

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12P 21/00
C12N 15/31 C12N 1/21
C12N 15/63



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03158776.3

[43] 公开日 2004 年 8 月 18 日

[11] 公开号 CN 1521264A

[22] 申请日 2003.9.24 [21] 申请号 03158776.3
[30] 优先权
[32] 2003.2.12 [33] KR [31] 10-2003-0008689
[71] 申请人 韩国科学技术院
地址 韩国大田广域市
[72] 发明人 李相烨 韩美正

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司
代理人 高龙鑫 楼仙英

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 11 页

[54] 发明名称 用半胱氨酸合成酶基因制备富含丝氨酸的蛋白质的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种制备异种蛋白的方法，其包括培养既含有半胱氨酸合成酶(cysK)基因，又含编码异种蛋白基因的细菌。本发明包含培养用含cysK基因的表达载体和含编码异种蛋白基因的表达式转化的细菌，或一种用既含cysK基因又含编码异种蛋白的基因的表达式转化的细菌，并从其中分离异种蛋白的步骤。本发明有望被广泛应用于提高富含丝氨酸的异种蛋白的制备产率。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.一种制备异种蛋白的方法，其包括在培养介质中培养含有半胱氨酸合成酶（cysK）基因和编码异种蛋白基因的细菌，由此产生异种蛋白，并收集异种蛋白的步骤。

2.根据权利要求1的方法，其中，细菌是一种用既含 cysK 基因又含编码异种蛋白基因的载体转化的细菌。

3.根据权利要求1所述的方法，其中，细菌是用一种含 cysK 基因的载体和一种含编码异种蛋白的基因的载体转化的细菌。

4.根据权利要求1所述的方法，其中，cysK 基因来源于 E.coli。

5.根据权利要求1所述的方法，其中，异种蛋白是富含丝氨酸的蛋白。

6. 根据权利要求5所述的方法，其中，富含丝氨酸的蛋白是肥胖蛋白或 IL-12p40。

7.一种重组载体，其既含 cysK 基因又含编码异种蛋白的基因。

8.一种用权利要求7中的重组载体转化的细菌。

9.一种用含 cysK 基因的载体和含编码异种蛋白基因的载体转化的细菌。

10.根据权利要求7的重组载体，其选自如图2所示的质粒 pAC104CysK，或如图3所示的质粒 EDIL-12p40。

11.根据权利要求2所述的方法，其中，cysK 基因来源于 E.coli。

12.根据权利要求3所述的方法，其中，cysK 基因来源于 E.coli。

13.根据权利要求2所述的方法，其中，异种蛋白是富含丝氨酸的蛋白。

14.根据权利要求3所述的方法，其中，异种蛋白是富含丝氨酸的蛋白。

用半胱氨酸合成酶基因制备富含丝氨酸的蛋白质的方法

技术领域

本发明涉及富含丝氨酸的蛋白质的制备方法，其包括培养含半胱氨酸合成酶（*cysK*）基因和编码异种蛋白基因的细菌。更具体而言，本发明涉及一种制备富含丝氨酸的蛋白质的方法，其包括培养既含富含丝氨酸的异种蛋白基因又含半胱氨酸合成酶（*cysK*）基因的细菌，并从中分离富含丝氨酸的异种蛋白。

背景技术

E. coli 是合成和制备异种蛋白的常用菌株，通过重组技术该菌株被用于生产蛋白质，诸如干扰素，白介素 2，集落刺激因子，生长激素，胰岛素样生长因子和人血清白蛋白的制备中。为了能在 *E. coli* 中有效得制备异种蛋白，需要有表达异种蛋白的质粒载体，适宜的培养条件，抑制所制得的异种蛋白降解的条件及类似条件，目前已经开发出了多种满足这些必要条件的系统（system）（Weickert et al., Curr. Opin. Biotechnol., 7:494-9,1996）。

然而，还存在一个问题，当使用目前常规的方法时，很难提高制备异种蛋白的产率，这是因为诱导表达后需要大量的时间。为了克服这一问题已付出了很多努力，但仍没有见到令人满意的结果的报导。

因此需要继续开发一种能够得到高产率的，由 *E. coli* 制备异种蛋白的方法。

鉴于此，本发明人通过研究开发了一种能够得到高产率的，由 *E. coli* 制备异种蛋白的方法。我们发现在 *E. coli* 中制备富含丝氨酸的异种蛋白时，通过使编码富含丝氨酸的异种蛋白基因和来源于细菌的半胱氨酸合成酶(*cysK*)基因共表达，能够使制备富含丝氨酸的异种蛋白的产率得以提高，从而完成本发明。

发明内容

本发明的目的是提供一种制备异种蛋白的方法，包括培养一种既含 *cysK* 基因又含编码异种蛋白基因的细菌。

本发明的另一个目的是提供一种用包含编码异种蛋白基因的重组载体和包含 *cysK* 基因的重组载体同时进行转化的细菌，和一种用既含 *cysK* 基因又含编码异种蛋白基因的重组载体进行转化的细菌。

本发明的再一目的是提供一种制备异种蛋白的方法，其是通过用 *cysK* 基因或包含 *cysK* 基因的重组载体进行转化微生物来制备的。

根据本发明，上述目的及其它目的可以通过提供一种制备异种蛋白的方法得以实现，该方法包括培养一种包含 *cysK* 基因和编码异种蛋白基因的细菌。

根据本发明，细菌可以用一种包含 *cysK* 基因和编码异种蛋白基因的载体进行转化。任选地，细菌还可以通过包含 *cysK* 基因的载体和包含编码异种蛋白基因的载体进行转化。

本发明的另一个方案在于提供一种包含 *cysK* 基因和编码异种蛋白基因的重组载体。本发明的又一个方案在于提供一种细菌，该细菌用包含 *cysK* 基因的载体和包含编码异种蛋白基因的载体进行转化。

