(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 110268047 B
(45)授权公告日 2022.01.18

(21)申请号 201780079529.9
(22)申请日 2017.12.22
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110268047 A
(43)申请公布日 2019.09.20
(66)本国优先权数据
201611195653.5 2016.12.22 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.06.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2017/117986 2017.12.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/113775 ZH 2018.06.28
(83)生物保藏信息
CCTCC M 2017174 2017.04.10
(73)专利权人 深圳市海普瑞药业集团股份有限公司
地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术园朗山路21号
(72)发明人 李锂 白佳珂 高金亮 马小来
(74)专利代理机构 北京永新同创知识产权代理有限公司 11376
代理人 栾星明 王子楠
(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
C12N 9/88(2006.01)
C12P 19/26(2006.01)
C12Q 1/527(2006.01)
C12R 1/38(2006.01)
(56)对比文件
CN 104593347 A,2015.05.06
UniProtKB-I4JHK3(I4JHK3_PSEST).Heparinase II/III.《UniProt》.2012,全文.
审查员 王帆

权利要求书3页 说明书12页
序列表4页 附图1页

(54)发明名称

产肝素酶的施氏假单胞菌菌株及从其衍生的肝素酶

(57)摘要

提供一个产肝素酶的施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)菌株及从其衍生的肝素酶。还提供该肝素酶的制备和应用。

CN 110268047 B

1.一种施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)菌株,所述菌株以保藏号:CCTCC M 2017174保藏于中国典型培养物保藏中心。

2.一种权利要求1的施氏假单胞菌菌株在生产肝素酶中的应用。

3.一种生产肝素酶的方法,包括培养权利要求1的施氏假单胞菌菌株,裂解培养获得的施氏假单胞菌细胞,从裂解产物分离和/或纯化肝素酶。

4.一种衍生自权利要求1所述施氏假单胞菌菌株的肝素酶,其中所述肝素酶具有以下特征:

i) 94716 Da的分子量;

ii) 5.76的等电点;

iii) 分别以肝素(HEP)和硫酸乙酰肝素(HS)为底物时,酶活比HEP/HS为1:4.3;

iv) 以HEP为底物时,米氏常数为0.09;和

v) 以HS为底物时,米氏常数为0.25。

5.一种肝素酶的制备方法,其包含以下步骤:

a) 培养权利要求1的施氏假单胞菌菌株并收集经培养的细菌细胞;

b) 在缓冲液中重悬并裂解步骤a)中获得的细胞,并在离心后收集上清液;

c) 步骤b)中获得的上清液进行20%-100%饱和度的硫酸铵沉淀,将所得沉淀溶解于缓冲液并针对所述缓冲液透析;

d) 将步骤c)的产物上样于阴离子交换柱,以缓冲液平衡所述柱,收集上样流穿液和平衡流穿液,将收集的上样流穿液和平衡流穿液针对缓冲液透析;

e) 将步骤d)的产物上样至阳离子交换柱,以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液线性梯度洗脱,收集具有肝素酶活性的洗脱液级分,并将所收集的洗脱液针对缓冲液进行透析。

6.根据权利要求5所述的制备方法,所述阴离子交换柱为Q-Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose Big Beads、Q-Sepharose XL或Q-Sepharose High Performance柱;

所述阳离子交换柱为SP-Sepharose Fast Flow柱;

所述氯化钠溶液浓度为0-0.5 M。

7.根据权利要求5所述的制备方法,其进一步包括一或多个亲和层析步骤对所述肝素酶进行进一步纯化,所述一或多个亲和层析步骤使用肝素酶亲和柱进行。

8.根据权利要求7所述的制备方法,所述肝素酶亲和柱为Cellufine Sulfate柱或结合肝素的CNBr-activated Sepharose CL-4B柱。

9.根据权利要求5所述的制备方法,其进一步包括以下步骤:

f) 将步骤e)的产物上样至肝素酶亲和柱,以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液线性梯度洗脱,收集具有肝素酶活性的洗脱液级分,并将收集的洗脱液针对缓冲液进行透析。

10.根据权利要求9所述的制备方法,所述肝素酶亲和柱为Cellufine Sulfate柱或结合肝素的CNBr-activated Sepharose CL-4B肝素酶亲和柱;

所述氯化钠溶液的浓度为0.15-0.6M。

11.一种权利要求4所述肝素酶的制备方法,其包含以下步骤:

a) 培养权利要求1的施氏假单胞菌菌株并收集经培养的细菌细胞;

b) 在缓冲液中重悬并裂解步骤a)中获得的细胞,并在离心后收集上清液;

c) 步骤b)中获得的上清液进行20%-100%饱和度的硫酸铵沉淀,将所得沉淀溶解于缓冲液并针对所述缓冲液透析;

d) 将步骤c)的产物上样于阴离子交换柱,以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液线性梯度洗脱,收集洗脱液中具有肝素酶活性的级分,并将收集的洗脱液针对缓冲液透析。

12.根据权利要求11所述的制备方法,所述阴离子交换柱为Q-Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose Big Beads、Q-Sepharose XL或Q-Sepharose High Performance柱;

所述氯化钠溶液的浓度为0-0.5 M。

13.根据权利要求11所述的制备方法,其进一步包括一或多个亲和层析步骤对所述肝素酶进行进一步纯化,所述一或多个亲和层析步骤使用肝素酶亲和柱进行。

14.根据权利要求13所述的制备方法,所述肝素酶亲和柱为Cellufine Sulfate柱或结合肝素的CNBr-activated Sepharose CL-4B肝素酶亲和柱。

15.根据权利要求11所述的制备方法,其进一步包括以下步骤:

e) 将步骤d)的产物上样至肝素酶亲和柱,以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液线性梯度洗脱,收集洗脱液中具有肝素酶活性的级分,并将收集的洗脱液针对缓冲液进行透析;

f) 将步骤e)的产物上样至肝素酶亲和柱,以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液等度洗脱,收集洗脱液中具有肝素酶活性的级分;和

g) 将步骤f)的产物上样至肝素酶亲和柱,以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液线性梯度洗脱,收集具有肝素酶活性的洗脱液级分,并将收集的洗脱液针对缓冲液进行透析。

16.根据权利要求15所述的制备方法,其中,步骤e)、f)和g) 中所述的肝素酶亲和柱各自为Cellufine Sulfate柱;

步骤e)中所述的氯化钠溶液浓度为0.05-0.5 M;

步骤f)中所述的氯化钠溶液浓度为2.5 M;

步骤g)中所述的氯化钠溶液浓度为0-0.5 M。

17.一种肝素酶,其由SEQ ID NO:2所示氨基酸序列组成或由SEQ ID NO:2所示氨基酸序列以及接头和/或标签组成。

18.一种分离的多核苷酸,其包含编码权利要求17的肝素酶的核苷酸序列。

19.权利要求18的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

20.一种表达构建体,其包含与表达调控序列可操作地连接的权利要求18或19的多核苷酸。

21.宿主细胞,其包含权利要求18或19的多核苷酸或以权利要求20的表达构建体转化,并且能够表达所述肝素酶。

22.产生权利要求17的肝素酶的方法,包括:

a) 在允许所述肝素酶表达的条件下培养权利要求21的宿主细胞;

b) 从得自步骤a)的培养物获得由所述宿主细胞表达的肝素酶;及

c)进一步纯化得自步骤b)的肝素酶。

23.权利要求1的施氏假单胞菌菌株、权利要求4或17所述的肝素酶或权利要求21的宿主细胞在生产低分子肝素或超低分子肝素中或在肝素、分子肝素或超低分子肝素的质量检测中的应用。

24.一种生产低分子肝素或超低分子肝素的方法，包括使肝素与权利要求1的施氏假单胞菌菌株、权利要求4或17所述的肝素酶或权利要求21的宿主细胞接触。

产肝素酶的施氏假单胞菌菌株及从其衍生的肝素酶

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域。具体而言，本发明涉及一个产肝素酶的施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)菌株及从其衍生的肝素酶。此外，本发明还涉及所述肝素酶的制备和应用。

