

(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
2025 年 1 月 9 日 (09.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/007436 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/18 (2006.01) *C02F 3/34* (2023.01)
C12N 15/55 (2006.01) *C02F 101/34* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/122672

(22) 国际申请日: 2023 年 9 月 28 日 (28.09.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310827201.8 2023年7月6日 (06.07.2023) CN

(71) 申请人: 山东大学(SHANGDONG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国山东省青岛市即墨区滨海路 72 号, Shandong 266200 (CN)。青岛华大基因研究院(BGI RESEARCH, QINGDAO) [CN/CN]; 中国山东省青岛市黄岛区团结路 2877 号中德生态园管委会, Shandong 266426 (CN)。

(72) 发明人: 李盛英(LI, Shengying); 中国山东省青岛市即墨区滨海路 72 号, Shandong 266200 (CN)。刘琨(LIU, Kun); 中国山东省青岛市即墨区滨海路 72 号, Shandong 266200 (CN)。孟亮(MENG, Liang); 中国山东省青岛市黄岛区团结路 2877 号中德生态园管委会, Shandong 266426 (CN)。李登辉(LI, Denghui); 中国山东省青岛市黄岛区团结路 2877 号中德生态园管委会, Shandong 266426 (CN)。张成松(ZHANG, Chengsong); 中国山东省青岛市即墨区滨海路 72 号, Shandong 266200 (CN)。陆瑞(LU, Rui); 中国山东省青岛市黄岛区团结路 2877 号中德生态园管委会, Shandong 266426 (CN)。姬倩悦(JI, Qianyue); 中

国山东省青岛市黄岛区团结路 2877 号中德生态园管委会, Shandong 266426 (CN)。

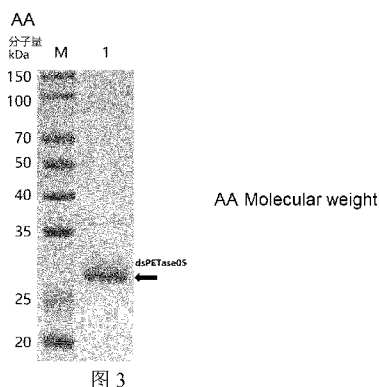
(74) 代理人: 青岛华慧泽专利代理事务所(普通合伙)(QINGDAO ARTFIX PATENT AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国山东省青岛市市南区香港中路 31 号银座中心 1903 室, Shandong 266000 (CN)。

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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)。

(54) Title: DEEP SEA-DERIVED PET HYDROLASE DSPETASE05 AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种深海来源的PET水解酶dsPETase05及其应用



(57) Abstract: The present invention relates to a deep sea-derived PET hydrolase and the use thereof. Provided is a deep sea-derived PET hydrolase dsPETase05, which has an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO. 1. Further provided is a gene encoding the PET hydrolytic enzyme dsPETase05, which gene has a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO. 2. The PET hydrolase dsPETase05 can exhibit a high hydrolytic activity against PET in a high-salt or high-temperature environment.

(57) 摘要: 涉及一种深海来源的PET水解酶及其应用。提供了一种深海来源的PET水解酶dsPETase05, 其氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。还提供了所述PET水解酶dsPETase05的编码基因, 其核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。PET水解酶dsPETase05能够在高盐或高温的环境下展现出对PET的高水解活性。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

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))。

一种深海来源的 PET 水解酶 dsPETase05 及其应用

技术领域

本发明属于生物化学和酶工程技术领域，具体涉及一种深海来源的 PET 水解酶及其应用。

背景技术

塑料因其耐久性、延展性、可塑性、稳定性、透光性等优良属性已遍布人类生产生活的各个方面。而塑料在常温下的化学惰性使得大量的塑料废弃物造成的白色污染日益严重，危害生态环境与人类健康。PET 是一类由对苯二甲酸和乙二醇为单体聚合而成的聚酯类塑料，在纺织产业、食品饮料包装等多个领域有着广泛应用。传统的 PET 处理手段如机械破碎、热塑再加工以及化学分解等方法成本昂贵，且会造成环境的二次污染。近年来，基于 PET 水解酶的生物酶法降解展现出巨大的应用潜力，如来自 PET 降解菌 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 中的 IsPETase(Yoshida et al., 2016)，以及来自于枝叶堆肥的宏基因组的 LCC(Sulaiman et al., 2012)，均有着很好的 PET 水解活性，而利用它们的突变体进行 PET 水解、单体回收以及 PET 再合成，已展现出 PET 的循环经济在理论上的可行性(Lu et al., 2022; Tournier et al., 2020)。

PET 水解酶的嗜盐性研究较少，来自嗜盐菌产期弧菌 (*Vibrio gazogenes*) 中的 PET6 被证明可耐受 0 ~ 2.5 M 的 NaCl，但其活性远远低于 IsPETase(Weigert et al., 2022)，因此，高盐条件下能够表现出高 PET 水解活性的酶目前是一个空白。

发明内容

本发明的目的是解决现有的高 PET 水解活性的酶不能耐受高盐环境的问题，提供一种来自深海 1199 米处热泉的宏基因组中挖掘并鉴定的 PET 水解酶 dsPETase05，该酶能够在高盐或高温的环境下展现出对 PET 的高水解活性。

本发明解决其技术问题采用的技术方案是：一种深海来源的 PET 水解酶 dsPETase05，其氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示。

