[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480014688.3

[45] 授权公告日 2008 年 9 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 100418985C

[22] 申请日 2004.4.23
[21] 申请号 200480014688.3
[30] 优先权
[32] 2003. 4.23 [33] DK [31] PA200300616
[32] 2003. 4.23 [33] US [31] 60/464,663
[86] 国际申请 PCT/DK2004/000282 2004.4.23
[87] 国际公布 WO2004/094478 英 2004.11.4
[85] 进入国家阶段日期 2005.11.28
[73] 专利权人 弗·哈夫曼 - 拉罗切有限公司
地址 瑞士巴塞尔
共同专利权人 伯瑞恩药物私人有限公司
[72] 发明人 R·H·劳伦森 C·H·芬波
[56] 参考文献
WO 03010204 2003.2.6

Definition and Redesign of the Extended Substrate Specificityof Granzyme B. Jennifer L. Harriset al. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 273 No. 42. 1998
审查员 杨振宇
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 吴亦华

权利要求书 6 页 说明书 107 页 附图 21 页

[54] 发明名称

使用粒酶 B 蛋白酶切割融合蛋白

[57] 摘要

通过使用粒酶 B 蛋白酶(EC 3.4.21.79)对融合蛋白进行酶切制备呈真实形式的目标多肽的方法。还提供了包含目标多肽和融合伴侣的融合蛋白，其中在目标多肽和融合伴侣之间的连接区包含紧邻目标多肽的粒酶 B 蛋白酶切割位点；还提供了人粒酶 B 蛋白酶变异体，其中第 228 号的(胰凝乳蛋白酶原编号)半胱氨酸残基突变为苯丙氨酸。

1. 制备呈真实形式的目标多肽的方法，所述的方法包含以下步骤：

(i)提供融合蛋白，其按N端到其C端的顺序包含(a)融合伴侣，(b)包含粒酶B蛋白酶切割位点的粒酶B蛋白酶识别位点，(c)目标多肽，其中所述的切割位点紧邻目标多肽；以及

(ii)使所述融合蛋白与粒酶B蛋白酶接触以在所述切割位点处切割产生呈真实形式的所述目标多肽。

2. 根据权利要求1的方法，其中的粒酶B蛋白酶识别位点具有以下的通式的氨基酸序列：

P4P3P2P1↓

其中

P4是氨基酸I或V

P3是氨基酸E，Q或M

P2是X，X代表任何氨基酸，

P1是氨基酸D，以及

↓是所述的粒酶B蛋白酶的切割位点。

3. 根据权利要求1的方法，其中的粒酶B蛋白酶识别位点具有的氨基酸序列选自由以下各项组成的组：ICPD↓，IEAD↓，IEPD↓，IETD↓，IQAD↓，ISAD↓，ISSD↓，ITPD↓，VAPD↓，VATD↓，VCTD↓，VDPD↓，VDSD↓，VEKD↓，VEQD↓，VGPD↓，VEID↓，VRPD↓，VTPD↓，LEED↓，LEID↓，LGND↓，LGPD↓，AQPD↓，其中↓是所述的粒酶B蛋白酶的切割位点。

4. 根据权利要求2的方法，其中所述通式还包含氨基酸P1′和P2′，产生以下的通式

P4P3P2P1↓P1′P2′，其中 P1′是 X，X 代表了任何氨基酸，P2′是 G，且其中 P1′和 P2′是目标多肽的一部分。

5. 根据权利要求 2 的方法，其中所述通式还包含氨基酸 P1′，P2′，P3′和 P4′，得到通式 P4P3P2P1↓P1′P2′P3′P4′，其中 P4′是 D 或 E，且其中 P1′，P2′，P3′和 P4′是目标多肽的一部分。

6. 根据权利要求 1 的方法，其中的目标多肽选自以下各项组成的组：酶、多肽激素、单链抗体可变区片段以及载脂蛋白 A。

7. 根据权利要求 6 的方法，其中的多肽激素选自由生长激素、胰高血糖素、胰岛素和干扰素组成的组。

8. 根据权利要求 6 的方法，其中的酶是粒酶 B。

9. 根据权利要求 1 的方法，其中的融合伴侣是亲和标签。

10. 根据权利要求 9 的方法，其中的亲和标签选自以下各项组成的组：多聚组氨酸标签、多聚精氨酸标签、FLAG 标签、Strep 标签、c-myc 标签、S-标签、钙调蛋白结合肽、纤维素结合肽、几丁质结合结构域、谷胱甘肽硫转移酶标签以及麦芽糖结合蛋白。

11. 根据权利要求 1 的方法，其中的粒酶 B 蛋白酶选自由人粒酶 B 蛋白酶、小鼠粒酶 B 蛋白酶和大鼠粒酶 B 蛋白酶组成的组。

12. 根据权利要求 11 的方法，其中的粒酶 B 蛋白酶是如序列编号 57 所示的人粒酶 B 蛋白酶变异体，其中胰凝乳蛋白酶原编号第 228 号的半胱氨酸残基突变为苯丙氨酸。

13. 根据权利要求 1 的方法，其中的粒酶 B 蛋白酶以固定化的形式出现。

14. 根据权利要求 13 的方法，其中的粒酶 B 蛋白酶通过 C 端被固定化。

15. 根据权利要求 13 的方法，其中的粒酶 B 蛋白酶通过一个赖氨酸残基被固定化。

16. 根据权利要求 10 的方法，其中的亲和标签是多聚组氨酸标签，其中的融合蛋白在 Ni^{2+} 离子和氨三乙酸存在下与粒酶 B 蛋白酶接触。

17. 根据权利要求 16 的方法，其中 Ni^{2+} 的浓度范围是 1-20mM，氨三乙酸的浓度范围是 1-20mM。

18. 融合蛋白，其按 N 端到其 C 端的顺序包含(a)融合伴侣，(b)包含粒酶 B 蛋白酶切割位点的粒酶 B 蛋白酶识别位点，以及(c)目标多肽，其中所述的切割位点紧邻目标多肽。

19. 根据权利要求 18 的融合蛋白，其中的粒酶 B 蛋白酶识别位点的氨基酸序列具有以下的通式:

P4P3P2P1↓

其中

P4 是氨基酸 I 或 V

P3 是氨基酸 E，Q 或 M

P2 是 X，X 代表任何氨基酸，

P1 是氨基酸 D，以及

↓是所述的粒酶 B 蛋白酶的切割位点。

20. 根据权利要求 18 的融合蛋白，其中的粒酶 B 蛋白酶识别位点具有的氨基酸序列选自由以下各项组成的组：ICPD↓，IEAD↓，IEPD↓，IETD↓，IQAD↓，ISAD↓，ISSD↓，ITPD↓，VAPD↓，VATD↓，VCTD↓，VDPD↓，VDSD↓，VEKD↓，VEQD↓，VGPD↓，VEID↓，VRPD↓，VTPD↓，LEED↓，LEID↓，LGND↓，LGPD↓，AQPD↓，其中↓是所述的粒酶 B 蛋白酶的切割位点。

21. 根据权利要求 19 的融合蛋白，其中的通式还包含氨基酸 P1′和 P2′，产生以下的通式

P4P3P2P1↓P1′P2′，其中 P1′是 X，X 代表了任何氨基酸，P2′是 G，且其中 P1′和 P2′是目标多肽的一部分。

22. 根据权利要求 19 的融合蛋白，其中的通式还包含氨基酸 P1′，P2′，P3′和 P4′，得到通式 P4P3P2P1↓P1′P2′P3′P4′，其中 P4′是 D 或 E，且其中 P1′，P2′，P3′和 P4′是目标多肽的一部分。

23. 根据权利要求 18 的融合蛋白，其中的目标多肽选自以下各项组成的组：酶、多肽激素、单链抗体可变区片段以及载脂蛋白 A。

24. 根据权利要求 23 的融合蛋白，其中的多肽激素选自由生长激素、胰高血糖素、胰岛素和干扰素组成的组。

25. 根据权利要求 23 的融合蛋白，其中的酶是粒酶 B。

26. 根据权利要求 25 的融合蛋白，其中的粒酶 B 包含一个 C 端多聚组氨酸标签。

27. 根据权利要求 25 的融合蛋白，选自序列编号 2 的

pro-IEPD-GrB-H6 和序列编号 3 的 pro-IEAD-GrB-H6。

28. 根据权利要求 25 的融合蛋白，选自由序列编号 5 的 pro-IEPD-GrB-H6 C228A，序列编号 6 的 pro-IEPD-GrB-H6 C228T，序列编号 7 的 pro-IEPD-GrB-H6 C228V，和序列编号 8 的 pro-IEPD-GrB-H6 C228F 组成的组。

29. 根据权利要求 25 的融合蛋白，其中所述酶粒酶 B 是人粒酶 B 蛋白酶变异体，其中胰凝乳蛋白酶原编号第 228 号的半胱氨酸残基突变为苯丙氨酸。

30. 根据权利要求 25 的融合蛋白，其中的人粒酶 B 蛋白酶变异体如序列编号 57 所示。

31. 根据权利要求 18 的融合蛋白，其中的融合伴侣是一个亲和标签。

32. 根据权利要求 31 的融合蛋白，其中的亲和标签选自以下各项组成的组：多聚组氨酸标签、多聚精氨酸标签、FLAG 标签、Strep 标签、c-myc 标签、S-标签、钙调蛋白结合肽、纤维素结合肽、几丁质结合结构域、谷胱甘肽硫转移酶标签以及麦芽糖结合蛋白。

33. 编码根据权利要求 18-32 中任何一个融合蛋白的分离的核酸序列。

34. 包含根据权利要求 33 的分离的核酸序列的重组载体。

35. 被根据权利要求 34 的载体转化的宿主细胞。

36. 制备根据权利要求 18 的融合蛋白的方法，该方法包含以下步骤：

(i)提供包含有效连接于启动子的根据权利要求 33 的分离的核酸序列的重组载体；

(ii)使用所述的重组载体转化宿主细胞；

(iii)在表达所述融合蛋白的条件下培养所述的宿主细胞；以及

(iv)选择地分离所述融合蛋白。

使用粒酶 B 蛋白酶切割融合蛋白

发明领域

本发明涉及的是通过使用粒酶 B（Granzyme B）蛋白酶对重组产生的融合蛋白进行酶切制备呈真实形式的目标多肽的方法。而且本发明涉及包含粒酶 B 切割位点的融合蛋白以及人粒酶 B 变异体。

本发明的背景和先有技术

一般在蛋白质工程，特别是在制药领域中，以高度纯化和经过充分研究的形式制备和纯化重组多肽例如药物蛋白，已经成为一项主要任务。

制备这种重组多肽常常依赖的技术涉及以融合或者杂合蛋白形式生产多肽，其中目标蛋白质或者多肽与载体或者融合伴侣（如多肽或者蛋白质）相融合。

与目标多肽融合的融合伴侣或者载体的存在具有以下优势：它可以使融合蛋白具有更高的抗蛋白酶降解能力；可以促进表达和分泌；可以提高溶解度并使融合蛋白能够进行随后的亲和纯化。而且，通过融合蛋白表达，可能具有生物危害的物质例如肽类激素，可以以无活性的形式产生，然后在体外通过切除融合伴侣使其激活。

但是这种融合蛋白自身通常并不适宜作为最终产物，原因有融合伴侣可能影响目标多肽的生物活性或者稳定性，并且如果将要在临床使用该蛋白，可能会产生抗原性问题。因此有必要切除融合蛋白以释放目标多肽。

原则上这可以通过化学方法或者生化方法例如酶切来实现。但是重要的是切割是高度特异的，且只发生在目标多肽和融合伴侣之间的切割序列处，即连接区，但优选地不在目标多肽自身的内部，因为这可能会例如严重影响目标多肽的生物活性。这种方法使用的试剂通过肽键的水解发生作用，且切割试剂的特异性决定于位于或者靠近被切割肽键的氨基酸残基的特性。

切割融合蛋白的生化方法是以蛋白酶（蛋白水解酶）的使用为基础的。但是如果切割位点特异的氨基酸同时出现在目标多肽自身的内部，则融合蛋白的酶切就受到限制。因此，为了达到切割的目的，酶不仅仅识别氨基酸，而是识别氨基酸序列，这才是特别适宜的，因为识别和切割切割序列所需的氨基酸数目越多，该氨基酸序列除了在目标多肽和融合伴侣之间存在以外还能够再次出现在目标多肽内部的概率就越低。

迄今为止已有数个蛋白酶用于融合蛋白的酶切，切割方法是使融合蛋白与蛋白酶在适当条件下接触。

WO 03/010204 涉及的是使用泛素切割酶从融合蛋白上分离多肽，根据此发明，泛素切割酶切割与在蛋白质（例如泛素）C 端 RGG 氨基酸序列相邻的肽键。

US 6,010,883 公开了一种方法，其中使用凝血因子 Xa（EC 3.4.21.6;通过对酶原因子 X 进行有限蛋白酶解形成的 S1 丝氨酸型肽酶）将融合伴侣从融合蛋白上切除。该蛋白酶在氨基酸序列 X-Y-Gly-Arg 之后进行特异切割，其中 X 是 Ile，Leu，Pro 或 Ala,Y 是 Glu，Asp，Gln 或 Asn。Xa 因子优选地在切割序列 Ile-Glu-Gly-Arg 之后切割。

在特异切割融合蛋白的方法中建议和使用的其它先有技术中的酶包括烟草蚀纹病毒 NIa 蛋白酶、胶原酶、肠激酶、枯草杆菌蛋白酶和凝血酶。

但是，在融合蛋白系统中使用蛋白酶切割可能会遇到许多问题。一个主要的问题是对融合蛋白的非特异蛋白水解，这会导致在几个不同位置的切割，结果使产物丢失，产生污染性的片段。而且目前已知的酶经常会出现使融合蛋白不充分或者不完全切割。这种不充分切割使产量下降，并且可能在纯化的蛋白中引入异质性，导致目标蛋白只有一小部分被回收。

另一个与许多目前在融合蛋白切割上应用的酶相关的问题是切割后的多肽产物（目标多肽）上经常连有假的或外来的氨基酸。当衔接物被切掉时通常会存在这些氨基酸，无关的氨基酸残基可能对产生的目标多肽的性质有所影响。这对于用于为治疗人类疾病生产的蛋白来说可能是至关重要的。因此，非常需要产生没有外来氨基酸短序列或者残基的真实的纯多肽。

目标多肽在切割后仍然残留外来氨基酸的问题在美国专利 4,543,329 中予以阐释，该专利描述了使用胶原酶对融合蛋白进行选择性切割的过程。但是，使用这种酶在目标多肽的 N 端引入了外来氨基酸序列 Gly-Pro。为了获得真实形式的目标多肽，随后必须通过使用一种或者更多不同的氨肽酶（例如氨酰色氨酸氨肽酶和色氨酸氨肽酶）在另一个反应步骤中除去这些外来氨基酸(Gly 和 Pro)。

这一问题还在美国专利 5,427,927 中予以阐释，该专利描述了使用 IgA 蛋白酶对融合蛋白进行序列特异切割的过程，其中 IgA 蛋白酶的识别位点被插入到融合蛋白的连接区，随后用 IgA 蛋白酶切割融合蛋白。IgA 蛋白酶的识别位点是氨基酸序列 Y-Pro↓X-Pro，其中 X 可

以是任何氨基酸，Y 可以是一个或者几个任意的氨基酸，↓指明了切割位点。但是在使用 IgA 蛋白酶切割后形成的目标蛋白在其 N 端具有 X-Pro 外来氨基酸序列，即产生的目标多肽并不以其本来或者真实的形式存在。

目前用于融合蛋白切割的最广泛使用的蛋白酶是丝氨酸蛋白酶因子 Xa 和凝血酶。但是，已知这两种酶对融合蛋白都有非特异性切割。此外，因子 Xa 需要从牛血清中分离，所以在治疗性应用中用 Xa 因子切割蛋白之后需要进行大量的纯化和分析以检测可能存在的病原性因子如病毒和朊病毒（例如导致牛海绵状脑病的朊病毒）。而且，这些酶相当昂贵。

考虑到先有技术的缺点和不足之处，因此本发明的目的是提供一种改进的方法用于切割融合蛋白。

本发明的发明者发现可以通过使用粒酶 B 蛋白酶(EC 3.4.21.79)用于切割融合蛋白从而克服上述技术问题。因此，令人惊讶地发现粒酶 B 蛋白酶可以对具有粒酶 B 蛋白酶切割位点的融合蛋白进行高效的切割，并且具有高度的切割特异性。特别是已经证明粒酶 B 蛋白酶与目前广泛使用的蛋白酶因子 Xa 相比对融合蛋白具有更高的特异性切割。而且已经发现粒酶 B 在切割具有粒酶 B 识别序列的融合蛋白（粒酶 B 识别序列的位置位于 N 端融合伴侣和 C 端目标多肽之间，其中切割位点紧邻目标多肽）时产生的目标多肽没有来自切割位点的外来氨基酸，即产生的是真实形式的多肽。这样可以通过粒酶 B 切割融合蛋白产生具有本来氨基酸序列的重组目标蛋白。而且，粒酶 B 蛋白酶还可以通过重组制备，这也是它的优势。最后还发现将人粒酶 B 中的第 228 号氨基酸（胰凝乳蛋白酶原编号）半胱氨酸替换为苯丙氨酸，在制备重组人粒酶 B 时可以得到更高的最终蛋白质回收。

发明概述

因此本发明涉及的首先是制备真实形式目标多肽的方法。该方法包含以下步骤：(i)提供融合蛋白，其按N端到其C端的顺序包含(a)融合伴侣，(b)包含粒酶B蛋白酶切割位点的粒酶B蛋白酶识别位点以及(c)目标多肽，其中所述的切割位点紧邻目标多肽；和(ii)使所述融合蛋白与粒酶B蛋白酶(EC 3.4.21.79)接触以在所述切割位点处切割产生真实形式的所述目标多肽。

另一方面提供了融合蛋白，其按N端到其C端的顺序包含(a)融合伴侣，(b)包含粒酶B蛋白酶切割位点的粒酶B蛋白酶识别位点以及(c)目标多肽，其中所述的切割位点紧邻目标多肽。

还提供了一个人粒酶B蛋白酶变异体，其中第228号的氨基酸(胰凝乳蛋白酶原编号）半胱氨酸突变为苯丙氨酸。

另一些方面本发明提供了编码这样的融合蛋白或者人粒酶B蛋白酶变异体的分离的核酸序列，包含该分离的核酸序列的重组载体，使用这种载体转化的宿主细胞，以及制备融合蛋白或者人粒酶B蛋白酶变异体的方法，该方法包含以下步骤：(i)提供有效连接于启动子的重组载体；(ii)使用该重组载体转化宿主细胞；(iii)在表达融合蛋白的条件下培养宿主细胞；以及(iv)选择地分离融合蛋白或者人粒酶B蛋白酶变异体。

发明详述

一方面本发明涉及的是通过酶切融合蛋白制备真实形式目标多肽的方法。因此，根据上面提及的，该方法包含提供融合蛋白的步骤，该融合蛋白按照从其N端到其C端的顺序包含融合伴侣、包含粒酶B蛋白酶切割位点的粒酶B蛋白酶识别位点以及目标多肽，其中切割位点的位置紧邻目标多肽。随后使融合蛋白与粒酶B蛋白酶接触，以在

粒酶 B 蛋白酶接切割位点处切割产生真实形式的目标多肽。在此使用的术语“融合蛋白”指包含来自至少两个不同蛋白的蛋白结构域的多肽。

根据本发明，提供一种制备真实形式目标多肽的方法。根据这里所使用的，术语“真实形式”指的是包含多肽自身氨基酸序列的多肽而没有任何额外的氨基酸残基。正如上面所述，与许多目前在融合蛋白切割上应用的酶相关的问题是切割后的多肽产物上经常连有假的或外来的氨基酸，即产生的多肽并不以其“真实形式”存在。因此，在此上下文中，真实形式的目标多肽所指的多肽，其氨基酸一级序列与编码目标多肽的本来基因序列所编码的氨基酸序列相同，即该多肽不含有任何非本来排列的氨基酸。术语“本来基因序列”不一定是天然存在的基因序列，它也可以是部分或者全部人工的序列。类似地应当理解真实形式的目标多肽不一定是天然存在的多肽，它也可以是部分或者全部人工的。相反，“非真实”的多肽含有的氨基酸中至少有一个不是编码目标多肽的本来基因序列所编码的。

根据本发明，目标多肽和融合伴侣之间的连接区包含粒酶 B 蛋白酶识别位点，它具有粒酶 B 蛋白酶切割位点。这样的识别位点指的是确定的氨基酸序列，它能够被粒酶 B 的识别并且在融合伴侣和目标多肽之间的连接区被切割。因此切割位点应当被理解为氨基酸序列的两个氨基酸之间、发生融合蛋白切割的位点。连接区的形式可以是任何适宜长度的不属于目标多肽的衔接物序列。但是为了得到真实形式的目标多肽，粒酶 B 切割位点的位置紧邻目标多肽的 N 端，目的是使融合蛋白在 N 端被特异切割而不会导致假的或者外来的氨基酸仍然附着在产生的目标多肽上。因此，术语“紧邻”暗示粒酶 B 识别序列（在一些实施方案中识别序列前面是一个衔接物序列或者识别序列自身是衔接物序列的一部分）所处的位置使粒酶 B 切割位点在目标多肽 N 端的侧旁。

粒酶是储存于颗粒中的丝氨酸蛋白酶，它们参与靶细胞识别后 T 细胞和自然杀伤细胞介导的细胞毒性防御反应。粒酶的主要功能是诱导病毒侵染的细胞和其他有潜在危害的细胞的死亡。粒酶 B 是粒酶的一种类型，在与靶细胞接触后它被定向地分泌到细胞外，并在穿孔素（一种由细胞毒性 T 细胞和自然杀伤细胞表达的溶细胞蛋白）的协助下进入靶细胞。粒酶 B 处理和激活各种不同的半胱天冬酶原，这样诱导靶细胞程序性死亡。根据本发明，术语“粒酶 B 蛋白酶”（这里也被称为 GrB）包括属于或者可能属于酶命名数据库第 34 期，2004 年 2 月(http://www.expasy.org/enzyme)中酶学委员会编号 EC 3.4.21.79 的酶。因此根据本发明任何适宜的粒酶 B 蛋白酶都可以使用，包括人粒酶 B 蛋白酶，小鼠粒酶 B 蛋白酶和大鼠粒酶 B 蛋白酶。当根据本发明的方法用于制备人治疗性蛋白产物时，一般优选使用人粒酶 B 蛋白酶。人粒酶 B 蛋白酶在大多数人组织中都存在，在那里它们的生物学功能是众所周知的。因此在最终的治疗性蛋白产物中存在痕量的残留粒酶 B 蛋白酶对施用该治疗性蛋白产物的病人表现为最小的风险。因此已知如果有活性的粒酶 B 蛋白酶注射到人血流中，它会迅速地被α-2-巨球蛋白所捕获，然后该复合体通过 LRP 清除受体被清除。粒酶 B 蛋白酶还有另外一个名字是“细胞毒性 T 淋巴细胞蛋白酶 2”。

已知粒酶 B 蛋白酶优先选择在天冬氨酸(D)残基之后切割，且粒酶 B 是已知的哺乳动物丝氨酸蛋白酶中唯一具有这种 P1 蛋白水解特异性的酶。因此根据本发明设想在有用的实施方案中的粒酶 B 切割位点在切割位点 N 端的 P1 位置至少包含一个天冬氨酸残基。一些目前已知的粒酶 B 蛋白酶识别位点在 Harris 等人(1998)中予以公开。因此在有用的实施方案中，识别位点的氨基酸序列具有以下的通式：切割位点的 N 端为 P4P3P2P1↓，其中 P4 优选的氨基酸为 I 或 V，P3 优选的氨基酸为 E，Q 或 M，P2 是 X，X 代表任何氨基酸，P1 优选的氨基酸是 D，↓是粒酶 B 蛋白酶的切割位点。

本发明的发明人发现粒酶 B 蛋白酶能够从融合蛋白上切掉目标多肽而不会在目标多肽上留下任何非本来氨基酸。特别是令人惊奇地发现粒酶 B 蛋白酶能够从融合蛋白上的 P1 位置之后识别和切掉多肽，而对 P1′-P4′位置，即切割位点后的氨基酸位置的特异氨基酸残基没有任何严格限制。这与先前技术中的发现相反。在例如 Sun 等人(2001)中，结论是粒酶 B 底物的 P1′-P4′残基对于底物结合是重要的，当存在酸性 P4′残基（即天冬氨酸或者谷氨酸）时，可以观察到最高的底物亲和性。此外，Harris 等人(1998)的结论是粒酶 B 对 P2′位置上的甘氨酸残基具有强的优选选择。虽然有这些先前技术的发现，但现在已经确定粒酶 B 蛋白酶一般可以用于从融合蛋白上切除目标多肽，而不需要在 P1′-P4′位置上有特异的氨基酸残基。

