



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103534349 B

(45)授权公告日 2017.07.21

(21)申请号 201180058129.2

(22)申请日 2011.09.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103534349 A

(43)申请公布日 2014.01.22

(30)优先权数据

10185793.6 2010.10.01 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.05.31

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/067167 2011.09.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/042037 EN 2012.04.05

(83)生物保藏信息

DSM23706 2010.06.18

(73)专利权人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72)发明人 P·R·奥斯特加德

C·P·索恩克森 T·霍夫

G·B·林格莱夫

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 史悦

(51)Int.Cl.

C12N 9/50(2006.01)

A61K 38/01(2006.01)

C12P 21/06(2006.01)

审查员 黄利

权利要求书1页 说明书43页

序列表7页 附图1页

(54)发明名称

具有内肽酶活性的多肽以及编码其的多核苷酸

(57)摘要

本发明涉及具有内肽酶活性的多肽以及生产和使用该多肽的方法。本发明还涉及使用来源于细菌的胰蛋白酶样内肽酶制备食品蛋白水解物的方法。

1. 一种具有内肽酶活性的分离的多肽,其选自下组:
 - (a) 多肽,其由与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有100%序列同一性的氨基酸序列组成;
 - (b) 多肽,其由多核苷酸编码,所述多核苷酸由SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列组成;和
 - (c) 多肽,其由SEQ ID NO:2组成。
2. 权利要求1的多肽,其由质粒ExpVec8中包含的多核苷酸编码,所述质粒包含于大肠杆菌DSM 23706中。
3. 包含权利要求1或2的多肽的组合物。
4. 一种产生权利要求1或2的多肽的方法,包括:
 - (a) 在有助于多肽生产的条件下,培养包含编码权利要求1或2的多肽的多核苷酸的重组宿主细胞,该多核苷酸与指导所述多肽产生的一个或多个调控序列可操作连接;和
 - (b) 回收所述多肽。
5. 权利要求1或2的多肽或权利要求3的组合物用于制备蛋白水解物的用途。
6. 一种制备蛋白水解物的方法,包括:
 - (a) 提供包含待水解的蛋白的溶液;
 - (b) 将权利要求1或2的多肽或权利要求3的组合物添加至所述溶液;和
 - (c) 获得蛋白水解物。
7. 权利要求6的方法,其中待水解的蛋白是食品蛋白。
8. 权利要求7的方法,其中所述多肽是分离的胰蛋白酶样内肽酶。
9. 权利要求7或8的方法,其中所述多肽源自放线菌。
10. 权利要求7或8的方法,其中蛋白是乳蛋白。
11. 权利要求7或8的方法,其中蛋白是乳清蛋白。
12. 权利要求7或8的方法,其中在步骤(b)之前、过程中或之后将至少一种其他的内肽酶添加至所述溶液。
13. 权利要求12的方法,其中权利要求12所述的至少一种其他的内肽酶是细菌丝氨酸内肽酶,其具有比权利要求8所述的胰蛋白酶样内肽酶的特异性较低的活性。
14. 权利要求7或8的方法,其中食品蛋白水解物具有5-30%的水解度。
15. 权利要求1或2的多肽用于制备食品蛋白水解物的用途。

具有内肽酶活性的多肽以及编码其的多核苷酸

[0001] 涉及序列表

[0002] 本申请包含计算机可读形式的序列表。所述计算机可读形式通过提述并入本文。

[0003] 涉及生物材料的保藏

[0004] 本申请包含对生物材料的保藏的引用,该保藏通过提述并入本文。

[0005] 发明背景

发明领域

[0006] 本发明涉及具有内肽酶活性的多肽,以及生产和使用该多肽的方法。本发明还涉及制备蛋白水解物如食品蛋白水解物的方法。

[0007] 相关领域的描述

[0008] 胰蛋白酶(EC3.4.21.4)是在许多脊椎动物的消化系统中发现的一种丝氨酸蛋白酶,在其消化系统中胰蛋白酶水解蛋白质。胰蛋白酶主要在氨基酸赖氨酸和精氨酸的羧基端裂解肽链。胰蛋白酶大量存在于胰腺中,而且可以很容易地纯化。因此,胰蛋白酶广泛应用于各种生物工艺学方法中。胰蛋白酶用于婴幼儿食品中以预先消化它。胰蛋白酶可以分解蛋白质分子,其帮助幼儿消化蛋白质分子,因为幼儿的胃没有充分发育到能消化较大的蛋白质分子。胰蛋白酶可用于分解乳蛋白以提供部分乳蛋白水解物用于婴儿配制食品。例如,W093/04593和US5,039,532公开了胰腺胰蛋白酶制品用于生产低过敏原乳清蛋白水解物的应用。

[0009] 由于几种原因,在食品生产中,尤其是在幼儿食品或婴儿配制食品的生产中,使用来源于微生物如细菌的蛋白水解酶可带来益处。例如,可以容易地优化细菌酶类的生产以有效地并易于调控其生产。因此,可以大量地并高纯度地生产这些酶。并且,使用微生物酶将有助于克服在从动物来源提取酶方面与增加的质量保证相关的困难。

[0010] 本发明的一个目标是提供新的微生物蛋白酶用于可能的用途,例如,用于食品工业中。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明人惊人地发现许多细菌内肽酶具有裂解特异性,其与胰腺胰蛋白酶的裂解特异性非常类似。此外,这种细菌内肽酶可用于制备食品蛋白水解物,其具有与利用胰腺胰蛋白酶获得的食品蛋白水解物类似的特性,如类似的水解程度和/或类似的肽谱。

[0013] 更进一步地,本发明人已经鉴定了一种具有胰蛋白酶样活性的新的细菌内肽酶。

[0014] 本发明因此涉及具有内肽酶活性的分离的多肽,其选自:

[0015] (a) 多肽,其与SEQ ID NO:2的成熟的多肽具有至少70%序列同一性;

[0016] (b) 多肽,其由多核苷酸编码,所述多核苷酸在低严格条件下与以下杂交:(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列,(ii) 包含SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列的基因组DNA序列,或(iii) (i) 或(ii)的全长互补链;

[0017] (c) 多肽,其由多核苷酸编码,所述多核苷酸与SEQ ID NO:1的成熟的多肽编码序列具有至少70%序列同一性;

[0018] (d) SEQ ID NO:2的成熟多肽的包含一个或多个(几个)氨基酸的取代、缺失和/或插入的变体;和

[0019] (e) (a)、(b)、(c)或(d)的多肽的具有内肽酶活性的片段。

[0020] 本发明还涉及生产该多肽的方法。

[0021] 本发明还涉及该多肽用于制备蛋白水解物的方法。

[0022] 另一个方面,本发明涉及一种制备食品蛋白水解物的方法,包括:

[0023] (a) 提供包含待水解的食品蛋白的溶液;

[0024] (b) 将来源于细菌的胰蛋白酶样内肽酶添加至所述溶液;和

[0025] (c) 获得食品蛋白水解物。

[0026] 附图简述

[0027] 图1显示了ExpVec8的质粒图,其具有编码来自Kutzneria albida的胰蛋白酶样内肽酶的基因。

[0028] 图2显示了用来自Kutzneria albida的胰蛋白酶样内肽酶(上扫描线)或猪胰蛋白酶(下扫描线)水解的牛 α -乳清蛋白的UV色谱。

[0029] 定义

[0030] 内肽酶活性:术语“内肽酶活性”指蛋白质分解活性,其能水解肽中的任何肽键。但是,由于内肽酶常常具有涉及与几个氨基酸结合的催化位点,而且常常位于裂解位点的两端,因此与从肽的任意一端水解肽键的肽链端解酶相反,内肽酶通常偏好非末端肽键。内肽酶一般被分类为EC3.4.21-25。就本发明而言,可通过使用如实施例2中所述的Protazyme AK分析,测定内肽酶活性。

[0031] 本发明的多肽可具有SEQ ID NO:2的成熟多肽的内肽酶活性的至少20%,例如,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%,或至少100%。

[0032] 胰蛋白酶样内肽酶:术语“胰蛋白酶样内肽酶”或“具有胰蛋白酶样活性的内肽酶”本文定义为,优选在精氨酸和/或赖氨酸的L-异构体的C-末端裂解肽或蛋白质的内肽酶。在一个优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶优选在精氨酸和赖氨酸的C-末端裂解肽或蛋白质。这意味着内肽酶对精氨酸和赖氨酸具有高于任何其他氨基酸的裂解特异性。在另一个优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶优选在精氨酸或赖氨酸的C-末端裂解肽或蛋白质。这意味着内肽酶对精氨酸或赖氨酸具有高于任何其他氨基酸裂解特异性。在另一个优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶优选在精氨酸的C-末端裂解肽或蛋白质。这意味着内肽酶对精氨酸具有高于任何其他氨基酸的裂解特异性。在另一个优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶优选在赖氨酸的C-末端裂解肽或蛋白质。这意味着内肽酶对赖氨酸具有高于任何其他氨基酸的裂解特异性。

[0033] 胰蛋白酶比率:“胰蛋白酶比率”确定为,裂解Arg或Lys时的酶活性(无论哪个较大),除以裂解Ala,Asp,Glu,Ile,Leu,Met,Phe或Val的任何一个时的酶活性(无论哪个较大)。在一个优选的实施方案中,本发明的胰蛋白酶样内肽酶具有大于100的胰蛋白酶比率。也即,在一个优选的实施方案中,本发明的胰蛋白酶样内肽酶对Arg或Lys的裂解特异性(无论哪个较大),比对Ala,Asp,Glu,Ile,Leu,Met,Phe或Val的任何一个的裂解特异性(无论哪个较大)高至少100倍。在内肽酶的活性为在它的pH最佳时的内肽酶活性的至少一半时的pH值,进行这种活性测定以确定胰蛋白酶比率。可以如本申请实施例2中所述地确定胰蛋白酶

比率。

[0034] 分离的多肽:术语“分离的多肽”用于本文中指从来源分离的多肽。优选地,所述多肽如通过SDS-PAGE测定的,为至少1%纯,优选至少5%纯,更优选至少10%纯,更优选至少20%纯,更优选至少40%纯,更优选至少60%纯,甚至更优选至少80%纯,并且最优选至少90%纯。

[0035] 基本上纯的多肽:术语“基本上纯的多肽”在本文表示制备物,其含有按重量计至多10%,优选至多8%,更优选至多6%,更优选至多5%,更优选至多4%,更优选至多3%,甚至更优选至多2%,最优选至多1%,并且甚至最优选至多0.5%的与其天然或重组结合的(associated)的其它多肽材料。因此,优选所述基本上纯的多肽是按存在于制备物中的全部多肽材料的重量计至少92%纯,至少94%纯,至少95%纯,至少96%纯,至少97%纯,至少98%纯,至少99%纯,至少99.5%纯,或最优选100%纯。本发明的多肽优选是基本上纯的形式。例如,这能够通过以下实现:通过公知的重组方法或由经典纯化方法制备多肽。

[0036] 成熟多肽:术语“成熟多肽”意指以其在翻译和任何翻译后修饰之后的最终形式存在的多肽,所述修饰如N-末端加工、C-末端截短、糖基化、磷酸化等。在一个实施方案中,根据实施例2中所N-末端测序和分子量测定,成熟多肽是SEQ ID NO:2的氨基酸1至225。

[0037] 成熟多肽编码序列:术语“成熟多肽编码序列”意指编码具有内肽酶活性的成熟多肽的多核苷酸。在一个实施方案中,基于成熟多肽的氨基酸序列,成熟多肽编码序列可为SEQ ID NO:1的核苷酸1至675。在另一个实施方案中,成熟多肽编码序列可为SEQ ID NO:3的核苷酸82至756。

[0038] 同一性:参数“同一性”描述两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性。

[0039] 就本发明而言,两个氨基酸序列之间的同一性程度使用如EMBOSS软件包(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice等, 2000, Trends in Genetics 16:276-277)的Needle程序,优选3.0.0版或更高版本中执行的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453)来确定。使用的可选参数为缺口罚分(gap penalty) 10, 缺口延伸罚分(gap extension penalty) 0.5和EBL0SUM62(BL0SUM62的EMBOSS版)取代矩阵。使用Needle标记为“最高同一性(longest identity)”的输出结果(使用-nobrief选项获得)作为百分比同一性,并计算如下:

[0040] (同样的残基×100)/(比对长度-比对中缺口的总数)

[0041] 就本发明而言,两个核苷酸序列之间的同一性程度使用如EMBOSS软件包(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice等, 2000, 见上文)的Needle程序,优选3.0.0版或更高版本中执行的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch, 1970, 见上文)来确定。使用的可选参数为缺口罚分10, 缺口延伸罚分0.5和EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版)取代矩阵。使用Needle标记为“最高同一性”的输出结果(使用-nobrief选项获得)作为同一性百分比,并计算如下:

[0042] (同样的脱氧核糖核苷酸×100)/(比对长度-比对中缺口的总数)

[0043] 片段:术语“片段”意指具有从成熟多肽的氨基和/或羧基末端缺失一个或多个(几个)氨基酸的多肽;其中该片段具有内肽酶活性。在一个实施方案中,片段包括至少100个氨基酸残基,至少150个氨基酸残基,或至少200个氨基酸残基。

[0044] 亚序列:术语“亚序列”意指具有从成熟多肽编码序列的5'和/或3'末端缺失一个或多个(几个)核苷酸的多核苷酸;其中该亚序列编码具有内肽酶活性的片段。在一个实施方案中,亚序列包括至少300个核苷酸,例如,至少400个核苷酸,至少500个核苷酸,或至少600个核苷酸。

[0045] 等位变体:术语“等位变体”意指占据相同染色体位点的基因的任意两个或多个可选择形式。等位变异通过突变天然发生,而且可导致种群内的多态性。基因突变可以是沉默的(编码的多肽中没有变化),或者可编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位变体是由基因的等位变体编码的多肽。

[0046] 分离的多核苷酸:术语“分离的多核苷酸”指相对于天然发现的多核苷酸,被人为修饰的多核苷酸。在一个实施方案中,如通过琼脂糖电泳测定的,分离的多核苷酸是至少1%纯的,例如,至少5%纯的,优选至少10%纯的,至少20%纯的,至少40%纯的,至少60%纯的,至少80%纯的,至少90%纯的,或更优选至少95%纯的。多核苷酸可以是基因组,cDNA, RNA, 半合成,合成来源的或其任何组合。

[0047] 基本上纯的多核苷酸:术语“基本上纯的多核苷酸”指无其他的外来或不需要的核苷酸,并以适于遗传工程多肽生产系统中应用的形式多核苷酸制品。因此,基本上纯的多核苷酸,按重量计算,包含至多10%,至多8%,至多6%,至多5%,至多4%,至多3%,至多2%,至多1%,或至多0.5%与该多核苷酸天然或重组结合的其他多核苷酸材料。但是,基本上纯的多核苷酸可包括天然存在的5'和3'非翻译区,如启动子和终止子。优选所述多核苷酸是按重量计至少90%纯,例如,至少92%纯,至少94%纯,至少95%纯,至少96%纯,至少97%纯,至少98%纯,至少99%,或至少99.5%纯的。本发明所述多核苷酸优选为基本上纯的形式。

[0048] 编码序列:术语“编码序列”指直接指定多肽的氨基酸序列的多核苷酸。编码序列的边界一般由开放读框确定,其通常以ATG起始密码子或作为选择的起始密码子如GTG和TTG开始,并以终止密码子如TAA, TAG和TGA结束。编码序列可以是DNA, cDNA, 合成的或重组的多核苷酸。

[0049] cDNA:术语“cDNA”指可通过逆转录从获自真核细胞的成熟,剪切,mRNA分子制备的DNA分子。cDNA缺乏可存在于相应的基因组DNA中的内含子序列。开始的,初级RNA转录物是作为成熟的剪切mRNA出现之前,通过包括剪切的一系列步骤加工的mRNA的前体。

[0050] 核酸构建体:术语“核酸构建体”指单链或双链的核酸分子,其分离自天然存在的基因,或者被修饰以包含不会另外天然存在的方式的核酸片段,或者其是合成的。当核酸构建体包含本发明的编码序列表达所需的调控序列时,术语核酸构建体与术语“表达盒”是同义的。

[0051] 调控序列:术语“调控序列”指编码本发明的多肽的多核苷酸表达所需的所有组件。每个调控序列可以是编码多肽的多核苷酸天然的或外源的,或者彼此是天然的或外源的。这种调控序列包括,但不限于,前导序列,聚腺苷酸化序列,前肽序列,启动子,信号肽序列和转录终止子。至少,调控序列包括启动子,以及转录和翻译终止信号。调控序列可以拥有接头,以便引入特异性限制位点,其促进调控序列与编码多肽的多核苷酸的编码区的连接。

[0052] 可操作连接:术语“可操作连接”指其中相对于多核苷酸的编码序列,调控序列置

于合适位置的结构,以便调控序列指导编码序列的表达。

[0053] 表达:术语“表达”包括涉及多肽生产的任何包括,包括但不限于,转录,转录后修饰,翻译,翻译后修饰和分泌。

[0054] 表达载体:术语“表达载体”指线性或环状DNA分子,其包括编码多肽的多核苷酸,并与提供用于其表达的其他核苷酸可操作连接。

[0055] 宿主细胞:术语“宿主细胞”指易受转化,转染,转导等等的任何细胞类型,其具有包含本发明的多核苷酸的核酸构建体或表达载体。术语“宿主细胞”包括亲本细胞的任何后代,其由于复制期间发生的突变而不同于亲本细胞。

[0056] 变体:术语“变体”指具有内肽酶活性的多肽,其包含改变,即,在一个或多个(几个)位置取代、插入和/或缺失一个或多个(几个)氨基酸残基。取代指用不同的氨基酸代替占据某位置的氨基酸;缺失指除去占据某位置的氨基酸;插入指在占据某位置的氨基酸邻近增加1-3个氨基酸。

[0057] 发明详述

[0058] 具有内肽酶活性的多肽

[0059] 多肽

[0060] 本发明涉及具有内肽酶活性的分离的多肽,其选自:

[0061] (a) 多肽,其与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少70%序列同一性;

[0062] (b) 多肽,其由多核苷酸编码,所述多核苷酸在低严格条件下与以下杂交:(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列,(ii) 包含SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列的基因组DNA序列,或(iii) (i)或(ii)的全长互补链;

[0063] (c) 多肽,其由多核苷酸编码,所述多核苷酸与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列具有至少70%序列同一性;

[0064] (d) SEQ ID NO:2的成熟多肽的包含一个或多个(几个)氨基酸取代、缺失和/或插入的变体;和

[0065] (e) (a), (b), (c) 或 (d) 的多肽的具有内肽酶活性的片段。

[0066] 本发明涉及分离的多肽,其与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%序列同一性的,其具有内肽酶活性。在一个实施方案中,多肽与SEQ ID NO:2的成熟多肽相差不多于10个氨基酸,例如相差5个氨基酸,相差4个氨基酸,相差3个氨基酸,相差2个氨基酸,或相差1个氨基酸。

[0067] 本发明的多肽优选包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其等位变体,或由SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其等位变体组成;或为它们具有内肽酶活性的片段。在另一个实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:2的成熟多肽或由SEQ ID NO:2的成熟多肽组成。在另一个优选的实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:2的氨基酸1至225,或由SEQ ID NO:2的氨基酸1至225组成。

[0068] 本发明还涉及具有内肽酶活性的分离的多肽,其由多核苷酸编码,所述多核苷酸在非常低的严格条件,低严格条件,中等严格条件,中-高严格条件,高严格条件,或非常高的严格条件下,与以下杂交:(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列,(ii) 包含SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列的基因组DNA序列,或(iii) (i)或(ii)的全长互补链(J.Sambrook,

E.F.Fritsch和T.Maniatis,1989,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor,New York)。

