



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105283556 B

(45)授权公告日 2020.07.14

(21)申请号 201480032258.8

(22)申请日 2014.04.18

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105283556 A

(43)申请公布日 2016.01.27

(30)优先权数据
61/813,914 2013.04.19 US (续)(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.12.04(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/034643 2014.04.18(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/172631 EN 2014.10.23(73)专利权人 苏特罗生物制药公司
地址 美国加利福尼亚州(72)发明人 艾丽丝·扬 丹·格罗夫
帕特里克·里弗斯 (续)(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C12P 21/02(2006.01)

(56)对比文件

WO 03025116 A2,2003.03.27,权利要求1,
2,4-10,12-14,图8.CN 101479379 A,2009.07.08,说明书第2-3
页,实施例.

CN 102348807 A,2012.02.08,全文.

CN 102732548 A,2012.10.17,全文.

In-Seok Oh等.Cell-free production of
functional antibody fragments.《Bioprocess
and Biosystems Engineering》.2009,第33卷
(第1期),摘要,Materials and methods部分.

(续)

审查员 任长辉

权利要求书4页 说明书32页

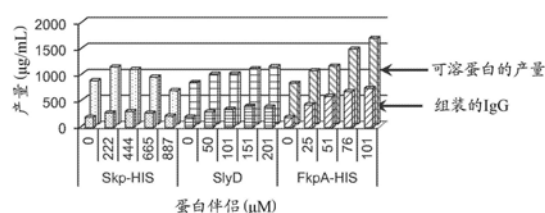
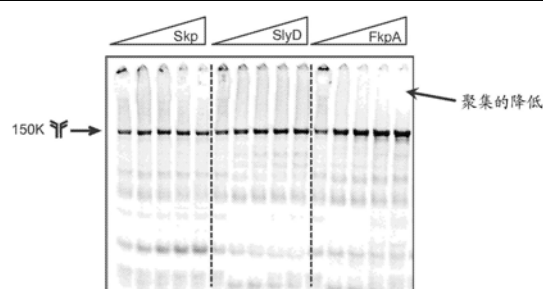
序列表24页 附图14页

(54)发明名称

在细菌无细胞合成系统中表达生物学活性
蛋白

(57)摘要

本申请描述了用于改善无细胞合成系统中正确折叠的生物学活性目标蛋白的表达的方法和系统。所述方法和系统使用具有活性氧化磷酸化系统的细菌无细胞提取物,并且包含外源蛋白伴侣。可通过用来制备所述无细胞提取物的细菌表达所述外源蛋白伴侣。所述外源蛋白伴侣可为蛋白二硫键异构酶和/或肽基脯氨酰顺反异构酶。发明人发现,蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶的组合对正确折叠的生物学活性目标蛋白的量产生协同增加。



[接上页]

(30) 优先权数据

61/937,069 2014.02.07 US

(72) 发明人 克里斯托弗·D·萨诺斯

(56) 对比文件

In-Seok Oh等.Providing an Oxidizing Environment for the Cell-Free Expression of Disulfide-Containing Proteins by Exhausting the Reducing Activity of Escherichia coli S30 Extract.

《Biotechnology Progress》.2006,第22卷(第4期),摘要,Materials and Methods部分.

Sang-Hyeon Kang等.Cell-Free

Production of Aggregation-Prone Proteins in Soluble and Active Forms.

《Biotechnology Progress》.2005,第21卷(第5期),摘要,第1413页,表1.

Yali Xu等.Effect of folding factors in rescuing unstable heterologous lipase B to enhance its overexpression in the periplasm of Escherichia coli.《Applied Microbiology and Biotechnology》.2008,第79卷(第6期),摘要,Materials and methods部分.

Yun-Chi Tang等.SnapShot: Molecular Chaperones, Part II.《Cell》.2007,第128卷(第2期),第212e1-212e2页.

1.改善细菌无细胞合成系统中生物学活性蛋白的表达水平的方法,其包括以下步骤:

i) 合并细菌提取物与编码目标蛋白的核酸,以产生细菌无细胞合成系统;以及,

ii) 在允许目标蛋白表达至浓度至少100mg/L和正确折叠的条件下,孵育所述细菌无细胞合成系统,

其中所述细菌提取物具有活性氧化磷酸化系统且包含用于无细胞蛋白合成所需的生物学功能tRNA、氨基酸和核糖体,且制备所述提取物的细菌所表达的外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶的总浓度为至少1g/L提取物,其中所述外源蛋白二硫键异构酶为DsbC,所述外源肽基脯氨酰异构酶为FkpA,并且

其中与当提取物从表达所述外源蛋白二硫键异构酶和所述外源肽基脯氨酰异构酶的一者而非两者的细菌制备且孵育条件在其他方面相同时由该细菌无细胞合成系统表达的浓度总和相比,正确折叠的目标蛋白的浓度增加。

2.如权利要求1所述的方法,其中用来制备所述提取物的细菌还表达外源解聚酶,所述解聚酶为协助目标蛋白进行解聚和/或溶解的蛋白伴侣。

3.如权利要求1或2所述的方法,其中用编码所述外源蛋白二硫键异构酶、外源肽基脯氨酰异构酶或解聚酶的基因共同转化用来制备所述提取物的细菌。

4.如权利要求2所述的方法,其中所述外源解聚酶为Skp。

5.如权利要求1或2所述的方法,其中所述细菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

6.如权利要求1或2所述的方法,其中用来制备所述提取物的细菌从可操作地连接组成型启动子的基因表达所述外源蛋白二硫键异构酶、外源肽基脯氨酰异构酶或解聚酶。

7.如权利要求1所述的方法,其中所述目标蛋白在其生物学活性构象中具有至少一个二硫键。

8.如权利要求1所述的方法,其中所述目标蛋白具有至少两个脯氨酸残基。

9.如权利要求1所述的方法,其中所述目标蛋白为抗体或抗体片段。

10.如权利要求1所述的方法,其中所述目标蛋白表达的浓度为100-1000mg/L。

11.如权利要求1所述的方法,其中正确折叠的目标蛋白的量大于600mg/L。

12.如权利要求1所述的方法,其中所述外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶在所述细菌中以1-20g/L提取物的水平表达。

13.如权利要求1所述的方法,其中所述外源蛋白二硫键异构酶在所述细菌中以2.5-4.1g/L提取物的水平表达,且所述外源肽基脯氨酰异构酶在所述细菌中以3.4-13.9g/L提取物的水平表达。

14.如权利要求1所述的方法,其中所述细菌无细胞合成系统具有0.5-500升的体积,并且所述孵育持续1-36小时。

15.用于表达生物学活性蛋白的细菌无细胞合成系统,其包含:

i) 细菌的无细胞提取物,所述细菌的无细胞提取物具有活性氧化磷酸化系统且含有用于无细胞蛋白合成所需的生物学功能tRNA、氨基酸和核糖体,并且其中在所述细菌中以至少1g/L提取物的水平表达外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶,其中所述外源蛋白二硫键异构酶为DsbC,所述外源肽基脯氨酰异构酶为FkpA;和

ii) 编码目标蛋白的核酸,

其中所述细菌无细胞合成系统表达目标蛋白至浓度至少100mg/L,

其中与当所述外源蛋白二硫键异构酶和所述外源肽基脯氨酰异构酶的一者而非两者表达在细菌中且孵育条件在其他方面相同时由所述细菌无细胞合成系统表达的浓度总和相比,正确折叠的目标蛋白的浓度增加。

16.如权利要求15所述的系统,其中用编码所述外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶的基因共同转化用来制备所述提取物的细菌。

17.如权利要求15或16所述的系统,其中所述细菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

18.如权利要求15或16所述的系统,其中用来制备所述提取物的细菌从可操作地连接组成型启动子的基因表达所述外源蛋白二硫键异构酶和所述外源肽基脯氨酰异构酶。

19.如权利要求15或16所述的系统,其中所述提取物为大肠杆菌的S30提取物。

20.如权利要求15或16所述的系统,其中所述目标蛋白表达的浓度为100-1000mg/L。

21.如权利要求15或16所述的系统,其中正确组装的目标蛋白的量大于600mg/L。

22.如权利要求15或16所述的系统,其中所述外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶在所述细菌中以1-20g/L提取物的水平表达。

23.如权利要求15或16所述的系统,其中所述外源蛋白二硫键异构酶在所述细菌中以2.5-4.1g/L提取物的水平表达,且所述外源肽基脯氨酰异构酶在所述细菌中以3.4-13.9g/L提取物的水平表达。

24.在细菌无细胞合成系统中表达正确折叠的生物学活性蛋白的方法,其包括以下步骤:

i) 合并细菌提取物与编码目标蛋白的核酸;以及

ii) 在允许所述目标蛋白表达和正确折叠的条件下,孵育所述细菌提取物与所述核酸,

其中,所述细菌提取物包含用于无细胞蛋白合成所需的生物学功能tRNA、氨基酸、核糖体,外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶,其中所述外源蛋白二硫键异构酶和所述外源肽基脯氨酰异构酶以至少1g/L提取物的浓度存在,以及其中所述外源蛋白二硫键异构酶为DsbC,所述外源肽基脯氨酰异构酶为FkpA;

并且改善所述目标蛋白的表达至浓度超过其中外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶的一者而非两者存在且所述孵育条件在其他方面相同时的浓度。

25.如权利要求24所述的方法,其中所述外源蛋白二硫键异构酶和所述外源肽基脯氨酰异构酶的总浓度为至少1g/L提取物。

26.如权利要求24所述的方法,其中所述外源蛋白二硫键异构酶和所述外源肽基脯氨酰异构酶的总浓度为1-14g/L提取物。

27.如权利要求24所述的方法,其中用来制备所述提取物的细菌从可操作地连接组成型启动子的基因表达所述外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶的至少一种。

28.如权利要求24所述的方法,其中所述细菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

29.如权利要求24所述的方法,其中所述目标蛋白在其生物学活性构象中具有至少一个二硫键。

30.如权利要求24所述的方法,其中所述目标蛋白具有至少两个脯氨酸残基。

31.如权利要求24所述的方法,其中所述目标蛋白为抗体或抗体片段。

32.如权利要求24所述的方法,其中所述目标蛋白表达的浓度为100-1000mg/L。

33.如权利要求24所述的方法,其中正确折叠的目标蛋白的量大于600mg/L。

34. 如权利要求24所述的方法,其中所述外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶在所述细菌中以1-20g/L提取物的水平表达。

35. 如权利要求24所述的方法,其中所述外源蛋白二硫键异构酶在所述细菌中以2.5-4.1g/L提取物的水平表达,且所述外源肽基脯氨酰异构酶在所述细菌中以3.4-13.9g/L提取物的水平表达。

36. 用于表达生物学活性蛋白的细菌无细胞合成系统,其包含:

i) 细菌的无细胞提取物,所述细菌的无细胞提取物具有活性氧化磷酸化系统且含有用于无细胞蛋白合成所需的生物学功能tRNA、氨基酸和核糖体,并且还包含外源蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶,

其中所述外源蛋白二硫键异构酶和所述外源肽基脯氨酰异构酶以至少1g/L提取物的浓度存在,以及其中所述外源蛋白二硫键异构酶为DsbC,所述外源肽基脯氨酰异构酶为FkpA;和

ii) 编码目标蛋白的核酸,

其中所述细菌无细胞合成系统表达目标蛋白至浓度至少100mg/L,并且

增加正确折叠的目标蛋白的表达提高至浓度超过其中外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶的一者而非两者存在且所述孵育条件在其他方面相同时的浓度。

37. 如权利要求36所述的系统,其中外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶的总浓度为至少1g/L提取物。

38. 如权利要求36所述的系统,其中外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶的总浓度为1-14g/L提取物。

39. 如权利要求36所述的系统,其中用来制备所述提取物的细菌从可操作地连接组成型启动子的基因表达所述外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶的至少一种。

40. 如权利要求36所述的系统,其中所述细菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

41. 如权利要求36所述的系统,其中所述目标蛋白在其生物学活性构象中具有至少一个二硫键。

42. 如权利要求36所述的系统,其中所述目标蛋白具有至少两个脯氨酸残基。

43. 如权利要求36所述的系统,其中所述目标蛋白为抗体或抗体片段。

44. 如权利要求36所述的系统,其中所述目标蛋白表达的浓度为100-1000mg/L。

45. 如权利要求36所述的系统,其中正确组装的目标蛋白的量大于600mg/L。

46. 如权利要求36所述的系统,其中所述外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶在所述细菌中以1-20g/L提取物的水平表达。

47. 如权利要求36所述的系统,其中所述外源蛋白二硫键异构酶在所述细菌中以2.5-4.1g/L提取物的水平表达,且所述外源肽基脯氨酰异构酶在所述细菌中以3.4-13.9g/L提取物的水平表达。

48. 制备细菌提取物的方法,其包括:

i) 培养表达外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶的细菌,以及

ii) 制备提取物,所述提取物具有活性氧化磷酸化系统,所述提取物包含用于无细胞蛋白合成所需的生物学功能tRNA、氨基酸和核糖体,

其中所述外源蛋白二硫键异构酶和所述外源肽基脯氨酰异构酶存在的总浓度为至少

1g/L提取物;以及其中所述外源蛋白二硫键异构酶为DsbC,所述外源肽基脯氨酰异构酶为FkpA。

49.如权利要求48所述的方法,其中所述细菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*),并且所述提取物为大肠杆菌的S30提取物。

50.用于表达生物学活性蛋白的细菌无细胞提取物,所述细菌无细胞提取物包含活性氧化磷酸化系统且含有用于无细胞蛋白合成所需的生物学功能tRNA、氨基酸和核糖体,以及还包含外源蛋白二硫键异构酶和外源肽基脯氨酰异构酶,

其中所述外源蛋白二硫键异构酶和所述外源肽基脯氨酰异构酶存在的总浓度为至少1g/L提取物;以及其中所述外源蛋白二硫键异构酶为DsbC,所述外源肽基脯氨酰异构酶为FkpA。

51.如权利要求50所述的细菌无细胞提取物,其中所述提取物为大肠杆菌的S30提取物。

52.如权利要求1、24和48中任一项所述的方法,权利要求15或36所述的系统,或者权利要求50所述的提取物,其中所述提取物由进一步表达外源解聚酶的细菌制备,所述解聚酶为协助目标蛋白进行解聚和/或溶解的蛋白伴侣,任选地,其中所述外源解聚酶为Skp。

在细菌无细胞合成系统中表达生物学活性蛋白

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2013年4月19日提交的美国专利申请第61/813,914号和于2014年2月7日提交的美国专利申请第61/937,069号的优先权的益处,其各自的公开通过引用整体并入本文。

[0003] 涉及“序列表”、表或计算机程序的列表附录提交为ASCII文本文件

[0004] 为了所有目的,将于2014年4月16日创建的文件-58-2PC.TXT中书写的序列表(73,728字节,机读格式IBM-PC,MS-Windows操作系统)通过引用整体并入本文。

[0005] 发明背景

[0006] 在细菌无细胞合成系统中表达蛋白是一种用于表达重组靶蛋白的成熟建立的技术。可从表达或过表达目标蛋白的细菌制备提取物以提供细菌无细胞合成系统,所述细菌无细胞合成系统具有取决于所述蛋白的改变的特性。然而,细菌生长期间蛋白的过表达经常导致细菌较慢的生长速率和从所述细菌制备的提取物中较低的蛋白合成活性。

[0007] 进一步,来自这样的提取物的重组蛋白的表达通常导致不正确的折叠和生物学活性的损失。蛋白伴侣的使用可改善蛋白的正确折叠和其生物学活性。因此,存在对改善的用于表达重组蛋白的细菌细胞提取物的需求,所述细菌细胞提取物从过表达蛋白伴侣的细菌制备,其中这样的提取物可合成大量正确折叠的蛋白。如下所述,本发明满足以上这些需求和其他需求。

[0008] 发明概述

[0009] 本公开提供用于改善无细胞合成系统中生物学活性和/或正确折叠的目标蛋白的表达的方法和系统。所述无细胞合成系统包含细菌提取物,所述细菌提取物具有活性氧化磷酸化系统和用于无细胞蛋白合成所需的组分。所述无细胞合成系统还包含外源蛋白伴侣。在某些实施方案中,通过用来制备所述细菌提取物的细菌表达外源蛋白伴侣。

[0010] 因此,在一个方面,描述了改善细菌无细胞合成系统中生物学活性蛋白的表达水平的方法,所述方法包括以下步骤:

[0011] i) 制备细菌提取物,所述细菌提取物具有活性氧化磷酸化系统且包含用于无细胞蛋白合成所需的生物学功能tRNA、氨基酸和核糖体,其中用来制备所述提取物的细菌以至少约1gm/升的提取物浓度表达外源蛋白伴侣;

[0012] ii) 合并所述细菌提取物与编码目标蛋白的核酸,以产生细菌无细胞合成系统;以及

[0013] iii) 在允许目标蛋白的表达至浓度至少约100mg/L的条件下,孵育所述细菌无细胞合成系统。

[0014] 在第二方面,描述了用于表达生物学活性蛋白的细菌无细胞合成系统,所述系统包含:

[0015] i) 细菌的无细胞提取物,所述细菌的无细胞提取物具有活性氧化磷酸化系统且含有用于无细胞蛋白合成所需的生物学功能tRNA、氨基酸和核糖体,并且其中在细菌中以至少1gm/升的提取物水平表达外源蛋白伴侣;和,

[0016] ii) 编码目标蛋白的核酸,

[0017] 其中所述细菌无细胞合成系统表达目标蛋白至浓度至少约100mg/L。

[0018] 在第三方面,描述了在细菌无细胞合成系统中表达正确折叠的生物学活性蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

[0019] i) 制备细菌提取物,所述细菌提取物包含用于无细胞蛋白合成所需的生物学功能tRNA、氨基酸、核糖体,蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰基顺/反异构酶,其中蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰基顺/反异构酶以足以改善正确折叠的生物学活性蛋白的表达的浓度存在;

[0020] ii) 合并所述细菌提取物与编码目标蛋白的核酸;以及

[0021] iii) 在允许目标蛋白的表达和正确折叠的条件下,孵育所述细菌提取物与所述核酸。

[0022] 在第四方面,描述了用于表达生物学活性蛋白的细菌无细胞合成系统,所述系统包含:

[0023] i) 细菌的无细胞提取物,所述细菌的无细胞提取物具有活性氧化磷酸化系统且含有用于无细胞蛋白合成所需的生物学功能tRNA、氨基酸和核糖体,并且还包含蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰基顺/反异构酶,

[0024] 其中,所述蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰基顺/反异构酶以足以改善正确折叠的生物学活性蛋白的表达的浓度存在;和

[0025] ii) 编码目标蛋白的核酸,

[0026] 其中,所述细菌无细胞合成系统表达目标蛋白至浓度至少约100mg/L。

[0027] 在第五方面,描述了改善大肠杆菌(E coli)细胞培养物的活力和/或生长速率的方法,所述方法包括以下步骤:

[0028] i) 用表达蛋白DsbC的核酸转化大肠杆菌,所述表达蛋白DsbC的核酸可操作地连接组成型启动子;以及

[0029] ii) 在允许过表达DsbC蛋白至胞内浓度至少1mg/ml的条件下,培养被转化的大肠杆菌细胞。

[0030] 附图简述

[0031] 图1显示真核PDI和细菌DsbC为功能上可互换的。

[0032] 图2A显示实施例中所描述的蛋白伴侣顺序表达筛选的示意图。

[0033] 图2B显示通过将细菌无细胞系统表达的蛋白伴侣加入至细菌无细胞合成系统可改善IgG滴度。

[0034] 图3显示蛋白伴侣Skp、SlyD和FkpA改善正确组装的IgG的溶解性和/或量。

[0035] 图4显示蛋白伴侣FkpA改善IgG蛋白的溶解性和折叠。

[0036] 图5显示将纯化的FkpA加入至含有DsbC的提取物促进IgG的折叠。

[0037] 图6显示将外源的DsbC蛋白加入至含有FkpA的提取物增加IgG滴度。

[0038] 图7显示在提取物中通过CFPS所产生的GMCSF蛋白的量,所述提取物来自表达蛋白伴侣DsbC或FkpA的所示的菌株。

[0039] 图8显示转化有质粒的细菌菌株的生长速率,所述转化有质粒的菌株在组成型启动子的控制下表达1X或2X拷贝的DsbC(上图)。下图显示存在于周质裂解物中的DsbC蛋白的

量。

[0040] 图9显示通过过表达1X或2X拷贝DsbC的细菌菌株所产生的DsbC蛋白的量。上图显示细胞内浓度。下图显示提取物浓度。

[0041] 图10显示转化有质粒的细菌菌株的生长速率(上图),所述转化有质粒的菌株在组成型启动子的控制下表达1X或2X拷贝FkpA。下面左图显示存在于总提取物中的FkpA蛋白的量,所述提取物制备自表达1X和2X拷贝FkpA的细菌。下面右图显示细菌菌株的倍增时间。

[0042] 图11显示来自表达1X和2X拷贝FkpA的细菌的提取物中FkpA浓度的测定量。

[0043] 图12显示将C端His标签加至FkpA的结果。(a)显示通过在30℃下提取物活化(预孵育)后的离心旋转,增加了提取物的FkpA水平,所述提取物制备自过表达FkpA-His (2XFkpA-His (e49))的细菌。(b)显示含有FkpA-His的提取物比含有野生型FkpA的提取物产生更多的总IgG(比较2XFkpA (e44)与2XFkpA-His (e49)),并且通过将活化后的提取物离心增加了正确折叠的IgG(比较最终旋转的2XFkpA与最终旋转的2XFkpA-His)。对照(Con)1和对照2为对照提取物,其制备自不表达FkpA的细菌。

[0044] 图13显示蛋白伴侣的过表达改善了开放式无细胞合成系统中几种IgG的产量。(A)在SBJY001、2xDsbC和2xD+2xF提取物中,在¹⁴C-亮氨酸存在下表达曲妥珠单抗(trastuzumab)、结合CD30抗原的布妥昔单抗(brentuximab)以及与生殖细胞系轻链Vk3-20结合的重链VH3-7和VH3-23,并且通过SDS-PAGE和放射自显影显现。(B)如实施例所述定量不同的提取物中所表达的组装的IgG。

[0045] 定义

[0046] 除非另有定义,本文使用的技术和科学术语与本领域普通技术人员通常理解的含义相同。参见例如,Lackie,Dictionary of Cell and Molecular Biology,Elsevier(第四版.2007);Sambrook等,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor Press(Cold Springs Harbor,NY 1989);Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons(Hoboken,NY 1995)。术语“a”或“an”意指“一个或多个”。术语“包含(comprise)”和其变体(如“包含(comprises)”和“包括(comprising)”),当其在所列举的步骤或元素之前时,意指其他步骤或元素的加入是任选的并且不被排除。与本文所描述的方法、装置和材料相似或等同的任何方法、装置和材料可被用于本发明的实践中。提供以下的定义以便于理解本文频繁使用的某些具体术语,并不意味着限制本公开的范围。

[0047] 术语“活性氧化磷酸化系统”指在蛋白合成期间显示活性氧化磷酸化作用的细菌裂解物。例如,所述细菌裂解物可使用ATP合成酶和氧的还原产生ATP。应理解,本领域已知的其他翻译系统在蛋白合成期间也可使用活性氧化磷酸化作用。可通过使用具体的抑制剂(如电子传递链抑制剂)来抑制该途径以证明氧化磷酸化作用的激活。

[0048] 术语“抗体”指这样的蛋白,其在功能上被定义为结合蛋白,且结构上被定义为包含被技术人员确认的源自产生抗体的动物的免疫球蛋白编码基因构架区的氨基酸序列。抗体可由基本上被免疫球蛋白基因或其片段所编码的一条或多条多肽组成。被确认的免疫球蛋白基因包括κ、λ、α、γ、δ、ε和μ恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链被归类为κ或λ。重链被归类为γ、μ、α、δ或ε,其分别地依次定义免疫球蛋白类型:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0049] 已知典型的免疫球蛋白(抗体)的结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对完全相

同的多肽链构成,每对具有一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD)。每条链的N端限定约100至110或更多个氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。术语“可变的轻链(VL)”和“可变的重链(VH)”分别指这些轻链和重链。

[0050] 抗体存在为完整的免疫球蛋白或存在为用不同的肽酶消化所产生的众多被良好表征的片段。因此,例如胃蛋白酶在铰链区中的二硫键下方消化抗体而产生F(ab)'₂(Fab的二聚体,其自身为通过二硫键与VH-CH1连接的轻链)。在温和的条件下破坏铰链区中的二硫键可还原F(ab)'₂,从而将(Fab')₂二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体本质上为具有部分铰链区的Fab(其他抗体片段的详细描述参见,Fundamental Immunology,W.E.Paul,ed.,Raven Press,N.Y.(1993))。虽然依据完整抗体的消化定义不同的抗体片段,但技术人员了解,这样的Fab'片段可用化学方法或通过利用重组DNA方法重新合成。因此,本文使用的术语“抗体”也包括通过完整抗体的修饰所产生的抗体片段或使用重组DNA方法重新合成的抗体片段。抗体也包括单链抗体(以单条多肽链存在的抗体),和单链Fv抗体(sFv或scFv),在单链Fv抗体中可变的重链和可变的轻链被连接在一起(直接地或通过肽接头)以形成连续的多肽。单链Fv抗体为共价连接的VH-VL异源二聚体,其可表达自包含VH-和VL-编码序列的核酸,所述VH-和VL-编码序列被直接地连接或通过编码肽的接头连接(Huston等.(1988) Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883)。虽然VH和VL彼此连接为单一多肽链,但VH和VL结构域以非共价连接。在丝状噬菌体的表面上所表达的首个功能性抗体分子为单链Fv's(scFv);然而,替代性表达策略也成功了。例如,如果链中的一条(轻链或重链)与g3衣壳蛋白融合,且互补链导出至周质作为可溶的分子,那么可在噬菌体上展示Fab分子。可在相同或不同的复制子上编码两条链;重点是,各个Fab分子中的两条抗体链在翻译后组装,并且通过链中的一条与g3p的连接而将二聚体并入噬菌体颗粒(参见,例如美国专利第5733743号)。将自然地聚集但化学上分开的来自抗体V区的轻链和重链多肽链转变为折叠为与抗原结合位点结构基本类似的三维结构的分子的scFv抗体和众多其他结构是本领域技术人员已知的(参见,例如美国专利第5,091,513号、5,132,405号和4,956,778号)。抗体也包括已在噬菌体上展示的所有的抗体(例如,scFv、Fv、Fab和二硫键连接的Fv(Reiter等(1995) Protein Eng.8:1323-1331)。抗体也可包括双抗体(diantibodies)、微抗体(miniantibodies)和scFv-Fc融合体。

[0051] 术语“源于细菌的无细胞提取物”指能够将DNA转录为mRNA和/或将mRNA翻译为多肽的体外反应混合物的制备物。所述混合物包括核糖体、ATP、氨基酸和tRNA。它们可直接地源自裂解的细菌、源自纯化的组分或两者的组合。

[0052] 术语“细菌无细胞合成系统”指在包含生物提取物和/或指定试剂的反应混合物中的多肽体外合成。所述反应混合物将包含用于生成大分子的模板,例如DNA、mRNA等等;用于合成大分子的单体,例如氨基酸、核苷酸等等;以及用于合成所需的辅因子、酶和其他试剂,例如核糖体、不带电荷的tRNA、具有非天然氨基酸的带电荷的tRNA、聚合酶、转录因子、tRNA合成酶等等。

[0053] 术语“生物学活性蛋白”指保留目标蛋白的至少部分生物学活性的蛋白。可通过将通过本文所描述的方法表达的目标蛋白的活性、功能和/或结构与参考目标蛋白的活性比较,测定所述生物学活性。例如,如果参考目标蛋白为IgG,那么生物学活性蛋白将包括正确折叠和组装的IgG分子。在某些实施方案中,参考蛋白可为通过不含有外源蛋白伴侣的细菌

无细胞合成系统所表达的蛋白。也可使用适合于目标蛋白的体外或体内检测来测定生物学活性。目标蛋白的生物学活性可被表示为,每单位体积的无细胞蛋白合成反应混合物的生物学活性。在某些实施方案中,通过本文所描述的方法产生的蛋白的生物学活性为参考蛋白活性的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。

[0054] 术语“组成型启动子”指这样的核酸序列,在适当的条件下,其允许与启动子序列可操作地结合或连接的核酸序列或基因连续地转录。合适的条件包括转录因子和核糖核苷酸,所述转录因子如RNA聚合酶与启动子序列结合,所述核糖核苷酸被并入转录的RNA。组成型启动子通常为未经调节的启动子,因为它们正常的细胞条件下促进连续的转录。

[0055] 术语“二硫键异构酶”或“蛋白二硫键异构酶(PDI)”指包含多重结构域的蛋白家族,每个结构域具有典型的硫氧还蛋白(Trx)折叠。PDI分子具有包含CXXC基序的两个或更多个活性位点,所述CXXC基序为用于异构酶活性的位点。在体外,根据环境的氧化还原电位,PDI催化二硫键的氧化形成、还原或异构化。PDI为折叠催化剂类的成员,也被称为折叠酶(foldases)。折叠催化剂通过以下步骤促进折叠:使蛋白折叠过程中某个限速步骤加速,从而降低聚集的蛋白折叠中间物的浓度。除了催化二硫键形成的异构酶功能之外,PDI也促进多肽折叠为它们的天然构型,并且因此作为蛋白伴侣。PDI的C端区包含多肽结合区,并且据信其负责蛋白伴侣的活性。PDI的异构酶活性和伴侣活性为分开且独立的活性,并且这两种活性似乎为用于含有二硫键的还原蛋白和变性蛋白的再活化所必需的。

[0056] 在革兰氏阴性菌中,通过Dsb(二硫键的形成)蛋白家族催化二硫键的形成、还原和异构化,所述Dsb蛋白家族包括DsbA、DsbB、DsbC和DsbD。DsbA通过转移其活性位点的二硫化物至靶蛋白来催化二硫键的氧化形成,其留下还原形式的DsbA。DsbB使DsbA重新氧化,并且将它的电子传递至呼吸链而使氧化的DsbB再生。DsbC催化二硫键的重新排列,并且被认为是真核PDI的对应物。通过DsbD将DsbC维持在其还原形式。DsbC为各23kDa亚基单体的同源二聚体,所述同源二聚体具有四个巯基,两个在活性位点-Cys⁹⁸-Gly-Tyr-Cys¹⁰¹(SEQ ID NO:29)处,另外两个在Cys¹⁴¹和Cys¹⁶³处。与PDI类似,DsbC具有独立于其异构酶活性的蛋白伴侣活性(参见,例如,Chen等,J.Biol.Chem.274:19601-19605,1999和Kolag,O.,等,Microbial cell Factories,2009,8:9)。各个单体由具有半胱氨酸蛋白酶抑制剂折叠的N端二聚化结构域和具有硫氧还蛋白折叠的C端催化结构域组成(McCarthy A.A.等,Nat.Struct.Biol.7:196-199,2000)。其他Dsb蛋白包括DsbE和DsbG。

