



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105073770 B

(45)授权公告日 2019.08.06

(21)申请号 201380070706.9

(22)申请日 2013.11.18

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105073770 A

(43)申请公布日 2015.11.18

(30)优先权数据  
13181697.7 2013.08.26 EP  
61/727,283 2012.11.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.07.16

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2013/074070 2013.11.18

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/076277 EN 2014.05.22

(73)专利权人 IBA股份有限公司  
地址 德国哥廷根

(72)发明人 托马斯·施密特

(74)专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11382  
代理人 曹津燕 王瑞琳

(51)Int.Cl.  
C07K 14/36(2006.01)

(56)对比文件  
US 6103493, 2000.08.15, 全文.  
INGO P.KORNDORFER et al..Improved  
affinity of engineered streptavidin for  
the Strep-tag II peptide is due to a  
fixed open conformation of the lid-like  
loop at the binding site.《Protein  
Science》.2002,第11卷(第4期),883-893.

审查员 王奇

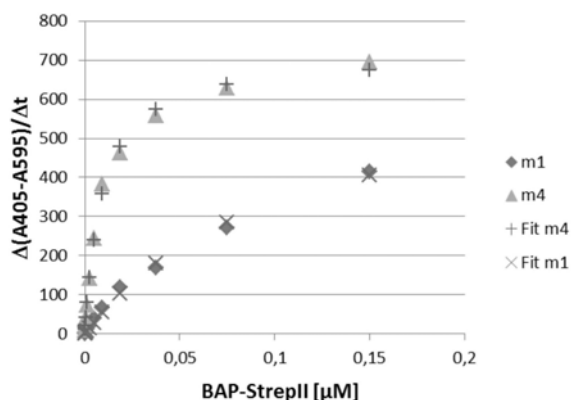
权利要求书5页 说明书47页  
序列表148页 附图14页

### (54)发明名称

链霉亲和素突变蛋白及其使用方法

### (57)摘要

本发明涉及新的链霉亲和素突变蛋白。在一个实施方案中,该突变蛋白(a)包含至少一个在与如SEQ ID NO:15所示野生型链霉亲和素的氨基酸序列相关的氨基酸位点115至121的区域中的突变,以及(b)对于包含氨基酸序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(SEQ ID NO:100)的肽配体,具有比以下各蛋白更高的结合亲和力:(i)包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>(SEQ ID NO:98)的链霉亲和素突变蛋白,或者(ii)在氨基酸位点44至47包含氨基酸序列Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>(SEQ ID NO:99)的链霉亲和素突变蛋白,或者(iii)野生型链霉亲和素(SEQ ID NO:15)。



1. 一种突变蛋白,其选自链霉亲和素的突变蛋白,其中,所述突变蛋白

(a) 包含至少两个在与氨基酸残基14至139示于SEQ ID NO:212的野生型链霉亲和素的氨基酸序列相关的氨基酸位点117至121的区域中的突变,以及

(b) 对于包含氨基酸序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:100)的肽配体,具有比以下各蛋白更高的结合亲和力

(i) 包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:98)的SEQ ID NO:112的链霉亲和素突变蛋白,或者

(ii) 在氨基酸位点44至47包含氨基酸序列Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:99)的SEQ ID NO:113的链霉亲和素突变蛋白,或者

(iii) 氨基酸残基示于SEQ ID NO:212的野生型链霉亲和素,  
其中所述突变蛋白在序列位置117至121包含以下氨基酸序列:

如SEQ ID NO:21所示的Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Phe<sup>120</sup>Met<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:22所示的Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Tyr<sup>120</sup>Ala<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:23所示的Ala<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:33所示的Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:55所示的Gly<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Met<sup>120</sup>Met<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:56所示的Glu<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:57所示的Asp<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:58所示的Glu<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:59所示的Arg<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Met<sup>120</sup>Met<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:60所示的Arg<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:61所示的Ala<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Pro<sup>120</sup>Ala<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:62所示的Ala<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Met<sup>120</sup>Val<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:63所示的Gln<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Ser<sup>120</sup>Ala<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:64所示的Ala<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:65所示的Gln<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Met<sup>120</sup>Val<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:75所示的Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Phe<sup>120</sup>Leu<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:76所示的Phe<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Phe<sup>120</sup>Leu<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:77所示的Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Leu<sup>120</sup>Trp<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:82所示的Thr<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Leu<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:83所示的His<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Leu<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:84所示的Ile<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Arg<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:85所示的His<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Thr<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:86所示的Thr<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Arg<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:87所示的Ala<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Arg<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:93所示的Ala<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:94所示的His<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Met<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:95所示的His<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup>,

如SEQ ID NO:96所示的Glu<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup>,或

如SEQ ID NO:97所示的Gln<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup>。

2. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,在序列位点114存在氨基酸残基,其中所述氨基酸残基是野生型苏氨酸或任意其它氨基酸。

3. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,在位点118和/或119的所述氨基酸残基缺失。

4. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,以各自的K<sub>d</sub>的比率表示,所述突变蛋白对于包含氨基酸序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:100)的肽配体具有的结合亲和力是包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:98)的SEQ ID NO:112的链霉亲和素突变蛋白或在氨基酸位点44至47包含氨基酸序列Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:99)的SEQ ID NO:113的链霉亲和素突变蛋白的至少1.1倍。

5. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其还包含至少两个在与如SEQ ID NO:15所示野生型链霉亲和素的氨基酸序列相关的氨基酸位点44至53的区域中的半胱氨酸残基。

6. 根据权利要求5所述的突变蛋白,其中,所述两个半胱氨酸残基存在于由氨基酸位点44至53的残基形成的环中的相对位点。

7. 根据权利要求5所述的突变蛋白,其中,所述两个半胱氨酸残基存在于野生型链霉亲和素的位点44和53。

8. 根据权利要求5所述的突变蛋白,其中,所述两个半胱氨酸残基存在于野生型链霉亲和素的氨基酸位点45和52。

9. 根据权利要求5所述的突变蛋白,其中,所述两个半胱氨酸残基存在于野生型链霉亲和素的位点46和51。

10. 根据权利要求5所述的突变蛋白,其中,所述两个半胱氨酸残基存在于野生型链霉亲和素的位点47和50。

11. 根据权利要求5所述的突变蛋白,其中,所述两个半胱氨酸残基存在于野生型链霉亲和素的位点48和49。

12. 根据权利要求6或权利要求8至11中任一项所述的突变蛋白,其中,在野生型链霉亲和素的氨基酸位点44存在Gly或Ala残基。

13. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白为最小链霉亲和素的突变蛋白,所述最小链霉亲和素N-端起始于野生型链霉亲和素的氨基酸10至16的区域中,C-端终止于野生型链霉亲和素的氨基酸133至142的区域中。

14. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,在序列位点44由疏水性脂肪族氨基酸替代Glu,在序列位点45存在任意氨基酸,在序列位点46存在疏水性脂肪族氨基酸,和/或在序列位点47由碱性氨基酸替代Val。

15. 根据权利要求14所述的突变蛋白,其中,在位点46存在Ala。

16. 根据权利要求15所述的突变蛋白,其中,在位点47存在Arg。

17. 根据权利要求16所述的突变蛋白,其中,所述序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:98)存在于氨基酸位点44至47的区域中。

18. 根据权利要求16所述的突变蛋白,其中,所述序列Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:99)存在于氨基酸位点44至47的区域中。

19. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白包含下述突变蛋白中任一个的序列:如SEQ ID NO:117所示的突变蛋白“1”-m36,如SEQ ID NO:118所示的突变蛋白“1”-

m23,如SEQ ID NO:119所示的突变蛋白“1”-m41,如SEQ ID NO:120所示的突变蛋白“1”-m4,如SEQ ID NO:121所示的突变蛋白“1”-m12,如SEQ ID NO:122所示的突变蛋白“1”-m22,如SEQ ID NO:123所示的突变蛋白“1”-m31,如SEQ ID NO:124所示的突变蛋白“1”-m32,如SEQ ID NO:125所示的突变蛋白“1”-m35,如SEQ ID NO:126所示的突变蛋白“1”-m38,如SEQ ID NO:127所示的突变蛋白“1”-m40,如SEQ ID NO:128所示的突变蛋白“1”-m42,如SEQ ID NO:129所示的突变蛋白“1”-m45,如SEQ ID NO:130所示的突变蛋白“1”-m46,如SEQ ID NO:131所示的突变蛋白“1”-m47,如SEQ ID NO:132所示的突变蛋白“1”-m7,如SEQ ID NO:133所示的突变蛋白“1”-m10,如SEQ ID NO:134所示的突变蛋白“1”-m17,如SEQ ID NO:135所示的突变蛋白“1”-m21,如SEQ ID NO:136所示的突变蛋白“1”-m24,如SEQ ID NO:137所示的突变蛋白“1”-m27,如SEQ ID NO:138所示的突变蛋白“1”-m28,如SEQ ID NO:139所示的突变蛋白“1”-m30,如SEQ ID NO:140所示的突变蛋白“1”-m33,如SEQ ID NO:141所示的突变蛋白“1”-m1,如SEQ ID NO:142所示的突变蛋白“1”-m3,如SEQ ID NO:143所示的突变蛋白“1”-m8,如SEQ ID NO:144所示的突变蛋白“1”-m15,如SEQ ID NO:145所示的突变蛋白“1”-m6,如SEQ ID NO:146所示的突变蛋白“1”-m9,如SEQ ID NO:147所示的突变蛋白“1”-m20,如SEQ ID NO:148所示的突变蛋白“1”-m34,如SEQ ID NO:149所示的突变蛋白“1”-m14,如SEQ ID NO:150所示的突变蛋白“1”-m18,如SEQ ID NO:151所示的突变蛋白“1”-m19,如SEQ ID NO:171所示的突变蛋白“1”-m101,如SEQ ID NO:172所示的突变蛋白“1”-m106,如SEQ ID NO:173所示的突变蛋白“1”-m111,如SEQ ID NO:174所示的突变蛋白“1”-m100,如SEQ ID NO:175所示的突变蛋白“1”-m110,如SEQ ID NO:176所示的突变蛋白“1”-m104,如SEQ ID NO:177所示的突变蛋白“1”-m108,如SEQ ID NO:178所示的突变蛋白“1”-m207,如SEQ ID NO:179所示的突变蛋白“1”-m212,如SEQ ID NO:180所示的突变蛋白“1”-m202,如SEQ ID NO:181所示的突变蛋白“1”-m204,如SEQ ID NO:182所示的突变蛋白“1”-m206,如SEQ ID NO:183所示的突变蛋白“1”-m208,如SEQ ID NO:184所示的突变蛋白“1”-m203,如SEQ ID NO:185所示的突变蛋白“1”-m209,如SEQ ID NO:186所示的突变蛋白“1”-m200,如SEQ ID NO:187所示的突变蛋白“1”-m201,如SEQ ID NO:188所示的突变蛋白“1”-m211,如SEQ ID NO:189所示的突变蛋白“1”-m300,如SEQ ID NO:190所示的突变蛋白“1”-m301,如SEQ ID NO:191所示的突变蛋白“1”-m302,如SEQ ID NO:192所示的突变蛋白“1”-m303,如SEQ ID NO:193所示的突变蛋白“1”-m304和如SEQ ID NO:194所示的m1-9。

20. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,对于所述肽配体的结合亲和力使得能够通过链霉亲和素配体进行竞争洗脱,所述链霉亲和素配体选自生物素、硫代生物素、亚氨基生物素、硫辛酸、脱硫生物素、二氨基生物素、HABA和/或二甲基-HABA。

21. 根据权利要求1所述的突变蛋白,其中,所述突变蛋白携带至少一个标记基团。

22. 一种核酸分子,其包含编码如权利要求1至21中任一项所述的链霉亲和素突变蛋白的序列。

23. 一种载体,其包含在可操作地功能性环境中的至少一个拷贝的如权利要求22所述的核酸。

24. 一种由如权利要求23所述的载体转化或转染的细胞。

25. 一种制备如权利要求1至21中任一项所述的链霉亲和素突变蛋白的方法,所述方法包括:



- (a) 用包含编码所述链霉亲和素突变蛋白的核酸的载体转化适当的宿主细胞;
- (b) 在其中发生所述链霉亲和素突变蛋白的表达的条件下培养所述宿主细胞;
- (c) 分离所述突变蛋白。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中, 步骤(c) 包括裂解所述宿主细胞, 以包涵体的形式分离所述链霉亲和素突变蛋白, 和使所述链霉亲和素突变蛋白复性。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中, 步骤(b) 中的所述表达包括表达携带信号肽的链霉亲和素, 和所述链霉亲和素分泌到所述宿主细胞的周质或培养基中。

28. 根据权利要求25至27中任一项所述的方法, 其中, 所述宿主细胞为大肠杆菌。

29. 一种分离、纯化或测定蛋白的方法, 所述蛋白与以下肽序列融合: a) 式Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa (SEQ ID NO:101) 的肽序列, 其中Xaa代表任意氨基酸, Yaa和Zaa均表示Gly, 或者Yaa表示Glu而Zaa表示Arg或Lys, 或b) 包含至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列的肽序列, 其中所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸, 其中一个结合模块具有3至8个氨基酸并至少包含序列-His-Pro-Baa-, 其中Baa是谷氨酰胺、天冬酰胺或蛋氨酸, 并且其中另一个结合模块具有序列-0aa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa- (SEQ ID NO:108), 其中0aa为Trp、Lys或Arg, Xaa为任意氨基酸, 其中Yaa和Zaa均为Gly, 或者Yaa为Glu而Zaa为Lys或Arg, 所述方法包括在适当的条件下, 使包含所述蛋白的样品与权利要求1至21中任一项所述的链霉亲和素突变蛋白接触, 以使所述肽序列结合于所述链霉亲和素突变蛋白, 和从所述样品中分离得到的复合物。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中, 所述链霉亲和素突变蛋白被结合于固相或能够结合于固相。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中, 为了从所述复合物中释放融合蛋白, 将所述复合物与足够量的对于所述链霉亲和素突变蛋白的配体一起孵育, 所述配体选自生物素及其衍生物。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中, 所述生物素衍生物为含硫生物素。

33. 根据权利要求29所述的方法, 其中, 所述肽序列选自Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:102), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:100), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGly Ser)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:103), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:109) 或Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:110)。

34. 根据权利要求31至33中任一项所述的方法, 其还包括从所述复合物中释放所述蛋白。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其还包括测定所述蛋白。

36. 一种测定蛋白的方法, 所述蛋白与以下肽序列融合: a) 式Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa (SEQ ID NO:101) 的肽序列, 其中Xaa代表任意氨基酸, Yaa和Zaa均表示Gly, 或者Yaa表示Glu而Zaa表示Arg或Lys, 或b) 包含至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列的肽序列, 其中所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸, 其中一个结合模块具有3至8个氨基酸并至少包含序列-His-Pro-Baa-, 其中Baa是谷氨酰胺、天冬酰胺或蛋氨酸。

酸,并且其中另一个结合模块具有序列-Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-(SEQ ID NO: 108),其中Oaa为Trp、Lys或Arg,Xaa为任意氨基酸,其中Yaa和Zaa均为Gly,或者Yaa为Glu而Zaa为Lys或Arg,所述方法包括在适当的条件下,使所述蛋白与权利要求11所述的链霉亲和素突变蛋白接触,以便结合所述链霉亲和素突变蛋白结合,和测定标记。

37.根据权利要求36所述的方法,其中,所述肽序列为Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:102),Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO.100),Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGly Ser)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:103),或Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:109) 或Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 110)。

38.一种固定蛋白的方法,所述蛋白与以下肽序列融合:a) 式Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa (SEQ ID NO:101) 的肽序列,其中Xaa代表任意氨基酸,Yaa和Zaa均表示Gly,或者Yaa表示Glu而Zaa表示Arg或Lys,或b) 包含至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列的肽序列,其中所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,其中一个结合模块具有3至8个氨基酸并至少包含序列-His-Pro-Baa-,其中Baa是谷氨酰胺、天冬酰胺或蛋氨酸,并且其中另一个结合模块具有序列-Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-(SEQ ID NO: 108),其中Oaa为Trp、Lys或Arg,Xaa为任意氨基酸,其中Yaa和Zaa均为Gly,或者Yaa为Glu而Zaa为Lys或Arg,所述方法包括在用于固定所述蛋白的条件下,使所述蛋白与固相接触,所述固相携带权利要求1至21中任一项所述的链霉亲和素突变蛋白。

39.根据权利要求38所述的方法,其中,所述肽序列为Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:102),Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO.100),Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGly Ser)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:103),Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:109) 或Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 110)。

40.一种测定或分离物质的方法,所述物质携带能够结合于链霉亲和素的基团,所述方法包括在用于与其结合的适当条件下,使所述物质与权利要求1至21中任一项所述的链霉亲和素突变蛋白接触,和测定或分离所述物质。

41.一种试剂盒,其包含权利要求1至21中任一项所述的链霉亲和素突变蛋白,和选自缓冲剂、辅助物质和添加剂的至少一种试剂。

## 链霉亲和素突变蛋白及其使用方法

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年11月16日向美国专利商标局提交的美国临时申请61/727,283的优先权,以及要求2013年8月26日向欧洲专利局提交的欧洲专利申请13 181 697.7的优先权,所述专利申请的全部内容并入本文用于所有目的。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及新的链霉亲和素突变蛋白,利用重组DNA技术制备该突变蛋白的方法,以及这些链霉亲和素突变蛋白在分离、纯化和测定生物物质中的用途,所述生物物质例如重组蛋白或生物实体,所述生物实体例如在细胞表面上具有特异性受体分子的细胞。

### 背景技术

[0004] 在蛋白研究中,短肽亲和标签已经变得不可缺少。它们不仅能够用于任意融合重组蛋白的亲和纯化,还能够用于任意融合重组蛋白的检测和测定。亲和标签 **Strep-tag®II** (Schmidt&Skerra,Nature Protocols 2 (2007),1528-1535;US 5,506,121,具有序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys,SEQ ID NO:100) 尤其广泛应用于在快速一步法操作程序中,利用生理条件以高纯度和高功能性通过重组蛋白。对于 **Strep-tag®II** 亲和标签,目前最有效的基于链霉亲和素的受体,是具有改进的结合亲和力的链霉亲和素突变蛋白,该链霉亲和素突变蛋白命名为 **Strep-Tactin®** (Voss&Skerra,Protein Engineering10 (1997),975-982;美国专利6,103,493或欧洲专利0 835 934)。该 **Strep-tag®II** 与生物素结合袋结合,从而使得能够利用生物素衍生物、优选脱硫生物素来进行温和竞争洗脱,从而实现亲和树脂的重复使用。在过去的15年中,所述 **Strep-tag®II**: **Strep-Tactin®** 系统有力地应用于纯化、检测和鉴定重组蛋白(在Schmidt&Skerra,Nature Protocols 2 (2007),1528-1535中回顾),甚至是细胞(Knabel等人,Nature Medicine 8 (2002),631-637)。

[0005] 所述 **Strep-tag®II**: **Strep-Tactin®** 相互作用以较快速结合、离解动力学和介质结合亲和力为特征。快速动力学在柱色谱过程中支持较高的流量,其中快速结合动力学确保了有效结合,而快速离解动力学实现了有效竞争洗脱。

[0006] 另一方面,当结合配偶体中的至少一个 (**Strep-tag®II** 融合蛋白或 **Strep-Tactin®**) 以低浓度应用或存在时,介质结合亲和力和快速离解动力学是限制的。第一种情况的实例是表达差,导致关于所述 **Strep-tag®II** 融合蛋白的提取物被稀释,或者在表达后使用大量缓冲液进行细胞裂解,或者向细胞培养上清液中分泌 **Strep-tag®II** 融合蛋白。在所有的实例中,需要将大量包含所述低浓度靶蛋白的样品应用于亲和柱,这经常导致柱穿透、**Strep-tag®II** 融合蛋白的重大损失以及产量减少。在对于这种介质结合亲和力相

互作用的不佳条件下所进行的其它不同工作,是稀释**Strep-Tactin®**反应配偶体,相比于柱提纯,其就分批纯化而言同样可能导致减少**Strep-tag®II**融合蛋白的产量。

[0007] 通过开发Di-tag亲和标签(类似或细微差别的序列,还已知名为**Strep-tag®III**、**One-STrEP-tag**或**Twin-Strep-tag®**)减少了上述限制,该Di-tag亲和标签由通过短的连接序列连接的两个(或更多个)**Strep-tag®II**部分的顺序排列组成。该连接序列以及链霉亲和素结合部分的使用可以有不同变化。Di-tag序列的实例是di-tag3序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Gly GlyGlySer)<sub>3</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 103)或di-tag2序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:109) (Junttila等人,Proteomics 5 (2005) 1199-1203; 美国专利7,981,632)。结合力改进的生化原因是亲和力(avidity)效应,即两个链霉亲和素结合部分与四聚体**Strep-Tactin®**的组合协同结合。这在非竞争条件下将较快的解离速率转变为更为稳定的结合,同时通过加入逆转该协同效应的竞争者来保持有效的洗脱效率。实际上,Di-tag具有**Strep-tag®II**所有的有益应用特性,包括在竞争条件下有效洗脱,但是另外在需要更为稳定的结合的应用中实现了更广泛的用途。然而这存在一个缺点,Di-tag与短**Strep-tag®II**相比,其具有相当大的尺寸(3倍),这对融合重组蛋白有更大可能会造成负面影响。

[0008] 除了亲和纯化外,关于结合亲和力和离解动力学,还有测定可能要求相当高,特别是在要求深度洗涤时。因此,如果要被分析的**Strep-tag®II**融合蛋白与涂覆有**Strep-Tactin®**的固相结合,由于相对较快的离解动力学,洗涤期间时可能会有重大损失,最终导致整体测定的敏感性减少。实例为ELISA或BiaCore™或石英晶体微天平(QCM)实验,其中将重组**Strep-tag® (II)**融合蛋白固定于分别各自涂覆有**Strep-Tactin®**的微孔板或CM5芯片或传感器表面。例如对于以下应用同样如此:在所述应用中少量的固定于固相的**Strep-tag® (II)**融合蛋白通过**Strep-Tactin®**检测,该**Strep-Tactin®**以敏感方式偶联到标记。实例为ELISA或蛋白质印迹或基于细胞的测定实验,在所述实验中将重组**Strep-tag® (II)**融合蛋白分别固定于或结合于微孔板或薄膜(硝化纤维素/PVDF)或细胞膜。例如当标记的**Strep-Tactin®**能够经由FACS来检测结合的**Strep-tag® (II)**蛋白时,也可以将细胞膜看作为固相。实际上,随着对于**Strep-tag (II)**或Di-tag的结合亲和力增大,利用链霉亲和素突变蛋白能改进任何检测**Strep-tag® (II)**融合蛋白的方法。

[0009] 由于上述原因,仍然期望这样的链霉亲和素突变蛋白:所述链霉亲和素突变蛋白比US 6,103,493公开的那些突变蛋白对于短**Strep-tag (II)**具有更高的结合亲和力。有了这样的链霉亲和素突变蛋白,可以使应用使用短**Strep-tag®II**亲和标签成为可能,而所述应用目前仅通过使用Di-tag才可行。并且,对于链霉亲和素结合肽比US 6,103,493的链霉亲和素突变蛋白具有更高结合亲和力的链霉亲和素突变蛋白,还可以增强如Di-tag融合蛋白在纯化、检测或测定方面的应用。此类应用的实例在以下应用中要求较高:上述纯化应用

中;和/或以成批形式捕获稀释的Di-tag融合蛋白,例如捕获具有链霉亲和素突变蛋白涂覆的磁珠的复合物;和/或检测分析,其中需要组合深度洗涤的最高灵敏性。同样可以期望亲和力和力增强的链霉亲和素突变蛋白用于以下应用:将融合蛋白最稳定固定,所述融合蛋白携带链霉亲和素亲和标签例如 **Strep-tag®II** 或Di-tag,其中这些融合蛋白要在固相上被表征或被测定或被检测,所述固相如表面等离子共振 (SPR) 芯片,芯片上涂覆有所述链霉亲和素突变蛋白,并且其中可选择地,涂覆有所述链霉亲和素突变蛋白的所述固相可易于在温和条件下再生,这意味着从第一个 **Strep-tag®II** 或Di-tag融合蛋白再次解放,到准备好与另一个 **Strep-tag®II** 或Di-tag融合蛋白结合。

[0010] 因此,本发明的目的是提供一种链霉亲和素突变蛋白,其相比于美国专利6,103,493公开的那些突变蛋白,对于链霉亲和素结合肽如 **Strep-tag®II** 和/或Di-tag亲和肽具有更高的亲和力。

## 发明内容

[0011] 第一个方面,本发明提供一种链霉亲和素突变蛋白,其中所述链霉亲和素突变蛋白

[0012] (a) 包含至少两个在如SEQ ID NO:15所示野生型链霉亲和素的氨基酸序列相关的氨基酸位点44至53的区域中的半胱氨酸残基,以及

[0013] (b) 对于包含氨基酸序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:100) 的肽配体,具有比以下各蛋白更高的结合亲和力

[0014] (i) 包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:98) 的链霉亲和素突变蛋白,或者

[0015] (ii) 在氨基酸位点44至47包含氨基酸序列Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:99) 的链霉亲和素突变蛋白,或者

[0016] (iii) 野生型链霉亲和素 (SEQ ID NO:15)。

[0017] 第二个方面,本发明提供一种链霉亲和素突变蛋白,其中所述链霉亲和素突变蛋白

[0018] (a) 包含至少一个在与如SEQ ID NO:15所示野生型链霉亲和素的氨基酸序列相关的氨基酸位点115至121的区域中的突变,以及

[0019] (b) 对于包含氨基酸序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:100) 的肽配体,具有比以下各蛋白更高的结合亲和力

[0020] (i) 包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:98) 的链霉亲和素突变蛋白,或者

[0021] (ii) 在氨基酸位点44至47包含氨基酸序列Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:99) 的链霉亲和素突变蛋白,或者

[0022] (iii) 野生型链霉亲和素 (SEQ ID NO:15)。

[0023] 第三个方面,本发明提供一种核酸分子,其包含编码根据第一方面或第二方面的链霉亲和素突变蛋白的序列。所述核酸可以是载体,其包含在可操作地功能性环境中的至少一个拷贝的此核酸分子。

[0024] 第四个方面,本发明提供一种用根据第三个方面的核酸或载体转化或转染的细胞。

[0025] 本发明还提供一种制备根据第一个方面或第二个方面的链霉亲和素突变蛋白的方法,所述方法包括:

[0026] (a) 用包含编码所述链霉亲和素突变蛋白的核酸的载体转化适当的宿主细胞;

[0027] (b) 在其中发生所述链霉亲和素突变蛋白的表达的条件下培养所述宿主细胞;

[0028] (c) 分离所述突变蛋白。

[0029] 本发明还提供一种分离、纯化或测定蛋白的方法,所述蛋白与以下肽序列融合:a) 式Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa (SEQ ID NO:101) 的肽序列,其中Xaa代表任意氨基酸,Yaa和Zaa均表示Gly,或者Yaa表示Glu而Zaa表示Arg或Lys,或b) 包含至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列的肽序列,其中所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,其中一个结合模块具有3至8个氨基酸并至少包含序列-His-Pro-Baa-,其中Baa是谷氨酰胺、天冬酰胺或蛋氨酸,并且其中另一个结合模块具有序列-Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa- (SEQ ID NO:108),其中Oaa为Trp、Lys或Arg,Xaa为任意氨基酸,并且其中Yaa和Zaa均为Gly,或者Yaa为Glu而Zaa为Lys或Arg,所述方法包括在适当的条件下,使包含所述蛋白的样品与如本文所述的链霉亲和素突变蛋白接触,以使所述肽序列结合于所述链霉亲和素突变蛋白,和从所述样品中分离得到的复合物。

[0030] 本发明还提供一种固定蛋白的方法,所述蛋白与以下肽序列融合:a) 式Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa (SEQ ID NO:101) 的肽序列,其中Xaa代表任意氨基酸,Yaa和Zaa均表示Gly或者Yaa表示Glu而Zaa表示Arg或Lys,或b) 包含至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列的肽序列,其中所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,其中一个结合模块具有3至8个氨基酸并至少包含序列-His-Pro-Baa-,其中Baa是谷氨酰胺、天冬酰胺或蛋氨酸,并且其中另一个结合模块具有序列-Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa- (SEQ ID NO:108),其中Oaa为Trp、Lys或Arg,Xaa为任意氨基酸,并且其中Yaa和Zaa均为Gly,或者Yaa为Glu而Zaa为Lys或Arg,所述方法包括在用于固定所述蛋白的条件下,使所述蛋白与固相接触,所述固相携带根据第一个或第二个方面的链霉亲和素突变蛋白。

[0031] 本发明还提供检测或分离物质的方法,所述物质携带能够结合于链霉亲和素的基团,所述方法包括在用于与其结合的适当条件下,使所述物质与所述链霉亲和素突变蛋白接触,和检测或分离所述物质。

[0032] 本发明还提供试剂盒,其包含如本文所述的链霉亲和素突变蛋白,和选自常规缓冲剂、辅助物质和添加剂的至少一种试剂。本发明还提供固定在固体支持物上的如本文所述的链霉亲和素突变蛋白,所述固体支持物例如色谱树脂、ELISA板或表面等离子体共振 (SPR) 测量芯片。

[0033] 通过以下说明、附图和非限制性实施例更全面理解本发明的这些方面。

[0034] 发明详述

[0035] 在进化研究方法中目前惊奇地发现,链霉亲和素突变蛋白对于 **Strep-tag®II** 亲和肽 (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) 的结合亲和力能够以不同方式显著增大。在 first 组试验中,与US 6,103,493公开的突变蛋白“1” (SEQ ID NO:112) (44-47=VTAR) 和突变蛋白“2” (SEQ ID NO:113) (44-47=IGAR) 的结合亲和力相比,链霉亲和素突变蛋白对

