



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108699104 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680081877.5

(22)申请日 2016.12.13

(30)优先权数据

15200111.1 2015.12.15 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/080847 2016.12.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/102759 EN 2017.06.22

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 M.施雷姆尔 W.斯蒂芬

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 黄希贵

(51)Int.Cl.

C07K 1/13(2006.01)

C12N 9/90(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页

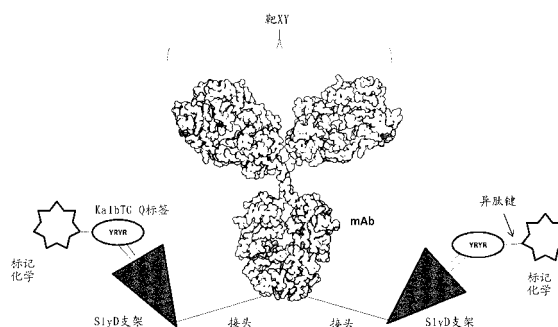
序列列表35页 附图9页

(54)发明名称

具有转谷氨酰胺酶识别位点的FKBP结构域

(57)摘要

本发明涉及重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,其包含FKBP多肽的FKBP结构域的氨基酸序列,其中其“插入翼片”(IF)结构域至少部分地被替换为5至20个氨基酸的氨基酸序列(“Q标签”),其包含与肽序列 X_1 -YRYRQ- X_2 (SEQ ID NO.1)的YRYRQ部分具有至少80%序列同一性的序列,并且其中所述TG底物是关于白色库茨涅尔氏菌TG的TG功能的底物。本发明另外涉及所述底物的用途。



1. 根据下述通式I的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物

$(F^*-L)_y-X$ (I)

其中,

F*选自FKBP多肽的FKBP结构域的氨基酸序列,其中其“插入翼片”(IF)结构域至少部分地被替换为5至20个氨基酸的氨基酸序列(“Q标签”),所述Q标签包含5个连续氨基酸的子序列,其与肽序列 $X_1-YR YR Q-X_2$ (SEQ ID NO. 1)的YR YR Q部分具有至少80%的序列同一性,其中 X_1 和 X_2 不存在或构成接头氨基酸;

L不存在或选自接头氨基酸序列;和

X是目标蛋白质;

y是1至100的整数,

并且其中所述TG底物是根据SEQ ID No. 23的白色库茨涅尔氏菌 TG的TG功能的底物。

2. 根据权利要求1的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,其中所述FKBP结构域选自真核生物或细菌FKBP多肽,其选自FKBP12、AIP、AIPL1、FKBP1A、FKBP1B、FKBP2、FKBP3、FKBP5、FKBP6、FKBP7、FKBP8、FKBP9、FKBP9L、FKBP10、FKBP11、FKBP14、FKBP15、FKBP52、LOC541473和SLYD、及其FKBP结构域的同源物。

3. 根据权利要求1或2的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,其中所述FKBP结构域包含约120至170,优选约130至160,且最优选约145至155个所述FKBP多肽的N末端氨基酸。

4. 根据权利要求1至3中任一项的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,其中所述FKBP结构域包含所述SLYD多肽的N末端氨基酸1至64和123至149,并且其中氨基酸65至122被替换为所述Q标签。

5. 根据权利要求1至4中任一项的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,其中所述接头序列L包含1至20个氨基酸,其中优选地所述氨基酸基本上不干扰所述FKBP结构域和/或目标蛋白质。

6. 根据权利要求1至5中任一项的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,其中所述目标蛋白质选自酶、抗原例如病毒蛋白质、抗体或其片段、以及其他免疫结合配偶体。

7. 一种用于标记目标蛋白质的体外方法,其包括

a) 提供附接至目标蛋白质的根据权利要求1至6中任一项的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,

b) 提供有效量的白色库茨涅尔氏菌的转谷氨酰胺酶,优选根据SEQ ID No. 23的白色库茨涅尔氏菌的转谷氨酰胺酶,

c) 提供包含烷基胺基团例如赖氨酸的连接的合适标记,和

d) 使根据a)至c)的所述组分接触,由此所述转谷氨酰胺酶将所述标记附接至所述底物。

8. 根据权利要求7的方法,其中所述白色库茨涅尔氏菌的转谷氨酰胺酶是重组产生的。

9. 根据权利要求7或8的方法,其中所述标记选自酶、生物素、放射性基团、染料例如荧光染料、同位素、化学发光标记和金属。

10. 根据权利要求7至9中任一项的方法,其中所述标记以标记和目标蛋白质的化学计量比,例如以约1:1实现。

11. 根据权利要求7-10中任一项的方法,其中所述目标蛋白质选自酶、抗原例如病毒蛋

白质、抗体或其片段、以及其他免疫结合配偶体。

12. 一种药物或诊断组合物,其包含如根据权利要求7至10中任一项的方法产生的至少一种标记的目标蛋白质,连同药学上可接受的载体化合物。

13. 根据权利要求12的药物或诊断组合物,其中所述目标蛋白质以标记和目标蛋白质的化学计量比,例如约1:1标记。

14. 一种诊断试剂盒,其包含根据权利要求12或13的诊断组合物,任选地连同用于执行免疫测定的其他组分一起。

具有转谷氨酰胺酶识别位点的FKBP结构域

[0001] 本发明涉及重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,其包含FKBP多肽的FKBP结构域的氨基酸序列,其中其“插入翼片(insert-in-flap)”(IF)结构域至少部分地被替换为 5至20个氨基酸的氨基酸序列(“Q标签”),其包含与肽序列X₁-YRYRQ-X₂(SEQ ID NO. 1),特别是肽序列的YRYRQ部分具有至少80%序列同一性的序列,并且其中所述TG底物是白色库茨涅尔氏菌(*Kutzneria albidus*) TG(KalbTG)的TG功能的底物。本发明另外涉及所述底物的用途。

[0002] 发明背景

可溶性和/或免疫反应性抗原及其变体对于体外诊断测试是重要的。例如,使用病毒外壳蛋白gp41的重组和可溶性变体,由此检测HIV-1感染。

[0003] 免疫反应性抗原及其变体所需的溶解度在有效测定的设计中可能是挑战,但可以通过融合至具有肽基脯氨酰异构酶(PPIase)活性的一个或多个蛋白伴侣单元来改善。使用蛋白质支架用于工程改造由支架展示的多肽结构域的技术是抗体和抗体片段领域已知的。因此,结构域例如抗体的抗原结合区的可变环已被广泛改造,以产生对已知靶具有改善结合(例如亲和力和/或特异性)的氨基酸序列区段(参见W02014/071978)。

[0004] FK506结合蛋白(FKBP)已在从酵母到人的许多真核生物中发现,并且充当用于含有脯氨酸残基的蛋白质的蛋白质折叠蛋白伴侣。连同亲环蛋白一起,FKBP属于亲免疫蛋白家族。在人基因组中,编码了15种蛋白质,其区段与12 kDa蛋白质的序列具有显著同源性,所述12 kDa蛋白质是强效免疫抑制性大环内酯类FK506或雷帕霉素的靶。FK506结合蛋白(FKBP)的12 kDa原型,称为FKBP-12,是丰富的细胞内蛋白质。FKBP12充当PPIase,其催化脯氨酰顺/反式构象之间的相互转换。FKBP涉及多种细胞功能,包括蛋白质折叠、细胞信号传导、细胞凋亡和转录。它们通过直接结合和改变其靶蛋白的构象来发挥其功能,因此充当分子开关。

[0005] 细菌slyD基因编码FKBP型肽基-脯氨酰顺反式异构酶(PPIase)。SlyD是细菌双结构域蛋白,其充当分子伴侣、脯氨酰顺/反式异构酶和镍结合蛋白。位于SlyD的一个结构域中的蛋白伴侣功能涉及双精氨酸易位,并且使蛋白质折叠中的脯氨酰顺/反式异构酶结构域的催化效率增加两个数量级。

[0006] Schlapschy和Skerra(于:Periplasmic chaperones used to enhance functional secretion of proteins in *E. coli*. Methods Mol Biol. 2011;705:211-24)公开了给予重组基因产物的折叠以及蛋白质聚集(即包涵体形成)的问题在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中经常遇到。对于携带结构二硫键的蛋白质尤其如此,所述蛋白质包括抗体片段、细胞因子、生长因子和真核细胞表面受体的细胞外片段。因此,他们开发了辅助质粒pTUM4,其影响四种已建立的周质蛋白伴侣和/或折叠催化剂的过表达:硫醇-二硫化物氧化还原酶DsbA和DsbC,其催化二硫键的形成和异构化,以及具有蛋白伴侣活性的两个肽基-脯氨酰顺/反式异构酶,FkpA和SurA。

[0007] 大肠杆菌SlyD和FKBP12(野生型和突变体C23A和C23S)可以在大肠杆菌中以可溶形式以高产率重组产生(Standaert, R.F.等人,Nature 346(1990)671-674)。衍生自嗜热生物的FKBP和大肠杆菌SlyD可以在大肠杆菌中的嵌合多肽的重组表达中用作蛋白伴侣

(Ideno, A.等人, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64(2004)99-105)。大肠杆菌SlyD和FKBP12多肽是可逆折叠多肽(Scholz, C等人, *J. Biol. Chem.* 271(1996)12703-12707)。Low C等人*J. Mol. Biol.* 398(2010)375-390报道了来自嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的金属伴侣 SlyD的晶体结构和功能特征。嗜热栖热菌由代表两个功能单元的两个结构域组成。PPIase活性位于典型的FKBP结构域中,而蛋白伴侣功能与自主折叠的插入翼片(IF)结构域相关。两个分离的结构域在溶液中是稳定和有功能的。

[0008] Kovermann等人(于:Kovermann M, Schmid FX, Balbach J Molecular function of the prolyl cis/trans isomerase and metallochaperone SlyD. *Biol Chem.* 2013 Aug;394(8):965-75)公开了SlyD是细菌双结构域蛋白质,其充当分子伴侣、脯氨酰顺/反式异构酶和镍结合蛋白。他们概括了关于SlyD的分子酶机制的最近发现。位于SlyD的一个结构域中的蛋白伴侣功能涉及双精氨酸易位,并且使蛋白质折叠中的脯氨酰顺/反式异构酶结构域的催化效率增加两个数量级。

[0009] FKBP 12多肽的氨基酸序列包含在位置60处的单个色氨酸残基。因此,可以简单地通过分析色氨酸荧光来分析FKBP12突变体的结构完整性(DeCenzo, M.T.等人, *Protein Eng.* 9(1996)173-180)。可以通过测定剩余的旋转异构酶活性来执行关于FKBP 12突变体的剩余催化活性的测试(Brecht, S.等人, *Neuroscience* 120(2003)1037-1048;Schories, B.等人, *J. Pept. Sci.* 13(2007)475-480;Timerman, A.P.等人, *J. Biol. Chem.* 270(1995)2451-2459)。还能够通过测定FK506-或雷帕霉素结合来测定FKBP 12突变体的结构完整性(DeCenzo, M.T.等人, *Protein Eng.* 9(1996)173-180)。

[0010] Geitner等人(于:Geitner AJ1, Varga E, Wehmer M, Schmid FX. Generation of a highly active folding enzyme by combining a parvulin-type prolyl isomerase from SurA with an unrelated chaperone domain. *J Mol Biol.* 2013 Nov 15;425(22):4089-98)公开了作为小脯氨酰异构酶的细小蛋白,其充当折叠酶的催化结构域。来自大肠杆菌周质的SurA(存活蛋白A)由无活性(Par1)和活性(Par2)细小蛋白结构域以及蛋白伴侣结构域组成。在不存在蛋白伴侣结构域的情况下,Par2的折叠活动实际上被取消。他们通过将SlyD(来自FKBP家族的无关折叠酶)的伴侣结构域插入SurA的分离的Par2结构域的环内来产生嵌合蛋白。这使其折叠活性增加至比SurA活性高450倍的值,其中Par2与其天然蛋白伴侣结构域连接。在天然和外来蛋白伴侣结构域两者的存在下,Par2的折叠活性增加了1500倍。相关和无关蛋白伴侣结构域因此在增强脯氨酰异构酶Par2的折叠活性方面类似地有效。各种蛋白伴侣结构域的序列分析提示,移动链区域中暴露的甲硫氨酸残基簇对于与未折叠蛋白质链的一般相互作用可能是重要的。这种结合是高度动态的,以允许折叠蛋白质链在蛋白伴侣和催化结构域之间的频繁转移。

