[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99817049.6

[51] Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 9/48 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1267551C

[22] 申请日 1999.10.19 [21] 申请号 99817049.6
[86] 国际申请 PCT/IB1999/001704 1999.10.19
[87] 国际公布 WO2001/029201 英 2001.4.26
[85] 进入国家阶段日期 2002.6.19
[71] 专利权人 印度生物技术国际有限公司
地址 印度海得拉巴
共同专利权人 科学及工业研究委员会
[72] 发明人 G·S·哈特里 R·沙马
审查员 徐益君

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张广育 孟凡宏

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 4 页

[54] 发明名称

重组成熟溶葡萄球菌素的表达

[57] 摘要

克隆了模仿葡萄球菌(staphylococcus simulans)溶葡萄球菌素基因的一部分并且在前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原不存在的条件下在大肠杆菌胞浆中过度表达，从而产生成熟溶葡萄球菌素，其表达在 IPTG 诱导型启动子和核糖体结合位点的转录控制下。 被转化宿主细胞的 IPTG 诱导在完全缺失前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的条件下产生细胞内的可溶成熟溶葡萄球菌素(27KDa)。 如此形成的成熟溶葡萄球菌素不需要翻译后修饰。 如此形成的成熟溶葡萄球菌素可以用于治疗和预防葡萄球菌感染。

1．一种生产不含前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的成熟溶葡萄球菌素内肽酶的方法，其特征在于：

（a）提供一种遗传构建体，该构建体含有一段在编码溶葡萄球菌素原的元件不存在的条件下编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列，该核苷酸序列位于表达载体中翻译起始密码子“ATG”的下游，和一个操作性连接在编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列上的 T7 φ10 启动子/lac 操纵子；

（b）转化宿主细胞使其含有和表达步骤（a）的遗传构建体，这样不含前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的成熟溶葡萄球菌素在宿主胞浆中积累；以及

（c）从宿主细胞中分离出成熟溶葡萄球菌素。

2．权利要求 1 的方法，其中在步骤（a）提供了含有一段在编码溶葡萄球菌素原的元件不存在的条件下编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列的构建体，在所述核苷酸序列 5’末端操作性连接一段起始序列 ATG，在该起始序列 5’末端操作性连接诱导型 T7 φ10 启动子/lac 操纵子序列。

3．权利要求 1 的方法，其中在步骤（a）提供进一步含有与编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列操作性连接的阻抑物的构建体。

4．权利要求 3 的方法，其中在步骤（a）提供进一步含有 lacI’阻抑物基因的构建体。

5．权利要求 1 的方法，其中在步骤（b）进行大肠杆菌转化。

6．权利要求 1 的方法，其中在步骤（c），通过以下方法分离成熟溶葡萄球菌素：

i） 裂解宿主细胞产生裂解液；

ii）使裂解液通过阴离子交换树脂，收集并合并表现葡萄球菌裂解活性的组分；

iii）酸化步骤 ii）合并的组分，将酸化后的合并组分通过阳离子交换树脂，以及收集并合并表现葡萄球菌裂解活性的组分。

7． 一种用于转化宿主使其表达不含前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的成熟溶葡萄球菌素内肽酶的表达构建体，该构建体含有：

一段在编码溶葡萄球菌素原的元件不存在的条件下编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列，和一个操作性连接在编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列上的启动子，以及与编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列操作性连接的起始密码子。

8. 权利要求 7 的构建体，其中构建体进一步含有与编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列操作性连接的 lacI'阻抑物。

9. 权利要求 8 的构建体，其中阻抑物是 lacI'阻抑物基因。

10. 一种遗传工程宿主细胞，包含经转化而含有权利要求 7 至 9 中的任意一项的构建体的宿主细胞，其中如此转化的遗传工程宿主细胞在其胞浆中表达不含前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的成熟溶葡萄球菌素内肽酶。

11. 权利要求 10 的遗传工程宿主细胞，其中宿主细胞是大肠杆菌。

重组成熟溶葡萄球菌素的表达

发明领域

本发明涉及一种在重组细菌宿主体内表达不含前溶葡萄球菌素原(preprolyostaphin)和溶葡萄球菌素原(prolysostaphin)的成熟溶葡萄球菌素的方法、与诱导型启动子操作性连接的编码表达成熟溶葡萄球菌素的载体、以及表达成熟溶葡萄球菌素的遗传工程细菌宿主。

先有技术的描述

葡萄球菌感染通过葡萄球菌食物中毒、烧伤和创伤感染以及泌乳反刍动物的乳腺感染给人类造成巨大的痛苦和经济损失。这些感染通常对常规抗生素具有抵抗力或者一旦停用抗生素，就具有复发的趋势。模仿葡萄球菌的生物变种溶血葡萄球菌（Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus）生成一种细胞外锌金属蛋白酶即甘氨酰甘氨酸内肽酶，一般称为“溶葡萄球菌素”，该酶可以水解细胞壁肽聚糖上的五甘氨酸联接。因此，溶葡萄球菌素对破坏葡萄球菌物种是有活性的，但对其他所有的属却无活性。溶葡萄球菌素这种对存活葡萄球菌细胞的独特性质提供了一种抗菌机制，该机制显著不同于现在使用的抗葡萄球菌抗生素的作用机制。同样的，溶葡萄球菌素提供了治疗和预防葡萄球菌性疾病的新颖方法的可能性。然而，由于天然来源的低水平表达以及强效毒素的共同分泌，使得从模仿葡萄球菌的生物变种溶血葡萄球菌中纯化溶葡萄球菌素而将其用于详细的物理和生化研究，以及评价其用于治疗和预防葡萄球菌感染的潜能都很困难。

