

一种新型天然蛋白及其应用

技术领域

本发明涉及一种新型天然蛋白及其应用，该蛋白可用于预防和治疗因垃圾蛋白过渡生成或过渡积累导致的疾病。

背景技术

在正常的生理活动中，机体产生大量垃圾蛋白，其中包括氧化蛋白、糖基化蛋白和一些异常剪切蛋白（多肽）等。机体保留多种清除垃圾蛋白的机制以维持正常的生理功能，但是衰老或疾病会导致垃圾蛋白过渡生成或机体清除垃圾蛋白的能力下降，由此引起大量垃圾蛋白累积。垃圾蛋白在细胞内或细胞外异常积累是导致一系列疾病的关键机制，典型疾病包括慢性肾病、阿尔兹海默症（Alzheimer's disease, AD）、亨廷顿氏症、糖尿病并发症等^[1-5]。循环系统中氧化蛋白、糖化蛋白或其他垃圾蛋白的积累还是机体衰老的重要原因之一^[6-7]。研究证明，血清中晚期氧化蛋白（Advanced oxidation protein, AOPP）损伤肾细胞，是慢性肾病的主要发病机制；血清中 AOPP 也会诱导胰岛 β 细胞的程序性凋亡^[3,8]。 β 淀粉样蛋白假说认为 $A\beta$ 蛋白在组织中产生和清除失衡导致的毒性蛋白进行性堆积，由此引起的突触功能紊乱、神经元死亡是导致 AD 的主要原因^[9]。Amylin 蛋白不仅在部分糖尿病患者的胰岛组织发生异常聚集，也会在脑组织的斑块中存在，与糖尿病和神经退行性疾病的进展密切相关^[10,11]。基于这些研究结果，在一些疾病模型上，例如利用抗体^[12]、多肽药物^[13]或小分子药物^[14]阻断 AD 模型动物中 $A\beta$ 聚集或生成可以减少神经组织斑块形成，提高动物认知水平。这些结果说明，通过药物抑制这些致病蛋白的生成、聚集或者促进致病蛋白清除，减少致病蛋白累积，是预防或治疗这些疾病的重要方法。

前期的研究表明，当细胞内发生氧化应激时，DSS1（deleted split hand/split foot 1）蛋白作为一种在真核生物中高度保守的小蛋白，能够在酶促反应并消耗 ATP 的条件下被共价修饰到氧化蛋白上，这种修饰将介导氧化蛋白在细胞内的降解^[15]。DSS1 基因敲除导致细胞死亡；高表达 DSS1 蛋白的细胞对

氧化应激或抗肿瘤药物诱导的细胞凋亡表现显著的抗性^[16]。这些结果显示 DSS1 蛋白在细胞清除氧化蛋白过程中的重要作用，对细胞的生存非常关键。

上述中涉及的参考文献如下：

1. Dobson CM (1999) Protein misfolding, evolution and disease. Trends Biochem Sci 24:329 - 332.

2. Liang M, Wang J, Xie C, Yang Y, Tian JW, Xue YM, Hou FF (2014) Increased plasma advanced oxidation protein products is an early marker of endothelial dysfunction in type 2 diabetes patients without albuminuria 2. J Diabetes 6(5):417-26.

3. Cao W, Hou FF, Nie J (2014) AOPPs and the progression of kidney disease. Kidney Int Suppl (2011) 4(1):102-106.

4. Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, Talebi M, Farhoudi M, Mahmoudi J (2015) Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. Med Princ Pract 24(1):1-10.

5. Choe YJ, Park SH, Hassemer T, Krner R, Vincenz-Donnelly L, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2016) Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress. Nature 531(7593):191-5.

6. Ott C, Grune T (2014) Protein oxidation and proteolytic signalling in aging. Curr Pharm Des 20(18):3040-51.

7. Simm A, Müller B, Nass N, Hofmann B, Bushnaq H, Silber RE, Bartling B (2015) Protein glycation - Between tissue aging and protection. Exp Gerontol 68:71-5.

8. Liang M, Li A, Lou A, Zhang X, Chen Y, Yang L, Li Y, Yang S, Hou FF (2017) Advanced oxidation protein products promote NADPH oxidase-dependent β -cell destruction and dysfunction through the Bcl-2/Bax apoptotic pathway. Lab Invest 24. [Epub ahead of print].

9. Zhao LN, Long H, Mu Y, Chew LY (2012) The toxicity of amyloid β oligomers. Int J Mol Sci 13(6):7303-27.

10. Fernández MS (2014) Human IAPP amyloidogenic properties and pancreatic β -cell death. *Cell Calcium* 56(5):416–27.
11. Lim YA, Rhein V, Baysang G, Meier F, Poljak A, Raftery MJ, Guilhaus M, Ittner LM, Eckert A, Götz J (2010) Abeta and human amylin share a common toxicity pathway via mitochondrial dysfunction. *Proteomics* 10 (8): 1621 – 33.
12. Winblad B, Andreasen N, Minthon L, Floesser A, Imbert G, Dumortier T, Maguire RP, Blennow K, Lundmark J, Staufenbiel M, Orgogozo JM, Graf A (2012) Safety, tolerability, and antibody response of active A β immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol* 11(7):597–604.
13. Chang L, Cui W, Yang Y, Xu S, Zhou W, Fu H, Hu S, Mak S, Hu J, Wang Q, Ma VP, Choi TC, Ma ED, Tao L, Pang Y, Rowan MJ, Anwyl R, Han Y, Wang Q (2015) Protection against β -amyloid-induced synaptic and memory impairments via altering β -amyloid assembly by bis(heptyl)-cognitin. *Sci Rep* 5:10256.
14. Kim HY, Kim HV, Jo S, Lee CJ, Choi SY, Kim DJ, Kim Y (2015) EPPS rescues hippocampus-dependent cognitive deficits in APP/PS1 mice by disaggregation of amyloid- β oligomers and plaques. *Nat Commun* 6:8997.
15. Zhang Y, Chang FM, Huang J, Junco JJ, Maffi SK, Pridgen HI, Catano G, Dang H, Ding X, Yang F, Kim DJ, Slaga TJ, He R, Wei SJ (2014) DSSylation, a novel protein modification targets proteins induced by oxidative stress, and facilitates their degradation in cells. *Protein Cell* 5(2):124–40.
16. Rezano A, Kuwahara K, Yamamoto-Ibusuki M, Kitabatake M, Moolthiya P, Phimsen S, Suda T, Tone S, Yamamoto Y, Iwase H, Sakaguchi N (2013) Breast cancers with high DSS1 expression that potentially maintains BRCA2 stability have poor prognosis in the relapse-free survival. *BMC Cancer* 13:562.

发明内容

在最新的研究中，我们（发明人）发现在高等灵长类（类人猿亚科）基因组中存在一类新亚型 DSS1 蛋白，命名为分泌型 DSS1 蛋白(secretary DSS1; sDSS1)。sDSS1 是首次发现的一种 DSS1 蛋白亚型，在序列和性质和功能上与 DSS1 高度相似，但是可以分泌到血液和脑脊液中，性质更活泼，不需要通过耗能的酶促反应就可以与血清或缓冲液中的氧化蛋白形成聚合体，或者与 A β 蛋白结合并抑制 A β 寡聚体的形成。sDSS1 蛋白添加到培养基中可以屏蔽氧化蛋白、A β 寡聚物、amylin 寡聚物、糖基化蛋白引起的细胞毒性，保护细胞活力。因而我们判断这种新型蛋白 sDSS1 有潜力成为药物用于预防和治疗氧化蛋白、糖基化蛋白、A β 、amylin 以及其他相似特征致病蛋白导致的疾病。

具体的技术方案如下：

一种新型天然蛋白 sDSS1，包括人在内的类人猿亚目动物存在天然蛋白 sDSS1，其中人源天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1。

优选地，所述类人猿亚目动物还包括黑猩猩、倭黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、白颊长臂猿、川金丝猴、恒河猴、东非狒狒、安哥拉疣猴、白顶白眉猴、鬼狒、豚尾猴；其中黑猩猩的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5，倭黑猩猩的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6，大猩猩的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7，红毛猩猩的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8，白颊长臂猿的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9，川金丝猴的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10，恒河猴的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11，东非狒狒的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12，安哥拉疣猴的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13，白顶白眉猴的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14，鬼狒的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15，豚尾猴的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16。

优选地，所述天然蛋白 sDSS1 分为 N 端 58 个氨基酸序列和 C 端 31 个氨基酸序列，其中人源 sDSS1 蛋白 N 端 58 个氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3，人源 sDSS1 蛋白 C 端的 31 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2；两段序列的特征分别在于，N 端 58 个氨基酸序列包含 3 个或 3 个以上连续排列的酸性氨基酸序列，每个连续排列

的酸性氨基酸序列片段包含的酸性氨基酸数目不高于 10 个，不同的连续排列的酸性氨基酸序列之间的间隔长度不超过 4 个氨基酸，每个这样的间隔中存在至少一个疏水氨基酸，pH 值不高于 4.5，N 端 58 个氨基酸组成的序列酸性氨基酸数量不低于 10 个；以 N 端 58 个氨基酸序列为基础的第 58 位氨基酸以后的 C 端氨基酸序列，总体偏疏水性质，C 端 31 个氨基酸组成的氨基酸序列中疏水氨基酸数量不低于 10 个；