**Strep-tag®II** 具有显著增大的结合亲和力,这通过在氨基酸44至53的区域中引入二硫键来获得。在第二组试验中,在氨基酸位点115至121的区域中的突变能够改进对于**Strep-tag®II**的结合亲和力。在氨基酸位点115至121的区域中观察到相似的突变/氨基酸交换,无论以氨基酸44至53的区域中哪一个链霉亲和素突变蛋白用作起点,即US 6,103,493公开的突变蛋白“1”,或本发明最优选的包含二硫化物的突变蛋白,由此表明通过在氨基酸位点115至121的区域中的突变发现的亲和力增加不依赖于氨基酸44至53的序列。因此,本发明这两个方面的每一个均提高了包括野生型链霉亲和素(wt-链霉亲和素)的任意链霉亲和素突变蛋白对于**Strep-tag®II**的结合亲和力。

[0036] 本发明所述的链霉亲和素突变蛋白可对应于位于氨基酸位点115至121的区域之外的wt-链霉亲和素的氨基酸序列。另一方面,根据本发明的氨基酸序列还可以不同于位于氨基酸位点115至121的区域之外的wt-链霉亲和素序列。同样地,本发明的在氨基酸44至53的区域中包含两个半胱氨酸残基的链霉亲和素突变蛋白,在链霉亲和素其它序列位点也可以具有突变。所述链霉亲和素序列的这种变体包括天然存在的变体以及人工产生的变体,这种变形被理解为置换,包括US 6,103,493公开的那些,所述那些包含二硫键、插入、氨基酸残基的缺失以及N-或/和C-端缺失或添加。

[0037] 如本文使用的术语“更高的亲和力”或“更高的结合亲和力”意为,针对根据本发明的链霉亲和素突变蛋白与所述**Strep-tag®II** (WSHPQFEK) 肽配体组成的复合物测量得到的亲和力,与**Strep-tag®II** 配体与以下物质形成的复合物的亲和力相比较:(i) 包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:98) 的链霉亲和素突变蛋白,或(ii) 在氨基酸位点44至47包含氨基酸序列Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup> (SEQ ID NO:99) 的链霉亲和素突变蛋白,或(iii) 野生型链霉亲和素 (SEQ ID NO:15)。但是也有可能,本发明所述突变蛋白相比较于野生型(wt)链霉亲和素或由美国专利6,103,493或欧洲专利0 835 934已知的链霉亲和素突变蛋白“1”和“2”,其对于其它链霉亲和素结合肽例如WRHPQFGG (**Strep-tag®**) 或SEQ ID NO:103的Di-tag3还具有更高的亲和力。

[0038] “更高的亲和力”或“更高的结合亲和力”例如能够使用待比较的固定于**Sepharose®**的链霉亲和素变体(wt-链霉亲和素;根据美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白和根据本发明的链霉亲和素突变蛋白)和所述**Strep-tag®II** 来测定,所述**Strep-tag®II** 作为与红色蛋白细胞色素b562的C-端融合蛋白。所述细胞色素b562-**Strep-tag®II** 融合蛋白与固定于**Sepharose®**的不同链霉亲和素变体的结合亲和力,可以在色谱法实验中视觉获得,所述色谱法实验中,将细胞色素b562-**Strep-tag®II** 融合蛋白上样于具有不同固定的链霉亲和素突变蛋白的柱子,并随后进行洗涤所述柱子。用大量缓冲液洗涤柱子,引发细胞色素b562-**Strep-tag®II** 融合蛋白从含有固定的链霉亲和素(突变蛋白)的**Sepharose**柱子中渗出。这一效应相比于离解动力学更与结合亲和力相关,这是因为,只要洗涤缓冲液的流量适中,就能在密集填充有链霉亲和素突变蛋白涂覆的树脂的柱基质中实现有效再结合。因此,较低的结合亲和力降低了柱子对于要被纯化的

**Strep-tag®II** 融合蛋白的性能,原因在于,取决于所应用的洗涤缓冲液体积,蛋白会从最大上样的亲和柱子上丢失。也就是说,在 **Strep-tag®II** 融合蛋白和固定于柱子的链霉亲和素突变蛋白之间的结合亲和力较高时,产能递减效应不太明显。在这样一种基于色谱法的检测方案中,测试结合亲和力的另一种方式是将具有C-端 **Strep-tag®II** 的相对大体积的稀释的有色细胞色素b562应用于含有不同固定的链霉亲和素突变蛋白的柱子,并且测定柱子上标记的细胞色素b562的富集。柱子上含有的链霉亲和素突变蛋白对于 **Strep-tag®II** 具有较高的亲和力,则富集越为明显。测量是通过将 **Strep-tag®II** 融合蛋白以某个流量(必须控制为在进行比较的所有情况下相似)应用到具有不同固定的链霉亲和素突变蛋白的柱子,以这种方式测定的结合亲和力由例如结合和离解速率常数( $k_{on}$ 和 $k_{off}$ )的参数决定,该常数意为动力学参数而不是热力学平衡参数。实际上,在这样一种基于流量的测定中,某种亲和力的相互作用(其由较快的结合和离解动力学决定,由此在柱子上接近或达到较快的平衡)比由较慢动力学决定的相等亲和力的相互作用更为可取。

[0039] 使用这些基于色谱法的系统来评价结合亲和力的优势在于,其几乎相当于亲和纯化,所述亲和纯化是本发明所述链霉亲和素突变蛋白最重要的实际应用之一,由此避免测量方法依赖性的变动,这指出了有利的差别,这些差别并不能被转化为亲和色谱的实际优势,正如上文所解释的,性能不仅取决于整体亲和常数还取决于潜在动力学。利用细胞色素b562作为对于亲和标签 **Strep-tag®II** 的融合配偶体(所述细胞色素b562与细菌碱性磷酸酶无关,所述细菌碱性磷酸酶在文库筛选期间用作融合配偶体来选择不同的链霉亲和素突变蛋白),确保了在结合亲和力评价的这些测定中所观察到的差异是归因于链霉亲和素突变蛋白和 **Strep-tag®II** 之间的相互作用,而不是链霉亲和素突变蛋白和细菌碱性磷酸酶之间的非特异性相互作用,所述细菌碱性磷酸酶有可能在筛选期间被选出。

[0040] 用于结合亲和力评价的另一种测定是ELISA,其通过利用固定于微孔板的孔的突变蛋白,并将不同浓度的融合至酶如细菌碱性磷酸酶的 **Strep-tag®II**, 然后根据所应用的浓度来测量复合物形成程度。链霉亲和素突变蛋白和 **Strep-tag®II** 肽之间的结合亲和力的离解常数( $K_D$ )能够例如如美国专利6,103,493的实施例5或如本文实施例10中所述被测定。

[0041] 测定结合亲和力的其他方法为荧光滴定(如美国专利6,103,493的实施例6中所述)、滴定量热法或表面等离子体共振(SPR)测量例如BiaCore™测量。以这种方式测定的结合亲和力由参数例如亲和力常数( $K_A$ )或离解常数( $K_D$ )决定,或在SPR测量例如BiaCore™时,还由参数例如亲和速率常数( $K_{on}$ )和离解速率常数( $K_{off}$ )决定。

[0042] 采用根据本发明的经修饰的链霉亲和素突变蛋白获得的结合亲和力的增加(独立于用于测定结合亲和力的方法)通常为至少1.1倍,优选至少1.2倍,更优选至少1.5倍,更优选至少2倍,更优选至少3倍,更优选至少5倍,更优选至少10倍,更优选至少20倍,与未经修饰的链霉亲和素(突变蛋白)相比,该根据本发明的经修饰的链霉亲和素突变蛋白是在氨基酸位点115至121的区域内进行的修饰,和/或在氨基酸位点44至53的区域内包含二硫键。

[0043] 根据本发明优选的链霉亲和素突变蛋白包含至少一个由在位点45和52的半胱氨酸



酸残基形成的二硫键,由此连接所述氨基酸位点45和52。在这个实施方案中,氨基酸44典型地是甘氨酸或丙氨酸,氨基酸46典型地是丙氨酸或更优选为甘氨酸,氨基酸47典型地是精氨酸。

[0044] 根据本发明其它优选的链霉亲和素突变蛋白包含至少一个在氨基酸位点117、120和121的突变,和/或包含氨基酸118和119的缺失和至少是氨基酸121的置换。

[0045] 从本发明明确看出,环中的氨基酸缺失不仅被容许,而且对于改进 **Strep-tag®II** 结合亲和力而言可能甚至是有利的,以使得在本发明内为了更高的结合亲和力而指定的位点上的优选变化之外还包含另外的缺失、置换或添加的链霉亲和素突变蛋白也都落入本发明的保护范围。

[0046] 因此,如本文使用的术语“突变”还包括氨基酸残基的缺失。然而在这方面注意到,本发明不涵盖这样的链霉亲和素突变蛋白:在所述链霉亲和素突变蛋白中,链霉亲和素的氨基酸114至121 (TTEANAWK) 的整个环或链霉亲和素的氨基酸115至121 (TEANAWK) 的环区域缺失。而是在于氨基酸115至121的区段内包含一个或多个突变的突变蛋白中,在位点115至121中的一个上存在至少一个氨基酸。在这些实施方案中的一些中,在位点117、118、119、120和121存在氨基酸,同时在位点118和/或119的氨基酸缺失。因此,在这类突变蛋白中,由序列位点115至121形成的区段被缩短一个或两个氨基酸。本发明不涵盖其中氨基酸115至121的整体区段缺失的突变蛋白,与上述这一披露相一致的是,本发明不涵盖Fletcher等人,Journal of Biotechnology 2003中描述的链霉亲和素突变蛋白。这意味着下述链霉亲和素突变蛋白被排除:1.突变蛋白,在所述突变蛋白中,在序列位点114至121的野生型氨基酸残基Thr-Thr-Glu-Asp-Asn-Ala-Trp-Lys (TTEANAWK) 缺失。在Fletcher等人中将该突变蛋白命名为SAPV。2.在Fletcher等人中命名为SAPV-Alb5和SAPV-84的两种突变蛋白,在所述突变蛋白中缺失的九个氨基酸残基Thr-Thr-Glu-Asp-Asn-Ala-Trp-Lys被氨基酸序列HPYFYAP ELLFFAK或EGGKETLTPSELRLDV替代。

[0047] 根据本发明优选的链霉亲和素突变蛋白源自链霉亲和素变体,该变体在N-端或/和C-端缩短。特别优选本领域现有技术已知的N-端和C-端缩短的最小链霉亲和素。根据本发明优选的多肽在被诱变区域之外包含最小链霉亲和素的氨基酸序列,该最小链霉亲和素N-端起始于氨基酸位点10至16的区域中,C-端终止于氨基酸位点133至142的区域中。尤其优选的多肽在突变区域之外对应于这样的最小链霉亲和素,所述最小链霉亲和素包含从位点Ala13至Ser139的氨基酸序列,并且可选择地具有替代Ala13的N-端蛋氨酸残基。本申请中氨基酸位点的编号整体参考wt-链霉亲和素的编号 (Argarana等人,Nucleic Acids Res.14 (1986),1871-1882,还参见图3)。

[0048] 根据本发明尤其优选的在氨基酸位点115至121的区域中携带一个或多个突变的链霉亲和素突变蛋白以不同亚类为特征。

[0049] 首先,存在于位点117、120和121的氨基酸必须取决于在位点118和119的两个氨基酸的缺失是否存在而单独认识。图2A概述了在这两种不同情况下存在于位点117、120和121的氨基酸,并且所述氨基酸因此可在每一个情况下有助于改进的亲和力。

[0050] 无缺失的突变蛋白可以具备以下特征:最优选地,它们在位点117携带大疏水性残基如Trp、Tyr或Phe,或带电荷的残基如Glu、Asp或Arg,或大亲水性残基如Asn或Gln,或次优选地,携带疏水性残基Leu、Met或Ala,或携带极性残基Thr、Ser或His,与以下组合:i)在位

点120的小残基如Ser或Ala或最优的Gly,其随后与在位点121的疏水性残基组合,最优地与大体积疏水性残基如Trp、Tyr或Phe组合;或者与以下组合:ii)在位点120的疏水性残基,为Leu、Ile、Met或Val或更优选的Tyr或Phe,其随后与在位点121的小残基如Gly、Ala或Ser组合,或与Gln组合,或与疏水性残基如Leu、Val、Ile、Trp、Tyr、Phe或Met组合。

[0051] 缺失氨基酸位点118和119的突变蛋白可以具备以下特征:位点117可以是任意氨基酸,其中大体积疏水性残基如Phe、Tyr或Trp为次优选的,位点120因而最优为Trp,次优选为Val,而位点121也是疏水性氨基酸,最优为Met、Leu、Tyr或Phe,或者位点121是小亲水性残基,最优为Ser或The,或者位点121是Arg。表1-7概述了与随机化位点组合的所鉴定特定突变蛋白序列和在过滤夹心筛选测定中获得的信号强度的定性。

[0052] 在一些实施方案中,本发明的链霉亲和素突变蛋白最重要的特征在于,其对于在野生型序列的序列117至121的位点117、120和121具有第一序列基序,该第一序列基序在序列位点120包含Gly残基(Gly<sup>120</sup>)。这一基序优选在序列位点121携带Phe或Tyr,次优选为Met残基,并且在序列位点117携带Glu、Asp、Arg、His、Leu、Met、Asn、Gln、Thr或Ser残基,由此位点117在该基序中为较多变的。所述突变蛋白可在序列位点118和119具有野生型链霉亲和素氨基酸Asn<sup>118</sup>和/或Ala<sup>119</sup>(参见实验部分,其中Asn<sup>118</sup>和Ala<sup>119</sup>均不经受诱变,而是在筛选实验中保持恒定,还参见图2B)。然而也在本发明的保护范围内的是,Asn<sup>118</sup>和Ala<sup>119</sup>被另外的氨基酸残基替代。突变可为保守置换(例如Gln或Asp替代Asn<sup>118</sup>,或者例如Ser、Val或Ile替代Ala<sup>119</sup>),或为非保守置换(例如带正电荷的或疏水性氨基酸残基替代Asn<sup>118</sup>)。所述基序1可以因此以下述共有序列1为特征:Xaa<sup>117</sup>Gly<sup>120</sup>Yaa<sup>121</sup>,其中Xaa可为任意氨基酸,Yaa可为Phe或Tyr或Met。

[0053] 在对于位点117至121的第二序列基序中,本文公开的链霉亲和素突变蛋白在序列位点120包含疏水性或芳香族氨基酸残基。优选地,在序列位点120的疏水性或芳香族氨基酸为Tyr、Phe、Leu、Ile或Met。在此第二序列基序中,疏水性或芳香族氨基酸也可存在于序列位点121(独立地选自位点120)。优选地,在位点121的残基是Leu、Ile和Met,次优选为Gly、Gln、Trp、Ser、Ala或Val。另外,独立于序列位点120和121,这样的突变蛋白也可在序列位点117具有突变。优选地,在序列位点117的突变为Tyr或Phe,次优选为Arg、Trp或Gln残基。具有该第二序列基序的这样的突变蛋白,或者可具有野生型链霉亲和素氨基酸Asn<sup>118</sup>和/或Ala<sup>119</sup>,或者可在序列位点118和119具有突变的残基。该基序2可以因此以下述共有序列2为特征:Aaa<sup>117</sup>Baa<sup>120</sup>Caa<sup>121</sup>,其中Aaa可为Tyr、Phe、Arg、Trp或Gln,Baa可为Tyr、Phe、Leu、Ile或Met,Caa可为任意氨基酸。

[0054] 在本文公开的在序列位点117至121具有突变的链霉亲和素突变蛋白的第三序列基序中,在序列位点118和119的残基缺失。在上下文中,在序列位点117,优选His、Glu、Gln、Thr、Arg、Asn、Lys、Ser、Ala或Ile残基,在序列位点120,高度优选的氨基酸则为Trp或次优选为Val残基,而在序列位点121,优选Tyr、Leu、Met、Thr、Ser、Phe或Arg残基。该基序3则可以因此以下述共有序列3为特征:Daa<sup>117</sup>Eaa<sup>118</sup>Faa<sup>119</sup>Gaa<sup>120</sup>Haa<sup>121</sup>,其中Daa和Haa可为任意氨基酸,Eaa和Faa均缺失,Gaa可为Trp或Val。

[0055] 如表3至7可以看出,还发现具有改进的亲力的链霉亲和素突变蛋白不被共有序列1至3之一损害,从而共有序列1至3不能被视为限制性的。

[0056] 如表1至7公开,本发明的示例性链霉亲和素突变蛋白在野生型链霉亲和素氨基酸

序列的序列位点44至53和/或序列位点117至121具有SEQ ID NOs:18至97中任一种的序列之一。这些链霉亲和素突变蛋白或者可为在其它任意序列位点的任意野生型链霉亲和素序列,或者可为任意已知链霉亲和素突变蛋白序列,例如,在氨基酸位点44至47包含氨基酸序列Val<sup>44</sup>-Thr<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>(SEQ ID NO:98)或Ile<sup>44</sup>-Gly<sup>45</sup>-Ala<sup>46</sup>-Arg<sup>47</sup>(SEQ ID NO:99)的已知突变蛋白“1”或“2”的序列。

[0057] 在一些实施方案中,本发明所述突变蛋白在序列位点117至121包含SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:65的氨基酸序列,以及在任意其他位点的野生型链霉亲和素序列、突变蛋白“1”或突变蛋白“2”的序列。

[0058] 在其它示例性实施方案中,本发明的链霉亲和素突变蛋白可包含图4所示的下述突变蛋白中任一个的序列组成,或由所述序列组成:m400,m402,m4001,突变蛋白“1”-m36,突变蛋白“1”-m23,突变蛋白“1”-m41,突变蛋白“1”-m4,突变蛋白“1”-m12,突变蛋白“1”-m22,突变蛋白“1”-m31,突变蛋白“1”-m32,突变蛋白“1”-m35,突变蛋白“1”-m38,突变蛋白“1”-m40,突变蛋白“1”-m42,突变蛋白“1”-m45,突变蛋白“1”-m46,突变蛋白“1”-m47,突变蛋白“1”-m7,突变蛋白“1”-m10,突变蛋白“1”-m17,突变蛋白“1”-m21,突变蛋白“1”-m24,突变蛋白“1”-m27,突变蛋白“1”-m28,突变蛋白“1”-m30,突变蛋白“1”-m33,突变蛋白“1”-m1,突变蛋白“1”-m3,突变蛋白“1”-m8,突变蛋白“1”-m15,突变蛋白“1”-m6,突变蛋白“1”-m9,突变蛋白“1”-m20,突变蛋白“1”-m34,突变蛋白“1”-m14,突变蛋白“1”-m18,突变蛋白“1”-m19,m4001-m8,m4001-m21,m4001-m9,m4001-m1,m4001-m2,m4001-m3,m4001-m5,m4001-m13,m4001-m14,m4001-m24,m4001-m4,m4001-m6,m4001-m7,m4001-m10,m4001-m15,m4001-m23,m4001-m17,m4001-m12,m4001-m20,突变蛋白“1”-m101,突变蛋白“1”-m106,突变蛋白“1”-m111,突变蛋白“1”-m100,突变蛋白“1”-m110,突变蛋白“1”-m104,突变蛋白“1”-m108,突变蛋白“1”-m207,突变蛋白“1”-m212,突变蛋白“1”-m202,突变蛋白“1”-m204,突变蛋白“1”-m206,突变蛋白“1”-m208,突变蛋白“1”-m203,突变蛋白“1”-m209,突变蛋白“1”-m200,突变蛋白“1”-m201,突变蛋白“1”-m211,突变蛋白“1”-m300,突变蛋白“1”-m301,突变蛋白“1”-m302,突变蛋白“1”-m303,突变蛋白“1”-m304和m1-9。

[0059] 对于本发明所述突变蛋白的实际应用而言(例如,亲和色谱法),其可有利的是使用配体,由于更高的结合亲和力或/和由于以比链霉亲和素结合肽更高的浓度存在,该配体能够分离链霉亲和素结合肽(例如如本文所述**Strep-tag® (II)**肽或Di-tag肽)与根据本发明的链霉亲和素突变蛋白的结合。通常该配体起到**Strep-tag® (II)**肽的竞争者的作用。该(竞争性)配体通常以游离形式存在,意为不与任何蛋白或其它分子融合。以这种方式,可以在非常温和的洗脱条件下释放(一般通过竞争洗脱)结合的链霉亲和素结合肽配体,或释放融合有链霉亲和素结合肽如**Strep-tag® (II)**肽或Di-tag肽的蛋白。这例如对于下述是重要的:将结合的融合蛋白从链霉亲和素突变蛋白亲和柱上洗脱,或者逆转多聚体低亲和力融合蛋白的结合,该多聚体低亲和力融合蛋白携带链霉亲和素结合肽并且经由本发明的链霉亲和素突变蛋白的骨架(多聚体)多聚体化。因此,在这方面,本发明涉及这样的链霉亲和素突变蛋白:该链霉亲和素突变蛋白对肽配体的结合亲和力使得它们可以通过其它链霉亲和素配体进行竞争洗脱,所述其它链霉亲和素配体例如生物素、亚氨基生物素、硫辛酸、

硫代生物素、脱硫生物素、二氨基生物素、HABA (羟基偶氮苯-苯甲酸) 或/和二甲基-HABA。使用有色物质如HABA或二甲基-HABA的优势在于,从柱子洗脱能够被视觉检测到。然而,除这些外,本发明链霉亲和素突变蛋白对肽配体、特别是如上文限定的 **Strep-tag®II** 的结合亲和力,高于潜在的wt-链霉亲和素或US6,103,493公开的突变蛋白“m1”或“m2”。因此,在一些实施方案中,更高的亲和力配体如硫代生物素或生物素优选进行高强度洗脱 (sharp elution)。或者,结合于生物素结合袋的分离的肽配体,如上述,可被用于竞争洗脱。为了表述完整性,本文指出链霉亲和素结合肽 (其通常与目标蛋白融合或缀合) 和本发明链霉亲和素突变蛋白的相互作用/结合可不仅需由竞争洗脱破坏,还通过能够破坏该非共价复合物的任何其它方式破坏。例如,如果这种融合蛋白固定于涂覆有本发明链霉亲和素突变蛋白的表面如表面等离子共振芯片、ELISA板或甚至是色谱树脂,该结合可随pH变化而被破坏,所述pH变化例如通过添加碱如NaOH (对比实施例13和14) 进行。这种方法甚至可对于表面等离子共振芯片或色谱树脂的再生是优选的。

[0060] 对于某些检测方法可优选的是以标记形式使用本发明的链霉亲和素突变蛋白。因此,本发明进一步的主题为根据本发明的多肽,其特征在于携带至少一个标记。适当的标记基团是本领域技术人员已知的,包括常用的放射性标记、荧光标记、发光标记和生色标记,以及产生能够在化学或酶促反应中测定的物质的物质和酶。关于这方面,wt-链霉亲和素的所有已知标记也能够偶联于根据本发明的链霉亲和素突变蛋白。

[0061] 本发明的另一方面涉及包含编码本发明链霉亲和素突变蛋白的序列的核酸。可选择地,该核酸可操作地连接至编码信号肽的序列,在特定实施方案中,编码信号肽的序列是编码OmpA信号肽的序列。此外还可以使用其它信号肽,取决于使用的表达系统或宿主细胞,这甚至可以是尤其优选的。大量此类信号肽都是本领域已知的,因此本文不再详述。然而,优选细胞质表达,即采用起始蛋氨酸代替信号肽 (参见 Schmidt & Skerra, J.Chromatogr. A676 (1994) 337-345)。

[0062] 本发明的另一个方面涉及包含在可操作地功能性环境中的至少一个拷贝的前述核酸的载体。可操作地功能性环境理解为那些使得能够、有利于、促进或/和增加表达的元件,所述表达即mRNA的转录或/和随后的处理。这些元件的实例为启动子、增强子、转录起始位点和终止位点、翻译起始位点、polyA-位点等。

[0063] 所述载体的选择取决于预期表达系统,对于此,可以考虑单拷贝质粒、多拷贝质粒以及促进核酸整合到宿主基因组中的介质。大量适当的载体是本领域已知的,因此本文不再详述。这些载体可选择地包含用于载体的标准元件,例如抗性、选择性标记物或/和例如能够实现核酸扩增或诱导表达的元件。

[0064] 本发明的另一个方面涉及细胞,该细胞用所述载体转化或转染,所述载体携带至少一个拷贝的编码根据本发明的链霉亲和素突变蛋白的核酸序列作为插入物。细胞的选择并非特别重要,通常而言可以使用任意适合这些目的细胞。可以考虑原核以及真核细胞、酵母菌。出于实际理由,通常优选原核细胞,在目前的情况下,尤其选择大肠杆菌来表达非糖基化的蛋白。

[0065] 本发明的还一个方面涉及制备根据本发明的链霉亲和素突变蛋白的方法,其特征在于以下步骤:

[0066] (a) 用包含编码链霉亲和素突变蛋白的核酸的载体转化适当的宿主细胞,

[0067] (b) 在其中发生所述链霉亲和素突变蛋白的表达的条件下培养所述宿主细胞,

[0068] (c) 分离多肽。

[0069] 关于制备方法,由于根据本发明的链霉亲和素突变蛋白能够结合于内源性生物素,因此它们可能产生毒性作用。因此,在培养宿主细胞时,应当选择所述条件,使得形成的表达产物通过适当的信号序列从使用的宿主细胞内部运送到例如周质中或到培养基中,或者该表达产物以不溶性包涵体的形式聚集在细胞内部。在前一种情况下,根据本发明的链霉亲和素突变蛋白可以从周质细胞级分或细胞上清液中分离出来,而在后一种情况下,根据本发明的方法的步骤(c)包括裂解宿主细胞,分离包涵体形式的链霉亲和素突变蛋白,和使链霉亲和素突变蛋白复性。在这种情况下,大肠杆菌是优选的宿主细胞。

[0070] 根据本发明的链霉亲和素突变蛋白或链霉亲和素突变蛋白/肽配体体系的实际应用,在实质上与常规链霉亲和素/生物素或链霉亲和素/肽配体体系相同。尤其是在以下情况下具备优势:在所述情况下,需要比天然链霉亲和素或如US 6,103,493公开的突变蛋白和肽配体之间的结合强度更高的结合强度,或者在所述情况下,无法将目标底物生物素化或比与肽配体的相应连接更困难。

[0071] 相比于常规链霉亲和素/生物素体系或如US 6,103,493公开的体系的优势尤其应用于亲和色谱法,以及应用于纯化、分离或测定重组蛋白的方法。因此本发明还涉及根据本发明的链霉亲和素突变蛋白在用于分离、纯化、检测或固定蛋白方法中的用途,所述蛋白与以下融合:a) 式Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa的肽序列,其中Xaa代表任意氨基酸,Yaa和Zaa均表示Gly,或者Yaa表示Glu而Zaa表示Arg或Lys,或b) 包含至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列的肽序列,其中所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,其中一个结合模块具有3至8个氨基酸并至少包含序列-His-Pro-Baa-,其中Baa是谷氨酰胺、天冬酰胺或蛋氨酸,并且其中另一个结合模块具有序列-0aa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-(SEQ ID NO:108),其中0aa为Trp、Lys或Arg,Xaa为任意氨基酸,其中Yaa和Zaa均为Gly,或者Yaa为Glu而Zaa为Lys或Arg。从国际专利申请W002/077018或美国专利7,981,632已知具有这种至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列的亲和肽。在所述分离、纯化或检测方法中,在适当的条件下,使含有要被分离或纯化的蛋白的液体与可选择地固定的链霉亲和素突变蛋白接触,以便将肽序列结合于链霉亲和素突变蛋白,将产生的复合物从液体中分离,从所述复合物中释放蛋白或检测。在一些实施方案中,所述肽序列优选**Strep-tag®II**。在其它实施方案中,所述肽序列优选di-tag3序列

(WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK;SEQ ID NO:103),在国际专利申请W002/077018或美国专利7,981,632描述的di-tag2序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)<sub>2</sub>-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(SEQ ID NO:109),或序列WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK(SEQ ID NO:110)。所述肽序列优选融合于蛋白的N-或/和C-端。所述链霉亲和素突变蛋白可结合于固相或可能结合于固相。

[0072] 在分离或纯化方法中利用根据本发明的链霉亲和素突变蛋白/肽配体体系的优势在于,可以使用非常温和的条件来洗脱携带肽配体的融合蛋白。因此,可以将与链霉亲和素突变蛋白偶联的固相,例如已吸附融合蛋白的亲和色谱柱,与足够浓度的选自生物素及其衍生物的配体一起孵育,以便再次从复合物中释放该融合蛋白。就此而论,证实生物素的使用是特别有利的。

[0073] 根据本发明的链霉亲和素突变蛋白可用于检测方法,其方式与已知用于常规链霉亲和素的相应方法实质上类似。另一个应用是定性或定量测定蛋白,该蛋白与以下融合:a) 式Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa的肽序列,其中Xaa代表任意氨基酸,Yaa和Zaa均表示Gly,或者Yaa表示Glu而Zaa表示Arg或Lys,或b) 包含至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列的肽序列,其中所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,其中一个结合模块具有3至8个氨基酸并至少包含序列-His-Pro-Baa-,其中Baa是谷氨酰胺、天冬酰胺或蛋氨酸,并且其中另一个结合模块具有序列-0aa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-(SEQ ID NO:108),其中0aa为Trp、Lys或Arg,Xaa为任意氨基酸,并且其中Yaa和Zaa均为Gly,或者Yaa为Glu而Zaa为Lys或Arg。该方法中,在适当的条件下使要被测定的蛋白与标记的链霉亲和素突变蛋白接触,以便将肽序列与所述链霉亲和素突变蛋白结合,洗涤,测定所述标记。这种测定方法可以例如定性地进行以在蛋白质印记中检测蛋白,或如在ELISA中定量测定蛋白。适当的标记为全部已知的放射性和非放射性标记基团,例如发光基团、酶、金属、金属配合物等。所述链霉亲和素可被直接标记,即通过共价偶联。然而,也可使用间接标记,如标记的抗链霉亲和素抗体或生物素化的酶等。