优选地，本发明还提供了编码所述 PET 水解酶 dsPETase05 的基因，其核苷酸序列如 SEQ ID No.2 所示。

优选地，本发明还提供了所述 PET 水解酶 dsPETase05 的载体，所述载体中

包含所述的基因。

优选地，所述的载体为真核载体或者原核载体。

优选地，所述的载体为质粒载体或者病毒载体。

优选地，本发明还提供了包含所述的载体的宿主细胞。

优选地，所述的宿主细胞为细菌。

优选地，本发明还进一步提供了所述的 PET 水解酶 dsPETase05、所述的载体、所述的宿主细胞在高盐或高温条件下降解 PET 中的应用。

优选地，本发明还进一步提供了 PET 降解剂，该 PET 降解剂含有所述的 PET 水解酶 dsPETase05、所述的表载体、所述的宿主细胞中的至少一种。

与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：本发明提供的 PET 水解酶 dsPETase05 能够在各种高盐浓度或高温条件下，表现出高效的 PET 水解能力，生成单羟乙基对苯二甲酸（MHET）、对苯二甲酸（TPA）和乙二醇（EG），从而实现 PET 的酶法降解。本发明的 dsPETase05 具有嗜盐性，且在高盐条件下能够展现出更高的活性与稳定性；同时，该酶嗜盐的特性使其更好的适用于高盐的工业废水、污水处理，因此本发明在环保、催化领域都有着重要意义。

附图说明

图 1 为 dsPETase05 在不同 NaCl 下催化 PET 水解；

图 2 为表达 dsPETase05 的 pDSP05 质粒图谱；

图 3 为纯化后的 dsPETase05 的 SDS-PAGE 分析；

图 4 为 dsPETase05 在不同盐浓度下催化 PET 水解 48 小时的产物浓度；HPLC 可检测到的水解产物为 TPA 与 MHET，以反应液中 TPA 与 MHET 的浓度之和表现 PET 水解活性的大小；

图 5 为 dsPETase05 在不同盐浓度下催化 PET 水解 120 小时的产物浓度；HPLC 可检测到的水解产物为 TPA 与 MHET，以反应液中 TPA 与 MHET 的浓度之和表现 PET 水解活性的大小；

图 6 为 dsPETase05 催化 scPET 膜的完全降解；试管中反应体系为 3mL，scPET 为 3mg，反应时间见左侧箭头标注，酶浓度标注于酶名称的下方；

图 7 为 dsPETase05 在不同温度下催化 PET 水解 48 小时的产物浓度；HPLC 可检测到的水解产物为 TPA 与 MHET，以反应液中 TPA 与 MHET 的浓度之和表

现 PET 水解活性的大小;

图 8 为 dsPETase05 在不同温度下催化 PET 水解 120 小时的产物浓度;HPLC 可检测到的水解产物为 TPA 与 MHET,以反应液中 TPA 与 MHET 的浓度之和表现 PET 水解活性的大小;

图 9 为 dsPETase05、HotPETase 和 FAST-PETase 催化 PET 水解产物浓度对比: A, dsPETase05 与 FAST-PETase 的活性比较; B, dsPETase05 与 FAST-PETase 的活性比较; FAST-PETase-0 和 HotPET-0 反应体系里未添加 NaCl, dsPETase05、FAST-PETase-6 和 HotPET-6 反应体系里添加了 5.3M NaCl。

具体实施方式

为了便于理解本研究,下面结合附图和具体实施例,对本研究进行更详细的说明。但是,本研究可以以许多不同的形式来实现,并不限于本说明书所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本研究公开内容的理解更加透彻全面。

本发明从深海宏基因组中间进行筛选,筛选得到一个酶,将其命名为 dsPETase05。以下通过实验对该酶进行功能特性及催化活性的测试和验证。

1.dsPETase05 的底物的制备

采用 GfPET (ES301445, Goodfellow, Huntingdon, England)验证 dsPETase05 功能,通过打孔器将制备成直径 6mm 的 GfPET 膜作为反应的底物。

scPET 膜的制备:通过溶剂溶解—挥发的方式自制 scPET 膜来检测 PET 水解活性的报道见参考文献(Liu et al., 2023; Cui et al., 2021)。本实例中所制备的 scPET 膜方法为:将 2 mL 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇 (HFIP) 溶解的 GfPET (40 mg/mL)均匀涂膜在直径为 10 cm 的平板玻璃板上,在室温下过夜蒸发 HFIP,在 75%乙醇中孵育 2 小时,将所得 scPET 膜从玻璃板上剥离。

2.dsPETase05 基因与蛋白序列分析

为了确定 dsPETase05 氨基酸序列的新颖性,本发明通过在线 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在 GenBank 中搜索它的同源蛋白并按序列相似性排列,如表 1 所列的为 GeneBank 数据库中与 dsPETase05 一致性最高的 30 个序列,其中与 dsPETase05 进化上最相近的蛋白的一致性为 99.31%,说明该蛋白的全长序列 (SEQ ID No.1) 尚未公开披露过,具有新颖性。

表 1. GeneBank 中与 dsPETase05 一致性最高的 30 个蛋白序列

GeneBank 序列号	Amino acids length	Identity (%)
MAQ51590.1	289	99.31
MAB42154.1	289	98.96
WP_083728668.1	289	98.96
RGP55161.1	289	95.16
WP_104739856.1	288	90.66
WP_118130543.1	275	95.64
WP_096004083.1	274	95.27
WP_269687148.1	289	91
WP_088273867.1	289	90.31
WP_228247456.1	290	88.62
MCK5533399.1	286	89.51
MAD27507.1	289	89.62
MAS66547.1	290	87.24
HDY98191.1	275	85.82
WP_238873665.1	275	94.55
WP_092283111.1	289	87.54
WP_092283112.1	289	84.43
WP_123889470.1	289	82.75
WP_123889471.1	288	78.89
HDY98190.1	290	81.38
HDY98189.1	288	82.01
WP_105644616.1	285	71.63
WP_093392992.1	287	73.7
GGI97475.1	286	69.2
WP_090537522.1	287	69.2
NLC01677.1	287	69.2
SER63710.1	287	69.28
EZQ14005.1	287	69.28
WP_095626218.1	286	75.78

