



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104540940 B

(45)授权公告日 2018.03.06

(21)申请号 201380027463.0

(22)申请日 2013.03.25

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104540940 A

(43)申请公布日 2015.04.22

(30)优先权数据
61/615,629 2012.03.26 US
13/830,494 2013.03.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.11.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/033716 2013.03.25

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/148580 EN 2013.10.03

(73)专利权人 科罗拉多州大学评议会
地址 美国科罗拉多州

(72)发明人 R.G. 卡里洛 J.P. 克劳斯 T. 马坦
D. 纳维

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 罗文锋 杨思捷

(51)Int.Cl.

C12N 9/88(2006.01)

(56)对比文件

CN 1552905 A, 2004.12.08,
EP 1878739 A1, 2008.01.16,
BELEW MS. ET AL. Kinetic

characterization of recombinant human
cystathionine beta-synthase purified from
E. coli. 《PROTEIN EXPRESSION AND
PURIFICATION》. 2009, 第164卷(第2期), 第141页
第2段.

BELEW MS. ET AL. Kinetic
characterization of recombinant human
cystathionine beta-synthase purified from
E. coli. 《PROTEIN EXPRESSION AND
PURIFICATION》. 2009, 第164卷(第2期), 第141页
第2段.

审查员 张彬

权利要求书2页 说明书15页
序列表9页 附图20页

(54)发明名称

胱硫醚 β -合酶的纯化

(57)摘要

本发明提供用于纯化胱硫醚 β -合酶(CBS)
蛋白、尤其是其截短的变体的色谱法以及自其制
备的组合物和药物组合物。

1. 一种用于纯化胱硫醚 β -合酶 (CBS) 蛋白的方法, 其中所述CBS蛋白为经化学或酶促切割的或经基因工程改造的SEQ ID NO: 2的截短物, 所述方法包括以下步骤:

(a) 提供包含一种或多种杂质的含CBS的溶液; 和

(b) 首先使用离子交换色谱柱进行所述含CBS溶液的色谱分离; 和

(c) 其次通过使含CBS的溶液与金属亲和色谱 (IMAC) 树脂接触而进行色谱分离, 其中因此去除杂质。

2. 权利要求1的方法, 其进一步包括使用疏水相互作用色谱 (HIC) 柱进行色谱分离的步骤。

3. 权利要求1-2中任一项的方法, 其进一步包括使用陶瓷羟磷灰石树脂进行色谱分离的步骤。

4. 权利要求1-2中任一项的方法, 其中所述离子交换色谱柱为弱阴离子交换柱。

5. 权利要求4的方法, 其中所述弱阴离子交换柱为DEAE-琼脂糖凝胶FF柱。

6. 权利要求1-2中任一项的方法, 其中使所述金属亲和色谱 (IMAC) 树脂荷载上二价金属阳离子。

7. 权利要求6的方法, 其中所述二价金属阳离子为镍、铜、钴或锌。

8. 权利要求7的方法, 其中所述二价金属离子为锌。

9. 权利要求1-2中任一项的方法, 其进一步包括用含咪唑的洗脱缓冲液将CBS从所述金属亲和色谱 (IMAC) 树脂上洗脱。

10. 权利要求1-2中任一项的方法, 其中所述截短的CBS蛋白具有由SEQ ID NO: 3确定的氨基酸序列。

11. 权利要求1-2中任一项的方法, 其中所述含CBS的溶液为澄清的CBS溶液。

12. 权利要求1-2中任一项的方法, 其中所述CBS在重组细胞中产生。

13. 权利要求12的方法, 其中所述重组细胞为细菌细胞。

14. 权利要求13的方法, 其中所述含CBS的溶液通过将表达重组构建体的重组细菌细胞均质化来获得, 所述重组构建体包含编码CBS的核酸序列。

15. 权利要求14的方法, 其中所述CBS核酸编码截短的CBS蛋白。

16. 权利要求15的方法, 其中将所述截短的CBS蛋白截短至来自SEQ ID NO: 2的382-532、382-550或543-550的氨基酸残基之一的末端位置。

17. 权利要求16的方法, 其中所述CBS核酸序列包含SEQ ID NO: 4。

18. 权利要求12的方法, 其中所述重组细胞为大肠杆菌细胞。

19. 权利要求16的方法, 其中编码所述截短的CBS蛋白的核酸序列针对在大肠杆菌细胞中的表达最优化。

20. 一种用于产生CBS富化的溶液的方法, 其中所述CBS蛋白为不带标签的, 并且为经化学或酶促切割或基因工程改造的SEQ ID NO: 2的截短物, 所述方法包括:

(a) 提供包含一种或多种杂质的含CBS的溶液; 和

(b) 通过使所述含CBS溶液与荷载有锌的固定化金属亲和色谱 (IMAC) 树脂接触而进行所述含CBS溶液的色谱分离, 其中因此去除杂质。

21. 权利要求20的方法, 其中所述截短的CBS蛋白具有由SEQ ID NO: 3确定的氨基酸序列。

22. 权利要求20-21中任一项的方法,其中所述CBS溶液为澄清的CBS溶液。
23. 权利要求20-21中任一项的方法,其中所述CBS在重组细胞中产生。
24. 权利要求23的方法,其中所述重组细胞为细菌细胞。
25. 权利要求24的方法,其中所述CBS溶液通过将表达重组构建体的重组细菌细胞均质化来获得,所述重组构建体包含编码CBS的核酸序列。
26. 权利要求25的方法,其中所述CBS编码截短的CBS蛋白。
27. 权利要求26的方法,其中将所述截短的CBS蛋白截短至来自SEQ ID NO: 2的382-532、382-550或543-550的氨基酸残基之一的末端位置。
28. 权利要求27的方法,其中所述CBS核酸序列包含SEQ ID NO: 4。
29. 权利要求24-28中任一项的方法,其中所述细菌细胞为大肠杆菌细胞。
30. 权利要求26-28中任一项的方法,其中编码所述截短的CBS蛋白的核酸序列针对在大肠杆菌细胞中的表达最优化。

胱硫醚 β -合酶的纯化

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护2012年3月26日提交的美国临时申请号61/615,629和2013年3月14日提交的美国申请号13/830,494的权益,其各自的公开内容通过引用并入。

发明领域

[0003] 本发明一般涉及用于纯化胱硫醚 β -合酶(CBS),尤其是其截短变体的方法。本发明亦涉及通过所述纯化方法产生的基本上纯的CBS的组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 胱硫醚 β -合酶(CBS)在真核生物的高半胱氨酸(Hcy)代谢中起重要作用(Mudd等,2001,遗传病的代谢和分子基础(*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*),第8版,第2007-2056页,McGraw-Hill,New York)。所述CBS酶催化丝氨酸和高半胱氨酸的5'-磷酸吡哆醛(PLP;维生素B₆)-依赖性缩合以形成胱硫醚,所述胱硫醚随后用于通过另一种PLP-依赖性酶(胱硫醚 γ -裂解酶)产生半胱氨酸。在具有转硫作用(transsulfuration)途径的哺乳动物细胞中,CBS在Hcy再甲基化为甲硫氨酸或其在半胱氨酸的生物合成中的备选用途之间占据了关键的调节位置。这两个竞争性途径之间的相对通量大致相等,并通过胞内S-腺苷甲硫氨酸(AdoMet)浓度来控制(Finkelstein和Martin,1984,*J. Biol. Chem.* 259:9508-13)。AdoMet使哺乳动物CBS酶激活多达5倍,表观解离常数为15 μ M (Finkelstein等,1975,*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66: 81-87;Roper等,1992,*Arch. Biochem. Biophys.* 298: 514-521;Kozich等,1992,*Hum.Mutation*1: 113-123)。

[0006] 人CBS的C端调节域由约140个氨基酸残基组成(Kery等,1998,*Arch. Biochem. Biophys.* 355: 222-232)。该区对于人的酶的四聚体化和AdoMet激活而言为必需的(Kery等,1998,同上)。所述C端调节区亦包含先前定义的“CBS结构域”(Bateman,1997,*Trends Biochem. Sci.* 22: 12-13)。分别跨越SEQ ID NO: 1的氨基酸残基416-468和486-543的这些疏水序列(CBS 1和CBS 2),在大范围的其它不相关的蛋白质中为保守的。尽管热诱导CBS激活的急剧转变以及此结构域中的突变可组成性激活酶的观察结果表明这些序列在所述C端区的自动抑制功能中起作用,但其功能仍未知(Janosik等,2001,*Biochemistry* 40: 10625-33;Shan等,2001,*Hum. Mol. Genet.* 10: 635-643;Miles和Kraus,2004,*J. Biol. Chem.* 279: 29871-4)。在酵母CBS的C端区中亦存在两个非常保守的CBS结构域,所述酵母CBS与人的酶的长度几乎相同。

[0007] 在健康的正常个体中,CBS介导的从Hcy到胱硫醚的转化为从甲硫氨酸(Met)代谢成半胱氨酸(Cys)的限速中间步骤。维生素B₆为此过程的必需辅酶。在CBS酶中具有某些基因突变的患者中,从Hcy到胱硫醚的转化变慢或缺失,导致在酶底物(Hcy)的血清浓度上的升高以及在酶产物(胱硫醚)的血清浓度上的相应降低。升高的Hcy血清水平及其并发的向尿中的排泄的临床病况,统称为高胱氨酸尿症。

[0008] CBS缺乏为遗传性高胱氨酸尿症的最常见原因,所述高胱氨酸尿症为一种严重的

威胁生命的疾病,其导致血浆、组织和尿中严重升高的高胱氨酸水平。对于高胱氨酸尿症的患病率的估计差异很大。通过新生儿筛查的确认和临床确认已指出范围为1:200,000-1:335,000的患病率(Mudd等,1995,遗传病的代谢和分子基础(*The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*),McGraw-Hill: New York,第1279页)。与CBS缺陷型高胱氨酸尿症(CBSDH)相关的主要健康问题包括:具有易染血栓形成倾向的心血管疾病,导致未经治疗和经局部治疗的患者中的高死亡率;以进行性近视和晶状体脱位影响视觉系统的结缔组织问题;影响骨骼的结缔组织问题,其特征为马方综合征、骨质疏松和脊柱侧凸;以及中枢神经系统问题,其包括智力迟钝和癫痫。症状包括脱位的眼晶状体、骨骼病症、智力迟钝以及过早的动脉硬化和血栓形成(Mudd等,2001,同上)。纯合的CBS缺乏与大量的临床症状相关联,这些症状包括智力迟钝、骨质疏松、脊柱后侧凸、中风、心肌梗死、晶状体异位和肺栓塞。所述疾病的心血管并发症(尤其是动脉和静脉血栓形成),为早期死亡率的主要促因。

[0009] CBS缺乏的病理生理学无疑为复杂的,但意见一致的是,终末器官损伤的根本诱因(instigator)为血清Hcy的极度升高,所述Hcy为CBS的底物,其因缺乏其经CBS催化的与L-丝氨酸缩合形成胱硫醚而在组织和血液中积累。在Hcy的血液和组织浓度上的极大升高的毒性可因Hcy本身的分子反应性和生物效应而产生,或者可因其影响大量生物过程的代谢物(例如Hcy-硫代内酯)而产生(Jakubowski等,2008,*FASEB J* 22: 4071-6)。在慢性血小板聚集中的异常、在血管参数中的改变以及内皮机能障碍均已在患有高胱氨酸尿症的患者中描述。

[0010] 目前对于CBSDH的治疗存在三种治疗选项:

[0011] 1) 在维生素B₆响应的患者中使用药理学剂量的维生素B₆来增加CBS活性的残余活性;

[0012] 2) 通过严格限制Met摄入的饮食来降低血清Hcy;和

[0013] 3) 通过甜菜碱介导的将Hcy转化成Met来解毒,从而降低血清Hcy浓度。

[0014] 这3种疗法各自目的均为降低血清Hcy浓度。对于受维生素B₆无响应的CBSDH所累的个体的标准治疗由补充以代谢配方和呈半胱氨酸形式的Cys(其在此情况下变为条件必需氨基酸)的Met-限制饮食组成。肉、乳制品以及富含天然蛋白质的其它食物的摄入为禁止的。需要每日消耗不美味的含氨基酸和微量营养物的合成代谢配方,以防止继发性营养不良。补充甜菜碱(商品名:CystadaneTM,同义词:三甲基甘氨酸)亦为标准疗法,其中甜菜碱充当用于在肝中通过甜菜碱-高半胱氨酸甲基转移酶催化的将Hcy再甲基化成Met的甲基供体(Wilcken等,1983,*N. Engl. J. Med.* 309: 448-53)。即便在其中提供最佳护理和资源的医疗中心中,饮食遵从性通常亦很差,并且这种非遵从性对于高胱氨酸尿症的威胁生命的并发症的发展具有较大牵连。

[0015] 为了使患有高胱氨酸尿症的患者享有不受限制得多的饮食(例如每日摄入限于2 g蛋白质/kg,其为容易实现的),并且具有从长远来看导致临床改善的显著降低的Hcy血浆水平,用于增加酶活性的策略为如在共同待审的美国临时专利申请系列号61/758,138中所阐述的治疗提供可能性。最有效的治疗策略为增加酶活性,如在对维生素B₆响应的高胱氨酸尿症患者给予吡哆醇(pyridoxone)时所证实。然而,因突变的性质所致,此策略对于维生素B₆无响应的患者为不可能的。作为增加这些患者中的酶活性的方式的酶替代疗法(ERT)

需要外源酶,所述外源酶在本领域中不存在并因此在本领域中提出对用于以用于治疗给药的充分纯化的酶的更高收率产生CBS的改良的试剂和方法的需要。

[0016] Kraus及同事已开发用于产生活性重组人CBS及其变体的表达系统和发酵条件(美国专利号5,635,375、5,523,225和7,485,307,通过引用以其整体并入到本文中用于任何目的)。这些蛋白质通过与学术目的相关的过程纯化,包括使用并不认为可用于药物制备的该蛋白质的蛋白质前导(leads)。

