

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02103538.5

C12N 15/63

C12N 15/57

C12N 15/62

C12N 7/01

C12N 15/70

C12N 15/866

C12N 9/48

[45] 授权公告日 2005 年 11 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1228447C

[22] 申请日 2002.2.5 [21] 申请号 02103538.5

[30] 优先权

[32] 2001.2.20 [33] CN [31] 01104112.9

[71] 专利权人 深圳市人民医院

地址 518020 广东省深圳市东门北路 3 号大院

[72] 发明人 李体远 戴勇 杜琪 黄瑞芳

石之磷 蔡筱彦 肖德明

审查员 罗霄

[74] 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司

代理人 黄韧敏

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 5 页

[54] 发明名称 一种含有人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白基因的重组表达载体

[57] 摘要

本发明涉及编码人胰激肽释放酶成熟蛋白的核苷酸序列和氨基酸序列，携带编码人胰激肽释放酶成熟蛋白基因的分泌型和非分泌型重组载体以及转化的宿主细胞，本发明还涉及应用基因工程技术制备重组人激肽释放酶的方法。本发明的表达载体可高效表达具有胰腺激肽释放酶活性的蛋白产物，同时，本发明的表达载体中还融合了 His 亲和序列，包含该亲和序列的表达产物，在分离纯化时可利用 His 亲和树脂进行亲和层析纯化。本发明为开发人源组织激肽释放酶基因工程产品，开发人源组织激肽释放酶的基因药物奠定基础。

ISSN 1008-4274

- 
- 1、一种重组载体，其特征在于，在质粒载体 pET28 中包含有 SEQ ID NO. 3 所示核苷酸序列，并且所述质粒载体的 C 端融合 His Tag 序列，使得表达的  
5 目的蛋白易于进行亲和层析纯化。
  - 2、一种由权利要求 1 所述重组载体转化的大肠杆菌宿主。

---

一种含有人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白基因的重组表达载体

## 5 技术领域

本发明涉及一种编码人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列；

本发明还涉及携带人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白基因的重组表达载体。

10 本发明还涉及由该重组表达载体转化的宿主细胞。

本发明还涉及应用基因工程技术制备重组激肽释放酶的方法。

## 背景技术

人类激肽释放酶分为两大类，即血浆激肽释放酶和组织激肽释放酶。组织激肽释放酶为一簇性质相似的化合物，可以由肝脏、胰脏、脑神经等合成。组织激肽释放酶基因编码的蛋白首先表达生成前体完整蛋白，该前体蛋白在体内经过蛋白酶切割加工后成为具有生物活性的成熟蛋白。组织激肽释放酶基因编码组织激肽释放酶（E.C.3.4.21.35），它是一种丝氨酸蛋白酶，通过裂解低分子量的激肽原生成具有血管活性的激肽，后者参与机体一系列的生理及病理过程。

### 一、胰激肽释放酶的生理作用

#### 1. 胰激肽释放酶与机体血压调节及肾脏功能的关系

激肽释放酶和激肽系统（KKS）是维持血压平衡中降压系统的一个重要组成部分，与利钠肽系统、EDRF/NO、PGE<sub>2</sub>/PDI<sub>2</sub>等共同参与血压的舒张调节。KKS的功能缺陷或抑制很可能参与了高血压的发生和维持。组织激肽释

放酶 (Kallikrein, KK) 是机体激肽释放酶-激肽系统的重要成员。KK 在人体的许多部位广泛表达, 通过与其他血管活性物质的相互作用, 参与肾脏功能的调节。组织激肽释放酶能够裂解低分子量激肽原 (kininogen) 生成具有血管活性的激肽 (kinin peptide), 后者可与缓激肽 (bradykinin) B<sub>2</sub> 受体相结合产生广泛的生理效应, 包括扩张肾内小动脉, 增加肾血流量, 抑制球旁细胞分泌肾素并促进髓质细胞分泌 PGE<sub>2</sub>; 抑制近曲小管对钠、水的重吸收; 进入血液循环后, 扩张外周血管, 增加血管通透性, 使血压下降, 并促进电解质及葡萄糖的转运。研究表明, 肾组织受损时, 由小管产生的激肽释放酶减少, 肾激肽水平下降。在抗肾小球基底膜抗血清所致的肾病综合征模型大鼠中, 尿激肽释放酶水平明显降低, 且与蛋白尿程度成反比。由于尿中的激肽释放酶来源于肾脏, 表明组织 KK 参与肾脏功能的调节及血压的自身平衡。将纯化后的大鼠组织 KK 对饲高盐饮食的 Dah<sub>1</sub> - 盐敏感大鼠进行长时间灌流发现, 大鼠的肾小管硬化减轻。表明, 施于组织 KK 对机体的血压调节及肾脏功能恢复均有重要作用。

## 15 2. 胰激肽释放酶与心脑血管疾病的关系

胰激肽释放酶可以裂解低分子量的激肽原生成具有血管活性的激肽, 扩张毛细血管, 增加血管通透性, 改善微循环。同时胰激肽释放酶又是一种活化因子, 能使纤维酶原激活成纤维酶, 使不溶性的纤维蛋白酶水解成可溶性的小肽, 从而对脑梗塞、动脉粥样硬化等疾病起到治疗作用, 并可以治疗血栓、预防血栓再形成。

## 20 3. 胰激肽释放酶对生殖的影响

研究表明, 胰激肽释放酶可以提高纤溶活性, 扩张周围血管, 促进生精细胞增生, 改善精子活力, 促进精液液化。给大鼠注射胰激肽释放酶后, 不但可以增加精子的产生, 而且可以增进精子在体外的活动能力。有人利用胰激肽释放酶治疗男性不育症, 取得明显疗效。

#### 4. 胰激肽释放酶对其他疾病的作用

研究表明，胰激肽释放酶对糖尿病肾病、视网膜静脉阻塞等均有较好疗效。

#### 二、 研究现状

- 5 目前使用的胰激肽释放酶均为由猪脏器提取、纯化的产品。尚没有人源胰激肽释放酶产品，利用基因工程技术生产重组人胰腺组织激肽释放酶的研究尚未见报道。

#### 发明内容

- 10 针对现有技术的缺陷，本发明的一个目的在于提供编码人胰激肽释放酶成熟蛋白的核苷酸序列 SEQ ID NO. 3，及其编码的氨基酸序列 SEQ ID NO. 4。

