(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101351548 B
(45)授权公告日 2015.08.19

(21)申请号 200680049665.5

(22)申请日 2006.12.08

(30)优先权数据
A2081/2005 2005.12.27 AT

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2008.06.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2006/011832 2006.12.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2007/073845 EN 2007.07.05

(73)专利权人 DSM精细化学奥地利NFG两合公司
地址 奥地利林茨

(72)发明人 格哈德·斯坦保尔
迈克尔·施塔内克
彼得·波亚尔里尔
沃夫冈·斯卡安可
赫尔马特·施瓦布
马塞尔·乌博尔特斯
乔纳斯·西基尔科斯
哈拉德·皮希勒　马诺拉·埃尔曼
克里斯托弗·赞兹马尔

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限责任公司 11258
代理人 肖善强

(51)Int.Cl.
*C12N 9/18*(2006.01)
*C12N 15/52*(2006.01)
*C12P 41/00*(2006.01)
*C12P 7/02*(2006.01)

(56)对比文件
WO 2004055177 A2,2004.07.01, 全文.
LANGE S ET AL.Cloning, functional expression, and characterization of recombinant pig liver esterase.《CHEMBIOCHEM : A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY》.2001, 第2卷(第7－8期),1439-4227.
TOONE E J ET A.ENZYMES IN ORGANIC SYNTHESIS 49. RESOLUTIONS OF RACEMIC MONOCYCLIC ESTERS WITH PIG LIVER ESTERASE.《TETRAHEDRON ASYMMETRY》.1991, 第2卷(第3期),207-222.
DAVID LAETITIA ET AL.Purification and molecular cloning of porcine intestinal glycerol-ester hydrolase: Evidence for its identity with carboxylesterase.《 EUROPEAN JOURNAL OFBIOCHEMISTRY》.1998, 第257卷(第1期),142-148.

审查员 徐莉

权利要求书2页　说明书10页
序列表6页　附图5页

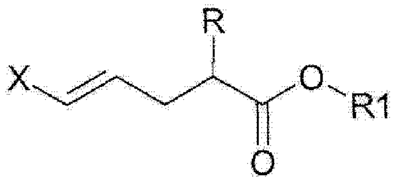
(54)发明名称

具有酯酶活性的多肽和重组的酯酶及其用途

(57)摘要

本发明公开了具有酯酶活性的多肽和重组蛋白质(其展示出氨基酸序列SEQ.ID.No.1)及其用途。

1. 具有酯酶活性的多肽，其展示出与 SEQ. ID. No. 1 所示氨基酸序列具有至少 98％的同一性的氨基酸序列，并且与野生型猪肝酯酶 PLE 的不同在于在氨基酸位置 73、75、76、77、80、87、92、93、129、133、134、138、139、234、236、237、286、287、290、294 和 302 上的氨基酸分别为 Glu、Ile、Gly、Gly、Leu、Arg、Ile、Pro、Val、Ser、Thr、Leu、Ala、Phe、Ala、Gly、Phe、Ala、Leu、Pro、Thr，并具有对式 (I)



(I)

的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯进行外消旋拆分的活性，其中 R 是 $C_1$-$C_6$的烷基，$R_1$是 $C_1$-$C_4$的烷基，且 X 是氯、溴或碘。

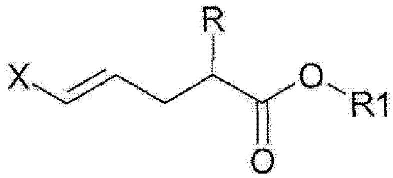
2. 权利要求 1 所述的多肽，其为重组蛋白质。

3. 核苷酸序列，其编码权利要求 1-2 任一项所述的多肽。

4. 核苷酸序列，其序列如 SEQ ID No. 2 所示。

5. 权利要求 3 或 4 所述的核苷酸序列，其可通过这样的方法获得：从生物分离 mRNA，接着使用包含核苷酸序列 GGGCAGCCAGCCTCGC 的第一引物和包含核苷酸序列 TCACAGCTCAG 的第二引物扩增核酸片段。

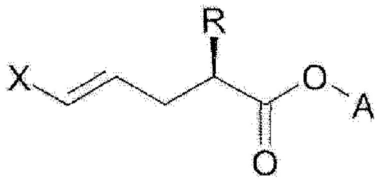
6. 权利要求 1-2 任一项所述的多肽用于对式 (I)



(I)

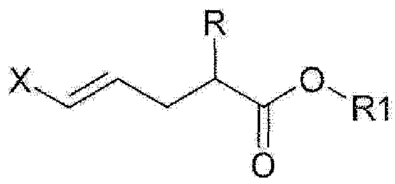
的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯进行外消旋拆分的用途，其中 R 是 $C_1$-$C_6$的烷基，$R_1$是 $C_1$-$C_4$的烷基，且 X 是氯、溴或碘。

7. 用于制备富含对映异构体的式 (II)



(II)

的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸或其酯的方法，其中 R 是 $C_1$-$C_6$的烷基，A 等于 H、$R_1$或$R_2$，其中 $R_1$是 $C_1$-$C_4$的烷基，其中 $R_2$是烷基但是不等于 $R_1$，且 X 为氯、溴或碘，所述方法包括在存在水或其中 $R_2$是不等于 $R_1$的烷基的式 $R_2OH$ 的醇作为亲核体时，通过权利要求 1-2 任一项所述的多肽来转化式 (I)



(I)

的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯的对映异构体混合物，其中 R、$R_1$和 X 如上文定义，以及

a) 分离剩余的下述富含对映异构体的式 (II) 的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯，所述式中 A 等于 $R_1$，或

b) 如果使用醇作为亲核体，分离得到的下述富含对映异构体的式 (II) 的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯，所述式中 A 等于 $R_2$，或

c) 如果使用水作为亲核体，分离得到的下述式 (II) 的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸，所述式中 A 等于 H。

# 具有酯酶活性的多肽和重组的酯酶及其用途

[0001] 本发明涉及具有酯酶活性、特别是具有 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯酶活性的新颖多肽,并涉及具有酯酶活性的酶活性重组蛋白质,及其用于拆分 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯对映异构体混合物外消旋化合物的用途。

[0002] 富含对映异构体的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸及其酯是用于制备药物(例如用于 δ - 氨基 - γ - 羟基 - ω - 芳基链烷羧酰胺)的有价值的中间产物,其具有肾素抑制特性,并可在药物制备中用作抗高血压剂。

[0003] 酯酶通常被用于拆分外消旋化合物和不对称化。

[0004] 然而,可商业获得的适用于制备手性化合物的酯酶非常少。

[0005] 已知来自猪肝的酯酶提取物仅是制备规模上的。猪肝酯酶 (PLE) 在很久以前是从天然来源中分离的,其活性也已知很长时间了 (Simonds,J.P.(1919)Amer.J.Physiol.48,141 ;Bamann,E.et al.(1934)Hoppe-Seyler Z.229,15 ;Falconer J.S.and Taylor,D.B.(1946)Biochem.J.40,831-834)。

[0006] 为了表征 PLE 也已经进行了多种研究 (Heymann,E.and Junge,W.(1979)Eur.J.Biochem.95,509-518 ;Lehner,R.and Verger,T.(1997)Biochemistry36,1861-1868)。此外,已可显示(例如在 WO 01/09079 中),来自猪肝的酯酶提取物可选择性地水解甲基 5- 氯代 -2-(1- 甲基乙基)-4- 戊烯酸盐的 (R) 对映异构体。

[0007] 然而,来自天然来源如猪肝的这类酯酶提取物的用途伴有缺点。

[0008] 首先,不同批次的品质不同,从而使得难以优化工业过程。其次,在药物制品制造中使用动物来源是人们不期望的,因为病毒和朊蛋白 (prion) 的存在不能总被清除。

