



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105802995 A

(43) 申请公布日 2016. 07. 27

(21) 申请号 201410853298. 0

(22) 申请日 2014. 12. 31

(71) 申请人 上海复宏汉霖生物技术有限公司

地址 201210 上海市浦东新区张江高科技园
区蔡伦路 780 号 7 楼 724 室

(72) 发明人 肖辉 郎国竣 姜伟东 何虹霖

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 张艳 李慧

(51) Int. Cl.

C12N 15/85(2006. 01)

C12N 15/52(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页

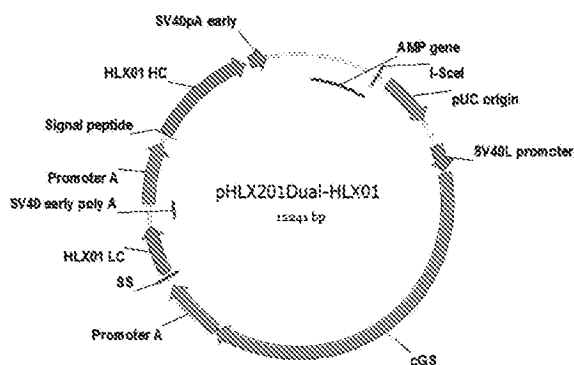
序列表15页 附图8页

(54) 发明名称

一种利用 CHO 细胞生产重组蛋白的基因表达系统
及真核表达载体

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种利用 CHO 细胞生产重组蛋白的基因表达系统及真核表达载体。本发明提供一种 pHIX201 真核表达载体,包括 GS 表达单元,所述 GS 表达单元的序列包括 5' 至 3' 方向依次排列的 SV40L 启动子基因序列、谷氨酰胺合成酶基因序列,所述 SV40L 启动子基因序列如 SEQ ID NO :2 所示;所述谷氨酰胺合成酶基因序列如 SEQ ID NO :3 所示。本发明所提供的表达系统能够实现外源基因在 CHO 细胞基因组中的整合和高效表达。该系统的制备方法主要包括:构建真核表达载体,适合于目的基因在 CHO 细胞中的瞬时表达,并适合于目的基因高表达细胞株筛选。利用本发明的 CHO 表达系统可以实现重组蛋白、单克隆抗体等在 CHO 细胞中的整合和表达,具有广阔的应用前景。



1. 一种 pHLX201 真核表达载体,包括 GS 表达单元,所述 GS 表达单元的序列包括 5' 至 3' 方向依次排列的 SV40L 启动子基因序列、谷氨酰胺合成酶基因序列,所述 SV40L 启动子基因序列如 SEQ ID NO :2 所示 ;所述谷氨酰胺合成酶基因序列如 SEQ ID NO :3 所示。

2. 如权利要求 1 所述的一种 pHLX201 真核表达载体,其特征在于,所述 GS 表达单元基因序列如 SEQ ID NO :4 所示。

3. 如权利要求 1 所述的一种 pHLX201 真核表达载体,其特征在于,所述 GS 表达单元的序列还包括酶切位点序列,所述 GS 表达单元的序列包括 5' 至 3' 方向依次排列的酶切位点序列、SV40L 启动子基因序列、谷氨酰胺合成酶基因序列以及酶切位点序列。

4. 如权利要求 3 所述的一种 pHLX201 真核表达载体,其特征在于,所述酶切位点序列选自 HindIII 酶、NotI 酶、XhoI 酶中的一种或多种的组合。

5. 如权利要求 4 所述的一种 pHLX201 真核表达载体,其特征在于,所述含有酶切位点的 GS 表达单元序列如 SEQ ID NO :5 所示。

6. 如权利要求 1 所述的一种 pHLX201 真核表达载体,其特征在于,本发明所提供的 pHLX201 真核表达载体是由 pHLX101 真核表达载体改造获得。

7. 如权利要求 1-6 任一权利要求所述的 pHLX201 真核表达载体的制备方法,由 pHLX101 真核表达载体改造获得,改造过程主要包括如下步骤 :

通过 PCR 的方法将 pHLX101 载体线性化,并在两端添加酶切位点序列,将单基因表达载体改为双基因表达载体 ;替换原来的 GS 表达单元,采用 PCR、酶切、连接的方法将新的 GS 表达单元插入表达载体,筛选、鉴定正确的连接产物为本发明的 pHLX201 真核表达载体。

8. 如权利要求 7 所述的制备方法,其特征在于,具体包括如下步骤 :

1) 双基因载体的制备 :利用引物 S322 和 S323 扩增抗体轻链表达单元,再用引物 S324、S325 获得线性化的抗体重链基因表达载体作为构建双基因载体的骨架,将以上两个片段连接、转化,筛选正确的转化子 ;

2)GS 表达单元的优化 :将 CHO 细胞的谷氨酰胺合成酶基因与 SV40L 启动子组成表达单元,并同时在两端添加酶切位点,通过酶切连接分别插入 pHLX101 双基因表达载体,替换载体上原有 GS 表达单元。

9. 一种 pHLX201-CHO 真核表达系统,包括如权利要求 1-6 任一权利要求所述的 pHLX201 真核表达载体以及中国仓鼠卵巢细胞。

10. 如权利要求 9 所述的 pHLX201-CHO 真核表达系统,其特征在于,所述中国仓鼠卵巢细胞为 GS 基因敲除的 CHO-S 细胞。

11. 如权利要求 9-10 任一权利要求所述的 pHLX201-CHO 真核表达系统制备重组蛋白的方法,包括如下步骤 :

1) 重组质粒的构建 :先将重组蛋白 1 或重组蛋白 2 的外源基因表达单元分别插入 pHLX201 单基因表达载体中,然后再构建表达双基因的重组质粒 ;

2) 表达系统的筛选 :重组质粒转化 CHO 细胞,筛选稳定表达的细胞株作为 pHLX201-CHO 真核表达系统 ;

3) 采用上一步筛选的 pHLX201-CHO 真核表达系统表达重组蛋白。

12. 如权利要求 1-6 任一权利要求所述的 pHLX201 真核表达载体、如权利要求 9-10 任一权利要求所述的 pHLX201-CHO 真核表达系统在重组蛋白表达中的用途。

一种利用 CHO 细胞生产重组蛋白的基因表达系统及真核表达载体

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种利用 CHO 细胞生产重组蛋白的基因表达系统及真核表达载体。

背景技术

[0002] 基因工程领域所用基因表达系统大致分为原核、酵母、植物、昆虫和哺乳动物细胞表达系统。与其它系统相比,哺乳动物细胞表达系统的优势在于能够指导蛋白质的正确折叠,提供复杂的糖基化修饰,因而表达产物在分子结构、理化特性和生物学功能方面最接近于天然的高等生物蛋白质分子。哺乳动物细胞的规模化生产技术也日渐成熟和完善。因此,通过哺乳动物细胞培养表达制备治疗性重组蛋白质药物已经成为当今生物制药领域的主流技术。目前已经上市和正在进行临床试验的蛋白质药物中,主要来自于哺乳动物细胞,而这其中中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)是最常用基因工程宿主细胞。

[0003] 为了获得高效的外源基因表达,基因工程 CHO 细胞中常使用二氢叶酸还原酶(Dihydrofolatereductase, DHFR) 和谷氨酰胺合成酶(Glutaminesynthetase, GS) 进行基因扩增和筛选。谷氨酰胺合成酶表达系统(GS 表达系统) 往往只需一轮加压筛选,所需筛选时间短;另外由于携带有 GS 基因的细胞株在放大培养过程中不需要添加谷氨酰胺,因此,受代谢副产物 NH₃ 毒的影响较小,有利于工艺优化及放大培养。

[0004] 利用 GS、DHFR 基因扩增和筛选系统的表达载体多由美国等发达国家开发,其专利保护、技术转让壁垒极大地限制了我国生物制药技术及工业的发展,因此现在急需一种具有自主知识产权的表达系统,以促进相关蛋白药物的开发和我国生物制药工业的进步。

发明内容

[0005] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种 pHLX201 真核表达载体,用于解决现有技术中的问题。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供一种 pHLX201 真核表达载体,包括 GS 表达单元,所述 GS 表达单元的序列包括 5' 至 3' 方向依次排列的 SV40L 启动子基因序列(SV40L promoter)、谷氨酰胺合成酶基因序列(GS),所述 SV40L 启动子基因序列如 SEQ ID NO :2 所示;所述谷氨酰胺合成酶基因序列如 SEQ ID NO :3 所示。

[0007] 优选的,所述 GS 表达单元基因序列如 SEQ ID NO :4 所示。

[0008] 优选的,所述 GS 表达单元的序列还包括酶切位点序列,所述 GS 表达单元的序列包括 5' 至 3' 方向依次排列的酶切位点序列、SV40L 启动子基因序列(SV40L promoter)、谷氨酰胺合成酶基因序列(GS) 以及酶切位点序列。

[0009] 更优的,所述酶切位点序列选自 HindIII 酶、NotI 酶、XhoI 酶中的一种或多种的组合。

[0010] 进一步优选的,所述含有酶切位点的 GS 表达单元序列可以如 SEQ ID NO :5 所示。

[0011] 优选的,本发明所提供的 pHLX201 真核表达载体是由 pHLX101 真核表达载体改造获得。

[0012] 更优的,所述 pHLX201 真核表达载体是在 pHLX101 载体的 GS 基因序列的 SV40PolyA 末端和 promotor A 之间插入第二个外源基因表达单元,即启动子 A、外源基因和 SV40PolyA,再将原有 GS 表达单元替换为新的 GS 基因序列及其启动子。

