

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 1 月 12 日 (12.01.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/005213 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 9/60 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) C12R 1/84 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/089324
- (22) 国际申请日: 2016 年 7 月 8 日 (08.07.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
2015104009669 2015 年 7 月 9 日 (09.07.2015) CN
- (71) 申请人: 广东东阳光药业有限公司 (SUNSHINE LAKE PHARMA CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省东莞市长安镇沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523000 (CN)。
- (72) 发明人: 肖海鹏 (XIAO, Haipeng); 中国广东省东莞市长安镇沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 李利佳 (LI, Lijia); 中国广东省东莞市长安镇沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 林树珊 (LIN, Shushan); 中国广东省东莞市长安镇沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 李宇晟 (LI, Yusheng); 中国广东省东莞市长安镇沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 杨彬 (YANG, Bin); 中国广东省东莞市长安镇沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 陈小锋 (CHEN, Xiaofeng); 中国广东省东莞市长安

镇沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。 李文佳 (LI, Wenjia); 中国广东省东莞市长安镇沙振安路 368 号东阳光科技园, Guangdong 523871 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: PREPARATION METHOD OF RECOMBINED LYSINE-SPECIFIC ENZYME

(54) 发明名称: 一种重组赖氨酸特异性酶的制备方法

(57) Abstract: A preparation method of recombining and expressing lysine-specific endoprotease in *Pichia pastoris*. The method comprises: optimizing, according to a codon preference of a yeast, a gene sequence of a lysine-specific endoprotease; constructing a recombination expression vector containing the optimized gene and genetically engineered bacteria; and fermenting and generating a recombinant lysine-specific endoprotease.

(57) 摘要: 一种在毕赤酵母中重组表达赖氨酸特异性内切蛋白酶 (Lysine-specific endoprotease) 的制备方法, 其包括根据酵母密码子偏好性优化赖氨酸特异性内切蛋白酶的基因序列, 构建含该优化基因的重组表达载体和基因工程菌, 并发酵生产重组赖氨酸特异性内切蛋白酶。



WO 2017/005213 A1

一种重组赖氨酸特异性酶的制备方法

技术领域

本发明涉及基因工程技术领域。具体地，本发明提供了一种重组赖氨酸特异性酶（Lysine-specific endoprotease, Lys-C）的高效制备方法，包括工程菌的构建、重组赖氨酸特异性酶的表达与纯化。

背景技术

赖氨酸特异性酶（Lysine-specific endoprotease）是一种碱性蛋白酶，分子量约为 26 kD，属于丝氨酸蛋白酶家族成员之一。作为一种高纯度蛋白酶，它能特异水解 Lys 的羧基端（与精氨酸相连时除外），可以产生比 Trypsin 多的酶解肽段，可用于通过肽质谱指纹印迹或 MS/MS 光谱匹配进行蛋白鉴定，因此在蛋白质组学分析中有着很好的应用前景。另外，因其高度的专一性和高酶切活性，Lys-C 也可用于重组蛋白工业生产中的前体切割（如胰岛素前体），因此 Lys-C 目前在基因工程制药领域成为蛋白表达下游纯化的重要工具酶，尤其适用于生物工程制药业及基因工程、生物化学、分子生物学研究。

目前市场上的赖氨酸特异性酶大多为天然菌种的表达产物，已知有三种微生物可合成 Lys-C：产酶溶杆菌，水解无色杆菌，铜绿假单胞菌。赖氨酸特异性酶主要由产酶溶杆菌表达生产，其次为水解无色杆菌培养液中分离得到。天然提取的 Lys-C 价格极为昂贵，如 Promega 的 Lys-C 市价约为 370 元/μg。同时产酶溶杆菌作为 Lys-C 的主要产生菌，生产效率不高，发酵周期较长，且提取工艺比较复杂，这些大大限制了 Lys-C 的广泛应用。