[0009] 因为这些原因,需要在微生物中生产具有标准化的品质的重组猪肝酯酶。

[0010] 对可能的酯酶基因的克隆见例如 FEBS Lett.(1991),293,37-41 所述。活性猪肝酯酶的第一次功能性表达首次被描述于 WO 02/48322 中。

[0011] WO 2004/055177 描述了通过对来自 WO 02/48322 的 seq.ID No.1 的重组猪肝酯酶 (rPLE) 进行定点诱变来制备其它重组酯酶。如从 WO2004/055177 的描述中和从相同发明人写作的文章 Protein Engineering,16,1139-1145,2003 的描述中显而易见的,选择对来自 WO 02/48322 的 rPLE 序列的修饰,从而获得在 David et al.,(1998)Eur.J.Biochem.257,142-148 中公开的重组肠内猪酯酶 (PICE)。

[0012] 对外消旋 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯的拆分在这些文章的任一中均未描述。

[0013] 然而,因为对酯酶(其具有针对 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯的期望的立体选择性活性并可以通过生物技术容易地制备)的需要没有满足,所以提供相应的新颖重组酯酶是本发明的一个目的。

[0014] 在分离和克隆 EBS Lett.(1991),293,37-41 和 WO 02/48322 所述的针对已知的猪肝酯酶 (PLE) 的基因(作为从来自猪肝的 mRNA 开始获得的 cDNA)的尝试中,除了已知的 PLE 序列以外,还发现了第二个新颖的酯酶序列。表达这两个序列后(其中制备了相应的蛋白质或酯酶,即已知的 rPLE 和新颖的、重组的“备选”酯酶 (rAPLE)),意外地发现仅 rAPLE 能够选择性拆分外消旋的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯。

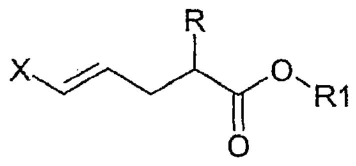
[0015] 因此可通过具有酯酶活性的新颖多肽和新颖的重组酯酶(rAPLE)来达成本发明的目的,所述重组酯酶的氨基酸序列与已知PLE序列在总共548个氨基酸中有21个不同。新颖的rAPLE与已知的猪肠道羧酸酯酶(PICE)的氨基酸序列也在总共548个氨基酸中有12个不同。然而,PICE被发现于猪肠道中。

[0016] 本发明因此涉及具有酯酶活性的多肽,其包含氨基酸序列SEQ.ID.No.1。

[0017] 本发明还涉及具有酯酶活性的新颖的重组蛋白质,其包含氨基酸序列SEQ.ID.No.1。

[0018] 本发明的多肽和重组rAPLE具有立体选择性地拆分外消旋的式(I)

[0019]



(I)

[0020] 的2-烷基-5-卤代戊-4-烯羧酸酯的活性,其中R是$C_1$-$C_6$的烷基,$R_1$是$C_1$-$C_4$的烷基且X是氯、溴或碘。

[0021] 如上文所述,具有酯酶活性的本发明的多肽和新颖的重组酯酶rAPLE与FEBS Lett.(1991),293,37-41中公开的已知序列的总计548个氨基酸中有21个不同,并与来自David et al.,(1998)Eur.J.Biochem.257,142-148中公开的已知PICE蛋白的总计548个氨基酸中有12个不同。

[0022] 本发明的新颖rAPLE蛋白质的序列在以下的氨基酸位置上与PLE蛋白质的已知序列不同:

| | APLE | 位置 | PLE |
|---|---|---|---|
| [0023] | APLE | 位置 | PLE |
| [0024] | Glu | 73 | Asp |
| [0025] | Ile | 75 | Val |
| [0026] | Gly | 76 | Val |
| [0027] | Gly | 77 | Glu |
| [0028] | Leu | 80 | Thr |
| [0029] | Arg | 87 | Gly |
| [0030] | Ile | 92 | Thr |
| [0031] | Pro | 93 | Leu |
| [0032] | Val | 129 | Leu |
| [0033] | Ser | 133 | Pro |
| [0034] | Thr | 134 | Met |
| [0035] | Leu | 138 | Val |
| [0036] | Ala | 139 | Val |
| [0037] | Phe | 234 | Leu |
| [0038] | Ala | 236 | Val |
| [0039] | Gly | 237 | Ala |
| [0040] | Phe | 286 | Leu |

| | | | |
|---|---|---|---|
| [0041] | Ala | 287 | Thr |
| [0042] | Leu | 290 | Phe |
| [0043] | Pro | 294 | Gln |
| [0044] | Thr | 302 | Pro |

[0045] 另外，本发明的蛋白质和新颖的重组 rAPLE 可以是 SEQ ID No 1 所示经修饰的序列的形式，所述经修饰的序列可得自例如常见修饰，例如序列 N 或 C 端的一个或多个氨基酸（例如来自 α 因子信号序列的 GluAlaGluAla）的交换、删除或附加，或通过与其它蛋白质融合来进行修饰。

[0046] 本发明还进一步包括在本发明的酶的蛋白质序列中具有修饰的突变蛋白质，所述本发明的酶具有合适的活性，尤其是对 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯的活性。突变蛋白质可通过例如通过已知的诱变技术（随机诱变、定点诱变、定向进化、基因改组等）修饰 DNA（其编码本发明的酶）获得，使得所述 DNA 编码与本发明的酶差异至少一个氨基酸的酶，并随后在合适的宿主细胞中表达经修饰的 DNA。因此，本发明还包括如 SEQ ID.No 1 所示的经修饰的 DNA 序列，其通过上述突变、删除、延伸、融合获得，并编码具有想要的酯酶活性的酶。

[0047] 酯酶活性，尤其是 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯酶活性在本文中被定义为拆分式 (I) 的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯的外消旋化合物的能力。

[0048] 本发明的多肽和重组 rAPLE 可以如下制备：

[0049] 首先，使用合适的试剂盒从猪肝分离 mRNA，然后基于 mRNA 提取物通过反转录产生 cDNA。

[0050] 接着，以 GenBank 编号 No.X63323(Matsushima et al.,1991) 的已知猪肝酯酶基因的序列为基础，制备特异性 PCR 引物，然后进行扩增及克隆。

[0051] 这些特异性引物是：

[0052] 引物 1：5’-CAGAATTCATGGCTATCGGGCAGCCAGCCTCGC-3’

[0053] 引物 2：5’-CCGGAA TTCAGCCTCCCCTTCACAGCTCAG-3’

[0054] 引物中包含编码 PLE 蛋白质的合适的核苷酸序列并且专属地存在于引物中的部分以粗体表示。

[0055] 引物的其它序列部分包含例如下列信息：限制性内切核酸酶（斜体）的切割位点或对表达来说重要的序列元件。在本发明的 rAPLE 制备中该部分可变化。

[0056] 然后可通过现有技术的 PCR 方法用引物 1 和 2 进行扩增。

[0057] 随后使用 PCR 产物，通过现有技术方法，来制备表达构建体，所述表达构建体用于在合适的宿主生物中异源表达所编码的 rAPLE 蛋白质。优选地，PCR 产物最初必须被克隆进合适的质粒载体中。

[0058] 然后将以该方式获得的重组质粒转化进合适的宿主例如 Escherichiacoli 中。然后对若干得到的克隆的插入物进行测序。

[0059] 出乎意料的是，其中鉴定了两组具有不同序列的重组克隆，一组与根据 Matsushima et al.,(1991)FEBS Lett.293,37-41 的 PLE 预期序列 100％相同，还有如 SEQ.ID.No.2 所示的新颖的核苷酸序列（APLE 序列）表达后得到本发明的氨基酸序列 SEQ.ID.No.1。

