

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/55

C12N 9/14 C08B 37/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00810155.8

[43] 公开日 2002 年 8 月 7 日

[11] 公开号 CN 1362995A

[22] 申请日 2000.5.9 [21] 申请号 00810155.8

[30] 优先权

[32] 1999.5.10 [33] US [31] 60/133,376

[86] 国际申请 PCT/US00/12531 2000.5.9

[87] 国际公布 WO00/68395 英 2000.11.16

[85] 进入国家阶段日期 2002.1.9

[71] 申请人 CP 凯尔科药物学科学院

地址 美国特拉华州

[72] 发明人 萨比娜·热尼科 格哈德·德勒伊特
伯恩哈德·克洛阿雷 贝亚·彭尼霍夫
菲利普·波坦 奥迪勒·理查德
布赖恩·鲁道夫

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 8 页 说明书 88 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 磺基水解酶,其相应的氨基酸序列和核苷酸序列,磺基水解酶制备物,方法及其产物

[57] 摘要

本发明提供了基于蛋白质总量纯度水平至少为约 40wt. % 的纯化的磺基水解酶,分离的核酸序列和氨基酸序列,和纯化至少一种磺基水解酶的方法,包括将海藻提取物进行分级分离获得级分;将至少一个级分进行苯基琼脂糖凝胶层析获得含有至少一种磺基水解酶的琼脂糖凝胶级分。本发明还提供了用基于蛋白质总量纯度水平至少为约 40wt. % 的分离的磺基水解酶修饰的酶促修饰的化合物,以及一种酶促修饰硫酸化的化合物的方法,所述方法包括将至少一种基于蛋白质总量纯度水平至少为约 40wt. % 的磺基水解酶与硫酸化的化合物形成反应混合物,温育该反应混合物以从硫酸化的化合物中除去硫酸酯基团,形成酶促修饰的化合物。本发明还涉及一种酶促修饰硫酸化的化合物的方法,所述方法包括将第一种磺基水解酶与硫酸化的化合物温育,以从硫酸化的化合物中除去硫酸酯基团,形成中间化合物;接着将第二种磺基水解酶与中间化合物温育,以除去硫酸酯基团,形成酶促修饰的化合物。本发明还提供了一种

从海藻中提取 nu - 和 mu - 角叉菜聚糖之一的方法,包括:将海藻分散于含有 K₂CO₃ 的盐溶液中,形成分散液;过滤此分散液获得液体;超滤此分散液以除去盐;浓缩液体;将液体的 pH 调节为大约 8 - 8.5;从液体中沉淀 nu - 和 mu - 角叉菜聚糖之一。

知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种基于总蛋白量纯化水平为至少 40 wt% 的磺基水解酶。
2. 权利要求 1 的磺基水解酶，其中基于总蛋白量的纯化水平为至少 70 wt%。
3. 权利要求 1 的磺基水解酶，其中基于总蛋白量的纯化水平为至少 90 wt%。
4. 权利要求 1 的磺基水解酶，其中基于总蛋白量的纯化水平为至少 95wt%。
5. 权利要求 1 的磺基水解酶，其中磺基水解酶能从水状胶体中除去硫酸酯。
6. 权利要求 5 的磺基水解酶，其中水状胶体是糖胺聚糖，岩藻聚糖和半乳聚糖之一。
7. 权利要求 1 的磺基水解酶，其中磺基水解酶能从半乳聚糖中除去硫酸酯。
8. 权利要求 7 的磺基水解酶，其中半乳聚糖包括角叉菜聚糖。
9. 权利要求 8 的磺基水解酶，其中角叉菜聚糖包括 μ -角叉菜聚糖。
10. 权利要求 8 的磺基水解酶，其中角叉菜聚糖包括至少大约 50 mol% 的 μ -角叉菜聚糖。
11. 权利要求 8 的磺基水解酶，其中角叉菜聚糖包括 ν -角叉菜聚糖。
12. 权利要求 8 的磺基水解酶，其中角叉菜聚糖包括至少大约 50 mol% 的 ν -角叉菜聚糖。
13. 权利要求 7 的磺基水解酶，其中半乳聚糖包括琼脂。
14. 权利要求 1 的磺基水解酶，其中磺基水解酶包括 6-O-磺基水解酶。
15. 权利要求 1 的磺基水解酶，其中磺基水解酶能将 ν -角

叉菜聚糖转变为 iota-角叉菜聚糖。

16. 权利要求 1 的磺基水解酶，其中磺基水解酶能将 mu-角叉菜聚糖转变为 kappa-角叉菜聚糖。

17. 权利要求 1 的磺基水解酶，其中磺基水解酶能除去 6-O-一硫酸酯以诱导脱水桥形成。

18. 一种分离的核酸序列，其包含 SEQ ID NO: 17 序列。

19. 一种分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO: 17 序列有至少大约 25%同源性的序列。

20. 权利要求 19 的分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO: 17 序列有至少大约 50%同源性的序列。

21. 权利要求 19 的分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO: 17 序列有至少大约 80%同源性的序列。

22. 权利要求 19 的分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO: 17 序列有至少大约 90%同源性的序列。

23. 一种分离的核酸序列，其在杂交条件下与 SEQ ID NO: 17 核酸杂交。

24. 一种分离的核酸序列，其包含 SEQ ID NO: 18 序列。

25. 一种分离的核酸序列，其包含 SEQ ID NO: 19 序列。

26. 一种分离的核酸序列，其包含 SEQ ID NO: 20 序列。

27. 一种分离的核酸序列，其包含 SEQ ID NO: 21 序列。

28. 一种分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO: 18 序列有至少大约 25%同源性的序列。

29. 权利要求 28 的分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO: 18 序列有至少大约 50%同源性的序列。

30. 权利要求 28 的分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO: 18 序列有至少大约 80%同源性的序列。

31. 权利要求 28 的分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO:

18 序列有至少大约 90%同源性的序列。

32. 一种分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO: 19 序列有至少大约 90%同源性的序列。

33. 一种分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO: 20 序列有至少大约 90%同源性的序列。

34. 一种分离的核酸序列，其包含与 SEQ ID NO: 21 序列有至少大约 90%同源性的序列。

35. 一种分离的核酸序列，其在杂交条件下与 SEQ ID NO: 18 核酸杂交。

36. 一种分离的核酸序列，其编码相当于 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列。

37. 一种分离的蛋白质，其包括包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列。

38. 一种分离的蛋白质，其包括与 SEQ ID NO: 22 有至少大约 35%同源性的氨基酸序列。

39. 权利要求 38 的分离的蛋白质，其中氨基酸序列与 SEQ ID NO: 22 有至少大约 50%的同源性。

40. 权利要求 38 的分离的蛋白质，其中氨基酸序列与 SEQ ID NO: 22 有至少大约 80%的同源性。

41. 一种分离的核酸序列，其编码相当于 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列。

42. 一种分离的蛋白质，其包括包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列。

43. 一种分离的蛋白质，其包括与 SEQ ID NO: 23 有至少大约 20%同源性的氨基酸序列。

44. 权利要求 43 的分离的蛋白质，其中氨基酸序列与 SEQ ID NO: 23 有至少大约 50%同源性

45. 权利要求 43 的分离的蛋白质，其中氨基酸序列与 SEQ ID NO: 23 有至少大约 80% 同源性

46. 一种纯化至少一种磺基水解酶的方法，包括：

将海藻提取物进行分级分离以获得级分；和

将至少一种级分进行苯基琼脂糖凝胶层析，以获得含有至少一种磺基水解酶的琼脂糖凝胶级分。

47. 权利要求 46 的方法，其中分级分离包括硫酸铵分级分离。

48. 权利要求 46 的方法，还包括将至少一种苯基琼脂糖凝胶层析级分进行 DEAE 琼脂糖凝胶层析，以获得 DEAE 琼脂糖凝胶级分。

49. 权利要求 48 的方法，还包括将至少一种 DEAE 琼脂糖凝胶层析级分进行肝素琼脂糖凝胶层析。

50. 一种酶促修饰的化合物，其已通过分离的磺基水解酶修饰，该磺基水解酶基于总蛋白量的纯化水平为至少大约 40 wt%。

51. 权利要求 50 的化合物，其中化合物包括半乳聚糖。

52. 权利要求 50 的化合物，其中化合物包括角叉菜聚糖。

53. 权利要求 50 的化合物，其中化合物包括包含 μ -角叉菜聚糖的角叉菜聚糖。

54. 权利要求 53 的化合物，其中角叉菜聚糖包括至少大约 50 mol% 的 μ -角叉菜聚糖。

55. 权利要求 50 的化合物，其中化合物包括琼脂。

56. 一种酶促修饰硫酸化的化合物的方法，包括：

将基于总蛋白量的纯化水平为至少大约 40 wt% 的至少一种磺基水解酶，与硫酸化的化合物组合形成反应混合物；

温育此反应混合物，以从硫酸化的化合物中除去硫酸酯基团，形成酶促修饰的化合物。

57. 权利要求 56 的方法，其中基于总蛋白的纯化水平为至少

大约 70 wt%。

58. 权利要求 56 的方法，其中基于总蛋白的纯化水平为至少大约 90 wt%。

59. 权利要求 56 的方法，其中基于总蛋白的纯化水平为至少大约 95wt%。

60. 权利要求 56 的方法，其中温育温度为大约 0—60℃。

61. 权利要求 56 的方法，其中温育 pH 为大约 5.5—9.5。

62. 权利要求 56 的方法，其中加入反应混合物中的至少一种磺基水解酶包含于溶液中，浓度为至少大约 2—85μg/ml。

63. 权利要求 56 的方法，其中硫酸化的化合物在反应混合物中的浓度为大约 0.012—2% (w/v)。

64. 权利要求 56 的方法，其中硫酸化的化合物包括半乳聚糖。

65. 权利要求 56 的方法，其中硫酸化的化合物包括角叉菜聚糖。

66. 权利要求 56 的方法，其中磺基水解酶在硫酸化的化合物中诱导脱水桥形成。

67. 权利要求 56 的方法，其中硫酸化的化合物包括包含 nu—角叉菜聚糖的角叉菜聚糖。

68. 权利要求 67 的方法，其中角叉菜聚糖包括至少大约 50 mol % 的 nu—角叉菜聚糖。

69. 权利要求 56 的方法，其中硫酸化的化合物包括包含 mu—角叉菜聚糖的角叉菜聚糖。

70. 权利要求 56 的方法，其中角叉菜聚糖包括至少大约 50 mol % 的 mu—角叉菜聚糖。

71. 权利要求 56 的方法，其中修饰的化合物包括 iota—角叉菜聚糖。

72. 权利要求 56 的方法，其中修饰的化合物包括 kappa—角

叉菜聚糖。

73. 权利要求 56 的方法，其中酶促修饰的化合物包括富有前体的 kappa-角叉菜聚糖。

74. 权利要求 56 的方法，其中酶促修饰的化合物包括富有前体的 iota-角叉菜聚糖。

75. 权利要求 56 的方法，其中除去硫酸酯包括从半乳聚糖中除去 6-硫酸酯基团。

76. 权利要求 56 的方法，其中半乳聚糖包括琼脂。

77. 权利要求 56 的方法，其中除去硫酸酯基团包括将 nu-角叉菜聚糖转变为 iota-角叉菜聚糖，以形成在一定条件下不凝胶的产物，所述条件为产物在含有 0.1M 钾的水溶液中浓度为 0.7% (w/v)，温度为 40°C，pH 为 7。

78. 权利要求 56 的方法，其中磺基水解酶包括 6-O-磺基水解酶。

79. 权利要求 56 的方法，其中至少一种磺基水解酶将 nu-角叉菜聚糖转变为 iota-角叉菜聚糖。

80. 权利要求 56 的方法，其中至少一种磺基水解酶将 mu-角叉菜聚糖转变为 kappa-角叉菜聚糖。

81. 权利要求 56 的方法，其中磺基水解酶能除去 6-O-硫酸酯，以诱导脱水桥形成。

82. 一种通过权利要求 56 的方法形成的产物。

83. 一种酶促修饰硫酸化的化合物的方法，包括：

将第一种磺基水解酶与硫酸化的化合物温育，以从硫酸化的化合物中除去硫酸酯基团，形成中间化合物；

接着将第二种磺基水解酶与中间化合物温育，以除去硫酸酯基团，形成酶促修饰的化合物。

84. 权利要求 83 的方法，其中第一种磺基水解酶随机除去硫

酸酯。

85. 权利要求 83 的方法，其中第二种磺基水解酶渐进性除去硫酸酯。

86. 一种产物，其通过用一种溶液温育硫酸化的化合物产生，所述溶液的蛋白质含量基本由渐进性除去硫酸酯基团的磺基水解酶组成。

87. 一种产物，其通过用一种溶液温育硫酸化的化合物产生，所述溶液的蛋白质含量基本由随机除去硫酸酯基团的磺基水解酶组成。

88. 一种从海藻中提取 nu- 和 mu- 角叉菜聚糖之一的方法，包括：

将海藻分散于含有 K_2CO_3 的盐溶液中，形成分散液；

过滤分散液获得液体；

超滤分散液以除去盐；

浓缩液体；

将液体的 pH 调节为大约 8—8.5；

从液体中沉淀 nu- 和 mu- 角叉菜聚糖之一。

89. 权利要求 88 的方法，其中海藻包括 *Spinosum*。

90. 权利要求 88 的方法，其中海藻是冻干的，并在分散于盐溶液之前研磨。

91. 权利要求 88 的方法，其中盐溶液还包括 KCl 溶液。

92. 权利要求 88 的方法，其中 KCl 的浓度为大约 1—1.5M。

93. 权利要求 88 的方法，其中将分散液在过滤之前至少静置大约 18 小时。

94. 权利要求 88 的方法，其中浓缩大约 2—3 倍。

95. 权利要求 88 的方法，其中通过加入碱调节液体的 pH 值。

96. 权利要求 88 的方法，其中沉淀是通过加入异丙醇进行的。

97. 权利要求 88 的方法，其中进行透析直至水的电导率稳定在大约 $2\mu\text{S}/\text{cm}$ 之下。

98. 权利要求 88 的方法，其中在沉淀经透析的 ν -和 μ -角叉菜聚糖之一后，将 ν -和 μ -角叉菜聚糖之一冻干并研磨。

99. 权利要求 88 的方法，其中沉淀的经透析的 ν -和 μ -角叉菜聚糖之一所具有的 ν -和 μ -之一的含量为大约 18–35 mol %。

100. 权利要求 88 的方法，其中沉淀的经透析的 ν -和 μ -角叉菜聚糖之一的分子量为大约 700–800kDa。

说明书

磺基水解酶，其相应的氨基酸序列和核苷酸序列， 磺基水解酶制备物，方法及其产物

相关申请交叉参考：

本申请根据 35U.S.C.§119 (e) 要求在 1999 年 5 月 10 日申请的美国临时专利申请 No.60/133376 的优先权，其内容全部并入参考。

发明背景

1. 发明领域

本发明涉及磺基水解酶，如半乳聚糖磺基水解酶，如 nu- 和 mu- 角叉菜聚糖磺基水解酶。本发明涉及磺基水解酶的氨基酸和核苷酸序列。本发明还涉及酶促修饰硫酸化的化合物，如半乳聚糖。例如，酶促修饰可包括修饰硫酸化的半乳聚糖性质，如凝胶性，如通过除去硫酸酯基团及在半乳聚糖的糖结构中的环位置之间形成桥区。本发明还涉及从海藻中提取 nu- 角叉菜聚糖的方法。本发明还涉及酶促修饰的化合物。

2. 背景阐述

水状胶体，可广泛的限定为是在存在水的情况下产生凝胶的物质，部分由于其流变学性质而使用，也可对稳定性有益处。

水状胶体有许多类别。一种分类方法将这些类别分为溢乳物，如阿拉伯胶，茄替胶，刺梧桐树胶，talha，和黄芪胶；提取物，如从褐色海藻中提取的海藻酸盐，从红色海藻中提取的琼脂，角叉菜聚糖，和 furcelleran，及从陆地植物中提取的 konjak（葡甘露聚糖），瓜耳胶，果胶和阿拉伯半乳聚糖；生物聚合物，如黄原胶；化学修饰的水状胶体，如纤维素制品，包括羧甲基纤维素，羟丙基纤维素，和羧甲基羟甲基纤维素；及中间形式，如微晶纤维素。

红色海藻已知是称为琼脂和角叉菜聚糖的工业凝胶和增稠用细胞

壁硫酸化半乳聚糖的原料。它们由通过交替 α (1-3) 或 β (1-4) 键连接的半乳糖吡喃糖残基的线性主链组成。尽管所有 β 连接的残基呈 D-构型，但是 α (1-4) 连接的半乳糖单位在琼脂中呈 L-构型，在角叉菜聚糖中呈 D-构型。

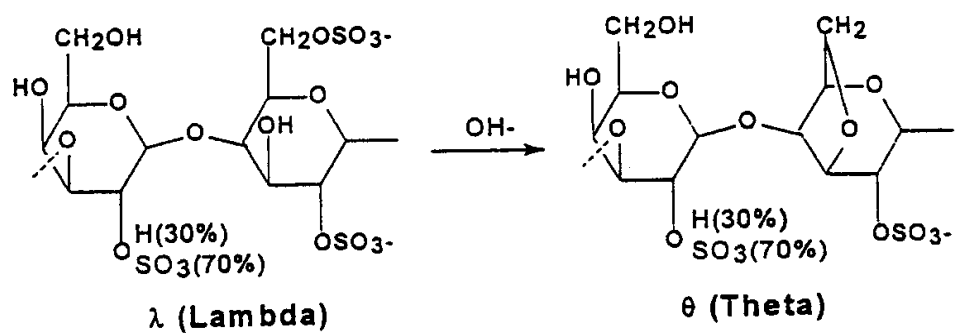
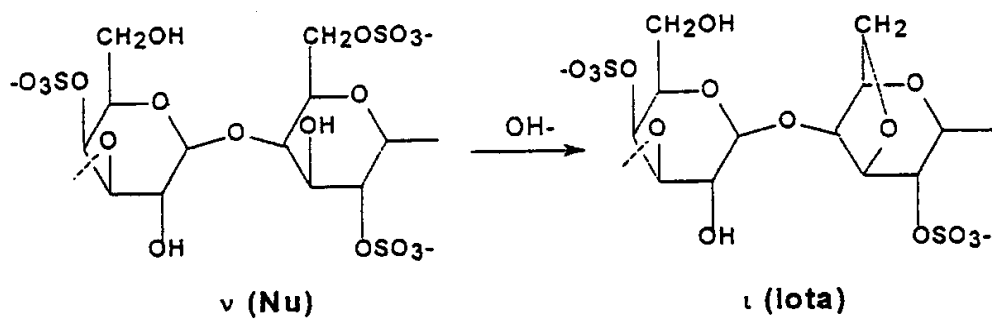
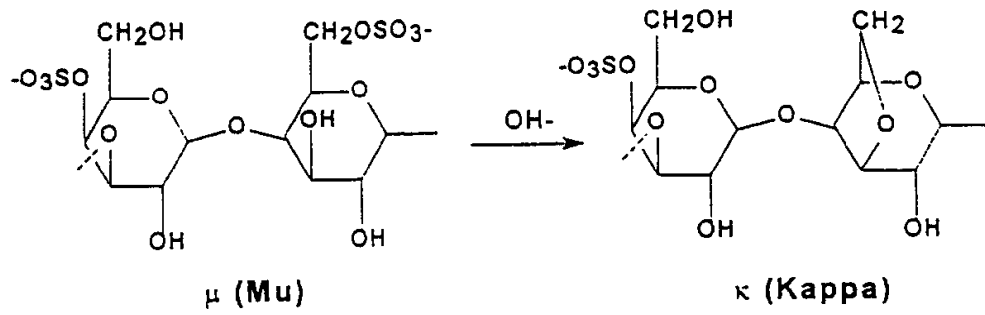
琼脂是通过或多或少加热的碱性溶液 (100—120℃) 从干燥的藻类中提取的。在过滤后，使琼脂溶液成为凝胶，加压脱水，干燥及磨碎，如 ARMISEN 等，“琼脂的生产和使用”，商业海藻产物的生产和利用，FAO 渔业技术文献，288，pp1—57 (1987) 所述，该文献全文并入参考。提取琼脂的海藻原料包括石花菜属，，鸡毛菜属，*Gelidiella*，和江篱属，如 STANLEY，“角叉菜聚糖的生产，性质和使用”，商业海藻产物的生产和利用，FAO 渔业技术文献，288，pp116—146 (1987) 所述，该文献全文并入参考。

角叉菜聚糖是分离自红色海藻的天然水溶的硫酸化半乳聚糖家族的通称。角叉菜聚糖的增稠和凝胶性用于食品和化妆品配方中，如 THERKELSEN，“角叉菜聚糖”，工业用凝胶：多糖及其衍生物，3rd ed，pp145—180，(1993)，和 DeRUITER 等，“角叉菜聚糖生物技术”，食品科学及技术趋势，第 8 卷，pp389—395 (1997) 所述，这两个文献均全文并入参考。

角叉菜聚糖的海藻原料包括麒麟菜属（如刺麒麟菜 (*E.spinosum*)，耳突麒麟菜 (*E.cottonii*) (= *Kappaphycus alvarezii*)，和 *E.denticulatum*)，*Chondrus* (如 *C.crispus*)，*Calliblepharis* (如 *C.jubata*)，和 *Gigartina* (如 *G.radula* 和 *G.stellata*)。

角叉菜聚糖是线性的，部分硫酸化的半乳聚糖，主要由 α (1-4) 连接的 D-半乳糖吡喃糖或 3, 6-脱水-D-半乳糖吡喃糖残基和 β (1-3) 连接的半乳糖吡喃糖残基的重复二聚体组成。如上所述，琼脂类似地也是线性的，部分硫酸化的半乳聚糖的相似结构，除了 α (1-4) 连接的 D-半乳糖吡喃糖残基是 L-形式的。角叉菜聚糖发生

的一些结构主要不同之处在于二聚体主链上硫酸酯基团的数目和位置，及二聚体的各个残基是以左手 (4C_1) 或右手 (C_4) “椅型” 构象存在。这些结构包括 kappa (κ), iota (ι), lambda (λ), theta (θ), mu (μ), 和 nu (ν), 如下所示。iota-, lambda 和 theta-角叉菜聚糖含有 3, 6-脱水桥, 而 nu-, mu-, 和 lambda-角叉菜聚糖不含有此桥。另外, nu-, mu-, 和 lambda-角叉菜聚糖的 α 连接的单位的构象, 不同于含有脱水桥的角叉菜聚糖, 阻止足够的螺旋聚集。螺旋聚集是重要的, 因为螺旋促进凝胶形成。在这点上, kappa 角叉菜聚糖形成坚硬的脆性凝胶, 而 iota 角叉菜聚糖形成弹性的柔软的凝胶, lambda 角叉菜聚糖是非凝胶化的增稠剂。



角叉菜聚糖中 SO_3^- 的数量相当多，并在 0—40% 之间 (w/w) 变化，产生高负电荷的聚合物。理想的 kappa，iota 和 lambda 角叉菜聚糖二聚体分别具有 1，2 和 3 个硫酸酯基团，产生典型的硫酸酯含量分别为 22%，32% 和 38% (w/w)。然而，因为海藻物种或批次不同硫酸酯在商业提取物中可发生较大变化。硫酸酯键在化学上是非常稳定的，且没有明显或实用的化学方法修饰硫酸酯水平或分布的同时不降低聚合物的分子量，除了在碱处理期间从前体角叉菜聚糖中除去 6-O—硫酸酯。

角叉菜聚糖是从红色海藻中，通过在水溶液中煮沸，有时在碱性条件下煮沸，随后经过滤，浓缩，沉淀和干燥而商业性提取的。沉淀可通过另加入乙醇，或通过用盐凝胶化随后加压此凝胶而进行，如 STANLEY，“角叉菜聚糖的生产，性质和使用”，商业海藻产物的生产和利用，FAO 渔业技术文献，288，pp116—146 (1987) 所述，该文献全文并入参考。半精制角叉菜聚糖也是通过用碱处理海藻，随后用水彻底清洗而产生的。这些处理改良了角叉菜聚糖的凝胶化性质，并除去了大部分蛋白质，色素和小代谢产物；这种制备物还含有其它聚合物如纤维素物质，如 HOFFMANN 等，“分离步骤对 *Eucheuma Cottonii* 角叉菜聚糖的分子组合物和物理性质的作用”，水状胶体食品，9，pp 281—289 (1995)，所述文献全文并入参考。

