



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101747438 A

(43) 申请公布日 2010.06.23

(21) 申请号 200810186033.4

(22) 申请日 2008.12.11

(71) 申请人 国立大学法人东京大学
地址 日本东京都文京区本乡七丁目三番一
号

申请人 中国科学院生物物理研究所

(72) 发明人 松田善卫 近藤直幸 岩本爱吉
王健琪

(74) 专利代理机构 北京君尚知识产权代理事务
所(普通合伙) 11200

代理人 李稚婷

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

C12Q 1/02(2006.01)

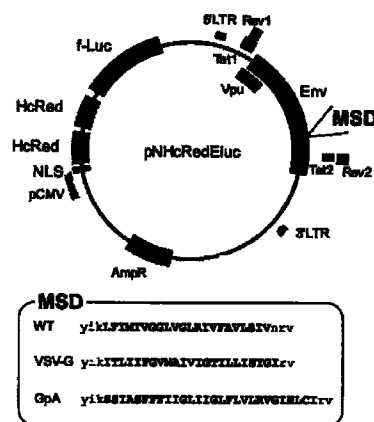
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合及其表达载体和应用

(57) 摘要

一种拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合和其表达载体,以及在细胞融合时通过检测该拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合中自我重新结合后的荧光蛋白的荧光来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。



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荧光蛋白的一部分和一种和磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol) 结合的蛋白的融合蛋白;第二拆分荧光蛋白的融合蛋白,为前述荧光蛋白的剩余部分和前述的磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol) 结合的蛋白的融合蛋白,

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,前述荧光蛋白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,前述一种和磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol) 结合的蛋白是 PH 结构域 (pleckstrin homology domain)。

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 214 和第 215 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。

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。

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 的组合体或是 CD4 与其辅助受体 CXCR4 的组合体。

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 的组合体或是 CD4 和其辅助受体 CXCR4 的组合体。

拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合及其表达载体和应用

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。特别是可以通过显示在细胞膜上的荧光来筛选病毒包膜蛋白的受体的方法,以及,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。膜融合是由两个膜所分开的两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] 膜融合是有包膜病毒(其中一些与新发传染病相关,例如禽流感, SARS 以及艾滋病)侵入宿主细胞时首先要发生的步骤。在这些新发传染病中, HIV-1 的感染以及 AIDS 已对人类的健康形成了全球性的威胁。在结构导向的融合抑制剂获得成功之后, HIV-1 包膜蛋白(Env)成为了一个重要的抗 HIV-1 化疗靶点(Chan, 1997 ;Weissenhorn, 1997 ;Eckert, 2001 ;Este, 2007 ;Poveda, 2005)。最近,研究人员设计出了一种旨在干扰 Env 与其辅助受体 CCR5 相互作用的新型抑制剂(Santoro, 2004)。因此, Env 介导的膜融合的表型鉴定方法对于新抑制剂的研发或者药物抗性突变株的评估是非常有价值的(Olson, 2003)。

[0004] 对于 HIV-1, 研究人员利用细胞-细胞或者病毒-细胞的膜融合分析方法已经设计出了一些能产生可测量或者可辨别信号的表型鉴定方法。其中, 观察合胞体的形成是最简单的方法(Kimpton, 1992); 但这种方法不能保证客观且定量。利用在膜融合过程中, 从一个区室到另一个区室发生的物质转移所释放出的信号, 如可视染料, 转录因子, 自我互补的蛋白质片断, 是分析膜融合的主要方法手段(Lin, 2005 ;Sakamoto, 2003 ;Blumenthal, 2002 ;Barbeau, 1998 ;Furuta, 2006)。使用这类方法, 通过光学设备的监测, 如激光共聚焦显微镜, 加载到膜上或者胞质中的染料的移动能提供膜融合的详细信息(Blumenthal, 2002)。还可以通过流式细胞技术(FACS)完成高通量的分析(Huerta, 2002 ;Lin, 2003)。

[0005] 但前者并不能处理太多的样品, 而后者需要进一步优化将细胞聚集现象和真正的融合现象区分出来(Huerta, 2006)。研究人员也广泛地使用转录因子实现对膜融合的检测, 例如使用 T7RNA 聚合酶(T7RNAPol) 或者 Tat, 与他们所识别的启动子驱动的报告基因(Feng, 1996 ;Lin, 2005 ;Sakamoto, 2003 ;Barbeau, 1998)。此方法既敏感而且可以定量, 但是由于报告基因存在转录和翻译的过程, 因而具有一段延迟时间。同时, 那些具有自我互补能力的蛋白片断, 特别是拆分的酶, 由于具有通用性也被研究人员经常用到; 但由于大部分的酶底物不具有膜通透性, 这样的分析方法通常需要破坏细胞膜(Holland, 2004 ;Jun, 2007)。这样就不能够对膜融合事件进行连续地监测。也有人使用电生理记录的方法(Monck, 1992), 但是这种方法使用并不广泛, 因为其方法建立非常复杂并且能够同时分析

的事件数目太少。

[0006] 所以在现有技术里就不存在一种技术,即为对大量样品既迅速又准确地鉴定 Env 介导的膜融合的表型的方法。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

[0007] (一) 发明的摘要

[0008] (发明所要解决的问题)

[0009] 本发明经过对大量拆分蛋白的研究和实验,发现利用基因工程改造的拆分绿色荧光蛋白 (GFP) 开发了一种基于细胞的通用膜融合检测方法。这种方法可以解决前述问题,即迅速又准确地鉴定 Env 介导的膜融合的表型的方法。同时也提供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。

