

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910142690.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月2日

[11] 公开号 CN 101591665A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

[22] 申请日 2009.5.25

[21] 申请号 200910142690.3

[30] 优先权

[32] 2008.5.26 [33] EP [31] 08009537.5

[71] 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 E·法茨 P·沙尔施米特

U·施米特 C·肖尔茨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 梁 谋 黄可峻

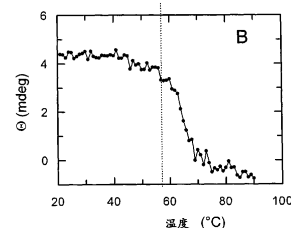
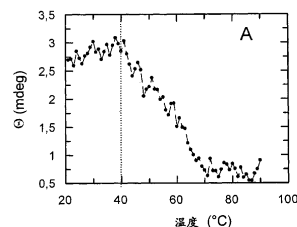
权利要求书 2 页 说明书 62 页 附图 9 页

[54] 发明名称

作为重组蛋白和酶技术的工具的 SlpA

[57] 摘要

本发明涉及作为重组蛋白和酶技术工具的 SlpA。具体来说,本发明涉及编码含有 SlpA 分子伴侣和靶多肽的融合蛋白的重组 DNA 分子,编码所述融合蛋白的相应表达载体以及用所述表达载体转化的宿主细胞,其中人 FK506 结合蛋白(FKBP)被排除作为靶多肽;还涉及生产所述融合蛋白的方法;所述融合蛋白作为结合配偶体的用途,或作为在免疫测定中降低干扰的工具的用途;所述融合蛋白用于产生抗体的用途和在疫苗生产中的用途;所述融合蛋白在免疫测定中检测分析物的方法,以及含有所述融合蛋白的试剂盒; SlpA 在免疫测定中降低干扰的用途,及其在蛋白制品中作为添加剂和在生物技术应用中作为折叠辅助物的用途。



1. 一种编码融合蛋白的重组 DNA 分子, 所述重组 DNA 分子含有至少一个编码靶多肽的核苷酸序列以及在所述核苷酸序列上游或下游的至少一个编码 SlpA 分子伴侣的核苷酸序列, 其中所述靶多肽不包括人 FK506 结合蛋白(FKBP)。
2. 一种含有有效连接的权利要求 1 的重组 DNA 分子的表达载体。
3. 一种用权利要求 2 的表达载体转化的宿主细胞。
4. 一种生产融合蛋白的方法, 所述方法包括以下步骤:
 - a)培养权利要求 3 的宿主细胞,
 - b)表达所述融合蛋白,
 - c)纯化所述融合蛋白, 和
 - d)重折叠成可溶性的免疫反应性的构象。
5. 一种重组产生的融合蛋白, 所述融合蛋白含有至少一个对应于 SlpA 分子伴侣的多肽序列和至少一个对应于靶多肽的多肽序列, 其中人 FK506 结合蛋白(FKBP)被排除作为靶多肽。
6. 权利要求 5 的重组产生的融合蛋白的用途, 其用作免疫测定中的结合配偶体。
7. 权利要求 5 的重组产生的融合蛋白的用途, 其用作降低免疫测定中的干扰的工具。
8. 权利要求 5 的重组产生的融合蛋白的用途, 其作为免疫原用于产生抗所述靶多肽的抗体。
9. 权利要求 5 的重组产生的融合蛋白在生产疫苗中的用途。
10. 一种包含权利要求 5 的重组产生的融合蛋白和药学上可接受的赋形剂的组合物。
11. 一种用于检测分离样品中的分析物特异性抗体的方法, 所述方法包括:

a)通过将体液样品与权利要求5的融合蛋白混合形成免疫反应混合物,

b)将所述免疫反应混合物保持一定时间,所述保持时间足以允许针体液样品中存在的抗所述分析物的抗体与所述融合蛋白发生免疫反应,形成免疫反应产物;和

c)检测所述免疫反应产物的存在情况。

12. 权利要求5的融合蛋白在检测分离样品中的针对被分析物的抗体的方法中的用途。

13. 一种试剂盒,其用于检测针对被分析物的抗体,所述试剂盒包含权利要求5的融合蛋白。

14. SlpA 在免疫测定中作为添加剂的用途,其用于降低干扰和减少免疫交叉反应。

15. SlpA 作为添加剂的用途,其用于改善溶解性和防止靶蛋白聚集。

作为重组蛋白和酶技术的工具的 SlpA

本发明涉及含有 SlpA 分子伴侣和靶多肽的融合蛋白；重组表达、纯化和重折叠这些融合蛋白的方法；它们在蛋白和酶生物技术中的用途，尤其是它们在诊断中的应用。此外，本发明涉及含有 SlpA 和靶多肽的任何复合物，所述复合物旨在增加用于生物技术应用的靶多肽或酶的溶解性、活性、稳定性和/或折叠可逆性。

发明背景

蛋白折叠是一个自发的过程，该过程由天然状态和未折叠状态之间的 Gibbs 自由能的微小差异驱动。在折叠过程中，基本上未结构化的多肽链采用所谓的蛋白的天然构象或三维结构。不完全折叠的分子的聚集与生产性折叠竞争，这成了一个严重问题，这种竞争在体内和体外均影响折叠收率。在活细胞中，折叠由辅助蛋白帮助。折叠辅助物为辅助其它蛋白折叠并维持其结构完整性的多肽。它们可逆地与其靶相互作用，由此防止有害的副反应，例如聚集过程，从而具有促进多肽链正确折叠的能力。它们在体内和体外均有此能力，这些折叠辅助物在生物技术问题中的应用数量一直在增加。一般而言，折叠辅助物被细分为折叠催化剂和分子伴侣。

分子伴侣已知与多肽的变性的、部分变性的或简单地疏水表面可逆地结合，并由此帮助复性蛋白或使它们保持在溶液中。分子伴侣通过可逆地结合和遮蔽疏水表面降低有聚集倾向的折叠中间体和有聚集倾向的折叠蛋白的浓度。它们因此只发挥结合功能。相反，折叠催化剂如二硫化物氧化还原酶和肽基脯氨酰顺/反异构酶加速蛋白折叠的限速步骤，由此缩短折叠中间体的寿命。折叠催化剂因其催化功能而降低有聚集倾向的折叠中间体的浓度。一类重要的折叠催化剂被

称为肽基脯氨酰顺/反异构酶(PPI 酶)。

基于序列相似性、蛋白拓扑学和免疫抑制分子的结合,脯氨酰异构酶被分成3个不同的家族:环孢素、小小菌素(parvulins)和FK506结合蛋白(因此首字母简略词为FKBP)。FKBP结合已用作免疫抑制药物的FK506、雷帕霉素和相关大环内酯衍生物,并被它们抑制。

在大肠杆菌(*E. coli*)中属于肽基脯氨酰顺/反异构酶的FKBP家族的推定折叠辅助物为SlpA,SlpA是“SlyD-样蛋白A”的首字母简略词(Hottenrott等,1997,JBC 272/25,15697-15701)。一直到现在还缺乏有关SlpA及其在大肠杆菌中的生理作用的信息。尽管已报道了SlpA的脯氨酰异构酶活性较差,但该蛋白迄今仍相当神秘。迄今为止,还没有有关SlpA的物理-化学特性或可能的分子伴侣特性的信息,甚至还没有提到SlpA在大肠杆菌胞质中的功能。

在许多诊断应用中,重组产生的蛋白用作结合配偶体,例如在设计用于检测特异性免疫球蛋白分析物的免疫测定中用作抗原。这些抗原可以作为融合蛋白含有的一部分生产,其构成目标部分或抗原性多肽,旨在识别和结合在所研究的样品或测定混合物中存在的特定部分。重组产生的融合蛋白的另一部分为多肽部分,该部分融合至赋予特异性的抗原性部分,以利于其克隆、表达、过度生产、折叠/重折叠和纯化,并利于增加其溶解性、其稳定性或其折叠可逆性。重组产生的融合蛋白的合成在先有技术中已充分描述。还已充分确认的是,使用分子伴侣作为融合蛋白的组成部分是有利的,该部分起辅助分子的作用,用于靶多肽的表达、折叠、纯化、溶解和增加整体稳定性。

美国专利号6,207,420公开了用于表达蛋白的融合蛋白系统,其中靶多肽部分的氨基酸序列和融合肽部分来源于不同生物。最近,可以表明FkpA和SlyD适合作为生产重组蛋白的融合组件。两个分子伴侣均增加其客户蛋白在原核宿主中的表达率,支持正确的重折叠,并增加甚至有极度聚集倾向的蛋白(如逆转录病毒跨膜蛋白)的整体溶解性(Scholz等,2005,JMB 345,1229-1241和WO 03/000877)。

尽管 FkpA 和 SlyD 尤其适用于帮助有难度的或有聚集倾向的蛋白在诊断试剂(更一般地讲, 生物技术应用)中采取和保持其天然结构, 但仍存在热稳定性的难题。蛋白的天然构象通过范德华接触、氢键、盐桥和疏水作用的细致平衡的网络来稳定。优化这些接触成为相应蛋白的微环境, pH、离子强度或温度的改变确实扰动折叠和去折叠分子之间的平衡。温度的增加尤其适合于变性蛋白, 其常常导致完全或部分去折叠的分子聚集。热诱导的蛋白聚集和伴随的功能丧失对任何蛋白制品都构成严重问题。完全可以想到的是, 在蛋白试剂或制品的不恰当装运或储存过程中可能发生温度升高, 或者更一般地讲, 可能发生热应激。

例如, 分子伴侣融合组件如 SlyD 显示于约 42°C 的温度发生热诱导的去折叠, 但是例如在用于转运、装运或储存蛋白制品的容器中的冷却系统有缺陷时很容易超过 42°C。就靶蛋白 X 高度疏水并完全依赖于其融合配偶体的分子伴侣活性的情况而言, SlyD 组件一去折叠, 完整的融合多肽就将聚集, 并伴随失去其溶解功能。换句话说, 当 X 为非常疏水并有聚集倾向的客户蛋白时, SlyD 的稳定性限制 SlyD-X 融合多肽的整体稳定性。

含有 FkpA 的融合蛋白显示出稍微增加的稳定性, 这可能归因于二聚化 FkpA 载体组件的较高内在热稳定性。大肠杆菌 SlyD 的解链温度已被确定为约 42°C, 而 FkpA 直至约 50°C 还相当稳定。然而, 由于在以下章节中概述的原因, 仍极度需要提供具有高内在稳定性的替代功能分子伴侣变体。

在双抗原夹心(DAGS)形式的异质免疫测定中, 例如, 在测定的任一侧使用抗原的两个变体。这些变体之一携带对固相具有高亲和力的标记, 另一个携带发信号部分, 以便产生信号输出。这些抗原变体中的每一个均可以融合辅助序列, 即载体或融合组件。至少一个分子伴侣(或功能性多肽结合域, 即分子伴侣结构域)附着或融合至靶多肽, 促进折叠, 增加稳定性和溶解性, 并将靶多肽保持为适宜构象, 以便

要测定的抗体分析物可特异性识别并结合靶多肽。优选地，不同的分子伴侣在免疫桥测定的任一侧均用作融合配偶体，以便打破测定的固有对称性。在任一侧(即在捕获侧和检测侧)含有不同载体或融合组件但含有相同或相似的靶多肽的测定形式也可以被称为不对称的 DAGS 形式。通过在 DAGS 测定的每一侧使用不同的融合组件，可显著降低由于载体组件而发生免疫交叉反应的风险以及伴随的错误高信号。

显然，测定的整体稳定性受限于具有最低固有稳定性的免疫组件。在不对称 DAGS 中使用 FkpA 和 SlyD 作为融合配偶体时，SlyD 是限制整体稳定性的融合配偶体。因此，明显需要发现其它分子伴侣，其可在功能上完全替代 SlyD，并固有地对热应激更稳定。即便已描述了大量来自嗜热或超嗜热生物的 SlyD 同源物，但对仅使用这些蛋白作为融合配偶体作一个提示：因为它们已对远超过 60°C 的温度进行了进化和优化，所以它们具有极高的热动力稳定性。因此，稳定和超稳定的蛋白经常倾向于在环境温度变成相当刚性的，即它们失去了柔韧性，而柔韧性是动态结合靶分子的先决条件。被广泛认可的是，蛋白的稳定性仅可以在损害其柔韧性和功能这二者的情况下增加，这经常阻止高稳定性蛋白于环境温度的应用。因此，本发明的目标是由嗜温生物鉴定热稳定的折叠辅助物。本发明的又一个目标是提供适于诊断和生物技术应用的多肽，其具有增加的热稳定性，并延长诊断试剂和蛋白制品的保存期限。

据最近 Kwon 等人(BMB reports 2008, 41(2), 108-111)的报道，大肠杆菌的一些蛋白于远超出 49°C 的温度是稳定且可溶的。通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定在暴露于提升的温度时可溶的蛋白。用大肠杆菌的超声提取物于多个温度温育后进行研究。在已鉴定的 17 种热稳定蛋白中，6 种蛋白原来是推定的折叠辅助物(GroEL、GroES、DnaK、FkpA、触发因子、EF-T)。值得注意的是，该实验采用大肠杆菌的无细胞裂解物，相应蛋白的溶解性被视为稳定性的唯一标准。

然而，在蛋白的溶解性和稳定性之间有显著差异。在本领域众所

周知，蛋白的溶解性经常在最大稳定性的条件下达到最小值。例如，蛋白的热力学稳定性在缓冲溶液的 pH 与相应蛋白的 pI 一致时达到最大值。然而，在这些特别条件下，蛋白溶解性达到最小值。另一个普遍的实例是利用硫酸铵或其它氢键形成剂(cosmotropic agents)的蛋白盐析：蛋白的溶解性在此也随其稳定性增加而降低(硫酸铵是强氢键形成剂，即其稳定蛋白结构)。

WO 2007/077008 公开了重组产生的嵌合融合蛋白，其含有非人分子伴侣如大肠杆菌 SlyD 的多肽结合区段，以及 N-和 C-末端融合至该区段的人 FKBP 型肽基脯氨酰顺/反异构酶。已公开了使用 SlpA 的分子伴侣区段的类似融合多肽。

令人惊奇的是，SlpA，尤其是大肠杆菌 SlpA，在用作融合配偶体时能够赋予其它靶多肽热稳定性。如 Hottenrott 等人(出处同上)所报道，SlpA 是肽基脯氨酰顺/反异构酶活性相当差的酶。出乎意料的是，SlpA 也表现出显著的分子伴侣特征，更令人惊奇的是，SlpA 具有高内在稳定性，并且赋予融合的靶多肽热稳定性，由此使靶多肽对热诱导的聚集不敏感。而密切相关的 SlyD 仅表现出临界稳定性，于约 42°C 具有热去折叠中点，SlpA 至少到 50°C 仍保留其天然折叠，于约 56°C 显示出热去折叠中点(定义为解链温度)。在已知 SlyD 和 SlpA (其代替 SlyD 样蛋白)之间的密切关系并已知二者均是得自嗜温生物如大肠杆菌的单体蛋白、具有 49°C 的最大生长温度这一事实的情况下，这确实令人费解。最令人惊奇的是，嗜温生物大肠杆菌具有推定的折叠辅助物，例如 SlpA，其组合了突出的热稳定性和分子伴侣特征。