野生型溶葡萄球菌素基因编码前酶原（preproenzyme），该前酶原由三个不同结构域组成，在其N末端是一个由38个氨基酸残基组成的典型的分泌性信号肽，然后是七个前后排列的重复的13个氨基酸序列构成的亲水性并且高度有序的结构域，接着是含有246个氨基酸的疏水性成熟溶葡萄球菌素自身。成熟的酶是一个大约27kDa的单体并且不含有二硫键。在溶血葡萄球菌培养基中，从溶葡萄球菌素原到成熟溶葡萄球菌素的转化在细胞外发生并且去除了酶原的亲水性前后排列的重复部分。

溶葡萄球菌素内肽酶的野生型基因（end）位于模仿葡萄球菌的生物变种溶血葡萄球菌的大分子β－内酰氨酶阳性质粒上。(Heath, L.S., H.E. Heath and G.L. Sloan (1987) "Cloning of the lysostaphin gene of S. simulans biovar staphylolyticus." Abstr. Ann. Meet, Am. Soc. Microb. H58p149; Heath, L.S., H.E. Heath 和 G.L. Sloan, (1987)"Plasmid encoded lysostaphin endopeptidase gene of S. simulans biovar staphylolyticus." FEMS Microb. Lell. 44:129-133.)。完整的操纵子已经被克隆（见 Recsei P.A., A.D. Gruss 和 R.P. Novick (1987) "Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from Staphylococcus simulans." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1127-1131; Heinrich P., R. Rosenstein, M. Bohmer, P. Sonner 和 F. Gotz (1987) "The molecular organization of the lysostaphin gene and its sequences repeated in tandem." Mol. Gen. Genet. 209:563-569, 以及1990年6月5日授权于Recsei的美国专利 4,931, 390）并且完整的序列和启动子元件都已经被测序。这些参考文献报道了前溶葡萄球菌素原在大肠杆菌中的表达，该前溶葡萄球菌素原然后在细胞外转化为溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素。这项工作用野生型溶葡萄球菌素内肽酶启动子来完成。溶葡萄球菌素原也可以在巨细胞病毒（CMV）启动子转录调控下，在真核系统内被表达。（Williamson C.M., A.J. Bramley 和 A.J. Lax (1994) "Expression f the lysostaphin gene of Staphylococcus simulans in a eukaryotic system." Appl Environ Microbiol; 60(3): 771-776.）

早期生产溶葡萄球菌素内肽酶的方法或者是直接从模仿葡萄球菌中纯化该酶（Schindler C.A. 和 V.T. Schuardt (1965)Schuardi (1965) "Purification and properties of lysostaphin: a lytic agent for the Staphylococcus aureus." Biochem. Biophys. Acta. 97:242-250; Iverson O.J. 和 A. Grov (1973) "Studies on lysostaphin. separation and characterization of three enzymes." Eur. J. Biochem. 38:293-300; Valisena S., F.E. Varaldo 和 G. Satta (1982) "Purification and Characterization

of three separate bacteriolytic enzymes excreted by S. aureus, S. simulans and S. saprophyficus." J Bact. 151:636-647; Sugai M., T. Akiyama, Y. Miyake, E. Ishida 和 H. Suginaka (1990) "Rapid purification of lysostaphin for analysis of cell-wall proteins." J Microb. Meth. 12:133-138: 和 Marova land 和 V. Dadak (1993) "Modified simplified method for isolation of lysostaphin from the culture filtrate of Staphylococus staphylolyticus." Folia Microbiol 38:245-252), 或者是表达溶葡萄球菌素原并利用模仿葡萄球菌提取物剪切前肽部分将其转化为成熟溶葡萄球菌素(Marova 和 Dadak, supra; Williamson et al., supra)。两种传统的途径都有不同的缺点。当从天然来源分离时，成熟溶葡萄球菌素能被致热原/致敏原和/或溶葡萄球菌素原或前溶葡萄球菌素原污染。当表达为酶原时，初始表达产生的溶葡萄球菌素原必须通过天然来源的提取物进行酶促转化而产生成熟溶葡萄球菌素。这也造成了溶葡萄球菌素被致热原或其他污染物污染的机会。

在现有技术中，还没有关于不经过蛋白原形或前蛋白原形式的表达，而克隆和直接表达成熟形式的溶葡萄球菌素的报道。这里所描述的是一种直接生产溶葡萄球菌素的方法，该方法不需要中间产生前溶葡萄球菌素原或溶葡萄球菌素原。因此，使用本方法生产的溶葡萄球菌素不含前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原。

发明概述

因为对溶葡萄球菌素的抗葡萄球菌潜能的进一步评价取决于容易获得大量从安全的、非致病的来源高度纯化的溶葡萄球菌素，本发明主要涉及一种重组质粒，该质粒驱动在经转化而含有重组质粒的宿主细胞，优选大肠杆菌细胞中过量表达产生成熟溶葡萄球菌素。

本发明还包括经转化而含有并且表达该质粒的宿主细胞（优选转化的大肠杆菌细胞），利用合适的被质粒转化的宿主生产成熟溶葡萄球菌素的方法，以及利用转化细胞生产的不含前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的溶葡萄球菌素。用包括下面所述的两个层析步骤的程序将根据本发明生产的重组溶葡萄球菌素纯化为均质。鉴定了重组产物的生化、酶以及生物物理特性，以便为重组产物建立适当的质量控制测定。

具体地，本发明的第一种实施方案是生产不含有前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的成熟溶葡萄球菌素内肽酶的方法。本发明的特征在于提供了一种遗传构建体，该构建体包括一段在前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的编码元件不存在的条件下编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列，以及与编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列操作性连接的启动子；转化宿主细胞使其含有并表达遗传构建体，从而在宿主胞浆内积聚不含前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的成熟溶葡萄球菌素；然后从宿主细胞中分离成熟溶葡萄球菌素。