目前天然提取的赖氨酸特异性酶不仅有限，而且成本高、得率低，也容易被其它杂质污染，从而导致目的蛋白降解。同时国内目前还未有赖氨酸特异性酶重组生产的企业，而进口 rLys-c 的价格较昂贵，大量购买进口 rLys-c 将会大大提高药物生产成本，因此，建立一种快速、简便、稳定、活性高 rLys-C 的生产方法，对于基因工程药物的开发以及生物学研究具有重要的应用与研究价值。

发明内容

本发明为了克服上述现有技术的缺陷和不足，提供了一种重组赖氨酸特异性酶制备方法，涉及重组赖氨酸特异性酶基因序列的设计、含有该基因的重组表达载体和基因工程菌的构建及重组赖氨酸特异性酶的制备方法。为重组赖氨酸特异性酶的工业生产提供了有效途径。

本发明一方面提供了一种高效表达重组赖氨酸特异性酶，该酶的 DNA 序列为 SEQ ID NO: 1。

上述重组赖氨酸特异性酶的氨基酸，其序列为 SEQ ID NO: 2。

一种重组载体，含有序列 SEQ ID NO: 1 的 pPIC9k-PIV。

本发明的技术方案另一方面提供了一种高效表达重组赖氨酸特异性酶的工程菌，所述工程菌为含序列 SEQ ID NO: 1 的毕赤酵母菌。

在本发明的一些实施方式中，所述的工程菌为 GS115/pPIC9k-PIV。

本发明的技术方案同时提供了一种高效表达重组赖氨酸特异性酶工程菌的构建方法，包括以下步骤：

- 1) 获得优化的 DNA 序列 SEQ ID NO: 1，在其 C 端添加 6×His 标签，并在基因序列 5' 端和 3' 端分别添加合适酶切位点与相 Kex2 位点，最终进行全基因合成，获得 PIV；
- 2) 将连接有前导肽 α 因子的 PIV 插入质粒 pPIC9k 中，得重组质粒 pPIC9k-PIV；
- 3) 将上述所得质粒 pPIC9k-PIV 进行 Sac 线性化，并电转至毕赤酵母 GS115 菌株中，经培养与酶活检测，筛选得高产菌株 GS115/pPIC9k-PIV。

一种利用上述基因工程菌生产重组赖氨酸特异性酶的方法，包括以下步骤，培养基因工程菌，并获得重组表达的重组赖氨酸特异性酶。

一种利用上述基因工程菌生产重组赖氨酸特异性酶的方法，其特征在于，包括以下步骤：

- a) 赖氨酸特异性酶高产菌株的筛选：将菌株接种至一级培养基中，在 28-30℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 15-20 时，转接至二级培养基中，28-30℃ 下震荡培养，每 8-12h 补加甲醇进行诱导表达，发酵 12-120h 后停止，离心培养液取上清；
- b) 发酵生产：将复筛后的菌株接种至发酵培养基中，在 28-30℃ 下培养至溶氧量达 70-80% 时，以 2-4ml/min 加入甘油 9~12 小时，加入含 1%~1.2%PTM1 的甲醇溶液进行诱导，60-72h 后每隔 4-12h 取发酵液进行酶活检测；
- c) 将上述培养液经分离、纯化后得到赖氨酸特异性酶蛋白的蛋白冻干粉。

在本发明的一些实施方式中，步骤 b) 发酵培养基中菌株的接种量为 1-5%。

在本发明的一些实施方式中步骤 a) 中甲醇诱导时的 pH 值为 4.0-8.0；步骤 b) 中甲醇诱导时培养基的 pH 值为 5.5-6.0。

在本发明的一些实施方式中，纯化选自交换层析、超滤或冻干。

除非明确地说明与此相反，否则，本发明引用的所有范围包括端值。例如，“步骤 a) 中甲醇诱导时的 pH 值为 4.0-8.0”，表示步骤 a 中甲醇诱导时的 pH 值为 $4.0 \leq \text{pH} \leq 8.0$ 。

本发明中的数字均为近似值，无论有否使用“大约”或“约”等字眼。数字的数值有可能会出现 1%、2%、5%、7%、8%、10% 等差异。每当公开一个具有 N 值的数字时，任何具有 N+/-1%，N+/-2%，N+/-3%，N+/-5%，N+/-7%，N+/-8% 或 N+/-10% 值的数字会被明确地公开，其中“+/-”是指加或减。

