



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112105730 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 18

(21) 申请号 201980017089.3

(22) 申请日 2019.03.07

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112105730 A

(43) 申请公布日 2020.12.18

(30) 优先权数据  
1803654.1 2018.03.07 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.09.04

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2019/055724 2019.03.07

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/170809 EN 2019.09.12

(73) 专利权人 北极酶 AS 公司  
地址 挪威特罗姆瑟

(72) 发明人 B·K·斯特里伯尼 C·佩德森  
J·R·亨利克森 O·拉内斯  
M·S·洛伦森

(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理  
有限公司 11728  
专利代理师 王庆云 尹吉伟

(51) Int.Cl.  
C12N 9/52 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2017006266 A1, 2017.01.12  
Atle Noralf Larsen 等  
.Characterization of a recombinantly  
expressed proteinase K-like enzyme from a  
psychrotrophic Serratia.The FEBS  
Journal.2006,第273卷(第1期),图1、图7以及第  
52页左栏第2段. (续)

审查员 郭雅萍

权利要求书4页 说明书46页  
序列表6页 附图5页

(54) 发明名称

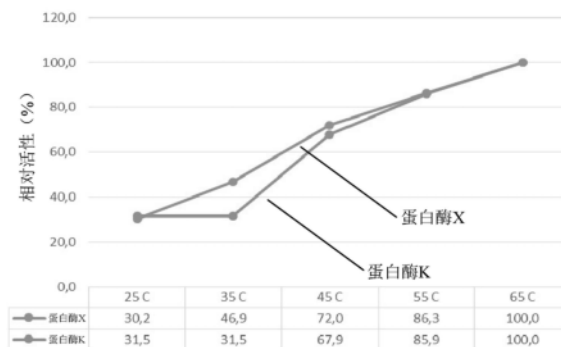
热不稳定蛋白酶

(57) 摘要

本发明提供了一种组合物,所述组合物包括蛋白酶或其酶活性片段,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中i)所述组合物中游离钙的浓度 $\leq$ 约80  $\mu$  M;或ii)所述组合物中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。在这种条件下,所述蛋白酶和其酶活性片段是可诱导地热不稳定的。本发明进一步提供了样品,所述样品包括一种或多种多肽以及蛋白酶或其酶活性片段,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中i)所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80  $\mu$  M;或ii)所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。本发明进一步提供了方法,所述方法包括灭活这种蛋白酶或其酶活性片

段,其中所述方法包括加热所述样品以灭活所述蛋白酶或酶活性片段的步骤,并且其中i)所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80  $\mu$  M;或ii)所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

蛋白酶X和蛋白酶K最佳温度



CN 112105730 B

[接上页]

(56) 对比文件

Atle Noralf Larsen 等  
.Characterization of a recombinantly

expressed proteinase K-like enzyme from a  
psychrotrophic *Serratia*.The FEBS  
Journal.2006,第273卷(第1期),图1、图7以及第  
52页左栏第2段.

1. 一种灭活样品中的蛋白酶的方法,其中所述蛋白酶来源于变形斑沙雷菌 (*Serratia proteamaculans*) 并且

-包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或

-由与SEQ ID NO:1至少99%相同的氨基酸序列组成,

并且其中所述方法包括在如下条件下加热所述样品以灭活所述蛋白酶的步骤:

在53到58°C的温度下持续45到75分钟;

在58到63°C的温度下持续2到40分钟;或

在63到67°C的温度下持续最多10分钟,

并且其中

i) 所述样品中NaCl的浓度 $\geq 20\text{mM}$ ;或

ii) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq 80\mu\text{M}$ 。

2. 一种消化样品中的多肽的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 使所述样品与蛋白酶接触,其中所述蛋白酶来源于变形斑沙雷菌 (*Serratia proteamaculans*) 并且

-包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或

-由与SEQ ID NO:1至少99%相同的氨基酸序列组成;

b) 在允许至少部分消化所述样品中的多肽的条件下温育所述样品;以及

c) 在如下条件下加热所述样品以灭活所述蛋白酶:

在53到58°C的温度下持续45到75分钟;

在58到63°C的温度下持续2到40分钟;或

在63到67°C的温度下持续最多10分钟,

并且其中

i) 所述样品中NaCl的浓度 $\geq 20\text{mM}$ ;或

ii) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq 80\mu\text{M}$ 。

3. 一种从样品中分离或纯化感兴趣的核酸分子的方法,其中所述样品包括一种或多种污染多肽,所述方法包括:

a) 使所述样品与蛋白酶接触,其中所述蛋白酶来源于变形斑沙雷菌 (*Serratia proteamaculans*) 并且

-包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或

-由与SEQ ID NO:1至少99%相同的氨基酸序列组成;

b) 在允许至少部分消化所述样品中的多肽的条件下温育所述样品;以及

c) 在如下条件下加热所述样品以灭活所述蛋白酶:

在53到58°C的温度下持续45到75分钟;

在58到63°C的温度下持续2到40分钟;或

在63到67°C的温度下持续最多10分钟,

并且其中

i) 所述样品中NaCl的浓度 $\geq 20\text{mM}$ ;或

ii) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq 80\mu\text{M}$ ;以及

d) 任选地从所述样品中去除所述感兴趣的核酸分子。

4. 一种从样品中的病毒的蛋白质荚膜释放感兴趣的核酸分子的方法,所述方法包括:
- a) 使所述样品与蛋白酶接触,其中所述蛋白酶来源于变形斑沙雷菌 (*Serratia proteamaculans*) 并且
    - 包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或
    - 由与SEQ ID NO:1至少99%相同的氨基酸序列组成;
  - b) 在允许通过消化肽键中的一个或多个肽键来释放所述核酸分子的条件下游育所述样品;以及
  - c) 在如下条件下加热所述样品以灭活所述蛋白酶:
    - 在53到58°C的温度下持续45到75分钟;
    - 在58到63°C的温度下持续2到40分钟;或
    - 在63到67°C的温度下持续最多10分钟,并且其中
    - i) 所述样品中NaCl的浓度 $\geq 20\text{mM}$ ;或
    - ii) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq 80\mu\text{M}$ ;以及
  - d) 任选地从所述样品中去除所述感兴趣的核酸分子。
5. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中
  - i) 所述样品中NaCl的浓度 $\geq 20\text{mM}$ ;或
  - ii) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq 80\mu\text{M}$ ,并且其中所述样品不含EDTA。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中ii)中所述样品不含钙螯合剂。
7. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中:
  - i) 所述样品中NaCl的浓度 $\geq 20\text{mM}$ ;并且
  - ii) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq 80\mu\text{M}$ 。
8. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中:
  - i) 所述样品中NaCl的浓度 $\geq 20\text{mM}$ ;和/或
  - ii) 所述样品中游离钙的浓度为1到80 $\mu\text{M}$ 。
9. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中
  - i) 所述样品中NaCl的浓度 $\geq 40\text{mM}$ ;和/或
  - ii) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq 35\mu\text{M}$ 。
10. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述样品中NaCl的浓度为至少100mM。
11. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述样品中NaCl的浓度为至少250mM。
12. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述样品中NaCl的浓度为至少300mM。
13. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述样品中游离钙的浓度 $\leq 5\mu\text{M}$ 。
14. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述样品的pH为6.5到9.5。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述样品的pH为7.5到8.5。
16. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述加热包括在53到58°C的温度下加热所述样品45到75分钟,并且其中所述样品中游离钙的浓度 $\leq 10\mu\text{M}$ 或所述样品中NaCl的

浓度为至少75mM。

17. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述加热包括在63到67°C的温度下加热所述样品最多10分钟,并且其中所述样品中游离钙的浓度 $\leq 65\mu\text{M}$ 或所述样品中NaCl的浓度为至少25mM。

18. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述加热包括在58到63°C的温度下加热所述样品2到40分钟,并且

其中所述加热包括加热所述样品

i) 5到15分钟;或

ii) 10到20分钟;或

iii) 20到40分钟。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中i)中所述样品中游离钙的浓度 $\leq 10\mu\text{M}$ 或所述样品中NaCl的浓度为至少75mM。

20. 根据权利要求18所述的方法,其中ii)中所述样品中游离钙的浓度 $\leq 35\mu\text{M}$ 或所述样品中NaCl的浓度为至少50mM。

21. 根据权利要求18所述的方法,其中iii)中所述样品中游离钙的浓度 $\leq 65\mu\text{M}$ 或所述样品中NaCl的浓度为至少25mM。

22. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中与对照组相比,在所述加热之后,所述蛋白酶的剩余蛋白酶活性 $\leq 25\%$ ,其中所述剩余蛋白酶活性由以下测定步骤测定:

i) 在1000 $\mu\text{l}$ 或250 $\mu\text{l}$ 比色皿中温育:

10到50mU/mL经过热处理的蛋白酶、1mM底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA、 $\leq 15\text{mM}$  NaCl、0.1mM Tris-HCl pH 8、10mM  $\text{CaCl}_2$ 和任选地1%DMSO;

ii) 通过使用分光光度计在 $\leq 40^\circ\text{C}$ 的温度下测量2分钟内410nm处吸光度的增加来测定所述底物到4-硝基苯胺的切割,其中一个单位被定义为在选定的温度下每分钟产生1 $\mu\text{mol}$  4-硝基苯胺的酶量;以及

iii) 使用相同的测定将步骤ii)中观察到的活性与用相同量的相同蛋白酶观察到的活性进行比较,所述相同蛋白酶尚未经过热处理但已经在与所述经过热处理的蛋白酶相同的条件下以其它方式保持。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中与对照组相比,在所述加热之后,所述蛋白酶的剩余蛋白酶活性 $\leq 10\%$ 。

24. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述样品包括:

a) 一种或多种选自由以下组成的组的另外的酶:核酸酶、DNA或RNA聚合酶、逆转录酶、DNA或RNA连接酶、甲基化酶、转移酶、拓扑异构酶、鸟苷酰转移酶、磷酸酶、转座酶、激酶、解旋酶和糖基化酶;

b) 一个或多个核酸分子,并且其中所述方法包括在加热所述样品以灭活所述蛋白酶的所述步骤之后的以下步骤:

i) 所述一个或多个核酸分子的核酸酶介导的消化;

ii) 所述一个或多个核酸分子的磷酸化或去磷酸化;或

iii) 所述一个或多个核酸分子的连接;

而没有预先去除或稀释所述蛋白酶;

c) 所述样品包括一个或多个RNA分子,并且其中所述方法包括在加热所述样品以灭活所述蛋白酶的所述步骤之后的逆转录步骤,而没有预先去除或稀释所述蛋白酶;

d) 一个或多个DNA分子,并且其中所述方法包括在加热所述样品以灭活所述蛋白酶的所述步骤之后的核酸聚合步骤,而没有预先去除或稀释所述蛋白酶;或

e) 一种或多种病毒颗粒或细胞,并且所述方法包括在加热所述样品以灭活所述蛋白酶的所述步骤之后的细胞裂解步骤,而没有预先去除或稀释所述蛋白酶。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中d)中所述核酸聚合是扩增。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中e)中所述细胞是细菌细胞。

27. 根据权利要求24所述的方法,其中a)中所述核酸酶是限制性酶。

## 热不稳定蛋白酶

[0001] 本发明涉及包括具有可诱导热不稳定性的蛋白酶的组合物以及其用途,特别是在核酸分离中的用途。

[0002] 蛋白酶(proteinase)(也称为肽酶(peptidase)、胰酶(protease)和蛋白水解酶)能够水解蛋白质中的肽键。蛋白酶在工业、生物技术和分子生物学研究技术中广泛用于各种各样的过程中。例如,蛋白酶用于核酸纯化期间不需要的蛋白质的消化、重组抗体片段的制备、肽测序以及蛋白质组学中的蛋白质的蛋白水解消化。

[0003] 为了成功地从样品中提取核酸,细胞壁/细胞膜的裂解是必要的。可以采用各种物理或化学方法,这可以通过添加胰酶来增强。然后通过应用去垢剂或表面活性剂或通过低渗溶液中的渗透裂解来实现膜脂的去除。使用蛋白酶从样品中去除蛋白质然后被认为是最佳实践。蛋白酶通过水解肽键来消化存在于样品中的污染即不需要的蛋白质、多肽和肽。蛋白酶也降解可以存在于样品中并且可以以其它方式降解核酸的任何核酸酶和其它酶。

[0004] 在制备用于扩增反应(例如,PCR和RT-PCR)的核酸样品时的核酸纯化期间,蛋白质的去除尤其重要。在细胞中,核酸通常与蛋白质结合而存在。例如,真核细胞中的基因组DNA与组蛋白结合,所述组蛋白实现了将DNA紧密包装到染色质中。如PCR等许多分子生物学技术需要裸DNA,即不与组蛋白结合的DNA,因为染色质中DNA的紧密包装减少了如聚合酶和核酸酶等DNA相互作用酶对核酸的接近。

[0005] 核酸纯化是涉及时间和成本以及样品损失的多步骤过程。当样品中核酸的起始量较小时,例如当从几百个或更少的细胞中例如从小针吸活检或液体活检中分离时,样品损失是特别不期望的。

[0006] 核酸纯化时最常用的蛋白水解酶是蛋白酶K(EC 3.4.21.64)。酶最初是在真菌共附生白色侧齿霉菌(*Engyodontium album*) (先前为白色念球菌(*Tritirachium album*))的提取物中发现的。蛋白酶K是催化芳香族、脂肪族或疏水性氨基酸残基的羧基侧的肽键的切割的非特异性丝氨酸内肽酶。蛋白酶K的广泛特异性允许其用于消化样品中不需要的蛋白质。蛋白酶K还迅速灭活核酸酶,核酸酶可以以其它方式降解存在于样品中的核酸。在存在DNA提取过程中使用的使其它蛋白质变性的化学品,如SDS和尿素、如EDTA等螯合剂、巯基试剂、胰蛋白酶抑制剂和的胰凝乳蛋白酶抑制剂的情况下,蛋白酶K具有活性。蛋白酶K在50-65°C的范围内(通常为约55°C)具有最佳活性。

[0007] 当蛋白酶K用于纯化样品时,有必要在添加下游蛋白质/酶例如聚合酶和逆转录酶之前灭活或去除蛋白酶K。在没有这种灭活或去除的情况下,蛋白酶由于其非比活性而将降解下游蛋白质/酶。

[0008] 可以例如通过苯酚提取或CsCl等密度超速离心法从样品中去除蛋白酶K。可替代地,可以增加样品的体积,从而稀释其中的蛋白酶K活性。然而,从样品中物理去除酶的行为引入了污染的风险以及失去期望的产物的风险。稀释在大多数情况下并不理想,尤其是当样品量较小时。

[0009] 用于灭活蛋白酶K的方案可以变化,但通常涉及加热到高温。然而,在许多情况下,灭活胰酶所需的热量导致样品中一种或多种期望的产物的降解。用于灭活蛋白酶K的方案

包含加热到75°C 5分钟(伯乐公司(Bio-Rad)方案)、加热到95°C 10分钟(新英格兰生物实验室(New England BioLabs)方案)、加热到70°C 15分钟(凯杰公司(Qiagen)方案),有时与试剂组合。对感兴趣的样品使用如此高的温度是相对苛刻的。

[0010] 因此,仍然需要降解蛋白质的替代性方法,特别是在核酸纯化方案期间,所述替代性方法允许缩短工作流程而不会从样品中损失期望的材料并且不涉及苛刻的蛋白酶灭活条件。

[0011] 蛋白酶X(也称为“沙雷氏菌属(*Serratia*) 肽酶”和“SPRK”)是从沙雷氏菌属物种(*Serratia* sp.)分离的蛋白酶K样蛋白酶。对蛋白酶X的研究(Larsen等人,(2006)《FEBS杂志(FEBS Journal)》273:47-60)已经确定,类似于蛋白酶K,蛋白酶X具有高热稳定性,并且进一步地,蛋白酶X实际上具有比蛋白酶K(55°C)更高的最佳温度(70°C)。Larsen等人还证明,蛋白酶X在50°C下加热30分钟之后保留了全部酶活性并且在存在各种浓度的SDS(从样品中分离核酸时常用的表面活性剂)的情况下加热到50°C之后仍保留比蛋白酶K高得多的活性。Larsen等人教导了,蛋白酶X未展现出从冷适应性生物体中分离出的酶的典型的热不稳定特征。

[0012] 诸位发明人首次确定,令人惊讶的是,当蛋白酶X存在于具有低浓度的游离钙离子的组合物中时,蛋白酶的热不稳定性被诱导。发明人已经确定,没有必要例如通过使用EDTA去除可以与蛋白酶结合并有助于蛋白酶的稳定性和结构的钙离子。相反,令人惊讶的是,组合物中仅游离钙离子的不存在或低浓度就足以诱导蛋白酶X的热不稳定性。诸位发明人还首次确定,令人惊讶的是,当蛋白酶X存在于具有特定浓度的单价盐的组合物中时,蛋白酶的热不稳定性被诱导。

[0013] 这种可诱导的热不稳定性性质是意想不到的并且在分子生物学应用中使用的黄金标准蛋白酶蛋白酶K中未观察到。发明人的发现允许在各种各样的分子生物学应用中有利地使用具有可诱导热不稳定性的蛋白酶X。

[0014] 因此,在一方面,本发明提供了一种组合物,所述组合物包括蛋白酶或其酶活性片段,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中

[0015] i) 所述组合物中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M;或

[0016] ii) 所述组合物中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0017] 优选地,所述组合物中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M,并且所述组合物中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0018] 本发明涉及包括SEQ ID NO:1的序列的蛋白酶并且涉及包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的序列的蛋白酶,所述蛋白酶在本文中被称为“SEQ ID NO:1的变体”、“变体蛋白酶”或仅“变体”。根据定义,本发明的SEQ ID NO:1的变体也是根据本发明的蛋白酶,即所述变体具有蛋白酶活性。本文对本发明的蛋白酶的引用是对SEQ ID NO:1的蛋白酶以及对本文所述的本发明的变体的引用。除非上下文另有指示,否则本文中任何地方对蛋白酶(或变体蛋白酶)的引用也是对其酶活性片段的引用。

[0019] 优选地,组合物是溶液,优选地水性溶液。如本文所用的术语“溶液”意指液体混合物,其中一种或多种次要组分(溶质)均匀分布在主要组分(溶剂)中。溶液的次要组分(溶质)通常可溶于主要组分(溶剂)。然而,如本文所用,术语“溶液”还包括其中次要组分(溶

质)不可溶于主要组分(溶剂)的混合物,即,如本文所用的术语“溶液”还涵盖其中主要组分是液相并且次要组分包括不可溶于液相的颗粒的混合物,即分散体。优选地,主要组分即溶剂,即液相是水。优选地,溶液包括水。本发明的溶液包括至少本发明的蛋白酶或其酶活性片段作为次要组分。

[0020] 在优选实施例中,本发明的溶液是用于应用于包括一种或多种多肽的样品的试剂。将这种试剂应用于样品,以便所述试剂中的蛋白酶消化样品中存在的所述一种或多种多肽。优选地,样品包括多种多肽。在本实施例中,溶液优选地包括本发明的蛋白酶或其酶活性片段并且不包括另外的酶。

[0021] 优选地,组合物还包括缓冲液。合适的缓冲液在本领域中是众所周知的,并且可以使用任何这种缓冲液。本领域普通技术人员将会能够出于其预期目的来鉴定合适的缓冲液以及其包含范围。优选地,缓冲液的缓冲范围为pH 6.5到9.5,优选地pH 6.8到9.2,更优选地pH 7到9,更优选地pH 7.5到8.5,更优选地约pH 8。优选地,缓冲液是Tris或HEPES。优选地,缓冲液存在于组合物中的浓度为1到250mM,更优选地10到200mM,更优选地20到150mM,更优选地25到100mM。

[0022] 如果存在,则优选地,Tris-HCl存在的浓度为25到200mM,更优选地50到150mM,更优选地约100mM。如果存在,则优选地,HEPES存在的浓度为5到50mM,更优选地10到40mM,更优选地20到30mM,更优选地约25mM。

[0023] 优选地,本发明的组合物和样品的pH为6.5到9.5,优选地6.8到9.2,更优选地7到9,更优选地7.5到8.5,更优选地约8.0。

[0024] 本发明的组合物和样品可以进一步包括DMSO。如果存在,则优选地,DMSO存在的浓度为0.1到5%w/w,更优选地0.5到2.5%DMSO,更优选地约1%DMSO。

[0025] 术语“样品”是指包括一种或多种除本发明的蛋白酶之外的多肽的任何组合物。

[0026] 在另外的方面,本发明提供了一种样品,所述样品包括一种或多种多肽以及蛋白酶或其酶活性片段,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中

[0027] i) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M;或

[0028] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0029] 优选地,所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M,并且所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0030] 不包括如本文所述的蛋白酶或酶活性片段的样品不是本发明的一方面。本文对“本发明的样品”的引用是仅对包括如本文所述的蛋白酶或酶活性片段的样品的引用。

[0031] 以下对“样品”的优选的和任选的特征和实施例的讨论适用于本发明的样品和不是本发明的一部分但是作为本发明的组合物可以应用于的样品的样品两者。

[0032] 本发明的蛋白酶在从包括污染即不需要的多肽的样品中纯化,即分离,即提取感兴趣的生物分子的方法中具有效用。因此,在优选实施例中,样品包括一种或多种污染多肽和一个或多个感兴趣的生物分子。如本文所用,术语“污染多肽”与“不需要的多肽”同义并且是指样品中除本发明的蛋白酶之外的任何多肽以及任何感兴趣的多肽。因此,污染多肽是那些用于被本发明的蛋白酶消化以便纯化或修饰所述一个或多个感兴趣的生物分子的多肽。

[0033] 本发明的蛋白酶还在从通过一个或多个肽键与感兴趣的生物分子融合分子的方法中，优选地多肽中通过水解所述肽键中的一个或多个肽键来释放感兴趣的生物分子的方法中具有效用。因此，在优选实施例中，样品包括通过一个或多个肽键与分子，优选地多肽融合的感兴趣的生物分子。所述一个或多个肽键能够被本发明的蛋白酶或其酶活性片段切割。

[0034] 如本文所用，术语“感兴趣的生物分子”是指样品中的任何生物分子，也包括一种或多种污染多肽，其中期望从所述样品中纯化所述生物分子，或其中期望通过一个或多个肽键从与所述生物分子融合分子中释放所述生物分子。优选地，感兴趣的生物分子是核酸分子，优选地DNA或RNA分子。可替代地，感兴趣的生物分子本身是多肽。感兴趣的生物分子不是用于本发明中的蛋白酶或其酶活性片段。

[0035] 优选地，样品包括细胞物质。优选地，样品包括粗细胞提取物。优选地，样品包括部分纯化的细胞提取物。优选地，样品包括细胞群。所述样品中的细胞可以是完整的或裂解的，优选地裂解的。优选地，样品包括组织样品或一种或多种体液。优选地，样品是细针活检。优选地，样品包括包封的病毒。蛋白酶可以用于消化病毒的蛋白质荚膜，以释放其中的RNA/DNA用于鉴定、定量和/或扩增。

[0036] 优选地，本发明的样品的体积 $\geq 10\mu\text{l}$ 。优选地，本发明的样品的体积 $\leq 1000\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 500\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 300\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 250\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 200\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 150\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 100\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 75\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 50\mu\text{l}$ 。可替代地，样品是微流体样品。优选地，本发明的微流体样品的体积 $\geq 0.01\mu\text{l}$ 。优选地，本发明的微流体样品的体积 $\leq 10\mu\text{l}$ ，优选地 $\leq 5\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 1\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 0.5\mu\text{l}$ ，更优选地 $\leq 0.1\mu\text{l}$ 。

[0037] 如本文所用的术语“多肽”是指蛋白质、多肽、肽、寡肽和三肽，即包括通过肽键连接的三个或更多个氨基酸的任何分子，所述肽键可以被本发明的蛋白酶水解。已知蛋白酶X将肽水解成长度短至三个氨基酸。术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用，并且每个术语的使用都明确地旨在指任何和所有蛋白质、多肽和肽。因此，存在于本文所述的样品中的多肽是本发明的蛋白酶或其酶活性片段的底物。清楚地，蛋白酶和其酶活性片段本身就是多肽。然而，如本文所用的术语“多肽”明确排除了用于本发明中的蛋白酶和其酶活性片段。

[0038] 术语“消化”、“水解”、“降解”和“切割”在本文中可互换使用并且是指样品中的多肽内的肽键的水解。消化可以是部分消化或完全消化。用于本发明中的蛋白酶是非特异性的并且在给予足够的时间时将在允许酶功能的条件下完全消化样品中的蛋白质。

[0039] 本发明的组合物和样品包括蛋白酶或其酶活性片段，所述蛋白酶包括SEQ ID NO: 1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO: 1至少约70%相同的氨基酸序列。

[0040] SEQ ID NO: 1的氨基酸序列为：

[0041] ADQPSPTWIDRIDQRNLPLDNNYHTDYDGSVTAFAVIDTGVLNTHNEFGGRASSGYDFIDNDYDATDC  
NGHGTHVAGTIGGSTYGVAKNVNVVGVRLNCSGSGSNSGVIAGINWVKNNASGPAVANMSLGGGASQATDDAVNAA  
VAAGITFVVAAGNDSNACNYSPARAADAITVGSTTSNDSRSSFSNYGTCLDIYAPGSSITSSWYTSNSATNTISGT  
SMASPHVAGVAALYLDPNLSAQVTNLLKTRATADKVTDAKTGSPNKLLFSLANDD