正如上面提及的，本发明另一个特别的优势是发现粒酶 B 蛋白酶使具有位于目标多肽 N 端的粒酶 B 蛋白酶切割位点的融合蛋白被高效切割，并且具有高度的切割特异性。特别是已经发现粒酶 B 蛋白酶与目前广泛使用的用于融合蛋白切割的蛋白酶，即 Xa 相比对融合蛋白具有更高的特异性切割。因此发现当五个以前作为可被 Xa 因子切割而制备的不同融合蛋白在使用粒酶 B 蛋白酶切割时，得到的切割结果与因子 Xa 切割的特异性相当或者更高，正如从以下实施例中可以清楚地看到的那样。这可以从例如实施例 8 以及相伴随的图 11 中看到，实施例 8 和图 11 对使用因子 Xa 和粒酶 B 分别消化融合蛋白 H6-IEGR-RAP 和 H6-IEPD-RAP，不同时间取样进行 PAGE 分析。从该实验可以清楚地看到，30 分钟以后使用两种蛋白酶融合蛋白都基本上被完全切割。但是使用 Xa 因子比使用粒酶 B 产生了更多的降解产物。这明显说明粒酶 B 是高度特异的，特异性甚至高于广泛使用的蛋白酶因子 Xa。发现粒酶 B 既能够从目标多肽上切除相当短的 N 端标签例如六聚组氨酸尾，又能够在被一个短衔接物序列非常紧密连接的融合伴侣和目标多肽之间产生切割，这里进一步证明了粒酶 B 高度的多能性和巨大的灵活性。

尽管不是必需的，但是在某些实施方案中最好对目标多肽进行选择，这样如果目标多肽是融合蛋白的一部分时，目标多肽的 N 端包含氨基酸 P1′和 P2′，产生粒酶 B 识别位点的通式 P4P3P2P1↓P1′P2′，其中 P1′是 X，X 表示任何氨基酸，而 P2′是 G。尽管粒酶 B 蛋白酶对于 P1′位置的氨基酸没有严格的限制，但是在此位置一般优选选择大的疏水性氨基酸，包括 Trp(T)，Leu(L)，Phe(F)和 Ile(I)。这样，在一个有用的实施方案中，P1′位置的氨基酸选自 T，L，F 和 I。在某些实施方案中在 P2′位置不包括 Pro(P)可能是有利的。本发明的另一个方面对目标多肽进行选择可能是有利的，这样如果目标多肽是融合蛋白的一部分时，目标多肽的 N 端 P4′位置包含酸性氨基酸例如 D 或 E。

在本发明的上下文中，术语“氨基酸”和“氨基酸残基”指的是全部天然存在的 L-α-氨基酸。这个定义意味着包括正亮氨酸、鸟氨酸和高半胱氨酸。氨基酸通过三字母或者单字母名称进行确定

Asp，D：天冬氨酸	Ile，I：异亮氨酸
Thr，T：苏氨酸	Leu，L：亮氨酸
Ser，S：丝氨酸	Tyr，Y：酪氨酸
Glu，E：谷氨酸	Phe，F：苯丙氨酸
Pro，P：脯氨酸	His，H：组氨酸
Gly，G：甘氨酸	Lys，K：赖氨酸
Ala，A：丙氨酸	Arg，R：精氨酸
Cys，C：半胱氨酸	Trp，W：色氨酸
Val，V：缬氨酸	Gln，Q：谷氨酰胺
Met，M：甲硫氨酸	Asn，N：天冬酰胺
Nle，J：正亮氨酸	Orn，O：鸟氨酸
Hcy，U：高半胱氨酸	Xxx，X：任何 L-α-氨基酸.

在另外的有用实施方案中，粒酶 B 蛋白酶的识别位点具有的氨基酸序列选自：ICPD↓，IEAD↓，IEPD↓，IETD↓，IQAD↓，ISAD↓，

ISSD↓，ITPD↓，VAPD↓，VATD↓，VCTD↓，VDPD↓，VDSD↓，VEKD↓，VEQD↓，VGPD↓，VEID↓，VRPD↓，VTPD↓，LEED↓，LEID↓，LGND↓，LGPD↓，AQPD↓，其中↓是粒酶B的切割位点。这些识别和切割位点以前被Casciola-Rosen等人(1999)有所描述。

根据本发明，术语"目标多肽"或者"所需的多肽"指的是在融合蛋白内需要表达出来的多肽。正如在这里所使用的，术语"多肽"不一定对所需目标多肽的大小提出限制，因此，这个术语应按照其最广义来理解，这样就包括直至50或者更多氨基酸的多肽，包括寡肽如二、三、五和六肽，多肽和蛋白质。目标多肽可以是中间产物或者最终产物，例如可以用于医药领域、研究领域、环保领域或者在工业过程或产物中。正如前面所描述的，在融合蛋白中目标多肽与另外一个蛋白或者蛋白质结构域即融合伴侣相连或者融合，目的是例如提高目标多肽的稳定性以及便于融合蛋白的纯化。在有用的实施方案中目标多肽是蛋白例如分泌蛋白。分泌蛋白具有各种不同的工业应用，包括药物和诊断学。目前可以获得的多数蛋白质药物例如溶栓药剂、干扰素、白介素、红细胞生成素、集落促生长因子以及多种不同的其他细胞因子都是分泌型蛋白。在有用的实施方案中，目标多肽是多肽激素例如生长激素、胰高血糖素、胰岛素或者干扰素、单链抗体可变区片段(scfv)，或者载脂蛋白如载脂蛋白a-i(apoA-I)，载脂蛋白A-II，或载脂蛋白A-IV。

在本发明的另一方面中，目标多肽是一种酶，例如粒酶B。这样，通过提供根据本发明的融合蛋白并且选择粒酶B蛋白酶作为目标多肽，就提供了自我激活的粒酶B蛋白酶，它提供了这样一种可能性，即提供无活性的粒酶B原，随后原则上只要加入一分子的活性粒酶B蛋白酶就可以使粒酶B酶原被激活。这样就可以提供不需要依赖外加例如外源激活剂生物物质来激活的粒酶B原。正如下面的实施例中可以清楚看到的那样，发现粒酶B自我激活是定量进行直至完成的，且

自我激活的粒酶 B 蛋白酶样品继续孵育几天后发现仍然保持稳定的活性水平并且只产生微量的自体分解产物。这清楚地证明了粒酶 B 蛋白酶自我激活的优势是对自体分解（cannibalism）具有高度稳定性，如实施例 5 和图 3 所示。

根据本发明，融合伴侣可以是任何适宜的类型，只要它是一种肽、寡肽、多肽或者蛋白质即可，包括四肽、五肽以及六肽。可以对其进行选择使融合蛋白对蛋白降解具有更高的抵抗力、有助于表达的提高以及融合蛋白的分泌、提高可溶性并且使融合蛋白随后用于亲和纯化。

本发明的融合蛋白在有用的实施方案中可能包含融合伴侣，它是一种亲和标签。这种亲和标签可能是例如一个亲和结构域，它可以使融合蛋白的纯化在亲和树脂上进行。亲和标签还可以是多聚组氨酸标签包括六聚组氨酸标签、多聚精氨酸标签、FLAG 标签、Strep 标签、c-myc 标签、S-标签、钙调蛋白结合肽、纤维素结合肽、几丁质结合结构域、谷胱甘肽硫转移酶标签或者麦芽糖结合蛋白。

正如上面提到的可以根据本发明使用任何适宜的粒酶 B 蛋白酶，包括人粒酶 B 蛋白酶、小鼠粒酶 B 蛋白酶和大鼠粒酶 B 蛋白酶。但是从以下的实施例中可以看出，发现将人粒酶 B 中的第 228 号氨基酸（胰凝乳蛋白酶原编号）半胱氨酸替换为苯丙氨酸，得到人粒酶 B 蛋白酶变异体，在制备人粒酶 B 时可以得到更高的最终蛋白质收率，而却没有对切割特异性或者产生的粒酶 B 的活性有任何可观察到的程度的影响。这一发现与以前的预期相左，因为苯丙氨酸（芳香氨基酸）与半胱氨酸（亲水性氨基酸）在化学上相差很大，所以一般不考虑用它来替代半胱氨酸。这样在现在的优选实施方案中，根据本发明的粒酶 B 蛋白酶是人粒酶 B 蛋白酶变异体，其中第 228 号氨基酸（胰凝乳蛋白酶原编号）半胱氨酸突变为苯丙氨酸。应当理解术语“人粒酶 B 蛋白酶变异体”还包括在第 228 号氨基酸（胰凝乳蛋白酶原编号）半胱氨

酸突变以外的变异体，在天然人粒酶 B 蛋白酶全长序列或者不同结构域中具有进一步变异的变异体，例如粒酶 B 蛋白酶变异体，其中在全长的天然粒酶 B 氨基酸序列的 N 或 C 端加入或者删除了一个或者更多氨基酸残基。例如使用本领域内已知的任何保守和非保守突变的技术和指导方针可以进行这样的进一步的变体。变体可以是编码人粒酶 B 蛋白酶的一个或者更多密码子的替换、删除或者插入，其结果是与天然的人粒酶B蛋白酶序列相比人粒酶B蛋白酶的氨基酸序列发生改变，优选地，改变对人粒酶 B 蛋白酶特异性和/或活性没有负面的影响。而且"人粒酶 B 蛋白酶变异体"的含义中也包括了全长的天然粒酶 B 氨基酸序列（例如激活的具有第 228 号半胱氨酸残基突变的形式）的片段。在一个有用的实施方案中，粒酶 B 蛋白酶变异体是序列编号 57 显示的变异体。

一般地，融合伴侣的选择通常依据的是使分离简化的性质，最合意的是那些由产生融合蛋白的微生物容易地分泌出来的融合伴侣。例如多聚组氨酸序列、谷胱甘肽硫转移酶以及麦芽糖结合蛋白一般是优选的，因为有现成的结合它们并且进行洗脱的亲和层析柱。

根据本发明的方法在有用的实施方案中可以包括一个随后的分离步骤，用于分离通过融合蛋白酶切产生的目标多肽。这一分离步骤可以通过任何本领域内已知用于蛋白质分离的适宜方法进行，包括使用离子交换、按照大小进行分级和亲和纯化，层析的选择取决于目标多肽的性质。因此为了用于亲和纯化的目的，目标多肽还可以例如包括一个 C 端连接的亲和标签，目的是使用上述提及的亲和标签系统分离产生的目标多肽。

根据本发明，融合蛋白与粒酶 B 蛋白酶相接触，以在紧邻目标多肽的粒酶 B 蛋白酶切割位点处切割融合蛋白，产生真实形式的目标多肽。这一反应可以使用游离的粒酶 B 分批进行，或者使用固定化形式

例如通过吸附、共价结合、截留或者膜限制固定的粒酶 B 蛋白酶。用于固定粒酶 B 蛋白酶的适宜载体包括常规载体例如聚丙烯酰胺、几丁质、葡聚糖、κ角叉胶、硅藻土和纤维素。通过共价偶联到不溶性的基质上对酶进行固定化是广泛使用的技术。在使酶共价结合到不溶性支持物方面，赖氨酸残基是最常使用的基团，原因是广泛暴露的表面和高度的反应性。因此在有用的实施方案中，粒酶 B 蛋白酶通过赖氨酸残基被固定化。另一方面，粒酶 B 蛋白酶通过其 C 端被固定化，例如通过多聚组氨酸标签（包括六聚组氨酸标签）。该反应还可以通过游离的粒酶 B 蛋白酶与膜类型的生物反应器联合使用来进行，或者使用连续类型的生物反应器以及固定化的粒酶 B 蛋白酶。

正如从以下实施例中可以清楚看到的那样，令人惊奇地发现如果包含一个多聚组氨酸融合伴侣（例如六聚组氨酸）的游离的融合蛋白（即非固定的）在 Ni^{2+}离子和氨三乙酸(NTA)的存在下与粒酶 B 蛋白酶接触，则其切割所需的时间会显著减少。考虑这一切割速度的显著提高主要原因是镍离子与融合蛋白的 N 端的多聚组氨酸融合伴侣结合并且有助于粒酶 B 蛋白酶接触到切割位点。此外还考虑到加入 NTA 会在溶液中包围在镍离子之外，正如在 Ni^{2+}-NTA 琼脂糖层析柱上的方式一样，这样就避免融合蛋白以及产生的蛋白出现沉淀。当进行这样的切割过程时，一般优选的镍离子浓度范围是 1-20mM，NTA 的浓度范围是 1-20mM。此外，优选的温度范围是 15-50°C，包括 20-45°C 的范围。在一个优选的实施方案中，温度范围是 20-30°C，例如大约 23°C。在另一个略不优选的实施方案中，温度范围是 30-45°C，例如大约 37°C。最佳的温度范围可以对每一个融合蛋白分别确定，因为这部分地取决于在不同温度下融合蛋白的稳定性。

根据本发明，已经如上面有所描述的，还提供了融合蛋白，其按 N 端到其 C 端的顺序包含(a)融合伴侣(b)包含粒酶 B 蛋白酶切割位点的粒酶 B 蛋白酶识别位点以及(c)目标多肽，其中所述的切割位点紧邻

目标多肽。在有用的实施方案中，目标多肽是粒酶 B，这样就提供了自体激活的粒酶 B 蛋白酶。特别地，提供了自体激活的人粒酶 B 酶原融合蛋白，从其 N 端到其 C 端的顺序包含具有粒酶 B 识别位点和切割位点的七氨基酸残基的原序列，之后是激活的人粒酶 B 氨基酸序列，最后是与粒酶 B 的 C 端融合的六聚组氨酸标签(H6)。因此粒酶 B 切割位点紧邻激活的粒酶 B 氨基酸序列的 Ile16（胰凝乳蛋白酶原编号）。更为特别的是，提供了人自体激活粒酶 B 融合蛋白 pro-IEPD-GrB-H6（序列编号 2）和 pro-IEAD-GrB-H6（序列编号 3）。而且还如前面描述的，发现将第 228 号残基半胱氨酸（胰凝乳蛋白酶原编号）通过定点突变替换为丙氨酸（A）、苏氨酸（T）、缬氨酸（V）或者苯丙氨酸（F）是有益的。在其他有用的实施方案中提供的自体激活融合蛋白选自以下各项组成的组：pro-IEPD-GrB-H6 C228A(序列编号 5)，pro-IEPD-GrB-H6 C228T(序列编号 6)，pro-IEPD-GrB-H6 C228V(序列编号 7)，和 pro-IEPD-GrB-H6 C228F(序列编号 8)。

融合蛋白或者本发明的粒酶 B 蛋白酶变异体可以在任意适宜的标准蛋白质表达系统中通过培养用编码融合蛋白的载体转化的宿主（培养条件是融合蛋白被表达）进行表达。优选地，表达系统是使目标融合蛋白能够在体外容易地分离和重折叠的表达系统。一般来讲，优选原核表达系统，因为可以得到高产量的蛋白，并且有有效的纯化和重折叠策略。但是，可以选择许多宿主细胞作为转化和表达所描述融合蛋白的适宜宿主，包括特别适宜的哺乳动物、昆虫、真菌和细菌宿主细胞。通常使用的细菌菌株包括芽孢杆菌和埃希氏菌，包括大肠杆菌。这样，选择适宜的或者中意的宿主和表达系统，完全是在具有技术从业人员的能力和判断力之内，而不需要过度的实验。类似地，一旦选定了本发明融合蛋白的一级氨基酸序列，本领域内具有普通技术的人员可以很容易地设计出编码本发明融合蛋白或者粒酶 B 蛋白酶变异体的适当的重组核酸序列或者 DNA 构建体，同时考虑到的因素包括所选宿主中的密码子偏好、宿主中对分泌信号序列的需要、信号序列中蛋

白酶切割位点的引入等等。这些重组 DNA 构建体可以按照阅读框插入到众多适宜于所选宿主的载体的任何一个中。适宜和中意的表达载体的选择也完全在具有技术从业人员的能力和判断力之内。优选地，表达载体包括强启动子，以引导重组构建体的表达。

最后，提供了一种生产根据本发明的融合蛋白或者粒酶 B 蛋白酶变异体的方法，包括如下步骤：(i)提供重组载体，该载体包含有效连接于启动子的编码本发明的融合蛋白或者粒酶 B 蛋白酶变异体的分离的核酸序列；(ii)使用该重组载体转化宿主细胞；(iii)在表达融合蛋白的条件下培养宿主细胞；以及(iv)选择性地分离融合蛋白或者粒酶 B 蛋白酶变异体。

现在通过在以下非限制性的实施例和图片进行举例说明来描述本发明。

附图描述

图 1 显示了 GrB-H6 与 FX_a 孵育几天的活性，使用以下的显色试验：500μl 缓冲液（100mM NaCl，50mM Tris-HCl pH 8.0），4μl 100mM Ac-IEPD-*p*NA 和 5μl GrB-H6。100μl GrB-H6（大约 10μg）和 1μl FX_a（1mg/ml）的混合物置于 4°C 孵育，在 0 小时、2 小时、5 小时、19 小时、2 天和 5 天后测定活性。

图 2 显示 GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 对几个显色底物的活性：Ac-IEPD-*p*NA，Ac-LEED-*p*NA，Ac-VEID-*p*NA，Ac-YVAD-*p*NA，和 Ac-DEVD-*p*NA。活性试验在 500μl 100mM HEPES pH 7.75 中进行，底物浓度为 400μM，每一次测定加入 1μg 蛋白酶。所有测定在 23°C 下进行，且测定 3 次，通过设置 Ac-IEPD-*p*NA 测得的活性为 100%，对所有得到的活性进行标准化。

图 3(A)显示在 100mM HEPES pH 7.4 下，于 4°C，23°C，和 37°C 孵育的 GrB-H6 C228F 样品的 SDS PAGE 结果。

A-N 泳道的样品描述：

A: 分子量标记

B: GrB-H6 C228F，孵育前

C: GrB-H6 C228F 4°C 孵育 1 天

D: GrB-H6 C228F 4°C 孵育 3 天

E: GrB-H6 C228F 4°C 孵育 6 天

F: GrB-H6 C228F 4°C 孵育 15 天

G: GrB-H6 C228F 23°C 孵育 1 天

H: GrB-H6 C228F 23°C 孵育 3 天

I: GrB-H6 C228F 23°C 孵育 6 天

J: GrB-H6 C228F 23°C 孵育 15 天

K: GrB-H6 C228F 37°C 孵育 1 天

L: GrB-H6 C228F 37°C 孵育 3 天

M: GrB-H6 C228F 37°C 孵育 6 天

N: GrB-H6 C228F 37°C 孵育 15 天

泳道 B 显示了完好的 GrB-H6 C228F。完好蛋白酶的条带在所有的泳道中都可以见到(1)，I-N 泳道中出现另外一个条带（2），该条带必定是蛋白酶降解的产物，很可能是由于在序列 IQDD↓FV 的 Asp50 和 Phe51 之间进行自体切割造成的。

图 3(B)显示了在 100mM HEPES pH 7.4 下，于 4°C，23°C，和 37°C 孵育的 GrB-H6 C228F 样品，孵育 0、6、(10)和 15 天后活性测定的结果。活性测定在 500μl 100mM HEPES pH 7.4 中进行，每次测定加入具有从孵育样品中取出的 0.2μg GrB-H6 C228F 的 400μM Ac-IEPD-*p*NA。

图 4 显示 H6-TripUB IEPD↓SP 和 H6-IEPD-TN123 与 GrB-H6 一同孵育 12 小时后样品的 SDS PAGE。

泳道 A-J 的描述:

A: 分子量标记

B: H6-TripUB IEPD↓SP 自身于 12 小时孵育之后

C: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 1μl GrB-H6 于 12 小时孵育之后

D: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 10μl GrB-H6 于 12 小时孵育之后

E: H6-FX-TripUB 与 FX_a 孵育

F: H6-IEPD-TN123 自身于 12 小时孵育之后

G: 200μl H6-IEPD-TN123 + 1μl GrB-H6 于 12 小时孵育之后

H: 200μl H6-IEPD-TN123 + 10μl GrB-H6 于 12 小时孵育之后

I: 与泳道 D 和 H 中相同浓度的 GrB-H6 自身

J: 使用 FX_a 切割小鼠 H6-FX-TN123

泳道 B 显示了未切割的 H6-TripUB IEPD↓SP(1), 其中没有加入 GrB-H6,而泳道 C 和 D 显示两次孵育,分别加入 1 和 10 微升的 GrB-H6。在这两个泳道中, 除了未切割的融合蛋白外, 还可以看到切割反应的产物, 即正确切割的 H6-TripUB IEPD↓SP(2)。泳道 E 中含有 FX_a 识别位点 IQGR 而不是 GrB 识别位点 IEPD 的构建体 H6-FX-TripUB 用 FX_a 切割, 产生的产物与 GrB-H6 切割的 H6-TripUB IEPD↓SP 具有相同的大小。

泳道 F-J 显示 GrB-H6 + H6-IEPD-TN123 孵育 12 小时后的结果。F 泳道显示未切割的 H6-IEPD-TN123(3)。泳道 G 和 H 显示在没有钙离子存在的条件下, H6-IEPD-TN123 是如何被 GrB-H6 切割的(4)。电泳的带型在图 12 中给予解释。泳道 J 中小鼠 H6-FX-TN123 构建体使用 FX_a 切割显示了正确切割产物的大小。图中标记为(5)的是 GrB-H6 的位置, 与加入 10μl GrB-H6 的样品中 GrB-H6 的浓度相同。

图 5 显示了 GrB-H6 + H6-TripUB IEPD↓SP 孵育 12、19 和 24 小

时后样品的 SDS PAGE 结果，以及 GrB-H6 + H6-IEPD-TN123 孵育的样品的 SDS PAGE 结果。

泳道 A-K 描述:

A: 分子量标记

B: H6-TripUB IEPD↓SP 自身于 12 小时孵育后

C: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 1μl GrB-H6 于 12 小时孵育后

D: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 1μl GrB-H6 于 19 小时孵育后

E: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 1μl GrB-H6 于 24 小时孵育后

F: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 10μl GrB-H6 于 19 小时孵育后

G: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 10μl GrB-H6 于 24 小时孵育后

H: GrB-H6 于自身如 F 和 G 中一样稀释

I: H6-IEPD-TN123 自身于 12 小时孵育后

J: 200μl H6-IEPD-TN123 + 1μl GrB-H6 于 12 小时孵育后

K: 200μl H6-IEPD-TN123 + 10μl GrB-H6 于 12 小时孵育后

泳道 B 显示了未切割的 H6-TripUB IEPD↓SP(1)。泳道 C-E 中正确切割的产物在所有的泳道中都有出现，在图中用(2)标记。加入的 GrB-H6 越多，孵育时间越长，在泳道中出现更多的切割产物。

图 3 中的 I、J 和 K 泳道与图 2 中具有 H6-IEPD-TN123 + GrB-H6 孵育物的 F，G，和 H 泳道相同，尽管在图 3 的凝胶上上样量更大。因此条带比图 2 中的条带更清楚。标记为(3)的条带是未切割的 H6-IEPD-TN123,标记为(4)，(5)，(6)和(7)的带型在图 12 中予以解释。

图 6 解释了图 2 和 3 中观察到的简单带型。当没有 GrB-H6 加入时，没有出现切割，在凝胶上只看到未切割的融合蛋白。在 GrB-H6 加入时，小的 N 端序列被切掉，在凝胶上除了剩余的未切割的融合蛋白以外还有正确切割的产物出现。被 GrB-H6 切掉的小 N 端序列由于太小，不能在 SDS 凝胶上观察到。

图 7、8 和 9 显示 H6-TripUB IEPD↓SP + GrB-H6 在 23°C(图 5)，37°C(图 6)和 42°C(图 7)下孵育样品的 SDS PAGE 结果，无添加物(1)，加入 4.2mM Ni^{2+}(2)以及加入 4.2mM Ni^{2+} + 5mM NTA(3)。A-K 泳道的描述（对所有的温度相同）：

A: 分子量标记

B: 未切割的 H6-TripUB IEPD↓SP

C: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6，无添加物

D: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6，无添加物

E: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6，无添加物

F: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6，4.2mM Ni^{2+}

G: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6，4.2mM Ni^{2+}

H: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6，4.2mM Ni^{2+}

I: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6，4.2mM Ni^{2+} + 5mM NTA

J: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6，4.2mM Ni^{2+} + 5mM NTA

K: 200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6，4.2mM Ni^{2+} + 5mM NTA