[0057] 术语“外源蛋白伴侣”通常指不是由用来制备细菌提取物的细菌菌株正常地表达的蛋白伴侣(例如重组蛋白伴侣),或由不存在于天然细菌菌株中的核酸构建体表达的重组蛋白伴侣。例如,如果用来制备细菌提取物的天然细菌菌株自然地表达低水平的内源性蛋白伴侣(例如,不足以改善生物学活性的目标蛋白的表达水平的水平),那么可从非天然的核酸构建体表达外源蛋白伴侣,使得编码外源蛋白伴侣的核酸序列处在与编码蛋白伴侣的内源性序列不同的调控序列的控制下。例如,蛋白伴侣DsbC和FkpA为自然生成的大肠杆菌蛋白,但它们的表达水平低于使用本文所描述的ELISA分析来检测细菌提取物中蛋白的检测极限。因此,术语“外源的”与“异源的”是同义的,其指不是由用来制备细菌提取物的细菌菌株正常地表达的蛋白伴侣,或编码不存在于天然细菌菌株中的蛋白伴侣的核酸。在某些实施方案中,该术语指重组蛋白伴侣,其被加入至细菌无细胞提取物中,并且因此不是由用来制备所述提取物的细菌所表达的。

[0058] 两个或更多个核酸或多肽序列的语境中的术语“同一的”、“基本上同一的”、“同一性百分比”，指在比较窗口或指定区域内比较且比对最大一致性时，使用分别在以下文献中所描述的BLAST和PSI-BLAST算法测定相同的或具有具体百分比的相同核苷酸或氨基酸残基（例如，指定区域内60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性）的两个或更多个序列或子序列：Altschul等(J.Mol.Biol.215:403-10,1990)和Altschul等(Nucleic Acids Res.,25:3389-3402,1997)。通过美国国家生物技术中心(National Center for Biotechnology Information) (参见网址ncbi.nlm.nih.gov)可公开地获得用于进行BLAST分析的软件。该算法涉及首先通过识别查询序列中长度W的短字来识别高得分序列对(HSP)，当短字与数据库序列中相同长度的字对齐时，其匹配或满足某些正值阈值分数T。T被称为相邻字得分阈值(neighborhood word score threshold)(Altschul等人,同上)。这些最初的相邻字匹配(hit)作为用于起始搜索的种子，以找到含有它们的更长HSP。字匹配沿着每条序列的两个方向延伸，远至累积的对比分数可被增加。使用参数M(给予一对匹配的残基奖励得分；总是>0)和N(给予错配残基处罚得分；总是<0)计算核苷酸序列的累积分数。对于氨基酸序列，使用记分矩阵计算累积分数。当出现以下情况时，中止字匹配在各个方向上的延伸：累积的比对分数从其最大实现值下降数量X；由于一个或多个负得分的残基比对的累积，累积的分数转向0或负数，或到达序列的末端。BLAST算法的参数W、T和X决定比对的敏感性和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用字长(W) 11，期望值(E) 10，M=5，N=-4和两条链比较作为默认值。对于氨基酸序列，BLASTP程序使用字长3，期望值(E) 10和BLOSUM62记分矩阵作为默认值(参见Henikoff and Henikoff, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915-10919,1992)。

[0059] 通过将比较窗口内两条最佳比对的序列比较，测定“序列同一性百分比”，其中与用于两条序列最佳比对的参考序列(其不包含添加或缺失)相比，比较窗口中的部分多核苷酸或多肽序列包含添加或缺失(即，缺口)。通过以下计算百分比：测定在两条序列上均出现的相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数以产生匹配位置数，将匹配位置数除以比较窗口中的位置总数，并且将结果乘以100以产生序列同一性百分比。

[0060] 本文使用的“比较窗口”包含涉及选自以下连续位置数中任一个的节段(segment)：从20至600、通常约50至约200、更通常约100至约150，其中，在最佳比对两条序列之后，可将序列与相同连续位置数的参考序列比较。用于比较的序列比对方法是本领域公知的。

[0061] BLAST算法也进行两条序列之间相似性的统计分析(参见，例如，Karlin and Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-87,1993)。BLAST算法所提供的一种相似性测定是最小求和概率(P(N))，其提供两条核苷酸或氨基酸序列之间的匹配偶然发生的概率指示。例如，如果将测试核酸与参考核酸比较的最小求和概率小于约0.2，通常小于约0.01，以及更通常小于约0.001，那么核酸被认为与参考序列相似。

[0062] 当使用序列同一性百分比提及多肽时，公认的是一个或多个在其他方面不相同的残基位置可以通过保守氨基酸替换而不同，其中，第一氨基酸残基被替换为具有相似化学特性(如相似的电荷、疏水性或亲水性质)的另一个氨基酸残基，并且因此不改变多肽的功能特性。当多肽序列因保守替换而不同时，可向上调整序列同一性的百分数以针对替换的保守性进行矫正。可使用公知的方法做出这样的调整，例如，将保守替换作为局部错配而

不是完全错配来记分,从而增加序列同一性百分比。因此,例如将相同的氨基酸记分为1,以及将非保守的替换记分为0,将保守的替换记分为0和1之间。可使用Pearson等人(Meth.Mol.Biol.24:307-331,1994)所描述的算法计算保守替换的得分。也可通过序列的简单目测和人工比对进行比对。

[0063] 当使用术语“保守地修饰的变异”提及具体的多核苷酸序列时,指不同的多核苷酸序列或基本上相同的序列,所述不同的多核苷酸序列编码相同或基本上相同的(例如指定区域内至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)氨基酸序列,或者其中多核苷酸不编码氨基酸序列。由于遗传密码子的简并性,大量功能相同的多核苷酸编码任何给定的多肽。例如,密码子CGU、CGC、CGA、CGG、AGA和AGG全部编码氨基酸精氨酸。因此,通过密码子指定每一个位置上的精氨酸,在不改变编码多肽的情况下可将密码子改变为所描述的任何相应的密码子。这样的核苷酸序列变异为“沉默变异”,其可被认为是“保守地修饰的变异”的种类。同样应认识到,本文所公开的编码蛋白变体的每条多核苷酸序列也描述每种可能的沉默变异。还应认识到,可通过标准技术修饰多核苷酸中除了AUG(其通常仅为甲硫氨酸的密码子)和UUG(其通常仅为色氨酸的密码子)之外的每个密码子以产生功能上相同的分子。因此,本文暗含地描述了不改变编码的多肽序列的多核苷酸的各个沉默变异。

[0064] 此外,应认识到,改变、添加或缺失编码序列中单个氨基酸或小百分比的氨基酸(通常小于10%,并且大体上小于1%)的单个替换、缺失或添加可被认为是保守地修饰的变异,只要该改变的结果是用化学上相似的氨基酸替换氨基酸。提供功能上相似的氨基酸的保守氨基酸替换是本领域公知的,其包括以下六组,其中每组含有被认为是用于彼此保守替换的氨基酸:

[0065] 1) 丙氨酸(Ala,A)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T);

[0066] 2) 天冬氨酸(Asp,D)、谷氨酸(Glu,E);

[0067] 3) 天冬酰胺(Asn,N)、谷氨酰胺(Gln,Q);

[0068] 4) 精氨酸(Arg,R)、赖氨酸(Lys,K)

[0069] 5) 异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、甲硫氨酸(Met,M)、缬氨酸(Val,V);以及

[0070] 6) 苯丙氨酸(Phe,F)、酪氨酸(Tyr,Y)、色氨酸(Trp,W)。

[0071] 如果氨基酸序列或核苷酸序列在给定的比较窗口内彼此之间或与参考序列之间共有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,那么两条或更多条氨基酸序列或者两条或更多条核苷酸序列被认为是“基本上相同的”。如果两个或更多个蛋白将提供功能上相似氨基酸的保守氨基酸替换并入氨基酸序列,那么它们也被认为是基本上相似的。

[0072] 术语“孵育条件在其他方面相同”指除了对照或参考提取物不含有或不表达外源蛋白伴侣,用于比较目的的实验条件是相同的。本术语也包括表达或含有一类外源蛋白伴侣(例如PDI)的对照提取物和表达或含有两种不同类的外源蛋白伴侣(例如PDI和PPIase)的提取物之间的比较。例如,可从表达或过表达一类蛋白伴侣(例如PDI或DsbC)的细菌菌株制备提取物,并且可将来自另一类蛋白伴侣(例如,纯化的PPIase如FkpA)的纯化蛋白加入至所述提取物。条件也可包括调整细菌提取物中外源蛋白伴侣的总浓度(例如,一类伴侣如PDI的总浓度,或两类不同的蛋白伴侣(如PDI和PPI)组合的总浓度)至相同。另外,细菌提取物的组分和编码目标蛋白的核酸是相同的。允许目标蛋白表达且正确折叠的示例性条件在

本申请实施例中有描述。

[0073] 术语“肽基脯氨酰异构酶”、“肽基脯氨酰顺反异构酶”和“脯氨酰基异构酶”(PPI或PPIase)可互换使用,并且其指被称为蛋白折叠催化剂的蛋白伴侣类。PPI催化氨基酸脯氨酸中的反式肽基脯氨酰基键转化为天然蛋白或功能蛋白中的顺式构型。PPI可拥有不同的亚基或具有不同功能的模块,例如,具有催化活性的模块和具有蛋白伴侣或蛋白结合活性的模块。PPI的三个家族已被确认:亲环素类(其异构酶活性被环孢菌素A抑制);FKBP(结合FK506的蛋白),其被FK506和雷帕霉素抑制;以及微小菌素(parvulin)。亲环素类的非限制性实例包括PpiA(RotA)。FKBP的非限制性实例包括FkpA、SlyD和触发因子(TF或tig)。微小菌素的非限制性实例包括SurA和PpiD。PPI的另外的实例包括CypA、PpiB、Cpr1、Cpr6和Fpr1。基于序列比对,FkpA、SlyD和触发因子是相关的。对于FkpA,蛋白伴侣活性和催化活性分别存在于N端和C端结构域(Saul F.A., J.Mol.Biol.335:595-608,2004)。

[0074] 术语“解聚酶(deaggregase)”指协助使例如在细菌无细胞翻译系统中产生的目标蛋白进行解聚和/或溶解的蛋白伴侣。这样的蛋白伴侣尤其在高浓度下是有益的,因为它们的作用机理是化学计量的而不是起催化作用的,并且据信是在新合成的蛋白折叠时通过使所述蛋白的疏水小片稳定来起作用。解聚酶的实例包括IbpA、IbpB和Skp。

[0075] 术语“肽”、“蛋白”和“多肽”在本文可互换使用,并且指氨基酸残基的聚合物(polymer)。该术语应用于其中一个或多个氨基酸残基为对应天然氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然氨基酸聚合物和非天然氨基酸聚合物。本文使用的该术语涵盖任何长度的氨基酸链,其包括全长的蛋白和截短的蛋白,其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0076] 术语“正确折叠的蛋白”指具有生物学活性或功能的蛋白或多肽的天然构象。因此,该术语指具有在折叠状态拥有最少自由能的三级结构的蛋白或多肽。当使用所述术语提及细菌中表达的重组蛋白时,大体上指在胞质溶胶中过表达的可溶蛋白,使得正确折叠的重组蛋白不形成不溶解的聚集体(aggregate)和/或不被变性或展开。

[0077] 术语“协同的”或“协同”可互换地指两种或更多种试剂的相互作用,使得它们的组合效果大于其各自效果的总和。协同的药物相互作用可使用中效原理来测定(参见,Chou and Talalay(1984)Adv Enzyme Regul 22:27and Synergism and Antagonism in Chem其他apy,Chou and Rideout,eds.,1996,Academic,pp.61-102),以及使用计算机程序Calculusyn通过联合指数来定量地测定(Chou and Hayball,1996,Biosoft,Cambridge,MA)。也参见,Reynolds and Maurer,Chapter 14in Methods in Molecular in Medicine,vol.110:Chemosensitivity,Vol.1:In vitro Assays,Blumenthal,ed.,2005,Humana Press。用联合指数(CI)来定量协同、总和和拮抗,如以下所示:CI<1(协同);CI=1(总和);CI>1(拮抗)。CI值0.7-0.9表明中度至轻度的协同。CI值0.3-0.7表明协同。CI值0.1-0.3表明强的协同。CI值<0.1表明非常强的协同。

[0078] 发明详述

[0079] 本文所描述的方法和系统可用于改善和/或增加无细胞合成系统(例如细菌的无细胞合成系统)中生物学活性蛋白的表达水平。通过使用细菌提取物来实现生物学活性的目标蛋白的表达水平增加,所述细菌提取物具有活性氧化磷酸化系统且含有外源蛋白伴侣。可通过用于制备提取物的细菌来表达外源蛋白伴侣。发明人意外地发现,通过在用于制

备提取物的细菌中表达相对大量的外源蛋白伴侣,通过无细胞合成系统表达了增加量的生物学活性的目标蛋白。因此,意外的是,提取物表达大量蛋白的能力没有被相对高浓度水平的蛋白伴侣负面地影响,使得在无细胞蛋白合成反应中所产生的正确折叠且生物学活性蛋白的总量大幅高于通过在不含有外源蛋白伴侣的无细胞合成系统中所表达的正确折叠且生物学活性蛋白的量。因此,虽然通过无细胞蛋白合成系统中所产生的目标蛋白的总量,与不表达外源伴侣的无细胞蛋白合成系统所产生的蛋白总量基本上相同,但提取物中蛋白伴侣的浓度水平的增加导致正确折叠的组装且生物学活性的目标蛋白的量增加。发明人也意外地发现,通过表达两种不同类的蛋白伴侣(例如,蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶),获得了正确折叠的生物学活性蛋白表达水平的协同改善。现在将描述所述方法和系统。

[0080] 为了产生生物学活性的目标蛋白,本文所描述的方法和系统使用具有活性氧化磷酸化系统的细菌提取物,以及用于无细胞蛋白合成所需的其它组分,如生物学功能tRNA、氨基酸和核糖体。所述细菌提取物的组分在下文更详细地描述。在一个方面,从表达外源蛋白伴侣的重组细菌制备所述细菌提取物。在某些实施方案中,用来制备所述提取物的细菌以至少约1克(g)/升(L)的提取物浓度表达外源蛋白伴侣。例如,用来制备所述提取物的细菌,可表达以下提取物浓度的外源蛋白伴侣:至少约1g/升、2g/升、3g/升、4g/升、5g/升、6g/升、7g/升、8g/升、9g/升、10g/升或更多的提取物。在某些实施方案中,外源蛋白伴侣的总浓度为约1-20g/L的提取物、约1-15g/L的提取物、约1-10g/L的提取物、或约1-5g/L的提取物。在某些实施方案中,细菌表达以下细胞内浓度的外源蛋白伴侣:至少1mg/ml、至少2mg/ml、至少3mg/ml、至少4mg/ml、至少5mg/ml、至少10mg/ml、至少15mg/ml、至少20mg/ml、至少30mg/ml、或至少40mg/ml。在某些实施方案中,细菌表达以下范围的细胞内浓度的外源蛋白伴侣:约1mg/ml至约40mg/ml、约1mg/ml至约20mg/ml、约1mg/ml至约15mg/ml、约1mg/ml至约10mg/ml、或约1mg/ml至约5mg/ml。

[0081] 外源蛋白伴侣可为导致正确折叠的和/或生物学功能的目标蛋白的产生增加的任何蛋白伴侣。如本文更详细地描述的,蛋白伴侣可为与目标靶蛋白相互作用以协助目标蛋白的正确折叠和/或防止其聚集为无功能聚集体的蛋白。虽然不受理论束缚,认为分子伴侣通过结合未折叠的、部分折叠的或错误折叠的多肽中暴露的疏水基团来防止聚集。因此,结合目标蛋白暴露的疏水基团并防止其聚集的任何蛋白伴侣,可被用于本文所描述的方法中。

[0082] 外源蛋白伴侣也可作为催化共价变化的酶,所述共价变化对目标蛋白形成天然和功能构象是重要的。例如,在某些实施方案中,外源蛋白伴侣为蛋白二硫键异构酶(PDI)或肽基脯氨酰顺反异构酶(PPI)。PDI的实例包括但不限于:哺乳类PDI、酵母PDI或细菌PDI。在某些实施方案中,PDI为大肠杆菌的Dsb(二硫键的形成)家族的成员(例如DsbA或DsbC)。在一个实施方案中,外源蛋白伴侣为硫氧还蛋白(Trx)。PPI的实例包括但不限于:亲环素类(其异构酶活性被环孢菌素A抑制);FKBPs(结合FK506的蛋白),其被FK506和雷帕霉素抑制;和微小菌素。大肠杆菌中的PPIase的三个家族呈现有限的序列和结构相似性,但是它们对于非结构肽共享高的催化活性和相对低的亲和力。本领域技术人员理解,PDI和PPI蛋白伴侣可具有包括蛋白伴侣(蛋白结合)结构域和催化结构域模块结构。参见,例如,Kolag, O.等, *Microbial cell Factories*, 2009, 8:9; Wang, C-C., *Methods in Enzymology*, 2002,

348:66-75。可用于本文所描述的方法和系统中的其他蛋白伴侣被称为解聚酶,其包括例如 Skp。

[0083] 在另一个方面,本公开也提供了用于在细菌无细胞合成系统中使用包含PDI和PPIase的细菌提取物来表达正确折叠的生物学活性蛋白的方法和系统。所述方法包括制备细菌提取物,所述细菌提取物包含用于无细胞蛋白合成所需的组分,如生物学功能tRNA、氨基酸、核糖体。细菌提取物还包括蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶,其中蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶以足以改善(例如提高)正确折叠的生物学活性蛋白的表达的浓度存在。在该实施方案中,蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶的表达,对正确折叠的生物学活性目标蛋白的表达提供协同的改善。例如,改善目标蛋白的表达至其浓度超过蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶的一者但不是两者存在时的浓度,并且其中孵育条件在其他方面相同。在蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶的表达对蛋白表达提供协同改善的实施方案中,蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶的总浓度为,至少约1gm/升(g/L)的提取物。例如,在某些实施方案中,所述蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶的总浓度为:至少约1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L或更多的提取物。在某些实施方案中,是蛋白二硫键异构酶和肽基脯氨酰顺反异构酶的总浓度为:约1-20g/L的提取物,约1-15g/L的提取物,约1-14g/L的提取物,约1-10g/L的提取物、或约1-5g/L的提取物。在某些实施方案中,PDI选自Dsb家族蛋白,如DsbA、DsbC和DsbG,而PPI选自:FkpA、SlyD、tig、SurA和Cpr6。

[0084] 本文所描述的细菌提取物,可从用编码二硫键异构酶和脯氨酰异构酶的基因共转化的细菌制备。用来制备所述提取物的细菌(例如,大肠杆菌)可从可操作地连接组成型启动子的基因表达外源蛋白伴侣。在某些实施方案中,所述外源蛋白伴侣为:DsbA、DsbC、FkpA、SlyD和/或Skp或其组合。在某些实施方案中,所述细菌提取物为来自大肠杆菌的S30提取物。

[0085] 本文所描述的细菌无细胞合成系统可具有约20微升和500升之间的体积,并且孵育时间为持续约1小时至约36小时。例如,孵育时间可为约1-36小时、约1-24小时、约1-18小时、或约1-12小时。

[0086] 为了产生目标蛋白,将细菌提取物与编码目标蛋白的核酸组合,以生成细菌无细胞合成系统。编码目标蛋白的核酸通常为DNA或mRNA。用于从核酸表达目标蛋白的方法在下文更详细地描述。在允许目标蛋白的表达和/或正确折叠的条件下,孵育细菌无细胞合成系统。在某些实施方案中,表达目标蛋白至浓度为:至少约100mg/L、200mg/L、300mg/L、400mg/L、500mg/L、600mg/L、700mg/L、800mg/L、900mg/L、1000mg/L或更高。用于表达目标蛋白的条件在下文更详细地描述。

[0087] 在某些实施方案中,目标蛋白在其生物学活性构象中具有至少一个二硫键。在一个实施方案中,目标蛋白具有至少两个脯氨酸残基。目标蛋白也可作为抗体或抗体片段。在某些实施方案中,目标蛋白被表示为具有本文所描述的伴侣蛋白的融合蛋白。

[0088] 在另一个方面,本公开提供了用于改善大肠杆菌细胞培养物的活力和/或生长速率的方法。所述方法包括用可操作地连接组成型启动子的Dsb蛋白转化大肠杆菌细胞;以及在允许Dsb蛋白过表达的条件下,培养被转化的大肠杆菌细胞。在某些实施方案中,以至少约1mg/ml的细胞内浓度表达Dsb蛋白。例如,在某些实施方案中,以约1mg/ml至约40mg/ml的

细胞内浓度表达Dsb蛋白。

[0089] 在某些实施方案中,蛋白伴侣可在N端或C端包含聚氨基酸标签,例如聚组氨酸(例如His₆;SEQ ID NO:24)标签或聚(Ser-Arg)标签。在某些实施方案中,聚氨基酸标签包含带电荷的氨基酸。在某些实施方案中,带电荷的氨基酸为带正电荷的。在某些实施方案中,带电荷的氨基酸为带负电荷的。在某些实施方案中,聚氨基酸标签包含极性氨基酸。在某些实施方案中,聚氨基酸标签包含交替带电荷的和极性的氨基酸。在某些实施方案中,聚氨基酸标签包含Ser-Arg-Ser-Arg-Ser-Arg-Ser-Arg(SEQ ID NO:25)。在某些实施方案中,聚氨基酸标签包含Ser-Lys-Ser-Lys-Ser-Lys-Ser-Lys(SEQ ID NO:26)。在某些实施方案中,聚氨基酸标签包含Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp(SEQ ID NO:27)。在某些实施方案中,聚氨基酸标签包含Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu(SEQ ID NO:28)。虽然不受任何具体的理论或作用机理的束缚,据信C端标签增加蛋白伴侣的溶解性,其导致在由表达被标记的蛋白伴侣的细菌制备的提取物中蛋白伴侣的量增加。在某些实施方案中,聚氨基酸标签的存在导致所产生的目标蛋白的总量增加。在某些实施方案中,离心含有聚氨基酸标记的蛋白伴侣的活化提取物,将增加正确地组装的目标蛋白的量。

[0090] 通用方法

[0091] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科技术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。从业者特别针对Green,M.R.and Sambrook,J.,编著,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第四版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2012)和Ausubel,F.M.,等.Current Protocols in Molecular Biology(Supplement 99),John Wiley&Sons,New York(2012),为了本领域的定义和术语,将其通过引用并入本文。标准方法也出现在Bindereif,**Schón**,&Westhof(2005)Handbook of RNA Biochemistry,Wiley-VCH,Weinheim,Germany,其描述了用于RNA操作和检测的详细方法,并且通过引用将其并入本文。用于产生重组核酸的合适分子技术的实例,以及足以指导技术人员进行某些克隆练习的说明参见文献:Green,M.R.,and Sambrook,J.,(Id.); Ausubel,F.M.,等.(Id.);Berger and Kimmel,Guide to Molecular Cloning Techniques,Methods in Enzymology(Volume 152Academic Press,Inc.,San Diego, Calif.1987);和PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(Academic Press,San Diego,Calif.1990),通过引用将其并入本文。

[0092] 用于蛋白纯化、层析、电泳、离心和结晶的方法描述于:Coligan等(2000)Current Protocols in Protein Science,Vol.1,John Wiley and Sons,Inc.,New York。用于无细胞合成的方法描述于:Spirin&Swartz(2008)Cell-free Protein Synthesis,Wiley-VCH, Weinheim,Germany。使用无细胞合成将非天然氨基酸并入蛋白的方法描述于:Shimizu等(2006)FEBS Journal,273,4133-4140。

[0093] PCR扩增方法是本领域公知的,并且描述于,例如,Innis等PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Academic Press Inc.San Diego,Calif.,1990。扩增反应通常包括要待扩增的DNA、热稳定的DNA聚合酶、两对寡核苷酸引物、脱氧核苷三磷酸(dNTP)、反应缓冲液和镁。通常,合适的热循环数目为1-25。用于引物设计和PCR条件优化的方法是本领域公知的,并且可在标准分子生物学文本中找到,如Ausubel等Short Protocols in Molecular Biology,第五版,Wiley,2002;和Innis等PCR Protocols,

Academic Press,1990。计算机程序可用于具有所需特异性和最佳扩增特性的引物设计(例如,Oligo Version 5.0(National Biosciences))。在某些实施方案中,PCR引物还可包含限制性内切酶的识别位点,以促进将扩增的DNA片段插入载体的特异性限制酶位点。如果限制性位点被加入至PCR引物的5'端,优选包含几个(例如两个或三个)额外的5'碱基,以允许更有效的酶切。在某些实施方案中,PCR引物也可包含RNA聚合酶启动子位点(如T7或SP6),以允许随后的体外转录。用于体外转录的方法是本领域技术人员公知的(参见,例如, Van Gelder等Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87:1663-1667,1990;Eberwine等Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:3010-3014,1992)。

[0094] 当通过名称提及本文所描述的蛋白时,应理解,该蛋白包括具有相似功能和相似氨基酸序列的蛋白。因此,本文所描述的蛋白包括野生型原型蛋白,以及同系物、多态变体和重组产生的突变蛋白。例如,名称“DsbC蛋白”包括来自大肠杆菌的野生型原型蛋白(例如SEQ ID NO:1)、以及来自其他物种的同系物、多态变体和重组产生的突变蛋白。如果蛋白如DsbC和FkpA与野生型蛋白具有基本上相同的生物学活性或功能能力(例如,任一项的至少80%),那么它们被定义为具有相似的功能。如果蛋白如DsbC和FkpA与原型蛋白具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,那么它们被定义为具有相似的氨基酸序列。使用BLASTP程序测定蛋白的序列同一性,默认为字长3、期望(E) 10以及BLOSUM62得分矩阵(参见Henikoff and Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915-10919,1992)。

[0095] 通过与针对原型蛋白所产生的多克隆抗体特异性结合的常规测试,确定蛋白同系物、多态变体或重组的突变蛋白是否包括在本文所描述的蛋白伴侣内。例如,DsbC蛋白包括与针对原型蛋白SEQ ID NO:1所产生的多克隆抗体结合的蛋白,以及FkpA蛋白包括与针对原型蛋白SEQ ID NO:6所产生的多克隆抗体结合的蛋白。

[0096] 关于本文所描述的蛋白伴侣与多克隆抗体的反应,在指定的免疫分析条件下,测试蛋白与至少两倍于背景的特异性抗体结合,并且特异性抗体基本上不大量结合样品中存在的其他蛋白。例如,可选择针对SEQ ID NO:1编码的DsbC,其剪接变体或部分产生多克隆抗体,以便仅获得与DsbC而不与除DsbC多态变体外的其他蛋白发生特异性免疫反应的那些多克隆抗体。可通过排除与Dsb家族其他成员发生交叉反应的抗体来实现这种选择。多种免疫分析的模式可被用来选择与具体蛋白发生特异性免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫分析被常规地用来选择与蛋白发生特异性免疫反应的抗体(参见,例如,Harlow&Lane, Antibodies,A Laboratory Manual(1988)for a description of immunoassay formats and condition that can be used to determine specific immunoreactivity)。通常,特异性的或选择性的反应具有至少两倍的背景信号或噪音,并且更通常多于10-100倍背景。

[0097] 应理解,本文所描述的伴侣蛋白中至少某些为具有相似功能和不同程度序列同源性的相关蛋白大家族的成员。因此,本文所描述的蛋白伴侣包括具有相似功能的家族成员的同系物,例如PDI和PPIases的同系物,Dsb蛋白的同系物,FkpA蛋白的同系物等等。因此,在某些实施方案中,蛋白伴侣可与本文所描述的蛋白伴侣具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。进一步,实施例提供的数据显示,真核的PDI和细菌的DsbC在它们产生正确组装的IgG的能力方面为功能上可互

换的,所述数据提供了本文所描述的蛋白伴侣的同系物可被用于本文所描述的方法和系统中的证据。

[0098] 无细胞蛋白合成 (CFPS) 技术

[0099] 为了表达本文所描述的生物学活性的目标蛋白,可使用无细胞蛋白合成系统。已开发了细胞提取物,其支持在体外合成反应期间由纯化的mRNA转录物或由转录自DNA的mRNA在体外合成蛋白。

[0100] 反应混合物中多肽的CFPS包含细菌提取物和/或指定的试剂。反应混合物至少包含ATP或能量来源;用于产生大分子的模板,例如DNA、mRNA等等;氨基酸以及用于多肽合成所需的这类辅因子、酶和其他试剂,例如核糖体、tRNA、聚合酶、转录因子、氨基酰合成酶、延伸因子、起始因子等等。在本发明的一个实施方案中,能量来源为自我平衡的能量来源。也包括催化从高能磷酸键再生ATP的酶,例如乙酸激酶、肌酸激酶等等。这样的酶可存在于用于翻译的提取物中,或可被加入至反应混合物。这样的合成反应系统为本领域公知的,并且已在文献中有描述。

[0101] 本文使用的术语“反应混合物”指能够催化从核酸模板合成多肽的反应混合物。所述反应混合物包含来自细菌细胞的提取物,例如大肠杆菌S30提取物。S30提取物是本领域公知的,并且描述于例如,Lesley, S. A., 等 (1991), J. Biol. Chem. 266, 2632-8。可在有氧或厌氧的条件下进行所述合成。

[0102] 在某些实施方案中,干燥细菌提取物。被干燥的细菌提取物(110%的原始固体,其通过测定原材料的固体百分比而确定),可在Milli-Q超纯水(例如反渗水)中复溶。在一个实施方案中,将精确称重的小份等分的干燥提取物(其代表10mL提取物的110%的原始固体),加入至磁力搅拌器上具有搅拌条的玻璃烧杯中10mL Milli-Q超纯水中。搅拌得到的混合物,直到使粉末溶解。一旦溶解,除非立即使用,否则将所述材料转移至15mL Falcon管中,并且保存在-80℃。

[0103] 反应混合物中的提取物的体积百分比将变化,其中所述提取物通常为至少约10%的总体积;更通常至少约20%;并且在某些实例中,当提供所述提取物为至少约50%;或至少约60%;并且通常不多于约75%的总体积时,其可提供另外的益处。

[0104] 一般的系统包含编码目标蛋白的核酸模板。所述核酸模板为RNA分子(例如mRNA)或编码mRNA的核酸(例如RNA、DNA),并且所述核酸为任何形式(例如线性的、环状的、超螺旋的、单链的、双链的等等)。核酸模板引导期望的蛋白的产生。

[0105] 为了维持模板,可选择被用来产生提取物的细胞,以用于降低、大大的降低、或消除有害的酶的活性,或者用于具有修饰的活性的酶。具有修饰的核酸酶或磷酸酶活性的细菌细胞(例如具有至少一个突变的磷酸酶或核酸酶基因或其组合),可被用于细胞提取物的合成以增加合成效率。例如,用来制备用于CFPS的S30提取物的大肠杆菌菌株可为RNase E或RNase A缺陷株(例如通过突变)。