本发明在对重组赖氨酸特异性酶的基因进行改进后，并采用毕赤酵母菌表达产物，为重组赖氨酸特异性酶的工业生产提供了有效途径。与目前常用的产酶溶杆菌，水解无色杆菌，铜绿假单胞菌表达产物相比，克服了生产效率不高，发酵周期较长，且提取工艺比较复杂等缺点，在降低生产成本的同时还具有快速、简便、稳定等特点，且生产的 rLys-C 活性高，对于基因工程药物的开发以及生物学研究具有重要的应用与研究价值。

图 1 为重组表达质粒 pPIC9k-PIV 的示意图；

图 2 为 PIV 不同诱导时间发酵液上清酶活测定结果示意图；

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步具体详细描述，但本发明的实施方式不限于此，对于未特别注明的工艺参数，可参经常规技术进行。

实施例 1 重组表达质粒 pPIC9k-PIV 的构建

1. 重组赖氨酸特异性酶基因(PIV)的全合成

根据 GenBank 公布的赖氨酸特异性酶基因序列(AY062882)和氨基酸序列 (AAL47683.1)，按照酵母密码子优化策略，对赖氨酸特异性酶核酸序列进行优化，同时在其 C 端添加 6×His 标签，并在 PIV 基因序列 5' 端带有 *XhoI* 位点和 Kex2 蛋白酶酶切位点 Lys-Arg 对应的密码子 AAAAGA，3' 端添加 TGA 终止密码子和 *NotI* 位点，获得编码基因 PIV，最终交给基因合成公司进行全基因合成 (pUC57-PIV)。

2. 重组表达质粒 pPIC9k-PIV 的构建

利用 *XhoI* 和 *NotI* 位点处理过的中间载体 18T- α 为载体片段，与 pUC57-PIV 经 *XhoI* 和 *NotI* 双酶切回收得到的片段进行连接，筛选得到阳性质粒 18T- α -PIV。得到的阳性质粒 18T- α -PIV 经 *BamHI* 和 *NotI* 双酶切后，回收目的基因片段 (α -PIV)，与 pPIC9k 经 *BamHI* 和 *NotI* 双酶切后回收的载体片段进行连接，筛选得到最终重组表达质粒 pPIC9k-PIV，结果见图 1。利用 5' AOX1 和 3' AOX1 引物进行测序，测序结果显示克隆基因片段与理论一致。

实施例 2 毕赤酵母 GS115 生产赖氨酸特异性酶

1. pPIC9k-PIV 电转化

利用 *SacI* 酶切位点对表达质粒 pPIC9k-PIV 进行线性化，按照 Invitrogen 公司 EasySele Pichia Expression Kit 中的方法制备酵母宿主菌感受态，并电转至毕赤酵母 GS115 菌株中，涂布于 MD 平板上，30℃ 下培养 3-4 天长出单菌落。

2. 赖氨酸特异性酶高产菌株的筛选

挑选大小适中且较为饱满的单菌落接种至 BMGY 培养基 (质量百分比，酵母粉 1%、蛋白胨 2%、YNB1.34%、Glycerol 1%、生物素 0.004%、100mM 磷酸盐缓冲液)，30℃ 过夜培养，OD₆₀₀ 约为 15-20，转接至含有 50mL BMMY 培养基 (质量百分比，酵母粉 1%、蛋白胨 2%、YNB1.34%、生物素 0.004%、100mM 磷酸盐缓冲液) 的 500mL 锥形瓶中，于 220rpm 摇床中 30℃ 培养，每 12h 补加 1% 体积的甲醇进行诱导表达，共培养 96h。发酵完后取培养液，离心 (12000rpm, 5min, 4℃)，取上清。测定不同单菌落的发酵液酶活，筛选酶活较高的菌株，再进行第二轮复筛。