本发明的第二种实施方案定位于一种用于转化宿主使其表达不含前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的成熟溶葡萄球菌素内肽酶的表达构建体，该构建体包括：在溶葡萄球菌素原编码元件不存在的条件下编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的一段核苷酸序列；与编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的核苷酸序列操作性连接的启动子。

本发明的第三种实施方案是用这里描述的表达构建体转化的遗传工程宿主细胞，转化细胞表达不受前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原污染的成熟溶葡萄球菌素。

本发明的第四种实施方案定位于含有无前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的纯化溶葡萄球菌素的组合物，以及根据这里所述方法生产的组合物。

附图简述

图.1 是表示去除分泌信号和 5'重复基序后扩增得到的溶葡萄球菌素基因的凝胶电泳图。

图.2 表示本发明的质粒构建体，pEnd-11b 的构建过程示意图。

图.3 是在诱导前后经转化而含有 pEnd-11b 质粒的大肠杆菌细胞裂解物中总蛋白的凝胶电泳图。

图.4 是对 12％SDS－PAGE 凝胶的光密度扫描图，显示在经转化而含有 pEnd-11b 质粒的大肠杆菌中重组成熟溶葡萄球菌素的表达水平。

发明详述

定义：

为了对说明书有一个清楚和一致的理解，在这里要用到以下定义。

构建体或表达构建体－DNA 构建体包含至少一个编码目的蛋白的亚序列，该亚序列操作性连接在一个或多个调节亚序列上，当构建体转化到合适的宿主细胞中后，调节亚序列驱动被编码蛋白的表达。这样的构建体也可以包括编码用于筛选转化后含有构建体的宿主细胞的方法的亚序列，例如使转化细胞具有抗生素抗性或者营养限制、多克隆位点等的亚序列。

操作性连接－ 当谈到连接的 DNA 序列时，“操作性连接”是指序列在同一个阅读框架内，并且上游调控序列将会执行与下游结构序列相关的功能。操作性连接的 DNA 序列并不需要互相之间的直接物理性连接，而是可以被间插核苷酸分开，间插核苷酸序列不会干扰被连接序列的操作关系。

聚合酶链式反应（PCR）— 一项使用变性循环、与引物对退火，以及利用 DNA 聚合酶延伸而产生所需多核苷酸序列的大量拷贝。反应的描述可见美国专利 4,683,195 和 4,683,202。PCR 技术广泛应用于核酸的操作。

启动子－ RNA 聚合酶与操纵子起始部位结合的 DNA 序列位点。一旦结合，RNA 聚合酶就会沿着 DNA 由 5’向 3’方向移动并且合成相应的 RNA 序列。尽管启动子的功能是作为 RNA 合成的启动信号，但启动子本身并不被转录。

遗传工程:

以下所述的 DNA 操作的许多步骤，包括利用限制性核酸内切酶消化，PCR 扩增，杂交，连接，通过凝胶电泳区分和分离，利用异源 DNA 转化细胞，筛选成功的转化体等等，已为熟悉本领域的人所熟知并且被广泛实施，因此这里就不再展开描述了。除非另外指出，这里应用的 DNA 操作方法都详细描述于 Sambrook, J., E.F. Fritsch. 和 T. Maniatis(1989), “分子克隆: 实验室手册,”冷泉港实验室出版社: 纽约, NY。

宿主细胞

这里描述的重组 DNA 掺入宿主微生物中，从而驱动不含前溶葡萄球菌素原和溶葡萄球菌素原的成熟溶葡萄球菌素的产生。宿主微生物可以是易于转化的任意细菌或者真核宿主。优选的宿主是大肠杆菌。仅仅为了简洁和清晰的目的，以下公开的内容局限于大肠杆菌转化体

的描述。由于其在学术和工业方面的独特性，它的快速生长率，为人熟知和易于操作的遗传学背景，以及该生物体具有完整的基因组序列，大肠杆菌成为优选的微生物。然而，本发明在其它原核微生物中，例如枯草杆菌等，以及酵母等真核生物中，也具有相同的功效。因此，以下的讨论并不是将本发明局限在用大肠杆菌所举例说明的实施方案中。

质粒构建

用于选择性扩增成熟溶葡萄球菌素基因的 PCR 引物是根据已发表的溶葡萄球菌素内肽酶（end）序列（见 Recsie 等，supra）而设计的，并且利用模仿葡萄球菌的生物变种溶血葡萄球菌 NRRL B-2628（农业研究机构保藏中心，以前称作北部地区研究实验室，国家农业研究中心，1815 North University St., Peoria, Illinois 61604-3999, USA）的总 DNA 通过 PCR 方法对 end 基因进行选择性扩增。然后，通过 PCR 介导的定位诱变在成熟溶葡萄球菌素（AATHE）起始部位之前用起始蛋氨酸密码子（ATG）代替溶葡萄球菌素的信号肽和前肽（propeptide）编码序列。将 NdeI 和 BamHI 限制性核酸内切酶位点分别掺入修饰基因的 5'和 3'末端以用于克隆目的。使用具有校对功能，并且热稳定的酶“VENT” DNA 聚合酶（New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA）。通过检测在溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶电泳上出现的一条 765bp 大小的条带，PCR 扩增产物证明编码成熟溶葡萄球菌素内肽酶的修饰基因被成功扩增出来（图.1）。

然后将扩增得到的成熟溶葡萄球菌素操作性连接到启动子序列上，优选诱导型启动子序列。如图.2 详细描述所示，优选的 T7φ10 诱导型启动子是被操作性连接到阻抑物基因 lac I^{9} 上的噬菌体启动子。