[0074] 相比于常规链霉亲和素/生物素体系或US 6,103,493公开的体系的优势还尤其应用于亲和色谱法和纯化、分离或测定细胞的方法中,该细胞优选哺乳动物细胞。上下文中的优选用途是其用于多聚体化低亲和配体(例如,包括但不限于Fab片段或MHC I分子),以用于融合于肽序列的特定细胞表面受体,所述肽序列具有式Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa,其中Xaa代表任意氨基酸,Yaa和Zaa均表示Gly,或者Yaa表示Glu而Zaa表示Arg或Lys。所述用途针对美国专利6,103,493中公开的链霉亲和素突变蛋白进一步描述于美国专利7,776,562或8,298,782中。还可将亲和配体用于此多聚体化/细胞的可逆染色或分离,该亲和配体融合于顺序排列的链霉亲和素结合模块如di-tag3序列

(WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK;SEQ ID NO:103)或描述于国际专利申请W002/077018或美国专利7,981,632的任意其它此种序列,连同本发明的链霉亲和素突变蛋白。本发明的链霉亲和素突变蛋白的更高的亲和力提供了具有改进的稳定性和使用性的多聚体试剂。为了可用于此类细胞纯化应用中,本发明的突变蛋白优选地进行多聚体化,以及可选择地用荧光染料直接标记,或固定于磁珠或任意其他固体支持物上。所述磁珠可为微或纳米珠,其它固体支持物可为如用于柱色谱法中的树脂,以进行柱纯化法,从而纯化细胞。

[0075] 本发明进一步有利的方面是根据本发明的链霉亲和素突变蛋白固定蛋白的用途,该蛋白与以下融合:a) 式Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa的肽序列,其中Xaa代表任意氨基酸,Yaa和Zaa均表示Gly,或者Yaa表示Glu而Zaa表示Arg或Lys,或b) 包含至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列的肽序列,其中所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,其中一个结合模块具有3至8个氨基酸并至少包含序列-His-Pro-Baa-,其中Baa是谷氨酰胺、天冬酰胺或蛋氨酸,并且其中另一个结合模块具有序列-0aa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-(SEQ ID NO:108),其中0aa为Trp、Lys或Arg,Xaa为任意氨基酸,并且其中Yaa和Zaa均为Gly,或者Yaa为Glu而Zaa为Lys或Arg。在一个实施方案中,所述肽序列是序列(WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK;SEQ ID NO:103)。在另一个实施方案中,所述肽序列是序列WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK(SEQ ID NO:110)。该固定优选在涂覆有本发明的链霉亲和素突变蛋白的固相上进行,所述固相如微孔板、珠子(例如由琼脂糖或其它聚

合物例如聚甲基丙烯酸酯制成)、由有机或顺磁性材料制成的微珠、由有机或顺磁性材料制成的纳米珠或传感器芯片,该芯片例如Biacore™芯片或其它例如用于横向流动分析或制备蛋白质阵列的载体。

[0076] 另外,当然也有可能在本发明的链霉亲和素/生物素(衍生物)体系中使用根据本发明的链霉亲和素突变蛋白。也就是说,这意味着根据本发明的链霉亲和素突变蛋白用于测定或分离携带能够结合于链霉亲和素的基团的物质。如果只是wt-链霉亲和素的一部分被根据本发明的链霉亲和素突变蛋白替代,在这种情况下经由混合四聚体的形成可获得特定效应。

[0077] 本发明的另一方面还涉及试剂盒,该试剂盒包含根据本发明的链霉亲和素突变蛋白和可选择的标准缓冲液、辅助物质和添加剂。这种试剂盒特别预期用于上述分离、纯化、测定或检测方法中的一个。然而,该试剂盒也适用于其它其中使用常规链霉亲和素/生物素体系的方法,例如用于核酸杂交测定或免疫测定。该试剂盒可包含根据本发明的作为游离、非修饰蛋白或/和以固相结合或/和标记形式的链霉亲和素突变蛋白。

[0078] 本发明还通过下述表格、附图和实施例进一步阐明。

[0079] 表格简要说明

[0080] 表1-7分别概述了分别从不同文库1-7筛选得到的不同链霉亲和素序列,包括在过滤夹心法测定中从不同的链霉亲和素突变蛋白获得的相对信号强度。用Xaa标出了随机化位点。作为比较,给出了wt-链霉亲和素和US6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”在相应位点的氨基酸(表4除外,其示出文库4的结果,其中由于这些突变蛋白来源于m4001,并非来源于US6,103,493的突变蛋白“1”,相同序列表示为本发明的m4001的)。因此,表3和5-7中所示的所有突变蛋白来源于美国专利6,103,493的突变蛋白“1”且因此关于氨基酸位点44-53的区域与美国专利6,103,493的突变蛋白“1”相同。表4的突变蛋白来源于本发明的突变蛋白m4001且因此关于氨基酸位点44-53的区域与本发明的突变蛋白m4001相同;

[0081] 表8上部示出了如通过描述于实施例10的ELISA针对复合物测定的结合亲和力结果,该复合物为融合于细菌碱性磷酸酶(BAP-StrepII)的 **Strep-tag®II** 和选择的本发明的链霉亲和素突变蛋白的复合物,所述结果为均源于美国专利6,103,493对于氨基酸位点44-53的突变蛋白“1”的氨基酸117-121区域中突变的那些突变蛋白(并非来自表4所示的包含二硫化物的本发明的突变蛋白m4001),与美国专利6,103,493的突变蛋白“1”和本发明的只在氨基酸位点44-53区域中突变的m402和4001进行比较。表8底部的阴影突出显示了,针对突变蛋白m1-9与上述所示m4001、m4及m23相比较,示出了通过不同的ELISA实验使用相同方案测定的结合亲和力结果。绝对亲和力结果指示了略低于上述实验中获得的相同链霉亲和素突变蛋白的亲和力数据。这证明了在该ELISA测定中m1-9的亲和力相比于突变蛋白“1”也获得了改进,从而证明能与融合于细菌碱性磷酸酶(BAP-StrepII)的 **Strep-tag®II** 结合。

[0082] 表9示出了如通过亲和色谱法实验,针对具有C-端融合的Strep-tagII的细胞色素b562在过载、之后在具有本发明的不同固定的链霉亲和素突变蛋白的Sephacrose柱子上进行限定洗涤后的保留而测定的结合亲和力结果,所述结果为均源于美国专利6,103,493对于氨基酸位点44-53的突变蛋白“1”的氨基酸117-121区域中突变的那些突变蛋白(并非来自包含二硫化物的本发明的突变蛋白m4001),与美国专利6,103,493的突变蛋白“1”和本发



明的只在氨基酸位点44-53区域中突变的m402和4001进行比较,以及与wt链霉亲和素比较。

[0083] 表10示出了如通过亲和色谱法实验,针对具有C-端融合的Strep-tagII的细胞色素b562在具有本发明的不同固定的链霉亲和素突变蛋白的Sepharose柱子上从稀溶液中捕获出来的结合亲和力结果,所述结果为均源于美国专利6,103,493对于氨基酸位点44-53的突变蛋白“1”的氨基酸117-121区域中突变的那些突变蛋白(并非来自包含二硫化物的本发明的突变蛋白m4001),与美国专利6,103,493的突变蛋白“1”和本发明的只在氨基酸位点44-53区域中突变的m402和4001进行比较,以及与wt链霉亲和素比较。

[0084] 表11示出了经由BiaCore™针对链霉亲和素突变蛋白“1”(此已知链霉亲和素突变蛋白具有图4顶部第2行(第2列)所示序列)和突变蛋白m1-9的动力学亲和性测量结果。所述突变蛋白m1-9在图4中显示为最后一个突变蛋白,为在位点117、120、121分别具有氨基酸Glu、Gly、Tyr的链霉亲和素突变蛋白,以及或者突变蛋白“1”(第2列)的序列。为进行BiaCore™测量,BiaCore™ S-CM5传感器芯片上的羧基采用标准EDC/NHS化学活化,突变蛋白“1”或突变蛋白m1-9经由氨基于2个不同密度下使用10mM pH5.0的醋酸盐作为缓冲剂进行偶联。以RU(任意单位)(第3列)给出了产生的相对固定量。为实现低密度固定,两个突变蛋白均以1μg/ml的浓度和10μl/min的流量应用。为实现以高密度固定,突变蛋白m1-9以20μg/ml的浓度使用,突变蛋白“1”以50μg/ml的浓度使用。该固定的突变蛋白“1”或突变蛋白m1-9与4种不同的重组表达且经由Strep-Tactin亲和色谱法纯化的融合蛋白的相互作用(所述融合蛋白即,在各自C-端具有链霉亲和素结合肽Strep-tagII的绿色荧光蛋白(GFP)(GFP-StrepII,SEQ ID NO:104),或具有链霉亲和素结合肽di-tag3的GFP(GFP-di-tag3,SEQ ID NO:105),与具有Strep-tagII的细胞色素b562(Cytb562-StrepII,SEQ ID NO:106),或具有di-tag3的细胞色素b562(Cytb562-di-tag3,SEQ ID NO:107);第1列,参见附录1的如从重组基因推导的氨基酸序列),在25℃下在Biacore T100仪器上,使用10mM HEPES(pH 7.4)、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.005% Tween 20作为电泳缓冲液(running buffer),进行分析。分析之前,该融合蛋白制备物针对缓冲液W(100mM Tris-Cl pH8、150mM NaCl、1mM EDTA)进行透析,经过分析性尺寸排阻色谱法检查其是否基本上不含有聚集体(可接受的最大含量为5%,在大部分情况下,其含量在1%以下),来确保能够只测量单价融合蛋白和固定的链霉亲和素突变蛋白的相互作用。在浓度为74nM、222nM、667nM、2000nM和6000nM下,分析170RU或4350RU突变蛋白m1-9与Cytb562-StrepII的相互作用;在浓度为1.2nM、3.7nM、11.1nM、33.3nM和100nM下,分析170RU或4350RU突变蛋白m1-9与Cytb562-di-tag3的相互作用;在浓度为11.1nM、33.3nM、100nM、300nM和900nM下,分析170RU或4350RU突变蛋白m1-9与GFP-StrepII的相互作用;在浓度为3.7nM、11.1nM、33.3nM、100nM和300nM下,分析170RU或4350RU突变蛋白m1-9与GFP-di-tag3的相互作用;在浓度各自为0.22nM、0.66nM、2nM、6nM和18μM下,分析325RU或5567RU突变蛋白“1”与Cytb562-StrepII或Cytb562-di-tag3的相互作用;在浓度各自为11.1nM、33.3nM、100nM、300nM和900nM下,分析325RU或5567RU突变蛋白“1”与GFP-StrepII或GFP-di-tag3的相互作用。使用动力学整体拟合(Langmuir 1:1)拟合数据,第4列、第5列、第6列分别示出得到的结合和离解速率与推导出的离解常数。由Biaffin GmbH&Co KG,Kassel,Germany,测量BiaCore数据。

[0085] 表12表示使用粗裂解液(大肠杆菌)进行的GFP-StrepII融合蛋白亲和色谱重复循环结果:在生物分析仪2100(安捷伦科技公司)上在缓冲液W中加入10mM生物素之后,通过分



析柱子的洗脱液来测定所述融合蛋白的产量和纯度。

[0086] 表13是便览表,指示出分配给本申请中公开的每个核苷酸和肽序列的序列标识符。

### 附图说明

[0087] 图1示出的两个图各自示出了在ELISA中美国专利6,103,493中公开的重组链霉亲和素突变蛋白“1”与选择的两个根据本发明的链霉亲和素突变蛋白相比较的结合亲和力。

[0088] 图1A示出了,与美国专利6,103,493公开的链霉亲和素突变蛋白“1”相比较,在ELISA中,表2中所示本发明的包含二硫化物的链霉亲和素突变蛋白m4001对肽配体 **Strep-tag®II** 具有改进的亲和力。为进行此实验,ELISA板的各行均各自涂覆有相等浓度的相应重组链霉亲和素突变蛋白“1”(菱形)和m4001(三角形)。用BSA饱和并洗涤后,在图中所示浓度下,用纯化的融合蛋白培养这些孔,该纯化的融合蛋白由大肠杆菌碱性磷酸酶 **Strep-tag®II** 融合蛋白(BAP-StrepII)组成,其由pASK75-phoA表达,序列为SEQ ID NO.1所示,通过 **Strep-Tactin®** 亲和色谱法得到纯化。在洗涤去除未结合的蛋白后,在对硝基苯磷酸酯的存在下,测量结合的BAP-StrepII融合蛋白的活性。使用非线性回归最小二乘法误差方法拟合数据。获得下述 $K_D$ 值:美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”为 $0.11\mu\text{M}$ , m4001(+)为 $0.02\mu\text{M}$ 。还显示m4001(+)和美国专利6,103,493(x)的链霉亲和素突变蛋白“1”在每个浓度下的拟合值,证实了实验数据与拟合相当一致。

[0089] 图1B示出了,与美国专利6,103,493公开的链霉亲和素突变蛋白“1”相比较,在ELISA中,表3中所示本发明的链霉亲和素突变蛋白m4对肽配体 **Strep-tag®II** 具有改进的结合亲和力。为进行此实验,ELISA板的各行均各自涂覆有相等浓度的相应重组链霉亲和素突变蛋白“1”(菱形)和m4(三角形)。用BSA饱和并洗涤后,在图中所示的浓度下,用纯化的融合蛋白培养这些孔,该纯化的融合蛋白由大肠杆菌碱性磷酸酶 **Strep-tag®II** 融合蛋白(BAP-StrepII)组成,其由pASK75-phoA表达,序列为SEQ ID NO.1所示,通过 **Strep-Tactin®** 亲和色谱法得到纯化。在洗涤去除未结合的蛋白后,在对硝基苯磷酸酯的存在下,测量结合的BAP-StrepII融合蛋白的活性。使用非线性回归最小二乘法误差方法拟合数据。获得下述 $K_D$ 值:美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”为 $0.11\mu\text{M}$ , m4为 $0.009\mu\text{M}$ 。还显示m4(+)和美国专利6,103,493(x)的链霉亲和素突变蛋白“1”在每个浓度下的拟合值,证实了实验数据与拟合相当一致。

[0090] 图2A示出了关于突变的非限制性回顾,所述突变在见于本发明链霉亲和素突变蛋白中的序列位点117至121,其中序列位点经受诱变。图2A示出了见于其中存在氨基酸残基118和119的突变蛋白中的突变,以及见于其中缺失氨基酸残基118和119的突变蛋白中的突变。

[0091] 图2B示出了,本发明的在链霉亲和素序列残基残基117至121的肽区段内具有至少一个突变的突变蛋白的序列基序。优选的残基以黑体表示,次优选的残基正常显示。氨基酸残基应被认为是按位点的,并且每一个在原则上可与在另一个位点上存在的任意其他残基结合。序列基序1的特征在于,在位点120高度优选甘氨酸,并且其可与大疏水性残基组合,

优选酪氨酸或苯丙氨酸;或者次优选地,在位点121为蛋氨酸,并且其与带电荷的、优选谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸或组氨酸组合;或者次优选地,在位点117为亲水性残基,如谷氨酰胺、天冬酰胺、丝氨酸或苏氨酸,或为疏水性残基,如亮氨酸或蛋氨酸。序列基序2的特征在于,在位点120高度优选大疏水性残基来代替小甘氨酸,该大疏水性残基优选酪氨酸或苯丙氨酸但不是色氨酸,而在位点120亮氨酸、异亮氨酸或蛋氨酸为次优选的。然后,在位点117和121还优选疏水性残基,由此对于位点117优选芳香族酪氨酸或苯丙氨酸,而对于位点121优选大的但并非芳香族的疏水性残基,该大的但并非芳香族的疏水性残基最优选亮氨酸、异亮氨酸和蛋氨酸。对于位点117,次优选的残基为精氨酸、色氨酸或谷氨酰胺,对于位点121,次优选的残基为谷氨酰胺、甘氨酸、色氨酸、丝氨酸、丙氨酸或缬氨酸。序列基序3的特征在于,在位点118和119的氨基酸缺失。这种情况下,高度优选在位点120的色氨酸,而次优选缬氨酸,并且这些残基可优选与在位点121的酪氨酸组合,由此在位点121还可存在其它残基如亮氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸或精氨酸,以及最优选地在位点117可存在氢键受体和/或供体如组氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸,或次优选还有其它残基如苏氨酸、精氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、丝氨酸、丙氨酸或异亮氨酸。

[0092] 图3示出野生型链霉亲和素 (SEQ ID NO:15) 序列位点14至139的氨基酸序列。

[0093] 图4示出实验产生的所有突变蛋白的氨基酸序列,并且所述氨基酸序列在本文通过与野生型链霉亲和素和美国专利6,103,493中描述的突变蛋白“1”和“2”的氨基酸位点14至139的氨基酸序列进行比对而表征。当所述突变蛋白由大肠杆菌分泌至周质时,如在过滤夹心测定中筛选期间,所得产生的蛋白序列在N-端(位点13)附加了丙氨酸。当大肠杆菌在细胞质中产生所述突变蛋白时,该突变蛋白作为包涵体进行随后的重新折叠、纯化和分析,所得产生的蛋白序列如所示在N-端(位点13)附加了蛋氨酸。破折号(-)表示缺失的氨基酸。在缺失的情况下,以保持相同位点的可比性的方式,进行氨基酸编号。然而,需要注意的是,包含缺失的分子的长度减少缺失的数目,对于图4所述相应的突变蛋白,缺失的数目为2。这意味着,图4中无缺失的突变蛋白包含的氨基酸总数为127,而那些有缺失的突变蛋白包含的氨基酸总数为125。由不同文库中随机密码子产生的氨基酸残基由黑体表示。如图4所示,当所述突变蛋白由大肠杆菌分泌至周质时,如在过滤夹心测定中筛选期间,所得产生的蛋白序列如上所示在N-端(位点13)附加了丙氨酸。当大肠杆菌在细胞质中产生所述突变蛋白时,该突变蛋白作为包涵体进行随后的重新折叠、纯化和分析,所得产生的蛋白序列如所示在N-端(位点13)附加了蛋氨酸。破折号(-)表示缺失的氨基酸。在缺失的情况下,以保持相同位点的可比性的方式,进行氨基酸编号。然而,需要注意的是,包含缺失的分子的长度减少缺失的数目,对于图4所述相应的突变蛋白,缺失的数目为2。这意味着,图4中无缺失的突变蛋白包含的氨基酸总数为127,而那些有缺失的突变蛋白包含的氨基酸总数为125。不同文库中随机密码子产生的氨基酸残基由黑体表示。

## 具体实施方案

[0094] 一般方法

[0095] 使用传统的基因工程方法(参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning.A Laboratory Manual(1989),Cold Spring Harbor Press)进行DNA操作。大肠杆菌K12TG1 (Stratagene)用于分泌的链霉亲和素突变蛋白的文库表达,大肠杆菌K12TOP10 (Life

Technologies) 用于克隆和文库表达, 大肠杆菌K12JM83 (Yanisch-Peron等人, (1985), Gene 33, 103-119) 用于大肠杆菌细胞色素b562和碱性磷酸酶的周质表达, 所述大肠杆菌细胞色素b562和碱性磷酸酶均融合于Strep-tagII。根据Schmidt和Skerra (1994), 如前述, 进行突变蛋白的细胞质表达, 用于随后的蛋白分离, 以缀合到Sepharose或用于涂覆微孔板。通过Sequence Laboratories Göttingen GmbH, 根据标准双脱氧技术, 进行质粒测序。利用Applied Biosystems Expedite DNA合成仪合成引物和寡核苷酸。

[0096] 实施例1: 制备文库1

[0097] 使用pfu-聚合酶 (Fermentas) 及以下引物P1和P2, 通过pASK-IBA2-SAm1的PCR扩增, 制备具有DNA序列的质粒库, 该DNA序列编码在氨基酸位点44至52 (关于wt-链霉亲和素) 的区域中经诱变的链霉亲和素衍生物。

[0098] P1: 5'-TCG TGA CCG CGG GTG CAG ACG GAG CTC TGA CCG GTA CCT ACN N(C/G) N N(G/T) G CGC GTG GCA ACG CCG AGN N(C/G) C GCT ACG TCC TGA CCG GTC GTT (SEQ ID NO.5), 其中3'端的T经由硫代磷酸酯键连接, 以及

[0099] P2: 5'-AGT AGC GGT AAA CGG CAG A (SEQ ID NO.6)。

[0100] 以这种方式产生DNA序列, 该DNA序列在链霉亲和素突变蛋白“1”的位点44、45和52中每一个上包含32倍简并密码子或包含终止密码子, 所述32倍简并密码子编码所有的20个氨基酸。将产生的PCR产物通过凝胶电泳纯化, 使用SacII和HindIII切割, 然后将其连接到pASK-IBA2-SAm1的相应切割的载体片段上。

[0101] 使用氯化钙法 (Sambrook等人, 1989), 用载体混合物转化大肠杆菌TOP10细胞。

[0102] 实施例2: 制备文库2

[0103] 使用pfu-聚合酶 (Fermentas) 及以下引物P2和P3, 通过pASK-IBA2-SAm1的PCR扩增, 制备具有DNA序列的质粒库, 该DNA序列编码在氨基酸位点44至52 (关于wt-链霉亲和素) 的区域中经诱变的链霉亲和素衍生物。

[0104] P3: 5'-CTG ACC GGT ACC TAC G(G/C) T TGC NN(G/C) NN(G/T) GGC AAC GCC GAG TGC CGC TAC GTC CTG A (SEQ ID NO.7), 其中3'端的A经由硫代磷酸酯键连接, 以及

[0105] P2: 5'-AGT AGC GGT AAA CGG CAG A (SEQ ID NO.6)。

[0106] 以这种方式产生DNA序列, 该DNA序列包含固定突变Thr45-->Cys和Ser52-->Cys、在链霉亲和素突变蛋白“1”的位点44包含编码Gly或Ala的2-倍简并密码子、在位点46和47中的每一个上包含32倍简并密码子或终止密码子, 所述32倍简并密码子编码所有的20个氨基酸。将产生的PCR产物通过凝胶电泳纯化, 使用KpnI和HindIII切割, 然后将其连接到pASK-IBA2-SAm1的相应切割的载体片段上。

[0107] 使用氯化钙法 (Sambrook等人, 1989), 用载体混合物转化大肠杆菌TOP10细胞。

[0108] 实施例3: 制备文库3

[0109] 使用pfuUltra-聚合酶 (Stratagene) 及以下引物P4和P5, 通过pASK-IBA2-SAm1的PCR扩增, 制备具有DNA序列的质粒库, 该DNA序列编码在氨基酸位点115至121 (关于wt-链霉亲和素) 的区域中经诱变的链霉亲和素衍生物。

[0110] P4: 5'-GCC NN(G/C) NN(G/T) TCC ACG CTG GTC GGC CA (SEQ ID NO.8), 其在5'端被磷酸化, 以及

[0111] P5: 5'-GTT(A/C) NN CTC GGT GGT GCC GGA GGT (SEQ ID NO.9), 其同样在5'端被

磷酸化。

[0112] 以这种方式产生整个载体的线性DNA序列,该序列包含链霉亲和素突变蛋白“1”基因变体,该基因变体在位点117、120和121中的每一个具有编码所有20个氨基酸的32倍简并密码子或终止密码子。将产生的PCR产物通过凝胶电泳纯化并将其连接。使用磷酸化引物,采用产生钝端的保真 (proof-reading) 聚合酶来扩增整个载体,这种策略的优势在于,其不必使用限制性酶,而且可以进行一个片段连接,其作为单分子反应,与浓度无关,而且比用于产生文库1和2的两个片段连接的效率更高。

[0113] 使用Bio-Rad MicroPulser按照制造商标准程序Ec2 (0.2cm比色皿;2.5kV) 进行电穿孔,用连接的载体混合物转化大肠杆菌TOP10或/和TG1细胞。

[0114] 实施例4:制备文库4

[0115] 使用PfuUltra聚合酶 (Stratagene) 和下述引物P4和P5,通过pASK-IBA2-SAm4001的PCR扩增,制备具有DNA序列的质粒库,该DNA序列编码在氨基酸位点115至121 (关于wt-链霉亲和素) 的区域中经诱变的链霉亲和素突变蛋白m4001衍生物:

[0116] P4:5'-GCC NN (G/C) NN (G/T) TCC ACG CTG GTC GGC CA (SEQ ID NO.8), 其在5' 端被磷酸化,以及

[0117] P5:5'-GTT (A/C) NN CTC GGT GGT GCC GGA GGT (SEQ ID NO.9), 其同样在5' 端被磷酸化。

[0118] 以这种方式产生整个载体的线性DNA序列,该序列包含链霉亲和素突变蛋白m4001基因变体,该基因变体在位点117、120和121中的每一个具有编码所有20个氨基酸的32倍简并密码子或终止密码子。将产生的PCR产物通过凝胶电泳纯化并将其连接。

[0119] 使用Bio-Rad MicroPulser按照制造商标准程序Ec2 (0.2cm比色皿;2.5kV) 进行电穿孔,用连接的载体混合物转化大肠杆菌TOP10或/和TG1细胞。

[0120] 实施例5:制备文库5

[0121] 使用PfuUltra聚合酶 (Stratagene) 和下述引物P4和P6,通过pASK-IBA2-SAm1的PCR扩增,制备具有DNA序列的质粒库,该DNA序列编码在氨基酸位点115至121 (关于wt-链霉亲和素) 的区域中经诱变的链霉亲和素突变蛋白“1”衍生物:

[0122] P4:5'-GCC NN (G/C) NN (G/T) TCC ACG CTG GTC GGC CA (SEQ ID NO.8), 其在5' 端被磷酸化,以及

[0123] P6:5'-GTT (A/T) A CTC GGT GGT GCC GGA GGT (SEQ ID NO.10), 其同样在5' 端被磷酸化。

[0124] 以这种方式产生整个载体的线性DNA序列,该序列包含链霉亲和素突变蛋白“1”基因变体,所述基因变体在位点117具有编码Phe或Tyr的2-简并密码子且在位点120和121中的每一个具有编码所有20个氨基酸的32倍简并密码子或终止密码子。将产生的PCR产物通过凝胶电泳纯化并将其连接。

[0125] 使用Bio-Rad MicroPulser按照制造商标准程序Ec2 (0.2cm比色皿;2.5kV) 进行电穿孔,用连接的载体混合物转化大肠杆菌TOP10或/和TG1细胞。

[0126] 实施例6:制备文库6

[0127] 使用PfuUltra聚合酶 (Stratagene) 和下述引物P7和P8,通过pASK-IBA2-SAm1的PCR扩增,制备具有DNA序列的质粒库,该DNA序列编码在氨基酸位点115至121 (关于wt-链霉

亲和素)的区域中经诱变的链霉亲和素突变蛋白“1”衍生物:

[0128] P7:5'-N(G/C)N N(G/T)T CCA CGC TGG TCG GCC AC(SEQ ID NO.11),其在5'端被磷酸化,以及

[0129] P8:5'-N(A/C)N NCT CGG TGG TGC CGG AGG T(SEQ ID NO.12),其同样在5'端被磷酸化。

[0130] 以这种方式产生整个载体的线性DNA序列,该序列包含链霉亲和素突变蛋白“1”基因变体,所述基因变体具有缺失的氨基酸位点118和119且在位点117、120和121中的每一个具有编码所有20个氨基酸的32倍简并密码子或终止密码子。将产生的PCR产物通过凝胶电泳纯化并将其连接。

[0131] 使用Bio-Rad MicroPulser按照制造商标准程序Ec2(0.2cm比色皿;2.5kV)进行电穿孔,用连接的载体混合物转化大肠杆菌TOP10或/和TG1细胞。

[0132] 实施例7:制备文库7

[0133] 使用PfuUltra聚合酶(Stratagene)和下述引物P9和P10,通过pASK-IBA2-SAm1的PCR扩增,制备具有DNA序列的质粒库,该DNA序列编码在氨基酸位点115至121(关于wt-链霉亲和素)的区域中经诱变的链霉亲和素突变蛋白“1”衍生物:

[0134] P9:5'-GGN N(G/T)T CCA CGC TGG TCG GCC AC(SEQ ID NO.13),其在5'端被磷酸化,以及

[0135] P10:5'-A(C/A)N NCT CGG TGG TGC CGG AGG T(SEQ ID NO.14),其同样在5'端被磷酸化。

[0136] 以这种方式产生整个载体的线性DNA序列,该序列包含链霉亲和素突变蛋白“1”基因变体,所述基因变体具有缺失的氨基酸位点118和119和在位点120的固定的Trp,并且在位点117和121中的每一个具有编码所有20个氨基酸的32倍简并密码子或终止密码子。将产生的PCR产物通过凝胶电泳纯化并将其连接。

[0137] 使用Bio-Rad MicroPulser按照制造商标准程序Ec2(0.2cm比色皿;2.5kV)进行电穿孔,用连接的载体混合物转化大肠杆菌TOP10或/和TG1细胞。

[0138] 实施例8:在过滤夹心法中,鉴定对肽配体具有增加的结合亲和力的链霉亲和素突变蛋白(参见美国专利6,103,493)

[0139] 为了鉴定对肽配体具有增加的结合亲和力的链霉亲和素突变蛋白,制备融合蛋白,该融合蛋白如通过pASK75-phoA(SEQ ID NO.1)编码,包含大肠杆菌的碱性磷酸酶(BAP)和附着于其C-端的**Strep-tag®II**肽(WSHPQFEK)。为进行此实验,如美国专利6,103,493所述用JM83表达pASK75-phoA并纯化重组蛋白,其中采用唯一的区别为,根据前述Schmidt和Skerra(2007)的操作程序,**Strep-Tactin®**替代链霉亲和素亲和色谱法以及使用脱疏生物素替代二氨基生物素来作为洗脱剂。在进一步的测定中,在使用**BAP-Strep-tag®II**融合蛋白(也表示为BAP-StrepII)之前通过透析去除脱疏生物素。

[0140] 将用实施例1-7中得到的质粒库转化的大肠杆菌细胞(TG1或TOP10)在醋酸硝化纤维素膜(OE66型,直径110mm,Whatman)上铺平板,该醋酸硝化纤维素膜已被置于包含具有100μg/ml氨比西林的LB培养基的琼脂平板上。将所述膜于30℃下孵育24小时,直至菌落变得可见。