氨基酸分类的界定如下：

疏水氨基酸：丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸，甲硫氨酸、色氨酸、酪氨酸；

中性氨基酸：苏氨酸、甘氨酸，丝氨酸、组氨酸、谷氨酰胺；

酸性氨基酸：谷氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、天冬酰胺。

碱性氨基酸：精氨酸，赖氨酸。

优选地，类人猿亚目动物的 sDSS1 蛋白包含的 C 端氨基酸通式为：

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ ；

X1 为中性氨基酸；X2 为疏水氨基酸；X3，X4 分别为疏水氨基酸；X5 为疏水氨基酸；X6 为疏水氨基酸；X7 为疏水氨基酸；X8 为疏水氨基酸；X9 为疏水氨基酸；X10 为酸性氨基酸；X11 为中性氨基酸；X12 为疏水氨基酸；X13 为疏水氨基酸；X14 为中性氨基酸；X15 为疏水氨基酸；X16 为疏水氨基酸；X17 为疏水氨基酸；X18 为疏水氨基酸；X19 为碱性氨基酸；X20 为酸性氨基酸；X21 为碱性氨基酸；X22 为中性氨基酸；X23 为碱性氨基酸；X24 为疏水氨基酸；X25 为疏水氨基酸；X26 为中性氨基酸；X27 为疏水氨基酸；X28 为疏水氨基酸；X29 为疏水氨基酸；X30 为疏水氨基酸；X31 为疏水氨基酸；

与 C 端 31 个氨基酸序列中有 40% 或 40% 以上同源性氨基酸序列，该序列与人源 sDSS1 蛋白 C 端的氨基酸序列在多肽中的性质和发挥的功能相同或相似。

一种多肽序列，以上述方案所述的新型天然蛋白 sDSS1 的 N 端 58 个氨基酸序列和 C 端 31 个氨基酸序列为基础构建的多肽序列，其是：

1) 该多肽序列的 N 端 58 个氨基酸组成的序列有 40%或 40%以上相似性, C 端氨基酸序列有 40%或 40%以上相似性的蛋白, 该蛋白与人源天然蛋白的性质和功能相同或相似; 或者,

2) 以人源天然蛋白中多肽序列的 N 端 58 个氨基酸组成的序列, 或以其 40%或 40%以上相似序列为基础, 在 C 端或 N 端融合其他氨基酸序列, 用于融合的氨基酸序列能实现与人源天然蛋白中 C 端 31 个氨基酸序列相同或相似的性质并且发挥相同或相似的功能, 修饰后的蛋白能发挥与人源天然蛋白 sDSS1 相同或相似功能的蛋白; 或者,

3) 用上述方案所述的新型天然蛋白 sDSS1 中的 C 端多肽序列融合其他天然或非天然多肽序列得到的蛋白。

一种融合蛋白, 所述融合蛋白包括上述方案所述的新型天然蛋白 sDSS1 的完整序列或部分序列和上述方案所述的多肽序列。

优选地, 所述融合蛋白是与该蛋白自身、载体蛋白、抗体或其他任意氨基酸序列连接形成的蛋白复合体。

一种复合体, 所述复合体包括上述方案所述的新型天然蛋白 sDSS1 的完整序列或部分序列、上述方案所述的多肽序列、上述方案所述的融合蛋白中的部分或全部复合。

优选地, 所述复合体是多肽/蛋白与医药上可应用的药物载体连接形成的复合体。

优选地, 所述载体包含微球/囊、脂质体、微乳液、纳米颗粒、磁颗粒和凝胶中的一种或一种以上。

一种核苷酸序列, 所述核苷酸序列可以编码上述方案所述的蛋白或上述方案所述的多肽序列。

优选地, 所述核苷酸序列包括 DNA 序列和 RNA 序列。

一种细胞, 所述细胞表达上述方案所述的蛋白或上述方案所述的多肽序列。

优选地, 所述细胞是任何一种哺乳动物的干细胞、前体细胞或成体细胞。

优选地，所述哺乳动物是人、猩猩、猴、马、牛、羊、猪、驴、狗、兔、猫、大鼠或小鼠。

优选地，所述细胞包括胚胎干细胞、诱导多能干细胞，或者来源于原代培养的干细胞、由母细胞分化得到的多能或单能干细胞。

一种表达体系，其把编码上述方案所述蛋白或上述方案所述的多肽序列的核苷酸序列导入生物体，并在生物体中表达上述方案所述的蛋白或上述方案所述的多肽序列。

优选地，所述表达体系包括真核表达质粒载体、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、CRISPR/Cas 技术及其他可行的基因编辑技术。

优选地，所述生物体是人、猩猩、猴、马、牛、羊、猪、驴、狗、兔、猫、大鼠、小鼠、鸡、鸭或鹅。

一种药物，所述药物以上述方案所述蛋白或上述方案所述的多肽序列为主要靶点，并在施用后可以影响机体内上述方案所述蛋白或上述方案所述的多肽序列的表达水平。

优选地，所述药物是化学小分子药物、蛋白/多肽药物或核酸药物、纳米药物。

优选地，所述的核酸药物包括 siRNA, microRNA, 反义寡核苷酸，三链 DNA 和核酶的一种或一种以上。

一种蛋白的生产方法，所述方法包括以下步骤：

S1. 表达载体构建：将可编码上述方案所述蛋白或上述方案所述的多肽序列的核苷酸序列插入质粒中并导入到细菌或酵母菌细胞中，或将可编码上述方案所述蛋白或上述方案所述的多肽序列的核苷酸序列插入昆虫细胞、哺乳动物细胞基因组中；

S2. 蛋白表达：将 S1 中所述改造细菌、酵母菌、昆虫细胞或哺乳动物细胞进行扩大培养，收集包含上述方案所述蛋白或上述方案所述的多肽序列的培养液或细胞裂解物；

S3. 蛋白纯化：将 S2 中得到的培养液或细胞裂解物经过粗过滤和纯化得到蛋白。

一种蛋白的生产方法，利用化学合成技术生产上述方案所述蛋白或上述方案所述的多肽序列。

一种蛋白的生产方法，利用体外核糖体表达系统生产上述方案所述蛋白或上述方案所述的多肽序列。

一种上述方案所述的蛋白、多肽序列、融合蛋白、复合体、核苷酸序列、细胞、表达体系、药物在疾病诊断、预防和治疗中的应用。

优选地，所述疾病指因致病蛋白/多肽过渡生成或积累导致的疾病。

优选地，所述致病蛋白/多肽是氧化、糖基化的蛋白产物、淀粉样前体蛋白及其剪切体、胰岛淀粉样多肽及其剪切体、以及其他具备氧化蛋白、糖基化蛋白、淀粉样蛋白、胰岛淀粉样多肽相似特征的致病蛋白/多肽。

优选地，所述疾病诊断包括检测上述方案所述蛋白全部或部分氨基酸序列表达水平、mRNA 水平、基因拷贝数量的一种或一种以上。

优选地，所述预防包括基因改造、核酸导入、药物注射/服用、细胞移植、组织移植中的一种或一种以上。

优选地，所述治疗包括基因改造、核酸导入、药物注射/服用、细胞移植、组织移植中的一种或一种以上。

本发明的特点和/或有益效果有：

1. 本发明提供的新型天然蛋白 sDSS1，典型的人源 sDSS1 蛋白多肽序列为 MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDDDNVEDDFS NQLRATVLLMILVCE TPYGCYVLHQKGRMCSAFLCC（参见 SEQ ID NO: 1）。经过生物信息学分析发现该蛋白是类人猿亚科动物具有的一种天然蛋白。

2. 本发明根据生物信息学分析和细胞实验验证，多肽 sDSS1 碳端 31 个氨基酸序列是信号肽，它们对该蛋白质的性质和分泌特性有关键作用。C 端 31 个氨基酸序列为：TVLLMILVCETPYGCYVLHQKGRMCSAFLCC（参见 SEQ ID NO: 2）。

3. 本发明所述的 sDSS1 蛋白可以与氧化蛋白、糖基化蛋白、A β 蛋白、amylin 蛋白结合并屏蔽这些毒性蛋白聚集诱导的细胞毒性，因而具有治疗这些毒性蛋白及其他具备相似特征的致病蛋白过渡生成或过渡积累导致的疾病的重要潜力。

4. 本发明的 sDSS1 蛋白通过大肠杆菌发酵生产。将编码 sDSS1 蛋白的核苷酸序列导入 pET151D 质粒中, sDSS1 表达的同时, 其氮端融合了一个 6-his 标签和一个 V5 标签用于纯化和免疫印迹检测。蛋白在大肠杆菌中表达, 利用镍-NTA 凝胶柱进行初步纯化, 然后利用 SDS-PAGE 进行切胶纯化。将切出的含有 His-V5-sDSS1 蛋白的胶条装入含有转膜液的透析袋中, 在电场的驱动下, 蛋白从凝胶中移出, 收集在透析袋中。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白纯度达到可以用于生物实验的水平。