[0042] SEQ ID NO: 1的蛋白酶基于如Larsen等人，(2006)《FEBS杂志》273:47-60中描述的来自在挪威北部分离的海洋沙雷氏菌属物种的蛋白酶X的氨基酸序列。蛋白酶X是蛋白酶K样蛋白酶[E.C.3.4.21]。术语“蛋白酶X”、“胰酶X”、“ProtX”、“PRX”、“肽酶X”、“沙雷氏菌属

肽酶”和“SPRK”在本文中可互换使用。优选地,本发明的蛋白酶衍生自变形斑沙雷菌(*Serratia proteamaculans*)。蛋白酶X是丝氨酸肽酶。

[0043] 对蛋白酶X进行编码的基因有1890个碱基对(SEQ ID NO:2)并且对629个氨基酸的前体蛋白(65.5kDa,SEQ ID NO:3)进行编码。

[0044] SEQ ID NO:2:

[0045] atgcataagaacattttaatagcagtcgcagtcgcaacgggacttgcttacttcctgttaacgctaa  
tgaataccaagcgactatggtaaatgtcccacaatctaaagccatcaaagatacttacatcgttgtattcaatacc  
ccaagtgttcttaatctaagtaataacaacacccatagctgaattcgcggttcaacaagccgagagtttagtcaatc  
aatatgatgtcagagtgatgaaaaactttggcaatgtgctcaacgggtgactcatcaatgccagtgcccaacaagt  
taaagcactgcttaaagatccaaacgtgaagtacgtagaacaagatcaagtgatgtcagtaacgccatgatggaa  
gccaatgcggaccaaccgagtcgcactggggcatagacagaatcgatcaacgcaacttgccattggataacaact  
accacacggattacgatggatctggtgtgaccgcctttgttattgatactggggtgcttaatacacacaatgagtt  
tggcgcccgcaagcagtggttatgactttatcgataatgattacgatgcgactgactgtaacggctcatggtacc  
catgtggcggggacgattggcggtcaacctacggtgtcgcgaaaaacgtcaatgtggtgggcgtcagagtgctta  
actgttcaggttctggcagtaactctggcgtgattgcagggataaactgggtgaaaaacaatgcttctggccccgc  
tgtcgcgaacatgagtttagggggcggcctcccaagccacggatgatgccgtcaatgccgctgttgccgcaggg  
atcaccttcgtcgtcgcagccgcaatgacaatagtaatgcttgaattattcacctgctcgtgccgcagatgcc  
tcaactgtcggttcaaccaccagtaacgattcccgtcgcagtttttctaactacgggacttgcccttgatatctatgc  
gccccgttcgagcataacttctcttggatatactcaaattcggcgactaataaccattagtgccacctcaatggct  
tcccccatgtggcaggcgtcgcggcattatacttagatgaaaatcctaaccttccccgcacaggtgactaact  
tactcaagacgcgcgccactgcggacaaagtcacagatgctaagacaggctcaccgaataagttactgttttact  
tgcaaacgatgatggaggctgtggcaacgattgccagttgacgagactcagctgcaaaataatgtgggtattgcg  
atcagtgagccacaggttcagcacttattactatcgcagtgctccccgcaaatgcagcaagtttaggcatcaacc  
tcgcggggggctctggcgatgcggatatttatgtgagccaaggacaaaaaccgactacgaccagctatcaatgccg  
cccatatcaaatggcaacaatgagagctgtaatttcaactgcacctacggcgggtcgttggtacgtgatggttcaa  
ggctatagcaattatgccaacgccagctgacagctagctacaacctcaatggcggcggaattgtaccgatgcga  
actgcttaagcaatggcgtaccgctcacgaatttaagcggcagaacgggaactgaagccctgtataaaatcgtcgt  
ccctgcgaatagccaactcagatattaccaccagtgccgggactgggtgacgtggatctgtatgtcaagcagggact  
gtcccaacgaccaccagctatgattgtcgtccctataaaaacggtaacaatgaaagctgttcaatcaccgtgactc  
aagcgggaacttaccatgtgatgttacgtggttatgctaattactcgagcgttcagctgagtgcaagctactag

[0046] SEQ ID NO:3:

[0047] MHKKHLI AVAVATGLAYFPVNANEYQATMVNVPQSKAIKDTYIVVFNTPSVLNLSNNNTIAEFAVQQAE  
SLVNQYDVRVMKNFGNVLNGLINASAQQVKALLKDPNVKYVEQDQVMSVTPMMEANADQPSPTWIDRIDQRNLPL  
DNNYHTDYDGSVTAFAVIDTGVLNTHNEFGGRASSGYDFIDNDYDATDCNKGHTHVAGTIGGSTYGVAKNVNVVGV  
VLNCSGSGSNSGVIAGINWVKNNASGPAVANMSLGGASQATDDAVNAVAAGITFVVAAGNDSNACNYSPARAAD  
AITVGSTTSNDSRSSFSNYGTCLDIYAPGSSITSSWYTSNSATNTISGTSMA SPHVAGVAALYLDENPNLSPAQVTN  
LLKTRATADKVTDAKTGSPNKLLFSLANDDGGCGNDPVDLQLQNNVGI AISGATGSATYYYYIDVPANAASLGINL  
AGGSGDADIYVSQGQKPTTTSYQCRPYQNGNNECNFTAPTAGRWYVMVQGYSNYANAQLTASYNLGGGNCTDANC  
LSNGVPVTNLSGRTGTEALYKIVVPANSQLSITSSGGTGDVDLYKAGTVPTTTSYDCRPYKNGNNECSITVTQAG

TYHVMLRGYANYSSVQLSASY

[0048] SEQ ID NO:3的蛋白酶由具有126个残基的N端前原(pre-pro)序列、具有278个残基的催化结构域和共由225个残基组成的两个C端结构域(重复序列)组成。

[0049] 酶在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中重组表达为具有活性的385个氨基酸、~40.2kDa的肽酶,其序列为SEQ ID NO:4:

[0050] NEYQATMVNVPQSKAIKDTYIVVFNTPSVLNLSNNTIAEFAVQQAESLVNQYDVRVMKNFGNVLNGVL  
INASAQQVKALLKDPNVKYVEQDQVMSVTPMMEANADQPSPTWIDRIDQRNLPLDNNYHTDYDGSVTAFFVIDTGV  
LNTHNEFGGRASSGYDFIDNDYDATDCNGHGTHVAGTIGGSTYGVAKNVNVGVRVNLNCSGSGSNGSVIAGINWVK  
NASGPAVANMSLGGGASQATDDAVNAAVAAGITFVVAAGNDNSNACNYSPPARAADAITVGSTTSNDSRSSFNSNYGTC  
LDIYAPGSSITSSWYTSNSATNTISGTSMASPHVAGVAALYLDPNLSLPAQVTNLLKTRATADKVTDKGTGSPNKL  
LFLSLANDD

[0051] SEQ ID NO:4的表达的蛋白酶排除了除第一C端结构域的前三个残基之外的两个C端结构域并且排除了SEQ ID NO:3的N端前原结构域的最初22个残基。可以纯化这种形式的蛋白质。

[0052] 大肠杆菌(*E. coli*)中蛋白酶X的重组表达描述于Larsen等人,(2006)《FEBS杂志》273:47-60中。

[0053] 在表达后,酶通过自溶降解转化为成熟的~34kDa、281个残基的成熟蛋白质,所述蛋白质含有催化结构域和三个C端氨基酸残基,并且所述蛋白质保留了全部催化活性(SEQ ID NO:1)。

[0054] SEQ ID NO:4的残基1到104对应于SEQ ID NO:3的残基23到126。SEQ ID NO:1的残基1到281对应于SEQ ID NO:4的残基105到385并且对应于SEQ ID NO:3的残基127到407。

[0055] 因此,在本发明的每个和所有方面和实施例中,蛋白酶可以包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4、优选地SEQ ID NO:1的氨基酸序列。SEQ ID NO:3和4是SEQ ID NO:1的蛋白酶的前体/未成熟形式。技术人员将会理解的是,由于进一步的自溶处理,SEQ ID NO:3或4的蛋白酶的使用或存在会导致SEQ ID NO:1的蛋白酶的使用或存在。为简洁起见,本文中任何地方对SEQ ID NO:1的引用都明确地旨在还是指SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4。

[0056] 本发明的组合物和样品包括蛋白酶或其酶活性片段,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列。

[0057] “至少约70%”意味着序列一致性可以为至少69%、69.5%或69.9%。

[0058] 在优选实施例中,本发明的蛋白酶包括与SEQ ID NO:1至少71%、至少72%、至少73%、至少74%或至少75%,优选地至少80%、85%、90%或95%,例如至少98%或99%或99.5%相同的氨基酸序列或由其组成。

[0059] 可以使用默认参数(DNA空位开放罚分=15.0;DNA空位延伸罚分=6.66;DNA矩阵=一致性;蛋白质空位开放罚分=10.0;蛋白质空位延伸罚分=0.2;蛋白质矩阵=Gonnet;蛋白质/DNA ENDGAP=-1;蛋白质/DNA GAPDIST=4)使用广泛可用的算法中的任何一种算法,例如使用ClustalW2多序列比对程序(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2>)来计算根据本发明的序列一致性百分比。

[0060] 优选地,在对SEQ ID NO:1和变体序列进行比对之后,测定以上SEQ ID NO:1中的N

端Ala残基(残基1)与C端Asp残基(残基281)之间的一致性百分比。

[0061] SEQ ID NO:1的变体包含氨基酸序列,其中所述SEQ ID No的一个或多个氨基酸已经经历保守取代或已经用所述一个或多个氨基酸的经过修饰的版本或非天然存在的氨基酸例如所述一个或多个氨基酸的D异构体置换。优选地,这种取代和修饰是沉默取代和修饰,因为本发明的核酸外切酶的经过修饰的形式具有与未修饰形式相同的酶和灭活特性。

[0062] 在一些实施例中,本发明的蛋白酶包括与SEQ ID NO:1相比具有单个或多个氨基酸改变(添加、取代、插入或缺失)的氨基酸序列(或由其组成)。这种序列优选地可以含有多达10个,例如仅1、2、4、4、5、6、7、8、9或10个,优选地多达5个,例如仅1、2、3、4或5个,优选地1、2或3个,更优选地1或2个改变的氨基酸。优选地,在对SEQ ID NO:1和变体序列进行比对之后,测定以上SEQ ID NO:1中的N端Ala残基(残基1)与C端Asp残基(残基281)之间的改变的数量。

[0063] 优选地,改变是沉默改变,因为本发明的改变的蛋白酶具有与未改变形式相同的酶和灭活特性。取代可以用保守或非保守氨基酸。优选地,所述改变是保守氨基酸取代。所述改变可以用SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸的经过修饰的版本置换或用非天然存在的氨基酸例如氨基酸的D异构体置换。

[0064] 可以从在冷水生态位中发现的原核生物体中获得包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列的蛋白酶。“原核生物”意指缺乏细胞核的任何生物体,即来自细菌和古菌领域的任何生物体。优选地,生物体是细菌。优选地,生物体不是真核生物,例如分类为分类学界动物界、植物界、真菌界或原生生物界的生物体。更优选地,生物体选自以下属:希瓦氏菌属(*Shewanella*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、冷单胞菌属(*Psychromonas*)、摩替亚氏菌属(*Moritella*)和沙雷氏菌属,优选地沙雷氏菌属。

[0065] 在一些实施例中,本发明的组合物和样品包括蛋白酶或其酶活性片段,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:3或4的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:3或4至少约70%相同的氨基酸序列。引用SEQ ID NO:1的在本文中其它地方的段落加以必要的变更适用于SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。

[0066] 优选地,本发明的蛋白酶由SEQ ID NO:1、3或4的氨基酸序列组成或由与SEQ ID NO:1、3或4至少约70%相同的氨基酸序列组成。

[0067] 优选地,本发明的蛋白酶包括SEQ ID NO:1、3或4的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的蛋白酶由SEQ ID NO:1、3或4的氨基酸序列组成。

[0068] 优选地,本发明的蛋白酶由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成或由与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列组成。

[0069] 优选地,本发明的蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些实施例中,本发明的蛋白酶由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。

[0070] 本发明的蛋白酶在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:4序列的N端或C端可以包括另外的氨基酸。优选地,这种另外的氨基酸与在SEQ ID NO:3的629个氨基酸的序列内的SEQ ID NO:1序列的N端或C端发现的分别定位的氨基酸相同。优选地,蛋白酶在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:4序列的N端和/或C端包括1到50个,更优选地1到40个,更优选地1到30个,更优选地1到20个,更优选地1到10个,即1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸,优选地其中所述N端和/或C端氨基酸与在SEQ ID NO:3的序列内的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:4序列的N端和/或C端发

现的相应氨基酸相同。

[0071] 存在于本发明的溶液或样品中的蛋白酶可以是经过修饰的形式,例如融合蛋白的形式,在所述融合蛋白中,所述蛋白酶通过肽接头序列直接或间接与在N端和/或C端的另外的肽融合。优选地,另外的N端肽和接头序列(如果存在)一起包括长度为1到50个,更优选地1到40个,更优选地1到30个,更优选地1到20个,更优选地1到10个,即1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的序列。优选地,另外的C端肽和接头序列(如果存在)一起包括长度为1到50个,更优选地1到40个,更优选地1到30个,更优选地1到20个,更优选地1到10个,即1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的序列。

[0072] 因此,在一个实施例中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包括蛋白酶或其酶活性片段,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中

[0073] i) 所述组合物中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M;或

[0074] ii) 所述组合物中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM,

[0075] 并且其中所述蛋白酶或其酶活性片段进一步包括在SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列的N端的另外的肽序列和/或C端的另外的肽序列。

[0076] 一个或多个另外的肽序列可以在用于蛋白酶的分泌、分离、溶解和/或纯化或鉴定或用于将蛋白酶束缚在固体载体上的过程中是有用的。合适的肽序列在本领域中是众所周知的,并且可以使用任何这种序列。合适的N端和C端序列包含例如组氨酸标签,优选地包括1到20个,更优选地5到15个,更优选地6、7、8、9、10、11或12个组氨酸残基,最优选地6或12个组氨酸残基。

[0077] 因此,本发明的蛋白酶可以是经过修饰的蛋白酶。另外修饰包含将小的化学基团引入多肽的可用原子,例如多肽内的非必需氨基酸残基的N端和C端的保护基团或R基团。在其它实施例中,本发明的蛋白酶可以设置成固定在以下固体载体上,例如选自颗粒、团粒、珠粒、薄片、凝胶、滤片、膜、纤维、毛细管、芯片、微量滴定条、载玻片、试管、板或孔等的固体载体。优选地,载体是磁性的(优选地顺磁性或超顺磁性),例如磁性颗粒,例如磁性珠粒和团粒。仍另外的经过修饰的形式包含本发明的蛋白酶的二聚体或三聚体。这种实体在其单体组合物中可以是同质的或异质的。

[0078] 优选地,这种修饰是沉默的,因为本发明的蛋白酶的经过修饰的形式具有与未修饰形式相同的酶和灭活特性。

[0079] 还提供了本发明的蛋白酶和变体蛋白酶的酶活性片段。酶活性片段是具有蛋白酶活性的片段。酶活性片段可以包括SEQ ID NO:1序列的至少225个、优选地至少235个、优选地至少250个、更优选地至少260个、至少270个、至少271、272、273或274个、更优选地至少275、276、277、278、279或280个氨基酸。

[0080] 优选地,本发明的酶活性片段包括SEQ ID NO:1序列的不超过5个氨基酸,优选地不超过4、3、2或1个氨基酸的N端截短。可替代地或另外,本发明的酶活性片段优选地包括SEQ ID NO:1序列的不超过30个氨基酸,优选地不超过29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸的C端截短。

[0081] 可替代地观察的,本发明的酶片段的长度优选地为SEQ ID NO:1的长度的或与SEQ

ID NO:1至少70%相同的氨基酸序列的长度的至少80%,优选地至少85%,优选地至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%。

[0082] 本发明的酶片段本身与SEQ ID NO:1的对应部分优选地至少70%,优选地至少80%、至少85%或至少90%,更优选地至少95%(例如,至少98%或99%或99.5%)或100%相同。以上描述了用于测定一致性百分比的方法。

[0083] 贯穿本申请,除非上下文另有指示,否则对本发明的蛋白酶的引用也是对其酶活性片段的引用。

[0084] 蛋白酶(也称为肽酶或胰酶)是进行蛋白水解即通过肽键的水解进行蛋白质分解代谢的酶。因此,根据本发明的蛋白酶是具有蛋白酶活性即胰酶活性即肽酶活性的酶。本发明的变体和酶活性片段也具有蛋白酶活性。

[0085] 作为SEQ ID NO:1的变体或经过修饰的形式本发明的蛋白酶展现出SEQ ID No:1的蛋白酶的蛋白酶活性的至少70%,优选地至少80%,更优选地至少85%、至少90%或至少95%,仍更优选地至少99%并且最优选地至少100%。

[0086] 本发明的酶活性片段展现出SEQ ID No:1的蛋白酶的蛋白酶活性的至少70%,优选地至少80%,更优选地至少85%、至少90%或至少95%,仍更优选地至少99%并且最优选地至少100%。

[0087] 适合于分析蛋白酶活性的测定在本领域中是已知的,并且任何这种测定都可以用于测定特定多肽的蛋白酶活性。因此,这种测定可以用于测定本发明的蛋白酶、变体蛋白酶和其酶活性片段的蛋白酶活性。

[0088] 优选的测定包括测定底物到分光光度计中可检测的产物的酶切割,优选地Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA到4-硝基苯胺的酶切割,这可以通过测量410nm处吸光度( $\epsilon=8800\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )的增加来测定。本领域普通技术人员能够鉴定用于产生和检测这种吸光度的合适的底物和设备。优选地,使用分光光度计或酶标仪检测吸光度。许多分光光度计利用1000 $\mu\text{l}$ 体积的比色皿。许多酶标仪利用体积为250 $\mu\text{l}$ 的孔。

[0089] 技术人员也将能够容易地出于其目的来测定合适的温育温度和测定时间。技术人员将会意识到,进行测定的温度应当是不会导致本发明的蛋白酶灭活的温度,例如不到40 $^{\circ}\text{C}$ ,优选地25 $^{\circ}\text{C}$ 。合适的测定时间可以是30秒到5分钟,例如2分钟。

[0090] 技术人员还将意识到,要在测定中包含的酶的适当浓度取决于所使用的分光光度计的可检测范围。技术人员将会意识到,在进行测定之前,可能需要稀释步骤,以产生浓度并且因此产生被测定的样品内的酶活性的水平,所述水平可以由所讨论的分光光度计检测。可以使用10到50mU/mL,优选地13到26mU/mL的活性,对于本发明实例中使用的SEQ ID NO:1的蛋白酶X,所述活性相当于0.2到0.4 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0091] 技术人员将能够容易地出于其预期目的来配制测定混合物的剩余部分。测定混合物可以包括如本文中其它地方所述的pH缓冲液,优选地pH为8的Tris-HCl。

[0092] 测定混合物优选地包括过量的钙(例如, $\geq 2\text{mM}$ ,优选地约10mM),使得避免了可以进一步灭活蛋白酶的低钙条件。NaCl可以以低浓度存在(例如 $\leq 15\text{mM}$ ),使得蛋白酶的盐诱导的热不稳定性不会被诱导。再次,如果需要,技术人员将能够容易地稀释溶液以提供必要浓度的组分。

[0093] 其它组分可以根据需要添加到反应混合物或由于已经在工作流程的早期阶段添

加并且对活性测定具有耐受性而存在,例如DMSO。

[0094] 用于测定蛋白酶活性的优选测定为测定A(用于本文的实例中)。测定A包括在1000  $\mu$ l或250 $\mu$ l比色皿中温育:

[0095] 13或26mU/mL蛋白酶(相当于0.2或0.4 $\mu$ g本发明实例中使用的SEQ ID NO:1的蛋白酶X)

[0096] 1mM底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

[0097]  $\leq$ 15mM NaCl(例如,12mM NaCl或4mM NaCl)

[0098] 0.1mM Tris-HCl pH 8

[0099] 10mM CaCl<sub>2</sub>和

[0100] 1%DMSO(任选的)

[0101] 以及通过在25°C或37°C下使用分光光度计(例如,Ultrospec 2000,瑞典法玛西亚生物技术公司(Pharmacia Biotec, Sweden))测量在2分钟内410nm处吸光度( $\epsilon=8800\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )的增加来测定底物到4-硝基苯胺的切割。一个单位被定义为在不到40°C,优选地25°C或37°C的温度下每分钟产生1 $\mu$ mol 4-硝基苯胺的酶量。

[0102] 技术人员可以直接设计替代性方法以测量蛋白酶活性。

[0103] 与任何合适的测定都可以用于测定本发明的蛋白酶的酶活性片段或变体或经过修饰的形式相比于SEQ ID NO:1的蛋白酶的活性的相对活性,并且技术人员将会清楚地意识到,应当如用于评估SEQ ID NO:1的蛋白酶的活性那样使用相同的技术和条件用于评估片段或变体或经过修饰的形式的活性。优选地,所使用的测定是以上测定A。

[0104] 根据以上优选的测定A,蛋白酶X的比活性为约65U/mg(65.2U/mg)。如通过上述测定A所测定的,优选地,本发明的变体、酶片段和经过修饰的形式的比活性为40到100U/mg,更优选地50到80U/mg,更优选地60到70U/mg,更优选地62.5到67.5U/mg,优选地约65U/mg或65.2U/mg。优选地,本发明的变体蛋白酶和酶片段具有与如通过上述测定A测定的SEQ ID NO:1的蛋白酶X相同的比活性。

[0105] 本发明的组合物和样品优选地包括 $\leq$ 80 $\mu$ M游离钙。如本文所用的术语“游离钙”仅指在本发明的组合物和样品内游离的即未结合的钙离子,即不与存在于本发明的组合物和样品中的任何蛋白质或其它组分结合的钙离子,即释放的钙。贯穿本说明书对本发明的组合物和溶液中的钙浓度的引用是对游离钙的浓度的引用。

[0106] 蛋白酶X(SEQ ID NO:1)包括由残基Asp11、Asp14、Gln15、Asp21和Asn23形成的钙结合位点。Ca<sup>2+</sup>离子与Asp11、Asp14和Asp21侧链的羧基氧原子、Gln15的酰胺氧原子以及Asp11和Asn23的羰基氧原子配位。这种结合的钙离子是校正蛋白质折叠所需要的。因此,用于本发明中的蛋白酶自然包括此结合的钙离子。如果用于本发明中的蛋白酶是重组产生的,则结合的钙离子也将存在。用于产生蛋白酶的任何环境都将必定包含钙,这意味着结合的离子将存在于折叠的蛋白酶结构中。这种结合的钙离子不是“游离钙”,如同术语在本文所用的那样。

[0107] 制备本发明的组合物或样品的本领域的普通技术人员可以直接确保仅通过选择用于包含在溶液或样品中的合适的溶质和溶剂就实现所需的钙浓度。本领域的普通技术人员能够通过针对大量无钙缓冲液进行透析,例如针对500到10000,优选地5000体积的无钙缓冲液进行透析来从溶液中去掉游离钙。合适的缓冲液对本领域的普通技术人员来说将会

是显而易见的并且优选地是如在本文中其它地方所述的缓冲液,例如pH为7到9的10mM Tris-HCl。优选地,所述缓冲液进一步包括甘油。

[0108] 本领域的普通技术人员也可以容易地测定任何给定溶液或样品中游离钙的浓度。用于测定钙的标准方法是本领域众所周知的并且包含例如用标准化EDTA溶液滴定。

[0109] 可以通过应用强钙螯合剂例如EDTA从蛋白酶中去除结合的钙离子。然而,不期望将许多感兴趣的生物分子暴露于EDTA。另外,EDTA结合 $Mg^{2+}$ 离子,所述离子是许多核酸相关酶(例如,聚合酶、核酸酶)所需要的。这种酶用于分子生物学技术中,随后用于使用蛋白酶制备样品—在这种情况下,EDTA的存在尤其有问题。EDTA在后续下游步骤中引入关于游离 $Mg^{2+}$ 浓度的不确定性,这是不期望的: $Mg^{2+}$ 是酶功能所需要的,但是过多会造成RNA降解。在消化多肽的任何方法中,省略试剂都是期望的,因为试剂的包含其和后续去除增加了过程的成本、时间和工作流程。

[0110] 诸位发明人已经作出了令人惊讶的发现:仅游离钙的不存在就足以诱导本发明的蛋白酶的热不稳定性。诸位发明人首次确定,令人惊讶的是,当蛋白酶X存在于具有低浓度的游离钙离子的环境中时,蛋白酶的热不稳定性被诱导。发明人已经确定,没有必要例如通过使用EDTA去除可以与蛋白酶结合并有助于蛋白酶的稳定性和结构的钙离子。相反,仅提供低浓度的游离钙离子就令人惊讶地足以对酶诱导热不稳定性性质。这种可诱导的性质是意想不到的并且如实例中证明的在分子生物学应用中使用的黄金标准蛋白酶蛋白酶K中未观察到。