[0017] 为了使用增加CBS酶活性的方法,需要CBS酶纯化的有效方法。用于重组CBS蛋白的现有纯化方法依赖于亲和标签来利于纯化,其并未提供所需的纯度和效率。因此为更有效地获得治疗使用所需的必需水平的CBS,存在对在微生物细胞中产生的CBS蛋白的改进的下游纯化的需要。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明提供用于纯化胱硫醚 β -合酶(CBS)的方法,其中所述CBS蛋白为天然存在的截短变体,或其经化学切割或基因工程改造的截短物(truncate),尤其为在重组细胞中产生的截短CBS。在具体的实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)提供存在至少一种杂质的含CBS的溶液;和(b)使用金属亲和色谱(IMAC)树脂进行所述含CBS溶液的色谱分离。在另外的具体实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)提供存在至少一种杂质的含CBS的溶液;和(b)使用离子交换色谱柱和金属亲和色谱(IMAC)树脂进行所述含CBS溶液的色谱分离。

[0020] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括进行另外的色谱步骤(在本领域中称为“精制”步骤)。在具体的实施方案中,本发明的方法包括使用疏水相互作用色谱(HIC)柱进行色谱分离的步骤。在其它实施方案中,所述方法进一步包括使用陶瓷羟磷灰石(hydroxyapatite)树脂进行色谱分离的步骤。

[0021] 在某些实施方案中,所述离子交换柱为阴离子交换柱,优选弱阴离子交换柱。在具体的实施方案中,所述阴离子交换柱为DEAE-琼脂糖凝胶FF(DEAE-Sepharose FF)柱。在进一步的实施方案中,使IMAC树脂荷载上二价离子。在更进一步的实施方案中,所述二价金属离子为镍、铜、钴或锌。在更具体的实施方案中,所述二价金属离子为锌。

[0022] 在某些其它实施方案中,所述方法进一步包括用含咪唑的洗脱缓冲液将CBS从所述IMAC树脂上洗脱。在某些实施方案中,所述含CBS的溶液为澄清的CBS溶液,其中将细胞碎片和其它颗粒物从含CBS的悬浊液中去除,该CBS溶液包括但不限于离心之后的上清液或者过滤之后的滤液。在再其它的实施方案中,所述含CBS的溶液通过将表达重组构建体的细胞均质化来获得,所述重组构建体包含编码CBS的核酸序列。在某些实施方案中,所述CBS核酸序列包含SEQ ID NO: 1并编码具有如SEQ ID NO: 2所确定的氨基酸序列的蛋白质。在其它的实施方案中,所述核酸序列为截短的。在再其它实施方案中,将所述截短的CBS核酸序列截短至来自SEQ ID NO: 2的382-532、382-550或543-550的氨基酸残基之一的末端位置。

[0023] 在其它某些实施方案中,所述重组细胞为微生物细胞,尤其为细菌细胞。在具体的实施方案中,所述细菌细胞为大肠杆菌(*E. coli*)细胞,尤其为产生哺乳动物(优选人)的CBS蛋白的重组大肠杆菌细胞。在某些具体的实施方案中,所述人CBS蛋白具有如在SEQ ID NO: 3中所述的氨基酸序列或者截短至来自SEQ ID NO: 2的382-532或543-550的氨基酸残基之一的末端位置的截短的CBS核酸序列。在其它具体的实施方案中,所述截短的CBS核酸序列针对在大肠杆菌中的表达最优化,其通过SEQ ID NO: 4确定。

[0024] 在另一方面中,使用包括以下步骤的方法提供基本上纯化的CBS溶液:a)提供存在至少一种杂质的含CBS的溶液,其中所述CBS蛋白为天然存在的截短变体,或其经化学切割或基因工程改造的截短物,尤其为截短的;和(b)使用金属亲和色谱(IMAC)树脂进行所述含CBS溶液的色谱分离。在另外的具体实施方案中,使用包括以下步骤的方法提供基本上纯化的CBS溶液:(a)提供存在至少一种杂质的含CBS的溶液;和(b)使用离子交换色谱柱和金属亲和色谱(IMAC)树脂进行所述含CBS溶液的色谱分离。

[0025] 在本发明的某些实施方案中,将基本上纯化的CBS溶液配制在药学上可接受的载体中。

[0026] 在另一方面中,本发明提供用于产生CBS富化的溶液的方法,所述方法包括:(a)提供存在至少一种杂质的含CBS的溶液,其中所述CBS蛋白为天然存在的截短变体,或其经化学切割或基因工程改造的截短物,尤其为截短的;和(b)使用荷载有二价金属离子的固定化金属亲和色谱(IMAC)树脂来进行所述含CBS溶液的色谱分离。

[0027] 在另一方面中,使用包括以下步骤的方法提供CBS富化的溶液:a)提供存在至少一种杂质的含CBS的溶液,其中所述CBS蛋白为天然存在的截短变体,或其经化学切割或基因工程改造的截短物,尤其为截短的;和(b)使用荷载有二价金属离子的固定化金属亲和色谱(IMAC)树脂来进行所述含CBS溶液的色谱分离。

[0028] 本发明的具体优点为,重组的全长或截短的CBS尤其是人CBS的纯化,可在无需对所述蛋白质进一步修饰的情况下实现,所述修饰例如通过掺入本领域已知的“标签”分子(聚-HIS、FLAG等)进行。本文所公开的色谱法的使用有利地使这些标签成为不必要的,从而避免了另外的重组操作以及可能引入到任何包含这类标签的重组CBS制品中的任何缺点(在免疫原性、体内半寿期或生物化学活性方面)。

[0029] 本发明的具体的优选实施方案可从某些优选实施方案的下列更详细描述和权利要求中变得显而易见。

[0030] 附图简述

[0031] 当结合下列附图阅读时,可最好地理解本发明的实施方案的下列详述。

[0032] 图1为概括自使用包含DEAE-琼脂糖凝胶-FF、Zn-IMAC和HIC色谱的多步色谱法的放大型(generation)运行的纯化队列概要。

[0033] 图2为概括自使用DEAE-琼脂糖凝胶-FF柱的纯化实验和使用“非最优化的”细菌表达构建体纯化的CBS的纯化概要。除在实施例中所所述的其它组分之外,流动相还包含10%乙二醇。

[0034] 图3为概括自使用包含DEAE-琼脂糖凝胶-FF、Zn-IMAC、陶瓷羟磷灰石树脂和HIC色谱的多步色谱法的放大型运行的纯化队列概要。

[0035] 图4为SDS page凝胶的影像,其显示使用DEAE柱的纯化步骤的各阶段的CBS蛋白和杂质的相对量。

[0036] 图5为SDS page凝胶的影像,其显示3柱纯化法(包括DEAE柱、Zn-IMAC柱和HIC柱)的CBS蛋白和杂质的相对量。

[0037] 图6为SDS page凝胶的影像,其显示4柱纯化法(包括DEAE柱、Zn-IMAC柱、陶瓷羟磷灰石树脂和HIC柱)的CBS蛋白和杂质的相对量。

[0038] 图7为色谱图,其显示在使用Zn-IMAC纯化之后分离的混合物的组分。

[0039] 图8为概括自使用Ni-IMAC柱的开发运行的纯化概要。

[0040] 图9为汇总表,其显示在使用Ni-IMAC柱的纯化法之后的总蛋白。

[0041] 图10为SDS page凝胶的影像,其显示使用Ni-IMAC柱的纯化步骤的各阶段的CBS蛋白和杂质的相对量。

[0042] 图11为概括自使用Cu-IMAC柱的放大型运行的纯化概要。

[0043] 图12为汇总表,其显示在使用Zn-IMAC柱的纯化法之后的总蛋白。

[0044] 图13为SDS page凝胶的影像,其显示使用Zn-IMAC柱的纯化步骤的各阶段的CBS蛋白和杂质的相对量。

[0045] 图14为使用多步色谱纯化步骤的纯化法的方案。

[0046] 发明详述

[0047] 本发明提供用于纯化CBS蛋白的方法,其中所述CBS蛋白为天然存在的截短变体,或其经化学切割或基因工程改造的截短物,尤其为在重组细胞中产生的截短蛋白质CBS。具体而言,本发明提供用于纯化CBS蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:(a)提供存在至少一种杂质的含CBS的溶液;和(b)使用金属亲和色谱(IMAC)树脂进行所述含CBS溶液的色谱分离。在另外的具体实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)提供存在至少一种杂质的含CBS的溶液;和(b)使用离子交换色谱柱和金属亲和色谱(IMAC)树脂进行所述含CBS溶液的色谱分离。

[0048] 本发明提供的方法的某些实施方案中的具体色谱分离步骤包含离子交换色谱柱。在一个实施方案中,所述离子交换色谱柱为阴离子交换柱,优选弱阴离子交换柱。可使用多种类型的阴离子交换树脂,包括DEAE-葡聚糖凝胶、QAE-葡聚糖凝胶、DEAE-葡聚糖纤维素、DEAE-纤维素和DEAE-琼脂糖凝胶-FF。根据一个实施方案,所述阴离子交换树脂为DEAE-琼脂糖凝胶-FF。

[0049] 本发明提供的某些方法中的另一种具体的色谱分离步骤包含金属亲和色谱(IMAC)树脂,其具有适当的pH和电导率,以便在使用选择性中间洗涤以去除较弱结合蛋白和其它分子物质的同时,允许所述蛋白质与柱结合。在某些实施方案中,利用改变咪唑的浓度来调节色谱法期间的分配。合适的金属亲和树脂包括荷载有二价金属离子(包括镍、铜、钴或锌)的固定化金属亲和柱。在本发明的方法的某些实施方案中,在离子交换色谱之后使用金属亲和色谱(IMAC)柱。在这类实施方案中,所述IMAC柱优选荷载有作为二价阳离子的锌。在本发明方法的其它实施方案中,将IMAC柱用作初始色谱步骤。在这类实施方案中,优选使用镍或铜二价阳离子荷载IMAC柱。

[0050] 在本发明的方法的某些实施方案中提供的用于从含CBS的溶液中纯化CBS的另外的色谱步骤包括但不限于疏水相互作用色谱(HIC)。HIC对于去除在捕获步骤期间与靶蛋白一起洗脱的具有相对密切相关的色谱性质的杂质而言为有用的。

[0051] 在本发明的方法的某些实施方案中提供的用于从含CBS的溶液中纯化CBS的再进一步的色谱步骤包括但不限于陶瓷羟磷灰石树脂。“陶瓷羟磷灰石”或“CHAP”是指式 $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ 的不可溶的羟基化磷酸钙,其在高温下烧结成球状大孔陶瓷形式。本发明的方法亦可与松散的或装填在柱中的羟磷灰石树脂一起使用。柱尺寸的选择可由技术人员来确定。

[0052] 在本发明的方法中有用的色谱基质为能够结合生化化合物(优选蛋白质、核酸和/

或内毒素)的物质,其中所述生化化合物对所述色谱基质的亲和力受到周围溶液(缓冲液)的离子组成所影响。控制所述溶液的离子组成允许以除去模式(CBS通过所述色谱基质,至少某些污染物与所述色谱基质结合)或优选以吸附模式(CBS与所述色谱基质结合)使用本发明的色谱物质。

[0053] 在具体的实施方案中,用于纯化的方法包括均质化宿主细胞(尤其是重组细胞以及在某些实施方案中为产生哺乳动物优选人CBS蛋白的重组细胞)的步骤,其中所述重组构建体编码CBS蛋白,所述CBS蛋白为天然存在的截短变体,或其经基因工程改造的截短物,尤其为其中所述构建物已针对重组细胞表达最优化。在具体的实施方案中,所述重组细胞为微生物细胞,尤其为细菌细胞。在某些具体的实施方案中,所述细菌细胞为大肠杆菌细胞并且所述CBS序列已在重组表达构建体中进行工程改造,以针对在所述细胞中的表达最优化;针对在大肠杆菌中的CBS表达最优化的所述核酸序列的具体实施方案阐述于SEQ ID NO: 4中。在所述方法中,收集细胞(例如通过离心),并任选储存于-80℃。宿主细胞的均质化通过使用物理、化学或酶促方式或通过其组合破坏所述细胞宿主来进行。有利的是,对于自细菌来源的纯化,均质化通过用超声处理破坏所述细菌宿主的细胞壁来进行。备选或另外地,均质化通过暴露给诸如溶菌酶等细胞壁降解酶使宿主的细菌细胞壁失稳来进行。

[0054] 本发明的方法可进一步包含澄清的CBS匀浆,其中细胞碎片已通过过滤或离心从所述匀浆中去除。在某些实施方案中,通过以有效的转速将匀浆离心来进行澄清。所需的离心时间尤其取决于匀浆的体积,其可凭经验确定以获得足够紧实的沉淀。为了获得基本上不含细胞碎片的澄清匀浆,可对所述匀浆进行离心和过滤的组合。

[0055] 本文所用的术语“重组细胞”是指已向其中引入重组表达构建体的来自任何物种的合适细胞(包括这类细胞的子代),所述重组表达构建体能够表达这样的核酸,其编码CBS蛋白,优选人CBS蛋白,最尤其其为天然存在的截短变体、或其经化学切割或基因工程改造的截短物的人CBS蛋白。在具体的实施方案中,通过所述重组表达构建体编码的截短的CBS蛋白具有如在SEQ ID NO: 3中所阐述的氨基酸序列。

[0056] 本文所用的术语“细菌细胞”是指尤其使用重组基因法产生哺乳动物(优选人)CBS蛋白的细菌,其包括所述重组细胞的子代,其中所述CBS蛋白为天然存在的截短变体,或其经基因工程改造的截短物。

[0057] 本文所用的术语“重组表达构建体”是指这样的核酸,其具有哺乳动物(优选人)CBS蛋白的核苷酸序列,以及足以指导CBS蛋白在已向其中引入所述重组表达构建体的细胞及其子代的培养物中合成的序列。

[0058] 如在本文中所使用,提及CBS蛋白或多肽优选包括天然存在的截短变体,或其经化学切割或基因工程改造的截短物,或融合蛋白,或其任何同源物(变体、突变体),并且具体为哺乳动物CBS及优选人CBS。所述CBS蛋白可包括但不限于纯化的CBS蛋白、重组产生的CBS蛋白、可溶性CBS蛋白、不溶性CBS蛋白以及与其它蛋白质缔合的分离的CBS蛋白。此外,“人CBS蛋白”是指来自人(人类(*Homo sapiens*))的CBS蛋白,优选包括天然存在的截短变体,或其经化学切割或基因工程改造的截短物。因此,人CBS蛋白可包括纯化的、部分纯化的、重组的、突变/修饰的以及合成的蛋白质。如在本文中以及在相关的美国专利号8,007,787和7,485,307中所公开,所述CBS蛋白截短物有利地为可溶性CBS蛋白,其在细菌中产生而不会产生不溶性包涵体。

