(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 101899460 A
(43)申请公布日 2010.12.01

(21)申请号 201010113940.3

(22)申请日 2010.02.24

(71)申请人 浙江大学
地址 310058 浙江省杭州市西湖区浙大路38号

(72)发明人 王晓慧 应盛华 冯明光

(74)专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有限公司 33100
代理人 刘晓春

(51)Int.Cl.
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)

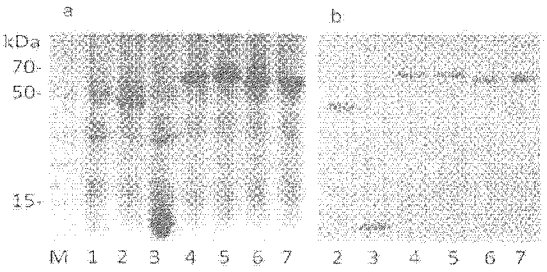
权利要求书 1 页 说明书 12 页 序列表 8 页
附图 2 页

(54)发明名称

一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法

(57)摘要

本发明提供了一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法，它包括以下步骤：硫氧还蛋白体系中硫氧还蛋白基因 Trx 和硫氧还蛋白还原酶基因 TrxR 的获得，设计融和肽序列，利用融合肽序列将基因 Trx 和 TrxR 融合，然后获得含有融合基因的重组菌株，最后进行异源表达纯化。本发明将在工业中具有广泛应用意义的 AnTrx 体系的两个蛋白的基因克隆，并将二者的基因进行融合改良，通过和食品中蛋白的孵育以还原食品蛋白中的二硫键，从而降低其过敏原反应。同时，通过基因融合的改良使得 An-TrxR 和 An-Trx 在作为一种食品添加剂时，在食品工业应用上得到简便。



CN 101899460 A

1. 一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法，其特征在于它包括以下步骤：

硫氧还蛋白体系中硫氧还蛋白基因 Trx 和硫氧还蛋白还原酶基因 TrxR 的获得，设计融和肽序列，利用融合肽序列将基因 Trx 和 TrxR 融合，然后获得含有融合基因的重组菌株，最后进行异源表达纯化。

2. 根据如权利要求 1 所述的一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法，其特征在于所述硫氧还蛋白体系为黑曲霉硫氧还蛋白体系。

3. 根据如权利要求 1 所述的一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法，其特征在于所述融合基因表达后的融合蛋白 N 端的 AnTrx 的催化活性高于处于其 C 端的 AnTrx 的活性。

4. 根据如权利要求 1 所述的一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法，其特征在于所述融合基因表达后的融合蛋白 N 端的 AnTrxR 的催化活性高于处于其 C 端的 AnTrxR 的活性。

5. 根据如权利要求 1 所述的一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法，其特征在于所述融合肽序列为 Link A 和 Link B，所述 Link A 为根据麻风分枝杆菌 (Mycobacterium leprae) 中的 TrxR 和 Trx 之间的 22aa 的天然连接肽基因序列设计的，所述 Link B 为人工设计的柔性肽 $(GGGGS)_3$。

一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，涉及生物工程技术领域的 DNA 重组技术和应用，具体涉及一种利用基因工程技术获得相应生物蛋白降低食物过敏性的的方法。

背景技术

[0002] 过敏是全世界各地普遍存在的一个问题，而食物过敏是过敏性疾病的一种，而且是严重过敏性疾病的诱因。流行病学研究显示，约 33％的过敏反应由食物诱发，食物过敏已成为重要的食品安全问题，引起了广泛的关注。据流行病学调查，在美国约有 2％～ 2.5％人 (600 万～ 700 万) 经历过食物过敏，婴幼儿发生率约 4％～ 6％，儿童和成人约 1％ -2％。在英国，食物过敏反应的发生率成人为 1.4％～ 1.9％，儿童占 5％。大约有 1000 万人发病，其中 100 万人反应严重。荷兰白种人食物过敏发生率成人为 1.4％，儿童为 5％～ 7％。重庆医科大学儿童医院在一年内对 314 名 2 岁以下儿童进行食物过敏流行病调查，确诊的食物过敏发病率为 5.2％。

[0003] 食物过敏有两种类型 :一种是速发型过敏反应，表现为吃了致过敏的食物 2h 内出现荨麻疹、血尿、哮喘发作等。严重的过敏反应伴随着呼吸困难，严重者会虚脱休克，甚至危及生命。随着食品种类的增多，近年来过敏性疾病呈持续上升趋势。

[0004] 目前，各种类型的食物过敏没有特效药，治疗的唯一有效措施是严格避免特定食物抗原的摄入。同时，由于食品的种类繁多，地区、季节、个人饮食习惯都各不相同，因而治疗和诊断带来困难。同时，虽然并非所有的蛋白质都会引起过敏，但是食物中 90％的过敏原是蛋白质，因而预防食物过敏的重要途径是预防食物中的蛋白质过敏。大多数蛋白质引起的食物过敏是由于蛋白质内部的二硫键。因此将蛋白中的二硫键还原可以降低食物中的过敏原性。生物体中的硫氧还蛋白系统能够还原蛋白质的二硫键。硫氧还蛋白体系在生物体中广泛存在，是除了谷胱甘肽体系以外的另一个保持细胞内还原势的蛋白体系。完整的硫氧还蛋白系统包括硫氧还蛋白 (Trx) 硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH)。其中硫氧还蛋白是一种 12-13kD 的小分子蛋白，含有一个保守活性区域 (WCGPC)，还原型 Trx 在细胞氧化还原调节和抗氧化防御上有着重要的作用。硫氧还蛋白还原酶是一种 NADPH 依赖的饱含 FAD 结构域的二聚体酶，属于吡啶核苷酸 - 二硫化物氧化还原酶家族成员，其在体系中维持 Trx 的还原型。在 NADPH 的存在下，硫氧还蛋白被硫氧还蛋白还原酶还原，然后，被还原的硫氧还蛋白接着去还原目标蛋白中的二硫键。已有的研究证明，大肠杆菌中的硫氧还蛋白体系可以还原牛奶中的 β - 乳球蛋白和小麦醇溶蛋白，还原后的蛋白被证明有效地降低了过敏原性。但是该种蛋白体系尚未在食品工业中作为食品添加剂而投入应用，同时，硫氧还蛋白体系中含有两种蛋白，在实际操作中多有不便。