发明概述

本发明涉及编码含有 SlpA 分子伴侣和靶多肽的融合蛋白的重组 DNA 分子、编码所述融合蛋白的相应表达载体以及用所述表达载体转化的宿主细胞。本发明的另一方面是生产所述融合蛋白的方法以及含有 SlpA 分子伴侣和靶多肽的重组产生的融合蛋白。本发明的又一方

面是重组产生的融合蛋白作为结合配偶体(例如抗原、酶或重组校准物质)或在免疫测定中用作降低干扰的工具的用途。此外,本发明涉及重组产生的融合蛋白作为免疫原用于生产针对所述靶多肽的抗体的用途,并涉及重组产生的融合蛋白在疫苗生产中的用途。另一方面是使用重组产生的融合蛋白以及含有重组产生的融合蛋白的试剂盒在免疫测定中检测分析物的方法,所述重组产生的融合蛋白含有 SlpA 分子伴侣和靶多肽。另一方面涉及 SlpA 在免疫测定中作为降低干扰和交叉反应的工具的用途。本发明的另一方面是含有 SlpA 和靶蛋白的可溶性功能复合物预期用于生物技术应用的用途,由此靶蛋白可具有治疗或诊断价值。

附图简述

图 1: 大肠杆菌的 SlpA 的近-UV CD 光谱。用 Jasco-720 分光偏振计在恒温池架中于 20°C 记录光谱。在 1 cm 比色皿中的蛋白浓度为 417 μM 。缓冲液为 50 mM 磷酸钾 pH 7.5、100 mM KCl、1 mM EDTA。带宽为 2 nm,分辨率为 0.5 nm,扫描速度为 50 nm/分钟,响应为 2 s。光谱记录 9 次,并平均,以便改善信噪比。将信号转变为平均残基椭圆率(以 $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ 给出)。光谱指向天然样折叠蛋白,信号最大值位于 262 nm。

图 2: 大肠杆菌的 SlyD 的近-UV CD 光谱。用 Jasco-720 分光偏振计在恒温池架中于 20°C 记录光谱。在 1 cm 比色皿中的蛋白浓度为 200 μM 。缓冲液为 50 mM 磷酸钾 pH 7.5、100 mM KCl、1 mM EDTA。带宽为 2 nm,分辨率为 0.5 nm,扫描速度为 50 nm/分钟,响应为 1 s。光谱记录 9 次,并平均,以便改善信噪比。将信号转变为平均残基椭圆率(以 $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ 给出)。SlyD 的光谱与 SlpA 的光谱显著不同。其指向天然样折叠的蛋白,信号最大值位于 275 nm。

图 3: 据 275 nm (SlyD)和 262 nm (SlpA)的近 UV CD 监测的 SlyD 和 SlpA 的热诱导去折叠转换。解链曲线标准化为天然分子的百分率。

SlyD 和 SlpA 的去折叠是完全可逆的, 当样品被冷却至环境温度时, 在热转换后天然分子的近-UV CD 信号可被完全恢复。解链温度(即 50%的分子折叠和 50%去折叠的温度)对 SlyD 为 42°C, 对 SlpA 为 56°C。图 3 清晰揭示了 SlpA 的优良热稳定性。

图 4: SlpA-gp41 融合蛋白的近-UV CD 光谱。用 Jasco-720 分光偏振计在恒温池架中于 20°C 记录光谱。在 1 cm 比色皿中的蛋白浓度为 18.7 μM 。缓冲液为 50 mM 磷酸钾(pH 7.5)、100 mM KCl、1 mM EDTA。带宽为 2.0 nm, 分辨率为 0.5 nm, 扫描速度为 50 nm/分钟, 响应为 2 s。光谱记录 9 次, 并平均, 以便改善信噪比。将信号转变为平均残基椭圆率(以 $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ 给出)。光谱指向天然样折叠的蛋白。于 293 的信号最小值指示天然样折叠的 gp41 胞外域片段, 该片段富含色氨酸残基, 并吸收 280 nm 以上的光。290 nm 左右的特征明确地指向 SlpA-gp41 融合多肽中天然样折叠的 gp41 部分。

图 5: SlyD-gp41 融合蛋白的近-UV CD 光谱。用 Jasco-720 分光偏振计在恒温池架中于 20°C 记录光谱。在 1 cm 比色皿中的蛋白浓度为 14.4 μM 。缓冲液为 50 mM 磷酸钾(pH 7.5)、100 mM KCl、1 mM EDTA。带宽为 2.0 nm, 分辨率为 0.5 nm, 扫描速度为 50 nm/分钟, 响应为 2 s。光谱记录 9 次, 并平均, 以便改善信噪比。将信号转变为平均残基椭圆率(以 $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ 给出)。于 293 的信号最小值指示天然样折叠的 gp41 胞外域片段, 该片段富含色氨酸残基, 并吸收 280 nm 以上的光。290 nm 左右的特征强烈指向 SlyD-gp41 融合多肽中天然样折叠的 gp41 部分。

图 6 A/B: 通过 270 nm 的圆二色性信号的降低监测 SlyD-gp41 (A) 和 SlpA-gp41 (B) 的热诱导去折叠。对应的分子伴侣融合配偶体的去折叠伴随着其溶解能力的丧失, 并导致极为疏水的 gp41 部分的自发聚集。对于 SlyD-gp41, 聚集于约 40°C 发生, 对于 SlpA-gp41, 聚集于约 56°C 发生。椭圆率以毫度(mdeg)给出, 超过其发生(不可逆)聚集的临界温度限以虚线突出显示。

图 7: 通过 280 nm 的近-UV CD 监测的 SlyD-gG1 (26-189)的热诱导去折叠转换。作为温度函数的融合蛋白的椭圆率以毫度(mdeg)给出。SlyD-gG1 (26-189)的去折叠大部分是可逆的, 当样品被冷却至环境温度时, 天然融合多肽的近-UV CD 信号大部分恢复。SlyD-gG1 (26-189)的解链温度(即 50%的分子折叠和 50%去折叠的温度)接近 53°C。

图 8: 通过 220 nm 的远-UV CD 监测的 SlpA-gG1 (26-189)的热诱导去折叠转换。作为温度函数的融合蛋白的椭圆率以毫度(mdeg)给出。SlpA-gG1 (26-189)的去折叠大部分是可逆的, 当样品被冷却至室温时, 天然融合多肽的远-UV CD 信号大部分恢复。SlpA-gG1 (26-189)的解链温度(即 50%的分子折叠和 50%去折叠的温度)接近 63°C。这清楚阐明了 SlpA-gG1 (26-189)与 SlyD-gG1 (26-189)相比时的优良热稳定性。

图 9: 在自动化 Elecsys®分析仪中 SlpA-gG1 (26-189)和 SlyD-gG1 (26-189)与人抗-HSV-1 阳性血清和抗-HSV-1 阴性血清的免疫反应性, 如在实施例 4 中所述。表 1 显示了在苛刻的 60°C 过夜热处理之前和之后两种抗原变体的效力。实验结果清楚表明了热应激的 SlpA-gG1 (26-189)以双重方式超越热应激的 SlyD-gG1 (26-189)的优越性。首先, 采用抗-HSV-1 阳性血清的信号回收率(表 1 的上半部分)对于热应激的 SlpA 融合多肽显著较高。其次, 采用抗-HSV-1 阴性血清的背景信号增加(表 1 的下半部分)对于热应激的 SlpA 融合多肽显著较低。两种作用均改善免疫测定的信号动力学, 突显了 SlpA 作为赋予稳定性和溶解性的融合配偶体对有难度的靶蛋白的优势。因此, 免疫测定的灵敏度可通过使用 SlpA 代替密切相关的 SlyD 作为融合配偶体来保证。

序列表简述

SEQ ID NO. 1 显示了大肠杆菌 SlpA 的完整氨基酸序列(149 个氨基酸), 由 SwissProt 数据库登录号 P0AEM0 得到:

```
MSESVQNSA VLVHFTLKLD DGTTAESTRN NGKPAFLRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK
TTFSLEPDAA FGVSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS
ITVDFNHPLA GQTVHFDIEV LEIDPALEA
```

SEQ ID NO. 2 显示了如在实施例章节中使用的大肠杆菌 SlpA 的氨基酸序列(氨基酸丝氨酸 2 至谷氨酸 148)。在大肠杆菌中协同翻译除去 N-末端甲硫氨酸。为利于克隆, C-末端丙氨酸也已被除去。此外, 已加入 C-末端六组氨酸标签, 以利于蛋白的纯化和重折叠:

```
SESVQNSAV LVHFTLKLDD GTTAESTRNN GKPALFRLGD ASLSEGLEQH LLGLKVGDKT
TFSLEPDAAF GVPSPDLIQY FSRREFMDAG EPEIGAIMLF TAMDGSEMPG VIREINGDSI
TVDFNHPLAG QTVHFHDIEVL EIDPALEHHH HHH
```

SEQ ID NO. 3 显示了大肠杆菌 SlpA-gp41 的氨基酸序列。gp41 部分含有 HIV 1 gp41 的氨基酸 536-681, SlpA 部分含有氨基酸 1-146。该序列带有已加入的 C-末端六组氨酸标签, 以利于融合蛋白的纯化和重折叠。

```
MSESVQNSA VLVHFTLKLDD DGTTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK
TTFSLEPDAA FGVSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS
ITVDFNHPLA GQTVHFHDIEV LEIDPAGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGT LTVQARQLLS
GIVQQQNNEL RAIEAQQHLE QLTVWGTKQL QARELAVERY LKDQQLLGIW GCSGKLICTT
AVPWNASWSN KSLEQIWNM TWMEWDREIN NYTSLIHSLI EESQNQQEKN EQELLELDKW
ASLWNWFNIT NWLWYLEHHH HHH
```

SEQ ID NO. 4 显示了大肠杆菌 SlpA-SlpA-gp41 的氨基酸序列。两个 SlpA 单元连接至 HIV gp41 胞外域, 构成了有强烈聚集倾向的靶多肽。第一个 SlpA 单元含有氨基酸 1-146, 第二个 SlpA 单元含有氨基酸 2-149 (就功能性和稳定性而言两个 SlpA 变体完全等同)。已加入 C-末端六组氨酸标签, 以利于融合蛋白的纯化和重折叠。

```
MSESVQNSA VLVHFTLKLDD DGTTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK
TTFSLEPDAA FGVSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS
ITVDFNHPLA GQTVHFHDIEV LEIDPAGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGG ESVQNSAVL
VHFTLKLDDG TTAESTRNG KPALFRLGDA SLSEGLEQHL LGLKVGDKTT FSLEPDAAFG
VSPDLIQYF SRREFMDAGE PEIGAIMLFT AMDGSEMPGV IREINGDSIT VDFNHPLAGQ
TVHFHDIEVLE IDPALEAGGG SGGSGGGSGG GSGGGSGGG TLTVQARQLL SGIVQQQNE
LRAIEAQQHL EQLTVWGTKQ LQARELAVER YLKDQQLLGI WGC SGKLICT TAVPWNASWS
NKSLEQIWNM MTWMEWDREI NNYTSLIHSL IEESQNQQEK NEQELLELDK WASLWNWFNI
TNWLWYLEHH HHHH
```

SEQ ID NO. 5 显示了大肠杆菌 SlyD-gp41 的氨基酸序列。已加入

C-末端六组氨酸标签，以利于蛋白的纯化和体外重折叠。

```
MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLGHGGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRF LAET DQGPV PVEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
SGGGSGGGTL TVQARQLLSG IVQQQNNELR AIEAQQHLEQ LTVWGTKQLQ ARELAVERYL
KDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPWNASWSNK SLEQIWNMT WMEWDREINN YTSLIHSLIE
ESQNQEKNE QELLELDKWA SLWNWFNITN WLWYLEHHHH HH
```

SEQ ID NO. 6 显示了大肠杆菌 SlyD-SlyD-gp41 的氨基酸序列。两个 SlyD 单元融合至靶多肽 gp41。已加入 C-末端六组氨酸标签，以利于蛋白的纯化和体外重折叠。

```
MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLGHGGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRF LAET DQGPV PVEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
SGGGSGGGKV AKDLVSLAY QVRTEDGV LV DESPV SAPLD YLHG HGLIS GLETAL EGHE
VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGG
GGGSGGGSGG GSGGGTLTVQ ARQLLSGIVQ QQNNELRAIE AQQHLEQLTV WGTKQLQARE
LAVERYLKDQ QLLGIWGCSG KLICTTAVPW NASWSNKSLE QIWNMTWME WDREINNYTS
LIHSLIEESQ NQQEKNEQEL LELDKWASLW NWFNITNWLW YHGH DHDHDH HHHHH
```

SEQ ID NO. 7 显示了融合多肽 SIpA-gG1 的氨基酸序列。1 个 SIpA 单元融合至靶多肽 gG1，该靶多肽 gG1 含有如在实施例 4 中使用的人单纯疱疹病毒 HSV-1 抗原 gG1 的氨基酸 26-189。

```
MSESVQNSA VLVHFTLKL D DGT TAESTRN NGK PALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK
TTFSLEPDAA FGVPSPLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS
ITVDFNHPLA GQTVHFDIEV LEIDPALEGG GSGGGSGGG GGGSGGGSGG GPTNVSSTTQ
PQLQTTGRPS HEAPNMTQTG TTDSPTAISL TTPDHTPPMP SIGLEEEEE EGAGDGEHLE
GGDGTTRDLP QSPGPAFPLA EDVEKDKPNR PVVPSDPNN SPARPETSRP KTPPTIIGPL
ATRPTTRLTS KGRPLVPTPQ HTPLFSFLTA SPALDLEHHH HHH
```

SEQ ID NO. 8 显示了融合多肽 SlyD-gG1 的氨基酸序列。1 个 SlyD 单元融合至靶多肽 gG1，该靶多肽 gG1 含有如在实施例 4 中使用的人单纯疱疹病毒 HSV-1 抗原 gG1 的氨基酸 26-189。

```
MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLGHGGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRF LAET DQGPV PVEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
```

SGGGSGGGPT NVSSTTQPQL QTTGRPSHEA PNMTQTGTTD SPTAISLTTP DHTPPMPSIG
LEEEEEEEGA GDGEHLEGGD GTRDTLPQSP GPAFFLAEDV EKDKPNRPVV PSPDPNNSPA
RPETS RPKTP PTIIGPLATR PTTRLTSKGR PLVPTPQHTP LFSFLTASPA LDLEHHHHHH

SEQ ID NO. 9 显示了依据 Swiss Prot ID: Q9CKP2 的多杀巴斯德杆菌(*Pasteurella multocida*) SlyD (全长)的氨基酸序列。

MKIAKNVVVS IAYQVRTEDG VLVDEAPVNO PLEYLQGHNN LVIGLENALE GKAVGDKFEV
RVKPEEAYGE YNENMVQRVP KDVFGQVDEL VVGMRFIADT DIGPLPVVIT EVAENDVVVD
GNHMLAGQEL LFSVEVATR EATLEEIAHG HIHQEGGCCG GHHHDSDEEG HGC GCGSHHH
HEHEHHAHDG CCGNGGCKH

SEQ ID NO. 10 显示了 C-末端截短的、无半胱氨酸的多杀巴斯德杆菌 SlyD 变体的氨基酸序列, 其优选在双抗原夹心免疫测定中用作融合蛋白的分子伴侣单元(PmS SlyD 1-156):

MKIAKNVVVS IAYQVRTEDG VLVDEAPVNO PLEYLQGHNN LVIGLENALE GKAVGDKFEV
RVKPEEAYGE YNENMVQRVP KDVFGQVDEL VVGMRFIADT DIGPLPVVIT EVAENDVVVD
GNHMLAGQEL LFSVEVATR EATLEEIAHG HIHQEG