背景技术

[0002] 肝素酶是指一类能够特异性裂解肝素和类肝素主链糖苷键的酶，其应用十分广泛，如:清除血液中残存肝素、制备低分子肝素、用于肝素结构的研究和质量检测等。肝素酶最初是从肝素黄杆菌中发现并分离出来的，其后又陆续在一些微生物和动物组织中也发现了肝素酶的存在。目前有论文报道的肝素酶有20多种，例如Yang V.C.从肝素黄杆菌中发现肝素酶I、II、III，Robert W.Bellamy等人从杆菌属BH100(FERM BP-2613)细菌中发现的分泌于胞外的肝素酶，Wan-Seok Kim等人从粪便拟杆菌HJ-15中发现一种肝素裂解酶(Carbohydrate Research,2012,359:37-43)。中国专利申请201410839278.8披露了从Sphingobacterium daejeonense细菌中得到的新型肝素酶SDhepI和SDhepII。中国专利申请201510040524.8披露了从脑膜脓毒性金黄杆菌(Chryseobacterium meningosepticum)细菌中得到新型肝素酶CMhepI。上述酶均为不同的肝素酶。

[0003] 目前研究和应用最广泛的是来自肝素黄杆菌的肝素酶I、肝素酶II、肝素酶III，他们分别是分子量大约为43、78、66kDa的单体蛋白质，等电点均在9.0左右。肝素酶的发现为肝素结构研究和质量检测起了重要的推动作用，其中产自肝素黄杆菌的酶I、II、III已经用于肝素类质量检测和低分子肝素生产。

[0004] 从自然界中得到的不同的产肝素酶微生物的所产肝素酶也多种多样，其用于酶解肝素得到的产物也各不相同。为了满足研究和工业上的多样化需求，本领域仍需要新的肝素酶。

发明内容

[0005] 在第一方面，本发明提供一种施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)菌株，所述菌株以保藏号CCTCC M 2017174保藏于中国典型培养物保藏中心。

[0006] 该菌株是本发明人从野外分离得到一株具有裂解肝素或其衍生物的活性的施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)菌株，命名为Z7。本发明人进一步从该菌株分离、纯化出两种新型胞内肝素酶PShepI、PShepII。这两种新的肝素酶理化性质不同于目前已知肝素酶，且酶解肝素时酶切位点选择性强，可用于肝素产品质量检测，或者制备低分子或超低分子肝素。

[0007] 因此，在另一方面，本发明还涵盖了所述施氏假单胞菌Z7菌株在生产肝素酶中的应用和方法。例如，从所述Z7菌株生产肝素酶的方法可以包括培养所述施氏假单胞菌Z7菌株，裂解培养获得的施氏假单胞菌细胞，从裂解产物分离和/或纯化肝素酶。优选地，所述培养在合适的条件下进行。例如，施氏假单胞菌Z7菌株可以在大约30℃的温度下培养。在一些

实施方案中，所述培养是发酵。本领域技术人员容易确定施氏假单胞菌的合适培养/发酵条件。所述裂解可以通过本领域已知的多种破碎细胞的方法进行，例如冻融裂解、超声处理、高压处理等。此外，本领域技术人员可以根据具体肝素酶的性质如分子量、等电点等选择合适的方法从细胞裂解物分离和/或纯化肝素酶，例如可以通过分子筛、阴离子交换层析、阳离子交换层析、肝素酶亲和层析等分离和/或纯化特定肝素酶。

[0008] 在另一方面，本发明提供了衍生自施氏假单胞菌，优选衍生自本发明的施氏假单胞菌Z7菌株的肝素酶。所述肝素酶例如是PShepI或PShepII。

[0009] 在一些实施方案中，所述肝素酶(如PShepI)具有选自以下的一或多种特征：

[0010] i)74791Da的分子量；

[0011] ii)约7.77的等电点；

[0012] iii)分别以肝素(HEP)和HS(硫酸乙酰肝素)为底物时，酶活比HEP/HS为约0.87:1；

[0013] iv)以HEP为底物时，米氏常数为约4.20；

[0014] v)以HS为底物时，米氏常数为约0.28；和

[0015] vi)以HEP为底物时，主要肝素二糖产物是IIS和IS。

[0016] 在一些实施方案中，所述肝素酶(如PShepI)例如可以通过包含以下步骤的方法获得：

[0017] a)培养本发明的施氏假单胞菌Z7菌株并收集经培养的细菌细胞；

[0018] b)在缓冲液中重悬并裂解步骤a)中获得的细胞，并在离心后收集上清液；

[0019] c)步骤b)中获得的上清液进行20％-100％饱和度的硫酸铵沉淀，将所得沉淀溶解于缓冲液并针对该缓冲液进行透析；

[0020] d)将步骤c)的产物上样于阴离子交换柱，包括但不限于Q-Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose Big Beads、Q-Sepharose XL或Q-Sepharose High Performance柱，以缓冲液平衡，收集上样流穿液和平衡流穿液，将收集的上样流穿液和平衡流穿液针对缓冲液进行透析；和

[0021] e)将步骤d)的产物上样至阳离子交换柱例如SP-Sepharose Fast Flow柱，以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如0-0.5M氯化钠溶液)线性梯度洗脱，收集具有肝素酶活性的洗脱液级分，并任选地将所收集的洗脱液针对缓冲液进行透析。

[0022] 本领域已知多种方法测量肝素酶活性，例如中国专利申请201110241260.4所记载的方法。因此，在本发明的方法中，可以在肝素酶制备过程中监测层析步骤中各个级分的肝素酶活性，从而收集所需级分。

[0023] 在上述步骤d)的阴离子交换柱粗分离后，PShepI和PShepII已经分开，在步骤e)，通过阳离子交换柱去除了大量的杂蛋白，此时获得的PShepI已得到纯化。然而，还可以进一步包括一或多个亲和层析步骤对PShepI肝素酶进行进一步纯化。所述一或多个亲和层析步骤使用肝素酶亲和柱例如Cellufine Sulfate柱或结合肝素的CNBr-activated Sepharose CL-4B肝素酶亲和柱进行。

[0024] 例如，在一些优选实施方案中，所述方法进一步包括以下步骤：

[0025] f)将步骤e)的产物上样至肝素酶亲和柱例如Cellufine Sulfate柱或结合肝素的CNBr-activated Sepharose CL-4B肝素酶亲和柱，以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如0.15-0.6M氯化钠溶液)线性梯度洗脱，收集具有肝素酶活性的洗脱液级分，

并任选地将收集的洗脱液针对缓冲液进行透析。

[0026] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括对产物进行浓缩的步骤。

[0027] 在一些实施方案中,所述缓冲液是Tris-HCl缓冲液。在一些实施方案中,所述缓冲液是含$CaCl_2$的Tris-HCl缓冲液。在一些实施方案中,所述Tris-HCl的浓度为大约10mM-大约50mM,优选大约25mM。在一些实施方案中,所述缓冲液中$CaCl_2$的浓度是大约1mM-大约50mM,优选大约10mM。在一些实施方案中,所述缓冲液的pH范围是大约7.0-大约7.5,优选大约7.0。在一些实施方案中,各步骤中使用相同的缓冲液。

[0028] 在另一些实施方案中,所述肝素酶(如PShepII)具有选自以下的一或多种特征:

[0029] i)94716Da的分子量;

[0030] ii)约5.76的等电点;

[0031] iii)分别以肝素(HEP)和HS(硫酸乙酰肝素)为底物时,酶活比HEP/HS为约1:4.3;

[0032] iv)以HEP为底物时,米氏常数为约0.09;

[0033] v)以HS为底物时,米氏常数为约0.25。

[0034] 在一些实施方案中,所述肝素酶(如PShepII)例如可以通过包含以下步骤的方法获得:

[0035] a)培养本发明的施氏假单胞菌Z7菌株并收集经培养的细菌细胞;

[0036] b)在缓冲液中重悬并裂解步骤a)中获得的细胞,并在离心后收集上清液;