[0005] 丝状真菌黑曲霉是一种重要的工业微生物和模式真菌，其基因组全序已经公布，它被广泛应用于发酵工业，用于生产柠檬酸和各种不同的工业用酶。在进一步开发生产燃料和化学品的生物过程中，黑曲霉是一个万能的细胞工厂，因为它能耐受低 pH 值，可以利用广泛的碳源，并有相对较高的转化率。而作为细胞两大抗氧化体系之一的硫氧还蛋白体

系，在黑曲霉发酵过程中，对不利条件的耐受上，起到很大的作用。

[0006] 研究发现，麻风分枝杆菌 (Mycobacterium leprae) 中的 TrxR 和 Trx 之间存在一个由 22 个氨基酸组成的天然连接肽 (Wieles et al.，1995；Wang et al.，1998)，可用于其他微生物 Trx 系统的酶融合。近年来，蛋白质融合技术的发展日益完善，并被广泛用于获得双功能或多功能的蛋白质或特殊功能的抗体。基于重叠延伸术 (splicing-by-overlap extension，SOE) 的基因首尾相连融合方法 (Horton et al.，1989；Lu et al.，2006)，目前常被用于融合蛋白的构建，其优点是不会引入任何额外的氨基酸残基，也无需对连接方向进行识别。

[0007] 因此，利用黑曲霉中的硫氧还蛋白体系来研究开发高效、便利的食品添加剂，对于降低加工食品的变应原性至关重要，而寻找适当的 Trx 系统进行改良，是推进这一研究的重要方式。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供了一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法，它利用 SOE(splicing-by-overlap extension，基于重叠延伸术）法得到含有黑曲霉硫氧还蛋白基因和硫氧还蛋白还原酶基因的融合蛋白基因，再进一步得到含有融合基因的重组菌株，通过将二者的基因进行融合改良，并通过和食品中蛋白的孵育以还原食品蛋白中的二硫键，从而降低食品过敏原反应。为此本发明采用以下技术方案：它包括以下步骤：硫氧还蛋白体系中硫氧还蛋白基因 Trx 和硫氧还蛋白还原酶基因 TrxR 的获得，设计融和肽序列，利用融合肽序列将基因 Trx 和 TrxR 融合，然后获得含有融合基因的重组菌株，最后进行异源表达纯化。

[0009] 本发明的技术方案具体依次通过以下步骤实现：

[0010] (1) 硫氧还蛋白体系相关基因的获得

[0011] 根据荷兰帝斯曼公司报道的黑曲霉硫氧还蛋白和硫氧还蛋白还原酶的疑似基因序列，用 PCR 方法分别从黑曲霉基因组中扩增出 An-TrxR 和 An-Trx。并根据基因序列设计带酶切位点 NdeI 和 HindIII 的引物。

[0012] (2) 设计融和肽序列

[0013] 根据硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白的蛋白结构，设计融合肽序列 (Link A，LinkB)。Link A 为根据麻风分枝杆菌 (Mycobacterium leprae) 中的 TrxR 和 Trx 之间的 22aa 的天然连接肽基因序列设计的。Link B 为人工设计的柔性肽 $(GGGGS)_3$。

[0014] (3) 含有硫氧还蛋白体系融合基因的重组菌株的构建

[0015] 利用 SOE 法分别用 Link A 和 Link B 将 An-TrxR 和 An-Trx 序列融合。用内切酶 NdeI 和 HindIII 分别切开融合基因的产物和质粒 Pet-29b。将融合序列与质粒相连。并转入宿主菌 BL21 中表达。

[0016] (4) 异源表达纯化

[0017] 利用 Pet29b 含有的 6 个组氨酸标签，通过镍柱亲和层析纯化硫氧还蛋白体系的融合蛋白。

[0018] 本发明根据黑曲霉所具有的较高的抗逆能力的特点，利用硫氧还蛋白体系能够还原二硫键，并且蛋白中的二硫键是引起食物过敏的主要原因的这一原理，利用 SOE 法将硫

氧还蛋白体系中的硫氧还蛋白(Trx)和硫氧还蛋白还原酶(TrxR)进行融合,以降低食品中蛋白过敏原反应。

[0019] 本发明的优点在于,其将在工业中具有广泛应用意义的AnTrx体系的两个蛋白的基因克隆,并将二者的基因进行融合改良,通过和食品中蛋白的孵育以还原食品蛋白中的二硫键,从而降低其过敏原反应。同时,通过基因融合的改良使得An-TrxR和An-Trx在作为一种食品添加剂时,在食品工业应用上得到简便。

附图说明

[0020] 图1为本发明中亲本AnTrx/AnTrxR及RMT、TMR、RGT、TGR四种融合蛋白表达后的SDS-PAGE图谱,M:分子量标记。

[0021] 图2为本发明中室温下DTT还原AnTrx和融合蛋白中AnTrx部分后,其还原牛胰岛素的活性(OD650)图。

[0022] 图3中左图为本发明中亲本蛋白(AnTrx、AnTrxR)与融合蛋白RMT和RGT对麦醇溶蛋白二硫键的还原,利用mBBr标记还原后的巯基并经SDS-PAGE电泳后荧光显色图,右图泳道4～8与左图相同,但经考马思亮蓝R250染色。

具体实施方式

[0023] 实施例1

[0024] 本发明所述的一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法依次包括以下步骤:

[0025] 1.AnTrx基因的克隆

[0026] (1)从NCBI中找到黑曲霉(A.niger)基因组中类黑曲霉硫氧还蛋白相关的序列号(CAK43619)。

[0027] (2)菌株总DNA的提取:接种黑曲霉(Aspergillus niger)3.4523菌株孢子悬浮液到马铃薯培养基PDA平板上,在25℃下培养3天后,通过液氮研磨法提取总DNA。

[0028] (3)设计一对引物,从黑曲霉基因组中得到含有内含子的AnTrx序列。

[0029] 正向引物:AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG(序列表中第1个序列)

[0030] 反向引物:TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG(序列表中第2个序列)

[0031] 以黑曲霉基因组为模板,扩增含有内含子的AnTrx的片段(456bp)。PCR采用50μl体系,包括50ng黑曲霉基因组、0.2μM引物、0.2mM dNTP、2.5mM$MgCl_2$、1×taq聚合酶缓冲液和1.5U taq聚合酶和1.5Upfu聚合酶。混匀后先94℃变性5min,此后经35个循环:94℃变性30s、65℃退火30s和72℃延伸45s;循环后72℃再延伸7min。扩增得到456bp的片段,割胶回收,与pGEMT-easy载体连接,经转化及鉴定后送样测序,确定得到的序列为含有内含子的硫氧还蛋白序列。