[0013] 本发明第二方面提供所述 pHLX201 真核表达载体的制备方法,由 pHLX101 真核表达载体改造获得,改造过程主要包括如下步骤:

[0014] 通过 PCR 的方法将 pHLX101 载体线性化,并在两端添加酶切位点序列,将单基因表达载体改为双基因表达载体;替换原来的 GS 表达单元,采用 PCR、酶切、连接的方法将新的 GS 表达单元插入表达载体,筛选、鉴定正确的连接产物为本发明的 pHLX201 真核表达载体。

[0015] 具体方法为:

[0016] 1) 双基因载体的制备:利用引物 S322(SEQ ID NO:6)和 S323(SEQ ID NO:7)扩增抗体轻链表达单元,再用引物 S324(SEQ ID NO:8)、S325(SEQ ID NO:9)获得线性化的抗体重链基因表达载体作为构建双基因载体的骨架,将以上两个片段连接、转化,筛选正确的转化子;

[0017] 2)GS 表达单元的优化:将 CHO 细胞的谷氨酰胺合成酶基因与 SV40L 启动子组成表达单元,并同时两端添加酶切位点,通过酶切连接分别插入 pHLX101 双基因表达载体,替换载体上原有 GS 表达单元。

[0018] 较优的,所述 pHLX201 真核表达载体适用于 CHO 细胞。

[0019] 更优的,所述 pHLX201 真核表达载体适用于 CHO-S 细胞。

[0020] 本发明第三方面公开了一种 pHLX201-CHO 真核表达系统,包括本发明所述的 pHLX201 真核表达载体以及中国仓鼠卵巢细胞。

[0021] 优选的,所述中国仓鼠卵巢细胞为 GS 基因敲除的 CHO-S 细胞。

[0022] 本发明第四方面公开了利用所述 pHLX201-CHO 真核表达系统制备重组蛋白的方法,包括如下步骤:

[0023] 1) 重组质粒的构建:先将重组蛋白 1 或重组蛋白 2 的外源基因分别插入 pHLX201 单基因表达载体中,然后再构建表达双基因的重组质粒;

[0024] 2) 表达系统的筛选:重组质粒转化 CHO 细胞,筛选稳定表达的细胞株作为 pHLX201-CHO 真核表达系统;

[0025] 3) 采用上一步筛选的 pHLX201-CHO 真核表达系统表达重组蛋白。

[0026] 所述步骤 1) 中外源基因插入载体后,构成外源基因表达单元,所述外源基因表达单元的序列包括 5'至 3'方向依次排列的启动子序列、外源基因序列以及终止信号和 polyA 加尾信号序列。

[0027] 更优的,步骤 1) 所述外源基因表达单元的序列还包括两端的酶切位点序列。

[0028] 更优的,步骤 1) 具体为:将外源基因表达单元通过酶切、连接的方法插入 pHLX201 真核表达载体,连接产物转化感受态细胞,筛选正确连接的载体作为构建成功的重组质粒。

[0029] 优选的,所述步骤 2) 中,筛选的具体方法为:采用添加有 Amp 的 2YT 培养基选择培养转化了连接产物的感受态细胞,挑取单克隆进行菌落 PCR,对 PCR 产物电泳分析或者测序分析。

[0030] 优选的,所述步骤 2) 中,筛选的具体方法为:重组质粒转化 CHO 细胞后,通过 MSX 进行加压筛选,获得稳定表达的细胞株。

[0031] 较优的,所述 MSX 加压筛选的终浓度为 $20 \sim 60 \mu\text{mol}$ 。

[0032] 本发明第五方面提供所述 pHLX201 真核表达载体、pHLX201-CHO 真核表达系统在重组蛋白表达中的用途。

[0033] 本发明公开了一种在 CHO 细胞中利用 pHLX201 双基因真核表达载体生产重组蛋白的基因表达系统,该表达系统能够实现外源基因在 CHO 细胞基因组中的整合和高效表达。该系统的制备方法主要包括:构建真核表达载体,适合于目的基因在 CHO 细胞中的瞬时表达,并适合于目的基因高表达细胞株筛选。利用本发明的 CHO 表达系统可以实现重组蛋白、单克隆抗体等在 CHO 细胞中的整合和表达,具有广阔的应用前景。

附图说明

[0034] 图 1:PCR 扩增片段“启动子 A+HLX01-LC+SV40polyA”及线性化 pHLX101-HLX01-HC 电泳图 (L1-L4: 用引物 S322、S323 扩增 DNA 片段“启动子 A+HLX01-LC+SV40polyA”, L5-L8: 用引物 S324、S325 线性化载体 pHLX101-HLX01-HC PCR 产物)

[0035] 图 2:菌液 PCR 鉴定阳性单克隆电泳图 (M:DNAMaker, L1-L7:用引物 S138 和引物 S146 扩增的产物,大小约为 4200 碱基对, L8:以 pHLX101-HLX01-HC 载体为模板的 PCR 产物)

[0036] 图 3:GS 基因前段和后段 PCR 产物电泳图 (L1:用引物 S341 和引物 S350 对 GS 基因前段的 PCR 产物, L2:用引物 S342 和引物 S3549 对 GS 基因后段的 PCR 产物)

[0037] 图 4:TK 启动子及 GS 基因融合电泳图 (M:DNA Marker, L1-L2:TK 及 GS 融合后产物, L3:回收胶中 TK 及 GS 融合后产物)

[0038] 图 5:菌液 PCR 鉴定阳性单克隆电泳图 (M:DNA Marker, L1-L10:1-10 个单克隆菌液为模板的 PCR 产物)

[0039] 图 6:SV40L 启动子与 GS 前段 PCR 产物电泳图 (M:DNA Marker, L1:SV40L 启动子与 GS 前段 PCR 产物)

[0040] 图 7:SV40L 启动子与 GS 融合电泳图 (M:DNA Marker, L1:SV40L 启动子与 GS 前段、后段融合产物,大小为 4964 碱基对)

[0041] 图 8:pHLX101-HLX01 双基因表达载体用 XhoI 和 NotI 双酶切图谱

[0042] 图 9:质粒双酶切筛选阳性克隆电泳图 (M:DNA Marker, L1:4# 克隆小抽质粒, L3:4# 克隆质粒双酶切 XhoI 和 NotI, L2:8# 克隆小抽质粒, L4:8# 克隆小抽质粒双酶切 XhoI 和 NotI, L5:13# 小抽质粒, L6:13# 克隆小抽质粒双酶切 XhoI 和 NotI)

[0043] 图 10:pHLX201-HLX01 双基因表达载体中增加 I-SceI 识别位点 PCR 电泳图 (M:DNA Marker, L1:引物 S364, S365 扩增产物, SacII $\rightarrow$ I-SceI 片段,大小为 2262 碱基对, L2:引物 S366, S367 扩增产物, I-SceI $\rightarrow$ HindIII 片段,大小为 1192 碱基对)

[0044] 图 11:图 11 中 SacII $\rightarrow$ I-SceI 片段与 I-SceI $\rightarrow$ HindIII 片段融合电泳图 (M:DNA Marker, L1:SacII $\rightarrow$ I-SceI 片段与 I-SceI $\rightarrow$ HindIII 片段融合后产物, L2:融合产物用引物 S364, S367 扩增后产物,大小约为 3300 碱基对, L3:回收胶中融合产物)

[0045] 图 12:pHLX201-HLX01 双基因表达载体酶切电泳图 (M:DNA Marker, L1:

pHLX201-HLX01 小抽质粒, L2 :L1 中质粒用 SacII 和 HindIII 酶切后结果, L3 :L1 中质粒 SacII 和 HindIII 酶切后回收胶电泳结果)

[0046] 图 13 :pHLX201-HLX01 双基因表达载体增加 I-SceI 位点后阳性克隆筛选结果 (M : DNA Marker, L1-11 :1-11# 克隆质粒用 SacII, I-SceI 和 HindIII 酶切后结果)

[0047] 图 14 :pHLX201-HLX01 与 pEE14.4-HLX01 双基因表达载体电转前线性化电泳图 (M :DNA Marker, L1 :pEE14.4-HLX01 双基因表达载体, 中抽质粒, L2 :PvuI 消化 pEE14.4-HLX01 双基因表达载体, L3 :pHLX201-HLX01I-SceI 中抽质粒, L4 :I-SceI 消化 pHLX201-HLX01 质粒)

[0048] 图 15 :pHLX101 双基因表达载体图谱

[0049] 图 16 :pHLX101TKGS 双基因表达载体图谱

[0050] 图 17 :pHLX201 双基因表达载体图谱

[0051] 图 18 :环形 pHLX101, pHLX201 和 pEE14.4 双基因表达载体在 CHO-S 细胞中的表达能力比较

[0052] 图 19 :线性化的 pHLX201 与 pEE14.4 双基因表达载体表达能力比较

具体实施方式

[0053] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0054] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0055] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0056] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组 DNA 技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见 Sambrook 等 MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989and Third edition,2001;Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley&Sons, New York,1987and periodic updates ;the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego ;Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego,1998 ;METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, Chromatin (P. M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego,

1999 ;和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol.119, Chromatin Protocols (P. B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999 等。

[0057] 实施例 1

[0058] pHLX101 双基因表达载体的构建

[0059] 用引物 S322, S323 将 pHLX101-HLX01-HC (由上海复宏汉霖生物技术有限公司构建, 参见中国专利 201210211812.1) 表达载体线性化, 作为双基因表达载体的框架, 再用引物 S324, S325 扩增 pHLX101-HLX01-LC (由上海复宏汉霖生物技术有限公司构建, 参见中国专利 201210211812.1) 表达载体的转录单元, 包括启动子 A 序列、HLX01 轻链基因序列和 SV40polyA 基因序列, 同时引入酶切位点 BglIII 和 XhoI。