所有三个图的泳道 C-E(1)中没有加入 Ni^{2+}或 NTA 时，H6-TripUB IEPD↓SP 融合蛋白的切割在不同温度下进行的速率不同。23°C 下 22 小时后，大约 40%的融合蛋白被切割。22 小时后，于 37°C 和 42°C 下比 23°C 下有更多的融合蛋白被切割，大约是于 37°C 为 60%，于 42°C 为 50%。

由于在 37°C 和 42°C 下加入 4.2mM Ni^{2+}时观察到蛋白的沉淀，2 小时孵育后在凝胶上没有再观察到融合蛋白的进一步切割。因此在图 6(37°C)和图 7(42°C)的泳道 F-H(2)中看到的蛋白少于图 5(23°C)的泳道 F-H(2)中看到的蛋白。在图 5 的泳道 F-H(2)中，大约 50%的融合蛋白在 22 小时的孵育后被切割为产物，这比没有加入 Ni^{2+}时要多。

孵育时加入 4.2mM Ni^{2+} + 5mM NTA，没有观察到沉淀。在图 5 的 I-K 泳道中(3)，比泳道 C-E(1)和 F-H(2)观察到更多的产物，所以在 Ni^{2+}和 NTA 存在的条件下于 23°C 孵育 22 小时后，大约 60%的融合蛋白被切割，而没有添加物时切割率是 40%，只加入 Ni^{2+}时切割率是 50%。

进一步提高温度至 37°C(图 6 泳道 I-K(3))和 42°C(图 7 泳道 I-K(3))，观察到切割率有更大的提高。于 37°C 孵育 22 小时后几乎所有的融合蛋白都被切割为正确的产物。于 42°C 孵育 22 小时后，与 37°C 相比只有少量的融合蛋白没有被切割。

图 10 显示 H6-IEPD-RAP 与 1 或 10μl GrB-H6 的共同孵育后样品的 SDS PAGE 结果。泳道(A-L)描述如下：

A: 分子量标记

B: H6-IEPD-RAP 自身于 5 小时孵育后

C: 200μl H6-IEPD-RAP + 1μl GrB-H6 于 5 小时孵育后

D: 200μl H6-IEPD-RAP + 10μl GrB-H6 于 5 小时孵育后

E: H6-IEPD-RAP 自身于 23 小时孵育后

F: 200μl H6-IEPD-RAP + 1μl GrB-H6 于 23 小时孵育后

G: 200μl H6-IEPD-RAP + 10μl GrB-H6 于 23 小时孵育后

H: H6-IEGR-RAP 被 FX_a部分切割，纯化的

I: H6-IEGR-RAP 几乎被 FX_a完全切割，纯化的

J: H6-IEPD-RAP 自身于 26 小时孵育后

K: 200μl H6-IEPD-RAP + 1μl GrB-H6 于 26 小时孵育后

L: 200μl H6-IEPD-RAP + 10μl GrB-H6 于 26 小时孵育后

未切割的 H6-IEPD-RAP(1)在泳道 B，E，和 J 中显示。泳道 C 和 D 中清楚显示在根据上面描述与 1 或 10μl GrB-H6 的共同孵育仅 5 小时后所有的 H6-IEPD-RAP 都被切割产生最终产物(2)。还清楚地显示在 RAP 中至少有一个内部切割位点，在这些泳道中产生两个低分子量的

条带，即最终的产物被切割呈两段，在凝胶上都可见(3)。泳道 F 和 G 以及泳道 K 和 L 与泳道 C 和 D 基本相同，尽管取样时间靠后，与 GrB-H6 共同孵育 23 和 26 小时后在 RAP 的显著内部位点中产生更多的切割。

泳道 H 和 I 中显示经过 FX_a 部分切割（泳道 H）或者完全切割（泳道 I）的 H6-IEGR-RAP 产生最终的 RAP 产物的纯化样品。在这些泳道中，已经通过纯化除去来自任何由 FX_a 在内部切割产生的降解产物。

图 11 显示 H6-IEPD-RAP + GrB-H6 和 H6-IEGR-RAP + FX_a 孵育样品的 SDS PAGE 结果。泳道(A-O)的描述：

A: 分子量标记

B: H6-IEGR-RAP 自身于 27 小时孵育后

C: 400μl H6-IEGR-RAP + 1μl FX_a 于 1/2 小时孵育后

D: 400μl H6-IEGR-RAP + 1μl FX_a 于 1 小时孵育后

E: 400μl H6-IEGR-RAP + 1μl FX_a 于 3 小时孵育后

F: 400μl H6-IEGR-RAP + 1μl FX_a 于 5 小时孵育后

G: 400μl H6-IEGR-RAP + 1μl FX_a 于 7 小时孵育后

H: 400μl H6-IEGR-RAP + 1μl FX_a 于 27 小时孵育后

I: H6-IEPD-RAP 自身于 27 小时孵育后

J: 400μl H6-IEPD-RAP + 2μl GrB-H6 于 1/2 小时孵育后

K: 400μl H6-IEPD-RAP + 2μl GrB-H6 于 1 小时孵育后

L: 400μl H6-IEPD-RAP + 2μl GrB-H6 于 3 小时孵育后

M: 400μl H6-IEPD-RAP + 2μl GrB-H6 于 5 小时孵育后

N: 400μl H6-IEPD-RAP + 2μl GrB-H6 于 7 小时孵育后

O: 400μl H6-IEPD-RAP + 2μl GrB-H6 于 27 小时孵育后

在泳道 B-H 中是 H6-IEGR-RAP 孵育后的样品(1)，其中泳道 B 显示未切割的 H6-IEGR-RAP。泳道 C-H 显示在仅仅半小时后几乎所有的融合蛋白都已经被 FX_a 切割产生正确的产物。泳道 D-G 中出现了一些降解产物，在泳道 H 中 27 小时的孵育后，所有的融合蛋白都已经被降

解，产生不同的小片段，没有剩下正确切割的产物。

泳道 I-O 显示了 H6-IEPD-RAP 孵育后的样品(2)。泳道 I 显示了未切割的 H6-IEPD-RAP，与 H6-IEGR-RAP 相同，在仅仅半小时后几乎所有的 H6-IEPD-RAP 都已经被 GrB-H6 切割产生正确的产物，如泳道 J 中所示。在泳道 K-N 中，出现了降解产物，但是与 H6-IEGR-RAP 孵育的结果相比要少。在泳道 O 中，27 小时孵育后仍然有相当多的正确切割的产物剩余。

图 12 显示 H6Ubi-IEPD-ApoA1 + GrB-H6 C228F 和 H6Ubi-IEGR-ApoA1 + FX_a 孵育样品的 SDS PAGE 结果。泳道(A-M)的描述：

A: 分子量标记

B: H6Ubi-IEPD-ApoA1 自身，0 小时孵育

C: 400μg H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0.4μg GrB-H6 C228F，1 小时孵育

D: 400μg H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0.4μg GrB-H6 C228F，3 小时孵育

E: 400μg H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0.4μg GrB-H6 C228F，6 小时孵育

F: 400μg H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0.4μg GrB-H6 C228F，24 小时孵育

G: 400μg H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0.4μg GrB-H6 C228F，48 小时孵育

H: H6Ubi-IEGR-ApoA1 自身，0 小时孵育

I: 350μg H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0.35μg FX_a，1 小时孵育

J: 350μg H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0.35μg FX_a，3 小时孵育

K: 350μg H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0.35μg FX_a，6 小时孵育

L: 350μg H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0.35μg FX_a，24 小时孵育

M: 350μg H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0.35μg FX_a，48 小时孵育

在泳道B-G中是H6Ubi-IEPD-ApoA1孵育后的样品(1)，其中泳道B显示未切割的H6Ubi-IEPD-ApoA1制备物。泳道H-M显示H6Ubi-IEGR-ApoA1孵育后的样品(2)，其中泳道H显示未切割的H6Ubi-IEGR-ApoA1制备物。完好的、未经切割的融合蛋白由(3)指示。(4)标记的条带是正确切割的ApoA1产物，而(5)标记的条带是H6Ubi融合伴侣。

图13显示H6-IEPD-TN123 + GrB-H6在没有加入Ca^{2+}的情况下孵育12小时和5天后的样品的SDS PAGE结果。一些样品经过还原处理。泳道(A-N)的描述:

A: 分子量标记

B: 200μl H6-IEPD-TN123 + 1μl GrB-H6 5天孵育后，样品被还原处理

C: 200μl H6-IEPD-TN123 + 10μl GrB-H6 5天孵育后，样品被还原处理

D + E: H6-IEPD-TN123自身于5天孵育后

F: 200μl H6-IEPD-TN123 + 1μl GrB-H6于5天孵育后

G: 200μl H6-IEPD-TN123 + 10μl GrB-H6于5天孵育后

H: GrB-H6自身如在C和G中一样稀释

I: H6-IEPD-TN123自身于12小时孵育后

J: 200μl H6-IEPD-TN123 + 1μl GrB-H6于12小时孵育后

K: 200μl H6-IEPD-TN123 + 10μl GrB-H6于12小时孵育后

L: H6-IEPD-TN123自身于12小时孵育后，样品被还原处理

M: 200μl H6-IEPD-TN123 + 1μl GrB-H6于12小时孵育后，样品被还原处理

N: 200μl H6-IEPD-TN123 + 10μl GrB-H6于12小时孵育后，样品被还原处理

泳道I-K与图2中的泳道F-H和图3中的泳道I-K相同，即与0，0.2或2 μg GrB-H6孵育12小时后的样品。这里的带型(1)表明

H6-IEPD-TN123 的 TN123 部分存在一个内部切割位点，该带型在图 12 中有进一步的解释。泳道 D-G 显示 5 天孵育后的结果，这里大部分的融合蛋白已被切割。泳道 G（加入了 10μl GrB-H6）中几乎所有的融合蛋白都被切割了两次(2)；在 IEPD↓序列处以及在 TN123 中具有 AQPD↓序列的内部位点。

泳道 L-N 以及泳道 B-D 分别是相同样品 12 小时后和 5 天后的结果，但是这里样品经过还原处理。带型(3)在图 12 中也有解释，同样几乎所有的融合蛋白在与 10μl GrB-H6 孵育 5 天后都被切割了两次，泳道 C(4).

图 14 显示了 H6-IEPD-TN123 + GrB-H6 在加入 Ca^{2+}的情况下孵育 12 小时和两天后样品的 SDS PAGE 结果。一些样品经过还原处理。泳道(A-K)：的描述：

A：分子量标记

B：200 μl H6-IEPD-TN123 + 1μl GrB-H6 以及 5mM $CaCl_2$，样品经过还原处理

C：200μl H6-IEPD-TN123 + 10μl GrB-H6 以及 5mM $CaCl_2$，样品经过还原处理

D：H6-IEPD-TN123 自身

E：200μl H6-IEPD-TN123 + 1μl GrB-H6 以及 5mM $CaCl_2$

F：200μl H6-IEPD-TN123 + 1μl GrB-H6 没有 $CaCl_2$

G：200μl H6-IEPD-TN123 + 10μl GrB-H6 以及 5mM $CaCl_2$

H：200μl H6-IEPD-TN123 + 10μl GrB-H6 没有 $CaCl_2$

I：GrB-H6 自身如在 G 和 H 中一样稀释

J：200μl H6-IEPD-TN123 + 1μl GrB-H6 没有 $CaCl_2$孵育两天后

K：200μl H6-IEPD-TN123 + 10μl GrB-H6 没有 $CaCl_2$孵育两天后

泳道 B-H 和 J-K 显示 H6-IEPD-TN123 与 GrB-H6 分别孵育 12 小时和两天的结果。

泳道 D 显示未切割的 H6-IEPD-TN123。比较泳道 E 和 G(+ 5mM Ca^{2+})与泳道 F 和 H(没有 Ca^{2+}),在 5mM Ca^{2+}存在时只出现两个条带(1),而在没有 Ca^{2+}时有 4 个条带(2),如图 2、3、10 和 12 的描述。在 Ca^{2+}存在时,与 10μl GrB-H6 孵育 12 小时后大约 40%的融合蛋白已经被正确切割(泳道 G),而在没有 Ca^{2+}存在时,两个位点发生的切割更快一些(泳道 H,12 小时后;泳道 K,2 天后)。在泳道 K 中几乎所有的融合蛋白都被切割了两次(3)。

泳道 B 和 C 中的样品经过还原处理且仍然只有两个条带出现(4);未切割的 H6-IEPD-TN123 和除去 H6 后的正确切割产物。

图 15 显示了在图 2、3、10 和 11 中的 SDS PAGE 凝胶上观察到的带型的示意图。

(A):当没有 Ca^{2+}存在时,H6-IEPD-TN123 构建体在两个不同的位置切割,用“GrB-H6→”表示。被切除的小的 N 端部分太小,所以不能在凝胶上观察到。产生的分子由两条多肽链组成,它们之间由一个二硫键维系。

(1)和(2):在非还原性凝胶上,(2)中的带型是在切割不完全时得到的。(1)是未切割的 H6-IEPD-TN123,在(2)中剩余未切割的融合蛋白是从上数第二条带。(2)中最上方的带是在内部位点 AQPD↓切割后的 H6-IEPD-TN123,产生的分子与未切割的 H6-IEPD-TN123 大小相同,但是较不紧密。在底部的带是正确切割的融合蛋白,而从上数第三条带是切割了两次的融合蛋白,即在正确的 IEPD↓位点和内部 AQPD↓位点的切割。在内部位点切割后,分子的紧密程度降低,因此在凝胶中比正确切割的融合蛋白迁移得要短。

(3)和(4):如果将样品还原处理,则观察到(4)中的带型。这里任

何的二硫键都被打断，所以在凝胶上只能看到单个多肽链。(3)显示了未切割的还原的 H6-IEPD-TN123 的位置。(4)中最上方的条带是剩余的未切割的 H6-IEPD-TN123，而从上数第二条带是正确切割的还原的 H6-IEPD-TN123。在还原条件下在内部被切割的分子不再被任何的二硫键所维系，所以在内部切割后两个多肽中只有稍大的多肽才能在凝胶上看到。因此从上数第三条带是融合蛋白内部切割后产生的稍大部分，而底部的条带是在正确的 IEPD↓位点和内部位点切割后产生的稍大部分。

(B)：在孵育中加入 5mM Ca^{2+}后，观察不到内部的切割。Ca^{2+}离子与 H6-IEPD-TN123 分子结合的方式阻止了 GrB-H6 在内部的 AQPD↓位点切割融合蛋白。随着 AQPD↓不能被切割，切割只在正确的 IEPD↓位点发生。

(5)和(6)：当只在正确的位点 IEPD↓位点处切割时就看到了(6)中的带型。未切割的 H6-IEPD-TN123 的位置在(5)中所示，所以(6)中上方的条带是剩余的未切割的 H6-IEPD-TN123。底部的条带是只在正确位点切割了仅一次的融合蛋白。小的 N 端肽太小，所以不能在凝胶上观察到。

图 16 显示了五个 H6-TripUB 变异体中的三个与 GrB-H6 孵育的样品。该三个变异体分别是 H6-TripUB IEPD↓SP，H6-TripUB IQAD↓SP 和 H6-TripUB IQAD↓SG。泳道(A-P)的描述：

A：分子量标记

B：H6-TripUB IEPD↓SP 自身于 24 小时孵育后

C：200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6 于 2 小时孵育后

D：200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6 于 6 小时孵育后

E：200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6 于 24 小时孵育后

F：200μl H6-TripUB IEPD↓SP + 5μl GrB-H6 于 48 小时孵育后

G: H6-TripUB IQAD↓SP 自身于 24 小时孵育后

H: 200μl H6-TripUB IQAD↓SP + 5μl GrB-H6 于 2 小时孵育后

I: 200μl H6-TripUB IQAD↓SP + 5μl GrB-H6 于 6 小时孵育后

J: 200μl H6-TripUB IQAD↓SP + 5μl GrB-H6 于 24 小时孵育后

K: 200μl H6-TripUB IQAD↓SP + 5μl GrB-H6 于 48 小时孵育后

L: H6-TripUB IQAD↓SG 自身于 24 小时孵育后

M: 200μl H6-TripUB IQAD↓SG + 5μl GrB-H6 于 2 小时孵育后

N: 200μl H6-TripUB IQAD↓SG + 5μl GrB-H6 于 6 小时孵育后

O: 200μl H6-TripUB IQAD↓SG + 5μl GrB-H6 于 24 小时孵育后

P: 200μl H6-TripUB IQAD↓SG + 5μl GrB-H6 于 48 小时孵育后

泳道 B 中显示了未切割的 H6-TripUB IEPD↓SP，在与 GrB-H6 共同孵育后，在泳道 C-F 中出现越来越多的正确切割的产物。在泳道 F 中，48 小时孵育后大约 2/3 起始量的未切割的 H6-TripUB IEPD↓SP 已经被正确切割。在泳道 G-K 中，显示的是 H6-TripUB IQAD↓SP 样品，与 H6-TripUB IEPD↓SP 的结果大致相同，未切割的 H6-TripUB IQAD↓SP 在泳道 G 中，而在泳道 H-K 中出现越来越多的正确切割的产物。但是切割比对 IEPD↓SP 序列的切割要慢得多，且在 48 小时的孵育后只有一小部分被切割。对于泳道 L-P 中的 H6-TripUB IQAD↓SG 样品，显然切割的速率要比 H6-TripUB IEPD↓SP 和 H6-TripUB IQAD↓SP 都快得多。泳道 L 显示未切割的 H6-TripUB IQAD↓SG 在仅仅两小时孵育后大部分的融合蛋白都已经被切割产生正确的产物了。

图 17 显示五个 H6-TripUB 变异体中的两个与 GrB-H6 孵育的样品。该两个剩余的变异体是 H6-TripUB VGPD↓SP 和 H6-TripUB VGPD↓FG。泳道(A-K)的描述:

A: H6-TripUB VGPD↓SP 自身于 24 小时孵育后

B: 200μl H6-TripUB VGPD↓SP + 5μl GrB-H6 于 2 小时孵育后

C: 200μl H6-TripUB VGPD↓SP + 5μl GrB-H6 于 6 小时孵育后

D: 200μl H6-TripUB VGPD↓SP + 5μl GrB-H6 于 24 小时孵育后

E: 200μl H6-TripUB VGPD↓SP + 5μl GrB-H6 于 48 小时孵育后

F: H6-TripUB VGPD↓FG 自身 24 小时孵育后

G: 200μl H6-TripUB VGPD↓FG + 5μl GrB-H6 于 2 小时孵育后

H: 200μl H6-TripUB VGPD↓FG + 5μl GrB-H6 于 6 小时孵育后

I: 200μl H6-TripUB VGPD↓FG + 5μl GrB-H6 于 24 小时孵育后

J: 200μl H6-TripUB VGPD↓FG + 5μl GrB-H6 于 48 小时孵育后

K: 分子量标记

泳道 A 中是未切割的 H6-TripUB VGPD↓SP，泳道 B-E 中出现越来越多正确切割的产物，如在 H6-TripUB IEPD↓SP 中所见到的一样(泳道 B-F，图 16)。48 小时后大约一半量的融合蛋白都已经被切割。在泳道 F 中显示了未切割的 H6-TripUB VGPD↓FG，在泳道 G-J 中出现 H6-TripUB VGPD↓FG 的正确切割产物。仅仅 2 小时孵育后，所有的融合蛋白都已经被正确切割。

图 18 显示 H6-TripUB IEPD↓SP，H6-TripUB IEPD↓TQ 和 H6-TripUB IEPD↓IV 与 GrB-H6 C228F 在 23°C 孵育的样品，蛋白酶和融合蛋白的比例是 1:500。

泳道 A-M 的描述:

A: 分子量标记

B: H6-TripUB IEPD↓SP，0 小时孵育

C: 250μl H6-TripUB IEPD↓SP + 1μl GrB-H6 C228F，4 小时孵育

D: 250μl H6-TripUB IEPD↓SP + 1μl GrB-H6 C228F，24 小时孵育

E: 250μl H6-TripUB IEPD↓SP + 1μl GrB-H6 C228F，96 小时孵育

F: H6-TripUB IEPD↓TQ，0 小时孵育

G: 250μl H6-TripUB IEPD↓TQ + 1μl GrB-H6 C228F，4 小时孵育

H: 250μl H6-TripUB IEPD↓TQ + 1μl GrB-H6 C228F，24小时孵育

I: 250μl H6-TripUB IEPD↓TQ + 1μl GrB-H6 C228F，96小时孵育

J: H6-TripUB IEPD↓IV，0小时孵育

K: 250μl H6-TripUB IEPD↓IV + 1μl GrB-H6 C228F，4小时孵育

L: 250μl H6-TripUB IEPD↓IV + 1μl GrB-H6 C228F，24小时孵育

M: 250μl H6-TripUB IEPD↓IV + 1μl GrB-H6 C228F，96小时孵育

在泳道B-E中显示了H6-TripUB IEPD↓SP的切割(1)，其中的切割在96小时后几乎是100%的完全。泳道F-I是H6-TripUB IEPD↓TQ的切割(2)，仅在24小时后切割几乎是100%完全了。对于泳道J-M显示的H6-TripUB IEPD↓IV(3)的切割也是相同的情况。完好的和切割的H6-TripUB IEPD↓TQ在凝胶上都位于比H6-TripUB IEPD↓SP的条带略偏下的位置，原因是H6-TripUB IEPD↓TQ是H6-TripUB IEPD↓SP的一个删除突变体。另一个删除突变体H6-TripUB IEPD↓IV的条带位置更靠下，因为删除的片段比H6-TripUB IEPD↓TQ中的删除片段要大。

图19，A显示H6-TripUB IEPD↓SP和H6-TripUB IEPD↓EP与GrB-H6 C228F在21°C和37°C孵育的样品，蛋白酶和融合蛋白的比例是1:500，总体积是200微升。

泳道A-O的描述:

A: 分子量标记

B: H6-TripUB IEPD↓SP，0小时孵育

C: 24μg H6-TripUB IEPD↓SP + 0.048μg GrB-H6 C228F，21°C，4小时

D: 24μg H6-TripUB IEPD↓SP + 0.048μg GrB-H6 C228F, 21°C, 24 小时

E: 24μg H6-TripUB IEPD↓SP + 0.048μg GrB-H6 C228F, 21°C, 48 小时

F: 24μg H6-TripUB IEPD↓SP + 0.048μg GrB-H6 C228F, 37°C, 4 小时

G: 24μg H6-TripUB IEPD↓SP + 0.048μg GrB-H6 C228F, 37°C, 24 小时

H: 24μg H6-TripUB IEPD↓SP + 0.048μg GrB-H6 C228F, 37°C, 48 小时

I: H6-TripUB IEPD↓EP, 0 小时孵育

J: 36μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.072μg GrB-H6 C228F, 21°C, 4 小时

K: 36μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.072μg GrB-H6 C228F, 21°C, 24 小时

L: 36μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.072μg GrB-H6 C228F, 21°C, 48 小时

M: 36μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.072μg GrB-H6 C228F, 37°C, 4 小时

N: 36μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.072μg GrB-H6 C228F, 37°C, 24 小时

O: 36μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.072μg GrB-H6 C228F, 37°C, 48 小时

完好的未切割的 H6-TripUB IEPD↓SP 在泳道 B 中显示(1)，而在 21°C 和 37°C 的切割分别在泳道 C-E(2)和泳道 F-H(3)中显示。在两个温度下几乎没有差异。21°C 下 48 小时后大约 40%已经被切割。未切割的 H6-TripUB IEPD↓EP 在泳道 I(4)中显示，而在 21°C 和 37°C 的切割反应分别在泳道 J-L(5)和泳道 M-O(6)中显示。同样两个温度间几乎没有差异，21°C 下 48 小时后大约 35-40%已经被切割，即 GrB-H6 C228F

对两个底物切割得都很好。

图 19，B 显示 H6-TripUB IEPD↓EG 和 H6-TripUB IEPD↓EP 与 GrB-H6 C228F 在 22°C 和 37°C 孵育的样品，蛋白酶和融合蛋白的比例是 1:500，总体积是 200 微升。

