



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116102640 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 12

(21) 申请号 202211255669.6

A61P 31/14 (2006.01)

(22) 申请日 2022.10.13

A61P 31/16 (2006.01)

(71) 申请人 浙江双糖生物科技有限公司

A61P 37/04 (2006.01)

地址 315000 浙江省宁波市象山县大徐镇  
汤家店村工业区(自主申报)

C12R 1/645 (2006.01)

(72) 发明人 赵策 王晓娟

(74) 专利代理机构 河北圆友缘专利代理事务所  
(普通合伙) 13173

专利代理师 吴秀兰

(51) Int. Cl.

C07K 14/79 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

A61K 38/40 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

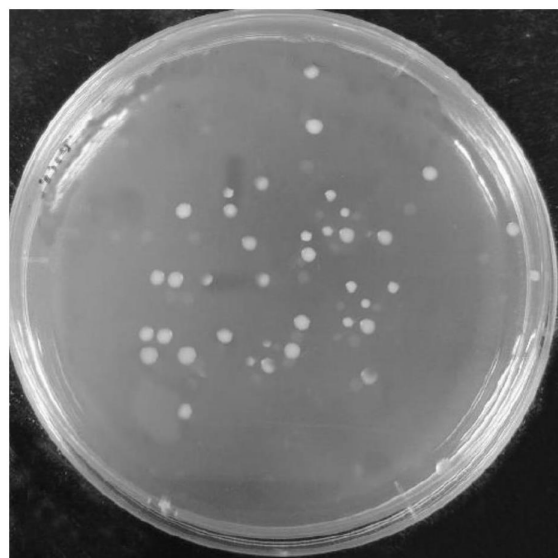
权利要求书2页 说明书13页  
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

重组乳铁蛋白衍生肽及其在提高免疫力方面的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种重组乳铁蛋白衍生肽,氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,编码序列如SEQ ID NO.2所示。该重组乳铁蛋白衍生肽是通过构建表达载体,将所述表达载体转入表达宿主中,通过所述表达宿主进行培养表达得到。通过体外抗病原菌和抗病毒实验证实了其具有抑制大肠杆菌、猪霍乱沙门菌、鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性,以及抗流感病毒、麻疹病毒和腮腺炎病毒的抗病毒活性,以及通过小鼠体内实验证实了其具有促进小鼠脾淋巴细胞增殖,全面促进小鼠淋巴细胞分泌IL-2、IL-4、IL-13和TNF- $\alpha$ 。由此表明该重组衍生肽Ta具有广谱的抑菌和抗病毒活性,还具有提升小鼠免疫力的作用。



1. 一种重组乳铁蛋白衍生肽, 其特征在于, 氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示, 编码序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 根据权利要求1所述的重组乳铁蛋白衍生肽, 其特征在于, 所述重组乳铁蛋白衍生肽是通过构建表达载体, 将所述表达载体转入表达宿主中, 通过所述表达宿主进行培养表达得到。

3. 根据权利要求2所述的重组乳铁蛋白衍生肽, 其特征在于, 所述表达载体为pYC54-Ta, 表达宿主为出芽酵母。

4. 一种如权利要求1-3任一项所述的重组乳铁蛋白衍生肽的生物合成方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

构建目的基因的表达载体, 所述表达载体为pYC54-Ta;

制备感受态的表达宿主, 所述表达宿主为出芽酵母;

将所述表达载体转化至所述表达宿主, 并获得转化子的培养物;

筛选阳性转化子, 所述阳性转化子为所述表达载体转入至细胞内并能够成功表达所述重组乳铁蛋白衍生肽的出芽酵母菌体;

收集所述阳性转化子, 裂解菌体, 纯化, 即可得到所述重组乳铁蛋白衍生肽。

5. 根据权利要求4所述的生物合成方法, 其特征在于, 所述目的基因为如SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。

6. 根据权利要求5所述的生物合成方法, 其特征在于, 所述目的基因的片段是通过构建含如SEQ ID NO.2所示基因的扩增质粒pμC19-L, 进行转化表达, 实现对其扩增而获得的。

7. 根据权利要求6所述的生物合成方法, 其特征在于, 所述表达pYC54-Ta载体的构建方法包括:

将pYC54转化感受态大肠杆菌DH10B, 并涂布至含有100μg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基, 于37℃恒温培养箱中静置培养16h, 待携带表达载体pYC54的DH10B阳性转化子菌落长出;

挑取单菌落的阳性转化子于100μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基于37℃震荡培养8h, 电泳检测并回收提取pYC54片段;

使用限制性核酸内切酶Eco53kI和Not I双酶切pYC54, 酶切体系为Eco53kI 1μL, Not I 1μL, 10×Buffer TangoTM 2μL、pYC54 2μL、dd water 14μL, 体系混匀后于37℃水浴过夜; 酶切反应结束后, 使用1%琼脂糖凝胶, 对酶切产物进行电泳检测, 回收提取酶切片段;

使用T4 DNA连接酶对胶回收获得的的目的基因片段与线性化pYC54进行连接, 构建重组表达载体pYC54-Ta, 反应体系为: T4 DNA连接酶1μL, 目的基因Ta 10μL, 10×Buffer TangoTM 2μL、pYC54 2μL、dd water 5μL, 体系混匀后于16℃反应3h, 用电泳检测酶连产物, 即可得到酶链重组表达载体pYC54-Ta。

8. 根据权利要求7所述的生物合成方法, 其特征在于, 筛选阳性转化子的步骤包括提取其表达载体, 并进行PCR鉴定, 所述PCR鉴定步骤包括:

以F-p: ccagtcacgacgttgtaaaacg和R-p: accatctaattcaacaagaattgggacaac为引物, 对所述表达载体进行PCR扩增, PCR反应体系为: 模板2μL, F-p 0.5μL, R-p 0.5μL, 2×Taq PCR Master Mix 10μL和dd water 7μL, 反应程序为: 预变性94℃5min、变性94℃1min、退火55℃45s、延伸72℃1min、终延伸72℃10min, 30个循环, 对扩增产物进行电泳鉴定。

9. 根据权利要求7所述的生物合成方法,其特征在于,所述生物合成方法还包括对所述阳性转化子进行诱导表达的步骤,具体包括将阳性转化子接种至种子培养基中培养后,转接至发酵培养基中发酵,收集发酵液,裂解,纯化,冻干,即可得到所述重组乳铁蛋白衍生肽。

10. 权利要求1-3任一项所述的重组乳铁蛋白衍生肽或者权利要求4-7任一项所述的生物合成方法合成的重组乳铁蛋白衍生肽在制备抑菌、抗病毒和提高免疫力药物中的应用。

## 重组乳铁蛋白衍生肽及其在提高免疫力方面的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及乳铁蛋白肽技术领域,尤其涉及重组乳铁蛋白衍生肽及其在提高免疫力方面的应用。

### 背景技术

[0002] 乳铁蛋白肽(Lactoferricin,简称为Lfcin)是乳铁蛋白在酸性环境下经胃蛋白酶作用N端释放的一段多肽,后研究发现,Lfcin与乳铁蛋白的功能密切相关,除不能结合铁离子外,Lfcin具备乳铁蛋白的所有生物学活性,如抗菌、抗病毒、抑制癌细胞生长、消炎及参与免疫反应等。Lfcin不含稀有氨基酸和外源化学成分,是一种健康安全的产品,Lfcin由于具有强大生物学功能及安全性等优点显示了其替代抗生素的巨大潜能。