[0106] 也可改造CFPS系统以引导将可检测标记的氨基酸,或者非常规或非天然氨基酸并入期望的蛋白。氨基酸可为合成的或源自另一种生物来源。为了特异性目的,可将不同种类的非天然氨基酸(其包括但不限于可检测标记的氨基酸)加入至CFPS反应中,并且被有效地并入蛋白。参见,例如,Albayrak, C. and Swartz, JR., Biochem. Biophys. Res. Commun., 431 (2): 291-5; Yang WC等. Biotechnol. Prog. (2012), 28 (2): 413-20; Kuechenreuther等. PLoS

One, (2012), 7 (9) :e45850;和Swartz JR., AIChE Journal, 58 (1) :5-13。

[0107] 在一般的CFPS反应中,编码目标蛋白的基因在转录缓冲液中表达,其产生mRNA,所述mRNA在CFPS提取物和翻译缓冲液中被翻译为目标蛋白。可分别地加入转录缓冲液、无细胞提取物和翻译缓冲液,或者在它们被加入之前将这些溶液中的两种或更多种混合,或者将它们同时地加入。

[0108] 为了在体外合成目标蛋白,在某些时候,CFPS提取物包含编码目标蛋白的mRNA分子。在某些CFPS系统中,在从天然来源纯化mRNA后,或在使用RNA聚合酶(如RNA聚合酶II、SP6 RNA聚合酶、T3 RNA聚合酶、T7 RNA聚合酶、RNA聚合酶III和/或源于噬菌体的RNA聚合酶)从克隆的DNA进行体外合成而制备mRNA后,将其外源地加入。在其他系统中,在体外从模板DNA产生mRNA;转录和翻译均发生于该类型的CFPS反应中。在某些实施方案中,转录和翻译系统是耦合的,或包含互补的转录和翻译系统,其在相同的反应中进行RNA和蛋白的合成。在这样的体外转录和翻译系统中,CFPS提取物含有在单个系统中进行转录(产生mRNA)和翻译(合成蛋白)所需的所有组分(外源的或内源的)。本文所描述的耦合的转录和翻译系统有时被称为开放的无细胞合成(OCFS)系统,并且能够实现高滴度的正确折叠的目标蛋白,例如高滴度的抗体表达。

[0109] 无细胞蛋白合成反应混合物包含以下组分:模板核酸,如DNA或PCR片段,所述DNA包含可操作地连接至少一个启动子和任选地一个或多个其他调控序列的目标基因(例如,含有目标基因的克隆或表达载体);RNA聚合酶,其识别目标基因可操作地连接的启动子(例如T7 RNA聚合酶),以及任选地,涉及模板核酸可操作地连接的任选的调控序列的一个或多个转录因子;核糖核苷三磷酸(rNTPs);任选地,其他转录因子和因此的辅因子;核糖体;转运RNA(tRNA);其他或任选的翻译因子(例如翻译起始、延伸和终止因子)和因此的辅因子;一种或多种能量来源(例如ATP、GTP);任选地,一种或多种能量再生组分(例如PEP/丙酮酸激酶、AP/乙酸激酶或磷酸肌酸/肌酸激酶);任选地,提高产量和/或效率的因子(例如核酸酶、核酸酶抑制剂、蛋白稳定剂、伴侣蛋白)和因此的辅因子;以及,任选地增溶剂。反应混合物还包含氨基酸和用于蛋白合成特异性地所需的其他材料,所述其他材料包括:盐(例如乙酸,谷氨酸或硫酸的钾、镁、铵和锰盐),聚合物(例如聚乙二醇、右旋糖酐、二乙基氨基乙基右旋糖酐、季铵乙基和氨基乙基右旋糖酐等等),环AMP,蛋白或核酸降解酶的抑制剂,蛋白合成的抑制剂或调节剂,氧化/还原调节剂(例如DTT、抗坏血酸、谷胱甘肽和/或它们的氧化物),非变性表面活性剂(例如Triton X-100),缓冲液组分,精胺,亚精胺,腐胺等等。CFPS反应的组分在以下文献中有更详细的讨论:美国专利第7,338,789号和7,351,563号,以及美国专利申请公布第2010/0184135号和第2010/0093024号,为了所有目的,通过引用将其各自的公开整体并入本文。

[0110] 根据提取物中存在的特异性酶,例如,一种或多种许多已知的核酸酶,可选择聚合酶或磷酸酶抑制剂,并且其被有利地用来改善合成效率。

[0111] 蛋白和核酸合成通常需要能量源。能量是用于起始转录以产生mRNA所必需的(例如,使用DNA模板并且用于翻译的起始时,使用例如GTP形式的高能磷酸)。通过核糖体一个密码子的各个随后步骤(三个核苷酸;一个氨基酸)需要将另外的GTP水解为GDP。ATP通常也是必需的。为了在蛋白合成期间使氨基酸聚合,ATP必须首先被激活。因此用于蛋白和/或核酸合成加工,需要来自高能磷酸键的相当数量的能量。

[0112] 能量来源为化学底物,其可被酶促地作用以提供能量来实现期望的化学反应。通常使用的能量来源其允许通过断裂如存在于核苷三磷酸(例如ATP)中的高能磷酸键来释放能量用于合成。可转变为高能磷酸键的任何来源是特别适合的。通常,ATP、GTP以及其他三磷酸盐被认为是用于支持蛋白合成的等同的能量来源。

[0113] 为了提供用于合成反应的能量,所述系统可包含添加的能量来源,如葡萄糖、丙酮酸盐、磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、氨甲酰磷酸、乙酰磷酸、磷酸肌酸、磷酸丙酮酸、甘油醛-3-磷酸、3-磷酸甘油酸盐和葡萄糖-6-磷酸,所述能量来源可形成或再生高能量的三磷酸盐化合物,如ATP、GTP、其他NTPs等等。

[0114] 起初合成系统中不存在充足的能量时,优先地补充另外的能量来源。也可在体外合成反应期间加入或补充能量来源。

[0115] 在某些实施方案中,使用PAN0x-SP系统进行无细胞蛋白合成反应,所述PAN0x-SP系统包含NTP、大肠杆菌tRNA、氨基酸、乙酸镁、谷氨酸镁、乙酸钾、谷氨酸钾、亚叶酸、Tris pH 8.2、DTT、丙酮酸激酶、T7 RNA聚合酶、二硫键异构酶、磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、NAD、CoA、草酸钠、腐胺、亚精胺和S30提取物。

[0116] 在某些实施方案中,可合成含有非天然氨基酸(nnAA)的蛋白。在这样的实施方案中,反应混合物可包含非天然氨基酸,与20种天然生成的氨基酸正交的tRNA,以及可连接nnAA与正交tRNA的tRNA合成酶。参见,例如,美国专利申请公布第2010/0093024号。或者,反应混合物可包含结合tRNA的nnAA,其中自然地生成的tRNA合成酶被缺失。参见,例如,PCT公布第W02010/081111号。

[0117] 在某些实例中,无细胞合成反应不需要添加常规的二次能量来源,而使用氧化磷酸化和蛋白合成的共活化。在某些实例中,在反应系统如Cytomim(细胞质模拟)系统中进行CFPS。Cytomim系统被定义的反应条件为:具有优化的镁离子浓度且在聚乙二醇不存在下进行。该系统不累积磷酸,已知磷酸抑制蛋白合成。

[0118] 可使用抑制剂测试活性氧化磷酸化途径的存在,所述抑制剂特异性地抑制所述途径中的步骤,如电子传递链抑制剂。氧化磷酸化途径的抑制剂实例包括毒素(如氰化物、一氧化碳、叠氮化物、羰基氰化物间氯苯腙(CCCP)和2,4-二硝基苯酚),抗体(如寡霉素),杀虫剂(如鱼藤酮),以及琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂(如丙二酸盐和草酰乙酸盐)。

[0119] 在某些实施方案中,使用Cytomim系统进行无细胞蛋白合成反应,所述系统包含NTP、大肠杆菌tRNA、氨基酸、乙酸镁、谷氨酸镁、乙酸钾、谷氨酸钾、亚叶酸、Tris pH 8.2、DTT、丙酮酸激酶、T7 RNA聚合酶、二硫键异构酶、丙酮酸钠、NAD、CoA、草酸钠、腐胺、亚精胺和S30提取物。在某些实施方案中,用于Cytomim系统的能量底物为丙酮酸盐、谷氨酸和/或葡萄糖。在所述系统的某些实施方案中,用核苷单磷酸(NMP)代替核苷三磷酸(NTP)。

[0120] 可用碘乙酰胺处理细胞提取物以便使能减少二硫键且损害蛋白正确折叠的酶失活。本文进一步所述,也可用原核生物的二硫键异构酶(如,但不限于大肠杆菌DsbC和PDI)处理细胞提取物。可用DsbC、FkpAh和肽基脯氨酰异构酶处理细胞提取物。也可将二硫化谷胱甘肽(GSSG)和谷胱甘肽(GSH)以能促进蛋白正确折叠且防止形成异常二硫化蛋白的比例加入至提取物。

[0121] 在某些实施方案中,CFPS反应包含倒转的膜囊泡以进行氧化磷酸化。如本文所述,这些囊泡可在细胞提取物制备过程的高压均质化步骤期间形成,并且保留在用于反应混合

物的提取物中。

[0122] 在用于CFPS反应之前,可使无细胞提取物解冻至室温。当合成具有二硫键的蛋白时,可将提取物与50 μ M碘乙酰胺孵育30分钟。在某些实施方案中,CFPS反应包含约30% (v/v) 碘乙酰胺处理的提取物,以及约8mM谷氨酸镁,约10mM谷氨酸铵,约130mM谷氨酸钾,约35mM丙酮酸钠,约1.2mM AMP,约0.86mM的各GMP、UMP和CMP,约2mM氨基酸(约1mM的酪氨酸),约4mM草酸钠,约0.5mM腐胺,约1.5mM亚精胺,约16.7mM磷酸钾,约100mM T7 RNA聚合酶,约2-10 μ g/mL质粒DNA模板,约1-10 μ M大肠杆菌DsbC,以及总浓度约2mM的被氧化的谷胱甘肽(GSSG)。任选地,无细胞提取物可包含1mM还原的GSH。

[0123] 无细胞合成反应条件可按本领域已知的分批、连续流动或半连续流动的方式进行。反应条件为可线性扩展的,例如,0.5L搅拌的釜反应器中0.3L规模,至10L发酵罐中4L规模,以及至200L发酵罐中100L规模。

[0124] Spirin等(1988) *Science* 242:1162-1164研发的连续流动的体外蛋白合成系统证明了反应可被延长至多数小时。从那以后,许多课题组重现且改善了该系统(参见,例如,Kigawa等(1991) *J. Biochem.* 110:166-168;Endo等(1992) *J. Biotechnol.* 25:221-230)。Kim和Choi (*Biotechnol. Prog.* 12:645-649, 1996)报道了使用简单的透析膜反应器,通过采用“半连续操作”,可将分批和连续流动系统的优点组合。它们能够重现连续流动系统的延长的反应周期,同时维持常规的分批系统的起始速率。然而,连续的和半连续的方法均需要大量的昂贵试剂,所述试剂量增加的因子明显大于产物产量增加的因子。

[0125] 已对常规的分批系统作出某些改进(Kim等(1996) *Eur. J. Biochem.* 239:881-886;Kuldlicki等(1992) *Anal. Biochem.* 206:389-393;Kawarasaki等(1995) *Anal. Biochem.* 226:320-324)。尽管半连续的系统在延长的周期内维持蛋白合成的起始速率,但常规的分批系统依然提供一些优势,例如操作的方便性、容易扩大规模、较低的试剂费用和极好的再现性。同样,分批系统可以多路(multiplexed)模式很容易地实施,以同时地表达不同的遗传材料。

[0126] Patnaik和Swartz (*Biotechniques* 24:862-868, 1998)已报道了,通过反应条件的大量优化,可将蛋白合成的起始具体速率提高至与体内表达的速率相似的水平。值得注意的是,他们使用无任何冷凝步骤所制备的常规细胞提取物实现了如此高速率的蛋白合成(Nakano等(1996) *J. Biotechnol.* 46:275-282;Kim等(1996) *Eur. J. Biochem.* 239:881-886)。Kigawa等(1999) *FEBS Lett* 442:15-19报道了高水平的蛋白合成,他们使用冷凝的提取物且使用磷酸肌酸作为能量来源。这些结果暗示,分批系统的进一步改进,尤其是在蛋白合成反应的长效性方面,会大大增加分批的体外蛋白合成的生产率。然而,关于常规的分批系统中蛋白合成提早停止的原因依然不清楚。

[0127] 本文所描述的蛋白合成反应可运用大规模的反应器,小规模的反应器,或可为多路反应(multiplexed)以同时进行多个合成。连续反应可使用加料机引入试剂流,并且作为该过程的一部分可分离终产物。分批系统也是令人感兴趣的,其中可引入另外的试剂以延长活性合成的时间周期。反应器可以任何模式运行,如分批、扩展的分批、半分批、半连续的、补料-分批和连续的模式,并且可根据应用目的选择运行模式。

[0128] 产生裂解物

[0129] 本文所描述的方法和系统使用细胞裂解物用于体外翻译目标靶蛋白。为了简便,

用作裂解物来源的生物体可被称为来源生物体或宿主细胞。宿主细胞可为细菌、酵母、哺乳动物或植物细胞,或能够合成蛋白的任何其他类型细胞。裂解物包含能够翻译编码期望的蛋白的信使核糖核酸(mRNA)的组分,以及任选地包含能够转录编码期望的蛋白的DNA的组分。这样的组分包括,例如DNA指导的RNA聚合酶(RNA聚合酶),用于编码期望蛋白的DNA的转录起始所需的任何转录活化剂,转运核糖核酸(tRNAs),氨酰基-tRNA合成酶,70S核糖体, N^{10} -甲酰四氢叶酸,甲酰甲硫氨酸-tRNA^{fMet}合成酶,肽基转移酶,起始因子如IF-1、IF-2和IF-3,延伸因子如EF-Tu、EF-Ts和EF-G,释放因子如RF-1、RF-2和RF-3,等。

[0130] 任何实施方案使用裂解物源自的细菌细胞。源自任何细菌菌株的细菌裂解物可被用于本发明的方法中。可按照以下获得细菌裂解物。在众多生长培养基的任一培养基中和本领域公知的且为了具体细菌生长专业人员很容易优化的生长条件下,培养所选择的细菌至对数期。例如,用于合成的自然环境利用源自在含葡萄糖和磷酸培养基上生长的细菌细胞的细胞裂解物,其中葡萄糖的存在浓度为至少约0.25%(重量/体积),更通常至少约1%;以及通常不多于约4%,更通常不多于约2%。这样的培养基的实例为2YTPG培养基,然而本领域技术人员应了解,许多培养基可适合于该目的,因为存在许多适合用于细菌(如大肠杆菌)生长的公开培养基,所述公开培养基使用明确的和不明确的营养物来源。通过以下方法裂解过夜收集的细胞:将细胞小球悬浮在合适的细胞悬浮缓冲液中,并且通过超声处理破碎悬浮的细胞,在弗氏压碎器中破坏悬浮的细胞,连续流动的高压匀浆,或本领域已知的可用于高效细胞裂解的任何其他方法。然后将细胞裂解物离心或过滤,以去除大的DNA片段和细胞碎片。

[0131] 用来制备细胞裂解物的细菌菌株通常具有降低的核酸酶和/或磷酸酶活性,以增加无细胞合成效率。例如,用来制备无细胞提取物的细菌菌株可在编码核酸酶RNase E和RNase A的基因上具有突变。所述菌株也可具有使细胞合成反应的组分稳定的突变,例如在基因如tnaA、speA、sdaA或gshA中的缺失,其分别防止在无细胞合成反应中氨基酸色氨酸、精氨酸、丝氨酸和半胱氨酸的降解。此外,所述菌株可具有使无细胞合成的蛋白产物稳定的突变,如在蛋白酶ompT或lonP中的敲除。

[0132] 目标蛋白

[0133] 本文所描述的方法和系统用于增加正确折叠的生物学活性目标蛋白的表达。目标蛋白可为能够在细菌无细胞合成系统中表达的任何蛋白。非限制性实例包括具有二硫键的蛋白和具有至少两个脯氨酸残基的蛋白。目标蛋白可为例如抗体或其片段、治疗蛋白、生长因子、受体、细胞因子、酶、配体等等。目标蛋白的其他实例如下文所述。

[0134] 具有二硫键的蛋白

[0135] 本文所提供的方法可用于在生物活性构象中具有至少一个二硫键的任何蛋白。二硫键通过以共价的方式连接残基而将折叠单元锁定为稳定的构象,使蛋白的三级结构稳定。

[0136] 在原核生物的细胞中,当DsbA蛋白将其二硫键提供至新合成的多肽时形成二硫键,所述新合成多肽在其天然结构中包含二硫键。整体的膜蛋白DsbB在自身内形成二硫键,然后所述二硫键被转移至DsbA。在某些真核生物细胞中,主要的二硫化物途径由膜相关的黄素蛋白EroI和可溶的硫氧还蛋白-样蛋白PDI构成。EroI,使用黄素辅因子通过氧介导其半胱氨酸对的再氧化,使其自身内形成二硫键,以及然后将所述键转移至PDI。依次地,PDI

将二硫键直接地转移至还未采用其天然结构的新合成多肽。

[0137] 二硫键存在于许多蛋白中,其包括但不限于:分泌蛋白、免疫蛋白、细胞外基质蛋白、糖蛋白、溶酶体蛋白和膜蛋白。二硫键和具有二硫键的蛋白的详细描述可在以下文献中找到:例如,Fass,D.*Annu.Rev.Biophys.*,2012,41:63-79,Sevier,C.S.and Kaiser,C.A.*Antioxidants&Redox Signaling*,2006,8(5):797-811和de Marco,A.,*Microbial Cell Factories*,2009,8:26。

[0138] 具有脯氨酸的蛋白

[0139] 本文所提供的方法可用于具有至少两个脯氨酸残基的任何蛋白。含有脯氨酸的蛋白通常有利于二级结构元件,如转角和聚脯氨酸螺旋。聚脯氨酸螺旋可为延长的、左手螺旋且扭转角 $\phi = -78^\circ$ 和 $\psi = +146^\circ$ 的肽骨架。相对高比例的脯氨酸可存在于蛋白中靠近跨膜螺旋的中心处。脯氨酸残基也可存在于 β -转角和 α -螺旋加帽的基序中,例如,在 α -螺旋的末端或甚至来自所述末端的一个或两个残基处。脯氨酸也可经历对蛋白正确折叠重要的顺反异构化。

[0140] 富含脯氨酸的蛋白包括具有重复性短的富含脯氨酸序列的蛋白,具有串联重复的富含脯氨酸序列的蛋白,具有非重复的富含脯氨酸区域的蛋白,和具有富含羟脯氨酸的蛋白。脯氨酸残基可存在于多种蛋白中,其包括但不限于:膜整合蛋白如转运蛋白、通道蛋白和受体蛋白、球状蛋白、荷尔蒙、神经肽、粘蛋白、免疫球蛋白以及细胞外基质蛋白。

[0141] 已表明,富含脯氨酸的肽可提高和/或维持细胞中一氧化氮的产生,加强细胞中精氨酸琥珀酸合成酶的活性,增加细胞内钙离子的浓度,并且作为含有SH3、WW、EVH1或BHB结构域的蛋白的配体。含有脯氨酸的蛋白的详细描述,可在以下文献中找到:例如Williamson,M.*Biochem.J.*1994,297:249-260和Kay等FASEB J.,14:231-241。

[0142] 蛋白伴侣

[0143] 为了改善生物学活性目标蛋白的表达,本方法和系统使用包含外源蛋白伴侣的细菌提取物。分子伴侣为协助其他大分子结构的非共价折叠或展开以及组装或拆解的蛋白。蛋白伴侣的一个主要功能是防止新合成的多肽链和组装的亚基聚集为无功能的结构。鉴定的首个蛋白伴侣核质蛋白,其协助从DNA和正确折叠的组蛋白组装核小体。这样的组装伴侣帮助折叠的亚基组装为低聚体结构。蛋白伴侣与最初蛋白的折叠有关因为它们从核糖体伸出、与细胞内蛋白的运输以及错误折叠的蛋白或变性蛋白的蛋白降解有关。虽然大多数新合成的蛋白能在蛋白伴侣不存在下折叠,但少数新合成的蛋白完全地需要它们。通常,蛋白伴侣的内部为疏水的,而表面结构为亲水的。虽然蛋白伴侣促进底物蛋白折叠的确切机理未知,但据认为,蛋白伴侣通过使部分折叠的结构和天然形式之间的活化障碍降低,加快期望的折叠步骤以确保正确的折叠。进一步,特异性蛋白伴侣展开错误折叠的蛋白或聚集的蛋白,并且通过相继的展开和重折叠回天然的生物学活性形式来拯救所述蛋白。

[0144] 压缩可折叠底物的一个蛋白伴侣子集被称为伴侣素(chaperonin)(例如组I伴侣素GroEL/GroES复合物)。组II伴侣素,例如,认为TRiC(TCP-1环复合物,也被称为CCT,用于含有TCP-1的伴侣素)折叠细胞骨架蛋白肌动蛋白和微管蛋白,以及其他底物。伴侣素以堆积的双环结构为特点,并且存在于原核生物、真核生物的胞质溶胶以及在线粒体中。

[0145] 其他类型的蛋白伴侣,涉及真核生物的线粒体和内质网(ER)的膜转运。细菌的易位特异性伴侣将新合成的前体多肽链维持在能够易位(通常为展开的)的状态中,并且将它

们引导至通常被称为转运蛋白或转运通道的易位子上。原核生物和真核生物中类似的蛋白复合物最通常指,将具有靶信号序列的新生多肽从胞质溶胶运输至内质网(ER)的内部(池状的或内腔)空间,但其也被用来将新生蛋白整合进膜自身(膜蛋白)中。在内质网(ER)中,存在帮助折叠蛋白的普通蛋白伴侣(BiP、GRP94、GRP170)、凝集素(钙联接蛋白和钙网蛋白)和非典型的分子伴侣(HSP47和ERp29)。折叠的蛋白伴侣包括:蛋白二硫键异构酶(PDI、DsbA、DsbC)和肽基脯氨酰顺反异构酶(PPI、FkpA、SlyD、TF)。

[0146] 也将多数的蛋白伴侣归类为热激蛋白(Hsp),因为它们细胞应激(如热激)期间被高度地上调,并且通过升高温度或其他细胞应激使蛋白变性时,聚集的趋势增加。标记用于降解的蛋白的泛素也具有热激蛋白的特征。某些高度特异的‘立体蛋白伴侣’将独特的结构构象(立体的)信息传达至蛋白上,所述蛋白不能被自发地折叠。蛋白伴侣的其他功能包括协助蛋白降解、细菌的粘附活性,以及对与蛋白聚集有关的朊病毒疾病的应答。

[0147] 被称为折叠酶的酶,催化用于合成的蛋白的天然和功能构象形成所必需的共价变化。折叠酶的实例包括蛋白二硫键异构酶(PDI)和肽基脯氨酰顺反异构酶(PPI),所述PDI用来催化天然二硫键的形成,所述PPI用来催化将稳定的反式肽基脯氨酰基键异构化为用于蛋白的功能折叠所需的顺式构型。天然二硫键的形成和脯氨酰亚胺键的顺反异构化均为共价反应,并且其常常为蛋白折叠过程中的限速步骤。最近被提议为蛋白伴侣,在化学计量的浓度中,折叠酶增加某些变性蛋白的再活化产量。蛋白伴侣的其他实例包括解聚酶如Skp,以及氧化还原蛋白Trr1和Glr1。

[0148] 在某些实施方案中,蛋白伴侣可与另一个蛋白共表达,所述另一个蛋白的作用为增加期望的蛋白伴侣的活性。例如Dsb蛋白DsbA和DsbC可与DsbB和DsbD共表达,其分别氧化和还原DsbA及DsbC。

[0149] 用编码蛋白伴侣的基因的转化细菌

[0150] 用于本文所描述的方法和系统的细菌提取物含有外源蛋白伴侣。可将本文所描述的外源蛋白伴侣加入至提取物中,或所述外源蛋白伴侣可被用来制备无细胞提取物的细菌表达。在后者的实施方案中,可从编码外源蛋白伴侣的基因表达外源蛋白伴侣,所述编码外源蛋白伴侣的基因与起始基因转录的启动子可操作地连接。

[0151] 可用于本发明的启动子包括组成型启动子和调控型(可诱导的)启动子。启动子可为原核生物的或真核生物的,其取决于宿主。用于本发明实践中的原核生物(包括噬菌体)启动子为: lac、T3、T7、 λ Pr'P1'和trp启动子。用于本发明实践中的真核生物(其包括病毒)启动子为:普遍存在的启动子(例如HPRT、波形蛋白、肌动蛋白、微管蛋白),中间丝启动子(例如结蛋白、神经丝、角蛋白、GFAP),治疗基因启动子(例如MDR类型、CFTR、VIII因子),组织特异性启动子(例如平滑肌细胞中的肌动蛋白启动子),应答刺激的启动子(例如类固醇激素受体、维甲酸受体),四环素调控的转录调节剂,即刻早期巨细胞病毒,逆转录病毒LTR,金属硫蛋白,SV-40,E1a和MLP启动子。WO 96/01313、美国专利第5,168,062号和5,385,839号中描述四环素调控的转录调节剂和CMV启动子,通过引用将其全部的公开并入本文。

[0152] 在某些实施方案中,所述启动子为组成型启动子。细菌中组成型启动子的实例包括spc核糖体蛋白操纵子启动子 P_{spc} 、质粒pBR322的 β -内酰胺酶基因启动子 P_{bla} 、噬菌体 λ 的 P_L 启动子、质粒pBR322的复制控制启动子 P_{RNAI} 和 P_{RNAII} 、rrnB核糖体RNA操纵子的P1和P2启动子、tet启动子以及pACYC启动子。

[0153] 定量的测定目标蛋白和蛋白伴侣

[0154] 可使用本领域已知的任何方法测定通过本文所述的方法和系统所产生的目标蛋白的量。例如,可使用凝胶电泳(例如PAGE)、Western分析或毛细管电泳(例如Caliper LabChip)来纯化和定量所表达的目标蛋白。可通过并入放射性标记氨基酸来监测无细胞翻译反应中的蛋白合成,通常用³⁵S-标记的甲硫氨酸或¹⁴C-标记的亮氨酸。可通过电泳后的放射自显影来显现放射性标记蛋白的分子大小并且将其定量,或者通过免疫沉淀来分离放射性标记蛋白。重组的His标签的并入,通过Ni²⁺亲和柱层析提供了另一种纯化手段。以可溶的蛋白产量或通过使用酶促或结合活性的检测来测定表达系统的蛋白产生。

[0155] 可通过以下方法定量被加入至无细胞合成系统的蛋白伴侣的量:在用来制备细菌提取物的细菌细胞培养物中加入放射性氨基酸如¹⁴C-亮氨酸,并且通过例如使用三氯乙酸(TCA)使放射性蛋白沉淀并测定回收的放射性总量以定量表达的蛋白伴侣的量。也可用免疫方法测定蛋白伴侣的量,例如,通过ELISA,其中针对蛋白伴侣的单克隆或多克隆抗体被用来检测和定量固定在板上或Western印迹上的伴侣蛋白。

[0156] 定量测定表达蛋白的生物学活性和正确折叠

[0157] 可使用特异性用于目标蛋白的体外或体内检测,来定量通过本文所描述的方法产生的目标蛋白的生物学活性。目标蛋白的生物学活性可被表示为每单位体积无细胞蛋白合成反应混合物的生物学活性。通过将所产生的总蛋白的量与可溶蛋白的量比较,可定量表达的目标蛋白的正确折叠。例如,可通过用放射性标记的氨基酸(如¹⁴C-亮氨酸)放射性地标记目标蛋白,并且用TCA使标记的蛋白沉淀,测定蛋白和所产生蛋白的可溶部分(fraction)的总量。可通过在还原和非还原条件下进行凝胶电泳(PAGE)以测定以正确分子量迁移的可溶蛋白部分,来确定折叠和组装的蛋白的量。在非还原条件下,蛋白聚集体可被捕获在凝胶基质上,或可迁移为高分子量的污点,所述污点难以表征为离散的实体;然而在还原的条件下,并且当加热样品时,含有二硫键的蛋白被变性,聚集体被离解,并且表达的蛋白迁移为单个条带。用于测定正确折叠和组装的抗体蛋白的量的方法如实施例所述。可使用免疫分析例如ELISA来确定抗体分子的功能活性。

实施例

[0158] 实施例1

[0159] 该实施例表明,通过细菌的无细胞蛋白合成系统所表达的伴侣蛋白,能增加通过无细胞蛋白合成系统所表达的正确地组装的IgG的量,并且细菌PDI和PPI的组合协同地作用以增加正确地组装的IgG的量。

[0160] 改造细菌内质网以用于免疫球蛋白的快速表达。

[0161] 材料和方法:

[0162] 小规模无细胞表达。VWR恒温混合仪上以650rpm,在10μg/mL DNA(表达载体pYD317中,2.5μg/mL曲妥珠单抗轻链DNA,7.5μg/mL曲妥珠单抗重链DNA)存在下的96-孔微量滴定板中,于30℃运行100μl无细胞蛋白合成反应12小时。室温(20℃)下,用50μM碘乙酰胺处理无细胞提取物30分钟,并且将其加入至预混的组分中。除非另有指示,蛋白合成反应的终浓度为30%细胞提取物(v/v),2mM GSSG,8mM谷氨酸镁,10mM谷氨酸铵,130mM谷氨酸钾,35mM丙酮酸钠,1.2mM AMP,0.86mM的各GMP、UMP和CMP,2mM氨基酸(除了1mM酪氨酸和苯

丙氨酸), 4mM草酸钠, 1mM腐胺, 1.5mM亚精胺, 15mM磷酸钾, 20 μ g/mL T7 RNAP。

[0163] PDI和DsbC的可交换性。在不同浓度的PDI和DsbC下运行无细胞蛋白合成反应, 以了解二硫键异构酶对IgG折叠和组装的需求。将0–5 μ M重组PDI与0–13 μ M重组DsbC结合, 加入至无细胞反应中。VWR恒温混合仪中以650rpm, 用30%对照提取物在8 μ g/mL HC-HIS6 DNA和2 μ g/mL LC DNA存在下的96-孔微量滴定板中, 于30 $^{\circ}$ C运行100 μ l无细胞反应12小时。随后将所述反应物以5000xg离心10分钟, 并且用PBS将上清液稀释2倍, 然后使用Biomek robotic系统在IMAC Phytips (200 μ l tip, 5 μ l树脂层)上纯化。用20mM Tris pH8, 300mM NaCl, 500mM咪唑洗脱样品, 并且使用毛细管电泳在Caliper LapChip GXII上定量所洗脱的IgG。

