

1. 一种拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合,包括第一拆分荧光蛋白的融合蛋白和第二拆分荧光蛋白的融合蛋白,其中,第一拆分荧光蛋白的融合蛋白,为可自我重新结合的已被拆分的第一荧光蛋白的一部分和可自我重新结合的已被拆分的第二荧光蛋白的一部分的融合蛋白;第二拆分荧光蛋白的融合蛋白,为前述第一荧光蛋白的剩余部分和前述第二荧光蛋白的剩余部分的融合蛋白,

其特征在于,前述的第一拆分荧光蛋白的融合蛋白与前述第二拆分荧光蛋白的融合蛋白结合后,前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个,可以自我重新结合恢复拆分前的荧光功能,从而发出荧光。

2. 根据权利要求1所述的一种拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合,其中,前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个,是海肾荧光素酶(Renilla luciferase,RL),其拆分点在氨基酸序列的第229和第230之间。

3. 根据权利要求1所述的一种拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合,其中,前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个,是绿色荧光蛋白,其拆分点在氨基酸序列的第157和第158之间。

4. 一种表达载体的组合,包括第一表达载体和第二表达载体,其特征在于,第一表达载体包括表达前述第一拆分荧光蛋白的融合蛋白的基因,第二表达载体包括表达前述第二拆分荧光蛋白的融合蛋白的基因。

5. 根据权利要求4所述的一种表达载体的组合,其中,前述第一表达载体和前述第二表达载体中的任一个为包膜蛋白表达载体,再包括了表达病毒包膜蛋白的基因,该包膜蛋白表达载体可以同时表达包膜蛋白以及第一拆分荧光蛋白的融合蛋白或第二拆分荧光蛋白的融合蛋白。

6. 根据权利要求5所述的包膜蛋白表达载体,其中,病毒包膜蛋白为HIV-1包膜蛋白。

7. 一种病毒包膜蛋白的受体的筛选方法,该方法包括以下步骤:

- a) 将权利要求5所述的包膜蛋白表达载体转入第一细胞中表达,
- b) 将权利要求5所述的另外一个不含有包膜蛋白的基因的表达载体转入第二细胞中表达,该第二细胞含有该包膜蛋白所对应的受体,
- c) 混合第一细胞和第二细胞,
- d) 检验第一细胞和第二细胞通过病毒包膜蛋白与受体结合的方式融合后的荧光,该荧光为前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个自我重新结合后恢复的拆分前的荧光。

8. 一种膜融合的促进剂或抑制剂的筛选方法,该方法包括以下步骤:

- a) 将权利要求5所述的包膜蛋白表达载体转入第一细胞中表达,
- b) 将权利要求5所述的另外一个不含有包膜蛋白的基因的表达载体转入第二细胞中表达,该第二细胞含有该包膜蛋白所对应的受体,
- c) 加入促进或抑制病毒包膜蛋白与受体结合的促进剂或抑制剂,
- d) 混合第一细胞和第二细胞,
- e) 检验第一细胞和第二细胞通过病毒包膜蛋白与受体结合的方式而融合后的荧光,该荧光为前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个自我重新结合后恢复的拆分前的荧光。

9. 根据权利要求7所述的病毒包膜蛋白的受体的筛选方法,病毒包膜蛋白为HIV-1,受体为CD4与其辅助受体CCR5的组合物或是CD4与其辅助受体CXCR4的组合物。

10. 根据权利要求8所述的膜融合的促进剂或抑制剂的筛选方法,病毒包膜蛋白为HIV-1,受体为CD4与其辅助受体CCR5的组合物或是CD4和其辅助受体CXCR4的组合物。

拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合、其表达载体及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合及其表达载体,以及通过该拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合筛选病毒包膜蛋白的受体的方法,和筛选膜融合的促进剂或抑制剂的方法。

背景技术

[0002] 膜融合是生物系统中非常普遍的现象。肌肉发生,受精作用,以及囊泡的运输过程中都涉及到膜融合。具有包膜的病毒侵染宿主细胞,同样依赖于膜融合。膜融合是由2个膜所分开的2个独立区室发生合并形成一个区室的过程。人们可以使用多种不同的技术监测这个过程。一种方法是使用一对拆分蛋白,当它们相互重新结合的时候,将会重新获得其整体蛋白的活性。

[0003] 在这类方法中已经建立了很多种报告蛋白系统。像天然就具有的自我组装能力的拆分 β -半乳糖苷酶(β -gal),以及拆分GFP蛋白(spGFP)都已应用于膜融合的分析中。拆分的酶可以实现定量的监测,但是如果使用的底物不具有膜通透性则需要破坏细胞膜才能实现。spGFP可以实现连续地观察活体细胞中发生的情况,但是其定量效果不如酶。

[0004] 所以在现有技术里就不存在一种技术,即可以实现定量地监测体细胞融合又可以实现连续地观察活体细胞融合蛋白或其组合以及方法。同时也缺乏一种简便地筛选病毒包膜蛋白的受体的方法,和一种简便地筛选膜融合的促进剂或抑制剂的方法。

发明内容

[0005] (一)发明的摘要

[0006] (发明所要解决的问题)

[0007] 本发明经过对大量拆分蛋白的研究和实验,发现在融合二种不同种类的拆分荧光蛋白的情况下,特别是这二种不同种类的拆分荧光蛋白中的至少一种为拆分荧光酶的情况下,就可以提供即可以实现定量地监测体细胞融合又可以实现连续地观察活体细胞融合蛋白或其组合以及方法的技术。

[0008] 本发明同时也发现了现有的荧光蛋白的新的拆分点。如果使用这个新的拆分点拆分的荧光蛋白作为拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合的一部分,可以解决现有的问题。