[0003] 其中,LfcinB来源于牛乳铁蛋白的第17~41位氨基酸,由25个氨基酸残基组成,其虽然具有免疫调节作用,LfcinB对机体的免疫反应的激活作用同时需要免疫趋化因子来介导,趋化因子与不同免疫细胞膜上的特异性受体结合,引导免疫细胞到达炎症部位,以产生对机体的免疫调节作用。而趋化因子的分泌和表达本身需防御素的介入,由此可见,LfcinB对机体的免疫反应的激活作用受到了诸多显著,并不能直接促进机体免疫反应。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种重组乳铁蛋白衍生肽,能够直接激活机体的免疫反应,提高机体的免疫力。

[0005] 第一方面,本发明实施例公开了一种重组乳铁蛋白衍生肽,氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,编码序列如SEQ ID NO.2所示。

[0006] 在本发明实施例中,所述重组乳铁蛋白衍生肽是通过构建表达载体,将所述表达载体转入表达宿主中,通过所述表达宿主进行培养表达得到。

[0007] 在本发明实施例中,所述表达载体为pYC54-Ta,表达宿主为出芽酵母。

[0008] 第二方面,本发明实施例公开了一种第一方面所述的重组乳铁蛋白衍生肽的生物合成方法,包括以下步骤:

[0009] 构建目的基因的表达载体,所述表达载体为pYC54-Ta;

[0010] 制备感受态的表达宿主,所述表达宿主为出芽酵母;

[0011] 将所述表达载体转化至所述表达宿主,并获得转化子的培养物;

[0012] 筛选阳性转化子,所述阳性转化子为所述表达载体转入至细胞内并能够成功表达所述重组乳铁蛋白衍生肽的出芽酵母菌体;

[0013] 收集所述阳性转化子,裂解菌体,纯化,即可得到所述重组乳铁蛋白衍生肽。

[0014] 在本发明实施例中,所述目的基因为如SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列。

[0015] 在本发明实施例中,所述目的基因的片段是通过构建含如SEQ ID NO.2所示基因的扩增质粒pUC19-L,进行转化表达,实现对其扩增而获得的。

[0016] 在本发明实施例中,所述表达pYC54-Ta载体的构建方法包括:

[0017] 将pYC54转化感受态大肠杆菌DH10B,并涂布至含有100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB固体培养基,于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中静置培养16h,待携带表达载体pYC54的DH10B阳性转化子菌落长出;

[0018] 挑取单菌落的阳性转化子于100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基于37 $^{\circ}$ C震荡培养8h,电泳检测并回收提取pYC54片段;

[0019] 使用限制性核酸内切酶Eco53kI和Not I双酶切pYC54,酶切体系为Eco53kI 1 $\mu$ L, Not I 1 $\mu$ L,10 $\times$ Buffer TangoTM 2 $\mu$ L、pYC54 2 $\mu$ L、dd water 14 $\mu$ L,体系混匀后于37 $^{\circ}$ C水浴过夜;酶切反应结束后,使用1%琼脂糖凝胶,对酶切产物进行电泳检测,回收提取酶切片段;

[0020] 使用T4 DNA连接酶对胶回收获得的目的基因片段与线性化pYC54进行连接,构建重组表达载体pYC54-Ta,反应体系为:T4 DNA连接酶1 $\mu$ L,目的基因Ta 10 $\mu$ L,10 $\times$ Buffer TangoTM 2 $\mu$ L、pYC54 2 $\mu$ L、dd water 5 $\mu$ L,体系混匀后于16 $^{\circ}$ C反应3h,用电泳检测酶连产物,即可得到酶链重组表达载体pYC54-Ta。

[0021] 在本发明实施例中,筛选阳性转化子的步骤包括提取其表达载体,并进行PCR鉴定,所述PCR鉴定步骤包括:

[0022] 以F-p:ccagtcacgacgttgtaaaacg和R-p:accatctaattcaacaagaattgggacaac为引物,对所述表达载体进行PCR扩增,PCR反应体系为:模板2 $\mu$ L,F-p 0.5 $\mu$ L,R-p 0.5 $\mu$ L,2 $\times$ Taq PCR Master Mix10 $\mu$ L和dd water 7 $\mu$ L,反应程序为:预变性94 $^{\circ}$ C5min、变性94 $^{\circ}$ C1min、退火55 $^{\circ}$ C45s、延伸72 $^{\circ}$ C1min、终延伸72 $^{\circ}$ C10min,30个循环,对扩增产物进行电泳鉴定。

[0023] 在本发明实施例中,所述生物合成方法还包括对所述阳性转化子进行诱导表达的步骤,具体包括将阳性转化子接种至种子培养基中培养后,转接至发酵培养基中发酵,收集发酵液,裂解,纯化,冻干,即可得到所述重组乳铁蛋白衍生肽。

[0024] 第三方面,本发明实施例还公开了所述的重组乳铁蛋白衍生肽在制备抑菌、抗病毒和提高免疫力药物中的应用。

[0025] 与现有技术相比,本发明至少具有以下有益效果:

[0026] 本发明实施例通过设计得到一种乳铁蛋白衍生肽的氨基酸序列和编码序列,依次合成和扩增其目的基因,并构建了合适的表达载体和表达宿主,以获得一种重组衍生肽Ta,通过体外抗病原菌和抗病毒实验证实了其具有抑制大肠杆菌、猪霍乱沙门菌、鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性,以及抗流感病毒、麻疹病毒和腮腺炎病毒的抗病毒活性,以及通过小鼠体内实验证实了其具有促进小鼠脾淋巴细胞增殖,全面促进小鼠淋巴细胞分泌IL-2、IL-4、IL-13和TNF- $\alpha$ ,而无需趋化因子的介导和防御素的介入即可激活小鼠脾淋巴细胞,促进其分泌相关抗炎因子。由此,本发明实施例提供的重组衍生肽Ta具有广谱的抑菌和抗病毒活性,还具有提升小鼠免疫力的作用,具有应用于制备相关抗菌、抗病毒和提升免疫力药物的广泛前景。

## 附图说明

[0027] 图1为本发明实施例提供的p $\mu$ C19-L阳性转化子的平板图。

[0028] 图2为本发明实施例提供的p $\mu$ C19-L的双酶切产物的电泳图;M泳道为Marker,1泳道酶切后产物,2泳道为未酶切产物,3泳道为回收胶目的基因。

[0029] 图3为本发明实施例提供的重组表达载体pYC54-Ta的酶切产物电泳图,M泳道为Marker,1泳道酶切pYC54后产物,2泳道为pYC54-Ta酶切产物。

[0030] 图4为本发明实施例提供的pYC54-Ta-ATCC30142阳性转化子的平板图。

[0031] 图5为本发明实施例提供的pYC54-Ta-ATCC30142阳性转化子的激光共聚焦显微镜图。

[0032] 图6为本发明实施例提供的重组多肽Ta经诱导表达后,初品(泳道1)包涵体经洗涤(泳道2)、裂解(泳道3)、乙醇分级沉淀(泳道4)、除盐(泳道5)、超滤(泳道6)、冻干后(泳道7)电泳图;泳道8为Marker。

## 具体实施方式

[0033] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

### [0034] 重组乳铁蛋白衍生肽及克隆表达

[0035] 本发明发明人通过对现有的乳铁蛋白肽进行改进,将其部分氨基酸进行调整,可以得到氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的乳铁蛋白衍生肽,并通过设计其如SEQ ID NO.2所示的编码基因进行克隆表达,以此得到的重组乳铁蛋白衍生肽Ta通过体内实验证实其具有抑制大肠杆菌、猪霍乱沙门菌、鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性,以及抗流感病毒、麻疹病毒和腮腺炎病毒的抗病毒活性,以及通过小鼠体内实验证实了其具有促进小鼠脾淋巴细胞增殖,全面促进小鼠淋巴细胞分泌IL-2、IL-4、IL-13和TNF- $\alpha$ 。由此表明,本发明公开了的重组的蛋白延伸肽Ta具有全面抗菌、抗病毒和提高免疫力的功能,具有极佳的制备相关药物的应用前景。