[0037] c)步骤b)中获得的上清液进行20%-100%饱和度的硫酸铵沉淀,将所得沉淀溶解于缓冲液并针对该缓冲液进行透析;

[0038] d)将步骤c)的产物上样于阴离子交换柱,包括但不限于Q-Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose Big Beads、Q-Sepharose XL或Q-Sepharose High Performance柱,以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如0-0.5M氯化钠溶液)线性梯度洗脱,收集洗脱液中具有肝素酶活性的级分,并任选地将收集的洗脱液针对缓冲液透析。

[0039] 本领域已知多种方法测量肝素酶活性,例如中国专利申请201110241260.4所记载的方法。因此,在本发明的方法中,可以在肝素酶制备过程中监测层析步骤中各个级分的肝素酶活性,从而收集所需级分。

[0040] 在上述步骤d)的阴离子交换柱粗分离后,PShepI和PShepII已经分开,且此时获得的PShepII已得到纯化。然而,还可以进一步包括一或多个亲和层析步骤对PShepII肝素酶进行进一步纯化。所述一或多个亲和层析步骤使用肝素酶亲和柱例如Cellufine Sulfate柱或结合肝素的CNBr-activated Sepharose CL-4B肝素酶亲和柱进行。

[0041] 例如,在一些优选实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:

[0042] e)将步骤d)的产物上样至肝素酶亲和柱(例如Cellufine Sulfate柱),以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如0.05-0.5M氯化钠溶液)线性梯度洗脱,收集洗脱液中具有肝素酶活性的级分,并将收集的洗脱液针对缓冲液进行透析;

[0043] f)将步骤e)的产物上样至肝素酶亲和柱(例如Cellufine Sulfate柱),以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如2.5M氯化钠溶液)等度洗脱,收集洗脱液中具有肝素酶活性的级分;

[0044] g)将步骤f)的产物上样至肝素酶亲和柱(例如Cellufine Sulfate柱),以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如0-0.5M氯化钠溶液)线性梯度洗脱,收集具有

肝素酶活性的洗脱液级分，并任选地将收集的洗脱液针对缓冲液进行透析。

[0045] 在一些实施方案中，所述方法进一步包括对产物进行浓缩的步骤。

[0046] 在一些实施方案中，所述缓冲液是Tris-HCl缓冲液。在一些实施方案中，所述缓冲液是含$CaCl_2$的Tris-HCl缓冲液。在一些实施方案中，所述Tris-HCl的浓度为大约10mM-大约50mM，优选大约25mM。在一些实施方案中，所述缓冲液中$CaCl_2$的浓度是大约1mM-大约50mM，优选大约10mM。在一些实施方案中，所述缓冲液的pH范围是大约7.0-大约7.5，优选大约7.0。在一些实施方案中，各步骤中使用相同的缓冲液。

[0047] 在另一方面，本发明提供一种产生肝素酶(如PShepI)的方法，所述方法包括以下步骤：

[0048] a)培养本发明的施氏假单胞菌菌株并收集经培养的细菌细胞；

[0049] b)在缓冲液中重悬并裂解步骤a)中获得的细胞，并在离心后收集上清液；

[0050] c)步骤b)中获得的上清液进行20％-100％饱和度的硫酸铵沉淀，将所得沉淀溶解于缓冲液并针对所述缓冲液透析；

[0051] d)将步骤c)的产物上样于阴离子交换柱，例如Q-Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose Big Beads、Q-Sepharose XL或Q-Sepharose High Performance柱，以缓冲液平衡所述柱，收集上样流穿液和平衡流穿液，将收集的上样流穿液和平衡流穿液针对缓冲液透析；

[0052] e)将步骤d)的产物上样至阳离子交换柱例如SP-Sepharose Fast Flow柱，以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如0-0.5M氯化钠溶液)线性梯度洗脱，收集具有肝素酶活性的洗脱液级分，并任选地将所收集的洗脱液针对缓冲液进行透析。

[0053] 在一些实施方案中，所述方法进一步包括一或多个亲和层析步骤对所述肝素酶进行进一步纯化，所述一或多个亲和层析步骤使用肝素酶亲和柱例如Cellufine Sulfate柱或结合肝素的CNBr-activated Sepharose CL-4B肝素酶亲和柱进行。

[0054] 在一些实施方案中，所述方法进一步包括以下步骤：

[0055] f)将步骤e)的产物上样至肝素酶亲和柱例如Cellufine Sulfate柱或结合肝素的CNBr-activated Sepharose CL-4B肝素酶亲和柱，以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如0.15-0.6M氯化钠溶液)液线性梯度洗脱，收集具有肝素酶活性的洗脱液级分，并任选地将收集的洗脱液针对缓冲液进行透析。

[0056] 在一些实施方案中，所述方法进一步包括对产物进行浓缩的步骤。

[0057] 在另一方面，本发明提供一种产生肝素酶(如PShepII)的方法，所述方法包括以下步骤：

[0058] a)培养本发明的施氏假单胞菌菌株并收集经培养的细菌细胞；

[0059] b)在缓冲液中重悬并裂解步骤a)中获得的细胞，并在离心后收集上清液；

[0060] c)步骤b)中获得的上清液进行20％-100％饱和度的硫酸铵沉淀，将所得沉淀溶解于缓冲液并针对所述缓冲液透析；

[0061] d)将步骤c)的产物上样于阴离子交换柱例如Q-Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose Big Beads、Q-Sepharose XL或Q-Sepharose High Performance柱，以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如0-0.5M氯化钠溶液)线性梯度洗脱，收集洗脱液中具有肝素酶活性的级分，并任选地将收集的洗脱液针对缓冲液透析。

[0062] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括一或多个亲和层析步骤对所述肝素酶进行进一步纯化,所述一或多个亲和层析步骤使用肝素酶亲和柱例如Cellufine Sulfate柱或结合肝素的CNBr-activated Sepharose CL-4B肝素酶亲和柱进行。

[0063] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:

[0064] e)将步骤d)的产物上样至肝素酶亲和柱(例如Cellufine Sulfate柱),以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如0.05-0.5M氯化钠溶液)线性梯度洗脱,收集洗脱液中具有肝素酶活性的级分,合并收集的洗脱液并将收集的洗脱液针对缓冲液进行透析;

[0065] f)将步骤e)的产物上样至肝素酶亲和柱(例如Cellufine Sulfate柱),以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如2.5M氯化钠溶液)等度洗脱,收集洗脱液中具有肝素酶活性的级分;和

[0066] g)将步骤f)的产物上样至肝素酶亲和柱(例如Cellufine Sulfate柱),以缓冲液平衡后用基于相同缓冲液的氯化钠溶液(例如0-0.5M氯化钠溶液)线性梯度洗脱,收集具有肝素酶活性的洗脱液级分,并任选地将收集的洗脱液针对缓冲液进行透析。

[0067] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括对产物进行浓缩的步骤。

[0068] 在本发明上述产生肝素酶的方法的一些实施方案中,所述缓冲液是Tris-HCl缓冲液。在一些实施方案中,所述缓冲液是含$CaCl_2$的Tris-HCl缓冲液。在一些实施方案中,所述Tris-HCl的浓度为大约10mM-大约50mM,优选大约25mM。在一些实施方案中,所述缓冲液中$CaCl_2$的浓度是大约1mM-大约50mM,优选大约10mM。在一些实施方案中,所述缓冲液的pH范围是大约7.0-大约7.5,优选大约7.0。在一些实施方案中,各步骤中使用相同的缓冲液。

[0069] 本发明人进一步鉴定了PShepI的序列,氨基酸序列示于SEQ ID NO:2,编码核苷酸序列示于SEQ ID NO:1。

[0070] 因此,在另一方面,本发明还提供了一种肝素酶,其包含与SEQ ID NO:2所示氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少99%的序列相同性的氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:2所示氨基酸序列相比具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。优选地,所述肝素酶保留或基本上保留PShepI的活性。在一些实施方案中,所述肝素酶衍生自或源自或分离自施氏假单胞菌。在一些实施方案中,所述肝素酶通过重组产生,即所述肝素酶是重组肝素酶。下文进一步描述了重组产生肝素酶的方法。