SEQ ID NO. 11 显示了依据 Swiss Prot ID: P45523 的大肠杆菌 FkpA (全长)的氨基酸序列:

MKSLEFKVTLL ATTMAVALHA PITFAAEAAK PATAADSKAA FKNDDQKSAY ALGASLGRYM
ENSLKEQEKL GIKLDKQOLI AGVQDAFADK SKLSDQEIEQ TLQAFEARVK SSAQAKMEKD
AADNEAKGKE YREKFAKEKG VKTSSTGLVY QVVEAGKGEA PKDSDTVVVN YKGTLDGKE
FDNSYTRGEP LSFRLDGVIP GWTEGLKNIK KGGKIKLVIP PELAYGKAGV PGIPPNSTLV
FDVELLDVKP APKADAKPEA DAKAADSACK

SEQ ID NO. 12 显示了大肠杆菌 FkpA 的氨基酸序列部分, 其优选在双抗原夹心免疫测定中用作融合蛋白的分子伴侣单元。该序列没有 N-末端信号序列(氨基酸残基 1-25), 并基本上对应于成熟 FkpA (FkpA 26-270):

AEAAKPATAA DSKAAFKNDD QKSAYALGAS LGRYMENSLK EQEKLGIKLD KDQLIAGVQD
AFADKSKLSD QEIEQTLQAF EARVKSSAQA KMEKDAADNE AKGKEYREKF AKEKGVKTSS
TGLVYQVVEA GKGEAPKDS DTVVVNYKGTLDGKEFDNSY TRGEPLSFRL DGVIPGWTEG
LKNIKKGGKI KLVIPPELAY GKAGVPGIPP NSTLVFDVEL LDVKPAPKAD AKPEADAKAA
DSACK

SEQ ID NO. 13 显示了 EB 病毒核抗原 1 (EBV 核抗原 1 或 EBNA-1) 401-641 位的氨基酸序列, (EBV = HHV-4 = 人疱疹病毒 4); 毒株 B95-8。EBNA-1 的完整氨基酸序列由 641 个残基组成, 可按照 Swiss Prot ID

P03211 得到。天然半胱氨酸残基对于 EBNA-1 的抗原性不是必要的，已被改变为丙氨酸(标下划线的)，以便简化纯化过程和增加天然样折叠的溶解性蛋白的收率。

GRRPFFHPVG EADYFEYHQE GPGDGE PDVP PGAIEQGPAD DPGEGPSTGP RGQGDGRRK
KGGWFGKHRG QGGSNP KFEN IAEGLRALLA RSHVERTTDE GTWVAGVFVY GGSKTSLYNL
RRGTALAI PQ ARLTPLSRLP FGMAPGPGPQ PGPLRESIVA YFMVFLQTHI FAEVLKDAIK
DLVMTKPAPT ANIRVTVASF DDGVDLPPWF PPMVEGAAAE GDDGDDGDEG GDGDEGEEGQ E

SEQ ID NO. 14 显示了依据 Swiss Prot ID P14348 的 EB 病毒蛋白 p18 的氨基酸序列的氨基酸 1-176 (可读框 BFRF3, HHV-4/B95-8)。在氨基酸位 56 的天然半胱氨酸残基对于 EBV p18 的抗原性不是必要的，已被改变为丙氨酸(标下划线的)，以便简化纯化过程和增加天然样折叠的溶解性蛋白的收率。

MARRLPKPTL QGRLEADFPD SPLLPKFQEL NQNNLPNDVF REAQRSYLVF LTSQFAYEEY
VQRTEGVPRR QRAIDKRQRA SVAGAGAH AH LGGSSATPVQ QAQAAASAGT GALASSAPST
AVAQSATPSV SSSISLRAA TSGATAAASA AAVDTGSGG GGQPHDTAPR GARKKQ

SEQ ID NO. 15 显示了依据 Swiss Prot ID P14348 的 EB 病毒蛋白 p18 的 C-末端部分的氨基酸序列的氨基酸 105-176 (可读框 BFRF3, HHV-4/B95-8)。

AASAGTGALA SSAPSTAVAQ SATPSVSSSI SSLRAATSGA TAAASAAA AV DTGSGGGGQP
HDTAPRGARK KQ

SEQ ID NO. 16 显示了依据 Swiss Prot ID P03197 的 EB 病毒蛋白 p23 的氨基酸序列的氨基酸 1-162 (可读框 BLRF2, HHV-4/B95-8)。在氨基酸位 46 的天然半胱氨酸对于 EBV p23 的抗原性不是必要的，已被改变为丙氨酸(标下划线的)，以便简化纯化过程和增加天然样折叠的溶解性蛋白的收率。

MSAPRKVRLP SVKAVDMSME DMAARLARLE SENKALKQQV LRGGAASST SVPSAPVPPP
EPLTARQREV MITQATGRLA SQAMKKIEDK VRKSV DGVTT RNEMENILQN LTLRIQV SML
GAKGQSPGGE GTRPRESNDP NATRRARSRS RGREAKKVQI SD

SEQ ID NO. 17 显示了如在实施例 1 中使用和显示的富含甘氨酸的接头肽序列 L=(GGGS)₅GGG，用于克隆含有 SIpA 和靶多肽的表达盒。

GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGG

发明详述

本发明的一个方面是编码融合蛋白的重组 DNA 分子，其含有有效连接的至少一个编码靶多肽的核苷酸序列，以及该核苷酸序列上游或下游的至少一个编码 SlpA 分子伴侣单元的核苷酸序列。

术语“重组 DNA 分子”是指通过组合两个分开的序列区段得到的 DNA 分子，所述组合通过基因工程技术或化学合成人工操作分离的多核苷酸区段来完成。这样做，人们可以将具有所需功能的多核苷酸区段连接在一起，从而产生所需的功能组合。

多核苷酸序列在它们彼此处于功能关系时是有效连接的。例如，如果启动子控制编码序列的转录或表达，则启动子有效连接至编码序列。一般而言，有效连接指连接的序列是连续的，在必须连接两个蛋白编码区的情况下，二者是连续的并在可读框内。然而，众所周知的是，某些遗传元件，如增强子，即使相隔一定距离时——即纵使不连续，也可以有效连接。

术语“上游”和“下游”是功能上的定义，是指编码核苷酸序列链的方向或极性。“上游”方向意指核苷酸位于给定多核苷酸序列的 5' 方向，即朝向起始核苷酸。就氨基酸序列而言，术语“上游”释为/指位于 N-末端方向的氨基酸，即朝向多肽链的起始处。优选地，编码 SlpA 分子伴侣单元的核苷酸序列位于编码靶多肽的核苷酸序列的上游。

“下游”方向是指核苷酸位于多核苷酸的 3' 方向，即朝向核苷酸序列的末端。就氨基酸序列而言，术语“下游”解释为位于 C-末端方向的氨基酸，即朝向多肽链的末端。

多核苷酸被说成“编码”多肽，多核苷酸在其天然状态下或通过本领域已知的方法操作时，可被转录为核苷酸模板和/或被翻译，以产生多肽或其片段。

本发明的另一方面是含有有效连接的重组 DNA 分子的表达载体，该重组 DNA 分子含有至少一个编码靶多肽的核苷酸序列，以及

该核苷酸序列的上游或下游的至少一个编码 SlpA 分子伴侣的核苷酸序列。

制备用于导入到宿主中的 DNA 构建体通常含有宿主识别的复制系统，包括编码所需靶融合肽的预期 DNA 片段，优选还包括与多肽编码区段有效连接的转录和翻译起始调节序列。表达系统(表达载体)可以包括例如复制起点或自主复制序列(ARS)和表达控制序列、启动子、增强子和必需的加工信息位点，例如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点、转录终止序列和 mRNA 稳定序列。

选择适宜的启动子和其它必需的载体序列，以便在宿主中有功能。许多在细菌、酵母、哺乳动物、昆虫、植物或其它细胞中有用的表达载体是本领域已知的，并市售可得。另外，可将构建体连接至可扩增的基因，以便可以获得该基因的多个拷贝。

表达和克隆载体有可能含有选择标记，其为编码对载体转化的宿主细胞的存活和生长所必需的蛋白的基因，尽管这样的标记基因可在另一个共导入宿主细胞中的多核苷酸序列上携带。在选择性条件下只有表达标记基因的那些宿主细胞才存活和/或生长。典型的选择基因包括但不限于编码以下蛋白的那些基因：(a)赋予对抗生素或其它毒素物质(例如氨基青霉素、四环素等)的抗性的蛋白；(b)补充营养缺陷的蛋白；或(c)提供由复合培养基无法获得的关键营养物的蛋白。适宜的选择标记的选择取决于宿主细胞，用于不同宿主的适宜标记是本领域已知的。

可通过本领域已知的任何方法将含有目标多核苷酸的载体导入到宿主细胞中。这些方法随对应宿主系统的类型变化，包括但不限于使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖、其它物质转染，以及通过病毒感染。本发明的大量多核苷酸和多肽可通过在相适的宿主细胞中的载体或其它表达载体中表达本发明的多核苷酸来制备。最常用的原核宿主为大肠杆菌菌株，尽管还可以使用其它原核生物，例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

在大肠杆菌中表达代表了实施本发明的优选模式。表达含有至少一个 SlpA 单元和至少一个靶多肽 X 单元的融合蛋白，或者，共表达 SlpA 和 X，以产生可溶性 SlpA-X 复合物，无论 SlpA 和 X 是否共价连接，这在原核以及在真核宿主细胞中均是可行的。

使用常规的连接技术构建依据本发明的载体。切割、修整分离的质粒或 DNA 片段，并以产生所需质粒需要的形式再连接。如有需要，以已知方式进行分析，以证实在构建质粒中的正确序列。适用于构建表达载体、制备体外转录物、将 DNA 导入宿主细胞中以及进行分析来评价表达和功能的方法是本领域技术人员已知的。可直接检测样品中的基因存在情况、扩增和/或表达，例如通过常规的 DNA 印迹、定量 mRNA 的转录的 RNA 印迹、点印迹(DNA 或 RNA 分析)或使用可基于本文提供的序列的适宜标记探针进行的原位杂交。如果需要，本领域的技术人员很容易设想如何修改这些方法。

本发明的又一个实施方案为用含有有效连接的重组 DNA 分子的表达载体转化的宿主细胞，所述重组 DNA 分子含有至少一个编码靶多肽的核苷酸序列，以及在该核苷酸序列上游或下游的至少一个编码 SlpA 分子伴侣的核苷酸序列。

本发明的另一个实施方案涉及在原核或真核宿主中共表达 SlpA 和靶多肽的方法，由此过量生产的 SlpA 与靶多肽相互作用，并形成可溶性非共价复合物，该复合物有利于制备天然样折叠的且有活性的靶多肽。这意味着编码 SlpA 的 DNA 序列和靶多肽可位于同一载体上，并由相同或不同的启动子控制。或者，编码 SlpA 和靶多肽的 DNA 分子可位于不同的相适载体上。为了同时表达 SlpA 和靶多肽，用两种载体转化宿主细胞。优选地，编码靶蛋白和 SlpA 的基因由响应于不同诱导物的不同启动子控制。因此，可以采用受控或限定的方式同时或连续进行 SlpA 和靶蛋白的诱导。例如，可首先诱导 SlpA 表达，以产生基础水平的功能性分子伴侣，随后可进行靶基因的诱导。暂且不谈此随后的方案，同时诱导折叠辅助物和靶多肽是可行的，同样可以

产生溶解性和功能性的靶蛋白。编码 SlpA 和靶蛋白的基因可位于相同或不同载体上。

术语“融合蛋白”是指两个分开或独立的多肽功能性地组合在一条多肽链上。融合蛋白的单个元件，即 SlpA 分子伴侣部分和靶多肽部分(也称为靶多肽 X)，可彼此直接邻接。可选地，它们被 1-100 个氨基酸残基、优选 5-30 个氨基酸残基、最优选约 20 个氨基酸残基的肽接头分隔。技术人员会认识到，这样的接头多肽被设计为对预期用途最适合的，尤其是就长度、柔性、电荷和亲水性而言。接头多肽序列还可以包含蛋白水解切割位点。可选地，融合蛋白还可以包含信号肽序列，用于将蛋白靶向其中应发生折叠的目标区室。

按照本发明，1 个以上的靶多肽 X，例如 2、3 或 4 个拷贝的靶多肽，可以为融合蛋白的组成部分。作为实例，SlpA-X2 指 1 个 SlpA 单元融合至 2 个 X 型的靶多肽单元。单个靶多肽单元可由或可不由接头多肽区段分隔。融合蛋白包含至少一个 SlpA 分子伴侣单元。串联、三重或更高的组合也可以构成融合蛋白，例如 SlpA-SlpA-X 或 SlpA-SlpA-SlpA-X。其中靶多肽夹在至少两个分子伴侣单元之间的融合蛋白也是本发明的一部分，例如 SlpA-X-SlpA 或 SlpA-SlpA-X-SlpA-SlpA。

SlpA 是 FKBP 家族的推定肽基脯氨酰顺/反异构酶。按照 SwissProt 登录号 P0AEM0 公开的大肠杆菌 SlpA 氨基酸序列示于 SEQ ID NO. 1。

按照本发明，术语“编码 SlpA 分子伴侣的核苷酸序列”是指编码含有 SlpA 的多肽结合区段的多肽片段的核苷酸序列。术语分子伴侣的“多肽结合区段”表示分子伴侣的结合感受态部分，即结合并保持客户或底物多肽链并因此与其整合的部分，以降低有聚集倾向的折叠中间体的浓度，并利于以后的折叠。SlpA 的“多肽结合区段”还可以被命名为 IF 结构域(在 flap 结构域中插入)。定义为自发折叠单元的蛋白结构域能够在适宜的重折叠条件下在水性溶液中采取天然样的

稳定折叠。术语“多肽结合区段”、“IF-环”、IF-结构域或分子伴侣结构域可同义使用。

依据本发明的“SlpA”或“SlpA 分子伴侣”或“SlpA 单元”包括 SlpA 的多肽结合区段或 IF 结构域。优选地，大肠杆菌 SlpA 的完整分子用作融合配偶体。或者，SlpA IF 结构域可以用作融合配偶体。其至少含有如下的片段：N-末端起始于 SEQ ID NO. 2 的第 59-78 个氨基酸之间的任何氨基酸，C-末端终止于 SEQ ID NO. 2 的第 125-139 个氨基酸之间的任何氨基酸。最优选的是编码 N-末端起始于 SEQ ID NO. 2 的第 72 个氨基酸(缬氨酸 72) 和 C-末端终止于 SEQ ID NO. 2 的第 132 个氨基酸(苏氨酸 132)的多肽的序列。按照本发明，SlpA 是指该分子伴侣的成熟的非人源化形式。这意味着 SlpA 分子伴侣既不包含 FKBP12 或任何其它人 FKBP 的 N-末端侧翼序列，也不包含其 C-末端侧翼序列。

