(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103992995 A
(43)申请公布日 2014.08.20

(21)申请号 201410246947.0

(22)申请日 2014.06.05

(71)申请人 山东大学
地址 250100 山东省济南市历城区山大南路27号

(72)发明人 李福川 赵梅 韩文君 王文爽 彭立正

(74)专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司 37219
代理人 朱家富

(51)Int.Cl.
C12N 9/88(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/74(2006.01)
C12N 15/81(2006.01)
C12N 15/75(2006.01)
C12N 15/80(2006.01)
C12N 15/82(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 1/15(2006.01)
C12N 1/19(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表4页 附图3页

(54)发明名称

一种高表达水溶性肝素酶Ⅰ融合蛋白及其编码基因

(57)摘要

本发明涉及一种高表达水溶性肝素酶Ⅰ融合蛋白及其编码基因，肝素酶Ⅰ融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示；肝素酶Ⅰ融合蛋白的编码基因核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。本发明通过利用pColdTF载体对肝素酶Ⅰ的表达基因进行改造，增加了一段表达pColdTF蛋白的核苷酸序列，获得了肝素酶Ⅰ融合蛋白；该肝素酶Ⅰ融合蛋白的酶活可达64000U/L发酵液，表达量可达320mg/L发酵液，比酶活可达200U/mg。并且该酶还可通过镍柱分离实现该融合蛋白的一步纯化。

CN 103992995 A

1. 一种肝素酶 I 融合蛋白，氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

2. 一种肝素酶 I 融合蛋白的编码基因，核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

3. 一种重组表达载体，在表达载体中插入了权利要求 2 所述肝素酶 I 融合蛋白的编码基因。

4. 如权利要求 3 所述的重组表达载体，其特征在于，所述表达载体选自大肠杆菌表达载体、酵母表达载体、枯草杆菌表达载体、乳酸菌表达载体、链霉菌表达载体、噬菌体载体、丝状真菌表达载体、植物表达载体、昆虫表达载体或哺乳动物细胞表达载体。

5. 一种重组菌或转基因细胞系，在宿主细胞或细胞系中插入了权利要求 2 所述肝素酶 I 融合蛋白的编码基因。

6. 如权利要求 5 所述的重组菌或转基因细胞系，其特征在于，所述宿主细胞或细胞系选自大肠杆菌宿主细胞、酵母菌宿主细胞、枯草杆菌宿主细胞、乳酸菌宿主细胞、放线菌宿主细胞、丝状真菌宿主细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。

7. 权利要求 2 所述的编码基因、权利要求 3 所述的重组表达载体或权利要求 5 所述的重组菌或转基因细胞系在制备肝素酶 I 融合蛋白中的应用。

一种高表达水溶性肝素酶 I 融合蛋白及其编码基因

技术领域

[0001] 本发明涉及一种高表达水溶性肝素酶 I 融合蛋白及其编码基因，属于基因工程技术领域。

背景技术

[0002] 肝素 / 硫酸乙酰肝素 (Heparin/Heparan Sulfate，Hep/HS) 两者具有相同的主链结构，是通过 20-100 个由 D- 葡糖醛酸 /L- 艾杜糖醛酸和 N- 乙酰葡糖胺组成二糖连接而成的直链多糖，糖链中不同部位的羟基 (-OH) 及 N- 乙酰葡糖胺 2 位氨基的乙酰化或硫酸化使 Hep/HS 的结构变得异常复杂 (Castelli et al. 2004 ;Casu2005)。Hep/HS 广泛分布于哺乳动物的细胞表面和胞外基质中，在各种生命过程中起着重要作用，如 :调节血管壁功能，凝血，炎症反应和细胞分化等。

[0003] 肝素酶 (Heparinase) 是研究 Hep/HS 构效关系的重要工具酶。肝素酶广泛存在于微生物和动物体内，通过选择性切割 Hep/HS 多糖链对 Hep/HS 的降解代谢和生物学功能进行调节。无论微生物还是哺乳动物来源的肝素酶对 Hep/HS 糖链的切割均具有结构选择性。哺乳动物来源的酶是通过对己糖醛酸和葡萄糖胺之间的糖苷键的水解作用来降解糖链的，而微生物来源的肝素酶则是通过 β - 消除机制对葡萄糖胺和己糖醛酸之间的糖苷键进行切割，在己糖醛酸残基的 4、5 位碳原子之间形成在 232nm 有特定紫外吸收的双键。哺乳动物来源的肝素降解酶参与了细胞信号转导，细胞迁移和癌变等各种生理病理过程。而微生物来源的肝素裂解酶则主要是参与微生物对肝素作为碳源的降解利用以及某些病原微生物对宿主的入侵过程。微生物来源的肝素酶由于种类多、酶活高、稳定性好、易于大量表达纯化、生产成本相对较低等优点，在科学研究、工业生产及临床上被广范应用。具有巨大的开发价值 (Tripathi CK et al. 2012)。

[0004] 三种来自于肝素黄杆菌 (Flavobacterium heparinum) 的肝素裂解酶被广泛研究并做为主要的商品化肝素酶被广泛应用，被分别命名为为肝素酶 I(Heparinase I)、肝素酶 II(Heparinase II)、肝素酶 III(Heparinase III)。这三种肝素裂解酶在降解肝素与硫酸乙酰肝素的能力上有差异，肝素酶 I 主要以降解肝素为主，肝素酶 III 主要降解硫酸乙酰肝素，肝素酶 II 既降解肝素也降解硫酸乙酰肝素 (Linhardt et al. 1987, 1990)。这三个酶均为周质空间空间蛋白，早期主要是通过对菌体进行渗透压冲击或超生破碎并结合各种色谱对天然酶蛋白进行分离纯化，天然酶蛋白具有酶活高水溶性好等特点，但存在产量低、操作复杂、纯度难以保证和成本高等问题。