[0060] 表 1. PCR 引物序列表

[0061]

引物名称	5'-3'序列		引入内切酶位点
S322	Aatccgctcgagagatcttatgttacttggcagaggcc	SEQ ID No.6	BglIII 和 XhoI
S323	taaggaagatctctcgagccgggagtcgactatacagac	SEQ ID No.7	BglIII 和 XhoI
S324	Aatccgctcgagtatgttacttggcagaggccgc	SEQ ID No.8	XhoI
S325	Taaggaagatcttaagatacattgatgagttgg	SEQ ID No.9	BglIII

[0062] 线性化 pHLX101-HLX01-HC PCR 反应条件: 变性 98℃ 10 秒, 退火 58℃ 5 秒, 延伸 72℃ 120 秒, 35 循环。

[0063] 扩增 pHLX101-HLX01-LC 表达载体的转录单元反应条件: 变性 98℃ 10 秒, 退火 58℃ 5 秒, 延伸 72℃ 60 秒, 35 循环。

[0064] 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示, 将扩增的轻链表达单元和线性化载体进行胶回收纯化, 然后分别用内切酶 BglIII 和 XhoI 在 37℃ 水浴中消化 1 个小时, 反应结束后再次纯化 DNA 片段和载体, 将轻链表达单元与载体在连接酶 (NEB 公司产品) 作用下进行连接反应, 将连接产物转化进入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。

[0065] 用 PCR 反应进行阳性单克隆鉴定, 所用引物为 S138 (SEQ ID NO:10) 和 S146 (SEQ ID NO:11), PCR 反应条件为: 变性 98℃ 10 秒, 退火 58℃ 5 秒, 延伸 72℃ 60 秒, 35 循环, 如图 2 所示, 将鉴定正确的载体命名为 pHLX101Dual-HLX01。

[0066] 实施例 2

[0067] 优化 GS 表达单元序列

[0068] 1. 构建含有 TK 启动子和 CHO 细胞 GS 基因的 pHLX101 双基因表达载体

[0069] 1.1 GS 基因序列合成用化学合成法制备 GS 基因的前段和后段, 其中前段序列为 SEQ ID No. 3 的 1-1691, 后段为 SEQ ID No. 3 的 1686-4599。采用引物 S341 (SEQ ID No. 12) 和 S350 (SEQ ID No. 13) 以及 S342 (SEQ ID No. 14) 和 S349 (SEQ ID No. 15), 利用 PCR 分别扩增 GS 基因的前段和后段, PCR 反应条件: 变性 98℃ 5 秒, 退火 58℃ 5 秒, 延伸 72℃ 60 秒, 35 循环。

[0070] 1.2 TK 启动子序列合成用引物 S355 (SEQ ID No. 16) 和 S337 (SEQ ID No. 18) 以载体 pHLX101 为模板, 扩增出 TK 启动子。PCR 反应条件: 变性 98℃ 5 秒, 退火 58℃ 5 秒, 延伸 72℃ 10 秒, 25 循环。

[0071] 1.3 融合 TK 启动子、GS 基因前段和后段

[0072] 表 2. 融合反应体系

[0073]

	TK 启动子	GS 前段	GS 后段
质量 (ng)	20	136	232
体积 (μL)	2.8	4.8	8.4
GC buffer (μL)	25		
H ₂ O (μL)	4.5		
HS DNA polymerase (μL)	0.5		
Total (μL)	50		

[0074] 反应条件:变性 98℃ 10 秒,退火 58℃ 5 秒,延伸 72℃ 3 分钟,25 循环。融合后 DNA 片段进行琼脂糖凝胶分析,如图 3 所示,然后将大小为 4770 碱基对的片段回收。

[0075] 1.4 用内切酶 XhoI 和 NotI 消化融合片段(包括 TK 启动子、GS 基因前段和后段)用 XhoI 和 NotI 同时对融合片段在 37℃ 水浴中消化 1 个小时,同时载体 pHLX101Dual-HLX01 也用 XhoI 和 NotI 进行消化,经琼脂糖凝胶电泳,并回收大小为 7200 碱基对的载体片段,如图 4 所示。

[0076] 1.5 连接反应用快速连接酶对内切酶消化并纯化后的融合片段和载体进行连接,挑选单克隆在 2YT 培养基中培养,以菌液为模板做 PCR 反应,结果如图 5 所示,送阳性克隆去测序验证,将测序正确的载体命名为 pHLX101DualTKGS-HLX01。

[0077] 2. 构建含有 SV40L 启动子和 CHO 细胞来源 GS 的 pHLX101 双基因表达载体即 pHLX201 双基因表达载体

[0078] 2.1 扩增 CHO 细胞来源 GS 前段及其启动子 SV40L:化学合成制备 SV40L 和 GS 前段序列的融和片段 (SEQ ID No. 17),以此序列为模板用引物 S350 (SEQ ID No. 13)、S360 (SEQ ID No. 19) 扩增得到 SV40L 及 GS 前段序列,反应条件:变性 98℃ 10 秒,退火 58℃ 5 秒,延伸 72℃ 1 分钟,30 循环。结果如图 6 所示,再与实施例 1.1 中制备得到的 GS 后段融合,融合反应为:变性 98℃ 10 秒,退火 58℃ 5 秒,延伸 72℃ 2 分钟,20 循环。融合成功的片段在琼脂糖凝胶中电泳,结果如图 7 所示,与非目的条带分离后,割胶回收。

[0079] 2.2 酶切连接反应:用 NotI 和 XhoI 同时消化实施例 2.1 制备得到的融合片段 SV40L 及 GS 全序列,同样用这两个酶对实施例 1.4 中得到的 pHLX101Dual-HLX01 双基因表达载体进行消化反应,目的片段在琼脂糖凝胶中电泳后割胶回收,结果如图 8。取 30ng 酶切后的载体和 70ng 酶切后的 SV40L 及 GS 融合片段,用快速连接酶进行连接反应,连接产物转化入 DH5α 感受态细胞。提取阳性克隆的质粒,经 NotI 和 XhoI 酶切验证筛选阳性克隆,结果如图 9。

[0080] 2.3 添加线性化酶切位点由于改变了 pHLX101 双基因表达载体中 GS 及其启动子序

列,原有的载体线性化酶切位点不能继续使用,所以需要在不影响各元件功能前提下,在载体上增加一个新的限制性内切酶识别位点。

[0081] I-SceI 识别序列为:TAGGGATAACAGGGTAAT(5' → 3'),序列较长,不易被重复,酶切反应易进行。为了在 pHLX201 第 1061-1062 碱基处引入 I-SceI 识别位点,设计引物 S364(SEQ ID No. 20) 和 S365(SEQ ID No. 21) 以及 S366(SEQ ID No. 22) 和 S367(SEQ ID No. 23),以实施例 2.2 得到的质粒为模板,采用 PCR 反应,反应条件为:变性 98℃ 10 秒,退火 58℃ 5 秒,延伸 72℃ 1 分钟,35 循环。分别扩增出大小为 2262 碱基对和 1192 碱基对的 DNA 片段产物,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离结果如图 10 所示。在利用 PCR 融合反应将两段 DNA 融合在一起,使用引物为 S364 和 S367 融合反应条件为:变性 98℃ 10 秒,退火 58℃ 5 秒,延伸 72℃ 2 分钟,20 循环。融合产物在琼脂糖凝胶中电泳并回收,结果如图 11。

[0082] 用 SacII 和 HindIII 分别对上述融合片段以及实施例 2.2 中制备的 pHLX201 双基因表达载体进行消化,反应结束后对片段 DNA 纯化试剂盒进行纯化,对 pHLX201 双基因经过琼脂糖凝胶电泳,结果如图 12,然后进行割胶回收。再用快速连接酶与片段、载体混合,在 25℃ 水浴里反应 5 分钟,连接产物转化进入 DH5 α 感受态细胞。用酶切验证筛选阳性克隆对比结果如图 13。

[0083] 3. 比较实例 1.4 中的 pHLX101 和实例 2.3 中 pHLX201 双基因表达载体在 CHO-S 细胞中的表达

[0084] 3.1 电转:将 pHLX101DualTKGS-HLX01, pHLX201-HLX01 和 pEE14.4-HLX01 双基因表达质粒电转进入 GS(谷氨酰胺合成酶基因)敲除的 CHO-S 细胞,48 小时后对电转后细胞进行活力计数,以 5000 细胞/孔,10000 细胞/孔的密度在 96 孔板中铺板,每个密度下筛选剂 MSX 的浓度分别为 0 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 筛选使用的培养基为含有 1 $\times$ GSSupplement 和一定浓度 MSX 的 CD CHO。

[0085] 3.2 筛选:电转后细胞种入 96 孔板后放入 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中,单克隆生长需要 18 至 22 天。从表 3 中可以看出, pHLX101DualTKGS-HLX01 几乎没有克隆长出,而 pHLX201-HLX01 和 pEE14.4-HLX01 都有一定数量的克隆长出,说明带有 TK 启动子的质粒,无法表达有效的 GS 基因。而 pHLX201-HLX01 能够耐受一定浓度 MSX 的筛选,说明 SV40L 的启动子在该条件下优于 TK 启动子。