[0060] 本发明还涉及编码本发明的多肽和重组酯酶 rAPLE 的核酸或核苷酸序列。

[0061] 例如,这类核酸具有 SEQ.ID.No.2 中所示的核苷酸序列。

[0062] 本发明还涉及下述核苷酸序列,所述核苷酸序列包含编码本发明多肽和重组酯酶 rAPLE 的核苷酸序列,或包含 SEQ.ID.No.2 所示的核苷酸序列。

[0063] 另一种可能性是通过标准化的合成技术(例如使用自动化DNA 合成仪),来制备对应于本发明核酸序列(其编码本发明的酯酶)的合适的寡核苷酸。

[0064] 对编码本发明酯酶的核酸序列进行纯合成制备尤其有利于在生产药物或其中间代谢物时使用,因为由此所述酶不从动物来源获得。

[0065] 然后对发现的两种序列(PLE 和 APLE 序列)进行表达。

[0066] 已知的猪肝酯酶(PLE,Swiss-Prot ID Q29550)包含 N 端信号序列和 C 端 ER 驻留信号(retension signal)——最后 4 个氨基酸 HAEL。

[0067] 为了表达已知的 PLE 和新颖的 APLE,构建了下述载体,其中序列被引入合适的表达系统中。然后将这些表达构建体转化进入合适的宿主细胞中。

[0068] 本文上下文中的合适宿主细胞是例如微生物、动物细胞系和植物。

[0069] 原核和真核微生物均可使用。优选的原核宿主(细菌)为 Escherichiacoli 和来自 Bacillus(例如 B.subtilis、B.licheniformis、B.amyloliquefaciens)、Pseudomonas(例如 P.fluorescens、P.putida)或 Streptomyces(例如 S.lividans、S.tendae)属的菌株。真核微生物是优选的,真菌是尤其优选的。其例子为 Saccharomyces cerevisiae、Pichiapastoris、Kluyveromyces lactis 或 Aspergillus sp.。

[0070] 表达可以是分泌的或细胞内的,以及诱导型的和组成型的。

[0071] 对于细菌表达而言,可以获得对物种特异信号的选择,a.o. 作为可商业获得的用于蛋白质表达的菌株和载体(例如由如 Invitrogen、Novagen、New England Biolabs 的公司提供的),所述菌株和载体允许诱导型或组成型的表达、靶蛋白的细胞内和分泌性定位;另外,可以使用下述技术,所述技术使得蛋白质能够正确折叠或促进该正确折叠以得到可溶的和活性的蛋白质。

[0072] 蛋白质优选以分泌方式表达,在该情况下优选构建下述载体,在所述载体中 PLE 和 APLE 的序列以 N 末端方式连接到 S.cerevisiae 的 α 因子信号序列上。

[0073] 还可制备其中 C 端四肽 HAEL 被额外删除的构建体,所述四肽如例如 Hardwick et al.,(1990)EMBO J.9,623-630 中所述作为 ER 保留信号作用。

[0074] 另一优选的表达是带有或不带有 ER 保留信号的构建体的诱导型表达。

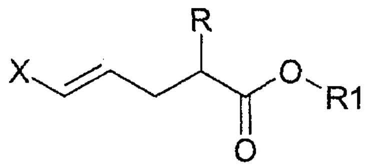
[0075] 出乎意料的是,具有 ER 保留信号的构建体也可以被表达并得到 rAPLE,所述 rAPLE 能够选择性拆分外消旋的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯。

[0076] 来自 APLE 基因核苷酸序列的新颖酯酶 rAPLE 的氨基酸序列如 SEQID No.1 所述。

[0077] 出乎意料的是,已可发现,与已知的 rPLE 相反,在每种情况下通过例如在 P.pastoris 细胞中表达分别编码 APLE 和 PLE 的 DNA 片断获得的新颖的多肽或 rAPLE 蛋白质,能够立体选择性地拆分外消旋的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯。

[0078] 本发明因此还涉及本发明的具有酯酶活性的多肽和重组酯酶(rAPLE)用于拆分式(I)

[0079]



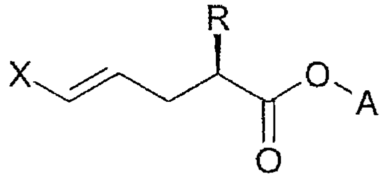
(I)

[0080] 的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯的外消旋化合物的用途，所述多肽和重组酯酶与 SEQ ID No.1 所示序列具有至少 80％的同一性，其中 R 为 $C_1$-$C_6$的烷基，$R_1$是 $C_1$-$C_4$的烷基且 X 是氯、溴或碘。

[0081] 本发明具有酯酶活性的多肽和重组酯酶 (rAPLE) 优选与 SEQ ID No.1 所示蛋白质的序列具有至少 90％、尤其优选至少 98％的同一性。还可使用本发明的下述具有酯酶活性的多肽或重组酯酶 (rAPLE)，其具有通过常见修饰例如突变、删除、延伸、融合获得的经修饰的 SEQ ID.No.1 所示 DNA 序列，所述经修饰的 DNA 序列编码具有想要的酯酶活性的酶。

[0082] 在这方面，富含对映异构体的式 (II)

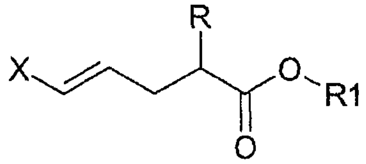
[0083]



(II)

[0084] 的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸或其酯（其中 R 为 $C_1$-$C_6$- 烷基，A 等于 H、$R_1$或 $R_2$，其中 $R_1$可以是 $C_1$-$C_4$的烷基，$R_2$是烷基但不等于 $R_1$，且 X 为氯、溴或碘）是这样获得的：在存在水或式 $R_2$OH（其中 $R_2$是不等于 $R_1$的烷基）的醇作为亲核体时，通过用本发明的多肽或本发明的 rAPLE 转化式 (I)

[0085]



(I)

[0086] 的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯（其中 R、$R_1$和 X 如上文定义）的对映异构体混合物，以及

[0087] a) 对剩余的下述富含对映异构体的式 (II) 的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯加以分离，所述式中 A 等于 $R_1$，或

[0088] b) 如果使用醇作为亲核体，那么对得到的下述富含对映异构体的式 (II) 的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯加以分离，所述式中 A 等于 $R_2$，或

[0089] c) 如果使用水作为亲核体，对得到的下述式 (II) 的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸加以分离，所述式中 A 等于 H。

[0090] 式 (II) 中的 R 是 $C_1$-$C_6$的烷基，例如甲基、乙基、正丙基和异丙基、正丁基、异丁基和叔丁基、戊基和己基。

[0091] $C_1$-$C_4$的烷基是优选的，异丙基是尤其优选的。

[0092] A 为 H、$R_1$（其中 $R_1$ 是 $C_1$-$C_4$ 的烷基，优选是 $C_1$-$C_2$ 的烷基，尤其优选是甲基）或 $R_2$（其中 $R_2$ 为不等于 $R_1$ 的烷基）。尤其优选地，$R_2$ 是 $C_1$-$C_6$ 的烷基。

[0093] X 为氯、溴或碘，优选氯。

[0094] 在这方面富含对映异构体的化合物表示：显示出＞ 80％的对映体过量（ee）、优选＞ 90％、尤其优选＞ 97％的那些。

[0095] 另外，本发明的酶可以以任何形式使用。例如作为分散剂、作为溶液、被固定的、作为粗酶、作为已经通过已知的纯化方法的组合得自其来源的酶、作为具有所需酶活性（天然或通过遗传活性）的完整细胞（其被适当固定和／或透化）或处于这类细胞的裂解物中。