[0141] 在进行上述孵育的同时,制备第二个膜。将总量为10ml的、用PBS (4mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 115mM NaCl) 1:200稀释的兔抗链霉亲和素免疫球蛋白 (Sigma) 于室温下涂覆类似尺寸的Immobilon-P膜 (Millipore) 约6小时,随后在PBS中的3%w/v的牛血清白蛋白 (BSA)、0.5%v/v Tween中封闭约2小时。

[0142] 将第二个膜用PBS洗涤,然后置于包含具有100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄西林和0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 去水四环素的LB培养基的琼脂板上。随后,将该硝化纤维素膜以菌落朝上置于第二个膜上,标出这两个膜的相对位置。在室温下培养过夜之后,去除具有菌落的上方的膜,将膜于4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存于新的LB氨苄西林琼脂板上。同样从琼脂板去除第二个膜,洗涤三次并持续30分钟,同时在PBS/Tween (在PBS中的0.1%v/v Tween20) 中振动。随后,在所述膜与10ml的含有纯化的BAP-Strep-tagII融合蛋白 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的新鲜PBS/Tween溶液混合。在室温下培育1小时之后,再次将膜于PBS/Tween中洗涤2次,于PBS缓冲液中洗涤两次。在10ml AP缓冲液 (100mM Tris-Cl pH 8.8, 100mM NaCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ ) 的存在下并加入30 $\mu\text{l}$ 溴-氯-吡啶磷酸 (BCIP) (在二甲基甲酰胺中50mg/ml) 和5 $\mu\text{l}$ 四唑氮蓝 (NBT) (在70%v/v二甲基甲酰胺中75mg/ml) 的情况下,发生信号产生1至2小时。将在这个过程中形成的色斑分配到第一个膜上的相应菌落。在分离和培养数个信号产生克隆之后,分离、测序相应的质粒DNA,并且在表1-7中示出了在随机化位点推断的氨基酸序列,连同在上述过滤测定法中获得的相对信号强度。来自不同文库的信号强度无法进行比较,这是因为它们产生于不同的非平行试验。令人惊讶的是,来自文库3的信号阳性克隆的测序在某些情况下出人意料地显示了在位点118和119的氨基酸缺失。这些缺失可被解释为是由于引物P4和P5引物制备中存在有缺陷的引物,每一个均在5'端缩短3个碱基。

#### [0143] 实施例9:以制备性规模生产链霉亲和素突变蛋白

[0144] 将重组最小链霉亲和素的已知表达系统 (Schmidt和Skerra (1994), 见上述) 用于以制备性规模生产链霉亲和素突变蛋白。为进行此实验,通过使用单个SacII和HindIII限制性位点,将编码区主要部分从包含wt-链霉亲和素编码区和T7启动因子的载体pSA1中去除,并且替代为来自突变的pASK-IBA2-SAm1质粒的相应区域。随后,wt-链霉亲和素和链霉亲和素突变蛋白以细胞质包涵体的形式表达,溶解,复性以及通过部分硫酸铵沉淀纯化,如Schmidt和Skerra (1994) (见上文) 所述。使用Agilent 2100生物分析仪检查所得到的链霉亲和素突变蛋白的纯度。本申请中描述的每个链霉亲和素突变蛋白以纯度>90%得到。通过探测234 $\mu\text{M}$ 溶液 (通过使用单体的理论摩尔消光系数 $\epsilon_{280}=42060\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 进行测定), 与系列稀释的还原的1,4-二硫-D-苏糖醇 (DTT) 标准品与Ellman试剂 (5,5'-二巯基双-(2-硝基苯甲酸)) 相比较,并且在412nm测量吸光度,测得在纯化的链霉亲和素突变蛋白m4001中,在位点45和52的半胱氨酸形成的二硫化物为98.6%。

#### [0145] 实施例10:ELISA

[0146] 进行ELISA,以测定链霉亲和素突变蛋白对于肽配体Strep-tagII的结合亲和力。

[0147] 将96孔微孔板 (Costar) 的孔在4 $^{\circ}\text{C}$ 下用100 $\mu\text{l}$ 的本发明重组链霉亲和素突变蛋白 (来自文库1的m400;来自文库2的m4001;来自文库3的m4、m23、m36、m41、m45;来自文库5的m101、m111;来自文库6的m207、m212;来自文库7的m301、m302) 以及美国专利6,103,493所述链霉亲和素突变蛋白“1”的溶液涂覆过夜,在每个情况下的浓度均为在10mM  $\text{NaBO}_3$ , pH 8.5中的15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。进一步处理在室温 (23 $^{\circ}\text{C}$ ) 下进行。用200 $\mu\text{l}$ 在TBS (100mM Tris-Cl pH8, 115mM

NaCl) 中的3%w/v BSA和0.5%v/v Tween20阻断各孔2小时。使用TBS/Tween(含0.05%v/v Tween20的TBS) 洗涤三次之后,将50 $\mu$ l的相同缓冲液加入每个孔中。将50 $\mu$ l在TBS/Tween中的0.3 $\mu$ M BAP-StrepII融合蛋白(将在PBS中的20 $\mu$ M纯化且透析的BAP-StrepII储备溶液用TBS/T稀释67倍而制备得到)加入每一行的第一个孔,混合。通过利用移液管从第一个孔移走50 $\mu$ l(从总量为100 $\mu$ l中)并将其与同一行中下一个孔的内容物(50 $\mu$ l)混合等,在行的其他孔中建立稀释系列。以这种方式得到的融合蛋白的浓度在150nM(在每一行的第一个孔)和0,146484nM(在第十一个孔)之间。

[0148] 孵育1小时之后移除该溶液,所述孔各自使用TBS/Tween洗涤两次,且使用TBS洗涤两次。随后,将100 $\mu$ l的在1mM ZnSO<sub>4</sub>、5mM MgCl<sub>2</sub>、1M Tris-Cl pH8中的0.5mg/ml对硝基苯磷酸溶液用移液管移入每一个孔中。通过使用BioTek酶标仪e1808测量在405nm的吸光度、减去在595nm的吸光度,每个孔的数据均提高了。每个孔中结合的BAP-StrepII融合蛋白的活性测量为在23℃下振荡孵育20min之前和之后获得的数据之间的差值,图1给出了以毫光密度单位(mOD)计的 $\Delta(A_{405}-A_{595})$ 。

[0149] 假设链霉亲和素突变蛋白单体(P)和BAP-StrepII融合蛋白(L)之间有单一的结合平衡,其产生离解常数 $K_D = [P] * [L] / [P * L]$ ,进行数据的评估。在假设 $[P]_{tot} = [P] + [P * L]$ 且[L]显著大于 $[P * L]$ ,以使得 $[L]_{tot}$ 几乎与[L]相同,测定结合的融合酶BAP-StrepII的数量为 $[P * L] = [L]_{tot} * [P]_{tot} / (K_D + [L]_{tot})$ 。通过非线性最小二乘回归,以 $K_D$ 和 $[P]_{tot}$ (对应于渐近活动值,  $(\Delta(A_{405}-A_{595}) / \Delta t)_{max}$ )作为参数,该方程式用于将针对 $[P * L]$ (酶活性方面,  $\Delta(A_{405}-A_{595}) / \Delta t$ )测量的数据相对 $[L]_{tot}$ (应用的BAP-StrepII融合酶的浓度)进行拟合。图1的图示出由选择的本发明2个链霉亲和素突变蛋白与美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”相比较得到的实验数据。(对于每一个BAP-StrepII浓度,在20min孵育期间,对照的 $\Delta(A_{405}-A_{595})$ 为<1,在所述对照中没有固定的链霉亲和素(突变蛋白),并且,仅封闭所述孔(图中没有示出)。表8给出了 $K_D$ 的评估结果,以及较大选择的本发明链霉亲和素突变蛋白与美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”相比较的 $(\Delta(A_{405}-A_{595}) / \Delta t)_{max}$ 。从这些数据中可以看出,本发明链霉亲和素突变蛋白对于融合于BAP的StreptagII具有比美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”更高的亲和力,因此,它们更适合于将Strep-tag(II)融合蛋白高效固定于固相,如本ELISA中所示。

#### [0150] 实施例11:亲和色谱法

[0151] 如实施例9中所述,制备链霉亲和素突变蛋白(来自文库1的m400;来自文库2的m4001;来自文库3的m4、m23、m36、m41、m45;来自文库5的m111;来自文库6的m207、m212;来自文库7的m301、m302),并且制备美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”和wt-链霉亲和素。然后,根据制造商说明书,将所述蛋白缀合于NHS-活化的Sepharose 4Fast Flow(GE Healthcare)(参见Schmidt和Skerra,如前述)。根据制造商说明书,使用BCA法(Pierce)测定装载相应链霉亲和素突变蛋白的Sepharose凝胶。简单来说,将50 $\mu$ l在缓冲液(100mM Tris-Cl pH8)中的10%v/v Sepharose凝胶悬浮液与新鲜制备的BCA试剂混合,然后在37℃下孵育30min。每个测量中,用链霉亲和素突变蛋白“1”的标准品,以在相同缓冲液的不同浓度,平行测定参考曲线。表9和表10中示出,相对于拟合的(二阶多项式)参考曲线,装载不同链霉亲和素突变蛋白的测定的Sepharose凝胶,结果取3次独立测量的平均值。作为对固相结合的链霉亲和素突变蛋白的此基于BCA法的测定方法的有效对照,平行测量已知的装载

链霉亲和素突变蛋白“1”的参考Sepharose凝胶。产生的BCA导出值与参考测量值的偏离小于1%，由此证明了BCA法为Sepharose结合的链霉亲和素突变蛋白的测定提供了可靠数据。

[0152] 为了检验以这种方式固定的链霉亲和素突变蛋白(包括美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”和wt-链霉亲和素)在携带Strep-tagII的融合蛋白的亲亲和纯化中的行为,经由tet启动子/操纵子控制的质粒pASK-IBA2-细胞色素b562 (SEQ ID NO.2) 表达融合于Strep-tagII的重组细胞色素b562 (Schmidt和Skerra1994, 见前述) (也表示为cytb562-StrepII), 基本上如Schmidt&Skerra (2007) (见前述) 中所述。简单来说, 用pASK-IBA2-细胞色素b562转化大肠杆菌JM83, 然后在37℃下在包含100μg/ml氨比西林的LB培养基中孵育。在OD<sub>550</sub>=0.5时, 用0.2μg/ml脱水四环素诱导表达, 在37℃下保持3小时。然后经由离心收获细胞, 再悬浮于百分之一体积(关于培养物体积)的预冷的缓冲液W (100mM Tris-Cl pH8、150mM NaCl、1mM EDTA) 中, 例如当来自1升培养物体积时再悬浮于10ml。通过超声裂解细胞, 离心(30000g, 15min, 4℃) 去除细胞碎片。然后澄清的上清液经受Strep-Tactin亲和色谱法, 以纯化重组细胞色素b562-Strep-tagII融合蛋白。纯化之后, 通过相对缓冲液W透析来去除脱硫生物素, 然后将这样制备的细胞色素b562-Strep-tagII融合蛋白用于下述亲和色谱法实验, 从而与美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”相比较, 并与wt-链霉亲和素相比较, 来表征本发明的链霉亲和素突变蛋白。

[0153] 在第一个亲和色谱法试验中, 将具有本发明的不同链霉亲和素突变蛋白以及美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”和wt-链霉亲和素中的每一个的450μl Sepharose凝胶(来源于4.5ml的10%悬浮液), 填充于2个聚乙烯滤片之间的2ml柱子(Pierce, 货号89896) 上。然后, 将3ml在缓冲液W中的1mg/ml纯化的细胞色素b562-Strep-tagII融合蛋白/ml以重力流施加到每个柱子上。以这种方式, 每个柱子都在很大程度上超负荷, 细胞色素b562Strep-tagII融合蛋白出现在洗脱液中。然后用2.5ml缓冲液W洗涤每个柱子两次。用在缓冲液W中的10mM生物素洗脱保留的细胞色素, 然后通过使用摩尔消光系数 $\epsilon_{280}=8250\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 测量洗脱液在280nm的吸光度, 从而以光谱光度法的方式对保留的细胞色素进行定量。结果见表9。本发明所有的突变蛋白比美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”保留了显著更多的细胞色素b562-Strep-tagII融合蛋白(达到3倍), 比wt-链霉亲和素保留了远远更多的细胞色素b562-Strep-tagII融合蛋白(达到28倍)。将结果针对固定的链霉亲和素(突变蛋白)的数量进行归一化。因此, 利用本发明的突变蛋白, 可制备显著提高的**Strep-tag®II**融合蛋白结合能力的亲和柱子。

[0154] 在第二个亲和色谱法实验中, 将具有1mg本发明的链霉亲和素突变蛋白、1mg美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”和1mg wt-链霉亲和素的聚集体的Sepharose凝胶(来源于10%悬浮液的相应量) 填充于2个聚乙烯滤片之间的2ml的柱子上(Pierce, 货号89896)。然后, 将10倍5ml在缓冲液W中的10μg/ml纯化的细胞色素**b562-Strep-tag®II**融合蛋白(总量500μg) 以重力流施加到每个柱子上。流量在所有情况下均为每分钟0.6ml和0.8ml之间。使用1个柱体积(CV) 的缓冲液W洗涤每个柱子。通过加入在缓冲液W中的10mM生物素来洗脱捕获的细胞色素**b562-Strep-tag®II**融合蛋白, 然后通过使用摩尔消光系数 $\epsilon_{280}=8250\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 测量洗脱液在280nm的吸光度, 从而以光谱光度法的方式对捕获的细胞色素**b562-Strep-tag®II**融合蛋白进行定量。结果见表10。对于每个固定的链霉亲和素(突变



蛋白),本发明所有的突变蛋白比美国专利6,103,493的突变蛋白“1”捕获了显著更多的细胞色素b562-Strep-tagII融合蛋白(高达超过3倍)。因此,利用本发明所述的突变蛋白,可以制备亲和柱子,所述亲和柱子提供以相对稀释形式应用的 **Strep-tag®II** 融合蛋白的显著增加的产量,如同例如由哺乳动物细胞向细胞培养基分泌重组蛋白的情况一样。利用本发明的突变蛋白,同时使用亲和材料量(该亲和材料量仅提供超过融合蛋白中应用的 **Strep-tag®II** 配体(在这种情况下为细胞色素b562)的理论上2倍过量的固定 **Strep-tag®II** 结合位点),可获得高达近70%的应用的 **Strep-tag®II** 融合蛋白的回收率,由此证明了使用本发明的固定于树脂的链霉亲和素突变蛋白, **Strep-tag®II** 融合蛋白的亲和和捕获的效率。

[0155] 还需要注意的是,与美国专利6,103,493的链霉亲和素突变蛋白“1”形成对照,在大多数本发明的链霉亲和素突变蛋白的情况下,脱疏生物素的使用不引起高效洗脱。当用生物素代替时,在所述突变蛋白的情况下也实现了高强度洗脱。

[0156] 实施例12:由于氨基酸115-121的区域中的突变导致的亲和力增加独立于氨基酸区域43-52

[0157] 突变蛋白m4001-m9(图4,包含在链霉亲和素氨基酸序列位点117至121的SEQ ID NO:58Glu<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup>的氨基酸序列)为筛选链霉亲和素突变蛋白文库的最高结果(top result)之一,所述文库基于在位点44、45、46、52分别携带氨基酸Ala、Cys、Gly、Cys的链霉亲和素突变蛋白m4001(图4),其中氨基酸位点117、120和121被随机化。选择标准/质量测定参数为在过滤夹心测定法中产生的信号强度(实施例8)。基于这些结果,在位点117、120和121鉴定的氨基酸Glu、Gly和Tyr从突变蛋白m4001被转化到突变蛋白“1”,以得到链霉亲和素突变蛋白m1-9(突变蛋白m1-9的完整的氨基酸序列参见图4)。因此,将对于氨基酸残基43-52形成环的某个氨基酸序列环境(即m4001的序列)的氨基酸区域115-121得到的结果(对于链霉亲和素结合肽的改进的结合亲和力)与另一个氨基酸序列(在这种情况下即突变蛋白“1”)的区域43-52组合。经由BiaCore™,针对此新组合的链霉亲和素突变蛋白m1-9与2种不同的Strep-tagII(单标签)或di-tag3融合蛋白的相互作用,测量亲和力,并且将所述亲和力与融合蛋白对于链霉亲和素突变蛋白“1”的亲和力相比较(表11)。突变蛋白m1-9对于GFP-StrepII(绿色荧光蛋白)提供约10倍的亲和力增加,对于Cytb562-StrepII提供约30倍的亲和力增加。这与从随机文库直接得到所选择的本发明链霉亲和素突变蛋白的亲和力增加在相同的范围内,证实了本发明的突变蛋白相比于已知突变蛋白“1”具有优势,其中所述亲和力增加是通过所选择的本发明链霉亲和素突变蛋白与BAP-Strep-tagII(单标签)融合蛋白的相互作用来实现的(表8)。

[0158] 还在类似亲和色谱法实验中测试了突变蛋白(组合产物)m1-9,如实施例10中对于从随机文库直接得到的所选择的链霉亲和素突变蛋白所述。在这个实际应用相关环境中,显现出所述突变蛋白m1-9显著优于突变蛋白“1”,其程度类似于与从随机文库直接得到选择的链霉亲和素突变蛋白相比较。

[0159] 所述突变蛋白m1-9的结果证明,对于氨基酸位点43-52的区域中的某个氨基酸序列环境,通过替代在氨基酸位点115-121的区域中的氨基酸产生的亲和力增加可以与氨基酸位点43-52的区域中的另一个氨基酸序列环境组合,同时保持这些突变的有益性能。因此

这证明了,针对该115-121区域中突变得到的结果是环境独立的,并且可(如果需要的话)将该结果与在链霉亲和素其它区域中的其它有益氨基酸序列组合。因此,本发明不仅提供了新的有利的链霉亲和素突变蛋白,还提供了另外的有益效果,即本文鉴定的突变还能够改进已知链霉亲和素突变蛋白的性能。

**[0160] 实施例13:粗裂解液(大肠杆菌)的重复亲和色谱法循环**

**[0161]** 基本上如实施例11所述,将所述链霉亲和素突变蛋白m1-9固定于琼脂糖(Superflow)上。产生的树脂具有233nmol/ml的生物素结合能力(对应于3.1mg突变蛋白m1-9/ml树脂的装载密度,假设活性为100%)。用0.5ml的树脂填充柱子,然后将该柱子用于在重力流下重复纯化来自大肠杆菌粗提取物的GFP-StrepII,以测试其用于重复纯化循环的适合性。在每个纯化循环之后测定GFP-StrepII的产量和纯度。

**[0162]** 为了这个目的,在GFP-StrepII的细胞质表达之后,根据描述于IBA GmbH的手册(例如,Manual (Twin) Strep-tag (版本PR02-0025),可作为PDF文档于<http://www.iba-lifesciences.com/technical-support.html>获得)中的标准操作程序,使用缓冲液W(100mM Tris-Cl pH8,150mM NaCl,1mM EDTA)制备大肠杆菌细胞可溶性总含量的澄清裂解液。每毫升裂解液包含大约1.2mg GFP-StrepII。在第一步,将0.25ml澄清的裂解液装载到含有0.5ml含突变蛋白m1-9的树脂的柱子上。用1个柱体积(CV)(对应于0.5ml)的缓冲液W洗涤柱子5次,然后用包含10mM生物素的缓冲液W洗脱。通过用5CV 10mM NaOH洗涤柱子2次使柱子再生(从生物素上释放)。然后施加0.25ml澄清裂解液的第二量,再次分离含有的GFP-StrepII,然后柱子如上述再生。而后在相同0.5-ml柱子上第三次纯化尝试中,施加澄清裂解液的第三量(0.75ml),进行包含的GFP-StrepII的纯化的相同处理,然后如上述再生柱子。然后,在相同0.5-ml柱子上第四次纯化尝试中,再次施加0.75ml澄清裂解液,进行包含的GFP-StrepII的纯化的相同处理,然后如上述再生柱子。表12总结了这一顺序纯化实验的结果,每一步骤使用相同的柱子。从表12可以看出,每一步骤中,施加基本上相同量的Strep-Tag II融合蛋白,可以纯化得到超过90%的纯度。因此该实验证明了,含本发明的链霉亲和素突变蛋白的亲合柱子可被可靠地用于以恒定高产量和高纯度重复纯化重组蛋白。除了使用10CV 10mM NaOH,所述柱子还能够通过使用更大体积的含10mM HABA的缓冲液W洗涤而再生。如果需要在温和条件下去除生物素,这可能是可取的,所述温和条件是指例如树脂或其它涂覆有本发明的链霉亲和素突变蛋白的载体对碱性PH值敏感的情况。

**[0163] 实施例14:突变蛋白m1-9和2个顺序排列的链霉亲和素结合肽部分的相互作用(di-tag3)**

**[0164]** 本发明提供了链霉亲和素突变蛋白,其相比于已知链霉亲和素突变蛋白,对于Strep-tagII融合蛋白具有显著增大的亲和力。然而,当在给定的应用中要求较高的亲和力,还可存在局限性。可能出现这样的情况,在纯化方案中,结合配偶体中的至少一个(Strep-tag®II融合蛋白或各自的链霉亲和素突变蛋白)在很低浓度下存在或应用。这些实例是Strep-tag®II融合蛋白的表达差,和/或对于细胞裂解使用了大体积的缓冲液,或将Strep-tag®II融合蛋白分泌到了细胞培养基中。在所有这些情况下,将含低浓度靶蛋白的大样本量施加于亲和柱子。另一方面,链霉亲和素突变蛋白反应配偶体的稀释也引发性能不佳,例如相比于柱纯化的批纯化的情况。然而,还有纯化下游的其它应用也可从更高的亲

和力得利。示例性实例是,将要分析的专用靶蛋白(或其它与Strep-tagII化学融合分子)定向、温和和稳定地固定于涂覆有链霉亲和素突变蛋白的固相上,以进行测定。固相和相应测定法的实例是,用于ELISA的微孔板;用于例如ForteBio的Octet®或GE的BiaCore®仪器系列的生物传感器,从而提供蛋白:蛋白、蛋白:多肽和蛋白:小分子相互作用分析的无标记实时测量;用于大量结合于其表面或珠子(如磁珠或 alphascreen®珠子或 luminex®珠子)的分析物的高通量分析的芯片,用于例如蛋白:蛋白相互作用分析。在所有这些实例中,用链霉亲和素突变蛋白对各自的固相的涂覆,应该提供通用平台,用于将任意蛋白简单、可再生、温和和稳定地固定到所述固相。这将是非常有利的,否则对于要固定和分析的每一个蛋白就得单独开发特定的固定操作程序。

[0165] 因此,还可能存在改进亲和力的空间,从而以更好的方式解决这些超出亲和纯化的应用。所以,还对于由短连接序列连接的两个 Strep-tag®II 结合序列的串联排列(WSHPQFEKGGSGGGSGGGWSHPQFEK;SEQ ID NO:103),测试了本发明链霉亲和素突变蛋白的结合特征,所述串联排列命名为di-tag3并描述于美国专利7,981,632。美国专利7,981,632还对于Strep-tag®亲和体系描述这种串联排列的优势,该串联排列引发两个Strep-tag®序列均和四聚体链霉亲和素突变体同时结合,由此在维持高效竞争洗脱的情况下提供更高的结合稳定性。而在本实施例中,数据由使用di-tag3融合蛋白产生,当然所述益处并不限于使用此特定的di-tag3链霉亲和素结合突变蛋白。当然,使用描述于美国专利7,981,632的任意其他顺序排列的链霉亲和素结合模块,也将实现所述亲合力效果,由此导致仍加强其他亲和性特征。

[0166] 因此,经由在BiaCore™ T100仪器上的实时相互作用分析,分析了本发明的链霉亲和素突变蛋白(示例为突变蛋白m1-9)和两个顺序排列的 Strep-tag®II 结合部分(示例为di-tag3)之间的相互作用的亲和力增加,并且将该亲和力增加与在突变蛋白“1”的情况下相同di-tag3相对于Strep-tagII的亲和力增加相比较(表11)。所述di-tag3和Strep-tagII存在于两个不同重组蛋白(即GFP和细胞色素b562)的C-端。结果是非常令人惊讶的。当在突变蛋白“1”情况下,di-tag3引起的在GFP情况下的亲和力增加仅为10倍,在细胞色素b562情况下的亲和力增加仅为200-400倍,在本发明的突变蛋白m1-9情况下,分别增加300-600倍和10000-40000倍。因此,本发明的突变蛋白m1-9提供的亲合效果与IgG抗体(Roitt等人,第三版,Mosby,St Louis,6.3-6.4页1993)相当,相比于比现有技术中突变蛋白“1”提供的亲合力效果,本发明的突变蛋白m1-9提供的亲合效果更为明显(提高了50-100倍)。

[0167] di-tag3对突变蛋白m1-9的亲合结合的离解速率( $\approx 0.000015\text{s}^{-1}$ )规定了与半衰期的相互作用,所述半衰期为 $T_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{off}} = 46,209\text{sec} = 770\text{min} = >12\text{h}$ 。在单体相互作用的情况下,竞争洗脱不能有效地破坏这样一个低的离解速率,其原因在于假设不发生重新结合,则需要2天来释放大约95%的结合分子。因此,当优选时,该单价相互作用并不适用于利用竞争洗脱的亲合色谱法,所述竞争洗脱是优选的,因为其可在温和生理条件下完成,以及由于非特异性结合污染物在洗脱期间从树脂最低限度地释放而提供高纯度。然而,亲合结合相互作用的离解速率在竞争条件下类似于具有最低离解速率的单个相互作用部分的离解速率。因此,di-tag3融合蛋白仍可从携带(固定于其上的)本发明链霉亲和素突变蛋白

的亲树脂上被相当高效地洗脱。对于这些融合蛋白的此洗脱能力,与美国专利7,981,632对与突变蛋白“1”相互作用的链霉亲和素结合肽di-tag3所做的观察结果相一致。从含有固定于其上的突变蛋白m1-9的柱子上的洗脱行为,事实上对于GFP-StrepII和GFP-di-tag3是相似,从而说明了上述的理论考虑具有实践意义(数据未示出)。GFP-StrepII的离解速率规定 $T_{1/2}=161\text{sec}$ ,因此大概需要11分钟来置换95%的结合分子。这对于进行亲和色谱法期间时的有效洗脱没有障碍。为了得到尽可能浓缩的靶蛋白,在第一步,可将柱子浸入1个柱体积(CV)的包含竞争体的洗脱缓冲液。然后,可以停止流量10-20分钟来允许取代结合的靶蛋白,之后通过再次使用洗脱缓冲液重新启动流量来进行洗脱。或者,该洗脱可在非常低的流量下进行从而提供更高浓度的靶蛋白。

[0168] 另一方面,在如上述(ELISA, alphascreen®, luminex®, BiaCore®, Octet®等等)分析设置的测定方法的发展中,di-tag3和突变蛋白m1-9之间在非竞争条件下( $T_{1/2}>12\text{h}$ )的非常稳定的相互作用使得这种相互作用对于一般用于下述用途是非常有吸引力的:所述用途为定向、温和和稳定地将(化学或重组)融合于di-tag3(或任何其他顺序设置的链霉亲和素突变蛋白结合模块,如美国专利7,981,632中所述)的任意给定靶蛋白固定于固相上。而且,在竞争者存在时的所述相互作用的可逆性,能够使涂覆有本发明链霉亲和素突变蛋白的装置或样品温和再生,从而在某个分析物被分析后移除结合的di-tag3融合蛋白,并且偶联另一个di-tag3融合蛋白,以用于分析结合于di-tag3融合蛋白的另一个分析物。温和再生保护了装置或样品以及偶联的蛋白质性受体,在这个实施例中,所述蛋白质性受体为本发明的链霉亲和素突变蛋白。

[0169] 可以利用此特性的另一示例性实例是通过表面等离子体共振技术例如BiaCore™的亲性测定。用本发明的链霉亲和素突变蛋白涂覆适合的芯片(例如,在BiaCore™时为CM5)。将目标是要测定其对于配体的亲和力的di-tag3融合蛋白通过其融合的di-tag3而被稳定的结合于芯片上,其融合的di-tag3稳定地结合于本发明的固定的链霉亲和素突变蛋白。然后,在测定以某个浓度施加的配体的结合动力学之后,所述芯片应从配体再生,该配体应该以另一个浓度施加。如果不破坏di-tag3融合蛋白是不可能的,则相同的芯片可从整个复合物(即具有结合的配体的di-tag3融合蛋白)再生,这通过加入竞争者例如生物素进行,然后在其他步骤中洗涤掉该竞争者,例如通过使用具有减少的亲和力的另一个竞争者(例如HABA(=2-(4-羟基苯基偶氮)苯甲酸))进行,最后只使用缓冲液洗涤芯片。最后,所述芯片再生,用于结合一个新数量的di-tag3融合蛋白,从而分析以另一个浓度施加的配体结合,不需要使用新的芯片。

[0170] di-tag3融合蛋白对于突变蛋白例如突变蛋白m1-9的高亲和力,应该使固定的链霉亲和素突变蛋白m1-9的结合位点在亲和色谱法过程中得到非常有效的利用。为了验证该假设,将上述固定的突变蛋白m1-9填充入0.6ml的柱子(每毫升结合生物素的能力为233nmol)。因此该柱子提供140nmol生物素结合位点的数量。提供添加2.6mg的GFP融合蛋白,该柱子超负荷装载了GFP-di-tag3融合蛋白。然后使用5CV的缓冲液W洗涤柱子,并用含10mM生物素的缓冲液W洗脱剩余的GFP-di-tag3融合蛋白。通过在280nm测量吸光度并使用理论消光系数 $E_{0.1\%}=1.053$ ,洗脱的GFP-di-tag3被定量为2.13mg。此2.13mg的量对应于71nmol GFP-di-tag3融合蛋白。因此,化学计量比为2:1。可以从该化学计量推断出,每个结合肽di-tag3在突变蛋白m1-9上占用了2个结合位点,而且每个结合位点均与Strep-tagII