[0164] 蛋白伴侣的连续表达筛选。将候选的蛋白伴侣克隆进无细胞表达质粒pYD317内。从这些质粒产生PCR片段, 所述PCR片段含有夹在T7启动子和终止子序列之间的蛋白伴侣基因。随后在标准微量滴定板条件下, 于30 $^{\circ}$ C通过无细胞蛋白合成从这些PCR片段表达蛋白伴侣16个小时。为了抵抗DNA的降解使PCR片段稳定, 将40 μ g/mL GamS蛋白加入至反应中。随后将表达蛋白伴侣的提取物在5000xg下离心10分钟, 并且将含有蛋白伴侣的上清液以20% (v/v)的比例加入新的无细胞反应中, 用于在 14 C-亮氨酸存在下表达IgG (8 μ g/mL曲妥珠单抗重链DNA和2 μ g/mL曲妥珠单抗轻链DNA)。如之前所述 (MAbs. 2012Mar 1; 4 (2)), 基于 14 C-亮氨酸并入IgG分子的比率计算IgG滴度。涉及蛋白伴侣的IgG滴度改善被表示为, 相对于加入表达GFP的提取物的改善倍数。为了估计被加入至IgG表达反应中的蛋白伴侣的量, 也在 14 C-亮氨酸存在下运行蛋白伴侣无细胞反应, 并且定量表达的蛋白。

[0165] 2xDsbC和2xFkpA提取物。制备细菌基因DsbC (2xDsbC) 和FkpA (2xFkpA) 在组成型启动子 (pACYC) 之后的双顺反子质粒, 并且将其转化进细菌。如Yang W.C.等. Biotechnol. Prog. (2012), 28 (2): 413–20所述, 将这些菌株培养至对数期, 并且将其裂解用于制备无细胞提取物。将FkpA蛋白加入至含有2xDsbC提取物的IgG无细胞反应中, 以测试FkpA是否进一步改善IgG折叠和组装。通过将13 μ M DsbC蛋白加入至具有2xFkpA提取物的无细胞反应进行该反向实验。

[0166] 结果:

[0167] PDI和DsbC的可互换性。为了更好地了解IgG折叠和组装对真核的和细菌的二硫键异构酶的依赖性, 在不同浓度的PDI和DsbC下运行IgG无细胞蛋白合成反应。在存在0–5 μ M PDI与0–13 μ M DsbC组合的无细胞反应中表达IgG。将表达的IgG-His通过Ni $^{++}$ 树脂纯化并且通过毛细管电泳定量 (图1)。不存在DsbC时, IgG高度地依赖于折叠的PDI (图1, 实心的圆圈)。然而, 当反应中DsbC的浓度增加时, 对PDI的依赖性下降, 使得在6.4 μ M DsbC下所述反应中不存在归因于PDI的额外益处 (图1, 空心的三角)。而且, 通过增加反应中DsbC的浓度, 我们发现IgG滴度的显著改善超过我们之前所观察到的 (图1, 空心的圆圈)。在效果方面, 我们观察到用相似功能的细菌蛋白伴侣代替真核二硫键异构酶在真核蛋白折叠方面的有效性。

[0168] 蛋白伴侣的连续表达筛选。在体内, 已知真核的蛋白伴侣对IgG的折叠和组装发挥重要的作用。因此, IgG分子在缺乏这些生理折叠酶的细菌系统中的表达是具有挑战性的 (REFS)。同样地, 我们实施筛选方法以鉴定应为IgG折叠和/或组装的积极效应物的蛋白伴侣。在我们的无细胞系统中表达候选的蛋白伴侣, 并且随后将所述表达的蛋白伴侣加入新的无细胞反应中用于IgG的表达。IgG折叠的任何改善被表示为, 相对于加入表达GFP (不太

可能与IgG相互作用的蛋白)的对照提取物的滴度改善。为了改善筛选的处理量,在蛋白伴侣被加入至IgG反应之前,不将其从提取物纯化。为此,我们想要确保蛋白伴侣DNA在随后的IgG反应中不被转录和表达。同样地,从比质粒DNA明显更不稳定的PCR模板表达蛋白伴侣。加入GamS蛋白帮助保护PCR模板,使得能够合成足够水平的伴侣蛋白。

[0169] 考虑到它们在体内折叠IgG的作用,蛋白伴侣的一些家族尤其令人关注。测试来自细菌、酵母和人的PPIases、折叠酶、解聚酶和氧化还原蛋白。在氧化还原蛋白伴侣当中,我们发现PDI(酵母同系物)和DsbC显著地协助IgG的形成,与我们之前的发现一致(图2B)。有趣的是,人PDI(hPDI)不显著地影响IgG的折叠,可能是由于其在细胞提取物中表达很弱,所述细胞提取物不允许加入足够量的人PDI来协助IgG折叠。相反,细菌蛋白DsbC在提取物中很好地表达,其允许加入~5μM DsbC至IgG反应(表达~25μM DsbC,并且将其以20%的比例加入至IgG反应)。所测试的PPIases中,证明一些PPIases有益于IgG的表达(图2B)。从这些结果,我们决定继续研究Skp、SlyD和FkpA。

[0170] 纯化的Skp、SlyD和FkpA可改善IgG滴度。为了证实来自蛋白伴侣筛选的匹配记录(hit),我们表达并纯化Skp、SlyD和FkpA,并且将它们加回至IgG无细胞蛋白合成反应(图3)。对于蛋白伴侣Skp,我们看出Skp有助于HC和LC的溶解性,但不显著增加组装的IgG的量。然而,对于脯氨酰异构酶SlyD和FkpA,我们观察到,加入这些蛋白伴侣越多,可溶蛋白和组装的IgG的量成比例地增加。我们推断出,脯氨酰基异构化是之前限制无细胞蛋白合成系统中IgG形成的功能,而这些外源蛋白的加入极大地改善了IgG折叠和组装。由于用DsbC和FkpA观察到的巨大改善,我们决定进一步表征它们在IgG折叠中的作用。

[0171] FkpA和DsbC协同地作用以折叠和组装IgG。为了更好地了解FkpA和DsbC在IgG形成中发挥的作用,我们独立地评估它们对IgG折叠的贡献(图4)。有趣的是,FkpA的加入显著地降低了在HC和LC合成期间形成的较高分子量聚集体的程度。增加FkpA的量,我们也观察到IgG的形成,以及许多部分组装的产物。这些蛋白迁移为模糊的条带,其暗示它们可能代表混合群体的二硫键交联键合的蛋白。另一方面,DsbC的加入产生了IgG的清楚明显的条带。然而,无FkpA时,显著比例的表达蛋白形成了较高阶的聚集体,其不能完全地进入SDS-PAGE凝胶。

[0172] 将两种蛋白伴侣组合进相同的IgG反应中时,它们协同地作用以折叠IgG(图5)。在含有DsbC的提取物(2xDsbC)中表达HC和LC,且加入不同量的外源FkpA蛋白。在50μM FkpA下,可表达大约900μg/mL的组装IgG。为了继续研究,改造过表达FkpA的菌株,从所述过表达FkpA的菌株制备细胞提取物。从加入有外源DsbC蛋白的FkpA提取物合成IgG(图6)。在30%提取物(v/v)的标准条件下以~600μg/mL制备具有降低的聚集作用的IgG。为进一步增加各个反应中FkpA的浓度,我们滴定反应中含有FkpA的提取物以使IgG滴度至>900μg/mL(图6)。

[0173] 以上实施例表明,两种不同种类的蛋白伴侣PDI和PPI的组合,对无细胞表达系统中蛋白的正确折叠和组装提供协同效果。

[0174] 实施例2

[0175] 该实施例表明,用来制备细胞提取物的细菌菌株中外源蛋白伴侣的过表达,不抑制目标蛋白如GMCSF的产生。

[0176] 菌株的描述:

[0177] SBDG028: SBJY001+pACYC 2x DsbC+ Δ RF1

[0178] SBDG031:SBJY001+pACYC 2x DsbC

[0179] SBDG044:SBJY001+pACYC 2x FkpA

[0180] SBDG049:SBJY001+pACYC 2x FkpA-6xHis

[0181] 细胞提取物的制备:

[0182] 基本上如以下文献所述制备来自大肠杆菌菌株SBDG028、SBDG031、SBDG044和SBDG049的提取物:Zawada等,Biotechnology and Bioengineering Vol.108,No.7,2011年7月。

[0183] GMCSF CFPS反应

[0184] 如以下文献所述进行用于GMCSF蛋白产生的无细胞反应步骤:Zawada等Biotechnology and Bioengineering Vol.108,No.7,2011年7月,通过引用将其整体并入本文。

[0185] 图7显示在来自过表达DsbC或FkpA的所示细菌的提取物中,通过CFPS所产生的GMCSF蛋白的量。在来自不表达外源DsbC或FkpA的细菌的对照提取物中,产生非常少的GMCSF(数据未显示)。

[0186] 实施例3

[0187] 该实施例表明,过表达蛋白伴侣的细菌细胞与不过表达蛋白伴侣的细菌具有相似的生长速率。

[0188] 方法:如实施例1所述,用表达一个(1X)或两个(2X)拷贝的DsbC和FkpA的重组质粒转化细菌菌株。将这些菌株培养至对数期,其被裂解用于制备无细胞提取物。测定菌株的生长速率(倍增时间),使用Western分析和/或ELISA来定量通过细菌菌株所产生的蛋白伴侣的量。

[0189] 为了测定所表达的蛋白伴侣的细胞内浓度,使用渗透压冲击法来裂解摇瓶中生长的细胞的周质。通过具有已知DsbC浓度标准物的凝胶电泳分离周质裂解物。光密度测定法被用来比较标准DsbC条带的强度与周质裂解物条带的强度。条带的强度被用来测定裂解物中DsbC浓度,其被用来反算细胞中DsbC的浓度。

[0190] 通过ELISA测定无细胞提取物中伴侣蛋白的量。测定无细胞提取物中DsbC和FkpA滴度的ELISA为直接ELISA模式。检测由以下步骤组成:用标准物和样品包被检测板,然后允许识别DsbC或FkpA的抗体进行结合,冲洗掉过量的DsbC和FkpA抗体,引入抗-兔IgG的偶联HRP的二抗(在兔中制备DsbC和FkpA抗体),冲洗掉过量的偶联二抗,然后使用ABTS底物检测存在于偶联二抗上的HRP。已知浓度的纯化DsbC和FkpA被用来创建7个点的标准曲线以用于样品浓度的测定。

[0191] DsbC:MSD(最小样品稀释):1/120,000;MSD下的LLOQ(定量下限):187.5 μ g/ml。

[0192] FkpA:MSD(最小样品稀释):1/75,000;MSD下的LLOQ(定量下限):390 μ g/ml

[0193] 结果:

[0194] 图8显示转化有质粒的细菌菌株的生长速率,所述转化有质粒的菌株在组成型启动子的控制下表达1X或2X拷贝的DsbC。表达1X和2X拷贝DsbC的菌株的生长速率与未用表达质粒转化的对照菌株相似。图8的下图显示存在于如上所述的周质裂解物中的DsbC蛋白的量。

[0195] 图9显示通过过表达1X或2X拷贝DsbC的菌株所产生的DsbC蛋白的量。上图显示如

上所述测定的细胞内浓度。下图显示通过ELISA测定的提取物浓度。

[0196] 图10显示转化有质粒的细菌菌株的生长速率,所述转化有质粒的细菌菌株在组成型启动子的控制下表达1X或2X拷贝的FkpA。表达1X和2X拷贝FkpA的菌株的生长速率与未用表达质粒转化的对照菌株相似。图10的下面左图显示存在于由细菌制备的总提取物中FkpA蛋白的量,所述细菌表达1X和2X拷贝FkpA。图11显示来自表达1X和2X拷贝FkpA的细菌的提取物中FkpA浓度的定量。

[0197] 示例性ELISA实验的结果如下表所示。关于FkpA的ELISA数据为来自与图9所示的提取制备物不同的提取制备物,其具有不同的DsbC浓度。

[0198] 表1:通过ELISA所测定的提取物中DsbC浓度。

菌株	描述	DsbC 滴度 (mg/ml)	标准偏差 (mg/ml)
SBJY-001	WT 对照提取物	< 0.188	N/A
[0199] SBDG-026	1x DsbC 提取物	1.084	0.016
SBDG-028	2x DsbC 提取物	3.155	0.351
SBDG-031	2x DsbC 提取物(无 RF1 缺失)	3.267	0.353
SBDG-033	3x DsbC 提取物	2.854	0.272

[0200] 表2:通过ELISA所测定的提取物中FkpA浓度。

菌株	描述	FkpA 滴度 (mg/ml)	标准偏差 (mg/ml)
SBJY-001	WT 对照提取物	< 0.390	N/A
SBDG-034	1x FkpA	3.029	0.305
[0201] SDDG-044	2x FkpA	5.121	0.076
SBDG-048	用于细胞质表达的去除了 前导序列的 2x FkpA	1.960	0.252
SBDG-049	2x FkpA w/6xHis(SEQ ID NO: 24)标签	5.415	0.147
SBDG-052	1x FkpA Pc7 启动子	2.786	0.059

[0202] 该实施例表明,过表达蛋白伴侣的重组细菌菌株能够快速生长,并且可用于制备无细胞蛋白合成的高质量提取物。

[0203] 实施例4

[0204] 该实施例显示,蛋白伴侣FkpA的C端上含有多电荷的氨基酸标签能增加提取物中FkpA的量,并且增加通过无细胞蛋白合成系统所产生的总蛋白的量。

[0205] 克隆编码FkpA的基因,在载体pACYC-Pc中C端具有His₆(SEQ ID NO:24)或(Ser-Arg)₄(SEQ ID NO:25)标签。如上所述,将这些载体转化进菌株SBJY001,并且制备提取物。FkpA的ELISA显示,通过活化的提取物的最终离心旋转增加了提取物中His标记的FkpA变体的水平(图12a)。与含有wt FkpA的提取物相比,含有这些标记溶解性的FkpA蛋白的提取物产生了更多的总蛋白。此外,通过活化的提取物的最终旋转提高了组装的IgG水平(图12b)。

[0206] 该实施例表明,在FkpA的C端加入多电荷的氨基酸标签,增加了通过用来制备提取物的细菌所表达FkpA的量,并且增加所产生的总蛋白的量。进一步,对于含有C端His-标记的FkpA的提取物,活化后使提取物向下旋转导致正确组装的IgG的量的增加。

[0207] 实施例5

[0208] 该实施例表明,两种独立的细菌菌株中的蛋白伴侣DsbC和FkpA的基因组整合导致具有高生长速率的细胞,其产生高的蛋白伴侣水平,并且源自这些菌株的无细胞提取物含有高水平的这两种蛋白伴侣,以及支持高水平的重组IgG和GMC-SF的无细胞合成。

[0209] 菌株108

[0210] 菌株SBDG108为SBMT095的衍生株。该菌株使用同源重组制备,将2拷贝的dsbC整合进染色体上的中等强度组成型启动子后的galK基因座。使SBMT095处于感受态,并且然后用pACYC-Pc0-2xFkpA(中等拷贝质粒,在组成型启动子后具有2拷贝的FkpA)转化。两个拷贝均编码野生型大肠杆菌FkpA,但是合成了一个基因以降低与WT基因的核苷酸同源性,使彼此能够在相同的质粒中被稳定地扩增。

[0211] 使用DM80-80在分批模式的标准提取物发酵中,菌株SBDG108能够实现高的生长速率,同时仍然产生非常高的蛋白伴侣水平(参见表3)。

[0212] 表3:提取物发酵中菌株108的特性。

[0213]	细胞内DsbC滴度	4.1mg/ml
	细胞内FkpA滴度	13.9mg/ml
	具体的生长速率	0.49/h

[0214] 由菌株108制备的提取物含有高水平的两种蛋白伴侣,并且支持非常高水平的重组IgG和其他蛋白的无细胞合成(参见表4)。

[0215] 表4:无细胞蛋白滴度

[0216]	GMC-SF	0.44mg/ml
	曲妥珠单抗	1.1mg/ml

[0217] 菌株150

[0218] 菌株SBMT150为SBHS016的衍生株,具有ompT敏感性RF1的KKG10衍生株。为了产生SBMT150,将2拷贝的DsbC整合进染色体上的xy1A基因座。将两拷贝的FkpA整合进galK基因座。用同源重组引入这两种染色体整合。

[0219] 使用DM80-80在分批模式的标准提取物发酵中,菌株SBMT150能够实现高的生长速率,同时仍然产生高的蛋白伴侣水平(参见表5)。因为蛋白伴侣从所述基因组过表达,所以该菌株的发酵期间不需要抗生素。

[0220] 表5:提取物发酵中菌株150的特性

[0221]	细胞内DsbC滴度	2.5mg/ml
	细胞内FkpA滴度	3.4mg/ml
	具体的生长速率	.071/h

[0222] 由菌株108制备的提取物含有高水平的两种蛋白伴侣,并且支持重组IgG和其他蛋白高水平的无细胞合成,如下面的表6所示。

[0223] 表6:无细胞蛋白滴度

[0224]	GMC-SF	0.46mg/ml
	曲妥珠单抗	0.49mg/ml

[0225] 总之,该实施例表明,可改造细菌菌株以稳定地并入蛋白伴侣表达盒,所述菌株在不损害生长速率的情况下表达高水平的伴侣蛋白,并且源自这些菌株的无细胞提取物产生高水平的重组目标蛋白。

[0226] 实施例6

[0227] 该实施例显示,源自过表达DsbC和FkpA蛋白伴侣的细菌细胞的提取物,可改善多种不同IgG的表达和组装。

[0228] 方法:

[0229] 2xDsbC和2xFkpA提取物。用基于pACYC的蛋白伴侣过表达质粒转化大肠杆菌菌株 SBJY001 (Yin G,等,Aglycosylated antibodies and antibody fragments produced in a scalable in vitro transcription-translation system.mAbs 2012;4),并且在对数期收集所述菌株以制备细胞提取物。制备在大肠杆菌启动子Mt-cons-10之后携带一拷贝 dsbC (1xDsbC) 或两串联拷贝 dsbC (2xDsbC) 的质粒,并将其转化进细菌 (Thouvenot B等.The strong efficiency of the Escherichia coli gapA Plpromoter depends on a complex combination of functional determinants.Biochem J 2004;383:371-82),同样如此的是一拷贝 fkpA (1xFkpA) 或两拷贝 fkpA (2xFkpA)。如以下文献所述,将这些菌株培养至对数期,并且将其裂解以制备无细胞提取物:Zawada J.F等.Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production--a new approach for shortening protein production development timelines.Biotechnol Bioeng 2011; 108:1570-8。单独或与外源加入的纯化蛋白结合,测试各提取物中产生IgG的活性。进一步修饰用于OCFS提取物所优化的细菌菌株SBHS016(源自菌株SBJY001),以提高DsbC蛋白的产生。该菌株具有整合进细菌galK基因座的双重串联拷贝的dsbC,使用修饰的MT-cons-10启动子将其组成性地表达(Thouvenot B.等Biochem J 2004;383:371-82)。该双重串联拷贝的dsbC是除正常dsbC基因座上野生型基因之外的基因。该双重串联的基因盒含有一拷贝亲本dsbC基因,以及一拷贝被设计用于编码野生型蛋白的合成版dsbC基因,但是具有改变的密码子以抑制与基因组别处的其他版dsbC基因进行不想要的序列重组。用2xFkpA质粒转化该过表达DsbC菌株,以产生菌株 '2xD+2xF'。

[0230] 结果:

[0231] 在本文所描述的细菌体外转录/翻译系统中翻译一组不同的IgG。在对照提取物 (SBJY001)、DsbC提取物 (2xDsbC提取物) 和DsbC+FkpA提取物 (2xD+2xF) 中翻译IgG。除与轻链Vk3-20结合的两种生殖细胞系重链VH3-7和VH3-23之外,所述组包括治疗抗体曲妥珠单抗 (抗-Her2IgG1) 和布妥昔单抗 (抗-CD30IgG1)。如图13所示,2xDsbC提取物中IgG的表达极

大地改善了所有四种IgG的产量。在DsbC+FkpA提取物中观察到进一步的改善,其促使曲妥单抗和布妥昔单抗两者的表达水平至1g/L,而生殖细胞系的IgG表达水平将近1.5g/L。

[0232] 该实施例表明,来自过表达伴侣DsbC和FkpA的经改造细菌的提取物能增加广泛范围的免疫球蛋白在耦合有转录-翻译系统的OCFS中表达。

[0233] 应理解,本文所描述的实施例和实施方案仅出于示例性目的,并且向本领域技术人员提示了基于以上实施例和实施方案的多种修饰或变化,并且其被包括在该申请的精神和范围以及所附权力要求的范围内。为了所有目的,通过引用将本文所引的所有出版物、序列登录号、专利和专利申请整体并入本文。

[0234] 非正式的序列表:

[0235] SEQ ID NO:1NP_417369蛋白二硫键异构酶II[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655] (DsbC;xprA) (UniProt P0AEG6)

[0236] 1 MKKGFMLFTL LAAFSGFAQA DDAAIQQTALA KMGIKSSDIQ PAPVAGMKTV LTNSGVLYIT
61 DDGKHIIQGP MYDVSGTAPV NVTNKMMLKQ LNALEKEMIV YKAPQEKHVI TVFTDITCGY
121 CHKLHEQMAD YNALGITVRY LAFPRQGLDS DAEKEMKAIW CAKDKNKAFD DVMAGKSVAP
181 ASCDVDIADH YALGVQLGVS GTPAVVLSNG TLVPGYQPPK EMKEFLDEHQ KMTSGK

[0237] SEQ ID NO:2NP_418297周质蛋白二硫键异构酶I[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655] (DsbA;dsf;ppfA) (UniProt P0AEG4)

[0238] 1 MKKIWLALAG LVLAFSASAA QYEDGKQYTT LEKPVAGAPQ VLEFFSFFCP HCYQFEEVLH
61 ISDNVKKKLP EGVKMTKYHV NFMGGDLGKD LTQAWAVAMA LGVEDKVTVP LFEGVQKTQT
121 IRSASDIRDV FINAGIKGEE YDAAWNSFV KSLVAQQEKA AADVQLRGVP AMFVNGKYQL
181 NPQGMDTSNM DVFVQQYADT VKYLSEKK

[0239] SEQ ID NO:3催化DsbA蛋白二硫键异构酶I重新氧化的NP_415703氧化还原酶[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655] (DsbB;roxB;ycgA) (UniProt P0A6M2)

[0240] 1 MLRFLNQCSQ GRGAWLLMAF TALALELTAL WFQHVMLLKP CVLCIYERCA LFGVLGAALI
61 GAIAPKTPLR YVAMVIWLYS AFRGVQLTYE HTMLQLYPSP FATCDFMVRF PEWLPLDKWV
121 PQVFVASGDC AERQWDFLGL EMPQWLLGIF IAYLIVAVLV VISQPFKAKK RDLFGR

[0241] SEQ ID NO:4NP_418559融合的巯基:二硫键互换的蛋白:DsbC/保守蛋白的活化剂[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655] (DsbD;C-型细胞色素生物起源蛋白CycZ;内膜铜耐受蛋白;蛋白-二硫键还原酶) (UniProt P36655)

[0242] 1 MAQRIFTLIL LLCSTSVFAG LFDAPGRSQF VPADQAFADF FQQNQHDNL TWQIKDGYLL
61 YRKQIRITPE HAKIADVQLP QGVWHEDEFY GKSEIYRDRL TLPVTINQAS AGATLTVTYQ
121 GCADAGFCYP PETKTVPLSE VVANNAAPQP VSVPPQEQPT AQLPFSALWA LLIGIGIAFT
181 PCVLPMYPLI SGIVLGGKQR LSTARALLT FIYVQGMALT YTALGLVVAA AGLQFQAALQ
241 HPYVLIGLAI VFTLLAMSMF GLFTLQLPSS LQTRLTMSN RQGGSPGGV FVMGAIAGLI
301 CSPCTTAPLS AILLYIAQSG NMWLGGGTLY LYALGMGLPL MLITVFGNRL LPKSGPWMEQ
361 VKTAFGFVIL ALPVFLLERV IGDVWGLRLW SALGVAFFGW AFITSLQAKR GWMRIVQIIL
421 LAAALVSVRP LQDWAFGATH TAQTQTHLNF TQIKTVDELN QALVEAKGKP VMLDLYADWC
481 VACKEFEKYT FSDPQVQKAL ADTVLLQANV TANDAQDVAL LKHLNVLGLP TILFFDGGQG
541 EHPQARVTGF MDAETFSABL RDRQP

[0243] SEQ ID NO:5NP_415137巯基:二硫键互换的蛋白,周质[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655] (DsbG;ybdP) (UniProt P77202)

1 MLKKILLALL LPAIAFAEEL PAPVKAIEKQ GITIIKTFDA PGGMKGYLGK YQDMGVITIYL
61 TPDGKHAISG YMYNEKGENL SNTLIEKEIY APAGREMWQR MEQSHWLLDG KKDAPVIVYV
[0244] 121 FADPFCPYCK QFWQQARPWV DSGKVQLRTL LVGVIKPESP ATAAAILASK DPAKTWQQYE
181 ASGGKLKLVN PANVSTEQMK VLSDNEKLM D LGANVTPAI YYMSKENTLQ QAVGLPDQKT
241 LNIIMGNK

[0245] SEQ ID NO:6NP_417806FKBP-型肽基脯氨酰顺反异构酶(旋转异构酶)[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655](FkpA;PPIase)(UniProt P45523)

1 MKSLFKVTLL ATTMAVALHA PITFAAEAAK PATAADSKAA FKNDDQKSAY ALGASLGRYM
61 ENSLKEQEK L GIKLDKQLI AGVQDAFADK SKLSDDQEIY TLQAFEARVK SSAQAKMEKD
[0246] 121 AADNEAKGKE YREKFAKEKG VKTSSTGLVY QVVEAGKGEA PKSDTVVVN YKGTLDGKE
181 FDNSYTRGEP LSFRLDGVIP GWTEGLKNIK KGGKIKLVIP PELAYGKAGV PGIPPNSTLV
241 FDVELLDVKP APKADAKPEA DAKAADSACK

[0247] SEQ ID NO:7NP_417808FKBP-型肽基脯氨酰顺反异构酶(旋转异构酶)[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655](SlyD;富含组氨酸的蛋白;金属伴侣蛋白SlyD;对溶菌蛋白D的敏感性;WHP;PPIase)(UniProt P0A9K9)

1 MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDSPVSA PLDYHLHGHS LISGLETELE GHEVGDKFDV
61 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
[0248] 121 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHGGCCGG HGHDHGHEHG
181 GEGCCGGKGN GCGGCH

[0249] SEQ ID NO:8NP_414595肽基脯氨酰顺反异构酶(PPIase)[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655](SurA;肽基脯氨酰顺反异构酶SurA;旋转异构酶SurA;存活蛋白A;PPIase SurA)(UniProt P0ABZ6)

1 MKNWKTLLLG IAMIANSTFA APQVVDKVAA VVNGGVLES DVDGLMQSVK LNAAQARQQL
61 PDDATLRHQI MERLIMDQII LQMGGKMGVK ISDEQLDQAI ANIAKQNNMT LDQMRSRLAY
121 DGLNYNTYRN QIRKEMIIE VRNNEVRRRI TILPQEVESL AQQVGNQND STELNLSHIL
[0250] 181 IPLPENPTSD QVNEAESQAR AIVDQARNGA DFGKLAIAHS ADQQALNGGQ MGWGRIQELP
241 GIFAQALSTA KKGDIVGPIR SGVGFHILKV NDLRGESKNI SVTEVHARHI LLKPSPIMTD
301 EQARVKLEQI AADIKSGKTT FAAAAKEFSQ DPGSANQGGD LGWATPDIFD PAFRDALTRL
361 NKGQMSAPVH SSFGWHLIEL LDTRNVDKTD AAQKDRAYRM LMNRKFSEEA ASWMQEQRAS
421 AYVKILSN

[0251] SEQ ID NO:9NP_414720周质伴侣蛋白[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655](Sfp;伴侣蛋白sfp;结合DNA的17kDa蛋白;组氨酸-样蛋白HLP-1;hlpA)(UniProt P0AEU7)

1 MKKWLLAAGL GLALATSAQA ADKIAIVNMG SLFQQVAQKT GVSNTLENEF KGRASELQRM
[0252] 61 ETDLQAKMKK LQSMKAGSDR TKLEKDVMQA RQTFAQKAQA FEQDRARRSN EERGKLVTRI
121 QTAVKSVANS QDIDLVDAN AVAYNSSDVK DITADVLKQV K

[0253] SEQ ID NO:10NP_009887蛋白二硫键异构酶PDI1[酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)S288c](yPDI;与硫氧还蛋白有关的糖蛋白1;TRG1;MFP1)(UniProt P17967)

1 MKFSAGAVLS WSSLLASSV FAQQEAVAPE DSAVVKLATD SFNEYIQSHD LVLAEFFAPW
 61 CGHCKNMAPE YVKAETLVE KNITLAQIDC TENQDLCMEH NIPGFPSLKI FKNSDVNNIS
 [0254] 121 DYEGPRTAEA IVQFMKQSQ PAVAVVADLP AYLNETFVT PVIVQSGKID ADFNATFYSM
 181 ANKHFNDYDF VSAENADDDF KLSIYLPSAM DEPVVYNGKK ADIADADVFE KWLQVEALPY
 241 FGEIDGSVFA QYVESGLPLG YLFYNDEEEL EYKPLFTEL AKKNRGLMNF VSIDARKFGR
 301 HAGNLMKEQ FPLFAIHDMT EDLKYGLPQL SEEAFFDELSD KIVLESKAIE SLVKDFLKG
 361 ASPIVKSQEI FENQDSSVFQ LVGKNHDEIV NDPKKDVLVL YYAPWCGHCK RLAPTYQELA
 [0255] 421 DTYANATSDV LIAKLDHTEN DVRGVVIEGY PTIVLYPGGK KSESVVYQGS RSLDSLDFDI
 481 KENGHFDVDG KALYEEAQEK AAEEADADA E LADEEDAIHD EL

[0256] SEQ ID NO:11NP_000909蛋白二硫键异构酶前体[智人(Homo sapiens)](hPDI;
 PDI;蛋白二硫键异构酶相关的1;DSI;胶原羟化酶;胶原脯氨酰基4-羟化酶 β ,原胶原-脯氨
 酸,2-酮戊二酸4-加双氧酶(脯氨酸4-羟化酶), β 多肽;脯氨酰基4-羟化酶亚基 β ;P4HB;
 PHDB;P04DB;P04HB;PROHB;P4HB;蛋白二硫键异构酶家族A,成员1;PDIA1;蛋白二硫键异构
 酶/氧化还原酶;结合甲状腺激素的蛋白p55;谷胱甘肽-胰岛素转氢酶;蛋白二硫键异构酶;
 脯氨酰基4-羟化酶亚基 β ;结合细胞甲状腺激素的蛋白;谷胱甘肽-胰岛素转氢酶;GIT;
 ERBA2L)(UniProt P07237)

