



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111346215 B

(45) 授权公告日 2023.02.28

(21) 申请号 201811583305.4

(22) 申请日 2018.12.24

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111346215 A

(43) 申请公布日 2020.06.30

(73) 专利权人 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心

地址 200031 上海市徐汇区岳阳路320号35号楼

(72) 发明人 陈江野 王文娟

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所(普通合伙) 31219

专利代理师 许亦琳 余明伟

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C07K 14/40 (2006.01)

(56) 对比文件

CA 2274984 A1,2000.01.10

US 2007027309 A1,2007.02.01

CN 107614005 A,2018.01.19

王勤 等.白色念珠菌CRK1基因的敲除及其功能研究.《生物化学与生物物理学报》.1999,第

31卷(第5期),第545-552页.

许莉 等.白色念珠菌经组织蛋白酶B 途径诱导小鼠腹腔巨噬细胞NLRP3炎性体表达.《新乡医学院学报》.2014,第31卷(第1期),第1-4页.

Wenjuan Wang 等.A small secreted protein triggers a TLR2/4-dependent inflammatory response during invasive Candida albicans infection.《NATURE COMMUNICATIONS》.2019,第10卷(第1015期),第1-14页.

Alice G. Sorgo 等.Mass spectrometric analysis of the secretome of Candida albicans.《Yeast》.2010,第27卷第661-672页.

Fabien Cottier 等.The Transcriptional Stress Response of Candida albicans to Weak Organic Acids.《G3 Genes genomes genetics》.2015,第5卷第497-505页.

Muzzey, D 等.Coilp [Candida albicans SC5314],NCBI Reference Sequence: XP_717601.1.《GenBank》.2018,第1-2页.

Muzzey,D 等.Candida albicans SC5314 Coilp (COI1), partial mRNA,NCBI Reference Sequence: XM_712508.1.《GenBank》.2018,第1-2页.

审查员 李莎莎

权利要求书1页 说明书9页
序列表4页 附图6页

(54) 发明名称

白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的用途

(57) 摘要

本发明涉及白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的用途。具体为白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11在制备宿主免疫应答激活剂中的用途。本发明首次揭示了白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11所述的宿主免疫应答中的作用,揭示了一个全新的白念珠菌与宿主相互作用机制,本发明所述的宿主免疫应答激活剂,通过白念珠菌

分泌蛋白与宿主细胞TLRs相互作用,从而介导宿主抗真菌免疫反应,防御真菌入侵。

1. 白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11或所述蛋白的促进剂在制备宿主免疫应答激活剂中的用途,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够刺激宿主免疫细胞的免疫反应。

3. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够诱导宿主免疫细胞产生细胞因子和趋化因子上调。

4. 如权利要求2或3所述的用途,其特征在于,所述免疫细胞选自巨噬细胞和/或树突状细胞。

5. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,还包括以下特征中的一项或两项:

a. 所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够激活巨噬细胞中NF- κ B信号通路中I κ B α 的磷酸化和降解,以及MAPK信号通路中JNK,ERK和p38的磷酸化激活;

b. 所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11通过TLR2和TLR4激活巨噬细胞传递免疫信号。

6. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的表达和分泌受低氮和血清诱导。

7. 白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白的编码基因SEL1在制备宿主免疫应答激活剂中的用途。

白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的用途。

背景技术

[0002] 每年全球将近三百万人罹患威胁生命的侵袭性真菌感染,而其中将近一半的患者因缺乏有效的抗真菌药物而导致死亡。近年来免疫抑制剂使用的不断增加,真菌感染的情况日趋严重。而所有致病型真菌感染病例中,白念珠菌感染致死率高居首位。白念珠菌为人类最为常见的机会型致病真菌,50%健康人群携带白念珠菌,它常以共生形式寄居于人体粘膜、皮肤以及肠道,同时也是肠道共生菌群的一部分。然而对于免疫低下的人群,例如艾滋病人、癌症病人、器官移植病人或使用免疫抑制剂的病人等,白念珠菌则可能导致全身性系统感染,导致宿主器官衰竭,致死率更高达40%。

[0003] 作为人体中最常见的机会型致病真菌,白念珠菌不仅能根据生存环境转变细胞形态(酵母态和菌丝态互换,白态与灰态互换)以适应生存,还能通过分泌一系列胞外蛋白助其生长。白念珠菌的分泌蛋白基因共计占全基因组大小的3.1%。感染过程中,白念珠菌能分泌不同的蛋白水解酶以降解宿主组织或蛋白以获取营养,其中包括分泌型天冬氨酸蛋白酶(Saps),脂酶(Lips),磷脂酶(Plbs)等;白念珠菌还能分泌蛋白以助其获取金属离子,包括Pra1获取锌离子,Csa2获取铁离子。在不同的宿主环境中,白念珠菌不断重构其细胞壁结构,而分泌蛋白也再此过程中扮演了重要角色,包括Cht3,Mp65,Scw11,Sim1,Sun41,Tos1以及Xog1等。白念珠菌还可通过分泌肽Candidalysin直接破坏宿主上皮细胞,破坏上皮细胞屏障以助其入侵。此外,分泌蛋白还能抵抗宿主免疫攻击,包括利用Pra1抑制宿主补体激活,利用Saps降解补体等。

[0004] 然而,白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的功能尚未有文献报道。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术中所存在的问题,本发明的目的在于提供一种白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的用途,用于解决现有技术中的问题。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供了一种白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11或所述蛋白的促进剂在制备宿主免疫应答激活剂中的用途。

[0007] 进一步的,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示。

[0008] 所述蛋白的促进剂是指提高白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11水平的物质。

[0009] 具体的,所述提高Se11水平可以采用各种化学、物理、生物的方法。包括但不限于:

[0010] (1) 调节Se11代谢通路以提高Se11表达水平或提高Se11活性;

[0011] (2) 于细胞内直接增加Se11水平。

[0012] 可将Se11递送至细胞内直接增加细胞内Se11水平。

[0013] 调节Se11代谢通路可以是采用Se11的促进剂来提高Se11的活性或促进Se11转录或表达,从而上调Se11水平。

[0014] 进一步的,所述激活剂是指当真菌入侵时,能够激活宿主的免疫应答,对宿主的免疫反应具有促进作用的分子。

[0015] 进一步的,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够刺激宿主免疫细胞的免疫反应。

[0016] 所述免疫细胞选自巨噬细胞和/或树突状细胞。

[0017] 进一步的,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够诱导宿主免疫细胞产生细胞因子和趋化因子上调。

[0018] 所述免疫细胞选自巨噬细胞和/或树突状细胞。

[0019] 在一种实施方式中,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够激活巨噬细胞中NF- κ B信号通路中I κ B α 的磷酸化和降解,以及MAPK信号通路中JNK,ERK和p38的磷酸化激活。