[0005] 自上世纪九十年代初开始，三种来自肝素黄杆菌的肝素酶被先后克隆表达 (Godavarti et al. 1996 ;Sasisekharan et al. 1993 ;Shaya et al. 2004)。但是，目前利用 pET 表达系统在大肠杆菌中表达肝素酶时，一直存在重组酶水溶性差，易形成包涵体，需要复杂的蛋白复性处理，且 复性蛋白不稳定，容易在保存过程中再度沉淀时候等问题。近年来，肝素酶 I 被广泛克隆到不同的表达载体与宿主中，但是依然面临着表达量低，活性低，水溶性差等问题，因此寻找和建立表达效率高、酶蛋白水溶性好、活力高的肝素酶重组表达技术具

有重要的理论和现实意义。

发明内容

[0006] 本发明针对现有技术的不足，提供一种水溶性好、酶活力高的肝素酶 I 融合蛋白及其编码基因。

[0007] 一种肝素酶 I 融合蛋白，氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

[0008] 一种肝素酶 I 融合蛋白的编码基因，核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

[0009] 一种重组表达载体，在表达载体中插入了上述肝素酶 I 融合蛋白的编码基因。

[0010] 上述表达载体选自大肠杆菌表达载体、酵母表达载体、枯草杆菌表达载体、乳酸菌表达载体、链霉菌表达载体、噬菌体载体、丝状真菌表达载体、植物表达载体、昆虫表达载体、或哺乳动物细胞表达载体。

[0011] 一种重组菌或转基因细胞系，在宿主细胞或细胞系中插入了上述肝素酶 I 融合蛋白的编码基因。

[0012] 上述宿主细胞或细胞系选自大肠杆菌宿主细胞、酵母菌宿主细胞、枯草杆菌宿主细胞、乳酸菌宿主细胞、放线菌宿主细胞、丝状真菌宿主细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。

[0013] 用于重组表达肝素酶 I 融合蛋白的重组菌或转基因细胞系，可以是大肠杆菌宿主细胞（如 Escherichia coli BL21、Escherichia coli JM109、Escherichia coli DH5α 等）、酵母菌宿主细胞（如 Saccharomyces cerevisiae、Pichia pastoris、Kluyveromyces lactis 等）、枯草杆菌宿主细胞（如 Bacillus subtilis R25、Bacillus subtilis9920 等）、乳酸菌宿主细胞（如 Lactic acid bacteria COCC101 等）、放线菌宿主细胞（如 Streptomyces spp. 等）、丝状真菌宿主细胞（如 Trichoderma viride, Trichoderma reesei, Aspergillus niger、Aspergillus nidulans 等）、昆虫细胞（如 Bombyxmori, Antharaea eucalypti 等）或哺乳动物细胞（如中国仓鼠卵巢细胞 CHO, 幼小仓鼠肾脏细胞 BHK、中国仓鼠肺细胞 CHL 等）。

[0014] 上述编码基因、重组表达载体、重组菌或转基因细胞系在制备肝素酶 I 融合蛋白中的应用。

[0015] 益效果

[0016] 本发明通过利用 pColdTF 载体对肝素酶 I 的表达基因进行改造，增加了一段表达 pColdTF 蛋白的核苷酸序列，获得了肝素酶 I 融合蛋白；该肝素酶 I 融合蛋白的酶活可达 64000U/L 发酵液，表达量可达 320mg/L 发酵液，比酶活可达 200U/mg。并且该酶还可通过镍柱分离实现该融合蛋白的一步纯化。

附图说明

[0017] 图 1 为表达载体 pColdTF-Hep01 的构建过程示意图。

[0018] 图 2 为从肝素黄杆菌中 PCR 扩增得到的肝素酶 I 基因电泳图谱。

[0019] 图 3 为转化子 PCR 验证电泳图谱。

[0020] 图 4 为转化子酶切验证电泳图谱。

[0021] 图 5 重组肝素酶 pColdTF-Hep01 表达及纯化情况的聚丙烯酰胺凝胶电泳图 (SDS-PAGE)；

[0022] 其中：M、蛋白质分子量标准，条带自上至下大小为 116kD，66.2kD，45kD，35kD，25kD，18.4kD，14.4kD；泳道 1、对照菌株破壁前菌体，上样量 10μL，泳道 2、重组菌破壁前菌体，上样量 10μL，泳道 3、重组菌破壁后上清，上样量 10μL，泳道 4、经镍柱纯化的 HCDase，上样量 10μL。

[0023] 图 6 重组肝素酶 pColdTF-Hep01 降解肝素所得产物的 HPLC 分析图。

具体实施方式

[0024] 以下实施例的阐述，是为了全面公开本发明如何实施的一些常用技术，而不是为了限制本发明的应用范围。发明人已经尽最大努力确保实施例中个参数的准确性（例如量，温度，等等），但是一些实验误差和偏差也应该予以考虑。除非另有说明，本发明中分子量是指重均分子量，温度是摄氏度。

[0025] 下述实施例中，如无特殊说明，均为常规方法。所述引物合成及测序工作均由上海生工生物技术有限公司完成，所有的限制性内切酶及 dNTP 均购 TaKaRa 公司；所有感受态细胞（如：DH5α、BL21）购自北京全式金生物技术有限公司）；肝素酶 I 酶活测定底物肝素购自 Sigma 公司，其它的化学药品均为一般分析纯试剂，购自国药集团化学试剂有限公司。