[0032] (4)设计一对引物,利用基因重叠延伸法(SOE)法获得无内含子的AnTrx基因序列。

[0033] 正向引物:

[0034] ATCATATGTCTCACAAGGTTCAC GACATCACCTCTAAGGCCGAGTTCGCCGAGA(序列表中第3个序列)

[0035] 反向引物：TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 4 个序列）

[0036] 利用该引物从已经得到的含有内含子的 AnTrx 序列中得到无内含子的 AnTrx 序列。

[0037] 无内含子的 AnTrx 片段的扩增：以含有内含子的 AnTrx 基因组为模板，扩增无内含子的部分片段 (324bp)。PCR 采用 50μl 体系，包括 50ng 含内含子的 AnTrxDNA、0.2μM 引物、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5Utaq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min，此后经 35 个循环：94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 45s；循环后 72℃再延伸 7min。扩增得到 308bp 的片段，割胶回收，与 pGEMT-easy 载体连接，经转化及鉴定后送样测序，确定得到的序列为无内含子的硫氧还蛋白序列。

[0038] 2. AnTrxR 基因的克隆

[0039] (1) 从 NCBI 中找到黑曲霉 (A. niger) 基因组中类黑曲霉硫氧还蛋白相关的序列号 (CAK43946)。

[0040] (2) 菌株总 DNA 的提取：接种黑曲霉 (Aspergillus niger)3.4523 菌株孢子悬浮液到马铃薯培养基 PDA 平板上，在 25℃下培养 3 天后，通过液氮研磨法提取总 DNA。

[0041] (3) 设计引物，从黑曲霉基因组中得到含有内含子的 AnTrxR 序列。

[0042] 正向引物：AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG（序列表中第 5 个序列）

[0043] 反向引物：TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 6 个序列）

[0044] 含有内含子的 AnTrxR 片段的扩增：以黑曲霉基因组为模板：PCR 采用 50μl 体系，包括 50ng 含内含子的黑曲霉基因组 DNA、0.2μM 引物、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5U taq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min，此后经 35 个循环：94℃变性 30s、65℃退火 60s 和 72℃延伸 30s；循环后 72℃再延伸 7min。扩增得到 1240bp 的片段。

[0045] (4) 利用基因重叠延伸法 (SOE) 法获得无内含子的 AnTrxR 基因序列

[0046] 从已经得到的含有内含子的 AnTrxR 序列中扩增得到无内含子的 AnTrxR 序列，由于整个基因序列中含有两个内含子，因此分为两段扩增无内含子的部分片段 a1 和 b1，需设计 a、b、c 三对引物，用引物 a 组得到去除第一个内含子的片段，用引物 b 组得到去除第二个内含子的片段，所得到得两个片度互相有重叠的部分，再利用引物 c 组，将两个重叠的区域融合在一起以后得到无内含子的 AnTrxR 基因。

[0047] 引物 a 组：

[0048] 正向引物：

[0049] ATAGCTCTCATATGGTGCACACCAACGTCGTTATCATCGGCTCCGGCCCCGCCGCCCACA（序列表中第 7 个序列）

[0050] 反向引物：CAATGCAGCCGGATCCGGCACTGGTGATGGCCTGGC（序列表中第 8 个序列）

[0051] 引物 b 组：

[0052] 正向引物：GCCATCACCAGTGCCGGATCCGGCTGCATTGCCGCTC（序列表中第 9 个序列）

[0053] 反向引物：TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 10 个序列）

[0054] 引物 c 组：

[0055] 正向引物：AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG（序列表中第 11 个序列）

[0056] 反向引物：TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 12 个序列）

[0057] 无内含子的AnTrxR片段的扩增：以含有内含子的AnTrxR基因组为模板，由于中间含有两个内含子，因此分为两段扩增无内含子的部分片段a1和b1。

[0058] ①片段a1的扩增：PCR采用50μl体系，包括50ng含内含子的AnTrx DNA、0.2μM引物a组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq聚合酶缓冲液和1.5U taq聚合酶和1.5Upfu聚合酶。混匀后先94℃变性5min，此后经35个循环：94℃变性30s、65℃退火30s和72℃延伸60s；循环后72℃再延伸7min。扩增得到937bp的片段。

[0059] ②片段b1的扩增：PCR采用50μl体系，包括50ng含内含子的AnTrx DNA、0.2μM引物b组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq聚合酶缓冲液和1.5U taq聚合酶和1.5Upfu聚合酶。混匀后先94℃变性5min，此后经35个循环：94℃变性30s、65℃退火30s和72℃延伸30s；循环后72℃再延伸7min。扩增得到195bp的片段，割胶回收后得到两个片段。

[0060] ③再次进行PCR扩增，PCR采用50μl体系，包括25ng a片段的DNA、25ng b片段的DNA、0.2μM引物c组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq聚合酶缓冲液和1.5U taq聚合酶和1.5Upfu聚合酶。混匀后先94℃变性5min，此后经35个循环：94℃变性30s、65℃退火30s和72℃延伸60s；循环后72℃再延伸7min。扩增得到bp的片段。与pGEMT-easy载体连接，经转化及鉴定后送样测序，确定得到的序列为无内含子的硫氧还蛋白序列。

[0061] 3. 连接AnTrxR基因和AnTrx基因的连接肽的基因序列

[0062] 连接肽的基因序列分别为Link A和Link B，Link A为根据麻风分枝杆菌(Mycobacterium leprae)中的TrxR和Trx之间的22aa的天然连接肽基因序列设计的，Link B为人工设计的柔性肽$(GGGGS)_3$。

[0063] 以引物组A1-A3为例，首先利用A1组，将AnTrxR基因序列的末端添加部分前半部分融合肽序列LinkerA，再利用A2组将AnTrx基因的前端添加后半部分融合肽LinkerA序列，AnTrx的前端序列和前面的AnTrxR末端的融合肽序列略有重叠。之后利用重叠延伸法，也就是SOE法，用A3组的引物，将前面得到的两个含有融合肽序列的AnTrxR和AnTrx融合后连接在一起，得到还有融合肽LinkerA的融合蛋白序列。