[0096] 用于本发明的转化的反应温度通常在 0℃和 99℃之间，优选 10 和 66℃之间。反应溶液的 pH 在 4 和 11 之间，优选 6 和 9 之间。

[0097] 对溶剂的选择取决于使用的亲核体。

[0098] 如果例如水为亲核体，则可以使用的溶剂是水，水和与水混溶的溶剂（例如与醇例如甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇等，二噁烷，四氢呋喃，丙酮或二甲基亚砜）的混合物或水和与水不混溶的溶剂（例如芳香化合物例如甲苯、二甲苯等，链烷例如己烷、庚烷、环己烷等，醚例如二异丙醚、甲基叔丁基醚等）的两相系统。如果亲核体是醇，则优选地使用的溶剂是醇 $R_2OH$，其中 $R_2$ 是不等于 $R_1$ 的烷基。然而，还可能使用醇与有机溶剂（例如四氢呋喃、庚烷、甲苯、己烷、$CH_3CN$、甲基叔丁基醚等）的混合物。

[0099] 酶催化的外消旋化合物拆分发生后，想要的终产物被分离。这可以是剩余的富含对映异构体的式（II）的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯（其中，A 等于 $R_1$），或当水为亲核体时是形成的富含对映异构体的式（II）的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸（其中，A 等于 H），或当醇为亲核体时是富含对映异构体的式（II）的 2- 烷基 -5- 卤代戊 -4- 烯羧酸酯（其中，A 等于 $R_2$）。

[0100] 分离可例如通过常规方法（例如抽提、结晶、柱色谱、蒸馏等）发生。

[0101] 本发明的方法以多达 98％的理论产率和多达＞ 99％的 e.e. 得到相应的式（I）的酸或酯。

[0102] <u>实施例 1：mRNA 分离和 cDNA 的产生</u>

[0103] 将来自新鲜宰杀的猪（其得自地方屠宰场）的 0.7g 肝在液氮中冷冻并用研钵匀化，使用 Fast Track mRNA 抽提试剂盒 2.0（Invitrogen，Carlsbad，Calif.，USA），根据制造商的说明书（Fast Track 2.0 试剂盒手册；version J；082301；25-0099），来分离或抽提被解离的 mRNA。抽提提供了 12.9ug 的 mRNA 总量。

[0104] 然后使用 0.26μg 该 mRNA 作为模板，使用用于 RT-PCR 的 SuperScript III First-Strand 第一链合成系统，根据制造商的说明书来产生 cDNA。

[0105] <u>实施例 2：从猪肝扩增和克隆 cDNA</u>

[0106] 制备基于 GenBank 编号 No.X63323（Matsushima et al.，1991）的猪肝酯酶基因序列的特异性引物：

[0107] 引物 1：5’-CAGAA TTCATGGCTATCGGGCAGCCAGCCTCGC-3’（SEQ ID No.3）

[0108] 引物 2：5’-CCGGAA TTCAGCCTCCCCTTCACAGCTCAG-3’（SEQID No.4）

[0109] 与已知的 PLE 序列同源的碱基用粗体表示。限制性内切核酸酶的识别序列用斜体表示。

[0110] 根据‘Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶’手册 (Finnzymes)，在 50μl 混合物中进行扩增，其中使用 1U husion DNA 聚合酶 (Finnzymes，Espoo，Finland)，用 500ng cDNA 作为模板，使用 20μmol 每种引物 1 和 2、5μl 的 dNTP 混合物（每种 2mM)，所有都在 1×Phusion HF 缓冲液中，从在 98℃变性 30 秒开始，随后是用于扩增的 30 个循环 (98℃ 10 秒、68℃ 20 秒、72℃ 1 分钟）和在 70℃孵育 8 分钟以制备完整的产物。

[0111] 该 PCR 产生了大小为 1.8kb（通过琼脂糖凝胶电泳测定）的 DNA 片段。

[0112] 然后使用 Qiaquick 试剂盒 (Qiagen，Hilden，Germany)，根据内含的手册纯化该 PCR 产物。

[0113] 用限制性核酸内切酶 EcoRI 切割约 0.1μg 经纯化的 PCR 产物，并通过 EcoRI 切割位点，将其克隆进质粒载体 pHILZ 和 pHIL-D2 中。

[0114] 然后将载体转化进根据‘Current Protocols in Molecular Biology’制备的 TOP10 电感受态细胞中。

[0115] 使用‘Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing’试剂盒 (AppliedBiosystems Inc.，Forster City，Calif.，USA)，对若干个得到的克隆的插入物进行测序。

[0116] 藉此鉴定了两条序列，一条 100％对应于由 Matsushima et al.，(1991)FEBS Lett.293，37-41 公开的预期序列，另一条序列对应于 SEQ ID No.2。

[0117] 实施例 3：引入 α 因子信号序列和改变 C 末端

[0118] 为了能够对本发明的蛋白质 rAPLE 和已知蛋白质 PLE 进行分泌型表达，构建下述载体，在所述载体中 PLE 和 APLE 的序列以 N 末端方式与克隆载体 pPICZα (Invitrogen) 的 α 因子起始序列相连。另外，制备其中 C 端四肽 HAEL 被删除的构建体。

[0119] PCR I：使用 EcoRI alpha 1/alpha PLE2 引物对来扩增克隆载体 pPICZα (Invitrogen) 的 α 因子信号序列。PCR 在 50μl 混合物 (2ng 模板、0.5μmol 每种引物、0.2mM dNTPs、1U Phusion DNA 聚合酶 (Finnzymes)，均在 1×Phusion HF 缓冲液中，根据‘Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶’手册 (Finnzymes)) 中进行。

[0120] 在 95℃变性 3 分钟，随后在 30 个循环 (95℃ 30 秒、57℃ 30 秒、72℃ 15 秒）中扩增，最终步骤为 72℃ 7 分钟。

[0121] PCR II：使用 PLEalpha1/EcoRIPLE+ER2 引物对或 PLEalpha1/EcoRIPLE2（删除 C 端 HAEL 四肽）引物对，从 pHILZ 质粒扩增 PLE 和 APLE 序列。

[0122] 再在 50μl 混合物 (2ng 模板、0.5μmol 每种引物、0.2mM dNTPs、1U Phusion DNA 聚合酶 (Finnzymes)，均在 1×Phusion HF 缓冲液中，根据‘Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶’手册 (Finnzymes)) 中进行这些 PCR。

[0123] 95℃ 3 分钟变性，然后在 30 个循环 (95℃ 30 秒、57℃ 30 秒、72℃ 15 秒）中扩增，最终步骤为 72℃ 7 分钟。

[0124] PCR III：使用 3μl 来自 PCR I 和 PCR II 的产物，通过无引物 PCR 将这两种产物组合起来。

[0125] 延伸在 45μl 混合物 (0.2mM dNTPs、1U 的 Phusion DNA 聚合酶 (Finnzymes)，均在 1×Phusion HF 缓冲液中）中进行。

[0126] 在 95℃将反应混合物加热 3 分钟，然后在 95℃ 30 秒和 72℃ 45 秒进行 10 个循环。为了扩增这些重叠的延伸产物，加入 5μl 引物混合物 (3μl 水、1μl 5μM 的 EcoRIalpha1

引物和 1μl 5μM 的 EcoRIPLE+ER2 或 EcoRIPLE2 引物）。用 20 个 PCR 循环（95℃ 30 秒、57℃ 30 秒、72℃ 1 分钟）扩增产物，并在 72℃单温度停止 7 分钟。

[0127] 引物序列：

[0128] EcoRlalpha1：5′ -TCTTCGAAGAA TTGACGATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGC-3′

