



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114698379 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 27

(21) 申请号 202080080416.2

J·奥曼 G·格罗斯曼 S·R·丁

(22) 申请日 2020.11.20

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理师 黄登高 彭昶

申请公布号 CN 114698379 A

(43) 申请公布日 2022.07.01

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C12N 9/12 (2006.01)

1917046.3 2019.11.22 GB

C12N 15/62 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2022.05.20

CN 108884154 A, 2018.11.23

(86) PCT国际申请的申请数据

Merideth Ann Cooper ET AL. Creating an Efficient Biopharmaceutical Factory: Protein Expression and Purification Using a Self-Cleaving Split Intein.《PHD THESIS ,Ohio State University》.2018,参见第113页最后1段以及第115页第1段.

PCT/EP2020/082966 2020.11.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/099607 EN 2021.05.27

(73) 专利权人 思拓凡生物工艺研发有限公司

审查员 张希兰

地址 瑞典乌普萨拉

(72) 发明人 C·J·塞文斯基 P·伦德贝克

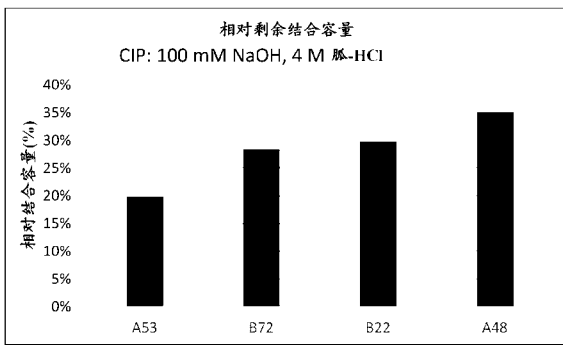
权利要求书3页 说明书54页 附图5页

(54) 发明名称

使用断裂内含肽系统的蛋白质纯化

(57) 摘要

本发明涉及主要在层析领域的蛋白质纯化。更确切地,本发明涉及使用具有改善的C-内含肽标签和N-内含肽配体的断裂内含肽系统的亲和层析,其中靶蛋白可以作为具有天然N末端的无标签的终产物进行纯化。



在以下位置处的氨基酸:

36	N	H	H	H
28	C	C	A	A
20, 35, 70, 73, 95	K	K	A	R

1. 一种N-内含肽变体,其由以下序列组成:

ALSYDTEILTVEYGFLPIGXIVEEXIEXTVYSVDXXGFVYTQPIAQWHNRGEQEVFEYXLED GSIIRATXD
HXFMTTDGXMLPIDEIFEXGLDLXQV,其中,

在位置20、35、70、73和95中的X是R;

在位置28中的X是A;

在位置36中的X是H;

在位置25中的X是N;

在位置59中的X是D;

在位置80中的X是E;和

在位置90中的X是Q;

并且与SEQ ID NO:1相比,所述N-内含肽变体的碱稳定性是增加的。

2. 一种N-内含肽变体,其由以下序列组成:

ALSYDTEILTVEYGFLPIGXIVEEXIEXTVYSVDXXGFVYTQPIAQWHNRGEQEVFEYXLED GSIIRATXD
HXFMTTDGXMLPIDEIFEXGLDLXQV,其中,

在位置20、35、70、73和95中的X是A;

在位置28中的X是A;

在位置36中的X是H;

在位置25中的X是N;

在位置59中的X是D;

在位置80中的X是E;和

在位置90中的X是Q;

并且与SEQ ID NO:1相比,所述N-内含肽变体的碱稳定性是增加的。

3. 一种N-内含肽变体,其由以下序列组成:

ALSYDTEILTVEYGFLPIGXIVEEXIEXTVYSVDXXGFVYTQPIAQWHNRGEQEVFEYXLED GSIIRATXD
HXFMTTDGXMLPIDEIFEXGLDLXQV,其中,

在位置20、35、70、73和95中的X是K;

在位置28中的X是C;

在位置36中的X是H;

在位置25中的X是N;

在位置59中的X是D;

在位置80中的X是E;和

在位置90中的X是Q;

并且与SEQ ID NO:1相比,所述N-内含肽变体的碱稳定性是增加的。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的N-内含肽变体,其与固相偶联。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的N-内含肽变体,其与膜、纤维、颗粒、珠或芯片偶联。

6. 根据权利要求4所述的N-内含肽变体,其中所述固相是天然或合成起源的层析树脂。

7. 根据权利要求4所述的N-内含肽变体,其中所述固相是层析树脂。

8. 根据权利要求4所述的N-内含肽变体,其中所述固相是天然或合成层析树脂。

9. 根据权利要求7所述的N-内含肽变体,其中所述固相是多糖。
10. 根据权利要求7所述的N-内含肽变体,其中所述固相是琼脂糖。
11. 根据权利要求6所述的N-内含肽变体,其中所述固相提供有嵌入的磁性颗粒。
12. 根据权利要求4所述的N-内含肽变体,其中所述固相是非扩散限制树脂/纤维材料。
13. 根据权利要求4所述的N-内含肽变体,其中所述N-内含肽变体经由在C末端上的包含一个或多个Lys的Lys尾与固相偶联。
14. 根据权利要求4所述的N-内含肽变体,其中所述N-内含肽变体经由在C末端上的Cys尾与固相偶联。
15. 根据权利要求4所述的N-内含肽变体,其中每ml固相偶联0.2-2 μ mol N-内含肽变体。
16. 根据权利要求7所述的N-内含肽变体,其中每ml层析树脂偶联0.2-2 μ mol N-内含肽变体。
17. 根据权利要求1-3中任一项所述的N-内含肽变体,其中所述N-内含肽变体在对应于0.05M-0.5M NaOH的碱性条件下是稳定的。
18. 根据权利要求1-3中任一项所述的N-内含肽变体,其中所述N-内含肽变体在对应于0.1-0.5M NaOH的碱性条件下是稳定的。
19. 一种用于目的蛋白质POI的亲纯化的断裂内含肽系统,其包含根据权利要求1-18中任一项所述的N-内含肽变体;和C-内含肽。
20. 根据权利要求19所述的断裂内含肽系统,其包含所述N-内含肽变体和SEQ ID NO:3所示的C-内含肽序列。
21. 根据权利要求19或20所述的断裂内含肽系统,其中所述C-内含肽和附加标签与所述POI共表达。
22. 根据权利要求19所述的断裂内含肽系统,其中将所述N-内含肽变体固定到固相。
23. 根据权利要求19-22中任一项所述的断裂内含肽系统用于亲和纯化目的蛋白质POI中的用途,其中所述C-内含肽与所述POI共表达,所述N-内含肽变体固定到固相,并且所述固相在所述POI从所述固相中切割后在0.05-0.5M NaOH的碱性条件下进行再生。
24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述固相再生多达100个循环。
25. 根据权利要求23所述的用途,其中所述固相再生多达50个循环。
26. 一种层析柱,其包含层析树脂,所述层析树脂包含一种或多种N-内含肽变体,其中所述N-内含肽变体如权利要求1-18中任一项所述。
27. 一种使用根据权利要求19-22中任一项所述的断裂内含肽系统纯化加上C-内含肽标签的目的蛋白质POI的方法,其中将所述N-内含肽变体固定到固相;所述方法包括在中性pH下,以及在二价阳离子的存在下,使C-内含肽和N-内含肽变体接触;在二价阳离子的存在下,洗涤所述固相;添加螯合剂,以允许C-内含肽和POI之间的自发切割;收集无标签的POI;并且在碱性条件下,使所述固相再生,其中所述中性pH为6-8,或者碱性条件为0.05-0.5M NaOH。
28. 一种使用根据权利要求19-22中任一项所述的断裂内含肽系统纯化加上C-内含肽标签的目的蛋白质POI的方法,其中将所述N-内含肽变体固定到固相;所述方法包括在中性pH下使C-内含肽和N-内含肽变体接触;洗涤所述固相;在C-内含肽和POI之间的切割后,收

集无标签的POI;并且在碱性条件下,使所述固相再生,其中所述中性pH为6-8,在高流速下使C-内含肽和N-内含肽变体接触,或者碱性条件为0.05-0.5M NaOH。

29.一种用于纯化目的蛋白质POI的方法,其使用根据权利要求19-22中任一项所述的断裂内含肽系统并且包括下述步骤:将POI与根据SEQ IDNO 3的C-内含肽和附加标签共表达;使所述附加标签与其在第一固相上的结合配偶体结合;切下POI和C-内含肽;在中性pH下,使所述C-内含肽与附着于第二固相的N-内含肽变体结合,并且从所述POI中切下所述结合的C-内含肽和N-内含肽变体;并且在碱性条件下,使所述第二固相再生,其中碱性条件为0.05-0.5M NaOH。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述附加标签是亲和标签或离子交换。

31.根据权利要求27-30中任一项所述的方法,其中所述碱性条件与离液剂组合,并且所述固相可以再生多达100次。

32.根据权利要求31所述的方法,其中所述碱性条件与胍或尿素组合。

33.根据权利要求27-30中任一项所述的方法,其中所述POI是:天然的N末端序列的蛋白质。

34.根据权利要求27-30中任一项所述的方法,其中将所述N-内含肽变体固定到层析树脂,并且静态结合容量为0.2-2 μ mol/ml。

使用断裂内含肽系统的蛋白质纯化

技术领域

[0001] 本发明涉及主要在层析领域的蛋白质纯化。更确切地,本发明涉及使用具有改善的C-内含肽标签和N-内含肽配体的断裂内含肽(split intein)系统的亲和层析,其中靶蛋白可以作为具有天然N末端的无标签的终产物进行纯化。

背景技术

[0002] 内含肽是作为框内插入物表达的蛋白质元件,其中断酶序列并催化其自身的两个侧翼多肽的切除和连接,生成活性蛋白质。在遗传上,内含肽以两种不同的方式编码:作为完整内含肽,中断两个侧翼外显肽序列,或作为断裂内含肽,其中每个外显肽和部分内含肽由两种不同基因编码。虽然它们作为生物工程和蛋白质纯化工具具有很大的希望,但在自然界中发现的具有快速动力学性质的断裂内含肽依赖于在内含肽-外显肽连接处的特定氨基酸,严重限制了可以与内含肽融合用于天然蛋白质序列的亲和纯化和回收的蛋白质。特别地,来自点形念珠藻的原型断裂内含肽DNAE显示出适合于蛋白质纯化应用的动力学性质。然而,它的活性依赖于在C-外显肽中的+2位置处的苯丙氨酸。这种依赖性严重缩小并损害了它的普遍适用性。

[0003] 内含肽已被改造为实现生物技术中的几个重要功能,包括作为自切割蛋白质用于重组蛋白质纯化的应用。断裂内含肽在这方面是特别有希望的,因为它们可以同时提供亲和和配体和自切割性质。在蛋白质纯化中,作为纯化对象的靶蛋白可以取代任一外显肽。迄今为止,断裂内含肽的DNAE家族已显示对于C末端切割蛋白质纯化方法的最大希望。

[0004] W02014/004336描述了与断裂内含肽N片段和断裂内含肽C片段融合的蛋白质,其可以附着至支持物。固体支持物可以是颗粒、珠、树脂或载玻片。

[0005] W02014/110393描述了与断裂内含肽C片段融合的目的蛋白质,使其与断裂内含肽N片段和纯化标签接触。N片段可以经由纯化标签附着到固相,并且讨论了用于亲和纯化的方法。

[0006] US 10 066027描述了蛋白质纯化系统和该系统的使用方法。公开的是包含N末端内含肽区段和C末端内含肽区段的断裂内含肽,所述N末端内含肽区段可以是固定的,所述C末端内含肽区段具有自切割性质且可以附着至目的蛋白质。N末端内含肽区段提供有增强敏感性的基序,所述基序致使其对外在条件更敏感。

[0007] US 10 308 679描述了包含N-内含肽多肽和N-内含肽溶解配偶体的融合蛋白,以及包含此类融合蛋白的亲和基质。

[0008] WO 2018/091424描述了用于生产亲和层析树脂的方法,所述亲和层析树脂包含氨基末端(N末端)的断裂内含肽片段作为亲和配体,所述方法包括下述步骤:a)在细菌细胞优选大肠杆菌中,作为包涵体中的不溶性蛋白质表达N末端的断裂内含肽片段蛋白质;b)收获所述包涵体;c)使所述包涵体溶解并释放所表达的蛋白质;d)在固体支持物上结合所述蛋白质;e)使所述蛋白质重折叠;f)从固体支持物中释放所述蛋白质;并且g)将所述蛋白质作为配体固定到层析树脂上,以形成亲和层析树脂。该程序使得能够固定2-10mg/ml树脂的配

体密度。

[0009] 如上所述,已使用组合的亲标签和标签切割机制,将断裂内含肽用于蛋白质纯化。然而,此类系统的效用受到几个因素的限制。首先,在预期产物的剪接点处存在氨基酸需求,即需要在C-外显肽的+2位置中的Phe,以进行切割和实现无标签蛋白质的纯化。在N末端没有外来氨基酸的重组蛋白质生产是高度期望的。其次,释放蛋白质的切割必须足够快速并提供可接受的产率。第三,存在断裂内含肽N或C片段的溶解度需求,用于其附着至固体支持物。第四,迄今为止不存在适合于无标签蛋白质的大规模纯化的可用断裂内含肽系统。

发明内容

[0010] 本发明克服了现有技术中的缺点,并且能够使用断裂内含肽系统,在仅一个快速亲和层析步骤中,对无标签/天然蛋白质进行通用纯化。

[0011] 本发明提供了天然断裂内含肽或衍生自天然内含肽和断裂内含肽的共有序列的N-内含肽蛋白质变体序列,其中与天然序列或共有序列相比,所述N-内含肽变体进行修饰,以消除序列中存在的所有天冬酰胺(N)氨基酸残基。优选地,所有此类N-内含肽变体序列进行进一步修饰,以用并非半胱氨酸的任何其它氨基酸取代在位置1处的半胱氨酸(C)。

[0012] 本发明提供了天然断裂内含肽或衍生自内含肽/断裂内含肽的共有序列的N-内含肽蛋白质变体,其中所述N-内含肽蛋白质变体不包括在变体序列的位置36处的天冬酰胺(N)。该位置根据与天然断裂内含肽的常规簇比对,从编号1的初始催化半胱氨酸开始进行计算。该位置对于现有技术中的N和天然N-内含肽序列是保守的,但本发明人已发现该位置可以突变为对脱酰胺作用较不敏感的任何其它氨基酸,例如组氨酸(H或His)或谷氨酰胺(Q或Gln),并且从而实现增加的碱稳定性,这是重要的,因为它给予对在例如层析程序期间增加的pH值的耐受性。至少在位置36处的N必须进行突变,但也考虑了在N-内含肽序列中的更多N可以进行突变,优选突变为H或Q。

[0013] 本发明还提供了N-内含肽和C-内含肽,其克服了在靶目的蛋白质(POI)的+2位置中的苯丙氨酸的绝对需求。本发明的N-内含肽和C-内含肽可以用于生产任何重组蛋白质。通过使用本发明的N-内含肽和C-内含肽,标签切割将在标签内含肽和POI的确切连接处发生,这意味着POI将以其天然形式表达,不含由亲和标签编码的外来氨基酸。此外,使用本发明的内含肽序列,POI以高产率且伴随快速切割动力学而产生。N-内含肽与可以在碱性条件下再生的固相偶联。

[0014] 本发明提供了如所附权利要求中定义的N-内含肽、C-内含肽、断裂内含肽系统及其使用方法。

附图说明

[0015] 图1是显示了与SPR生物传感器芯片偶联的,根据本发明的N-内含肽配体(A40、A41和A48)的相对结合容量的图。

[0016] 图2是显示了与SPR传感器芯片偶联的,根据本发明的N-内含肽配体(B72、B22、A48)和比较配体(A53)的相对结合容量的钉状图解(staple diagram)。

[0017] 图3显示了本发明的N-内含肽配体的静态结合容量。氨基酸分析(AAA)通过常规方

法完成。A48原型通过环氧化学与多孔琼脂糖颗粒偶联。

[0018] 图4A是实验6的纯化结果的层析图。

[0019] 图4B显示了来自实验6的SDS PAGE结果。

[0020] 图5是显示了与SPR生物传感器芯片偶联的,根据本发明的N-内含肽配体(A40和A48)的相对结合容量的图。

具体实施方式

[0021] 定义

[0022] 如说明书和所附权利要求中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数指示物,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“官能团”、“烷基”或“残基”包括两个或更多个此类官能团、烷基或残基等等的混合物。

[0023] 范围在本文中 can 表示为从“约”一个特定值和/或到“约”另一个特定值。当表示此类范围时,进一步方面包括从一个特定值和/或到另一个特定值。类似地,当值表示为近似值时,通过使用先行词“约”,将理解特定值形成进一步的方面。将进一步理解,每个范围的端点相对于另一个端点和独立于另一个端点两者均为重要的。还应理解,存在本文公开的许多值,并且除值本身之外,每个值在本文中也公开为“约”该特定值。例如,如果公开了值“10”,则也公开了“约10”。还应理解,还公开了两个特定整数之间的每个整数。例如,如果公开了10和15,则还公开了11、12、13和14。

[0024] 除非特别地相反陈述,否则组分的重量百分比(重量%)基于其中包括该组分的制剂或组合物的总重量。

[0025] 如本文使用的,术语“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情况可以发生或可以不发生,并且该描述包括其中所述事件或情况发生的实例以及其中它不发生的实例。

[0026] 如本文使用的,术语“接触”指将两个生物实体以这样的方式结合在一起,使得化合物可以直接影响靶的活性;即,通过与靶本身相互作用,或间接影响靶的活性;即,通过与靶的活性依赖于其的另一种分子、辅因子、因子或蛋白质相互作用。“接触”还可以意指促进两个生物实体例如肽的相互作用,以共价地或以其它方式键合。

[0027] 如本文使用的,“试剂盒”意指构成试剂盒的至少两种组分的集合。这些组分一起构成用于给定目的的功能单元。单个成员组分可以在物理上包装在一起或分开包装。例如,包含使用试剂盒的说明书的试剂盒在物理上可以包括或不包括其它个别成员组分的说明书。相反,说明书可以作为分开的成员组分以纸质形式或电子形式或作为录制的演示文稿供应,所述电子形式可以在计算机可读存储装置上供应或从互联网网站下载。

[0028] 如本文使用的,“说明书”意指描述涉及试剂盒的有关材料或方法的文件。这些材料可能包括下述的任何组合:背景信息、组分列表及其可用性信息(购买信息等)、使用试剂盒的简要或详细方案、故障排除、参考资料、技术支持和任何其它有关文件。说明书可以与试剂盒一起供应,或者作为分开的成员组分作为纸质形式或电子形式或作为录制的演示文稿供应,所述电子形式可以在计算机可读存储装置上供应或从互联网网站下载。说明书可以包含一个或多个文件,并且意欲包括未来的更新。

[0029] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,并且包括蛋白质及其片段。多肽在本文中公开为氨基酸残基序列。这些序列在从氨基末端到羧基末端的方向上,从左到

右书写。按照标准命名法,氨基酸残基序列通过如下所示的三字母或单字母代码命名:丙氨酸(Ala,A)、精氨酸(Arg,R)、天冬酰胺(Asn,N)、天冬氨酸(Asp,D)、半胱氨酸(Cys,C)、谷氨酰胺(Gln,Q)、谷氨酸(Glu,E)、甘氨酸(Gly,G)、组氨酸(His,H)、异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、赖氨酸(Lys,K)、甲硫氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、脯氨酸(Pro,P)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、色氨酸(Trp,W)、酪氨酸(Tyr,Y)和缬氨酸(Val,V)。肽包括任何寡肽、多肽、基因产物、表达产物或蛋白质。肽由连续氨基酸构成并且涵盖天然存在或合成的分子。