5. 本发明经过分子实验验证, sDSS1 蛋白可以与血清中氧化蛋白、缓冲液中的氧化蛋白结合形成聚合体, 或与 A β 蛋白结合从而减少 A β 寡聚物形成。

6. 本发明通过细胞实验证明 sDSS1 蛋白可以有效屏蔽培养基中氧化蛋白、糖基化蛋白、A β 寡聚物、amylin 寡聚物引起的细胞毒性, 维持细胞活力。

综上, 本发明提供了一种新型天然 sDSS1 蛋白, 通过生物信息学、分子生物学、细胞生物学三个层次的研究证明 sDSS1 蛋白的生物学性质和活性。sDSS1 蛋白可以有效降低培养基中氧化蛋白、糖基化蛋白、A β 寡聚物、amylin 寡聚物引起的细胞毒性, 维持细胞活力。由于 sDSS1 蛋白是高等灵长类动物本身具有的蛋白, 在临床使用时可以免除免疫反应的问题。因而, 本发明提供了一种新型预防和治疗氧化蛋白、糖基化蛋白、A β 蛋白、amylin 多肽及其他具备相似特征的致病蛋白过渡生成或过渡积累导致的相关疾病的候选药物, 在生物医学上有重要的应用前景。

附图说明

下面结合附图, 对本发明做进一步详细的阐述, 以使本发明能够清楚、完整, 但不是为了限制本发明的保护范围。

图 1A. sDSS1 基因是 DSS1 基因的新亚型, 人 DSS1 基因 cDNA (NM_006304.1, 509bp) 与人 sDSS1 基因 cDNA (AK309241.1, 1195bp) 比对显示二者有重叠区, 重叠区域核酸序列经分析可编码 N 端 58 个氨基酸序列。

图 1B. 用 Clustal X2.1 软件对灵长目 13 个物种的 sDSS1 蛋白氨基酸序列进

行比对,结果显示 sDSS1 蛋白氨基酸序列高度保守,N 端 58 个氨基酸序列完全相同,C 端 31 个氨基酸序列仅有少量位点出现点突变。

图 2A. 质粒转染 293T 细胞,24h 后观察 GFP 蛋白分布。对照细胞 (GFP) 内绿色荧光清晰明亮,溶液中背景暗淡。sDSS1 与 GFP 整合蛋白 (sDSS1-GFP) 或 sDSS1 蛋白 C 端 31 个氨基酸序列与 GFP 整合蛋白 (sDSS1-c-GFP) 的培养物溶液中观察到明显的绿色荧光信号,而细胞内荧光弥散且强度下降,说明 GFP 蛋白随着 sDSS1 蛋白或 sDSS1 蛋白 C 端序列分泌而被带到细胞外。

图 2B. 点膜免疫印迹方法检测转染细胞培养基,结果显示在 sDSS1-GFP 和 sDSS1-c-GFP 组培养基中检测到 GFP 信号,在空白对照 (blank) 和 GFP 对照组没有检测到明显的信号,证明 sDSS1 蛋白是一种分泌蛋白,而 C 端 31 个氨基酸序列是信号肽。

图 3A. 利用 sDSS1 蛋白 C 端多肽序列特异性抗体 (抗原序列: sDSS1 蛋白的 C 端 31 个氨基酸序列) 在人血清 (human serum) 或脑脊液 (human cerebral spinal fluid, CSF) 样本中可以检测到 sDSS1 信号。Human CSF 样本来源于老年人,a 血清样本来源剧烈运动后青年人血液,b, c, d 血清样本来源保持静息状况下的青年人血液。

图 3B. 利用 PCR 方法可以在人脑星形胶质母细胞瘤 (U-87 MG) 检测到 sDSS1 基因特异的 mRNA 序列 (扩增产物为 293bp),DSS1 基因的作为对照 (扩增产物为 238bp)。

图 4A-图 4B. 考马斯亮蓝染色显示 sDSS1 蛋白生产和纯化过程中目的蛋白的含量。**图 4A.** 挑选阳性大肠杆菌克隆菌株扩大培养,加入 IPTG 后可以诱导 sDSS1 蛋白的表达,没有诱导的细胞中目的蛋白的表达量极低。**图 4B.** 检测镍-NTA 凝胶柱初步纯化后浓缩的裂解物和纯化之后目的蛋白含量,a 通道显示纯化的 sDSS1 蛋白,b 通道显示初步纯化的细胞裂解液。

图 5A-图 5D. 生化实验和细胞实验证明 sDSS1 蛋白可以与氧化蛋白结合并屏

蔽氧化蛋白的毒性。图 5A. 用 $0.72 \mu\text{g}$ 纯化的 sDSS1 蛋白与不同比例的血清蛋白混合后孵育, 用 V5 结合蛋白 (V5-HRP) 检测 sDSS1 蛋白, 结果显示 sDSS1 蛋白与血清的氧化蛋白形成大分子的蛋白复合体。图 5B. 晚期氧化蛋白 (AOPP, $200 \mu\text{g/mL}$) 与不同浓度纯化的 sDSS1 蛋白在 4°C 共同孵育过夜, 产物用 SDS-PAGE 分离后考马斯亮蓝染色显示, sDSS1 蛋白与 AOPP 可以形成大分子的复合体, 随着 sDSS1 蛋白浓度增加复合体含量增加。图 5C. 在培养基中加入 10% 氧化的血清显著降低细胞增殖, 在培养基中 sDSS1 蛋白可以屏蔽氧化的血清带来的细胞毒性。图 5D. 在无血清培养基中添加 $100 \mu\text{g/mL}$ AOPP 蛋白降低细胞活力, 加入等浓度 sDSS1 蛋白可以挽回细胞活力, $100 \mu\text{g/mL}$ BSA 用于对照组。数据用 t-test 双尾检验分析并用 ANOVA 分析验证。**, $p\text{-value} < 0.01$ 。

图 6A-图 6E. sDSS1 蛋白减少 A β 寡聚体形成, 并且降低 A β 寡聚体引起的细胞毒性和细胞凋亡。图 6A. 不同比例的 sDSS1 蛋白与 $10 \mu\text{g}$ A β 蛋白混合后孵育, 经 A β 抗体检测显示, sDSS1 蛋白与 A β 形成共价结合的高分子量蛋白复合体, 这种结合可以减少有细胞毒性的 A β 寡聚体的形成。图 6B. V5 结合蛋白 (V5-HRP) 检测 sDSS1 蛋白, 结果显示 sDSS1 蛋白与 A β 形成蛋白复合体。图 6C. 培养基中添加 A β 寡聚体导致细胞毒性, 从而降低细胞活力, sDSS1 蛋白可以完全屏蔽 A β 寡聚物导致的细胞毒性。图 6D. 细胞凋亡实验显示, sDSS1 蛋白降入到培养液中显著降低 A β 寡聚体导致的 SH-SY5Y 细胞的早期凋亡和晚期凋亡, 从而降低毒性蛋白对细胞的影响。图 6E. sDSS1 蛋白也可以屏蔽 A β 寡聚物对小鼠神经干细胞 (NSCs) 的毒性。数据用 t-test 双尾检验分析并用 ANOVA 分析验证。**, $p\text{-value} < 0.01$ 。

图 7. Amylin 寡聚物添加到培养基中引起细胞毒性降低细胞活力, 添加 sDSS1 蛋白能挽回细胞活力, 促进细胞存活。数据用 t-test 双尾检验分析并用 ANOVA 分析验证。**, $p\text{-value} < 0.01$ 。

图 8. $400 \mu\text{g/mL}$ 糖基化蛋白引起的细胞活力下降可以被 sDSS1 蛋白挽回, 随着 sDSS1 蛋白浓度增加 ($100 \mu\text{g/mL}$ 到 $200 \mu\text{g/mL}$) 挽回效应更加强烈。 $400 \mu\text{g/mL}$ BSA 蛋白用于对照组。数据用 t-test 双尾检验分析并用 ANOVA 分析验证。**, $p\text{-value} < 0.01$ 。

图 9A. 示意图显示在 SAMP8 小鼠的侧脑室 (Ventricle) 注射病毒的操作方法和病毒注射位点。

图 9B. 在 5 月龄早衰型小鼠 SAMP8 小鼠的大脑侧脑室中注射腺病毒后 (左右半脑各 1 μ L 病毒液), 连续观察显示动物存活情况。结果显示随着时间延长, 注射表达 sDSS1 蛋白腺病毒的小鼠术后生存率明显高于对照小鼠 (表达 GFP 蛋白)。数据用 ANOVA 分析分析。 **, p-value < 0.01。

具体实施方式

以下内容将结合实例对本发明中的优选方案进行说明和验证, 不是对本发明的范围进行限定。本发明的所有范围限定以权利要求书中的限定为准。

下述实施案例中所用的实验方法如无特殊说明, 均为常规实验方法。

下述实施案例中 sDSS1 蛋白由自己生产并检验纯度达到生物实验的水平, 其他材料和试剂均可以通过商业途径获取。

实施例 1、sDSS1 蛋白是一种灵长目动物具有的分泌型蛋白

生物信息学分析工具:

美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 基因组数据库; Nucleotide blast tool (NCBI); Align sequences nucleotide blast tool (NCBI), Translate tool (SIB Bioinformatics Resource Portal); Clustal X2.1: Multiple Sequence Alignment (EMBL-EBI); SecretomeP 2.0 (CBS prediction service); WoLF PSORT II。

生物实验方法:

1. 细胞培养 293T 细胞购自美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC), 细胞培养在含有 90% 基础培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) (Life technology 公司 C#12500062) 和 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) (Gibco 公司 C#10100-147) 的细胞培养基中, 放在在细胞培养箱 (温度 37°C, 湿度 95%, CO₂ 浓度 5%) 中培养, 每两天传代一次。