本发明的再一个方案在于提供 *cysK* 基因或包含 *cysK* 基因的重组载体在被转化的微生物中制备异种蛋白的方法中的应用。

根据本发明，*cysK* 基因是从 *E. coli* 中得到，异种蛋白选自富含丝氨酸的蛋白质。

富含丝氨酸的蛋白质包括肥胖蛋白(leptin)、IL-12P40（白细胞介素 12 β 链），但不受限于此。

在此，对本发明进行详细描述。

首先，对本发明使用的术语进行如下定义。

本发明所用的术语“富含特定氨基酸的蛋白质”指的是一种蛋白质，它包含一种超过 *E.coli* 中平均氨基酸组成的特定氨基酸（Koonin et al., in *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*(eds. Neidhardt, F.C. et al.) American Society for Microbiology, Washington, DC, 2203-17, 1996)。

所用术语“富含丝氨酸的蛋白质”定义为蛋白质中的丝氨酸在氨基酸成分中的含量为 10%或更多，且在蛋白质中的含量至少排名第二。

根据目前了解的事实，如果通过 DNA 重组技术在 *E. coli* 中生产富含丝氨酸的蛋白质如肥胖蛋白，制备肥胖蛋白的方法涉及高浓度培养转化的 *E. coli*，肥胖蛋白表达的诱导，肥胖蛋白的表达，转化的 *E. coli* 的分离和 *E. coli* 中肥胖蛋白的提取。制备肥胖蛋白时，从诱导表达起至达到最大的含量需要超过 8 个小时。本发明通过二维电泳确认了需要如此长的时间表达是因为，当产生肥胖蛋白的 *E. coli* 以高浓度培养时抑制了 *E. coli* 中的丝氨酸家族氨基酸的生物合成途径（图 1）。

本发明的发明人发现通过编码促进丝氨酸家族氨基酸合成的半胱氨酸合成酶基因和富含丝氨酸的蛋白质基因的共表达，与只表达一种富含丝氨酸的蛋白质基因相比，可使制备富含丝氨酸蛋白质的时间缩短，并由此导致产率的增加。

通过以下实施例对本发明进行详细描述。然而，对于本领技术人员而言，显然，这些实施例只是用于举例说明，本发明并不受限于此。

附图说明

结合如下附图进行详细描述能够充分理解本发明进一步的目的和优点：

图 1 是显示用重组 *E. coli* 诱导肥胖蛋白表达之前和之后的细胞中 GlyA 和 CysK 蛋白质的表达水平的曲线图。

图 2 是 pAC104CysK 质粒的基因图。

图 3 是 pEDIL-12p40 质粒的基因图。

图 4a 是在培养能产生肥胖蛋白的 *E. coli* BL21(DE3)(pEDOb5)时，随着培养时间的不同，细胞密度、干细胞重量和异种蛋白数量发生变化的曲线图。

图 4b 是在培养能产生肥胖蛋白与共表达 *cysK* 基因的重组 *E. coli* BL21(DE3)(pEDOb5)(pAC104CysK)时，随着培养时间的不同，细胞密度、干细胞重量和异种蛋白数量发生变化的曲线图。

图 5a 是显示 *E. coli* 蛋白中的氨基酸组成的曲线图。

图 5b 是显示肥胖蛋白中的氨基酸组成的曲线图。

图 5c 是显示 G-CSF 中的氨基酸组成的曲线图。

图 5d 是显示 IL-12p40 中的氨基酸组成的曲线图。

图 6a 是在培养能产生 IL-12p40 的重组 *E.coli* BL21(DE3)(pEDIL-12p40)时, 随着培养时间的不同, 细胞密度、干细胞重量和异种蛋白数量发生变化的曲线图。

图 6b 是在培养能产生 IL-12p40 与共表达 *cysK* 基因的重组 *E.coli* BL21(DE3)(pEDIL-12p40)(pAC104CysK)时, 随着培养时间的不同, 细胞密度、干细胞重量和异种蛋白数量发生变化的曲线图。

具体实施方式

实施例 1: 利用二维电泳测定肥胖蛋白生产菌的生理性变化

根据已知方法, 采用二维电泳比较 *E.coli* BL21(DE3)(pEDOb5)中的人源肥胖蛋白过量产生之前和之后的蛋白质水平的变化 (Hochstrasser et al., Anal. Biochem., 173:424-5, 1988; Han et al., J. Bacteriol., 183:301-8, 2001):即在 *E.coli* BL21 (DE3)(pEDOb5) 预培养之后, 诱导肥胖蛋白的表达并在高浓度下进行培养。取出诱导表达之前和之后的培养肉汤。每一种培养肉汤在 4℃, 以 6000rpm 转速下离心 5 分钟, 得到的沉淀物用 500 μ l 的低盐缓冲液(KCl 3mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, NaCl 68 mM, NaH₂PO₄ 9 mM) 清洗。然后, 将产物悬浮在 200 μ l 的 TE 缓冲液中 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM)。悬浮液用声波降解器进行声波降解, 并在 4℃时, 以 12000rpm 转速下离心 10 分钟。弃去上清液, 真空干燥固体并在-20℃下储存, 作为随后的测试样品备用。

将 200 μ g准备好的样品溶解在 340 μ l调节后的 IEF 溶液中 (尿素 9M, CHAPS 0.5%(w/v), DTT 10 mM, Bio-lyte pH 3-10 0.2%(w/v), 溴苯酚兰 0.001%(w/v)), 得到一个 17cm 的电泳带 (ReadyStrip™ IPG Strips PH3-10, Bio-Rad Laboratories Inc., USA)。在 20℃下, 水化该电泳带达 12 小时, 进行等电聚焦。然后, 将电泳带浸入平衡的缓冲液 I (尿素 6M, SDS 2%(w/v), Tris-HCl (pH8.8) 0.375 M, 甘油 20% (V/V), DTT 130 mM) 中震荡 15 分钟, 然后浸入平衡的缓冲液 II (尿素 6M, SDS 2%(w/v), Tris-HCl (pH8.8) 0.375 M, 甘油 20% (V/V), 碘化乙酰胺 135 mM, 溴苯酚兰 3.5M) 中震荡 15 分