[0071] “包含”一词在本文中用于描述蛋白质或核酸的序列时,所述蛋白质或核酸可以是由所述序列组成,或者在所述蛋白质或核酸的一端或两端可以具有额外的氨基酸或核苷酸,但仍然具有本发明所述的活性。

[0072] 在一些实施方案中,本发明的肝素酶可以包含额外的接头或者与其它标签蛋白融合。这些接头和/或标签可以有利于本发明的肝素酶在目标宿主细胞中的产生,增加表达量或增加可溶性表达,有利于所述肝素酶的分离和纯化,但基本上不会影响肝素酶的活性。本领域已知许多这样的接头和/或标签。合适的接头和/或标签包括例如6×His、GST(谷胱甘肽转移酶)、MBP(麦芽糖结合蛋白)等等。合适的接头和/或标签通常可以通过选择合适的商品化表达载体而获得。

[0073] 在肽或蛋白中,合适的保守型氨基酸取代是本领域技术人员已知的,并且一般可

以进行而不改变所得分子的生物活性。通常，本领域技术人员认识到多肽的非必需区中的单个氨基酸取代基本上不改变生物活性(参见，例如，Watson et al.,Molecular Biology of the Gene,4th Edition,1987,The Benjamin/Cummings Pub.co.,p.224)。

[0074] 序列“相同性”具有本领域公认的含义，并且可以利用公开的技术计算两个核酸或多肽分子或区域之间序列相同性的百分比。可以沿着多核苷酸或多肽的全长或者沿着该分子的区域测量序列相同性。(参见，例如:Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.,ed.,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.,ed.,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,Part I,Griffin,A.M.,and Griffin,H.G.,eds.,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;and Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.and Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991)。虽然存在许多测量两个多核苷酸或多肽之间的相同性的方法，但是术语“相同性”是技术人员公知的(Carrillo,H.&Lipman,D.,SIAM J Applied Math 48:1073(1988))。

[0075] 在另一方面，本发明还提供一种分离的多核苷酸，其包含编码本发明前述的肝素酶的核苷酸序列。

[0076] 如本文所用，“多核苷酸”是指多个核苷酸通过3’-5’-磷酸二酯键连接而成的大分子，其中所述核苷酸包括核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸。本发明的多核苷酸的序列可以针对不同的宿主细胞(如大肠杆菌)进行密码子优化，从而改善肝素酶的表达。进行密码子优化的方法是本领域已知的。

[0077] 在该方面一些具体实施方案中，所述多核苷酸包含SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

[0078] 在另一方面，本发明提供了一种表达构建体，其包含与表达调控序列可操作地连接的本发明的多核苷酸。

[0079] 在本发明的表达构建体中，编码本发明的肝素酶的多核苷酸的序列与表达调控序列可操作地连接以进行希望的转录及最终在宿主细胞中产生所述肝素酶。合适的表达调控序列包括但不限于启动子、增强子、核糖体作用位点如核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、转录剪接序列、转录终止序列和稳定mRNA的序列等等。

[0080] 如本文中所用，术语“可操作地连接”指调控序列与目的核苷酸序列连接，使得目的核苷酸序列的转录被所述转录调控序列控制和调节。用于将表达调控序列可操作地连接于目的核苷酸序列的技术为本领域已知的。

[0081] 用于本发明的表达构建体的载体包括那些在宿主细胞中自主复制的载体，如质粒载体；还包括能够整合到宿主细胞DNA中并和宿主细胞DNA一起复制的载体。可商购获得许多适于本发明的载体。在一个具体实施方案中，本发明的表达构建体衍生自Novagen公司的pET30a。在一个具体实施方案中，本发明的表达构建体衍生自Novagen公司的pET28a。

[0082] 在另一方面，本发明提供一种宿主细胞，其含有包含编码本发明的肝素酶的核苷酸序列的多核苷酸或以包含所述多核苷酸的表达构建体转化，其中所述宿主细胞能够表达本发明的肝素酶。优选地，所述宿主细胞是重组宿主细胞。

[0083] 用于表达本发明肝素酶的宿主细胞包括原核生物、酵母和高等真核细胞。示例性

的原核宿主包括埃希氏菌属(Escherichia)、芽孢杆菌属(Bacillus)、沙门氏菌属(Salmonella)以及假单胞菌属(Pseudomonas)和链霉菌属(Streptomyces)的细菌。在优选的实施方案中,宿主细胞是埃希氏菌属细胞,优选是大肠杆菌。在本发明的一个具体实施方案中,所使用的宿主细胞为大肠杆菌BL21(DE3)菌株细胞。

[0084] 可以通过许多已熟知的技术之一将本发明的重组表达构建体导入宿主细胞,这样的技术包括但不限于:热激转化,电穿孔,DEAE-葡聚糖转染,显微注射,脂质体接介导的转染,磷酸钙沉淀,原生质融合,微粒轰击,病毒转化及类似技术。

[0085] 在另一方面,本发明提供了一种重组产生肝素酶的方法,包括:

[0086] a)在允许所述肝素酶表达的条件下培养本发明的宿主细胞;

[0087] b)从得自步骤a)的培养物获得由所述宿主细胞表达的肝素酶;及

[0088] c)任选进一步纯化得自步骤b)的肝素酶。

[0089] 在仍然另一方面,本发明提供了本发明的施氏假单胞菌菌株、本发明的肝素酶或本发明的宿主细胞在生产低分子肝素或超低分子肝素中或在肝素、分子肝素或超低分子肝素的质量检测中的应用。

[0090] 在仍然另一方面,本发明提供了一种生产低分子肝素或超低分子肝素的方法,包括使肝素与本发明的施氏假单胞菌菌株、本发明的肝素酶或本发明的宿主细胞接触的步骤。

附图说明

[0091] 图1示出经纯化的PShepI、PShepII的SDS-PAGE图像。

[0092] 图2.PShepI酶解HEP的产物液相层析图像。

具体实施方式

[0093] 下面将通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所描述的实施例范围中。

[0094] 本申请实施例中,对肝素(HEP)、硫酸乙酰肝素(HS)的酶活性测定参考中国专利申请201110241260.4。蛋白质含量测定及酶纯度测定方法参考文献Carbohydrate Research,2012,359:37-43。

[0095] 脱硫酸基酶检测方法:取52mIU的肝素酶与10μl的1mg/ml I-S反应,并加入25mM Tris-HCl(含10mM$CaCl_2$,pH7.0)缓冲液使反应体系达到200μl。在常温下反应24hr,并在100℃水浴中煮沸5min将肝素酶灭活,再上样于HPLC-SAX柱检测其II-S与I-S的相对百分含量。

[0096] 实施例1:施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)新菌株的分离和鉴定

[0097] 产肝素酶菌种的筛选

[0098] 从中国湖北省云梦县城关镇城西采集土样;将肝素溶于纯化水(小于等于8g/L)后,浇注于每份土样中,使每份土样保持湿润即可。每周浇注1-2次(浇注频率视土样的干燥程度而定),连续培养35-40天。用称量匙舀取两匙土样加入经过高压蒸汽灭菌后的纯化水中,于30℃摇床中震荡(150rpm)2-3小时,使土样能够均匀分布于纯化水中。用移液枪吸取20ml溶有土样的纯化水加入200ml高压蒸汽灭菌后的种子培养基中,于30℃摇床中震荡(150rpm)16小时后,吸取2.5ml菌液加入4ml石英比色皿中检测其OD600读数,用于判断菌体

的生长情况。若上一步骤中的菌体OD600读数大于2.4，则用移液枪吸取20ml菌液加入200ml高压蒸汽灭菌后的发酵培养基中，于30℃摇床中震荡(150rpm)24小时后，吸取3ml菌液留样。