[0030] 另外,如本文使用的,术语“肽”指通过肽键或修饰的肽键彼此连接的氨基酸,例如肽等排体等,并且可以含有除20种基因编码的氨基酸外的修饰的氨基酸。肽可以通过天然过程例如翻译后加工或通过本领域众所周知的化学修饰技术进行修饰。修饰可以在肽中的任何位置发生,包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基末端或羧基末端。相同类型的修饰可以以相同或不同程度存在于给定多肽中的几个位点处。另外,给定的肽可以具有多种类型的修饰。修饰包括但不限于不同结构域或基序的连接、乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价交联或环化、核黄素的共价附着、血红素部分的共价附着、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附着、脂质或脂质衍生物的共价附着、磷脂酰肌醇的共价附着、二硫键形成、去甲基化、半胱氨酸或焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻化、氧化、聚乙二醇化(perglylation)、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化、硫酸化和转移-RNA介导的氨基酸向蛋白质的添加例如精氨酰化。(参见Proteins—Structure and Molecular Properties第2版,T. E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, 编辑, Academic Press, New York, 第1-12页(1983))。

[0031] 如本文使用的,“变体”指保留与原始序列相同或基本上相似的生物活性的分子。变体可以来自相同或不同的物种,或者是基于天然分子或先前分子的合成序列。此外,如本文使用的,“变体”指这样的分子,其具有从亲本分子(例如,本文公开的蛋白质或肽)的结构获得的结构,并且其结构或序列与本文公开的那些充分相似,基于该相似性,本领域技术人员预计与亲本分子相比,所述分子显示出相同或相似的活性和效用。例如,取代给定肽中的特定氨基酸可以产生与亲本具有相似活性的变体肽。

[0032] 在本发明的上下文中,变体蛋白质中的取代指示为:[原始氨基酸/序列中的位置/取代的氨基酸]。例如,在已突变为组氨酸(H)的氨基酸序列的位置36处的天冬酰胺(N)可互换地指示为“N36H”或“N36至H”。

[0033] 如本文使用的,术语“目的蛋白质(POI)”包括任何合成或天然存在的蛋白质或肽。因此,该术语涵盖传统上被视为药物、疫苗和生物药物的那些化合物,包括分子例如蛋白质、肽等等。治疗剂的实例在众所周知的参考文献中进行描述,所述参考文献例如Merck Index (第14版)、Physicians' Desk Reference (第64版)和The Pharmacological Basis of Therapeutics (第1版),并且它们包括但不限于药剂;用于疾病或病的治疗、预防、诊断、治愈或缓解的物质;影响身体结构或功能的物质,或前药,所述前药在它们已置于生理环境中后变得具有生物活性或更具活性。

[0034] 如本文使用的,“分离的肽”或“纯化的肽”意欲意指肽(或其片段),其基本上不含所述肽在自然界中通常与之结合的材料,或者不含所述肽在人工表达或生产系统中与之结

合的材料,包括但不限于表达宿主细胞裂解物、生长培养基组分、缓冲液组分、细胞培养上清液或合成体外翻译系统的组分。本文公开的肽或其片段可以例如通过以下获得:从天然来源(例如哺乳动物细胞)中提取、(例如在细胞中或在无细胞翻译系统)表达编码肽的重组核酸、或化学合成肽。另外,肽片段可以通过这些方法中的任一种或通过切割全长蛋白质和/或肽来获得。

[0035] 如本文使用的,词语“或”意指特定列表的任何一个成员,并且还包括该列表的成員的任何组合。

[0036] 如本文使用的,短语“核酸”指天然存在的或合成的寡核苷酸或多核苷酸,无论是DNA还是RNA或DNA-RNA杂合体、单链或双链、有义或反义,其能够通过沃森-克里克碱基配对与互补核酸杂交。本发明的核酸还可以包括核苷酸类似物(例如BrdU)和非磷酸二酯核苷间键合(例如肽核酸(PNA)或硫二酯键合)。特别地,核酸可以包括但不限于DNA、RNA、cDNA、gDNA、ssDNA、dsDNA或其任何组合。

[0037] 如本文使用的,“分离的核酸”或“纯化的核酸”意欲意指不含在本发明的DNA由其衍生的生物体的天然存在的基因组中侧接基因的基因的DNA。因此,该术语包括例如掺入载体内的重组DNA,例如自主复制的质粒或病毒;或者掺入原核生物或真核生物的基因组DNA内(例如转基因);或者作为分开的分子存在(例如,通过PCR、限制性内切酶消化、或化学合成或体外合成产生的cDNA或基因组或cDNA片段)。它还包括重组DNA,其为编码另外多肽序列的杂合基因的部分。术语“分离的核酸”还指RNA,例如,由分离的DNA分子编码的,或化学合成的,或与至少一些细胞组分分开或基本上不含至少一些细胞组分的mRNA分子,所述细胞组分例如其它类型的RNA分子或肽分子。

[0038] 如本文使用的,“外显肽”指内含肽修饰蛋白的一部分,其并非内含肽的部分,并且在内含肽切除后可以进行剪接或切割。

[0039] “内含肽”指蛋白质中的框内插入序列。内含肽可以通过翻译后蛋白质剪接过程催化其自身从蛋白质中的切除,以产生游离内含肽和成熟蛋白质。内含肽还可以催化在内含肽N末端、或内含肽C末端、或内含肽-外显肽末端两者处的内含肽-外显肽键的切割。如本文使用的,“内含肽”涵盖微型内含肽、修饰或突变的内含肽和断裂内含肽。

[0040] 如本文使用的,术语“断裂内含肽”指任何内含肽,其中一个或多个肽键断裂存在于N末端内含肽区段和C末端内含肽区段之间,使得N末端和C末端内含肽区段变成分开的分子,其可以非共价重新结合或重构成对于剪接或切割反应有功能的内含肽。任何具有催化活性的内含肽或其片段可以用于衍生用于本文公开的系统和方法中的断裂内含肽。例如,在一个方面,断裂内含肽可以衍生自真核内含肽。在另一个方面,断裂内含肽可以衍生自细菌内含肽。在另一个方面,断裂内含肽可以衍生自古细菌内含肽。优选地,如此衍生的断裂内含肽将仅具有对于催化剪接反应所必需的氨基酸序列。

[0041] 如本文使用的,“N末端内含肽区段”或“N-内含肽”指包含N末端氨基酸序列的任何内含肽序列,当与相应的C末端内含肽区段组合时,所述任何内含肽序列对于剪接和/或切割反应是有功能的。因此,N末端内含肽区段还包含当剪接发生时被剪接掉的序列。N末端内含肽区段可以包含其为天然存在的(天然)内含肽序列的N末端部分的修饰的序列。非内含肽残基也可以遗传融合到内含肽区段,以提供另外的功能性,例如亲和纯化或共价固定的能力。

[0042] 如本文使用的,“C末端内含肽区段”或“C-内含肽”指包含C末端氨基酸序列的任何内含肽序列,当与相应的N末端内含肽区段组合时,所述任何内含肽序列对于剪接或切割反应是有功能的。在一个方面,C末端内含肽区段包含当剪接发生时被剪接掉的序列。在另一个方面,C末端内含肽区段从与其C末端融合的肽序列中切割。从C末端内含肽的C末端中切割的序列在本文中被称为“目的蛋白质POI”,在下文更详细地讨论。C末端内含肽区段可以包含其为天然存在的(天然)内含肽序列的C末端部分的修饰的序列。例如,C末端内含肽区段可以包含另外的氨基酸残基和/或突变的残基,只要此类另外的和/或突变的残基的包括并不致使C末端内含肽区段对于剪接或切割无功能。

[0043] 共有序列是代表对准的有关序列的DNA、RNA或蛋白质序列。有关序列的共有序列可以以不同方式进行限定,但通常由每个位置处最常见的核苷酸或氨基酸残基限定。本发明的共有序列的实例是SEQ ID NO: 6的N-内含肽共有序列。

[0044] 如本文使用的,术语“剪接(splice)”或“剪接(splices)”意指切除多肽的中心部分,以形成两个或更多个更小的多肽分子。在一些情况下,剪接还包括将两个或更多个更小的多肽融合在一起,以形成新多肽的步骤。剪接也可以指通过断裂内含肽的作用,在两个分开的基因产物上编码的两种多肽的连接。

[0045] 如本文使用的,术语“切割(cleave)”或“切割(cleaves)”意指分裂单个多肽,以形成两个或更多个更小的多肽分子。在一些情况下,切割通过添加外源性内肽酶来介导,其经常被称为“蛋白酶解切割”。在其它情况下,切割可以由切割的肽序列中的一个或两个的内在活性介导,其经常被称为“自切割”。切割还可以指通过添加非蛋白酶解的第三肽诱导的两种多肽的自切割,如在本文所述的断裂内含肽系统的作用下。

[0046] 术语“融合”意指与之共价键合。例如,当两种肽(例如,经由肽键)彼此共价键合时,第一肽与第二肽融合。

[0047] 如本文使用的,“分离的”或“基本上纯的”物质是已与天然伴随其的组分分开的物质。通常,当多肽按重量计至少50% (例如,60%、70%、80%、90%、95%和99%) 不含其它蛋白质以及它与之天然结合的天然存在的有机分子时,它是基本上纯的。

[0048] 在本文中,“结合(bind)”或“结合(binds)”意指一种分子识别并粘附到样品中的另一种分子,但基本上不识别或粘附到样品中的其它分子。如果一种分子对于另一分子具有大于约 10^5 至 10^6 升/摩尔的结合亲和力,则该分子“特异性结合”另一种分子。

[0049] 本文提及的核酸、核苷酸序列、蛋白质或氨基酸序列可以被分离、纯化、化学合成或通过重组DNA技术产生。所有这些方法都是本领域众所周知的。

[0050] 如本文使用的,如“修饰的内含肽”或“突变的内含肽”中的术语“修饰的”或“突变的”,指当与天然或天然存在的结构相比时,所提及的核酸序列或氨基酸序列例如内含肽中的一种或多种修饰。此类修饰可以是取代、添加或缺失。修饰可以在所提及的结构例如内含肽的一个或多个氨基酸残基或者一个或多个核苷酸中发生。

[0051] 如本文使用的,术语“修饰的肽”、“修饰的蛋白质”或“修饰的目的蛋白质”或“修饰的靶蛋白”指已进行修饰的蛋白质。

[0052] 如本文使用的,“可操作地连接的”指两种或更多种生物分子的结合,其相对于彼此的配置使得可以执行生物分子的正常功能。关于核苷酸序列,“可操作地连接的”指两种或更多种核酸序列借助于酶促连接或其它方式的结合,其相对于彼此的配置使得可以执行

序列的正常功能。例如,如果编码前序列或分泌前导区的核苷酸序列作为参与多肽分泌的前蛋白表达,则它与多肽的核苷酸序列是可操作地连接的;如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与编码序列是可操作地连接的;并且如果核糖体结合位点这样定位以便促进序列的翻译,则它与编码序列是可操作地连接的。

[0053] “序列同源性”可以指其中核酸或蛋白质序列由于它们具有共同的进化起源而相似的情况。“序列同源性”可以指示序列是非常相似的。序列相似性是可观察到的;同源性可以基于观察。“非常相似的”可以意指至少70%的同一性、同源性或相似性;至少75%的同一性、同源性或相似性;至少80%的同一性、同源性或相似性;至少85%的同一性、同源性或相似性;至少90%的同一性、同源性或相似性;例如至少93%或至少95%甚至至少97%的同一性、同源性或相似性。可以使用Myers等人(1988) CABIOS 4:11-17且可在NCBI处获得的“Align”程序,来确定核苷酸序列的相似性或同源性或同一性。另外或可替代地,氨基酸序列相似性或同一性或同源性可以使用可在NCBI处获得的BlastP程序(Altschul等人Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)进行确定。可替代地或另外地,例如,关于核苷酸序列的术语“相似性”或“同一性”或“同源性”预期指示两个序列之间的同源性的定量测量。

[0054] 可替代地或另外,关于序列的“相似性”指具有等同核苷酸的位置数目除以两个序列中的较短序列中的核苷酸数目,其中可以按照Wilbur和Lipman算法(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726确定两个序列的比对。例如,使用20个核苷酸的窗口大小、4个核苷酸的字长和4的空位罚分,并且可以使用商购可得的程序(例如,Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc. CA),方便地执行序列数据包括比对的计算机辅助分析和解释。当RNA序列被说成与DNA序列相似或具有一定程度的序列同一性时,DNA序列中的胸苷(T)被视为等于RNA序列中的尿嘧啶(U)。下述参考文献还提供了用于比较两种蛋白质的氨基酸残基的相对同一性或同源性或相似性的算法,并且相对于前述另外或可替代地,参考文献可以用于确定同源性或同一性或相似性百分比。Needleman等人(1970) J. Mol. Biol. 48:444-453; Smith等人(1983) Advances App. Math. 2:482-489; Smith等人(1981) Nucleic Acids Res. 11:2205-2220; Feng等人(1987) J. Molec. Evol. 25:351-360; Higgins等人(1989) CABIOS 5:151-153; Thompson等人(1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-480; 以及Devereux等人(1984) 12:387-395。“严格杂交条件”是本领域众所周知的术语;参见例如,Sambrook, “Molecular Cloning, A Laboratory Manual” 第二版, CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989; “Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach”, Hames and Higgins编辑, IRL Press, Oxford, 1985; 还参见图2及其在本文中的描述,其中存在序列比较。

[0055] 术语“质粒”和“载体”和“盒”指染色体外元件,其经常携带并非细胞中心代谢的部分的基因,且通常以环状双链DNA分子的形式。此类元件可以是衍生自任何来源的、线性或环状的单链或双链DNA或RNA的自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体或核苷酸序列,其中许多核苷酸序列已连接或重组到独特的构建体内,所述构建体能够将启动子片段和选定基因产物的DNA序列连同适当的3'非翻译序列一起引入细胞内。通常,“载体”是修饰的质粒,其含有用于克隆的另外的多重插入位点和“表达盒”,其含有用于在宿主细胞中表达的选定基因产物的DNA序列(即转基因)。这种“表达盒”通常包括5'启动子区、转基因ORF和3'终止子区,以及ORF转录和翻译所需的所有必要调控序列。因此,将表达盒整合到宿主内允许盒

中的转基因ORF表达。

[0056] 术语“缓冲液”或“缓冲溶液”指通过其共轭酸-碱范围的作用抵抗pH变化的溶液。

[0057] 术语“装载缓冲液”或“平衡缓冲液”指含有一种或多种盐的缓冲液,其与蛋白质制剂混合用于将蛋白质制剂装载到柱上。该缓冲液还用于在装载前平衡柱,并且用于在装载蛋白质后洗涤柱。

[0058] 术语“洗涤缓冲液”在本文中用于指在目的蛋白质(例如与C末端内含肽片段偶联的蛋白质)装载之后以及在目的蛋白质的洗脱之前,通过(例如)柱的缓冲液。洗涤缓冲液可以作用于去除一种或多种污染物,而不会显著洗脱所需蛋白质。

[0059] 术语“洗脱缓冲液”指用于从柱中洗脱所需蛋白质的缓冲液。如本文使用的,术语“溶液”指缓冲溶液或非缓冲溶液,包括水。

[0060] 术语“洗涤”意指使适当的缓冲液通过或经过固体支持物,例如层析树脂。

[0061] 术语从固体支持物中“洗脱”分子(例如所需的蛋白质或污染物)意指从此类材料中去除分子。

[0062] 术语“污染物”或“杂质”指存在于待纯化的蛋白质样品中,除待纯化蛋白质外的任何外来或有害分子,特别是生物大分子,例如DNA、RNA或蛋白质。污染物包括例如来自表达和/或分泌待纯化蛋白质的细胞的其它蛋白质。

[0063] 如与蛋白质纯化结合使用的术语“分开”或“分离”指在包含所需蛋白质和第二蛋白质或其它污染物或杂质混合物两者的混合物中,将所需蛋白质与第二蛋白质或其它污染物或杂质混合物分开,使得至少大部分的所需蛋白质分子从混合物的那部分中取出,所述混合物包含至少大部分的第二蛋白质分子或其它污染物或杂质混合物。

[0064] 术语从包含所需蛋白质和一种或多种污染物的组合物或溶液中“纯化(purify)”或“纯化(purifying)”所需蛋白质,意指通过从组合物或溶液中(完全或部分)去除至少一种污染物,增加组合物或溶液中的所需蛋白质的纯度。

[0065] N-内含肽蛋白质变体

[0066] 本发明涉及使用根据本发明的断裂内含肽系统,在单个步骤中的亲和层析和亲和标签切割机制,所述断裂内含肽系统以广泛的氨基酸耐受性进行切割,以生成作为终产物的无标签的目的蛋白质(POI)。内含肽的两半是亲和配体(N-内含肽)和亲和标签(C-内含肽),并且它们快速结合。将一半(N-内含肽)固定到层析树脂上使得能够从溶液中捕获与POI偶联的另一半(C-内含肽)。在 Zn^{2+} 离子的存在下,切割反应受到抑制,使得能够形成稳定的复合物,同时洗掉杂质。在消除杂质后,加入螯合剂或还原剂,并且切割反应继续进行,使得能够收集POI,同时内含肽标签保持非共价结合与层析树脂连接的同源内含肽。

[0067] 优选地,本发明提供了天然断裂内含肽或衍生自天然内含肽和断裂内含肽的共有序列的N-内含肽蛋白质变体序列,其中与天然序列或共有序列相比,所述N-内含肽变体进行修饰,以消除序列中存在的所有天冬酰胺(N)氨基酸残基。优选地,所有此类序列都不包括在N-内含肽变体序列的位置1处的半胱氨酸(C)。

[0068] 优选地,本发明提供了并不包括在变体序列的位置36处的天冬酰胺(N)的N-内含肽蛋白质变体序列。该位置根据与天然断裂内含肽的常规簇比对,从编号1的初始催化半胱氨酸开始进行计算。该位置对于现有技术和天然N-内含肽序列中的N是保守的,但本发明人已发现该位置可以突变为与天然N-内含肽蛋白质序列相比提供增加的碱稳定性的氨基酸,

这是重要的,因为它给予对在例如层析程序期间增加的pH值的耐受性。优选地,提供增加的碱稳定性的氨基酸是组氨酸(H或His)或谷氨酰胺(Q或Gln)。

[0069] 天然内含肽是本领域已知的。内含肽列表在下表1中找到。所有内含肽都具有制备成断裂内含肽的潜力,而一些内含肽以断裂形式天然存在。表中发现的所有内含肽或者作为断裂内含肽存在,或者具有制备成按照本发明在位置36处进行修饰的断裂内含肽的潜力,使得保守的N被替换为赋予碱稳定性的另一种氨基酸例如H或Q。

[0070] 表1-天然存在的内含肽

内含肽名称	生物体名称	生物体描述
Eucarya		
APMV Pol	多食棘阿米巴(<i>Acanthamoeba polyphaga</i>) 拟菌病毒	分离株=“Rowbotham-Bradford”, 病毒, 感染阿米巴, 分类群: 212035
Abr PRP8	短柄曲霉(<i>Aspergillus brevipes</i>) FRR2439	真菌, ATCC 16899, 分类群: 75551
Aca-G186AR PRP8	荚膜阿耶罗菌(<i>Ajellomyces capsulatus</i>) G186AR	分类群: 447093, 菌株 G186AR
		分类群: 544712
Aca-H143 PRP8	荚膜阿耶罗菌 H143	菌株= JER2004, 分类群: 5037,
Aca-JER2004 PRP8	荚膜阿耶罗菌(无性型: 荚膜组织胞浆菌(<i>Histoplasma capsulatum</i>))	真菌
Aca-NAml PRP8	荚膜阿耶罗菌 NAml	菌株= “NAml”, 分类群:

		339724
Ade-ER3 PRP8	<i>Ajellomyces dermatitidis</i> ER-3	人真菌
		病原体。分类群: 559297
Ade-SLH14081 PRP8	<i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081,	人真菌病原体
Afu-Af293 PRP8	烟曲霉橘孢变种(<i>Aspergillus fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i>), 菌株 Af293	人致病性真菌, 分类群: 330879
Afu-FRR0163 PRP8	烟曲霉(<i>Aspergillus fumigatus</i>)菌株 FRR0163	人致病性真菌, 分类群: 5085
Afu-NRRL5109 PRP8	烟曲霉橘孢变种, 菌株 NRRL 5109	人致病性真菌, 分类群: 41121
Agi-NRRL6136 PRP8	巨大曲霉(<i>Aspergillus giganteus</i>)菌株 NRRL 6136	真菌, 分类群: 5060
[0072]	Ani-FGSCA4 PRP8	构巢曲霉(<i>Aspergillus nidulans</i>) FGSC A
		丝状真菌, 分类群: 227321
Avi PRP8	绿垂曲霉(<i>Aspergillus viridinitans</i>)菌株 FRR0577	真菌, ATCC 16902, 分类群: 75553
Bci PRP8	灰葡萄孢菌(<i>Botrytis cinerea</i>) (富氏葡萄 孢盘菌(<i>Botryotinia fuckeliana</i>) B05.10 的有性型)	植物真菌病原体
Bdc-JEL197 RPB2	蛙壶菌(<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>) JEL197	壶菌, 分离株=“AFTOL-ID 21”, 分类群: 109871
Bdc-JEL423 PRP8-1	蛙壶菌 JEL423	壶菌, 分离株 JEL423, 分类群 403673
Bdc-JEL423 PRP8-2	蛙壶菌 JEL423	壶菌, 分离株 JEL423, 分类群 403673
Bdc-JEL423 RPC2	蛙壶菌 JEL423	壶菌, 分离株 JEL423, 分类群 403673
Bdc-JEL423 cIF-5B	蛙壶菌	壶菌, 分离株

	JEL423	JEL423, 分类群 403673
Bfu-B05 PRP8	富氏葡萄孢盘菌 B05.10	分类群: 332648
CIV RIR1	Chilo 虹彩病毒	dsDNA 真核病毒, 分类群: 10488
CV-NY2A ORF212392	小球藻属(<i>Chlorella</i>)病毒 NY2A 感染 小球藻属 NC64A, 其感染 绿草履虫(<i>Paramecium bursaria</i>)	dsDNA 真核 病毒, 分类群: 46021, 家族 藻类 DNA 病毒科 (Phycodnaviridae)
CV-NY2A RIR1	小球藻属病毒 NY2A 感染 小球藻属 NC64A, 其感染 绿草履虫	dsDNA 真核 病毒, 分类群: 46021, 家族 藻类 DNA 病毒科
CZIV RIR1	新西兰肋翅鳃金龟 (<i>Costelytra zealandica</i>) 虹彩病毒	dsDNA 真核病毒, 分类群: 68348
[0073] Cba-WM02.98 PRP8	杆孢隐球菌(<i>Cryptococcus bacillisporus</i>) 菌株 WM02.98 (又名格特新型隐球菌 (<i>Cryptococcus neoformans gattii</i>))	酵母, 人病原体, 分类群: 37769
Cba-WM728 PRP8	杆孢隐球菌菌株 WM728	酵母, 人病原体, 分类群: 37769
Ceu ClpP	卵配衣藻(<i>Chlamydomonas eugametos</i>) (叶绿体)	绿藻, 分类群: 3053
Cga PRP8	格特隐球菌(<i>Cryptococcus gattii</i>) (又名 杆孢隐球菌)	酵母, 人病原体
Cgl VMA	光滑假丝酵母(<i>Candida glabrata</i>)	酵母, 分类群: 5478
Cla PRP8	罗伦特隐球菌(<i>Cryptococcus laurentii</i>)菌株 CBS139	真菌, 担子菌纲 (Basidiomycete)酵母, 分类群: 5418
Cmo ClpP	<i>Chlamydomonas moewusii</i> , 菌株 UTEX 97	绿藻, 叶绿体基因, 分类群: 3054
Cmo RPB2 (RpoBb)	<i>Chlamydomonas moewusii</i> , 菌株	绿藻, 叶绿体基因,

	UTEX 97	分类群: 3054
Cnc-A PRP8 (Fnc-A PRP8)	新型线黑粉菌(<i>Filobasidiella neoformans</i>) (新型隐球菌(<i>Cryptococcus neoformans</i>)) 血清型 A, PHLS_8104	酵母, 人病原体
Cnc-AD PRP8 (Fnc-AD PRP8)	新型隐球菌 (新型线黑粉菌), 血清型 AD, CBS132。	酵母, 人病原体, ATCC32045, 分类群: 5207
Cnc-JEC21 PRP8	新型隐球菌新型变种 (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>) JEC21	酵母, 人病原体, 血清型="D" 分类群: 214684
Cpa ThrRS	近平滑假丝酵母(<i>Candida parapsilosis</i>), 菌株 CLIB214	酵母, 真菌, 分类群: 5480
Cre RPB2	莱茵衣藻(<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>) (核)	绿藻, 分类群: 3055
CroV Pol	伦比约餐厅虫病毒 (<i>Cafeteria roenbergensis</i>)BV-PW1	分类群: 693272, 巨大病毒感染海洋微型异养鞭毛虫
CroV RIR1	伦比约餐厅虫病毒 BV-PW1	分类群: 693272, 巨大病毒感染海洋微型异养鞭毛虫
CroV RPB2	伦比约餐厅虫病毒 BV-PW1	分类群: 693272, 巨大病毒感染海洋微型异养鞭毛虫
CroV Top2	伦比约餐厅虫病毒 BV-PW1	分类群: 693272, 巨大病毒感染海洋微型异养鞭毛虫
Cst RPB2	复蚊雕蚀菌(<i>Coelomomyces stegomyiae</i>)	壶菌, 分离株="AFTOL-ID 18", 分类群: 143960
Ctr ThrRS	热带假丝酵母 (<i>Candida tropicalis</i>) ATCC750	酵母
Ctr VMA	热带假丝酵母(核)	酵母
Ctr-MYA3404 VMA	热带假丝酵母 MYA-3404	分类群: 294747
Ddi RPC2	盘基网柄菌(<i>Dictyostelium discoideum</i>)菌 粘菌(社会变形虫)	

[0074]

	株	
	AX4 (核)	
Dhan GLT1	汉逊德巴利酵母(<i>Debaryomyces hansenii</i>) 真菌, 无性型: 无名假丝酵母 CBS767	(<i>Candida famata</i>), 分类群: 4959
Dhan VMA	汉逊德巴利酵母 CBS767	真菌, 分类群: 284592
Eni PRP8	构巢裸胞壳(<i>Emericella nidulans</i>) R20 (无性型: 构巢曲霉)	分类群: 162425
Eni-FGSCA4 PRP8	构巢裸胞壳(无性型: 构巢曲霉) FGSC A4	丝状真菌, 分类群: 162425
Fte RPB2 (RpoB)	<i>Floydiella terrestris</i> , 菌株 UTEX 1709	绿藻, 叶绿体基因, 分类群: 51328
Gth DnaB	蓝隐藻(<i>Guillardia theta</i>) (质体)	隐藻
HaV01 Pol	赤潮异弯藻(<i>Heterosigma akashiwo</i>)病毒 01	藻类病毒, 分类群: 97195,
[0075]		菌株 HaV01
Hca PRP8	荚膜组织胞浆菌(无性型: 荚膜阿耶罗菌)	真菌, 人病原体
IIV6 RIR1	无脊椎动物虹彩病毒 6	dsDNA 真核病毒, 分类群: 176652
Kex-CBS379 VMA	少孢哈萨克斯坦酵母 (<i>Kazachstania exigua</i>), 以前的少孢酵母(<i>Saccharomyces exiguus</i>), 菌株 CBS379	酵母, 分类群: 34358
Kla-CBS683 VMA	乳酸克鲁维酵母(<i>Kluyveromyces lactis</i>), 菌株 CBS683	酵母, 分类群: 28985
Kla-IFO1267 VMA	乳酸克鲁维酵母 IFO1267	真菌, 分类群: 28985
Kla-NRRL Y1140 VMA	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140	真菌, 分类群: 284590
Lel VMA	长孢洛德酵母 (<i>Lodderomyces elongisporus</i>)	酵母
Mca-CBS113480 PRP8	犬小孢子菌(<i>Microsporum canis</i>) CBS 113480	分类群: 554155

[0076]	Nau PRP8	鲜橙新萨托菌 (<i>Neosartorya aurata</i>) NRRL 4378	真菌, 分类群: 41051
	Nfe-NRRL5534 PRP8	芬尼新萨托菌 (<i>Neosartorya fennelliae</i>) NRRL 5534	真菌, 分类群: 41048
	Nfi PRP8	费希新萨托菌 (<i>Neosartorya fischeri</i>)	真菌
	Ngl-FR2163 PRP8	光滑新萨托菌 (<i>Neosartorya glabra</i>) FRR2163	真菌, ATCC 16909, 分类群: 41049
	Ngl-FRR1833 PRP8	光滑新萨托菌 FRR1833	真菌, 分类群: 41049, (初步鉴定)
	Nqu PRP8	四绕新萨托菌 (<i>Neosartorya quadricincta</i>), 菌株 NRRL 4175	分类群: 41053
	Nspi PRP8	刺孢新萨托菌 (<i>Neosartorya spinosa</i>) FRR4595	真菌, 分类群: 36631
	Pabr-Pb01 PRP8	巴西副球孢子菌 (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>) Pb01	分类群: 502779
	Pabr-Pb03 PRP8	巴西副球孢子菌 Pb03	分类群: 482561
	Pan CHS2	鹅柄孢壳菌 (<i>Podospora anserina</i>)	真菌, 分类群 5145
	Pan GLT1	鹅柄孢壳菌	真菌, 分类群 5145
	Pbl PRP8-a	布拉克须霉 (<i>Phycomyces blakesleeana</i>)	接合菌纲 (Zygomycete) 真菌, 菌株 NRRL155
	Pbl PRP8-b	布拉克须霉	接合菌纲真菌, 菌株 NRRL155
	Pbr-Pb18 PRP8	巴西副球孢子菌 Pb18	真菌, 分类群: 121759
	Pch PRP8	产黄青霉 (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	真菌, 分类群: 5076
	Pex PRP8	扩展青霉 (<i>Penicillium expansum</i>)	真菌, 分类群 27334
	Pgu GLT1	季也蒙毕赤酵母 (假丝酵母) (<i>Pichia</i> (<i>Candida</i>) <i>guilliermondii</i>)	真菌, 分类群 294746
	Pgu-alt GLT1	季也蒙毕赤酵母 (假丝酵母)	真菌
	Pno GLT1	颖枯壳针孢 (<i>Phaeosphaeria nodorum</i>) SN15	真菌, 分类群: 321614
	Pno RPA2	颖枯壳针孢 SN15	真菌, 分类群: 321614

Ppu DnaB	紫菜(<i>Porphyra purpurea</i>) (叶绿体)	红藻
Pst VMA	树干毕赤酵母(<i>Pichia stipitis</i>) CBS 6054, 分类群: 322104	酵母
Ptr PRP8	偃麦草核腔菌(<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>) Pt-1C-BF	子囊菌纲(Ascomycete) 真菌, 分类群: 426418
Pvu PRP8	外阴青霉(<i>Penicillium vulpinum</i>) (以前的棒形青霉(<i>P. claviforme</i>))	真菌
Pye DnaB	条斑紫菜(<i>Porphyra yezoensis</i>) 叶绿体, 栽培变种 U-51	红藻, 细胞器 = “质体: 叶绿体”, “分类群: 2788
Sas RPB2	<i>Spiromyces spiralis</i> NRRL 22631	接合菌纲真菌, 分离株=“AFTOL-ID 185”, 分类群: 68401
[0077] Sca-CBS4309 VMA	<i>Saccharomyces castellii</i> , 菌株 CBS4309	酵母, 分类群: 27288
Sca-IFO1992 VMA	<i>Saccharomyces castellii</i> , 菌株 IFO1992	酵母, 分类群: 27288
Scar VMA	卡氏酵母(<i>Saccharomyces cariocanus</i>), 菌株=“UFRJ 50791	酵母, 分类群: 114526
Sce VMA	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (核)	酵母, 也在 Sce 菌株 OUT7163、OUT7045、OUT7163、IFO1992 中
Sce-DH1-1A VMA	酿酒酵母菌株 DH1-1A	酵母, 分类群: 173900, 也在 Sce 菌株 OUT7900 、 OUT7903 、 OUT7112 中
Sce-JAY291 VMA	酿酒酵母 JAY291	分类群: 574961
Sce-OUT7091 VMA	酿酒酵母 OUT7091	酵母, 分类群: 4932, 也在 Sce 菌株 OUT7043、OUT7064 中

[0078]	Sce-OUT7112 VMA	酿酒酵母 OUT7112	酵母, 分类群: 4932, 也在 Sce
	Sce-YJM789 VMA	酿酒酵母菌株 YJM789	菌株 OUT7900、OUT7903 中酵母, 分类群: 307796
	Sda VMA	乳品酵母(<i>Saccharomyces dairenensis</i>), 菌株 CBS 421	酵母, 分类群: 27289, 也在 Sda 菌株 IFO0211 中
	Sex-IFO1128 VMA	少孢酵母, 菌株=“IFO1128”	酵母, 分类群: 34358
	She RPB2 (RpoB)	淡黄毛枝藻(<i>Stigeoclonium helveticum</i>), 菌株 UTEX 441	绿藻, 叶绿体基因, 分类群: 55999
	Sja VMA	日本裂殖酵母 (<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>) yFS275	子囊菌纲真菌, 分类群: 402676
	Spa VMA	巴斯德酵母(<i>Saccharomyces pastorianus</i>) IFO11023	酵母, 分类群: 27292
	Spu PRP8	斑点小壶菌(<i>Spizellomyces punctatus</i>)	壶菌,
	Sun VMA	单孢酵母(<i>Saccharomyces unisporus</i>), 菌株 CBS 398	酵母, 分类群: 27294
	Tgl VMA	球形环孢菌(<i>Torulaspora globosa</i>), 菌株 CBS 764	酵母, 分类群: 48254
	Tpr VMA	比勒陀利亚有孢酵母 (<i>Torulaspora pretoriensis</i>), 菌株 CBS 5080	酵母, 分类群: 35629
	Ure-1704 PRP8	<i>Uncinocarpus reesii</i>	丝状真菌
	Vpo VMA	范德瓦尔托霉多孢菌(<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>), 以前的多孢克鲁维酵母(<i>Kluyveromyces polysporus</i>), 菌株 CBS 2163	酵母, 分类群: 36033
	WIV RIR1	蝙蝠蛾(<i>Wiseana</i>)虹彩病毒	dsDNA 真核

		病毒, 分类群: 68347
Zba VMA	拜耳接合酵母 (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>), 菌株 CBS 685	酵母, 分类群: 4954
Zbi VMA	二孢接合酵母 (<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>), 菌株 CBS 702	酵母, 分类群: 4957
Zro VMA	鲁氏接合酵母 (<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>), 菌株 CBS 688	酵母, 分类群: 4956
真细菌		
AP-APSE1 dpol	豌豆蚜(<i>Acyrtosiphon pisum</i>)次级 内共生体阶段 1	细菌噬菌体, 分类群: 67571
AP-APSE2 dpol	细菌噬菌体 APSE-2, 分离株= T5A	暂定种 <i>Hamiltonella defensa</i> 的细菌噬 菌体, 豌豆蚜 的内共生体, 分类群: 340054
AP-APSE4 dpol	暂定种 <i>Hamiltonella defensa</i> 菌株 5ATac 的细菌 噬菌体, 豌豆蚜 的内共生体	细菌噬菌体, 分类群: 568990
AP-APSE5 dpol	细菌噬菌体 APSE-5	暂定种 <i>Hamiltonella defensa</i> 的细菌噬 菌体, <i>Uroleucon</i> <i>rudbeckiae</i> 的内共生体, 分类 群: 568991
AP-Aaphi23 MupF	细菌噬菌体 Aaphi23, 嗜血杆菌属 (<i>Haemophilus</i>) 噬菌体 Aaphi23	伴放线放线杆菌属 (<i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i>)

[0079]

		细菌噬菌体, 分类群: 230158
Aac RIR2	<i>Aquifex aeolicus</i> 菌株 VF5	嗜热
		化能自养生物,
		分类群: 63363
Aave-AAC001	燕麦食酸菌西瓜亚种(<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>)	分类群: 397945
Aave1721	AAC00-1	
Aave-AAC001 RIR1	燕麦食酸菌西瓜亚种	分类群: 397945
	AAC00-1	
Aave-ATCC19860	燕麦食酸菌燕麦亚种(<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>)	分类群: 643561
RIR1	ATCC 19860	
Aba Hyp-02185	鲍曼不动杆菌(<i>Acinetobacter baumannii</i>) ACICU	分类群: 405416
Acc RIR1	解纤维热酸菌 (<i>Acidothermus cellulolyticus</i>) 11B	分类群: 351607
[0080] Ach DnaB-1	欧氏碱湖生菌(<i>Alkalilimnicola ehrlichi</i>) MLHE-1	分类群: 187272
Ach DnaB-2	欧氏碱湖生菌 MLHE-1	分类群: 187272
Ach RIR1	欧氏碱湖生菌 MLHE-1	分类群: 187272
AgP-S1249 MupF	凝聚杆菌属 (<i>Aggregatibacter</i>) 噬菌体 S1249	分类群: 683735
Aha DnaE-c	盐生隐杆藻(<i>Aphanothece halophytica</i>)	蓝细菌(<i>Cyanobacterium</i>), 分类群: 72020
Aha DnaE-n	盐生隐杆藻	蓝细菌, 分类群: 72020
Alvi-DSM180 GyrA	<i>Allochrocatium vinosum</i> DSM 180	分类群: 572477
Ama MADE823	噬菌体未表征蛋白质	可能的原噬菌体基因,
	[麦氏交替单胞菌(<i>Alteromonas macleodii</i>) ‘深层生态型’]	分类群: 314275
Amax-CS328 DnaX	极大节旋藻(<i>Arthrospira maxima</i>) CS-328	分类群: 513049
Aov DnaE-c	卵孢束丝藻(<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>)	蓝细菌, 分类群: 75695
Aov DnaE-n	卵孢束丝藻	蓝细菌, 分类群: 75695
Apl-C1 DnaX	钝顶节旋藻(<i>Arthrospira platensis</i>)	分类群: 118562, 菌株 C1

