

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104745574 A

(43) 申请公布日 2015.07.01

(21) 申请号 201310750736.6

C07K 14/435(2006.01)

(22) 申请日 2013.12.31

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号  
8214 室

(72) 发明人 孙飞 庞效云 翟宇佳 王刚刚  
谢天

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 9/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页  
序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

用于在细菌表面呈递目的蛋白的 DNA 分子及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于在细菌表面呈递目的蛋白的 DNA 分子及其应用。本发明提供的 DNA 分子,自上游至下游依次包括 N 端信号肽的编码序列、Passenger 结构域的编码序列和 C 端跨膜转运结构域的编码序列;所述 N 端信号肽如序列表的序列 2 所示;所述 Passenger 结构域如序列表的序列 3 所示;所述 C 端跨膜转运结构域如序列表的序列 4 所示。本发明为进一步开发应用于工业生产的全细胞生物催化剂打下了坚实的基础。本发明在全细胞生物催化、环境生物吸附剂的开发、抗体制备等众多领域具有潜在的应用价值。

1. 一种 DNA 分子, 自上游至下游依次包括 N 端信号肽的编码序列、Passenger 结构域的编码序列和 C 端跨膜转运结构域的编码序列; 所述 N 端信号肽如序列表的序列 2 所示; 所述 Passenger 结构域如序列表的序列 3 所示; 所述 C 端跨膜转运结构域如序列表的序列 4 所示。

2. 如权利要求 1 所述的 DNA 分子, 其特征在于: 所述 N 端信号肽的编码序列如序列表的序列 1 自 5' 末端第 4-129 位核苷酸所示。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 DNA 分子, 其特征在于: 所述 Passenger 结构域的编码序列如序列表的序列 1 自 5' 末端第 250-810 位核苷酸所示。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一所述的 DNA 分子, 其特征在于: 所述 C 端跨膜转运结构域的编码序列如序列表的序列 1 自 5' 末端第 811-1650 位核苷酸所示。

5. 如权利要求 1 至 4 中任一所述的 DNA 分子, 其特征在于: 所述 DNA 分子中, 在所述 N 端信号肽的编码序列和所述 Passenger 结构域的编码序列之间, 还具有多克隆位点序列。

6. 如权利要求 5 所述的 DNA 分子, 其特征在于: 所述多克隆位点序列如序列表的序列 1 自 5' 末端第 199-249 位核苷酸所示。

7. 如权利要求 1 所述的 DNA 分子, 其特征在于: 所述 DNA 分子如序列表的序列 1 所示。

8. 含有权利要求 1 至 7 中任一所述 DNA 分子的重组质粒、转基因细胞系或重组菌。

9. 权利要求 1 至 7 中任一所述的 DNA 分子或权利要求 8 所述重组质粒的应用; 所述应用为在细菌表面呈递目的蛋白。

10. 一种在细菌表面呈递目的蛋白的方法, 包括如下步骤:

(1) 在权利要求 8 所述重组质粒中插入目的蛋白的编码基因, 插入位点为所述 N 端信号肽的编码序列和所述 Passenger 结构域的编码序列之间;

(2) 将步骤(1)得到的质粒导入宿主细菌;

(3) 培养步骤(2)得到的细菌, 从而在细菌表面呈递所述目的蛋白。

## 用于在细菌表面呈递目的蛋白的 DNA 分子及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于在细菌表面呈递目的蛋白的 DNA 分子及其应用。

### 背景技术

[0002] 细菌表面呈递技术是运用 DNA 重组技术使外源的蛋白质或多肽以融合蛋白的形式展示在细菌的表面,被展示的目标蛋白质或多肽可以保持相对独立的空间结构和生物活性,因此重组细菌就具有了该蛋白质和多肽的功能。更为重要的是,利用细菌表面呈递技术可以省去目标蛋白的提取纯化等一系列操作,直接用细胞进行后续研究和应用,方便快捷、经济实用。细菌表面展示系统呈现载体多样性,有细菌外膜蛋白和脂蛋白系统,冰晶核蛋白系统和自体运输蛋白系统等。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种用于在细菌表面呈递目的蛋白的 DNA 分子及其应用。

[0004] 本发明提供的 DNA 分子,自上游至下游依次包括 N 端信号肽的编码序列、Passenger 结构域的编码序列和 C 端跨膜转运结构域的编码序列;所述 N 端信号肽如序列表的序列 2 所示;所述 Passenger 结构域如序列表的序列 3 所示;所述 C 端跨膜转运结构域如序列表的序列 4 所示。

[0005] 所述 N 端信号肽的编码序列可如序列表的序列 1 自 5' 末端第 4-129 位核苷酸所示。所述 Passenger 结构域的编码序列可如序列表的序列 1 自 5' 末端第 250-810 位核苷酸所示。所述 C 端跨膜转运结构域的编码序列可如序列表的序列 1 自 5' 末端第 811-1650 位核苷酸所示。

[0006] 所述 DNA 分子中,在所述 N 端信号肽的编码序列和所述 Passenger 结构域的编码序列之间,还可具有多克隆位点序列。所述多克隆位点序列可如序列表的序列 1 自 5' 末端第 199-249 位核苷酸所示。

[0007] 所述 DNA 分子中,在所述 N 端信号肽的编码序列和所述多克隆位点序列之间,还可具有蛋白标签的编码序列。所述蛋白标签具体可为 His 标签。所述蛋白标签的编码序列具体可如序列表的序列 1 自 5' 末端第 181-198 位核苷酸所示。

[0008] 所述 DNA 分子具体如序列表的序列 1 所示。

[0009] 含有以上任一所述 DNA 分子的重组质粒、转基因细胞系或重组菌均属于本发明的保护范围。

[0010] 所述重组质粒可为将以上任一所述 DNA 分子插入表达载体的多克隆位点得到的重组质粒。所述重组质粒具体可为将以上任一所述 DNA 分子插入 pET-22b(+) 载体的多克隆位点(如 NdeI 和 Bpu1102I 酶切位点之间)得到的重组质粒 pAutoDisplay。

