



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113913402 A

(43) 申请公布日 2022.01.11

(21) 申请号 202111174974.8

C12P 19/34 (2006.01)

(22) 申请日 2021.10.09

C12Q 1/48 (2006.01)

(71) 申请人 武汉爱博泰克生物科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新二路388号武汉光谷国际生
物医药企业加速器1.1期7栋4层01室

(72) 发明人 朱振宇 孙大鹏

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

代理人 信建

(51) Int. Cl.

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

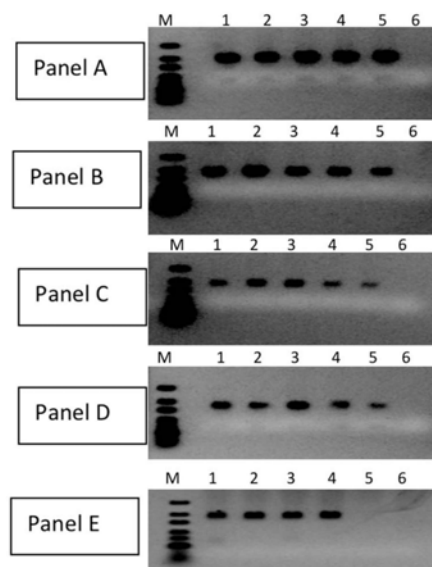
序列表12页 附图2页

(54) 发明名称

钾离子耐受的M-MLV逆转录酶突变体

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体而言,涉及一种钾离子耐受的M-MLV逆转录酶突变体。该逆转录酶突变体在野生型M-MLV逆转录酶的基础上具有如下突变中的一种或多种:E275K、E441K、E596K和K658E;且具有显著提高的对高浓度钾离子的耐受性。



1. 逆转录酶突变体,其氨基酸序列在SEQ ID NO:1所示的M-MLV逆转录酶的基础上具有如下突变中的一种或多种:

E275K、E441K、E596K和K658E。

2. 根据权利要求1所述的逆转录酶突变体,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:2~5中的任一种。

3. 根据权利要求1或2所述的逆转录酶突变体,其包含标签,优选标签融合于所述逆转录酶突变体的C端。

4. 根据权利要求3所述的逆转录酶突变体,所述标签为Arg标签、His标签、Strep标签、Flag标签、T7标签、V5-肽标签、GST标签和c-Myc标签中的任一种。

5. 分离的核酸,其编码权利要求1~4任一项所述的逆转录酶突变体。

6. 包含权利要求5所述核酸的载体。

7. 宿主细胞,其基因组中掺有权利要求5所述的核酸,或被权利要求6所述的载体所转化。

8. 生产逆转录酶突变体的方法,包括:

a) 培养权利要求7所述的宿主细胞;

b) 表达所述逆转录酶突变体;并

c) 由所述宿主细胞分离所述逆转录酶突变体。

9. 试剂盒,其包含权利要求1~4任一项所述的逆转录酶突变体。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其还包含RNA提取试剂、逆转录反应液、dNTPs、水、双脱氧核苷酸以及逆转录引物中的一种或多种。

11. 组合物,其由权利要求9或10所述的试剂盒中的各成分混合得到。

12. 用于逆转录一种或多种核酸分子的方法,包括:

i) 使用权利要求1~4任一项所述的逆转录酶突变体与模板RNA接触,并且

ii) 在足以生产与所述模板RNA互补的DNA的反应体系下保温。

13. 用于检测样品中RNA标记物的方法,包括:

i) 使用权利要求1~4任一项所述的逆转录酶突变体与RNA标记物接触;

ii) 在足以生产与所述RNA标记物互补的DNA的反应体系下保温;和

iii) 检测步骤ii)中合成的DNA的存在,从而检测所述样品中的RNA标记物。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清、尿、胆汁、脑脊髓液、拭子、临床样本、器官样品和组织样品,和/或其中所述样品得自细胞培养物、怀疑被污染的来源或受试者,特别地其中所述受试者选自人、动物和植物。

15. 根据权利要求12~14任一项所述的方法,所述反应体系中钾离子的浓度小于等于90mM,可选75mM~90mM,进一步可选80mM~90mM。

16. 用于产生钾离子耐受性增强的逆转录酶的方法,包括:

在编码M-MLV逆转录酶的核酸中引入突变,以使得所述核酸的表达产物具有如下突变中的至少一种:

E275K、E441K、E596K和K658E;

上述突变的位置以SEQ ID NO:1所示的M-MLV逆转录酶的氨基酸为参考。

钾离子耐受的M-MLV逆转录酶突变体

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体而言,涉及一种钾离子耐受的M-MLV逆转录酶突变体。

背景技术

[0002] 逆转录酶(EC 2.7.7.49)最初被发现为负责RNA病毒基因组复制的酶。它可以使用RNA或单链DNA(ssDNA)作为模板,同时具有RNase H活性和DNA聚合酶活性。莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶(M-MLV RT),因为其高催化活性和保真度,是目前互补DNA(cDNA)合成中使用最广泛的逆转录酶。M-MLV逆转录酶活性蛋白是一个75KDa大小的单体,其具有两个活性位点,其中一个位于N端结构域中以进行DNA聚合,另一个位于C端域中以实现RNase H活性。

[0003] 目前,市售的M-MLV RT产品一般都提供含有KCl的第一链缓冲液。例如,来自Thermo Fisher Scientific和Promega的M-MLV RT带有5×第一链缓冲液,其中含有375mM KCl,这使得KCl的最终反应浓度达到75mM。此外,在样品处理或核酸提取过程中,许多抑制剂可能会被带入RNA样品中。比如,氯化钠和氯化钾是可能会残留在RNA样品中的常见盐类,它们会抑制随后的逆转录反应的过程。研究发现将KCl从15mM增加到75mM会增加逆转录酶-寡核苷酸解结合的表观速率常数($0.2-1.5s^{-1}$)。此外,钾(K^{+})可以与DNA骨架上的磷酸基团(P^{-})结合并稳定双链体形成和引物退火。大量的 K^{+} 和PCR和RT-PCR反应中常见的 Mg^{2+} 成分结合起来会大大降低PCR和RT-PCR反应的特异性。目前的一种替代解决方案是基于铵离子(NH_4^{+})会破坏错配的引物-模板碱基配对之间的弱氢键,所以使用硫酸铵($(NH_4)_2SO_4$)代替缓冲液中的KCl来增强特异性。然而,硫酸铵并非适用于所有不同的Taq聚合酶或逆转录酶。因此,耐受大量KCl的新M-MLV RT突变体不仅可以提高反应效率的同时也可以减少RT反应对复杂的RNA样品纯化处理步骤的依赖。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种逆转录酶突变体,其氨基酸序列在SEQ ID NO:1所示的莫洛尼鼠白血病病毒(M-MLV)逆转录酶的基础上具有如下突变中的一种或多种:

[0005] E275K、E441K、E596K和K658E。

[0006] 上述逆转录酶突变体相对于未发生相应突变的M-MLV逆转录酶,具有显著提高的对高浓度钾离子的耐受性,因而可以无需过多顾虑RNA样品中残留的钾离子的影响,具有更广阔的应用前景。

[0007] 本发明还涉及分离的核酸,其编码如上所述的逆转录酶突变体,以及包含如上所述核酸的载体。

[0008] 本发明还涉及宿主细胞,其基因组中掺有如上所述的核酸,或被如上所述的载体所转化。

[0009] 本发明还涉及生产逆转录酶突变体的方法,包括:

[0010] a) 培养如上所述的宿主细胞;

- [0011] b) 表达所述逆转录酶突变体;并
- [0012] c) 由所述宿主细胞分离所述逆转录酶突变体。
- [0013] 本发明还涉及试剂盒,其包含如上所述的逆转录酶突变体。
- [0014] 本发明还涉及组合物,其由如上所述的试剂盒中的各成分混合得到。
- [0015] 本发明还涉及用于逆转录一种或多种核酸分子的方法,包括:
- [0016] i) 使用如上所述的逆转录酶突变体与模板RNA接触,并且
- [0017] ii) 在足以生产与所述模板RNA互补的DNA的反应体系下保温。
- [0018] 本发明还涉及用于检测样品中RNA标记物的方法,包括:
- [0019] i) 使用如上所述的逆转录酶突变体与RNA标记物接触;
- [0020] ii) 在足以生产与所述RNA标记物互补的DNA的反应体系下保温;和
- [0021] iii) 检测步骤ii) 中合成的DNA的存在,从而检测所述样品中的RNA标记物。
- [0022] 本发明还涉及用于产生钾离子耐受性增强的逆转录酶的方法,包括:
- [0023] 在编码M-MLV逆转录酶的核酸中引入突变,以使得所述核酸的表达产物具有如下突变中的至少一种:
- [0024] E275K、E441K、E596K和K658E;
- [0025] 上述突变的位置以SEQ ID NO:1所示的M-MLV逆转录酶的氨基酸为参考。

附图说明

[0026] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0027] 图1为本发明一个实施例中所采用的逆转录反应示意图;

[0028] 图2为本发明一个实施例所提供的野生型逆转录酶和E275K、E441K、E596K、K658E对KCl耐受性的比较;RT-PCR使用E275K、E441K、E596L、K658E、野生型RNase H-M-MLV RT和10mM KCl (Panel A)、60mM KCl (Panel B)、70mM KCl (Panel C)、80mM KCl (Panel D) 和90mM KCl (Panel E);泳道M:GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific),泳道1:E275K,泳道2:E441K,泳道3:E596K,泳道4:K658E,泳道5:野生型RNase H-M-MLV RT,泳道6:无模板对照。

具体实施方式

[0029] 现将详细地提供本发明实施方式的参考,其一个或多个实例描述于下文。提供每一实例作为解释而非限制本发明。实际上,对本领域技术人员而言,显而易见的是,可以对本发明进行多种修改和变化而不背离本发明的范围或精神。例如,作为一个实施方式的部分而说明或描述的特征可以用于另一实施方式中,来产生更进一步的实施方式。

[0030] 除非另有说明,用于披露本发明的所有术语(包括技术和科学术语)的意义与本发明所属领域普通技术人员所通常理解的相同。通过进一步的指导,随后的定义用于更好地理解本发明的教导。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。

[0031] 本发明中所使用的术语“含有”、“包含”和“包括”是同义词,其是包容性或开放式的,不排除额外的、未被引述的成员、元素或方法步骤。

[0032] 本发明中用端点表示的数值范围包括该范围内所包含的所有数值及分数,以及所引述的端点。

[0033] 本发明中涉及浓度数值,其含义包括在一定范围内的波动。比如,可以在相应的精度范围内波动。比如2%,可以允许 $\pm 0.1\%$ 范围内波动。对于数值较大或无需过于精细控制的数值,还允许其含义包括更大波动。比如100mM,可以允许 $\pm 1\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 5\%$ 等范围内的波动。涉及分子量,允许其含义包括 $\pm 10\%$ 的波动。

[0034] 本发明中,涉及“多个”、“多种”等描述,如无特别限定,指在数量上指大于等于2。

[0035] 本发明中,以开放式描述的技术特征中,包括所列举特征组成的封闭式技术方案,也包括包含所列举特征的开放式技术方案。

[0036] 本发明中,“优选”、“更好”、“更佳”、“为宜”仅为描述效果更好的实施方式或实施例,应当理解,并不构成对本发明保护范围的限制。

[0037] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。除非和本申请的发明目的和/或技术方案相冲突,否则,本发明涉及的引用文献以全部内容、全部目的被引用。本发明中涉及引用文献时,相关技术特征、术语、名词、短语等在引用文献中的定义也一并被引用。本发明中涉及引用文献时,被引用的相关技术特征的举例、优选方式也可作为参考纳入本申请中,但以能够实施本发明为限。应当理解,当引用内容与本申请中的描述相冲突时,以本申请为准或者适应性地根据本申请的描述进行修正。

[0038] 本发明中,“钾离子耐受性”,是指M-MLV逆转录酶在适于逆转录反应发生、但具有增加的钾离子浓度的条件仍然具有逆转录活性的能力。钾离子浓度约为小于等于90mM,例如10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM,优选75mM~90mM,再优选80mM~90mM。钾离子通常以可溶性盐的形式存在于反应体系中,典型的例如KCl。

[0039] 本发明涉及一种逆转录酶突变体,其氨基酸序列在SEQ ID NO:1所示的M-MLV逆转录酶的基础上具有如下突变中的一种或多种:

[0040] E275K、E441K、E596K和K658E。

[0041] 对应上述单个突变位点,逆转录酶突变体的氨基酸序列是示例依次如SEQ ID NO:2~5所示。

[0042] 上述逆转录酶突变体相对于未发生相应突变的M-MLV逆转录酶,具有显著提高的对高浓度钾离子的耐受性,且在M-MLV逆转录酶的逆转录效率、逆转录模板灵敏度以及保真度等方面未产生明显的不利影响。

[0043] 逆转录酶突变体并不排除在除SEQ ID NO:1以外的M-MLV逆转录酶进行突变的可能,亦即,本申请所请求保护的逆转录酶突变体可以为与所述逆转录酶突变体(特别是SEQ ID NO:2~5所示的逆转录酶突变体)实质上相似的酶。

[0044] “实质上相似”意指给定核酸或氨基酸序列与参比序列共有至少约80%同一性、至少约90%同一性、至少约95%同一性、至少约96%同一性、至少约97%同一性、至少约98%同一性、至少约99%同一性或至少约99.5%同一性的序列的酶,且保留E275K、E441K、E596K和K658E中至少一种突变位点,保留逆转录酶活性,并保留钾离子耐受性(其耐受性与SEQ

