



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116406370 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 07

(21) 申请号 202180072463.7

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

(22) 申请日 2021.10.27

专利代理师 张国梁 张莹

(30) 优先权数据

2020-179557 2020.10.27 JP

(51) Int.Cl.

C07K 5/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.04.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/039582 2021.10.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/092132 JA 2022.05.05

(71) 申请人 出光兴产株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 小池和好 大岩圣佳

权利要求书1页 说明书16页  
序列表35页 附图7页

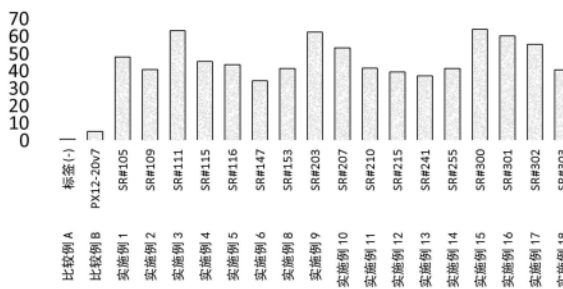
(54) 发明名称

肽标签和包含其的附加有标签的蛋白

(57) 摘要

具有下述的序列、由3~8个氨基酸残基组成的肽。 $X_m Z_n P U_q \dots (I)$  此处,P是脯氨酸,Z是独立选自赖氨酸(K)和天冬酰胺(N)的氨基酸残基,X是独立选自异亮氨酸(I)、苯丙氨酸(F)、甲硫氨酸(M)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)、组氨酸(H)、半胱氨酸(C)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)的氨基酸残基,U是独立选自精氨酸(R)、甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、赖氨酸(K)、苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、天冬酰胺(N)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)的氨基酸残基。m是0、1、2或3,n是1或2,q是0、1、2或3。

大肠杆菌 GFP2 表达量 (无标签比)



1. 肽,其具有下述的序列,由3~8个氨基酸残基组成,  
 $X_m Z_n P U_q \cdots$  (I)  
此处,P是脯氨酸,  
Z是独立选自赖氨酸(K)和天冬酰胺(N)的氨基酸残基,  
X是独立选自异亮氨酸(I)、苯丙氨酸(F)、甲硫氨酸(M)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)、组氨酸(H)、半胱氨酸(C)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)的氨基酸残基,  
U是独立选自精氨酸(R)、甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、赖氨酸(K)、苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、天冬酰胺(N)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)的氨基酸残基,  
m是0、1、2或3,n是1或2,q是0、1、2或3。
2. 权利要求1中所述的肽,其由3~6个氨基酸残基组成。
3. 权利要求1或2中所述的肽,其中,m是0或1,q是0或1。
4. 权利要求1~3的任一项中所述的肽,其具有序列编号1~18、序列编号65~71、NKP、KNP、NNP、INP、MNP、QNP、IKP、HKP、SKP、MKP、RKP中的任一种氨基酸序列。
5. 附加有标签的蛋白,其包含权利要求1~4的任一项中所述的肽和有用蛋白。
6. 权利要求5中所述的附加有标签的蛋白,其中,有用蛋白是酶、细胞因子、抗体、或荧光蛋白。
7. DNA,其编码权利要求5或6中所述的附加有标签的蛋白。
8. 重组载体,其包含权利要求7中所述的DNA。
9. 转化体,其由权利要求7中所述的DNA或权利要求8中所述的重组载体转化而成。
10. 附加有标签的蛋白的制备方法,其特征在于,培养权利要求9中所述的转化体,使附加有标签的蛋白表达和蓄积,回收附加有标签的蛋白。
11. 附加有标签的蛋白的制备方法,其特征在于,将权利要求7中所述的DNA或从其转录的RNA导入无细胞表达系统,使附加有标签的蛋白表达和蓄积,回收附加有标签的蛋白。

## 肽标签和包含其的附加有标签的蛋白

### 技术领域

[0001] 本发明涉及肽标签和包含其的附加有标签的蛋白、编码其的DNA、包含该DNA的转化体以及附加有标签的蛋白的制备方法。

### 背景技术

[0002] 由于基因重组技术的发展,在今日,通常进行通过异源表达的有用蛋白的生产。在通过异源表达的有用蛋白的生产中,启动子和终止子的选择、翻译增强子、导入基因的密码子改变、蛋白的细胞内输送和定位等作为使蛋白的表达、蓄积量提高的策略被研究。例如,在专利文献1中公开了使细菌毒素蛋白在植物等中表达的技术,公开了用以一定间隔配置脯氨酸的肽接头连接细菌毒素蛋白使其表达(专利文献1)。

[0003] 此外,除此之外,开发了几种通过使肽标签与目标蛋白连接使其表达提高的技术(专利文献2~6、非专利文献1~3)。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:专利5360727号说明书

[0007] 专利文献2:专利5273438号说明书

[0008] 专利文献3:国际公开W02016/204198号小册子

[0009] 专利文献4:国际公开W02017/115853号小册子

[0010] 专利文献5:国际公开W02020/045530号小册子

[0011] 专利文献6:美国专利公开20090137004号公报

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献1:Smith,D.B.and Johnson,K.S.,:Gene,67,31,1988

[0014] 非专利文献2:Marblestone,J.G.et al.:Protein Sci.,15,182,2006

[0015] 非专利文献3:di Guan,C.et al.:Gene,67,21,1988,

### 发明内容

[0016] 发明要解决的课题

[0017] 通过应用专利文献1中公开的以一定间隔配置脯氨酸的肽接头连接毒素蛋白,毒素融合蛋白在植物内的高蓄积化成为可能。此外,在专利文献4、5中,研究了肽标签中脯氨酸间的氨基酸,提供了适于蛋白的高表达、可溶性表达的肽标签。但是,这些肽接头、肽标签以一定间隔配置的脯氨酸的存在为前提,为了使作为蛋白高表达标签的性能提高,有进一步研究序列的余地。因此,本发明的课题是提供新的肽标签,其在使目标蛋白在宿主细胞、无细胞表达系统中表达的情形中,能够通过与该目标蛋白结合而增加目标蛋白的表达量。

[0018] 用于解决课题的手段

[0019] 本发明人为了提高肽标签的性能进行序列的研究。并且,应用具有在脯氨酸(P)前配置赖氨酸(K)或天冬酰胺(N)的4~8个氨基酸残基的短氨基酸序列的肽标签,研究附加该

- 标签的蛋白的表达量时,发现目标蛋白的表达量显著地提高。本发明基于这样的知识完成。
- [0020] 即,本发明如下。
- [0021] [1]肽,其具有下述的序列,由3~8个氨基酸残基组成:
- [0022]  $X_m Z_n P U_q \cdot \cdot \cdot (I)$
- [0023] 此处,P是脯氨酸,
- [0024] Z是独立选自赖氨酸(K)和天冬酰胺(N)的氨基酸残基,
- [0025] X是独立选自异亮氨酸(I)、苯丙氨酸(F)、甲硫氨酸(M)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)、组氨酸(H)、半胱氨酸(C)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)的氨基酸残基,
- [0026] U是独立选自精氨酸(R)、甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、赖氨酸(K)、苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、天冬酰胺(N)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)的氨基酸残基。
- [0027] m是0、1、2或3,n是1或2,q是0、1、2或3。
- [0028] [2][1]中记载的肽,其由3~6个氨基酸残基组成。
- [0029] [3][1]或[2]中记载的肽,其中,m是0或1,q是0或1。
- [0030] [4][1]~[3]的任一项中记载的肽,其具有序列编号1~18、序列编号65~71、NKP、KNP、NNP、INP、MNP、QNP、IKP、HKP、SKP、MKP、RKP中的任一种氨基酸序列。
- [0031] [5]附加有标签的蛋白,其包含[1]~[4]的任一项中记载的肽和有用蛋白。
- [0032] [6][5]中记载的附加有标签的蛋白,其中,有用蛋白是酶、细胞因子、抗体、或荧光蛋白。
- [0033] [7]DNA,其编码[5]或[6]中记载的附加有标签的蛋白。
- [0034] [8]重组载体,其包含[7]中记载的DNA。
- [0035] [9]转化体,其由[7]中记载的DNA或[8]中记载的重组载体转化而成。
- [0036] [10]附加有标签的蛋白的制备方法,其特征在于,培养[9]中记载的转化体,使附加有标签的蛋白表达和蓄积,回收附加有标签的蛋白。
- [0037] [11]附加有标签的蛋白的制备方法,其特征在于,将[7]中记载的DNA或从其转录的RNA导入无细胞表达系统,使附加有标签的蛋白表达和蓄积,回收附加有标签的蛋白。
- [0038] 发明效果
- [0039] 通过使用本发明的肽标签,可以使目标蛋白的表达量提高。因此,在应用酵母、大肠杆菌、短芽孢杆菌等宿主细胞或无细胞表达系统的蛋白的生产中 useful。
- [0040] 附图简单说明
- [0041] [图1]是附加有标签的蛋白表达载体(N末端侧附加有标签)构建的模式图。
- [0042] [图2]是用于大肠杆菌和无细胞的附加有标签的蛋白表达载体(C末端侧附加有标签)构建的模式图。
- [0043] [图3]是大肠杆菌-解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)穿梭载体的模式图。
- [0044] [图4]是用于解脂耶氏酵母的附加有标签的蛋白表达载体(N末端侧附加有标签)构建的模式图。
- [0045] [图5]是用于解脂耶氏酵母的附加有标签的蛋白表达载体(C末端侧附加有标签)构建的模式图。
- [0046] [图6]是显示无细胞表达系统中附加有标签的绿色荧光蛋白(GFP2)的表达量的

图。显示以无标签GFP2(比较例A)的表达量为1时的相对值。

[0047] [图7]是显示大肠杆菌(BL21)中附加有标签的GFP2的IPTG诱导时的表达量的图(实施例1~6、8~18)。显示以无标签GFP2(比较例A)的表达量为1时的相对值。

[0048] [图8]是显示大肠杆菌(BL21)中附加有标签的GFP2的IPTG诱导时的荧光强度的图(实施例1~6、8~18)。显示以无标签GFP2(比较例A)的荧光强度为1时的相对值。

[0049] [图9]是显示大肠杆菌(BL21)中附加有标签的GFP2的IPTG诱导时的表达量的图(实施例19~36)。显示以无标签GFP2(比较例A)的表达量为1时的相对值。

[0050] [图10]是显示大肠杆菌(BL21)中附加有标签的GFP2的IPTG诱导时的荧光强度的图(实施例19~36)。显示以无标签GFP2(比较例A)的荧光强度为1时的相对值。

[0051] [图11]是显示大肠杆菌(BL21)中N末端附加有标签的VHH抗体的表达量的图。显示以无标签VHH抗体(比较例A)的表达量为1时的相对值。

[0052] [图12]是显示大肠杆菌(BL21)中C末端附加有标签的VHH抗体的表达量的图。显示以无标签VHH抗体(比较例A)的表达量为1时的相对值。

[0053] [图13]是显示解脂耶氏酵母中N末端侧附加有标签的GFP2的IPTG诱导时的表达量的图。显示以无标签GFP2的表达量为1时的相对值。

[0054] [图14]是显示解脂耶氏酵母中C末端侧附加有标签的GFP2的IPTG诱导时的表达量的图。显示以无标签GFP2的表达量为1时的相对值。

[0055] 发明的具体实施方式

[0056] 本发明的肽(也称为肽标签)具有下述的氨基酸序列。

[0057]  $X_m Z_n P U_q \cdots (I)$

[0058] 此处,P是脯氨酸,Z是独立选自赖氨酸(K)和天冬酰胺(N)的氨基酸残基,n是1或2。

[0059] 因此,通式(I)中包含下述的6种序列。

[0060]  $X_m K P U_q \cdots (I-1)$

[0061]  $X_m K N P U_q \cdots (I-2)$

[0062]  $X_m K K P U_q \cdots (I-3)$

[0063]  $X_m N P U_q \cdots (I-4)$

[0064]  $X_m N K P U_q \cdots (I-5)$

[0065]  $X_m N N P U_q \cdots (I-6)$

[0066] X是分别独立选自异亮氨酸(I)、苯丙氨酸(F)、甲硫氨酸(M)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)、组氨酸(H)、半胱氨酸(C)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)的氨基酸残基,

[0067]  $X_m$ 意味着X是连续m个,该情形中的m个的X可以是选自I、F、M、A、V、W、Y、H、C、R、Q、S的相同氨基酸残基,也可以是不同氨基酸残基。

[0068] m是0、1、2或3,优选0或1,更优选1。另外,在上述(I-1)或(I-4)的序列中,优选m不是0。

[0069] U是分别独立选自精氨酸(R)、甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、赖氨酸(K)、苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、天冬酰胺(N)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)的氨基酸残基。例如,U是甘氨酸(G)。

[0070]  $U_q$ 意味着U是连续q个,该情形中的q个的U可以是选自R、G、S、K、T、L、N、H、I的相同氨基酸残基,也可以是不同氨基酸残基。

- [0071] q是0、1、2或3,优选0或1。
- [0072] 本发明的肽的长度是3~8个氨基酸,更优选3~7个氨基酸,进一步优选3~6个氨基酸。
- [0073] 作为本发明的肽的具体例,没有特别限制,例如,由后述的表1所示的序列编号1~18、序列编号65~71、NKP、KNP、NNP、INP、MNP、QNP、IKP、HKP、SKP、MKP、RKP中的任一种表示的氨基酸序列组成的肽。
- [0074] 本发明的附加有标签的蛋白是本发明的肽标签与目标蛋白结合的那种(也称为标签与目标蛋白的融合蛋白)。可以是肽标签与目标蛋白的N末端结合,可以是肽标签与目标蛋白的C末端结合,也可以是肽标签与目标蛋白的N末端与C末端两者结合。可以是肽标签与目标蛋白的N末端和/或C末端直接结合,也可以经由1~数个氨基酸(例如,1~5个氨基酸)的序列结合。1~数个氨基酸的序列只要是对附加有标签的蛋白的功能、表达量没有不良影响的序列则可以是任意的序列,通过作为蛋白酶识别序列,表达、纯化后可以将肽标签从有用蛋白切离。作为蛋白酶识别序列,示例因子Xa识别序列。此外,本发明的附加有标签的蛋白也可以包含His标签、HN标签、FLAG标签等检测或纯化等所需的其它标签序列。
- [0075] 作为本发明的附加有标签的蛋白中包含的有用蛋白,没有特别限制,列举生长因子、激素、细胞因子、血液蛋白、酶、抗原、抗体、转录因子、受体、荧光蛋白或它们的部分肽等。
- [0076] 作为酶,例如,列举脂肪酶、蛋白酶、类固醇合成酶、激酶、磷酸酶、木聚糖酶、酯酶、甲基化酶、去甲基酶、氧化酶、还原酶、纤维素酶、芳香化酶、胶原酶、转谷氨酰胺酶、糖苷酶和壳多糖酶。
- [0077] 作为生长因子,例如,列举上皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、转化生长因子(TGF)、神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、血小板衍生长因子(PDGF)、促红细胞生成素(EPO)、促血小板生成素(TPO)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子(HGF)。
- [0078] 作为激素,例如,列举胰岛素、胰高血糖素、生长抑素、生长激素、甲状旁腺素、催乳素、瘦素、降钙素。
- [0079] 作为细胞因子,例如,列举白细胞介素、干扰素(IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ )、肿瘤坏死因子(TNF)。
- [0080] 作为血液蛋白,例如,列举凝血酶、血清白蛋白、VII因子、VIII因子、IX因子、X因子、组织纤溶酶原活化因子。
- [0081] 作为抗体,例如,列举完整抗体、Fab、F(ab')、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fc融合蛋白、重链(H链)、轻链(L链)、单链Fv(scFv)、sc(Fv)<sub>2</sub>、二硫键Fv(sdFv)、Diabody、VHH抗体。
- [0082] 作为疫苗使用的抗原蛋白只要是能够引起免疫应答的那种则没有特别限制,相应于设想的免疫应答的对象适当选择即可,例如,列举来自病原性细菌的蛋白、来自病原性病毒的蛋白。
- [0083] 本发明的附加有标签的蛋白可以附加用于分泌生产中在宿主细胞发挥功能的分泌信号肽。分泌信号肽在以酵母为宿主的情形中列举转化酶分泌信号、P3分泌信号、 $\alpha$ 因子分泌信号等,在以大肠杆菌为宿主的情形中列举PelB分泌信号,在以短芽孢杆菌为宿主的