PCR 产物用 NdeI 和 BamHI 限制性酶消化，将得到的开放阅读框架插入到 pET-11b 表达载体（Stratagene, Lajolla, California, USA）的 NdeI 和 BamHI 位点之间，这样，就将成熟溶葡萄球菌素内肽酶开放阅读框架基因置于强效可调节性噬菌体 T7φ10 启动子的转录控制下（见图.2）。

重组构建体在利用终止子染色化学的 ABI Prism 337 型自动 DNA 测序仪上，通过自动双脱氧链终止 DNA 测序法来证实。获得的核苷酸序列与已知的编码成熟溶葡萄球菌素序列完全一致。

成熟溶葡萄球菌素的表达:

成熟溶葡萄球菌素基因在ATCC47092的大肠杆菌BL21(DE3)(美国典型培养物保藏中心, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA)的T7φ10启动子的转录控制下表达。命名为pEnd-11b的重组质粒通过常规方法(氯化钙方法)转化到优选的宿主细胞,大肠杆菌BL21(DE3)中。加入异丙基-1-硫-β-D-半乳糖苷(IPTG)使其终浓度为0.4mM,诱导对应met-溶葡萄球菌素蛋白,分子量约为27kDa条带处的蛋白过量表达。通过SDS-PAGE分析(见图.3)诱导得到条带的大小与以前报道的成熟溶葡萄球菌素的分子量完全一致。12% SDS-PAGE的光密度仪扫描显示,诱导的条带约占诱导细胞提取物总蛋白的20.2%(见图.4)。

由于金黄色葡萄球菌细胞裂解物掺入聚丙烯酰胺凝胶中,通过清除区域可以证实,对葡萄球菌的裂解活性位于同一个27kDa条带上。根据上述方法形成的溶葡萄球菌素内肽酶,甚至在SDS和2-巯基乙醇中煮沸后,仍可重新获得其活性,这与早期的报道是一致的(Leclerc D.和A.Asselin(1989)"Detection of cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide electrophoresis." Can.J.Microb. 35:749-753)。

重组溶葡萄球菌素内肽酶的纯化:

利用计算机程序DNASTAR(DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, USA)分析由插入到质粒pEnd-11b中的核苷酸序列翻译得到的met-溶葡萄球菌素内肽酶序列。得到的数据有助于设计有效的蛋白纯化方案.在中性pH条件下,由滴定曲线估计met-溶葡萄球菌素内肽酶的净电荷是+11.39,由此明确判断met-溶葡萄球菌素是一个含有8.91%(以频率计)/11.04%(以重量计)碱性残基的碱性蛋白.在pH8.5条件下进行阴离子交换层析,大肠杆菌的大部分蛋白被吸附在Q-琼脂糖树脂上,而重组溶葡萄球菌素内肽酶则出现在100mM盐浓度的洗脱液中。

然后合并得到的阳性部分并在pH5.5的缓冲液中进行透析,大量宿主(大肠杆菌)蛋白在该pH条件下变性并从溶液中沉淀出来,从而在溶液中留下非常纯的溶葡萄球菌素制剂。在pH5.5条件下,成熟溶葡萄球菌素是强碱性蛋白,净电荷为+18.6。大量的净阳性电荷有助

于利用阳离子交换层析将少量污染物从溶葡萄球菌素内肽酶制备液中分离出去。得到的含纯化蛋白的部分在储存缓冲液中透析并分装储存在-20℃下。

在现有技术途径中，溶葡萄球菌素是利用硫酸胺沉淀法和 DEAE-纤维素膜层析法进行纯化，产率为 4.3 毫克/升培养液（Schindler 和 Schuardt, supra）。此外还报道了其它大量从模仿葡萄球菌的培养物滤液中纯化溶葡萄球菌素的方法，包括使用离子交换层析（见 Iversen 和 Grov, supra）或者使用等电聚焦和 G-100 凝胶过滤联合（见 Wadstrom T. 和 O.Vesterberg (1971) "Studies on endo-beta-acetyl-glucosaminidase, staphylolytic peptidase, and N-acetylmuramyl-L-alanineamidase in lysostaphin and from S. aureus." Acta Pathol. Microbiol. Scand. 79: 248-264）。Valisena 等，supra 也报道了利用几丁质-琼脂糖 CL4B 亲和纯化方法进行溶葡萄球菌素的纯化。Sugai 等, supra, 报道了涉及 Cibacron 蓝 3G-A（Tskgel Blue-5PW）上的染料配体亲和高压液相层析的方法。然而也有报道说 Cibacron 蓝对溶葡萄球菌素活性有害（Marova 和 Dadak, supra）。

Marova 和 Dadak 也报道了一种用于从溶血葡萄球菌培养物过滤液中分离溶葡萄球菌素的纯化方法，它利用一系列包括超滤，DEAE-纤维素膜层析法，以及在交联葡聚糖 G-50 上进行凝胶过滤层析的技术，得到 75.6% 的产率。这种方法的不足之处在于它依赖于三种不同的层析步骤，其中包括的凝胶过滤层析是麻烦而又耗时的过程。

这里使用的生产过程在每升实验室摇瓶培养液中能够生产 8.9 毫克基本上为均质纯度的纯化成熟溶葡萄球菌素（见实施例中的表格）。获得了具有良好溶葡萄球菌活性的溶葡萄球菌素内肽酶的 11 倍纯化（比活性为 11960U/mg，与 Sigma, St. Louis, Missouri, USA 提供的成熟溶葡萄球菌素相似）。根据本发明生产的溶葡萄球菌素回收率是 70%。在考马斯亮蓝染色的 12% SDS-PAGE 凝胶上可以看出，制备物的纯度近于均质。

