

截短的绝缘子及其用于重组蛋白的瞬时表达的用途

本申请要求于 2023 年 10 月 08 日提交中国专利局、申请号为 202311295717.9、发明名称为“截短的绝缘子及其用于重组蛋白的瞬时表达的用途”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本公开涉及生物技术领域，具体涉及截短的绝缘子以及包含其和转座子（PiggyBac）元件的表达系统及其进行蛋白瞬时表达生产的方法。

背景技术

目前全球已批准的抗体药物多达上百个，抗体市场规模已经达到千亿美元，各治疗领域的抗体药物正在越来越多的造福患者。用于治疗抗体药物需要同时满足有效性、稳定性、免疫原性、药效和药代动力学，容易表达和纯化等多个严格的标准，通常需要进行几轮工程设计和工艺优化。每一轮设计和优化均需要大量的蛋白质进行必要的表征，这就产生了快速生产大量高质量纯化蛋白质的需求。

报道绝缘子（Insulator）在调控真核基因时空特异表达的过程中起着至关重要的作用，其具有保护目的基因免受周围调控因子影响的能力，以避免基因被不正确地激活或是沉默，即增强子阻断和异染色质屏障功能，可以有效抑制“位置效应”。HS4 是位于鸡β球蛋白基因座 5'端上游的一个具有绝缘子功能的 DNaseI 超敏感位点（DNase I hypersensitive site, HS），即 cHS4，其长度约为 1.2kp，研究表明其同时具有以上两种功能，但现有研究表明完整序列的插入会造成载体过大，降低其转染效率，从而影响蛋白的表达量，因此需要对 cHS4 进行截短研究。研究表明 cHS4 发挥其功能依赖于 5'端的 250bp 的核心区，但此核心区的功能不完全，并不能起到良好的提升表达的作用，其 3'端 400bp 也起着重要作用，且 cHS4-650（250bp 核心区和 3'端 400bp 序列）的作用优于 cHS4-250，但 650bp 长度的绝缘子仍然存在导致载体过大、降低转染效率的问题，因而存在着在 650bp 长度的基础上进一步优化绝缘子序列长度、提高转染效率的技术需求。但是目前对 cHS4 绝缘子的截短研究，大多依据已有研究的不同区段进行组合的策略，主要是以 250bp 的核心区为基础加上其他不同区段进行组合，但并未对其长度做进一步优化，也未对截短绝缘子的功能进行验证。并且未实际应用于抗体药物生产的稳转细胞株的构建，距离工业化应用尚存在很大距离。

瞬时表达是一种快速生产毫克到克级别的重组蛋白的方法。区别于稳定表达，表达目的蛋白的基因不需要稳定整合进宿主细胞的基因组，目的基因以质粒 DNA 的形式存在于被转染的细胞中，也不需要筛选压力来维持质粒 DNA。相比于稳定表达，瞬时表达的主要特点是：(1)实现蛋白的快速表达，一般只需要 1-3 个星期；(2)可以运用到各种不同重组蛋白上，包括对宿主细胞有毒性的蛋白。由于这些特点，瞬时表达是一个理想的快速生产蛋白的方法。但瞬时表达蛋白的产量通常比较低，通常在 60-80mg/L 范围内。

为了提高瞬时表达的产量，研究者们开发了多种不同方法，如提高宿主细胞密度，共转染促进表达基因，添加增强试剂等，这些方法需要增加操作步骤，同时也增加了成本。PiggyBac 转座子可以促进基因整合和促进蛋白表达，但常规的 PiggyBac 转座子表达系统通常需要进行压力筛选和细胞恢复的步骤，耗时较长，同时蛋白表达量有限，仍无法满足快速制备蛋白的需求。因此需要一种操作简单、工业成本低、且高产的瞬时表达系统。

发明内容

一方面，本公开提供了一种用于真核细胞中多肽或蛋白表达的绝缘子（可参见 WO2024146587A1）。所述绝缘子为包含 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的核酸序列，或者为包含与 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的核酸序列的任一具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的核酸序列；优选地，所述绝缘子为如 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的核酸序列，或者为与 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的核酸序列的任一具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的核酸序列。

