

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 30 日 (30.12.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/258372 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/47 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/095114
- (22) 国际申请日: 2019 年 7 月 8 日 (08.07.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910557170.2 2019 年 6 月 25 日 (25.06.2019) CN
- (71) 申请人: 成都英普博集生物科技有限公司(CHENGDU ENZPRO BIOTECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国四川省成都市高新区天府大道中段 1388 号 1 栋 5 层 522 号, Sichuan 610041 (CN)。
- (72) 发明人: 刘懿 (LIU, Yi); 中国四川省成都市双流区东升镇三强北路二段 88 号, Sichuan 610200 (CN)。
- (74) 代理人: 成都顶峰专利事务所(普通合伙)(CHENGDU DINGFENG PATENT AGENCY (GENERAL PARTNER)); 中国四川省成都市高新区府城大道西段 399 号, Sichuan 610000 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(54) **Title:** THIOREDOXIN MUTANT, PREPARATION METHOD THEREOF, AND APPLICATION THEREOF IN PRODUCTION OF RECOMBINANT FUSION PROTEIN

(54) 发明名称: 硫氧还蛋白突变体、其制备方法及其在重组融合蛋白生产中的应用

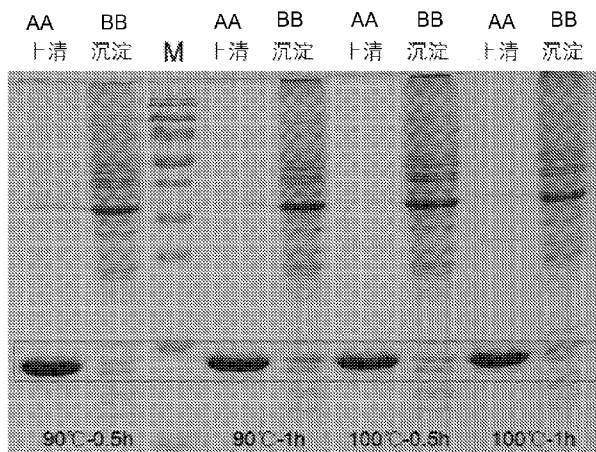


图 2

AA Supernate
BB Precipitate

(57) **Abstract:** Disclosed are a thioredoxin mutant, preparation method thereof, and application thereof in production of recombinant fusion protein. The recombinant fusion protein produced by the expression of the thioredoxin mutant of the present invention has good solubility and stability in high-temperature environments and is not easily denatured.

(57) **摘要:** 本发明公开了一种硫氧还蛋白突变体、其制备方法及其在重组融合蛋白生产中的应用。利用本发明的硫氧还蛋白突变体表达生产的重组融合蛋白在高温环境下的可溶稳定性好、不易变性。



WO 2020/258372 A1

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

硫氧还蛋白突变体、其制备方法及其在重组融合蛋白生产中的应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及硫氧还蛋白突变体，这些突变导致硫氧还蛋白突变体热稳定性、可溶性和净电荷特性的改变，硫氧还蛋白突变体的制备方法以及利用该硫氧还蛋白突变体在重组融合蛋白生产中的应用。

背景技术

许多有着生物活性的多肽和蛋白质在现代农业、生物化工、医药健康、美容护理和食品保健等领域具有潜在的用途和商业价值，但是它们的应用往往受到工业化生产条件的限制，例如在热，有机溶剂和各种化学品操作条件下易变性。然而，在这些条件下稳定的蛋白质已广泛应用于工业生产。

蛋白质的三维结构对其功能至关重要。事实上，蛋白质功能和结构的多样性完全取决于不同氨基酸序列所折叠形成的不同三维构象。关于蛋白质三维结构与其生物学和结构性质之间的关系研究是蛋白质化学发展的重要方面。

折叠蛋白质的稳定性决定于不同稳定蛋白质结构的相互作用，如疏水和亲水相互作用，氢键，二级结构等之间的平衡，以及由去折叠自由能变化引起的不稳定趋势。因此，通过改变影响蛋白质稳定性相互作用的氨基酸，可以增加或减少蛋白质的稳定性。然而，构象和其他变化可能使氨基酸替代的效果难以预测，实际这也是蛋白质工程研究领域中的重要挑战。

许多肽和蛋白质可以通过重组方法在多种表达系统中产生，例如各种细菌，真菌，哺乳动物、植物或昆虫细胞。然而，当细菌被用作异源基因表达宿主时，通常会出现以下一些困难与问题。首先，编码多肽的异源基因通常在细菌中难以成功表达。由于它们氨基酸序列长度太短，大多数多肽异源表达时难以形成稳定和可溶的构象，从而受到宿主细胞中蛋白酶和肽酶的降解。那些在大肠杆菌或其他细菌宿主中能直接表达的多肽通常以不溶性或包涵体形式存在，这种情况使得它们无法直接用于生物活性筛选，同时对这些多肽的提取与纯化带来了困难。其次，即便产生的多肽不以包涵体形式存在，由于它们具有高度的构象自由度，也可能具有大量潜在的不同结构，而这些结构的生物活性会有高低差别。因此，多肽在生产中即使一级结构一致，但活性大小也会因其高级结构的不同而受影响。这也是短肽异源表达时遇到的另一个困难。

此外，蛋白质在细菌细胞中异源表达时，也经常会以包涵体形式产生。这些包涵体通常需要通过重溶与复性的过程才能恢复蛋白的生物活性，但复性的过程影响因素复杂，因此，复性的效果具有不确定性。而且，复性的方法在技术上通常具有难度，使用的试剂昂贵，对重组蛋白的生产来说成本过高。

为了解决上述问题，本领域已经使用某些肽或蛋白作为目标肽或蛋白质的融合标签，以使目标异源多肽或蛋白质以融合蛋白的形式在细菌表达系统中重组表达。常用的融合标签包括弹性蛋白样多肽（ELPs）、麦芽糖结合蛋白（MBP）、钙调素结合蛋白（CaMBPs）、N-利用物质 A（NusA）、翻译起始因子 IF2、谷胱甘肽-S-转移酶（GST）、肽基脯氨酰顺反异构酶（PPIases）、二硫键形成蛋白 A（DsbA）和硫氧还蛋白（Trx）等。

然而，通过这些标签蛋白融合生产的目标肽或蛋白即便在细菌宿主细胞中以可溶形式表达，在后续下游生产工艺中仍然具有其他潜在缺点。这些胞内成功表达的重组多肽或蛋白质进入下游纯化工艺的最初步骤即破胞释放。通常在工业化生产中，采用的破胞方法主要有三类：一是物理破胞，主要是细胞冻融、冷冻干燥和高压匀浆破胞。物理法除了高压匀浆可进行大规模工业化生产外，其余均难以适应规模化生产所需，然而高压匀浆法所用设备昂贵，处理时间通常在 10 小时以上，不利于压力敏感或易蛋白酶降解的重组多肽或蛋白的生产；二是化学破胞，主要是用溶媒和表面活性剂破胞提取，该方式不仅有有机溶剂使用量大，对重组多肽或蛋白的空间构型有潜在影响，容易导致生物活性丧失，还会造成环境污染。三是生

物破胞，主要是利用一些复合溶菌酶进行破胞，然而，酶法破胞时间长且一般不彻底，重组多肽或蛋白收率不高，同时外源加入的溶菌酶使得后续纯化过程复杂化，导致产率降低，此外，对成品质量控制也会造成潜在隐患。

因此，本领域现有使用的破胞方法对细菌宿主异源表达的重组多肽或蛋白（简称为重组融合蛋白）释放与提取均不能满足高效、低廉且可规模化生产的工业化要求。

发明内容

本发明所要解决的技术问题在于针对上述现有技术中的不足，提供硫氧还蛋白突变体。本发明采用的技术方案是：一种硫氧还蛋白突变体，该硫氧还蛋白突变体是具有高温可溶性的非天然蛋白。

本发明的工作原理或有益效果为：硫氧还蛋白突变体在长时间高温条件下仍旧能够保持可溶性；硫氧还蛋白突变体同时具有热稳定性和在细菌宿主菌体内的可溶表达性，即表达产生的重组融合蛋白能够快速释放，能够快速提取、提取需要的试剂和实验设备价格低廉且能够用于工业上的大规模生产，高温环境下的可溶稳定性好和不易变性。

进一步限定，该硫氧还蛋白突变体是在硫氧还蛋白模型蛋白的氨基酸序列的基础上人工突变得到的。

本发明通过对天然硫氧还蛋白的分子改造，在保留天然硫氧还蛋白在细菌宿主体内可溶表达性质的同时，赋予其在对细菌宿主发酵液高温搅拌破胞时，长期保持在水相中稳定可溶的特性，而宿主细胞蛋白、其他杂质蛋白和细胞碎片因不具备高温下在水相中长期稳定的性质，经过一定时间保温处理后，会逐渐聚集沉淀，经固液分离处理，从破胞混悬液中获得分离提取，最后本发明提供的硫氧还蛋白突变体会以较高的纯度保留在清液中。因为热破胞不需要特殊设备，（通常在发酵罐中即可进行），破胞保温时间与发酵液体积无关，因此，通过使用本发明提供的硫氧还蛋白突变体可有效满足重组多肽或蛋白质的高效、低廉和规模化生产的商业化需求。

本发明还提供硫氧还蛋白突变体的制备方法，包括以下步骤：

1) 以硫氧还蛋白模型蛋白的编码基因为模板，对其进行随机突变，从而获得编码硫氧还蛋白突变体的基因突变库；

2) 将硫氧还蛋白模型蛋白的基因突变库克隆至表达载体，获得重组表达载体，然后将所述表达载体转化至适宜的表达宿主，并筛选出表达量高的硫氧还蛋白突变体表达文库；

3) 对硫氧还蛋白突变体表达文库中的硫氧还蛋白突变体编码基因进行测序分析，计算出 $\Delta\Delta G$ 值和 Δ 净电荷，并筛选出 $\Delta\Delta G$ 有显著下降且 Δ 净电荷提升的硫氧还蛋白突变体优选文库；

4) 将硫氧还蛋白突变体优选文库的转化子置于含有抗生素的液体培养基中培养至对数生长期，加入诱导剂开始诱导，继续培养至终点，然后于培养液中加入等体积的缓冲液混匀，于70-100℃水浴中孵育一段时间，取样离心后将上清样进行SDS-PAGE分析，根据条带光密度值大小进行硫氧还蛋白突变体热稳定性及热可溶性能的复筛；

5) 使用编码具有硫氧还蛋白模型蛋白的基因或一种或多种同源基因，获得具有耐热可溶性能提升的硫氧还蛋白突变体的突变基因，可选择性地将步骤1)到4)重复一次或若干次；