1 MLRRALLCLA VAALVRADAP EEEDHVLVLR KSNFAEALAA HKYLLVEFYA PWCCHCKALA
 61 PEYAKAAGKL KAEGSEIRLA KVDATESDL AQQYGVGRYP TIKFFRNGDT ASPKEYTAGR
 121 EADDIVNWLK KRTGPAATTL PDGAAAESLV ESSEVAVIGF FKDVESDSAK QFLQAAEAID
 181 DIPFGITSNS DVFSKYQLDK DGVVLFKKFD EGRNFEFEV TKENLLDFIK HNQLPLVIEF
 [0257] 241 TEQTAPKIFG GEIKTHILLF LPKSVSDYDG KLSNFKTAAE SFKGKILFIF IDSDHTDNQR
 301 ILEFFGLKKE ECPAVRLITL EEEMTKYKPE SEELTAERIT EFCHRFLEGG IKPHLMSQEL
 361 PEDWDKQPVK VLVGKNFEDV AFDEKKNVVF EFYAPWCGHC KQLAPIWDKL GETYKDHENI
 421 VIAKMDSTAN EVEAVKVHSF PTLKFFPASA DRTVIDYNGE RTLDGFKKFL ESGGQDGAGD
 481 DDDLEDLEEA EEPDMEEDDD QKAVKDEL

[0258] SEQ ID NO:12NP_010640硫氧还蛋白二硫键还原酶TRR1[酿酒酵母S288c](yTrr1;
 细胞质硫氧还蛋白还原酶)(UniProt P29509)

1 MVHNKVTIIG SGPAHAATAI YLARAEIKPI LYEGMMANGI AAGGQLTTTT EIENFPGFPD
 61 GLTGSELMR MREQSTKFGT EIITETVSKV DLSSKPFLW TEFNEDAEPV TTDAILLATG
 [0259] 121 ASAKRMHLP EETYWQKGIS ACAVCDGAVP IFRNKPLAVI GGGDSACEEA QFLTKYGSKV
 181 FMLVRKDHLR ASTIMQKRAE KNEKIEILYN TVALEAKGDG KLLNALRIKN TTKNEETDLP
 241 VSGLFYAIGH TPATKIVAGQ VDTDEAGYIK TVPGSSLTSTV PGFFAAGDVQ DSKYRQAITS
 301 AGSGCMAALD AEKYLTSLE

[0260] SEQ ID NO:13NP_015234谷胱甘肽二硫键还原酶GLR1[酿酒酵母S288c](yGlr1;谷
 胱甘肽还原酶;GR;GRase;LPG17)(UniProt P41921)

- 1 MLSATKQTFR SLQIRTMSTN TKHYDYLVI GGS GGVASAR RAASYGAKTL LVEAKALGGT
61 CVNVGCVPKK VMWYASDLAT RVSHANEYGL YQNLPLDKEH LTFNWPEFKQ KRDAYVHRLN
121 GIYQKNLEKE KVDVVFVGWAR FNKDGNVEVQ KRDNTTEVYS ANHILVATGG KAIFPENIPG
181 FELGTSDSGF FRLEEQPKKV VVVGAGYIGI ELAGVFHGLG SETHLVIRGE TVLRKFDECI
[0261] 241 QNTITDHYVK EGINVHKLSK IVKVEKNVET DKLKIHMNDS KSIDDVDELI WTIGRKSHLG
301 MGSENVGIKL NSHDQIIADE YQNTNVPNIY SLGDVVGKVE LTPVAIAAGR KLSNRLFGPE
361 KFRNDKLDYE NVPSVIFSHP EAGSIGISEK EAIEKYGKEN IKVYNSKFTA MYAAMLSEKS
421 PTRYKIVCAG PNEKVVGLHI VGDSSAEILQ GFGVAIKMGA TKADFDNCVA IHPTSAEELV
481 TMR
- [0262] SEQ ID NO:14NP_414970肽基脯氨酰基顺/反异构酶(触发因子)[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655](tig;TF;ECK0430;JW0426;PPIase)(UniProt P0A850)
- [0263] 1 MQVSVETTQ LGRRTITIA ADSIETAVKS ELVNVAKKVR IDGFRKGKVP MNIVAQRYGA
61 SVRQDVLGDL MSRNFIIDAI KEKINPAGAP TYVPGEYKLG EDFTYSVEFE VYPEVELQGL
121 EAIEVEKPIV ETDADVDGM LDTLRKQAT WKEKDGAVEA EDRVTIDFTG SVDGEEFEGG
181 KASDFVLAMG QGRMIPGFED GIKGHKAGEE FTIDVTFPEE YHAENLKGKA AKFAINLKKV
[0264] 241 EERELPELTA EFIKRFVED GSVEGLRAEV RKNMERELKS AIRNRVKSQA IEGLVKANDI
301 DVPAALIDSE IDVLRQAQA RFGGNEKQAL ELPRELFEEQ AKRRVVVGLL LGEVIRTNEL
361 KADEERVKGL IEEMASAYED PKEVIEFYSK NKELMDNMRN VALEEQAVEA VLAKAKVTEK
421 ETTFNELMNQ QA
- [0265] SEQ ID NO:15NP_000933肽基脯氨酰顺反异构酶B前体[智人](hPIIB;PPIase B;PIIB;旋转异构酶B;亲环素B;亲环素-样蛋白;S-亲环素;SCYLP;CYP-S1;CYPB)(UniProt P23284)
- 1 MLRLSERNMK VLLAAALIAG SVFFLLLPGP SAADEKKKGP KVTVKVYFDL RIGDEDVGRV
61 IFGLFGKTVK KTVDNFVALA TGEKGFYKYN SKFHRVIKDF MIQGGDFTRG DGTGGKSIYG
[0266] 121 ERFPDENFKL KHYGPGWVSM ANAGKDTNGS QFFITTVKTA WLDGKHVVFG KVLEGMEVVR
181 KVESTKTDSR DKPLKDVIIA DCGKIEVEKP FAIAKE
- [0267] SEQ ID NO:16NP_010439肽基脯氨酰基异构酶CPR1[酿酒酵母S288c](Cpr1,肽基脯氨酰顺反异构酶,亲环素,CPH1,CYP1,结合环孢菌素A的蛋白,旋转异构酶,PPIase,PPI-II)(UniProt P14832)
- 1 MSQVYFDVEA DGQPIGRVVF KLYNDIVPKT AENFRALCTG EKGFGYAGSP FHRVIPDFML
[0268] 61 QGGDFTAGNG TGGKSIYGGK FPDENFKKHH DRPGLLSMAN AGPNTNGSQF FITTVPCPWL
121 DGKHVVFG EV VDG YDIVKKV ESLGSPSGAT KARIVVAKSG EL
- [0269] SEQ ID NO:17NP_013317肽基脯氨酰基异构酶CPR6[酿酒酵母S288c](Cpr6,亲环素,CYP40,旋转异构酶CPR6,PPIase CPR6)(UniProt P53691)
- 1 MTRPKTFFDI SIGGKPQGRI VFELYNDIVP KTAENFLKLC EGNAGMAKTK PDVPLSYKGS
61 IFHRVIKDFM CQFGDFTNFN GTGGESIYDE KFEDENFTVK HDKPFLLSMA NAGPNTNGSQ
121 AFITCVPTPH LDGKHVVFG VIQGKRIVRL IENQQCDQEN NKPLRDVKID DCGVLPDDYQ
[0270] 181 VPENAEATPT DEYGDNYEDV LKQDEKVDLK NFDTVLKAIE TVKNIGTEQF KKQNSVALE
241 KYVKCDKFLK EYFPEDLEKE QIEKINQLKV SIPLNIAICA LKLKDYKQVL VASSEVLYAE
301 AADEKAKAKA LYRRGLAYYH VNDTDMALND LEMATTQPN DAAILKAIHN TKLKRKQQNE
361 KAKKSLSKMF S
- [0271] SEQ ID NO:18NP_014264肽基脯氨酰基异构酶FPR1[酿酒酵母S288c](Fpr1,FK506

结合蛋白1,FKBP,FKB1,雷帕霉素结合蛋白,RBP1,PPIase) (UniProt P20081)

[0272] 1 MSEVIEGNVK IDRISPGDGA TFPKTGDLVT IHYTGTLENG QKFDSSVDRG SPFQCNIGVG
61 QVIKGWDVGI PKLSVGEKAR LTIPGPYAYG PRGFPGLIPP NSTLVFDVEL LKVN

[0273] SEQ ID NO:19NP_057390dnaJ同系物亚家族B成员11前体[智人] (hERdj3;DnaJ (Hsp40) 同系物,亚家族B,成员11;ER相关的DNAJ;ER相关的Hsp40共同伴侣蛋白;ER相关的dnaJ蛋白3;ERdj3;ERj3p;EDJ;ERJ3;ERj3;HEDJ;人DnaJ蛋白9;DnaJ蛋白同系物9HDJ9;DJ9;Dj-9;hDj-9;PWP1-相互作用蛋白4;APOBEC1结合蛋白2;ABBP-2;ABBP2;DNAJB11;PRO1080;UNQ537) (UniProt Q9UBS4)

[0274] 1 MAPQNLSTFC LLLYLIGAV IAGRDFYKIL GVPRASAIKD IKKAYRKLAL QLHPDRNPDD
61 PQAQEKFDL GAAYEVLSDS EKRKQYDTYG EEGLKDGHS SHGDIFSHFF GDFGFMFGGT
121 PRQQDRNIPR GSDIIVDLEV TLEEVYAGNF VEVVRNKPVA RQAPGKRKC CNCRQEMRTTQL
181 GPGRFQMTQE VVCDECPNVK LVNEERTLEV EIEPGVRDGM EYPFIDGEEP HVDGEPGDLR
241 FRIKVVKHPI FERRGDDLYT NVTISLVESL VGFEMDITHL DGHKVHISR DKITRPGAKLW
301 KKGEGLPNFD NNNIKGSLII TFDVDFPKEQ LTEEAREGIK QLLKQGSVQK VYNGLQGY

[0275] SEQ ID NO:20NP_005338 78kDa调节葡萄糖的蛋白前体[智人] (BiP;内质网腔Ca (2+) 结合蛋白grp78;GRP-78;热激70kDa蛋白5;HSPA5;免疫球蛋白重链结合蛋白;MIF2) (UniProt P11021)

[0276] 1 MKLSLVAAML LLLSAARAE EDKKEDVGT VVGIDLGTTYS CVGVFKNGRV EIIANDQGNR
61 ITPSYVAFTP EGERLIGDAA KNQLTSNPEN TVFDAKRLIG RTWNDPSVQQ DIKFLPFKVV
121 EKKTTPYIQV DIGGGQTKTF APEEISAMVL TKMKETA EAYLGKKVTHAVV TVPAYFNDAQ
181 RQATKDAGTI AGLNVMRIIN EPTAAAIAYG LDKREGEKNI LVFDLGGGT DVSLTIDNG
241 VFEVVATNGD THLGGEDFDQ RVMEHFIKLY KKKTGKDVRK DNRAVQKLRR EVEKAKRALS
301 SQHQARIEIE SFYEGEDFSE TLTRAKFEEL NMDLFRSTMK PVQKVLEDS LKKS DIDEIV
361 LVGGSTRIPK IQQLVKEFFN GKEPSRGINP DEAVAYGAAV QAGVLSGDQD TGDVLVLDVC
421 PLTLGIETVG GVMTKLIPRN TVVPTKKSQI FSTASDNQPT VTIKVYEGER PLTKDNHLLG
481 TFDLTGIPPA PRGVPQIEVT FEIDVNGILR VTAEDKGTGN KNKITITNDQ NRTLPEEIER
541 MVNDAEKFAE EDKKLKERID TRNELESYAY SLKNQIGDKE KLGKGLSSED KETMEKAVEE
601 KIEWLESHQD ADIEDFKAKK KELEEIVQPI ISKLYGSAGP PPTGEEDTAE KDEL

[0277] SEQ ID NO:21NP_013911Hsp90家族伴侣蛋白HSC82[酿酒酵母S288c] (yHsc82; HSC82;ATP依赖性分子伴侣蛋白HSC82;82kDa热激同源蛋白;热激蛋白Hsp90组成型同种型; HSP90;Hsp90家族的细胞质伴侣蛋白) (UniProt P15108)

1 MAGETFEFQA EITQLMSLII NTVYSNKEIF LRELISNASD ALDKIRYQAL SDPKQLETEP
61 DLFIRITPKP EEKVLEIRDS GIGMTKAELI NNLGTIAKSG TKAFMEALSA GADVSMIGQF
121 GVGFYSLFLV ADRVQVISKN NEDEQYIWES NAGGSFTVTL DEVNERIGRG TVLRLFLKDD
181 QLEYLEEKRI KEVIKRHSEF VAYPIQLLVT KEVEKEVPIP EEEKKDEEKK DEDDKKPKLE
241 EVDEEEEEKK PKTKKVKEEV QELEELNKT PLWTRNPSDI TQEEYNAFYK SISNDWEDPL
[0278] 301 YVKHFSVEGQ LEFRAILFIP KRAPFDLFES KKKKNNIKLY VRRVFITDEA EDLIPEWLSF
361 VKGVVDSDEL PLNLSREMLQ QNKIMKVIK NIVKKLIEAF NEIAEDSEQF DKFYSAFAKN
421 IKLGVHEDTQ NRAALAKLLR YNSTKSVDL TSLTDYVTRM PEHQKNIYYI TGESLKAVEK
481 SPFLDALKAK NFEVLFLTDP IDEYAFTQLK EFEGKTLVDI TKDFELEETD EEKAEREKEI
541 KEYEPLTKAL KDILGDQVEK VVVSYKLLDA PAAIRTGQFG WSANMERIMK AQALRDSSMS
601 SYMSSKKTFE ISPKSPIIKE LKKRVDEGGA QDKTVKDLTN LLFETALLTS GFSLEEPTSF
661 ASRINRLISL GLNIDEDEET ETAPEASTE A PVEEVPADTE MEEVD

[0279] SEQ ID NO:22NP_418142热激伴侣蛋白[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655] (IbpA; 小热激蛋白IbpA; 16kDa热激蛋白A; hslT; htpN; ECK3679; JW3664) (UniProt P0C054)

1 MRNFDLSPLY RSAIGFDRLF NHLENNQSQS NGGYPPYNVE LVDENHYRIA IAVAGFAESE
[0280] 61 LEITAQDNLL VVKGAHADEQ KERTYLYQGI AERNFERKFQ LAENIHVRGA NLVNGLLYID
121 LERVIPEAKK PRRIEIN

[0281] SEQ ID NO:23NP_418141热激伴侣蛋白[大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655] (IbpB; 小热激蛋白IbpB; 16kDa热激蛋白B; hslS; htpE; ECK3678; JW3663) (UniProt P0C058)

1 MRNFDLSPLM RQWIGFDKLA NALQNAGESQ SFPPYNIEKS DDNHYRITLA LAGFRQEDLE
[0282] 61 IQLEGTRLSV KGTPEQPKEE KKWLHQGLMN QPFSLSFTLA ENMEVSGATF VNGLLHIDLI
121 RNEPEPIAAQ RIAISERPAL NS

序列表

<110> 艾丽丝. 扬; 丹. 格罗夫; 帕特里克. 里弗斯;
克里斯托弗. D. 萨诺斯; 苏特罗生物制药公司

<120> 使用呈现出蛋白伴侣表达水平升高的经转化的细菌
细胞在细菌无细胞合成系统中表达生物学活性蛋白

<130> 91200-905971

<140> W0还未分配

<141> 还未分配

<150> US 61/813, 914

<151> 2013-04-19

<150> US 61/937, 069

<151> 2014-02-07

<160> 29

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 236

<212> PRT

<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)

[0001]

<220>

<223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655蛋白二硫键异构酶II,
疏基: 二硫键互换的蛋白DsbC, 基因座b2893, JW2861, xprA

<400> 1

```

Met Lys Lys Gly Phe Met Leu Phe Thr Leu Leu Ala Ala Phe Ser Gly
 1           5           10          15
Phe Ala Gln Ala Asp Asp Ala Ala Ile Gln Gln Thr Leu Ala Lys Met
          20          25          30
Gly Ile Lys Ser Ser Asp Ile Gln Pro Ala Pro Val Ala Gly Met Lys
          35          40          45
Thr Val Leu Thr Asn Ser Gly Val Leu Tyr Ile Thr Asp Asp Gly Lys
          50          55          60
His Ile Ile Gln Gly Pro Met Tyr Asp Val Ser Gly Thr Ala Pro Val
          65          70          75          80
Asn Val Thr Asn Lys Met Leu Leu Lys Gln Leu Asn Ala Leu Glu Lys
          85          90          95
Glu Met Ile Val Tyr Lys Ala Pro Gln Glu Lys His Val Ile Thr Val
          100         105         110
Phe Thr Asp Ile Thr Cys Gly Tyr Cys His Lys Leu His Glu Gln Met
          115         120         125
Ala Asp Tyr Asn Ala Leu Gly Ile Thr Val Arg Tyr Leu Ala Phe Pro
          130         135         140
Arg Gln Gly Leu Asp Ser Asp Ala Glu Lys Glu Met Lys Ala Ile Trp
          145         150         155         160
Cys Ala Lys Asp Lys Asn Lys Ala Phe Asp Asp Val Met Ala Gly Lys
          165         170         175
Ser Val Ala Pro Ala Ser Cys Asp Val Asp Ile Ala Asp His Tyr Ala
          180         185         190

```

Leu Gly Val Gln Leu Gly Val Ser Gly Thr Pro Ala Val Val Leu Ser
 195 200 205
 Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Met Lys Glu
 210 215 220
 Phe Leu Asp Glu His Gln Lys Met Thr Ser Gly Lys
 225 230 235

<210> 2
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌

<220>
 <223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655周质蛋白二硫键异构酶I,
 疏基: 二硫键互换的蛋白DsbA, 基因座b3860, JW3832,
 dsf, ppfA

[0002] <400> 2
 Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Ala Gln Tyr Glu Asp Gly Lys Gln Tyr Thr Thr Leu Glu
 20 25 30
 Lys Pro Val Ala Gly Ala Pro Gln Val Leu Glu Phe Phe Ser Phe Phe
 35 40 45
 Cys Pro His Cys Tyr Gln Phe Glu Glu Val Leu His Ile Ser Asp Asn
 50 55 60
 Val Lys Lys Lys Leu Pro Glu Gly Val Lys Met Thr Lys Tyr His Val
 65 70 75 80
 Asn Phe Met Gly Gly Asp Leu Gly Lys Asp Leu Thr Gln Ala Trp Ala
 85 90 95
 Val Ala Met Ala Leu Gly Val Glu Asp Lys Val Thr Val Pro Leu Phe
 100 105 110
 Glu Gly Val Gln Lys Thr Gln Thr Ile Arg Ser Ala Ser Asp Ile Arg
 115 120 125
 Asp Val Phe Ile Asn Ala Gly Ile Lys Gly Glu Glu Tyr Asp Ala Ala
 130 135 140
 Trp Asn Ser Phe Val Val Lys Ser Leu Val Ala Gln Gln Glu Lys Ala
 145 150 155 160
 Ala Ala Asp Val Gln Leu Arg Gly Val Pro Ala Met Phe Val Asn Gly
 165 170 175
 Lys Tyr Gln Leu Asn Pro Gln Gly Met Asp Thr Ser Asn Met Asp Val
 180 185 190
 Phe Val Gln Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys Tyr Leu Ser Glu Lys Lys
 195 200 205

<210> 3
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌

<220>
 <223> 催化DsbA蛋白二硫键异构酶I重新氧化的大肠杆菌菌株K-12亚株
 MG1655氧化还原酶, 二硫键形成的蛋白B(DsbB), 基因座b1185,
 JW5182, roxB, ycgA

<400> 3

```

Met Leu Arg Phe Leu Asn Gln Cys Ser Gln Gly Arg Gly Ala Trp Leu
 1             5             10             15
Leu Met Ala Phe Thr Ala Leu Ala Leu Glu Leu Thr Ala Leu Trp Phe
      20             25             30
Gln His Val Met Leu Leu Lys Pro Cys Val Leu Cys Ile Tyr Glu Arg
      35             40             45
Cys Ala Leu Phe Gly Val Leu Gly Ala Ala Leu Ile Gly Ala Ile Ala
      50             55             60
Pro Lys Thr Pro Leu Arg Tyr Val Ala Met Val Ile Trp Leu Tyr Ser
65             70             75             80
Ala Phe Arg Gly Val Gln Leu Thr Tyr Glu His Thr Met Leu Gln Leu
      85             90             95
Tyr Pro Ser Pro Phe Ala Thr Cys Asp Phe Met Val Arg Phe Pro Glu
      100            105            110
Trp Leu Pro Leu Asp Lys Trp Val Pro Gln Val Phe Val Ala Ser Gly
      115            120            125
Asp Cys Ala Glu Arg Gln Trp Asp Phe Leu Gly Leu Glu Met Pro Gln
      130            135            140
Trp Leu Leu Gly Ile Phe Ile Ala Tyr Leu Ile Val Ala Val Leu Val
145            150            155            160
Val Ile Ser Gln Pro Phe Lys Ala Lys Lys Arg Asp Leu Phe Gly Arg
      165            170            175

```

<210> 4

<211> 565

<212> PRT

[0003] <213> 大肠杆菌

<220>

<223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655融合的巯基：二硫键
 互换的蛋白DsbD, DsbC/保守蛋白的活化剂,
 C-型细胞色素生物起源蛋白CycZ; 铜耐受蛋白;
 蛋白-二硫键还原酶, 基因座b4136, JW5734, cutA2

<400> 4

```

Met Ala Gln Arg Ile Phe Thr Leu Ile Leu Leu Cys Ser Thr Ser
 1             5             10             15
Val Phe Ala Gly Leu Phe Asp Ala Pro Gly Arg Ser Gln Phe Val Pro
      20             25             30
Ala Asp Gln Ala Phe Ala Phe Asp Phe Gln Gln Asn Gln His Asp Leu
      35             40             45
Asn Leu Thr Trp Gln Ile Lys Asp Gly Tyr Tyr Leu Tyr Arg Lys Gln
      50             55             60
Ile Arg Ile Thr Pro Glu His Ala Lys Ile Ala Asp Val Gln Leu Pro
65             70             75             80
Gln Gly Val Trp His Glu Asp Glu Phe Tyr Gly Lys Ser Glu Ile Tyr
      85             90             95
Arg Asp Arg Leu Thr Leu Pro Val Thr Ile Asn Gln Ala Ser Ala Gly
      100            105            110
Ala Thr Leu Thr Val Thr Tyr Gln Gly Cys Ala Asp Ala Gly Phe Cys
      115            120            125
Tyr Pro Pro Glu Thr Lys Thr Val Pro Leu Ser Glu Val Val Ala Asn
      130            135            140
Asn Ala Ala Pro Gln Pro Val Ser Val Pro Gln Gln Glu Gln Pro Thr
145            150            155            160

```

Ala Gln Leu Pro Phe Ser Ala Leu Trp Ala Leu Leu Ile Gly Ile Gly
 165 170 175
 Ile Ala Phe Thr Pro Cys Val Leu Pro Met Tyr Pro Leu Ile Ser Gly
 180 185 190
 Ile Val Leu Gly Gly Lys Gln Arg Leu Ser Thr Ala Arg Ala Leu Leu
 195 200 205
 Leu Thr Phe Ile Tyr Val Gln Gly Met Ala Leu Thr Tyr Thr Ala Leu
 210 215 220
 Gly Leu Val Val Ala Ala Ala Gly Leu Gln Phe Gln Ala Ala Leu Gln
 225 230 235 240
 His Pro Tyr Val Leu Ile Gly Leu Ala Ile Val Phe Thr Leu Leu Ala
 245 250 255
 Met Ser Met Phe Gly Leu Phe Thr Leu Gln Leu Pro Ser Ser Leu Gln
 260 265 270
 Thr Arg Leu Thr Leu Met Ser Asn Arg Gln Gln Gly Gly Ser Pro Gly
 275 280 285
 Gly Val Phe Val Met Gly Ala Ile Ala Gly Leu Ile Cys Ser Pro Cys
 290 295 300
 Thr Thr Ala Pro Leu Ser Ala Ile Leu Leu Tyr Ile Ala Gln Ser Gly
 305 310 315 320
 Asn Met Trp Leu Gly Gly Gly Thr Leu Tyr Leu Tyr Ala Leu Gly Met
 325 330 335
 Gly Leu Pro Leu Met Leu Ile Thr Val Phe Gly Asn Arg Leu Leu Pro
 340 345 350
 Lys Ser Gly Pro Trp Met Glu Gln Val Lys Thr Ala Phe Gly Phe Val
 355 360 365
 Ile Leu Ala Leu Pro Val Phe Leu Leu Glu Arg Val Ile Gly Asp Val
 370 375 380
 [0004] Trp Gly Leu Arg Leu Trp Ser Ala Leu Gly Val Ala Phe Phe Gly Trp
 385 390 395 400
 Ala Phe Ile Thr Ser Leu Gln Ala Lys Arg Gly Trp Met Arg Ile Val
 405 410 415
 Gln Ile Ile Leu Leu Ala Ala Ala Leu Val Ser Val Arg Pro Leu Gln
 420 425 430
 Asp Trp Ala Phe Gly Ala Thr His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Leu
 435 440 445
 Asn Phe Thr Gln Ile Lys Thr Val Asp Glu Leu Asn Gln Ala Leu Val
 450 455 460
 Glu Ala Lys Gly Lys Pro Val Met Leu Asp Leu Tyr Ala Asp Trp Cys
 465 470 475 480
 Val Ala Cys Lys Glu Phe Glu Lys Tyr Thr Phe Ser Asp Pro Gln Val
 485 490 495
 Gln Lys Ala Leu Ala Asp Thr Val Leu Leu Gln Ala Asn Val Thr Ala
 500 505 510
 Asn Asp Ala Gln Asp Val Ala Leu Leu Lys His Leu Asn Val Leu Gly
 515 520 525
 Leu Pro Thr Ile Leu Phe Phe Asp Gly Gln Gly Gln Glu His Pro Gln
 530 535 540
 Ala Arg Val Thr Gly Phe Met Asp Ala Glu Thr Phe Ser Ala His Leu
 545 550 555 560
 Arg Asp Arg Gln Pro
 565

<210> 5

<211> 248

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<220>

<223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655周质
 巯基：二硫键互换的蛋白DsbG，基因座
 b0604, JW00597, ybdP

<400> 5

Met Leu Lys Lys Ile Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Leu Pro Ala Pro Val Lys Ala Ile Glu Lys Gln Gly Ile
 20 25 30
 Thr Ile Ile Lys Thr Phe Asp Ala Pro Gly Gly Met Lys Gly Tyr Leu
 35 40 45
 Gly Lys Tyr Gln Asp Met Gly Val Thr Ile Tyr Leu Thr Pro Asp Gly
 50 55 60
 Lys His Ala Ile Ser Gly Tyr Met Tyr Asn Glu Lys Gly Glu Asn Leu
 65 70 75 80
 Ser Asn Thr Leu Ile Glu Lys Glu Ile Tyr Ala Pro Ala Gly Arg Glu
 85 90 95
 Met Trp Gln Arg Met Glu Gln Ser His Trp Leu Leu Asp Gly Lys Lys
 100 105 110
 Asp Ala Pro Val Ile Val Tyr Val Phe Ala Asp Pro Phe Cys Pro Tyr
 115 120 125
 Cys Lys Gln Phe Trp Gln Gln Ala Arg Pro Trp Val Asp Ser Gly Lys
 130 135 140
 Val Gln Leu Arg Thr Leu Leu Val Gly Val Ile Lys Pro Glu Ser Pro
 145 150 155 160
 [0005] Ala Thr Ala Ala Ala Ile Leu Ala Ser Lys Asp Pro Ala Lys Thr Trp
 165 170 175
 Gln Gln Tyr Glu Ala Ser Gly Gly Lys Leu Lys Leu Asn Val Pro Ala
 180 185 190
 Asn Val Ser Thr Glu Gln Met Lys Val Leu Ser Asp Asn Glu Lys Leu
 195 200 205
 Met Asp Asp Leu Gly Ala Asn Val Thr Pro Ala Ile Tyr Tyr Met Ser
 210 215 220
 Lys Glu Asn Thr Leu Gln Gln Ala Val Gly Leu Pro Asp Gln Lys Thr
 225 230 235 240
 Leu Asn Ile Ile Met Gly Asn Lys
 245

<210> 6

<211> 270

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<220>

<223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655 FKBP(FK506结合蛋白)-型肽基
 脯氨酰顺反异构酶(PPIase)(旋转异构酶)FkpA，基因座b3347,
 JW3309, yzzS

<400> 6

Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
 20 25 30

Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
 35 40 45
 Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
 50 55 60
 Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
 85 90 95
 Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
 100 105 110
 Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
 115 120 125
 Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
 130 135 140
 Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
 165 170 175
 Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
 180 185 190
 Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
 195 200 205
 Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
 210 215 220
 Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
 225 230 235 240
 Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
 245 250 255
 [0006] Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys
 260 265 270

<210> 7

<211> 196

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<220>

<223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655 FKBP(FK506结合蛋白)-型肽基
 脯氨酰顺反异构酶(PPIase)(旋转异构酶), 富含组氨酸的蛋白,
 对溶菌蛋白D(SlyD)的敏感性, 金属伴侣SlyD,
 基因座b3349, JW3311

<400> 7

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
 1 5 10 15
 Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
 20 25 30
 Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
 35 40 45
 Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
 50 55 60
 Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
 65 70 75 80
 Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
 85 90 95
 Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val


```

      100      105      110
Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
      115      120      125
Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
      130      135      140
Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
      145      150      155      160
Asp His Asp His Asp Gly Cys Cys Gly Gly His Gly His Asp His Gly
      165      170      175
His Glu His Gly Gly Glu Gly Cys Cys Gly Gly Lys Gly Asn Gly Gly
      180      185      190
Cys Gly Cys His
      195

```

<210> 8

<211> 428

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<220>

<223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655肽基脯氨酰顺反异构酶(PPIase)
(旋转异构酶), 存活蛋白A(SurA), 蛋白伴侣SurA,
基因座b0053, JW0052

<400> 8

```

[0007] Met Lys Asn Trp Lys Thr Leu Leu Leu Gly Ile Ala Met Ile Ala Asn
      1      5      10      15
Thr Ser Phe Ala Ala Pro Gln Val Val Asp Lys Val Ala Ala Val Val
      20      25      30
Asn Asn Gly Val Val Leu Glu Ser Asp Val Asp Gly Leu Met Gln Ser
      35      40      45
Val Lys Leu Asn Ala Ala Gln Ala Arg Gln Gln Leu Pro Asp Asp Ala
      50      55      60
Thr Leu Arg His Gln Ile Met Glu Arg Leu Ile Met Asp Gln Ile Ile
      65      70      75      80
Leu Gln Met Gly Gln Lys Met Gly Val Lys Ile Ser Asp Glu Gln Leu
      85      90      95
Asp Gln Ala Ile Ala Asn Ile Ala Lys Gln Asn Asn Met Thr Leu Asp
      100      105      110
Gln Met Arg Ser Arg Leu Ala Tyr Asp Gly Leu Asn Tyr Asn Thr Tyr
      115      120      125
Arg Asn Gln Ile Arg Lys Glu Met Ile Ile Ser Glu Val Arg Asn Asn
      130      135      140
Glu Val Arg Arg Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Glu Val Glu Ser Leu
      145      150      155      160
Ala Gln Gln Val Gly Asn Gln Asn Asp Ala Ser Thr Glu Leu Asn Leu
      165      170      175
Ser His Ile Leu Ile Pro Leu Pro Glu Asn Pro Thr Ser Asp Gln Val
      180      185      190
Asn Glu Ala Glu Ser Gln Ala Arg Ala Ile Val Asp Gln Ala Arg Asn
      195      200      205
Gly Ala Asp Phe Gly Lys Leu Ala Ile Ala His Ser Ala Asp Gln Gln
      210      215      220
Ala Leu Asn Gly Gly Gln Met Gly Trp Gly Arg Ile Gln Glu Leu Pro
      225      230      235      240
Gly Ile Phe Ala Gln Ala Leu Ser Thr Ala Lys Lys Gly Asp Ile Val