ID NO:2~5所示的酶相仿,例如不低于它们的至少一个,或在约90mM的钾离子浓度下仍然具有逆转录酶活性)。

[0045] 实质上相似的酶通常较参比序列发生保守性的氨基酸置换,通常视为保守置换的置换是在脂肪族氨基酸Ala、Val、Leu和Ile中的彼此置换、羟基残基Ser和Thr的互换、酸性残基Asp和Glu的交换、酰胺残基Asn和Gln之间的置换、碱性残基Lys和Arg的交换以及芳香残基Phe、Tyr间的置换。

[0046] 另外,实质上相似的酶还包括通过天然过程(诸如加工和其他翻译后修饰),或通过化学修饰技术所得到衍生物,例如通过添加一个或多个聚乙二醇分子、糖、磷酸酯和/或其他这样的分子来进行化学修饰,其中一个或多个分子不是天然地附着到蛋白质。衍生物包括盐。这样的化学修饰在基础教科书和更详细的专论中以及在大量研究文献中有详细描述,并且它们是本领域技术人员熟知的。应当理解,相同类型的修饰可以以相同或不同程度存在于给定蛋白质或多肽中的几个位点。此外,给定的蛋白质或多肽可以含有许多类型的修饰。修饰可发生在蛋白质或多肽中的任何位置,包括肽骨架,氨基酸侧链以及氨基或羧基末端。修饰包括例如乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价连接黄素、共价连接血红素部分、共价连接核苷酸或核苷酸衍生物、共价连接脂质或脂质衍生物、共价连接磷脂酰肌醇、交联、环化、形成二硫键、脱甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲基化、 γ -羧化、糖基化、形成GPI锚接、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白质酶解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、糖基化、脂质连接、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧化、烃基化和ADP-核糖基化、硒化、硫酸化、蛋白质的氨基酸的传递RNA介导加成(诸如精氨酰化)以及泛素化。它们还可以结合至维生素,例如生物素、叶酸或维生素B12。参见例如Proteins--Structure And Molecular Properties, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993) 和 Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects," pgs.1-12 in Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter等人., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990) 和 Rattan等人., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging," Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)。术语“衍生物”包括导致蛋白质或多肽在支链化或不支链化的情况下变成支链的或环状的化学修饰。环状、支链和支链圆形蛋白质或多肽可以从翻译后自然加工得来并且还可以完全由合成方法制成。在一些实施方式中,化合物可以共价连接至载体蛋白质,诸如血清白蛋白或其他血浆蛋白质。

[0047] 实质上相似的酶可以不具有RNase H活性,或者具有减弱的RNase H活性。

[0048] 实质上相似的酶可以包含本领域公知的其他有利于M-MLV逆转录酶功能实现的突变为点,例如,其可以具有包含至少一个位于选自下组的氨基酸位置处的突变:

[0049] Q19, Y64, R116, D124, H126, Y133, K152, T197, V223, L435, D524;

[0050] 可用于替代Tyr的氨基酸包括Lys、Arg、His、Asp、Glu、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Trp、Gly、Ser、Thr、Cys、Asn或Gln。可用于替代Arg的氨基酸包括Tyr、His、Asp、Glu、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Trp、Gly、Ser、Thr、Cys、Phe、Asn、或Gln。可用于替代Lys的氨基酸包括Tyr、Arg、His、Asp、Glu、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Trp、Gly、Ser、Thr、Cys、Asn、或Gln。可用于替代Glu的氨基酸包括Lys、Arg、His、Asp、Tyr、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Trp、Gly、

Ser、Thr、Cys、Asn、或Gln。可用于替代Thr的氨基酸包括Lys、Arg、His、Asp、Glu、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Trp、Gly、Ser、Tyr、Cys、Asn、或Gln。可用于替代Val的氨基酸包括Lys、Arg、His、Asp、Glu、Ala、Tyr、Leu、Ile、Pro、Met、Trp、Gly、Ser、Thr、Cys、Asn、或Gln。可用于替代Leu的氨基酸包括Lys、Arg、His、Asp、Glu、Ala、Val、Tyr、Ile、Pro、Met、Trp、Gly、Ser、Thr、Cys、Asn或Gln。可用于替代Asp的氨基酸包括Lys、Arg、His、Leu、Glu、Ala、Val、Tyr、Ile、Pro、Met、Trp、Gly、Ser、Thr、Cys、Asn或Gln。

[0051] 可以通过众所周知的方法例如定点诱变来制备这些突变体。

[0052] 本领域技术人员在本申请的基础上容易对上述效果进行验证,这不需要付出创造性劳动,因而在上述M-MLV逆转录酶基础上进行突变得到的逆转录酶突变体也在本申请的保护范围内。

[0053] 优选地,本发明所述的逆转录酶突变体包含标签。进一步优选的,标签融合于所述逆转录酶突变体的C端。标签出于各种目的而附着在蛋白质,例如以便容易纯化,帮助蛋白质的正确折叠,防止蛋白质沉淀,改变层析特性,修饰蛋白质或者标记蛋白质或给蛋白质贴标签。标签的实例包括Arg标签、His标签、Strep标签、Flag标签、T7标签、V5-肽标签、GST标签和c-Myc标签。本发明中的优选标签是由六个组氨酸残基组成的His标签。

[0054] 根据本发明的再一方面,还涉及分离的核酸,其编码如上所述的逆转录酶突变体。

[0055] 核酸通常是RNA或DNA。核酸可以是单链或双链的。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。当其连入载体时优选采用DNA核酸。核酸可以经过密码子优化以在期望的宿主细胞中获得更为高效的表达。

[0056] 根据本发明的再一方面,还涉及包含如上所述核酸的载体。

[0057] 术语“载体(vector)”是指,可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时,载体称为表达载体。载体可以通过转化,转导或者转染导入宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的,包括但不限于:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色体,例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于,逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。在一些实施方式中,本发明所述载体中包含基因工程中常用的调控元件,例如增强子、启动子、内部核糖体进入位点(IRES)和其他表达控制元件(例如转录终止信号,或者多腺苷酸化信号和多聚U序列等)。

[0058] 本发明还涉及宿主细胞,其基因组中如上所述的核酸,或被如上所述的载体所转化。

[0059] 术语“宿主细胞”是指,可用于导入载体的细胞,其包括但不限于,如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞,如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞,如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞,或者如纤维原细胞,CHO细胞,COS细胞,NS0细胞,HeLa细胞,BHK细胞,HEK 293细胞或人细胞等的动物细胞。宿主细胞优选为真核细胞,

[0060] 根据本发明的再一方面,还涉及一种生产逆转录酶突变体的方法,包括:

[0061] a) 培养如上所述的宿主细胞;

[0062] b) 表达所述逆转录酶突变体;并

[0063] c) 由所述宿主细胞分离所述逆转录酶突变体。

[0064] 分离所述逆转录酶突变体可以理解为将粗品分离,也可以理解为包括纯化和/或浓缩过程,例如可将目的产物根据本领域标准程序从细胞培养内容物纯化出,标准程序包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等。这类技术在本领域技术范围内,不限定本发明。表达得到的蛋白可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃~-80℃,或者冻干。

