产物,其蛋白电泳图如图1所示,图1中(M)蛋白Marker;(1)诱导前和(2)诱导后贝类调理素DCP-His重组蛋白;(3-7)不同的洗脱条件下纯化后的DCP-His重组蛋白,由此得到贝类调理素DCP-His重组蛋白。

[0032] 5. 免疫荧光

[0033] (1)将副溶血弧菌*V. parahaemolyticus*滴加在载玻片上;(2)用4%冷的多聚甲醛固定20分钟,PBS洗三遍;(3)分别加BSA和纯化的贝类调理素DCP-His重组蛋白进行孵育30min,PBS洗三遍,其中BSA作为control;(4)加入抗His标签抗体,孵育1小时PBS洗三遍;(5)加入FITC标记的二抗,避光孵育半小时,PBS洗三遍;(6)封片,荧光显微镜观察。结果如图2所示,免疫荧光显示贝类调理素DCP-His重组蛋白可以结合至副溶血弧菌*Vibrio parahaemolyticus*表面。(A)光镜下和(B)荧光显微镜下DCP-His同弧菌的结合;(C)光镜下和(D)荧光显微镜下BSA(阴性对照)同弧菌的结合。

[0034] 6. 流式细胞检测

[0035] (1)利用FITC标记副溶血弧菌*V. parahaemolyticus*;(2)分别加BSA和纯化的贝类调理素DCP-His进行孵育15min,其中BSA作为control;(3)取新鲜太平洋牡蛎血淋巴细胞至6孔板,培养10min;(4)把步骤(2)蛋白孵育的弧菌加入含有血淋巴细胞的6孔板中,继续培养30min;(5)吹打收集培养板中的细胞;(6)用流式专用管过滤细胞,利用流式细胞仪(BD FACSCalibur)检测细胞荧光强度,使用的参数为FL1通道,530nm;(7)利用软件Cell Quest对荧光强度进行测量,最后统计求显著性差异。结果如图3所示,图3表明贝类调理素DCP能强烈促进血淋巴细胞对弧菌的吞噬作用。

序列表

<110>中国科学院南海海洋研究所

<120>一种新型贝类促进血淋巴细胞吞噬作用的调理素 DCP

<160>2

<210>1

<211>432

<212>DNA

<213>太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)

<400>1

[0001]

ATGGCAGAGT GGGTATCAAC GACTGGAAAT ACAATCCCAG ATAATGCGAT ACGTGCTGGG 60
TACGATATTA ACAAAAAGGC TTTGTTTATT GCCCGGGCTG TAGTCTCGGG CGAAATGACC 120
CCCGGAAAAT GCGGAACCCA CCTCGAAGGG GCACACATTC CTTTCGCTGG CAAAGAGCAT 180
ATTATCCAGA ATTACGAGGT TCTAGTCTAC CCGATCAACG CCTTGGGGTT CTTAGACTGG 240
CAACAGGCAT CCAATGGTGA CGTGCCGGGT AACGCCATCG ACACAGCCAG CGGCATCTAC 300
ATAGGACGGG TTCTTTACTC CGGAAGTCTG ATTCCTTGCA AGATCCATAC CGGCTTCAAG 360
GTTGCCTACA TGGGTTTCGC CGGTAAAGAA CACCAATCAA AGGAATACGA AGCTCTGTAT 420
AAAGTCATTT AG 432

<210>2

<211>112

<212>PRT

<213>太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)

<400>2

Met Ala Trp Val Ser Thr Thr Gly Asn Thr Ile Asp Asn Ala Ile

1 5 10 15

Arg Ala Gly Tyr Asp Ile Asn Lys Lys Ala Ile Ala Arg Ala Val

 20 25 30

Val Ser Gly Met Thr Gly Lys Cys Gly Thr His Gly Ala His Ile

 35 40 45

Ala Gly Lys His Ile Ile Asn Tyr Val Val Tyr Ile Asn Ala Gly

[0002]