情形中列举P22分泌信号。此外,以植物为宿主的情形中,列举来自下列的分泌信号:属于茄科(Solanaceae)、蔷薇科(Rosaceae)、十字花科(Brassicaceae)、菊科(Asteraceae)的植物,进一步优选属于烟草属(*Nicotiana*)、拟南芥属(*Arabidopsis*)、草莓属(*Fragaria*)、莴苣属(*Lactuca*)等的植物,优选烟草(*Nicotianatabacum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、草莓(*Fragaria*×*ananassa*)、莴苣(*Lactuca sativa*)等。

[0084] 进一步,为了在特定的细胞区室表达,本发明的附加有标签的蛋白可以附加内质网滞留信号肽、液泡转移信号肽等运输信号肽。

[0085] 本发明的附加有标签的蛋白可以化学合成,也可以基因工程生产。关于基因工程生产的方法,见后述。

[0086] 本发明的DNA的特征在于包含编码本发明的附加有标签的蛋白的DNA。即,本发明的DNA包含编码有用蛋白的DNA和编码肽标签的DNA。编码有用蛋白的DNA和编码肽标签的DNA读框连接。

[0087] 例如,基于公知的碱基序列,通过通常的基因工程方法,可以得到编码有用蛋白的DNA。

[0088] 此外,对于编码本发明的附加有标签的蛋白的DNA,相应于使该蛋白生产的宿主细胞,表示构成附加有标签的蛋白的氨基酸的密码子被适当改变也是优选的,以便增加杂合蛋白的翻译量。此外,列举选择宿主细胞中使用频率高的密码子、选择GC含量高的密码子、选择宿主细胞的管家基因中使用频率高的密码子的方法。

[0089] 为了使宿主细胞中的表达提高,本发明的DNA可以包含在宿主细胞中发挥功能的增强子序列等。作为增强子,列举Kozak序列、来自植物的醇脱氢酶基因的5' -非翻译区。

[0090] 本发明的DNA可以通过通常的基因工程方法制备,例如,可以通过应用PCR、DNA连接酶等连接编码本发明的肽标签的DNA、和编码有用蛋白的DNA等而构建。

[0091] 本发明的重组载体只要是编码前述附加有标签的蛋白的DNA以可在导入了载体的宿主细胞中表达的方式插入载体内即可。载体只要在宿主细胞中可复制则没有特别限制,例如,列举质粒DNA、病毒DNA等。此外,载体优选包含耐药性基因等的选择标记物。作为具体的质粒载体,例如,示例pTrcHis2载体、pUC119、pBR322、pBluescript II KS+、pYES2、pAUR123、pQE-Tri、pET、pGEM-3Z、pGEX、pMAL、pRI909、pRI910、pBI221、pBI121、pBI101、pIG121Hm、pTrc99A、pKK223、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA I/Neo、p3×FLAG-CMV-14、pCAT3、pcDNA3.1、pCMV等。

[0092] 载体内应用的启动子可以相应于载体被导入的宿主细胞适当选择。例如,在酵母中表达的情形中,可使用GAL1启动子、PGK1启动子、TEF1启动子、ADH1启动子、TPI1启动子、PYK1启动子等。在植物中表达的情形中,可使用花椰菜花叶病毒35S启动子、水稻的肌动蛋白启动子、玉米的泛素启动子、莴苣的泛素启动子等。在大肠杆菌中表达的情形中,列举T7启动子等,在短芽孢杆菌中表达的情形中,列举P2启动子、P22启动子等。可以是可诱导的启动子,例如,除了为可通过IPTG诱导的启动子的lac、tac、trc之外,可以使用可由IAA诱导的trp、可由L-阿拉伯糖诱导的ara、可应用四环素诱导的Pzt-1、可在高温(42℃)诱导的P<sub>L</sub>启动子、为冷休克基因之一的cspA基因的启动子等。

[0093] 此外,按需要,也可以相应于宿主细胞包含终止子序列。

[0094] 例如,通过将DNA构建体用适当的限制性酶切割或通过PCR附加限制酶位点、插入

载体的限制酶位点或多克隆位点,可以制备本发明的重组载体。

[0095] 本发明的转化体的特征在于,由前述DNA或包含其的重组载体转化而成。转化中应用的宿主细胞可以是真核细胞和原核细胞中的任一种。

[0096] 作为真核细胞,优选应用酵母细胞、哺乳动物细胞、植物细胞、昆虫细胞等。作为酵母,列举酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或产朊假丝酵母(*Candida utilis*)或粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)或毕赤酵母(*Pichia pastoris*)或解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、美极梅奇酵母(*Metschnikowia pulcherrima*)等。进一步,也可以应用曲霉(*Aspergillus*)等微生物。作为原核细胞,列举大肠杆菌(*Escherichia coli*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、短芽孢杆菌(*Brevibacillus*)、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)、蓝细菌(Cyanobacteria)、链霉菌(*Streptomyces*)等。作为植物细胞,列举属于莴苣属(*Lactuca*)等的菊科(Asteraceae)、茄科(Solanaceae)、十字花科(Brassicaceae)、蔷薇科(Rosaceae)、藜科(Chenopodiaceae)的植物的细胞等。

[0097] 本发明中应用的转化体可以通过应用通常的基因工程方法、将本发明的重组载体导入宿主细胞而制备。例如,可以应用电穿孔法(Tada, et al., 1990, Theor. Appl. Genet., 80:475)、原生质体法(Gene, 39, 281-286 (1985))、聚乙二醇法(Lazzeri, et al., 1991, Theor. Appl. Genet. 81:437)、利用农杆菌的导入方法(Hood, et al., 1993, Transgenic, Res. 2:218, Hiei, et al., 1994 Plant J. 6:271)、粒子枪法(Sanford, et al., 1987, J. Part. Sci. tech. 5:27)、聚阳离子法(Ohtsuki, et al., FEBS Lett. 1998 May 29; 428(3): 235-40.)等方法。另外,基因表达可以是瞬时表达,也可以是整合入染色体的稳定表达。

[0098] 将本发明的重组载体导入宿主细胞后,可以通过选择标记物的表型选择转化体。此外,通过培养选择的转化体,可以生产前述附加有标签的蛋白。培养中应用的培养基和条件可以相应于转化体的种类适当选择。

[0099] 此外,在宿主细胞是植物细胞的情形中,通过将选择的植物细胞按照常规方法培养,可以再生植物体,可以使前述附加有标签的蛋白蓄积在植物细胞内或植物细胞的细胞膜外。

[0100] 另外,通过将本发明的DNA、从其转录的RNA (mRNA) 或本发明的重组载体导入无细胞表达系统,也可以使附加了本发明的肽标签的蛋白表达。

[0101] 无细胞表达系统只要是具备核糖体等蛋白表达机制的表达系统则没有特别限制,可以是来自大肠杆菌的细胞提取物、来自小麦胚芽的细胞提取物、来自兔网织红细胞的细胞提取物、来自昆虫细胞的细胞提取物等细胞提取物、重构核糖体等因子的蛋白表达系统。

[0102] 培养基或细胞内或无细胞表达系统中蓄积的附加了本发明的肽标签的蛋白可以按照本领域技术人员公知的方法分离纯化。例如,可以通过盐析、乙醇沉淀、超滤、凝胶过滤色谱、离子交换柱色谱、亲和色谱、中高压液相色谱、反相色谱、疏水色谱等已知的适当方法、或组合它们而分离纯化。

[0103] 以下,说明本发明的实施例,但本发明不限于该实施例。

## 实施例

[0104] (1) 编码用于大肠杆菌无细胞表达系统的附加有标签的GFP2蛋白或VHH抗体的各

### 种质粒的构建

[0105] 以下列顺序,分别构建质粒,其用于由大肠杆菌无细胞表达系统或大肠杆菌(BL21)表达向GFP2蛋白或VHH抗体的N末端或C末端附加了各种肽标签(表1)的融合蛋白。

[0106] 将编码GFP2蛋白的人工合成DNA(序列编号42)或编码VHH抗体的人工DNA(序列编号134)插入pUC19改变质粒pUCFa(FASMAC)的EcoRV识别位点,得到质粒pUCFa-GFP2(质粒1)和pUCFa-Amy1D9(质粒2)。

[0107] 使用大肠杆菌和作为无细胞系统表达用质粒的具有T7启动子的pET28a(Invitrogen)(质粒3)。

[0108] 随后,为了向GFP2蛋白或VHH抗体的N末端或C末端附加各种肽标签,以pUCFa-GFP2(质粒1)或pUCFa-Amy1D9(质粒2)为模板,通过表2、3和4所示的模板质粒、正向引物、反向引物的组合实施PCR。在各引物的5'末端附加与质粒3相同的序列。PCR应用KOD-PLUS-Ver.2(东洋纺),以成为2pg/ $\mu$ l模板质粒、0.3 $\mu$ M正向引物、0.3 $\mu$ M反向引物、0.2mM dNTPs、1 $\times$  Buffer for KOD-Plus-Ver.2、1.5mM MgSO<sub>4</sub>、0.02U/ $\mu$ l KOD-PLUS-Ver.2的方式配制50 $\mu$ l反应液,94 $^{\circ}$ C加热5分钟后,进行30个循环的98 $^{\circ}$ C,10秒、60 $^{\circ}$ C,30秒、68 $^{\circ}$ C,40秒的加热处理,最后在68 $^{\circ}$ C加热5分钟。得到的扩增片段用QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen)纯化。

[0109] 质粒3用NcoI、HindIII消化后,应用1.0% SeaKem GTG Agarose通过电泳分离,应用QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)从凝胶提取。

[0110] 混合约50ng份的提取的质粒3的1 $\mu$ l、纯化PCR产物1 $\mu$ l和1 $\mu$ l将液体量调整为3 $\mu$ l后,与In-Fusion HD Cloning Kit(TaKaRa)所附的5 $\times$ In-Fusion HD Enzyme Premix 0.75 $\mu$ l混合,在50 $^{\circ}$ C静置15分钟,其后在冰上静置5分钟。

[0111] 将反应液1 $\mu$ l与感受态细胞DH5- $\alpha$ 15 $\mu$ l混合在冰上静置30分钟后,在42 $^{\circ}$ C加温45秒,在冰上静置2分钟后,添加200 $\mu$ l SOC,在37 $^{\circ}$ C、200rpm振荡1小时。其后,将振荡物的总量涂布于包含100mg/1卡那霉素的2 $\times$ YT琼脂培养基后,在37 $^{\circ}$ C静置培养过夜,得到转化菌落。然后,将菌落移植到包含100mg/1卡那霉素的2 $\times$ YT液体培养基4ml,在37 $^{\circ}$ C、200rpm振荡培养过夜后,进行通过图1或2所示顺序构建的附加有标签的GFP2蛋白或VHH抗体表达用质粒的提取。提取的质粒在确认碱基序列后,在大肠杆菌无细胞表达试验和大肠杆菌(BL21(DE3))株的转化中应用。

[0112] [表1]

[0113] 各种肽标签的氨基酸序列

[0114]

实施例1	SR#105	HKPG(序列编号1)
实施例2	SR#109	RKPG(序列编号2)
实施例3	SR#111	IKPG(序列编号3)
实施例4	SR#115	NKPG(序列编号4)
实施例5	SR#116	MKPG(序列编号5)
实施例6	SR#147	CKPG(序列编号6)
实施例7	SR#150	YKPG(序列编号7)
实施例8	SR#153	FKPG(序列编号8)
实施例9	SR#203	INKP(序列编号9)
实施例10	SR#207	MNKP(序列编号10)

实施例11	SR#210	ANKP (序列编号11)
实施例12	SR#215	VNKP (序列编号12)
实施例13	SR#241	FNKP (序列编号13)
实施例14	SR#255	WNKP (序列编号14)
实施例15	SR#300	RNKP (序列编号15)
实施例16	SR#301	RKNP (序列编号16)
实施例17	SR#302	IKNP (序列编号17)
实施例18	SR#303	AKNP (序列编号18)
实施例19	SR#304	RNPG (序列编号65)
实施例20	SR#305	RQNP (序列编号66)
实施例21	SR#306	NKP
实施例22	SR#307	KNP
实施例23	SR#308	NNP
实施例24	SR#309	INP
实施例25	SR#310	MNP
实施例26	SR#311	QNP
实施例27	SR#312	IKP
实施例28	SR#313	[ ]KP
实施例29	SR#314	SKP
实施例30	SR#315	MKP
实施例31	SR3316	RKP
实施例32	SR3317	IKPGKG (序列编号67)
实施例33	SR#318	INKPNK (序列编号68)
实施例34	SR#319	INKPIN (序列编号69)
实施例35	SR#320	RNKPNK (序列编号70)
实施例36	SR#321	RNKPRS (序列编号71)
比较例A	无标签	
比较例B	PX1220v7	RKPKKKPKKPRS (序列编号19)
比较例C	SKIK	SKIK (序列编号20)
比较例D	PX12-20	RKPGKGPGKPRS (序列编号72)

[0115] 编码各肽标签(1~18和比较例B、C)的碱基序列示于序列编号21~40。

[0116] [表2]

[0117] 大肠杆菌表达用各种GFP2基因的PCR扩增中应用的模板质粒和引物的组合

[0118]