3.dsPETase05 基因的克隆

通过 dsPETase 氨基酸序列进行全基因合成，并针对大肠杆菌表达做密码子优化，合成的序列见 SEQ ID No.2。以 DSP05-F 及 DSP05-R 为引物对 dsPETase05 基因片段进行扩增。以 pET32a-LIC 为模板，32a-F 及 32a-R 为引物对 pET32a 进行线性化扩增。引物序列如表 2 所示。PCR 扩增条件为：98℃ 10 分钟；98℃ 10 秒，55℃ 30 秒，72℃ 1 分钟，循环 35 次；72℃ 5 分钟。将获得的 dsPETase05 片段与线性化的 pET32a 载体片段利用无缝克隆试剂盒（ClonExpress II One Step Cloning Kit，诺唯赞，南京）进行连接形成表达载体 pDSP05，图谱如图 2 所示，

并转化大肠杆菌表达菌株 *Escherichia coli*Rosseta-gami 2(DE3), 获得表达菌株 RgDSP05。菌株 RgDSP05 表达 N 端带有 Trx-His6 tag 标签的融合蛋白, 并可通过 TEV 蛋白酶将 N 端标签切除, 通过两次 Ni-NTA 亲和层析可获得无蛋白标签的 dsPETase05 以进行活性检测。

表 2. dsPETase05 克隆至 pET32a-LIC 的引物及其序列

片段	引物名称	引物序列 (5' - 3')
dsPETase05	DSP05-F	AAAACTTGTATTTCAGAGCATGACCAATCCTGGTGGTG
	DSP05-R	TGGTGGTGGTGCTCGAGTCAGTTAATGCCTTTGCGGC
线性化	32a-F	TGACTCGAGCACCACCACCA
pET32a-LIC 载体	32a-R	GCTCTGGAAATACAAGTTTTTCGG

4.dsPETase05 的表达与纯化

挑取 RgDSP05 单克隆接到培养基中 (含有 50 µg/mL 氨苄青霉素和 10 µg/ml 氯霉素双抗性) 进行种子液培养, 37 °C 220 rpm 摇床培养 8-12 h; 扩大培养的比例为 1:500 ~ 1:100, 37 °C 220 rpm 摇床培养约 4 ~ 6 小时, 当 OD₆₀₀ 达到 0.6 ~ 0.8 时加入 IPTG 开始诱导, IPTG 终浓度可以为 0.2~1 mM。诱导条件为 18 ~30 °C 诱导 18-24 h。将诱导结束的菌液在 4 °C 3000 ~ 6000 g 条件下离心 10 分钟, 收集菌体。

收集的菌体用 50 mL 预冷的 lysis buffer 重悬, 在冰浴中利用超声破碎仪对菌体进行破碎, 破碎程序为功率为 290 W, 超声破碎 4 s, 停止 8 s, 超声总时长为 15 min。在 4 °C 13000 g 60 min 条件下离心取上清, 上清液与 3mL Ni-NTA 树脂在 4 °C 的下孵育 1 小时使目标蛋白与树脂充分结合, 先后用 15 mL lysisbuffer 和 15 mL wash buffer 冲洗, 用 5mL elution buffer 洗脱收集目标蛋白, 用 Ultracel-30K 的超滤管对洗脱液浓缩至 2.5 mL。将脱盐柱 PD-10 用 25 mL desalting buffer 平衡, 将 2.5 mL 浓缩蛋白液加入到脱盐柱 PD-10 中, 加入 3.5 mL 的 desalting buffer 收集蛋白, 向收集到的蛋白液加入 10 µL 的带有 His6 tag 的 TEV 蛋白酶 4 °C 孵育 12 小时。Ni-NTA 树脂用 20 ml desalting buffer 平衡, 加入 3mL Ni-NTA 树脂在 4 °C 的下孵育 1 小时 Trx-His6 tag 以及 TEV 酶与树脂充分结合, 收集流出液即为无标签的 dsPETase05。用 Ultracel-30K 的超滤管将 dsPETase05 浓缩至 1 mL, 用微量分光光度计检测 280 nm 的吸光值以测定纯化蛋白质的浓度, 取 5 µL 蛋白用于 SDS-PAGE 检测, 检测结果如图 3 所示。剩余蛋白用液氮速冻并保存于 -80 °C。

上述蛋白纯化-各缓冲液配方:

Lysis buffer (1L): 3.03 g Tris、8.77 g NaCl、100 g 甘油, 1.36 g 咪唑, pH 7.5。

Wash buffer (1L): 3.03 g Tris、8.77 g NaCl、100 g 甘油, 2.72 g 咪唑, pH 7.5。

Elution buffer (1L): 3.03 g Tris、8.77g NaCl、100 g 甘油, 10.2 g 咪唑, pH 7.5。

Desalting buffer (1L): 3.03 g Tris、8.77g NaCl、100 g 甘油, pH 7.5。

5.dsPETase05 在不同盐浓度下催化 GfPET 水解反应

直径 6mm 的 GfPET 膜为反应底物, 50 mM Tris-HCl 中加入不同浓度的 NaCl 作为反应缓冲液, 调整各缓冲液的 pH 至 9.0。NaCl 的浓度为: 0M, 0.6M, 1.2M, 1.9 M, 2.8 M, 3.7M, 4.5 M, 5.3 M, 反应总体积 500 μ L, 酶终浓度 50 nM, 反应温度 37 $^{\circ}$ C。IsPETase 以相同条件反应以进行活性比较, 每个反应设三个重复。反应 48 和 120 小时分别取 100 μ L 样品, 加入 200 μ L 甲醇终止反应之后用 100 $^{\circ}$ C 处理 10min 使酶失活, 离心取上清液进行 HPLC 检测。