Arsp-FB24 DnaB	节杆菌属(<i>Arthrobacter</i>)物种 FB24	分类群: 290399
Asp DnaE-c	鱼腥藻属(<i>Anabaena</i>)物种 PCC7120, (念珠藻属 (<i>Nostoc</i>) 物种 PCC7120)	蓝细菌, 固氮 分类群: 103690
Asp DnaE-n	鱼腥藻属物种 PCC7120, (念珠藻属 物种 PCC7120)	蓝细菌, 固氮 分类群: 103690
Ava DnaE-c	多变鱼腥藻 (<i>Anabaena variabilis</i>) ATCC29413	蓝细菌, 分类群: 240292
Ava DnaE-n	多变鱼腥藻 ATCC29413	蓝细菌, 分类群: 240292
Avin RIR1 BIL	棕色固氮菌(<i>Azotobacter vinelandii</i>)	分类群: 354
Bce-MCO3 DnaB	洋葱伯克霍尔德菌 (<i>Burkholderia cenocepacia</i>) MC0-3	分类群: 406425
Bce-PC184 DnaB	洋葱伯克霍尔德菌 PC184	分类群: 350702
Bse-MLS10 TerA	还原硫酸盐芽孢杆菌 (<i>Bacillus selenitireducens</i>) MLS10	可能的原噬菌体基因, 分类群: 439292
[0081] BsuP-M1918 RIR1	枯草芽孢杆菌(<i>B. subtilis</i> M1918) (原噬菌体)	枯草芽孢杆菌 M1918 中的原噬菌体。 分类群: 157928
BsuP-SPBc2 RIR1	枯草芽孢杆菌菌株 168 Sp β c2 原噬菌体	枯草芽孢杆菌分类群 1423. SPbeta c2 噬菌体, 分类群: 66797
Bvi IcmO	越南伯克霍尔德菌 (<i>Burkholderia vietnamiensis</i>) G4	质粒=“pBVIE03”。 分类群: 269482
CP-P1201 Thy1	棒状杆菌属(<i>Corynebacterium</i>) 噬菌体 P1201	裂解性细菌噬菌体 P1201 来自谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) NCHU 87078.病毒; dsDNA 病毒, 分类群: 384848
Cag RIR1	聚生染绿菌 (<i>Chlorochromatium aggregatum</i>)	能动的, 光养的聚生体

Cau SpoVR	橙色绿屈挠菌(<i>Chloroflexus aurantiacus</i>) J-10-fl	不产氧 光氧生物, 分类群: 324602
CbP-C-St RNR	肉毒杆菌(<i>Clostridium botulinum</i>)噬菌体 C-St	噬菌体, 具体_宿主= “肉毒杆菌” C 型菌株 C-Stockholm, 分类群: 12336
CbP-D1873 RNR	肉毒杆菌噬菌体 D	来自肉毒杆菌 D 型菌株 1873 的噬菌体亚种, 分类群: 29342
Cbu-Dugway DnaB	伯氏考克斯氏体(<i>Coxiella burnetii</i>) Dugway 5J108-111	变形菌门(Proteobacteria); 军团 菌目(Legionellales); 分类群: 434922
Cbu-Goat DnaB	伯氏考克斯氏体 ‘MSU Goat Q177’	变形菌门; 军团菌目; 分类群: 360116
Cbu-RSA334 DnaB	伯氏考克斯氏体 RSA 334	变形菌门; 军团菌目; 分类群: 360117
Cbu-RSA493 DnaB	伯氏考克斯氏体 RSA 493	变形菌门; 军团菌目; 分类群: 227377
Cce Hyp1-Csp-2	蓝杆藻属(<i>Cyanothece</i>)物种 ATCC 51142	海洋单细胞 固氮蓝细菌, 分类群: 43989
Cch RIR1	氯铬绿霉菌(<i>Chlorobium chlorochromatii</i>) CaD3	分类群: 340177
Ccy Hyp1-Csp-1	蓝杆藻属物种 CCY0110	蓝细菌, 分类群: 391612
Ccy Hyp1-Csp-2	蓝杆藻属物种 CCY0110	蓝细菌, 分类群: 391612
Cfl-DSM20109 DnaB	产黄纤维单胞菌(<i>Cellulomonas flavigena</i>) DSM 20109	分类群: 446466
Chy RIR1	生氢一氧化碳嗜热菌(<i>Carboxydotherrmus</i> <i>hydrogenoformans</i>) Z-2901	嗜热菌, 分类群 = 246194
Ckl PTerm	克鲁维梭菌(<i>Clostridium kluyveri</i>)	DSM 质粒= “pCKL555A”,

[0082]

	555	
		分类群: 431943
Cra-CS505 DnaE-c	拟柱孢藻(<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>) CS-505	分类群: 533240
Cra-CS505 DnaE-n	拟柱孢藻 CS-505	分类群: 533240
Cra-CS505 GyrB	拟柱孢藻 CS-505	分类群: 533240
Csp-CCY0110 DnaE-c	蓝杆藻属物种 CCY0110	分类群: 391612
Csp-CCY0110 DnaE-n	蓝杆藻属物种 CCY0110	分类群: 391612
Csp-PCC7424 DnaE-c	蓝杆藻属物种 PCC 7424	蓝细菌, 分类群: 65393
Csp-PCC7424 DnaE-n	蓝杆藻属物种 PCC7424	蓝细菌, 分类群: 65393
Csp-PCC7425 DnaB	蓝杆藻属物种 PCC 7425	分类群: 395961
Csp-PCC7822 DnaE-n	蓝杆藻属物种 PCC 7822	分类群: 497965
[0083] Csp-PCC8801 DnaE-c	蓝杆藻属物种 PCC 8801	分类群: 41431
Csp-PCC8801 DnaE-n	蓝杆藻属物种 PCC 8801	分类群: 41431
Cth ATP 酶 BIL	热纤梭菌(<i>Clostridium thermocellum</i>)	ATCC27405, 分类群: 203119
Cth-ATCC27405 TerA	热纤梭菌 ATCC27405	可能的原噬菌体, ATCC27405, 分类群: 203119
Cth-DSM2360 TerA	热纤梭菌 DSM 2360	可能的原噬菌体 基因, 分类群: 572545
Cwa DnaB	<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501 (集胞藻属(<i>Synechocystis</i>)物种 WH 8501)	分类群: 165597
Cwa DnaE-c	<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501 (集胞藻属物种 WH 8501)	蓝细菌, 分类群: 165597
Cwa DnaE-n	<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501 (集胞藻属物种 WH 8501)	蓝细菌, 分类群: 165597
Cwa PEP	<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501 (集胞藻属物种 WH 8501)	分类群: 165597

[0084]	Cwa RIR1	<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501 (集胞藻属物种 WH 8501)	分类群: 165597
	Daud RIR1	暂定种 <i>Desulforudis audaxviator</i> MP104C	分类群: 477974
	Dgc DnaB	地热奇球菌(<i>Deinococcus geothermalis</i>) DSM11300	嗜热, 抗辐射
	Dha-DCB2 RIR1	哈夫氏脱硫杆菌(<i>Desulfitobacterium hafniense</i>) DCB-2	厌氧脱卤 菌, 分类群: 49338
	Dha-Y51 RIR1	哈夫氏脱硫杆菌 Y51	厌氧脱卤 菌, 分类群: 138119
	Dpr-MLMS1 RIR1	δ -变形菌 MLMS-1	分类群: 262489
	Dra RIR1	抗辐射奇异球菌(<i>Deinococcus radiodurans</i>) R1, TIGR 菌株	抗辐射, 分类群: 1299
	Dra Snf2-c	抗辐射奇异球菌 R1, TIGR 菌株	抗辐射和 DNA 损伤 , 分类群: 1299
	Dra Snf2-n	抗辐射奇异球菌 R1, TIGR 菌株	抗辐射和 DNA 损伤 , 分类群: 1299
	Dra-ATCC13939 Snf2	抗辐射奇异球菌 R1, ATCC13939/Brooks & Murray 菌株	抗辐射和 DNA 损伤 , 分类群: 1299
	Dth UDP GD	嗜热网球菌(<i>Dictyoglomus thermophilum</i>) H-6-12	菌株=“H-6-12; ATCC 35947, 分类群: 309799
	Dvul ParB	普通脱硫弧菌普通亚种(<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>) DP4	分类群: 391774
	EP-Min27 引物酶	肠杆菌属(<i>Enterobacteria</i>)噬菌体 Min27	宿主=“大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>) O157: H7 菌株 Min27”的细菌 噬菌体
	Fal DnaB	桤木弗兰克氏菌(<i>Frankia alni</i>) ACN14a	植物共生体, 分类群: 326424

Fsp-CcI3 RIR1	弗兰克氏菌属(<i>Frankia</i>)物种 CcI3	分类群: 106370
Gob DnaE	隐球出芽菌 (<i>Gemmata obscuriglobus</i>) UQM2246	分类群 114, TIGR 基因组 菌株, 出芽细菌
Gob Hyp	隐球出芽菌 UQM2246	分类群 114, TIGR 基因组 菌株, 出芽细菌
Gvi DnaB	紫色粘杆菌 (<i>Gloeobacter violaceus</i>), PCC 7421	分类群: 33072
Gvi RIR1-1	紫色粘杆菌, PCC 7421	分类群: 33072
Gvi RIR1-2	紫色粘杆菌, PCC 7421	分类群: 33072
Hhal DnaB	嗜盐嗜盐红螺菌 (<i>Halorhodospira halophila</i>) SL1	分类群: 349124
Kfl-DSM17836 DnaB	苍黄色克里布所菌 (<i>Kribbella flavida</i>) DSM 17836	分类群: 479435
Kra DnaB	抗辐射动球菌 (<i>Kineococcus radiotolerans</i>) SRS30216	抗辐射
[0085] LLP-KSY1 PolA	乳球菌属(<i>Lactococcus</i>)噬菌体 KSY1	细菌噬菌体, 分类群: 388452
LP-phiHSIC 解旋酶	海利斯顿氏菌(<i>Listonella pelagia</i>)噬菌体 phiHSIC	分类群: 310539, 海利斯顿氏菌的 假温带海洋 噬菌体
Lsp-PCC8106 GyrB	鞘丝藻属(<i>Lyngbya</i>)物种 PCC 8106	分类群: 313612
MP-Bc DnaB	分枝杆菌噬菌体 (<i>Mycobacteriophage</i>) Bethlehem	细菌噬菌体, 分类群: 260121
MP-Bc gp51	分枝杆菌噬菌体 Bethlehem	细菌噬菌体, 分类群: 260121
MP-Catera gp206	分枝杆菌噬菌体 Catera	分枝杆菌噬菌体, 分类群: 373404
MP-KBG gp53	分枝杆菌属(<i>Mycobacterium</i>)噬菌体 KBG	分类群: 540066
MP-Mcjlw1 DnaB	分枝杆菌噬菌体 CJW1	细菌噬菌体, 分类群: 205869
MP-Omega DnaB	分枝杆菌噬菌体 Omega	细菌噬菌体, 分类群: 205879
MP-U2 gp50	分枝杆菌噬菌体 U2	细菌噬菌体, 分类群: 260120
Maer-NIES843	铜绿微囊藻 (<i>Microcystis aeruginosa</i>) 形成水华的毒性	

	DnaB	NIES-843	蓝细菌, 分类群: 449447
	Maer-NIES843 DnaE-c	铜绿微囊藻 NIES-843	形成水华的毒性 蓝细菌, 分类群: 449447
	Maer-NIES843 DnaE-n	铜绿微囊藻 NIES-843	形成水华的毒性 蓝细菌, 分类群: 449447
	Mau-ATCC27029	橙色小单孢菌 (<i>Micromonospora aurantiaca</i>) ATCC 27029	分类群: 644283
	GyrA	27029	
	Mav-104 DnaB	鸟分枝杆菌(<i>Mycobacterium avium</i>) 104	分类群: 243243
	Mav-ATCC25291	鸟分枝杆菌鸟亚种(<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>) ATCC 25291	分类群: 553481
	DnaB	ATCC 25291	
	Mav-ATCC35712	鸟分枝杆菌	ATCC35712, 分类群 1764
	DnaB		
[0086]	Mav-PT DnaB	鸟分枝杆菌副结核亚种(<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>)菌株 k10	分类群: 262316
	Mbo Pps1	牛分枝杆菌牛型亚种(<i>Mycobacterium bovis</i> subsp. <i>bovis</i>) 菌株=“AF2122/97”, AF2122/97	分类群: 233413
	Mbo RecA	牛分枝杆菌牛型亚种 AF2122/97	分类群: 233413
	Mbo SufB (Mbo Pps1)	牛分枝杆菌牛型亚种 AF2122/97	分类群: 233413
	Mbo-1173P DnaB	牛分枝杆菌(<i>Mycobacterium bovis</i>) BCG Pasteur 1173P	菌株= BCG Pasteur 1173P2, 分类群: 410289
	Mbo-AF2122 DnaB	牛分枝杆菌牛型亚种 AF2122/97	菌株=“AF2122/97”, 分类群: 233413
	Mca MupF	荚膜甲基球菌(<i>Methylococcus capsulatus</i>) Bath,	原噬菌体 MuMc02,

	原噬菌体 MuMc02	分类群: 243233
Mca RIR1	荚膜甲基球菌 Bath	分类群: 243233
Mch RecA	甲壳分枝杆菌(<i>Mycobacterium chitae</i>)	IP14116003, 分类群: 1792
Mcht-PCC7420 DnaE-1	喜泥微鞘藻(<i>Microcoleus chthonoplastes</i>)	蓝细菌,
	PCC7420	分类群: 118168
Mcht-PCC7420 DnaE-2c	喜泥微鞘藻	蓝细菌,
	PCC7420	分类群: 118168
Mcht-PCC7420 DnaE-2n	喜泥微鞘藻	蓝细菌,
	PCC7420	分类群: 118168
Mcht-PCC7420 GyrB	喜泥微鞘藻 PCC	分类群: 118168
	7420	
Mcht-PCC7420 RIR1-1	喜泥微鞘藻 PCC	分类群: 118168
	7420	
[0087] Mcht-PCC7420 RIR1-2	喜泥微鞘藻 PCC	分类群: 118168
	7420	
Mex 解旋酶	外链甲基杆菌 (<i>Methylobacterium extorquens</i>) AMI	α -变形菌
Mex TrbC	外链甲基杆菌 AMI	α -变形菌
Mfa RecA	诡诈分枝杆菌(<i>Mycobacterium fallax</i>)	CITP8139, 分类群: 1793
Mfl GyrA	微黄分枝杆菌(<i>Mycobacterium flavescens</i>) Fla0	分类群: 1776, 参考 #930991
Mfl RecA	微黄分枝杆菌 Fla0	菌株= Fla0, 分类群: 1776, 参考 #930991
Mfl-ATCC14474 RecA	微黄分枝杆菌, ATCC14474	菌株= ATCC14474, 分类群: 1776, 参考#930991
Mfl-PYR-GCK DnaB	微黄分枝杆菌 PYR-	分类群: 350054

	GCK	
Mga GyrA	胃分枝杆菌(<i>Mycobacterium gastri</i>)	HP4389, 分类群: 1777
Mga RecA	胃分枝杆菌	HP4389, 分类群: 1777
Mga SufB (Mga Pps1)	胃分枝杆菌	HP4389, 分类群: 1777
Mgi-PYR-GCK DnaB	浅黄分枝杆菌(<i>Mycobacterium gilvum</i>) PYR-GCK	分类群: 350054
Mgi-PYR-GCK GyrA	浅黄分枝杆菌 PYR-GCK	分类群: 350054
Mgo GyrA	戈登分枝杆菌(<i>Mycobacterium goodii</i>)	分类群: 1778, 参考编号 930835
Min-1442 DnaB	胞内分枝杆菌(<i>Mycobacterium intracellulare</i>)	菌株 1442, 分类群: 1767
Min-ATCC13950 GyrA	胞内分枝杆菌 ATCC 13950	分类群: 487521
Mkas GyrA	堪萨斯分枝杆菌(<i>Mycobacterium kansasii</i>)	分类群: 1768
[0088] Mkas-ATCC12478 GyrA	堪萨斯分枝杆菌 ATCC 12478	分类群: 557599
Mle-Br4923 GyrA	麻风分枝杆菌(<i>Mycobacterium leprae</i>) Br4923	分类群: 561304
Mle-TN DnaB	麻风分枝杆菌, 菌株 TN	人病原体, 分类群: 1769
Mle-TN GyrA	麻风分枝杆菌 TN	人病原体, 菌株= TN, 分类群: 1769
Mle-TN RecA	麻风分枝杆菌, 菌株 TN	人病原体, 分类群: 1769
Mle-TN SufB (Mle Pps1)	麻风分枝杆菌	人病原体, 分类群: 1769
Mma GyrA	玛尔摩分枝杆菌(<i>Mycobacterium mageritense</i>)	分类群: 1780
Mmag Magn8951 BIL	向磁磁螺菌(<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>) MS-1	革兰氏阴性, 分类群: 272627
Msh RecA	<i>Mycobacterium shimodei</i>	ATCC27962, 分类群: 29313
Msm DnaB-1	耻垢分枝杆菌(<i>Mycobacterium smegmatis</i>) MC2 155	MC2 155, 分类群: 246196

Msm DnaB-2	耻垢分枝杆菌 MC2 155	MC2 155, 分类群: 246196
Msp-KMS DnaB	分枝杆菌属物种 KMS	分类群: 189918
Msp-KMS GyrA	分枝杆菌属物种 KMS	分类群: 189918
Msp-MCS DnaB	分枝杆菌属物种 MCS	分类群: 164756
Msp-MCS GyrA	分枝杆菌属物种 MCS	分类群: 164756
Mthe RecA	耐高温分枝杆菌 (<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>)	ATCC19527, 分类群: 1797
Mtu SufB (Mtu Pps1)	结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)菌株 H37Rv & CDC1551	人病原体, 分类群: 83332
Mtu-C RecA	结核分枝杆菌 C	分类群: 348776
Mtu-CDC1551 DnaB	结核分枝杆菌, CDC1551	人病原体, 分类群: 83332
Mtu-CPHL RecA	结核分枝杆菌 CPHL_A	分类群: 611303
[0089] Mtu-Canetti RecA	结核分枝杆菌/ 菌株=“Canetti”	分类群: 1773
Mtu-EAS054 RecA	结核分枝杆菌 EAS054	分类群: 520140
Mtu-F11 DnaB	结核分枝杆菌, 菌株 F11	分类群: 336982
Mtu-H37Ra DnaB	结核分枝杆菌 H37Ra	ATCC 25177, 分类群: 419947
Mtu-H37Rv DnaB	结核分枝杆菌 H37Rv	人病原体, 分类群: 83332
Mtu-H37Rv RecA	结核分枝杆菌 H37Rv, 也是 CDC1551	人病原体, 分类群: 83332
Mtu-Haarlem DnaB	结核分枝杆菌菌株 Haarlem	分类群: 395095
Mtu-K85 RecA	结核分枝杆菌 K85	分类群: 611304
Mtu-R604 RecA-n	结核分枝杆菌‘98- R604 INH-RIF-EM’	分类群: 555461
Mtu-So93 RecA	结核分枝杆菌 So93/亚种 =“Canetti”	人病原体, 分类群: 1773
Mtu-T17 RecA-c	结核分枝杆菌 T17	分类群: 537210