[0086] 3.3 96 孔板中 IgG 表达量定量:用 2 μ g/mL 抗人 Fd 多抗包被 96 半孔板, PBS 缓冲液冲洗 2 次,再以含有 5% 牛奶的 PBS 封闭 96 半孔板 1 个小时, PBS 缓冲液冲洗 2 次;取有克隆生长出的孔中上清 10 μ L, 用 PBS 稀释 200 或 400 倍,向半孔板中每孔加入 30 μ L, 室温结合 1 个小时;将上清吸去, PBS 缓冲液冲洗 3 次;向每孔中加入 30 μ L 抗人 kappa 轻链并带有 HRP 标记的二抗, 室温结合 1 个小时;将上清吸去, PBS 冲洗 4 次。每孔加入 30 μ L TMB, 反应 3 到 5 分钟用 2M H₂SO₄ 终止反应,最后在 450nm 波长下读取吸光值。结果如图 18,可以看出 pHLX201-HLX01 的克隆的表达量,其中表达量高的能达到 50 μ g/mL,与商业化的表达载体 pEE14.4-HLX01 的表达量相近。

[0087] 表 3. 各筛选条件下单克隆数目统计

[0088]

pHLX101CCT TKGS		MSX Conc.(μM)			
Dual-HLX01		0	20	40	60
Cell density	5000 cells/well	1	0	0	0
	10000				
	cells/well	2	1	1	0
pHLX201-HLX01		0	20	40	60
[0089]					
Cell density	5000 cells/well	28	7	1	1
	10000				
	cells/well	30	16	10	1
pEE14.4-HLX01		0	20	40	60
Cell density	5000 cells/well	30	3	0	0
	10000				
	cells/well	30	18	5	3

[0090] 4. 比较线性化实例 2.3 中质粒与 pEE14.4-HLX01 在 CHO-S 细胞中的表达

[0091] 4.1 线性化质粒：为提高质粒整合进入宿主细胞基因组效率，用限制性内切酶 I-SceI 消化实例 2.3 得到的质粒，限制性内切酶 PvuI 消化 pEE14.4-HLX01，经琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果如图 14。

[0092] 4.2 纯化并浓缩质粒：用等体积酚 / 氯仿 / 异戊醇 (25:24:1) 与质粒溶液充分混匀，高速离心后取上层水相至另一新管，用等体积氯仿与含有 DNA 的水相充分混匀，高速离心后取最上层水相至另一新管中，加入 1/10 体积的 3M NaAC, pH5.2，再加入 3 倍体积的无水乙醇混匀后使质粒 DNA 发生沉淀，14000 转 / 分钟离心 10 分钟，使 DNA 沉淀至管底，弃上清，用预冷的 75% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次，使 DNA 沉淀在室温下自然干燥，加入一定体积的超纯水使 DNA 溶解，并且浓度不低于 1 μ g/ μ L。

[0093] 4.3 电转：将线性化的 pHLX201-HLX01 和 pEE14.4-HLX01 双基因表达质粒电转进入 GS (谷氨酰胺合成酶基因) 敲除的 CHO-S 细胞，48 小时后对电转后细胞进行活力计数，以 3000 细胞 / 孔，6000 细胞 / 孔和 9000 细胞 / 孔的密度在 96 孔板中铺板，每个密度下筛选剂 MSX 的浓度分别为 0 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M，筛选使用的培养基为含有 1 $\times$ GS Supplement 和一定浓度 MSX 的 CD CHO。

[0094] 4.4 筛选：电转后细胞种入 96 孔板后放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中，单克隆生长需要 18 至 22 天。

[0095] 4.5 96 孔板中 IgG 表达量定量：用 2 μ g/mL 抗人 Fd 多抗包被 96 半孔板，PBS 缓冲液冲洗 2 次，再以含有 5% 牛奶的 PBS 封闭 96 半孔板 1 个小时，PBS 缓冲液冲洗 2 次；取有克隆生长出的孔中上清 10 μ L，用 PBS 稀释 200 或 400 倍，向半孔板中每孔加入 30 μ L，室温结合 1 个小时；将上清吸去，PBS 缓冲液冲洗 3 次；向每孔中加入 30 μ L 抗人 kappa 轻链并带有

HRP 标记的二抗,室温结合 1 个小时;将上清吸去,PBS 冲洗 4 次。每孔加入 30 μ L TMB,反应 3 到 5 分钟用 2M H_2SO_4 终止反应,最后在 450nm 波长下读取吸光值。

[0096] 4.6 在管式反应器中比较表达量:将 96 孔板中表达量最高的细胞吸出放入 24 孔板中培养 3 到 4 天,细胞总数增加至 10^6 个左右时,将细胞转移至 5mL 管式反应器中,进行扩增培养,将所有克隆的细胞密度调整为 3×10^5 个/mL,开始做补料培养。培养期间对细胞活率和密度进行记录。待细胞活率下降至 50% 以下收集培养上清,用 ELISA 做定量,具体方法与 4.5 中描述相同。结果如图 19,可以看出 pHX201 载体的表达量能达到 200 μ g/mL 左右,与商业化的 pEE4.4 的表达量相当。

[0097] 综上所述,本发明有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0098] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

[0001]

序列表

<110> 复宏汉霖

<120> 一种利用 CHO 细胞生产重组蛋白的基因表达系统及真核表达载体

<130> PCN

<160> 23

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 172

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TK 启动子

<400> 1

ccccggaaga aatatatttg catgtcttta gttctatgat gacacaaacc ccgcccagcg	60
tcttgtcatt ggcgaattcg aacacgcaga tgcagtcggg gcggcgcggg ccgaggtcca	120
cttcgcatat taaggtgaag cgtgtggcct cgaacaccga gcgaccctgc gg	172

<210> 2

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SV40L 启动子

<400> 2

ctttggcagc caagctagat ccagcttttt gcaaaagcct aggcctccaa aaaagcctcc	60
tcactacttc tggaaatagct cagaggecga ggcggcctcg gccctctgcat aaataaaaaa	120
aattagtcag ccatggggcg gagaatgggc ggaactgggc ggagttaggg gcgggatggg	180
cggagttagg gcggggacta tggttgctga ctaattgaga tgcatgcttt gcatacttct	240
gcctgctggg gagectgggg actttccaca cctggttget gactaattga gatgcatget	300
ttgcatactt ctgcctgctg gggagcctgg ggactttcca ca	342

[0002]

<210> 3

<211> 4599

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 谷氨酰胺合成酶基因 (GS)

<400> 3

```

ccaagctagc ttgaattaat tcccagagccc tccaataca aaaactaatt agactttgag      60
tgatcttgag cctttcctag tttttgtatt ggaagggctc gtcgccagtc tcattgagaa    120
ggcatgtgcg gaegatggct tetgtcactg caaaggggtc acaattggca gaggggcggc    180
ggtettcaaa gtaaccttctc ttctcctggtc egagccgaga atgggagtag agccgactgc    240
ttgattccca caccaatctc ctgcgcgtc tcacttcgcc tegtctcgtt ggtctgtggc    300
cctgtccacc cegtcacatc tcccggcggtc caccgtcag agcaccttcc accatggcca    360
cctcagcaag ttcccacttg aacaaaaaca tcaagcaaat gtaettgtgc ctgccccagg    420
gtgagaaagt ccaagccatg tatactctggg ttgatggtag tggagaagga ctgcgctgca    480
aaaccgcac cctggactgt gagcccaagt gtgtagaaga gttacctgag tggaaatttg    540
atggctctag tacctttcag tctgagggtc ccaacagtga catgtatctc agccctgttg    600
ccatgtttcg ggaccccttc cgcagagatc ccaacaagct ggtgtttctgt gaagttttca    660
agtacaaccg gaagcctgca gagaccaatt taaggcactc gtgtaaacgg ataattggaca    720
tggtgagcaa ccagcacccc tggtttgga tggaaacagga gtatactctg atgggaacag    780
atgggcaccc ttttggttgg ctttccaatg gtttctctgg gcccgaaggt ccgtattact    840
gtggtgtggg cgcagacaaa gcctatggca gggatatcgt ggaggtcac taccgcgcct    900
gcttgtatgc tggggctcaag attacaggaa caaatgtga ggtcatgcct gccagtgagg    960
agttccaaat aggacctgt gaaggaatcc gcatgggaga tcatctctgg gtgccccgtt   1020
tcatcttgca tegagtatgt gaagactttg gggtaatagc aacctttgac cccaagccca   1080
ttctgggaa ctggaatggt gcaggtgcc ataccaactt tagcaccaag gccatgcggg   1140
aggagaatgg tctgaagtaa gtagcttcc tggagccat ctttattctc atggggtgga   1200
agggtttgt gttagggttg ggaaagttag acttctcaca aactacatgc catgetcttc   1260
gtgtttgtca taagcctatc gttttgtacc cgttgagaa gtgacagtac tctaggaata   1320
gaattacagc tgtgatatgg gaaagttgtc acgtagggtc aagcatttaa aggtctttag   1380
taagaactaa atacacatac aagcaagtgg gtgacttaat tcttactgat gggaagaggc   1440
cagtgatggg ggtettecca tccaaaagat aatttggtatt acatgttgag gactggctgt   1500
aagcacttga gacatagggtc acaaggcaga cacagcctgc atcaagtatt tattggtttc   1560

