(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 103864910 B
(45)授权公告日 2016.01.20

(21)申请号 201410075253.5

(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 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 14/46(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
C12R 1/19(2006.01)

(56)对比文件
万志红等.LPS受体及信号转导研究进展.《国外医学分子生物学分册》.2001,第23卷(第3期),
Zhang G. et al.The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation.《nature》.2012,第490卷
Zhang G. et al.K1RBW9 - K1RBW9_CRAGI.《UniProt》.2012,

审查员 李煦颖

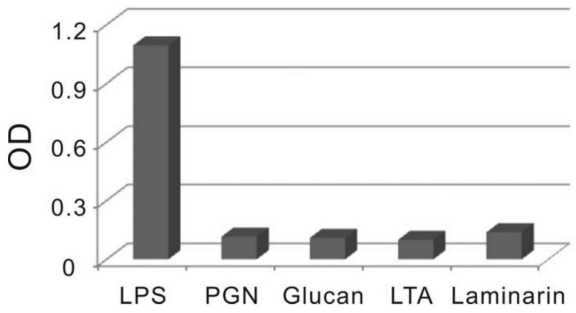
权利要求书1页 说明书3页
序列表4页 附图1页

(54)发明名称

一种新型特异结合LPS的贝类模式识别受体LRRP

(57)摘要

本发明公开了一种新型特异结合LPS的贝类模式识别受体LRRP。贝类模式识别受体LRRP,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出富含亮氨酸重复蛋白(Leucine-rich repeat protein,LRRP),可以特异的识别LPS,从而激发后续的免疫反应的新型贝类模式识别受体LRRP。本发明中的LRRP在贝类免疫识别中发挥中重要的作用,监控体内的革兰氏阴性菌的侵入状况,为贝类的抗病育种提供了重要的理论与实践依据。



CN 103864910 B

1.一种新型贝类模式识别受体LRRP,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所述的新型贝类模式识别受体LRRP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所述的新型贝类模式识别受体LRRP的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表达载体pGEX-4T-1。

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所述的新型贝类模式识别受体LRRP在制备特异识别脂多糖的药物中的应用。

一种新型特异结合 LPS 的贝类模式识别受体 LRRP

技术领域：

[0001] 本发明属于贝类免疫识别和免疫防御的分子机理领域，具体涉及一种新型特异结合 LPS 的贝类模式识别受体 LRRP。

背景技术：

[0002] 贝类在我国沿海经济社会发展中占据举足轻重的地位，是世界上最重要经济类群之一，并具有巨大的发展潜力。太平洋牡蛎（Crassostrea gigas），是软体动物门，双壳纲，珍珠贝目，牡蛎科动物，是一种重要的海洋生物资源，为全球性分布种类。然而，良种匮乏导致牡蛎免疫能力低下，疾病爆发，甚至出现大规模死亡，是制约产业发展的主要瓶颈。

[0003] 在贝类免疫反应中，病原微生物的保守结构比如脂多糖（LPS）、肽聚糖（PGN）等，可以作为模式识别分子（pattern-recognition molecule，PRM）被宿主所识别，继而激发宿主的免疫防御反应。

发明内容：

[0004] 本发明的目的是提供一种新型贝类模式识别受体 LRRP。

[0005] 本发明的新型贝类模式识别受体LRRP，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模式识别受体 LRRP 的基因，其特征在于，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

[0007] 一种含有新型贝类模式识别受体 LRRP 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 pGEX-4T-1。

[0009] 一种含有含有新型贝类模式识别受体 LRRP 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模式识别受体 LRRP 在制备特异识别脂多糖的药物中的应用。

[0012] 本发明首次从太平洋牡蛎中分离出富含亮氨酸重复蛋白（Leucine-rich repeat protein，LRRP），可以特异的识别 LPS，从而激发后续的免疫反应的新型贝类模式识别受体 LRRP。本发明中的 LRRP 在贝类免疫识别中发挥中重要的作用，监控体内的革兰氏阴性菌的侵入状况，为贝类的抗病育种提供了重要的理论与实践依据。

