

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510011850.2

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 12 月 6 日

[11] 公开号 CN 1873005A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 25/28 (2006.01)

[22] 申请日 2005.6.2

[21] 申请号 200510011850.2

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路 15 号

[72] 发明人 赫荣乔 赵 静 王东亮 王兴胜
赫 坚

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 程金山

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 7 页

[54] 发明名称

蚯蚓微管结合蛋白 Tau、其编码基因及其应用

[57] 摘要

本发明提供一种从蚯蚓总 RNA 中通过 RT-PCR 得到的基因 E-tau 和该基因表达的蛋白质 E-Tau、含有上述基因序列的重组载体及其亚克隆和重组微生物,以及由该基因构建的真核表达载体、转染细胞系。该基因属于一种新的微管相关蛋白质 Tau 的基因,其表达产物属于一种新的蛋白质。本领域已部分了解神经 tau 与神经退行性疾病,特别是与老年性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 的病理过程密切相关;该蛋白质具有促进微管装配和稳定微管网络的作用。本发明还涉及该基因在治疗神经退行性疾病中的应用。

1. 一种多核苷酸，该多核苷酸的序列与 SEQ ID NO. 1 所示序列的同源性至少为 80%。
- 5 2. 根据权利要求 1 所述的多核苷酸，其中，该多核苷酸的序列与 SEQ ID NO. 1 所示序列的同源性至少为 90%。
3. 根据权利要求 1 所述的多核苷酸，其具有 SEQ ID NO. 1 所示序列。
4. 一种蛋白质，该蛋白质的氨基酸序列与 SEQ ID NO. 2 所示序列的同源性至少为 80%。
- 10 5. 根据权利要求 4 所述的蛋白质，其中，该蛋白质的氨基酸序列与 SEQ ID NO. 2 所示序列的同源性至少为 90%。
6. 根据权利要求 4 所述的蛋白质，其具有 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列。
7. 一种重组载体，该重组载体的特征在于含有权利要求 1-3 中任一项所述的多核苷酸。
- 15 8. 一种含有权利要求 7 所述的重组载体的宿主细胞。
9. 根据权利要求 8 所述的宿主细胞，其选自原核细胞或真核细胞。
10. 权利要求 1-3 中任一项所述的多核苷酸转染的真核细胞，该细胞系包括：HEK 293，HeLa，NIH 3T3，BNL CL2，HepG2，COS-7，CHO，
20 5HSY-5Y，IMR 32，MRC5，MCF7，562，SKOV-3，IGROV-1，HUV-EC 和 C6 等真核细胞系。
11. 一种 GFP 融合蛋白，其特征在于含有权利要求 1-3 中任一项所述的多核苷酸所表达的蛋白质。
12. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的多核苷酸在调控细胞微管组装
25 中的应用。
13. 根据权利要求 4-6 中任何一项的蛋白质在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用。
14. 根据权利要求 13 的应用，其中所述神经退行性疾病为早老性痴呆。
- 30 15. 根据权利要求 4-6 及 11 中任一项所述的蛋白质在免疫组织化学

或抗体制备中的应用。

蚯蚓微管结合蛋白 Tau、其编码基因及其应用

5 技术领域

本发明属于基因工程领域，具体地说，本发明涉及编码一种蚯蚓的微管结合蛋白的基因 *Etau*。本发明还涉及该基因编码的蛋白质功能、含有上述基因序列的重组载体及其亚克隆和重组微生物，以及由这些亚克隆获得到的真核表达载体及转染的细胞系。此外，本发明还涉及该基因在
10 神经元微管组装中的作用及其临床医学中对神经退行性疾病研究的应用。

背景技术

1975 年，Weingarten 等在研究神经元微管系统的分子结构过程中，
15 发现了一种与微管蛋白质具有高亲和力的蛋白质，将其归类于微管结合蛋白 (microtubule associated protein, MAP)，命名为神经 tau。该蛋白质具有促进微管装配和稳定微管网络的作用，与信号转导、物质运输以及神经细胞发育相关。近十几年的研究显示，神经 tau 与神经退行性疾病，特别是与早老性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 的病理过程密切相关。Tau
20 的异常超磷酸化是神经纤维缠结 (NFTs) 的主要成分，而 NFTs 是 AD 等神经退行性疾病的一种重要的病理特征。1998 年，Hutton 等发现了 17 号染色体相关的帕金森氏病 (Parkinson's PD) 样额颞叶痴呆 (frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17, FTDP-17) 的病因是该染色体上的 tau 基因发生了突变。最近研究表明，该蛋白质也存在于神
25 经细胞核内，能与 DNA 相互作用，具有稳定双螺旋结构的作用；还能与某些具有重要功能的蛋白质相互作用，表现出类似分子伴侣的功能。由于 tau 在 AD 等神经退行性疾病病理机制研究中的重要地位，使其成为微管结合蛋白家族中最受瞩目的成员之一。

自从 tau 首先从成体脑组织中被提取出来，人们就知道它以几种形式
30 (异构体) 存在，后来发现这是发育调控的结果 (Matus, 1988)。分子克

隆研究现已发现成体哺乳动物的神经系统中至少存在六种 tau 蛋白质异构体，它们来源于同一个基因，经 mRNA 转录后的不同剪接而得到。

Tau 基因位于 17 号染色体上，它在种系间高度保守。迄今为止，已经从小鼠、大鼠、牛以及人类的表达库中获得了 tau 的克隆 (Lee 等, 1988; 5 Goedert 等, 1988; Goedert 等, 1989a; Himmler, 1989a; Himmler 等, 1989b; Mori 等, 1989; Kosik 等, 1989; Kanai 等, 1989; Goedert 等, 1989b)。目前以全长 cDNA 克隆形式被分离出来的六种人类 tau 的异构体分别由 352-441 个氨基酸组成，差别主要在于三个插入序列的存在与否 (Goedert 等, 1988; Goedert 等, 1989a; Goedert 等, 1989b; Goedert 和 Jakes, 1990)。

10 与 tau 蛋白质沉积相关的病症并不只限于阿尔茨海默病，在许多中枢神经系统疾病中也可以观察到，诸如皮克病（心包性假性肝硬变）和进行性核上麻痹 (Joachim 等, 1987)。除此之外，还发现在大部分老龄的唐氏综合症患者脑中 tau 是配对螺旋样纤维的组成部分。这提示对于多种神经细胞的损伤，tau 可能以一种相对非专一性的方式被影响。换句话说，tau 15 的不同修饰，每一种针对特定的疾病，可能导致相似的神纤维缠结的形成。

Tau 是阿尔茨海默病病理学研究中的关键分子之一，并且与其他几种神经退行性疾病有关 (Grundke-Iqbal 等, 1986a; Grundke-Iqbal 等, 1986b; Iqbal 等, 1986)。统计数字显示，所有与 tau 有关的病理学占据了痴呆病的 20 75%。在这些神经系统的疾病中，家族遗传性额颞页痴呆引起了广泛的关注。此种家族性痴呆的患者，其 tau 基因发生了某些错义突变 (Poorkaj 等, 1998; Hutton 等, 1998; Spillantini 等, 1998)，表明 tau 蛋白质的单基因突变引发其积累和加工的异常可以直接导致痴呆产生。为了弄清阿尔茨海默病及其他与 tau 蛋白质有关的病理学过程的分子机制，了解 tau 蛋白 25 质各方面的功能是十分必要的。

