



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103068984 B

(45)授权公告日 2017.12.01

(21)申请号 201080064860.1	PTA-10211 2009.09.25
(22)申请日 2010.12.28	PTA-10212 2009.07.14
(65)同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 103068984 A	PTA-10213 2009.07.14
(43)申请公布日 2013.04.24	PTA-10214 2009.07.14
(30)优先权数据 61/290,469 2009.12.28 US	PTA-10215 2009.07.14
(85)PCT国际申请进入国家阶段日 2012.08.28	PTA-10208 2009.07.14
(86)PCT国际申请的申请数据 PCT/US2010/062274 2010.12.28	(73)专利权人 DSM IP资产公司 地址 荷兰海尔伦 专利权人 梅里亚有限公司
(87)PCT国际申请的公布数据 W02011/082189 EN 2011.07.07	(72)发明人 K.E.埃普特 A-C.V. 贝恩 J.C.利普梅尔 X.郭 J.A.普利特查德
(83)生物保藏信息 PTA-9695 2009.01.07 PTA-9696 2009.01.07 PTA-9697 2009.01.07 PTA-9698 2009.01.07 PTA-10209 2009.09.25 PTA-10210 2009.09.25	(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105 代理人 谢梦欣
	(51)Int.Cl. C12N 15/45(2006.01) A61K 39/17(2006.01) 审查员 翟羽佳
	权利要求书1页 说明书14页 序列表9页 附图8页

(54)发明名称

微藻中血凝素-神经氨酸酶蛋白的生产

(57)摘要

本发明涉及重组微藻细胞及其用于生产异源血凝素-神经氨酸酶(HN)多肽的用途,以及组合物及其用途。

1. 一种生产血凝素-神经氨酸酶 (HN) 多肽的方法, 包括在培养基中培养重组微藻宿主细胞以产生异源HN多肽, 其中所述的重组微藻宿主细胞含有包含编码全长异源HN多肽的多核苷酸序列的核酸分子, 其中HN多肽包含膜结构域和天然HN信号肽, 以产生异源HN多肽, 和其中微藻宿主细胞不含有编码其它异源病毒多肽的多核苷酸序列, 其中所述方法进一步包括从培养基回收HN多肽; 其中所述HN多肽被分泌。

2. 依照权利要求1的方法, 其中所述HN多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:11是至少90%相同的。

3. 一种生产包含异源HN多肽的组合物的方法, 所述方法包括:

(a) 在微藻宿主细胞中表达全长异源HN多肽, 其中HN多肽包含膜结构域和天然HN信号肽, 和

(b) 在足以产生异源HN多肽的条件下培养微藻宿主细胞,

其中所述组合物是作为包含所述异源HN多肽的培养上清产生的, 和其中微藻宿主细胞不含有编码其它异源病毒多肽的多核苷酸序列, 并且其中所述HN多肽被分泌。

4. 依照权利要求3所述的方法, 其进一步包括从组合物中去除培养上清和在液体载体中重悬所述异源HN多肽。

5. 依照权利要求1或3所述的方法, 其中所述宿主细胞是网粘菌门 (Labyrinthulomycota) 宿主细胞。

6. 依照权利要求5所述的方法, 其中宿主细胞是裂殖壶菌属 (Schizochytrium) 或破囊壶菌属 (Thraustochytrium) 宿主细胞。

微藻中血凝素-神经氨酸酶蛋白的生产

[0001] 发明背景

技术领域

[0002] 本发明涉及一种重组微藻细胞及其在血凝素-神经氨酸酶 (HN) 多肽生产中的用途,以及组合物及其用途。

背景技术

[0003] 通过微生物发酵生产蛋白相对于现有的系统,例如植物和动物细胞培养具有一些优势。例如,基于微生物发酵的方法可以提供 (i) 高浓度蛋白的快速生产; (ii) 使用无菌、充分受控的生产条件 (例如良好生产规范 (GMP) 的条件) 的能力; (iii) 使用简单、化学上确定成分的生长培养基以允许更简单的发酵和更少杂质的能力; (iv) 人或动物病原体污染的规避; 和 (v) 易于回收蛋白 (例如通过从发酵培养基中分离)。此外,发酵设施通常比细胞培养设施建设的成本更低。

[0004] 微藻,例如破囊壶菌 (thraustochytrids),能够以标准的发酵设备,非常短的培养周期 (例如,1-5天),低廉的确定成分培养基和最低限度的纯化 (如果有的话) 进行培养。此外,某些微藻,例如裂殖壶菌属 (Schizochytrium),其生物质及自其衍生的脂质具有已经证明的用于食品应用的安全历史。例如,来自此类微生物的富含DHA的甘油三酯油已获得美国食品和药物管理局的GRAS (一般认为安全) 状态。

[0005] 微藻已被证明能够表达重组蛋白。例如,美国专利第7,001,772号公开了第一个适于转化破囊壶菌,包括裂殖壶菌属成员的重组构建体。此出版物公开了乙酰乳酸合酶、乙酰乳酸合酶启动子和终止子区、 α -微管蛋白启动子、来自聚酮合酶 (PKS) 系统的启动子、和脂肪酸去饱和酶启动子的裂殖壶菌属核酸和氨基酸序列等。美国申请公开号2006/0275904和2006/0286650随后公开了肌动蛋白、延伸因子1 α (ef1 α) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 启动子和终止子的裂殖壶菌序列。

[0006] 病毒疫苗通常从与为了用它们进行防治的疾病对应的病毒培养物的灭活或减毒制备物制备。通常,病毒是从与病毒在野生环境可能感染的细胞类型相同或相似的细胞类型培养而来。这种细胞培养价格昂贵而且往往难以形成规模。为了解决此问题,已经尝试在转基因宿主中表达病毒蛋白抗原,这可以使培养成本更低并且更适于形成规模。然而,病毒膜蛋白,例如血凝素-神经氨酸酶 (HN) 蛋白的大量产生是非常困难的,而且在异源系统中全部或部分地表达病毒包膜蛋白的尝试常常仅能获得有限的成功。因此,对于能够规模化并能够产生病毒HN抗原的新的异源表达系统,例如本发明的系统,具有需求。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及一种生产血凝素-神经氨酸酶 (HN) 多肽的方法,包括在培养基中培养重组微藻宿主细胞以产生异源HN多肽,其中所述重组微藻宿主细胞含有包含编码异源HN多肽的多核苷酸序列的核酸分子。在一些实施方案中,HN多肽被分泌。在一些实施方案中,该方法进一步包括从培养基回收HN多肽。在一些实施方案中,所述HN多肽与SEQ ID NO:2或

SEQ ID NO:11是至少90%相同的。在一些实施方案中,编码HN多肽的多核苷酸序列进一步包含膜结构域。

[0009] 本发明涉及一种生产包含异源HN多肽的组合物的方法,该方法包括:(a)在微藻宿主细胞中表达异源HN多肽,并(b)在足以产生异源HN多肽的条件下培养所述微藻宿主细胞,其中所述组合物作为包含所述异源HN多肽的培养上清产生。在一些实施方案中,该方法进一步包括从组合物中去除培养上清和在液体载体中重悬所述异源HN多肽。

[0010] 在一些实施方案中,上述任意一种方法的宿主细胞是网粘菌门(Labyrinthulomycota)宿主细胞。在一些实施方案中,上述任意一种方法的宿主细胞是裂殖壶菌属或破囊壶菌属宿主细胞。

[0011] 本发明涉及一种重组微藻细胞,其含有包含编码异源HN蛋白的多核苷酸序列的核酸分子。在一些实施方案中,HN蛋白与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:11是至少90%相同的。在一些实施方案中,编码HN蛋白的多核苷酸序列进一步包含膜结构域。在一些实施方案中,微藻细胞是网粘菌门宿主细胞。在一些实施方案中,微藻细胞是裂殖壶菌属或破囊壶菌属宿主细胞。

[0012] 附图简述

[0013] 图1显示了编码新城疫病毒的血凝素-神经氨酸酶(HN)蛋白的多核苷酸序列(SEQ ID NO:1),该序列经过优化以在裂殖壶菌属菌种ATCC 20888中表达。

[0014] 图2显示了裂殖壶菌属的密码子选择表。

[0015] 图3显示了pCL0081[pEPCT(+)-caliNDV_HN]的质粒图谱,也称为pCL0081。

[0016] 图4显示了转基因裂殖壶菌属CL0081-23("23")进行的HN蛋白的分泌。分离低速上清和不溶级分的离心流程如图4A所示。从低速上清回收的重组HN蛋白(如箭头所示)显示于考马斯染色的凝胶("考马斯")和抗-NDV免疫印迹("IB:抗-NDV")中,如图4B所示,并且从不溶级分回收的如图4C所示。共纯化的肌动蛋白条带用星号表示。

[0017] 图5显示了回收的重组HN蛋白的肽序列分析,这是通过涵盖蛋白序列(SEQ ID NO:2)68%的共32条多肽确定的。胰蛋白酶位点用下划线表示。

[0018] 图6A和图6B显示了示例裂殖壶菌属中HN蛋白糖基化的考马斯染色凝胶("考马斯")和抗-NDV免疫印迹("IB:抗-NDV")。"-Ctrl"指免疫印迹的阴性对照,其是转基因裂殖壶菌属AB0018。"23"指转基因裂殖壶菌属CL0081-23。"EndoH"和"PNGase F"指转基因裂殖壶菌属CL0081-23的不溶级分使用各个酶的酶处理。"NT"指不用酶但在与EndoH和PNGase F处理相同条件下温育的转基因裂殖壶菌属CL0081-23。

[0019] 图7显示了通过总离子流映射(total ion mapping)确定的天然裂殖壶菌分泌的蛋白的N-聚糖结构。

[0020] 图8显示了NSI-总离子流映射获得的聚糖种类。

[0021] 图9显示了来自转基因裂殖壶菌属CL0081-23("23")上清的HN的血凝素活性。"[蛋白质]"指蛋白浓度,随样品稀释度增加而从左至右降低。"-"指缺少HN的阴性对照。"+"指流感血凝素阳性对照。"HAU"指基于从左至右的样品倍数稀释的血凝素活性单位。"2"指第一孔中2倍稀释的样品;从左至右的随后的孔代表在上一孔之上的加倍稀释,从而使从左至右从第一孔到最后的孔的倍数稀释是2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024、2048和4096。

[0022] 图10显示了基于使用SignalP算法预测的天然裂殖壶菌属的信号锚序列。参见,例

如, Bendsten等, J, Mol. Biol. 340:783-795 (2004); Nielsen, H. 和 Krogh, A. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 6:122-130 (1998); Nielsen, H. 等, Protein Engineering 12:3-9 (1999); Emanuelsson, O. 等, Nature Protocols 2:953-971 (2007)。

[0023] 发明详述

[0024] 本发明涉及在微藻宿主细胞中异源血凝素-神经氨酸酶(HN)多肽的生产。本发明还涉及包含异源HN多肽的微藻宿主细胞, 产自所述微藻宿主细胞的HN多肽, 以及组合物及其用途。

[0025] 微藻宿主细胞

[0026] 微藻, 又称微小藻类(microscopic algae), 经常发现于淡水和海洋系统。微藻是单细胞的但也可以生长成链和组。单个细胞的大小从几微米到几百微米。因为细胞能够生长在含水悬液中, 它们能有效地获得营养和进入液体环境。

[0027] 在一些实施方案中, 微藻宿主细胞是不等鞭毛体(heterokont)或原生藻菌(stramenopile)。

[0028] 在一些实施方案中, 微藻宿主细胞是网粘菌门(Labyrinthulomycota)成员。在一些实施方案中, 网粘菌门宿主细胞是破囊壶菌目(Thraustochytriales)或网粘菌目(Labyrinthulales)成员。根据本发明, 术语“破囊壶菌(thraustochytrid)”是指破囊壶菌目(Thraustochytriales)的任何成员, 包括破囊壶菌科(Thraustochytriaceae), 而术语“网粘菌(labyrinthulid)”是指网粘菌目(Labyrinthulales)的任何成员, 包括网粘菌科(Labyrinthulaceae)。网粘菌科的成员从前曾被认为是破囊壶菌目的成员, 但是在最近此类生物体的分类学归类的修订版中, 网粘菌科现在被认为是网粘菌目的成员。网粘菌目和破囊壶菌目均被认为是网粘菌门的成员。分类学理论现在通常将这两个群的微生物与原生藻菌世系中的藻或藻样原生生物放在一起。破囊壶菌和网粘菌当前的分类学地位可以归纳如下:

[0029] 界: 藻菌界(Stramenopila) (管毛生物界(Chromista))

[0030] 门: 网粘菌门(Labyrinthulomycota) (不等毛门(Heterokonta))

[0031] 纲: 网粘菌纲(Labyrinthulomycetes) (Labyrinthulae)

[0032] 目: 网粘菌目(Labyrinthulales)

[0033] 科: 网粘菌科(Labyrinthulaceae)

[0034] 目: 破囊壶菌目(Thraustochytriales)

[0035] 科: 破囊壶菌科(Thraustochytriaceae)

[0036] 对于本发明的目的而言, 作为破囊壶菌描述的菌株包括如下生物体: 目: 破囊壶菌目; 科: 破囊壶菌科; 属: 破囊壶菌属(种: 菌种, arudimentale, aureum, benthicola, globosum, kinnei, motivum, multirudimentale, pachydermum, proliferum, roseum, striatum)、吾肯氏壶菌属(Ulkenia) (种: 菌种, amoeboida, kerguelensis, minuta, profunda, radiata, sailens, sarkariana, schizochytrops, visurgensis, yorkensis)、裂殖壶菌属(种: 菌种, aggregatum, limnaceum, mangrovei, minutum, octosporum), Japonochytrium属(种: 菌种, marinum)、Aplanochytrium属(种: 菌种, haliotidis, kerguelensis, profunda, stocchinoi)、Althornia属(种: 菌种, crouchii)、或Elina属(种: 菌种, marisalba, sinorifica)。出于本发明的目的, 吾肯氏壶菌属中描述的物种将被看作

是破囊壶菌属的成员。*Aurantiochytrium*、*Oblongichytrium*、*Botryochytrium*、*Parietichytrium*、和*Sicyoidochytrium*是本发明网粘菌门包括的额外的属。

[0037] 本发明作为网粘菌描述的菌株包括如下生物体：目：网粘菌目，科：网粘菌科，属：网粘菌属（种：菌种，*algeriensis*，*coenocystis*，*chattonii*，*macrocystis*，*macrocystis atlantica*，*macrocystis macrocystis*，*marina*，*minuta*，*roscoffensis*，*valkanovii*，*vitellina*，*vitellina pacifica*，*vitellina vitellina*，*zopfii*），*Labyrinthuloides*属（种：菌种，*haliotidis*，*yorkensis*），*Labyrinthomyxa*属（种：菌种，*marina*），*Diolophrys*属（种：菌种，*archeri*），*Pyrrhosorus*属（种：菌种，*marinus*），*Sorodiplophrys*属（种：菌种，*stercorea*）或*Chlamydomyxa*属（种：菌种，*labyrinthuloides*，*montana*）（尽管关于*Pyrrhosorus*、*Sorodiplophrys*或*Chlamydomyxa*的精确分类学地位目前尚没有达成一致）。

[0038] 网粘菌门的微藻细胞包括但不限于保藏菌株PTA-10212、PTA-10213、PTA-10214、PTA-10215、PTA-9695、PTA-9696、PTA-9697、PTA-9698、PTA-10208、PTA-10209、PTA-10210、PTA-10211、以SAM2179保藏的微生物（保藏者命名为“吾肯氏壶菌SAM2179”）、任何破囊壶菌属菌种（包括前述的吾肯氏壶菌属菌种，例如*U. visurgensis*，*U. amoeboida*，*U. sarkariana*，*U. profunda*，*U. radiata*，*U. minuta*和吾肯氏壶菌菌种BP-5601），并且包括*Thraustochytrium striatum*，*Thraustochytrium aureum*，*Thraustochytrium roseum*；和任何*Japonochytrium*属菌种。破囊壶菌目菌株包括但不限于破囊壶菌属菌种（23B）（ATCC 20891）；*Thraustochytrium striatum*（Schneider）（ATCC 24473）；*Thraustochytrium aureum*（Goldstein）（ATCC 34304）；*Thraustochytrium roseum*（Goldstein）（ATCC 28210）；和*Japonochytrium*属菌种（L1）（ATCC 28207）。裂殖壶菌属包括但不限于*Schizochytrium aggregatum*，*Schizochytrium limacinum*，裂殖壶菌属菌种（S31）（ATCC 20888），裂殖壶菌属菌种（S8）（ATCC 20889），裂殖壶菌属菌种（LC-RM）（ATCC 18915），裂殖壶菌属菌种（SR 21），保藏菌株ATCC 28209，和保藏的*Schizochytrium limacinum*菌株IFO 32693。在一些实施方案中，细胞是裂殖壶菌属（*Schizochytrium*）或破囊壶菌属（*Thraustochytrium*）的。裂殖壶菌属能够通过连续二等分裂和通过形成孢子囊两种方式复制，最终释放游动孢子。但是，破囊壶菌属仅通过形成孢子囊复制，然后释放游动孢子。

[0039] 在一些实施方案中，微藻宿主细胞是破囊壶菌属的。在一些实施方案中，微藻宿主细胞是裂殖壶菌属或破囊壶菌属细胞。

[0040] 在一些实施方案中，微藻宿主细胞是网粘菌。

[0041] 在一些实施方案中，微藻宿主细胞含有包含编码选择标记的核酸序列的重组载体。在一些实施方案中，选择标记允许选择经转化的微生物。在一些实施方案中，选择标记是营养缺陷标记、显性选择标记（如，例如，降解抗生素活性的酶），或另一种参与转化选择的蛋白。

[0042] 根据本发明，术语“转化”是指能够将外源核酸分子（即，重组核酸分子）插入微生物细胞的任何方法。在微生物体系中，术语“转化”用来描述由于微生物获得外源核酸所致的一种遗传性改变而且基本上与术语“转染”同义。用于将外源核酸分子引入网粘菌门宿主细胞的合适的转化技术，包括但不限于粒子轰击、电穿孔、显微注射，脂转染、吸附、感染和原生质体融合。在一些实施方案中，将外源核酸分子包括重组载体，引入处于静止阶段的微生物细胞。

[0043] 在本发明的一些实施方案中,微藻宿主细胞经遗传修饰引入或删除参与与转运和/或合成碳水化合物相关的生物合成途径的基因,包括那些参与糖基化的基因。例如,可以通过删除内源性糖基化基因和/或插入人或动物的糖基化基因来修饰宿主细胞以使糖基化模式能够更接近地类似于人的模式。在酵母中的糖基化修饰示于,例如,美国专利第7,029,872号和美国申请公开号2004/0171826,2004/0230042,2006/0257399,2006/0029604和2006/0040353。在一些实施方案中,微藻宿主细胞包括其中RNA病毒元件用于增加或调节基因表达的细胞。

[0044] 用于微藻宿主细胞的有效培养条件包括但不限于允许蛋白产生和/或重组的有效培养基、生物反应器、温度、pH和氧条件。有效的培养基指任何通常培养微藻细胞的培养基。这种培养基通常包含具有可同化的碳、氮、和磷源、以及适当的盐、无机物、金属和其他营养物质,如维生素的含水培养基。适合破囊壶菌目微生物的非限制性培养条件描述于,例如,美国专利第5,340,742号。本发明的细胞可以培养于常规的发酶生物反应器、摇瓶、试管、微滴定皿和培养皿中。可以在适于重组细胞的温度、pH和氧含量下进行培养。

[0045] 破囊壶菌宿主细胞的非限制性发酶条件如下表1所示。

[0046] 表1:容器培养基

	<u>成分</u>	<u>浓度</u>	<u>范围</u>
	Na ₂ SO ₄	g/L 13.62	0-50, 15-45, 或 25-35
	K ₂ SO ₄	g/L 0.72	0-25, 0.1-10, 或 0.5-5
	KCl	g/L 0.56	0-5, 0.25-3, 或 0.5-2
[0047]	MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L 2.27	0-10, 1-8, 或 2-6
	(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L 17.5	0-50, 0.25-30, 或 5-20
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	g/L 0.19	0.1-5, 0.1-3, 或 0.15-1
	KH ₂ PO ₄	g/L 6.0	0-20, 0.1-10, 或 1-7
[0048]	<u>高压灭菌后(金属)</u>		
	柠檬酸	mg/L 3.50	0.1-5000, 1-3000, 或 3-2500
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L 51.5	0.1-1000, 1-500, 或 5-100
[0049]	MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/L 3.10	0.1-100, 1-50, 或 2-25
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L 6.20	0.1-100, 1-50, 或 2-25
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/L 0.04	0-1, 0.001-0.1, 或 0.01-0.1
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/L 0.04	0.001-1, 0.005-0.5, 或 0.01-0.1
[0050]	CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/L 2.07	0.1-100, 0.5-50, 或 1-25
	NiSO ₄ ·6H ₂ O	mg/L 2.07	0.1-100, 0.5-50, 或 1-25
[0051]	<u>高压灭菌后(维生素)</u>		

[0052]	硫胺素**	mg/L	9.75	0.1-100, 1-50, 或 5-25
	维生素 B12**	mg/L	0.16	0.01-100, 0.05-5, 或 0.1-1.0
	Ca ^{1/2} -泛酸盐**	mg/L	3.33	0.1-100, 0.1-50, 或 1-10

** 过滤灭菌并在高压灭菌后加入

[0053] 高压灭菌后(碳)

[0054] 葡萄糖g/L 20.05-150, 10-100, 或20-50

[0055] 氮供料:

[0056] 成分 浓度

NH₄OH mL/L 23.6 5-150, 10-100, 15-50

[0057] 常规培养条件包括下列:

[0058] pH: 5.5-9.5, 6.5-8.0, 或6.3-7.3

[0059] 温度: 15°C-45°C, 18°C-35°C, 或20°C-30°C

[0060] 溶解氧: 0.1%-100%饱和, 5%-50%饱和, 或10%-30%饱和

[0061] 受控制的葡萄糖: 5g/L-100g/L, 10g/L-40g/L, 或15g/L-35g/L。

[0062] 多肽

[0063] 本发明也涉及包含异源HN多肽的微藻宿主细胞及自其产生的HN多肽。本文使用的术语“异源”指例如非天然在微藻宿主细胞中发现的序列或多肽。

[0064] 术语“多肽”包括单链多肽分子以及多重-多肽复合物, 其中单个组分性多肽通过共价或非共价手段相连。根据本发明, 分离的多肽是从其天然环境中移出的多肽(即, 已经经过人为操作), 并且例如包括纯化的蛋白、纯化的肽、部分纯化的蛋白、部分纯化的肽、重组产生的蛋白或肽、和合成产生的蛋白和肽。

[0065] 在一些实施方案中, 异源HN多肽包含膜结构域。本文所用的术语“膜结构域”是指将多肽靶向到膜和/或允许多肽保持膜相关联的多肽中的任何结构域, 而且包括但不限于, 跨膜结构域(例如单次或多次跨膜区)、完整单境域(integral monotopic domain)、信号锚序列, ER信号序列、N-端或内部或C-端终止转移信号、糖基磷脂酰肌醇锚, 及其组合。膜结构域可以位于多肽中的任何位置, 包括多肽的N-端、C-端或中间。膜结构域可以与永久或暂时将多肽附着于膜相关。在一些实施方案中, 膜结构域可以从膜蛋白裂解。在一些实施方案中, 膜结构域是信号锚序列。在一些实施方案中, 膜结构域是如图10所示的任何信号锚序列或自其衍生的锚序列。在一些实施方案中, 膜结构域是病毒信号锚序列。

[0066] 在一些实施方案中, 异源HN多肽包含是天然HN蛋白膜结构域的膜结构域。HN是包含单一膜结构域的II型膜蛋白, 其中C-末端是胞外的而N-末端是胞质的。N-末端进一步包含信号锚序列。