钟。将电泳带放置在 SDS 凝胶上按分子量进行分离。

将二维凝胶用银染色试剂盒染色 (AmershamBiosciences, Uppsala, Sweden), 用扫描仪扫描 (GS710 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad Laboratories Inc., USA), 用 Melanie II 软件(Bio-Rad Laboratories Inc., USA)对蛋白质进行定量分析。将需要的蛋白质从二维凝胶中选择性分出以进行蛋白质分析, 清洗并真空干燥, 然后在 37℃ 下与胰蛋白酶反应 8 个小时或更长。用 MALDI-TOF MS(基质辅助镭射解吸附/离子化飞行时间质谱仪) (VoyagerTM Biospectrometry, Perseptive Biosystems Inc., USA) 测定由胰蛋白酶切的肽分子量。将肥胖蛋白表达之前的蛋白质水平与肥胖蛋白中最大含量的蛋白水平进行比较。

结果显示, 在肥胖蛋白基因表达后基本所有的氨基酸的合成都被抑制了。更具体而言, 涉及合成丝氨酸家族氨基酸 (CysK, GlyA) 的酶水平由于肥胖蛋白的过量产生而大量的减少, 其中, GlyA 减少了 2.5 倍, CysK 减少了 2.3 倍 (图 1)。丝氨酸家族氨基酸的生物合成由于肥胖蛋白的过量产生而被严重地抑制了, 因此, 为了使产生肥胖蛋白, 这种富含丝氨酸的蛋白质的菌株中与丝氨酸家族氨基酸生物合成的减少相关的代谢得以促进, 导入了编码 cysK 蛋白的 cysK 基因, 其是该途径中的关键酶。

实施例 2: 导入 cysK 基因的重组质粒的制备

表达 CysK 蛋白的重组质粒 pAC104CysK 的制备如下: 首先, 以 *E.coli* BL21(DE3) 染色体为模板进行聚合酶链反应 (PCR), 引物 1: 5'-gcgaattcatgagtaagattttgaagataa-3'(SEQ ID NO:1) 和 引物 2: 5'-gcgaattctatatactgttgcaattcttctc-3'(SEQ ID NO:2)。在 95℃ 下, 进行第一次变性达 5 分钟; 第二次变性在 95℃ 达 50 秒, 在 55℃ 时退火 1 分钟, 在 72℃ 延伸 1 分钟 30 秒, 重复 30 个循环; 最后在 72℃ 延伸 5 分钟。这样就得到了由限制性内切酶 EcoRI 酶切的 cysK 基因, 将得到的片段插入具有 gntT104 启动子的质粒 p10499A(Park et al., FEMS Microbiol. Lett., 214:217-22, 2002) 中, 其被相同的限制性内切酶消化, 从而形成质粒 p104CysK。然后, 质粒被限制性内切酶 EcoRV 和 ScaI 酶切, 并被克隆到用限制性内切酶 EcoRV 消化的质粒 pACYC184 中。产物被转移至 *E.coli* XL1-蓝中以制备重组的质粒

pAC104CysK (图 2)。

实施例 3: 导入 IL-12p40 基因的重组质粒的制备

按如下方法制备重组质粒 pEDIL-12p40, 以表达 IL-12p40 (白细胞介素 12 β 链) 蛋白。用包含人白细胞介素 β 链基因的质粒 pUC18/p40 为模板, 及引物 3: 5'-ggctagcattaatgatatgggaactgaagaaagat-3'(SEQ ID NO:3) 和引物 4:5'-gccggatccttattaactgcagggcacaga-3'(SEQ ID NO:4) 通过实施例 2 相同的方法进行 PCR, 得到 IL-12p40 基因。该基因用限制性内切酶 *AdeI* 和 *BamHI* 消化。将得到的片段嵌入肥胖蛋白表达载体中 (Jeong and Lee, Appl. Environ. Microbiol., 65:3027-32, 1999) 以构成 pEDIL-12p40, 其中该载体已被限制性内切酶 *NdeI* 和 *BamHI* 消化(图 3)。

实施例 4: 通过 *cysK* 的共表达系统制备人肥胖蛋白

将实施例 2 制备的重组质粒 pAC104Cysk 和常规的肥胖蛋白表达质粒 pEDOb5 (Jeong and Lee, Appl. Environ. Microbiol. 65, 3027-32, 1999) 同时转化至细菌 *E.coli* BL21(DE3) 中来制备 *E.coli* BL21(DE3) (pEDOb5) (pAC104Cysk)。培养重组的 *E.coli* 以制备肥胖蛋白。用只有常规的肥胖蛋白表达质粒 pEDOb5 转化的 *E.coli* BL21(DE3) (pEDOb5) 作为对照, 并使其在相同的条件下进行培养而产生肥胖蛋白。

将每一个被转化的 *E.coli* 菌株接种至 10mL 的 R/2 介质中 (KH_2PO_4 6.75g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2g/L, 柠檬酸 0.85g/L, 痕量金属溶液 (HCl 5M, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g/L, CaCl_2 2g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.54g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1g/L, $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.02g/L), 5mL/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7g/L), 其含有 10g/L 的葡萄糖, 在 37°C 下培养过夜, 转移至 200mL 的含有 10g/L 葡萄糖的 R/2 介质中, 在 37°C 下培养 8 小时。然后, 将 200 mL 的已在 R/2 介质中培养的重组 *E. coli* 接种到 1.8L 的含 10g/L 葡萄糖的 R/2 介质中, 在培养箱中于 37°C 和 pH 6.88 的条件下进行培养, 培养箱备有包含 700g/L 的葡萄糖和 20g/L 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的溶液。储备液根据 pH 的变化而供给。例如, 当介质的 pH 值为 6.88 或更高, 储备液被自动调节并以 10 mL/分钟的速度充入, 以致发酵箱中葡萄糖的浓度为 0.7g/L。空气

和纯净氧气可被自动调节和供给,以保持介质中溶解的氧气(DO)占 40%。在 600 nm 下用分光光度仪测定培养肉汤的光学密度(O.D.)为 30 时,加入 1mM 的 IPTG(异丙基- β -硫代半乳糖苷)以诱导肥胖蛋白的表达。在所有的培养物中,用 100 mg/L 的氨卡青霉素和 30 mg/L 的氯霉素稳定质粒。