[0011] 所述重组菌具体可为将以上任一所述重组质粒(如重组质粒 pAutoDisplay)导入宿主菌得到的重组菌。所述宿主菌可为大肠杆菌,具体可为大肠杆菌 C41(DE3)。

[0012] 本发明还保护以上任一所述的 DNA 分子或以上任一所述重组质粒的应用;所述应

用为在细菌表面呈递目的蛋白。所述细菌可为大肠杆菌,具体可为大肠杆菌 C41 (DE3)。所述目的蛋白具体可为 GFP 蛋白或 CotA 蛋白。

[0013] 本发明还保护一种在细菌表面呈递目的蛋白的方法,包括如下步骤:

[0014] (1) 在以上任一所述重组质粒中插入目的蛋白的编码基因,插入位点为所述 N 端信号肽的编码序列和所述 Passenger 结构域的编码序列之间;

[0015] (2) 将步骤(1)得到的质粒导入宿主细菌;

[0016] (3) 培养步骤(2)得到的细菌,从而在细菌表面呈递所述目的蛋白。

[0017] 所述步骤(1)中,所述插入位点具体可位于所述 DNA 分子的多克隆位点序列中。

[0018] 所述步骤(2)中,所述宿主细菌可为大肠杆菌,具体可为大肠杆菌 C41 (DE3)。

[0019] 所示步骤(3)中,所述培养中包括 IPTG 诱导的步骤。所示步骤(3)中,所述培养的方法具体如下:将步骤(2)得到的细菌接种至 LB 液体培养基,37℃培养至  $OD_{600nm}=0.8-1.0$ ,然后加入 IPTG 并使其浓度为 0.2mM,继续 37℃、220rpm 振荡培养 4 小时。

[0020] 所述目的蛋白具体可为 GFP 蛋白或 CotA 蛋白。所述目的蛋白的编码基因具体可为序列表的序列 5 所示的 GFP 基因或序列表的序列 6 所示的 CotA 基因。

[0021] N 端信号肽通过 Sec (Secretion) 依赖途径运输融合蛋白通过细胞内膜到达周质腔,信号肽被切掉。C 端跨膜转运结构域在外膜上组装折叠成桶状结构。Passenger 结构域通过桶状结构形成的通道被输送到细菌表面。蛋白标签的作用是便于检测目的蛋白是否呈递到细菌表面。多克隆位点序列便于不同异源蛋白表达载体的构建,以使操作过程简洁方便。

[0022] 本发明的有益效果及优点如下:

[0023] (1) 本发明提供的 DNA 分子实现将目的蛋白运输至细胞外膜和通过外膜分泌所需要的所有信息都集中在其本身,不需要其它蛋白的辅助;

[0024] (2) 本发明提供的 DNA 分子可用于各种目的蛋白的细菌表面呈递,具有非常良好的通用性。

[0025] 采用本发明提供的 DNA 分子或方法将目的蛋白呈递到细菌表面,可用于全细胞生物催化,例如将 CotA 蛋白呈递到大肠杆菌表面,可以作为具有降解多环染料功能的全细胞生物催化剂。本发明为进一步开发应用于工业生产的全细胞生物催化剂打下了坚实的基础。本发明在全细胞生物催化、环境生物吸附剂的开发、抗体制备等众多领域具有潜在的应用价值。

## 附图说明

[0026] 图 1 为重组质粒 pAutoDisplay 的结构示意图。

[0027] 图 2 为实施例 2 中的 Western blot 结果。

[0028] 图 3 为实施例 2 中的荧光照片。

[0029] 图 4 为实施例 3 中的 Western blot 结果。

[0030] 图 5 为实施例 3 中的酶活检测结果。

## 具体实施方式

[0031] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验

方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0032] ABTS,英文全称为 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt,中文全称为 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐;Sigma, HPLC 级纯度。pET-22b(+) 载体:Merck Novagen,69744。大肠杆菌 C41(DE3):Lucigen,60442。Trypsin:Merck,108367。

[0033] 实施例 1、重组质粒(细菌表面呈递载体)的构建

[0034] 1、合成序列表的序列 1 所示的双链 DNA 分子。

[0035] 序列表的序列 1 中,自 5' 末端第 4-129 位核苷酸为 N 端信号肽的编码序列,第 181-198 位核苷酸为 His 标签(由六个组氨酸残基组成)的编码序列,第 199-249 位核苷酸为多克隆位点序列,第 250-810 位核苷酸为 Passenger 结构域的编码序列,第 811-1650 位核苷酸为 C 端跨膜转运结构域的编码序列。

[0036] 2、将步骤 1 合成的双链 DNA 分子插入 pET-22b(+) 载体的 NdeI 和 Bpu1102I 酶切位点之间,得到重组质粒 pAutoDisplay。重组质粒 pAutoDisplay 的结构示意图见图 1。

[0037] 实施例 2、在细菌表面呈递绿色荧光蛋白(GFP 蛋白)

[0038] 1、将序列表的序列 5 所示的 GFP 基因插入重组质粒 pAutoDisplay 的 BamHI 和 XhoI 酶切位点之间,得到重组质粒 pAutoDisplay-GFP。

[0039] 2、将步骤 1 得到的重组质粒导入大肠杆菌 C41(DE3),得到重组菌。

[0040] 3、将步骤 2 得到的重组菌接种至 LB 液体培养基,37℃ 培养至  $OD_{600nm}=0.8-1.0$ ,然后加入 IPTG 并使其浓度为 0.2mM,继续 37℃、220rpm 振荡培养 4 小时。

[0041] 4、完成步骤 3 后,取两份菌液(每份 400  $\mu$ l),4℃、2000g 离心 10 分钟,收集菌体,每份菌体用 200  $\mu$ l PBS 缓冲液(pH7.4)重悬。

[0042] 5、取一份步骤 4 得到的菌液,加入 4  $\mu$ l 110mg/ml Trypsin 溶液然后 37℃ 水浴 10 分钟,然后迅速置于 4℃ 并加入 20  $\mu$ l 胎牛血清以终止反应,然后 2000g 离心 5 分钟收集菌体,然后用含 10%FBS 的 PBS 缓冲液(pH7.4)洗涤 3 遍,然后用 PBS 缓冲液(pH7.4)洗涤一遍,然后用 200  $\mu$ l PBS 缓冲液(pH7.4)重悬。