	正向引物	反向引物	模板质粒
实施例1	SR#105-GFP2F(序列编号43)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例2	SR#109-GFP2F(序列编号44)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例3	SR#111-GFP2F(序列编号45)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例4	SR#115-GFP2F(序列编号46)	GFP2RstopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例5	SR#116-GFP2F(序列编号47)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2

实施例6	SR#147-GFP2F(序列编号48)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例7	SR#150-GFP2F(序列编号49)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例8	SR#153-GFP2F(序列编号50)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例9	SR#203-GFP2F(序列编号51)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例10	SR#207-GFP2F(序列编号52)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例11	SR#210-GFP2F(序列编号53)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例12	SR#215-GFP2F(序列编号54)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例13	SR#241-GFP2F(序列编号55)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例14	SR#255-GFP2F(序列编号56)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例15	SR#300-GFP2F(序列编号57)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例16	SR#301-GFP2F(序列编号58)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例17	SR#302-GFP2F(序列编号59)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例18	SR#303-GFP2F(序列编号60)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例19	SR#304-GFP2F(序列编号73)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例20	SR#305-GFP2F(序列编号74)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例21	SR#306-GFP2F(序列编号75)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例22	SR#307-GFP2F(序列编号76)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例23	SR#308-GFP2F(序列编号77)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例24	SR#309-GFP2F(序列编号78)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例25	SR#310-GFP2F(序列编号79)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例26	SR#311-GFP2F(序列编号80)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例27	SR#312-GFP2F(序列编号81)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例28	SR#313-GFP2F(序列编号82)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例29	SR#314-GFP2F(序列编号83)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例30	SR#315-GFP2F(序列编号84)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例31	SR#316-GFP2F(序列编号85)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例32	SR#317-GFP2F(序列编号86)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例33	SR#318-GFP2F(序列编号87)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例34	SR#319-GFP2F(序列编号88)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例35	SR#320-GFP2F(序列编号89)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
实施例36	SR#321-GFP2F(序列编号90)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
比较例A	Nu11-GFP2F(序列编号61)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
比较例B	PX12-20v7-GFP2F(序列编号62)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2
比较例C	SKIK-GFP2F(序列编号63)	GFP2R-stopT7(序列编号64)	pUCFa-GFP2

[0119] [表3]

[0120] 大肠杆菌表达用各种VHH抗体基因的PCR扩增中应用的模板质粒和引物的组合  
 [0121] (N末端附加有标签)

[0122]

	正向引物	反向引物	模板质粒
实施例3	SR#111-Amy1D9F(序列编号91)	Amy1D9-stopT7(序列编号92)	pUCFa-Amy1D9
实施例9	SR#203-Amy1D9F(序列编号93)	Amy1D9-stopT7(序列编号92)	pUCFa-Amy1D9
实施例10	SR#207-Amy1D9F(序列编号94)	Amy1D9-stopT7(序列编号92)	pUCFa-Amy1D9

实施例15	SR#300-Amy1D9F (序列编号95)	Amy1D9-stopT7 (序列编号92)	pUCFa-Amy1D9
实施例20	SR#305-Amy1D9F (序列编号96)	Amy1D9-stopT7 (序列编号92)	pUCFa-Amy1D9
实施例21	SR#306-Amy1D9F (序列编号97)	Amy11)9-stopT7 (序列编号92)	pUCFa-Amy1D9
实施例24	SR#309-Amy1D9F (序列编号98)	Amy1D9-stopT7 (序列编号92)	pUCFa-Amy1D9
实施例33	SR#318-Amy1D9F (序列编号99)	Amy1D9-stopT7 (序列编号92)	pUCFa-Amy1D9
比较例A	Null-Amy1D9F (序列编号100)	Amy1D9-stopT7 (序列编号92)	pUCFa-Amy1D9
比较例B	PX12-20v7-Amy1D9F (序列编号101)	Amy1D9-stopT7 (序列编号92)	pUCFa-Amy1D9
比较例D	PX12-20-Amy1D9F (序列编号102)	Amy1D9-stopT7 (序列编号92)	pUCFa-Amy1D9

[0123] [表4]

[0124] 大肠杆菌表达用各种VHH抗体基因的PCR扩增中应用的模板质粒和引物的组合

[0125] (C末端附加有标签)

	正向引物	反向引物	模板质粒
实施例 9	Null-Amy1D9F (序列编号 100)	Amy1D9-SR#203-stopT7 (序列编号 103)	pUCFa-Amy1D9
实施例 15	Null-Amy1D9F (序列编号 100)	Amy1D9-SR#300-stopT7 (序列编号 104)	pUCFa-Amy1D9
实施例 33	Null-Amy1D9F (序列编号 100)	Amy1D9-SR#318-stopT7 (序列编号 105)	pUCFa-Amy1D9
实施例 35	Null-Amy1D9F (序列编号 100)	Amy1D9-SR#320-stopT7 (序列编号 106)	pUCFa-Amy1D9
比较例 A	Null-Amy1D9F (序列编号 100)	Amy1D9-stopT7 (序列编号 92)	pUCFa-Amy1D9
比较例 B	Null-Amy1D9F (序列编号 100)	Amy1D9-PX12-20v7-stopT7 (序列编号 107)	pUCFa-Amy1D9
比较例 D	Null-Amy1D9F (序列编号 100)	Amy1D9-PX12-20-stopT7 (序列编号 108)	pUCFa-Amy1D9

[0126]

[0127] [表5]

[0128] 解脂耶氏酵母表达用各种GFP2基因的PCR扩增中应用的模板质粒和引物的组合

[0129] (N末端附加有标签)

[0130]

	正向引物	反向引物	模板质粒
实施例 3	YH-SR#111-GFP2F (序列编号 109)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 5	YH-SR#116-GFP2F (序列编号 110)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 9	YH-SR#203-GFP2F (序列编号 111)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 15	YH-SR#300-GFP2F (序列编号 112)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 16	YH-SR#301-GFP2F (序列编号 113)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 19	YH-SR#304-GFP2F (序列编号 114)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 20	YH-SR#305-GFP2F (序列编号 115)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 21	YH-SR#306-GFP2F (序列编号 116)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 22	YH-SR#307-GFP2F (序列编号 117)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 24	YH-SR#309-GFP2F (序列编号 118)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 26	YH-SR#311-GFP2F (序列编号 119)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
实施例 31	YH-SR#316-GFP2F (序列编号 120)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
比较例 A	YH-Nu11-GFP2F (序列编号 121)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
比较例 B	YH-PX12-20v7-GFP2F (序列编号 122)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
比较例 C	YH-SK1K-GFP2F (序列编号 123)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
比较例 D	YH-PX12-20-GFP2F (序列编号 124)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2

[0131] [表6]

[0132] 解脂耶氏酵母表达用各种GFP2基因的PCR扩增中应用的模板质粒和引物的组合

[0133] (C末端附加有标签)

[0134]

	正向引物	反向引物	模板质粒
实施例 9	YH-Null-GFP2F (序列编号 121)	YH-GFP2-SR#203-R (序列编号 126)	pUCFa-GFP2
实施例 15	YH-Null-GFP2F (序列编号 121)	YH-GFP2-SR#300-R (序列编号 127)	pUCFa-GFP2
实施例 16	YH-Null-GFP2F (序列编号 121)	YH-GFP2-SR#301-R (序列编号 128)	pUCFa-GFP2
实施例 19	YH-Null-GFP2F (序列编号 121)	YH-GFP2-SR#304-R (序列编号 129)	pUCFa-GFP2
实施例 35	YH-Null-GFP2F (序列编号 121)	YH-GFP2-SR#320-R (序列编号 130)	pUCFa-GFP2
比较例 A	YH-Null-GFP2F (序列编号 121)	YH-GFP2-R (序列编号 125)	pUCFa-GFP2
比较例 B	YH-Null-GFP2F (序列编号 121)	YH-GFP2-PX12-20v7-R (序列编号 131)	pUCFa-GFP2
比较例 C	YH-Null-GFP2F (序列编号 121)	YH-GFP2-SKITK-R (序列编号 132)	pUCFa-GFP2
比较例 D	YH-Null-GFP2F (序列编号 121)	YH-GFP2-PX12-20-R (序列编号 133)	pUCFa-GFP2

[0135] (2)通过无细胞表达系统的各种附加有肽标签的GFP2蛋白的表达

[0136] 作为无细胞表达系统应用PUREfrex 1.0(Gene Frontier株式会社)。将Kit所附的Solution I在室温融解后,在冰上静置。所附的Solution II、Solution III在冰上融解。将Solution I、Solution II、Solution III轻轻涡旋后,用台式离心机离心(spin down)后,向融解的Solution II、Solution III加入灭菌蒸馏水各25 $\mu$ l,涡旋后,离心(spin down),与融解的Solution I混合。将该混合溶液用涡旋充分混合。将规定量的附加有标签的GFP2蛋白表达用质粒和灭菌蒸馏水分配到灭菌1.5 $\mu$ l微量离心管,进一步加入Solution I~III的混合溶液8 $\mu$ l,以移液不起泡的方式混合,用台式离心机离心(spin down)。然后,在37 $^{\circ}$ C水浴中进行4小时反应,使蛋白表达。反应结束后,向反应物加入10 $\mu$ l的灭菌蒸馏水后,加入2x样品缓冲液(Atto株式会社)20 $\mu$ l混合后,在沸腾浴中加热10分钟,作为SDS-PAGE用样品。

[0137] (3)蛋白表达用大肠杆菌的转化

[0138] 将大肠杆菌BL21 (DE3) (Novagen)的甘油原液植入放入3ml SOB培养基(20g/1Bacto蛋白胨、5g/1 Bacto酵母提取物、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgSO<sub>4</sub>、10mM MgCl<sub>2</sub>)的灭菌聚苯乙烯制14ml管,在37 $^{\circ}$ C以200rpm振荡培养过夜。向放入100ml SOB培养基的灭菌三角烧瓶植入上述预培养液0.2ml后,在30 $^{\circ}$ C、以200rpm振荡培养。波长600nm的浊度(OD600)成为0.4-0.6时,冰冷10-30分钟停止培养。将培养液转移到50ml锥形管,2,500 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、离心分离10分钟。丢弃上清,向沉淀(pellet)加入冰冷的15ml TB(10mM PIPES-KOH、pH6.7、15mM CaCl<sub>2</sub>、0.25M KCl、55mM MnCl<sub>2</sub>)平稳地悬浮。将悬浮液2,500 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C离心分离10分钟。丢弃上清,向沉淀(pellet)加入冰冷的10ml TB平稳地悬浮。加入DMSO 700 $\mu$ l,边冰冷便悬浮。向1.5ml微量离心管每50 $\mu$ l地注入,作为感受态细胞。用液氮冷冻后,-80 $^{\circ}$ C保存直至使用。

[0139] 将得到的感受态细胞在冰上融解,添加上述制备的附加有标签的GFP2蛋白表达用质粒1ng后,平稳地混合并在冰上静置30分钟。在42 $^{\circ}$ C处理45秒(热休克)后,在冰上静置5min。添加250 $\mu$ l的SOC后,使管水平,在37 $^{\circ}$ C、200rpm振荡1小时。将振荡物100 $\mu$ l涂布于包含

100mg/1卡那霉素的2×YT琼脂培养基后,在37℃静置培养过夜,得到转化菌落。

[0140] (4)大肠杆菌的蛋白诱导培养

[0141] 将转化后的单菌落涂布于平板培养基(2×YT、100mg/1卡那霉素),在37℃培养箱中静置过夜进行培养。然后,用灭菌一次性环从培养后的平板培养基刮去菌体,植入注入了2ml预培养培养基(2×YT,100mg/1卡那霉素)的灭菌聚苯乙烯制14ml管,在37℃、200rpm进行振荡培养,直至OD600值达到0.6~1.0。向除去这些培养物的离心上清的沉淀物添加1.0ml 2×YT培养基(100mg/1卡那霉素)时,将OD600值成为0.3所需量的培养物分配到1.5ml微量离心管,在4℃(冰箱内)静置保管过夜。次日,将前述样品2,000rpm、4℃离心30min后,除去上清,加入新的2×YT培养基(100mg/1卡那霉素)1ml,悬浮沉淀。进一步,以OD600值成为0.03的方式,向2.7ml的2×YT培养基(100mg/1卡那霉素)植入上述样品1ml中的300μl,在37℃、200rpm振荡培养,直至OD600值达到0.4~1.0。然后,加入1M IPTG(诱导剂)3μl(终浓度1mM),在30℃、200rpm进行振荡培养12小时。培养结束后,将放入样品的试验管在冰上冷却5分钟,使大肠杆菌的增殖停止后,将培养液200μl分配到新的1.5ml的微量离心管,在5,000rpm、4℃进行5min离心分离。然后,除去上清,将菌体用液氮冷冻后,在-80℃冷冻保存。

[0142] (5)从大肠杆菌的蛋白提取

[0143] 向冷冻保存样品加入100μl的样品缓冲液(EZ Apply、ATTO株式会社),用涡旋混合器搅拌后,在沸水中加热10分钟,进行样品的SDS化。

[0144] (6)蛋白印迹分析

[0145] 蛋白定量时的标准物质应用GFP2蛋白纯化标准品。通过将其用1x样品缓冲液(Atto株式会社)反复2倍稀释制成稀释系列,用作标准。

[0146] 蛋白的电泳(SDS-PAGE)应用电泳槽(Criterion cell、BIO RAD)和Criterion TGX-凝胶(BIO RAD)。向电泳槽放入电泳缓冲液(Tris/Glycine/SDS Buffer、BIO RAD),向孔施加SDS化的样品10μl,在200V恒定电压电泳40分钟。

[0147] 电泳后的凝胶应用转印包(BIO RAD)、用转印Turbo(BIO RAD)进行印迹。

[0148] 将印迹后的膜浸入封闭溶液(TBS系,pH7.2、Nakarai Tesk),在室温振荡1小时或在4℃静置16小时后,在TBS-T(137mM氯化钠、2.68mM氯化钾、1%聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯、25mM Tris-HCl、pH 7.4)中进行3次室温、5分钟的振荡并洗涤。

[0149] 在绿色荧光蛋白(GFP2)的检测中,将抗血清Rabbit-monoclonal Anti-GFP antibody ab32146(Abcam)用TBS-T稀释6,000倍使用,在VHH抗体(Amy1D9)的检测中,将抗血清Rabbit-monoclonal Anti-VHH antibody A01860(GenScript)用TBS-T稀释6,000倍使用。在稀释液中浸入膜,通过在室温振荡2小时进行抗原抗体反应,在TBS-T中进行3次室温、5分钟的振荡并洗涤。