附图说明：

[0013] 图 1. 表达和纯化的贝类模式识别受体 LRRP 重组蛋白

[0014] M：蛋白 Marker；Lane1：重组表达蛋白 GST-LRRP（贝类模式识别受体 LRRP 重组蛋白）；Lane2：纯化后的 GST-LRRP（贝类模式识别受体 LRRP 重组蛋白），箭头指示重组表达的目的蛋白 GST-LRRP；

[0015] 图 2. ELISA 分析重组蛋白对多种 PRMs 的结合能力，表明贝类模式识别受体 LRRP

可以特异的识别 LPS。

[0016] 注:OD,光密度值;LPS,脂多糖;PGN,肽聚糖;Glucan,葡聚糖;LTA,脂磷壁酸;Laminarin,昆布多糖。

具体实施方式

[0017] 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。

[0018] 实施例 1:

[0019] 1、RNA 提取

[0020] 总 RNA 的提取使用 Trizol(Invitorgen) 提取,具体步骤如下:(1) 取 50mg 太平洋牡蛎组织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 200μL 氯仿,剧烈震荡 40s,室温放置 5min;(3)4℃,12,000×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℃沉淀过夜;(5) 4℃,12,000×g 离心 10min,弃上清;(6)75% 乙醇 wash 两次沉淀;(7)弃上清,加入 100μL DEPC 水溶解 RNA。

[0021] 2.cDNA 文库构建和 cDNA 全长的获得

[0022] 1)全长 cDNA 文库构建使用 SMART cDNA library construction Kit(Clontech),具体步骤如下:(1) 利用步骤 1 的 RNA,使用 MMLV 合成 cDNA 第一条链;(2) 使用 LD PCR 扩增 cDNA;(3)蛋白酶 K 消化并纯化 cDNA 产物;(4)Sfil 消化,使用 Chroma Spin400 进行产物大小分离;(5) 连接 cDNA 至 λTripEx2 载体,经 λ 噬菌体包装后,转化至宿主细胞中;(6) 检测 cDNA 文库滴度。

[0023] 2)从牡蛎转录组获得 LRRP 的 EST 序列;(3)根据 EST 序列,设计用于 RACE 扩增的引物(First PCR 引物:

[0024] LRRPF1:5'-AGTAAATGTGCCGTGTGTGGGGAGT-3';

[0025] LRRPR1:5'-GACCTCCTCTTCTTGTACTGAATGGAC-3';

[0026] Nest PCR 引物:

[0027] LRRPF2:5'-TGCGGGCTTTACTCTGTTCTTATCG-3';

[0028] LRRPR2:5'-GTAATGCACAGATTTCCACGGGTAG-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 1059 个碱基,其编码的蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示,含有 352 个氨基酸,命名为贝类模式识别受体 LRRP 的基因。

[0029] 3. 原核表达载体构建

[0030] (1) 设计一对涵盖贝类模式识别受体 LRRP ORF 的引物(LRRPF3:5'-CGGGATCC ATGGCGGACACTATGCTTGTTCG-3';LRRPR3:5'-GCCTCGAGTCAGTCACGATGCGGC CGCTCGA-3'),引物的两端分别加入 BamH-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 50μl,其中包括 H_2O38.5μL,10×buffer (含 Mg^{2+}) 5μL, dNTP (10mM/L) 1μL,上下游引物(10μM) 各 2μL,模板 cDNA1μL, ExTaq 酶 0.5μL;反应条件为:94℃ 2min,(94℃ 30sec,55℃ 30sec,72℃ 60sec) 35 个循环,72℃ 10min);(3) PCR 产物和 pGEX-4T-1 载体分别使用 BamH-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 pGEX-4T-1 载体；(5) 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 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(贝类模式识别受体 LRRP 的基因)插入了 pGEX-4T-1 载体中，进行后续试验，由此得到含有贝类模式识别受体 LRRP 的基因的 pGEX-4T-1 载体。