[0009] (二)发明的详细说明

[0010] 本发明的目的是提供一种拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合,包括第一拆分荧光蛋白的融合蛋白和第二拆分荧光蛋白的融合蛋白,其中,第一拆分荧光蛋白的融合蛋白,为可自我重新结合的已被拆分的第一荧光蛋白的一部分和可自我重新结合的已被拆分的第二荧光蛋白的一部分的融合蛋白;第二拆分荧光蛋白的融合蛋白,为前述第一荧光蛋白的剩余部分和前述第二荧光蛋白的剩余部分的融合蛋白,其特征在于,前述的第一拆分荧光蛋白的融合蛋白与前述第二拆分荧光蛋白的融合蛋白结合后,前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个,可以自我重新结合恢复拆分前的荧光功能,从而发出荧光。

[0011] 本发明的另外一个目的是提供一种病毒包膜蛋白的受体的筛选方法,该方法包括以下步骤:a)将本发明(权利要求5)所述的包膜蛋白表达载体转入第一细胞中表达,b)将本发明(权利要求5)所述的另外一个不含有包膜蛋白的基因的表达载体转入第二细胞中表达,该第二细胞同时含有该包膜蛋白所对应的受体,c)混合第一细胞和第二细胞,d)检验第一细胞和第二细胞通过病毒包膜蛋白与受体结合的方式融合后的荧光,该荧光为前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个自我重新结合后恢复的拆分前的荧光。

[0012] 本发明的另外一个目的是提供一种膜融合的促进剂或抑制剂的筛选方法,该方法包括以下步骤:a)将本发明(权利要求5)所述的包膜蛋白表达载体转入第一细胞中表达,b)将本发明(权利要求5)所述的另外一个不含有包膜蛋白的基因的表达载体转入第二细胞中表达,该第二细胞同时含有该包膜蛋白所对应的受体,c)加入促进或抑制病毒包膜蛋白与受体结合的促进剂或抑制剂,d)混合第一细胞和第二细胞,e).检验第一细胞和第二细胞通过病毒包膜蛋白与受体结合的方式而融合后的荧光,该荧光为前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个自我重新结合后恢复的拆分前的荧光。

[0013] (具体实施形态)

[0014] 以下通过提供本发明的具体实施形态来说明本发明,但是这里说明的具体实施形态只是本发明的一个实施例而已,不是用来限定本发明的范围以及其等同范围的。属于本技术领域的技术者可以容易地理解本说明书所记述的发明范围以及本发明的等同范围。

[0015] (第一实施形态)

[0016] 本发明的第一实施形态为提供一种拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合,包括第一拆分荧光蛋白的融合蛋白和第二拆分荧光蛋白的融合蛋白,其中,第一拆分荧光蛋白的融合蛋白,为可自我重新结合的已被拆分的第一荧光蛋白的一部分和可自我重新结合的已被拆分的第二荧光蛋白的一部分的融合蛋白;第二拆分荧光蛋白的融合蛋白,为前述第一荧光蛋白的剩余部分和前述第二荧光蛋白的剩余部分的融合蛋白,其特征在于,前述的第一拆分荧光蛋白的融合蛋白与前述第二拆分荧光蛋白的融合蛋白结合后,前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个,可以自我重新结合恢复拆分前的荧光功能,从而发出荧光。

[0017] 本发明不局限特定的蛋白,可以使用的拆分荧光蛋白可以是现有的技术中存在的所有的可拆分的荧光蛋白(fluorescent)或是可拆分的冷光(luminescent)蛋白。本发明所采用的拆分荧光蛋白优选拆分荧光酶。因为通过加入酶的对应底物(substrate)就可以定量地测量拆分荧光酶的活性(activity)。

[0018] 另外本发明中的所谓的「拆分」是指,在蛋白的氨基酸序列的一个点上将蛋白拆分为两部分,而这被拆分的两部分可能自我重新结合后恢复其原来的功能。这里所谓的「自我重新结合」包括自我重聚(self-reassociate)或是自我再组(self reassemble)等形式。

[0019] 在本发明中优先采用的两种拆分荧光蛋白分别为,海肾荧光素酶(renillaluciferase, RL)和绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)。本发明采用的海肾荧光素酶(renilla luciferase, RL)是可以通过使用具有膜通透性的底物endurene,在活体细胞中连续地监测膜融合的过程,从而定量地检测膜融合。RL是一种应用广泛的酶,已经建立了完善的检测系统。但是它的缺点在于拆分RL(spRL)具有众所周知较低自我结合能力。因此为了增强spRL的自我结合能力,本发明采用了接合另外一个拆分

荧光蛋白 (spGFP) 的方式。

[0020] 本发明人通过大量的实验等在大量的可拆分的荧光蛋白中选定另外一个拆分荧光蛋白,其为绿色荧光蛋白 (GFP)。绿色荧光蛋白的拆分点有多种,本发明优选在拆分点位于氨基酸序列的第 157 和第 158 之间的,这样就把绿色荧光蛋白拆分为 GFP₁₋₇ 和 GFP₈₋₁₀ 两部分。这两部分自我结合后可以恢复原来的 GFP 的萤光功能是本发明人通过多种试验结果首次发现的,是一种新颖的可拆分的绿色荧光蛋白的形态。

[0021] 可以拆分为 GFP₁₋₇ 和 GFP₈₋₁₀ 两部分的 GFP 不尽是一种新颖的可拆分的绿色荧光蛋白而且是协助和增大被拆分的 RL 的恢复能力。所以,本发明的特征在于,第一拆分荧光蛋白的融合蛋白和第二拆分荧光蛋白的融合蛋白里的 spGFP 各部分自我结合后可以恢复原来的 GFP 的蛋白功能,同时,在 spGFP 的促进下 spRL 各部分自我结合后也可以恢复原来的海肾荧光素酶 (Renilla luciferase, RL) 的蛋白功能。

[0022] 本发明采用的海肾荧光素酶 (renilla luciferase, RL) 的拆分点位于氨基酸序列的第 229 和第 230 之间,把海肾荧光素酶拆分为 nRL 和 cRL 两部分。本发明采用的绿色荧光蛋白的拆分点位于氨基酸序列的第 157 和第 158 之间。拆分点位于氨基酸序列的第 157 和第 158 之间的绿色荧光蛋白是和最适合于被拆分海肾荧光素酶组成拆分荧光蛋白的融合蛋白。