	Mtu-T17 RecA-n	结核分枝杆菌 T17	分类群: 537210
	Mtu-T46 RecA	结核分枝杆菌 T46	分类群: 611302
	Mtu-T85 RecA	结核分枝杆菌 T85	分类群: 520141
	Mtu-T92 RecA	结核分枝杆菌 T92	分类群: 515617
	Mvan DnaB	范巴伦分枝杆菌 (<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>) PYR-1	分类群: 350058
	Mvan GyrA	范巴伦分枝杆菌 PYR-1	分类群: 350058
	Mxa RAD25	黄色粘球菌 (<i>Myxococcus xanthus</i>) DK1622	δ -变形菌
	Mxe GyrA	蟾分枝杆菌(<i>Mycobacterium xenopi</i>)菌株 IMM5024	分类群: 1789
	Naz-0708 RIR1-1	满江红念珠藻(<i>Nostoc azollae</i>) 0708	分类群: 551115
	Naz-0708 RIR1-2	满江红念珠藻 0708	分类群: 551115
	Nfa DnaB	皮疽诺卡氏菌(<i>Nocardia farcinica</i>) IFM 10152	分类群: 247156
	Nfa Nfa15250	皮疽诺卡氏菌 IFM 10152	分类群: 247156
[0090]	Nfa RIR1	皮疽诺卡氏菌 IFM 10152	分类群: 247156
	Nosp-CCY9414 DnaE-n	泡沫节球藻 (<i>Nodularia spumigena</i>) CCY9414	分类群: 313624
	Npu DnaB	点形念珠藻	蓝细菌, 分类群: 63737
	Npu GyrB	点形念珠藻	蓝细菌, 分类群: 63737
	Npu-PCC73102 DnaE-c	点形念珠藻 PCC73102	蓝细菌, 分类群: 63737, ATCC29133
	Npu-PCC73102 DnaE-n	点形念珠藻 PCC73102	蓝细菌, 分类群: 63737, ATCC29133
	Nsp-JS614 DnaB	类诺卡氏菌属(<i>Nocardioides</i>)物种 JS614	分类群: 196162
	Nsp-JS614 TOPRIM	类诺卡氏菌属物种 JS614	分类群: 196162
	Nsp-PCC7120 DnaB	念珠藻属物种 PCC7120, (鱼腥藻属物种 PCC7120)	蓝细菌, 固氮, 分类群: 103690
	Nsp-PCC7120 DnaE-c	念珠藻属物种 PCC7120, (鱼腥藻属物种 PCC7120)	蓝细菌, 固氮, 分类群: 103690

Nsp-PCC7120 DnaE-n	念珠藻属物种 PCC7120, (鱼腥藻属 物种 PCC7120)	蓝细菌, 固氮 , 分类群: 103690
Nsp-PCC7120 RIR1	念珠藻属物种 PCC7120, (鱼腥藻属 物种 PCC7120)	蓝细菌, 固氮 , 分类群: 103690
Oli DnaE-c	沼泽颤藻 (<i>Oscillatoria limnetica</i>) 菌株 'Solar Lake'	蓝细菌, 分类群: 262926
Oli DnaE-n	沼泽颤藻菌株'Solar Lake'	蓝细菌, 分类群: 262926
PP-PhiEL 解旋酶	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) 噬菌体	感染铜绿假单胞菌的噬菌体
	phiEL	, 分类群: 273133
PP-PhiEL ORF11	铜绿假单胞菌噬菌体	感染铜绿假单胞菌的噬菌体
	phiEL	, 分类群: 273133
PP-PhiEL ORF39	铜绿假单胞菌噬菌体	感染铜绿假单胞菌的噬菌体
	phiEL	, 分类群: 273133
PP-PhiEL ORF40	铜绿假单胞菌噬菌体	感染铜绿假单胞菌的噬菌体
	phiEL	, 分类群: 273133
[0091] Pfl Fha BIL	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>) Pf-5	植物共生生物体, 分类群: 220664
Plut RIR1	微黄暗网菌(<i>Pelodictyon luteolum</i>) DSM 273	绿色硫细菌, 分类群 319225
Pma-EXH1 GyrA	海珀尔女神菌(<i>Persephonella marina</i>) EX-H1	分类群: 123214
Pma-ExH1 DnaE	海珀尔女神菌 EX-H1	分类群: 123214
Pna RIR1	食茶极单胞菌 (<i>Polaromonas</i> <i>naphthalenivorans</i>) CJ2	分类群: 365044
Pnuc DnaB	多核杆菌属 (<i>Polynucleobacter</i>) 物种 QLW- PIDMWA-1	分类群: 312153
Posp-JS666 DnaB	极地单胞菌属(<i>Polaromonas</i>)物种 JS666	分类群: 296591
Posp-JS666 RIR1	极地单胞菌属物种 JS666	分类群: 296591
Pssp-A1-1 Fha	假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)物种 A1-1	

Psy Fha	丁香假单胞杆菌番茄致病变种 (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato) 菌株 DC3000	植物(番茄)病原体, 分类群: 223283
Rbr-D9 GyrB	<i>Raphidiopsis brookii</i> D9	分类群: 533247
Rce RIR1	<i>Rhodospirillum centenum</i> SW	分类群: 414684, ATCC 51521
Rer-SK121 DnaB	红城红球菌 (<i>Rhodococcus erythropolis</i>) SK121	分类群: 596309
Rma DnaB	海洋红嗜热盐菌(<i>Rhodothermus marinus</i>)	嗜热菌, 分类群: 29549
Rma-DSM4252 DnaB	海洋红嗜热盐菌 DSM 4252	分类群: 518766
Rma-DSM4252 DnaE	海洋红嗜热盐菌 DSM 4252	嗜热菌, 分类群: 518766
Rsp RIR1	玫瑰变色菌属(<i>Roseovarius</i>)物种 217	分类群: 314264
SaP-SETP12 dpol	沙门菌属(<i>Salmonella</i>)噬菌体 SETP12	噬菌体, 分类群: 424946
SaP-SETP3 解旋酶	沙门菌属噬菌体 SETP3	噬菌体, 分类群: 424944
SaP-SETP3 dpol	沙门菌属噬菌体 SETP3	噬菌体, 分类群: 424944
SaP-SETP5 dpol	沙门菌属噬菌体 SETP5	噬菌体, 分类群: 424945
[0092] Sare DnaB	沙栖盐孢菌(<i>Salinispora arenicola</i>) CNS- 205	分类群: 391037
Sav RecG 解旋酶	阿维链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>) MA-4680	分类群: 227882, ATCC 31267
Sel-PC6301 RIR1	细长聚球藻 (<i>Synechococcus elongatus</i>) PCC 6301	分类群: 269084 Berkely 菌株 6301~等价名称: Ssp PCC 6301~同义词: 巢状组囊藻(<i>Anacystis nudulans</i>)
Sel-PC7942 DnaE-c	细长聚球藻 PC7942	分类群: 1140
Sel-PC7942 DnaE-n	细长聚球藻 PC7942	分类群: 1140
Sel-PC7942 RIR1	细长聚球藻 PC7942	分类群: 1140
Sel-PCC6301 DnaE- c	细长聚球藻 PCC 6301 和 PCC7942	蓝细菌, 分类群: 269084, “Berkely 菌株 6301~等价名称: 聚球藻属(<i>Synechococcus</i>)物种 PCC

		6301~同义词: 巢状组囊藻”
Sel-PCC6301 DnaE- n	细长聚球藻 PCC 6301	蓝细菌, 分类群: 269084”Berkely 菌株 6301~等价名称: 聚球藻属物种 PCC 6301~同义词: 巢状组囊藻”
Sep RIR1	表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) RP62A	分类群: 176279
ShP-Sfv-2a-2457T-n 引物酶	福氏志贺氏菌(<i>Shigella flexneri</i>) 2a 菌株 2457T	假定的细菌噬菌体
ShP-Sfv-2a-301-n 引物酶	福氏志贺氏菌 2a 菌株 301	假定的细菌噬菌体
ShP-Sfv-5 引物酶	福氏志贺氏菌 5 菌株 8401	细菌噬菌体, 分离_来源_ 流行病, 分类群: 373384
SoP-SO1 dpol	伴突属(<i>Sodalis</i>)噬菌体 SO-1	噬菌体/分离_来源=“ <i>Sodalis glossinidius</i> 菌株 GA-SG, 奥斯汀舌蝇(<i>Glossina austeni</i>) (Newstead)的次级共生体”
Spl DnaX	钝顶螺旋藻(<i>Spirulina platensis</i>), 菌株 C1	蓝细菌, 分类群: 1156
Sru DnaB	鲁伯盐碱杆菌(<i>Salinibacter ruber</i>) DSM 13855	分类群: 309807, 菌株=“DSM 13855; M31”
Sru PolBc	鲁伯盐碱杆菌 DSM 13855	分类群: 309807, 菌株=“DSM 13855; M31”
Sru RIR1	鲁伯盐碱杆菌 DSM 13855	分类群: 309807, 菌株=“DSM 13855; M31”
Ssp DnaB	集胞藻属物种, 菌株 PCC6803	蓝细菌, 分类群: 1148

[0093]

Ssp DnaE-c	集胞藻属物种, 菌株 PCC6803	蓝细菌, 分类群: 1148
Ssp DnaE-n	集胞藻属物种, 菌株 PCC6803	蓝细菌, 分类群: 1148
Ssp DnaX	集胞藻属物种, 菌株 PCC6803	蓝细菌, 分类群: 1148
Ssp GyrB	集胞藻属物种, 菌株 PCC6803	蓝细菌, 分类群: 1148
Ssp-JA2 DnaB	聚球藻属物种 JA-2-3B'a(2-13)	蓝细菌, 分类群: 321332
Ssp-JA2 RIR1	聚球藻属物种 JA-2-3B'a(2-13)	蓝细菌, 分类群: 321332
Ssp-JA3 DnaB	聚球藻属物种 JA-3-3Ab	蓝细菌, 分类群: 321327
Ssp-JA3 RIR1	聚球藻属物种 JA-3-3Ab	蓝细菌, 分类群: 321327
Ssp-PCC7002 DnaE-c	集胞藻属物种, 菌株 PCC 7002	蓝细菌, 分类群: 32049
Ssp-PCC7002 DnaE-n	集胞藻属物种, 菌株 PCC 7002	蓝细菌, 分类群: 32049
Ssp-PCC7335 RIR1	聚球藻属物种 PCC 7335	分类群: 91464
StP-Twort ORF6	葡萄球菌属 (<i>Staphylococcus</i>) 噬菌体 Twort	噬菌体, 分类群 55510
Susp-NBC371 DnaB 内含肽	硫卵菌属(<i>Sulfurovum</i>)物种 NBC37-1	分类群: 387093
Taq-Y51MC23 DnaE	水生栖热菌 (<i>Thermus aquaticus</i>) Y51MC23	分类群: 498848
Taq-Y51MC23 RIR1	水生栖热菌 Y51MC23	分类群: 498848
Tcu-DSM43183 RecA	弯曲高温单孢菌 (<i>Thermomonospora curvata</i>) DSM 43183	分类群: 471852
Tel DnaE-c	细长嗜热聚球藻 (<i>Thermosynechococcus elongatus</i>) BP-1	蓝细菌, 分类群: 197221
Tel DnaE-n	细长嗜热聚球藻 BP-1	蓝细菌,
Ter DnaB-1	红海束毛藻 (<i>Trichodesmium erythraeum</i>) IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124

[0094]

	Ter DnaB-2	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter DnaE-1	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter DnaE-2	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter DnaE-3c	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter DnaE-3n	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter GyrB	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter Ndse-1	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter Ndse-2	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter RIR1-1	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter RIR1-2	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter RIR1-3	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter RIR1-4	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter Snf2	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
	Ter ThyX	红海束毛藻 IMS101	蓝细菌, 分类群: 203124
[0095]	Tfus RecA-1	褐色喜热裂孢菌(<i>Thermobifida fusca</i>) YX	嗜热菌, 分类群: 269800
	Tfus RecA-2	褐色喜热裂孢菌 YX	嗜热菌, 分类群: 269800
	Tfus Tfu2914	褐色喜热裂孢菌 YX	嗜热菌, 分类群: 269800
	Thsp-K90 RIR1	硫碱弧菌属(<i>Thioalkalivibrio</i>) 物种 K90mix	分类群: 396595
	Tth-DSM571 RIR1	热解糖热厌氧杆菌(<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>) DSM 571	分类群: 580327
	Tth-HB27 DnaE-1	嗜热栖热菌(<i>Thermus thermophilus</i>) HB27	嗜热菌, 分类群: 262724
	Tth-HB27 DnaE-2	嗜热栖热菌 HB27	嗜热菌, 分类群: 262724
	Tth-HB27 RIR1-1	嗜热栖热菌 HB27	嗜热菌, 分类群: 262724
	Tth-HB27 RIR1-2	嗜热栖热菌 HB27	嗜热菌, 分类群: 262724
	Tth-HB8 DnaE-1	嗜热栖热菌 HB8	嗜热菌, 分类群: 300852
	Tth-HB8 DnaE-2	嗜热栖热菌 HB8	嗜热菌, 分类群: 300852
	Tth-HB8 RIR1-1	嗜热栖热菌 HB8	嗜热菌, 分类群: 300852
	Tth-HB8 RIR1-2	嗜热栖热菌 HB8	嗜热菌, 分类群: 300852
	Tvu DnaE-c	<i>Thermosynechococcus vulcanus</i>	蓝细菌, 分类群: 32053
	Tvu DnaE-n	<i>Thermosynechococcus vulcanus</i>	蓝细菌, 分类群: 32053
	Tyc RNR-1	黄石热脱硫弧菌(<i>Thermodesulfobivrio</i>)	分类群: 289376

	<i>yellowstonii</i>	
	DSM 11347	
Tye RNR-2	黄石热脱硫弧菌	分类群: 289376
	DSM 11347	
古细菌		
Ape APE0745	敏捷气热菌(<i>Aeropyrum pernix</i>) K1	嗜热菌, 分类群: 56636
Cmc-boo Pol-II	暂定种 <i>Methanoregula boonei</i>	分类群: 456442
	6A8	
Fac-Fer1 RIR1	<i>Ferroplasma acidarmanus</i> ,	菌株 Fer1, 吃铁
	分类群: 97393 和分类群 261390	
Fac-Fer1 SufB (Fac	<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	菌株 fer1, 吃铁
Pps1)		, 分类群: 97393
Fac-I 型 RIR1	<i>Ferroplasma acidarmanus</i> I 型,	吃铁, 分类群 261390
Fac-I 型 SufB (Fac	<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	吃铁, 分类群: 261390
Pps1)		
Hma CDC21	死海盐盒菌 (<i>Haloarcula marismortui</i>)	分类群: 272569,
[0096]	ATCC	
	43049	
Hma Pol-II	死海盐盒菌 ATCC	分类群: 272569,
	43049	
Hma PolB	死海盐盒菌 ATCC	分类群: 272569,
	43049	
Hma TopA	死海盐盒菌 ATCC	分类群: 272569
	43049	
Hmu-DSM12286	康夫氏盐微菌 (<i>Halomicrobium mukohataei</i>) DSM	分类群: 485914 (盐杆菌属
MCM	12286	(<i>Halobacteria</i>))
Hmu-DSM12286	康夫氏盐微菌 DSM	分类群: 485914
PolB	12286	
Hsa-R1 MCM	盐沼盐杆菌(<i>Halobacterium salinarum</i>) R-	嗜盐菌,
	1	
		分类群: 478009, 菌株=“R1;
		DSM 671”

	Hsp-NRC1 CDC21	盐杆菌属(<i>Halobacterium</i>)物种 NRC-1	嗜盐菌, 分类群: 64091
	Hsp-NRC1 Pol-II	盐沼盐杆菌 NRC-1	嗜盐菌, 分类群: 64091
	Hut MCM-2	<i>Halorhabdus utahensis</i> DSM 12940	分类群: 519442
	Hut-DSM12940 MCM- 1	<i>Halorhabdus utahensis</i> DSM 12940	分类群: 519442
	Hvo PolB	沃氏富盐菌(<i>Haloferax volcanii</i>) DS70	分类群: 2246
	Hwa GyrB	窝氏盐方扁平古菌 (<i>Haloquadratum walsbyi</i>) DSM 16790	嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 = HBSQ001
	Hwa MCM-1	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 = HBSQ001
	Hwa MCM-2	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 = HBSQ001
[0097]	Hwa MCM-3	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 = HBSQ001
	Hwa MCM-4	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 = HBSQ001
	Hwa Pol-II-1	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 = HBSQ001
	Hwa Pol-II-2	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 = HBSQ001
	Hwa PolB-1	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 = HBSQ001
	Hwa PolB-2	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 =

	Hwa PolB-3	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	HBSQ001 嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 =
	Hwa RCF	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	HBSQ001 嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 =
	Hwa RIR1-1	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	HBSQ001 嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 =
	Hwa RIR1-2	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	HBSQ001 嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 =
	Hwa Top6B	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	HBSQ001 嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 =
[0098]	Hwa rPol A"	窝氏盐方扁平古菌 DSM 16790	HBSQ001 嗜盐菌, 分类群: 362976, 菌株: DSM 16790 =
	Mao Pol-II	<i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3	分类群: 419665
	Mao RFC	<i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3	分类群: 419665
	Mao RNR	<i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3	分类群: 419665
	Mao-N3 解旋酶	<i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3	分类群: 419665
	Mao-N3 RtcB	<i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3	分类群: 419665
	Mao-N3 UDP GD	<i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3	分类群: 419665
	Mein-ME PEP	<i>Methanocaldococcus infernus</i> ME	嗜热菌, 分类群: 573063
	Mein-ME RFC	<i>Methanocaldococcus infernus</i> ME	分类群: 573063
	Memar MCM2	黑海甲烷袋状菌 (<i>Methanoculleus marisnigri</i>) JR1	分类群: 368407
	Memar Pol-II	黑海甲烷袋状菌 JR1	分类群: 368407
	Mesp-FS406 PolB-1	甲烷暖球菌属(<i>Methanocaldococcus</i>)物种 FS406-22	分类群: 644281
	Mesp-FS406 PolB-2	甲烷暖球菌属物种 FS406-22	分类群: 644281

Mesp-FS406 PolB-3	甲烷暖球菌属物种 FS406-22	分类群: 644281
Mesp-FS406-22 LHR	甲烷暖球菌属物种 FS406-22	分类群: 644281
Mfe-AG86 Pol-1	沸泉甲烷热球菌 (<i>Methanocaldococcus fervens</i>) AG86	分类群: 573064
Mfe-AG86 Pol-2	沸泉甲烷热球菌 AG86	分类群: 573064
Mhu Pol-II	亨氏甲烷螺菌 (<i>Methanospirillum hungatei</i>) JF-1	分类群: 323259
Mja GF-6P	詹氏甲烷球菌 (<i>Methanococcus jannaschii</i>) 嗜热菌, DSM 2661, (詹氏甲烷暖球菌 (<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> DSM 2661))	分类群: 2190
Mja 解旋酶	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja Hyp-1	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
[0099] Mja IF2	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja KlbA	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja PEP	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja Pol-1	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja Pol-2	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja RFC-1	詹氏甲烷球菌	嗜热菌, DSM 2661,

	(詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	分类群: 2190
Mja RFC-2	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja RFC-3	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja RNR-1	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja RNR-2	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja RtcB (Mja Hyp- 2)	詹氏甲烷球菌	嗜热菌, DSM 2661,
[0100]	(詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	分类群: 2190
Mja TFIIB	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja UDP GD	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja r-Gyr	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja rPol A'	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190
Mja rPol A''	詹氏甲烷球菌 (詹氏甲烷暖球菌 DSM 2661)	嗜热菌, DSM 2661, 分类群: 2190