[0036] 利用The Antimicrobial Peptide Database中的计算工具和ProtParam工具对该衍生肽的理化参数计算得到后得到,衍生肽的净电荷数在+7~+9之间,疏水残基比例在51%之间,分子量为3236,理论等电点为11.84,脂肪指数为50.8,GRAVY为-0.70。

[0037] 在分子量大的蛋白中,疏水氨基酸通常隐藏在蛋白质内部,由于其疏水相互作用,在保持蛋白质稳定性和三级结构的形成中尤为重要。根据ProtScale的计算方法,衍生肽的总体疏水值分布从N-末端到C-末端不断增加,形成很明显的两亲性趋势,保证了衍生肽具有与LFcinB相似的抗菌活性。

### [0038] 1、材料与方法

#### [0039] 1.1、目的基因的合成与克隆

[0040] 重组质粒p $\mu$ C19-L的扩增与提取:将上述得到的含有如SEQ ID NO.2所示基因的扩增质粒p $\mu$ C19-L转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,挑取阳性转化子大量培养以扩增质粒,使用Qiagen Plasmid Midi Kit(Sigma-Aldrich)提取扩增质粒p $\mu$ C19-L,实验方法如下:

[0041] 大肠杆菌感受态细胞的制备:取出-80℃冻存的大肠杆菌E.coli TOP10(Solarbio),在冰上解冻后使用接种环划线接种于LB固体培养基,在37℃恒温培养箱中培养12~16h,挑取单菌落再次接种至LB液体培养基中,于37℃220r/min恒温摇床中振荡培养菌液OD600值达到0.4以上时即可收集菌体,于1500 $\times$ g离心10min,弃上清;加入1mL冰上预冷的0.1M的无菌CaCl<sub>2</sub>溶液,轻轻重悬,于冰上放置30min处理后,再于4℃1500 $\times$ g离心

10min,弃上清,加入100 $\mu$ L冰上预冷的0.1M的无菌CaCl<sub>2</sub>溶液,轻轻重悬,即可得感受态的E.coli TOP10细胞,可于4℃冰箱保存备用或添加终浓度15%的甘油保藏至-80℃。

[0042] p $\mu$ C19-L转化:待高压蒸汽灭菌的LB固体培养基冷却至45℃,向培养基中加入氨苄青霉素贮液至浓度为100 $\mu$ g/mL,混匀后立刻倒平板,待其凝固后备用,平板如图1所示。

[0043] 在4℃冰箱中取出制备好的大肠杆菌感受态细胞,于冰上放置5~10min预冷;取1 $\mu$ g重组质粒p $\mu$ C19-L溶于10 $\mu$ L无菌去离子水,吸取质粒溶液加入大肠杆菌感受态细胞,吸打混匀,冰上放置30min后于42℃水浴90s,立即冰上放置2min后加入900 $\mu$ L LB液体培养基,于37℃120r/min振荡培养45min;1000 $\times$ g离心5min收集被p $\mu$ C19-L转化的感受态细胞,取沉淀物涂布至含有氨苄青霉素的LB平板,于恒温培养箱中37℃静置培养16~18h,筛选携带扩增质粒p $\mu$ C19-L的阳性转化子。

[0044] 扩增质粒p $\mu$ C19-L的提取

[0045] 1) 挑取上述筛选的阳性转化子,接种至100mL含有100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,于37℃220r/min震荡培养10h,到转化子的菌液。

[0046] 2) 收集菌液于4℃6000 $\times$ g条件离心15min,得其沉淀;用4mL Buffer P1(北京百奥莱博科技有限公司,下同)重悬,再加入4mL Buffer P2混匀,室温静置5min;再次加入4mL Buffer P3,再次混匀置于冰浴处理15min后,再于4℃20000 $\times$ g离心30min,取上清(重复1次Buffer P1~P4的操作);将上清小心加入经Buffer QBT(上海恒斐生物科技有限公司)平衡过的吸附柱,使用10mL Buffer QC(上海科敏生物科技有限公司)清洗吸附柱两次,使用Buffer QF(上海恒斐生物科技有限公司)将质粒DNA洗脱下来,使用50mL无菌离心管收集洗脱液。

[0047] 3) 收集质粒洗脱液向其中加入约5~8%v/v的室温异丙醇,充分混合均匀后,于4℃15000 $\times$ g离心30min,小心地弃掉上清。

[0048] 4) 使用2mL室温70%的乙醇洗涤沉淀,于4℃15000 $\times$ g离心10min,小心地弃掉上清。

[0049] 5) 室温干燥沉淀5~10min,待乙醇完全挥发后,将沉淀溶解于适当体积的备用TE Buffer中,-20℃保存,备用,即为得到的质粒溶液,使用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0050] 扩增目的基因:

[0051] 使用限制性核酸内切酶EcoR I和Not I对重组质粒p $\mu$ C19-L进行双酶切,获取目的基因片段。双酶切的反应体系为:EcoR I 1 $\mu$ L,Not I 1 $\mu$ L,10 $\times$ Buffer Tango<sup>TM</sup> 2 $\mu$ L、p $\mu$ C19-Ta10 $\mu$ L、dd water 6 $\mu$ L,将上述反应体系混匀后,于37℃水浴过夜;反应结束后,使用2.2%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0052] 目的基因Ta片段胶回收:

[0053] 1) 将含有衍生肽目的基因片段的条带从琼脂糖凝胶上切下来,放入1.5mL离心管并称量取重后,加入3倍胶体积的Buffer G(北京华新康信生物科技有限公司)置于50℃水浴处理10min至胶块完全溶解;继续加入1倍胶体积的异丙醇完全混匀。

[0054] 2) 将上述混匀溶液加入到平衡过的吸附柱中,室温放置2min,于12000 $\times$ g离心1min,倒掉废液;向吸附柱中加入500 $\mu$ L Buffer G,于12000 $\times$ g离心1min,倒掉废液;向吸附柱中加入650 $\mu$ L Buffer W,于12000 $\times$ g离心1min,倒掉废液,将空吸附柱于12000 $\times$ g离心2min;将吸附柱放入干净的1.5mL离心管中,在吸附膜中央加入15 $\mu$ L BufferB,室温静置1~

2min,于12000×g离心1min,收集离心管里的DNA溶液,置于-20℃保存备用;对回收得到的衍生肽目的基因片段进行琼脂糖凝胶电泳检测。

[0055] 1.2、目的基因表达pYC54-Ta载体的构建

[0056] 表达载体pYC54转化感受态大肠杆菌细胞:

[0057] 从-80℃取出保藏的感受态大肠杆菌细胞,于冰上放置10min,按照上述方法将pYC54(ZYbscience)转化感受态大肠杆菌DH10B(购自上海雅吉生物科技有限公司)细胞,并涂布至含有100μg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基,于37℃恒温培养箱中静置培养16h,待携带表达载体pYC54的DH10B阳性转化子菌落长出;挑取单菌落的阳性转化子于100μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基于37℃震荡培养8h,提取pYC54,电泳检测。

[0058] 使用限制性核酸内切酶Eco53kI和Not I对上节提取的pYC54进行双酶切,酶切体系:Eco53kI 1μL,Not I 1μL,10×Buffer Tango™ 2μL、pYC54 2μL、dd water 14μL,体系混匀后于37℃水浴过夜。酶切反应结束后,使用1%琼脂糖凝胶,对酶切产物进行电泳检测。