在诱导肥胖蛋白表达之后,每小时取出培养肉汤。每等份都被稀释至光学密度(O.D.)为 5,并在 4℃,以 6000 rpm 转速离心 5 分钟,得到沉淀。将沉淀物悬浮在 200 μ l 的 TE 缓冲液中 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) 并按照已知方法进行 12%的 SDS-PAGE 分析(图 4a 和 图 4b)。图 4a 是在培养对照组时,随着培养时间的不同,细胞密度、干细胞重量和异种蛋白数量发生变化的曲线图。图 4b 是在培养能产生肥胖蛋白的重组 *E.coli* BL21(DE3)(pEDOb5)(pAC104CysK)时,随着培养时间的不同,细胞密度、干细胞重量和异种蛋白数量发生变化的曲线图,其中(■)表示细胞光学密度,(○)表示干细胞重量,(▲)表示产生的肥胖蛋白数量。如图 4a 所示,当肥胖蛋白表达质粒被单独表达时,肥胖蛋白的表达从诱导开始的 8 个小时后达到最大值。此时产率达到 0.457g/L·小时。另一方面,如图 4b 所示,当肥胖蛋白表达质粒与 pAC104CysK 一起被共表达时,肥胖蛋白的表达从诱导起的 2 个小时后达到最大值。此时,产率达到 1.56 g/L·小时。

因此可证明,与常规的方法相比,根据本发明采用 *cysK* 基因共表达生产富含丝氨酸的蛋白的方法能将肥胖蛋白的产率提高 3.4 倍。

实施例 5: 通过 *cysK*-共表达系统制备富含丝氨酸的蛋白质

根据报导,亮氨酸和丙氨酸是普遍存在于 *E.coli* 蛋白质中的普通成分(亮氨酸 10.5%, 丙氨酸 9.6%), 丝氨酸平均为 5.6% (图 5a,图 5b,图 5c 和图 5d)。图 5a 至图 5d 的曲线图表示目前所知的蛋白质中氨基酸的组成比率, 其中, 图 5a 显示了 *E. coli* 蛋白质中氨基酸的组成比率, 图 5b 显示了肥胖蛋白中氨基酸的组成比率, 图 5c 显示了 G-CSF 中氨基酸的组成比率, 图 5d 显示了 IL-12p40 中氨基酸的组成比率。

如图 5b 所示,肥胖蛋白这种典型的富含丝氨酸的蛋白质包含异常多的丝氨酸, 其中丝氨酸的组成比率为 11.6%。如图 5c 所示, 另一个已知的蛋白质 hG-CSF(人类粒细胞集落刺激因子)包含 19%的主要成分亮氨酸和 12%的

丙氨酸，其与 *E. coli* 中的蛋白质相类似，尽管它的丝氨酸的含量为 8.2%。如图 5d 所示，另一个蛋白质 IL-12p40，也是一种已知的富含丝氨酸的蛋白质，其含 11.1% 的丝氨酸。

为了确认实施例 4 的结果是否能被应用于所有富含丝氨酸的蛋白质制备中，本发明人将 hG-CSF 和富含丝氨酸的蛋白质 IL-12p40 以相同的方法制备(Jeong and Lee, Protein Expr. Purif., 23:311-8, 2001)。

对于 hG-CSF，结果不同于实施例 4，因为蛋白质没有 *cysK* 基因的共表达，在短时间内（3 个小时）蛋白质的产生达到了高峰。然而，IL-12p40 表现出了类似于由 *cysK* 基因共表达的肥胖蛋白产率增加的效果(图 6a 和图 6b)。

图 6a 是在培养能产生 IL-12p40 的重组 *E. coli*，BL21(DE3)(pEDIL-12p40)时，随着培养时间的不同，细胞密度、干细胞重量和异种蛋白数量发生变化的曲线图。图 6b 是在培养能产生 IL-12p40 和共表达 *cysK* 基因的重组 *E. coli*BL21(DE3)(pEDIL-12p40)(pAC104CysK)时，随着培养时间的不同，细胞密度、干细胞重量和异种蛋白数量发生变化的曲线图，其中(■)表示细胞光学密度，(○)表示干细胞重量，(▲)表示制备的白细胞介素 12 β 链的数量。如图 6a 所示，当采用实施例 4 的方法制备 IL-12p40，而不是采用实施例 3 中制备 pEDIL-12p40 的方法时，从诱导时起的 7 个小时后 IL-12p40 的表达达到了高峰。此时产率为 0.090 g/L·小时。另一个方面，如图 6b 所示，当 IL-12p40 依据实施例 4 的方法制备，而不是采用实施例 2 中制备 pAC104CysK 和实施例 3 中制备 pEDIL-12p40 的方法，从诱导起的 2 个小时后表达达到高峰，此时的最大产率为 0.349 g/L·小时。

因此，根据本发明由 *cysK* 基因的共表达制备富含丝氨酸的蛋白质的方法能够提高 IL-12p40 的产率，其与常规方法相比提高了大约 3.9 倍。

如上所述，本发明的具体部分给予了详细的解释。然而，对于本领域技术人员而言，这些具体描述只是本发明的优选实施例，本发明并不受限于此。例如，作为过度表达半胱氨酸合成酶的方法，将 *cysK* 基因导入一种异种蛋白表达载体中或融合至宿主细胞的染色体中，可以使 *cysK* 基因的表达数量达到相同效果。

正如详细描述与证明的，本发明提供了制备异种蛋白的方法，其包括培养含有 *cysK* 基因和编码异种蛋白基因的细菌。更具体而言，本发明提供了一种制备富含丝氨酸的异种蛋白的方法，包括培养一种用含有富含丝氨酸的异种蛋白基因的一种表达载体和包含 *cysK* 基因的一种表达载体转化的细菌，或一种用既含 *cysK* 基因又含编码富含丝氨酸的异种蛋白基因的表达载体转化的细菌，以及从中分离异种蛋白。

根据本发明，当采用重组的 *E.coli* 制备富含丝氨酸的异种蛋白，可大大地缩短制备最大量的蛋白所需的时间。因此，本发明有望被广泛采用以增加富含丝氨酸的异种蛋白的产率。