本公开提供了一种表达载体，其包含本公开的绝缘子。优选地，所述表达载体为 PiggyBac 转座子转基因载体；优选地，所述表达载体不含筛选标记基因，或者优选地，所述表达载体包含筛选标记基因。

本公开还提供了一种表达系统，其包含本公开的绝缘子，优选地，所述表达系统为真核细胞的表达系统，更优选地，其为 PiggyBac 转座子表达系统。

优选地，所述 PiggyBac 转座子表达系统包括 PiggyBac 转座子转基因载体；优选地，所述 PiggyBac 转座子表达系统还包括 PiggyBac 辅助载体或编码 PB 转座酶的 mRNA，所述 PiggyBac 辅助载体含有编码 PB 转座酶的核酸，优选地，所述 PiggyBac 辅助载体由 pcDNA3.4 构建获得。

优选地，所述 PiggyBac 转座子转基因载体包含本公开的绝缘子。优选地，所述 PiggyBac 转座子转基因载体包含 5'末端重复序列 5'ITR 和反向的 3'末端重复序列 3'ITR，5'ITR 和 3'ITR 之间设有所述绝缘子；优选地，所述 5'ITR 和 3'ITR 之间依次设有正向和反向互补的或同为正向的两个所述绝缘子；优选地，所述绝缘子之间设有多克隆位点；优选地，所述 PiggyBac 转座子转基因载体的其他元件来自 P3 载体原始序列。

优选地，所述 PiggyBac 转座子转基因载体不含筛选标记基因；或者优选地，所述 PiggyBac 转座子转基因载体包含筛选标记基因。

另一方面，本公开提供了一种使用所述表达系统的方法，特别是进行基因重组瞬时表达的方法，所述方法包括以下步骤：

- 1) 构建含有目的蛋白编码基因的表达系统；
- 2) 将步骤 1) 中所述表达系统通过转染导入宿主细胞中；
- 3) 在所述转染后，使用转染细胞池进行表达生产；

其中，所述表达系统包含本公开的绝缘子。优选地，所述表达系统为真核细胞表达系统。优选地，所述表达系统为 PiggyBac 转座子表达系统；优选地，所述 PiggyBac 转座子表达系统包括 PiggyBac 转座子转基因载体；优选地，所述的 PiggyBac 转座子转基因载体包括 5' 末端重复序列 5ITR 和反向的 3' 末端重复序列 3ITR，5ITR 和 3ITR 之间设有所述绝缘子；优选地，所述 5ITR 和 3ITR 之间依次设有正向和反向互补的或同为正向的两个所述绝缘子；优选地，所述绝缘子之间设有多个克隆位点；优选地，所述的 PiggyBac 转座子转基因载体其他元件来自 P3 载体原始序列；优选地，所述 PiggyBac 转座子转基因载体不含筛选标记基因，或者优选地，所述 PiggyBac 转座子转基因载体包含筛选标记基因；优选地，所述 PiggyBac 转座子表达系统还包括 PiggyBac 辅助载体或编码 PB 转座酶的 mRNA，所述 PiggyBac 辅助载体含有编码 PB 转座酶的核酸；优选地，所述宿主细胞为真核宿主细胞，更优选地，所述宿主细胞为 CHO 细胞。

优选地，步骤 1) 中目的蛋白可以为抗体、融合蛋白、抗原、酶或其他类型蛋白或多肽。

优选地，步骤 1) 中使用体外转录法，以编码 PB 转座酶的 DNA 序列为模板，通过体外转录、加帽和加尾修饰，获得 PB 转座酶的编码 mRNA。

优选地，步骤 1) 中载体构建使用无内毒素质粒抽提试剂盒。

优选地，步骤 2) 中转染方式为电转染、化学转染及其他转染方式。

优选地，步骤 3) 中转染后为转染后 1 天、2 天、3 天或其他时间。

优选地，步骤 3) 中转染后或生产之前无需进行压力筛选。优选地，步骤 3) 中表达生产为瞬时表达生产。

优选地，步骤 3) 中表达生产方式为补料培养。

与现有技术相比，本公开的优越之处在于：对 cHS4 核心区 250bp 进行截短，打破了原有核心区的设定，相比于现有技术中已有的 650bp cHS4 绝缘子序列，既显著缩短了绝缘子序列长度还提升了蛋白表达量；当应用于蛋白瞬时表达时，在获得了提高的蛋白瞬时表达产量的同时，还降低了生产成本，因而在抗体筛选和生产领域中有广阔的应用前景。