6) 对获得的具有耐热可溶性能提升的硫氧还蛋白突变体进行表达。

本发明还提供硫氧还蛋白突变体在重组融合蛋白生产中的应用，所述重组融合蛋白的结构有两种，分别命名为结构体1和结构体2，其中：结构体1的结构为：硫氧还蛋白突变体——连接肽——切割位点——目标异源多肽或蛋白质，结构体2的结构为：硫氧还蛋白突变体——切割位点——目标异源多肽或蛋白质；结构体1的制备方法为：目标异源多肽或蛋白质与切割位点结合后得到中间体1，中间体1与连接肽结合后得到中间体2，中间体2与硫氧还蛋白突变体的氨基末端或羧基末端结合得到所述结构体1；结构体2的制备方法为：目标异源多肽或

蛋白质与切割位点结合后得到中间体1, 中间体1与硫氧还蛋白突变体的氨基末端或羧基末端结合得到所述结构体2, 所述目标异源多肽或蛋白质为由数量不大于60的氨基酸组成的聚合物。

附图说明

图1是表示部分高表达硫氧还蛋白突变体表达筛选实验的 SDS-PAGE 检测结果图, 图中箭头指示硫氧还蛋白突变体条带, 其中: 顶部数字为部分硫氧还蛋白突变体筛选编号, M 为蛋白 Marker。

图2是表示部分硫氧还蛋白突变体优选文库的热稳定性及热可溶性能复筛的 SDS-PAGE 电泳检测结果图, 图中矩形框指示硫氧还蛋白突变体条带, M 代表蛋白 Marker。

图3是表示重组工程菌在 30L 发酵罐培养过程中, 重组融合蛋白 mTrx39-GSGSG-DDDDK-Arg³⁴GLP-1(9-37)随时间的表达的 SDS-PAGE 电泳检测结果图, 图中箭头指示重组融合蛋白 mTrx39-GSGSG-DDDDK-Arg³⁴GLP-1(9-37)条带。

图4是表示在重组肠激酶裂解反应中, 通过反相 HPLC 测定的重组融合蛋白 mTrx39-GSGSG-DDDDK-Arg³⁴GLP-1(9-37)裂解为 Arg³⁴GLP-1(9-37)随时间变化的色谱分析图, 检测波长 214nm, 其中横坐标为检测时间, 纵坐标为紫外检测响应值。

图5是表示经等电点沉淀后获得的 Arg³⁴GLP-1(9-37)沉淀重溶后, 通过反相 HPLC 测定色谱分析图, 其中横坐标为检测时间, 纵坐标为紫外检测响应值。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明做进一步的详细说明, 以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。应当理解, 本文所使用的诸如“具有”、“包含”以及“包括”术语并不排除一个或多个其它元件或其组合的存在或添加。

在文所使用的描述中, “若干”的含义是两个或两个以上, 除非另有明确具体的限定。术语“ $\Delta\Delta G$ ”在本文中被定义为蛋白质解折叠自由能差值, 计算公式为: $\Delta\Delta G = \Delta G_{TrxWT} - \Delta G_{mTrx}$, 量纲 kcal/mol, 其值反映了野生型蛋白和突变体结构之间的稳定性差异, 该值越小, 表明突变体比野生型蛋白结构越稳定。术语“ ΔG_{TrxWT} ”在本文中被定义为硫氧还蛋白模型蛋白分子的解折叠自由能, 量纲 kcal/mol。术语“ ΔG_{mTrx} ”在本文中被定义为硫氧还蛋白突变体分子的解折叠自由能, 量纲 kcal/mol。术语“ Δ 净电荷”在本文中被定义为在 pH=8.0 环境下蛋白质分子净电荷差异, 计算公式为: Δ 净电荷=净电荷 TrxWT-净电荷 mTrx, 其值反映了野生型蛋白和突变体结构之间的带电量差异, 该值越小, 表明突变体比野生型蛋白分子带电量越高。术语“净电荷 TrxWT”在本文中被定义为硫氧还蛋白模型蛋白分子的净电荷数。术语“净电荷 mTrx”在本文中被定义为硫氧还蛋白突变体分子的净电荷数。术语“光密度”或“OD”在本文中被定义为利用凝胶成像系统中投射白光拍摄记录的蛋白凝胶电泳图中各蛋白条带的入射光与透射光比值的对数: $OD = \lg(\text{入射光}/\text{透射光})$ 或 $OD = \lg(1/\text{透光率})$, 为无量纲值。术语“连接肽”在本文中被定义为连接硫氧还蛋白突变体与切割位点之间的一段多肽序列, 具体为硫氧还蛋白突变体 C 端与切割位点 N 端之间的一段氨基酸序列。术语“切割位点”在本文中被定义为蛋白内切酶或化学试剂识别的一段特定氨基酸序列。

本发明共包含七个方面, 第一方面, 本发明提供了用于多肽和蛋白质融合表达的一系列硫氧还蛋白突变体 (mTrx), 它们是具有可溶性的模型蛋白的突变体。本发明提供的硫氧还蛋白突变体与具有可溶性的模型蛋白相比, 所述硫氧还蛋白突变体在长时间高温条件下仍旧能够保持可溶性。

在本发明的上下文中, “硫氧还蛋白突变体 (mTrx)” 指任何这样的蛋白: 其具有高温可溶性, 但并非从天然来源获得, 其氨基酸序列与 *Geobacillus stearothermophilus* 和 *Bacillaceae* 和 *Anoxybacillus tepidamans* 和 *Falsibacillus pallidus* 的天然硫氧还蛋白的氨基酸序列有所不同。

本发明提供的硫氧还蛋白突变体, 所述硫氧还蛋白突变体是在硫氧还蛋白模型蛋白氨基

酸序列的基础上人工突变得到的, 所述硫氧还蛋白模型蛋白为来源于 *Geobacillus stearothermophilus* 的硫氧还蛋白, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。所述硫氧还蛋白突变体, 其优选地在 SEQ ID NO. 1 以下区域内至少一个氨基酸位置被修饰: 由位置 8、10、12、13、15、17、23、29、33、36、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93、94 和 102 组成的组 1 中的氨基酸序列。更优的选择是硫氧还蛋白突变体在 SEQ ID NO. 1 以下区域内至少一个氨基酸位置被修饰: 由位置 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 组成的组 2 中的氨基酸序列。最优选地, 硫氧还蛋白突变体在 SEQ ID NO. 1 以下区域内至少一个氨基酸位置被修饰: 由位置 12、15、23、44、51、56、71、85、93 和 102 组成的组 3 中的氨基酸序列。

在氨基酸位置上的修饰包括被另一氨基酸取代, 所述另一氨基酸选自 20 种 L 构型天然氨基酸, 如表 1 所示。或者, 氨基酸位置上的修饰包括删除所述位置上的氨基酸。另外, 氨基酸位置上的修饰可包括取代所述氨基酸 C 端或 N 端侧的一个或多个氨基酸。

表 1 20 种 L 构型天然氨基酸

氨基酸名称	三字母缩写	单字母缩写
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬氨酸	Asp	D
天冬酰胺	Asn	N
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

本发明中所述的具有硫氧还蛋白结构的模型蛋白选自下列蛋白构成的组: 具有硫氧还蛋白结构且优选具有 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列, 即 *Geobacillus stearothermophilus* 菌的硫氧还蛋白或具有 SEQ ID NO.2 的氨基酸序列, 即 *Bacillaceae* 菌种的硫氧还蛋白或具有 SEQ ID NO.3 的氨基酸序列, 即 *Anoxybacillus tepidamans* 菌种的硫氧还蛋白或具有 SEQ ID NO.4 的氨基酸序列, 即 *Falsibacillus pallidus* 菌种的硫氧还蛋白。

所述模型蛋白具有与 SEQ ID NO.1 有至少 70%, 优选至少 75%, 更优选至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 最优选至少 95% 的百分比同一性的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.2 有至少 70%, 优选至少 75%, 更优选至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 最优选至少 95% 的百分比同一性的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.3 有至少 70%, 优选至少 75%, 更优选至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 最优选至少 95% 的百分比同一性的氨基酸序列, 或具有与 SEQ ID NO.4 有至少 70%, 优选至少 75%, 更优选至少

80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，最优选至少 95%的百分比同一性的氨基酸序列的蛋白。作为用于本发明的具有耐高温且可溶的模型蛋白而言，更优选的是具有高温可溶性，并且具有 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列或具有 SEQ ID NO.2 的氨基酸序列或具有 SEQ ID NO.3 的氨基酸序列或具有 SEQ ID NO.4 的氨基酸序列的蛋白。作为具有高温可溶性的模型蛋白而言，最优选的是 *Geobacillus stearothermophilus* 菌的硫氧还蛋白 (SEQ ID NO.1)。

本发明优选提供了选自下述系列硫氧还蛋白模型的突变体，所述系列由具有 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列的 TrxA 和具有 SEQ ID NO.2 的氨基酸序列的 Trx 和具有 SEQ ID NO.3 的氨基酸序列的 Trx 和具有 SEQ ID NO.4 的氨基酸序列的 Trx，以及具有与 SEQ ID NO.1 有至少 70%，优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，最优选至少 95%的百分比同一性的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO.2 有至少 70%，优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，最优选至少 95%的百分比同一性的氨基酸序列且具有高温可溶性的蛋白结构，并且，所述突变体具有至少在以下位点的修饰：

选自 8、10、12、13、15、17、23、29、33、36、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93、94 和 102 的一个或多个氨基酸位置。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的一个或多个氨基酸位置。选自 12、15、23、44、51、56、71、85、93 和 102 的一个或多个氨基酸位置。选自 12、15、23、44、51、56、71、85、93 和 102 的 2 个或多个氨基酸位置，更优选地在位置 15+51 或 23+51 或 85+93 或 15+93 或 23+93 或 51+102 或 15+102 或 15+23。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 3 个或多个氨基酸位置，更优选地在位置 23+85+93 或 15+85+93 或 51+85+93 或 44+85+93 或 85+93+102 或 23+44+51 或 44+51+85。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 4 个或多个氨基酸位置，更优选地在位置 23+51+85+93 或 15+51+85+93 或 15+23+85+93 或 23+44+51+85 或 44+51+85+93 或 23+44+85+93。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 5 个或多个氨基酸位置，更优选地在位置 15+23+51+85+93 或 23+51+85+93+102 或 23+44+51+85+93 或 15+44+51+85+93 或 12+56+71+93+102 或 12+15+56+71+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 6 个或多个氨基酸位置，更优选地在位置 15+23+29+44+51+85 或 15+23+44+51+85+93 或 12+23+56+71+93+102 或 12+56+71+85+93+102 或 15+23+44+51+85+93 或 23+44+51+85+93+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 7 个或多个氨基酸位置，更优选地在位置 15+23+44+51+85+93+102 或 15+23+44+51+71+85+93 或 15+23+44+51+74+85+93 或 12+15+23+44+51+85+93 或 15+23+43+44+51+85+93。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 8 个或多个氨基酸位置，更优选地在位置 12+15+23+44+51+85+93+102 或 15+23+44+51+56+85+93+102 或 15+23+44+51+71+85+93+102 或 15+23+29+44+51+85+93+102 或 12+15+23+44+51+56+85+93 或 15+23+29+44+51+56+71+85。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 9 个或多个氨基酸位置，更优选地在位置 12+15+23+44+51+56+71+85+93 或 15+23+43+44+51+74+85+91+93 或 15+23+29+44+51+71+85+93+102 或 15+23+44+51+56+71+85+93+102 或 12+15+23+44+51+71+85+93+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 10 个或多个氨基酸位置，更优选地在位置 12+15+23+29+44+51+56+71+85+93 或 15+23+43+44+51+71+74+85+91+93 或 15+23+43+44+51+74+85+91+93+102 或 12+15+23+44+51+56+71+85+93+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 11 个氨基酸位置，更优选地在位置 12+15+23+44+51+56+71+85+91+93+102 或 12+15+23+29+44+51+56+71+85+93+102 或 12+15+23+44+51+56+71+74+85+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+71+85+93+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、