SEQUENCE LISTING

<110> 韩国科学技术院

<120> 用半胱氨酸合成酶基因制备富含丝氨酸的蛋白质的方法

<130> PI034728C

<150> KR10-2003-0008689

<151> 2003-02-12

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

gcgaattcat gagtaagatt tttgaagata a

31

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

gcgaattcta tatactgttg caattctttc tc

32

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

ggctagcatt aatgatatgg gaactgaaga aagat

35

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

gccggatcct tattaactgc agggcacaga

30

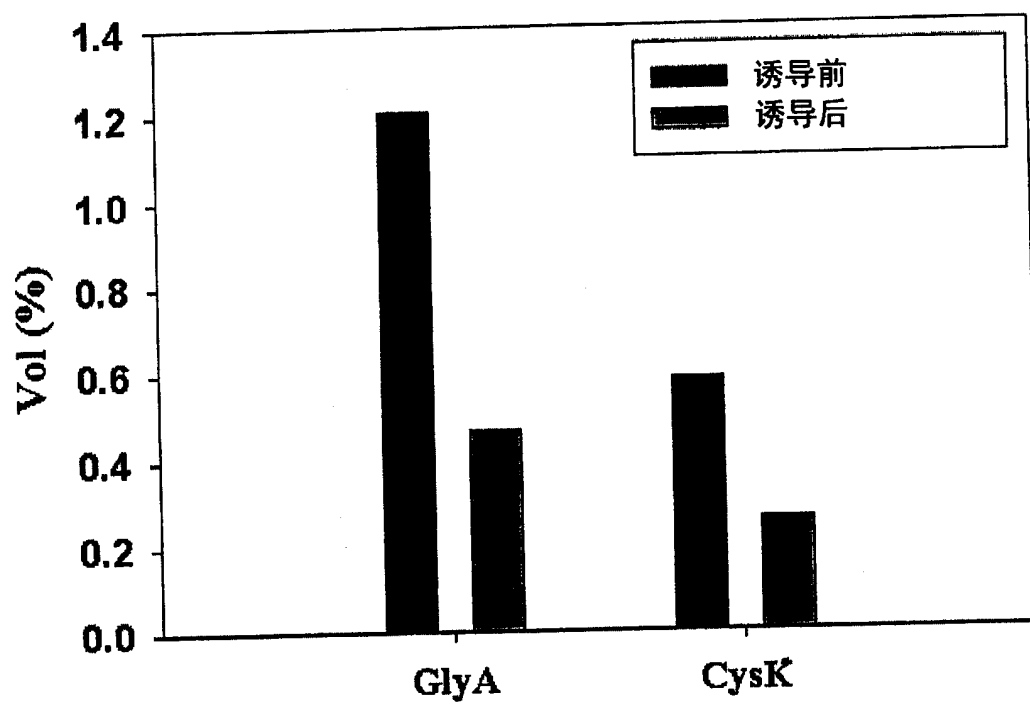


图 1

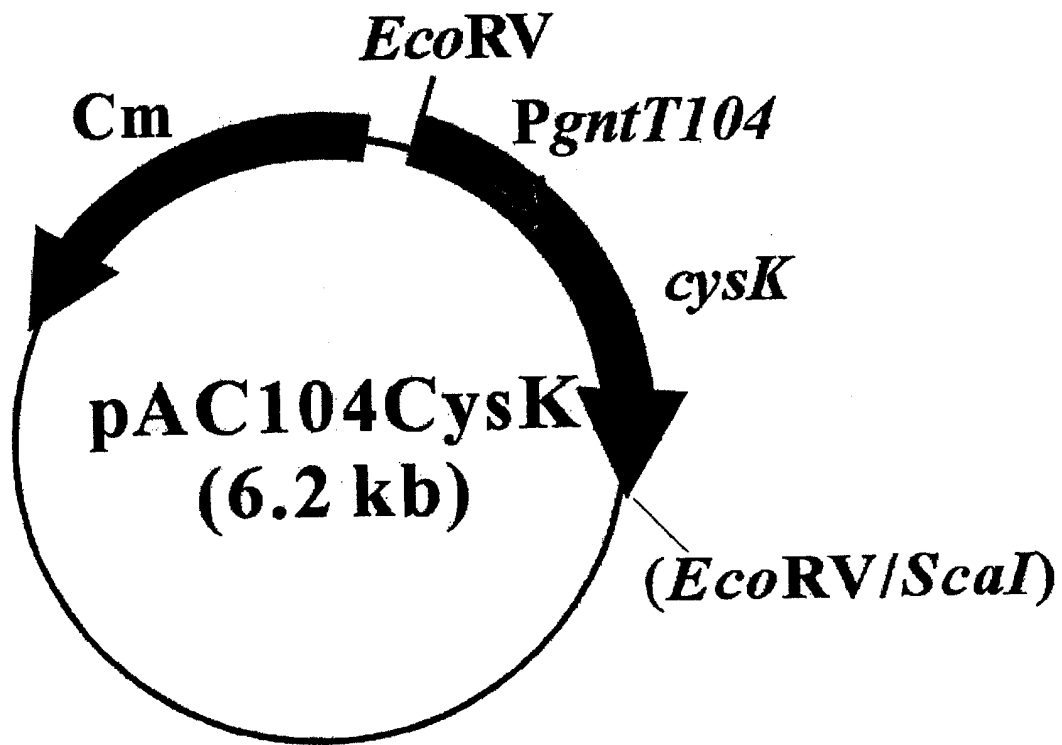


图 2

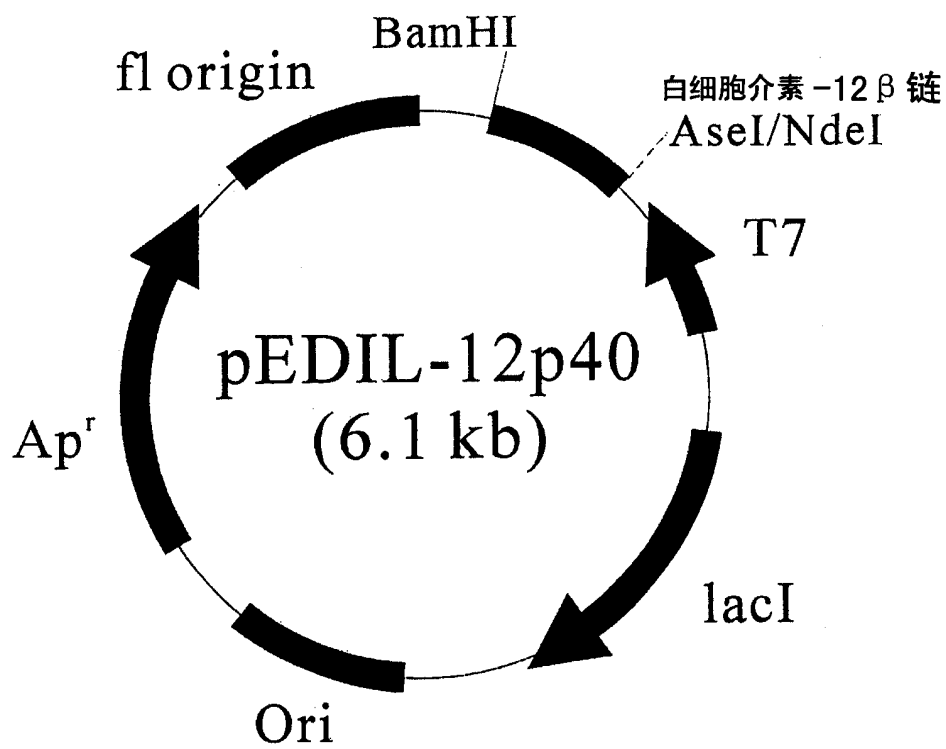


图 3

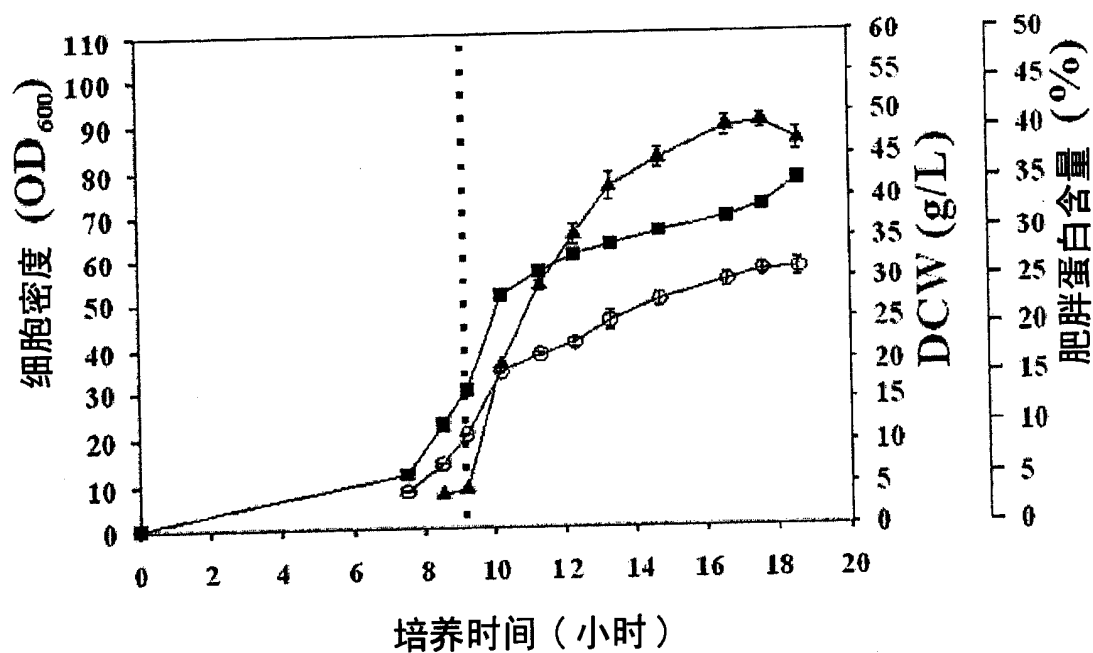


图 4a

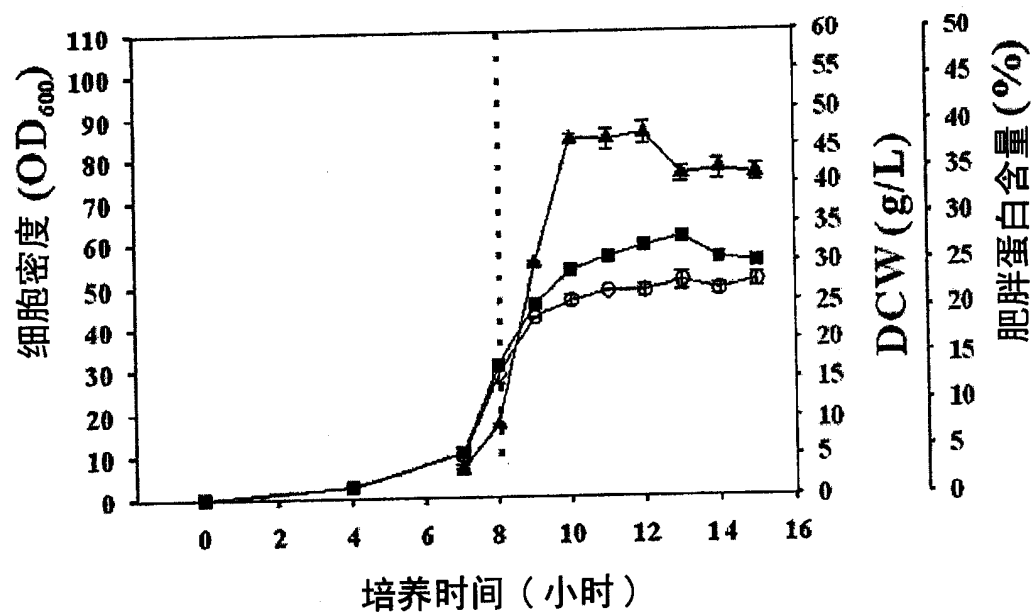


图 4b

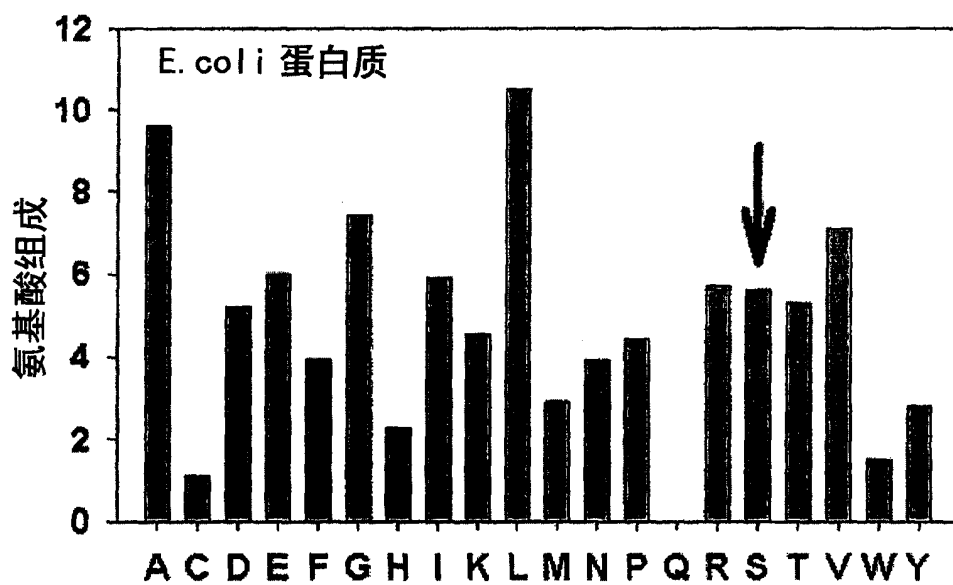