依据本发明，来自其它生物的 SlpA 分子伴侣同源物可以与具有分子伴侣活性的脯氨酰异构酶组合用作折叠辅助物。这样的 SlpA 同源物可起源于以下的生物(Swiss Prot 数据库 ID 号在括号中显示)：福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)(Prot.ID. P0AEM3)、宋内氏志贺菌(*Shigella sonnei*)(Prot.ID Q3Z5Y2)、痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*)(Prot. ID Q32K69)、柯氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter Koseri*)(Prot.ID A8ALT4)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)(Prot.IDQ8XG79)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)(Prot.ID Q7CR92)、甲型和乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi*)(Prot.ID Q5PKI5 和 A9MYG7)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)(Prot.ID Q57TL3)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)(Q9RF46)、亚利桑那沙门氏菌(*Salmonella arizonae*)(Prot.ID A9MR44)、肠杆菌属(*Enterobacter sp.*)(Prot.ID A4W6E3)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)(A7MIM1)、变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)(Prot.ID A8G9L6)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)(Prot.ID Q8CZP4 或 Q0WJI9)、假结核耶尔森氏菌

(*Yersinia pseudotuberculosis*)(Prot.ID A7FMD5)、耶尔森氏肠杆菌(*Yersinia enterocolitica*)(A1JJE3)、胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)(Prot.ID Q6D0C5)、发光光杆状菌(*Photobacterium luminescens*)(Prot.ID Q7N8X0)、*Sodalis glossinidius* (Prot.ID Q2NVY4)、*Idiomarina baltica* (Prot.ID A3WMS1)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)(Prot.ID A6ATG3 或 A7MTD8)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)(Prot.ID Q7MNM6 或 Q8DES9)、坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)(Prot.ID A8T7R0)、*Vibrio shilonii* (Prot.ID A6D8Q3)、灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)(Prot.ID A3UXQ8)、*Idiomarina loihiensis* (Prot.ID Q5QZR6)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)(Prot.ID Q1V5T9)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)(Prot.ID A4SIX7)、发光杆菌属(*Photobacterium sp.*)(Q2C7V1)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)(Prot.ID Q87S88 或 A6B565)、假别单胞菌(*Pseudoalteromonas atlantica*)(Prot.ID Q15R06)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)(Prot.ID A5F8X4, 或 Q9KU45, 或 A6Y5H7, 或 A6XZU4, 或 A6ADB4, 或 A6A5W5, 或 A3H4C9, 或 A3GPA9, 或 A3EG01, 或 A2PSS5, 或 A2P8T9, 或 A1F6Q8)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)(Prot.ID A0KG41)、*Vibrio angustum* (Prot.ID Q1ZMQ4)、南极细菌属(*Moritella sp.*)(Prot.ID A6FG75)、交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas haloplanktis*)(Prot.ID Q3IEA0)、*Alteromonadales bacterium* (Prot.ID A0Y1B2)、*Psychromonas ingrahamii* (Prot.ID A1SZP1)、费歇尔弧菌(*Vibrio fischeri*)(Prot.ID Q5E7N2 或 A9IPH0)、*Photobacterium profundum* (Prot.ID Q1Z378 或 Q6LUK9)、*Pseudoalteromonas tunicate* (Prot.ID A4C627)、*Psychromonas sp.* (Prot.ID Q1ZHS3)、*Reineka sp.* (Prot.ID A4BJL0)、*Vibrio psychroerythrus* (Prot.ID Q486T8)、*Shewanella amazonensis* (Prot.ID A1S427)、希瓦氏菌属(*Shewanella sp.*)(Prot.ID Q0HFZ1 或 Q0HS84 或 A0KZY9)、*Shewanella pealeana* (Prot.ID A8H1H5)、*Shewanella frigidimarina*

(Prot.ID Q07Z37)、*Shewanella denitrificans* (Prot.ID Q12KM6)、*Shewanella loihica* (Prot.ID A3QBX4)和腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)(Prot.ID A4Y4A6)。

按照本发明, SlpA 分子伴侣序列可通过氨基酸取代(优选同源取代)、缺失和插入来修饰, 前提是保持 SlpA 分子伴侣的整体结构、功能和稳定性。通过确定所研究的含有靶多肽和 SlpA 分子伴侣序列的融合蛋白的解链温度, 可易于测试该 SlpA 变体的功能保持。解链温度定义为 50%的分子折叠和 50%去折叠的温度, 即解链温度确定了在给定的缓冲体系中于给定的蛋白浓度热诱导去折叠转换的中点。根据芳香族残基的含量, 可通过简单的光谱探针如 UV 吸光度、荧光或圆二色性监测蛋白的解链。具体地说, 圆二色性完全适合监测蛋白的二级结构(酰胺 CD 或远-UV CD)或三级结构(芳香族 CD 或近-UV CD)的构象变化。

通过近-UV CD 评价的热诱导 SlpA 去折叠揭示, 去折叠过程是完全可逆的, 即在样品由 95°C 冷却降至环境温度后, 即降至 15-25°C 后, SlpA 自发地再采取其天然构象。这种折叠和去折叠的可逆性在生物技术应用中是理想的折叠辅助物的必要前提条件: 通常, 当重组融合蛋白严重过度生产时, 它们在大肠杆菌胞质中作为包涵体累积。在此情况下, 必须精心设计强力有效的复性方案, 以在 7.0 M 氯化胍或其它离液剂如尿素中裂解的细菌细胞或包涵体开始。不言而喻的是, 任何分子伴侣融合配偶体的重折叠必需足够强力、有效和可逆, 以便帮助目标客户蛋白的体外重折叠。在先有技术中已知的许多融合配偶体, 例如 NusA、MBP (麦芽糖结合蛋白)和 GST (谷胱甘肽-S-转移酶), 在宿主细胞中翻译时表现出非常强的从头折叠, 但它们在热诱导或化学诱导的去折叠后不易被重折叠。因此, 为了在宿主系统中溶解性表达靶蛋白而使用这些融合配偶体。当它们在宿主细胞中翻译时, 如果在从头折叠过程中不能赋予它们的客户蛋白溶解性, 就难以通过体外复性试验恢复聚集的融合蛋白。按照本发明, 完全可逆的融合配偶体

如 SlpA 具有明显优势, 因为其同样可在宿主细胞中从头折叠时导致溶解性蛋白产生。另外, SlpA 依靠其折叠可逆性, 同样可用于帮助融合多肽的体外重折叠, 所述融合多肽在宿主细胞中大量过度生产时以不溶性包涵体累积。去折叠的完全可逆性连同高固有稳定性和显著的分子伴侣特征是本发明的融合配偶体的重要先决条件。SlpA 完全满足这些标准。

按照本发明, 一个或多个、优选 2 个编码 SlpA 分子伴侣的核苷酸序列位于编码靶多肽的核苷酸序列的上游, 产生含有 2 个邻接的 SlpA 单元的串联 SlpA 分子伴侣。一个或多个编码 SlpA 分子伴侣的核苷酸序列可被编码(按读框) 1-100 个氨基酸的肽接头的核苷酸序列分隔。可使用不同的核苷酸序列编码两个 SlpA 分子伴侣单元。同样, 应使用不同的核苷酸序列编码融合多肽中所有其它的高重复性元件, 例如接头或间隔区段。应该变性核苷酸序列, 以避免由于大肠杆菌宿主中的无意重组事件而导致失去 1 个 SlpA 编码序列。通过细心选择相同或重复性氨基酸序列的不同密码子, 可保证表达盒的稳定性。

本发明的“靶多肽”可以为溶解性或稳定性有限的任何多肽(即任何氨基酸序列), 其在不利条件下倾向于聚集, 需要得到折叠辅助物支持或帮助, 但条件是 FK506 结合蛋白(FKBP), 尤其是人 FK506 结合蛋白, 被排除作为靶多肽。这意味着 FK506 结合蛋白如人 FKBP12 被排除作为靶多肽。在优选的实施方案中, 显示出聚集倾向性和/或对热应激敏感的多肽可以用作靶多肽。而且, 具有酶活性的多肽为依据本发明的优选靶多肽。具体地说, 接受并周转疏水底物(并因此具有它们自身的疏水表面模式)的酶是依据本发明的优选靶多肽。在进一步优选的实施方案中, 细菌或病毒蛋白或朊蛋白或与类风湿性关节炎相关的蛋白用作靶多肽。

哺乳动物病原体的任何结构性的、膜结合的、膜束缚的或分泌性的基因产物均可用作靶多肽。哺乳动物病原体包括可感染或寄居于哺乳动物宿主的病毒、细菌、单细胞或多细胞寄生物。例如, 起源于诸

如以下的病毒的多肽可以在本发明的融合蛋白中用作靶多肽：人免疫缺陷病毒(HIV)、痘苗病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒、流感病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、登革病毒、日本乙型脑炎病毒、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒、EB病毒、轮状病毒以及引起麻疹、黄热病、腮腺炎、狂犬病、疱疹、流感、副流感等的病毒。例如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、麻风分支杆菌(*Mycobacterium leprae*)、立氏立克次体(*R. rickettsii*)、志贺氏菌(*Shigella*)、奈瑟双球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、厌酷球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、博氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)等的细菌蛋白可以用作靶多肽。

优选通过本发明方法生产的靶多肽的进一步实例包括哺乳动物基因产物，例如酶、细胞因子、生长因子、激素、疫苗、抗体等。更具体地说，本发明优选的过表达基因产物包括基因产物，例如促红细胞生成素、胰岛素、生长激素、生长激素释放因子、血小板衍生生长因子、表皮生长因子、转化生长因子 α 、转化生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子、胰岛素样生长因子 I、胰岛素样生长因子 II、凝血因子 VIII、超氧化物歧化酶、干扰素、 γ -干扰素、白介素-1、白介素-2、白介素-3、白介素-4、白介素-5、白介素-6、粒细胞集落刺激因子、多谱系集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞刺激因子、巨噬细胞集落刺激因子、T细胞生长因子、淋巴毒素等。优选的过表达基因产物为人基因产物。

对于诊断用途，例如当要测定的分析物为抗体时，靶多肽含有至少一个由待测定的抗体识别的表位。这样的表位也叫做诊断相关表位。本发明的靶多肽还可以含有来自几种不同蛋白的、类似于例如诊

断相关表位的序列，其构建用于作为单个重组多肽表达。优选地，靶多肽具有 10-500 个氨基酸的长度。

最优选地，靶多肽为由逆转录病毒蛋白(例如 HIV-1 的 gp41 和 p17、HIV-2 的 gp36 和 p16、HTLV-I/II 的 gp21)组成的群体的成员，由包膜蛋白(例如风疹病毒的 E1 和 E2)组成的群体的成员或由致淀粉样变蛋白(例如 β -AP42 (阿尔茨海默肽))或朊蛋白组成的群体的成员。

还优选单纯疱疹病毒 1 的糖蛋白 G1 和单纯疱疹病毒 2 的糖蛋白 G2 作为靶多肽。更确切地说，没有其信号序列及其跨膜区的相应糖蛋白片段(gG1 26-189、gG2 343-594)为适宜的靶多肽。

进一步优选以下的人巨细胞病毒的蛋白和蛋白片段作为靶多肽：pp28 (15-179)、pp150 (821-1048)、pp150 (547-725)、pp150 (495-854)、p38 (105-308)、p38 (105-373)、p38 (209-308)、p52 (254-293)、p52 (295-330)、p52 (298-433)、gB (67-84)、pp65 (372-549)和 pp65 (372-458)。

还优选以下的梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)的蛋白和蛋白片段：TpN17 (23-156)、TpN47 (21-434)、TpN15 (23-142)、TmpA (23-345)、TpO453 (27-287)。所有这些密螺旋体抗原的信号序列均已被略去，以确保在大肠杆菌宿主中表达时的胞质定位。

进一步优选的靶多肽为以下的包柔氏螺旋体菌(*Borrelia*)的蛋白和蛋白片段：内部鞭毛片段 p41i (137-262)、VlsE (IR6/C6)、DbpA (26-175)、OspB (17-296)和 OspC (19-214)。

进一步优选的靶多肽为 EB 病毒(EBV)的蛋白，例如在 SEQ ID NO. 13 中显示的 EBV 核抗原 1 (EBNA-1)、分别在 SEQ ID NO. 14 和 15 中显示的 p18 的多肽和片段以及如在 SEQ ID NO. 16 中显示的来源于 p23 的多肽。

在融合至 SIpA 分子伴侣时，这些靶多肽中的任一种均可在免疫测定中作为结合配偶体用于检测分析物，例如针对靶多肽的抗体，或者可以用作用于免疫测定的标准品或校准物质，如下文进一步详述。

本发明的又一个实施方案是生产融合蛋白的方法，所述方法包括

以下步骤: a)培养宿主细胞,其含有至少一个编码靶多肽的核苷酸序列,以及该序列上游的至少一个编码 SlpA 分子伴侣的核苷酸序列, b)表达所述融合蛋白, c)纯化所述融合蛋白和 d)重折叠成可溶性的和天然样的或免疫反应性的(即抗原性的)构象。通过该方法生产的融合蛋白也是本发明的一个方面。

本发明的融合蛋白表现出高溶解性。当以低速率在胞质中过表达时,它们主要以可溶性部分累积。根据细胞生长和诱导的条件,尤其是在大量过表达时, SlpA-X 基因产物也可以包涵体累积。通常,技术人员目的在于在大肠杆菌胞质中过量生产溶解性靶多肽。然后通过超声或组合的溶菌酶/EDTA 处理裂解细胞,并由溶解性部分中分离推定的天然样的折叠靶蛋白。这对 SlpA-X 融合蛋白是可行的,在靶多肽 X 具有足够高的内在溶解性的情况下产生溶解性物质。在靶多肽 X 非常疏水并强烈倾向于聚集的情况下,可应用替代策略,该策略在基质辅助的复性方法中利用 SlpA 的有效且坚固的重折叠特性。在适宜的缓冲条件下,如在离液物质中,裂解细胞,所述条件强烈变性和溶解甚至疏水的细胞组分以及包涵体,尽管损害了结构完整性。当融合蛋白在 N-末端或 C-末端用 6 组氨酸部分标记时,它们可以去折叠状态特异性结合至含金属的柱子(Ni-NTA 或 Zn^{2+} 或 Cu^{2+} 支持体)。固定至固相的分子在适宜的缓冲条件下容易有效地重折叠。这种被称作基质辅助复性已被表明增加许多有难度的蛋白的重折叠收率,得到共价连接的 SlpA 强有力支持, SlpA 利用其分子伴侣特性有可能识别并可逆地遮蔽折叠中间体中的疏水补丁。如在实施例章节中更详细表明的适宜的纯化和重折叠方案是技术人员众所周知的。

本发明的又一方面涉及含有 SlpA 和靶多肽序列的任何复合物,其包括将 SlpA 加至任何蛋白制品。本发明的又一方面涉及重组产生的融合蛋白,其含有至少一个对应于 SlpA 的多肽序列和至少一个对应于靶多肽的多肽序列。本发明的又一方面涉及单独的或与重组或合成来源的靶多肽组合的合成产生的 SlpA。

按照本发明, SlpA 分子伴侣在用作融合配偶体时, 能够改善有难度的靶多肽的热稳定性。SlpA 赋予融合靶多肽热稳定性, 由此使靶多肽对热诱导的聚集不敏感, 如在实施例章节中所示。当对融合至大肠杆菌 SlyD 的有强烈聚集倾向的靶蛋白实施热应激时, 产生的融合蛋白于约 42°C 显示出开始热诱导的聚集, 这与 SlyD 的固有稳定性明显一致。当相同的靶蛋白融合至 SlpA、优选大肠杆菌 SlpA 时, 它们直到约 56°C 仍稳定并可溶。例如, 含有 SlyD 和 HIV 蛋白 gp41 的片段 536-681 的融合蛋白(SEQ ID NO. 5)于 42°C 的温度开始聚集, 而依据本发明的融合至大肠杆菌 SlpA 的相同靶蛋白(SEQ ID NO. 3)在 50°C 以上的温度是热稳定的。可以表明, SlpA 作为融合蛋白的一部分防止有难度的或有聚集倾向的蛋白在热诱导的变性后聚集。