[0059] 衍生肽基因片段与pYC54酶连:使用T4 DNA连接酶对胶回收获得的衍生肽基因片段与线性化pYC54进行连接,构建重组表达载体pYC54-Ta,反应体系为:T4 DNA连接酶(赛默飞世尔中国)1μL,目的基因Ta 10μL,10×Buffer Tango™ 2μL、pYC54 2μL、dd water 5μL,体系混匀后于16℃反应3h,用电泳检测酶连产物,即可得到酶链重组表达载体pYC54-Ta。

[0060] 将重组表达载体pYC54-Ta转化感受态大肠杆菌DH10B细胞,获得阳性转化子,接种于含100μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基于37℃震荡培养8h,按照上述方法提取重组表达载体pYC54-Ta,进行PCR扩增和鉴定。

[0061] 以F-p:ccagtcacgacgttgtaaaacg,SEQ ID NO.3所示和R-p:accatctaattcaacaagaattgggacaac,SEQ ID NO.4所示为引物,对重组表达载体pYC54-Ta和pYC54分别进行PCR扩增,由于重组表达载体在多克隆位点处插入了目的基因片段,经计算,pYC54-Ta应比pYC54多75bp的基因片段,PCR反应体系为:模板2μL,F-p 0.5μL,R-p 0.5μL,2×Taq PCR Master Mix10μL和dd water 7μL,反应程序为:预变性94℃5min、变性94℃1min、退火55℃45s、延伸72℃1min、终延伸72℃10min,30个循环。

[0062] 将提取的重组表达载体pYC54-Ta送至生物公司进行测序鉴定,与pYC54序列对照分析。

[0063] 另外,本发明还采用上述类似的方法构建了pEsc-HIS和pLac-EGFP分别作为对照例的表达载体。

[0064] 1.3、重组表达载体pYC54-Ta的转化以及表达

[0065] 感受态出芽酵母的制备:

[0066] 将出芽短梗霉(黑酵母)(购自上海研生实业有限公司ATCC30142)接种于YPD平板,于30℃恒温培养箱中静置培养48~72h,待单菌落长出;挑取单菌落接种于YPD液体培养基中,于30℃220r/min振荡培养至OD600为0.8时收集菌体,作为种子液再次接种于100mL YPD液体培养基中,于30℃220r/min振荡培养22~24h培养至OD600 0.8时于4℃1500×g离心5min收集菌体,使用100mL冰上预冷的无菌去离子水重悬菌体。分别用无菌水、0.68wt%无菌生理盐水、和1M乙二醇溶液重悬菌体,分装,4℃暂存备用。

[0067] 重组表达载体pYC54-Ta电转化:

[0068] 使用电击法将线性化的重组表达载体pYC54-Ta转化整合至出芽酵母ATCC30142的



基因组中,具体为:吸取感受态ATCC30142细胞80 $\mu$ L与10 $\mu$ L线性化表达载体pYC54-Ta,混合均匀后转入冰上预冷的0.2cm电转杯;将电转杯冰浴5min,使用Bio-Rad电转化仪进行电击,设置电转参数为:电压,1500V;电容,25 $\mu$ F;电阻,200 $\Omega$ ;取出电转杯,立刻加入1mL冰上预冷的1M的无菌乙二醇溶液,将菌液转入无菌的1.5mL离心管;将菌液涂布于制备好的1MD平板,于30℃恒温培养箱中静置培养72h,待转化子pYC54-Ta-ATCC30142长出,如图4所示。

[0069] pYC54-Ta-ATCC30142阳性转化子的筛选:由于pYC54-Ta具有黄色荧光蛋白(YFP)标签,只需要对生长的转化子进行过激光共聚焦显微镜照相并观察菌体是否有黄色荧光产生即可,有荧光产生即为阳性转化子,如图5所示。

[0070] 阳性转化子的诱导表达:

[0071] 将经过黄色荧光筛选的阳性转化子,进行诱导表达,得到能够高效表达Ta衍生肽的阳性转化子。具体方法如下:

[0072] 1)挑取初步阳性转化子单菌落接种至25mL种子培养基于100mL摇瓶中30℃、260r/min透气振荡培养16~18h至OD<sub>600</sub>=1.0;种子培养基成分为:葡萄糖20g/L、酵母粉2.5g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5g/L、NaCl 1g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g/L,pH 6.5。

[0073] 2)收集种子液,于室温1500×g离心5min后,用种子培养基重悬为10mL,合并收集为300mL,接种至含有3mL的发酵培养基的发酵罐中,于30℃、400r/min、3L/min通气(无菌空气)振荡发酵,其中,发酵培养基为酵母粉3g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g/L、NaCl 1g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g/L、CaSO<sub>4</sub> 0.05~0.1g/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5mg/L、0.03mg/L二水钼酸钠、生物素0.02mg/L、生物素0.02mg/L、微生物素B9 0.02mg/L、微生物素B6 0.1mg/L、微生物素B1 0.05mg/L、微生物素B2 0.05mg/L、维生素B3 0.05mg/L、微生物素B5 0.05mg/L、微生物素B12 0.001mg/L、微生物素K31mg/L、对氨基苯甲酸0.05mg/L和硫辛酸0.05mg/L,pH 3.8。

[0074] 3)发酵时间为120h,5000×g离心收集菌体,通过SDS-PAGE检测重组延伸肽Ta表达水平。

[0075] 重组Ta的纯化:

[0076] 1)按每25g菌体加入100mL裂解缓冲液(50mmol/L Tris-HCl,pH8.0,0.5g/L溶菌酶,1%Triton X-100)混悬,-20℃冻融1次;

[0077] 2)加入10 $\mu$ mL DNA酶室温搅拌至不再黏稠,10000×g离心15min取沉淀,用包涵体洗涤液(50mmol/L Tris-HCl,pH8.0,0.5%Triton X-100,每10g沉淀加入50mL)洗涤2次,10000×g离心15min。

[0078] 3)得到的包涵体用包涵体裂解液(50mmol/L Tris-HCl,pH8.0,8mmol/L尿素,每10g包涵体加入50mL)混悬,4℃搅拌过夜,10000×g离心15min弃沉淀,上清在搅拌的情况下缓慢加入2倍体积的冰乙醇,4℃放置2h后,10000×g离心15min保留沉淀;每6g蛋白加入100mL 100mmol/L HCL,48℃水浴72h。

[0079] 4)水解后的溶液用0.1mol/L NaOH调pH至4.2,10000×g离心15min。

[0080] 5)将含目的多肽的上清4℃透析除盐,然后用截留分子量3000的中空纤维柱(美国Millipore公司)进行超滤浓缩后,取浓缩液进行5000g离心进行浓缩;浓缩后的样品冻干,收集多肽粉末并称重,-20℃保存。

[0081] 重组多肽Ta的质谱鉴定:将重组多肽送至百泰派克公司进行质谱鉴定。重组多肽Ta的体外抑菌实验:

[0082] 1) 体外抗病原菌

[0083] 在无菌96孔板上将重组多肽Ta依次稀释为2000 $\mu\text{g/mL}$ 、1000 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 和1 $\mu\text{g/mL}$ 的多个浓度梯度,各梯度均取10 $\mu\text{L}$ ,与90 $\mu\text{L}$ 提前制备好的菌悬液混合,另取100 $\mu\text{L}$ 菌悬液作为阳性对照。具体的,菌悬液包括:大肠杆菌ATCC25922的菌悬液,猪霍乱沙门菌CMCC50020、鼠伤寒沙门菌CMCC 50013、肠炎沙门菌CMCC 50041和金黄色葡萄球菌ATCC 25923,供试菌株来自于中国普通微生物菌种保藏管理中心。将96孔板密封于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养18~24h;观察96孔板底部是否有细菌沉淀产生,用MTT比色法用Bio-Rad标仪测定各孔OD<sub>570</sub>值,即可为各孔的细菌浓度,并计算重组蛋白肽Ta的最小抑菌浓度。