[0059] 本文所用的术语“同源物”(或者变体或突变体)是用于表示这样的蛋白质或肽,其通过对天然存在的蛋白质或肽的修饰而不同于所述天然存在的蛋白质或肽(即“原型”或“野生型”蛋白质),但保持所述天然存在形式的基本蛋白质结构和侧链结构。这类改变包括但不限于:在一个、少数乃至数个氨基酸侧链上的改变;在一个、少数或数个氨基酸上的改变,包括缺失(例如所述蛋白或肽的截短形式)、插入和/或取代;在一个或少数原子的立体化学上的改变;和/或较小的衍生化,包括但不限于:甲基化、糖基化、磷酸化、乙酰化、肉豆蔻酰化、异戊烯化、棕榈酰化(palmitation)、酰胺化和/或添加糖基磷脂酰肌醇。与天然存在的蛋白质或肽相比,同源物可具有增强、减少、改变或基本上类似的性质。同源物可包括蛋白质的激动剂或蛋白质的拮抗剂。

[0060] 同源物可以是自然等位基因变异或自然突变的结果。编码蛋白质的核酸的天然存在的等位基因变体为这样的基因,其与编码这类蛋白质的基因存在于基因组中基本上相同的基因座上,但因例如突变或重组引起的自然变异所致而具有类似但不完全相同的序列。等位基因变体通常编码这样的蛋白质,其具有类似于与其进行比较的基因编码的蛋白质的活性。因遗传密码的简并性所致,一类等位基因变体可编码相同的蛋白质但具有不同的核酸序列。等位基因变体亦可包含在基因的5'或3'非翻译区(例如调控区)中的改变。等位基因变体为本领域技术人员所熟知。

[0061] 同源物可使用本领域已知的用于产生蛋白质的技术产生,包括但不限于对分离的天然存在的蛋白质的直接修饰、直接的蛋白质合成、或者使用例如产生随机或定向诱变的经典或重组DNA技术对编码蛋白质的核酸序列进行修饰。CBS变体描述于美国专利号8,007,787,其通过引用以其整体并入到本文中;在具体和优选的实施方案中,本文所述的本发明的试剂和方法优选包括人CBS蛋白的天然存在的截短变体或经化学切割或基因工程改造的截短物。根据本发明的SEQ ID NO: 3的具体截短形式包括N端缺失变体、C端缺失变体以及N端和C端双缺失的变体。

[0062] 本文所用的“基本上纯的”是指允许蛋白在体外、离体或体内的有效使用的纯度。对于可用于体外、离体或体内的蛋白质,优选其基本上不含可干扰或者会干扰其使用、或者至少不希望包含在CBS蛋白(包括其同源物)中的污染物、其它蛋白质和/或化学物质。

[0063] 本文所用的CBS富化的溶液为已经历一个或多个纯化步骤的溶液。

[0064] 蛋白质的纯度可通过计算倍数纯化(即提供纯化的溶液与更少纯化的溶液或未加工的提取物相比高多少的量度的公式)来确定。倍数纯化使用下式来计算:

[0065] 最终部分的比活/未加工部分的比活。

[0066] 评价纯度的另一种量度为“比活”,其计量酶的纯度。比活可使用下式来计量:

$$[0067] \quad \frac{\frac{\mu\text{U}}{\text{ml}}}{\frac{\text{mg}}{\text{mg}}} = \frac{\mu\text{U}}{\text{mg}}$$

[0068] 本发明提供的CBS蛋白组合物对于调节生物过程,尤其是与催化丝氨酸和高半胱氨酸的5'-磷酸吡哆醛(PLP)依赖性缩合形成胱硫醚相关的过程是有用的。具体而言,本发明的组合物对于体外产生胱硫醚和半胱氨酸或者对于治疗可受益于增加的CBS活性的患者(例如患有高胱氨酸尿症的患者)是有用的。在某些实施方案中,本发明提供所述CBS蛋白(优选人CBS蛋白)的组合物作为包含所述CBS蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物,其中所述CBS蛋白为人CBS蛋白的天然存在的截短变体、或其经化学切割或基因工程改造的截

短物。

[0069] 本文所用的“药学上可接受的载体”包括药学上可接受的赋形剂和/或药学上可接受的递送媒介物,其适用于所述组合物的合适的体外、离体或体内给药。合适的体外、体内或离体给药优选包含其中需要调节CBS活性的任何位点。合适的药学上可接受的载体能够使如通过本发明提供的CBS蛋白保持这样的形式:在蛋白质到达培养物或患者中的靶细胞或组织时,所述蛋白质具有其预期或所需的生物活性。药学上可接受的载体的实例包括但不限于水、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液、含血清的溶液、Hank's溶液、其它水性的生理平衡溶液、油、酯和二醇。水性载体可包含接近受者的生理条件所需的合适的辅助物质,例如通过增强化学稳定性和等渗性来接近。本发明的组合物可通过常规方法来灭菌和/或冻干。

[0070] 本文所描述和/或引用的各参考文献均通过引用以其整体并入。

[0071] 提供下列实施例是以说明为目的而不意图限制本发明的范围。

实施例

[0072] 实施例1:在细菌中产生截短的CBS蛋白

[0073] 构建缺少非保守区的特定部分的截短的人CBS变体(r-hCBS Δ C;SEQ ID No: 3)并使用先前所述的基于大肠杆菌的表达系统过表达(Kozich和Kraus,1992,上述)。在对本文所公开的该系统的改进中(即表达截短物而非全长CBS蛋白),在*tac*启动子的调控下且不使用任何融合配偶体的情况下表达SEQ ID NO: 3编码的CBS截短物。编码所述截短的人CBS蛋白变体r-hCBS Δ C的构建体(SEQ ID NO: 4)通过修饰先前所述的pHCS3 CBS表达构建体(Kozich和Kraus,1992,Hum. Mutat. 1,113-123)来产生,所述pHCS3 CBS表达构建体含有克隆到pKK388.1中的CBS全长编码序列(SEQ ID NO: 1)。在此构建体中,CBS表达通过可IPTG诱导的*lac*启动子控制。为了产生C端缺失构建体,使用将Sph I和Kpn I位点分别掺入PCR产物的5'和3'端的引物扩增跨越所需核苷酸残基的CBS cDNA片段。然后使用Sph I和Kpn I切开所有PCR产物并通过连接到经Sph I和Kpn I消化的pHCS3载体来克隆。在CBS cDNA中天然存在一个Sph I位点,恰位于反义引物杂交位点的上游(碱基对(base pair)位置1012,根据CBS cDNA编号,参考文献25)。然后使用Nco I和Sph I消化如此产生的PCR产物并连接到经相同的酶切开的pHCS3质粒中。

[0074] pKK CBS Δ 414-551

[0075] 有义:CGTAGAATTACCTTTGCCGCGATGCTGAT (SphI) (SEQ ID NO: 5)

[0076] 反义:TACGGGTACCTCAACGGAGGTGCCACCACCAGGGC (KpnI) (SEQ ID NO: 6)

[0077] 最后,将所述构建体转化到大肠杆菌BL21 (Stratagene)中。按照制造商的说明书,通过使用Thermo Sequenase Cy5.5测序试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech)和Visible Genetics Long-Read Tower System-V3.1 DNA测序仪的DNA测序来验证构建体的可靠性。

[0078] CBS缺失突变体的细菌表达分析-大肠杆菌的生长。依照先前所述方法(Maclean等,2002,Hum. Mutat. 19(6), 641-55)对含CBS截短突变构建体的BL21细胞进行诱导表达并产生未加工的细胞裂解物。简单地说,在存在或不存在0.3 mM δ -氨基乙酰丙酸盐(δ -ALA)的情况下,使细菌在含75 μ g/mL氨苄青霉素(ampicilin)和0.001%硫胺素的1 L

NZCYMT培养基 (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.) 中在37℃下有氧生长,直至其达到600 nm下0.5的浊度。然后加入IPTG至0.5 mM并使细菌进一步生长。不溶性部分按如下制备:在将超声处理的匀浆离心之后,用冷冻的1x Tris-缓冲盐水 (pH 8.0) 充分洗涤沉淀的细胞碎片。然后用1 ml裂解缓冲液重悬浮沉淀 (Maclean等,同上),接着进行简短的超声处理以使所述不溶性部分均匀。

[0079] CBS活性测定- CBS活性通过先前所述的放射性同位素测定法使用 $[^{14}\text{C}]$ 丝氨酸作为标记底物来确定 (Kraus, 1987, *Methods Enzymol.* 143, 388-394)。蛋白质浓度通过Lowry程序 (Lowry等, 1951, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275) 使用牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准品来确定。一个活力单位定义为37℃下在1 h中催化1 μmol 胱硫醚形成的CBS的量。

[0080] 变性和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白质印迹-如前所述 (Janosik, 2001, 同上) 在一些改动下在变性和非变性两种条件下进行未加工细胞裂解物的蛋白质印迹分析。将含有所表达的突变蛋白质的大肠杆菌裂解物的可溶性部分与样品缓冲液混合并在不含浓缩胶的6%非变性PAGE上跑动。样品缓冲液的最终组成为:50mM Tris-HCl (pH 8.9)、1mM DTT、10%甘油、0.001%溴酚蓝。使用依赖于血红素过氧化物酶活性的先前所述的方法 (Vargas等, 1993, *Anal. Biochem.* 209 (2), 323-6) 进行血红素的检测。

[0081] 光密度扫描分析-定量光密度分析使用Imagemaster ID (版本2.0) 软件 (Pharmacia) 进行。为了构建校正曲线,使50、75、100、250、500和1000 ng纯化的野生型CBS蛋白连同各突变体的未加工的细胞裂解物一起在SDS-PAGE上跑动。电泳之后,使用兔抗CBS血清进行蛋白质印迹免疫分析。对应于实验观察到的CBS突变体亚基的信号均在使用纯化的人CBS构建的校正曲线的线性范围内。

[0082] 实施例2:未加工提取物的制备

[0083] 制备未加工的含CBS蛋白的提取物以用于下游色谱步骤。使从产生人截短CBS变体 (r-hCBS ΔC ; SEQ ID No: 3) 的重组细菌的发酵获得的冷冻沉淀 (细胞) 裂解,其中所述细菌表达由SEQ ID NO: 4编码的截短的人CBS。用于初步分离的裂解缓冲液含有1 mM DTT、1% Triton X-100和蛋白酶抑制剂。最终将这些组分从缓冲液中去除。用于最终分离 (产生用于放大运行的物质) 的缓冲液由20 mM磷酸钠、50 mM NaCl、0.1 mM PLP (pH 7.2) 组成,在均质化之后加入溶菌酶至2 mg/mL的浓度。在4℃下与溶菌酶混合1小时之后,将匀浆超声处理直至粘度减少,并随后经历20,000 rpm (48,000 x g) 下的离心达30 min。将上清液收集、等分并在使用前储存于-70℃。通常在色谱纯化之前于37℃融化所述未加工的提取物。

[0084] 实施例3:DEAE-琼脂糖凝胶FF色谱

[0085] 在CBS的纯化方法的本实施例中使用DEAE-琼脂糖凝胶FF,因为其具有良好的性能和流动性并且已始终如一地生产数年。该步骤使用含有约6 mL树脂的滴注/重力柱。在含有50 mM NaCl (pH 7.0) 的磷酸钠缓冲液中使柱平衡。将未加工提取物的上样量目标定为约20 mg总蛋白/mL树脂。对柱上样之后,红色的上样物集中在柱顶端附近。用平衡缓冲液洗涤之后,用含有150 mM NaCl的缓冲液洗涤柱,借此将大部分颜色从柱上洗脱 (所有步骤均在pH 7.0进行)。使用300 mM NaCl洗涤液从柱上去除基本上所有的颜色。基于这些结果,可以流动模式操作来装填柱。所述条件使用了以NaCl浓度50 mM进行的平衡/上样,以250 mM NaCl进行的洗脱。最终条件需要用H₂O稀释柱上样品,以接近平衡/洗涤缓冲液 (50 mM NaCl) 的离子强度,并用137 mM NaCl洗脱 (图1、2和3)。通过SDS-PAGE分析样品以确定CBS蛋

白和杂质的相对量(图4)。下表显示柱操作参数以及来自使用所述参数的放大运行的数据。

表 1.用于 DEAE 捕获步骤的操作参数

工艺步骤	柱上样量目标 (总蛋白 mg/mL)	NaCl 浓度(含 20mM Na ₂ PO ₄ , pH 7.0)	柱体积 (mL)	接触时间 柱体积/流速(min.)
平衡	N/A	50 mM	3-5	10
上样	20-25 mg/mL	约 50 mM	可变	15
洗涤	N/A	50 mM	3	10
洗脱	N/A	137 mM	可变*	15
2M NaCl 解吸(strip)	N/A	2 M	3	10

[0087] *注意:洗脱物收集开始于约0.4 AU以及结束于约0.55 AU。外水体积通常约为1倍柱体积。

表 2.来自放大运行的数据(n=6)

输入		输出		
柱上样量(mL 树脂)				
总蛋白(mg)	单位	回收率(%)	倍数纯化(按 S.A.)	
14.5-19.8	3275-5443	79.3-93.0	2.5-3.3	范围
18.2	4431	86	2.8	平均值

[0089] 实施例4: IMAC 色谱

[0090] 表明了固定化金属亲和柱(IMAC)来自生物来源(例如重组细菌细胞匀浆)的杂质和其它污染物中分离CBS蛋白的能力。因避免低pH条件(<5, 传闻的(anecdotal))的需要所致, 利用改变咪唑的浓度来调节色谱期间的分配。