还可以表明, SlpA 的融合即便对几乎没有聚集倾向的蛋白或蛋白片段也发挥有益作用。当 HSV-1 的糖蛋白 G1 片段 gG1 (26-189)融合至 SlyD 时, 产生的融合蛋白可以用基本上可逆的方式以 53°C 的近似解链温度经热力去折叠(图 7)。然而, 当同一片段融合至 SlpA 时, 产生的融合蛋白于约 63°C 显示出热诱导去折叠中点(图 8)。显然, 在 SlpA 取代 SlyD 作为融合配偶体时, gG1 融合多肽的稳定性移动 10°C。该发现清楚表明了 SlpA-X 融合多肽相比于其 SlyD-X 对应物的优良稳定性特征。

为了阐明在免疫测定中是否也反映出 SlpA 融合多肽的这些优良稳定性特征, 用抗-HSV 阳性和阴性的人血清评价热挑战(thermally challenged/heat-challenged)的 SlyD-gG1 和 SlpA-gG1 样品(实施例 4)在热应激后恢复的免疫反应性。在与未应激样品相比时, 观察到清晰的结果(参见实施例 4 和图 9): 热处理的 SlyD-gG1 和 SlpA-gG1 与抗-HSV 阳性血清产生的信号在所有情况下都降低, 但采用 SlyD 融合变体的信号损失更加明显。反过来, 热处理的 SlyD-gG1 和 SlpA-gG1 和抗-HSV 阴性血清产生的背景信号在所有情况下均增加(指示缀合钉的抗原的聚集过程), 但采用 SlyD 融合变体的信号高度的增加又更加显

著。就阳性和阴性血清的信号读取结果(即对于信号动力学)而论, SlpA 作为用于 gG1 (26-189)的融合配偶体明显优于 SlyD。显然, 使用 SlpA 代替 SlyD 作为融合配偶体, 确保了针对阴性血清的较低信号水平和针对阳性血清的较高信号回收率。简而言之, 使用 SlpA 作为融合配偶体, 即便是苛刻处理用于检测免疫球蛋白分析物、含有多肽抗原的免疫测定试剂盒后, 也确保了极佳的信号动力学。可充分设想的是, 经由足够长和柔性的交联接头(利用标准化学方法)共价连接至其靶分子的 SlpA 或相关的分子伴侣组件发挥出类似的溶解性作用。在这些情况下, 当融合多肽不可行时, 应生产分子伴侣和靶分子, 并在共价连接前单独重折叠。

本发明的又一方面涉及重组或合成产生的、含有 SlpA 分子伴侣和靶多肽的融合蛋白在免疫测定中作为结合配偶体的用途。免疫测定以及各种均质和异质测试形式对技术人员是众所周知的。它们可在本领域技术人员已知的所有生物液体中进行。优选的样品是体液, 如全血、血清、血浆、尿或唾液。

依照本发明含有 SlpA 和至少一种靶多肽的融合多肽也可以用作标准品或校准物质。SlpA 对在免疫测定中需要作为校准物的有难度的蛋白也是良好的融合配偶体。例如, 我们克隆、表达和纯化了与 SlpA 融合的肌钙蛋白 I 变体(含有 1-209 个残基)。产生的融合多肽 SlpA-肌钙蛋白 I 原来是可溶的和免疫反应性的, 非常适合用作肌钙蛋白 I 免疫测定的标准校准物质。由于 SlpA 融合配偶体, 肌钙蛋白 I 部分的稳定性在与分离的肌钙蛋白 I 相比时显著增加, 分离的肌钙蛋白 I 仅临界稳定, 即便在有利的缓冲条件下也自发聚集。本发明的又一个实施方案是, 使用 SlpA 与有难度的蛋白复合, 以产生可溶并且稳定的校准物或标准物质。本发明的又一方面是使用 SlpA 作为添加剂, 以改善溶解性, 并防止靶蛋白聚集。

本发明的又一个实施方案是用于检测分离样品中分析物的特异性抗体的方法, 所述方法包括

a)通过将体液样品与融合蛋白混合形成免疫反应混合物,所述融合蛋白包含至少一个对应于 SlpA 分子伴侣的多肽序列和至少一个对应于靶多肽的多肽序列,

b)将所述免疫反应混合物保持一定时间,该保持时间足以允许体液样品中存在的针对所述分析物的抗体与所述融合蛋白免疫反应,形成免疫反应产物;和

c)检测所述免疫反应产物的存在情况。

在优选的实施方案中,可通过被称作双抗原夹心测试(DAGS;也叫作桥测试)进行特异性抗体的检测,双抗原夹心测试是一种异质形式,其中要测定的特异性抗体分析物在两种相同或相似的抗原之间形成桥。可容易地使该形式适合于高通量自动化分析仪。更具体地说,要测定的抗体与介导固定至固相的第一抗原和携带标记(即发信号部分,如本领域技术人员已知的发色标记、荧光标记、化学发光标记、电化学发光标记或其它标记)的第二抗原形成免疫复合物或免疫反应产物,由此允许在分离液相和固相后定量或定性检测特异性结合的抗体。因此,只有在所研究的抗体存在于样品中时才形成桥,并可以检测信号。在该测定形式中,本发明的融合蛋白可用作结合配偶体,其中固相结合抗原或标记抗原或这二者为含有大肠杆菌 SlpA 分子伴侣和靶多肽的融合蛋白。靶多肽构成了融合蛋白的抗原性部分。

本发明的优选实施方案是所谓的不对称双抗原夹心测试,其用于检测特异性抗体,其中使用各自含有分子伴侣和靶多肽的第一种融合蛋白和第二种融合蛋白。该形式称为不对称的,因为两种融合蛋白的分子伴侣单元彼此不同。例如,第一种融合蛋白可以含有至少一个 SlpA 分子伴侣单元和至少一个靶多肽单元,并可以携带介导与固相特异性结合的部分,例如结合包被链霉抗生物素蛋白的固相的生物素。第二种融合蛋白可以包含至少一个不同于 SlpA 的分子伴侣单元和至少一个与第一种融合蛋白的靶多肽相同或相似的靶多肽单元。另外,后一种融合蛋白可以携带发信号部分或用于信号读出的报告基团。

优选地,第二种融合蛋白的分子伴侣单元也是于环境温度具有足够的内在柔性(即高度动力学结合活性)的热稳定分子伴侣。用于第二种融合蛋白的分子伴侣单元的适宜候选物为例如 FkpA (解链温度约 50°C)和来自多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)的 SlyD 直系同源物的 C-末端截短(无半胱氨酸)变体(解链温度约 49°C)。两种分子伴侣的氨基酸序列(优选在融合蛋白中用作分子伴侣单元的完整序列和部分序列)示于 SEQ ID NO. 9 至 12。第一种和第二种融合蛋白的分子伴侣单元可以交换,即 SlpA 可以为第二种融合蛋白的组成部分,在此情况下,其它热稳定的分子伴侣,例如 FkpA 或来自多杀性巴氏杆菌的 SlyD 直系同源物,可以为第一种融合蛋白的组成部分。将第一种和第二种融合蛋白同时或连续加至所研究的特异性抗体分析物的样品。样品中存在抗体时,抗体结合第一种和第二种融合蛋白的靶多肽单元,由此桥接所述第一种融合蛋白和所述第二种融合蛋白的靶多肽部分,产生免疫反应产物或免疫复合物。

在形成免疫复合物之前、之后或同时,加入固相,如微珠或 ELISA 板,使得第一种融合蛋白结合至固相。因而,含有所述第一种融合蛋白、要检测的抗体和所述第二种融合蛋白的完整免疫反应产物(即免疫复合物)与固相结合。在将固相与液相分开后,可以检测免疫反应产物的存在情况。作为替代方案,在第一种融合蛋白中存在的分子伴侣单元可以用作第二种融合蛋白的分子伴侣单元,反之亦然。然而,应优选在两种融合蛋白中的分子伴侣单元不同,因为由于在样品中存在针对这些分子伴侣的抗体,可能(不可预知)产生融合蛋白的非分析物特异性的交联。作为替代,高度特异性的 DAGS 免疫测定在测定的任一侧采用相同的分子伴侣融合配偶体也应是可行的。在此情况下,测定的开发者必须考虑很可能在人血清的实质性部分中存在针对所用融合配偶体的抗体。这些抗体应将发信号多肽桥接至固相,产生信号,由此引起假阳性结果。为了避免这样的干扰,应将融合配偶体(即分子伴侣单元)以高度聚合并未标记的形式作为抗干扰物质加至样品。抗干

扰物质设计用于有效捕获针对融合配偶体、接头区段、间隔物和标签序列以及不是真正抗原的组成部分的所有其它部分的免疫球蛋白。利用其高表位密度，化学聚合的(即交联的)抗干扰物质能够与标记的融合多肽有效竞争抗分子伴侣抗体的结合。这样，可以方便可靠的方式排除归因于具有不需要的特异性的免疫球蛋白的干扰。所有的生物液体如体液都可以用作样品。优选使用血液、血清、血浆、尿或唾液。

标记或发信号基团可以选自任何已知的可检测标记基团，例如染料；发光标记基团，如化学发光基团，例如吡啶鎓酯类或二氧杂环丁烷类(dioxetanes)；或荧光染料，例如荧光素、香豆素、罗丹明、噁嗪、试卤灵、花青及其衍生物。标记基团的其它实例为发光金属复合物，例如钌或钨复合物；酶，例如用于ELISA的酶；或者放射性同位素。

免疫复合物或免疫反应产物与固相的连接可以使用生物亲和结合对(例如生物素和链霉抗生物素蛋白)的一个配偶体进行。优选地，生物素偶合至本发明的融合蛋白。该生物素-融合蛋白-缀合物以高亲和性结合链霉抗生物素蛋白包被的固相。

分析物的实例是在“靶多肽”章节下提及的所有病原体和针对这些病原体的抗体。例如，按照本发明，优选地，可特异性检测针对HIV(人免疫缺陷病毒)、HTLV-1/HTLV-II(人T-细胞淋巴细胞白血病病毒I和II)、HCV(丙肝病毒)、HBV(乙肝病毒)、HAV(甲肝病毒)、HCMV(人巨细胞病毒)、HSV-1/-2(单纯疱疹病毒1和2)、EBV(EB病毒)、水痘-带状疱疹病毒、人疱疹病毒6、人疱疹病毒7、人疱疹病毒8、风疹病毒、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、包柔氏螺旋体菌(*Borrelia* (*burgdorferi*)、(*afzelii*)、(*garinii*))、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)和刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)的抗体。

本发明的又一个实施方案是用于检测针对分析物的抗体的试剂盒，所述分析物含有融合蛋白，所述融合蛋白含有至少一个对应于SlpA的多肽序列和至少一个对应于靶肽的多肽序列。该试剂盒的其它

部分是本领域技术人员已知的，包括缓冲液、防腐剂、标记物质和使用说明书。

本发明的其它实施方案包括本发明的重组或合成产生的融合蛋白在免疫测定中作为降低干扰的工具的用途，以及其用于免疫实验动物和生产疫苗的用途。

本发明的另一个实施方案涉及含有重组或合成产生的融合蛋白和药学上可接受的赋形剂的组合物，所述融合蛋白含有至少一个对应于 SlpA 的多肽序列和至少一个对应于靶肽的多肽序列。

按照本发明，通过将纯化形式的 SlpA 加至靶多肽，包括将 SlpA 作为稳定剂或溶解剂加至任何蛋白制品，SlpA 可以用作靶多肽的折叠辅助物。例如，可以在靶多肽的生物技术生产过程当中或之后加入 SlpA 和来自肽基脯氨酰顺/反异构酶的 FKBP 家族的相关折叠辅助物，由此赋予靶多肽溶解性或热稳定性。这样的生物技术应用包括例如大规模工业化生产酶、肽激素，如胰岛素，或者更一般地，有商业价值的蛋白。

在本发明的又一个实施方案中，SlpA 可以在免疫测定中用作添加剂，以降低或抑制引起错误的阳性结果的免疫交叉反应或干扰，尤其是在双抗原夹心免疫测定形式中。

更具体地说，在免疫测定中，SlpA-X 或 SlpA-SlpA-X 融合蛋白可以用作检测免疫球蛋白分析物的抗原，其中 X 为分析物特异性抗体结合的靶多肽。为降低干扰，SlpA 或 SlpA-SlpA 应作为抗干扰物质加入，以通过分子伴侣单元避免免疫交叉反应。优选地，SlpA 或 SlpA-SlpA 应以化学聚合形式加入，以便增加表位密度，促进 IgG 和 IgM 分子针对 SlpA、接头区段或六组氨酸标签的结合。

SlpA 赋予靶分子溶解性和稳定性，但其可能由于任何其它部分或基团而与绝对的靶分子不同，引起损害对应免疫测定专属性的免疫交叉反应。为了克服该专属性问题，将 SlpA 或 SlpA-SlpA 的未标记变体以聚合形式作为免疫测定试剂。该 SlpA 或 SlpA-SlpA 多肽含有所

有可能引起交叉反应的元件，例如 SlpA 单元自身、任何接头或间隔区段、六组氨酸标签或其它标签基序乃至标记部分，即使为失活形式。由于化学交联，这些潜在有干扰倾向的基序以高表位密度被提呈至交叉反应抗体，该交叉反应抗体非常适合于结合并由此中和这些潜在的干扰抗体。除了此抗干扰作用外，SlpA 或 SlpA-SlpA 聚合物甚至可以具有额外的有利作用：与高度聚合的分子伴侣一样，其应当能够吸附至任何固体表面(例如珠、微量滴定板和管或容器壁)的疏水表面区域，由此降低必需的免疫组分的非特异性吸附。此外，其可能依靠其分子伴侣特征促进其它免疫组分的溶解性，所述分子伴侣特征在其聚合形式时甚至有可能更加显著。

实施例进一步阐明本发明。

实施例 1

SlpA 和 SlyD 融合多肽的克隆和纯化

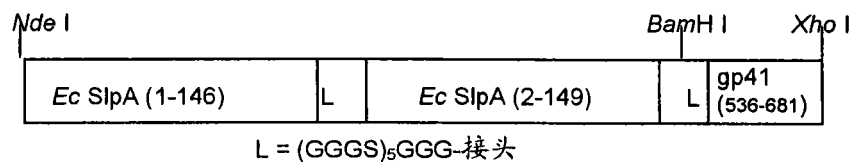
表达盒的克隆

基于 Novagen (Madison, WI, USA)的 pET24a 表达质粒，获得编码 SlyD 或 SlpA 融合多肽的表达盒。由 SwissProt 数据库取回 gp41 胞外域的序列。编码具有富含甘氨酸的、按读框与 N-末端融合的接头区的 gp41 (氨基酸 536-681)的合成基因购自 Medigenomix (Martinsried, Germany)。BamHI 和 XhoI 限制位点分别位于编码区的 5'和 3'末端。编码经由富含甘氨酸的接头区连接的两个 SlpA 单元(依据 SEQ ID NO. 1 的残基 1-146 和 2-149, SwissProt 登录号 P0AEM0)并在 C 末端含有另一接头区的一部分的另一个合成基因同样购自 Medigenomix。NdeI 和 BamHI 限制位点分别位于该表达盒的 5'和 3'末端。所述基因和限制位点设计用于使 SlpA-SlpA 和 gp41 胞外域片段能通过简单的连接按读框融合。为了避免无意的重组过程和增加表达盒在大肠杆菌宿主中的遗传稳定性，编码 SlpA 单元的核苷酸序列以及编码延长的接头区的核苷酸序列是简并的，即，使用不同的密码子组合编码相同的氨基