[0026] 实施例 1、肝素酶 I 融合蛋白 pColdTF-HepI 的表达

[0027] 一、去除信号肽的肝素黄杆菌肝素酶 I 编码序列的克隆

[0028] 表达载体 pColdTF-HepI 的构建过程如图 1 所示，具体过程如下：

[0029] 1、引物的设计及合成

[0030] 经 Genbank 查询得到肝素黄杆菌 (Flavobacterium heparinum) 肝素酶 I 的 DNA 序列 (Su, H., Blain, F., Musil, R.A., Zimmermann, J.J., Gu, K. and Bennett, D.C. Isolation and expression in Escherichia coli of hepB and hepC, genes codingfor the glycosaminoglycan-degrading enzymes heparinase II and heparinase III, respectively, from Flavobacterium heparinum. Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62, 2723-2734)，再根据去除编码信号肽碱基的肝素黄杆菌肝素酶 I 的 DNA 序列设计引物，并在引物序列中引入限制性内切酶 xba I 和 Nde I 的识别位点，所用的上下游引物分别为：

[0031] 上游引物（引物 P1）：5'-GCATATGCAGCAAAAAAAATCCGGTAACATC-3'（带下划线的碱基为 NdeI 的酶切位点），

[0032] 下游引物（引物 P2）：5'-GTCTAGATCTGGCAGTTTCGCTGTACCCGC-3'（带下划线的碱基为 Xba I 的酶切位点），扩增后，即分别引入 Nde I 和 Xba I 酶切位点。

[0033] 2、PCR 扩增去除信号肽的肝素黄杆菌肝素酶 I 的编码序列

[0034] PCR 扩增的反应体系为：50ng 肝素黄杆菌基因组 DNA 模版，上游引物和下游引物各 100pmol，1× 扩增缓冲液（北京天为生物技术有限公司），每种 dNTP 各 200μmol/L，1 单位高保真 PrimerSTAR HS DNA Polymerase；

[0035] 扩增程序为：95 摄氏度变性 5 分钟，68 摄氏度引物退火并延伸 2 分钟，30 个循环后，72 摄氏度延伸 10 分钟结束反应。

[0036] 该 PCR 结果如图 2 所示，表明扩增得到了 1.1kb 的肝素酶 I 基因片段，测序表明，扩增产物的核苷酸序列如序列表中序列 1 的第 1414-2502 位所示（命名为 Hep01）。图 2 中，泳道 1, 2 分别为退火温度为对照以及实验扩增结果，泳道 M 为分子量 marker（条带大小依

次为 8kb、5kb、3kb、2kb、、1kb、750bp、500bp、250bp、100bp)，箭头所指处为 1.1kb 左右目标片段。

[0037] 3、构建含有目的片段的克隆载体

[0038] 参照试剂盒说明书进行操作，将步骤一中 2 中的 PCR 扩增的目的片段直接连接到载体 pEasy Blunt Simple(TaKaRa 公司）中，得连接产物。

[0039] 4、转化大肠杆菌及阳性克隆转化子的筛选及测序

[0040] 将步骤 3 获得的连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，具体方法为：

[0041] 将 10μl 的连接产物与 50μl 的大肠杆菌 DH5α 感受态细胞混匀，冰浴 30 分钟，42 摄氏度热激 60 秒，冰浴 3 分钟，然后加入 300μl 含 100μg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基（蛋白胨 3g，酵母提取物 1.5g，NaCl3g，水 285mL）中，180rpm、37 摄氏度振摇 60 分钟，涂于含 100μg/L 氨苄青霉素的 LB 抗性培养平板（蛋白胨 3g，酵母提取物 1.5g，NaCl3g，琼脂粉 4.5g，水 285mL，16μl X-gal 和 4μl IPTG/ 平板）进行蓝白斑筛选。37 摄氏度培养 12-20 小时。挑选白斑并以此为模版，用引物 P1 和 P2 进行菌落 PCR 鉴定，PCR 反应体系及反应条件与步骤 2 相同。

[0042] 反应结束后，对扩增产物进行 0.8wt％琼脂糖凝胶电泳检测，可含转化子的阳性克隆。将筛选得到的阳性克隆转至 5mL 含 0.05mg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37 摄氏度、220rpm 振摇 12 小时，将菌液进行测序，将含有具有序列表中序列 1 的第 1414-2502 位核苷酸序列的肝素酶 I 蛋白编码基因的 pEasy Blunt-Hep01 重组载体命名为 pEasy Blunt-Hep01。

[0043] 二、重组大肠杆菌表达载体的构建

[0044] 以 pEasy Blunt-Hep01 质粒为模版，用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增肝素黄杆菌肝素酶 I 的基因，PCR 反应体系及反应条件与步骤一中 2 相同。

[0045] 将 pColdTF 载体（购自美国 TaKaRa 公司和 PCR 产物（以 pColdTF-Hep01 质粒为模版的扩增产物）分别用 Xba I 和 Nde I 双酶切，用 T4DNA 连接酶（TaKaRa 公司）连接，转化 DH5α，以 P1 和 P2 为引物，通过菌落 PCR 筛选转化子（如图 3 所示），提取可得到 1.1kbPCR 产物的转化子中的 pColdTF 重组载体，分别通过 Xba I 和 Nde I 双酶切验证（如图 4 所示）。图 3 中 M 为分子量 marker 条带大小依次为 8kb、5kb、3kb、2kb、、1kb、750bp、500bp、 250bp、100bp)，泳道 1、2 为 PCR 验证的转化子，箭头所指处为肝素酶 I 基因条带。图 4 中 M 为分子量 marker 条带大小依次为 8kb、5kb、3kb、2kb、1kb、750bp、500bp、250bp、100bp)，泳道 1 为质粒 pColdTF 被 Xba I 和 Nde I 双切后电泳图，泳道 2 为重组质粒 pColdTF-Hep01 被 Xba I 和 Nde I 双切后电泳图，箭头所指处为肝素酶 I 基因通过 Xba I 和 Nde I 双酶切得到的 1.1kb 片段的质粒进行测序，将含有具有序列表中序列 1 的第 1414-2502 位核苷酸序列的肝素酶 I 融合蛋白编码基因的 pColdTF 重组载体命名为 pColdTF-HepI。