2. 细胞转染 293T 细胞按照 3×10^5 每孔接种到 6 孔板中, 添加 1.5mL 细胞培养基, 细胞贴壁 12 小时后开始转染质粒。采用真核表达质粒 pCMV-C-Flag, 插入的表达 sDSS1 蛋白核酸序列如参见 SEQ ID NO: 17 所示。质粒 2500ng 用 750 μ L Opti-MEM Medium (Life technology 公司 C#31985062) 稀释并混匀, 10 μ L 转染试剂 Lip2000 (Invitrogen 公司 C#12566014) 用 750 μ L Opti-MEM Medium 稀释并混匀, 将稀释的质粒溶液逐滴滴入稀释的转染试剂中, 混匀后常温孵育 5 分钟。吸去 6 孔板中的细胞培养基, 用 PBS 清洗细胞一遍, 然后换成孵育好的转染工作液。细胞继续放在培养箱中培养, 在 24 至 48 小时期间观察细胞中荧光蛋白表达。

3. 点膜蛋白免疫印迹实验 PVDF 膜用甲醇活化后干燥, 分别把对照培养基和不同转染细胞培养基滴加到膜上。等待膜干燥后, PVDF 膜依次完成 1%BSA 封闭、第一级抗体 (Rabbit-anti-GFP) (Cell signal technology 公司 C#2956) 孵育, 第二级抗体 (Goat-anti-rabbit HRP 抗体) (中杉金桥, ZDR-5403) 孵育。膜用 PBST 清洗三次, 用发光液 (中杉金桥, ZLI-9017) 显影并用 X 光胶片曝光条带。

结果分析:

在对人基因组中 shfm1 基因进行生物信息学分析时, 我们发现该基因有多条转录本 (参考 NCBI 数据库中 shfm1 基因信息, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7979>)。除了共同编码 DSS1 蛋白序列的一条 mRNA 序列 (NM_006304.1, 509bp), 还有一条更长的 mRNA 序列 (AK309241.1, 1195bp)。短 mRNA 序列与长 mRNA 序列仅有 256bp 重复序列 (图 1A), 经核酸序列分析, 利用 Translate tool 得知重复序列可编码 DSS1 蛋白 N 端 58 个氨基酸序列。长 mRNA 序列编码 89 个氨基酸的多肽序列。通过多肽序列比对可知, 长 mRNA 编码的多肽序列与 DSS1 多肽序列有 N 端 58 个氨基酸的重叠区, 另有 31 个氨基酸的变异区。我们命名这条新的多肽为分泌型 DSS1 蛋白 (secretory DSS1, sDSS1), 多肽序列如下面所示:

DSS1 (Homo sapiens):

MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDDDNVEDDFSQNLRAELEKHG
YKMETS (参见 SEQ ID NO: 4)

s-DSS1 (Homo sapiens):

**MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDDDNVEDDFSQQLRATVLLMI
LVCETPYGCVLHQKGRMCSAFLCC** (参见 SEQ ID NO: 1)

通过对 NCBI 数据库中已测序的灵长目动物基因组和其他模式动物基因组的筛查, 我们发现只有在类人猿亚目动物的基因组中存在类似的长 mRNA 序列并且得到与人源 sDSS1 蛋白相似的多肽序列, 如表 1 所示。这些多肽序列比对结果显示, sDSS1 蛋白序列高度保守, N 端 59 个氨基酸序列完全相同, C 端其余氨基酸序列仅有少量点突变 (图 1B)。

表 1

灵长类 (Primate)	物种	氨基酸序列
类人猿亚目 (Haplorrhini)	人 (Homo sapiens)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQQLRATVLLMILVCETPYGCVLHQKGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 1)
	黑猩猩 (Pan troglodytes)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQQLRATVLLMILVCETPYGCVLHQKGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 5)
	倭黑猩猩 (Pan paniscus)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQQLRATVLLMILVCETPYGCVLHQKGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 6)
	大猩猩 (Gorilla gorilla)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQQLRATVLLMILVCETLYGCVLHQKGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 7)
	红毛猩猩 (Pongo abelii)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQQLRATVLLMILVCETPYGCVLHQKGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 8)
	白颊长臂猿 (Nomascus leucogenys)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQQLRATVLLMVLVCETPYGCVLHQKERMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 9)
	川金丝猴 (Rhinopithecus roxellana)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQQLRATVLLMIKVYETPYGCVILHQKGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 10)
	恒河猴 (Macaca mulatta)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQQLRATVLLMIKVYETPYGCVILHQKGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 11)

东非狒狒 (<i>Papio anubis</i>)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQRLRATVLLMIKVVETPYGCYILHQGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 12)
安哥拉疣猴 (<i>Colobus angolensis</i>)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQRLRATVLLMIKVVETPYGCYILHQGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 13)
白顶白眉猴 (<i>Cercocebus atys</i>)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQRLRATVLLMIKVVETPYGCYILHQGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 14)
鬼狒 (<i>Mandrillus leucophaeus</i>)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQRLRATVLLMIKVVETPYGCYILHQGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 15)
豚尾猴 (<i>Macaca nemestrina</i>)	MSEKKQPVDLGLLEEDDEFEEFPAEDWAGLDEDEDAHVWEDNWDD DNVEDDFSQRLRATVLLMIKVVETPYGCYILHQGRMCSAFLCC (参见 SEQ ID NO: 16)

利用两种分泌蛋白分析预测软件 **Wolf PSORT** 和 **SecretomeP 2.0** 分析 **sDSS1** 蛋白氨基酸序列, 预测结果显示 **sDSS1** 蛋白定位于细胞外, 与多种已鉴定的分泌型蛋白相似, 被预测是一种分泌蛋白 (表 2)。其中, 根据 **Wolf PSORT** 软件的分析结果, **sDSS1** 蛋白的信号肽剪切位点 (Cleavage site) 位于 58-59 位氨基酸之间。

表 2

物种 (Species)	SecretomeP 2.0 (预测分泌蛋白阈值: 0.6)	WOLF PSORT (相似特征的分泌蛋白数量)	预测蛋白的细胞定位
人 (<i>Homo sapiens</i>)	0.85	28	细胞外
黑猩猩 (<i>Pan troglodytes</i>)	0.85	28	细胞外
倭黑猩猩 (<i>Pan paniscus</i>)	0.85	28	细胞外
白颊长臂猿 (<i>Nomascus leucogenys</i>)	0.85	27	细胞外
大猩猩 (<i>Gorilla gorilla</i>)	0.752	23	细胞外

红毛猩猩 (<i>Pongo abelii</i>)	0.86	27	细胞外
川金丝猴 (<i>Rhinopithecus roxellana</i>)	0.836	29	细胞外
恒河猴 (<i>Macaca mulatta</i>)	0.836	29	细胞外
安哥拉疣猴 (<i>Colobus angolensis</i>)	0.823	28	细胞外
白顶白眉猴(<i>Cercocebus atys</i>)	0.836	29	细胞外
鬼狒(<i>Mandrillus leucophaeus</i>)	0.836	29	细胞外
豚尾猴(<i>Macaca nemestrina</i>)	0.836	29	细胞外
东非狒狒 (<i>Papio anubis</i>)	0.836	29	细胞外

根据生物信息学分析结果,分别把该蛋白全序列或C端31个氨基酸序列(58位氨基酸之后的31个氨基酸序列)与绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)连接并表达至293T细胞中(sDSS1-GFP, sDSS1-c-GFP),结果可以观察到溶液中出现绿色荧光,背景发光,细胞内荧光模糊暗淡;而对照组(GFP)溶液中没有荧光,背景很暗,细胞内荧光清晰明亮(图2A)。用点膜免疫印迹方法检测细胞培养基,发现在sDSS1-GFP和sDSS1-c-GFP组的细胞培养基中检测到GFP信号,在对照组(GFP)中没有检测到信号(图2B)。总结这些结果,说明sDSS1蛋白是一类分泌蛋白,可以在细胞内合成并被分泌到细胞外,sDSS1蛋白的C端31个氨基酸序列发挥了信号肽的功能。

实施例2、sDSS1蛋白是一类天然蛋白质

1. 人血清和脑脊液样品处理。收集新鲜的人全血,室温静置10-20分钟后,3500g离心30分钟,取上清即为人血清。向血清中加入100mM β 巯基乙醇,混匀后沸水浴处理10分钟,冷却后12000g高速离心10分钟,取上清与1/5体积的5x上样缓冲液混合。从医院得到新鲜脑脊液放置于冰盒中运输,当天处理。新鲜脑脊液直接与5x loading buffer混合后直接制成样品用于上样。

2. 蛋白免疫印迹实验 (western blotting) 15 μ L 制备的上样样品加入上样孔, 4-12%预制胶 (Life technology 公司 G#NP0321BOX) 分离蛋白后转移到 PVDF 膜上。膜依次经过第一级抗体 (Rabbit-anti-sDSS1) (抗原序列: sDSS1 蛋白的 C 端 31 个氨基酸序列) 孵育, PBST 溶液清洗三遍; 第二级抗体 (Goat-anti-rabbit HRP 抗体) 孵育。用 PBST 清洗三遍, 完成后用发光液显影并用 X 光片显示条带。

3. 细胞培养 人脑胶质瘤细胞 (U87-MG 细胞) 购自 ATCC, 细胞培养在含有 90% 基础培养基 DMEM 和 10% 胎牛血清 FBS 的完全细胞培养基中, 放在在细胞培养箱 (温度 37°C, 湿度 95%, CO₂ 浓度 5%) 中培养, 每两天传代一次。