[0031] 4. 重组蛋白的原核表达和纯化

[0032] (1) 提取步骤 3 的大肠杆菌 DH5α 中的含有贝类模式识别受体 LRRP 的基因的 pGEX-4T-1 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℃，180rmp 的条件下诱导表达；(3) 4h 后收集菌液，4℃，12,000×g 离心 10min；(4) 加入 Lysozyme 至终浓度 2mg/ml，然后超声破碎；(5) 使用 Glutathione Sepharose4B(GE Healthcare) 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 是表达和纯化的贝类模式识别受体 LRRP 重组蛋白，M：蛋白 Marker；Lane1：重组表达蛋白 GST-LRRP（贝类模式识别受体 LRRP）；Lane2：纯化后的 GST-LRRP；箭头指示重组表达的目的蛋白 GST-LRRP。由此得到纯化的贝类模式识别受体 GST-LRRP 重组蛋白。

[0033] 5.ELISA

[0034] (1) 将 LPS、PGN、LTA、GLucan、Laminarin 等多种 PRMs 分别溶解在双蒸水（40mg/ml）中；(2) 分别吸取 50μl 至 96- 孔板(Costar)，室温放置，直至蒸干；(3) 60℃，半小时，固定 PRMs；(4) 加入 200μl 含有 BSA 的 Tris Buffer，37℃，2h；(4) 弃上清，Tris Buffer wash4 次，每次 2min；(5) 加入含有纯化好的贝类模式识别受体 GST-LRRP 重组蛋白，室温孵育 3h；(6) 弃上清，Tris Buffer wash4 次，每次 2min；(7) 加入 mouse anti-GST antibody(Abmat, 1:5000)，孵育 2h；(8) 弃上清，Tris Buffer wash4 次，每次 2min；(9) 加入 HRP 偶联的 goat anti-mouse IgG(Abmat, 1:3000)，孵育 2h；(10) 加入 HRP 底物 TMB(Tiangen) 进行显色，450nm 光吸收测量结果。结果如图 2 所示，图 2 是 ELISA 分析贝类模式识别受体 GST-LRRP 重组蛋白对多种 PRMs 的结合能力，结果表明贝类模式识别受体 LRRP 可以特异的识别 LPS。注：OD，光密度值；LPS，脂多糖；PGN，肽聚糖；Glucan，葡聚糖；LTA，脂磷壁酸；Laminarin，昆布多糖。

[0001]