[0046] 三、肝素酶 I 融合蛋白 pColdTF-HepI 的表达

[0047] 提取步骤二中含有 pColdTF-HepI 的大肠杆菌 DH5α 中的质粒，按照常规方法转化大肠菌 BL21(DE3)。E.coli DH5α、E.coli BL21(DE3)、感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司。经过氨苄青霉素筛选和利用步骤一中步骤 1 提供的引物进行菌落 PCR 鉴定，得到含有 pColdTF-HepI 的大肠杆菌 BL21(DE3)，即 BL21(DE3)/pColdTF-HepI 作为表达 pColdTF-HepI 的工程菌。

[0048] 以质粒 pColdTF 转化大肠杆菌 BL21(DE3)，得到空载体对照 BL21(DE3)/pColdTF。

[0049] 以下操作对上面的工程菌平行进行。

[0050] 将空载体对照和工程菌分别在含氨苄青霉素抗性的 LB 培养基 (NaCl10g/L，酵母提取物为 5g/L，蛋白胨 10g/L，含 100μg/L 氨苄青霉素)37 摄氏度培养 2.5 小时后，加入终浓度为 005mM IPTG16 摄氏度诱导 24 小时。10000rpm，8 分钟离心收集菌体并用 20mmol/LTris-HCl(pH7.5) 洗涤两次，重悬至 OD_{600} 约为 8.000 附近。将上面 OD_{600} 约为 8.000 重悬液进行超声破碎 (输出功率为 300W，每次超声 3 秒和间歇 3 秒的处理 198 次)，12000rpm，30 分钟离心，超声破碎后离心所得的上清液即为粗酶液。

[0051] 酶活力 (单位为 IU/L) 的检测采用 232nm 的光吸收法，1IU 的酶活定义为 30 摄氏度每分钟产生 1μmol 不饱和键的反应效力。取肝素底物溶液 0.5ml(25g/L 肝素，40mM NaCl，3.5mM CaCl2，17mM Tris-HCl，pH7.5)，加入上步中所得的粗酶液，其他体积以 Tris 缓冲液补充，最终的反应体积为 1.5ml，测单位时间内在 232nm 的吸光度变化 ΔA232。消光系数 ε = 3800M-1。比酶活 (单位为 IU/mg 蛋白) 的定义为酶活力与粗酶液蛋白浓度 (单位为 mg/L) 的比值。蛋白浓度监测采用常规的 Bradford 法。

[0052] 结果如表 1 所示，空载体对照菌株 BL21(DE3)/pColdTF 诱导培养后无酶活，工程菌 BL21 表达出了有活性的可溶性 pColdTF-HepI 融合蛋白。

[0053] 经过测序，BL21(DE3)/pColdTF-Hep01 表达出的融合蛋白的氨基酸序列如序列表 SEQ ID No :2 所示 ；并且该融合蛋白 pColdTF-HepI 中 pColdTF 的氨基酸序列如 SEQ ID No :2 的自氨基酸第 1-471 所示 ；该融合蛋白中的 HepI 的氨基酸序列如 SEQ ID No :2 的自氨基酸第 471-834 所示。

[0054] 对最佳宿主 BL21 表达的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳 ：取上述超声破碎后离心所得的上清夜 (粗酶液)5μl 做可溶蛋白组分 SDS-PAGE 电泳，取上述超声破碎后离心所得的沉淀来做不可溶蛋白组分 SDS-PAGE 电泳。结果如图 5 所示。

[0055] 图 5 中 M 为 marker(由上至下大小为 116kD，66.2kD，45kD，35kD，25kD，18.4kD，14.4kD ；泳道 1、对照菌株破壁前菌体，上样量 10μL，泳道 2、重组菌破壁前菌体，上样量 10μL，泳道 3、重组菌破壁后上清，上样量 10μL，泳道 4、经镍柱纯化的 HCDase，上样量 10μL(目的蛋白 91.7KDa)。

[0056] 实施例 2、通过镍柱纯化肝素酶 I 融合蛋白 pColdTF-HepI

[0057] 将 pColdTF-HepI 转化大肠杆菌菌株 BL21(DE3)(购自美国 Novagen 公司)，然后按照该公司提供的操作步骤进行重组酶诱导表达。并用 Ni Sepharose6Fast Flow(GE) 凝胶对 HepI 融合蛋白进行纯化，纯化条件按照 GE 公司的产品手册操作。用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测重组 pColdTF-HepI 的纯化情况，结果如图 5 的 5 号泳道所示，纯化后的重组 HepI 融合蛋白在电泳胶上呈单一条带，且位置与预测的分子量相吻合。

[0058] 实施例 3、HepI 融合蛋白的酶活测定

[0059] 将质量浓度为 1％肝素、pColdTF-HepI 酶液、5 倍缓冲液 (250mM Tris-HCl、500mM NaCl、10mM $CaCl_2$，PH7.9) 以及水按 2 :1 :2 :5(体积比) 的比例混合后，在最适温度和最适 pH 下反应 2-10min，按前述的紫外法测酶活力 (Yamagata，Saito et al. 1968)，同时用购于康为世纪公司的蛋白质定量试剂盒测定 HepI 融合蛋白酶液的蛋白含量，结果表明重组 HepI 融合蛋白对肝素的比活为 200U/mg。

[0060] 实施例 4、HepI 融合蛋白降解肝素降解产物的高效液相 (HPLC) 分析

[0061] 将质量浓度为 1％肝素、HepI 融合蛋白酶液、5 倍缓冲液 (250mM Tris-HCl、500mM NaCl、10mM $CaCl_2$, PH7.9) 缓冲液以及水按 2 :1 :2 :5(体积比) 的比例混合后，在最适温度和最适 pH 下反应 10min 条件下反应，进行 HPLC 分析。HPLC 分析条件为凝胶柱 :superdex peptide10/300GL(GE) ;流动相 :0.2M 碳酸氢铵 ;流速 :0.4mL/min ;检测条件 :UV232nm。