[0067] 在一些实施方案中, 异源HN多肽不包含天然膜结构域, 而是经过重组与异源膜结构域融合。在一些实施方案中, 膜结构域是微藻膜结构域。在一些实施方案中, 膜结构域是网粘菌门膜结构域。在一些实施方案中, 膜结构域是破囊壶菌膜结构域。在一些实施方案中, 膜结构域是裂殖壶菌属或破囊壶菌属膜结构域。在一些实施方案中, 膜结构域包含来自裂殖壶菌属 α -1,3-甘露糖基- β -1,2-GlcNac-转移酶-I-样蛋白#1 (SEQ ID NO:3)、裂殖壶菌属 β -1,2-木糖基转移酶样蛋白#1 (SEQ ID NO:5)、裂殖壶菌属 β -1,4-木糖苷酶样蛋白 (SEQ

ID NO:7)或裂殖壶菌属半乳糖基转移酶样蛋白#5 (SEQ ID NO:9)的信号锚序列。

[0068] 在一些实施方案中,异源膜结构域来自与HN蛋白是不同类型的膜蛋白。例如,如Chou和Elrod, *Proteins: Structure, Function and Genetics* 34:137-153 (1999)描述的,其他类型的膜蛋白包括:

[0069] 1) I型膜蛋白:这些蛋白在成熟蛋白中具有单个跨膜结构域。N-末端是胞外的,而C-末端是胞质的。这些蛋白细分为Ia型(含可切割信号序列)和Ib型(无可切割信号序列)。

[0070] 2) 多次跨膜蛋白:在I型和II膜蛋白中多肽跨越脂双层1次,而在多次跨膜蛋白中多肽跨越膜多次。多次跨膜蛋白也细分为IIIa型和IIIb型。IIIa型蛋白具有可切割的信号序列。IIIb型蛋白的氨末端暴露于膜的外表面,但不具有可切割的信号序列。

[0071] 3) 脂质链锚定的膜蛋白:这些蛋白通过一个或更多共价附接的脂肪酸链或其他类型的称为异戊二烯基的脂质链与膜双层相连。

[0072] 4) GPI锚定的膜蛋白:这些蛋白通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚与膜结合。

[0073] 5) 外周膜蛋白:这些蛋白通过与其他膜蛋白的非共价相互作用间接与膜结合。

[0074] 在一些实施方案中,异源膜结构域来自与HN蛋白不同的II型膜蛋白。在一些实施方案中,异源II型膜结构域的N-末端包含信号锚序列。

[0075] 在一些实施方案中,异源HN多肽是一种糖蛋白。在一些实施方案中,异源HN多肽具有在网粘菌门细胞中表达的糖基化模式特点。在一些实施方案中,异源HN多肽具有在破囊壶菌细胞中表达的糖基化模式特点。在一些实施方案中,在微藻宿主细胞中表达的异源HN多肽是具有比酵母或大肠杆菌中产生的蛋白更接近地类似于哺乳动物糖基化模式的糖基化模式的糖蛋白。在一些实施方案中,糖基化模式包括N-联糖基化模式。在一些实施方案中,糖蛋白包括高甘露寡糖。在一些实施方案中,糖蛋白基本上不含唾液酸。本文使用的术语“基本上不含唾液酸”是指低于10%、低于9%、低于8%、低于7%、低于6%、低于5%、低于4%、低于3%、低于2%、或低于1%的唾液酸。在一些实施方案中,糖蛋白中不存在唾液酸。

[0076] 在一些实施方案中,用于在微藻宿主细胞中表达异源HN多肽的表达系统包含在微藻宿主细胞中有活性的调节性调控元件。在一些实施方案中,表达系统包含在网粘菌门细胞中有活性的调节性调控元件。在一些实施方案中,表达系统包含在网粘菌纲中有活性的调节性调控元件。在一些实施方案中,表达系统包含在破囊壶菌中有活性的调节性调控元件。在一些实施方案中,表达系统包含在裂殖壶菌属或破囊壶菌属中有活性的调节性调控元件。许多微藻调节性调控元件,包括各种启动子,在许多不同物种中具有活性。

[0077] 在一些实施方案中,用于在微藻宿主细胞中表达异源HN多肽的表达系统包含衍生自微藻序列的调节元件。在一些实施方案中,在微藻宿主细胞中表达异源HN多肽的表达系统包含衍生自非微藻序列的调节元件。在一些实施方案中,表达系统包含编码异源HN多肽的多核苷酸序列,其中所述多核苷酸序列与在微藻宿主细胞中有功能的任何启动子序列、任何终止子序列、和/或任何其他调节序列相连。可以使用诱导性或组成型活性的序列。

[0078] 本发明还包括使用表达盒以供在微藻宿主细胞中表达异源HN多肽。表达盒的设计和构建使用本领域技术人员已知的标准分子生物学技术。参见,例如,Sambrook等,2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版。在一些实施方案中,微藻宿主细胞包含含有遗传元件的表达盒,例如至少启动子、编码序列、和终止子区,它们以在微藻宿主细胞中有功能的方式可操作地连接。在一些实施方案中,表达盒包含编码膜结构域的多核苷

酸序列。在一些实施方案中,表达盒包含编码信号锚序列的多核苷酸序列。在一些实施方案中,编码信号锚序列的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、或SEQ ID NO:10。

[0079] 在一些实施方案中,编码异源HN多肽的分离的核酸序列可操作地连接启动子序列和/或终止子序列,两者都是在宿主细胞中有功能的。启动子和/或终止子序列与编码要表达的异源HN多肽的分离的核酸序列可操作地连接并且可以包括任何启动子和/或终止子序列。可以使用诱导性或组成型活性的调节序列。调节序列包括但不限于美国申请公开号2010/0233760、美国专利第7,001,772号和美国申请公开号2006/0275904和2006/0286650中描述的裂殖壶菌属调节序列,例如OrfC启动子、OrfC终止子、EF1短启动子、EF1长启动子、Sec1启动子、60S短启动子、60S长启动子、乙酰乳酸合酶启动子、乙酰乳酸合酶终止子、 α -微管蛋白启动子、聚酮合酶(PKS)系统的启动子、脂肪酸去饱和酶启动子、肌动蛋白启动子、肌动蛋白终止子、延伸因子1 α (EF1 α)启动子、ef1 α 终止子、甘油醛3-磷酸脱氢酶(gapdh)启动子、gapdh终止子,及其组合,或其他在微藻细胞中有功能的调节序列,在所述微藻细胞中其经转化与编码异源HN多肽的多核苷酸序列可操作地连接。在一些实施方案中,编码异源HN多肽的多核苷酸序列可操作地连接编码膜结构域的多核苷酸。在一些实施方案中,编码异源HN多肽的多核苷酸序列是为特定微藻宿主细胞密码子优化的,以优化翻译效率。

[0080] 在一些实施方案中,微藻宿主细胞含有包含如上所述的表达盒的重组载体。重组载体包括但不限于质粒、噬菌体和病毒。在一些实施方案中,重组载体是线性载体。在一些实施方案中,重组载体是表达载体。如本文使用的短语“表达载体”指适于异源HN多肽产生的载体。在一些实施方案中,编码异源HN多肽的多核苷酸序列插入重组载体以产生重组核酸分子。在一些实施方案中,重组载体包含选择标记以选择包含重组载体的重组微藻宿主细胞。在一些实施方案中,重组载体包含可操作地连接异源HN多肽的膜结构域。

[0081] 在一些实施方案中,异源HN多肽是包含与已知的HN序列,例如,SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:11,具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%同一性的氨基酸序列的多肽,或编码包含与已知的HN序列,例如,SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:11,具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%同一性的氨基酸序列的异源HN多肽的多核苷酸,其中所述多肽能够由特异性结合HN序列的抗体识别。

[0082] 本发明也涉及异源HN多肽的生产方法,包括在培养基中培养重组微藻宿主细胞以产生异源HN多肽,其中所述重组微藻宿主细胞包括包含编码异源HN多肽的多核苷酸序列的核酸分子。

[0083] 在一些实施方案中,产自微藻宿主细胞的异源HN多肽以商业规模生产。

[0084] 本发明也涉及包括产自微藻宿主细胞的异源HN多肽和含水液体载体的组合物。

[0085] 在一些实施方案中,从培养微藻宿主细胞的培养基或发酵培养基中回收异源HN多肽。在一些实施方案中,产自微藻宿主细胞的异源HN多肽可以以“基本上纯”的形式分离。如本文所使用,“基本上纯”指允许有效使用产自微藻宿主细胞的异源HN多肽作为商业产品的纯度。

[0086] 本发明也涉及一种生产包含异源HN多肽的组合物方法,该方法包括:(a)在微藻宿主细胞中表达异源HN多肽,和(b)在足以产生包含异源HN多肽的微藻宿主细胞的培养条

件下培养微藻宿主细胞,其中组合物是作为包含异源HN多肽的培养上清生成的。在一些实施方案中,该方法进一步包括去除培养上清并在含水液体载体中重悬异源HN多肽。在一些实施方案中,将所述组合物用作疫苗。

[0087] 在一些实施方案中,本文所述的微藻宿主细胞表达异源HN多肽,除了其他所需的病毒HN抗原外,所述多肽不含或基本上不含相关的病毒物质,例如病毒遗传物质。本文使用的术语“接玻尿酸不含相关的病毒物质”指相关的病毒物质低于10%、低于9%、低于8%、低于7%、低于5%、低于4%、低于3%、低于2%、或低于1%。

[0088] 本发明还涉及NDV疫苗或组合物,其包含有效量的重组NDV HN抗原和药学或兽医学上可接受的载体、赋形剂、或载剂(vehicle),其中所述重组NDV HN抗原在微藻细胞中表达。在一些实施方案中,微藻细胞是裂殖壶菌属的。在一些实施方案中,NDV HN抗原是部分纯化的,或实质上纯化的。在一些实施方案中,NDV抗原存在于整体收获的微藻中。在一些实施方案中,NDV抗原是“生物质”的形式,其是收获的微藻的裂解物。在一些实施方案中,重组NDV HN抗原的在转基因微藻细胞中表达。

[0089] 本发明还涉及实质上纯化的在微藻中表达的NDV HN抗原。

[0090] 本发明还涉及用表达NDV HN多肽或其片段或变体的基因稳定转化的微藻细胞或培养物。

[0091] 本发明也涉及生产多肽的方法,包括:(a)在微藻培养基中培养微藻细胞培养物,其中微藻细胞培养物经稳定转化以表达多肽,而其中多肽表达自包含多肽编码序列的核苷酸序列和:可操作地连接的指导多肽分泌到培养基中的信号肽编码序列,或可操作地连接的与膜结构域相关的序列;和(b)从培养基收集多肽。在一些实施方案中,膜结构域是NDV HN膜结构域。术语收集包括但不限于从培养基收获或纯化。重组多肽在微藻中产生后,本领域任何可用的方法可用于蛋白纯化。各个步骤包括从非蛋白或微藻材料释放蛋白,接着从其他蛋白中纯化感兴趣的蛋白。纯化过程的初始步骤包括离心、过滤或两者的联合。分泌到组织的胞外间隙内的蛋白可以使用真空或离心提取获得。最小化处理也可以涉及粗产品的制备。其他方法包括浸渍和提取以允许直接使用提取物。这些纯化感兴趣的蛋白的方法可以利用蛋白大小、物理化学性质和结合亲和力的差异。这些方法包括层析、包括普鲁卡因胺亲和、排阻、高压液相、反相、阴离子交换层析,亲和标签、过滤等。特别的是,固定化Niion亲和层析可用于纯化表达的蛋白。参见,Favacho等,Protein Expression and Purification 46:196-203 (2006)。也参见,Zhou等,Protein J 26:29-37 (2007);Wang等,Vaccine 15:2176-2185 (2006);和WO/2009/076778。防护剂,例如渗透剂、抗氧化剂、酚类氧化抑制剂、蛋白酶抑制剂等可用于纯化过程。

[0092] 利用微藻宿主细胞和异源HN多肽的方法

[0093] 本发明也包括包含异源HN多肽的微藻宿主细胞、产自微藻宿主细胞的异源HN多肽及其组合物用于在动物或人中在从预防性治疗到疾病中的治疗性应用。

[0094] 术语“处理”和“治疗”指治疗性治疗和预防或防止性措施,其中目标是防止或缓解(减轻)不需要的生理状况、疾病或失调,或是获得有益或需要的临床结果。对于本发明目的,有益或需要的临床结果包括但不限于缓解或消除与某一病症、疾病或失调相关的症状或征兆;减轻某一病症、疾病或失调的程度;稳定某一病症、疾病或失调(即其中所述病症、疾病或失调不恶化);延迟所述病症、疾病或失调的发生或进展;改善所述病症、疾病或失