[0010] (二) 发明的详细说明

[0011] 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荧光蛋白的一部分和一种和磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol) 结合的蛋白的融合蛋白;第二拆分荧光蛋白的融合蛋白,为前述荧光蛋白的剩余部分和前述的磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol) 结合的蛋白的融合蛋白,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,前述荧光蛋白可以自我重新结合恢复拆分前的荧光功能,从而发出荧光。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 本发明是利用基因工程改造的拆分绿色荧光蛋白 (GFP) 开发了一种基于细胞的通用膜融合检测方法。其原理在于这种拆分 GFP 蛋白在膜融合的时候会发生重新结合,进而能够发出荧光。本发明将为膜周边蛋白 (PMP:peripheral membrane protein) 融合到拆分 GFP 蛋白的 N 末端就可以进一步将这个检测信号定位到膜上。

[0015] 如果将膜周边蛋白的一种 PH 结构域 (pleckstrin homology domain) 融合到拆分 GFP 蛋白的 N 末端就可以进一步将这个检测信号定位到膜上。当使用该方法检测 HIV-1Env

介导的膜融合过程的时候,在共培养的 30 分钟后即可检测到绿色荧光信号。使用该方法不加入任何其它外源性底物即可进行活体细胞监测。

[0016] (具体实施形态)

[0017] 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。

[0018] (第一实施形态)

[0019] 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荧光蛋白的一部分和一种和磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol) 结合的蛋白的融合蛋白;第二拆分荧光蛋白的融合蛋白,为前述荧光蛋白的剩余部分和前述的磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol) 结合的蛋白的融合蛋白,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,前述荧光蛋白可以自我重新结合恢复拆分前的荧光功能,从而发出荧光。

[0020] 本发明不局限特定的拆分荧光蛋白,可以使用的拆分荧光蛋白可以是现有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,也可以使用拆分荧光酶。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)。

[0021] 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。

[0022] 在本发明中优先采用的拆分荧光蛋白为,绿色荧光蛋白 (GreenFluorescent Protein, GFP)。本发明采用的一种和磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol) 结合的蛋白为膜周边蛋白 (PMP :peripheral membrane protein),优选 PH 结构域 (pleckstrin homology domain)。因为将膜周边蛋白和被拆分的荧光蛋白的一部分融合后,表达在细胞膜附近的当该融合蛋白和该荧光蛋白的另一部结合后就会导致荧光蛋白的自我重新结合发出荧光,所以可以通过检验显示在细胞膜上的荧光,即迅速又准确地判断细胞融合是否发生。

[0023] 本实施形态所优选的 PH 结构域是人磷脂酶 C δ 的 PH 结构域,由 10 个 79 碱基长度的寡居核苷酸组装合成的。另外优化的拆分荧光蛋白为 GFP,其拆分点在氨基酸序列的第 214 和第 215 之间,可以将 GFP 拆分成 GFP₁₋₁₀ 和 GFP₁₁ 两部分。

[0024] 因此,本实施形态优选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,PH 和 GFP₁₋₁₀ 的融合蛋白或 PH 和 GFP₁₁ 的融合蛋白,拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合为 PH 和 GFP₁₋₁₀ 的融合蛋白以及 PH 和 GFP₁₁ 的融合蛋白的组合。其融合蛋白的序列如下;

[0025] PH 和 GFP₁₋₁₀ 的融合蛋白 (PH-split-GFP₁₀) (SEQ ID No :1)

[0026] (PH :1-170, linker :171-172, splitGFP₁₋₁₀ :173-386)

[0027] MDSGRDFLTLHGLQDDEDLQALLKGSQLLKVKSSSWRRERFYKLQEDCKTIWQESRKVMRTPESQLFSI
EDIQEVRMGHRTEGLEKFARDVPEDRCFSIVFKDQRNTLDLIAPSPADAQHWVLGLHKIIHHSMSMDQRQKLQHWI
H SCLRKADKNKDNKMSFKELQNFLKEFMVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATIGKLTLLKFICTT

GKLPVWPVPTLVTTLYGVQCFSRYDPHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGKYKTRAVVKFEGDTLVNRIELKG
TDFKEDGNILGHKLEYNFNHNVYITADKQKNGIKANFTVRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQ
TVLSKDPNE

[0028] PH 和 GFP₁₁ 的融合蛋白 (PH-split-GFP₁₁) (SEQ ID No :2)

[0029] (PH :1-170, linker :171-172, splitGFP₁₁ :173-189)

[0030] MDSGRDFLTLHGLQDDEDLQALLKGSQQLLVKSSSWRRERFYKLQEDCKTIWQESRKVMRTPESQLFSI
EDIQEVRMGHRTEGLEKFARDVPEDRCFSIVFKDQRNTLDLIAPSPADAQHWVLGLHKIIHHSMSMDQRQKLQHWI
SCLRKADKNKDNKMSFKELQNFLKEFKRDHMLHEVYVNAAGIT

[0031] (第二实施形态)

[0032] 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。

[0033] 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,PH 和 GFP₁₋₁₀ 的融合蛋白基因的表达载体,PH 和 GFP₁₁ 的融合蛋白基因的表达载体。

[0034] 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的技术人员所熟知的表达载体。

[0035] 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两组:

[0036] A. 包括 HIV-1 的包膜蛋白的基因,PH 和 GFP₁₋₁₀ 的融合蛋白的基因的表达载体,以及,包括 PH 和 GFP₁₁ 的融合蛋白的基因的表达载体的组合;

[0037] B. 包括 HIV-1 的包膜蛋白的基因,PH 和 GFP₁₁ 的融合蛋白的基因的表达载体,以及,包括 PH 和 GFP₁₋₁₀ 的融合蛋白的基因的表达载体的组合;

[0038] (第三实施形态)

[0039] 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。

[0040] 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。而且因为本实施形态的被拆分荧光蛋白和膜周边蛋白相结合,所以当细胞融合时,通过显示在细胞表面的荧光来即时的判断细胞是否发生融合。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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, GFP₁₋₁₀ 和 GFP₁₁ 重组后的荧光。所以本实施形态可以通过细胞表面上显示的荧光的测试来筛选包膜蛋白所对应的受体。