[0064] 设计引物组B1-B3、C1-C3、D1-D3的原理与设计引物组A1-A3相同。

[0065] ①Linker A：

[0066] GCTAACGAAACAACAGAGGAAACTGGAGACGTTGACAGTACCGACACAACCGATTGGAGCACTGCG(序列表中第13个序列)

[0067] ②LinkerB：

[0068] GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATC (序列表中第14个序列)

[0069] ③利用SOE法重叠延伸得到融合序列。

[0070] 设计引物：

[0071] A1：

[0072] 正向引物：

[0073] AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG(序列表中第15个序列)

[0074] 反向引物：

[0075] GTCGGTACTGTCAACGTCTCCAGTTTCCTCTGTTGTTTCGTTAGCAAGCAGAGGGTTGGACTTGTA(序列表中第16个序列)

[0076] A2：

[0077] 正向引物：

[0078] ACTGGAGACGTTGACAGTACCGACACAACCGATTGGAGCACTGCGATGTCTCACAAGGTTCACGACA（序列表中第 17 个序列）

[0079] 反向引物：

[0080] TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 18 个序列）

[0081] A3：

[0082] 正向引物：

[0083] AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG（序列表中第 19 个序列）

[0084] 反向引物：

[0085] TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 20 个序列）

[0086] B1：

[0087] 正向引物：

[0088] ACTGGAGACGTTGACAGTACCGACACAACCGATTGGAGCACTGCGATGGTGCACACCAACGTCGTTA（序列表中第 21 个序列）

[0089] 反向引物：

[0090] TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 22 个序列）

[0091] B2：

[0092] 正向引物：

[0093] AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG（序列表中第 23 个序列）

[0094] 反向引物：

[0095] GTCGGTACTGTCAACGTCTCCAGTTTCCTCTGTTGTTTCGTTAGCTGCAAGCAGAGCCTGGATCTTC（序列表中第 24 个序列）

[0096] B3：

[0097] 正向引物：

[0098] AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG（序列表中第 25 个序列）

[0099] 反向引物：

[0100] TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 26 个序列）

[0101] C1：

[0102] 正向引物：

[0103] AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG（序列表中第 27 个序列）

[0104] 反向引物：

[0105] CCACCCGACCCACCACCGCCCGAGCCACCGCCACCAAGCAGAGGGTTGGACTTGTA（序列表中第 28 个序列）

[0106] C2：

[0107] 正向引物：

[0108] GCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCCATGTCTCACAAGGTTCACGA（序列表中第 29 个序列）

[0109] 反向引物：

[0110] TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 30 个序列）

[0111] C3：

[0112] 正向引物：

[0113] AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG（序列表中第 31 个序列）

[0114] 反向引物：

[0115] TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 32 个序列）

[0116] D1：

[0117] 正向引物：

[0118] GCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCCATGGTGCACACCAACGTCGTTA（序列表中第 33 个序列）

[0119] 反向引物：

[0120] TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 34 个序列）

[0121] D2：

[0122] 正向引物：

[0123] AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG（序列表中第 35 个序列）

[0124] 反向引物：

[0125] CCACCCGACCCACCACCGCCCGAGCCACCGCCACCTGCAAGCAGAGCCTGGATCTTC（序列表中第 36 个序列）

[0126] D3：

[0127] 正向引物：

[0128] AACACCCATATGTCTCACAAGGTTCACG （序列表中第 37 个序列）

[0129] 反向引物：

[0130] TGGAAGCTTTGCAAGCAGAGCCTGG（序列表中第 38 个序列）

[0131] 4. 以已经得到的 AnTrx 和 AnTrxR 基因序列为模板，分别克隆得到含有部分连接肽序列的基因片段，再对两者进行融合。

[0132] 蛋白质融合技术包括首尾相连的融合 (end-to-end fusion) 与插入式融合 (insertion fusion)，融合后的蛋白组分会因相互作用而增强或削弱各自的活性 (Trujillo et al.，1997)。因此，蛋白质融合需要选择合适的连接肽和融合技术进行优化，尽可能使融合的蛋白组分正向互作。

[0133] 设计以下 RMT、TMR、RGT、TGR 四种融合基因是因为用两种融合肽分别首位颠倒地连接 AnTrxR 基因和 AnTrx 基因，用两种融合肽是为了考察这两种融合肽哪一种对融合蛋白的催化效率的影响更好一些，首位颠倒地连接是因为想要考察 AnTrxR 在 N 端和在 C 端融合的活性是否有所变化，以及 AnTrx 在 N 端和在 C 端的活性是否有所变化。同时，对于整个 AnTrx 体系来说，也想通过设计这四种融合蛋白，想了解究竟是 AnTrxR 放在融合蛋白 N 端的体系酶活高还是将 AnTrxR 放在融合蛋白 C 端的体系酶活高。

[0134] (1) 融合基因 RMT（用 LinkerA 连接 AnTrxR 和 AnTrx) 的获得：

[0135] ①末端含有连接肽序列的 AnTrxR 的基因 (M1) 序列的获得：以不含有内含子的 AnTrxR 基因组为模板，PCR 采用 50μl 体系，包括 50ng 不含内含子的 AnTrxRDNA、0.2μM 引物 A1 组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5U taq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min，此后经 35 个循环：94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延

伸 60s ;循环后 72℃再延伸 7min。

[0136] ②首端含有连接肽序列的 AnTrx 的基因 (M2) 的获得 :以不含有内含子的 AnTrx 基因组为模板,PCR 采用 50μl 体系,包括 50ng 不含内含子的 AnTrxR DNA、0.2μM 引物 A2 组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5Utaq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min,此后经 35 个循环 :94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 30s ;循环后 72℃再延伸 7min。

[0137] ③ RMT 的获得 :将 M1、M2 分别融合 :以 M1 和 M2 基因为模板,PCR 采用 50μl 体系,包括 25ngM1 和 25ng M2、0.2μM 引物 A3 组、0.2mM dNTP、2.5mM$MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5U taq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min,此后经 35 个循环 :94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 100s ;循环后 72℃再延伸 7min。扩增得到 1494bp 的片段。

[0138] (2) 融合基因 TMR(用 LinkerA 连接 AnTrx 和 AnTrxR) 的获得 :

[0139] ①首端含有连接肽序列的 AnTrxR 的基因 (M1') 的获得 :以不含有内含子的 AnTrxR 基因组为模板,PCR 采用 50μl 体系,包括 50ng 不含内含子的 AnTrxRDNA、0.2μM 引物 B1 组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5U taq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min,此后经 35 个循环 :94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 60s ;循环后 72℃再延伸 7min。