[0150] 二次抗体使用用TBS-T稀释3,000倍的Anti-Rabbit IgG,AP-linked Antibody#7054(Cell Signaling)。在本稀释液中浸入膜,通过在室温振荡1小时进行抗原抗体反应,在TBS-T中进行3次室温、5分钟的振荡并洗涤。通过碱性磷酸酶的显色反应通过在显色液(0.1M氯化钠、5mM氯化镁、0.33mg/ml硝基四氮唑蓝(nitroblue tetrazolium)、0.33mg/ml 5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸、0.1M Tris-HCl、pH9.5)中浸入膜、在室温振荡15分钟进行,用蒸馏水洗涤膜后,在无尘纸(Kimtowel)上常温干燥。

[0151] 显色的膜通过扫描仪 (PM-A900、Epson) 用分辨率600dpi成像,应用图像分析软件 (CS Analyzer ver.3.0、Atto株式会社),进行GFP2蛋白的定量。

[0152] (7)GFP2蛋白的荧光强度测定

[0153] 向96孔微板分配GFP2蛋白的诱导培养样品100 $\mu$ l,用灭菌蒸馏水2倍稀释后,应用荧光酶标仪Spectra Max id5 (Molecular DEVICES),以激发波长( $\lambda$ Ex)395nm测定510nm的荧光强度( $\lambda$ Em)。同时,对相同样品,在600nm测定OD值,估计大肠杆菌的增殖量。然后,通过用前述的荧光强度除以上述OD值,算出每OD值1.0的荧光强度。

[0154] (8)大肠杆菌-解脂耶氏酵母穿梭载体的构建

[0155] 在株式会社FASMAC合成由解脂耶氏酵母内涉及质粒复制的ori1001 (GenBank: EU340887.1) 和Centromere1.1 (GenBank:AF099207.1)、大肠杆菌内涉及质粒复制的ColE1 ori、潮霉素抗性基因 (HYG)、涉及代谢酶表达的TEF启动子、多克隆位点和CYC1终止子组成的质粒,取得pEYHG(质粒4) (图3、序列编号136)。

[0156] (9)编码各种附加有标签的GFP2蛋白的解脂耶氏酵母用基因表达质粒的构建

[0157] 与(1)同样,将编码GFP2蛋白的人工合成DNA(序列编号42)插入pUC19改变质粒pUCFa(FASMAC)的EcoRV识别位点,将得到的质粒1(pUCFa-GFP2)用作模板。

[0158] 具体地,为了向GFP2蛋白的N末端或C末端附加各种标签(表1),通过表5和6所示的模板质粒DNA、正向引物、反向引物的组合实施PCR。在各引物的5'末端附加与质粒4相同的序列。得到的扩增片段用QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)纯化后,按照图4和5所示顺序,应用In-Fusion HD Cloning Kit(TaKaRa)插入用Not I、Hind III消化的质粒4(pEYHG),得到表达用质粒。随后,向感受态细胞DH5- $\alpha$ (株式会社Nippon gene)导入构建的质粒,进行克隆。然后,提取质粒,确认碱基序列后,在解脂耶氏酵母的转化中应用。

[0159] (10)解脂耶氏酵母的转化

[0160] 应用500ml的带挡板的三角烧瓶,将解脂耶氏酵母用YPD-Rich培养基150mL(2%酵母提取物,4%蛋白胨,4% D-葡萄糖,0.01%色氨酸,0.002%腺嘌呤)在28 $^{\circ}$ C、180rpm振荡培养16~18小时。确认浊度(OD600)成为16~24后,将培养物400 $\mu$ l取至灭菌的1.5ml微量离心管,4 $^{\circ}$ C、500g离心分离5分钟后,除去上清后,向沉淀加入1M山梨醇400 $\mu$ l,悬浮后,再度进行离心分离。向除去上清的沉淀再度加入1M山梨醇400 $\mu$ l,悬浮菌体后,进行离心分离。进一步除去上清后,向沉淀加入1M山梨醇400 $\mu$ l,同时加入1,000ng用于转化中构建的各种质粒DNA,用涡旋混合器混合。

[0161] 将上述的悬浮液200 $\mu$ l注入于电穿孔用0.2cm比色皿(Bio-Rad公司制Gene Pulser Cuvette),应用Micro Pulser(Bio-Rad公司制),以3.0KV的电压每一个样品实施2次电穿孔。向样品悬浮液200 $\mu$ l加入YPD-Rich培养基1,200 $\mu$ l,在28 $^{\circ}$ C、200rpm振荡1小时。振荡后,进行离心分离,除去上清后,向沉淀加入1ml的1M山梨醇,悬浮沉淀,将悬浮液200 $\mu$ l涂布于YPDm平板培养基(0.2%酵母提取物,5%蛋白胨,0.1% D-葡萄糖,50mM钠-磷酸缓冲液pH6.8,2%琼脂)。在28 $^{\circ}$ C静置培养5~7日,得到转化菌落。

[0162] (11)解脂耶氏酵母的培养和采样

[0163] 将可以通过菌落PCR确认目的基因的导入的克隆以OD600成为0.1的量植入注入了YPD培养基(1%蛋白胨、1%酵母提取物、6%葡萄糖)4ml的15ml灭菌圆管,在28 $^{\circ}$ C、200rpm进行振荡培养48小时。

[0164] 培养后,将培养物100 $\mu$ l分配到1.5ml微量离心管,在4 $^{\circ}$ C、10,000g进行离心分离5分钟,除去上清后,将沉淀作为用于GFP2蛋白的蛋白印迹分析的样品。

[0165] (12)从解脂耶氏酵母的酶提取

[0166] GFP2蛋白的提取按照Akira Hosomi等的方法(Akira Hosomi, et al.: J Biol Chem, 285, (32), 24324-24334, 2010),向(11)中采样的试样加入100 $\mu$ l的0.1N NaOH溶液,用涡旋混合器悬浮菌体后,冰冷化静置10分钟。然后,在4 $^{\circ}$ C、15,000g进行5分钟离心分离,弃去上清后,回收沉淀。

[0167] (13)蛋白印迹分析

[0168] 向得到的GFP2蛋白的沉淀加入100 $\mu$ l的样品缓冲液(EZ Apply、ATTO制),用涡旋混合器搅拌后,在沸水中加温10分钟,进行样品的SDS化。以下,通过与(6)同样的方法,以纯化GFP为标准品进行电泳(SDS-PAGE)和印迹。

[0169] 印迹后也与(6)同样,将膜浸入封闭溶液(TBS系,pH7.2、Nakarai Tesk),在室温振荡1小时后,在TBS-T(137mM氯化钠、2.68mM氯化钾、1%聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯、25mM Tris-HCl、pH 7.4)中进行3次室温、5分钟的振荡并洗涤。在GFP2蛋白的检测中,将抗血清Rabbit-monoclonal Anti-GFP antibody ab32146(Abcam)用TBS-T进行6,000倍稀释使用。在本稀释液中浸入膜,通过在室温振荡2小时进行抗原抗体反应,在TBS-T中进行3次室温、5分钟的振荡并洗涤。二次抗体使用Anti-Rabbit IgG,AP-linked Antibody#7054(Cell Signaling)。显色的膜通过扫描仪(PM-A900、Epson)以分辨率600dpi成像,应用图像分析软件(CS Analyzer ver.3.0、Atto),测定各种酶的表达量。

[0170] (8)结果

[0171] 结果示于图6~14。

[0172] 如图6所示,在无细胞表达系统中,与将比较例B的专利文献4记载的肽标签、比较例C的包含K但不包含P的肽标签(SKIK:序列编号20(专利文献3))与GFP2的N末端连接的融合蛋白相比,将实施例3、5、7、9~18的肽标签与GFP2的N末端连接的融合蛋白的表达量显著地提高。

[0173] 如图7和9所示,在大肠杆菌表达系统中,与将比较例B的肽标签与GFP2的N末端连接的融合蛋白相比,将实施例1~6、8~36的肽标签与GFP2的N末端连接的融合蛋白的表达量显著地提高。

[0174] 另外,如图8和10所示,GFP的荧光强度在将实施例1~6、8~36的肽标签与GFP2的N末端连接的融合蛋白中显示显著高的值,可以确认功能性蛋白被表达。

[0175] 如图11所示,在大肠杆菌表达系统中,与将比较例B和D的专利文献4记载的肽标签与VHH抗体的N末端连接的融合蛋白相比,将实施例3、9、10、15、20、21、24、33的肽标签与VHH抗体的N末端连接的融合蛋白的表达量显著地提高。

[0176] 如图12所示,在大肠杆菌表达系统中,与将比较例B和D的专利文献4记载的肽标签与VHH抗体的C末端连接的融合蛋白相比,将实施例9、15、33、35的肽标签与VHH抗体的C末端连接的融合蛋白的表达量显著地提高。

[0177] 如图13所示,在解脂耶氏酵母表达系统中,与将比较例B和D的专利文献4记载的肽标签、比较例C的包含K但不包含P的肽标签(SKIK:序列编号20(专利文献3))与GFP2的N末端连接的融合蛋白相比,将实施例3、5、9、15、16、19~22、24、26、31的肽标签与GFP2的N末端连

接的融合蛋白的表达量显著地提高。

[0178] 此外,如图14所示,在解脂耶氏酵母表达系统中,与将比较例B和D的专利文献4记载的肽标签、比较例C的包含K但不包含P的肽标签(SKIK:序列编号20(专利文献3))与GFP2的C末端连接的融合蛋白相比,将实施例9、15、16、19、35的肽标签与GFP2的C末端连接的融合蛋白的表达量显著地提高。

[0179] 产业上的可利用性

[0180] 本发明的肽标签在基因工程、蛋白工程等领域中 useful,附加本发明的肽标签的蛋白在医疗、研究、食品、畜牧等领域中 useful。

## 序列表

<110> 出光兴产株式会社  
<120> 肽标签和包含其的附加有标签的蛋白  
<130> 2000385-502  
<150> JP2020-179557  
<151> 2020-10-27  
<160> 136  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#105  
<400> 1  
His Lys Pro Gly  
1  
<210> 2  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#109  
<400> 2  
Arg Lys Pro Gly  
1  
<210> 3  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#111  
<400> 3  
Ile Lys Pro Gly  
1  
<210> 4  
<211> 4  
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#115  
<400> 4  
Asn Lys Pro Gly  
1  
<210> 5  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#116  
<400> 5  
Met Lys Pro Gly  
1  
<210> 6  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#147  
<400> 6  
Cys Lys Pro Gly  
1  
<210> 7  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#150  
<400> 7  
Tyr Lys Pro Gly  
1  
<210> 8  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#153

<400> 8  
Phe Lys Pro Gly  
1  
<210> 9  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#203  
<400> 9  
Ile Asn Lys Pro  
1  
<210> 10  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#207  
<400> 10  
Met Asn Lys Pro  
1  
<210> 11  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#210  
<400> 11  
Ala Asn Lys Pro  
1  
<210> 12  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#215  
<400> 12  
Val Asn Lys Pro  
1

<210> 13  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#241  
<400> 13  
Phe Asn Lys Pro  
1  
<210> 14  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#255  
<400> 14  
Trp Asn Lys Pro  
1  
<210> 15  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#300  
<400> 15  
Arg Asn Lys Pro  
1  
<210> 16  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#301  
<400> 16  
Arg Lys Asn Pro  
1  
<210> 17  
<211> 4  
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#302  
<400> 17  
Ile Lys Asn Pro  
1  
<210> 18  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#303  
<400> 18  
Ala Lys Asn Pro  
1  
<210> 19  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> PX12-20v7  
<400> 19  
Arg Lys Pro Lys Lys Lys Pro Lys Lys Pro Arg Ser  
1                   5                   10  
<210> 20  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SKIK  
<400> 20  
Ser Lys Ile Ser  
1  
<210> 21  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#105

<400> 21	
cataaaccag gt	12
<210> 22	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#109	
<400> 22	
cgtaaaccag gt	12
<210> 23	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#111	
<400> 23	
attaaaccag gt	12
<210> 24	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#115	
<400> 24	
aataaaccag gt	12
<210> 25	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#116	
<400> 25	
atgaaaccag gt	12
<210> 26	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223> SR#147	
<400> 26	
tgtaaaccag gt	12
<210> 27	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#150	
<400> 27	
tataaaccag gt	12
<210> 28	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#153	
<400> 28	
tttaaaccag gt	12
<210> 29	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#203	
<400> 29	
attaataaac ca	12
<210> 30	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#207	
<400> 30	
atgaataaac ca	12
<210> 31	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	SR#210	
<400>	31	
gctaataaac ca		12
<210>	32	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#215	
<400>	32	
gttaataaac ca		12
<210>	33	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#241	
<400>	33	
tttaataaac ca		12
<210>	34	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#255	
<400>	34	
tggaataaac ca		12
<210>	35	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#300	
<400>	35	
cgtaataaac ca		12
<210>	36	
<211>	12	
<212>	DNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#301	
<400> 36	
cgtaaaaatc ca	12
<210> 37	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#302	
<400> 37	
attaaaaatc ca	12
<210> 38	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#303	
<400> 38	
gctaaaaatc ca	12
<210> 39	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PX12-20v7	
<400> 39	
cgtaaacc aa aaaaaaaacc aaaaaaacca cgttca	36
<210> 40	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SKIK	
<400> 40	
tctaaaataa aa	12
<210> 41	
<211> 238	

<212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> GFP2  
 <400> 41  
 Met Ser Gly Gly Glu Glu Leu Phe Ala Gly Ile Val Pro Val Leu Ile  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Leu Asp Gly Asp Val His Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu  
                   20                   25                   30  
 Gly Glu Gly Asp Ala Asp Tyr Gly Lys Leu Glu Ile Lys Phe Ile Cys  
                   35                   40                   45  
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu  
                   50                   55                   60  
 Cys Tyr Gly Ile Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Glu His Met Lys Met  
 65                   70                   75                   80  
 Asn Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Ile Gln Glu Arg  
                   85                   90                   95  
 Thr Ile Gln Phe Gln Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Gly Glu Val  
                   100                   105                   110  
 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Lys  
                   115                   120                   125  
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Ser  
                   130                   135                   140  
 Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Arg Pro Asp Lys Ala Asn Asn Gly  
 145                   150                   155                   160  
 Leu Glu Ala Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Gly Gly Gly Val  
                   165                   170                   175  
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Thr Asn Val Pro Leu Gly Asp Gly Pro  
                   180                   185                   190  
 Val Leu Ile Pro Ile Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Thr Lys Ile Ser  
                   195                   200                   205  
 Lys Asp Arg Asn Glu Ala Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Ser Phe  
                   210                   215                   220  
 Ser Ala Cys Cys His Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Arg  
 225                   230                   235  
 <210> 42  
 <211> 717  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>		
<223>	GFP2	
<400>	42	
atgagcgggg	gcgaggagct gttcgccggc atcgtgcccg tgctgatcga gctggacggc	60
gacgtgcacg	gccacaagtt cagcgtgcg ggcgaggcg agggcgacgc cgactacggc	120
aagctggaga	tcaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc cegtgcctg gcccaccctg	180
gtgaccaccc	tctgctacgg catccagtgc ttgcccgt accccgagca catgaagatg	240
aacgacttct	tcaagagcgc catgcccag ggctacatcc aggagcgcac catccagttc	300
caggacgacg	gcaagtacaa gaccgcggc gaggtgaagt tcgaggcgca caccctggtg	360
aaccgcatcg	agctgaagg caaggactt aaggaggac gcaacatcct gggccacaag	420
ctggagtaca	gcttcaacag ccacaactg tacatccgc ccgacaagg caacaacggc	480
ctggaggcta	acttcaagac ccgccacaac atcgaggcg gggcggtgca gctggccgac	540
cactaccaga	ccaactgcc cctggggcggc ggccccgtgc tgatcccat caaccactac	600
ctgagcactc	agaccaagat cagcaaggac cgcaacgagg cccgcgacca catggtgctc	660
ctggagtctc	tcagcgctg ctgccacacc cacggcatgg acgagctgta caggtga	717
<210>	43	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#105-GFP2F	
<400>	43	
aagaaggaga	tataccatgc ataaaccagg tagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210>	44	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#109-GFP2F	
<400>	44	
aagaaggaga	tataccatgc gtaaaccagg tagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210>	45	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#111-GFP2F	
<400>	45	
aagaaggaga	tataccatga ttaaaccagg tagcgggggc gaggagctgt tc	52