非凝胶化的 mu—和 nu—角叉菜聚糖是分别存在于海藻中的 kappa—，iota—角叉菜聚糖的天然前体，并在二聚体单位的 α —(1-4) 连接的 D-半乳糖吡喃糖残基 C-6 位具有硫酸酯基团。通常认为在强碱处理期间，相伴发生从前体的 C-6 硫酸酯中消除硫酸酯，及形成 3，6—脱水桥。

不同角叉菜聚糖的功能性质（包括螺旋形成，流变学性质及应用）是通过（1）聚合物的分子量，（2）硫酸酯基团的数目及其在碳主链的取代位置，和（3）3，6—脱水半乳糖残基的数目而确定的，如

THERKELSEN, “角叉菜聚糖”, 工业树脂: 多糖及其衍生物, 第三版, pp 145—180 (1993); VIEBKE 等, “通过 MALLS/GPC 定性 kappa—, iota—角叉菜聚糖卷曲和螺旋”, 碳水聚合物, 第 27 卷, pp145—154 (1995); 和 Le QUESTEL 等, “硫酸化的碳水化合物应用于角叉菜聚糖的计算机模式”, Int.J.Biol.Macromol, 第 17 卷, pp161—174 (1995), 所述文献以其全文并入参考。

碱处理可对终产物中角叉菜聚糖形式的比率加以某些控制。然而, 通常难以推断及获得所需终产物。

已有报道红色海藻脐形紫菜含有磺基水解酶, 该酶催化硫酸酯从紫菜聚糖中释放, 紫菜聚糖是与琼脂相关的紫菜属中的主要多糖, 其含有大约 10% (w/w) 的 3, 6—脱水—L—半乳糖。其还含有 L—半乳糖—6—硫酸酯。这些 L—半乳糖—6—硫酸酯单位可通过部分纯化自亲代海藻提取物的酶的作用, 转化成 3, 6—脱水—L—半乳糖, 如 REES, “在紫菜聚糖中由 L—半乳糖 6—硫酸酯单位酶促合成 3, 6—脱水—L—半乳糖”, 生物化学 I, 81, pp347—352 (1961); 和 REES, “紫菜聚糖的酶促脱硫化”, 生物化学 I, 80, pp449—453 (1961), 以上文献均全文并入参考。

另外还有报道生产角叉菜聚糖的红色海藻含有“磺基水解酶”, 该酶催化硫酸酯从角叉菜聚糖前体中释放。皱波角叉菜中的磺基水解酶见于 WONG 等, “皱波角叉菜 (红藻纲) 中磺基水解酶活性和角叉菜聚糖生物合成”, 植物生理学, 第 61 卷, pp663—666 (1978), 所述文献以其全文并入参考。Calliblepharis jubata 中的磺基水解酶见于 ZINOUN 等, “在红藻 Calliblepharis jubata 中磺基水解酶活性迹象”, Botanica Marina, 第 40 卷, pp49—53 (1997), 所述文献以其全文并入参考。Gigartina stellata 中磺基水解酶见于 LAWSON 等, “酶对多糖构象和功能的代谢控制”, 自然, 第 227 卷, pp392—93 (1970 年 7 月 25 日), 及 WONG 等, “皱波角叉菜 (红藻纲) 中磺基水解

酶活性和角叉菜聚糖生物合成”，植物生理学，第 61 卷 pp663—666 (1978)，所述文献以其全文并入参考。这种些酶目前未纯化为均一性，并未有报道提供电泳数据。

半乳聚糖磺基水解酶的作用模式和特异性程度只在文献中以一般术语加以阐述。如 CRAIGIE 等，“角叉菜聚糖生物合成”，Proc.Int.Seaweed.Symp.pp369—377 (1978)，所述文献以其全文并入参考，还不清楚有多少不同特异性的磺基水解酶存在于皱波角叉菜中。一般文献中少有关于磺基水解酶底物的化学结构，酶促作用的终产物，和磺基水解酶对半乳聚糖前体作用程度的阐述。

因此，需要各种具有不同特异性的磺基水解酶，以可用于修饰硫酸化的化合物，如半乳聚糖。

发明概述

本发明在于提供具有各种特异性的纯化的磺基水解酶。

本发明还涉及磺基水解酶的氨基酸和核苷酸序列。

本发明涉及酶促修饰硫酸化的化合物的方法。

本发明还涉及从海藻中提取角叉菜聚糖的方法。

本发明还涉及硫酸化的化合物，如半乳聚糖，其已经磺基水解酶修饰，如修饰凝胶化性质。

根据一方面，本发明涉及基于总蛋白量纯化水平至少为 40wt% 的磺基水解酶。纯化水平还可至少为 70wt%，90wt%，或 95wt%。

根据另一方面，本发明涉及包含 SEQ ID NO: 17 序列的分离的核酸序列。

根据又一方面，本发明涉及包含与 SEQ ID NO: 17 序列有至少 25 %同源性的序列的分离的核酸序列。与 SEQ ID NO: 17 序列的同源性还可至少为 50%，80%，或 90%。

根据另一方面，本发明涉及一种分离的核酸序列，其在杂交条件下与 SEQ ID NO: 17 核酸杂交。

根据另一方面，本发明涉及包含 SEQ ID NO: 18 序列的分离的核酸序列。

根据另一方面，本发明涉及包含 SEQ ID NO: 19 序列的分离的核酸序列。

根据另一方面，本发明涉及包含 SEQ ID NO: 20 序列的分离的核酸序列。

根据另一方面，本发明涉及包含 SEQ ID NO: 21 序列的分离的核酸序列。

根据又一方面，本发明涉及包含与 SEQ ID NO: 18 序列有至少 25 %同源性的序列的分离的核酸序列。与 SEQ ID NO: 18 序列的同源性还可至少为 50%，80%，或 90%。

根据又一方面，本发明涉及包含与 SEQ ID NO: 19 序列有至少 90 %同源性的序列的分离的核酸序列。

根据又一方面，本发明涉及包含与 SEQ ID NO: 20 序列有至少 90 %同源性的序列的分离的核酸序列。

根据又一方面，本发明涉及包含与 SEQ ID NO: 21 序列有至少 90 %同源性的序列的分离的核酸序列。

根据另一方面，本发明涉及一种分离的核酸序列，其在杂交条件下与 SEQ ID NO: 18 核酸杂交。

根据另一方面，本发明涉及编码相应于 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列的分离的核酸序列。

根据另一方面，本发明涉及包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列的分离的蛋白质。

根据另一方面，本发明涉及包含与 SEQ ID NO: 22 有至少 35 %同源性的氨基酸序列的分离的蛋白质。与 SEQ ID NO: 22 的同源性还可至少为 50%或 80%。

根据另一方面，本发明涉及编码相当于 SEQ ID NO: 23 的氨基

酸序列的分离的核酸序列。

根据另一方面，本发明涉及包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列的分离的蛋白质。

根据另一方面，本发明涉及包含与 SEQ ID NO: 23 有至少 20% 同源性的氨基酸序列的分离的蛋白质。与 SEQ ID NO: 22 的同源性还可至少为 50% 或 80%。

根据另一方面，本发明涉及纯化至少一种磺基水解酶的方法，包括：将海藻提取物进行分级分离以获得级分；并将至少一种级分进行苯基琼脂糖凝胶层析，以获得含有至少一种磺基水解酶的琼脂糖凝胶级分。

根据又一方面，本发明涉及一种酶促修饰的化合物，其已通过纯化水平为至少大约 40wt% 总蛋白量的分离的磺基水解酶修饰。分离的磺基水解酶的纯化水平还可至少为 70wt%，90wt% 或 95wt%。

根据另一方面，本发明涉及一种酶促修饰硫酸化的化合物的方法，包括：将纯化水平为至少大约 40wt% 总蛋白量的分离的磺基水解酶，与硫酸化的化合物组合，形成反应混合物；温育此反应混合物以从硫酸化的化合物中除去硫酸酯基团，形成酶促修饰的化合物。

根据另一方面，本发明涉及一种酶促修饰硫酸化的化合物的方法，包括：将硫酸化的化合物与第一种磺基水解酶温育，以从硫酸化的化合物中除去硫酸酯基团，形成中间化合物；随后用第二种磺基水解酶温育此中间化合物，以除去硫酸酯基团，形成酶促修饰的化合物。

根据另一方面，本发明涉及一种产物，其是通过用蛋白质含量基本由磺基水解酶组成的溶液温育硫酸化的化合物而产生的，所述磺基水解酶进行性除去硫酸酯基团。

根据另一方面，本发明涉及一种产物，其是通过用蛋白质含量基本由磺基水解酶组成的溶液温育硫酸化的化合物而产生的，所述磺

基水解酶随机除去硫酸酯基团。

根据另一方面，本发明涉及一种从海藻中提取 ν -或 μ -角叉菜聚糖的方法，包括：将海藻分散于含有 K_2CO_3 的盐溶液中形成分散系；过滤此分散系获得一种液体；超滤此分散系以除去盐；浓缩此液体；将此液体的 pH 调节为 8—8.5；并从此液体中沉淀 ν -或 μ -角叉菜聚糖。

一方面，磺基水解酶能从水状胶体中除去硫酸酯。水状胶体可以是糖胺聚糖，岩藻聚糖和半乳聚糖之一。

另一方面，磺基水解酶能从半乳聚糖中除去硫酸酯。

另一方面，半乳聚糖包含角叉菜聚糖。角叉菜聚糖可包括 μ -角叉菜聚糖，如包含至少大约 50 mol% 的 μ -角叉菜聚糖。角叉菜聚糖可包括 ν -角叉菜聚糖，如包含至少大约 50 mol% 的 ν -角叉菜聚糖。

另一方面，半乳聚糖包括琼脂。

另一方面，磺基水解酶包括 6-O-磺基水解酶。

另一方面，磺基水解酶能将 ν -角叉菜聚糖转变为 ι -角叉菜聚糖。

另一方面，磺基水解酶能将 μ -角叉菜聚糖转变为 κ -角叉菜聚糖。

另一方面，磺基水解酶能除去 6-O-硫酸酯以诱导脱水桥形成。

另一方面，级分包含硫酸铵级分。

另一方面，此方法还包括对至少一种苯基琼脂糖凝胶级分进行 DEAE 琼脂糖凝胶层析，以获得 DEAE 琼脂糖凝胶级分。至少一种 DEAE 琼脂糖凝胶级分可进行肝素琼脂糖凝胶层析。

另一方面，温育是在大约 0—60°C 的温度下进行。

另一方面，温育是在 pH 大约为 5.5—9.5 的情况下进行。

另一方面，加入反应混合物中的至少一种磺基水解酶是包含于溶

液中的，浓度为至少一种磺基水解酶至少为 $2-85 \mu\text{g/ml}$ 。

另一方面，反应混合物中硫酸化的化合物的浓度为大约 $0.012-2\%$ (w/v)。

另一方面，修饰的化合物包括 iota-角叉菜聚糖。

另一方面，修饰的化合物包括 kappa-角叉菜聚糖。

另一方面，酶促修饰的化合物包括富含前体的 iota-角叉菜聚糖。

另一方面，酶促修饰的化合物包括富含前体的 kappa-角叉菜聚糖。

另一方面，除去硫酸酯包括从半乳聚糖中除去 6-硫酸酯基团。

另一方面，除去硫酸酯包括将 nu-角叉菜聚糖转变为 iota-角叉菜聚糖，形成在一定条件下不发生凝胶的产物，所述条件为产物在含有 0.1M 钾的水溶液中浓度为大约 0.7% (w/v)，温度为 40°C ，pH 为 7。

另一方面，第一种磺基水解酶随机除去硫酸酯。

另一方面，第二种磺基水解酶进行性除去硫酸酯。

另一方面，海藻包括 Spinosum。

另一方面，海藻在分散于盐溶液之前是冻干并磨碎的。

另一方面，盐溶液还包含 KCl。KCl 的浓度为大约 $1-1.5\text{M}$ 。

另一方面，在过滤前将分散系静置至少 18 小时。

另一方面，浓缩约 2-3 倍。

另一方面，通过加入碱调节液体的 pH。

另一方面，通过加入异丙醇进行沉淀。

另一方面，进行透析直至水的电导率稳定在大约 $2 \mu\text{S/cm}$ 以下。

另一方面，在沉淀经透析的 nu-或 mu-角叉菜聚糖之后，将 nu-或 mu-角叉菜聚糖冻干并磨碎。

另一方面，沉淀的透析的 nu-或 mu-角叉菜聚糖中 nu-或 mu-含量为大约 $18-35 \text{mol}\%$ 。

另一方面，沉淀的透析的 nu- 或 mu- 角叉菜聚糖的分子量为大约 700—800kDa。

发明详述

本文所阐述的是举例说明本发明的各种实施方案，并提供据信是本发明的最实用和最易理解的原理和概念。在这点上，未尝试示出比基本理解本发明所必需的更详细的内容，结合附图本领域技术人员可明白有几种形式可实际应用。

本申请中所有百分率，除非特别说明，均通过基于重量 (g) / 体积 (ml) 测定的。因此，例如 30% 代表 30g/100ml 样品。

除非特别说明，提及的化合物或组分，包括化合物或组分自身，以及与其它化合物或组分的组合，如化合物的混合物。

在进一步阐述之前，对以下术语进行解释将有助于理解本发明。

“半乳聚糖”：一种由半乳糖单位和其它的单位组成的多糖；如琼脂和角叉菜聚糖。半乳聚糖具有至少 50mol% 的半乳糖单位。

“水状胶体”：一种亲水性多糖或衍生物，例如植物多糖，当将其加入水中时，其膨胀产生黏性分散系或溶液。

“杂交条件”：将相应核酸移至得自 Amersham Pharmacia Biotech AB 的尼龙膜上，如 SAMBROOK 等，分子克隆实验手册，第二版，CSH 实验室出版社，冷泉港，NY (1989)，所述文献全文并入参考。将此膜在 6×SSC，5×Denhart，0.1%SDS 和 100 μg/ml 鲑精 DNA 中，在 42℃ 杂交过夜。SSC 是 3M NaCl 和 0.3M 柠檬酸钠的水溶液，根据 SAMBROOK 等，分子克隆实验手册，第二版，CSH 实验室出版社，冷泉港，NY (1989) 所述程序制备，所述文献全文并入参考。在杂交后，将滤膜在 42℃ 用以下溶液洗 15 分钟：2×SSC，0.1%SDS；1×SSC，0.1%SDS，并曝光于得自 Molecular Dynamics, Uppsala, Sweden 光刺激屏，用也得自于 Molecular Dynamics, Uppsala, Sweden

的 Storm 扫描。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列之间的相同性百分比或同源性百分率，对序列进行最佳对比（例如可将缺口导入第一个氨基酸或核酸序列中，以与第二个氨基酸或核酸序列最佳排列对比）。然后将在相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸进行对比。当第一个序列中的一个位置由与第二个序列中相应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，则分子在这个位置是相同的。两个序列之间的相同性百分比通过序列呈现的相同性位置的数目（即相同性百分比 = 相同性位置数 / 位置总数（如重叠位） × 100）。优选地，这两个序列是等长的。

确定两个序列之间的同源性百分比可通过用数学公式进行。优选地，用于对比两个序列的公式非限制性的例如是 KARLIN 等，美国科学院院报，87，pp2264—2268（1990）所述公式，所述文献以其全文并入参考，KARLIN 等，美国科学院院报，90，pp5873—5877（1993）对此公式加以修改，所述内容全文并入参考。这个公式被掺入 ALTSCHUL 等，分子生物学杂志，215，pp403—410（1990）所述的 NBLAST 和 XBLAST 程序中，所述文献以其全文并入参考。可用 NBLAST 程序，分值 = 100，字长 = 12 进行 BLAST 核苷酸检索，以获得同源于本发明磺基水解酶核酸分子的核苷酸序列。可用 XBLAST 程序，分值 = 50，字长 = 3 进行 BLAST 蛋白质检索，以获得同源于本发明磺基水解酶蛋白质分子的氨基酸序列。为进行缺口的序列对比，可利用 ALTSCHUL 等，核酸研究，25，pp3389—3402（1997）所述的缺口 BLAST，所述文献以其全文并入参考。或者，可使用 PSI-Blast 进行重复检索，其检测分子间的远缘关系。当利用 BLAST，缺口的 BLAST，和 PSI-Blast 程序时，可使用各自程序（如 XBLAST 和 NBLAST）的缺省参数。见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。另外优选地的用于对比两个序列的公式非限制性的例如是 MYERS

等, CABIOS, 4, pp11-17 (1988) 所述的公式, 所述文献以其全文并入参考。这个公式掺入 ALIGN 程序 (2.0 版本) 中, 该程序是 GCG 序列对比软件程序包的一部分。当利用 ALIGN 程序对比氨基酸序列时, 可使用 PAM120 权重残基表, 缺口长度罚分 12, 和缺口罚分 4。

总而言之, 本发明涉及磺基水解酶的分离和纯化。例如, 磺基水解酶可纯化自海藻。磺基水解酶优选能从硫酸化的化合物如角叉菜聚糖中除去硫酸酯。磺基水解酶还可在硫酸化的化合物如角叉菜聚糖上形成 3, 6-脱水桥。本发明还涉及酶促修饰硫酸化的化合物的方法。本发明还涉及修饰的硫酸化的化合物, 如修饰的角叉菜聚糖, 如已被修饰为至少具有相应于 iota-角叉菜聚糖的部分的 nu-角叉菜聚糖, 或如已被修饰为至少具有相应于 kappa-角叉菜聚糖的部分的 mu-角叉菜聚糖。本发明还涉及从海藻中提取角叉菜聚糖的方法。

本申请和现有技术领域所提供的指导是: (1) 蛋白质纯化和 (2) 部分氨基酸序列确定; (3) 构建和使用探针以确定相应 DNA 序列位置; 和 (4) 克隆和测序, 如下的讨论将能够: (1) 分离磺基水解酶; (2) 鉴别其氨基酸序列; (3) 构建相应 DNA 序列的探针; 和 (4) 鉴别, 分离, 纯化和确定编码此酶的 DNA 序列。见例如 SAMBROOK 等, 分子克隆实验手册, 第二版, CSH 实验室出版社, 冷泉港, NY (1989), 所述文献以其全文并入参考。

本发明酶促修饰的化合物包括硫酸化的化合物。硫酸化的化合物包括半乳聚糖, 糖胺聚糖, 和岩藻聚糖。

岩藻聚糖是高度不均一的硫酸化多糖, 由不同糖残基组成, 如岩藻糖, 半乳糖, 甘露糖和糖醛酸。岩藻聚糖基团数目及其组成模式相当不同。岩藻聚糖是在褐色海藻和棘皮类动物中产生的。在这点上, 岩藻聚糖可来自褐色海藻细胞壁的基质相, 其主要含有 L-岩藻糖。L-岩藻糖残基通常通过 α (1-3) 键连接, 并在 C4 位硫酸化。

对岩藻聚糖酶促修饰可影响其抗凝聚性质。

糖胺聚糖 (GAGs) 是来自动物胞外基质的硫酸化多糖家族, 其包括肝素, 硫酸肝素, 硫酸软骨素, 硫酸皮肤素, 和硫酸角质素。GAGs 由含有己糖醛酸和己糖胺的二糖重复单位组成。肝素和硫酸肝素是可变的硫酸化糖胺聚糖, 其主要由 α (1-4) 连接的 D-艾杜糖醛酸-2-硫酸酯残基或 D-葡萄糖醛酸-2-硫酸酯残基和 N-磺基-D-葡萄糖胺-6-硫酸酯残基组成。对肝素酶促修饰可影响其抗凝血性质。硫酸软骨素和硫酸皮肤素主要由 α (1-4) 连接的 D-艾杜糖醛酸或 D-葡萄糖醛酸和 N-磺基-D-葡萄糖胺-6-硫酸酯残基组成。通常 N-乙酰半乳糖胺的 C2 或 C4 位是硫酸化的, 且硫酸皮肤素中艾杜糖醛酸的 C2 位也通常是硫酸化的。硫酸角质素多糖由半乳糖和 N-乙酰半乳糖胺组成。半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺的 C6 位可以是硫酸化的。

半乳聚糖可得自许多不同原料。例如, 半乳聚糖可得自海藻。半乳聚糖例如包括角叉菜聚糖和琼脂。

例如, 从海藻中提取琼脂是已知的。例如从海藻中提取琼脂见于 SELBY 等, “琼脂”, 工业树脂: 多糖及其衍生物, 第三版, (1993), 所述文献以其全文并入参考。

从海藻中提取角叉菜聚糖是已知的。例如, 从海藻中提取角叉菜聚糖见于 THERKELSEN, “角叉菜聚糖”, 工业用树胶: 多糖及其衍生物, 第三版, (1993), 所述文献以其全文并入参考。

本发明还涉及提取高于天然水平的高分子量即分子量在大约 500kDa 以上的 nu- 和 mn- 角叉菜聚糖的方法。基于待提取的角叉菜聚糖, 角叉菜聚糖的原料可以是海藻, 如 *Spinosum*, *Cottonii*, 和 *Gigartina radula*。

海藻可以是冻干, 磨碎并分散于浓度优选为大约 0.05-0.3M, 更优选为 0.1-0.15M, 最优选为大约 0.125M 的 KCl 水溶液中。此分

散系还含有浓度优选为 0.0005—0.003M，更优选为 0.001—0.0015M，最优选为大约 0.00125M 的 K_2CO_3 ，以保持碱性环境，即 pH 优选为大约 7—9，更优选为 7.5—8.5，最优选为大约 7.8—8.3。也可使用相应钙盐，如氯化钙和碳酸钙，但由于这些钙盐溶解性相对低，因此优选钾盐。

将此分散系静置一段时间，优选大约 1—72 小时，更优选大约 16—32 小时，最优选大约 24 小时，温度为大约 5—55℃，优选大约 22—50℃，更优选大约在室温。

在此阶段后，将此分散系过滤。例如，可用加压硅藻土滤膜过滤。

在过滤之后，优选将此液体例如用 30kDa 的 MWCO—膜超滤或渗滤，以除去过量的盐。在超滤后，通过加入自来水在室温清洗提取物。持续清洗直至电导率低于 2mS/cm 并且稳定。将此液体优选通过超滤浓缩 25—30%。优选用 0.1M 的 NaCl 将 pH 调节为 8—8.5。

然后将此液体优选蒸发至大约 10—90%，更优选大约 30—70%，最优选大约 50%。例如，此液体可在真空蒸发器中蒸发。

在蒸发后，将 pH 优选调节为大约 7—9，更优选大约 7.5—8.5，最优选大约为 8。例如，可通过加入 1M NaOH 将 pH 调节为 8。然后用异丙醇 (IPA) 沉淀并冻干，如用得自英国 BP 化学制品公司的 100% (v/v) IPA 沉淀。

所得提取物具有富集的 nu—或 mu—含量，优选大约为 15—40mol%，更优选为大约 17—30mol%，最优选为大约 19—24mol%。所得提取物还具有高分子量，优选大约为 500—1100kDa，更优选为 600—900kDa，最优选为大约 700—800kDa。

本发明的磺基水解酶可分离自产生硫酸化半乳聚糖的海藻，如 Solieriaceae 科（如麒麟菜属，Kappaphycus），杉藻科（如角叉菜属，杉藻属），Furcellariaceae，沙菜科，育叶藻科，Cystocloniaceae（如 Calliblepharis），和红毛菜科（如紫菜属）。例如，磺基水解酶的非详

尽海藻原料和潜在海藻原料包括刺麒麟菜，耳突麒麟菜（= *Kappaphycus alvarezii*），*Eucheuma denticulatum*，皱波角叉菜，*Calliblepharis jubata*，*Gigartina radula*，星芒杉藻，和脐形紫菜。

以下段落阐述了分离磺基水解酶的方法。从本发明所述的纯化方法的指导和实施例中，本领域技术人员可开发另外的分离磺基水解酶的方法。

根据本发明为分离磺基水解酶，通常优选对潜在的酶原料如海藻进行筛选酶活性，以保证相应的酶存在于潜在的酶原料中。如以下更详细的阐述，筛选包括从潜在酶原料中获得粗提物。然后，将此粗提物在各种条件下用于处理各种底物，以一般性地确定粗提物中存在的所有酶活性。通过此信息，本领域技术人员可一般性地确定是否值得对潜在酶原料进行如下所述的进一步纯化，及一般性地确定酶是保持稳定且活性的条件。