 50 55 60

Asp Trp Ala Ser Asn Gly Asp Val Gly Asn Ala Ile Asp Thr Ala

 65 70 75

Ser Gly Ile Tyr Ile Gly Arg Val Tyr Ser Gly Ser Ile Cys Lys

 80 85 90

Ile His Thr Gly Lys Val Ala Tyr Met Gly Ala Gly Lys His Ser

 95 100 105

Lys Tyr Ala Tyr Lys Val Ile

 110 112

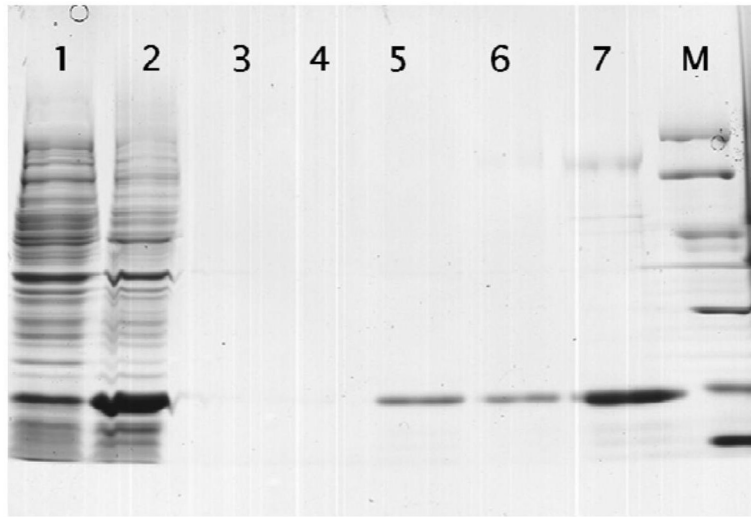


图1

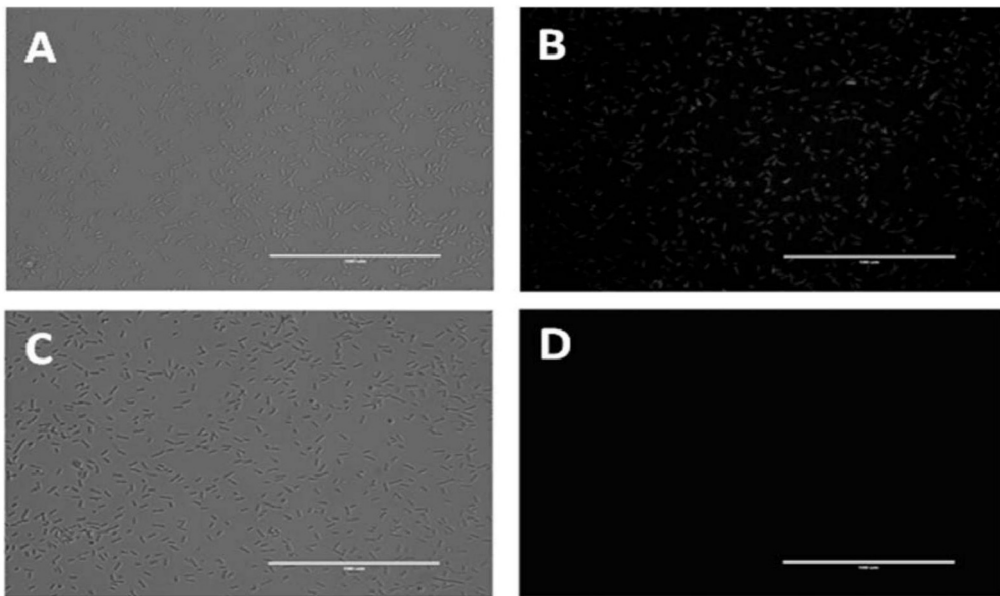


图2

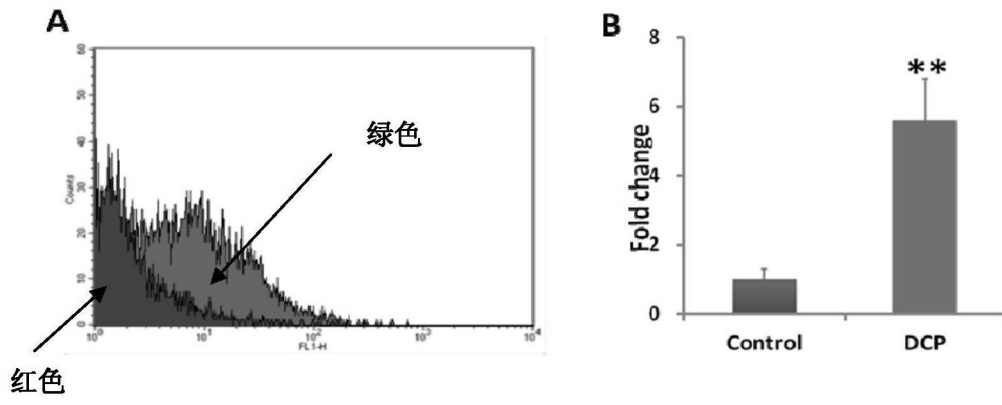


图3