<210>	46	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#115-GFP2F	
<400>	46	
	aagaaggaga tataccatga ataaaccagg tagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210>	47	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#116-GFP2F	
<400>	47	
	aagaaggaga tataccatga tgaaccagg tagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210>	48	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#147-GFP2F	
<400>	48	
	aagaaggaga tataccatgt gtaaaccagg tagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210>	49	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#150-GFP2F	
<400>	49	
	aagaaggaga tataccatgt ataaaccagg tagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210>	50	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#153-GFP2F	
<400>	50	

aagaaggaga tataccatgt ttaaccagg tagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 51	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#203-GFP2F	
<400> 51	
aagaaggaga tataccatga ttaataaacc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 52	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#207-GFP2F	
<400> 52	
aagaaggaga tataccatga tgaataaacc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 53	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#210-GFP2F	
<400> 53	
aagaaggaga tataccatgg ctaataaacc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 54	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#215-GFP2F	
<400> 54	
aagaaggaga tataccatgg ttaataaacc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 55	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#241-GFP2F	

<400> 55	
aagaaggaga tataccatgt ttaataaacc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 56	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#255-GFP2F	
<400> 56	
aagaaggaga tataccatgt ggaataaacc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 57	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#300-GFP2F	
<400> 57	
aagaaggaga tataccatgc gtaataaacc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 58	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#301-GFP2F	
<400> 58	
aagaaggaga tataccatgc gtaaaaatcc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 59	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#302-GFP2F	
<400> 59	
aagaaggaga tataccatga ttaaaaatcc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 60	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223> SR#303-GFP2F	
<400> 60	
aagaaggaga tataccatgg ctaaaaatcc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 61	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> primer	
<400> 61	
aagaaggaga tataccatga gcggggggcga ggagctgttc	40
<210> 62	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PX12-20v7-GFP2F	
<400> 62	
aagaaggaga tataccatgc gtaaaccaaa aaaaaaacca aaaaaaccac gttcaagcgg	60
gggcgaggag ctgttc	76
<210> 63	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SKIK-GFP2F	
<400> 63	
aagaaggaga tataccatgt ctaaaataaa aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210> 64	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> GFP2R-stopT7	
<400> 64	
tcgagtgcgg ccgcaagctt tcacctgtac agctcgtcca tgc	43
<210> 65	
<211> 4	
<212> PRT	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#304  
<400> 65  
Arg Asn Pro Gly  
1  
<210> 66  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#305  
<400> 66  
Arg Gln Asn Pro  
1  
<210> 67  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#317  
<400> 67  
Ile Lys Pro Gly Lys Gly  
1                   5  
<210> 68  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#318  
<400> 68  
Ile Asn Lys Pro Asn Lys  
1                   5  
<210> 69  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> SR#319

<400> 69

Ile Asn Lys Pro Ile Asn

1 5

<210> 70

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SR#320

<400> 70

Arg Asn Lys Pro Asn Lys

1 5

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SR#321

<400> 71

Arg Asn Lys Pro Arg Ser

1 5

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> PX12-20

<400> 72

Arg Lys Pro Gly Lys Gly Pro Gly Lys Pro Arg Ser

1 5 10

<210> 73

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SR#304-GFP2F

<400> 73

aagaaggaga tataccatgc gtaatccagg tagcgggggc gaggagctgt tc

<210> 74

52

<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#305-GFP2F	
<400>	74	
	aagaaggaga tataccatgc gtcaaatcc aagcgggggc gaggagctgt tc	52
<210>	75	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#306-GFP2F	
<400>	75	
	aagaaggaga tataccatga ataaaccaag cgggggcgag gagctgttc	49
<210>	76	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#307-GFP2F	
<400>	76	
	aagaaggaga tataccatga aaaatccaag cgggggcgag gagctgttc	49
<210>	77	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#308-GFP2F	
<400>	77	
	aagaaggaga tataccatga ataatccaag cgggggcgag gagctgttc	49
<210>	78	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#309-GFP2F	
<400>	78	
	aagaaggaga tataccatga ttaatccaag cgggggcgag gagctgttc	49

<210> 79	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#310-GFP2F	
<400> 79	
aagaaggaga tataccatga tgaatccaag cgggggagag gagctgttc	49
<210> 80	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#311-GFP2F	
<400> 80	
aagaaggaga tataccatgc aaaatccaag cgggggagag gagctgttc	49
<210> 81	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#312-GFP2F	
<400> 81	
aagaaggaga tataccatga ttaaaccaag cgggggagag gagctgttc	49
<210> 82	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#313-GFP2F	
<400> 82	
aagaaggaga tataccatgc ataaaccaag cgggggagag gagctgttc	49
<210> 83	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#314-GFP2F	
<400> 83	

aagaaggaga tataccatgt ctaaaccaag cgggggag gagctgttc	49
<210> 84	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#315-GFP2F	
<400> 84	
aagaaggaga tataccatga tgaaccaag cgggggag gagctgttc	49
<210> 85	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#316-GFP2F	
<400> 85	
aagaaggaga tataccatgc gtaaccaag cgggggag gagctgttc	49
<210> 86	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#317-GFP2F	
<400> 86	
aagaaggaga tataccatga ttaaccagg taaagtagc gggggag agctgttc	58
<210> 87	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#318-GFP2F	
<400> 87	
aagaaggaga tataccatga ttaataaacc aaataaagc gggggag agctgttc	58
<210> 88	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#319-GFP2F	

<400> 88	
aagaaggaga tataccatga ttaataaacc aattaatagc gggggcgagg agctgttc	58
<210> 89	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#320-GFP2F	
<400> 89	
aagaaggaga tataccatgc gtaataaacc aaataaaagc gggggcgagg agctgttc	58
<210> 90	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#321-GFP2F	
<400> 90	
aagaaggaga tataccatgc gtaataaacc acgttcaagc gggggcgagg agctgttc	58
<210> 91	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SR#111-Amy1D9F	
<400> 91	
aagaaggaga tataccatga ttaaaccagg tcaggttcag ttggtcgaaa g	51
<210> 92	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> Amy1D9-stopT7	
<400> 92	
tcgagtgagg ccgcaagctt tcaagacgac accgtaacct gtg	43
<210> 93	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

- <223> SR#203-Amy1D9F  
 <400> 93  
 aagaaggaga tataccatga ttaataaacc acaggttcag ttggtcgaaa g 51  
 <210> 94  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>
- <223> SR#207-Amy1D9F  
 <400> 94  
 aagaaggaga tataccatga tgaataaacc acaggttcag ttggtcgaaa g 51  
 <210> 95  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>
- <223> SR#300-Amy1D9F  
 <400> 95  
 aagaaggaga tataccatgc gtaataaacc acaggttcag ttggtcgaaa g 51  
 <210> 96  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>
- <223> SR#305-Amy1D9F  
 <400> 96  
 aagaaggaga tataccatgc gtcaaatcc acaggttcag ttggtcgaaa g 51  
 <210> 97  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>
- <223> SR#306-Amy1D9F  
 <400> 97  
 aagaaggaga tataccatga ataaaccaca ggttcagttg gtcgaaag 48  
 <210> 98  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>		
<223>	SR#309-Amy1D9F	
<400>	98	
aagaaggaga tataccatga ttaatccaca gttcagttg gtcgaaag		48
<210>	99	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	SR#318-Amy1D9F	
<400>	99	
aagaaggaga tataccatga ttaataaacc aaataaacag gttcagttgg tcgaaag		57
<210>	100	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	Null-Amy1D9F	
<400>	100	
aagaaggaga tataccatgc aggttcagtt ggtcgaaag		39
<210>	101	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	PX12-20v7-Amy1D9F	
<400>	101	
aagaaggaga tataccatgc gtaaaccaaa aaaaaacca aaaaaccac gttcacaggt		60
tcagttggtc gaaag		75
<210>	102	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	PX12-20-Amy1D9F	
<400>	102	
aagaaggaga tataccatgc gtaaaccagg taaaggtcca ggtaaaccac gttcacaggt		60
tcagttggtc gaaag		75
<210>	103	

<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	Amy1D9-SR#203-stopT7	
<400>	103	
	tcgagtgcgg ccgcaagctt tcatggttta tttatagacg acaccgtaac ctgtg	55
<210>	104	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	Amy1D9-SR#300-stopT7	
<400>	104	
	tcgagtgcgg ccgcaagctt tcatggttta ttacgagacg acaccgtaac ctgtg	55
<210>	105	
<211>	61	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	Amy1D9-SR#318-stopT7	
<400>	105	
	tcgagtgcgg ccgcaagctt tcatttattt ggtttattaa tagacgacac cgtaacctgt	60
	g	61
<210>	106	
<211>	61	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	Amy1D9-SR#320-stopT7	
<400>	106	
	tcgagtgcgg ccgcaagctt tcatttattt ggtttattac gagacgacac cgtaacctgt	60
	g	61
<210>	107	
<211>	79	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	Amy1D9-PX12-20v7-stopT7	

<400> 107	
tcgagtgcgg ccgcaagctt tcaggaacgt ggtttttttg gttttttttt tggtttacga	60
gacgacaccg taacctgtg	79
<210> 108	
<211> 79	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> Amy1D9-PX12-20-stopT7	
<400> 108	
tcgagtgcgg ccgcaagctt tcaggaacgt ggtttacctg gacctttacc tggtttacga	60
gacgacaccg taacctgtg	79
<210> 109	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-SR#111-GFP2F	
<400> 109	
atcattcaaaa ccatgataaa accaggtagc gggggcgagg agct	44
<210> 110	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-SR#116-GFP2F	
<400> 110	
atcattcaaaa ccatgatgaa accaggtagc gggggcgagg agct	44
<210> 111	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-SR#203-GFP2F	
<400> 111	
atcattcaaaa ccatgataaa taaaccaagc gggggcgagg agct	44
<210> 112	
<211> 44	
<212> DNA	

- <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> YH-SR#300-GFP2F  
 <400> 112  
 atcattcaaaa ccatgcgaaa taaaccaagc gggggcgagg agct 44  
 <210> 113  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> YH-SR#301-GFP2F  
 <400> 113  
 atcattcaaaa ccatgcgaaa aaatccaagc gggggcgagg agct 44  
 <210> 114  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> YH-SR#304-GFP2F  
 <400> 114  
 atcattcaaaa ccatgcgaaa tccaggtagc gggggcgagg agct 44  
 <210> 115  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> YH-SR#305-GFP2F  
 <400> 115  
 atcattcaaaa ccatgcgaca aaatccaagc gggggcgagg agct 44  
 <210> 116  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> YH-SR#306-GFP2F  
 <400> 116  
 atcattcaaaa ccatgaataa accaagcggg ggcgaggagc t 41  
 <210> 117  
 <211> 41

<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-SR#307-GFP2F	
<400> 117	
atcattcaaaa ccatgaaaaa tccaagcggg ggcgaggagc t	41
<210> 118	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-SR#309-GFP2F	
<400> 118	
atcattcaaaa ccatgataaa tccaagcggg ggcgaggagc t	41
<210> 119	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-SR#311-GFP2F	
<400> 119	
atcattcaaaa ccatgcaaaa tccaagcggg ggcgaggagc t	41
<210> 120	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-SR#316-GFP2F	
<400> 120	
atcattcaaaa ccatgcgaaa accaagcggg ggcgaggagc t	41
<210> 121	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-Null-GFP2F	
<400> 121	
atcattcaaaa ccatgagcgg gggcgaggag ctgttc	36
<210> 122	

<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	YH-PX12-20v7-GFP2F	
<400>	122	
	atcattcaaaa ccatgcgaaa accaaaaaaaa aaaccaaaaa aaccaagatc tagcgggggc	60
	gaggagctgt tc	72
<210>	123	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	YH-SKIK-GFP2F	
<400>	123	
	atcattcaaaa ccatgtctaa aataaaaagc gggggcgagg agctgttc	48
<210>	124	
<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	YH-PX12-20-GFP2F	
<400>	124	
	atcattcaaaa ccatgcgaaa accaggtaaa ggtccaggta aaccaagatc tagcgggggc	60
	gaggagctgt tc	72
<210>	125	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	YH-GFP2-R	
<400>	125	
	ttgtagacgc aagctttcac ctgtacagct cgtccatgcc g	41
<210>	126	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	YH-GFP2-SR#203-R	

<400> 126	
ttgtagacgc aagctttcat ggtttattta tctgtacag ctcgtccatg ccg	53
<210> 127	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-GFP2-SR#300-R	
<400> 127	
ttgtagacgc aagctttcat ggtttatttc gctgtacag ctcgtccatg ccg	53
<210> 128	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-GFP2-SR#301-R	
<400> 128	
ttgtagacgc aagctttcat ggattttttc gctgtacag ctcgtccatg ccg	53
<210> 129	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-GFP2-SR#304-R	
<400> 129	
ttgtagacgc aagctttcaa cctggatttc gctgtacag ctcgtccatg ccg	53
<210> 130	
<211> 59	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-GFP2-SR#320-R	
<400> 130	
ttgtagacgc aagctttcat ttatttggtt tatttcgct gtacagctcg tccatgccg	59
<210> 131	
<211> 77	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	