[0062] 结果如图 6 所示，从图 6 可以看出经 HepI 融合蛋白降解后，肝素寡糖产物聚合度随降解时间的延长而快速降低，最终转变成二糖。该结果表明 HepI 融合蛋白属于内切肝素 / 硫酸乙酰肝素裂解酶，可被用于肝素 / 硫酸乙酰肝寡糖的制备及其构效关系研究。

[0063] 实施例 5、切除 HepI 融合蛋白水溶性蛋白标签后酶活比较

[0064] 将质量浓度为 1％肝素、HepI 酶液、5 倍缓冲液 (250mM Tris-HCl、500mM NaCl、10mM $CaCl_2$, PH7.9) 缓冲液以及水按 2 :1 :2 :5(体积比) 的比例混合后，在最适温度和最适 pH 下反应 10min 条件下反应，

[0065] 以上 HepI 酶是重组 HepI 融合蛋白经抗凝血酶在 37 度处理 pColdTF-Hep012h 切除水溶性蛋白标签后，加入到以上反应体系中，按前述的紫外法测酶活力 (Yamagata, Saito et al. 1968)，同时用购于康为世纪公司的蛋白质定量试剂盒测定 pColdTF-HepI 酶液的蛋白含量，结果表明重组 pColdTF-HepI 已切除水溶性标签对肝素的比活为 250U/mg，接近天然酶活力。

[0066] 说明书中涉及的参考文献

[0067] 1. Castelli R, Porro F, and Tarsia P. (2004) The heparins and cancer: review of clinical trials and biological properties. Vasc Med, 9:205

[0068] 2. Casu B. (2005) Structure and active domains of heparin. In: Garg HG, Linhardt RJ, Hales CA (eds) Chemistry and biology of heparin and heparan sulfate. Elsevier, London, pp1 - 28

[0069] 3. Tripathi CK1, Banga J, and Mishra V. (2012) Microbial heparin/heparan sulphate lyases: potential and applications. Appl Microbiol Biotechnol. 94:307-21

[0070] 4. Linhardt RJ, Galliher PM, Cooney CL (1987) Polysaccharide lyases. Appl. Biochem. Biotechnol. 12:135 - 176

[0071] 5. Linhardt RJ, Turnbull JE, Wang HM, Loganathan D, Gallagher JT (1990) Examination of the substrate specificity of heparin and heparan sulfate lyases. Biochemistry29:2611 - 2617

[0072] 6. Godavarti R, Sasisekharan R (1996) A comparative analysis of the primary sequences and characteristics of heparinases I, II, and III from Flavobacterium heparinum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 229:770 - 777

[0073] 7. Godavarti R, Davis M, Venkataraman G, Cooney C, Langer R, Sasisekharan R (1996) Heparinase III from Flavobacterium heparinum: cloning and recombinant expression in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 225:751 - 758

[0074] 8. Sasisekharan R, Bulmer M, Moremen KW, Cooney CL, Langer R (1993) Cloning and expression of heparinase I gene from Flavobacterium heparinum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:3660 - 3664

[0075] 9. Shaya D, Li Y, Cygler M(2004)Crystallization and preliminary X-ray analysis of heparinase II from Pedobacter heparinus. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60:1644 - 1646

[0076] 10. Yamagata, T., et al. (1968). "Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases." The Journal of biological chemistry243(7):1523-1535。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 山东大学
<120> 一种高表达水溶性肝素酶I融合蛋白及其编码基因
<160> 2
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 2511
<212> DNA
<213> 人工合成

<400> 1

atgaatcaca aagtgcatca tcatcatcat cacatgcaag tttcagttga aaccactcaa 60
ggccttggcc gccgtgtaac gattactatc gctgctgaca gcatcgagac cgctgttaaa 120
agcgagctgg tcaacgttgc gaaaaaagta cgtattgacg gcttccgcaa gggcaaagtg 180
ccaatgaata tcgttgctca gcgttatggc gcgtctgtac gccaggacgt tctgggtgac 240
ctgatgagcc gtaacttcat tgacgccatc attaaagaaa aaatcaatcc ggctggcgca 300
ccgacttatg ttccgggcga atacaagctg ggtgaagact tcacttactc tgtagagttt 360
gaagtttatc cggaagttga actgcaaggt ctggaagcga tcgaagttga aaaaccgatc 420
gttgaagtga ccgacgctga cgttgacggc atgctggata ctctgcgtaa acagcaggcg 480
acctggaaag aaaaagacgg cgctgttgaa gcagaagacc gcgtgaccat cgacttcacc 540
ggttctgtag acggcgaaga gttcgaaggc ggtaaagcgt ctgatttcgt actggcgatg 600
ggccagggtc gtatgatccc gggctttgaa gacggtatca aaggccacaa agctggcgaa 660
gagttcacca tcgacgtgac cttcccggaa gaataccacg cagaaaacct gaaaggtaaa 720
gcagcgaaat tcgctatcaa cctgaagaaa gttgaagagc gtgaactgcc ggaactgacc 780
gcagagttca tcaaacgttt cggcgttgaa gatggttccg tagaaggtct gcgcgctgaa 840
gtgcgtaaaa acatggagcg cgagctgaag agcgccatcc gtaaccgcgt taagtctcag 900
gcgatcgaag gtctggtaaa agctaacgac atcgacgtac cggctgcgct gatcgacagc 960
gaaatcgacg ttctgcgtcg ccaggctgca cagcgtttcg gtggcaacga aaaacaagct 1020
ctggaactgc cgcgcgaact gttcgaagaa caggctaaac gccgcgtagt tgttggcctg 1080
ctgctgggcg aagttatccg caccaacgag ctgaaagctg acgaagagcg cgtgaaaggc 1140
ctgatcgaag agatggcttc tgcgtacgaa gatccgaaag aagttatcga gttctacagc 1200
aaaaacaaag aactgatgga caacatgcgc aatgttgctc tggaagaaca ggctgttgaa 1260
gctgtactgg cgaaagcgaa agtgactgaa aaagaaacca ctttcaacga gctgatgaac 1320
cagcaggcgt ccgcgggtct ggaagttctg ttccaggggc cctccgcggg tctggtgcca 1380
cgcggtagtg gtggtatcga aggtaggcat atgcagcaaa aaaaatccgg taacatccct 1440
taccgggtaa atgtgcaggc cgacagtgct aagcagaagg cgattattga caacaaatgg 1500
gtggcagtag gcatcaataa accttatgca ttacaatatg acgataaact gcgctttaat 1560
ggaaaaccat cctatcgctt tgagcttaaa gccgaagaca attcgcttga aggttatgct 1620
gcaggagaaa caaagggccg tacagaattg tcgtacagct atgcaaccac caatgatttt 1680
aagaaatttc ccccaagcgt ataccaaaat gcgcaaaagc taaaaaccgt ttatcattac 1740
ggcaaaggga tttgtgaaca ggggagctcc cgcagctata ccttttcagt gtacataccc 1800
tcctccttcc ccgacaatgc gactactatt tttgcccaat ggcatggtgc acccagcaga 1860
acgcttgtag ctacaccaga gggagaaatt aaaacactga gcatagaaga gtttttggcc 1920