本发明因此可用于在安全的，非致病宿主内生产重组的基本上为均质的溶葡萄球菌素内肽酶。这种方法可以按实验室规模实施或扩大规模到工业水平生产。

根据本发明生产的重组溶葡萄球菌素内肽酶的生化和酶特征:

在使用安福灵的聚丙烯酰胺凝胶电泳中的等电聚焦得到的实验数据是9.8，结果与文献中报道的天然成熟溶葡萄球菌素的数值一致。由迁移率（Rf）对标准分子量对数的曲线计算得出重组溶葡萄球菌素内肽酶亚单位分子量是26.9kDa。这一数值与理论估计的27.2kDa数值以及以上引用文献中报道的数值极为接近。

本发明中用"Sephacryl S－200"(Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden)凝胶过滤层析法生产的溶葡萄球菌素的分子量约为27kDa，并且与从模仿葡萄球菌培养物过滤液中得到的成熟溶葡萄球菌素是完全一致的。根据本发明生产的蛋白，其溶葡萄球菌素活性率从一分钟到十分钟之间成线性，其比活性在Sigma指定条件下与商用溶葡萄球菌素（Sigma）的比活性具有可比性。重组成熟溶葡萄球菌素内肽酶在约47℃和pH值约7.0到8.0范围内（峰值约为8.0）具有最大活性。尽管如此，根据本发明制备的蛋白在pH值约为10.0时仍保留约82％的活性。当在不同温度温育不同的时间间隔时，根据发明制备的蛋白在约50℃，温育时间约10分钟内保持稳定，超过这些参数后，蛋白迅速失去其稳定性（例如60℃热处理十分钟后，蛋白只能保留约40％活性）。在20℃和30℃下，重组溶葡萄球菌素保持稳定至少达24小时。在40℃下，重组溶葡萄球菌素可维持十分稳定的状态达四小时，保持70％残存活性。本发明获得的重组溶葡萄球菌素的特性与以往Schindler和Schuardt, Recsei等，以及Iverson和Grov, supra的报道的不同之处在于以往报道的最适温度和pH值分别为37℃和7.5。相反，根据本发明生产的溶葡萄球菌素在约47℃和pH约8.0的条件下有最佳活性。

实施例

以下实施例只是用于帮助对此处所描述和要求保护的发明有更全面的了解。所举实施例并不以任何形式限制所要求保护的发明的范围。

重组表达载体的构建

现在参看图.2，分泌信号肽和代表前肽的前后排列的重复序列被ATG起始密码子代替，利用如下引物，通过PCR介导的定位诱变，在溶葡萄球菌素结构基因的5'末端建立EcoRI限制性位点，在终止密码子

后建立 BamHI 限制性位点：

5'－ACTGAATTCCATATGGCTGCAACACATGAACATTCAGCAC-3'
(SEQ. ID. NO: 1) (划线处是 NdeI 限制性位点)；和

5'－CAGATCTGGATCCTCACTTTATAGTTCCCCAAAGAACAC-3'
(SEQ. ID. NO: 2) (划线处是 BamHI 限制性位点)。

利用 "VENT"DNA 聚合酶 (New England Biolabs)，通过标准反应从质粒 pRJ5(Recsei et al, supra, ATCC 67079)中选择性 PCR 扩增修饰的基因，所选用的 DNA 聚合酶在 Perkin-Elmer Cetus 热循环仪上具有 3'到 5'核酸外切酶的校准活性。扩增条件是 94℃下 1 分钟，65℃下 1 分钟，72℃下 40 秒/循环，共计 25 个循环。扩增得到的片断如图.1 所示，M 表示分子量标记的泳道，泳道 1 和 2 表示两个完全相同的 765 个碱基对扩增产物的条带。

扩增得到的成熟溶葡萄球菌素基因去除了分泌信号和前后排列的重复序列，但操作性连接上 ATG 起始密码子，然后将其连接在编码 lacI' 阻抑物的序列和噬菌体 T7φ10 启动子上，生成一个构建体，其中具有 5'ATG 起始密码子的成熟溶葡萄球菌素基因操作性连接在 lacI' 阻抑物和 IPTG 诱导型 T7φ10 启动子上。lacI' 和启动子序列可以从例如 pET-11b 这样容易获得的载体上得到。

通过 NdeI 和 BamHI 限制性核酸内切酶消化含有操作性连接到启动子的成熟溶葡萄球菌素的构建体，然后插入到相应的消化了的 pET-11b 表达载体上，生成重组质粒 pEnd-11b，其溶葡萄球菌素基因处在 T7φ10 启动子转录调控下。

成熟溶葡萄球菌素的胞浆表达和葡萄球菌裂解活性的定位：

用 pEnd-11b 质粒转化表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3)。将 200 微升大肠杆菌 BL21(DE3)(pEnd-11b)过夜培养物接种到含 50μg/ml 氨苄青霉素的 Luria Bertani 肉汤中。培养物在 37℃条件下，剧烈震荡生长到光密度为 0.6(波长 600nm)，然后加入 0.4mM 的 IPTG 诱导成熟溶葡萄球菌素在大肠杆菌胞浆中表达。诱导三小时后，细胞离心沉降，用 2.5ml，50mM 的 Tris-HCl 重悬，超声裂解，然后离心去除颗粒部分。

总细胞提取液和可溶性部分按照已知方法（Laemmli U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4." Nature 227:680-685）用考马斯亮蓝方法在12%SDS-PAGE凝胶上分析。通过使用FUJI GELSCAN光密度仪的凝胶光密度测量分析12%SDS-PAGE来确定重组蛋白表达水平。结果如图.4所示，表大的成熟溶葡萄球菌素占胞浆蛋白的20.2%。

葡萄球菌裂解活性的定位:

利用Sugai等(1990),supra描述的方法并进行轻微的修改,在12%SDS-PAGE凝胶上定位葡萄球菌裂解活性条带。电泳使用的缓冲系统与Laemmli(1970),supra报道的相同。简要地，制备含有1%（w/v湿细胞团块)金葡菌237细胞的12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶。使用BIORAD Miniprotean垂直板凝胶电泳装置，在20mA恒定电流，4℃条件下进行电泳。电泳结束后，用冷的蒸馏水（3×100ml）彻底冲洗凝胶。最后,在37℃下将凝胶浸泡在含100mM氯化钠的50mM,pH8.0的Tris-HCl中30分钟。在暗背景下，利用间接光线观察活性条带。

成熟溶葡萄球菌素的纯化:

向两升含有50mg/ml氨苄青霉素的LB肉汤培养基中接种10ml含大肠杆菌BL21(DE3)(pEnd-11b)转化菌的过夜培养物，在37℃，恒定转速（200rpm）条件下培养到光密度值为0.6（波长600nm），然后加入IPTG到终浓度为0.4mM诱导蛋白表达。诱导后的细胞可以在42℃下再生长3小时。然后将诱导的细胞用Sorvall GS-3转头在4℃下，8000rpm离心10分钟，用100ml裂解缓冲液重悬（50mM Tris-HCl,pH8.5,含有100mM氯化钠和0.5mM苯基甲基磺酰基氟化物）。

步骤I: 阴离子交换层析:

在玻璃柱中装入70ml阴离子交换树脂"Q-sepharose FF"(Pharmacia)，用100ml裂解缓冲液平衡。流速保持在2ml/min。将蛋白溶液加入到柱中，按每份体积10ml收集洗脱液。然后用100ml相同缓冲液清洗柱，并按上述收集组分。如上所述，利用SDS-PAGE分析峰值部分及葡萄球菌裂解活性。

步骤II: 酸化和阳离子交换层析:

收集含有溶葡萄球菌素的组分，在4℃下20倍体积的阳离子交换缓冲液中（40mM Tris-醋酸 pH5.5,100mM氯化钠）透析16小时。透

析物在4℃，15000rpm条件下离心15分钟，得到的上清液用于阳离子交换层析。用S-sepharose FF(Pharmacia)装满20ml容积的玻璃柱，用 40ml 阳离子交换缓冲液平衡。整个层析过程中，流速保持在2ml/min。

将上面得到的上清液加入平衡的柱中，用5倍柱体积(100ml)的相同缓冲液洗柱，然后再用5倍柱体积含有150mM氯化钠的相同缓冲液清洗。结合在基质上的溶葡萄球菌素利用100ml150mM到500mM氯化钠梯度的阳离子交换缓冲液洗脱。每组分按5ml体积收集并通过SDS-PAGE分析成熟溶葡萄球菌素内肽酶的存在和葡萄球菌裂解活性。合并含有纯化的重组蛋白组分，将均质制剂放入到10倍体积的储存缓冲液（50mM Tris-HCl, pH7.5, 100mM氯化钠，50%（v/v）甘油）中透析，然后在-20℃储存，产率是8.9mg/ml。关于每一步的产率和活性数据见下表:

纯化步骤	总体积 (ml)	总蛋白 (mg)	活性 U/mg	产率 (%)	纯化 (倍)
细胞提取液（超声裂解）	100	280	1086	100	—
可溶性组分	100	232	1250	96	1.15
阴离子交换	170	55.25	5169	94	4.76
酸化	174	43.50	5540	78	5.61
阳离子交换	37	17.80	11960	70	11.10

溶葡萄球菌素活性的分析:

利用改进的已报道的方法（Robinson, J.M., J.K. Hardman and G.L. Sloan (1979) "Relationship between lysostaphin endopeptidase production and cell wall composition in Staphylococcus staphylolyticus." J. Bact. 137:1158-1164），通过监测金葡菌237细胞的裂解而对溶葡萄球菌素内肽酶活性进行分析。简要地，活跃生长的金葡菌237细胞经漂洗后悬浮于活性缓冲液中(50mM Tris-HCl, Ph7.5, 100mM氯化钠)，光密度值(波长600nM)

调节到 0.400。在 Shimadzu 2101 分光光度仪上，使用 1cm 光程，在 3.0ml 石英比色杯内测量分析，Shimadzu 2101 分光光度仪具有一个温度维持在 37℃的“原位”控温比色杯座。将等分的适当稀释的重组溶葡萄球菌素溶液加入到悬浮液中，37℃温育 5 分钟后，记录在波长 600nm 时细胞 OD 值的下降情况。溶葡萄球菌素的一个单位定义为，在 37℃条件下， 3ml 反应体积内反应 5 分钟，金葡菌 237 细胞悬浮液 OD 值（波长 600nM）下降 0.001 所需的酶量。根据本发明制得的纯化溶葡萄球菌素活性为 11960U/mg.