[0069] SEQ ID NO:1的多核苷酸或其亚序列,以及SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其片段,可用于设计核酸探针以根据本领域公知的方法,从不同属或种的菌株鉴定和克隆编码具有内肽酶活性的多肽的DNA。特别是,按照标准Southern印迹方法,这种探针可用于与目标属或种的基因组或cDNA杂交,以便鉴定和分离其中相应的基因。这种探针可显著短于总序列,但是长度应当为至少14,例如,至少25,至少35,或至少70个核苷酸。优选地,核酸探针的长度为至少100个核苷酸,例如,至少200个核苷酸,至少300个核苷酸,至少400个核苷酸,至少500个核苷酸,或至少600个核苷酸。DNA和RNA探针都可以使用。一般对探针进行标记用于检测相应的基因(例如,用³²P,³H,³⁵S,生物素或抗生物素蛋白(avidin)标记)。这些探针涵盖于本发明中。

[0070] 因而,可从由这些其它菌株制备的基因组DNA或cDNA文库中筛选DNA,所述DNA与上述探针杂交并且编码具有内肽酶活性的多肽。可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,或通过其它分离技术分离来自这些其它菌株的基因组或其它DNA。可以将来自文库的DNA或分离的DNA转移至并且固定于硝化纤维素(nitrocellulose)或其它合适的载体材料。为了鉴定与SEQ ID NO:1,或其亚序列同源的克隆或DNA,将所述载体材料优选用于Southern印迹中。

[0071] 就本发明而言,杂交表示核苷酸序列在非常低至非常高的严格条件下与标记的核酸探针杂交,所述核酸探针对应于SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列;包含SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列的基因组DNA序列;其全长互补链;或它们的亚序列。可使用例如X射线片(X-ray film)检测在这些条件下与核酸探针杂交的分子。

[0072] 在一个实施方案中,核酸探针是SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列。在另一个实施方案中,核酸探针是SEQ ID NO:1的核苷酸1至200,核苷酸201至400,核苷酸401至600,或核苷酸401至625。在另一个实施方案中,核酸探针是编码SEQ ID NO:2的多肽或其片段的多核苷酸。在另一个优选的实施方案中,核酸探针是SEQ ID NO:1。在另一个实施方案中,核酸探针是包含于质粒ExpVec8中的多核苷酸,该质粒ExpVec8包含于大肠杆菌DSM23706中,其中该多核苷酸编码具有内肽酶活性的多肽。在另一个实施方案中,核酸探针是包含于质粒ExpVec8中的成熟多肽编码区,该质粒ExpVec8包含于大肠杆菌DSM23706中。

[0073] 对于长度至少100个核苷酸的长探针,非常低至非常高的严格条件定义为在42℃,在5X SSPE、0.3% SDS、200μg/ml已剪切并且变性的鲑精DNA中,以及对于非常低和低严格性为25%的甲酰胺,对于中等和中-高严格性为35%的甲酰胺,或对于高和非常高严格性为50%的甲酰胺,根据标准的Southern印迹步骤进行预杂交和杂交最佳12至24小时。使用2× SSC,0.2% SDS于45℃(非常低严格),50℃(低严格),55℃(中等严格),60℃(中-高严格),65℃(高严格)和70℃(非常高严格)将所述载体材料最终洗涤3次,每次15分钟。

[0074] 对于长度大约15个核苷酸至大约70个核苷酸的短探针,将严格条件定义为在比使用根据Bolton和McCarthy的计算法(1962,Proceedings of the National Academy of Sciences USA48:1390)计算的T_m低大约5℃至大约10℃,在0.9M NaCl,0.09M Tris-HCl pH7.6,6mM EDTA,0.5% NP-40,1× Denhardt 溶液,1mM焦磷酸钠(sodium pyrophosphate),1mM磷酸二氢钠(sodium monobasic phosphate),0.1mM ATP和0.2mg/ml的酵母RNA中,根

据标准的Southern印迹步骤进行预杂交和杂交最佳12至24小时。载体材料在6X SSC加0.1%SDS中最终洗涤一次15分钟,并使用6X SSC在比计算的 T_m 低5℃到10℃洗涤两次,每次15分钟。

[0075] 本发明还涉及具有内肽酶活性的分离的多肽,其由多核苷酸编码,所述多核苷酸与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%的序列同一性。

[0076] 本发明还涉及SEQ ID NO:2的成熟多肽或其同源序列的包含取代、缺失和/或插入一个或多个(几个)氨基酸的人工变体。优选地,氨基酸改变对性质是较不重要的(of a minor nature),即保守的氨基酸取代或插入,其不显著影响蛋白质的折叠和/或活性;小缺失,通常为1至大约30个氨基酸的小缺失;小的氨基或羧基末端延伸,如氨基末端甲硫氨酸残基;多至大约20-25个残基的小接头肽;或通过改变净电荷或其它功能来促进纯化的小延伸,如多组氨酸序列(poly histidine tract)、抗原表位(antigenic epitope)或结合域(binding domain)。

[0077] 保守取代的实例是在以下组之内:碱性氨基酸组(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸组(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸组(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸组(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸组(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)和小氨基酸组(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)。通常不改变比活性(specific activity)的氨基酸取代是本领域已知的,并且例如由H.Neurath和R.L.Hill,1979,于The Proteins, Academic Press, New York中描述。最普遍发生的交换是Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu和Asp/Gly。

[0078] 或者,氨基酸变化可为这样的性质,其使得所述多肽的物理化学性质改变。例如,氨基酸变化可改善多肽的热稳定性,改善其底物特异性,改变最适pH等。

[0079] 能够根据本领域已知的方法,例如定位诱变或丙氨酸分区诱变法(Cunningham和Wells,1989,Science244:1081-1085)来鉴定亲本多肽中的必需氨基酸。在后一技术中,将单一丙氨酸突变引入到分子中的每个残基,并且测试所得突变分子的内肽酶活性,优选胰蛋白酶样内肽酶活性,以鉴定对于所述分子的活性关键的氨基酸残基。同样参见Hilton等,1996,J.Biol.Chem.271:4699-4708。酶的活性部位或其它的生物相互作用也能够通过结构的物理分析而确定,如通过以下这些技术:如核磁共振、晶体学、电子衍射或光亲和标记,连同推定的接触位点氨基酸的突变来确定。参见例如de Vos等,1992,Science255:306-312;Smith等,1992,J.Mol.Biol.224:899-904;Wlodaver等,1992,FEBS Lett.309:59-64。还可以从与亲本多肽相关的多肽的同一性分析来推测必需氨基酸的身份(identity)。

[0080] 能够使用已知的诱变、重组和/或改组(shuffling)方法,然后是有关的筛选方法,例如那些由Reidhaar-Olson和Sauer,1988,Science241:53-57;Bowie和Sauer,1989,Proc.Natl.Acad. Sci.USA86:2152-2156;W095/17413;或W095/22625公开的那些方法来进行并测试单个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。能够使用的其它方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如,Lowman等,1991,Biochem.30:10832-10837;美国专利No.5,223,409;W092/06204)和区域定向的诱变(Derbyshire等,1986,Gene46:145;Ner等,1988,DNA7:127)。

[0081] 诱变/改组方法能够与高通量、自动化的筛选方法组合以检测由宿主细胞表达的

克隆的、诱变的多肽的活性 (Ness等, 1999, *Nature Biotechnology* 17:893-896)。能够从宿主细胞回收编码活性多肽的诱变的DNA分子, 并且使用本领域内标准方法快速测序。这些方法允许快速确定感兴趣的多肽中单个氨基酸残基的重要性。

[0082] SEQ ID NO:2的成熟多肽的氨基酸取代、缺失和/或插入的总数不大于10个, 例如, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8或9个。

[0083] 多肽可以是杂种多肽, 其中一个多肽的一部分融合到另一个多肽的一部分的N-末端或C-末端。

[0084] 多肽可以是融合多肽或可裂解的融合多肽, 其中另一个多肽融合到本发明多肽的N-末端或C-末端。通过把编码另一个多肽的多核苷酸融合到本发明多核苷酸上来生产融合多肽。生产融合多肽的技术是本领域已知的, 包括连接编码多肽的编码序列以便它们处于框中, 而且融合多肽的表达处于相同启动子和终止子的调控下。也可以使用翻译后产生融合体的内蛋白技术来构建融合蛋白 (Cooper等, 1993, *EMBO J.* 12:2575-2583; Dawson等, 1994, *Science* 266:776-779)。

[0085] 融合多肽可另外包括两个多肽之间的切割位点。融合蛋白分泌以后, 切割位点以释放两个多肽。切割位点的例子包括, 但不限于, Martin等, 2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 3:568-576; Svetina等, 2000, *J. Biotechnol.* 76:245-251; Rasmussen-Wilson等, 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3488-3493; Ward等, 1995, *Biotechnology* 13:498-503; 和Contreras等, 1991, *Biotechnology* 9:378-381; Eaton等, 1986, *Biochemistry* 25:505-512; Collins-Racie等, 1995, *Biotechnology* 13:982-987; Carter等, 1989, *Proteins: Structure, Function and Genetics* 6:240-248和Stevens, 2003, *Drug Discovery World* 4:35-48中公开的那些位点。

[0086] 优选地, 本发明的多肽是胰蛋白酶样内肽酶。

[0087] 具有内肽酶活性的多肽的来源

[0088] 本发明的具有内肽酶活性的多肽可以从任何属的微生物获得。就本发明而言, 本文使用的与给定来源相关的术语“获得自”意思是由多核苷酸编码的多肽由所述来源或由其中插入了来自所述来源的多核苷酸的菌株产生。在一个优选的方面, 获得自给定来源的多肽是胞外分泌的。

[0089] 多肽可以是细菌多肽。例如, 所述多肽可为具有内肽酶活性的革兰氏阳性细菌多肽如Actinocynnema、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、梭菌属 (*Clostridium*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、地芽孢杆菌属 (*Geobacillus*)、Kribbella、库兹勒氏菌属 (*Kutzneria*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、海洋芽孢杆菌属 (*Oceanobacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 多肽; 或革兰氏阴性细菌多肽, 如弯曲杆菌属 (*Campylobacter*)、大肠杆菌、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、泥杆菌属 (*Ilyobacter*)、奈瑟氏菌属 (*Neisseria*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)或脲原体属 (*Ureaplasma*) 多肽。

[0090] 在一个优选的方面, 所述多肽是嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus*

coagulans)、坚强芽孢杆菌 (*Bacillus firmus*)、灿烂芽孢杆菌 (*Bacillus lautus*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 或苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 多肽。

[0091] 在另一个优选的方面,所述多肽是似马链球菌 (*Streptococcus equisimilis*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*) 或马链球菌兽瘟亚种 (*Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*) 多肽。

[0092] 在另一个优选的方面,所述多肽是不产色链霉菌 (*Streptomyces achromogenes*)、除虫链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*)、天蓝链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)、灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 或浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 多肽。

[0093] 多肽也可真菌多肽,例如,多肽可为酵母多肽如假丝酵母属 (*Candida*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、酵母属 (*Saccharomyces*)、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 或西洋蓍霉属 (*Yarrowia*) 多肽;或丝状真菌多肽如枝顶孢霉属 (*Acremonium*)、伞菌属 (*Agaricus*)、链格孢属 (*Alternaria*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、短梗霉属 (*Aureobasidium*)、*Botryosphaeria*、拟蜡菌属 (*Ceriporiopsis*)、毛喙壳属 (*Chaetomidium*)、金孢子菌属 (*Chrysosporium*)、*Clayiceps*、*Cochliobolus*、鬼伞属 (*Coprinopsis*)、*Coptotermes*、棒囊壳属 (*Corynascus*)、隐丛赤壳菌属 (*Cryphonectria*)、隐球菌属 (*Cryptococcus*)、色二孢属 (*Diplodia*)、黑耳属 (*Exidia*)、*Filibasidium*、镰孢属 (*Fusarium*)、赤霉属 (*Gibberella*)、全鞭毛虫属 (*Holomastigotoides*)、腐质霉属 (*Humicola*)、耙齿菌属 (*Irpex*)、蘑菇属 (*Lentinula*)、*Leptosphaeria*、梨孢菌属 (*Magnaporthe*)、*Melanocarpus*、多孔菌属 (*Meripilus*)、毛霉属 (*Mucor*)、毁丝霉属 (*Myceliophthora*)、新考玛脂霉属 (*Neocallimastix*)、脉孢菌属 (*Neurospora*)、拟青霉属 (*Paecilomyces*)、青霉属 (*Penicillium*)、平革菌属 (*Phanerochaete*)、瘤胃壶菌属 (*Piromyces*)、*Poitrasia*、假黑盘菌属 (*Pseudoplectania*)、*Pseudotrichonympha*、根毛霉属 (*Rhizomucor*)、裂褶菌属 (*Schizophyllum*)、柱顶孢属 (*Scytalidium*)、踝节菌属 (*Talaromyces*)、嗜热子囊菌属/嗜热霉属 (*Thermoascus*)、梭孢壳属 (*Thielavia*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*)、木霉属 (*Trichoderma*)、长毛盘菌属 (*Trichophaea*)、轮枝孢属 (*Verticillium*)、包脚菇属 (*Volvariella*) 或炭角菌属 (*Xylaria*) 多肽。

[0094] 在一个优选的方面,所述多肽是卡尔酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、糖化酵母 (*Saccharomyces diastaticus*)、道格拉氏酵母 (*Saccharomyces douglasii*)、克鲁弗酵母 (*Saccharomyces kluyveri*)、诺地酵母 (*Saccharomyces norbensis*) 或卵形酵母 (*Saccharomyces oviformis*) 多肽。

[0095] 在另一优选的方面,所述多肽是解纤维枝顶孢霉 (*Acremonium cellulolyticus*)、棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*)、泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*)、日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、*Chrysosporium inops*、嗜角质金孢子菌 (*Chrysosporium keratinophilum*)、*Chrysosporium lucknowense*、*Chrysosporium merdarium*、毡金孢子菌

(*Chrysosporium pannicola*)、*Chrysosporium queenslandicum*、热带金孢子菌(*Chrysosporium tropicum*)、*Chrysosporium zonatum*、杆孢状镰孢(*Fusarium bactridioides*)、禾谷镰孢(*Fusarium cerealis*)、库威镰孢(*Fusarium crookwellense*)、大刀镰孢(*Fusarium culmorum*)、禾本科镰孢(*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢(*Fusarium graminum*)、异孢镰孢(*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢(*Fusarium negundi*)、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢(*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢(*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢(*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢(*Fusarium sarcochroum*)、拟分枝孢镰孢(*Fusarium sporotrichioides*)、硫色镰孢(*Fusarium sulphureum*)、圆镰孢(*Fusarium torulosum*)、拟丝孢镰孢(*Fusarium trichothecioides*)、镶片镰孢(*Fusarium venenatum*)、灰腐质霉(*Humicola grisea*)、特异腐质霉(*Humicola insolens*)、疏棉状腐质霉(*Humicola lanuginosa*)、白耙齿菌(*Irpex lacteus*)、米黑毛霉(*Mucor miehei*)、嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)、产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)、黄孢平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、*Thielavia achromatica*、*Thielavia albomyces*、*Thielavia albopilosa*、澳洲梭孢壳(*Thielavia australeinsis*)、*Thielavia fimeti*、小孢梭孢壳(*Thielavia microspora*)、卵孢梭孢壳(*Thielavia ovispora*)、*Thielavia peruviana*、毛梭孢壳(*Thielavia setosa*)、瘤孢梭孢壳(*Thielavia spededonium*)、*Thielavia subthermophila*、土生梭孢霉(*Thielavia terrestris*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、康宁木霉(*Trichoderma koningii*)、长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)或绿色木霉(*Trichoderma viride*)多肽。

[0096] 在一个优选的实施方案中,多肽是库兹勒氏菌属多肽,例如,获得自*Kutzneria albida*的多肽,例如,获得自*Kutzneria albida* ATCC25243(可从ATCC保藏中心获得)的多肽。

[0097] 可理解的是对于前述的种,本发明包含完全和不完全阶段(perfect and imperfect states),和其它分类学的等同物(equivalent),例如无性型(anamorph),而无论它们已知的种名。本领域的技术人员会容易地识别适合的等同物的身份(identity)。

[0098] 这些种的菌株在许多培养物保藏机构对于公众能够容易地取得,所述保藏机构如美国典型培养物保藏中心(the American Type Culture Collection)(ATCC)、德意志微生物和细胞培养物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)(DSMZ)、真菌菌种保藏中心(Centraalbureau voor Schimmelcultures)(CBS)和农业研究机构专利培养物保藏中心北区研究中心(Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center)(NRRL)。

[0099] 此外,可以使用上述的探针从其它来源,包括从自然界(例如,土壤、堆肥、水等)分离的微生物鉴定和获得这些多肽。用于从天然生境(habitat)分离微生物的技术是本领域内公知的。随后可通过相似地筛选这种微生物的基因组或cDNA文库来获得所述多核苷酸。一旦用所述探针检测到编码多肽的多核苷酸,就能够使用本领域普通技术人员熟知的技术将所述多核苷酸分离或克隆(参见,例如,Sambrook等,1989,见上)。

[0100] 核酸构建体

[0101] 本发明还涉及包含编码本发明多肽的多核苷酸的核酸构建体,该多核苷酸与一个或多个(几个)调控序列可操作连接,所述调控序列在与调控序列相容的条件下在合适的宿主细胞中指导编码序列的表达。

[0102] 可以多种方式对多核苷酸进行操作以供多肽的表达。依赖于表达载体,在将多核苷酸的序列插入载体之前对其进行操作可能是理想的或必需的。使用重组DNA方法修饰多核苷酸序列的技术是本领域熟知的。

[0103] 调控序列可为启动子序列,其是由用于表达编码本发明多肽的多核苷酸的宿主细胞识别的核苷酸序列。启动子序列含有介导多肽的表达的转录调控序列。启动子可以是在所选的宿主细胞中显示转录活性的任何多核苷酸,包括突变的、截短的和杂合的启动子,并且可以从编码与宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。

[0104] 用于指导本发明的核酸构建体转录,特别是在细菌宿主细胞中转录的合适启动子的实例是从下述获得的启动子:解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyQ)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyL)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因(penP)、嗜热脂肪芽孢杆菌产麦芽淀粉酶基因(amyM)、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因(sacB)、枯草芽孢杆菌xylA和xylB基因、大肠杆菌lac操纵子、天蓝链霉菌琼脂糖酶基因(dagA)和原核 β -内酰胺酶基因(Villa-Kamaroff等,1978,Proceedings of the National Academy of Sciences USA75:3727-3731),以及tac启动子(DeBoer等,1983,Proceedings of the National Academy of Sciences USA80:21-25)。另外的启动子在"Useful proteins from recombinant bacteria"于Scientific American,1980,242:74-94中;和在Sambrook等,1989,见上中描述。

[0105] 用于指导本发明的核酸构建体在丝状真菌宿主细胞中转录的合适启动子的实例是从下列酶的基因获得的启动子:构巢曲霉乙酰胺酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡萄糖淀粉酶(glaA)、米曲霉TAKA淀粉酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶(W096/00787)、镶片镰孢淀粉葡萄糖苷酶(W000/56900)、镶片镰孢Daria(W000/56900)、镶片镰孢Quinn(W000/56900)、曼赫根毛霉脂肪酶、曼赫根毛霉(Rhizomucor miehei)天冬氨酸蛋白酶、里氏木霉 β -葡萄糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶I、里氏木霉纤维二糖水解酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶I、里氏木霉内切葡聚糖酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶III、里氏木霉内切葡聚糖酶IV、里氏木霉内切葡聚糖酶V、里氏木霉木聚糖酶I、里氏木霉木聚糖酶II、里氏木霉 β -木糖苷酶,以及NA2-tpi启动子(一种修饰的启动子,其包含编码曲霉中的中性 α -淀粉酶的基因,其中非翻译前导序列已由来自编码曲霉中的丙糖磷酸异构酶的基因的非翻译前导序列取代;非限制性实例包括修饰的启动子,其包含编码黑曲霉中的中性 α -淀粉酶的基因,其中非翻译的前导序列已由来自编码构巢曲霉或米曲霉中的丙糖磷酸异构酶的基因的非翻译前导序列取代);和它们的突变的、截短的和杂合的启动子。