3. 赖氨酸特异性酶的发酵生产

具体方法为：以复筛得到的高产菌株（摇瓶发酵酶活 0.817U/mL）进行 50L 发酵罐发酵。种子液接种量为 5%，转接至装有 20L 基础培养基（甘油 40g/L、K₂SO₄ 17.5 g/L、MgSO₄ 14 g/L、KOH 3.2g/L、CaSO₄ 0.8g/L、PTM1 3ml/L，pH 为 6.0）的 50L 发酵罐中，培养 16-18h，待溶氧从接近 0% 上升到 70-80%，按 2mL/min 加入甘油 10 小时，开始诱导，优化诱导的 pH 为 5.5-6.0，稳定诱导期内加入含 1.2%PTM1 的甲醇诱导 60-72h，共发酵 121h，每隔 4h 取发酵液进行酶活检测，结果见图 2。

实施例 3 赖氨酸特异性酶的纯化与活性检测

1. 赖氨酸特异性酶的纯化

发酵液上清经超滤系统置换缓冲液，置换溶液为 30mMTris-HCl，膜包选择为 5k 分子量，面积为 0.1m²，超滤后的溶液经 pH5.0，0.1M NaAc 缓冲液平衡过的阳离子层析填料，上样量根据小试穿透情况确定，上样的 pH 调为 pH 5.0，电导 7.0ms/cm。并用 pH5.0，0.1M NaAc 缓冲液进行冲洗，紧接着用 0.1M NaAc 和 0.3M NaCl 缓冲液（pH 6.0）进行洗脱，最后用 0.5M NaOH 溶液进行再生，最后进行冻干，测定酶活，见表 1。

2. 赖氨酸特异性酶的酶活测定

1) 溶液配制：Tris-HCL 缓冲液（100mM，pH8.5）：称取 Tris2.428g 溶于 200mg 超纯水中，用 HCl 调 pH 至 8.5。Lys-C 底物溶液：取一支 5mg 装底物（N-p-Tosyl-Gly-Pro-Lys 4-硝基苯胺醋酸盐）直接用 3.939mL 超纯水溶解即得。

2) 实验过程：取 Tris-HCL 缓冲液 180μL，加入样品 10μL，底物溶液 10μL，混匀后用酶标仪，于 405nm 处，每隔 20S 读一次数，共 30min，反应温度 30℃，绘制动力学曲线，取反应初始阶段呈线性部分求酶活。

3) 计算公式：

$$\text{供试品酶活 (U/mL)} = \frac{\Delta A / t \times (Tv / Sv) \times N}{[\xi \times b]}$$

ΔA/t: 动力学曲线斜率（取反应初始阶段呈线性的部分）

Tv: 反应体系的体积

Sv: 加入样品的体积

b: 光径为 1cm

N: 样品稀释倍数

ξ: 摩尔消光系数（硝基苯胺为 9.620mL/μmol/cm）

4) 酶活定义：每分钟催化 1μmol 底物水解所需的酶量定义为一个酶单位。

表 1 赖氨酸特异性酶纯化富集后酶活测定结果

纯化步骤	酶活 (U/mL)	回收率(%)
发酵上清	13.32	
阳离子交换	75.09	43.28
超滤	80.97	62.17
冻干	7.763U/mg	75.35