[0020] 在一种实施方式中,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11通过TLR2和TLR4激活巨噬细胞传递免疫信号。

[0021] 进一步的,所述宿主为哺乳动物,具体的,可以为啮齿类动物,灵长类动物。例如,人,小鼠。

[0022] 所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的表达和分泌受低氮和血清诱导。

[0023] 具体的,是指,当环境中氮源缺乏和/或包含血清时,白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的表达和分泌增多。

[0024] 本发明第二方面提供白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白的编码基因SEL1在制备宿主免疫应答激活剂中的用途。

[0025] 进一步的,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白的编码基因SEL1的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0026] SEL1基因用于制备或筛选宿主免疫应答激活剂是指,将SEL1基因作为激活剂的作用靶标应用于制备宿主免疫应答激活剂。

[0027] 进一步的,所述激活剂是指当真菌入侵时,SEL1基因的表达量能够大大提高,其表达产物能够激活宿主的免疫应答,对宿主的免疫反应具有促进作用的分子。

[0028] 所述将SEL1基因作为激活剂的作用靶标应用于制备宿主免疫应答激活剂具体是指:将SEL1基因作为激活剂作用的靶标,来研制激活宿主免疫应答的制剂,从而提高宿主细胞内SEL1基因的表达水平;另一方面,可以将SEL1基因作为激活剂作用的靶标,通过提高表达细胞内SEL1基因的表达水平,来研制激活宿主免疫应答的制剂。例如,如本发明实施例所述,可以通过在表达细胞中转染pSe11质粒,来过表达Se11。或者通过在大肠杆菌中转化pET28a-Se11质粒,来过表达Se11。

[0029] 进一步的,所述过表达白念珠菌SEL1基因产物能够刺激宿主免疫细胞的免疫反应。

[0030] 所述免疫细胞选自巨噬细胞和/或树突状细胞。

[0031] 进一步的,所述过表达白念珠菌SEL1基因产物能够诱导宿主免疫细胞产生细胞因子和趋化因子上调。

[0032] 所述免疫细胞选自巨噬细胞和/或树突状细胞。

[0033] 在一种实施方式中,所述过表达白念珠菌SEL1基因产物能够激活巨噬细胞中NF- κ B信号通路中I κ B α 的磷酸化和降解,以及MAPK信号通路中JNK,ERK和p38的磷酸化激活。

[0034] 在一种实施方式中,所述过表达白念珠菌SEL1基因产物通过TLR2和TLR4激活巨噬细胞传递免疫信号。

[0035] 进一步的,所述宿主为哺乳动物,具体的,可以为啮齿类动物,灵长类动物。例如,人,小鼠。

[0036] 本发明第三方面,提供一种宿主免疫应答激活剂,所述宿主免疫应答激活剂包括有效量的白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11蛋白或所述蛋白的促进剂。

[0037] 进一步的,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0038] 进一步的,所述激活剂是指当真菌入侵时,Se11蛋白的分泌量能够大大提高,并能够激活宿主的免疫应答,对宿主的免疫反应具有促进作用的分子。

[0039] 进一步的,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够刺激宿主免疫细胞的免疫反应。

[0040] 所述免疫细胞选自巨噬细胞和/或树突状细胞。

[0041] 进一步的,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够诱导宿主免疫细胞细胞因子和趋化因子表达上调。

[0042] 所述免疫细胞选自巨噬细胞和/或树突状细胞。

[0043] 在一种实施方式中,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够激活巨噬细胞中NF- κ B信号通路和MAPK信号通路,能够诱导巨噬细胞产生细胞因子和趋化因子上调。

[0044] 在一种实施方式中,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11通过TLR2和TLR4传递免疫信号,并在宿主的致病过程和免疫应答过程起激活作用。

[0045] 进一步的,所述宿主为哺乳动物,具体的,可以为啮齿类动物,灵长类动物。例如,人,小鼠。

[0046] 本发明第四方面,提供一种宿主免疫应答激活剂,所述宿主免疫应答激活剂包括:含有白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白编码基因SEL1的核酸构建体,能够表达Se11蛋白。

[0047] 在一种实施方式中,所述核酸构建体为含有白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白编码基因SEL1的质粒。

[0048] 在一种实施方式中,所述核酸构建体为pSe11质粒和/或pET28a-Se11质粒。

[0049] 进一步的,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白编码基因SEL1的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0050] SEL1基因用于制备或筛选宿主免疫应答激活剂是指,将SEL1基因作为激活剂的作用靶标应用于制备宿主免疫应答激活剂。

[0051] 进一步的,所述激活剂是指当真菌入侵时,Se11蛋白的分泌量能够大大提高,并能够激活宿主的免疫应答,对宿主的免疫反应具有促进作用的分子。

[0052] 所述将SEL1基因作为激活剂的作用靶标应用于制备宿主免疫应答激活剂具体是指:将SEL1基因作为激活剂作用的靶标,来研制激活宿主免疫应答的制剂,从而提高宿主细胞内SEL1基因的表达水平。另一方面,可以将SEL1基因作为激活剂作用的靶标,通过提高表

达细胞内SEL1基因的表达水平,来研制激活宿主免疫应答的制剂。例如,如本发明实施例中所述,可以通过在宿主细胞中转染pSe11质粒,来过表达Se11。或者通过在大肠杆菌中转化pET28a-Se11质粒,来过表达Se11。

[0053] 进一步的,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够刺激宿主免疫细胞的免疫反应。

[0054] 所述免疫细胞选自巨噬细胞和/或树突状细胞。

[0055] 进一步的,所述白念珠菌SEL1基因编码的分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够诱导宿主免疫细胞产生细胞因子和趋化因子上调。

[0056] 所述免疫细胞选自巨噬细胞和/或树突状细胞。

[0057] 在一种实施方式中,所述核酸构建体能大量表达Se11蛋白,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11能够激活巨噬细胞中NF- κ B信号通路中I κ B α 的磷酸化和降解,以及MAPK信号通路中JNK,ERK和p38的磷酸化激活。

[0058] 在一种实施方式中,所述白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11通过TLR2和TLR4激活巨噬细胞传递免疫信号。

[0059] 进一步的,所述宿主为哺乳动物,具体的,可以为啮齿类动物,灵长类动物。例如,人,小鼠。

[0060] 本发明的有益效果为:

[0061] 本发明首次揭示了白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11所述的宿主免疫应答中的作用,揭示了一个全新的白念珠菌与宿主相互作用机制,本发明所述的宿主免疫应答激活剂,通过白念珠菌分泌蛋白与宿主细胞TLRs相互作用,从而介导宿主抗真菌免疫反应,防御真菌入侵。