[0084] 2) 体外抗病毒试验

[0085] 病毒培养及TCID<sub>50</sub>的测定:将不同浓度IV-A3株(流感病毒A3株,购自中国医科院病毒研究所)接种MDCK细胞(购自ATCC MDCK Cell Lines)的单层培养物中;不同浓度的麻疹疫苗株沪191(卫生部上海生物制品研究所)接种VeroE6细胞(尚恩生物)的单层培养物中;不同浓度的SP-A株(腮腺炎病毒,购自中国医学科学院医学生物学研究所)接种于人二倍体细胞KMB17细胞株中;以此分别以形成不同滴度的IV-A3、191和SP-A的病毒液。

[0086] 以细胞圆缩、融合和脱落等细胞病变效应(CPE)为指标,测定各病毒液引起50%细胞病变的组织细胞感染剂量TCID<sub>50</sub>。其中,两种细胞均在含10%小牛血清(FCS)的DMEM培养液(赛默飞)中37 $^{\circ}\text{C}$ 培养2~3天传代,第二代细胞用于种植病毒。

[0087] 将 $1 \times 10^4$ 个/mL的MDCK、VeroE6和KMB17细胞悬液接种于96孔细胞培养板,每孔0.1mL,5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24h,用2.5% FCS-DMEM分别配制不同浓度的各Ta,200 $\mu\text{g/mL}$ 对照品吗琳脲呱盐酸盐(Mo,北京百灵威科技有限公司)以及4倍TCID<sub>50</sub>浓度的IV-A3、191和SP-A病毒液。取0.25mL各病毒液分别与等量不同浓度(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ )的各重组衍生肽Ta、化学合成的多肽Ta或吗琳脲呱盐酸盐液混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 分别作用1h后在96孔细胞培养板中接种3孔,每孔0.2mL,5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养5天,每天观察CPE分级。实验同时设置2倍TCID<sub>50</sub>浓度各病毒作用的感染对照。同时用MTT比色法用Bio-Rad标仪测定各孔OD<sub>570</sub>值得。

[0088] 本发明实施例同样采用毕赤酵母进行转化和表达,并进行诱导表达,方法参照上述实施过程。

[0089] 2、结果

[0090] 对扩增质粒p $\mu\text{C}$ -SP-L3及其双酶切产物进行2.2%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图3所示,泳道1为双酶切产物,在100by条带下方出现89bp的目的基因片段条带,说明目的基因获取成功。泳道2为未双酶切的重组质粒p $\mu\text{C}$ 19-L,在2.7kb条带附近出现扩增质粒条带,说明质粒提取及双酶切成功。图3中,还对对胶回收所得产物进行2.2%琼脂糖凝胶电泳检测,说明成功回收目的基因片段。

[0091] 分别以pYC54和重组表达载体pYC54-Ta为模板,进行PCR反应,pYC54的PCR产物长度应为365bp,插入的衍生肽Ta目的基因长度为75bp,重组表达载体pYC54-Ta的PCR产物长度应为440bp。PCR结束后经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测结果如图3所示,表明衍生肽Ta目的基因已正确插入pYC54。

[0092] 如图6所示,经诱导表达后,包涵体经洗涤、裂解、乙醇分级沉淀、除盐、超滤、冻干后,获得了较高纯度的融合蛋白粗品,经过上述纯化后得到的目的多肽,经-SDS-PAGE电泳

和考马斯亮蓝G250染色,获得的多肽具有较高的纯度。各实施例和对比例均活动了获得重组多肽Ta。如图质谱显示,纯化获得的重组多肽分子量与理论分子量3236相近。

[0093] 表1

实施方式	目的基因	表达载体	表达宿主
实施例1	Ta	pYC54	出芽酵母
对比例1	Ta	pEsc-HIS	毕赤酵母
对比例2	Ta	pLac-EGFP	大肠杆菌
对比例3	Ta	pYC54	毕赤酵母
对比例4	Ta	pYC54	大肠杆菌

[0095] 表2 MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ), “—”表示未检出

实施方式	ATCC25922	CMCC50020	CMCC50013	CMCC50041	ATCC25923
实施例1	1.5	1.3	2.7	1.3	1.6
对比例1	92	106	79	86	95
对比例2	73	76	87	79	72
对比例3	61	45	29	24	31
对比例4	49	36	36	33	29
对比例5	162	172	—	—	—
阿莫西林	0.001	0.001	—	—	0.016

[0097] 为了研究本发明实施例提供的重组多肽Ta与化学合成的多肽Ta的不同生物学功能,本发明还提供了化学合成的多肽Ta,其氨基酸序列与重组多肽Ta相同,由上海波泰提供,作为对比例5。

[0098] 由表2可知,实施例1制备重组多肽Ta对上述五种致病菌具有更低的MIC值,而对比例1-4对此五种致病菌的MIC值较大,说明本发明实施例1提供的重组多肽Ta对此五种致病菌具有更好的抑菌效果。对比例1和2均采用了不同的表达载体和表达宿主细胞,导致其获得的重组多肽Ta对五种致病菌的抑菌MIC值显著高于实施例1,而对比例3、4采用了不同的表达载体,同样导致其对五种致病菌的抑菌MIC值显著高于实施例1;由此说明本发明实施例1采用表达载体和表示宿主细胞更利于获得产生更有效抑菌作用的重组多肽Ta。另外,对比例5化学合成的多肽Ta,虽然其具有与重组多肽Ta相同的氨基酸序列,但是其未经生物合成过程,未产生对多肽Ta的三维结构的影响,继而其对CMCC50013、CMCC50041和ATCC25923无明显的抑菌作用。

[0099] 为了进一步探究本发明实施例提供的重组衍生肽Ta体外抗病毒作,本发明实施例选择了IV-A3、191和SP-A病毒作为受试株。

[0100] 表3 MTT法检测的 $\text{OD}_{570}$ , “—”表示未检出

	实施方式	剂量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	IV- A3 感染的	191 感染的	SP-A 感染的
			细胞 MDCK	细胞 VeroE6	细胞 KMB17
[0101]	实施例 1	25	$0.42\pm 0.06\text{d}$	$0.46\pm 0.07\text{d}$	$0.57\pm 0.07\text{d}$
		50	$0.67\pm 0.03\text{c}$	$0.53\pm 0.03\text{c}$	$0.72\pm 0.07\text{c}$
		100	$0.82\pm 0.12\text{b}$	$0.78\pm 0.04\text{b}$	$0.98\pm 0.12\text{b}$
	对比例 1	25	$0.12\pm 0.07\text{g}$	$0.37\pm 0.08\text{e}$	$0.25\pm 0.04\text{g}$
		50	$0.26\pm 0.09\text{f}$	$0.45\pm 0.04\text{d}$	$0.37\pm 0.05\text{f}$
		100	$0.35\pm 0.08\text{e}$	$0.54\pm 0.08\text{c}$	$0.49\pm 0.05\text{e}$
	对比例 2	25	$0.16\pm 0.02\text{fg}$	$0.36\pm 0.08\text{e}$	$0.23\pm 0.05\text{g}$
		50	$0.29\pm 0.04\text{f}$	$0.43\pm 0.04\text{d}$	$0.34\pm 0.07\text{f}$
		100	$0.37\pm 0.05\text{e}$	$0.53\pm 0.07\text{c}$	$0.47\pm 0.02\text{e}$
	对比例 3	25	$0.22\pm 0.09\text{f}$	$0.27\pm 0.04\text{f}$	$0.36\pm 0.05\text{f}$
		50	$0.34\pm 0.02\text{e}$	$0.32\pm 0.05\text{e}$	$0.47\pm 0.04\text{e}$
		100	$0.46\pm 0.07\text{d}$	$0.42\pm 0.04\text{d}$	$0.67\pm 0.09\text{cd}$
	对比例 4	25	$0.19\pm 0.07\text{f}$	$0.18\pm 0.05\text{g}$	$0.32\pm 0.07\text{f}$
		50	$0.31\pm 0.02\text{e}$	$0.26\pm 0.08\text{f}$	$0.46\pm 0.05\text{e}$
		100	$0.46\pm 0.07\text{d}$	$0.42\pm 0.07\text{d}$	$0.61\pm 0.07\text{cd}$
[0102]	对比例 5	25	—	—	—
		50	—	—	—
		100	—	—	—
	阳性对照	—	$1.33\pm 0.11\text{a}$	$1.24\pm 0.03\text{a}$	$1.37\pm 0.12\text{a}$
	正常对照	—	$0.07\pm 0.04\text{h}$	$0.06\pm 0.002\text{h}$	$0.13\pm 0.02\text{h}$