泳道 A-O 的描述：

A：分子量标记

B：H6-TripUB IEPD↓EG，0 小时孵育

C：40μg H6-TripUB IEPD↓EG + 0.08μg GrB-H6 C228F，23°C，6 小时

D：40μg H6-TripUB IEPD↓EG + 0.08μg GrB-H6 C228F，23°C，24 小时

E：40μg H6-TripUB IEPD↓EG + 0.08μg GrB-H6 C228F，23°C，50 小时

F：40μg H6-TripUB IEPD↓EG + 0.08μg GrB-H6 C228F，37°C，6 小时

G：40μg H6-TripUB IEPD↓EG + 0.08μg GrB-H6 C228F，37°C，24 小时

H：40μg H6-TripUB IEPD↓EG + 0.08μg GrB-H6 C228F，37°C，50 小时

I：H6-TripUB IEPD↓EP，0 小时孵育

J：38μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.08μg GrB-H6 C228F，23°C，6 小时

K：38μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.08μg GrB-H6 C228F，23°C，24 小时

L：38μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.08μg GrB-H6 C228F，23°C，50 小时

M：38μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.08μg GrB-H6 C228F，37°C，6 小时

N: 38μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.08μg GrB-H6 C228F, 37°C, 24 小时

O: 38μg H6-TripUB IEPD↓EP + 0.08μg GrB-H6 C228F, 37°C, 50 小时

完好的未切割的 H6-TripUB IEPD↓EG 在泳道 B 中显示(1)，而在 21°C 和 37°C 的切割分别在泳道 C-E(2)和泳道 F-H(3)中显示。在两个温度下几乎没有差异，仅仅 6 小时后切割就已经完全。未切割的 H6-TripUB IEPD↓EP 在泳道 I(4)中显示，而在 21°C 和 37°C 的切割反应分别在泳道 J-L(5)和泳道 M-O(6)中显示。同图 19A 中一样，21°C 切割 50 小时后大约 40%已经被切割。令人惊奇的是 GrB-H6 C228F 对 IEPD↓EG 底物的切割比对 IEPD↓SP 和 IEPD↓EP 的切割要好得多。

图 20 显示 H6-TripUB IQAD↓SP 或 H6-TripUB IQAD↓SG 与六个不同的固定化 GrB-H6 C228F 制备物孵育的样品，实验 A-F，在实施例 9 中描述。

泳道 A-M 的描述:

A: H6-TripUB IQAD↓SP + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 A

B: H6-TripUB IQAD↓SP + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 B

C: H6-TripUB IQAD↓SP + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 C

D: H6-TripUB IQAD↓SP + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 D

E: H6-TripUB IQAD↓SP + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 E

F: H6-TripUB IQAD↓SP + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 F

G: H6-TripUB IQAD↓SG + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 A

H: H6-TripUB IQAD↓SG + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 B

I: H6-TripUB IQAD↓SG + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 C

J: H6-TripUB IQAD↓SG + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 D

K: H6-TripUB IQAD↓SG + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 E

L: H6-TripUB IQAD↓SG + 固定化的 GrB-H6 C228F, 实验 F

M: 分子量标记

H6-TripUB IQAD↓SP 的孵育在泳道 A-F 中显示(1)，而 H6-TripUB IQAD↓SG 的孵育在泳道 G-L 中显示(2)，代表未切割的融合蛋白(H6-TripUB IQAD↓SP 或 H6-TripUB IQAD↓SG)的条带由(3)标记，正确切割的产物的条带的位置由(4)标记。

实施例

实施例 1

人粒酶 B 表达载体的设计和构建

为了制备无活性的粒酶 B 酶原构建体，将编码活化的人粒酶 B(E.C. 3.4.21.79)的序列，即从 Ile21(胰凝乳蛋白酶原编号 Ile16)到 Tyr246 的序列克隆到含有 C 端六聚 His 标签(H6)的 pT7 克隆载体中(pT7 C-term H6)，得到表达载体 pT7-IEGR-GrB-H6。含有凝血因子 X_a(FX$_a$)识别序列 IEGR 的序列 MGSIEGR 置于粒酶 B 中 Ile21 的 N 端，在 Arg(R)和 Ile21 之间提供了一个 FX$_a$切割位点。产生的融合蛋白粒酶 B 酶原含有 FX$_a$识别序列和 C 端的六聚 His 标签，在下面称为 pro-IEGR-GrB-H6，在序列编号 1 中示出。

为了形成自我激活的粒酶 B 酶原蛋白，构建表达载体 pT7-IEPD-GrB-H6 和 pT7-IEAD-GrB-H6，其中的 FX$_a$识别序列 IEGR 被分别替换为粒酶 B 的识别序列 IEPD 或 IEAD。产生的自我激活 GrB 蛋白在下面分别称为 pro-IEPD-GrB-H6 和 pro-IEAD-GrB-H6，并在序列编号 2 和序列编号 3 中示出。在下面的部分中概述了载体的设计和克隆。

在人粒酶 B 中特别是上面描述的粒酶 B 蛋白 pro-IEGR-GrB-H6、pro-IEPD-GrB-H6 和 pro-IEAD-GrB-H6 中于氨基酸 228 位（使用现成的标准胰凝乳蛋白酶原氨基酸编号系统）存在的游离的半胱氨酸，在实施例 2 中描述的重折叠过程中可能产生问题，降低了活化的酶的稳定性，对含有二硫键的底物产生更高的非酶反应性。因此制备了一些

基于 pro-IEPD-GrB-H6 的重组突变蛋白，其中 Cys228 氨基酸残基（胰凝乳蛋白酶原氨基酸编号）通过使构建体 pT7-IEPD-GrB-H6 定点突变，被替换为丝氨酸(S)，丙氨酸(A)，苏氨酸(T)，缬氨酸(V)，或苯丙氨酸(F)，分别得到表达载体 pT7-IEPD-GrB-H6 C228S，pT7-IEPD-GrB-H6 C228A，pT7-IEPD-GrB-H6 C228T，pT7-IEPD-GrB-H6 C228V 和 pT7-IEPD-GrB-H6 C228F。产生的突变体蛋白在下面分别称为 Pro-IEPD-GrB-H6 C228S(序列编号 4)，pro-IEPD-GrB-H6 C228A(序列编号 5)，pro-IEPD-GrB-H6 C228T(序列编号 6)，pro-IEPD-GrB-H6 C228V(序列编号 7)，和 pro-IEPD-GrB-H6 C228F(序列编号 8)，它们被一起称为 pro-IEPD-GrB-H6 C228X 突变体。所有这些突变体都构建为自我激活的粒酶 B 蛋白酶。

pT7 C-term H6 克隆载体的构建

从寡聚核苷酸引物 H6 C-term fw(序列编号：9)和 H6 C-term rev(序列编号：10)得到的 DNA 片段使用标准的步骤连接到 *Nco*I 和 *Eco*RI 切割的载体 pT7(Christensen JH 等人，1991)中构建为克隆载体 pT7 C-term H6。

将人粒酶 B 克隆到克隆载体 pT7 C-term H6 中

从人骨髓、人白细胞、人淋巴结和淋巴瘤(Raji)细胞(Clontech Laboratories，Inc 目录号 7181-1，7182-1，7164-1，7167-1)中分离得到的 cDNA 混合物，用寡聚核苷酸引物 GrBfw(序列编号：11)和 GrBrev EcoRI(序列编号：12)扩增后产生的 DNA 片段 GrB EcoRI，经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切，然后用标准的步骤插入到 *Bam*HI 和 *Eco*RI 切割的 pT7 C-term H6 载体中，构建得到表达载体 pT7-IEGR-GrB-H6。得到的核苷酸序列 GrB EcoRI 在序列编号 13 中示出。

自我激活的人粒酶 B 表达载体 pro-IEPD-GrB-H6 和 pro-IEAD-GrB-H6 的构建

根据生产商的说明，使用 QuikChange™ 定点突变试剂盒(STRATAGENE,目录编号#200518)构建编码自我激活粒酶B酶原蛋白的表达载体 pT7-IEPD-GrB-H6 和 pT7-IEAD-GrB-H6。用表达载体 pT7-IEGR-GrB-H6 作为模板。寡聚核苷酸引物 GrB GR-PD fw 和 GrB GR-PD rev(序列编号 14 和 15)用于构建 pT7-IEPD-GrB-H6; 寡聚核苷酸引物 GrB GR-AD fw 和 GrB GR-AD rev(序列编号 16 和 17)用于构建 pT7-IEAD-GrB-H6。

自我激活的 pro-IEPD-GrB-H6 C228X 突变体表达载体的构建

根据生产商的说明，使用 QuikChange™ 定点突变试剂盒(STRATAGENE,目录编号#200518)构建编码自我激活 pro-GrB-H6 C228X 突变体的表达载体 pT7-IEPD-GrB-H6 C228X。使用表达载体 pT7-IEPD-GrB-H6 作为模板。经简并的核苷酸引物 GrB SAT fw 和 GrB SAT rev(序列编号 18 和 19)用于构建 pT7-IEPD-GrB-H6 C228S, pT7-IEPD-GrB-H6 C228A, 和 pT7-IEPD-GrB-H6 C228S, 在表 1 中所示的 GrB SAT fw 和 GrB SAT rev 引物序列中，D = A, G, 或 T 和 H = T, C, 或 A。简并核苷酸引物 GrB VF fw 和 GrB VF rev(序列编号 20 和 21)用于构建 pT7-IEPD-GrB-H6 C228V 和 pT7-IEPD-GrB-H6 C228F, 在表 1 中所示的 GrB VF fw 和 GrB VF rev 引物序列中，K = G 或 T 和 M = A 或 C。

表 1: 寡聚核苷酸引物

引物	核苷酸序列	序列编号
H6 C-term fw	5'-CATGGACGGAAGCTTGAATTCACATCACCATCACCATCACTAACGC-3'	9
H6 C-term rev	5'-AATTGCGTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAATTCAAGCTTCCGCT-3'	10
GrBfw	5'-CATGGGATCCATCGAGGGTAGGATCATCGGGGGACATGAG-3'	11
GrBrev EcoRI	5'-GCGTGAATTCAGGTACCGTTTCATGGTTTTCTTTATCC-3'	12
GrB GR-PD fw	5'-TCCATCGAGCCGGATATCATCGGGGGACATGAG-3'	14
GrB GR-PD rev	5'-CCCCGATGATATCCGGCTCGATGGATCCCATATG-3'	15
GrB GR-AD fw	5'-TCCATCGAGGCTGATATCATCGGGGGACATGAG-3'	16
GrB GR-AD rev	5'-CCCCGATGATATCAGCCTCGATGGATCCCATATG-3'	17
GrB SAT fw	5'-TCCACGAGCADCCACCAAAGTCTCAAG-3'	18
GrB SAT rev	5'-AGACTTTGGTGGHGGCTCGTGGAGGC-3'	19
GrB VF fw	5'-TCCACGAGCCKTCACCAAAGTCTCAAG-3'	20
GrB VF rev	5'-AGACTTTGGTGAMGGCTCGTGGAGGC-3'	21

实施例 2

自我激活的人粒酶 B 的表达和重折叠

可被 FX_a 激活的重组 pro-IEGR-GrB-H6

可被 FX_a 激活的重组粒酶 B 酶原融合蛋白 pro-IEGR-GrB-H6(序列编号 1)制备如下：根据 Studier FW 等人(1990)中的描述，实施例 1 中制备的表达载体 pT7-IEGR-GrB-H6 在 *E. coli* BL21 细胞中进行中等规模(3×1 升)的生长和表达。于 37°C 以对数生长的培养物在 OD_{600} = 0.8 时用噬菌体 λCE6 感染，感染复数约为 5。培养物继续在 37°C 培养，感染后 50 分钟加入 0.1 g/L 利福平(溶解于甲醇中制成 0.1 g/mL)。于 37°C 继续培养 3 小时，离心收获细胞。通过渗透休克和超声波裂解细胞，将总细胞蛋白抽提到苯酚(用 Trisma 碱调节 pH 至 8)中。加入 2.5 倍体积的乙醇离心沉淀酚相中的蛋白质。蛋白质沉淀溶于含 6M 盐酸胍、50mM Tris-HCl pH 8，和 100mM 二硫苏糖醇的缓冲液中。使用 Sephadex™ G-25 Fine(Amersham Biosciences)凝胶过滤将蛋白洗脱到 8 M 尿素，0.5M NaCl，50mM Tris-HCl pH 8，和 5mM 2-巯基乙醇中。粗加工蛋白制备物上样于 Ni^{2+}-活化的 NTA-琼脂糖层析柱(Ni^{2+}-NTA-agarose，Quiagen)上。

粗蛋白提取物上样于 Ni^{2+}-NTA-琼脂糖层析柱后，用 1 柱体积的上样缓冲液；而后 1 柱体积的 8 M 尿素，0.5M NaCl，50mM 磷酸钠 pH6.3 和 5mM 2-巯基乙醇；½柱体积的 6 M 盐酸胍，50mM Tris-HCl pH8，和 5mM 2-巯基乙醇；最后用½柱体积的 8 M 尿素，0.5M NaCl，50mM Tris-HCl pH 8 和 3mM 还原型谷胱甘肽分别洗柱，将融合蛋白 pro-IEGR-GrB-H6 从大量 *E. coli* 和 λ 噬菌体蛋白中纯化出来。

使用 Thøgersen 等人描述的循环重折叠步骤(国际专利申请号 WO 9418227)，使融合蛋白 pro-IEGR-GrB-H6 在 Ni^{2+}-NTA-琼脂糖层析柱上重折叠。梯度操作概览在下面的表 2 中描述，其中缓冲液 A 是 0.5M NaCl，50mM Tris-HCl pH 8，2mM 还原型谷胱甘肽，和 0.2mM 氧化型

谷胱甘肽；缓冲液 B 是 6M 尿素，0.5M NaCl，50mM Tris-HCl pH 8 和 3mM 还原型谷胱甘肽。

表 2:

步骤	Time(min)	Flow(mL/min)	% A	% B
1	0	2	100	0
2	45	2	100	0
3	46	2	0	100
4	52	2	0	100
5	60	2	100	0
6	105	2	100	0
7	106	2	4	96
8	113	2	4	96
9	120	2	100	0
10	165	2	100	0
11	166	2	8	92
12	172	2	8	92
13	180	2	100	0
14	225	2	100	0
15	226	2	10	90
16	232	2	10	90
17	240	2	100	0
18	285	2	100	0
19	286	2	12	88
20	292	2	12	88
21	300	2	100	0
22	345	2	100	0
23	346	2	14	86
24	352	2	14	86
25	360	2	100	0
26	405	2	100	0
27	406	2	16	84
28	412	2	16	84
29	420	2	100	0
30	465	2	100	0
31	466	2	18	82
32	472	2	18	82

33	480	2	100	0
34	525	2	100	0
35	526	2	20	80
36	532	2	20	80
37	540	2	100	0
38	585	2	100	0
39	586	2	22	78
40	592	2	22	78
41	600	2	100	0
42	645	2	100	0
43	646	2	24	76
44	652	2	24	76
45	660	2	100	0
46	705	2	100	0
47	706	2	30	70
48	713	2	30	70
49	720	2	100	0
50	765	2	100	0
51	766	2	35	65
52	772	2	35	65
53	780	2	100	0
54	825	2	100	0
55	826	2	40	60
56	832	2	40	60
57	840	2	100	0
58	885	2	100	0
59	886	2	45	55
60	892	2	45	55
61	900	2	100	0
62	945	2	100	0
63	946	2	50	50
64	952	2	50	50
65	960	2	100	0
66	1005	2	100	0
67	1006	2	55	45
68	1012	2	55	45
69	1020	2	100	0
70	1065	2	100	0

71	1066	2	60	40
72	1072	2	60	40
73	1080	2	100	0
74	1125	2	100	0
75	1126	2	60	40
76	1132	2	60	40
77	1140	2	100	0
78	1185	2	100	0
79	1186	2	60	40
80	1192	2	60	40
81	1200	2	100	0
82	1245	2	100	0
83	1246	2	65	35
84	1252	2	65	35
85	1260	2	100	0
86	1305	2	100	0
87	1306	2	65	35
88	1312	2	65	35
89	1319	2	100	0
90	1364	2	100	0
91	1365	2	65	35
92	1371	2	65	35
93	1378	2	100	0
94	1423	2	100	0

循环重折叠步骤完成后，使用含有 0.5M NaCl，50mM Tris-HCl pH 8 和 10 mM EDTA pH 8 的缓冲液将 pro-IEGR-GrB-H6 融合蛋白从 Ni^{2+}-NTA-琼脂糖层析柱上洗脱下来。

从 Ni^{2+}-NTA-琼脂糖层析柱上洗脱下来之后，用 1 体积的 50mM Tris-HCl pH 8.0 稀释 pro-IEGR-GrB-H6 蛋白，然后用盐酸调节 pH 至 7。然后蛋白质上样于 SP Sepharose™ Fast Flow（Amersham Biosciences）离子交换层析柱上。使用 10 柱体积以上的 250mM NaCl、50mM Tris-HCl pH 7.0 到 1M NaCl、50mM Tris-HCl pH 7.0 的线性梯度洗脱蛋白。洗脱过程中取样进行 SDS-PAGE 分析可见一条显著的条

带，其为预计分子量 27.4 kDa 的单体 pro-IEGR-GrB-H6 的迁移。

自我激活的 pro-IEPD-GrB-H6 和 pro-IEAD-GrB-H6

自我激活的重组粒酶 B 融合蛋白 pro-IEPD-GrB-H6(序列编号：2)和 pro-IEAD-GrB-H6(序列编号：3)通过实施例 1 中制备的载体 pT7-IEPD-GrB-H6 和 pT7-IEAD-GrB-H6 的表达产生，其中的表达、重折叠和纯化基本上与上面描述的 pro-IEGR-GrB-H6 按同样方法进行。

两个酶 pro-IEPD-GrB-H6 和 pro-IEAD-GrB-H6 的自我激活按照以下实施例 3 中描述的方法进行。

自我激活的 pro-IEPD-GrB-H6 C228X 突变体

所有的 pro-IEPD-GrB-H6 C228X 突变体（序列编号 4、5、6、7 和 8）用表达载体 pT7-IEPD-GrB-H6 C228X 进行表达，基本上与上面描述的 pro-IEGR-GrB-H6 按同样方法进行。pro-IEPD-GrB-H6 C228X 突变体的重折叠也基本上与上面描述的 pro-IEGR-GrB-H6 按同样方法进行。在阳离子交换层析柱上的激活按照上面描述的用于 pro-IEPD-GrB-H6 和 pro-IEAD-GrB-H6 的方法进行。

在酶原形式的重折叠蛋白上样于阳离子交换层析柱 SP Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)后仅 4 小时就完成了自我激活的 pro-IEPD-GrB-H6 C228X 突变体的纯化和完全激活，用 250mM NaCl，50mM TrisHCl，pH 7.0 洗柱 4 小时，最后用 750mM NaCl，50mM TrisHCl，pH 7.0 洗脱激活的蛋白。洗脱后被激活的突变体称为 GrB-H6 C228S，GrB-H6 C228A，GrB-H6 C228T，GrB-H6 C228V,和 GrB-H6 C228F。

pro-IEPD-GrB-H6 C228X 突变体的表达水平与 pro-IEPD-GrB-H6 的表达水平相似。但是重折叠效率与 pro-IEPD-GrB-H6 相比最高相差

90%。一个突变体 pro-IEPD-GrB-H6 C228S 的重折叠效率非常低，因此没有进一步进行分析。这与预期的相反，即预期替换半胱氨酸残基最明显的保守选择是丝氨酸，因为丝氨酸在蛋白质中天然存在的所有氨基酸中与半胱氨酸在大小、亲水性和化学性质上最为相似。

其他突变体中的三个 pro-IEPD-GrB-H6 C228A，pro-IEPD-GrB-H6 C228T，和 pro-IEPD-GrB-H6 C228V 的重折叠效率与 pro-IEPD-GrB-H6 的重折叠效率相似。

非常有趣的发现是 pro-IEPD-GrB-H6 C228F 突变体，比未突变的含有 Cys228 氨基酸残基的 pro-IEPD-GrB-H6 在重折叠和纯化后得到了更高的蛋白质回收率，而其中的半胱氨酸替换为苯丙氨酸。因此当 70 毫克（用 Bradford 法(Coomassie ®PlusProtein Assay Reagent Kit，Pierce Biotechnology)定量，使用牛血清白蛋白作为蛋白质标准）的 pro-IEPD-GrB-H6 C228F 或未突变的 pro-IEPD-GrB-H6 进行上面描述的重折叠和纯化步骤以后，最终产率（蛋白质回收率）分别为 1.5%和 0.5%。这清楚地说明突变的 pro-IEPD-GrB-H6 C228F 提供了提高的最终蛋白质回收率。未突变的 Pro-IEPD-GrB-H6 的低回收率的原因是当蛋白通过阳离子交换层析纯化和激活时，蛋白明显倾向于沉淀这样就降低了活性酶的最终产率（回收率）。pro-IEPD-GrB-H6 C228F 没有观察到明显的沉淀。因此，用苯丙氨酸替换半胱氨酸 228 看来对粒酶 B 是有利的，特别是对于自我激活的粒酶 B。这是非常令人惊奇的，因为苯丙氨酸在化学上与半胱氨酸相差很大，一般不选作半胱氨酸的替代物。

因此在以下的实施例中我们重点研究 C228F 突变体 pro-IEPD-GrB-H6 C228F，与 pro-IEGR-GrB-H6 进行比较。

实施例 3

使用纯化的牛因子 X_a 激活 pro-IEGR-GrB-H6 融合蛋白，以及 pro-IEPD-GrB-H6 和 pro-IEAD-GrB-H6 的自我激活

因子 Xa 激活 pro-IEGR-GrB-H6

根据实施例 2 中的描述制备单体未激活的 pro-IEGR-GrB-H6，直接从 SP Sepharose 离子交换的洗脱物中取样。向 1 毫克 pro-IEGR-GrB-H6（大约 10 毫升）被如此激活，即加入 50μg FX_a(50μl 的 1 mg/ml 储液)，室温孵育几天。pro-IEGR-GrB-H6 被 FX_a 切割/激活产生 GrB-H6 的程度，通过 SDS PAGE 进行分析。

此外，pro-IEGR-GrB-H6 和 FX_a 孵育的过程中使用以下的显色反应体系对粒酶 B 活性监测几天：500μl 缓冲液(100mM NaCl，50mM Tris-HCl pH 8.0)，4μl 100mM Ac-IEPD-*p*NA，和 5μl 孵育混合物。将 100μl Pro-IEGR-GrB-H6(大约 10μg)与 1μl FX_a(1 mg/ml)混和制备孵育混合物，孵育时维持在 4°C。结果总结在表 3 和图 1 中。

表 3:

时间	时刻(小时)	ΔOD_{405}/min
0 小时	0	0.0073
2 小时	2	0.0200
5 小时	5	0.0250
19 小时	19	0.0829
2 天	45	0.1325
5 天	120	0.1832

为了除去加入的 FX_a，将孵育混合物上样于 SP Sepharose™ Fast Flow（Amersham Biosciences）离子交换层析柱上，用 250mM NaCl，50mM Tris-HCl pH 7.0 洗柱。FX_a 不与层析介质结合，而产生的 GrB-H6 用 750mM NaCl，50mM Tris-HCl pH 7.0 从层析柱上洗脱。

呈色活性测定

为了测定加入的 FX_a 是否被正确地从孵育混合物中除去，在 FX_a 加入和除去的前后对 GrB-H6 和 FX_a 的活性进行测定，使用底物 S2222(N-苯甲酰-L-异亮氨酰-L-谷氨酰-甘氨酰-L-精氨酰-*p*-硝基苯胺，Chromogenix，意大利，目录编号 S2222)和 Ac-IEPD-*p*NA(N-乙酰-L-异亮氨酰-L-谷氨酰-L-脯氨酰-L-天冬氨酰-*p*-硝基苯胺，Calbiochem，La Jolla，美国，目录编号 368067)，吸收在 405nm 测量大约 3 分钟，计算 $\Delta OD_{405}/min$。使用以下的混合物测定 FX_a 活性：500μl 缓冲液，25μl 3mM S2222，和 5μl FX_a。使用以下的混合物测定 GrB-H6 活性：500μl 缓冲液，2μl 100mM Ac-IEPD-*p*NA，和 5μl GrB-H6。

使用的缓冲液是 100mM NaCl，50mM Tris-HCl pH 8.0 或 100mM HEPES pH 7.4。使用 100mM NaCl，50mM Tris-HCl pH 8.0 缓冲液的实例在下面的表 3 中示出，其中使用了除去 FX_a 后 SP Sepharose 洗脱物中的顶层级分（the top fraction）。

表 4:

FX_a 除去之前 ($\Delta OD_{405}/min$)		FX_a 除去之后 ($\Delta OD_{405}/min$)	
GrB 活性	FX_a 活性	GrB 活性	FX_a 活性
0.1401	0.0139	0.2213	0.0001