[0002]

```
ttatacgacc gcatgatctt caaaaaaaat atcgcccatg ataaagttga aaaaaaagat   1980
aaggacggaa aaattactta tgtagccgga aagccaaatg gctggaaggt agaacaaggt   2040
ggttatccca cgctggcctt tggtttttct aaagggtatt tttacatcaa ggcaaactcc   2100
gaccggcagt ggcttaccga caaagccgac cgtaacaatg ccaatcccga gaatagtgaa   2160
gtaatgaagc cctattcctc ggaatacaaa acttcaacca ttgcctataa aatgcccttt   2220
gcccagttcc ctaaagattg ctggattact tttgatgtcg ccatagactg gacgaaatat   2280
ggaaaagagg ccaatacaat tttgaaaccc ggtaagctgg atgtgatgat gacttatacc   2340
aagaataaga aaccacaaaa agcgcatatc gtaaaccagc aggaaatcct gatcggacgt   2400
aacgatgacg atggctatta cttcaaattt ggaatttaca gggtcggtaa cagcacggtc   2460
ccggttactt ataacctgag cgggtacagc gaaactgcca gatctagata g            2511
```

<210> 2
<211> 836
<212> PRT
<213> 人工合成

<400> 2

```
Met Asn His Lys Val His His His His His His Met Gln Val Ser Val
1               5                  10                  15
Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr Ile Thr Ile Ala Ala
            20                  25                  30
Asp Ser Ile Glu Thr Ala Val Lys Ser Glu Leu Val Asn Val Ala Lys
        35                  40                  45
Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys Val Pro Met Asn Ile
    50                  55                  60
Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln Asp Val Leu Gly Asp
65                  70                  75                  80
Leu Met Ser Arg Asn Phe Ile Asp Ala Ile Ile Lys Glu Lys Ile Asn
                85                  90                  95
Pro Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Val Pro Gly Glu Tyr Lys Leu Gly Glu
            100                 105                 110
Asp Phe Thr Tyr Ser Val Glu Phe Glu Val Tyr Pro Glu Val Glu Leu
        115                 120                 125
Gln Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro Ile Val Glu Val Thr
    130                 135                 140
Asp Ala Asp Val Asp Gly Met Leu Asp Thr Leu Arg Lys Gln Gln Ala
145                 150                 155                 160
Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Val Glu Ala Glu Asp Arg Val Thr
                165                 170                 175
Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu Phe Glu Gly Gly Lys
            180                 185                 190
Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly Arg Met Ile Pro Gly
        195                 200                 205
Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly Glu Glu Phe Thr Ile
```

[0003]

210 215 220
Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu Asn Leu Lys Gly Lys
225 230 235 240
Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val Glu Glu Arg Glu Leu
245 250 255
Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Val Glu Asp Gly
260 265 270
Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys Asn Met Glu Arg Glu
275 280 285
Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser Gln Ala Ile Glu Gly
290 295 300
Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala Ala Leu Ile Asp Ser
305 310 315 320
Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln Arg Phe Gly Gly Asn
325 330 335
Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu Phe Glu Glu Gln Ala
340 345 350
Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly Glu Val Ile Arg Thr
355 360 365
Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys Gly Leu Ile Glu Glu
370 375 380
Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val Ile Glu Phe Tyr Ser
385 390 395 400
Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn Val Ala Leu Glu Glu
405 410 415
Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys Val Thr Glu Lys Glu
420 425 430
Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala Ser Ala Gly Leu Glu
435 440 445
Val Leu Phe Gln Gly Pro Ser Ala Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly
450 455 460
Gly Ile Glu Gly Arg His Met Gln Gln Lys Lys Ser Gly Asn Ile Pro
465 470 475 480
Tyr Arg Val Asn Val Gln Ala Asp Ser Ala Lys Gln Lys Ala Ile Ile
485 490 495
Asp Asn Lys Trp Val Ala Val Gly Ile Asn Lys Pro Tyr Ala Leu Gln
500 505 510
Tyr Asp Asp Lys Leu Arg Phe Asn Gly Lys Pro Ser Tyr Arg Phe Glu
515 520 525
Leu Lys Ala Glu Asp Asn Ser Leu Glu Gly Tyr Ala Ala Gly Glu Thr
530 535 540
Lys Gly Arg Thr Glu Leu Ser Tyr Ser Tyr Ala Thr Thr Asn Asp Phe
545 550 555 560
Lys Lys Phe Pro Pro Ser Val Tyr Gln Asn Ala Gln Lys Leu Lys Thr
565 570 575