[0140] ②末端含有连接肽序列的 AnTrx 的基因 (M2') 序列的获得 :以不含有内含子的 AnTrx 基因组为模板,PCR 采用 50μl 体系,包括 50ng 不含内含子的 AnTrxDNA、0.2μM 引物 B2 组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5U taq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min,此后经 35 个循环 :94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 30s ;循环后 72℃再延伸 7min。

[0141] ③ TMR 的获得 :将 M1'、M2' 分别融合 :以 M1' 和 M2' 基因为模板,PCR 采用 50μl 体系,包括 25ng M1' 和 25ng M2'、0.2μM 引物 B3 组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5U taq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min,此后经 35 个循环 :94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 100s ;循环后 72℃再延伸 7min。扩增得到 1494bp 的片段。

[0142] (3) 融合基因 RGT(Linker B 连接 AnTrxR 和 AnTrx) 的获得 :

[0143] ①末端含有连接肽序列的 AnTrxR 的基因 (G1) 序列的获得 :以不含有内含子的 AnTrxR 基因组为模板,PCR 采用 50μl 体系,包括 50ng 不含内含子的 AnTrxRDNA、0.2μM 引物 C1 组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5U taq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min,此后经 35 个循环 :94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 60s ;循环后 72℃再延伸 7min。

[0144] ②首端含有连接肽序列的 AnTrx 的基因 (G2) 的获得 :以不含有内含子的 AnTrx 基因组为模板,PCR 采用 50μl 体系,包括 50ng 不含内含子的 AnTrxR DNA、0.2μM 引物 C2 组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5Utaq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min,此后经 35 个循环 :94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 30s ;循环后 72℃再延伸 7min。

[0145] ③ RGT 的获得 :将 G1、G2 分别融合 :以 G1 和 G2 基因为模板,PCR 采用 50μl 体系,

包括 25ng G1 和 25ng G2、0.2μM 引物 B3 组、0.2mM dNTP、2.5mM$MgCl_2$1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5U taq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min，此后经 35 个循环：94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 100s；循环后 72℃再延伸 7min。扩增得到 1467bp 的片段。

[0146] (4) 融合基因 TGR(LinkerB 连接 AnTrx 和 AnTrxR) 的获得：

[0147] ①首端含有连接肽序列的 AnTrxR 的基因 (G1') 的获得：以不含有内含子的 AnTrxR 基因组为模板，PCR 采用 50μl 体系，包括 50ng 不含内含子的 AnTrxR DNA、0.2μM 引物 D1 组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5Utaq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min，此后经 35 个循环：94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 60s；循环后 72℃再延伸 7min。

[0148] ②末端含有连接肽序列的 AnTrx 的基因 (G2') 序列的获得：以不含有内含子的 AnTrx 基因组为模板，PCR 采用 50μl 体系，包括 50ng 不含内含子的 AnTrxDNA、0.2μM 引物 D2 组、0.2mM dNTP、2.5mM $MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5U taq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min，此后经 35 个循环：94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 30s；循环后 72℃再延伸 7min。

[0149] ③ TGR 的获得：将 G1'、G2' 分别融合：以 G1' 和 G2' 基因为模板，PCR 采用 50μl 体系，包括 25ng G1' 和 25ng G2'、0.2μM 引物 D3 组、0.2mM dNTP、2.5mM$MgCl_2$、1×taq 聚合酶缓冲液和 1.5U taq 聚合酶和 1.5Upfu 聚合酶。混匀后先 94℃变性 5min，此后经 35 个循环：94℃变性 30s、65℃退火 30s 和 72℃延伸 100s；循环后 72℃再延伸 7min。扩增得到 1467bp 的片段。

[0150] 应用这种方法，分别得到融合基因 RMT、TMR、RGT、TGR。

[0151] 5. 原核表达载体 pET-AnTrx、pET-AnTrxR、pET-RMT、pET-TMR、pET-RGT、pET-TGR 的构建

[0152] pET-AnTrx 构建：扩增得到的 AnTrx 序列经限制性内切酶 NdeI 和 HindIII 消化后插入原核表达载体 pET-29b+ 中，构建原核表达载体 pET-AnTrx。

[0153] pET-AnTrxR、pET-RMT、pET-TMR、pET-RGT、pET-TGR 的构建同上。

[0154] 6. 重组质粒的扩增及目的蛋白表达

[0155] 将重组质粒 pET-AnTrx、pET-AnTrxR、pET-RMT、pET-TMR、pET-RGT、pET-TGR 用热击转化法分别转化大肠杆菌 E.coli DH5α，经过菌落 PCR 鉴定及酶切鉴定及测序后，提取阳性克隆质粒转化 E.coli BL21(DE3)，于 37℃、150r/min 条件下培养至对数生长期 (OD_{600} = 0.8)，而后加入 0.5mM IPTG 后，其中含质粒 pET-AnTrx、pET-AnTrxR 的转化菌株在 30℃和 160r/min 条件下诱导培养过夜。含质粒 pET-RMT、pET-TMR、pET-RGT、pET-TGR 的转化菌株在 25℃和 160r/min 条件下诱导培养过夜。

[0156] 7. 重组蛋白的可溶性分析

[0157] 通过离心收集步骤 4 中诱导后的菌液，进行细胞超声破碎，运行程序为为超声时间 15s、间隙时间 15s 及全程时间 20min。4℃下 10000g 离心收集上清后，用不连续的十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳缓冲液系统进行分析。取 20μl 破碎上清液，加入 5.0μL 5× 上样缓冲液 [60mM Tris-HCl，pH 6.8；25% (w/v) 甘油；2% (w/v)SDS，14.4mM β - 巯基乙醇和 0.1% 溴酚蓝]。不连续凝胶中浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和

12.5%。各泳道的上样量为 15μL,在 HoeferminiVE 垂直电泳系统 (Amersham Pharmacia Biotech) 上进行电泳。样品在浓缩胶中的电流保持 12mA,在分离胶中的电流保持 18mA。电泳结束后。凝胶在染色液 (1.20g 考马撕亮蓝 R250、250mL 乙醇、80mL 乙酸和 670mL dd-H2O) 中染色过夜,然后在脱色液 (250mL 乙醇、80mL 乙酸和 670mL dd-H2O) 中脱色,直至背景无色。