[0099] 从取样的3ml菌液中吸取2.5ml菌液加入4ml石英比色皿中检测其OD600读数，用于判断菌体的生长情况。若菌体OD600读数大于2.0，则说明菌体在发酵培养基中生长情况良好。同时，将剩余的0.5ml菌液离心(4℃、5000g、5min)获得上清液，将上清液用超纯水稀释10倍待用。将肝素溶解于超纯水中，并梯度稀释成0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml。取2.5ml的天青A溶液(20mg/L)和25μl肝素水溶液置于比色皿中混匀，检测其在620nm的吸收值，并绘制出标准曲线。然后，再以同样方法检测稀释过的菌液上清液的620nm吸收值，并计算其肝素浓度。若肝素浓度低于5.5g/L，则被认为菌液中含有能够消耗肝素(可产肝素酶)的菌种。将肝素浓度低于5.5g/L的菌液稀释涂布(10e-6、10e-7、10e-8、10e-9)，约3-4天后，可在固体培养基表面观测到菌落或菌群。从上一步骤中的培养基表面挑取多个菌落平板划线，培养2-3天后，可挑选出相对较纯的单菌落。

[0100] 将平板划线得到的菌落刮取并加入种子培养基中，培养16小时后，转接入发酵培养基(10％接种量)中培养约24小时。从发酵培养基中取样，参照前述步骤检测其肝素消耗量。若其肝素消耗量仍然小于5.5g/L，则重复稀释涂布与平板划线的步骤，对菌种进行再一次的纯化，直至得到纯的单菌落。可根据菌落的纯化程度，进行多次复筛，本次实验中，针对初筛有活性的土样，全部进行过3次复筛。

[0101] 单菌落已进行斜面划线以及液体培养基保存。其中，斜面划线保存于冷库中，液体培养的菌液保存于50％甘油中，存放于-20℃冰箱。

[0102] 产肝素酶菌种的鉴定

[0103] 将筛选得到的产肝素酶的菌种纯化至单一纯菌落，培养后送至广东省微生物分析检测中心进行菌种鉴定。

[0104] 通过细菌镜检观察、理化性质分析和16S rDNA序列比对，确定本发明人筛选出一株能够产肝素酶的施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)菌株，命名为Z7。该菌株根据布达佩斯条约于2017年4月10日以保藏号:CCTCC M 2017174保藏于中国典型培养物保藏中心(中国武汉，武汉大学，邮编，430072)。

[0105] 已知施氏假单胞菌对人体基本无致病性，并且能降解卡拉胶，是污水处理和土壤废物处理的有效细菌，并且是一种反硝化细菌，具有腐蚀金属的能力。然而，目前未见关于施氏假单胞菌能够产肝素酶的相关报道。

[0106] Z7菌株的肝素酶活性鉴定

[0107] 对已筛选到的有酶活的Z7菌株进行发酵，细胞破碎(1L发酵细胞)后测定对HEP和HS的活性，所得结果如表1所示：

[0108] 表1.Z7菌株发酵破碎细胞后测定的HEP和HS活性

[0109]

HEP酶活(IU/L)	HS酶活(IU/L)
592.2	602.1

[0110] 实施例2:来自Z7菌株的肝素酶的制备及活性测定

[0111] 培养基的配制：

[0112] 种子培养基配方为:牛肉浸膏5g/L,蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L,氯化钠5g/L,pH7.0;发酵培养基配方为:肝素8g/L,蛋白胨2g/L,磷酸二氢钾2.5g/L,硫酸铵1g/L,硫酸镁0.5g/L,氯化钠5g/L,pH7.0;固体培养基配方为:在发酵培养基基础上加入20g/L琼脂粉。

[0113] 菌株的发酵及粗酶液制备:

[0114] 将Pseudomonas stutzeri Z7菌株从平板或斜面上刮取两环接种到种子培养基中,培养16hr后,按15%接种量接入二级液体种子培养基中,培养1天,再按20%接种量接入2L发酵培养基中,培养1天。收集菌液3800rpm,4℃离心45分钟,将沉淀悬浮在25mMTris-HCl缓冲液(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)中,用高压均质机4℃,800bar,破碎3-4个循环,并离心30min(12000rpm,4℃)。将上清液在冰浴条件下做硫酸铵沉淀,收取硫酸铵饱和度20%-100%的沉淀并溶解于100ml的Tris-HCl缓冲液中,于相同的缓冲液中透析过夜。

[0115] 制备方法I

[0116] Q-Sepharose Fast Flow柱分离:将上一步骤透析后的粗酶液上样于用25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡过的规格为2.5×30cm的Q柱,以同样缓冲液平衡3个柱体积,再以含0-0.5M氯化钠的缓冲液线性梯度洗脱,得到1个活性峰命名为PShepII。检测上样流穿液与平衡流穿液,发现其具有肝素酶活性,并将此部分的酶液命名为PShepI。收集PShepI和PShepII组分,用2L体积的25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液过夜透析。

[0117] Cellufine Sulfate柱I纯化PShepI:将透析后的含PShepI酶液上样于CS柱(规格为2.5×30cm),用25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡3个柱体积,再以含0-1M氯化钠的同样缓冲液梯度洗脱。检测有酶活部分,并将其对2L体积25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡过夜透析。

[0118] Cellufine Sulfate柱II纯化PShepI:将上一步透析后的酶液取出上样于已平衡好的同等规格的CS柱,用含0.15M氯化钠的25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡3个柱体积,再以含0.15-0.6M氯化钠的同样缓冲液梯度洗脱。检测有酶活部分,过夜透析。

[0119] SP柱纯化PShepI:将上一步透析后的酶液上样于已平衡好的SP柱(规格为2.5×30cm),用25mM Tris-HCl(含10mM$CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡3个柱体积,再以含0-0.5M氯化钠的同样缓冲液梯度洗脱。检测肝素酶活性。对有酶活部分单管做杂酶反应(脱硫酸基酶检测),收集无杂酶反应,且对肝素进行处理后IIS含量低于1%的有酶活组分,该组分基本无杂条带。最后用30K超滤离心管浓缩,浓缩后所得的酶即为高纯度的PShepI酶,将浓缩后的酶用相应的缓冲液补充至0.5ml并用甘油按1:1比例混合后保存于-20℃冰箱。

[0120] Cellufine Sulfate柱I梯度洗脱纯化PShepII:将透析后的PShepII组分上样于用25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡过的规格为2.5×30cm的CS柱,再以含有0.05M氯化钠的缓冲液平衡3个柱体积,然后以含0.05-0.5M氯化钠的同样缓冲液线形梯度洗脱,收集活性组分,用2L体积的25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液过夜透析。

[0121] Cellufine Sulfate柱II等度洗脱纯化PShepII:将上一步透析后的PShepII组分上样于用25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡过的规格为2.5×30cm的CS柱,再以同样缓冲液平衡3个柱体积,然后以含0.25M氯化钠的同样缓冲液等度洗脱,收集活性组分。

[0122] Cellufine Sulfate柱III浓缩PShepII:将上一步等度洗脱后有活性的PShepII组分加1倍25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液后,上样于平衡过的规格为2.5×30cm的CS柱,再以同样缓冲液平衡3个柱体积,然后用含0-0.5M氯化钠的同样缓冲液梯度洗脱,将有酶活性的组分分别做脱硫酸基酶检测(杂酶检测),收集无杂酶反应,且对肝素进行处理后IIS含量小于1%的有酶活组分--即为高纯度的新型酶PShepII,做SDS-PAGE,确认基本无杂条带。再将高纯度的PShepII利用30KD超滤离心管浓缩,并加入1倍体积甘油放入-20℃冰箱保存。

[0123] PShepI和PShepII各步骤中每一步完成后所得酶活、蛋白含量、(比活)纯化倍数、(总活力)产率分别如表2及表3所示:

[0124] 表2方法I中PShepI纯化各步骤酶活和蛋白含量

[0125]