[0106] 在酵母宿主中,有用的启动子从如下酶的基因获得:酿酒酵母烯醇化酶(ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶(GAL1)、酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶(ADH1,ADH2/GAP)、酿酒酵母丙糖磷酸异构酶(TPI)、酿酒酵母金属硫蛋白(CUP1)和酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶。对于酵母宿主细胞有用的其它启动子由Romanos等,1992,Yeast8:423-488描述。

[0107] 调控序列也可以是合适的转录终止子序列,其由宿主细胞识别以终止转录。终止子序列与编码多肽的多核苷酸的3'-末端可操作连接。在选择的宿主细胞中发挥功能的任

何终止子都可以用于本发明中。

[0108] 优选用于丝状真菌宿主细胞的终止子获自构巢曲霉氨基苯甲酸合酶,黑曲霉葡萄糖淀粉酶,黑曲霉 α -葡萄糖苷酶,米曲霉TAKA淀粉酶和尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶的基因。

[0109] 对于酵母宿主细胞优选的终止子从如下酶的基因获得:酿酒酵母烯醇化酶、酿酒酵母细胞色素C(CYC1)和酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶。对于酵母宿主细胞有用的其它终止子由Romanos等,1992,见上描述。

[0110] 调控序列还可以是合适的前导序列,在翻译时,其是对于宿主细胞的翻译重要的mRNA非翻译区。前导序列可操作地连接于编码多肽的多核苷酸的5'-末端。可以施用在所选宿主细胞中有功能的任何前导序列。

[0111] 对于丝状真菌宿主细胞优选的前导序列从如下酶的基因获得:米曲霉TAKA淀粉酶和构巢曲霉丙糖磷酸异构酶。

[0112] 对于酵母宿主细胞合适的前导序列从如下酶的基因获得:酿酒酵母烯醇化酶(ENO-1)、酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母 α 因子和酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶(ADH2/GAP)。

[0113] 调控序列也可以是聚腺苷酸化序列,其是与多核苷酸的3'末端可操作地连接的序列,并且在转录时,宿主细胞将其识别为向转录的mRNA添加聚腺苷残基的信号。可以使用在所选宿主细胞中有功能的任何聚腺苷酸化序列。

[0114] 对于丝状真菌宿主细胞优选的聚腺苷酸化序列从如下酶的基因获得:米曲霉TAKA淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶和黑曲霉 α -葡萄糖苷酶。

[0115] 对于酵母宿主细胞有用的聚腺苷酸化序列由Guo和Sherman,1995,Mol.Cellular Biol.15:5983-5990描述。

[0116] 调控序列还可以是信号肽编码区,其编码与多肽的N末端相连的信号肽,并且指导多肽进入细胞分泌途径。多核苷酸的编码序列5'端可固有地包含信号肽编码序列,该信号肽编码序列与编码多肽的编码序列区段一起天然地连接在翻译阅读框中。或者,编码序列5'端可含有对于所述编码序列为外源的信号肽编码序列。外源信号肽编码序列在编码序列不天然地含有信号肽编码序列时可为必需的。或者,外源信号肽编码序列可以简单地取代天然信号肽编码序列以增强多肽的分泌。然而,可以使用指导表达的多肽进入所选宿主细胞的分泌途径的任何信号肽编码序列。

[0117] 对于细菌宿主细胞有效的信号肽编码序列是从如下酶的基因获得的信号肽编码序列:芽孢杆菌属NCIB11837产麦芽糖淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草蛋白酶(subtilisin)、地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT,nprS,nprM)和枯草芽孢杆菌prxA。另外的信号肽由Simonen和Palva,1993, Microbiological Reviews57:109-137描述。

[0118] 对于丝状真菌宿主细胞有效的信号肽编码序列是从如下酶的基因获得的信号肽编码序列:黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、米曲霉TAKA淀粉酶、特异腐质霉纤维素酶、特异腐质霉内切葡聚糖酶V、疏棉状腐质霉脂肪酶和曼赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶。

[0119] 对于酵母宿主细胞有用的信号肽从酿酒酵母 α 因子和酿酒酵母转化酶的基因获得。其它有用的信号肽编码序列由Romanos等,1992,见上描述。

[0120] 调控序列还可以是前肽编码序列,其编码位于多肽N末端的前肽。所得多肽称为酶原(proenzyme)或前多肽(propolypeptide)(或在某些情况下称为酶原(zymogen))。前多肽通常是无活性的并且能够通过从前多肽催化或自催化切割所述前肽而转化为活性多肽。前肽编码序列可从如下酶的基因获得:枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶(aprE)、枯草芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT)、热毁丝霉漆酶(W095/33836)、曼赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶和酿酒酵母 α 因子。

[0121] 当信号肽和前肽序列二者均出现在多肽的N末端时,使前肽序列的位置紧接着(next to)多肽N末端,并且使信号肽序列的位置紧接着前肽序列的N末端。

[0122] 同样理想的是添加调节序列,其允许相对于宿主细胞的生长来调节多肽的表达。调节系统的实例是引起基因表达响应化学或物理刺激物,包括调节化合物的存在而开启或关闭的那些系统。原核系统中的调节系统包括lac、tac和trp操纵基因系统。在酵母中,可以使用ADH2系统或GAL1系统。在丝状真菌中,可以使用黑曲霉葡萄糖淀粉酶启动子、米曲霉TAKA α -淀粉酶启动子、和米曲霉葡萄糖淀粉酶启动子。调节序列的其它实例是那些允许基因扩增的序列。在真核系统中,这些调节序列包括在氨甲蝶呤(methotrexate)存在下扩增的二氢叶酸还原酶基因,和以重金属(with heavy metal)扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况下,编码多肽的多核苷酸与调节序列可操作地连接。

[0123] 表达载体

[0124] 本发明还涉及重组表达载体,所述重组表达载体包含编码本发明多肽的多核苷酸、启动子和转录和翻译终止信号。多种核苷酸和调控序列可以结合在一起以产生重组表达载体,所述表达载体可以包括一个或多个(数个)方便的限制位点以允许在这些位点插入或取代编码多肽的多核苷酸。可供选择的是,可以通过在适当的用于表达的载体中插入包含所述序列的多核苷酸或核酸构建体来表达多核苷酸。在制备表达载体的过程中,将编码序列置于载体中,从而将该编码序列与适当的表达用调控序列可操作地连接。

[0125] 重组表达载体可以是任何载体(例如,质粒或病毒),其能够方便地进行重组DNA步骤,并且能够产生多核苷酸的表达。载体的选择将通常依赖于载体与将引入该载体的宿主细胞的相容性。载体可以是线状或闭合环状质粒。

[0126] 载体可以是自主复制载体,即,作为染色体外实体(entity)存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如,质粒、染色体外元件、微型染色体(minichromosome)或人工染色体。载体可以含有任何用于确保自复制的手段(means)。或者,载体可以是一种当被引入宿主细胞中时,整合到基因组中并且与整合了该载体的染色体一起复制的载体。此外,可以使用单独的载体或质粒或两个或更多个载体或质粒,其共同含有待引入宿主细胞基因组的完整DNA(total DNA),或可以使用转座子(transposon)。

[0127] 载体优选地含有一个或多个(数个)选择性标记,其允许简单选择经转化、转染、转导等的细胞。选择性标记是基因,其产物提供杀生物剂或病毒抗性、对重金属的抗性、对营养缺陷型的原养性(prototrophy to auxotrophs)等。

[0128] 细菌选择性标记的实例是来自枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的dal基因,或赋予抗生素抗性的标记,所述抗生素抗性如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素或四环素抗性。对于酵母宿主细胞合适的标记是ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1和URA3。用于丝状真菌宿主细胞的选择性标记包括但不限于amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、bar(草

铵磷(phosphinothricin)乙酰转移酶)、hph(潮霉素磷酸转移酶)、niaD(硝酸还原酶)(nitrate reductase)、pyrG(乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶)(orotidine-5'-phosphate decarboxylase)、sC(硫酸腺苷酰转移酶)和trpC(邻氨基苯甲酸合酶(anthranilate synthase))以及它们的等同物。优选用在曲霉属细胞中的是构巢曲霉或米曲霉的amdS和pyrG基因和吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的bar基因。

[0129] 载体优选含有元件,其允许载体整合入宿主细胞基因组或允许载体在细胞中独立于基因组自主复制。

[0130] 为了整合入宿主细胞基因组,载体可依赖编码多肽的多核苷酸的序列或用于通过同源或非同源重组整合入基因组的任何其它载体元件。或者,载体可以含有额外的多核苷酸,用于指导通过同源重组整合入宿主细胞基因组染色体中的精确位置。为了增加在精确位置整合的可能性,整合元件应含有足够数量的核酸,如100至10,000碱基对、400至10,000碱基对、和800至10,000碱基对,其与相应的目标序列具有高度序列同一性以增强同源重组的概率。整合元件可以是任何序列,其与宿主细胞基因组中的目标序列同源。此外,整合元件可以是非编码或编码的多核苷酸。另一方面,可以将载体通过非同源重组整合到宿主细胞的基因组中。

[0131] 为了自主复制,载体可以还包含复制起点,其使载体能够在所述的宿主细胞中自主地复制。复制起点可以是介导自主复制的任何质粒复制子(replicator),其在细胞中发挥功能。术语“复制起点”或“质粒复制子”意指能够使质粒或载体体内复制的多核苷酸。

[0132] 细菌复制起点的实例是允许在大肠杆菌中复制的质粒pBR322、pUC19、pACYC177和pACYC184的复制起点,和允许在芽孢杆菌属中复制的质粒pUB110、pE194、pTA1060和pAMB1的复制起点。

[0133] 用于酵母宿主细胞中的复制起点的实例是2微米复制起点,ARS1,ARS4,ARS1和CEN3的组合,和ARS4和CEN6的组合。

[0134] 在丝状真菌细胞中有用的复制起点的实例是AMA1和ANS1 (Gems等,1991, Gene 98: 61-67; Cullen等,1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; W000/24883)。分离AMA1基因和构建包含该基因的质粒或载体能够根据W000/24883中公开的方法完成。

[0135] 可以将多于一个拷贝的本发明的多核苷酸插入宿主细胞以增加多肽的产生。多核苷酸拷贝数的增加可通过如下方法获得:将至少一个额外拷贝的序列整合入宿主细胞基因组,或将可扩增的选择性标记基因包括于多核苷酸,其中可通过在合适的选择剂(selectable agent)存在下培养细胞来选择含有选择性标记基因的扩增拷贝,从而也含有多核苷酸的额外拷贝的细胞。

[0136] 用于连接上述元件以构建本发明的重组表达载体的方法是本领域技术人员熟知的(参见,例如, Sambrook等,1989, 见上)。

[0137] 宿主细胞

[0138] 本发明还涉及重组宿主细胞,其包含编码本发明多肽的多核苷酸可操作地连接于一个或多个(几个)调控序列,其指导本发明的多肽的产生。将包含多核苷酸的构建体或载体引入宿主细胞从而将所述载体作为染色体整合体或作为自复制的染色体外载体保持,如前文所述。术语“宿主细胞”包含亲本细胞的任何子代,其因为在复制过程中发生的突变而与该亲本细胞不同。宿主细胞的选择在很大程度上会依赖于编码多肽的基因及其来源。

[0139] 宿主细胞可以是在本发明的多肽的重组产生中有用的任何细胞,例如,原核或真核细胞。

[0140] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包括但不限于,芽孢杆菌属、梭菌属、肠球菌属、地芽孢杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、海洋芽孢杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属和链霉菌属。革兰氏阴性细菌包括但不限于,弯曲杆菌属、大肠杆菌、黄杆菌属、梭杆菌属、螺杆菌属、泥杆菌属、奈瑟氏菌属、假单胞菌属、沙门氏菌属和脉原体属。

[0141] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌细胞,其包括但不限于,嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌细胞。

[0142] 细菌宿主细胞还可以是任何链球菌属细胞,其包括但不限于,似马链球菌、酿脓链球菌、乳房链球菌和马链球菌兽瘟亚种细胞。

[0143] 细菌宿主细胞还可以是任何链霉菌属细胞,其包括但不限于,不产色链霉菌、除虫链霉菌、天蓝链霉菌、灰色链霉菌和浅青紫链霉菌细胞。

[0144] 可通过如下方法实现将DNA引入到芽孢杆菌属细胞:例如原生质体转化(参见,例如,Chang和Cohen,1979,Mol.Gen.Genet.168:111-115),使用感受态细胞(参见,例如,Young和Spizizen,1961,J.Bacteriol.81:823-829或Dubnau和Davidoff-Abelson,1971,J.Mol.Biol.56:209-221),电穿孔(参见,例如,Shigekawa和Dower,1988,Biotechniques6:742-751)或接合(参见,例如,Koehler和Thorne,1987,J.Bacteriol.169:5271-5278)。可通过如下方法实现将DNA引入到大肠杆菌细胞:例如原生质体转化(参见,例如,Hanahan,1983,J.Mol.Biol.166:557-580)或电穿孔(参见,例如,Dower等,1988,Nucleic Acids Res.16:6127-6145)。可通过如下方法实现将DNA引入到链霉菌属细胞:例如原生质体转化和电穿孔(参见,例如,Gong等,2004,Folia Microbiol. (Praha) 49:399-405),接合(参见,例如,Mazodier等,1989,J.Bacteriol.171:3583-3585),或转导(参见,例如,Burke等,2001,Proc.Natl.Acad.Sci.USA98:6289-6294)。可通过如下方法实现将DNA引入到假单胞菌属细胞:例如电穿孔(参见,例如,Choi等,2006,J.Microbiol.Methods64:391-397)或接合(参见,例如,Pinedo和Smets,2005,Appl.Environ.Microbiol.71:51-57)。可通过如下方法实现将DNA引入到链球菌属细胞:例如天然感受态(natural competence)(参见,例如,Perry和Kuramitsu,1981,Infect.Immun.32:1295-1297),原生质体转化(参见,例如,Catt和Jollick,1991,Microbios.68:189-207),电穿孔(参见,例如,Buckley等,1999,Appl.Environ.Microbiol.65:3800-3804)或接合(参见,例如,Clewell,1981,Microbiol.Rev.45:409-436)。然而,可以使用任何本领域已知的将DNA引入宿主细胞的方法。

[0145] 宿主细胞还可以是真核生物,如哺乳动物、昆虫、植物或真菌细胞。

[0146] 宿主细胞可以是真菌细胞。“真菌”用在本文包括以下门:子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)和接合菌门(Zygomycota)(如由Hawksworth等,于Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi,第八版,1995,CAB International,University Press,Cambridge,UK中所定义)以及卵菌门(Oomycota)(如

Hawksworth等,1995,见上,171页中所引用),和所有有丝分裂孢子真菌(mitosporic fungi)(Hawksworth等,1995,见上)。

[0147] 真菌宿主细胞可以是酵母细胞。“酵母”用在本文包括产子囊酵母(ascosporogenous yeast)(内孢霉目(Endomycetales))、产担子酵母(basidiosporogenous yeast)和属于半知菌类(Fungi Imperfecti)(芽孢纲(Blastomycetes))的酵母。由于酵母的分类在未来可能改变,就本发明而言,会将酵母定义为如Biology and Activities of Yeast(Skinner,F.A.,Passmore,S.M.,和Davenport,R.R.编,Soc.App.Bacteriol.Symposium Series No.9,1980)中所述。

[0148] 酵母宿主细胞可以是假丝酵母属、汉逊酵母属(Hansenula)、克鲁维酵母属、毕赤酵母属、酵母属、裂殖酵母属或西洋蓍霉属细胞如乳酸克鲁维酵母(Kluyveromyces lactis)、卡尔酵母、酿酒酵母、糖化酵母、道格拉氏酵母、克鲁弗酵母、诺地酵母、卵形酵母细胞或解脂西洋蓍霉(Yarrowia lipolytica)细胞。

[0149] 真菌宿主细胞可以是丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌门(Eumycota)和卵菌门的亚门(如由Hawksworth等,1995,见上文,所定义)的所有丝状形式。丝状真菌通常的特征在于由壳多糖(chitin)、纤维素、葡聚糖、壳聚糖(chitosan)、甘露聚糖和其它复杂多糖组成的菌丝体壁。通过菌丝延伸进行营养生长,而碳分解代谢是专性需氧的。相反,酵母例如酿酒酵母的营养生长通过单细胞菌体的出芽生殖(budding)进行,而碳分解代谢可以是发酵的。

[0150] 丝状真菌宿主细胞可以是枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属、烟管霉属(Bjerkandera)、Ceriporiopsis、金孢子菌属、鬼伞属(Coprinus)、革盖菌属(Coriolus)、隐球菌属,Filibasidium、镰孢属、腐质霉属、梨孢菌属、毛霉属、毁丝霉属、新考玛脂霉属、脉孢菌属、拟青霉属、青霉属、平革菌属、射脉菌属(Phlebia)、瘤胃壶菌属、侧耳属(Pleurotus)、裂褶菌属、踝节菌属、嗜热子囊菌属、梭孢壳属、弯颈霉属、栓菌属(Trametes)或木霉属细胞。

[0151] 例如,丝状真菌宿主细胞可以是泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、黑刺烟管菌(Bjerkandera adusta)、Ceriporiopsis aneirina、Ceriporiopsis caregiea、Ceriporiopsis gilvescens、Ceriporiopsis pannocinta、Ceriporiopsis rivulosa、Ceriporiopsis subrufa、Ceriporiopsis subvermispora、Chrysosporium inops、嗜角质金孢子菌、Chrysosporium lucknowense、Chrysosporium merdarium、毡金孢子菌、Chrysosporium queenslandicum、热带金孢子菌、Chrysosporium zonatum、灰盖鬼伞(Coprinus cinereus)、毛革盖菌(Coriolus hirsutus)、杆孢状镰孢、禾谷镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾本科镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、拟分枝孢镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢、镶片镰孢、特异腐质霉、疏棉状腐质霉、米黑毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙脉孢菌、产紫青霉、黄孢平革菌(Phanerochaete chrysosporium)、辐射射脉菌(Phlebia radiata)、刺芹侧耳(Pleurotus eryngii)、土生梭孢霉、Trametes villosa、Trametes versicolor、哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉或绿色木霉细胞。

[0152] 可以将真菌细胞通过涉及原生质体形成、原生质体转化和细胞壁重建的方法以本身公知的方式转化。用于转化曲霉属和木霉属宿主细胞的合适方法在EP238023和Yelton

等,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA81:1470-1474中描述。用于转化镰孢属菌种的合适方法由Malardier等,1989,Gene78:147-156和W096/00787描述。可以使用由如下文献描述的方法转化酵母:Becker和Guarente,于Abelson,J.N.和Simon,M.I.编,Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology,Methods in Enzymology,Volume194,182-187页,Academic Press,Inc.,New York;Ito等,1983,J.Bacteriol.153:163;和Hinnen等,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.USA75:1920。

[0153] 生产方法

[0154] 本发明还涉及产生本发明多肽的方法,其包括:(a)在有助于产生多肽的条件下培养细胞,所述细胞以其野生型形式产生所述多肽;和(b)回收所述多肽。在一个优选的实施方案中,所述细胞是库兹勒氏菌属的。在一个更优选的实施方案中,所述细胞是Kutzneria albida。在一个最优选的实施方案中,所述细胞是Kutzneria albida ATCC25243。