酸序列。

用 *Nde*I 和 *Xho*I 消化 pET24a 载体, 插入含有按读框与 HIV-1 gp41 胞外域片段 536-681 融合的串联 SlpA 的表达盒。由此构建含有 SlyD 或串联的 SlyD 代替 SlpA 或串联的 SlpA 的表达盒, 以及含有的靶多肽不同于 gp41 的表达盒。所有的重组融合多肽变体均含有 C-末端六组氨酸标签, 以利于 Ni-NTA-辅助的纯化和重折叠。使用 QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 和标准 PCR 技术在相应的表达盒中产生点突变、缺失和延伸变体或限制位点。

下图显示了产生的 HIV-1 gp41 胞外域片段 536-681 的图解, 该片段携带两个按读框与其 N-末端融合的串联 SlpA 分子伴侣。



测序所产生质粒的插入片段, 发现其编码目标融合蛋白。完整的氨基酸序列示于 SEQ ID NO. 4。接头 L 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO. 17。

SlpA、SlyD 以及含有 SlpA、SlyD 和 FkpA 的融合蛋白的纯化

使用实际上相同的方案纯化 SlyD、SlpA 和所有融合蛋白变体。于 37°C 在 LB 培养基加卡那霉素 (30 µg/ml) 中将具有特定 pET24a 表达质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞培养至 OD₆₀₀ 为 1.5, 通过加入 1 mM 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导胞质过表达。在诱导后 3 小时, 通过离心 (20 分钟, 5000 g) 收获细胞, 冷冻, 并储存于 -20°C。对于细胞裂解, 将冷冻的沉淀重悬浮在冷却的 50 mM 磷酸钾 pH 8.0、7.0 M GdmCl、5 mM 咪唑中, 将悬浮液在冰上搅拌 2 小时, 以完成细胞裂解。在离心和过滤 (硝酸纤维素膜, 0.45 µm/0.2 µm) 后, 将裂解物加至用包含 5.0 mM TCEP 的裂解缓冲液平衡的 Ni-NTA 柱上。随后的洗涤步骤针对

相应的靶蛋白修改, 范围为在 50 mM 磷酸钾 pH 8.0、7.0 M GdmCl、5.0 mM TCEP 中的 5-15 mM 咪唑。应用至少 10-15 体积的洗涤缓冲液。然后, 通过 50 mM 磷酸钾 pH 7.8、100 mM KCl、10 mM 咪唑、5.0 mM TCEP 替代 GdmCl 溶液, 以诱导基质结合蛋白的构象重折叠。为了避免共纯化的蛋白酶的再活化, 将蛋白酶抑制剂混合物(Complete®, 无 EDTA, Roche)包含在重折叠缓冲液中。在过夜反应中应用总共 15-20 个柱体积的重折叠缓冲液。然后, 用 3-5 个柱体积的 50 mM 磷酸钾 pH 7.8、100 mM KCl、10 mM 咪唑洗涤除去 TCEP 和 Complete® 无 EDTA 的抑制剂混合物。然后通过相同缓冲液中的 250 mM 咪唑洗脱天然蛋白。通过 Tricine-SDS-PAGE 评价含蛋白部分的纯度, 并合并。最后, 对蛋白进行大小排阻层析(Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia), 合并含蛋白级分, 并在 Amicon 单元(YM10)中浓缩。

在偶合的纯化和重折叠方案之后, 根据相应的靶蛋白, 可由 1 g 大肠杆菌湿细胞获得约 5-20 mg 的产量。

实施例 2

光谱检测

圆二色性光谱(CD)是评价蛋白的二级结构和三级结构的精选方法。芳香区(260-320 nm)中的椭圆率报告了蛋白中的三级接触(即有规则折叠的蛋白的球状结构), 而酰胺区(190-250 nm)中的椭圆率反映出蛋白骨架(即二级结构)中的有规则重复元件。

用 Uvikon XL 双束分光光度计进行蛋白浓度检测。使用 Pace (1995), Protein Sci. 4, 2411-2423 描述的程序测定摩尔消光系数(ϵ_{280})。

用带有恒温池架的 Jasco-720 分光偏振计记录近-UV CD 光谱, 并转换为平均残基椭圆率。缓冲液为 50-150 mM 磷酸钾 pH 7.5、100 mM KCl、1 mM EDTA。通路长度为 0.5 cm 或 1.0 cm, 蛋白浓度为 20-500 μ M。带宽为 2 nm, 扫描速度为 50 nm/分钟, 分辨率为 0.5 nm, 响应为 1 或 2 s。为了改善信噪比, 检测光谱 9 次, 并平均。

用带有恒温池架的 Jasco-720 分光偏振计记录远-UV CD 光谱, 并转换为平均残基椭圆率。缓冲液为 10 mM 磷酸钾 pH 7.5、25 mM KCl、0.5 mM EDTA。通路长度为 0.2 cm, 蛋白浓度在 2.5-20 μ M 之间。带宽为 2 nm, 扫描速度为 50 nm/分钟, 分辨率为 0.5 nm, 响应为 1 或 2 s。为了改善信噪比, 检测光谱 9 次, 并平均。

实施例 3

生物素和钆部分与融合蛋白的偶联

于 10-20 mg/ml 的蛋白浓度分别用 N-羧基-琥珀酰亚胺活化的生物素和钆标记修饰融合多肽的赖氨酸 ϵ -氨基。标记/蛋白比率由 2:1 至 5:1 (mol:mol)变化, 取决于相应的融合蛋白。反应缓冲液为 150 mM 磷酸钾 pH 8.0、100 mM KCl、1 mM EDTA。反应于室温进行 15 分钟, 并通过加入缓冲的 L-赖氨酸至 10 mM 终浓度终止。为避免标记的水解失活, 在无水 DMSO (超低含水量(seccosolv)品质, Merck, Germany) 中制备相应母液。在反应缓冲液中直至 15%的 DMSO 浓度被所研究的所有融合蛋白良好耐受。在偶联反应后, 通过使粗蛋白缀合物穿过凝胶过滤柱(Superdex 200 HiLoad)除去未反应的游离标记。

实施例 4

多肽融合蛋白的免疫反应性

在自动化的 Elecsys® 2010 分析仪(Roche Diagnostics GmbH)中评价不同融合蛋白的免疫反应性(即抗原性)。Elecsys®是 Roche 集团的注册商标。以双抗原夹心形式进行检测。

在 Elecsys® 2010 中的单次检测基于电化学发光。将生物素-缀合物(即捕获物-抗原)固定在包被链霉抗生物素蛋白的磁珠表面上, 而检测物-抗原携带复合的钆阳离子(在氧化还原态 2+和 3+之间切换)作为发信号部分。在存在特异性免疫球蛋白分析物的情况下, 发色钆复合物与固相桥接, 并在激发后于铂电极处发射 620 nm 的光。信号输出

为任意光单位。

在用于捕获物和检测抗原的测定中使用含有 HSV-1 抗原 gG1 的融合多肽(氨基酸 26-189, 参见 SEQ ID NO. 7 和 8)作为 HSV-1 特异性抗原序列。gG1 抗原融合至 SlpA 或 SlyD。在双抗原夹心免疫测定中, 将 SlpA-gG1 (26-189)-生物素缀合物与 SlpA-gG1 (26-189)-钉复合缀合物(本发明)以各 100 ng/ml 的浓度一起应用。同样, 将 SlyD-gG1 (26-189)-生物素缀合物与 SlyD-gG1 (26-189)-钉复合缀合物(比较)以各 100 ng/ml 的浓度一起应用。

评价 gG1(26-189)的融合多肽变体的生物素和钉缀合物以各 100 ng/ml 浓度针对抗 HSV-1 阳性血清的反应性。在所有检测中, 未标记的化学聚合 SlyD-SlyD 在反应缓冲液中作为抗干扰物质, 以避免经由分子伴侣融合单元发生的免疫交叉反应。11 种抗 HSV-1 阴性人血清用作对照。

为评价融合蛋白的热耐受性, 如下对 SlyD-gG1 和 SlpA-gG1 实施苛刻的温度条件: SlyD-gG1 和 SlpA-gG1 (在 50 mM 磷酸钾 pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA 中的蛋白)于 60°C 温育过夜。gG1-生物素缀合物的浓度各自约为 1.3 mg/ml, gG1-钉缀合物的浓度各自约为 0.6 mg/ml。随后, 在 Elecsys® 2010 自动化分析仪中在上述实验条件下评价热应激样品的残余免疫反应性。SlyD-gG1 和 SlpA-gG1 的未挑战样品(储存于 2-8°C)用作参比。

实验结果示于表 1 (图 9)。

表 1 显示了在自动化 Elecsys®分析仪中 SlpA-gG1(26-189)和 SlyD-gG1(26-189)与人抗 HSV-1 阳性血清和抗 HSV-1 阴性血清的免疫反应性, 如在实施例 4 中所述。显示了在 60°C 的苛刻过夜热处理之前和之后两种抗原变体的效力。实验结果清楚表明了热应激的 SlpA-gG1 (26-189)以双重方式超越热应激的 SlyD-gG1 (26-189)的优越性。首先, 采用抗-HSV-1 阳性血清的特异性信号回收率(表 1 的上半部分)对于热挑战的 SlpA 融合多肽显著较高。其次, 采用抗-HSV-1 阴

性血清的非特异性背景信号增加(表1的下半部分)对于热挑战的 SlpA 融合多肽显著较低。我们观察到,在热处理 SlyD 融合多肽之后,背景信号有相当大的增加(参见右列,背景信号增加约 100%-900%)。

然而,在使用本发明的 SlpA 融合多肽时,在热应激后的背景信号增加低得可以忽略,即在除一种情况以外的所有情况下都低于 20%。在该一种情况下,(血清样品 Trina 07/06-533)背景信号增加 48%。完全相同的样品(Trina 07/06-533)表明,在使用 SlyD 融合多肽代替时,背景信号增加 800%以上。这表明,即便采用固有地引起背景信号稍微增加的有难度样品,SlpA 融合多肽也可以显著降低背景信号。在免疫测定的开发中高度需要低背景信号,因为它们能使生产者设定低截取值。一般地讲,就灵敏度而言,测定性能增加需要背景信号降低。原因是产生截取值以上的信号的样品被视为阳性(即假定样品含有所研究的分析物);产生截取值以下的信号的样品被视为阴性。因此,易于理解为什么绝对需要低截取值:截取值越低,含低分析物浓度(并伴随着产生低信号)的样品被正确地发现为低阳性的概率就越高。因此,可通过降低固有地源于其免疫组分的背景信号增加免疫测定的灵敏度。因此,SlpA 作为折叠辅助物的用途明显有助于改善和保证免疫测定的长期灵敏度。

总而言之,含有 SlpA 的融合多肽增加融合靶多肽的稳定性和溶解性,尤其在临界状态(例如热应激)下,所述临界状态经常会损害天然折叠,并导致聚集过程。简而言之,SlpA 是极佳的折叠辅助物,其即便在非常不利的条件下也保护其客户蛋白的完整性,有利于其客户蛋白重折叠为活性构象,并将它们保持在溶液中。因此,与 SlpA 融合,或者更简单地讲,加入 SlpA,是稳定预期用于诊断和其它生物技术用途的蛋白制品中的靶分子的极佳方法。

序 列 表

<110> Roche Diagnostics GmbH (和 Hoffmann La-Roche AG)
Roche Diagnostics GmbH (和 Hoffmann La-Roche AG)

<120> 作为重组蛋白及酶技术的工具的 S1pA

<130> 24705 EP1-IR

<150> EP 08009537.5

<151> 2008-05-26

<160> 17

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 149

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 1

Met Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr
1 5 10 15

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

Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu
 35 40 45

Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser
 50 55 60

Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln

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

Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile
 245 250 255

Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr
 260 265 270

Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu
 275 280 285

Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp
 290 295 300

Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Leu Glu His His His
 305 310 315 320

His His His

<210> 4

<211> 494

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 融合多肽串联的 SlpA 和 gp41

<400> 4

Met Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr
 1 5 10 15

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

Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu
 35 40 45

Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser
50 55 60

Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln
65 70 75 80

Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly
85 90 95

Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val
100 105 110

Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro
115 120 125

Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp
130 135 140

Pro Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn
165 170 175

Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr
180 185 190

Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly
195 200 205

Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys
210 215 220

Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly
225 230 235 240

Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met
 245 250 255

Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met
 260 265 270

Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser
 275 280 285

Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe
 290 295 300

Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp Pro Ala Leu Glu Ala Gly Gly Gly
 305 310 315 320

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 325 330 335

Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly
 340 345 350

Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln
 355 360 365

His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Gln Leu Gln Ala Arg
 370 375 380

Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile
 385 390 395 400

Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn
 405 410 415

Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr
 420 425 430

Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His

	85		90		95
Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val					
	100		105		110
Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln					
	115		120		125
Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu					
	130		135		140
Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His					
	145		150		155
					160
Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly					
	165		170		175
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val					
	180		185		190
Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu					
	195		200		205
Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp					
	210		215		220
Gly Thr Lys Gln Leu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu					
	225		230		235
					240
Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile					
	245		250		255
Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu					
	260		265		270
Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile					
	275		280		285

Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
 290 295 300

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala
 305 310 315 320

Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Leu Glu
 325 330 335

His His His His His His
 340

<210> 6

<211> 535

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 融合多肽串联的 SlyD-gp41

<400> 6

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
 1 5 10 15

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

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
 35 40 45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
 50 55 60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
 65 70 75 80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
 85 90 95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
 100 105 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 115 120 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
 130 135 140

Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
 145 150 155 160

Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 165 170 175

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Ala Lys
 180 185 190

Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg Thr Glu Asp Gly Val
 195 200 205

Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tyr Leu His Gly
 210 215 220

His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly His Glu
 225 230 235 240

Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala Asn Asp Ala Tyr Gly
 245 250 255

Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp Val Phe Met
 260 265 270

Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala Glu Thr Asp
 275 280 285

Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His Val
 290 295 300

Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe Asn
 305 310 315 320

Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His
 325 330 335

Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp
 340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 355 360 365

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu
 370 375 380

Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala Ile Glu
 385 390 395 400

Ala Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Gln Leu
 405 410 415

Gln Ala Arg Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu
 420 425 430

Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val
 435 440 445

Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn
 450 455 460

Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser

65		70		75		80
Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly						
	85		90		95	
Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val						
	100		105		110	
Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro						
	115		120		125	
Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp						
	130		135		140	
Pro Ala Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser						
145		150		155		160
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Thr Asn Val Ser						
	165		170		175	
Ser Thr Thr Gln Pro Gln Leu Gln Thr Thr Gly Arg Pro Ser His Glu						
	180		185		190	
Ala Pro Asn Met Thr Gln Thr Gly Thr Thr Asp Ser Pro Thr Ala Ile						
	195		200		205	
Ser Leu Thr Thr Pro Asp His Thr Pro Pro Met Pro Ser Ile Gly Leu						
	210		215		220	
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gly Asp Gly Glu His Leu Glu						
225		230		235		240
Gly Gly Asp Gly Thr Arg Asp Thr Leu Pro Gln Ser Pro Gly Pro Ala						
	245		250		255	
Phe Pro Leu Ala Glu Asp Val Glu Lys Asp Lys Pro Asn Arg Pro Val						
	260		265		270	