本发明的另一目的在于提供包含本发明编码人源胰激肽释放酶成熟蛋白基因的重组表达载体。

本发明另一目的在于提供由该重组载体转化的宿主细胞。

- 15 本发明的再一目的在于提供一种利用基因工程技术制备重组人胰腺组织激肽释放酶的方法。

根据本发明的一方面，根据 GenBank 报告的基因序列，利用计算机辅助系统设计了 PCR 引物，从中国人胰腺组织中提取 RNA，逆转录后进行 PCR 扩增，克隆获得具有 SEQ ID NO:1 序列的 DNA，其编码的多肽序列如 SEQ ID

- 20 NO: 2。

- 本发明克隆的编码胰腺组织激肽释放酶的基因与 GenBank 报告的人胰腺激肽释放酶基因有一个碱基不同。以翻译起始密码子 ATG 为 1，本发明克隆的激肽释放酶基因的第 340 位碱基为 A，Genbank 报告的为 G。编码氨基酸的密码子 Genbank 为 GAC，中国人为 AAC，编码的氨基酸 Genbank 为天冬氨酸 (Asp, Genbank)，中国人为天冬酰氨 (Asn)。天冬氨酸与天冬酰氨分
- 25

子量接近，Asp 为 133.1，Asn 为 132.1，结构也相近，但两者的侧链基团不同。Asp 为酸性氨基酸，Asn 则偏碱性。该位置氨基酸的变化对激肽释放酶的空间结构以及活性可能产生影响。

在合成胰腺组织激肽释放酶的过程中，由激肽释放酶原（由激肽释放酶  
5 全长基因表达的激肽释放酶完整蛋白）将进一步被蛋白酶切割和加工成为成熟的具有生物学活性的激肽释放酶。因此，由克隆的全长基因表达的激肽释放酶完整蛋白的活性大大低于激肽释放酶成熟蛋白的活性。本发明利用电脑软件分析比较了人（胰腺组织）、猪、大鼠、小鼠激肽释放酶的氨基酸序列，推测出激肽释放酶原（激肽释放酶完整蛋白）转换为激肽释放酶（激肽释放  
10 酶成熟蛋白）的可能蛋白切割位点及激肽释放酶成熟蛋白的氨基酸序列，合成 PCR 引物，进一步从克隆的人胰腺组织激肽释放酶基因全序列中调出编码激肽释放酶成熟蛋白的基因，其具有如 SEQ ID NO. 3 所示序列。其编码如 SEQ ID NO. 4 所示的氨基酸序列，相应地表达的人胰腺组织激肽释放酶含有 SEQ ID NO. 4 的多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。

15 根据本发明的另一方面，提供包含 SEQ ID NO: 3 序列的重组载体。其中载体可以以质粒、病毒颗粒以及噬菌体等形式，构建的重组载体可表达具有高生物学活性的人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白。在本发明的一个实施方案中，构建了质粒形式的载体，在本发明的另一个实施方案中，构建了杆状病毒形式的转移载体。

20 可通过多种方法将目的 DNA 插入到载体中，一般而言，通过本领域技术人员已知的一些方法可以将本发明的 DNA 序列插入到一个适当的限制性内切酶位点上。表达载体中的 DNA 可操作地与一个适当的表达调控序列（启动子）连接以指导 mRNA 的合成，表达载体也含有一个用于翻译起始的核糖体结合位点以及一个转录终止子。表达载体同时含有用于筛选转化宿主细胞  
25 的表型性状基因。用于构建表达载体的质粒或病毒可通过商业途径获得。

本发明的一个优选实施方案中，通过将人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白基因 (SEQ ID NO. 3) 插入质粒 pET20b 的限制性内切酶 EcoR1、Xho1 位点，构建成分泌型表达载体，该载体可以在大肠杆菌中表达出具有高生物学活性的人组织激肽释放酶成熟蛋白，并在 N 端融合信号肽序列，使得表达的目的蛋白分布于细胞浆中；在本发明的另一个优选实施方案中，通过将表达人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白基因 (SEQ ID NO. 3) 插入质粒 pE28 的限制性内切酶 EcoR1、Xho1 位点，构建成非分泌型表达载体，该载体可以在大肠杆菌中表达出具有高生物学活性的组织激肽释放酶成熟蛋白。更为特别的是，本发明进一步在该基因 C 端融合 His Tag 序列，使得表达的目的蛋白易于进行亲合层析纯化。在本发明的另一个优选实施方案中，将本发明的 DNA 插入病毒载体 pBacPAK9 的 EcoR1、Xho1 位点，构建出杆状病毒转移载体。

根据本发明的又一方面，进一步提供了由本发明的载体转化的宿主细胞，宿主细胞可以包括原核细胞和真核细胞，其中用于转化的原核细胞可以包括各种细菌，在本发明的一个优选实施方案中，以大肠杆菌作为本发明载体的宿主细胞。用于转化的真核细胞宿主可以是高等真核细胞（如哺乳动物细胞）或是低等真核细胞（如酵母细胞），本发明的一个优选实施方案以培养的昆虫细胞作为宿主细胞。

宿主细胞的转化可以通过各种方法，例如磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖介导、电穿孔等方法，本发明的一个实施方案中，采用本发明构建的杆状病毒转移载体通过共转染将本发明 DNA 导入培养的昆虫细胞，在昆虫细胞中表达的蛋白被高度糖基化，其较在大肠杆菌中表达的人胰组织激肽释放酶蛋白具有更接近天然蛋白的结构和更高的酶活力。

根据本发明的又一方面，提供制备重组激肽释放酶的方法。本发明的方法包括：1) 将编码胰组织激肽释放酶成熟蛋白的基因 (SEQ ID NO. 3) 可操作的连接于表达调控序列，构建表达载体；2) 用该表达载体转化原核或真核

细胞，形成宿主细胞；3) 在适当的培养条件下培养本发明的宿主细胞；4) 从培养液中分离出具有激肽释放酶活性的蛋白质；5) 用亲和层析纯化获得重组激肽释放酶。

本发明成功地从中国人胰腺组织中克隆了编码具有胰激肽释放酶活性的蛋白的新基因 (SEQ ID NO. 1 序列)，利用电脑软件比较分析人 (胰腺组织) 及猪、大鼠、小鼠激肽释放酶的氨基酸序列 (图 3)，同时利用软件进一步进行激肽释放酶蛋白的三维结果分析，确定了激肽释放酶原 (激肽释放酶完整蛋白) 转换为激肽释放酶 (激肽释放酶成熟蛋白) 的可能的蛋白酶切割位点及激肽释放酶成熟蛋白的氨基酸序列，再将该序列转换为相应的核苷酸序列，然后设计合成 PCR 引物，从该基因中调出了编码人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白的基因片段 (SEQ ID NO. 3)，用该基因片段构建了携带编码人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白基因的分泌型、非分泌型表达载体以及杆状病毒表达载体，进而获得了由本发明表达载体转化的原核和真核细胞宿主。