[0155] 本发明还涉及产生本发明的多肽的方法,其包括:(a)在有助于产生多肽的条件下培养本发明的重组宿主细胞;和(b)回收所述多肽。

[0156] 使用本领域熟知的方法在适合于产生所述多肽的营养培养基中培养宿主细胞。例如,可以通过在合适培养基中和允许表达和/或分离所述多肽的条件下进行的摇瓶培养,和实验室或工业发酵罐中的小规模或大规模发酵(包括连续、分批、补料分批或固态发酵)来培养细胞。使用本领域已知的方法在合适的营养培养基中进行培养,所述营养培养基包含碳源和氮源和无机盐。合适的培养基能够从商业供应商获得或可以根据公开的组成制备(例如,在美国典型培养物保藏中心的目录中)。如果多肽分泌到营养培养基中,该多肽能够从所述培养基中直接回收。如果不分泌多肽,其能够从细胞裂解物(lysate)回收。

[0157] 可以使用本领域已知的对于所述多肽是特异性的方法来检测多肽。这些检测方法可包括特异性抗体的使用、酶产物的形成或酶底物的消失。例如,酶试验(enzyme assay)可用于测定多肽的活性。

[0158] 可以使用本领域已知的方法回收多肽。例如,多肽可以通过常规方法从营养培养基中回收,所述常规方法包括但不限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。

[0159] 多肽可以通过多种本领域已知的方法纯化以获得基本上纯的多肽,所述方法包括但不限于层析(例如,离子交换、亲和、疏水、层析聚焦和大小排阻)、电泳方法(例如,制备型(preparative)等电聚焦)、差示溶解度(例如,硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE或提取(参见,例如,Protein Purification,J.-C.Janson 和Lars Ryden编,VCH Publishers,New York,1989)。

[0160] 在一个作为选择的实施方案中,没有回收多肽,而是将表达多肽的本发明宿主细胞用作多肽的来源。

[0161] 植物

[0162] 本发明还涉及植物,例如,转基因植物、植物部分或植物细胞,其包含本发明的分离的多核苷酸,从而以可回收的量表达和产生所述多肽。多肽可从植物或植物部分回收。或者,同样可以将含有该多肽的植物或植物部分用于改进食品或饲料的质量,例如,改进营养价值、适口性(palatability)和流变性质(rheological properties),或用于破坏抗营养因子。

[0163] 转基因植物可以是双子叶的(双子叶植物)或单子叶的(单子叶植物)。单子叶植物

的实例是草 (grasses), 如草地早熟禾 (meadow grass) (蓝草 (blue grass), 早熟禾属 (Poa)); 饲用牧草 (forage grass) 如羊茅属 (Festuca)、黑麦草属 (Lolium); 寒地型牧草 (temperate grass), 如 *Agrostis* (翦股颖属); 和谷类, 例如, 小麦、燕麦、黑麦、大麦、稻 (rice)、高粱和玉蜀黍 (maize) (玉米)。

[0164] 双子叶植物的实例是烟草 (tobacco), 豆类 (legumes), 如羽扇豆 (lupins), 马铃薯, 糖甜菜 (sugar beet), 豌豆, 豆 (bean) 和大豆 (soybean) 和十字花科的 (cruciferous) 植物 (十字花科 (family Brassicaceae)), 如花椰菜 (cauliflower), 油菜籽 (rape seed) 和紧密相关的模型生物体拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)。

[0165] 植物部分的实例是茎 (stem)、愈伤组织 (callus)、叶 (leaf)、根 (root)、果实 (fruit)、种子 (seed) 和块茎 (tuber), 以及包含这些部分的独立组织, 例如, 表皮 (epidermis)、叶肉 (mesophyll)、薄壁组织 (parenchyme)、维管组织 (vascular tissue)、分生组织 (meristem)。具体的植物细胞区室 (compartments), 如叶绿体 (chloroplast)、质外体 (apoplast)、线粒体 (mitochondria)、液泡 (vacuole)、过氧化物酶体 (peroxisome) 和细胞质 (cytoplasm) 也被认为是植物部分。此外, 任何植物细胞, 无论什么组织来源, 都被认为是植物部分。同样地, 植物部分, 如为了促进本发明的应用而分离的具体组织和细胞也被认为是植物部分, 例如胚 (embryo)、胚乳 (endosperm)、糊粉 (aleurone) 和种皮 (seed coat)。

[0166] 同样包含于本发明范围内的还有这些植物、植物部分和植物细胞的子代。

[0167] 表达多肽的转基因植物或植物细胞可以依照本领域已知方法构建。简而言之, 通过如下方法构建所述植物或植物细胞: 将编码多肽的一个或多个 (数个) 表达构建体并入植物宿主基因组或叶绿体基因组, 并且将所得的修饰植物或植物细胞繁殖为转基因植物或植物细胞。

[0168] 表达构建体便利地是包含编码多肽的多核苷酸的核酸构建体, 所述多核苷酸与在选择的植物或植物部分中表达该多核苷酸所需的适当的调节序列可操作地连接。此外, 表达构建体可以包含对于鉴定在其中整合了该表达构建体的宿主细胞有用的选择性标记和将该构建体引入到所述植物中所必需的DNA序列 (后者依赖于使用的DNA引入方法)。

[0169] 调节序列的选择, 例如启动子和终止子序列和任选地信号或转运序列的选择, 举例来说, 基于期望何时、何处以及如何表达多肽而确定。例如, 编码多肽的基因的表达可以是组成型的或诱导型的, 或可以是发育、阶段或组织特异性的, 并且基因产物可以靶向特定的组织或植物部分例如种子或叶。调节序列由例如 Tague 等, 1988, *Plant Physiology* 86: 506 所述。

[0170] 对于组成性表达, 可以使用 35S-CaMV、玉米泛素 1 和稻肌动蛋白 1 启动子 (Franck 等, 1980, *Cell* 21: 285-294, Christensen 等, 1992, *Plant Mo. Biol.* 18: 675-689; Zhang 等, 1991, *Plant Cell* 3: 1155-1165)。器官特异性启动子可以是例如来自贮藏库组织 (storage sink tissue) 例如种子、马铃薯块茎和果实的启动子 (Edwards and Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), 或来自代谢库组织 (metabolic sink tissue) 例如分生组织的启动子 (Ito 等, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), 种子特异性启动子诸如来自稻的谷蛋白 (glutelin)、醇溶蛋白 (prolamin)、球蛋白 (globulin) 或白蛋白 (albumin) 启动子 (Wu 等, 1998, *Plant Cell Physiol.* 39: 885-889), 来自豆球蛋白 (legumin) B4 和蚕豆 (*Vicia faba*) 的未知种子蛋白基因的蚕豆启动子 (Conrad 等, 1998, *J. Plant Physiol.* 152: 708-

711)、来自种子油体蛋白(oil body protein)的启动子(Chen等,1998,Plant Cell Physiol.39:935-941),来自欧洲油菜(*Brassica napus*)的贮藏蛋白napA启动子,或本技术领域公知的任何其它种子特异性的启动子,例如,在W091/14772中所描述的。此外,启动子可为叶特异性的启动子,如来自稻或番茄的rbcS启动子(Kyozuka等,1993,Plant Physiol.102:991-1000),小球藻病毒(*chlorella virus*)腺嘌呤甲基转移酶(adenine methyltransferase)基因启动子(Mitra和Higgins,1994,Plant Mol.Biol.26:85-93),来自稻的aldP基因启动子(Kagaya等,1995,Mol.Gen.Genet.248:668-674),或伤口诱导的启动子,如马铃薯pin2启动子(Xu等,1993,Plant Mol.Biol.22:573-588)。同样地,所述启动子可通过非生物的处理诱导,所述非生物的处理诸如温度、干旱或盐度变化,或通过外源施加的激活所述启动子的物质诱导,例如乙醇、雌激素(oestrogens)、植物激素(plant hormones)如乙烯、脱落酸(abscisic acid)和赤霉素(gibberellic acid),和重金属。

[0171] 启动子增强子元件也可以用于实现多肽在植物中的较高表达。例如,启动子增强子元件可以是内含子,其置于启动子和编码多肽的多核苷酸之间。例如Xu等,1993,见上,公开了使用稻肌动蛋白1基因的第一内含子以增强表达。

[0172] 选择性标记基因和表达构建体的任何其它部分可以选自本领域内可用的那些。

[0173] 将核酸构建体根据本领域已知的常规技术并入植物基因组,所述常规技术包括土壤杆菌属(*Agrobacterium*)介导的转化、病毒介导的转化、显微注射(microinjection)、粒子轰击、生物射弹转化和电穿孔(Gasser等,1990,Science244:1293;Potrykus,1990,Bio/Technology8:535;Shimamoto等,1989,Nature338:274)。

[0174] 目前,根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的基因转移(gene transfer),是产生转基因双子叶植物的优选方法(为了参考,见Hooykas和Schilperoort,1992,Plant Mol.Biol.19:15-38),而且它也可以用于转化单子叶植物,虽然对于这些植物常常使用其它的转化方法。目前,产生转基因单子叶植物的优选的方法,是用粒子(用转化DNA涂覆的微观的金或钨粒子)轰击胚愈伤组织(embryonic calli)或发育中的胚(developing embryos)(Christou,1992,Plant J.2:275-281;Shimamoto,1994,Curr.Opin.Biotechnol.5:158-162;Vasil等,1992,Bio/Technology10:667-674)。转化单子叶植物的可供选择的方法是基于原生质体转化,如由Omirulleh等,1993,Plant Mol.Biol.21:415-428所描述的。用于依照本披露使用的另外的转化方法包括那些记载于美国专利No.6,395,966和7,151,204(两者均通过提述完整并入本文)的。

[0175] 转化之后,根据本领域熟知的方法选择并入了表达构建体的转化体并且再生成为完整植株。通常设计转化方法用于通过如下方法在再生期间或在后续世代中选择性消除选择基因:例如,使用带有两种独立的T-DNA构建体的共转化或通过特异性重组酶位点特异性地切除选择基因。

[0176] 除了用根据本发明制备的构建体直接转化特定的植物基因型之外,还可以通过使具有该构建体的植物与缺乏该构建体的第二种植物杂交来制备转基因植物。例如,可以通过杂交把编码多肽的构建体引入到特定的植物品种中,而不需要对该给定品种的植物的任何直接转化。因此,本发明不仅包括直接从已经根据本发明转化的细胞再生的植物,而且包括这种植物的后代。如本文使用的,后代可指根据本发明制备的亲本植物的任何世代的后代。这类后代可包括根据本发明制备的DNA构建体,或者根据本发明制备的DNA构建体的部

分。杂交导致通过用供体株系杂交授粉起始系把转基因引入到植物系中。美国专利号7,151,204中进一步清楚描述了这类步骤的非限制性例子。

[0177] 可以通过回交转变方法产生植物。例如,植物包括称为回交转变基因型,系,近交种或杂种的植物。

[0178] 遗传标记可用于帮助把一个或多个本发明的转基因从一个遗传背景基因渗入到另一个遗传背景。标记辅助选择提供的相对于常规育种的优点是它能用于避免由表型变异导致的误差。此外,遗传标记可提供关于特定杂交的单独后代中优异种质的相对程度。例如,当具有想要性状但另外具有非农学期望的遗传背景的植物与优异亲本杂交时,遗传标记可用于选择不仅具有目标性状,而且具有相对较大比例的想要种质的后代。这样,最小化了将一个或多个性状基因渗入到特定遗传背景中所需的世代数。

[0179] 本发明还涉及生产本发明多肽的方法,其包括:(a)在有助于生产多肽的条件下,培养包含编码多肽的多核苷酸的转基因植物或植物细胞;和(b)回收多肽。

[0180] 组合物

[0181] 本发明还涉及包含本发明的多肽的组合物。优选地,所述组合物富含这种多肽。术语“富含”表示所述组合物的内肽酶活性,优选地胰蛋白酶样内肽酶活性得到了增加,例如,以至少1.1的富集因数(enrichment factor)增加。

[0182] 所述组合物可以包含本发明的多肽作为主要酶成分,例如,单成分组合物。或者,所述组合物可以包含多种酶活性,例如氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、卤素过氧化物酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、肽谷氨酰胺酶(peptidoglutaminase)、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。额外的酶可以通过例如属于以下属或种的微生物产生:曲霉属,例如棘孢曲霉、泡盛曲霉、臭曲霉、烟曲霉、日本曲霉、构巢曲霉、黑曲霉或米曲霉;镰孢属,例如杆孢状镰孢、禾谷镰孢、库威镰孢、大刀镰孢、禾本科镰孢、禾赤镰孢、异孢镰孢、合欢木镰孢、尖镰孢、多枝镰孢、粉红镰孢、接骨木镰孢、肤色镰孢、硫色镰孢、圆镰孢、拟丝孢镰孢或镰片镰孢;腐质霉属,例如特异腐质霉或疏棉状腐质霉;或木霉属,例如哈茨木霉、康宁木霉、长枝木霉、里氏木霉或绿色木霉。

[0183] 可以依照本领域内已知的方法制备组合物,并且可以是液体或干组合物的形式。例如,所述组合物可以是颗粒(granulate)或微粒(microgranulate)的形式。可以依照本领域内已知方法将多肽稳定化。

[0184] 用途

[0185] 本发明还针对使用本发明多肽及其组合物的方法。

[0186] 优选地,本发明涉及本发明的多肽或其组合物用于制备蛋白水解物,优选食物蛋白水解物,更优选乳蛋白水解物,例如乳清蛋白水解物或酪蛋白水解物的用途。

[0187] 本发明还涉及一种制备蛋白水解物的方法,包括:

[0188] (a)提供包含待水解的蛋白的溶液;

[0189] (b)添加本发明多肽或其组合物到所述溶液中;和

[0190] (c)获得蛋白水解物。

[0191] 在一个优选的实施方案中,待水解的蛋白是食品蛋白,因此获得的蛋白水解物是

食品蛋白水解物。

[0192] 食品蛋白可以是任何食品蛋白。包含食品蛋白的溶液可以是包含来自植物如例如大麦、canola、羽扇豆(lupin)、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、稻、大豆、小麦或其任何组合的蛋白材料的溶液。包含食品蛋白的溶液可以是包含来自动物的蛋白材料如例如卵蛋白材料、肉类蛋白材料或乳蛋白材料的溶液。它也可以是植物来源蛋白材料与动物来源蛋白材料的组合。

[0193] 在一个优选的实施方案中,食品蛋白是乳蛋白。也即,起始材料是包含乳蛋白的溶液。这种溶液可以包含任何比例的乳清蛋白与酪蛋白,或者它可基本上只包含乳清蛋白或基本上只包含酪蛋白,或者它可以是纯乳清蛋白或纯酪蛋白的溶液。它可以是,例如,乳如原料乳或包含来源于乳的乳蛋白的任何溶液。

[0194] 在一个实施方案中,这种溶液是乳清蛋白的溶液,其可以来源于获自干酪制造的乳清,尤其是甜乳清如来源于通过凝乳酶(rennet)凝固的酪蛋白。乳清蛋白也可以来自于乳清蛋白浓缩物或来自于乳清蛋白分离物。在一个优选的实施方案中,乳蛋白是乳清蛋白浓缩物(WPC)。

[0195] 在另一个实施方案中,这种溶液是酪蛋白溶液。酪蛋白的来源可以是酸酪蛋白或非脂乳固体。

[0196] 包含食品蛋白的溶液,如包含乳蛋白的溶液,优选包含大约2-35%重量的蛋白,更优选大约5-30%重量。

[0197] 在一个实施方案中,包含乳蛋白的溶液,优选包含乳清蛋白的溶液,还包含乳糖。

[0198] 应当理解,技术上而言,溶液可以更确切地被表征为分散液(dispersion)的形式。

[0199] 本发明还涉及本发明多肽用于在湿加工期间,也即浸泡,脱毛和/或软化期间处理皮革的用途。

[0200] 在本发明的一个特定的实施方案中,在浸泡期间利用本发明的多肽对皮革进行酶促处理。可以在常规的浸泡条件下进行本发明的浸泡程序,也即pH4-11范围,优选pH6-10范围的pH,20-30℃范围,优选24-28℃范围的温度,2-24小时范围,优选4-16小时范围的反应时间,以及如果需要,与已知的表面活性剂和防腐剂一起。

[0201] 在本发明的一个更特定的实施方案中,在脱毛期间利用本发明的多肽对皮革进行酶促处理。可以在常规条件下进行本发明的脱毛程序,也即,pH5.5-12.5范围,优选6到12范围,更优选7到10范围的pH,5℃到32℃范围,优选15℃到30℃范围的温度,1-5小时,优选1.5到4小时的反应时间。

[0202] 在另一个特定的实施方案中,在软化期间对皮革进行酶促处理。在一个最优选的实施方案中,在脱灰(diliming)阶段以后,在软化期间进行酶促处理。可以在常规条件下进行本发明的软化程序,也即pH6-9范围,优选pH6.5-8.5范围的pH,20-30℃范围,优选25-28℃范围的温度,和20-90分钟范围,优选40-80分钟范围的反应时间。

[0203] 制备食品蛋白水解物的方法

[0204] 方法

[0205] 在另一个方面中,本发明涉及一种制备食品蛋白水解物的方法,包括:

[0206] (a) 提供包含待水解的食品蛋白的溶液;

[0207] (b) 添加来源于细菌的胰蛋白酶样内肽酶到所述溶液中;和

[0208] (c) 获得食品蛋白水解物。

[0209] 食品蛋白底物

[0210] 食品蛋白可以是任何食品蛋白。包含食品蛋白的溶液可以是包含来自植物如例如大麦、canola、羽扇豆、玉米、燕麦、豌豆、马铃薯、稻、大豆、小麦或其任何组合的蛋白材料的溶液。包含食品蛋白的溶液可以是包含来自动物如例如卵蛋白材料、肉类蛋白材料或乳蛋白材料的蛋白材料的溶液。它也可以是植物来源蛋白材料与动物来源蛋白材料的组合。

[0211] 在一个优选的实施方案中，食品蛋白是乳蛋白，优选乳清蛋白。也即，起始材料是包含乳蛋白的溶液。这种溶液可以包含任何比例的乳清蛋白与酪蛋白，或者它可基本上只包含乳清蛋白或基本上只包含酪蛋白，或者它可以是纯乳清蛋白或纯酪蛋白的溶液。它可以是，例如，原料乳或包含来源于原料乳的乳蛋白的任何溶液。

[0212] 在一个实施方案中，这种溶液是乳清蛋白的溶液，其可以来源于获自干酪制造的乳清，尤其是甜乳清如来源于通过凝乳酶凝固的酪蛋白。乳清蛋白也可以来自于乳清蛋白浓缩物或来自于乳清蛋白分离物。在一个优选的实施方案中，乳蛋白是乳清蛋白浓缩物(WPC)。

[0213] 在另一个实施方案中，这种溶液是酪蛋白溶液。酪蛋白的来源可以是酸酪蛋白或非脂乳固体。

[0214] 包含食品蛋白的溶液，如包含乳蛋白的溶液，优选包含大约2-35%重量的蛋白，更优选大约5-30%重量，甚至更优选大约5-20%重量。

[0215] 在一个实施方案中，包含乳蛋白的溶液，优选包含乳清蛋白的溶液，还包含乳糖。

[0216] 应当理解，技术上而言，溶液可以更确切地被表征为分散液的形式。

[0217] 胰蛋白酶样内肽酶

[0218] 用来源于细菌的胰蛋白酶样内肽酶处理包含食品蛋白的溶液，如包含乳蛋白的溶液。

[0219] 就本发明而言，如本文使用的与来源于给定来源(也即，生物学生物体)的多肽相关的术语“来源于”，可指该多肽与由该来源的基因组天然编码的多肽相同或是其变体，不管该多肽是否由另一来源产生，例如已经插入了来自该来源的编码内切蛋白酶的多核苷酸的菌株。