序列表

<110>中国科学院南海海洋研究所

<120>一种新型特异结合 LPS 的贝类模式识别受体 LRRP

<160>2

<210>1

<211>1059

<212>DNA

<213>太平洋牡蛎（*Crassostrea gigas*）

<400>1

ATGGCGGACA CTATGCTTGT TCGTGCTCTT AAGGGTAAAC CAAAAGCCTT AAACCTATGC 60

AATAAGAAAT TAGACAAAGT GCCAAAGATC ATTGGAAAGC TTGATTGTGT TTTACATCTT 120

CAATTACGAG GGAACAAGCT AAATACTCTT CCAATGGAGC TTAGTCACTT GTTTCAGCTA 180

CAGATCCTAA ATCTGGGAAA TAATGAATTT GAAGAATTAC CCGAAGTCCT TGAATATCTT 240

ACAATGTTAG AGAAACTTCA TCTGTTCAAC AACAAGCTGA AAACTCTGGC TCCAAAAGTG 300

CTAACAAACC TGAGGAATTT AACATTCCTT AACCTAAATT CAAACAACCT AAAAACATTT 360

CCTCCTGAAA TATGTAGACT GTCTAGTCTC CAACATCTGT CAGTGGATTC GAACCAGTTA 420

ACAGAGCTAC CCGTGGAAAT CTGTGCATTA CTTCGACTGG AGGAATTCCA TGTAGCCAAT 480

AACCAGCTGA CAAGTCTTCC GCTTGAGTTT GGATTCCTTG TCAATCTAGA AAAATTGTAC 540

CTTCAGAAGA ACAAAATTAG AGAACTGCCA GAGAGTCTAG GAAAGTGTTA TAAATTAAGG 600

ACAGTTGATA TTGCTGCAAA TGAACTGAGA ATTTTTCCTA CTGAGCTGAG TGCTCTCCCT 660

[0002]

TTGAAAGAGT TACACTGTGA GGAAAACCCC CTGTTACAAC ACATTCCTGT CCATTCAGTA 720

CAAGAAGAGG AGGTCCTCTC ACTGAAGGAA ATTGGTGCAA GATACATTAT GAAGGAACTC 780

AAGGATAGGT GGTCCTACCT GAGGAAGGCT ATCCGCCATT ACCCCCAGAT CAAGGAGATG 840

CTGGCCCAGT CCAGTAAATG TGCCGTGTGT GGGGAGTCCT TCCTCAATAC ATGGCTGGAG 900

TGTGTACGCT TTGTAGATGC TAGAGAGGAT TTGAAACTCA ACAACCTGTC AGGTCTGATC 960

CCAGTGCGGG CTTTACTCTG TTCTTATCGA TGCTTCAACT CTTCAGGGCA TGATTACTAT 1020

GGTGTGGCCT TTCCTCTCGA GCGGCCGCAT CGTGACTGA 1059

<210>2

<211>352

<212>PRT

<213>太平洋牡蛎（*Crassostrea gigas*）

<400>2

Met Ala Asp Thr Met Leu Val Arg Ala Leu Lys Gly Lys Pro Lys

1 5 10 15

Ala Leu Asn Leu Cys Asn Lys Lys Leu Asp Lys Val Pro Lys Ile

20 25 30

Ile Gly Lys Leu Asp Cys Val Leu His Leu Gln Leu Arg Gly Asn

35 40 45

Lys Leu Asn Thr Leu Pro Met Glu Leu Ser His Leu Phe Gln Leu

50 55 60

[0003]

Gln Ile Leu Asn Leu Gly Asn Asn Glu Phe Glu Glu Leu Pro Glu

65 70 75

Val Leu Glu Tyr Leu Thr Met Leu Glu Lys Leu His Leu Phe Asn

80 85 90

Asn Lys Leu Lys Thr Leu Ala Pro Lys Val Leu Thr Asn Leu Arg

95 100 105

Asn Leu Thr Phe Leu Asn Leu Asn Ser Asn Asn Leu Lys Thr Phe

110 115 120

Pro Pro Glu Ile Cys Arg Leu Ser Ser Leu Gln His Leu Ser Val

125 130 135

Asp Ser Asn Gln Leu Thr Glu Leu Pro Val Glu Ile Cys Ala Leu

140 145 150

Leu Arg Leu Glu Glu Phe His Val Ala Asn Asn Gln Leu Thr Ser

155 160 165

Leu Pro Leu Glu Phe Gly Phe Leu Val Asn Leu Glu Lys Leu Tyr

170 175 180

Leu Gln Lys Asn Lys Ile Arg Glu Leu Pro Glu Ser Leu Gly Lys

185 190 195

Cys Tyr Lys Leu Arg Thr Val Asp Ile Ala Ala Asn Glu Leu Arg

200 205 210

[0004]