SEQUENCE LISTING

<110> 广东东阳光药业有限公司

<120> 一种重组赖氨酸特异性酶的制备方法

<130> 2010

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1355

<212> DNA

<213> Lys-c

<400> 1

ctcgagaaaa gagccccagg agcctcagag atggcaggag atgtcgccgt tcttcaagcc	60
tcaccagctt ccacaggtca cgetagattc gctaacccta atgttgccac ttctgcagct	120
ggaattcatt ttgcegcacc acctgctaga agagttgcc a gagctgcccc attggctcca	180
aagcctggta ctctcttca agttgggtgc ggattgaaaa ccgcaactcc agaaattgat	240
cttgctacct tggagtggat cgatactcca gacggtagac atacagctag attccctatt	300
tccgcagctg gagccgcac acttagagct gccatcagat tggaaactag atctggttcc	360
ttgcctgatg acgttttget tcactttgca ggtgctggaa aggaaat ttt cgaggttct	420
ggtaaagatt tgtccgttaa cagaccatac tggctctctg tcatcgaagg agacacactt	480
accgttgagc ttgtcttgcc agctaatttg caacctggag atttgagatt gtcagttcca	540
caggtcagtt attttgc tga ttctttgtac aaggccggtt atagagacgg tttcggagct	600
tcaggaagtt gtgaggttga tgccgtctgc gcaactcaat ccggtacaag agcatacgac	660
aacgtacag cagctgttgc taagatggtc tttacctctt ccgccgacgg tggatcttac	720
atctgtactg gtacattgct taacaatgga aattccccta aaagacaatt gtttttgtca	780
gccgcacatt gtattgaaga tcaagctacc gctgccactt tgcagacaat ctggtttctac	840

aacactacac aatgctatgg tgacgcttcc actattaacc agtcagttac cgctcttact 900
 ggtggagcca atatcttgca cagagatgca aagagagaca ccttgctttt ggagttgaaa 960
 agaactccac ctgctgggtgt tttctaccaa ggatggagtg ccactccaat tgcaaacggt 1020
 tctttgggac atgatatcca tcacctaga ggtgacgcca agaaatacag tcagggaaat 1080
 gtttctgctg ttggtgtcac ttatgatgga cacacagcat tgaccagagt tgactggcca 1140
 tccgctgttg tcgaagggtg atcaagtggg tcaggacttt tgactgttgc tggagatgga 1200
 tcttatcaac ttagagggtg attgtacggg ggaccaagtt attgcggtgc tctacatct 1260
 cagagaaacg actattttctc cgatttcagt ggtgtttact cacagatttc cagatacttc 1320
 gcccctcacc atcatcatca tcattaggcg gccgc 1355

<210> 2
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Lys-C

<400> 2

Ala Pro Gly Ala Ser Glu Met Ala Gly Asp Val Ala Val Leu Gln Ala
 1 5 10 15

Ser Pro Ala Ser Thr Gly His Ala Arg Phe Ala Asn Pro Asn Ala Ala
 20 25 30

Thr Ser Ala Ala Gly Ile His Phe Ala Ala Pro Pro Ala Arg Arg Val
 35 40 45

Ala Arg Ala Ala Pro Leu Ala Pro Lys Pro Gly Thr Pro Leu Gln Val
 50 55 60

Gly Val Gly Leu Lys Thr Ala Thr Pro Glu Ile Asp Leu Ala Thr Leu
 65 70 75 80

Glu Trp Ile Asp Thr Pro Asp Gly Arg His Thr Ala Arg Phe Pro Ile
 85 90 95

Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ser Leu Arg Ala Ala Ile Arg Leu Glu Thr
 100 105 110