[0220] 胰蛋白酶样内肽酶可以来源于革兰氏阳性细菌菌株如Actinocynnema、芽孢杆菌属、梭菌属、肠球菌属、地芽孢杆菌属、Kribbella、库兹勒氏菌属、乳杆菌属、乳球菌属、海洋芽孢杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、或链霉菌属的菌株，或革兰氏阴性细菌菌株如弯曲杆菌属、大肠杆菌、黄杆菌属、梭杆菌属、螺杆菌属、泥杆菌属、奈瑟氏菌属、假单胞菌属、沙门氏菌属或脲原体属的菌株。

[0221] 在一个实施方案中、胰蛋白酶样内肽酶来源于嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌菌株。

[0222] 在另一个实施方案中，胰蛋白酶样内肽酶来源于似马链球菌、酿脓链球菌、乳房链球菌或马链球菌兽瘟亚种菌株。

[0223] 在另一个实施方案中，胰蛋白酶样内肽酶来源于不产色链霉菌、除虫链霉菌、天蓝

链霉菌、灰色链霉菌或浅青紫链霉菌菌株。

[0224] 这种细菌的胰蛋白酶样内肽酶,在大约5.0到大约11.0的pH,优选在大约6到大约10的pH,和大约40℃到大约75℃的温度,优选大约50℃到大约70℃的温度,具有最佳的蛋白质分解活性。

[0225] 在一个优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶与SEQ ID NOs:2,5或6的任何成熟多肽具有至少40%,至少45%,至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%的序列同一性。在另一个优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶与SEQ ID NO:2,5或6的任何成熟相差至多10个氨基酸,例如相差5个氨基酸,相差4个氨基酸,相差3个氨基酸,相差2个氨基酸,或相差1个氨基酸。

[0226] SEQ ID NO:2的成熟多肽可为1-225位氨基酸。SEQ ID NO:5的成熟多肽可以是38-261位氨基酸。SEQ ID NO:6的成熟多肽可为40-266位氨基酸。

[0227] 在一个优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶来源于放线菌。

[0228] 在一个更优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶来源于库兹勒氏菌属的菌株,例如来自于*Kutzneria albida*。

[0229] 在另一个更优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%的序列同一性。在另一个优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶与SEQ ID NO:2的成熟多肽相差至多10个氨基酸,例如相差5个氨基酸,相差4个氨基酸,相差3个氨基酸,相差2个氨基酸,或相差1个氨基酸。这种胰蛋白酶样内肽酶,在大约5.0到大约11.0的pH,优选在大约6到大约10的pH,和大约40℃到大约75℃的温度,优选大约50℃到大约70℃的温度,具有最佳的蛋白质分解活性。它可被抑肽酶抑制。

[0230] 在另一个更优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶来源于*Actinosynnema*的菌株,例如来自于*Actinosynnema mirum*。它可以,例如,具有本申请SEQ ID NO:5的成熟多肽的氨基酸序列(UNIPROT:C6WDM8)。

[0231] 在另一个更优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶与SEQ ID NO:5的成熟多肽具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%的序列同一性。在另一个优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶与SEQ ID NO:5的成熟多肽相差至多10个氨基酸,例如相差5个氨基酸,相差4个氨基酸,相差3个氨基酸,相差2个氨基酸,或相差1个氨基酸。这种胰蛋白酶样内肽酶,在大约5.0到大约11.0的pH,优选在大约8到大约10的pH,和大约40℃到大约75℃的温度,优选大约50℃到大约70℃的温度,具有最佳的蛋白质分解活性。它可被PMSF抑制。

[0232] 在另一个更优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶来源于*Kribbella*的菌株,例如来自于*Kribbella flavida*。它可以,例如,具有本申请SEQ ID NO:6的成熟多肽的氨基酸序列(UNIPROT:D2PZJ1)。

[0233] 在另一个更优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶与SEQ ID NO:6的成熟多肽具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%的序列同一性。在另一个优选的实施方案中,胰蛋白酶样内肽酶与SEQ ID NO:6的成熟多肽相差至多10个氨基酸,例如相差5个氨基酸,相差4个氨基酸,相

差3个氨基酸,相差2个氨基酸,或相差1个氨基酸。这种胰蛋白酶样内肽酶,在大约5.0到大约11.0的pH,优选在大约8到大约11的pH,和大约40℃到大约75℃的温度,优选大约40℃到大约60℃的温度,具有最佳的蛋白质分解活性。它可被EDTA抑制。

[0234] 可以通过胰蛋白酶样内肽酶来源的菌株来生产胰蛋白酶样内肽酶。或者可以从包含编码内肽酶的多核苷酸的重组宿主细胞生产内肽酶,该多核苷酸与指导内肽酶生产的一个或多个(几个)调控序列可操作连接。引入包含多核苷酸的构建体或载体到宿主细胞中,以便保持该构建体或载体作为染色体组成部分,或作为自我复制染色体外载体。

[0235] 宿主细胞可以是可用于重组生产内肽酶的任何细胞,例如原核细胞或真核细胞。

[0236] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包括但不限于,芽孢杆菌、梭菌、肠球菌、地芽孢杆菌、乳杆菌、乳球菌、海洋芽孢杆菌、葡萄球菌、链球菌、或链霉菌的菌株。革兰氏阴性细菌包括但不限于,弯曲杆菌、大肠杆菌、黄杆菌、梭杆菌、螺杆菌、泥杆菌、奈瑟氏菌、假单胞菌、沙门氏菌或脲原体。

[0237] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌细胞,包括但不限于,嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌细胞。

[0238] 细菌宿主细胞也可以是任何链球菌细胞,包括但不限于,似马链球菌、酿脓链球菌、乳房链球菌或马链球菌兽瘟亚种细胞。

[0239] 细菌宿主细胞还可以是任何链霉菌细胞,包括但不限于,不产色链霉菌、除虫链霉菌、天蓝链霉菌、灰色链霉菌或浅青紫链霉菌细胞。

[0240] 宿主细胞也可以是真核细胞,如哺乳动物,昆虫,植物或真菌细胞。

[0241] 胰蛋白酶样内肽酶优选为分离的胰蛋白酶样内肽酶。胰蛋白酶样内肽酶的浓度可以是每克食品蛋白100-500,000USP胰蛋白酶单位,例如250-250,000或500-100,000。

[0242] 1USP胰蛋白酶单位是使用N-苯甲酰基-L-精氨酸盐酸乙酯(BAEE)作为底物,在pH7.6和25℃时,导致253nm吸光度改变0.003的活性。

[0243] 不同的胰蛋白酶样内肽酶之间的特定活性可以非常显著的不同,但是本领域技术人员将能容易地测定待使用的胰蛋白酶样内肽酶的量,例如根据水解程度。

[0244] 胰蛋白酶样内肽酶与食品蛋白的比率优选为0.01-5%重量/重量,更优选0.01-2%,更优选0.05-0.8%,甚至更优选0.1-0.6%,和最优选大约0.2%。

[0245] 任选纳入特异性较低的另一种内肽酶

[0246] 在一个优选的实施方案中,在步骤(b)之前,期间或之后,添加至少一种其它内肽酶到溶液中。

[0247] 优选地,所述至少一种其它内肽酶是分离的内肽酶。

[0248] 优选地,所述至少一种其它内肽酶是丝氨酸内肽酶。

[0249] 在一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶具有比胰蛋白酶样内肽酶特异性低的活性。

[0250] 在另一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶具有与哺乳动物胰凝乳蛋白酶,例如从猪胰腺组织提取的胰凝乳蛋白酶的活性类似的活性。

[0251] 在另一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶在酪氨酸、苯丙氨酸、色氨

酸、亮氨酸、甲硫氨酸或组氨酸中任何一个的羧基末端侧面裂解的特异性高于在任何其他天然氨基酸的羧基末端侧面裂解的特异性。

[0252] 在另一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶在酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸或组氨酸中的至少一种的羧基末端侧面裂解的特异性,比在丙氨酸、精氨酸、天门冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸的中任何一种的羧基末端侧面裂解的特异性高至少3倍,优选高至少5倍。

[0253] 在另一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶在酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和组氨酸组成的组的至少3种氨基酸中的每一种的羧基末端侧面裂解的特异性高于在精氨酸的羧基末端侧面裂解的特异性。

[0254] 在另一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶在酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和组氨酸组成的组的至少3种氨基酸中的每一种的羧基末端侧面裂解的特异性高于在赖氨酸的羧基末端侧面裂解的特异性。

[0255] 在另一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶在酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和组氨酸的每一种的羧基末端侧面裂解的特异性高于在精氨酸和赖氨酸两种氨基酸的羧基末端侧面裂解的特异性。

[0256] 在另一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶的胰凝乳蛋白酶比率至少为3,优选至少5。胰凝乳蛋白酶比率至少为5,意指裂解Phe,Leu或Met之一时的酶活性(无论哪个较大),比裂解Ala,Arg,Asp,Glu,Ile,Lys或Val任何一个时的酶活性(无论哪个较大)高至少5倍。也即,所述至少一种其它内肽酶裂解Phe,Leu或Met之一的特异性(无论哪个较大),比裂解Ala,Arg,Asp,Glu,Ile,Lys或Val的任何一个的特异性(无论哪个较大)高至少3倍,优选高至少5倍。在内肽酶的活性为在它的最佳pH值时的内肽酶活性的至少一半时的pH值,进行这种活性测定以确定胰凝乳蛋白酶比率。可以如专利申请no.WO2010/112546的实施例1中所述的测定胰凝乳蛋白酶比率。

[0257] 在另一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶是细菌内肽酶。

[0258] 在一个更优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶来源于拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)菌株,优选来源于拟诺卡氏菌种NRRL18262(例如前面W088/03947中所述的)。它可以,例如,具有本申请SEQ ID NO:7的成熟多肽的氨基酸序列。例如之前在DK专利申请号199600013中已经公开了来源于拟诺卡氏菌种NRRL18262的蛋白酶的DNA和氨基酸序列。

[0259] 在另一个更优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶来源于Metarhizium,优选Metarhizium anisopliae,例如具有本申请SEQ ID NO:8的成熟多肽的氨基酸序列(TREMBL:Q9Y843)。在另一个更优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶来源于Brachysporiella,优选Brachysporiella gayana,例如具有本申请SEQ ID NO:9的成熟多肽的氨基酸序列(CGMCC0865)。例如之前在W004072279中已经公开了来源于Metarhizium anisopliae和Brachysporiella gayana的蛋白酶的DNA和氨基酸序列。

[0260] 在另一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶与SEQ ID NOs:7,8或9的任何一种成熟多肽具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%的序列同一性。在另一个优选的实施方案

中,所述至少一种其它内肽酶与SEQ ID NOs:7,8或9的任何一种成熟多肽相差至多10个氨基酸,例如相差5个氨基酸,相差4个氨基酸,相差3个氨基酸,相差2个氨基酸,或相差1个氨基酸。

[0261] SEQ ID NO:7的成熟多肽可以是1-188位氨基酸。SEQ ID NO:8的成熟多肽可以是187-374位氨基酸。SEQ ID NO:9的成熟多肽可以是190-375位氨基酸。

[0262] 在一个更优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶与SEQ ID NO:7的成熟多肽具有至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%的序列同一性。在另一个优选的实施方案中,所述至少一种其它内肽酶与SEQ ID NO:7的成熟多肽相差至多10个氨基酸,例如相差5个氨基酸,相差4个氨基酸,相差3个氨基酸,相差2个氨基酸,或相差1个氨基酸。

[0263] 所述至少一种其它内肽酶的浓度优选为每g食品蛋白100-100,000USP胰凝乳蛋白酶单位,更优选500-50,000,最优选1,000-20,000。

[0264] 1USP胰凝乳蛋白酶单位是使用N-乙酰-L-酪氨酸乙酯(ATEE)作为底物,在pH7.0和25℃时,导致237nm吸光度改变0.0075的活性。

[0265] 不同的内肽酶之间的特定活性可以非常显著的不同,但是技术人员将能容易地测定待使用的至少一种其它内肽酶的量,例如根据水解程度。

[0266] 所述至少一种其它内肽酶与食品蛋白的比率优选为0.001-1%重量/重量,更优选0.001-0.5%,更优选0.005-0.25%,最优选0.01-0.05%。

[0267] 优选地,以基于内肽酶的重量添加的胰蛋白酶样内肽酶浓度的1%到50%的浓度,添加至少一种其它内肽酶。在一个优选的实施方案中,以胰蛋白酶样内肽酶的2%到20%w/w,优选3%到5%的浓度,添加至少一种其它内肽酶。在另一个优选的实施方案中,以胰蛋白酶样内肽酶的5%到15%w/w,优选大约10%的浓度,添加至少一种其它内肽酶。

[0268] 食品蛋白水解物

[0269] 水解之前的任选预备步骤是预热包含食品蛋白的溶液。在一个优选的实施方案中,进行预处理步骤,其包括在大约75-95℃加热食品蛋白大约5-30分钟。在另一个优选的实施方案中,进行预处理步骤,其包括在超过135℃加热食品蛋白大约1-5秒。在另一个优选的实施方案中,进行预处理步骤,其包括在大约130℃加热食品蛋白大约30-60秒。

[0270] 技术人员将了解优选用于水解反应的条件。它可以,例如,在大约40℃到60℃的温度,以6.5到8.5范围内,优选6.5到8的pH值进行1到6小时。

[0271] 在一个优选的实施方案中,用内肽酶第一次处理之后,蛋白质性材料另外经受第二次蛋白水解,接着进行内肽酶灭活。在一个更优选的实施方案中,在第一次与第二次蛋白分解的水解之间,蛋白质性材料经受热处理,如US5,039,532所公开的,其通过提述据此并入。

[0272] 不管水解条件,水解物优选经受另外的内肽酶灭活步骤。在一个优选的实施方案中,这种肽酶灭活包括在大约70到110℃,优选75到95℃的温度,热处理大约0.1到30min。做为选择,可通过在超高温灭菌来灭活内肽酶(例如,在大约130℃持续大约30-60秒)。

[0273] 可以对获得的食物蛋白水解物进一步进行处理。可以对它进行澄清。也可以把它以液态保存。还可以对水解物进行超滤,可以例如通过蒸发对它进行浓缩,而且可以例如通过喷雾干燥或冻干对它进行干燥。

[0274] 在一个优选的实施方案中,获得的食品蛋白水解物具有中等的水解度。在另一个优选的实施方案中,获得的食品蛋白水解物是部分水解物。在另一个优选的实施方案中,获得的食品蛋白水解物的水解度为5到30%,优选6到15%。特别优选的水解度为大约14%。另一个特别优选的水解度为大约15%。

[0275] 水解度(DH)表示通过该方法获得的蛋白水解程度。在本发明的上下文中,水解度(DH)定义如下:

[0276] $DH = (\text{裂解的肽键数} / \text{肽键的总数}) \times 100\%$

[0277] 可以根据Church,F.C.等,(1983) Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins,J.Dairy Sci.66:1219-1227的方法,光谱测定获得的蛋白水解物的水解度(DH)。

[0278] 可以例如通过大小排阻色谱法(SEC)测定获得的食品蛋白水解物中肽的分子量分布。在一个优选的实施方案中,本发明的水解物由肽构成,其中基于重量计小于1%的肽分子量大于20,000kDa。

[0279] 通过本发明的方法获得的食品蛋白水解物优选缺乏可检测的完整食品蛋白。可以通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)证实水解物中缺乏完整的食品蛋白。可以在同一凝胶中,对水解物与未水解的蛋白起始材料进行直接比较。在一个优选的实施方案中,本发明的水解物由肽构成,其中完整食品蛋白的重量小于1%。

[0280] 可以使用酶联免疫吸附测定(ELISA),测定通过本发明的方法获得的水解物的残余抗原性。以分析中建立的线性剂量反应范围内的浓度,将未水解的食品蛋白固相固定。类似地固定水解物制品。随后,与家兔抗体以及与家兔IgG反应性的酶缀合物的连续孵育揭示了可抗原识别的蛋白质与肽的存在。在质量基础上,对用水解物获得的结果与用未水解蛋白起始材料获得的结果进行比较。然后计算水解物的抗原性降低百分数。

[0281] 在一个优选的实施方案中,如通过ELISA测定的,相对于相应的未水解的食品蛋白材料,通过本发明的方法获得的食品蛋白水解物的抗原性降低至少大约80%,优选至少大约85%,更优选至少大约90%或至少大约95%,最优选至少大约98%,甚至最优选抗原性降低至少大约99%。

[0282] 通过下面的实施例进一步描述本发明,这些实施例不应认为是对本发明范围的限制。

实施例

[0283] 实施例1:克隆并表达来自Kutzneria albida的胰蛋白酶样内肽酶

[0284] 基因:

[0285] 在枯草芽胞杆菌中表达来自合成基因的Kutzneria albida胰蛋白酶样内肽酶。根据SEQ ID NO:2(Kutzneria albida成熟胰蛋白酶样内肽酶)设计合成基因序列,并进行密码子优化用于在枯草芽胞杆菌中表达。表达的DNA序列为SEQ ID NO:3。用Savinase®分泌信号(具有以下氨基酸序列:MKKPLGKIVASTALLISVAFSSS IASA(SEQ ID NO:4))代替天然的分泌信号,表达Kutzneria albida胰蛋白酶样内肽酶。SEQ ID NO:3的1-81位核苷酸是Savinase分泌信号的DNA序列,82-756位核苷酸编码成熟多肽。

[0286] 表达载体:

[0287] ExpVec8用作表达载体,质粒图如图1中所示。该载体使通过同源重组把枯草芽胞杆菌染色体上的基因构建体整合到枯草芽胞杆菌宿主的果胶酸裂合酶基因座上成为可能。从由来自地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyL)、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因(amyQ)的启动子和包括稳定序列的苏芸金杆菌cry111A启动子组成的三启动子系统表达基因。(如W099/43835所述)。ExpVec8包含savinase信号肽、savinase终止子、用于能选择枯草芽胞杆菌中的整合体的氯霉素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因(bla)、卡那霉素抗性基因(neo)和大肠杆菌复制起点。

[0288] 表达克隆:

[0289] 把包含合成基因的标准克隆载体转化到大肠杆菌中(dam-/dcm-,来自New England BioLabs,DNA中腺嘌呤与胞嘧啶残基的甲基化作用有缺陷)。纯化质粒,并用ClaI和MluI消化以释放具有合成基因的插入。ExpVec8用作表达载体,并用相同的限制性内切酶(ClaI和MluI)进行消化。连接载体和纯化的片段并转化到大肠杆菌中(Top10,Invitrogen)。从转化体之一纯化包含插入的表达质粒,并再转化到枯草芽胞杆菌中。包含整合的表达构建体的重组枯草芽胞杆菌克隆生长于液体培养基中。收获含酶的上清液,并如实施例2中所述的纯化酶。

[0290] 实施例2:纯化并表征来自Kutzneria albida的AC3胰蛋白酶样内肽酶

[0291] 纯化活性测定:

[0292] pNA底物:Boc-VLGR-pNA (Bachem L-1205)。

[0293] 温度:室温(25℃)

[0294] 测定缓冲液:100mM琥珀酸,100mM HEPES,100mM CHES,100mM CABS,1mM CaCl₂,150mM KCl,0.01%Triton X-100,pH6.0。

[0295] 20 μ l蛋白酶(稀释于0.01%Triton X-100中)分发到微量滴定板孔中。通过添加200 μ l pNA底物(50mg Boc-VLGR-pNA溶于1.0ml DMSO中,并进一步用分析缓冲液稀释90x),启动分析。监测OD₄₀₅的初始增加作为对蛋白酶活性的量度。

[0296] 表征活性测定:

[0297] 1) pNA测定:

[0298] pNA底物:Boc-VLGR-pNA (Bachem L-1205)

[0299] Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)

[0300] Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775)

[0301] Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)

[0302] Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835)

[0303] Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710)

[0304] Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790)

[0305] Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390)

[0306] Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725)

[0307] Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395)

[0308] Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770)

[0309] 温度:室温(25℃)

[0310] 测定缓冲液:100mM琥珀酸,100mM HEPES,100mM CHES,100mM CABS,1mM CaCl₂,

150mM KCl, 0.01% Triton X-100, 用HCl或NaOH调节到pH值2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0和12.0。