Tau 最初是以一种重要的脑微管结合蛋白被发现的，它可以促进微管的组装并稳定后者的结构 (Weingarten 等, 1975)。90 年代，几个实验室分别报道了 tau 存在于多种细胞株系的细胞核中 (Loomis 等, 1990; Davis and Johnson, 1999)，Greenwood 等人发现核 tau 与 DNA 有直接或间接的 30 结合 (Greenwood and Johnson, 1995)，因此推测 tau 蛋白质除作为微管结

合蛋白外，还具有其他的功能。弄清 tau 的功能无疑将会有助于阐明阿尔茨海默病及其他与 tau 蛋白质相关的病理学过程的分子机制。

到目前为止，尽管已经在许多动物种类中发现了 Tau 蛋白质并对其功能做了大量研究，但是从未见在蚯蚓中发现 Tau 蛋白质的报道。根据果蝇、大鼠、小鼠及人类的 Tau 结构的保守性，本发明人从蚯蚓身体部分及神经节部分的总 RNA 中，通过 RT-PCR 发现一个新的 Tau 基因，命名为 *Etau*，并且对其限制性酶谱、序列及表达的蛋白质进行了分析，并得到了多克隆抗体。此外，本发明人还研究了该基因在真核细胞中的表达模式，发现该基因与微管的组装及与信号转导、物质运输以及神经细胞发育相关。

发明内容

本发明提供一种从蚯蚓总 RNA 中通过 RT-PCR 得到的基因 *E-tau* 和该基因表达的蛋白质 E-Tau、含有上述基因序列的重组载体及其亚克隆和重组微生物，以及由该基因构建的真核表达载体、转染细胞系。该基因属于一种新的微管相关蛋白质 Tau 的基因，其表达产物属于一种新的蛋白质。本领域已部分了解神经 Tau 蛋白质具有促进微管装配和稳定微管网络的作用，与信号转导、物质运输以及神经细胞发育相关；神经 tau 与神经退行性疾病，特别是与早老性痴呆（Alzheimer's disease, AD）的病理过程密切相关。本发明还涉及该基因表达的蛋白质 E-Tau 在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用，该神经退行性疾病特别是早老性痴呆。

本发明提供的基因 *Etau* 具有如 SEQ ID NO. 1 所示的多核苷酸序列。另一方面，该基因中的一个或多个碱基的缺失、插入或替代产生具有与 SEQ ID NO. 1 所示序列具有相同功能的变异体也应包括在本发明的内容之内。因此，本发明应当包括具有 SEQ ID NO. 1 所示序列的多核苷酸的变异体，这些变异体的序列与 SEQ ID NO. 1 所示序列的同源性至少为 80%，优选的至少为 90%。

所以本发明还提供了该基因的变异体的片段。

另一方面，本发明提供含有该基因及其变异体或其片段的重组载体。选择的载体通常能在使用的特定宿主细胞内发挥功能，也就是说，载体

与宿主细胞兼容，从而能实现基因的扩增和（或）基因的表达。在本发明的一个实施方案中，上述载体是 pET28a (NOVAGEN)，插入的是 Etau 或其片段，插入位点可以是 Nco I 和 Xho I 或 EcoR I 和 BamH I 等。

用于实现本发明的优选载体是能够与细菌、酵母和哺乳动物宿主细胞相容的那些载体。其中尤其包括 pCRII、pCR3 和 pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA)、pBSII (Stratagene, La Jolla, CA)、pET15 (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA)、pETL (BlueBacII, Invitrogen)、pDSR- α (PCT Pub. No. WO90/14363) 和 pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY)。

另一方面，本发明还提供含有上述重组载体的重组微生物。当载体构建完成，即将本发明多核苷酸插入到载体的适当部位之后，就可以将所得载体导入适当的宿主细胞内，用于本发明多核苷酸的扩增和（或）表达。可以用本领域熟知的方法将载体转化到选定的宿主细胞内，这些方法包括，例如，转染法、感染法、氯化钙法、电穿孔法、显微注射法、脂转染法、DEAE-葡聚糖法，或已知的其他方法。选择的方法会根据所用宿主细胞的类型而有部分变化。这些方法以及其他适当的方法已为该领域的技术人员所熟知，并且在 Sambrook 等人的《分子克隆实验手册》(Cold Spring Harbor Laboratories, 1989) 和 Davis 等人的《分子生物学基本方法》(Elsevier, 1986) 中均有所描述。

本发明的多核苷酸的扩增和（或）表达可以在原核宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞（杆状病毒系统）和（或）真核宿主细胞中进行。表达宿主细胞的选择在某种程度上取决于是是否要对目的蛋白质进行翻译后修饰（如糖基化和/或磷酸化）。如果需要，则优选的是酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞或哺乳动物宿主细胞。有关表达载体的综述，可参考 Meth. Enz., Vol. 185 (D.V. Goeddel, ed., Academic Press 1990)。

另一方面，本发明还提供一种方法，用以获得本发明的表达蛋白质。该方法包括培养宿主细胞以合成该蛋白质，然后收集和裂解宿主细胞，再用本领域熟知的方法选择性地回收产物。

另一方面，本发明还提供该基因及其变异体或其片段的转染细胞系。在本发明的实施方案中，使用 GFP 融合的 Etau 来转染真核细胞，并得到

稳定转染的细胞系。该细胞系例如包括 HEK 293 (ATCC CRL-1573)、HeLa (ATCC CCL-2)、NIH 3T3 (ATCC CRL-1658)、BNL CL.2 (ATCC TIB-73)、HepG2 (ATCC HB-8065)、COS7 (ATCC CRL-1651)、CHO (ATCC CRL-9618)、SH-SY5Y (ATCC CRL-2266)、IMR 32 (ATCC CCL-127)、
5 MRC5 (ATCC CCL-171)、MCF7 (ATCC HTB-22)、562 (ATCC CCL-243)、SKOV-3 (ATCC HTB-77)、HUV-EC (ATCC CRL-1730) (primary cell) 和 C6 (ATCC CCL-107) 等真核细胞系 (购自 ATCC)。

另外根据本领域常规技术方法, 还得到 Etau 的多克隆抗体, 这些标记 GFP 的 Etau 细胞系及多克隆抗体可以用于原位杂交以研究本发明的基因 Etau 的表达模式, 但不局限于此。
10

由于神经 tau 与神经退行性疾病, 特别是与早老性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 的病理过程密切相关。本发明还涉及蛋白质 E-Tau 在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用, 该神经退行性疾病特别是早老性痴呆。
15

附图说明

图 1: 表示蚯蚓总 RNA 的琼脂糖凝胶图。

图 2: 表示本发明 RT-PCR 的琼脂糖凝胶图。M: DNA 标记; 1: *Etau* DNA, 其中方框内为本发明基因。

图 3: 表示本发明多核苷酸的限制性酶切琼脂糖凝胶图。M: DNA 标记; 1: 重组载体; 2: 空载体; 3: 双酶切重组载体; 4: *Etau* DNA。
20

图 4: 表示本发明基因经真核表达载体构建 Etau-GFP 的酶切琼脂糖凝胶图。M: DNA 标记; 1: 重组载体; 2: 空载体; 3: 双酶切重组载体; 4: *Etau* DNA。