4. PCR 实验 收集 U87-MG 细胞后迅速裂解细胞, 用一个总 RNA 提取试剂盒 (QIAGEN, 51304) 从细胞裂解液中提取总 RNA, RNA 样品继续用 1U/ μ L DNase I 在室温处理 15 分钟除去残余的基因组 DNA。获得的 RNA 样品用一个 cDNA 合成试剂盒 (全式金生物技术有限公司, AT301) 全部转化合成为 cDNA 并被用作模板样本进行后续 PCR 实验。PCR 反应采用 20 μ L 反应体系, 其中包括 10 μ L PCR 预混试剂 (PCR Taq Mixture) (Omega bio-tek, TQ2200), 0.5 μ L cDNA 模板 (3.5 μ g/mL), 0.5 μ L 引物, 9 μ L 超纯水, 混匀后开始 PCR 反应。DSS1 cDNA 引物: 前向引物: GCAGACAGTCGAGATGTCAGAG, 反向引物: TTCTTCTGGATGCTATGAAGTCTCC; sDSS1 cDNA 引物: 前向引物: GCAGACAGTCGAGATGTCAGAG, 反向引物: TGATGATCTGTAAACAGCAGAGG。PCR 反应程序: 94°C 10 分钟, 开始循环反应 40 次: 包括 94°C 10s、62°C 20s、72°C 20s, 循环结束后继续 72°C 10 分钟然后在 4°C 保存并用 3% 琼脂糖凝胶 [0.05% SYBR Green Stain (Thermo Fisher, 4472903)] 电泳检测 PCR 产物中的 DNA 含量。

结果分析:

利用 sDSS1 特异性抗体, 可以在人脑脊液或血清中检测到 sDSS1 蛋白的信号, 不同个体来源的血清样本表现出不同的信号模式, 运动之后的个体血清中 sDSS1 信号明显高于静息状态下的个体 (图 3A)。在 U87-MG 细胞内, 可以检测到 sDSS1 基因的 mRNA 信号, PCR 扩增产物的基因测序结果与数据库的序列完全相同 (图 3B)。这些结果说明, sDSS1 蛋白是一种天然蛋白质, 存在于人脑脊液和血清。

实施例 3、sDSS1 蛋白的少量制备

实验方法

1. sDSS1 蛋白制备：全基因合成编码人 sDSS1 蛋白的核苷酸片段（参见 SEQ ID NO: 17），插入到 pET151D 中 Hisx6-V5 标签后面。然后将质粒转入表达菌株 BL21 (DE3) 中。大肠杆菌中融合表达 Hisx6-V5-sDSS1 蛋白，利用镍-NTA 凝胶柱进行初步纯化，然后利用 SDS-PAGE 进行切胶纯化。将切出的含有 His-V5-sDSS1 蛋白的胶条装入含有转膜液的透析袋中，在电场的驱动下，蛋白从凝胶中移出，收集在透析袋中。浓缩蛋白至 500 微升左右，在 PBS 溶液中 4 度透析 4 次，每次 200 毫升。

2. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 纯化制备的 sDSS1 蛋白或细菌裂解液蛋白与 5x 上样缓冲液混合后，沸水浴处理 10 分钟，12000g 高速离心 10 分钟，取上清液用于分析。用 4-12% 预制胶分离蛋白后，考马斯亮蓝染液染色胶块 1 小时，然后用脱色液室温下脱色过夜。脱色完成后，观察胶块上的条带并拍照保存。

结果分析：

挑选阳性克隆的大肠杆菌菌株，扩大培养，在细菌生长的对数期开始用 IPTG 刺激细菌细胞表达目的蛋白。裂解细菌，检测目的蛋白的表达水平，结果显示 IPTG 刺激后，细菌细胞表达 sDSS1 蛋白的水平显著上升，在胶图上可以看到明显的蛋白条带（图 4A）。细菌裂解液经过镍-NTA 凝胶柱初步纯化之后，浓缩液中目的蛋白得到极大的浓缩（b 通道），杂蛋白含量减少；继续纯化可以得到纯度极高的 sDSS1 蛋白（a 通道）（图 4B），可以用于后续的生物实验。纯化之后的 sDSS1 蛋白经 BCA 蛋白定量，终浓度为 0.72mg/ml，4 度保存备用。

实施例 4、sDSS1 蛋白与氧化蛋白反应并屏蔽氧化蛋白的细胞毒性

实验方法

1. 氧化血清与 sDSS1 蛋白反应 新鲜人血液经 3500g 离心 30 分钟，取上层血清用于后续实验。实验中对 10 μ L sDSS1 蛋白溶液 (0.72mg/mL) 中分别与 10, 20, 50 和 100 微升氧化血清混合，sDSS1 与血清蛋白质量比大概为 1: 100, 1: 200, 1: 500, 1: 1000，另外添加 20 μ M Fenton 试剂 (FeSO₄ 和 H₂O₂ 按照 1: 1 的质量比混合)，混合均匀后放在 4°C 避光孵育过夜。第二天，用 10 微升 Ni-NTA 磁珠，将各反应中的 His-V5-sDSS1 分离出来。反应液与磁珠 4 度混合 2 小时，用磁力架将磁珠吸附在管壁上，吸走液体，加入 1ml PBST，将管子从磁力架上

取下,反复震荡洗涤后,磁力架吸附磁珠,吸走 PBST,如此反复 4 次,最后用 50 微升含 50mM EDTA 的 TBS 洗脱蛋白,洗脱液加入等体积 2x SDS 溶液,100°C 处理 10 分钟,12000g 离心 10 分钟,取上清液用于检测。上清液与 5X 上样缓冲液混合,100°C 加热处理 10 分钟,制备的样品用于蛋白质免疫印迹实验。

2. 氧化胎牛血清和晚期氧化蛋白制备 10mL 胎牛血清加入 10mM NaClO 处理 1 小时,氧化的血清用 3000Da 透析袋在 PBS 溶液中连续透析 24 小时,透析期间每隔 8 小时换液一次,处理完成的血清溶液中加入 1mM 维生素 C (Vc) 以彻底清除参与的氧化剂。BCA 蛋白定量方法检测蛋白浓度。利用两种方法检测氧化蛋白的含量,氯胺 T 方法测量氧化血清中双酪氨酸值为 75.31 $\mu\text{M}/\text{mg}$ 蛋白(未处理血清为 15.05 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白),二硝基苯肼法检测羰基含量为 16.33nmol/mg 蛋白(未处理血清为 13.68 nmol/mg 蛋白)。

10mg 血清白蛋白首先用 160mM NaClO 处理 1 小时,氧化蛋白用 3000Da 透析袋在 PBS 溶液中连续透析 24 小时,透析期间每隔 8 小时换液一次。处理完成的晚期氧化蛋白(AOPP)首先用 BCA 蛋白定量方法测定蛋白浓度。氯胺 T 方法测 AOPP 样品中双酪氨酸值为 54.21 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白(未处理的 BSA 为 14.55 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白),二硝基苯肼法检测羰基含量为 1042.57nmol/mg 蛋白(未处理的 BSA 为 10.26 nmol/mg 蛋白)。

3. 晚期氧化蛋白与 sDSS1 蛋白反应 在 150 μL 反应体系中加入 30 μg AOPP 蛋白(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$),另外分别加入 15 μg (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、30 μg (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、60 μg (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sDSS1 蛋白,用无菌 PBS 溶液补充多余的体积。溶液混匀后在 4°C 环境下反应过夜。反应完成后的样品中加入 5x 上样缓冲液,100°C 加热处理 10 分钟,处理好的样品用 SDS-PAGE 分离并用考马斯亮蓝染色显示条带。

4. 蛋白免疫印迹实验 反应完成的蛋白混合物与 5x loading buffer 混合后,沸水浴 10 分钟并用于 western blotting 分析。具体方法与前述相同。所用的抗体为 V5-HRP 抗体(1:5000 稀释)。

5. 细胞系培养 人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)生长于基础培养基 DMEM 添加 10%胎牛血清;细胞每两天传代一次。

6. 细胞活力检测 为了检测 sDSS1 蛋白对氧化血清的细胞毒性的效应,SH-SY5Y 细胞按照 10^4 细胞每孔接种到 96 孔板中,200 μL 完全培养基。12 小时

后，完全培养基换成含 0.5%BSA 的无血清 DMEM 每孔 200 μ L。继续处理 24 小时后，DMEM 溶液换成 10%氧化血清和含有 20 μ g/mL sDSS1 蛋白的 10%氧化血清的培养基，每孔 200 μ L。继续处理 48 小时后，弃去 96 孔板中旧培养基，每孔加入 100 μ L 稀释的 CCK-8 工作液（1: 20 稀释）（同仁化学，CK04）检测细胞活力变化。加入等浓度 BSA 组用于对照组。

为了检测 sDSS1 蛋白对 AOPP 引起的细胞毒性的保护效应，SH-SY5Y 细胞按照 2×10^4 细胞每孔接种到 96 孔板中，12 小时贴壁后，培养基换成含有 0.5%BSA 的无血清培养基。继续处理 24 小时后，换成含有 100 μ g/mL AOPP 蛋白的无血清培养基，处理组同时加入 100 μ g/mL sDSS1 蛋白，每孔 200 μ L。96 孔板继续处理 48 小时后，用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力变化。