图 5a

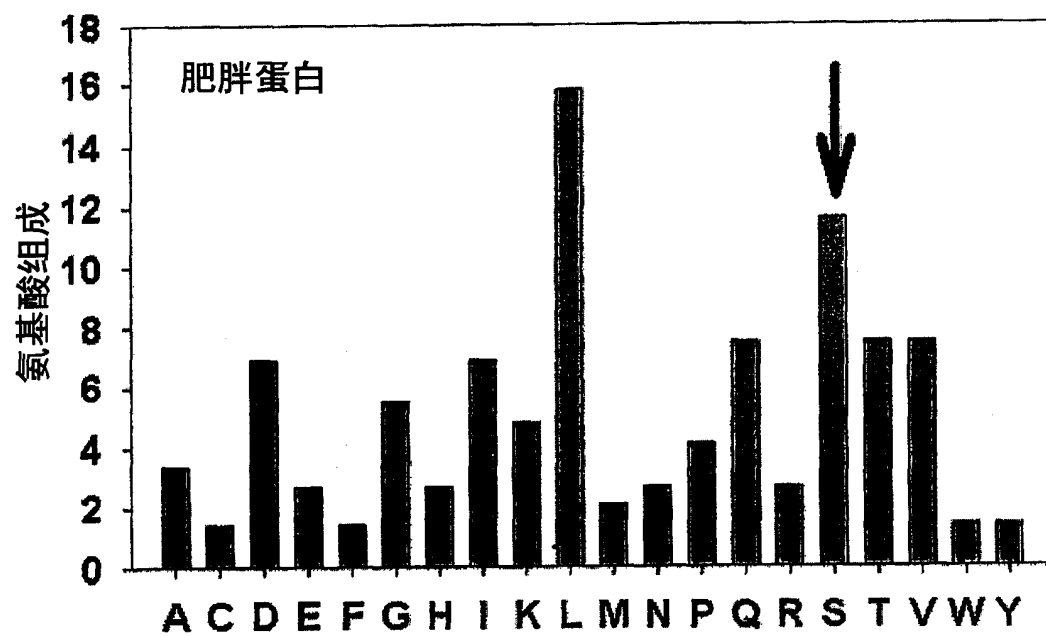


图 5b

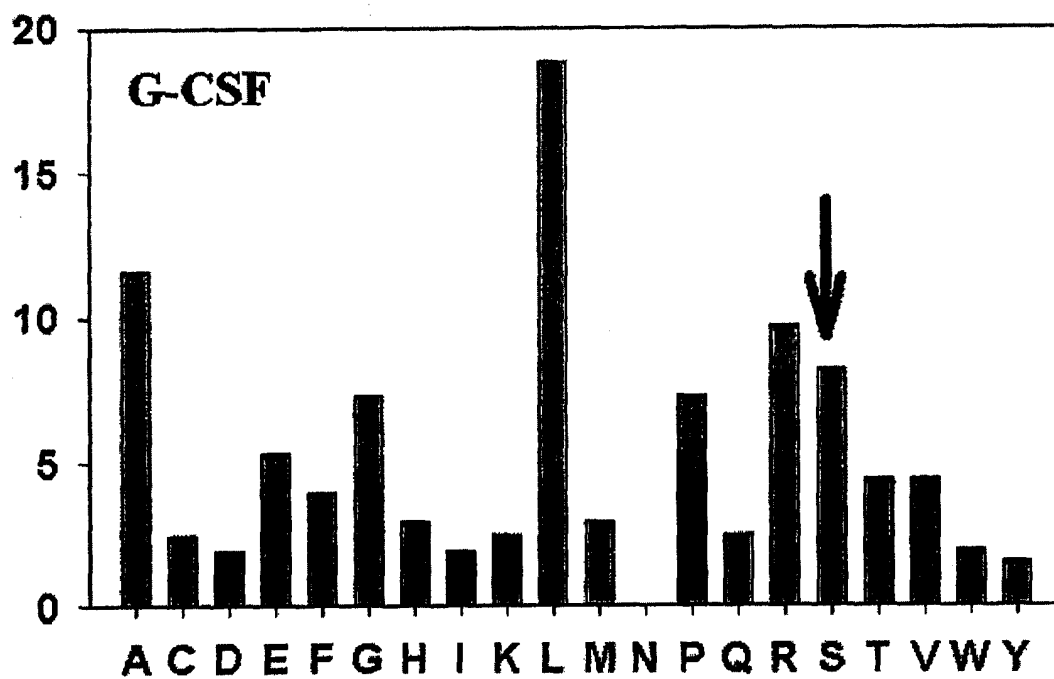


图 5c

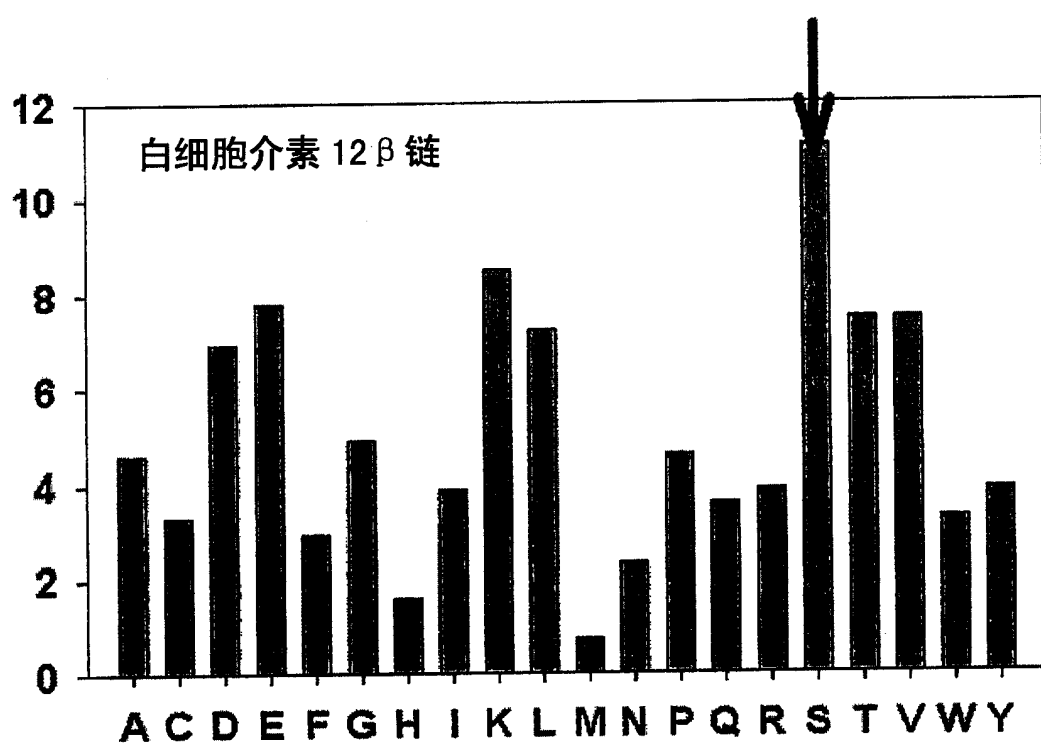


图 5d

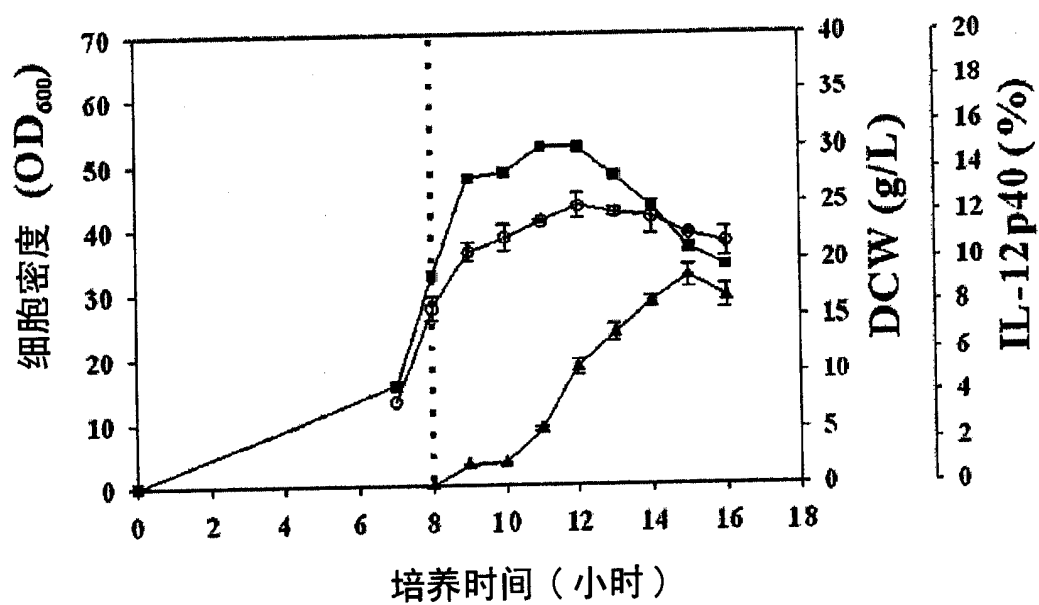


图 6a

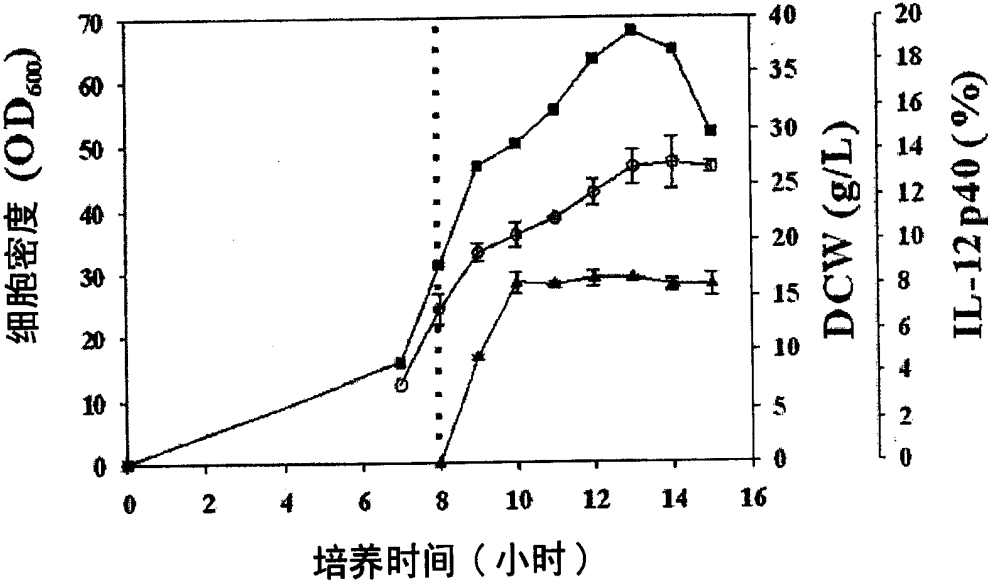


图 6b