[0103] 体外抗病毒试验结果如表3所示。表3所示,除对比例5外,实施例1和对比例1-4均对三种病毒感染的细胞具有拯救作用,由此可见,实施例1和对比例1-4提供的重组多肽Ta均具有抗病毒作用,而对比例5提供的化学合成的多肽Ta由于没有经过生物过程的折叠作用,对其三维结构产生了显著影响,进而影响其生活活性作用。而对比例1和2均采用了不同的表达载体和表达宿主细胞,导致其获得的重组多肽Ta抗病毒的作用不及实施例1,而对比例3、4采用了不同的表达载体,同样导致其抗病毒作用不及实施例1。由此说明本发明实施例1采用表达载体和表示宿主细胞更利于获得产生更有效抗病毒作用的重组多肽Ta。

#### [0104] 体内实验

#### [0105] 1、材料与方法

##### [0106] 1.1、实验动物

[0107] 动物SPF级昆明种小鼠6只,雌性,平均体质量( $20\pm 2$ )g,新疆医科大学实验动物中心提供,动物合格证号,新医动字SCXK(新)2011-00031。

##### [0108] 1.2、试验

[0109] 取50只昆明小鼠,随机分为蒸馏水对照组、给药组和给药对照组。

[0110] 蒸馏水对照组给药小鼠每kg体重,每天0.5mL蒸馏水,正常喂食。

[0111] 给药组给药小鼠每kg体重,每天50mg上述实施例1和对比例1-5分别提供多肽Ta。

[0112] 给药对照组给药小鼠每kg体重,每天300mg复方一枝篙颗粒(国药准字220026711,新疆西域药业有限公司)。

[0113] 1.3、对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬影响

[0114] 实验共进行7天,于末次给药后3h,2%鸡红细胞悬液1mL腹腔注射每只小鼠,并轻揉腹部,50min后,脱颈处死小鼠,继续腹腔注射0.9%氯化钠溶液2mL,轻揉腹部约1min,然后用注射器吸取腹腔液1mL,涂片,0.2mL/片,瑞姬氏染液染色,在油镜下计数100个巨噬细胞中吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数及每巨噬细胞中被吞噬的鸡红细胞数。

[0115] 按下式计算其吞噬百分率和吞噬指数:

[0116] 吞噬百分率% = 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/100个巨噬细胞 × 100%; 吞噬指数 = 被吞噬的鸡红细胞总数/100个巨噬细胞

[0117] 1.3、对小鼠血清中IgG、IgM抗体水平的影响

[0118] 采集上述各组小鼠末次给药后2h的血清,利用ELISA试剂盒(上海恒远生物)测定血清中IgG、IgM含量。

[0119] 1.4、对小鼠淋巴细胞增殖能力的影响

[0120] 小鼠脾细胞悬液制备:将脱颈椎处死小鼠消毒后,于无菌条件下取出脾脏,置于无菌Hank's液中清洗,剪碎,过滤,用100目不锈钢网筛过滤,并用中Hank's液冲洗过滤液制成脾细胞的悬浮液,1000rpm离心10min,取沉淀,用0.83%NH<sub>4</sub>CL重悬静置低渗处理2~3min,除去红细胞,1000rpm离心5min,取沉淀,再用RPMI1610营养液(豪威生物科技有限公司)清洗3次,1000rpm离心5min,取沉淀,以台盼蓝排除法计数活细胞数在95%以上,最后用RPMI1610培养液调节脾细胞浓度为10<sup>6</sup>个/mL。

[0121] 淋巴细胞增殖反应:将上述制备的脾细胞悬液加入96孔培养板中,每孔1.50μL,设置对照组、实验组和LPS组。除对照组外,各实验组分别向孔板中加入50μL 40μg/mL LPS(北京索莱宝科技有限公司)和50μL 50μg/mL的重组多肽Ta,或者50μL 300μg/mL的复方一枝篙颗粒药液,细胞对照组加RPMI1610培养液50μL,LPS组加入100μL 40μg/mL LPS;

[0122] 各组均做5个复孔,然后将96孔板置于37℃5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养48h,用50μL的80%三氯乙酸(TCA)固定,室温静置5分钟后移96孔板于4℃冰箱固定1小时,倒掉固定液,用去离子水清洗,甩干,空气干燥;每孔加入100μL SRB液,室温放置10分钟,未与蛋白质结合的SRB用1%醋酸清洗5遍,空气干燥。每孔加入150μL 10mmol/L非缓冲Tris碱液(pH10.5)振荡5分钟。于酶标仪490nm测定各孔吸光值,计算各浓度药液对淋巴细胞增殖的抑制率。淋巴细胞增殖抑制率(%) = 各给药组吸光度均值/对照组均值 × 100%。

[0123] 1.5、对小鼠脾细胞IL-2、IL-4、IL-13和TNF-α分泌的影响

[0124] 将上述制备的小鼠脾细胞悬液,按上述实验分组进行实验,37℃5%CO<sub>2</sub>培养48小时后,收集培养上清,利用IL-2、IL-4、IL-13和TNF-α检测试剂盒(江莱生物)说明书的方法,检测培养上清中各细胞因子的含量。

[0125] 2、结果

[0126] 表4

[0127]

实施方式		吞噬百分率 (%)	IgG ( $\mu\text{g/mL}$ )	IgM ( $\mu\text{g/mL}$ )
实验组	实施例 1	29.35 $\pm$ 3.1a	11.23 $\pm$ 0.63a	7.23 $\pm$ 0.67a
	对比例 1	10.42 $\pm$ 3.4d	5.82 $\pm$ 3.02c	4.49 $\pm$ 0.82c
	对比例 2	9.86 $\pm$ 2.2d	5.91 $\pm$ 1.88c	4.55 $\pm$ 0.63c
	对比例 3	15.36 $\pm$ 4.7b	6.92 $\pm$ 2.32bc	4.62 $\pm$ 0.17c
	对比例 4	13.48 $\pm$ 2.6c	7.23 $\pm$ 1.72b	5.32 $\pm$ 0.52b
	对比例 5	10.12 $\pm$ 3.7d	5.64 $\pm$ 1.67c	4.37 $\pm$ 0.88cd
给药对照组		26.35 $\pm$ 3.1a	10.23 $\pm$ 1.07a	7.15 $\pm$ 0.72a
正常对照组		10.25 $\pm$ 2.3d	5.78 $\pm$ 1.24c	4.32 $\pm$ 0.82cd