附图说明

[0062] 图1显示了利用生物信息学方法从白念珠菌基因组中筛选小分子分泌型富含半胱氨酸的蛋白(SCP)。

[0063] 图2A显示了利用白念珠菌感染巨噬细胞过程中SCP备选因子的表达情况。

[0064] 图2B显示了将白念珠菌培养在不同培养基中SEL1的表达情况。SCD:人工合成全营养型培养基;SCLD:碳源缺乏的SCD;SCD-aa:氨基酸缺乏的SCD;SCDLA:氮源缺乏的SCD;

[0065] 图2C显示了将白念珠菌培养在不同培养基中Se11蛋白的表达与分泌情况。

[0066] 图3A显示了利用纯化的Se11蛋白刺激巨噬细胞BMDM,细胞产生细胞因子以及趋化因子的结果。

[0067] 图3B显示了利用纯化的Se11蛋白刺激巨噬细胞BMDM,细胞内NF- κ B和MAPK信号通路激活情况。

[0068] 图3C显示了利用纯化的Se11蛋白刺激树突状细胞BMDC,细胞产生细胞因子的结果。

[0069] 图3D显示了利用纯化的Se11蛋白从尾静脉注入小鼠体内,小鼠血液以及脾脏中细胞因子产生的结果。

[0070] 图4A显示了利用纯化的Se11蛋白刺激Tlr2^{-/-}Tlr4^{-/-}BMDM,细胞产生细胞因子的结果。

[0071] 图4B显示了利用纯化的Se11蛋白刺激Tlr2^{-/-}Tlr4^{-/-}BMDM,细胞内NF-κB和MAPK信号通路激活情况。

[0072] 图5A显示了利用野生型WT或敲除菌se11/se11白念珠菌培养后的培养上清刺激BMDM,细胞产生细胞因子的结果。

[0073] 图5B显示了利用野生型WT或敲除菌se11/se11白念珠菌感染小鼠后,小鼠血液和肾脏中细胞因子产生情况。

[0074] 图6A显示了利用野生型WT或敲除菌se11/se11白念珠菌感染小鼠后,小鼠肾脏、肝脏和脾脏中白念珠菌载量的情况。

[0075] 图6B显示了利用野生型WT或敲除菌se11/se11白念珠菌感染ICR小鼠后,小鼠的生存情况。

[0076] 图6C显示了利用野生型WT或敲除菌se11/se11白念珠菌感染C57B/L6小鼠后,小鼠的生存与体重变化情况。

[0077] 图7显示了利用野生型WT或敲除菌se11/se11白念珠菌感染Tlr2^{-/-}Tlr4^{-/-}双敲除小鼠后,小鼠的生存与体重变化情况。

[0078] 附图中,*表示有差异,**表示有差异,且差异显著性大于*,***表示有差异,且差异显著性大于**。

具体实施方式

[0079] 如图1,本发明利用生物信息学的方法寻找白念珠菌分泌型富半胱氨酸小蛋白。基于筛选标准:小于300个氨基酸、半胱氨酸数不少于4,具有胞外分泌信号肽,本发明从白念珠菌基因组中筛选到62个可能的备选因子。考虑到这些蛋白最终将被分泌到细胞外发挥功能,我们对62个备选因子进行细胞亚定位分析,排除可能定位在细胞膜或者细胞壁上的蛋白,最终得到27个备选因子。

[0080] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0081] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0082] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的药剂学,药物分析学,药物化学,分析化学,分子生物学、生物化学及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明。

[0083] 实施例1白念珠菌Se11蛋白在氮源缺乏以及富含血清的条件中显著上调表达

[0084] 如图2A,本发明模拟白念珠菌感染宿主过程,利用白念珠菌野生型菌株SC5314感染宿主巨噬细胞,检测27个备选因子的表达情况,发现其中第6号备选因子Se11 (Secreted

Elicitor1) 明显上调表达。如图2B, 进一步实验, 发现将白念珠菌培养在宿主细胞生长培养基 (DMEM或RPMI 1640培养基) 中也能诱导Sel1的上调表达; 本发明将白念珠菌培养在不同温度以及不同类型培养基中 (全营养型、氮源缺乏型、碳源缺乏型、是否包含血清以及是否回补硫酸铵等), 研究发现Sel1在氮源缺乏且包含血清的培养条件中上调表达最明显。如图2C, 将白念珠菌培养于含10%血清的氮源缺乏的SCDLA或RPMI 1640培养基中, Sel1蛋白能大量表达并分泌。白念珠菌作为胞外菌, 或寄居宿主皮肤/粘膜表层, 或通过血液传播感染宿主, 均能在宿主环境中遇见氮源缺乏或包含血清的环境, 因此本发明认为Sel1在白念珠菌感染宿主过程中发挥了重要作用。

[0085] 实施例2白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Sel1的表达与纯化

[0086] 1.1白念珠菌RNA抽提:

[0087] 收集不同条件处理后得到的白念珠菌细胞, 利用冰水洗两次。再将细胞悬浮于500 μ l TES溶液 (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS) 中, 再加等体积酚, 剧烈震荡混合15秒后, 将样品置于65 $^{\circ}$ C水浴1小时 (每十分钟颠倒混匀一次)。随后, 将样品置于冰上冷却, 离心 (最高速, 5分钟), 样品分层后取上层水相于新的EP管。再于样品中加入等体积酚, 震荡混匀后再次离心 (最高速, 5分钟); 样品分层后取上层水相于新的EP管, 于样品中加入等体积氯仿, 震荡混匀后再次离心 (最高速, 5分钟); 再次取上层水相, 加入3倍体积无水乙醇 (乙醇终浓度70%-75%), 颠倒混合均匀后再次离心 (最高速, 5分钟); 此时收集得到RNA沉淀, 再用75%乙醇洗3次, 烘干RNA沉淀。

[0088] 1.2哺乳动物细胞RNA抽提:

[0089] 收集经过不同处理后得到的哺乳动物细胞 (6孔板为例), 用冰PBS洗2次后, 加入400 μ l TRIZOL后重悬细胞; 样品室温放置15分钟裂解细胞, 随后加入1/5体积氯仿, 剧烈震荡15秒后将样品置于冰上2分钟; 将样品进行离心 (最高速, 15分钟), 取上层水相, 加入等体积异丙醇, 颠倒混合均匀后室温放置10分钟; 将样品进行离心 (最高速, 10分钟), 得到RNA沉淀; 用75%乙醇洗3次, 烘干RNA沉淀。

[0090] 1.3RNA反转得到cDNA与实时定量PCR分析:

[0091] DEPC水溶解RNA沉淀, 测量RNA浓度, 取1 μ g RNA反转 (TIANscript RT Kit, KR104) 得到cDNA。取反转所得cDNA为模板, 加入目标检测基因引物, 加入SuperReal PreMix Plus (SYBR Green, FP205) 实验体系, 于仪器ABI 7900HT Fast Real-time PCR System中反应; 随后以相应内参基因调齐样品量, 以 $\Delta\Delta$ CT法分析数据。

[0092]

引物名称	引物序列	序列号
SEL1-400s	GCTTCTGGTTGTTCTAGTGATGC	SEQ ID NO:3
SEL1-561a	ACCACCAACGACTTCAGCTT	SEQ ID NO:4
caACT-R	GCTTTTGGTGTGTTGACGAGTTTCT	SEQ ID NO:5
caACT-F	GTGAGCCGGGAAATCTGTATAGTC	SEQ ID NO:6
mTNF α -F	GTCCCCAAAGGGATGAGAAGTT	SEQ ID NO:7
mTNF α -R	GTTTGCTACGACGTGGGCTACA	SEQ ID NO:8
mIL-1 β -F	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	SEQ ID NO:9
mIL-1 β -R	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	SEQ ID NO:10
mIL-6-F	AGATAAGCTGGAGTCACAGAAGGAG	SEQ ID NO:11

mIL-6-R	CGCACTAGGTTTGCCGAGTAG	SEQ ID NO:12
mACT-R	AGGGACAGCACAGCCTGGAT	SEQ ID NO:13
mACT-F	TTACCAACTGGGACGACATG	SEQ ID NO:14

[0093] 1.4 Western blot分析:

[0094] 收集的白念珠菌细胞重悬于裂解液(50mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄), 加入0.6g酸洗玻璃珠(425-600μm, Sigma), 在振荡器FP120上振4次, 每次20秒, 间隔冰浴5分钟。将全细胞裂解液最高速离心5分钟, 取上清再离心5分钟, 收集上清。将收集的哺乳动物细胞重悬于细胞裂解液, 冰浴裂解30分钟, 全细胞裂解液最高速离心10分钟, 取上清去细胞碎片。

[0095] 收集得到的蛋白上清, 利用Bradford方法测定蛋白浓度, 取适量蛋白裂解液加入SDS-loading, 于100℃加热10分钟。制备所得蛋白样品上样于SDS-PAGE进行电泳分离, 随后将蛋白转移到固相膜硝酸纤维素膜(NC膜), 随后以牛奶室温封闭1小时, 后加入对应抗体进行反应以及显色。

[0096] 1.5 大肠杆菌中蛋白表达与纯化: 将构建好的pET28a-Sel1质粒转化入大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3), 挑取单克隆过夜培养于LB培养基。转接过夜菌于新鲜LB培养基, 待OD₆₀₀为0.6-0.8时, 加入终浓度0.1mM IPTG诱导蛋白表达(16℃, 24小时)。

[0097] 收集培养的大肠杆菌, 以冰ddH₂O洗两次, 重悬于裂解液(50mM Tris pH 8.0, 300mM NaCl, 10mM imidazole, 0.1% Triton X-100, 1mM PMSF)。利用高压破碎法裂解细胞, 离心去除细胞碎片得上清(10000rpm, 30分钟)。上清中加入裂解液平衡后的Ni-beads, 于4℃旋转孵育2小时; 洗beads(50mM Tris pH 8.0, 300mM NaCl, 20mM imidazole, 1mM PMSF)三次, 每次旋转15分钟; 洗脱beads(50mM Tris pH 8.0, 300mM NaCl, 300mM imidazole, 1mM PMSF)。利用快速蛋白液相色谱系统(FPLC)进一步纯化蛋白, 利用分子筛(Superdex 20016/60(preparative grade) column, 0.4ml/min, GE Healthcare)和阴离子交换柱(HiTrap Q HP column, 1ml/min, GE Healthcare)纯化蛋白。随后利用内毒素去除试剂盒(Pierce High Capacity Endotoxin Removal Spin Column)去除残余内毒素, 以0.22μm滤膜过滤, 所得蛋白冻存于-80℃。

[0098] 实施例3白念珠菌Sel1蛋白功能

[0099] 2.1 小鼠骨髓细胞诱导巨噬细胞和树突状细胞:

[0100] 取6-10周C57B/L6小鼠股骨和胫骨, 用RPMI 1640(10%FBS)培养基冲出股骨和胫骨中骨髓细胞, 连续吹打重悬细胞成为单细胞悬液, 将细胞培养于诱导培养基(10%FBS RPMI1640培养基:L929细胞培养上清=7:3)。取细胞后第4天, 洗去未贴壁细胞, 添加新鲜诱导培养基。取细胞后第6天, 消化收集诱导成功的BMDM细胞, 按一定浓度铺于细胞培养板中。

[0101] 取6-10周C57B/L6小鼠股骨和胫骨, 用RPMI 1640(10%FBS)培养基冲出股骨和胫骨中骨髓细胞, 连续吹打重悬细胞成为单细胞悬液, 利用ACK红细胞裂解液去掉红细胞(0.15M NH₄Cl, 1mM KHClO₃ and 0.1mM Na₂EDTA, pH 7.3), 随后将细胞培养于树突状细胞(BMDC)诱导培养基(10%FBS RPMI 1640培养基, 10ng/ml IL-4, 5% J558L细胞培养上清, 2mM L-谷氨酰胺以及200μMβ-巯基乙醇)。随后每两天用BMDC诱导培养基进行换液。诱导第九天时收集悬浮细胞进行实验。

[0102] 2.2 Sel1蛋白刺激骨髓细胞诱导的巨噬细胞和树突状细胞

[0103] 利用大肠杆菌纯化的Se11蛋白或AldoB蛋白(对照蛋白)刺激巨噬细胞BMDM(300ng/ml)和树突状细胞BMDC,30分钟后分别收集细胞,制备蛋白样品进行蛋白质印记杂交实验以检测信号通路激活情况;或3小时后分别收集细胞,提取细胞RNA进行q-PCR实验以检测细胞因子表达情况。

[0104] 2.3Se11蛋白诱导小鼠免疫应答:

[0105] 利用实施例2中纯化的Se11蛋白或AldoB蛋白(对照蛋白)尾静脉注射进入小鼠体内(C57B/L6小鼠,6周,n=3),6小时后取小鼠血液制备血清进行ELISA实验检测血清中细胞因子表达水平;取小鼠脾脏匀浆取上清进行ELISA实验检测脾脏中细胞因子表达水平。

[0106] 2.4实验结果:

[0107] 利用实施例2中纯化的Se11蛋白刺激骨髓细胞诱导的巨噬细胞(bone marrow derived macrophage,BMDM)和树突状细胞(bone marrow derived dendritic cells,BMDC)。如图3A,本发明表明Se11能显著诱导巨噬细胞BMDM产生细胞因子和趋化因子上调,包括Tnf,Il1 β ,Il6,Cxcl1,Cxcl2,Il12a,Il12b,Ip10,Ifn β 以及iNos等。如图3B,纯化的Se11蛋白能激活BMDM中NF- κ B信号通路中I κ B α 的磷酸化和降解以及MAPK信号通路中JNK,ERK以及p38的磷酸化激活。如图3C,纯化的Se11蛋白能显著诱导树突状细胞BMDC产生细胞因子。如图3D,纯化的Se11蛋白能激活小鼠体内免疫应答,产生TNF,IL-1 β ,IL-6。

[0108] 由此可知,Se11蛋白具备免疫调节功能,能诱导宿主细胞免疫反应的激活。

[0109] 实施例4白念珠菌Se11蛋白通过TLR2以及TLR4激活BMDM免疫信号

[0110] 分别取Tlr2^{-/-}Tlr4^{-/-}双敲除小鼠骨髓细胞诱导巨噬细胞,细胞获取及诱导方法与前述一致;随后以纯化的Se11蛋白刺激诱导成熟的巨噬细胞,3小时后收集细胞抽提RNA并以q-PCR方法检测细胞内细胞因子表达情况;或30分钟后收集细胞进行蛋白印记杂交实验检测细胞内免疫信号激活情况。

[0111] 如图4A和4B所示,本发明利用Tlr2^{-/-}Tlr4^{-/-}双敲除小鼠BMDM(Tlr2^{-/-}Tlr4^{-/-}BMDM)进行实验,发现Tlr2^{-/-}Tlr4^{-/-}BMDM不能应答Se11蛋白的刺激,NF- κ B和MAPK信号通路均未能激活,也无细胞因子的产生。这表明,Se11蛋白同时通过TLR2和TLR4传递免疫信号。

[0112] 实施例5白念珠菌培养上清刺激巨噬细胞BMDM

[0113] 本发明利用同源重组的方法敲除SEL1基因,得到sel1/sel1敲除菌。将白念珠菌野生型和sel1/sel1敲除菌分别培养于含10%血清的RPMI 1640培养基(25 $^{\circ}$ C,12小时),随后以0.22 μ m滤膜过滤并收集上清,以上清刺激诱导成功的BMDM细胞。如图5A所示,与野生型白念珠菌培养上清相比,sel1/sel1敲除菌培养上清刺激BMDM产生的细胞因子明显减少,表明白念珠菌培养上清中的Se11蛋白能诱导巨噬细胞BMDM产生免疫反应。

[0114] 实施例6白念珠菌感染小鼠实验

[0115] 5.1将白念珠菌过夜培养在YPD培养基中,随后取白念珠菌(野生型菌或sel1/sel1敲除菌)以PBS洗涤三次,尾静脉注射进入C57B/L6小鼠(6周,1 \times 10⁵白念细胞/鼠,n=4)。感染小鼠5天后,取小鼠血液获取血清进行ELISA实验,检测血清中细胞因子表达情况;取肾脏匀浆,将上清进行ELISA实验,检测小鼠肾脏中细胞因子表达情况。

[0116] 5.2将白念珠菌过夜培养在YPD培养基中,随后取白念珠菌(野生型菌或sel1/sel1敲除菌)以PBS洗涤三次,尾静脉注射进入ICR小鼠(18-21克,1 \times 10⁵白念细胞/鼠,n=10)或野生型C57B/L6小鼠(6周,1 \times 10⁵白念细胞/鼠,n=15)或Tlr2^{-/-}Tlr4^{-/-}C57B/L6小鼠(6周,1

$\times 10^5$ 白念细胞/鼠, $n=8$)。感染后30天内每天检测小鼠体重以及生存情况,得小鼠生存曲线图以及体重变化图。

[0117] 利用野生型WT以及sel1/sel1敲除菌感染小鼠过程中,如图5B所示,发现感染sel1/sel1敲除菌的小鼠免疫应答水平明显低于感染WT菌株的小鼠。如图6A所示,感染sel1/sel1敲除菌的小鼠脏器中(肾,肝,脾)有更高的菌载量,如图6B和6C所示,研究发现感染sel1/sel1敲除菌的小鼠表现出更多的死亡率以及更差的生活状态。进一步表明缺失SEL1基因的白念珠菌不能引起宿主足够的免疫反应,使宿主不能很好地清除体内的白念珠菌,从而造成更高的死亡率和更差的生存状态。如图7所示,利用野生型WT以及sel1/sel1敲除菌感染Tlr2^{-/-}Tlr4^{-/-}双敲除小鼠过程中,Tlr2^{-/-}Tlr4^{-/-}双敲除小鼠死亡率以及体重变化无明显差别。进一步表明Sel1蛋白通过TLR2和TLR4激活宿主免疫反应。

[0118] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

[0001]	序列表															
[0002]	<110>	中国科学院上海生命科学研究院														
[0003]	<120>	白念珠菌分泌型富半胱氨酸蛋白Se11的用途														
[0004]	<160>	14														
[0005]	<170>	SIPOSequenceListing 1.0														
[0006]	<210>	1														
[0007]	<211>	191														
[0008]	<212>	PRT														
[0009]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
[0010]	<400>	1														
[0011]	Met Val Ser Phe Lys Ser Leu Ile Thr Leu Ala Ile Ala Ala Thr Ser															
[0012]	1	5	10	15												
[0013]	Val Ser Ser Phe Asn Leu Leu His Asp Asp Lys Gly Phe Ala Ile Leu															
[0014]	20	25	30													
[0015]	Pro Pro Thr Asn Ile Val Leu Asp His Leu Lys Glu Val Gly Lys Lys															
[0016]	35	40	45													
[0017]	Ala Val Thr Thr His Tyr Asp Val Leu Asn Thr Ile Lys Glu Asp Gly															
[0018]	50	55	60													
[0019]	Glu Ile Val His Val Asn Leu His Thr His Glu Thr Lys Cys Thr Gly															
[0020]	65	70	75	80												
[0021]	Lys Tyr Ala Lys Asp Tyr Asp Asn Ser Met Tyr Asn Lys Leu Asn Lys															
[0022]	85	90	95													
[0023]	Lys Gln Leu Phe Ile Arg Thr Ile Glu Asp Ser Ser Leu Lys Gln Cys															
[0024]	100	105	110													
[0025]	Leu Asn Lys Glu Phe Glu Ala Glu Thr Ser Glu Cys Gly Phe Glu Phe															
[0026]	115	120	125													
[0027]	Ile Glu Tyr Asn Ser Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Ala Thr Lys Tyr															
[0028]	130	135	140													
[0029]	Ser Cys Leu Leu Asp Val Met Lys Gln Gln Asp Ala Thr Lys Lys Leu															
[0030]	145	150	155	160												
[0031]	Lys Asp Met Asp Asp Val Pro Ala Gln Val Arg Cys Tyr His Lys Leu															
[0032]	165	170	175													
[0033]	Glu Gln Ala Thr Lys Ala Glu Val Val Gly Gly Ala Cys Ala Lys															
[0034]	180	185	190													
[0035]	<210>	2														
[0036]	<211>	576														
[0037]	<212>	DNA														
[0038]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)														