[0091] 基于其相对强的结合特性, 对铜(Cu⁺⁺)作为IMAC柱的候选物质进行测试。在施加到IMAC柱之前, 将CBS溶液调节至0.4 M NaCl。结果表明以可接受的活性回收率(70-80%)近乎完全捕获。CBS的回收使用100mM咪唑获得, 100mM咪唑导致在从-70℃储存融化时显著沉淀(图11)。此外, 与上样物相比在纯度上仅具有小量增加。因此, 进行采用Ni⁺⁺ IMAC的实验作为所选择的金属。在这些实验中, 在将溶液上样至IMAC柱之前, 使CBS样品运行通过G-25柱以去除二硫苏糖醇(DTT)。纯度增加仍低, 并且选择性类似于Cu⁺⁺, 如通过高咪唑解吸流分中相对小的A₂₈₀峰所证实(图8、9和10)。

[0092] 亦测试了相对弱结合的Zn⁺⁺。尽管捕获、洗涤和洗脱条件需要显著更低的咪唑浓度, 但纯度增加的可能性提供了阳性结果, 因为上样之后的洗涤和高咪唑解吸流分中的A₂₈₀峰具有显著大小。向平衡和洗涤缓冲液中加入0.4 M NaCl和0.01% Triton X-100, 以使非特异性结合降至最低(图1和3)。通过SDS-PAGE分析样品以确定CBS蛋白和杂质的相对量(图13)。IMAC实验的结果在图7中显示。下表显示柱操作参数以及来自使用所述参数的放大运行的数据。

表 3.用于 Zn-IMAC 步骤的操作参数

工艺步骤	柱上样量目标 (总蛋白 mg/mL)	咪唑浓度 (含 20mM Na ₂ PO ₄ pH 7.0)	柱体积 (mL)	接触时间 柱体积/流速(min.)
[0093] 平衡	N/A	1 mM	3	10
上样	10	0	可变	10
洗涤	N/A	1 mM	3	10
洗脱	N/A	11 mM	可变*	10
解吸	N/A	100 mM	3	10

[0094] *注意:洗脱物收集开始于约0.25 AU以及结束于约0.16 AU。外水体积通常约为1.5倍柱体积。

表 4.来自放大运行的数据(n=5)

输入		输出		
柱上样量(mL 树脂)				
总蛋白(mg)	单位	回收率(%)	倍数纯化(按 S.A.)	
6.5-9.3	4414-7038	71.8-84.6	1.3-1.6	范围
8.1	5687	80	1.4	平均值

[0096] 实施例5:HIC色谱

[0097] 进行多个实验以确定用于HIC色谱的参数。采用具有相对强结合配体(苯基)的树脂,以IMAC洗脱物作为起始材料/上样物来进行初步的滴注柱实验。此实验以1.3M (NH₄)₂SO₄得到凭经验的完全结合。然而,即便在用低离子强度缓冲液洗涤之后,仍证实CBS在柱上的显著保留。基于这些结果,测试了具有较弱结合配体(丁基)的树脂。使用该树脂的初步实验显示在0.5M (NH₄)₂SO₄下无明显的捕获。收集该柱实验的未结合的流经物,调节至1.25M (NH₄)₂SO₄,并重新上样到平衡至相同的(NH₄)₂SO₄浓度的柱上。在此情况下,证实与柱显著结合。进行从1.25 M-0.25 M (NH₄)₂SO₄的20倍柱体积(NH₄)₂SO₄梯度洗脱,收集流分。流分的SDS-PAGE分析指出在梯度下端清除杂质的显著可能性。利用不同(NH₄)₂SO₄浓度下的阶梯梯度洗涤的实验确定了最终的操作参数(图1和3)。所述参数和放大运行数据在下表中概述。

表 5.用于 HIC 步骤的操作参数(n=6)

工艺步骤	柱上样量目标 (总蛋白 mg/mL)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 浓度 (含 20mM Na ₂ PO ₄ pH 7.0)	柱体积 (mL)	接触时间 柱体积/流速(min.)
[0098] 平衡	N/A	1.4M	3	10
上样	5-10	1.4M	可变	10
洗涤	N/A	1.4M	3	10
洗脱	N/A	1.1M	可变*	10
解吸	N/A	0.05M NaCl	3	10

[0099] *注意:洗脱物收集开始于约0.25 AU以及结束于约0.15 AU。外水体积通常约为

1.4倍柱体积。

表 6.来自放大运行的数据(n=5)

[0100]	输入		输出		
	柱上样量/(mL 树脂)				
	总蛋白(mg)	单位	回收率(%)	倍数纯化(按 S.A.)	
	5.1-7.2	5375-9248	77.8-92.7	1.0-1.3	范围
	6.3	7638	85	1.2	平均值

[0101] 实施例6:CHAP色谱

[0102] 陶瓷羟磷灰石为具有已用于CBS纯化方法的独特的可能混合的结合模式化学的树脂。CBS显示酸性特征并因此初步研究集中于使用磷酸盐调节的分配。初步实验使用了HIC洗脱液,其缓冲液被更换成0.05M NaCl、0.005M磷酸钾(pH 6.8)缓冲液。在相同的缓冲液中平衡5 mL陶瓷羟磷灰石(1型)柱,并将调适的HIC洗脱物上样到柱上。在使用平衡/洗涤缓冲液的上样和后续洗涤期间未见蛋白质的穿透(breakthrough) (如通过A₂₈₀所测定)。然后运行0.005 M-0.5 M磷酸钾的线性梯度(5%)并收集流分。基于色谱图,通过SDS-PAGE分析样品以确定CBS蛋白和杂质的相对量。在后续实验(基于对前述实验结果的分析)中,使用以不同磷酸盐水平的阶梯洗涤来确定用于上样、洗涤和洗脱步骤的最佳条件。此外,将缓冲盐的组成由磷酸钾转变成磷酸钠(图3)。下表显示柱操作参数以及来自使用所述参数的放大运行的数据。

表 7.用于 CHAP 步骤的操作参数

[0103]	工艺步骤	柱上样量目标 (总蛋白 mg/mL)	Na ₂ PO ₄ 浓度 (含 50mM NaCl pH 7.0)	柱体积 (mL)	接触时间 柱体积/流速(min)
	平衡	N/A	10 mM	3	6
	上样	10-13	10 mM	可变	6
	洗涤	N/A	30 mM	3	6
	洗脱	N/A	90 mM	可变*	6
	解吸	N/A	130 mM	3	6

[0104] *注意:洗脱物收集开始于约0.20 AU以及结束于约0.16 AU。外水体积通常约为1.0倍柱体积。

表 8.来自放大运行的数据(n=5)

[0105]

输入		输出		
柱上样量(mL 树脂)				
总蛋白(mg)	单位	回收率(%)	倍数纯化(按 S.A.)	
9.9-12.2	11205-12297	84.6-92.4	1.1-1.2	范围
11.1	11751	89	1.2	平均值

[0106] 实施例7:综合的过程结果

[0107] 以60mL捕获柱的规模评价在这些实施例中所述的具体多步方法。所有纯化队列

均使用获自接种有包含构建体的重组细胞的发酵的起始材料(未加工的提取物),所述构建体包含由具有针对在大肠杆菌中的表达最优化的密码子的核酸编码的截短的人CBS变体。此构建体得到近乎为2倍高比活的起始材料,并且显著影响获自综合纯化方法的最终纯度。使用多步方法的总体纯化结果通过SDS-PAGE和比活来测量(图5和6)。结果表明,纯度和比活符合或者超过纯化的带标签的截短CBS。通过目前可能的最大规模获得的最终柱洗脱物的所有比活均超过了1200 U/mg总蛋白。下表概述了来自放大运行的总体纯化结果。

表 9.来自放大运行的总体结果

[0108]

	总回收率(%)		倍数纯化	
	范围	平均值	范围	平均值
3 柱队列(n=3)	57-60	58	5.7-6.2	5.9
4 柱队列(n=2)	47-52	50	4.6-5.4	5.0

[0109] 最终柱洗脱物的比活=1206-1509。

[0110] 已通过参考其具体实施方案详细阐述本发明,显而易见的是,在不背离随附权利要求中所限定的本发明的范围的情况下的修改和变动为可能的。更具体而言,尽管本发明的一些方面在本文中确定为特别有利的,但预期的是本发明不一定限于本发明的这些具体方面。

表 10: CBS 序列

[0111]

分子	SEQ ID NO	序列
天然人 CBS 核酸序列	1	atgecltctgagacccccaggcagaaagtgaggccacaggtgtccccc ccgtcagggccacacitcggcgaagggagccctggagaaggggtccccc agaggataagggaagccaaaggagccccctgggaicccggcccgatctccg agcaggttgcaacttggcagctgggcccggcctgctccaggtcccccacatca ccacacitgcccccgcanaatcccaanaatctggccagatattcigaagaaa atcgggggacacccctatgggtcagaatcaacnagattgggaagaagttcggc ctgaagtctgagctcttggccaagtggagttctcaacccggggcggaggc gtgaaggacccgacacgcttgcggatgatgaggatgctgagcgcgacgg gacgtgaagccccggggacacgattatcgaagccgacatccgggaacacc gggatccgggtctggcccctggctgcggcagtgaggggctatcgctgcatcat cgtgatgccagagaagatgagctccgagaagggtgacgtgctcgggca ctgggggtcagatatttgaggacgcccacccaatgccaggttcgactcccg gagtcaacagtggggtggccctggcggctgaagaacgaatcccccaattct caatctctagaccagtaccgcacgcgcagcaacccccctggtcactacgac accaccgtgatgagatccgcagcagtgatgaggaagctggacatgctg gtgcttcagtgggcagggcggcaccatcscgggcatigccaggaagct gaaggagaagtgctctgagtcaggaatcttgggtggatccgaagggt ccatctctgcagagccggaggagctgaaccagacggagcagacaacctca

[0112]

分子	SEQ ID NO	序列
		ccaggctggaaggatcggctacgacttcacccacggctcggacaggga cggctgggacaaagtggtcaagagcaacgaagaggaggcgtaacattg cccgcatgctatcgcgcgaagagggcgctctgtcgggtggcagtgctggc agcacgggtggcggggccgtgaaggctggcaggagctgcaaggagggc cagcgcctggcggcattctgcccgaactcagtgccgaactacatgaccnaat tctgagcgacaggatgaatgctgcagaaggccttctgaaggaggaggac ctacaggagaagaagccctgggtggcaccctccgtgttcaggagctggg cctgtcagcccgctgacctgtciccggaccatcaccitgtgggcaacat cgagatccctccgggagaagggtctgaccaggcgcccggtggatgag ggggggtaatcctgggaatggtgacgcttgggaacatgctctgtccctg ctgcccgggaagggtcagccgtcagaccnaagttggcnaagtcactacaag cagttcaacagatccgcctcagggacacgctgggcaggctctcgcacatc ctggagatggaccactcgcctgggtggcagcaggcagatccagtagaac agcaccgggaagtcagtcagcggcagatgggtgtcgggtgtgacccgc catgactgtgtaactcgtggcgcgccaggagcgggaccagaagtgga
天然人 CPS 多肽序列	2	MPSETPQAEVGP TGCPHRS GPHSAKGSLEKGSPE DKEAKEPLWIRPDAPSRCTWQLGRPASESPHHH TAPAKSPKILPDILKKIGDTPMVRINKIGKKFGLK CELLAKCEFFNAGGSVKDRISLRMIEDAERDGT LKPGDTHEPTSGNTGIGLALAAAVRGYRCIIVMPE KMSSEKVDVLRALGAEIVRTPTNARFDSPESHV GVAWRLKNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDTTA DEILQQCDGKLDMLVASVGTGGTTTGIARKLKE KCPGCRIGVDPEGSILAEPEELNQTEQTTYEVEG IQYDFIPTVLDRTVVDKWFKSNDEEAFTFARMLI AQEGLLCGGSAGSTVAVAVKAAQELQEGQRCV VILPDSVRNYMTKFLSDRWMLQKGFLKEEDLTE KKPWWHLRVQELGLSAPLTVLPITTCGHTIEIL REKGFDDQAPVVDEAGVILGMVTLGNMLSSLLA GKVQPSDQVGKVIYKQFKQIRLTDTLGRLSHILE MDHFALVVHEQIQYHSTGKSSQRQMVFGVVTAI DLLNFVAAQERDQK

[0113]

分子	SEQ ID NO	序列
截短的人 CPS 多肽序 列	3	MPSETPQAEVGP TGCPHRS GPHSAKGSLENGSPED KEAKEPLWIRPDAPSRCTWQLGRPASESPHHHTAP AKSPKILPDILKQIGDTPMVRINKIGKKFGLKCEL LAKCEFFNAGGSVKDRISLRMIEDASPDGTLKPGD TILPTSGNTGIGLALAAAVPGYRCIIVMPEKMS EKVDVLRALGAEIVRTPTNARFDSPESHVGVWRL KNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDTTADDEILQQCD GKLDMLVASVGTGGTTTGIARKLREKCPGCRIGV DPEGSILAEPEELNQTEQTTYEVEG IQYDFIPTVL DRTVVDKWFKSNDEEAFTFARMLIAQEGLLCGGS

分子	SEQ ID NO	序列
		GSTVAVAVYKAAQELQEGGFCVVILFDEVPHNTKFL LSDRWMLQNGFLKEEDLTENKFWWHLE
本发明的优化人 CβS 核酸序列	4	ATGCCGTCAGAAACCCGACAGGCAGAACTGGGTCCGACCG GTTGCCCCGACCGGTAGCGGTCCGCATTCTGCAGAAAGGCAG TCTGGGAAAAGGTTCCCGGAGATAGAGAGCCAAAGAA CCGCTGTGGATTGGTCCGACCGACCGTCCAGCGTGTACCT GGCAGCTGGGTGCTCCGGCAAGCGAATCTCCGCATCACCA TACCGGTCCCGCGAAAGTCCGAAAATTCTGCCGATATC CTGAAGAAAATTGGTGACACCCCGATGGTTCGTATCAACA AATCGGCAAAAAATTCGGTCTGAAATGGGAACCTGCTGGC TAAATGTGAATTTTCAATGCGGCGCGTTCCGTGAAGAT CGTATCTCACTGCGCATGATTGAAGATGCTGAACCGGAGG GCACCTTGAAACCGGCTGATACGATTATCGAACCAGCTTC TGGCAACACCGGTTTGGGTCTGGCACTCGCGGCGCGAGTC CGTGGTTATCGCTGCATTATCGTGATCCCGGAAAGAAATGA GCTCTGAAAAGTTGATGTCCCTGGGTGCTCTGGGCGCGGA AATTGTCTGACCCCGACGAATTCCTGCTTCGACAGTTCGG GAATCCCATGTGGGTGTTGCATGGCGCGCTGAAAAACGAA TCCCGAATTCGCACATTCTGGATCAGTATCGTAACGCTAG CAATCCGCTGGCGCATTACGATACACCGGCGGACGAAATC CTGCAGCAATGTGATGGCAACTGGACATGCTGGTGGCTT CTGTGGGTACCGCGGTACCAATTACGGGCTATCGGCGGTAA ACTGAAGGAAAATGCCCCGGCTGTGCGATTATCGGTGTG GATCCGGAAGGCAGTATTCTGGCGGACCGGAGCACTGA AECAGACCGAACAAATCACTATGAAGTTGAAAGCATCGG TTACGATTTTATTCGACCGTCTCTGGATCGACGGTGGTT GACAAATGGTTCAAAGGCAATGAGGAGAAAGCTTTACCT TGCACGTATGCTGATCGCTCAGGAAGGTCTGCTGTGCGG TGGTTCAGCAGGTTGACGGTCCGAGTGGCAGTTAAGCT GGCAGGAACCTGCAGGAAGGTCAGCGTTGTGTGTGATTC TGGCGGATTCGTTCCCACTACATGACCAAAATTTCTGAG TGACCGTTGGATGCTGCAGAAAGGCTTCTCTGAAGAGAA GATCTGACCGAGAAAAAACCGTGGTGGTGGCACCTGCGCT AA