本发明的表达载体可高效表达具有高生物学活性的胰腺激肽释放酶，采用国际药学联合会 (FIP)、中国药品生物制品检定所改进的电位滴定法以及 Abe M 等人使用的酶促荧光分光光度法检测了本发明表达载体表达的蛋白产物的活性，同时与采用编码人胰腺组织激肽释放酶完整蛋白的基因 (SEQ ID NO. 1) 构建的表达载体比较。结果表明本发明构建的分泌型、非分泌型原核表达载体以及杆状病毒表达载体表达的产物均具有较高的胰腺激肽释放酶活力，可以用于进一步的动物实验研究，并可进一步用于治疗高血压等疾病的临床前研究。同时，本发明的表达载体中还融合了 His 亲和序列，包含该亲和序列的表达产物，在分离纯化时可利用 His 亲和树脂进行亲和层析纯化。本发明为开发人源组织激肽释放酶基因工程产品，开发人源组织激肽释放酶的基因药物奠定基础。

25



## 附图简述

下面，结合附图，通过对本发明较佳实施例的描述，详细说明但不限制本发明。

图 1 为 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

5 泳道 1: 100bp DNA ladder;

泳道 2: 人胰腺激肽释放酶基因;

图 2 为本发明克隆的新基因的测序图谱;

图 3 为人(胰腺组织)、猪、大鼠、小鼠激肽释放酶氨基酸序列比较分析;

图 4 本发明表达载体 pE20mK 结构示意图;

10 图 5 为本发明另一分泌型表达载体 pE28pK 的结构示意图;

图 6 为发明非分泌型表达载体 pE28mK 的结构示意图;

图 7 为本发明杆状病毒转移载体 pBac-KK 的结构示意图;

图 8 为采用电位滴定法分析表达产物活力的曲线。

## 15 发明的具体实施方式

### 实施例 1 人胰组织激肽释放酶基因的克隆和测序

#### 1 材料与方法

##### 1.1 材料

20 胰腺组织取材于一例行胰腺切除术患者术后的部分新鲜组织，洗净血液，立即提取总 RNA。

##### 1.2 质粒及菌株

质粒 pBluescript II KS (+)，大肠杆菌 XL1-Blue 分别购于 STRATAGENE (晶美公司)。

##### 1.3 工具酶及其它试剂

25 RNA 分离试剂盒、逆转录试剂盒购于 STRATAGENE (晶美公司)，限制

性内切酶、修饰酶、pfu 高保真 Taq DNA 聚合酶等分别购于 promega、gene 公司及上海生工。

#### 1.4 PCR 引物设计及合成

根据 GENBANK 报告的基因序列，利用计算机辅助系统设计一对 PCR  
5 引物，由上海生工合成并聚丙烯凝胶电泳纯化。

引物序列为：上游引物如 SEQ ID NO. 5 所示序列；

下游引物如 SEQ ID NO. 6 所示序列。

#### 1.5 RNA 提取及 PCR 扩增

制备组织匀浆后，参照试剂盒说明提取总 RNA。变性琼脂糖电泳确认  
10 RNA 质量，紫外分光光度法测定 RNA 含量。采用 oligo (dT) 引物进行逆转录。使用 eppendorf 梯度 PCR 仪，95℃，40s； 60℃，1min； 72℃，1min；总温度梯度 10℃扩增 30 循环，72℃延伸 10min 结束。确认最佳条件后取适量产物进行 PCR 扩增。直接将适量 Klenow 大片段加至扩增溶液中，25℃反应 30min 补平产物。

#### 15 1.6 重组质粒的构建

采用低熔点琼脂糖法回收 PCR 产物，插入质粒 KS。连接后转化 XL1-Blue 受体菌，利用 X-gal 进行兰-白筛选，酶切鉴定。

1.7 DNA 序列分析 碱裂解法提取质粒并用 PEG-8000 纯化，使用通用引物双向测序。

## 20 2 结果

2.1 激肽释放酶基因的扩增 将 PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，在 800-900bp 之间可见特异 DNA 条带，与预计大小~830bp 相符(图 1)。

2.2 激肽释放酶基因的克隆及鉴定 按常规方法进行基因克隆，分别使  
25 用限制性内切酶 StyI、PvuII 鉴定重组质粒，结果正确。

2.3 激肽释放酶基因的序列分析 制备重组质粒后上海 Sangon 生物工程公司测序部进行序列分析。序列分析结果与 GenBank 报告的 KK 进行序列比较，结果两者有一个核苷酸不同。图 2 为激肽释放酶基因测序图谱，序列分析结果得到 SEQ ID NO.1 的序列，其对应的氨基酸序列为 SEQ ID NO. 2。

### 5 实施例 2 人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白基因的克隆

利用电脑软件比较分析人（胰腺组织）、猪、大鼠、小鼠激肽释放酶的氨基酸序列（图 3），推测激肽释放酶原（激肽释放酶完整蛋白）转换为激肽释放酶（激肽释放酶成熟蛋白）的可能蛋白酶切割位点及激肽释放酶成熟蛋白的氨基酸序列，合成如下序列的 PCR 引物：

- 10 上游（真核细胞）：SEQ ID NO. 7所示序列；  
上游（原核细胞）： SEQ ID NO. 8所示序列；  
下游：SEQ ID NO. 9所示序列；

在上述引物设计中：

1. 成熟蛋白前面增加一个 ATG，用于真核表达；
- 15 2. 成熟蛋白前面没有 ATG，用于原核表达；
3. 共用下游引物；
4. 上下游均增加酶切位点利于克隆。

PCR 扩增方法和条件同实施例 1，扩增的成熟蛋白的编码序列起始 SEQ ID NO 1 序列的第 72 个碱基，具有 SEQ ID NO. 3 所示的核苷酸序列。其编码的相应的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示。

20

### 实施例 3 表达载体的构建

1. 人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白分泌型表达载体 pE20mK 的构建

图 4 所示为中国人胰腺组织激肽释放酶基因原核分泌型表达载体 pE20mK。具体方法是从质粒 KSKK 中利用高保真 Taq 酶扩增成熟激肽释放酶基因（SEQ ID NO. 3, mKK），利用限制性内切酶 EcoR I、XhoI 消化后，将