一种粗提方法例如是从 *C.crispus* 中分离酶，可将 *C.crispus* 的配子体植物在液氮中冷冻，并研磨成粉末。虽然此粉末可立即使用，以保持粉末中酶的完整性，但此粉末仍可在低温保持直至进一步使用，如在 -20°C 至 -80°C 保持。

然后，此粉末可用缓冲液提取，如含有 10mM 2-巯基乙醇和 500mM KCl 的 4 体积的 50mM Tris-HCl 缓冲液（pH9.5）。在离心之后，可将上清用冻（如 -20°C ）丙酮分级分离，例如以两步方法：（1）从 0—30%丙酮饱和液中分级分离；（2）从 30—60%丙酮饱和液中分级分离。在每个分级步骤之后，优选例如在 4°C ，以 $10000\times g$ 离心 30 分钟。将粒状沉淀溶解于缓冲液中，如含有 10mM 2-巯基乙醇的 2ml 的 50mM Tris-HCl 缓冲液（pH7.1）。然后，将粒状沉淀以及上清等分透析，如在 4°C ，用得自美国 Spectrum 实验室公司，Rancho Dominguez, CA 的 MWCO 6—8000 或 3500 Spectra/por 膜，经含有 10mM 的 2-巯基乙醇的 3×3 升 50mM Tris-HCl 缓冲液（pH7.1）透

析过夜。粒状沉淀和上清可用于寻找磺基水解酶的活性。

另一种粗提方法例如是从耳突麒麟菜 (=Kappaphycus alvarezii) 中分离酶, 可将耳突麒麟菜在液氮中冷冻。此耳突麒麟菜可立即使用或在低温下保持直至进一步使用, 如在一80℃保持。在提取之前, 可将耳突麒麟菜研磨为细末。

除非特别指出, 以下所有步骤均可在 4℃进行。将粉末用缓冲液提取, 例如用 50mM Tris-HCl (pH9.5) 加上 500mM KCl 和 10mM 2-巯基乙醇提取。将所得悬浮液搅拌过夜, 然后离心, 如用得自美国 Beckman Instruments 公司, Fullerton, CA 的 Beckman J2-21, Rotor JA20, 以 10000×g 离心 75 分钟。将上清如前所述用冻丙酮分级分离。在离心之后, 收集上清和粒状沉淀。然后, 将粒状沉淀以及上清等分进行透析, 例如用得自美国 Spectrum 实验室公司, Rancho Dominguez, CA 的 MWCO 6-8000 或 3500 透析膜, 经含有 10mM 的 2-巯基乙醇的 4×1 升 50mM Tris-HCl 缓冲液(pH7.1)加上 10mM 2-巯基乙醇透析 20 小时。在透析之后, 将上清和再溶解的粒状沉淀用于寻找磺基水解酶。

一旦获得粗提物, 为确定粗提物是否具有磺基水解酶活性, 可进行一些分析。例如, 磺基水解酶可从角叉菜聚糖中除去硫酸酯基团, 因此测定的游离硫酸根游离硫酸根基团可表示磺基水解酶活性。能除去 6-O-硫酸酯的 6-O-磺基水解酶, 也趋于导致 3, 6-脱水半乳糖桥形成, 并因此诱导黏性增加。因此, 测定 3, 6-脱水半乳糖桥的水平是另一种测定磺基水解酶活性的方法。另外, 6-O-磺基水解酶活性与黏性增加相关, 因此可测定黏性以表示磺基水解酶活性。

就测定游离硫酸根游离硫酸根而言, 磺基水解酶对角叉菜聚糖的活性在本申请书中是通过一种新的测定游离硫酸根游离硫酸根的方法测定的。一些确定游离硫酸根游离硫酸根的分析已由一些文献阐

述，但这些分析费时或费钱。见 WONG 等，“在皱波角叉菜（红藻纲）中，磺基水解酶活性和角叉菜聚糖生物合成”，植物生理学，第 6 全，pp663—666（1978）；REES，“紫菜聚糖的酶促脱硫化”，生物化学杂志，80，pp449—453（1961）；和 ZINOUN 等，“在红色海藻 *Calliblepharis jubata* 中磺基水解酶活性迹象”，Botanica Marina，第 40 卷，pp49—53（1997），所述文献以其全文并入参考。

确定游离硫酸根游离硫酸根水平的新方法，是基于通过高效阴离子交换色谱在 8 分钟内用自动抑制的电导率检测而确定游离硫酸根游离硫酸根水平。除了快速和完全自动化，此方法还因为可易于检测少如 10ppm 的游离硫酸根游离硫酸根而具有再现性和敏感性的优点。

例如，磺基水解酶活性可通过测定温育角叉菜聚糖的酶提取物所释放的硫酸根数量而分析。此反应化合物可含有 100 μ l 酶样品，50mM Tris-HCl (pH7.1) /10mM 2-巯基乙醇和 100 μ l 的 1.4% (w/v) 角叉菜聚糖。其中，角叉菜聚糖存在于相同缓冲液中，或在得自美国 Millipore Corporation, Bedford, MA 的 MilliQ 水中。应指出的是，酶样品可通过任何适当方法获得，如上述粗提方法。然而样品可以是任何其它测定活性所需的样品。除非特别指出，在使用前将酶提取物煮沸 10 分钟而制备参照混合物。在 48℃温育 6—15 小时之后，通过在得自美国 Amicon Bioseparations, Millipore Corporation, Bedford, MA 的 Microcon—10 装置中，在 30℃以 3320×g 离心 1 小时，从反应混合物中除去角叉菜聚糖。

存在于 Microcon—10 装置过滤物中的游离硫酸根游离硫酸根的数量，然后通过 HPAEC（高效阴离子层析）分析，使用装备 GP40 梯度泵，和 ED40 电化学检测仪的 Dionex DX 500 层析系统进行分析，所述设备均得自美国 Dionex 公司, Sunnyvale, CA。将 IonPac AS12 阴离子层析柱（4×200 mm，也得自 Dionex 公司）安放在 AG12 Guard

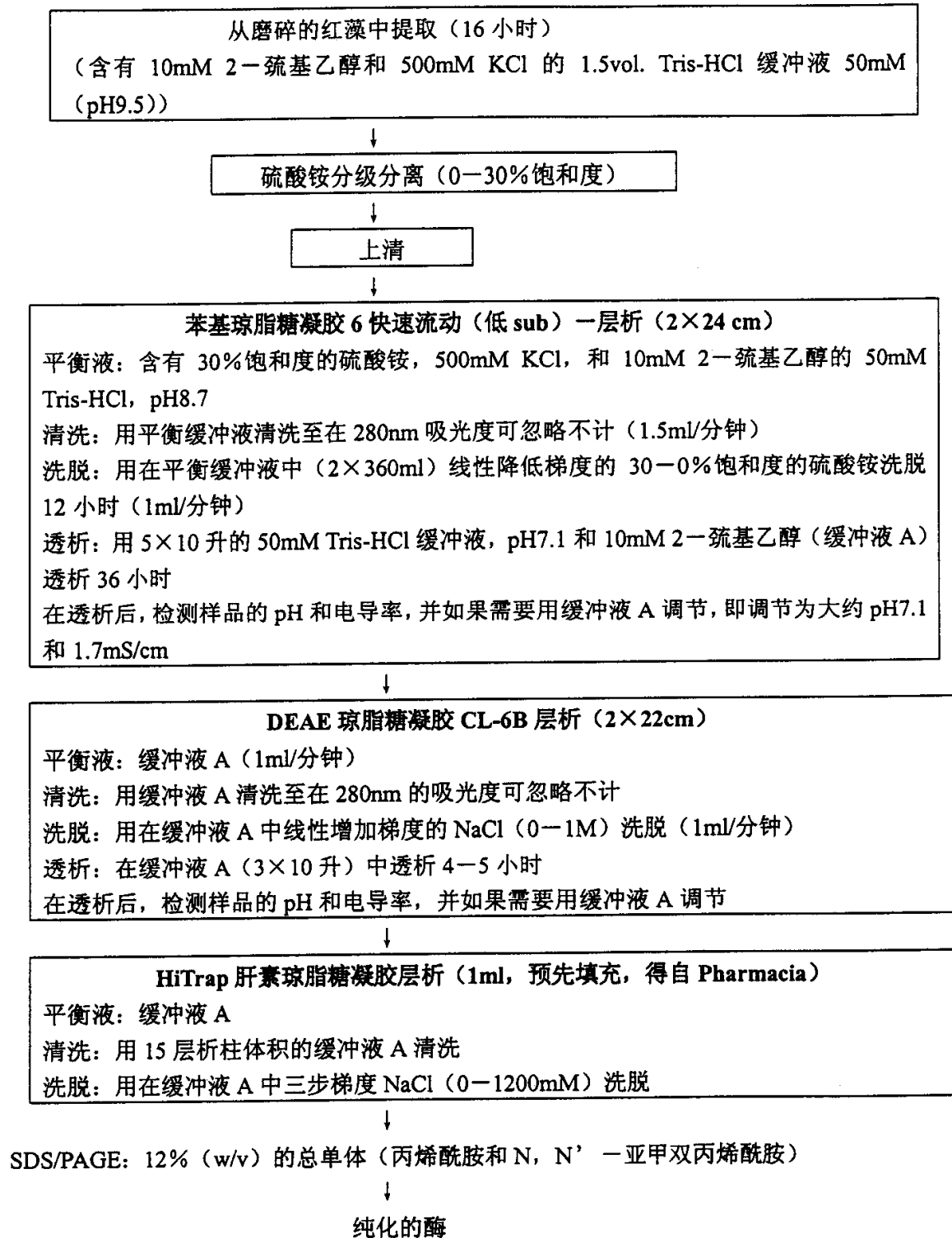
层析柱（4×50 mm，也得自 Dionex 公司）上。洗脱液是 9.5mM Na_2CO_3 /0.5mM NaHCO_3 ，在流速为 1.5 ml/分洗脱。通过 ASRS 电导率检测阴离子，使用具有电流为 50 mA 的 SRS（自动再生抑制器）的阴离子自动再生抑制器 ASRS-1（4mm，也得自 Dionex 公司）进行。

就测定 3, 6-脱水半乳糖桥而言，可使用另一种方法。在脱硫反应期间产生的 3, 6-脱水半乳糖桥数量，在本申请中是用 JOL 等，“分析含有 3, 6-脱水半乳糖的角叉菜聚糖和琼脂的一种新的高效阴离子交换层析法”，268，pp213-222（1999）所述的方法测定的，所述文献以其全文并入参考。

就测定黏性水平而言，可在反应混合物中进行粘度测定。反应混合物的粘度是用得自美国 Brookfield Engineering 实验室，Stoughton, MA 的可编程的 Brookfield 流变仪 DV III，自动调温在 48°C 而直接测定的。用 CP52 轴以 120 rpm 剪切速率处理 10 分钟而测定。

一旦例如通过上述筛选鉴别了酶的潜在原料，可根据本发明将磺基水解酶纯化为均一性。通过本发明所述的指导和纯化方法，本领域技术人员可开发出另外的纯化方法。

下文示出并阐述了从皱波角叉菜中纯化酶的一典型例子；除非特别指出，所有步骤均在 4°C 进行：



如上所述，除非特别指出在上述纯化过程中所有分级分离和纯化步骤，均在 4℃ 进行。

可将皱波角叉菜配子体植物在液氮中冷冻并磨碎。例如，可将冷冻的皱波角叉菜用得自法国 Forplex 工厂，Billancourt 生产的 Forplex 研磨器自动研磨为小于 1 mm 长的碎片。此“粉末”可立即使用或

可在低温保持直至进一步使用，如在一20℃至-80℃保持。

然后可将研磨的皱波角叉菜进行提取。例如，将 650 g 的此冷冻的皱波角叉菜在 4℃，在 1.5 体积 (v/w) 的提取液 (50mM Tris-HCl, pH9.5/500mM KCl /10mM 2-巯基乙醇) 中解冻过夜。换言之，将 650 g 的皱波角叉菜在 975 ml 的缓冲液中解冻。将上清搅拌过夜，然后如以 10000×g 离心 75 分钟。

然后将提取液上清进行分级分离。例如，将上清通过加入硫酸铵调节为 30% (NH₄)₂SO₄ 饱和度 (16.4 g 硫酸铵/100ml 样品)。在这点上，此百分率指硫酸铵的百分数，硫酸铵溶液在 0℃在 3.9M 是饱和的。当所有硫酸铵都溶解时，将此混合物静置大约 30 分钟，然后以 24700×g 离心 60 分钟。

磺基水解酶的活性在粗提物中通常不能检测，有时在硫酸铵上清中也不能检测。这可以是由于在下述苯基琼脂糖凝胶层析期间除去的多糖或蛋白质的干扰所致。苯基琼脂糖凝胶层析的一重要目的是除去藻红蛋白，藻红蛋白是组成角叉菜提取物的主要成分的一种亲水性蛋白质。

在对硫酸铵混合物离心后，收集上清并加样于苯基琼脂糖凝胶层析柱中，如得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala 的苯基琼脂糖凝胶 6 快速流动 (2.0×24cm) 层析柱，该层析柱预先用 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.7)，30% 饱和度的 (NH₄)₂SO₄，500mM KCl 和 10mM 2-巯基乙醇 (缓冲液 D) 平衡。将此层析柱用此缓冲液清洗，直至流出物在 280nm 的吸光度可忽略不计。然后将结合的蛋白质用线性降低梯度的 (NH₄)₂SO₄ 洗脱，线性降低梯度的 (NH₄)₂SO₄ 由 360ml 缓冲液 D 和 360ml 无 (NH₄)₂SO₄ 的相同缓冲液 (缓冲液 C) 制备。在梯度末，藻红蛋白以及一些其它蛋白质通常只用缓冲液 C 洗脱。例如，洗脱可在以下条件下进行：

缓冲液 D：50mM Tris-HCl 缓冲液，pH8.7，含有 30% 饱和度的

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 500mM KCl, 和 10mM 2-巯基乙醇。

缓冲液 C: 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH8.7, 含有 500mM KCl, 和 10mM 2-巯基乙醇。

流速: 1 ml/分钟

级分规格: 8 ml

时间 (分钟)	%缓冲液 D	%缓冲液 C
0	100	0
720	0	100

上述提取和苯基琼脂糖凝胶层析优选至少进行两次, 以具有足够的物质进行接下来的步骤。

苯基琼脂糖凝胶层析中相应的级分, 即后来发现具有磺基水解酶活性的级分, 然后可进行透析。例如, 可集合活性级分并用得自美国 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA 的 MWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜, 经 5×10 升的含有 10mM 2-巯基乙醇的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.1) (缓冲液 A) 透析 36 小时。在透析后, 检测样品的 pH 和电导率, 并如果需要用缓冲液 A 调节 (即 pH7.1 及电导率为大约 1.7mS/cm)。

在透析后, 将样品进行 DEAE 琼脂糖凝胶层析。例如, 将样品以 1ml/分钟的流速应用于预先用缓冲液 A 平衡的 DEAE 琼脂糖凝胶层析柱 ($2.0 \times 22\text{cm}$) 中, 该层析柱得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala。此层析柱可用缓冲液 A 清洗, 直至在 280nm 的吸光度可忽略不计。然后, 可洗脱吸附的蛋白质, 如以 1 ml/分钟流速, 用在缓冲液 A 中的线性 NaCl 梯度 (0—1M) 洗脱。例如, 可如下进行洗脱:

缓冲液 A: 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH7.1, 和 10mM 2-巯基乙醇

缓冲液 B: 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH7.1, 和 10mM 2-巯基乙醇 + 1 M NaCl

级分规格: 7.5 ml

流速: 1 ml/分钟

时间 (分钟)	% 缓冲液 A	% 缓冲液 B
0	100	0
390	35	65
450	35	65
630	0	100

对在 650—800mM NaCl 梯度洗脱的 DEAE 琼脂糖凝胶层析级分进行的 SDS PAGE 分析, 通常示出存在一个 34.9kDa 的单一一条带。此条带相当于磺基水解酶 II, 其在下文加以详细阐述。

除了磺基水解酶 II 之外, 磺基水解酶 I 在 DEAE 层析期间在 300—600mM NaCl 之间洗脱。然而, 这些级分通常包含杂质。为分离磺基水解酶 I, 需要进一步纯化, 如透析和半亲和性及阳离子交换层析, 例如肝素层析。

例如肝素层析, 用 580mM NaCl 洗脱的级分的一半可用得自美国的 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA 的 MWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜, 经缓冲液 A 透析。然后, 可将此级分加样于 (流速为 1.5 ml/分钟) 预先用缓冲液 A 平衡的 HiTrap 肝素层析柱顶部, 该层析柱得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala。然后将此层析柱可用缓冲液 A 以流速为 1.5 ml/分钟清洗, 直至在 280nm 的吸光度可忽略不计。接着将结合的蛋白质用三步增加梯度的 NaCl (0—1200mM) 洗脱。尤其地, 可用如下梯度进行洗脱:

缓冲液 A: 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH7.1, 和 10mM 2-巯基乙

醇

缓冲液 B: 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH7.1, 和 10mM 2-巯基乙醇 + 1 M NaCl

级分规格: 1.5 ml

流速: 1.5ml/分钟

时间 (分钟)	%缓冲液 A	%缓冲液 B
0	100	0
10	71	29
15	71	29
25	34	66
30	34	66
35	0	100
45	0	100

对用 1200mM NaCl 洗脱的级分进行 SDS-PAGE 分析显示一个单一的模糊条带, 其特征在于分子量为 62.1kDa。此条带相当于磺基水解酶 I。

上述纯化步骤优选 2×600—700 g 新鲜海藻开始, 如上述的 650 g。用此数量的物质, 在 DEAE 层析后这两种酶均充分分离, 但磺基水解酶 I 仍是未纯化的。上述半亲和性和阳离子交换层析是必需的, 以将此酶纯化为均一性。

Cottonii 磺基水解酶也可经类似于上述纯化皱波角叉菜磺基水解酶 I 和 II 的步骤进行纯化。

例如, 可将 cottonii 在液氮中冷冻, 并在 -80℃ 保持直至进一步使用。在提取之前, 将冷冻的 cottonii 研磨, 如在研钵中手工研磨为细末, 将液氮用烘炉注入研钵中以使 cottonii 在研磨期间保持冷冻状态。

为部分纯化 *cottonii* 磺基水解酶，以下步骤可在 4℃ 进行。将磨碎的 *cottonii* 在缓冲液中提取，如 25 g 的磨碎 *cottonii* 在 40ml 的 50mM Tris-HCl (pH9.5) + 500mM KCl 和 10mM 2-巯基乙醇中提取。将所得上清用磁性搅拌棒搅拌过夜，然后以 10000×g 离心 75 分钟，使用得自美国 Beckman Instruments 公司，Fullerton, CA 的 Beckman J2-21, Rotor JA20 离心。将上清用得自美国 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA 的 NWCO6-8000 或 3500 透析膜，经 4×1 升 50mM Tris-HCl (pH8.5) + 10mM 2-巯基乙醇透析 20 小时。在透析之后，将上清以 1 ml/分钟的流速加样于预先用相同缓冲液平衡的肝素琼脂糖 II-S 型层析柱 (27.5×1cm 层析柱，10×0.5 cm 凝胶规格) 的顶部，该层析柱得自英国 Millipore, Stonehouse, 肝素 II-S 型琼脂糖凝胶得自美国 Sigma Chemical, St.Louis, MO。将此层析柱用此缓冲液清洗直至在 280nm 的吸光度可忽略不计。然后，吸附的蛋白质可例如用线性 NaCl 梯度 (0-1M) 洗脱 40 分钟。尤其洗脱可用以下梯度进行：

缓冲液 A: 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.5) + 10mM 2-巯基乙醇

缓冲液 B: 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH8.5) + 10mM 2-巯基乙醇 + 1 M NaCl

级分规格: 2ml

流速: 1 ml/分钟

时间 (分钟)	%缓冲液 A	%缓冲液 B
0	100	0
40	0	100

尽管大多数蛋白质在提取中不与肝素琼脂糖结合，但磺基水解酶结合凝胶因为在硫酸根释放和/或粘度提高方面的大部分活性，在后面级分中发现。可将从肝素层析所得级分浓缩 13 倍，例如通过在得

自美国 Amicon Bioseparations, Millpore 公司, Bedford, MA 的 Microcon-10 装置中, 在 4℃中以 3320×g 离心 1 小时, 之后进行 SDS-PAGE 分析和硝酸银染色, 如 MERRIL 等, “在聚丙烯酰胺凝胶上对蛋白质进行超敏感染色, 以示出脑脊液蛋白质中区域性变化”, 科学, 211, pp1437-1438 (1981) 所述, 所述文献以其全文并入参考。

不同活性的级分特征均在于存在两个共同的蛋白质, 其中一个分子量为大约 65kDa, 另一个分子量大约为 55kDa。

根据本发明, 基于样品中蛋白质的总量, 磺基水解酶可具有高纯度。基于蛋白质总量磺基水解酶优选纯化为至少大约 40wt%, 更优选为至少大约 50wt%, 更优选为至少大约 60wt%, 更优选为至少大约 70wt%, 更优选为至少大约 80wt%, 更优选为至少大约 90wt%, 更优选为至少大约 95wt%, 更优选为至少大约 99wt%, 最优选为 100wt%。如下更详细的阐述, 此高纯度水平使待修饰的硫酸化的化合物的性质被修饰。

一旦已经纯化磺基水解酶, 则可确定其氨基酸序列。这些蛋白质的肽序列可通过常规方法确定, 如 Edman's 降解法。

为确定这两种磺基水解酶的 N-末端氨基酸序列, 将磺基水解酶根据上述纯化方法一般性纯化, 包括提取, 硫酸铵分级分离, 苯基琼脂糖凝胶层析, DEAE 琼脂糖凝胶层析等。尤其将 DEAE 琼脂糖凝胶层析的 60 和 61 级分浓缩 20 倍, 通过用得自美国 Amicon Bioseparations, Millpore 公司, Bedford, MA 的 Microcon-10 装置, 在 4℃中以 3320×g 离心 1 小时进行浓缩, 之后进行 SDS PAGE。集合 DEAE 琼脂糖凝胶层析的 38-47 级分, 并用得自美国 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA 的 NWCO6-8000 或 3500 透析膜, 经 3×3 升 50mM Tris-HCl (pH7.1) + 10mM 2-巯基乙醇在 4℃透析 6 小时。在透析后, 将样品的电导率通过用 MilliQ 水稀

释而调节为缓冲液的电导率，MilliQ 水得自美国 Millipore 公司，Bedford, MA。然后将一半样品（57ml）加样于（流速 1.5 ml/分钟）预先用 50mM Tris-HCl（pH7.1）+10mM 2-巯基乙醇平衡的 HiTrap 肝素层析柱的顶部，该层析柱得自瑞典 Pharmacia Biotech AB，Uppsala。将此层析柱用此缓冲液清洗，直至在 280 nm 的吸光度可忽略不计。然后，用增加梯度的 NaCl（0—1.2M）洗脱蛋白质。将构成在 280nm 吸光度洗脱峰值的 24，25，26 和 28 级分浓缩 13 倍，通过用得自美国 Amicon Bioseparations，Millipore 公司，Bedford, MA 的 Microcon-10 装置，在 4℃中以 $3320\times g$ 离心 1 小时进行浓缩，之后加样于 SDS 凝胶上进行 SDS PAGE。

由此，将 DEAE 层析的两个级分（60 和 61）以及 HiTrap 肝素层析的四个级分（24，25，26 和 28），进行 SDS PAGE（12%总单体（丙烯酰胺+N，N'-亚甲双丙烯酰胺）克数/100ml 凝胶）以分离酶，根据 LAEMMLI，自然，227，pp680—685（1970）所述方法进行，所述文献以其全文并入参考。