部分复合,由此对应于接近100%的能力利用。从这个结果和从BiaCore™数据显示的强亲和力效果可以看出,无论该芯片是以低密度还是以高密度装载突变蛋白1-9(参见表11),都可以推断出一个di-tag3结合肽非常有效地占用2个结合位点,所述2个结合位点在一个四聚体上彼此靠近(实际上,每一个四聚体具有4个结合位点,该结合位点的位置成对接近;Weber等人,1989,Science 243,85-88),使得在本实验中使用的浓度下,对于位置接近的这些结合位点,不存在或存在很少的不同di-tag3序列的竞争。这还意味着,应该可以以充分限定的方式将di-tag3(或其它顺序排列的链霉亲和素结合表位,例如如美国专利7,981,632中公开的)融合蛋白或缀合到本发明链霉亲和素突变蛋白四聚体上的di-tag3的蛋白二聚体化。由于非常慢的离解速率( $T_{1/2} > 12\text{h}$ ),在通常于1小时范围内完成的标准分析测定法的时间框内,没有相当大的复合物形成配偶体的交换。因此,当使用2个不同标记的链霉亲和素突变蛋白m1-9制备物(该标记可以是荧光标记、有色标记、酶标记、磁性标记(磁珠),或如用于alphascreen或luminex检测平台的其它珠子,或简单地是具有某个尺寸或任意其他可寻址性能的琼脂糖珠子)时,每一个标记的变体被不同的di-tag3融合蛋白复合。这种情况下,两个复合物制备物均可混合,且标记的链霉亲和素突变蛋白和di-tag3融合蛋白之间在<1h的标准测定持续时间不发生显著交换。提供一个说明性实例:制备物1由突变蛋白m1-9-标记1与di-tag3-融合-蛋白X的复合物组成,制备物2由突变蛋白m1-9-标记2与di-tag3-融合-蛋白Y的复合物组成。然后两个制备物均可混合而不形成突变蛋白m1-9-标记1与di-tag3-融合-蛋白Y复合以及突变蛋白m1-9-标记2与di-tag3-融合-蛋白X复合的显著群体。该性能实现多通道检测,在所述多通道检测中,例如在样品或样本中(例如在免疫细胞化学中)或者在细胞或任意其它实体上,不同靶标可同时通过专用标记来寻址,而没有由于互换的检测复合物的假象(artifact),该专用标记经由本发明的链霉亲和素突变蛋白与配体结合,所述配体对于融合或缀合到di-tag3的某个靶标是特异性的。但是,由于通过添加竞争者如生物素,di-tag3:链霉亲和素突变蛋白复合物仍能够被有效逆转,该方法学可选择地另外允许从靶标有效去除标记。这对于再利用样本或样品或细胞或任意其它生物实体可能是很重要的,在进一步检测中,任意其它生物实体可能是珍贵的唯一样本。由于通过这种策略使配体多聚体化(在一个标记的链霉亲和素突变蛋白四聚体上二聚体化,或者在例如经由化学交联多聚体化的标记的链霉亲和素突变蛋白多聚体上多聚体化),低的亲和力配体也可以在这种方法中用于多通道标记检测。在这种情况下,通过di-tag3和本发明链霉亲和素突变蛋白之间的复合物的竞争破裂而单体化并且之后进行洗涤后,该配体也可被容易地从样本或样品或细胞或任意其它实体中去除(参见Streptamer®技术,例如如Stemberger等人2012,PLoS ONE,第7卷,第4期|e35798中描述的技术)。这是本发明链霉亲和素突变蛋白的进一步的优势,说明了这些突变蛋白具有比已知用于与链霉亲和素结合肽相互作用的链霉亲和素突变蛋白更优越的性能。

[0171] 通过电子提交的序列文件进一步阐明本发明,尤其其中:

[0172] SEQ ID NO 1:示出表达载体pASK75-phoA的核苷酸序列,该载体pASK75-phoA包含编码PhoA信号肽(粗体)的序列,其后为编码大肠杆菌碱性磷酸酶(BAP,下划线,连续线)的序列,其后为编码连接子(下划线,虚线)的序列,其后为编码Strept-tag®II(下划线,虚线)的序列。该基因可操作地连接于四环素启动子/操纵子(tetP/O)用于转录调控。所述载体适

合于周质表达 **BAP-Strep-tag®II** 融合蛋白。此基于tet-启动子的表达系统的一般用途描述于美国专利5,849,576。

[0173] SEQ ID NO 2: 示出表达载体pASK-IBA2-细胞色素b562的核苷酸序列, 该载体pASK-IBA2-细胞色素b562包含编码OmpA信号肽(粗体)的序列, 其后为编码大肠杆菌细胞色素b562(Cytb562, 下划线, 连续线)的序列, 其后为编码连接子(下划线, 虚线)的序列, 其后为序列编码 **Strep-tag®II** (下划线, 虚线)的序列。细胞色素b562Strep-tagII融合蛋白(还表示为cytb562-StrepII)的基因可操作地连接于四环素启动子/操纵子(tetP/O)用于转录调控。所述载体适合于周质表达cytb562-Strep-tagII融合蛋白。此基于tet-启动子的表达系统的一般用途描述于美国专利5,849,576。

[0174] SEQ ID NO 3: 示出表达载体pASK-IBA2-SAm1的核苷酸序列, 该载体pASK-IBA2-SAm1包含编码OmpA信号肽(粗体)的序列, 其后为编码美国专利6,103,493公开的链霉亲和素突变蛋白“1”(Ala13-Ser139, 下划线, 连续线)的序列。该基因可操作地连接于四环素启动子/操纵子(tetP/O)用于转录调控。所述载体适合于周质表达链霉亲和素突变蛋白“1”。此基于tet-启动子的表达系统的一般用途描述于美国专利5,849,576。

[0175] SEQ ID NO 4: 示出表达载体pASK-IBA2-SAm4001的核苷酸序列, 该载体pASK-IBA2-SAm4001包含编码OmpA信号肽(粗体)的序列, 其后为编码本发明的链霉亲和素突变蛋白m4001(Ala13-Ser139, 下划线, 连续线)的序列。该基因可操作地连接于四环素启动子/操纵子(tetP/O)用于转录调控。所述载体适合于周质表达链霉亲和素突变蛋白m4001。此基于tet-启动子的表达系统的一般用途描述于美国专利5,849,576。

[0176] SEQ ID NO 5: 示出寡核苷酸引物P1的核苷酸序列。

[0177] SEQ ID NO 6: 示出寡核苷酸引物P2的核苷酸序列。

[0178] SEQ ID NO 7: 示出寡核苷酸引物P3的核苷酸序列。

[0179] SEQ ID NO 8: 示出寡核苷酸引物P4的核苷酸序列。

[0180] SEQ ID NO 9: 示出寡核苷酸引物P5的核苷酸序列。

[0181] SEQ ID NO 10: 示出寡核苷酸引物P6的核苷酸序列。

[0182] SEQ ID NO 11: 示出寡核苷酸引物P7的核苷酸序列。

[0183] SEQ ID NO 12: 示出寡核苷酸引物P8的核苷酸序列。

[0184] SEQ ID NO 13: 示出寡核苷酸引物P9的核苷酸序列。

[0185] SEQ ID NO 14: 示出寡核苷酸引物P10的核苷酸序列。

[0186] 本领域技术人员很容易领会, 本发明很适于实施上述对象以及获得目的和优点, 以及其中所固有的那些。而且, 对本领域技术人员显而易见的是, 可以对本文公开的本发明进行不同的替换和修改, 而并不脱离本发明的保护范围和发明精神。本文所述组合物、方法、操作步骤、处理、分子和特定化合物在某些实施方案中具有典型代表性, 其并不预期作为对发明保护范围的限制。其中的变化和本领域技术人员将会想到的涵盖于对本发明的精神内的其它用途均受本发明权利要求保护范围限定。本发明说明书中对已经公开的文件列表或讨论不应该必然地被认为是承认所述文件是本领域现有技术的一部分或为公知常识。

[0187] 在本文示例性描述的本发明可适当地不存在本文并未详细公开的任何一或多个

个元素、一个或多个限制的情况下实施。因此,例如,术语“包含”、“包括”、“含有”等应被扩大理解,并无限制性。此外,本文采用的术语和表达是作为描述的措辞,并无限制性,并且没有使用这些术语和表达而排除所示或描述的特征或其部分的等同形式的意图,但是认可的是,可以在本发明要求保护的范围内进行各种修改。因而,应该理解,尽管通过典型实施例和可选择的特征具体公开了本发明,但是本领域技术人员可能会对本文呈现的发明进行修改和改变,这种修改和改变被认为是在本发明的保护范围内。

[0188] 本文对本发明进行了宽泛和一般性描述。落入一般公开内容内的每一个较窄种类和亚属分组也形成本发明的一部分。在从类别中去除任何主题的前提或负面限制情况下,这包括了本发明的一般性描述,无论删除的内容是否在本文详细说明。

[0189] 其它实施方案都在下述权利要求范围内。而且,在本发明的特征或方面按照马库什组进行描述的情况下,本领域技术人员将认识到,本发明还由此按照马库什组的任何个别成员或成员子组进行了描述。

[0190] 表1

[0191]

文库1 (SEQ ID NO: 203)	<b>Xaa<sup>44</sup>Xaa<sup>45</sup>Ala<sup>46</sup>Arg<sup>47</sup>Gly<sup>48</sup>Asn<sup>49</sup>Ala<sup>50</sup>Glu<sup>51</sup>Xaa<sup>52</sup></b>	相对信号
Wt (SEQ ID NO: 15)	Glu <sup>44</sup> Ser <sup>45</sup> Ala <sup>46</sup> Val <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Ser <sup>52</sup>	-
突变蛋白“1” (SEQ ID NO: 16)	Val <sup>44</sup> Thr <sup>45</sup> Ala <sup>46</sup> Arg <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Ser <sup>52</sup>	+
m400 (SEQ ID NO: 18)	<b>Gly<sup>44</sup>Cys<sup>45</sup>Ala<sup>46</sup>Arg<sup>47</sup>Gly<sup>48</sup>Asn<sup>49</sup>Ala<sup>50</sup>Glu<sup>51</sup>Cys<sup>52</sup></b>	++
m402 (SEQ ID NO: 19)	<b>Ala<sup>44</sup>Cys<sup>45</sup>Ala<sup>46</sup>Arg<sup>47</sup>Gly<sup>48</sup>Asn<sup>49</sup>Ala<sup>50</sup>Glu<sup>51</sup>Cys<sup>52</sup></b>	++

[0192] 表2

[0193]

文库2 (SEQ ID NO: 204)	<b>(Ala/Gly)<sup>44</sup>Cys<sup>45</sup>Xaa<sup>46</sup>Xaa<sup>47</sup>Gly<sup>48</sup>Asn<sup>49</sup>Ala<sup>50</sup>Glu<sup>51</sup>Cys<sup>52</sup></b>	相对信号
Wt (SEQ ID NO: 205)	Glu <sup>44</sup> Ser <sup>45</sup> Ala <sup>46</sup> Val <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Ser <sup>52</sup>	-
突变蛋白“1” (SEQ ID NO: 16)	Val <sup>44</sup> Thr <sup>45</sup> Ala <sup>46</sup> Arg <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Ser <sup>52</sup>	+
m4001 (SEQ ID NO: 20)	<b>Ala<sup>44</sup>Cys<sup>45</sup>Gly<sup>46</sup>Arg<sup>47</sup>Gly<sup>48</sup>Asn<sup>49</sup>Ala<sup>50</sup>Glu<sup>51</sup>Cys<sup>52</sup></b>	+++

[0194] 表3

[0195]

文库 3 (SEQ ID NO: 206)	Xaa <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Xaa <sup>120</sup> Xaa <sup>121</sup>	相对信号
Wt (SEQ ID NO: 207)	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup>	-
突变蛋白“1”	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup>	-
m36 (SEQ ID NO: 21)	Tyr <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Phe <sup>120</sup> Met <sup>121</sup>	+++++++



[0196]

m23 (SEQ ID NO: 22)	Tyr <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Tyr <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup>	+++++
m41 (SEQ ID NO: 23)	Ala <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	+++++
m4 (SEQ ID NO: 24)	Asp <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	+++++
m12 (SEQ ID NO: 25)	Arg <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	+++++
m22 (SEQ ID NO: 26)	Gln <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	+++++
m31 (SEQ ID NO: 27)	Phe <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Ser <sup>120</sup> Trp <sup>121</sup>	+++++
m32 (SEQ ID NO: 28)	Asp <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Val <sup>120</sup> Met <sup>121</sup>	+++++
m35 (SEQ ID NO: 29)	Ala <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Met <sup>121</sup>	+++++
m38 (SEQ ID NO: 30)	Glu <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	+++++
m40 (SEQ ID NO: 31)	Tyr <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Tyr <sup>120</sup> Ser <sup>121</sup>	+++++
m42 (SEQ ID NO: 32)	Phe <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Tyr <sup>120</sup> Gly <sup>121</sup>	+++++
m45 (SEQ ID NO: 33)	Tyr <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	+++++
m46 (SEQ ID NO: 34)	Arg <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Tyr <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup>	+++++
m47 (SEQ ID NO: 35)	Trp <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Tyr <sup>120</sup> Gly <sup>121</sup>	+++++
m7 (SEQ ID NO: 36)	Leu <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	++++
m10 (SEQ ID NO: 37)	His <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	++++
m17 (SEQ ID NO: 38)	Met <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	++++
m21 (SEQ ID NO: 39)	Arg <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	++++
m24 (SEQ ID NO: 40)	Glu <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Trp <sup>121</sup>	++++
m27 (SEQ ID NO: 41)	His <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	++++
m28 (SEQ ID NO: 42)	Ser <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	++++
m30 (SEQ ID NO: 43)	Thr <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	++++
m33 (SEQ ID NO: 44)	Asn <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	++++
m1 (SEQ ID NO: 45)	Glu <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Met <sup>121</sup>	+++
m3 (SEQ ID NO: 46)	Trp <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Cys <sup>120</sup> Cys <sup>121</sup>	+++
m8 (SEQ ID NO: 47)	Met <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Phe <sup>120</sup> Val <sup>121</sup>	+++
m15 (SEQ ID NO: 48)	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Asp <sup>120</sup> Trp <sup>121</sup>	+++
m6 (SEQ ID NO: 49)	Ser <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Met <sup>120</sup> Met <sup>121</sup>	++
m9 (SEQ ID NO: 50)	Arg <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Val <sup>120</sup> Val <sup>121</sup>	++
m20 (SEQ ID NO: 51)	Ser <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Ser <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	++
m34 (SEQ ID NO: 52)	Ala <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Asp <sup>121</sup>	++
m14 (SEQ ID NO: 53)	Arg <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Arg <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup>	+
m18 (SEQ ID NO: 54)	Ser <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Ala <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	+
m19 (SEQ ID NO: 55)	Gly <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Met <sup>120</sup> Met <sup>121</sup>	+

[0197] 表4

[0198]

文库 4 (SEQ ID NO: 208)	Xaa <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Xaa <sup>120</sup> Xaa <sup>121</sup>	相对信号
Wt	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup>	-
m4001	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup>	-

[0199]

m8 (SEQ ID NO: 56)	Glu <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	++++++
m21 (SEQ ID NO: 57)	Asp <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	++++++
m9 (SEQ ID NO: 58)	Glu <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	+++++
m1 (SEQ ID NO: 59)	Arg <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Met <sup>120</sup> Met <sup>121</sup>	++++
m2 (SEQ ID NO: 60)	Arg <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	++++
m3 (SEQ ID NO: 61)	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Pro <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup>	++++
m5 (SEQ ID NO: 62)	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Met <sup>120</sup> Val <sup>121</sup>	++++
m13 (SEQ ID NO: 63)	Gln <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Ser <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup>	++++
m1 (SEQ ID NO: 64)	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	++++
m24 (SEQ ID NO: 65)	Gln <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Met <sup>120</sup> Val <sup>121</sup>	++++
m4 (SEQ ID NO: 66)	Asn <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	+++
m6 (SEQ ID NO: 67)	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Ala <sup>120</sup> Val <sup>121</sup>	+++
m7 (SEQ ID NO: 68)	Ser <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Met <sup>120</sup> Ile <sup>121</sup>	+++
m10 (SEQ ID NO: 69)	His <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Gly <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	+++
m15 (SEQ ID NO: 70)	Ser <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Met <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup>	+++
m23 (SEQ ID NO: 71)	Gln <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Val <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup>	+++
m17 (SEQ ID NO: 72)	Tyr <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Tyr <sup>120</sup> Met <sup>121</sup>	++
m12 (SEQ ID NO: 73)	Leu <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Gly <sup>121</sup>	+
m20 (SEQ ID NO: 74)	His <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Ser <sup>120</sup> Met <sup>121</sup>	+

[0200] 表5

[0201]

文库 5 (SEQ ID NO: 209)	(Phe/Tyr) <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Xaa <sup>120</sup> Xaa <sup>121</sup>	相对信号
Wt	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup>	-
突变蛋白 “1”	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup>	-
m101 (SEQ ID NO: 75)	Tyr <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Phe <sup>120</sup> Leu <sup>121</sup>	++++++
m106 (SEQ ID NO: 76)	Phe <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Phe <sup>120</sup> Leu <sup>121</sup>	++++++
m111 (SEQ ID NO: 77)	Tyr <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Leu <sup>120</sup> Trp <sup>121</sup>	++++++
m100 (SEQ ID NO: 78)	Phe <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Tyr <sup>120</sup> Ile <sup>121</sup>	+++++
m110 (SEQ ID NO: 79)	Tyr <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Tyr <sup>120</sup> Leu <sup>121</sup>	+++++
m104 (SEQ ID NO: 80)	Tyr <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Tyr <sup>120</sup> Gln <sup>121</sup>	++++
m108 (SEQ ID NO: 81)	Phe <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Ile <sup>120</sup> Trp <sup>121</sup>	++++

[0202] 表6

[0203]

文库 6 (SEQ ID NO: 210)	Xaa <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Xaa <sup>120</sup> Xaa <sup>121</sup>	相对信号
Wt	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup>	-
突变蛋白 “1”	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup>	-
m207 (SEQ ID NO: 82)	Thr <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Leu <sup>121</sup>	++++++
m212 (SEQ ID NO: 83)	His <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Leu <sup>121</sup>	++++++
m202 (SEQ ID NO: 84)	Ile <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Arg <sup>121</sup>	+++++
m204 (SEQ ID NO: 85)	His <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Thr <sup>121</sup>	+++++
m206 (SEQ ID NO: 86)	Thr <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Arg <sup>121</sup>	+++++
m208 (SEQ ID NO: 87)	Ala <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Arg <sup>121</sup>	+++++
m203 (SEQ ID NO: 88)	Arg <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Ser <sup>121</sup>	++++
m209 (SEQ ID NO: 89)	Asn <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Arg <sup>121</sup>	++++
m200 (SEQ ID NO: 90)	Lys <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Ser <sup>121</sup>	+++
m201 (SEQ ID NO: 91)	Ser <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Val <sup>120</sup> Phe <sup>121</sup>	+++
m211 (SEQ ID NO: 92)	Lys <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Thr <sup>121</sup>	+++

[0204] 表7

[0205]

文库 7 (SEQ ID NO: 209)	Xaa <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Xaa <sup>121</sup>	相对信号
Wt	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup>	-
突变蛋白 “1”	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup>	-
m300 (SEQ ID NO: 93)	Ala <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	+++++++
m301 (SEQ ID NO: 94)	His <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Met <sup>121</sup>	+++++++
m302 (SEQ ID NO: 95)	His <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	+++++++
m303 (SEQ ID NO: 96)	Glu <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	+++++++
m304 (SEQ ID NO: 97)	Gln <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Tyr <sup>121</sup>	+++++++

[0206] 表8

[0207]

突变蛋白	K <sub>D</sub> [nM]	K <sub>D</sub> (突变蛋白“1”) /K <sub>D</sub> 突变蛋白	(Δ(A <sub>405</sub> -A <sub>595</sub> )/Δt) max
突变蛋白 “1” (SEQ ID NO: 16)	110	1,0	703
m4 (SEQ ID NO: 24)	9	12,2	716
m23 (SEQ ID NO: 22)	12	9,2	968
m36 (SEQ ID NO: 21)	12	9,2	945
m41 (SEQ ID NO: 23)	13	8,5	613

[0208]

m45 (SEQ ID NO: 33)	18	6,1	566
m101 (SEQ ID NO: 75)	14	7,9	589
m111 (SEQ ID NO: 77)	13	8,5	492
m207 (SEQ ID NO: 82)	27	4,1	493
m212 (SEQ ID NO: 83)	17	6,5	607
m301 (SEQ ID NO: 94)	10	11,0	725
m302 (SEQ ID NO: 95)	5	22,0	726
m402 (SEQ ID NO: 19)	92	1,2	880
m4001 (SEQ ID NO: 20)	20	5,5	986
m1-9 (SEQ ID NO: 194)	25		1696
m4001 (SEQ ID NO: 20)	27		1049
m4 (SEQ ID NO: 24)	12		518
m23 (SEQ ID NO: 22)	13		644

[0209] 表9

[0210]

变体	Sepharose 凝胶装 载量 (100%凝胶悬 浮液)	相对于突 变蛋白 “1” 的固定程 度	保留的 Cytb <sub>562</sub> -StrepII	保留的 Cytb <sub>562</sub> -StrepII /固定的突变蛋 白	相对于突变蛋白 “1”的保留的 Cytb <sub>562</sub> -StrepII / 固定的突变蛋白
	[μg/ml]	[%]	[μg]	[μg/μg]	[%]
突变蛋白 “1”	2747	100	156	0,13	100
链霉亲和素 wt	2034	74	12	0,01	11
m4	3557	129	564	0,35	280
m23	3452	126	479	0,31	245
m36	2985	109	429	0,32	254
m41	3284	120	289	0,20	155
m45	2711	99	472	0,39	308
m111	2277	83	318	0,31	246
m207	2767	101	358	0,29	229
m212	3489	127	390	0,25	197
m301	3149	115	400	0,28	225
m302	2804	102	350	0,28	221
m402	1776	51	111	0,14	111
m4001	2429	65	175	0,16	127

[0211] 链霉亲和素突变蛋白对应于表8所列出的那些。表10

[0212]

变体	Sepharose 凝胶装 载量 (100%凝胶 悬浮液)	用于 1 mg 固定的突变 蛋白的柱尺 寸	捕获的 Cytb <sub>562</sub> -StrepI I	相对于突变蛋 白“1”的捕获的 Cytb <sub>562</sub> -StrepII /固定的突变蛋	应用的 Cytb <sub>562</sub> -StrepI I 的产率
----	-------------------------------------	--------------------------------	---	---	---

[0213]

				白	
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[ $\mu\text{l}$ ]	[ $\mu\text{g}$ ]	[%]	[%]
突变蛋白“1”	2747	364	98	100	20
链霉亲和素 wt	2034	492	4	4	1
m4	3557	281	321	327	64
m23	3452	290	301	308	60
m36	2985	335	307	314	61
m41	3284	305	235	240	47
m45	2711	369	335	342	67
m111	2277	439	337	344	67
m207	2767	361	274	279	55
m212	3489	287	233	238	47
m301	3149	318	285	291	57
m302	2804	357	313	320	63
m402	1776	563	153	156	31
m4001	2429	412	168	171	34

[0214] 链霉亲和素突变蛋白对应于表8所列出的那些。

[0215] 表11

[0216]

融合蛋白	链霉亲和素 突变蛋白	链霉亲和素突变蛋白 在芯片上的相对密度 [RU]	$k_{\text{on}} \times 10^5$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{off}} \times 10^{-4}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_D$ [pM]
GFP-StrepII	突变蛋白 “1”	325	1.00	300.00	300000
		5567	1.90	250.00	130000
	m1-9	170	1.50	47.00	32000
		4350	1.70	38.00	23000
GFP-di-tag3	突变蛋白 “1”	325	0.80	43.00	57000
		5567	1.50	17.00	11000
	m1-9	170	2.80	0.15	53
		4350	2.20	0.17	79
Cytb <sub>562</sub> -StrepII	突变蛋白 “1”	325	0.17	2900.00	16700000
		5567	0.14	2400.00	16700000
	m1-9	170	0.70	410.00	586000
		4350	0.52	250.00	485000
Cytb <sub>562</sub> -di-tag3	突变蛋白 “1”	325	0.60	58.00	97000
		5567	1.20	53.00	44000
	m1-9	170	10.00	0.15	14
		4350	4.40	0.19	43

[0217] 表12

[0218]

	具有 3.1 mg/ml 链霉亲和素突变蛋白 ml-9 的 0.5 ml 柱子			
	纯化 1	纯化 2	纯化 3	纯化 4
应用的澄清裂解液 体积 [ml]	0.25	0.25	0.75	0.75
GFP-StrepII 产量 [mg]	0.57	0.54	1.80	1.82
纯度 [%]	91.6	93.5	98.7	94.5

[0219] 表13

[0220]

SEQ ID NO	命名	序列
SEQ ID NO. 1	大肠杆菌碱性磷酸酶 Strep-tag II 融合蛋白 (BAP-StrepII) 由 pASK75-phoA 表达	
SEQ ID NO. 2	质粒 pASK-IBA2-细胞色素 b562	
SEQ ID NO. 3	表达载体 pASK-IBA2-SAm1 的核苷酸序列, 其包含编码 OmpA 信号肽的序列, 其后是编码美国专利 6,103,493 公开的链霉亲和素突变蛋白 “1” 的序列	
SEQ ID NO. 4	表达载体 pASK-IBA2-SAm4001 的核苷酸序列, 其包含编码 OmpA 信号肽的序列, 其后是编码本发明的链霉亲和素突变蛋白 m4001 的序列	
SEQ ID NO. 5	引物 1 (P1)	5'-TCG TGA CCG CGG GTG CAG ACG GAG CTC TGA CCG GTA CCT ACN N(C/G)N N(G/T)G CGC GTG GCA ACG CCG AGN N(C/G)C GCT ACG TCC TGA CCG GTC GTT 为: TCG TGA CCG CGG GTG CAG ACG GAG CTC TGA CCG GTA CCT ACN NSN NKG CGC GTG GCA ACG CCG AGN NSC GCT ACG TCC TGA CCG GTC GTT
SEQ ID NO. 6	引物 2 (P2)	5'-AGT AGC GGT AAA CGG CAG A
SEQ ID NO. 7	引物 3 (P3)	5'-CTG ACC GGT ACC TAC G(G/C)T TGC NN(G/C)NN(G/T)GGC AAC GCC GAG TGC CGC TAC GTC CTG A 为: CTG ACC GGT ACC TAC GST TGC NNS NNK GGC AAC GCC GAG TGC CGC TAC GTC CTG A
SEQ ID NO. 8	引物 4 (P4)	5'-GCC NN(G/C)NN(G/T)TCC ACG CTG GTC GGC CA 为: GCC NNS NNK TCC ACG CTG GTC GGC CA
SEQ ID NO. 9	引物 5 (P5)	5'-GTT(A/C)NN CTC GGT GGT GCC GGA GGT 为: GTT MNN CTC GGT GGT GCC GGA GGT
SEQ ID NO. 10	引物 6 (P6)	5'-GTT A(A/T)A CTC GGT GGT GCC GGA GGT 为: GTT AMA CTC GGT GGT GCC GGA GGT

[0221]

SEQ ID NO. 11	引物 7 (P7)	5'-N(G/C)N N(G/T)T CCA CGC TGG TCG GCC AC 为: NSN NKT CCA CGC TGG TCG GCC AC
EQ ID NO. 12	引物 8 (P8)	5'-N(A/C)N NCT CGG TGG TGC CGG AGG T 为: NMN NCT CGG TGG TGC CGG AGG T
SEQ ID NO. 13	引物 9 (P9)	5'-GGN N(G/T)T CCA CGC TGG TCG GCC AC 为: GGN NKT CCA CGC TGG TCG GCC AC
SEQ ID NO. 14	引物 10 (P10)	5'-A(C/A)N NCT CGG TGG TGC CGG AGG T 为: AMN NCT CGG TGG TGC CGG AGG T
SEQ ID NO: 15	野生型链霉亲和素	Glu <sup>44</sup> Ser <sup>45</sup> Ala <sup>46</sup> Val <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Ser <sup>52</sup> 为: ESAVGNAES
SEQ ID NO: 16	突变蛋白 1	Val <sup>44</sup> Thr <sup>45</sup> Ala <sup>46</sup> Arg <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Ser <sup>52</sup> 为: VTARGNAES
SEQ ID NO: 17	突变蛋白 2 (44-47)	IGAR
SEQ ID NO: 18	m400	Gly <sup>44</sup> Cys <sup>45</sup> Ala <sup>46</sup> Arg <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Cys <sup>52</sup> 为: GCARGNAEC
SEQ ID NO: 19	m402	Ala <sup>44</sup> Cys <sup>45</sup> Ala <sup>46</sup> Arg <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Cys <sup>52</sup> 为: ACARGNAEC
SEQ ID NO: 20	m4001	<b>Ala</b> <sup>44</sup> Cys <sup>45</sup> <b>Gly</b> <sup>46</sup> <b>Arg</b> <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Cys <sup>52</sup> 为: ACGRGNAEC
SEQ ID NO: 21	m36	<b>Tyr</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Phe</b> <sup>120</sup> <b>Met</b> <sup>121</sup> 为: YNAFM
SEQ ID NO: 22	m23	<b>Tyr</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Tyr</b> <sup>120</sup> <b>Ala</b> <sup>121</sup> 为: YNAYA
SEQ ID NO: 23	m41	<b>Ala</b> <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> <b>Trp</b> <sup>120</sup> <b>Tyr</b> <sup>121</sup> 为: AXXWY
SEQ ID NO: 24	m4	<b>Asp</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Phe</b> <sup>121</sup> 为: DNAGF
SEQ ID NO: 25	m12	<b>Arg</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Phe</b> <sup>121</sup> 为: RNAGF
SEQ ID NO: 26	m22	<b>Gln</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Phe</b> <sup>121</sup> 为: QNAGF
SEQ ID NO: 27	m31	<b>Phe</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Ser</b> <sup>120</sup> <b>Trp</b> <sup>121</sup> 为: FNASW
SEQ ID NO: 28	m32	<b>Asp</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Val</b> <sup>120</sup> <b>Met</b> <sup>121</sup> 为: DNAVM
SEQ ID NO: 29	m35	<b>Ala</b> <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> <b>Trp</b> <sup>120</sup> <b>Met</b> <sup>121</sup> 为: AXXWM
SEQ ID NO: 30	m38	<b>Glu</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Phe</b> <sup>121</sup> 为: ENAGF