[0043] 6、取另一份步骤 4 得到的菌液,加入 4  $\mu$ l PBS 缓冲液(pH7.4)然后 37℃ 水浴消化 10 分钟,然后迅速置于 4℃ 并加入 20  $\mu$ l 胎牛血清以终止反应,然后 2000g 离心 5 分钟收集菌体,然后用含 10%FBS 的 PBS 缓冲液(pH7.4)洗涤 3 遍,然后用 PBS 缓冲液(pH7.4)洗涤一遍,然后用 200  $\mu$ l PBS 缓冲液(pH7.4)重悬。

[0044] 7、分别取步骤 5 得到的菌液(实验组)和步骤 6 得到的菌液(对照组),进行 12%SDS-PAGE 和 western blot。采用的一抗为 1:3000 倍稀释的鼠源 His 抗体(Sigma, H1029),采用的二抗为 1:5000 倍稀释的辣根过氧化氢酶标记的羊抗鼠二抗。

[0045] Trypsin 消化的原理:在不破坏整个细胞的情况下,Trypsin 可以将分泌至细菌表面的蛋白消化,通过实验组和对照组的比较,可以判断该蛋白是否分泌到细菌表面,实验组细菌表面的蛋白会被消化,Western blot 图谱中不显示目的条带,对照组细菌表面的蛋白没有被消化,在 Western blot 图谱中显示目的条带。

[0046] 序列 1 编码的融合蛋白中的 C 端跨膜转运结构域在外膜上组装折叠成桶状结构,

Passenger 结构域上游的片段(含 Passenger 结构域)通过桶装结构被输送到细胞表面,在细胞自身的作用下,N 端信号肽被切割掉,Passenger 结构域的最后一个氨基酸残基与 C 端跨膜转运结构域的第一个氨基酸残基的连接被切断,目的片段(具有 GFP 蛋白的片段,预期分子量约为 49.3KD)粘附于细胞表面,加入 Trypsin 后粘附于细胞表面的目的片段会被消化。如果序列 1 编码的融合蛋白中 Passenger 结构域的最后一个氨基酸残基与 C 端跨膜转运结构域的第一个氨基酸残基尚未发生切割(预期分子量约为 79.7KD),即使加入 Trypsin 也不会被消化。

[0047] Western blot 结果见图 2(泳道 1 为分子量标记,泳道 2 为实验组,泳道 3 为对照组,箭头标注目的片段)。对照组样本(未进行过 Trypsin 消化)显示约 49.3KD 的阳性条带,实验组样本(进行过 Trypsin 消化)没有对应的条带。结果表明,GFP 蛋白成功展示到细菌表面。

[0048] 8、取步骤 3 得到的菌液,在荧光显微镜下进行观察,照片见图 3。可以观察到菌表面具有荧光。

[0049] 进行五次重复实验,结果一致。

[0050] 对比例、

[0051] 1、将序列表的序列 5 所示的 GFP 基因插入 pET-22b(+) 载体的 NdeI 和 XhoI 酶切位点之间,得到对照质粒。

[0052] 2、将步骤 1 得到的重组质粒导入大肠杆菌 C41(DE3),得到重组菌。

[0053] 3、将步骤 2 得到的重组菌接种至 LB 液体培养基,37℃培养至  $OD_{600nm}=0.8-1.0$ ,然后加入 IPTG 并使其浓度为 0.2mM,继续 37℃、220rpm 振荡培养 4 小时。

[0054] 4、完成步骤 3 后,取两份菌液(每份 400  $\mu$ l),4℃、2000g 离心 10 分钟,收集菌体,每份菌体用 200  $\mu$ l PBS 缓冲液(pH7.4)重悬。

[0055] 5、取一份步骤 4 得到的菌液,加入 4  $\mu$ l 110mg/ml Trypsin 溶液然后 37℃水浴 10 分钟,然后迅速置于 4℃并加入 20  $\mu$ l 胎牛血清以终止反应,然后 2000g 离心 5 分钟收集菌体,然后用含 10%FBS 的 PBS 缓冲液(pH7.4)洗涤 3 遍,然后用 PBS 缓冲液(pH7.4)洗涤一遍,然后用 200  $\mu$ l PBS 缓冲液(pH7.4)重悬。

[0056] 6、取另一份步骤 4 得到的菌液,加入 4  $\mu$ l PBS 缓冲液(pH7.4)然后 37℃水浴消化 10 分钟,然后迅速置于 4℃并加入 20  $\mu$ l 胎牛血清以终止反应,然后 2000g 离心 5 分钟收集菌体,然后用含 10%FBS 的 PBS 缓冲液(pH7.4)洗涤 3 遍,然后用 PBS 缓冲液(pH7.4)洗涤一遍,然后用 200  $\mu$ l PBS 缓冲液(pH7.4)重悬。

[0057] 7、分别取步骤 5 得到的菌液(实验组)和步骤 6 得到的菌液(对照组),进行 12%SDS-PAGE 和 western blot。采用的一抗为 1:3000 倍稀释的鼠源 GFP 抗体,采用的二抗为 1:5000 倍稀释的辣根过氧化氢酶标记的羊抗鼠二抗。

[0058] 结果表明,实验组和对照组均显示约 28.1KD 的目的带,即 GFP 蛋白存在于细菌内部,没有被 Trypsin 消化掉。

[0059] 实施例 3、在细菌表面呈递枯草杆菌漆酶(CotA 蛋白)

[0060] 漆酶属于多铜氧化酶,每个单体含有四个铜离子,单核铜离子中心位于底物结合位点,三核铜离子中心位于 O<sub>2</sub> 结合位点,漆酶吸收电子氧化底物,电子传递给 O<sub>2</sub>,生成水。漆酶能够通过自由基-催化反应机制直接氧化芳香族化合物底物,或者在介体的介导