Val Pro Ser Pro Asp Pro Asn Asn Ser Pro Ala Arg Pro Glu Thr Ser
275 280 285

Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Ile Ile Gly Pro Leu Ala Thr Arg Pro
290 295 300

Thr Thr Arg Leu Thr Ser Lys Gly Arg Pro Leu Val Pro Thr Pro Gln
305 310 315 320

His Thr Pro Leu Phe Ser Phe Leu Thr Ala Ser Pro Ala Leu Asp Leu
325 330 335

Glu His His His His His His
340

<210> 8

<211> 360

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 融合多肽 SlyD-gG1 (HSV)

<400> 8

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
1 5 10 15

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

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
35 40 45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
50 55 60

Glu Gly Gly Asp Gly Thr Arg Asp Thr Leu Pro Gln Ser Pro Gly Pro
 260 265 270

Ala Phe Pro Leu Ala Glu Asp Val Glu Lys Asp Lys Pro Asn Arg Pro
 275 280 285

Val Val Pro Ser Pro Asp Pro Asn Asn Ser Pro Ala Arg Pro Glu Thr
 290 295 300

Ser Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Ile Ile Gly Pro Leu Ala Thr Arg
 305 310 315 320

Pro Thr Thr Arg Leu Thr Ser Lys Gly Arg Pro Leu Val Pro Thr Pro
 325 330 335

Gln His Thr Pro Leu Phe Ser Phe Leu Thr Ala Ser Pro Ala Leu Asp
 340 345 350

Leu Glu His His His His His His
 355 360

<210> 9

<211> 199

<212> PRT

<213> 多杀性巴氏杆菌(Pasteurella multocida)

<400> 9

Met Lys Ile Ala Lys Asn Val Val Val Ser Ile Ala Tyr Gln Val Arg
 1 5 10 15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ala Pro Val Asn Gln Pro Leu
 20 25 30

Glu Tyr Leu Gln Gly His Asn Asn Leu Val Ile Gly Leu Glu Asn Ala
 35 40 45

Leu Glu Gly Lys Ala Val Gly Asp Lys Phe Glu Val Arg Val Lys Pro
50 55 60

Glu Glu Ala Tyr Gly Glu Tyr Asn Glu Asn Met Val Gln Arg Val Pro
65 70 75 80

Lys Asp Val Phe Gln Gly Val Asp Glu Leu Val Val Gly Met Arg Phe
85 90 95

Ile Ala Asp Thr Asp Ile Gly Pro Leu Pro Val Val Ile Thr Glu Val
100 105 110

Ala Glu Asn Asp Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
115 120 125

Glu Leu Leu Phe Ser Val Glu Val Val Ala Thr Arg Glu Ala Thr Leu
130 135 140

Glu Glu Ile Ala His Gly His Ile His Gln Glu Gly Gly Cys Cys Gly
145 150 155 160

Gly His His His Asp Ser Asp Glu Glu Gly His Gly Cys Gly Cys Gly
165 170 175

Ser His His His His Glu His Glu His His Ala His Asp Gly Cys Cys
180 185 190

Gly Asn Gly Gly Cys Lys His
195

<210> 10

<211> 156

<212> PRT

<213> 多杀性巴氏杆菌

<400> 10

Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
 1 5 10 15

Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
 20 25 30

Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
 35 40 45

Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
 50 55 60

Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
 65 70 75 80

Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
 85 90 95

Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
 100 105 110

Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
 115 120 125

Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
 130 135 140

Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
 145 150 155 160

Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
 165 170 175

Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
 180 185 190

Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn

195	200	205
Ile Lys Lys Gly Gly Lys	Ile Lys Leu Val	Ile Pro Pro Glu Leu Ala
210	215	220
Tyr Gly Lys Ala Gly Val	Pro Gly Ile Pro Pro	Asn Ser Thr Leu Val
225	230	235 240
Phe Asp Val Glu Leu Leu	Asp Val Lys Pro Ala Pro	Lys Ala Asp Ala
245	250	255
Lys Pro Glu Ala Asp Ala	Lys Ala Ala Asp Ser Ala	Lys Lys
260	265	270
<210> 12		
<211> 245		
<212> PRT		
<213> 大肠杆菌		
<400> 12		
Ala Glu Ala Ala Lys Pro	Ala Thr Ala Ala Asp Ser	Lys Ala Ala Phe
1	5	10 15
Lys Asn Asp Asp Gln Lys	Ser Ala Tyr Ala Leu Gly	Ala Ser Leu Gly
20	25	30
Arg Tyr Met Glu Asn Ser	Leu Lys Glu Gln Glu Lys	Leu Gly Ile Lys
35	40	45
Leu Asp Lys Asp Gln Leu	Ile Ala Gly Val Gln Asp	Ala Phe Ala Asp
50	55	60
Lys Ser Lys Leu Ser Asp	Gln Glu Ile Glu Gln Thr	Leu Gln Ala Phe
65	70	75 80
Glu Ala Arg Val Lys Ser	Ser Ala Gln Ala Lys Met	Glu Lys Asp Ala

	85	90	95
Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys			
	100	105	110
Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val			
	115	120	125
Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val			
	130	135	140
Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr			
145	150	155	160
Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly			
	165	170	175
Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu			
	180	185	190
Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile			
	195	200	205
Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys			
	210	215	220
Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala			
225	230	235	240
Asp Ser Ala Lys Lys			
	245		

<210> 13

<211> 241

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> EBVNA-1 401-641, 半胱氨酸变为丙氨酸

<400> 13

Gly Arg Arg Pro Phe Phe His Pro Val Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu
1 5 10 15

Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro Asp Gly Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly
 20 25 30

Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala Asp Asp Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr
 35 40 45

Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp Gly Gly Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp
 50 55 60

Phe Gly Lys His Arg Gly Gln Gly Gly Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn
65 70 75 80

Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ser His Val Glu Arg
 85 90 95

Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp Val Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly
 100 105 110

Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile
 115 120 125

Pro Gln Ala Arg Leu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala
 130 135 140

Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Ala
145 150 155 160

Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys
 165 170 175

Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Ala Asn
 180 185 190

Ile Arg Val Thr Val Ala Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro
 195 200 205

Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly
 210 215 220

Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln
 225 230 235 240

Glu

<210> 14

<211> 176

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> EBV p18, 1-176, 半胱氨酸变为丙氨酸

<400> 14

Met Ala Arg Arg Leu Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gly Arg Leu Glu Ala
 1 5 10 15