图 5: 通过 SDS-PAGE 检测纯化的本发明基因的表达产物。M: 标准分子量; 1: 纯化的本发明蛋白质, 其分子量约为 46 KDa。
25

图 6: 表示本发明基因经真核表达载体构建成 Etau-GFP 在细胞中的表达模式。

图 7: 表示本发明基因所得的多克隆抗体的 western blot 图。M: 标准分子量; 1: 纯化的本发明蛋白质的免疫条带, 其分子量约为 46 KDa。
30

图 8: 表示本发明基因表达的蛋白质 E-Tau 与微管相互作用的紫外光谱图。在 37°C 保温的微管蛋白质 (10 μ M) 溶液中加入 E-Tau (2 μ M), 用日立分光光度计检测溶液在 350 nm 吸光值的变化 (微管组装后溶液的吸光值将变大)。曲线 1: 溶液中只有微管蛋白质; 曲线 2: 溶液中同时含有微管蛋白质和 E-Tau 蛋白质。

图 9: *Etau* 的限制性酶切图谱的的确定和各种亚克隆的构建。

图 10: *Etau* 与人类 tau(Htau)蛋白活性的对比 (在 37°C 保温的微管蛋白质 (10 μ M) 溶液中加入 E-Tau 或 Htau (2 μ M), 用日立分光光度计检测溶液在 350 nm 吸光值的变化)。

图 11: 通过 SDS-PAGE 检测纯化的 *Etau* 亚克隆的表达产物。M: 标准蛋白分子量, B: 亚克隆 B, E: 亚克隆 E。

图 12: 亚克隆 B、E 蛋白表达产物的生物活性测定 (在 37°C 保温的微管蛋白质 (10 μ M) 溶液中加入 B 或 E (2 μ M), 用日立分光光度计检测溶液在 350 nm 吸光值的变化)。

具体实施方式

以下结合优选的实施例对本发明作详细的说明, 但并不意味着对本发明的内容限制。

实施例 1: 蚯蚓总 RNA 的制备

步骤 1: 实验器具的处理与准备

1) 塑料制品: (包括枪头、EP 管、匀浆管等)

先将 DEPC (焦碳酸二乙酯) 水从容量瓶中倒入瓷缸中, 将塑料制品逐个浸泡其中, 其中小枪头需要吸管打入 DEPC 水, 过夜, 然后高压, 再烤干备用, 实验前将枪头等放入吸头台, 再高压一次 (EP 管);

2) 玻璃制品: 泡酸过夜, 冲洗干净, 蒙锡纸烤干备用 (DEPC 水泡) (洗净后先泡 1‰ DEPC 过夜, 再烤干);

3) 匀浆器: (包括剪刀、镊子) 先洗净后, 再高压 (不需要泡 DEPC);

4) 取组织用的剪刀用时在火上烤一下。

步骤 2: 蚯蚓样品制备

1) 首先准备好用于包装样本的铝箔或冷冻保存管, 并且用油性记号

笔在铝箔或冻存管外表多处写明样本编号。

2) 准确切除蚯蚓（赤子爱胜蚓，*Esiena fetida*）所需组织后，立即在冰上剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型。

3) 在不含 RNase 的 PBS 中迅速漂洗样本，以去除血渍和污物。

5 4) 用准备好的铝箔或冷冻保存管装载包裹组织，迅速投入液氮冷却。

步骤 3：组织样本的碾磨及匀浆

1) 将超低温保存的样品除去样品袋，在电子天平上称重后，转移至用液氮预冷的碾钵中，用杵子碾磨组织，其间不断加入液氮，直至碾磨成粉末状。

10 2) 将碾磨成粉末状的样品，转移至已经加入适量 TRIzol 试剂的匀浆管中，把匀浆管置于冰浴中，在组织匀浆粉碎机上进行匀浆。匀浆液较透明且无颗粒即可。

3) 小心吸取匀浆液转入新的离心管，在 15~30℃ 放置 5 min。

4) 将离心管于 4℃，12000 rpm，10 min 离心。

15 5) 小心吸取上清液转入新的离心管。

步骤 4：蚯蚓总 RNA 的抽提

1) 向裂解液中加入氯仿，盖紧离心管盖，用力振荡离心管（溶液充分乳化，成乳白状，无分相现象）；在 15~30℃ 放置 3 min。

2) 于 4℃，12000 rpm，离心 15 min。

20 3) 从离心机中小心地取出离心管，吸取体积约为 TRIzol 试剂起始加入量一半的上清至另一无 RNA 酶的离心管。

步骤 5：蚯蚓总 RNA 的洗涤及洗脱（应用 Qiagen RNA 提取试剂盒）（QIAGEN）

25 1) 向在步骤 4 离心得到的上清液中加入一倍体积的 70%乙醇，反复颠倒直至混匀。

2) 小心的吸取 700 μL 混合液（包括其中的沉淀物）转移到放置于 2 mL 收集管中（试剂盒中提供）的 RNease 旋转柱（spin column）中，10,000 rpm 离心 15 秒，弃去过滤液和收集管。

30 3) 转移 RNease 旋转柱到一个新的 2 mL 收集管中。吸取 700 μL Buffer RW1 到 RNease 旋转柱 中，10,000 rpm 离心 15 sec 进行洗涤，弃去过

滤液和收集管。

4) 转移 RNease 旋转柱到一个新的 2 mL 收集管中。吸取 500 μ L Buffer RPE 到 RNease 旋转柱, 10,000 rpm 离心 15 sec 进行洗涤, 弃去过滤液和收集管。

5) 小心的打开 RNease 旋转柱, 加入 500 μ L Buffer RPE, 盖上盖子, 14,000 rpm 离心 3 min。

6) 转移 RNease 旋转柱到一个新的 2 mL 收集管中, 14,000 rpm 离心 1 min。

7) 转移 RNease 旋转柱到 1.5 mL 离心管中, 在 RNease membrane 表面加入 30 μ L RNase-free 水, 室温放置 1 min 后, 10,000 rpm 离心 1 min。

8) 再加入 30 μ L RNase-free 水, 10,000 rpm 离心 1 min。

步骤 6: 蚯蚓 RNA 检测

所得总 RNA 在 1%琼脂糖凝胶中检测, 如图 1 所示。

注意事项

所有的实验步骤 (包括离心) 必须在室温下 (15~25 $^{\circ}$ C) 进行。

实施例 2 通过 RT-PCR 得到 *Etau*

化学合成如下寡核苷酸序列 (上海生工):

引物 1: 5' ATGGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAA 3'

引物 2: 5' CAAACCCTGCTTGGCCAGGGAGGC 3'

取实施例 1 中的蚯蚓总 RNA, 采用 RT-PCR one step kit (Qiagen Inc.), 按照说明书所述方法来操作。利用引物 1 和引物 2, 使用 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 反应, 95 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟, 50 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟之后, 进入如下循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟, 冷却至 4 $^{\circ}$ C, 得到 *Etau* 的核苷酸序列。将所得的 DNA 克隆于克隆载体 pBluescript II KS⁻ 质粒 (NOVAGEN) EcoR I 位点, 其序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

根据载体 pBluescript II KS 的特性, 采用 T3 primer 和 T7 primer 为引物, 分别用 T3 聚合酶和 T7 聚合酶对 *Etau* 的正反两个方向进行测序 (上海生工), 该基因的核酸序列总长 1053 bp。其基因核苷酸序列 (即全部

的可读框) 结果见 SEQ ID NO. 1, 由该核苷酸序列所推导的蛋白质为 351 个氨基酸, 序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