[0023] 本发明的一种拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合中的第一拆分荧光蛋白的融合蛋白和第二拆分荧光蛋白的融合蛋白分别为, nRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白以及 cRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白,或是 nRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白以及和 cRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白。本发明优选由 nRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白以及 cRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白的组合。优选 nRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白以及 cRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白的组合。

[0024] 其融合蛋白的序列如下;

[0025] nRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白 (Dual₁₋₇) (SEQ ID No :1)

[0026] (nRL :1-229, linker :230-233, splitGFP₁₋₇ :234-390)

[0027] MASKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGNAASSYLWRHVVPHEIP
VARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELNLPKKIIFVGHWDWACLAHFHYSYEHQDKIKAIVHAESV
VDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEKGMVLENNFFVETMLPSKIMRKLPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREI
PLVKGGGLQGMVSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT
YGVQCFSRYDPHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGKYKTRAVVKFEGDTLVNRIELKGTDFKEDGNILGHKLEY
NFNSHNVYITADK

[0028] cRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白 (Dual₈₋₁₁) (SEQ ID No :2)

[0029] (splitGFP₈₋₁₁ :2-75, linker :76-77, cRL :78-159)

[0030] MQKNGIKANFTVRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHVLSQTVLSKDPNEKRDHMLHEI
VNAAGITVDKPDVVQIVRNYAYLRASDDLPMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGHLHFSQEDAPDEM
GKYIKSFVERVLKNEQ

[0031] 另外,本实施形态的优选融合蛋白通过 2 至 4 个氨基酸来连接。这种融合蛋白的连接方式对本技术领域中的技术人员来说不需要付出创造性的劳力就可以容易地想到。

[0032] 从图 1a 显示了 nRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白以及 cRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白的组合的立体图,以及,在 GFP 的其自我重新结合的影响下 cRL 和 nRL 也自我重组的过程。图中的

数字表示引入拆分点的氨基酸残基位置。该图是根据 RL(PDBid:2pse) 和 GFP 超级折叠体(PDBid:2b3p) 的晶体结构猜测的示意图,相应的使用黄色和绿色表示。

[0033] 本发明人根据最近解出的 RL 三维结构 (PDB id:2pse),分析了拆分 RL 的连接点的构造,和 GFP 超级折叠体 (PDBid:2b3p) 中发现的反向平行的 β 折叠连接的构造,发现了以反向的方式融合两个被拆分的荧光蛋白可以达到本发明的效果。

[0034] 因此本实施形态中的 nRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白通过 GFP₁₋₇ 的第 157 位氨基酸和 nRL 的第 229 位氨基酸的结合而构成。cRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白通过 GFP₈₋₁₀ 的第 232 位氨基酸和 nRL 的第 229 位氨基酸的结合而构成。在通过 GFP₁₋₇ 和 GFP₈₋₁₀ 的自我重新结合的影响下带动了 RL 的重组,使得这二种荧光蛋白恢复拆分前的荧光功能,从而发出荧光。

[0035] (第二实施形态)

[0036] 本发明的第二实施形态为一种表达载体的组合,包括第一表达载体和第二表达载体,其特征在于,第一表达载体包括表达前述第一拆分荧光蛋白的融合蛋白的基因,第二表达载体包括表达前述第二拆分荧光蛋白的融合蛋白的基因。

[0037] 本实施形态中的表达载体组合中的第一表达载体和第二表达载体的具体例为, nRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白基因的表达载体, nRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白基因的表达载体, cRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白基因的表达载体,以及, cRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白基因的表达载体。

[0038] 本实施形态中的表达载体可以使用质粒载体等本技术领域技术人员所熟知的表达载体。

[0039] 本发明的第二实施形态为一种表达载体的组合,其中,前述第一表达载体和前述第二表达载体中的任一个为包膜蛋白表达载体,再包括了表达病毒包膜蛋白的基因,该包膜蛋白表达载体可以同时表达包膜蛋白以及第一拆分荧光蛋白的融合蛋白或第二拆分荧光蛋白的融合蛋白。由此,本实施形态中的表达载体组合优选以下四组:

[0040] A. 包括 HIV-1 的包膜蛋白的基因, nRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白的基因的表达载体,以及,包括 cRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白的基因的表达载体的组合;

[0041] B. 包括 HIV-1 的包膜蛋白的基因, nRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白的基因的表达载体,以及,包括 cRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白的基因的表达载体的组合;

[0042] C. 包括 HIV-1 的包膜蛋白的基因, cRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白的基因的表达载体,以及,包括 nRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白的基因的表达载体的组合;

[0043] D. 包括 HIV-1 的包膜蛋白的基因, cRL 和 GFP₈₋₁₀ 的融合蛋白的基因的表达载体,以及,包括 nRL 和 GFP₁₋₇ 的融合蛋白的基因的表达载体的组合。

[0044] (第三实施形态)

[0045] 本发明的第三实施形态为一种病毒包膜蛋白的受体的筛选方法,该方法包括以下步骤:a) 将本发明(权利要求5)所述的包膜蛋白表达载体转入第一细胞中表达,b) 将本发明(权利要求5)所述的另外一个不含有包膜蛋白的基因的表达载体转入第二细胞中表达,该第二细胞同时含有该包膜蛋白所对应的受体,c) 混合第一细胞和第二细胞,d) 检验第一细胞和第二细胞通过病毒包膜蛋白与受体结合的方式融合后的荧光,该荧光为前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个自我重新结合后恢复的拆分前的荧光。

[0046] 本实施形态是一种拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合的使用,它用于病毒包膜蛋白的受体的筛选方法的形态。因为本发明的拆分荧光蛋白在自我重新结合恢复拆分前的荧光