[0065] 根据本发明的再一方面,还涉及一种试剂盒,其包含如上所述的逆转录酶突变体。

[0066] 所述试剂盒优选用于执行逆转录。

[0067] 在一些实施方式中,其还包含RNA提取试剂、逆转录反应液、dNTPs、水、双脱氧核苷酸以及逆转录引物中的一种或多种。

[0068] 根据需要,逆转录引物可以为Oligo dT引物、随机引物或基因特异性引物。

[0069] 术语“试剂盒”是指包括至少一个设备的任何制品(例如,包装或容器),可进一步包括在本文中描述的方法或其步骤中使用的使用说明书、补充试剂和/或组分或组件。

[0070] 优选的,试剂盒中的核酸组分和蛋白组分,例如引物和逆转录酶突变体以干粉形式存放于试剂盒中。各组分也可以冻干形式,例如以一种或多种所谓的冻干珠的形式实现。冻干珠通常可以被理解是指是在制造后(在所述制造后物质通常作为粉末存在)被压制成球形的冻干物。

[0071] 根据本发明的再一方面,还涉及一种组合物,其包含如上所述的逆转录酶突变体。

[0072] 在一些实施方式中,所述组合物,其由如上所述的试剂盒中的各成分混合得到。

[0073] 根据本发明的再一方面,还涉及用于逆转录一种或多种核酸分子的方法,包括:

[0074] i) 使用如上所述的逆转录酶突变体与模板RNA接触,并且

[0075] ii) 在足以生产与所述模板RNA互补的DNA的反应体系下保温。

[0076] 根据本发明的再一方面,还涉及用于检测样品中RNA标记物的方法,包括:

[0077] i) 使用如上所述的逆转录酶突变体与RNA标记物接触;

[0078] ii) 在足以生产与所述RNA标记物互补的DNA的反应体系下保温;和

[0079] iii) 检测步骤ii)中合成的DNA的存在,从而检测所述样品中的RNA标记物。

[0080] 在一些实施方式中,所述样品选自血液、血浆、血清、尿、胆汁、脑脊髓液、拭子、临床样本、器官样品和组织样品。

[0081] 在一些实施方式中,所述样品得自细胞培养物、怀疑被污染的来源或受试者。

[0082] 在一些实施方式中,所述受试者选自人、动物(如大鼠、小鼠、猫、犬、马、牛、羊、猪、鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸽子、线虫、斑马鱼)和植物(如水稻、拟南芥、小麦、玉米)。

[0083] 容易理解,上述方法为可应用于不同物种、不同目的的普适性方法。但在一些优选的实施方式中,上述方法用于疾病的检测。

[0084] 所述RNA标记物可以用于指示微生物、细胞、病毒、细菌、真菌、寄生虫、哺乳动物物种、遗传状况或疾病。RNA可以在各种应用中用作标记物。检测到的RNA可以指示本身,或者它可以指示DNA的存在或目标基因的表达,其继而指示疾病、病原体的存在等。RNA本身可以指示病毒RNA,特别是逆转录病毒RNA的存在。逆转录病毒引起各种疾病,例如癌症、AIDS、自身免疫性以及中枢神经系统、骨骼和关节疾病,例如髓样白血病、红细胞系白血病、淋巴样

白血病、淋巴瘤、肉瘤、乳腺癌、肾癌、再生障碍性贫血、溶血性贫血、自身免疫性疾病、免疫缺陷、骨硬化病、关节炎、周围神经病、脑病、神经变性、痴呆、肺炎和腺瘤病。诱导此类疾病的病毒包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、人T淋巴病毒(HTLV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)和鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)。然而,RNA标记物可以指示基因表达。许多基因仅在特定条件(包括疾病条件)下或由特定物种表达。相应地,蛋白质(或相应mRNA)的存在可以指示疾病状态、细胞或病原体。例如,癌细胞的特征在于特定标记物,其核酸可以用于其检测和定量。可以提及的实例(尤其是癌基因和肿瘤抑制基因)是:例如p53,ras家族的基因erb-B2、c-myc、mdm2、c-fos、DPC4、FAP、nm23、RET、WT1等等,例如关于p53、DCC、APC、Rb等等的LOH,以及遗传性肿瘤中的BRCA1和BRCA2,MSH2、MLH1、WT1等等的微卫星不稳定性;以及肿瘤RNA,例如CEA,细胞角蛋白例如CK20、BCL-2、MUC1,特别是其肿瘤特异性剪接变体、MAGE3、Muc18、酪氨酸酶、PSA、PSM、BA46、Mage-1等等,或其它形态发生RNA,例如乳腺丝抑蛋白、hCG、GIP、胃动素、hTG、SCCA-1、AR、ER、PR、各种激素等等;此外,尤其是影响转移概况的RNA和蛋白质,即涉及血管生成、运动、粘附和基质降解的分子的表达,例如bFGF、bFGF-R、VEGF、VEGF-Rs例如VEGF-R1或VEGF-R2、E-钙粘蛋白、整联蛋白、选择素、MMP、TIMP、SF、SF-R等等、细胞周期概况或增殖概况例如细胞周期蛋白(例如,细胞周期蛋白D、E和B的表达比)、Ki67、p120、p21、PCNA等等,或凋亡概况例如FAS(受体和/或配体)、TNF(受体和/或配体)、穿孔素、颗粒酶B、BAX、bcl-2、半胱天冬酶3等等。可替代地,RNA可以指示除逆转录病毒外的病原体的DNA。

[0085] 示例性的病毒包括:腺病毒科(adenoviridae)、沙粒病毒科(arenaviridae)、星状病毒科(astroviridae)、本雅病毒科(bunyaviridae)、杯状病毒科(caliciviridae)、黄病毒科(flaviviridae)、肝炎病毒科(hepeviridae)、单分子负链RNA病毒目(mononegavirales)、网巢病毒目(nidovirales)、小RNA病毒科(picornaviridae)、正黏液病毒科(orthomyxoviridae)、乳头瘤病毒科(papillomaviridae)、细小病毒科(parvoviridae)、多瘤病毒科(polyomaviridae)、痘病毒科(poxviridae)、呼肠孤病毒科(reoviridae)、反转录病毒科(retroviridae)以及披膜病毒科(togaviridae)中的一种或多种。

[0086] 示例性的细菌包括:葡萄球菌属、链球菌属、李氏杆菌属、丹毒丝菌属、肾杆菌属、芽孢杆菌属、梭菌属、分支杆菌属、放线菌属、奴卡菌属、棒状杆菌属、红球菌属中的一种或多种,和/或,炭疽杆菌、丹毒杆菌、破伤风杆菌、李氏杆菌、气肿疽杆菌、结核杆菌、大肠杆菌外、变形杆菌、痢疾杆菌、肺炎杆菌、布氏杆菌、产气荚膜杆菌、流感嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、卡他摩拉克氏菌、不动杆菌属、耶尔森菌属、嗜肺军团菌、百日咳杆菌、副百日咳杆菌、志贺菌属、巴斯德菌属、霍乱弧菌以及副溶血性杆菌中的一种或多种。