[0128] 由表4可知,实验组(除对比例1、2、5)和给药对照组提供的多肽Ta对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬作用均产生了不同程度的促进作用,对小鼠血清中IgG、IgM抗体的分泌亦产生了促进作用。而对比例1、2和5提供的重组多肽Ta或化学合成Ta均相对于正常对照组未产生明显作用。结合上述实施例的结果表面,本发明实施例中采用合适的表达载体和表达宿主细胞对于重组多肽Ta的三维结构和生物学活性产生了重大影响。

[0129] 表5

[0130]

实施方式		淋巴细胞增殖率(%)	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
实验组	实施例1	133.22 $\pm$ 2.17a	232.21 $\pm$ 21.42a	37.21 $\pm$ 6.82a	42.29 $\pm$ 7.13a	352.21 $\pm$ 32.19a
	对比例1	105.35 $\pm$ 0.33c	69.18 $\pm$ 7.25c	22.16 $\pm$ 4.32c	13.82 $\pm$ 1.36c	162.47 $\pm$ 24.32c
	对比例2	104.28 $\pm$ 0.42c	64.35 $\pm$ 6.14c	24.02 $\pm$ 5.34c	15.15 $\pm$ 2.14c	157.35 $\pm$ 19.27c
	对比例3	105.24 $\pm$ 1.34c	181.32 $\pm$ 32.05b	31.17 $\pm$ 4.25b	26.33 $\pm$ 3.47b	261.47 $\pm$ 25.04b
	对比例4	104.05 $\pm$ 1.25c	175.35 $\pm$ 24.26b	30.36 $\pm$ 2.17b	24.37 $\pm$ 2.36b	269.27 $\pm$ 32.27b
	对比例5	101.29 $\pm$ 0.52c	12.35 $\pm$ 3.62d	18.97 $\pm$ 4.23d	6.62 $\pm$ 0.64d	31.02 $\pm$ 4.32d
	给药对照组	131.05 $\pm$ 4.22a	66.35 $\pm$ 6.85c	19.29 $\pm$ 2.32d	6.85 $\pm$ 0.19d	36.25 $\pm$ 2.18d
LPS 组		125.32 $\pm$ 0.24b	9.21 $\pm$ 1.07d	19.22 $\pm$ 2.62d	6.77 $\pm$ 0.88d	352.28 $\pm$ 56.27a
细胞对照组		-	55.45 $\pm$ 6.85cd	19.37 $\pm$ 4.25d	6.59 $\pm$ 1.24d	29.37 $\pm$ 4.25d

[0131] 表5中,实验组、给药对照组和LPS组分别相对细胞对照组,试验组中实施例1对淋巴细胞增殖具有明显的促进作用。表5中,小鼠脾淋巴细胞IL-2、IL-4、IL-13和TNF- $\alpha$ 分泌结果。实施组、给药对照组和LPS组分别相对细胞对照组,对上述四种细胞抗炎因子的分泌有不同促进作用,但是给药对照组和LPS组对小鼠脾淋巴细胞仅能够促进其中一种或两种,而实施例1提供的重组多肽Ta能够全部促进其脾淋巴细胞四种抗炎因子的分泌,对小鼠免疫能力的提升作用全面。同样,对比例1-4的促进分泌作用不够显著,对比例5几乎无促进作用,这与这些对比例1-4生物合成的过程中采用了不同的表达载体和表达宿主细胞有关,或者其仅仅为化学合成的物质,而无生物活性有关。

[0132] 综上所述,本发明实施例通过设计得到一种乳铁蛋白衍生肽的氨基酸序列和编码序列,依次合成和扩增其目的基因,并构建了合适的表达载体和表达宿主,以获得一种重组衍生肽Ta,通过体外抗病原菌和抗病毒实验证实了其具有抑制大肠杆菌、猪霍乱沙门菌、鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性,以及抗流感病毒、麻疹病毒和腮腺炎病毒的抗病毒活性,以及通过小鼠体内实验证实了其具有促进小鼠脾淋巴细胞增殖,全面促进小鼠淋巴细胞分泌IL-2、IL-4、IL-13和TNF- $\alpha$ ,而无需趋化因子的介导和防御素的介

入即可激活小鼠脾淋巴细胞,促进其分泌相关抗炎因子。

[0133] 由此,本发明实施例提供的重组衍生肽Ta具有广谱的抑菌和抗病毒活性,还具有提升小鼠免疫作用,具有应用于制备相关抗菌、抗病毒和提升免疫力药物的广泛前景。