HPLC 检测所用仪器型号为 Agilent Technologies 1220 infinity LC, 分析柱型号 ZORBAX SB-C18, 柱温 30 $^{\circ}$ C。流动相 A 为含 0.1% 三氯乙酸的去离子水, 流动相 B 为含 0.1% TCA 的乙腈, 流速固定为 1 mL/min。PET 水解产物 TPA 和 MHET 可通过如下梯度的流动相分离: 0~5 分钟, 15% B; 5~20 分钟, 15%~100% B 梯度; 20~25 分钟, 100%~15% B 梯度; 25~30 分钟, 15% B。检测波长为 254 nm。产生的 TPA 和 MHET 的浓度根据标准样品进行计算。

反应结果如图 4、图 5 所示。从结果可见, IsPETase 在不加 NaCl 的条件下表现出最高活性, 因此在该条件下的 IsPETase 催化的 PET 水解反应作为参照。

48 小时反应结果如图 4 所示, dsPETase05 在所有 NaCl 条件下均能表现出 PET 水解活性, 且活性随着 NaCl 浓度的增加而提高, 当达到 5.3 M 时表现出最高的活性, 在该时间点下表现出的活性是 IsPETase 的 5.4 倍。

120 小时反应结果如图 5 所示, dsPETase05 在所有 NaCl 条件下均能表现出 PET 水解活性, 且活性随着 NaCl 浓度的增加而提高, 当达到 5.3 M 时表现出最高的活性, 在该时间点下表现出的活性是 IsPETase 的 16 倍。

6.dsPETase05 在不同盐浓度下催化 scPET 膜的水解反应

dsPETase05 的 PET 水解活性可通过对自制 scPET 膜的完全水解来展现。称

取 3 mg scPET 薄膜放入玻璃试管中, 随后加入 3mL 反应液: *IsPETase* 反应液中包含 50 mM tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0) 和 500 nM 酶; *dsPETase05* 反应液中包含 50 mM tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0), 5.3 M NaCl, 以及 500 nM 酶。在总计为 10 天的反应时间里每 2 天进行拍照观察 scPET 膜的降解情况。结果如图 6 所示, *dsPETase05* 在 500 nM 浓度下在 6 天时能看到明显的 scPET 膜的降解, 且在 10 天内能够一直保持活性, 10 天内能够催化大部分 scPET 发生降解; 而作为对照的 *IsPETase*, 在 10 天的反应过程中并未观察到明显的降解现象。

以上结果表明 *dsPETase05* 在高盐条件下具有更高活性的同时也具有很高的稳定性。

7. *dsPETase05* 在不同温度度下催化 GfPET 水解反应

直径 6mm 的 GfPET 膜为反应底物, 50 mM Tris-HCl 中加入 5.3 M 的 NaCl, 调整各缓冲液的 pH 至 9.0。反应总体积 500 μ L, 酶终浓度 50 nM, 反应温度为 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、75 $^{\circ}$ C, 每个反应设三个重复。反应 48 和 120 小时分别取 100 μ L 样品, 加入 200 μ L 甲醇终止反应之后用 100 $^{\circ}$ C 处理 10 min 使酶失活, 离心取上清液进行 HPLC 检测。

HPLC 检测所用仪器型号为 Agilent Technologies 1220 infinity LC, 分析柱型号 ZORBAX SB-C18, 柱温 30 $^{\circ}$ C。流动相 A 为含 0.1% 三氯乙酸的去离子水, 流动相 B 为含 0.1% TCA 的乙腈, 流速固定为 1 mL/min。PET 水解产物 TPA 和 MHET 可通过如下梯度的流动相分离: 0 ~ 5 分钟, 15% B; 5 ~ 20 分钟, 15% ~ 100% B 梯度; 20 ~ 25 分钟, 100% ~ 15% B 梯度; 25 ~ 30 分钟, 15% B。检测波长为 254 nm。产生的 TPA 和 MHET 的浓度根据标准样品进行计算。

48 小时反应结果如图 7 所示, *dsPETase05* 催化的水解产物量在 25 $^{\circ}$ C 到 55 $^{\circ}$ C 下随着温度的升高而增加, 并且在 55 $^{\circ}$ C 达到最高, 之后 55 $^{\circ}$ C 到 75 $^{\circ}$ C 随着温度的升高而降低。

120 小时反应结果如图 8 所示, *dsPETase05* 催化的水解产物量在 25 $^{\circ}$ C 到 55 $^{\circ}$ C 下随着温度的升高而增加, 并且在 55 $^{\circ}$ C 达到最高, 之后 55 $^{\circ}$ C 到 75 $^{\circ}$ C 随着温度的升高而降低。