[0101]	Mka CDC48	坎德勒氏甲烷嗜热菌 (<i>Methanopyrus kandleri</i>) AV19	嗜热菌, 分类群: 190192
	Mka EF2	坎德勒氏甲烷嗜热菌 AV19	嗜热菌, 分类群: 190192
	Mka RFC	坎德勒氏甲烷嗜热菌 AV19	嗜热菌, 分类群: 190192
	Mka RtcB	坎德勒氏甲烷嗜热菌 AV19	嗜热菌, 分类群: 190192
	Mka VatB	坎德勒氏甲烷嗜热菌 AV19	嗜热菌, 分类群: 190192
	Mth RIR1	热自养甲烷嗜热杆菌 (<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>) (嗜热自养甲烷杆菌(<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>))	嗜热菌, δ H 菌株
	Mvu-M7 解旋酶	火山甲烷暖球菌 (<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>) M7	分类群: 579137
	Mvu-M7 Pol-1	火山甲烷暖球菌 M7	分类群: 579137
	Mvu-M7 Pol-2	火山甲烷暖球菌 M7	分类群: 579137
	Mvu-M7 Pol-3	火山甲烷暖球菌 M7	分类群: 579137
	Mvu-M7 UDP GD	火山甲烷暖球菌 M7	分类群: 579137
	Neq Pol-c	骑行纳古菌 (<i>Nanoarchaeum equitans</i>) Kin4-M	嗜热菌, 分类群: 228908
	Neq Pol-n	骑行纳古菌 Kin4-M	嗜热菌, 分类群: 228908
	Nma-ATCC43099	马加蒂湖无色需钠菌 (<i>Natrialba magadii</i>) ATCC 43099	分类群: 547559
	MCM		
	Nma-ATCC43099	马加蒂湖无色需钠菌 ATCC 43099	分类群: 547559
	PolB-1		
	Nma-ATCC43099	马加蒂湖无色需钠菌 ATCC 43099	分类群: 547559
	PolB-2		
	Nph CDC21	法老嗜盐碱单胞菌 (<i>Natronomonas pharaonis</i>) DSM 2160	分类群: 348780
	Nph PolB-1	法老嗜盐碱单胞菌 DSM 2160	分类群: 348780
	Nph PolB-2	法老嗜盐碱单胞菌 DSM 2160	分类群: 348780
	Nph rPol A"	法老嗜盐碱单胞菌 DSM 2160	分类群: 348780
	Pab CDC21-1	深渊热球菌 (<i>Pyrococcus abyssi</i>)	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292

	Pab CDC21-2	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab IF2	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab KlbA	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab Lon	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab Moaa	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab Pol-II	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab RFC-1	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab RFC-2	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
[0102]	Pab RIR1-1	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab RIR1-2	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab RIR1-3	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab RtcB (Pab Hyp-2)	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Pab VMA	深渊热球菌	嗜热菌, 菌株 Orsay, 分类群: 29292
	Par RIR1	砷化热棒菌 (<i>Pyrobaculum arsenaticum</i>) DSM 13514	分类群: 340102
	Pfu CDC21	激烈火球菌 (<i>Pyrococcus furiosus</i>)	嗜热菌, 分类群: 186497, DSM3638
	Pfu IF2	激烈火球菌	嗜热菌, 分类群: 186497,

		DSM3638
Pfu KlbA	激烈火球菌	嗜热菌, 分类群: 186497, DSM3638
Pfu Lon	激烈火球菌	嗜热菌, 分类群: 186497, DSM3638
Pfu RFC	激烈火球菌	嗜热菌, DSM3638, 分类群: 186497
Pfu RIR1-1	激烈火球菌	嗜热菌, 分类群: 186497, DSM3638
Pfu RIR1-2	激烈火球菌	嗜热菌, 分类群: 186497, DSM3638
Pfu RtcB (Pfu Hyp-2)	激烈火球菌	嗜热菌, 分类群: 186497, DSM3638
Pfu TopA	激烈火球菌	嗜热菌, 分类群: 186497, DSM3638
Pfu VMA	激烈火球菌	嗜热菌, 分类群: 186497, DSM3638
[0103]		
Pho CDC21-1	掘越氏火球菌 (<i>Pyrococcus horikoshii</i>) OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho CDC21-2	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho IF2	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho KlbA	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho LHR	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho Lon	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho Pol I	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho Pol-II	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho RFC	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho RIR1	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho RadA	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho RtcB (Pho Hyp-2)	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho VMA	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953
Pho r-Gyr	掘越氏火球菌 OT3	嗜热菌, 分类群: 53953

[0104]	Psp-GBD Pol	火球菌属(<i>Pyrococcus</i>)物种 GB-D	嗜热菌
	Pto VMA	<i>Picrophilus torridus</i> , DSM 9790	DSM 9790, 分类群: 263820, 嗜热嗜酸菌
	Smar 1471	海葡萄嗜热菌(<i>Staphylothermus marinus</i>) F1	分类群: 399550
	Smar MCM2	海葡萄嗜热菌 F1	分类群: 399550
	Tac-ATCC25905 VMA	嗜酸热原体 (<i>Thermoplasma acidophilum</i>), ATCC 25905	嗜热菌, 分类群: 2303
	Tac-DSM1728 VMA	嗜酸热原体, DSM1728	嗜热菌, 分类群: 2303
	Tag Pol-1 (Tsp-TY Pol-1)	成团耐热球菌(<i>Thermococcus aggregans</i>)	嗜热菌, 分类群: 110163
	Tag Pol-2 (Tsp-TY Pol-2)	成团耐热球菌	嗜热菌, 分类群: 110163
	Tag Pol-3 (Tsp-TY Pol-3)	成团耐热球菌	嗜热菌, 分类群: 110163
	Tba Pol-II	嗜压热球菌(<i>Thermococcus barophilus</i>) MP	分类群: 391623
	Tfu Pol-1	<i>Thermococcus fumicolans</i>	嗜热菌, 分类群: 46540
	Tfu Pol-2	<i>Thermococcus fumicolans</i>	嗜热菌, 分类群: 46540
	Thy Pol-1	热水管热球菌 (<i>Thermococcus hydrothermalis</i>)	嗜热菌, 分类群: 46539
	Thy Pol-2	热水管热球菌	嗜热菌, 分类群: 46539
	Tko CDC21-1	柯达热球菌 (<i>Thermococcus kodakaraensis</i>) KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko CDC21-2	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko 解旋酶	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko IF2	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko K1bA	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko LHR	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko Pol-1 (Pko Pol-1)	<i>Pyrococcus</i> /柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014

[0105]	Tko Pol-2 (Pko Pol-2)	<i>Pyrococcus</i> /柯达热球菌	嗜热菌, 分类群: 69014
		KOD1	
	Tko Pol-II	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko RFC	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko RIR1-1	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko RIR1-2	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko RadA	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko TopA	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tko r-Gyr	柯达热球菌 KOD1	嗜热菌, 分类群: 69014
	Tli Pol-1	利托氏热球菌(<i>Thermococcus litoralis</i>)	嗜热菌, 分类群: 2265
	Tli Pol-2	利托氏热球菌	嗜热菌, 分类群: 2265
	Tma Pol	<i>Thermococcus marinus</i>	分类群: 187879
	Ton-NA1 LHR	<i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	分类群: 523850
	Ton-NA1 Pol	<i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	分类群: 342948
	Tpe Pol	嗜 热 球 菌 (<i>Thermococcus peptonophilus</i>)菌株	分类群: 32644
		SM2	
	Tsi-MM739 Lon	西伯利亚热球菌(<i>Thermococcus sibiricus</i>) MM 739	嗜热菌, 分类群: 604354
	Tsi-MM739 Pol-1	西伯利亚热球菌 MM 739	分类群: 604354
	Tsi-MM739 Pol-2	西伯利亚热球菌 MM 739	分类群: 604354
	Tsi-MM739 RFC	西伯利亚热球菌 MM 739	分类群: 604354
	Tsp AM4 RtcB	热球菌属(<i>Thermococcus</i>)物种 AM4	分类群: 246969
	Tsp-AM4 LHR	热球菌属物种 AM4	分类群: 246969
	Tsp-AM4 Lon	热球菌属物种 AM4	分类群: 246969
	Tsp-AM4 RIR1	热球菌属物种 AM4	分类群: 246969
	Tsp-GE8 Pol-1	热球菌属物种 GE8	嗜热菌, 分类群: 105583
	Tsp-GE8 Pol-2	热球菌属物种 GE8	嗜热菌, 分类群: 105583
	Tsp-GT Pol-1	热球菌属物种 GT	分类群: 370106
	Tsp-GT Pol-2	热球菌属物种 GT	分类群: 370106
	Tsp-UGL-20P Pol	热球菌属物种 UGL-20P	分类群: 277988
	Tthi Pol	硫 还 原 热 球 菌 (<i>Thermococcus</i> 超嗜热菌	

	<i>thioreducens</i>)	
Tvo VMA	火山热原体 (<i>Thermoplasma volcanium</i>) GSS1	嗜热菌, 分类群: 50339
Tzi Pol	<i>Thermococcus zilligii</i>	分类群: 54076
Unc-ERS PFL	未培养的古细菌 Gzfos13E1	分离_来源=“Eel River 沉积物”, 克隆=“GZfos13E1”, 分类群: 285397
Unc-ERS RIR1	未培养的古细菌 GZfos9C4	分离_来源=“Eel River 沉积物”, 分类群: 285366, 克隆=“GZfos9C4”
Unc-ERS RNR	未培养的古细菌 GZfos10C7	分离_来源=“Eel River 沉积物”, 克隆=“GZfos10C7”, 分类群: 285400
Unc-MetRFS MCM2	未培养的古细菌(稻簇 I)	来自稻田土壤的 富集产甲烷菌聚生体 , 分类群: 198240

[0107] 所公开的组合物断裂内含肽或可以用于所公开的方法中的断裂内含肽可以是修饰或突变的内含肽。修饰的内含肽可以包含对N末端内含肽区段、C末端内含肽区段或两者的修饰。修饰可以包括在断裂内含肽的任一部分的N末端、C末端处的另外氨基酸,或者修饰可以在断裂内含肽的任一部分内。表2显示了氨基酸列表、其缩写、极性和电荷。

[0108] 表2- 氨基酸列表

3 字母代码 1 字母代码

氨基酸			极性	电荷
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性
精氨酸	Arg	R	碱性	正
			极性	
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性
天冬氨酸	Asp	D	酸性	负
			极性	
半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性
谷氨酸	Glu	E	酸性	负
			极性	
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性
[0109] 组氨酸	His	H	碱性	正(10%)
			极性	中性(90%)
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性
赖氨酸	Lys	K	碱性	正
			极性	
甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性
苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性
丝氨酸	Ser	S	极性	中性
苏氨酸	Thr	T	极性	中性
色氨酸	Trp	W	非极性	中性
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性
缬氨酸	Val	V	非极性	中性

[0110] 优选地,本发明提供了点形念珠藻(Npu)的天然N-内含肽结构域的N-内含肽蛋白质变体,其中所述天然N-内含肽结构域具有下述序列:CLSYETEILTVEYGLLP I G K I V E K R I E C T V Y S V D N N G N I Y T Q P V A Q W H D R G E Q E V F E Y C L E D G S L I R A T K D H K F M T V D G Q M L P I D E I F E R E L D L M R V (SEQ ID

NO: 1)

[0111] 其中所述蛋白质变体包含在SEQ ID NO: 1的位置36处的天冬酰胺(N)用以下氨基酸进行的氨基酸取代:与SEQ ID NO: 1的天然N-内含肽的碱稳定性相比,所述氨基酸增加N-内含肽蛋白质变体的碱稳定性。

[0112] 优选地,本发明提供了SEQ ID NO: 1的N-内含肽蛋白质变体,其中所述蛋白质变体包含在SEQ ID NO: 1的位置1处的半胱氨酸(C)取代为并非半胱氨酸的任何其它氨基酸的氨基酸取代,加上在SEQ ID NO: 1的位置36处的天冬酰胺(N)用以下氨基酸进行的氨基酸取代:与SEQ ID NO: 1的天然N-内含肽的碱稳定性相比,所述氨基酸增加N-内含肽蛋白质变体的碱稳定性。

[0113] 本发明还提供了参考蛋白的N-内含肽蛋白质变体,其中所述参考蛋白与SEQ ID NO: 1具有至少约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,并且优选地其中所述参考蛋白与SEQ ID NO: 1具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,并且其中本发明的N-内含肽蛋白质变体包含在参考蛋白的位置36处的天冬酰胺(N)用以下氨基酸进行的氨基酸取代:与SEQ ID NO: 1的天然N-内含肽的碱稳定性相比,所述氨基酸增加N-内含肽蛋白质变体的碱稳定性。

[0114] 在另一个实施方案中,N-内含肽包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列,其是N-内含肽共有衍生序列。基于SEQ ID NO: 2的N-内含肽变体序列还包含在位置36处的除N外的氨基酸,与SEQ ID NO: 1的天然N-内含肽的碱稳定性相比,所述氨基酸增加N-内含肽蛋白质变体的碱稳定性。优选地,增加碱稳定性的氨基酸是与天冬酰胺(N)相比对脱酰胺作用较不敏感的氨基酸。SEQ ID NO: 2的氨基酸序列如下:

[0115] ALSYDTEILTVEYGFLPIGXIVEEXIEXTVYSVDXXGFFVYTQPIAQWHNRGEQEVFEYXLEDGSIIRA
TXDHXFMTTDGXMLPIDEIFEXGLDLXQV (SEQ ID NO: 2)

[0116] 其中

[0117] 在位置20、35、70、73和95中的X各自独立地选自K、R或A;

[0118] 在位置28中的X是C、A或S;

[0119] 在位置36中的X是N、H或Q;

[0120] 在位置25中的X是N或R;

[0121] 在位置59中的X是D或C;

[0122] 在位置80中的X是E或Q;和

[0123] 在位置90中的X是Q、R或K。

[0124] 按照本发明的N-内含肽的优选实施方案选自本文称为A48、B22、B72和A41的N-内含肽变体组,其中:

[0125] A48具有SEQ ID NO: 2的序列,其中:

[0126] 在位置20、35、70、73和95中的X是R;

[0127] 在位置28中的X是A;

[0128] 在位置36中的X是H;

[0129] 在位置25中的X是N;

[0130] 在位置59中的X是D;

[0131] 在位置80中的X是E;和

- [0132] 在位置90中的X是Q;
- [0133] B22具有SEQ ID NO: 2的序列,其中:
- [0134] 在位置20、35、70、73和95中的X是A;
- [0135] 在位置28中的X是A;
- [0136] 在位置36中的X是H;
- [0137] 在位置25中的X是N;
- [0138] 在位置59中的X是D;
- [0139] 在位置80中的X是E;和
- [0140] 在位置90中的X是Q;
- [0141] B72具有SEQ ID NO: 2的序列,其中:
- [0142] 在位置20、35、70、73和95中的X是K;
- [0143] 在位置28中的X是C;
- [0144] 在位置36中的X是H;
- [0145] 在位置25中的X是N;
- [0146] 在位置59中的X是D;
- [0147] 在位置80中的X是E;和
- [0148] 在位置90中的X是Q
- [0149] A40具有SEQ ID NO: 2的序列,其中:
- [0150] 在位置20、35、70、73和95中的X是R;
- [0151] 在位置28中的X是A;
- [0152] 在位置36中的X是N;
- [0153] 在位置25中的X是N;
- [0154] 在位置59中的X是D;
- [0155] 在位置80中的X是E;和
- [0156] 在位置90中的X是Q。
- [0157] A41具有SEQ ID NO: 2的序列,其中:
- [0158] 在位置20、35、70、73和95中的X是K;
- [0159] 在位置28中的X是A;
- [0160] 在位置36中的X是N;
- [0161] 在位置25中的X是N;
- [0162] 在位置59中的X是D;
- [0163] 在位置80中的X是E;和
- [0164] 在位置90中的X是Q;
- [0165] 比较配体A53,具有SEQ ID NO: 2的序列,其中:
- [0166] 在位置20、35、70、73和95中的X是K;
- [0167] 在位置28中的X是C;
- [0168] 在位置36中的X是N;
- [0169] 在位置25中的X是N;
- [0170] 在位置59中的X是D;

[0171] 在位置80中的X是E;和

[0172] 在位置90中的X是Q。

[0173] 本发明的N-内含肽可以与固相例如膜、纤维、颗粒、珠或芯片偶联。固相可以是天然或合成起源的层析树脂,例如天然或合成树脂,优选多糖例如琼脂糖。固相例如层析树脂可以提供有嵌入的磁性颗粒。在另一个实施方案中,固相是非扩散限制树脂/纤维材料。

[0174] 在这种情况下,固相可以由一种或多种聚合物纳米纤维基材例如静电纺聚合物纳米纤维形成。用于本发明中的聚合物纳米纤维通常具有10 nm至1000 nm的平均直径。聚合物纳米纤维的长度没有特别限制。聚合物纳米纤维可以适当地是单丝纳米纤维,并且可以例如具有圆形、椭圆形或基本圆形/椭圆形的横截面。通常,一种或多种聚合物纳米纤维以一种或多种非织造片材的形式提供,每个非织造片材包含一种或多种聚合物纳米纤维。包含一种或多种聚合物纳米纤维的非织造片材是所述一种或多种聚合物纳米纤维的垫子,其中每种纳米纤维基本随机取向,即它没有被制造成使得一种或多种纳米纤维采取特定模式。非织造片材通常具有1至40 g/m²的面积密度。非织造片材通常具有5至120 μm的厚度。聚合物应该是在层析方法中适合于用作层析介质,即吸附剂的聚合物。合适的聚合物包括聚酰胺,例如尼龙、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚丙烯腈、聚苯乙烯、聚砜例如聚醚砜(PES)、聚己内酯、胶原、壳聚糖、聚环氧乙烷、琼脂糖、乙酸琼脂糖、纤维素、乙酸纤维素及其组合。

[0175] 根据本发明的N-内含肽可以以非常高的程度固定到固体支持物上,每ml树脂(溶胀凝胶)偶联0.2 -2 μmole/ml N-内含肽。

[0176] 根据本发明的N-内含肽可以经由在C末端上的Lys尾与固相偶联,所述Lys尾包含一个或多个,例如至少两个Lys。可替代地,N-内含肽经由在C末端上的Cys尾与固相偶联。

[0177] C-内含肽蛋白质变体

[0178] 优选地,本发明还提供了C-内含肽,其包含如下的下述序列SEQ ID NO 3:

[0179] VKIVSRKSLGVQNVYDIGVEKDHNFLLANGLIASN (SEQ ID NO: 3)

[0180] 或与其具有至少50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的序列,且优选与其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的序列。

[0181] 应了解,N-内含肽和C-内含肽的选择可以来自相同的野生型断裂内含肽(例如,两者均来自Npu,或者N-内含肽或C-内含肽的变体,或者可替代地可以选自不同的野生型断裂内含肽或共有断裂内含肽序列,因为已发现N片段对于不同C片段(例如,Npu N片段或其变体对于Ssp C片段或其变体)的亲和力仍然维持足够的结合亲和力,以用于所公开的方法中。

[0182] 包含本发明的内含肽变体的载体

[0183] 在第三个方面,本发明涉及包含上述SEQ ID NO: 3的C-内含肽和编码目的蛋白质(POI)的基因的载体。本文还公开的是包含编码C末端内含肽区段的核酸的载体,以及包含所述载体的细胞系。如本文使用的,质粒或病毒载体是将所公开的核酸(例如编码C末端内含肽区段和目的肽的那些核酸)转运到细胞中而不降解的试剂,并且包括在它们可以递送到其内的细胞中产生基因表达的启动子。在一个实例中,C末端内含肽区段和目的肽衍生自病毒或逆转录病毒。与其它病毒载体相比,逆转录病毒载体能够携带更大的遗传有效载荷,即转基因或标记物基因,并且因此是常用的载体。然而,它们在非增殖细胞中没有那么有用。腺病毒载体是相对稳定且易于操作的,具有高滴度,并且可以以气溶胶制剂递送,并且