在 SDS PAGE 之后，将蛋白质移至得自瑞典 Pharmacia Biotech AB，Uppsala 的“Hybond-P”膜（聚偏二氟乙烯（PVDF）膜）上。此转移在含有 50mM 硼酸盐的 50mM Tris-HCl（pH8.25）缓冲液中，在 250mA 进行 2 小时。在转移之后，将蛋白质在 100%（w/v）甲醇中固定几秒，然后将此膜在 50%（v/v）甲醇和 10%（v/v）乙酸中，用 0.1%（w/v）的 Coomassie Blue R250 溶液染色 1 分钟，Coomassie Blue R250 得自美国 Bio-Rad 实验室，Hercules，CA。将此膜在 50%（v/v）甲醇和 10%（v/v）乙酸溶液中浸泡 4—5 分钟而脱色。在用得自美国 Millipore 公司，Bedford, MA 的 MilliQ 水清洗 1—2 分钟之后，切下相当于磺基水解酶 I 和 II 的条带，并送至法国巴黎 Pasteur 研究所，以通过 Edman's 降解法确定 N-末端氨基酸序列。从此试验中，示出磺基水解酶 II 具有封闭的氨基端，因此其氨基端序列

不能确定。对磺基水解酶 I 进行 Edman' s 降解确定 N-末端具有 SEQ ID NO: 1 所示序列。

用一些相似方法确定一些内部肽的氨基酸序列。然而在这种情况下, 在进行 SDS PAGE (12% 总单体 (丙烯酰胺 + N, N' - 亚甲双丙烯酰胺) 克数/100ml 凝胶) 之后, 不进行分离, SDS PAGE 根据 LAEMMLI, 自然, 227, pp680-685 (1970) 所述方法进行, 所述文献以其全文并入参考。尤其在电泳之后, 立即将凝胶用在 50% (v/v) 甲醇和 10% (v/v) 乙酸中的 0.0033% (w/v) 酰胺黑溶液染色过夜。然后将此凝胶简单用得自美国 Millipore 公司, Bedford, MA 的 MilliQ 水清洗 (4×10 分钟), 以除去甲醇和乙酸。然后, 将相当于磺基水解酶 I 和 II 的条带切下, 并在 30℃, 在装备冷阱 RCT90 (法国, Jouan) 的离心脱水器 RC 10.10 (法国, Jouan) 中脱水大约 30 分钟, 之后送至法国巴黎 Pasteur 研究所, 以进行蛋白酶消化和微量测序, 如下所述。

将含有大约 15-30 μ g 磺基水解酶 I 的丙烯酰胺片段, 用在 350 μ l 的 0.05 Tris-HCl (pH8.6) / 0.03% (w/v) SDS 中的 0.4 μ g 内切蛋白酶-LysC, 在 37℃ 进行蛋白酶酶切 18 小时。然后将所得肽在 250mm × 2.1mm 的 DEAE C18 层析柱上进行反相 HPLC, DEAE C18 层析柱得自法国巴黎 CIL CLUZEAU。用在 0.1% (v/v) 三氟乙酸中 2-45% (v/v) 梯度的乙腈, 以 0.2ml/分钟的流速进行洗脱, 使许多肽被分离。其中, 肽 11, 12, 18, 22 和 25 是明显的, 收集它们进行测序。这些肽在法国巴黎 Pasteur 研究所, 通过 Edman' s 降解, 用应用生物系统 473A 自动气相氨基酸测序仪, 根据标准方法进行分析, 应用生物系统 473A 自动气相氨基酸测序仪得自美国 PE 应用生物系统, Foster City, CA。分析结果确定磺基水解酶 I 包括 SEQ ID NO: 2-5 所述序列。

将含有大约 10 μ g 经 SDS PAGE 纯化的磺基水解酶 II 的丙烯酰

胺片段, 在 600 μ l 的 0.05M Tris-HCl (pH8.6) /0.01% (v/v) “Tween 20” 聚氧化乙烯山梨聚糖单月桂酸脂, 和 4% (w/v) 牛胰蛋白酶中进行蛋白酶酶解, “Tween 20” 聚氧化乙烯山梨聚糖单月桂酸酯得自美国 USB, Cleveland, OH。在 37°C 进行 18 小时蛋白酶消化。将所得胰蛋白酶消化的肽在 250mm $\times$ 2.1mm 的 DEAE C18 层析柱中, 通过反相 HPLC 纯化, DEAE C18 层析柱得自法国巴黎 CIL CLUZEAU。用 2—45% (v/v) 梯度的乙腈, 以 0.2ml/分钟的流速在 0.1% (v/v) 三氟乙酸中进行洗脱。在分离的肽中, 收集肽 13, 14, 24 和 25, 因为它们是最明显的, 并在法国巴黎 Pasteur 研究所通过使用应用生物系统 473A 自动气相氨基酸测序仪, 根据标准方法经 Edman’ s 降解进行分析, 所用测序仪得自美国 PE 应用生物系统, Foster City, CA。分析结果确定磺基水解酶 I 包括 SEQ ID NOS: 6—11。

基于以上所示氨基酸序列, 对相应的 cDNA 进行序列探查, 以确定磺基水解酶 I 和 II 的核苷酸序列。如以下更详细的阐述, mRNA 分离自皱波角叉菜, 从该 mRNA 中合成 cDNA 文库, 用基于上述磺基水解酶 I 和 II 的氨基酸序列的寡核苷酸获得的 PCR 片段探查此 cDNA 文库, 并对阳性的 cDNAs 进行测序。

从皱波角叉菜的配子体中制备总 RNA, 如 APT 等, “编码褐色海藻巨藻属 *pyrifer* 的岩藻黄质叶绿素蛋白的基因家族”, Mol.Gen. Genet., 246, pp455—464 (1995) 所述, 以其全文并入参考。然后, 用 PolyA T tract mRNA 分离系统 IV 试剂盒纯化 mRNA, 所用试剂盒得自美国 Promega, Madison, WI, 根据说明书使用。

一旦分离 mRNA, 构建皱波角叉菜的 cDNA 文库。用 λ ZAP[®] II 载体 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA, 所用试剂盒得自美国 Stratagene, La Jolla, CA, 根据说明书使用。双链 cDNA 通过琼脂糖凝胶 CL-2B 层析柱分级分离, 所用层析柱得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala。选择经在丙烯酰胺凝胶 (5%) 上估计平均大小为 600

—1500bp 的级分，以制备文库。根据生产商说明将 cDNA 连接于 λ ZAP ® II 载体中，以及转化宿主菌株 XL1-Blue MRF'（美国 Stratagene, La Jolla, CA）。

探针设计及筛选 cDNA 文库的方法如下。分别从 SEQ ID NO: 2 和 10 中设计磺基水解酶 I 和 II 的简并的寡核苷酸，对磺基水解酶 I 而言，其相当于 SEQ ID NO: 12，对磺基水解酶 II 而言，相当于 SEQ ID NO: 13—14。简并的寡核苷酸 SEQ ID NO: 12 与载体引物 SEQ ID NO: 16（5' AATACGACTCACTATAG3'）一起使用，通过 PCR 扩增皱波角叉菜 cDNA 文库中相当于磺基水解酶 I 的 DNA 片段。

简并的寡核苷酸 SEQ ID NO: 13 和 14 与载体引物 SEQ ID NO: 15（5' ATTAACCCTCACTAAAG3'）一起使用，通过 PCR 扩增皱波角叉菜 cDNA 文库中相当于磺基水解酶 II 的 DNA 片段。使用寡核苷酸 SEQ ID NO: 14 和 15 的第一个 PCR 提供 DNA 片段。使用此第一个 PCR 产物和寡核苷酸 SEQ ID NO: 15 和 13，扩增相当于磺基水解酶 II 的 DNA 片段。

将相当于磺基水解酶 I 基因和磺基水解酶 II 基因的克隆的 DNA 片段，用 Megaprime 试剂盒及 1850kBq 的 ^{32}P dCTP，通过随机引发进行标记，Megaprime 试剂盒和 ^{32}P dCTP 得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala。所得探针用 Sephacryl SR 200 纯化并用于筛选皱波角叉菜配子体 cDNA 文库，Sephacryl SR 200 得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala。

为筛选磺基水解酶 I 和 II，将噬斑移至尼龙膜上，所用尼龙膜得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala，如 SAMBROOK 等，分子克隆实验手册，第二版，CSH 实验室出版社，冷泉港，NY(1989)，所述内容以其全文并入参考。将此膜在 65°C ，在 $6\times\text{SSC}$ ， $5\times\text{Dehar' t}$ ，0.1% SDS 和 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的鲑精 DNA 中杂交过夜。SSC 是 3M NaCl 和 0.3M 柠檬酸钠的水溶液，如 SAMBROOK 等，分子

克隆实验手册，第二版，CSH 实验室出版社，冷泉港，NY(1989)，所述内容以其全文并入参考。在杂交之后，将滤膜用以下溶液清洗 15 分钟， $2\times\text{SSC}$ ，0.1%SDS； $1\times\text{SSC}$ ，0.1%SDS 和 $0.4\times\text{SSC}$ ，0.1%SDS，并曝光于光刺激屏，用 Storm 扫描，光刺激屏得自瑞典 Molecular Dynamics，Uppsala，Storm 也得自 Molecular Dynamics。

就磺基水解酶 I 而言，使用上述筛选条件，将磺基水解酶 I 的上述标记的探针用于 3 次筛选循环中，以从含有磺基水解酶 I cDNA 的 cDNA 文库中筛选 300000 个噬菌体。共有 408 个阳性噬菌体 (1.4%)，从中选择 30 个。在第二循环中，对 10 个这些噬菌体进行筛选，其中 7 个是阳性的。这 7 个阳性噬菌体在第三循环中发现有 6 个是阳性的。

就磺基水解酶 II 而言，使用上述筛选条件，将磺基水解酶 II 的上述标记的探针用于 3 次筛选循环中，以从含有磺基水解酶 II cDNA 的 cDNA 文库中筛选 600000 个噬菌体。发现有 12 个阳性噬菌体 (1/50000)，从中选择 10 个。在第二循环中，对这些阳性噬菌体进行筛选，其中 9 个是阳性的。这 9 个阳性噬菌体在第三循环中发现 9 个均是阳性的。将这 9 个阳性 cDNA 的 5' 和 3' 末端进行测序，结果表明这 9 个阳性 cDNA 中只有 4 个相当于磺基水解酶 II cDNA。因此，磺基水解酶 II 基因似乎在角叉菜配子体中弱表达 (1/150000 cDNAs)。

就磺基水解酶 I 和 II 而言，根据产品说明书进行体内切除 (packaging 试剂盒，得自美国 Stratagene, La Jolla, CA)，对每个 cDNA 的 5' 和 3' 末端进行测序，以能够鉴别它们。特别地，使用具有 7-脱氮-dGTP 的 Thermo-Sequenase 核心测序试剂盒测序。测序反应在 Vistra DNA 自动测序仪 725 中进行，所用测序仪得自瑞典 Molecular Dynamics，Uppsala。

使用上述方法，确定磺基水解酶 I cDNA 的序列为 SEQ ID NO:

17. 特别地, 对一个 cDNA 充分测序并确定其它 cDNA 的序列末端。测序结果表明它们是相同的 cDNA, 5 个是全长 cDNA, 一个是部分长度的 cDNA。

磺基水解酶 I 的序列包括 ATG 起始密码子, 信号肽 (可能用于从 ER 分泌至细胞壁), 很可能氨基酸在丙氨酸 20 与赖氨酸 21 之间断裂, 终止密码子和 3' UTR (未翻译区)。

由上述方法推测磺基水解酶 II cDNA 的核苷酸序列是 SEQ ID NO: 18, 19, 20 和 21。很明显这 4 个 cDNA 是不同的。其中 3 个 cDNA 是全长的 (SEQ ID NO: 19, 20 和 21), 1 个可以是部分长度的 cDNA (SEQ ID NO: 18)。

从磺基水解酶 I 和 II 的核苷酸序列中, 可推导相应的氨基酸序列。特别地, 发现磺基水解酶 I 的氨基酸序列是 SEQ ID NO : 22。磺基水解酶 II 的氨基酸序列是 SEQ ID NO : 23。

关于磺基水解酶 I 的氨基酸序列, 在此序列中发现通过 Edman' s 降解确定的所有蛋白质微序列。磺基水解酶 I 的氨基酸序列有长度为 20 个氨基酸的信号肽。切割位点位于 Ala20 和 Lys21 之间。因此, 成熟的酶包含 594 个氨基酸, 及含有一个潜在的 N-糖基化位点 (NFTI; AA 72-75), 并与 FAD 结合结构域有一些相似性。

磺基水解酶 I 的 C 末端有 300 个氨基酸以上与衣滴虫 *reinhardtii* 的 L-氨基酸氧化酶呈 22% 序列相同性, 衣滴虫 *reinhardtii* 的 L-氨基酸氧化酶由 VALLON 等, “M(α) 的 cDNA 序列, 衣滴虫 *reinhardtii* 的 L-氨基酸氧化酶的催化亚基 (登记号 No.U78797): 由黄色蛋白的各种变种呈现的一种新序列基序”, 植物生理学, 115, pp1729-1731 (1997) 阐述, 所述内容以其全文并入参考。在这点上, 在许多有机体中发现 L-氨基酸氧化酶。它们催化以下反应: $\text{H}_2\text{N-CHR-COOH} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O=CR-COOH} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ 。在衣滴虫 *reinhardtii* 中, 已示出此 65kDa 酶位于外周质, 是配子特异性的, 并由除去铵诱导

的。

磺基水解酶 II 长度为 279 个氨基酸，并含有一个糖基化位点。对磺基水解酶 II 的序列分析表明，用 BLAST 软件未发现与 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 中已知序列有明显相似性。

确定磺基水解酶 I 和 II 的氨基酸序列还可精确确定这些酶的分子量。在这点上，通过 SDS PAGE 估计，磺基水解酶 I 和 II 的分子量分别为 62.1 和 34.9kDa。在磺基水解酶 I 的情况中，此 MW 略低于从氨基酸序列推导的分子量，后者为 66.8kDa。相反，磺基水解酶 II 的分子量从氨基酸序列计算时，为 30.9kDa，略低于由 SDS PAGE 估计的分子量。

从这两个序列中，用 Mac Molly 翻译程序计算理论等电点 (pI)。磺基水解酶 I 和 II 的 pI 分别为 8.4 和 9.3。

从磺基水解酶 I 和 II 的氨基酸和核苷酸序列中，基于与本文所述磺基水解酶的序列同源性，用已知方法可检测这些磺基水解酶的类似物或同源物，并分离。因此，所有或部分已知酶编码序列可用于构建探针，该探针将选择性地与特定来源的基因组或 cDNA 文库中存在的相同或高度相似的酶编码序列杂交。特别地，与本发明特异鉴别的序列有至少 25%，优选至少 50%，更优选至少 80% 同源性的核苷酸序列属于本发明。相似地，与本发明特异鉴别的序列有至少 25%，优选至少 50%，更优选至少 80% 同源性氨基酸序列属于本发明。

杂交方法包括杂交筛选铺板的 cDNA 文库，和用相当于保守的序列结构域的寡核苷酸引物经聚合酶链反应 (PCR) 扩增。见 INNIS 等，PCR 方法及应用指导，科学出版社 (1990)，所述内容以其全文并入参考。

另外，关于上述方法的参考文献包括 AUSUBEL 等，分子生物学

通用方法，格林出版公司协会和 John Wiley Interscience, (1992); 和 BERGER 等, 分子克隆方法指导，科学出版社 (1987)，所述内容以其全文并入参考。

例如通过从相应来源中提取 DNA 和 RNA，并用已知碘基水解酶之一的完全或部分序列进行 Southern 杂交，基因组和 cDNA 文库筛选可发现同源性碘基水解酶。

例如，根据 APT 所述方法提取总 DNA，“编码褐色海藻巨藻属 *pyrifer* 中岩藻黄质叶绿素蛋白的基因家族”，Mol. Gen. Genet., 246, pp455-464 (1995)，所述内容以其全文并入参考。在这点上应指出的是通常非必需用 APT 所述方式除去多糖。

Southern 杂交例如可通过在 37°C，将 7 μ g 的皱波角叉菜，耳突麒麟菜，刺麒麟菜和 *Gracilaria gracilis* 的总 DNA 用 60 U 的 HindIII 和 80 U 的 EcoRI 消化 4 小时而进行，HindIII 得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala; EcoRI 得自美国 Biolabs, Beverly, MA。在沉淀后，可将消化的 DNA 再溶解于 40 μ l 的 100mM Tris(pH7.5) + 10mM EDTA 中。然后将此片段在 0.8% 琼脂糖凝胶上分级分离（在 35V 迁移过夜），之后用“Trans DNA 表达真空印迹仪”在真空下移至 Hybond-N+膜上，Hybond-N+膜得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala; Trans DNA 表达真空印迹仪得自美国 Appligene, Gaithersburg, MD，在生产者所给定的条件下使用。

预杂交和杂交就皱波角叉菜而言在 60°C，就其它海藻而言在 42°C 进行，条件如 SAMBROOK 等, 分子克隆实验手册，第二版，CSH 实验室出版社，冷泉港，NY (1989)，所述内容以其全文并入参考。在杂交后，将此膜如下清洗：

对除皱波角叉菜之外所有海藻而言，
2×SSC+0.1%SDS，2×20 分钟；和
1×SSC+0.1%SDS，2×15 分钟。

对皱波角叉菜而言，如上清洗并另用 $0.5 \times \text{SSC} + 0.1\% \text{SDS}$ 清洗 15 分钟。

Southern 杂交是用编码磺基水解酶 I 的部分长度 cDNA 进行的。在用 HindIII 和 XhoI 消化 cDNA 后，产生二个片段：一个为 400bp，另一个为 1600bp，HindIII 和 XhoI 均得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala。然后收集后一个片段，并用 ECF 随机引发标记和检测系统标记，ECF 随机引发标记和检测系统得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala。标记，杂交和检测根据生产者推荐方法进行。

Southern 杂交还可用编码磺基水解酶 II 的全长 cDNA 进行。此 Southern 杂交揭示皱波角叉菜中一条大约 2.5kB 的主要条带以及 3 个其它条带（4—1.2kB）。然而，即使在曝光 60 小时后，在刺麒麟菜和耳突麒麟菜中仍能检测到 3 条微弱可见的条带，但在 *Gracilariagracilis* 中不能检测到。用编码磺基水解酶 I 的全长 cDNA 作探针可获得相似结果。

结果概况如下：

海藻	磺基水解酶 I cDNA	磺基水解酶 II cDNA
皱波角叉菜	1 条主要条带 + 2—3 条微弱条带	1 条主要条带 + 3 条微弱条带
<i>Gigartina skottsbergii</i>	1 个条带 + 3—4 条微弱条带	未测定
<i>Gracilaria gracilis</i>	NA	无条带
麒麟菜	1 个条带 + 微弱条带	3 个微弱条带
麒麟菜	微弱条带	3 个微弱条带

所有这些结果表明，在刺麒麟菜，耳突麒麟菜，和 *Gigartina skottsbergii* 中存在同源性磺基水解酶 I，在刺麒麟菜，耳突麒麟菜中

存在同源性磺基水解酶 II，但与各自角叉菜的酶的同源性较低。

几乎纯化的磺基水解酶 II 与 iota-前体温育形成凝胶，而煮沸的酶不形成凝胶，所述几乎纯化的酶是基于样品中总蛋白量已纯化为 80—90% (w/w) 均一性。将此酶还与 4 种不同浓度的 iota-前体温育。酶量低产生柔软的凝胶，而较多数量的酶产生较硬的凝胶。

在用磺基水解酶 I 温育 nu-角叉菜聚糖之后，检测到硫酸根释放，但角叉菜聚糖样品的粘度未增加。相反，用磺基水解酶 II 温育导致硫酸根释放及粘度增加。NMR 分析示出所有分离的酶级分将 nu-角叉菜聚糖转变为 iota-角叉菜聚糖。

由于所观测的修饰作用，美国临时申请 No.60/133376 中的磺基水解酶和脱水酶的先前理论已经废弃。先前理论阐述这两种酶有两种不同功能：(1) 一种酶除去 nu 前体上的 C-6 硫酸酯，和 (2) 一种酶形成 3, 6-脱水半乳糖桥，从而将结构转变为 iota-角叉菜聚糖。应指出的是，尽管美国临时申请 No.60/133376 未能准确阐述此酶的作用模式，但此临时申请揭示了怎样纯化和使用这些酶。

尽管不希望受理论的限制，但现据信磺基水解酶 I 是随机除去硫酸酯基团的。相反，磺基水解酶 II 可通过沿分子滑动从而产生 iota 段而渐进性地起作用，其可与其它相似分子凝聚产生凝胶。

当先用随机酶温育 iota-前体，随后灭活及之后用渐进酶温育时，与只用渐进酶所得结果相比粘度较高。似乎是随机酶制备聚合物，以此方式易于渐进酶沿分子滑动。

通过以上所述，本发明高纯度的磺基水解酶可修饰硫酸化的化合物的性质。

使用酶的一优点是其能在相对低的温度下工作，如 0—60℃，优选 20—55℃，更优选 37—48℃。因此，酶不需高热以生产角叉菜聚糖凝胶。

优选在 pH 为 5.5—9.5，更优选为 6—9.5，最优选为 7—9 进行温

育。在这点上，用皱波角叉菜磺基水解酶温育优选在 pH 为 6.5—7.5 进行。用 *cottonii* 磺基水解酶温育优选在 pH 为 8—9.5 进行。

含有磺基水解酶的样品的总蛋白浓度优选至少为 2—85 $\mu\text{g/ml}$ ，更优选为 10—80 $\mu\text{g/ml}$ ，最优选为 25—70 $\mu\text{g/ml}$ 。在几乎纯化的磺基水解酶 II 的情况下，此浓度优选为 1—10 $\mu\text{g/ml}$ ，更优选为 2.5—10 $\mu\text{g/ml}$ ，最优选为 2.5—5 $\mu\text{g/ml}$ 。

反应混合物中底物如角叉菜聚糖的浓度优选为 0.012—2% (w/v)，更优选为 0.12—2% (w/v)，最优选为 0.7—1.75% (w/v)。

就用 *cottonii* 提取物温育而言，其中进行脱硫反应的最佳条件如下：

—底物：终浓度为大约 1.5% (w/v) 的 μ -角叉菜聚糖

—作为温度函数的活性/稳定性：在 48°C 温育 9 小时与在 37°C 温育 16 小时或在 20°C 温育 48 小时释放同样多的游离硫酸根。

—作为 pH 函数的活性/稳定性：Tris-HCl 100mM (pH9.0) + 2-巯基乙醇 10mM 或 Bis-tris 100mM (pH8.5) + 10mM 2-巯基乙醇似乎是 *cottonii* 的磺基水解酶的最适当的缓冲液。

—蛋白质量：5 μg 的总蛋白是在 Dionex 上获得明显信号所需的最小量。

本发明纯化的磺基水解酶在修饰硫酸化的化合物如角叉菜聚糖中是有效的，例如，根据本发明的 1mg 酶提取物（在此情况中 0—30% 丙酮级分）每小时能释放 400nmol 的硫酸根。

磺基水解酶 I 和 II 可分别使用，或组合使用，以修饰底物，尤其特异修饰角叉菜聚糖中硫酸酯基团和/或脱水桥的数目和分布。本发明高纯度的磺基水解酶尤其用于修饰性质。

此发现的最直接应用可能是取代现有的化学修饰方法的酶促修饰方法，其中用酶促修饰可使功能性相当（或更好），如食物的凝胶性，粘度，质地更好。

例如，含有前体且因此不发生胶凝的角叉菜聚糖可经酶促诱导而凝胶化。

另外例如， κ -角叉菜聚糖可转变为 ι -角叉菜聚糖，以形成在一定条件下不发生胶凝的产物，所述条件是在 65°C ，在 pH 7，产物的浓度是在含有 0.1M 钾的水溶液中为大约 0.7% (w/v)。