```

```

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

```

<210> 9

<211> 161

<212> PRT

[0008]

<213> 大肠杆菌

<220>

<223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655周质分子伴侣,

外膜蛋白Skp, 结合DNA 17 kDa蛋白,

组氨酸-样蛋白HLP-1(hlpA), 基因座b0178, JW0173, ompH

<400> 9

```

Met Lys Lys Trp Leu Ala Ala Gly Leu Gly Leu Ala Leu Ala Thr
 1                5                10                15
Ser Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu
                20                25                30
Phe Gln Gln Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn
                35                40                45
Glu Phe Lys Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu
                50                55                60
Gln Ala Lys Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg
65                70                75                80
Thr Lys Leu Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln
                85                90                95
Lys Ala Gln Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu
                100                105                110
Arg Gly Lys Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala
                115                120                125
Asn Ser Gln Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr
                130                135                140
Asn Ser Ser Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val
145                150                155                160
Lys

```

<210> 10
 <211> 522
 <212> PRT
 <213> 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

 <220>
 <223> 酿酒酵母菌株S288c蛋白二硫键异构酶PDI1(yPDI),
 硫氧还蛋白相关糖蛋白1(TRG1), 基因座YCL043C

<400> 10
 Met Lys Phe Ser Ala Gly Ala Val Leu Ser Trp Ser Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser Ser Val Phe Ala Gln Gln Glu Ala Val Ala Pro Glu Asp Ser
 20 25 30
 Ala Val Val Lys Leu Ala Thr Asp Ser Phe Asn Glu Tyr Ile Gln Ser
 35 40 45
 His Asp Leu Val Leu Ala Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys
 50 55 60
 Lys Asn Met Ala Pro Glu Tyr Val Lys Ala Ala Glu Thr Leu Val Glu
 65 70 75 80
 Lys Asn Ile Thr Leu Ala Gln Ile Asp Cys Thr Glu Asn Gln Asp Leu
 85 90 95
 Cys Met Glu His Asn Ile Pro Gly Phe Pro Ser Leu Lys Ile Phe Lys
 100 105 110
 Asn Ser Asp Val Asn Asn Ser Ile Asp Tyr Glu Gly Pro Arg Thr Ala
 115 120 125
 Glu Ala Ile Val Gln Phe Met Ile Lys Gln Ser Gln Pro Ala Val Ala
 130 135 140
 Val Val Ala Asp Leu Pro Ala Tyr Leu Ala Asn Glu Thr Phe Val Thr
 145 150 155 160
 Pro Val Ile Val Gln Ser Gly Lys Ile Asp Ala Asp Phe Asn Ala Thr
 165 170 175
 Phe Tyr Ser Met Ala Asn Lys His Phe Asn Asp Tyr Asp Phe Val Ser
 180 185 190
 Ala Glu Asn Ala Asp Asp Asp Phe Lys Leu Ser Ile Tyr Leu Pro Ser
 195 200 205
 Ala Met Asp Glu Pro Val Val Tyr Asn Gly Lys Lys Ala Asp Ile Ala
 210 215 220
 Asp Ala Asp Val Phe Glu Lys Trp Leu Gln Val Glu Ala Leu Pro Tyr
 225 230 235 240
 Phe Gly Glu Ile Asp Gly Ser Val Phe Ala Gln Tyr Val Glu Ser Gly
 245 250 255
 Leu Pro Leu Gly Tyr Leu Phe Tyr Asn Asp Glu Glu Glu Leu Glu Glu
 260 265 270
 Tyr Lys Pro Leu Phe Thr Glu Leu Ala Lys Lys Asn Arg Gly Leu Met
 275 280 285
 Asn Phe Val Ser Ile Asp Ala Arg Lys Phe Gly Arg His Ala Gly Asn
 290 295 300
 Leu Asn Met Lys Glu Gln Phe Pro Leu Phe Ala Ile His Asp Met Thr
 305 310 315 320
 Glu Asp Leu Lys Tyr Gly Leu Pro Gln Leu Ser Glu Glu Ala Phe Asp
 325 330 335
 Glu Leu Ser Asp Lys Ile Val Leu Glu Ser Lys Ala Ile Glu Ser Leu
 340 345 350
 Val Lys Asp Phe Leu Lys Gly Asp Ala Ser Pro Ile Val Lys Ser Gln

[0009]

```

      355              360              365
Glu Ile Phe Glu Asn Gln Asp Ser Ser Val Phe Gln Leu Val Gly Lys
      370              375              380
Asn His Asp Glu Ile Val Asn Asp Pro Lys Lys Asp Val Leu Val Leu
385              390              395              400
Tyr Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Arg Leu Ala Pro Thr Tyr
      405              410              415
Gln Glu Leu Ala Asp Thr Tyr Ala Asn Ala Thr Ser Asp Val Leu Ile
      420              425              430
Ala Lys Leu Asp His Thr Glu Asn Asp Val Arg Gly Val Val Ile Glu
      435              440              445
Gly Tyr Pro Thr Ile Val Leu Tyr Pro Gly Gly Lys Lys Ser Glu Ser
      450              455              460
Val Val Tyr Gln Gly Ser Arg Ser Leu Asp Ser Leu Phe Asp Phe Ile
465              470              475              480
Lys Glu Asn Gly His Phe Asp Val Asp Gly Lys Ala Leu Tyr Glu Glu
      485              490              495
Ala Gln Glu Lys Ala Ala Glu Glu Ala Asp Ala Asp Ala Glu Leu Ala
      500              505              510
Asp Glu Glu Asp Ala Ile His Asp Glu Leu
      515              520

```

<210> 11
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0010]

<220>
 <223> 蛋白二硫键异构酶家族A成员1(PDIA1, PDI)前体,
 胶原脯氨酰基4-羟化酶亚基β(P4HB, P4Hβ),
 原胶原-脯氨酸, 2-酮戊二酸4-加双氧酶β,
 甲状腺激素结合蛋白p55, GIT, ERBA2L, DSI

```

<400> 11
Met Leu Arg Arg Ala Leu Leu Cys Leu Ala Val Ala Ala Leu Val Arg
 1              5              10              15
Ala Asp Ala Pro Glu Glu Glu Asp His Val Leu Val Leu Arg Lys Ser
      20              25              30
Asn Phe Ala Glu Ala Leu Ala Ala His Lys Tyr Leu Leu Val Glu Phe
      35              40              45
Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Glu Tyr Ala
      50              55              60
Lys Ala Ala Gly Lys Leu Lys Ala Glu Gly Ser Glu Ile Arg Leu Ala
65              70              75              80
Lys Val Asp Ala Thr Glu Glu Ser Asp Leu Ala Gln Gln Tyr Gly Val
      85              90              95
Arg Gly Tyr Pro Thr Ile Lys Phe Phe Arg Asn Gly Asp Thr Ala Ser
      100             105             110
Pro Lys Glu Tyr Thr Ala Gly Arg Glu Ala Asp Asp Ile Val Asn Trp
      115             120             125
Leu Lys Lys Arg Thr Gly Pro Ala Ala Thr Thr Leu Pro Asp Gly Ala
      130             135             140
Ala Ala Glu Ser Leu Val Glu Ser Ser Glu Val Ala Val Ile Gly Phe
145             150             155             160
Phe Lys Asp Val Glu Ser Asp Ser Ala Lys Gln Phe Leu Gln Ala Ala
      165             170             175

```

Glu Ala Ile Asp Asp Ile Pro Phe Gly Ile Thr Ser Asn Ser Asp Val
 180 185 190
 Phe Ser Lys Tyr Gln Leu Asp Lys Asp Gly Val Val Leu Phe Lys Lys
 195 200 205
 Phe Asp Glu Gly Arg Asn Asn Phe Glu Gly Glu Val Thr Lys Glu Asn
 210 215 220
 Leu Leu Asp Phe Ile Lys His Asn Gln Leu Pro Leu Val Ile Glu Phe
 225 230 235 240
 Thr Glu Gln Thr Ala Pro Lys Ile Phe Gly Gly Glu Ile Lys Thr His
 245 250 255
 Ile Leu Leu Phe Leu Pro Lys Ser Val Ser Asp Tyr Asp Gly Lys Leu
 260 265 270
 Ser Asn Phe Lys Thr Ala Ala Glu Ser Phe Lys Gly Lys Ile Leu Phe
 275 280 285
 Ile Phe Ile Asp Ser Asp His Thr Asp Asn Gln Arg Ile Leu Glu Phe
 290 295 300
 Phe Gly Leu Lys Lys Glu Glu Cys Pro Ala Val Arg Leu Ile Thr Leu
 305 310 315 320
 Glu Glu Glu Met Thr Lys Tyr Lys Pro Glu Ser Glu Glu Leu Thr Ala
 325 330 335
 Glu Arg Ile Thr Glu Phe Cys His Arg Phe Leu Glu Gly Lys Ile Lys
 340 345 350
 Pro His Leu Met Ser Gln Glu Leu Pro Glu Asp Trp Asp Lys Gln Pro
 355 360 365
 Val Lys Val Leu Val Gly Lys Asn Phe Glu Asp Val Ala Phe Asp Glu
 370 375 380
 Lys Lys Asn Val Phe Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys
 385 390 395 400
 [0011] Lys Gln Leu Ala Pro Ile Trp Asp Lys Leu Gly Glu Thr Tyr Lys Asp
 405 410 415
 His Glu Asn Ile Val Ile Ala Lys Met Asp Ser Thr Ala Asn Glu Val
 420 425 430
 Glu Ala Val Lys Val His Ser Phe Pro Thr Leu Lys Phe Phe Pro Ala
 435 440 445
 Ser Ala Asp Arg Thr Val Ile Asp Tyr Asn Gly Glu Arg Thr Leu Asp
 450 455 460
 Gly Phe Lys Lys Phe Leu Glu Ser Gly Gly Gln Asp Gly Ala Gly Asp
 465 470 475 480
 Asp Asp Asp Leu Glu Asp Leu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Asp Met Glu
 485 490 495
 Glu Asp Asp Asp Gln Lys Ala Val Lys Asp Glu Leu
 500 505

<210> 12

<211> 319

<212> PRT

<213> 酿酒酵母

<220>

<223> 酿酒酵母菌株S288c硫氧还蛋白二硫键还原酶

TRR1(yTrr1)细胞质硫氧还蛋白还原酶1, 基因座YDR353W

<400> 12

Met Val His Asn Lys Val Thr Ile Ile Gly Ser Gly Pro Ala Ala His
 1 5 10 15
 Thr Ala Ala Ile Tyr Leu Ala Arg Ala Glu Ile Lys Pro Ile Leu Tyr
 20 25 30

Glu Gly Met Met Ala Asn Gly Ile Ala Ala Gly Gly Gln Leu Thr Thr
 35 40 45
 Thr Thr Glu Ile Glu Asn Phe Pro Gly Phe Pro Asp Gly Leu Thr Gly
 50 55 60
 Ser Glu Leu Met Asp Arg Met Arg Glu Gln Ser Thr Lys Phe Gly Thr
 65 70 75 80
 Glu Ile Ile Thr Glu Thr Val Ser Lys Val Asp Leu Ser Ser Lys Pro
 85 90 95
 Phe Lys Leu Trp Thr Glu Phe Asn Glu Asp Ala Glu Pro Val Thr Thr
 100 105 110
 Asp Ala Ile Ile Leu Ala Thr Gly Ala Ser Ala Lys Arg Met His Leu
 115 120 125
 Pro Gly Glu Glu Thr Tyr Trp Gln Lys Gly Ile Ser Ala Cys Ala Val
 130 135 140
 Cys Asp Gly Ala Val Pro Ile Phe Arg Asn Lys Pro Leu Ala Val Ile
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Asp Ser Ala Cys Glu Glu Ala Gln Phe Leu Thr Lys Tyr
 165 170 175
 Gly Ser Lys Val Phe Met Leu Val Arg Lys Asp His Leu Arg Ala Ser
 180 185 190
 Thr Ile Met Gln Lys Arg Ala Glu Lys Asn Glu Lys Ile Glu Ile Leu
 195 200 205
 Tyr Asn Thr Val Ala Leu Glu Ala Lys Gly Asp Gly Lys Leu Leu Asn
 210 215 220
 Ala Leu Arg Ile Lys Asn Thr Lys Lys Asn Glu Glu Thr Asp Leu Pro
 225 230 235 240
 Val Ser Gly Leu Phe Tyr Ala Ile Gly His Thr Pro Ala Thr Lys Ile
 245 250 255
 [0012] Val Ala Gly Gln Val Asp Thr Asp Glu Ala Gly Tyr Ile Lys Thr Val
 260 265 270
 Pro Gly Ser Ser Leu Thr Ser Val Pro Gly Phe Phe Ala Ala Gly Asp
 275 280 285
 Val Gln Asp Ser Lys Tyr Arg Gln Ala Ile Thr Ser Ala Gly Ser Gly
 290 295 300
 Cys Met Ala Ala Leu Asp Ala Glu Lys Tyr Leu Thr Ser Leu Glu
 305 310 315

<210> 13

<211> 483

<212> PRT

<213> 酿酒酵母

<220>

<223> 酿酒酵母菌株S288c谷胱甘肽二硫键还原酶

GLR1(yG11, GR, GRase),

细胞溶质和线粒体的谷胱甘肽氧化还原酶,

细胞溶质Glr1p, 基因座YPL091W, LPG17

<400> 13

Met Leu Ser Ala Thr Lys Gln Thr Phe Arg Ser Leu Gln Ile Arg Thr
 1 5 10 15
 Met Ser Thr Asn Thr Lys His Tyr Asp Tyr Leu Val Ile Gly Gly Gly
 20 25 30
 Ser Gly Gly Val Ala Ser Ala Arg Arg Ala Ala Ser Tyr Gly Ala Lys
 35 40 45
 Thr Leu Leu Val Glu Ala Lys Ala Leu Gly Gly Thr Cys Val Asn Val

50 55 60
 Gly Cys Val Pro Lys Lys Val Met Trp Tyr Ala Ser Asp Leu Ala Thr
 65 70 75 80
 Arg Val Ser His Ala Asn Glu Tyr Gly Leu Tyr Gln Asn Leu Pro Leu
 85 90 95
 Asp Lys Glu His Leu Thr Phe Asn Trp Pro Glu Phe Lys Gln Lys Arg
 100 105 110
 Asp Ala Tyr Val His Arg Leu Asn Gly Ile Tyr Gln Lys Asn Leu Glu
 115 120 125
 Lys Glu Lys Val Asp Val Val Phe Gly Trp Ala Arg Phe Asn Lys Asp
 130 135 140
 Gly Asn Val Glu Val Gln Lys Arg Asp Asn Thr Thr Glu Val Tyr Ser
 145 150 155 160
 Ala Asn His Ile Leu Val Ala Thr Gly Gly Lys Ala Ile Phe Pro Glu
 165 170 175
 Asn Ile Pro Gly Phe Glu Leu Gly Thr Asp Ser Asp Gly Phe Phe Arg
 180 185 190
 Leu Glu Glu Gln Pro Lys Lys Val Val Val Gly Ala Gly Tyr Ile
 195 200 205
 Gly Ile Glu Leu Ala Gly Val Phe His Gly Leu Gly Ser Glu Thr His
 210 215 220
 Leu Val Ile Arg Gly Glu Thr Val Leu Arg Lys Phe Asp Glu Cys Ile
 225 230 235 240
 Gln Asn Thr Ile Thr Asp His Tyr Val Lys Glu Gly Ile Asn Val His
 245 250 255
 Lys Leu Ser Lys Ile Val Lys Val Glu Lys Asn Val Glu Thr Asp Lys
 260 265 270
 Leu Lys Ile His Met Asn Asp Ser Lys Ser Ile Asp Asp Val Asp Glu
 275 280 285
 Leu Ile Trp Thr Ile Gly Arg Lys Ser His Leu Gly Met Gly Ser Glu
 290 295 300
 Asn Val Gly Ile Lys Leu Asn Ser His Asp Gln Ile Ile Ala Asp Glu
 305 310 315 320
 Tyr Gln Asn Thr Asn Val Pro Asn Ile Tyr Ser Leu Gly Asp Val Val
 325 330 335
 Gly Lys Val Glu Leu Thr Pro Val Ala Ile Ala Ala Gly Arg Lys Leu
 340 345 350
 Ser Asn Arg Leu Phe Gly Pro Glu Lys Phe Arg Asn Asp Lys Leu Asp
 355 360 365
 Tyr Glu Asn Val Pro Ser Val Ile Phe Ser His Pro Glu Ala Gly Ser
 370 375 380
 Ile Gly Ile Ser Glu Lys Glu Ala Ile Glu Lys Tyr Gly Lys Glu Asn
 385 390 395 400
 Ile Lys Val Tyr Asn Ser Lys Phe Thr Ala Met Tyr Tyr Ala Met Leu
 405 410 415
 Ser Glu Lys Ser Pro Thr Arg Tyr Lys Ile Val Cys Ala Gly Pro Asn
 420 425 430
 Glu Lys Val Val Gly Leu His Ile Val Gly Asp Ser Ser Ala Glu Ile
 435 440 445
 Leu Gln Gly Phe Gly Val Ala Ile Lys Met Gly Ala Thr Lys Ala Asp
 450 455 460
 Phe Asp Asn Cys Val Ala Ile His Pro Thr Ser Ala Glu Glu Leu Val
 465 470 475 480
 Thr Met Arg

[0013]

<210> 14

<211> 432
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌

<220>

<223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655肽基脯氨酰顺反异构酶(PPIase),
 触发因子(tig, TF), 基因座b0436, JW0426, ECK0430

<400> 14

Met Gln Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr
 1 5 10 15
 Ile Thr Ile Ala Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Val Lys Ser Glu Leu
 20 25 30
 Val Asn Val Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys
 35 40 45
 Val Pro Met Asn Ile Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln
 50 55 60
 Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Ser Arg Asn Phe Ile Asp Ala Ile Ile
 65 70 75 80
 Lys Glu Lys Ile Asn Pro Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Val Pro Gly Glu
 85 90 95
 Tyr Lys Leu Gly Glu Asp Phe Thr Tyr Ser Val Glu Phe Glu Val Tyr
 100 105 110
 Pro Glu Val Glu Leu Gln Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro
 115 120 125
 Ile Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Gly Met Leu Asp Thr Leu
 130 135 140
 Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Val Glu Ala
 145 150 155 160
 Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu
 165 170 175
 Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly
 180 185 190
 Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly
 195 200 205
 Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu
 210 215 220
 Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe
 245 250 255
 Gly Val Glu Asp Gly Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys
 260 265 270
 Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser
 275 280 285
 Gln Ala Ile Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala
 290 295 300
 Ala Leu Ile Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln
 305 310 315 320
 Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu
 325 330 335
 Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly
 340 345 350
 Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys
 355 360 365
 Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val
 370 375 380

[0014]

Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn
 385 390 395 400
 Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys
 405 410 415
 Val Thr Glu Lys Glu Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala
 420 425 430

<210> 15
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <223> 肽基脯氨酰顺反异构酶B前体(PPIase B, PPIB),
 旋转异构酶B, 亲环素B, 亲环素-样蛋白,
 S-亲环素, 附睾分泌蛋白Li39(HEL-S-39),
 SCYLP, CYP-S1, CYPB, OI9

<400> 15
 Met Leu Arg Leu Ser Glu Arg Asn Met Lys Val Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Leu Ile Ala Gly Ser Val Phe Phe Leu Leu Leu Pro Gly Pro Ser Ala
 20 25 30
 Ala Asp Glu Lys Lys Lys Gly Pro Lys Val Thr Val Lys Val Tyr Phe
 35 40 45
 Asp Leu Arg Ile Gly Asp Glu Asp Val Gly Arg Val Ile Phe Gly Leu
 50 55 60
 [0015] Phe Gly Lys Thr Val Pro Lys Thr Val Asp Asn Phe Val Ala Leu Ala
 65 70 75 80
 Thr Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr Lys Asn Ser Lys Phe His Arg Val
 85 90 95
 Ile Lys Asp Phe Met Ile Gln Gly Gly Asp Phe Thr Arg Gly Asp Gly
 100 105 110
 Thr Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Glu Arg Phe Pro Asp Glu Asn Phe
 115 120 125
 Lys Leu Lys His Tyr Gly Pro Gly Trp Val Ser Met Ala Asn Ala Gly
 130 135 140
 Lys Asp Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val Lys Thr Ala
 145 150 155 160
 Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly Lys Val Leu Glu Gly Met
 165 170 175
 Glu Val Val Arg Lys Val Glu Ser Thr Lys Thr Asp Ser Arg Asp Lys
 180 185 190
 Pro Leu Lys Asp Val Ile Ile Ala Asp Cys Gly Lys Ile Glu Val Glu
 195 200 205
 Lys Pro Phe Ala Ile Ala Lys Glu
 210 215

<210> 16
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> 酿酒酵母

<220>
 <223> 酿酒酵母菌株S288c肽基脯氨酰顺反异构酶(PPIase)CPR1(Cpr1),

旋转异构酶, 亲环素 (CPH, CPH1, CYP1),
环孢菌素A结合蛋白, 基因座YDR155C, PPI-II, SCC1

<400> 16

```

Met Ser Gln Val Tyr Phe Asp Val Glu Ala Asp Gly Gln Pro Ile Gly
 1           5           10           15
Arg Val Val Phe Lys Leu Tyr Asn Asp Ile Val Pro Lys Thr Ala Glu
      20           25           30
Asn Phe Arg Ala Leu Cys Thr Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr Ala Gly
      35           40           45
Ser Pro Phe His Arg Val Ile Pro Asp Phe Met Leu Gln Gly Gly Asp
      50           55           60
Phe Thr Ala Gly Asn Gly Thr Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Gly Lys
65           70           75           80
Phe Pro Asp Glu Asn Phe Lys Lys His His Asp Arg Pro Gly Leu Leu
      85           90           95
Ser Met Ala Asn Ala Gly Pro Asn Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile
      100          105          110
Thr Thr Val Pro Cys Pro Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly
      115          120          125
Glu Val Val Asp Gly Tyr Asp Ile Val Lys Lys Val Glu Ser Leu Gly
      130          135          140
Ser Pro Ser Gly Ala Thr Lys Ala Arg Ile Val Val Ala Lys Ser Gly
145          150          155          160
Glu Leu

```

[0016]

<210> 17

<211> 371

<212> PRT

<213> 酿酒酵母

<220>

<223> 酿酒酵母菌株S288c肽基脯氨酰异构酶 (PPIase) CPR6 (Cpr6),
旋转异构酶, 亲环素, 基因座YLR216C, CYP40

<400> 17

```

Met Thr Arg Pro Lys Thr Phe Phe Asp Ile Ser Ile Gly Gly Lys Pro
 1           5           10           15
Gln Gly Arg Ile Val Phe Glu Leu Tyr Asn Asp Ile Val Pro Lys Thr
      20           25           30
Ala Glu Asn Phe Leu Lys Leu Cys Glu Gly Asn Ala Gly Met Ala Lys
      35           40           45
Thr Lys Pro Asp Val Pro Leu Ser Tyr Lys Gly Ser Ile Phe His Arg
      50           55           60
Val Ile Lys Asp Phe Met Cys Gln Phe Gly Asp Phe Thr Asn Phe Asn
65           70           75           80
Gly Thr Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Asp Glu Lys Phe Glu Asp Glu Asn
      85           90           95
Phe Thr Val Lys His Asp Lys Pro Phe Leu Leu Ser Met Ala Asn Ala
      100          105          110
Gly Pro Asn Thr Asn Gly Ser Gln Ala Phe Ile Thr Cys Val Pro Thr
      115          120          125
Pro His Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly Glu Val Ile Gln Gly
      130          135          140
Lys Arg Ile Val Arg Leu Ile Glu Asn Gln Gln Cys Asp Gln Glu Asn
145          150          155          160

```

```

Asn Lys Pro Leu Arg Asp Val Lys Ile Asp Asp Cys Gly Val Leu Pro
    165                      170                      175
Asp Asp Tyr Gln Val Pro Glu Asn Ala Glu Ala Thr Pro Thr Asp Glu
    180                      185                      190
Tyr Gly Asp Asn Tyr Glu Asp Val Leu Lys Gln Asp Glu Lys Val Asp
    195                      200                      205
Leu Lys Asn Phe Asp Thr Val Leu Lys Ala Ile Glu Thr Val Lys Asn
    210                      215                      220
Ile Gly Thr Glu Gln Phe Lys Lys Gln Asn Tyr Ser Val Ala Leu Glu
    225                      230                      235                      240
Lys Tyr Val Lys Cys Asp Lys Phe Leu Lys Glu Tyr Phe Pro Glu Asp
    245                      250                      255
Leu Glu Lys Glu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Gln Leu Lys Val Ser Ile
    260                      265                      270
Pro Leu Asn Ile Ala Ile Cys Ala Leu Lys Leu Lys Asp Tyr Lys Gln
    275                      280                      285
Val Leu Val Ala Ser Ser Glu Val Leu Tyr Ala Glu Ala Ala Asp Glu
    290                      295                      300
Lys Ala Lys Ala Lys Ala Leu Tyr Arg Arg Gly Leu Ala Tyr Tyr His
    305                      310                      315                      320
Val Asn Asp Thr Asp Met Ala Leu Asn Asp Leu Glu Met Ala Thr Thr
    325                      330                      335
Phe Gln Pro Asn Asp Ala Ala Ile Leu Lys Ala Ile His Asn Thr Lys
    340                      345                      350
Leu Lys Arg Lys Gln Gln Asn Glu Lys Ala Lys Lys Ser Leu Ser Lys
    355                      360                      365
Met Phe Ser
    370

```

[0017]

<210> 18
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 酿酒酵母

<220>
 <223> 酿酒酵母菌株S288c肽基脯氨酰基异构酶(PPIase)
 FPR1(Fpr1), FK506结合蛋白1(FKBP, FKB1),
 非组蛋白染色质结合蛋白 Hmolp结合蛋白,
 雷帕霉素结合蛋白(RBP1), 基因座YNL135C

<400> 18
 Met Ser Glu Val Ile Glu Gly Asn Val Lys Ile Asp Arg Ile Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Asp Gly Ala Thr Phe Pro Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Ile His
 20 25 30
 Tyr Thr Gly Thr Leu Glu Asn Gly Gln Lys Phe Asp Ser Ser Val Asp
 35 40 45
 Arg Gly Ser Pro Phe Gln Cys Asn Ile Gly Val Gly Gln Val Ile Lys
 50 55 60
 Gly Trp Asp Val Gly Ile Pro Lys Leu Ser Val Gly Glu Lys Ala Arg
 65 70 75 80
 Leu Thr Ile Pro Gly Pro Tyr Ala Tyr Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly
 85 90 95
 Leu Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys
 100 105 110
 Val Asn

<210> 19
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>

<223> DnaJ (Hsp40) 同系物亚家族B成员11 (DNAJB11)
 前体, ER相关的dnaJ蛋白3 (ERdj3, ERj3p, EDJ,
 ERJ3, ERj3, HEDJ), 人DnaJ蛋白9 (9HDJ9, DJ9, Dj-9),
 APOBEC1结合蛋白2 (ABBP-2), 基因座PSEC0121, PR01080

<400> 19

Met Ala Pro Gln Asn Leu Ser Thr Phe Cys Leu Leu Leu Leu Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ile Gly Ala Val Ile Ala Gly Arg Asp Phe Tyr Lys Ile Leu Gly Val
 20 25 30
 Pro Arg Ser Ala Ser Ile Lys Asp Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu
 35 40 45
 Ala Leu Gln Leu His Pro Asp Arg Asn Pro Asp Asp Pro Gln Ala Gln
 50 55 60
 Glu Lys Phe Gln Asp Leu Gly Ala Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Ser
 65 70 75 80
 Glu Lys Arg Lys Gln Tyr Asp Thr Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Asp
 85 90 95
 Gly His Gln Ser Ser His Gly Asp Ile Phe Ser His Phe Phe Gly Asp
 100 105 110
 Phe Gly Phe Met Phe Gly Gly Thr Pro Arg Gln Gln Asp Arg Asn Ile
 115 120 125
 Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ile Val Asp Leu Glu Val Thr Leu Glu Glu
 130 135 140
 Val Tyr Ala Gly Asn Phe Val Glu Val Val Arg Asn Lys Pro Val Ala
 145 150 155 160
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Lys Cys Asn Cys Arg Gln Glu Met Arg
 165 170 175
 Thr Thr Gln Leu Gly Pro Gly Arg Phe Gln Met Thr Gln Glu Val Val
 180 185 190
 Cys Asp Glu Cys Pro Asn Val Lys Leu Val Asn Glu Glu Arg Thr Leu
 195 200 205
 Glu Val Glu Ile Glu Pro Gly Val Arg Asp Gly Met Glu Tyr Pro Phe
 210 215 220
 Ile Gly Glu Gly Glu Pro His Val Asp Gly Glu Pro Gly Asp Leu Arg
 225 230 235 240
 Phe Arg Ile Lys Val Val Lys His Pro Ile Phe Glu Arg Arg Gly Asp
 245 250 255
 Asp Leu Tyr Thr Asn Val Thr Ile Ser Leu Val Glu Ser Leu Val Gly
 260 265 270
 Phe Glu Met Asp Ile Thr His Leu Asp Gly His Lys Val His Ile Ser
 275 280 285
 Arg Asp Lys Ile Thr Arg Pro Gly Ala Lys Leu Trp Lys Lys Gly Glu
 290 295 300
 Gly Leu Pro Asn Phe Asp Asn Asn Asn Ile Lys Gly Ser Leu Ile Ile
 305 310 315 320
 Thr Phe Asp Val Asp Phe Pro Lys Glu Gln Leu Thr Glu Glu Ala Arg
 325 330 335
 Glu Gly Ile Lys Gln Leu Leu Lys Gln Gly Ser Val Gln Lys Val Tyr