[0011] 对于免疫学诊断系统,抗原和/或抗体或其他免疫结合配偶体(目标蛋白质)另外经常与生物素(用于由链霉抗生物素蛋白固定)或其他标记如钆缀合,用于它们的检测。通常,使用化学方法,由此将这些标记物与反应性氨基-或巯基-部分缀合。

[0012] 不幸的是,用于蛋白质修饰的常规化学策略难以控制,并且产生具有可变化学计量的免疫缀合物的异质群体,其各自具有其自身的体内特征。此外,缀合分子或标记的数目无法控制,并且因此未被限定,并且通常遵循正态分布,这在希望量化反应时引起问题。

[0013] 用于位点特异性和化学计量蛋白质修饰的人工生物正交基团的引入为这个问题

提供了潜在的解决方案。这些策略是流行的,但经常是费力的,且仍然存在产物异质性的风险。此外,系统的所有组分必须并且不得经过延长时间段且在缀合条件下保持稳定。另外,不能控制缀合的位置/定位。例如在蛋白质的活性中心处或附近,或在介导免疫活性的位置处或附近的位置处非特异性地包括的标记物,可以干扰免疫反应性或甚至完全抑制它。

[0014] 用于标记物的位点特异性酶促缀合的方法是已知的(例如,分选酶(sortase), MTG),但这些要求在待标记的目标蛋白质中存在另外的特异性识别序列(标签序列)。

[0015] 微生物转谷氨酰胺酶(MTG)是许多食品和生物技术应用中的蛋白质和肽交联的最重要的酶。MTG最初在生物茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)中发现,且之后从其中提取。重组产生的茂原链霉菌MTG代表了大部分当今工业上使用的MTG。该酶催化酰基例如谷氨酰胺(Q)侧链和烷基胺例如赖氨酸(K)侧链之间的异肽键形成。在不存在反应性胺基团的情况下,与水的酶促反应导致谷氨酰胺侧链的脱氨基。细菌酶无需添加辅因子如 Ca^{2+} 或GTP且在广泛范围的pH、缓冲和温度条件下起作用。MTG已被用于开发治疗性抗体-药物缀合物,但由于酶的低特异性,尚未建立这种MTG介导的缀合物的大规模生产。所有已知的活性微生物转谷氨酰胺酶物种显示出> 38 kDa的分子量。作为自然界中的交联酶,微生物转谷氨酰胺酶展示对于胺供体分子的广泛底物特异性和对于酰基供体的相对低的特异性。因为仅来自茂原链霉菌的酶和同源酶的底物特异性是已知的,所以采用生物正交缀合方法,例如使用两种或更多种不同的标记底物和两种或更多种转谷氨酰胺酶物种同时标记生物分子目前是不可能的。

[0016] 鉴于上文,本发明的目的是提供新的工具和方法,由此在免疫诊断和/或治疗系统和方法的背景下提供抗原和/或抗体或其他免疫结合配偶体(目标蛋白质)的有效和受控的标记。在阅读本发明的下述更详细的描述后,其他方面和目的对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0017] 根据其第一个方面,通过提供根据下述通式I的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物解决了上述目的。

[0018] $(F^*-L)_y-X$ (I)。

[0019] 在所述式(I)中, F^* 选自FKBP多肽的FKBP结构域的氨基酸序列,优选包含“插入翼片”(IF)结构域,所述结构域在未修饰的多肽中作为客体内部插入宿主结构域的表面环内,其是FK506结合蛋白(FKBP)类型的脯氨酰异构酶。然而,本发明还包括天然(未修饰的)FKBP结构域,其不包括“插入翼片”(IF)结构域,其中Q标签插入酶中的同源位置(参见例如, Knappe等人,下文)。

[0020] 所述“插入翼片”(IF)结构域至少部分地被替换为具有5至20个氨基酸长度的氨基酸序列(“Q标签”),所述氨基酸序列包含5个连续氨基酸的子序列,所述子序列与肽序列 $X_1-YR YR Q-X_2$ (SEQ ID NO. 1),特别是肽序列 $X_1-YR YR Q-X_2$ (SEQ ID NO. 1)的YR YR Q部分具有至少80%序列同一性,其中 X_1 和 X_2 不存在或构成接头氨基酸。在一个具体实施方案中,IF结构域至少部分地被替换为具有5至15或5至20个氨基酸长度的 $X_1-YR YR Q-X_2$ (SEQ ID NO. 1) (“Q标签”),所述Q标签包含5个氨基酸的连续子序列(即由5个连续氨基酸残基组成的子序列),所述子序列与肽序列 $X_1-YR YR Q-X_2$ (SEQ ID NO. 1) (中)的YR YR Q部分具有至少80%的序列同一性,其中 X_1 和 X_2 不存在或构成接头氨基酸。

[0021] 在一个更具体的实施方案中,仅 X_1 不存在,并且肽序列 X_1 -YRYRQ- X_2 的长度为6至15或6至20个氨基酸。在一个甚至更具体的实施方案中, X_2 包含(或可以由其组成)直接在YRYRQ子序列或与YRYRQ部分具有至少80%序列同一性的子序列后的精氨酸残基。

[0022] 在又一个进一步非常具体的实施方案中,在由与肽序列 X_1 -YRYRQ- X_2 (SEQ ID NO. 1)的YRYRQ部分具有至少80%序列同一性的5个连续氨基酸残基组成的子序列中,谷氨酰胺残基位于子序列的选定位置上,该子序列中的位置选自第三个位置、第四个位置、第五个位置及其组合。

[0023] 在又一个进一步非常具体的实施方案中,在由与肽序列 X_1 -YRYRQ- X_2 (SEQ ID NO. 1)的YRYRQ部分具有至少80%序列同一性的5个连续氨基酸残基组成的子序列中,精氨酸残基位于子序列的选定位置上,该子序列中的位置选自第四个位置、第五个位置及其组合。

[0024] 进一步理解,根据本发明,接头氨基酸 X_1 和 X_2 (如果存在的话)彼此独立地选择。

[0025] 优选的是根据本发明的Q标签选自序列 X_1 -YRYRQ- X_2 (SEQ ID NO: 1)、 X_1 -RYRQR- X_2 (SEQ ID NO: 2)、 X_1 -RYSQR- X_2 (SEQ ID NO: 3)、 X_1 -FRQRQ- X_2 (SEQ ID NO: 4)、 X_1 -RQRQR- X_2 (SEQ ID NO: 5)、 X_1 -FRQRG- X_2 (SEQ ID NO: 6)、 X_1 -QRQRQ- X_2 (SEQ ID NO: 7)、 X_1 -YKYRQ- X_2 (SEQ ID NO: 8)、 X_1 -QYRQR- X_2 (SEQ ID NO: 9)、 X_1 -YRQTR- X_2 (SEQ ID NO: 10)、 X_1 -LRYRQ- X_2 (SEQ ID NO: 11)、 X_1 -YRQSR- X_2 (SEQ ID NO: 12)、 X_1 -YQRQR- X_2 (SEQ ID NO: 13)、 X_1 -RYTQR- X_2 (SEQ ID NO: 14)、 X_1 -RFSQR- X_2 (SEQ ID NO: 15)、 X_1 -QRQTR- X_2 (SEQ ID NO: 16)、 X_1 -WQRQR- X_2 (SEQ ID NO: 17)、 X_1 -PRYRQ- X_2 (SEQ ID NO: 18)、 X_1 -AYRQR- X_2 (SEQ ID NO: 19)、 X_1 -VRYRQ- X_2 (SEQ ID NO: 20)、 X_1 -VRQRQ- X_2 (SEQ ID NO: 21)和 X_1 -YRQRA- X_2 (SEQ ID NO: 22),其中 X_1 和 X_2 如上文所述。

[0026] 令人惊讶地发现,FKBP结构域的两个部分IF结构域的上游和下游插入片段对于序列以结构上相当刚性且精确的支架或“套环”起作用,所述序列插入IF结构域部分内和/或替换IF结构域部分(“头部”,“Q标签”)。因此,插入/替换的呈现和取向可靠地基本上不干扰底物的其他组分的任何其他功能,特别是目标蛋白质(X)的功能。此外,在这种情况下-TG底物结合位点(Q标签)的呈现导致标记的高度受控的化学计量结合,并且因此标记目标蛋白质。

[0027] 在式(I)中,L不存在或选自接头氨基酸序列。优选地,所述接头序列L包含1至20个氨基酸,且更优选所述氨基酸基本上不干扰FKBP结构域(特别是替换/插入)和/或目标蛋白质的功能(例如免疫功能)。

[0028] X指定目标蛋白质;其优选选自酶、抗原例如病毒蛋白质、抗体或其片段、以及其他免疫结合配偶体。

[0029] 在式(I)中,y是1至100的整数,因此,几个标记物基团 F^*-L 可以附接至目标蛋白质。

[0030] 优选地,根据本发明的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物可以另外包含用于纯化和/或固定的蛋白质标签,例如在N末端和/或C末端处,如生物素、麦芽糖或his标签。

[0031] 优选地,底物 F^* 、L和/或X的不同组分彼此共价附接,由此允许底物使用TG活性的受控标记。底物可以作为融合蛋白重组产生,并且从宿主细胞例如细菌或酵母宿主细胞表达且纯化。分别的方法是技术人员众所周知的。组分也可以分开或部分地产生(例如合成),然后根据其环境和所需目的后续共价或缀合连接。

[0032] 根据本发明,本发明的TG底物是关于根据SEQ ID No. 23的白色库茨涅尔氏菌 TG 的转谷氨酰胺酶(TG)功能的底物,或同源蛋白质,其与TG底物氨基酸序列至少80%,优选至少90%,更优选至少95、98或99%相同,并且显示出如本文所述的实质的TG活性。优选地,TG多肽或者其具有实质转谷氨酰胺酶功能或活性的部分在宿主细胞中克隆并重组产生,并且随后(至少部分地)纯化,取决于其环境和所需目的。分别的方法是技术人员众所周知的。可以使用同样是技术人员众所周知的测定来测量TG活性。在本发明的上下文中,“重组TG底物”应意指作为整体的底物在自然界中不存在。

[0033] 如用于根据本发明的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物的FKBP结构域优选选自真核或细菌FKBP多肽,其选自FKBP12、AIP、AIPL1、FKBP1A、FKBP1B、FKBP2、FKBP3、FKBP5、FKBP6、FKBP7、FKBP8、FKBP9、FKBP9L、FKBP10、FKBP11、FKBP14、FKBP15、FKBP52、LOC541473和SLYD,以及其FKBP结构域的同源物(与其氨基酸序列至少80%,优选至少90%,更优选至少95、98或99%相同),并且适合插入Q标签。分别的结构域可以如本文和文献中所述分析其适合性,例如使用比对程序,特别是识别结构比对。

[0034] 在一个实施方案中,如用于根据本发明的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物的FKBP结构域包含具有PPI酶活性的多肽的氨基酸序列。具有PPIase活性的多肽具有原核生物或真核生物起源,或具有与其人工变体(突变体)一样的PPI酶活性的多肽。具有PPI酶活性的多肽的人工变体可以通过根据蛋白质工程现有技术的技术产生。根据本发明,具有PPI酶活性的多肽的人工变体的特征在于例如一个或多个氨基酸的替换、添加或缺失。在一个具体实施方案中,如用于根据本发明的重组转谷氨酰胺酶底物的FKBP结构域的PPIase活性和/或蛋白伴侣功能在人工变体中得到保存。