附图说明

图 1 为 P3-5ITR-3ITR-cHS4-TT 载体图。

图 2 为 pcDNA3.4-PiggyBac 载体图。

图 3 为瞬时转染 7 天内蛋白产量。

图 4 为质粒构建和蛋白生产所需时间。

图 5 为瞬时转染所需的成本。

图 6 为 P3-AscI 载体图。

具体实施方式

术语

本说明书中提及的所有公布、专利和专利申请都以引用的方式并入本文，所述引用的程度就如同已特定地和个别地指示将各个别公布、专利或专利申请以引用的方式并入本文。

在下文详细描述本公开前，应理解本公开不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本公开的范围。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本公开所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

本文所公开的某些实施方案包含了数值范围，并且本公开的某些方面可采用范围的方式描述。除非另有说明，应当理解数值范围或者以范围描述的方式仅是出于简洁、便利的目的，并不应当认为是对本公开的范围的严格限定。因此，采用范围方式的描述应当被认为具体地公开了所有可能的子范围以及在该范围内的所有可能的具体数值点，正如这些子范围和数值点在本文中已经明确写出。不论所述数值的宽窄，上述原则均同等适用。当采用范围描述时，该范围包括范围的端点。

当涉及可测量值比如量、暂时持续时间等时，术语“约”是指包括指定值的 $\pm 20\%$ 、或在某些情况下 $\pm 10\%$ 、或在某些情况下 $\pm 5\%$ 、或在某些情况下 $\pm 1\%$ 、或在某些情况下 $\pm 0.1\%$ 的变化。

本文所用的术语“抗体”，典型是指包含通过共价二硫键和非共价相互作用保持在一起的两条重(H)多肽链和两条轻(L)多肽链的 Y 型四聚蛋白。天然 IgG 抗体即具有这样的结构。每条轻链包含一个可变结构域(VL)和一个恒定结构域(CL)。每条重链包含一个可变结构域(VH)和一个恒定结构域(CH)。

如在此使用的，广义上的“抗体”的类型可包括如多克隆抗体(polyclonal antibodies)、单克隆抗体、嵌合抗体、

人源化抗体及灵长类抗体、CDR 移植抗体 (CDR-grafted antibody)、人类抗体 (包括重组产生的人类抗体)、重组产生的抗体、胞内抗体、多特异性抗体、双功能融合蛋白、单价抗体、多价抗体、抗个体基因型抗体、合成抗体 (包括突变蛋白及其变体) 等等。

术语“PiggyBac 转座子表达系统”指 PiggyBac 转座子载体系统。PiggyBac 载体系统成员主要有：一个辅助载体或质粒：其编码 PB (PiggyBac) 转座酶；一个转座子载体 (也称供体载体) 或质粒：其两端含优化的反向末端重复序列 (inverted terminal repeat sequences, ITR)，中间是被转座区域，可插入期望转座到宿主基因组中的目的基因序列。实验时需同时将辅助质粒和转座子质粒共同转化靶细胞，辅助质粒编码的转座酶识别转座子质粒两端的 ITR 序列并切割，释放的被转座区被转座酶整合到宿主基因组中含 TTAA 序列的位点，并在被转座区两端出现 TTAA 重复序列。也可使用体外转录的转座酶编码 mRNA 替换辅助质粒和转座子质粒共同转化靶细胞用于转座酶的表达。