	340	345	350
Asn Gly Leu	Gln Gly Tyr		
355			
<210> 20			
<211> 654			
<212> PRT			
<213> 智人			
<220>			
<223> 78 kDa调节葡萄糖的蛋白(BiP, BIP)前体,			
ER腔Ca(2+)结合蛋白grp78(GRP-78), 热激			
70 kDa蛋白5(HSPA5), 免疫球蛋白重链结合蛋白,			
附睾分泌的精子结合蛋白Li 89n			
<400> 20			
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Ser Ala Ala			
1 5 10 15			
Arg Ala Glu Glu Asp Lys Lys Glu Asp Val Gly Thr Val Val Gly			
20 25 30			
Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Phe Lys Asn Gly			
35 40 45			
Arg Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Ile Thr Pro Ser			
50 55 60			
Tyr Val Ala Phe Thr Pro Glu Gly Glu Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala			
65 70 75 80			
Lys Asn Gln Leu Thr Ser Asn Pro Glu Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys			
85 90 95			
Arg Leu Ile Gly Arg Thr Trp Asn Asp Pro Ser Val Gln Gln Asp Ile			
100 105 110			
Lys Phe Leu Pro Phe Lys Val Val Glu Lys Lys Thr Lys Pro Tyr Ile			
115 120 125			
Gln Val Asp Ile Gly Gly Gly Gln Thr Lys Thr Phe Ala Pro Glu Glu			
130 135 140			
Ile Ser Ala Met Val Leu Thr Lys Met Lys Glu Thr Ala Glu Ala Tyr			
145 150 155 160			
Leu Gly Lys Lys Val Thr His Ala Val Val Thr Val Pro Ala Tyr Phe			
165 170 175			
Asn Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly			
180 185 190			
Leu Asn Val Met Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile Ala			
195 200 205			
Tyr Gly Leu Asp Lys Arg Glu Gly Glu Lys Asn Ile Leu Val Phe Asp			
210 215 220			
Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser Leu Leu Thr Ile Asp Asn Gly			
225 230 235 240			
Val Phe Glu Val Val Ala Thr Asn Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu			
245 250 255			
Asp Phe Asp Gln Arg Val Met Glu His Phe Ile Lys Leu Tyr Lys Lys			
260 265 270			
Lys Thr Gly Lys Asp Val Arg Lys Asp Asn Arg Ala Val Gln Lys Leu			
275 280 285			
Arg Arg Glu Val Glu Lys Ala Lys Arg Ala Leu Ser Ser Gln His Gln			
290 295 300			
Ala Arg Ile Glu Ile Glu Ser Phe Tyr Glu Gly Glu Asp Phe Ser Glu			
305 310 315 320			

[0019]

Thr Leu Thr Arg Ala Lys Phe Glu Glu Leu Asn Met Asp Leu Phe Arg
 325 330 335
 Ser Thr Met Lys Pro Val Gln Lys Val Leu Glu Asp Ser Asp Leu Lys
 340 345 350
 Lys Ser Asp Ile Asp Glu Ile Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile
 355 360 365
 Pro Lys Ile Gln Gln Leu Val Lys Glu Phe Phe Asn Gly Lys Glu Pro
 370 375 380
 Ser Arg Gly Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val
 385 390 395 400
 Gln Ala Gly Val Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr Gly Asp Leu Val Leu
 405 410 415
 Leu Asp Val Cys Pro Leu Thr Leu Gly Ile Glu Thr Val Gly Gly Val
 420 425 430
 Met Thr Lys Leu Ile Pro Arg Asn Thr Val Val Pro Thr Lys Lys Ser
 435 440 445
 Gln Ile Phe Ser Thr Ala Ser Asp Asn Gln Pro Thr Val Thr Ile Lys
 450 455 460
 Val Tyr Glu Gly Glu Arg Pro Leu Thr Lys Asp Asn His Leu Leu Gly
 465 470 475 480
 Thr Phe Asp Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln
 485 490 495
 Ile Glu Val Thr Phe Glu Ile Asp Val Asn Gly Ile Leu Arg Val Thr
 500 505 510
 Ala Glu Asp Lys Gly Thr Gly Asn Lys Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn
 515 520 525
 Asp Gln Asn Arg Leu Thr Pro Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Asn Asp
 530 535 540
 [0020] Ala Glu Lys Phe Ala Glu Glu Asp Lys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Asp
 545 550 555 560
 Thr Arg Asn Glu Leu Glu Ser Tyr Ala Tyr Ser Leu Lys Asn Gln Ile
 565 570 575
 Gly Asp Lys Glu Lys Leu Gly Gly Lys Leu Ser Ser Glu Asp Lys Glu
 580 585 590
 Thr Met Glu Lys Ala Val Glu Glu Lys Ile Glu Trp Leu Glu Ser His
 595 600 605
 Gln Asp Ala Asp Ile Glu Asp Phe Lys Ala Lys Lys Lys Glu Leu Glu
 610 615 620
 Glu Ile Val Gln Pro Ile Ile Ser Lys Leu Tyr Gly Ser Ala Gly Pro
 625 630 635 640
 Pro Pro Thr Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Lys Asp Glu Leu
 645 650

<210> 21

<211> 705

<212> PRT

<213> 酿酒酵母

<220>

<223> 酿酒酵母菌株S288c 82 kDa热激同源蛋白,
 热激蛋白Hsp90组成型同种型(HSP90), Hsp90家族伴侣HSC82,
 ATP依赖性分子伴侣HSC82, Hsp90家族的细胞质伴侣,
 基因座YMR186W

<400> 21

Met Ala Gly Glu Thr Phe Glu Phe Gln Ala Glu Ile Thr Gln Leu Met

1	5	10	15
Ser Leu Ile	Ile Asn Thr Val Tyr Ser	Asn Lys Glu Ile	Phe Leu Arg
20	25	30	
Glu Leu Ile	Ser Asn Ala Ser Asp Ala	Leu Asp Lys Ile	Arg Tyr Gln
35	40	45	
Ala Leu Ser	Asp Pro Lys Gln Leu Glu Thr	Glu Pro Asp Leu	Phe Ile
50	55	60	
Arg Ile Thr	Pro Lys Pro Glu Glu Lys Val	Leu Glu Ile Arg	Asp Ser
65	70	75	80
Gly Ile Gly	Met Thr Lys Ala Glu Leu Ile	Asn Asn Leu Gly Thr	Ile
85	90	95	
Ala Lys Ser	Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu	Ala Leu Ser Ala Gly	Ala
100	105	110	
Asp Val Ser	Met Ile Gly Gln Phe Gly Val	Gly Phe Tyr Ser	Leu Phe
115	120	125	
Leu Val Ala	Asp Arg Val Gln Val Ile Ser	Lys Asn Asn Glu Asp	Glu
130	135	140	
Gln Tyr Ile	Trp Glu Ser Asn Ala Gly Gly	Ser Phe Thr Val Thr	Leu
145	150	155	160
Asp Glu Val	Asn Glu Arg Ile Gly Arg Gly	Thr Val Leu Arg	Leu Phe
165	170	175	
Leu Lys Asp	Asp Gln Leu Glu Tyr Leu Glu	Glu Lys Arg Ile Lys	Glu
180	185	190	
Val Ile Lys	Arg His Ser Glu Phe Val Ala	Tyr Pro Ile Gln Leu	Leu
195	200	205	
Val Thr Lys	Glu Val Glu Lys Glu Val Pro	Ile Pro Glu Glu Glu	Lys
210	215	220	
Lys Asp Glu	Glu Lys Lys Asp Glu Asp Asp	Lys Lys Pro Lys Leu	Glu
225	230	235	240
Glu Val Asp	Glu Glu Glu Glu Lys Lys	Pro Lys Thr Lys Lys	Val
245	250	255	
Lys Glu Glu	Val Gln Glu Leu Glu Glu Leu	Asn Lys Thr Lys Pro	Leu
260	265	270	
Trp Thr Arg	Asn Pro Ser Asp Ile Thr Gln	Glu Glu Tyr Asn Ala	Phe
275	280	285	
Tyr Lys Ser	Ile Ser Asn Asp Trp Glu Asp	Pro Leu Tyr Val Lys	His
290	295	300	
Phe Ser Val	Glu Gly Gln Leu Glu Phe Arg	Ala Ile Leu Phe Ile	Pro
305	310	315	320
Lys Arg Ala	Pro Phe Asp Leu Phe Glu Ser	Lys Lys Lys Asn Asn	
325	330	335	
Ile Lys Leu	Tyr Val Arg Arg Val Phe Ile	Thr Asp Glu Ala Glu	Asp
340	345	350	
Leu Ile Pro	Glu Trp Leu Ser Phe Val Lys	Gly Val Val Asp Ser	Glu
355	360	365	
Asp Leu Pro	Leu Asn Leu Ser Arg Glu Met	Leu Gln Gln Asn Lys	Ile
370	375	380	
Met Lys Val	Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys	Lys Leu Ile Glu Ala	Phe
385	390	395	400
Asn Glu Ile	Ala Glu Asp Ser Glu Gln Phe	Asp Lys Phe Tyr Ser	Ala
405	410	415	
Phe Ala Lys	Asn Ile Lys Leu Gly Val His	Glu Asp Thr Gln Asn	Arg
420	425	430	
Ala Ala Leu	Ala Lys Leu Leu Arg Tyr Asn	Ser Thr Lys Ser Val	Asp
435	440	445	
Glu Leu Thr	Ser Leu Thr Asp Tyr Val Thr	Arg Met Pro Glu His	Gln
450	455	460	

[0021]

Lys Asn Ile Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ser Leu Lys Ala Val Glu Lys
 465 470 475 480
 Ser Pro Phe Leu Asp Ala Leu Lys Ala Lys Asn Phe Glu Val Leu Phe
 485 490 495
 Leu Thr Asp Pro Ile Asp Glu Tyr Ala Phe Thr Gln Leu Lys Glu Phe
 500 505 510
 Glu Gly Lys Thr Leu Val Asp Ile Thr Lys Asp Phe Glu Leu Glu Glu
 515 520 525
 Thr Asp Glu Glu Lys Ala Glu Arg Glu Lys Glu Ile Lys Glu Tyr Glu
 530 535 540
 Pro Leu Thr Lys Ala Leu Lys Asp Ile Leu Gly Asp Gln Val Glu Lys
 545 550 555 560
 Val Val Val Ser Tyr Lys Leu Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ile Arg Thr
 565 570 575
 Gly Gln Phe Gly Trp Ser Ala Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln
 580 585 590
 Ala Leu Arg Asp Ser Ser Met Ser Ser Tyr Met Ser Ser Lys Lys Thr
 595 600 605
 Phe Glu Ile Ser Pro Lys Ser Pro Ile Ile Lys Glu Leu Lys Lys Arg
 610 615 620
 Val Asp Glu Gly Gly Ala Gln Asp Lys Thr Val Lys Asp Leu Thr Asn
 625 630 635 640
 Leu Leu Phe Glu Thr Ala Leu Leu Thr Ser Gly Phe Ser Leu Glu Glu
 645 650 655
 Pro Thr Ser Phe Ala Ser Arg Ile Asn Arg Leu Ile Ser Leu Gly Leu
 660 665 670
 Asn Ile Asp Glu Asp Glu Glu Thr Glu Thr Ala Pro Glu Ala Ser Thr
 675 680 685
 [0022] Glu Ala Pro Val Glu Glu Val Pro Ala Asp Thr Glu Met Glu Glu Val
 690 695 700
 Asp
 705

<210> 22

<211> 137

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<220>

<223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655热激蛋白伴侣,
 小热激蛋白IbpA, 16 kDa热激蛋白A,
 基因座b3687, JW3664, hsIT, htpN, ECK3679

<400> 22

Met Arg Asn Phe Asp Leu Ser Pro Leu Tyr Arg Ser Ala Ile Gly Phe
 1 5 10 15
 Asp Arg Leu Phe Asn His Leu Glu Asn Asn Gln Ser Gln Ser Asn Gly
 20 25 30
 Gly Tyr Pro Pro Tyr Asn Val Glu Leu Val Asp Glu Asn His Tyr Arg
 35 40 45
 Ile Ala Ile Ala Val Ala Gly Phe Ala Glu Ser Glu Leu Glu Ile Thr
 50 55 60
 Ala Gln Asp Asn Leu Leu Val Val Lys Gly Ala His Ala Asp Glu Gln
 65 70 75 80
 Lys Glu Arg Thr Tyr Leu Tyr Gln Gly Ile Ala Glu Arg Asn Phe Glu
 85 90 95

Arg Lys Phe Gln Leu Ala Glu Asn Ile His Val Arg Gly Ala Asn Leu
 100 105 110
 Val Asn Gly Leu Leu Tyr Ile Asp Leu Glu Arg Val Ile Pro Glu Ala
 115 120 125
 Lys Lys Pro Arg Arg Ile Glu Ile Asn
 130 135

<210> 23
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌

<220>
 <223> 大肠杆菌菌株K-12亚株MG1655热激蛋白伴侣,
 小热激蛋白IbpB, 16 kDa热激蛋白B,
 基因座b3686, JW3663, hslS, htpE, ECK3678

[0023] <400> 23
 Met Arg Asn Phe Asp Leu Ser Pro Leu Met Arg Gln Trp Ile Gly Phe
 1 5 10 15
 Asp Lys Leu Ala Asn Ala Leu Gln Asn Ala Gly Glu Ser Gln Ser Phe
 20 25 30
 Pro Pro Tyr Asn Ile Glu Lys Ser Asp Asp Asn His Tyr Arg Ile Thr
 35 40 45
 Leu Ala Leu Ala Gly Phe Arg Gln Glu Asp Leu Glu Ile Gln Leu Glu
 50 55 60
 Gly Thr Arg Leu Ser Val Lys Gly Thr Pro Glu Gln Pro Lys Glu Glu
 65 70 75 80
 Lys Lys Trp Leu His Gln Gly Leu Met Asn Gln Pro Phe Ser Leu Ser
 85 90 95
 Phe Thr Leu Ala Glu Asn Met Glu Val Ser Gly Ala Thr Phe Val Asn
 100 105 110
 Gly Leu Leu His Ile Asp Leu Ile Arg Asn Glu Pro Glu Pro Ile Ala
 115 120 125
 Ala Gln Arg Ile Ala Ile Ser Glu Arg Pro Ala Leu Asn Ser
 130 135 140

<210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多组氨酸, His-6, 6xHis标签, 聚氨基酸标签

<400> 24
 His His His His His His
 1 5

<210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的聚氨基酸标签

<400> 25
Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg
1 5

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的聚氨基酸标签

<400> 26
Ser Lys Ser Lys Ser Lys Ser Lys
1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的聚氨基酸标签

[0024] <400> 27
Asp Asp Asp Asp Asp Asp
1 5

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的聚氨基酸标签

<400> 28
Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5

<210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的DsbC活性位点

<400> 29
Cys Gly Tyr Cys
1

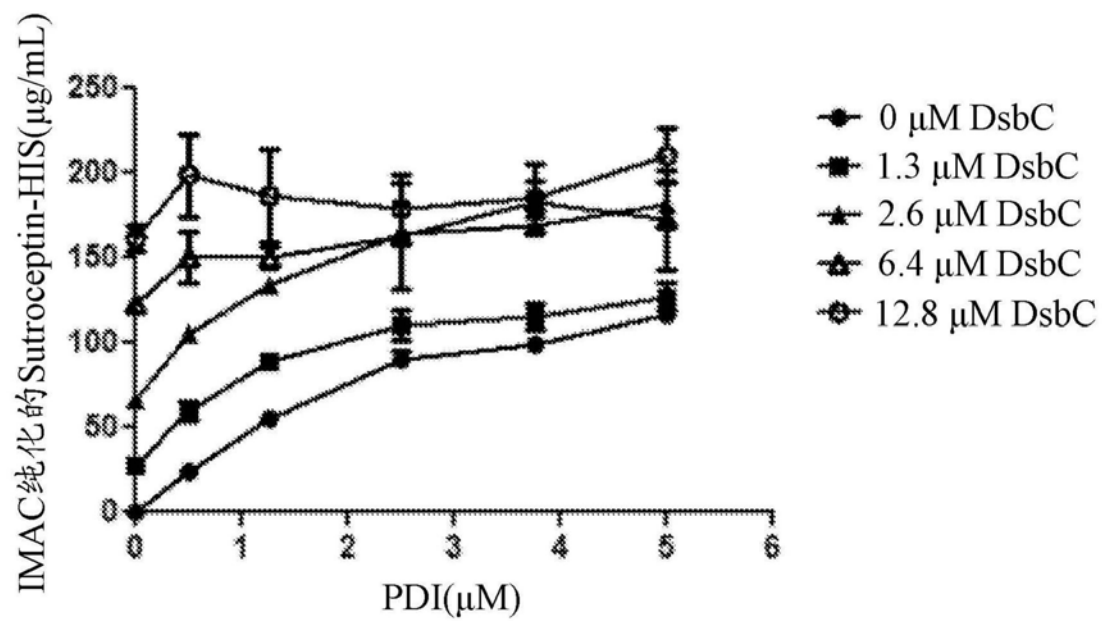


图1

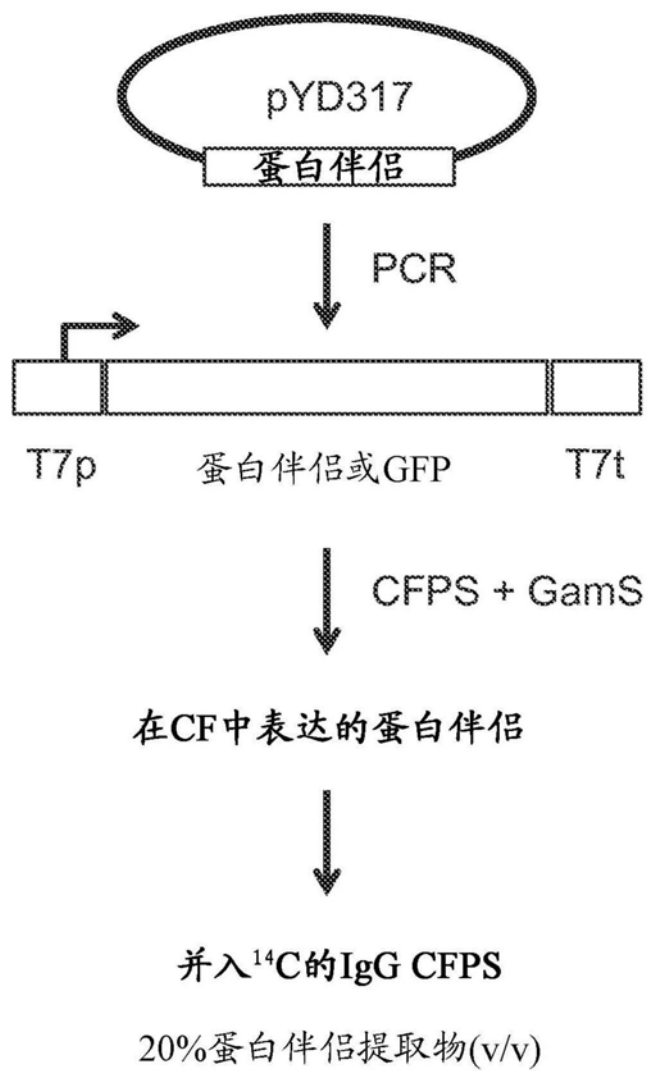


图2A

蛋白伴侣被表达的浓度:

氧化还原蛋白		MW (kDa)	μM
	DsbC	23.6	26
	DsbG	29.8	11
	yPDI	55.8	3
	hPDI	55.3	3
	yTrr1	34.2	18
脯氨酰异构酶		MW (kDa)	μM
	SlyD	20.9	43
	tig	48.2	15
	SurA	45.1	8
	FkpA	28.9	48
	hPPIB	20.3	23
解聚酶		MW (kDa)	μM
	hERdj3	38.2	12
	hBiP	70.5	3
	yHsc82	80.9	7
	IbpA	15.8	52
	IbpB	16.1	69
	Skp	17.7	71

相对于GFP对照，在IgG滴度上的改善倍数

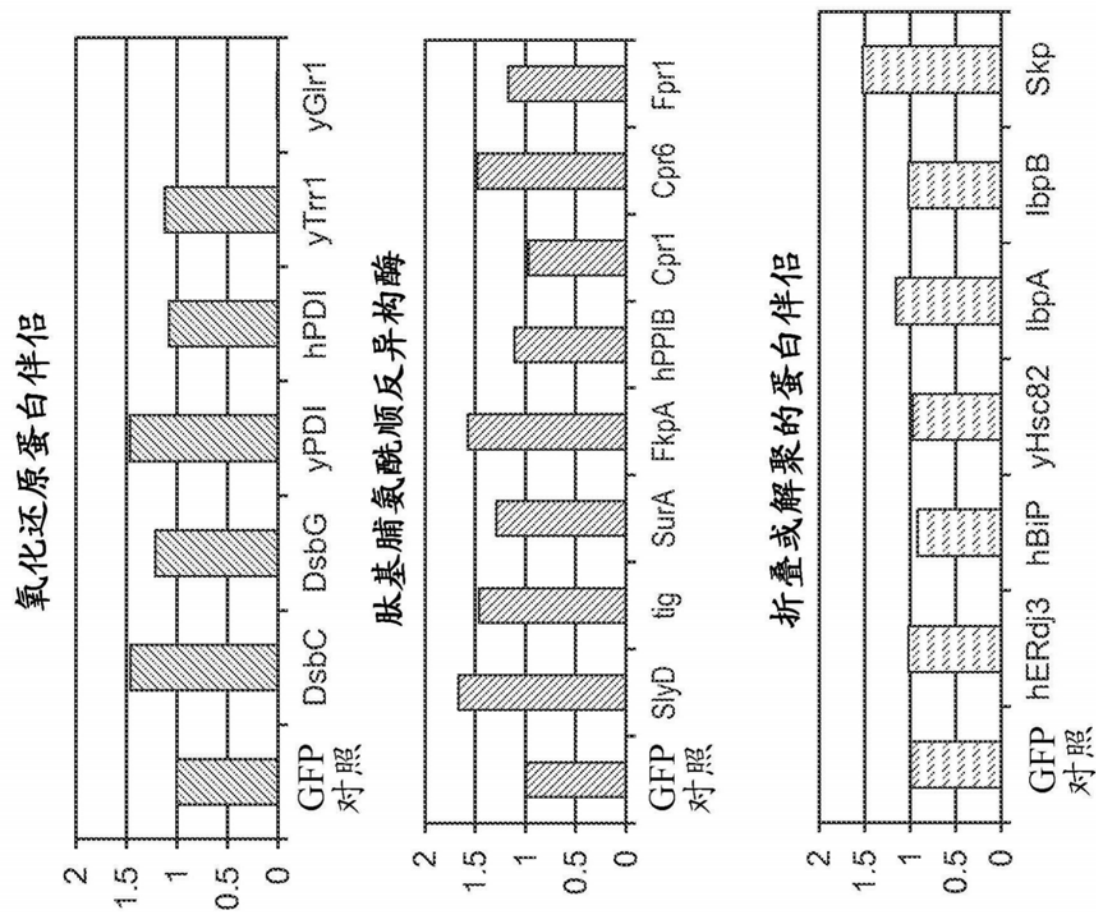


图2B

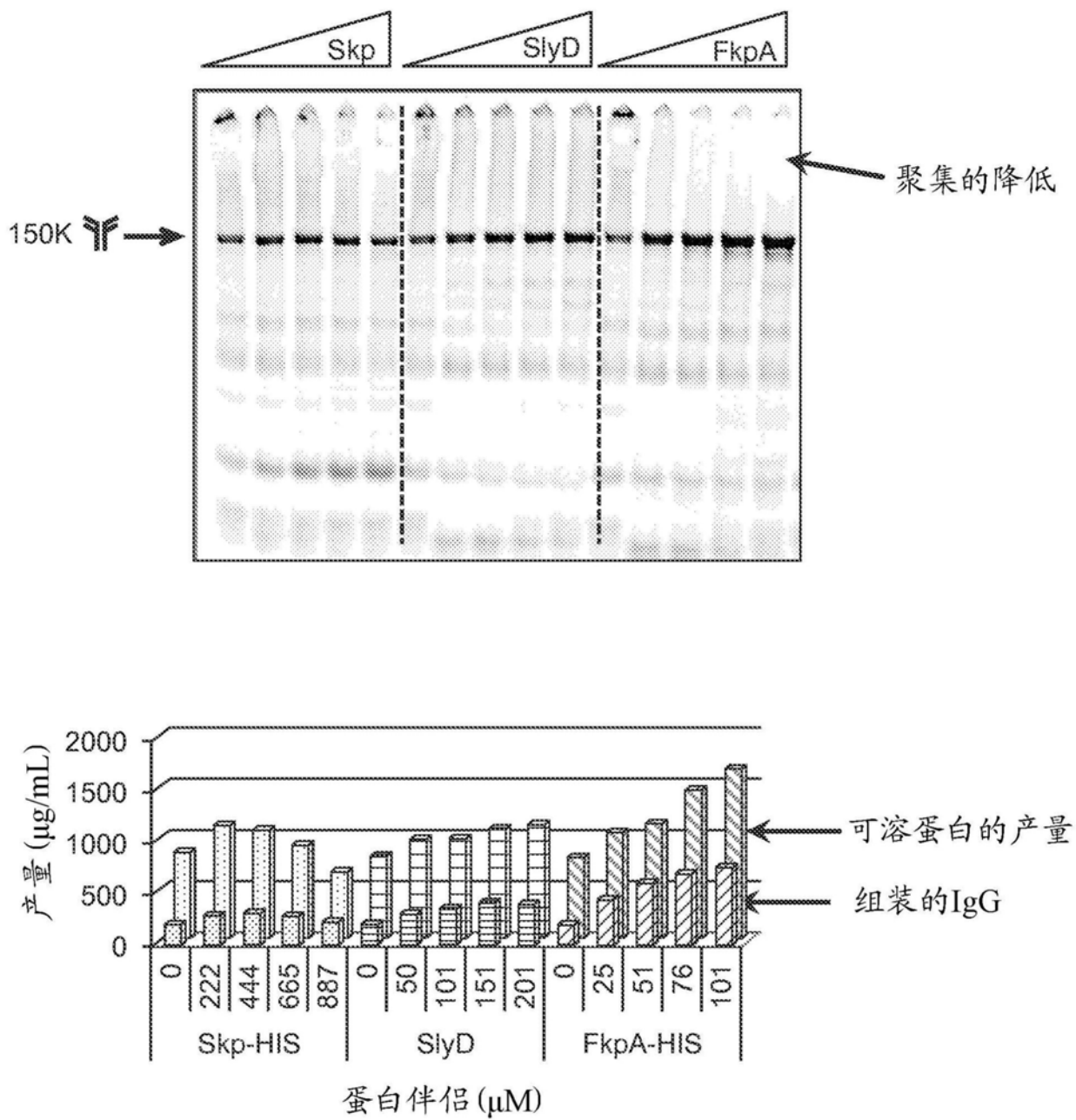


图3

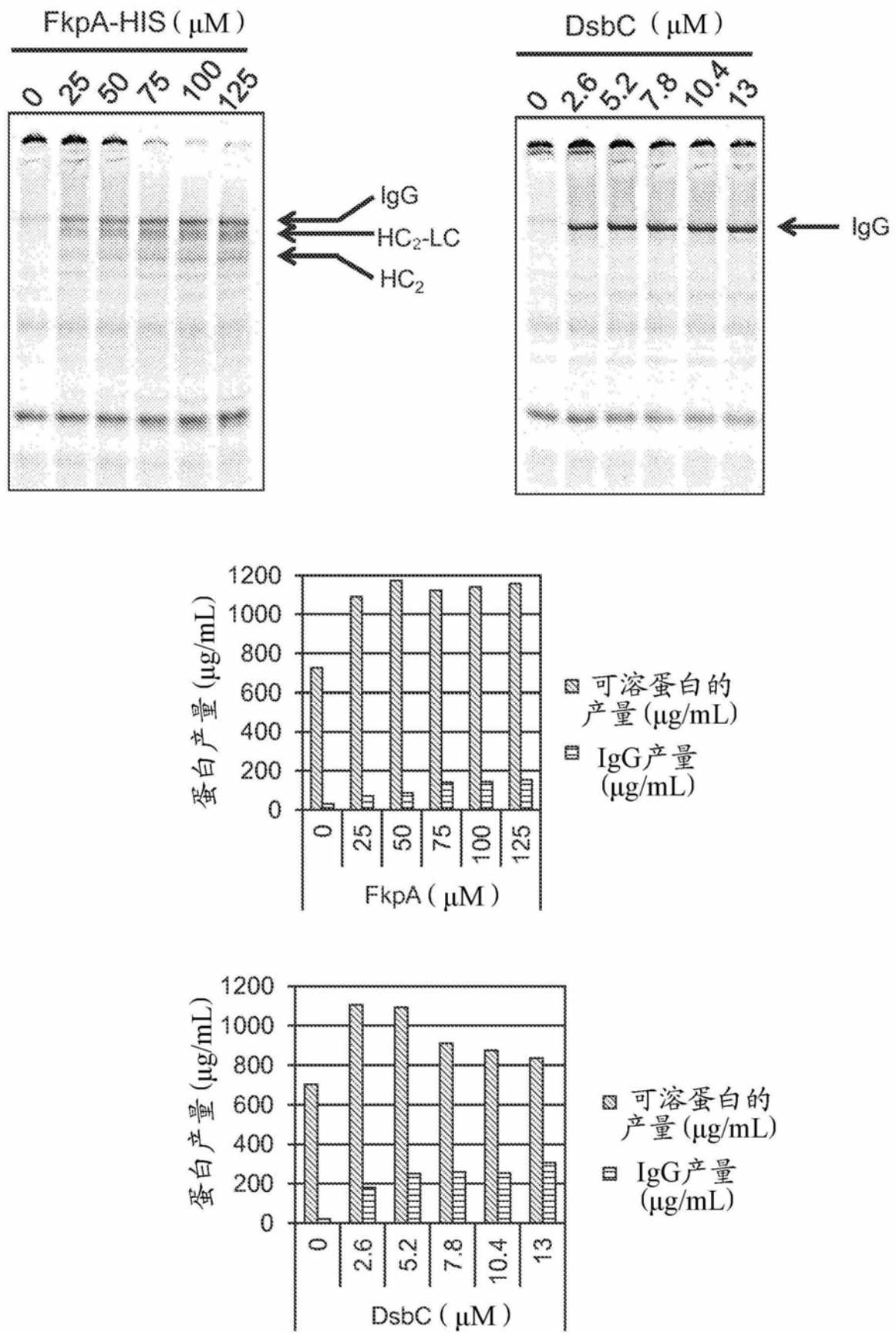


图4

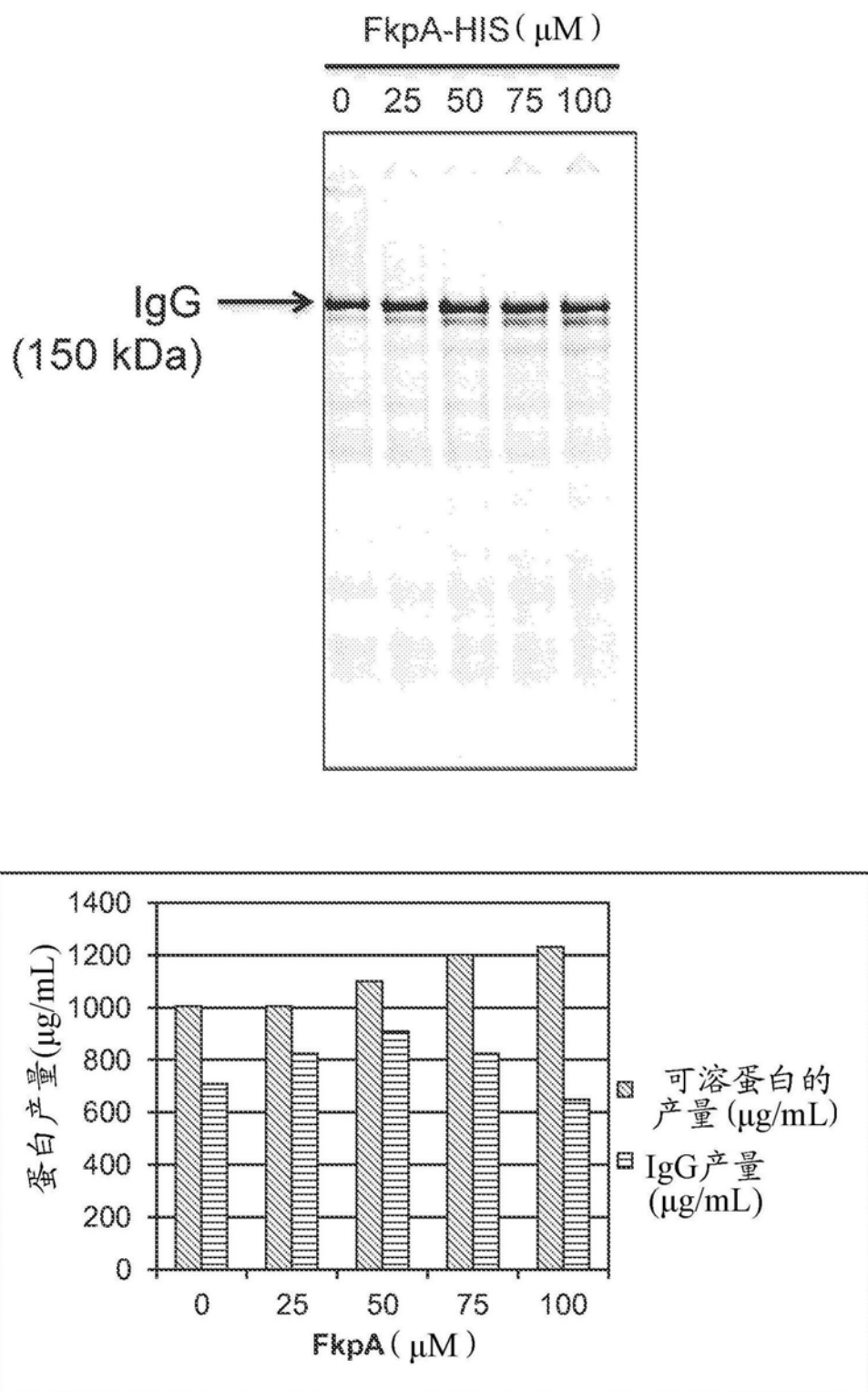


图5

2x FkpA提取物的百分比(每个反应(rxn), v/v)