可以转染非分裂细胞。痘病毒载体很大,并且具有用于插入基因的几个位点;它们是耐热的,并且可以在室温下贮存。

[0184] 断裂内含肽系统

[0185] 优选地,本发明提供了用于目的蛋白质(POI)的亲纯化断裂内含肽系统,其包含如上所述的N-内含肽和C-内含肽。

[0186] 优选地,N-内含肽包含N36H突变用于增加的碱稳定性。

[0187] 优选地,N-内含肽附着到固相,并且C-内含肽与POI共表达,并且用作用于POI的亲纯化的标签。反之也是可能的,即将C-内含肽附着到固相并使用N-内含肽作为标签,但前者是优选的。

[0188] 根据本发明的断裂内含肽系统中的N-内含肽配体的碱稳定性使得能够在POI从固相中切割后,在碱性条件例如0.05-0.5 M NaOH下再生。固相可以再生多达100次。

[0189] 在一个实施方案中,C-内含肽和附加标签与POI共表达。附加标签可以是任何常规层析标签,例如IEX标签或亲和标签。

[0190] 纯化目的蛋白质(POI)的方法

[0191] 在第五个方面,本发明涉及使用根据本发明的断裂内含肽系统纯化目的蛋白质(POI)的方法,其包括在中性pH例如6-8下,以及在二价阳离子(其削弱自发切割)的存在下,C-内含肽和N-内含肽结合;在二价阳离子的存在下,洗涤所述固相;添加螯合剂,以允许C-内含肽和POI之间的自发切割;收集无标签的POI;并且在碱性条件例如0.5M NaOH下,使所述固相再生。

[0192] 该方案适合于对于Zn不敏感的蛋白质。优点是允许与树脂的长接触时间和大样品体积的添加。样品装载可以进行很长时间,例如长达1.5小时。

[0193] 根据本发明,在少于4小时的切割中获得多于30%,优选50%,最优选多于80%的POI产率。

[0194] 当N-内含肽固定到固相时,本发明使得高配体密度成为可能。优选地,N-内含肽附着至层析树脂例如琼脂糖或用于蛋白质纯化的任何其它合适树脂。根据本发明,实现0.2 - 2 $\mu\text{mole/ml}$ C-内含肽结合的POI/沉降的ml树脂的静态结合容量是可能的。

[0195] 亲和标签

[0196] 本发明还涉及用于纯化目的蛋白质(POI)的方法,其包括下述步骤:将POI与根据本发明的C-内含肽和附加标签共表达;使所述附加标签与其在固相上的结合配偶体结合;切下POI和C-内含肽;在中性pH下,使所述C-内含肽与附着于固相的N-内含肽结合,并且从所述POI中切下所述结合的C-内含肽和N-内含肽;并且在碱性条件例如0.5M NaOH下,使所述固相再生。这种双标签的目的:增加纯度(使得双重亲和纯化成为可能)、溶解度、可检测性。

[0197] 亲和标签可以是与改变蛋白质行为的蛋白质编码序列符合读框地克隆的肽或蛋白质序列。亲和标签可以附加到蛋白质的N或C末端,其可以用于从细胞纯化蛋白质的方法中。表达包含亲和标签的肽的细胞可以在上清液/细胞培养基中与信号序列一起表达。表达包含亲和标签的肽的细胞也可以进行沉淀、裂解,并且将细胞裂解物施加到柱、树脂或其它固体支持物,其展示针对亲和标签的配体。亲和标签和任何融合的肽都与固体支持物结合,所述固体支持物也可以用缓冲液洗涤几次,以消除未结合的(污染)蛋白质。如果附着到亲

和标签,则目的蛋白质可以经由缓冲液从固体支持物中洗脱,其促使亲和和标签与配体解离,导致纯化的蛋白质,或者可以使用可溶性蛋白酶,从结合的亲和和标签中切割。如本文公开的,亲和和标签通过活性内含肽复合物中的C-内含肽区段的自切割机制进行切割。

[0198] 亲和性的实例包括但不限于麦芽糖结合蛋白,其可以结合固定的麦芽糖,以促进融合靶蛋白的纯化;几丁质结合蛋白,其可以与固定的几丁质结合;谷胱甘肽S转移酶,其可以与固定的谷胱甘肽结合;多组氨酸,其可以与固定的螯合金属结合;FLAG八肽,其可以与固定的抗FLAG抗体结合。

[0199] 亲和和标签也可以通过各种方法,使用所公开的修饰的肽,用于促进目的蛋白质的纯化,所述方法包括但不限于选择性沉淀、离子交换层析、与能够沉淀的配体结合、透析(通过改变靶蛋白的大小和/或电荷)和其它高选择性分离方法。

[0200] 在一些方面,可以使用这样的亲和和标签,其实际上并不与配体结合,而是选择性地沉淀或充当固定的相应结合结构域的配体。在这些情况下,标签更一般地被称为纯化标签。例如,ELP标签在特定的盐和温度条件下选择性沉淀,允许通过离心纯化融合肽。另一个实例是抗体Fc结构域,其充当固定的蛋白A或蛋白G结合结构域的配体。

[0201] 目的蛋白质

[0202] 用于所有方案的靶蛋白是:任何重组蛋白质,尤其是需要天然或接近天然的N末端序列的蛋白质,例如治疗性蛋白质候选物、生物制品、抗体片段、抗体模拟物、蛋白质支架、酶、重组蛋白质或肽,例如生长因子、细胞因子、趋化因子、激素、抗原(病毒、细菌、酵母、哺乳动物)生产、疫苗生产、细胞表面受体、融合蛋白。

[0203] 现在将结合一些非限制性实例和附图更确切地描述本发明。

实施例

[0204] 实验1:本发明的N-内含肽配体的碱稳定性

[0205] 将根据本发明的N-内含肽配体A40、A41和A48固定到Biacore™ CM5传感器芯片(Cytiva,瑞典),其量足以给出约450个响应单位(RU)或更高的固定水平。为了跟踪加上C-内含肽标签的POI与固定表面的相对结合容量,将20 µg/ml加上C-内含肽(SEQ ID NO: 3)标签的绿色荧光蛋白(GFP)流过芯片1分钟,并且记录信号强度。然后将表面原位清洁(CIP),即在室温22 ± 3°C下,用100 mM NaOH、4 M胍-HCl冲洗10分钟。这重复50个循环,并且在每个循环后跟踪固定配体的碱稳定性,作为相对加上C-内含肽标签的GFP结合容量(信号强度)的相对损失。

[0206] 结果显示于图1中,并且指示了与配体A41和A40相比,配体A48(具有N36H突变)具有改善的碱稳定性。与天然序列相比,碱稳定性得到进一步改善。另外,与野生型Npu N-内含肽序列相比,N36H突变显著改善了碱稳定性(与SEQ ID NO: 1相比,具有C1A突变的A52)。

[0207] 在50个CIP循环后,A40和A41的相对剩余结合容量(%)为55%,而对于A48为69%。使用0.5 M NaOH的碱稳定性显示于图5中。

[0208] 图5显示了A40和A48在20个循环期间的结果。相对剩余结合容量(%)

[0209] CIP:2分钟。100 mM NaOH, 4 M Gdn-HCl,然后为2分钟0.5 M NaOH。

[0210] 实验2:本发明的N-内含肽配体的碱稳定性

[0211] 将纯化的N-内含肽配体A53、B72、B22和A48固定到Biacore™ CM5传感器芯片

(Cytiva, 瑞典), 其量足以给出约450个响应单位(RU)或更高的固定水平。为了跟踪不可切割的加上C-内含肽标签的POI与固定表面的相对结合容量, 将20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 不可切割的加上C-内含肽 (SEQ ID NO: 3) 标签的IL-1b流过芯片1分钟, 并且记录信号强度。然后将表面原位清洁(CIP), 即在室温 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 下, 用100 mM NaOH、4 M胍-HCl冲洗10分钟。这重复50个循环, 并且在每个循环后跟踪固定配体的碱稳定性, 作为不可切割的加上C-内含肽标签的IL-1b结合容量(信号强度)的相对损失。

[0212] 结果显示于图2中, 并且指示了与配体A53相比, 具有N36H突变的所有三种配体(A48、B22和B72)都具有改善的碱稳定性。在50个CIP循环后, A53的相对剩余结合容量(%) 仅为20%, 而对于B72为28%, 对于B22为30%, 且对于A48为35%。

[0213] 实验3: 将N-内含肽配体A48固定到琼脂糖凝胶树脂

[0214] 将5毫升环氧活化的交联活化的凝胶树脂加入聚丙烯试管内。将2.7毫升在磷酸盐缓冲液中的对应于135毫克具有C末端Lys尾的N-内含肽配体A48加入管内, 随后加入1.3毫升的磷酸盐缓冲液(pH 12.1), 以将琼脂糖树脂浆料调整至约50%, 然后加入2克硫酸钠。将所得到的反应混合物的pH调整至11.5。并且将反应混合物在振荡台上加热直至 33°C , 并且在 33°C 下保持振荡4小时。然后将浆料转移到玻璃过滤器中, 并且用10毫升的蒸馏水洗涤3次。在洗涤后, 将凝胶转移到三颈圆底烧瓶(RBF)内, 并且加入5毫升的Tris缓冲液(pH 8.6)和375微升硫代甘油。将反应混合物在 45°C 下在振荡台上放置2小时。在反应后, 将浆料转移至玻璃过滤器。凝胶用5毫升的碱性洗涤缓冲液洗涤3次, 然后用5毫升的酸性洗涤缓冲液洗涤3次。将这个碱/酸洗涤再重复2次, 在该步骤中总共18次洗涤。然后用5毫升的蒸馏水将凝胶树脂洗涤10次。在分析之前, 将洗涤和沥干的凝胶保持在冰箱中的20%乙醇中。

[0215] 通过测量1毫升凝胶的重量来确定凝胶树脂的干重。在样品制备中, 将2克沥干的凝胶树脂与2克水充分混合, 以给出约50%的树脂浆料, 然后将浆料加入1 mL Teflon立方体内。然后施加真空以使立方体中的凝胶沥干, 并且因此获得1 mL凝胶。将凝胶转移到干重天平上。在35分钟后确定重量, 其中干燥温度设定为 105°C 。

[0216] 在干重确定后测量氨基酸分析。通过相应的干重以及蛋白质大小和一级氨基酸序列的信息, 配体密度可以以 mg/mL 凝胶树脂得出。

[0217] 关于偶联的琼脂糖树脂的结果是 $90.6 \text{ mg}/\text{ml}$ 的干重, 且具有 $18.4 \text{ mg}/\text{ml}$ 的配体含量, 其对应于 $1.38 \text{ umole}/\text{ml}$ 。

[0218] 实验4: 与配体密度有关的静态结合容量

[0219] 本文呈现的提议的容量方法可以测量试管中树脂的结合容量。

[0220] 反应设置

[0221] 简言之, 将具有各种配体密度的固定的A48配体的原型树脂和加上双重标签的测试蛋白质A43 (SEQ ID NO: 5) 分别在测定缓冲液(2x PBS)中稀释至2.5%树脂浆料和 $0.4 \text{ mg}/\text{mL}$ 。将 $50 \mu\text{L}$ 的2.5%树脂浆料加入ILLUSTRA™微型离心柱中, 随后加入 $150 \mu\text{L}$ 稀释的A43 (SEQ ID NO: 5)。允许反应在 22°C 下伴随1450rpm振荡温育, 持续2小时的固定时间点, 然后以3000rcf离心1分钟。

[0222] SDS-PAGE

[0223] 将离心的样品(含有切割的蛋白质和未结合的未切割蛋白质)与2x SDS-PAGE还原样品缓冲液1:1混合, 在 95°C 下煮沸5分钟, 然后经受SDS-PAGE (装载 $18 \mu\text{L}$)。添加加上C-内

含肽标签的测试蛋白质A43 (SEQ ID NO: 5) 标准 (通常为18.75-300 μ g/mL的五点标准), 以便能够根据光密度体积计算浓度。凝胶进行考马斯染色共60分钟 (~100mL/凝胶), 随后为在室温下伴随轻轻搅拌的脱色共120-180分钟 (直到背景完全透明)。用IQTL软件对未切割/未结合且切割的测试蛋白质执行光密度定量。然后将光密度原始数据导出到Microsoft Excel。

[0224] SBC计算

[0225] 由于反应中的测试蛋白质输入是已知的, 我们可以通过下述等式间接计算静态结合容量 (SBC):

$$[0226] \quad SBC \frac{mg}{mL} = \frac{(\text{以}\mu\text{g的输入量} - \text{以}\mu\text{g的未结合的量})}{\text{树脂体积}(\mu\text{L})}$$

[0227] 图3显示了本发明的N-内含肽配体的静态结合容量。通过常规方法完成氨基酸分析 (AAA)。A48原型通过环氧化学与多孔琼脂糖颗粒偶联。

[0228] 实验5: 使用和不使用Zn方案的延伸因子G的纯化

[0229] 在本实施例中, 使用具有固定配体A48的树脂原型, 纯化来自嗜热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 的延伸因子G (Ef-G)。加上C-内含肽 (SEQ ID NO 3) 标签的EfG在大肠杆菌菌株BL21 (DE3) 中进行细胞内表达。

[0230] 将发酵收获后的冷冻细胞沉淀解冻, 并且通过磁力搅拌用提取缓冲液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) 重悬浮。加入DNA酶I (牛胰腺) 和1 mM MgSO_4 , 随后添加溶菌酶 (鸡蛋)。在室温下搅拌30分钟后, 将重悬浮并经过溶菌酶处理的细胞悬浮液在水浴中加热至70-75 $^{\circ}\text{C}$, 并且在该温度下保持5分钟。使提取物在冰上短暂冷却后, 通过离心使提取物澄清。

[0231] 在样品装载和洗涤期间, 以2 mL/分钟, 然后以1 mL/分钟, 在ÄKTA™ Avant系统上完成使用无Zn方案的纯化。使用含有固定的A48配体的1 mL HiTrap™ 柱。加上C-内含肽标签的靶蛋白的平衡和结合在20 mM以pH 6.3补充有100 mM NaCl的MES缓冲液中完成, 并且样品使用2M乙酸调整至pH 6.3。用20 mM以pH 8.0补充有400 mM NaCl的Tris-HCl缓冲液完成在样品施加后的柱洗涤和后续洗脱。在柱洗涤后, 停止流动用于在室温下的4小时温育, 然后洗脱切割的EfG。添加第二次流动停止, 以允许第二次洗脱, 其在另外的16小时温育后完成。

[0232] 在HiTrap™ 柱上的4小时温育后, 洗脱17.8 mg纯的、无标签的EfG。根据质谱法分析, 洗脱蛋白质和经CIP的蛋白质之间的质量差异等于C-内含肽标签的质量。根据SDS-PAGE的纯度与Superdex™ 200 Increase上的SEC分析一样高。根据在280 nm处的理论UV吸收系数以及稀释洗脱和CIP级分的UV信号来计算总蛋白量。

[0233] 使用平衡缓冲液和澄清样品中包括Zn离子的方案重复纯化。最终的Zn浓度为1.6 mM。流速在样品施加期间减少至0.5 mL/分钟, 然后在洗涤和洗脱期间增加至1 mL/分钟。用50 mM Tris-HCl、20 mM咪唑缓冲液pH7.5完成洗涤和洗脱。在该纯化中仅收集到一个洗脱峰, 并且这在柱洗涤后的温育4小时后。

[0234] 在HiTrap™ 柱上的4小时温育后, 洗脱16.6 mg纯的、无标签的EfG。根据在Superdex™ 200 Increase上的SEC分析, 纯度为92%。根据在280 nm处的理论UV吸收系数以及稀释洗脱级分的UV信号计算总蛋白量。

[0235] 实验6: IL-1 β 的纯化

[0236] 含有固定的A48配体的1 mL HiTrap™柱用于纯化加上C-内含肽标签的靶蛋白IL-1 β (SEQ ID NO: 5), 所述IL-1 β 在大肠杆菌BL21 (DE3) 中进行细胞内表达, 并且通过超声处理进行裂解。通过离心收获可溶性蛋白质, 并且装载到固定有A48配体的1mL HiTrap™柱上。在样品装载和洗涤期间, 以4 mL/分钟 (600cm/小时线性流速), 在ÄKTA™ Avant系统上使用无Zn方案 (如实验4中)。然后将运行暂停4小时, 然后以1mL/分钟再次启动流动, 以洗脱切割的蛋白质 (4小时切割级分)。然后将运行再次暂停另外12小时, 然后以1mL/分钟起始流动, 以洗脱在4小时后未被切割的蛋白质。用一种单一缓冲液执行洗涤和洗脱的结合和平衡。来自纯化的层析图显示于图4A中。使原材料、流通物、洗涤级分、4小时和16小时洗脱级分经受SDS-PAGE和考马斯染色, 以及使用IQTL软件的后续分析 (图4B)。

[0237] 在HiTrap™柱上的4小时温育后, 洗脱9.4 mg切割的IL-1 β , 随后为在16小时后的另外1.1mg。根据SDS-PAGE分析, 纯度为99.5 (4小时) 和99.8% (16小时)。根据切割的蛋白质在280 nm处的理论UV吸收系数来计算总蛋白量。

[0238] 实验7: SARS-COV-2的受体结合结构域的纯化

[0239] 用C-内含肽加上标签的SARS-COV-2 NCBI的受体结合结构域 (RBD) 在ExpiHEK细胞中进行表达, 并且分泌到细胞培养基内。使用ÄKTA™ Avant FPLC系统, 将大约210mL上清液装载到具有固定的A48配体的1mL HiTrap柱上, 并且不向细胞培养上清液中添加任何盐或其它添加剂。以4mL/分钟 (装载时间~52.5分钟 (600cm/小时线性流速)) 执行样品施加和洗涤, 随后为6个柱体积的洗涤, 随后为暂停/保持步骤共4小时。洗脱阶段以1mL/分钟执行。将柱静置另外68小时, 随后为第二次洗脱。补充有300mM NaCl的单一40mM磷酸盐缓冲液pH 7.4缓冲液用于所有层析步骤。

[0240] 理论吸光度0.1%系数用于确定Unicorn™软件 (Cytiva Sweden AB) 内的蛋白质浓度和产率。通过光密度SDS-PAGE分析确定纯度。对于该实验, 获得了总共14.1mg切割的蛋白质, 具有高于96%的纯度。理论分子量为~25kDa, 而实验性SDS-PAGE分析指示了33 kDa的分子量, 这可以通过两个糖基化来解释, 并且也通过质谱法分析进行确定。

[0241] CCT-RBD蛋白具有下述序列:

[0242] METDTLLLWVLLLWVPGSTGVKIVSRKSLGVQNVYDIGVEKDHNFLLANGLIASNRVQPTESIVRFPN
ITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV
RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGV
EGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFHHHHH (SEQ ID NO: 4)

[0243] 信号序列-粗体下划线。

[0244] CCT-标签-点下划线。

[0245] RBD结构域是双下划线的。

[0246] His标签-虚线下划线

[0247] 来自切割蛋白质的纯度结果在表3中找到。

[0248] 表3

[0249]