结果分析：

血清中含有大量蛋白，主要是血清白蛋白。在 Fenton 试剂的作用下，血清中的蛋白被氧化，氧化产物可与 sDSS1 发生反应形成复合体。在对照组，可以看到 sDSS1 蛋白单体，没有发生明显的蛋白聚集；在实验组，与血清共同孵育导致大量高分子量蛋白复合体形成，这些复合体不能被 SDS-PAGE 分开（图 5A）。结果说明，sDSS1 蛋白可以与血清中氧化蛋白结合。在细胞毒性实验中，与对照血清相比，加入 10%氧化蛋白可以明显抑制细胞增殖和细胞活力，培养基中包含 20 μ g/mL sDSS1 蛋白就可以挽回氧化蛋白的细胞毒性（图 5B）。

继续把 sDSS1 与 AOPP 蛋白混合，可以看到 sDSS1 与 AOPP 蛋白结合形成复合体，这些复合体不能被 SDS-PAGE 分开。随着反应体系中 sDSS1 蛋白浓度增加，复合体明显增多（图 5C）。在细胞实验中，AOPP 对细胞造成显著的细胞毒性，降低细胞活力，而等浓度的 sDSS1 可以完全屏蔽 AOPP 的细胞毒性（图 5D）。综合以上结果，sDSS1 能保护细胞不受氧化血清或 AOPP 的细胞毒性的影响。

另外，总结 sDSS1 蛋白有氧化蛋白的反应，两种蛋白都能够和氧化蛋白发生紧密结合，这种结合力可以抵抗高浓度的 SDS，疑似为共价相互作用。不同之处在于 DSS1 与氧化蛋白结合的过程需要一个 ATP 酶的协助[Zhang *et al*, 2014]，而我们的证据显示 sDSS1 与氧化蛋白发生紧密结合不需要添加 ATP，即不需要 ATP 酶的参与。比较 DSS1 和 sDSS1 的氨基酸序列可知，两种蛋白 1 到 58 位的氨基酸序列完全相同，而 DSS1 的 59 到 70 位的氨基酸序列和 sDSS1 的 59 到 89 位

的氨基酸序列完全不同。因而推断 DSS1 与 sDSS1 与氧化蛋白发生紧密结合的特性, 应该是源于共享氨基酸序列的贡献, 亦即前 58 氨基酸序列。sDSS1 异于 DSS1 的特性, 亦即不依赖 ATP 酶介导与氧化蛋白发生紧密结合的特性, 应该源于 sDSS1 独特的氨基酸序列, 亦即 59 到 89 位的 C 端氨基酸序列。总而言之, sDSS1 这种不依赖于 ATP 酶介导就能与氧化蛋白发生紧密结合的特性来源于前 58 个氨基酸序列和后 31 个氨基酸序列的有机组合。

实施例 5、sDSS1 蛋白降低 A β 寡聚物形成并降低 A β 寡聚物的细胞毒性

实验方法

1. 细胞系培养 人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 生长于基础培养基 DMEM 添加 10% 胎牛血清; 细胞每两天传代一次。

2. 神经干细胞培养 神经干细胞 (neural stem cell, NSC) 来自 P2 小鼠脑组织, 原代悬浮培养的神经干细胞经过两次传代后用于毒性检测实验, 神经干细胞培养于干细胞培养基中, 包含 88% DMEM/F12 基础培养基 (Gibco, C#12500-062), 10% Proliferation supplementary 添加物 (Stem cell technology, C#05701), 2% BSA (Sigma, C#V900933), 10ng/mL Heparin (Sigma, C#H3149), 10ng/mL bFGF (Roche, C#11104616001), 20ng/mL EGF (BD Bioscience, C#354010)。

3. A β 与 sDSS1 蛋白反应 A β 蛋白 (Human, 1-42) 冻干粉由苏州强耀生物科技有限公司提供。2mg A β 冻干粉用 20 μ L DMSO 溶解, 继续用 PBS 稀释为 2mg/mL。-20 度冷冻保存。反应体系中首先加入 300 μ L PBS 溶液中 10 μ g A β 与 sDSS1 蛋白按摩尔质量比 1: 1, 1: 5, 1: 10 混合, 混合后放在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。孵育完成的反应物中加入 5X 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 处理 10 分钟用于蛋白免疫印迹分析。

4. A β 蛋白预处理 A β 用基础培养基 (pH7.2) 稀释 A β 储液至 1000 μ g/mL, A β 稀释液放在 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 小时后形成的寡聚物用于细胞实验。后续实验中 A β 的浓度始终按孵育前的蛋白浓度来标注。

5. 蛋白免疫印迹实验 处理好的反应物用 SDS-PAGE 分离, 继续用于 western blotting 分析, 具体方法与前述相同。所用的抗体为 V5-HRP 抗体 (1: 5000 稀

释), A β 抗体 (Cell signal technology, 9888), 二抗 (Goat-anti-rabbit HRP 抗体)。

6. 细胞活性检测 SH-SY5Y 细胞按照 2×10^4 细胞每孔接种到 96 孔板中, 贴壁 12 小时后, 将旧培养基换成含有 0.5%BSA 的无血清培养基, 继续处理 24 小时后。弃去旧培养基后换成包含 A β 或 A β 与 sDSS1 蛋白的 DMEM 溶液。细胞继续处理 48 小时后, 用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力水平。

7. 细胞凋亡检测 细胞凋亡检测试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司 (AD10)。SH-SY5Y 细胞按照 3×10^5 细胞每孔接种到 6 孔板中, 贴壁 12 小时后将旧培养基换成含 0.5%BSA 的无血清 DMEM 溶液, 继续处理 24 小时后换成包含 A β 或 A β 与 sDSS1 蛋白的溶液。继续处理 48 小时后, 用凋亡试剂盒检测细胞凋亡水平。收集所有溶液和细胞, 离心弃去上清。用 400 μ L 凋亡试剂盒提供的染色缓冲液重悬细胞, 吸取其中的 185 μ L 细胞悬液用于后续检测。在细胞悬液中加入 5 μ L Annexin V 染色液后混匀, 细胞放在 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟。继续加入 10 μ L PI 染液, 混匀后用流式细胞仪检测细胞凋亡水平。

神经干细胞首先贴壁培养于 6 孔板中, 孔板首先用 0.025%Laminin 处理至少两个小时, 然后用无菌 PBS 清洗 6 遍备用。神经干细胞制成单细胞后, 按照 3×10^5 每孔接种到 6 孔板中, 细胞贴壁 24h 后用于后续实验。

结果分析

经过孵育, A β 蛋白发生明显的聚集, 在 10-20KD 之间形成大小不一的蛋白聚集体。根据文献报道, 这些 A β 寡聚体是 A β 导致的细胞毒性的主要来源。加入 sDSS1 蛋白与 A β 共同孵育之后, sDSS1 蛋白可以与 A β 蛋白聚集形成大分子量的复合体 (分子量高于 20KD), 10-20KD 之间形成的寡聚体明显减少 (图 6A)。随着 sDSS1 蛋白浓度增加, A β 寡聚物生成被明显抑制。检测 sDSS1 蛋白信号时, 可以确定复合体是 sDSS1 蛋白与 A β 反应形成的 (图 6B), 并且不能被 SDS-PAGE 打开。

继续检测 sDSS1 蛋白对 A β 引起的细胞毒性的屏蔽效应。在细胞活力检测实验中, 添加预处理的 A β 寡聚物之后, 细胞活力显著下降。在培养液中加入 sDSS1 蛋白后, SH-SY5Y 细胞活力得到显著的恢复并且细胞活力高于对照组 (图 6C)。在细胞凋亡检测实验中, A β 寡聚物加入培养液后诱导 SH-SY5Y 细胞或神经干细

胞的细胞凋亡，在培养液中添加 sDSS1 蛋白可以显著降低细胞的早期凋亡和晚期凋亡水平（图 6D, 图 6E）。根据以上结果，sDSS1 蛋白可以与 A β 蛋白结合降低 A β 寡聚物形成，从而缓解 A β 蛋白引起的细胞毒性。

实施例 6、sDSS1 蛋白降低 amylin 寡聚物的细胞毒性

实验方法

1. 细胞系培养 人神经母细胞瘤细胞（SH-SY5Y）生长于基础培养基 DMEM 添加 10%胎牛血清；细胞每两天传代一次。

2. amylin 蛋白预处理 amylin 蛋白（Human）冻干粉由苏州强耀生物科技有限公司提供。2mg amylin 冻干粉用 10mM 醋酸钠溶液（pH5.5）溶解为 2mg/mL，-20 度冷冻保存。用基础培养基（pH7.2）稀释 amylin 储液至 1mg/mL，amylin 稀释液放在 4℃孵育 48 小时后形成的寡聚物用于细胞实验。后续实验中 amylin 的浓度始终按孵育前的蛋白浓度来标注。

3. 细胞活性检测 SH-SY5Y 细胞按照 2×10^4 细胞每孔接种到 96 孔板中，贴壁 12 小时后，将旧培养基换成含有 0.5%BSA 的无血清培养基，继续处理 24 小时后。弃去旧培养基后换成包含 amylin 或 amylin 与 sDSS1 蛋白的 DMEM 溶液。细胞继续处理 48 小时后，用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力水平。