```

[0003]

ttatggaact	catgcctgct	cctgcccttg	aaggacaggt	ttctagtgac	aaggtcagac	1620
cctcaccttt	actgttcca	ccaggcacat	cgaggaggec	atcgagaaac	taagcaagcg	1680
gcaccggtag	cacattcgag	cctacgatec	caaggggggc	ctggacaatg	cccgctgtct	1740
gactgggttc	caegaaacgt	ccaacatcaa	cgacttttct	gttggtgtcg	ccaatcgag	1800
tgccagcatc	cgcattcccc	ggactgtcgg	ccaggagaag	aaaggttact	ttgaagaccg	1860
ccgccccctc	gccaatgtg	acccctttgc	agtgacagaa	gccatcgctc	gcacatgcct	1920
tctcaatgag	actggcgacg	agcccttcca	atacaaaaac	taattagact	ttgagtgate	1980
ttgagccttt	cctagttcat	cccacccgcg	ccagctgttc	tcattgtaac	tcaaaggatg	2040
gaatatcaag	gtctttttat	tctcgtgcc	cagttaatct	tgtttttatt	ggtcagaata	2100
gaggagtcaa	gttcttaate	cctatacacc	caacctcat	ttcttttteta	tttagctttc	2160
tagtgggggt	gggagggtta	gggggaagg	aacgtaacca	ctgcttccatc	tcacaggaa	2220
tgcattgtcca	gtaggcagag	ctgccacaga	gtgggtgtat	ttgtggagga	ggactttttc	2280
ttcaggacag	ttaaaagagc	aggtccactg	cttggttga	caattcccc	ataggtagag	2340
agctgctagt	tcttcaggta	aaaccaactt	tctattccaa	atggaagtta	ggtgaggagt	2400
agtgggagga	gttcattgcc	tccatgaaga	cagctcagtg	taccacctga	cagatgggta	2460
gcctactgt	aaaagaagga	aaagtatttt	ctgggtcttc	catttataac	acaaagcaga	2520
gtagtatttt	tatatattaaa	tgtaaaaaca	aaagtattat	atatggatat	gtggatatat	2580
gtgtattttc	aattgaggaa	accatccatg	ttactgggtt	tgccaaagttt	gaagagcttg	2640
gttaacaaga	aaggatctct	tgagtagagg	tgggggtgca	gtaccaggaa	aggtggttat	2700
ctggggctca	gcgcttttatt	actatgtggg	gtttccctgc	ccactctgca	ggagcagatg	2760
ctggacaggt	agcagggttg	gacaccagtg	cttgccacca	cctgtccctg	tgcttaggct	2820
aagatgcata	tgtatccaca	cagagttagc	aggatggagt	tggctggtea	acttgaacat	2880
tgttactgat	aggggtgggt	gggttttatt	ttttgggtgg	actagcatgt	cactaaagca	2940
ggccttttga	tatattaaat	tttttaaagc	aaaacaagtt	cagcttttaa	tcaactttgt	3000
agggtttcta	actttacaga	attgcctgtt	tgtttcagtg	tctccatcca	ctttgtctct	3060
ggaggaaacg	aggacaggca	gacctggagt	taaaacattt	gtcattttgt	gtcatagtgt	3120
ctactttctc	ccagcagaat	attcctttcc	ttcttaggag	tccatggag	ttttgttttt	3180
gttttttttc	tattacgata	aacatacccc	acctccattc	tggttgccc	tgtgtttctc	3240
tggttgtttg	tgtgctgtcc	gcagcaggct	gcctgtgggt	ttctcttgcc	atgacgactt	3300
ctaattgcca	tgtacagtat	gttcagttag	ataactcctc	attgtaaaca	gactgtaact	3360
gccagagcag	cgtttataaa	tcaacctaac	atttataaga	tttctcttg	acttgtttct	3420
ttgtggtttg	gggaggaaga	aaaaaaaaag	cgtgcagtat	ttttttgttc	cttcatttcc	3480
tatcaaaaga	aaggggagtg	gttcigtttt	gtttactcgc	aaaataagct	agcttatcta	3540

[0004]

```

ttggettttc tttttttttt tttttttaaa cgggettttt cttgtaccta taatttgggg 3600
taagggtgtga gagtttttat agttttttga gacagggtct tgggtataac cettggctgg 3660
cctggagcta actatgtaga ctgggctagc ctttaacttg cagttctgct ttcaattagg 3720
gtttatacat ttagtcttgg caattcctag ttccacgttt aatctcttta catttcaaag 3780
cagtgtttatc tgaagagttc aggcgcagag tcaattcaat agagttacac aaaaacctaa 3840
aaaacaagtt ttaaatacca agttatgttg gcctggccac ttttcacagc tgtccacaac 3900
tcaatgtgac aaggctacaa attggatata ctagaatttc ctgggtgattt ggaacccctg 3960
cttcatttcc cggaaccagg gcttttggig acagtcctag cttatcagat tatttaaaac 4020
agttactctt cctgcccttc ttctgagac ctttgtccag ctgccatgag ccctctacac 4080
agtacttgct tccctgttga agtcaactgaa ggcacatcag cccaagacat aaaggcttgt 4140
cccggattca ctagecctggg gaacttgttg ttctctgatg tttgtctctg ttttgttgtg 4200
atthagttct aaattttcca gcctgggttg aaaatctggg ctcccagcct tcaataagga 4260
ggactacaga tatgtacgac tgagcctiga ttccagcctc atgtttatac gtctgtgctc 4320
agctccctga aggttccagt ttgaaaactca ataatccagg ggtcagaaaag tcttgatctt 4380
atccccacag tatggcacca agcctggctg agccttctga cttagtctgc cctgttgcta 4440
tttaagcaact tttcttcaact aggcataaaaa taaaaggagc ttctctcttt gccatggcgc 4500
tgtgcatgat aggaaaaggt agctatctac tagcatatta actccactgt ttttgctttg 4560
tgtgttttgt ttttgaggaa ggtctctaac tgtgtatcc 4599

```

<210> 4

<211> 4965

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 谷氨酰胺合成酶基因 (GS) 表达单元

<400> 4

```

ctttggcagc caagctagat ccagcttttt gcaaaagcct aggcctccaa aaaagcctcc 60
tcaactacttc tggaatagct cagaggccga ggcgccctcg gcctctgcat aaataaaaaa 120
aattagtcag ccatggggcg gagaatgggc ggaactgggc ggagttaggg gcgggatggg 180
cggagttagg ggcgggacta tggttgctga ctaattgaga tgcattgctt gcatacttct 240
gcctgctggg ggcctgggg actttccaca cctggttgcg gactaattga gatgcatgct 300
ttgcatactt ctgcctgctg gggagcctgg ggactttcca caccctaact gacacacatt 360
ccacagecaa gctagcttga attaatccc gagcccttcc aatacaaaaa ctaattagac 420

```

[0005]

tttgagtgat	cttgagcctt	tcctagtttt	tgtattggaa	gggctcgtcg	ccagtetcat	480
tgagaaggca	tgtgeggacg	atggettctg	tcactgcaaa	ggggtcacaa	ttggcagagg	540
ggcggcggtc	ttcaaagtaa	ctttcttct	cctggccgag	ccgagaatgg	gagtagagcc	600
gactgettga	tccccacacc	aatctcctcg	ccgtctctac	ttegcctcgt	tctcgtgget	660
cgtggccctg	tccaccccg	ccatcatccc	ggcgccacc	gctcagagca	ccttccacca	720
tggecacctc	agcaagttcc	cacttgaaca	aaaacatcaa	gcaaattgtac	ttgtgcctgc	780
cccagggtga	gaaagtccaa	gccatgtata	tctgggttga	tggtactgga	gaaggactgc	840
gtgcaaaaac	ccgcaccctg	gactgtgagc	ccaagtgtgt	agaagagtta	cctgagtgga	900
atthttgatgg	ctctagtacc	tttcagtctg	agggtccaa	cagtgcacatg	tatctcagcc	960
ctgttgccat	gtttcgggac	cccttcgca	gagatcccaa	caagctggtg	ttctgtgaag	1020
ttttcaagta	caaccggaag	cctgcagaga	ccaatttaag	gcactcgtgt	aaacggataa	1080
tggacatggt	gagcaaccag	cacccctggt	ttggaatgga	acaggagtat	actctgatgg	1140
gaacagatgg	gcaccctttt	ggttggcctt	ccaatggctt	tectgggccc	caaggtecg	1200
attactgtgg	tgtgggcgca	gacaaagcct	atggcaggga	tatcgtggag	gctcactacc	1260
gcgcctgctt	gtatgtctgg	gtcaagatta	caggaacaaa	tgctgaggtc	atgcctgccc	1320
agtgggagtt	ccaaatagga	ccctgtgaag	gaatccgcat	gggagateat	ctctgggtgg	1380
cccgtttcat	cttgcatega	gtatgtgaag	actttggggt	aatagcaacc	tttgacccca	1440
agcccatctc	tgggaactgg	aatggtgcag	gctgccatac	caacttttagc	accaaggcca	1500
tgcgggagga	gaatggtctg	aagtaagtag	cttctctctg	agccatcttt	attctcatgg	1560
ggttgaaggg	ctttgtgtta	gggttgggaa	agttggactt	ctcacaaact	acatgccatg	1620
ctcttcgtgt	ttgtcataag	ctatcgtttt	tgtaccctgt	ggagaagtga	cagtactcta	1680
ggaatagaat	tacagctgtg	atatgggaaa	gttgtcacgt	aggttcaagc	atttaaaggt	1740
ctttagtaag	aactaaatac	acatacaagc	aagtgggtga	cttaattctt	actgatggga	1800
agaggccagt	gatgggggtc	ttcccatcca	aaagataatt	ggtattacat	gttgaggact	1860
ggtctgaagc	acttgagaca	taggtcacia	ggcagacaca	gcctgcatca	agtattttatt	1920
ggtttcttat	ggaactcatg	cctgctcctg	cccttgaagg	acaggtttct	agtgacaagg	1980
tcagaccctc	acctttactg	cttccaccag	gcacatcgag	gaggccatcg	agaaactaag	2040
caagcggcac	cgggtaccaca	ttcgagccta	cgatcccaag	gggggcctgg	acaatgccc	2100
tcgtctgact	gggttccacg	aaacgtccaa	catcaacgac	ttttctgctg	gtgtcgccaa	2160
tcgcagtgcc	agcatccgca	ttccccggac	tgctggccag	gagaagaaag	gttactttga	2220
agaccgccc	ccctctgcca	attgtgaccc	ctttgcagt	acagaagcca	tcgtccgcac	2280
atgccttctc	aatgagactg	gcgaecgagc	cttccaatac	aaaaactaat	tagactttga	2340
gtgatcttga	gcctttccta	gttcatccca	ccccgccc	gctgtctcat	tgtaactcaa	2400