[0222]

SEQ ID NO: 31	m40	<b>Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Tyr<sup>120</sup>Ser<sup>121</sup></b> 为: YNAYS
SEQ ID NO: 32	m42	<b>Phe<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Tyr<sup>120</sup>Gly<sup>121</sup></b> 为: FNAYG
SEQ ID NO: 33	m45	<b>Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup></b> 为: YNAGF
SEQ ID NO: 34	m46	<b>Arg<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Tyr<sup>120</sup>Ala<sup>121</sup></b> 为: RNAYA
SEQ ID NO: 35	m47	<b>Trp<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Tyr<sup>120</sup>Gly<sup>121</sup></b> 为: W NayG
SEQ ID NO: 36	m7	<b>Leu<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup></b> 为: LNAGF
SEQ ID NO: 37	m10	<b>His<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup></b> 为: HNAGY
SEQ ID NO: 38	m17	<b>Met<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup></b> 为: MNAGF
SEQ ID NO: 39	m21	<b>Arg<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup></b> 为: RNAGY
SEQ ID NO: 40	m24	<b>Glu<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Trp<sup>121</sup></b> 为: ENAGW
SEQ ID NO: 41	m27	<b>His<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup></b> 为: HNAGF
SEQ ID NO: 42	m28	<b>Ser<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup></b> is: SNAGF
SEQ ID NO: 43	m30	<b>Thr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup></b> 为: TNAGF
SEQ ID NO: 44	m33	<b>Asn<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup></b> 为: NNAGF
SEQ ID NO: 45	m1	<b>Glu<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Gly<sup>120</sup>Met<sup>121</sup></b> 为: ENAGM
SEQ ID NO: 46	m3	<b>Trp<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Cys<sup>120</sup>Cys<sup>121</sup></b> 为: WNACC
SEQ ID NO: 47	m8	<b>Met<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Phe<sup>120</sup>Val<sup>121</sup></b> 为: MNAFV
SEQ ID NO: 48	m15	<b>Ala<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Asp<sup>120</sup>Trp<sup>121</sup></b> 为: ANADW
SEQ ID NO: 49	m6	<b>Ser<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Met<sup>120</sup>Met<sup>121</sup></b> 为: SNAMM
SEQ ID NO: 50	m9	<b>Arg<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Val<sup>120</sup>Val<sup>121</sup></b> 为: RNAVV
SEQ ID NO: 51	m20	<b>Ser<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Ser<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup></b> 为: SNASF
SEQ ID NO: 52	m34	<b>Ala<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Asp<sup>121</sup></b> 为: AXXWD

[0223]

SEQ ID NO: 53	m14	<b>Arg</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Arg</b> <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup> 为: RNARA
SEQ ID NO: 54	m18	<b>Ser</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Ala <sup>120</sup> <b>Phe</b> <sup>121</sup> 为: SNAAF
SEQ ID NO: 55	m19	<b>Gly</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Met</b> <sup>120</sup> <b>Met</b> <sup>121</sup> 为: GNAMM
SEQ ID NO: 56	m8	<b>Glu</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Phe</b> <sup>121</sup> 为: ENAGF
SEQ ID NO: 57	m21	<b>Asp</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Tyr</b> <sup>121</sup> 为: DNAGY
SEQ ID NO: 58	m9	<b>Glu</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Tyr</b> <sup>121</sup> 为: ENAGY
SEQ ID NO: 59	m1	<b>Arg</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Met</b> <sup>120</sup> <b>Met</b> <sup>121</sup> 为: RNAMM
SEQ ID NO: 60	m2	<b>Arg</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Phe</b> <sup>121</sup> 为: RNAGF
SEQ ID NO: 61	m3	<b>Ala</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Pro</b> <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup> 为: ANAPA
SEQ ID NO: 62	m5	<b>Ala</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Met</b> <sup>120</sup> <b>Val</b> <sup>121</sup> 为: ANAMV
SEQ ID NO: 63	m13	<b>Gln</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Ser</b> <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup> 为: QNASA
SEQ ID NO: 64	m14	<b>Ala</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Phe</b> <sup>121</sup> 为: ANAGF
SEQ ID NO: 65	m24	<b>Gln</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Met</b> <sup>120</sup> <b>Val</b> <sup>121</sup> 为: QNAMV
SEQ ID NO: 66	m4	<b>Asn</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Tyr</b> <sup>121</sup> 为: NNAGY
SEQ ID NO: 67	m6	<b>Ala</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Ala <sup>120</sup> <b>Val</b> <sup>121</sup> 为: ANAAV
SEQ ID NO: 68	m7	<b>Ser</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Met</b> <sup>120</sup> <b>Ile</b> <sup>121</sup> 为: SNAMI
SEQ ID NO: 69	m10	<b>His</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Gly</b> <sup>120</sup> <b>Tyr</b> <sup>121</sup> 为: HNAGY
SEQ ID NO: 70	m15	<b>Ser</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Met</b> <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup> 为: SNAMA
SEQ ID NO: 71	m23	<b>Gln</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Val</b> <sup>120</sup> Ala <sup>121</sup> 为: QNAVA
SEQ ID NO: 72	m17	<b>Tyr</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Tyr</b> <sup>120</sup> <b>Met</b> <sup>121</sup> 为: YNAYM
SEQ ID NO: 73	m12	<b>Leu</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Trp</b> <sup>120</sup> <b>Gly</b> <sup>121</sup> 为: LNAWG
SEQ ID NO: 74	m20	<b>His</b> <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> <b>Ser</b> <sup>120</sup> <b>Met</b> <sup>121</sup> 为: HNASM

[0224]

SEQ ID NO: 75	m101	<b>Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Phe<sup>120</sup>Leu<sup>121</sup></b> 为: YNAFL
SEQ ID NO: 76	m106	<b>Phe<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Phe<sup>120</sup>Leu<sup>121</sup></b> 为: FNAFL
SEQ ID NO: 77	m111	<b>Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Leu<sup>120</sup>Trp<sup>121</sup></b> 为: YNALW
SEQ ID NO: 78	m100	<b>Phe<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Tyr<sup>120</sup>Ile<sup>121</sup></b> 为: FNAYI
SEQ ID NO: 79	m110	<b>Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Tyr<sup>120</sup>Leu<sup>121</sup></b> 为: YNAYL
SEQ ID NO: 80	m104	<b>Tyr<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Tyr<sup>120</sup>Gln<sup>121</sup></b> 为: YNAYQ
SEQ ID NO: 81	m108	<b>Phe<sup>117</sup>Asn<sup>118</sup>Ala<sup>119</sup>Ile<sup>120</sup>Trp<sup>121</sup></b> 为: FNAIW
SEQ ID NO: 82	m207	<b>Thr<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Leu<sup>121</sup></b> 为: TXXWL
SEQ ID NO: 83	m212	<b>His<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Leu<sup>121</sup></b> 为: HXXWL
SEQ ID NO: 84	m202	<b>Ile<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Arg<sup>121</sup></b> 为: IXXWR
SEQ ID NO: 85	m204	<b>His<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Thr<sup>121</sup></b> 为: HXXWT
SEQ ID NO: 86	m206	<b>Thr<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Arg<sup>121</sup></b> 为: TXXWR
SEQ ID NO: 87	m208	<b>Ala<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Arg<sup>121</sup></b> 为: AXXWR
SEQ ID NO: 88	m203	<b>Arg<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Ser<sup>121</sup></b> 为: RXXWS
SEQ ID NO: 89	m209	<b>Asn<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Arg<sup>121</sup></b> 为: NXXWR
SEQ ID NO: 90	m200	<b>Lys<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Ser<sup>121</sup></b> 为: KXXWS
SEQ ID NO: 91	m201	<b>Ser<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Val<sup>120</sup>Phe<sup>121</sup></b> 为: SXXVF
SEQ ID NO: 92	m211	<b>Lys<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Thr<sup>121</sup></b> 为: KXXWT
SEQ ID NO: 93	m300	<b>Ala<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup></b> 为: AXXWY
SEQ ID NO: 94	m301	<b>His<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Met<sup>121</sup></b> 为: HXXWM
SEQ ID NO: 95	m302	<b>His<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup></b> 为: HXXWY
SEQ ID NO: 96	m303	<b>Glu<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup></b> 为: EXXWY

[0225]

SEQ ID NO: 97	m304	<b>Gln<sup>117</sup>---<sup>118</sup>---<sup>119</sup>Trp<sup>120</sup>Tyr<sup>121</sup></b> 为: QXXWY
SEQ ID NO: 98	链霉亲和素突变蛋白 (44-47=VTAR)	Val <sup>44</sup> -Thr <sup>45</sup> -Ala <sup>46</sup> -Arg <sup>47</sup> 为: VTAR
SEQ ID NO: 99	链霉亲和素突变蛋白	Ile <sup>44</sup> -Gly <sup>45</sup> -Ala <sup>46</sup> -Arg <sup>47</sup> 为: IGAR
SEQ ID NO: 100	Strep-tag II 亲和肽配体	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys 为: WSHPQFEK
SEQ ID NO: 101	肽序列	Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa 其中 Xaa 表示任意氨基酸, Yaa 和 Zaa 都表示 Gly, 或者 Yaa 表示 Glu 而 Zaa 表示 Arg 或 Lys 是 WXHPQFXX
SEQ ID NO: 102	Strep-tag 链霉亲和素结合肽	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(WRHPQFGG)
SEQ ID NO: 103	肽序列	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) <sub>3</sub> -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys 是 WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWHPQFEK
SEQ ID NO: 104	GFP-StrepII	
SEQ ID NO: 105	GFP-di-tag3	
SEQ ID NO: 106	Cytb562-StrepII	
SEQ ID NO: 107	Cytb562-di-tag3	
SEQ ID NO: 108	肽序列	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa 其中 Oaa 是 Trp、Lys 或 Arg, Xaa 是任意氨基酸, 并且其中 Yaa 和 Zaa 均是 Gly, 或者 Yaa 是 Glu 而 Zaa 是 Lys 或 Arg 是 XXHPQFXX
SEQ ID NO: 109	di-tag2	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) <sub>2</sub> -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys 是 WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWHPQFEK
SEQ ID NO: 110	肽序列	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSAWHPQFEK
SEQ ID NO: 111	野生型	图 4
SEQ ID NO: 112	突变蛋白 “1”	图 4
SEQ ID NO: 113	突变蛋白 “2”	图 4
SEQ ID NO: 114	m400	图 4
SEQ ID NO: 115	m402	图 4
SEQ ID NO: 116	m4001	图 4
SEQ ID NO: 117	突变蛋白 “1” -m36	图 4
SEQ ID NO: 118	突变蛋白 “1” -m23	图 4
SEQ ID NO: 119	突变蛋白 “1” -m41	图 4
SEQ ID NO: 120	突变蛋白 “1” -m4	图 4

[0226]

120		
SEQ ID NO: 121	突变蛋白“1”-m12	图 4
SEQ ID NO: 122	突变蛋白“1”-m22	图 4
SEQ ID NO: 123	突变蛋白“1”-m31	图 4
SEQ ID NO: 124	突变蛋白“1”-m32	图 4
SEQ ID NO: 125	突变蛋白“1”-m35	图 4
SEQ ID NO: 126	突变蛋白“1”-m38	图 4
SEQ ID NO: 127	突变蛋白“1”-m40	图 4
SEQ ID NO: 128	突变蛋白“1”-m42	图 4
SEQ ID NO: 129	突变蛋白“1”-m45	图 4
SEQ ID NO: 130	突变蛋白“1”-m46	图 4
SEQ ID NO: 131	突变蛋白“1”-m47	图 4
SEQ ID NO: 132	突变蛋白“1”-m7	图 4
SEQ ID NO: 133	突变蛋白“1”-m10	图 4
SEQ ID NO: 134	突变蛋白“1”-m17	图 4
SEQ ID NO: 135	突变蛋白“1”-m21	图 4
SEQ ID NO: 136	突变蛋白“1”-m24	图 4
SEQ ID NO: 137	突变蛋白“1”-m27	图 4
SEQ ID NO: 138	突变蛋白“1”-m28	图 4
SEQ ID NO: 139	突变蛋白“1”-m30	图 4
SEQ ID NO: 140	突变蛋白“1”-m33	图 4
SEQ ID NO: 141	突变蛋白“1”-m1	图 4
SEQ ID NO:	突变蛋白“1”-m3	图 4

[0227]

142		
SEQ ID NO: 143	突变蛋白“1”-m8	图 4
SEQ ID NO: 144	突变蛋白“1”-m15	图 4
SEQ ID NO: 145	突变蛋白“1”-m6	图 4
SEQ ID NO: 146	突变蛋白“1”-m9	图 4
SEQ ID NO: 147	突变蛋白“1”-m20	图 4
SEQ ID NO: 148	突变蛋白“1”-m34	图 4
SEQ ID NO: 149	突变蛋白“1”-m14	图 4
SEQ ID NO: 150	突变蛋白“1”-m18	图 4
SEQ ID NO: 151	突变蛋白“1”-m19	图 4
SEQ ID NO: 152	m4001-m8	图 4
SEQ ID NO: 153	m4001-m21	图 4
SEQ ID NO: 154	m4001-m9	图 4
SEQ ID NO: 155	m4001-m1	图 4
SEQ ID NO: 156	m4001-m2	图 4
SEQ ID NO: 157	m4001-m3	图 4
SEQ ID NO: 158	m4001-m5	图 4
SEQ ID NO: 159	m4001-m13	图 4
SEQ ID NO: 160	m4001-m14	图 4
SEQ ID NO: 161	m4001-m24	图 4
SEQ ID NO: 162	m4001-m4	图 4
SEQ ID NO: 163	m4001-m6	图 4
SEQ ID NO:	m4001-m7	图 4

[0228]

164		
SEQ ID NO: 165	m4001-m10	图 4
SEQ ID NO: 166	m4001-m15	图 4
SEQ ID NO: 167	m4001-m23	图 4
SEQ ID NO: 168	m4001-m17	图 4
SEQ ID NO: 169	m4001-m12	图 4
SEQ ID NO: 170	m4001-m20	图 4
SEQ ID NO: 171	突变蛋白“1”-m101	图 4
SEQ ID NO: 172	突变蛋白“1”-m106	图 4
SEQ ID NO: 173	突变蛋白“1”-m111	图 4
SEQ ID NO: 174	突变蛋白“1”-m100	图 4
SEQ ID NO: 175	突变蛋白“1”-m110	图 4
SEQ ID NO: 176	突变蛋白“1”-m104	图 4
SEQ ID NO: 177	突变蛋白“1”-m108	图 4
SEQ ID NO: 178	突变蛋白“1”-m207	图 4
SEQ ID NO: 179	突变蛋白“1”-m212	图 4
SEQ ID NO: 180	突变蛋白“1”-m202	图 4
SEQ ID NO: 181	突变蛋白“1”-m204	图 4
SEQ ID NO: 182	突变蛋白“1”-m206	图 4
SEQ ID NO: 183	突变蛋白“1”-m208	图 4
SEQ ID NO: 184	突变蛋白“1”-m203	图 4
SEQ ID NO: 185	突变蛋白“1”-m209	图 4
SEQ ID NO:	突变蛋白“1”-m200	图 4

[0229]

186		
SEQ ID NO: 187	突变蛋白 “1” -m201	图 4
SEQ ID NO: 188	突变蛋白 “1” -m211	图 4
SEQ ID NO: 189	突变蛋白 “1” -m300	图 4
SEQ ID NO: 190	突变蛋白 “1” -m301	图 4
SEQ ID NO: 191	突变蛋白 “1” -m302	图 4
SEQ ID NO: 192	突变蛋白 “1” -m303	图 4
SEQ ID NO: 193	突变蛋白 “1” -m304	图 4
SEQ ID NO: 194	突变蛋白 m1-9	图 4
SEQ ID NO: 195	链霉亲和素氨基酸 114 至 121 的环	TTEANAWK
SEQ ID NO: 196	链霉亲和素氨基酸 115 至 121 的环区	TEANAWK
SEQ ID NO: 197	突变蛋白	HPYFYAPELLFFAK
SEQ ID NO: 198	突变蛋白	EGGKETLTPSELRLDV
	基序 1 共有序列 1	Xaa <sup>117</sup> Gly <sup>120</sup> Yaa <sup>121</sup> , 其中 Xaa 可为任意氨基酸, 并且 Yaa 可为 Phe 或 Tyr 或 Met 为 XGX—因此不超过 4 个氨基酸
SEQ ID NO: 199	基序 1 (图 2B)	<b>Xaa Asn Ala Gly Zaa,</b> Xaa 为 <b>Glu、Asp、Arg</b> 、His、Asn、Gln、Thr、Ser、Leu、Met, Zaa 为 <b>Phe、Tyr</b> , Met 为 XNAGX
	基序 2 共有序列 2	Aaa <sup>117</sup> Baa <sup>120</sup> Caa <sup>121</sup> , 其中 Aaa 可为 Tyr、Phe、Arg、Trp 或 Gln, Baa 可为 Tyr、Phe、Leu、Ile 或 Met, Caa 可为任意氨基酸, 其中 Caa <sup>121</sup> 优选为 Leu、Ile、Met、Gly、Gly、Trp、Ser、Ala 或 Val 残基
SEQ ID NO: 200	基序 2 (图 2B)	Xaa-Asn-Ala-Yaa-Zaa, 其中 <b>Xaa</b> 是 <b>Tyr、Phe</b> 、Arg、Trp、Gln; Yaa 是 <b>Tyr、Phe</b> 、Leu、Ile、Met, <b>Zaa</b> 是 <b>Leu、Ile、Met</b> 、Gln、Gly、Trp、Ser、Ala、Val 是 XNAXX
SEQ ID NO:	基序 3	Daa <sup>117</sup> Eaa <sup>118</sup> Faa <sup>119</sup> Gaa <sup>120</sup> Haa <sup>121</sup> , 其中 Daa 和 Haa 可为



[0230]

201	共有序列 3	任意氨基酸, Eaa 和 Faa 均缺失, Gaa 可为 Trp 或 Val, 其中 Daa <sup>117</sup> 优选 His、Glu、Gln、Thr、Ala 或 Ile 残基, 并且其中 Haa <sup>121</sup> 优选为 Tyr、Leu、Met 或 Arg 残基, 为 XXXXX
SEQ ID NO: 202	基序 2 (图 2B)	Xaa --- --- Yaa Zaa, 其中 Xaa 为 His、Glu、Gln、Thr、Ala、Ile、Arg、Asn、Lys、Ser; Yaa 为 Trp、Val, Zaa 为 Tyr、Leu、Met、Arg、Thr、Ser、Phe 为 XXXXX
SEQ ID NO: 203	文库 1	Xaa <sup>44</sup> Xaa <sup>45</sup> Ala <sup>46</sup> Arg <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Xaa <sup>52</sup> 是 XXARGNAEX
SEQ ID NO: 204	文库 2	(Ala/Gly)44Cys45Xaa46Xaa47Gly48Asn49Ala50 Glu51Cys52 是 XCXXGNAEC
SEQ ID NO: 205	Wt (文库 2)	Glu <sup>44</sup> Ser <sup>45</sup> Ala <sup>46</sup> Val <sup>47</sup> Gly <sup>48</sup> Asn <sup>49</sup> Ala <sup>50</sup> Glu <sup>51</sup> Ser <sup>52</sup> 是 ESAVGNAES
SEQ ID NO: 206	文库 3	Xaa <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Xaa <sup>120</sup> Xaa <sup>121</sup> 是 XNAXX
SEQ ID NO: 207	Wt (文库 2) 突变蛋白“1” (文库 2) Wt (文库 4) m4001 (文库 4) Wt (文库 5) 突变蛋白“1” (文库 5) Wt (文库 6) 突变蛋白“1” (文库 6) Wt (文库 7) 突变蛋白“1” (文库 7)	Ala <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Lys <sup>121</sup> 是 ANAWK
SEQ ID NO: 208	文库 4	Xaa <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Xaa <sup>120</sup> Xaa <sup>121</sup> 是 XNAXX
SEQ ID NO: 209	文库 5	(Phe/Tyr) <sup>117</sup> Asn <sup>118</sup> Ala <sup>119</sup> Xaa <sup>120</sup> Xaa <sup>121</sup> 是 XNAXX
SEQ ID NO: 210	文库 6	Xaa <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Xaa <sup>120</sup> Xaa <sup>121</sup> 是 XXXXX
SEQ ID NO: 211	文库 7	Xaa <sup>117</sup> --- <sup>118</sup> --- <sup>119</sup> Trp <sup>120</sup> Xaa <sup>121</sup> 是 XXXWX
SEQ ID NO: 212	Wt 链霉亲和素氨基酸序列 (残基 14 至 139)	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVG NAESRYVLTGRYDSAPATDG SGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAE ARINTQWLLTSGTTEANAWKST LVGHDTFTKVKPSAAS

## 序列表

[0001]	<110>	IBA 股份有限公司	
	<120>	链霉亲和素突变蛋白及其使用方法	
	<130>	LC15310008P	
	<150>	US61727283	
	<151>	2012-11-16	
	<150>	EP13181697.7	
	<151>	2013-08-26	
	<160>	212	
	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
	<211>	4568	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	大肠杆菌碱性磷酸酶 Strep-tag II 融合蛋白 (BAP-StrepII) - 由 pASK75-phoA 表达	
	<400>	1	
		ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt	60
		tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaat gaatagttcg acaaaaaatct	120
		agaacatgga gaaaataaag tgaaacaaag cactattgca ctggcactct taccgttact	180
		gtttaccct gtgacaaaag cccggacacc agaatgcct gttctggaaa accgggctgc	240
		tcaggcgat attactgcac ccggcgggtgc tcgccgttta acgggtgatc agactgccgc	300
		tctgcgtgat tctcttagcg ataaacctgc aaaaaatatt attttctga ttggcgatgg	360
		gatgggggac tcggaaatta ctgccgcacg taattatgcc gaaggtgcgg gcggcttttt	420
		taaaggtata gatgccttac cgcttaccgg gcaatacact cactatgcgc tgaataaaaa	480

	aaccggcaaa ccggactacg tcaccgactc ggctgcatca gcaaccgcct ggtaaccgg	540
	tgtcaaaacc tataacggcg cgctgggcgt cgatattcac gaaaaagatc acccaacgat	600
	tctggaaatg gcaaaagccg caggctctggc gaccggtaac gtttctaccg cagagttgca	660
	ggatgccacg cccgctgcgc tgggtggcaca tgtgacctcg cgcaaatgct acggtccgag	720
	cgcgaccagt gaaaaatgtc cgggtaacgc tctggaaaaa ggcggaag gatcgattac	780
	cgaacagctg cttaacgctc gtcccgacgt tacgcttggc ggcggcgcaa aaacctttgc	840
	tgaacggca accgctggtg aatggcaggg aaaaacgctg cgtgaacagg cacaggcgcg	900
	tggttatcag ttggtgagcg atgctgcctc actgaattcg gtgacggaag cgaatcagca	960
	aaaacccctg ctgacctgt ttgctgacgg caatatgcca gtgcctggc taggaccgaa	1020
	agcaacgtac catggcaata tcgataagcc cgcagtcacc tgtacgcaa atccgcaacg	1080
	taatgacagt gtaccaaccc tggcgagat gaccgacaaa gccattgaat tgttgagtaa	1140
[0002]	aatgagaaa ggctttttcc tgcaagtga aggtgcgtca atcgataaac aggatcatgc	1200
	tgcaatcct tgtgggcaaa ttggcgagac ggtcgatctc gatgaagccg tacaacgggc	1260
	gctggaattc gctaaaaagg agggtaacac gctggtcata gtcaccgctg atcacgcca	1320
	cgcagccag attgttgccg cgataccaa agctccgggc ctcaccagc cgctaaatac	1380
	caaagatggc gcagtgatgg tgatgagtta cgggaactcc gaagaggatt cacaagaaca	1440
	taccggcagt cagttgcgta ttgcggcgta tggcccgcat gccccaatg ttgttgact	1500
	gaccgaccag accgatctct tctacaccat gaaagccgt ctggggctga aaccgcctag	1560
	cgcttggtct caccgcagt tcgaaaaata ataagcttga cctgtgaagt gaaaaatggc	1620
	gcacattgtg cgacattttt tttgtctgcc gtttaccgt actgcgtcac ggatctccac	1680
	gcgccctgta gcggcgcat aagcgcgcg ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgt	1740
	acacttgcca gcgccctagc gccgcctct ttcgctttct tcccttctt tctcgccacg	1800

	ttcgccggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt ccgatttagt	1860
	gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattagggtg atggttcacg tagtgggcca	1920
	tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt taatagtgga	1980
	ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt tgatttataa	2040
	gggattttgc cgatttcggc ctatttggtta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac	2100
	gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg	2160
	cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga	2220
	caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat	2280
	ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca	2340
	gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc	2400
	gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca	2460
[0003]	atgatgagca cttttaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg	2520
	caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca	2580
	gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata	2640
	accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag	2700
	ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg	2760
	gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca	2820
	acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaattg	2880
	atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ctttccggt	2940
	ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg gctctcgcg tatcattgca	3000
	gcactggggc cagatggtaa gccctccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag	3060
	gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat	3120

	tggttagaat taatgatgtc tcgtttagat aaaagtaaag tgattaacag cgcattagag	3180
	ctgcttaatg aggtcggaat cgaaggttta acaacccgta aactcgccca gaagctaggt	3240
	gtagagcagc ctacattgta ttggcatgta aaaaataagc gggctttgct cgacgcctta	3300
	gccattgaga tgtagatag gcaccatact cacttttgcc ctttagaagg ggaaagctgg	3360
	caagattttt tacgtaataa cgctaaaagt tttagatgtg ctttactaag tcatcgcgat	3420
	ggagcaaaag tacathtaggt tacacggcct acagaaaaac agtatgaaac tctcgaaaat	3480
	caattagcct ttttatgccca acaaggtttt tctactagaga atgcattata tgcactcagc	3540
	gcagtggggc attttacttt aggttgcgta ttggaagatc aagagcatca agtcgctaaa	3600
	gaagaaaggg aaacacctac tactgatagt atgccgccat tattacgaca agctatcgaa	3660
	ttatttgatc accaaggtgc agagccagcc ttcttattcg gccttgaatt gatcataigc	3720
	ggattagaaa aacaacttaa atgtgaaagt gggctttaa agcagcataa cctttttccg	3780
[0004]	tgatggtaac ttcactagtt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg	3840
	acaaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc	3900
	aaaggatctt ctgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa	3960
	ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttcgaag	4020
	gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta	4080
	ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgita	4140
	ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaactc aagacgatag	4200
	ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg	4260
	gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg	4320
	cttcccgaag ggagaaagc ggacaggtat ccggtgaagc gcagggtcgg aacaggagag	4380
	cgcacgaggg agcttcagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc	4440

	cacctctgac ttgagcgctcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa	4500
	aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg	4560
	acccgaca	4568
	<210> 2	
	<211> 3535	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 质粒 pASK-IBA2-细胞色素 b562	
	<400> 2	
	ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt	60
	tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaaat gaatagtctg acaaaaaatct	120
	agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgca ttgcagtggc actggctggt	180
[0005]	ttcgtaccg tagcgcaggc cgctgatctt gaagacaata tggaaccct caacgacaat	240
	ttaaaagtga tcgaaaaagc ggataacgcg gcgcaagtca aagacgcgtt aacgaagatg	300
	cgcgccgcag ccctggatgc gcaaaaagca acgccgccga agctcgaaga taaatcaccg	360
	gacagcccgg aaatgaaaga tttccgccac ggtttcgaca ttctggtcgg tcagattgac	420
	gacgcgtga agctggcaaa tgaaggtaaa gtaaaagaag cgaggctgc tgcagagcaa	480
	ctgaaaacga cccgcaacgc ctatcaccag aagtatcgtc cgccgagcgc ttggagccac	540
	ccgcagtctg aaaaataata agcttgacct gtgaagtga aaatggcgca cattgtgcga	600
	catttttttt gtctgccgtt taccgtact gcgtcacgga tctccacgcg ccctgtagcg	660
	gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgtaca cttgccagcg	720
	ccctagegcc cgctcctttc gctttcttcc ctctctttct cgccacgttc gccggtttc	780
	ccgtcaagc tctaaatcgg gggtccctt tagggttccg atttagtgct ttacgcacc	840

	tcgaccccaa aaaacttgat tagggatgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga	900
	cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca cgttctttta tagtggactc ttgttccaaa	960
	ctggaacaac actcaaccct atctcggctc attcttttga tttataaggg attttgccga	1020
	tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga ttttaacaaa atttaacgcg aattttaaca	1080
	aaatattaac gcttacaatt tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta	1140
	tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat	1200
	aatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcggc	1260
	ttattccctt ttttgcggca ttttgccctc ctgtttttgc tcaccagaa acgttggtga	1320
	aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca	1380
	acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt	1440
	ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg	1500
[0006]	gtcgcgcgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc	1560
	atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtc tgccataacc atgagtgata	1620
	acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt	1680
	tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag	1740
	ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgttagc aatggcaaca acgttgcgca	1800
	aactattaac tggcgaacta ctactctag ctccccgga acaattgata gactggatgg	1860
	aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg	1920
	ctgataaatc tggagccggt gagcgtggct ctgcggtat cattgcagca ctggggccag	1980
	atggtaaagc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg	2040
	aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taggaattaa	2100
	tgatgtctcg tttagataaa agtaaagtga ttaacagcgc attagagctg cttaatgagg	2160