功能,从而发出荧光,所以,转染在不同的细胞里第一拆分荧光蛋白的融合蛋白和第二拆分荧光蛋白的融合蛋白只有在其细胞融合之际才能自我重新结合恢复拆分前的荧光功能,从而发出荧光。通过检验荧光(GFP的信号)就可以检验出细胞是否融合。同时通过RL的活性以及GFP的信号,能够在活体细胞中既定量又可视地监测膜融合过程。

[0047] 本实施形态优选通过病毒包膜蛋白和其对应的受体的结合而发生的细胞融合。比如HIV-1的包膜蛋白和受体CD4与其辅助受体CCR5或受体CD4与其辅助受体CXCR4的结合会导致含有HIV-1的包膜蛋白的细胞和含有受体CD4与其辅助受体CCR5或受体CD4与其辅助受体CXCR4的细胞发生细胞融合。本实施形态可以筛选HIV-1的包膜蛋白的受体是CD4与其辅助受体CCR5还是受体CD4与其辅助受体CXCR4,或是其两者。

[0048] 本实施形态的第一步骤为本发明所述的包膜蛋白表达载体转入第一细胞中表达,这样就产生了包括包膜蛋白以及第一拆分荧光蛋白的融合蛋白或第二拆分荧光蛋白的融合蛋白的第一细胞。本实施形态的第二步骤为本发明所述的另外一个不含有包膜蛋白的基因的表达载体转入第二细胞中表达,该第二细胞同时含有该包膜蛋白所对应的受体,这样就产生了只含有第一细胞内的包膜蛋白所对应的受体和另外一个拆分荧光蛋白的融合蛋白的第二细胞。

[0049] 在混合第一细胞和第二细胞后(本实施形态的第三步骤),只有在包膜蛋白和其对应的受体存在下才可能发生第一细胞和第二细胞的融合以及检测到,cRL和nRL重组后的,以及GFP₁₋₇和GFP₈₋₁₀重组后的荧光。所以本实施形态可以通过荧光的测试来筛选包膜蛋白所对应的受体。

[0050] 另外本发明的荧光蛋白为RL,其有一种膜通透性的底物endurene。可以通过投入底物endurene来测试RL的反应而定量地算出细胞融合。

[0051] 另外,为了提高筛选包膜蛋白所对应的受体的效率,本实施形态里还可以增加一个筛选第一细胞和第二细胞的步骤。

[0052] (第四实施形态)

[0053] 本发明的第四实施形态为一种膜融合的促进剂或抑制剂的筛选方法,该方法包括以下步骤:a)将本发明(权利要求5)所述的包膜蛋白表达载体转入第一细胞中表达,b)将本发明(权利要求5)所述的另外一个不含有包膜蛋白的基因的表达载体转入第二细胞中表达,该第二细胞同时含有该包膜蛋白所对应的受体,c)加入促进或抑制病毒包膜蛋白与受体结合的促进剂或抑制剂,d)混合第一细胞和第二细胞,e)检验第一细胞和第二细胞通过病毒包膜蛋白与受体结合的方式而融合后的荧光,该荧光为前述第一荧光蛋白和前述第二荧光蛋白中的至少一个自我重新结合后恢复的拆分前的荧光。

[0054] 从前述的第三实施形态可以知道,如果采用和HIV-1的包膜蛋白对应的受体,第一细胞和第二细胞一般会融合。在此前提下,在细胞融合时再添加抑制剂的话,就可以用这个系统来筛选抑制细胞融合,也就是抑制HIV-1的包膜蛋白和其对应的受体结合的抑制剂。同样也可以用这个系统来筛选促进细胞融合,也就是促进HIV-1的包膜蛋白和其对应的受体结合的促进剂。

[0055] 和前述的第三实施形态一样,如果再添加RL的膜通透性的底物endurene,就可以定量地测试抑制剂或促进剂的反应程度,算出抑制剂或促进剂的效果。

[0056] 另外,为了提高筛选包膜蛋白所对应的受体的效率,本实施形态里还可以增加一

个筛选第一细胞和第二细胞的步骤。

[0057] (三)发明的效果

[0058] 本发明通过提供一种新颖的拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合,并且使用此融合蛋白的组合可以来监测膜融合,由于拆分荧光蛋白的融合蛋白的双重功能,膜融合可以在相同的活体细胞中使用下述的 2 个参数来定量的评估。一个是平衡的膜融合步骤是如何倾向于融合孔洞形成的,这个可以通过定量的 RL 活性的绝对数值或者 GFP 信号阳性细胞的数目来估计。另一个是根据 RL 活性的时间进程来评估膜融合发生有多快。使用本发明的方法获得的信息对于阐明膜融合的机制将会很有帮助。进一步的定量膜融合检测将会对于新药开发很有帮助。

附图说明

[0059] 图 1 为拆分蛋白或拆分蛋白的融合蛋白的构建以及互补效率的检测结果。

[0060] 图 2 为在非细胞体系中分析 RL 活性恢复的酶动力学以及使用拆分蛋白的融合蛋白组合系统监测膜融合在非细胞体系中互补反应酶动力学的测量结果。

[0061] 具体的实施方式

[0062] (实施例一)

[0063] 拆分点位于氨基酸序列的第 157 和第 158 之间的绿色荧光蛋白的活性:

[0064] 本发明人对图 1(b) 所示的不同拆分点的绿色荧光蛋白进行了测试,包括 GFP₁₋₁₀ 和 GFP₁₁ 以及 GFP₁₋₇ 和 GFP₈₋₁₁。所用到的缩略词如下:nRL:RL 的 N 末端片断,cRL:RL 的 C 末端片断,BaseVel:来源于具有异源二聚亮氨酸拉链结构的多肽(Velcro 多肽)的基因工程多肽衍生物,其含有 Velcro 多肽碱性的氨基酸残基,AcidVel:亮氨酸拉链多肽的另一部分,其含有一些酸性的氨基酸残基,PH domain:pleckstrin 同源结构域,Dual:GFP 片断和 RL 片断相互融合形成的融合蛋白(下标的数字表示引入拆分点的 GFP 蛋白折叠的位置)。