[0129] (SEQ ID No.5)

[0130] alphaPLE2：5′ -GAGGCTGGCTGCCCAGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCG-3′

[0131] (SEQ ID No.6)

[0132] PLEalpha1：5′ -AGAGAGGCTGAAGCTGGGCAGCCAGCCTCGCCG-3′

[0133] (SEQ ID No.7)

[0134] EcoRIPLE+ER2：5′ -ATGGTACCGAATTCTCACAGCTCAGCATGCTTTATCTTG-3′

[0135] (SEQ ID No.8)

[0136] EcoRIPLE2：5′ -ATGGTACCGAATTCTCACTTTATCTTGGGTGGCTTCTTTG-3′

[0137] (SEQ ID No.9)

[0138] 与模板具有同源性的区域是粗体，限制性内切核酸酶的识别序列是斜体。

[0139] 实施例 4：对用于在 Pichia pastoris 中异源表达猪肝酯酶的表达构建体的构建

[0140] 使用 Qiaquick 试剂盒（Qiagen，Hilden，Germany），根据内含的手册来纯化来自实施例 3 的重叠延伸 PCR 产物。使用 EcoRI 限制性内切核酸酶切割约 0.1μg 经纯化的 PCR 产物，并通过 EcoRI 切割位点将其克隆进质粒载体 pGAPZ A（Invitrogen）中。

[0141] 借助于对照切割（例如使用 NcoI），检查插入物相对于启动子的正确方向。

[0142] 在每种情况下，选择带有方向正确的插入物的克隆，对其测序并保存。

[0143] 按照下文所述，对相应的质粒命名：

[0144] 含有 Matsushima et al.，(1991)FEBS Lett.293，37-41 中公开的已知 PLE 序列的质粒被称作 pGAPZ A PLE-ER（HAEL 四肽被删除）和 pGAPZ APLE+ER（HAEL 四肽仍然存在）。

[0145] 来自新颖的 APLE 序列的质粒被称作 pGAPZ A APLE-ER（HAEL 四肽被删除）和 pGAPZ A APLE-ER（HAEL 四肽仍然存在）。

[0146] 实施例 5：猪肝酯酶在 Pichia pastoris 中的组成型表达

[0147] 将质粒 pGAPZ A PLE-ER、pGAPZ A PLE+ER、pGAPZ A APLE-ER 和 pGAPZ A APLE+ER 转化进 P.pastoris X-33。根据来自 Invitrogen 的 Pichia Expressions 试剂盒的方案说明书来进行转化。在含有 100mg/lzeocin 的 YPD 平板（1%酵母提取物、2%蛋白胨、2% D-葡萄糖、2%琼脂）上选择转化子。在含有 100mg/l zeocin 的 YPD 平板上对经 52 个 zeocin 抗性的克隆划线，并将其保存于 15%甘油中。

[0148] 实施例 6：对酯酶活性的定量分析

[0149] 在含有 100mg/l zeocin 的 YPD 平板上，于 30℃下，对 P.pastoris 转化子进行 48 小时的培养。将细胞挑至 Whatman 541 硬化的无灰 70 mmØ 滤纸上并晾干。用 6mg α-萘基醋酸盐（Sigma，溶于 500μl 丙酮中）、2.5mg 邻联茴香胺（tetrazotized o-dianisidine）（Fast Blue Salt BN，Sigma，溶于 125μl 水中）和 5ml 0.1M 磷酸氢二钾缓冲液，pH 7 的溶液孵育滤纸，以通过显色反应来观察酯酶活性。

[0150] 在整合了 4 种质粒 pGAPZ A PLE-ER、pGAPZ A PLE+ER、pGAPZ AAPLE-ER 和 pGAPZ A APLE+ER 之一的所有转化子中都检测到了活性。这证明了具有酯酶活性的功能蛋白质的

表达。为了核实，也以相同方式测试整合了空载体的克隆。在该情况下，在相当长的反应周期内都未看到显著的酯酶活性。

[0151] 实施例 7 :与甲基 5- 氯代 -2-(1- 甲基乙基 )-4- 戊烯酸酯相关的立体选择性酯酶活性

[0152] 在含有 100mg/l zeocin 的 YPD 平板上，于 30℃下，对实施例 6 中所述的 P.pastoris 转化子进行 48 小时的培养。将细胞挑至 Whatman 541 硬化的无灰 70 mmØ 滤纸上并晾干。将滤纸与底物溶液 A(100μl 外消旋的甲基 5- 氯代 -2-(1- 甲基乙基 )-4- 戊烯酸酯、200μl 0.1M 磷酸二氢钾缓冲液，pH 8 ;150μl 10mg/ml 酚磺酞 ;450μl DMSO ; 650μl $H_2O$) 或底物溶液 B( 与底溶液 A 相同，但是使用甲基 (2S,4E)-5- 氯代 -2-(1- 甲基乙基 )-4- 戊烯酸酯代替外消旋化合物 ) 一起孵育。

[0153] 由于有针对底物的特异酯酶活性，酯底物水解得到的酸释放导致 pH 降低，这随后导致酚磺酞指示剂的颜色变黄。

[0154] 这显示 :含有质粒 pGAPZ A APLE-ER 的转化子如果在底物溶液 A 上测试时在孵育 3 到 4 小时后给出信号 ( 菌落周围黄色 )，而使用底物溶液 B 时不能发现显著的转化 ( 图 1)。

[0155] 使用质粒 pGAPZ A PLE-ER 或 pGAPZ A PLE+ER 获得的转化子在相同的条件下显示不与底物溶液 A 或 B 反应。

[0156] 这显示重组的 rAPLE 与重组的 rPLE 具有底物特异性差异，且使用 rAPLE 对甲基 5- 氯代 -2-(1- 甲基乙基 )-4- 戊烯酸酯的水解是立体选择性地针对 (R) 对映异构体发生的。

[0157] 实施例 8 :SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0158] 向 10μl 可商业获得的猪肝酯酶或 10μl P.pastoris 培养物 ( 在带盖 2LErlenmeyer 摇瓶中的 250ml YPD 培养基中，于 100rpm 和 28℃下培养 72 小时 ) 的 60 倍浓缩 (Centricon Ultrafiltrations-Spin Columns，来自 Sartorius) 的上清液中加入 10μl 2×SDS 样品缓冲液 (125mM Tris-HCl，pH6.8 ;4％ SDS，20％甘油、5％ β-巯基乙醇、0.05％溴酚蓝 )，所述培养物含有质粒 pGAPZ A APLE-ER 或空的 pGAPZ A 质粒 ( 对照菌株 )。

[0159] 样品已经在 95℃加热 5 分钟后，在 12.5％的聚丙烯酰胺凝胶 (4％成层胶 ) 上分离蛋白质，用考马斯亮蓝 R250 染色用于检测。SDS-PAGE 显示 :在具有 pGAPZ A APLE 质粒的酵母菌株中有具有 rAPLE 的期望大小 ( ～ 60kDa) 的蛋白质条带，但是在对照菌株中没有 ( 图 2)。

[0160] 也被分析以用于比较的可商业获得的猪肝酯酶在相同尺寸范围内显示出两条蛋白质条带 ( 图 2 中箭头 )。

[0161] 实施例 9 :用 AOX1 启动子对猪肝酯酶的诱导表达

[0162] 用限制性内切核酸酶 XhoI 切割质粒 pGAPZ A PLE-ER、pGAPZ APLE+ER、pGAPZ A APLE-ER 和 pGAPZ A APLE+ER，并通过 XhoI 切割位点将编码 APLE 和 PLE 蛋白质的各片段 ( 其具有或不具有 ER 保留信号 ) 克隆进 pPIC9 载体 (Invitrogen) 中。通过用限制性内切核酸酶 NcoI 核实片段相对于 AOX1 启动子的正确方向。与实施例 4 中命名的质粒类似，具有 AOX1 启动子的载体被称作 pPIC9PLE-ER、pPIC9PLE+ER、pPIC9APLE-ER 和 pPIC9APLE+ER，用 SalI 对其进行线性化，并将其转化进 P.pastoris KM71 中。根据来自 Invitrogen 的 Pichia 表达试剂盒的说明书进行转化以及对 His 原营养型的选择。根据来自 Invitrogen 的