[0039]	<400> 2	
[0040]	atggtttcat tcaagtcatt aatcactttg gctattgctg ccacttccgt ttcattcattc	60
[0041]	aattttattac atgatgataa aggttttgct attttaccac caaccaacat tgttttagat	120
[0042]	catttgaaag aagttggtaa aaaagctgct actactcatt atgatgttct taactactatt	180
[0043]	aaagaagatg gtgaaattgt tcatgttaat ttacatactc atgaaactaa atgtactggt	240
[0044]	aatatgcta aagattatga taattccatg tataacaaat taaacaaaaa acaattatntt	300
[0045]	attagaacta ttgaagatag ttcttttaaaa caatgtttga acaaagaatt tgaagctgaa	360
[0046]	actagtgaat gtggatttga atttattgaa tataattctg cttctggttg ttctagtgat	420
[0047]	gctactaaat attcatgtct tttggatggt atgaaacaac aagatgctac taagaaatta	480
[0048]	aaagatatgg atgatgttcc agctcaagtc agatgttacc ataaattaga acaagctact	540
[0049]	aaagctgaag tcgttggtgg tgcttgtgct aaataa	576
[0050]	<210> 3	
[0051]	<211> 23	
[0052]	<212> DNA	
[0053]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0054]	<400> 3	
[0055]	gcttctggtt gttctagtga tgc	23
[0056]	<210> 4	
[0057]	<211> 20	
[0058]	<212> DNA	
[0059]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0060]	<400> 4	
[0061]	accaccaacg acttcagctt	20
[0062]	<210> 5	
[0063]	<211> 24	
[0064]	<212> DNA	
[0065]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0066]	<400> 5	
[0067]	gcttttggtg tttgacgagt ttct	24
[0068]	<210> 6	
[0069]	<211> 24	
[0070]	<212> DNA	
[0071]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0072]	<400> 6	
[0073]	gtgagccggg aaatctgtat agtc	24
[0074]	<210> 7	
[0075]	<211> 22	
[0076]	<212> DNA	
[0077]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

[0078]	<400> 7	
[0079]	gtccccaag g gatgagaag tt	22
[0080]	<210> 8	
[0081]	<211> 22	
[0082]	<212> DNA	
[0083]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0084]	<400> 8	
[0085]	gtttgctacg acgtgggcta ca	22
[0086]	<210> 9	
[0087]	<211> 25	
[0088]	<212> DNA	
[0089]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0090]	<400> 9	
[0091]	caaccaaca gtgatattct ccatg	25
[0092]	<210> 10	
[0093]	<211> 21	
[0094]	<212> DNA	
[0095]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0096]	<400> 10	
[0097]	gatccacact ctccagctgc a	21
[0098]	<210> 11	
[0099]	<211> 25	
[0100]	<212> DNA	
[0101]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0102]	<400> 11	
[0103]	agataagctg gagtcacaga aggag	25
[0104]	<210> 12	
[0105]	<211> 21	
[0106]	<212> DNA	
[0107]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0108]	<400> 12	
[0109]	cgcactaggt ttgccgagta g	21
[0110]	<210> 13	
[0111]	<211> 20	
[0112]	<212> DNA	
[0113]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0114]	<400> 13	
[0115]	agggacagca cagcctggat	20
[0116]	<210> 14	

[0117]	<211>	20	
[0118]	<212>	DNA	
[0119]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0120]	<400>	14	
[0121]	ttaccaactg	ggacgacatg	20