[0158] 8. 蛋白纯化

[0159] 由于重组蛋白带有 6×His 标签,可采用 Ni^{2+} 亲和层析进行纯化。

[0160] (1) 取诱导后菌液 50ml,4℃下 5000r/min 离心 10min 收集菌体,沉淀悬浮于 25ml Binding Buffer(50mM Tris-HCl,pH 7.8,500mM NaCl 和 5mM 咪唑) 中,冰浴下超声波破碎菌体,4℃下 12000r/min 离心 25min,取上清 4℃保存备用。

[0161] (2) 采用 ÄKTA purifier(GE Healthcare,Uppsala,Sweden) 纯化系统对目的蛋白进行纯化。上样前,使用 10 倍柱体积的 Binding Buffer 以 5ml/min 的流速平衡镍柱 ;流速为 1ml/min 上样,再次以 Binding Buffer 以 5ml/min 的流速平衡镍柱 5-10 个体积 ;梯度洗脱,依次以 10%、20%、30%和 100%的 Elution Buffer 洗脱 5 个柱体积,流速为 5ml/min,进行 OD280 蛋白吸收峰收集洗脱液。收集洗脱峰通过 SDS-PAGE 分析检测纯度。最后发现 AnTrx 和 AnTrxR 在 10% Elution Buffer 中洗脱后的蛋白纯度最高,而融合蛋白在 20%的 Elution Buffer 的洗脱浓度中蛋白的纯度最高。

[0162] (3)SDS-PAGE 鉴定获得的纯化部分用 Sephadex™ G-25 脱盐。图 1 为本发明中 AnTrx 与 AnTrxR 单独表达和融合表达后的 SDS-PAGE 图谱。(a) 泳道 1 ～ 7 分别为空载体对照与独立表达的 AnTrxR、AnTrx、RMT、TMR、RGT 及 TGR 的细胞破碎液。(b) 图 a 中泳道 2-7 表达产物纯化后的图谱。M :分子量标记。

[0163] 9、融合蛋白的重构

[0164] 由于 AnTrxR 含有辅酶 FAD,但其在 E.coli BL21(DE3) 内的大量表达,以及后面的纯化步骤,使得其中的 AnTrxR 部分为脱辅基酶,为了重构 AnTrxR 部分,从而进行后期的活性测定,将 AnTrxR、RMT、TMR、RGT 和 TGR 和其辅酶 FAD(Sigma St.Louis,USA) 一同孵育。将 FAD 浓缩液加入已经纯化过的融合蛋白溶液中,使其最终浓度为蛋白浓度的 5 倍。在黑暗中孵育 20 分钟。再利用 HiTrap(GE Healthcare) 脱盐柱除去 FAD 并将蛋白溶液转换成 0.1M 的磷酸盐缓冲液,pH7.0(Williams et.al.,1967 ;Thön et.al.,2007)

[0165] 10、AnTrx、AnTrxR 及融合蛋白 RMT RGT TMR TGR 的酶活测定。

[0166] (1) 用浊度法测定 AnTrx 的活性及融合蛋白中 AnTrx 部分的活性。

[0167] 由于 Trx 可被二硫苏糖醇 (DTT) 还原且还原型的 Trx 可还原牛胰岛素 α 链和 β 链之间的二硫键而使游离的 β 链成为不溶于水的沉淀,故采用浊度法 (Holmgren,1979) 测定 AnTrx 的活性。配制新鲜的牛胰岛素反应液 (1.25mg/mL 牛胰岛素 .0.1M PBS,2.0mM EDTA-Na_2,pH 7.0)。将 10μL 200mM DTT 加入 100μL 样品液中,室温下孵育 30min,然后加入到 500μL 牛胰岛素反应液中,蛋白样品的终浓度为 4μM。室温下测定 650nm 的吸收光值,每分钟测定一次,共测定 13 次。酶活力用第 13 分钟的 OD 值表示。结果见图 2。图 2 显示的曲线为为本发明中室温下用 DTT 还原 AnTrx 和融合蛋白中 AnTrx 部分后,其对牛胰岛素的还原活性 (OD_{650})。

[0168] 结果分析 :

[0169] 13 分钟时 OD_{650} 的读数：

[0170] AnTrx：0.046

[0171] TGR：0.04

[0172] TMR：0.035

[0173] RGT：0.024

[0174] RMT：0.0125

[0175] 无论将 AnTrx 融合在 C 端还是 N 端，融合蛋白中 AnTrx 部分的催化活性总是降低，RMT 和 RGT 中 AnTrx 部分的催化活性分别是亲本蛋白活性的 27.1％和 52.1％，TMR 和 TGR 中同一部分的催化活性分别是亲本的 76.1％和 87.0％。显然，处于融合白 N 端的 AnTrx 的催化活性高于处于其 C 端的 AnTrx 的活性。

[0176] (2) 用 DTNB 还原法测定 AnTrxR 及其融合蛋白中的 AnTrxR 部分的活性

[0177] 以单独表达的 AnTrxR 还原 DTNB(Sigma)(Arnér et al.，1999；Luthman &Holmgren，1982)。反应液为 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)，含 2μM AnTrxR。DTNB 的反应浓度变化范围从 0.2～2mM。将反应液和 DTNB 混合之后，加入终浓度为 0.05mM NADPH(Roche，Shanghai，china) 启动反应。利用分光光度计测定其在 412nm 的吸收光值 (OD_{412}) 变化。在 NADPH 的存在下，1nmol 的 DTNB 被 AnTrxR 还原成为 2μmol 的 NTB。其酶活单位定义：每分钟释放 2μmolNTB 定义为一个酶活单位（消光系数 $\varepsilon_{412nm} = 2\times13.6mM^{-1}cm^{-1}$）。

[0178] 结果分析：

[0179] 表 1：AnTrxR 和融合蛋白中的 AnTrxR 部分还原 DTNB 后的动力学常熟。

[0180]

Substrate	Enzyme	Kinetic parameters				r^2
		K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m (mM^{-1} s^{-1})	
DTNB	AnTrxR	1.64±0.20	10.81±0.76	7.21	4.4	0.98
	RMT	0.06±0.006	25.52±0.23	17.01	283.6	0.99
	TMR	5.0±1.9	9.33±2.78	6.2	1.24	0.95
	RGT	0.5±0.06	70.93±2.95	47.2	94.6	0.98
	TGR	2.4±0.6	6.03±1.01	4.2	1.75	0.94