	tcggaatcga aggtttaaca acccgtaaac tcgcccagaa gctaggtgta gagcagccta	2220
	cattgtattg gcatgtaaaa aataagcggg ctttgctcga cgccttagcc attgagatgt	2280
	tagataggca ccatactcac ttttgccctt tagaaggga aagctggcaa gattttttac	2340
	gtaataacgc taaaagtttt agatgtgctt tactaagtca tcgcatgga gcaaaagtac	2400
	atthaggtac acggcctaca gaaaaacagt atgaaactct cgaaaatcaa ttagcctttt	2460
	tatgccaaca aggtttttca ctagagaatg cattatatgc actcagcgca gtggggcatt	2520
	ttactttagg ttgcgtattg gaagatcaag agcatcaagt cgctaaagaa gaaaggga	2580
	cacctactac tgatagtatg ccgccattat tacgacaagc tatcgaatta ttgatcacc	2640
	aagggtcaga gccagccttc ttattcggcc ttgaattgat catatgcgga ttagaaaaac	2700
	aacttaaatg tgaaagtggg tcttaaaagc agcataacct tttccgtga tggtaacttc	2760
	actagtttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt	2820
[0007]	aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt	2880
	gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag	2940
	cgggtggttg ttgcccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca	3000
	gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca	3060
	agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg	3120
	ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg	3180
	cgcagcggtc gggctgaacg ggggttctgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct	3240
	acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga	3300
	gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc	3360
	ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg	3420
	agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg	3480



	cggccttttt acggttcctg gccttttgc ggccttttgc tcacatgacc cgaca	3535
<210>	3	
<211>	3562	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	表达载体 pASK-IBA2-SAm1 的核苷酸序列, 其包含编码 OmpA 信号肽的序列, 其后是编码美国专利 6, 103, 493 公开的链霉亲和素突变蛋白“1”的序列	
<400>	3	
	ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt	60
	tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaat gaatagttcg acaaaaatct	120
	agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgca ttgcagtggc actggctggt	180
	ttcgtaccg tagcgcaggc tgcagaagca ggtatcacg gcacctggta caaccagctc	240
[0008]	ggctcgacct tcacgtgac cgcgggtgca gacggagctc tgaccggtag ctacgtcacg	300
	gcgcgtggca acgccgagag ccgctacgtc ctgaccggtc gttacgacag cgccccggcc	360
	accgacggca gcggcaccgc cctcggttgg acggtggcct ggaagaataa ctaccgcaac	420
	gcccactccg cgaccacgtg gagcggccag tacgtcggcg gcgccgaggc gaggatcaac	480
	accagtggc tgctgacctc cggcaccacc gaggccaacg cctggaagtc cagctggtc	540
	ggccacgaca ccttcaccaa ggtgaagccg tccgccgcct cctaataagc ttgacctgtg	600
	aagtgaaaaa tggcgcacat tgtgcgacat ttttttgc tgccgtttac cgctactgcg	660
	tcacggatct ccacgcgcc tgtagcggcg cattaagcg gcgggtgtg gtggttacgc	720
	gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc tagcggccgc tcctttcgct ttcttcctt	780
	cctttctgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcgggg ctcccttag	840
	ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt	900
	cacgtagtgg gccatgccc tgatagacgg tttttgccc tttgacgttg gattccacgt	960

	tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt	1020
	cttttgattt ataagggatt ttgccgattt cgccctattg gttaaaaaat gagctgattt	1080
	aacaaaaatt taacgcgaat ttttaacaaaa tattaacgct tacaatttca ggtggcactt	1140
	ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt	1200
	atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta	1260
	tgagtattca acatttccgt gtgcgccctta ttcccttttt tgccgcatth tgcccttctg	1320
	tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac	1380
	gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaatat ccttgagagt ttccgccccg	1440
	aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagtctctgt atgtggcgcg gtattatccc	1500
	gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg	1560
	ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat	1620
[0009]	gcagtgcctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg	1680
	gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg	1740
	atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc	1800
	ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt	1860
	cccggcaaca attgatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct	1920
	cgcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtggctctc	1980
	gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca	2040
	cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct	2100
	cactgattaa gcattggtag gaattaatga tgtctcgtht agataaaaagt aaagtgatta	2160
	acagcgcatt agagctgctt aatgaggctg gaatcgaagg ttttaacaacc cgtaaacctg	2220
	cccagaagct aggtgtagag cagcctacat tgtattggca tgtaaaaaat aagcgggctt	2280

	tgctcgacgc cttagccatt gagatgtag ataggcacca tactcacttt tgcccttttag	2340
	aaggggaaag ctggcaagat tttttacgta ataacgctaa aagttttaga tgtgctttac	2400
	taagtcacgc cgatggagca aaagtacatt taggtacacg gcctacagaa aaacagtatg	2460
	aaactctcga aaatcaatta gcctttttat gccacaagg tttttcacta gagaatgcat	2520
	tatatgcact cagcgcagtg gggcatttta ctttaggttg cgtattggaa gatcaagagc	2580
	atcaagtcgc taaagaagaa agggaaacac ctactactga tagtatgccg ccattattac	2640
	gacaagctat cgaattatit gatcaccaag gtgcagagcc agccttctta ttcggccttg	2700
	aattgatcat atgcggatta gaaaaacaac tttaatgtga aagtgggtct taaaagcagc	2760
	ataacctttt tccgtgatgg taacttcact agtttaaaag gatctaggtg aagatccttt	2820
	ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc	2880
	ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct	2940
[0010]	tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgitt gccggatcaa gagctaccaa	3000
	ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagegcagat accaaatact gtccttctag	3060
	tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc	3120
	tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg	3180
	actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca	3240
	cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat	3300
	gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggtat agcggcagg	3360
	tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc	3420
	ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc	3480
	ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttttac gttcctggcc ttttctggc	3540
	cttttgetca catgaccga ca	3562

<210>	4	
<211>	3562	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	表达载体 pASK-IBA2-SAm4001 的核苷酸序列, 其包含编码 OmpA 信号肽的序列, 其后是编码链霉亲和素突变蛋白 m4001 的序列	
<400>	4	
	ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt	60
	tatattacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaaat gaatagttag acaaaaaatct	120
	agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgga ttgcagtggc actggctggt	180
	ttcgctaccg tagcgcaggc tgcagaagca ggtatcaccg gcacctggta caaccagctc	240
	ggctcgacct tcatcgtgac cgcggttgca gacggagctc tgaccggtac ctacgcttgc	300
[0011]	ggccggggca acgccgagtg ccgctacgtc ctgaccggtc gttacgacag cgccccggcc	360
	accgacggca gcggcaccgc cctcggttgg acggtggcct ggaagaataa ctaccgcaac	420
	gcccactccg cgaccacgtg gagcgccag tacgtcggcg gcgccgaggc gaggatcaac	480
	accagtggtc tgctgacctc cggcaccacc gaggccaacg cctggaagtc cacgctggtc	540
	ggccacgaca cttcaccaa ggtgaagccg tccgccgcct cctaataagc ttgacctgtg	600
	aagtgaaaaa tggcgacat tgtgcgacat tttttttgtc tgccgtttac cgctactgcg	660
	tcacggatct ccacgcgcc ttagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc	720
	gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc tagcgcccgc tcctttcgtt ttcttccctt	780
	cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcgggg ctccctttag	840
	ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt	900
	cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttagcgttg ggtccacgt	960

	tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt	1020
	cttttgattt ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt	1080
	aacaaaaatt taacgcgaat ttttaacaaaa tattaacgct tacaatttca ggtggcactt	1140
	ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt	1200
	atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta	1260
	tgagtattca acatttccgt gtgcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttctctg	1320
	tttttgcctc cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac	1380
	gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtagat ccttgagagt ttctgccccg	1440
	aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagtctctgt atgtggcgcg gtattatccc	1500
	gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg	1560
	ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat	1620
[0012]	gcagtgcctc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg	1680
	gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg	1740
	atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc	1800
	ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt	1860
	cccggcaaca attgatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct	1920
	cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtggctctc	1980
	gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca	2040
	cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct	2100
	cactgattaa gcattggtag gaattaatga tgtctcgttt agataaaaagt aaagtgatta	2160
	acagcgcatt agagctgctt aatgaggteg gaatcgaagg ttttaacaacc cgtaaacctg	2220
	cccagaagct aggtgtagag cagcctacat tgtattggca tgtaaaaaat aagcgggctt	2280

	tgctcgacgc cttagccatt gagatgtag ataggcacca tactcacttt tgccctttag	2340
	aaggggaaag ctggcaagat tttttacgta ataacgctaa aagttttaga tgtgctttac	2400
	taagtcacgc cgatggagca aaagtacatt taggtacacg gcctacagaa aaacagtatg	2460
	aaactctcga aaatcaatta gcctttttat gccacaagg tttttcacta gagaatgcat	2520
	tatatgcact cagcgcagtg gggcatttta ctttaggttg cgtattggaa gatcaagagc	2580
	atcaagtcgc taaagaagaa agggaaacac ctactactga tagtatgccg ccattattac	2640
	gacaagctat cgaattatit gatcaccaag gtgcagagcc agccttctta ttcggccttg	2700
	aattgatcat atgcggatta gaaaaacaac tttaatgtga aagtgggtct taaaagcagc	2760
	ataacctttt tccgtgatgg taacttcaact agttttaaag gatctaggtg aagatccttt	2820
	ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc	2880
	ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct	2940
[0013]	tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgitt gccggatcaa gagctaccaa	3000
	ctctttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag	3060
	tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc	3120
	tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg	3180
	actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggctcggg ctgaacgggg gggtcgtgca	3240
	cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat	3300
	gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg	3360
	tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc	3420
	ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc	3480
	ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttttac gttcctggcc ttttctggc	3540
	cttttgetca catgaccga ca	3562

	<210> 5	
	<211> 90	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 1	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (42).. (43)	
	<223> n 是 a、c、g、或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (44).. (44)	
	<223> s 是 g 或 c	
	<220>	
	<221> misc_feature	
[0014]	<222> (45).. (46)	
	<223> n 是 a、c、g、或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (47).. (47)	
	<223> k 是 g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (66).. (67)	
	<223> n 是 a、c、g、或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (68).. (68)	
	<223> s 是 g 或 c	
	<400> 5	
	tcgtgaccgc ggggtgcagac ggagctctga ccggtaccta cnnsnnkcg cgtggcaacg	60
	ccgagnnseg ctacgtcctg accggtcgtt	90

<210> 6  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引物 2

<400> 6  
agtagcggta aacggcaga

19

<210> 7  
<211> 55  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引物 3

[0015]

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17).. (17)  
<223> s 是 g 或 c

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22).. (23)  
<223> n 是 a、c、g、或 t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (24).. (24)  
<223> s 是 g 或 c

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (25).. (26)  
<223> n 是 a、c、g、或 t

<220>



<221> misc\_feature

<222> (27)..(27)

<223> k 是 g 或 t

<400> 7

ctgaccggta cctacgsttg cnnssnnkggc aacgccgagt gccgctacgt cctga

55

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 4

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(5)

<223> n 是 a、c、g、或 t

[0016]

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)..(6)

<223> s 是 g 或 c

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(8)

<223> n 是 a、c、g、或 t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)..(9)

<223> k 是 g 或 t

<400> 8

gccnnsnnkt ccacgctggt cggeca

26

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

	<p>&lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;223&gt; 引物 5</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (5).. (5)</p> <p>&lt;223&gt; m 是 a 或 c</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (6).. (6)</p> <p>&lt;223&gt; n 是 a、c、g、或 t</p> <p>&lt;400&gt; 9</p> <p>gttmnnctcg gtggtgccgg aggt</p>	24
[0017]	<p>&lt;210&gt; 10</p> <p>&lt;211&gt; 24</p> <p>&lt;212&gt; DNA</p> <p>&lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;223&gt; 引物 6</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (5).. (5)</p> <p>&lt;223&gt; m 是 a 或 c</p> <p>&lt;400&gt; 10</p> <p>gttamactcg gtggtgccgg aggt</p>	24
	<p>&lt;210&gt; 11</p> <p>&lt;211&gt; 23</p> <p>&lt;212&gt; DNA</p> <p>&lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt;</p>	

	<223> 引物 7	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> n 是 a、c、g、或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(2)	
	<223> s 是 g 或 c	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3)..(3)	
	<223> n 是 a、c、g、或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (4)..(4)	
	<223> k 是 g 或 t	
[0018]	<400> 11	
	nsnnktccac gctggtcggc cac	23
	<210> 12	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 8	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> n 是 a、c、g、或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(2)	

	<p>&lt;223&gt; m 是 a 或 c</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (3)..(4)</p> <p>&lt;223&gt; n 是 a、c、g、或 t</p> <p>&lt;400&gt; 12</p> <p>nmnnctcggt ggtgccggag gt</p>	22
	<p>&lt;210&gt; 13</p> <p>&lt;211&gt; 23</p> <p>&lt;212&gt; DNA</p> <p>&lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;223&gt; 引物 9</p>	
[0019]	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (3)..(4)</p> <p>&lt;223&gt; n 是 a、c、g、或 t</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (5)..(5)</p> <p>&lt;223&gt; k 是 g 或 t</p> <p>&lt;400&gt; 13</p> <p>ggnnktccac gctggtcggc cac</p>	23
	<p>&lt;210&gt; 14</p> <p>&lt;211&gt; 22</p> <p>&lt;212&gt; DNA</p> <p>&lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;223&gt; 引物 10</p> <p>&lt;220&gt;</p>	

<221> misc\_feature

<222> (2)..(2)

<223> m 是 a 或 c

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)..(4)

<223> n 是 a、c、g、或 t

<400> 14

amnnctcggt ggtgccggag gt

22

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素野生型

[0020]

<400> 15

Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1

<400> 16

Val Thr Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser

1 5

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 2

<400> 17

Ile Gly Ala Arg

1

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m400 片段

<400> 18

[0021] Gly Cys Ala Arg Gly Asn Ala Glu Cys  
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m402 片段

<400> 19

Ala Cys Ala Arg Gly Asn Ala Glu Cys  
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m4001 片段

<400> 20

Ala Cys Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m36 片段

<400> 21

Tyr Asn Ala Phe Met

1 5

[0022]

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m23 片段

<400> 22

Tyr Asn Ala Tyr Ala

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m41 片段

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2).. (3)  
<223> 氨基酸缺失

<400> 23

Ala Xaa Xaa Trp Tyr  
1 5

<210> 24  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m4 片段

<400> 24

[0023]

Asp Asn Ala Gly Phe  
1 5

<210> 25  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m12 片段

<400> 25

Arg Asn Ala Gly Phe  
1 5

<210> 26  
<211> 5  
<212> PRT



<213> 人工序列

<220>

<223> m22 片段

<400> 26

Gln Asn Ala Gly Phe

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m31 片段

<400> 27

[0024] Phe Asn Ala Ser Trp

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m32 片段

<400> 28

Asp Asn Ala Val Met

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

[0025]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m35 片段

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (2).. (3)

&lt;223&gt; 氨基酸缺失

&lt;400&gt; 29

Ala Xaa Xaa Trp Met

1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m38 片段

&lt;400&gt; 30

Glu Asn Ala Gly Phe

1 5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m40 片段

&lt;400&gt; 31

Tyr Asn Ala Tyr Ser

1 5

&lt;210&gt; 32

<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m 42 片段

<400> 32

Phe Asn Ala Tyr Gly  
1 5

<210> 33  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m45 片段

[0026] <400> 33

Tyr Asn Ala Gly Phe  
1 5

<210> 34  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m46 片段

<400> 34

Arg Asn Ala Tyr Ala  
1 5

<210> 35  
<211> 5  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m47 片段

<400> 35

Trp Asn Ala Tyr Gly

1 5

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m7 片段

<400> 36

[0027] Leu Asn Ala Gly Phe

1 5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m10 片段

<400> 37

His Asn Ala Gly Tyr

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m17 片段

<400> 38

Met Asn Ala Gly Phe

1 5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m21 片段

<400> 39

Arg Asn Ala Gly Tyr

1 5

[0028]

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m24 片段

<400> 40

Glu Asn Ala Gly Trp

1 5

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m27 片段

<400> 41

His Asn Ala Gly Phe  
1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m28 片段

<400> 42

Ser Asn Ala Gly Phe  
1 5

[0029]

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m30 片段

<400> 43

Thr Asn Ala Gly Phe  
1 5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m33 片段

<400> 44

Asn Asn Ala Gly Phe

1 5

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m1 片段

&lt;400&gt; 45

Glu Asn Ala Gly Met

1 5

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

[0030] &lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m3 片段

&lt;400&gt; 46

Trp Asn Ala Cys Cys

1 5

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m8 片段

&lt;400&gt; 47

Met Asn Ala Phe Val

1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m15 片段

<400> 48

Ala Asn Ala Asp Trp

1 5

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

[0031]

<220>

<223> m6 片段

<400> 49

Ser Asn Ala Met Met

1 5

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m9 片段

<400> 50

Arg Asn Ala Val Val

1 5



<210> 51  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m20 片段

<400> 51

Ser Asn Ala Ser Phe  
1 5

<210> 52  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m34 片段

[0032]

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(3)  
<223> 氨基酸缺失

<400> 52

Ala Xaa Xaa Trp Asp  
1 5

<210> 53  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m14 片段

<400> 53

Arg Asn Ala Arg Ala  
1 5

<210> 54  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m18 片段

<400> 54

Ser Asn Ala Ala Phe  
1 5

<210> 55  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

[0033]

<220>  
<223> m19 片段

<400> 55

Gly Asn Ala Met Met  
1 5

<210> 56  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m8 片段

<400> 56

Glu Asn Ala Gly Phe

1 5

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m21 片段

<400> 57

Asp Asn Ala Gly Tyr

1 5

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

[0034]

<220>

<223> m9 片段

<400> 58

Glu Asn Ala Gly Tyr

1 5

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m1 片段

<400> 59

Arg Asn Ala Met Met

1 5

<210> 60  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m2 片段

<400> 60

Arg Asn Ala Gly Phe  
1 5

<210> 61  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m3 片段

[0035]

<400> 61

Ala Asn Ala Pro Ala  
1 5

<210> 62  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m5 片段

<400> 62

Ala Asn Ala Met Val  
1 5

<210> 63

<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m13 片段

<400> 63

Gln Asn Ala Ser Ala  
1 5

<210> 64  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m14 片段

[0036] <400> 64

Ala Asn Ala Gly Phe  
1 5

<210> 65  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m24 片段

<400> 65

Gln Asn Ala Met Val  
1 5

<210> 66  
<211> 5  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m4 片段

<400> 66

Asn Asn Ala Gly Tyr  
1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m6 片段

<400> 67

[0037] Ala Asn Ala Ala Val  
1 5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m7 片段

<400> 68

Ser Asn Ala Met Ile  
1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m10 片段

<400> 69

His Asn Ala Gly Tyr

1 5

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m15 片段

<400> 70

Ser Asn Ala Met Ala

1 5

[0038]

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m23 片段

<400> 71

Gln Asn Ala Val Ala

1 5

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m17 片段

<400> 72

Tyr Asn Ala Tyr Met  
1 5

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m12 片段

<400> 73

Leu Asn Ala Trp Gly  
1 5

[0039]

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m20 片段

<400> 74

His Asn Ala Ser Met  
1 5

<210> 75

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m101 片段

<400> 75



Tyr Asn Ala Phe Leu  
1 5

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m106 片段

<400> 76

Phe Asn Ala Phe Leu  
1 5

<210> 77

<211> 5

<212> PRT

[0040] <213> 人工序列

<220>

<223> m111 片段

<400> 77

Tyr Asn Ala Leu Trp  
1 5

<210> 78

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m100 片段

<400> 78

Phe Asn Ala Tyr Ile

1 5

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m110 片段

<400> 79

Tyr Asn Ala Tyr Leu

1 5

<210> 80

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

[0041]

<220>

<223> m104 片段

<400> 80

Tyr Asn Ala Tyr Gln

1 5

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m108 片段

<400> 81

Phe Asn Ala Ile Trp

1 5

<210> 82  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m207 片段

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(3)  
<223> 氨基酸缺失

<400> 82

Thr Xaa Xaa Trp Leu  
1 5

[0042]

<210> 83  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m212 片段

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(3)  
<223> 氨基酸缺失

<400> 83

His Xaa Xaa Trp Leu  
1 5

<210> 84  
<211> 5  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m202 片段

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2).. (3)

<223> 氨基酸缺失

<400> 84

Ile Xaa Xaa Trp Arg

1 5

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

[0043]

<220>

<223> m204 片段

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2).. (3)

<223> 氨基酸缺失

<400> 85

His Xaa Xaa Trp Thr

1 5

<210> 86

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m206 片段

96

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2).. (3)  
<223> 氨基酸缺失

<400> 86

Thr Xaa Xaa Trp Arg  
1 5

<210> 87  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m208 片段

[0044]

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2).. (3)  
<223> 氨基酸缺失

<400> 87

Ala Xaa Xaa Trp Arg  
1 5

<210> 88  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m203 片段

<220>  
<221> MISC\_FEATURE

	<222>	(2).. (3)
	<223>	氨基酸缺失
	<400>	88
	Arg Xaa Xaa Trp Ser	
	1	5
	<210>	89
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	m209 片段
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2).. (3)
[0045]	<223>	氨基酸缺失
	<400>	89
	Asn Xaa Xaa Trp Arg	
	1	5
	<210>	90
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	m200 片段
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2).. (3)
	<223>	氨基酸缺失
	<400>	90

Lys Xaa Xaa Trp Ser  
1 5

<210> 91

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m201 片段

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> 氨基酸缺失

<400> 91

[0046]

Ser Xaa Xaa Val Phe  
1 5

<210> 92

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m211 片段

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> 氨基酸缺失

<400> 92

Lys Xaa Xaa Trp Thr  
1 5

<210> 93  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m300 片段

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2).. (3)  
<223> 氨基酸缺失

<400> 93

Ala Xaa Xaa Trp Tyr  
1 5

[0047]

<210> 94  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m301 片段

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2).. (3)  
<223> 氨基酸缺失

<400> 94

His Xaa Xaa Trp Met  
1 5

<210> 95  
<211> 5  
<212> PRT



<213> 人工序列

<220>

<223> m302 片段

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2).. (3)

<223> 氨基酸缺失

<400> 95

His Xaa Xaa Trp Tyr

1 5

<210> 96

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

[0048]

<220>

<223> m303 片段

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2).. (3)

<223> 氨基酸缺失

<400> 96

Glu Xaa Xaa Trp Tyr

1 5

<210> 97

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m304 片段

101

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2).. (3)  
<223> 氨基酸缺失

<400> 97

Gln Xaa Xaa Trp Tyr  
1 5

<210> 98  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 链霉亲和素突变蛋白

<400> 98

[0049]

Val Thr Ala Arg  
1

<210> 99  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 链霉亲和素突变蛋白

<400> 99

Ile Gly Ala Arg  
1

<210> 100  
<211> 8  
<212> PRT

	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Strep-tagII 亲和肽配体
	<400>	100
	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	
	1	5
	<210>	101
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	肽序列
	<220>	
[0050]	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2)..(2)
	<223>	Xaa 是任意氨基酸
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(7)..(8)
	<223>	Xaa 是 Gly
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(7)..(7)
	<223>	Xaa 是 Glu
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(8)..(8)
	<223>	Xaa 是 Arg 或 Lys
	<400>	101
	Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa	
	1	5

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Strep-tag 链霉亲和素结合肽

<400> 102

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

1 5

<210> 103

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0051] <223> 肽序列

<400> 103

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25

<210> 104

<211> 248

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GFP-StrepII

<400> 104

	Met	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val
	1				5					10					15	
	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu
				20					25					30		
	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys
			35					40					45			
	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe
		50					55					60				
	Ser	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Arg
	65					70					75					80
[0052]	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg
					85					90					95	
	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val
					100				105					110		
	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile
				115					120				125			
	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn
		130					135					140				
	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly
	145					150					155					160
	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val
					165					170					175	

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro  
180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser  
195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val  
210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Gln Ser Ala  
225 230 235 240

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
245

[0053]

<210> 105  
<211> 268  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> GFP-di-tag3

<400> 105

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val  
1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu  
20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys  
35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe  
50 55 60

	Ser	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Arg
	65					70					75				80	
	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg
					85					90					95	
	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val
					100				105						110	
	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile
			115					120						125		
	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn
	130						135					140				
[0054]	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly
	145					150					155				160	
	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val
					165					170					175	
	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro
			180						185						190	
	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser
			195					200						205		
	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val
	210						215					220				
	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Gln	Ser	Ala
	225					230					235				240	

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
260 265

<210> 106

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Cytb562-StrepII

<400> 106

[0055] Ala Asp Leu Glu Asp Asn Met Glu Thr Leu Asn Asp Asn Leu Lys Val  
1 5 10 15

Ile Glu Lys Ala Asp Asn Ala Ala Gln Val Lys Asp Ala Leu Thr Lys  
20 25 30

Met Arg Ala Ala Ala Leu Asp Ala Gln Lys Ala Thr Pro Pro Lys Leu  
35 40 45

Glu Asp Lys Ser Pro Asp Ser Pro Glu Met Lys Asp Phe Arg His Gly  
50 55 60

Phe Asp Ile Leu Val Gly Gln Ile Asp Asp Ala Leu Lys Leu Ala Asn  
65 70 75 80

Glu Gly Lys Val Lys Glu Ala Gln Ala Ala Ala Glu Gln Leu Lys Thr  
85 90 95



Thr Arg Asn Ala Tyr His Gln Lys Tyr Arg Pro Pro Ser Ala Trp Ser  
 100 105 110

His Pro Gln Phe Glu Lys  
 115

<210> 107

<211> 139

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Cytb562-di-tag3

<400> 107

Ala Asp Leu Glu Asp Asn Met Glu Thr Leu Asn Asp Asn Leu Lys Val  
 1 5 10 15

[0056]

Ile Glu Lys Ala Asp Asn Ala Ala Gln Val Lys Asp Ala Leu Thr Lys  
 20 25 30

Met Arg Ala Ala Ala Leu Asp Ala Gln Lys Ala Thr Pro Pro Lys Leu  
 35 40 45

Glu Asp Lys Ser Pro Asp Ser Pro Glu Met Lys Asp Phe Arg His Gly  
 50 55 60

Phe Asp Ile Leu Val Gly Gln Ile Asp Asp Ala Leu Lys Leu Ala Asn  
 65 70 75 80

Glu Gly Lys Val Lys Glu Ala Gln Ala Ala Glu Gln Leu Lys Thr  
 85 90 95

Thr Arg Asn Ala Tyr His Gln Lys Tyr Arg Pro Pro Ser Ala Trp Ser  
 100 105 110

His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
130 135

<210> 108

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1).. (1)

[0057] <223> Xaa 是 Trp、Lys 或 Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2).. (2)

<223> Xaa 是任意氨基酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7).. (8)

<223> Xaa 是 Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Xaa 是 Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Xaa 是 Lys 或 Arg

<400> 108

Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa  
1 5

<210> 109

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> di-tag2

<400> 109

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
20

[0058]

<210> 110

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽序列

<400> 110

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
20 25

<210> 111

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 野生型

<400> 111

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser  
20 25 30

Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0059]

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 112

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1

&lt;400&gt; 112

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0060] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 突变蛋白 2

<400> 113

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0061] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 114

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 m400

<400> 114

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Gly Cys  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

[0062]

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 115

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 m402

<400> 115

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

[0063]

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 116

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 m4001

&lt;400&gt; 116

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15



Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

[0064]

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 117

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 m36

&lt;400&gt; 117

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Ala Phe Met Ser Thr Leu Val  
100 105 110

[0065]

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 m23

&lt;400&gt; 118

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Ala Tyr Ala Ser Thr Leu Val  
100 105 110

[0066]

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 119

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 m41

&lt;400&gt; 119

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Trp Tyr Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

[0067]

&lt;210&gt; 120

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 m4

&lt;400&gt; 120

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Asp Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

[0068]

<210> 121  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 1 m12

<400> 121

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Arg Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

[0069]

<210> 122  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 1 m22

<400> 122

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Gln Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 123

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

[0070]

<220>

<223> 突变蛋白 1 m31

<400> 123

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Phe Asn Ala Ser Trp Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 124

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

[0071]

<220>

<223> 突变蛋白 1 m

<400> 124

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80



Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Asp Asn Ala Val Met Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 125

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m35

[0072]

<400> 125

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Trp Met Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

<210> 126

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m38

<400> 126

[0073]

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 127

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m40

<400> 127

[0074] Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Ala Tyr Ser Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 128

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m42

<400> 128

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

[0075]

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Phe Asn Ala Tyr Gly Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 129

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m45

<400> 129

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

[0076]

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 130

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m46

<400> 130

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

[0077]

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Arg Asn Ala Tyr Ala Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 131  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 1 m47

<400> 131

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

[0078]

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Trp Asn Ala Tyr Gly Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 132  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 1 m7

<400> 132

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

[0079]

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Leu Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 133  
<211> 126



<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m10

<400> 133

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0080]

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu His Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 134

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m17

&lt;400&gt; 134

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0081] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Met Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 突变蛋白 1 m21

<400> 135

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0082] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Arg Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 136

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m24

<400> 136

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

[0083]

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Trp Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 137

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m27

<400> 137

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

[0084]

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu His Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m28

&lt;400&gt; 138

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

[0085]

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ser Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m30

&lt;400&gt; 139

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Thr Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

[0086]

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 140

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m33

&lt;400&gt; 140

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Asn Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

[0087]

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 ml

&lt;400&gt; 141

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30



Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Met Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

[0088]

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m3

&lt;400&gt; 142

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Trp Asn Ala Cys Cys Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

[0089]

<210> 143  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 1 m8

<400> 143

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Met Asn Ala Phe Val Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

[0090]

<210> 144  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 1 m15

<400> 144

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Asp Trp Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 145

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

[0091]