作用下氧化木质素等大分子物质，介体系统的发展极大的扩展了漆酶的应用范围，使漆酶成为具有广泛应用前景的重要工业酶。目前，漆酶已经用于纸浆造纸、纺织工业、食品工程、药物有机合成、污染环境生物修复以及生物质能源开发等领域。

[0061] 一、实验组的检测

[0062] 1、将序列表的序列 6 所示的 CotA 基因插入重组质粒 pAutoDisplay 的 BamHI 和 XhoI 酶切位点之间，得到重组质粒 pAutoDisplay-CotA。

[0063] 2、将步骤 1 得到的重组质粒 pAutoDisplay-CotA 导入大肠杆菌 C41(DE3)，得到重组菌甲。

[0064] 3、将步骤 2 得到的重组菌甲接种至 LB 液体培养基，37℃ 培养至  $OD_{600nm}=0.8-1.0$ ，然后加入 IPTG 并使其浓度为 0.2mM，继续 37℃、220rpm 振荡培养 4 小时。

[0065] 4、完成步骤 3 后，取两份菌液（每份 400  $\mu$  l），4℃、2000g 离心 10 分钟，收集菌体，每份菌体用 200  $\mu$  l PBS 缓冲液（pH7.4）重悬。

[0066] 5、取一份步骤 4 得到的菌液，加入 4  $\mu$  l 110mg/ml Trypsin 溶液然后 37℃ 水浴 10 分钟，然后迅速置于 4℃ 并加入 20  $\mu$  l 胎牛血清以终止反应，然后 2000g 离心 5 分钟收集菌体，然后用含 10%FBS 的 PBS 缓冲液（pH7.4）洗涤 3 遍，然后用 PBS 缓冲液（pH7.4）洗涤一遍，然后用 200  $\mu$  l PBS 缓冲液（pH7.4）重悬。

[0067] 6、取另一份步骤 4 得到的菌液，加入 4  $\mu$  l PBS 缓冲液（pH7.4）然后 37℃ 水浴消化 10 分钟，然后迅速置于 4℃ 并加入 20  $\mu$  l 胎牛血清以终止反应，然后 2000g 离心 5 分钟收集菌体，然后用含 10%FBS 的 PBS 缓冲液（pH7.4）洗涤 3 遍，然后用 PBS 缓冲液（pH7.4）洗涤一遍，然后用 200  $\mu$  l PBS 缓冲液（pH7.4）重悬。

[0068] 7、分别取步骤 5 得到的菌液（实验组）和步骤 6 得到的菌液（对照组），进行 12%SDS-PAGE 和 western blot。采用的一抗为 1:3000 倍稀释的鼠源 His 抗体（Sigma，H1029），采用的二抗为 1:5000 倍稀释的辣根过氧化氢酶标记的羊抗鼠二抗。

[0069] 目的片段的预期分子量约 80.8KD。

[0070] Western blot 结果见图 4（泳道 1 为分子量标记，泳道 2 为实验组，泳道 3 为对照组，箭头标注目的片段）。对照组样本（未进行过 Trypsin 消化）显示约 80.8KD 的阳性条带，实验组样本（进行过 Trypsin 消化）没有对应的条带。结果表明，CotA 蛋白成功展示到细菌表面。

[0071] 8、枯草杆菌漆酶 CotA 的酶活性检测

[0072] 漆酶活性检测试验以 ABTS 为底物，一个活力单位（1U）定义为：在 40℃ 和 pH5.0 的条件下，一分钟内转化 1  $\mu$  mol 底物所需的酶量。

[0073] （1）取步骤 3 得到的菌液，4℃、2000g 离心 10 分钟，收集菌体。

[0074] （2）用 PBS 缓冲液（pH6.8）悬浮步骤（1）得到的菌体，得到不同浓度的菌液。

[0075] （3）将 50  $\mu$  l 步骤（2）得到的菌液、900  $\mu$  l 柠檬酸钠 - 磷酸二氢钠缓冲液（pH5.0、100mM）和 50  $\mu$  l ABTS 水溶液混合，得到反应体系，ABTS 在反应体系中的初始浓度为 1mM；在 40℃ 水浴中反应 3min。

[0076] （4）完成步骤（3）后，检测  $OD_{420nm}$  吸光值的变化。

[0077] 酶活（单位为 mU） =  $\frac{\Delta OD_{420} \times V \times 1000}{t \times \epsilon_{ABTS} \times d}$ ； $\Delta OD_{420}$  为  $OD_{420nm}$  吸光值的变化值；t 为

反应时间(单位 min);V 为反应体系的体积(单位 ml); $\epsilon_{\text{ABTS}}$  为 ABTS 在 420nm 处的摩尔吸光系数,  $36/(\mu\text{mol/ml} \times \text{cm})$ ;d 为光程(单位 cm)。

#### [0078] 二、对照组的检测

[0079] 将重组质粒 pAutoDisplay 导入大肠杆菌 C41(DE3), 得到重组菌乙;将重组菌乙接种至 LB 液体培养基, 37°C 培养至  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.8-1.0$ , 然后加入 IPTG 并使其浓度为 0.2mM, 继续 37°C、220rpm 振荡培养 4 小时, 4°C、2000g 离心 10 分钟, 收集菌体;用 PBS 缓冲液(pH6.8)悬浮菌体, 得到不同浓度的菌液;将 50  $\mu\text{l}$  菌液、900  $\mu\text{l}$  柠檬酸钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH5.0、100mM)和 50  $\mu\text{l}$  ABTS 水溶液混合, 得到反应体系, ABTS 在反应体系中的初始浓度为 1mM;在 40°C 水浴中反应 3min, 然后检测  $\text{OD}_{420\text{nm}}$  吸光值的变化。

#### [0080] 三、结果分析

[0081] 步骤一和步骤二的结果见图 5。结果显示:重组菌甲的活体细胞具有漆酶活性, 可以氧化底物 ABTS, 全细胞酶活随着细胞数量的增加而增加, 可达到每  $5.2 \times 10^8$  个菌细胞的活性为 0.12mU;重组菌乙的活体细胞不具有漆酶活性, 不能氧化底物 ABTS。