另外，这些酶例如非限制性地具有以下应用：选择性控制 3, 6-脱水半乳糖残基的诱导；修饰角叉菜聚糖的与硫酸酯基团和 3, 6-脱水半乳糖残基的数目和分布相关的性质；诱导 ι -前体在水溶液系统中的修饰和凝胶化（包括冷却下可溶的角叉菜聚糖溶液和粘膏的冻结，代表性用途包括食品，制药，纺织业，和人体卫生制品，还包括特别的用途如奶制品，尤其奶粉配方，牙膏和其它膏状或浆状制品）；控制生产 ι -角叉菜聚糖以替代明胶（因为期望此酶提供与当前的碱化方法相比不完全的修饰，这将更好的控制依赖于这种不完全修饰的类明胶性质）；只修饰 κ - ι -前体混合物中 ι -前体，例如冷水海藻的中性提取物，由此可提供较低的凝胶强度，但提高水结合性以及带来其它新特性；与具有 6 硫酸酯基团的其它半乳聚糖结构，包括类琼胶一起使用，以及与角叉菜聚糖和琼脂中同源核酸和蛋白质一起使用。

含有前体的角叉菜聚糖可通过注射使用或包被于未烹调的肉类如鸡肉，鲑鱼。如果这种酶包含于混合物中，它们将产生角叉菜聚糖凝胶，因此当烹调肉类时，可防止汁液从肉类中漏出。

其它可能用途包括如下：

—通过使用温和条件提取角叉菜聚糖，随后使用酶修饰角叉菜聚糖制备具有高粘度和高凝胶强度的高分子量的角叉菜聚糖；

—在或接近周围环境温度凝胶化（冷凝），减少或消除需要加热和/或冷却的步骤，如生产酸奶需要产生凝胶。

本发明通过以下实施例将得以进一步例证。这些实施例非限制本

发明的范围。

除非特别指出，实施例中所有百分率，份数等都是以重量为单位。

实施例 1-4

这些实施例涉及皱波角叉菜磺基水解酶提取物对不同类型角叉菜聚糖的特异性研究。

为研究皱波角叉菜磺基水解酶的特异性，将 nu-，mu-，iota-，和 kappa-角叉菜聚糖用作底物。Iota-和 kappa-角叉菜聚糖通过碱提取形成完全 3，6-脱水半乳糖而分离自其海藻原料。含有 mu-，nu-或 lambda-角叉菜聚糖的富含前体的角叉菜聚糖，是通过用水中性提取而分离的。lambda-角叉菜聚糖分离自经人工拣选的四分孢子体。所有角叉菜聚糖通过在异丙醇中沉淀而回收。下表 1 中所列的这些角叉菜聚糖是由丹麦 Lille Skensved, Hercules 公司提供的。

表 1

角叉菜聚糖	海藻原料植物学名称	海藻商品名	硫酸酯含量（% （w/w））
Nu	<i>Eucheuma denticulatum</i>	Spinosum	33
Mu	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Cottonii	23
Iota	<i>Eucheuma denticulatum</i>	Spinosum	33
Kappa	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Cottonii	20

在使用之前，将角叉菜聚糖用 10 升含有 10mM 2-巯基乙醇的 50mM Tris-HC (pH7.1) 缓冲液，经得自美国 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA 的 MWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜透析过夜。在透析后，角叉菜聚糖的终浓度为大约 1.25% (w/v)。

将皱波角叉菜的配子体植物在液氮中冷冻，并用 Forplex 研磨仪自动研磨为长度小于 1 mm 的碎片，Forplex 研磨仪得自法国 Forplex Industrie, Boulogne Billancourt。将此“粉末”立即使用或在 -20℃ 或 -80℃ 保存直至进一步使用。

以如下方式制备皱波角叉菜提取物。将 15 g 研磨的皱波角叉菜用含有 10mM 2-巯基乙醇和 500mM KCl 的 4 体积(即 60ml)的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH9.5) 提取。然后将上清用冷冻的 (-20°C) 丙酮分级分离: 进行两步分离: 从 0—30% 饱和度和从 30—60% 饱和度的丙酮中分离。在这点上, 当冷丙酮的饱和度从 A%—B% 时, 加入 z ml 样品中的丙酮体积如下确定: $z(B-A)/(100-B)$ 。

在每个分级分离步骤之后, 在 4°C 以 $10000\times g$ 离心 30 分钟。将粒状沉淀溶解于 2 ml 的含有 10mM 2-巯基乙醇的 50mM Tris-HCl (pH7.1) 中。然后将粒状沉淀以及每个上清等分在 4°C , 用 3×3 升含有 10mM 2-巯基乙醇的 50mM Tris-HC (pH7.1) 缓冲液, 经得自美国 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA 的 MWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜透析过夜。

从这些提取物中制备用于筛选活性的反应混合物, 其组分如下表 2 所示。

表 2

组成成分	对照组	样品
表 3 所列的角叉菜聚糖 (在 50mM Tris-HCl (pH7.1) + 10mM 2-巯基乙醇中浓度为 1.25% (w/v))	500 μl	500 μl
50mM Tris-HCl (pH7.1) + 10mM 2-巯基乙醇	500 μl	250 μl
角叉菜提取物	0 μl	250 μl

如下表 3 所示, 将上述各种角叉菜聚糖在室温在 pH7.1 与经上述方式获得的角叉菜提取物温育 40 小时。每个样品的游离硫酸根数量用本申请所述游离硫酸根分析方法测定。相似地, 通过相同方法对每个相应对照组的游离硫酸根数量进行测定, 对照组包括相同角叉菜聚糖但不包括角叉菜提取物, 如表 2 所示。每个样品与其对照组之间游离硫酸根的差异是释放的游离硫酸根的相对水平, 如下表 3 所示。

表 3

实施例	提取物	释放的硫酸根的相对水平 (ppm)			
		Nu	Mu	Iota	Kappa
1	上清 (0—30%丙酮)	101.0	15.3	6.4	6.7
2	粒状沉淀 (0—30%丙酮)	48.1	7.1	2.4	3.2
3	上清 (30—60%丙酮)	72.8	16.5	4.3	6.2
4	粒状沉淀 (30—60%丙酮)	40.6	8.7	2.6	2.0

如表 3 所示, 角叉菜提取物对 nu-角叉菜聚糖是活性的。第一个上清 (0—30%丙酮饱和度) 和第二个上清 (30—60%丙酮饱和度) 对 mu-角叉菜聚糖也有一些活性, 但对该底物的活性与对 nu-角叉菜聚糖的活性相比相对较低。

实施例 5—38

如以下实施例所示, 为确定皱波角叉菜磺基水解酶的最佳条件, 对分级分离的皱波角叉菜提取物进行部分定性, 包括不同 pH, 温度, 酶和底物浓度下的活性。从这些实施例中, 显示 nu-角叉菜聚糖的脱硫化应在 48℃, 用终浓度为 0.7% (w/v) 的底物最少进行 6—15 小时。这些实施例还示出角叉菜提取物特征在于最佳 pH 为 7, 用 Tris-HCl (50mM, pH7.1+10mM 2-巯基乙醇) 作缓冲液。

除非特别指出, 将表 1 所列的 nu-角叉菜聚糖溶解于含有 10mM 2-巯基乙醇的 Tris-HCl (50mM, pH7.1) 缓冲液中, 并用得自美国 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA 的 MWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜, 用 6×2 升相同缓冲液透析 24 小时。用于反应混合物中的底物终浓度为 0.6% (w/v)。

为获得磺基水解酶提取物, 将如实施例 1—4 所述方式研磨为粉末的皱波角叉菜, 在 -20℃ 用 0—30% 或 30—60% 饱和度的冷丙酮分级分离。

将级分用 4×2.5 升的 50mM Tris-HCl (pH7.1) +10mM 2-巯基乙醇缓冲液透析 16 小时。从 0—30% 丙酮饱和度所得皱波角叉菜提

取物的蛋白质浓度为大约 $170 \mu\text{g/ml}$ ，这是用牛血清白蛋白作标准，经德国 Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich 的 Bio-Rad 蛋白质分析测定的。

实施例 5—13

这些实施例涉及在不同 pH 皱波角叉菜提取物对 nu-角叉菜聚糖的活性。

在这些实施例中，将 300 mg 的 nu-角叉菜聚糖用 6×2 升 MilliQ 水，用 MWCO 6-8000 或 3500Spectra/por 膜，透析 24 小时，MilliQ 水得自美国 Millipore Corporation, Bedford, MA，MWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜得自美国 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA。在透析后角叉菜聚糖的终浓度为 1.1% (w/v)。

样品和对照组反应混合物如下表 4 所示制备。

表 4

组成成分	对照组	样品
Nu-角叉菜聚糖（在水中浓度为 1.1% (w/v)）	500 μl	500 μl
缓冲液（100mM Tris, Pipes 或 Mes, 如下所述）	250 μl	250 μl
50mM Tris-HCl pH7.1	250 μl	0 μl
角叉菜提取物（在 50mM Tris-HCl pH7.1 中） （0—30% 丙酮饱和度）	0 μl	250 μl

根据所需的 pH，如下表 5 所示，反应混合物中所用缓冲液如下：

—pH5.5—6.5: 100mM MES（2—（N—吗啉代）乙磺酸）+10mM 2—巯基乙醇

—pH6.5 和 7.0: 100mM Pipes（哌嗪—N, N'（2—乙磺酸））+10mM 2—巯基乙醇

—pH7.0—9.0: 100mM Tris-HCl +10mM 2—巯基乙醇

缓冲液的 pH 在 Tris-HCl 的情况下通过加入 HCl 或在 MES 和 Pipes 的情况下加入 NaOH 而改变。

将反应混合物在 29°C 温育 26 小时。在温育后，释放的硫酸根数量根据本申请所述游离硫酸根分析方法测定。通过对样品及其相应

对照组中游离硫酸根的数量进行对比，计算下表 5 所示游离硫酸根的相对数量。

表 5

实施例	PH	释放的硫酸根的相对水平 (ppm)			%相对水平
		MES	Pipes	Tris-HCl	
5	5.5	2.7			6.6
6	6	20.0			48.7
7	6.5	31.2			75.9
8	6.5		29.8		72.5
9	7		32.6		79.3
10	7			41.1	100
11	8			32.1	78.1
12	8.5			23.0	56.0
13	9			23.5	57.2

表 5 示出皱波角叉菜提取物的最佳 pH 为大约 7。

实施例 14-21

这些实施例涉及确定作为提取物的蛋白质包括磺基水解酶的数量函数的皱波角叉菜提取物对 nu-角叉菜聚糖的活性。

样品和对照组反应混合物以下表 6 所示比例制备。

表 6

实施例	Nu-角叉菜聚糖(在 50mM Tris-HCl(pH7.1)+10mM 2-巯基乙醇中浓度为 1.25% (w/v))	角叉菜提取物 (170 μ g/ml 蛋白质) (0-30%丙酮饱和度)	50mM Tris-HCl (pH7.1)+10mM 2-巯基乙醇
对照组	500 μ l	0 μ l	500 μ l
14	500 μ l	50 μ l	450 μ l
15	500 μ l	100 μ l	400 μ l
16	500 μ l	150 μ l	350 μ l
17	500 μ l	200 μ l	300 μ l
18	500 μ l	250 μ l	250 μ l
19	500 μ l	300 μ l	200 μ l
20	500 μ l	400 μ l	100 μ l
21	500 μ l	500 μ l	0 μ l

将含有不同浓度磺基水解酶提取物的对照组和样品混合物，在 30

℃在 pH7.1 温育 30 小时。在温育之后，释放的硫酸根数量根据本申请所述游离硫酸根分析方法测定。通过对样品及其相应对照组中游离硫酸根的数量进行对比，计算下表 7 所示游离硫酸根的相对量。

表 7

实施例	蛋 白 质 量 (μg)	在 30 小时内释放的硫酸根的相对水平 (ppm)
14	8.5	14.1
15	17	24.5
16	25.5	34.2
17	34	40.2
18	42.5	54.6
19	51	53.1
20	68	74.7
21	85	65.2

正如所期望的，酶量增加提高了释放的硫酸根量。

实施例 22—32

这些实施例涉及确定对于不同 nu-角叉菜聚糖浓度，皱波角叉菜提取物的活性。

如上表 1 所述相同方式制备对照组和样品反应混合物，除了反应混合物的体积降至 $500\ \mu\text{l}$ ，即所有成分的体积减少 50%，并使用 30—60% 丙酮饱和度的角叉菜提取物。

为确定在脱硫反应期间使用的 nu-角叉菜聚糖的最佳浓度，对 0—2.5% (w/v) (终浓度) 范围内的 12 种不同浓度的 nu-角叉菜聚糖进行测试，如下表 8 所示。

在 37℃ 温育 15 小时后，释放的硫酸根数量根据本申请所述游离硫酸根分析方法测定。通过对样品及其相应对照组中游离硫酸根的数量进行对比，计算下表 8 所示游离硫酸根的相对量。

表 8

实施例	反应混合物中 nu-角叉菜聚糖的终浓度 (% (w/v))	释放的硫酸根的相对水平 (ppm)	%相对活性
22	0.37	40.0	81.3
23	0.54	47.3	96.0
24	0.7	49.2	100
25	0.85	43.8	88.9
26	1.03	44.6	90.5
27	1.12	43.0	87.3
28	1.27	19.0	38.6
29	1.45	9.0	18.3
30	1.76	39.8	80.8
31	2.07	29.1	59.1
32	2.49	33.1	67.2

表 8 示出 0.7% (w/v) 的 nu-角叉菜聚糖 (反应混合物中的终浓度) 是用于通过 nu 磺基水解酶进行脱硫反应的最佳底物浓度。

实施例 33—38

这些实施例涉及确定在不同温度皱波角叉菜提取物对 nu 角叉菜聚糖的活性。如以上实施例 1—4 所述相同方式制备对照组和样品反应混合物, 只是使用 30—60% 丙酮饱和度的角叉菜提取物。

将反应混合物在 0, 13, 20, 30, 37 和 48℃, 在 pH7.1 进行温育。为测定在不同时间释放的硫酸根量, 在上述温度温育 0, 2, 8, 26, 46 和 72 小时后, 取反应混合物的少量等分 (大约 0.2ml)。

表 9

实施例	温度 (°C)	释放的硫酸根的相对水平 (ppm)					
		0 小时	2 小时	8 小时	26 小时	46 小时	72 小时
33	0	0.2	1.8	2.0	0	7.2	11.6
34	13	0	2.7	9.0	15.2	29.2	27.0
35	20	0.2	4.9	13.6	26.1	44.7	47.5
36	30	0.25	7.1	13.2	39.7	61.8	51.6
37	37	0.3	9.0	22.9	44.6	77.8	58.6
38	48	0.3	14.6	34.8	—	—	—

表 9 示出从 nu-角叉菜聚糖释放的硫酸根量随着温度提高而增加。尤其地，48°C 似乎是粗提物的最佳温度。事实上，在 48°C 温育 8 小时与在室温温育 40 小时释放的硫酸根量相同。

实施例 39—46

这些实施例涉及研究基于总蛋白含量纯化的皱波角叉菜磺基水解酶 II 对不同类型角叉菜聚糖的特异性。

基于总蛋白含量纯化的皱波角叉菜磺基水解酶 II 是通过本申请书技术方法分离的。尤其地，用 650—850mM 浓度的 NaCl 从 DEAE 层析柱洗脱纯化的皱波角叉菜的级分。对纯化的磺基水解酶 II 对不同类型角叉菜聚糖的特异性进行测试。尤其地，下表 10 所示对照组和样品反应混合物是通过用表 11 所示的角叉菜聚糖产生的。因此，在富含 nu 的 iota-角叉菜聚糖（如表 11 中“E”制备法所示）上测试纯化的磺基水解酶 II。另外在用 iotase 温育的 nu 富集的 iota-和 iota-角叉菜聚糖的酶抗性级分上测试纯化的磺基水解酶 II，如以下所述（如表 11 中“ER”制备法所示）。另外还在中性提取的 iota-和 kappa-角叉菜聚糖上测试纯化的磺基水解酶 II，如以下所述制备（如表 11 中“N”制备法所示）。另外在 nu 富集的 iota-和 mu-富集的 kappa-角叉菜聚糖上测试纯化的磺基水解酶 II，如以下所述制备（如表 11 中“C”制备法所示）。

表 11 中制备 nu 富集的 iota-角叉菜聚糖的“E”制备法如下。

将 15kg *Eucheuma denticulatum* 用 80% (w/v) 异丙醇清洗 3 次, 在 60°C 在干燥室内干燥直至恒重, 并研磨为直径为 0.5mm 的颗粒。将研磨的海藻在 50°C 在 1000 升的 0.125M KCl/K₂CO₃ (9.15kg KCl 和 0.17kg) 中提取 4 小时。在提取期间, 测定 pH 值, 以保证在 8—9 之间。如果 pH 低于 8, 加入适量的 K₂CO₃。

将提取液在 kieselgur—滤膜上过滤, 并将提取液用自来水 UF (超滤) 清洗, 直至电导率为 2 mS/cm (<2000 μ S/cm) 或更低, 及稳定。然后, 将提取液浓缩为总体积为大约 65—70 升。将 pH 用 0.1M NaOH 调节为大约 8.5。在这点上, 用吸液管加入 1—10dl 的 0.1M NaOH, 同时搅拌, 并密切监视 pH 值。在 100% (w/v) 异丙醇中进行沉淀实验, 如果形成沉淀, 全部都沉淀。如果沉淀较少, 将提取液在以下真空和 pH 及温度下通过蒸发浓缩。提取液的 pH 必须不超过 9.2。在一些情况中, 必须使角叉菜聚糖沉淀过夜。将沉淀的角叉菜聚糖用 100% (w/v) 异丙醇清洗两次。所有步骤均在室温下进行。将角叉菜聚糖冻干。NMR 结果表明前体水平富集为总重量的 32% 左右。

如上表 1 所示制备 iota—角叉菜聚糖的同样方式制备 iota—角叉菜聚糖。

制备 nu 富集的 iota—角叉菜聚糖和 iota—角叉菜聚糖的酶抗性级分 (表 11 的 ER 方法) 如下进行。起始物是通过上述 E 方法获得的 nu 富集的 iota—角叉菜聚糖, 或表 1 所列的 iota—角叉菜聚糖。

在这些起始物中, 将 1g 产生酶抗性的角叉菜聚糖溶解于 50mM Tris-HCl (pH7.0) + 100mM NaCl 和 5mM CaCl₂ 中。将所得消化混合物在 37°C, 间隔 2 小时通过每 mg 角叉菜聚糖加入 0.2U 的 iota—角叉菜聚糖酶温育 4 小时, iota—角叉菜聚糖酶已根据 POTIN 等, “从海产类噬细胞菌属细菌中纯化和定性新的 κ —角叉菜聚糖酶”, 欧洲生物化学杂志, 201, pp241—247 (1991) 所述纯化, 所述内容以其

期望并入参考。1 单位 (U) 的酶活性是指在还原糖分析中, 每分钟在 237nm 吸光度增加 0.1 单位的酶数量, 如 KIDBY 等, “在 nm 范围内还原糖的常规铁氰化物评估”, 分析生物化学, 55, pp321-325 (1973) 所述, 所述内容以其全文并入参考。第一种酶抗性级分 (ERF1) 是在用 2 体积的 50% (v/v) 乙醇沉淀后获得的。在 4℃ 以 10000×g 离心 20 分钟后, 收集粒状沉淀并认为是 ERF1。然后将 2 体积的 95% (v/v) 乙醇加入上清中。在如前相同条件下离心后, 收集粒状沉淀并称为 ERF2。将 ERF1 和 ERF2 分别再溶解于水中, 并用 NWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜, 经 5×2 升的 20mM (NH₄) HCO₃ 透析, NWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜得自美国 Spectrum Laboratories 公司, Rancho Dominguez, CA。然后将 ERF1 和 ERF2 冻干。

中性提取方法 (即表 11 中 N 方法) 如下。将表 11 所列的 200g 海藻, 在 10 升自来水中在 110℃ 提取 35 分钟, 随后过滤, 浓缩及在异丙醇中沉淀, 如 THERKELSEN, “角叉菜聚糖”, 工业树脂: 多糖及其衍生物, 第三版, pp145-180, (1993), 所述内容以其全文并入参考。

C 制备方法如上述 E 制备方法, 除了起始物是 *Cottonii* (= *Kappaphycus alvarezii*)。

谈及表 11, 将反应混合物在 pH7.1 在 48℃ 温育 14 小时。释放的硫酸根数量根据本申请书所述游离硫酸根分析方法测定。通过对比样品及其相应对照组中游离硫酸根的数量, 计算下表 11 所示游离硫酸根的相对数量。

表 10

组成成分	对照组	样品
表 5 所列角叉菜聚糖 (在 MilliQ 水中浓度为 1.4% (w/v))	200 μl	200 μl
沸腾 10 分钟的纯化磺基水解酶 II	200 μl	0 μl
纯化的磺基水解酶 II	0 μl	200 μl

表 11

实施例	角叉菜聚糖	制备方法	角叉菜聚糖原料	释放的硫酸根的相对水平 (ppm)
39	Nu 富集的 iota	E	E.spinosum	87.7
40	ERF1	ER	E.spinosum	4.9
41	ERF2	ER	E.spinosum	77.3
42	中性提取的 iota	N	E.spinosum	43.8
43	Nu 富集的 iota	C	G.skottsbergii	9.0
44	中性提取的 iota	N	G.skottsbergii	7.4
45	Mu 富集的 kappa	C	K.alvarezii	1.4
46	中性提取的 kappa	N	K.alvarezii	1.6

如筛选研究所期望的,表 11 示出皱波角叉菜磺基水解酶 II 对 kappa 一角叉菜聚糖或其前体即 mu 一角叉菜聚糖无活性。皱波角叉菜磺基水解酶 II 只对从 spinosum 中经中性提取的 iota 一角叉菜聚糖或其富集 nu 的配体有活性。令人惊奇的是,此 nu 一角叉菜聚糖的 ERF1 不是磺基水解酶 II 的良好底物。不期望受理论限制,ERF1 据信含有相对高分子量的 nu 一角叉菜聚糖。所观测的对 ERF2 有活性及对 ERF1 无活性还不完全清楚。

实施例 47—53

这些实施例涉及研究温度对基于蛋白质含量纯化的皱波角叉菜磺基水解酶 II 对不同类型角叉菜聚糖的活性/稳定性的影响。

基于蛋白质含量纯化的皱波角叉菜磺基水解酶 II 是通过本申请书所述的方法分离的。尤其地,集合 DEAE 琼脂糖凝胶层析的 59—61 级分,并用作磺基水解酶 II 的原料。

将 1 体积的 DEAE 琼脂糖凝胶层析的 59—61 级分集合,用 1 体积的在 50mM Tris-HCl+10mM 2-巯基乙醇 (pH7.1) 中的 1.4% (w/v) 的 nu 一角叉菜聚糖温育,nu 一角叉菜聚糖是根据实施例 5—12 的方法产生的。以相同方式制备参考混合物,除了酶(纯化的磺基水解酶 II)在用 nu 一角叉菜聚糖温育之前在大气压下煮沸 10 分钟。

如表 12 所示，将反应混合物以及参考混合物在不同温度下温育，从 0℃—60℃。在上述温度下温育 3，8，15，24，32 和 40 小时后取等分。结果以通过用本说明书所述的方法测定的释放的硫酸根相对数量表示，作为温育期间的作用结果。

表 12

实施例	温度℃	在不同时间（小时）释放的硫酸根相对水平					
		3	8	15	24	32	40
47	0	0	0	1.7	2.1	3.9	3.2
48	12	0	0	6.0	6.1	10.3	12.9
49	20	2.4	4.7	13.6	14.0	25.3	30.5
50	30	4.7	—	21.4	29.0	32.3	27.0
51	37	9.0	15.7	34.3	41.2	53.5	35.4
52	48	—	26.6	55.7	73.0	97.2	97.7
53	60	15.2	16.3	14.6	33.3	35.3	—

如表 12 所示，磺基水解酶的活性在 48℃活性最大。高于这个温度，由于酶变性而丧失活性。

实施例 54—59

这些实施例涉及对 *Kappaphycus alvarezii* (Cottonii) 提取物的磺基水解酶活性进行定性。

Cottonii 是由菲律宾宿雾岛 Genu Philippines 提供的活产品。将 Cottonii 在液氮中冷冻运输，并保持在 -80℃直至进一步使用。在提取之前，将 Cottonii 在研磨器中人工研磨为细末，在研磨期间用烘炉导入液氮以保持 Cottonii 处于冷冻状态。