8. *dsPETase05* 催化活性与高活性突变体 HotPETase、FAST-PETase 的比较

IsPETase 的两个最具代表性的突变体 HotPETase(Bell et al., 2022) 和

FAST-PETase(Lu et al., 2022)具有比野生型更高的活性,也是目前报道的表现最好的两个 PET 水解酶突变体。本实例以直径 6mm 的 GfPET 膜为反应底物,对比 dsPETase05 与这两个突变体的活性。dsPETase05 反应体系为 50 mMTris-HCl + 5.3M NaCl, 55℃孵育; HotPETase 反应体系为 50 mMTris-HCl 或 50 mMTris-HCl + 5.3 MNaCl, 50℃孵育; FAST-PETase 反应体系为 50 mMTris-HCl 或 50 mMTris-HCl + 5.3 M NaCl, 40℃孵育。所有酶终浓度均为 50 nM, 每个反应设三个重复, 取样时间设置为 8 小时、24 小时、48 小时、72 小时、96 小时、120 小时。分别取 20 μ L 样品, 加入 120 μ L 甲醇和 40 μ L 去离子水终止反应之后用 100℃ 处理 10 min 使酶失活, 离心取上清液进行 HPLC 检测。

HPLC 检测所用仪器型号为 Agilent Technologies 1220 infinity LC, 分析柱型号 ZORBAX SB-C18, 柱温 30℃。流动相 A 为含 0.1%三氯乙酸的去离子水, 流动相 B 为含 0.1% TCA 的乙腈, 流速固定为 1 mL/min。PET 水解产物 TPA 和 MHET 可通过如下梯度的流动相分离: 0~5 分钟, 15% B; 5~20 分钟, 15%~100% B 梯度; 20~25 分钟, 100%~15% B 梯度; 25~30 分钟, 15% B。检测波长为 254 nm。产生的 TPA 和 MHET 的浓度根据标准样品进行计算。

反应结果如图 9 所示, 在 5.3 MNaCl 存在下, HotPETase 和 FAST-PETase 失去了大部分活性, 只有在不加 NaCl 的缓冲体系中才能正常表现活性。而 dsPETase05 的酶活性在各个时间点均高于 HotPETase 和 FAST-PETase, 120 小时总产物的量为 HotPETase 的 2.5 倍, 为 FAST-PETase 的 4.5 倍。本实例证明了 dsPETase05 酶的嗜盐和嗜温的特性, 且在高盐、高温下表现出比 *Is*PETase 酶工程改造后的突变体更好的催化能力。

权利要求书

- 1.一种深海来源的 PET 水解酶 dsPETase05, 其特征在于: 其氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示。
- 2.编码如权利要求 1 所述的 PET 水解酶 dsPETase05 的基因, 其特征在于: 其核苷酸序列如 SEQ ID No.2 所示。
- 3.包含如权利要求 2 所述的基因的载体。
- 4.根据权利要求 3 所述的载体, 其特征在于: 所述的载体为真核载体或者原核载体。
- 5.根据权利要求 3 所述的载体, 其特征在于: 所述的载体为质粒载体或者病毒载体。
- 6.包含如权利要求 3-5 任一项所述的表达载体的宿主细胞。
- 7.根据权利要求 6 所述的宿主细胞, 其特征在于: 所述的宿主细胞为细菌
- 8.如权利要求 1 所述的 PET 水解酶 dsPETase05、权利要求 3-5 任一项所述的载体或权利要求 6-7 任一项所述的宿主细胞在降解 PET 中的应用。
- 9.根据权利要求 8 所述的应用, 其特征在于: 在高盐或高温条件下降解 PET。
10. PET 降解剂, 其特征在于: 含有权利要求 1 所述的 PET 水解酶 dsPETase05、权利要求 3-5 任一项所述的载体、权利要求 6-7 任一项所述的宿主细胞中的至少一种。