25

其插入质粒 pET20b 的 EcoR I、XhoI 位点，保证激肽释放酶基因与 His 读框正确，构建出分泌型表达载体 pE20pK。该载体可以在大肠杆菌中表达出组织激肽释放酶成熟蛋白，并在 N 端融合信号肽序列，使得表达的目的蛋白倾向于分布在细胞质（periplasmic localization）中。

#### 5 2. 人胰腺组织激肽释放酶完整蛋白非分泌型表达载体 pE28pK 的构建

图 5 所示为中国人胰腺组织激肽释放酶基因原核非分泌型表达载体 pE28pK。具体方法是从质粒 KSKK 中利用高保真 Taq 酶扩增完整激肽释放酶基因(SEQ ID NO. 1, pKK)，利用限制性内切酶 EcoR I、XhoI 消化后，将其插入质粒 pET28 的 EcoR I、XhoI 位点，保证激肽释放酶基因与 His 读框正确，  
10 构建出非分泌型表达载体 pE28pK。该载体可以在大肠杆菌中表达出组织激肽释放酶完整的前提蛋白，并在 C 端融合 His Tag 序列，使得表达的目的蛋白易于进行亲和层析纯化。

#### 3. 人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白非分泌型表达载体 pE28mK 的构建

图 6 所示为中国人胰腺组织激肽释放酶基因原核非分泌型表达载体  
15 pE28mK。具体方法是从质粒 KSKK 中利用高保真 Taq 酶扩增成熟激肽释放酶基因（SEQ ID NO. 3, mKK），利用限制性内切酶 EcoR I、XhoI 消化后，将其插入质粒 pET28 的 EcoR I、XhoI 位点，保证激肽释放酶基因与 His 读框正确，构建出非分泌型表达载体 pE28mK。该载体可以在大肠杆菌中表达出组织激肽释放酶成熟蛋白，并在 C 端融合 His Tag 序列，使得表达的目的蛋白  
20 易于进行亲和层析纯化。

#### 4. 杆状病毒转移载体 pBac-KK 的构建

图 7 所示为中国人胰腺组织激肽释放酶基因的杆状病毒表达转移载体。具体方法是从质粒 KSKK 中利用限制性内切酶 EcoR I、XhoI 切出激肽释放酶基因(SEQ ID NO. 3)，将其插入转移载体 pBacPAK9 的 EcoR I、XhoI 位点，  
25 构建出杆状病毒转移载体 pBac-KK。

#### 实施例 4 人胰腺组织激肽释放酶基因在大肠杆菌中的表达

##### 1. 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化

大肠杆菌感受态细胞制备，采用氯化钙制备法，具体方法参照金冬雁、黎孟枫等译《分子克隆实验指南》第二版，科学出版社（1992），第 55~56 页。只是采用由 0.75mmol/L Tris-HCl 代替水为溶剂配制 0.1mol/L CaCl<sub>2</sub>。感受态细胞的转化方法，参照上述参考文献进行。

2. 质粒的大量制备（除有特殊说明外，试剂配制均参照《分子克隆实验指南》第二版，科学出版社（1992）

参照金冬雁、黎孟枫等译《分子克隆实验指南》第二版，科学出版社（1992），第 26~28 页，采用碱裂解法制备，用 PEG 沉淀法纯化。具体操作方法如下，离心收获经质粒转化、培养后的菌体，用 STE 悬浮、洗涤菌体一次，然后用特殊 TE(10mmol/L Tris, 50mmol/L EDTA pH8.0)，悬浮沉淀。加入 2 倍于 TE 体积的溶液 II 裂解，加入 1.5 倍体积的溶液 III 中和，离心后取上清，加入 0.7 倍体积的异丙醇沉淀。离心弃上清。用 TE(pH8.0)溶解沉淀，加入等倍于 TE 体积的 5mol/L LiCl，离心去除大分子 RNA。移出上清至一新离心管中，加入 2 倍于上清体积的无水乙醇，沉淀 DNA。加适量 70%乙醇洗涤沉淀一次，凉干。用 TE 溶解沉淀，其中含无 DNA 酶的 RNA 酶终浓度为 20Mg/ml，以去除 RNA。加入等倍于 TE 体积的 PEG 溶液（20% PEG 6000，2.5mol/L NaCl）混匀，置 4℃过夜后离心，弃上清。用 TE 溶解沉淀，用 20 倍于 TE 体积的饱和酚、酚：氯仿，按顺序各抽提一次，然后用 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA，用 70%乙醇洗涤沉淀一次，凉干，最后溶于 TE(pH8.0)中备用。

##### 3. 质粒的限制性内切酶消化与 DNA 片段的回收

质粒的限制性内切酶消化均参照下列反应条件进行，每微克质粒 DNA 用 5 单位限制性内切酶消化，加 1/10 体积的限制性内切酶反应缓冲液，加灭

菌二馏水调整反应总体积为所用限制性内切酶体积的 10 倍,按各种限制性内切酶的供应商推荐的反应温度反应 2~3 小时。质粒用限制性内切酶消化后, DNA 片段的回收采用 DEAE-纤维素膜电泳回收法,具体方法参照金冬雁、黎孟枫等译《分子克隆实验指南》第二版,科学出版社(1992),第 319~321 5 页。本研究采用 DE-81 离子交换纸(Whatman 公司产品)代替 DEAE-纤维素膜。

#### 4. 线性质粒的末端去磷酸化和 DNA 片段的连接

酶切后线性质粒的末端去磷酸化,采用小牛小肠碱性磷酸酶(CIP),具体操作参照金冬雁、黎孟枫等译《分子克隆实验指南》第二版,科学出版社 10 (1992),第 40~41 页。去磷酸化反应后,CIP 的灭活采用 5mmol/L EDTA (PH8.0)存在下,75℃加热 10min。然后用酚:氯仿抽提去除 CIP,乙醇沉淀去磷酸化后的线性质粒,溶于灭菌双馏水中,用于连接反应。

线性质粒与 DNA 片段的连接反应按 GIBCO-BRL 公司提供的 T<sub>4</sub> DNA 连接酶推荐的条件进行。粘性末端的连接按质粒载体:目的 DNA 片段的摩尔 15 比=1:2,25℃连接 1h。平末端的连接采用质粒载体:目的 DNA 片段摩尔比=1:5 的比例,14.16℃,连接 17.24h,然后将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞。