[0111] 因此,优选地,本发明的蛋白酶和其酶活性片段包括与其结合的钙离子。换句话说,优选地,本发明的组合物和样品包括蛋白酶和其天然钙结合状态的酶活性片段。在这种场景下,钙可以被认为是蛋白质的“辅因子”,并且在本发明的组合物和样品中,蛋白酶因此呈其“全酶形式”。全酶是由脱辅酶与其辅因子(在此情况下为钙)组合而形成的生物化学活性酶。

[0112] 因此,优选地,本发明的组合物和样品基本上不含,优选地不包括EDTA,更优选地任何钙螯合剂。优选地,存在于本发明的溶液和样品中的蛋白酶和其酶活性片段在任何时候都未暴露于EDTA,更优选地任何钙螯合剂。

[0113] 可替代地观察的,本发明提供了一种组合物,所述组合物包括蛋白酶或其酶活性片段,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中

[0114] i) 所述组合物中钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M并且所述组合物基本上不含EDTA,优选地基本上不含钙螯合剂;或

[0115] ii) 所述组合物中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0116] 此外,可替代地观察的,本发明提供了一种样品,所述样品包括一种或多种多肽以及蛋白酶或其酶活性片段,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中

[0117] i) 所述样品中钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M并且所述样品基本上不含EDTA,优选地基本上不含钙螯合剂;或

[0118] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0119] 此外,可替代地观察的,本发明提供了一种组合物,所述组合物包括蛋白酶或其酶

活性片段,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中

[0120] i) 所述组合物中钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M并且所述组合物基本上不含EDTA,优选地基本上不含钙螯合剂;或

[0121] ii) 所述组合物中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM,

[0122] 并且其中所述蛋白酶或其酶活性片段进一步包括在SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列的N端的另外的肽序列和/或C端的另外的肽序列。

[0123] 在本文中任何其它地方描述的优选的和可选的特征和实施例加以必要的变更更适用于本发明的“可替代地观察的”方面。具体地,在本文中其它地方公开的“游离钙”的浓度是基本上不含EDTA,更优选地基本上不含任何钙螯合剂的本发明的可替代地观察的组合物和样品中钙(未定义为“游离钙”)的优选浓度。这同样适用于下文中本发明的方法,所述方法是指“钙”而不是“游离钙”的浓度,并且其指明所述方法的样品或组合物基本上不含EDTA。

[0124] 优选地,本发明的所有方面的组合物和样品都基本上不含EDTA和EGTA,更优选地基本上不含能够从蛋白酶X结构中去除结合的钙的钙螯合剂,更优选地基本上不含钙螯合剂。

[0125] “基本上不含”例如EDTA或游离钙意味着组合物和样品基本上不含EDTA或游离钙,但是这并不意味着严格要求组合物和样品完全缺乏EDTA或游离钙。即使在已经采取步骤以防止EDTA或游离钙的存在之后,也可能存在微量水平的EDTA或游离钙,例如由于用于制备本发明的组合物或样品的商业产品或储备溶液中存在少量的EDTA或游离钙。虽然详细的检查可以揭示存在一些EDTA,但是其存在的量如此之小,以至于出于预期目的,可以认为其不存在,即与不存在EDTA时将会出现的这种水平或程度相比,EDTA不以基本上改变游离钙的水平或钙与本发明蛋白酶结合的程度存在。

[0126] 在钙螯合剂的上下文中,“基本上不含”意味着样品中蛋白酶X的浓度与钙螯合剂例如EDTA或EGTA的浓度的比率为至少10:1,更优选地至少100:1,更优选地至少1000:1。如果样品含有超过一种钙螯合剂,则这些比率就是样品中蛋白酶X的浓度与钙螯合剂的总浓度的比率。

[0127] 虽然详细的检查可以揭示存在一些游离钙,但是其存在的量如此之小,以至于出于预期目的,可以认为其不存在,即与不存在游离钙时将会出现的这种水平或程度相比,其不以基本上改变本发明的蛋白酶的热不稳定性的水平存在。

[0128] 优选地,本发明的组合物和样品完全不含EDTA,更优选地不含能够从蛋白酶X结构中去除结合钙的钙螯合剂,更优选地不含钙螯合剂。

[0129] 优选地,本发明的组合物和样品完全不含游离钙,即不包括游离钙。

[0130] 本发明的组合物和样品中游离钙的浓度优选地 $\leq$ 约80 $\mu$ M,优选地 $\leq$ 约65 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约40 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约35 $\mu$ M、 $\leq$ 约32 $\mu$ M或 $\leq$ 约30 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约25 $\mu$ M或 $\leq$ 约20 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约16 $\mu$ M或 $\leq$ 约15 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约10 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约8 $\mu$ M或 $\leq$ 约5 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约2.5 $\mu$ M。术语“ $\leq$ 约X”相当于“0到X mM”。优选地,本发明的组合物和样品不包括游离钙。

[0131] 优选地,本发明的组合物和样品中游离钙的浓度为至少约1 $\mu$ M。因此,本发明的组

合物和样品中游离钙的浓度优选地为约1到约80 $\mu\text{M}$ ,更优选地约1到约65 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约40 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约35 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约32 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约30 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约25 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约20 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约16 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约15 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约10 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约8 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约5 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约2.5 $\mu\text{M}$ 。

[0132] 优选地,本发明的组合物和样品中游离钙的浓度为至少约2 $\mu\text{M}$ 。因此,本发明的组合物和样品中游离钙的浓度优选地为约2到约80 $\mu\text{M}$ ,更优选地约2到约65 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约40 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约35 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约32 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约30 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约25 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约20 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约16 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约15 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约10 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约8 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约5 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约2.5 $\mu\text{M}$ 。

[0133] 优选地,本发明的组合物和样品基本上不含游离钙,更优选地不包括游离钙。术语“基本上不含”如本文其它地方所定义的。

[0134] 特别优选地,本发明的组合物和样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约35 $\mu\text{M}$ 、 $\leq$ 约32 $\mu\text{M}$ ,优选地 $\leq$ 约16 $\mu\text{M}$ ,优选地 $\leq$ 约10 $\mu\text{M}$ 。特别优选地,本发明的组合物和样品中游离钙的浓度为至少约1 $\mu\text{M}$ ,优选地至少约2 $\mu\text{M}$ 。因此,特别优选地,本发明的组合物和样品中游离钙的浓度为约1到约35 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约32 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约35 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约32 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约16 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约16 $\mu\text{M}$ ,优选地约1到约10 $\mu\text{M}$ ,优选地约2到约10 $\mu\text{M}$ 。

[0135] 如以上所提及的,优选地,本发明的组合物和样品优选地包括这种浓度的游离钙并且基本上不含EDTA,优选地基本上不含钙螯合剂。

[0136] 优选地,本发明的组合物中蛋白酶或其酶活性片段的浓度为0.1mg/ml到20mg/ml,更优选地0.5mg/ml到10mg/ml,最优选地2mg/ml到5mg/ml。

[0137] 使用以上优选的测定A,诸位发明人已经测定蛋白酶X的比活性为约65U/mg。优选地,当使用以上测定A测定时,本发明的组合物中蛋白酶或其酶活性片段的活性为0.0015U/ $\mu\text{l}$ 到0.30U/ $\mu\text{l}$ ,更优选地0.008U/ $\mu\text{l}$ 到0.15U/ $\mu\text{l}$ ,最优选地约0.03U/ $\mu\text{l}$ 到0.08U/ $\mu\text{l}$ 。

[0138] 优选地,本发明的样品中蛋白酶或其酶活性片段的浓度为0.001mg/ml到5mg/ml,更优选地0.05mg/ml到0.5mg/ml,最优选地0.015mg/ml到0.1mg/ml。

[0139] 优选地,当使用以上测定A测定时,本发明的样品中蛋白酶或其酶活性片段的活性为0.07U/ml到325U/ml,更优选地3.25U/ml到32.5U/ml,最优选地1.0U/ $\mu\text{l}$ 到6.5U/ml。

[0140] 任选地,本发明的组合物或样品包括一种或多种选自由抗体、单链DNA结合蛋白(SSB)和酶组成的组的另外的功能蛋白。

[0141] 优选地,所述另外的酶选自由以下组成的组:核酸酶(优选地脱氧核糖核酸酶、核酸外切酶、Ba1 31核酸酶、核糖核酸酶、绿豆核酸酶或S1核酸酶)、聚合酶(优选地DNA聚合酶或RNA聚合酶)、逆转录酶、转座酶、连接酶(优选地DNA连接酶或RNA连接酶)、甲基化酶、多核苷酸腺苷酰-转移酶、拓扑异构酶、鸟苷酰转移酶、磷酸酶(优选地碱性磷酸酶,优选地热不稳定的碱性磷酸酶,更优选地虾碱性磷酸酶)、激酶、解旋酶、限制性酶和糖基化酶。组合物或样品优选地包括这种另外的酶的结合。

[0142] 优选地,组合物或样品包括DNA聚合酶或逆转录酶。如果溶液或样品包括细胞或细胞材料,则其优选地包括作为外源酶,即不由样品内的细胞或样品中的细胞材料源自的细胞表达的另外的酶。换句话说,另外的酶被应用于样品,而不是由样品中的细胞或细胞材料提供。在这些实施例中,不排除另外存在内源地产生的酶。

[0143] 本发明的组合物和样品优选地包括单价盐,优选地单价无机盐。自始至终同义地使用术语“盐”和“单价盐”。单价盐是包括单价抗衡离子的盐。二价盐是抗衡离子中的至少一种为二价的盐。例如, $MgCl_2$ 。无机盐是其中抗衡离子中的两种都不包括碳的盐。优选地,盐是钠盐或钾盐,更优选地钠盐。优选地,盐是氯化钠(NaCl)或氯化钾(KCl),最优选地氯化钠。

[0144] 可替代地观察的,本发明的组合物和样品优选地包括单价抗衡离子。优选地,本发明的组合物和样品包括单价阳离子并且优选地还包括单价阴离子。优选地,单价离子是无机的。优选地,阳离子是钠离子或钾离子,优选地钠离子。优选地,组合物和样品包括钠离子和氯离子或钾离子和氯离子,最优选地钠离子和氯离子。本文公开的单价盐的优选浓度固有地是单价抗衡离子的优选浓度,并且反之亦然。

[0145] 如实例所示,诸位发明人首次证明,增加单价盐的浓度会诱导蛋白酶X的热不稳定性,然而增加单价盐浓度会稳定蛋白酶K至热灭活。此结果尤其令人惊讶。SEQ ID NO:1的蛋白酶X是从盐水生物体中获得的并且因此预计通常将会耐受高盐条件。相比之下,蛋白酶K是从非海洋来源真菌共附生白色侧齿霉菌(先前为白色念球菌)获得的并且预计将不会通过高盐条件稳定。

[0146] 在包括单价盐的本发明的样品和组合物中,优选地,组合物和样品的pH为6.5到9.5,优选地6.8到9.2,更优选地7到9,更优选地7.5到8.5,更优选地约8.0。

[0147] 优选地,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM,优选地 $\geq$ 约25mM,更优选地 $\geq$ 约30mM,更优选地 $\geq$ 约40mM,更优选地 $\geq$ 约50mM,更优选地 $\geq$ 约75mM,更优选地 $\geq$ 约100mM,更优选地 $\geq$ 约125mM,更优选地 $\geq$ 约150mM,更优选地 $\geq$ 约175mM。任选地,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约200mM、 $\geq$ 约250mM、 $\geq$ 约300mM、 $\geq$ 约400mM、或 $\geq$ 500mM。

[0148] 优选地,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度 $\leq$ 约1M,优选地 $\leq$ 约500mM,优选地 $\leq$ 约350mM。本发明的组合物和样品中单价盐的浓度优选地为约20mM到约1M,优选地约20到约500mM,优选地约20到约400mM,优选地约20到约350mM,优选地约30到约350mM,优选地约40到约350mM,优选地约50到约350mM,优选地约75到约350mM,优选地约100到约350mM,优选地约125到约350mM,优选地约150到约350mM,优选地约175到约350mM。任选地,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约200到约350mM或约300到约350mM。

[0149] 优选地,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度 $\leq$ 约500mM,优选地 $\leq$ 约400mM,优选地 $\leq$ 约300mM,优选地 $\leq$ 约250mM,优选地 $\leq$ 约200mM,优选地 $\leq$ 约175mM,优选地 $\leq$ 约150mM。

[0150] 优选地,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约20到约300mM,优选地约30到约300mM,优选地约40到约300mM,优选地约50到约300mM,优选地约75到约300mM,优选地约100到约300mM,优选地约125到约300mM,优选地约150到约300mM,优选地约175到约300mM。任选地,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约200到约300mM。

[0151] 优选地,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约20到约250mM,优选地约30到约250mM,优选地约40到约250mM,优选地约50到约250mM,优选地约75到约250mM,优选地约100到约250mM,优选地约125到约250mM,优选地约150到约250mM,优选地约175到约250mM。任选地,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约200到约250mM。

[0152] 优选地,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约20到约200mM,优选地约30到

约200mM, 优选地约40到约200mM, 优选地约50到约200mM, 优选地约75到约200mM, 优选地约100到约200mM, 优选地约125到约200mM, 优选地约150到约200mM, 优选地约175到约200mM。

[0153] 优选地, 本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约20到约175mM, 优选地约30到约175mM, 优选地约40到约175mM, 优选地约50到约175mM, 优选地约75到约175mM, 优选地约100到约175mM, 优选地约125到约175mM, 优选地约150到约175mM。

[0154] 优选地, 本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约20到约150mM, 优选地约30到约150mM, 优选地约40到约150mM, 优选地约50到约150mM, 优选地约75到约150mM, 优选地约100到约150mM, 优选地约125到约150mM。

[0155] 特别优选地, 本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约20到约175mM, 优选地约20到约150mM, 优选地约50到约150mM。特别优选地, 本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约30到约175mM, 优选地约30到约150mM, 优选地约30到约150mM。特别优选地, 本发明的组合物和样品中单价盐的浓度为约40到约175mM, 优选地约40到约150mM, 优选地约40到约150mM。

[0156] 优选地, 本发明的组合物和样品包括一定浓度的游离钙和一定浓度的单价盐, 如在本文中任何地方定义的。因此, 就本发明的所有方面和实施例而言, 在此明确公开了本文公开的任何钙浓度值或范围与本文公开的任何单价盐浓度值或范围的组合。优选地, 单价盐是NaCl或KCl, 优选地NaCl。

[0157] 下文示出了最大游离钙浓度和最小单价盐浓度的优选组合:

[0158]

#	最大游离 Ca <sup>2+</sup> 浓度	结合 最小盐浓度
1	约 80 μM	约 20 mM
2	约 80 μM	约 25 mM
3	约 80 μM	约 50 mM
4	约 80 μM	约 75 mM
5	约 80 μM	约 100 mM
6	约 80 μM	约 125 mM
7	约 80 μM	约 150 mM
8	约 80 μM	约 200 mM
9	约 80 μM	约 300 mM
10	约 80 μM	约 400 mM
11	约 80 μM	约 500 mM
23	约 40 μM	约 20 mM
24	约 40 μM	约 25 mM
25	约 40 μM	约 50 mM
26	约 40 μM	约 75 mM
27	约 40 μM	约 100 mM
28	约 40 μM	约 125 mM
29	约 40 μM	约 150 mM
30	约 40 μM	约 200 mM
31	约 40 μM	约 300 mM
32	约 40 μM	约 400 mM
33	约 40 μM	约 500 mM
45	约 32 μM	约 20 mM
46	约 32 μM	约 25 mM
47	约 32 μM	约 50 mM
48	约 32 μM	约 75 mM

#	最大游离 Ca <sup>2+</sup> 浓度	结合 最小盐浓度
12	约 65 μM	约 20 mM
13	约 65 μM	约 25 mM
14	约 65 μM	约 50 mM
15	约 65 μM	约 75 mM
16	约 65 μM	约 100 mM
17	约 65 μM	约 125 mM
18	约 65 μM	约 150 mM
19	约 65 μM	约 200 mM
20	约 65 μM	约 300 mM
21	约 65 μM	约 400 mM
22	约 65 μM	约 500 mM
34	约 35 μM	约 20 mM
35	约 35 μM	约 25 mM
36	约 35 μM	约 50 mM
37	约 35 μM	约 75 mM
38	约 35 μM	约 100 mM
39	约 35 μM	约 125 mM
40	约 35 μM	约 150 mM
41	约 35 μM	约 200 mM
42	约 35 μM	约 300 mM
43	约 35 μM	约 400 mM
44	约 35 μM	约 500 mM
56	约 30 μM	约 20 mM
57	约 30 μM	约 25 mM
58	约 30 μM	约 50 mM
59	约 30 μM	约 75 mM

[0159]

49	约 32 $\mu$ M	约 100 mM	60	约 30 $\mu$ M	约 100 mM
50	约 32 $\mu$ M	约 125 mM	61	约 30 $\mu$ M	约 125 mM
51	约 32 $\mu$ M	约 150 mM	62	约 30 $\mu$ M	约 150 mM
52	约 32 $\mu$ M	约 200 mM	63	约 30 $\mu$ M	约 200 mM
53	约 32 $\mu$ M	约 300 mM	64	约 30 $\mu$ M	约 300 mM
54	约 32 $\mu$ M	约 400 mM	65	约 30 $\mu$ M	约 400 mM
55	约 32 $\mu$ M	约 500 mM	66	约 30 $\mu$ M	约 500 mM
67	约 25 $\mu$ M	约 20 mM	78	约 20 $\mu$ M	约 20 mM
68	约 25 $\mu$ M	约 25 mM	79	约 20 $\mu$ M	约 25 mM
69	约 25 $\mu$ M	约 50 mM	80	约 20 $\mu$ M	约 50 mM
70	约 25 $\mu$ M	约 75 mM	81	约 20 $\mu$ M	约 75 mM
71	约 25 $\mu$ M	约 100 mM	82	约 20 $\mu$ M	约 100 mM
72	约 25 $\mu$ M	约 125 mM	83	约 20 $\mu$ M	约 125 mM
73	约 25 $\mu$ M	约 150 mM	84	约 20 $\mu$ M	约 150 mM
74	约 25 $\mu$ M	约 200 mM	85	约 20 $\mu$ M	约 200 mM
75	约 25 $\mu$ M	约 300 mM	86	约 20 $\mu$ M	约 300 mM
76	约 25 $\mu$ M	约 400 mM	87	约 20 $\mu$ M	约 400 mM
77	约 25 $\mu$ M	约 500 mM	88	约 20 $\mu$ M	约 500 mM
89	约 16 $\mu$ M	约 20 mM	100	约 15 $\mu$ M	约 20 mM
90	约 16 $\mu$ M	约 25 mM	101	约 15 $\mu$ M	约 25 mM
91	约 16 $\mu$ M	约 50 mM	102	约 15 $\mu$ M	约 50 mM
92	约 16 $\mu$ M	约 75 mM	103	约 15 $\mu$ M	约 75 mM
93	约 16 $\mu$ M	约 100 mM	104	约 15 $\mu$ M	约 100 mM
94	约 16 $\mu$ M	约 125 mM	105	约 15 $\mu$ M	约 125 mM
95	约 16 $\mu$ M	约 150 mM	106	约 15 $\mu$ M	约 150 mM
96	约 16 $\mu$ M	约 200 mM	107	约 15 $\mu$ M	约 200 mM
97	约 16 $\mu$ M	约 300 mM	108	约 15 $\mu$ M	约 300 mM
98	约 16 $\mu$ M	约 400 mM	109	约 15 $\mu$ M	约 400 mM
99	约 16 $\mu$ M	约 500 mM	110	约 15 $\mu$ M	约 500 mM
111	约 10 $\mu$ M	约 20 mM	122	约 8 $\mu$ M	约 20 mM
112	约 10 $\mu$ M	约 25 mM	123	约 8 $\mu$ M	约 25 mM

	113	约 10 $\mu\text{M}$	约 50 mM	124	约 8 $\mu\text{M}$	约 50 mM
	114	约 10 $\mu\text{M}$	约 75 mM	125	约 8 $\mu\text{M}$	约 75 mM
	115	约 10 $\mu\text{M}$	约 100 mM	126	约 8 $\mu\text{M}$	约 100 mM
	116	约 10 $\mu\text{M}$	约 125 mM	127	约 8 $\mu\text{M}$	约 125 mM
	117	约 10 $\mu\text{M}$	约 150 mM	128	约 8 $\mu\text{M}$	约 150 mM
	118	约 10 $\mu\text{M}$	约 200 mM	129	约 8 $\mu\text{M}$	约 200 mM
	119	约 10 $\mu\text{M}$	约 300 mM	130	约 8 $\mu\text{M}$	约 300 mM
	120	约 10 $\mu\text{M}$	约 400 mM	131	约 8 $\mu\text{M}$	约 400 mM
	121	约 10 $\mu\text{M}$	约 500 mM	132	约 8 $\mu\text{M}$	约 500 mM
[0160]	133	约 5 $\mu\text{M}$	约 20 mM	144	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 20 mM
	134	约 5 $\mu\text{M}$	约 25 mM	145	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 25 mM
	135	约 5 $\mu\text{M}$	约 50 mM	146	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 50 mM
	136	约 5 $\mu\text{M}$	约 75 mM	147	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 75 mM
	137	约 5 $\mu\text{M}$	约 100 mM	148	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 100 mM
	138	约 5 $\mu\text{M}$	约 125 mM	149	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 125 mM
	139	约 5 $\mu\text{M}$	约 150 mM	150	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 150 mM
	140	约 5 $\mu\text{M}$	约 200 mM	151	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 200 mM
	141	约 5 $\mu\text{M}$	约 300 mM	152	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 300 mM
	142	约 5 $\mu\text{M}$	约 400 mM	153	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 400 mM
	143	约 5 $\mu\text{M}$	约 500 mM	154	约 2.5 $\mu\text{M}$	约 500 mM

[0161] 此外,优选地,本发明的组合物和样品中游离钙的浓度为至少约 $1\mu\text{M}$ ,更优选地至少约 $2\mu\text{M}$ 。此外,本发明的组合物和样品中单价盐的浓度优选地不超过约 $500\text{mM}$ ,优选地不超过约 $400\text{mM}$ ,优选地不超过约 $350\text{mM}$ ,优选地不超过约 $300\text{mM}$ ,优选地不超过约 $250\text{mM}$ ,优选地不超过约 $200\text{mM}$ ,优选地不超过约 $175\text{mM}$ ,优选地不超过约 $150\text{mM}$ 。

[0162] 下文示出了最大游离钙浓度和单价盐浓度的优选组合:

[0163]

#	最大游离 Ca <sup>2+</sup> 浓度	盐浓度	#	最大游离 Ca <sup>2+</sup> 浓度	盐浓度
155	约 80 μM	约 20 到约 175 mM	183	约 20 μM	约 20 到约 175 mM
156	约 80 μM	约 20 到约 150 mM	184	约 20 μM	约 20 到约 150 mM
157	约 80 μM	约 50 到约 175 mM	185	约 20 μM	约 50 到约 175 mM
158	约 80 μM	约 50 到约 150 mM	186	约 20 μM	约 50 到约 150 mM
159	约 65 μM	约 20 到约 175 mM	187	约 16 μM	约 20 到约 175 mM
160	约 65 μM	约 20 到约 150 mM	188	约 16 μM	约 20 到约 150 mM
161	约 65 μM	约 50 到约 175 mM	189	约 16 μM	约 50 到约 175 mM
162	约 65 μM	约 50 到约 150 mM	190	约 16 μM	约 50 到约 150 mM
163	约 40 μM	约 20 到约 175 mM	191	约 15 μM	约 20 到约 175 mM
164	约 40 μM	约 20 到约 150 mM	192	约 15 μM	约 20 到约 150 mM
165	约 40 μM	约 50 到约 175 mM	193	约 15 μM	约 50 到约 175 mM
166	约 40 μM	约 50 到约 150 mM	194	约 15 μM	约 50 到约 150 mM
167	约 35 μM	约 20 到约 175 mM	195	约 10 μM	约 20 到约 175 mM
168	约 35 μM	约 20 到约 150 mM	196	约 10 μM	约 20 到约 150 mM
169	约 35 μM	约 50 到约 175 mM	197	约 10 μM	约 50 到约 175 mM
170	约 35 μM	约 50 到约 150 mM	198	约 10 μM	约 50 到约 150 mM
171	约 32 μM	约 20 到约 175 mM	199	约 8 μM	约 20 到约 175 mM
172	约 32 μM	约 20 到约 150 mM	200	约 8 μM	约 20 到约 150 mM
173	约 32 μM	约 50 到约 175 mM	201	约 8 μM	约 50 到约 175 mM
174	约 32 μM	约 50 到约 150 mM	202	约 8 μM	约 50 到约 150 mM
175	约 30 μM	约 20 到约 175 mM	203	约 5 μM	约 20 到约 175 mM
176	约 30 μM	约 20 到约 150 mM	204	约 5 μM	约 20 到约 150 mM
177	约 30 μM	约 50 到约 175 mM	205	约 5 μM	约 50 到约 175 mM
178	约 30 μM	约 50 到约 150 mM	206	约 5 μM	约 50 到约 150 mM
179	约 25 μM	约 20 到约 175 mM	207	约 2.5 μM	约 20 到约 175 mM
180	约 25 μM	约 20 到约 150 mM	208	约 2.5 μM	约 20 到约 150 mM
181	约 25 μM	约 50 到约 175 mM	209	约 2.5 μM	约 50 到约 175 mM
182	约 25 μM	约 50 到约 150 mM	210	约 2.5 μM	约 50 到约 150 mM