[0114]

CPCH1462652P

序 列 表

<110> 科罗拉多州大学评议会
Carrillo, Richard
Kraus, Jan P.
Majtan, Thomas
Naveh, David

<120> 胱硫醚 β -合酶的纯化

<130> 11-1635-PCT

<140> TBD

<141> 2013-03-25

<150> US 13/830,494

<151> 2013-03-14

<150> US 61/615,629

<151> 2012-03-26

<160> 6

[0001]

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 1656

<212> DNA

<213> 人类

<400> 1

```

atgccttctg agacccccca ggcagaagtg ggccccacag gctgccccca cegetcaggg      60
ccacactegg cgaagggggag cctggagaag gggtccccag aggataagga agccaaggag      120
ccccgtgga tccggcccca tgetccgagc aggtgcaact ggcagctggg ceggcctgcc      180
tcgagtcac cacatcacca caetgccccg gcaaaatctc caaaaatctt gccagatatt      240
ctgaagaaaa tcggggacac ccttatggtc agaatcaaca agattgggaa gaagttcggc      300
ctgaagtgtg agctcttggc caagtgtgag ttcttcaacg cgggcggggag cgtgaaggac      360
cgcatcagcc tgcggatgat tgaggatget gagecgagc ggacgctgaa gcccggggac      420
acgattatcg agcgcacatc cgggaacacc gggatcgggc tggccctggc tgcggcagtg      480
aggggctatc gctgcatcat cgtgatgccg gagaagatga gctccgagaa ggtggacgtg      540

```

	ctgcgggac tgggggtga gatgtgagg acgccacca atgccaggtt egactccccg	600
	gagtcacaag tgggggtggc ctggcggtg aagaacgaaa tcccaattc tcacatecta	660
	gaccagtacc gcaacgccag caacccctg gctactacg acaccacgc tgatgagatc	720
	ctgcagcagt gtgatggaa gctggacatg ctggtggtt cagtgggac gggcggcacc	780
	atcagggca ttgccaggaa gctgaaggag aagtgtctg gatgcaggat catgggggtg	840
	gateccgaag ggtccatct cgcagagccg gaggagctga accagacgga gcagacaacc	900
	tacgaggtgg aaggatcgg ctacgacttc atccccacgg tgcaggacag gacggtggtg	960
	gacaagtgg tcaagagcaa cgtgaggag gcgttcact ttgcccgcat gctgatccg	1020
	caagaggggc tgcgtgctg tggcagtgct ggcagcacgg tggcggtgga cgtgaaggct	1080
	ggcaggagc tgcaggagg ccagcgtgc gtggtcattc tggccgactc agtgcggaac	1140
	tacatgacca agttctgag cgacaggtgg atgtgcaga agggtttct gaaggaggag	1200
	gacctcacgg agaagaagc ctgggtggtg cactccgtg ttcaggagct gggcctgtca	1260
[0002]	gccccgtga ccgtgtccc gaccatcac tgtgggcaca ccategagat cctccgggag	1320
	aagggtctg accagcgcc cgtggtgat gaggcggggg taatctggg aatggtgacg	1380
	cttgggaaca tgcctcgtc cctgttgc gggaagggtc agccgtcaga ccaagttggc	1440
	aaagtcactt acaagcagtt caaacagatc cgcctcacgg acacgtggg caggctctcg	1500
	cacatcctgg agatggacca ctccgctg gtggtgcacg agcagatcca gtaccacagc	1560
	accgggaagt ccagtcagc gcagatggtg ttgggggtg tcaecgcat tgacttgctg	1620
	aaattcgtgg ccgccagga ggggaccag aagtga	1656

<210> 2

<211> 551

<212> PRT

<213> 人类

<400> 2

Met Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Cys Pro
 1 5 10 15

	His Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser	
	20 25 30	
	Pro Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala	
	35 40 45	
	Pro Ser Arg Cys Thr Trp Gln Leu Gly Arg Pro Ala Ser Glu Ser Pro	
	50 55 60	
	His His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile	
	65 70 75 80	
	Leu Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly	
	85 90 95	
	Lys Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe	
	100 105 110	
[0003]	Asn Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu	
	115 120 125	
	Asp Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu	
	130 135 140	
	Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val	
	145 150 155 160	
	Arg Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu	
	165 170 175	
	Lys Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro	
	180 185 190	
	Thr Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp	
	195 200 205	
	Arg Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg	
	210 215 220	

	Asn	Ala	Ser	Asn	Pro	Leu	Ala	His	Tyr	Asp	Thr	Thr	Ala	Asp	Glu	Ile
	225					230					235				240	
	Leu	Gln	Gln	Cys	Asp	Gly	Lys	Leu	Asp	Met	Leu	Val	Ala	Ser	Val	Gly
				245						250					255	
	Thr	Gly	Gly	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Ala	Arg	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Cys
				260					265						270	
	Pro	Gly	Cys	Arg	Ile	Ile	Gly	Val	Asp	Pro	Glu	Gly	Ser	Ile	Leu	Ala
				275				280						285		
	Glu	Pro	Glu	Glu	Leu	Asn	Gln	Thr	Glu	Gln	Thr	Thr	Tyr	Glu	Val	Glu
		290					295						300			
	Gly	Ile	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ile	Pro	Thr	Val	Leu	Asp	Arg	Thr	Val	Val
	305					310					315				320	
[0004]	Asp	Lys	Trp	Phe	Lys	Ser	Asn	Asp	Glu	Glu	Ala	Phe	Thr	Phe	Ala	Arg
					325						330				335	
	Met	Leu	Ile	Ala	Gln	Gln	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly	Gly	Ser	Ala	Gly	Ser
				340						345					350	
	Thr	Val	Ala	Val	Ala	Val	Lys	Ala	Ala	Glu	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Gln
				355				360							365	
	Arg	Cys	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Arg	Asn	Tyr	Met	Thr	Lys
		370					375					380				
	Phe	Leu	Ser	Asp	Arg	Trp	Met	Leu	Gln	Lys	Gly	Phe	Leu	Lys	Glu	Glu
	385					390					395				400	
	Asp	Leu	Thr	Glu	Lys	Lys	Pro	Trp	Trp	Trp	His	Leu	Arg	Val	Gln	Glu
					405					410					415	
	Leu	Gly	Leu	Ser	Ala	Pro	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Thr	Ile	Thr	Cys	Gly
				420					425						430	

His Thr Ile Glu Ile Leu Arg Glu Lys Gly Phe Asp Gln Ala Pro Val
435 440 445

Val Asp Glu Ala Gly Val Ile Leu Gly Met Val Thr Leu Gly Asn Met
450 455 460

Leu Ser Ser Leu Leu Ala Gly Lys Val Gln Pro Ser Asp Gln Val Gly
465 470 475 480

Lys Val Ile Tyr Lys Gln Phe Lys Gln Ile Arg Leu Thr Asp Thr Leu
485 490 495

Gly Arg Leu Ser His Ile Leu Glu Met Asp His Phe Ala Leu Val Val
500 505 510

His Glu Gln Ile Gln Tyr His Ser Thr Gly Lys Ser Ser Gln Arg Gln
515 520 525

[0005]

Met Val Phe Gly Val Val Thr Ala Ile Asp Leu Leu Asn Phe Val Ala
530 535 540

Ala Gln Glu Arg Asp Gln Lys
545 550

<210> 3

<211> 413

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

Met Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Cys Pro
1 5 10 15

His Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser
20 25 30

	Pro	Glu	Asp	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Pro	Leu	Trp	Ile	Arg	Pro	Asp	Ala	
	35							40					45				
	Pro	Ser	Arg	Cys	Thr	Trp	Gln	Leu	Gly	Arg	Pro	Ala	Ser	Glu	Ser	Pro	
	50						55				60						
	His	His	His	Thr	Ala	Pro	Ala	Lys	Ser	Pro	Lys	Ile	Leu	Pro	Asp	Ile	
	65				70					75					80		
	Leu	Lys	Lys	Ile	Gly	Asp	Thr	Pro	Met	Val	Arg	Ile	Asn	Lys	Ile	Gly	
				85					90					95			
	Lys	Lys	Phe	Gly	Leu	Lys	Cys	Glu	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Glu	Phe	Phe	
			100					105						110			
	Asn	Ala	Gly	Gly	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Ile	Ser	Leu	Arg	Met	Ile	Glu	
		115					120						125				
[0006]	Asp	Ala	Glu	Arg	Asp	Gly	Thr	Leu	Lys	Pro	Gly	Asp	Thr	Ile	Ile	Glu	
	130					135					140						
	Pro	Thr	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Ile	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	
	145					150				155					160		
	Arg	Gly	Tyr	Arg	Cys	Ile	Ile	Val	Met	Pro	Glu	Lys	Met	Ser	Ser	Glu	
				165					170						175		
	Lys	Val	Asp	Val	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Glu	Ile	Val	Arg	Thr	Pro	
			180					185						190			
	Thr	Asn	Ala	Arg	Phe	Asp	Ser	Pro	Glu	Ser	His	Val	Gly	Val	Ala	Trp	
		195					200						205				
	Arg	Leu	Lys	Asn	Glu	Ile	Pro	Asn	Ser	His	Ile	Leu	Asp	Gln	Tyr	Arg	
	210					215						220					
	Asn	Ala	Ser	Asn	Pro	Leu	Ala	His	Tyr	Asp	Thr	Thr	Ala	Asp	Glu	Ile	
	225				230					235					240		

Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly
245 250 255

Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys
260 265 270

Pro Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala
275 280 285

Glu Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu
290 295 300

Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val
305 310 315 320

Asp Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg
325 330 335

[0007]

Met Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser
340 345 350

Thr Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln
355 360 365

Arg Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys
370 375 380

Phe Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu
385 390 395 400

Asp Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg
405 410

<210> 4

<211> 1242

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 4

atgcegteag aaacecegea ggcagaagtg ggtcegaegg gttgecegea ccgtagegggt	60
ccgcattctg caaaaggcag tctggaaaaa ggttcecegg aagataaaga agccaaagaa	120
ccgtgttgga ttctgcegga cgcacccgea cgcigtacct ggcagctggg tctgceggaa	180
agegaatctc cgcateacca tacggctcgg gcgaaaagtc cgaaaattct gccggatact	240
ctgaagaaaa ttggtgacac cccgatgggt cgtatcaaca aaatcgccaa aaaattcggt	300
ctgaaatgcg aactgtctgc taaatgtgaa tttttcaatg cgggcgggtc cgtgaaagat	360
cgtatctcac tgcgcattgat tgaagatgct gaacgcgacg gcacctgaa accgggtgat	420
acgattatcg aaccgacctc tggcaacacg ggtatcggtc tggeactgga ggcggcagtc	480
cgtgggttact gctgcattat cgtgatgcgg gaaaaaatga gctctgaaaa agttgatgtc	540
ctgcgtgctc tgggcgcgga aattgttctg accccgacga atgcccgttt cgacagtcgg	600
gaatcccatg tgggtgttgc atgggccttg aaaaacgaaa tcccgatttc gcacattctg	660
gatcagtatc gtaacgctag caatccgttg gcgcattacg ataccacgga cgacgaaatc	720
ctgcagcaat gtgatggcaa actggacatg ctggctgctt ctgtgggtac cggcgggtacc	780
attacgggca tgcgcgtaa actgaaagaa aaatgccegg gctgtgcgat tatcgggtgtg	840
gafcegggaag gcagtattct ggcggaaccg gaagaactga accagaccga acaaaccacg	900
tatgaagttg aaggcatcgg ttacgatttt attccgaccg tccctggatcg caccgttggt	960
gacaaatggt tcaaaagcaa tgacgaagaa gcccttacct tgcacgtat gctgatcgtt	1020
caggaaagtc tgcgtgcggg tggctcagca ggttcgacgg tgcagtgga agttaaagct	1080
gcgcaggaac tgcaagaagg tcaacgttgt gtctgatttc tgcgggattc tgttcgcaac	1140
tacatgacca aatttctgag tgaccgttg atctgcaaa aaggttctt gaaagaagaa	1200
gactctgaccg agaaaaaacc gtgggtggtg cacctgcgct aa	1242

[0008]

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	5	
		cgtagaattc acctttgccc gcattgctgat	30
[0009]	<210>	6	
	<211>	35	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	6	
		taagggtacc tcaacggagg tgccaccacc agggc	35