术语“CHO 平台”指 CHO 细胞株筛选技术平台。将 CHO (中华仓鼠卵巢细胞) 驯化至化学成分限定培养基 CD CHO Fusion Medium 中，并进行亚克隆筛选后建立 CHO 细胞系，还包括表达载体 P3、克隆构建阶段用的培养基及流加工艺平台培养基等配套试剂和工艺。

术语“载体”意指能够载运与其相连的另一核酸的核酸分子，其可以为单链或双链，包括 DNA 和 RNA。一种类型的载体是“质粒”，其是指环状双链 DNA 环，其中可以连接附加的 DNA 区段。另一种类型的载体是病毒载体，其中附加的 DNA 区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制 (例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体 (例如，非附加型哺乳动物载体) 可以在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中，从而与宿主基因组一起复制。

表达载体指能够使目的基因表达的载体。目的基因包括但不限于编码广义的抗体、抗原、融合蛋白、多肽等产物的脱氧核苷酸序列。

术语“绝缘子 (Insulators)”或“绝缘子序列”指一类染色质结构域边界的 DNA 序列，其功能是作为中性屏障，阻止临近基因元件或周围致密染色质的影响，使被保护的基因得以在正常的时间和空间进行表达。绝缘子的作用效果与其所处基因的位置和自身序列的方向有关。示例性的绝缘子序列包括 chicken hypersensitive site-4 (cHS4)。

术语“多克隆位点”是指载体上含有的人工合成的 DNA 片段，其上含有多个单一限制性酶切位点，为外源 DNA 的插入部位，也称为多位点接头，是基因工程中常用载体质粒的标准配置序列。多克隆位点中，每个限制性酶切位点通常是唯一的，即它们在一个特定的载体质粒中只出现一次，不同酶的酶切位点可有重叠。

术语“重组表达”是指将包含遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体，在足以使得在宿主细胞内表达 mRNA、蛋白、多肽或肽的条件下将该构建体与宿主细胞接触时，所述构建体允许该宿主细胞表达 mRNA、蛋白、多肽或肽，所述构建体包含编码 mRNA、蛋白、多肽或肽的核苷酸序列。

术语“转染”是指将外源性基因导入细胞内的一种专门技术，包括化学转染法、生物转染法和物理转染法。

术语“瞬时表达”是指将构建好的质粒通过转染导入到宿主细胞内，该质粒上的外源基因不整合到细胞自身的基因组上，而以质粒的形式存在。随着细胞的生长分裂，外源基因会逐渐丢失，在此时间内，质粒外源基因在细胞内发生转录翻译，表达蛋白。

实施例

通过以下实施例进一步详细说明本公开。

以下列举具体实施例来阐明本公开，然而应当理解，列举这些实施例只是为了对本公开起说明作用，而非限制本公开的范围。

材料与试剂：

PB 转座酶编码序列由苏州泓迅生物科技股份有限公司将序列针对 CHO 细胞进行优化 (在 5' 端侧翼添加 EcoRI 酶切位点和 kozak 序列，在 3' 端侧翼添加 HindIII) 并合成，克隆到载体 PUC57 上得到 PUC57-PiggyBac。

PiggyBac 转座酶编码 mRNA 模板 DNA 序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

PiggyBac 供体载体由南京金斯瑞生物科技有限公司合成和环化。

空白表达载体 pcDNA3.4 由南京金斯瑞生物科技有限公司提供。

实施例 1：cHS4 绝缘子截短序列的设计和载体构建

1. cHS4 绝缘子截短序列的设计

使用的绝缘子中 cHS4-650、cHS4-400、cHS4-250 来源于文献 (例如可参见 CN102943092A、WO2018083274A1、US20150315611A1)。将 cHS4-650 序列 (包括 250bp 核心区和 3' 端 400bp 序列) 输入 AnimalTFDB3.0 在线预测网站，对可能结合的转录因子进行预测，结果显示共有 3897 个 TFBS，对应 389 个转录因子；然后使用 STRING 数据库对 389 个转录因子进行富集分析，共 1993 个 GO term 被显著富集；挑取与染色质结构调控或绝缘子功能相关的 85 个 GO term 对应的 91 个转录因子进行 PPI 分析，然后选取连接度高的转录因子和与已报道的与核心区结合的 3 个转录因子 CTCF、USF1/2、VEZF1，根据 AnimalTFDB3.0 预测的结合序列，将这些转录因子定位到 cHS4-650 序列上，挑取转录因子结合较少或无结合的 DNA 区域进行截短设计，进行单个或多个可截区域组合截短，最后得到 4 条绝缘子序列 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.4。其核酸序列分别如下所示：