实施例 3: *Etau* 的限制性酶切图谱的确定和各种亚克隆的构建

5 步骤 1: 对本发明的 *Etau* 克隆进行单酶切、双酶切及多酶切, 并通过琼脂糖凝胶电泳计算各酶切片段大小, 并分析其多克隆位点, 绘制出限制性酶切图谱, 见图 3。

步骤 2: 用 Pst I 对 *Etau* 进行酶切, 并通过琼脂糖凝胶电泳回收该酶切片段, 然后以 pET28a 载体, 用同样的酶 (Pst I) 将其酶切, 最后通过
10 连接反应构建得到亚克隆 A 和 B; 用 Pfu I/Ace II 对 *Etau* 进行双酶切, 构建得到亚克隆 C; 另外分别用 BlnI/Pfu I、Pfu I/Pst I、Pst I/Hind III、Pfu I/BsrF I、BsrF I/Xho I 及 Ace II/Xho I 对 *Etau* 双酶切, 构建得到亚克隆 D、E、F、G、H 和 I; 共获得 *Etau* 不同片段大小的亚克隆 9 种, 但不局限于此, 见图 9。

15

实施例 4: 绿色荧光蛋白质与 *Etau* 融合蛋白质 (pEGFP-N1-*Etau*) 的构建

我们应用 pEGFP-N1 真核表达载体 (CLONTECH) 将 GFP 的氨基端连接到 *Etau* 的羧基端。*Etau* 全长 DNA 是从蚯蚓总 RNA 中应用 RT-PCR 反应扩增获得。上游引物为:

20 5'CTCGAGATGGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAA 3', 在起始密码 ATG 前加入了 Xho I 位点; 下游引物为: 5'-

GGATCCAACAAACCCTGCTTGGCCAGGGAGGC 3', 在 GFP 的起始密码 ATG 前引入了 BamHI 位点。为构建 *Etau*-GFP 融合基因, *Etau* DNA 先通过 Xho I 和 BamHI 双酶切克隆入 pEGFP-N1 载体中, 构建成
25 pEGFP-N1-*Etau* 并经测序验证, 如图 4 所示。

实施例 5: *Etau* 全长基因的表达与纯化

步骤 1: 表达质粒的构建。用 Nco I 和 Xho I 酶切 *Etau*, 同时将所用的表达载体 pET 28a 也用这两种酶进行双酶切, 然后用 T4 DNA 连接酶
30 将上述片段连接起来, 命名为 pET 28a-*Etau*。酶切图谱和 DNA 测序结果

表明表达质粒的构建准确无误。

步骤 2: 重组蛋白质的表达和纯化。用 CaCl_2 法将 pET 28a-Etau 转化 BL21 (DE3) (Stratagene) 菌株感受态细胞, 用 LB 培养基 37°C 液体培养。当 $\text{OD}_{600}=0.6$ 时, 加入 IPTG (终浓度 0.4 mM) 开始诱导本发明基因的表达, 继续培养 3 小时, 离心收集菌体。用添加蛋白质酶抑制剂的磷酸缓冲液 ($\text{pH } 7.3$, aprotinin $1 \mu\text{g/ml}$, PMSF $100 \mu\text{g/ml}$) 悬浮菌体, 每 1 升培养液用 50ml 缓冲液悬浮, 于冰浴中超声裂解菌体。随后, 加入 Triton X-100 (终浓度 1%), 轻轻搅拌均匀 30 分钟。离心取上清 (4°C , 10000 rpm), 用 Ni^{++} -螯合 Sepharose 4B 柱亲和吸附, 用 50 mM 咪唑洗脱除去杂蛋白质。然后收集 200 mM 咪唑洗脱组分, 透析, 真空冷冻干燥, 最后用 SDS-PAGE 实验来验证该样品, 结果显示其分子量与预期一致 (约为 46 KDa), 并且其纯度在 90%以上, 见图 5。

实施例 5: 转染真核细胞的表达模式

15 选择 HEK 293, HeLa, COS-7, CHO, 5HSY-5Y 等真核细胞系进行转染。

步骤 1: 准备转染细胞 (应用 Inventrogen 的转染试剂 lipofectamine 2000)

20 转染前一天, 胰酶消化细胞并计数, 细胞铺板在 $500 \mu\text{L}/2 \text{ mL}$ 含血清, 不含抗生素的正常生长的培养基 (LB 培养基) 中 (每孔 $0.5\text{-}2 \times 10^5 / 3 \times 10^5$ 个细胞)。使其在转染日能达到 90-95% 的融合。

步骤 2: 准备 DNA/脂质体复合物

1) 对于每孔细胞, 使用 $50 \mu\text{L}/250 \mu\text{L}$ 无血清培养基 (如 OPTI-MEM I、DMEM 培养基) 稀释 $0.8 \mu\text{g DNA} / 4.0 \mu\text{g DNA}$, 轻轻混匀。

25 2) 使用前将 Lipofectamine 2000 转染试剂轻轻混匀, 每孔细胞用 $50 \mu\text{L} / 250 \mu\text{L}$ 无血清培养基稀释 $2 \mu\text{L} / 10 \mu\text{L}$ Lipofectamine 2000 转染试剂。轻轻混匀, 室温孵育 5 分钟。

3) 混合稀释的 DNA 和稀释的 Lipofectamine 2000, 此时总体积是 $100 \mu\text{L} / 500 \mu\text{L}$ 。轻轻混匀, 室温放置 20 分钟以使 DNA- Lipofectamine 2000 复合物形成。溶液可能会比较浑浊, 但这不影响转染效率。

30

步骤 3: 转染细胞

1) 将 24 孔板中的旧营养液吸出, 用无血清培养基清洗两次。加入 0.5 ml/2 ml 无血清配培养基。

2) 逐滴加入 100 μL /500 μL 脂质体/DNA 混合物到每孔中 (从培养孔一边到另一边), 边加边前后来回摇动培养板, 轻轻混匀。

3) 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 中孵育 24-48 小时。无需去掉复合物或更换培养基。或者在 4-5 小时后更换培养生长基也不会降低转染活性。

4) 在细胞中加入复合物 24-72 小时后, 荧光镜下观察转染效率, 分析细胞抽提物或进行原位细胞染色, 检测各项指标。

10 步骤 4: 筛选稳定转染细胞系

1) 转染 24h 后施加筛选压力, 改用含 G418 ($\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{10}\cdot 2\text{H}_2\text{SO}_4$, 无中文名称, 是一种抗生素) 的培养基培养。在 G418 筛选浓度下持续培养 14 天后, 挑出单克隆, 扩大培养, 期间每 3 天换液一次。

2) 转染后细胞在非选择性培养液中培养 18~24 h, 使转染的外源基因得到表达后, 胰酶消化, 按 1: 15~1: 20 稀释传代, 接种入各种选择性培养液中继续培养, 在 2~3 周内每 2~4 天更换培养液一次, 使抗性克隆得以生长 (如图 6)。

3) 挑选克隆进行扩大培养, 然后进行 DNA 或 RNA 的杂交分析, 新合成的蛋白质的检测以及相关各项指标的检测。

20

实施例 5: 应用纯化的 Etau 产物以制备抗体

经纯化的重组表达的 Etau 产物进一步纯化后, 直接溶于水中, 这样得到的单一蛋白质可用本领域所熟知的方法免疫动物以制备多克隆抗体。得到多克隆抗体后, 检测其效价及免疫特性。如图 7。