<223> YH-GFP2-PX12-20v7-R	
<400> 131	
ttgtagacgc aagctttcaa gatcttggt tttttggtt ttttttggt tttcgctgt	60
acagctcgtc catgccg	77
<210> 132	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-GFP2-SKIK-R	
<400> 132	
ttgtagacgc aagctttcat tttatttag acctgtacag ctcgtccatg ccg	53
<210> 133	
<211> 77	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> YH-GFP2-PX12-20-R	
<400> 133	
ttgtagacgc aagctttcaa gatcttggt tacctggacc tttacctggt tttcgctgt	60
acagctcgtc catgccg	77
<210> 134	
<211> 366	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> VHH(Amy1D9)	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1) .. (363)	
<400> 134	
atg cag gtt cag ttg gtc gaa agt gga ggt gga agc gtt caa gct ggt	48
Met Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly	
1                    5                    10                    15	
ggc tcc tta tcc ctg tca tgt gcg gct tct acc tat acg gat acc gta	96
Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Tyr Thr Asp Thr Val	
20                    25                    30	
gga tgg ttt cgt caa gcg cct ggt aag gaa cgc gaa ggt gtt gcg gcg	144
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala Ala	

35	40	45	
att tat cgc cgt aca ggc tac acg tat agt gcc gac agc gtc aaa ggg			192
Ile Tyr Arg Arg Thr Gly Tyr Thr Tyr Ser Ala Asp Ser Val Lys Gly			
50	55	60	
cgc ttt acc ctc tct cag gac aac aac aag aac acc gtg tat ctg cag			240
Arg Phe Thr Leu Ser Gln Asp Asn Asn Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln			
65	70	75	80
atg aac tcg ctc aaa ccg gaa gat act ggc atc tac tac tgc gcc act			288
Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ala Thr			
	85	90	95
ggc aat agc gtg cgt tta geg tct tgg gaa ggc tac ttc tat tgg ggt			336
Gly Asn Ser Val Arg Leu Ala Ser Trp Glu Gly Tyr Phe Tyr Trp Gly			
	100	105	110
caa ggc aca cag gtt acg gtg tcg tct tga			366
Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210>	135		
<211>	121		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	Synthetic Construct		
<400>	135		
Met Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly			
1	5	10	15
Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Tyr Thr Asp Thr Val			
	20	25	30
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala Ala			
	35	40	45
Ile Tyr Arg Arg Thr Gly Tyr Thr Tyr Ser Ala Asp Ser Val Lys Gly			
50	55	60	
Arg Phe Thr Leu Ser Gln Asp Asn Asn Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln			
65	70	75	80
Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ala Thr			
	85	90	95
Gly Asn Ser Val Arg Leu Ala Ser Trp Glu Gly Tyr Phe Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	



gcagacgcgc	tacttcgagc	ggaggcatcc	ggagcttgca	ggatcgccgc	ggctccgggc	1980
gtatatgctc	cgcatctgtc	ttgaccaact	ctatcagagc	ttggttgacg	gcaatttcga	2040
tgatgcagct	tgggcgcagg	gtcgatgcga	cgcaatcgtc	cgatccggag	ccgggactgt	2100
cgggcgtaca	caaatcgccc	gcagaagcgc	ggccgtctgg	accgatggct	gtgtagaagt	2160
actcgccgat	agtggaaacc	gacgccccag	cactcgtccg	gatcgggaga	tgggggaggc	2220
taactgagca	attaacagat	agtttgccgg	tgataattct	cttaacctcc	cacactcctt	2280
tgacataacg	atztatgtaa	cgaaactgaa	atitgaccag	atattgttgt	aaatagaaaa	2340
tctggcttgt	aggtggcaaa	atcccgtctt	tgttcatcaa	ttccctctgt	gactactcgt	2400
catcccttta	tgttcgactg	tcgtatTTTT	atitccata	catacgcaag	tgagatgccc	2460
gtgtccgaat	tcggcagtcg	catggactat	cggttgctct	gtacatacac	atacgcgagg	2520
ctggaaccta	tatcagagca	ctactttag	ggttgatgta	acattcaaga	aaagcgcaag	2580
ccagtgggtg	atgtatagca	gctacagcaa	ctactgctca	acatgaaaa	ggagggtgtt	2640
aagacggcca	agactgcttt	cttgetacgc	ctgagcaacg	tagctctgca	acagagcaac	2700
agataatcgc	ctacggagac	agagacagat	ctagagaccg	ggttggcggc	gcatttgtgt	2760
ccccaaaaac	agcccccaatt	gcccccaattg	accccccaatt	gaccagtag	cgggccccac	2820
cccggcgaga	gcccccttct	ccccacatat	caaacctccc	ccggttccca	cacttgccgt	2880
taagggcgta	gggtactgca	gtctggaatc	tacgcttgtt	cagactttgt	actagtttct	2940
ttgtctggcc	atccgggtaa	cccatgccgg	acgcaaaata	gactactgaa	aatTTTTTg	3000
ctttgtgggt	gggacttttag	ccaagggtat	aaaagaccac	cgtccccgaa	ttacctttcc	3060
tcttcttttc	tctctctcct	tgtcaactca	caccgaaat	cgtaagcat	ttccttctga	3120
gtataagaat	cattcaaacc	atgggatccg	ctagcaagct	tgcgtctaca	actggaccct	3180
tagcctgtat	atatcaattg	attatttaaa	gatttggctg	gtaggcggtt	cgtattgtac	3240
aatgggatct	gttactgagg	tggatctacc	caacttgcga	gattcaattg	cgagattcaa	3300
tcgcgagatt	caattgcgag	aatcagttgc	gagttgttct	aacactcagc	ttctacgagc	3360
gcttgtatta	ggacgagtga	tactccgtgg	ggcgacggct	tctcttgcgt	cttctgttgt	3420
attctttctt	acactatcgt	ccatctccaa	ccacctgta	cgaattcgga	gaaaactcac	3480
cgaggcagtt	ccggtaccga	gacaataacg	gaggatatgt	ctgataaaag	gatgtaacat	3540
aggcaagctg	ctcgtgagtg	ttgagtacga	accttagatc	caaatcacc	gcaccacgg	3600
atatacttgc	ttgaatatac	agtagtatgt	ctagaatcag	atcggaagag	cgctgttaag	3660
ggaaaagagt	ttccgtactc	agagagctat	tacaattcac	tggccgtcgt	tttacaacgt	3720
cgtgactggg	aaaaccaggg	cgttacccaa	cttaatgcc	ttgcagcaca	tctccgttt	3780
gcgagttggc	ggaatagcga	agaagcgcgt	acagatcgtc	cgtcacagca	gttgcgctct	3840
ctgtaacgta	ccgcagttca	aagtctacac	ctacaaacgc	gaaagtcgct	atcgctgtt	3900
tgtggatgtg	caaagcgaca	tcatcgatac	tcttggtcgt	cgcacggtga	ttccgttggc	3960
ttctgcacgg	ttactgagcg	acaaagtctc	ccgtgaactc	tatccggttg	tccacattgg	4020
ggatgaaagc	tggcgtatga	tgaccacgga	tatggcgtea	gtaccagtgt	cggttaattgg	4080
cgaagagggt	gcggatctgt	cgcacgcgca	gaatgacatc	aagaacgcca	ttaacctgat	4140
gttttggggc	atttaattaa	gccagccccg	acaccgcca	acaccgctg	acgcgccctg	4200
acgggcttgt	ctgctcccgg	catccgctta	cagacaagct	gtgaccgtct	ccgggagctg	4260

catgtgtcag	aggttttcac	cgatcatcacc	gaaacgcgcg	agacgaaagg	gcctcgtgat	4320
acgcctatatt	ttataggtta	atgtcatgat	aataatggtt	tcttagacgt	caggtggcac	4380
ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaaccctat	ttgtttatatt	ttctaaatac	attcaaatat	4440
gtatccgctc	atgagacaat	aacctgata	aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	4500
tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgcct	tattcccttt	tttgcggcat	tttgccttcc	4560
tgtttttgct	cacccagaaa	cgctggtgaa	agtaaaagat	gctgaagatc	agttgggtgc	4620
acgagtgggt	tacatcgaac	tggatctcaa	cagcggtaag	atccttgaga	gttttcgccc	4680
cgaagaacgt	ttccaatga	tgagcacttt	taaagttctg	ctatgtggcg	cggtattatc	4740
ccgtattgac	gccgggcaag	agcaactcgg	tcgccgata	cactattctc	agaatgactt	4800
ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	4860
atgcagtgt	gccataacca	tgagtgataa	cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	4920
cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgcct	4980
tgatcgttg	gaaccggagc	tgaatgaagc	cataccaac	gacgagcgtg	acaccacgat	5040
gcctgtagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	5100
ttcccggcaa	caattaatag	actggatgga	ggcggataaa	gttgcaggac	cacttctgcg	5160
ctcggccctt	ccggctggct	ggtttattgc	tgataaatct	ggagccggtg	agcgtgggtc	5220
tcgcggtatc	attgcagcac	tggggccaga	tggtaaagcc	tcccgtatcg	tagttatcta	5280
cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	acgaaataga	cagatcgtg	agataggtgc	5340
ctcactgatt	aagcattggt	aactgtcaga	ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	5400
tttaaaactt	catttttaat	ttaaagagat	ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	5460
gaccaaatac	ccttaacgtg	agttttcggt	ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	5520
caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	5580
accaccgcta	ccagcgggtg	ttgtttgcc	ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	5640
ggtaactggc	ttcagcagag	cgagataacc	aaatactggt	cttctagtgt	agccgtagtt	5700
aggccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	gcctacatac	ctcgtctctgc	taatcctggt	5760
accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	gtgtcttacc	gggttgact	caagacgata	5820
gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	aacggggggt	tcgtgcacac	agcccagctt	5880
ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	cctacagcgt	gagctatgag	aaagcggcac	5940
gcttcccgaa	gggagaaaag	cggacaggta	tccggtaagc	ggcagggtcg	gaacaggaga	6000
gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	ctggtatctt	tatagtctctg	tcgggtttcg	6060
ccacctctga	cttgagcgtc	gatttttgtg	atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	6120
aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacggtt	cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	6180
gttctttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	ggataaccgt	attaccgctt	ttgagtgagc	6240
tgataccgct	cgccgcagcc	gaacgaccga	gcgcagcag	tcagtgagcg	aggaagcgga	6300
agagcggcca	atacgcaaac	cgctctctcc	cgcgcgttgg	ccgattcatt	aatgcagctg	6360
gcacgacagg	tttcccgact	ggaaagcggg	cagtgagcgc	aacgcaatta	atgtgagtta	6420
gctcactcat	taggcacccc	aggetttaca	ctttatgctt	ccggctcgta	tgttgtgtgg	6480
aattgtgagc	ggataacaat	ttcacacagg	aaacagctat	gaccatgacc	atgattacgc	6540
caagctatct	gggcgatacc	attgaagact	ggagttcaga	cgtgtgctct	tccgatctga	6600