SEQ ID NO.1

cggggacagccccccccaaagccccaggatgtaattacgtccctcccccgtagggggcagcagcagccgccggggctccgctccgggtccggcgtcccccc
gcatccccgagccggcagcgtgctggggacagccccgggacggggaaggtggcaggggagcttctctgaacgcttctcgtctcttgaacctgcagacacctgggggga
tacggggaaaaatgtgtctgagcctgcatgttggatgtgtctggaagcagaagggtggagagcttgcctggagagatacagctgggtcagtaggactgggacaggcagc
tatcccaagaccaacccccaccaccgctgcccactggccatgtcttcatcacctccaggacgggtgacccccccacctccgtgggagctgtgccactgcagcaccgct
cttggagaaggtaaatctgtctaaatccagccccaccctccccggcacaacgtaaggccattatctct

SEQ ID NO.2

cggggacagccccccccaaagccccaggatgtaattacgtccctcccccgtagggggcagcagcagccgccggggctccgctccgggtccggcgtcccccc
gcatccccgagccggcagcgtgctggggacagccccgggacggggaaggtggcaggggagcttctctgaacgcttctcgtctcttgaacctgcagacacctgggggatacgggaaaaatgtgtctgagcctgcat
gttggatgtgtctggatgcaagcagaagggtggagagcttgcctggagagatacagctgggtcagtaggactgggacaggcagctatccccaaagaccaacccccaccacc
caccgtgcccactgtccatgtcttcatcacctccaggacgggtgacccccccacctccgtgggacagctgtgccactgcagcaccgctcttggagaaggtaaatctgtctaaatcc
agccccaccctccccggcacaacgtaaggccattatctct

SEQ ID NO.3

cggggacagccccccccaaagccccaggatgtaattacgtccctcccccgtagggggcagcagcagccgccggggctccgctccgggtccggcgtcccccc
gcatccccgagccggcagcgtgctggggacagccccgggacggggaaggtggcaggggagcttctctgaacgcttctcgtctcttgaacctgcagacacctgggggga
tgatgcaagcagaagggtggagagcttgcctggagagatacagctgggtcagtaggactgggacaggcagctatccccaaagaccaacccccaccaccaccgtgccact
ggccatgtcttcatcacctccaggacgggtgacccccccacctccgtgggacagctgtgccactgcagcaccgctcttggagaaggtaaatctgtctaaatccagccccaccctcc
cctggcacaacgtaaggccattatctct

SEQ ID NO.4

cggggacagccccccccaaagccccaggatgtaattacgtccctcccccgtagggggcagcagcagccgccggggctccgctccgggtccggcgtcccccc
gcatccccgagccggcagcgtgctggggacagccccgggacggggaaggtggcaggggagcttctctgaacgcttctcgtctcttgaacctgcagacacctgggggga
cttgcttggagatacagctgggtcagtaggactgggacaggcagctatccccaaagaccaacccccaccaccaccgtgccactggccatgtcttcatcacctccaggac
ggtgacccccccaccctccgtgggacagctgtgccactgcagcaccgctcttggagaaggtaaatctgtctaaatccagccccaccctccccggcacaacgtaaggccattatctct