[0087] 示例性的真菌包括:粗球孢子菌、普赛德斯球孢子菌、荚膜组织胞浆菌、杜氏组织胞浆菌、洛博芽生菌、巴西副球孢子菌、皮炎芽生菌、申克氏孢子丝菌、马尔尼菲青霉菌、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、葡萄牙假丝酵母、曲霉菌、甄氏外瓶霉、裴氏着色霉、紧密着色霉、疣状着色霉、皮炎着色霉、白地霉、波氏足肿菌、新型隐球菌、丝孢酵母菌、米根霉、印度毛霉、伞枝犁头霉、总状共头霉、蛙粪霉、冠状耳霉、异孢耳霉、西伯鼻孢子菌、透明丝孢霉以及暗色丝孢霉中的一种或多种。

[0088] 示例性的寄生虫包括:消化道内寄生虫、肝内寄生虫、肺内寄生虫、脑组织寄生虫、血管内寄生虫、淋巴管内寄生虫、肌肉组织寄生虫、细胞内寄生虫、骨组织寄生虫以及眼内

寄生虫中的一种或多种。

[0089] 在一些实施方式中,所述反应体系中钾离子浓度约为小于等于90mM,例如10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM,优选75mM~90mM,再优选80mM~90mM。

[0090] 根据本发明的再一方面,还涉及用于产生钾离子耐受性增强的逆转录酶的方法(或称之为提高逆转录酶钾离子耐受性的方法),包括:

[0091] 在编码M-MLV逆转录酶的核酸中引入突变,以使得所述核酸的表达产物具有如下突变中的至少一种:

[0092] E275K、E441K、E596K和K658E;

[0093] 上述突变的位置以SEQ ID NO:1所示的M-MLV逆转录酶的氨基酸为参考。

[0094] 由于已知E275K、E441K、E596K和K658E位点的突变可以用以提高钾离子耐受性,那么适于产生突变或产生所需要的重组蛋白序列的任何方法均可应用。

[0095] 需要注意的是,上述M-MLV逆转录酶的参考序列不构成对本发明所产生的逆转录酶的限制,该方法除SEQ ID NO:1外,亦可用于其他已然发生其他突变的M-MLV逆转录酶的改进,只需要使得E275K、E441K、E596K和K658E的变异发生在相对于SEQ ID NO:1所示的M-MLV逆转录酶的相应位置上即可,本领域技术人员可通过常规的序列分析方法找到相应的位点。

[0096] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,优先参考本发明中给出的指引,还可以按照本领域的实验手册或常规条件,还可以参考本领域已知的其它实验方法,或者按照制造厂商所建议的条件。

[0097] 下述的具体实施例中,涉及原料组分的量度参数,如无特别说明,可能存在称量精度范围内的细微偏差。涉及温度和时间参数,允许仪器测试精度或操作精度导致的可接受的偏差。

[0098] 实施例

[0099] 具有C末端His tag标记的M-MLV逆转录酶(序列如下所示)在C3019(New England Biolabs,MA)中进行表达,质粒构建使用的是具有卡那霉素抗性的pBAD载体。

[0100] MLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLI IPLKATSTPVS IKQYPMSQ
EARLG IKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQ
WYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGI SGLTWTRLPQGFKNSPTLFD EALHRDLADFRIQHPDLILL
QYVDDLLLAATSELD CQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKT
PRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDE
KQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVA AIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPP
DRWLSNARMTHYQALLLD TDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTN
GSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTD SRYAFATAHIHGEIYRR
RGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSI IHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLGSGSSG
(SEQ ID NO:1) -HHHHHH(His tag)

[0101] 载体转化之后的细菌首先在37℃下培养5小时,以达到OD_{600nm}=0.5,之后向细菌培养液中加入0.2%阿拉伯糖以在25℃下诱导蛋白质表达。蛋白诱导表达过夜之后,先离心沉淀收集细菌,经超声破碎处理后上清液与His-琼脂糖珠一起孵育以纯化M-MLV逆转录酶。

最后用200mM Imidazole buffer将蛋白质从His-琼脂糖珠上洗脱下来,并标准化为10ng/ μ l,用于后续逆转录酶活性的鉴定测试。

[0102] 逆转录酶的活性通过图1所示的一步法RT-PCR测试。RT-PCR反应制备为10 μ l混合物,其中含有10ng逆转录酶、1ng人293RNA、1 $\times$ mod缓冲液(20mM Tris-HCl,10mM (NH₄)₂SO₄)、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1%Triton-X100、80mM Tris-Acetate、3mM Mg-Acetate,pH=8.8@25℃)、10mM DTT、0.2 μ M正向引物(CCCATGTTCGTCATGGGTGT)、0.2 μ M反向引物(TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA),0.2 μ l 10mM dNTP,25ng Taq聚合酶D578R(参考:用于更快扩增的Taq聚合酶突变体,美国专利号:#10,865,441)。在最终反应混合物中制备不同的KCl浓度,以测试RT突变体对10mM KCl、60mM KCl、70mM KCL、80mM KCl和90mM KCl的耐受性能。反应在42℃下孵育5分钟进行逆转录,然后进行PCR扩增:程序设置为95℃3分钟,(95℃30秒,60℃1分钟)进行35个循环。最后使用2%琼脂糖凝胶检测RT-PCR产量(图2)。在相同的缓冲液和RT-PCR反应体系中,当KCl的最终反应浓度在10mM到80mM之间时,这四个RT突变体保持和野生型RNase H-M-MLV RT一致的活性。然而,野生型RNase H-M-MLV RT在90mM KCl下失去其RT活性,而E275K、E441K、E596K和K658E仍保留其RT活性。

[0103] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准,说明书及附图可以用于解释权利要求的内容。

SEQUENCE LISTING

<110> 武汉爱博泰克生物科技有限公司

<120> 钾离子耐受的M-MLV 逆转录酶突变体

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 677

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> wild type

<400> 1

```

Met Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1           5           10           15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
          20           25           30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
          35           40           45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
          50           55           60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65           70           75           80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
          85           90           95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
          100          105          110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
          115          120          125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
          130          135          140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145          150          155          160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
          165          170          175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
          180          185          190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
          195          200          205

```

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp		
210	215	220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr		
225	230	235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala		
245	250	255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu		
260	265	270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val		
275	280	285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu		
290	295	300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met		
305	310	315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp		
325	330	335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu		
340	345	350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu		
355	360	365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys		
370	375	380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp		
385	390	395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile		
405	410	415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu		
420	425	430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro		
435	440	445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu		
450	455	460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro		
465	470	475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu		
485	490	495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln		
500	505	510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asn Gly Ser Ser Leu		