CBS 纯化队列									
DEAE-FF → Zn-IMAC (Chel. Seph FF) → HIC (T基-S Seph)									
批号 RC-199									
重量	CONV.	U/mL	总 U	mg/mL	总 mg	S.A.	活性回收率		
离心前	88.6	1.0	2655	12.4	1099	214	100.0%		
离心后	85.2	1.0	2459	11.3	963	218	89.1%		
活性收率(离心前/离心后)									
信数纯化(X)									
1.0									
DEAE-FF									
柱体积		6 mL		柱上样量/mL 树脂					
				总蛋白		单位			
				14.5		3275			
重量	CONV.	U/mL	总 U	mg/mL	总 mg	S.A.	活性回收率		
上样	102.6	1.0	199762	8.6	882	226	100.0%		
FT	105.2	1.0	427	1.9	200	2	0.2%		
洗涤	159.7	1.0	197	0.8	128	2	0.1%		
外水	57.6	1.0	716	0.2	12	62	0.4%		
洗脱物	47	1.0	172551	6.5	306	565	86.4%		
洗脱物尾	33.7	1.0	15912	1.7	57	278	8.0%		
2M NaCl	140.8	1.0	9417	2.0	282	33	4.7%		
信数纯化(X)						2.5		总蛋白核算	
								总单位核算	
								111%	
								100%	

图1A

CBS 纯化队列									
DEAE-FF → Zn-IMAC (Chel. Seph FF) → HIC (T 基-S Seph)									
Zn-IMAC	柱体积	40 mL	柱上样量/mL 树脂		总蛋白		单位		
			6.5		4414				
上样	重量	47.3	CONV	U/mL	总 U	mg/mL	总 mg	S.A.	活性回收率
FT		156	1.0	3733	176573	5.5	260	679	100.0%
洗涤/外水		54.8	1.0	13	1998	0.43	67	30	1.1%
洗脱物 PK 1		39.4	1.0	22	1186	0.07	4	309	0.7%
洗脱物 PK 2		50.5	1.0	941	37071	0.91	36	1034	21.0%
洗脱物组合 PKS		88	1.0	2158	108961	2.10	106	1027	61.7%
100 mM 解吸		86	1.0	1681	147928	1.50	132	1121	83.8%
					5517	0.58	50	111	3.1%
倍数纯化(X)	1.5	总蛋白衡算		计量		单位衡算		量	
		97%						89%	

图1B

CBS 纯化队列									
DEAE-FF → Zn-IMAC (Chel. Seph FF) → HIC (丁基-S Seph)									
HIC	柱体积=	23 mL	柱上样量/mL 树脂						
			总蛋白	单位					
			6.5	6745					
	重量	CONV.	U/mL	总 U	mg/mL	总 mg	SA	活性回收率	
上样	103.9	1.1	1357	155143	1.58	149	1040	100.0%	
FT/洗涤	85	1.1	26	2470	0.080	6	400	1.6%	
外水	30.5	1.1	34	1133	0.060	2	681	0.7%	
洗脱物	41.1	1.1	2671	120762	2.50	93	1293	77.8%	
解吸	43.8	1.0	282	13591	0.87	38	357	8.8%	
信数纯化(X)	1.2				总蛋白衡算 计量		单位衡算 量		89%
					93%				

自第一个柱上样回收的总蛋白
10.6%

自第一个柱上样回收的总单位
60%

总信数纯化(X)
5.7

图1C

RC-1-64 DEAE FF (DEAE-IMAC-HIC 过程队列)										
日期		04/21/11		柱 ID		RC-3-10		实验号		
								RC-1-64		
柱体积=				26		30				
上样的总蛋白/mL 树脂				26		mg/mL				
流分 ID	重量或 体积 (g 或 mL)	CONV.	蛋白质 (mg/mL)	流分中的 总蛋白 (mg)	测定的脱硫酸 (nmol.mL.小时)	测定的 稀释因子	流分中的 总单位	S.A. 流分	%回收 单位(%)	%回收总 蛋白(%)
CE 离心前	37.6	1.0	20.9	784.3	46423	40	69820	89.0	100.0%	100.0%
CE 离心后	36.3	1.0	20.7	752.9	52427	40	76124	101.1	109.0%	96.0%
DEAE 上样	49.8	1.0	15.4	766.8	36740	40	73186	95.4	96.1%	101.8%
DEAE FT	49.7	1.0	3.0	151.0	3403	1	169	1.1	0.2%	20.1%
DEAE 外水	31	1.0	0.3	8.8	10298	1	319	36.4	0.4%	1.2%
DEAE 洗脱物	24.9	1.0	5.2	130.0	63422	40	63168	485.8	83.0%	17.3%
DEAE 洗脱物尾	18.9	1.0	1.9	35.16	69389	5	6557	186.5	8.6%	4.7%
DEAE 洗涤	89.3	1.0	1.6	143.16	5519	1	493	3.4	0.6%	19.0%
DEAE 2M NaCl	76	1.0	3.2	241.44	13935	5	5295	21.9	7.0%	32.1%
缓冲液:										
平衡	0.02 M Na3PO4, 0.05 M NaCl, 10% 乙二醇, pH 7.0									
洗涤	0.02 M Na3PO4, 0.05 M NaCl, 10% 乙二醇, pH 7.0									
洗脱	0.02 M Na3PO4, 0.137 M NaCl, 10% 乙二醇, pH 7.0									
解吸	2 M NaCl									
净化	1.0 M NaOH									
质量平衡单位				质量平衡单位				质量平衡蛋白		
99.8%				103.8%				94.2%		

CBS 纯化队列									
DEAE-FF → Zn-IMAC (Chel. Seph FF) → HAP (购壳 1 型) → HIC (丁基-S Seph)									
批号 RC-1-103									
CE	重量	CONV.	U/mL	总 U	mg/mL	总 mg	S.A.	活性回收率	
离心前	87.1	1.0	3369	293422	13.9	1211	242	100.0%	
离心后	100.4	1.0	3050	306270	11.7	1175	261	104.4%	
活性收率(离心前/离心后)									
倍数纯化(X)									
1.1									
柱上样量/mL 树脂									
总蛋白									
19.6									
单位									
5105									
DEAE-FF	重量	CONV.	U/mL	总 U	mg/mL	总 mg	S.A.	活性回收率	
上样*	100.4	1.0	3050	306270	11.7	1175	261	100.0%	
FT	102.6	1.0	6	585	2.3	236	2	0.2%	
洗涤	164.6	1.0	2	410	1.0	165	2	0.1%	
外水	56.3	1.0	11	644	0.3	17	38	0.2%	
洗脱物	52.6	1.0	4976	261744	7.2	379	691	85.5%	
洗脱物尾	30.6	1.0	441	13488	1.3	40	339	4.4%	
2M NaCl	115.4	1.0	75	8635	3.0	346	25	2.8%	
倍数纯化(X)									
2.7									
*与离心后相同的上样;									
使管平衡用于离心期间发生的稀释									
总蛋白衡算						总单位衡算			
101%						93%			

DEAE-FF → Zn-IMAC (Chel. Seph FF) → HAP (陶瓷 1 型) → HIC (丁基-S Seph)									
CBS 纯化队列									
Zn-IMAC	柱体积=	40 mL	柱上样量/mL 树脂						
			总蛋白	单位					
			9.3	6337					
			重量	CONV.	U/mL	总 U	mg/mL	总 mg	S.A.
			52.9	1.0	4792	253492	7.0	370	685
			144.9	1.0	23	3388	0.65	94	36
			52.3	1.0	64	3355	0.16	8	401
			82.6	1.0	2457	202919	2.67	221	920
			89	1.0	19	1689	0.15	13	127
			洗脱物组合 PKS						
			100 mM 解吸*						
			1.3						
			倍数纯化(X)						
			*在解吸样品中观察到的沉淀。						
							总蛋白核算 计算量		单位核算计 量
							91%		83%
HAP	柱体积=	18 mL	柱上样量/mL 树脂						
			总蛋白	单位					
			12.2	11205					
			重量	CONV.	U/mL	总 U	mg/mL	总 mg	S.A.
			82.1	1.0	2457	201691	2.67	219	920
			132.2	1.0	26	3383	0.08	11	320
			37.5	1.0	4552	170694	4.34	163	1049
			34.5	1.0	348	12013	0.55	19	633
			洗脱物						
			解吸						
			1.1						
			倍数纯化(X)						
			总蛋白核算 计算量						
							88%		单位核算计 量
									92%

CBS 纯化队列									
DEAE-FF → Zn-IMAC (Chel. Seph FF) → HAP (陶瓷 1 型) → HIC (丁基-S Seph)									
HIC	柱体积=	21 mL		柱上样量/mL 树脂					
		总蛋白		单位					
		7.2		8447					
重量		CONV.	U/mL	总 U	mg/mL	总 mg	S.A.	活性回收率	
上样		43.8	1.1	3682		177384	3.82	152	1166
FT/洗涤		105.7	1.1	1		96	0.020	2	50
外水		28.7	1.1	4		126	0.020	1	241
洗脱物		44.9	1.1	3251		160544	3.26	133	1206
解吸		40.2	1.0	325		14375	0.54	22	662
倍率纯化(X)		1.0					总蛋白衡算	总蛋白衡算	单位衡算
							103%	103%	99%
自第一个柱上样回收的总蛋白		11.3%		自第一个柱上样回收的总单位				总倍率纯化(X)	
				52%				4.6	