[0065] 拆分荧光蛋白的融合蛋白在 293FT 细胞中的实验结果显示在图 1(c)。RL 或者 GFP 的活性在转染 36 小时后检测。图中上部分是根据材料和方法部分的方法测量出的 RL 活性。R. L. U. 表示相对发光值。下部分是使用 IN CellAnalyzer 检测的 GFP 信号。图中给出了 GFP 信号的图片以及明场(BF)的图片。所有仅转染了单个 DNA 的细胞都没有表现出 RL 活性以及 GFP 信号。pEGFP 表示使用了表达增强型 GFP 表达质粒,天然的 RL 表示使用了含有 RL 全长的质粒。

[0066] 本发明人检测了利用这个具有较强自我结和能力的蛋白对 GFP₁₋₇/GFP₈₋₁₁ 构建的 spRL 的互补效率。基于 GFP₁₋₇/GFP₈₋₁₁ 的拆分荧光蛋白的融合蛋白(DualSplit fusion Protein(DSP):DSP₁₋₇/DSP₈₋₁₁)中的 spRL(图 1c, DSP₁₋₇/DSP₈₋₁₁)互补效率比使用 GFP₁₋₁₀/GFP₁₁(图 1c, DSP₁₋₁₀/DSP₁₁)或者比命名为“Velcro”的异源二聚卷曲螺旋要高 2 个数量级(图 1c, nRL-baVel/acVel-cRL)。事实上,在所有测试的 DSPs 中, DSP₁₋₇/DSP₈₋₁₁ 恢复的 GFP 信号是最强的(图 1c, DSP1-7/DSP8-11)。本发明人也尝试了在 DSPs 上融合 pleckstrin 同源结构域(PH domain)(图 1b),因为在此前的研究中,它有助于 GFP 片断的表达。但在本实验中附加上的 PH 结构域却降低了活性 2 个数量级,因此 PH 结构域使用在 DSP 上起到的是一个减弱活性的效果(图 1c, PH-GFP₁₋₁₀/PH-GFP₁₁ 和 PH-GFP₁₋₇/PH-GFP₈₋₁₁)。与预期一致,单个 DSP 片断并不产生 GFP 信号,或者具有 RL 活性。这两种拆分荧光蛋白的融合蛋白在表

达细胞中都是均匀分布的,没有观察到特异的定位模式。本发明人接下来在非细胞体系中研究了 DSP₁₋₇/DSP₈₋₁₁ 互补反应的酶动力学。通过将含有单个拆分荧光蛋白的融合蛋白的细胞抽提物相互混合,然后测定选定时间点的 RL 活性。DSP₁₋₇ 和 DSP₈₋₁₁ 的互补反应起始非常迅速,并在 8 分钟内完成了反应(图 2a);表明拆分荧光蛋白的融合蛋白可以用于研究膜融合的早期步骤。

[0067] (实施例二)

[0068] (1) 拆分蛋白和融合蛋白的组合质粒的构建

[0069] 本发明人使用了 phRL-CMV 质粒 (Promega) 的骨架序列来表达融合蛋白。RL 拆分点的选择是基于此前的遗传学研究 (Paulmurugan, 2003)。spRL 的 N 末端或者 C 末端片断相应地命名为 nRL 或者 cRL。本发明人在实验中将一些结合蛋白融合到了 spRL 上。这包括使用了一个称作 Velcro 多肽的亮氨酸拉链片断,其含有形成平行卷曲螺旋 (parallel coiled coil) 的酸性或者碱性残基 (O'Shea, 1993)。Velcro 含有酸性残基的片段 (AcidVel) 被克隆到了 nRL 的 C 末端。Velcro 含有碱性残基的片段 (BaseVel) 被克隆到了 cRL 的 N 末端。

[0070] 为了将 spGFP 与 spRL 相互融合,通过使用 OPT GFP₁₋₁₁ (Cabantous, 2006) 为模板使用 KOD(+) 聚合酶 (Toyobo) 或者 Pfu turbo (Stratagene) PCR 扩增得到两端含有 NheI 和 SbfI 酶切位点的 spGFPs 的片段 (GFP₁₋₁₀, GFP₁₋₇ 和 GFP₈₋₁₁)。该扩增片段随后被克隆到 PCR-4TOP0blunt 中,并测序。然后 GFP₁₋₁₀ 和 GFP₁₋₇ 片段被克隆到 nRL 或者 phRL 上游的 NheI 和 SbfI 酶切位点之间。GFP₈₋₁₁ 片段被克隆到 spRL/phRL-CMV 载体的 SalI 和 XbaI 酶切位点之间。

[0071] 在 5' 末端和 3' 末端含有 NheI 和 SbfI 酶切位点 GFP₁₁ 片段是通过退火一对合成的寡居核苷酸片段获得,并克隆得到。这些构建的 spRL 基因融合到 GFP₁₋₁₀, GFP₁₋₇, GFP₈₋₁₁ 和 GFP₁₁ 上后,相应的命名为 dual₁₋₁₀, dual₁₋₇, dual₈₋₁₁, 和 dual₁₁。为了将 PH 结构域附着到双重拆分蛋白的基因序列上,所有的双重拆分蛋白的基因序列都通过 PCR 反应扩增,在 5' 和 3' 末端相应地添加上了 EcoRI 和 KpnI 酶切位点,并克隆到了前述的含有 PH 结构域序列的 spGFP/pdDEGFP 载体中 (WJQ 等)。

[0072] (2) 在哺乳动物细胞中共转拆分蛋白和双重拆分蛋白的互补分析

[0073] 所有的细胞培养都是在 37°C, 5% CO₂ 浓度的条件下培养的。2×10⁵ 细胞密度的 293FT 细胞使用 Fugene HD 转染了 100ngDNA (Fugene HD/20ng/μl DNA 所用试剂比例是 1/17;本实验中所有的转染都是使用这个比例完成的)。转染完成后 2 天,使用 IN Ce11 Analyzer 1000 (GE healthcare) 对 293FT 细胞拍照 (使用 10× 物镜,每孔选择 5 个不同的区域取样拍照)。在此分析之后,同样的培养物使用 Renilla Luciferase Assay 试剂盒 (Promega) 跟据产品说明书测量 RL 活性。