[0164] 下文示出了游离钙浓度和单价盐浓度的优选组合：

[0165]

#	最大游离 Ca <sup>2+</sup> 浓度	盐浓度	#	最大游离 Ca <sup>2+</sup> 浓度	盐浓度
211	约 1 到约 80 μM	约 20 到约 175 mM	239	约 1 到约 20 μM	约 20 到约 175 mM
212	约 1 到约 80 μM	约 20 到约 150 mM	240	约 1 到约 20 μM	约 20 到约 150 mM
213	约 1 到约 80 μM	约 50 到约 175 mM	241	约 1 到约 20 μM	约 50 到约 175 mM
214	约 1 到约 80 μM	约 50 到约 150 mM	242	约 1 到约 20 μM	约 50 到约 150 mM
215	约 1 到约 65 μM	约 20 到约 175 mM	243	约 1 到约 16 μM	约 20 到约 175 mM
216	约 1 到约 65 μM	约 20 到约 150 mM	244	约 1 到约 16 μM	约 20 到约 150 mM
217	约 1 到约 65 μM	约 50 到约 175 mM	245	约 1 到约 16 μM	约 50 到约 175 mM
218	约 1 到约 65 μM	约 50 到约 150 mM	246	约 1 到约 16 μM	约 50 到约 150 mM
219	约 1 到约 40 μM	约 20 到约 175 mM	247	约 1 到约 15 μM	约 20 到约 175 mM
220	约 1 到约 40 μM	约 20 到约 150 mM	248	约 1 到约 15 μM	约 20 到约 150 mM
221	约 1 到约 40 μM	约 50 到约 175 mM	249	约 1 到约 15 μM	约 50 到约 175 mM
222	约 1 到约 40 μM	约 50 到约 150 mM	250	约 1 到约 15 μM	约 50 到约 150 mM
223	约 1 到约 35 μM	约 20 到约 175 mM	251	约 1 到约 10 μM	约 20 到约 175 mM
224	约 1 到约 35 μM	约 20 到约 150 mM	252	约 1 到约 10 μM	约 20 到约 150 mM
225	约 1 到约 35 μM	约 50 到约 175 mM	253	约 1 到约 10 μM	约 50 到约 175 mM
226	约 1 到约 35 μM	约 50 到约 150 mM	254	约 1 到约 10 μM	约 50 到约 150 mM
227	约 1 到约 32 μM	约 20 到约 175 mM	255	约 1 到约 8 μM	约 20 到约 175 mM
228	约 1 到约 32 μM	约 20 到约 150 mM	256	约 1 到约 8 μM	约 20 到约 150 mM
229	约 1 到约 32 μM	约 50 到约 175 mM	257	约 1 到约 8 μM	约 50 到约 175 mM
230	约 1 到约 32 μM	约 50 到约 150 mM	258	约 1 到约 8 μM	约 50 到约 150 mM
231	约 1 到约 30 μM	约 20 到约 175 mM	259	约 1 到约 5 μM	约 20 到约 175 mM
232	约 1 到约 30 μM	约 20 到约 150 mM	260	约 1 到约 5 μM	约 20 到约 150 mM
233	约 1 到约 30 μM	约 50 到约 175 mM	261	约 1 到约 5 μM	约 50 到约 175 mM
234	约 1 到约 30 μM	约 50 到约 150 mM	262	约 1 到约 5 μM	约 50 到约 150 mM
235	约 1 到约 25 μM	约 20 到约 175 mM	263	约 1 到约 2.5 μM	约 20 到约 175 mM
236	约 1 到约 25 μM	约 20 到约 150 mM	264	约 1 到约 2.5 μM	约 20 到约 150 mM
237	约 1 到约 25 μM	约 50 到约 175 mM	265	约 1 到约 2.5 μM	约 50 到约 175 mM
238	约 1 到约 25 μM	约 50 到约 150 mM	266	约 1 到约 2.5 μM	约 50 到约 150 mM

[0166] 下文示出了游离钙浓度和单价盐浓度的优选组合：

#	最大游离 Ca <sup>2+</sup> 浓度	盐浓度	#	最大游离 Ca <sup>2+</sup> 浓度	盐浓度
267	约 2 到约 80 μM	约 20 到约 175 mM	295	约 2 到约 20 μM	约 20 到约 175 mM
268	约 2 到约 80 μM	约 20 到约 150 mM	296	约 2 到约 20 μM	约 20 到约 150 mM
269	约 2 到约 80 μM	约 50 到约 175 mM	297	约 2 到约 20 μM	约 50 到约 175 mM
270	约 2 到约 80 μM	约 50 到约 150 mM	298	约 2 到约 20 μM	约 50 到约 150 mM
271	约 2 到约 65 μM	约 20 到约 175 mM	299	约 2 到约 16 μM	约 20 到约 175 mM
272	约 2 到约 65 μM	约 20 到约 150 mM	300	约 2 到约 16 μM	约 20 到约 150 mM
273	约 2 到约 65 μM	约 50 到约 175 mM	301	约 2 到约 16 μM	约 50 到约 175 mM
274	约 2 到约 65 μM	约 50 到约 150 mM	302	约 2 到约 16 μM	约 50 到约 150 mM
275	约 2 到约 40 μM	约 20 到约 175 mM	303	约 2 到约 15 μM	约 20 到约 175 mM
276	约 2 到约 40 μM	约 20 到约 150 mM	304	约 2 到约 15 μM	约 20 到约 150 mM
277	约 2 到约 40 μM	约 50 到约 175 mM	305	约 2 到约 15 μM	约 50 到约 175 mM
278	约 2 到约 40 μM	约 50 到约 150 mM	306	约 2 到约 15 μM	约 50 到约 150 mM
279	约 2 到约 35 μM	约 20 到约 175 mM	307	约 2 到约 10 μM	约 20 到约 175 mM
280	约 2 到约 35 μM	约 20 到约 150 mM	308	约 2 到约 10 μM	约 20 到约 150 mM
281	约 2 到约 35 μM	约 50 到约 175 mM	309	约 2 到约 10 μM	约 50 到约 175 mM
282	约 2 到约 35 μM	约 50 到约 150 mM	310	约 2 到约 10 μM	约 50 到约 150 mM
283	约 2 到约 32 μM	约 20 到约 175 mM	311	约 2 到约 8 μM	约 20 到约 175 mM
284	约 2 到约 32 μM	约 20 到约 150 mM	312	约 2 到约 8 μM	约 20 到约 150 mM
285	约 2 到约 32 μM	约 50 到约 175 mM	313	约 2 到约 8 μM	约 50 到约 175 mM
286	约 2 到约 32 μM	约 50 到约 150 mM	314	约 2 到约 8 μM	约 50 到约 150 mM
287	约 2 到约 30 μM	约 20 到约 175 mM	315	约 2 到约 5 μM	约 20 到约 175 mM
288	约 2 到约 30 μM	约 20 到约 150 mM	316	约 2 到约 5 μM	约 20 到约 150 mM
289	约 2 到约 30 μM	约 50 到约 175 mM	317	约 2 到约 5 μM	约 50 到约 175 mM
290	约 2 到约 30 μM	约 50 到约 150 mM	318	约 2 到约 5 μM	约 50 到约 150 mM
291	约 2 到约 25 μM	约 20 到约 175 mM	319	约 2 到约 2.5 μM	约 20 到约 175 mM
292	约 2 到约 25 μM	约 20 到约 150 mM	320	约 2 到约 2.5 μM	约 20 到约 150 mM
293	约 2 到约 25 μM	约 50 到约 175 mM	321	约 2 到约 2.5 μM	约 50 到约 175 mM
294	约 2 到约 25 μM	约 50 到约 150 mM	322	约 2 到约 2.5 μM	约 50 到约 150 mM

[0167] 特别优选地,本发明的组合物和样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约5μM,优选地 $\leq$ 约2μM,更优选地 $\leq$ 约1μM并且最优选地约0mM。特别优选地,组合物和样品中单价盐的浓度为20到125mM,优选地20到100mM,最优选地20到50mM。特别优选地,组合物和样品中单价盐的浓度为30到125mM,优选地30到100mM,最优选地30到50mM。

[0168] 本发明的组合物和样品包括可以在特别温和的条件下灭活的蛋白酶。因此,组合物在各种分子生物学方法中具有有利的效用,所述方法涉及随后或预先使用其它酶。下文更详细地讨论了这种方法。因此,另外的方面提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括:

[0170] i) 本发明的组合物;以及

[0171] ii) 包括第二酶的第二组合物。

[0172] 第二酶不是本发明的蛋白酶。任选地,所述试剂盒包括包含多种酶的多种溶液,

即,所述试剂盒包括包含第三酶的第三溶液,任选地,包括第四酶的第四溶液等。存在于本发明的试剂盒中的每种溶液优选地包括不同的酶,所述酶中的每一种都不是本发明的蛋白酶。优选地,第二溶液和后续溶液中的酶独立地选自由以下组成的组:核酸酶(优选地脱氧核糖核酸酶、核酸外切酶、Ba1 31核酸酶、核糖核酸酶、绿豆核酸酶或S1核酸酶)、聚合酶(优选地DNA聚合酶或RNA聚合酶)、逆转录酶、连接酶(优选地DNA连接酶或RNA连接酶)、甲基化酶、转移酶(优选地多核苷酸腺苷酰-转移酶)、拓扑异构酶、鸟苷酰转移酶、除蛋白酶X之外的蛋白酶和磷酸酶或其组合。

[0173] 优选地,本发明的试剂盒包括本发明的组合物和包括DNA聚合酶或逆转录酶的第二组合物。

[0174] 本发明的组合物和样品包括可以通过特别温和的热处理步骤灭活的蛋白酶。因此,组合物在各种分子生物学方法中具有有利的效用,在所述方法中,将蛋白酶应用于样品对于消化样品中的一种或多种多肽是必要的或期望的,但是在所述方法中,还期望避免对存在的一个或多个生物分子的结构或功能产生有害影响。使用标准蛋白酶需要i)使用高温进行灭活持续大量持续时间,这可能会对存在的感兴趣的生物分子造成损伤;或ii)去除/稀释蛋白酶,这增加了工作流程、时间和成本并且可能会导致感兴趣的生物分子的损失或损伤。本发明的组合物允许不需要这种不期望的处理步骤的方法。

[0175] 本发明提供了下文所讨论的方法。以上关于本发明的组合物、样品和试剂盒所描述的定义以及优选的和任选的特征和实施例加以必要的变更适用于本发明的任何和所有方法。在本发明的所有方法的上下文中,多肽、样品、蛋白酶、酶活性片段、游离钙、游离钙的浓度、单价盐和单价盐的浓度如在本文中任何其它地方所描述的。具体地,游离钙(或钙)和单价盐的以上所公开的特征和浓度中的任何一个特征和浓度以及其组合在本发明的方法中是有用的,即,优选地,在本发明的方法中接触或处理的样品包括一定浓度的游离钙或单价盐或其任何组合,如在本文中任何其它地方公开的。

[0176] 因此,术语在本发明的方法中接触的“样品”是指包括一种或多种多肽的任何组合物。优选地,样品包括细胞物质。优选地,样品包括粗细胞提取物。优选地,样品包括部分纯化的细胞提取物。优选地,样品包括细胞群。所述样品中的细胞可以是完整的或裂解的,优选地裂解的。优选地,样品包括组织样品或一种或多种体液。优选地,样品是细针活检。优选地,样品包括包封的病毒。蛋白酶可以用于消化病毒的蛋白质荚膜,以释放其中的RNA/DNA用于鉴定、定量和/或扩增。

[0177] 优选地,样品的体积 $\geq 10\mu\text{l}$ 。优选地,样品的体积 $\leq 1000\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 500\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 300\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 250\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 200\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 150\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 100\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 75\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 50\mu\text{l}$ 。可替代地,样品是微流体样品。优选地,微流体样品的体积 $\geq 0.01\mu\text{l}$ 。优选地,微流体样品的体积 $\leq 10\mu\text{l}$ ,优选地 $\leq 5\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 1\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 0.5\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 0.1\mu\text{l}$ 。

[0178] 除非上下文另有指示,否则本文中任何地方对蛋白酶的引用也是对其酶活性片段的引用。

[0179] 在本发明的所有方法中,优选地,样品基本上不含EDTA,优选地任何钙螯合剂。此术语的含义如在本文中其它地方所定义的。样品在与蛋白酶或其酶活性片段接触后基本上不含EDTA,优选地任何钙螯合剂。

[0180] 因此,在另外的方面,提供了一种消化样品中的多肽的方法,所述方法包括使所述样品与蛋白酶或其酶活性片段接触,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中

[0181] i) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M;或

[0182] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0183] 可替代地观察的,本发明提供了一种消化样品中的多肽的方法,所述方法包括使所述样品与蛋白酶或其酶活性片段接触,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中

[0184] i) 所述样品中钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M并且所述样品基本上不含EDTA;或

[0185] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0186] 在本发明的所有方法,特别是其中样品包括单价盐的那些方法中,优选地,样品的pH为6.5到9.5,优选地6.8到9.2,更优选地7到9,更优选地7.5到8.5,更优选地约8.0。诸位发明人首次确定,本发明的蛋白酶可以在温和的条件下(包含在中性和接近中性的pH下)灭活。

[0187] 优选地,样品中游离钙(或钙)的浓度不超过约80 $\mu$ M,并且所述样品中单价盐的浓度为至少约20mM。优选地,所述样品中单价盐的浓度为至少约30mM,更优选地至少约40mM,更优选地至少约50mM。

[0188] 术语“消化”、“水解”、“降解”和“切割”在本文中可互换使用并且是指样品中的多肽内的肽键的水解。消化可以是部分消化或完全消化。用于本发明中的蛋白酶是非特异性的并且在给予足够的时间时将在允许酶功能的条件下完全消化样品中的蛋白质。

[0189] 术语“接触(contacting/contact)”、“应用于(apply to)”/“应用(application)”和“添加到(adding to)”/“添加(addition)”具有其通常的含义并且在本文中可互换使用。

[0190] 在本发明的方法中,优选地,蛋白酶或其酶活性片段以本发明的组合物的形式提供,所述组合物在以上进行了描述。

[0191] 优选地,将蛋白酶或其酶活性片段以0.001mg/ml到5mg/ml,更优选地0.05mg/ml到0.5mg/ml,最优选地0.015mg/ml到0.1mg/ml的浓度添加到所述样品。这些浓度是样品中蛋白酶的浓度。

[0192] 优选地,当使用以上测定A测定时,蛋白酶或其酶活性片段在应用于样品,即在样品中之后的活性为0.07U/ml到325U/ml,更优选地3.25U/ml到32.5U/ml,最优选地1.0U/ $\mu$ l到6.5U/ml。

[0193] 因此,本发明的蛋白酶和其酶活性片段用于降解样品中的多肽。具体地,所述方法涉及在允许消化存在于样品中的多肽的至少一部分的条件下使样品与本发明的蛋白酶接触。因此,优选地,在样品已经与蛋白酶或其酶活性片段接触之后,所述方法进一步包括“消化步骤”,即在用于允许消化样品中的多肽的条件下温育样品的步骤。所需的消化量将取决于执行方法的人的目的和意图,并且本领域的普通技术人员将容易地可确定用于实现所需消化量的合适条件。

[0194] 优选地,消化步骤包括在介于4与65 $^{\circ}$ C之间,更优选地介于20与55 $^{\circ}$ C之间,最优选地介于30与55 $^{\circ}$ C之间的温度下加热样品。优选地,温育步骤的持续时间为1秒到45分钟,更

优选地30秒到30分钟,更优选地1到15分钟,更优选地1到10分钟,仍更优选地1到5分钟。如果使用在这些范围的较高端的温度,则温育的持续时间可以在这些范围的较低端,并且反之亦然。技术人员将意识到,在用微流体样品进行的方法以及其中存在于样品中的底物量小的其它方法的情况下,1或2秒的非常短的温育将会足够。

[0195] 优选地,以上方法包括后续“灭活步骤”,即加热样品以灭活蛋白酶或其酶活性片段的步骤。在使样品与蛋白酶接触的步骤之后以及在用于允许消化样品中的多肽的条件下温育样品的步骤之后进行这种灭活步骤。

[0196] 这些消化和灭活步骤通常将是温育并且在本文中,特别是在实例中进行了描述。与pH以及(游离)钙、单价盐和EDTA浓度相关的以上所提及的特征和实施例是样品中的在进行灭活步骤时的条件。

[0197] 因此,在另外的方面,提供了一种消化样品中的多肽的方法,所述方法包括以下步骤:

[0198] a) 使所述样品与蛋白酶或其酶活性片段接触,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列;

[0199] b) 在允许至少部分消化所述样品中的多肽的条件下温育所述样品;以及

[0200] c) 加热所述样品以灭活所述蛋白酶或其酶活性片段;其中

[0201] i) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M;或

[0202] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0203] 可替代地观察的,以上方法的步骤c) 包括

[0204] c) 加热样品以灭活蛋白酶或其酶活性片段;其中

[0205] i) 所述样品中钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M并且所述样品基本上不含EDTA;或

[0206] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0207] 优选地,所述样品中游离钙(或钙)的浓度不超过约80 $\mu$ M,并且所述样品中单价盐的浓度为至少约20mM。优选地,单价盐是单价无机盐,优选地钠盐或钾盐,更优选地氯化钾或氯化钠,最优选地氯化钠。消化步骤b) 如以上所讨论的。

[0208] 如以上所提及的,消化可以是部分消化或完全消化。用于本发明中的蛋白酶是非特异性的并且在给予足够的时间时将在允许酶功能的条件下完全消化样品中的蛋白质。

[0209] 因此,“消化样品中的多肽”意味着在一定程度上减少样品中全长多肽的量。可以使用许多众所周知的测定以直接的方式测定蛋白质消化的程度。技术人员将会能够出于其预期目的来设计合适的测定。例如,样品中酶的剩余活性可以用作蛋白质降解的量度。可以例如通过质谱法来测定的蛋白质组曲线的变化也可以用于测定样品中的多肽降解程度。用于可视化蛋白质降解程度的简单测定是进行SDS Page并用如考马斯蓝等蛋白质染色染料或其它可视报道分子进行染色。完整的蛋白质将展现为沿凝胶的条带,而随着蛋白质降解的增加,条带变得不那么清晰。使用基于软件的图像分析,可以对降解程度进行定量。

[0210] 优选地,蛋白酶添加到的样品包括细胞物质。优选地,样品包括粗细胞提取物。优选地,样品包括部分纯化的细胞提取物。优选地,样品包括细胞群。所述样品中的细胞可以是完整的或裂解的,优选地裂解的。优选地,样品包括组织样品或一种或多种体液。优选地,样品包括约1到约1,000,000个细胞。在优选实施例中,样品包括1到10,000个细胞,优选地1到1000个细胞,优选地1到100个细胞。在优选实施例中,样品包括单个细胞。在其它优选实

施例中,样品包括100到1,000,000个细胞,优选地100到10,000个细胞,优选地100到1000个细胞。优选地,样品是细针活检或液体活检。蛋白酶可以在细胞物质的裂解中使用。

[0211] 本发明的蛋白酶可以用于消化存在于样品中的任何多肽。优选地,样品中的多肽包含衣壳蛋白或支架蛋白、DNA或RNA结合蛋白和/或作用于DNA或RNA的酶,如在本文中其它地方所述的那些。

[0212] 在另外的方面,本发明提供了一种灭活样品中的蛋白酶或其酶活性片段的方法,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中所述方法包括加热所述样品以灭活所述蛋白酶或酶活性片段的步骤,并且其中

[0213] i) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M;或

[0214] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0215] 可替代地观察的,本发明提供了一种灭活样品中的蛋白酶或其酶活性片段的方法,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列,其中所述方法包括加热所述样品以灭活所述蛋白酶或酶活性片段的步骤,并且其中

[0216] i) 所述样品中钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M并且所述样品基本上不含EDTA,优选地基本上不含钙螯合剂;或

[0217] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0218] 在本发明的所有方法中,优选地,所述样品中游离钙(或钙)的浓度不超过约80 $\mu$ M,并且所述样品中单价盐的浓度为至少约20mM。优选地,单价盐是单价无机盐,优选地钠盐或钾盐,更优选地氯化钾或氯化钠,最优选地氯化钠。

[0219] 如以上所提及的,本发明的方法中在本文中的任何地方所述的游离钙(或钙)和单价盐的浓度是在灭活步骤开始时在样品中的浓度。优选地,浓度也是在样品与蛋白酶或其酶活性片段接触后在样品中的那些浓度。在本发明的方法中,优选地,不从样品中去除蛋白酶(例如,通过纯化、提取或离心),并且优选地,在灭活步骤之前或期间不稀释样品中蛋白酶的浓度。

[0220] 本发明基于令人惊讶的发现:在给予一定游离钙和/或单价盐浓度的温和条件下,本文所述的蛋白酶变得热不稳定。因此,这些条件需要在本发明的方法的灭活步骤期间存在。本领域的普通技术人员将容易地理解,使样品与蛋白酶或其酶活性片段接触将增加样品的体积并且可以因此降低其中的游离钙和单价盐的浓度。在使用中,优选地,本发明的组合物体积小,这不会显著改变样品的体积。类似地,本发明的蛋白酶可以在这样的溶液中提供:其中游离钙的浓度超过约80 $\mu$ M和/或其中单价盐的浓度不到约20mM,但是其中游离钙和/或单价盐添加到的样品中游离钙和/或单价盐的体积和浓度为使得根据本发明,蛋白酶或其酶活性片段已经应用于的所得样品包括不超过约80 $\mu$ M的游离钙浓度和至少约20mM的单价盐浓度。

[0221] 优选地,本发明的方法中的所述灭活步骤包括与进行所述灭活步骤之前样品中蛋白酶的活性相比,将所述样品中所述蛋白酶的活性降低至少75%,更优选地至少80%或至少85%,更优选地至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%。可替代地观察的,优选地,所述灭活步骤导致少于25%,更优选地少于20%、少于15%、少于10%、少

于5%、少于4%、少于3%、少于2%、少于1%的剩余蛋白酶活性。优选地,蛋白酶完全灭活,即,优选地,没有可检测的蛋白酶活性留下。

[0222] 即使当包括经过热处理的蛋白酶的溶液返回低于40°C的温度时,本发明的蛋白酶也不会恢复活性,即,基本上没有残留活性;具体地,小于10%,优选地小于5%、2%、1%、0.5%或0.1%,最优选地没有可检测的蛋白酶活性残留。因此,本文中所指的灭活是不可逆的。

[0223] 如以上所提及的,用于测定蛋白酶活性的合适的测定是本领域已知的。因此,这种测定可以用于相比于未经历热处理的相同蛋白酶的蛋白酶活性来测定通过热处理经历灭活的蛋白酶或其酶活性片段的蛋白酶活性,从而测定剩余活性或通过灭活步骤实现的灭活程度。任何蛋白酶活性测定都可以用于测定经过热处理的蛋白酶相比于未处理的蛋白酶的相对活性。技术人员将会清楚地意识到,相同的经过热处理的和未处理的蛋白酶应当保持在相同的条件下并使用相同的方案进行测定。优选地,所使用的测定是以上的测定A,并且优选地,未处理的蛋白酶保持在冰上,直到蛋白酶活性得以测定。剩余活性的另外的优选测定是实例中公开的那些。

[0224] 因此,在本发明地方方法的灭活步骤之后的剩余活性,即通过本发明的方法的灭活步骤实现的灭活程度,可以由本领域的普通技术人员通过以下来容易地测定:在合适的条件下使用合适的蛋白酶测定已经经历灭活步骤的蛋白酶的蛋白酶活性并且将其与未经历这种灭活步骤的相同蛋白酶的活性进行比较,其中在相同的条件下使用相同的测定来测定活性。优选地,所使用的测定是以上测定A或本发明实例中使用的测定中的任何一种测定。优选地,未处理的蛋白酶保持在冰上,直到蛋白酶活性得以测定。

[0225] 可以用相对于未处理的蛋白酶活性的灭活百分比或剩余活性百分比来表示灭活程度。

[0226] 由于样品中游离钙的浓度不超过约80 $\mu$ M和/或样品中单价盐的浓度为至少约20mM,因此样品中的蛋白酶和其酶活性片段可以通过使用温和的加热条件来进行灭活。