调;缓和(无论组分或全部且无论可检测或不可检测)所述病症、疾病或失调;或者改良或者改进某一病症、疾病或失调。治疗包括引出临床上显著的反应而没有过多的副作用。治疗也包括与若不接受治疗的预期存活期相比,延长存活期。

[0095] 在一些实施方案中,从培养上清回收产自微藻宿主细胞的异源HN多肽以直接用作动物或人疫苗。

[0096] 在一些实施方案中,根据感兴趣的用途的要求,例如作为疫苗施用,纯化产自微藻宿主细胞的异源HN多肽。对于典型的人疫苗应用,低速上清会通过浓缩(例如切向过滤接超滤)、层析分离(例如阴离子交换层析)、体积排阻层析、和灭菌(例如0.2 μ m过滤)进行初始纯化。在一些实施方案中,本发明的疫苗没有潜在的变应原性遗留蛋白(carry-over protein),例如,蛋中的蛋白。在一些实施方案中,与病毒HN多肽不同,产自微藻宿主细胞的包含异源HN多肽的疫苗没有任何病毒物质。

[0097] 根据公开的方法,施用可以,例如,通过肌肉内(i.m.)、静脉内(i.v.)、皮下(s.c.)、或肺内途径。施用的其他合适途径包括但不限于气管内、透皮、眼内、鼻内、吸入、腔内、导管内(例如,到胰腺内)和脑实质内(例如到任何组织)施用。透皮递送包括但不限于,皮内(例如进入真皮或表皮)、透皮(例如经皮)、和经粘膜施用(例如进入或通过皮肤或粘膜组织)。腔内施用包括但不限于,施用到口腔、阴道、直肠、鼻、腹膜、和肠腔、以及鞘内(例如进入椎管),室内(例如到脑室或心室内)、房内的(例如进入心房)和蛛网膜下(例如到脑蛛网膜下腔内)施用。

[0098] 在一些实施方案中,本发明包括含有产自微藻宿主细胞的异源HN多肽的组合物。在一些实施方案中,组合物包含含水液体载体。在进一步的实施方案中,含水液体载体是培养上清。在一些实施方案中,本发明的组合物包括本领域已知的常规药学上可接受的赋形剂,例如但不限于,人血清白蛋白、离子交换剂、氧化铝、卵磷脂、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、和盐或电解质,例如硫酸鱼精蛋白,以及例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第21版.(2005)所列的赋形剂。

[0099] 本发明的组合物最有效的施用方式和剂量方案依赖于疾病的严重程度和进程、个体的健康和对治疗的反应和主治医生的判断。因此,组合物的剂量对于单独的受试者应该逐步增加(titrate to the individual subject)。然而,本发明的组合物的有效剂量可以从1mg/kg-2000mg/kg,1mg/kg-1500mg/kg,1mg/kg-1000mg/kg,1mg/kg-500mg/kg,1mg/kg-250mg/kg,1mg/kg-100mg/kg,1mg/kg-50mg/kg,1mg/kg-25mg/kg,1mg/kg-10mg/kg,500mg/kg-2000mg/kg,500mg/kg-1500mg/kg,500mg/kg-1000mg/kg,100mg/kg-2000mg/kg,100mg/kg-1500mg/kg,100mg/kg-1000mg/kg,或100mg/kg-500mg/kg。

[0100] 实施例1

[0101] pCL0081表达载体的构建

[0102] 以BamHI和NdeI消化载体pAB0018(ATCC登录号PTA-9616)产生长838碱基对(bp)和9879bp的两条片段。通过标准电泳技术在琼脂凝胶中分出了9879bp的片段,使用商用DNA纯化试剂盒纯化,并连接到之前已经经BamHI和NdeI消化的合成序列(SEQ ID NO:1;参见图1)。然后使用制造商的说明将连接产物用于转化商业提供的感受态DH5 α 大肠杆菌细胞菌株(Invitrogen,CA)。然后通过限制性消化或PCR筛选这些质粒以确认连接产生了预期的质粒结构。按所述方法产生的这样一个质粒载体通过Sanger测序进行了验证并命名为pCL0081,

参见图3。pCL0081载体包括驱动HN转基因表达的来自裂殖壶菌属延伸因子-1基因(EF1)的启动子,接着HN转基因的OrfC终止子(又称为PFA3终止子),和赋予甲嘧磺隆抗性的选择标记盒。

[0103] SEQ ID NO:1编码新城疫病毒(“California株”),又称为分离株gamefowl/U.S.(CA)/211472/02)的HN蛋白。该蛋白质序列匹配GenBank登录号AAS67142的序列。按照图2所示的裂殖壶菌属密码子选择表的指导,SEQ ID NO:1的特定核酸序列经密码子优化并由Blue Heron Biotechnology(Bothell,WA)合成以在裂殖壶菌属中表达。

[0104] 实施例2

[0105] 裂殖壶菌属中产生的HN蛋白的表达和表征

[0106] 使用裂殖壶菌属菌种ATCC 20888作为宿主细胞用于用pCL0081载体的转化。

[0107] 使用酶预处理的电穿孔-细胞在50mL M50-20培养基(参见美国申请公开号2008/0022422)中在30℃、200rpm的摇床上生长2天。细胞按1:100稀释到M2B培养基(见后段)并培养过夜(16-24h),试图达到对数生长中期(OD_{600} 1.5-2.5)。细胞在50mL锥形管中以约3000×g离心5分钟。去除上清并在合适体积的1M甘露醇、pH5.5中重悬细胞以达到终浓度20 OD_{600} 单位。将5mL细胞分装入25mL摇瓶并以10mM $CaCl_2$ (1.0M贮存液,过滤除菌)和0.25mg/mL蛋白酶XIV(10mg/mL贮存液,过滤除菌;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)修正。培养瓶在30℃和约100rpm的摇床上温育4h。在显微镜下监测细胞以确定原生质体程度(degree of protoplasting),理想的是单个细胞。细胞在圆底管(即14mL Falcon™管,BD Biosciences, San Jose,CA)中以约2500×g离心5min。去除上清,并轻轻地用5mL冰冷的10%甘油重悬细胞。细胞在圆底管中以约2500×g重新离心5min。去除上清,并使用大口径枪头轻轻地用500μL冰冷的10%甘油重悬细胞。将90μL的细胞分装入预冷的电转杯(electro-cuvette)(Gene Pulser®小杯-0.2cm间隙,Bio-Rad,Hercules,CA)。添加1μg-5μg的DNA(以小于或等于10μL体积)到小杯中,用枪头轻轻混合,并置于冰上5min。细胞在200ohms(电阻),25μF(电容)和500V电穿孔。0.5mL的M50-20培养基立即加入小杯。然后将细胞转移到在25mL摇瓶的4.5mL M50-20培养基中并在30℃和约100rpm的摇床上温育2-3h。细胞在圆底管中以约2500×g离心5min。去除上清并在0.5mL的M50-20培养基中重悬细胞沉淀。将细胞铺板到含合适选择(如需要)的适当数量(2-5)的M2B平板上并于30℃温育。

[0108] M2B培养基由10g/L葡萄糖,0.8g/L $(NH_4)_2SO_4$,5g/L Na_2SO_4 ,2g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.5g/L KH_2PO_4 ,0.5g/L KCl ,0.1g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,0.1M MES (pH 6.0),0.1%PB26金属,和0.1%PB26维生素(v/v)组成。PB26维生素由50mg/mL维生素B12,100μg/mL硫胺素和100μg/mL泛酸钙组成。调整PB26金属到pH 4.5并由3g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,1g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$,800mg/mL $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$,20mg/mL $CoCl_2 \cdot 6H_2O$,10mg/mL $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$,600mg/mL $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,和800mg/mL $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 组成。PB26贮存液分开过滤除菌后加入到高压灭菌的培养液中。在混合前,葡萄糖、 KH_2PO_4 和 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 与其余培养液成分分别单独高压灭菌以防止盐析出和碳水化合物焦化。所有培养基成分均购自Sigma Chemical(St.Louis,MO)。

[0109] 转基因裂殖壶菌属(以pCL0081转化的)的冷冻贮存液在M50-20中生长到汇合,然后在50mL带挡板的摇瓶中在培养基中在27℃,200rpm增殖48小时,所述培养基包含以下(每L):

	Na ₂ SO ₄	13.62 g
	K ₂ SO ₄	0.72 g
	KCl	0.56 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.27 g
[0110]	(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.19 g
	一水 MSG	3 g
	MES	21.4 g
	KH ₂ PO ₄	0.4 g

[0111] 用去离子水将体积调整到900mL并在高压灭菌35min前将pH调整到6。然后添加过滤灭菌的葡萄糖(50g/L)、维生素(2mL/L)和痕量金属(2mL/L)到培养基中并将体积调整到1L。维生素溶液含有0.16g/L维生素B12,9.75g/mL硫胺素和3.33g/L泛酸钙。痕量金属溶液(pH 2.5)含有1.00g/L柠檬酸,5.15g/L FeSO₄·7H₂O,1.55g/L MnCl₂·4H₂O,1.55g/L ZnSO₄·7H₂O,0.02g/LCoCl₂·6H₂O,0.02g/L Na₂MoO₄·2H₂O,1.035g/L CuSO₄·5H₂O,和1.035g/LNiSO₄·6H₂O。

[0112] 将裂殖壶菌属培养物转移到50mL锥形管中并以3000×g或4500×g离心15min。参见图4A。离心产生的上清,称为“无细胞上清”,用于血凝活性分析。

[0113] 无细胞上清进一步以100,000×g超速离心1小时。参见图4A。生成的 包含HN蛋白的不溶性级分的块状沉淀重悬于磷酸盐缓冲盐水(PBS)并用于肽序列分析以及糖基化分析。

[0114] 通过免疫印迹分析接着是标准免疫印迹程序验证了HN蛋白自转基因裂殖壶菌属CL0081-23(“23”)的表达。通过在4-12%的bis-tris胶(Invitrogen)上的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离了来自无细胞上清和来自块状沉淀的不溶性级分的蛋白。然后用考马斯亮蓝(SimplyBlue Safe Stain,Invitrogen)进行蛋白染色或转移到聚偏氟乙烯膜并用来自鸡(1:1000稀释,Charles River Laboratories)的抗-新城疫病毒(NDV)抗血清,接着用偶联碱性磷酸酶的抗-鸡二抗(1:5000稀释,AP-AffiniPure山羊抗-鸡#103-055-155,Jackson ImmunoResearch Laboratories),探针检测HN蛋白的存在。然后根据制造商的说明(KPL,Gaithersburg,MD)用5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸盐/四唑氮蓝溶液(BCIP/NBT)处理膜。转基因裂殖壶菌属“CL0081-23”的考马斯亮蓝-染色凝胶和相应的抗-NDV免疫印迹如图4B和图4C所示。在无细胞上清(图4b)和不溶性级分(图4C)中检测到重组HN蛋白。阴性对照(-Ctrl)是裂殖壶菌属菌种ATCC 20888的野生型菌株或转基因裂殖壶菌属AB0018。此外,溶解沉淀的不溶性级分,以4500xg,10分钟离心两次,并在来自表达HN蛋白的转基因裂殖壶菌属的上清(称为“无细胞提取物”)中检测到了HN蛋白(数据未显示)。

[0115] 通过SDS-PAGE分离无细胞上清100,000xg离心生成的不溶性级分并用考马斯亮蓝染色或转移到PVDF并用鸡的抗-NDV抗血清进行免疫印迹,如上所述。从考马斯染色凝胶切下对应免疫印迹中交叉反应的条带并进行肽序列分析。简言之,在50%乙醇,5%醋酸中清洗/脱色感兴趣的条带。然后在乙腈中脱水凝胶块,在 SpeedVac® (Thermo Fisher