可以从上面的表 4 中看出，通过 SP Sepharose™ Fast Flow 离子交换层析，加入的 FX_a 被完全从激活混合物中除去。使用包含 100mM HEPES pH 7.4 的缓冲液得到相同的结果。

pro-IEPD-GrB-H6 和 pro-IEAD-GrB-H6 的自我激活

根据实施例 2 中的描述，使用实施例 1 中描述的表达载体 pT7-IEPD-GrB-H6 和 pT7-IEAD-GrB-H6 制备重组的自我激活人粒酶 B

衍生物 IEPD-GrB-H6 和 IEAD-GrB-H6。从 SP Sepharose 层析柱上洗脱 IEAD-GrB-H6 和 IEPD-GrB-H6 蛋白，在 4°C 保存 2 天，然后使用呈色检测对各自洗脱物的顶层级分进行活性测定。对于这一目的使用以下的混合物：500μl 缓冲液(100mM HEPES pH 7.5)，2μl 100mM Ac-IEPD-*p*NA，和 5μl 蛋白质溶液。吸收的改变在 405nm 测量 3 分钟。在 4°C 继续孵育 1 天和 2 天后再次测定活性。结果总结于表 5 中。

表 5:

蛋白质		ΔOD_{405}/min
IEAD-GrB-H6	2 天	0.1372
IEPD-GrB-H6	2 天	0.1284
IEAD-GrB-H6	3 天	0.1607
IEPD-GrB-H6	3 天	0.1375
IEAD-GrB-H6	4 天	0.1983
IEPD-GrB-H6	4 天	0.1351

可以从表 5 中看到，自我激活衍生物 pro-IEPD-GrB-H6 和 pro-IEAD-GrB-H6 不需要加入任何事先活化的粒酶 B 即可被激活，且自我激活过程在 4°C 下至少三或四天后才能完成。

实施例 4

用小的呈色肽底物测定粒酶 B 的活性

激活和纯化的 GrB-H6 的活性在不同的缓冲液中使用底物 Ac-IEPD-*p*NA 进行测量：500μl 缓冲液，2μl 100mM Ac-IEPD-*p*NA，和 5μl GrB-H6。除非特别说明，从第一个 0.75 分钟开始计算 ΔOD_{405}/min。

表 6:

缓冲液	加入的 GrB-H6 的大致量(μg)	活性 (ΔOD_{405}/min)	
TNPH 8.1	1	0.2213	(1 min)
TNPH 7.0	1	0.2794	
TNPH 7.4	1	0.2930	
		0.2624	
	0.5	0.0835	
		0.1082	
	0.2	0.0245	(3 min)
TNPH 7.4 + 0.1% TWEEN20	0.5	0.0887	
	0.2	0.0303	(3 min)
TNPH 7.4 + 5mM Ca^{2+}	0.5	0.1401	
TNPH 7.4 + 5mM Mg^{2+}	0.5	0.1491	
100mM HEPES pH 7.5	0.5	0.2350	
100mM HEPES pH 7.5 + 5mM Ca^{2+}	0.5	0.2425	
100mM HEPES pH 7.2	0.5	0.1970	
100mM HEPES pH 7.4	0.5	0.2273	
		0.2328	
100mM HEPES pH 7.4 + 50mM KCl	0.5	0.2167	
100mM HEPES pH 7.4 + 50mM NaCl	0.5	0.1993	
		0.1938	
100mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4	0.5	0.1682	
50mM NaCl, 25mM Tris-HCl pH 7.4	0.5	0.1948	
100mM KCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4	0.5	0.1662	

TN = 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl

可以从上面的表 6 中看到，在所有研究的缓冲液中，100mM HEPES pH 7.4-7.5 对于 GrB-H6 的活性是最佳的。

在随后用 GrB-H6 C228F 进行的 pH 筛选实验中，对底物 Ac-IEPD-*p*NA 的活性最佳的 pH 是 100mM HEPES，pH 范围 7.5-7.8。

为了测定稳态动力学参数 K_M 和 k_{cat}，使用与上面描述相同的呈色检测，检测比色皿中的总体积是 500 微升。检测缓冲液是 100mM HEPES pH 7.75，在每一次测定中使用的 GrB-H6 或 GrB-H6 C228F 浓度都是 20 nM。使用以下的底物浓度作 Lineweaver-Burk 曲线: 5，40，150，

300，和 600μM。得到的结果在下面的表 7 中示出：

表 7：

	GrB-H6	GrB-H6 C228F
K_M (μM)	66.9	27.0
k_{cat} (s^{-1})	5.03	4.85
k_{cat}/K_M (10^4 $s^{-1}M^{-1}$)	7.5	18.0

在上面的表 7 中示出的 GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 的 K_M、k_{cat} 和 k_{cat}/K_M 测定数值与重组大鼠 GrB 的数值(Harris J.L.等人，1998)非常相近。

实施例 5

GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 特异性以及 GrB-H6 C228F 稳定性的测定

GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 的特异性

除了实施例 4 中应用的 Ac-IEPD-*p*NA 底物以外，使用呈色底物 Ac-LEED-*p*NA、Ac-VEID-*p*NA、Ac-YVAD-*p*NA 和 Ac-DEVD-*p*NA 检测 GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 蛋白酶的特异性。同样在 500μl 100mM HEPES pH 7.75 中进行活性检测，底物浓度为 400μM。每一次测定时在检测比色皿中加入 1 微克蛋白酶。所有的检测重复三次，设定在 Ac-IEPD-*p*NA 上的活性测量为 100％对获得的活性数据进行标准化。结果在图 2 中示出，可以看到 GrB-H6 蛋白酶的特异性至少与 GrB-H6 C228F 蛋白酶的特异性相同。

GrB-H6 C228F 的稳定性

为了测定 GrB-H6 C228F 蛋白酶的稳定性，GrB-H6 C228F 样品在 100mM HEPES pH 7.4 中于 4°C、23°C 和 37°C 下分别孵育 15 天。选择 100mM HEPES 缓冲液的目的是检查任何自体切割和降解，但是没有从 SDS PAGE 观察到明显的“自体裂解”（参见图 3A）。在孵育期间还测

定了对显色底物 Ac-IEPD-*p*NA 的水解活性，参见图 3B。

GrB-H6 C228F 蛋白酶在 4°C 和 23°C 非常稳定。于 23°C 孵育 15 天，活性只轻度下降了大约 10%，在凝胶中几乎看不见降解的片段。即使于 37°C 在 15 天后仍剩余大约 20%的活性，在凝胶中只有很少的降解片段。

还发现 GrB-H6 C228F 蛋白酶在 10 分钟的短时间内直至 50°C 都是稳定的（这里没有显示）。在该实验中蛋白酶的样品在给定的温度下孵育 10 分钟然后放回室温，于 23°C 孵育 10 分钟。在 23°C 测定对 Ac-IEPD-*p*NA 的活性。蛋白酶的孵育温度在 50°C 以下，在返回室温(23°C)孵育后活性几乎 100%的恢复，但是在 50°C 以上的温度下孵育，蛋白酶就不能再恢复为活性形式了，只能检测到很少的活性。

实施例 6

含有可被 GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 切割的识别序列的融合蛋白表达载体的设计和构建

为了制备适宜的融合蛋白作为 GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 的底物，将可以被 FX_a 切割的融合蛋白 H6-FX-TripBUB，H6-IEGR-RAP，H6Ubi-IEGR-ApoA1，和 H6-FX-TN123（分别由 pT7H6-FX-TripBUB，pT7H6-FX-RAP，pT7H6Ubi-FX-ApoA1，和 pT7H6-FX-TN123 编码）中的 FX_a 识别序列 IEGR 或 IQGR 改为 IEPD，得到构建体 H6-TripUB IEPD↓SP（序列编号 22），H6-IEPD-RAP（序列编号 23），H6Ubi-IEPD-ApoA1(序列编号 24)，和 H6-IEPD-TN123(序列编号 25)。

在构建体 H6-TripUB IEPD↓SP 中，粒酶 B 的识别序列是 IEPD↓SP，其中↓表示了切割位点。这个识别序列位于构建体中 H6 和 TripUB 部分之间，其中位于可被切割的肽键 C 端的两个氨基酸残基 S 和 P 是

TripUB 的 N 端部分。

在以下 H6-TripUB 融合蛋白（称为 H6-TripUB 变异体）中的识别序列作为它们名称的最后部分，如 XXXX↓YY，其中 XXXX 是位于六聚 His 和 TripUB 之间的粒酶 B 识别序列的一部分，而 YY 是 TripUB 的一部分。

H6-TripUB IEPD↓SP 构建体中的 IEPD↓SP 切割位点改变为另外的 8 个切割位点，得到以下的变异体：H6-TripUB IQAD↓SP(序列编号 26)，H6-TripUB IQAD↓SG(序列编号 27)，H6-TripUB VGPD↓SP(序列编号 28)，H6-TripUB VGPD↓FG(序列编号 29)，H6-TripUB IEPD↓TQ(序列编号 30)，H6-TripUB IEPD↓IV(序列编号 31)，H6-TripUB IEPD↓EP(序列编号 32)，和 H6-TripUB IEPD↓EG(序列编号 33)，其中↓表示切割位点。在这 8 个构建体的 6 个中，融合蛋白的 P_1' 和 P_2' 位点（都是 TripUB 的一部分）被改变，即 H6-TripUB IQAD↓SG，H6-TripUB VGPD↓FG，H6-TripUB IEPD↓TQ，H6-TripUB IEPD↓IV，H6-TripUB IEPD↓EP，和 H6-TripUB IEPD↓EG。

融合蛋白表达载体的构建

根据生产商的说明，使用 QuikChange™ 定点突变试剂盒(STRATAGENE，目录编号 200518)构建表达载体 pT7H6-TripUB IEPD↓SP，载体 pT7H6-FX-TripBUB(国际专利申请 WO 9856906)作为模板，寡聚核苷酸引物为：TripUB GrB fw(序列编号：34)和 TripUB GrB rev(序列编号：35)。

使用载体 pT7H6-FX-RAP(Nykjær 等人，1992)作为模板以及寡聚核苷酸引物 RAP GrB fw(序列编号：36)和 RAP GrB rev(序列编号：37)根据上面的描述通过定点突变构建表达载体 pT7H6-IEPD-RAP。

使用载体 pT7H6Ubi-FX-ApoA1(国际专利申请 WO0238609)作为模板以及寡聚核苷酸引物 Mut-GrB fw(序列编号: 38)和 Mut-GrB rev(序列编号: 39)根据上面的描述通过定点突变构建表达载体 pT7H6Ubi-IEPD-ApoA1。

使用载体 pT7H6-FX-TN123(Holtet 等人,1997)作为模板以及寡聚核苷酸引物 TN GrB fw(序列编号: 40)和 TN GrB rev(序列编号: 41)根据上面的描述通过定点突变构建表达载体 pT7H6-IEPD-TN123。

使用载体 pT7H6-FX-TripBUB(WO 9856906)作为模板以及寡聚核苷酸引物 PC7TripUB GR-AD fw(序列编号:42)和 PC7TripUB GR-AD rev(序列编号: 43)根据上面的描述通过定点突变构建表达载体 pT7H6-TripUB IQAD↓SP。

使用载体 pT7H6-TripUB IQAD↓SP 作为模板以及寡聚核苷酸引物 PC7TripUB P-G fw(序列编号: 44)和 PC7TripUB P-G rev(序列编号: 45)根据上面的描述通过定点突变构建表达载体 pT7H6-TripUB IQAD↓SG。

使用载体 pT7H6-TripUB IEPD↓SP 作为模板和寡聚核苷酸引物 DNATrip IE-VG fw(序列编号: 46)和 DNATrip IE-VG rev(序列编号: 47)根据上面的描述通过定点突变构建表达载体 pT7H6-TripUB VGPD↓SP。

使用载体 pT7H6-TripUB VGPD↓SP 作为模板以及寡聚核苷酸引物 DNATrip SP-FG fw(序列编号: 48)和 DNATrip SP-FG rev(序列编号: 49)根据上面的描述通过定点突变构建表达载体 pT7H6-TripUB VGPD↓FG。

使用载体 pT7H6-TripUB IEPD↓SP 作为模板以及寡聚核苷酸引物 Trip IEPD-TQ(序列编号: 50)和 UB3(序列编号: 52)通过 PCR 反应构建表达载体 pT7H6-TripUB IEPD↓TQ。产生的 PCR 产物用 *Bam*HI 和 *Hin*dIII 酶切然后连接到 *Bam*HI-*Hin*dII 酶切的 pT7H6(GS)3 载体(Christensen J.H 等人, 1991)中。

使用载体 pT7H6-TripUB IEPD↓SP 作为模板以及寡聚核苷酸引物 Trip IEPD-IV(序列编号: 51)和 UB3(序列编号: 52)通过 PCR 反应构建表达载体 pT7H6-TripUB IEPD↓IV。产生的 PCR 产物用 *Bam*HI 和 *Hin*dIII 酶切然后连接到 *Bam*HI-*Hin*dII 酶切的 pT7H6(GS)3 载体(Christensen J.H 等人,1991)中。

使用载体 pT7H6-TripUB IEPD↓SP 作为模板和寡聚核苷酸引物 TripUB EP fw(序列编号: 53)和 TripUB EP rev(序列编号: 54)根据上面的描述通过定点突变构建表达载体 pT7H6-TripUB IEPD↓EP。

使用载体 pT7H6-TripUB IEPD↓EP 作为模板以及寡聚核苷酸引物 TripUB EG fw(序列编号: 55)和 TripUB EG rev(序列编号: 56)根据上面的描述通过定点突变构建表达载体 pT7H6-TripUB IEPD↓EG。

表 8: 寡聚核苷酸引物

引物	核苷酸序列	序列编号
TripUB GrB fw	5'- GTGGATCCATCGAGCCTGACTCTCCTGGTACCGAGCC-3'	34
TripUB GrB rev	5'-GGTACCAGGAGAGTCAGGCTCGATGGATCCACTACCAC-3'	35
RAP GrB fw	5'-CGGATCCATCGAGCCTGACTACTCGCGGGAGAAG-3'	36
RAP GrB rev	5'-CCCGCGAGTAGTCAGGCTCGATGGATCCGTGATG-3'	37
Mut-GrB fw	5'-CGTGGTGGATCCATCGAGCCGGACGGTGGAGATGAACCC CCC-3'	38
Mut-GrB rw	5'-GGGGGGTTCATCTCCACCGTCCGGCTCGATGGATCCACC ACG-3'	39
TN GrB fw	5'-GGATCCATCGAGCCTGACGGCGAGCCACCAACC-3'	40
TN GrB rev	5'-GGCTCGCCGTCAGGCTCGATGGATCCGTGATGG-3'	41
PC7TripUB GR-AD fw	5'-GGATCCATCCAGGCAGACTCTCCTGGTACCGAG-3'	42
PC7TripUB GR-AD	5'-GTACCAGGAGAGTCTGCCTGGATGGATCCACTAC-3'	43

rev		
PC7TripUBP-G fw	5'-GGATCCATCCAGGCAGACTCTGGTGGTACCGAGCCAC-3'	44
PC7TripUBP-G rev	5'-CTCGGTACCACCAGAGTCTGCCTGGATGGATCCACTAC-3'	45
DNATrip IE-VG fw	5'-GTAGTGGATCAGTCGGGCCTGACTCTCCTGGTAC-3'	46
DNATrip IE-VG rev	5'-GAGAGTCAGGCCCGACTGATCCACTACCACTACC-3'	47
DNATrip SP-FG fw	5'-GGCCTGACTTTGGTGGTACCGAGCCACCAAC-3'	48
DNATrip SP-FG rev	5'-GGCTCGGTACCACCAAAGTCAGGCCCGACTG-3'	49
Trip IEPD-TQ	5'-GGGAAAGGATCCATCGAGCCTGACACCCAGAAGCCCAA GAAGATTGTAAATG-3'	50
Trip IEPD-IV	5'-GGGAAAGGATCCATCGAGCCTGACATTGTAAATGCCAAG AAAGATGTTGTGAAC-3'	51
UB3	5'-CGCAAGCTTGCATGCTTAGGATCCACCACGAAGTCTCAA-3'	52
TripUB EP fw	5'-CGAGCCTGACGAGCCTGGTACCGAGCCAC-3'	53
TripUB EP rev	5'-CGGTACCAGGCTCGTCAGGCTCGATGGATC-3'	54
TripUB EG fw	5'-CCTGACGAGGGTGGTACCGAGCCACCAAC-3'	55
TripUB EG rev	5'-GCTCGGTACCACCCTCGTCAGGCTCGATG-3'	56

实施例 7

含有可被 GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 切割的识别序列的融合蛋白的表达、纯化和重折叠

融合蛋白的表达

为了制备嵌合融合蛋白 H6-TripUB IEPD↓SP，H6-IEPD-RAP，H6-IEGR-RAP，H6Ubi-IEPD-ApoA1，H6Ubi-IEGR-ApoA1，H6-IEPD-TN123 和 H6-TripUB 变异体，对表达载体 pT7H6-TripUB IEPD↓SP，pT7H6-IEPD-RAP，pT7H6-FX-RAP，pT7H6Ubi-IEPD-ApoA1，pT7H6Ubi-IEGR-ApoA1，pT7H6-IEPD-TN123，pT7H6-TripUB IQAD↓SP，pT7H6-TripUB IQAD↓SG，pT7H6-TripUB VGPD↓SP，pT7H6-TripUB VGPD↓FG，pT7H6-TripUB IEPD↓TQ，pT7H6-TripUB IEPD↓IV，pT7H6-TripUB IEPD↓EP，和 pT7H6-TripUB IEPD↓EG(后面 8 个是 H6-TripUB 变异体)在大肠杆菌 BL21 中进行中等规模的培养(3 升；2xTY 培养基，5mM $MgSO_4$ 和 0.1 mg/ml 氨苄青霉素)，根据 Studier FW 等人(1990)的描述。在 37°C 生长呈对数生长的培养物于 OD_{600} = 0.8 时用噬菌体 λCE6 感染，感染复数约为 5。于 37°C 继续培养 4 小时，离心收获细胞。将细胞重悬于 100 毫升 750mM NaCl，100mM Tris-HCl

pH 8，1mM EDTA pH 8 中。加入苯酚（150 毫升，用 Trima 碱调节 pH 至 8），超声波处理混合物以提取总蛋白。离心(25 分钟，10.000 g)澄清后，向苯酚相中加入 2.5 倍体积的 96%乙醇离心沉淀粗蛋白质级分。蛋白质沉淀溶于 75 毫升 6M 盐酸胍、50mM Tris-HCl pH 8，和 100mM 二硫苏糖醇（DTT）的缓冲液中。

H6-TripUB IEPD ↓ SP，H6-IEPD-RAP，H6-IEGR-RAP，H6Ubi-IEPD-ApoA1，H6Ubi-IEPD-ApoA1 以及 H6-TripUB 变异体的纯化

使用 Sephadex™ G-25 Fine(Amersham Biosciences)凝胶过滤将蛋白洗脱到 8 M 尿素，0.5M NaCl，50mM Tris-HCl pH 8，和 10mM 2-巯基乙醇的缓冲液中后，将 H6-IEPD-TripUB 和 H6-IEPD-RAP 融合蛋白的粗蛋白制备物分批上样吸附于 Ni^{2+} 活化的 NTA-琼脂糖层析柱(Ni^{2+}-NTA-agarose，Quiagen)上（柱体积通常为 50-75 毫升）进行纯化(Hochuli E 等人，1988)。层析柱按照以下洗涤：

1. 2 x 柱体积 8M 尿素，500mM NaCl，50mM Tris-HCl pH 8，和 10mM 2-巯基乙醇

2. 1 x 柱体积 8M 尿素，500mM NaCl，50mM 磷酸钠 pH 6.3，和 10mM 2-巯基乙醇

3. 1 x 柱体积 6M 盐酸胍，50mM Tris-HCl pH 8，和 10mM 2-巯基乙醇

4. 2 x 柱体积 500mM NaCl，和 50mM Tris-HCl pH 8

用 500mM NaCl，50mM Tris-HCl pH 8，和 10mM EDTA 洗脱纯化的融合蛋白。

H6-IEPD-TN123 融合蛋白的纯化和重折叠

使用 Sephadex™ G-25 Fine(Amersham Biosciences)凝胶过滤将蛋白洗脱到 8 M 尿素，0.5M NaCl，50mM Tris-HCl pH 8，和 10mM 2-巯基乙醇的缓冲液中后，将 H6-IEPD-TN123 融合蛋白的粗蛋白制备物分批上样吸附于 Ni^{2+} 活化的 NTA-琼脂糖层析柱(Ni^{2+}-NTA-agarose，

Quiagen)上（柱体积通常为 50-75 毫升）进行纯化和体外重折叠。层析柱按照以下洗涤:

1. 2 x 柱体积 8M 尿素，500mM NaCl，50mM Tris-HCl pH 8，和 10mM 2-巯基乙醇

2. 1 x 柱体积 8M 尿素，500mM NaCl，50mM 磷酸钠 pH 6.3，和 10mM 2-巯基乙醇

3. 1 x 柱体积 6M 盐酸胍，50mM Tris-HCl pH 8，和 10mM 2-巯基乙醇

然后使用 Thøgersen 等人用于纤溶酶原 kringle 4 的循环重折叠步骤(国际专利申请 WO 9418227)对每一个融合蛋白进行重折叠。重折叠步骤完成之后用 500mM NaCl，50mM Tris-HCl pH 8，10mM EDTA 将每一个重折叠的蛋白从 Ni^{2+}-NTA-琼脂糖层析柱上洗脱。

每一个重折叠蛋白的各个级分通过凝胶过滤洗脱到 50mM NaCl，25mM 乙酸钠 pH 5.0 和 1mM $CaCl_2$ 中，然后进一步使用 SP Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences，1.6 厘米直径(i.d.)20 厘米长层析柱)离子交换层析进行纯化，使用盐梯度从 50mM NaCl，25mM 乙酸钠 pH 5.0，1mM $CaCl_2$ 到 1M NaCl，25mM 乙酸钠 pH 5.0，1mM $CaCl_2$ 进行洗脱。

每一个正确折叠蛋白产物的最后纯化是通过凝胶过滤将其洗脱到 25mM NaCl，10mM Tris-HCl pH 8，和 1mM $CaCl_2$ 中，然后进一步使用 Q Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences，1.6 厘米直径(i.d.)20 厘米长层析柱)离子交换层析进行纯化，使用盐梯度从 25mM NaCl，10mM Tris-HCl pH 8，和 1mM $CaCl_2$ 到 500mM NaCl，10mM Tris-HCl pH 8，和 1mM $CaCl_2$ 进行洗脱。

实施例 8

使用 GrB-H6，GrB-H6 C228F 和 FXa 对制备的融合蛋白进行切割

用 GrB-H6 切割 H6-TripUB IEPD↓SP

Ni^{2+}-NTA-琼脂糖层析柱上洗脱的融合蛋白 H6-TripUB IEPD↓SP（根据实施例 7 中的描述制备）通过凝胶过滤洗脱到 100mM HEPES pH 7.5 中，取 200 微升顶层级分样品分别与 0、1 或 10μl 激活的 GrB-H6（大约 0，0.2 和 2μg GrB-H6）共同在室温下孵育。

12，19，和 24 小时孵育后取样，进行 SDS PAGE，凝胶示于图 4 和 5 中。

只有正确切割的产物在图 4 的 C-D 泳道和图 5 的 C-G 泳道中出现，孵育时间越长，泳道中出现的切割产物越多，对于加入 1 和 10μl GrB-H6 的结果是相同的。观察到的单一带型在图 6 中予以解释。从这里就很清楚 GrB-H6 对 H6-TripUB IEPD↓SP 上的单一位点进行特异性切割。在 IEPD 序列后的正确位点进行切割在图 4 的 E 泳道中得到确证，此处含有 FX_a 识别位点 IQGR 而不是 GrB 识别位点 IEPD 的构建体 H6-FX-TripUB 被 FX_a 切割产生与被 GrB-H6 切割的 H6-TripUB IEPD↓SP 同样大小的产物。

温度以及添加 Ni^{2+} 和 NTA 对 H6-TripUB IEPD↓SP 被 GrB-H6 切割的影响

用 H6-TripUB IEPD↓SP 融合蛋白建立以下 9 个孵育（表 9），每一个孵育使用 200μl H6-TripUB IEPD↓SP 和 5μl GrB-H6（大约 1μg GrB-H6）。

表 9:

1	无添加物	23°C
2	4.2mM Ni^{2+}	
3	4.2mM Ni^{2+} + 5mM NTA	
4	无添加物	37°C
5	4.2mM Ni^{2+}	
6	4.2mM Ni^{2+} + 5mM NTA	
7	无添加物	42°C
8	4.2mM Ni^{2+}	
9	4.2mM Ni^{2+} + 5mM NTA	

2，7 和 22 小时孵育后取样进行 SDS PAGE，参见图 7、8 和 9。

预期Ni^{2+}离子会结合融合蛋白的 N 端六聚 His 尾巴(H6)，使 GrB-H6 更容易接近被其识别的切割位点。此外，Ni^{2+}离子还结合 GrB-H6 构建体的 C 端六聚 His 尾巴。加入 NTA 罩住了溶液中的 Ni^{2+}离子，与在 Ni^{2+}-NTA 琼脂糖凝胶珠上出现的情况相同，即模拟了 Ni^{2+}-NTA 琼脂糖层析柱上的环境。

图 7 显示了于 23°C 的孵育，图 8 显示了于 37°C 的孵育，图 9 显示了于 42°C 的孵育。当没有添加 Ni^{2+}或 NTA 时，H6-TripUB IEPD↓SP 融合蛋白的切割与在图 4 和 5 中观察到的相似，尽管 22 小时后似乎于 37°C 的孵育是所检测的三个温度下最佳的孵育温度。

加入 4.2mM Ni^{2+}后一些蛋白在较高的温度 37°C 和 42°C 下沉淀，但是在 23°C 下没有看到沉淀。因此在这两个温度下 2 小时孵育后在凝胶中看不到融合蛋白被进一步切割，似乎一些 H6-TripUB IEPD↓SP 和 GrB-H6 都沉淀了。与没有添加 Ni^{2+}相比，于 23°C 下更多的融合蛋白在 22 小时后被切割。

向孵育混合物中加入 5mM NTA 消除了观察到的沉淀问题。于 23°C 下孵育 22 小时后，与没有添加 Ni^{2+}或 NTA 相比，更多的融合蛋白被切割，所以添加 Ni^{2+}和 NTA 似乎加速了切割反应。通过进一步提高温度至 37°C 和 42°C，观察到切割速率有更大的提高。于 37°C 下孵育 22 小时后，几乎所有的融合蛋白都被切割为正确的产物。于 42°C 孵育 22 小时后，与 37°C 相比只有少量的融合蛋白没有被切割。

将在图 4 和 5 中显示的实验中最初估计的切割速率与这里观察到的切割速率相比，显然添加 Ni^{2+}和 NTA 以及在 37°C 孵育极大地加速了 GrB-H6 对 H6-TripUB IEPD↓SP 的特异切割。

GrB-H6 对 H6-IEPD-RAP 的切割

Ni^{2+}-NTA-琼脂糖层析柱上洗脱的融合蛋白 H6-IEPD-RAP（根据实施例 7 中的描述制备）通过凝胶过滤洗脱到 100mM HEPES pH 7.4 中，取 200 微升顶层级分样品分别与 0，1 或 10μl 激活的 GrB-H6(大约 0，0.2 和 2μg GrB-H6)共同在室温下孵育。5，23 和 26 小时孵育后取样进行 SDS PAGE，参见图 10。

根据上面的描述，与 1 或 10 μl GrB-H6 共同孵育仅 5 小时后，所有的 H6-IEPD-RAP 都被切割产生正确的最终产物。还很清楚在 RAP 中至少有一个内部切割位点，但是该内部位点的切割却比 IEPD 序列的切割慢得多。通过比较纯化的 H6-FX-RAP 样品被 FX_a部分切割的产物（泳道 H）或者完全切割给出最终的 RAP 产物（泳道 I）的大小，可以看到 GrB-H6 在 IEPD 序列处将 H6 正确地切掉了。在这些泳道中，任何由 FX_a进行内部切割产生的降解产物都被纯化除去。

GrB-H6 切割 H6-IEPD-RAP 和 FX_a切割 H6-IEGR-RAP 的比较

将 GrB-H6 切割 H6-IEPD-RAP 与 FX_a切割 H6-IEGR-RAP 进行比较。

H6-IEPD-RAP 和 H6-IEGR-RAP 都溶于 100mM HEPES pH 7.4 中，在室温 23°C 下进行以下的孵育，蛋白酶和融合蛋白的比例是 1:1000。

1. 400μl(约 500μg)H6-IEGR-RAP + 0.5μl FX_a(1 mg/ml)(约 0.5μg)

2. 400μl(约 400μg)H6-GrB-RAP + 2μl GrB-H6(约 0.4μg)

0，½，1，3，5，7 和 27 小时孵育后取样进行 SDS PAGE，参见图 11。

显然两种情况下，融合蛋白都被它们相应的蛋白酶迅速地切割。两种孵育中，仅仅半小时后几乎所有的融合蛋白都已经被切割产生正确的产物。

但是 27 小时后，在 H6-IEGR-RAP + FX_a的孵育中，所有的融合蛋白都已经被降解产生不同的小片段，而没有剩余的正确切割的产物。

在 H6-IEPD-RAP + GrB-H6 的孵育中也看到了降解的片段，但是没有在 H6-IEGR-RAP + FX_a的孵育中那么多。在 RAP 中的 19 个可能位点（RAP 产物中有 19 个 Asp 残基）中似乎只有一个 GrB-敏感的位点，而有几个 FX_a敏感位点（26 个可能的位点，26 个 Arg 残基）。这减缓了 H6-IEPD-RAP 被 GrB-H6 的降解，所以在 27 小时孵育后仍然存在相当多的正确切割的产物（大约 25%）。

总之，GrB-H6 对 RAP 融合蛋白的正确切割与 FX_a对 RAP 融合蛋白的切割一样迅速，但是 GrB-H6 对 RAP 融合蛋白的降解要比 FX_a对 RAP 融合蛋白的降解慢得多。因此在这个实施例中 GrB-H6 优于 FX_a，而且也显示 GrB-H6 是一个非常特异的蛋白酶。

GrB-H6 C228F 切割 H6Ubi-IEPD-ApoA1 和 FX_a 切割 H6Ubi-IEGR-ApoA1 的比较

对于 H6Ubi-IEPD-ApoA1 + GrB-H6 C228F 以及 H6Ubi-IEGR-ApoA1 + FX_a 的切割反应，蛋白酶和底物的比例是 1:1000，切割在 100mM HEPES pH 7.75 中，室温 23°C 下进行。

1. 250μl (约 400μg) H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0.4μg GrB-H6 C228F
2. 250μl (约 350μg) H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0.35μg FX_a

0，1，3，6，24 和 48 小时在 23°C 孵育后取样进行 SDS PAGE，参见图 12。

GrB 的底物 H6Ubi-IEPD-ApoA1 在 23°C 孵育仅 6 小时后约 100%被切割，而 6 小时后只有一小部分的 FX_a 的底物 H6Ubi-IEGR-ApoA1 被切割。还看到 FX_a 需要 48 小时以上的时间以完全切割 FX_a 底物。

在以上的两个实施例中 GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 蛋白酶，如所提及的，都优于 FX_a，因为它们比纯化的牛 FX_a 切割时要迅速得多（对 H6Ubi-X-ApoA1 而言），或者要特异得多（对于 H6-X-RAP 而言）（其中的 X 指的是识别位点 IEPD 或 IEGR）。这两个实施例证明 GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 可以既切除短的 N 端标签例如六聚 His 尾巴 (H6-IEPD-RAP 中的 H6)，又可以在由一个短的衔接物序列（衔接物序列包含紧邻目标多肽的 GrB 切割位点）非常紧密连接的两个蛋白质结构域之间切割（在这里如 H6Ubi-IEPD-ApoA1 中的 ApoA1，衔接物序列是 GGSIEPD，其中 IEPD 是 GrB 的识别位点）。在以上两种情况中通过 N 端测序证实 GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 产生正确切割的产物。

GrB-H6 对 H6-IEPD-TN123 的切割

Q Sepharose 上洗脱的融合蛋白 H6-IEPD-TN123（根据实施例 7 中的描述制备）通过最终纯化经凝胶过滤洗脱到 100mM HEPES pH 7.5

中，取 200 微升顶层级分样品分别与 0，1 或 10μl 激活的 GrB-H6(大约 0，0.2 和 2μg GrB-H6)在没有钙存在或者 5mM $CaCl_2$存在的条件下共同在室温下孵育。没有 $CaCl_2$存在时孵育的样品在 12、19、24 小时以及 5 天孵育后取样进行 SDS PAGE，参见图 4、5 和 13。有和没有 $CaCl_2$存在时孵育的样品在大约 20 和 48 小时的孵育后取样进行 SDS PAGE，参见图 14。

无 Ca^{2+}:

当没有 Ca^{2+}存在时，H6-IEPD-TN123 被 GrB-H6 切割显示了独特的带型，如图 4、5 和 13 所示。H6-IEPD-TN123 在 IEPD 序列处被正确切割，而且与在内部位点 AQPD 序列处的切割同样迅速。这一带型在图 15 中予以解释。H6-IEPD-TN123 在 IEPD↓位点被正确切割可以从图 4 的泳道 J 中观察到，图 4 中小鼠 H6-FX-TN123 被 FX_a切割产生的产物的大小与 GrB-H6 在没有内部切割时切割 H6-IEPD-TN123 产生的产物大小相同，即带型中四条带中最靠下的条带。

当对样品进行还原处理如图 13 中的泳道 B-D 和 L-N 所示，出现了不同的带型。该带型也在图 15 中予以解释，并且支持了特异内部切割位点 AQPD 的观点。

有 Ca^{2+}存在:

图 11 显示了 H6-IEPD-TN123 与 GrB-H6 的孵育，其中在某些孵育中加入了 5mM $CaCl_2$。这里在钙存在时只出现两个条带（泳道 E 和 G），而没有钙存在时有四个条带，如图 4、5、13 和 15 中描述的。这表明在孵育中加入 Ca^{2+}，使 GrB-H6 不能接触到 Tetranectin (TN123)中的内部切割位点 AQPD。这是由于在 Tetranectin 中 AQPD 序列位于一个环内，其中 Q 和 D 残基参与与钙离子的结合。这样就只出现融合蛋白中的特异位点 IEPD 处被正确切割而 TN123 中的内部切割位点由于 Ca^{2+}的加入而被“关闭”。

H6-TripUB 变异体的切割

每一个 Ni^{2+}-NTA-琼脂糖层析柱上洗脱的融合蛋白经凝胶过滤洗脱到 100mM HEPES pH 7.4 中，使用五个不同变异体浓度大致相同的级分。五个变异体是 H6-TripUB IEPD↓SP，H6-TripUB IQAD↓SP，H6-TripUB IQAD↓SG，H6-TripUB VGPD↓SP 和 H6-TripUB VGPD↓FG。每一种融合蛋白各取 200 微升，分别与 5μl 激活的 GrB-H6(大约 1μg GrB-H6)共同在室温 23°C 下孵育。蛋白酶和融合蛋白的比例是 1:500。在 2，6，24 和 48 小时孵育后取样进行 SDS PAGE，凝胶在图 16 和 17 中示出。

在图 16 中显示了 H6-TripUB IEPD↓SP，H6-TripUB IQAD↓SP 和 H6-TripUB IQAD↓SG 的样品。在 48 小时孵育后，大约 2/3 原来未切割的 H6-TripUB IEPD↓SP 已经被正确切割。与此相比，序列 IQAD↓SP 的切割要比 H6-TripUB IEPD↓SP 中序列 IEPD↓SP 的切割慢得多。2 小时孵育后不能观察到产物，48 小时孵育后只有少量被切割。从 H6-TripUB IQAD↓SG 样品来看，显然切割与 H6-TripUB IEPD↓SP 和 H6-TripUB IQAD↓SP 二者相比要快得多。2 小时孵育后融合蛋白的大部分已经被切割产生正确的产物。识别序列中 P2′位点上的 Pro(P)到 Gly(G)的单突变已经足以使切割速率发生如此巨大的改变。

在图 17 中显示了 H6-TripUB VGPD↓SP 和 H6-TripUB VGPD↓FG 孵育后的样品。对 VGPD↓SP 序列的切割几乎与图 16 中 H6-TripUB IEPD↓SP 的切割一样迅速。2 小时后形成少量的产物而在 48 小时后大约一半量的融合蛋白已经被切割。在 H6-TripUB VGPD↓SP 中当 P1′和 P2′位点从 SP 改变为 FG 时，反应速率出现巨大的改变。仅仅 2 小时孵育后所有的融合蛋白都已经被正确切割。

图 18 显示了 H6-TripUB IEPD↓TQ 和 H6-TripUB IEPD↓IV 切割

的样品与 H6-TripUB IEPD↓SP 切割的比较。两个构建体 H6-TripUB IEPD↓TQ 和 H6-TripUB IEPD↓IV 是 H6-TripUB IEPD↓SP 的 Trip 部分的删除突变体，其中在 H6-TripUB IEPD↓TQ 中删除了前 7 个残基而在 H6-TripUB IEPD↓IV 中删除了前 13 个残基。

这里蛋白酶和融合蛋白的比例也是 1:500，反应在 23°C 下进行。4，24，和 96 小时孵育后取样进行 SDS PAGE。

从图 18 所示的凝胶可以清楚看到 对 H6-TripUB IEPD↓TQ 和 H6-TripUB IEPD↓IV 二者的切割都比 H6-TripUB IEPD↓SP 的切割要快得多。如以下得图 19 所示，这可能是由于 H6-TripUB IEPD↓SP 中 P2′位置上的 Pro 所致。

图 19，A 显示了 H6-TripUB IEPD↓SP 和 H6-TripUB IEPD↓EP 的切割，而 B 显示了 H6-TripUB IEPD↓EP 和 H6-TripUB IEPD↓EG 的切割。这里蛋白酶与融合蛋白的比例还是 1:500，切割反应混合物在 23°C 和 37°C 下孵育。对于 A 图中的凝胶，在 0，4，24 和 48 小时后取样进行 SDS PAGE；对于 B 图中的凝胶，在 0，6，24 和 50 小时后取样进行 SDS PAGE。

从这些凝胶中可以清楚看出 P2′位置上的 Pro 对于使用 GrB-H6 C228F 进行切割的速率是非常不利的。一个意外是 GrB-H6 C228F 能够切割含有 IEPD↓EP 位点的底物。它切割这个位点与切割 IEPD↓SP 具有相同的低效率，但是 P_1' 位置上的一个酸性残基如 Glu(E)是很不好的，因为这使大多数丝氨酸蛋白酶（如纯化的牛 FX_a）都不能切割。

如果我们现在考虑 IEPD↓SP，IQAD↓SP，IQAD↓SG，IEPD↓EP，和 IEPD↓EG 的 P1′P2′位置，P_2' 位置从色氨酸改变为甘氨酸显著增强了切割。Harris JL 等人，1998 使用噬菌体颗粒上展示的肽底物研究

野生型大鼠 GrB 时也观察到 P_2'位置对 G 的偏好。同样 GrB-H6 C228F 在 IEPD↓EG 位点处表现出不可思议的有效切割，尽管 P_1'位置是 E，如上所述，E 在本领域内是众所周知的阻碍大多数丝氨酸蛋白酶切割的残基。在蛋白酶与底物的比例为 1:500时，只需要不到 5 小时，GrB-H6 C228F 就能完成对 H6-TripUbi IEPD↓EG 的切割。在这方面 GrB-H6 C228F 再次优于 FX_a。

除了这些观察之外，还有重要的一点是注意到即使与 GrB-H6 或 GrB-H6 C228F 共同孵育 48 小时以上，在任何 H6-TripUB 变异体中也没有发生内部切割，表明 GrB-H6 和 GrB-H6 C228F 非常特异地在工程化的识别位点处切割，尽管 TripUB 序列含有 7 个另外的 Asp(D)残基。

实施例 9

粒酶 B 的固定化

为了能够容易地从切割混合物中除去粒酶 B 酶，在以下描述的 6 个实验中使用 GrB-H6 C228F 变异体固定在凝胶基质上。

使用二乙烯砜活化的基质 Mini-Leak(Kem-En-Tec)在 0.3M $NaHCO_3$/NaOH，pH 8.6 中进行固定化。使用两个水平的活化：每升沉降的小珠分别使用 2-5 毫摩尔和 10-50 毫摩尔的乙烯基团，对于每个活化水平，使用不同蛋白质浓度以及存在或者不存在 PEG 20000 的条件下进行三次实验。六次实验的结果总结在表 10 中。为了进行固定化，GrB-H6 C228F 在 0.3M $NaHCO_3$/NaOH pH 8.6 中于蛋白质浓度根据 Bradford 检测使用牛血清白蛋白为标准品测定为 4mg/ml。GrB-H6 C228F 溶液的酶活性根据实施例 4 中的描述进行测定，使用 0.3M $NaHCO_3$/NaOH、pH 8.6 缓冲液和 30% PEG 20000、0.3M $NaHCO_3$缓冲液作为检测缓冲液。将控干水的凝胶、蛋白质溶液和缓冲液混和起来以提供表 10 中列出的体积和浓度，随后在室温下混和 48 小时，进行固定化。

表 10:

实验	活化水平 (mM)	蛋白质浓度 (mg/ml)	%PEG 20000	效率 (%)
A	2-5	0.75	0	10
B	2-5	0.75	9	18
C	2-5	2	0	10
D	10-50	0.75	0	16
E	10-50	0.75	9	10
F	10-50	2	0	10

在通过离心控干凝胶并且除去上清后通过加入 600μl 0.2 M 乙醇胺，pH 为 9.0 阻断多余的活性基团，随后在室温下混和过夜。通过用 1M NaCl 漂洗凝胶三次除去未结合的蛋白（离心后除去上清），最后凝胶用 250mM NaCl; 50mM Tris-HCl，pH 8.0 漂洗。固定化的 GrB-H6 C228F 的酶活性测定如下：称取控干的凝胶基质与 300μl 含有 100mM HEPES，pH 7.75; 400μM Ac-IEPD-*p*NA(Calbiochem)的底物溶液混和，孵育一定时间后测量上清的 OD_{405nm}，确定每毫升底物溶液每克干胶的 $\Delta OD_{405\ nm}$/min。使用固定化的 GrB-H6 C228F 的酶活性确定偶联效率，表达为计算出的酶活性（如果所有上样的酶都被偶联并且具有活性）的百分比。

偶联效率也在表 10 中列出，两个活化水平的偶联效率没有显著差异，对于两个蛋白浓度，偶联效率也处于相同的范围内，所以在固定化混合物中使用高蛋白质浓度则得到最高的偶联水平。还不能推断在偶联混合物中加入 PEG 20000 是否有利于固定化，对于高蛋白质浓度也没有对其进行测定。

对使用高蛋白浓度的两个固定化实验（实验 C 和 F）测定了固定化的 GrB-H6 C228F 对使用尿素和盐酸胍(GdmCl)变性的稳定性。实验 C 和 F 的凝胶基质分成三小份，置于旋转小层析柱内，分别与 8M 尿素; 0.5M NaCl; 50mM Tris-HCl，pH 8.0(尿素)、6M 盐酸胍; 50mM Tris-HCl，

pH 8.0(GdmCl)、或者 100mM HEPES，pH 7.75(HEPES)在室温下共同孵育 30 分钟，然后用 100mM HEPES，pH 7.75 漂洗并平衡。然后根据上面的描述测定固定化 GrB-H6 C228F 的酶活性。

得到的酶活性在下面的表 11 中示出。使用尿素变性似乎有利于固定化的 GrB-H6 C228F，因为孵育之后的酶活性与使用无变性能力的 HEPES 缓冲液孵育后的酶活性相比有所增加，而使用盐酸胍变性似乎使酶活性略微下降。

表 11:

实验	缓冲液	酶活性[a]
C	尿素	99
	GdmCl	89
	HEPES	91
F	尿素	104
	GdmCl	78
	HEPES	90
[a] 每毫升底物溶液每克干胶的 ΔOD_{405}/min		

通过切割按照实施例 6 中制备的融合蛋白 H6-TripUB IQAD↓SP 和 H6-TripUB IQAD↓SG 证明了固定化的 GrB-H6 C228F 具有功能。来自六个固定化实验中的 50μl 凝胶基质进行切割实验。凝胶基质用 200μl 含有 100mM HEPES，pH 7.75 的缓冲液重悬，并与 100μl 所述两种融合蛋白的每一种分别在室温下振荡孵育过夜。取出上清通过非还原 SDS-PAGE 进行分析，参见图 20。

对于所有 12 个切割实验，融合蛋白都被切割产生对应于 TripUbi 部分的单一产物，H6 融合伴侣已经从 TripUbi 部分上被切掉。正如预期，来自实验 C 和 F 的应该具有最高偶联水平的凝胶基质切割了略多的融合蛋白。没有测定切割效率。

参考文献

Christensen J.H.等人(1991), FEBS Letters, 281(1-2): 181-184.

Nykjær A.等人(1992), Journal of Biological Chemistry, 267(21): 14543-14548.

Holtet T.L.等人(1997), Protein Science, 6: 1511-1515

Studier F.W.等人(1990), Methods in Enzymology, 185: 60-89

Hochuli E.等人(1988), Biotechnology, 1321-1325

Harris 等人(1998), Journal of Biological Chemistry 273(42): 27364-27373.

Casciola-Rosen 等人(1999), Journal of Experimental Medicine 190(6): 815–825.

Thøgersen 等人(1994), InternationalPatent Application WO 9418227

Sun J.等人(2001), Journal of Biological Chemistry 276(18): 15177-15184.