515	520	525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys	Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr	
530	535	540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg		
545	550	555
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys		
565	570	575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His		
580	585	590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly		
595	600	605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu		
610	615	620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys		
625	630	635
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala		
645	650	655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Gly		
660	665	670
Ser Gly Ser Ser Gly		
675		
<210> 2		
<211> 607		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> E275K mutant		
<400> 2		
Met Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu		
1	5	10
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala		
20	25	30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu		
35	40	45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr		
50	55	60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg		
65	70	75
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr		

				85					90					95			
Pro	Leu	Leu	Pro	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Thr	Asn	Asp	Tyr	Arg	Pro	Val		
				100				105					110				
Gln	Asp	Leu	Arg	Glu	Val	Asn	Lys	Arg	Val	Glu	Asp	Ile	His	Pro	Thr		
				115				120					125				
Val	Pro	Asn	Pro	Tyr	Asn	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	His	Gln		
				130				135					140				
Trp	Tyr	Thr	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asp	Ala	Phe	Phe	Cys	Leu	Arg	Leu		
145					150				155					160			
His	Pro	Thr	Ser	Gln	Pro	Leu	Phe	Ala	Phe	Glu	Trp	Arg	Asp	Pro	Glu		
				165				170					175				
Met	Gly	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Thr	Trp	Thr	Arg	Leu	Pro	Gln	Gly	Phe		
				180				185					190				
Lys	Asn	Ser	Pro	Thr	Leu	Phe	Asp	Glu	Ala	Leu	His	Arg	Asp	Leu	Ala		
				195				200					205				
Asp	Phe	Arg	Ile	Gln	His	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu	Leu	Gln	Tyr	Val	Asp		
				210				215				220					
Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Ser	Glu	Leu	Asp	Cys	Gln	Gln	Gly	Thr		
225					230				235					240			
Arg	Ala	Leu	Leu	Gln	Thr	Leu	Gly	Asn	Leu	Gly	Tyr	Arg	Ala	Ser	Ala		
				245				250					255				
Lys	Lys	Ala	Gln	Ile	Cys	Gln	Lys	Gln	Val	Lys	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Leu		
				260				265					270				
Leu	Lys	Lys	Gly	Gln	Arg	Trp	Leu	Thr	Glu	Ala	Arg	Lys	Glu	Thr	Val		
				275				280					285				
Met	Gly	Gln	Pro	Thr	Pro	Lys	Thr	Pro	Arg	Gln	Leu	Arg	Glu	Phe	Leu		
				290				295					300				
Gly	Thr	Ala	Gly	Phe	Cys	Arg	Leu	Trp	Ile	Pro	Gly	Phe	Ala	Glu	Met		
305					310				315					320			
Ala	Ala	Pro	Leu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Lys	Thr	Gly	Thr	Leu	Phe	Asn	Trp		
				325				330					335				
Gly	Pro	Asp	Gln	Gln	Lys	Ala	Tyr	Gln	Glu	Ile	Lys	Gln	Ala	Leu	Leu		
				340				345					350				
Thr	Ala	Pro	Ala	Leu	Gly	Leu	Pro	Asp	Leu	Thr	Lys	Pro	Phe	Glu	Leu		
				355				360					365				
Phe	Val	Asp	Glu	Lys	Gln	Gly	Tyr	Ala	Lys	Gly	Val	Leu	Thr	Gln	Lys		
				370				375				380					
Leu	Gly	Pro	Trp	Arg	Arg	Pro	Val	Ala	Tyr	Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Asp		
385					390				395					400			

Pro	Val	Ala	Ala	Gly	Trp	Pro	Pro	Cys	Leu	Arg	Met	Val	Ala	Ala	Ile
				405			410				415				
Ala	Val	Leu	Thr	Lys	Asp	Ala	Gly	Lys	Leu	Thr	Met	Gly	Gln	Pro	Leu
				420			425				430				
Val	Ile	Leu	Ala	Pro	His	Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Pro	Pro
				435			440				445				
Asp	Arg	Trp	Leu	Ser	Asn	Ala	Arg	Met	Thr	His	Tyr	Gln	Ala	Leu	Leu
				450			455				460				
Leu	Asp	Thr	Asp	Arg	Val	Gln	Phe	Gly	Pro	Val	Val	Ala	Leu	Asn	Pro
465				470			475				480				
Ala	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	Glu	Gly	Leu	Gln	His	Asn	Cys	Leu
				485			490				495				
Asp	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	His	Gly	Thr	Arg	Pro	Asp	Leu	Thr	Asp	Gln
				500			505				510				
Pro	Leu	Pro	Asp	Ala	Asp	His	Thr	Trp	Tyr	Thr	Asn	Gly	Ser	Ser	Leu
				515			520				525				
Leu	Gln	Glu	Gly	Gln	Arg	Lys	Ala	Gly	Ala	Ala	Val	Thr	Thr	Glu	Thr
				530			535				540				
Glu	Val	Ile	Trp	Ala	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Gly	Thr	Ser	Ala	Gln	Arg
545				550			555				560				
Ala	Glu	Leu	Ile	Ala	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Lys	Met	Ala	Glu	Gly	Lys
				565			570				575				
Lys	Leu	Asn	Val	Tyr	Thr	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ala	Phe	Ala	Thr	Ala	His
				580			585				590				
Ile	His	Gly	Glu	Ile	Tyr	Arg	Arg	Arg	Gly	Leu	Leu	Thr	Ser	Glu	
				595			600				605				
<210> 3															
<211> 677															
<212> PRT															
<213> artificial sequence															
<220>															
<223> E441K mutant															
<400> 3															
Met	Leu	Asn	Ile	Glu	Asp	Glu	His	Arg	Leu	His	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu
1				5			10				15				
Pro	Asp	Val	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Trp	Leu	Ser	Asp	Phe	Pro	Gln	Ala
				20			25				30				
Trp	Ala	Glu	Thr	Gly	Gly	Met	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Leu
				35			40				45				

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr		
50	55	60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg		
65	70	75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr		
85	90	95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val		
100	105	110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr		
115	120	125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln		
130	135	140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu		
145	150	155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu		
165	170	175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe		
180	185	190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala		
195	200	205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp		
210	215	220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr		
225	230	235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala		
245	250	255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu		
260	265	270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val		
275	280	285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu		
290	295	300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met		
305	310	315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp		
325	330	335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu		
340	345	350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu		

355	360	365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys		
370	375	380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp		
385	390	395
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile		400
405	410	415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu		
420	425	430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Lys Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro		
435	440	445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu		
450	455	460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro		
465	470	475
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu		
485	490	495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln		
500	505	510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asn Gly Ser Ser Leu		
515	520	525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr		
530	535	540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg		
545	550	555
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys		
565	570	575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His		
580	585	590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly		
595	600	605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu		
610	615	620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys		
625	630	635
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala		
645	650	655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Gly		
660	665	670