Scientific, Inc., Waltham, MA) 中干燥, 并通过在50mM的碳酸氢铵中加入5 μ L 10ng/ μ L的胰蛋白酶并于室温温育过夜来用胰蛋白酶消化。用两份30 μ L含5%甲酸的50%乙腈从聚丙烯酰胺提取形成的肽。合并这些提取物并在 **SpeedVac®** 中蒸发到<10 μ L, 然后在1%醋酸中重悬以补足约30 μ L的终体积以供LC-MS分析。LC-MS系统是Finnigan™ LTQ™线性离子阱质谱仪 (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA)。HPLC柱是自包装的9cm $\times$ 75 μ m Phenomenex Jupiter™ C18反相毛细管层析柱 (Phenomenex, Torrance, CA)。然后, 注射 μ L体积的提取物并通过乙腈/0.1%甲酸梯度以0.25 μ L/min的流速从柱洗脱 肽并引入到线上质谱仪的源中。在2.5kV操作微电喷雾离子源。使用选择性反应 (SRM) 实验分析消化物, 其中在LC实验整个过程中质谱片段化一系列m/z比。然后将感兴趣的肽的片段化模式用于产生色谱图。确定每个肽的峰面积并以内标标准化。在此分析中使用的内标是在研究的样本之间具有不变的丰度的蛋白。通过比较每个蛋白均一化的峰比值确定两个系统之间的最终比较。然后对NCBI数据库搜索碰撞-诱导的解离光谱。通过覆盖蛋白质序列68%的共32个肽确定HN蛋白。测序的特定的肽如图5所示。

[0116] 最初通过酶处理评估HN蛋白上聚糖的存在。转基因裂殖壶菌属“CL0081-23”的不溶性级分重悬于PBS并根据制造商的说明 (New England Biolabs, Ipswich, MA) 用EndoH或PNGase F消化。然后通过用考马斯亮蓝 (图6A) 染色的12%SDS-PAGE上分离蛋白时预期的流动性迁移, 或通过以抗-NDV抗血清 (图6B) 进行的免疫印迹确定聚糖的去除。免疫印迹的阴性对照 (“-Ctrl”) 为转基因裂殖壶菌属AB0018。酶处理的阴性对照为未用酶温育的转基因裂殖壶菌属“CL0081-23” (“NT”=未处理)。

[0117] 通过基质-辅助激光-解吸电离飞行时间质谱和纳流喷雾电离线性离子阱质谱分析裂殖壶菌属中生产的HN蛋白的糖基化概貌。简言之, 将考马斯亮蓝染色的感兴趣蛋白的凝胶片切成更小的块 (~1mm³) 并以40mM碳酸氢铵 (AmBic) 和100%乙腈交替脱色直到颜色变为澄清。脱色胶在10mM DTT、40mM Ambic中在55°C重新膨胀1h。以55mM碘乙酰胺 (IAM) 替换DTT溶液并在黑暗中温育45min。温育之后用40mM AmBic和100%乙腈交替洗两次。最初用胰蛋白酶溶液 (溶于40mM AmBic的胰蛋白酶) 在冰上重新膨胀脱水凝胶45分钟, 并在37°C过夜进行蛋白消化。将上清转移到另一个管中。依次用含20%乙腈的5%甲酸、含50%乙腈的5%甲酸、再用含80%乙腈的5%甲酸从凝胶中提取肽和糖肽。干燥样品溶液并合并成一管。提取的胰蛋白酶消化物通过C18 **Sep-Pak®** 筒 (Waters Corporation, Milford, MA) 并以5%醋酸清洗以去除污染物 (例如盐和SDS)。依次用含20%异丙醇的5%醋酸、含40%异丙醇的5%醋酸、和100%异丙醇洗脱肽和糖肽, 然后在高速真空浓缩器中干燥。合并干燥样品并以50mM磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 重构并在100°C加热5分钟以灭活胰蛋白酶。胰蛋白酶消化物用PNGase F在37°C温育过夜以释放N-聚糖。消化后, 样品通过C18 **Sep-Pak®** 筒并用5%醋酸洗脱碳水化合物级分并且冻干干燥。基于Anumula, K.R. 和Taylor, P.B. Anal. Biochem. 203 (1): 101-108 (1992) 的方法全甲基化释放的N-联寡糖并用质谱 (MS) 分析概貌。

[0118] 按照复杂碳水化合物研究中心 (Aoki, K. 等, J. Biol. Chem. 23: 282: 9127-9142 (2007)) 开发的方法进行质谱分析。通过使用NSI-LTQ/MSn确定质量分析。简言之, 全甲基化聚糖溶于含1mM氢氧化钠的50%甲醇中并以0.4 μ L/min的恒定流速直接注入仪器 (Finnigan™ LTQ™线性离子阱质谱仪)。以正离子模式进行质谱分析。

[0119] 进行总离子流映射以检测可表明聚糖的碎片离子的存在。对于总离子流映射, 以

与前面的窗口重叠2质量单位的连续2.8质量单位窗口扫描自动MS/MS分析(35碰撞能量), m/z 范围从500-2000。获得 m/z 500- m/z 2000的所有MS/MS数据,然后手动分析原始数据。

[0120] NSI总离子流映射获得的色谱图和聚糖种类表分别如图7和图8所示。通过扫描过滤处理色谱图; m/z 139的中性丢失是高甘露糖型聚糖的特点。总离子流映射揭示了样品包含一系列具有长甘露糖链的高甘露糖型聚糖。这些结果与通过相同方法确定的,对于天然裂殖壶菌属分泌的蛋白和异源表达的蛋白检测到的N-聚糖结构相似(数据未显示)。

[0121] 通过血凝活性测定评价了裂殖壶菌属中生产的HN蛋白的活性。功能性HN蛋白显示血凝活性,其易于通过标准血凝活性分析检测。简言之,在96孔微滴定板中制备了50 μ L低速上清在PBS中的2倍稀释物。然后向每孔中加入等体积的在PBS中约1%的火鸡红细胞溶液(Fitzgerald Industries),接着在室温下温育30分钟。然后通过视觉分析凝集程度。血凝活性单位(HAU)定义为导致孔中可见血凝的无细胞上清的最高稀释度。

[0122] 在转基因裂殖壶菌属“CL0081-23”上清中以512HAU数量级发现了典型的活性(图9)。PBS或与转基因菌株以相同方式生长和制备的野生型裂殖壶菌属菌种ATCC 20888菌株用来作为阴性对照并没有表现出任何血凝活性。流感血凝素(HA)重组蛋白(Protein Sciences#3006H5N1,在PBS中1:1000稀释)用来作为阳性对照。发现来自转基因裂殖壶菌属CL0081-23上清的HN的血凝活性经过多轮的冻/融后是稳定的并经2 μ M过滤后保存。

[0123] 实施例3

[0124] 裂殖壶菌中产生的副流感病毒HN蛋白的表达和表征

[0125] 使用裂殖壶菌属菌种ATCC 20888作为用包含编码副流感病毒HN蛋白的序列的载体转化的宿主细胞。一个副流感病毒HN蛋白的代表序列如SEQ ID NO:11(来自GenBank登录号P08492的人副流感3病毒(NIH 47885株))提供。以包含编码与副流感病毒HN蛋白关联的天然信号锚序列的序列的载体转化一些细胞。以包含与编码副流感病毒HN蛋白的序列融合的不同信号锚序列(包括裂殖壶菌信号锚序列)的载体转化其他细胞,以使得用异源信号锚序列表达副流感病毒HN蛋白。进行转化,而且按实施例2所述生长和增殖冷冻贮存物。将裂殖壶菌属培养物转移到50mL锥形管中并以3000 $\times$ g或4500 $\times$ g离心15min以产生低速上清。进一步将低速上清以100,000 $\times$ g超速离心1h。参见图4A。生成的含副流感病毒HN蛋白的不溶性级分的块状沉淀重悬于磷酸盐缓冲盐水(PBS)并如实施例2所述用于肽序列分析和糖基化分析。

[0126] 通过如实施例2所述使用适当稀释的抗-副流感病毒HN抗血清和二抗的免疫印迹分析接标准免疫印迹程序验证副流感病毒HN蛋白自转基因裂殖壶菌属的表达。在低速上清和不溶性级分中检测重组副流感病毒HN蛋白。此外,在来自表达副流感病毒HN蛋白的转基因裂殖壶菌属的无细胞提取物中检测重组副流感病毒HN蛋白。

[0127] 通过副流感病毒HN活性分析评估裂殖壶菌属中生产的副流感病毒HN蛋白的活性。功能性副流感病毒HN蛋白显示出通过标准副流感病毒活性分析易于检出的副流感病毒HN活性。

[0128] 本文所述的各个方面、实施例和选项均可以任何和所有变化形式结合。

序列表

- <110> DSM IP 资产公司
梅里亚有限公司
- <120> 微藻中血凝素-神经氨酸酶蛋白的生产
- <130> 2715.045PC01/JUK/SAS/BNC
- <140> 待指定
- <141> 同此
- <150> 61/290,469
- <151> 2009-12-28
- <160> 11
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 1728
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 密码子优化的 HN

[0001]

<400> 1
ggatccatgg accgtgtcgt ctcccgcgtg gtccctcgaga acgaggagcg tgaggccaag 60
aacacctggc gccttgtctt tegtgtcgcc gtctctctcc ttatigtcat gacctctgcc 120
atctccgtcg ccgccctcgt ctacagcatg gaggttagca cccccaacga tctcgccgga 180
atctcgactg ttatctcccg cgcgcaggac cgcgtcacct cctctctcaa ctccaaccag 240
gatgtcgttg atcggcttca caagcaggtc gccctcgagt cccctctcgc cctctctaac 300
accgagagca tcattatgaa cgcctatacc tccctcagct accagattaa cggcgccgcc 360
aacctgtcgc gctgcggcgc ccccgcccat gacctgatt acatcggcgg cgtcgccaag 420
gagctcatcg tcagcgacac tagcgatgcc acgtcttct accctagcgc ctaccaggag 480
caccctaacct tcactcctgc cccactacc ggctccggct gaaccgcgat tcccagcttc 540
gacatgtcgc ccactcacta ctgtacacc cataacgta tcttttcggg ttgcgcgac 600
cactcccaaa gccaccagta cctcgccctc ggagttcttc gtaegtccgc caccggccgc 660
gtcttttttt ccacctcgc cagcatcaac ctgcagata ccagaaccg caagagctgc 720
tcggtctcgc ccaccccgct cggtcgagac atgtctgtgt ccaaggtaac cgagacggag 780
gaggaggatt acaagtcgt tactcccaact tcgatgtgt accgcccgt tggtctgac 840
ggccagtacc acgagaagga cctcgacgtc accgttctct ttaaggactg ggttgccaac 900
taccgccgcg tcggcgccgc ctccctcact gatgaccgcg tctggtttcc tgtctacggt 960
ggtctcaagc ctaacagccc ctccgatacc gcccaggagg gtaagtaagt gatctacaag 1020
cgctacaaca acacctgccc tgacgagcag gattaccagg tccgatgga caagtctcgc 1080
taaaagcccg gtgttttcgg cggcaagcgc gtcacgagg ccattctctc gatcaaggtc 1140
tcgaccagcc tcggagagga ccccgctctc accgttcccc ctaacacct cacccttatg 1200
ggcgccgagg gccgcatctt caaccgtcgt acctcccaact tctctacca gcgcggctcg 1260

```

agctactttt cccctgcctt tctttacccc atgaactgttc gcaacaagac tgetaccctc 1320
cacagccctt acacctttta cgccttcacg cgccecgga gcgteccctg ccaggcgagc 1380
gcccgtgtcc ctaactcctg cattaccggc gctacacccg acccttaccg tgtegtcttt 1440
caccgcaacc ataccctteg cggcgcttcc ggtactatgc ttgataacga gcaggcccgc 1500
ctcaaccccg tctcggccat tticgactac acttcccgct cccgtatcac ccgctctctc 1560
tcacctccca ccaaggccgc ctacaccacc tcacctgtct ttaaggttgt caagactaac 1620
aaggcttact gcctctccat cgcggagatt agcaaacccc tcttcggaga gticcgcatt 1680
gtcccccctg tctcgagat cctcaaggac gatcgcttct aacatatg 1728

```

<210> 2
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 密码子优化的 HN

<400> 2

```

Met Asp Arg Val Val Ser Arg Val Val Leu Glu Asn Glu Glu Arg Glu
1          5          10          15