[0074] (3) 非细胞体系中拆分荧光蛋白的融合蛋白的互补分析

[0075] 在 6cm 的培养皿 (BD falcon) 上铺种每毫升密度为 4×10⁴ 的 293FT 细胞和 293CD4 细胞。在铺种 2 天之后,使用 DSP₁₋₇ 和 DSP₈₋₁₁ 基因相应的转染 293FT 细胞和 293CD4 细胞。在使用 PBS 洗涤细胞 2 次以后,转染的细胞使用细胞刮刀 (BD falcon) 移除细胞,并使用离心机 (20,000g, 4°C, 10 分钟) 收集,然后按照说明书 (Renilla Luciferase Assay Kit, Promega) 使用 500 μl 的样品裂解缓冲液裂解细胞,获得细胞裂解液。每份裂解液取 20 μl 混合,在室温使用 Glomax 仪器 (Promega) 根据选定时间进程测量活性值。每个独立

的实验都至少重复 3 次。

[0076] (4) 使用拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合基因以及 enduren 底物监测活体细胞的膜融合

[0077] 当细胞大约 50% 铺满的时候, 向 293FT 细胞中转入 DSP1-7 以及表达 HIV-1 包膜蛋白 Env 或其突变型的表达载体 pNHcRedEluc [WJQ 等], 以在 96 孔板中产生 HIV-1 Env 表达细胞。另一方面, 将转入 DSP8-11 的 293CD4 细胞培养在温度依赖型的 6cm 培养皿中, 当温度从 37°C 降到 25°C 的时候, 细胞可以很容易的从这种培养皿壁上脱离下来。转染 36 到 48 小时后, 293CD4 细胞的培养基使用含有 60 μ M RL 膜通透底物 enduren (Promega) 的 50 μ l 培养基替换, 然后在 37°C 培养 2 个小时。与此同时, 293FT 细胞的培养基使用不含 enduren 的培养基替换。在培养 2 小时结束后, 将培养于温度依赖的培养皿中的 293CD4 细胞置于室温温育 5 分钟, 然后使用吸移管轻轻的摇动使得 293CD4 细胞的浓度均一。这些悬浮起的 293CD4 细胞随后与每孔中的 293FT 细胞共同铺种。在共培养这些细胞的期间, 按照时间顺序使用 Glomax (Promega) 的 enduren 分析程序测量每个孔的 RL 活性。也按照时间顺序使用 In Cell analyzer 1000 (GE healthcare) 检测 GFP 的绿色荧光信号。

[0078] 使用可溶性的 CD4 和 T-20 (NIH AIDS 研究和参考试剂计划) 检测了抑制剂的效果。除了抑制剂的添加, 共培养细胞进行的所有实验都使用上述方法进行。每种抑制剂在共培养之后的 0, 20, 40, 60, 100, 150 分钟时添加。RL 的活性在共培养后 200 分钟测量。

[0079] 本实验的结果表示在图 2。在非细胞体系中分析 RL 活性恢复的酶动力学以及使用双重拆分蛋白系统监测膜融合 (图 2a) 在非细胞体系中互补反应酶动力学的测量。将转染了 DSP1-7 和 DSP8-11 基因的 293FT 细胞和 293CD4 细胞的细胞裂解液混合后, 监测恢复的 RL 活性。本实验重复了 3 次以上, 具有代表性的数据呈列在此。(图 2b) 实时检测 HIV-1 包膜蛋白介导的膜融合, (图 2b) 使用 RL 的膜通透底物 enduren 的 RL 活性。

[0080] 通过共培养表达 HIV-1 包膜蛋白或其受体以及相应的双重互补蛋白的转染细胞, 并在选定的时间点做出测量。所使用的 Env 基因是来自于 HXB2 (空心方块) 的野生型 Env, 其突变体的跨膜区被血型糖蛋白 A (GpA, 空心菱形) 以及水泡性口炎病毒 (VSV-G, 空心三角) 的跨膜区所替代。使用相同的骨架序列但是不含 env 基因的质粒 (no Env, 空心圆) 作为负对照。(d) 在膜融合过程中抑制剂的效果。可溶性 CD4 是 Env 及其受体结合的抑制剂。T-20 是膜融合过程中 gp41 形成中间产物的抑制剂。

[0081] 从通过以上的恢复的 GFP 信号, 就能够很容易的掌握膜融合的分布范围。融合的数目随着时间的增加而增加, 与此前的结果一致 (图 2)。同时也使用膜通透底物 enduren 测量了 RL 的活性, 与此前得到使用的定量 T7RNA 聚合酶转移实验结果相一致。即使是在共培养 8 小时之后, 也能够检测到突变体较低的 RL 活性。野生型的 Env 表现出与此前报道相似的 S- 型酶动力学曲线 (图 2b), 共培养之后完成 50% 最多融合的时间 $t_{1/2}$, 为 100 分钟 (图 2b)。

[0082] 而在突变体中, GpA 突变体表现出了较慢的酶动力学, 其 $t_{1/2} = 165$ 分钟, 而 VSV-G 突变体表现出了更慢的酶动力学, $t_{1/2} = 264$ 分钟。即使是 GpA 和 VSV-G 突变体自身的酶动力学也存在差异。这个差异在本发明人以前使用 T7RNA 聚合酶转移分析法或者染料转移分析法的时候都没有检测到。连续地实时监测同一个培养物是拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合系统的一个很大的优势。本发明人注意到本实验的检测和以前的检测中得到的

t1/2 的不同是由于染料的转移原因,本实验的检测结果表明出更长的 t1/2。

[0083] 这种使用拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合和染料转移的方法间产生的差异可能是由于在使用拆分荧光蛋白的融合蛋白的组的实验中需要两个成分间形成足够大的孔洞使拆分荧光蛋白的融合蛋白能够通过,而对于小分子的染料来说,可以转移得比蛋白要快得多。或者也有可能是拆分荧光蛋白的融合蛋白的恢复活性所需要的延迟时间导致了这个差异。本发明人也利用这个系统检测了融合抑制剂的效果。在加入可溶性 CD4 之后 t1/2 大约为 51 分钟;在加入六螺旋管束形成抑制剂之后 t1/2 大约为 78 分钟(图 2c)。这些值都与所预测的这些抑制剂在膜融合过程中的作用点顺序相一致。