[0044] 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。

[0045] (第四实施形态)

[0046] 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。

[0047] 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, 就可以通过细胞表面上显示的荧光的测试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。同样也可以通过细胞表面上显示的荧光的测试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。

[0048] 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。

[0049] (三) 发明的效果

[0050] 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开发了一种基于细胞的膜融合检测方法。由于不需要其他的外源性底物, 该方法可以节省开支和劳力。此外, 本发明可以在分析中使用相同的活体细胞培养监测膜融合的过程。这两个特性都非常适用于高通量地筛选那些作用于膜融合过程中不同时间点的新膜融合抑制剂。如果使用 CCR5/CD4+ 细胞和 CXCR4/CD4+ 细胞, 这个方法可以很容易地应用与检测 HIV-1Env 的指向(嗜性), 将会对于新药开发很有帮助。当然, 也可以容易地监测除 HIV-1 外其它病毒的膜融合过程。

[0051] 另外使用不同的胞内定位标记之后,所产生的绿色荧光信号可以用于检测两个区室之间的信息交流,例如囊泡运输。且 GFP₁₁ 蛋白具有分子量较小的优点,可以使用前人工工作中所述方法与其它蛋白融合。

附图说明

[0052] 图 1 为本发明中所使用质粒的图谱。(A) 图片上部,表达 HIV-1 包膜蛋白的 pNHcRedEluc 质粒图谱, pCMV :人巨细胞病毒启动子, NLS :核定位信号, HcRed :红色荧光蛋白, f-Luc :萤火虫荧光素酶, MSD :跨膜区, AmpR :氨苄青霉素抗性基因。图片下部,所用 MSD 的一级结构。WT :野生型, VSV-G :水泡性口炎病毒 G 蛋白, GpA :血型糖蛋白 A. 预测的 MSD 区域使用大写字母表示。(B) 拆分 GFP 蛋白的表达载体。其中质粒骨架 pdEGFP (图片上部) 是通过删除 EGFP-N2 质粒 SmaI 和 BsrGI 之间的 EGFP 基因序列获得。MCS :多克隆位点, spGFP :拆分 GFP 的插入位点, pSV40 :来源于 SV40 的启动子区域, SV40ori :SV40 的复制起始位点, Kan/NeoR :卡那霉素 / 新霉素抗性基因。(图片下部) 不同的 spGFP 蛋白。PH domain :Pleckstrin 同源结构域。GFP 的下标数字表示引入拆分点的 GFP 蛋白 β 折叠的位点。图中标示了所用限制性酶切位点。

[0053] 图 2 为拆分 GFP 蛋白在转染细胞中的表达。(A) 免疫印迹分析转染了 GFP₁₋₁₀ 和 PH-GFP₁₋₁₀ 的 293CD4 细胞,使用抗 GFP 抗体。图中标示了所表达的蛋白。EGFP :细胞转染了增强型 GFP 蛋白。(B) 转染了 GFP₁₁-FLAG 或者 PH-GFP₁₁-FLAG 表达载体的 293FT 细胞的蛋白表达,使用抗 FLAG 单克隆抗体。(C) 使用显微镜观察转染细胞中单个拆分 GFP 蛋白的 GFP 信号。BF 表示明场, GFP :绿色荧光信号。

[0054] 图 3 为拆分 GFP 蛋白的胞内定位。(A) 转染了 GFP₁₋₁₀ 或者 PH-GFP₁₋₁₀ 细胞的免疫荧光检测,使用抗 GFP 抗体。(B) 转染了 GFP₁₁-FLAG, PH-GFP₁₁-FLAG 以及 PH-GFP₁₁ 表达质粒的细胞免疫荧光检测,使用抗 FLAG 抗体。(C) PH-GFP₁₋₁₀ 或者 GFP₁₋₁₀ 与 PH-GFP₁₁, GFP₁₁ 的共转。

[0055] 图 4 为通过膜融合产生绿色荧光信号。使用激光共聚焦显微镜监测转染了相应拆分 GFP 蛋白表达载体的包膜表达细胞和受体表达细胞间发生的细胞融合。

[0056] 图 5 为通过拆分 GFP 方法和 T7RNA 聚合酶 (T7RNApo1) 转移分析方法分析 HIV-1Env 介导的膜融合的时间进程 (A) 拆分 GFP 方法的结果。箭头标示出了在早期时间点观察到的 GFP 信号区域。(B) T7RNApo1 转移分析方法的结果。融合效率使用转移的 T7RNApo1 所激活的海肾荧光素酶 (RenillaLuciferase) 活性表示。海肾荧光素酶的活性通过除以萤火虫荧光素酶活性以标准化转染效率。NC 表示负对照, PC :正对照。

[0057] 具体的实施方式

[0058] (实施例一)

[0059] (1) 拆分荧光蛋白和 PH 结构域以及表达载体的构建 :

[0060] 本实施例使用的是人磷脂酶 C δ 的 PH 结构域,由 10 个 79 碱基长度的寡居核苷酸组装合成。通过 PCR 将这些寡居核苷酸结合组装起来 (94°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 40 秒 30 个循环)。类似的,优化的 GFP 基因是由 30 段 40nt 每段具有 18 个碱基重叠的寡居核苷酸组装合成的,命名为 GFP_{opt1-11}。这两段扩增得序列随后被克隆到 CR4Blunt-TOPO 中并测序。GFP_{opt1-11} 通过 PCR 拆分为 GFP₁₋₁₀ (1-642bp) 和 GFP₁₁ (643-696bp), 并克隆到

pCR4Blunt-TOPO 中。PH-GFP₁₋₁₀ 和 PH-GFP₁₁ 基因是通过结合 PH 结构域基因和拆分的 GFP 基因获得,随后被克隆到 pdEGFP 中,构建成相应的表达载体 pdPH-GFP₁₋₁₀ 和 pdPH-GFP₁₁ (图 1B)。通过在 3' 引物中引入 FLAG 标记序列,使用 PCR 的方法将 FLAG 标记引入到拆分 GFP 的 C 末端。根据前人工作获得的 pElucEnv (Miyachi, 2005),通过使用前面含有核定位信号 (NLS) 的红色荧光蛋白 HcRed 替换原载体中的 EGFP 部分,发明人得到了这种载体的衍生形式,一种新的 HIV-1Env 表达载体,命名为 pNHcRedEluc (图 1A)。细胞转染的效率可以通过红色细胞核的数目或者萤火虫荧光素酶活性来监测。