<220>

<223> 突变蛋白 1 m6

<400> 145

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ser Asn Ala Met Met Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 146

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

[0092]

<220>

<223> 突变蛋白 1 m9

<400> 146

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Arg Asn Ala Val Val Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 147

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m20

[0093]

<400> 147

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ser Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 148

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m34

<400> 148

[0094]

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Trp Asp Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

<210> 149

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m14

<400> 149

[0095] Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95



Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Arg Asn Ala Arg Ala Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 150

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m18

<400> 150

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

[0096]

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ser Asn Ala Ala Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 151  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 m19

<400> 151

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

[0097]

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Gly Asn Ala Met Met Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 152

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m4001-m8

<400> 152

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

[0098]

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 153  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m4001-m21

<400> 153

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

[0099]

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Asp Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 154  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m4001-m9

<400> 154

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

[0100]

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 155  
<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m4001-m1

<400> 155

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0101]

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Arg Asn Ala Met Met Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 156

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m4001-m2

&lt;400&gt; 156

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0102] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Arg Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 157

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> m4001-m3

<400> 157

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0103] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Pro Ala Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 158

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m4001-m5



<400> 158

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

[0104]

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Met Val Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 159

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m4001-m13

<400> 159

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

[0105]

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Gln Asn Ala Ser Ala Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 160

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m4001-m14

&lt;400&gt; 160

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

[0106]

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Gly Phe Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 161

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m4001-m24

<400> 161

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Gln Asn Ala Met Val Ser Thr Leu Val  
100 105 110

[0107]

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 162

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m4001-m4

&lt;400&gt; 162

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Asn Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val  
100 105 110

[0108]

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 163

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m4001-m6

&lt;400&gt; 163

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Ala Val Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

[0109]

&lt;210&gt; 164

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; m4001-m7

&lt;400&gt; 164

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ser Asn Ala Met Ile Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

[0110]

<210> 165  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m4001-m10

<400> 165

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu His Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

[0111]

<210> 166  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> m4001-m15

<400> 166

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60



Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ser Asn Ala Met Ala Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 167

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

[0112]

<220>

<223> m4001-m23

<400> 167

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Gln Asn Ala Val Ala Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 168

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

[0113]

<220>

<223> m4001-m17

<400> 168

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Ala Tyr Met Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 169

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m4001-m12

[0114]

<400> 169

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Leu Asn Ala Trp Gly Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 170

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m4001-m20

<400> 170

[0115]

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ala Cys  
20 25 30

Gly Arg Gly Asn Ala Glu Cys Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu His Asn Ala Ser Met Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 171

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m101

<400> 171

[0116] Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Ala Phe Leu Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 172

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m106

<400> 172

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

[0117]

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Phe Asn Ala Phe Leu Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 173

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m111

<400> 173

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

[0118]

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Ala Leu Trp Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 174

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m100

<400> 174

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

[0119]

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Phe Asn Ala Tyr Ile Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125



<210> 175  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 1 m110

<400> 175

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

[0120]

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Ala Tyr Leu Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 176  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 1 m104

<400> 176

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

[0121]

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Ala Tyr Gln Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 177  
<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m108

<400> 177

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0122]

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Phe Asn Ala Ile Trp Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 178

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m207

&lt;400&gt; 178

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0123] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Thr Trp Leu Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

&lt;210&gt; 179

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 突变蛋白 1 m212

<400> 179

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

[0124] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu His Trp Leu Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

<210> 180

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m202

<400> 180

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

[0125]

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ile Trp Arg Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

<210> 181

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m204

<400> 181

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

[0126]

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu His Trp Thr Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

&lt;210&gt; 182

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m206

&lt;400&gt; 182

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

[0127]

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Thr Trp Arg Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

&lt;210&gt; 183

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m208

&lt;400&gt; 183

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15



Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Trp Arg Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

[0128]

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

&lt;210&gt; 184

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m203

&lt;400&gt; 184

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Arg Trp Ser Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

[0129]

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

&lt;210&gt; 185

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m209

&lt;400&gt; 185

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Asn Trp Arg Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

[0130]

&lt;210&gt; 186

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 突变蛋白 1 m200

&lt;400&gt; 186

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Lys Trp Ser Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

[0131]

<210> 187  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 1 m201

<400> 187

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ser Val Phe Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

[0132]

<210> 188  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变蛋白 1 m211

<400> 188

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Lys Trp Thr Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

<210> 189

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

[0133]

<220>

<223> 突变蛋白 1 m300

<400> 189

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Trp Tyr Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

<210> 190

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

[0134]

<220>

<223> 突变蛋白 1 m301

<400> 190

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu His Trp Met Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

<210> 191

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m302

[0135]

<400> 191

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80



Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu His Trp Tyr Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

<210> 192

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m303

<400> 192

[0136]

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Trp Tyr Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

<210> 193

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 1 m304

<400> 193

[0137] Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Gln Trp Tyr Ser Thr Leu Val Gly His  
100 105 110

Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120

<210> 194

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白 m1-9

<400> 194

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

[0138]

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr  
20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

<210> 195

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素氨基酸 114 至 121 的环

<400> 195

Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys  
1 5

<210> 196

<211> 7

[0139] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素氨基酸 115 至 121 的环区

<400> 196

Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys  
1 5

<210> 197

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白

<400> 197

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys  
1 5 10

<210> 198

<400> 198

000

<210> 199

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序 1

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1).. (1)

[0140]

<223> Xaa 是 Glu、Asp、Arg、His、Asn、Gln、Thr、Ser、Leu、Met

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Xaa 是 Phe、Tyr、Met

<400> 199

Xaa Asn Ala Gly Xaa

1 5

<210> 200

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序 2

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1).. (1)  
<223> Xaa 是 Tyr、Phe、Arg、Trp、Gln  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4).. (4)  
<223> Xaa 是 Tyr、Phe、Leu、Ile、Met  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5).. (5)  
<223> Xaa 是 Leu、Ile、Met、Gln、Gly、Trp、Ser、Ala、Val  
  
<400> 200

Xaa Asn Ala Xaa Xaa  
1 5

[0141]

<210> 201  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 基序 3  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1).. (1)  
<223> Xaa 是任意氨基酸  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2).. (2)  
<223> Xaa 是氨基酸缺失  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3).. (3)  
<223> Xaa 是氨基酸缺失

	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (4).. (4)
	<223> Xaa 是 Trp 或 Val
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (5).. (5)
	<223> Xaa 是任意氨基酸
	<400> 201
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
	1 5
	<210> 202
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列
[0142]	<220>
	<223> 基序 2 (图 2B)
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (1).. (1)
	<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (2).. (3)
	<223> Xaa 是氨基酸缺失
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (4).. (5)
	<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失
	<400> 202
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
	1 5

<210> 203  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 文库 1

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1).. (2)  
<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9).. (9)  
<223> Xaa 可以是任意天然存在的氨基酸

<400> 203

[0143]

Xaa Xaa Ala Arg Gly Asn Ala Glu Xaa  
1 5

<210> 204  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 文库 2

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1).. (1)  
<223> Xaa 是 Ala 或 Gly

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3).. (4)



<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失

<400> 204

Xaa Cys Xaa Xaa Gly Asn Ala Glu Cys  
1 5

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 文库 2 野生型

<400> 205

Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser  
1 5

[0144]

<210> 206

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 文库 3

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失

<400> 206

Xaa Asn Ala Xaa Xaa

	1	5
	<210>	207
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Wt (文库 2), 突变蛋白"1" (文库 2), Wt (文库 4), m4001 (文库 4), Wt (文库 5), 突变蛋白"1" (文库 5), Wt (文库 6), 突变蛋白"1" (文库 6), Wt (文库 7), 突变蛋白"1" (文库 7)
	<400>	207
	Ala Asn Ala Trp Lys	
	1	5
[0145]	<210>	208
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	文库 4
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1).. (1)
	<223>	Xaa 是任意氨基酸或缺失
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(4).. (5)
	<223>	Xaa 是任意氨基酸或缺失
	<400>	208
	Xaa Asn Ala Xaa Xaa	
	1	5

<210> 209  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 文库 5

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1).. (1)  
<223> Xaa 是 Phe/Tyr

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4).. (5)  
<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失

<400> 209

[0146] Xaa Asn Ala Xaa Xaa  
1 5

<210> 210  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 文库 6

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1).. (1)  
<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2).. (3)  
<223> Xaa 是氨基酸缺失

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4).. (5)  
<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失

<400> 210

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 211  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 文库 7

[0147] <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1).. (1)  
<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2).. (3)  
<223> Xaa 是氨基酸缺失

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5).. (5)  
<223> Xaa 是任意氨基酸或氨基酸缺失

<400> 211

Xaa Xaa Xaa Trp Xaa  
1 5

<210> 212  
<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Wt 链霉亲和素氨基酸序列（残基 14 至 139）

<400> 212

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser  
20 25 30

Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
35 40 45

[0148]

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val  
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
115 120 125

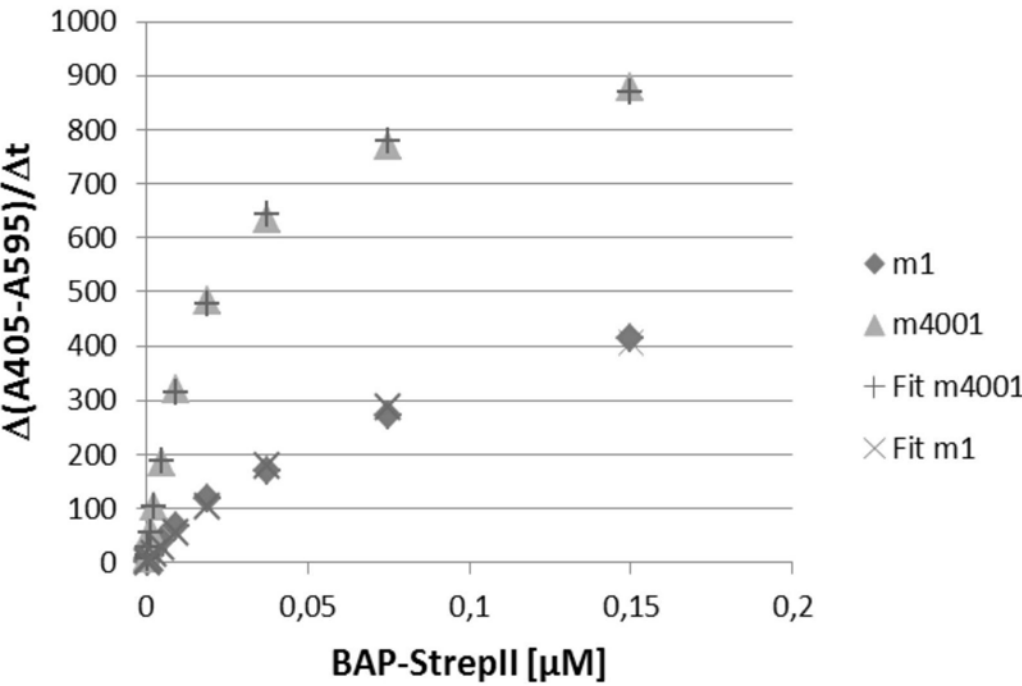


图1A

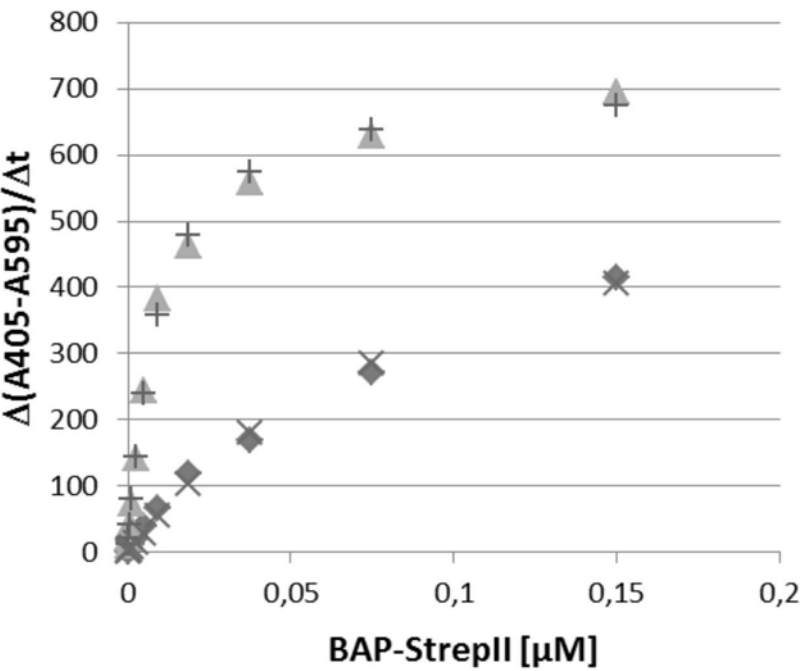


图1B

**无缺失的链霉亲和素突变蛋白**

- + 在位点117发现的氨基酸： W;Y;F;H;Q;N;E;D;R;L;M;T;S;A;G
- 在位点117没有发现的氨基酸： K;I;V;P;C
- + 在位点120发现的氨基酸 W;Y;F;D;R;L;I;M;V;P;C;S;A;G
- 在位点120没有发现的氨基酸 H;Q;N;E;K;T
- + 在位点121发现的氨基酸 W;Y;F;Q;L;I;M;V;C;S;A;G
- 在位点121没有发现的氨基酸 H;N;E;D;K;R;P;T

**在位点118和/或119具有缺失的链霉亲和素突变蛋白**

- + 在位点117发现的氨基酸 H;Q;N;E;K;R;I;T;S;A
- 在位点117没有发现的氨基酸 W;Y;F;D;L;M;V;P;C;G
- + 在位点120发现的氨基酸 W;V
- 在位点120没有发现的氨基酸 Y;F;H;Q;N;E;D;K;R;L;I;M;P;T;C;S;A;G
- + 在位点121发现的氨基酸 Y;F;D;R;L;M;T;S
- 在位点121没有发现的氨基酸 W;H;Q;N;E;K;I;V;P;C;A;G

图2A

<b>位点 :</b>		117	118	119	120	121
<b>基序1 (SEQ ID NO: 199):</b>		<b>Glu</b>	Asn	Ala	<b>Gly</b>	<b>Phe</b>
		<b>Asp</b>				<b>Tyr</b>
		<b>Arg</b>				Met
		<b>His</b>				
		Asn				
		Gln				
		Thr				
		Ser				
		Leu				
	Met					
		117	118	119	120	121
<b>基序2 (SEQ ID NO: 200):</b>		<b>Tyr</b>	Asn	Ala	<b>Tyr</b>	<b>Leu</b>
		<b>Phe</b>			<b>Phe</b>	<b>Ile</b>
		Arg			Leu	<b>Met</b>
		Trp			Ile	Gln
		Gln			Met	Gly
		Trp				
		Ser				
		Ala				
		Val				
<b>基序3 (SEQ ID NO: 201):</b>		<b>His</b>	---	---	<b>Trp</b>	<b>Tyr</b>
		<b>Glu</b>			Val	Leu
		<b>Gln</b>				Met
		Thr				Arg
		Ala				Thr
		Ile				Ser
		Arg				Phe
		Asn				
		Lys				
		Ser				

图2B



**wt链霉亲和素氨基酸序列 ( 残基14至139 ; SEQ ID NO : 212 )**

14

EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTAL  
GWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKV  
KPSAAS

139

图3

pASK75-phoA; SEQ ID NO. 1:

CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTGTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACT  
CCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTGACAAAAATCTAGAACATGGAGAAAATAAAGT  
**GAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCCGACACCA**  
**GAAATGCCTGTTCTGGAAAACCGGGCTGCTCAGGGCGATATTACTGCACCCGGCGGTGCTCGCCGTTTAA**  
**CGGGTGATCAGACTGCCGCTCTGCGTGATTCTCTTAGCGATAAACCTGCAAAAAATATTATTTTGTCTGATT**  
**GGCGATGGGATGGGGGACTCGGAAATTACTGCCGCACGTAATTATGCCGAAGGTGCGGGCGGCTTTTT**  
**AAAGGTATAGATGCCTTACCGCTTACCGGGCAATACACTCACTATGCGCTGAATAAAAAAACCGGCAAAC**  
**CGGACTACGTCACCGACTCGGCTGCATCAGCAACCGCCTGGTCAACCGGTGTCAAAACCTATAACGGCGC**  
**GCTGGGCGTCGATATTCACGAAAAAGATCACCAACGATTCTGGAAATGGCAAAAGCCGCAGGTCTGGC**  
**GACCGGTAACGTTTCTACCGCAGAGTTGCAGGATGCCACGCCCGCTGCGCTGGTGGCACATGTGACCTCG**  
**CGAAATGCTACGGTCCGAGCGCGACCACTGAAAAATGTCCGGGTAACGCTCTGGAAAAAGGCGGAAA**  
**AGGATCGATTACCGAACAGCTGCTTAACGCTCGTGCCGACGTTACGCTTGGCGGCGGCGCAAAAAACCTTT**  
**GCTGAAACGGCAACCGCTGGTGAATGGCAGGGAACGCTGCGTGAACAGGCACAGGCGCGTGTTA**  
**TCAGTTGGTGAGCGATGCTGCCTCACTGAATTCGGTGACGGAAGCGAATCAGCAAAAAACCCCTGCTTGGC**  
**CTGTTTGTGACGGCAATATGCCAGTGCGCTGGCTAGGACCGAAAGCAACGTACCATGGCAATATCGATA**  
**AGCCCGCAGTCACCTGTACGCCAAATCCGCAACGTAATGACAGTGTACCAACCTGGCGCAGATGACCGA**  
**CAAAGCCATTGAATTGTTGAGTAAAAATGAGAAAGGCTTTTTCTGCAAGTTGAAGGTGCGTCAATCGAT**  
**AAACAGGATCATGCTGCGAATCCTTGTGGGCAAATTGGCGAGACGGTCGATCTCGATGAAGCCGTACAA**  
**CGGGCGCTGGAATTCGCTAAAAAGGAGGGTAACACGCTGGTCATAGTCACCGCTGATCACGCCACGCC**  
**AGCCAGATTGTTGCGCCGGATACCAAAGCTCCGGGCCCTACCCAGGCGCTAAATACCAAAGATGGCGCA**  
**GTGATGGTGATGAGTTACGGGAACCTCCGAAGAGGATTCAAGAACATACCGGCAGTCAGTTGCGTATT**  
**GCGGCGTATGGCCCGCATGCCGCCAATGTTGTTGACTGACCGACCAGACCGATCTCTTCTACACCATGA**  
**AAGCCGCTCTGGGGCTGAAAaccgctagcgctTGGTCTCACCCGCAGTTGAAAAATAATAAGCTTGACCTGT**  
GAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTGTCTGCCGTTTACCGCTACTGCGTCACGGATCT  
CCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACT  
TGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTCCCGT  
CAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACT  
TGATTAGGGTGATGGTTACGTAAGTGCGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAG  
TCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTT  
GATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTAACGC  
GAATTTTAACAAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCT  
ATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAA  
TAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCATT  
TGCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC  
GAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTT  
TCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAG  
CAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAAGTCACAGAAAAGCATCT  
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAA  
CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTA  
ACTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG  
CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACA  
ATTGATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTG  
GTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGCTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGAT

图3 (续)

GGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGA  
CAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAGGAATTAATGATGTCTCGTTTAGATAAAA  
GTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAACAACCCGTAAACT  
CGCCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGAC  
GCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACTTTTGCCCTTTAGAAGGGGAAAGCTGGCAAG  
ATTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACAT  
TTAGGTACACGGCCTACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAG  
GTTTTCTACTAGAGAATGCATTATATGCACTCAGCGCAGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAA  
GATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTATTAC  
GACAAGCTATCGAATTATTTGATCACCAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCTTGAATTGATCATA  
TGCGGATTAGAAAAACAACCTAAATGTGAAAGTGGGTCTTAAAAGCAGCATAACCTTTTTCCGTGATGGT  
AACTTCACTAGTTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGT  
GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCT  
GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAG  
CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTA  
GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC  
CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA  
AGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACC  
GAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG  
GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG  
TATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG  
GCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC  
ACATGACCCGACA

图3 (续)

pASK-IBA2-cytochrome b562; SEQ ID NO. 2:

CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTGTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACT  
CCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATG  
AAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGCTGATCTT  
GAAGACAATATGGAAACCTCAACGACAATTTAAAAGTGATCGAAAAAGCGGATAACGCGGCGCAAGTC  
AAAGACGCGTTAACGAAGATGCGCGCCGAGCCCTGGATGCGCAAAAAGCAACGCCGCCGAAGCTCGA  
AGATAAATCACCGGACAGCCCGGAAATGAAAGATTTCCGCCACGGTTTCGACATTCTGGTCGGTCAGATT  
GACGACGCGCTGAAGCTGGCAAATGAAGGTAAAGTAAAAGAAGCGCAGGCTGCTGCAGAGCAACTGAA  
AACGACCCGCAACGCCTATCACCAGAAGTATCGTCCGCCGAGCGCTTGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAA  
TAATAAGCTTGACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTGTCTGCCGTTTACCGC  
TACTGCGTCACGGATCTCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGGTGTGGTGTTACGCGC  
AGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACG  
TTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCA  
CCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTT  
CGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCC  
TATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT  
TTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAA  
ATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC  
CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATT  
CCCTTTTTTGCGGCATTTTGCTTCTGTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA  
AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT  
CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTAT  
TGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGGCATACACTATTCTCAGAACTGACTTGGTTGAGTACTACCA  
GTCAAGAAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGT  
GATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACA  
ACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACG  
AGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTAC  
TCTAGCTTCCCGGCAACAATTGATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCG  
GCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGCTCTCGCGGTATCATTG  
CAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTA  
TGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAGGAATTAATGA  
TGTCTCGTTTAGATAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTGCGAATCGAAGG  
TTTAACAACCCGTAAACTCGCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAAT  
AAGCGGGCTTTGCTCGACGCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACTTTTGCCCTTAGA  
AGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGC  
GATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAGAAAAACAGTATGAACTCTCGAAAAATCAATTA  
GCCTTTTTATGCCAACAAGGTTTTCTAGAGAAATGCATTATATGCACTCAGCGCAGTGGGGCATTTTAC  
TTTAGGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGA  
TAGTATGCCGCCATTATTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATCACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTAT  
TCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTTAAATGTGAAAGTGGGTCTTAAAGCAGCA  
TAACCTTTTTCCGTGATGGTAACTTCACTAGTTTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCAT  
GACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT  
TCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGT

图3(续)

TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA  
AATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCT  
CGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCA  
AGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTT  
GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGA  
AGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT  
CCAGGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT  
GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGC  
CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGACCCGACA

pASK-IBA2-SAm1; SEQ ID NO. 3:

CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCCT  
CCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTTCGACAAAAATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATG  
AAAAAGACAGCTATCGCGATTGCACTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCTGCAGAAGC  
AGGTATCACCGGCACCTGGTACAACCACTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGTGACAGCGGAGC  
TCTGACCGGTACCTACGTACGCGCGCTGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCTGACCGGTGCTTACGAC  
AGCGCCCCCGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGC  
AACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTGCGCGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCA  
GTGGCTGCTGACCTCCGGCACCACCGAGGCCAACGCCTGGAAGTCCACGCTGGTCGGCCACGACACCTTC  
ACCAAGGTGAAGCCGTCCGCCGCTCCTAATAAGCTTGACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGC  
GACATTTTTTTTGTCTGCCGTTTACCGCTACTGCGTCACGGATCTCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAA  
GCGCGGCGGGTGTTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCGCTCCTTT  
CGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTT  
AGGGTTCCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTAGT  
GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTT  
GTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTT  
GGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAATATTAACGCTTA  
CAATTTCAAGTGCGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTCAA  
ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG  
TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTGCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAA  
ACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTC  
AACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT  
GCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCT  
CAGAATGACTTGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAA  
TTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGAC  
CGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGA  
GCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCG  
CAAATATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTGATAGACTGGATGGAGGCGGAT  
AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG  
GTGAGCGTGGCTCTCGCGGTATCATTCGAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTAT  
CTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACT  
GATTAAGCATTGGTAGGAATTAATGATGTCTGTTTAGATAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAG  
CTGCTTAATGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAAACACCCGTAAACTCGCCAGAAAGCTAGGTGTAGAGCAG

图3 (续)

CCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATA  
GGCACCATACTCACTTTTGCCCTTTAGAAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTACGTAATAACGCTAAAAAG  
TTTTAGATGTGCTTTACTAAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAGAAAAA  
CAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAAGTTTTTCACTAGAGAATGCATTATA  
TGCACTCAGCGCgGTGGGGCATTCTTTAGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAA  
GAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTATTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATC  
ACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTAA  
ATGTGAAAGTGGGTCTTAAAAGCAGCATAACCTTTTTCCGTGATGGTAACTTCACTAGTTTAAAAGGATCT  
AGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA  
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC  
AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTA  
ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGCTCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA  
AGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGAT  
AAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACG  
GGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAG  
CTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGG  
AACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTATCTTATAGTCTGTGCGGTTTCG  
CCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAAACGCCAGC  
AACCGGCGCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGACCCGACA

pASK-IBA2-5Am4001; SEQ ID NO. 4:

CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCCT  
CCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTTCGACAAAAATCTAGATAACGAGGGGCAAAAAATG  
**AAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCTGCAGAAGC**  
AGGTATCACCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGTGCAGACGGAGC  
TCTGACCGGTACCTACGCTTGGCGCCGGGGCAACGCCGAGTGCCGCTACGTCTGACCGGTGCTTACGAC  
AGCGCCCCCGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGC  
AACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAGTACGTGCGCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCA  
GTGGCTGCTGACCTCCGGCACCCAGGCGCAACGCCTGGAAGTCCACGCTGGTCCGCCACGACACCTTC  
ACCAAGGTGAAGCCGTCGCCGCTCTAATAAGCTTGACCTGTGAAGTGAATAATGGCGCACATTGTGC  
GACATTTTTTTGTCTGCCGTTTACCGCTACTGCGTCACGGATCTCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAA  
GCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCGCTCCTTT  
CGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTT  
AGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGT  
GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTT  
GTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTT  
GGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTA  
CAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTCAA  
ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG  
TATCAACATTTCCGTGTGCCCCATTCCCTTTTTTGCGGCATTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAA  
ACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTC  
AACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT  
GCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCT

图3 (续)



CAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAA  
TTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGAC  
CGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGA  
GCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCG  
CAAATACTTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTgATAGACTGGATGGAGGCGGAT  
AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG  
GTGAGCGTGGCTCTGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTAT  
CTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACT  
GATTAAGCATTGGTAGGAATTAATGATGTCTCGTTTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAG  
CTGCTTAATGAGGTGCGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAAACTCGCCAGAAAGCTAGGTGTAGAGCAG  
CCTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCCTAGCCATTGAGATGTTAGATA  
GGCACCATACTCACTTTTCCCTTTAGAAGGGGAAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAG  
TTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAAGTACATTTAGGTACAGGCCCTACAGAAAAA  
CAGTATGAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAAGTTTTTCACTAGAGAATGCATTATA  
TGCACTCAGCGCgGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAA  
GAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTATTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATC  
ACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTAA  
ATGTGAAAGTGGGTCTTAAAGCAGCATAACCTTTTTCCGTGATGGTAACTTCACTAGTTTAAAAGGATCT  
AGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA  
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC  
AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA  
ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTCTAGTGATAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA  
AGAATCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGAT  
AAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACG  
GGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAG  
CTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGG  
AACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCG  
CCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGC  
AACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTCTGGCCTTTTCTCACATGACCCGACA

GFP-StreptII (SEQ ID NO: 104):

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTlkFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRY  
PDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYS  
HNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDM  
VLLEFVTAAGITHGMDELYQSAWSHPQFEK

GFP-di-tag3 (SEQ ID NO: 105):

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTlkFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRY  
PDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYS  
HNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDM  
VLLEFVTAAGITHGMDELYQSAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWHPQFEK

Cytb562-StreptII (SEQ ID NO: 106):

图3 (续)

ADLEDNMETLNDNLKVEKADNAAQVKDALTKMRAAALDAQKATPPKLEDKSPDSPDKDFRHGFDILVGQ  
IDDALKLANEGKVKEAQAAAEQLKTTRNAYHQKYRPPSAWSHPQFEK

Cytb562-di-tag3 (SEQ ID NO: 107):

ADLEDNMETLNDNLKVEKADNAAQVKDALTKMRAAALDAQKATPPKLEDKSPDSPDKDFRHGFDILVGQ  
IDDALKLANEGKVKEAQAAAEQLKTTRNAYHQKYRPPSAWSHPQFEKGGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK

下划线为strep-tagII模块的序列

图3(续)





[illegible]

图4(续)

表 7  
突变蛋白 1"-m300: EAGITGTWYNOLGSTFIVTAGAAGALTGTGTTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGGTALGWTVAWKNYRNHSAITWSCQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEA--WYSTLVGHDTFTTKVKPSAAS  
突变蛋白 1"-m301: EAGITGTWYNOLGSTFIVTAGAAGALTGTGTTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGGTALGWTVAWKNYRNHSAITWSCQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEH--WMTLVGHDTFTTKVKPSAAS  
突变蛋白 1"-m302: EAGITGTWYNOLGSTFIVTAGAAGALTGTGTTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGGTALGWTVAWKNYRNHSAITWSCQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEH--WYSTLVGHDTFTTKVKPSAAS  
突变蛋白 1"-m303: EAGITGTWYNOLGSTFIVTAGAAGALTGTGTTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGGTALGWTVAWKNYRNHSAITWSCQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEH--WYSTLVGHDTFTTKVKPSAAS  
突变蛋白 1"-m304: EAGITGTWYNOLGSTFIVTAGAAGALTGTGTTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGGTALGWTVAWKNYRNHSAITWSCQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEQ--WYSTLVGHDTFTTKVKPSAAS  
实施例 12  
突变蛋白 m1-9: EAGITGTWYNOLGSTFIVTAGAAGALTGTGTTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGGTALGWTVAWKNYRNHSAITWSCQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTTKVKPSAAS

图4(续)