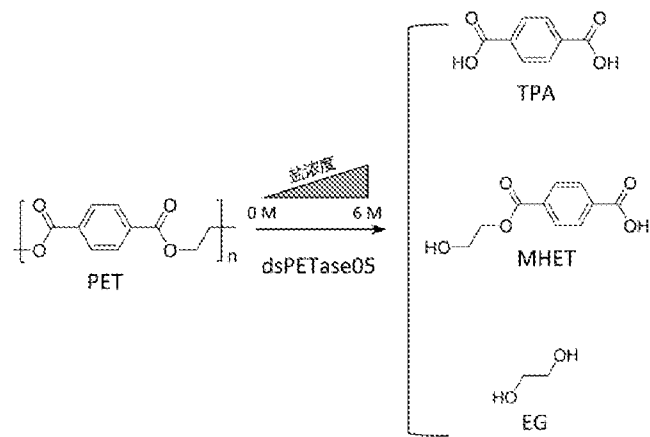


图 1

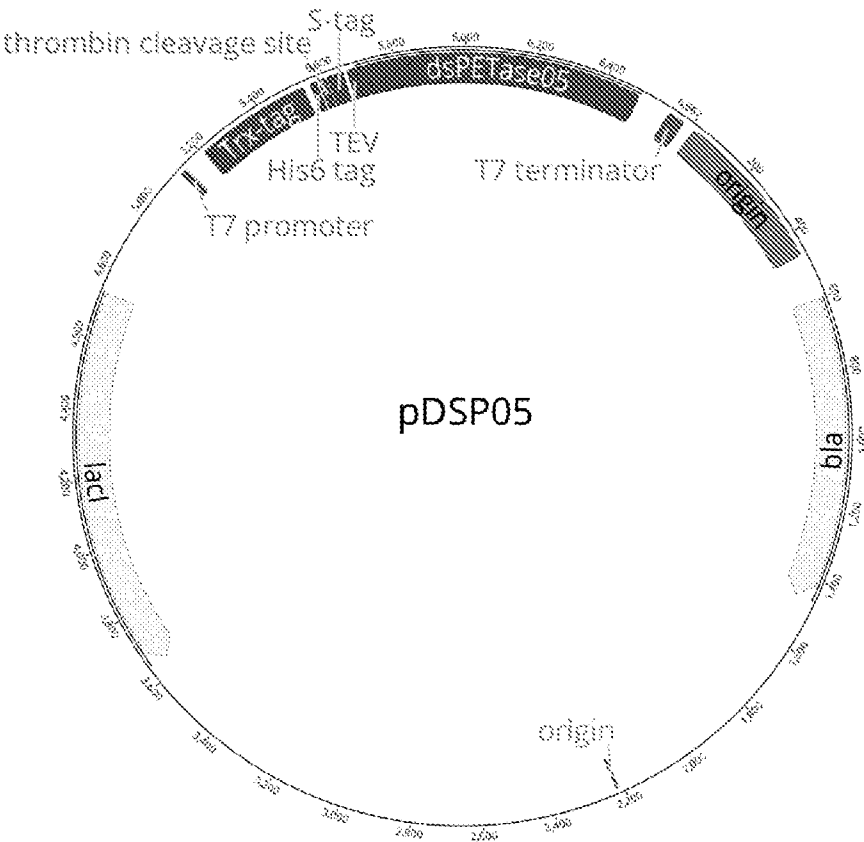


图 2

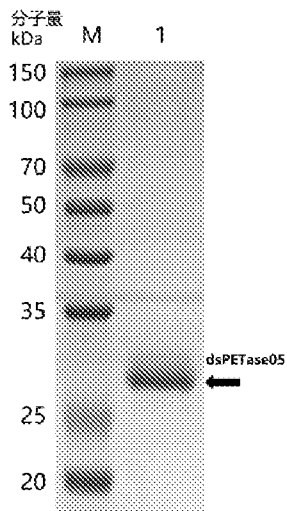


图 3

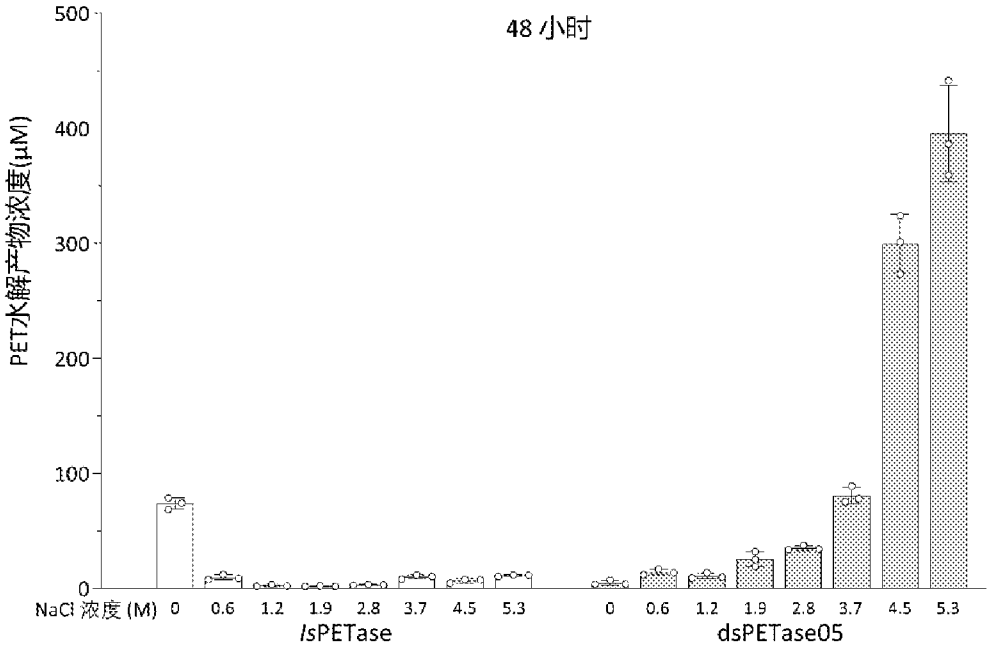


图 4

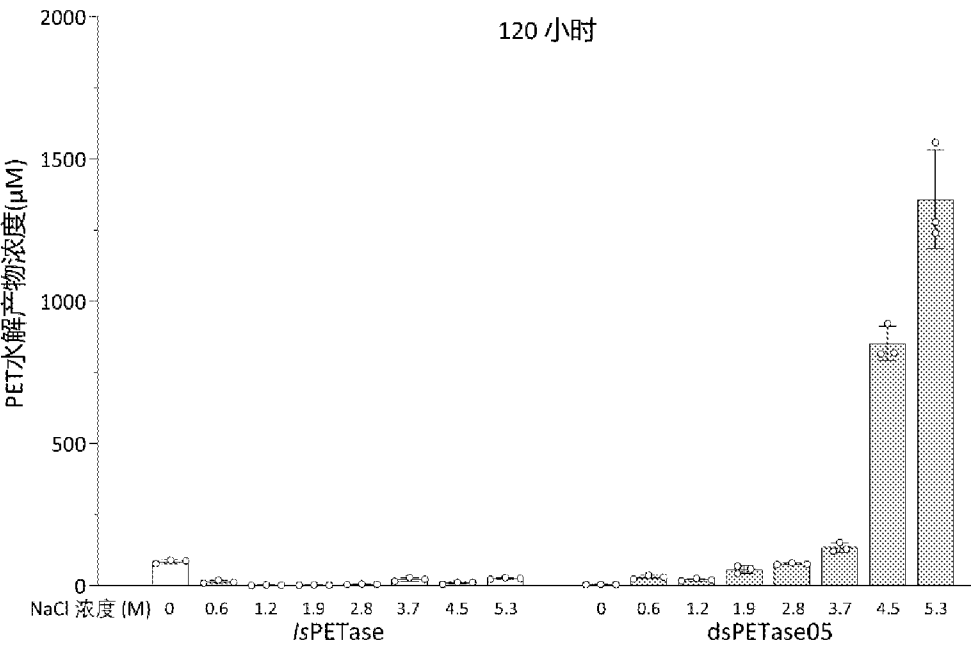


图 5

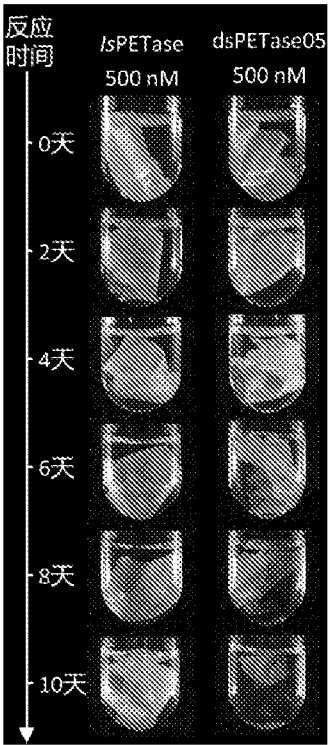


图 6

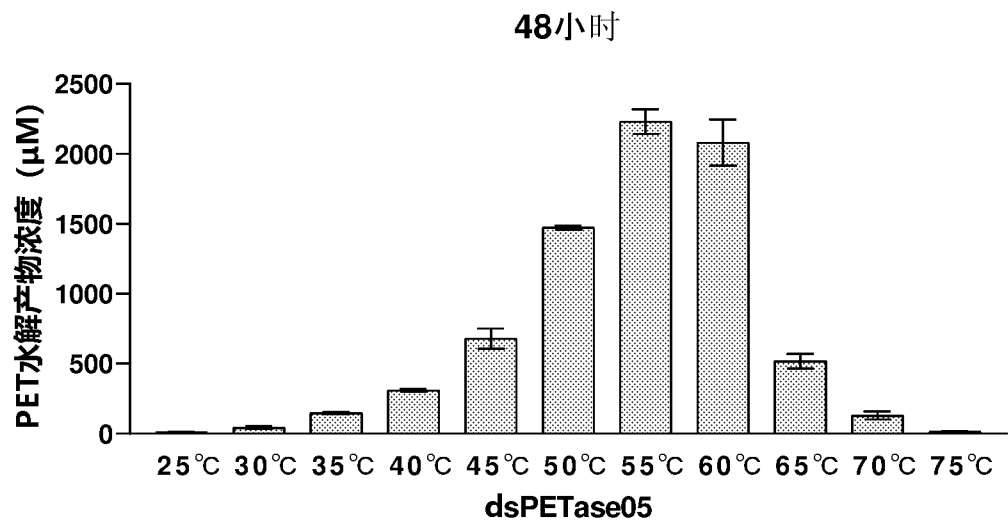


图 7

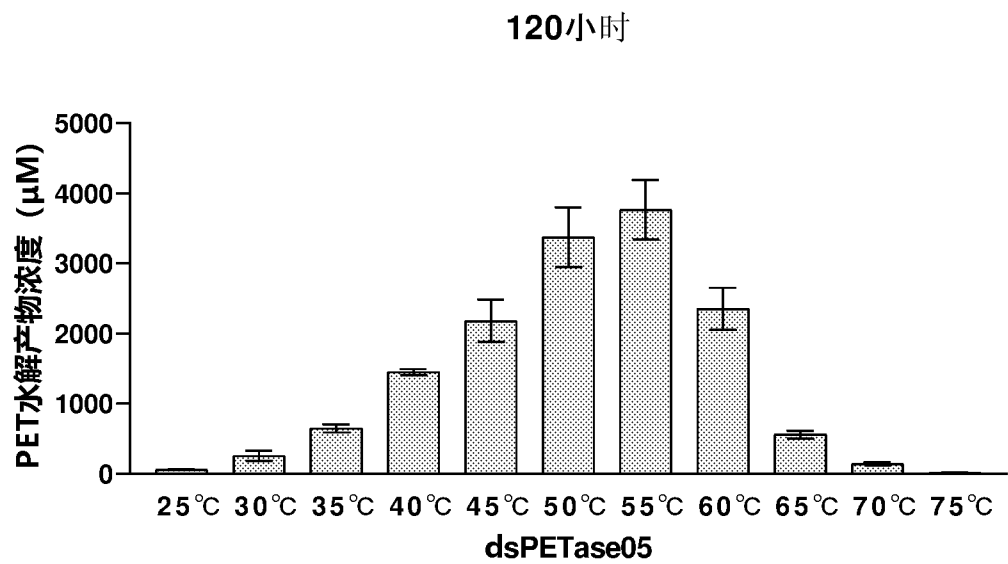


图 8

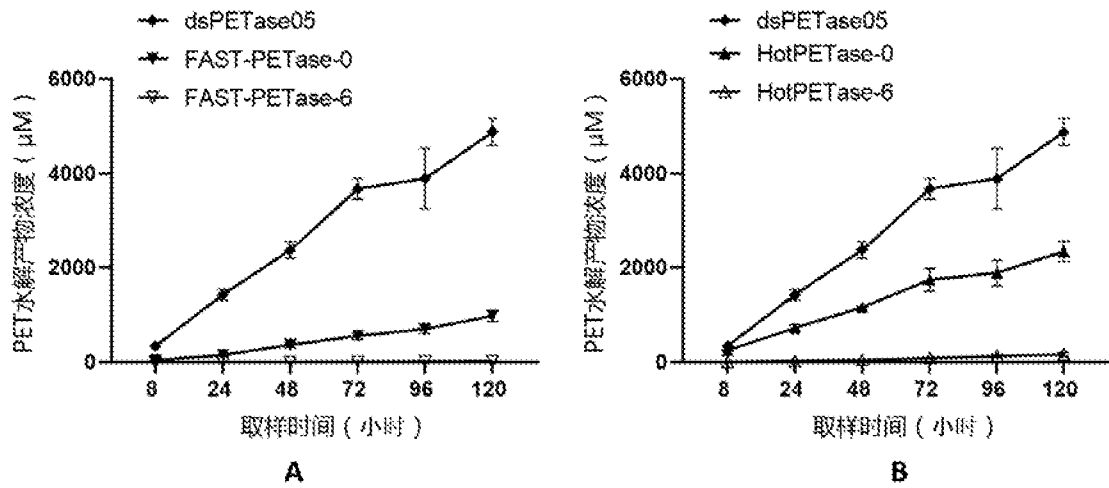


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/122672

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/18(2006.01)i; C12N15/55(2006.01)i; C02F3/34(2023.01)i; C02F101/34(2006.01)i

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)

IPC: C12N; C02F

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)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, EPTXT, WOTXT, USTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, Bing, NCBI, STN: PET水解酶, PET hydrolase, PET hydrolytic enzyme, 聚对苯二甲酸乙二醇酯, poly(ethylene terephthalate), PET, dsPETase05, 深海, deep sea, 宏基因组, marine metagenome, SEQ ID NOs: 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenPept. "WP_083728668.1" , 17 April 2017 (2017-04-17), entire document	1-7
Y	GenPept. "WP_083728668.1" , 17 April 2017 (2017-04-17), entire document	8-10
Y	赵之怡等 (ZHAO, Zhiyi et al.). "聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶研究进展 (Advances in Poly(Ethylene Terephthalate)hydrolases)" 生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology), Vol. 39, No. 5, 25 May 2023 (2023-05-25), 1998-2014 page 2004, left column, last paragraph to page 2005, right column, paragraph 1	8-10