[0004]

Val Tyr His Tyr Gly Lys Gly Ile Cys Glu Gln Gly Ser Ser Arg Ser
580 585 590
Tyr Thr Phe Ser Val Tyr Ile Pro Ser Ser Phe Pro Asp Asn Ala Thr
595 600 605
Thr Ile Phe Ala Gln Trp His Gly Ala Pro Ser Arg Thr Leu Val Ala
610 615 620
Thr Pro Glu Gly Glu Ile Lys Thr Leu Ser Ile Glu Glu Phe Leu Ala
625 630 635 640
Leu Tyr Asp Arg Met Ile Phe Lys Lys Asn Ile Ala His Asp Lys Val
645 650 655
Glu Lys Lys Asp Lys Asp Gly Lys Ile Thr Tyr Val Ala Gly Lys Pro
660 665 670
Asn Gly Trp Lys Val Glu Gln Gly Gly Tyr Pro Thr Leu Ala Phe Gly
675 680 685
Phe Ser Lys Gly Tyr Phe Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Asp Arg Gln Trp
690 695 700
Leu Thr Asp Lys Ala Asp Arg Asn Asn Ala Asn Pro Glu Asn Ser Glu
705 710 715 720
Val Met Lys Pro Tyr Ser Ser Glu Tyr Lys Thr Ser Thr Ile Ala Tyr
725 730 735
Lys Met Pro Phe Ala Gln Phe Pro Lys Asp Cys Trp Ile Thr Phe Asp
740 745 750
Val Ala Ile Asp Trp Thr Lys Tyr Gly Lys Glu Ala Asn Thr Ile Leu
755 760 765
Lys Pro Gly Lys Leu Asp Val Met Met Thr Tyr Thr Lys Asn Lys Lys
770 775 780
Pro Gln Lys Ala His Ile Val Asn Gln Gln Glu Ile Leu Ile Gly Arg
785 790 795 800
Asn Asp Asp Asp Gly Tyr Tyr Phe Lys Phe Gly Ile Tyr Arg Val Gly
805 810 815
Asn Ser Thr Val Pro Val Thr Tyr Asn Leu Ser Gly Tyr Ser Glu Thr
820 825 830
Ala Arg Ser Arg
835

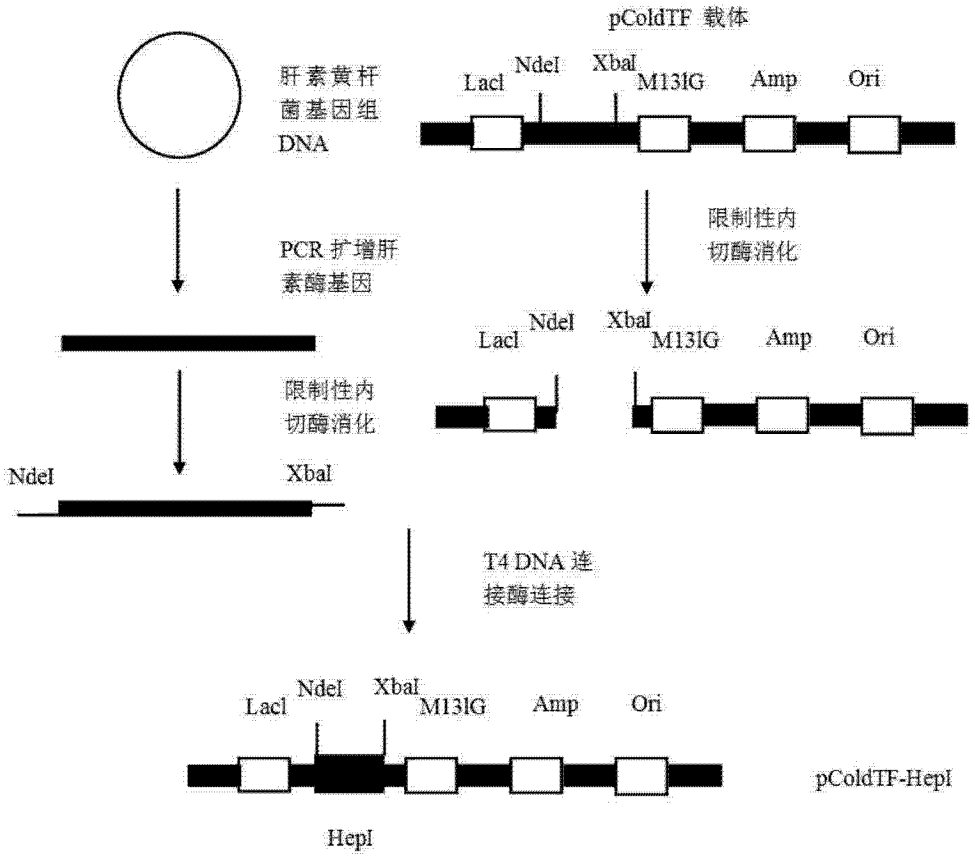

pColdTF 载体
肝素黄杆菌基因组DNA
LacI
NdeI
XbaI
M13IG
Amp
Ori
PCR 扩增肝素酶基因
限制性内切酶消化
限制性内切酶消化
NdeI
XbaI
T4 DNA 连接酶连接
HepI
pColdTF-HepI