74、82、85、91、93 和 102 的 12 个氨基酸位置,更优选地在位置 12+15+23+29+44+51+56+71+85+91+93+102 或 12+15+23+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+71+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+71+74+85+93+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 13 个氨基酸位置,更优选地在位置 12+15+23+29+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+44+51+56+71+74+82+85+91+93+102 或 12+15+23+44+51+56+58+71+74+85+91+93+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 14 个氨基酸位置,更优选地在位置 12+15+23+43+44+51+56+71+74+82+85+91+93+102 或 12+15+23+29+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+13+15+23+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+33+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+58+71+74+85+91+93+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 15 个氨基酸位置,更优选地在位置 12+13+15+23+29+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+13+15+23+33+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+58+71+74+82+85+91+93+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 16 个氨基酸位置,更优选地在位置 12+13+15+23+29+43+44+51+56+58+71+74+85+91+93+102 或 12+13+15+23+33+43+44+51+56+58+71+74+82+85+91+93+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 17 个氨基酸位置,更优选地在位置 12+13+15+23+33+43+44+51+56+58+71+74+82+85+91+93+102 或 12+13+15+23+29+33+43+44+51+56+58+71+74+85+91+93+102 或 12+13+15+23+29+43+44+51+56+58+71+74+82+85+91+93+102。选自 12、13、15、23、29、33、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93 和 102 的 18 个氨基酸位置。

本发明还提供前述定义的硫氧还蛋白突变体,其为 *Geobacillus stearothermophilus* 菌的硫氧还蛋白的突变体,所述硫氧还蛋白突变体在选自以下氨基酸位置上被修饰:由位置 D8、T10、A12、A13、T15、D17、D23、C29、R33、A36、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93、E94 和 K102 组成的组,其中数字前的字母表示各自的氨基酸(单字母缩写),后面的数字是 SEQ ID NO.1 中所述 *Geobacillus stearothermophilus* 的硫氧还蛋白的氨基酸序列中的氨基酸位置。

优选的硫氧还蛋白突变体是至少在下述位点具有修饰的 *Geobacillus stearothermophilus* 硫氧还蛋白突变体:

选自 D8、T10、A12、A13、T15、D17、D23、C29、R33、A36、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93、E94 和 K102 的一个或多个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的一个或多个氨基酸位置。选自 A12、T15、D23、R44、K51、N56、S71、D85、K93 和 K102 的一个或多个氨基酸位置。选自 A12、T15、D23、R44、K51、N56、S71、D85、K93 和 K102 的 2 个或多个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 3 个或多个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 4 个或多个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 5 个或多个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 6 个或多个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 7 个或多个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 8 个或多个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、

C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 9 个或多个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 10 个或多个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 11 个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 12 个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 13 个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 14 个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 15 个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 16 个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 17 个氨基酸位置。选自 A12、A13、T15、D23、C29、R33、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93 和 K102 的 18 个氨基酸位置。

Geobacillus stearothermophilus 的硫氧还蛋白中各个位置的优选修饰如下（使用氨基酸单字母缩写代码）：

SEQ ID NO.1 位置 8 的 D 被 Q、E、A、K、R、S 或 T 取代，更优选地被 Q、E、A、或 K 取代，最优选被 A 取代。SEQ ID NO.1 位置 10 的 T 被 D、E、Q、K、R、S 或 I 取代，更优选地被 D、I 或 Q 取代，最优选被 I 取代。SEQ ID NO.1 位置 12 的 A 被 G、E、Q、K、R、S 或 I 取代，更优选地被 G 或 I 取代，最优选被 I 取代。SEQ ID NO.1 位置 13 的 A 被 D、E、Q、K、R、S 或 I 取代，更优选地被 I 或 Q 取代，最优选被 I 取代。SEQ ID NO.1 位置 15 的 T 被 I、V、A、T 取代或被删除，更优选地被 I 或 Q 取代，最优选 I 取代。SEQ ID NO.1 位置 17 的 D 被 N、E、Q、K、R、S、G 或 A 取代，更优选地被 E 或 Q 取代，最优选 E 取代。SEQ ID NO.1 位置 23 的 D 被 T、Q、K、R、S、G 或 N 取代，更优选地被 S 或 T 取代，最优选 T 取代。SEQ ID NO.1 位置 29 的 C 被 R、D、S、T、N、K、W 取代或被删除，更优选地被 R、S、K、W 取代或被删除，最优选被 S 取代和被删除。SEQ ID NO.1 位置 33 的 R 被 D、E、Q、K、N 或 R 取代，更优选地被 K、Q 或 N 取代，最优选被 K 取代。SEQ ID NO.1 位置 36 的 A 被 G、S、T、K、R、H、L 取代或被删除，更优选地被 L、S、K 取代或被删除，最优选被删除。SEQ ID NO.1 位置 43 的 D 被 Q、Y、W、P、I 或 E 取代，更优选地被 Q 或 E 取代，最优选被 E 取代。SEQ ID NO.1 位置 44 的 R 被 L、A、Q、S、T、K 或 H 取代，更优选地被 L、A 或 Q 取代，最优选被 Q 取代。SEQ ID NO.1 位置 51 的 K 被 Q、D、R、E 或 I 取代，更优选地被 Q 或 R 取代，最优选 K51R 取代。SEQ ID NO.1 位置 56 的 N 被 E、Q、R、K、W 或 Y 取代，更优选地被 K、R 或 Q 取代，最优选被 K 取代。SEQ ID NO.1 位置 58 的 D 被 W、R、T、D、Q、H 或 E 取代，更优选地被 R、Q 或 E 取代，最优选被 E 取代。SEQ ID NO.1 位置 71 的 S 被 I、L、K、D、M、E 或 N 取代，更优选地被 I、L 或 M 取代，最优选被 M 取代。SEQ ID NO.1 位置 74 的 T 被 I、L、D、S、M 或 V 取代，更优选地被 I 或 M 取代，最优选被 I 取代。SEQ ID NO.1 位置 82 的 E 被 Q、N、R 或 K 取代，更优选地被 K、N 或 R 取代，最优选被 K 取代。SEQ ID NO.1 位置 85 的 D 被 R、Q、H、N、E 或 K 取代，更优选地被 E、Q 或 K 取代，最优选被 E 取代。SEQ ID NO.1 位置 91 的 Q 被 E、Y、I、N 或 R 取代，更优选地被 R 或 K 取代，最优选被 K 取代。SEQ ID NO.1 位置 93 的 K 被 P、M、S、I、Q 或 N 取代，更优选地被 P 或 M 取代，最优选被 P 取代。SEQ ID NO.1 位置 94 的 E 被 D、S、E、Q、N、K 或 R 取代，更优选地被 D、S、E 或 Q 取代，最优选 E94Q 取代。SEQ ID NO.1 位置 102 的 K 被 D、S、E、H、Y、K 或 R 取代，更优选地被 H、Y 或 S 取代，最优选被 H 取代。

高度优选的硫氧还蛋白突变体如表 2 所示, 每个突变体由其编号标识: 突变被引入来自 *Geobacillus stearothermophilus* 的硫氧还蛋白 (SEQ ID NO.1)。根据实施例 3 中的 $\Delta\Delta G$ 和 Δ 净电荷计算方法, 以来自 *Geobacillus stearothermophilus* 的硫氧还蛋白 (SEQ ID NO.1) 的 ΔG 和净电荷为模型对照。

本发明提供的硫氧还蛋白突变体与具有耐热性的硫氧还蛋白模型蛋白相比, $\Delta\Delta G$ 更小或 Δ 净电荷更大, 更利于后期基于高温和电荷性质开发的下游纯化工工艺。硫氧还蛋白突变体 $\Delta\Delta G$ 降低了至少 -1 kcal/mol、更优选地至少 -2 kcal/mol、更优选地至少 -3 kcal/mol、更优选地至少 -4 kcal/mol、更优选地至少 -5 kcal/mol、更优选地至少 -6 kcal/mol、更优选地至少 -7 kcal/mol、更优选地至少 -8 kcal/mol、更优选地至少 -9 kcal/mol、更优选地至少 -10 kcal/mol、更优选地至少 -11 kcal/mol、更优选地至少 -12 kcal/mol、更优选地至少 -13 kcal/mol。硫氧还蛋白突变体 Δ 净电荷提高了至少 -0.8、更优选地至少 -1、更优选地至少 -2、更优选地至少 -3。对高温环境更稳定且净电荷更大的硫氧还蛋白突变体更有利于应用在目标异源多肽或蛋白的生产方法中, 详细方法在下文会进一步描述。最有价值地是, 本发明提供的硫氧还蛋白突变体同时具有热稳定性和在细菌宿主菌体内的可溶表达性, 以及高温环境下的可溶稳定性。

第二方面, 本发明提供编码本发明硫氧还蛋白突变体的多核苷酸。编码本发明硫氧还蛋白突变体的多核苷酸可以是编码本发明合适氨基酸序列的任何多核苷酸。或者, 本发明的多核苷酸可包括含编码序列, 其中多种氨基酸的密码子选择不同于来自 *Geobacillus stearothermophilus* 中的密码子选择。例如所述密码子可以被优化来适合特定的宿主细胞的密码子偏好需求, 并用于编码硫氧还蛋白突变体的 DNA 片段转化。

第三方面, 本发明提供包含前文所述多核苷酸的表达载体。

第四方面, 本发明提供经转化的宿主细胞, 其利用本发明的多核苷酸或本发明的表达载体转化。经转化的宿主细胞可用于生产本发明的硫氧还蛋白突变体, 或所述宿主细胞可用于生产目的异源多肽或蛋白。

用于生产本发明硫氧还蛋白突变体的宿主细胞优选地是下述宿主细胞, 所述宿主细胞因其在细胞外或细胞内有效生产多肽或蛋白质而被本领域所共知, 例如微生物, 如真菌、酵母菌和细菌。优选的宿主细胞的实例包括, 但不限于以下属: *Saccharomyces* (例如 *S.cerevisiae*)、*Pichia* (例如 *P.pastoris*)、*Bacillus* (例如 *B.subtilis*、*B.licheniformis*)、*Escherichia* (例如 *E.coli*)。