Arg Ser Gly Ser Leu Pro Asp Asp Val Leu Leu His Phe Ala Gly Ala
 115 120 125

Gly Lys Glu Ile Phe Glu Ala Ser Gly Lys Asp Leu Ser Val Asn Arg
 130 135 140

Pro Tyr Trp Ser Pro Val Ile Glu Gly Asp Thr Leu Thr Val Glu Leu
 145 150 155 160

Val Leu Pro Ala Asn Leu Gln Pro Gly Asp Leu Arg Leu Ser Val Pro
 165 170 175

Gln Val Ser Tyr Phe Ala Asp Ser Leu Tyr Lys Ala Gly Tyr Arg Asp
 180 185 190

Gly Phe Gly Ala Ser Gly Ser Cys Glu Val Asp Ala Val Cys Ala Thr
 195 200 205

Gln Ser Gly Thr Arg Ala Tyr Asp Asn Ala Thr Ala Ala Val Ala Lys
 210 215 220

Met Val Phe Thr Ser Ser Ala Asp Gly Gly Ser Tyr Ile Cys Thr Gly
 225 230 235 240

Thr Leu Leu Asn Asn Gly Asn Ser Pro Lys Arg Gln Leu Phe Trp Ser
 245 250 255

Ala Ala His Cys Ile Glu Asp Gln Ala Thr Ala Ala Thr Leu Gln Thr
 260 265 270

Ile Trp Phe Tyr Asn Thr Thr Gln Cys Tyr Gly Asp Ala Ser Thr Ile
 275 280 285

Asn Gln Ser Val Thr Val Leu Thr Gly Gly Ala Asn Ile Leu His Arg
 290 295 300

Asp Ala Lys Arg Asp Thr Leu Leu Leu Glu Leu Lys Arg Thr Pro Pro
 305 310 315 320

Ala Gly Val Phe Tyr Gln Gly Trp Ser Ala Thr Pro Ile Ala Asn Gly
 325 330 335

Ser Leu Gly His Asp Ile His His Pro Arg Gly Asp Ala Lys Lys Tyr
 340 345 350

Ser Gln Gly Asn Val Ser Ala Val Gly Val Thr Tyr Asp Gly His Thr
 355 360 365

Ala Leu Thr Arg Val Asp Trp Pro Ser Ala Val Val Glu Gly Gly Ser
 370 375 380

Ser Gly Ser Gly Leu Leu Thr Val Ala Gly Asp Gly Ser Tyr Gln Leu
 385 390 395 400

Arg Gly Gly Leu Tyr Gly Gly Pro Ser Tyr Cys Gly Ala Pro Thr Ser
 405 410 415

Gln Arg Asn Asp Tyr Phe Ser Asp Phe Ser Gly Val Tyr Ser Gln Ile
 420 425 430

Ser Arg Tyr Phe Ala Pro
 435

权 利 要 求 书

- 1.一种重组赖氨酸特异性酶，其特征在于，其核苷酸序列为 SEQ ID NO: 1。
- 2.根据权利要求 1 所述的重组赖氨酸特异性酶，其特征在于，其氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2。
- 3.一种重组载体，其特征在于，所述载体为含有序列 SEQ ID NO: 1 的 pPIC9k-PIV。
- 4.一种高效表达重组赖氨酸特异性酶的基因工程菌，其特征在于，所述工程菌为含序列 SEQ ID NO: 1 的毕赤酵母菌。
- 5.根据权利要求 4 所述的基因工程菌，其特征在于，所述的基因工程菌为 GS115/pPIC9k-PIV。
- 6.一种高效表达重组赖氨酸特异性酶工程菌的构建方法，其特征在于，包括以下步骤：
 - 1) 获得优化的 DNA 序列 SEQ ID NO: 1，在其 C 端添加 6×His 标签，并在基因序列 5' 端和 3' 端分别添加合适酶切位点与 Kex2 位点，最终进行全基因合成，获得 PIV；
 - 2) 将连接有前导肽 α 因子的 PIV 插入质粒 pPIC9k 中，得重组质粒 pPIC9k-PIV；
 - 3) 将上述所得质粒 pPIC9k-PIV 进行 *Sac* 线性化，并电转至毕赤酵母 GS115 菌株中，经培养与酶活检测，筛选得高产菌株 GS115/pPIC9k-PIV。
- 7.一种生产权利要求 1 所述重组赖氨酸特异性酶的方法，其特征在于，培养如权利要求 4~5 中任一项所述的基因工程菌，获得重组表达的所述重组赖氨酸特异性酶。
- 8.一种生产权利要求 1 所述重组赖氨酸特异性酶的方法，其特征在于，包括以下步骤：
 - a) 赖氨酸特异性酶高产菌株的筛选：将菌株接种至一级培养基中，在 28-30℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 15-20 时，转接至二级培养基中，在 28-30℃ 下震荡培养，每 8-12h 补加甲醇进行诱导表达，发酵 12-120h 后停止，离心培养液并取上清；
 - b) 发酵生产：将复筛后的菌株接种至发酵培养基中，在 28-30℃ 下培养至溶氧量达 70-80% 时，以 2-4ml/min 加入甘油 9~12 小时，加入含 1%~1.2%PTM1 的甲醇溶液进行诱导，60-72h 后每隔 4-12h 取发酵液进行酶活检测；
 - c) 将上述培养液经分离、纯化后得到赖氨酸特异性酶蛋白的蛋白冻干粉。
- 9.根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，步骤 b) 发酵培养基中菌株的接种量为 1-5%。
- 10.根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，步骤 a) 中甲醇诱导时的 pH 值为 4.0-8.0；步骤 b) 中甲醇诱导时培养基的 pH 值为 5.5-6.0。