t

6601

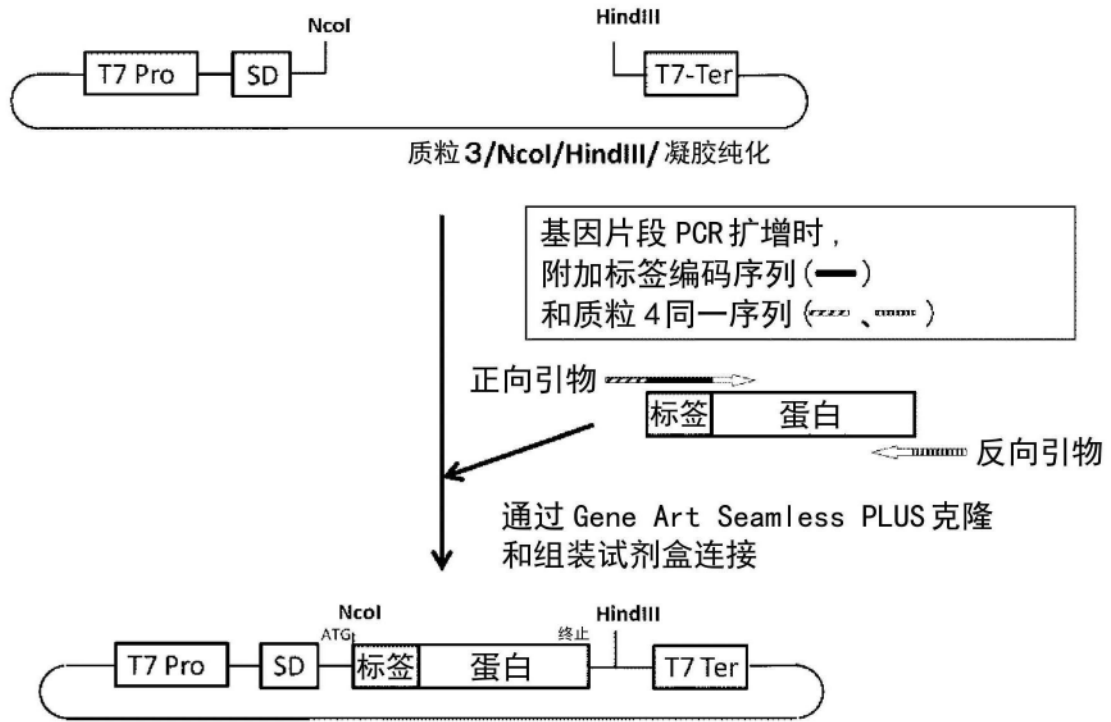


图1

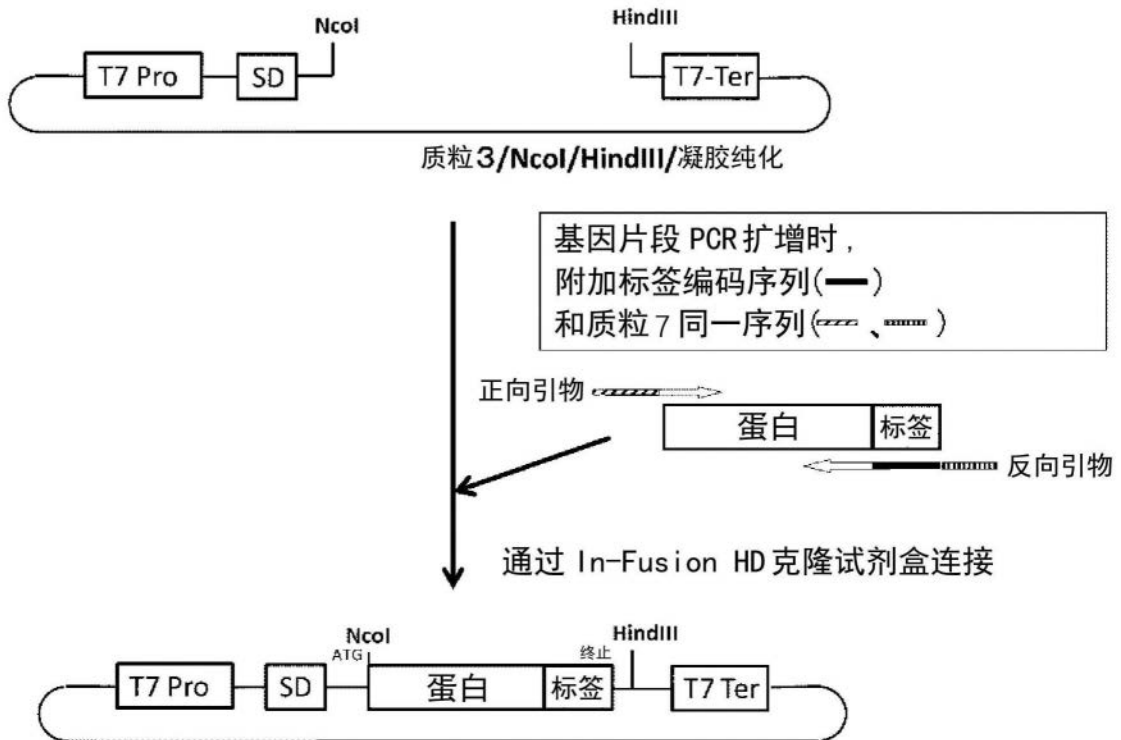


图2

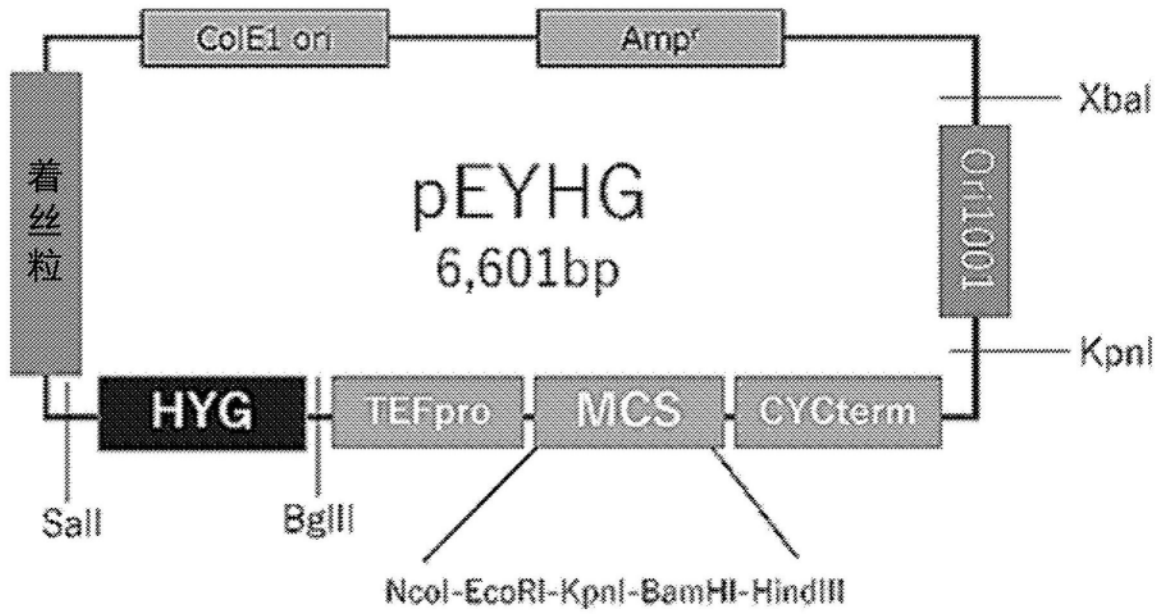


图3

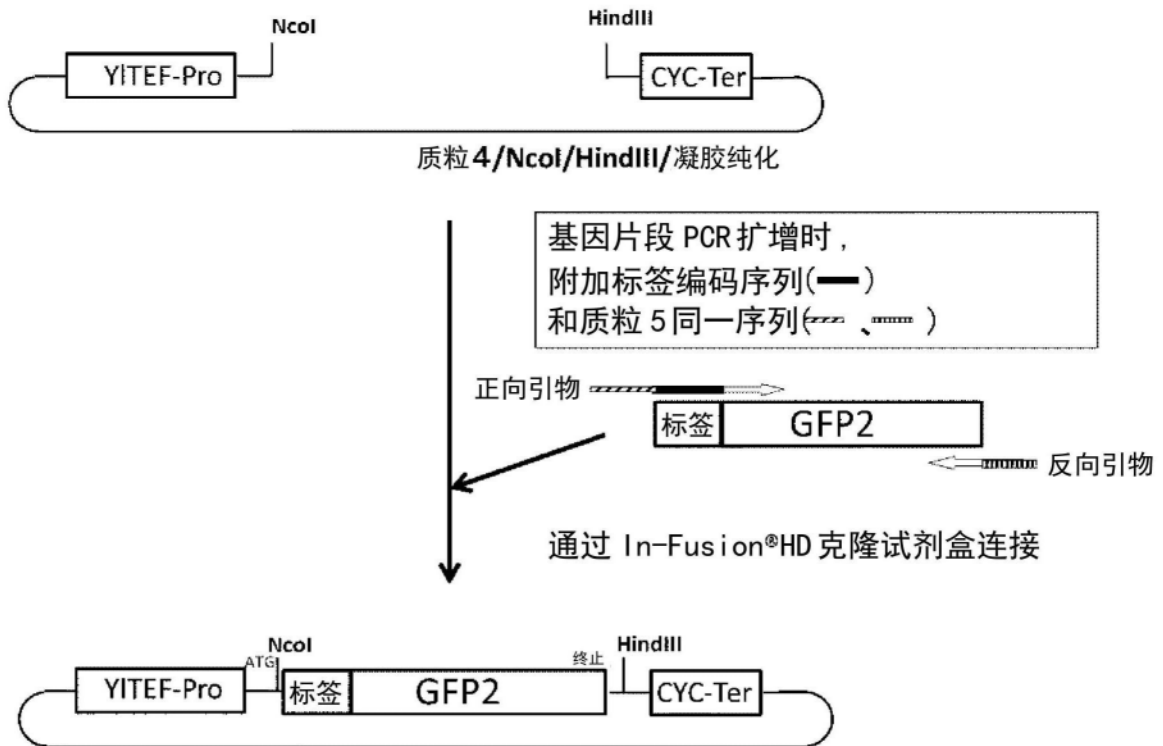


图4

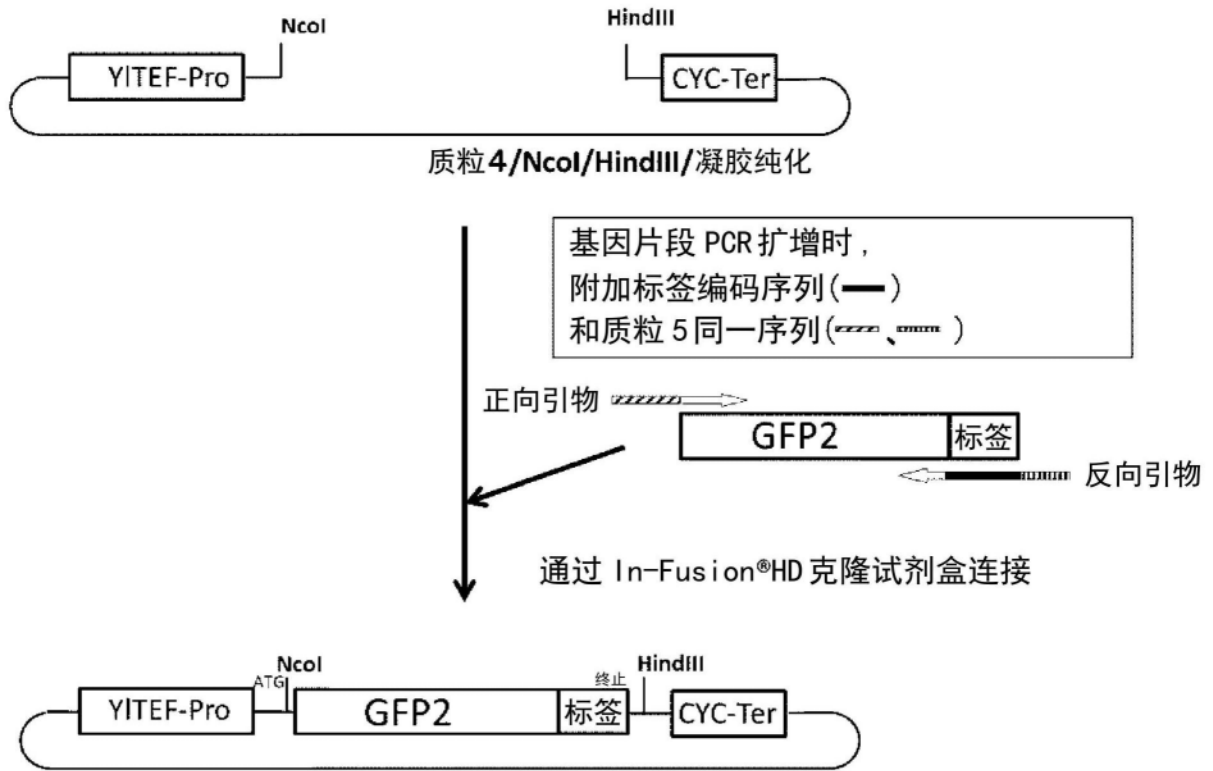


图5

无细胞系统 GFP2 表达量 (无标签比)