洗脱	切割时间	纯度	靶蛋白产率
4小时	4小时	96.5%	4.9毫克

72小时	72小时	99.4%	9.2毫克
------	------	-------	-------

[0250] 实验8:在两个柱上的串联加标签和亲和纯化

[0251] 大肠杆菌BL21 (DE3) 用A43表达质粒TwinStrep™ 和加上C-内含肽 (SEQ ID NO 3) 标签的IL-1b进行转化,并且在含有50 μg/ml卡那霉素的琼脂板上铺平板。第二天,挑取单个菌落,并且在5ml Luria-Bertani (LB) 肉汤中生长至OD600 0.6。将培养物转移到含有相同抗生素的200 ml LB肉汤中,并且在37°C下生长直到OD600为0.6。通过添加异丙基b-D-1-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG, 0.5mM), 在22°C下诱导蛋白质表达16小时。在表达后,通过以4,000 x g离心15分钟收获细胞,并且在-80°C下贮存直至使用。

[0252] 对于纯化,将细胞沉淀以每克湿重10 ml重悬浮于缓冲液A1 (100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM EDTA, pH 8.0), 并且通过超声处理 (SonicsVibracell, 微尖端, 30%幅度, 开启2秒, 关闭4秒, 总共3分钟) 进行破碎。

[0253] 在4°C下以40,000 x g离心20分钟后,收集含有可溶性级分的上清液,并且通过5 ml HiTrap™ 柱, Streptactin™ XT (GE Healthcare, 瑞典)。用相同的缓冲液A1洗涤柱,直到在280 nm处的UV吸光度低于20 mAU。结合的加上C-内含肽标签的IL-1b在缓冲液B1 (100 mM Tris-HCl、150mM NaCl、1 mM EDTA、50 mM生物素, pH 8.0) 中进行洗脱并收集。

[0254] 将纯化的蛋白质立即施加到1 ml HiTrap™ 柱,所述柱填充有含有固定的N-内含肽配体A48的树脂,而不添加抑制剂ZnCl₂。在流通物中收集切割的、无标签的IL-1b。

[0255] MSAWSHPQFEKGGSGGGSGGSAWSHPQFEKGGSGGGSVKIVSRKSLGVQNVYDIGVEKDHNFLLANGLIASNAFVRSNLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVFMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFFVNKIEINNKLFEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSSAAA (SEQ ID NO: 5)

[0256] TwinStrep - 点下划线

[0257] CCT-粗体下划线

[0258] IL1b (测试蛋白质) - 加下划线的

[0259] 本文提及的专利和科学文献确立了本领域技术人员可获得的知识。本文引用的所有美国专利和公开或未公开的美国专利申请都通过引用并入。本文引用的所有公开的外国专利和专利申请都在此通过引用并入。本文引用的所有其它发表的参考文献、文件、手稿和科学文献都在此通过引用并入。

[0260] 虽然本发明已参考其优选实施方案进行特别显示且描述,但本领域技术人员将理解,可以在其中进行在形式和细节方面的各种改变,而不背离由所附权利要求涵盖的本发明的范围。还应该理解,本文描述的实施方案并非相互排斥的,并且来自各个实施方案的特征可以按照本发明进行整体或部分组合。

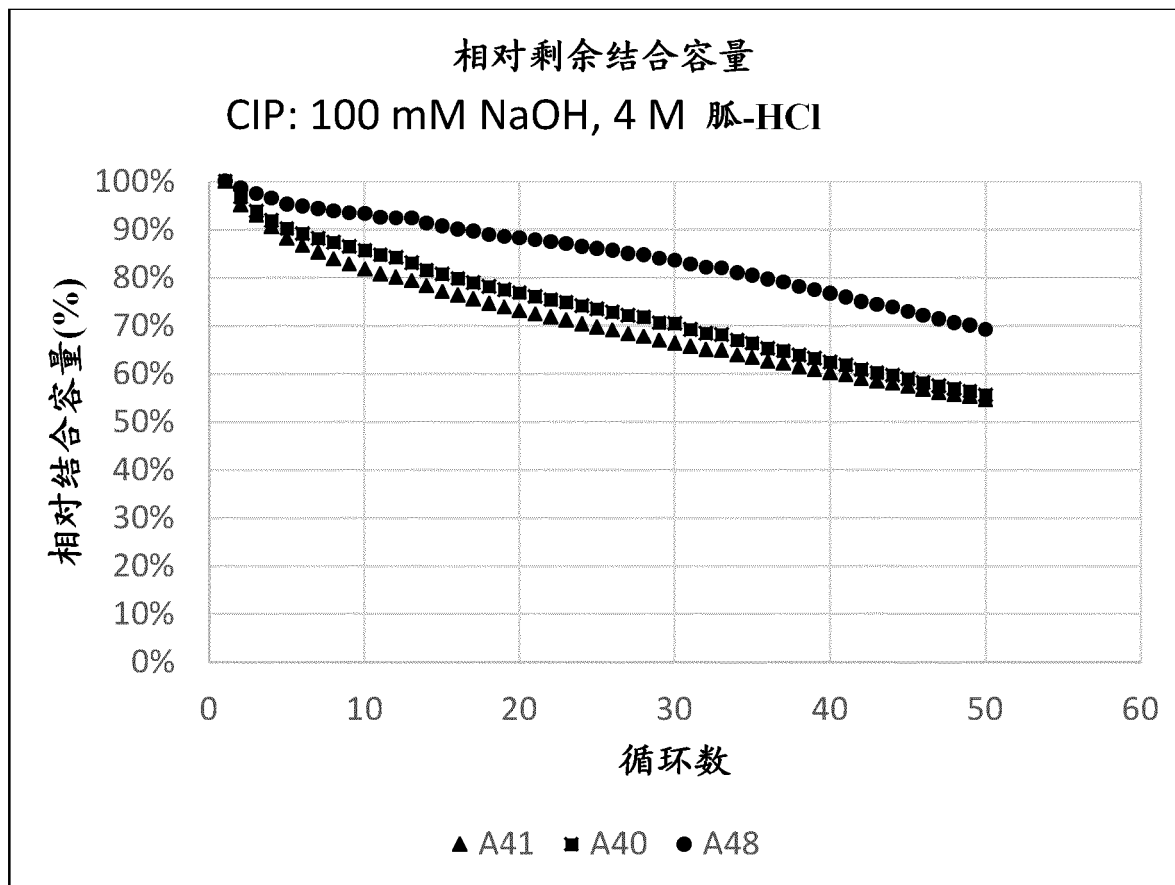
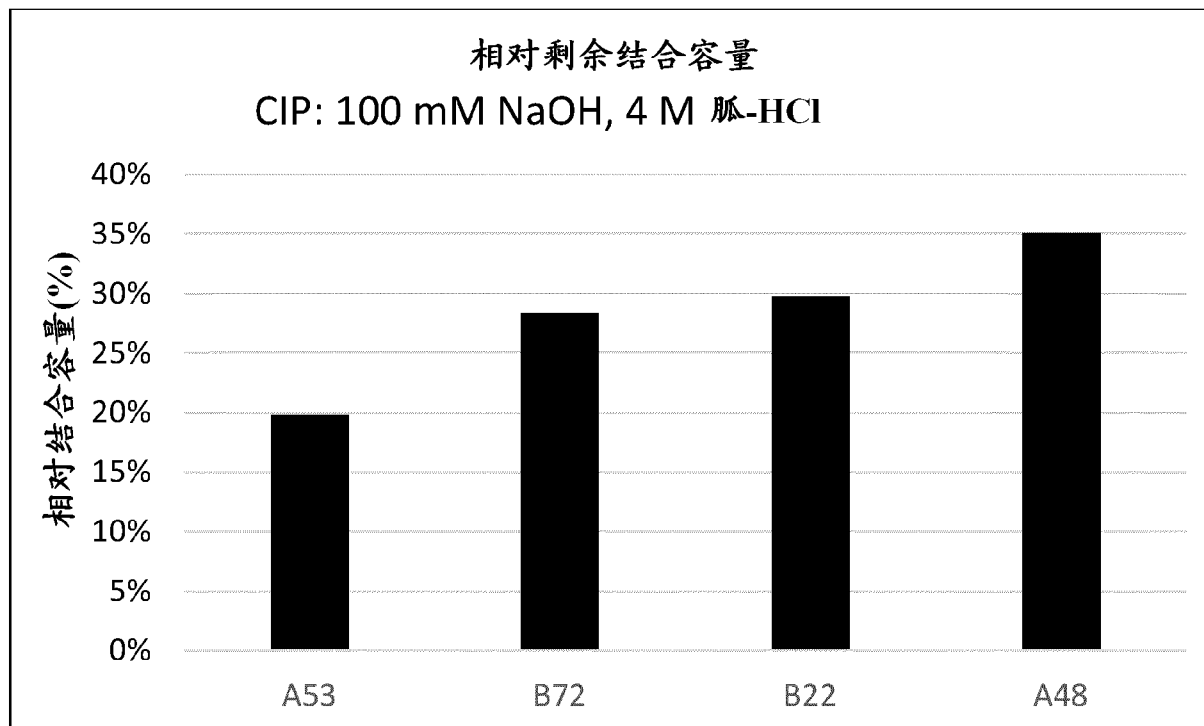


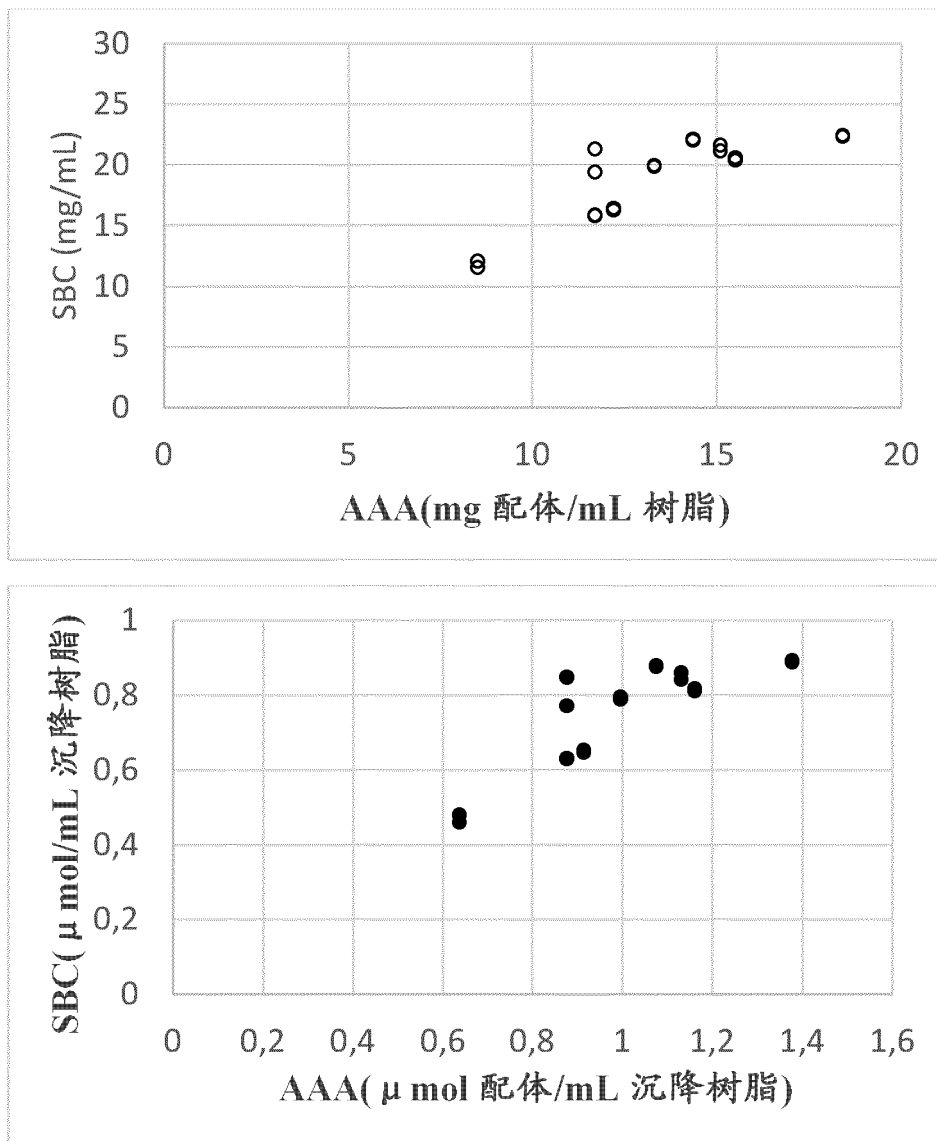
图 1



在以下位置处的氨基酸：

36	N	H	H	H
28	C	C	A	A
20, 35, 70, 73, 95	K	K	A	R

图 2



SBC = 静态结合容量

图 3

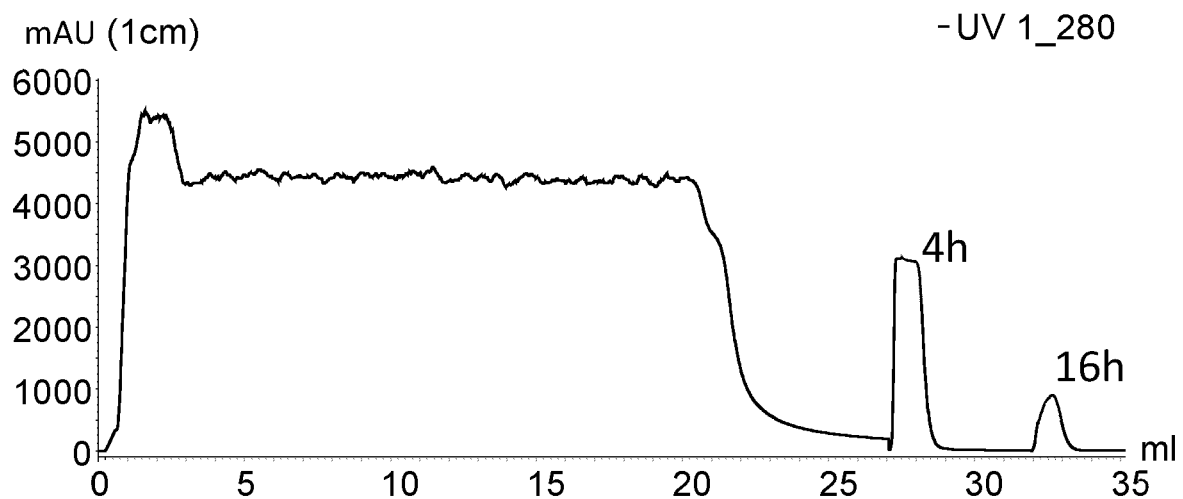


图 4A

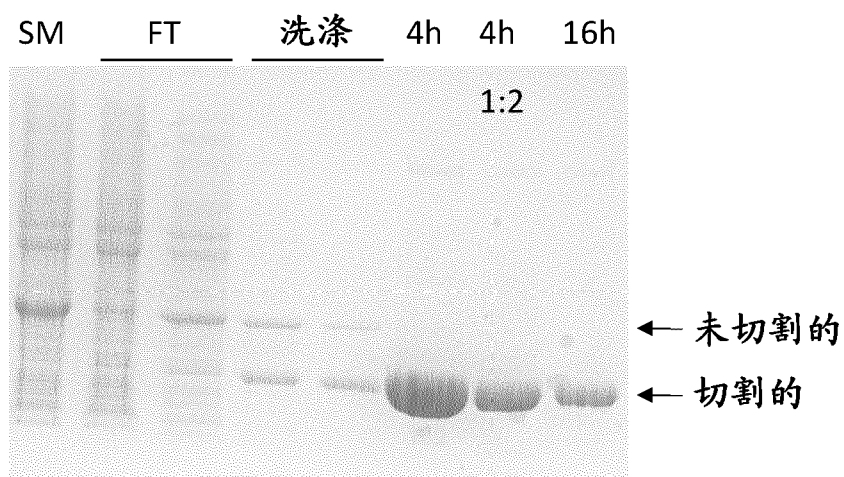


图 4B

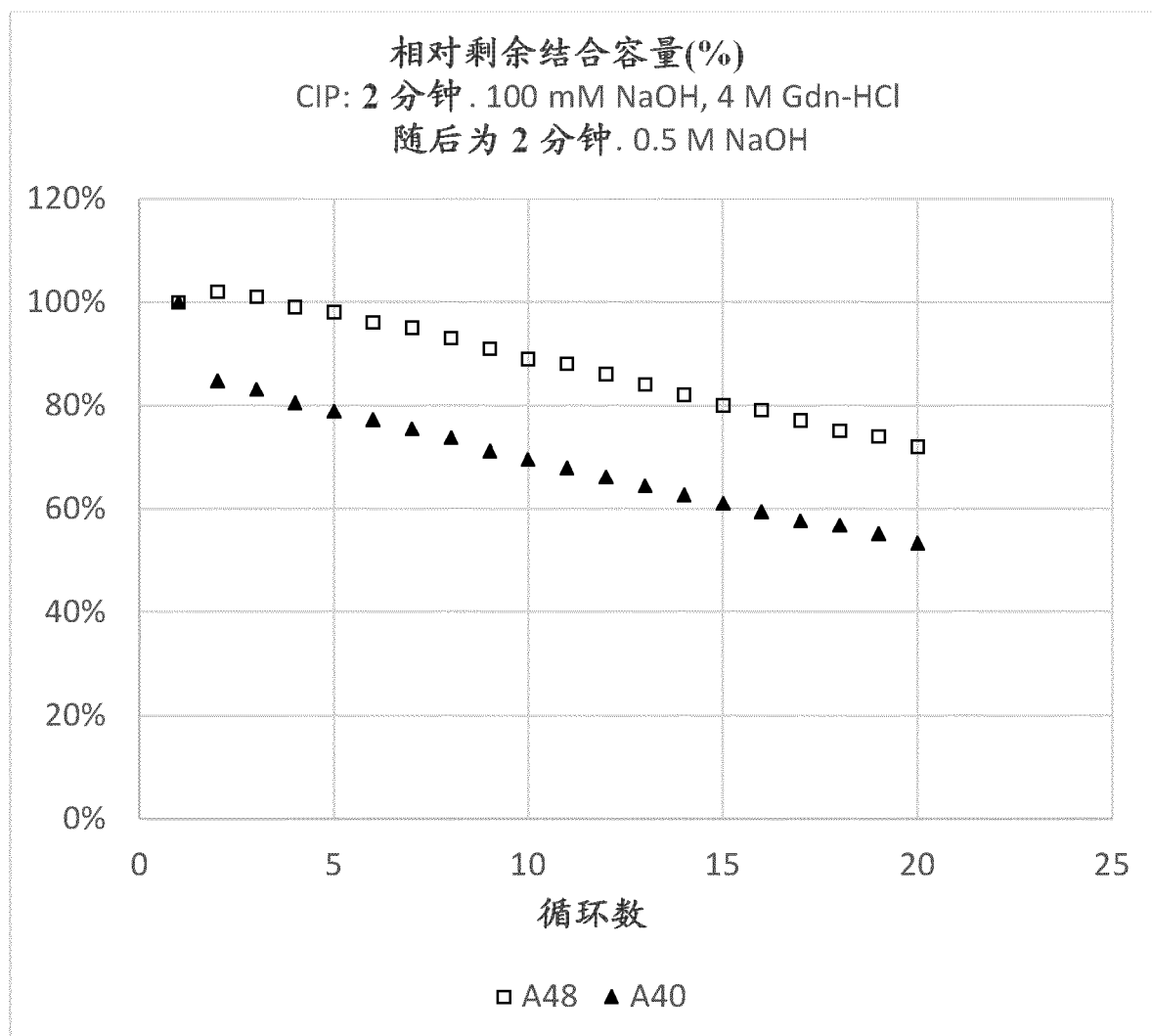


图 5