[0082] 结果表明, 利用本发明提供的重组质粒 pAutoDisplay 将 CotA 展示在细菌表面得到的重组菌具有良好的催化活性。由于漆酶的分离纯化步骤繁多, 耗时耗力, 导致酶的应用成本较高, 另外, 纯化的漆酶往往容易受环境因素影响失去活性, 也不利于漆酶的应用。所以, 利用本发明可以实现全细胞漆酶, 具有制备方便快捷、使用成本低、稳定性高的优势, 对于将漆酶广泛应用于工业生产具有重要的意义。



- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国科学院生物物理研究所
- [0003] <120> 用于在细菌表面呈递目的蛋白的 DNA 分子及其应用
- [0004] <130>CGGNAY133349
- [0005] <160>6
- [0006] <210>1
- [0007] <211>1708
- [0008] <212>DNA
- [0009] <213> 人工序列
- [0010] <220>
- [0011] <223>
- [0012] <400>1
- [0013] catatgtacc tggaccgctt ccgtcagtgc cctagcagcc tgcaaatccc gcgtagtgcc60
- [0014] tggcgcctgc acgcattagc cgcagcatta gccctggccg gtatggcccc ttagcacct120
- [0015] gccgcagccc aagccccctca accgccgggt gcaggtgcac cgcattgccc agacgcaggc180
- [0016] catcatcacc atcatcatgg atccaagctt gaattcggta cctcgtcgac gggctcgagt240
- [0017] gggagctctg ccggtattag tctgagcgtt gcaagcggcg cagcatggca tggtgcaacc300
- [0018] caggttctgc agagtgccac cctgggcaaa ggtggcacct gggtggtgaa tgcagacagt360
- [0019] cgtgtgcagg acatgagcat gcgcggcggc cgtgtggaat ttcaagcacc ggccccggag420
- [0020] gcaagctaca agaccctgac cctgcagaca ctggacggta acggcgtgtt cgtgctgaac480
- [0021] accaacgtgg cagccggctca aaacgaccag ctgcgtgtga ccggtcgtgc agatggccag540
- [0022] caccgtgttc tgggtgcgca ccccggtggt gaagcagata gccgtggtgc acgcctgggt600
- [0023] ctggttcaca cccagggcca aggcaacgcc accttctgtc tggccaacgt tggcaaggca660
- [0024] gtggatctgg gcacctggcg ctatagtctg gccgaagacc cgaagacca cgtgtggagt720
- [0025] ctgcagcgtg ccggtcaggc ctttaagtgg gcagccaatg ccgccgtgaa tgccgcagat780
- [0026] ctgagcagta tcgccctggc agaaagtaat gccctggaca agcgcctggg tgagctgcgt840
- [0027] ttacgtgcag acgcaggtgg tccgtgggca cgcacctca gcgaacgcca gcagatcage900
- [0028] aaccgtcatg cccgtgcata cgaccagacc gtgagcggcc tggagattgg tctggatcgt960
- [0029] ggttggagtg ccagcgggtg tcgctggtat gcaggtggtt tactgggcta cacctatgcc1020
- [0030] gaccgtacct atccgggcca tgggtggtgt aaggttaagg gcttacacgt gggcggctat1080
- [0031] gcagcatacg tgggcgacgg cggctactac ctggataccg ttctgctct gggccgctac1140
- [0032] gaccaacagt acaacatgc cggctacagac ggtggccgtg ttacagcca ctaccgtacc1200
- [0033] agcgggtgcag catggagttt agagggcggc cggcgttcg aactgccgaa cgactggttt1260
- [0034] gccgaaccgc aagccgaggt tatgctgtgg cgcaccagcg gcaaacgta ccgcgcaagc1320
- [0035] aatggcctgc gcgttaaggt ggatgccaat accgccacac tgggtcgtt aggttacgc1380
- [0036] ttggcgcgc gtattgcaact ggccgggtggc aatatcgtgc agccgtatgc ccgtctgggc1440
- [0037] tggaccagc agtttaagag caccggcgac gtgcgcacca atggtattgg ccatgcaggc1500
- [0038] gcaggtcgtc acggtcgtgt tgaactgggc gcaggtgtt acgcagcctt aggtaaaggc1560

- [0039] cacaacctgt acgcaagcta cgagtatgcc gccggtgacc gtatcaacat cccgtggagc1620  
[0040] ttccacgceg gttaccgtta cagcttttaa gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa1680  
[0041] gctgagttgg ctgctgccac cgctgagc1708  
[0042] <210>2  
[0043] <211>42  
[0044] <212>PRT  
[0045] <213> 人工序列  
[0046] <220>  
[0047] <223>  
[0048] <400>2  
[0049] Met Tyr Leu Asp Arg Phe Arg Gln Cys Pro Ser Ser Leu Gln Ile Pro  
[0050] 151015  
[0051] Arg Ser Ala Trp Arg Leu His Ala Leu Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ala  
[0052] 202530  
[0053] Gly Met Ala Arg Leu Ala Pro Ala Ala Ala  
[0054] 3540  
[0055] <210>3  
[0056] <211>187  
[0057] <212>PRT  
[0058] <213> 人工序列  
[0059] <220>  
[0060] <223>  
[0061] <400>3  
[0062] Ala Gly Ile Ser Leu Ser Val Ala Ser Gly Ala Ala Trp His Gly Ala  
[0063] 151015  
[0064] Thr Gln Val Leu Gln Ser Ala Thr Leu Gly Lys Gly Gly Thr Trp Val  
[0065] 202530  
[0066] Val Asn Ala Asp Ser Arg Val Gln Asp Met Ser Met Arg Gly Gly Arg  
[0067] 354045  
[0068] Val Glu Phe Gln Ala Pro Ala Pro Glu Ala Ser Tyr Lys Thr Leu Thr  
[0069] 505560  
[0070] Leu Gln Thr Leu Asp Gly Asn Gly Val Phe Val Leu Asn Thr Asn Val  
[0071] 65707580  
[0072] Ala Ala Gly Gln Asn Asp Gln Leu Arg Val Thr Gly Arg Ala Asp Gly  
[0073] 859095  
[0074] Gln His Arg Val Leu Val Arg Asn Ala Gly Gly Glu Ala Asp Ser Arg  
[0075] 100105110  
[0076] Gly Ala Arg Leu Gly Leu Val His Thr Gln Gly Gln Gly Asn Ala Thr  
[0077] 115120125