Pichia 表达试剂盒的说明书，在完全培养基上对选出的转化子和 KM71 菌株进行过夜培养，并用 1％的甲醇诱导 48 小时。通过实施例 7 中所述的定量 pH- 迁移测定法分析得到的培养物，在每种情况下对混合物中 2μl 的培养物进行测试。与实施例 7 中针对组成型表达所述的情况相比，诱导型 AOX1 控制下的表达导致高得多的与外消旋的甲基 5- 氯代 -2-(1- 甲基乙基 )-4- 戊烯酸酯相关的 rAPLE 酶活性。仅在几分钟后就可检测到酚磺酞颜色改变 ( 红到黄 )( 图 3)。出乎意料的是，rAPLE 活性与 C 端 ER 保留信号 HAEL 的存在无关，即，甚至表达带有 ER 保留信号的 rAPLE 的细胞也显示活性。相反，用于生产 rPLE 的酵母菌株不具有与外消旋甲基 5- 氯代 -2-(1- 甲基乙基 )-4- 戊烯酸酯相关的活性。

# 序列表

<110>DSM 精细化学奥地利 NFG 两合公司

<120> 具有酯酶活性的多肽和重组的酯酶及其用途

<130>0.Z.1302a

<160>9

<170>PatentIn version 3.3

<210>1
<211>548
<212>PRT
<213> 人工

<220>
<223>rAPLE

<400>1

Gly Gln Pro Ala Ser Pro Pro Val Val Asp Thr Ala Gln Gly Arg Val
1 5 10 15
Leu Gly Lys Tyr Val Ser Leu Glu Gly Leu Ala Gln Pro Val Ala Val
20 25 30
Phe Leu Gly Val Pro Phe Ala Lys Pro Pro Leu Gly Ser Leu Arg Phe
35 40 45
Ala Pro Pro Gln Pro Ala Glu Pro Trp Ser Phe Val Lys Asn Thr Thr
50 55 60
Ser Tyr Pro Pro Met Cys Cys Gln Glu Pro Ile Gly Gly Gln Met Leu
65 70 75 80
Ser Asp Leu Phe Thr Asn Arg Lys Glu Arg Leu Ile Pro Glu Phe Ser
85 90 95
Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Thr Lys
100 105 110
Arg Gly Arg Leu Pro Val Met Val Trp Ile His Gly Gly Gly Leu Val
115 120 125
Val Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Ala Leu Ala Ala His Glu

130 135 140

Asn Val Val Val Val Ala Ile Gln Tyr Arg Leu Gly Ile Trp Gly Phe
145 150 155 160

Phe Ser Thr Gly Asp Glu His Ser Arg Gly Asn Trp Gly His Leu Asp
165 170 175

Gln Val Ala Ala Leu His Trp Val Gln Glu Asn Ile Ala Asn Phe Gly
180 185 190

Gly Asp Pro Gly Ser Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly Glu
195 200 205

Ser Val Ser Val Leu Val Leu Ser Pro Leu Ala Lys Asn Leu Phe His
210 215 220

Arg Ala Ile Ser Glu Ser Gly Val Ala Phe Thr Ala Gly Leu Val Arg
225 230 235 240

Lys Asp Met Lys Ala Ala Ala Lys Gln Ile Ala Val Leu Ala Gly Cys
245 250 255

Lys Thr Thr Thr Ser Ala Val Phe Val His Cys Leu Arg Gln Lys Ser
260 265 270

Glu Asp Glu Leu Leu Asp Leu Thr Leu Lys Met Lys Phe Phe Ala Leu
275 280 285

Asp Leu His Gly Asp Pro Arg Glu Ser His Pro Phe Leu Thr Thr Val
290 295 300

Val Asp Gly Val Leu Leu Pro Lys Met Pro Glu Glu Ile Leu Ala Glu
305 310 315 320

Lys Asp Phe Asn Thr Val Pro Tyr Ile Val Gly Ile Asn Lys Gln Glu
325 330 335

Phe Gly Trp Leu Leu Pro Thr Met Met Gly Phe Pro Leu Ser Glu Gly
340 345 350

Lys Leu Asp Gln Lys Thr Ala Thr Ser Leu Leu Trp Lys Ser Tyr Pro
355 360 365

Ile Ala Asn Ile Pro Glu Glu Leu Thr Pro Val Ala Thr Asp Lys Tyr
370 375 380

Leu Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Lys Lys Lys Asp Leu Phe Leu Asp
385 390 395 400

Leu Met Gly Asp Val Val Phe Gly Val Pro Ser Val Thr Val Ala Arg
405 410 415

Gln His Arg Asp Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Met Tyr Glu Phe Gln Tyr
420 425 430

Arg Pro Ser Phe Ser Ser Asp Lys Lys Pro Lys Thr Val Ile Gly Asp
435 440 445

His Gly Asp Glu Ile Phe Ser Val Phe Gly Phe Pro Leu Leu Lys Gly
450 455 460
Asp Ala Pro Glu Glu Glu Val Ser Leu Ser Lys Thr Val Met Lys Phe
465 470 475 480
Trp Ala Asn Phe Ala Arg Ser Gly Asn Pro Asn Gly Glu Gly Leu Pro
485 490 495
His Trp Pro Met Tyr Asp Gln Glu Glu Gly Tyr Leu Gln Ile Gly Val
500 505 510
Asn Thr Gln Ala Ala Lys Arg Leu Lys Gly Glu Glu Val Ala Phe Trp
515 520 525
Asn Asp Leu Leu Ser Lys Glu Ala Ala Lys Lys Pro Pro Lys Ile Lys
530 535 540
His Ala Glu Leu
545

<210>2
<211>1647
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223>rAPLE

<400>2
gggcagccag cctcgccgcc tgttgtggac actgcccagg gccgagtcct ggggaagtac 60
gtcagcttag aaggcctggc acagccggtg gccgtcttcc tgggagtccc ttttgccaag 120
ccccctctcg gatccttgag gtttgctccg ccgcagcctg cagaaccatg gagcttcgtg 180
aagaacacca cctcctaccc tcccatgtgc tgccaagagc caattggggg acagatgctc 240
tcagatctat ttaccaacag aaaggagagg ctcattccgg agttttctga agactgtctc 300
tacctaaata tttacacccc tgctgacctg acaaagaggg gcagactgcc ggtgatggtg 360
tggatccacg gaggaggtct ggtggtgggc ggggcttcca cctatgatgg actggccctc 420
gctgcgcatg aaaacgtggt ggtggtggcc atccagtacc gcctgggcat ctggggattc 480
ttcagcacag ggacgaaca cagccggggc aactggggtc acttggacca ggtggccgca 540
ctgcactggg tccaggagaa catcgccaac tttggaggcg acccaggctc tgtgaccatc 600
tttggagagt cagcaggagg ggaaagtgtc tctgttctgg tgttgtctcc cttggccaag 660
aacctcttcc accgggccat ctctgagagt ggcgtggcct tcactgctgg cctggtcagg 720
aaggacatga aggctgcagc taagcaaatt gctgtccttg ctgggtgtaa aaccaccacc 780
tcggctgtct ttgttcactg cctgcgccag aagtcggagg acgagctctt ggacttaacg 840
ctgaagatga aatttttcgc tcttgatttg catggagacc ccagagagag ccatcccttc 900