结果分析

在细胞培养液中加入 10 μ M 孵育的 amylin 蛋白可以引起显著的细胞毒性，同时加入 sDSS1 蛋白可以屏蔽 amylin 寡聚物引起的细胞毒性，细胞活力甚至高于对照组（图 7），说明 sDSS1 蛋白可以有效屏蔽 amylin 蛋白的细胞毒性。

实施例 7、sDSS1 蛋白降低糖基化蛋白的细胞毒性

实验方法

1. 细胞系培养 人神经母细胞瘤细胞（SH-SY5Y）生长于基础培养基 DMEM 添加 10%胎牛血清；细胞每两天传代一次。

2. 糖基化蛋白制备 10mg/mL 血清白蛋白与 2.5M 核糖混合后在 37℃环境下连续孵育 7 天，完成后用 3000Da 的透析袋在 PBS 中透析 24 小时，每隔 8 小时换液一次。糖基化蛋白制作完成后，BCA 蛋白定量，样品放在 -80℃保存备用。

3. 细胞活性检测 SH-SY5Y 细胞按照 2×10^4 细胞每孔接种到 96 孔板中, 贴壁 12 小时后, 将旧培养基换成含有 0.5%BSA 的无血清培养基, 继续处理 24 小时后。弃去旧培养基后换成含糖基化蛋白或糖基化蛋白与不同浓度 sDSS1 蛋白的 DMEM 溶液, 加入等浓度 BSA 组用于对照。细胞继续处理 48 小时后, 用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力水平。

结果分析

在细胞培养液中加入 $400 \mu\text{g/mL}$ 糖基化蛋白可以引起显著的细胞毒性, 同时加入 sDSS1 蛋白可以降低糖基化蛋白引起的细胞毒性, 随着 sDSS1 蛋白浓度的提高, 细胞活力甚至高于对照组 (图 8), 说明 sDSS1 蛋白可以有效屏蔽糖基化蛋白的细胞毒性。

实施例 8、sDSS1 蛋白延长早衰型小鼠 SAMP 术后生存期

实验方法

1. 动物饲养 早衰型 SAMP8 小鼠 (5 月龄, 雄性) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物饲养在南方模式动物中心的洁净级实验动物饲养中心。给动物提供充足的无菌水和标准小鼠繁育饲料, 12h/12h 明暗交替光照, 每月定期更换垫料和鼠笼, 每天定期观察动物存活情况。

2. 腺病毒合成 表达 sDSS1 蛋白的腺病毒由我们 (发明人) 提供核酸序列 (参见 SEQ ID NO: 17), 腺病毒构建和合成由赛业 (广州) 生物科技有限公司完成。腺病毒启动区和转录区序列构成: pAV[Exp]-UBC>EGFP:T2A:ORF_363bp, 含泛素蛋白启动子序列。经测定, 病毒滴度大于 10^{10} PFU/mL。经感染 U87-MG 细胞和小鼠神经母细胞瘤细胞 (N2a) 验证, 腺病毒可以高效率感染细胞并表达 sDSS1 蛋白。表达 GFP 蛋白的腺病毒 (pAV[Exp]-UBC>EGFP) 作为对照。

3. 脑立体定位注射 早衰型 SAMP8 小鼠 (6 月龄, 雄性) 按照 800mg/kg 体重腹腔注射 20%乌拉坦 (溶解在生理盐水中, $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤除杂质和除菌) 麻醉。小鼠麻醉后, 固定到小鼠脑立体定位仪 (Stoelting, 51500) 上, 保持颅骨水平。切开头部皮肤, 暴露颅骨, 以前囟 (Bregma) 为坐标起点, 定位侧脑室区域 (0.58mm , 1.25mm , 1.75mm), 用牙科钻在标记点打孔。在微量注射器 (Hamilton 600- $2.5 \mu\text{L}$, 针头直径 0.2mm) 中吸去 $2 \mu\text{L}$ 病毒液, 按照相同坐标数值重新定位侧脑室区域。按照指定坐标值快速进针到侧脑室区域, 平均

200nL/min 缓慢注射病毒液，总计 1000nL。注射完成后，每提针 0.25mm，等待 3 分钟直至针头完全拔出脑组织。重新定位另一侧侧脑室区域，完成进针、注射和提针步骤，注射 1 μ L 病毒液。注射完成的小鼠，首先用 100U/mL 的氨苄青霉素/链霉素擦拭颅骨及周边组织，再用缝合线缝合皮肤。给小鼠腹腔注射 150 μ L 抗生素并腹部朝上放置到鼠笼中，直至小鼠苏醒。

结果分析

示意图指示小鼠侧脑室病毒注射的基本操作和腺病毒注射位点（图 9A）。其中，注射表达 sDSS1 腺病毒小鼠共两批次，共 10 只小鼠；注射表达 GFP 腺病毒小鼠两个批次，共 14 只。注射腺病毒 1 个月内，对照组小鼠死亡 3 只，实验组小鼠死亡 1 只；8 个月内，对照组小鼠陆续出现死亡，而实验组仅仅死亡一只（图 9B）。总结结果，注射表达 sDSS1 蛋白腺病毒 SAMP8 小鼠的术后生存期显著长于仅仅注射对照病毒的小鼠，ANOVA 分析二者呈现显著差异（ P -value < 0.01）。

上文所列出的一系列的详细说明仅仅是针对本发明的可行性实施例的具体说明，它们并非用以限制本发明的保护范围，凡未脱离本发明精神所作的等效实施例或变更均应包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 上海清流生物医药科技有限公司

<120> 一种新型天然蛋白及其应用

<130> 2016

<160> 17

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
50 55 60

Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys

$\langle 210 \rangle$	2
$\langle 211 \rangle$	31
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	人工序列

 $\langle 400 \rangle$ 2

Thr Val Leu Leu Met Ile Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr
1 5 10 15

Val Leu His Gln Lys Gly Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys

20 25 30

$\langle 210 \rangle$	3
$\langle 211 \rangle$	58
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	人工序列

<400> 3

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu

20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala
50 55

<210> 4

<211> 70

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Glu Leu Glu Lys His Gly
50 55 60

Tyr Lys Met Glu Thr Ser
65 70

<210> 5

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
50 55 60

Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
85

<210> 6

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
50 55 60

Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
85

<210> 7

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Val Thr Val Leu Leu Met Ile
50 55 60

Leu Val Cys Glu Thr Leu Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
85

<210> 8
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 8

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Ile Leu Leu Met Ile
50 55 60

Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
85

<210> 9

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Val
50 55 60

Leu Val Cys Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Val Leu His Gln Lys Glu
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
85

<210> 10

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
50 55 60

Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly

65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys

85

<210> 11

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 11

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp

1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu

20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val

35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile

50 55 60

Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly

65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys

85

<210> 12

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 12

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
50 55 60

Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
85

<210> 13

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 13

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Lys
50 55 60

Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
85

<210> 14

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 14

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp

1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
 20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
 35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
 50 55 60

Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
 85

<210> 15

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 15

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
 20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
50 55 60

Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
85

<210> 16

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 16

Met Ser Glu Lys Lys Gln Pro Val Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Asp
1 5 10 15

Asp Glu Phe Glu Glu Phe Pro Ala Glu Asp Trp Ala Gly Leu Asp Glu
20 25 30

Asp Glu Asp Ala His Val Trp Glu Asp Asn Trp Asp Asp Asp Asn Val
35 40 45

Glu Asp Asp Phe Ser Asn Gln Leu Arg Ala Thr Val Leu Leu Met Ile
50 55 60

Lys Val Tyr Glu Thr Pro Tyr Gly Cys Tyr Ile Leu His Gln Lys Gly
65 70 75 80

Arg Met Cys Ser Ala Phe Leu Cys Cys
85

<210> 17
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 17
atgagccacc accaccacca ccacgccggc gactacaagg acgacgacga caagggcagc
60

gactacaagg acgacgacga caagggcagc atgagcgaga agaagcagcc cgtggacctg
120

ggcctgctgg aggaggacga cgagttcgag gagtccccg ccgaggactg ggccggcctg
180

gacgaggacg aggacgcca cgtgtgggag gacaactggg acgacgaaa cgtggaggac
240

gattcagea accagctgcg cgccaccgtg ctgctgatga tccctggtgtg cgagaccccc

300

tacggctgct acgtgctgca ccagaagggc cgcatgtgca ggccttcct gtgctgctaa

360

taa

363

权利要求书

1. 一种新型天然蛋白 sDSS1, 其特征在于, 包括人在内的类人猿亚目动物存在天然蛋白 sDSS1, 其中人源天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1。

2. 根据权利要求 1 所述的新型天然蛋白 sDSS1, 其特征在于, 所述类人猿亚目动物还包括黑猩猩、倭黑猩猩、大猩猩、红毛猩猩、白颊长臂猿、川金丝猴、恒河猴、东非狒狒、安哥拉疣猴、白顶白眉猴、鬼狒、豚尾猴; 其中黑猩猩的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5, 倭黑猩猩的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6, 大猩猩的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7, 红毛猩猩的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8, 白颊长臂猿的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9, 川金丝猴的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10, 恒河猴的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11, 东非狒狒的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12, 安哥拉疣猴的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13, 白顶白眉猴的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14, 鬼狒的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15, 豚尾猴的天然蛋白 sDSS1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16。