- [0078] Phe Arg Leu Ala Asn Val Gly Lys Ala Val Asp Leu Gly Thr Trp Arg  
[0079] 130135140
- [0080] Tyr Ser Leu Ala Glu Asp Pro Lys Thr His Val Trp Ser Leu Gln Arg  
[0081] 145150155160
- [0082] Ala Gly Gln Ala Leu Ser Gly Ala Ala Asn Ala Ala Val Asn Ala Ala  
[0083] 165170175
- [0084] Asp Leu Ser Ser Ile Ala Leu Ala Glu Ser Asn  
[0085] 180185
- [0086] <210>4
- [0087] <211>279
- [0088] <212>PRT
- [0089] <213>人工序列
- [0090] <220>
- [0091] <223>
- [0092] <400>4
- [0093] Ala Leu Asp Lys Arg Leu Gly Glu Leu Arg Leu Arg Ala Asp Ala Gly  
[0094] 151015
- [0095] Gly Pro Trp Ala Arg Thr Phe Ser Glu Arg Gln Gln Ile Ser Asn Arg  
[0096] 202530
- [0097] His Ala Arg Ala Tyr Asp Gln Thr Val Ser Gly Leu Glu Ile Gly Leu  
[0098] 354045
- [0099] Asp Arg Gly Trp Ser Ala Ser Gly Gly Arg Trp Tyr Ala Gly Gly Leu  
[0100] 505560
- [0101] Leu Gly Tyr Thr Tyr Ala Asp Arg Thr Tyr Pro Gly Asp Gly Gly Gly  
[0102] 65707580
- [0103] Lys Val Lys Gly Leu His Val Gly Gly Tyr Ala Ala Tyr Val Gly Asp  
[0104] 859095
- [0105] Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Leu Arg Leu Gly Arg Tyr Asp Gln  
[0106] 100105110
- [0107] Gln Tyr Asn Ile Ala Gly Thr Asp Gly Gly Arg Val Thr Ala Asp Tyr  
[0108] 115120125
- [0109] Arg Thr Ser Gly Ala Ala Trp Ser Leu Glu Gly Gly Arg Arg Phe Glu  
[0110] 130135140
- [0111] Leu Pro Asn Asp Trp Phe Ala Glu Pro Gln Ala Glu Val Met Leu Trp  
[0112] 145150155160
- [0113] Arg Thr Ser Gly Lys Arg Tyr Arg Ala Ser Asn Gly Leu Arg Val Lys  
[0114] 165170175
- [0115] Val Asp Ala Asn Thr Ala Thr Leu Gly Arg Leu Gly Leu Arg Phe Gly  
[0116] 180185190

- [0117] Arg Arg Ile Ala Leu Ala Gly Gly Asn Ile Val Gln Pro Tyr Ala Arg  
 [0118] 195200205  
 [0119] Leu Gly Trp Thr Gln Glu Phe Lys Ser Thr Gly Asp Val Arg Thr Asn  
 [0120] 210215220  
 [0121] Gly Ile Gly His Ala Gly Ala Gly Arg His Gly Arg Val Glu Leu Gly  
 [0122] 225230235240  
 [0123] Ala Gly Val Asp Ala Ala Leu Gly Lys Gly His Asn Leu Tyr Ala Ser  
 [0124] 245250255  
 [0125] Tyr Glu Tyr Ala Ala Gly Asp Arg Ile Asn Ile Pro Trp Ser Phe His  
 [0126] 260265270  
 [0127] Ala Gly Tyr Arg Tyr Ser Phe  
 [0128] 275  
 [0129] <210>5  
 [0130] <211>717  
 [0131] <212>DNA  
 [0132] <213> 人工序列  
 [0133] <220>  
 [0134] <223>  
 [0135] <400>5  
 [0136] atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac60  
 [0137] ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccaccta120  
 [0138] ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccac180  
 [0139] ctcgtgacca ccctgacctg cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag240  
 [0140] cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc300  
 [0141] ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg360  
 [0142] gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac420  
 [0143] aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac480  
 [0144] ggcataaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc540  
 [0145] gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac600  
 [0146] tacctgagca cccagtcgac cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgca tcacatggtc660  
 [0147] ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaag717  
 [0148] <210>6  
 [0149] <211>1539  
 [0150] <212>DNA  
 [0151] <213> 人工序列  
 [0152] <220>  
 [0153] <223>  
 [0154] <400>6  
 [0155] atgacacttg aaaaatttgt ggatgctctc ccaatcccag ataacactaaa gccagtacag60