#### 5. 重组质粒的筛选与鉴定

将连接反应物转化感受态细菌,涂于含抗生素的平板上,挑选过夜培养长 20 出的单菌落,接种于 2ml LB 液体培养基中,培养 16~20h。然后参照金冬雁、黎孟枫等译《分子克隆实验指南》第二版,科学出版社(1992),第 19~22 页介绍的碱裂解法小量制备质粒,以空载体质粒作对照进行质粒的琼脂糖凝胶电泳,挑选重组质粒,作限制性内切酶酶切,琼脂糖凝胶电泳,鉴定插入的目的基因及其插入方向。

#### 25 实施例 5 目的基因的表达

参照 Novagen 公司的实验指南进行。将重组质粒分别转化 pET 表达系统的表达菌株，如 BL21 (DE3)、BL21 (DE3) *plysS*、HMS174 (DE3) 等以及非表达 (对照) 菌株 BL21，挑选过夜培养长出的单菌落，接种于 2ml LB 液体培养基中，于 37℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6-1.0，4℃ 保存过夜。次日收集菌体，重悬于 2ml 新鲜培养基，然后接种于 50ml 培养基，于 37℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6-1.0，加 IPTG 诱导，继续培养 3hr。收集菌体，裂解后进行蛋白的纯化、分析。

### 实施例 6 重组蛋白的分离纯化及活性测定

#### 1. 亲和层析纯化

10 融合 His Tag 蛋白的纯化：使用 Qiagen 公司生产的 Ni<sup>2+</sup>-NTA 金属亲和树脂，将菌体超声裂解后，上 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和柱，依次使用不同的缓冲液进行梯度洗脱。分别收集洗脱液进行 SDS-PAGE 分析。将含目的蛋白洗脱液透析后冻干保存。

15 2. 常规纯化：参照试剂盒说明书以及《精编分子生物学实验指南》第 10 章部分的实验步骤进行层析纯化。

#### 3. 激肽释放酶的活性分析

20 激肽释放酶的生物活性可以通过其催化活力进行测定。以纯化的猪激肽释放酶 (Sigma 产品，购自深圳晶美公司) 为标准品，采用两种方法检测了重组人胰激肽释放酶活力。结果表明，本实验表达的激肽释放酶的初步纯化产物具有激肽释放酶催化活性。

#### 采用两种方法检测重组人胰激肽释放酶活力

(1) 用国际药学联合会 (FIP) 推荐 (Ruysen Rand Lauwers A. *Pharmaceutical Enzymes Properties and Assay Methods: Kallikrein*. 1978. 147-152)、中国药品生物制品检定所改进的电位滴定法 (扬化新, 沈佳, 刘金秀. *药物分析杂志* 25 1994; 14 (2): 9-12) 检测重组人胰激肽释放酶活力。

(2)采用 Abe M 等 (Abe M, Nakamura F, Tan F, et al. Expression of rat kallikrein and epithelikein polarity in transfected Madin-Darby canine kidney cells. Hypertension 1995;26:891-898) 使用的酶促荧光分光光度法检测重组人胰激肽释放酶活力。

5 实施例 7 人胰腺组织激肽释放酶基因在昆虫细胞 (sf9) 中的表达

1.共转染

(1) 接种  $1.0 \times 10^6$  sf9 昆虫细胞于培养皿, 加入 1.5ml 完全培养基, 27°C 培养 4hr;

(2) 将转移载体与线性化野生型杆状病毒 DNA 共转染;

10 a. 使用含 10%胎牛血清的完全培养基培养 sf9 昆虫细胞;

b. 当细胞生长成片时更换新鲜培养基, 重悬细胞;

c. 计数细胞;

d. 接种  $2 \times 10^6$  sf9 昆虫细胞于 60mm 培养皿;

e. 逐滴加入 Lipofectin-DNA 复合物, 混匀, 27°C 培养 4-5 小时;

15 (3) 同源重组后进行空斑筛选, 光学显微镜下筛选出重组杆状病毒。

2.表达

大规模培养重组杆状病毒后接种昆虫细胞中进行表达(参照试剂盒说明书以及《精编分子生物学实验指南》第 16 章部分的实验步骤进行表达)。

3.表达蛋白的初步纯化

20 参照试剂盒说明书以及《精编分子生物学实验指南》第 16 章部分的实验步骤进行层析纯化。

4.表达蛋白的活性检测

参照原核表达产物活性检测方法进行。

实施例 8 大肠杆菌表达的人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白与完整蛋白的生物活性比较

25



分别构建激肽释放酶完整蛋白、成熟蛋白载体（本发明表达载体 pE28pK 以及表达载体 pE28mK）并在大肠杆菌中进行表达，初步纯化、复性，利用凝血酶切除融合的氨基酸，采用电位滴定法检测产物活力，结果表明：pE28mK 表达产物水解苯甲酰精氨酸乙酯的活力明显高于 pE28pK 的表达产物（图 8）。说明，表达载体 pE28mK 可以表达具有生物活力的成熟激肽释放酶。表达载体 pE28pK 表达的激肽释放酶原在大肠杆菌中没有获得翻译后的切割加工。

以上实施例说明，本发明成功地从人基因组中克隆出了编码成熟人胰腺组织激肽释放酶蛋白的基因，并构建了可以携带人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白基因的重组表达载体，该载体在宿主细胞中表达的重组人胰腺组织激肽释放酶具有较高的生物学活性，并且可以利用亲和层析对重组蛋白进行纯化。

本发明不限于以上方式，本领域技术人员可以根据本发明做出各种改变和变形，只要不脱离本发明精神，均应属于本发明的范围。

03P100123.ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> 深圳市人民医院

<120> 一种编码人胰腺组织激肽释放酶成熟蛋白的基因、其重组表达载体及重组人胰腺组织激肽释放酶的制备

<130> SZ64-03P100123

<140> 02103538.5

<141> 2002-02-05

<150> CN 01104112.9

<151> 2001-02-20

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 818

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(789)