Asp Phe Pro Asp Ser Pro Leu Leu Pro Lys Phe Gln Glu Leu Asn Gln
 20 25 30

Asn Asn Leu Pro Asn Asp Val Phe Arg Glu Ala Gln Arg Ser Tyr Leu
 35 40 45

Val Phe Leu Thr Ser Gln Phe Ala Tyr Glu Glu Tyr Val Gln Arg Thr
 50 55 60

Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala
 50 55 60

Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
 65 70

<210> 16

<211> 162

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> EBV p23, 1-162, 半胱氨酸变为丙氨酸

<400> 16

Met Ser Ala Pro Arg Lys Val Arg Leu Pro Ser Val Lys Ala Val Asp
 1 5 10 15

Met Ser Met Glu Asp Met Ala Ala Arg Leu Ala Arg Leu Glu Ser Glu
 20 25 30

Asn Lys Ala Leu Lys Gln Gln Val Leu Arg Gly Gly Ala Ala Ala Ser
 35 40 45

Ser Thr Ser Val Pro Ser Ala Pro Val Pro Pro Pro Glu Pro Leu Thr
 50 55 60

Ala Arg Gln Arg Glu Val Met Ile Thr Gln Ala Thr Gly Arg Leu Ala
 65 70 75 80

Ser Gln Ala Met Lys Lys Ile Glu Asp Lys Val Arg Lys Ser Val Asp
 85 90 95

Gly Val Thr Thr Arg Asn Glu Met Glu Asn Ile Leu Gln Asn Leu Thr
 100 105 110

Leu Arg Ile Gln Val Ser Met Leu Gly Ala Lys Gly Gln Pro Ser Pro
 115 120 125

Gly Glu Gly Thr Arg Pro Arg Glu Ser Asn Asp Pro Asn Ala Thr Arg
 130 135 140

Arg Ala Arg Ser Arg Ser Arg Gly Arg Glu Ala Lys Lys Val Gln Ile
 145 150 155 160

Ser Asp

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 用于融合蛋白表达盒的人工接头

<400> 17

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 20

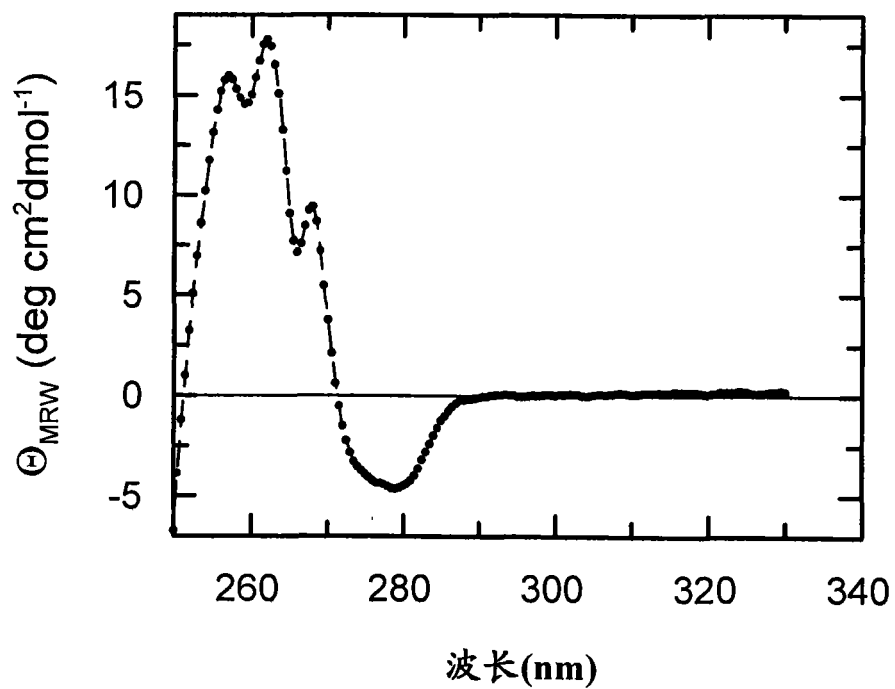


图 1

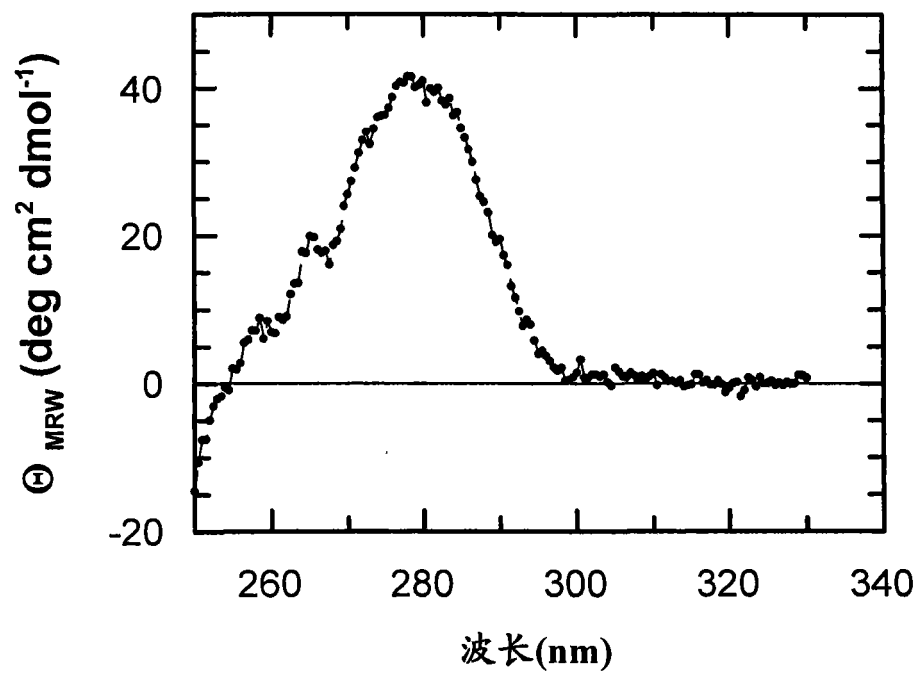


图 2

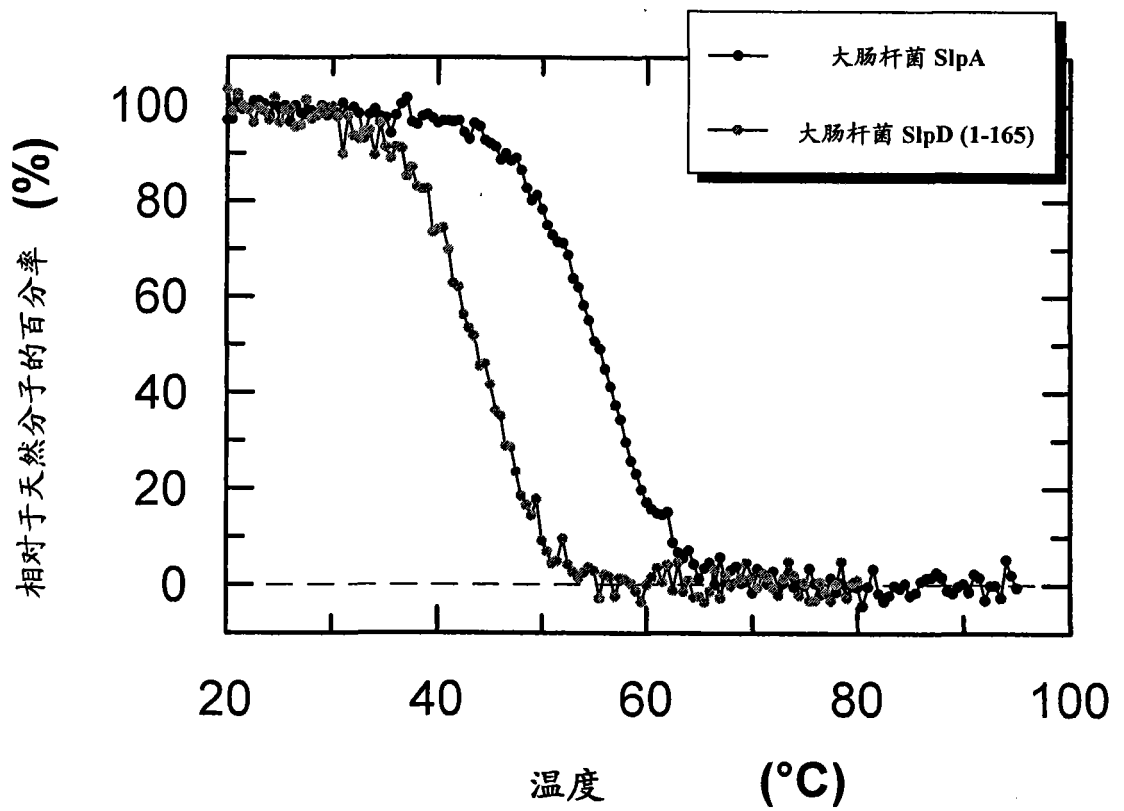


图 3

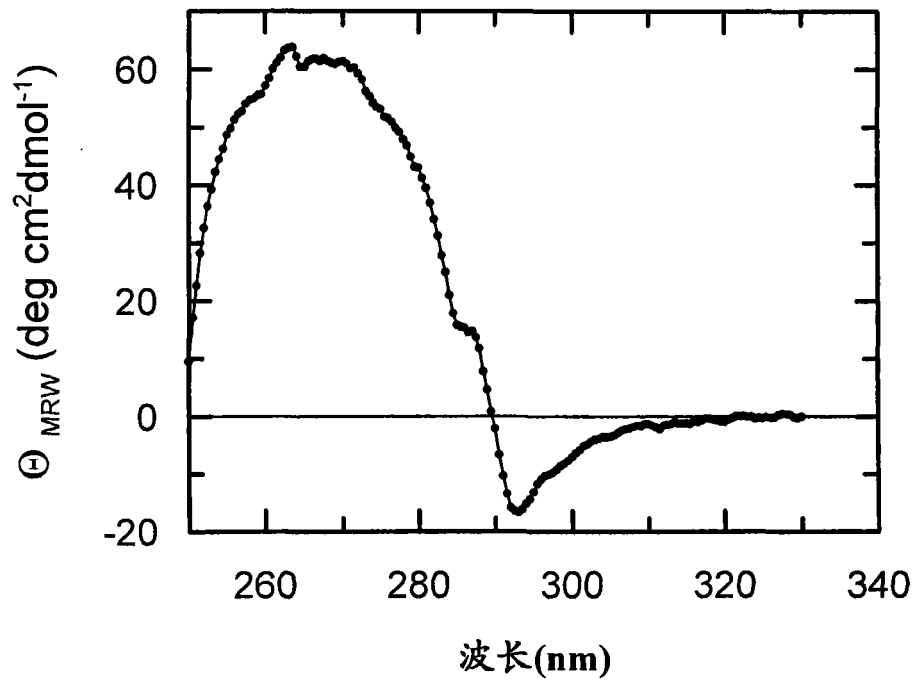


图 4

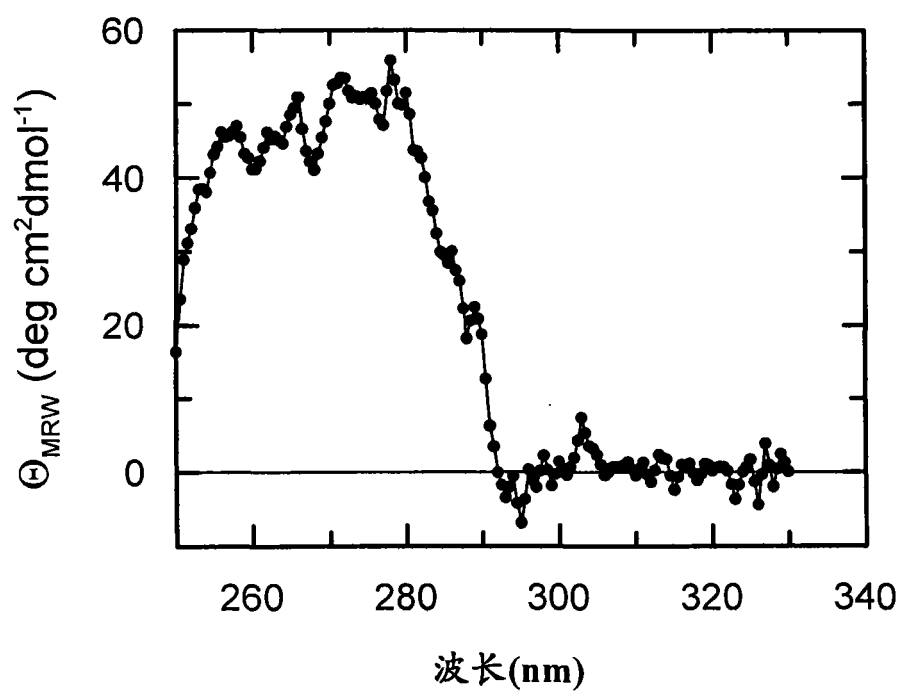


图 5

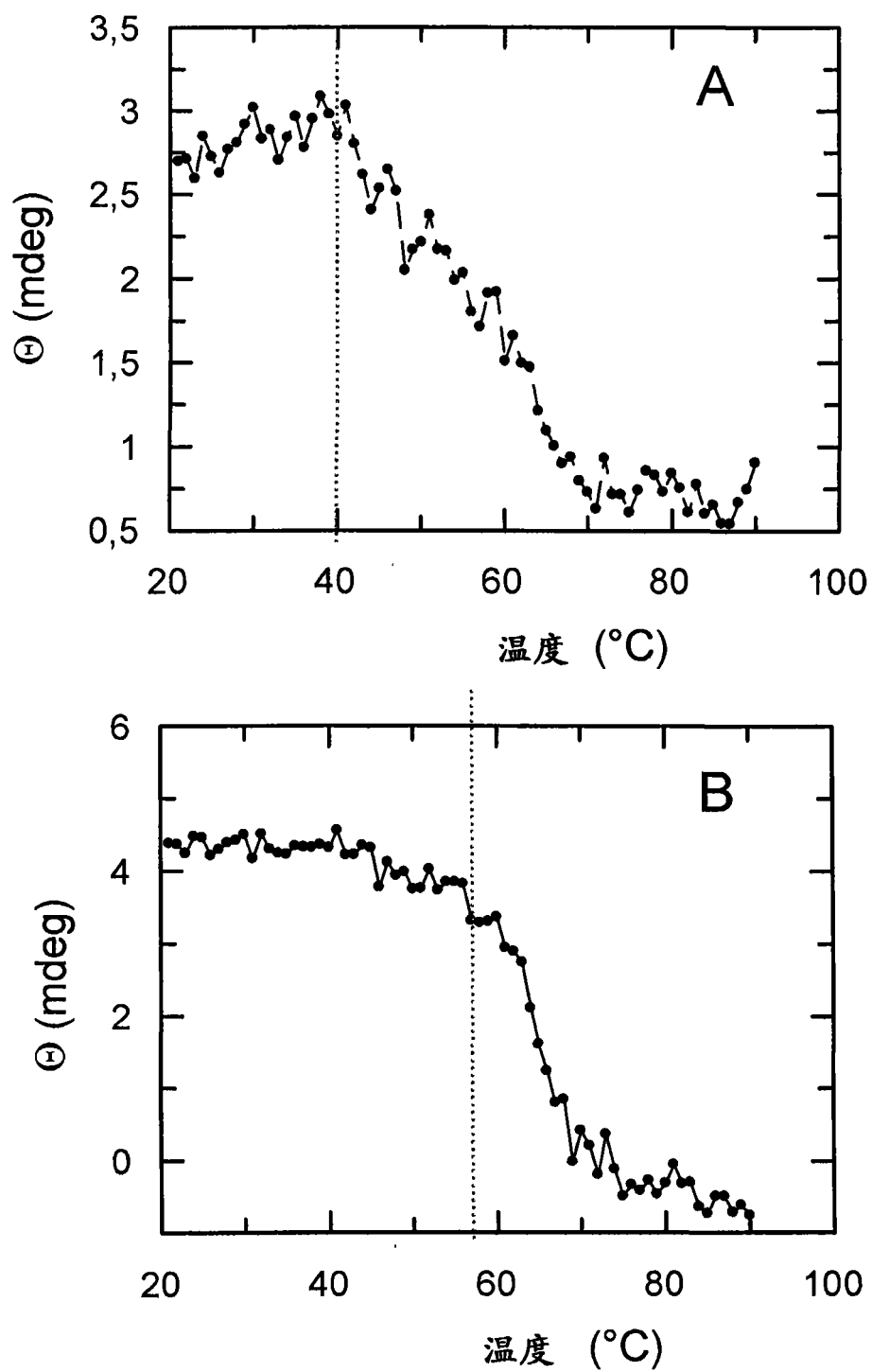


图 6

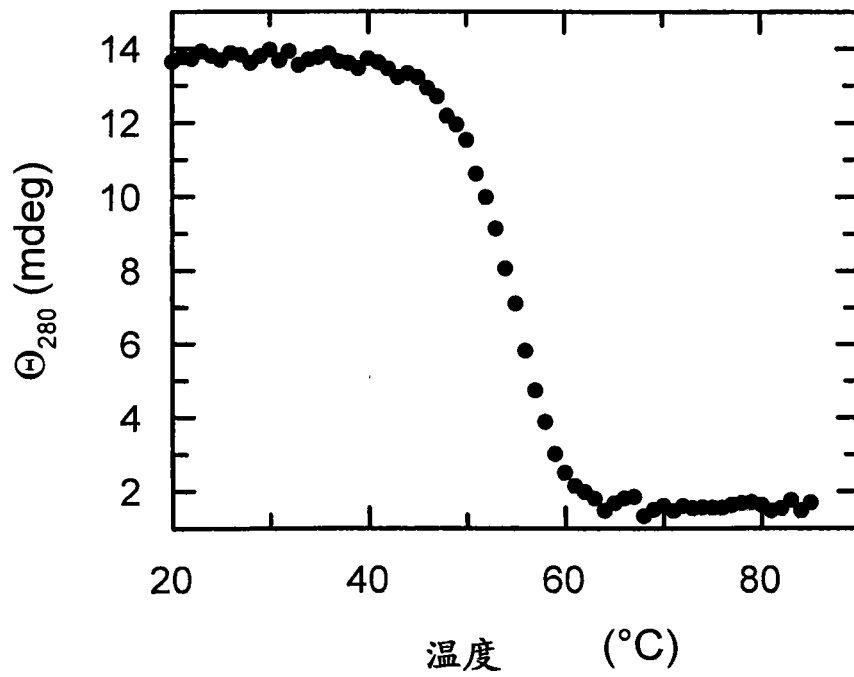


图 7

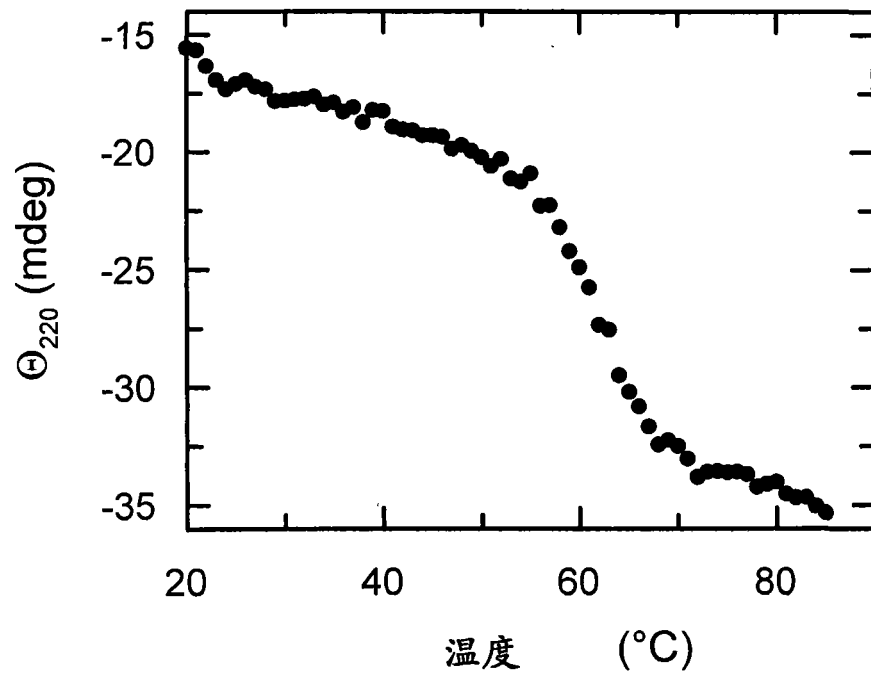


图 8

	SlpA-gGI(26-189)		SlpA-gGI(26-189)		SlpA-gGI(26-189)		SlpA-gGI(26-189)		SlpA-gGI(26-189)		SlpA-gGI(26-189)	
	参比抗原 信号(计数)	热应激抗原 (60°C) 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	热应激抗原 (60°C) 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	热应激抗原 (60°C) 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	热应激抗原 (60°C) 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	热应激抗原 (60°C) 信号(计数)	信号回收率 热应激后 (%)	信号回收率 热应激后 (%)
抗-HSV-1阳性血清												
SB neg109	241954	180593	152719	100019							75	66
Trina 1115128	181472	130598	119166	74423							72	62
Trina 4444479	1176920	806119	636858	293919							68	46
trina LQ12733	1139220	917258	782170	455511							81	58
Trina 07/06-531	35549	34581	24915	22257							97	89
Trina1115128	183623	129815	122962	56036							71	46
IBS-4414	709157	531756	508355	256149							75	50
IBS-4528	199456	144827	135291	70244							73	52
IBS-4451	110236	76853	71378	34602							70	48
IBS-4450	312373	235076	219408	123093							75	56
IBS-4532	392030	292690	286622	155743							75	54
IBS-4531	409398	287665	294428	141952							70	48
IBS-4530	713555	521780	469525	290578							73	62
SB109	247457	189436	158065	96283							77	61
在热应激后的背景 信号增加 (%)												
抗-HSV-1阴性血清												
Trina 07/06-512	606	680	1146	2619							12	128
Trina 07/06-514	608	685	1340	4783							13	257
Trina 07/06-518	604	697	1426	4014							15	181
Trina 07/06-524	642	714	1403	5995							11	327
Trina 07/06-526	636	732	1432	6050							15	322
Trina 07/06-533	669	990	1429	13566							48	849
Trina 07/06-537	631	707	1402	3323							12	137
Trina 07/06-542	623	719	1448	2899							15	100
705 2197	644	749	1428	7027							16	392
IBS-4452	629	742	1421	4598							18	224
IBS-1092	657	731	1422	7227							11	408

表 1

图 9

专利名称(译)	作为重组蛋白和酶技术的工具的SlpA		
公开(公告)号	CN101591665A	公开(公告)日	2009-12-02
申请号	CN200910142690.3	申请日	2009-05-25
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	E法茨 P沙尔施米特 U施米特 C肖尔茨		
发明人	E·法茨 P·沙尔施米特 U·施米特 C·肖尔茨		
IPC分类号	C12N15/62 C12N15/63 C12N1/21 C12P21/02 C07K19/00 G01N33/53 C07K16/00 A61K39/00 G01N33/536 C12R1/19 C12R1/125		
CPC分类号	G01N33/54393 C12N9/90 G01N33/536 C12N15/62 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 Y02A50/57		
代理人(译)	梁谋		
优先权	2008009537 2008-05-26 EP		
其他公开文献	CN101591665B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及作为重组蛋白和酶技术工具的SlpA。具体来说，本发明涉及编码含有SlpA分子伴侣和靶多肽的融合蛋白的重组DNA分子，编码所述融合蛋白的相应表达载体以及用所述表达载体转化的宿主细胞，其中人FK506结合蛋白(FKBP)被排除作为靶多肽；还涉及生产所述融合蛋白的方法；所述融合蛋白作为结合配偶体的用途，或作为在免疫测定中降低干扰的工具的用途；所述融合蛋白用于产生抗体的用途和在疫苗生产中的用途；所述融合蛋白在免疫测定中检测分析物的方法，以及含有所述融合蛋白的试剂盒；SlpA在免疫测定中降低干扰的用途，及其在蛋白制品中作为添加剂和在生物技术应用中作为折叠辅助物的用途。