[0156] caatcaaaag aaaaaacata ctacgaagtc accatggagg aatgcactca tcagctccat120  
[0157] cgcgatctcc ctccaacccg cctgtggggc tacaacggct tatttccggg accgaccatt180  
[0158] gaggttaaaa gaaatgaaaa cgtatatgta aaatggatga ataaccttcc ttccacgcat240  
[0159] ttccttccga ttgatcacac cattcatcac agtgacagcc agcatgaaga gcccagggt300  
[0160] aagactgttg ttcatttaca cggcggcgtc acgccagatg atagtgacgg gtatccggag360  
[0161] gcttggtttt ccaaagactt tgaacaaaca ggaccttatt tcaaaagaga ggtttatcat420  
[0162] tatecaaacc agcagcgcgg ggctatatg tggatcacg atcacgcat ggcgctcacc480  
[0163] aggctaaatg tctatgccgg acttgtcggg gcataataca ttcagacc aaaggaaaa540  
[0164] cgcttaaaac tgccttcaga cgaatacga gtgccgctt ttatcacaga ccgcacgatc600  
[0165] aatgaggatg gttctttgtt ttatccgagc gcaccgaaa acccttctcc gtcactgcct660  
[0166] aatccttcaa tegtccggc tttttgcgga gaaaccatac tcgtcaacgg gaaggtatgg720  
[0167] ccatacttg aagtcgagcc aaggaaatac cgattccgtg tcatcaacgc ctccaataca780  
[0168] agaacctata acctgtcact cgataatggc ggagatttta ttcagattgg ttcagatgga840  
[0169] gggctcctgc cgcgatctgt taaactgaat tctttcagcc ttgcgctgc tgaacgttac900  
[0170] gatatcatca ttgacttcac agcgtatgaa ggagaatcga tcattttggc aaacagcgcg960  
[0171] ggctgcggcg gtgacgtcaa tctgaaaca gatgcgaata tcatgcaatt cagagtcaca1020  
[0172] aaaccattgg cacaaaaaga cgaaagcaga aagccgaagt acctcgctc ataccttctg1080  
[0173] gtacagcatg aaagaataca aaacatcaga acgttaaaac tggcaggcac ccaggacga1140  
[0174] tacggcagac cegtcttct gcttaataac aaacgctggc acgatcccgt cacagaaaca1200  
[0175] ccaaaagtcg gcacaactga aatatggtcc attatcaacc cgacacgcgg aacacatccg1260  
[0176] atccacctgc atctagtctc cttccgtgta ttagaccggc ggccggttga tatcgcccgt1320  
[0177] tatcaagaaa gcggggaatt gtccataacc ggtccggctg tcccgccgc gccaaagtga1380  
[0178] aagggtgga aagacacat tcaagcgcgc gcaggtgaag tctgagaat cgcggcgaca1440  
[0179] ttcggtccgt acagcggacg atacgtatgg cattgccata ttctagagca tgaagactat1500  
[0180] gacatgatga gaccgatgga tataactgat cccataaa1539

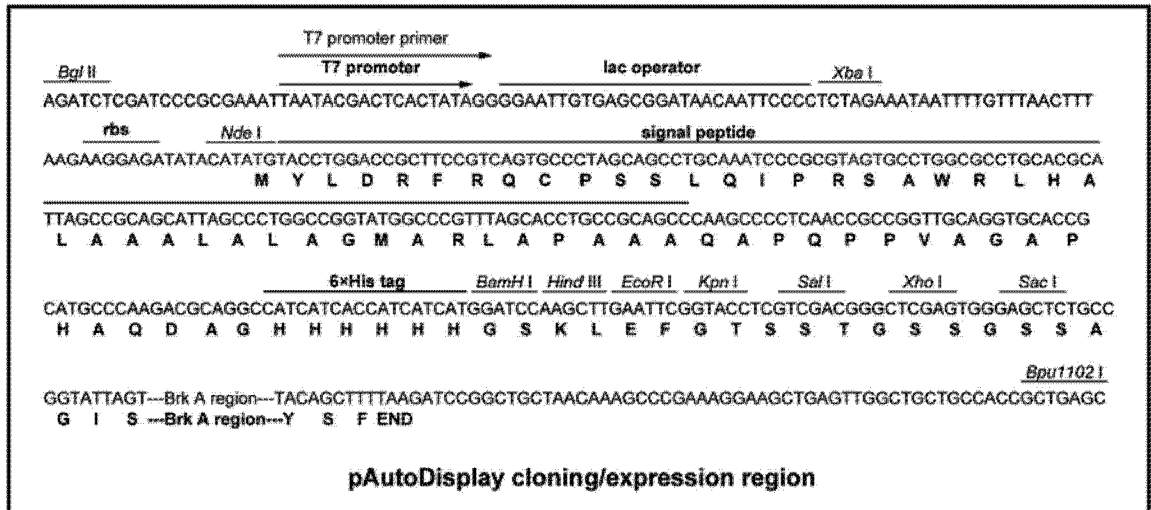
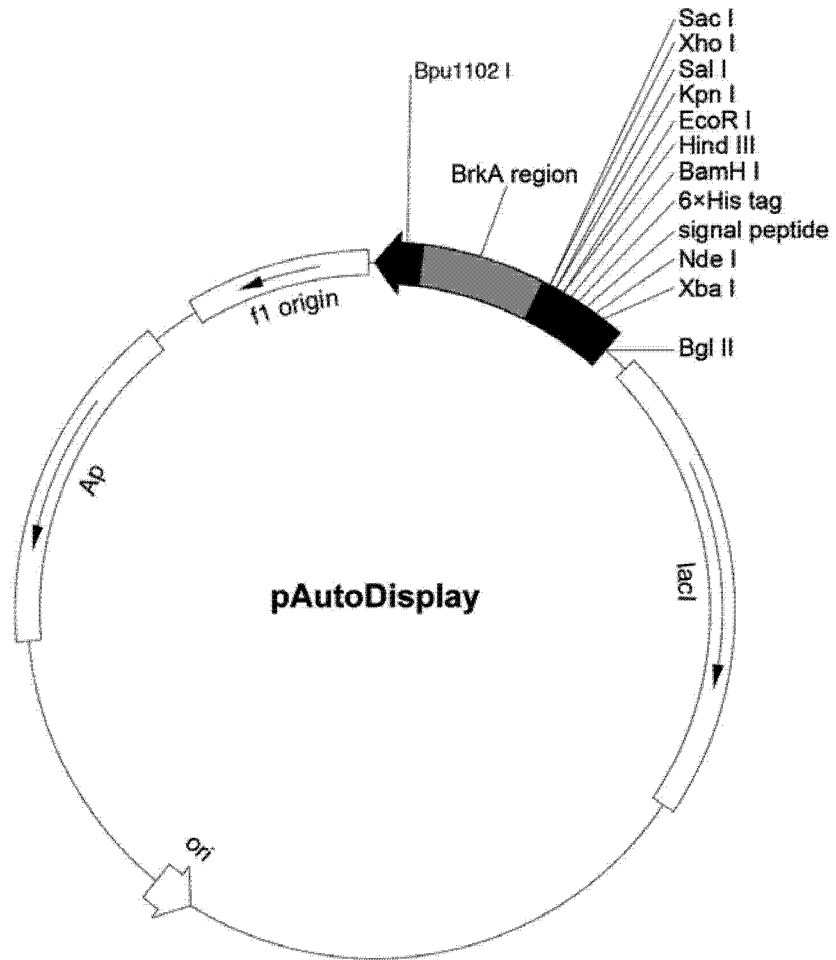