[0311] 20 μ l蛋白酶(稀释于0.01% Triton X-100)与100 μ l测定缓冲液混合。通过添加100 μ l pNA底物(50mg溶于1.0ml DMSO中,并进一步用0.01% Triton X-100稀释45x),启动分析。监测OD₄₀₅的初始增加作为对蛋白酶活性的量度。

[0312] 2) Protazyme AK测定:

[0313] 底物: Protazyme AK片剂(交联的和染色的酪蛋白;来自Megazyme)

[0314] 温度: 受控(测定温度)

[0315] 分析缓冲液: 100mM琥珀酸, 100mM HEPES, 100mM CHES, 100mM CABS, 1mM CaCl₂, 150mM KCl, 0.01% Triton X-100, 用HCl或NaOH调节到pH值2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0和11.0。

[0316] 通过温和搅拌,使Protazyme AK片剂悬浮于2.0ml 0.01% Triton X-100中。在Eppendorf管中混合500 μ l该悬浮液与500 μ l测定缓冲液,并置于冰上。添加20 μ l蛋白酶样品(稀释于0.01% Triton X-100中)。通过转移Eppendorf管到设置成分析温度的Eppendorf热混合仪中启动测定。将管在Eppendorf热混合仪上以其最高振动速率(1400rpm)孵育15分钟。通过把管转回到冰浴中停止孵育。然后在冰冷的离心机中离心管几分钟,并转移200 μ l上清液到微量滴定板中。将OD₆₅₀的读数作为对蛋白酶活性的量度。该测定中包括缓冲液空白(代替酶)。

[0317] 纯化来自Kutzneria albida的AC3胰蛋白酶样蛋白酶

[0318] 离心来自实施例1的培养液(20000xg, 20min),小心地从沉淀小心倒出上清液。组合的上清液通过Nalgene 0.2 μ m过滤装置过滤以除去剩余的芽孢杆菌宿主细胞。通过添加固体硫酸铵到3.4M最终(NH₄)₂SO₄浓度,用硫酸铵沉淀0.2 μ 滤液。离心收集形成的沉淀(20000xg, 20min),把沉淀溶于最小体积的去离子水中。溶液转移至50mM H₃BO₃, 5mM MES, 1mM CaCl₂, pH6的G25Sephadex®柱上,并施加到在相同的缓冲液中平衡的S-sepharose® HP柱。用平衡缓冲液大量洗涤柱后,用相同缓冲液中的线性NaCl梯度(0-->0.5M)洗脱蛋白酶。分析来自柱的级分的蛋白酶活性(纯化活性测定)。添加固体硫酸铵到S-sepharose柱的BOC-VLGR-pNA活性峰,以提供酶溶液中1.6M的最终(NH₄)₂SO₄浓度。(NH₄)₂SO₄添加期间用磁性搅拌器温和地混合酶溶液,并在添加以后继续搅拌30分钟以产生平衡的系统。然后将酶溶液施加到在100mM H₃BO₃, 10mM MES, 2mM CaCl₂, 1.6M (NH₄)₂SO₄, pH6中平衡的Phenyl-sepharose FF(高sub)柱。用平衡缓冲液大量洗涤柱后,用相同缓冲液中的线性(NH₄)₂SO₄梯度(1.6-->0M)洗脱AC3胰蛋白酶。分析来自柱的级分的蛋白酶活性(纯化活性测定),并通过SDS-PAGE进一步分析活性级分。合并并在考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE凝胶上只看到一个条带的级分,并转移至100mM H₃BO₃, 10mM MES, 2mM CaCl₂, pH6的G25sephadex柱上作为纯化的制备物并用于进一步表征。

[0319] 表征.pH-活性, pH-稳定性和温度-活性

[0320] pNA测定用于获得对Boc-VLGR-pNA和Suc-AAPR-pNA的pH-活性谱,以及用于获得pH-稳定性谱。为了获得pH-稳定性谱,蛋白酶用测定缓冲液稀释10x,并37℃孵育2小时。孵育以后,在分析剩余活性之前,通过用pH9测定缓冲液稀释将蛋白酶样品转移到pH9。Protazyme AK分析用于获得37℃时的pH-活性谱,和pH7的温度-活性谱。结果示于下面的表

1-3中。对于表1,活性是相对于酶的每种底物的最佳pH值。对于表2,活性是相对于样品的剩余活性,其保持在稳定的条件下(5℃,pH9)。对于表3,活性是相对于酶在pH7时的最佳温度。

[0321] 表1:pH-活性谱

[0322]

pH	对Boc-VLFR-pNA	对Suc-AAPR-pNA	对Protazyme AK的
----	---------------	---------------	----------------

[0323]

	的AC3胰蛋白酶	的AC3胰蛋白酶	AC3胰蛋白酶
2	0.00	0.00	0.00
3	0.01	0.01	0.00
4	0.06	0.04	0.00
5	0.30	0.14	0.01
6	0.79	0.41	0.67
7	1.00	0.66	1.00
8	0.87	0.96	0.71
9	0.77	1.00	0.50
10	0.61	0.97	0.28
11	0.48	0.86	0.16
12	0.00	—	—

[0324] 表2:pH-稳定性谱

[0325]

pH	AC3胰蛋白酶
2.0	0.00
2.5	0.00
3.0	0.78
3.5	1.01
4.0	1.01
5.0	1.00
6.0	1.00
7.0	0.99
8.0	0.98
9.0	0.99
10.0	1.03
11.0	0.61
12.0	0.01
9.0而且于5℃2小时以后	1.00

[0326] 表3:pH7.0时的温度活性谱

[0327]

温度(℃)	对Protazyme AK的AC3胰蛋白酶
15	0.05

25	0.07
----	------

[0328]

37	0.20
50	0.45
60	1.00
70	0.74
80	0.19

[0329] 表征：对Suc-AAPX-pNA底物的P1特异性和胰蛋白酶比率计算

[0330] 使用10Suc-AAPX-pNA底物，以两个不同的pH值：pH7.0和pH9.0，进行pNA测定用于获得AC3胰蛋白酶的P1特异性。该活性还用于计算如W02010/112546所定义的胰蛋白酶比率。结果显示于下面的表4中。对于表4，每种Suc-AAPX-pNA底物的活性相对于最佳Suc-AAPX-pNA底物 (Suc-AAPR-pNA) 的活性。

[0331] 表4：对Suc-AAPX-pNA的P1特异性和胰蛋白酶比率

[0332]

Suc-AAPX-pNA	pH7时的AC3胰蛋白酶	pH9时的AC3胰蛋白酶
Suc-AAPA-pNA	0.00001	0.00000
Suc-AAPR-pNA	1.00000	1.00000
Suc-AAPD-pNA	0.00000	0.00000
Suc-AAPI-pNA	0.00000	0.00000
Suc-AAPM-pNA	0.00002 (0.0000151)	0.00001 (0.0000113)
Suc-AAPV-pNA	0.00000	0.00000
Suc-AAPL-pNA	0.00001	0.00000
Suc-AAPE-pNA	0.00001	0.00000
Suc-AAPK-pNA	0.67242	0.49569
Suc-AAPF-pNA	0.00001	0.00001 (0.0000086)
Suc-AAP (R/K) -pNA的最大值	1.00000	1.00000
Suc-AAP非 (R/K) -pNA的最大值	0.00002 (0.0000151)	0.00001 (0.0000113)
胰蛋白酶比率	66000	88000

[0333] 其他特征

[0334] AC3胰蛋白酶被抑肽酶抑制。

[0335] 通过SDS-PAGE测定的相对分子量是Mr=26kDa。

[0336] 测定的N-末端序列为：IVGGTKASTSTY。

[0337] 测定的完整分子量为Mw=23087.67Da。

[0338] 这些数据表明成熟AC3胰蛋白酶具有以下序列 (SEQ ID NO:2的1到225位氨基酸)：

[0339] I V G G T K A S T S T Y P F V V F L T D S T G F Q F C G G T L V K P N K V V T A A H C T V G E
S A A N I R V V A G R D D K Q S T A G T V S K V S K I W I H P S Y Q D A T K G S D V S V L T L S T S
L T Q F T P L P L A A T T D T A L Y K E G T A A T I L G W G D T T E G G S A S R Y L L K A T V P L T
S D A T C K K A Y G E Y S S T A M V C A G Y P Q G G T D T C Q G D S G G P L V A G N K L I G I T S
W G Q G C A E A G Y P G V Y T R V A T Y S S L I T Q Q L G

[0340] 实施例3:对来自Kutzneria albida的4C3胰蛋白酶样内肽酶进行裂解特异性分析

[0341] 引言:

[0342] 比较微生物的胰蛋白酶样内肽酶,AC3与猪胰蛋白酶的蛋白水解裂解特异性。

[0343] 通过把所述的内肽酶与来自Daisco Foods international的天然模式底物牛BioPURE- α 乳清蛋白一起孵育,进行裂解特异性分析。通过RP-HPLC分离和214nm处的UV信号检测,测定得到的蛋白水解肽的肽谱。

[0344] 样品:

[0345] 蛋白酶:猪胰蛋白酶(UniProt登录号:P00761)AC3(来自Kutzneria albida的胰蛋白酶样内肽酶)

[0346] 底物:来自Daisco的 α 乳清蛋白,来自Daisco Foods international的BE-2009-00036,97%蛋白

[0347] 蛋白水解:

[0348] 1g α -乳清蛋白溶于17.6ml 5mM CaCl₂中。样品加热到55℃,并用0.25MNaOH调节pH到7.5。以每克 α -乳清蛋白2mg酶的比率添加酶。在Titralab 856上进行pH滴定120min。120min以后取出200 μ l样品,并通过添加2.2 μ l三氟乙酸(TFA)停止。RP-HPLC分析之前,在-20℃储存样品。

[0349] RP-HPLC分析:

[0350] 在由Waters C18柱(ACQUITYUPLC® BEH C18,1.7 μ m,2.1x100mm)和来自Thermo Scientific的Accela液相色谱系统组成的RP-HPLC系统上对蛋白水解样品进行分析。所有样品在0.1%TFA中稀释5x(10 μ l样品+40 μ l 0.1%TFA)。注射5 μ l体积到柱中。

[0351] 通过以下梯度分离肽:

[0352] 所有样品稀释5x。注射体积:5 μ l

[0353] 溶剂A:在UHQ水中的0.1%TFA(CAS号76-05-1)和溶剂B:在乙腈(CAS号75-05-8)中的0.08%TFA。

[0354]

时间(分钟)	%B溶剂
0	5
2	5
49	50
51	90
53	90
55	5
60	5

[0355] 通过紫外检测器于214nm处监测洗脱肽。

[0356] 结果:

[0357] 为了比较,将AC3测定的UV色谱(上部迹线)与猪胰蛋白酶测定(下部迹线)一起显示于图2中。

[0358] 结论:

[0359] AC3水解的 α -乳清蛋白的RP-HPLC肽谱与猪胰蛋白酶产生的肽谱相似;因此,AC3具

有胰蛋白酶样特异性。

[0360] 实施例4:比较用AC3胰蛋白酶样蛋白酶与用猪来源的胰蛋白酶水解乳清蛋白浓缩物和 α -乳清蛋白

[0361] 材料:

[0362] 乳清蛋白浓缩物(WPC),80%干物质蛋白,Lacprodan80,Aria Foods Ingredients,DK

[0363] α -乳清蛋白(ALA),97%干物质蛋白,Davisco Foods International,MN,US

[0364] 无水 CaCl_2 ,Merck art2387

[0365] NaOH,Prolabo31627.368

[0366] 水解测定:

[0367] 产生溶于17.6ml 5mM CaCl_2 中的1g α 乳清蛋白或溶于17.4ml 5mM CaCl_2 中的1.2g Lacprodan80,以获得5%的终蛋白浓度。

[0368] 样品加热到55℃,并调节pH到7.5。记录用于pH调节所消耗的NaOH体积。添加酶,并在Titralab 856 (Radiometer)上进行pH滴定120min。监测NaOH消耗并转变为%DH。

[0369] 水解度:

[0370] 如Adler-Nissen,J.1986,Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins,第6章,所述的,通过pH stat测定悬浮液的水解度。

[0371] 水解度(DH)定义为裂解的肽键百分比,其可用pH-stat技术监测: $\text{DH} = h/h_{\text{tot}} \times 100$

[0372] h:裂解的肽键数,与反应期间消耗的碱量成比例。

[0373] h_{tot} :从氨基酸组成计算的蛋白中的肽键数。

[0374] ALA的 $h_{\text{tot}}=8.16$ 和WPC的 $h_{\text{tot}}=8.8$

[0375] $h = B \times N_b \times 1/\alpha \times 1/\text{Mp}$

[0376] B=碱消耗(ml)

[0377] N_b =碱当量浓度(normality) (0.25N)

[0378] $1/\alpha$ = α -NH₂基团的平均解离度

[0379] Mp=蛋白质量(g), (N x Kjeldahl因子)

[0380] 使用的内肽酶:

[0381]

酶	胰蛋白酶浓度(mg/ml)
来自Kutzneria albida的AC3胰蛋白酶样蛋白酶	1.3mg/ml
胰蛋白酶,从猪胰蛋白酶色谱纯化(PTN6.0S)	9.5mg/ml

[0382] 数据:

[0383] ALA:

[0384]

	剂量	DH(120min)
来自Kutzneria albida的AC3胰蛋白酶样蛋白酶	2mg酶蛋白/蛋白	6.9
胰蛋白酶,从猪胰蛋白酶色谱纯化(PTN6.0S)	2mg酶蛋白/蛋白	9.0

[0385] WPC:

[0386]

	剂量	DH(120min)
来自Kutzneria albida的AC3胰蛋白酶样蛋白酶	2mg酶蛋白/蛋白	6.0
胰蛋白酶,从猪胰蛋白酶色谱纯化 (PTN6.0S)	2mg酶蛋白/蛋白	7.6

[0387] 结论:

[0388] 在乳清蛋白级分 α -乳清蛋白与乳清蛋白浓缩物两者中,通过利用微生物来源的AC3胰蛋白酶样蛋白酶获得与利用从PTN6.0S色谱纯化的猪胰蛋白酶相同范围的水解度(DH)看来是可能的。

[0389] 实施例5:纯化并表在来自Actinosynnema mirum的胰蛋白酶样内肽酶

[0390] 纯化活性测定:

[0391] pNA底物:Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)

[0392] 温度:室温(25℃)

[0393] 测定缓冲液:100mM琥珀酸,100mM HEPES,100mM CHES,100mM CABS,1mM CaCl₂,150mM KCl,0.01%Triton X-100,pH9.0。

[0394] 20 μ l蛋白酶(稀释于0.01%Triton X-100)分散于微量滴定板孔中。通过添加200 μ l pNA底物启动分析(50mg Suc-AAPR-pNA溶于1.0ml DMSO中,并进一步用测定缓冲液稀释90x)。监测OD405的初始增加,作为对蛋白酶活性的量度。

[0395] 表征活性测定:

[0396] 1) pNA测定:

[0397] pNA底物:Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)

[0398] Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)

[0399] Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775)

[0400] Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835)

[0401] Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710)

[0402] Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790)

[0403] Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390)

[0404] Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725)

[0405] Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395)

[0406] Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770)

[0407] 温度:室温(25℃)

[0408] 测定缓冲液:100mM琥珀酸,100mM HEPES,100mM CHES,100mM CABS,1mM CaCl₂,150mM KCl,0.01%Triton X-100,用HCl或NaOH调节到pH值2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0和11.0。

[0409] 20 μ l蛋白酶(稀释于0.01%Triton X-100)与100 μ l测定缓冲液混合。通过添加100 μ l pNA底物(50mg溶于1.0ml DMSO中,并进一步用0.01%Triton X-100稀释45x),启动分析。监测OD405的初始增加,作为对蛋白酶活性的量度。

[0410] 2) Protazyme AK分析:

[0411] 底物:Protazyme AK片剂(交联的和染色的酪蛋白;来自Megazyme)

[0412] 温度:受控(测定温度)

[0413] 测定缓冲液:100mM琥珀酸,100mM HEPES,100mM CHES,100mM CABS,1mM CaCl_2 ,150mM KCl,0.01%Triton X-100,用HCl或NaOH调节到pH值2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0和11.0。

[0414] 通过温和地搅拌,使Protazyme AK片剂悬浮于2.0ml0.01%Triton X-100中。在Eppendorf管中混合500 μ l该悬浮液与500 μ l测定缓冲液,并置于冰上。添力20 μ l蛋白酶样品(稀释于0.01%Triton X-100中)。通过转移Eppendorf管到设置成测定温度的Eppendorf热混合仪中启动分析。将管在Eppendorf热混合仪上以其最高振动速率(1400rpm)孵育15分钟。通过把管转回到冰浴中停止孵育。然后在冰冷的离心机中离心试管几分钟,并转移200 μ l上清液到微量滴定板中。将OD650的读数作为对蛋白酶活性的量度。该分析中包括缓冲液空白(代替酶)。

[0415] 从菌株RBP00013纯化胰蛋白酶样蛋白酶

[0416] RBP00013是一种枯草芽胞杆菌菌株,其构建为用于表达来自Actinosynnema mirum的成熟胰蛋白酶样蛋白酶到培养基中,该成熟胰蛋白酶样蛋白酶的氨基酸序列如本申请SEQ ID NO:5所示。

[0417] 离心RBP00013培养液(20000x g,20min),小心地从沉淀慢慢倒出上清液。组合的上清液通过Nalgene0.2 μ m过滤装置过滤以除去剩余的芽胞杆菌宿主细胞。添加固体硫酸铵到0.2 μ m滤液以达到1.8M最终 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加期间用磁性搅拌器温和地混合滤液,并在添加以后继续搅拌30分钟以产生平衡的系统。然后将溶液施加到在100mM H_3BO_3 ,10mM MES,2mM CaCl_2 ,1.8M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,pH6中平衡的Phenyl Toyopearl 650S(TosoHaas)柱。用平衡缓冲液大量洗涤柱后,用相同缓冲液中的线性 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度(1.6-->0M)洗脱胰蛋白酶样蛋白酶。分析来自柱的级分的胰蛋白酶样蛋白酶活性(纯化活性测定),并合并形成主要活性峰的级分。将来自Phenyl Toyopearl柱的合并物转移到50mM H_3BO_3 ,5mM MES,1mM CaCl_2 ,pH6的G25Sephadex (GE Healthcare)柱上,并施加到在相同的缓冲液中平衡的S-sepharose FF柱(GE Healthcare)。用平衡缓冲液大量洗涤柱后,用相同缓冲液中的线性NaCl梯度(0-->0.5M)洗脱蛋白酶。分析来自柱的级分的胰蛋白酶样蛋白酶活性(纯化活性测定),并通过SDS-PAGE进一步分析活性级分。合并并在考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE凝胶上看起来至少90%纯的级分,并用于进一步表征。

[0418] 表征:pH-活性,pH-稳定性和温度-活性

[0419] pNA测定用于获得对Suc-AAPR-pNA的pH-活性谱,以及用于获得pH-稳定性谱。为了获得pH-稳定性谱,蛋白酶在测定缓冲液中稀释10x,并在37℃孵育2小时。孵育以后,在分析剩余活性之前,通过用pH9测定缓冲液稀释将蛋白酶样品转移到pH9。Protazyme AK测定用于获得pH7时的温度-活性谱。结果显示于下面的表5-7中。对于表5,活性相对于酶的最佳pH值。对于表6,活性是相对于样品的剩余活性,其保持在稳定的条件下(5℃,pH9)。对于表7,活性相对于酶在pH7时的最佳温度。

[0420] 表5:pH-活性谱

[0421]

pH	Actinofynnema mirum胰蛋白酶
2	0.00
3	0.00

4	0.02
5	0.12
6	0.28
7	0.48
8	0.86
9	1.00
10	0.98
11	0.77

[0422] 表6:pH-稳定性谱(于37℃2小时以后的剩余活性)