[0035] Knappe等人(于:Knappe TA, Eckert B, Schaarschmidt P, Scholz C, Schmid FX. Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. J Mol Biol. 2007 May 18;368(5):1458-68. Epub 2007 Mar 14)公开了人FKBP 12作为脯氨酰异构酶的催化活性高于短肽,但在脯氨酸限制的蛋白质折叠反应中非常低。相比之下,作为FKBP家族成员的SlyD蛋白作为折叠酶高度活性。它们含有在脯氨酰异构酶活性位点附近额外的“插入翼片”或IF结构域。该结构域的切除不影响来自大肠杆菌的SlyD针对短肽底物的脯氨酰异构酶活性,但使其失去了在脯氨酸限制的蛋白质折叠反应中的催化活性。将SlyD的IF结构域交互插入(reciprocal insertion)人FKBP12内使其折叠活性增加200倍,并且生成比SlyD自身更有活性的折叠催化剂。IF结构域与重折叠蛋白质链结合,并且因此充当蛋白伴侣模块。

[0036] 在大肠杆菌中,认为SLYD的氨基酸1至69形成PPIase结构域的第一部分,氨基酸76至120形成IF-蛋白伴侣(结构域),并且氨基酸129至151形成PPIase结构域的第二部分。因此,氨基酸1至151形成FKBP结构域。氨基酸152至196涉及金属结合。

[0037] 优选的是根据本发明的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,其中所述FKBP结构域具有长度为约120至170,优选约130至160,且最优选约145至155的所述FKBP多肽的N末端氨基酸。这包括IF结构域序列。

[0038] 在本发明的上下文中,“约”应意指给定值的 $\pm 10\%$ 。

[0039] 优选的是根据权利要求1至3中任一项的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,其中所述FKBP结构域包含SLYD多肽的N末端氨基酸1至64和123至149,并且其中氨基酸65至122被替

换为所述Q标签。

[0040] 如上所述,接头序列L可以包含1至20个氨基酸,优选1至10个氨基酸,更优选1至5个氨基酸,其中优选地所述氨基酸基本上不干扰FKBP结构域和/或目标蛋白质。优选的接头氨基酸是小氨基酸,如甘氨酸或丙氨酸。氨基酸接头及其组合物是本领域已知的(参见例如Chichili等人Linkers in the structural biology of protein-protein interactions Protein Sci. 2013 Feb;22(2): 153-167)。

[0041] 在本发明的上下文中,目标蛋白质一般是可以使用本技术标记的所有蛋白质。优选的是根据本发明的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物,其中所述目标蛋白质选自酶、抗原例如病毒蛋白质、抗体或其片段、以及其他免疫结合配偶体。本发明特别用于其中需要定量的免疫反应和测定。

[0042] 然后,本发明的另一个方面涉及用于标记目标蛋白质的体外方法,其包括a)提供包含目标蛋白质的根据本发明的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物;b)提供有效量的如本文所述的白色库茨涅尔氏菌的转谷氨酰胺酶(例如根据SEQ ID NO:23)或其同源物,c)提供包含烷基胺基团(“胺供体”)例如赖氨酸的合适标记,并且d)使根据a)至c)的所述组分接触,由此所述转谷氨酰胺酶(活性)将所述标记附接至所述底物。

[0043] 优选的是根据本发明的方法,其中如本文所述重组产生如本文所述的白色库茨涅尔氏菌的转谷氨酰胺酶或其同源物。

[0044] 在根据本发明的这种方法中,使用白色库茨涅尔氏菌的转谷氨酰胺酶的活性标记包含含有Q标签(任选替换IF-结构域区域)的F*基团的底物。优选地,待附接的标记选自酶、生物素、放射性基团、染料例如荧光染料、同位素和金属。所述标记是标记组分/化合物的部分,其包含烷基胺基团,例如赖氨酸。最优选地,所述标记组分/化合物包含与肽序列RYESK具有至少80%序列同一性的胺供体标签(“K标签”)。关于优选的K标签及其组合物的实例在下文描述,并且也可以在文献中找到。

[0045] 优选的是根据本发明的方法,其中所述标记是受控的,并且例如以标记和目标蛋白质的化学计量比,例如以约1:1实现。使用另外的酶(例如除Ka1b-TG外的其他TG)和分别的其他TG底物也可以实现多重标记,由此将两种或甚至多重标记附接至一种或多种目标蛋白质。

[0046] 优选的是根据本发明的方法,其中所述目标蛋白质选自酶、抗原例如病毒蛋白质、抗体或其片段、以及其他免疫结合配偶体。本发明特别用于其中需要定量的免疫反应和测定。

[0047] 目标蛋白质的选择还可以取决于如使用的piRNA分子在治疗、研究和/或诊断中的预期用途。优选的是根据本发明的方法,其中所述目标蛋白质选自在癌症、神经疾病、免疫疾病、过敏、代谢疾病、生育力(例如繁殖率或数量)、动物生产(例如肉或乳的量)中涉及/引起的蛋白质,细胞生长和/或发育、mRNA降解、翻译抑制和/或转录基因沉默所必需的蛋白质。

[0048] 然后,本发明的另一个方面涉及药物或诊断组合物,其包含根据本发明的至少一种重组转谷氨酰胺酶(TG)底物、连同药学上可接受的载体和组分例如缓冲剂。还可以获得用于多重标记的药物或诊断组合物,其包含另外的酶(例如除Ka1b-TG外的其他TG)和分别的其他TG底物,由此能够将两种或甚至多重标记附接至一种或多种目标蛋白质。

[0049] 然后,本发明的另一个方面涉及药物或诊断组合物,其包含如根据本发明的方法产生的至少一种标记的目标蛋白质、连同药学上可接受的载体和组分例如缓冲剂。

[0050] 优选的是根据本发明的药物或诊断组合物,其中所述目标蛋白质以标记和蛋白质的化学计量比,例如约1:1标记。两种或甚至几种标记也可以附接至一种或多种目标蛋白质。

[0051] 然后,本发明的另一个方面涉及诊断试剂盒,其包含根据本发明的诊断组合物,任选地连同用于执行免疫测定的其他组分一起。该试剂盒可以在结合或分开的容器中包含微生物重组转谷氨酰胺酶,例如纯化的微生物转谷氨酰胺酶,其与如本文所述的白色库茨涅尔氏菌微生物转谷氨酰胺酶具有至少80%的序列同一性。该试剂盒可以进一步包括底物,例如包括与肽序列RYESK具有至少80%序列同一性的胺供体标签的底物。该试剂盒还可以包括用于执行反应(例如免疫测定)的说明书,所述反应要求使用标记或未标记的根据本发明的底物。

[0052] 本发明的另一个方面涉及根据本发明的重组转谷氨酰胺酶(TG)底物、药物或诊断组合物或试剂盒在标记或在目标蛋白质标记中的用途,特别是在其中需要量化的免疫反应和测定中的用途。

[0053] 本发明的方法可以在体内或体外,特别是在实验室动物中或在培养物中执行。

[0054] 本发明现在将参考附图在下述非限制性实施例中进一步示出。出于本发明的目的,本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用以其整体并入本文。

[0055] 图1显示了来自白色库茨涅尔氏菌的转谷氨酰胺酶的氨基酸序列(数据库编号WP_030111976)、大肠杆菌的slyD的氨基酸序列、圆杆菌科细菌(*Cyclobacteriaceae bacterium*) AK24的slyD的氨基酸序列、以及拟杆菌目细菌(*Bacteroidales bacterium*)的slyD的氨基酸序列。

[0056] 图2显示了根据下文实施例使用Cy3或Cy5标记的结果。图2B显示了在6.2至9.0范围内的相对pH独立性。

[0057] 图3A显示了钆标记的融合构建体的一般结构,并且图3A显示了根据下文实施例使用SDS-PAGE标记的结果。

[0058] 图4显示了根据本发明的底物标记的目标蛋白质(此处,抗体的两条链)的优选实施方案。

[0059] 图5A呈现了SEQ ID NO:60的‘TtSlyQD-Xa-gp21-8H’的示意性视图。指示了SlyD部分,进一步地融合蛋白中的Q标签,以及因子Xa蛋白酶的识别位点,以及如实施例中所示的‘gp21’部分。星号象征钆标记。

[0060] 图5B显示了SDS-PAGE分析后的结果,其显示了重组gp21(HTLV)抗原用茂原链球菌的细菌转谷氨酰胺酶的特异性和非特异性钆标记。描述的是在Ru标记后未标记的、单一标记的、双重标记的和三重标记的‘TtSlyQD-Xa-gp21-8H’融合蛋白。

[0061] 图5C描绘了钆标记。

[0062] 图6 A-E呈现了在Elecys测定中使用根据SEQ ID NO:62的标记的‘TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H’的结果。

[0063] SEQ ID NO: 1至22显示了如在本发明的上下文中鉴定的Q标签基序的序列,其中N

末端X如上文X₁,并且C末端X如上文X₂。

[0064] SEQ ID NO: 23显示了来自白色库茨涅尔氏菌的转谷氨酰胺酶的氨基酸序列(数据库编号WP_030111976)。

[0065] SEQ ID NO: 24显示了大肠杆菌的slyD的氨基酸序列。

[0066] SEQ ID NO: 25显示了圆杆菌科细菌AK24的slyD的氨基酸序列。

[0067] SEQ ID NO: 26显示了拟杆菌目细菌CF的slyD的氨基酸序列。

[0068] SEQ ID NO: 27显示了大肠杆菌的slyD的FKBP结构域的氨基酸序列。

[0069] SEQ ID NO: 28显示了大肠杆菌的FKBP16的FKBP结构域的氨基酸序列。

[0070] SEQ ID NO: 29显示了嗜热栖热菌的slyD的FKBP结构域的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO: 30至51显示了如在本发明的上下文中鉴定的Q标签基序的序列,其中N末端和C末端氨基酸是一个示例性的甘氨酸接头。

[0072] SEQ ID NO: 52显示了KalbTG谷氨酰胺供体序列的氨基酸序列,其重组移植到SlyD的FKBP结构域上。

[0073] SEQ ID NO: 53显示了转谷氨酰胺酶赖氨酸供体序列(K标签)的氨基酸序列。

[0074] SEQ ID NO: 54显示了SlyD氨基酸序列。

[0075] SEQ ID NO: 55显示了具有MTG Q标签的SlyD的氨基酸序列。

[0076] SEQ ID NO: 56显示了具有KalbTG Q标签的SlyD的氨基酸序列。

[0077] SEQ ID NO: 57显示了SlpA氨基酸序列。

[0078] SEQ ID NO: 58显示了主要HTLV抗原和病毒包膜糖蛋白氨基酸序列'gp21'。

[0079] SEQ ID NO: 59显示了经修饰的'gp21'胞外域多肽序列的氨基酸序列,其被改造用于免疫测定中更好的溶解性、稳定性和反应性。

[0080] SEQ ID NO: 60显示了重组融合蛋白'TtSlyQD-Xa-gp21-8H'的氨基酸序列。

[0081] SEQ ID NO: 61显示了重组融合蛋白'TtSlyD-Xa-gp21-8H'的氨基酸序列。

[0082] SEQ ID NO: 62显示了重组融合蛋白'TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H'的氨基酸序列。

实施例

[0083] IF结构域的位置的鉴定

原则上,可以使用FKBP结构域的氨基酸序列的一级结构的比对,由此鉴定待替换(或添加)的IF结构域的位置,例如使用程序Clustal Omega。特别是关于非细菌FKBP的替代方案是3D结构的比对(例如使用程序PyMol),因为该结构域构成结构上保守的元件。

[0084] 具体实例如下:

大肠杆菌(菌株K12)的SLYD_ECOLI FKBP型肽基-脯氨酰顺-反式异构酶SlyD.FKBP域,IF结构域加双重下划线。

MKVAKDLVVSLAYQVRTEDGVLVDESPVSAPLDYLHGHGSLISGLETALEGHEVGDKFDVAV
GANDAYGQYDENLVQRVPKDVFMGVDELQVGMRFLEAETDQGPVPVEITAVEDDHVVVDGNHM
LAGQNLKFNVEVVAIREATEEELAHGHVHGHAHDHHDHHDH (SEQ ID NO: 27).