[0006]

aggatggaat atcaaggtct ttttatteet cgtgcccagt taatcttgct tttattggtc	2460
agaantagagg agtcaagttc ttaatcccta tacacccaac cctcatttct tttctattta	2520
gctttctagt gggggtggga ggggtagggg gaagggaacg taaccactgc ttcattctcat	2580
caggaatgca tgtccagtag gcagagctgc cacagagtgg gtgtatttgt ggaggaggac	2640
tttttcttca ggacagttaa aagagcaggt ccactgcttg gattgacaat tccccatag	2700
gtagagagct gctagttctt caggtaaaae caactttcta ttccaaatgg aagttagggtg	2760
aggagtagtg ggaggagtgc atgcccctca tgaagacagc tcagtgtatc acctgacaga	2820
tgggtagccc tactgtaaaa gaaggaaaag ttattttctgg gtccctccatt tataacacaa	2880
agcagagtag tatttttata tttaaatgta aaaacaaaag ttatatatat ggatatgtgg	2940
atatatgtgt atttctaatt gaggaacca tcttagttac tgggtttgcc aagtttgaag	3000
agcttgggtta acaagaaagg atctcttgag tagaggtggg ggtgcagtag caggaaaggt	3060
ggttatctgg ggtcagcgc tttattacta tgtgggggtt cctgcccac tctgcaggag	3120
cagatgctgg acaggtagca gggtaggaca ccagtgttg ccaccacctg tccctgtgct	3180
taggctaaga tgcatatgta tccacacaga gttagcagga tggagtggc tggtaactt	3240
gaacattgtt actgataggg gtgggtgggg tttatttttt ggtgggacta gcatgtcact	3300
aaagcaggcc tttgatata tttaattttt taaagcaaaa caagttcagc tttaaatcaa	3360
ctttgtaggg tttctaactt tacagaattg cctgtttgtt tcagtgtctc catccacttt	3420
gctcttgagg gaacggagga caggcagacc tggagttaaa acatttgtea ttttgtgtca	3480
tagtgtctac tttctcccag cagaatatte ctttccttct taggagtcct atggagtttt	3540
gtttttgttt tttttctatt acgataaaca taccacacct ccattctggc ttgccctgct	3600
gttctctggg tgtttgtgtg ctgtccgcag caggctgcct gtggttttct cttgccatga	3660
cgacttctaa ttgccatgta cagtatgttc agttagataa ctctcattg taaacagact	3720
gtaactgcca gagcagcgt tataaatcaa cctaacattt ataagatttc ctcttgactt	3780
gtttctttgt ggttggggga ggaagaaaaa aaaaagcgtg cagtattttt ttgttccttc	3840
atttctatc aaaagaaagg ggagtgggtc tgttttgttt actcgcaaaa taagctagct	3900
tatctattgg cttttctttt tttttttttt tttaaacggg ctttttcttg tactataat	3960
ttggggtaag gtgtgagagt ttttatagtt ttttgagaca gggctcttgg gtataccctt	4020
ggctggcctg gagctaacta ttagactgg gctagccttt aacttgcagt tctgtttca	4080
attagggttt atacatttag tcttgcaat tcttagttcc acgtttaatc tctttacatt	4140
tcaaagcagt gttatctgaa gatttcaggc gcagagtcaa ttcaatagag ttacacaaaa	4200
acctaaaaaa caagttttta ataccaagtt atgttggcct ggccactttt cacagctgtc	4260
cacaactcaa tgtgacaagg ctacaaattg gatatactag aatttcttgg tgatttggaa	4320
ccctgcttc atttcccga accagggtt ttggtgacag tcttagetta tcagattatt	4380

[0007]

taaaacagtt actcttctcg cccttcttcc tgagaccttt gtccagctgc catgagccat	4440
ctacacagta cttgcttccc tgttgaagtc actgaaggca catcagccca agacataaag	4500
gcttgtcccg gattcactag cctggigaac ttgtggttct ctgatgtttt gtccgttttt	4560
gttgtgattt agtctcaaat ttcccagcct ggtttgaaaa tetgggctcc cagccttcaa	4620
taaggaggac tacagatatg tacgactgag ccttgattcc agcctcatgt ttatacgtct	4680
gtgetcaget cccgaaggt tccagtttga aactcaataa tccaggggtc agaaagtctt	4740
gatcttatcc ccacagtatg gcaccaagcc tggetgagcc ttctgactta gtctgccttg	4800
ttgtatttta agcacttttc ttacttaggc taaaaataaa aggagcttcc tcctttgcca	4860
tggecgctgtg catgatagga aaaggtagct atctactagc atattaactc cactgttttt	4920
gctttgtgtg tttggttttt gaggaagggt ctcaactgtg tatcc	4965

<210> 5

<211> 4992

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 含酶切位点的谷氨酰胺合成酶基因(GS)表达单元

<400> 5

aagettatgc ggccgcgata tctttggcag ccaagctaga tccagctttt tgcaaaagcc	60
taggectcca aaaaagcctc ctcaactact ctggaatagc tcagaggccg aggcggcctc	120
ggcctctgea taaataaaaa aaattagtca gccatggggc ggagaatggg cggaactggg	180
cggagttagg ggcgggatgg gcggagttag gggcgggact atggttgctg actaattgag	240
atgcattgct tgcatacttc tgctgtctgg ggagcctggg gactttccac acctggttgc	300
tgactaattg agatgcattg ttgcatact tctgctgtct ggggagcctg gggactttcc	360
acacctaac tgacacacat tccacagcca agctagcttg aattaattcc cgagcccttc	420
caatacaaaa actaattaga ctttgagtga tcttgagcct ttctagttt ttgtattgga	480
agggctcgtc gccagtctca ttgagaagge atgtgcggac gatggcttct gtcactgcaa	540
aggggtcaca attggcagag gggcggcggt cttcaaagta acctttcttc tcctggccga	600
gccgagaatg ggagtagage cgactgcttg attcccacac caatctctc gccgtctca	660
cttcgctctg ttctegtggc tcgtggccct gtccaccccg tccatcatcc cggcggccac	720
cgtcagagc accttccacc atggccacct cagcaagttc ccacttgaac aaaaacatca	780
agcaaatgta cttgtgcttg ccccagggtg agaaagteca agccatgtat atctgggttg	840
atggtactgg agaaggactg cgctgcaaaa cccgcacctt ggactgtgag cccaagtgtg	900

[0008]

tagaagagtt	acctgagtgg	aattttgatg	gctctagtag	ctttcagtct	gagggetcca	960
acagtacat	gtatctcagc	ctgtttgcca	tgtttcggga	ccccttcgcg	agagatccca	1020
acaagctggt	gttctgtgaa	gttttcaagt	acaaccggaa	gcctgcagag	accaatttaa	1080
ggcactcgtg	taaacggata	atggacatgg	tgagcaacca	gcacccctgg	tttggaatgg	1140
aacaggagta	tactctgatg	ggaacagatg	ggcacccctt	tggttggect	tccaatggct	1200
ttcctgggce	ccaaggtccg	tattactgtg	gtgtgggggc	agacaaagcc	tatggcaggg	1260
atategtgga	ggetcactac	cgcgcctgct	tgtatgctgg	ggccaagatt	acaggaacaa	1320
atgetgaggt	catgcctgcc	cagtgggagt	tccaaatagg	accctgtgaa	ggaatccgca	1380
tgggagatca	tctctgggtg	gcccgtttca	tcttgcatcg	agtatgtgaa	gactttgggg	1440
taatagcaac	ctttgacccc	aagcccattc	ctgggaactg	gaatgggtga	ggctgccata	1500
ccaactttag	caccaaggcc	atgcgggagg	agaatgtctc	gaagtaagta	gcttcctctg	1560
gagccatctt	tattctcatg	gggtggaagg	gctttgtgtt	agggttggga	aagtgggact	1620
tctcacaac	tacatgccat	gctcttcgtg	tttgtcataa	gcctatcggt	ttgtaccctg	1680
tggagaagtg	acagtaactc	aggaatagaa	ttacagctgt	gatatgggaa	agttgtcacg	1740
taggttcaag	catttaaagg	tctttagtaa	gaactaaata	cacatacaag	caagtgggtg	1800
acttaattct	tactgatggg	aagaggccag	tgatgggggt	cttcccatcc	aaaagataat	1860
tggtattaca	tgttagaggc	tggtctgaag	cacttgagac	ataggteaca	aggcagacac	1920
agcctgcac	aagtatttat	tggtttctta	tggaactcat	gcctgtcctc	gcccttgaag	1980
gacaggtttc	tagtgacaag	gtcagaccct	caectttact	gcttcacca	ggcacatcga	2040
ggaggccatc	gagaaactaa	gcaagcggca	ccggtaccac	attcgagcct	acgatcccaa	2100
ggggggcctg	gacaatgccc	gtcgtctgac	tgggttccac	gaaacgtcca	acatcaacga	2160
cttttctgct	gggtgcgcca	atcgcagtgc	cagcatccgc	attccccgga	ctgtcggcca	2220
ggagaagaaa	ggttactttg	aagaccgcgc	cccctctgcc	aattgtgacc	cttttgacgt	2280
gacagaagcc	atcgtecgca	catgccttct	caatgagaact	ggcgacgagc	cttccaata	2340
caaaaactaa	ttagactttg	agtgatcttg	agcctttcct	agttcatecc	accccgcccc	2400
agctgtctca	ttgtaactca	aaggatggaa	tatcaaggtc	tttttattec	tcgtgcccgag	2460
ttaatcttgc	ttttattggt	cagaatagag	gagtcaagtt	cttaatccct	atacacccaa	2520
ccctcatttc	ttttctatct	agctttctag	tgggggtggg	aggggtaggg	ggaagggaac	2580
gtaaccactg	cttcactctca	tcaggaatgc	atgtccagta	ggcagagctg	ccacagagtg	2640
gggtgtattg	tggaggagga	ctttttcttc	aggacagtta	aaagagcagg	tccactgctt	2700
ggattgacaa	tccccctata	ggtagagagc	tgctagtctc	tcaggtaaaa	ccaactttct	2760
attccaaatg	gaagtttaggt	gaggagtagt	gggaggagtt	catgccctcc	atgaagacag	2820
ctcagtgtat	cacctgacag	atgggttagcc	ctaactgtaaa	agaaggaaaa	gttatctctg	2880