[0423]

pH	Actinofynnema mirum胰蛋白酶
2.0	0.00
3.0	0.28

[0424]

4.0	1.00
5.0	1.03
6.0	1.05
7.0	1.03
8.0	1.02
9.0	1.01
10.0	0.95
11.0	0.25
9.0而且于5℃2小时以后	1.00

[0425] 表7:pH7.0时的温度活性谱

[0426]

温度(℃)	Actinofynnema mirum胰蛋白酶
15	0.01
25	0.01
37	0.05
50	0.33
60	1.00
70	0.52
80	0.07

[0427] 表征:对Suc-AAPX-pNA底物的P1特异性和胰蛋白酶比率计算

[0428] 使用10Suc-AAPX-pNA底物,在pH9.0,进行pNA测定用于获得来自Actinosynnema mirum的胰蛋白酶样蛋白酶的P1特异性。该活性还用于计算如W02010/112546所定义的胰蛋白酶比率。结果显示于下面的表8中。对于表8,每种Suc-AAPX-pNA底物的活性相对于最佳Suc-AAPX-pNA底物(Suc-AAPR-pNA)的活性。

[0429] 表8:pH9.0时对Suc-AAPX-pNA的P1特异性和胰蛋白酶比率

[0430]

Suc-AAPX-pNA	Actinofynnema mirum胰蛋白酶
Suc-AAPA-pNA	0.00000
Suc-AAPR-pNA	1.00000
Suc-AAPD-pNA	0.00000
Suc-AAPI-pNA	0.00000
Suc-AAPM-pNA	0.00005
Suc-AAPV-pNA	0.00000
Suc-AAPL-pNA	0.00003

[0431]

Suc-AAPE-pNA	0.00000
Suc-AAPK-pNA	0.40723
Suc-AAPF-pNA	0.00013 (0.0001315)
Suc-AAP (R/K) -pNA的最大值	1.00000
Suc-AAP非 (R/K) -pNA的最大值	0.00013 (0.0001315)
胰蛋白酶比率	7600

[0432] 其他特征

[0433] 来自Actinosynnema mirum的胰蛋白酶样蛋白酶被PMSF抑制。

[0434] 通过SDS-PAGE测定的相对分子量是Mr=26kDa。

[0435] 测定的N-末端序列为:IVGGTRA。

[0436] 测定的完整分子量为Mw=22460.9Da。

[0437] 这些数据表明来自Actinosynnema mirum的成熟胰蛋白酶样蛋白酶具有以下序列 (SEQ ID NO:5的38-261位氨基酸):

[0438] I V G G T R A S I S E A P W T V Y L A S S S G S Q F C G G T L V K A N K V V T A A H C V A G R S A
 S S T R V V I G R E D K Q S T A G T V A T V S G I W S H P S Y R T A T S G Y D V A V L T L G T S V S
 G T Y L P L A T P S D T A L Y A A G T N A V A Y G W G A T C S G C S T S R Y L L K V T V P V T S D
 A T C K T A Y S Q Y S N T S M V C A G V P A G G K D T C Q G D S G G P L V A G G K L I G A T S W G N G C A L P N Y P G V Y A R V A A Y Y S V L S A Q I G

[0439] 实施例6:纯化并表征来自Kutzneria albida的胰蛋白酶样内肽酶

[0440] 纯化活性测定:

[0441] pNA底物:Suc-AAPR-pNA (BachemL-1720) .

[0442] 温度:室温 (25℃)

[0443] 测定缓冲液:100mM琥珀酸,100mM HEPES,100mM CHES,100mM CABS,1mM CaCl₂, 150mM KCl,0.01%Triton X-100, pH 9.0。

[0444] 20μl蛋白酶 (稀释于0.01%Triton X-100) 分散于微量滴定板孔中。通过添加200μl pNA底物 (50mg Suc-AAPR-pNA溶于1.0ml DMSO中,并进一步用测定缓冲液稀释90x),启动分析。监测OD405的初始增加,作为对蛋白酶活性的量度。

[0445] 表征活性测定:

[0446] 1) pNA测定:

[0447] pNA底物:Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)

[0448] Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)

[0449] Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775)

[0450] Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835)

[0451] Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710)

[0452] Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790)

[0453] Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390)

[0454] Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725)

[0455] Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395)

[0456] Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770)

[0457] 温度:室温 (25℃)

[0458] 测定缓冲液:100mM琥珀酸,100mM HEPES,100mM CHES,100mM CABS,1mM CaCl₂, 150mM KCl,0.01% Triton X-100,用HCl或NaOH调节到pH值2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0, 8.0,9.0,10.0和11.0。

[0459] 20μl蛋白酶(稀释于0.01% Triton X-100)与100μl测定缓冲液混合。通过添加100 μl pNA底物(50mg溶于1.0ml DMSO中,并进一步用0.01% Triton X-100稀释45x),启动分析。监测OD405的初始增加,作为对蛋白酶活性的量度。

[0460] 2) Protazyme AK测定:

[0461] 底物:Protazyme AK片剂(交联的和染色的酪蛋白;来自Megazyme)

[0462] 温度:受控(测定温度)

[0463] 测定缓冲液:100mM琥珀酸,100mM HEPES,100mM CHES,100mM CABS,1mM CaCl₂, 150mM KCl,0.01% Triton X-100,用HCl或NaOH调节到pH值2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,5.0, 6.0,7.0,8.0,9.0,10.0和11.0。

[0464] 通过温和搅拌,使Protazyme AK片剂悬浮于2.0ml 0.01% Triton X-100中。在Eppendorf管中混合500μl该悬浮液与500μl测定缓冲液,并置于冰上。添加20μl蛋白酶样品(稀释于0.01% Triton X-100中)。通过转移Eppendorf管到设置成测定温度的Eppendorf热混合仪中启动分析。将管在Eppendorf热混合仪上以其最高振动速率(1400rpm)孵育15分钟。通过把管转回到冰浴中停止孵育。然后在冰冷的离心机中离心试管几分钟,并转移200μl上清液到微量滴定板中。将OD650的读数作为对蛋白酶活性的量度。该分析中包括缓冲液空白(代替酶)。

[0465] 从THFF0037菌株纯化胰蛋白酶样蛋白酶

[0466] THFF0037是一种枯草芽胞杆菌菌株,其构建为用于表达来自Kribbella flavida的成熟胰蛋白酶样蛋白酶到培养基中,该成熟胰蛋白酶样蛋白酶的氨基酸序列如本申请SEQ ID NO:6所示。

[0467] 离心THFF0037培养液(20000xg,20min),小心地从沉淀慢慢倒出上清液。组合的上清液通过Nalgene 0.2μm过滤装置过滤以除去剩余的芽胞杆菌宿主细胞。添加固体硫酸铵到0.2μm滤液以达到1.5M最终(NH₄)₂SO₄浓度。(NH₄)₂SO₄添加期间用磁性搅拌器温和混合滤液,并在添加以后继续搅拌30分钟以产生平衡的系统。然后将溶液施加到在100mM H₃BO₃, 10mM MES,2mM CaCl₂,1.5M (NH₄)₂SO₄,pH6中平衡的Phenyl Toyopearl 650S柱(TosoHaas)。用平衡缓冲液大量洗涤柱后,用相同缓冲液中的线性(NH₄)₂SO₄梯度(1.5-->0M)洗脱胰蛋

白酶样蛋白酶。分析来自柱的级分的胰蛋白酶样蛋白酶活性(纯化活性测定),并合并形成主要活性峰的级分。将来自Phenyl Toyopearl柱的合并物转移到50mM H₃BO₃,5mM MES,1mM CaCl₂,pH6的G25 Sephadex柱(GE Healthcare)上,并用20%CH₃COOH调节pH到pH4.5。将pH经调节的溶液施加到在10mM CH₃COOH/NaOH,1mM CaCl₂,pH4.5中平衡的SOURCE S柱(GE Healthcare)。用平衡缓冲液大量洗涤柱后,用相同缓冲液中的线性NaCl梯度(0→0.5M)洗脱蛋白酶。分析来自柱的级分的胰蛋白酶样蛋白酶活性(纯化活性测定),并合并形成活性峰的级分。将来自SOURCE S柱的合并物转移到在100mM H₃BO₃,10mM MES,2mM CaCl₂,100mM NaCl,pH6中平衡的Sephadex75柱(GE Healthcare)上。用相同缓冲液洗脱柱,分析来自柱的级分的胰蛋白酶样蛋白酶活性(纯化活性测定),并通过SDS-PAGE进一步分析活性级分。合并并在考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE凝胶上看起来至少90%纯的级分,并用于进一步表征。

[0468] 表征:pH-活性,pH-稳定性和温度-活性

[0469] pNA测定用于获得对Suc-AAPR-pNA的pH-活性谱,以及用于获得pH-稳定性谱。为了获得pH-稳定性谱,蛋白酶在测定缓冲液中稀释10x,并在37℃孵育2小时。孵育以后,在分析剩余活性之前,通过用pH9测定缓冲液稀释将蛋白酶样品转移到pH9。Protazyme AK测定用于获得pH7时的温度-活性谱。结果显示于下面的表9-11中。对于表9,活性是相对于酶的最佳pH。对于表10,活性是相对于样品的剩余活性,其保持在稳定的条件下(5℃,pH9)。对于表11,活性是相对于酶在pH7时的最佳温度。

[0470] 表9:pH-活性谱

[0471]

pH	Kribbella flavida胰蛋白酶
2	0.00
3	0.00
4	0.01
5	0.07
6	0.29
7	0.60
8	0.83
9	0.93
10	1.00
11	0.90

[0472] 表10:pH-稳定性谱(于37℃2小时以后的剩余活性)

[0473]

pH	Kribbella flavida胰蛋白酶
2.0	0.19
3.0	0.37
4.0	0.66
5.0	0.91
6.0	0.96
7.0	0.95

8.0	0.95
9.0	0.86
10.0	0.48
11.0	0.01
9.0而且于5℃2小时以后	1.00

[0474] 表11:pH7.0时的温度活性谱

[0475]

温度(℃)	Kribbella flavida胰蛋白酶
15	0.04
25	0.10

[0476]

37	0.30
50	1.00
60	0.27
70	0.12

[0477] 表征:对Suc-AAPX-pNA底物的P1特异性和胰蛋白酶比率计算

[0478] 使用10种Suc-AAPX-pNA底物,在pH9.0,进行pNA测定用于获得来自Actinosynnema mirum的胰蛋白酶样蛋白酶的P1特异性。该活性还用于计算如W02010/112546所定义的胰蛋白酶比率。结果显示于下面的表12中。对于表8,每种Suc-AAPX-pNA底物的活性相对于最佳Suc-AAPX-pNA底物(Suc-AAPR-pNA)的活性。

[0479] 表12:pH9.0时对Suc-AAPX-pNA的P1特异性和胰蛋白酶比率

[0480]

Suc-AAPX-pNA	Kribbella flavida胰蛋白酶
Suc-AAPA-pNA	0.00001
Suc-AAPR-pNA	1.00000
Suc-AAPD-pNA	0.00000
Suc-AAPI-pNA	0.00002
Suc-AAPM-pNA	0.00004
Suc-AAPV-pNA	0.00000
Suc-AAPL-pNA	0.00002
Suc-AAPE-pNA	0.00001
Suc-AAPK-pNA	0.56906
Suc-AAPF-pNA	0.00005 (0.0000477)
Suc-AAP (R/K) -pNA的最大值	1.00000
Suc-AAP非 (R/K) -pNA的最大值	0.00005 (0.0000477)
胰蛋白酶比率	21000

[0481] 其他特征

[0482] EDTA抑制来自Kribbella flaviDa的胰蛋白酶样蛋白酶。

[0483] 通过SDS-PAGE测定的相对分子量是Mr=26kDa。

[0484] 测定的N-末端序列为:IVGGSL。

[0485] 测定的完整分子量为 $M_w=23169.0\text{Da}$ 。

[0486] 这些数据表明来自Kribbella flaVida的成熟胰蛋白酶样蛋白酶具有以下序列(SEQ ID NO:6的40-266位氨基酸):

[0487] I V G G S L A S T A Q A P W A I A L N N S Q S P S P S G Q W C G A T L V K A N K I V T A A H
C V T K A R S T Y T A I Q G R D S L S S T T G R T S K I A S I W K D P Q Y G R A P G H D V A V L T L
A T P F T G V P T L P L E T S L A A D A V G A Q P T V Y G W G N T E G T G P A D R F Q K V L V P V
L G D A Y C G Q V Y A N Y D Y V A N G E I C A G Y K E G G K D S C Q G D S G G P L V L N G R L F
G V V S W G I G C A D A G N P G V Y A E V A T Y A A A L T A Q I N S

[0488] 从该成熟序列计算的分子量是23168.7Da。

[0489] 实施例7:用来自Actinosynnema mirum与Kribbella flavida的胰蛋白酶样蛋白酶水解乳清蛋白浓缩物与 α -乳清蛋白

[0490] 材料:

[0491] 乳清蛋白浓缩物(WPC),80%干物质蛋白,Lacprodan80,Aria Foods Ingredients,DK

[0492] α -乳清蛋白(ALA),97%干物质蛋白,Davisco Foods International,MN,US

[0493] 无水 CaCl_2 ,Merck art2387

[0494] NaOH,Prolabo 31627.368

[0495] 水解测定:

[0496] 产生溶于17.6ml 5mM CaCl_2 的1g α -乳清蛋白或溶于17.4ml 5mM CaCl_2 的1.2g Lacprodan 80以获得5%的终蛋白浓度。

[0497] 样品加热到55℃或50℃,并调节pH到7.5。记录用于pH调节所消耗的NaOH体积。添加酶,并在Titralab 856(Radiometer)上进行pH滴定120min。监测NaOH消耗并转变为%DH。

[0498] 水解度(DH):

[0499] 如Adler-Nissen,J.1986,Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins,第6章,所述的,通过pH stat测定悬浮液的水解度。

[0500] 可以用pH-stat技术监测水解度(DH),其定义为裂解的肽键百分数: $\text{DH}=\text{h}/\text{h}_{\text{tot}} \times 100$

[0501] h:裂解的肽键数,其与反应期间消耗的碱量成正比。

[0502] h_{tot} :从氨基酸组成计算的蛋白中的肽键数。

[0503] ALA的 $\text{h}_{\text{tot}}=8.16$,WPC的 $\text{h}_{\text{tot}}=8.8$

[0504] $\text{h}=\text{B} \times \text{Nb} \times 1/\alpha \times 1/\text{Mp}$

[0505] B=碱消耗(ml)

[0506] Nb=碱当量浓度(0.25N)

[0507] $1/\alpha=\alpha\text{-NH}_2$ 基团的平均解离度

[0508] Mp=蛋白质量(g),(N x Kjeldahl因子)

[0509] 使用的内肽酶:

[0510]

酶	浓度(mg/ml)
---	-----------

来自Actinosynnema mirum的胰蛋白酶样蛋白酶	0.69mg/ml
来自Kribbella flavida的胰蛋白酶样蛋白酶	0.38mg/ml
来自尖镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶	8.0mg/ml
胰蛋白酶,从猪胰蛋白酶色谱纯化 (PTN6.0S)	9.5mg/ml
来自拟诺卡氏菌种NRRL 18262的胰凝乳蛋白酶样蛋白酶	8.8mg/ml
猪胰腺胰蛋白酶Novo 6.0S,PTN	200mg/g

[0511] 来自尖镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶的氨基酸序列和来自拟诺卡氏菌种NRRL 18262的胰凝乳蛋白酶样蛋白酶的氨基酸序列参见W02010/112546。

[0512] 数据:

[0513] 用胰蛋白酶样酶水解的ALA:

[0514]

	剂量	DH (120min)
来自Actinosynnema mirum的胰蛋白酶样蛋白酶	2mg酶蛋白/g蛋白	6.5
来自Kribbella flavida的胰蛋白酶样蛋白酶	2mg酶蛋白/g蛋白	7.9
来自尖镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶	2mg酶蛋白/g蛋白	4.8
胰蛋白酶,从猪胰蛋白酶色谱纯化 (PTN 6.0S)	2mg酶蛋白/g蛋白	9.0

[0515] 用胰蛋白酶样酶+胰凝乳蛋白酶样酶水解的ALA:

[0516]

	剂量	DH (120min)
来自Actinosynnema mirum的胰蛋白酶样蛋白酶+来自拟诺卡氏菌的胰凝乳蛋白酶	1.8+0.2mg酶蛋白/g蛋白	11.9
来自Kribbella flavida的胰蛋白酶样蛋白酶+来自拟诺卡氏菌的胰凝乳蛋白酶	1.8+0.2mg酶蛋白/g蛋白	8.9
来自尖镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶+来自拟诺卡氏菌的胰凝乳蛋白酶	1.8+0.2mg酶蛋白/g蛋白	8.4
猪胰蛋白酶(PTN 6.0S)	2mg酶蛋白/g蛋白	13.3

[0517] 用胰蛋白酶样酶+胰凝乳蛋白酶样酶水解的WPC:

[0518]

	剂量	DH (120min)
来自Actinosynnema mirum的胰蛋白酶样蛋白	1.8+0.2mg酶蛋白/g蛋白	10.9

[0519]

酶+来自拟诺卡氏菌的胰凝乳蛋白酶		
来自尖镰孢的胰蛋白酶样蛋白酶+来自拟诺卡氏菌的胰凝乳蛋白酶	1.8+0.2mg酶蛋白/g蛋白	9.9
猪胰蛋白酶(PTN 6.0S)	2mg酶蛋白/g蛋白	10.1

[0520] 生物材料保藏

[0521] 下面的生物材料已经在布达佩斯条约的条款下在德国Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSM),Mascheroder Weg1B,D-38124Braunschweig保藏,并提供以下保藏号:

[0522] 保藏物:保藏号: 保藏日期:

[0523] 大肠杆菌NN059278 DSM23706 2010年6月18日

[0524] 所述菌株于下述条件下保藏:确保在本专利申请未决期间,依据该外国专利法律的授权的人能够获得所述培养物。所述保藏物代表所保藏菌株的基本上纯的培养物。在提交了该申请的副本,或其后续文本的国家,依据该外国专利法律可以获得所述保藏物。然而,应当理解,保藏物的获得并不构成对实施本发明的许可,实施本发明是对政府行为所授予的专利权的侵犯。

[0525] 本文描述和要求保护的本发明并不局限于本文公开的特定实施方案的范围内,因为这些实施方案旨在例示本发明的几个实施方案。旨在将任何等同的方面包含于本发明的范围内。实际上,从前面的说明中,除本文所显示和描述的之外,本发明的多种修改对于本领域的技术人员来说是显而易见的。这些修改也旨在落入所附的权利要求的范围内。在冲突的情况下,将以包括定义部分的本公开为准。

序列表

<110> 诺维信公司(Novozymes A/S)

<120> 具有内肽酶活性的多肽以及编码其的多核苷酸

<130> 11728-WO-PCT

<160> 9

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 675

<212> DNA

<213> Kutzneria albida

<400> 1

```

atcgtcggcg gtacgaaggc cagtacctcg acctaccctg tcgtggtctt cctgactgac    60
agcaccgggt tccagttctg cgggtggcacg ctgggtcaagc cgaacaaggt ggtcacggcg    120
gcgcactgca ccgtcgggtg gtccgcggcc aacatcccg tttgtgcccg tcgcgacgac    180
aagcagagca ccgccggcac tgtctcgaag gtcagcaaga tctggatcca cccgagttac    240
caggacgccca ccaagggcag cgacgtgtcg gtgctgacct tgtcgaccag cctgaccacg    300
ttcacgccgt tgccgtggcg tgccaccact gacaccgcgc tgtacaagga gggcaccgcc    360
gcgaccatcc tcggctgggg tgacaccacc gagggcgggt cggectctcg gtacctgctc    420
aaggcgacag tgccgtgac cagcgacgcc acctgcaaga aggcgtacgg cgagtacagt    480
tccaccgcga tggctgtgtc cggatacccg cagggtggca cggacacctg ccaggcgac    540
tccggcggtc cgctcgtcgc cggcaacaag ctgatcgcca tcacctcgtg gggccagggc    600
tgccgccagg ccggttatcc aggcgtctac acccgggtcg ccacctacag ttcgtgatc    660
accagcagc tcggc                                         675