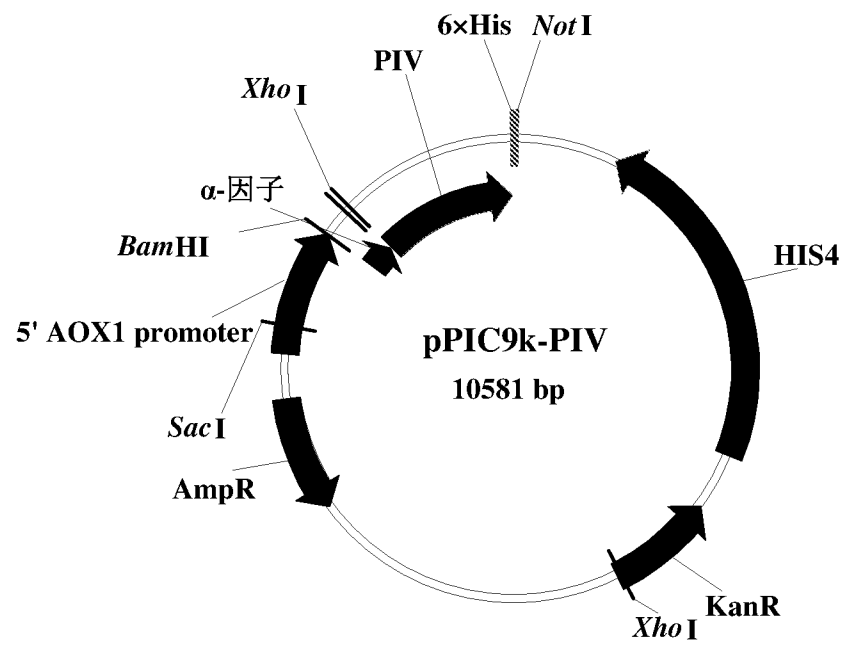


图 1

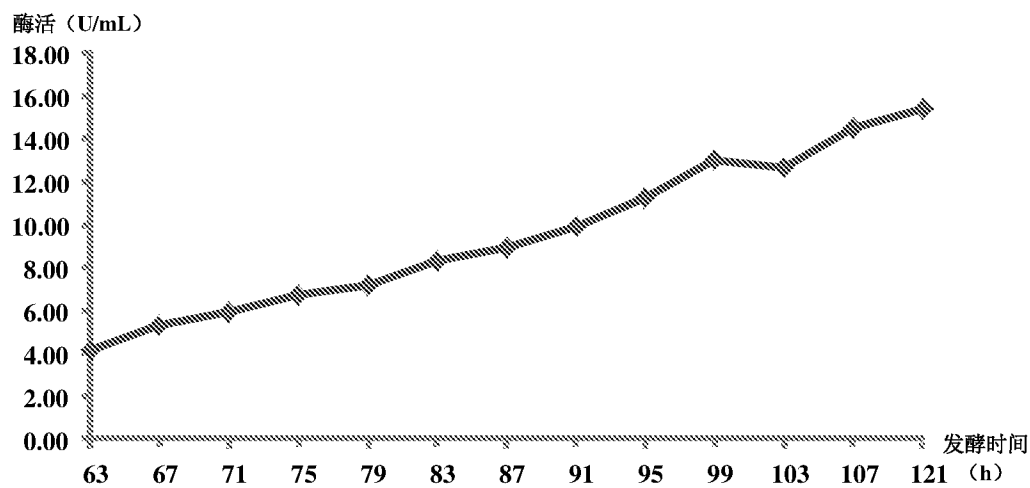


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/089324

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/60 (2006.01) i; C12N 15/81 (2006.01) i; C12N 1/19 (2006.01) i; C12R 1/84 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of knowledge: endonuclease, lysine-specific enzyme, lysine-specific, lysine, endoproteinase, endoprotease, endopeptidase, yeast, pichia, lys-c