2. 供体载体构建

以 SEQ ID NO.1 作为示例性的截短绝缘子构建供体载体。PiggyBac 供体载体元件中包含 5ITR-cHS4 (正向), 3ITR-cHS4 (正向), 其中 5ITR 和 3ITR 之间有两个正向 cHS4, cHS4 包含 SEQ ID NO.1 所示核酸序列。在 P3-AscI 载体 (图 6 所示, 在 P3 质粒中插入了 AscI 酶切位点识别序列 GGCGCGCC 构建得到) 的基础上, 删除筛选标记 GS 基因表达框和一个目的基因表达框, 以 AscI 单酶切连接或同源重组的方式加入元件 5ITR 和 cHS4 并以 SgrAI 单酶切连接或同源重组的方式加入元件 3ITR 和 cHS4, 得到 PiggyBac 供体载体序列, 并命名为 P3-5ITR-3ITR-cHS4-TT (图 1)。

3. 表达载体构建

载体 P3-5ITR-3ITR-cHS4-TT 利用 BstBI/PacI 双酶切连接, 将 QL01 蛋白的 (本申请人保存) 的 S1 链和 S2 链编码核酸序列分别连接在多克隆位点上, 构建重组表达载体 P3-5ITR-3ITR-cHS4-TT-QL01-S1 和 P3-5ITR-3ITR-cHS4-TT-QL02-S2; 将 QL02 蛋白 (本申请人保存) 的编码核酸序列连接在多克隆位点上, 构建重组表达载体 P3-5ITR-3ITR-cHS4-TT-QL02。

4. 辅助载体构建

将载体 PUC57-PiggyBac 及空白载体 pcDNA3.4 以 EcoRI/HindIII 双酶切, 然后将其酶切产物经 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up 试剂盒纯化回收后连接, 构建包含 PB 转座酶编码基因的辅助质粒 pcDNA3.4-PiggyBac (图 2); 也可以采用体外转录法, 以 PB 转座酶编码 DNA 序列为模板, 通过体外转录, 加帽和加尾修饰, 获得 PB 转座酶编码 mRNA-PiggyBac。

实施例 2: cHS4 绝缘子截短序列的瞬时转染抗体表达

包含 cHS4 绝缘子截短序列的表达载体的瞬时转染表达: 使用的宿主细胞为 CHOZN (来自 Merck), 电转法转染 CHO 细胞, 转染质粒量为 60μg 表达载体+6μg 辅助载体, 电压 300V, 950μF, 细胞量为 1E7, 一次电击。细胞转染后用培养基 EX-CELL® CD CHO Fusion Medium (含 6mM L-glutamine) 重悬, 并置于培养箱静置培养, 条件为 37°C, 5% CO₂。对培养 24h 的细胞进行计数, 确定活细胞密度 (VCD) 和细胞活率 (Via) 后离心, 用适量培养基以 6×10⁶cells/mL 密度重悬, 并进行 7 天的补料蛋白表达生产。

作为对照, 使用 ExpiCHO™ 试剂盒按照建议的方法进行蛋白的瞬时表达: 表达体系为 25mL, 转染用质粒总量为 20μg。按照试剂盒建议进行转染和补料, 并培养至第 7 天。

统一采用 Cedex 仪器检测抗体表达量, 试验结果见图 3。

对比两系统的瞬转结果, P3-5ITR-3ITR-cHS4-TT 表达系统蛋白产量比 ExpiCHO™ 提高 488.2% (QL01) 和 29.6% (QL02), 现有表达系统中生产难度较大的蛋白 QL01 采用本公开的表达系统也可以取得较好的表达效果, 并且质粒构建与蛋白表达生产的时间相当 (见图 4), 而成本则下降 96% 以上 (见图 5)。

因此, 本公开提供了一种操作简单、工业成本低、蛋白高产的瞬时表达系统。

上文所述的本公开的实施方案仅为示例性的, 并不能理解为对本公开实施方式的限制, 任何本领域技术人员都可以认识到或者可以确定无数的特定化合物、材料和操作的等价物, 而不需要进行超出常规的试验。所有这些等价物都是在本公开范围之内的, 并且被权利要求所包含。