[0181] 其中 RMT 和 RGT 中 AnTrxR 部分的催化效率比亲本 AnTrxR 要高，而 TMR 和 TGR 中 AnTrxR 的催化效率比亲本 AnTrxR 要低。由于 AnTrxR 是整个体系第一步反应中的关键酶，而 TMR 和 RMT 中 AnTrxR 部分的催化效率过低，因此在后面考察对小麦醇溶蛋白的二硫键的还原时直接考察亲本 (AnTrxR、AnTrx)、RMT 和 RGT。

[0182] 由此，得到的结论是两个融合肽的总体效果相差不大，且当 AnTrxR 融合在 N 端时 AnTrxR 的催化效率大大提高。虽然融合蛋白 RMT 和 RGT 中的 AnTrx 部分的活性较亲本略低，但是由于其第一步反应中的酶 AnTrxR 的催化效率的大幅度提高，其在 NADPH 的存在下可以具备整个 AnTrx 体系的活性，并且在工业应用上也更为简便，便于其整个进行后面的工业应用。

[0183] 11、小麦醇溶蛋白的还原

[0184] 根据小麦蛋白的不同溶解性分离获得麦醇溶蛋白。将小麦粉 1g 溶于 5mL70％酒精之中，室温下摇荡过夜后 11,000×g 高速离心 20min。收集上清液，并在室温下挥发过夜后冷冻干燥，获得麦醇溶蛋白粉剂 (Sun et al.2008)。

[0185] 不同 AnTrx 系统还原麦醇溶蛋白二硫键的活力测定，均采用 100μL 反应体系，含 127.5μg 麦醇溶蛋白和 5μL 6mM NADPH，酶的含量为独立表达的 AnTrx 和 AnTrxR 各 10μg 或融合表达的 RGT 20μg 或 RMT 20μg，并设阴性对照（反应体系中任何待测酶样）和阳性对照（反应体系中加 20μL 0.05mM DTT，化学还原二硫键）。将各反应液在室温下孵育 3h 后，利用巯基特异荧光分子探针 (mBBr) 与巯基结合后在荧光下显色的原理 (Buchanan et al.，1997 ；del Val et al.，1999)，鉴定二硫键被还原的程度，方法是在 20μL 醇溶蛋白溶液中加入 8μL 30mM mBBr(Sigma)，室温下黑暗放置 20min，然后进行 SDS-PAGE 电泳和荧光显色分析（结果见图 3)。

[0186] 图 3 给出经亲本酶和融合酶处理后的麦醇溶蛋白被还原二硫键与 mBBr 结合后的荧光显色结果。左图的泳道 1 ～ 3 ：分别为纯化后的 AnTrxR/AnTrx、RMT、RGT 加 NADPH（不含醇深蛋白）。泳道 4 ：只有小麦醇溶蛋白（不含酶），阴性对照。泳道 5 ：用 DTT 还原小麦醇溶蛋白的阳性对照。泳道 6 ～ 8 ：分别为纯化后的 AnTrxR/AnTrx、RMT、RGT 加 NADPH 和醇溶蛋白。右图泳道 4 ～ 8 与左图相同，但考马思亮蓝 R250 染色。图 3 所示结果表明 ：麦醇溶蛋白中富含的二硫键，在被 DTT 化学还原后，显示出很强的亮度。在 NADPH 存在的情况下，亲本蛋白 AnTrx/AnTrxR 与融合蛋白 RMT 和 RGT 分别同麦醇溶蛋白孵育 3h 后，三者的显色强度差别并明显，但均弱于上述阳性对照。由此说明，亲本蛋白与融合蛋白 RMT、RGT 对麦醇溶蛋白二硫键的还原程度相近。

序列表

<110> 浙江大学
<120> 一种制备降低食物过敏原反应的融合蛋白的方法
<130>
<160>38
<170>PatentIn version 3.3
<210>1
<211>28

<212>DNA
<213> 人工序列

<400>1
aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28

<210> 2
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>2
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25
<210>3
<211>54
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>3
atcatatgtc tcacaaggtt cacgacatca cctctaaggc cgagttcgcc gaga 54

<210>4
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>4
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>5
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列
<400>5
aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28

<210>6
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<400>6
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>7
<211>60
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>7
atagctctcatatggtgcac accaacgtcg ttatcatcgg ctccggcccc gccgcccaca 60

<210>8
<211>36
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>8
caatgcagcc ggatccggca ctggtgatgg cc tggc 36

<210>9
<211>37
<212>DNA
<213> 人工序列
<400>9
gccatcacca gtgccggatc cggctgcatt gccgctc 37

<210>10
<211>25

<212>DNA
<213> 人工序列

<400>10
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>11
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>11
aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28

<210>12
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>12
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>13
<211>66
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>13
gctaacgaaa caacagagga aactggagac gttgacagta ccgacacaac cgattggagc 60
actgcg 66

<210>14
<211>44
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>14
ggtggcggtg gctcgggcgg tggtgggtcg ggtggcggcg gatc 44

<210>15
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>15
aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28

<210>16
<211>66
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>16
gtcggtactg tcaacgtctc cagtttcctc tgttgtttcg ttagcaagca gagggttgga 60
cttgta 66

<210>17
<211>67
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>17
actggagacg ttgacagtac cgacacaacc gattggagca ctgcgatgtc tcacaaggtt 60
cacgaca 67

<210>18
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<400>18
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>19
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>19

aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28

<210>20
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>20
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>21
<211>67
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>21
actggagacg ttgacagtac cgacacaacc gattggagca ctgcgatggt gcacaccaac 60
gtcgtta 67

<210>22
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<400>22
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>23
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>23
aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28

<210>24
<211>67
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>24
gtcggtactg tcaacgtctc cagtttcctc tgttgtttcg ttagctgcaa gcagagcctg 60
gatcttc 67

<210>25
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>25
aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28

<210>26
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>26
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>27
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>27
aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28
<210>28
<211>56
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>28
ccacccgacc caccaccgcc cgagccaccg ccaccaagca gagggttgga cttgta 56

<210>29
<211>55
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>29
gctcgggcgg tggtgggtcg ggtggcggcg gatccatgtc tcacaaggtt cacga 55

<210>30
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>30
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>31
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>31
aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28

<210>32
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列
<400>32
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>33
<211>56
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>33
gctcgggcgg tggtgggtcg ggtggcggcg gatccatggt gcacaccaac gtcgtt 56