用于生产目的异源多肽或蛋白的宿主细胞优选地是下述宿主细胞, 所述宿主细胞因其在细胞外或细胞内有效生产多肽或蛋白质而被本领域所共知。优选的宿主细胞的实例包括, 但不限于以下属: *Saccharomyces* (例如 *S.cerevisiae*)、*Pichia* (例如 *P.pastoris*)、*Bacillus* (例如 *B.subtilis*、*B.licheniformis*)、*Escherichia* (例如 *E.coli*)。

第五方面, 本发明提供了利用本发明前文所述硫氧还蛋白突变体与目标异源多肽或蛋白质的重组融合蛋白, 该重组融合蛋白的结构为: (1) 硫氧还蛋白突变体——连接肽——切割位点——目标异源多肽或蛋白质或 (2) 硫氧还蛋白突变体——切割位点——目标异源多肽或蛋白质, 目标异源多肽或蛋白质与连接肽和/或切割位点结合后融合到本发明提供的硫氧还蛋白突变体的氨基末端或羧基末端。所述连接肽包含柔性连接肽或刚性连接肽或无连接肽, 所述切割位点包含但不限于蛋白内切酶切割位点或化学切割位点。

本发明连接肽优选地是下列柔性连接肽或刚性连接肽, 所述的连接肽在重组融合蛋白生产中的功能被本领域所共知, 优选的柔性连接肽实例包括, 但不限于以下类别 (氨基酸单字母缩写): (GGGGS) n ($n \leq 6$), GSAGSAAGSGEF, GSGSG, GSG 和 (G) n ($n \leq 8$); 优选的刚性连接肽实例包括, 但不限于以下类别 (氨基酸单字母缩写): (EAAAK) n ($n \leq 6$), (XP) n (X 可以设计为任意一种氨基酸, $n \leq 18$), (PT) n P ($n \leq 18$) 和 A(EAAAK)4ALEA(EAAAK)4A。

本发明切割位点包含的位点优选地是下列蛋白内切酶切割位点或化学切割位点, 所述的蛋白内切酶切割位点或化学切割位点能有效地被相应的蛋白内切酶或化学试剂识别并特异

性地切割而被本领域所共知，优选的蛋白内切酶和化学试剂的实例包括，但不仅限于以下类别：凝血酶，烟草蚀纹病毒蛋白酶，3C 蛋白酶，V8 蛋白酶，肠激酶，胰蛋白酶和赖氨酰肽链内切酶，所述化学试剂包括溴化氰，羟胺和甲酸。

第六方面，本发明提供了利用本发明前文所述结构为：(1) 硫氧还蛋白突变体——连接肽——切割位点——目标异源多肽或蛋白质；(2) 硫氧还蛋白突变体——切割位点——目标异源多肽或蛋白质的重组融合蛋白，以及生产目标异源多肽和蛋白质的方法。该方法包括在有利于生产上述重组融合蛋白的条件下培养本发明的经转化的宿主细胞，以及培养结束后破胞回收上述重组融合蛋白。优选的上述重组融合蛋白中目标异源多肽或蛋白质是指由 60 个或更少氨基酸组成的聚合物，实例包括，但不仅限于以下类型：胰高血糖素样肽-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) 及其类似聚合物 (例如 GLP-1 (7-37)、GLP-1 (9-37)、GLP-1 (7-36)、GLP-1 (11-37)、Arg34GLP-1 (7-37)、Arg34GLP-1 (9-37))；甲状旁腺激素 (Parathyroid hormone, PTH) 及其类似聚合物 (例如 hPTH (1-34))；胰高血糖素样肽-2 (Glucagon-like peptide-2, GLP-2) 及其类似聚合物 (例如 GLP-2 (1-33)、Lys17Arg30GLP-2 (1-33))；促肾上腺皮质激素 (Adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 及其类似聚合物；黑色素细胞刺激素 (Melanocyte-stimulating hormones, MSH) 及其类似聚合物；肾上腺髓质素 (Adrenomedullin ADM) 及其类似聚合物；心房钠尿肽 (Atrial natriuretic peptide, ANP) 及其类似聚合物；催产素 (Oxytocin, Oxt) 及其类似聚合物；生长激素释放激素 (Growth hormone-releasing hormone, GHRH) 及其类似聚合物；血管活性肠肽 (Vasoactive intestinal peptide, VIP) 及其类似聚合物；尿鸟苷蛋白 (Uroguanylin) 及其类似聚合物。在优选的实施方案中，本发明提供通过培养 *Escherichia coli* 宿主菌株来生产目标异源多肽或蛋白 Arg34GLP-1 (9-37) 的方法，所述菌株已用编码本发明硫氧还蛋白突变体的选定的本发明多核苷酸转化。高度优选的硫氧还蛋白突变体选自表 2 组成的组。

第七方面，本发明提供获得本发明硫氧还蛋白突变体的方法，其中所述方法包括以下步骤：

以硫氧还蛋白模型蛋白的编码基因为模板，对其进行随机突变，从而获得编码硫氧还蛋白突变体的基因突变库；

将硫氧还蛋白模型蛋白的编码基因突变库克隆至表达载体，获得重组表达载体，然后将所述表达载体转化至适宜的表达宿主，并筛选出表达量高的硫氧还蛋白突变体表达文库；

对上述文库中的硫氧还蛋白突变体编码基因进行测序分析，采用本领域所共知的算法软件，例如 Foldx、Rosetta $\Delta\Delta G$ 、BindProfX、PROTEIN CALCULATOR v3.4 等，计算出 $\Delta\Delta G$ 值和 Δ 净电荷，并筛选出 $\Delta\Delta G$ 有显著下降且 Δ 净电荷提升的硫氧还蛋白突变体优选文库；

将上述筛选出的硫氧还蛋白突变体优选文库的转化子于含有抗生素的液体培养基中培养至对数生长期，加入诱导剂开始诱导，继续培养至终点，然后于培养液中加入等体积的缓冲液混匀，于 70-100℃ 水浴中孵育一段时间，取样离心后将上清样进行 SDS-PAGE 分析，根据条带光密度值大小进行硫氧还蛋白突变体热稳定性及热可溶性能的复筛；

使用编码具有硫氧还蛋白模型蛋白的基因或一种或多种同源基因，获得具有耐热可溶性能提升的硫氧还蛋白突变体的突变基因，可选择性地将步骤 1 到 4 重复一次或若干次；

可根据本领域已知的方法，对获得的具有耐热可溶性能提升的硫氧还蛋白突变体进行表达。

优选的硫氧还蛋白模型蛋白选自由下述蛋白组成的组：来自 *Geobacillus stearothermophilus* 的硫氧还蛋白，其优选的具有 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列，更优选地至少 70%、更优选地至少 75%、更优选地至少 80%、更优选地至少 85%、更优选地至少 90%、最优选地至少 95% 的同一性，例如表 2 中概括的硫氧还蛋白。

可采用分子生物学中所熟知的手段来进行上述步骤 1-6 的实施。可采用分子生物学中的任何基因突变手段进行编码基因突变，较为适宜的手段有易错 PCR (Error-prone PCR) 和基

因改组 (DNA Shuffling)。

实施例 1

步骤 1) 硫氧还蛋白突变基因库的建立

将来自 *Geobacillus stearothermophilus* 的硫氧还蛋白氨基酸序列 (SEQ ID NO.1) 按照 *E. coli* 密码子偏好性优化后由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成, 将此基因命名为 TrxWT, 并插入载体 pET28a 的多克隆位点, 得到重组载体 pET28a-TrxWT。设计引物并以硫氧还蛋白 TrxWT 基因为模板, 进行易错 PCR 扩增, 并将获得的随机突变片段混合物插入载体 pET28a, 得到含有突变基因的重组载体 pET28a-TrxWT_epmut mix, 将重组载体混合物转入感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3), 获得库容量约 11000-12000 的表达文库。随机选择了 50 个单菌落进行双酶切验证, 结果显示大约 25% 为假阳性转化子, 随后, 随机选择了 15 个阳性转化子的菌株进行测序分析, 以测定突变率。

步骤 2) 高表达硫氧还蛋白突变体表达文库的建立

将获得的硫氧还蛋白突变体大肠杆菌表达文库中阳性转化子接种于含有 50 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基的 96 孔深孔板中, 37°C, 700 rpm 培养过夜。将所得培养液作为种子, 以 1% 接种量接种于新鲜的含 50 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 96 孔深孔板中 37°C, 700 rpm 培养 4-6 h, 将温度调至 30°C 并加入 IPTG 至终浓度 0.4 mM, 继续振荡培养 20-25 h。所得培养液于室温 4000 rpm 离心 10 min, 收集菌体, 保存于 -20°C。所得菌体样品加入一定体积的上样缓冲液, 100°C 煮沸 5 min 制样。SDS-PAGE 分析目的蛋白条带的光密度值, 其中部分筛选结果如图 1 中的 (a) 和 (b) 所示, 由图中结果可知硫氧还蛋白突变体获得了正常表达。

步骤 3) 硫氧还蛋白突变体优选文库的建立

从高表达硫氧还蛋白突变体表达文库获得的阳性转化子中随机挑选若干进行序列测定分析, 根据测序结果利用本领域所共知的算法软件, 例如 Foldx、Rosetta ΔΔG、BindProfX、PROTEIN CALCULATOR v3.4 等, 以来自 *Geobacillus stearothermophilus* 的模板硫氧还蛋白 (SEQ ID NO. 1) 的 ΔG 和净电荷为对照, 按照下述公式计算出每个硫氧还蛋白突变体与模板硫氧还蛋白之间的 ΔΔG 值和 Δ 净电荷, 其中部分计算结果如表 2 所示。从表中结果可知筛选获得的硫氧还蛋白突变体无论是 ΔΔG 还是 Δ 净电荷都较天然来源模板硫氧还蛋白的性质得到提升, 其中 ΔΔG 值越小, 表明硫氧还蛋白突变体稳定性越强; Δ 净电荷值越小, 表明硫氧还蛋白突变体极性越大。