图1

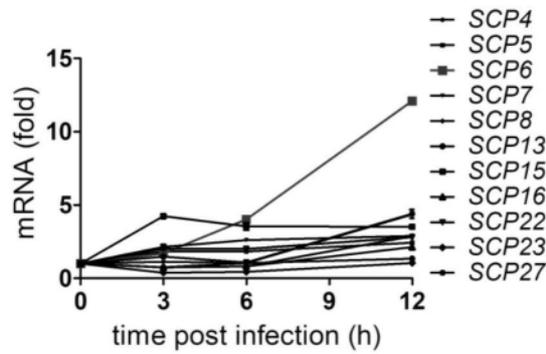


图2A

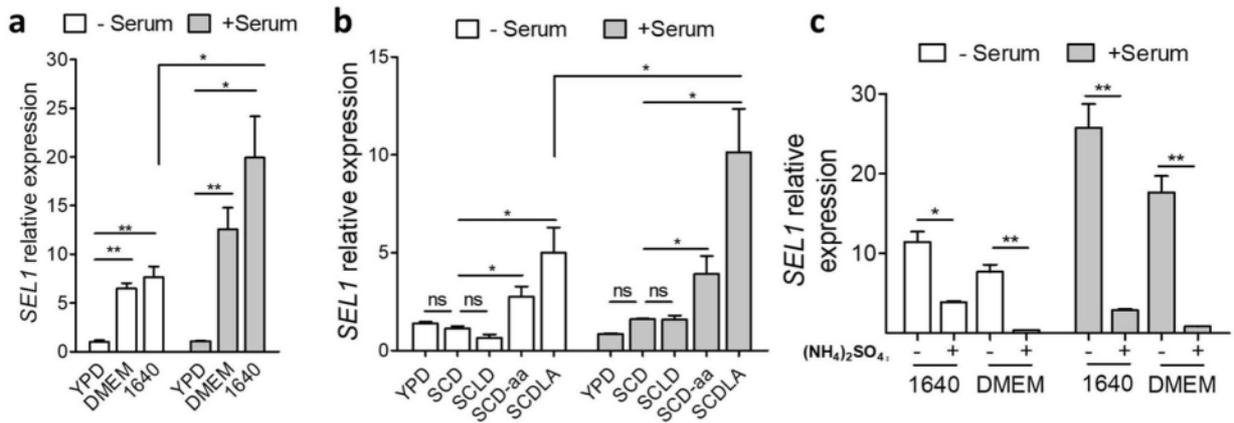


图2B

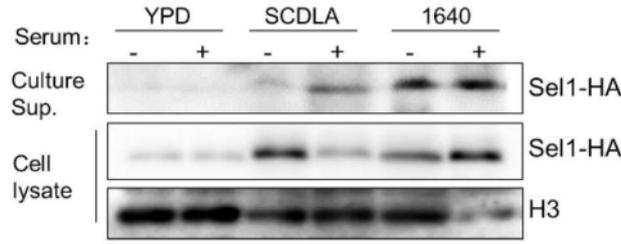


图2C

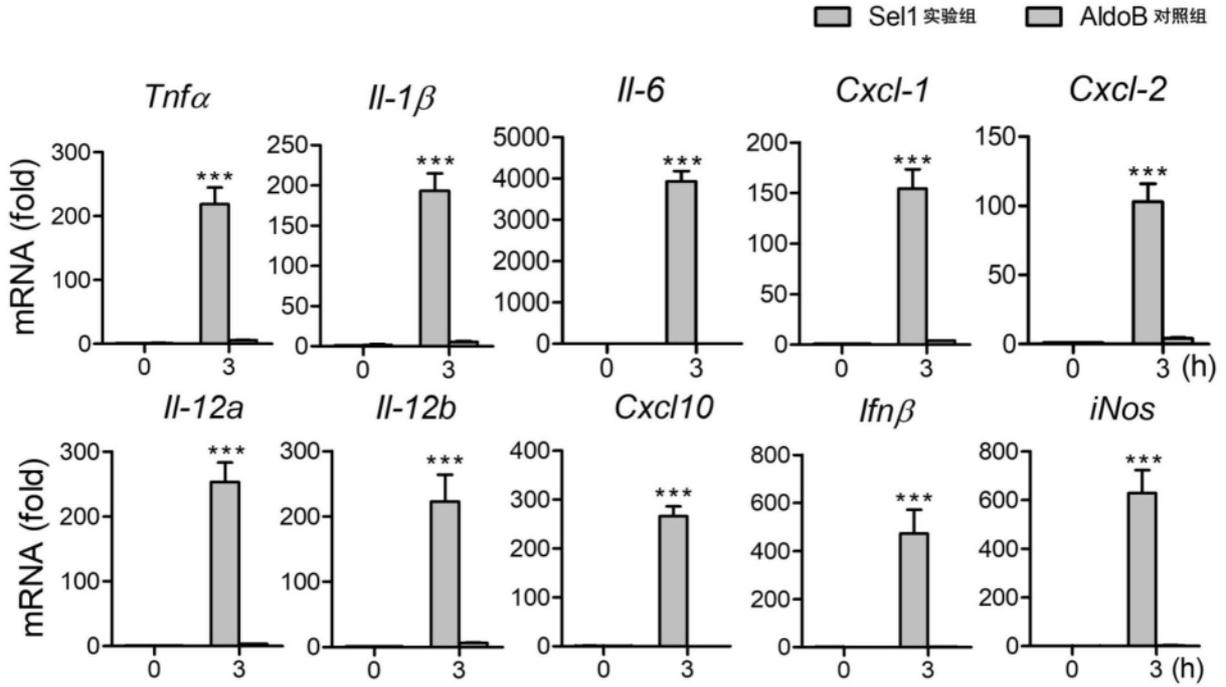


图3A

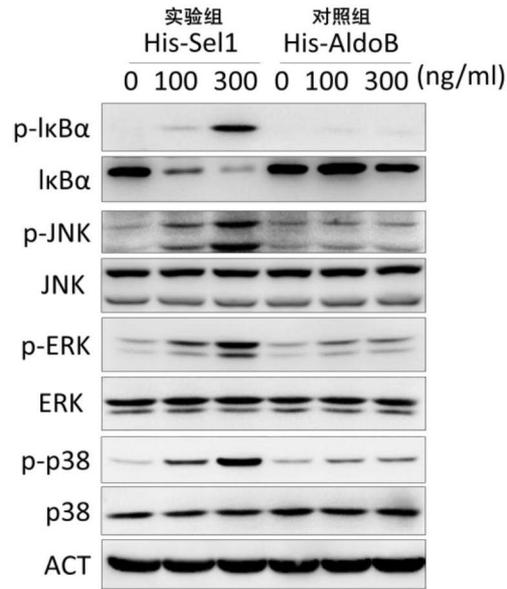


图3B

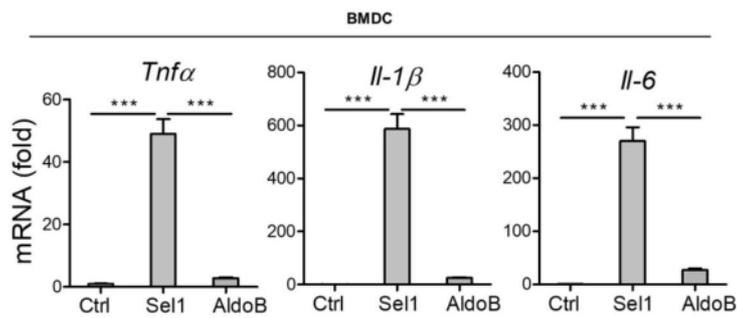


图3C

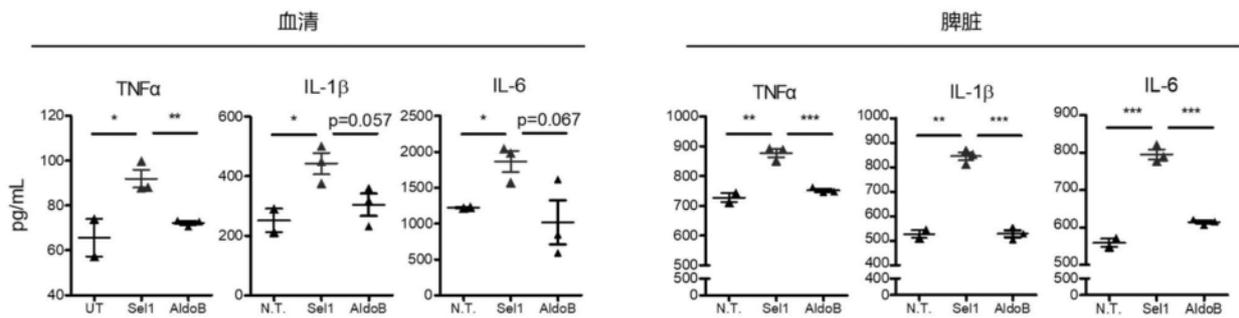


图3D