[0061] (2) 细胞培养及转染:

[0062] 293FT 细胞 (Invitrogen) 以及 293CD4 细胞 (Miyachi, 2005) 培养在含有 10% 胎牛血清 (Hyclone) 的 Dulbecco 修饰的 Eagle 培养基中 (DMEM, Sigma)。293FT 培养基中按照说明书加入了终浓度为 500 μ g/ml 的遗传霉素 (Gibco)。瞬转实验中使用的是 Fugene HD 试剂 (Roche)。表达 PH-GFP₁₋₁₀ 的稳转细胞系是使用电转化 (Biorad GenePulsar) 的方法将 pdPH-GFP₁₋₁₀ 转入到 293CD4 细胞中建立。所转染细胞通过 700 μ g/ml 遗传霉素进行筛选。

[0063] (3) 融合检测:

[0064] 拆分 GFP 介导的融合检测使用如下步骤进行。将表达载体 pNHcRedEluc 和 pdPH-GFP₁₁ 转入 293FT 细胞中。同时将 pdPH-GFP₁₋₁₀ 转入 293CD4 细胞中。转染 42 小时后,将转染后的 293FT 细胞与转染后的 293CD4 细胞贴面培养,并使用 IN Cell Analyzer 1000 (GE healthcare) 观察活体细胞的融合情况,或者将细胞固定 (4% 多聚甲醛) 使用激光共聚焦显微镜 (Olympus FLUOVIEWFV1000) 检测选定时间点的细胞融合情况。除了实验中所使用的载体是 pNHcRedEluc, T7RNA^{pol} 转移方法的融合检测均按照前人所述方法进行 (Miyachi, 2005)。

[0065] (4) 蛋白分析:

[0066] 样品的准备和免疫印迹实验均按照前人所述方法完成 (Miyachi, 2005)。其中抗 FLAG 抗体来自 Sigma 公司。抗 GFP 抗体来自 Santa Cruz Biotechnology 公司。化学发光信号使用 LAS3000lite (Fuji) 检测。

[0067] (5) 免疫荧光检测:

[0068] 将转染细胞用丙酮:甲醇溶液 (1:1, 体积比) 于室温处理 15 分钟固定,并使用抗 FLAG 抗体 (3 μ g/ml) 于 30°C 温育 40 分钟。实验所使用二抗使用 Alexa Fluor 555 标记,荧光信号是使用激光共聚焦显微镜 (Olympus FLUOVIEWFV1000) 观测。

[0069] 实验结果

[0070] (1) 蛋白表达:

[0071] GFP_{opt1-11} 和 PH 结构域的 DNA 片段使用材料与部分所述方法生成。将图 1 中 A 和 B 所示表达载体转入细胞中表达,并使用免疫印迹法检测蛋白表达情况。当使用抗 GFP 抗体检测的时候, GFP₁₋₁₀ 和 PH-GFP₁₋₁₀ 分别对应为 25kDa 和 40kDa 的条带 (图 2A),检测到的 PH-GFP₁₋₁₀ 的分子量大小与 PH-GFP₁₋₁₀ (23kDa) 和 PH 结构域 (18kDa) 之和所预测的大小一致。在检测 GFP₁₁ 的表达时,抗 GFP 抗体没有能够检测到任何条带 (数据未显示)。这可能是由于 GFP₁₁ 只有 17 个氨基酸,分子量太小的缘故,或者是该片段上缺乏抗 GFP 抗体的抗原表位的缘故。

[0072] 因此发明人又使用了含有或者不含有 PH 结构域的 FLAG 标记 GFP₁₁ 用于免疫印迹检测。检测到了 22kDa 大小的 PH-GFP₁₁ 蛋白,但是没有检测到 GFP₁₁-FLAG 蛋白(图 2B)。这个结果表明不含 PH 结构域的 GFP₁₁ 片段是不稳定的。与所预期的一致,单独的拆分 GFP 蛋白和拆分 PH-GFP 蛋白是不产生荧光信号的(图 2C)。

[0073] (2) 使用免疫荧光分析检测了 PH 结构域的结合效果:

[0074] 理论上来讲,PH 结构域能将拆分 GFP 蛋白定位到细胞质膜附近。实验结果表明,在不含有 PH 结构域的时候,拆分的 GFP₁₋₁₀ 在整个细胞中分布,而拆分的 PH-GFP₁₋₁₀ 则定位在转染细胞的外周(图 3A)。无法检测到 FLAG 标记的 GFP₁₁ 的表达(图 3B,上),这与免疫印迹的结果相一致(图 2B)。另一方面,可以在细胞外周检测到含有 FLAG 标记的 PH-GFP₁₁(图 3B,中)。不含 FLAG 标记的 PH-GFP₁₁ 无法用 anti-FLAG 抗体检测到(图 3B,下)。

[0075] (实施例二)