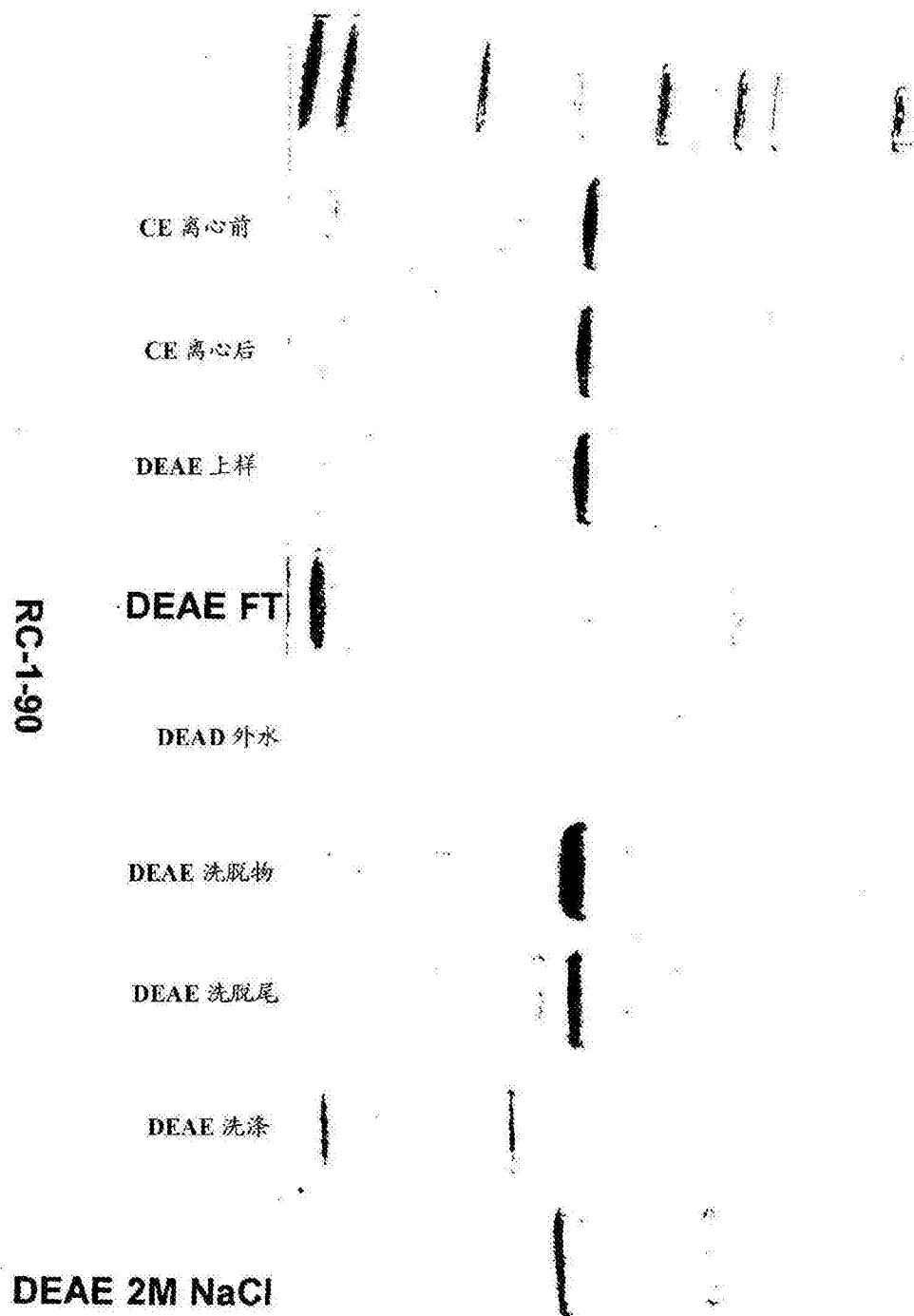


图4

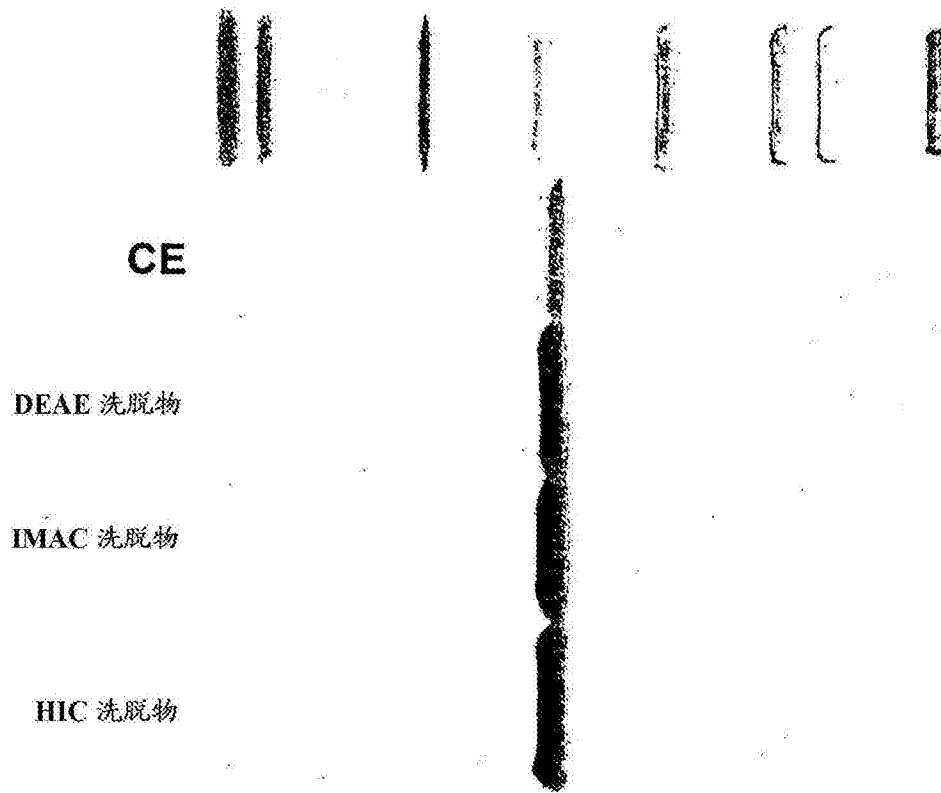


图5

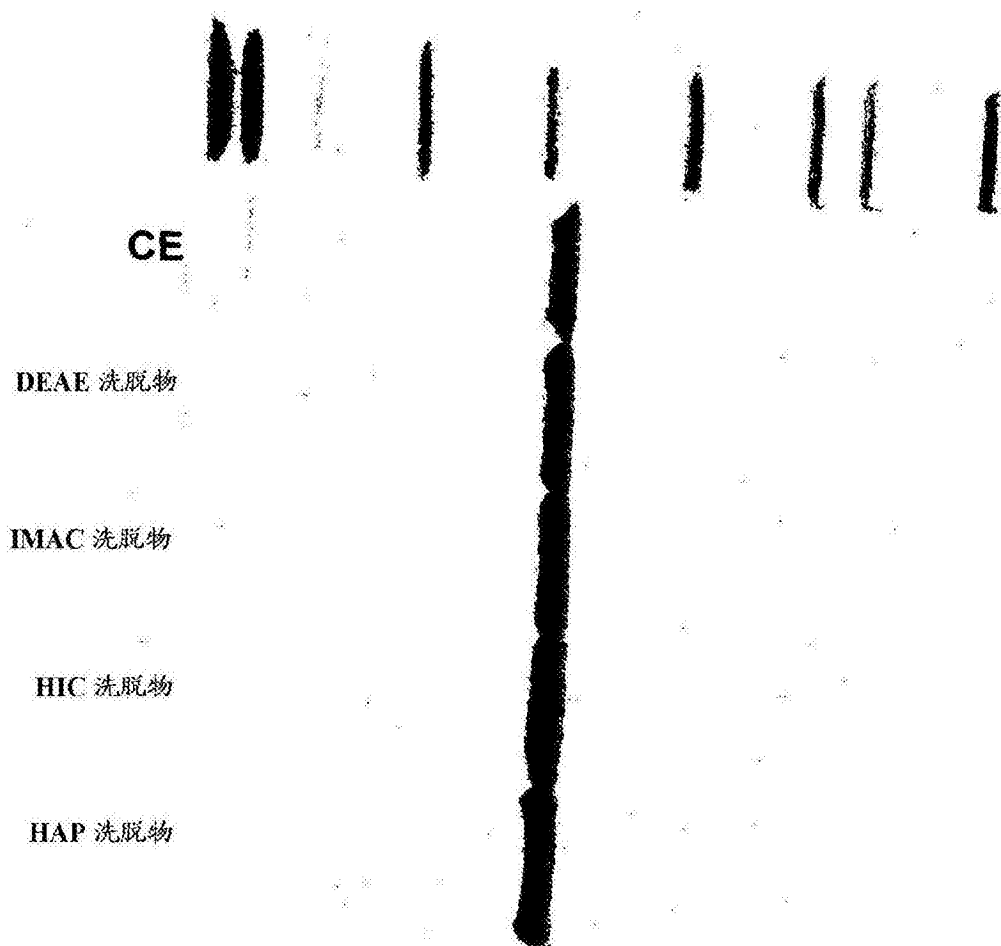


图6

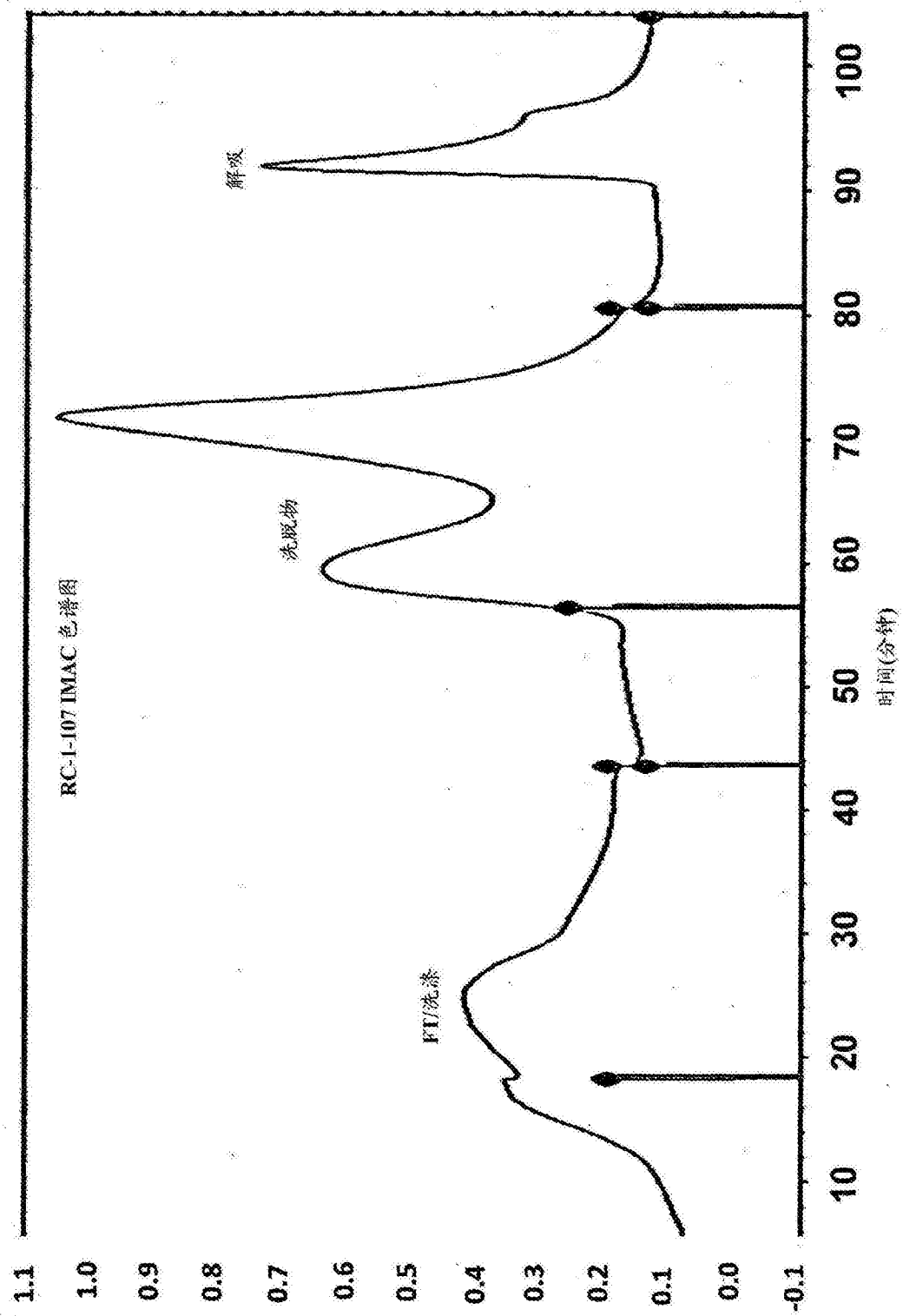


图7A

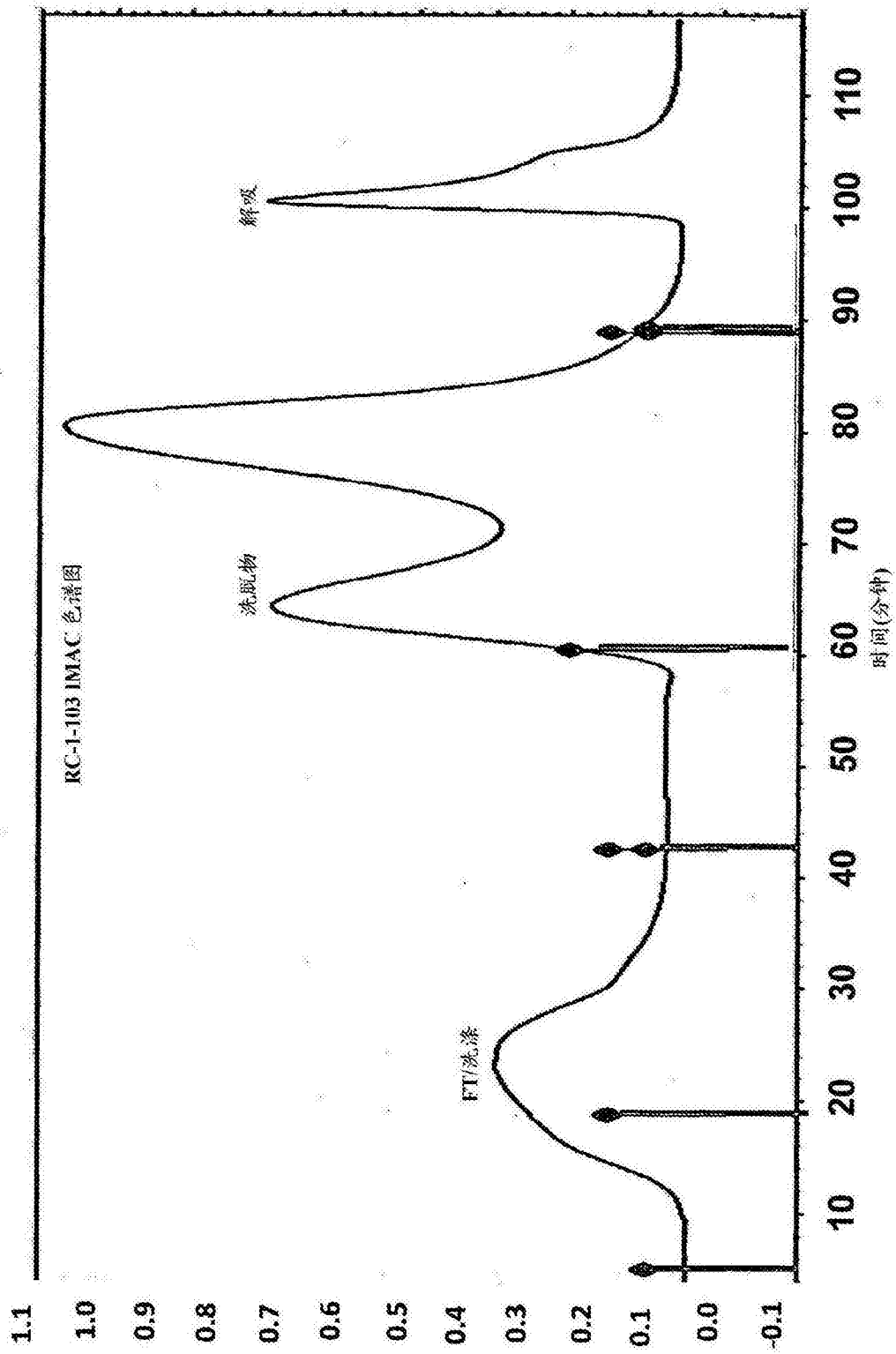


图7B

日期		04/06/11	实验号		RC-1-57 IMAC
柱 ID		RC-3-			
柱体积=					
上样的总蛋白/mL 树脂		29 mg/mL			

流分 ID	重量或体积 (g 或 mL)	CONV.	蛋白质 (mg/mL)	流分中的总 蛋白(mg)	测定的脱硫酸 (mmol.mL.小时)	测定的稀 释因子	流分中的 总单位	S.A. 流分	%回收单 位(%)	%回收总 蛋白(%)
CE	16	1.0	15.3	244.1	76.39	20	24332	100	100.0%	100.0%
IMAC 上样	34.7	1.0	7.6	264.7	40808	20	28321	107	116.4%	108.5%
IMAC FT	34.3	1.0	2.3	77.9	50	20	34	0	0.1%	31.9%
IMAC 平衡洗涤	32.6	1.0	2.8	91.6	4111	1	134	1	0.5%	37.5%
IMAC 5mM Imid.	34.3	1.0	0.6	19.2	9211	1	316	16	1.1%	7.9%
IMAC 外水	6.9	1.0	0.4	3.0	3813	1	264	89	0.9%	1.2%
IMAC 洗脱物前峰	14	1.0	0.7	9.8	77625	1	1087	110	3.8%	4.0%
IMAC 洗脱物	16.6	1.0	4.6	77.2	75941	20	25212	327	89.0%	31.6%
IMAC 洗脱物尾	6.7	1.0	1.4	9.3	40388	5	1353	145	4.8%	3.8%
IMAC 100mM Imid.	38	1.0	0.4	16.7	29197	1	1109	66	3.9%	6.8%

缓冲液:		50 mM NiSO4
荷载		
平衡	0.02 M Na3PO4, 0.4 M NaCl, 0.002 M 咪唑, 0.01% Triton, pH 7.0	
洗涤	0.02 M Na3PO4, 0.4 M NaCl, 0.005 M 咪唑, 0.01% Triton, pH 7.0	
洗脱	0.02 M Na3PO4, 0.4 M NaCl, 0.050 M 咪唑, 0.01% Triton, pH 7.0	
解吸	100 mM 咪唑	
净化	1 M NaOH	
储存	0.001 M NaOH	

质量平衡单位(自上样起)	质量平衡蛋白
104.2%	115.1%

图8

Bradford 测定(总蛋白)
日期: 4/7/2011

RC-1.57 IMAC

标准曲线:

BSA 贮存液:

2000 ug/mL

样品:

孔号	ug/mL BSA	BSA (uL)	水(uL)
1	0	0	40
2	50	1	39
3	125	2.5	37.5
4	250	5	35
5	500	10	30
6	750	15	25
7	1000	20	20