序列表

<110> Borean Pharma A/S

<120> 使用粒酶B蛋白酶切割融合蛋白

<130> 3106

<160> 57

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> pro-IEGR-GrB-H6

<400> 1

Met Gly Ser Ile Glu Gly Arg Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15

His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30

Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45

Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60

Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80

Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95

Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110

Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125

Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140

His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160

Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175

Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Cys Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 2
<211> 243

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> pro-IEPD-GrB-H6

<400> 2

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15

His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30

Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45

Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60

Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80

Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95

Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110

Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125

Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140

His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160

Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175

Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Cys Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 3
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> pro-IEAD-GrB-H6

<400> 3

Met Gly Ser Ile Glu Ala Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15

His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30

Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45

Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60

Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80

Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95

Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110

Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125

Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140

His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160

Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175

Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Cys Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 4
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> pro-IEPD-GrB-H6 C228S

<400> 4

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15

His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30

Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45

Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60

Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80

Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95

Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110

Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125

Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140

His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160

Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175

Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Ser Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 5
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> pro-IEPD-GrB-H6 C228A

<400> 5

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15

His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30

Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45

Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60

Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80

Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95

Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110

Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125

Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140

```
His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145                 150                 155                 160

Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
                165                 170                 175

Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
            180                 185                 190

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
        195                 200                 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Ala Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
    210                 215                 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225                 230                 235                 240

His His His
```

<210> 6
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> pro-IEPD-GrB-H6 C228T

<400> 6

```
Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1               5                   10                  15
```

His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30

Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45

Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60

Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80

Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95

Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110

Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125

Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140

His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160

Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175

Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Thr Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 7
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> pro-IEPD-GrB-H6 C228V

<400> 7

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15

His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30

Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45

Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60

Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80

Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95

Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110

Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125

Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140

His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160

Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175

Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Val Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 8
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> pro-IEPD-GrB-H6 C228F

<400> 8

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15

His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30

Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45

Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60

Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80

Pro Ilė Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95

Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110

Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125

Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140

His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160

Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175

Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Phe Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 9
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> H6 C-term fw

<400> 9
catggacgga agcttgaatt cacatcacca tcaccatcac taacgc 46

<210> 10
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> H6 C-term rev

<400> 10
aattgcgtta gtgatggtga tggtgatgtg aattcaagct tccgct 46

<210> 11
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> GrBfw 引物

<400> 11
catgggatcc atcgagggta ggatcatcgg gggacatgag 40

<210> 12
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> GrBrev EcoRI 引物

<400> 12
gcgtgaattc aggtaccgtt tcatggtttt ctttatcc 38

<210> 13
<211> 715
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> GrB EcoRI fragment

<400> 13
catgggatcc atcgagggta ggatcatcgg gggacatgag gccaagcccc actcccgccc 60

ctacatggct tatcttatga tctgggatca gaagtctctg aagaggtgcg gtggcttcct 120

gatacaagac gacttcgtgc tgacagctgc tcactgttgg ggaagctcca taaatgtcac 180

cttgggggcc cacaatatca aagaacagga gccgacccag cagtttatcc ctgtgaaaag 240

acccatcccc catccagcct ataatcctaa gaacttctcc aacgacatca tgctactgca 300

gctggagaga aaggccaagc ggaccagagc tgtgcagccc ctcaggctac ctagcaacaa 360

ggcccaggtg aagccagggc agacatgcag tgtggccggc tgggggcaga cggccccccc 420

gggaaaacac tcacacacac tacaagaggt gaagatgaca gtgcaggaag atcgaaagtg 480

cgaatctgac ttacgccatt attacgacag taccattgag ttgtgcgtgg gggacccaga 540

gattaaaaag acttccttta agggggactc tggaggccct cttgtgtgta acaaggtggc 600

ccagggcatt gtctcctatg gacgaaacaa tggcatgcct ccacgagcct gcaccaaagt 660

ctcaagcttt gtacactgga taaagaaaac catgaaacgg tacctgaatt cacgc 715

<210> 14
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> GrB GR-PD fw

<400> 14
tccatcgagc cggatatcat cgggggacat gag 33

<210> 15
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> GrB GR-PD rev

<400> 15
ccccgatgat atccggctcg atggatccca tatg 34

<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> GrB GR-AD fw

<400> 16
tccatcgagg ctgatatcat cgggggacat gag 33

<210> 17
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> GrB GR-AD rev

<400> 17
ccccgatgat atcagcctcg atggatccca tatg 34

<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> GrB SAT fw

<400> 18
tccacgagca dccaccaaag tctcaag 27

<210> 19
<211> 26

<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> GrB SAT rev

<400> 19
agactttggt gghggctcgt ggaggc 26

<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> GrB VF fw

<400> 20
tccacgagcc ktcaccaaag tctcaag 27

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> GrB VF rev

<400> 21
agactttggt gamggctcgt ggaggc 26

<210> 22
<211> 150
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-TripUB IEPD!SP

<400> 22

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ile
1 5 10 15

Glu Pro Asp Ser Pro Gly Thr Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys
20 25 30

Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu
35 40 45

Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys Thr
65 70 75 80

Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile
85 90 95

Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp
100 105 110

Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr
115 120 125

Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu
130 135 140

Arg Leu Arg Gly Gly Ser
145 150

<210> 23
<211> 338
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-IEPD-RAP

<400> 23

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Ile Glu Pro Asp Tyr
1 5 10 15

Ser Arg Glu Lys Asn Gln Pro Lys Pro Ser Pro Lys Arg Glu Ser Gly
20 25 30

Glu Glu Phe Arg Met Glu Lys Leu Asn Gln Leu Trp Glu Lys Ala Gln
35 40 45

Arg Leu His Leu Pro Pro Val Arg Leu Ala Glu Leu His Ala Asp Leu
50 55 60

Lys Ile Gln Glu Arg Asp Glu Leu Ala Trp Lys Lys Leu Lys Leu Asp
65 70 75 80

Gly Leu Asp Glu Asp Gly Glu Lys Glu Ala Arg Leu Ile Arg Asn Leu
85 90 95

Asn Val Ile Leu Ala Lys Tyr Gly Leu Asp Gly Lys Lys Asp Ala Arg
100 105 110

Gln Val Thr Ser Asn Ser Leu Ser Gly Thr Gln Glu Asp Gly Leu Asp
115 120 125

Asp Pro Arg Leu Glu Lys Leu Trp His Lys Ala Lys Thr Ser Gly Lys
130 135 140

Phe Ser Gly Glu Glu Leu Asp Lys Leu Trp Arg Glu Phe Leu His His
145 150 155 160

Lys Glu Lys Val His Glu Tyr Asn Val Leu Leu Glu Thr Leu Ser Arg
165 170 175

Thr Glu Glu Ile His Glu Asn Val Ile Ser Pro Ser Asp Leu Ser Asp
180 185 190

Ile Lys Gly Ser Val Leu His Ser Arg His Thr Glu Leu Lys Glu Lys
195 200 205

Leu Arg Ser Ile Asn Gln Gly Leu Asp Arg Leu Arg Arg Val Ser His
210 215 220

Gln Gly Tyr Ser Thr Glu Ala Glu Phe Glu Glu Pro Arg Val Ile Asp
225 230 235 240

Leu Trp Asp Leu Ala Gln Ser Ala Asn Leu Thr Asp Lys Glu Leu Glu
245 250 255

Ala Phe Arg Glu Glu Leu Lys His Phe Glu Ala Lys Ile Glu Lys His
260 265 270

Asn His Tyr Gln Lys Gln Leu Glu Ile Ala His Glu Lys Leu Arg His
275 280 285

Ala Glu Ser Val Gly Asp Gly Glu Arg Val Ser Arg Ser Arg Glu Lys
290 295 300

His Ala Leu Leu Glu Gly Arg Thr Lys Glu Leu Gly Tyr Thr Val Lys
305 310 315 320

Lys His Leu Gln Asp Leu Ser Gly Arg Ile Ser Arg Ala Arg His Asn
325 330 335

Glu Leu

<210> 24
<211> 336
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6Ubi-IEPD-ApoA1

<400> 24

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys
1 5 10 15

Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr
20 25 30

Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro
35 40 45

Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg
50 55 60

Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val
65 70 75 80

Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Ile Glu Pro Asp Gly Gly Asp Glu Pro
85 90 95

Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val
100 105 110

Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly
115 120 125

Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp
130 135 140

Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val
145 150 155 160

Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg
165 170 175

Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro
180 185 190

Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr
195 200 205

Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg
210 215 220

Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu
225 230 235 240

Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu
245 250 255

Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu
260 265 270

Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys
275 280 285

Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu
290 295 300

Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val
305 310 315 320

Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
325 330 335

<210> 25
<211> 197
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-IEPD-TN123

<400> 25

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Ile Glu Pro Asp Gly
1 5 10 15

Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp
20 25 30

Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
50 55 60

Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys Phe Leu Ala Phe
65 70 75 80

Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp Cys Ile Ser Arg
85 90 95

Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu Asn Asp Ala Leu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala Glu Ile Trp Leu
115 120 125

Gly Leu Asn Asp Met Ala Ala Glu Gly Thr Trp Val Asp Met Thr Gly
130 135 140

Ala Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile Thr Ala Gln Pro
145 150 155 160

Asp Gly Gly Lys Thr Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser Gly Ala Ala Asn
165 170 175

Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu Pro Tyr Ile Cys
180 185 190

Gln Phe Gly Ile Val
195

<210> 26
<211> 150
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-TripUB IQAD!SP

<400> 26

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ile
1 5 10 15

Gln Ala Asp Ser Pro Gly Thr Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys
20 25 30

Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu
35 40 45

Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys Thr
65 70 75 80

Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile
85 90 95

Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp
100 105 110

Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr
115 120 125

Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu
130 135 140

Arg Leu Arg Gly Gly Ser
145 150

<210> 27
<211> 150
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-TripUB IQAD!SG

<400> 27

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ile
1 5 10 15

Gln Ala Asp Ser Gly Gly Thr Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys
20 25 30

Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu
35 40 45

Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys Thr
65 70 75 80

Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile
85 90 95

Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp
100 105 110

Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr
115 120 125

Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu
130 135 140

Arg Leu Arg Gly Gly Ser
145 150

<210> 28
<211> 150

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-TripUB VGPD!SP

<400> 28

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val
1 5 10 15

Gly Pro Asp Ser Pro Gly Thr Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys
20 25 30

Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu
35 40 45

Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys Thr
65 70 75 80

Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile
85 90 95

Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp
100 105 110

Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr
115 120 125

Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu
130 135 140

Arg Leu Arg Gly Gly Ser
145 150

<210> 29
<211> 150
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-TripUB VGPD!FG

<400> 29

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val
1 5 10 15

Gly Pro Asp Phe Gly Gly Thr Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys
20 25 30

Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu
35 40 45

Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys Thr
65 70 75 80

Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile
85 90 95

Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp
100 105 110

Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr
115 120 125

Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu
130 135 140

Arg Leu Arg Gly Gly Ser
145 150

<210> 30
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-TripUB IEPD!TQ

<400> 30

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ile
1 5 10 15

Glu Pro Asp Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp
20 25 30

Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
50 55 60

Val Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr
65 70 75 80

Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile
85 90 95

Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala
100 105 110

Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln
115 120 125

Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser
130 135 140

<210> 31
<211> 137
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-TripUB IEPD!IV

<400> 31

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ile
1 5 10 15

Glu Pro Asp Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met
20 25 30

Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala
35 40 45

Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Gly Ser Gln Ile Phe
50 55 60

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

Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile
85 90 95

Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp
100 105 110

Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His
115 120 125

Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser
130 135

<210> 32
<211> 150
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-TripUB IEPD!EP

<400> 32

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ile
1 5 10 15

Glu Pro Asp Glu Pro Gly Thr Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys
20 25 30

Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu
35 40 45

Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys Thr
65 70 75 80

Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile
85 90 95

Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp
100 105 110

Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr
115 120 125

Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu
130 135 140

Arg Leu Arg Gly Gly Ser
145 150

<210> 33
<211> 150
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> H6-TripUB IEPD!EG

<400> 33

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ile
1 5 10 15

Glu Pro Asp Glu Gly Gly Thr Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys
20 25 30

Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu
35 40 45

Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys Thr
65 70 75 80

Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile
85 90 95

Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp
100 105 110

Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr
115 120 125

Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu
130 135 140

Arg Leu Arg Gly Gly Ser
145 150

<210> 34
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> TripUB GrB fw 引物

<400> 34
gtggatccat cgagcctgac tctcctggta ccgagcc 37

<210> 35
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> TripUB GrB rev 引物

<400> 35
ggtaccagga gagtcaggct cgatggatcc actaccac 38

<210> 36
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> RAP GrB fw 引物

<400> 36
cggatccatc gagcctgact actcgcggga gaag 34

<210> 37
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> RAP GrB rev 引物

<400> 37
cccgcgagta gtcaggctcg atggatccgt gatg 34

<210> 38
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> Mut-GrB fw

<400> 38
cgtggtggat ccatcgagcc ggacggtgga gatgaacccc cc 42

<210> 39
<211> 42

<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> Mut-GrB rw

<400> 39
gggggttca tctccaccgt ccggctcgat ggatccacca cg 42

<210> 40
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> TN GrB fw 引物

<400> 40
ggatccatcg agcctgacgg cgagccacca acc 33

<210> 41
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> TN GrB rev 引物

<400> 41
ggctcgccgt caggctcgat ggatccgtga tgg 33

<210> 42
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PC7TripUB GR-AD fw

<400> 42
ggatccatcc aggcagactc tcctggtacc gag 33

<210> 43
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PC7TripUB GR-AD rev

<400> 43
gtaccaggag agtctgcctg gatggatcca ctac 34

<210> 44
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PC7TripUB P-G fw

<400> 44
ggatccatcc aggcagactc tggtggtacc gagccac 37

<210> 45
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> PC7TripUB P-G rev

<400> 45
ctcggtacca ccagagtctg cctggatgga tccactac 38

<210> 46
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> DNATrip IE-VG fw

<400> 46
gtagtggatc agtcgggcct gactctcctg gtac 34

<210> 47
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> DNATrip IE-VG rev

<400> 47
gagagtcagg cccgactgat ccactaccac tacc 34

<210> 48
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> DNATrip SP-FG fw

<400> 48
ggcctgactt tggtggtacc gagccaccaa c 31

<210> 49
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> DNATrip SP-FG rev

<400> 49
ggctcggtac caccaaagtc aggcccgact g 31

<210> 50
<211> 52

<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> Trip IEPD-TQ

<400> 50
gggaaaggat ccatcgagcc tgacacccag aagcccaaga agattgtaaa tg 52

<210> 51
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> Trip IEPD-IV

<400> 51
gggaaaggat ccatcgagcc tgacattgta aatgccaaga aagatgttgt gaac 54

<210> 52
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> UB3

<400> 52
cgcaagcttg catgcttagg atccaccacg aagtctcaa 39

<210> 53
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> TripUB EP fw

<400> 53
cgagcctgac gagcctggta ccgagccac 29

<210> 54
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> TripUB EP rev

<400> 54
cggtaccagg ctcgtcaggc tcgatggatc 30

<210> 55
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> TripUB EG fw

<400> 55
cctgacgagg gtggtaccga gccaccaac 29

<210> 56
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> TripUB EG rev

<400> 56
gctcggtacc accctcgtca ggctcgatg 29

<210> 57
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> GrB variant C228F

<400> 57

Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro His Ser Arg Pro Tyr Met Ala
1 5 10 15

Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe
20 25 30

Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Trp Gly Ser
35 40 45

Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro
50 55 60

Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg
85 90 95

Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn
100 105 110

Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly
115 120 125

Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser His Thr Leu Gln Glu Val Lys
130 135 140

Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr
145 150 155 160

Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys
165 170 175

Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Lys Val
180 185 190

Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg
195 200 205

Ala Phe Thr Lys Val Ser Ser Phe Val His Trp Ile Lys Lys Thr Met
210 215 220

Lys Arg Tyr
225

图1

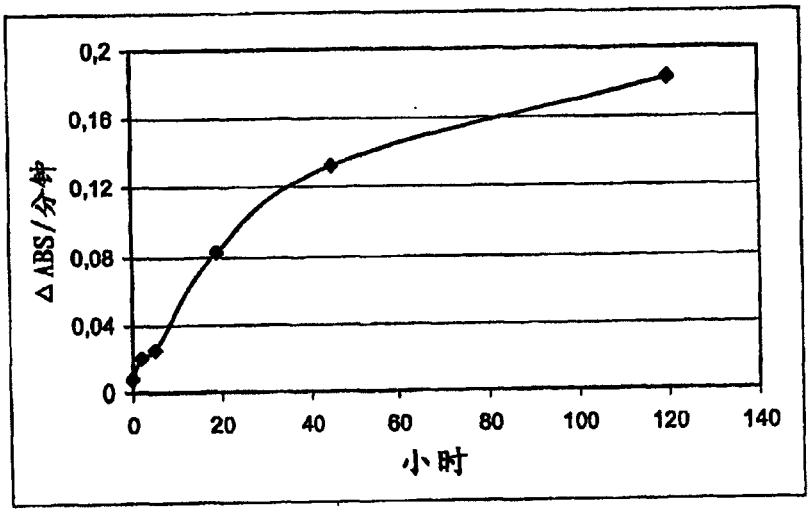


图2

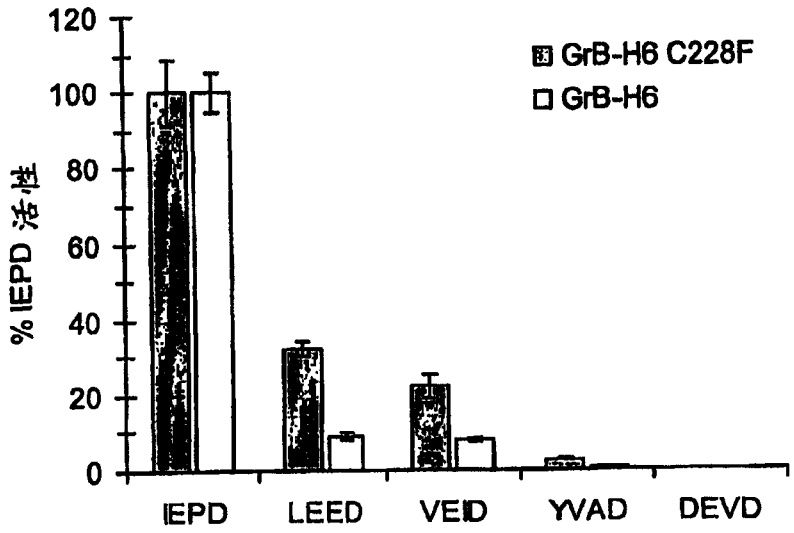
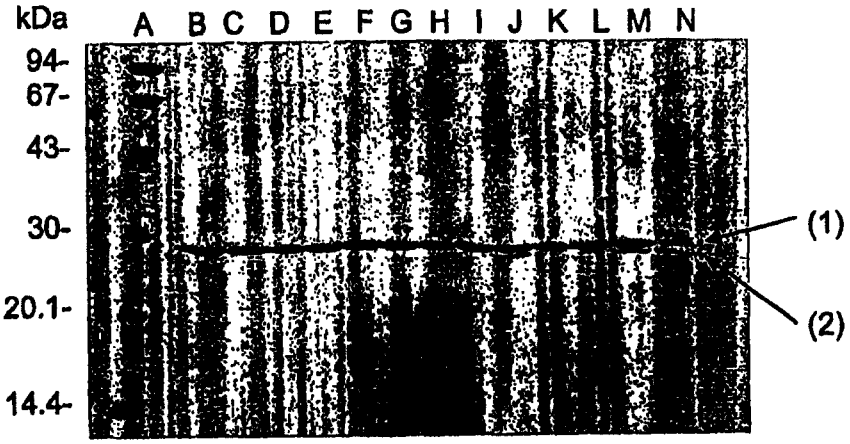

120
100
80
60
40
20
0
% IEPD 活性
GrB-H6 C228F
GrB-H6
IEPD
LEED
VEID
YVAD
DEVD

图3

(A)


kDa
A B C D E F G H I J K L M N
94-
67-
43-
30-
20.1-
14.4-
(1)
(2)

(B)

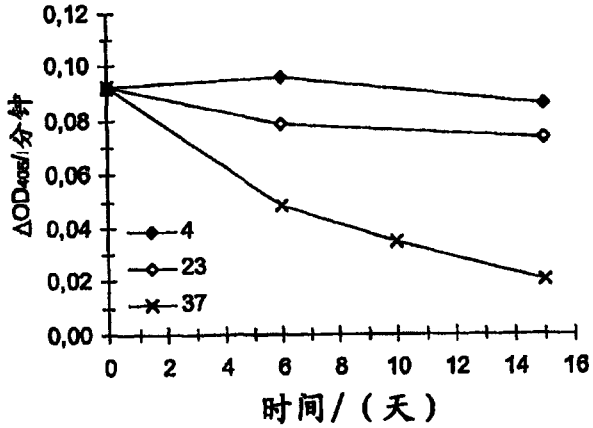

0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
ΔODnm/分钟
4
23
37
0 2 4 6 8 10 12 14 16
时间/（天）