<223>

<400> 1

acc	atg	tgg	ttc	ctg	gtt	ctg	tgc	ctc	gcc	ctg	tcc	ctg	ggg	ggg	act	48
	Met	Trp	Phe	Leu	Val	Leu	Cys	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	
	1			5					10						15	
ggt	gct	gcg	ccc	ccg	att	cag	tcc	cgg	att	gtg	gga	ggc	tgg	gag	tgt	96
Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	Ile	Gln	Ser	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Trp	Glu	Cys	
			20					25					30			
gag	cag	cat	tcc	cag	ccc	tgg	cag	gcg	gct	ctg	tac	cat	ttc	agc	act	144
Glu	Gln	His	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Ala	Ala	Leu	Tyr	His	Phe	Ser	Thr	
			35				40					45				
ttc	cag	tgt	ggg	ggc	atc	ctg	gtg	cac	cgc	cag	tgg	gtg	ctc	aca	gct	192
Phe	Gln	Cys	Gly	Gly	Ile	Leu	Val	His	Arg	Gln	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	
		50				55						60				
gct	cat	tgc	atc	agc	gac	aat	tac	cag	ctc	tgg	ctg	ggt	cgc	cac	aac	240
Ala	His	Cys	Ile	Ser	Asp	Asn	Tyr	Gln	Leu	Trp	Leu	Gly	Arg	His	Asn	

03P100123.ST25.txt

65	70	75	
ttg ttt gac gac gaa aac aca gcc cag ttt gtt cat gtc agt gag agc Leu Phe Asp Asp Glu Asn Thr Ala Gln Phe Val His Val Ser Glu Ser 80 85 90 95			288
ttc cca cac cct ggc ttc aac atg agc ctc ctg gag aac cac acc cgc Phe Pro His Pro Glu Phe Asn Met Ser Leu Leu Glu Asn His Thr Arg 100 105 110			336
caa gca aac gag gac tac agc cac gac ctc atg ctg ctc cgc ctg aca Gln Ala Asn Glu Asp Tyr Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Thr 115 120 125			384
gag cct gct gat acc atc aca gac gct gtg aag gtc gtg gag ttg ccc Glu Pro Ala Asp Thr Ile Thr Asp Ala Val Lys Val Val Glu Leu Pro 130 135 140			432
acc cag gaa ccc gaa gtg ggg agc acc tgt ttg gct tcc ggc tgg ggc Thr Gln Glu Pro Glu Val Gly Ser Thr Cys Leu Ala Ser Gly Trp Gly 145 150 155			480
agc atc gaa cca gag aat ttc tca ttt cca gat gat ctc cag tgt gtg Ser Ile Glu Pro Glu Asn Phe Ser Phe Pro Asp Asp Leu Gln Cys Val 160 165 170 175			528
gac ctc aaa atc ctg cct aat gat gag tgc gaa aaa gcc cac gtc cag Asp Leu Lys Ile Leu Pro Asn Asp Glu Cys Glu Lys Ala His Val Gln 180 185 190			576
aag gtg aca gac ttc atg ctg tgt gtc gga cac ctg gaa ggt ggc aaa Lys Val Thr Asp Phe Met Leu Cys Val Gly His Leu Glu Gly Gly Lys 195 200 205			624
gac acc tgt gtg ggt gat tca ggg ggc ccg ctg atg tgt gat ggt gtg Asp Thr Cys Val Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Asp Gly Val 210 215 220			672
ctc caa ggt gtc aca tca tgg ggc tac gtc cct tgt ggc acc ccc aat Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Val Pro Cys Gly Thr Pro Asn 225 230 235			720
aag cct tct gtc gcc gtc aga gtg ctg tct tat gtg aag tgg atc gag Lys Pro Ser Val Ala Val Arg Val Leu Ser Tyr Val Lys Trp Ile Glu 240 245 250 255			768
gac acc ata gcg gag aac tcc tgaacgccca gcctgtccc ctaccccca Asp Thr Ile Ala Glu Asn Ser 260			818

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 262

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Trp Phe Leu Val Leu Cys Leu Ala Leu Ser Leu Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Pro Ile Gln Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu  
20 25 30

Gln His Ser Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Tyr His Phe Ser Thr Phe  
35 40 45

03P100123.ST25.txt

Gln Cys Gly Gly Ile Leu Val His Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala  
50 55 60

His Cys Ile Ser Asp Asn Tyr Gln Leu Trp Leu Gly Arg His Asn Leu  
65 70 75 80

Phe Asp Asp Glu Asn Thr Ala Gln Phe Val His Val Ser Glu Ser Phe  
85 90 95

Pro His Pro Gly Phe Asn Met Ser Leu Leu Glu Asn His Thr Arg Gln  
100 105 110

Ala Asn Glu Asp Tyr Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Thr Glu  
115 120 125

Pro Ala Asp Thr Ile Thr Asp Ala Val Lys Val Val Glu Leu Pro Thr  
130 135 140

Gln Glu Pro Glu Val Gly Ser Thr Cys Leu Ala Ser Gly Trp Gly Ser  
145 150 155 160

Ile Glu Pro Glu Asn Phe Ser Phe Pro Asp Asp Leu Gln Cys Val Asp  
165 170 175

Leu Lys Ile Leu Pro Asn Asp Glu Cys Glu Lys Ala His Val Gln Lys  
180 185 190

Val Thr Asp Phe Met Leu Cys Val Gly His Leu Glu Gly Gly Lys Asp  
195 200 205

Thr Cys Val Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Asp Gly Val Leu  
210 215 220

Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Val Pro Cys Gly Thr Pro Asn Lys  
225 230 235 240

Pro Ser Val Ala Val Arg Val Leu Ser Tyr Val Lys Trp Ile Glu Asp  
245 250 255

Thr Ile Ala Glu Asn Ser  
260

<210> 3

<211> 726

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(717)