实施例 54—57

这些实施例涉及用各种 Cottonii 磺基水解酶提取物处理角叉菜聚糖以筛选活性。如实施例 1—4 制备皱波角叉菜所述制备 Cottonii 的提取物。然而在此情况中，进行额外的分级分离步骤，因为上清在冷丙酮中也配成 60—85%饱和度。加入的丙酮量如实施例 1—4 所述计算。在每个分级分离步骤之后，进行如实施例 1—4 所述的离心。然后将粒状沉淀再溶解于 50mM Tris-HCl (pH7.1) +10mM 2-巯基

乙醇中，之后在 4℃用 3×3 升的上述缓冲液透析过夜。在透析后样品的体积为大约 1.5ml。

根据实施例 1—4 所述产生对照组和样品，除了是从 Cottonii 而非皱波角叉菜中提取。因此，如下表 13 所述，在一些情况中，将 Cottonii 的原始提取物用丙酮分级分离。

如表 13 所示，在 25℃用各种提取物与角叉菜聚糖温育 40 小时。释放的硫酸根量用本申请书中所述方法测定。

表 13

实施例	Cottonii 提取物	各种底物中释放的硫酸根 (ppm)			
		Nu	Mu	Iota	Kappa
54	原始	0	18.9	3.5	7.2
55	0—30%丙酮 (粒状沉淀)	0	85.9	2.2	24.1
56	30—60%丙酮 (粒状沉淀)	58.9	37.1	0	1.6
57	60—85%丙酮 (粒状沉淀)	0	1	0	17

如表 13 所示，即使不进行分级分离 Cottonii 的提取物对 mu—角叉菜聚糖也是活性的。从 0—30%或从 30—60%丙酮中分级分离的相同提取物示出相同底物的较高活性。一个提取物还示出对 nu—角叉菜聚糖的活性。

实施例 58—75

这些实施例涉及确定 Cottonii 磺基水解酶在不同 mu—角叉菜聚糖浓度的活性。

将 Cottonii 提取物的 30—60%丙酮级分 (粒状沉淀)，在 4℃用 NWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜，经 3×3 升的 50mM Tris-HCl (pH7.1) + 10mM 2—巯基乙醇透析，NWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜得自美国 Spectrum Laboratories 公司，Rancho Dominguez, CA。

制备具有表 14 所列组分的对照组和样品反应混合物。为制备这些反应混合物，制备两种母液。母液 1 是 1.25% (w/v) 的 mu—角叉菜聚糖，母液 2 是 5% (w/v) 的 mu—角叉菜聚糖，均在 50mM

Tris-HCl (pH7.1) +10mM 2-巯基乙醇中。在表 14 中, 缓冲液是 50mM Tris-HCl (pH7.1) +10mM 2-巯基乙醇。提取物中蛋白质的浓度估计为大约 105 μ g/ml, 这是用牛血清白蛋白作标准, 经得自德国 Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich 的 Bio-Rad 蛋白质分析测定的。

表 14

实施例	提取物 (μ l)	母液 1 (μ l)	母液 2 (μ l)	缓冲液 (μ l)	Mu 的终浓度 (% (w/v))
对照组	125	0	0	375	0
58	125	5	0	370	0.012
59	125	10	0	365	0.025
60	125	20	0	355	0.05
61	125	50	0	325	0.125
62	125	75	0	300	0.187
63	125	100	0	275	0.25
64	125	150	0	225	0.375
65	125	200	0	175	0.5
66	125	250	0	125	0.625
67	250	0	74	676	0.37
68	250	0	110	640	0.55
69	250	0	140	610	0.7
70	250	0	170	580	0.85
71	250	0	200	550	1
72	250	0	220	530	1.1
73	250	0	300	450	1.5
74	250	0	350	400	1.75
75	250	0	400	350	2

将对照组和样品反应混合物在 25°C 在 pH7.1, 与下表 15 所示的不同浓度的 mu-角叉菜聚糖温育 40 小时。释放的硫酸根的相对量用本说明书所述方法测定。

表 15

实施例	Mu 的终浓度 (%(w/v))	释放的硫酸根的相 对水平 (ppm)
58	0.012	3.8
59	0.025	5.1
60	0.05	5.8
61	0.125	11.9
62	0.187	17.9
63	0.25	19.7
64	0.37	22.2
65	0.375	23.2
66	0.5	31.2
67	0.5	26.7
68	0.625	32.8
69	0.7	32.6
70	0.85	36.9
71	1	29.2
72	1.1	29.6
73	1.5	66.1
74	1.75	65.4
75	2	55.9

如表 15 所示, 1.75% (w/v) 左右的 mu-角叉菜聚糖是用于对 Cottonii 提取物进行脱硫反应的最佳底物浓度。事实上, 在此浓度释放的硫酸根量是 0.5—1% (w/v) mu-角叉菜聚糖浓度释放的硫酸根量的两倍。

实施例 76—81

这些实施例涉及确定在不同温度 Cottonii 磺基水解酶对 mu-角叉菜聚糖的活性。

将 Cottonii 提取物的 0—30% 丙酮级分 (粒状沉淀), 在 4°C 用 NWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜, 经 3×3 升的 50mM Tris-HCl (pH7.1) + 10mM 2-巯基乙醇透析, NWCO 6-8000 或 3500 Spectra/por 膜得自美国 Spectrum Laboratories 公司, Rancho Dominguez, CA。

对照组和样品反应混合物如实施例 54—57 所述相同方式产生。这样, Cottonii 提取物的量为 250 μ l。另外, 在样品反应混合物中 mu 一角叉菜聚糖溶液 (在 50mM Tris-HCl (pH7.1) + 10mM 2-巯基乙醇中浓度为 1.25% (w/v)) 的量为 500 μ l。

在 pH 7.1, 在下表 16 所列不同温度进行温育。在下表所列不同时间取反应混合物的等分, 并用本申请书所述方法测定释放的硫酸根的相对量。

表 16

实施例	温 度 (°C)	释放的硫酸根的相对量 (ppm)				
		3 小时	9 小时	27 小时	48 小时	70 小时
76	4	2.4	2.6	25.5	15.9	42.1
77	12	10.2	6.4	29.5	38.8	79.4
78	20	11	18.4	53.5	59.4	79.8
79	30	17.8	34.8	—	61.7	90.4
80	37	24	49.7	74.4	73.2	90.4
81	48	11.9	61.8	81.2	77.2	105

表 16 示出尽管提取物在低温度 (4°C) 有活性, 但 Cottonii 的 mu 磺基水解酶提取物在 48°C 呈现最大活性。在这点上, 应指出 48°C 是测试的最高温度, 由此提取物在更高温度可能有更高活性。在任何情况下, 在 48°C, 在用酶温育 mu 一角叉菜聚糖 9 小时后, 明显释放硫酸根。

实施例 82—95

这些实施例涉及测定在不同 pH Cottonii 磺基水解酶对 mu 一角叉菜聚糖的活性。

用于这些实施例中的 Cottonii 提取物, 用牛血清白蛋白作标准, 通过 Bio-Rad 蛋白质分析测定其蛋白质浓度为大约 105 μ g/ml, Bio-Rad 蛋白质分析得自德国慕尼黑 Bio-Rad Laboratories GmbH。样品和对照组反应混合物如下表 17 所示制备。

表 17

组成成分	对照组	样品
Mu—角叉菜聚糖（在水中 1.2% （w/v））	250 μ l	250 μ l
缓冲液（100mM Tris, Pipes, Mes, 或 Bis-Tris, 如下所述）	125 μ l	125 μ l
50mM Tris-HCl pH7.1 + 10mM 2— 巯基乙醇	125 μ l	0 μ l
Cottonii 提取物（在 50mM Tris-HCl pH7.1 + 10mM 2—巯基乙醇中）	0 μ l	125 μ l

在这些实施例中，pH 根据实施例 5—13 的方法变化，实施例 5—13 涉及确定皱波角叉菜磺基水解酶的活性。除了关于皱波角叉菜所述的缓冲液之外，为确定最佳 pH 值，使用 bis—tris 缓冲液（100mM bis tris + 2—巯基乙醇 10mM），pH8.0—9.5。bis tris 是（双（2—羟乙基）亚氨基 tris（羟甲基）甲烷；2—双（2—羟乙基）氨基—2—（羟甲基）—1, 3—丙二醇），其得自美国圣路易斯 Sigma Chemical, MO。

将反应混合物在 48℃ 温育 18 小时。在温育后，释放的硫酸根量根据本申请书所述游离硫酸根分析方法测定。通过对比样品和对照组中游离硫酸根的量，计算下表 18 所示游离硫酸根的相对量。

表 18

实施例	PH	释放的硫酸根 (ppm)			
		MES	Pipes	Tris-HCl	Bis—Tris
82	5.5	1.94			
83	6	19.8			
84	6.5	49.8			
85	6.5		58.0		
86	7		58.1		
87	7			47.4	
88	7.5			54.4	
89	8.2			56.5	
90	8.2				73.2
91	8.5			69.0	
92	8.5				71.6
93	9			85.6	
94	9				18.8
95	9.5				41.0

表 18 示出根据反应混合物中所用的缓冲液, mu—磺基水解酶的最佳 pH 值在 8.2—9.0 之间。因此, Cottonii 提取物的最佳 pH 比皱波角叉菜提取物的最佳 pH 值更碱化。

实施例 96—104 和对比例 1

这些实施例和对比例涉及确定在不同蛋白质量, Cottonii 磺基水解酶对 mu—角叉菜聚糖的活性。

在实施例和对比例中, Cottonii 提取物中蛋白质的浓度测定为 105 μ g/ml。反应混合物中蛋白质的量根据下表 19 变化。将反应混合物在 48°C, 在 pH7.1 温育 18 小时。

在表 19 中, 缓冲液是 50mM Tris-HCl pH7.1+10mM 2—巯基乙醇。根据本说明书所述方法测定的释放的硫酸根量, 在下表 19 中示出。

表 19

实施例	Cottonii 提取物(μ l)	缓冲液(μ l)	在水中 1.2% (w/v) μ -角叉菜聚糖 (μ l)	蛋白质量(μ g)	释放的硫酸根(ppm)
对比例 1	0	250	250	0	1.9
96	5	245	250	0.52	5.7
97	10	240	250	1.05	7.2
98	20	230	250	2.10	10.4
99	50	200	250	5.20	17.9
100	75	175	250	7.90	26.2
101	100	150	250	10.50	30.8
102	150	100	250	15.70	50.2
103	200	50	250	21.00	66.8
104	250	0	250	26.20	84.5

表 19 示出 μ 磺基水解酶是一种活性酶，因为少如 5μ g 的总蛋白就足以释放显著量的硫酸酯。

实施例 105

此实施例涉及从 Cottonii 中分离和部分纯化 μ 磺基水解酶。

将 50g 新鲜 Cottonii 在液氮中冷冻，并用 Grinomix GM200 研磨仪研磨，新鲜 Cottonii 由菲律宾宿务岛 Genu 提供，Grinomix GM200 研磨仪得自德国 Retsch BV。然后将此粉末在 4°C ，在 1.5 体积，即 75ml 的 50mM Tris-HCl (pH9.5) + 10mM 2-巯基乙醇 + 500mM KCl 中解冻大约 60 小时。将提取物在 4°C 以 $24000 \times g$ 离心 90 分钟。

然后用在 50mM Tris-HCl (pH7.1) + 10mM 2-巯基乙醇中 1.5% (w/v) 的 ν 或 μ -角叉菜聚糖，测试上清的磺基水解酶活性。在 48°C 用 Cottonii 提取物温育 20 小时。此温育混合物含有 250μ l 50mM Tris-HCl (pH7.1) + 10mM 2-巯基乙醇，pH7.1， 500μ l 提取物，和在 50mM Tris-HCl (pH7.1) + 10mM 2-巯基乙醇中的 500μ l 底物 (1.5% (w/v))。释放的硫酸根量通过本申请书所述方法测定。

ι -前体释放的硫酸根最高 (在 20 小时后 80ppm)， κ -前体最低 (在 20 小时后 10-30ppm)，尤其地，当底物是表 1 所述的

mu-角叉菜聚糖时，释放的硫酸根是 11ppm，而当底物是根据实施例 39-46 所述“C”方法产生的 mu-角叉菜聚糖时，释放的游离硫酸根是 29ppm。

为进一步纯化磺基水解酶，通过加入 16.4g 硫酸铵/100 ml 样品将提取物调节为 30%硫酸铵饱和度。在 4℃在 16 小时后，将样品在 4℃以 24000×g 离心 90 分钟。将上清（40ml）以 3ml/分钟流速加样于苯基琼脂糖凝胶 6 快速流动层析柱（高 sub）中，所用层析柱得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala，并预先用 50mM Tris-HCl（pH8.7）+10mM 2-巯基乙醇+500mM KCl+30%饱和度的硫酸铵平衡。将此层析柱用此缓冲液清洗，直至在 280nm 的吸光度可忽略不计。然后，将蛋白质用降低梯度的硫酸铵洗脱，如以下及表 20 所述。

缓冲液 A: 50mM Tris-HCl(pH8.7)+10mM 2-巯基乙醇+500mM KCl+30%饱和度的硫酸铵

缓冲液 B: 50mM Tris-HCl(pH8.7)+10mM 2-巯基乙醇+500mM KCl

级分规格：5ml

流速：3ml/分钟

表 20

时间（分钟）	%缓冲液 A	%缓冲液 B
0	100	0
120	0	100

实施例 106-109 和对比例 2

这些实施例涉及从皱波角叉菜中纯化磺基水解酶 I 和 II。

从皱波角叉菜中将磺基水解酶 I 和 II 均纯化为均一性。酶的提取是用两批 0.6-0.7 kg 的新鲜海藻开始，随后进行两次苯基琼脂糖凝

胶层析。集合活性级分（根据释放的硫酸根），利用 MWCO 6—8000 或 3500 Spectra/por 膜，用 5×10 升含有 10mM 2—巯基乙醇的 50mM Tris-HCl 缓冲液（pH7.1）（缓冲液 A）透析，MWCO 6—8000 或 3500 Spectra/por 膜得自美国 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA。然后将透析的级分加样于 DEAE 琼脂糖凝胶层析柱，产生纯化的磺基水解酶 II，DEAE 琼脂糖凝胶层析柱得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala。将含有磺基水解酶 I 以及一些其它蛋白的一种级分的一半，加样于 HiTrap 肝素层析柱，产生纯化的磺基水解酶 I，HiTrap 肝素层析柱得自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala。

级分中纯化的磺基水解酶 I 和 II 的浓度是非常低的，且用牛血清白蛋白作标准，经 Bio-Rad 蛋白质分析不能确定，因为溶液中磺基水解酶 I 和 II 的数量低于检测限。

将下表 21 所示的反应混合物在 48°C 温育 14 小时。在这些反应混合物中，将不同量的几乎纯化的（基于蛋白质总量大约 80%（w/v）纯化的）磺基水解酶 II，与根据以上实施例 39—46 所述的“E”方法所得的 iota—前体温育，产生凝胶，所用磺基水解酶 II 的浓度经得自德国慕尼黑 Bio—Rad 实验室的 Bio-Rad 蛋白质分析测定为 $30 \mu\text{g/ml}$ 。相反，当将酶在 100°C 煮沸 10 分钟后温育时，在相同条件下的温育不能产生凝胶。在温育后，将所有反应混合物在 100°C 煮沸 10 分钟，以终止反应。

对比例 2 用作对照，并在反应混合物中不加入磺基水解酶而制备。

表 21

实施例	磺基水解酶 II, 30 μ g/ml (μ l)	水 (μ l)	Nu 角叉菜聚糖(1.4%(w/v) 在水中) (μ l)
对比例 2	0	1500	1500
106	100	1400	1500
107	250	1250	1500
108	500	1000	1500
109	1000	500	1500

温育的样品的凝胶强度和复数粘度如表 22 所示测定。表 22 中的测定法是基于温度变化，其中温度从 80℃ 降至 10℃，然后依次从 10℃ 升至 80℃。在温度变化期间将样品进行各种变形，并测定所得力。此测试在具有杯状—振动系统 (C14) 的 Bohlin VOR 流变仪上进行，Bohlin VOR 流变仪得自瑞典 Bohlin Reologi AB, Sjöbo。扭矩元件为 0.24 gcm，频率为 0.5Hz，振幅为 10+80%。

将力转变为弹粘性模量(分别为 G' 和 G'')和复数粘度(η^*)。凝胶温度是当温度降低变化时，其中 G' 和 G'' 温度交叉，且高于 G'' 时的温度。熔解温度是当温度升高变化时 G'' 高于 G' 的温度。凝胶强度是指 G' 凝胶或 G' 熔解，和在 10℃ 所得的 G' 。复数粘度 (η^*) 是在 10℃ 的粘度。

表 22

实施例	凝胶温 度(℃)	熔 解 温 度 (℃)	在 10℃ 的 G' 凝胶 (Pa)	在 10℃ 的 G' 熔解 (Pa)	在 10℃ 的 η^* 凝胶 (Pa.s)	在 10℃ 的 η^* 熔解 (Pa.s)
对比例 2	—	—	—	—	0.0041	0.0346
106	—	—	4	0.124	0.097	0.135
107	25.3	35.5	38	46	11.65	17.38
108	51.4	58.4	76	69	24.54	21.868
109	64.4	68.1	39	39	12.19	12.16

表 22 示出凝胶强度和复数粘度随着酶浓度提高而增加，并呈现在大约 5 μ g/ml 达到最大值，之后凝胶强度和复数粘度降低，并变

得类似于碱处理的 iota-角叉菜聚糖。需要一定量的磺基水解酶产生可测定的凝胶，大约为 $1 \mu\text{g/ml}$ 。少量的酶 ($2.5 \mu\text{g/ml}$) 产生柔软的凝胶，而较多量的酶 (5 和 $10 \mu\text{g/ml}$) 产生较硬的凝胶。

实施例 110 和对比例 3—5

这些实施例涉及用部分纯化的皱波角叉菜提取物温育 iota-和 nu-角叉菜聚糖。

表 24 中的 iota-和 nu-角叉菜聚糖均提取自 *Eucheuma denticulatum* (Spinosum)，如下所述。

对比例 3 用作对照，并含有 iota-角叉菜聚糖，其是商业提取物，并已用氢氧化钙处理，以充分除去 6-O-硫酸酯基团，并用作对照。

以如下方式提取用于对比例 4—5 和实施例的 nu-角叉菜聚糖。将 25 g 冻干并研磨的 Spinosum 分散于 2.5 升的 0.125M KCl 中。在室温提取 24 小时。用 614—200 mm 的 Frisenette 滤纸进行过滤，所用滤纸得自丹麦 A.G.Frisenette & sØnner APS, Ebeltoft。由于容易粘结，因此需要更换滤纸，共需更换 3 次。将液体在冰箱中冷藏 (5°C) 过夜。然后将液体在 Roto-蒸发器 RE 120 上，在 40°C 用水浴以 2—3 rpm 蒸发至 50 % 体积，Roto-蒸发器 RE 120 得自瑞士 LaboratoriumsTechnik AG, Flawil。将 pH 通过加入 6 滴 1M NaOH 调节为大约 8.0。将角叉菜聚糖用 100% (v/v) 异丙醇 (IPA) 沉淀并冻干，异丙醇得自英国 BP 化学制品有限公司。将 nu-角叉菜聚糖人工修整为最大为 1cm^2 的薄片，并以 1% (w/v) nu-角叉菜聚糖水平分散于蒸馏水中。将 nu-角叉菜聚糖用自来水经 Spectra/por 膜 MWCO 6—8000 或 3500 透析，直至在水中的电导率为 $1.5\mu\text{S/cm}$ ，Spectra/por 膜 MWCO 6—8000 或 3500 得自美国 Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA。将 nu-角叉菜聚糖的 pH 调节为 9.3，然后将此溶液沉淀并冻干。将冻干的组分在研磨器中研磨。此提取物具有丰富的 nu-含量和高分子量。

还示出用来自皱波角叉菜的含有磺基水解酶部分纯化的级分温育 nu-一角叉菜聚糖的结果。纯化方法一般如本说明书所示方法，即硫酸铵分级分离，苯基琼脂糖凝胶层析，除了用 Poros HQ 层析代替 DEAE 琼脂糖凝胶层析。Poros HQ 层析柱（4.6×100 mm）得自美国 Foster 市，PerSeptive Biosystems, CA。Poros HQ 层析法包括 DEAE 琼脂糖凝胶层析中所用的相同缓冲液，但洗脱如下及如表 23 所示进行：

缓冲液 A：50mM Tris-HCl+10mM 2-巯基乙醇 pH7.1

缓冲液 B：50mM Tris-HCl+10mM 2-巯基乙醇+1M NaCl pH7.1

流速：2 ml/分钟

级分规格：2 ml

表 23

时间（分钟）	%缓冲液 A	%缓冲液 B
0	100	0
60	0	100

集合含有磺基水解酶活性的级分 28—37，并如下所述用作酶级分。

将 nu-一角叉菜聚糖与含有以下成分的混合物温育：1.5ml 的 1.4 %（w/v，在 50mM Tris-HCl（pH7.1）+10mM 2-巯基乙醇 中）nu-一角叉菜聚糖，和 1.5ml 在 50mM Tris-HCl（pH7.1）/10mM 2-巯基乙醇中的酶级分。

对比例 5 的参照混合物是用苯基琼脂糖凝胶层析的级分产生的，该级分没有磺基水解酶活性，即不从 nu-一角叉菜聚糖中释放硫酸根。对比例 5 涉及确定凝胶化是否是与蛋白质相互作用所致，或凝胶化是否是与磺基水解酶相互作用所致。

在 48°C 温育 20 小时后，将角叉菜聚糖通过在 30°C 在 Microcon-10 装置上，以 3320×g 离心 1 小时而从反应混合物中除去，以如

本说明书所述测定释放的游离硫酸根数量，Microcon-10 装置购自美国 Amicon Bioseparations, Millipore Corporation, Bedford, MA。相反，其它测定法（即半乳糖，3，6 AG，和粘度测定）直接在反应混合物中进行。

提取自 *E. denticulatum* (Spinosum) 的 nu-角叉菜聚糖，和与一些蛋白质或含有皱波角叉菜的两种磺基水解酶的部分纯化的酶级分温育的相同 nu-角叉菜聚糖的主要结构特点，在表 24 中概括。

表 24 的粘度测定是在上述反应混合物中进行的，只是在 48°C 温育后反应混合物的粘度是用可程序化的 DV III 型 Brookfield 流变仪，自动调温在 48°C 直接测定的，DV III 型 Brookfield 流变仪得自美国 Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, MA。用 CP52 杆以 120rpm 剪切速率测定 10 分钟。

在表 24 中，磺基水解酶活性是在温育 nu 角叉菜聚糖的酶提取物基础上，通过测定释放的硫酸根量分析的。过滤物中存在的游离硫酸根量根据本说明书所述方法测定。

表 24

实施例	含量	半乳糖 (mol%)	3, 6-脱水 Gal(mol%)	游离硫酸根 (%w/w)	Brookfield 粘度 (cP)
对比例 3	Iota-角叉菜聚糖	50	50	0.6	太高 (凝胶)
对比例 4	Nu-角叉菜聚糖	68	32	NA	<5
对比例 5	Nu-角叉菜聚糖+蛋白质	71	29	0.4	<5
110	Nu-角叉菜聚糖+部分纯化的磺基水解酶 I 和 II	59	41	2.3	40

表 24 示出存在磺基水解酶时释放硫酸根，及 3，6 AG 水平增加导致凝胶形成。

实施例 111—116 和对比例 6—11

这些实施例涉及用来自皱波角叉菜的磺基水解酶 I 和 II 的分离的级分温育 nu-角叉菜聚糖，以测定对粘度的作用。

为获得磺基水解酶 I 和 II，纯化方法一般包括本说明书所述的方案。在此唯一不同之处是起始物为 2kg。

级分 21 和 40 得自相同纯化实验，而级分 23 和 48 得自用相同方法分别进行的层析。通常当使用 0.6—0.7 kg 海藻时，在 DEAE 琼脂糖凝胶层析后首先洗脱磺基水解酶 I，而后洗脱磺基水解酶 II，这与级分 23 和 48 的情况一样。然而，在用 2 kg 海藻进行的纯化中，级分的顺序是相反的，这样磺基水解酶 II 在级分 21 中，而磺基水解酶 I 在级分 40 中。