```

```

Ala Lys Asn Thr Trp Arg Leu Val Phe Arg Val Ala Val Leu Ser Leu
          20          25          30

```

[0002]

```

Ile Val Met Thr Leu Ala Ile Ser Val Ala Ala Leu Val Tyr Ser Met
          35          40          45

```

```

Glu Ala Ser Thr Pro Asn Asp Leu Ala Gly Ile Ser Thr Val Ile Ser
          50          55          60

```

```

Arg Ala Glu Asp Arg Val Thr Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gln Asp Val
65          70          75          80

```

```

Val Asp Arg Val Tyr Lys Gln Val Ala Leu Glu Ser Pro Leu Ala Leu
          85          90          95

```

```

Leu Asn Thr Glu Ser Ile Ile Met Asn Ala Ile Thr Ser Leu Ser Tyr
          100          105          110

```

```

Gln Ile Asn Gly Ala Ala Asn Ser Ser Gly Cys Gly Ala Pro Val His
          115          120          125

```

```

Asp Pro Asp Tyr Ile Gly Gly Val Gly Lys Glu Leu Ile Val Asp Asp
          130          135          140

```

```

Thr Ser Asp Ala Thr Ser Phe Tyr Pro Ser Ala Tyr Gln Glu His Leu
          145          150          155          160

```

```

Asn Phe Ile Pro Ala Pro Thr Thr Gly Ser Gly Cys Thr Arg Ile Pro

```


Arg Pro Gly Ser Val Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro Asn Ser
450 455 460

Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Val Val Phe His Arg
465 470 475 480

Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Asn Glu Gln
485 490 495

Ala Arg Leu Asn Pro Val Ser Ala Ile Phe Asp Tyr Thr Ser Arg Ser
500 505 510

Arg Ile Thr Arg Val Ser Ser Thr Ser Thr Lys Ala Ala Tyr Thr Thr
515 520 525

Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Val Tyr Cys Leu Ser
530 535 540

Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile Val Pro
545 550 555 560

Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp Arg Val
565 570

[0004]

<210> 3
<211> 51
<212> PRT
<213> 裂殖壶菌属菌种 ATCC 20888

<220>
<223> GlcNac-转移酶-I-样蛋白

<400> 3

Met Arg Gly Pro Gly Met Val Gly Leu Ser Arg Val Asp Arg Glu His
1 5 10 15

Leu Arg Arg Arg Gln Gln Gln Ala Ala Ser Glu Trp Arg Arg Trp Gly
20 25 30

Phe Phe Val Ala Thr Ala Val Val Leu Leu Val Phe Leu Thr Val Tyr
35 40 45

Pro Asn Val
50

<210> 4
<211> 153
<212> DNA
<213> 裂殖壶菌属菌种 ATCC 20888

<220>
<223> 信号锚序列

<400> 4

atgcgcggcc cggcacatggt cggcctcagc cgcgtggacc gcgagcaact gggcgggcgg 60
cagcagcagg cggcgagcga atggcggcgc tgggggttet tegtgcgac ggccgtcgtc 120
ctgctcgtct ttctaccgt ataccagaac gta 153

<210> 5
<211> 66
<212> PRT
<213> 裂殖壶菌属菌种 ATCC 20888

<220>
<223> β -1,2- 木糖基转移酶-样蛋白

<400> 5

Met Arg Thr Arg Gly Ala Ala Tyr Val Arg Pro Gly Gln His Glu Ala
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ser Ser Arg Ser Ser Asp Glu Gly Tyr Thr Thr Val Asn
20 25 30

Val Val Arg Thr Lys Arg Lys Arg Thr Thr Val Ala Ala Leu Val Ala
35 40 45

Ala Ala Leu Leu Val Thr Gly Phe Ile Val Val Val Val Phe Val Val
50 55 60

[0005] Val Val
65

<210> 6
<211> 198
<212> DNA
<213> 裂殖壶菌属菌种 ATCC 20888

<220>
<223> 信号锚序列

<400> 6

atgcgcacgc gggcgcgccg gtaagtgcgg cggggacagc acgaggcgaa ggcgtctcgt 60
tcaaggagca gcgacgaggg atatacgacg gtcaacgttg taaggaccaa gcgaaagagg 120
accactgtag ccgcgcttgt agccgcggcg ctgctgtga cgggttttat cgtcgtcgtc 180
gtcttcgtcg tegtgttt 198

<210> 7
<211> 64
<212> PRT
<213> 裂殖壶菌属菌种 ATCC 20888

<220>
<223> β -1,4-木糖苷酶-样蛋白

<400> 7

Met Glu Ala Leu Arg Glu Pro Leu Ala Ala Pro Pro Thr Ser Ala Arg
1 5 10 15

Ser Ser Val Pro Ala Pro Leu Ala Lys Glu Glu Gly Glu Glu Glu Asp
20 25 30

Gly Glu Lys Gly Thr Phe Gly Ala Gly Val Leu Gly Val Val Ala Val
35 40 45

Leu Val Ile Val Val Phe Ala Ile Val Ala Gly Gly Gly Gly Asp Ile
50 55 60

<210> 8
<211> 192
<212> DNA
<213> 裂殖壶菌属菌种 ATCC 20888

<220>
<223> 信号锚序列

<400> 8

atggaggccc tgcgcgagcc ctgggtgcg ccgccaacgt cggcgcgata gtcggtgcca 60
gcgcgcgtcg cgaaggagga gggggaggag gaggacgggg aaaaaggagc gtttggggcg 120
ggggtcctcg gtgtcgtggc ggtgctcgtc atcgtggtgt ttgcgacgt ggcgggagge 180
ggaggcgata tt 192

[0006]

<210> 9
<211> 73
<212> PRT
<213> 裂殖壶菌属菌种 ATCC 20888

<220>
<223> 半乳糖基转移酶-样蛋白

<400> 9

Met Leu Ser Val Ala Gln Val Ala Gly Ser Ala His Ser Arg Pro Arg
1 5 10 15

Arg Gly Gly Glu Arg Met Gln Asp Val Leu Ala Leu Glu Gln Ser Ser
20 25 30

Arg Asp Arg Lys Arg Ala Thr Ala Arg Pro Gly Leu Tyr Arg Ala Leu
35 40 45

Ala Ile Leu Gly Leu Pro Leu Ile Val Phe Ile Val Trp Gln Met Thr
50 55 60

Ser Ser Leu Thr Thr Ala Pro Ser Ala
65 70

<210> 10
<211> 219
<212> DNA
<213> 裂殖壶菌属菌种 ATCC 20888

<220>

<223> 信号锚序列

<400> 10

```

atgttgagcg tagcacaagt cgcggggctcg gcccaactcgc ggccgagacg aggtgggtgag      60
cggatgcaag acgtgctggc ccctggaggaa agcagcagag ategaaaacg agcaacagea      120
aggeccgggc tatatcgcgc acttgcgatt ctggggctgc cgtcctcgtt attcatcgta      180
tggcaaatga ctagctccct cagcactgcc ccgagcgcc                                219

```

<210> 11

<211> 572

<212> PRT

<213> 人副流感病毒 3 病毒

<400> 11

```

Met Glu Tyr Trp Lys His Thr Asn His Gly Lys Asp Ala Gly Asn Glu
1          5          10          15

```

```

Leu Glu Thr Ser Met Ala Thr His Gly Asn Lys Ile Thr Asn Lys Ile
          20          25          30

```

```

Thr Tyr Ile Leu Trp Thr Ile Ile Leu Val Leu Leu Ser Ile Val Phe
          35          40          45

```

[0007]

```

Ile Ile Val Leu Ile Asn Ser Ile Lys Ser Glu Lys Ala His Glu Ser
          50          55          60

```

```

Leu Leu Gln Asp Val Asn Asn Glu Phe Met Glu Val Thr Glu Lys Ile
65          70          75          80

```

```

Gln Met Ala Ser Asp Asn Ile Asn Asp Leu Ile Gln Ser Gly Val Asn
          85          90          95

```

```

Thr Arg Leu Leu Thr Ile Gln Ser His Val Gln Asn Tyr Ile Pro Ile
          100          105          110

```

```

Ser Leu Thr Gln Gln Met Ser Asp Leu Arg Lys Phe Ile Ser Glu Ile
          115          120          125

```

```

Thr Ile Arg Asn Asp Asn Gln Glu Val Pro Pro Gln Arg Ile Thr His
          130          135          140

```

```

Asp Val Gly Ile Lys Pro Leu Asn Pro Asp Asp Phe Trp Arg Cys Thr
          145          150          155          160

```

```

Ser Gly Leu Pro Ser Leu Met Lys Thr Pro Lys Ile Arg Leu Met Pro
          165          170          175

```

```

Gly Pro Gly Leu Leu Ala Met Pro Thr Thr Val Asp Gly Cys Val Arg
          180          185          190

```

Thr Pro Ser Leu Val Ile Asn Asp Leu Ile Tyr Ala Tyr Thr Ser Asn
 195 200 205
 Leu Ile Thr Arg Gly Cys Gln Asp Ile Gly Lys Ser Tyr Gln Val Leu
 210 215 220
 Gln Ile Gly Ile Ile Thr Val Asn Ser Asp Leu Val Pro Asp Leu Asn
 225 230 235 240
 Pro Arg Ile Ser His Thr Phe Asn Ile Asn Asp Asn Arg Lys Ser Cys
 245 250 255
 Ser Leu Ala Leu Leu Asn Thr Asp Val Tyr Gln Leu Cys Ser Thr Pro
 260 265 270
 Lys Val Asp Glu Arg Ser Asp Tyr Ala Ser Ser Gly Ile Glu Asp Ile
 275 280 285
 Val Leu Asp Ile Val Asn His Asp Gly Ser Ile Ser Thr Thr Arg Phe
 290 295 300
 Lys Asn Asn Asn Ile Ser Phe Asp Gln Pro Tyr Ala Ala Leu Tyr Pro
 305 310 315 320
 Ser Val Gly Pro Gly Ile Tyr Tyr Lys Gly Lys Ile Ile Phe Leu Gly
 325 330 335
 Tyr Gly Gly Leu Glu His Pro Ile Asn Glu Asn Ala Ile Cys Asn Thr
 340 345 350
 Thr Gly Cys Pro Gly Lys Thr Gln Arg Asp Cys Asn Gln Ala Ser His
 355 360 365
 Ser Pro Trp Phe Ser Asp Arg Arg Met Val Asn Ser Ile Ile Val Val
 370 375 380
 Asp Lys Gly Leu Asn Ser Ile Pro Lys Leu Lys Val Trp Thr Ile Ser
 385 390 395 400
 Met Arg Gln Asn Tyr Trp Gly Ser Glu Gly Arg Leu Leu Leu Leu Gly
 405 410 415
 Asn Lys Ile Tyr Ile Tyr Thr Arg Ser Thr Ser Trp His Ser Lys Leu
 420 425 430
 Gln Leu Gly Ile Ile Asp Ile Thr Asp Tyr Ser Asp Ile Arg Ile Lys
 435 440 445
 Trp Thr Trp His Asn Val Leu Ser Arg Pro Gly Asn Asn Glu Cys Pro
 450 455 460
 Trp Gly His Ser Cys Pro Asp Gly Cys Ile Thr Gly Val Tyr Thr Asp

[0008]

	465		470		475		480
	Ala Tyr Pro Leu Asn Pro Thr Gly Ser Ile Val Ser Ser Val Ile Leu						
		485			490		495
	Asp Ser Gln Lys Ser Arg Val Asn Pro Val Ile Thr Tyr Ser Thr Ser						
		500			505		510
[0009]	Thr Glu Arg Val Asn Glu Leu Ala Ile Arg Asn Lys Thr Leu Ser Ala						
		515			520		525
	Gly Tyr Thr Thr Thr Ser Cys Ile Thr His Tyr Asn Lys Gly Tyr Cys						
		530			535		540
	Phe His Ile Val Glu Ile Asn His Lys Ser Leu Asp Thr Phe Gln Pro						
		545			550		555
							560
	Met Leu Phe Lys Thr Glu Ile Pro Lys Ser Cys Ser						
		565			570		