Ser Gly Ser Ser Gly

675

<210> 4

<211> 677

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> E596K mutant

<400> 4

Met	Leu	Asn	Ile	Glu	Asp	Glu	His	Arg	Leu	His	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu
1				5					10					15	
Pro	Asp	Val	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Trp	Leu	Ser	Asp	Phe	Pro	Gln	Ala
			20					25					30		
Trp	Ala	Glu	Thr	Gly	Gly	Met	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Leu
		35					40					45			
Ile	Ile	Pro	Leu	Lys	Ala	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Ser	Ile	Lys	Gln	Tyr
	50					55				60					
Pro	Met	Ser	Gln	Glu	Ala	Arg	Leu	Gly	Ile	Lys	Pro	His	Ile	Gln	Arg
65				70				75						80	
Leu	Leu	Asp	Gln	Gly	Ile	Leu	Val	Pro	Cys	Gln	Ser	Pro	Trp	Asn	Thr
			85					90					95		
Pro	Leu	Leu	Pro	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Thr	Asn	Asp	Tyr	Arg	Pro	Val
			100					105					110		
Gln	Asp	Leu	Arg	Glu	Val	Asn	Lys	Arg	Val	Glu	Asp	Ile	His	Pro	Thr
			115				120					125			
Val	Pro	Asn	Pro	Tyr	Asn	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	His	Gln
			130				135					140			
Trp	Tyr	Thr	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asp	Ala	Phe	Phe	Cys	Leu	Arg	Leu
145				150						155				160	
His	Pro	Thr	Ser	Gln	Pro	Leu	Phe	Ala	Phe	Glu	Trp	Arg	Asp	Pro	Glu
				165					170					175	
Met	Gly	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Thr	Trp	Thr	Arg	Leu	Pro	Gln	Gly	Phe
			180					185					190		
Lys	Asn	Ser	Pro	Thr	Leu	Phe	Asp	Glu	Ala	Leu	His	Arg	Asp	Leu	Ala
			195					200					205		
Asp	Phe	Arg	Ile	Gln	His	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu	Leu	Gln	Tyr	Val	Asp
			210					215				220			
Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Ser	Glu	Leu	Asp	Cys	Gln	Gln	Gly	Thr
225				230						235				240	

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala		
245	250	255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu		
260	265	270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val		
275	280	285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu		
290	295	300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met		
305	310	315
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp		
325	330	335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu		
340	345	350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu		
355	360	365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys		
370	375	380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp		
385	390	395
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile		
405	410	415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu		
420	425	430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro		
435	440	445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu		
450	455	460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro		
465	470	475
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu		
485	490	495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln		
500	505	510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asn Gly Ser Ser Leu		
515	520	525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr		
530	535	540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg		

545	550	555	560
Ala Glu Leu Ile	Ala Leu Thr Gln Ala	Leu Lys Met Ala	Glu Gly Lys
	565	570	575
Lys Leu Asn Val	Tyr Thr Asp Ser Arg	Tyr Ala Phe Ala	Thr Ala His
	580	585	590
Ile His Gly Lys	Ile Tyr Arg Arg Arg	Gly Leu Leu Thr	Ser Glu Gly
	595	600	605
Lys Glu Ile Lys	Asn Lys Asp Glu Ile	Leu Ala Leu Leu	Lys Ala Leu
	610	615	620
Phe Leu Pro Lys	Arg Leu Ser Ile Ile	His Cys Pro Gly	His Gln Lys
625	630	635	640
Gly His Ser Ala	Glu Ala Arg Gly Asn	Arg Met Ala Asp	Gln Ala Ala
	645	650	655
Arg Lys Ala Ala	Ile Thr Glu Thr Pro	Asp Thr Ser Thr	Leu Leu Gly
	660	665	670
Ser Gly Ser Ser	Gly		
	675		
<210> 5			
<211> 677			
<212> PRT			
<213> artificial sequence			
<220>			
<223> K658E mutant			
<400> 5			
Met Leu Asn Ile	Glu Asp Glu His	Arg Leu His Glu	Thr Ser Lys Glu
1	5	10	15
Pro Asp Val Ser	Leu Gly Ser Thr	Trp Leu Ser Asp	Phe Pro Gln Ala
	20	25	30
Trp Ala Glu Thr	Gly Gly Met Gly	Leu Ala Val Arg	Gln Ala Pro Leu
	35	40	45
Ile Ile Pro Leu	Lys Ala Thr Ser	Thr Pro Val Ser	Ile Lys Gln Tyr
	50	55	60
Pro Met Ser Gln	Glu Ala Arg Leu	Gly Ile Lys Pro	His Ile Gln Arg
65	70	75	80
Leu Leu Asp Gln	Gly Ile Leu Val	Pro Cys Gln Ser	Pro Trp Asn Thr
	85	90	95
Pro Leu Leu Pro	Val Lys Lys Pro	Gly Thr Asn Asp	Tyr Arg Pro Val
	100	105	110
Gln Asp Leu Arg	Glu Val Asn Lys	Arg Val Glu Asp	Ile His Pro Thr

115	120	125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu	Leu Ser Gly Leu Pro Pro	Ser His Gln
130	135	140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu	Lys Asp Ala Phe Phe Cys	Leu Arg Leu
145	150	155
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu	Phe Ala Phe Glu Trp Arg	Asp Pro Glu
165	170	175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu	Thr Trp Thr Arg Leu Pro	Gln Gly Phe
180	185	190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe	Asp Glu Ala Leu His Arg	Asp Leu Ala
195	200	205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro	Asp Leu Ile Leu Leu Gln	Tyr Val Asp
210	215	220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr	Ser Glu Leu Asp Cys Gln	Gln Gly Thr
225	230	235
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu	Gly Asn Leu Gly Tyr Arg	Ala Ser Ala
245	250	255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln	Lys Gln Val Lys Tyr Leu	Gly Tyr Leu
260	265	270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp	Leu Thr Glu Ala Arg Lys	Glu Thr Val
275	280	285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys	Thr Pro Arg Gln Leu Arg	Glu Phe Leu
290	295	300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg	Leu Trp Ile Pro Gly Phe	Ala Glu Met
305	310	315
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu	Thr Lys Thr Gly Thr Leu	Phe Asn Trp
325	330	335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala	Tyr Gln Glu Ile Lys Gln	Ala Leu Leu
340	345	350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu	Pro Asp Leu Thr Lys Pro	Phe Glu Leu
355	360	365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly	Tyr Ala Lys Gly Val Leu	Thr Gln Lys
370	375	380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro	Val Ala Tyr Leu Ser Lys	Lys Leu Asp
385	390	395
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro	Pro Cys Leu Arg Met Val	Ala Ala Ile
405	410	415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala	Gly Lys Leu Thr Met Gly	Gln Pro Leu
420	425	430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro		
435	440	445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu		
450	455	460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro		
465	470	475
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu		
	485	490
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln		
	500	505
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asn Gly Ser Ser Leu		
	515	520
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr		
	530	535
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg		
545	550	555
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys		
	565	570
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His		
	580	585
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly		
	595	600
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu		
	610	615
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys		
625	630	635
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala		
	645	650
Arg Glu Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Gly		
	660	665
Ser Gly Ser Ser Gly		670
	675	