[0227] 本领域的普通技术人员将会能够例如通过使用加热块、微波、焦耳加热设备、激光加热设备或水浴将样品加热到期望的温度,持续期望的时间段。

[0228] 在本方法的灭活步骤期间样品被加热到的即蛋白酶被暴露于的温度被称为灭活温度。优选地,所述灭活温度 $\leq$ 约70°C,优选地 $\leq$ 约67°C,优选地 $\leq$ 约65°C,优选地 $\leq$ 约64°C,优选地 $\leq$ 约63°C,优选地 $\leq$ 约62°C,优选地 $\leq$ 约61°C,优选地 $\leq$ 约60°C,优选地 $\leq$ 约58°C。

[0229] 优选地,所述灭活步骤包括将含有蛋白酶的样品加热到约50到约67°C,优选地约50到约65°C,优选地约50到约64°C,优选地约50到约63°C,优选地约50到约62°C,优选地约50到约61°C,优选地约50到约60°C,优选地约50到约58°C的温度。

[0230] 优选地,所述灭活步骤包括将含有蛋白酶的样品加热到以下温度:约53到约67°C,优选地约53到约65°C,优选地约53到约64°C,优选地约53到约63°C,优选地约53到约62°C,优选地约53到约61°C,优选地约53到约60°C,优选地约53到约58°C。

[0231] 优选地,所述灭活步骤包括将含有蛋白酶的样品加热到约55到约67°C,优选地约55到约65°C,优选地约55到约64°C,优选地约55到约63°C,优选地约55到约62°C,优选地约55到约61°C,优选地约55到约60°C的温度。

[0232] 优选地,所述灭活步骤包括将含有蛋白酶的样品加热到以下温度:约56到约67℃,优选地约56到约65℃,优选地约56到约64℃,优选地约56到约63℃,优选地约56到约62℃,优选地约56到约61℃,优选地约56到约60℃。

[0233] 优选地,所述灭活步骤包括将含有蛋白酶的样品加热到以下温度:约57到约67℃,优选地约57到约65℃,优选地约57到约64℃,优选地约57到约63℃,优选地约57到约62℃,优选地约57到约61℃,优选地约57到约60℃。

[0234] 优选地,所述灭活步骤包括将含有蛋白酶的样品加热到以下温度:约58到约67℃,优选地约58到约65℃,优选地约58到约64℃,优选地约58到约63℃,优选地约58到约62℃,优选地约58到约61℃,优选地约58到约60℃。

[0235] 优选地,所述灭活步骤包括将含有蛋白酶的样品加热到以下温度:约59到约67℃,优选地约59到约65℃,优选地约59到约64℃,优选地约59到约63℃,优选地约59到约62℃,优选地约59到约61℃,优选地约59到约60℃。

[0236] 优选地,所述灭活步骤包括将含有蛋白酶的样品加热到约55℃到约65℃,优选地约60℃到约65℃,更优选地约55℃到约60℃的温度。

[0237] 特别优选地,所述灭活步骤包括在约53℃到约60℃,更优选地约53℃到约58℃,更优选地在约55℃下加热。

[0238] 特别优选地,所述灭活步骤包括在约58℃到约67℃,更优选地约58℃到约63℃,更优选地在约60℃下加热。

[0239] 特别优选地,所述灭活步骤包括在约60到约67℃,更优选地约63到约67℃,更优选地在约65℃下加热。

[0240] 优选地,灭活步骤包括在以上温度中的任何一个温度下加热样品一定时间段,所述时间段被称为“保持时间”。必要的保持时间取决于所使用的灭活温度、样品中游离钙和单价盐的浓度以及所需的灭活程度。考虑到本申请中的教导,本领域的普通技术人员将会能够出于其特定目的来选择保持时间。

[0241] 优选地,保持时间 $\leq$ 约75分钟,优选地 $\leq$ 约60分钟,优选地 $\leq$ 约55分钟,优选地 $\leq$ 约50分钟,优选地 $\leq$ 约45分钟,优选地 $\leq$ 约40分钟,优选地 $\leq$ 约35分钟,优选地 $\leq$ 约30分钟,优选地 $\leq$ 约25分钟,优选地 $\leq$ 约20分钟,优选地 $\leq$ 约15分钟,优选地 $\leq$ 约10分钟,优选地 $\leq$ 约5分钟,优选地 $\leq$ 约2分钟。

[0242] 优选地,保持时间为至少约1分钟,优选地至少约2分钟,优选地至少约5分钟,优选地至少约10分钟,优选地至少约15分钟,优选地至少约20分钟,优选地至少约25分钟,优选地至少约30分钟,优选地至少约35分钟,优选地至少约40分钟,优选地至少约45分钟,优选地至少约50分钟,优选地至少约60分钟。

[0243] 优选地,保持时间为约2到约75分钟,优选地约2到约60分钟,优选地约2到约55分钟,优选地约2到约50分钟,优选地约2到约45分钟,优选地约2到约40分钟,优选地约2到约35分钟,优选地约2到约30分钟,优选地约2到约25分钟,优选地约2到约20分钟,优选地约2到约15分钟,优选地约2到约10分钟,优选地约2到约5分钟。

[0244] 优选地,保持时间为约5到约75分钟,优选地约5到约60分钟,优选地约5到约55分钟,优选地约5到约50分钟,优选地约5到约45分钟,优选地约5到约40分钟,优选地约5到约35分钟,优选地约5到约30分钟,优选地约5到约25分钟,优选地约5到约20分钟,优选地约5

到约15分钟,优选地约5到约10分钟。

[0245] 优选地,保持时间为约10到约75分钟,优选地约10到约60分钟,优选地约10到约55分钟,优选地约10到约50分钟,优选地约10到约45分钟,优选地约10到约40分钟,优选地约10到约35分钟,优选地约10到约30分钟,优选地约10到约25分钟,优选地约10到约20分钟,优选地约10到约15分钟。

[0246] 优选地,保持时间为约15到约75分钟,优选地约15到约60分钟,优选地约15到约55分钟,优选地约15到约50分钟,优选地约15到约45分钟,优选地约15到约40分钟,优选地约15到约35分钟,优选地约15到约30分钟,优选地约15到约25分钟,优选地约15到约20分钟。

[0247] 优选地,保持时间为约20到约75分钟,优选地约20到约60分钟,优选地约20到约55分钟,优选地约20到约50分钟,优选地约20到约45分钟,优选地约20到约40分钟,优选地约20到约35分钟,优选地约20到约30分钟,优选地约20到约25分钟。

[0248] 优选地,保持时间为约25到约75分钟,优选地约25到约60分钟,优选地约25到约55分钟,优选地约25到约50分钟,优选地约25到约45分钟,优选地约25到约40分钟,优选地约25到约35分钟,优选地约25到约30分钟。

[0249] 优选地,保持时间为约30到约75分钟,优选地约30到约60分钟,优选地约30到约55分钟,优选地约30到约50分钟,优选地约30到约45分钟,优选地约30到约40分钟,优选地约30到约35分钟。

[0250] 优选地,保持时间为约35到约75分钟,优选地约35到约60分钟,优选地约35到约55分钟,优选地约35到约50分钟,优选地约35到约45分钟,优选地约35到约40分钟。

[0251] 优选地,保持时间为约40到约75分钟,优选地约40到约60分钟,优选地约40到约55分钟,优选地约40到约50分钟,优选地约40到约45分钟。

[0252] 优选地,保持时间为约45到约75分钟,优选地约45到约60分钟,优选地约45到约55分钟,优选地约45到约50分钟。

[0253] 优选地,保持时间为约50到约75分钟,优选地约50到约60分钟,优选地约50到约55分钟。

[0254] 优选地,保持时间为约55到约75分钟,优选地约55到约60分钟。

[0255] 优选地,保持时间为约5分钟到约40分钟,优选地约10分钟到约35分钟,优选地约15分钟到约30分钟。特别优选地,保持时间为约5到约15分钟或约10到约20分钟或约20到约40分钟,优选地约25到约35分钟。

[0256] 以上保持时间特别适合于体积 $\leq 1000\mu\text{l}$ 、优选地 $\leq 500\mu\text{l}$ 、更优选地 $\leq 300\mu\text{l}$ 、更优选地 $\leq 250\mu\text{l}$ 、更优选地 $\leq 200\mu\text{l}$ 、更优选地 $\leq 150\mu\text{l}$ 、更优选地 $\leq 100\mu\text{l}$ 、更优选地 $\leq 75\mu\text{l}$ 、更优选地 $\leq 50\mu\text{l}$ 的样品。

[0257] 技术人员将意识到,对加热温度和保持时间中的一个的调节可以通过调节另一个来补偿。例如,增加灭活温度可能会允许减少保持时间。相反,增加保持时间可能允许使用较低的灭活温度。

[0258] 另外,技术人员将意识到,当存在的蛋白酶的量较小时,例如在微流体样品的情况下,足够的灭活可以在非常短的时间范围内发生,例如1到30秒,优选地1到20秒,优选地1到10秒,优选地1到5秒并且甚至可能仅在1或2秒内。以上所提及的灭活温度中的任何一个温度都可以用于这些短保持时间。为了使这种短保持时间有效,含有待灭活的蛋白酶的样品

的体积优选地 $\leq 10\mu\text{l}$ , 优选地 $\leq 5\mu\text{l}$ , 更优选地 $\leq 1\mu\text{l}$ , 更优选地 $\leq 0.5\mu\text{l}$ , 更优选地 $\leq 0.1\mu\text{l}$ 。

[0259] 在包括灭活步骤的本发明的方法中, 以上灭活温度中的任何一个灭活温度可以与以上保持时间中的任何一个保持时间组合使用。明确公开了在本文中任何地方公开的灭活温度和保持时间的任何和所有组合。

[0260] 优选地, 灭活步骤包括在约 $53^{\circ}\text{C}$ 到约 $67^{\circ}\text{C}$ , 优选地约 $55^{\circ}\text{C}$ 到约 $65^{\circ}\text{C}$ , 优选地约 $55$ 到约 $63^{\circ}\text{C}$ 的温度下加热约 $2$ 到约 $75$ 分钟, 优选地约 $5$ 到约 $40$ 分钟, 更优选地约 $10$ 到约 $30$ 分钟, 例如约 $10$ 、约 $15$ 或约 $30$ 分钟的保持时间。

[0261] 优选地, 灭活步骤包括在约 $55$ 到约 $60^{\circ}\text{C}$ 的温度下加热约 $2$ 到约 $75$ 分钟, 优选地约 $5$ 到约 $40$ 分钟, 更优选地约 $10$ 到约 $30$ 分钟, 例如约 $10$ 、约 $15$ 或约 $30$ 分钟的保持时间。

[0262] 优选地, 灭活步骤包括在约 $60$ 到约 $65^{\circ}\text{C}$ 的温度下加热约 $2$ 到约 $75$ 分钟, 优选地约 $5$ 到约 $40$ 分钟, 更优选地约 $10$ 到约 $20$ 分钟, 例如约 $10$ 或约 $15$ 分钟的保持时间。

[0263] 本发明的优选的灭活步骤如下:

[0264] A) 在约 $53$ 到约 $58^{\circ}\text{C}$ 下, 优选地在约 $55^{\circ}\text{C}$ 下加热约 $45$ 到约 $75$ 分钟, 更优选地约 $45$ 到约 $60$ 分钟, 更优选地约 $60$ 分钟。

[0265] 在这种实施例中, 样品中游离钙的浓度优选地 $\leq$ 约 $10\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $8\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq 5\mu\text{M}$ , 更优选地, 样品不包括游离钙。

[0266] 可替代地或另外, 在这种实施例中, 样品中单价盐的浓度优选地为至少约 $50\text{mM}$ , 更优选地至少约 $75\text{mM}$ , 更优选地至少约 $100\text{mM}$ 或至少约 $150\text{mM}$ 。

[0267] B) 在约 $58$ 到约 $63^{\circ}\text{C}$ 下, 优选地在约 $60^{\circ}\text{C}$ 下加热, 持续下文B1到B4中的任何一项所阐述的以下时间:

[0268] B1) 持续约 $2$ 到约 $40$ 分钟, 更优选地约 $5$ 到约 $30$ 分钟。

[0269] 在这种实施例中, 样品中游离钙的浓度优选地 $\leq$ 约 $80\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $65\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $35\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $20\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $10\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $5\mu\text{M}$ 。

[0270] 可替代地或另外, 在这种实施例中, 样品中单价盐的浓度优选地为至少约 $20\text{mM}$ , 更优选地至少约 $25\text{mM}$ , 更优选地至少约 $30\text{mM}$ , 更优选地至少约 $40\text{mM}$ , 更优选地至少约 $50\text{mM}$ , 更优选地至少约 $75\text{mM}$ , 更优选地至少约 $100\text{mM}$ , 更优选地至少约 $150\text{mM}$ 。

[0271] B2) 约 $5$ 到约 $15$ 分钟, 更优选地约 $10$ 分钟。

[0272] 在这种实施例中, 样品中游离钙的浓度优选地 $\leq$ 约 $10\mu\text{M}$ 、 $\leq$ 约 $8\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $5\mu\text{M}$ , 更优选地, 样品不包括游离钙。

[0273] 可替代地或另外, 在这种实施例中, 样品中单价盐的浓度优选地为至少约 $75\text{mM}$ , 更优选地至少约 $100\text{mM}$ , 更优选地至少约 $150\text{mM}$ 。

[0274] B3) 约 $10$ 到约 $20$ 分钟, 更优选地约 $15$ 分钟。

[0275] 在这种实施例中, 样品中游离钙的浓度优选地 $\leq$ 约 $35\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $16\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $8\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $5\mu\text{M}$ , 更优选地样品不包括游离钙。

[0276] 可替代地或另外, 在这种实施例中, 样品中单价盐的浓度优选地为至少约 $50\text{mM}$ , 更优选地至少约 $75\text{mM}$ , 更优选地至少约 $100\text{mM}$ , 更优选地至少约 $150\text{mM}$ 。

[0277] B4) 约 $20$ 到 $40$ 分钟, 更优选地约 $30$ 分钟。

[0278] 在这种实施例中, 样品中游离钙的浓度优选地 $\leq$ 约 $80\mu\text{M}$ 、 $\leq$ 约 $65\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $35\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $30\mu\text{M}$ , 更优选地 $\leq$ 约 $16\mu\text{M}$ 。

[0279] 可替代地或另外,在这种实施例中,样品中单价盐的浓度优选地为至少约25mM,更优选地至少约30mM,更优选地至少约40mM,更优选地至少约50mM,更优选地至少约75mM,更优选地至少约100mM。

[0280] 优选地,在这种实施例中,如果单价盐浓度为100mM或更小,则钙浓度不超过30 $\mu$ M。优选地,如果单价盐浓度为75mM或更小,则钙浓度不超过20 $\mu$ M。优选地,如果单价盐浓度为50mM或更小,则钙浓度不超过10 $\mu$ M。

[0281] C) 在约63到约67 $^{\circ}$ C下,优选地在约65 $^{\circ}$ C下加热最多约15分钟,更优选地最多约10分钟,更优选地最多约5分钟。

[0282] 在这种实施例中,样品中游离钙的浓度优选地 $\leq$ 约80 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约65 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约35 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约20 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约10 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约5 $\mu$ M。

[0283] 可替代地或另外,在这种实施例中,样品中单价盐的浓度优选地为至少约20mM,更优选地至少约25mM,更优选地至少约30mM,更优选地至少约40mM,更优选地至少约50mM,更优选地至少约75mM,更优选地至少约100mM。

[0284] 由诸位发明人确定的对热不稳定性的游离钙依赖性影响和单价盐依赖性影响也允许在高温下灭活本发明的蛋白酶和其酶活性片段,持续令人惊讶地短的时间量。因此,在替代性优选实施例中,灭活步骤包括

[0285] D) 在约65到约70 $^{\circ}$ C,优选地约67到约70 $^{\circ}$ C,更优选地约67 $^{\circ}$ C或约70 $^{\circ}$ C下加热最多约5分钟,更优选地最多约2分钟。

[0286] 在这种实施例中,样品中游离钙的浓度优选地 $\leq$ 约80 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约65 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约35 $\mu$ M,更优选地 $\leq$ 约20 $\mu$ M。

[0287] 可替代地或另外,在这种实施例中,样品中单价盐的浓度优选地为至少约20mM,更优选地至少约25mM,更优选地至少约30mM,更优选地至少约40mM,更优选地至少约50mM,更优选地至少约75mM,更优选地至少约100mM。

[0288] 最优选地,加热/灭活步骤C) 包括将样品加热到55到60 $^{\circ}$ C的温度,持续15到30分钟的持续时间。

[0289] 对于技术人员来说将容易显而易见的是,对参数加热时间、加热温度、游离钙浓度和单价盐浓度中的一个参数的调节可以通过调节其它参数中的一个或多个参数来补偿。

[0290] 然而,至关重要,根据本发明,最大游离钙浓度为80 $\mu$ M。正是处于或低于此游离钙浓度时,本发明的蛋白酶的热不稳定性被诱导到以下程度:在有利地温和的条件下,具体地其中灭活温度为53到67 $^{\circ}$ C并且保持时间为2到75分钟,优选地5到60分钟,更优选地10到40分钟,优选地15到30分钟,可以实现蛋白酶的基本灭活(75%灭活)。

[0291] 类似地,根据本发明,最小单价盐浓度为20mM。正是处于或高于此单价盐浓度时,本发明的蛋白酶的热不稳定性被诱导到以下程度:在有利地温和的条件下,具体地其中灭活温度为53到67 $^{\circ}$ C并且保持时间为2到75分钟,优选地5到60分钟,更优选地10到40分钟,优选地15到30分钟,可以实现蛋白酶的基本灭活(75%灭活)。

[0292] 如以上所提及的,现场使用的黄金标准蛋白酶的典型灭活方案要求苛刻得多的条件:例如,在75 $^{\circ}$ C下加热5分钟(伯乐公司方案)、在95 $^{\circ}$ C下加热10分钟(新英格兰生物实验室方案)、在70 $^{\circ}$ C下加热15分钟(凯杰公司方案)。

[0293] 在本发明的方法中,优选地,样品在与蛋白酶接触时基本上不含,更优选地不包括

EDTA,更优选地任何钙螯合剂。可替代地观察的,优选地,蛋白酶所应用于的样品基本上不含,更优选地不包括EDTA,优选地任何钙螯合剂。优选地,本发明的方法不包括在添加蛋白酶之后向样品应用EDTA,优选地任何钙螯合剂的步骤。样品可能在工作流程早期的某个时间或在样品的制备期间已经与钙螯合剂接触,但是在这种情况下,必须在应用蛋白酶之前已经去除钙螯合剂。钙螯合剂如在本文中其它地方所述,并且本领域的普通技术人员能够在使样品与蛋白酶接触之前将钙螯合剂从样品中去除。

[0294] 如以上所提及的,在本发明的所有方法,特别是其中样品包括单价盐的那些方法中,优选地,样品的pH为6.5到9.5,优选地6.8到9.2,更优选地7到9,更优选地7.5到8.5,更优选地约8.0。诸位发明人首次确定,本发明的蛋白酶可以在温和的条件下(包含在中性和接近中性的pH下)灭活。因此,优选地,所述方法进一步包括在灭活步骤之前将样品的pH调节到6.5到9.5,优选地6.8到9.2,更优选地7到9,更优选地7.5到8.5,更优选地约8.0的步骤。用于调节样品的pH的步骤对于本领域的普通技术人员是众所周知的,并且任何这种步骤都可以用于本发明的方法中。

[0295] 优选地,蛋白酶添加到的样品的体积 $\geq 10\mu\text{l}$ 。优选地,样品的体积 $\leq 1000\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 500\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 300\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 250\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 200\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 150\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 100\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 75\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 50\mu\text{l}$ 。可替代地,样品是微流体样品。优选地,微流体样品的体积 $\geq 0.01\mu\text{l}$ 。优选地,微流体样品的体积 $\leq 10\mu\text{l}$ ,优选地 $\leq 5\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 1\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 0.5\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 0.1\mu\text{l}$ 。

[0296] 优选地,蛋白酶或酶活性片段添加到的样品包括感兴趣的生物分子和一种或多种污染即不需要的多肽。

[0297] 因此,在另外的方面,本发明提供了一种从样品中分离或纯化感兴趣的生物分子的方法,其中所述样品包括一种或多种污染多肽,所述方法包括:

[0298] a) 使所述样品与蛋白酶或其酶活性片段接触,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列;

[0299] b) 在允许至少部分消化所述样品中的多肽的条件下温育所述样品;以及

[0300] c) 加热所述样品以灭活所述蛋白酶或其酶活性片段,其中

[0301] i) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约 $80\mu\text{M}$ ;或

[0302] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约 $20\text{mM}$ ;以及

[0303] d) 任选地从所述样品中去除所述感兴趣的生物分子。

[0304] 可替代地观察的,以上方法的步骤c) 包括:

[0305] 加热所述样品以灭活所述蛋白酶或其酶活性片段,其中

[0306] i) 所述样品中钙的浓度 $\leq$ 约 $80\mu\text{M}$ 并且所述样品基本上不含EDTA;或

[0307] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约 $20\text{mM}$ 。

[0308] 优选地,“感兴趣的生物分子”是核酸分子,优选地DNA或RNA分子。优选地,感兴趣的生物分子本身是多肽。感兴趣的生物分子不是蛋白酶或其酶活性片段。

[0309] 本发明的蛋白酶可以用于消化病毒的蛋白质荚膜,以释放其中的RNA/DNA,以用于鉴定、定量和/或扩增。因此,优选地,生物样品包括一种或多种包封的病毒,感兴趣的生物分子是所述病毒的核酸分子,优选地RNA或DNA,污染多肽是病毒蛋白质荚膜的那些,并且步骤b) 包括在允许至少部分消化所述一种或多种病毒的蛋白质荚膜的情况下(即,充分消化

以从所述荚膜中释放所述核酸分子) 温育样品。

[0310] 优选地, 样品包括染色质, 感兴趣的生物分子是不含结合的组蛋白的DNA, 污染蛋白是与其结合的组蛋白, 并且步骤b) 包括在允许至少部分消化样品中的组蛋白的条件下温育样品。

[0311] 优选地, 样品是或包括核酸扩增反应例如PCR反应的产物并且包括DNA结合的聚合酶, 感兴趣的生物分子是不含结合的聚合酶的DNA, 污染蛋白是结合的聚合酶, 并且步骤b) 包括在允许至少部分消化样品中的聚合酶的条件下温育样品。扩增方法包含但不限于PCR和其修饰3SR、SDA、LAR或LCR以及LAMP和其修饰。

[0312] 术语“核酸扩增反应”是指用于增加核酸靶序列或其互补序列的拷贝数的任何体外手段。

[0313] “核酸扩增反应的产物”因此被认为包括从所讨论的反应的最终扩增步骤直接获得的基本上所有组分。可以添加其它组分, 或组分中的某些组分可以经历一些修饰或处理, 但是基本上没有一种组分或至少没有一种核酸组分将已经被去除。优选地, 核酸扩增反应的产物是最终扩增步骤的直接产物; 然而, 可能还优选的是在用本发明的蛋白酶处理之前使核酸扩增反应的产物经历处理以实现任何未掺入的NTP的去磷酸化, 例如, 用碱性磷酸酶, 优选地热不稳定的碱性磷酸酶, 例如不耐热的虾碱性磷酸酶 (SAP) 进行处理。可从ArcticZymes™ AS公司获得有利的重组SAP。

[0314] 优选地, 所述样品中的感兴趣的生物分子通过一个或多个肽键与分子, 优选地多肽融合。在另外的方面, 本发明因此提供了一种从通过一个或多个肽键与感兴趣的生物分子融合的多肽中释放所述感兴趣的生物分子的方法, 所述方法包括:

[0315] a) 使所述样品与蛋白酶或其酶活性片段接触, 所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列;

[0316] b) 在允许通过消化所述肽键中的一个或多个肽键来释放所述感兴趣的生物分子的情况下温育所述样品; 以及

[0317] c) 加热所述样品以灭活所述蛋白酶或其酶活性片段, 其中

[0318] i) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M; 或

[0319] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM; 以及

[0320] d) 任选地从所述样品中去除所述感兴趣的生物分子。

[0321] 可替代地观察的, 以上方法的步骤c) 包括加热所述样品以灭活所述蛋白酶或其酶活性片段, 其中

[0322] i) 所述样品中钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M并且所述样品基本上不含EDTA; 或

[0323] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0324] 优选地, 感兴趣的生物分子是多肽或蛋白质, 并且感兴趣的生物分子与之融合的多肽信号序列或融合标签, 优选地his标签 (例如, 六组氨酸标签)、FLAG标签、麦芽糖结合蛋白 (MBP)、谷胱甘肽S-转移酶 (GST)、硫氧还蛋白 (TRX)、小泛素样修饰物 (SUMO)、泛素 (Ub) 或绿色荧光蛋白 (GFP)。

[0325] 在另外的方面, 本发明提供了一种由前体多肽生产感兴趣的肽的方法, 所述方法包括

[0326] a) 使所述多肽与蛋白酶或其酶活性片段接触, 所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨

氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列;

[0327] b) 在允许消化所述前体多肽以释放所述感兴趣的肽的条件下温育样品;以及

[0328] c) 加热所述样品以灭活所述蛋白酶或其酶活性片段,其中

[0329] i) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M;或

[0330] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM;以及

[0331] d) 任选地从所述样品中去除所述感兴趣的生物分子。

[0332] 可替代地观察的,以上方法的步骤c) 包括加热所述样品以灭活所述蛋白酶或其酶活性片段,其中

[0333] i) 所述样品中钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M并且所述样品基本上不含EDTA;或