[0085] 大肠杆菌(菌株K12)的ECOLI FKBP型16 kDa肽基-脯氨酰顺-反式异构酶.FKBP域,IF结构域加双重下划线。

MSESVQSNSAVLVHFTLKLDDGTTAESTRNNGKPALFRLGDASLSEGLEQHLLGLKVGDKTT
FSLEPDAAFGVPSPDLIQYFSRREFMDAGEPEIGAIMLFTAMDGSEMPGVIREINGDSITVD
FNHPLAGQTVHFDIENVLEIDPALEA (SEQ ID NO: 28).

[0086] 嗜热栖热菌(菌株HB8/ATCC 27634)的肽基-脯氨酰顺-反式异构酶FKBP结构域,IF结构域加双重下划线。

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEGEAFQAHVPAEKA
YGPHDPEGVQVVPLSAFPEDAEEVPGAQFYAQDMEGNPMPLTVVAVEGEEVTVDFNHPLAGK
 DLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAH (SEQ ID NO: 29).

[0087] Ka1bTG的Q标签序列的分析

使用标记测定鉴定的Ka1bTG肽底物的分析揭示了由这些底物共有的一组特征,所述标记测定使用包含5聚体氨基酸序列的一组肽,其具有三个3个N末端和C末端甘氨酸残基(G₁和G₂)。具体实例如下:

G₁-YRQR-G₂(SEQ ID NO: 30)、G₁-RYRQR-G₂(SEQ ID NO: 31)、G₁-RYSQR-G₂(SEQ ID NO: 32)、G₁-FRQR-G₂(SEQ ID NO: 33)、G₁-RQRQR-G₂(SEQ ID NO: 34)、G₁-FRQRG-G₂(SEQ ID NO: 35)、G₁-QRQR-G₂(SEQ ID NO: 36)、G₁-YKYR-G₂(SEQ ID NO: 37)、G₁-QYRQR-G₂(SEQ ID NO: 38)、G₁-YRQTR-G₂(SEQ ID NO: 39)、G₁-LYRQR-G₂(SEQ ID NO: 40)、G₁-YRQSR-G₂(SEQ ID NO: 41)、G₁-YQRQR-G₂(SEQ ID NO: 42)、G₁-RYTQR-G₂(SEQ ID NO: 43)、G₁-RFSQR-G₂(SEQ ID NO: 44)、G₁-QRQTR-G₂(SEQ ID NO: 45)、G₁-WQRQR-G₂(SEQ ID NO: 46)、G₁-PRYR-G₂(SEQ ID NO: 47)、G₁-AYRQR-G₂(SEQ ID NO: 48)、G₁-VRYR-G₂(SEQ ID NO: 49)、G₁-VRQR-G₂(SEQ ID NO: 50)和G₁-YRQRA-G₂(SEQ ID NO: 51)。

[0088] 对于Ka1bTG,数据揭示包括具有式Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅的5聚体氨基酸序列的酰基供体底物,其中Xaa是任何氨基酸,一般顺应几种设计规则。首先,每个5聚体序列包括至少一个谷氨酰胺(Q)。更特别地,5聚体序列的第三个、第四个和第五个位置(即Xaa₃、Xaa₄和Xaa₅)中的至少一个是谷氨酰胺。观察到几个序列,其在第三个和第五个位置各自处包括谷氨酰胺。此外,观察到每个5聚体序列包括至少一个精氨酸(R)。更具体地,5聚体序列的第四个和第五个位置(即Xaa₄和Xaa₅)中的至少一个是精氨酸。

[0089] 标记测定

1. 荧光染料

对于标记测定,来自嗜热栖热菌的蛋白伴侣SlyD(Universal Protein Resource(UniProt)编号Q5SLE7)用作关于Ka1bTG的标记支架。SlyD序列是:

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEGEAFQAH
 VPAEKAYGPHDPEGVQVVPLSAFPEDAEEVPGAQFYAQDMEGNPMPLTVVAVEGEE
 VTVDFNHPLAGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAH (SEQ ID NO: 29)。

[0090] 将Ka1bTG谷氨酰胺供体序列(Q标签,加下划线)重组移植到SlyD的FKBP结构域上,得到下述多肽序列:

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEGEAFQAH
 VPAEKAYGAGSGGGGRYRQRGGGGGSSGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAH

MSESVQSNSAVLVHFTLKLDDGTTAESTRNNGKPALFRLGDASLSEGLEQHLLGLKV
GDKTTFSLEPDAAFGVPSPLIQYFSRREFMDAGEPEIGAIMLFTAMDGSEMPGVIREI
NGDSITVDFNHPLAGQTVHFDIEVLEIDPALEA (SEQ ID NO:57)

主要的HTLV抗原和病毒包膜糖蛋白序列‘gp21’是：

IVSSACNNLILPPFSLSPVPTVGSRSRRAPVAVVWFVSALAMGAGVAGGITGSMSLA
SGKSLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKNLLKIAQYAAQNRRGLDLLFWEQGGGLCKALQ
EQCCFLNITNSHVSILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLSQWAREALQTGITLVALLL
VILAGPCIRCPCRTMHP (SEQ ID NO:58)

为了在免疫测定中更好的溶解度、稳定性和反应性工程改造的gp21胞外域多肽序列是：

MSLASGKSLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKNLLKIAQYAAQNRRGLDLLFWEQGGGLA
KALQEQA AFLNITNSHVSILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLSQWAREALQTG (SEQ
ID NO:59)

用于标记测定的重组融合序列是：

‘TtSlyQD-Xa-gp21-8H’：

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEGEAFQAH
VPAEKAYGAGSGGGGDYALQGGGGGSSGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAHG
GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGIEGRMSLASGKSLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKNL
LKIAQYAAQNRRGLDLLFWEQGGGLAKALQEQA AFLNITNSHVSILQERPPLENRVLT
GWGLNWDLGLSQWAREALQTGGHHHHHHHH (SEQ ID NO:60)

‘TtSlyD-Xa-gp21-8H’：

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEGEAFQAH
VPAEKAYGPHDPEGVQVVPLSAFPEDA EVVPGAQFYAQDMEGNPMPPLTVVAVEGEE
VTVDFNHPLAGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAHGGSGGGSGGGSGGGSGG
GSGGGIEGRMSLASGKSLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKNLLKIAQYAAQNRRGLDLL
FWEQGGGLAKALQEQA AFLNITNSHVSILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLSQWARE
ALQTGGHHHHHHHH (SEQ ID NO:61)

‘TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H’:

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEGEAFQAH
VPAEKAYGAGSGGGGYRQRQGGGGSSGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAGH
GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGMSESVQSNSAVLVHFTLKLDDGTAESTRNNGKP
ALFRLGDASLSEGLEQHLLGLKVGDKTTFSLEPDAAFGVPSPDLIQYFSRREFMDAGE
PEIGAIMLFTAMDGSEMPGVIREINGDSITVDFNHPLAGQTVHFDIEVLEIDPALEAGG
GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGIEGRMSLASGKSLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKNLL
KIAQYAAQNRRGLDLLFWEQGGGLAKALQEQAFLNITNSHVSILQERPPLENRVLTG
WGLNWDLGLSQWAREALQTGGHHHHHHHHH (SEQ ID NO:62)

[0096] 8X-组氨酸标签标记蛋白质在大肠杆菌B121 Tuner中产生,并且通过标准的基于Ni 琼脂糖凝胶的固定化金属离子亲和层析和尺寸排阻层析(HisTrap,Superdex 200;GE Healthcare)纯化。

[0097] 化学合成标记的肽,以具有(以从N末端到C末端的次序)“Z”基团(即羧基苄基)、转谷氨酰胺酶赖氨酸供体序列(K标签)、聚乙二醇(PEG)、肽和生物素标记或联吡啶钌(BPRu)复合物。标记肽的一级化学结构是:

KalbTG K标签-Bi(“Bi”代表生物素标签):

Z-RYESKG-PEG27-K(Bi)-OH(2532.0 g/mol)

KalbTG K标签-Ru(“Ru”代表用于电化学发光的基于钌的标记):

Z-RYESKG-PEG27-K(BPRu)-OH(2958,4 g/mol)。

[0098] 如果没有另外说明,则典型的标记反应在37℃下在200 mM MOPS pH 7.4中的65 μM底物蛋白质、1000 μM标记肽和0.1 μM转谷氨酰胺酶的存在下执行15分钟用于由KalbTG酶标记,并且在37℃下在200 mM MOPS pH 7.4中的72 μM底物蛋白质、720 μM标记肽和1 μM转谷氨酰胺酶的存在下执行15分钟用于由MTG酶标记。转谷氨酰胺酶标记在申请US 2016/0178627 ‘System and Method for Identification and Characterization of Transglutaminase Species’和WO 2016/096785 ‘IDENTIFICATION OF TRANSGLUTAMINASE SUBSTRATES AND USES THEREFOR’中更详细地描述。

[0099] 通过尺寸排阻层析(Superdex 200;GE Healthcare)分离标记反应混合物,并且分离含有标记的融合蛋白的级分用于后续分析。

[0100] 生物素和钌标记的分析以及免疫测定

通过SDS-PAGE分析标记反应的质量和数量。生物素标记的效率通过考马斯染色凝胶中条带的分子量位移来估计。钌标记的效率通过考马斯染色凝胶中条带的分子量位移和凝胶内荧光(BioRad ChemiDoc凝胶记录系统,Cy3 LED和滤波器组)来估计。根据制造商关于Elecsys e411仪器的说明执行诊断免疫测定(Roche HTLV I/II),将测试的试剂R1中的生物素标记的抗原部分分别替换为用MTG标记的‘TtSlyD-Xa-gp21-8H’生物素或用KalbTG标记的‘TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H’生物素,并且将测试的试剂R2中钌标记的抗原部分分别替换为用MTG标记的‘TtSlyD-Xa-gp21-8H’钌或用KalbTG标记的‘TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H’钌。用HTLV阳性血清和商购可得的HTLV I/II试剂盒执行阳性对照。用HTLV阴性血清以及不同校准物和对照溶液组合的HTLV阳性血清执行阴性对照。

[0101] 关于结果,参见图5和6。

[0102] TtSlyQD-Xa-gp21-8H钉标记的质谱分析

图5A示意性地描绘了SEQ ID NO:60的融合蛋白‘TtSlyQD-Xa-gp21-8H’。图5B显示了SDS-PAGE分析后的结果,其显示了重组gp21 (HTLV) 抗原用茂原链球菌的细菌转谷氨酰胺酶的特异性和非特异性钉标记。描述的是在Ru标记后未标记的、单一标记的、双重标记的和三重标记的‘TtSlyQD-Xa-gp21-8H’融合蛋白。Ru标记参见图5C。

[0103] 分析了钉标记的融合蛋白的两个合并级分,[1] TtSlyQD-Xa-gp21-8H_Fraction 17-19和[2] TtSlyQD-Xa-gp21-8H_Fraction 20-23;未标记的‘TtSlyQD-Xa-gp21-8H’蛋白质作为对照(TtSlyQD-Xa-gp21-8H_Control)。

[0104] 执行肽作图。在通过用胰蛋白酶消化的肽作图、层析分离、随后的MS/MS分析以及与手动解释工具组合的数据库检索后,发现下述:

(a) 具有一个标记的胰蛋白酶肽, 62-85' **“AYGAGSGGGGDYALQGGGGGSSGK”** SEQ ID NO:63 (编号参考下文给出的序列),在两个级分中均发现,TtSlyQD-Xa-gp21-8H_Fraction 17-19’和TtSlyQD-Xa-gp21-8H_Fraction 20-23’。

[0105] (b) 具有一个标记的胰蛋白酶肽 195-222' **“ALQEQAAFLNITNSHVSILQERPPLENR”** SEQ ID NO:64 仅在TtSlyQD-Xa-gp21-8H_Fraction 17-19’中以痕量发现。

[0106] (c) 具有一个标记的胰蛋白酶肽 241-255' **“EALQTGGHHHHHHHH”** SEQ ID NO:65 (His标签)在两个级分TtSlyQD-Xa-gp21-8H_Fraction 17-19’和TtSlyQD-Xa-gp21-8H_Fraction 20-23’中均发现。

[0107] (d) 除上述之外,还发现其他钉标记的肽/副产物存在于两个级分中,然而以不大的数量。

[0108] TtSlyQD-Xa-gp21-8H的氨基酸序列,如上文(a-c)中给出的胰蛋白酶肽以黑体标记并且加下划线:

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEGEAFQAH
VPAEK**AYGAGSGGGGDYALQGGGGGSSGK**DLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAH
GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGIEGRMSLASGKSLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKN
LLKIAQYAAQNRRLDLLFWEQGGLAK**ALQEQAAFLNITNSHVSILQERPPLENRV**
LTGWGLNWDLGLSQWARE**EALQTGGHHHHHHHH**(SEQ ID NO:60)

[0109] 使用白色库茨涅尔氏菌的细菌转谷氨酰胺酶用生物素和钉位点特异性标记的重组gp21 (HTLV) 抗原证实了本发明在Elecys HTLV-I/II体外诊断测定中的优点。

[0110] 结果呈现于图6和下文中。

[0111] 图6 A描绘了图示,其显示了钉和生物素标记的gp21抗原的一级结构(Q = KalbTG Q标签,L = 接头,Xa = 因子Xa切割位点,8H = His标签)和诊断测试原理;来自患者样品的血清抗体(红色)桥接生物素和钉标记的抗原(绿色)。

[0112] 图6 B-D:SDS-PAGE分析显示gp21用KalbTG的单一生物素或钉标记。B:考马斯染色的SDS-PAGE凝胶,其显示了生物素标记,泳道1:预染色的蛋白质分子量标记物,泳道2:与KalbTG和生物素标记一起温育的TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H。C:考马斯染色的SDS-PAGE凝

胶,其显示了钉标记,泳道3a:与Ka1bTG和钉标记一起温育的TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H,泳道4a:未修饰的TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H(对照)。D:C中所示的SDS-PAGE分析的荧光图像。泳道3b-4b对应于泳道3a-4a。

[0113] 图6 E:使用MTG标记的试剂或商业试剂盒(对照)试剂对于HTLV抗体的血清阴性(左)和阳性(右)的Elecsys测定(HTLV-I/II)。注意,阳性对照信号高于Ka1bTG标记的gp21信号,因为对照中的标记化学计量高于1:1。即,Ka1bTG标记的分子携带更少的标记。测量一式两份执行,显示的是平均信号。

[0114] TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H的氨基酸序列如下:

```
MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEGEAFQAH  
VPAEKAYGAGSGGGGYRQRQGGGGGSSGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAHG  
GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGMSESVQSNSAVLVHFTLKLDDGTTAESTRNNGKP  
ALFRLGDASLSEGLEQHLLGLKVGDKTTFSLEPDAAFGVPSPDLIQYFSRREFMDAGE  
PEIGAIMLFTAMDGSEMPGVIREINGDSITVDFNHPLAGQTVHFDIEVLEIDPALEAGG  
GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGIEGRMSLASGKSLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKNLL  
KIAQYAAQNRRLDLLFWEQGGLAKALQEQAFLNITNSHVSILQERPPLNRVLTG  
WGLNWDLGLSQWAREALQTGGHHHHHHHHH (SEQ ID NO:62)。
```

序列表

	<110>	Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG Roche Diagnostics Operations, Inc.
	<120>	具有转谷氨酰胺酶识别位点的FKBP结构域
	<130>	R30521W0
	<150>	EP15200111.1
	<151>	2015-12-15
	<160>	65
	<170>	PatentIn version 3.5
	<210>	1
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Q标签的基序
[0001]	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(7)..(7)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400>	1
		Xaa Tyr Arg Tyr Arg Gln Xaa
		1 5
	<210>	2
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Q标签的基序
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	

	<221>	misc_feature
	<222>	(7)..(7)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400>	2
	Xaa Arg Tyr Arg Gln Arg Xaa	
	1	5
	<210>	3
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Q标签的基序
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(7)..(7)
[0002]	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400>	3
	Xaa Arg Tyr Ser Gln Arg Xaa	
	1	5
	<210>	4
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Q标签的基序
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(7)..(7)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400>	4

Xaa Phe Arg Gln Arg Gln Xaa
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q标签的基序

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 5

Xaa Arg Gln Arg Gln Arg Xaa
1 5

[0003]

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q标签的基序

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 6

Xaa Phe Arg Gln Arg Gly Xaa
1 5

<210> 7
<211> 7

	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Q标签的基序
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(7)..(7)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400>	7
	Xaa	Gln Arg Gln Arg Gln Xaa
	1	5
	<210>	8
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
[0004]	<220>	
	<223>	Q标签的基序
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(7)..(7)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400>	8
	Xaa	Tyr Lys Tyr Arg Gln Xaa
	1	5
	<210>	9
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	Q标签的基序

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 9

Xaa Gln Tyr Arg Gln Arg Xaa
1 5

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q标签的基序

[0005] <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 10

Xaa Tyr Arg Gln Thr Arg Xaa
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q标签的基序

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400> 11
	Xaa Leu Arg Tyr Arg Gln Xaa
	1 5
	<210> 12
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> Q标签的基序
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0006]	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400> 12
	Xaa Tyr Arg Gln Ser Arg Xaa
	1 5
	<210> 13
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> Q标签的基序
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400> 13

Xaa Tyr Gln Arg Gln Arg Xaa
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q标签的基序

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 14

Xaa Arg Tyr Thr Gln Arg Xaa
1 5

[0007]

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q标签的基序

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 15

Xaa Arg Phe Ser Gln Arg Xaa
1 5

<210> 16

	<211> 7 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> Q标签的基序 <220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸 <220> <221> misc_feature <222> (7)..(7) <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸 <400> 16 Xaa Gln Arg Gln Thr Arg Xaa 1 5
[0008]	<210> 17 <211> 7 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> Q标签的基序 <220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸 <220> <221> misc_feature <222> (7)..(7) <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸 <400> 17 Xaa Trp Gln Arg Gln Arg Xaa 1 5 <210> 18 <211> 7 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> Q标签的基序

	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400> 18
	Xaa Pro Arg Tyr Arg Gln Xaa
	1 5
	<210> 19
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> Q标签的基序
[0009]	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400> 19
	Xaa Ala Tyr Arg Gln Arg Xaa
	1 5
	<210> 20
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> Q标签的基序
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400> 20
	Xaa Val Arg Tyr Arg Gln Xaa 1 5
	<210> 21
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> Q标签的基序
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0010]	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400> 21
	Xaa Val Arg Gln Arg Gln Xaa 1 5
	<210> 22
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> Q标签的基序
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1)..(1)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (7)..(7)
	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 22

Xaa Tyr Arg Gln Arg Ala Xaa
1 5

<210> 23

<211> 262

<212> PRT

<213> 白色库茨涅尔氏菌

<400> 23

Met His Lys Trp Phe Leu Arg Ala Ala Val Val Ala Ala Val Gly Phe
1 5 10 15

Gly Leu Pro Thr Leu Ile Ala Thr Thr Ala Gln Ala Ala Ala Val Ala
20 25 30

Ala Pro Thr Pro Arg Ala Pro Leu Ala Pro Pro Leu Ala Glu Asp Arg
35 40 45

Ser Tyr Arg Thr Trp Arg Val Glu Asp Tyr Val Glu Ala Trp Glu Arg
50 55 60

[0011]

Tyr His Gly Arg Glu Met Thr Glu Asp Glu Arg Glu Asn Leu Ala Arg
65 70 75 80

Gly Cys Ile Gly Val Thr Val Val Asn Leu Asn Arg Glu Asp Leu Ser
85 90 95

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

Val Gln Ala Ala Leu Asn Lys Ile Val Asp Thr His Pro Ser Pro Ala
115 120 125

Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Lys Asp Pro Ile Leu Lys Arg Leu Lys
130 135 140

Asn Val Val Lys Ala Leu Pro Ser Trp Ile Asp Ser Ala Lys Leu Lys
145 150 155 160

Ala Ser Ile Phe Ser Lys Arg Phe Tyr Ser Trp Gln Asn Pro Asp Trp
165 170 175

Ser Glu Glu Arg Ala His Thr Thr Tyr Arg Pro Asp Arg Glu Thr Asp
180 185 190

Gln Val Asp Met Ser Thr Tyr Arg Tyr Arg Ala Arg Pro Gly Tyr Val
195 200 205

Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Gln Asp Thr Asn Thr Trp Trp His
210 215 220

Ala Asn His Glu Glu Pro Arg Met Val Val Tyr Gln Ser Thr Leu Arg
225 230 235 240

His Tyr Ser Arg Pro Leu Gln Asp Phe Asp Glu Gln Val Phe Thr Val
245 250 255

Ala Phe Ala Lys Lys Asp
260

[0012] <210> 24
<211> 196
<212> PRT
<213> 大肠杆菌

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp His Asp His Asp Gly Cys Cys Gly Gly His Gly His Asp His Gly
165 170 175

His Glu His Gly Gly Glu Gly Cys Cys Gly Gly Lys Gly Asn Gly Gly
180 185 190

Cys Gly Cys His
195

[0013]

<210> 25
<211> 176
<212> PRT
<213> 圆杆菌科细菌

<400> 25

Met Arg Phe Gln Ser Gln Leu Val Phe Met Glu Ile Ser Glu Asn Thr
1 5 10 15

Val Val Gly Leu Thr Tyr Glu Leu Lys Val Thr Asn Asn Glu Glu Asp
20 25 30

Ser Ile Pro Phe Ser Val Glu Val Arg Asp Glu Glu Asp Pro Phe Tyr
35 40 45

Phe Val Phe Gly Asn Ser Gly Leu Pro Glu Lys Phe Glu Arg Leu Leu
50 55 60

Glu Asn Lys Val Ala Gly Asn Thr Phe Asn Phe Thr Leu Ser Ile Glu
65 70 75 80

Glu Ala Tyr Gly His Ala Asp Glu Glu Leu Ile Leu Thr Val Pro Lys

	85	90	95
	Lys Gln Phe Thr Gly Glu Lys Gly Phe Glu Pro Glu Met Leu Glu Glu 100	105	110
	Gly Asn Phe Leu Pro Leu Ile Asp Glu Asp Gly Tyr Pro Met Gln Ala 115	120	125
	Lys Val Ile Lys Asp Leu Gly Glu Glu Leu Leu Leu Asp Phe Asn His 130	135	140
	Pro Leu Val Gly Met Asn Leu His Phe Asp Gly Glu Val Tyr Lys Val 145	150	155
	Arg Lys Ala Thr Lys Glu Glu Thr Glu Lys Gly Tyr Ile Glu Val Asn 165	170	175
	<210> 26 <211> 176 <212> PRT <213> 拟杆菌目细菌		
[0014]	<400> 26		
	Met Lys Ile Gly Thr Asn Lys Val Val Ser Leu Ala Tyr Thr Leu Glu 1	5	10
	Val Glu Gly Asp Val Met Glu Thr Val Thr Ser Glu Lys Pro Leu Glu 20	25	30
	Phe Ile Phe Gly Thr Gly Tyr Leu Leu Pro Lys Phe Glu Glu Asn Val 35	40	45
	Ser Asn Lys Val Val Gly Asp Ala Phe Asp Phe Thr Leu Thr Ala Ser 50	55	60
	Glu Gly Tyr Gly Glu Glu Asn Pro Asp Ala Ile Ile Glu Leu Pro Lys 65	70	75
	Asp Ile Phe Lys Val Asp Gly Lys Ile Glu Glu Gly Leu Leu Thr Val 85	90	95
	Gly Asn Ile Leu Pro Met Gln Asp Ser Asp Gly Asn Arg Leu Gln Gly 100	105	110

Ser Ile Asp Glu Ile Lys Asp Asp Val Val Val Met Asn Phe Asn His
115 120 125

Pro Leu Ala Gly Ala Asp Leu His Phe Lys Gly Ile Val Val Ala Val
130 135 140

Arg Glu Ala Ser Glu Thr Glu Leu Val Asn Gly Leu Arg Gly Glu Leu
145 150 155 160

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

<210> 27

<211> 165

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 27

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

[0015]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp His Asp His Asp
165

<210> 28
<211> 149
<212> PRT
<213> 大肠杆菌

<400> 28

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

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

[0016]