Ile Phe Pro Thr Glu Leu Ser Ala Leu Pro Leu Lys Glu Leu His

215 220 225

Cys Glu Glu Asn Pro Leu Leu Gln His Ile Pro Val His Ser Val

230 235 240

Gln Glu Glu Glu Val Leu Ser Leu Lys Glu Ile Gly Ala Arg Tyr

245 250 255

Ile Met Lys Glu Leu Lys Asp Arg Trp Ser Tyr Leu Arg Lys Ala

260 265 270

Ile Arg His Tyr Pro Gln Ile Lys Glu Met Leu Ala Gln Ser Ser

275 280 285

Lys Cys Ala Val Cys Gly Glu Ser Phe Leu Asn Thr Trp Leu Glu

290 295 300

Cys Val Arg Phe Val Asp Ala Arg Glu Asp Leu Lys Leu Asn Asn

305 310 315

Leu Ser Gly Leu Ile Pro Val Arg Ala Leu Leu Cys Ser Tyr Arg

320 325 330

Cys Phe Asn Ser Ser Gly His Asp Tyr Tyr Gly Val Ala Phe Pro

335 340 345

Leu Glu Arg Pro His Arg Asp

350 352

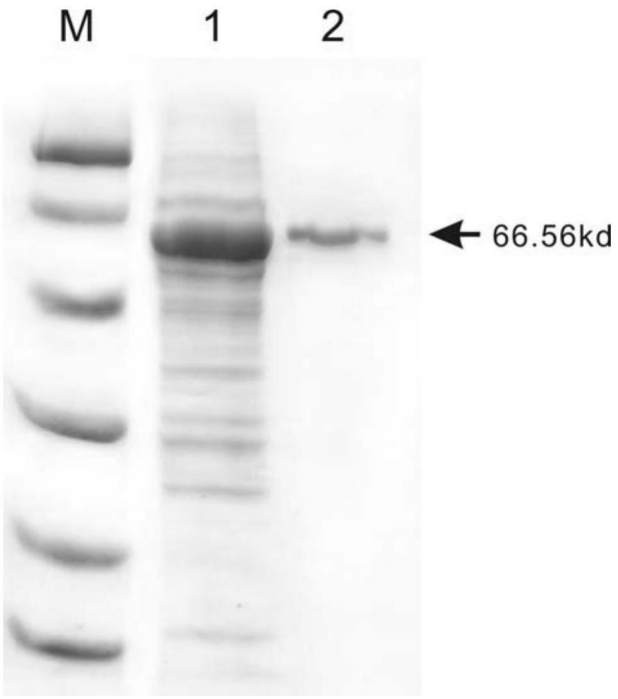


图 1

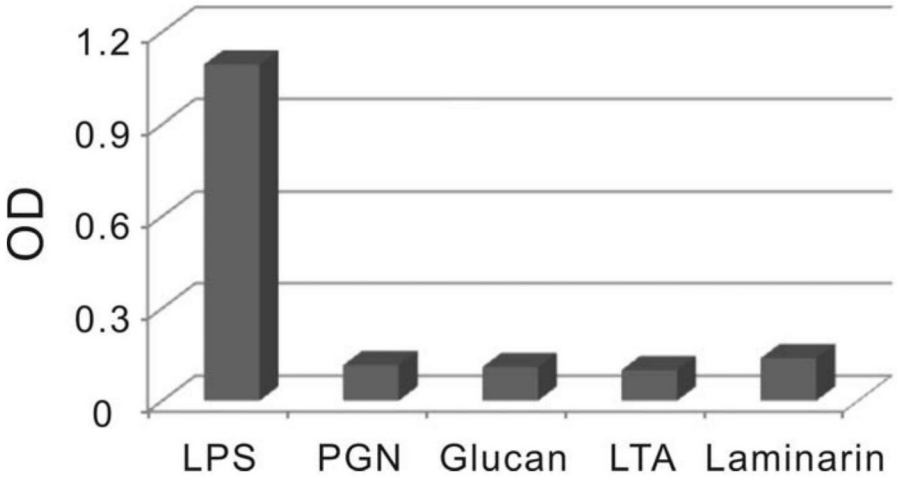


图 2