图 1

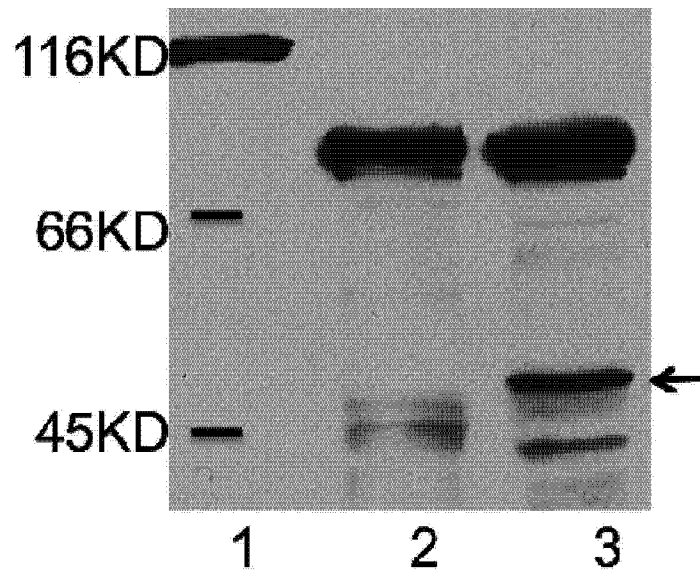


图 2



图 3

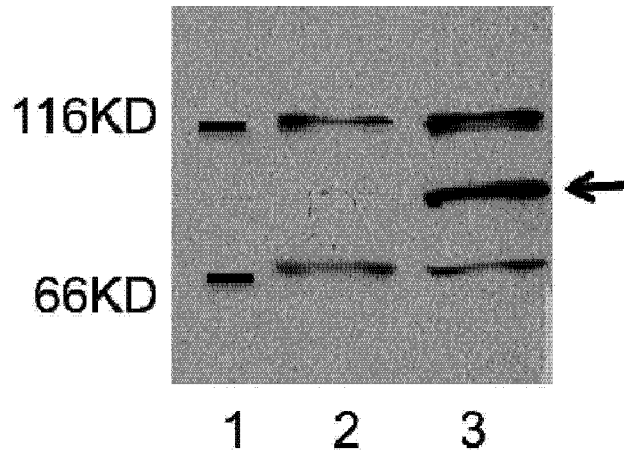


图 4

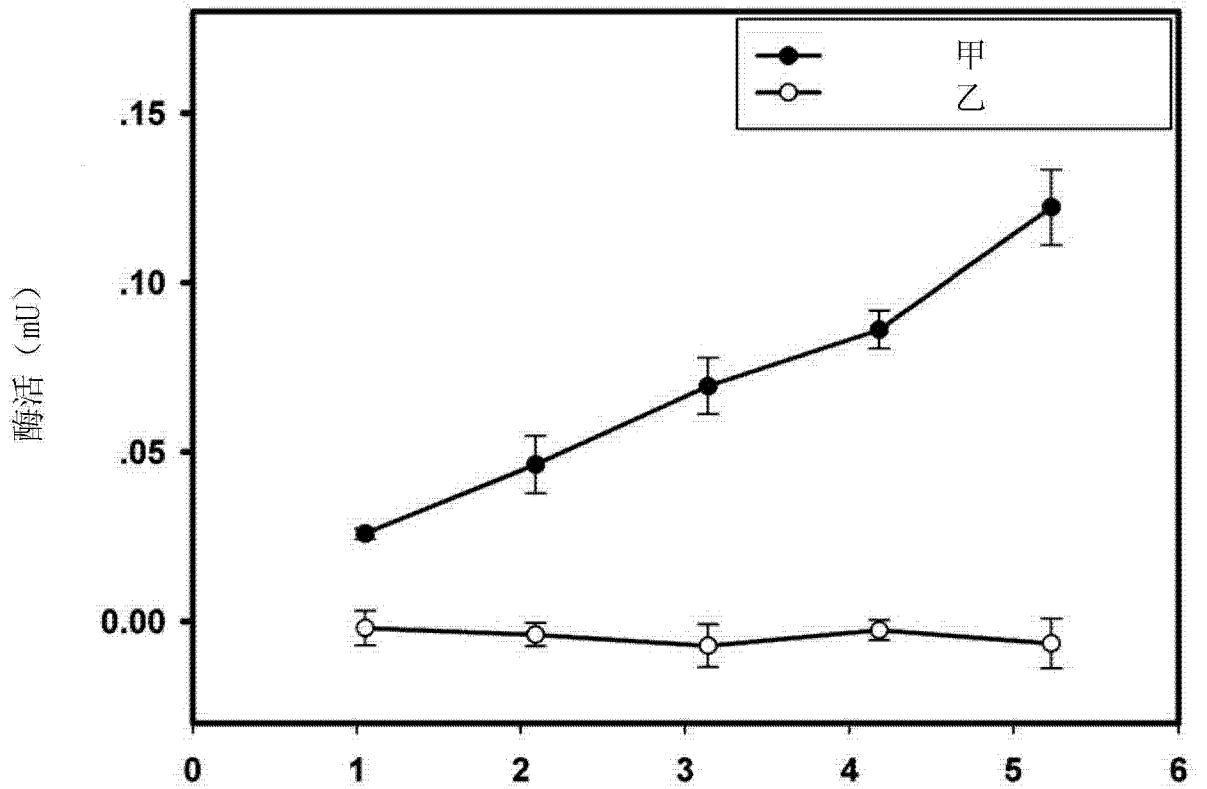


图 5