在表 25 中，“21+nu”，“23+nu”，“40+nu”，和“48+nu”分别表示 1ml 的级分 21，23，40 和 48（在 50mM Tris-HCl+10mM 2-巯基乙醇 pH7.1 中），2ml MilliQ 水，和 3ml 1.4%（w/v，在 MilliQ 水中）nu-角叉菜聚糖的混合物，将此混合物在 48℃温育 15 小时，然后在 100℃灭活 15 分钟，混合物中 nu-角叉菜聚糖是通过实施例 39—46 的“E”方法获得的。对照组包括的混合物进行相同处理，除了使用煮沸的酶，即表 25 所示“@100”酶。“40+nu+21”，和“23+nu+48”分别表示 1ml 级分 40 或 23（在 50mM Tris-HCl+10mM 2-巯基乙醇 pH7.1 中），2ml MilliQ 水，和 3ml 1.4%（w/v，在 MilliQ 水中）nu-角叉菜聚糖的混合物，将此混合物在 48℃温育 15 小时，然后在 100℃灭活 15 分钟，然后向其中分别加入 1ml 级分 21 或 48（在 50mM Tris-HCl+10mM 2-巯基乙醇 pH7.1 中），接着在 48℃温育 6 小时，混合物中 nu-角叉菜聚糖是通过实施例 39—46 的“E”方法获得的。

结果如下表 25 所示。

表 25

实施例	级分	平 均 MW (kDa)	硫酸酯释放		粘度增加			Iota mol%
			Y/N	ppm	Y/N	cP	T(°C)	
111	21+nu	35 (磺基水解酶 II)	Y	139	Y	12	40	92
对比例 6	21@100+nu	35 (磺基水解酶 II)		7	N	0.0	40	77
112	23+nu	62 (磺基水解酶 I)	Y	194	N	0.3	55	87
对比例 7	23@100+nu	62 (磺基水解酶 I)		18	N	0.0	55	77
113	40+nu	62 (磺基水解酶 I)	Y	69	N	0.0	40	83
对比例 8	40@100+nu	62 (磺基水解酶 I)		16	N	0.0	40	76
114	48+nu	35 (磺基水解酶 II)	Y	93	Y	5.6	55	83
对比例 9	48@100+nu	35 (磺基水解酶 II)		12	Y	0.8	55	76
115	40 + nu + 21	62/35 (磺基水解酶 I 和 II)	Y	105	Y	29	40	95
116	23 + nu + 48	62/35 (磺基水解酶 I 和 II)	Y	?	Y	12	55	89

表 25 示出在用酶温育 nu-角叉菜聚糖后，磺基水解酶 I 不增加样品粘度，而磺基水解酶 II 增加样品粘度。

将实施例 113 和 115 进行对比示出先用随机酶（磺基水解酶 I）温育 iota-前体，即 nu-角叉菜聚糖，随后灭活并用渐进酶（磺基水解酶 II）温育，所得结果与只用渐进酶的结果相比粘度更高。

将酶促修饰的样品经 NMR 分析，以确定这两种酶的作用模式。数据表明这两种酶是磺基水解酶，从 iota-前体（nu）的 C-6 位释

放硫酸根，并随后诱导 3, 6-脱水桥形成。

测定的温育样品的凝胶强度和复数粘度如表 28 所示。在表 28 中，对比例 10 的样品是通过将表 1 所列的 0.7% (w/v) 的 iota-角叉菜聚糖，分散于含有 2ml 的 0.5% (w/v) KC 和 2ml 的 0.25% (w/v) CaCl_2 的离子交换水中产生的。将此溶液加热至 80℃ 并蒸发至 5ml。对比例 11 的样品是未用酶处理的 nu-角叉菜聚糖。

表 28 中的测定基于表 26 和 27 所述的方法。表 26 示出确定凝胶分布图的方法，起始温度为 80℃。表 27 示出确定熔解分布图的方法，起始温度为 10℃。除非表 26-27 中特别指出，用 Bohlin VOR Rheometer 进行测定，如实施例 106-109 和对比例 2 所述。

表 26

模式	蔓延/保持	温 度 (°C)	时间 (s)	样品 Int. (s)	频 率 (Hz)	Amp. (%)
振荡	蔓延	61	1140	20	0.5	80
振荡	蔓延	10	3060	20	0.5	10

表 27

模式	斜面 / 保持	温 度 (°C)	时间 (s)	样品 Int. (s)	频 率 (Hz)	Amp. (%)
振荡	蔓延	58	2280	20	0.5	10
振荡	蔓延	80	1320	20	0.5	80

表 28

实施例	成分	胶凝温度 (°C)	熔解温度 (°C)	在 40 °C 的 η · (cP)	在 10 °C 的 η · (cP)	G' (Pa)
对 比 例 10	Iota	60.8	65.3	8372	12287	38.4
111	21+nu	37.1	39.2	42	15120	47.3
113	40+nu	22.5	28.8	4.3	6557	20.6
115	40 + nu + 21	49.4	56.8	3979	13560	42.4
对 比 例 11	Nu	—	—	—	—	—

如表 28 所示，酶制品能影响聚合物的胶凝和熔解温度。酶促修饰的聚合物的粘度低于传统的 iota 角叉菜聚糖。粘度和胶凝点的不同可能是由于离子和粘度作用所致，并可以针对酶促制备样品而优化。

本发明结合一些优选的实施方案进行了阐述，因此可更充分理解和应用本发明的各方面，这些实施方案无限制本发明之意。相反，在所附权利要求范围内可对本发明进行修改。

序列

磺基水解酶 I

NH2-末端

KEGCETAIVGAGIGGAYSAFRLASP (SEQ ID NO: 1)

内部肽

GLIGLNNLVTPMEK (SEQ ID NO: 2)

MSGVEQVYFDDLHAQIK (SEQ ID NO: 3)

EIRDRVEELEKEEDYAK (SEQ ID NO: 4)

GRINVEELYAK (SEQ ID NO: 5)

磺基水解酶 II

内部肽

WVVNIVINGVR (SEQ ID NO: 6)

QVLELEFTVVR (SEQ ID NO: 7)

LSPLTFQR (SEQ ID NO: 8)

INDNLVYQXGNLPAGK (SEQ ID NO: 9)

NYNIQNTDGSVFR (SEQ ID NO: 10)

额外的内部肽

MTVEFQ (SEQ ID NO: 11)

磺基水解酶 I 简并寡核苷酸

AAR GAR GGR TGY GAR AC (SEQ ID NO: 12)

磺基水解酶 II 简并寡核苷酸

GTRTTYTGDAIRTRTAGTT (SEQ ID NO: 13)

AANACNYWNCCRTCIGTGTT (SEQ ID NO: 14)

载体引物

ATTAACCCTCACTAAAG

(SEQ ID NO: 15)

AATACGACTCACTATAG

(SEQ ID NO: 16)

磺基水解酶 I 核苷酸序列

(SEQ ID NO: 17)

GACAGCCCTCCCCAACATGGGGCTCACCTACGTTCTTTTGTCTGTTCTTGTCTT
ACAAGCAACCCACGCACTTGCCAAAGAGGGATGCGAGACCGCTATAGTTGGA
GCCGGAATTGGTGGCGCTTATTCTGCCTTCCGTTTGGCAAGCCCATCAGTCTGTA
TCTTTGAAGCCAACCGTCGCCCAGGAGGGCGCATCTTGACCGTTCGGGATCCA
AGCGCCTCGTTTCTGAACCTTCACTATTGACCTTGGTGCGTATCGCTACCATCGT
GCACACCATCGTCTTGTCCGCCTCGTTGCTGAAGACCTACTCAACCTTCCTGTG
GCTTGCTATACGGACTTGCTCAACAACCGAAAAGATTGTCCGGACGCGACGATT
CGTCTCTTTTCAACTCGAGGGAACGTGCTTGGAGCTCTTGGAGGCCGGATTGC
TCAAGACTTAATAAAGAAGTACGGACCGTTCCTGCCATATGTGATTCAGAGGA
GCTTTCGGTGGGGACAAGGAAAGCCCTTGAAGGAAAGACGGACAATGTCTGG
GTTGCTAATCGGGCCAAACTCAGTAATCAAAGAGATCCGAGATCGCGTTGAG
GAGCTTGAGAAAGAGGAAGACTATGCGAAAGCGATGCAGATTGCGGACGAA
ATCATTGCGGCAATGCAAGATGGCTCGTACAGAGGCATCCCGTATTACAGAGA
TCAGTTTGATGCAAGTCGCGATCCGTGAAGGCTTTACGACAGAGGAGATGCA
ACTGGAAACGGACTTCTCATTTCTCAGCAGTGTGGAAAGGCGGCAGACGCTA
GAATACAACGGGCAGCTTTCAATCAGGCAAATGGCACTAGAAAAGGGACTTA
TAGGGCTTAACAATCTAGTGACGCCGATGGAGAAGCGGCGTGGAGTGCTACG
TAGAGCGGGCATGATCACGCTCGTGGACGGCCTGCTTGAGCGGGCGATGAAGGG
CGGTGTGCAGGTACAATATGGGAAGAAGGTCGTGAGAATTACGCGCACCGGA
AATGAGAAGAGGCCTATAAGACTCAAGTTCGAGGACGGCGGGATGGTAGAAG
TGAAGAACGTGATTCTCAACATTGGCAAGCCGGGGCTGATTGCTCTTGGGCTG
GACTCGGAGCCGATGATGAGCACCAAGGAGCCTTTCCGGCGAGCGGTGAGC
GAAACTTTGTGCTGAGCTTATCCAAGACGTATTGTTTCTGGGAAGACGCGTGGT

GGTTGACAAAGTTGGGGCAACGGGATGGGCGTATTCAGGTTCTTCAGATTC
 GATGCAGTCAATGCGATACCACGATGGACACGTCGTGTGCAAGGACGAGAGA
 AGGCTTAAAAGTTGCCGTGGCGGATTGCTCGCGTCGTA CT CGGGGGGCGATC
 AGATGGGGCTTGGGGCTGCTTTGCATGCGCACGTGCATAATGCTAAACCGTACA
 CACCGCTGACAAGCAGTGACAACGTAGTGAAATTGATTCCAGGGAAGATGTC
 TGGAGTAGAGCAAGTATACTTTGATGACCTGCACGCACAAATCAAGCGTGTGCA
 CAAGAGGTCTGGTGGAGCGGAAGGGGCTTGACGTGGACAAGGTGATTTCCAAG
 CCGGCTATGTGCCTATTTGCGGATTGGCGGGAGGTGGGTACTCATGCGGCCA
 TGGGGCCGGGAAAAGGAAGAACGAATGTGTACGAGTTGTACGCTAAACCGG
 TTAGTGATTTGAGAATCGCACTGGTAAACGAAGCGTGGAGTGGGGACCAAG
 GGTGGGCGGAGGGGAGCTTGAGAAGCGCAGAGCGGGCGCTGTTCCACCAAT
 TCGGAATGGAGAAGCCAGAGTGGATGGATAAGGAGTATCACCGGTCGGTGAT
 TGAGAGGTACAACCAGGGGTGATTTGCGCGCGGGCATAACAGTATGCGTGTGCG
 TTCGTGAAGTTGTAGCAAAGGGCTAATCCTTCCACCTGTCGTCTCGGCGCAAA
 GAATAAAAGCTCGAAGATTAGTGGTGACGTTAGAAGTAGGCATACAGAACCA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

磺基水解酶 II 核苷酸序列

(SEQ ID NO: 18)

AAATTTAAAGGAATTTTNAAAAAATTTTAAAGCTTAAATTTGCCATTTGCCAT
 TAAGGTGGGCAATTGTTGGAAAGCGATCGGTTGGGCCTTTTGTGTTTTACGCA
 AGCTGGAAAAGGGGATTGTGCTCCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCAAGGG
 TTTTCCCAGTCAGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTC
 ACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTTCAGAGGCGAAAGGTGTCGTTTACTGAAATCTCAAGTACGGGAGCAACT
 CCGCCCATCTCTACTCATCGTTCACTACAAGTTGCAGACACTATTTACGCTC
 ATCACGAGGTAAGGGAAACGGTACTCGATACCTTTACTCACTCCTCTTAGAC
 AGTGAACCTCGAGCTCAAGAACCTGCCTGCCGTCCACGTTTCGAGCGGCCCAAC
 CTGCGTTCAACCCTGACTCCGTTGATCACAATGTTGACTACCCACCTTGTGCG

GTTATTGAAGCAGTTGTTGAAATGGAACAGCTTGACAGTGTACTTCCCTGGAA
 CCATGTTTCGTGAACGACACAGCTTCCTTGCCGGCCGGCAAGTTGCCGCACTG
 GTACACCAAGTTGTCATTGATACGTCCTCCCTGGGAGCCCGGCGGCCCATCA
 ACGGAAAGGTCGAAATCATCGGACGAATCCCACGCCACGTCCACCACGATCG
 GCCGCACAACCGTCTGGAATGAGACGCAGTCCCTGGCGTCGGACGTCGCGAT
 CGTGCGGAACACGGACCCATCGGTGTTCTGAATGTTGTAGTTGCGGATCGGA
 AGACGGATGCAGAGGTCGTCGAGGAAGTCCTCCTGGTTACCCACAGGGCTAC
 GGCGGGAGACACCCCTGAGTTCGCGCTGGAACGTGAGAGGGGAAAGACGGA
 AGTAGTTTGGCGGGAACGGGTGGCTCAGTCCGTTTGGCCTGTACCTGTTGATG
 GGGGTGGTGCGTGAGCCCGATTCAACGAGGGCAACGCCAGTTTTTGCGGATGC
 TGCCGAGCGTCCGGCCGCGCGGGAAGTTACGGCAGACGGATGCCTGCAGCCC
 GGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTT
 TGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT
 GTTTTCTGTGTGAAATTGGTATCCGCTCACAATTCACACAACATAACCAGCCCC
 GAAACATAAATGTTAAAGCCTGGGTGGCTAATGAGTGAGCTTACTTACATTA
 ATTGGNTTGGCNNTACTTGCCCCTTTTTAAATCGGGGAAACCTTTCNGCCNAC
 TNTNTTAAANAATCGGCCAACCCCCCGGGGANAGGGG

(SEQ ID NO: 19)

TTTTGGCCATTGCCCATCAAGGTGGGCAATTTTTGGAAAGGCGATCGGGTGG
 GGCTTTTGGTAATTACGCAAGCTGCAAAAGGGGAATGTGCTGCAAGCCGAT
 TAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAGAACGTTGTAAACGCGGGCA
 GTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCT
 CGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGATGAAAGG
 TGTCGTTTACTGATACCAAGTACGGCGCAACTCCGCCCATCTCTACTCATCGT
 CACTACAGGTTGCAAACACTATTCCACGACCATGACGATTTAAGGGAACGCT
 ACTTGGGACCTTCCACTCATTCCTCTTAGACGGTGAACCTCGAGCTCGAGAACC
 CTCCTGCCGTCCACATTCGACCGCCCCAACCTGCGTTGAATTCTTACCCCGTT
 GACCACAACGTTCAACACCCACTTCGTACGCTTATTGAAGCAGTTGTTGAAGT

GGAACAGCGTGACCGTGTACTTCCCTCGAACCATGTTTTCTGAAGGACACAGC
 TTCCTTGCCGGCCGGAGAGTCGCCGCACGCGGCCACCAAGTTGTCATTGATA
 CGGCCTCCTACAGATCCAGGGGGACCAACAACGGAAAGGTCGAAGTCATCG
 GACGAATCCCACGCCACGTCCACCACGATCGGCCGCACAACCGTCCGGAATG
 AAAGGCAGTCCCTGGCGTCCGACGTTCGAGATCGTCCGGAACACAGTCCCATC
 CGTGTTCCTGAATGTTGTAGTTGCGGATCGGAAGACGGATGCAGAGGTCGTCG
 AGGAACTCCTCCTGGTTACCCATGGCGCCACGACGAGCGACGCCCTTGCGGT
 CGCGCTGGAATGTCAGAGGCGTCAGACGGAAGTAGTTTCTCGGGAACGCGGG
 TCTCAGTCCATTAGGCCGGTACCTGTTGATCGGCGTGGTGCCTGAGCCTGATT
 CAATGAGCGCCGCGCCAGTGGTGCGAACGTTGCCGAGCGTTCTCCCGCCGGG
 GAAGTTACGGCAGATGAATGCTGAGCGGGAGTAGTCTGGCCCGCGGAGAAG
 GATCTTCGCACCCTTGGGACGCATGGAGCCATCAGCGCGGCAGAAGCGGAAC
 CGGCATGAGCGGCCCGCATTGCGCGTTCGCTGTGAAGGCGATAGCGGCC
 AGGAGAAGGACGAACAGGAATGAAGCGTTCATTGTTGGTATGTGAAGACTGC
 CGCACCGAAATGAAGGCTGCTGGTGCCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCA
 CTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTA
 GTGAGGGTTAATTCGAGCTTGGCGTAATG

(SEQ ID NO: 20)

ATCTCGAAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGG
 TGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACC
 AGCAGCCTTCATTTTCGGTGCGGCAGTCTTCACATACCAACAATGAACGCTTCA
 TTCCTGTTTCGTCCTTCTCCTGGCCGCTATCGCCTTCACAGCGAACGCCCAATG
 CGGCCGCTCATGCCGGTTCGCTTCTGCCGCGCTGATGGCTCCATGCGTCCCA
 AGGGTGCGAAGGTCCTTCTCCGCGGGCCAGACTACTCCCGCTCAGCATTATC
 TGCCGTAACCTTCCCTGGCGGGGAGAACGCTCGGCAACGTTTCGCACCACTGGCG
 CGGCGCTCATTGAATCAGGCTCAGGCACCACGCCGATCAACAGGTACCGGCC
 CAATGGACTGAGACCCGCGTTCCCGAGAACTACTTCCGTCTGACGCCTCTG
 ACATTCCAGCGCGACCGCAAGGGCGTCGCTCGTCGTGGCGCCATGGGTAAACC

AGGAGGAGTTCCTCGACGACCTCTGCATCCGTCTTCCGATCCGCAACTACAAC
 ATTCAGAACAAGGATGGGTCTGTGTTCCGGACGATCTCGACGTCGGACGCCA
 GGGACTGCCTTTCATTCCGGACGGTTGTGCGGCCGATCGTGGTGGACGTGGC
 GTGGGATTCTGTCGATGACTTCGACCTTTCGGTTGTTGGTCCCCCTGGATCTG
 TAGGAGGCCGTATCAATGACAACTTGGTGGCCGCGTGCGGCGACTCTCCGGC
 CGGCAAGGAAGCTGTGTCCTTCGAAAACATGGTTCGAGGGAAGTACACGGTC
 ACGCTGTTCCACTTCAACAACCTGCTTCAATAAGCGTACGAAGTGGGTGGTGA
 ACGTTGTGGTCAACGGGGTAAGGATTCAACGCAGGTTGGGGCGGTGCAATGT
 GGACGGCAGGAGGGTTCTCGAGCTCGAGTTCACCGTCTAAGAGGAATGAGTG
 GAAGGTCCCAAGTAGCGTTCCTTACATCGTCATGGTCGTGGAATAGTGTTTG
 CAACCTGTAGTGACGATGAGTAGAGATGGGCGGAGTTGCGCCGCACTTGGA
 TCAGTAAACGACACCTTTCATCTCTGTTTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAACTC
 GAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGAATTACAATTCA
 CTGGCCGCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGCGTTACCCAACCTA
 ATCGCTTTGAAGACAATCCCTTTTTTCCAACCTGGGGTAAAAACCAAAAGGGC
 CCGCACCAATTCGCCTTTCCAAAAATTTGCCACCCTTAATGGCAAAATGGCAA
 ATTTTAAGCCTTAAATTTTTTTTAAAAATTCCCGTTAAATTTTTTTAAATAAC
 TTATTTTTTTAACCAATAGGCCCAAATCGGGAAAATCCCTTTTAA

(SEQ ID NO: 21)

GAATTCGGCACGAGCAGCCTTCATTTCCGGTGCGGCAGTCTTCACATACCAAC
 AATGAACGCTTCATTCCTGTTCTGTCCTTCTCCTGGCCGCTATCGCCTTCACAG
 CGAACGCCCAATGCGGCCGCTCATGCCGGTTCCGCTTCTGCCGCGCTGATGG
 CTCCATGCGTCCCAAGGGTGCGAAGATCCTTCTCCGCGGGCCAGACTACTCC
 CGCTCAGCATTCTGCCGTAACCTCCCCGGCGGGAGAACGCTCGGCAACG
 TTCGCACCACTGGCGCGGCGCTCATTGAATCAGGCTCAGGCACCACGCCGAT
 CAACAGGTACCGGCCCAATGGACTGAGACCCGCGTTCCCGAGAACTTCTTC
 CGTCTGACGCCTCTGACATTCCAGCGCGACCGCAAGGGCGTCGCTCGTCGTG
 GCGCCATGGGTAAACCAGGAGGAGTTCCTCGACGACCTCTGCATCCGTCTTCC

GATCCGCAACTACAACATTCAGAACAAGGATGGGTCTGTGTTCCGGACGATC
 TCGACGTCGGACGCCAGGGACTGCCTTTCATTCCGGACGGTTGTGCGGCCGA
 TCGTGGTGGACGTGGCGTGGGATTCGTCCGATGACTTCGACCTTTCGGTTGTT
 GGTCCCCCTGGATCTGTAGGAGGCCGTATCAATGACAACTTGGTGGCCGCGT
 GCGGCGACTCTCCGGCCGGCAAGGAAGCTGTGTCCTTCGAAAACATGGTTTCG
 AGGGAAGTACACGGTCACGCTGTTCCACTTCAACAACTGCTTCAATAAGCGT
 ACGAAGTGGGTGGTGAACGTTGTGGTCAACGGGGTAAGGATTCAACGCAGGT
 TGGGGCGGTCTGAATGTGGACGGCAGGAGGGTTCTCGAGCTCGAGTTCACCGT
 CTAAGAGGAATGAGTGGAAGGTCCCAAGTAGCGTTCCTTACATCGTCATGG
 TCGTGGAATAGTGTGTTGCAACCTGTAGTGACGATGAGTAGAGATGGGCGGAG
 TTGCGCCGCACTTGGTATCAGTAAACGACACCTTTCATCTCTGTTCGAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAG

磺基水解酶 I 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 22)

MGLTYVLLSVLVLQATHALAKEGCETAIVGAGIGGAY
 SAFRLASPSVCIFEANRRPGGRILTVRDPSASFLNFTID
 LGAYRYHRAHHRLVRLVAEDLLNLPVACYTDLLNNR
 KDCPDATIRLFSTRGNVLGALGGRIAQDLIKKYGPFLP
 YVIQRSFRWGQGKPLKERRTMSGLLIGPNSVIKEIRD
 VEELEKEEDYAKAMQIADDEHAAMQDGSYRGIPYSEIS
 LMQVAIREGFTTEEMQLETDFFSFLSSVERRQTLEYNG
 QLSIRQMALEKGLIGLNNLVTPMEKRRGVLRRAAGMIT
 LVDGLLERAMKGGVQVQYGKKVVRITRTGNEKRPIR
 LKFEDGGMVEVKNVILNIGKPGLIALGLDSEPMSTK
 EPFRAVERNFVLSLSKTYCFWEDAWWLTCLGQRDG
 RIQVPSDSMQSMRYHDGHVVCKDERRLKSCRGGLLA
 SYSGGDQMGLGAALHAHVHNAKPYTPLTSSDNVVKL
 IPGKMSGVEQVYFDDLHAQIKRVHKRSVERKGLDVD

KVISKPAMCLFADWREVGTHAAMGPGKGRTNVYELY
AKPVSDLRIALVNEAWSGDQGWAEGLRSAERALFH
QFGMEKPEWMDKEYHRSVIERYNQG

磺基水解酶 II 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 23)

MNASFLFVLNLAAIAFTANAQCGRSCRFRFCRADGSMRPGAKILLRGPD
YSRSAFICRNFPGGRTLGNVRTTGAALIESGSGTTPINRYRPNGLRPAFPRN
FFRLTPLTFQRDRKGVARRGANGNQEEFLDDLCIRLPINYNIQNKDGSVF
RTISTSDARDCLSFRTVVRPIVVDVAWDSSDDFDLSVVGPPGSVGGRINDN
LVAACGDSPAGKEAVSFENMVRGKYTVTLFHFNNCFNKRTKWVVNVVV
NGVRIQRRLGRSNVDGRRVLELEFTV