GGATCCATGGACCGTGTCTCTCCCGCGTGGTCCTCGAGAACGAGGAGCGTGAGGCC
AAGAACACCTGGCGCCTTGTCTTTCTGTCTCGCCGTCTCTCCCTTATTGTCATGACCCT
CGCCATCTCCGTGCGCGCCCTCGTCTACAGCATGGAGGCTAGCACCCCAACGATCTC
GCCGGAATCTCGACTGTTATCTCCCGCGCCGAGGACCGCGTCACCTCCCTCCTCAACT
CCAACCAGGATGTCTGTTGATCGCGTCTACAAGCAGGTCGCCCTCGAGTCCCCTCTCGC
CCTCCTTAACACCGAGAGCATCATTATGAACGCCATTACCTCCCTCAGCTACCAGATTA
ACGGCGCCGCAACTCGTCCGGCTGCGGCGCCCCCGTCCATGACCCTGATTACATCG
GCGGCGTCGGCAAGGAGCTCATCGTCGACGACACTAGCGATGCCACGTCTTCTACC
CTAGCGCCTACCAGGAGCACCTCAACTTCATCCCTGCCCCCACTACCGGCTCCGGCTG
CACCCGCATTCCCAGCTTCGACATGTCCGCCACTCACTACTGCTACACCCATAACGTCA
TCCTTTTCGGGTTGCCGCGACCACTCCCACAGCCACCAGTACCTCGCCCTCGGAGTTCT
TCGTACGTCCGCCACCGGCCGCGTCTTTTTTTCCACCCTCCGCAGCATCAACCTCGAC
GATACCCAGAACCAGCAAGAGCTGCTCGGTCTCCGCCACCCCGCTCGGCTGCGACATG
CTCTGCTCCAAGGTCACCGAGACGGAGGAGGAGGATTACAAGTCCGTTACCCCCACTT
CGATGGTCCACGGCCGCTTGGCTTCGACGGCCAGTACCACGAGAAGGACCTCGACG
TCACCGTTCTCTTTAAGGACTGGGTTGCCAACTACCCCGGCGTCGGCGGCGGCTCCCT
CATCGATGACCGCGTCTGGTTTCCTGTCTACGGTGGTCTCAAGCCTAACAGCCCCCTCC
GATACCGCCCAGGAGGGTAAGTACGTGATCTACAAGCGCTACAACAACACCTGCCCTG
ACGAGCAGGATTACCAGGTCCGCATGGCCAAGTCCTCGTACAAGCCCGGTCGTTTCGG
CGGCAAGCGCGTCCAGCAGGCCATTCTCTCGATCAAGGTCTCGACCAGCCTCGGAGA
GGACCCCGTGCTCACCGTTCCCCCTAACACCGTCAACCTTATGGGCGCCGAGGGCCG
CATCCTCACCGTCGGTACCTCCCACTTCTCTACCAGCGCGGCTCGAGCTACTTTTCCC
CTGCCCTTCTTTACCCCATGACTGTTCCGAACAAGACTGCTACCCTCCACAGCCCCCTAC
ACCTTTAACGCCTTCACGCGCCCCGGAAGCGTCCCTGCCAGGCGAGCGCCCGCTGC
CCTAACTCCTGCATTACCGGCGTCTACACCGACCCTTACCCTGTCTCTTTCACCGCAA
CCATACCTTCGCGGCGTCTTCGGTACTATGCTTGATAACGAGCAGGCCCCGCTCAAC
CCCGTCTCCGCCATTTTCGACTACACTTCCCGCTCCCGTATCACCCGCGTCTCCTCCAC
CTCCACCAAGGCCGCTACACCACCTCCACCTGCTTTAAGGTTGTCAAGACTAACAAG
GTCTACTGCCTCTCCATCGCCGAGATTAGCAACACCCTCTTCGGAGAGTTCCGCATTGT
CCCCCTGCTCGTCGAGATCCTCAAGGACGATCGCGTTTAACATATG

(SEQ ID NO:1)

图1

AA*	密码子	分数	AA*	密码子	分数	AA*	密码子	分数	AA*	密码子	分数
Ala	GCC	0.64	End	TAA	0.34	Leu	CTT	0.16	Ser	TCG	0.33
Ala	GCA	0.03	End	TGA	0.33	Leu	TTG	0.02	Ser	TCC	0.31
Ala	GCT	0.18	End	TAG	0.33	Leu	CTG	0.12	Ser	AGT	0.03
Ala	GCG	0.16	Gln	CAA	0.08	Leu	CTC	0.69	Ser	TCA	0
Arg	CGG	0.01	Gln	CAG	0.92	Leu	TTA	0	Ser	TCT	0.09
Arg	AGA	0	Glu	GAA	0.09	Leu	CTA	0	Thr	ACG	0.3
Arg	CGC	0.8	Glu	GAG	0.91	Lys	AAA	0.04	Thr	ACC	0.54
Arg	CGA	0.01	Gly	GGA	0.1	Lys	AAG	0.96	Thr	ACA	0.02
Arg	AGG	0	Gly	GGT	0.2	Met	ATG	1	Thr	ACT	0.14
Arg	CGT	0.17	Gly	GGG	0	Phe	TTT	0.45	Trp	TGG	1
Asn	AAC	0.94	Gly	GGC	0.7	Phe	TTC	0.55	Tyr	TAC	0.94
Asn	AAT	0.06	His	CAC	0.83	Pro	CCT	0.21	Tyr	TAT	0.06
Asp	GAT	0.24	His	CAT	0.17	Pro	CCG	0.34	Val	GTC	0.62
Asp	GAC	0.76	Ile	ATC	0.7	Pro	CCC	0.43	Val	GTA	0
Cys	TGC	0.95	Ile	ATA	0	Pro	CCA	0.02	Val	GTT	0.14
Cys	TGT	0.05	Ile	ATT	0.3	Ser	AGC	0.24	Val	GTG	0.24