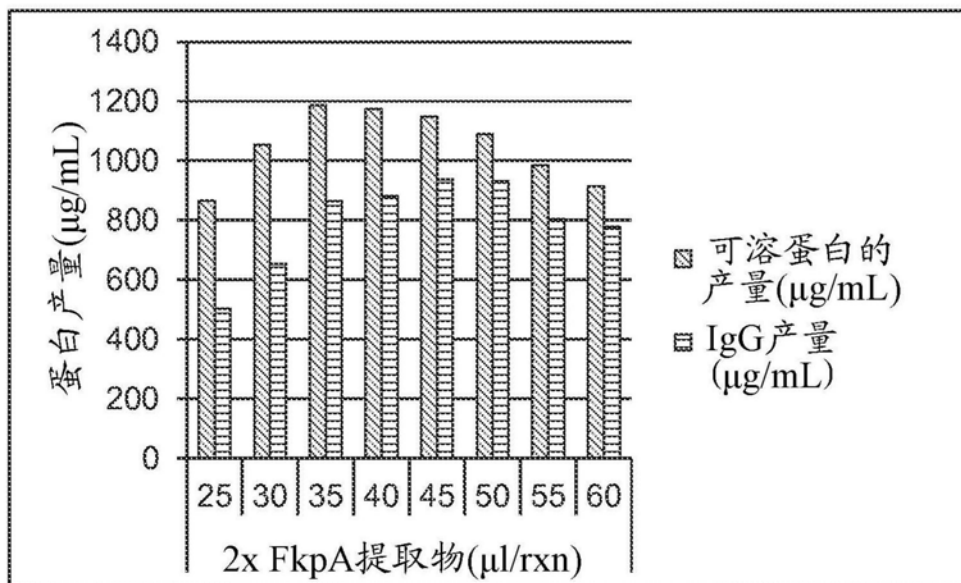
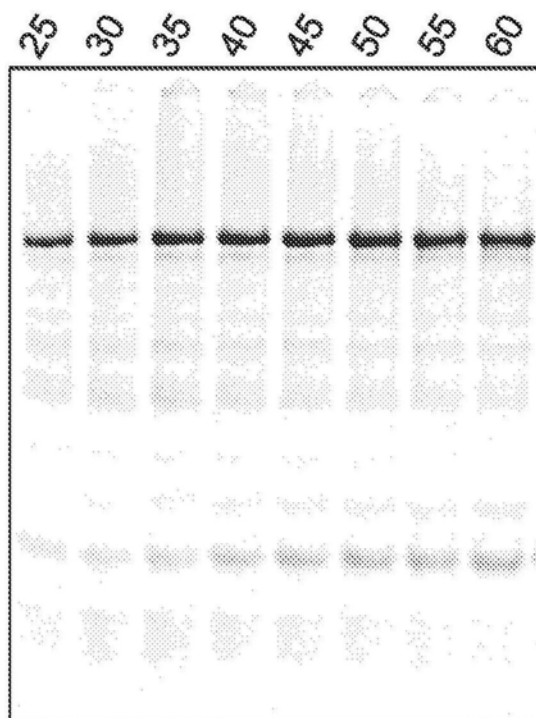


图6

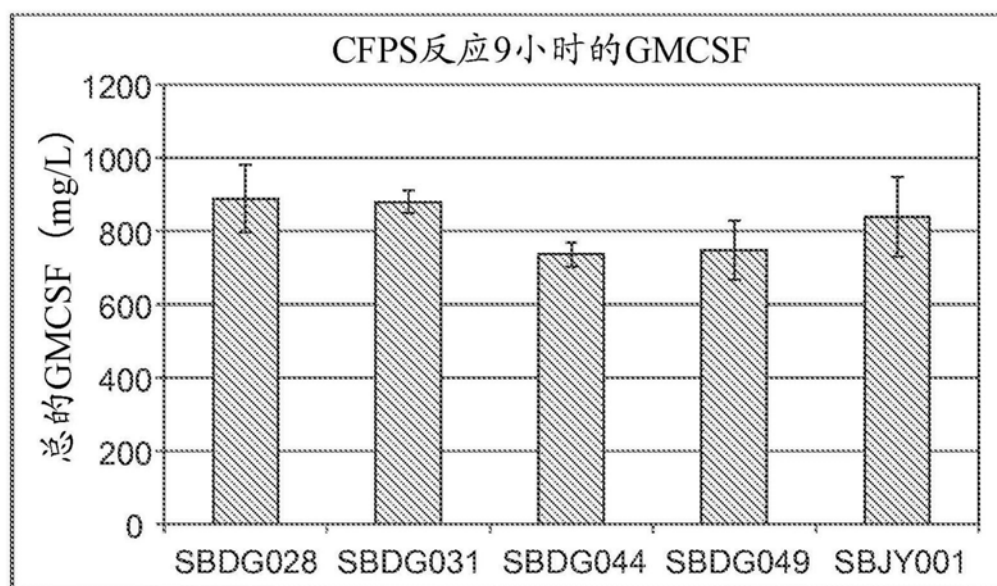
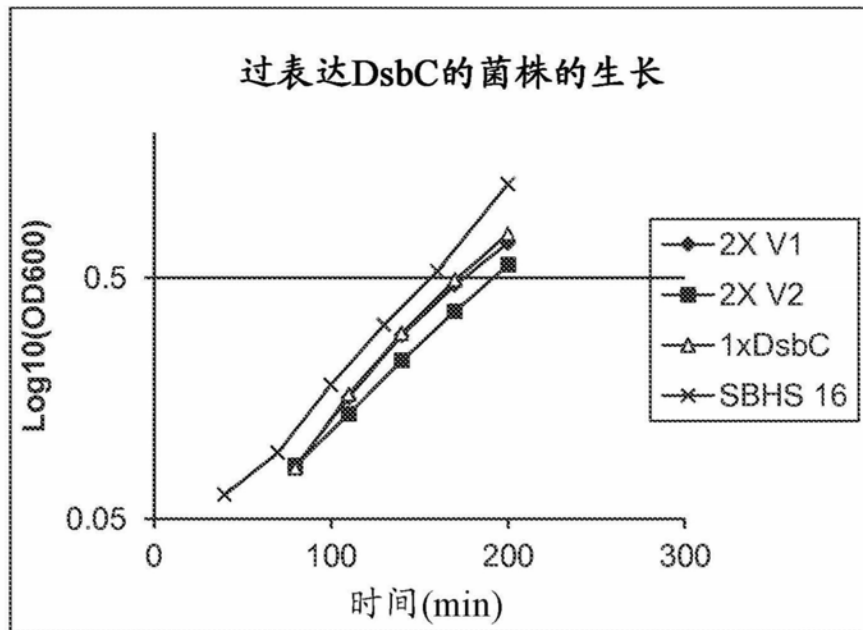
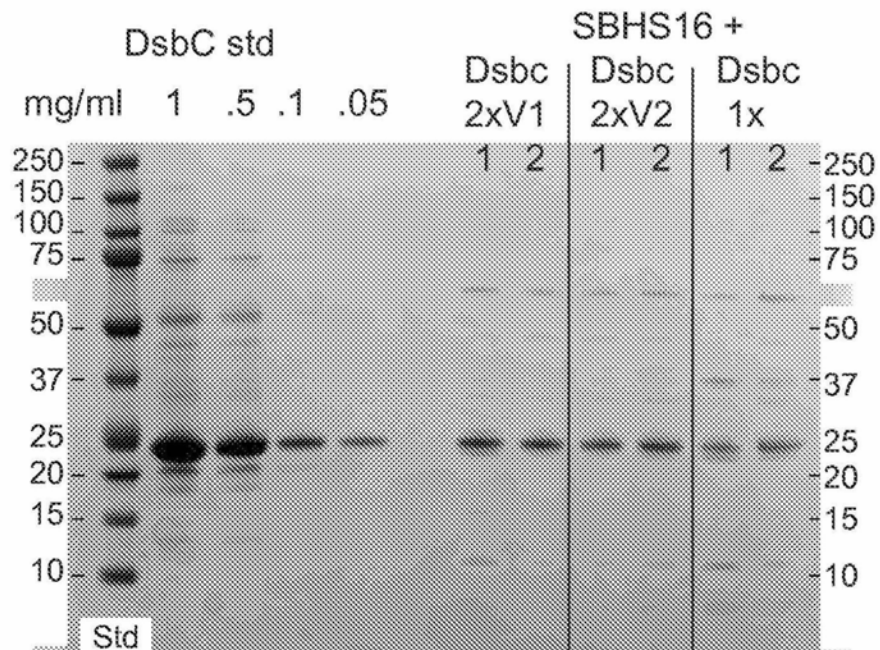


图7



生长速率

菌株	SBHS16	+1xDsbC	+2X ver 1	+2X ver 2
倍增时间 (h)	.65	.64	.70	.73



周质裂解期间以1:20稀释细胞

图8

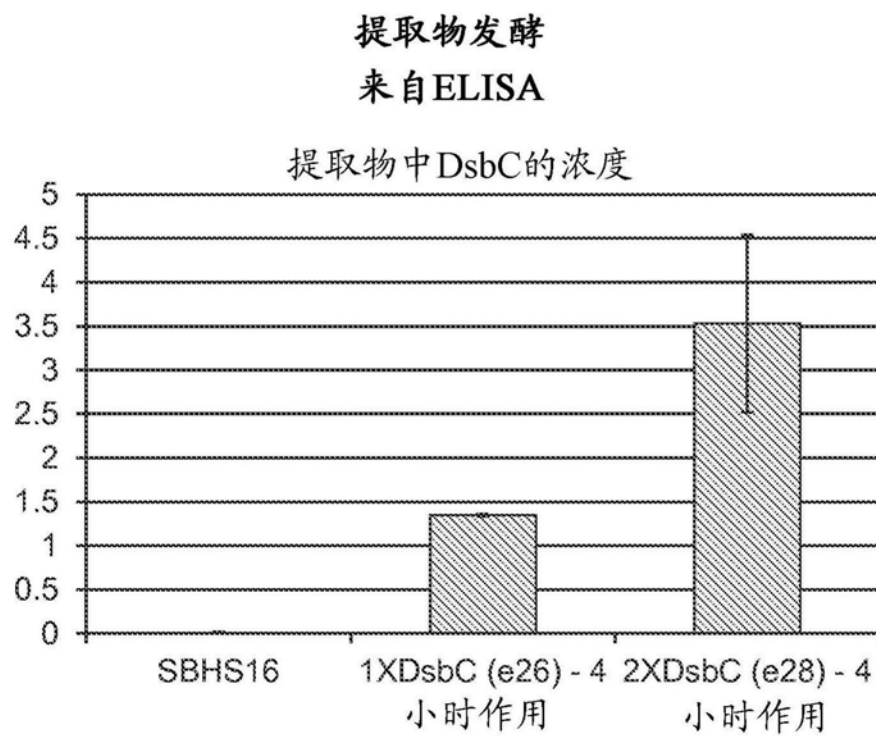
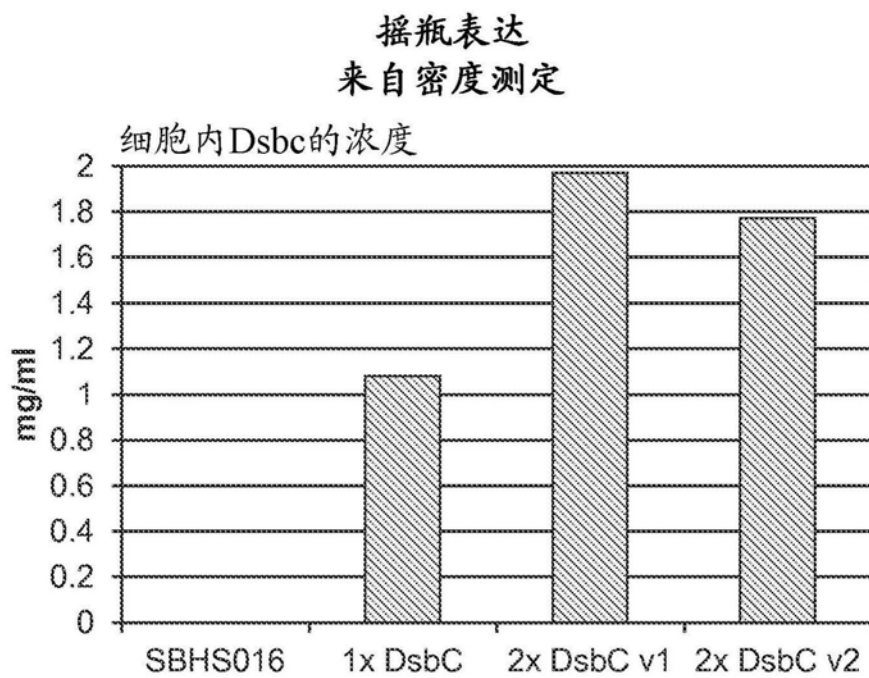


图9

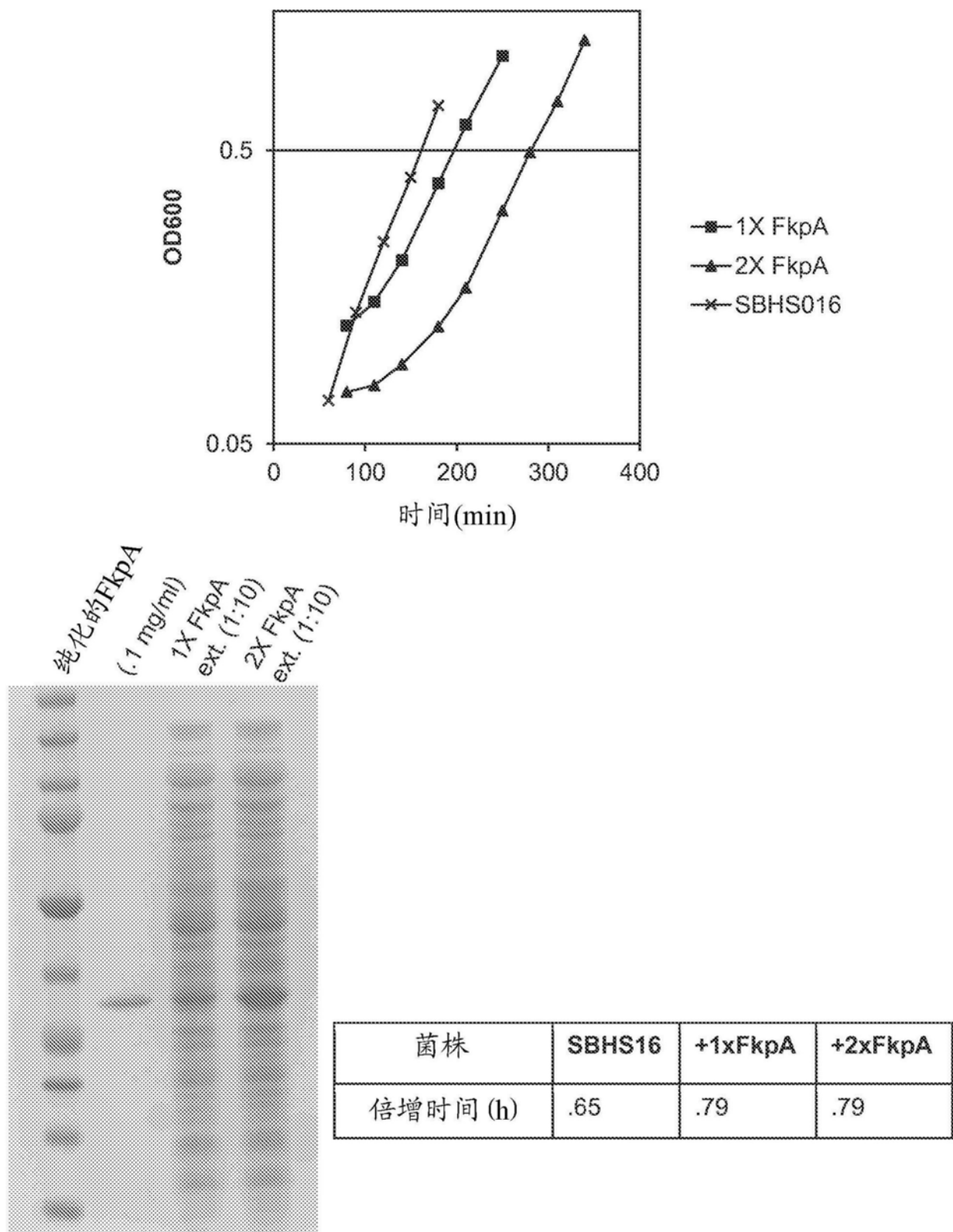


图10

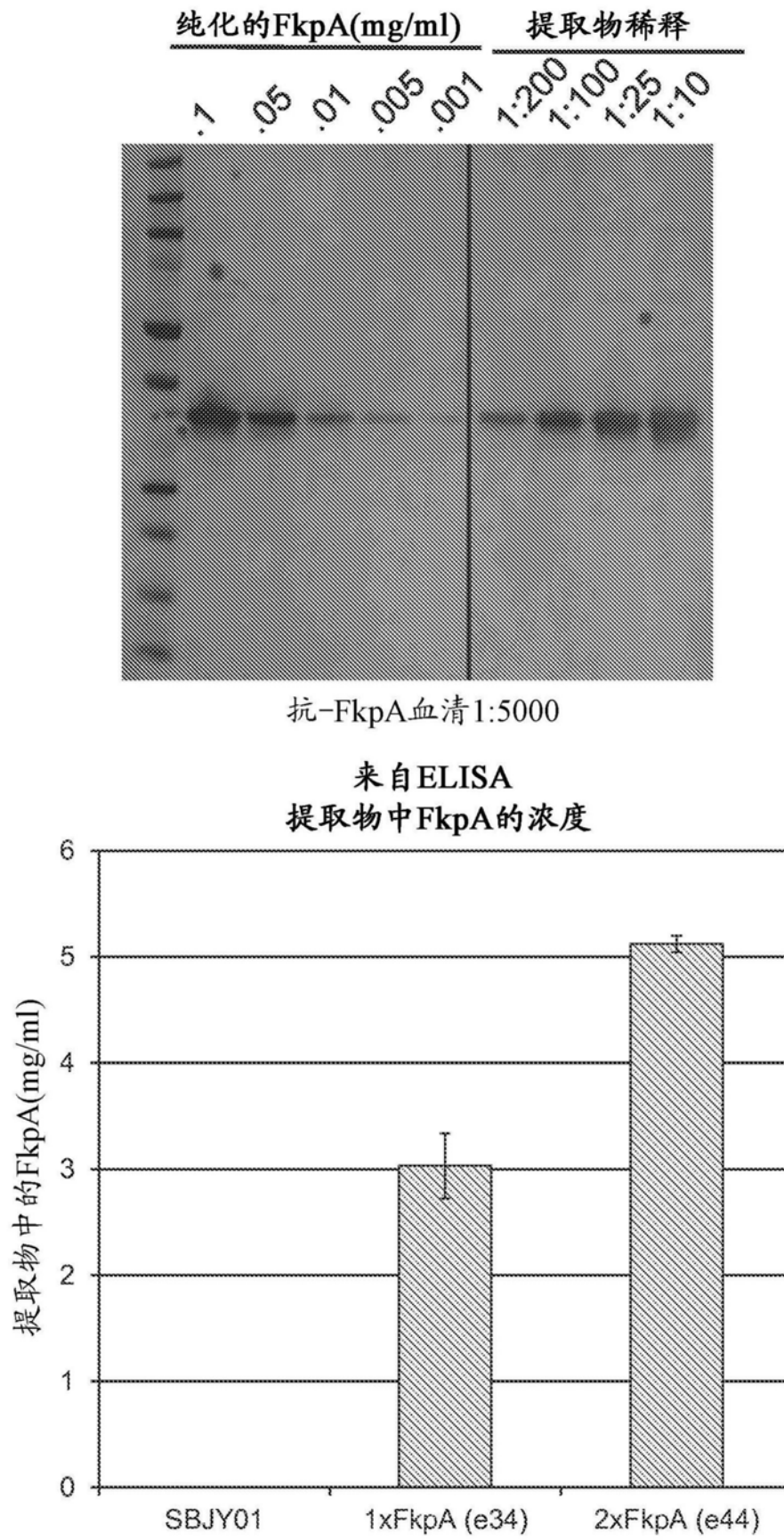


图11

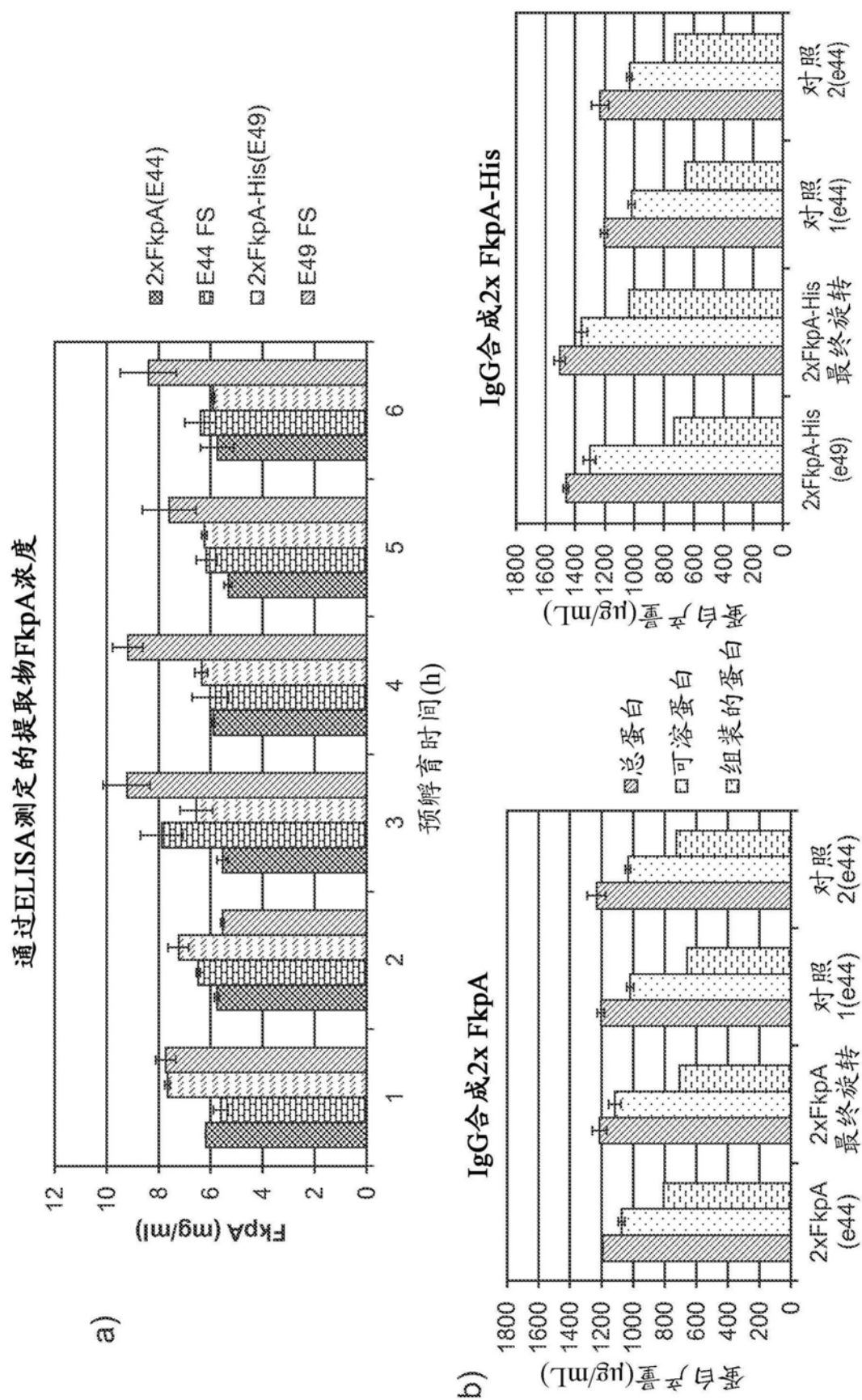


图12

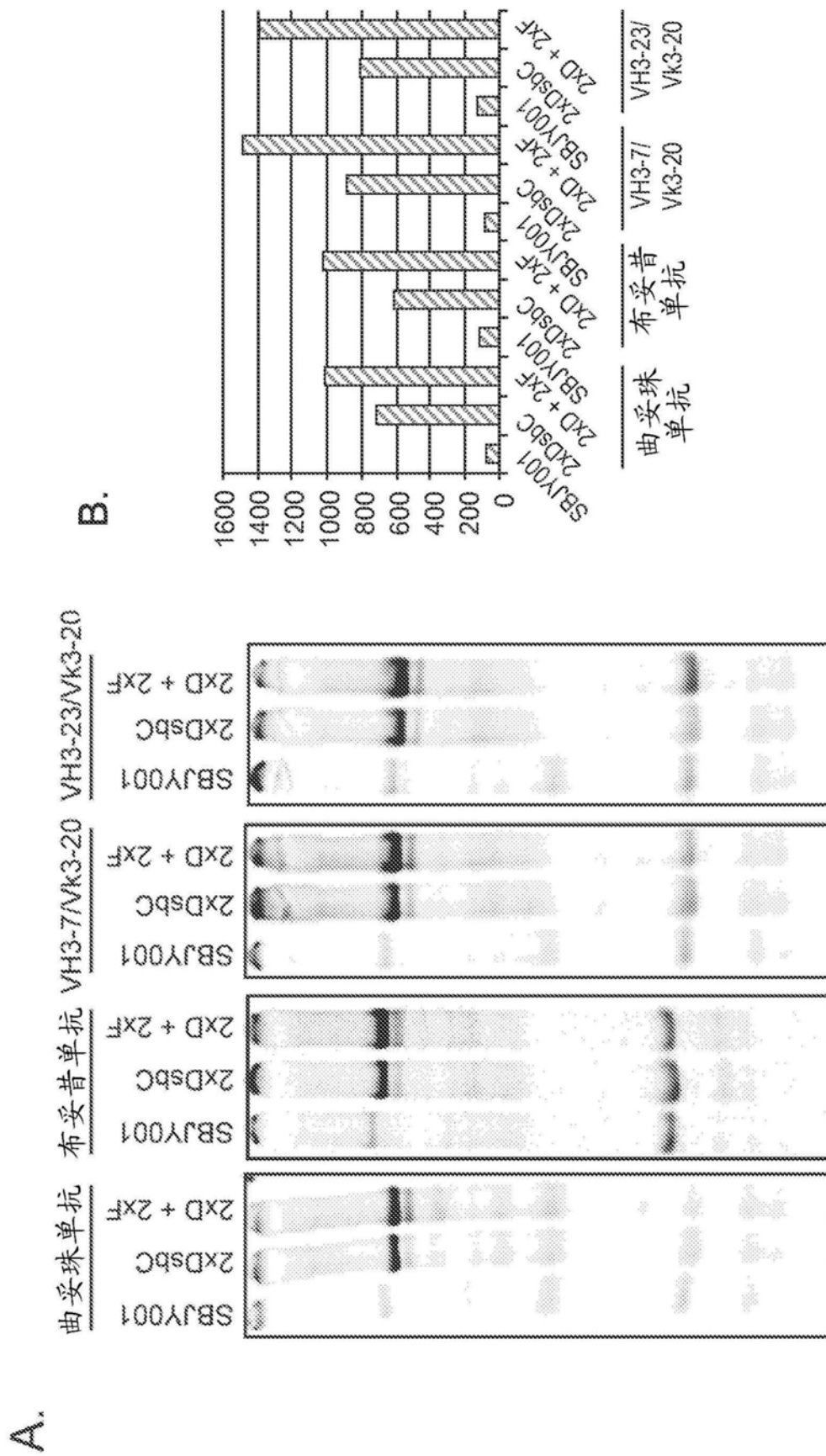


图13