[0076] (1) 哺乳动物细胞中拆分 GFP 蛋白和 PH 融合的拆分 GFP 蛋白的互补实验。

[0077] 发明人将一对拆分 GFP 蛋白的表达质粒共转至 293FT 细胞中。当两个拆分 GFP 蛋白片段被共转染后,可以观察到绿色荧光信号(图 3C)。与图 2 和图 3 中所示数据一致的是,如果转入 PH-GFP₁₁ 可以产生绿色荧光信号,而转入 GFP₁₁ 则不能。当 PH-GFP₁₁ 与 GFP₁₋₁₀ 共转的时候,可以在共转染的细胞中观测到均匀的绿色荧光信号。这个数据结果表明这两个片段的结合在它们被定位到质膜上之前就发生了。而 PH-GFP₁₋₁₀ 和 PH-GFP₁₁ 共转的时候,观测到主要的绿色荧光信号位于共转细胞的边缘,同时在胞质中也观测到了一些绿色荧光信号。后者可能反映了蛋白的结合发生在定位之前。

[0078] (2) 使用瞬时转染检测细胞之间的膜融合

[0079] 将含有野生型的 Env pNHcRedEluc 质粒(pNHcRedElucWT)和 pdPH-GFP₁₁ 瞬转入 293FT 细胞,随后与稳定表达 PH-GFP₁₋₁₀ 的 293CD4 共培养。我们首先使用激光共聚焦显微镜对共培养的细胞进行了详细的图像分析(图 4A)。由于转入了核定位的 HcRed 蛋白,表达包膜蛋白的细胞核会变成红色。我们观察到一些红色的细胞核,其细胞周围具有来自于含 PH 结构域的互补 spGFP 产生的线状绿色荧光信号。这些绿色荧光信号具有特异的定位,很容易将其与细胞中非特异的自发荧光区分开来。同时可以通过合胞体中缺乏红色的细胞核来排除那些可能存在的自发融合现象。这个结果表明,不加入任何其它的染料或者底物,我们可以同时利用 pNHcRedEluc 和拆分 GFP 蛋白更加客观地监测膜融合现象。

[0080] 发明人接下来检测了在这个方法中,GFP 信号随着时间进程的发展情况。使用 IN Cell Analyzer 实时地监测融合的过程可。30 分钟后即可检测到 spGFP 重新结合所产生的绿色荧光信号,并且检测到的数目和强度逐渐地增加(图 5A)。发明人将结果同传统的 T7RNAPol 转移分析方法做了比较(图 5B)。这两组数据相互吻合,在这两个方法中都记录到了不断增加的膜融合事件。本文所使用的拆分 GFP 方法的一个优点是,它可以检测到单个膜的融合事件,而不是使用 T7 方法检测到的平均活性。此外,与 T7 方法不同,该方法可以对同样的共培养活体细胞进行连续地实时监测。

[0081] 序列表 (SEQUENCE LISTING)

[0082] <110> 国立大学法人东京大学 (The University of Tokyo)

[0083] 中国科学院生物物理研究所

[0084] <120> 拆分荧光蛋白的融合蛋白的组合及其表达载体和应用

[0085] <130>JSP080385
 [0086] <160>2
 [0087] <170>PatentIn version 3.1
 [0088] <210>1
 [0089] <211>386
 [0090] <212>PRT
 [0091] <213>人工序列
 [0092] <220>
 [0093] <223>人工融合蛋白 (An artificial fusion protein)
 [0094] <400>1
 [0095] Met Asp Ser Gly Arg Asp Phe Leu Thr Leu His Gly Leu Gln Asp Asp
 [0096] 1 5 10 15
 [0097] Glu Asp Leu Gln Ala Leu Leu Lys Gly Ser Gln Leu Leu Lys Val Lys
 [0098] 20 25 30
 [0099] Ser Ser Ser Trp Arg Arg Glu Arg Phe Tyr Lys Leu Gln Glu Asp Cys
 [0100] 35 40 45
 [0101] Lys Thr Ile Trp Gln Glu Ser Arg Lys Val Met Arg Thr Pro Glu Ser
 [0102] 50 55 60
 [0103] Gln Leu Phe Ser Ile Glu Asp Ile Gln Glu Val Arg Met Gly His Arg
 [0104] 65 70 75 80
 [0105] Thr Glu Gly Leu Glu Lys Phe Ala Arg Asp Val Pro Glu Asp Arg Cys
 [0106] 85 90 95
 [0107] Phe Ser Ile Val Phe Lys Asp Gln Arg Asn Thr Leu Asp Leu Ile Ala
 [0108] 100 105 110
 [0109] Pro Ser Pro Ala Asp Ala Gln His Trp Val Leu Gly Leu His Lys Ile
 [0110] 115 120 125
 [0111] Ile His His Ser Gly Ser Met Asp Gln Arg Gln Lys Leu Gln His Trp
 [0112] 130 135 140
 [0113] Ile His Ser Cys Leu Arg Lys Ala Asp Lys Asn Lys Asp Asn Lys Met
 [0114] 145 150 155 160
 [0115] Ser Phe Lys Glu Leu Gln Asn Phe Leu Lys Glu Phe Met Val Ser Lys
 [0116] 165 170 175
 [0117] Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
 [0118] 180 185 190
 [0119] Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu Gly Glu Gly
 [0120] 195 200 205
 [0121] Asp Ala Thr Ile Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly
 [0122] 210 215 220
 [0123] Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly

[0124]	225	230	235	240
[0125]	Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Asp Pro His Met Lys Gln His Asp Phe			
[0126]		245	250	255
[0127]	Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Ser			
[0128]		260	265	270
[0129]	Phe Lys Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Ala Val Val Lys Phe Glu			
[0130]		275	280	285
[0131]	Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Thr Asp Phe Lys			
[0132]		290	295	300
[0133]	Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Asn Ser			
[0134]	305	310	315	320
[0135]	His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala			
[0136]		325	330	335
[0137]	Asn Phe Thr Val Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala			
[0138]		340	345	350
[0139]	Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu			
[0140]		355	360	365
[0141]	Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Thr Val Leu Ser Lys Asp Pro			
[0142]		370	375	380
[0143]	Asn Glu			
[0144]	385			
[0145]	<210>2			
[0146]	<211>189			
[0147]	<212>PRT			
[0148]	<213>人工序列			
[0149]	<220>			
[0150]	<223>人工融合蛋白 (An artificial fusion protein)			
[0151]	<400>2			
[0152]	Met Asp Ser Gly Arg Asp Phe Leu Thr Leu His Gly Leu Gln Asp Asp			
[0153]	1	5	10	15
[0154]	Glu Asp Leu Gln Ala Leu Leu Lys Gly Ser Gln Leu Leu Lys Val Lys			
[0155]		20	25	30
[0156]	Ser Ser Ser Trp Arg Arg Glu Arg Phe Tyr Lys Leu Gln Glu Asp Cys			
[0157]		35	40	45
[0158]	Lys Thr Ile Trp Gln Glu Ser Arg Lys Val Met Arg Thr Pro Glu Ser			
[0159]		50	55	60
[0160]	Gln Leu Phe Ser Ile Glu Asp Ile Gln Glu Val Arg Met Gly His Arg			
[0161]	65	70	75	80
[0162]	Thr Glu Gly Leu Glu Lys Phe Ala Arg Asp Val Pro Glu Asp Arg Cys			

[0163]		85		90		95
[0164]	Phe Ser Ile Val	Phe Lys Asp Gln Arg Asn Thr Leu Asp Leu Ile Ala				
[0165]		100		105		110
[0166]	Pro Ser Pro Ala Asp Ala Gln His Trp Val Leu Gly Leu His Lys Ile					
[0167]		115		120		125
[0168]	Ile His His Ser Gly Ser Met Asp Gln Arg Gln Lys Leu Gln His Trp					
[0169]		130		135		140
[0170]	Ile His Ser Cys Leu Arg Lys Ala Asp Lys Asn Lys Asp Asn Lys Met					
[0171]	145		150		155	160
[0172]	Ser Phe Lys Glu Leu Gln Asn Phe Leu Lys Glu Phe Lys Arg Asp His					
[0173]		165		170		175
[0174]	Met Val Leu His Glu Tyr Val Asn Ala Ala Gly Ile Thr					
[0175]		180		185		