<210>34
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>34
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

<210>35
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>35
aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28

<210>36
<211>57
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>36
ccacccgacc caccaccgcc cgagccaccg ccacctgcaa gcagagcctg gatcttc 57

<210>37
<211>28
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>37
aacacccata tgtctcacaa ggttcacg 28

<210>38
<211>25
<212>DNA
<213> 人工序列

<400>38
tggaagcttt gcaagcagag cctgg 25

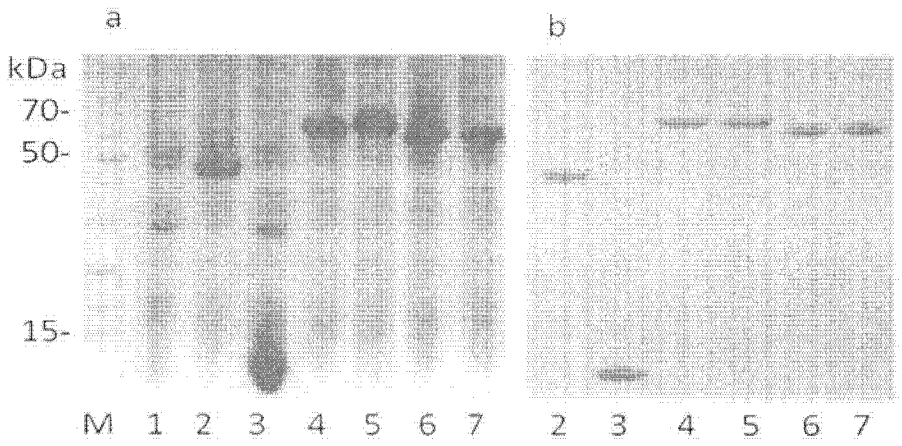

a
b
kDa
70-
50-
15-
M 1 2 3 4 5 6 7
2 3 4 5 6 7

图 1

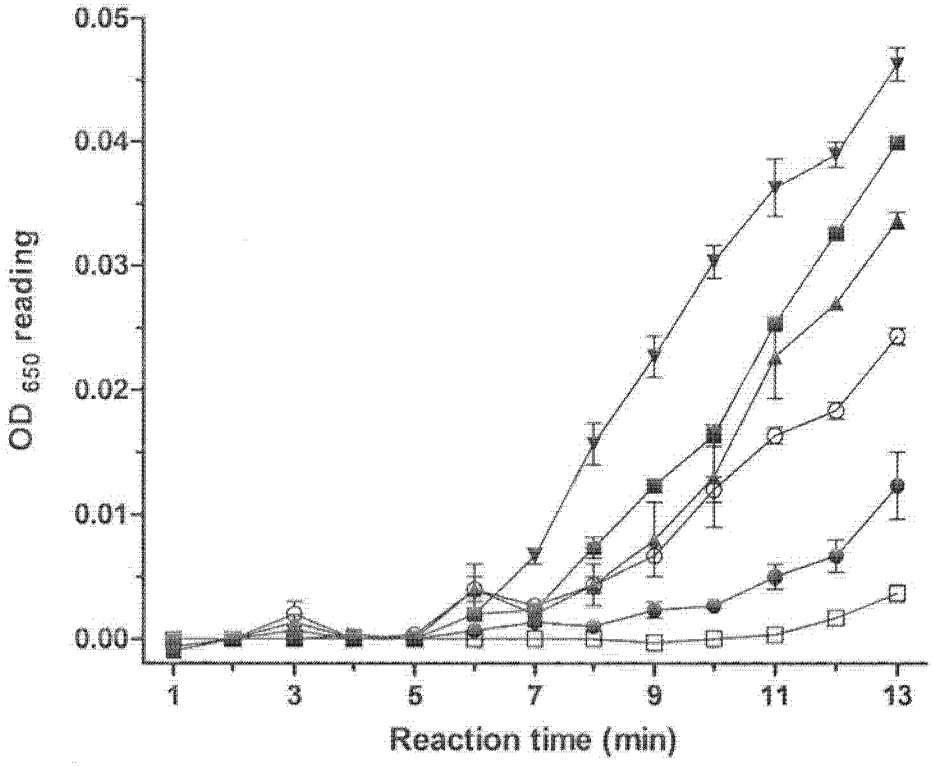

0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
OD 650 reading
1 3 5 7 9 11 13
Reaction time (min)

图 2

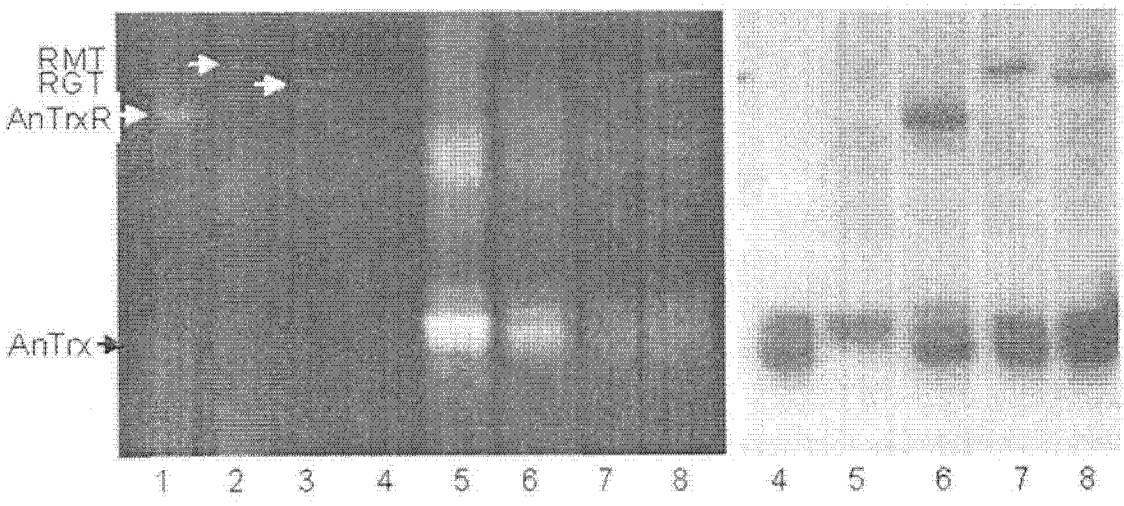


图 3