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Leu Glu Ala
145

<210> 29
<211> 149
<212> PRT
<213> 嗜热栖热菌

<400> 29

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln
1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly
20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu
35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly
50 55 60

[0017] Pro His Asp Pro Glu Gly Val Gln Val Val Pro Leu Ser Ala Phe Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ala Glu Val Val Pro Gly Ala Gln Phe Tyr Ala Gln Asp Met
85 90 95

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

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

Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu
130 135 140

His Gly His Ala His
145

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 30

Gly Tyr Arg Tyr Arg Gln Gly
1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 31

Gly Arg Tyr Arg Gln Arg Gly
1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0018]

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 32

Gly Arg Tyr Ser Gln Arg Gly
1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 33

Gly Phe Arg Gln Arg Gln Gly
1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 34

Gly Arg Gln Arg Gln Arg Gly
1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 35

Gly Phe Arg Gln Arg Gly Gly
1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0019]

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 36

Gly Gln Arg Gln Arg Gln Gly
1 5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 37

Gly Tyr Lys Tyr Arg Gln Gly
1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0020]

<220>
<223> Q标签的基序

<400> 38

Gly Gln Tyr Arg Gln Arg Gly
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q标签的基序

<400> 39

Gly Tyr Arg Gln Thr Arg Gly
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q标签的基序

<400> 40

Gly Leu Arg Tyr Arg Gln Gly
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q标签的基序

<400> 41

Gly Tyr Arg Gln Ser Arg Gly
1 5

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

[0021]

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 42

Gly Tyr Gln Arg Gln Arg Gly
1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 43

Gly Arg Tyr Thr Gln Arg Gly
1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 44

Gly Arg Phe Ser Gln Arg Gly
1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 45

Gly Gln Arg Gln Thr Arg Gly
1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 46

Gly Trp Gln Arg Gln Arg Gly
1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 47

Gly Pro Arg Tyr Arg Gln Gly
1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0022]

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 48

Gly Ala Tyr Arg Gln Arg Gly
1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 49

Gly Val Arg Tyr Arg Gln Gly
1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 50

Gly Val Arg Gln Arg Gln Gly
1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Q标签的基序

<400> 51

Gly Tyr Arg Gln Arg Ala Gly
1 5

<210> 52

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

[0023]

<220>

<223> Q标签实例

<400> 52

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln
1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly
20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu
35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly
50 55 60

Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Arg Tyr Arg Gln Arg Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

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

Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala His His His
 100 105 110

His His His His His
 115

<210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> K标签实例序列

<400> 53

Arg Tyr Glu Ser Lys Gly
 1 5

<210> 54
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0024]

<220>
 <223> SlyD氨基酸序列

<400> 54

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly
 20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu
 35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Glu Val Val Pro Gly Ala Gln Phe Tyr Ala Gln Asp Met
 85 90 95

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

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

Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu
130 135 140

His Gly His Ala His
145

<210> 55

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有MTG Q标签的SlyD

<400> 55

[0025] Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln
1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly
20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu
35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly
50 55 60

Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

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

Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala His
100 105 110

<210> 56

<211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有KalbTG Q标签的SlyD

<400> 56

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly
 20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu
 35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly
 50 55 60

Ala Gly Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Tyr Arg Gln Gly Gly Gly Gly
 65 70 75 80

[0026]

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

Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala His
 100 105 110

<210> 57
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SlpA氨基酸序列

<400> 57

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

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

Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu

	35	40	45
	Glu Gln His Leu Leu Gly	Leu Lys Val Gly Asp Lys	Thr Thr Phe Ser
	50	55	60
	Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro	Ser Pro Asp Leu Ile Gln	
	65	70	75 80
	Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp	Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly	
		85	90 95
	Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp	Gly Ser Glu Met Pro Gly Val	
		100	105 110
	Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp	Phe Asn His Pro	
		115	120 125
	Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val	Leu Glu Ile Asp	
		130	135 140
[0027]	Pro Ala Leu Glu Ala		
	145		
<210>	58		
<211>	189		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	主要HTLV抗原和病毒包膜糖蛋白氨基酸序列' gp21'		
<400>	58		
	Ile Val Ser Ser Ala Cys Asn Asn Ser Leu Ile Leu Pro Pro Phe Ser		
	1	5	10 15
	Leu Ser Pro Val Pro Thr Val Gly Ser Arg Ser Arg Arg Ala Val Pro		
		20	25 30
	Val Ala Val Trp Phe Val Ser Ala Leu Ala Met Gly Ala Gly Val Ala		
		35	40 45
	Gly Gly Ile Thr Gly Ser Met Ser Leu Ala Ser Gly Lys Ser Leu Leu		
		50	55 60

[0028]

His Glu Val Asp Lys Asp Ile Ser Gln Leu Thr Gln Ala Ile Val Lys
65 70 75 80

Asn His Lys Asn Leu Leu Lys Ile Ala Gln Tyr Ala Ala Gln Asn Arg
85 90 95

Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Trp Glu Gln Gly Gly Leu Cys Lys Ala
100 105 110

Leu Gln Glu Gln Cys Cys Phe Leu Asn Ile Thr Asn Ser His Val Ser
115 120 125

Ile Leu Gln Glu Arg Pro Pro Leu Glu Asn Arg Val Leu Thr Gly Trp
130 135 140

Gly Leu Asn Trp Asp Leu Gly Leu Ser Gln Trp Ala Arg Glu Ala Leu
145 150 155 160

Gln Thr Gly Ile Thr Leu Val Ala Leu Leu Leu Val Ile Leu Ala
165 170 175

Gly Pro Cys Ile Arg Cys Pro Cys Arg Thr Met His Pro
180 185

<210> 59

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经修饰的‘gp21’胞外域多肽序列的氨基酸序列，其被改造用于免疫测定中更好的溶解性、稳定性和反应性

<400> 59

Met Ser Leu Ala Ser Gly Lys Ser Leu Leu His Glu Val Asp Lys Asp
1 5 10 15

Ile Ser Gln Leu Thr Gln Ala Ile Val Lys Asn His Lys Asn Leu Leu
20 25 30

Lys Ile Ala Gln Tyr Ala Ala Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu
35 40 45

Phe Trp Glu Gln Gly Gly Leu Ala Lys Ala Leu Gln Glu Gln Ala Ala
50 55 60

Phe Leu Asn Ile Thr Asn Ser His Val Ser Ile Leu Gln Glu Arg Pro
65 70 75 80

Pro Leu Glu Asn Arg Val Leu Thr Gly Trp Gly Leu Asn Trp Asp Leu
85 90 95

Gly Leu Ser Gln Trp Ala Arg Glu Ala Leu Gln Thr Gly
100 105

<210> 60

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组融合蛋白' TtSlyQD-Xa-gp21-8H'

<400> 60

[0029] Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln
1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly
20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu
35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly
50 55 60

Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

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

Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala His Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ile Glu Gly Arg Met Ser Leu Ala Ser Gly Lys
130 135 140

Ser Leu Leu His Glu Val Asp Lys Asp Ile Ser Gln Leu Thr Gln Ala
145 150 155 160

Ile Val Lys Asn His Lys Asn Leu Leu Lys Ile Ala Gln Tyr Ala Ala
165 170 175

Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Trp Glu Gln Gly Gly Leu
180 185 190

Ala Lys Ala Leu Gln Glu Gln Ala Ala Phe Leu Asn Ile Thr Asn Ser
195 200 205

His Val Ser Ile Leu Gln Glu Arg Pro Pro Leu Glu Asn Arg Val Leu
210 215 220

[0030] Thr Gly Trp Gly Leu Asn Trp Asp Leu Gly Leu Ser Gln Trp Ala Arg
225 230 235 240

Glu Ala Leu Gln Thr Gly Gly His His His His His His His His
245 250 255

<210> 61

<211> 294

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组融合蛋白' TtSlyD-Xa-gp21-8H'

<400> 61

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln
1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly
20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu
35 40 45

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

[0031]

Gly Leu Ser Gln Trp Ala Arg Glu Ala Leu Gln Thr Gly Gly His His
275 280 285

His His His His His His
290

<210> 62
<211> 427
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重组融合蛋白' TtSlyKQD-SlpA-Xa-gp21-8H'

<400> 62

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln
1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly
20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu
35 40 45

[0032]

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly
50 55 60

Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Tyr Arg Tyr Arg Gln Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

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

Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala His Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Met Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val
130 135 140

Leu Val His Phe Thr Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser
145 150 155 160

Thr Arg Asn Asn Gly Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser
165 170 175

Leu Ser Glu Gly Leu Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp
180 185 190

Lys Thr Thr Phe Ser Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser
195 200 205

Pro Asp Leu Ile Gln Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly
210 215 220

Glu Pro Glu Ile Gly Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser
225 230 235 240

Glu Met Pro Gly Val Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val
245 250 255

Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu
260 265 270

[0033]

Val Leu Glu Ile Asp Pro Ala Leu Glu Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275 280 285

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
290 295 300

Gly Ile Glu Gly Arg Met Ser Leu Ala Ser Gly Lys Ser Leu Leu His
305 310 315 320

Glu Val Asp Lys Asp Ile Ser Gln Leu Thr Gln Ala Ile Val Lys Asn
325 330 335

His Lys Asn Leu Leu Lys Ile Ala Gln Tyr Ala Ala Gln Asn Arg Arg
340 345 350

Gly Leu Asp Leu Leu Phe Trp Glu Gln Gly Gly Leu Ala Lys Ala Leu
355 360 365

Gln Glu Gln Ala Ala Phe Leu Asn Ile Thr Asn Ser His Val Ser Ile
370 375 380

Leu Gln Glu Arg Pro Pro Leu Glu Asn Arg Val Leu Thr Gly Trp Gly
385 390 395 400

Leu Asn Trp Asp Leu Gly Leu Ser Gln Trp Ala Arg Glu Ala Leu Gln
405 410 415

Thr Gly Gly His His His His His His His His
420 425

<210> 63
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胰蛋白酶肽, 62-85'

<400> 63

Ala Tyr Gly Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly
1 5 10 15

[0034] Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Lys
20

<210> 64
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胰蛋白酶肽, 241-255'

<400> 64

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

Ser Ile Leu Gln Glu Arg Pro Pro Leu Glu Asn Arg
20 25

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 胰蛋白酶肽, 241-255'

[0035] <400> 65

Glu	Ala	Leu	Gln	Thr	Gly	Gly	His	His	His	His	His	His	His	His
1				5				10					15	

A) SEQ ID NO: 23

1 mhwkflraav vaavgfglpt liattaqaaa vaaptprapl applaedrsy rtwrvedyve
 61 aweryhgreem tederenlar gcigvtvvn1 nredlsnppl nlsfgslrta eavqaalnki
 121 vdthspaqy eaavakdpil krlknvkal pswidsaklk asifskrfys wqnpdwseer
 181 ahttyrpdre tdqvdmstyr yrarpgyvnf dygwfdqdn twwhanheep rmvvyqstlr
 241 hysrplqdfd eqvftvafak kd

B) SEQ ID NO: 24 (大肠杆菌)

10	20	30	40	50
MKVAKDLVVS	LAYQVRTEDG	VLVDESPVSA	PLDYLHGHGS	LISGLETALE
60	70	80	90	100
GHEVGDKFDV	AVGANDAYGQ	YDENLVQRVP	KDVFMGVDEL	QVGMRFLEAET
110	120	130	140	150
DQGPVPVEIT	AVEDDHVVVD	GNHMLAGQNL	KFNVEVVAIR	EATEEELAHG
160	170	180	190	
HVHGAHDHHH	DHDHDGCCGG	HGHDHGHEHG	GEGCCGGKGN	GGCGCH

C) SEQ ID NO: 25 (圆杆菌科细菌AK24)

10	20	30	40	50
MRFQSQLVFM	EISENTVVGL	TYELKVTNNE	EDSIPFSVEV	RDEEDPFYFV
60	70	80	90	100
FGNSGLPEKF	ERLLENKVAG	NTFNFTLSIE	EAYGHADEEL	ILTVPKKQFT
110	120	130	140	150
GEKGFEP EML	EEGNFLPLID	EDGYPMQAKV	IKDLGEELLL	DFNHPLVGMN
160	170			
LHFDGEVYKV	RKATKEETEK	GYIEVN		