3. 根据权利要求 2 所述的新型天然蛋白 sDSS1, 其特征在于, 所述天然蛋白 sDSS1 分为 N 端 58 个氨基酸序列和 C 端 31 个氨基酸序列, 其中人源 sDSS1 蛋白 N 端 58 个氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3, 人源 sDSS1 蛋白 C 端的 31 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2; 两段序列的特征分别在于, N 端 58 个氨基酸序列包含 3 个或 3 个以上连续排列的酸性氨基酸序列, 每个连续排列的酸性氨基酸序列片段包含的酸性氨基酸数目不高于 10 个, 不同的连续排列的酸性氨基酸序列之间的间隔长度不超过 4 个氨基酸, 每个这样的间隔中存在至少一个疏水氨基酸, pH 值不高于 4.5, N 端 58 个氨基酸组成的序列酸性氨基酸数量不低于 10 个; 以 N 端 58 个氨基酸序列为基础的第 58 位氨基酸以后的 C 端氨基酸序列, 总体偏疏水性, C 端 31 个氨基酸组成的氨基酸序列中疏水氨基酸数量不低于 10 个;

氨基酸分类的界定如下:

疏水氨基酸: 丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸, 甲硫氨酸、色氨酸、酪氨酸;

中性氨基酸: 苏氨酸、甘氨酸, 丝氨酸、组氨酸、谷氨酰胺;

酸性氨基酸：谷氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、天冬酰胺。

碱性氨基酸：精氨酸，赖氨酸。

4. 根据权利要求 1-3 任一所述的新型天然蛋白 sDSS1，其特征在于，类人猿亚目动物的 sDSS1 蛋白包含的 C 端氨基酸通式为：

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ ；

X1 为中性氨基酸；X2 为疏水氨基酸；X3，X4 分别为疏水氨基酸；X5 为疏水氨基酸；X6 为疏水氨基酸；X7 为疏水氨基酸；X8 为疏水氨基酸；X9 为疏水氨基酸；X10 为酸性氨基酸；X11 为中性氨基酸；X12 为疏水氨基酸；X13 为疏水氨基酸；X14 为中性氨基酸；X15 为疏水氨基酸；X16 为疏水氨基酸；X17 为疏水氨基酸；X18 为疏水氨基酸；X19 为碱性氨基酸；X20 为酸性氨基酸；X21 为碱性氨基酸；X22 为中性氨基酸；X23 为碱性氨基酸；X24 为疏水氨基酸；X25 为疏水氨基酸；X26 为中性氨基酸；X27 为疏水氨基酸；X28 为疏水氨基酸；X29 为疏水氨基酸；X30 为疏水氨基酸；X31 为疏水氨基酸；

与 C 端 31 个氨基酸序列中有 40%或 40%以上同源性氨基酸序列，该序列与人源 sDSS1 蛋白 C 端的氨基酸序列在多肽中的性质和发挥的功能相同或相似。

5. 一种多肽序列，其特征在于，以权利要求 1-4 任一所述的新型天然蛋白 sDSS1 的 N 端 58 个氨基酸序列和 C 端 31 个氨基酸序列为基础构建的多肽序列，其是：

1) 该多肽序列的 N 端 58 个氨基酸组成的序列有 40%或 40%以上相似性，C 端氨基酸序列有 40%或 40%以上相似性的蛋白，该蛋白与人源天然蛋白的性质和功能相同或相似；或者，

2) 以人源天然蛋白中多肽序列的 N 端 58 个氨基酸组成的序列，或以其 40%或 40%以上相似序列为基础，在 C 端或 N 端融合其他氨基酸序列，用于融合的氨基酸序列能实现与人源天然蛋白中 C 端 31 个氨基酸序列相同或相似的性质并且发挥相同或相似的功能，修饰后的蛋白能发挥与人源天然蛋白 sDSS1 相同或相似功能的蛋白；或者，

3) 用权利要求 4 中所述的新型天然蛋白 sDSS1 中的 C 端多肽序列融合其他天然或非天然多肽序列得到的蛋白。

6. 一种融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白包括权利要求 1-4 任一所述的新型天然蛋白 sDSS1 的完整序列或部分序列和权利要求 5 所述的多肽序列。

7. 根据权利要求 6 所述的融合蛋白，其特征在于，其是与该蛋白自身、载体蛋白、抗体或其他任意氨基酸序列连接形成的蛋白复合体。

8. 一种复合体，其特征在于，所述复合体包括权利要求 1-4 任一所述的新型天然蛋白 sDSS1 的完整序列或部分序列、权利要求 5 任一所述的多肽序列、权利要求 6-7 任一所述的融合蛋白中的部分或全部复合。

9. 根据权利要求 8 所述的复合体，其特征在于，其是多肽/蛋白与医药上可应用的药物载体连接形成的复合体。

10. 根据权利要求 9 所述的复合体，其特征在于，所述载体包含微球/囊、脂质体、微乳液、纳米颗粒、磁颗粒和凝胶中的一种或一种以上。

11. 一种核苷酸序列，其特征在于，所述核苷酸序列可以编码权利要求 1-4 任一所述的蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列。

12. 根据权利要求 11 所述的核苷酸序列，其特征在于，所述核苷酸序列包括 DNA 序列和 RNA 序列。

13. 一种细胞，其特征在于，所述细胞表达权利要求 1-4 任一所述的蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列。

14. 根据权利要求 13 所述的细胞，其特征在于，所述细胞是任意一种哺乳动物的干细胞、前体细胞或成体细胞。

15. 根据权利要求 14 所述的细胞，其特征在于，所述哺乳动物是人、猩猩、猴、马、牛、羊、猪、驴、狗、兔、猫、大鼠或小鼠。

16. 根据权利要求 13 所述的细胞，其特征在于，所述细胞包括胚胎干细胞、诱导多能干细胞，或者来源于原代培养的干细胞、由母细胞分化得到的多能或单能干细胞。

17. 一种表达体系，其特征在于，其把编码权利要求 1-4 任一所述蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列的核苷酸序列导入生物体，并在生物体中表达权利要求 1-4 任一所述的蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列。

18. 根据权利要求 17 所述的表达体系, 其特征在于, 所述表达体系包括真核表达质粒载体、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、CRISPR/Cas 技术及其他可行的基因编辑技术。

19. 根据权利要求 17 所述的表达体系, 其特征在于, 所述生物体是人、猩猩、猴、马、牛、羊、猪、驴、狗、兔、猫、大鼠、小鼠、鸡、鸭或鹅。

20. 一种药物, 其特征在于, 所述药物以权利要求 1-4 任一所述蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列为主要靶点, 并在施用后可以影响机体内权利要求 1-4 任一所述蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列的表达水平。

21. 根据权利要求 20 所述的药物, 其特征在于, 所述药物是化学小分子药物、蛋白/多肽药物或核酸药物、纳米药物。

22. 根据权利要求 21 所述的药物, 其特征在于, 所述的核酸药物包括 siRNA, microRNA, 反义寡核苷酸, 三链 DNA 和核酶的一种或一种以上。

23. 一种蛋白的生产方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

S1. 表达载体构建: 将可编码权利要求 1-4 任一所述蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列的核苷酸序列插入质粒中并导入到细菌或酵母菌细胞中, 或将可编码权利要求 1-4 任一所述蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列的核苷酸序列插入昆虫细胞、哺乳动物细胞基因组中;

S2. 蛋白表达: 将 S1 中所述改造细菌、酵母菌、昆虫细胞或哺乳动物细胞进行扩大培养, 收集包含权利要求 1-4 任一所述蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列的培养液或细胞裂解物;

S3. 蛋白纯化: 将 S2 中得到的培养液或细胞裂解物经过粗过滤和纯化得到蛋白。

24. 一种蛋白的生产方法, 其特征在于, 利用化学合成技术生产权利要求 1-4 任一所述蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列。

25. 一种蛋白的生产方法, 其特征在于, 利用体外核糖体表达系统生产权利要求 1-4 任一所述蛋白或权利要求 5 所述的多肽序列。

26. 一种权利要求 1-4 任一所述的蛋白、权利要求 5 所述的多肽序列、权利要求 6 或 7 所述的融合蛋白、权利要求 8-10 任一所述的复合体、权利要求 11

或 12 所述的核苷酸序列、权利要求 13-16 任一所述的细胞、权利要求 17-19 任一所述的表达体系、权利要求 20-22 任一所述的药物在疾病诊断、预防和治疗中的应用。

27. 根据权利要求 26 所述的应用，其特征在于，所述疾病指因致病蛋白/多肽过渡生成或积累导致的疾病。

28. 根据权利要求 27 所述的应用，其特征在于，所述致病蛋白/多肽是氧化、糖基化的蛋白产物、淀粉样前体蛋白及其剪切体、胰岛淀粉样多肽及其剪切体、以及其他具备氧化蛋白、糖基化蛋白、淀粉样蛋白、胰岛淀粉样多肽相似特征的致病蛋白/多肽。

29. 根据权利要求 26 所述的应用，其特征在于，所述疾病诊断包括检测权利要求 1-4 任一所述蛋白全部或部分氨基酸序列表达水平、mRNA 水平、基因拷贝数量的一种或一种以上。

30. 根据权利要求 26 所述的应用，其特征在于，所述预防包括基因改造、核酸导入、药物注射/服用、细胞移植、组织移植中的一种或一种以上。

31. 根据权利要求 26 所述的应用，其特征在于，所述治疗包括基因改造、核酸导入、药物注射/服用、细胞移植、组织移植中的一种或一种以上。