[0334] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0335] 蛋白酶也用于通过消化细胞外基质蛋白将一个或多个细胞与组织内的其它细胞或与其粘附到的底物解离。在另外的方面,本发明提供了一种将一个或多个细胞与组织内的其它细胞或与所述一个或多个细胞粘附到的底物解离的方法,所述方法包括:

[0336] a) 使所述一个或多个细胞与蛋白酶或其酶活性片段接触,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列;

[0337] b) 在允许通过消化一种或多种细胞外基质蛋白来释放所述一个或多个细胞的条件下温育样品;以及

[0338] c) 加热所述样品以灭活所述蛋白酶或其酶活性片段,其中

[0339] i) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M;或

[0340] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM;以及

[0341] d) 任选地从所述样品中去除所述感兴趣的生物分子。

[0342] 可替代地观察的,以上方法的步骤c) 包括加热所述样品以灭活所述蛋白酶或其酶活性片段,其中

[0343] i) 所述样品中钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M并且所述样品基本上不含EDTA;或

[0344] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM。

[0345] 优选地,样品是或包括包含多肽的聚丙烯酰胺凝胶,其中消化所述多肽是产生用于通过质谱法来分析的小片段所期望的。因此,本发明提供了一种制备蛋白质片段样品的方法,优选地以用于质谱法分析,所述方法包括

[0346] a) 使包括一种或多种多肽的样品与蛋白酶或其酶活性片段接触,所述蛋白酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或包括与SEQ ID NO:1至少约70%相同的氨基酸序列;

[0347] b) 在允许至少部分消化所述样品中的多肽的条件下温育所述样品;以及

[0348] c) 加热所述样品以灭活所述蛋白酶或其酶活性片段,其中

[0349] i) 所述样品中游离钙的浓度 $\leq$ 约80 $\mu$ M;或

[0350] ii) 所述样品中单价盐的浓度 $\geq$ 约20mM;以及

[0351] d) 任选地从所述样品中去除所述感兴趣的生物分子。

[0352] 优选地,样品是包括一种或多种多肽的聚丙烯酰胺凝胶。

[0353] 优选地,蛋白酶或其酶活性片段添加到的样品包括一种或多种另外的酶。优选地,所述另外的酶选自以下组成的组:核酸酶(优选地脱氧核糖核酸酶、核酸外切酶、Ba1 31核酸酶、核糖核酸酶、绿豆核酸酶或S1核酸酶)、聚合酶(优选地DNA聚合酶或RNA聚合酶)、逆

转录酶、连接酶(优选地DNA连接酶或RNA连接酶)、甲基化酶、转移酶(优选地多核苷酸腺苷酰-转移酶)、拓扑异构酶、鸟苷酰转移酶、磷酸酶(优选地碱性磷酸酶,优选地热不稳定的碱性磷酸酶,更优选地虾碱性磷酸酶)、激酶、解旋酶、限制性酶和糖基化酶。样品优选地包括这种另外的酶的组合。优选地,样品包括DNA聚合酶或逆转录酶。优选地,这种酶是外源酶,即不由样品内的细胞或样品中的细胞材料源自的细胞表达。本发明的方法提供了有利地温和的蛋白酶灭活条件,所述条件是这种另外的酶可以耐受的,因此这种酶可以在蛋白酶灭活步骤期间存在,从而简化了后续工作流程。

[0354] 如以上所提及的,本领域中目前使用的黄金标准蛋白酶蛋白酶K需要在高温下灭活,这可能损伤样品中的酶或感兴趣的生物分子。如果期望在不加热的情况下在高温下灭活蛋白酶K,则必须从样品中去除蛋白酶或必须对酶的浓度进行充分稀释。这种去除或稀释步骤延长了工作流程;增加了成本并且可能会导致样品中材料的损失或损伤。当处理小样品量时,这种去除或稀释步骤尤其不合适。

[0355] 优选地,蛋白酶添加到的样品的体积 $\leq 1000\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 500\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 300\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 250\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 200\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 150\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 100\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 75\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 50\mu\text{l}$ 。可替代地,样品是微流体样品。优选地,微流体样品的体积 $\geq 0.01\mu\text{l}$ 。优选地,微流体样品的体积 $\leq 10\mu\text{l}$ ,优选地 $\leq 5\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 1\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 0.5\mu\text{l}$ ,更优选地 $\leq 0.1\mu\text{l}$ 。

[0356] 因此,优选地,以上方法中的任何一种方法包括灭活步骤之后的步骤,所述步骤包括底物的酶催化,其中所述后续步骤在没有预先去除或稀释蛋白酶或其酶活性片段的情况下进行。

[0357] “没有预先去除”意味着蛋白酶没有从样品中物理去除,例如通过纯化、提取或离心。

[0358] “没有预先稀释”意味着样品中蛋白酶的浓度没有被显著稀释,即没有通过稀释基本上灭活。基本上灭活的定义如在本文中其它地方所述。优选地,将样品中蛋白酶的浓度稀释不超过4倍,更优选地不超过3倍,更优选地不超过2倍。

[0359] 优选地,样品包括一个或多个核酸分子,并且所述方法包括在灭活步骤之后的对核酸分子进行核酸酶介导的消化的步骤,而没有预先去除或稀释蛋白酶或其酶活性片段。

[0360] 优选地,样品包括一个或多个核酸分子,并且所述方法包括在灭活步骤之后的对核酸分子进行磷酸化或去磷酸化的步骤,而没有预先去除或稀释蛋白酶或其酶活性片段。

[0361] 优选地,样品包括一个或多个核酸分子,并且所述方法包括在灭活步骤之后的对核酸分子进行连接的步骤,而没有预先去除或稀释蛋白酶或其酶活性片段。

[0362] 优选地,样品包括一个或多个RNA分子,并且所述方法包括在灭活步骤之后的逆转录步骤,而没有预先去除或稀释蛋白酶或其酶活性片段。

[0363] 优选地,样品包括一个或多个核酸分子,并且所述方法包括在灭活步骤之后的核酸聚合步骤,而没有预先去除或稀释蛋白酶或其酶活性片段。

[0364] 优选地,样品包括一个或多个核酸分子,并且所述方法包括在灭活步骤之后的核酸扩增步骤,而没有预先去除或稀释蛋白酶或其酶活性片段。

[0365] 优选地,样品包括一个或多个核酸分子,并且所述方法包括在灭活步骤之后的纳米孔测序步骤,而没有预先去除或稀释蛋白酶或其酶活性片段。

[0366] 优选地,样品包括一种或多种病毒颗粒或细胞,优选地细菌细胞,并且所述方法包括在灭活步骤之后的细胞裂解步骤,而没有预先去除或稀释蛋白酶或其酶活性片段。

[0367] 现在将参考以下附图通过非限制性实例的方式来描述本发明,在附图中:

[0368] 图1示出了蛋白酶X和蛋白酶K在不同温度下的蛋白酶活性。活性以相对于在具有10mM游离钙的标准测定条件下在65°C下观察到的最大活性的活性%呈现。

[0369] 图2示出了蛋白酶X在不同温度下的活性,其中测定缓冲液中有0 $\mu$ M、5 $\mu$ M或10mM游离钙。结果相对(%)于每个温度下的标准测定条件呈现,所述标准测定条件为10mM游离钙。

[0370] 图3示出了蛋白酶K在不同温度下的活性,其中测定缓冲液中有0 $\mu$ M、5 $\mu$ M或10mM游离钙。结果相对(%)于每个温度下的标准测定条件呈现,所述标准测定条件为10mM游离钙。

[0371] 图4示出了在存在不同游离钙浓度的情况下在60°C下加热15分钟和30分钟后蛋白酶X的灭活程度。活性以剩余活性%呈现,即相对于对照组(保持在冰上,无加热步骤)。

[0372] 图5示出了在存在不同游离钙浓度的情况下在60°C下加热15分钟和30分钟后蛋白酶K的灭活程度。活性以剩余活性%呈现,即相对于对照组(保持在冰上,无加热步骤)。

[0373] 图6示出了在存在变化的游离钙浓度的情况下在60°C下加热15分钟和30分钟后蛋白酶X和蛋白酶K的灭活程度。活性以相对于在相同缓冲液(包括10mM CaCl<sub>2</sub>)中用相同蛋白酶观察到的最大活性的活性%呈现,所述缓冲液和所述蛋白酶在没有热处理的情况下保持在冰上。

[0374] 图7示出了NaCl浓度对蛋白酶X和蛋白酶K的热不稳定性曲线的影响。在不存在游离钙的情况下以及在存在50mM或300mM NaCl的情况下,在指定温度下温育30分钟。活性以相对于在相同缓冲液(包括10mM CaCl<sub>2</sub>)中用相同蛋白酶观察到的最大活性的活性%呈现,所述缓冲液和所述蛋白酶在没有热处理的情况下保持在冰上。

[0375] 图8示出了在存在各种浓度的NaCl的情况下蛋白酶X在50和60°C下的灭活。活性以相对于在相同缓冲液(包括0M NaCl、0.03mM CaCl<sub>2</sub>)中用蛋白酶X观察到的最大活性的活性%呈现,所述缓冲液和所述蛋白酶在没有热处理的情况下保持在冰上。

[0376] 图9示出了在存在各种浓度的NaCl的情况下蛋白酶X在60°C下的灭活。活性以相对于在相同缓冲液(包括0M NaCl、30 $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>)中用蛋白酶X观察到的最大活性的活性%呈现,所述缓冲液和所述蛋白酶在没有热处理的情况下保持在冰上。

[0377] 实例

[0378] 实例1:蛋白酶比活性

[0379] 在所有实例中,蛋白酶K是从赛默飞世尔公司(Thermo-Fischer)(产品号E00491, 28.9kDa)购买的,并且蛋白酶X在北极酶公司(ArcticZymes)的毕赤酵母中重组产生(批次1602-1, SEQ ID NO:1)。

[0380] 为了测定这两种蛋白酶的比活性(U/mg蛋白酶),首先通过使用NanoDrop来测定溶液中的蛋白酶浓度。Nanodrop是用于通过测量在280nm波长处的吸光度来对蛋白质浓度进行定量的分光光度方法。

[0381] 确定蛋白酶K以14.3mg/ml的浓度存在。随后使用10,000倍的储备溶液(1.43 $\mu$ g/ml)。确定蛋白酶X以9.2mg/ml的浓度存在。随后使用1,000倍的储备溶液(9.2 $\mu$ g/ml)。

[0382] 使用基于肽的标准动力学测定来测定蛋白酶X和蛋白酶K的活性(以U/mL为单位)。在1000 $\mu$ l比色皿中提供

[0383] 0.4 $\mu$ g/ml蛋白酶X或0.06 $\mu$ g/ml蛋白酶K

[0384] 1mM底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

[0385] 12mM NaCl、0.1M Tris-HCl pH 8、10mM CaCl<sub>2</sub>

[0386] 1%DMSO

[0387] 总体积1000 $\mu$ l

[0388] 通过在25 $^{\circ}$ C下使用UV分光光度计(Ultrospec 2000,瑞典法玛西亚生物技术公司)测量在两分钟内410nm处吸光度(EM 8.8)的增加来测定底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA到4-硝基苯胺的酶切割。一个单位被定义为在25 $^{\circ}$ C下每分钟产生1 $\mu$ mol 4-硝基苯胺的酶量。

[0389] 测定了以下比活性(表1)。

[0390] 表1:蛋白酶X和蛋白酶K的比活性

[0391]	U/ml	mg/ml	比活性
蛋白酶X	~ 600	9.2	~ 65 (U/mg)
蛋白酶K	~ 5700	14.3	~ 400 (U/mg)

[0392] 使用来自不同供应商(西格玛公司(Sigma), 04850, 测量为400 U/mg)的一小瓶蛋白酶K对结果进行验证。

[0393] 实例2:游离钙浓度对蛋白酶活性的影响

[0394] 在各种温度下使用基于肽的标准测定来测定蛋白酶X和蛋白酶K的活性:在1.5ml比色皿中提供

[0395] 0.37 $\mu$ g/ml蛋白酶X或0.06 $\mu$ g/ml蛋白酶(相当于24mU/mL蛋白酶)

[0396] 1mM底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

[0397] 12mM NaCl、pH为8.0的0.1M Tris-HCl、10mM CaCl<sub>2</sub>

[0398] 1%DMSO

[0399] 总体积1000 $\mu$ l

[0400] 在指定温度下温育比色皿,持续测定的持续时间。通过使用UV分光光度计(Ultrospec 2000,瑞典法玛西亚生物技术公司)在1.5mL半微量比色皿(德国普兰德公司(Brand, Germany))中测量在30秒内410nm处吸光度(EM 8.8)随时间推移的增加来测定底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA到4-硝基苯胺的酶切割。

[0401] 活性计算为相比于在65 $^{\circ}$ C下观察到的最大活性的相对活性%。65 $^{\circ}$ C以上的测量在技术上是不可行的。现有技术教导了,蛋白酶X和蛋白酶K两者的最佳温度都位于65 $^{\circ}$ C与70 $^{\circ}$ C之间。

[0402] 如图1所示,这两种蛋白酶在存在10mM钙的情况下具有类似的温度-活性曲线。

[0403] 还确定了在低钙(5 $\mu$ M)和无钙(0 $\mu$ M)条件下蛋白酶X和蛋白酶K的温度-活性曲线。再次,在指定温度下将24mU/mL蛋白酶(相当于0.37 $\mu$ g/ml蛋白酶X或0.06 $\mu$ g/ml蛋白酶K)与1mM底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA一起温育在缓冲液(pH为8.0的0.1M Tris-HCl、0mM/0.005mM/10mM CaCl<sub>2</sub>、1%DMSO、12mM NaCl)中;总体积1000 $\mu$ l。

[0404] 通过使用UV分光光度计测量在30秒内410nm处吸光度(EM 8.8)随时间推移的增加来测定底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA到4-硝基苯胺的酶切割。

[0405] 活性计算为相比于在存在10mM CaCl<sub>2</sub>的情况下在65 $^{\circ}$ C下观察到的活性的相对活性%(表2),因为这是观察到的最高活性。

[0406] 表2:相对于10mM钙和65°C下的活性的蛋白酶X和蛋白酶K的活性(%)

温度(°C)	蛋白酶 X					蛋白酶 K				
	25	35	45	55	65	25	35	45	55	65
0 mM Ca	29.7	47.0	65.1	81.8	82.6	29.4	29.4	64.1	78.0	90.1
0.005 mM Ca	29.1	43.8	64.6	80.3	88.7	30.8	30.8	66.8	82.3	94.2
10 mM Ca	30.2	46.9	72.0	86.3	100.0	31.5	31.5	67.9	85.9	100.0

[0408] 在每种钙浓度下,两种蛋白酶的温度曲线都类似,其中在65°C下观察到最大活性。在一些温度下,钙浓度的降低似乎仅导致了蛋白酶活性的小的降低。当活性被认为相对于在每个特定温度下使用10mM钙实现的活性时,这两种蛋白酶的活性曲线不同。表3和4以及图2和图3中示出了结果,所述结果强调了在不同温度下对蛋白酶活性的任何钙依赖性影响。

[0409] 表3:相对于在规定温度下使用10mM钙的活性的蛋白酶X活性。

	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C
0mM Ca	98.2	100.0	90.4	94.8	82.6
0.005mM Ca	96.2	93.4	89.7	93.1	88.7
10mM Ca	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

[0411] 表4:相对于在规定温度下使用10mM钙的活性的蛋白酶K活性。

	25°C	35°C	45°C	55°C	65°C
0mM Ca	93.4	93.4	94.4	90.7	90.1
0.005mM Ca	97.6	97.6	98.4	95.8	94.2
10mM Ca	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

[0413] 图2和表3示出,对于蛋白酶X,低钙浓度或钙的不存在导致在55°C和45°C下活性有一些损失(最大降低<10%),其中在25°C或35°C下活性没有可辨别的下降。在不存在钙的情况下,在65°C下观察到活性降低大约20%,并且在低钙(0.005mM)下,在65°C下观察到降低大约10%。

[0414] 相比之下,图3和表4示出,蛋白酶K在每个温度下的活性很大程度上不受钙条件的影响,即,无论在存在高钙浓度、低钙浓度的情况下还是在不存在钙的情况下,随着温度的升高,仅观察到最小程度的活性变化。

[0415] 总之,数据表明,相比于蛋白酶K,低钙浓度可以更大程度地诱导蛋白酶X的热灭活。

[0416] 实例3:蛋白酶的Ca<sup>2+</sup>依赖性可诱导热不稳定性

[0417] 进一步研究了蛋白酶X和蛋白酶K的钙依赖性热不稳定性。

[0418] 热处理步骤:

[0419] 在PCR热循环仪(Veriti,应用生物系统公司(Applied Biosystems))中在60°C下在包括各种不同浓度的游离钙的缓冲液中温育蛋白酶15或30分钟。缓冲液包括

[0420] 0.1mg/ml蛋白酶X(相当于6.5U/ml蛋白酶X初始活性)或0.014mg/ml蛋白酶K(相当于5.6U/ml蛋白酶K初始活性)

[0421] pH为8的0.025M Tris-HCl、300mM NaCl,

- [0422]  $\text{CaCl}_2$  (1mM/0.25mM/0.125mM/0.063mM/0.031mM/0.016mM/0.008mM/0mM)
- [0423] 体积:50 $\mu$ l。
- [0424] 在灭活之后,将样品放回冰上。将用作对照组的样品始终保持在冰上。
- [0425] 剩余活性的测定
- [0426] 在热处理步骤之后,在pH为8的0.025M Tris-HCl、300mM NaCl中以1:10对样品进行稀释。进行稀释步骤以降低样品中的酶活性U/ml,以使样品处于反应测定中可检测的范围内。
- [0427] 蛋白酶的剩余活性评估如下:
- [0428] 在37°C下将0.4 $\mu$ g/ml蛋白酶X或0.06 $\mu$ g/ml蛋白酶K(分别相当于26和24mU/ml初始活性)与1mM底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA一起温育在标准反应缓冲液(pH为8.0的0.1M Tris-HCl、10mM  $\text{CaCl}_2$ 、1%DMSO、12mM NaCl)中;总体积250 $\mu$ l。
- [0429] 通过使用多模式酶标仪(Synergy H1,美国伯腾公司(BioTek,USA))以每11秒一次信号检测测量在10分钟内405nm处吸光度(EM 8.8)随时间推移的增加来测定底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA到4-硝基苯胺的酶切割。
- [0430] 图4和图5中示出了结果。活性展现为相比于对照样品(相同的蛋白酶和缓冲液,保持在冰上,不暴露于加热步骤)的剩余活性百分比。
- [0431] 如图5所示,降低游离钙浓度不影响蛋白酶K的热灭活,所述蛋白酶在60°C下温育的所有样品中都损失约40%的活性,而与游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度无关。蛋白酶K在任何条件下都未实现基本灭活( $\geq 75\%$ )。
- [0432] 相比之下,如图4所示,降低游离钙浓度导致蛋白酶X的热不稳定性增加。通过在游离钙浓度 $\leq 0.063\text{mM}$ 时在60°C下加热30分钟以及通过在游离钙浓度 $\leq 0.016\text{mM}$ 时在60°C下加热15分钟来实现基本灭活( $\geq 75\%$ ,即小于25%剩余活性)。 $\geq 90\%$ 的灭活是优选的,并且这是用蛋白酶X通过在游离钙浓度 $\leq 0.031\text{mM}$ 时在60°C下加热30分钟或在不存在游离钙的情况下加热15分钟来实现的。
- [0433] 因此,蛋白酶X在存在低钙浓度的情况下是可诱导地热不稳定的,而蛋白酶K的热不稳定性不受钙浓度的影响。
- [0434] 图6中进一步证明了此差异,所述图示出了在各种钙浓度下在60°C下加热15/30分钟后这两种蛋白酶的灭活曲线。
- [0435] 实例4:蛋白酶的游离钙依赖性灭活曲线
- [0436] 评估了不同热处理步骤对蛋白酶X和蛋白酶K灭活的影响。在以下实验中,使用5 $\mu$ M的游离钙上限,并且在一定温度和加热时间范围内进行热灭活步骤。
- [0437] 热处理步骤:
- [0438] 在不同温度(45°C、50°C、55°C、60°C、65°C和70°C)下,在包括各种不同浓度的游离钙( $\text{CaCl}_2$ , 0 $\mu$ M、2.5 $\mu$ M或5 $\mu$ M)的缓冲液中温育蛋白酶各个时间(2、5、10、15、30、60分钟)。缓冲液进一步包括
- [0439] 0.1mg/ml(6.5U/ml初始活性)蛋白酶X或0.016mg/ml(6.4U/ml初始活性)蛋白酶K、pH为8的25mM HEPES、100mM NaCl,总体积:50 $\mu$ l。
- [0440] 在使用前针对无Ca储存缓冲液对蛋白酶K进行透析,以去除其中的游离钙。在灭活之后,将样品放回冰上。将用作对照组的样品始终保持在冰上。

[0441] 剩余活性的测定

[0442] 在热处理步骤之后,在pH为8的50mM HEPES、100mM NaCl中以1:20对样品进行稀释。进行稀释步骤以降低样品中的酶活性U/ml,以使样品处于反应测定中可检测的范围内。

[0443] 蛋白酶的剩余活性评估如下:

[0444] 在37°C下将0.2 $\mu$ g/ml蛋白酶X或0.03 $\mu$ g/ml蛋白酶K(分别相当于13mU和12mU初始活性)与1mM底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA一起温育在标准反应缓冲液(pH为8.0的0.1M Tris-HCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、1%DMSO、4mM NaCl)中;总体积250 $\mu$ l。

[0445] 通过使用多模式酶标仪(Synergy H1,美国伯腾公司)以每11秒一次信号检测测量在10分钟内405nm处吸光度(EM 8.8)随时间推移的增加来测定底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA到4-硝基苯胺的酶切割。将剩余活性与保持在冰上但在其它方面与测试样品相同的对照样品进行比较。

[0446] 表5到7中示出了结果。

[0447] 表5:剩余活性(百分比):蛋白酶X,0 $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>

[0448]

	灭活温度	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
灭活时间	2 分钟	110.7	107.6	98.4	83.8	42.1	6.7
	5 分钟	101.6	83.8	80.4	46.3	8.3	1.6
	10 分钟	95.9	76.2	63.6	23.3	1.8	1.5
	15 分钟	94.0	78.2	49.7	11.3	1.2	1.0
	30 分钟	88.2	70.8	29.7	2.4	1.0	1.0
	60 分钟	71.1	49.3	11.2	0.7	1.1	0.9
	冰	100.0					
	半衰期[分钟]	-	60	15	5	< 2	< 2
	75%灭活[分钟]			< 60	< 10	< 5	< 2
	90 %灭活[分钟]			60	15	< 5	< 2

[0449] 以上数据证明,在不存在游离钙的情况下,实现了 $\geq$ 大约75%的蛋白酶X灭活:

[0450] 当在至少70°C下加热时,在2分钟内;

[0451] 当在至少65°C下加热时,在5分钟内;

[0452] 当在至少60°C下加热时,在10分钟内;以及

[0453] 当在至少55°C下加热时,在60分钟内。

[0454] 此外,实现了 $\geq$ 大约90%的蛋白酶X灭活

[0455] 当在至少70°C下加热时,在2分钟内;

[0456] 当在至少65°C下加热时,在5分钟内;

[0457] 当在至少60°C下加热时,在15分钟内;以及

[0458] 当在至少55°C下加热时,在60分钟内。

[0459] 表6:剩余活性:蛋白酶X,2.5 $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>

	灭活温度	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
[0460] 灭活时间	2 分钟	吸光度检测问题					
	5 分钟	117.0	107.8	83.3	55.7	<u>14.1</u>	<u>1.5</u>
	10 分钟	97.5	94.2	58.5	29.3	<u>2.3</u>	<u>1.2</u>
	15 分钟	108.4	83.8	59.8	<u>17.9</u>	<u>1.3</u>	<u>1.2</u>
	30 分钟	98.7	76.5	37.6	<u>4.1</u>	<u>0.8</u>	<u>0.9</u>
	60 分钟	81.2	62.9	<u>15.9</u>	<u>1.6</u>	<u>0.4</u>	<u>0.8</u>
	冰	100.0					
	半衰期[分钟]	-	> 60	< 30	5	< 5	< 5
	75%灭活[分钟]	-	-	< 60	< 15	< 5	< 5
	90 %灭活[分钟]			60	< 30	< 10	< 5

[0461] 以上数据证明,在游离钙浓度低于 $2.5\mu\text{M}$ 时,实现了 $\geq$ 大约75%的蛋白酶X灭活:

[0462] 当在至少70℃下加热时,在5分钟内;

[0463] 当在至少65℃下加热时,在5分钟内;

[0464] 当在至少60℃下加热时,在15分钟内;以及

[0465] 当在至少55℃下加热时,在60分钟内。

[0466] 此外,实现了 $\geq$ 大约90%的蛋白酶X灭活:

[0467] 当在至少70℃下加热时,在5分钟内;

[0468] 当在至少65℃下加热时,在10分钟内;以及

[0469] 当在至少60℃下加热时,在30分钟内。

[0470] 表7:剩余活性:蛋白酶X,  $5\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$

	灭活温度	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
[0471] 灭活时间	2 分钟	吸光度检测问题					
	5 分钟	119.3	100.7	93.2	59.9	<u>17.0</u>	<u>1.2</u>
	10 分钟	104.7	86.3	90.8	37.1	<u>3.2</u>	<u>0.6</u>
	15 分钟	90.5	81.3	71.8	<u>21.9</u>	<u>1.3</u>	<u>0.9</u>
	30 分钟	104.1	66.1	46.5	<u>5.6</u>	<u>1.0</u>	<u>0.2</u>
	60 分钟	96.3	60.9	<u>21.8</u>	<u>0.9</u>	<u>1.0</u>	<u>1.1</u>
	冰	100.0					
	半衰期[分钟]	-	> 60	30	< 10	< 2	< 5
	75%灭活[分钟]	-	-	< 60	< 15	< 5	< 5
	90 %灭活[分钟]			> 60	< 30	< 10	< 5

[0472] 以上数据证明,在游离钙浓度低于 $5\mu\text{M}$ 时,实现了 $\geq$ 大约75%的蛋白酶X灭活:

[0473] 当在至少70℃下加热时,在5分钟内;

[0474] 当在至少65℃下加热时,在5分钟内;

[0475] 当在至少60℃下加热时,在15分钟内;以及

[0476] 当在至少55℃下加热时,在60分钟内。

[0477] 此外,实现了 $\geq$ 大约90%的蛋白酶X灭活:

[0478] 当在至少70℃下加热时,在5分钟内;

[0479] 当在至少65℃下加热时,在10分钟内;以及

[0480] 当在至少60℃下加热时,在30分钟内。

[0481] 因此,在游离钙浓度 $\leq 5\mu\text{M}$ 时,在70℃下温育在5分钟内实现了 $\geq 95\%$ 的蛋白酶X灭活,并且在65℃下温育在10分钟内实现了 $\geq 95\%$ 的蛋白酶X灭活(在不存在游离钙的情况下为5分钟内)。

[0482] 在存在2.5和5 $\mu\text{M}$ 游离钙两者的情况下,在60℃下温育在30分钟内(在不存在游离钙的情况下为15分钟内)实现了 $\geq 90\%$ 的蛋白酶X灭活。

[0483] 在 $\geq 55\text{℃}$ 下温育60分钟在存在5 $\mu\text{M}$ 游离钙的情况下实现了80%的蛋白酶X灭活,在存在 $\leq 2.5\mu\text{M}$ 游离钙的情况下实现了85%的灭活,并且在不存在游离钙的情况下实现了约90%的灭活。

[0484] 使用蛋白酶K进行相同的研究以进行比较。下表8到10中示出了结果。

[0485] 表8:剩余活性:蛋白酶K,0 $\mu\text{M}$  CaCl<sub>2</sub>

	灭活温度	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
[0486] 灭活时间	2 分钟	77.8	61.0	108.5	86.3	47.6	<u>8.4</u>
	5 分钟	92.6	76.1	92.1	68.4	31.0	<u>0.2</u>
	10 分钟	96.8	86.1	87.7	55.6	<u>8.5</u>	<u>0.1</u>
	15 分钟	83.1	88.1	80.8	42.9	<u>2.7</u>	<u>-0.1</u>
	30 分钟	85.9	90.0	61.0	<u>15.9</u>	<u>0.3</u>	<u>-0.1</u>
	60 分钟	84.0	61.4	<u>19.6</u>	<u>1.7</u>	<u>0.2</u>	<u>0.1</u>
	冰	100					
	半衰期[分钟]	-	> 60	< 60	10	2	< 2
	75%灭活[分钟]	-	-	< 60	< 30	< 10	< 2
	90 %灭活[分钟]			> 60	< 60	< 10	< 2

[0487] 以上数据证明,在不存在游离钙的情况下,实现了 $\geq$ 大约75%的蛋白酶K灭活:

[0488] 当在至少70℃下加热时,在2分钟内;

[0489] 当在至少65℃下加热时,在10分钟内(针对蛋白酶X为5分钟内);

[0490] 当在至少60℃下加热时,在30分钟内(针对蛋白酶X为10分钟内);以及

[0491] 当在至少55℃下加热时,在60分钟内(与蛋白酶X相比更少灭活)。

[0492] 此外,实现了 $\geq$ 大约90%的蛋白酶K灭活:

[0493] 当在至少70℃下加热时,在2分钟内;

[0494] 当在至少65℃下加热时,在10分钟内(针对蛋白酶X为5分钟内);以及

[0495] 当在至少60℃下加热时,在60分钟内(针对蛋白酶X为15分钟内)。

[0496] 表9:剩余活性:蛋白酶K,2.5 $\mu\text{M}$  CaCl<sub>2</sub>

		灭活温度	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
[0497]	5 分钟	102.1	101.7	100.0	76.3	40.1	0.4	
	10 分钟	96.2	97.3	86.2	60.3	14.3	3.3	
	15 分钟	100.9	94.3	78.4	45.3	4.7	0.2	
	30 分钟	94.5	80.9	53.7	16.9	0.6	0.3	
	60 分钟	79.8	61.5	18.4	1.9	0.3	0.3	
		冰	100					
		半衰期[分钟]	-	> 60	30	< 15	< 5	< 5
		75%灭活[分钟]	-	-	< 60	< 30	< 10	< 5
		90 %灭活[分钟]			> 60	< 60	< 15	< 5

[0498] 以上数据证明,在游离钙浓度低于 $2.5\mu\text{M}$ 时,实现了 $\geq$ 大约75%的蛋白酶K灭活:

[0499] 当在至少70℃下加热时,在5分钟内;

[0500] 当在至少65℃下加热时,在10分钟内(针对蛋白酶X为5分钟内);

[0501] 当在至少60℃下加热时,在30分钟内(针对蛋白酶X为15分钟内);以及

[0502] 当在至少55℃下加热时,在60分钟内(与蛋白酶X相比更少灭活)。

[0503] 此外,实现了 $\geq$ 大约90%的蛋白酶K灭活:

[0504] 当在至少70℃下加热时,在5分钟内;

[0505] 当在至少65℃下加热时,在15分钟内(针对蛋白酶X为10分钟内);以及

[0506] 当在至少60℃下加热时,在60分钟内(针对蛋白酶X为30分钟内)。

[0507] 表10:剩余活性:蛋白酶K, $5\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$

		灭活温度	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
[0508]	5 分钟	112.4	102.7	106.4	95.9	55.9	0.7	
	10 分钟	110.5	99.9	99.5	65.4	13.2	0.5	
	15 分钟	106.1	103.5	97.6	60.0	8.9	0.0	
	30 分钟	94.5	92.4	65.3	22.3	1.0	0.2	
	60 分钟	84.8	58.5	19.8	2.5	0.0	-0.2	
		冰	100					
		半衰期[分钟]	-	> 60	< 60	< 30	5	< 5
		75%灭活[分钟]	-	-	< 60	< 30	< 10	< 5
		90 %灭活[分钟]			> 60	< 60	< 15	< 5

[0509] 以上数据证明,在游离钙浓度低于 $5\mu\text{M}$ 时,实现了 $\geq$ 大约75%的蛋白酶K灭活:

[0510] 当在至少70℃下加热时,在5分钟内;

[0511] 当在至少65℃下加热时,在10分钟内(针对蛋白酶X为5分钟内);

[0512] 当在至少60℃下加热时,在30分钟内(针对蛋白酶X为15分钟内);以及

[0513] 当在至少55℃下加热时,在60分钟内。

[0514] 此外,通过以下加热步骤实现了 $\geq$ 大约90%的蛋白酶K灭活:

[0515] 当在至少70℃下加热时,在5分钟内;

[0516] 当在至少65℃下加热时,在15分钟内(针对蛋白酶X为10分钟内);以及

[0517] 当在至少60℃下加热时,在60分钟内(针对蛋白酶X为30分钟内)。

[0518] 因此,结果示出,在所有游离钙浓度下,对于蛋白酶X,在给定温度下实现相同灭活程度所需的加热时间大大低于蛋白酶K。可替代地观察的,在绝大多数测试的加热时间和温度下,蛋白酶X实现了大于蛋白酶K的灭活。这是由于观察到蛋白酶X在低钙浓度下被诱导热不稳定性,这在蛋白酶K中未观察到。

[0519] 因此,钙对蛋白酶K通过热处理被灭活的能力的影响显著小于对蛋白酶X的影响。

[0520] 实例5:蛋白酶的单价盐依赖性可诱导热不稳定性

[0521] 为了确定NaCl对蛋白酶X和蛋白酶K的热不稳定性的影响,在不同温度下在包括i) 50mM(低盐条件)或ii) 300mM NaCl(高盐条件)的溶液中确定两种蛋白酶的灭活曲线。

[0522] 热处理步骤:

[0523] 在包括50mM或300mM NaCl的缓冲液中在各种温度(45°C、50°C、55°C、60°C、65°C和70°C)下温育蛋白酶30分钟。缓冲液包括0.1mg/ml蛋白酶(相当于6.5U/ml蛋白酶X或40U/ml蛋白酶K)、pH为8的25mM HEPES、0 $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>;体积:50 $\mu$ l。

[0524] 在灭活之后,将样品放回冰上。将用作对照组的样品始终保持在冰上。

[0525] 剩余活性的测定

[0526] 在热处理步骤之后,在pH为8的50mM HEPES、300mM NaCl中分别针对蛋白酶X或蛋白酶K以1:10或1:100对样品进行稀释。蛋白酶的剩余活性评估如下:

[0527] 在37°C下将0.4 $\mu$ g/ml蛋白酶X(相当于26mU/ml的初始活性)或0.04 $\mu$ g/ml蛋白酶K(相当于16mU/ml的初始活性)与1mM底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA一起温育在标准反应缓冲液(pH为8.0的0.1M Tris-HCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、1%DMSO、12mM NaCl)中;总体积250 $\mu$ l。

[0528] 通过使用多模式酶标仪(Synergy H1,美国伯腾公司)以每11秒一次信号检测测量在10分钟内405nm处吸光度(EM 8.8)随时间推移的增加来测定底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA到4-硝基苯胺的酶切割。将剩余活性与保持在冰上但在其它方面与测试样品相同的对照样品进行比较。

[0529] 如图7所示,与蛋白酶K相比,增加NaCl浓度对蛋白酶X的热不稳定性产生了相反的影响。高NaCl浓度在高温下稳定蛋白酶K,然而高NaCl浓度会诱导蛋白酶X的热不稳定性。

[0530] 此结果尤其令人惊讶。SEQ ID NO:1的蛋白酶X是从盐水生物体中获得的并且因此预计通常将会耐受高盐条件。相比之下,蛋白酶K是从非海洋来源真菌共附生白色侧齿霉菌(先前为白色念珠菌)获得的并且预计将不会通过高盐条件稳定。

[0531] 实例6:蛋白酶的单价盐依赖性热不稳定性曲线

[0532] 为了进一步研究NaCl对蛋白酶X的热不稳定性的影响,评估了比实例5中使用的浓度更广泛的NaCl浓度范围。

[0533] 热处理步骤:

[0534] 在50°C或60°C下将蛋白酶X在包括0、50、150、300或600mM NaCl的缓冲液中温育15或30分钟。缓冲液包括0.1mg/ml蛋白酶X(相当于6.5U/ml)、pH为8的25mM HEPES、0.03mM CaCl<sub>2</sub>,体积:50 $\mu$ l。

[0535] 在灭活之后,将样品放回冰上。将用作对照组的样品始终保持在冰上。

[0536] 剩余活性的测定

[0537] 在热处理步骤之后,在pH为8的50mM HEPES、300mM NaCl中以1:10对样品进行稀释。蛋白酶的剩余活性评估如下:

[0538] 在37℃下将0.4μg/ml蛋白酶X(相当于26mU/ml初始活性)与1mM底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA一起温育在标准反应缓冲液(pH为8.0的0.1M Tris-HCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、1% DMSO、12mM NaCl)中;总体积250μl。

[0539] 通过使用多模式酶标仪(Synergy H1,美国伯腾公司)以每11秒一次信号检测测量在10分钟内405nm处吸光度(EM 8.8)随时间推移的增加来测定底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA到4-硝基苯胺的酶切割。将剩余活性与保持在冰上但在其它方面与测试样品相同的对照样品进行比较。

[0540] 图8和表11中示出了结果。

[0541] 表11:对蛋白酶X的热不稳定性的NaCl依赖性影响

灭活温度		50℃		60℃		冰
灭活时间		15 分钟	30 分钟	15 分钟	30 分钟	30 分钟
[0542] NaCl 浓度	600 mM	79.5	66.1	<u>2.9</u>	<u>0.4</u>	82.3
	300 mM	94.2	67.8	<u>17.6</u>	<u>2.9</u>	84.0
	150 mM	97.0	72.3	32.9	<u>15.9</u>	86.5
	50 mM	101.0	64.2	50.3	38.7	81.7
	0 mM	115.7	94.9	86.2	67.9	100

[0543] 以上数据证明,在NaCl浓度≥150mM时,通过在60℃下加热,在30分钟内实现了≥大约80%的蛋白酶X灭活。

[0544] 以上数据还证明,在NaCl浓度≥300mM时,通过在60℃下加热,在30分钟内实现了≥大约95%的蛋白酶X灭活,并且通过在60℃下加热,在150分钟内实现了≥大约80%的蛋白酶X灭活。

[0545] NaCl浓度(x轴)对在60℃下加热30/15分钟后的剩余活性(y轴)的绘图图9证明,通过在NaCl浓度为至少约210mM的情况下在60℃下加热15分钟并且在NaCl浓度为至少约100mM的情况下加热30分钟实现了基本灭活(≥75%)。

[0546] 实例7:游离钙和单价盐浓度对蛋白酶的热不稳定性的组合影响。

[0547] 以上研究证明,相比于蛋白酶K, i) 降低游离钙的浓度或 ii) 提高NaCl的浓度更大程度地诱导蛋白酶X的热不稳定性。随后研究了这些条件的组合影响。

[0548] 热处理步骤:

[0549] 在包括变化的浓度的NaCl (0、25、50、75、100、125mM) 和游离钙 (0、5、10、20和20μM CaCl<sub>2</sub>) 的缓冲液中在60℃下温育蛋白酶X和蛋白酶K 30分钟。缓冲液包括6.5U/ml蛋白酶X或6.4U/ml蛋白酶K(相当于0.1mg/ml蛋白酶X或0.016mg/ml蛋白酶K)、pH为8的25mM HEPES, 体积:50μl。

[0550] 在使用前针对无Ca储存缓冲液对蛋白酶K进行透析,以去除其中的游离钙。

[0551] 在灭活之后,将样品放回冰上。将用作对照组的样品始终保持在冰上。

[0552] 剩余活性的测定

[0553] 在热处理步骤之后,在pH为8的50mM HEPES、100mM NaCl中以1:20对样品进行稀释。蛋白酶的剩余活性评估如下:

[0554] 在37℃下将0.2μg/ml蛋白酶X(相当于13mU/ml初始活性)或0.03μg/ml蛋白酶K(相当于12mU/ml初始活性)与1mM底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA一起温育在标准反应缓冲液

(pH为8.0的0.1M Tris-HCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、1%DMSO、4mM NaCl)中;总体积250μl。

[0555] 通过使用多模式酶标仪(Synergy H1,美国伯腾公司)以每11秒一次信号检测测量在10分钟内405nm处吸光度(EM 8.8)随时间推移的增加来测定底物Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NA到4-硝基苯胺的酶切割。将剩余活性与保持在冰上但在其它方面与测试样品相同的对照样品进行比较。

[0556] 表12和13中示出了结果。

[0557] 表12:CaCl<sub>2</sub>和NaCl对蛋白酶X热不稳定性的组合影响。

NaCl	CaCl <sub>2</sub>				
	0 μM	5 μM	10 μM	20 μM	30 μM
0 mM	35.0	51.3	43.4	59.0	54.9
25 mM	<u>20.0</u>	31.3	35.0	42.2	44.2
50 mM	<u>12.2</u>	<u>20.5</u>	<u>22.4</u>	32.3	39.7
75 mM	<u>4.8</u>	<u>12.6</u>	<u>15.5</u>	<u>25.0</u>	32.6
100 mM	<u>2.8</u>	<u>8.0</u>	<u>10.8</u>	<u>19.2</u>	<u>22.8</u>
125 mM	<u>1.9</u>	<u>4.5</u>	<u>6.6</u>	<u>13.3</u>	<u>16.8</u>

[0559] 在存在≥100mM NaCl的情况下,在所有游离钙浓度下都实现了基本灭活(≥75%)。

[0560] 另外,在存在至少75mM NaCl的情况下,在最大游离钙浓度为20μM时实现了基本灭活(≥约75%)。

[0561] 另外,在存在至少50mM NaCl的情况下,在最大游离钙浓度为10μM时实现了基本灭活(≥约75%)。

[0562] 另外,在存在至少50mM NaCl的情况下,在最大游离钙浓度为5μM时实现了基本灭活(≥约75%)。

[0563] 另外,在不存在游离钙但存在至少25mM NaCl的情况下,实现了基本灭活(≥约75%)。

[0564] 在存在至少125mM NaCl的情况下,在最大游离钙浓度为20μM时实现了优越灭活(≥约90%)。

[0565] 在存在至少100mM NaCl的情况下,在最大游离钙浓度为10μM时实现了优越灭活(≥约90%)。

[0566] 在存在至少75mM NaCl的情况下,在最大游离钙浓度为5μM时实现了优越灭活(≥约90%)。

[0567] 在不存在游离钙的情况下,在存在至少50mM NaCl的情况下实现了优越灭活(≥约90%)。

[0568] 表13:CaCl<sub>2</sub>和NaCl对蛋白酶K热不稳定性的组合影响。

NaCl	CaCl <sub>2</sub>				
	0 μM	5 μM	10 μM	20 μM	30 μM
<b>0 mM</b>	<u>2.3</u>	<u>5.7</u>	<u>6.4</u>	<u>8.9</u>	<u>8.4</u>
<b>25 mM</b>	<u>4.8</u>	<u>8.4</u>	<u>9.4</u>	<u>11.0</u>	<u>10.7</u>
<b>50 mM</b>	<u>10.4</u>	<u>13.6</u>	<u>15.5</u>	<u>20.6</u>	<u>15.5</u>
<b>75 mM</b>	<u>14.1</u>	<u>22.9</u>	23.7	28.3	27.2
<b>100 mM</b>	<u>20.2</u>	24.8	31.3	36.9	34.0
<b>125 mM</b>	31.6	36.5	42.6	44.8	43.7

[0569]

[0570] 结果证明,蛋白酶K具有与蛋白酶X大不相同的热不稳定性曲线。蛋白酶K在低盐条件下变得越来越热不稳定、在高盐条件下稳定并且很大程度上不受钙浓度的影响。在另一方面,蛋白酶X在高盐条件和低游离钙条件下变得越来越热不稳定。

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 北极酶AS公司(ArcticZymes AS)  
 [0003] <120> 热不稳定性蛋白酶  
 [0004] <130> FSP1V202374ZX  
 [0005] <150> GB1803654.1  
 [0006] <151> 2018-03-07  
 [0007] <160> 4  
 [0008] <170> PatentIn版本3.5  
 [0009] <210> 1  
 [0010] <211> 281  
 [0011] <212> PRT  
 [0012] <213> 变形斑沙雷菌  
 [0013] <400> 1  
 [0014] Ala Asp Gln Pro Ser Pro Thr Trp Gly Ile Asp Arg Ile Asp Gln Arg  
 [0015] 1 5 10 15  
 [0016] Asn Leu Pro Leu Asp Asn Asn Tyr His Thr Asp Tyr Asp Gly Ser Gly  
 [0017] 20 25 30  
 [0018] Val Thr Ala Phe Val Ile Asp Thr Gly Val Leu Asn Thr His Asn Glu  
 [0019] 35 40 45  
 [0020] Phe Gly Gly Arg Ala Ser Ser Gly Tyr Asp Phe Ile Asp Asn Asp Tyr  
 [0021] 50 55 60  
 [0022] Asp Ala Thr Asp Cys Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile  
 [0023] 65 70 75 80  
 [0024] Gly Gly Ser Thr Tyr Gly Val Ala Lys Asn Val Asn Val Val Gly Val  
 [0025] 85 90 95  
 [0026] Arg Val Leu Asn Cys Ser Gly Ser Gly Ser Asn Ser Gly Val Ile Ala  
 [0027] 100 105 110  
 [0028] Gly Ile Asn Trp Val Lys Asn Asn Ala Ser Gly Pro Ala Val Ala Asn  
 [0029] 115 120 125  
 [0030] Met Ser Leu Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala Thr Asp Asp Ala Val Asn  
 [0031] 130 135 140  
 [0032] Ala Ala Val Ala Ala Gly Ile Thr Phe Val Val Ala Ala Gly Asn Asp  
 [0033] 145 150 155 160  
 [0034] Asn Ser Asn Ala Cys Asn Tyr Ser Pro Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ile  
 [0035] 165 170 175  
 [0036] Thr Val Gly Ser Thr Thr Ser Asn Asp Ser Arg Ser Ser Phe Ser Asn  
 [0037] 180 185 190  
 [0038] Tyr Gly Thr Cys Leu Asp Ile Tyr Ala Pro Gly Ser Ser Ile Thr Ser  
 [0039] 195 200 205  
 [0040] Ser Trp Tyr Thr Ser Asn Ser Ala Thr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser  
 [0041] 210 215 220



[0084] gtccaacga ccaccagcta tgattgtcgt ccctataaaa acggtataca tgaagctgt 1800  
 [0085] tcaatcaccg tgactcaagc gggaacttac catgtgatgt tacgtggta tgctaattac 1860  
 [0086] tcgagcgttc agctgagtgc aagctactag 1890  
 [0087] <210> 3  
 [0088] <211> 629  
 [0089] <212> PRT  
 [0090] <213> 变形斑沙雷菌  
 [0091] <400> 3  
 [0092] Met His Lys Lys His Leu Ile Ala Val Ala Val Ala Thr Gly Leu Ala  
 [0093] 1 5 10 15  
 [0094] Tyr Phe Pro Val Asn Ala Asn Glu Tyr Gln Ala Thr Met Val Asn Val  
 [0095] 20 25 30  
 [0096] Pro Gln Ser Lys Ala Ile Lys Asp Thr Tyr Ile Val Val Phe Asn Thr  
 [0097] 35 40 45  
 [0098] Pro Ser Val Leu Asn Leu Ser Asn Asn Asn Thr Ile Ala Glu Phe Ala  
 [0099] 50 55 60  
 [0100] Val Gln Gln Ala Glu Ser Leu Val Asn Gln Tyr Asp Val Arg Val Met  
 [0101] 65 70 75 80  
 [0102] Lys Asn Phe Gly Asn Val Leu Asn Gly Val Leu Ile Asn Ala Ser Ala  
 [0103] 85 90 95  
 [0104] Gln Gln Val Lys Ala Leu Leu Lys Asp Pro Asn Val Lys Tyr Val Glu  
 [0105] 100 105 110  
 [0106] Gln Asp Gln Val Met Ser Val Thr Pro Met Met Glu Ala Asn Ala Asp  
 [0107] 115 120 125  
 [0108] Gln Pro Ser Pro Thr Trp Gly Ile Asp Arg Ile Asp Gln Arg Asn Leu  
 [0109] 130 135 140  
 [0110] Pro Leu Asp Asn Asn Tyr His Thr Asp Tyr Asp Gly Ser Gly Val Thr  
 [0111] 145 150 155 160  
 [0112] Ala Phe Val Ile Asp Thr Gly Val Leu Asn Thr His Asn Glu Phe Gly  
 [0113] 165 170 175  
 [0114] Gly Arg Ala Ser Ser Gly Tyr Asp Phe Ile Asp Asn Asp Tyr Asp Ala  
 [0115] 180 185 190  
 [0116] Thr Asp Cys Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Gly Gly  
 [0117] 195 200 205  
 [0118] Ser Thr Tyr Gly Val Ala Lys Asn Val Asn Val Val Gly Val Arg Val  
 [0119] 210 215 220  
 [0120] Leu Asn Cys Ser Gly Ser Gly Ser Asn Ser Gly Val Ile Ala Gly Ile  
 [0121] 225 230 235 240  
 [0122] Asn Trp Val Lys Asn Asn Ala Ser Gly Pro Ala Val Ala Asn Met Ser  
 [0123] 245 250 255  
 [0124] Leu Gly Gly Gly Ala Ser Gln Ala Thr Asp Asp Ala Val Asn Ala Ala  
 [0125] 260 265 270