D) SEQ ID NO: 26 (拟杆菌目细菌CF)

10	20	30	40	50
MKIGTNKVVS	LAYTLEVEGD	VMETVTSEKP	LEFIFGTGYL	LPKFEENVSN
60	70	80	90	100
KVVGDAFDFT	LTASEGYGEE	NPDAILLPK	DIFKVDGKIE	EGLLTVGNIL
110	120	130	140	150
PMQDSDGNRL	QGSIDEIKDD	VVVMNFNHPL	AGADLHFKGI	VVAVREASET
160	170			
ELVNGLRGEL	GTSCGDGGCS	GCSGCH		

图 1

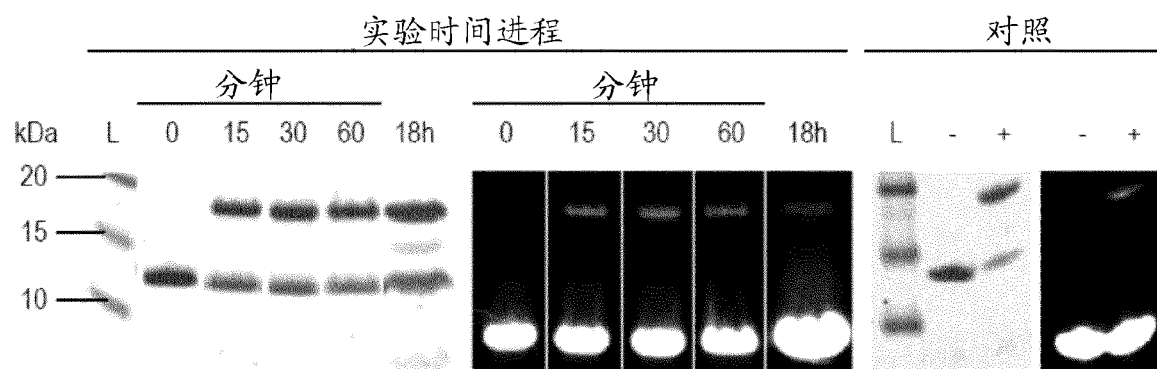
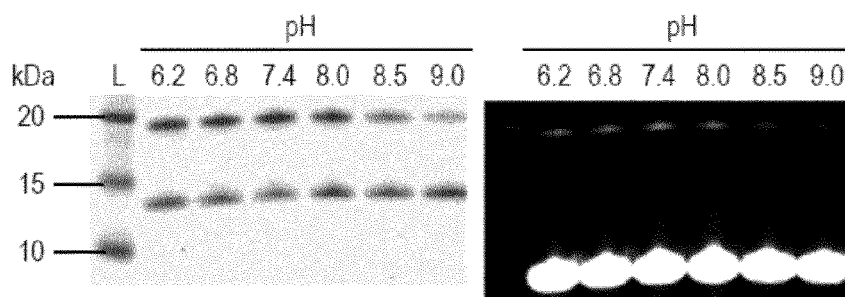
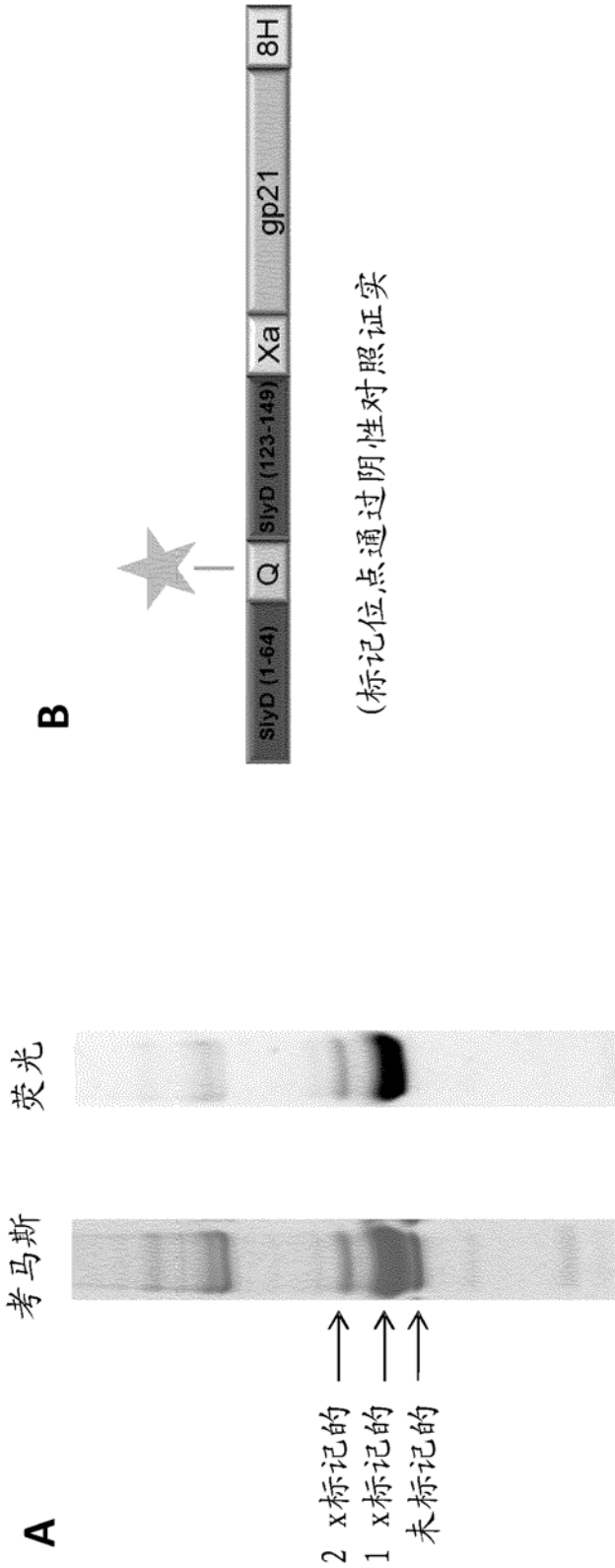
**A****B**

图 2

使用对特定Q标签（YRYRQ）的Ka1bTG的TtSlyD-Qtag-gp21钉标记：



用EcSlyD2-Ka1bTG和Ka1bTG-Ktag-Ru (1-6) [1-Z: 6-PEG27-Lys (BPRu)] (DXRR, BMO 28.430948) 标记 45分钟, 37°C

图 3

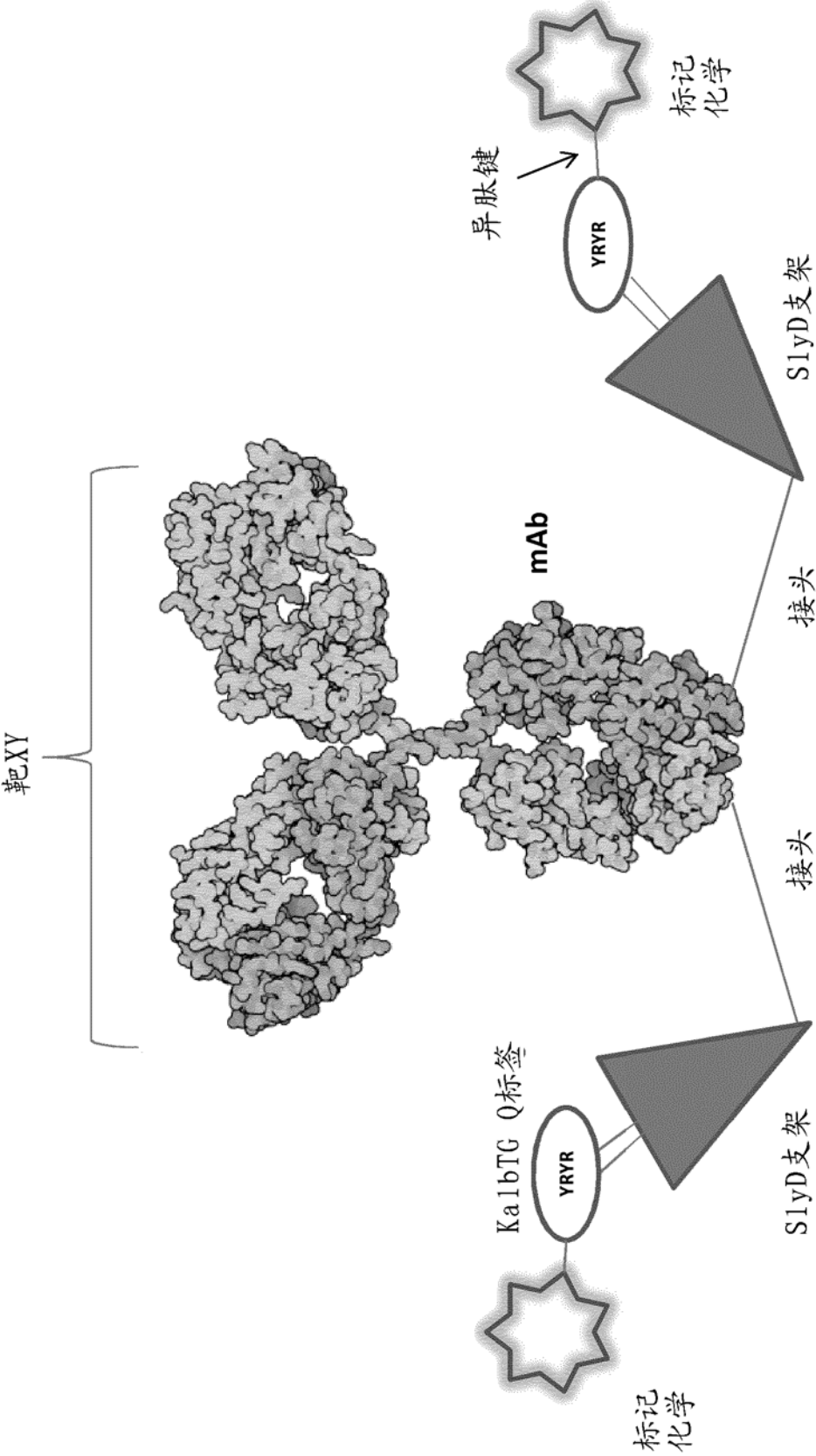
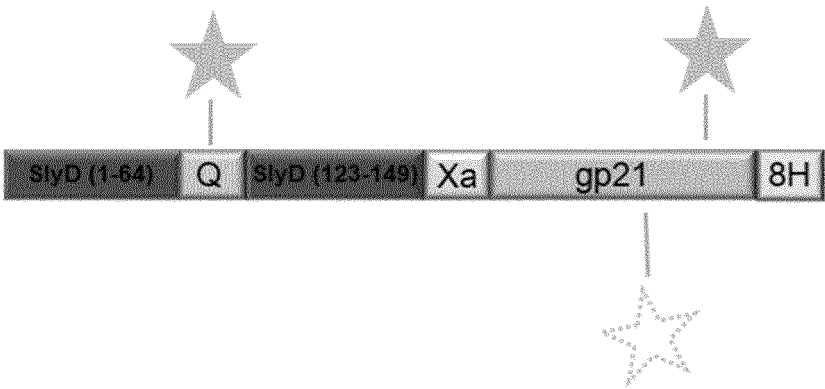