<223>

## 03P100123.ST25.txt

```

<400> 3
att gtg gga ggc tgg gag tgt gag cag cat tcc cag ccc tgg cag gcg      48
Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Gln His Ser Gln Pro Trp Gln Ala
1          5          10          15

gct ctg tac cat ttc agc act ttc cag tgt ggg ggc atc ctg gtg cac      96
Ala Leu Tyr His Phe Ser Thr Phe Gln Cys Gly Gly Ile Leu Val His
          20          25          30

cgc cag tgg gtg ctc aca gct gct cat tgc atc agc gac aat tac cag      144
Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Ser Asp Asn Tyr Gln
          35          40          45

ctc tgg ctg ggt ggc cac aac ttg ttt gac gac gaa aac aca gcc cag      192
Leu Trp Leu Gly Arg His Asn Leu Phe Asp Asp Glu Asn Thr Ala Gln
          50          55          60

ttt gtt cat gtc agt gag agc ttc cca cac cct ggc ttc aac atg agc      240
Phe Val His Val Ser Glu Ser Phe Pro His Pro Gly Phe Asn Met Ser
          65          70          75          80

ctc ctg gag aac cac acc cgc caa gca gac gag gac tac agc cac gac      288
Leu Leu Glu Asn Thr Arg Gln Ala Asp Glu Asp Tyr Ser His Asp
          85          90          95

ctc atg ctg ctc cgc ctg aca gag cct gct gat acc atc aca gac gct      336
Leu Met Leu Leu Arg Leu Thr Glu Pro Ala Asp Thr Ile Thr Asp Ala
          100          105          110

gtg aag gtc gtg gag ttg ccc acc cag gaa ccc gaa gtg ggg agc acc      384
Val Lys Val Val Glu Leu Pro Thr Gln Glu Pro Glu Val Gly Ser Thr
          115          120          125

tgt ttg gct tcc ggc tgg ggc agc atc gaa cca gag aat ttc tca ttt      432
Cys Leu Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile Glu Pro Glu Asn Phe Ser Phe
          130          135          140

cca gat gat ctc cag tgt gtg gac ctc aaa atc ctg cct aat gat gag      480
Pro Asp Asp Leu Gln Cys Val Asp Leu Lys Ile Leu Pro Asn Asp Glu
          145          150          155          160

tgc gaa aaa gcc cac gtc cag aag gtg aca gac ttc atg ctg tgt gtc      528
Cys Glu Lys Ala His Val Gln Lys Val Thr Asp Phe Met Leu Cys Val
          165          170          175

gga cac ctg gaa ggt ggc aaa gac acc tgt gtg ggt gat tca ggg ggc      576
Gly His Leu Glu Gly Gly Lys Asp Thr Cys Val Gly Asp Ser Gly Gly
          180          185          190

ccg ctg atg tgt gat ggt gtg ctc caa ggt gtc aca tca tgg ggc tac      624
Pro Leu Met Cys Asp Gly Val Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr
          195          200          205

gtc cct tgt ggc acc ccc aat aag cct tct gtc gcc gtc aga gtg ctg      672
Val Pro Cys Gly Thr Pro Asn Lys Pro Ser Val Ala Val Arg Val Leu
          210          215          220

tct tat gtg aag tgg atc gag gac acc ata gcg gag aac tcc tga      717
Ser Tyr Val Lys Trp Ile Glu Asp Thr Ile Ala Glu Asn Ser
          225          230          235

acgcccagc      726

<210> 4
<211> 238
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

03P100123.ST25.txt

&lt;400&gt; 4

Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Gln His Ser Gln Pro Trp Gln Ala  
 1 5 10 15

Ala Leu Tyr His Phe Ser Thr Phe Gln Cys Gly Gly Ile Leu Val His  
 20 25 30

Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Ser Asp Asn Tyr Gln  
 35 40 45

Leu Trp Leu Gly Arg His Asn Leu Phe Asp Asp Glu Asn Thr Ala Gln  
 50 55 60

Phe Val His Val Ser Glu Ser Phe Pro His Pro Gly Phe Asn Met Ser  
 65 70 75 80

Leu Leu Glu Asn His Thr Arg Gln Ala Asp Glu Asp Tyr Ser His Asp  
 85 90 95

Leu Met Leu Leu Arg Leu Thr Glu Pro Ala Asp Thr Ile Thr Asp Ala  
 100 105 110

Val Lys Val Val Glu Leu Pro Thr Gln Glu Pro Glu Val Gly Ser Thr  
 115 120 125

Cys Leu Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile Glu Pro Glu Asn Phe Ser Phe  
 130 135 140

Pro Asp Asp Leu Gln Cys Val Asp Leu Lys Ile Leu Pro Asn Asp Glu  
 145 150 155 160

Cys Glu Lys Ala His Val Gln Lys Val Thr Asp Phe Met Leu Cys Val  
 165 170 175