ctgaccactg tggtggatgg agtgctgctg cccaagatgc ctgaagagat tctggctgaa 960
aaggatttca acactgtccc ctacatcgtg ggaatcaaca agcaagagtt tggctggctt 1020
ctgccaacga tgatgggctt ccccctctct gaaggcaagc tggaccagaa gacggccacg 1080
tcactcctgt ggaagtccta ccccatcgct aacatccctg aggaactgac tccagtggcc 1140
actgacaagt atttgggggg gacagacgac cccgtcaaaa agaaagacct gttcctggac 1200
ttgatggggg atgtggtgtt tggtgtccca tctgtgacgg tggcccgtca acacagagat 1260
gcaggagccc ccacctacat gtatgagttt cagtatcgcc caagcttctc atcggacaag 1320
aaacccaaga cggtgatcgg ggaccacggg gatgagatct tctccgtctt tggttttcca 1380
ctgttaaaag gcgatgcccc agaagaggag gtcagtctca gcaagacggt gatgaaattc 1440
tgggccaact ttgctcgcag tgggaacccc aatggggagg ggctgcccca ttggccgatg 1500
tacgaccagg aagaagggta ccttcagatc ggcgtcaaca cccaggcagc caagaggctg 1560
aaaggtgaag aagtggcctt ctggaacgat ctcctgtcca aggaggcagc aaagaagcca 1620
cccaagataa agcatgctga gctgtga 1647

<210>3
<211>33
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>3
cagaattcat ggctatcggg cagccagcct cgc 33

<210>4
<211>30
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>4
ccggaattca gcctcccctt cacagctcag 30

<210>5
<211>43
<212>DNA

<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>5
tcttcgaaga attcacgatg agatttcctt caatttttac tgc 43

<210>6
<211>36
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>6
gaggctggct gcccagcttc agcctctctt ttctcg 36

<210>7
<211>33
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>7
agagaggctg aagctgggca gccagcctcg ccg 33v
<210>8
<211>39
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>8
atggtaccga attctcacag ctcagcatgc tttatcttg 39

<210>9

<211>40

<212>DNA

<213> 人工

<220>

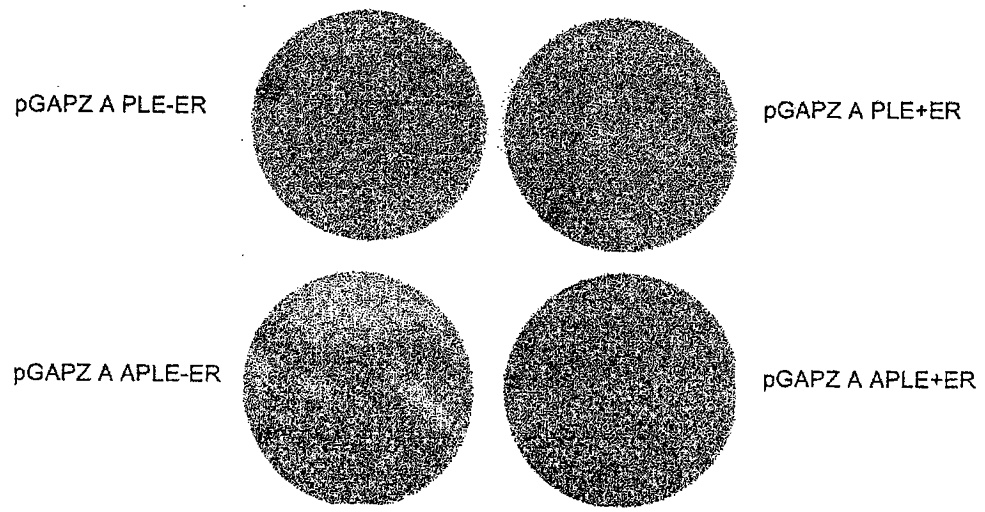
<223> 引物

<400>9

atggtaccga attctcactttatcttgggt ggcttctttg 40

甲基5-氯代-2-(1-甲基乙基)-4-戊烯酸盐上的立体选择性酯酶活性

A：外消旋底物上的活性：P. pastoris X-33转化体




B：外消旋底物对比(S)对映异构体上的活性

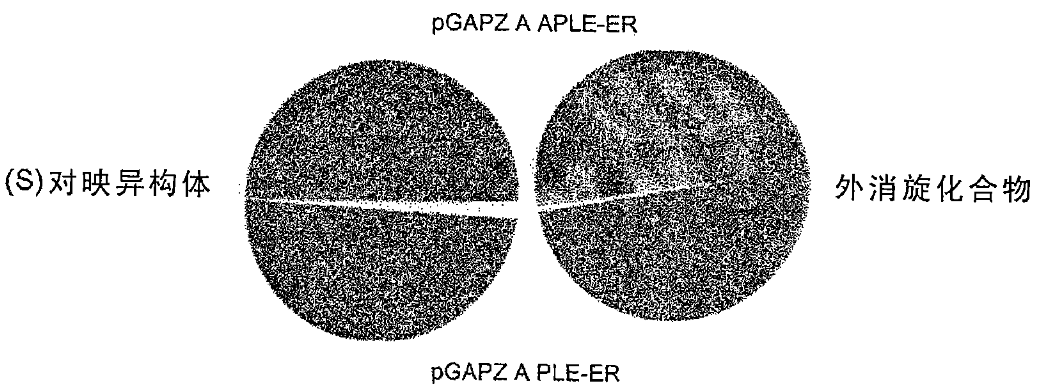
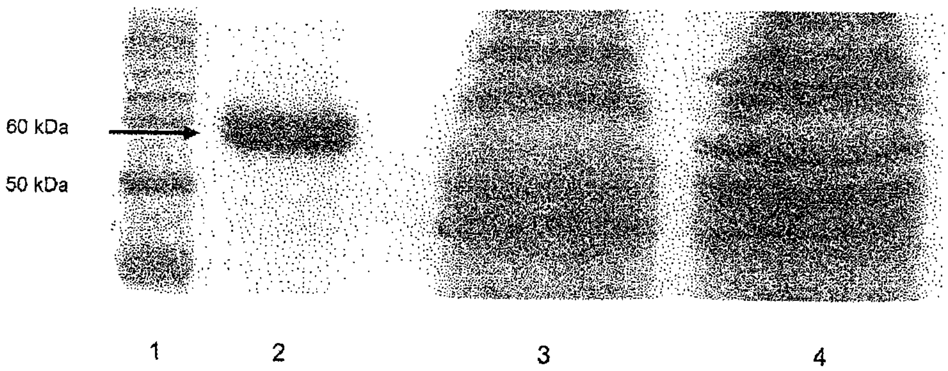