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{TrxWT}} - \Delta G_{\text{mTrx}};$$

$$\Delta \text{净电荷} = \text{净电荷}_{\text{TrxWT}} - \text{净电荷}_{\text{mTrx}};$$

表 2 硫氧还蛋白突变体及其 ΔΔG 和 Δ 净电荷

突变体编号	突变位置	稳定及净电荷性能	
		ΔΔG (kcal/mol)	Δ 净电 荷
mTrx 1	D23T+K93P	-5.34	-1.0
mTrx 2	T15I+D23T+C29S+R44Q+K51R+D85E+K93P	-7.87	-1.8
mTrx 3	K93P	-2.87	-2.0
mTrx 4	D23T+R44Q+K51R+D85E+K93P	-8.24	-2.0
mTrx 5	T15I+D23T+R44Q	-4.22	-1.0
mTrx 6	T15I+K93P	-4.57	-2.0
mTrx 7	T15I+D23T+R44Q+K51R+D85E+K93P	-8.87	-2.0
mTrx 8	T15I+D23T+R44Q+K51R+D85E+Q91K+K93P	-9.52	-1.0
mTrx 9	R44Q+K51R+D85E+K93P	-6.47	-3.0
mTrx 10	D85E+K93P	-5.16	-2.0

mTrx 11	D23T+K51R+K93P	-5.37	-1.0
mTrx 12	C29S+K93P	-1.87	-1.8
mTrx 13	D23T+R44Q+K51R	-5.85	-1.0
mTrx 14	T15I+D23T+R44Q+K51R+D85E+K93P+K102H	-9.56	-3.0
mTrx 15	T15I+D23T+R44Q+K51R+T74I+D85E+K93P	-9.56	-2.0
mTrx 16	T15I+D23T+D43E+R44Q+K51R+D85E+K93P	-9.43	-2.0
mTrx 17	T15I+D23T+R44Q+K51R+N56K+D85E+K93P	-9.56	-1.0
mTrx 18	T15I+D23T+C29S+R44Q+K51R+D85E	-9.58	-0.8
mTrx 19	T15I+D23T+R44Q+K51R	-6.06	-1.0
mTrx 20	D23T+R44Q+K51R+D85E	-6.49	-1.0
mTrx 21	T15I+D23T+R44Q+K51R+N56K+D85E+K93P+K102H	-10.34	-2.0
mTrx 22	D23T+K51R+D85E+K93P+K102H	-9.17	-2.0
mTrx 23	T15I+D23T+D43E+R44Q+K51R+T74I+D85E+Q91K+K93P	-11.26	-1.0
mTrx 24	K51R+D85E+K93P	-6.82	-2.0
mTrx 25	T15I+D23T+R44Q+K51R+D85E	-7.19	-1.0
mTrx 26	R44Q+K51R+D85E	-4.62	-2.0
mTrx 27	T15I+D23T+R44Q+K51R+D85E+K93M	-7.16	-2.0
mTrx 28	T15I+D23T+D43E+R44Q+K51R+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-11.72	-2.0
mTrx 29	T15I+D23T+C29S+R44Q+K51R+S71M+D85E+K93P+K102H	-9.61	-2.7
mTrx 30	T15I+K51R+D85E+K93P	-7.62	-2.0
mTrx 31	A12I+T15I+D23T+R44Q+K51R+D85E+K93P	-9.62	-2.0
mTrx 32	T15I+D23T+R44Q+K51R+S71M+D85E+K93P	-9.92	-2.0
mTrx 33	D43E+T74I+Q91K	-2.67	-0.1
mTrx 34	A12I+T15I+D23T+R44Q+K51R+D85E+K93P+K102H	-10.28	-3.0
mTrx 35	T15I+D23T+R44Q+K51R+S71M+D85E+K93P+K102H	-10.48	-3.0
mTrx 36	A12I+T15I+D23T+R44Q+K51R+N56K+D85E+K93P	-10.27	-1.0
mTrx 37	T15I+D23T+C29S+R44Q+K51R+N56K+S71M+D85E	-10.61	-1.0
mTrx 38	T15I+D23T+R44Q+K51R+N56K+S71M+D85E+K93P+K102H	-11.02	-2.0
mTrx 39	T15I+D23T+D43E+R44Q+K51R+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P	-12.40	-1.0
mTrx 40	A12I+D23T+N56K+S71M+K93P+K102H	-8.24	-1.0
mTrx 41	A12I+T15I+D23T+C29S+R44Q+K51R+N56K+S71M+D85E+K93P	-10.23	-0.8
mTrx 42	A12I+T15I+D23T+C29S+R44Q+K51R+N56K+S71M+D85E+K93P+K102H	-7.74	-1.8

mTrx 43	A12I+T15I+D23T+C29S+R44Q+K51R+N56K+S71M+D85E+Q91K+K93P+K102H	-8.00	-0.8
mTrx 44	A12I+T15I+D23T+R44Q+K51R+S71M+D85E+K93P+K102H	-11.23	-3.0
mTrx 45	A12I+N56K+S71M+K93P+K102H	-6.07	-2.0
mTrx 46	A12I+T15I+D23T+R44Q+K51R+N56K+S71M+D85E+K93P	-11.13	-1.0
mTrx 47	A12I+T15I+D23T+C29S+R44Q+K51R+N56K+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-8.41	-0.8
mTrx 48	A12I+T15I+D23T+R44Q+K51R+N56K+S71M+D85E+K93P+K102H	-11.85	-2.0
mTrx 49	A12I+T15I+D23T+R44Q+K51R+N56K+S71M+D85E+Q91K+K93P+K102H	-8.40	-1.0
mTrx 50	A12I+N56K+S71M+D85E+K93P+K102H	-7.55	-2.0
mTrx 51	A12I+C29S+N56K+S71M+K102H	-2.22	-0.8
mTrx 52	A12I+T15I+D23T+C29S+D43E+R44Q+K51R+N56K+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-8.95	-0.8
mTrx 53	A12I+T15I+D23T+R44Q+K51R+N56K+S71M+T74I+D85E+K93P+K102H	-8.16	-2.0
mTrx 54	A12I+T15I+D23T+R44Q+K51R+N56K+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-8.79	-1.0
mTrx 55	A12I+T15I+D23T+D43E+R44Q+K51R+N56K+S71M+D85E+K93P+K102H	-8.29	-2.0
mTrx 56	A12I+T15I+D23T+D43E+R44Q+K51R+N56K+S71M+D85E+Q91K+K93P+K102H	-8.94	-1.0
mTrx 57	A12I+T15I+D23T+D43E+R44Q+K51R+N56K+S71M+T74I+Q82K+D85E+Q91K+K93P+K102H	-9.84	1.0
mTrx 58	A12I+T15I+D23T+D43E+R44Q+K51R+N56K+S71M+T74I+D85E+K93P+K102H	-8.70	-2.0
mTrx 59	A12I+T15I+D23T+D43E+R44Q+K51R+N56K+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-9.34	-1.0
mTrx 60	A12I+T15I+N56K+S71M+K102H	-4.77	-1.0
mTrx 61	A12I+A13I+T15I+D23T+C29S+R33K+D43E+R44Q+K51R+N56K+D58E+S71M+T74I+Q82K+D85E+Q91K+K93P+K102H	-10.14	1.2
mTrx 62	A12I+A13I+T15I+D23T+C29S+R33K+D43E+R44Q+K51R+N56K+D58E+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-9.73	-0.8
mTrx 63	A12I+A13I+T15I+D23T+R33K+D43E+R44Q+K51R+N56K+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-9.53	-1.0
mTrx 64	A12I+A13I+T15I+D23T+C29S+D43E+R44Q+K51R+N56K+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-9.14	-0.8

mTrx 65	A12I+A13I+T15I+D23T+R33K+D43E+R44Q+K51R+N56K+D58E+S71M+T74I+Q82K+D85E+Q91K+K93P+K102H	-10.46	1.0
mTrx 66	A12I+A13I+T15I+D23T+R33K+D43E+R44Q+K51R+N56K+D58E+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-10.09	-1.0
mTrx 67	A12I+A13I+T15I+D23T+C29S+D43E+R44Q+K51R+N56K+D58E+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-9.70	-0.8
mTrx 68	A12I+A13I+T15I+D23T+D43E+R44Q+K51R+N56K+S71M+T74I+D85E+Q91K+K93P+K102H	-9.53	-1.0
mTrx 69	K51R+K102H	-2.71	-2.0
mTrx70	R44Q+K102H	-2.09	-3.0
mTrx71	D23T+K102H	-2.77	-1.0
mTrx72	T15I+K102H	-2.41	-2.0
mTrx73	D23T+K51R	-4.23	0.0
mTrx74	T15I+D23T	-3.74	0.0
mTrx75	T15I+K51R	-3.61	-1.0
mTrx76	T15I+D85E+K93P	-6.96	-2.0
mTrx77	D23T+D85E+K93P	-7.75	-1.0
mTrx78	R44Q+D85E+K93P	-5.22	-3.0
mTrx79	D85E+K93P+K102H	-5.09	-3.0
mTrx80	T15I+D23T+K51R	-5.94	0.0
mTrx81	T15I+D23T+D85E+K93P	-6.60	-1.0
mTrx82	D23T+R44Q+D85E+K93P	-5.31	-2.0
mTrx83	D23T+K51R+D85E+K93P	-8.48	-1.0
mTrx84	T15I+D23T+K51R+D85E+K93P	-9.17	-1.0
mTrx85	T15I+R44Q+K51R+D85E+K93P	-7.04	-3.0
mTrx86	D23T+R44Q+K51R+D85E+K93P+K102H	-7.00	-3.0

由表 2 可知, 已获得的 86 个硫氧还蛋白突变体, 其具有 $\Delta\Delta G$ 从 -2.22 kcal/mol 到 -12.40 kcal/mol 范围内的降低和 Δ 净电荷从 0.0 到 -3.0 范围内的提高。

步骤 4) 硫氧还蛋白突变体优选文库的热稳定性及热可溶性能复筛

将获得的硫氧还蛋白突变体优选文库获得的阳性转化子接种于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基的 96 孔深孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 700 rpm 培养过夜。将所得培养液作为种子, 以 1% 接种量接种于新鲜的含 50 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基的 24 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 500 rpm 培养 4-6 h, 将温度调至 30 $^{\circ}\text{C}$ 并加入乳糖至终浓度 2%, 继续振荡培养 20-25 h。所得培养液加入等体积的缓冲液混匀后, 于 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴和 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴中分别孵育 30 min 和 60 min, 取样离心 12000 rpm, 3 min, 上清及沉淀分别制样进行 SDS-PAGE。根据 SDS-PAGE 光密度值结果分析硫氧还蛋白突变体的热稳定性及热可溶性能的情况, 其中部分筛选结果如图 2 所示, 表明这些硫氧还蛋白突变体较之培养液中菌体蛋白、细胞碎片和其他杂质蛋白而言具有在高温条件下可溶且稳定, 不易分解的特性, 这也与表 2 中显示的硫氧还蛋白突变体 $\Delta\Delta G$ 和 Δ 净电荷性能改变相呼应; 同时也表明, 可以通过一步离心的简单步骤或工艺将本专利提供的硫氧还蛋白突变体与培养液中菌体蛋白、细胞碎片和其他杂质蛋白进行有效分离。根据结果剔除上清中目标蛋白量显著较少的阳性转化子, 其余加甘油保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。

步骤 5) 硫氧还蛋白突变体/Arg34GLP-1 (9-37) 重组融合蛋白工程菌的构建

选择硫氧还蛋白突变体优选文库复筛获得的硫氧还蛋白突变体 mTrx39 (氨基酸序列为 SEQ ID NO.5) 和连接肽 GSGSG (氨基酸单字母缩写), 肠激酶切割位点 DDDDK (氨基酸单字母缩写) 构建结构为: mTrx39-GSGSG-DDDDK-Arg34GLP-1 (9-37) 的重组融合蛋白 (氨基酸序列为 SEQ ID NO.6), 质粒构建方法参阅例如中国专利 201810858509.8, 具体为将上述测序正确的单个阳性转化子即工程菌接种于含有硫酸卡那霉素(50g/mL)的 LB 液体培养基, 37℃, 220rpm 培养过夜。将所得培养液作为种子, 1%接种量接种于新鲜的含硫酸卡那霉素(50ug/mL)的 LB 液体培养基中, 即 1mL 种子加入 100mL 新鲜培养基中, 37℃培养 4h, 将温度调至 30℃并加入 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷)至 IPTG 终浓度 0.4mM/L, 继续振荡培养 20h。将所得培养液于室温 4000rpm 离心 10min, 收集菌体, 多余菌体保存于-20℃。取一定体积的菌体, 向其中加入一定体积的 Sample loadingbuffer, 100℃煮沸 5min 制样, 获得重组表达载体 pET28a-mTrx39/(R34)9-37。将上述构建正确的表达载体热激转化大肠杆菌 BL21(DE3)中, 涂布于含有 50 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 平板培养基。大肠杆菌感受态制备以及热激转化的方法参见《分子克隆实验指南》。待转化子长出, 筛选若干送出测序, 测序正确的转化子保存备用, 测序正确的转化子即为重组工程菌。