[0009]

ggctctccat	ttataacaca	aagcagagta	gtatitttat	atttaaagt	aaaaacaaaa	2940
gttatatata	tggatatgtg	gatatatgtg	tatttctaata	tgaggaaacc	atcctagtta	3000
ctgggtttgc	caagtttgaa	gagcttgggt	aacaagaaag	gacictttga	gtagagggtg	3060
gggtgcagta	ccaggaaagg	tggttatctg	gggtcagcg	ctttattact	atgtgggggt	3120
teccctgcca	ctctgcagga	gcagatgctg	gacaggtagc	agggtgggac	accagtgcct	3180
gccaccacct	gtccctgtgc	ttaggetaag	atgcatatgt	atccacacag	agttagcagg	3240
atggagttgg	ctggccaact	tgaacattgt	tactgatagg	gggtgggtgg	gtttatittt	3300
tggtgggact	agcatgtcac	taaagcaggc	cttttgatat	attaaatttt	ttaaagcaaa	3360
acaagttcag	cttttaataca	actttgtagg	gtttctaact	ttacagaatt	gcctgtttgt	3420
ttcagtgtct	ccatccactt	tgctcttga	ggaacggagg	acaggcagac	ctggagttaa	3480
aacatttgte	attttgtgte	atagtgtcta	ctttctccca	gcagaatatt	ctttctcttc	3540
ttaggagtc	tatggagttt	tgttttgtt	ttttttctat	tacgataaac	ataccccacc	3600
tccattctgg	cttgcctgc	tgctctctgg	ttgtttgtgt	gctgtccgca	gcaggetgcc	3660
tgtggttttc	tcttgccatg	acgacttcta	attgccatgt	acagtatgtt	cagttagata	3720
actectcatt	gtaaacagac	tgtaactgce	agagcagcgc	ttataaatca	acctaacatt	3780
tataagattt	cctcttgact	tgttctttg	tggttggggg	aggaagaaaa	aaaaaagcgt	3840
gcagtatttt	ttgttccctt	catttccctat	caaaagaaag	gggagtgggt	ctgttttgtt	3900
tactcgcaaa	ataagctagc	ttatctattg	gcttttcttt	tttttttttt	ttttaaacgg	3960
gctttttctt	gtacctataa	tttggggtaa	ggtgtgagag	tttttatagt	tttttgagac	4020
agggtcttgg	tgtataccct	tggtctggct	ggagctaact	atgtagactg	ggctagcctt	4080
taacttgcag	ttctgctttc	aattaggggt	tatacattta	gtcttggeaa	ttcctagttc	4140
cacgtttaat	ctctttacat	ttcaaagcag	tgttatctga	agagttcagg	cgcagagtca	4200
attcaataga	gttacacaaa	aacctaaaaa	acaagtttta	aataccaagt	tatgttgccc	4260
tggccacttt	tcacagctgt	ccacaactca	atgtgacaag	gtacaaaatt	ggatatacta	4320
gaatttctctg	gtgatttgga	acctctgctt	catttcccg	aaccagggt	tttggtgaca	4380
gtcctagctt	atcagattat	ttaaaacagt	tactcttctt	gcccttcttc	ctgagacctt	4440
tgteacagctg	ccatgagcca	tctacacagt	acttgcttcc	ctgttgaagt	cactgaaggc	4500
acatcagccc	aagacataaa	ggcttgtccc	ggattcacta	gcctggtgaa	cttgtgttcc	4560
tctgatgttt	tgtcctgttt	tgttgtgatt	tagtctcaaa	tttcccagcc	tggtttgaaa	4620
atctgggctc	ccagccttca	ataaggagga	ctacagatat	gtacgactga	gccttgattc	4680
cagcctcatg	tttataegtc	tgtgctcagc	tccctgaagg	ttccagtttg	aaactcaata	4740
atccaggggt	cagaaagtct	tgatcttate	cccacagtat	ggcaccaagc	ctggetgagc	4800
cttctgactt	agctctgcct	gttgetattt	aagcactttt	cttcaactagg	ctaaaaataa	4860

[0010]

aaggagcttc ctectttgcc atggcgetgt gcatgatagg aaaaggtagc tatctactag 4920
catattaact ccactgtttt tgettttgtt gtttggtttt tgaggaaggg tetcaactgt 4980
gtatccctcg ag 4992

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 6

aatccgctcg agagatctta tgttacttgg cagaggcc 38

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 7

taaggaagat ctctcgagcc cgggagtcga ctatacagac 40

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 8

aatccgctcg agtatgttac ttggcagagg ccgc 34

<210> 9

<211> 34

[0011]

<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	
<400>	9	
taaggaagat cttaagatac attgatgagt ttgg		34
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	
<400>	10	
aacccttcca atacaagaac		20
<210>	11	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	
<400>	11	
gtgtacacct gtggttc		17
<210>	12	
<211>	65	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	
<400>	12	
cgacctgeg gacttcctcc ccaagctagc ttgaattaat tcccgagccc ttccaataca		60

[0012]

aaaac	65
<210> 13	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 13	
gatcgtaggc tgaatgtgg taccggtgcc gcttgettag	40
<210> 14	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 14	
cccgggtcgc agggatacac agttgagacc ctctctcaaa aaccaaacac	50
<210> 15	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 15	
ctaagcaagc ggcaccggta ccacattcga gctacgatc	40
<210> 16	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial	

[0013]

<220>

<223> 引物

<400> 16

atctggcggc cgcgatatcc ccggaagaaa tatatttgca tgt 43

<210> 17

<211> 2033

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SV40L 和 GS 前段序列

<400> 17

ctttggcagc caagctagat ccagcttttt gcaaaagcct aggcctccaa aaaagcctcc 60
 tcaetacttc tggaatagct cagaggccga ggcggcctcg gcctctgcat aaataaaaaa 120
 aattagtcag ccatggggcg gagaatgggc ggaactgggc ggagttaggg gcgggatggg 180
 cggagttagg ggcgggacta tggttgctga ctaattgaga tgcattgttt gcatacttct 240
 gcctgtctgg gagectgggg actttccaca cctggttgct gactaattga gatgcattgt 300
 ttgcatactt ctgcctgctg gggagcctgg ggactttcca caccaagcta gcttgaatta 360
 attcecgagc cettccaata caaaaactaa ttagactttg agtgatcttg agcctttcct 420
 agtttttgta ttggaagggc tcgtcgccag tctcattgag aaggcatgtg cggacgatgg 480
 cttctgtcac tgcaaagggg tcacaattgg cagagggcg gcggtcttca aagtaacctt 540
 tcttctcttg gccgagccga gaatgggagt agagccgact gcttgattcc cacaccaatc 600
 tcttcgccgc tctacttgc cctcgttctc gtggetcgtg gccctgtcca ccccgccat 660
 cateccgcgc gccaccgctc agagcacctt ccaccatggc caccctagca agttcccact 720
 tgaacaaaaa catcaagcaa atgtacttgt gcctgcccc aagtgagaaa gtccaagcca 780
 tgtatatctg ggttgatggt actggagaag gactgcgtg caaaacecgc accctggact 840
 gtgagcccaa gtgtgtagaa gagttacctg agtggatttt tgatggetct agtacctttc 900
 agtctgaggg ctccaacagt gacatgtatc tcagccctgt tgccatgttt cgggaccctc 960
 tccgcagaga tcccaacaag ctggtgttct gtgaagtttt caagtacaac cggaagcctg 1020
 cagagaccaa tttaaggcac tcgtgtaaac ggataatgga catggtgagc aaccagcacc 1080
 cctggtttgg aatggaacag gagtatactc tgatgggaac agatgggcac ctttttggtt 1140
 ggctttccaa tggttttctt gggecccaag gtccttatta ctgtggtgtg ggccagaca 1200
 aagcctatgg cagggatata gtggaggctc actaccgcgc ctgcttgtat gctgggggtca 1260