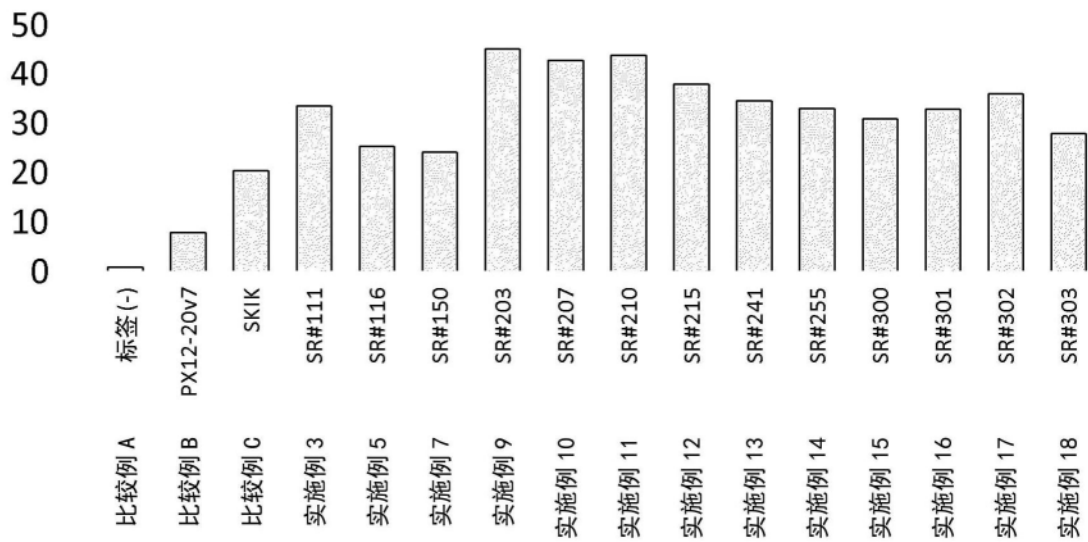


图6

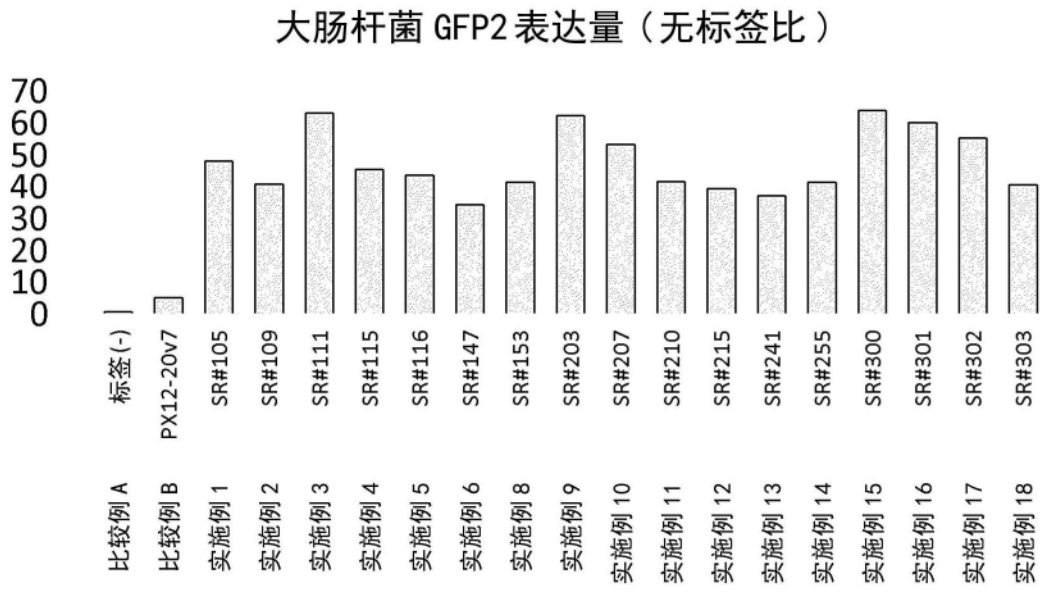


图7

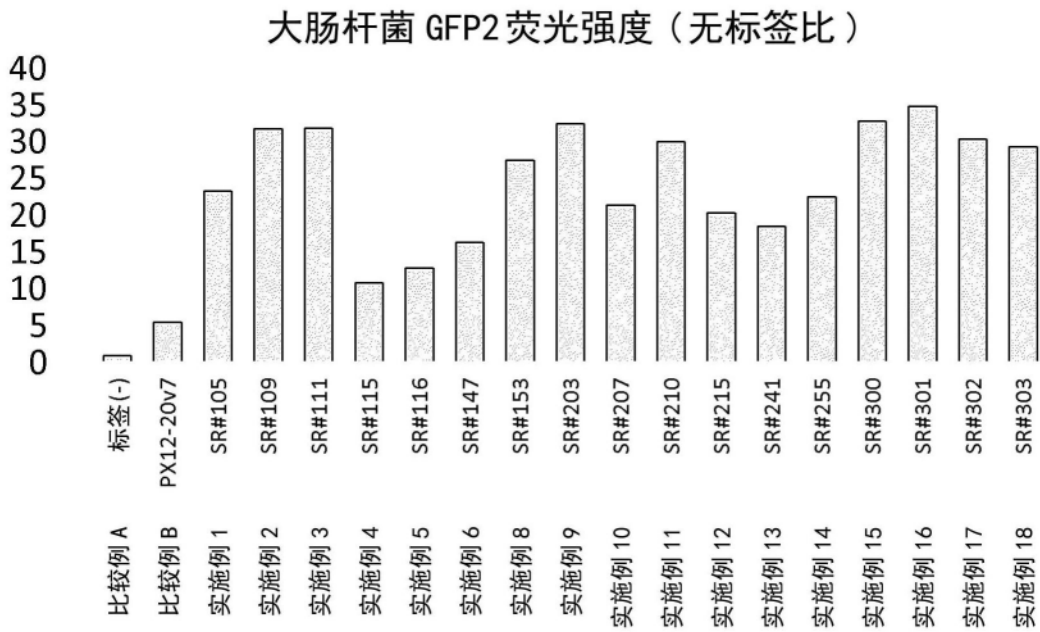


图8

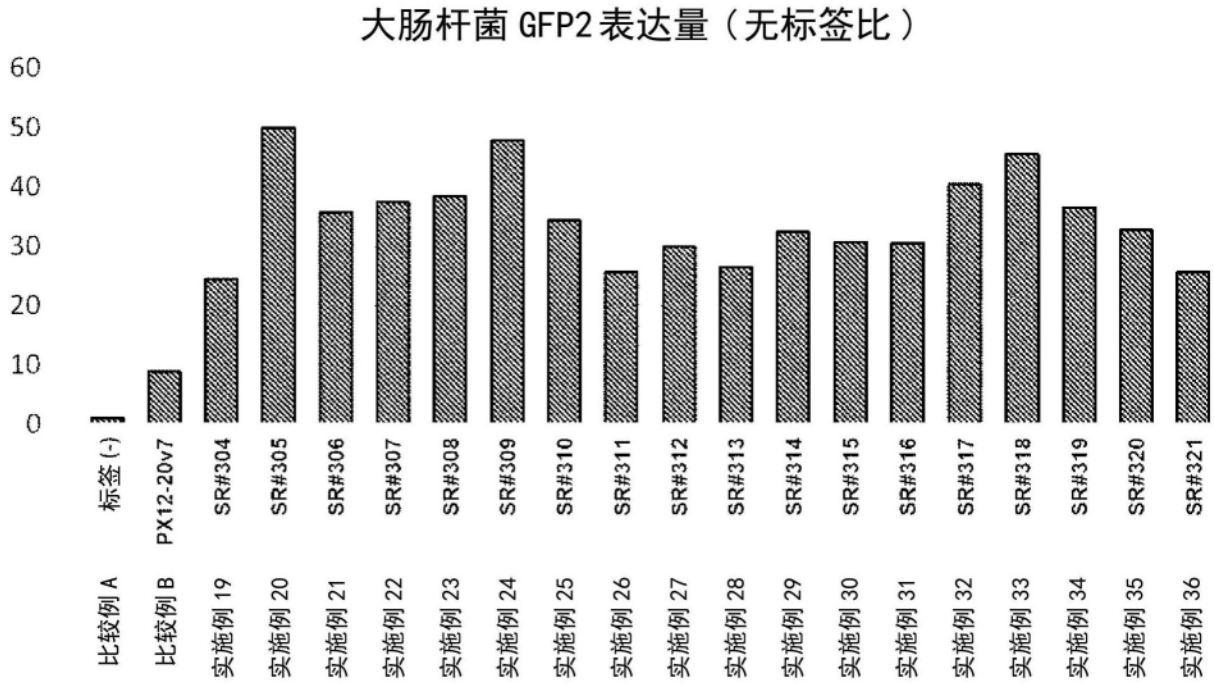


图9

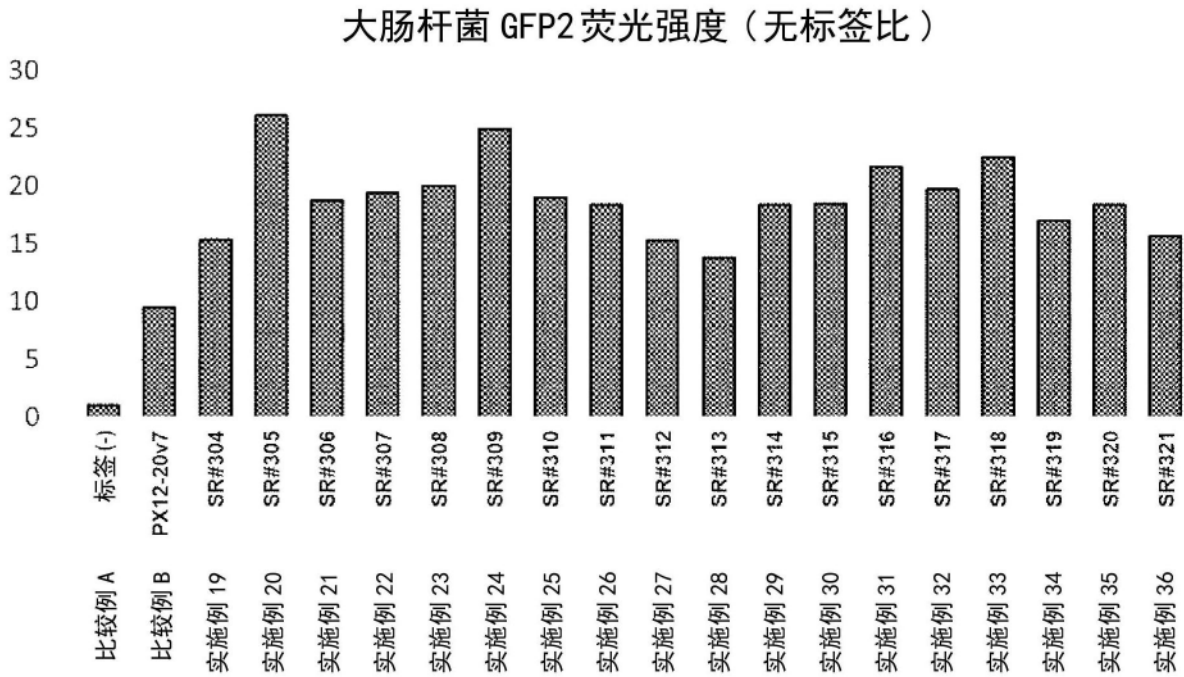


图10

大肠杆菌 VHH 抗体表达量 (无标签比)

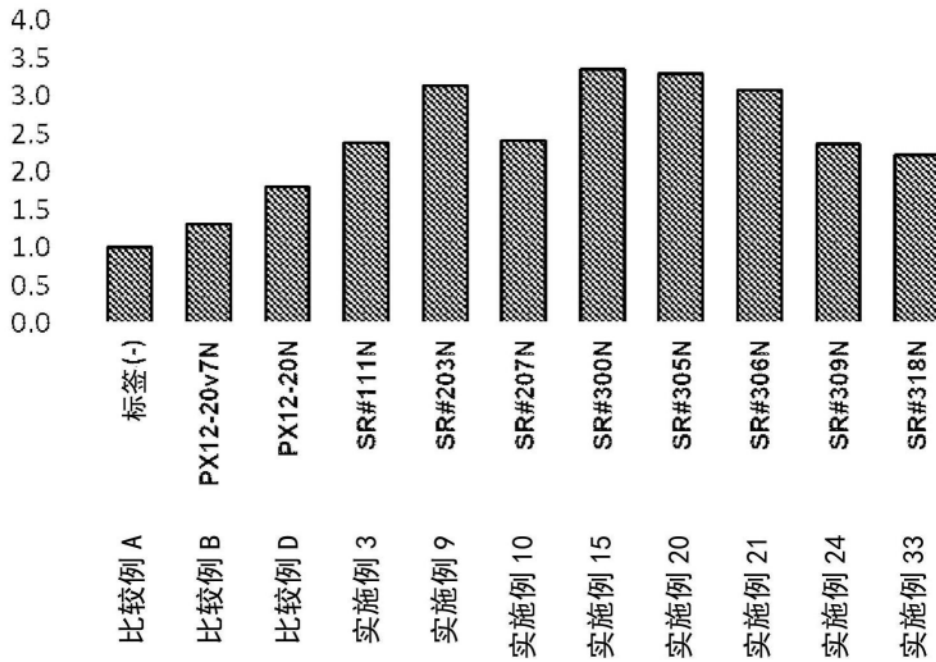


图11

大肠杆菌 VHH 抗体表达量 (无标签比)

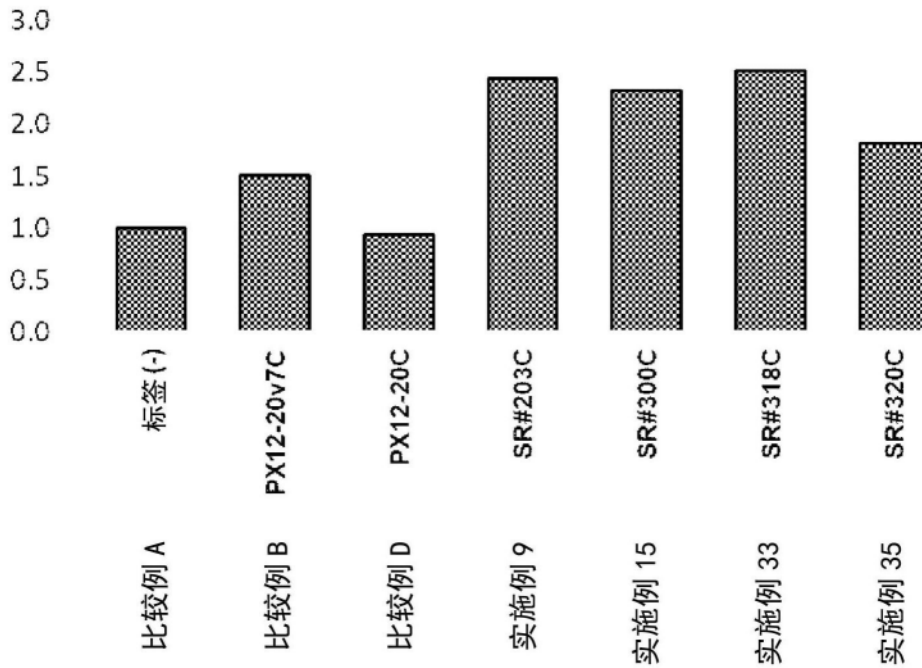


图12

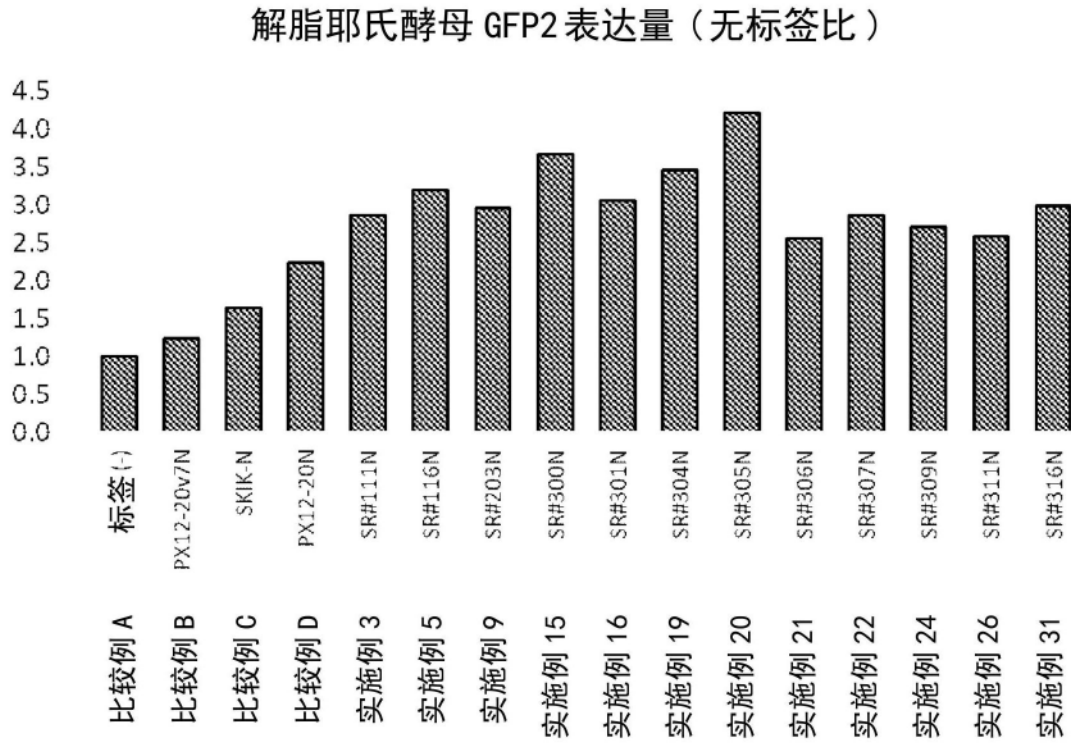


图13

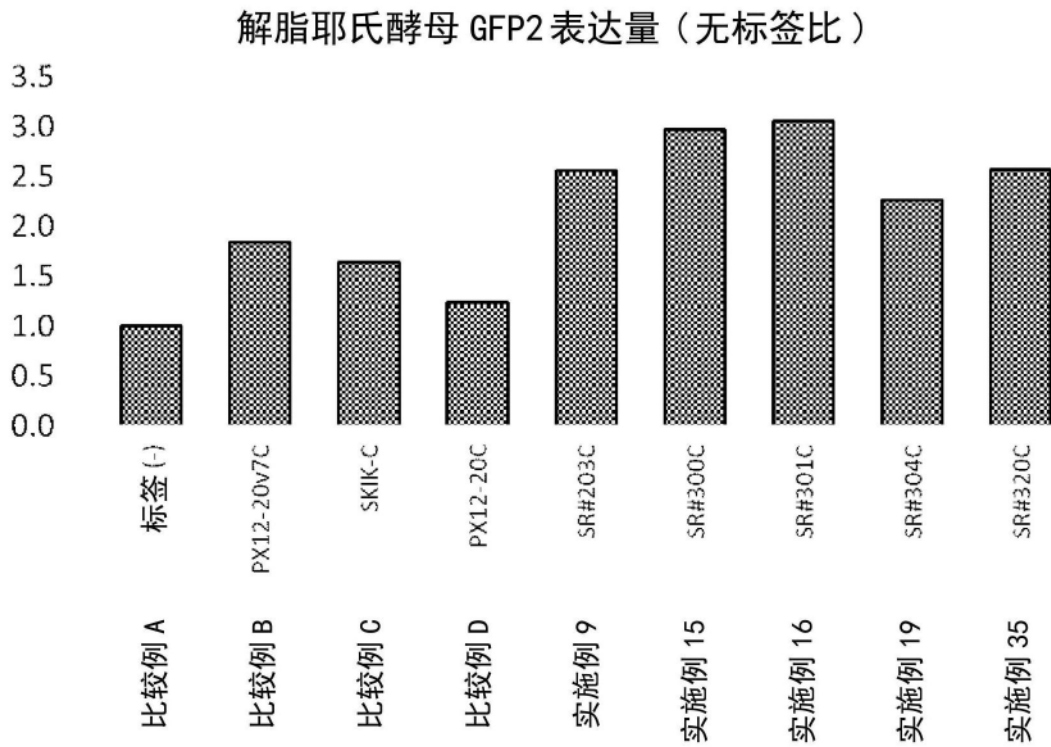


图14