步骤 6) 硫氧还蛋白突变体/Arg34GLP-1 (9-37)重组融合蛋白的生产

将构建好的重组工程菌从平皿三接种于含有 50 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体摇瓶培养基中, 37℃, 220 rpm 培养约 8-12 h。将所得培养液作为 1 级种子, 以 1%接种量接种于新鲜的含 50 μg/mL 硫酸卡那霉素的 2 级种子液体培养基中: 磷酸氢二胺 0.2%、磷酸二氢钾 0.675%、一水柠檬酸 0.093%、七水硫酸镁 0.07%、葡萄糖 2%、微量盐 5ml/L (微量盐组成: 七水硫酸亚铁 1%、五水硫酸锰 0.05%、七水硫酸锌 0.225%、五水硫酸铜 0.1%、十水四硼酸钠 0.023%、二水氯化钙 0.2%、七钼酸铵 0.01%、盐酸 5mol/L), 34℃, 220 rpm 培养约 10-12 h, 将所得 2 级种子培养液, 以 2-5%接种量接种于 30 L 发酵罐中, 发酵培养基与 2 级种子培养基一致, 发酵过程中根据菌体生长情况补加葡萄糖和七水硫酸镁, 发酵 pH 通过添加浓氨水控制在 pH 6.8-7.0。发酵前期温度 37℃, 发酵至 6-8 h 后开始补料, 发酵约 10-14 h 时将温度调至 30℃并加入乳糖至终浓度 2%, 继续发酵至 22-26 h。图 3 为 SDS-PAGE 检测的发酵过程中不同发酵取样点, 重组融合蛋白 (mTrx39-GSGSG-DDDDK-Arg34GLP-1 (9-37)) 的表达结果。从该结果可知重组融合蛋白 (mTrx39-GSGSG-DDDDK-Arg34GLP-1 (9-37)) 获得了正常表达, 且随着发酵时间延长至 25h 时均无分解现象发生。

所得培养液加入等体积的缓冲液混匀后, 于 80℃水浴中孵育约 15min, 放出料液, 采用碟片离心机~12000 rpm 离心收集上清, 经澄清膜过滤后, 用 5-10 kD 超滤膜浓缩 8-10 倍, 再用反应缓冲液置换后, 将料液转入玻璃反应釜, 加入重组肠激酶 25℃酶切 6-8 h, 调节 pH 至目标异源多肽等电点附近沉淀 Arg34GLP-1 (9-37), 板框过滤后获得重组多肽 Arg34GLP-1 (9-37) 粗品。图 4 是通过反相 HPLC 分析从重组融合蛋白 mTrx39-GSGSG-DDDDK-Arg34GLP-1 (9-37)酶切获得 Arg34GLP-1(9-37)不同时间取样检测的结果, 随着反应进程目标异源多肽 Arg34GLP-1(9-37)不断生成, 重组融合蛋白 mTrx39-GSGSG-DDDDK-Arg34GLP-1(9-37)不断裂解成重组融合蛋白 mTrx39-GSGSG-DDDDK。通过酶切反应, 85% 的重组融合蛋白 mTrx39-GSGSG-DDDDK-Arg34GLP-1(9-37)被裂解, 用等电点沉淀后获得纯度 75% 的 Arg34GLP-1 (9-37)粗品, 如图 5 所示, 通过一步沉淀的简单步骤或工艺即可获得较高纯度的目标异源多肽 Arg34GLP-1(9-37)。分析条件: YMC-Pack PROTEIN-RP 色谱柱, 流动相 A 为 20% 乙腈 + 0.1% 三氟乙酸, 流动相 B 为 100% 乙腈 + 0.1%三氟乙酸, 流速为 1ml/min, 按如下梯度洗脱: 0-8 min 流动相 B 由 10%升至 20%, 8-25 min 流动相 B 由 20%升至 55%, 检测波长 214nm, 柱温 35℃。

本发明不局限于上述可选实施方式, 任何人在本发明的启示下都可得出其他各种形式的产品, 但不论在其形状或结构上作任何变化, 凡是落入本发明权利要求界定范围内的技术方

案，均落在本发明的保护范围之内。

Sequence Listing (序列表)

SEQ ID NO.1

MAIVNATDQTFAAETKDGLTLVDFWAPWCGPCRMIAPVLEELDREM GDKVKIVKVNVDENQETASKFG
VMSIPTLLVFKNGELVDKAVGYQPKEALVQLVGKHVS

SEQ ID NO.2

MAIVNATDQTFAAETKDGLTLVDFWAPWCGPCRMIAPVLEELDREM GDKVKIVKVNVDENQETASKFG
VMSIPTLLVFKNGELVDKAIGYQPKEALVQLVGKHVS

SEQ ID NO.3

MAIVNATDQTFVTETSTGVTLVDFWAPWCGPCRMIAPVLEEVDQEM GDKVKIVKVNVDENQETASKYG
VMSIPTLLVFKDGNVVDKTVGFQPKEALVQLLQQHV

SEQ ID NO.4

MAITNATDQNFGAETSQGLVLADFWAPWCGPCKMIAPVLEELDSEM GDKVKIVKVDVDENQETASSFG
VMSIPTLIVLKDGEVVDKVI GFQPKEALAE LLNKHA

SEQ ID NO.5

MAIVNATDQTFIAETKDGLTLVDFWAPWSGPCRMIAPVLEELDREM GDKVKIVKVKVDENQETASKFGV
MMIPTLLVFKNGELVDKAVGYQPKEALVQLVGHHV

SEQ ID NO.6

MAIVNATDQTFIAETKDGLTLVDFWAPWSGPCRMIAPVLEELDREM GDKVKIVKVKVDENQETASKFGV
MMIPTLLVFKNGELVDKAVGYQPKEALVQLVGHHV GSGSGDDDDKEGTFTSDVSSYLEGQA AKEFI AWL
VRGRG

权利要求书

1.一种硫氧还蛋白突变体，其特征在于，该硫氧还蛋白突变体是具有高温可溶性的非天然蛋白。

2.根据权利要求1所述的硫氧还蛋白突变体，其特征在于，该硫氧还蛋白突变体是在硫氧还蛋白模型蛋白的氨基酸序列的基础上人工突变得到的。

3.根据权利要求2所述的硫氧还蛋白突变体，其特征在于，所述硫氧还蛋白模型蛋白为蛋白组，所述蛋白组由如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列、如SEQ ID NO.2所示氨基酸序列、如SEQ ID NO.3所示氨基酸序列以及如SEQ ID NO.4所示氨基酸序列中的至少一种组成。

4.根据权利要求3所述的硫氧还蛋白突变体，其特征在于，所述硫氧还蛋白模型蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示，该硫氧还蛋白突变体是由组1中的至少一个氨基酸位置被修饰而得到，其中：组1的氨基酸序列由如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置D8、T10、A12、A13、T15、D17、D23、C29、R33、A36、D43、R44、K51、N56、D58、S71、T74、Q82、D85、Q91、K93、E94和K102组成。

5.根据权利要求4所述的硫氧还蛋白突变体，其特征在于，所述如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置D8的D被Q、E、A、K、R、S或T取代；所述如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置T10的T被D、E、Q、K、R、S或I取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置A12的A被G、E、Q、K、R、S或I取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置A13的A被D、E、Q、K、R、S或I取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置T15的T被I、V、A、T取代或被删除；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置D17的D被N、E、Q、K、R、S、G或A取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置D23的D被T、Q、K、R、S、G或N取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置C29的C被R、D、S、T、N、K、W取代或被删除；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置R33的R被D、E、Q、K、N或R取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置A36的A被G、S、T、K、R、H、L取代或被删除；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置D43的D被Q、Y、W、P、I或E取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置R44的R被L、A、Q、S、T、K或H取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置K51的K被Q、D、R、E或I取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置N56的N被E、Q、R、K、W或Y取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置D58的D被W、R、T、D、Q、H或E取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置S71的S被I、L、K、D、M、E或N取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置T74的T被I、L、D、S、M或V取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置E82的E被Q、N、R或K取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置D85的D被R、Q、H、N、E或K取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置Q91的Q被E、Y、I、N或R取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置K93的K被P、M、S、I、Q或N取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置E94的E被D、S、E、Q、N、K或R取代；如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的位置K102的K被D、S、E、H、Y、K或R取代。

6.根据权利要求2所述的硫氧还蛋白突变体，其特征在于，所述硫氧还蛋白模型蛋白具有如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列的至少70%的百分比同一性的氨基酸序列或如SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的至少70%的百分比同一性的氨基酸序列或如SEQ ID NO.3所示氨基酸序列的至少70%的百分比同一性的氨基酸序列或如SEQ ID NO.4所示氨基酸序列的至少70%的百分比同一性的氨基酸序列。

7.根据权利要求2所述的硫氧还蛋白突变体，其特征在于，所述硫氧还蛋白模型蛋白由具有如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的TrxA、如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的Trx、如SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的Trx、如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的Trx、具有与如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的至少70%百分比同一性的氨基酸序列以及具有与如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的至少70%百分比同一性的氨基酸序列组成，该硫氧还蛋白突变体由组4中的至少一个氨基酸位置被修饰而得到，其中：组4的氨基酸序列由该

硫氧还蛋白模型蛋白的氨基酸序列的位置 8、10、12、13、15、17、23、29、33、36、43、44、51、56、58、71、74、82、85、91、93、94 和 102 组成。