[0134] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。



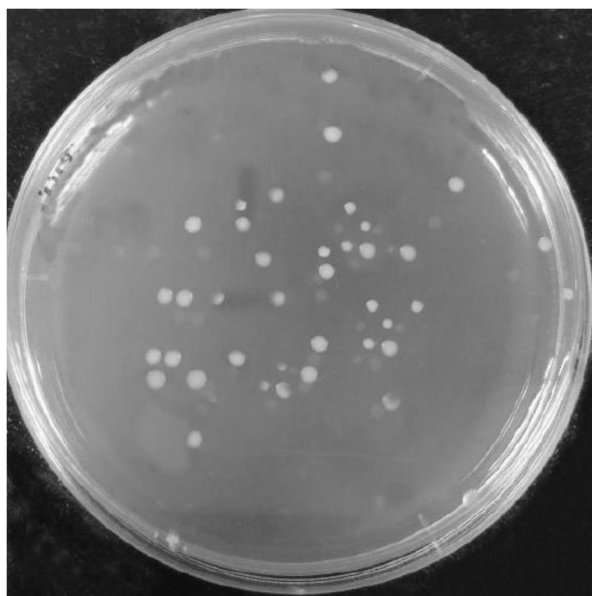


图1

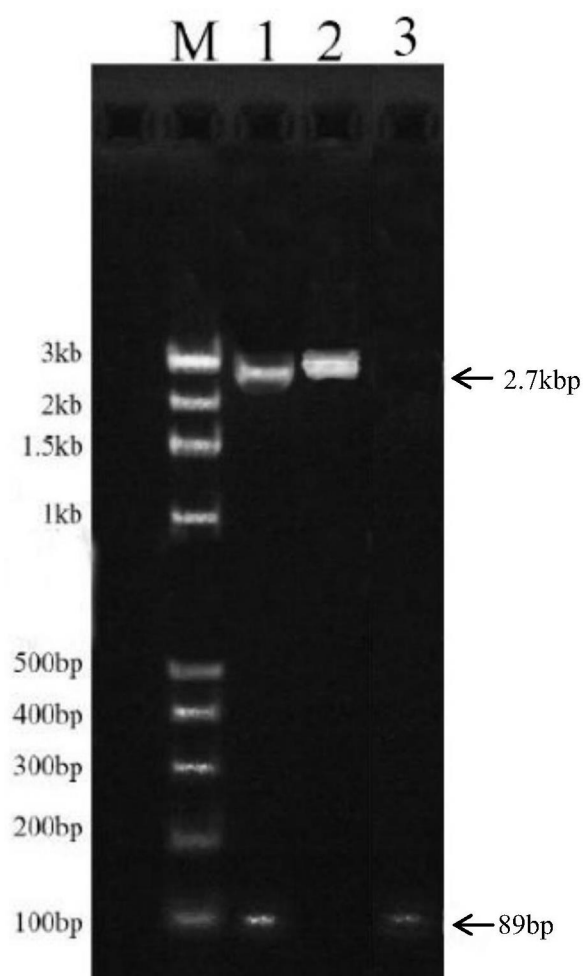


图2

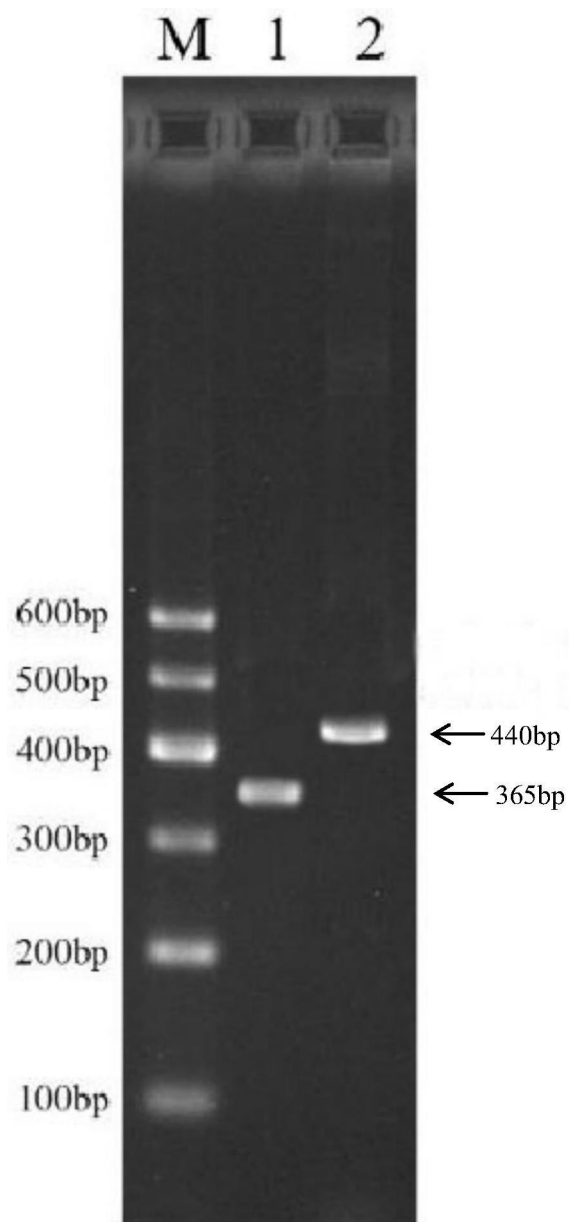


图3

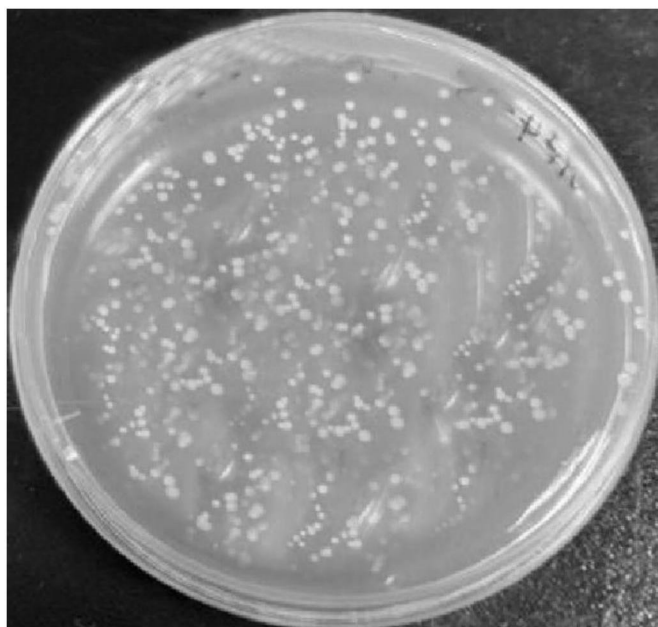


图4

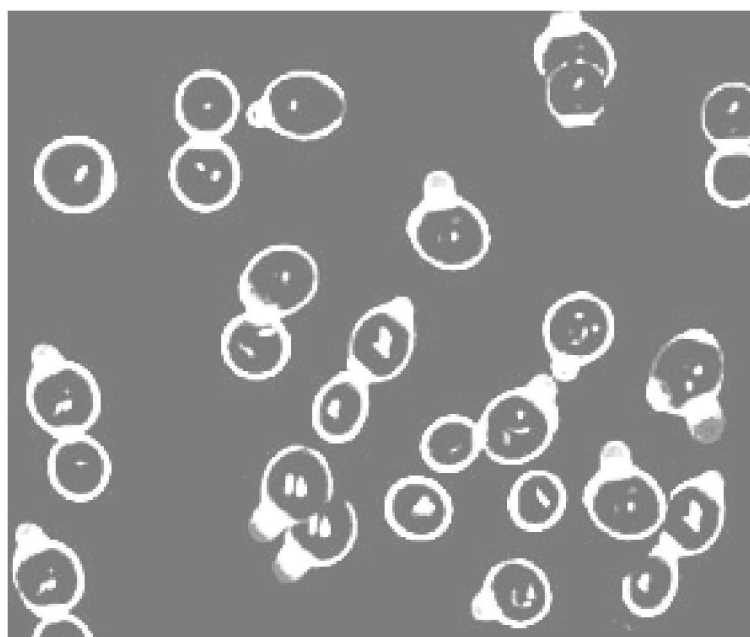


图5

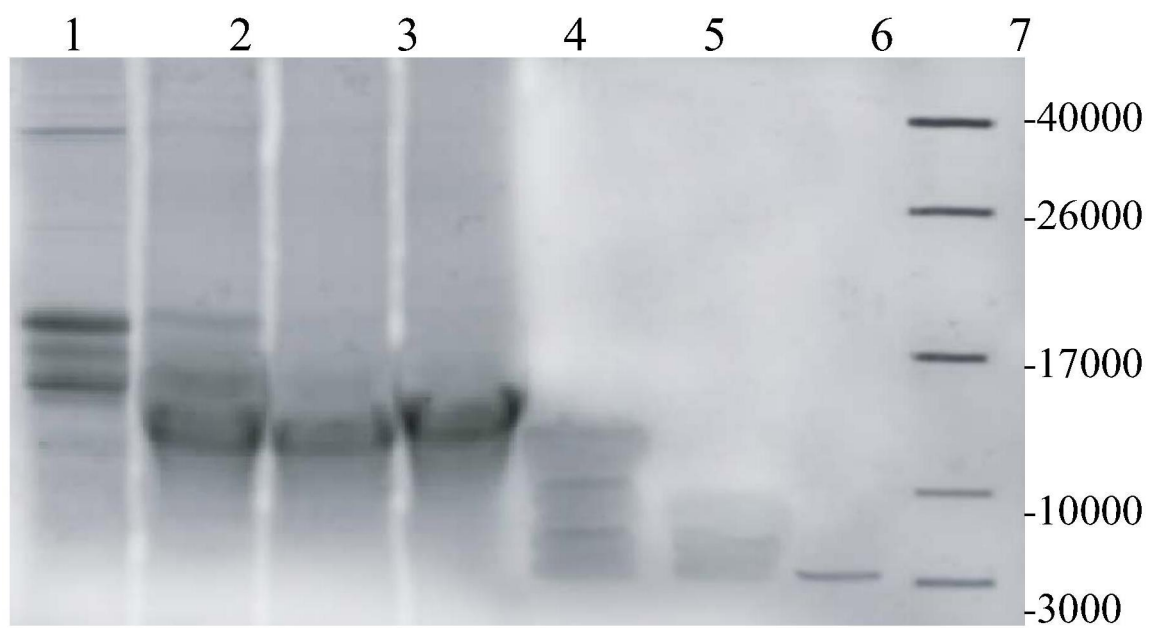


图6