图 4

A



B

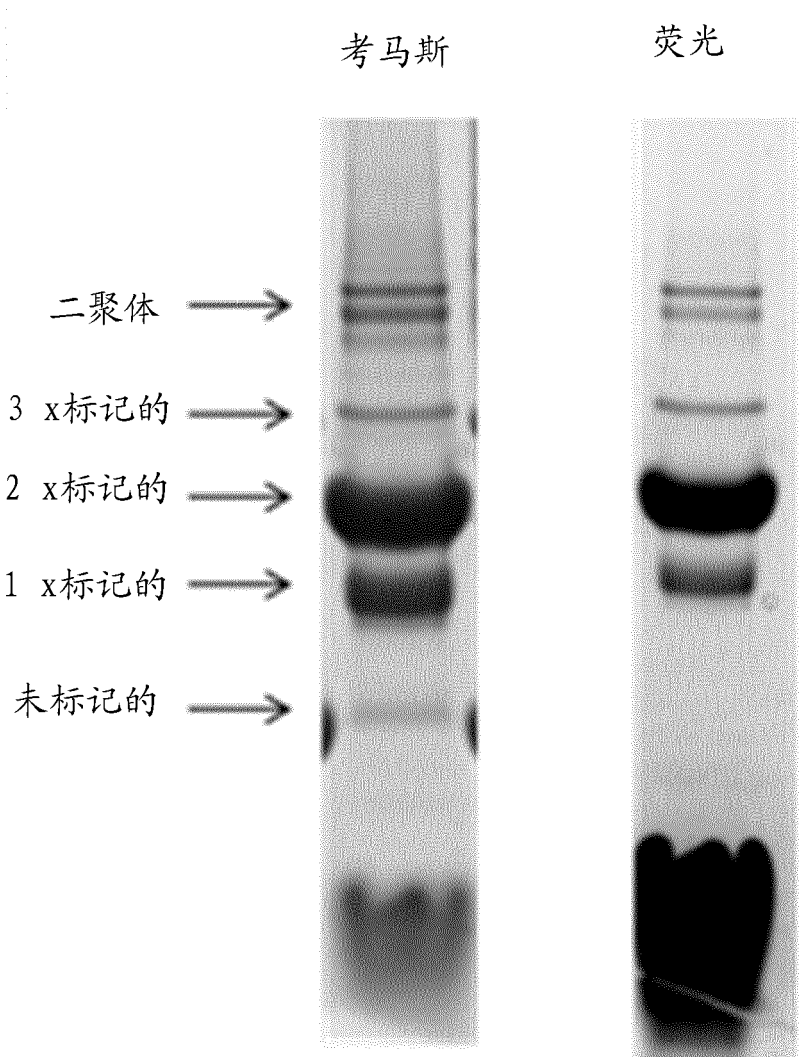
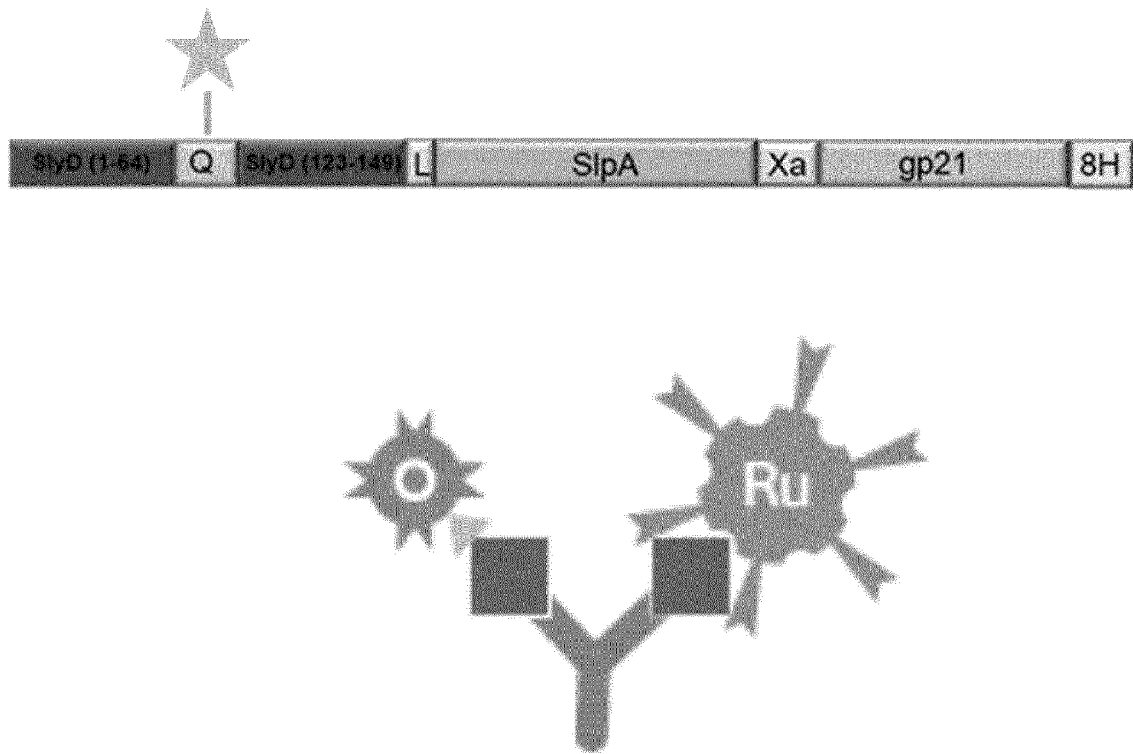


图 5

A

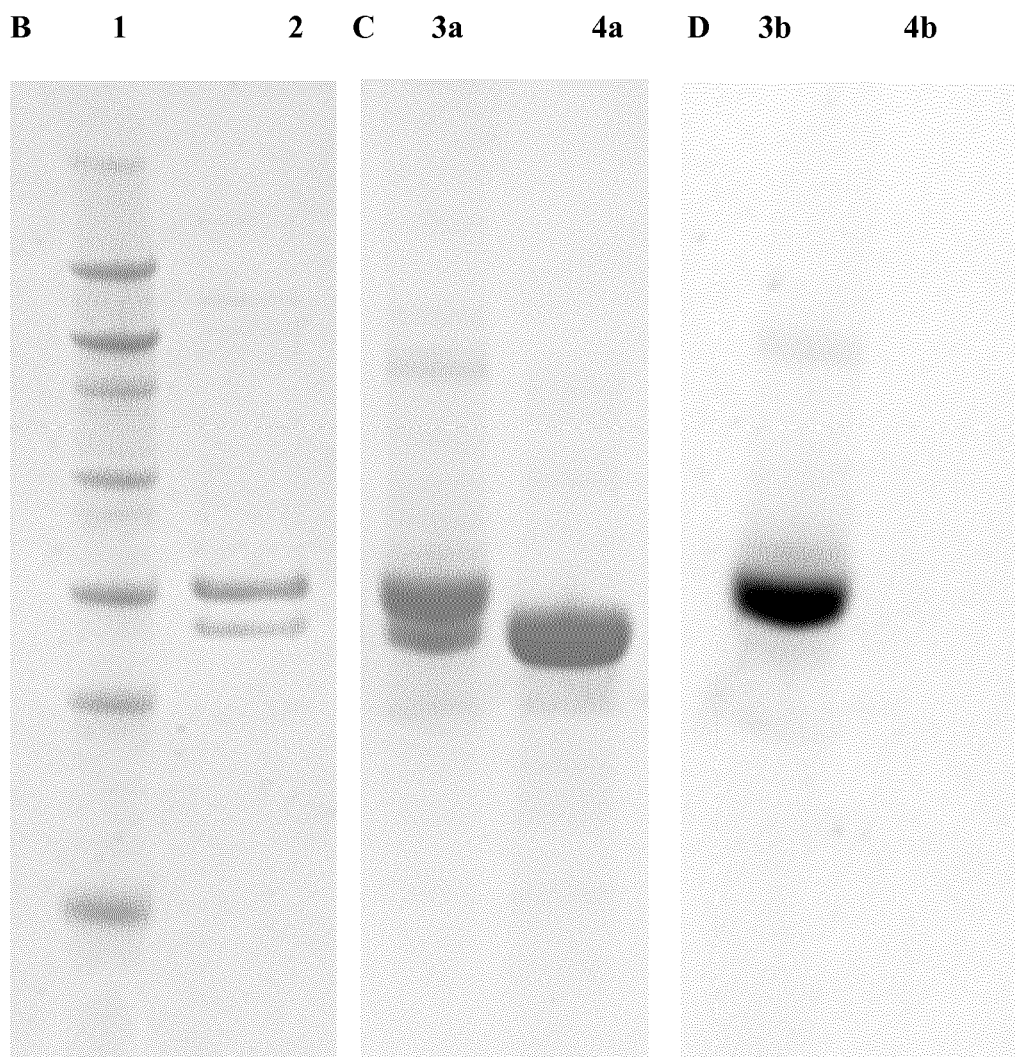


图 6

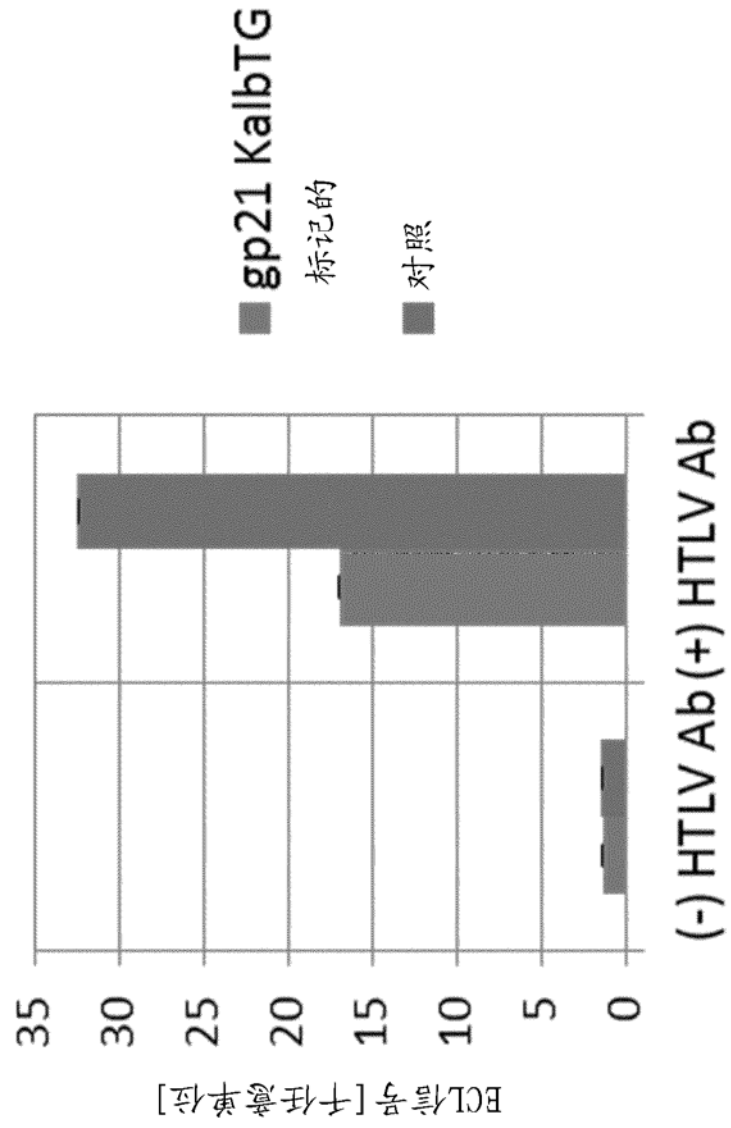


图 6E

专利名称(译)	具有转谷氨酰胺酶识别位点的FKBP结构域		
公开(公告)号	CN108699104A	公开(公告)日	2018-10-23
申请号	CN201680081877.5	申请日	2016-12-13
申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
[标]发明人	M 施雷姆尔 W 斯蒂芬		
发明人	M.施雷姆尔 W.斯蒂芬		
IPC分类号	C07K1/13 C12N9/90 G01N33/532 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	A61K47/65 C07K1/13 C07K2319/21 C07K2319/35 C12N9/90 C12N2740/14022 G01N33/532		
代理人(译)	梁谋		
优先权	2015200111 2015-12-15 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及重组转谷氨酰胺酶 (TG) 底物，其包含FKBP多肽的FKBP结构域的氨基酸序列，其中其“插入翼片” (IF) 结构域至少部分地被替换为5至20个氨基酸的氨基酸序列 (“Q标签”)，其包含与肽序列 X1-YRYRQ-X2 (SEQ ID NO.1) 的YRYRQ部分具有至少80%序列同一性的序列，并且其中所述TG底物是关于白色库茨涅尔氏菌TG的TG功能的底物。本发明另外涉及所述底物的用途。