PShepI 纯化步骤	总体积 (ml)	总蛋白 (mg)	HEP 酶活 (IU/ml)	总活力 (IU)	比活 (IU/mg)	纯化倍数	产率(%)
粗酶	461.00	231.71	0.48	220.12	0.95	/	/
硫铵沉淀	415.00	144.93	0.51	211.60	1.46	1.54	96.13
Q柱	75.00	10.53	0.76	56.00	5.32	5.60	25.44
CS-I柱	30.00	3.88	1.35	40.50	10.45	11.00	18.41
CS-II柱	45.00	2.18	0.65	29.00	13.31	30.53	13.17
SP柱	1.00	0.50	12.80	12.80	25.60	26.95	5.81

[0126] 表3方法I中PShepII纯化各步骤酶活和蛋白含量

[0127]

PShepII 纯化步骤	总体积 (ml)	总蛋白 (mg)	HEP 酶活 (IU/ml)	总活力 (IU)	比活 (IU/mg)	纯化倍数	产率(%)
粗酶	461.00	231.71	0.48	220.12	0.95	/	/
硫铵沉淀	415.00	144.93	0.51	211.6	1.46	1.54	96.13
Q柱	99.00	18.11	0.45	40.00	2.21	2.33	18.17

[0128]

CS-I柱	31.00	3.88	0.52	16.00	4.12	4.34	7.27
CS-II柱	22.00	1.94	0.64	14.00	7.20	7.58	6.36
Sephadex G-100	1.00	0.46	8.20	8.20	18.00	18.95	3.73

[0129] 制备方法II

[0130] Q-Sepharose Fast Flow柱分离:将上述硫酸铵沉淀制备的经透析的粗酶液上样于用25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡过的规格为2.5×30cm的Q-Sepharose Fast Flow柱,以同样缓冲液平衡3个柱体积。再以同样缓冲液中0-1M氯化钠线性梯度洗脱,检测有酶活部分,标记为PShepII,收集并用2L的25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液过夜透析。检测流穿液和平衡液,收集有酶活部分,标记为PShepI。

[0131] SP柱纯化PShepI:将上一步得到的含PShepI的酶液上样于用25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡过的规格为2.5×30cm的SP-Sepharose Fast Flow柱,再以同样缓冲液平衡3个柱体积,然后以含0-0.5M氯化钠的同样缓冲液线性梯度洗脱,收集活性组分,用2L体积的25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液过夜透析。

[0132] Cellufine Sulfate柱纯化PShepI:将上一步得到的酶液上样于用25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡过的规格为2.5×30cm的Cellufine Sulfate柱,再以含0.15M氯化钠的同样缓冲液平衡3个柱体积,然后以含0.15-0.6M氯化钠的同样缓冲液线性梯度洗脱,收集各活性组分后合并,用30kD的超滤离心管超滤浓缩至1mL。

[0133] Cellufine Sulfate-I线性梯度洗脱纯化PShepII:将Q柱分离得到的透析过的酶液上样于用25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡过的规格为2.5×30cm的Cellufine Sulfate柱,然后用含0.05M氯化钠的同样缓冲液平衡,含0.05-0.5M氯化钠的缓冲液梯度洗脱,收集有活性组分,在25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液中透析过夜。

[0134] Cellufine Sulfate-II柱等度洗脱纯化PShepII:将上一步透析的酶液再次上样于用25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡过的规格为2.5×30cm的Cellufine Sulfate柱,然后以含0.25M氯化钠的同样缓冲液等度洗脱800ml,收集有活性组分。

[0135] Cellufine Sulfate-III柱浓缩:在等度洗脱后有活性的PShepII溶液中加入一倍体积的25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液,并上样于一根用25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液平衡过的规格为2.5×30cm的CS柱,再以同样缓冲液平衡,然后以含0-0.5M氯化钠的同样缓冲液线性梯度洗脱,收集活性组分,合并,用30kD的超滤离心管超滤浓缩至1mL。

[0136] 纯化流程各步骤所得酶活和蛋白含量如下表4和表5所示:

[0137] 表4方法II中PShepI纯化各步骤酶活和蛋白含量

[0138]

PShepI 纯化步骤	总体积 (ml)	总蛋白 (mg)	HEP 酶活 (IU/ml)	总活力(IU)	比活 (IU/mg)	纯化倍数	产率(%)
粗酶	461.00	231.71	0.48	220.12	0.95	/	/
硫铵沉淀	415.00	144.93	0.51	211.60	1.46	1.54	96.13
Q 柱	115.08	41.66	1.18	135.80	3.26	3.43	61.69
SP 柱	54.00	9.49	1.91	103.14	10.87	11.44	46.86
CS 柱	1.00	1.35	57.70	57.70	42.70	44.95	26.21

[0139] 表5方法II中PShepII纯化各步骤酶活和蛋白含量

[0140]

PShepII 纯化步骤	总体积 (ml)	总蛋白 (mg)	HEP 酶活 (IU/ml)	总活力(IU)	比活 (IU/mg)	纯化倍数	产率(%)
粗酶	461.00	231.71	0.48	220.12	0.95	/	/
硫铵沉淀	415.00	144.93	0.51	211.6	1.46	1.54	96.13
Q 柱	99.00	18.11	0.45	40.00	2.21	2.33	18.17
CS-I 柱	31.00	3.88	0.52	16.00	4.12	4.34	7.27
CS-II 柱	1.00	1.94	0.64	14.00	7.20	7.58	6.36

[0141] 实施例3:肝素酶PShepI和PShepII的表征

[0142] 经SDS-PAGE测定,PShepI分子量大约是74700Da。经MALDI-TOF-MS质谱测定分析,PShepI确切分子量为74791Da。经等电点聚焦电泳测定,PShepI的等电点是7.77。

[0143] 经SDS-PAGE测定,PShepII分子量大约是94000Da,经MALDI-TOF-MS质谱测定分析其确切分子量为94716Da。经等电点聚焦电泳测定,PShepII的等电点是5.76。

[0144] 将硫酸乙酰肝素(HS)底物溶于25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)缓冲液中,配制成浓度为1mg/mL的硫酸乙酰肝素溶液。再将硫酸乙酰肝素底物浓度分别设置为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/mL,测定酶在各种硫酸乙酰肝素底物浓度下的酶活,计算酶对硫酸乙酰肝素的米氏常数。

[0145] 将肝素(HEP)底物溶于25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$)缓冲液中,配制成浓度为1mg/mL的肝素溶液。再将肝素底物浓度分别设置为0.01、0.03、0.05、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0mg/mL,测定酶在各种肝素底物浓度下的酶活,计算酶对肝素的米氏常数。以不同的底物浓度测定各条件下酶反应的初速度,以求得米氏常数。

[0146] 经测定,以HEP和HS为底物时PShepI的米氏常数分别为4.20和0.28。经测定,以HEP和HS为底物时PShepII的米氏常数分别为0.09和0.25。

[0147] 实施例4:PShepI和PShepII的底物特异性和产物特异性研究

[0148] PShepI底物特异性研究:分别以肝素(HEP)、硫酸乙酰肝素(HS)、硫酸软骨素(CS)、硫酸皮肤素(DS)为底物,测定PShepI的活性。发现PShepI酶在以CS和DS为底物时没有酶活,在以HEP和HS为底物时有酶活,且活性比约为HEP:HS=0.87:1。

[0149] PShepII底物特异性研究:分别以肝素(HEP)、硫酸乙酰肝素(HS)、硫酸软骨素(CS)、硫酸皮肤素(DS)为底物,测定PShepII的活性。发现PShepII酶在以CS和DS为底物时没有酶活,在以HEP和HS为底物时有酶活,且活性比约为HEP:HS=1:4.3。

[0150] PShepI酶解HEP双糖分析:在50mg的肝素中加入3IU(以肝素为底物的酶活)的PShepI,用缓冲液25mM Tris-HCl(含10mM $CaCl_2$,pH7.0)定容至500μl,37℃条件下酶解24h,然后置于100℃水浴中,灭活5min,样品进行二糖组分液相分析。结果如图2所示,PShepI酶解HEP后,产物主要二糖组分为IIS和IS,其中IS的峰面积占67.92%。