8. 根据权利要求 7 所述的硫氧还蛋白突变体, 其特征在于, 被修饰的氨基酸的位置为 15+51 或 23+51 或 85+93 或 15+93 或 23+93 或 51+102 或 15+102 或 15+23 或 23+85+93 或 15+85+93 或 51+85+93 或 44+85+93 或 85+93+102 或 23+44+51 或 44+51+85 或 23+51+85+93 或 15+51+85+93 或 15+23+85+93 或 23+44+51+85 或 44+51+85+93 或 23+44+85+93 或 15+23+51+85+93 或 23+51+85+93+102 或 23+44+51+85+93 或 15+44+51+85+93 或 12+56+71+93+102 或 12+15+56+71+102 或 15+23+29+44+51+85 或 15+23+44+51+85+93 或 12+23+56+71+93+102 或 12+56+71+85+93+102 或 15+23+44+51+85+93 或 23+44+51+85+93+102 或 15+23+44+51+85+93+102 或 15+23+44+51+56+85+93 或 15+23+44+51+71+85+93 或 12+15+23+44+51+85+93 或 12+15+23+44+51+85+93+102 或 15+23+44+51+56+85+93+102 或 15+23+44+51+71+85+93+102 或 15+23+29+44+51+85+93+102 或 12+15+23+44+51+56+85+93 或 15+23+29+44+51+56+71+85 或 12+15+23+44+51+56+71+85+93 或 15+23+43+44+51+74+85+91+93 或 15+23+29+44+51+71+85+93+102 或 15+23+44+51+56+71+85+93+102 或 12+15+23+44+51+71+85+93+102 或 12+15+23+29+44+51+56+71+85+93 或 15+23+43+44+51+71+74+85+91+93 或 15+23+43+44+51+74+85+91+93+102 或 12+15+23+44+51+56+71+85+93+102 或 12+15+23+44+51+56+71+85+91+93+102 或 12+15+23+44+51+56+71+85+93+102 或 12+15+23+44+51+56+71+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+71+85+93+102 或 12+15+23+29+44+51+56+71+85+91+93+102 或 12+15+23+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+71+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+29+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+13+15+23+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+33+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+58+71+74+85+91+93+102 或 12+13+15+23+29+43+44+51+56+58+71+74+85+91+93+102 或 12+13+15+23+33+43+44+51+56+71+74+85+91+93+102 或 12+15+23+43+44+51+56+58+71+74+82+85+91+93+102 或 12+13+15+23+29+43+44+51+56+58+71+74+85+91+93+102 或 12+13+15+23+33+43+44+51+56+58+71+74+82+85+91+93+102 或 12+13+15+23+29+33+43+44+51+56+58+71+74+85+91+93+102 或 12+13+15+23+29+43+44+51+56+58+71+74+82+85+91+93+102 或 12+13+15+23+29+33+43+44+51+56+58+71+74+82+85+91+93+102。

9. 一种如权利要求 1-8 任一项所述的硫氧还蛋白突变体的制备方法, 包括以下步骤:

1) 以硫氧还蛋白模型蛋白的编码基因为模板, 对其进行随机突变, 从而获得编码硫氧还蛋白突变体的基因突变库;

2) 将硫氧还蛋白模型蛋白的基因突变库克隆至表达载体, 获得重组表达载体, 然后将所述表达载体转化至适宜的表达宿主, 并筛选出表达量高的硫氧还蛋白突变体表达文库;

3) 对硫氧还蛋白突变体表达文库中的硫氧还蛋白突变体编码基因进行测序分析, 计算出 $\Delta\Delta G$ 值和 Δ 净电荷, 并筛选出 $\Delta\Delta G$ 有显著下降且 Δ 净电荷提升的硫氧还蛋白突变体优选文库;

4) 将硫氧还蛋白突变体优选文库的转化子置于含有抗生素的液体培养基中培养至对数生长期, 加入诱导剂开始诱导, 继续培养至终点, 然后于培养液中加入等体积的缓冲液混匀, 于 70-100℃ 水浴中孵育一段时间, 取样离心后将上清样进行 SDS-PAGE 分析, 根据条带光密度值大小进行硫氧还蛋白突变体热稳定性及热可溶性能的复筛;

5) 使用编码具有硫氧还蛋白模型蛋白的基因或一种或多种同源基因, 获得具有耐热可溶性能提升的硫氧还蛋白突变体的突变基因, 可选择性地将步骤 1) 到 4) 重复一次或若干次

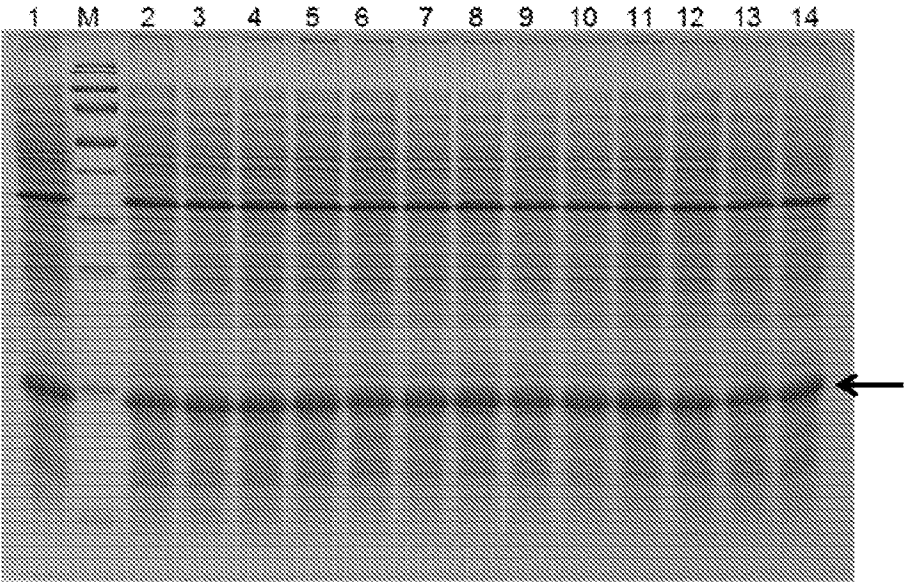
;

6) 对获得的具有耐热可溶性能提升的硫氧还蛋白突变体进行表达。

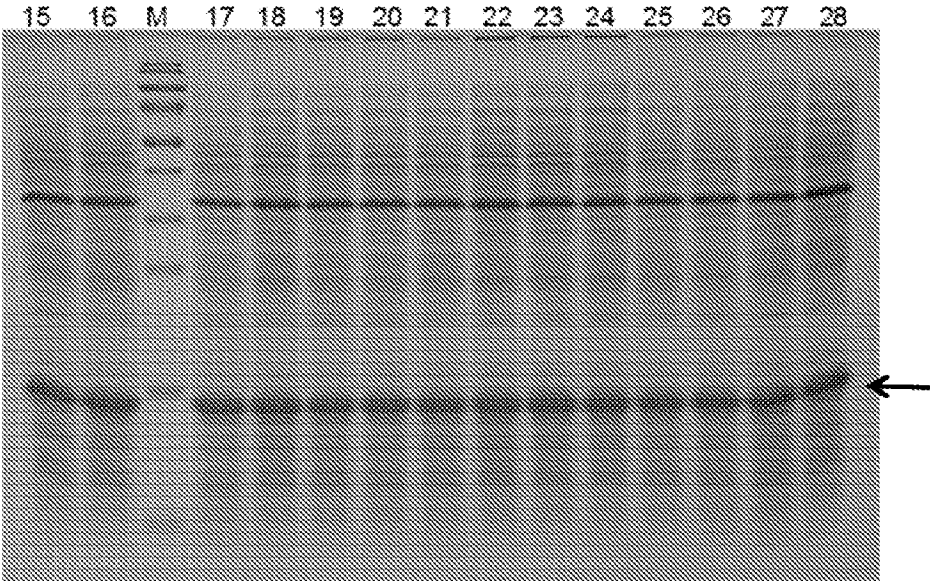
10. 一种如权利要求 1-8 任一项所述硫氧还蛋白突变体在重组融合蛋白生产中的应用，其特征在于，所述重组融合蛋白的结构有两种，分别命名为结构体 1 和结构体 2，其中：结构体 1 的结构为：硫氧还蛋白突变体——连接肽——切割位点——目标异源多肽或蛋白质，结构体 2 的结构为：硫氧还蛋白突变体——切割位点——目标异源多肽或蛋白质；

结构体 1 的制备方法为：目标异源多肽或蛋白质与切割位点结合后得到中间体 1，中间体 1 与连接肽结合后得到中间体 2，中间体 2 与硫氧还蛋白突变体的氨基末端或羧基末端结合得到所述结构体 1；

结构体 2 的制备方法为：目标异源多肽或蛋白质与切割位点结合后得到中间体 1，中间体 1 与硫氧还蛋白突变体的氨基末端或羧基末端结合得到所述结构体 2；所述目标异源多肽或蛋白质为由数量不大于 60 的氨基酸组成的聚合物。



(a)



(b)