权利要求书

1. 一种绝缘子，其包含 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的核酸序列，或包含与 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的核酸序列的任一具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的核酸序列。
2. 权利要求 1 所述的绝缘子，其中所述绝缘子为 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的核酸序列，或为与 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 或 SEQ ID NO.4 所示的核酸序列的任一具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的核酸序列。
3. 一种表达载体，其包含权利要求 1 或 2 所述的绝缘子。
4. 如权利要求 3 所述的表达载体，所述表达载体为 PiggyBac 转座子转基因载体，优选地，所述表达载体不含筛选标记基因，或者优选地，所述表达载体包含筛选标记基因。
5. 一种表达系统，其包含权利要求 1 或 2 所述的绝缘子。
6. 如权利要求 5 所述的表达系统，其中所述表达系统是 PiggyBac 转座子表达系统。
7. 如权利要求 6 所述的表达系统，其中所述 PiggyBac 转座子表达系统包括 PiggyBac 转座子转基因载体；优选地，所述 PiggyBac 转座子转基因载体包含权利要求 1 或 2 所述的绝缘子；优选地，所述 PiggyBac 转座子转基因载体包含筛选标记基因，或者优选地，所述 PiggyBac 转座子转基因载体不含筛选标记基因。
8. 如权利要求 4 所述的表达载体或权利要求 7 所述的表达系统，所述的 PiggyBac 转座子转基因载体包括 5' 末端重复序列 5ITR 和反向的 3' 末端重复序列 3ITR，所述 5ITR 和 3ITR 之间设有所述绝缘子；优选地，所述 5ITR 和 3ITR 之间依次设有正向和反向互补的或同为正向的两个所述绝缘子；优选地，所述绝缘子之间设有多克隆位点；优选地，所述的 PiggyBac 转座子转基因载体的其他元件来自 P3 载体原始序列。
9. 如权利要求 6-8 任一项所述的表达系统，其中所述 PiggyBac 转座子表达系统包括 PiggyBac 辅助载体或编码 PB 转座酶的 mRNA，所述 PiggyBac 辅助载体含有编码 PB 转座酶的核酸。
10. 如权利要求 9 所述的表达系统，其中所述 PiggyBac 辅助载体由 pcDNA3.4 构建获得。
11. 一种蛋白瞬时表达生产的方法，其中包含以下步骤：
 - 1) 构建含有目的蛋白编码基因的表达系统；
 - 2) 将步骤 1) 中所述表达系统通过转染导入宿主细胞中；
 - 3) 在所述转染后，使用转染细胞池进行表达生产；其中，所述表达系统包含权利要求 1 或 2 中所述的绝缘子。
12. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述目的蛋白为抗体、融合蛋白、抗原、酶或其他类型蛋白或多肽。
13. 如权利要求 11 或 12 所述的方法，其中所述转染的方法为电转染、PEI 或脂质体转染或其他转染方法。
14. 如权利要求 11-13 任一项所述的方法，其所述方法不包含压力筛选过程。
15. 如权利要求 11-14 任一项所述的方法，所述宿主细胞为哺乳动物细胞，优选为 CHO 细胞。
16. 如权利要求 11-15 任一项所述的方法，其中所述表达系统选自权利要求 5-10 任一项所述的表达系统。
17. 权利要求 1 或 2 所述的绝缘子、权利要求 3-4 和 8 任一项所述的表达载体或权利要求 5-10 中任一项所述的表达系统在核酸的重组表达中的应用，优选所述重组表达不包含压力筛选过程。
18. 如权利要求 17 所述的应用，其中所述核酸编码抗体、融合蛋白、抗原、酶或其他类型蛋白或多肽。
19. 权利要求 1 或 2 所述的绝缘子、权利要求 3-4 和 8 任一项所述的表达载体或权利要求 5-10 中任一项所述的表达系统在制备蛋白或多肽中的应用。
20. 如权利要求 19 所述的应用，所述蛋白或多肽包括抗体、融合蛋白、抗原和酶。
21. 权利要求 1 或 2 所述的绝缘子、权利要求 3-4 和 8 任一项所述的表达载体或权利要求 5-10 中任一项所述的表达系统在构建重组细胞株中的应用。
22. 如权利要求 21 所述的应用，所述重组细胞为哺乳动物细胞，优选为 CHO 细胞。