图 1

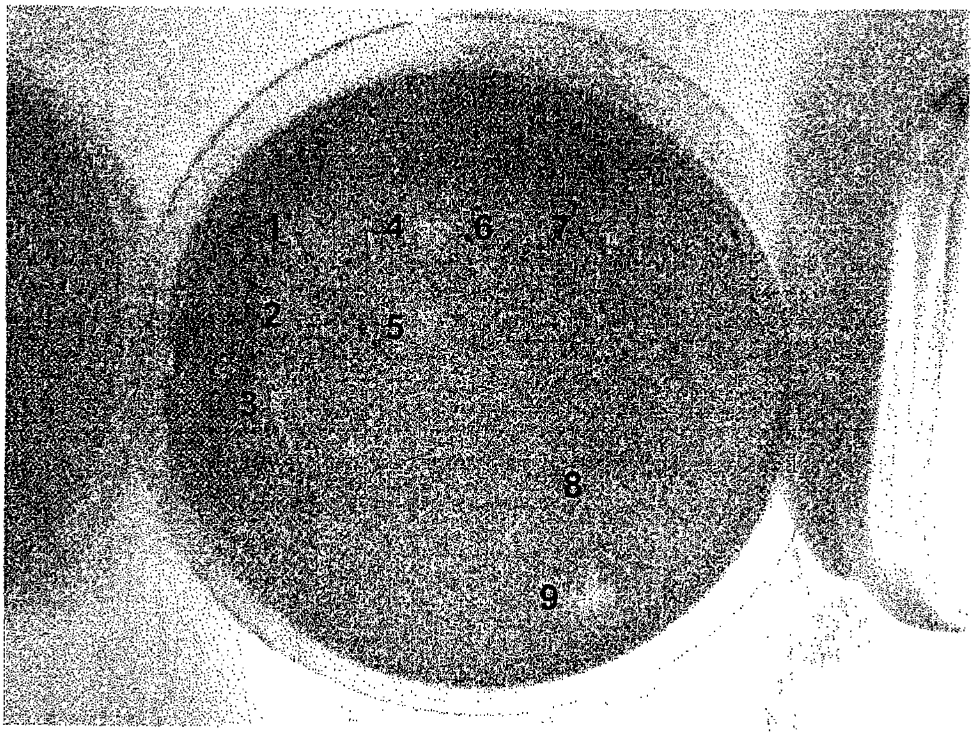
重组的APLE的SDS-PAGE




1: Page Ruler Protein Ladder (Fermentas)
2: 可商业获得的PLE
3: 整合了pGAPZ A 的P. pastoris X-33（对照菌株）
4: 整合了pGAPZ A APLE-ER的P. pastoris X-33

图 2

用AOX1启动子诱导的猪肝酯酶表达




1: 整合了pPIC9 APLE-ER 的P. pastoris KM71
2: 整合了pPIC9 APLE-ER 的P. pastoris KM71
3: 整合了pPIC9 APLE-ER 的 P. pastoris KM71
4: 整合了pPIC9 APLE+ER 的P. pastoris KM71
5: 整合了pPIC9 APLE+ER 的P. pastoris KM71
6: 整合了pPIC9 PLE-ER 的P. pastoris KM71
7: 整合了pPIC9 PLE+ER 的P. pastoris KM71
8: P. pastoris KM71
9: 可商业获得的 PLE

图 3

SEQ ID No 1
rAPLE的蛋白质序列

GQPASPPVVDTAQGRVLGKYVSLEGLAQPVAVFLGVPFAKPPLGSLRFAPPQPAEPWSFVKNTTSYPPMCCQEPI
GGQMLSDLFTNRKERLIPEFSEDCLYLNIYTPADLTKRGRLPVMVWIHGGGLVVGGASTYDGLALAAHENVVVVA
IQYRLGIWGFFSTGDEHSRGNWGHLDQVAALHWVQENIANFGGDPGSVTIFGESAGGESVSVLVLSPLAKNLFHR
AISESGVAFTAGLVRKDMKAAAKQIAVLAGCKTTTSAVFVHCLRQKSEDELLDLTLKMKFFALDLHGDPRESHPF
LTTVVDGVLLPKMPEEILAEKDFNTVPYIVGINKQEFGWLLPTMMGFPLSEGKLDQKTATSLLWKSYPIANIPEE
LTPVATDKYLGGTDDPVKKKDLFLDLMGDVVFGVPSVTVARQHRDAGAPTYMYEFQYRPSFSSDKKPKTVIGDHG
DEIFSVFGFPLLKGDAPEEEVSLSKTVMKFWANFARSGNPNGEGLPHWPMYDQEEGYLQIGVNTQAAKRLKGEEV
AFWNDLLSKEAAKKPPKIKHAEL

SEQ ID No 2:
rAPLE的核苷酸序列

gggcagccag cctcgccgcc tgttgtggac actgcccagg gccgagtcct ggggaagtac
gtcagcttag aaggcctggc acagccggtg gccgtcttcc tgggagtccc ttttgccaag
ccccctctcg gatccttgag gtttgctccg ccgcagcctg cagaaccatg gagcttcgtg
aagaacacca cctcctaccc tcccatgtgc tgccaagagc caattggggg acagatgctc
tcagatctat ttaccaacag aaaggagagg ctcattccgg agttttctga agactgtctc
tacctaaata tttacacccc tgctgacctg acaaagaggg gcagactgcc ggtgatggtg
tggatccacg gaggaggtct ggtggtgggc ggggcttcca cctatgatgg actggccctc
gctgcgcatg aaaacgtggt ggtggtggcc atccagtacc gcctgggcat ctggggattc
ttcagcacag gggacgaaca cagccggggc aactggggtc acttggacca ggtggccgca
ctgcactggg tccaggagaa catcgccaac tttggaggcg acccaggctc tgtgaccatc
tttggagagt cagcaggagg ggaaagtgtc tctgttctgg tgttgtctcc cttggccaag
aacctcttcc accgggccat ctctgagagt ggcgtggcct tcactgctgg cctggtcagg
aaggacatga aggctgcagc taagcaaatt gctgtccttg ctgggtgtaa aaccaccacc
tcggctgtct ttgttcactg cctgcgccag aagtcggagg acgagctctt ggacttaacg
ctgaagatga aatttttcgc tcttgatttg catggagacc ccagagagag ccatcccttc
ctgaccactg tggtggatgg agtgctgctg cccaagatgc ctgaagagat tctggctgaa
aaggatttca acactgtccc ctacatcgtg ggaatcaaca agcaagagtt tggctggctt
ctgccaacga tgatgggctt ccccctctct gaaggcaagc tggaccagaa gacggccacg
tcactcctgt ggaagtccta ccccatcgct aacatccctg aggaactgac tccagtggcc
actgacaagt atttgggggg gacagacgac cccgtcaaaa agaaagacct gttcctggac
ttgatggggg atgtggtgtt tggtgtccca tctgtgacgg tggcccgtca acacagagat
gcaggagccc ccacctacat gtatgagttt cagtatcgcc caagcttctc atcggacaag
aaacccaaga cggtgatcgg ggaccacggg gatgagatct tctccgtctt tggttttcca
ctgttaaaag gcgatgcccc agaagaggag gtcagtctca gcaagacggt gatgaaattc
tgggccaact ttgctcgcag tgggaacccc aatggggagg ggctgcccca ttggccgatg
tacgaccagg aagaagggta ccttcagatc ggcgtcaaca cccaggcagc caagaggctg
aaaggtgaag aagtggcctt ctggaacgat ctcctgtcca aggaggcagc aaagaagcca
cccaagataa agcatgctga gctgtga

SEQ ID. No. 3: 引物1

5'-CA*GAATTC*ATGGCTATC**GGGCAGCCAGCCTCGC**-3'

SEQ ID No. 4: 引物2

5'-CCG*GAATTC*AGCCTCCCCT**TCACAGCTCAG** -3'

SEQ ID No. 5: EcoRIα 1

5'-TCTTCGAA*GAATTC*ACG**ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGC**-3'

SEQ ID No. 6: alphα 2

5'-GAGGCTGGCTGCCC**AGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCG**-3'

SEQ ID No. 7: PLEα 1

5'-AGAGAGGCTGAAGCT**GGGCAGCCAGCCTCGCCG**-3'

SEQ ID No. 8: EcoRIPLE+ER2

5'-AT*GGTACCGAATTC***TCACAGCTCAGCATGCTTTATCTTG**-3'

SEQ ID No. 9: EcoRIPLE2

5'-AT*GGTACCGAATTC*TCA**CTTTATCTTGGGTGGCTTCTTTG**-3'