图 1

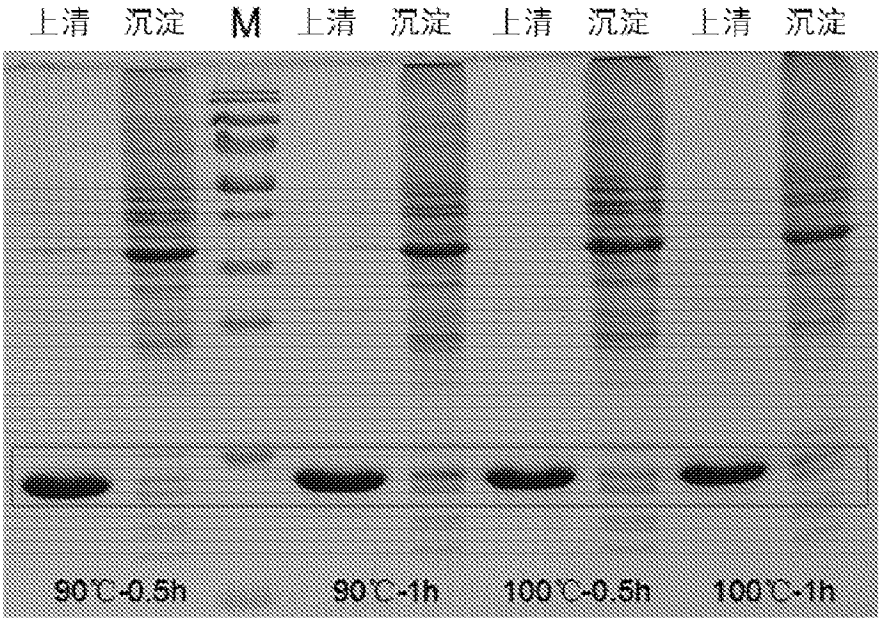


图 2

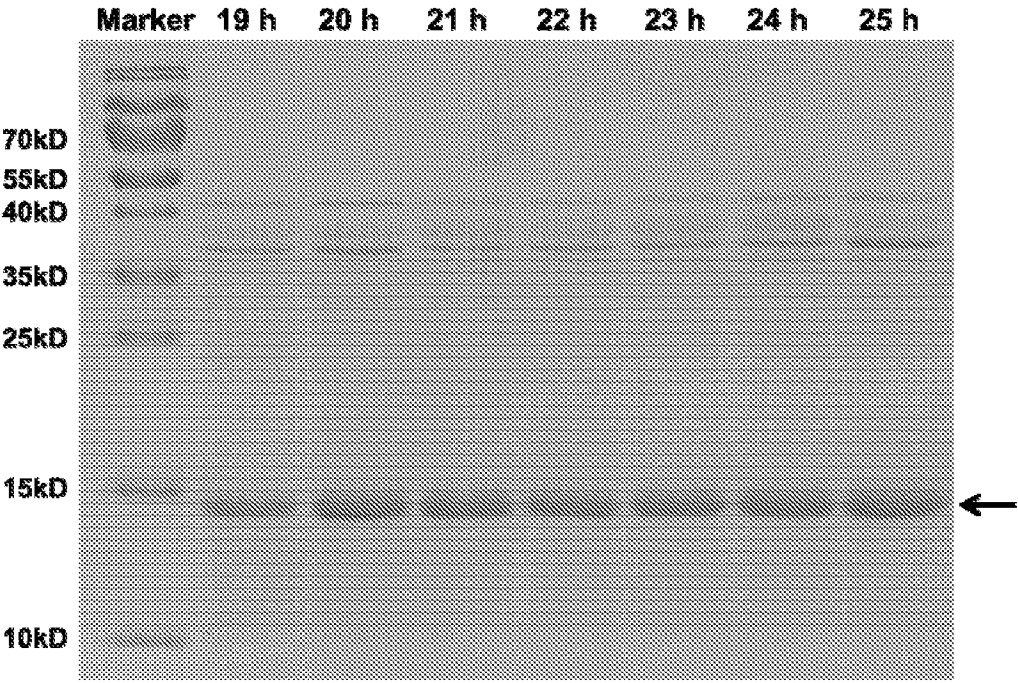


图 3

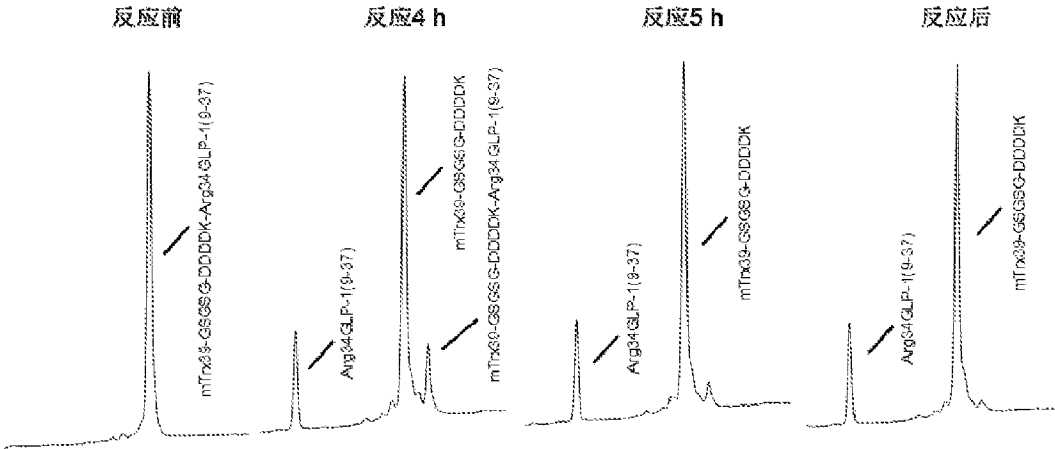


图 4

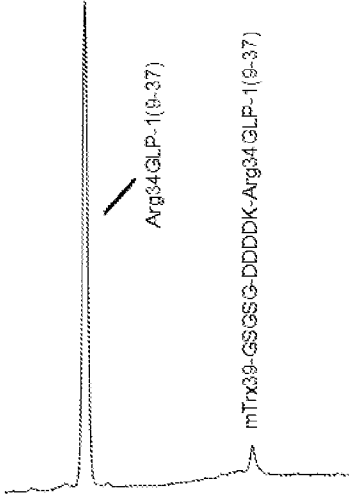


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/095114

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/47(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方, ISI Web of Knowledge, BAIDU和检索词: 硫氧还蛋白, 突变, 变体, 热稳定性, 融合, thioredoxin, TRX, mutant, mutation, thermal stability, fusion, etc.; Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 1及其变体序列. China Patents Biological Sequence Search System and searched sequence: SEQ ID NO:1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 108912221 A (CHENGDU YINGPUBOJI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 30 November 2018 (2018-11-30) claims 1-10 and embodiments 1-5	1-10
A	WO 2004013283 A3 (UNIVERSITY OF ROCHESTER et al.) 11 August 2005 (2005-08-11) entire document	1-10 (partially)
A	JP 2003274944 A (RIKOGAKU, S.) 30 September 2003 (2003-09-30) entire document	1-10 (partially)
A	US 2003166518 A1 (BEARDSLEE TA et al.) 04 September 2003 (2003-09-04) entire document	1-10 (partially)
A	WO 2010056901 A2 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA et al.) 20 May 2010 (2010-05-20) entire document	1-10 (partially)



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 March 2020

Date of mailing of the international search report

23 March 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/095114

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: a thioredoxin mutant, a preparation method therefor, and a use in recombinant fusion protein production, the thioredoxin mutant being obtained by modifying at least one amino acid position in the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO. 1, wherein the modified amino acid position includes D8.
- [2] Invention 2: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes T10.
- [3] Invention 3: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes A12.
- [4] Invention 4: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes A13.
- [5] Invention 5: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes T15.
- [6] Invention 6: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes D17.
- [7] Invention 7: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes D23.
- [8] Invention 8: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes C29.
- [9] Invention 9: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes R33.
- [10] Invention 10: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes A36.
- [11] Invention 11: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes D43.
- [12] Invention 12: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes R44.
- [13] Invention 13: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes K51.
- [14] Invention 14: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes N56.
- [15] Invention 15: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes D58.
- [16] Invention 16: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes S71.
- [17] Invention 17: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes T74.
- [18] Invention 18: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes Q82.
- [19] Invention 19: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes D85.
- [20] Invention 20: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes Q91.
- [21] Invention 21: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes K93.
- [22] Invention 22: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes E94.
- [23] Invention 23: the same subject matter as invention 1, wherein the modified amino acid position includes K102.
- [24] The same or corresponding technical features shared by inventions 1-23 are: performing amino acid substitution on thioredoxin as shown in SEQ ID NO. 1, and obtaining a thioredoxin mutant having good stability under a high temperature environment. However, embodiments 1-5 of document 1 (CN 108912221 A, publication date 2018-11-30) disclose a thioredoxin mutant which is obtained by performing amino acid mutation on thioredoxin as shown in SEQ ID NO. 1, and has better thermal stability. It is apparent that the same or corresponding technical features shared by inventions 1-23 are disclosed by document 1. Therefore, the inventions do not share a same or corresponding special technical feature that defines a contribution which the inventions make over the prior art, and thus do not satisfy the requirement of unity of invention, and do not satisfy the criteria of PCT Rule 13.1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/095114

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Claims 1-10 (in part)**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/095114

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108912221	A	30 November 2018	CN	110128521	A	16 August 2019
WO	2004013283	A3	11 August 2005	AU	2003263795	A8	23 February 2004
				US	2006148057	A1	06 July 2006
				WO	2004013283	A2	12 February 2004
				AU	2003263795	A1	23 February 2004
JP	2003274944	A	30 September 2003	None			
US	2003166518	A1	04 September 2003	None			
WO	2010056901	A2	20 May 2010	US	8802394	B2	12 August 2014
				US	2011300579	A1	08 December 2011
				WO	2010056901	A3	22 July 2010

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/095114

A. 主题的分类 C07K 14/47(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方, ISI Web of Knowledge, BAIDU和检索词: 硫氧还蛋白, 突变, 变体, 热稳定性, 融合, thioredoxin, TRX, mutant, mutation, thermal stability, fusion等; Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO:1及其变体序列。		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 108912221 A (成都英普博集生物科技有限公司) 2018年 11月 30日 (2018 - 11 - 30) 权利要求1-10, 实施例1-5	1-10
A	WO 2004013283 A3 (UNIV ROCHESTER等) 2005年 8月 11日 (2005 - 08 - 11) 全文	1-10 (部分)
A	JP 2003274944 A (RIKOGAKU SHINKOKAI) 2003年 9月 30日 (2003 - 09 - 30) 全文	1-10 (部分)
A	US 2003166518 A1 (BEARDSLEE TA等) 2003年 9月 4日 (2003 - 09 - 04) 全文	1-10 (部分)
A	WO 2010056901 A2 (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA等) 2010年 5月 20日 (2010 - 05 - 20) 全文	1-10 (部分)
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2020年 3月 5日		国际检索报告邮寄日期 2020年 3月 23日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 马振莲 电话号码 62412131

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 发明1: 涉及一种硫氧还蛋白突变体、其制备方法及在重组融合蛋白生产中的应用, 所述硫氧还蛋白突变体是由SEQ ID NO. 1所示氨基酸序列的至少一个氨基酸位置被修饰而得到的, 所述被修饰氨基酸位置包括D8;
- [2] 发明2: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括T10;
- [3] 发明3: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括A12;
- [4] 发明4: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括A13;
- [5] 发明5: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括T15;
- [6] 发明6: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括D17;
- [7] 发明7: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括D23;
- [8] 发明8: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括C29;
- [9] 发明9: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括R33;
- [10] 发明10: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括A36;
- [11] 发明11: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括D43;
- [12] 发明12: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括R44;
- [13] 发明13: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括K51;
- [14] 发明14: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括N56;
- [15] 发明15: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括D58;
- [16] 发明16: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括S71;
- [17] 发明17: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括T74;
- [18] 发明18: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括Q82;
- [19] 发明19: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括D85;
- [20] 发明20: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括Q91;
- [21] 发明21: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括K93;
- [22] 发明22: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括E94;
- [23] 发明23: 与发明1的主题相同, 所述被修饰氨基酸位置包括K102。
- [24] 发明1-23之间相同或相应的技术特征是: 对SEQ ID NO:1所示的硫氧还蛋白进行氨基酸取代, 得到高温环境下稳定性好的硫氧还蛋白突变体。然而, 现有技术如文献1 (CN108912221 A, 公开日2018-11-30) 的实施例1-5公开了对SEQ ID NO:1所示的硫氧还蛋白进行氨基酸突变而得到的、具有较佳热稳定性的硫氧还蛋白突变体。可见, 这23项发明之间相同或相应的技术特征已经被文献1公开, 因此它们发明之间不具有相同或相应的体现发明对现有技术作出贡献的特定技术特征, 因而不满足发明单一性的要求, 不符合《PCT实施细则》13.1的规定。

第III栏

缺乏发明单一性的意见(续第I页第3项)

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 权利要求1-10（部分）

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/095114

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	108912221	A	2018年 11月 30日	CN	110128521 A 2019年 8月 16日
WO	2004013283	A3	2005年 8月 11日	AU	2003263795 A8 2004年 2月 23日
				US	2006148057 A1 2006年 7月 6日
				WO	2004013283 A2 2004年 2月 12日
				AU	2003263795 A1 2004年 2月 23日
JP	2003274944	A	2003年 9月 30日	无	
US	2003166518	A1	2003年 9月 4日	无	
WO	2010056901	A2	2010年 5月 20日	US	8802394 B2 2014年 8月 12日
				US	2011300579 A1 2011年 12月 8日
				WO	2010056901 A3 2010年 7月 22日