[0151] 实施例5:肝素酶PShepI的序列测定

[0152] 利用“TIANamp Bacteria DNA Kit细菌基因组DNA提取试剂盒”提取Pseudomonas stutzeri Z7菌株基因组,按照试剂盒说明书进行操作。之后,对提取的Pseudomonas stutzeri Z7菌株基因组进行测序,得到Pseudomonas stutzeri Z7菌株基因组序列。

[0153] 对于从Pseudomonas stutzeri Z7分离纯化获得的PShep I酶,通过Kumarathasan法(简称K法)进行胶内酶解,之后做MALDI分析得到肝素酶PShepI的肽谱。将肽谱所获得的蛋白序列信息与由Z7菌株的基因组序列获得的ORF进行比对,最终获得PShepI编码序列(1971bp,SEQ ID NO:1)和氨基酸序列(656个氨基酸残基,SEQ ID NO:2)。

[0154] 实施例6:制备PShep I酶工程菌

[0155] 为了进一步提高PShep I的产量(Z7菌株所得酶产量约为150IU/L),本发明人根据E.coli BL21(DE3)的密码子偏好性,对PShepI编码序列进行了密码子优化,同时在PShep I酶的N端添加6xHis标签。相应的编码序列克隆至pET-30a载体中,然后转化至E.coli BL21(DE3)菌种中,获得工程菌。该工程菌的发酵获得产量高达约10000IU/L的工程酶(Z7菌株产量约为150IU/L)。工程酶与野生酶酶解肝素的232nm终点吸光度值、分子量、效价与收率具有一致性,确认工程酶和野生酶具有基本相同的性质。

[0001] 序列表

[0002] <110> 深圳市海普瑞药业集团股份有限公司

[0003] <120> 产肝素酶的施氏假单胞菌菌株及从其衍生的肝素酶

[0004] <130> P2019TC3362CB

[0005] <160> 2

[0006] <170> PatentIn version 3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 1971