图4

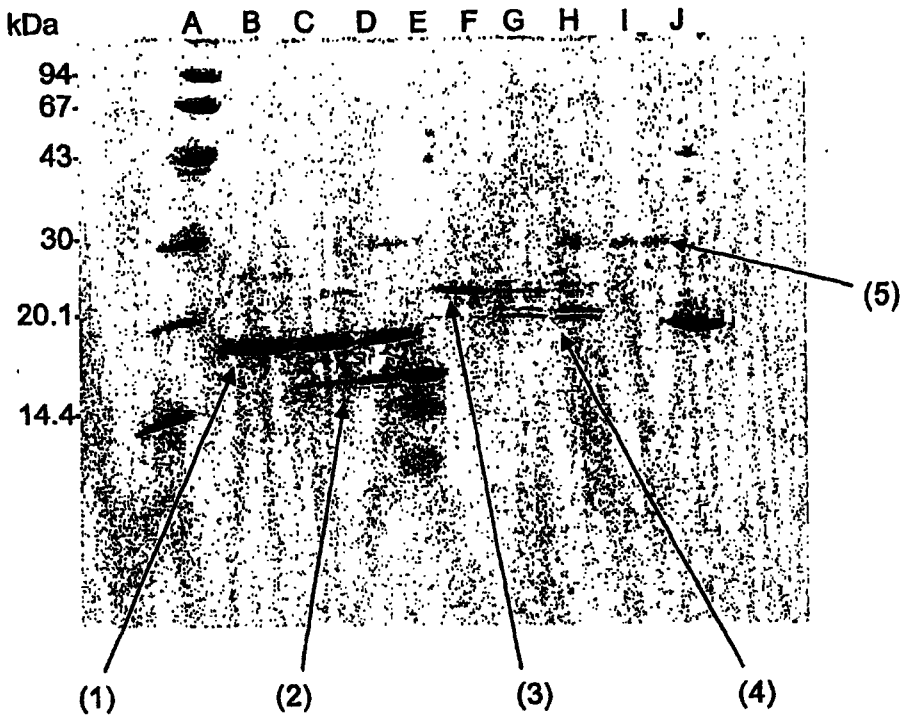


图5

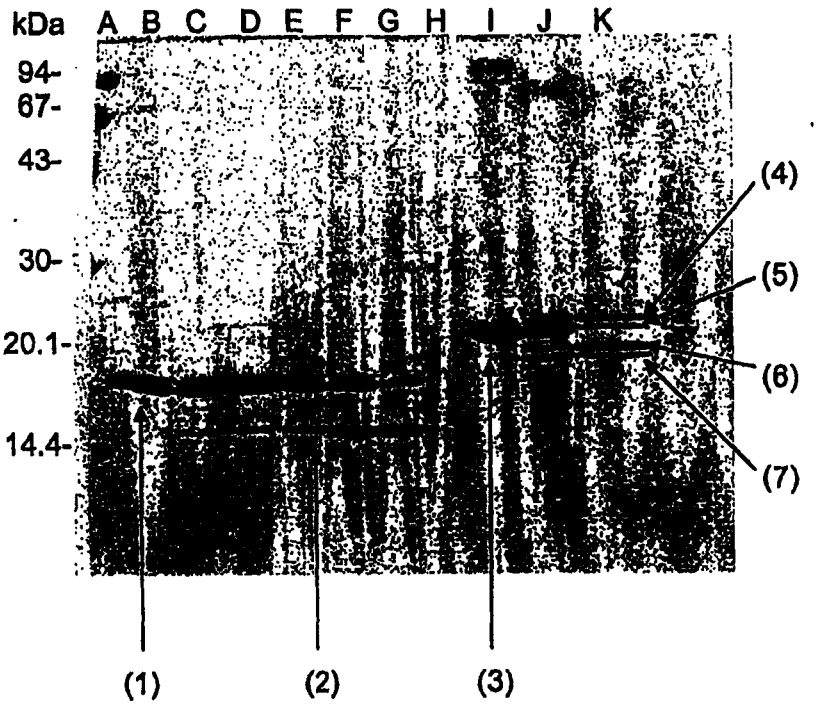


图6

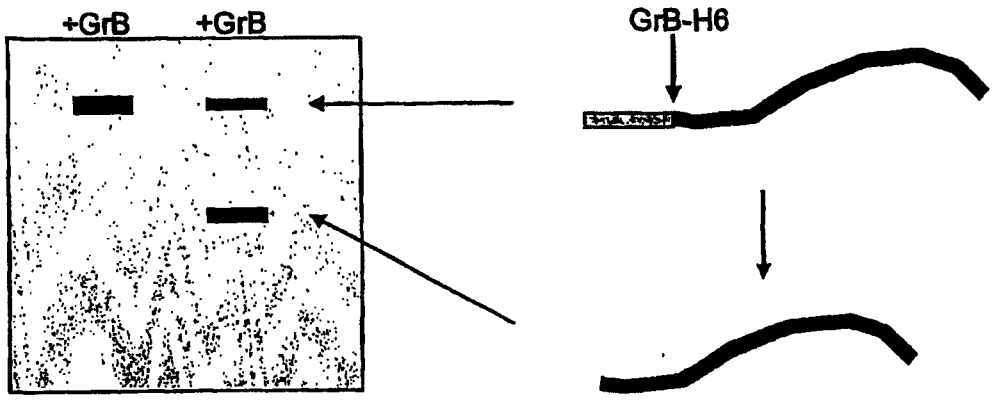


图7



图8

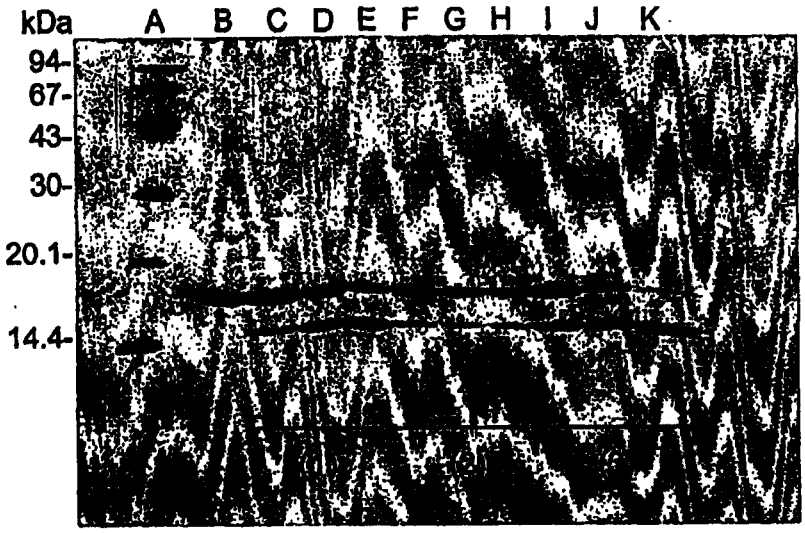


图9

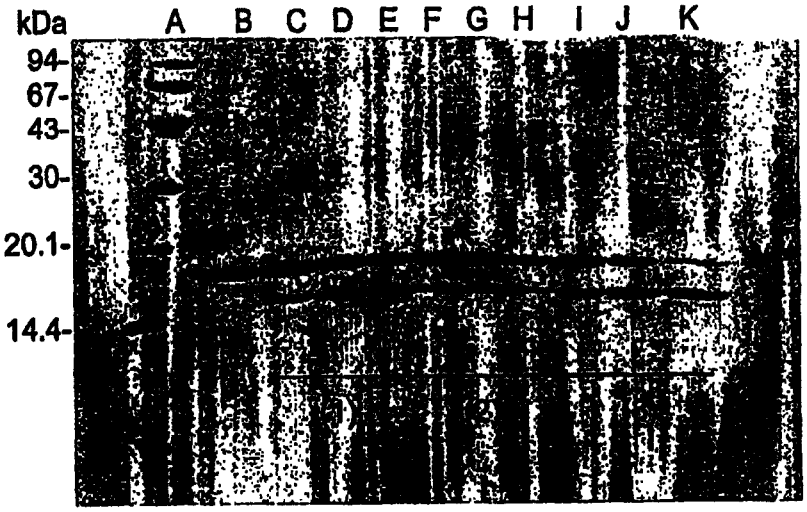


图10

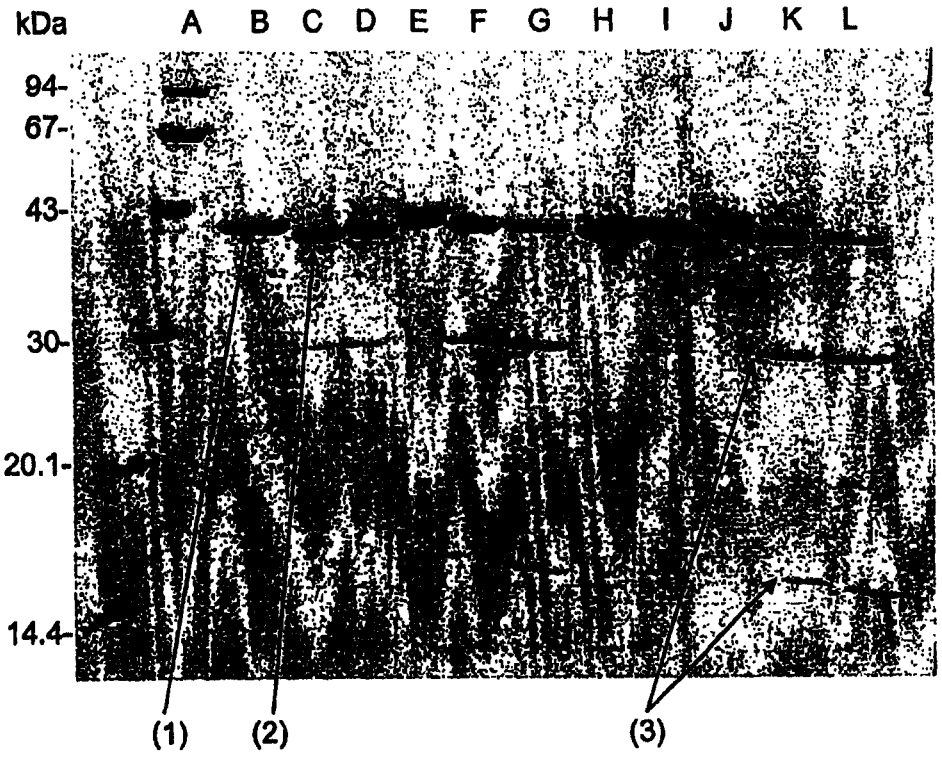


图11

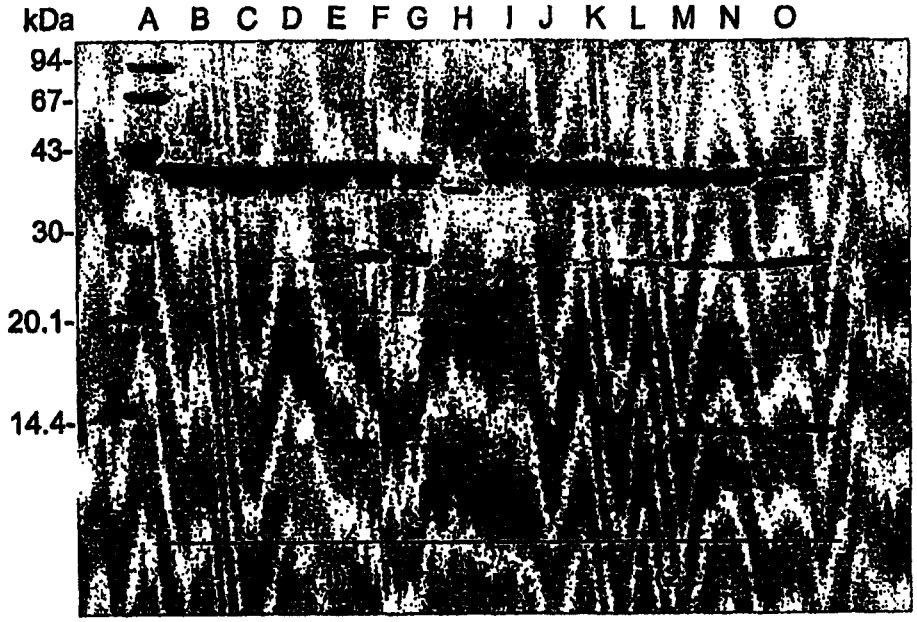


图12

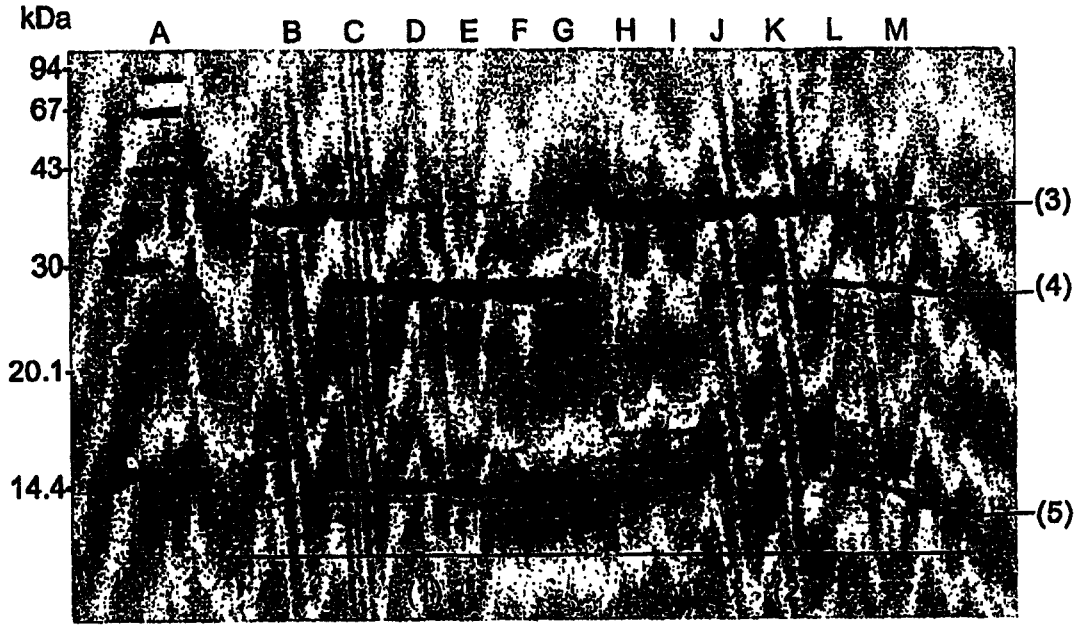


图13

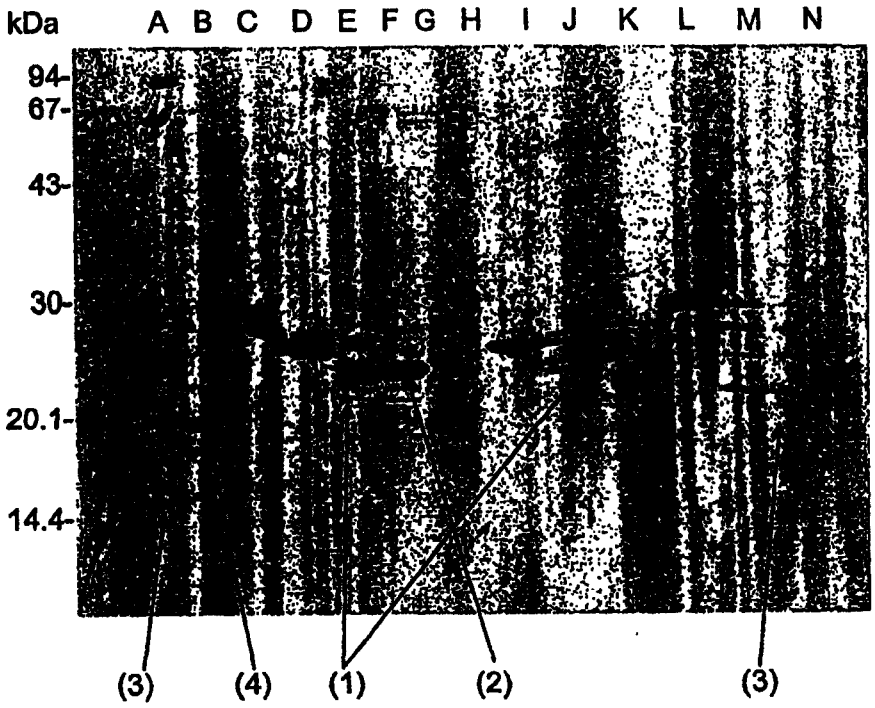


图14

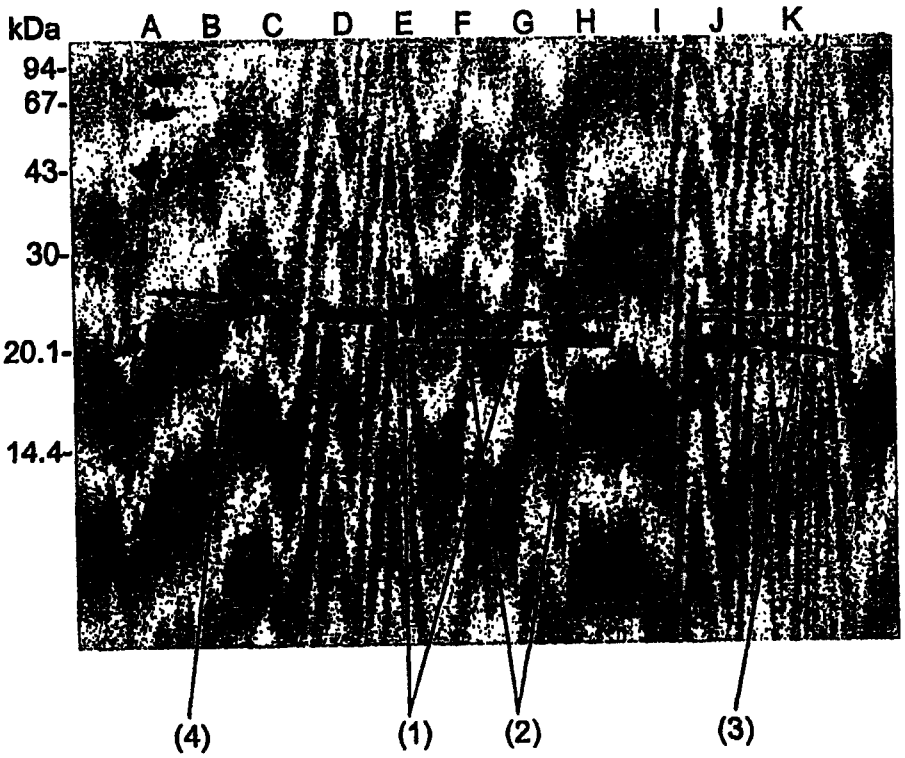


图15

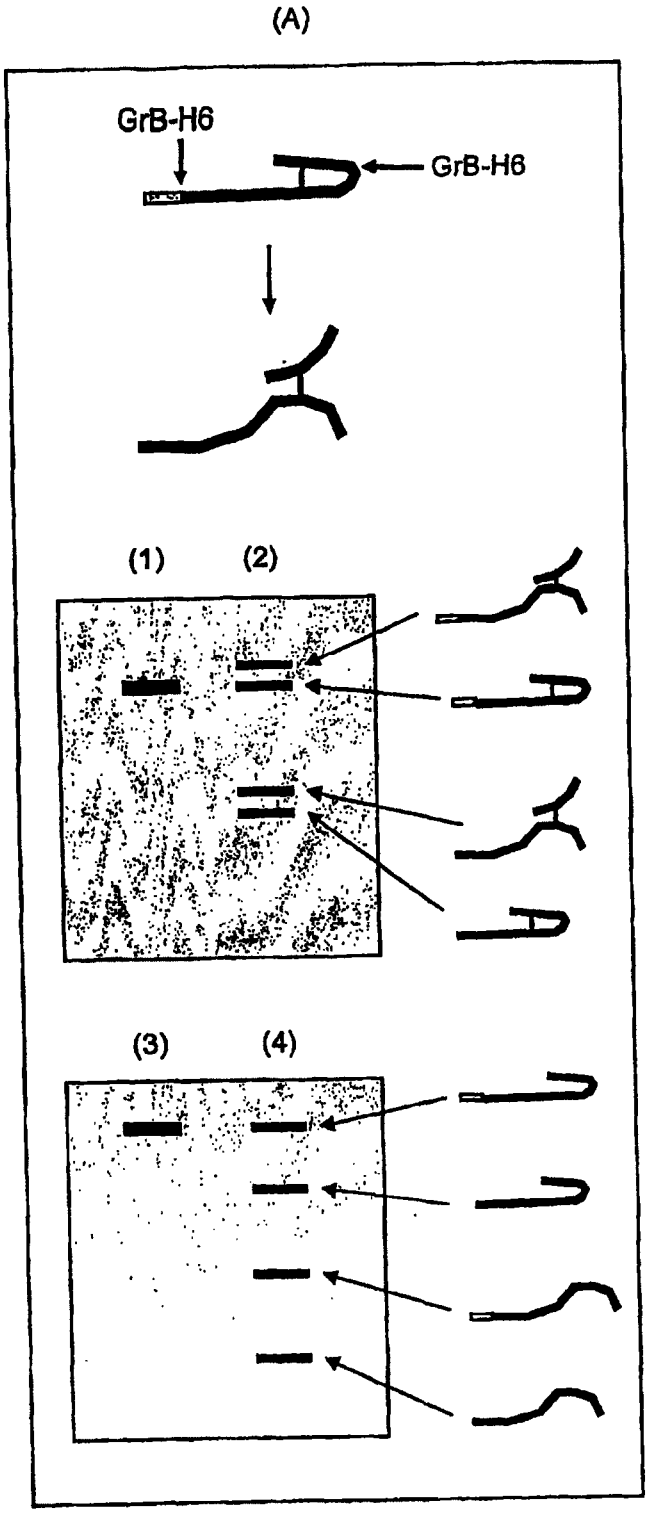


图15 续

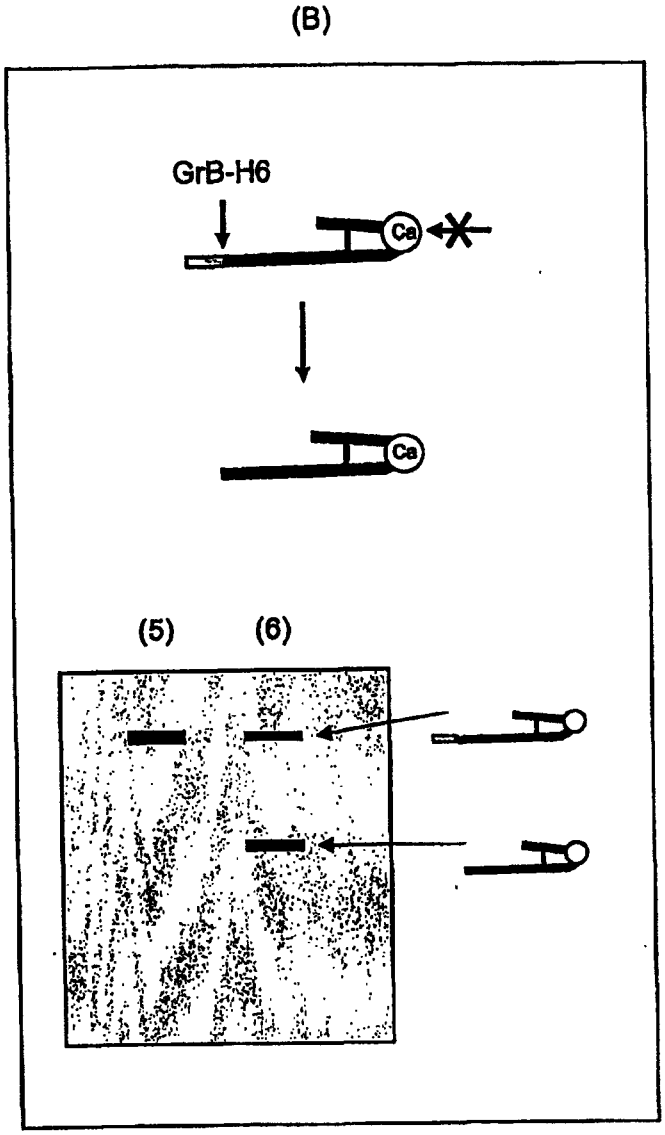


图16

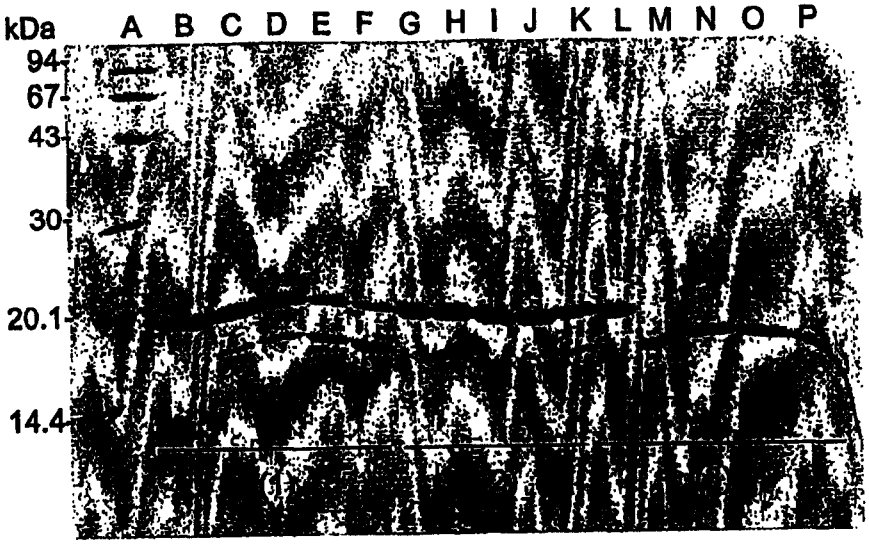


图17

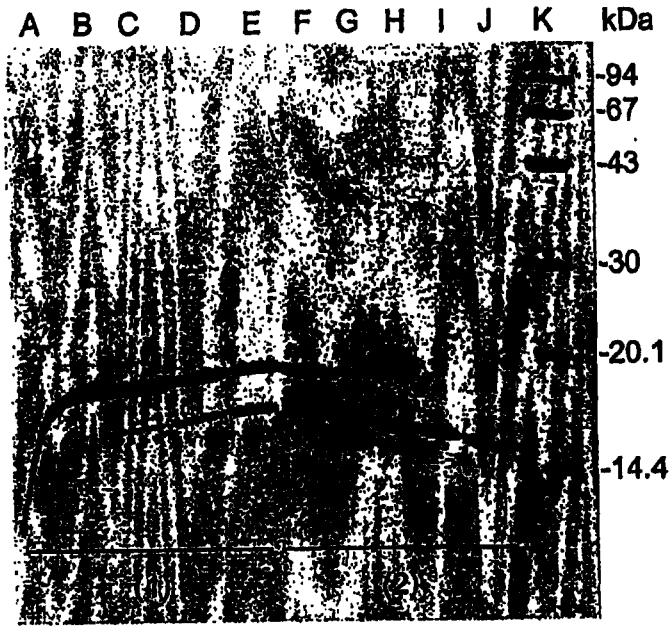


图18

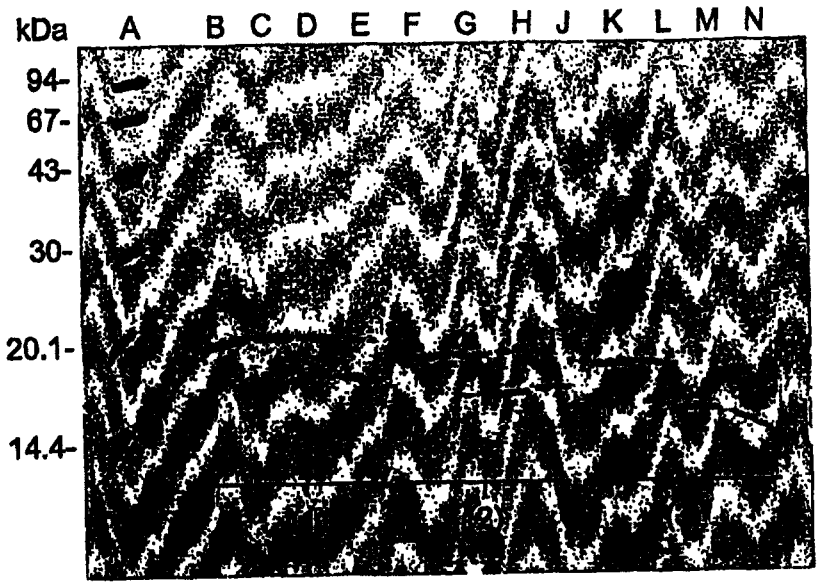
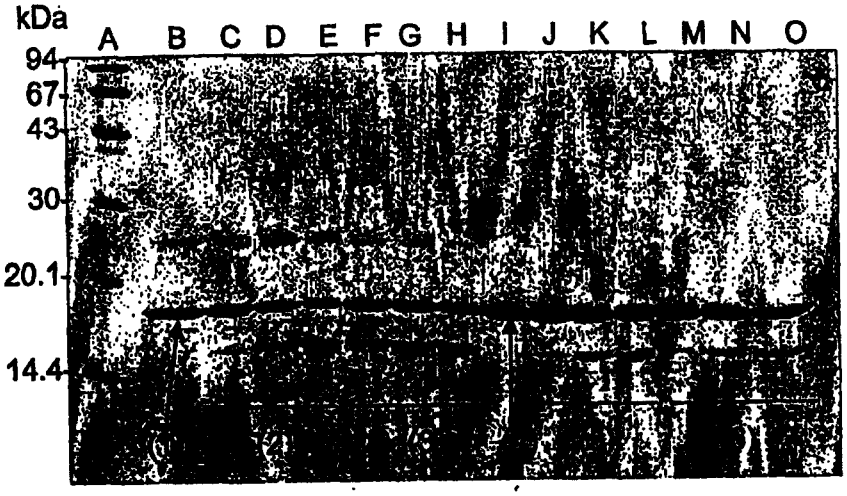


图19

A



B

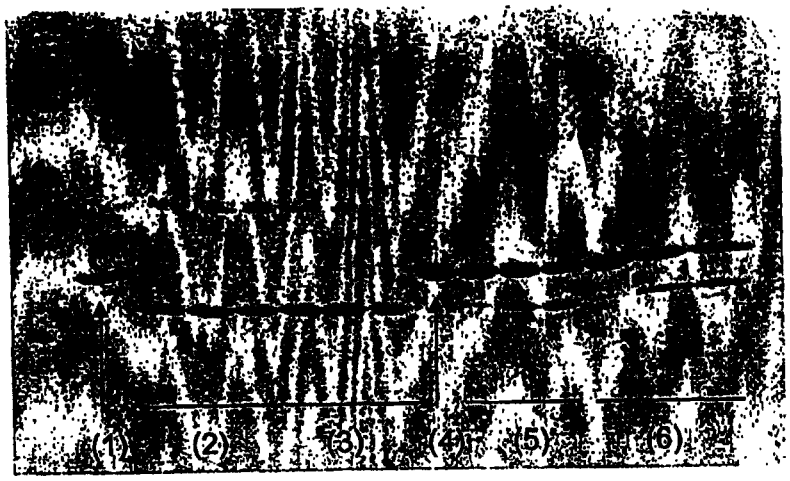


图20