序列表

<110> 萨比娜·热尼科
 伯恩哈德·克洛阿雷
 菲利普·波坦
 布伯恩·鲁道夫
 格哈德·德勒伊特
 贝亚·彭尼霍夫
 奥迪勒·理查德

<120> 磺基水解酶，其相应的氨基酸序列和核苷酸序列，磺基水解酶制备物，方法及其产物

<130> P18666的序列公开

<140>

<141>

<150> 60/133,376

<151> 1999-05-10

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> 皱波角叉菜

<400> 1

Lys Glu Gly Cys Glu Thr Ala Ile Val Gly Ala Gly Ile Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Tyr Ser Ala Phe Arg Leu Ala Ser Pro
 20 25

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 皱波角叉菜

<400> 2

Gly Leu Ile Gly Leu Asn Asn Leu Val Thr Pro Met Glu Lys
 1 5 10

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 3
 Met Ser Gly Val Glu Gln Val Tyr Phe Asp Asp Leu His Ala Gln Ile
 1 5 10 15

Lys

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 4
 Glu Ile Arg Asp Arg Val Glu Glu Leu Glu Lys Glu Glu Asp Tyr Ala
 1 5 10 15

Lys

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 5
 Gly Arg Thr Asn Val Tyr Glu Leu Tyr Ala Lys
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 6
 Trp Val Val Asn Ile Val Ile Asn Gly Val Arg
 1 5 10

<210> 7

<211> 11
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 7
 Gln Val Leu Glu Leu Glu Phe Thr Val Val Arg
 1 5 10

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 8
 Leu Ser Pro Leu Thr Phe Gln Arg
 1 5

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 9
 Ile Asn Asp Asn Leu Val Tyr Gln Xaa Gly Asn Leu Pro Ala Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 10
 Asn Tyr Asn Ile Gln Asn Thr Asp Gly Ser Val Phe Arg
 1 5 10

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 11
 Met Thr Val Glu Phe Gln
 1 5

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 12
 Ala Ala Arg Gly Ala Arg Gly Gly Arg Thr Gly Tyr Gly Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Cys

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 13
 Gly Thr Arg Thr Thr Tyr Thr Gly Asp Ala Thr Arg Thr Thr Arg Thr
 1 5 10 15

Ala Gly Thr Thr
 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 皱波角叉菜

<400> 14
 Ala Ala Asn Ala Cys Asn Tyr Trp Asn Cys Cys Arg Thr Cys Ile Gly
 1 5 10 15

Thr Gly Thr Thr
 20

<210> 15
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 皱波角叉菜

<400> 15
 attaacccctc actaaag

17

<210> 16
<211> 17
<212> DNA
<213> 皱波角叉菜

<400> 16
aatacgactc actatag

17

<210> 17
<211> 2020
<212> DNA
<213> 皱波角叉菜

<400> 17
gacagccctc cccaacatgg ggetcaccta cgttctcttg tctgttcttg tcttacaagc 60
aaccacgcga cttgccaaag agggatgcga gaccgctata gttggagccg gaattggtgg 120
cgcttattct gccttccgtt tggcaagccc atcagtcctgt atctttgaag ccaaccgtcg 180
cccaggaggg cgcattctga ccgttcggga tccaagcgcc tcgtttctga acttcaactat 240
tgacctgggt gcgtatcgct accatcgtgc acaccatcgt cttgtccgcc tcgttgctga 300
agacctactc aaccttcctg tggcttgcta tacggacttg ctcaacaacc gaaaagattg 360
tccggacgcg acgattcgtc tcttttcaac tcgaggggaac gtgcttgagg ctcttgagg 420
ccggattgct caagacttaa taaagaagta cggaccgttc ctgccatatg tgattcagag 480
gagctttcgg tggggacaag gaaagccctt gaaggaaaga cggacaatgt ctgggttgct 540
aatcgggcca aactcagtaa tcaagagat ccgagatcgc gttgaggagc ttgagaaaga 600
ggaagactat gcgaaagcga tgcagattgc ggacgaaatc attgcggaac tgcaagatgg 660
ctcgtacaga ggcattccgt attcagagat cagtttgatg caagtcgcga tccgtgaagg 720
ctttacgaca gaggagatgc aactggaaac ggacttctca tttctcagca gtgtggaaag 780
gcggcagacg ctagaataca acgggcagct ttcaatcagg caaatggcac tagaaaagg 840
acttataggg cttaacaatc tagtgacgcc gatggagaag cggcgtggag tgctacgtag 900
agcgggcatg atcacgctcg tggacggcct gcttgagcgg gcgatgaagg gcggtgtgca 960
ggtacaatat gggaaagaagg tcgtgagaat tacgcgcacc ggaaatgaga agaggcctat 1020
aagactcaag ttcgaggacg gcgggatggg agaagtgaag aacgtgattc tcaacattgg 1080
caagccgggg ctgattgctc ttgggctgga ctcgagccg atgatgagca ccaaggagcc 1140
tttccggcga gcggtcgagc gaaactttgt gctgagctta tccaagacgt attgtttctg 1200
ggaagacgcg tgggtggtga caaagtggg gcaacgggat gggcgtattc aggttccttc 1260
agattcgatg cagtcaatgc gataccacga tggacacgct gtgtgcaagg acgagagaag 1320
gcttaaaagt tgccgtggcg gattgctcgc gtcgtactcg gggggcgatc agatggggct 1380
tggggctgct ttgcatgccc acgtgcataa tgctaaccg tacacaccgc tgacaagcag 1440
tgacaacgta gtgaaattga ttccagggaa gatgtctgga gtagagcaag tatactttga 1500
tgacctgcac gcacaaatca agcgtgtgca caagaggtcg gtggagcgga aggggcttga 1560
cgtggacaag gtgatttcca agccggctat gtgcctattt gcggattggc gggaggtggg 1620
tactcatgcg gccatggggc cgggaaaagg aagaacgaat gtgtacgagt tgtacgctaa 1680
accggttagt gatcttgaga tcgcactggt aaacgaagcg tggagtgggg accaaggggtg 1740
ggcggagggg agcttgagaa gcgcagagcg ggcgctgttc caccaattcg gaatggagaa 1800
gccagagtgg atggataagg agtatcaccg gtcggtgatt gagaggatca accaggggtg 1860
atttcggcgc gggcatacag tatgcgtgct gttcgtgaag ttgtagcaaa gggctaatacc 1920
ttccacctgt cgtctcggcg caaagaataa aagctcgaag attagtgggt acgttagaag 1980
taggcataca gaaccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2020

<210> 18
 <211> 1399
 <212> DNA
 <213> 皱波角叉菜

<400> 18
 aaattttaag gaatttttnaa aaaatttttaa agctttaaatt tgccatttgc cattaagggtg 60
 ggcaattgtt ggaaagcgat cggttggggc tttttgtttt tacgcaagct ggaaaagggg 120
 attgtgctcc aaggcgatta agttgggtta cgcaaggggt tttccagtc gacgttgtaa 180
 aacgacggcc agtgaattgt aatacgactc actatagggt gaattgggtta ccgggcccc 240
 cctcgagttt tttttttttt ttttttttca gaggcgaaaag gtgtcgttta ctgaaatctc 300
 aagtacggga gcaactccgc ccatctctac tcatcgttca ctacaagttg cagacactat 360
 ttcacgctca tcacgaggtta agggaaacgg tactcgatac ctttactcac tctctttaga 420
 cagtgaactc gagctcaaga acctgcctgc cgtccacgtt cgagcggccc aacctgcgtt 480
 caaccctgac tccgttgatc acaatgttga ctaccacact tgtgcggtta ttgaagcagt 540
 tgttgaaatg gaacagcttg acagtgtact tccctggaac catgttcgtg aacgacacag 600
 cttccttgcc ggccggcaag ttgccgact ggtacaccaa gttgtcattg atacgtcctc 660
 cctgggagcc cggcggccca tcaacggaaa ggtcgaaatc atcggacgaa tcccacgcca 720
 cgtccaccac gatcggccgc acaaccgtct ggaatgagac gcagtccctg gcgtcggacg 780
 tcgcatcgt gcggaacacg gaccatcgg tgttctgaat gttgtagttg cggatcggaa 840
 gacggatgca gaggtcgtcg aggaagtcct cctggttacc cacagggtta cggcgggaga 900
 cacccttgag ttgcgctgg aacgtgagag gggaaagacg gaagtgtttt ggcgggaacg 960
 ggtggctcag tccgtttggc ctgtacctgt tgatgggggt ggtgcgtgag cccgattcaa 1020
 cgagggcaac gccagttttg cggatgctgc cgagcgtccg gccgccggg aagttacggc 1080
 agacggatgc ctgcagccc ggggatccac tagttctaga gcggccgcca ccgggtgga 1140
 gctccagctt ttgttccctt tagtgagggt taatttcgag cttggcgtaa tcatggtcat 1200
 agctgttttc tgtgtgaaat tggtatccgc tcacaattca cacaacatac cagccccgaa 1260
 acataaatgt taaagcctgg gtggctaag agtgagctta cttacattaa ttggnctggc 1320
 nntacttgcc ctttttttaa tcggggaaac ctttcngccn actntnttaa anaatcggcc 1380
 aaccccccg gganaagggg 1399

<210> 19
 <211> 1387
 <212> DNA
 <213> 皱波角叉菜

<400> 19
 tttttgcccc ttgccatca aggtgggcaa tttttggaaa ggcgatcggg tggggccttt 60
 tggtaattac gcaagctgca aaaggggaat gtgctgcaag ccgattaagt tgggtaacgc 120
 cagggttttc ccagtcagaa cgttgtaaac gcgggcagtg aattgtaata cgactcacta 180
 tagggcgaat tgggtaccgg gccccctc gagttttttt tttttttttt tttttttttt 240
 tttttttttt tttggagatg aaaggtgtcg tttactgata ccaagtacgg cgcaactccg 300
 cccatctcta ctcatcgtca ctacaggttg caaacactat tccacgacca tgacgattta 360
 agggaaacgt acttgggacc ttccactcat tctctttaga cggtgaaact gagctcgaga 420
 accctcctgc cgtccacatt cgaccgccc aacctgcgtt gaattcttac ccggttgacc 480
 acaacgttca ccaccactt cgtacgttta ttgaagcagt tgttgaagtg gaacagcgtg 540
 accgtgtact tccctcgaac catgttttcg aaggacacag cttccttgcc ggccggagag 600

```

tcgccgcacg cggccaccaa gttgtcattg atacggcctc ctacagatcc aggggggacca 660
acaacggaaa ggtcgaagtc atcggacgaa tcccacgcca cgtccaccac gatcggccgc 720
acaaccgtcc ggaatgaaag gcagtccttg gcgtccgacg tcgagatcgt ccggaacaca 780
gtcccatccg tgttctgaat gttgtagttg cggatcggaa gacggatgca gaggtcgtcg 840
aggaactcct cctggttacc catggcgcca cgacgagcga cgcctctgcg gtcgcgctgg 900
aatgtcagag gcgtcagacg gaagtagttt ctcgggaaac cgggtctcag tccattaggg 960
cggtagctgt tgatcggcgt ggtgcctgag cctgattcaa tgagcgccgc gccagtggtg 1020
cgaacgttgc cgagcgttct cccgccgggg aagttacggc agatgaatgc tgagcgggag 1080
tagtctggcc cgcggaagag gatcttcgca cctctgggac gcatggagcc atcagcgcg 1140
cagaagcgga accggcatga gcggccgcac tcgcgcttcg ctgtgaaggc gatagcgggc 1200
aggagaagga cgaacaggaa tgaagcgttc attgttggtg tgtgaagact gccgcaccga 1260
aatgaaggct gctgggtgcc aattcctgca gcccggggga tccactagtt ctagagcggc 1320
cgccaccgcg gtggagctcc agcttttgtt cctcttagtg agggttaatt tcgagcttgg 1380
cgtaatg
1387

```

<210> 20

<211> 1460

<212> DNA

<213> 皱波角叉菜

<400> 20

```

atctcgaaat taaccctcac taaagggaaac aaaagctgga gctccaccgc ggtggcgggc 60
gctctagaac tagtggatcc cccgggctgc aggaattcgg caccagcagc cttcatttcg 120
gtgcggcagt cttcacatac caacaatgaa cgcttcattc ctgttcgtcc ttctcctggc 180
cgctatcgcc ttcacagcga acgccaatg cggccgctca tgccggttcc gcttctgccc 240
cgctgatggc tccatgcgtc ccaagggtgc gaaggctcct ctccgcgggc cagactactc 300
ccgctcagca ttcatctgcc gtaacttccc tggcgggaga acgctcggca acgttcgcac 360
cactggcgcg gcgctcattg aatcaggctc aggcaccacg ccgatcaaca ggtaccggcc 420
caatggactg agaccgcgtt tcccgagaaa ctacttccgt ctgacgcctc tgacattcca 480
gcgcgaccgc aaggcgctcg ctcgctcgtg cgccatgggt aaccaggagg agttcctcga 540
cgacctctgc atccgtcttc cgatccgcaa ctacaacatt cagaacaagg atgggtctgt 600
gttccggacg atctcgacgt cggacgccag ggactgcctt tcattccgga cggttgtgcg 660
gccgatcgtg gtggacgtgg cgtgggattc gtccgatgac ttcgaccttt ccgttggttg 720
tccccctgga tctgtaggag gccgtatcaa tgacaacttg gtggccgctg gcggcgactc 780
tccggccggc aaggaaagctg tgtccttcga aaacatgggt cgagggaaag acacgggtcac 840
gctgttccac ttcaacaact gcttcaataa gcgtacgaag tgggtgggtg acgttggtgg 900
caacggggta aggatccaac gcaggttggg gcggtcgaat gtggacggca ggagggttct 960
cgagctcgag ttaccgctct aagaggaaat agtggaaagg cccaagtagc gttcccttac 1020
atcgctcatg tcgtggaata gtgtttgcaa cctgtagtga cgatgagtag agatgggcgg 1080
agttgcgccc cacttggtat cagtaaacga cacctttcat ctctgttcga aaaaaaaaaa 1140
aaaaaaaaact cgaggggggg cccggtaccc aattcgccct atagtgagtc gaattacaat 1200
tactggcccg cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaaacc tcggttacc aacttaatcg 1260
ctttgaagac aatccctttt tccaacttgg ggtaaaaacc aaaagggccc gcaccattcg 1320
cctttccaaa aatttgccca cccttaatgg caaaatggca aattttaagc cttaaatttt 1380
tttcaaaaat tcccgttaaa tttttttaa ataaacttatt tttttaacca ataggcccaa 1440
atcgggaaaa tcccttttaa
1460

```

<210> 21

<211> 1068

<212> DNA

<213> 皱波角叉菜

<400> 21

```

gaattcggca cgagcagcct tcatttcggt gcggcagctt tcacatacca acaatgaacg 60
cttcattect gttcgtcctt ctcttgccg ctatcgctt cacagcgaac gcccaatgcg 120
gcegtcatg ccggttcgcg ttctgcccgc ctgatggctc catgcgtccc aaggggtgca 180
agatccttct ccgcgggcca gactactccc gctcagcatt catctgccgt aacttccccg 240
gcggggagaac gctcggcaac gttcgcacca ctggcgcggc gtcattgaa tcagggtcag 300
gcaccacgcc gatcaacagg taccggccca atggactgag acccgcgctc ccgagaaact 360
tcttccgtct gacgcctctg acattccagc gcgaccgcaa gggcgctcgt cgtcgtggcg 420
ccatgggtaa ccaggaggag ttctcgacg acctctgcat ccgtcttccg atccgcaact 480
acaacattca gaacaaggat gggctctgtg tccggacgat ctcgacgtcg gacgccaggg 540
actgcctttc attccggacg gttgtgcggc cgatcgtggg ggacgtggcg tgggattcgt 600
ccgatgaatt cgacctttcc gttgttggtc cccctggatc tgtaggaggc cgtatcaatg 660
acaacttggt ggccgcgtgc ggcgactctc cgcccgcaa ggaagctgtg tccttcgaaa 720
acatggttcg agggaagtac acggtcacgc tgttccactt caacaactgc ttcaataagc 780
gtacgaagtg ggtggtgaac gttgtggtca acggggtaag gattcaacgc aggttggggc 840
ggtcgaatgt ggacggcagg agggttctcg agctcgagtt caccgtctaa gaggaatgag 900
tggaagggtc caagtagcgt tcccttacat cgtcatggtc gtggaatagt gtttgcaacc 960
tgtagtgacg atgagtagag atgggcggag ttgcgccgca cttggtatca gtaaacgaca 1020
cctttcatct ctgttcgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aactcgag 1068

```

<210> 22

<211> 614

<212> PRT

<213> 皱波角叉菜

<400> 22

```

Met Gly Leu Thr Tyr Val Leu Leu Ser Val Leu Val Leu Gln Ala Thr
  1                      5                      10                     15

His Ala Leu Ala Lys Glu Gly Cys Glu Thr Ala Ile Val Gly Ala Gly
      20                      25                     30

Ile Gly Gly Ala Tyr Ser Ala Phe Arg Leu Ala Ser Pro Ser Val Cys
      35                      40                     45

Ile Phe Glu Ala Asn Arg Arg Pro Gly Gly Arg Ile Leu Thr Val Arg
      50                      55                     60

Asp Pro Ser Ala Ser Phe Leu Asn Phe Thr Ile Asp Leu Gly Ala Tyr
      65                      70                     75                     80

Arg Tyr His Arg Ala His His Arg Leu Val Arg Leu Val Ala Glu Asp
      85                      90                     95

```

Leu Leu Asn Leu Pro Val Ala Cys Tyr Thr Asp Leu Leu Asn Asn Arg
 100 105 110
 Lys Asp Cys Pro Asp Ala Thr Ile Arg Leu Phe Ser Thr Arg Gly Asn
 115 120 125
 Val Leu Gly Ala Leu Gly Gly Arg Ile Ala Gln Asp Leu Ile Lys Lys
 130 135 140
 Tyr Gly Pro Phe Leu Pro Tyr Val Ile Gln Arg Ser Phe Arg Trp Gly
 145 150 155 160
 Gln Gly Lys Pro Leu Lys Glu Arg Arg Thr Met Ser Gly Leu Leu Ile
 165 170 175
 Gly Pro Asn Ser Val Ile Lys Glu Ile Arg Asp Arg Val Glu Glu Leu
 180 185 190
 Glu Lys Glu Glu Asp Tyr Ala Lys Ala Met Gln Ile Ala Asp Glu Ile
 195 200 205
 Ile Ala Ala Met Gln Asp Gly Ser Tyr Arg Gly Ile Pro Tyr Ser Glu
 210 215 220
 Ile Ser Leu Met Gln Val Ala Ile Arg Glu Gly Phe Thr Thr Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Gln Leu Glu Thr Asp Phe Ser Phe Leu Ser Ser Val Glu Arg Arg
 245 250 255
 Gln Thr Leu Glu Tyr Asn Gly Gln Leu Ser Ile Arg Gln Met Ala Leu
 260 265 270
 Glu Lys Gly Leu Ile Gly Leu Asn Asn Leu Val Thr Pro Met Glu Lys
 275 280 285
 Arg Arg Gly Val Leu Arg Arg Ala Gly Met Ile Thr Leu Val Asp Gly
 290 295 300
 Leu Leu Glu Arg Ala Met Lys Gly Gly Val Gln Val Gln Tyr Gly Lys
 305 310 315 320
 Lys Val Val Arg Ile Thr Arg Thr Gly Asn Glu Lys Arg Pro Ile Arg
 325 330 335
 Leu Lys Phe Glu Asp Gly Gly Met Val Glu Val Lys Asn Val Ile Leu
 340 345 350

Asn Ile Gly Lys Pro Gly Leu Ile Ala Leu Gly Leu Asp Ser Glu Pro
 355 360 365

Met Met Ser Thr Lys Glu Pro Phe Arg Arg Ala Val Glu Arg Asn Phe
 370 375 380

Val Leu Ser Leu Ser Lys Thr Tyr Cys Phe Trp Glu Asp Ala Trp Trp
 385 390 395 400

Leu Thr Lys Leu Gly Gln Arg Asp Gly Arg Ile Gln Val Pro Ser Asp
 405 410 415

Ser Met Gln Ser Met Arg Tyr His Asp Gly His Val Val Cys Lys Asp
 420 425 430

Glu Arg Arg Leu Lys Ser Cys Arg Gly Gly Leu Leu Ala Ser Tyr Ser
 435 440 445

Gly Gly Asp Gln Met Gly Leu Gly Ala Ala Leu His Ala His Val His
 450 455 460

Asn Ala Lys Pro Tyr Thr Pro Leu Thr Ser Ser Asp Asn Val Val Lys
 465 470 475 480

Leu Ile Pro Gly Lys Met Ser Gly Val Glu Gln Val Tyr Phe Asp Asp
 485 490 495

Leu His Ala Gln Ile Lys Arg Val His Lys Arg Ser Val Glu Arg Lys
 500 505 510

Gly Leu Asp Val Asp Lys Val Ile Ser Lys Pro Ala Met Cys Leu Phe
 515 520 525

Ala Asp Trp Arg Glu Val Gly Thr His Ala Ala Met Gly Pro Gly Lys
 530 535 540

Gly Arg Thr Asn Val Tyr Glu Leu Tyr Ala Lys Pro Val Ser Asp Leu
 545 550 555 560

Arg Ile Ala Leu Val Asn Glu Ala Trp Ser Gly Asp Gln Gly Trp Ala
 565 570 575

Glu Gly Ser Leu Arg Ser Ala Glu Arg Ala Leu Phe His Gln Phe Gly
 580 585 590

Met Glu Lys Pro Glu Trp Met Asp Lys Glu Tyr His Arg Ser Val Ile
 595 600 605

Glu Arg Tyr Asn Gln Gly
610

<210> 23

<211> 278

<212> PRT

<213> 皱波角叉菜

<400> 23

Met Asn Ala Ser Phe Leu Phe Val Leu Asn Leu Ala Ala Ile Ala Phe
1 5 10 15

Thr Ala Asn Ala Gln Cys Gly Arg Ser Cys Arg Phe Arg Phe Cys Arg
20 25 30

Ala Asp Gly Ser Met Arg Pro Lys Gly Ala Lys Ile Leu Leu Arg Gly
35 40 45

Pro Asp Tyr Ser Arg Ser Ala Phe Ile Cys Arg Asn Phe Pro Gly Gly
50 55 60

Arg Thr Leu Gly Asn Val Arg Thr Thr Gly Ala Ala Leu Ile Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ser Gly Thr Thr Pro Ile Asn Arg Tyr Arg Pro Asn Gly Leu Arg
85 90 95

Pro Ala Phe Pro Arg Asn Phe Phe Arg Leu Thr Pro Leu Thr Phe Gln
100 105 110

Arg Asp Arg Lys Gly Val Ala Arg Arg Gly Ala Asn Gly Asn Gln Glu
115 120 125

Glu Phe Leu Asp Asp Leu Cys Ile Arg Leu Pro Ile Arg Asn Tyr Asn
130 135 140

Ile Gln Asn Lys Asp Gly Ser Val Phe Arg Thr Ile Ser Thr Ser Asp
145 150 155 160

Ala Arg Asp Cys Leu Ser Phe Arg Thr Val Val Arg Pro Ile Val Val
165 170 175

Asp Val Ala Trp Asp Ser Ser Asp Asp Phe Asp Leu Ser Val Val Gly
180 185 190

Pro Pro Gly Ser Val Gly Gly Arg Ile Asn Asp Asn Leu Val Ala Ala
195 200 205

Cys Gly Asp Ser Pro Ala Gly Lys Glu Ala Val Ser Phe Glu Asn Met
 210 215 220

Val Arg Gly Lys Tyr Thr Val Thr Leu Phe His Phe Asn Asn Cys Phe
 225 230 235 240

Asn Lys Arg Thr Lys Trp Val Val Asn Val Val Val Asn Gly Val Arg
 245 250 255

Ile Gln Arg Arg Leu Gly Arg Ser Asn Val Asp Gly Arg Arg Val Leu
 260 265 270

Glu Leu Glu Phe Thr Val
 275