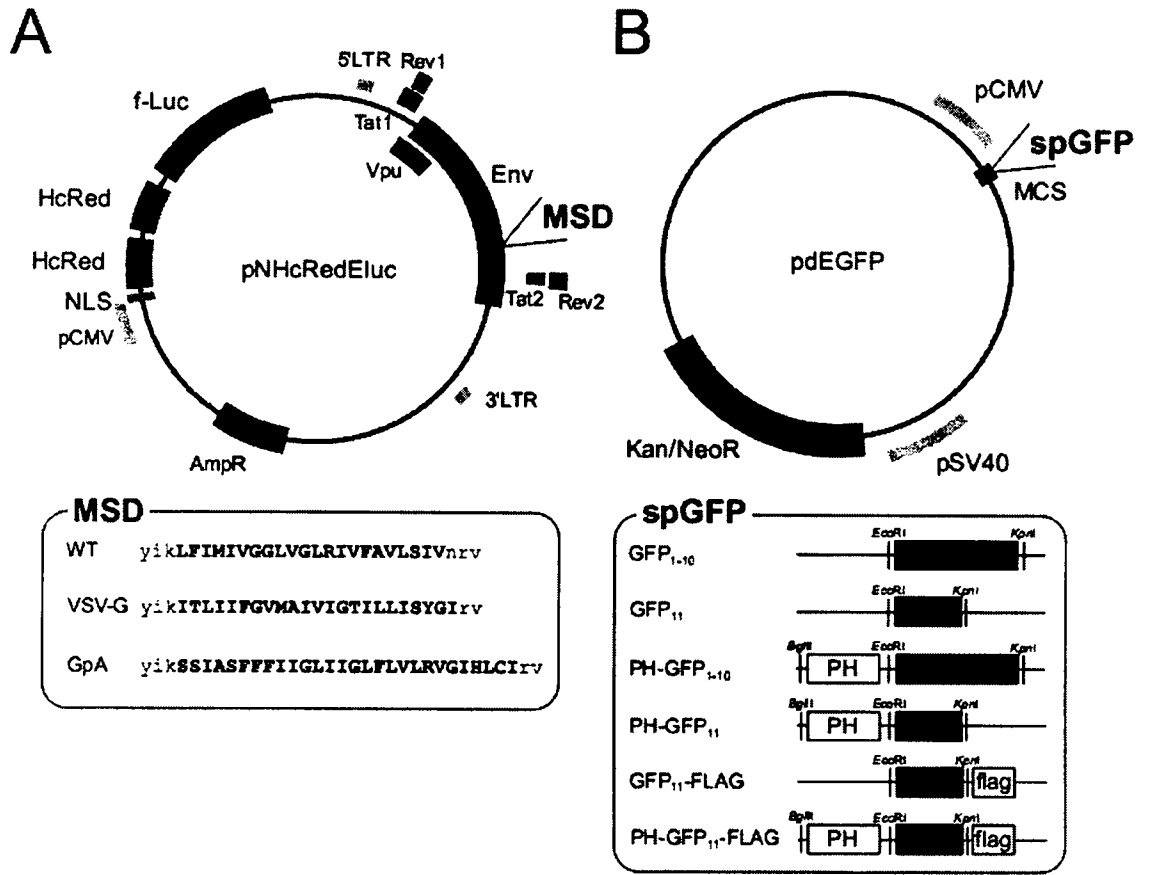


图 1

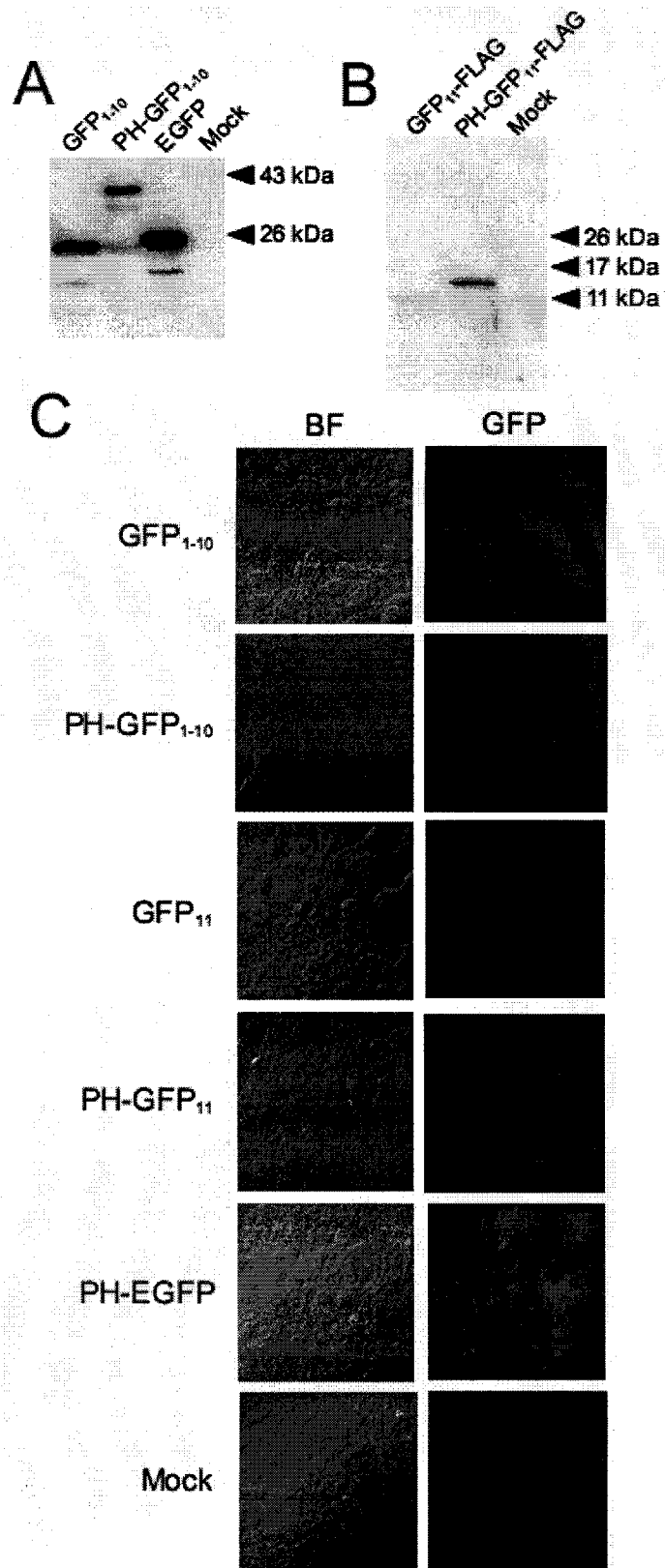


图 2

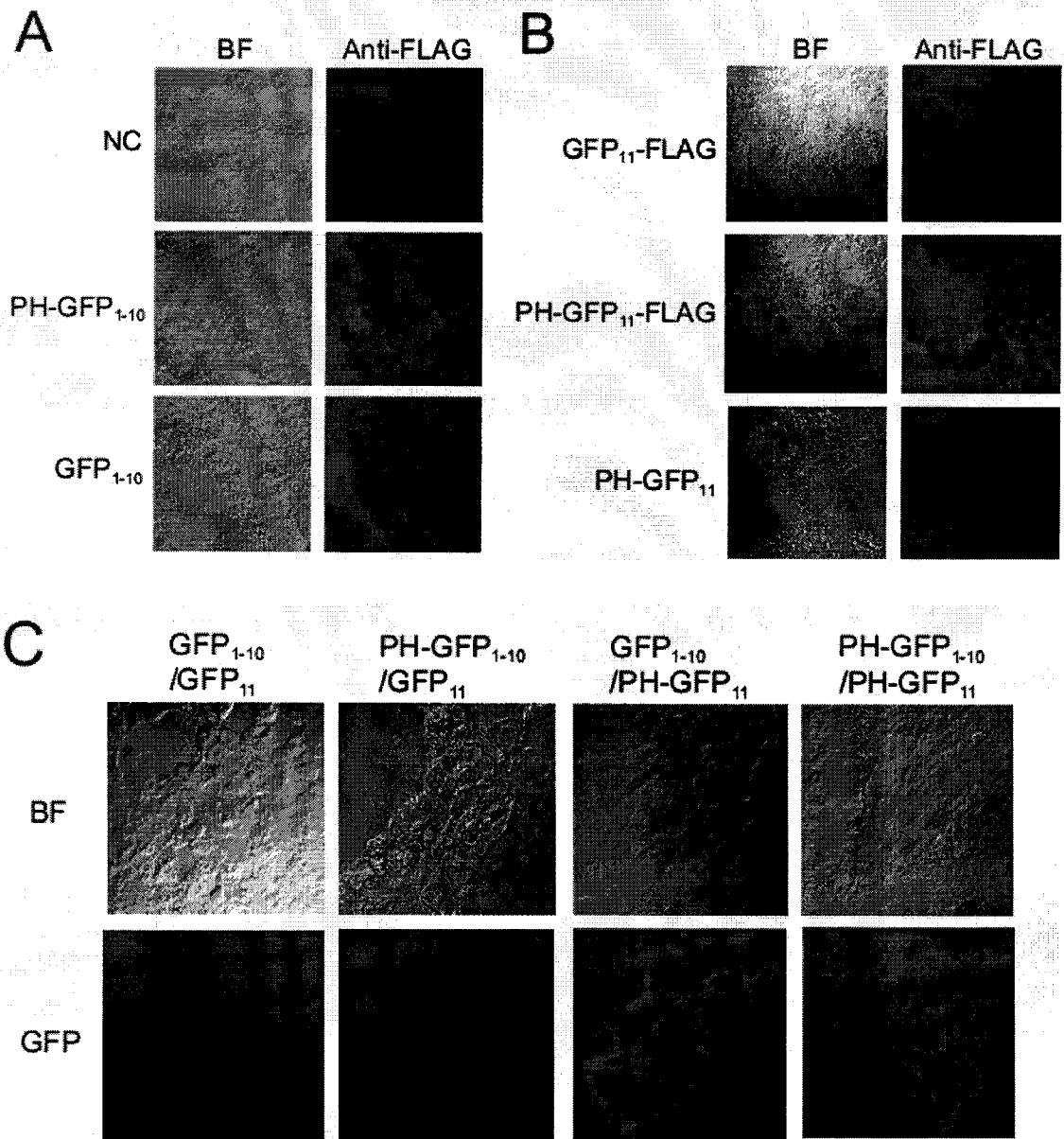