图 1

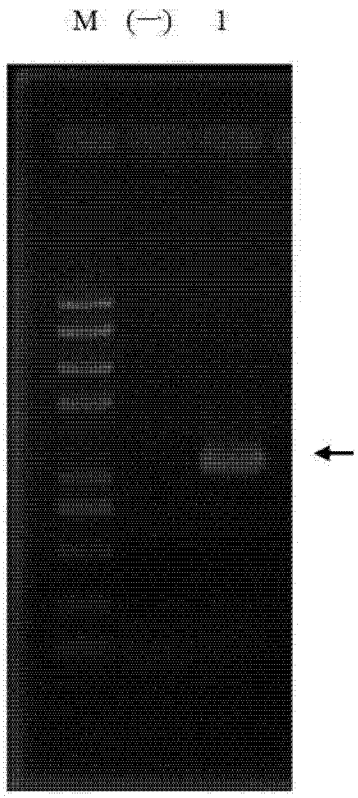


图 2

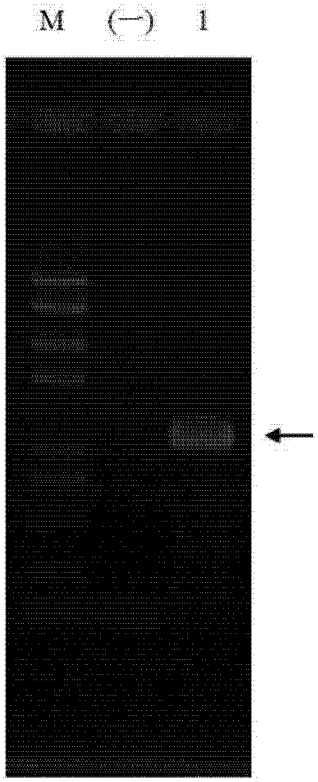


图 3

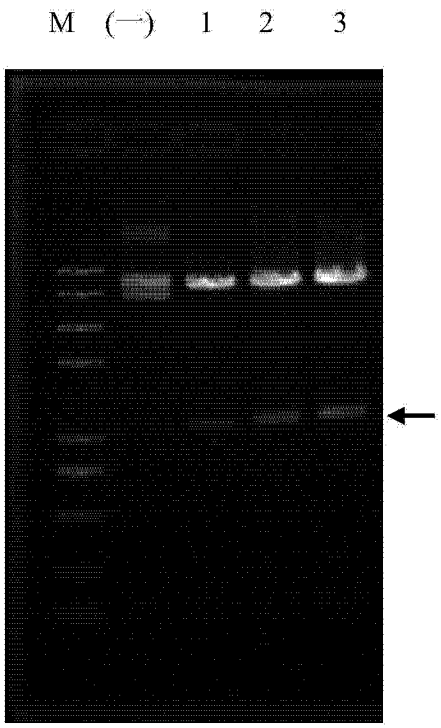


图 4

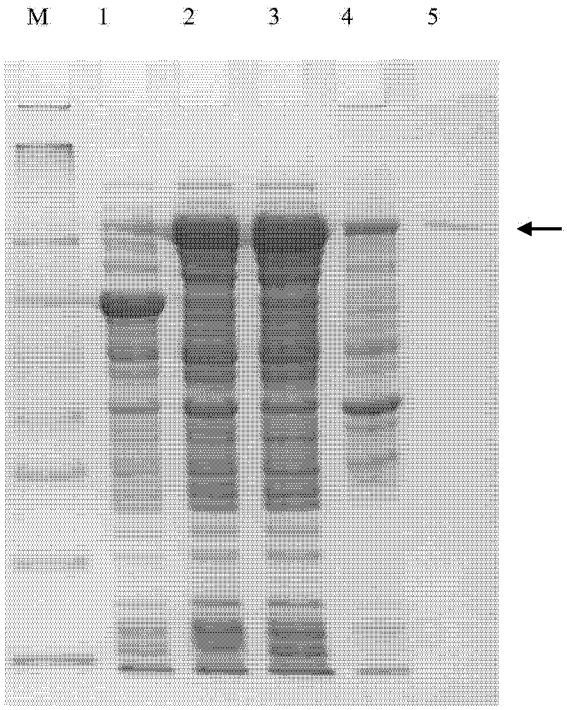


图 5

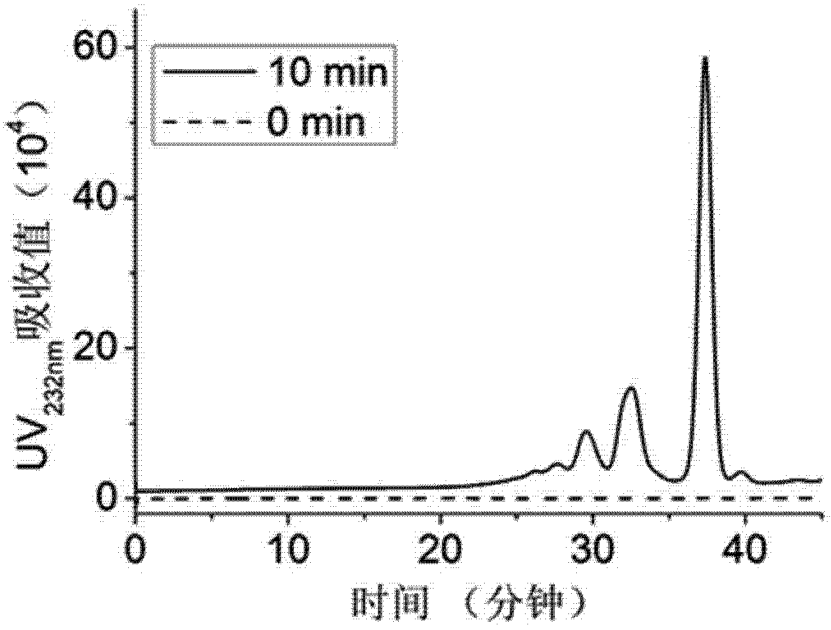


图 6