Gly His Leu Glu Gly Gly Lys Asp Thr Cys Val Gly Asp Ser Gly Gly  
 180 185 190

Pro Leu Met Cys Asp Gly Val Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr  
 195 200 205

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

Ser Tyr Val Lys Trp Ile Glu Asp Thr Ile Ala Glu Asn Ser  
 225 230 235

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

## 03P100123.ST25.txt

<222> (1)..(20)

<223> 引物

<400> 5

ctggcccctg gacacctctg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 引物

<400> 6

gtaggggaca gggctgggcg

20

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(29)

<223> 引物

<400> 7

cgggatccat gattgtggga ggctgggag

29

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(26)

03P100123.ST25.txt

&lt;223&gt; 引物

&lt;400&gt; 8

cgggatccat tgtgggaggc tgggag

26

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(29)

&lt;223&gt; 引物

&lt;400&gt; 9

cagacaagct tcaggagttc tccgctatg

29



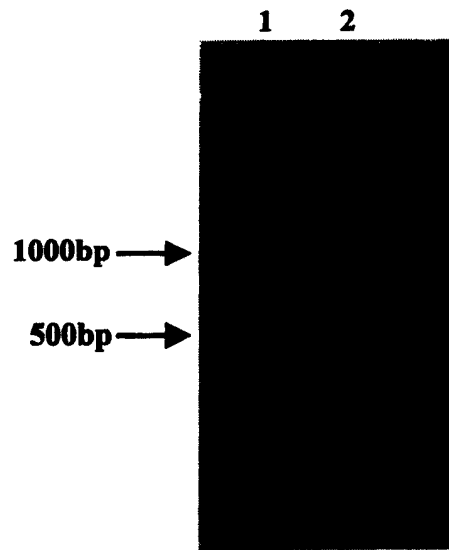


图 1

人组织激肽释放酶	M W F L V L C L A L S L G G T G A A P P I Q S R I
猪组织激肽释放酶	I
大鼠前组织激肽释放酶原	M W F L I L F L A L S L G R N D A A P P V Q S R V
小鼠前组织激肽释放酶原	M W F L I L F L A L S L G G I D A A P P V Q S R I
人组织激肽释放酶	V G G W E C E Q H S Q P W Q A A L Y H F
猪组织激肽释放酶	I G G R E C E K N S H P W Q V A I Y H Y
大鼠前组织激肽释放酶原	V G G Y N C E M N S Q P W Q V A V Y Y F
小鼠前组织激肽释放酶原	V G G F K C E K N S Q P W H V A V Y R Y
人组织激肽释放酶	S T F Q C G G I L V H R Q W V L T A A H
猪组织激肽释放酶	S S F Q C G G V L V N P K W V L T A A H
大鼠前组织激肽释放酶原	G Y L C G G V L I D P S W V I T A A H
小鼠前组织激肽释放酶原	K E Y I C G G V L I N S Q W V L T A A H
人组织激肽释放酶	C I S D N Y Q L W L G R H N L F D D E N
猪组织激肽释放酶	C K N D N Y E V W L G R H N L F E N E N
大鼠前组织激肽释放酶原	C A T D N Y Q V W L G R N N L Y E D E P
小鼠前组织激肽释放酶原	C Y Y E K N N V W L G K N N L Y Q D E P
人组织激肽释放酶	T A Q F V H V S E S F P H P G F N M S L

猪组织激肽释放酶	T A Q F F G V T A D F P H P G F N L S
大鼠前组织激肽释放酶原	F A Q H R L V S Q S F P H P G F Q D S L
小鼠前组织激肽释放酶原	S A Q H R L V S K S F L H P G F N M S L
人组织激肽释放酶	L E N H T R Q A D - E D Y S H D L M L L R
猪组织激肽释放酶	A D G K D Y S H D L M L L R
大鼠前组织激肽释放酶原	I W N H T R Q - P G D D Y S N D L M L L H
小鼠前组织激肽释放酶原	H R N R I Q N - P Q D D Y S Y D L M L L R
人组织激肽释放酶	L T E P A D T I T D A V K V V E L P T Q
猪组织激肽释放酶	L Q S P A K - I T D A V K V L E L P T Q
大鼠前组织激肽释放酶原	L S Q P A D - I T D G V K V I D L P I E
小鼠前组织激肽释放酶原	L S K P A D - I T D V V K P I A L P T E
人组织激肽释放酶	E P E V G S T C L A S G W G S I E P - - E N
猪组织激肽释放酶	E P E L G S T C E A S G W G S I E P G P D D
大鼠前组织激肽释放酶原	E P K V G S T C L A S G W G S I T P - - D G
小鼠前组织激肽释放酶原	E P K L G S T C L A S G W G S I T P - - V K
人组织激肽释放酶	F S F P D D L Q C V D L K I L P N D E C
猪组织激肽释放酶	F E F P D E I Q C V Q L T L L Q N T F C
大鼠前组织激肽释放酶原	L E L S D D L Q C V N I D L L S N S K C
小鼠前组织激肽释放酶原	F Q Y A K D L Q C V N L K L L P N E D C
人组织激肽释放酶	E K A H V Q K V T D F M L C V G H L E G
猪组织激肽释放酶	A D A H P C K V T E S M L C A G Y L P G
大鼠前组织激肽释放酶原	V E A H K E E V T D L M L C A G E M D G
小鼠前组织激肽释放酶原	D K A Y V Q K V T D V M L C A G V K G G
人组织激肽释放酶	G K D T C V G D S G G P L M C D G V L Q
猪组织激肽释放酶	G K D T C M G D S G G P L I C N G M V Q
大鼠前组织激肽释放酶原	G K D T C K G D S G G P L I C N G V L Q
小鼠前组织激肽释放酶原	G K D T C K G D S G G P L I C D G V L Q
人组织激肽释放酶	G V T S W G Y V P C G T P N K P S V A V
猪组织激肽释放酶	G I T S W G H T P C G S A N K P S I Y T
大鼠前组织激肽释放酶原	G I T S W G F N P C G E P N K P G I Y T
小鼠前组织激肽释放酶原	G L T S W G Y N P C G E P N K P G V Y T
人组织激肽释放酶	R V L S Y V K W I E D T I A E N S
猪组织激肽释放酶	K L R F Y L D W I D D T I T E N P
大鼠前组织激肽释放酶原	K L R K F T P W I K E V M K E N P
小鼠前组织激肽释放酶原	K L R K F T S W I K D T L A Q N P

图 3



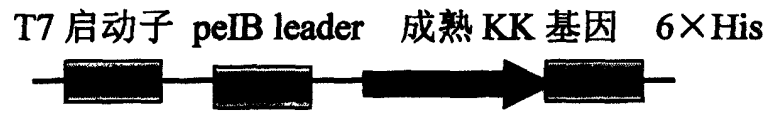


图 4

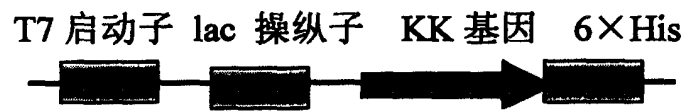


图 5

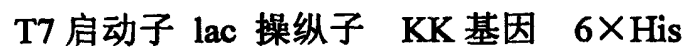
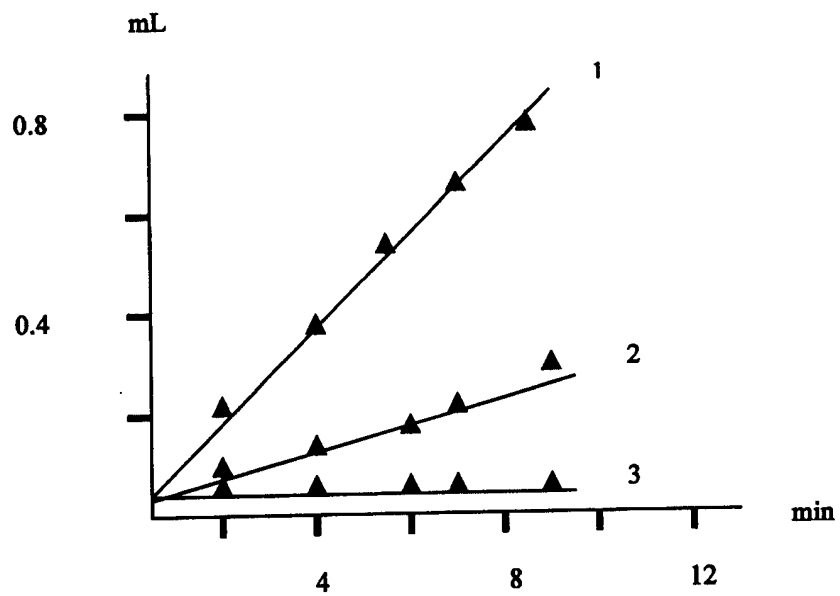


图 6



图 7



1. 猪激肽释放酶标准品 (1IU)
2. pE28mK 表达产物 (初步纯化)
3. pE28pK 表达产物 (初步纯化)

图 8