序列表

<110> G.S.哈特里
R.沙马
印度生物技术国际有限公司

<120> 重组成熟溶葡萄球菌素的表达

<130> 溶葡萄球菌素

<140>
<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: PCR引物

<400> 1
actgaattcc atatggctgc aacacatgaa cattcagcac 40

<210> 2
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: PCR引物

<400> 2
cagatctgga tcctcacttt atagttcccc aaagaacac 39

从模仿葡萄球菌NRRL B2628总DNA中选择性PCR扩增成熟体溶葡萄球菌素基因

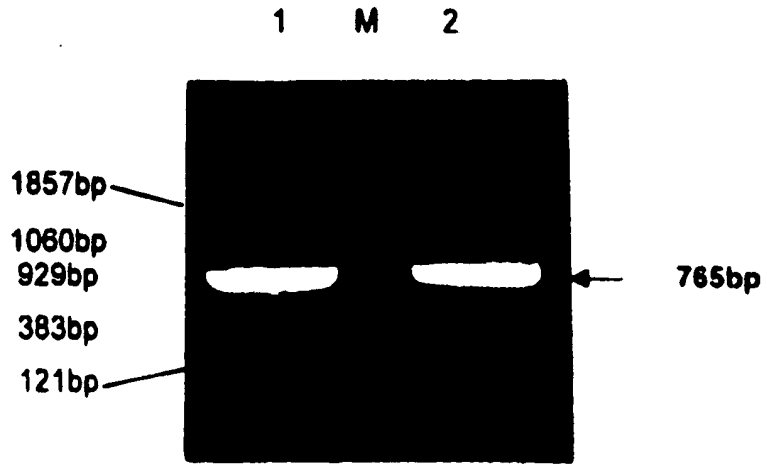