GenBank + EMBL + DDBJ: search on SEQ ID NOs: 1 and 2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103865836 A (THE GENERAL HOSPITAL OF CHINESE PEOPLE'S LIBERATION ARMY et al.), 18 June 2014 (18.06.2014), see the whole document	1-10
Y	MA, Yan; "Research of Recombinant Lysine Endopeptidase Construction Expression and Activity", JOURNAL OF CHONGQING UNIVERSITY OF TECHNOLOGY (NATURAL SCIENCE), vol. 29, no. 4, 30 April 2015 (30.04.2015), ISSN: 1674-8425, pages 53-59, see pages 54-56	3-10
A	OHARA, T. et al., "Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of Achromobacter Protease I Gene", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 34, 05 December 1989 (05.12.1989), ISSN: 1083-351x, pages 20625-20831, see the whole document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20 September 2016 (20.09.2016)	Date of mailing of the international search report 09 October 2016 (09.10.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Qiyang Telephone No.: (86-10) 62088409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/089324

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Traidej, M. et al., "Identification of the Active Site Residues of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Protease IV", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 4, 24 January 2003 (24.01.2003), ISSN: 1083-351x, pages 2549-2553, see abstract, page 2549, left column, last paragraph & GenBank accession number AY062882	1-2
Y	TRAIDEJ, M. et al., "Identification of the Active Site Residues of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Protease IV", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 4, 24 January 2003 (24.01.2003), ISSN: 1083-351x, pages 2549-2553, see abstract, page 2549, left column, last paragraph & GenBank accession number AY062882	3-10

International application No.
PCT/CN2016/089324

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

A. 主题的分类 C12N 9/60(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12R 1/84(2006.01)n 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N, C12R 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of knowledge:赖氨酸特异性酶, 赖氨酸特异性, 赖氨酸, 内肽酶, 内切酶, 内切蛋白酶, 胞内蛋白酶, 肽链内切酶, 酵母, 毕赤, lysine-specific enzyme, lysine-specific, lysine, endoproteinase, endoprotease, endopeptidase, yeast, pichia, lys-c; GenBank+EMBL+DBJ:关于SEQ ID NOs:1和2的检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103865836 A (中国人民解放军总医院等) 2014年 6月 18日 (2014 - 06 - 18) 参见全文	1-10
Y	马妍. "重组赖氨酸内肽酶构建表达及活性方法研究" 重庆理工大学学报(自然科学), 第29卷, 第4期, 2015年 4月 30日 (2015 - 04 - 30), ISSN: 1674-8425, 第53-59页, 参见第54-56页	3-10
A	Takeshi Ohara等. "Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of Achromobacter Protease I Gene" The Journal of Biological Chemistry, 第264卷, 第34期, 1989年 12月 5日 (1989 - 12 - 05), ISSN: 1083-351x, 第20625-20831页, 参见全文	1-10
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2016年 9月 20日		2016年 10月 9日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		王启扬 电话号码 (86-10)62088409

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	Mullika Traidej等. "Identification of the Active Site Residues of Pseudomonas aeruginosa Protease IV" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第278卷, 第4期, 2003年 1月 24日 (2003 - 01 - 24), ISSN: 1083-351x, 第2549-2553页, 参见摘要, 第2549页左栏最后一段&GenBank 登录号AY062882	1-2
Y	Mullika Traidej等. "Identification of the Active Site Residues of Pseudomonas aeruginosa Protease IV" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第278卷, 第4期, 2003年 1月 24日 (2003 - 01 - 24), ISSN: 1083-351x, 第2549-2553页, 参见摘要, 第2549页左栏最后一段&GenBank 登录号AY062882	3-10

国际申请号
PCT/CN2016/089324

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 103865836 A	2014年 6月 18日	CN 103865836 B	2015年 3月 11日