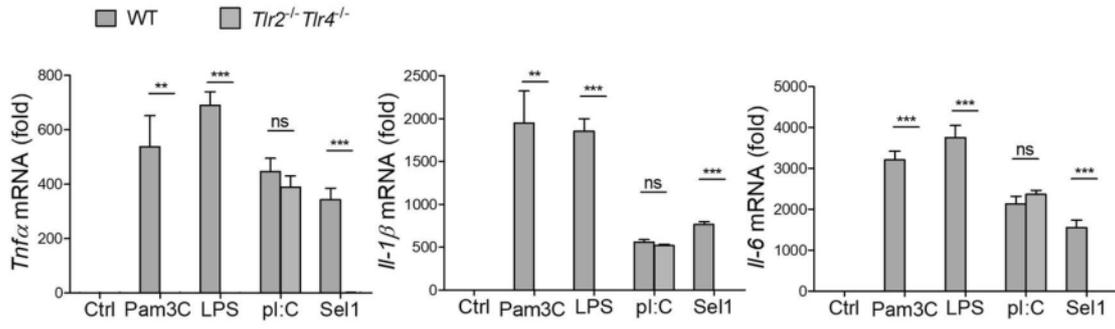


图4A

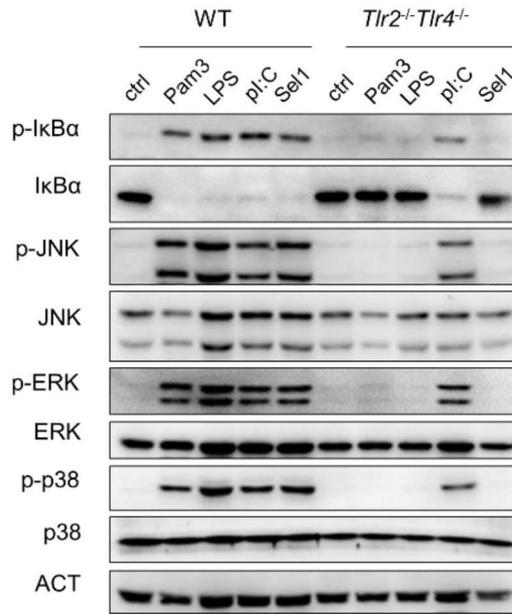


图4B

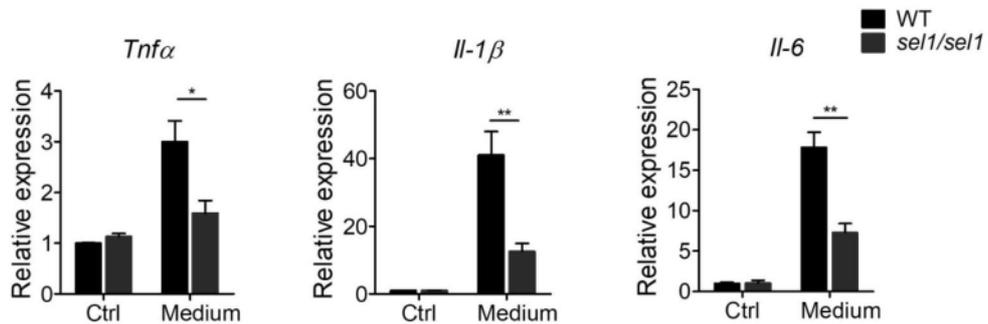


图5A

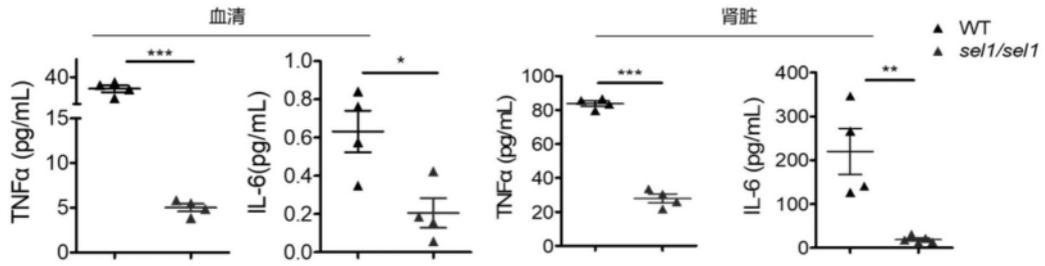


图5B

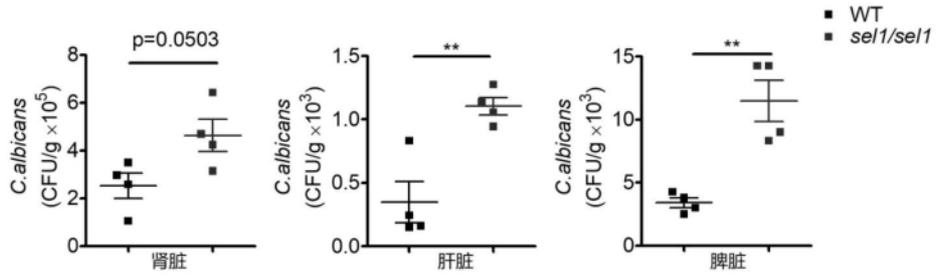


图6A

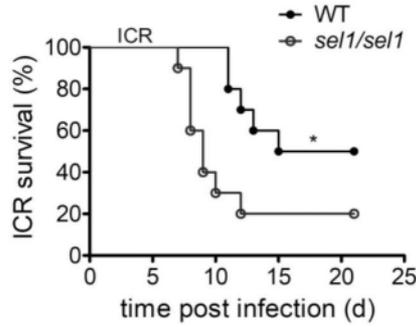


图6B

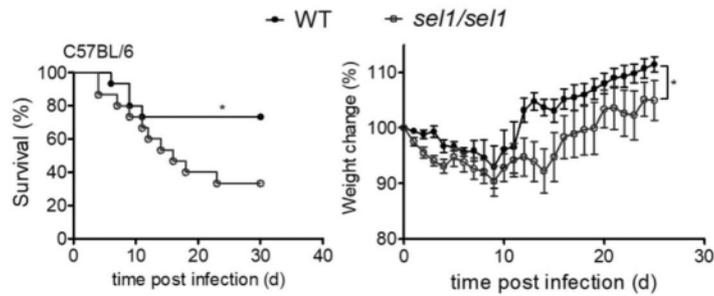


图6C

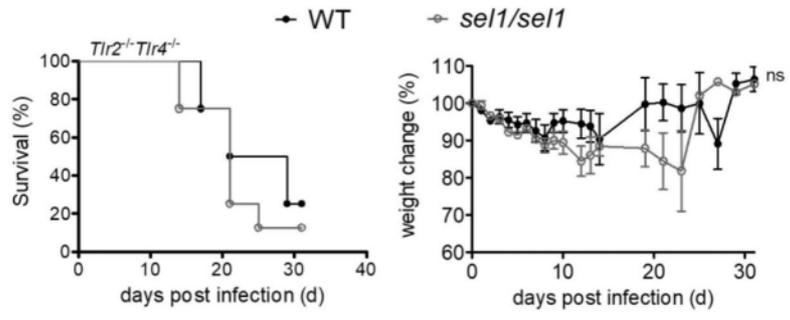


图7