[0084] 在本发明中,本发明人应用了拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合来监测膜融合。由于拆分荧光蛋白的融合蛋白的组的双重功能,膜融合可以在相同的活体细胞中使用下述的 2 个参数来定量的评估。一个是平衡的膜融合步骤是如何倾向于融合孔洞形成的,这个可以通过定量的 RL 活性的绝对数值或者 GFP 信号阳性细胞的数目来估计。另一个是根据 RL 活性的时间进程来评估膜融合发生有多快。使用本方法获得的信息对于阐明膜融合的机制将会很有帮助。进一步的定量膜融合检测将会对于新药开发很有帮助。另外,拆分荧光蛋白的融合蛋白的组也可以用于测试细胞中的两个区室间的相互作用,例如囊泡运输。

[0085] 序列表 (SEQUENCE LISTING)

[0086] <110> 国立大学法人东京大学 (The University of Tokyo)

[0087] 中国科学院生物物理研究所

[0088] <120> 拆分荧光蛋白的融合蛋白的组、其表达载体及用途

[0089] <130> JSP080384

[0090] <160> 2

[0091] <170> PatentIn version 3.1

[0092] <210> 1

[0093] <211> 390

[0094] <212> PRT

[0095] <213> 人工序列

[0096] <220>

[0097] <223> 人工融合蛋白 (An artificial fusion protein)

[0098] <400> 1

[0099] Met Ala Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr

[0100] 1 5 10 15

[0101] Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser

[0102] 20 25 30

[0103] Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile

[0104] 35 40 45

[0105] Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val

[0106] 50 55 60

[0107] Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly

[0108] 65 70 75 80

[0109]	Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
[0110]	85 90 95
[0111]	His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys
[0112]	100 105 110
[0113]	Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His
[0114]	115 120 125
[0115]	Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu
[0116]	130 135 140
[0117]	Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
[0118]	145 150 155 160
[0119]	Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
[0120]	165 170 175
[0121]	Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
[0122]	180 185 190
[0123]	Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
[0124]	195 200 205
[0125]	Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
[0126]	210 215 220
[0127]	Leu Val Lys Gly Gly Gly Leu Gln Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu
[0128]	225 230 235 240
[0129]	Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val
[0130]	245 250 255
[0131]	Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr
[0132]	260 265 270
[0133]	Ile Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
[0134]	275 280 285
[0135]	Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys
[0136]	290 295 300
[0137]	Phe Ser Arg Tyr Asp Pro His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser
[0138]	305 310 315 320
[0139]	Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Ser Phe Lys Asp
[0140]	325 330 335
[0141]	Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Ala Val Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr
[0142]	340 345 350
[0143]	Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Thr Asp Phe Lys Glu Asp Gly
[0144]	355 360 365
[0145]	Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Asn Ser His Asn Val
[0146]	370 375 380
[0147]	Tyr Ile Thr Ala Asp Lys

[0148] 385 390
 [0149] <210>2
 [0150] <211>159
 [0151] <212>PRT
 [0152] <213>人工序列
 [0153] <220>
 [0154] <223>人工融合蛋白 (An artificial fusion protein)
 [0155] <400>2
 [0156] Met Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Thr Val Arg His Asn Val
 [0157] 1 5 10 15
 [0158] Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro
 [0159] 20 25 30
 [0160] Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr
 [0161] 35 40 45
 [0162] Gln Thr Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val
 [0163] 50 55 60
 [0164] Leu His Glu Tyr Val Asn Ala Ala Gly Ile Thr Val Asp Lys Pro Asp
 [0165] 65 70 75 80
 [0166] Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp
 [0167] 85 90 95
 [0168] Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn
 [0169] 100 105 110
 [0170] Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys
 [0171] 115 120 125
 [0172] Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly
 [0173] 130 135 140
 [0174] Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
 [0175] 145 150 155