图 1

在大肠杆菌中构建用于表达甘氨酰甘氨酸内肽酶
（溶葡萄球菌素）的pEnd11b质粒

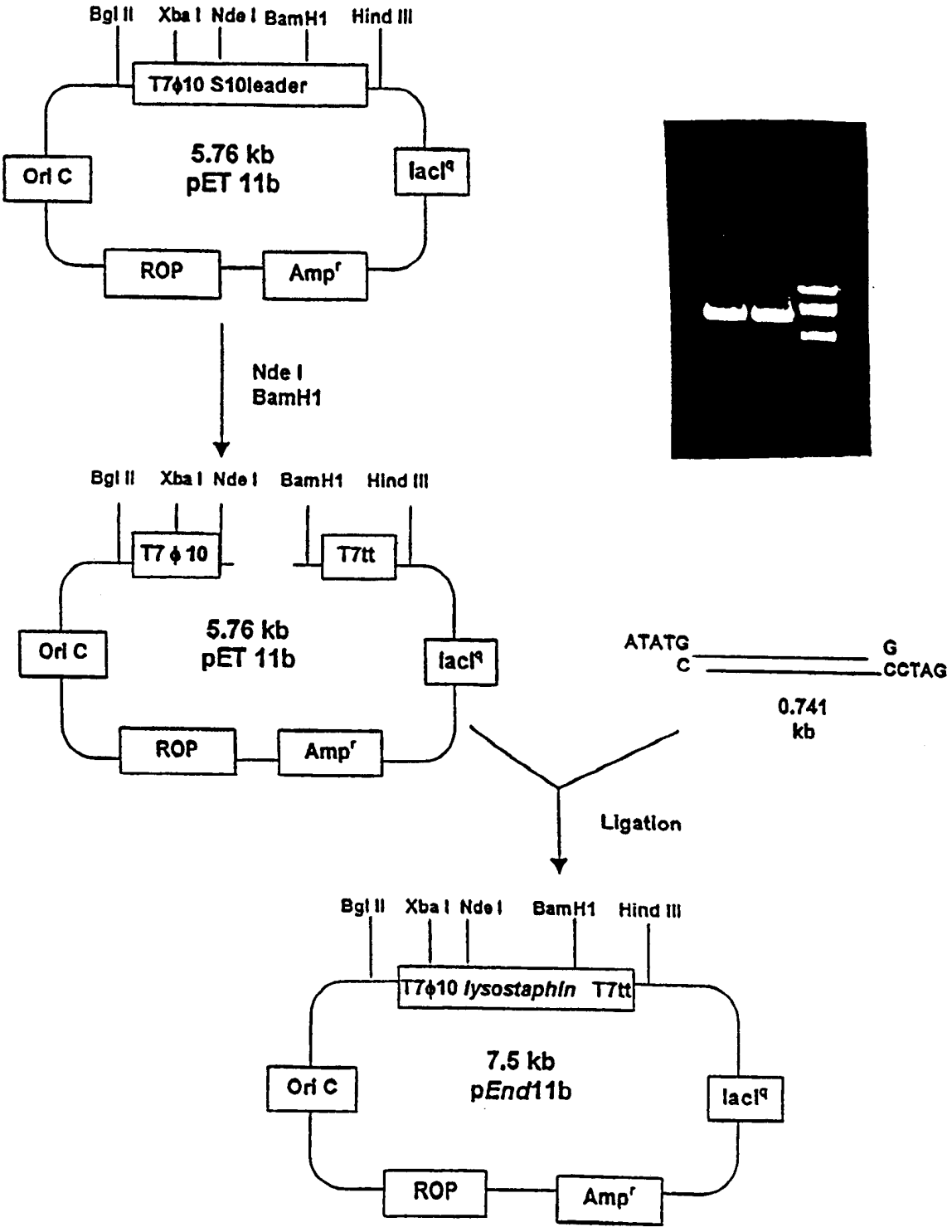


图 2

IPTG诱导的大肠杆菌BL21（λDE3）/pEnd11b中

成熟溶葡萄球菌素内肽酶的过量表达

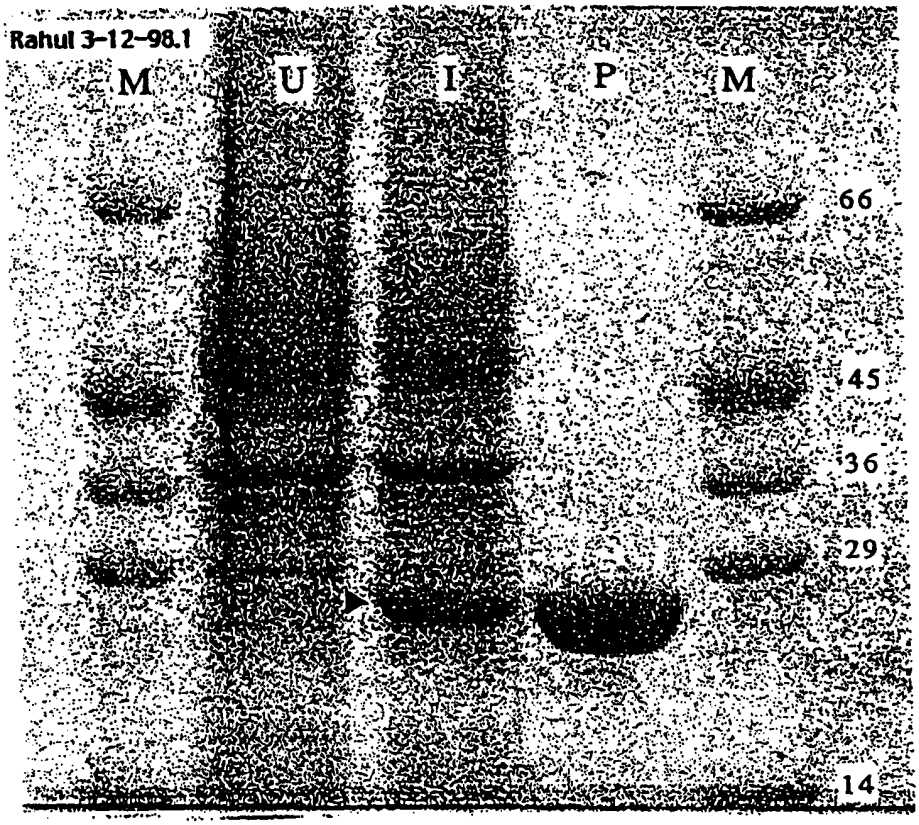


图 3

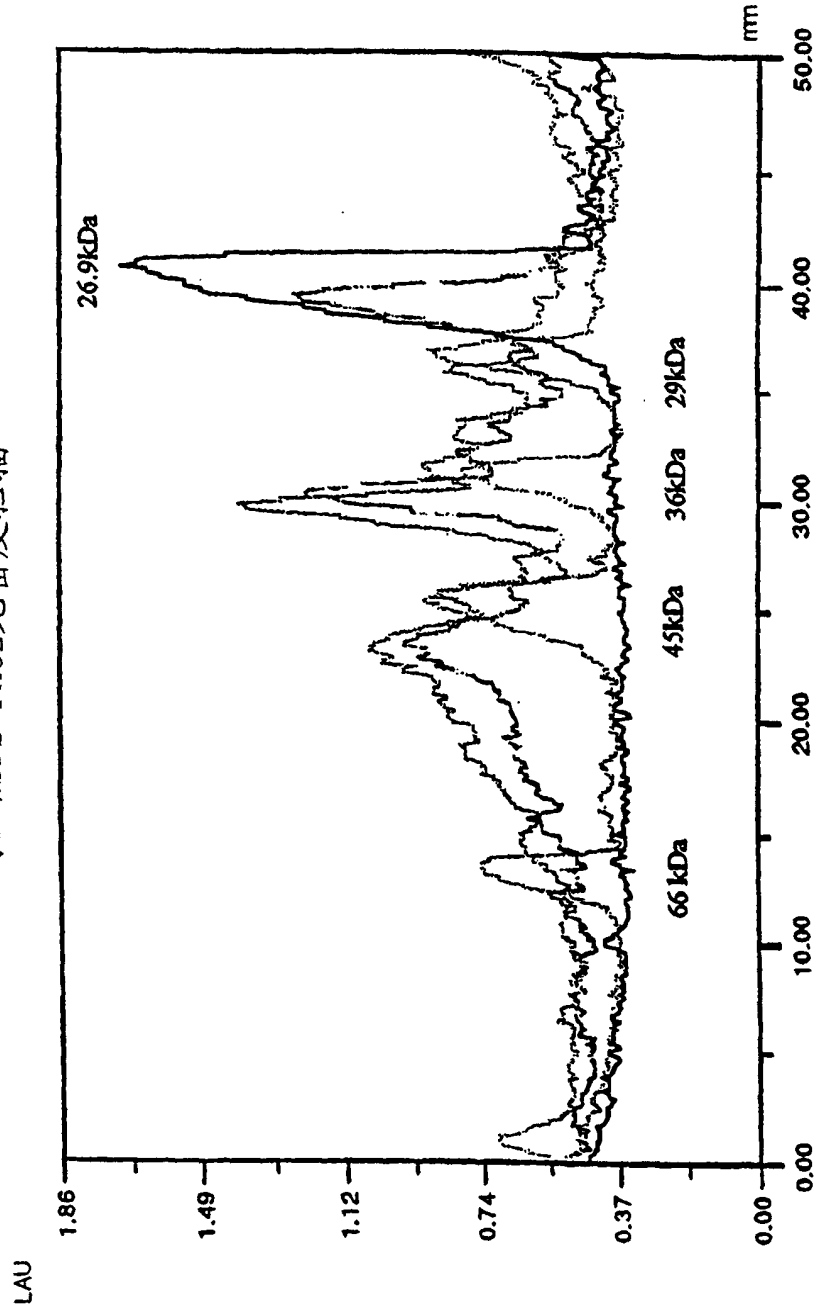

在大肠杆菌BL21（λDE3）/pEnd11b中表达的重组溶葡萄球菌素
的12%SDS PAGE光密度扫描
LAU
1.86
1.49
1.12
0.74
0.37
0.00
0.00
10.00
20.00
30.00
40.00
50.00
mm
26.9kDa
66 kDa
45kDa
36kDa
29kDa

图 4