[0126]	Val Ala Ala Gly Ile Thr Phe Val Val Ala Ala Gly Asn Asp Asn Ser
[0127]	275 280 285
[0128]	Asn Ala Cys Asn Tyr Ser Pro Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ile Thr Val
[0129]	290 295 300
[0130]	Gly Ser Thr Thr Ser Asn Asp Ser Arg Ser Ser Phe Ser Asn Tyr Gly
[0131]	305 310 315 320
[0132]	Thr Cys Leu Asp Ile Tyr Ala Pro Gly Ser Ser Ile Thr Ser Ser Trp
[0133]	325 330 335
[0134]	Tyr Thr Ser Asn Ser Ala Thr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala
[0135]	340 345 350
[0136]	Ser Pro His Val Ala Gly Val Ala Ala Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Pro
[0137]	355 360 365
[0138]	Asn Leu Ser Pro Ala Gln Val Thr Asn Leu Leu Lys Thr Arg Ala Thr
[0139]	370 375 380
[0140]	Ala Asp Lys Val Thr Asp Ala Lys Thr Gly Ser Pro Asn Lys Leu Leu
[0141]	385 390 395 400
[0142]	Phe Ser Leu Ala Asn Asp Asp Gly Gly Cys Gly Asn Asp Cys Pro Val
[0143]	405 410 415
[0144]	Asp Glu Thr Gln Leu Gln Asn Asn Val Gly Ile Ala Ile Ser Gly Ala
[0145]	420 425 430
[0146]	Thr Gly Ser Ala Thr Tyr Tyr Tyr Ile Asp Val Pro Ala Asn Ala Ala
[0147]	435 440 445
[0148]	Ser Leu Gly Ile Asn Leu Ala Gly Gly Ser Gly Asp Ala Asp Ile Tyr
[0149]	450 455 460
[0150]	Val Ser Gln Gly Gln Lys Pro Thr Thr Thr Ser Tyr Gln Cys Arg Pro
[0151]	465 470 475 480
[0152]	Tyr Gln Asn Gly Asn Asn Glu Ser Cys Asn Phe Thr Ala Pro Thr Ala
[0153]	485 490 495
[0154]	Gly Arg Trp Tyr Val Met Val Gln Gly Tyr Ser Asn Tyr Ala Asn Ala
[0155]	500 505 510
[0156]	Gln Leu Thr Ala Ser Tyr Asn Leu Asn Gly Gly Gly Asn Cys Thr Asp
[0157]	515 520 525
[0158]	Ala Asn Cys Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Thr Asn Leu Ser Gly Arg
[0159]	530 535 540
[0160]	Thr Gly Thr Glu Ala Leu Tyr Lys Ile Val Val Pro Ala Asn Ser Gln
[0161]	545 550 555 560
[0162]	Leu Ser Ile Thr Thr Ser Gly Gly Thr Gly Asp Val Asp Leu Tyr Val
[0163]	565 570 575
[0164]	Lys Ala Gly Thr Val Pro Thr Thr Thr Ser Tyr Asp Cys Arg Pro Tyr
[0165]	580 585 590
[0166]	Lys Asn Gly Asn Asn Glu Ser Cys Ser Ile Thr Val Thr Gln Ala Gly
[0167]	595 600 605

[0168] Thr Tyr His Val Met Leu Arg Gly Tyr Ala Asn Tyr Ser Ser Val Gln  
 [0169] 610 615 620  
 [0170] Leu Ser Ala Ser Tyr  
 [0171] 625  
 [0172] <210> 4  
 [0173] <211> 385  
 [0174] <212> PRT  
 [0175] <213> 变形斑沙雷菌  
 [0176] <400> 4  
 [0177] Asn Glu Tyr Gln Ala Thr Met Val Asn Val Pro Gln Ser Lys Ala Ile  
 [0178] 1 5 10 15  
 [0179] Lys Asp Thr Tyr Ile Val Val Phe Asn Thr Pro Ser Val Leu Asn Leu  
 [0180] 20 25 30  
 [0181] Ser Asn Asn Asn Thr Ile Ala Glu Phe Ala Val Gln Gln Ala Glu Ser  
 [0182] 35 40 45  
 [0183] Leu Val Asn Gln Tyr Asp Val Arg Val Met Lys Asn Phe Gly Asn Val  
 [0184] 50 55 60  
 [0185] Leu Asn Gly Val Leu Ile Asn Ala Ser Ala Gln Gln Val Lys Ala Leu  
 [0186] 65 70 75 80  
 [0187] Leu Lys Asp Pro Asn Val Lys Tyr Val Glu Gln Asp Gln Val Met Ser  
 [0188] 85 90 95  
 [0189] Val Thr Pro Met Met Glu Ala Asn Ala Asp Gln Pro Ser Pro Thr Trp  
 [0190] 100 105 110  
 [0191] Gly Ile Asp Arg Ile Asp Gln Arg Asn Leu Pro Leu Asp Asn Asn Tyr  
 [0192] 115 120 125  
 [0193] His Thr Asp Tyr Asp Gly Ser Gly Val Thr Ala Phe Val Ile Asp Thr  
 [0194] 130 135 140  
 [0195] Gly Val Leu Asn Thr His Asn Glu Phe Gly Gly Arg Ala Ser Ser Gly  
 [0196] 145 150 155 160  
 [0197] Tyr Asp Phe Ile Asp Asn Asp Tyr Asp Ala Thr Asp Cys Asn Gly His  
 [0198] 165 170 175  
 [0199] Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Gly Gly Ser Thr Tyr Gly Val Ala  
 [0200] 180 185 190  
 [0201] Lys Asn Val Asn Val Val Gly Val Arg Val Leu Asn Cys Ser Gly Ser  
 [0202] 195 200 205  
 [0203] Gly Ser Asn Ser Gly Val Ile Ala Gly Ile Asn Trp Val Lys Asn Asn  
 [0204] 210 215 220  
 [0205] Ala Ser Gly Pro Ala Val Ala Asn Met Ser Leu Gly Gly Gly Ala Ser  
 [0206] 225 230 235 240  
 [0207] Gln Ala Thr Asp Asp Ala Val Asn Ala Ala Val Ala Ala Gly Ile Thr  
 [0208] 245 250 255  
 [0209] Phe Val Val Ala Ala Gly Asn Asp Asn Ser Asn Ala Cys Asn Tyr Ser

[0210]		260		265		270
[0211]	Pro Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ile Thr Val Gly Ser Thr Thr Ser Asn					
[0212]		275		280		285
[0213]	Asp Ser Arg Ser Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Thr Cys Leu Asp Ile Tyr					
[0214]		290		295		300
[0215]	Ala Pro Gly Ser Ser Ile Thr Ser Ser Trp Tyr Thr Ser Asn Ser Ala					
[0216]		305		310		315
[0217]	Thr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly					
[0218]		325		330		335
[0219]	Val Ala Ala Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Pro Asn Leu Ser Pro Ala Gln					
[0220]		340		345		350
[0221]	Val Thr Asn Leu Leu Lys Thr Arg Ala Thr Ala Asp Lys Val Thr Asp					
[0222]		355		360		365
[0223]	Ala Lys Thr Gly Ser Pro Asn Lys Leu Leu Phe Ser Leu Ala Asn Asp					
[0224]		370		375		380
[0225]	Asp					
[0226]		385				

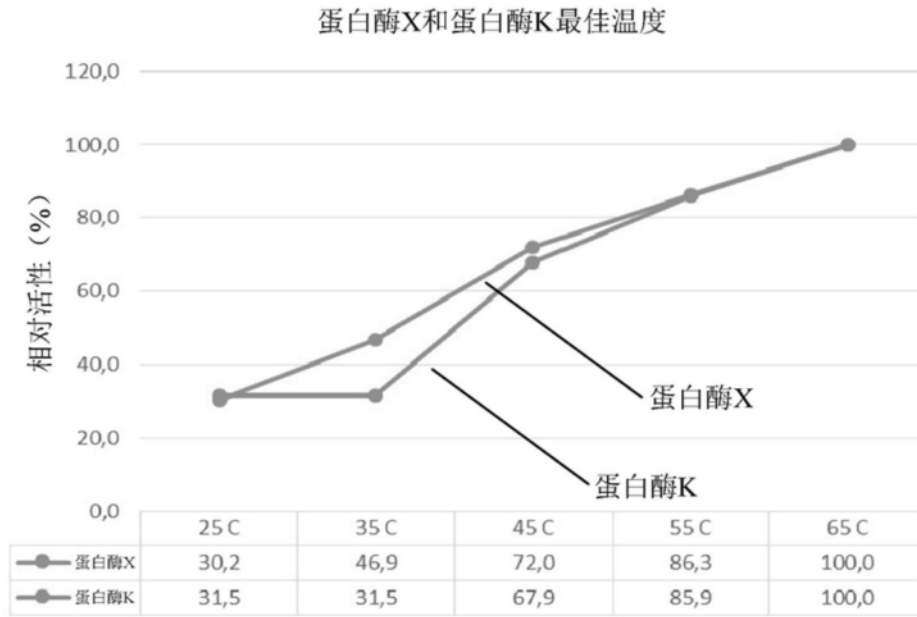


图1

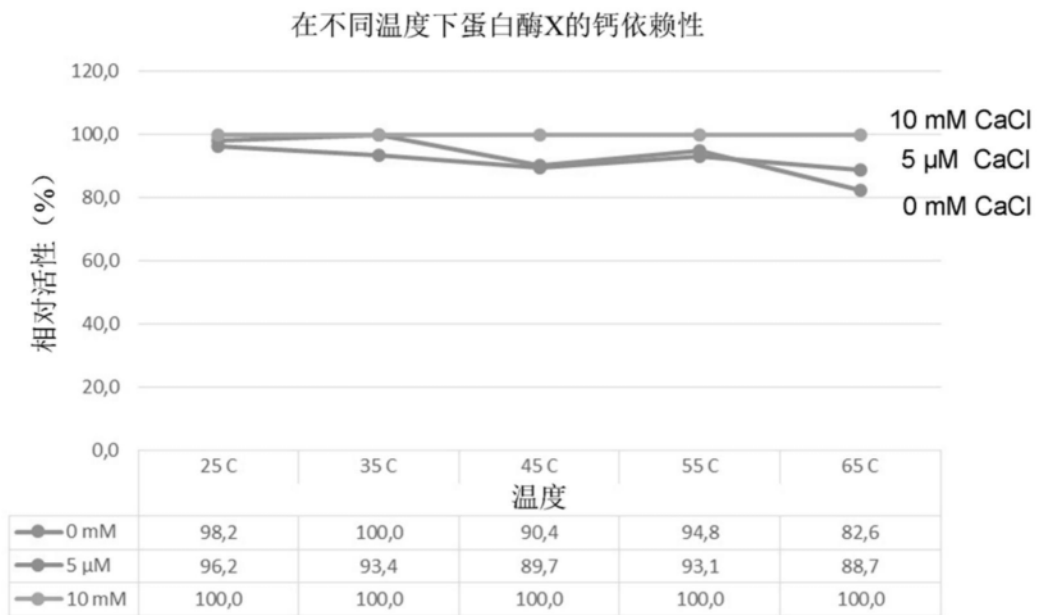


图2

在不同温度下蛋白酶K的钙依赖性

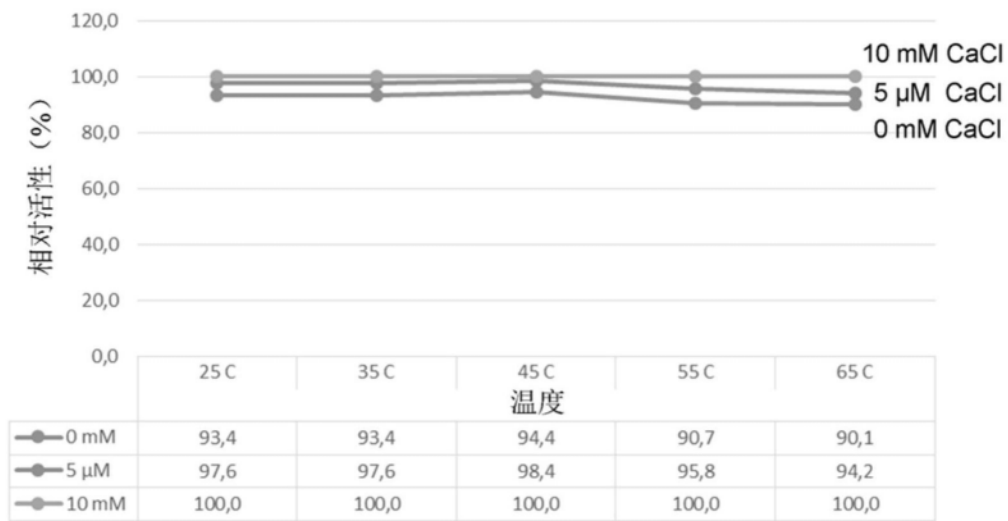


图3

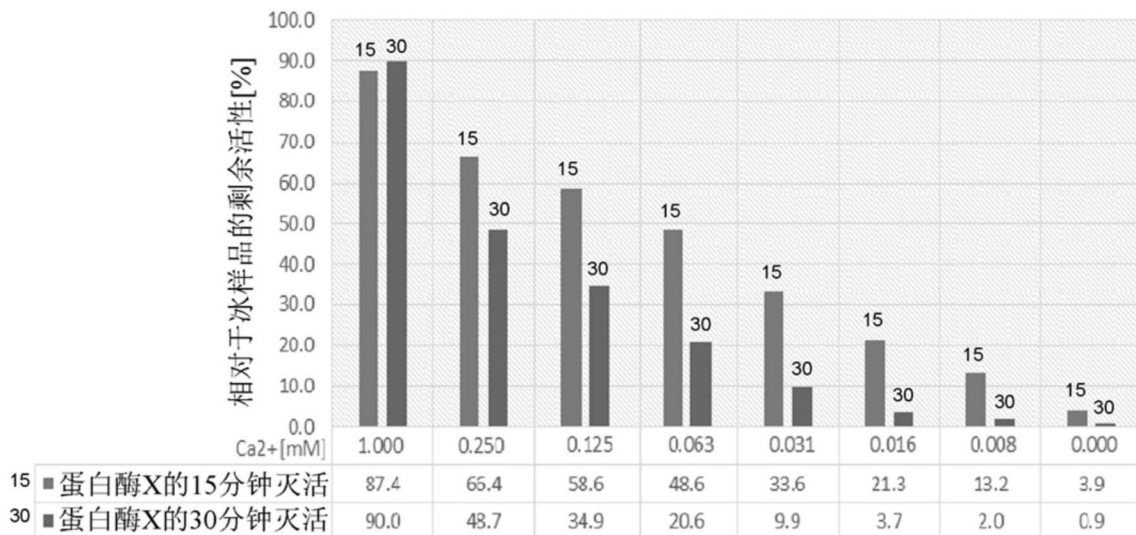


图4

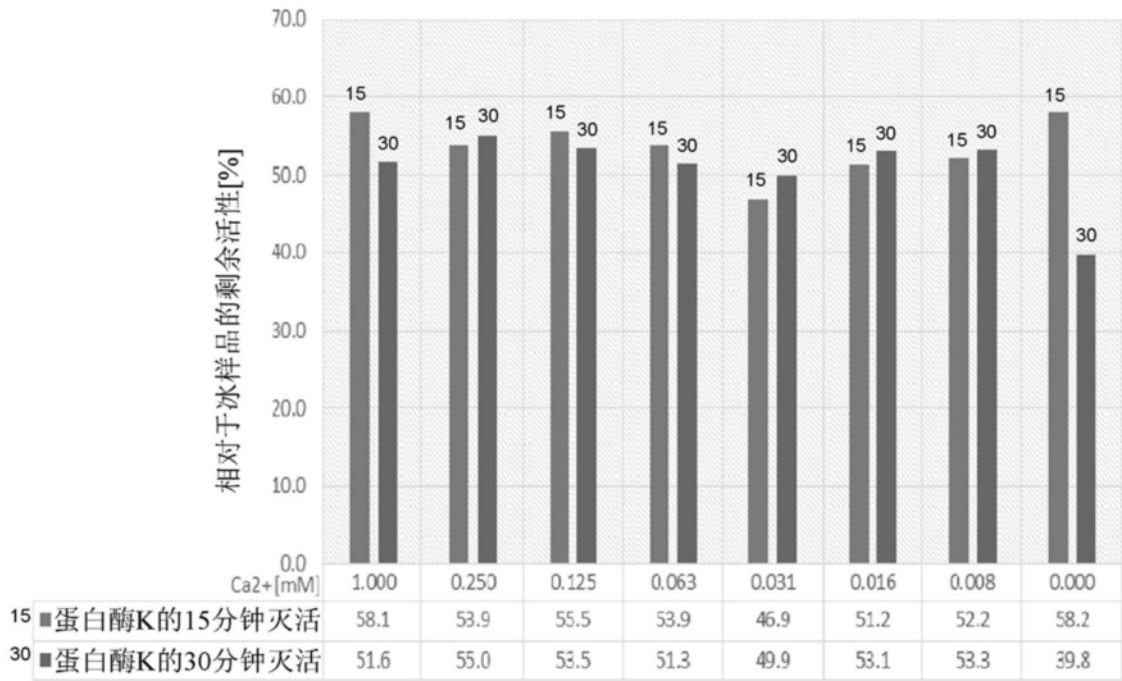


图5

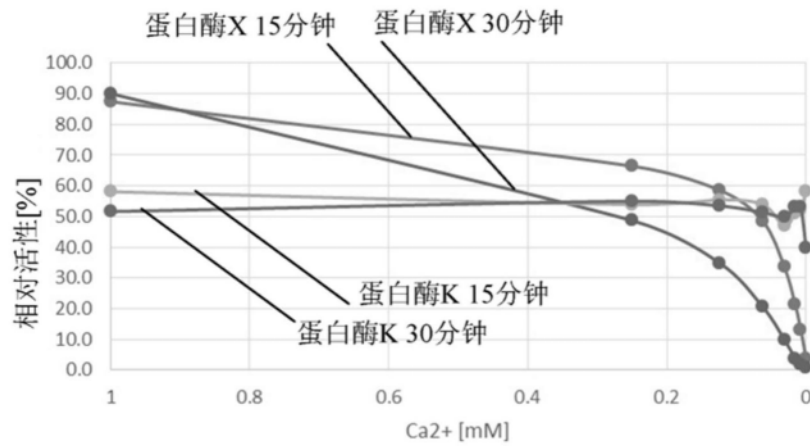


图6

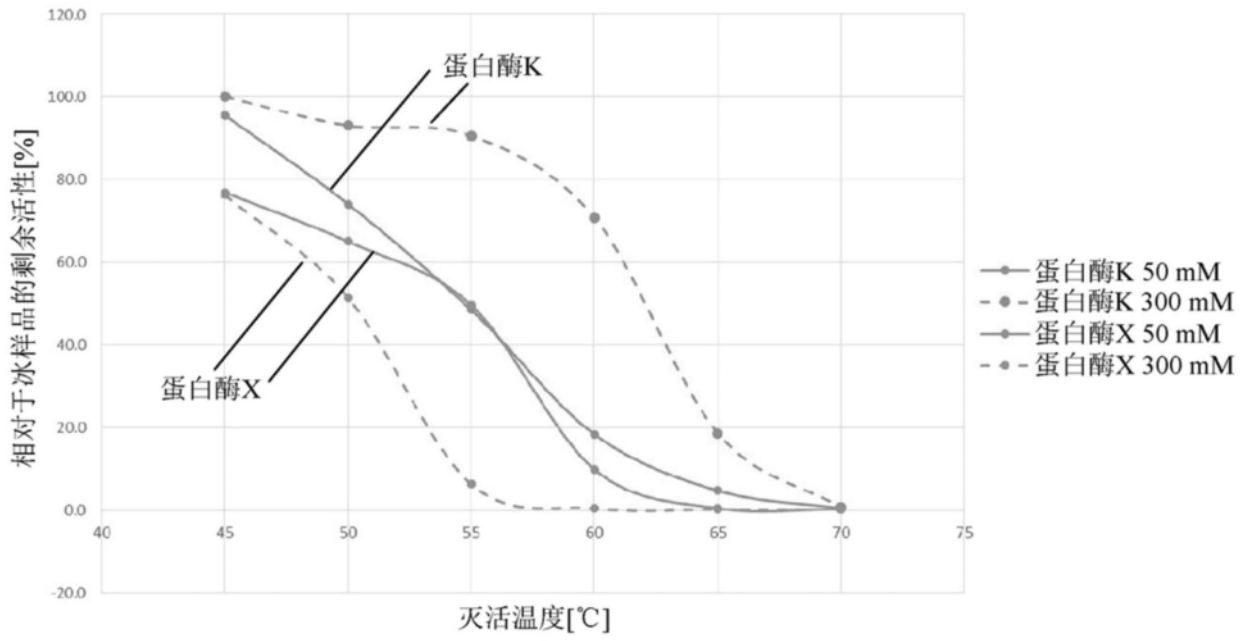


图7

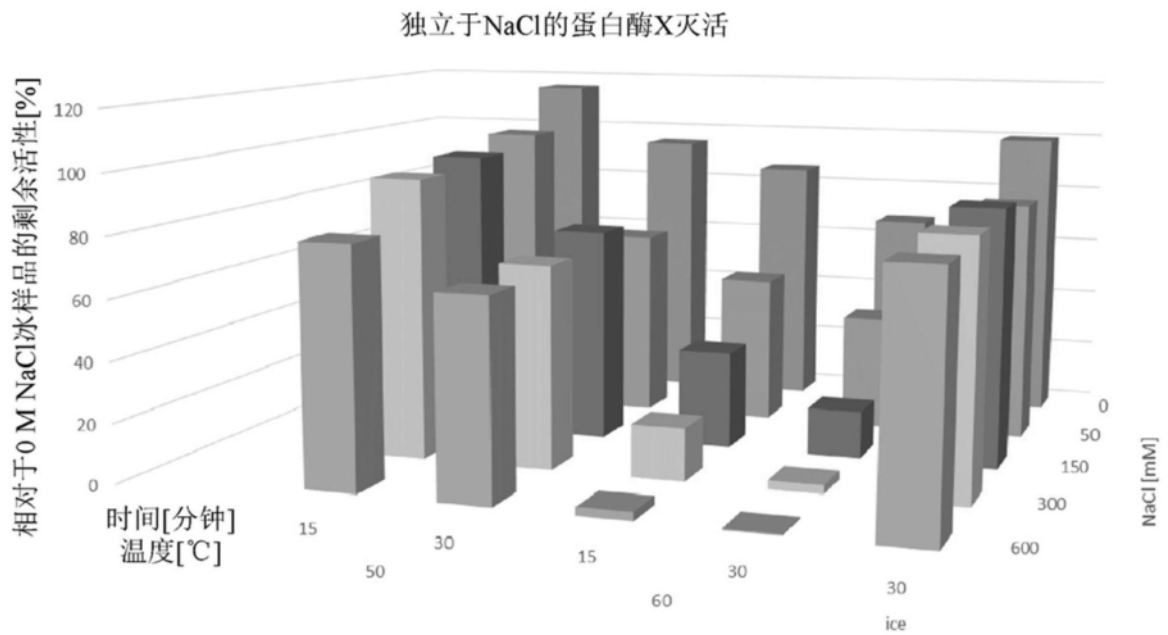


图8

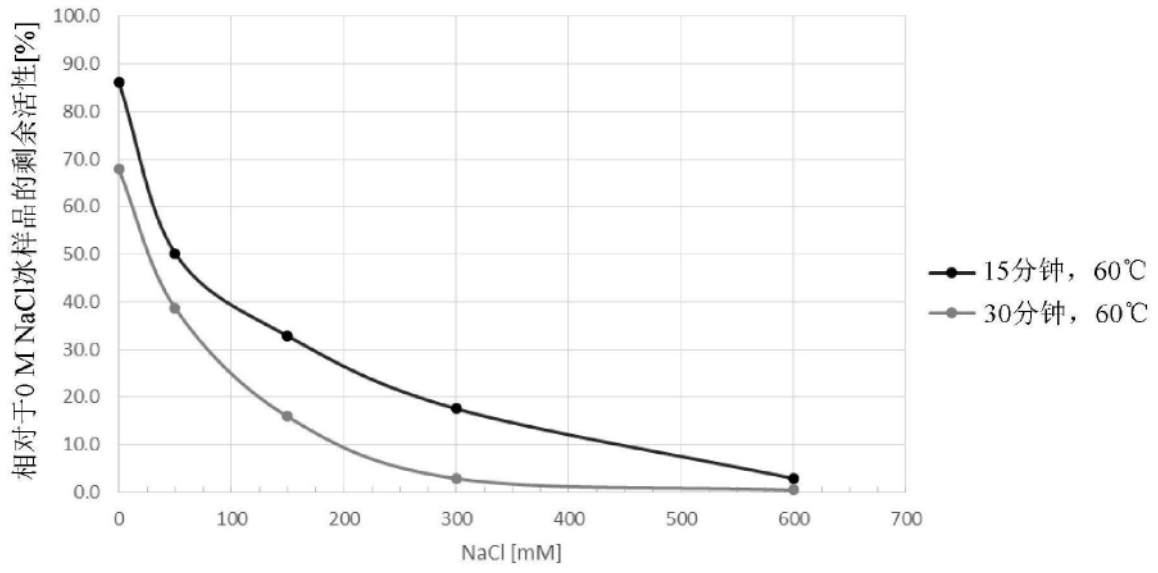


图9