图 3

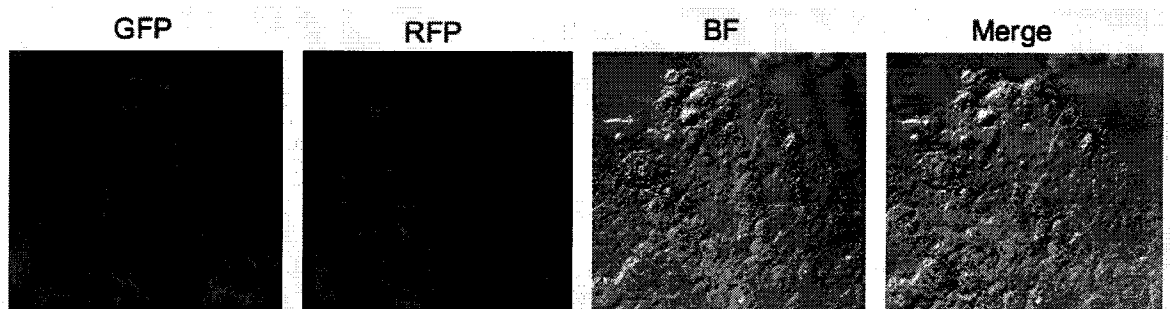


图 4

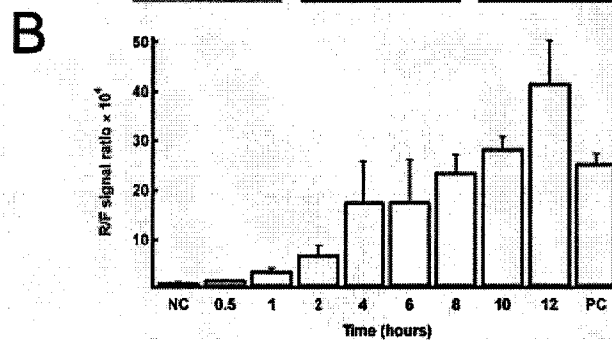
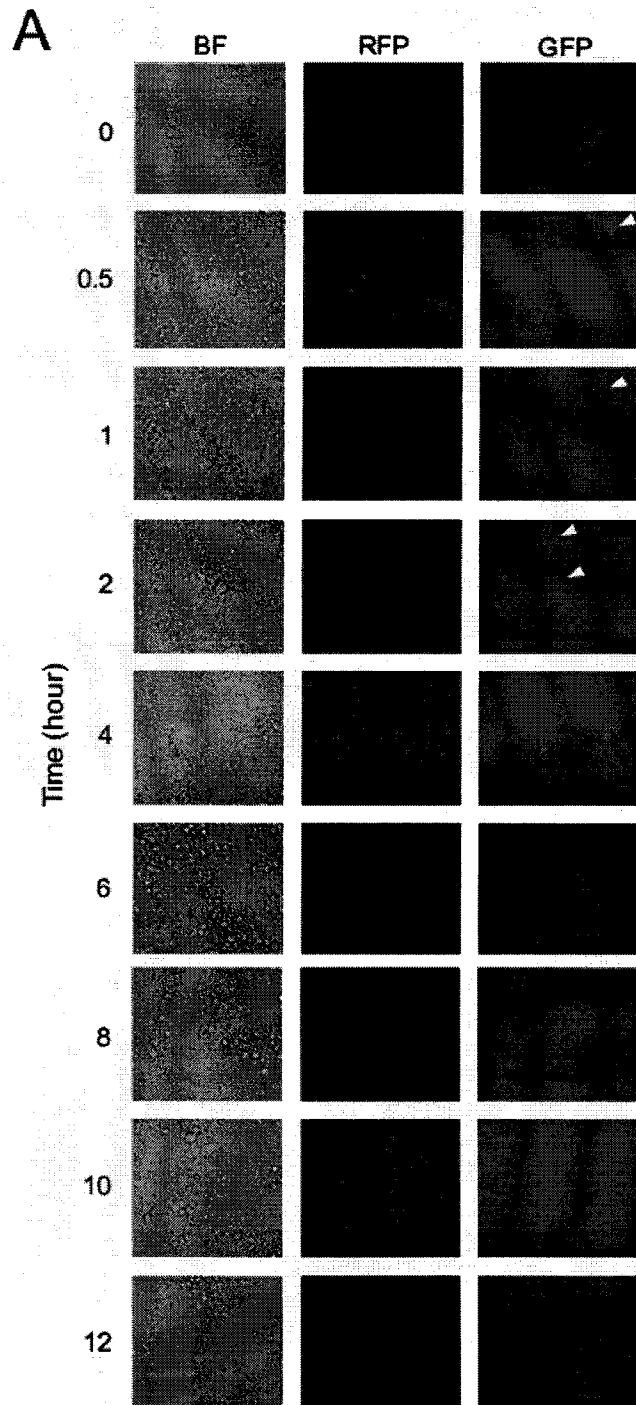


图 5