25

实施例 6: 纯化的 Etau 产物适用于分子神经生物学

已知该基因的产物 Etau 是一种神经 Tau 蛋白质具有启动微管装配和稳定微管网络的作用 (如图 8), 与信号转导、物质运输以及神经细胞发育相关, 神经 tau 与神经退行性疾病, 特别是与早老性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 的病理过程密切相关。因此应用该蛋白质产物可研究其与

30

DNA 和蛋白质的相互作用，以进一步明确 Tau 神经退行性疾病中的调控作用。因此，本发明的蛋白质 E-Tau 还可以用于制备治疗神经退行性疾病的药物，该神经退行性疾病特别是老年性痴呆。

5 实施例 7: Etau 产物的抗体适用于免疫细胞化学及免疫组织化学

按照《分子克隆实验手册》(Cold Spring Harbor Laboratories, 1989)中所述方法，应用 Etau 的抗体可对蚯蚓组织和细胞进行原位杂交，从而进行 Etau 基因的表达模式以及 Tau 蛋白质执行功能的时间和部位，以及表达强度。

10

实施例 8: Etau 亚克隆产物蛋白生物活性的鉴定

按照 Etau 全长基因的表达方法，将实施例 3 中的亚克隆片段 B、E 经对应的双酶切后用 T4 连接酶连接到相应酶切的表达载体 pET 28a 中，然后将质粒转入 BL21 感受态细胞，表达纯化得到相应的蛋白（见图 11），
15 发现亚克隆蛋白 B、E、都具有一定的活性，即促进微管蛋白的组装（见图 12）。

实施例 9: 蚯蚓 Etau 和人 Htau 的活性比较

Etau 与人类 tau(Htau)蛋白活性的对比（在 37°C 保温的微管蛋白质
20 （10 μ M）溶液中加入 E-Tau 或 Htau（2 μ M）（微管蛋白自猪脑内提取，提取方法参考文献（Robley C. 1982），Htau 蛋白是按照文献先将连接到表达载体上的人 tau 基因转入大肠杆菌表达、纯化后得到的，表达和纯化方法参考文献(Goedert 和 Jakes, 1990)，用日立分光光度计检测溶液在 350 nm 吸光值的变化）。实验结果见图 10。由此可见，蚯蚓 Etau 具有比已知
25 的人 Htau 更高的促进微管蛋白组装的活性。

参考文献

1. Davis, P. K. and Johnson, G. V. (1999) The microtubule binding of Tau and high molecular weight Tau in apoptotic PC12 cells is impaired because of
30 altered phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 35686-35692

2. Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E. and Klug, A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4051-4055
- 5 3. Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J., and Crowther, R. A. (1989a) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8, 393-399
4. Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D. and Crowther, R. A.
10 (1989b) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526.
5. Goedert, M. and Jakes, R. (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin
15 polymerization. *EMBO J.* 9, 4225-4230
6. Greenwood, J. A. and Johnson, G. V. W. (1995) Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp Cell Res* 220, 332-337.
7. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.-C., Zaidi, M. S., and Wisniewski, H. M. (1986a) Microtubule-associated protein tau. A component
20 of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084-6089
8. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.-C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and Binder, L. I. (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4913-4917
- 25 9. Himmler, A. (1989a) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1389-1396.
10. Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M. W. and Martin, D. W. Jr. (1989b) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1381-1388
- 30 11. Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H.,

- Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Heutink, P., et al. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705
12. Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Zaidi, T., Merz, P. A., Wen, G. Y., Shaikh, S. S., Wisniewski, H. M., Alafuzoff, I., and Winblad, B. (1986) Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2, 421-426
- 10 13. Joachim, C. L., Morris, J. H., Kosik, K. S. and Selkoe, D. J. (1987) Tau antisera recognize neurofibrillary tangles in a range of neurodegenerative disorders. *Ann. Neurol.* 22, 514-520.
14. Kanai, Y., Takemura R, Oshima T, Mori H, Ihara Y, Yanagisawa M, Masaki T, Hirokawa N. (1989) Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J. Cell Biol.* 15 109, 1173-1184.
15. Kosik, K. S., Orecchio, L. D., Bakalis, S. and Neve, R. L. (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389-1397
- 20 16. Lee, G., Newman, S. T., Gard, D. L., Band, H. and Panchamoorthy, G. (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 111, 3167-3177
17. Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., and Binder LI (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8422-8426
- 25 18. Matus, A. (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu. Rev. Neurosci.* 11, 29-44.
19. Mori H, Hamada Y, Kawaguchi M, Honda T, Kondo J, Ihara Y. (1989) A distinct form of tau is selectively incorporated into Alzheimer's paired helical filaments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 1221-1226
- 30

-
20. Poorkaj, P., Bird, T. D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R. M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W. C., Raskind, M., and Schellenberg, G. D. (1998) TAU as a susceptibility gene for amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex of Guam. *Ann. Neurol.* 43, 815-825
- 5 21. Robley C., Williams J.R. and James C.L. (1982) Preparation of tubulin from brain. *Methods Enzymol.*, 85, 376-85.
22. Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7737-7741
- 10 23. Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1858-1862

序列表

	<110> 中国科学院生物物理研究所	
5	<120> 蚯蚓微管结合蛋白 Tau、其编码基因及其应用	
	<130> IB052846	
	<160> 2	
10	<170> PatentIn version 3.1	
	<210> 1	
15	<211> 1053	
	<212> DNA	
	<213> 蚯蚓 (Esiena fetida)	
20	<400> 1	
	atggagcccc gccaggagtt cgaagtgatg gaagatcacg ctgggacgta cgggttgggg	60
	gacaggaaag atcagggggg ctacaccatg caccaagacc aagagggtga cacggacgct	120
25	ggcctgaaag ctgaagaagc aggcattgta gacaccccca gcctggaaga cgaagctgct	180
	ggtcacgtga cccaagctcg catggtcagt aaaagcaaag acgggactgg aagcgtgac	240
30	aaaaaagcca agggggctga tggtaaaacg aagatcgcca caccgcgggg agcagcccct	300
	ccaggccaga agggccagge caacgccacc aggattccag caaaaacccc gcccgctcca	360
	aagacaccac ccagctctgg tgaacctcca aatcagggg atcgagcgg ctacagcagc	420
35	cccggctccc caggcactcc cggcagccgc tcccgcacc cgtecccttc aaceccacc	480
	accggggagc ccaagaaggt ggcagtggtc cgtactccac ccaagtcgcc gtcttccgcc	540
40	aagagccgcc tgcagacagc ccccgtgccc atgccagacc tgaagaatgt caagtccaag	600
	atcggetcca ctgagaacct gaagcaccag cggggaggcg ggaaggtgca aatagtctac	660
	aaaccagttg acctgagcaa ggtgacctcc aagtgtggct cattaggcaa catccatcat	720
45		

aaaccaggag gtggccaggt ggaagtaaaa tctgagaagc ttgactcaa ggacagagtc 780
 cagtcgaaga ttgggtccct ggacaatata acccactgcc ctggcggagg aaataaaaag 840
 5 attgaaacc acaagctgac ctccgcgag aacgccaag ccaagacaga ccacggggcg 900
 gagatcgtgt acaagtcgcc agtggtgtct ggggacacgt ctccacggca tctcagcaat 960
 gtctctcca cggcagcat cgacatgga gactcgcccc agctcgccac gctagctgac 1020
 10 gaggtgtctg cctccctggc caagcagggt ttg 1053