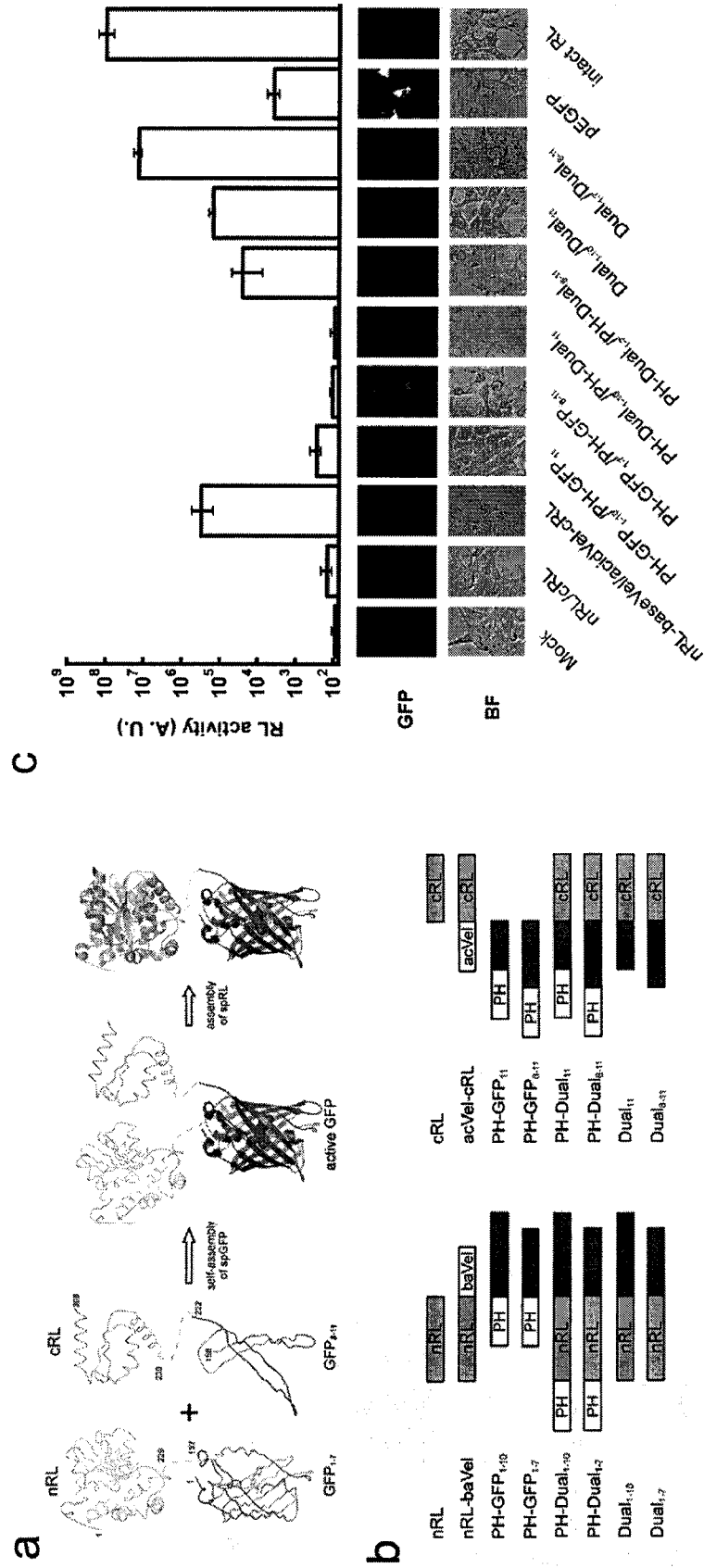


图 1

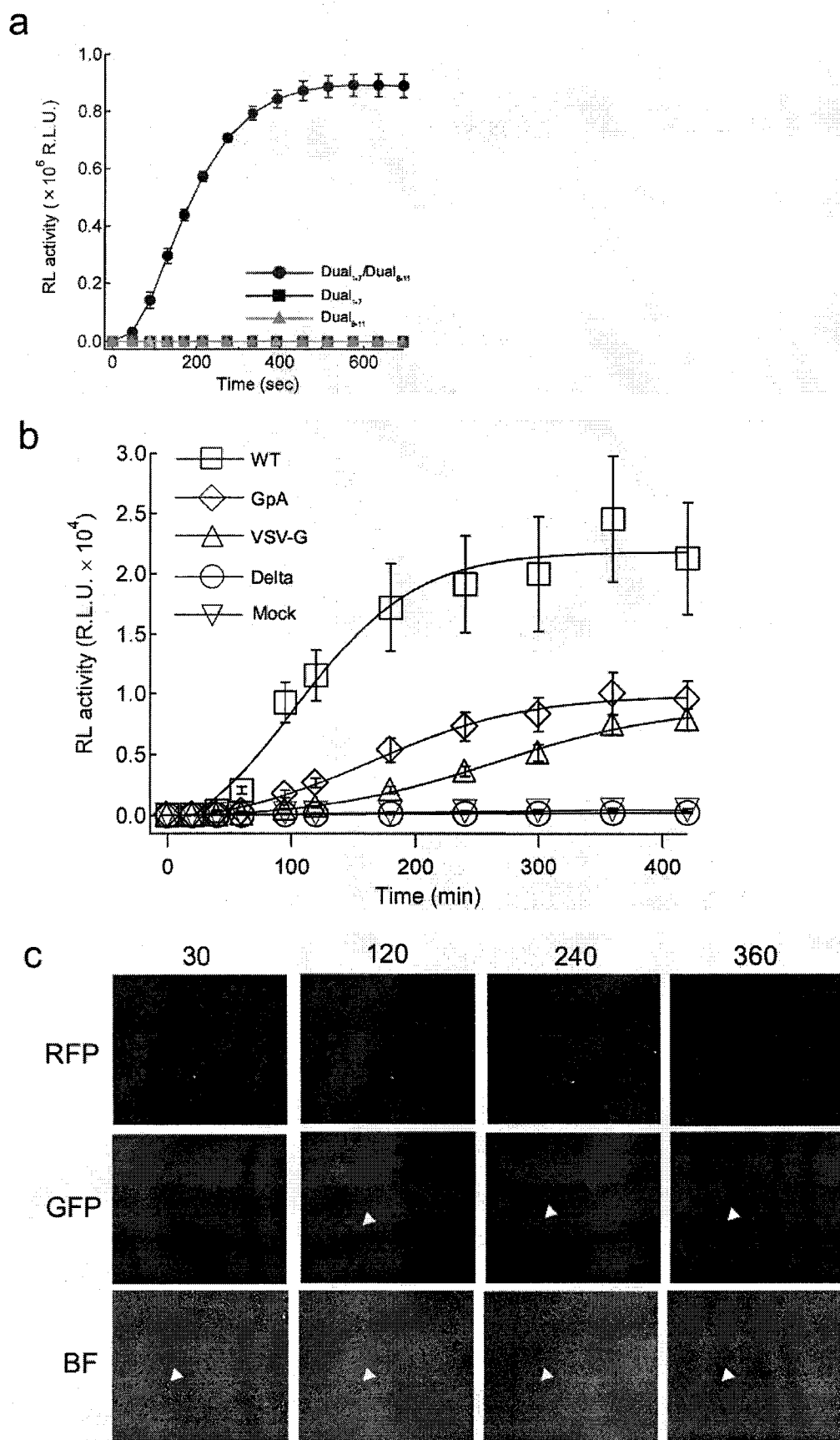


图 2