X	GenPept. "MAB42154.1" , 13 July 2018 (2018-07-13), entire document	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 December 2023

Date of mailing of the international search report

12 December 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/122672

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GenPept. "MAB42154.1" , 13 July 2018 (2018-07-13), entire document	8-10
Y	石利霞等 (SHI, Lixia et al.). "PET 水解酶的研究进展 (Research Advance in Polyethylene Terephthalate Hydrolytic Enzymes)" 生物技术通报 (<i>Biotechnology Bulletin</i>), Vol. 36, No. 10, 31 December 2020 (2020-12-31), 226-236 page 227, right column, page 229 left column, and page 231 right column to page 232 left column	8-10
A	CN 108467857 A (SICHUAN UNIVERSITY) 31 August 2018 (2018-08-31) entire document	1-10
A	WO 2022043545 A1 (CYCLEZYME AB) 03 March 2022 (2022-03-03) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/122672

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/122672

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	108467857	A	31 August 2018	None		
WO	2022043545	A1	03 March 2022	EP	4204549 A1	05 July 2023

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

A. 主题的分类 C12N9/18(2006.01)i; C12N15/55(2006.01)i; C02F3/34(2023.01)i; C02F101/34(2006.01)i 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) IPC: C12N; C02F 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)) CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, EPTXT, WOTXT, USTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, Bing, NCBI, STN: PET水解酶, PET hydrolase, PET hydrolytic enzyme, 聚对苯二甲酸乙二醇酯, poly(ethylene terephthalate), PET, dsPETase05, 深海, deep sea, 宏基因组, marine metagenome, SEQ ID NOs: 1-2		
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	GenPept. "WP_083728668.1" , 2017年4月17日 (2017 - 04 - 17), 全文	1-7
Y	GenPept. "WP_083728668.1" , 2017年4月17日 (2017 - 04 - 17), 全文	8-10
Y	赵之怡等. "聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶研究进展" 生物工程学报, 第39卷, 第5期, 2023年5月25日 (2023 - 05 - 25), 1998-2014 第2004页左栏最后一段至2005页右栏第一段	8-10
X	GenPept. "MAB42154.1" , 2018年7月13日 (2018 - 07 - 13), 全文	1-7
Y	GenPept. "MAB42154.1" , 2018年7月13日 (2018 - 07 - 13), 全文	8-10
☒ 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 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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 2023年12月6日		国际检索报告邮寄日期 2023年12月12日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		授权官员 张蕾 电话号码 (+86) 010-53962037

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
Y	石利霞等. "PET 水解酶的研究进展" 生物技术通报, 第36卷, 第10期, 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 226-236 第227页右栏, 第229页左栏, 第231页右栏至第232页左栏	8-10
A	CN 108467857 A (四川大学) 2018年8月31日 (2018 - 08 - 31) 全文	1-10
A	WO 2022043545 A1 (CYCLEZYME AB) 2022年3月3日 (2022 - 03 - 03) 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/122672

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	108467857	A	2018年8月31日	无	
WO	2022043545	A1	2022年3月3日	EP	4204549 A1 2023年7月5日