```

[0001]

<210> 2

<211> 225

<212> PRT

<213> Kutzneria albida

<400> 2

```

Ile Val Gly Gly Thr Lys Ala Ser Thr Ser Thr Tyr Pro Phe Val Val
1          5          10          15
Phe Leu Thr Asp Ser Thr Gly Phe Gln Phe Cys Gly Gly Thr Leu Val
20          25          30
Lys Pro Asn Lys Val Val Thr Ala Ala His Cys Thr Val Gly Glu Ser
35          40          45
Ala Ala Asn Ile Arg Val Val Ala Gly Arg Asp Asp Lys Gln Ser Thr
50          55          60
Ala Gly Thr Val Ser Lys Val Ser Lys Ile Trp Ile His Pro Ser Tyr
65          70          75          80
Gln Asp Ala Thr Lys Gly Ser Asp Val Ser Val Leu Thr Leu Ser Thr
85          90          95
Ser Leu Thr Gln Phe Thr Pro Leu Pro Leu Ala Ala Thr Thr Asp Thr
100         105         110
Ala Leu Tyr Lys Glu Gly Thr Ala Ala Thr Ile Leu Gly Trp Gly Asp
115         120         125

```

Thr Thr Glu Gly Gly Ser Ala Ser Arg Tyr Leu Leu Lys Ala Thr Val
 130 135 140

Pro Leu Thr Ser Asp Ala Thr Cys Lys Lys Ala Tyr Gly Glu Tyr Ser
 145 150 155 160

Ser Thr Ala Met Val Cys Ala Gly Tyr Pro Gln Gly Gly Thr Asp Thr
 165 170 175

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Ala Gly Asn Lys Leu Ile
 180 185 190

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Glu Ala Gly Tyr Pro Gly
 195 200 205

Val Tyr Thr Arg Val Ala Thr Tyr Ser Ser Leu Ile Thr Gln Gln Leu
 210 215 220

Gly
 225

<210> 3
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> 合成的

[0002] <400> 3
 atgaagaaac cgttggggaa aattgtcgca agcaccgcac tactcatttc tgttgctttt 60
 agttcatcga tcgcacggc tatcgttggt ggcactaaag cttcaacttc aacataccca 120
 ttctgtgttt ttcttactga ctctacaggt ttccagtttt gtggtggcac acttggttaa 180
 ccaaacaaag ttgttactgc agcgattgc acagttggcg agtcagctgc aaacatccgc 240
 gttgttgccg gtcgcgacga caaacagtca actgttgcca ctgtttctaa agtaagcaaa 300
 atctggatcc atccttctta ccaagacgct acaaaaagct cagacgtttc agtacttact 360
 ctttctacgt ctcttacgca gttcacacct ctccgcttg cagcaactac ggacacagca 420
 ctttacaag agggaaactgc ggcaactatc cttggttggg gtgacacaac tgaggaggcg 480
 tctgtttcac gctaccttct taaagcaaca gtacctctta ctacgacgc tacttgcaag 540
 aaagcttacg gtgagtactc ttcaacagcg atggtttgcg caggctatcc tcaaggcgga 600
 actgacacgt gccaggcgga ctctggtgga cctctttag ctggcaacaa gcttatcggc 660
 atcacttctt ggggtcaagg ctgtgctgag gctggttacc caggagtta cactcgcgtt 720
 gctacttatt ctacgttat cactcaacag cttggc 756

<210> 4
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 克劳氏芽孢杆菌(Bacillus clausii)

<400> 4

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala
 20 25

<210> 5
 <211> 261

<212> PRT
<213> Actinosynnema mirum

<400> 5

Met Ala Lys Thr Leu Arg Arg Leu Ala Lys Phe Ile Gly Leu Gly Val
1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ile Gly Leu Met Thr Thr Pro Val Ser Ser Ala Ser
20 25 30

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

Ala Pro Trp Thr Val Tyr Leu Ala Ser Ser Ser Gly Ser Gln Phe Cys
50 55 60

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

Val Ala Gly Arg Ser Ala Ser Ser Thr Arg Val Val Ile Gly Arg Glu
85 90 95

Asp Lys Gln Ser Thr Ala Gly Thr Val Ala Thr Val Ser Gly Ile Trp
100 105 110

Ser His Pro Ser Tyr Arg Thr Ala Thr Ser Gly Tyr Asp Val Ala Val
115 120 125

Leu Thr Leu Gly Thr Ser Val Ser Gly Thr Tyr Leu Pro Leu Ala Thr
130 135 140

Pro Ser Asp Thr Ala Leu Tyr Ala Ala Gly Thr Asn Ala Val Ala Tyr
145 150 155 160

[0003] Gly Trp Gly Ala Thr Cys Ser Gly Cys Ser Thr Ser Arg Tyr Leu Leu
165 170 175

Lys Val Thr Val Pro Val Thr Ser Asp Ala Thr Cys Lys Thr Ala Tyr
180 185 190

Ser Gln Tyr Ser Asn Thr Ser Met Val Cys Ala Gly Val Pro Ala Gly
195 200 205

Gly Lys Asp Thr Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Ala Gly
210 215 220

Gly Lys Leu Ile Gly Ala Thr Ser Trp Gly Asn Gly Cys Ala Leu Pro
225 230 235 240

Asn Tyr Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Ala Ala Tyr Tyr Ser Val Leu
245 250 255

Ser Ala Gln Ile Gly
260

<210> 6
<211> 266
<212> PRT
<213> Kribbella flavida

<400> 6

Met Thr Gly Lys Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ala Leu Ala Ala Ala Val
1 5 10 15

Val Ala Leu Ala Ser Thr Gly Ala Val Gly Ala Ala Gln Ala Lys Pro
20 25 30

Pro Ala Pro Pro Val Thr Asn Ile Val Gly Gly Ser Leu Ala Ser Thr
35 40 45

Ala Gln Ala Pro Trp Ala Ile Ala Leu Asn Asn Ser Gln Ser Pro Ser
50 55 60

Pro Ser Gly Gln Trp Cys Gly Ala Thr Leu Val Lys Ala Asn Lys Ile
65 70 75 80

Val Thr Ala Ala His Cys Val Thr Lys Ala Arg Ser Thr Tyr Thr Ala
85 90 95

Ile Gln Gly Arg Asp Ser Leu Ser Ser Thr Thr Gly Arg Thr Ser Lys
100 105 110

Ile Ala Ser Ile Trp Lys Asp Pro Gln Tyr Gly Arg Ala Pro Gly His
115 120 125

Asp Val Ala Val Leu Thr Leu Ala Thr Pro Phe Thr Gly Val Pro Thr
130 135 140

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

Thr Val Tyr Gly Trp Gly Asn Thr Glu Gly Thr Gly Pro Ala Asp Arg
165 170 175

Phe Gln Lys Val Leu Val Pro Val Leu Gly Asp Ala Tyr Cys Gly Gln
180 185 190

Val Tyr Ala Asn Tyr Asp Tyr Val Ala Asn Gly Glu Ile Cys Ala Gly
195 200 205

Tyr Lys Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
210 215 220

Leu Val Leu Asn Gly Arg Leu Phe Gly Val Val Ser Trp Gly Ile Gly
225 230 235 240

[0004] Cys Ala Asp Ala Gly Asn Pro Gly Val Tyr Ala Glu Val Ala Thr Tyr
245 250 255

Ala Ala Ala Leu Thr Ala Gln Ile Asn Ser
260 265

<210> 7
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> 拟诺卡氏菌属菌种(Nocardiopsis sp.) NRRL 18262

<400> 7

Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser
1 5 10 15

Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr
20 25 30

Ala Gly His Cys Gly Arg Val Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly
35 40 45

Arg Gly Val Phe Glu Gln Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe
50 55 60

Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr
65 70 75 80

Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile
85 90 95

Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly
100 105 110

Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val
115 120 125

Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly
130 135 140

Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr
165 170 175

Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr
180 185

<210> 8
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Metarhizium anisopliae

<400> 8

Met Glu Leu Thr Lys Phe Leu Ala Leu Leu Ala Val Ile Leu Pro Val
1 5 10 15

Ala Tyr Gly Ala Pro Thr Gln Ala Ala Ser Leu His Pro Gln Ile Leu
20 25 30

Glu Ala Met Lys Arg Asp Leu Gly Leu Asn Ala Glu Gln Ala Thr Val
35 40 45

Arg Val Ala Arg Glu Ile His Ala Thr Asp Val Ile Glu Gln Leu Arg
50 55 60

Ser Ser Val Ala Phe Ala Gly Ala Trp Ile Asp Ala Asp Val Leu Tyr
65 70 75 80

[0005] Ile Gly Ile Thr Asp Gln Ala Leu Ala Asp Glu Val Thr Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Thr Pro Ile Val Met Thr Asn Ser Leu Ser Lys Leu Glu Lys Ala
100 105 110

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

Thr Ser Ser Asp Thr Ser Ser Gly Ile Ala Ser Tyr Phe Val Asp Val
130 135 140

Ala Ala Asn Lys Leu Val Ile Glu Ala Leu Ala Asp Ser His Gly His
145 150 155 160

Ala Glu Gln Leu Ala Ala Gln Val Gly Leu Thr Ser Glu Phe Glu Val
165 170 175

Arg Thr Val Glu Thr Met Pro Thr Thr Met Ala Thr Val Gln Gly Gly
180 185 190

Asp Val Tyr Tyr Ile Asn Arg Ser Ser Arg Cys Ser Ile Gly Phe Ala
195 200 205

Val Thr Thr Gly Phe Val Ser Ala Gly His Cys Gly Gly Ser Gly Ala
210 215 220

Ser Ala Thr Thr Ser Ser Gly Glu Ala Leu Gly Thr Phe Ser Gly Ser
225 230 235 240

Val Phe Pro Gly Ser Ala Asp Met Ala Tyr Val Arg Thr Val Ser Gly
245 250 255

Thr Val Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Gly Tyr Gly Gln Gly Ser Phe Pro
260 265 270

Val Ser Gly Ser Ser Glu Ala Ala Val Gly Ala Ser Ile Cys Arg Ser

	275		280		285
	Gly Ser Thr Thr Gln Val His Cys Gly Thr Ile Gly Ala Lys Gly Ala				
	290		295		300
	Thr Val Asn Tyr Pro Gln Gly Ala Val Ser Gly Leu Thr Arg Thr Ser				
	305		310		315
	Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Tyr Ser Gly Ser				
		325		330	335
	Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asp Cys Ser Arg Gly				
		340		345	350
	Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Arg Ile Leu Gln Thr Tyr Gly				
		355		360	365
	Leu Thr Leu Val Thr Ala				
	370				
	<210> 9				
	<211> 375				
	<212> PRT				
	<213> Brachysporiella gayana				
	<400> 9				
	Met Glu Leu Thr Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Ile Leu Pro Ile				
	1	5		10	15
	Ala Tyr Gly Val Pro Met Asp Ala Thr Thr Asn Leu Ser Pro Lys Val				
		20		25	30
	Leu Ala Ala Met Lys Arg Asp Leu Gly Leu Asp Ala Arg Glu Ala Thr				
		35		40	45
	Ala Arg Val Thr Phe Glu Arg Arg Ala Gly Asp Val Ile Glu Glu Leu				
		50		55	60
	Arg Ser Ser Leu Gly Asp Ser Phe Ala Gly Ala Trp Val Thr Asp Gly				
	65		70		75
	Lys Val Ile Asn Ile Gly Val Thr Asp Gln Ala Leu Val Ser Lys Val				
		85		90	95
	Lys Glu Ala Gly Ala Glu Pro Met Val Met Lys Asn Ser Leu Gly Lys				
		100		105	110
	Leu Gln Glu Ala Lys Lys Lys Leu Asp Gln Ile Ile Lys Glu Lys Pro				
		115		120	125
	Lys Thr Leu Ser Thr Ser Gly Lys Pro Gly Ile Ala Thr Tyr Tyr Val				
		130		135	140
	Asp Ile Glu Thr Asn Lys Leu Ile Ile Thr Ala Leu Ser Thr Ser Ile				
	145		150		155
	Thr Gln Ala Glu Asp Leu Ala Lys Glu Val Gly Leu Ser Glu Ser Glu				
		165		170	175
	Phe Glu Val Arg Lys Thr Glu Lys Met Pro Ser Pro Phe Ile Leu Gly				
		180		185	190
	Gly Asp Pro Phe Val Ile Asn Asn Ser Ala Val Cys Ser Val Gly Phe				
		195		200	205
	Ala Val Ser Gly Gly Phe Val Ser Ala Gly His Cys Gly Gly Gln Gly				
		210		215	220
	Ser Pro Val Thr Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Leu Gly Thr Ile Glu Gly				
	225		230		235
					240

[0006]

	Ser	Val	Phe	Pro	Gly	Asp	Ala	Asp	Met	Ser	Phe	Ile	Arg	Ala	Val	Asp	
					245					250					255		
	Gly	Thr	Asp	Leu	Pro	Gly	Ile	Val	Gly	Thr	Tyr	Gly	Asn	Gly	Asp	Gln	
				260					265					270			
	Pro	Ile	Phe	Gly	Ser	Asn	Val	Ala	Pro	Ile	Gly	Ser	Gly	Val	Cys	Arg	
			275					280					285				
	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Gly	Tyr	His	Cys	Gly	Gln	Leu	Asp	Ala	Tyr	Asp	
		290					295					300					
[0007]	Val	Thr	Val	Asn	Tyr	Asp	Val	Gly	Pro	Val	Phe	Gly	Leu	Thr	Met	Thr	
	305					310					315					320	
	Ser	Ala	Cys	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	Phe	Phe	Ala	Gly	
				325						330					335		
	Asp	Gln	Ala	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	Cys	Thr	Ser	
				340					345					350			
	Gly	Gly	Gln	Thr	Phe	Phe	Gln	Pro	Val	Asn	Glu	Ile	Leu	Glu	Thr	Tyr	
			355					360					365				
	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr	Thr	Ala										
		370					375										

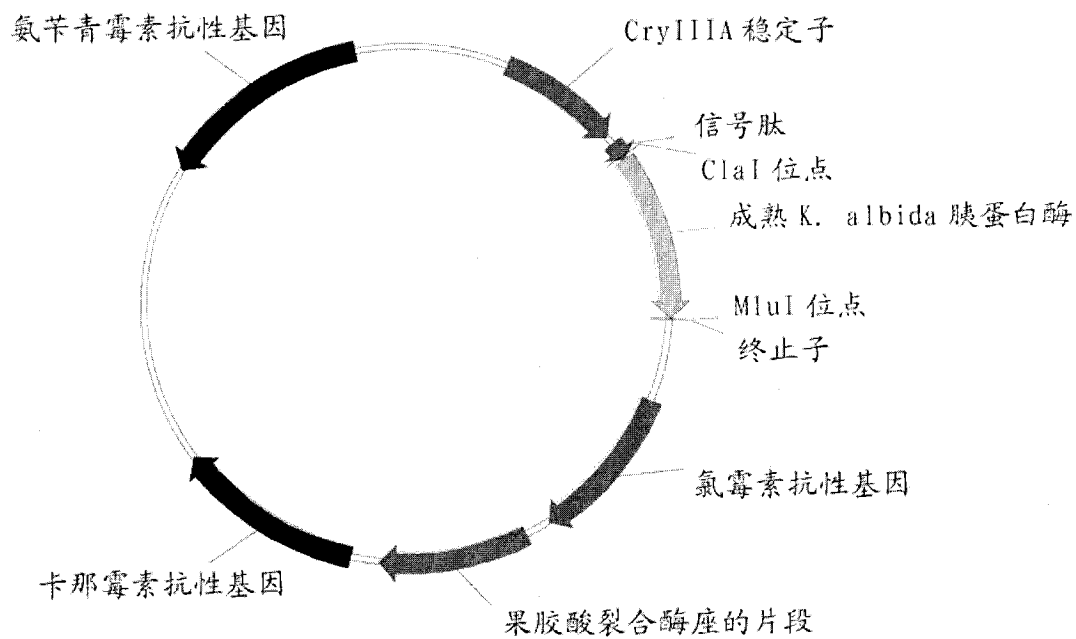


图1

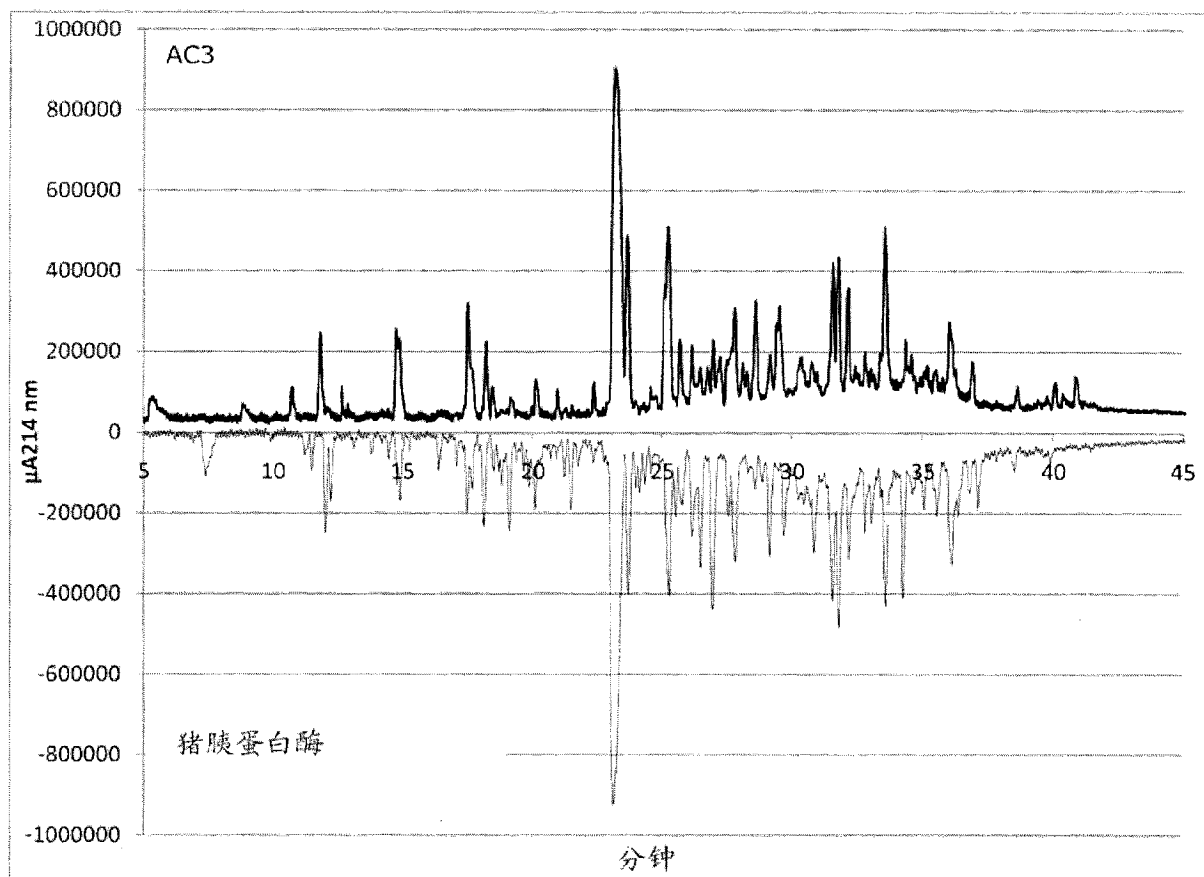


图2