[0009] <212> DNA

[0010] <213> Pseudomonas Stutzeri

[0011] <400> 1

[0012] atgaaattga aatttctata tctgtttatc ctacttttcc cactgtccgt tatcgggcaa 60

[0013] aagaaatcca gtatttctaa ggatgatttt gccatcctta atctggatca cccgggatta 120

[0014] gaaaaagtta aacaattggt ttccaaacaa aaataccaag aagcttccaa aacgctgttg 180

[0015] aattattata aaaagcgtac agacattaaa catccagatt acaatcttgc ggataaaggt 240

[0016] cggtttttgg gcaagaaatt atccaaagat aatcaagaaa aggccgacaa agggctagat 300

[0017] catcactttt atgttcataa aggttatggt tactttgact atggaaaaga catcaactgg 360

[0018] gaatactggc ctgttaagga caacgaagta agatggcaac ttcatcgtca ttattggtgg 420

[0019] actccaatgg gtttagctta ttggtcaagt ggagatgaaa aatatgctaa agaatgggtc 480

[0020] gcacaatatg tggactgggt gaagaaaaac cctaaaggac tctccaaaga gaatgaccgg 540

[0021] tttgcttggc gtccattaga ggtatcacat cgtattcaag aacagacagg cttatttaat 600

[0022] atgttcttga cttcgcctca tttcacgccc gaatttctga tggtgttttt aaacaactat 660

[0023] aataagcatg caaaccatat attagaaaat tactcggaaa agggcaacca tttacttttc 720

[0024] gaagcacaac gtatgattta tgcaggtgcg tttttcccgg aattaaaaaa tgcacctact 780

[0025] tggcgtaaaa gcggaatcga aatcttaaat acagagataa aaaagcagat ctatccagat 840

[0026] ggtatgcagt ttgaattatc tcccaactac cacaccgctg ccattaatat ctttttgaaa 900

[0027] gcactacgaa tggcacaatt ggcgaatatt gaccatgagt ttccgccatc ttataaagat 960

[0028] attatagaaa aaatgatcat ggcgcaggta aacttttctt ttccagacta ttcatttccg 1020

[0029] atgtttggag acgcgtgggt agccgacaag aaggtctcta ttagaaactt tcaggattgg 1080

[0030] cagaaggtat ttccagaaaa caacacaata acctattatg ctacagacgg taaaaaagga 1140

[0031] gaaacacttc cctttctttc tcacgggttg aaagatggcg gattttacac ctttcgaaac 1200

[0032] agctggaaag ataacgccac ggctatggta ctcaaagcaa gcccaccggc tttctggcat 1260

[0033] agtcaaccgg ataacggaac atttgagtta tgggtgaagg gtagaaactt tatgcctgat 1320

[0034] gcgggcgtat ttgtttatgg tggcgacgaa gaaatcctaa agctacggaa ttggtaccgt 1380

[0035] cagacaaaaa tccataagac gttgacttta aataacgagg acatagaaat caacgatgcg 1440

[0036] cagcttatta actggcatac ttctgacaaa ctggatgttc tggtctataa aaatccaagt 1500

[0037] tatgcaggat tgaatcatat ccggacagtc ttatttattg atcaacaata ttttatcatc 1560

[0038] ttagataaag ctgaaggaaa agatgtcggt aaggtcggta ttcacttcca attggttgag 1620

[0039] aatagtaacc cggtatacaa taaccaacaa aatagtgtta ccacaaggtt taaagatggt 1680

[0040] aataacctat tcattcgcaa ctttaatcaa gaccaagcac aattagcaga agaagaagga 1740

[0041] aaagtttctt acttctaccg gaccgaggta gaacgtcctg cttttgtatt tgaacaaaac 1800

[0042] aagacaaacg aaaatagtat aaattttgcc acagtgctct acccttatca aggagaacat 1860

[0043] gtaccaaata ttgtttttga agaagaaacg ggtaatgacc cagagagagg caatatccat 1920

[0044] ttctctattt ccgtagacgg aaaaaaacag acgattcagc atcgttttta a 1971

[0045] <210> 2

[0046] <211> 656

[0047] <212> PRT

[0048] <213> Pseudomonas Stutzeri

[0049] <400> 2

[0050] Met Lys Leu Lys Phe Leu Tyr Leu Phe Ile Leu Leu Phe Pro Leu Ser

[0051] 1 5 10 15

[0052] Val Ile Gly Gln Lys Lys Ser Ser Ile Ser Lys Asp Asp Phe Ala Ile

[0053] 20 25 30

[0054] Leu Asn Leu Asp His Pro Gly Leu Glu Lys Val Lys Gln Leu Val Ser

[0055] 35 40 45

[0056] Lys Gln Lys Tyr Gln Glu Ala Ser Lys Thr Leu Leu Asn Tyr Tyr Lys

[0057] 50 55 60

[0058] Lys Arg Thr Asp Ile Lys His Pro Asp Tyr Asn Leu Ala Asp Lys Gly

[0059] 65 70 75 80

[0060] Arg Phe Leu Gly Lys Lys Leu Ser Lys Asp Asn Gln Glu Lys Ala Asp

[0061] 85 90 95

[0062] Lys Gly Leu Asp His His Phe Tyr Val His Lys Gly Tyr Gly Tyr Phe

[0063] 100 105 110

[0064] Asp Tyr Gly Lys Asp Ile Asn Trp Glu Tyr Trp Pro Val Lys Asp Asn

[0065] 115 120 125

[0066] Glu Val Arg Trp Gln Leu His Arg His Tyr Trp Trp Thr Pro Met Gly

[0067] 130 135 140

[0068] Leu Ala Tyr Trp Ser Ser Gly Asp Glu Lys Tyr Ala Lys Glu Trp Val

[0069] 145 150 155 160

[0070] Ala Gln Tyr Val Asp Trp Val Lys Lys Asn Pro Lys Gly Leu Ser Lys

[0071] 165 170 175

[0072] Glu Asn Asp Arg Phe Ala Trp Arg Pro Leu Glu Val Ser His Arg Ile

[0073] 180 185 190

[0074] Gln Glu Gln Thr Gly Leu Phe Asn Met Phe Leu Thr Ser Pro His Phe

[0075] 195 200 205

[0076] Thr Pro Glu Phe Leu Met Val Phe Leu Asn Asn Tyr Asn Lys His Ala

[0077] 210 215 220

[0078] Asn His Ile Leu Glu Asn Tyr Ser Glu Lys Gly Asn His Leu Leu Phe

[0079] 225 230 235 240

[0080] Glu Ala Gln Arg Met Ile Tyr Ala Gly Ala Phe Phe Pro Glu Leu Lys

[0081] 245 250 255

[0082] Asn Ala Pro Thr Trp Arg Lys Ser Gly Ile Glu Ile Leu Asn Thr Glu

[0083] 260 265 270

[0084] Ile Lys Lys Gln Ile Tyr Pro Asp Gly Met Gln Phe Glu Leu Ser Pro
[0085] 275 280 285
[0086] Asn Tyr His Thr Ala Ala Ile Asn Ile Phe Leu Lys Ala Leu Arg Met
[0087] 290 295 300
[0088] Ala Gln Leu Ala Asn Ile Asp His Glu Phe Pro Pro Ser Tyr Lys Asp
[0089] 305 310 315 320
[0090] Ile Ile Glu Lys Met Ile Met Ala Gln Val Asn Phe Ser Phe Pro Asp
[0091] 325 330 335
[0092] Tyr Ser Phe Pro Met Phe Gly Asp Ala Trp Val Ala Asp Lys Lys Val
[0093] 340 345 350
[0094] Ser Ile Arg Asn Phe Gln Asp Trp Gln Lys Val Phe Pro Glu Asn Asn
[0095] 355 360 365
[0096] Thr Ile Thr Tyr Tyr Ala Thr Asp Gly Lys Lys Gly Glu Thr Leu Pro
[0097] 370 375 380
[0098] Phe Leu Ser His Gly Leu Lys Asp Gly Gly Phe Tyr Thr Phe Arg Asn
[0099] 385 390 395 400
[0100] Ser Trp Lys Asp Asn Ala Thr Ala Met Val Leu Lys Ala Ser Pro Pro
[0101] 405 410 415
[0102] Ala Phe Trp His Ser Gln Pro Asp Asn Gly Thr Phe Glu Leu Trp Val
[0103] 420 425 430
[0104] Lys Gly Arg Asn Phe Met Pro Asp Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly
[0105] 435 440 445
[0106] Asp Glu Glu Ile Leu Lys Leu Arg Asn Trp Tyr Arg Gln Thr Lys Ile
[0107] 450 455 460
[0108] His Lys Thr Leu Thr Leu Asn Asn Glu Asp Ile Glu Ile Asn Asp Ala
[0109] 465 470 475 480
[0110] Gln Leu Ile Asn Trp His Thr Ser Asp Lys Leu Asp Val Leu Val Tyr
[0111] 485 490 495
[0112] Lys Asn Pro Ser Tyr Ala Gly Leu Asn His Ile Arg Thr Val Leu Phe
[0113] 500 505 510
[0114] Ile Asp Gln Gln Tyr Phe Ile Ile Leu Asp Lys Ala Glu Gly Lys Asp
[0115] 515 520 525
[0116] Val Gly Lys Val Gly Ile His Phe Gln Leu Val Glu Asn Ser Asn Pro
[0117] 530 535 540
[0118] Val Tyr Asn Asn Gln Gln Asn Ser Val Thr Thr Arg Phe Lys Asp Gly
[0119] 545 550 555 560
[0120] Asn Asn Leu Phe Ile Arg Asn Phe Asn Gln Asp Gln Ala Gln Leu Ala
[0121] 565 570 575
[0122] Glu Glu Glu Gly Lys Val Ser Tyr Phe Tyr Arg Thr Glu Val Glu Arg
[0123] 580 585 590
[0124] Pro Ala Phe Val Phe Glu Gln Asn Lys Thr Asn Glu Asn Ser Ile Asn
[0125] 595 600 605

[0126] Phe Ala Thr Val Leu Tyr Pro Tyr Gln Gly Glu His Val Pro Asn Ile

[0127] 610 615 620

[0128] Val Phe Glu Glu Glu Thr Gly Asn Asp Pro Glu Arg Gly Asn Ile His

[0129] 625 630 635 640

[0130] Phe Ser Ile Ser Val Asp Gly Lys Lys Gln Thr Ile Gln His Arg Phe

[0131] 645 650 655

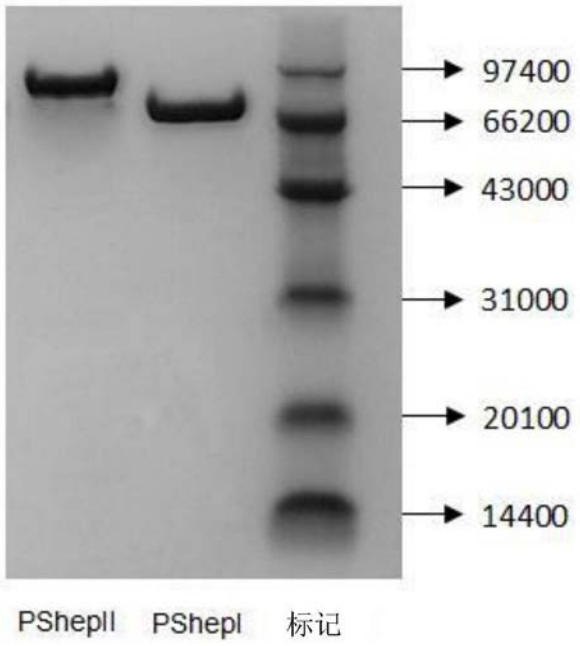

97400
66200
43000
31000
20100
14400
PShepII
PShepI
标记

图1

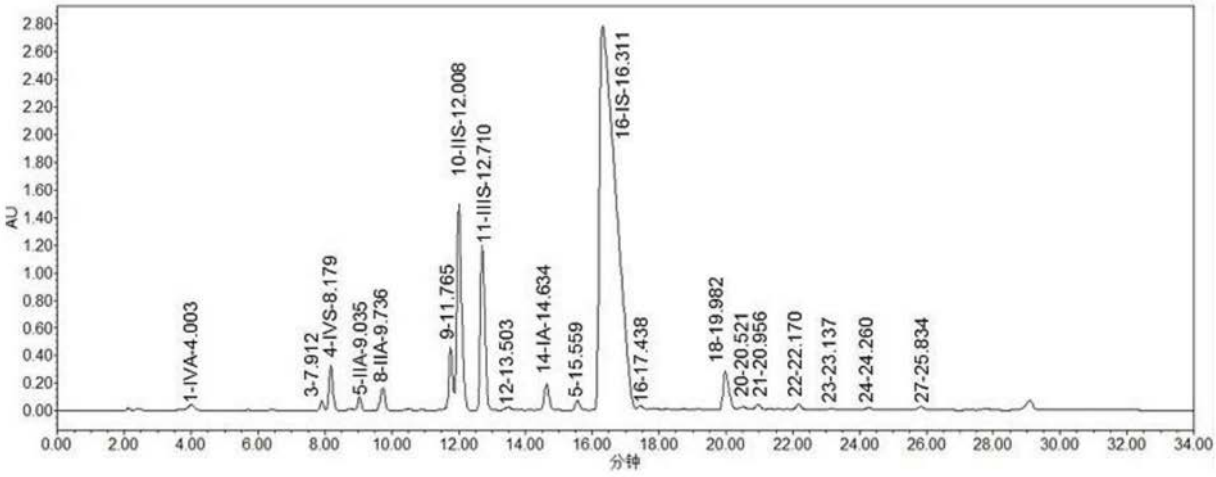

AU
分钟
1-IVA-4.003
3-7.912
4-IVS-8.179
5-IIA-9.035
8-IIA-9.736
9-11.765
10-IIS-12.008
11-IIIS-12.710
12-13.503
14-IA-14.634
15-15.559
16-IS-16.311
16-17.438
18-19.982
20-20.521
21-20.956
22-22.170
23-23.137
24-24.260
27-25.834

图2