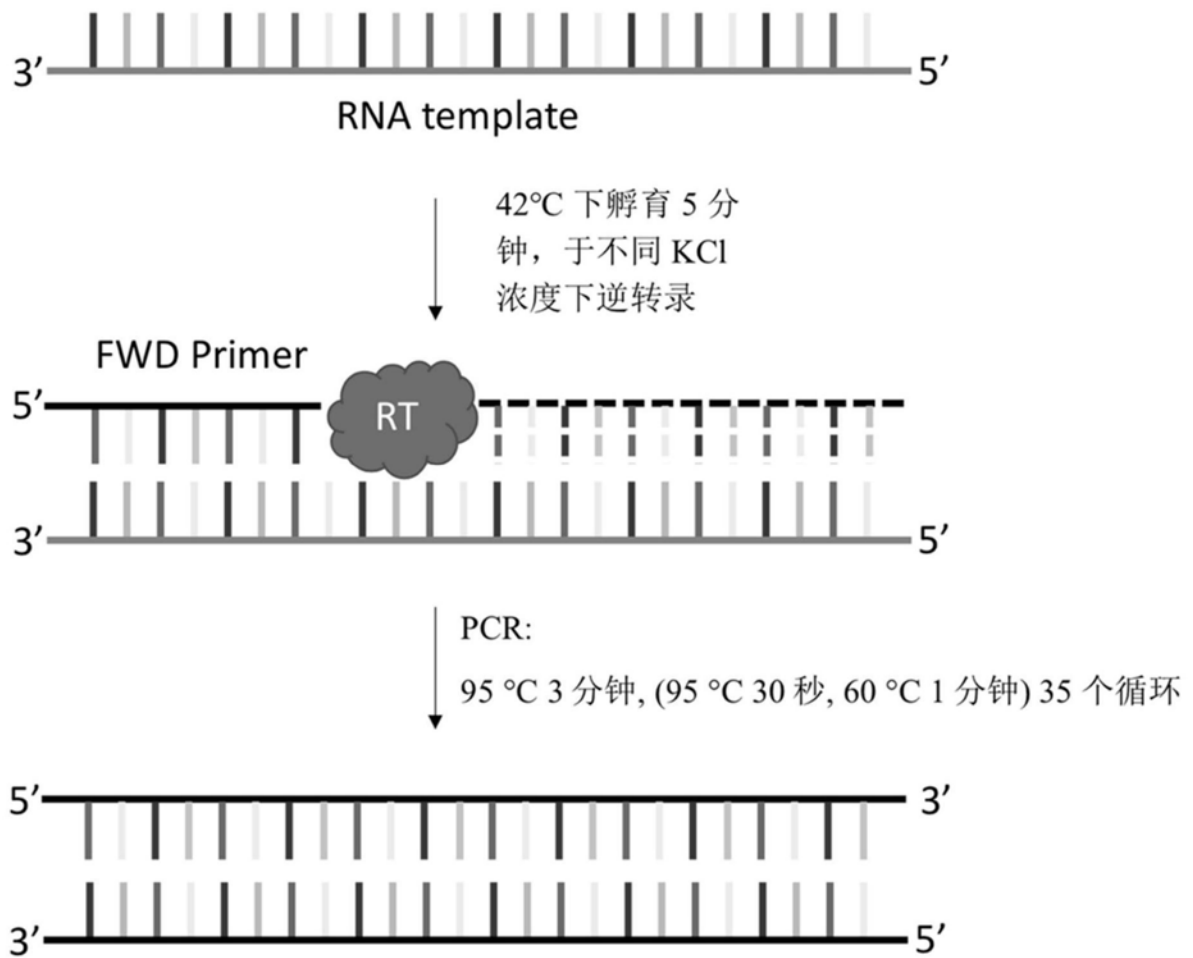


图1

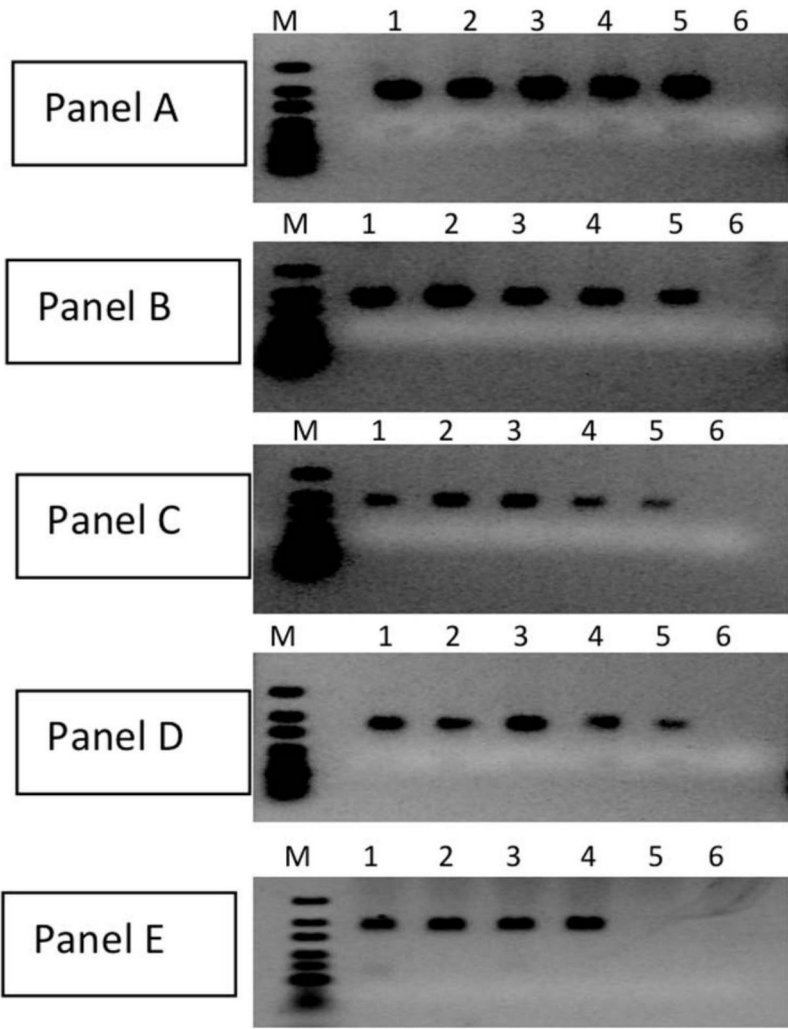


图2