<210> 2

15 <211> 351

<212> PRT

<213> 蚯蚓 (Esiena fetida)

20

<400> 2

Met Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr
 1 5 10 15
 25 Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln
 20 25 30
 Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala Gly
 35 40 45
 Ile Val Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr
 30 50 55 60
 Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp
 65 70 75 80
 Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg
 85 90 95
 35 Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile
 100 105 110
 Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu
 115 120 125
 Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro
 40 130 135 140
 Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
 145 150 155 160
 Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser
 165 170 175
 45 Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro

	180	185	190
	Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys		
	195	200	205
	His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp		
5	210	215	220
	Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His		
	225	230	235
	Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe		
	245	250	255
10	Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His		
	260	265	270
	Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe		
	275	280	285
	Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr		
15	290	295	300
	Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn		
	305	310	315
	Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala		
	325	330	335
20	Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu		
	340	345	350

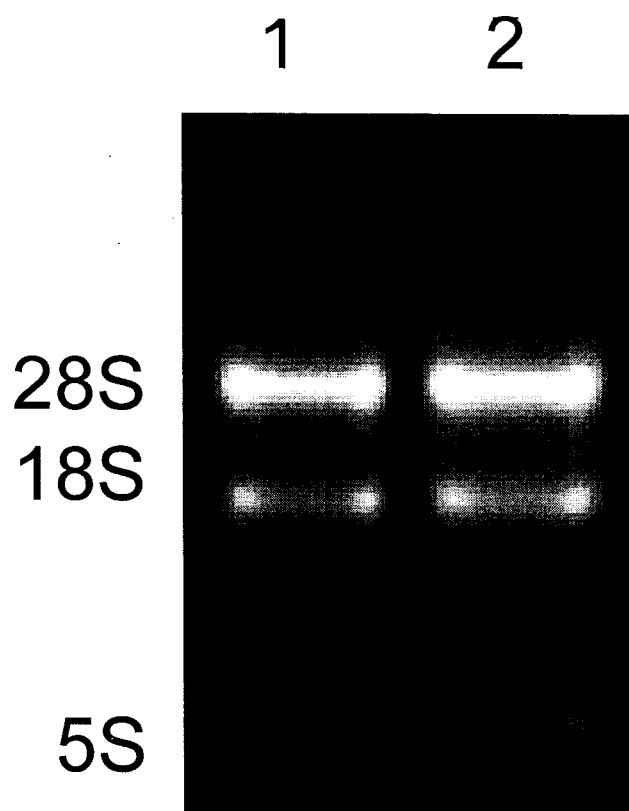


图1

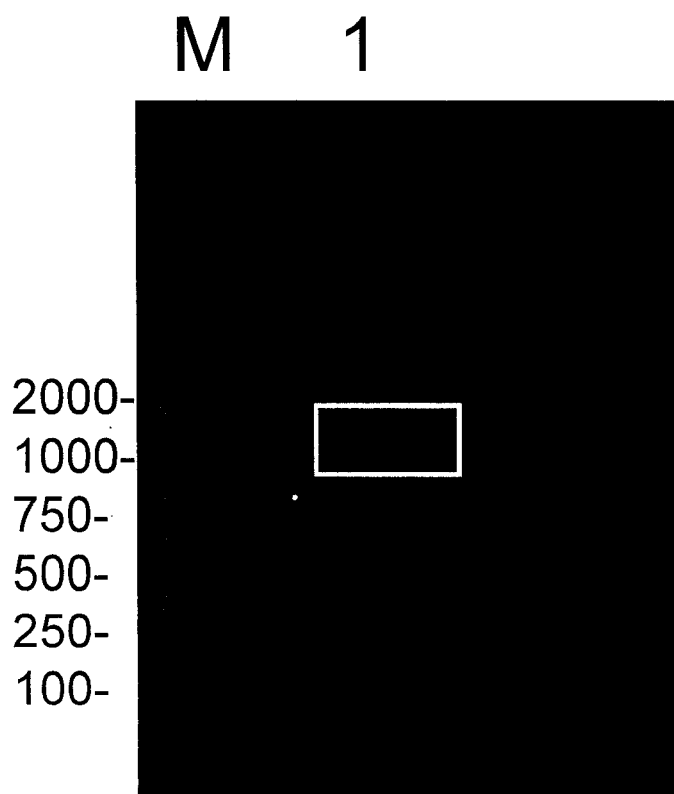


图2

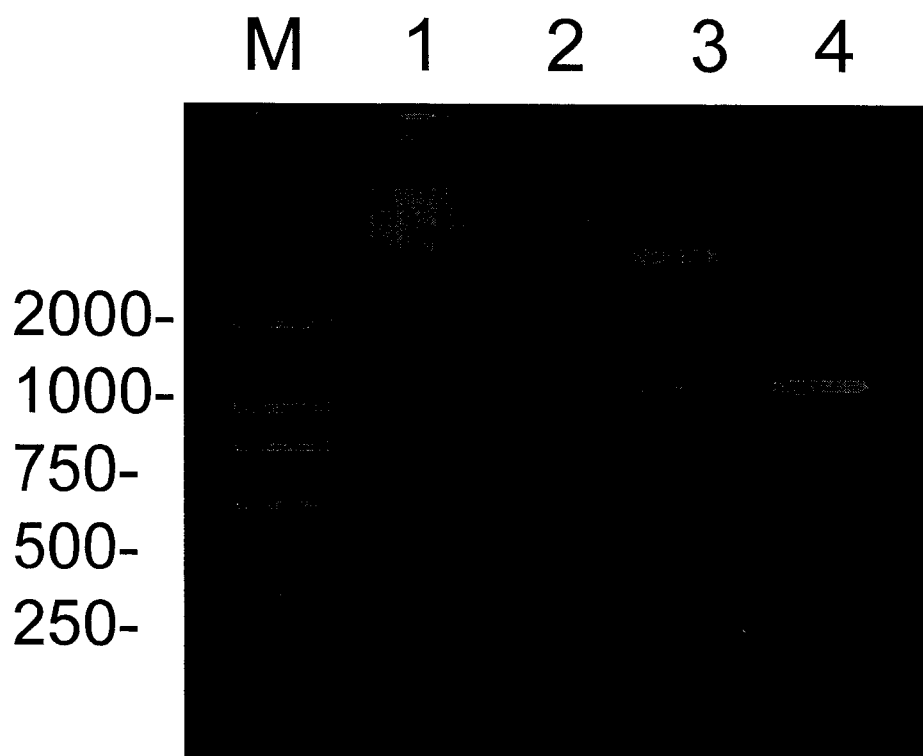


图3

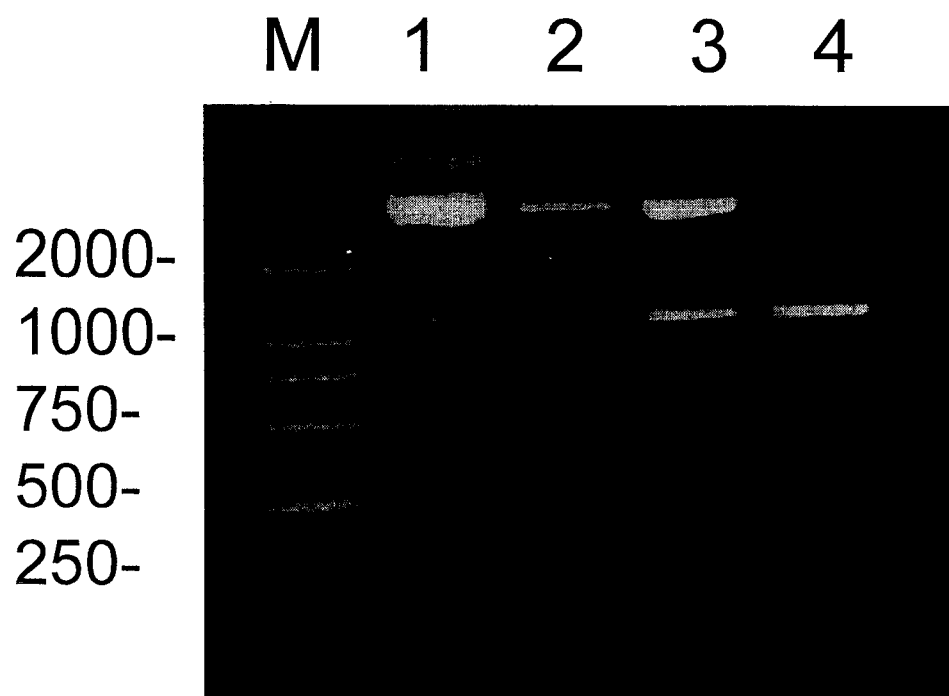


图4

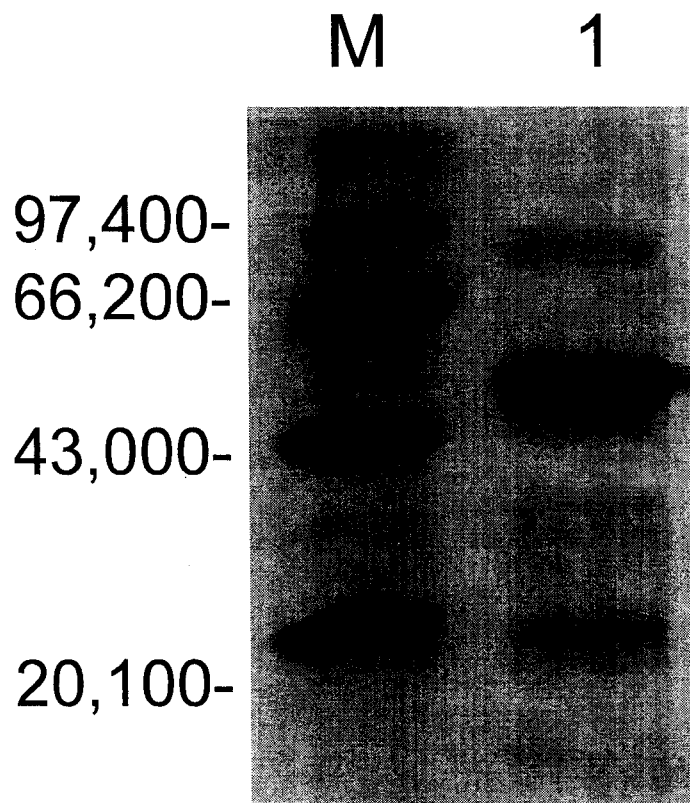


图5



图6

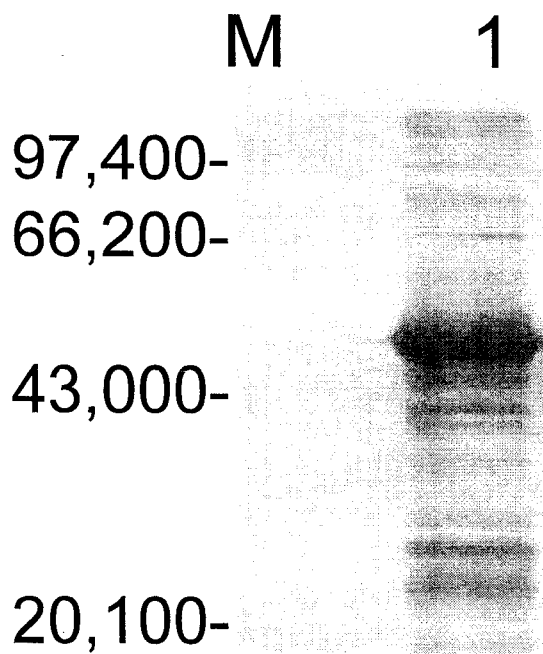


图7

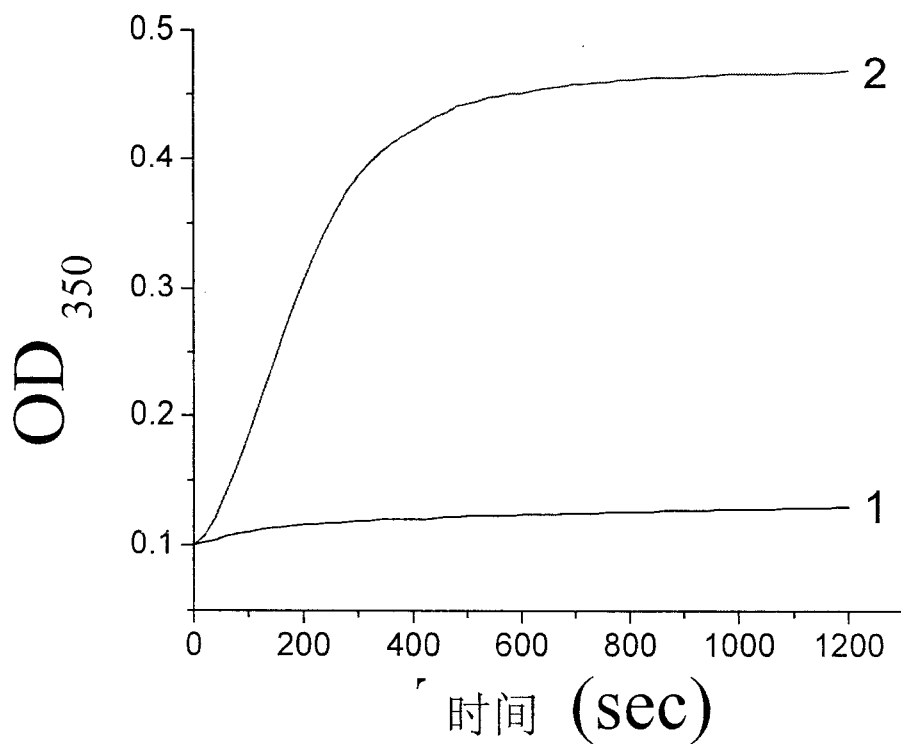


图8

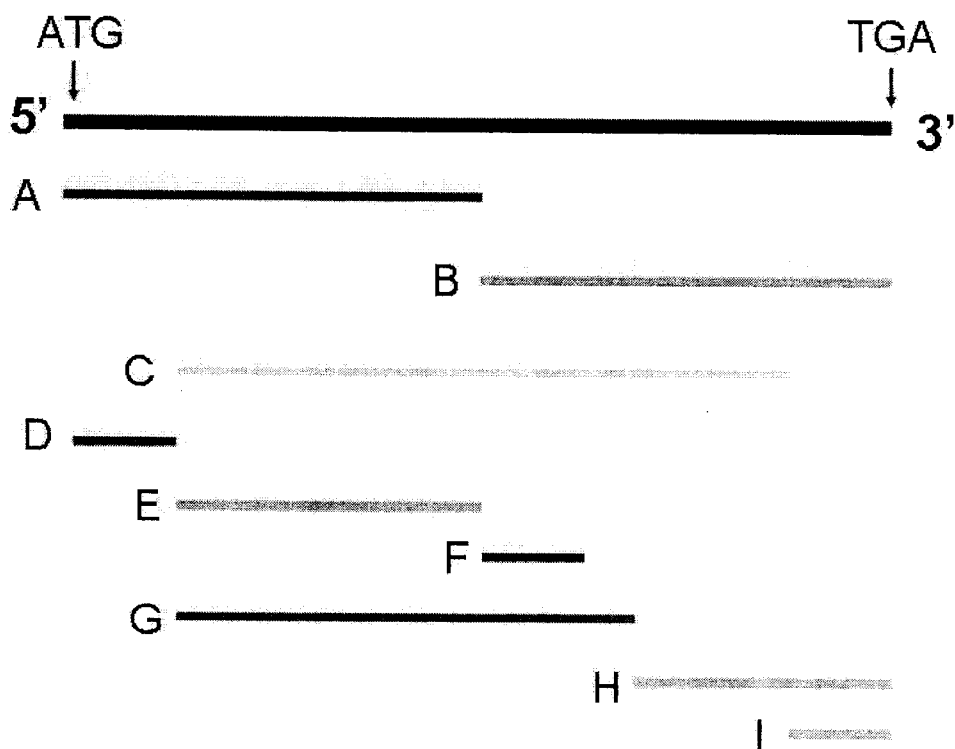


图9

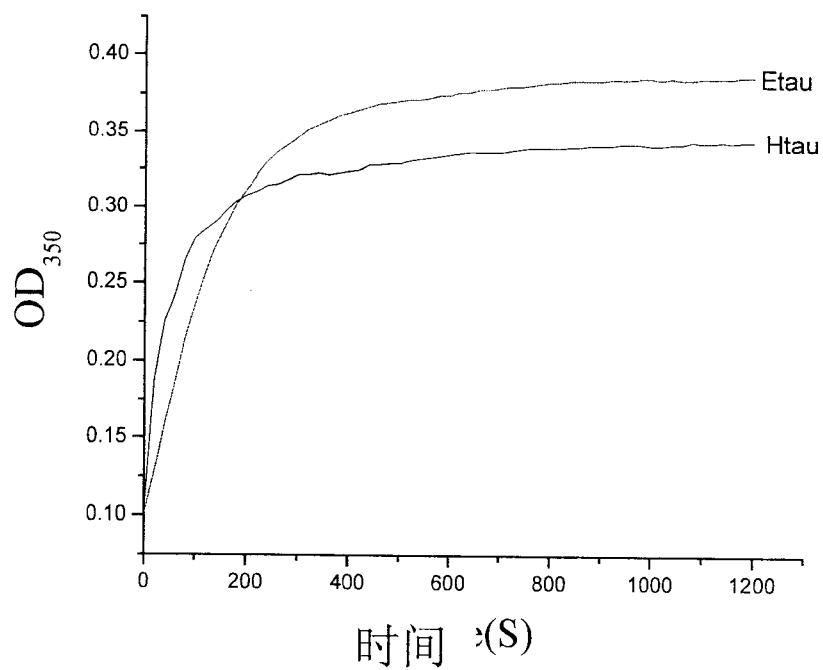


图10

M E B

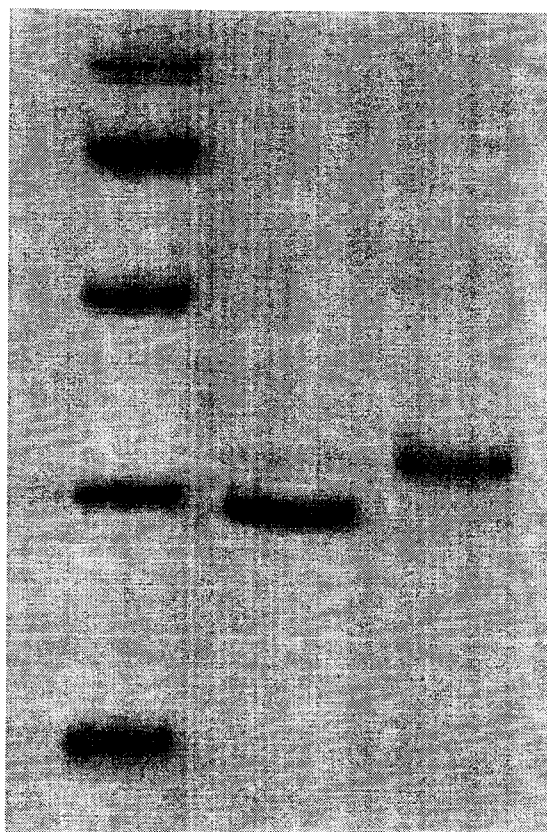


图11

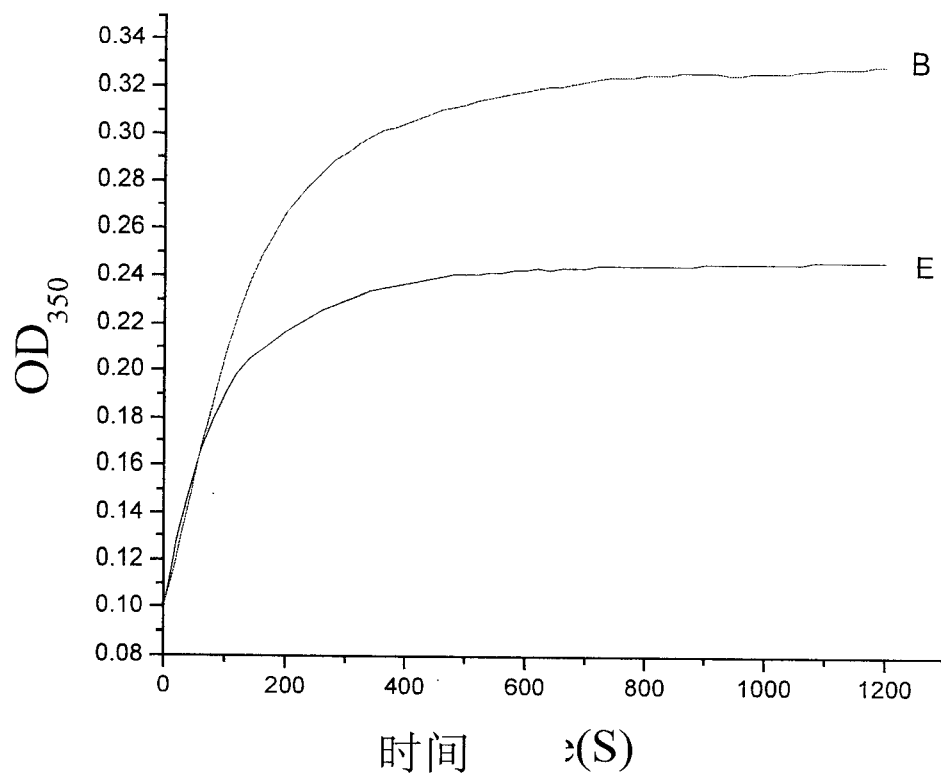


图12