样品数量(不包括一式三份的) { 10
所需 Bradford 试剂的量(mL) { 19

对于 10 uL/标准品, 一式三份运行

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	标准品 1	标准品 1	标准品 1	样品 1	样品 1	样品 1	样品 1	样品 9	样品 9	样品 17	样品 17	样品 17
B	标准品 2	标准品 2	标准品 2	样品 2	样品 2	样品 2	样品 2	样品 10	样品 10	样品 18	样品 18	样品 18
C	标准品 3	标准品 3	标准品 3	样品 3	样品 3	样品 3	样品 3	样品 11	样品 11	样品 19	样品 19	样品 19
D	标准品 4	标准品 4	标准品 4	样品 4	样品 4	样品 4	样品 4	样品 12	样品 12	样品 20	样品 20	样品 20
E	标准品 5	标准品 5	标准品 5	样品 5	样品 5	样品 5	样品 5	样品 13	样品 13	样品 21	样品 21	样品 21
F	标准品 6	标准品 6	标准品 6	样品 6	样品 6	样品 6	样品 6	样品 14	样品 14	样品 22	样品 22	样品 22
G	标准品 7	标准品 7	标准品 7	样品 7	样品 7	样品 7	样品 7	样品 15	样品 15	样品 23	样品 23	样品 23
H	标准品 7	标准品 7	标准品 7	样品 8	样品 8	样品 8	样品 8	样品 16	样品 16	样品 24	样品 24	样品 24

- 1 取出适当量的试剂并使其达到 RT
- 2 向各孔中加入 10 uL 标准品或样品
- 3 使用多通道移液器向各孔中加入 300 uL 试剂
- 4 于 RT 孵育 10min
- 5 用 VersaMax 读数

样品号	稀释	蛋白质(uL)	水(uL)	Bradford(ug/mL)	ug/uL
1	CE	100	2	15255.9	15.2559
2	IMAC 上样	50	4	7629.2	7.6292
3	IMAC FT	50	4	2270.7	2.2707
4	IMAC 平衡洗涤	25	8	2810.3	2.8103
5	AC 5mM 咪唑洗涤	10	20	559.3	0.5593
6	IMAC 外水	10	20	432.3	0.4323
7	IMAC 洗脱物前峰	10	20	702.7	0.7027
8	IMAC 洗脱物	50	4	4649.2	4.6492
9	IMAC 洗脱物尾	25	8	1389	1.389
10	IMAC 100mM 咪唑	10	20	439.3	0.4393

图9

凝胶 1

泳道	样品	TP 浓度 (ug/ml)	凝胶 浓度 (ug)	稀释 (X)	样品 缓冲液 (ul)	蛋白质 (10 ug/25ul)	ddH2O (ul)
1	BIORAD 标准品	--	--	1	12.5	1.00	11.50
2	CE	15.256	10	1		0.66	11.84
3	IMAC 上样	7.6292	10	1		1.31	11.19
4	IMAC FT	2.2707	10	1		4.40	8.10
5	IMAC 平衡洗涤	2.8103	10	1		3.56	8.94
6	IMAC 5mM 咪唑洗涤	0.5593	10	1		12.50	0.00

仅上样
7 ug

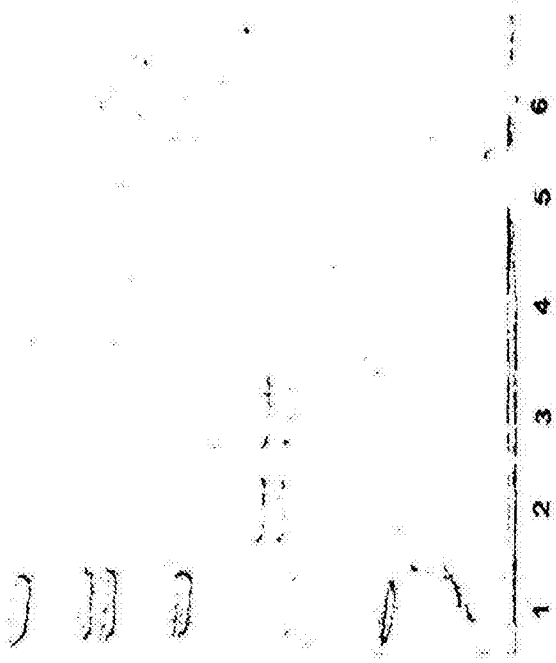


图10A

凝胶 1:

泳道	样品	TP 浓度 (ug/ul)	凝胶 浓度 (ug)	稀释 (X)	样品 缓冲液(ul)	蛋白质 (10 ug/25uL)	ddH2O (ul)
1	BIORAD 标准品	--	--	1	12.5	1.00	11.50
2	IMAC 外水	0.4323	10	1		12.50	0.00
3	IMAC 洗脱物前峰	0.7027	10	1		12.50	0.00
4	IMAC 洗脱物	4.6492	10	1		2.15	10.35
5	IMAC 洗脱物尾	1.389	10	1		7.20	5.3
6	IMAC 100mM 咪唑	0.4393	10	1		12.50	0.00

仅上样 5.4 ug
仅上样 8.78 ug
仅上样 5.49 ug

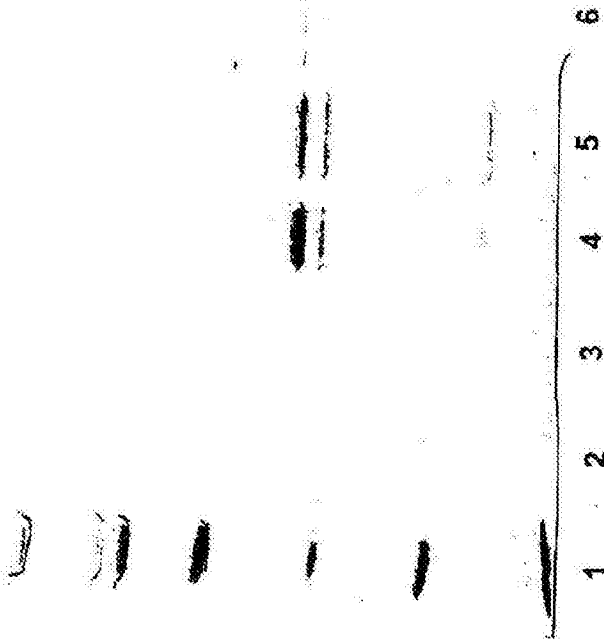


图10B

整合琼脂糖凝胶 FF 上的 CBS 未加工提取物										
日期		02/18/11		实验号		RC-1-39				
柱 ID		RC-3-2 整合 Seph.FF								
柱体积=		6.2 mL		注意: 柱装填至 6.2 mL, 6.5cm						
上样的总蛋白/mL 树脂		14 mg/mL								
流分 ID	重量或 体积 (g 或 mL)	CONV.	蛋白质 (mg/mL)	流分中 的 总蛋白 (mg)	测定的 脱硫酸 (umol/m L·小时)	测定的 稀释 因子	流分中 的 总单位	S.A. 流分	%回收 单位 (%)	%回收 总蛋白 (%)
CE	11	1.0	8.0	88.0	74067	10	8147	92.6	100.0%	100.0%
上样	11.4	1.0	8.1	92.3	82223	10	9373	101.5	115.0%	104.9%
外水	16	1.0	0.3	4.8	7	1	0	0.0	0.0%	5.5%
FT/洗涤	62	1.0	1.2	74.4	5939	1	368	4.9	4.5%	84.5%
洗脱物	25	1.0	2.1	52.5	56851	5	7106	135.4	87.2%	59.7%
500 mM Imid.解吸	36	1.0	0.2	7.2	1152	1	41	5.8	0.5%	8.2%

缓冲液:		洗脱物中的回收率 (自上样起)75.8%	
平衡	0.02 M 磷酸盐, 0.002 M 咪唑, 0.4 M NaCl, pH 7.0		
洗涤	0.02 M 磷酸盐, 0.002 M 咪唑, 0.4 M NaCl, pH 7.0		
洗脱	0.02 M 磷酸盐, 0.1 M 咪唑, 0.4 M NaCl, pH 7.0		
解吸	0.5 M 咪唑		
净化	1.0 M NaOH		
储存	0.001 M NaOH		

质量平衡单位 (自 CE 起) 92.3%	质量平衡蛋白	152.4%
--------------------------	--------	--------

质量平衡单位(自上样起)	80.2%
--------------	-------

图11

Bradford 测定(总蛋白)									
日期: 4/18/2011		RC-1-63							
标准曲线:		BSA 贮存液:		2000 ug/mL		样品:			
孔号		ug/mL BSA		BSA (uL)		水 (uL)		样品数量(不包括一式三份的):	
1		0		0		40		6	
2		50		1		39			
3		125		2.5		37.5		15.4	
4		250		5		35			
5		500		10		30			
6		750		15		25			
7		1000		20		20			
对于 10 uL/标准品, 一式三份运行									
1		3		4		5		6	
2		3		4		5		6	
3		3		4		5		6	
4		3		4		5		6	
5		3		4		5		6	
6		3		4		5		6	
7		3		4		5		6	
8		3		4		5		6	
9		3		4		5		6	
10		3		4		5		6	
11		3		4		5		6	
12		3		4		5		6	
13		3		4		5		6	
14		3		4		5		6	
15		3		4		5		6	
16		3		4		5		6	
17		3		4		5		6	
18		3		4		5		6	
19		3		4		5		6	
20		3		4		5		6	
21		3		4		5		6	
22		3		4		5		6	
23		3		4		5		6	
24		3		4		5		6	
1 取出适当量的试剂并使其达到 RT									
2 向各孔中加入 10 uL 标准品或样品									
3 使用多通道移液器向各孔中加入 300 uL 试剂									
4 于 RT 孵育 10min									
5 用 VersaMax 读数									
样品号									
1 离心后 CE 上样									
2 平衡洗涤									
3 FT									
4 5mM 洗涤									
5 8mM 洗涤									
6 20mM 洗涤									

图12

泳道	样品	TP 浓度 (ug/ul)	凝胶 浓度 (ug)	稀释 (X)	样品 缓冲液 (ul)	蛋白质 (10 ug/25uL)	ddH2O (ul)
1	BIORAD 标准品	--	--	1	12.5	1.00	11.50
2	平衡洗涤	11.83	10	1		0.85	11.65
3	5mM 洗涤	0.2526	10	1		12.50	0.00
4	8mM 洗涤	0.6703	10	1		12.50	0.00
5	20mM 洗涤	0.5249	10	1		12.50	0.00

上样 3.16 ug 蛋白质
上样 8.38 ug 蛋白质
上样 6.56 ug 蛋白质

图13

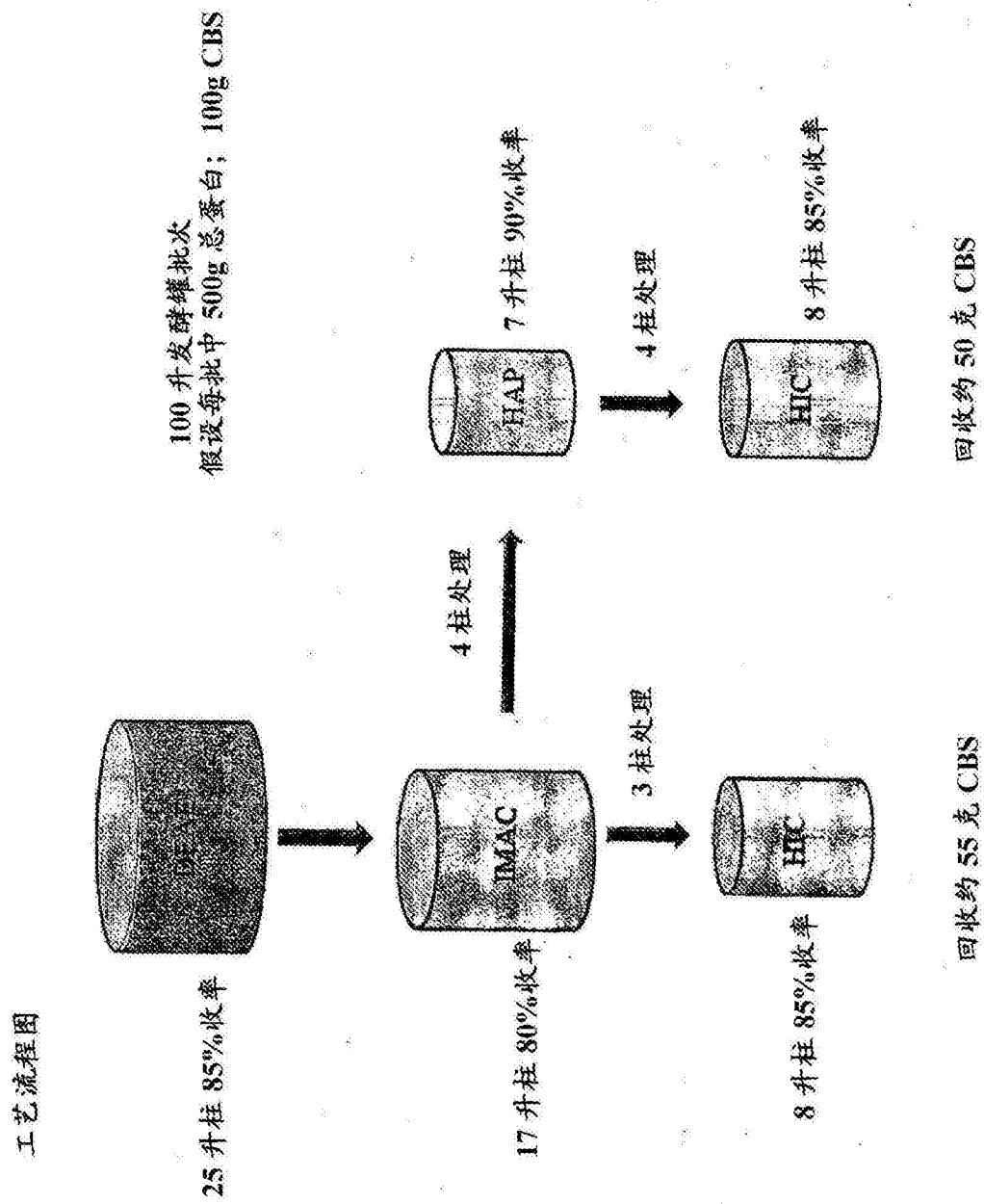


图14