*AA=氨基酸

图2

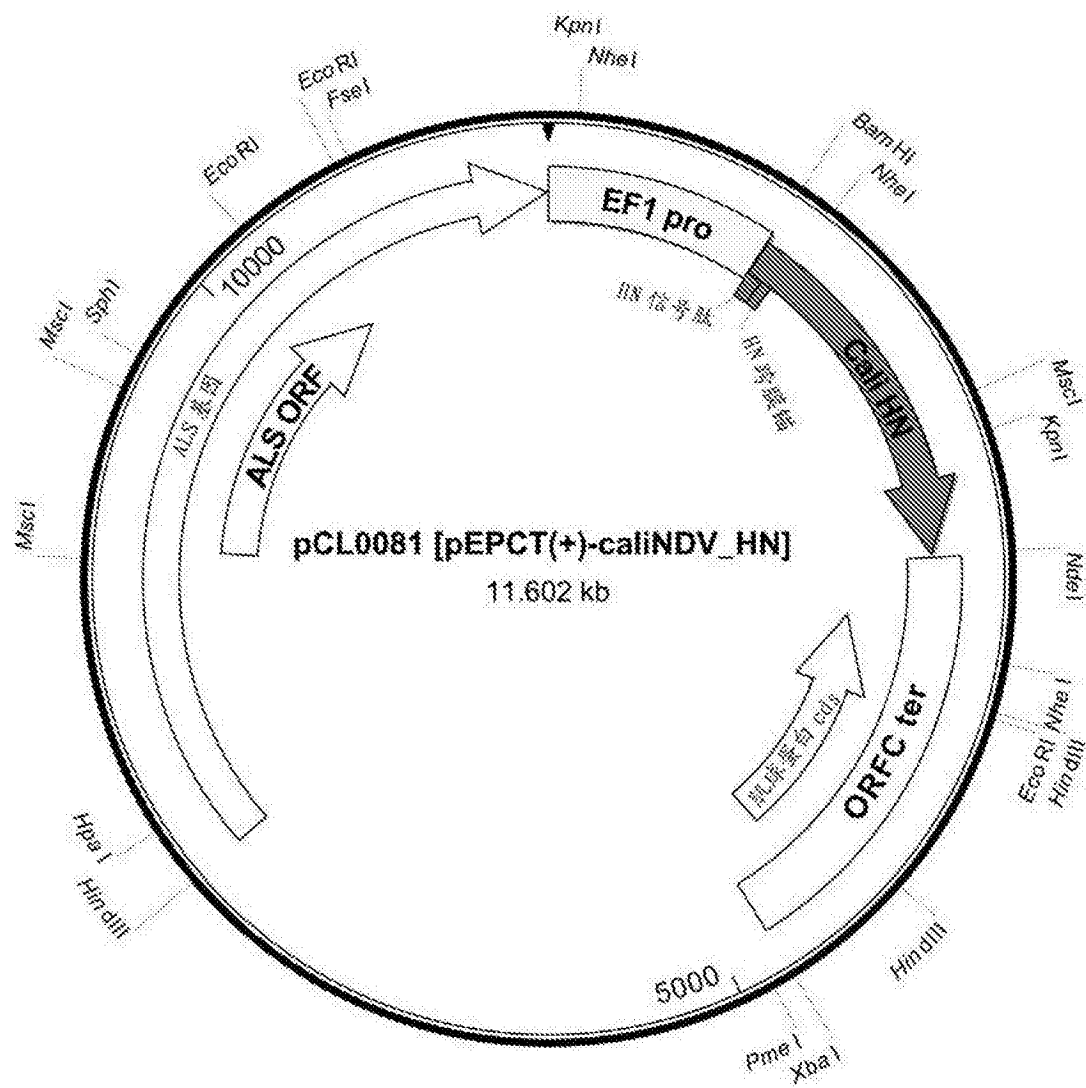


图3

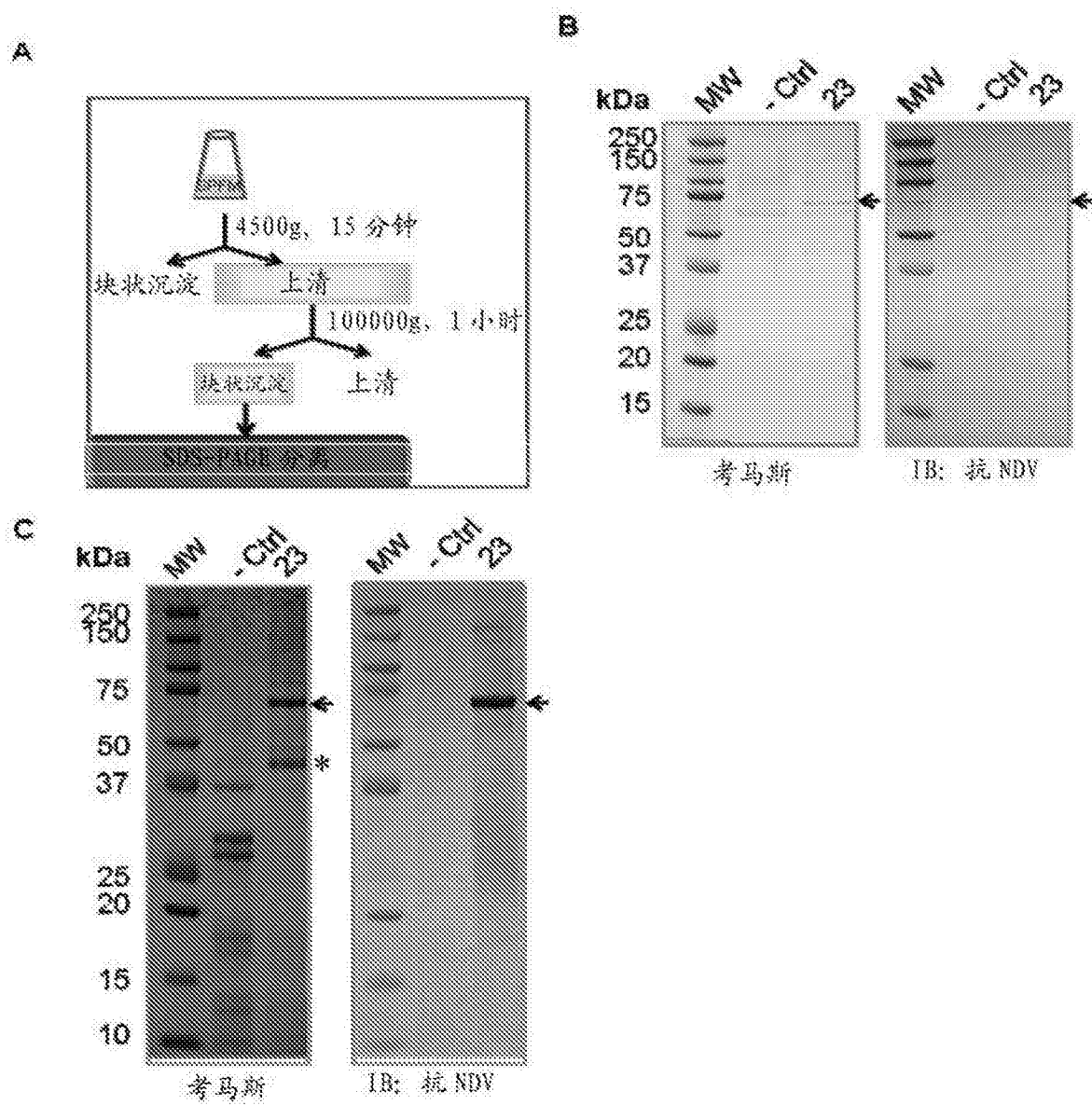


图4

物种: 新城疫病毒

名称: 血凝素-神经氨酸酶

通过覆盖蛋白质序列 68% 的 32 个肽鉴定

```

1 mdrvvsrvvl eneereaknt wrlvfrvavl slivmtlais vaalvysmea stpndlagis
61 tvisraedrv tslhnsnqdv vdrvykqval esplallnte siimnaitsl syqingaans
121 sgcegapvhdp dyiggvgkel ivddtsdats fypsayqehl nfipapttgs getripsfdm
181 sathycythn vilsgcrdhs hshqylalgv lrtsatgrvf fstlrsinld dtqrkscsv
241 satplgcdml eskvteteee dyksvtpism vhgrlgfdgq yhekdlldvtv lfkdwvanyp
301 gvgggslidd rvwfpvyggl kpnspsdtaq egkyviykry nntepdeqdy qvrnakssyk
361 pgrfggkrvq qailsikvst slgedpvlty ppntvtlmga egriltvgts hflyqrgssy
421 fspallypmt vrnkatalhs pytfnafrp gsvpcqasar cpnscitgvy tdpypvvfhr
481 nhltlgvfgt mldneqarln pvsalfdyts rsnitrysst stkaayttst cfkvvktmkv
541 yclsiaeisn tlfgefrivp llveilkddr y

```

(SEQ ID NO: 2)

图5

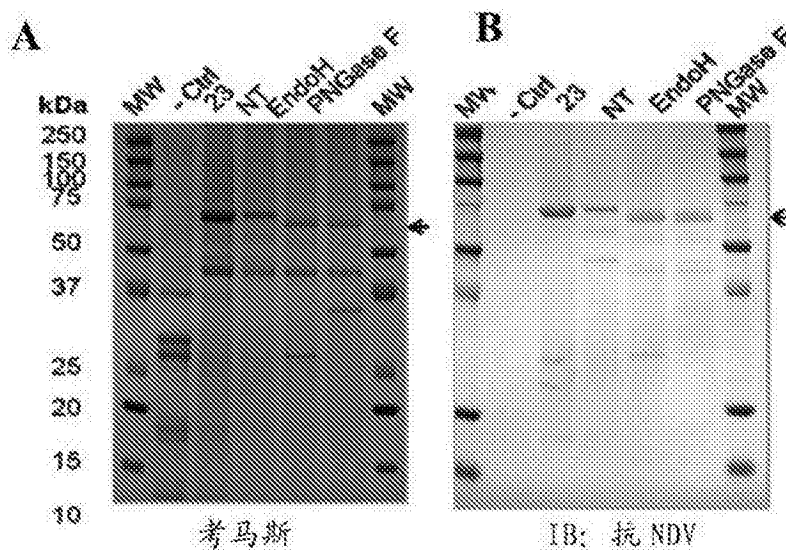


图6

全甲基化 N-聚糖的 NSI-总离子映射

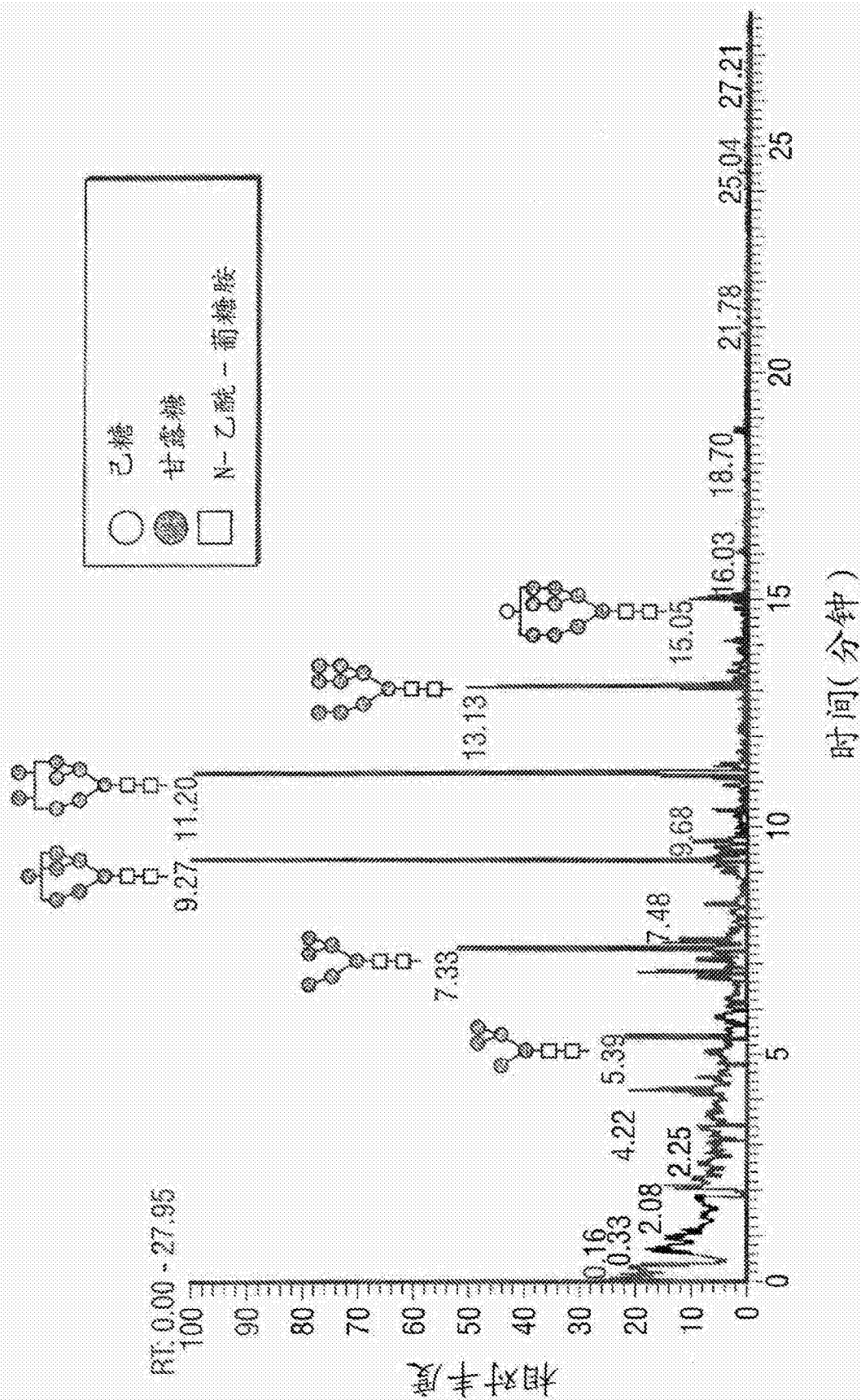


图7

提出的结构	质量 [M+Na]	电荷状态 [z]	23
Hex ₅ HexNAc ₂	1579 802	1 2	✓
Hex ₆ HexNAc ₂	1783 903	1 2	✓
Hex ₇ HexNAc ₂	1987 1005	1 2	✓
Hex ₈ HexNAc ₂	1108	2	✓
Hex ₉ HexNAc ₂	1210	2	✓
Hex ₁₀ HexNAc ₂	1312	2	✓

图8

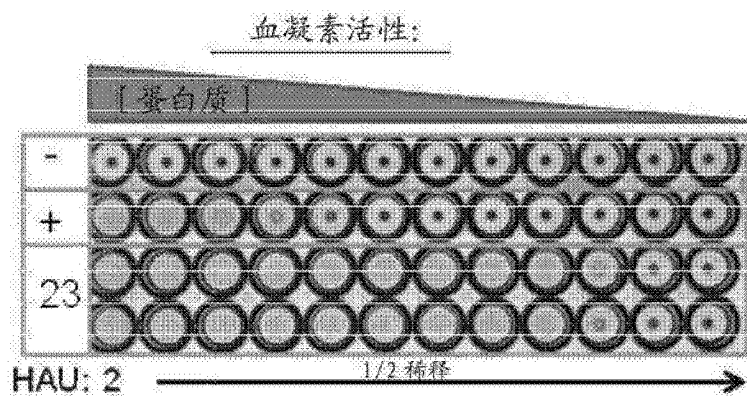


图9

裂殖壶菌属预测的信号锚序列

 α -1,3 甘露糖基- β -1,2-GlcNAc- 转移酶 I 样蛋白 #1

MRGPGMVGLSRVDREHLRRRQQQAASEWRRWGFFVATAVVLLVFLTVYPNV (SEQ ID NO: 3)

ATGCGCGGCCCCGGGCATGGTCGGCCTCAGCCGCGTGGACCGCGAGCACCTGCGGCGGCG
GCAGCAGCAGGCGGCGAGCGAATGGCGGCGCTGGGGGTTCTTCGTCGCGACGGCCGTCG
TCCTGCTCGTCTTTCTCACCGTATACCCGAACGTA (SEQ ID NO: 4)

 β -1,2- 木糖基转移酶样蛋白 #1

MRTGAAYVRPGQHEAKALSSRSSDEGYTTVNVRVTRKRTTVAALVAAALLVTGFIVVVV
FVVVV (SEQ ID NO: 5)

ATGCGCACGCGGGGCGCGGCGTACGTGCGGCCGGGACAGCACGAGGCGAAGGCGCTCTC
GTCAAGGAGCAGCGACGAGGGATATACGACGGTCAACGTTGTCAGGACCAAGCGAAAG
AGGACCACTGTAGCCGCGCTTGTAGCCGCGGCGCTGCTGGTGACGGGCTTTATCGTCGTC
GTCGTCTTCGTCGTCGTTGTT (SEQ ID NO: 6)

 β -1,4- 木糖苷酶样蛋白

MEALREPLAAPPTSARSSVPAPLAKEEGEEEDGEKGTFGAGVLGVVAVLVIVVFAIVAGGGG
DI (SEQ ID NO: 7)

ATGGAGGCCCTGCGCGAGCCCTTGGCTGCGCCGCCAACGTCGGCGCGATCGTCGGTGCC
AGCGCCGCTCGCGAAGGAGGAGGGGgAGGAGGAGGACGGGGAAAAaGGGACGTTTGGG
GCGGGGGTCTCTGGTGTCGTGGCGGTGCTCGTCATCGTGGTGTTTTCGATCGTGCGGGA
GGCGGAGGCGATATT (SEQ ID NO: 8)

半乳糖基转移酶样蛋白 #5

MLSVAQVAGSAHSRPRRGGERMQDVLALEESSRDRKRATARPGLYRALAILGLPLIVFIVWQ
MTSSLTTAPSA (SEQ ID NO: 9)

ATGTTGAGCGTgGCACAAGTCGCGGGGTGCGCCCACTCGCGGCCGAGACGAGGTGGTGA
GCGGATGCAAGACGTGCTGGCCCTGGAGGAAAGCAGCAGAGATCGAAAACGAGCAACA
GCAAGGCCCGGGCTATATCGCGCACTTGCGATTCTGGGGCTGCCGCTCATCGTATTCATC
GTATGGCAAATGACTAgCTCCCTCACGACTGCCCCGAGCGCC (SEQ ID NO: 10)

图10