[0014]

```

agattacagg aacaaatgct gaggtcatgc ctgcccagtg ggagttccaa ataggaccct 1320
gtgaaggaat cgcgatggga gatcatctct gggtggeceg ttcatcttg catcgagtat 1380
gtgaagactt tgggtaata gcaacctttg accecaagcc cattcctggg aactggaatg 1440
gtgcaggetg ccataccaac tttagcacca aggccatgag ggaggagaat ggtctgaagt 1500
aagtagcttc ctctggagcc atctttatct tcatgggggtg gaagggttt gtgttaggt 1560
tgggaaagt ggacttctca caaactacat gccatgctct tcgtgtttgt cataagccta 1620
tcgttttgta cccgttgag aagtacagt actctaggaa tagaattaca gctgtgatat 1680
gggaaagtgc tcacgtaggt tcaagcattt aaagggttt agtaagaact aaatacacat 1740
acaagcaagt ggggtgactta attcttactg atgggaagag gccagtgatg ggggtcttcc 1800
catccaaaag ataattggtt ttacatgttg aggactggtc tgaagcaatt gagacatagg 1860
tcacaaggca gacacagcct gcatcaagta tttattggtt tcttatggaa ctcatgcctg 1920
ctcctgccct tgaaggacag gttcttagtg acaaggtag accctcacct ttactgettc 1980
caccaggcac atcgaggagg ccatcgagaa actaagcaag cggcaccggt acc 2033

```

<210> 18

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 18

```

attaattcaa gctagcttgg ggaggaagtc cgcagggtcg ctcgg 45

```

<210> 19

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 19

```

ttatgcggcc gcgatatctt tggcagccaa gctagatcc 39

```

<210> 20

[0015]

<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	
<400>	20	
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc		30
<210>	21	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	
<400>	21	
tgacagatta cctgttate cctattacca atgettaate agtgagge		48
<210>	22	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	
<400>	22	
tgghtaatagg gataacaggg taatctgtca gaccaagttt actcatatat ac		52
<210>	23	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	引物	
<400>	23	
[0016]		
ccgcataagc ttggegtaat catggtc		27

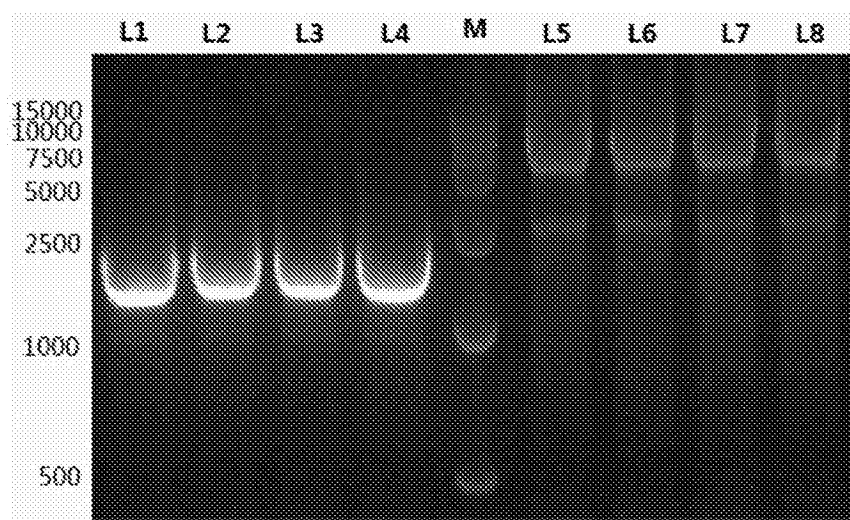


图 1

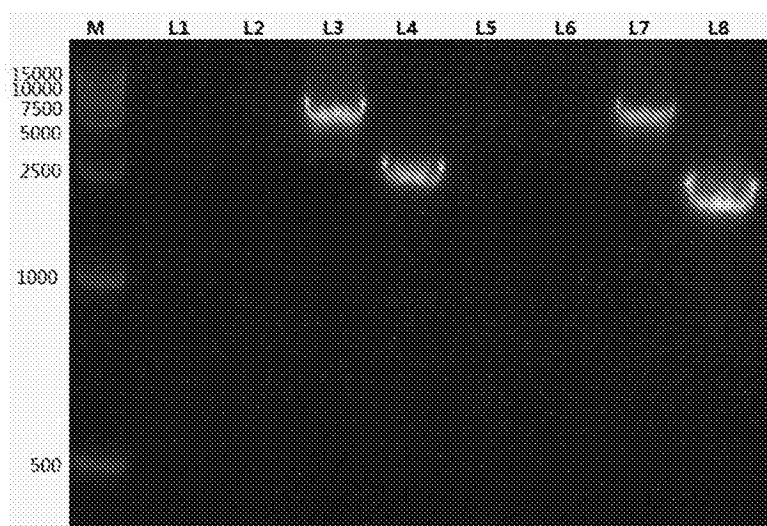


图 2

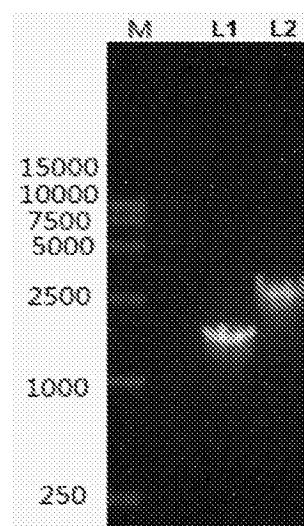


图 3

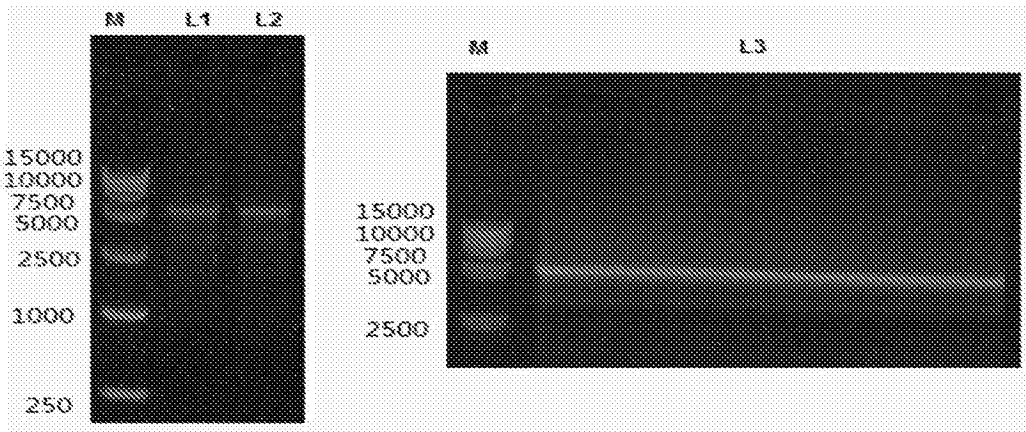


图 4

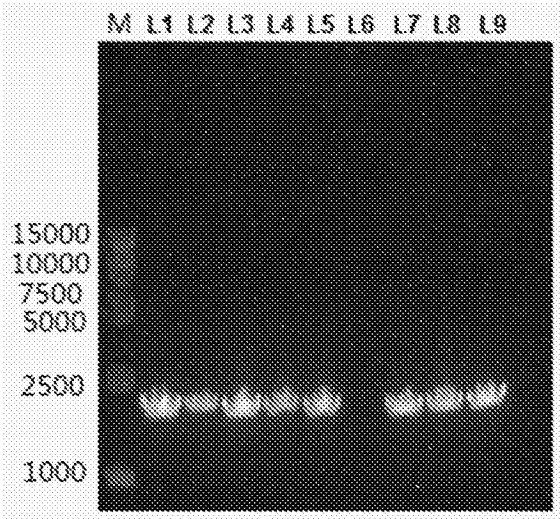


图 5

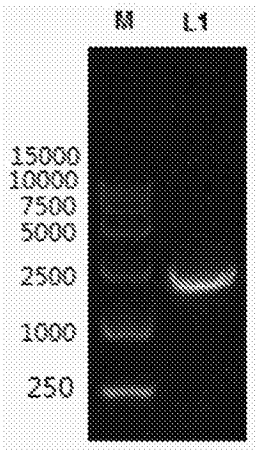


图 6

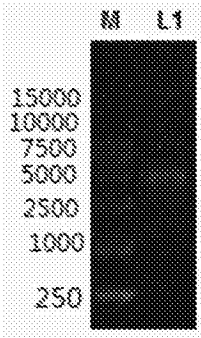


图 7

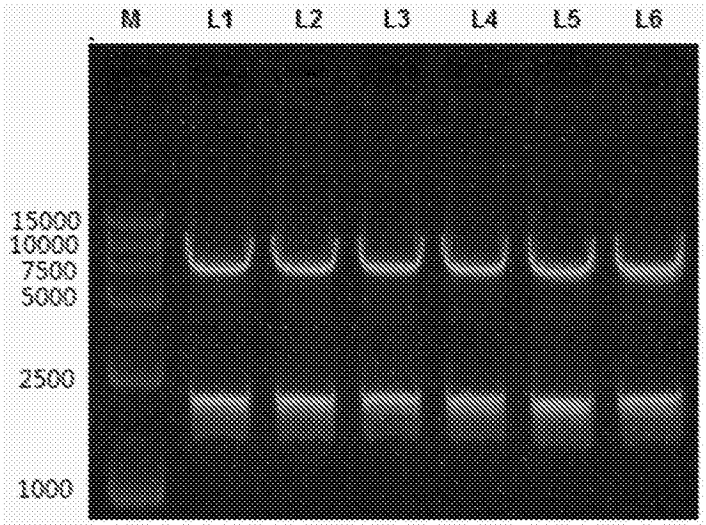


图 8

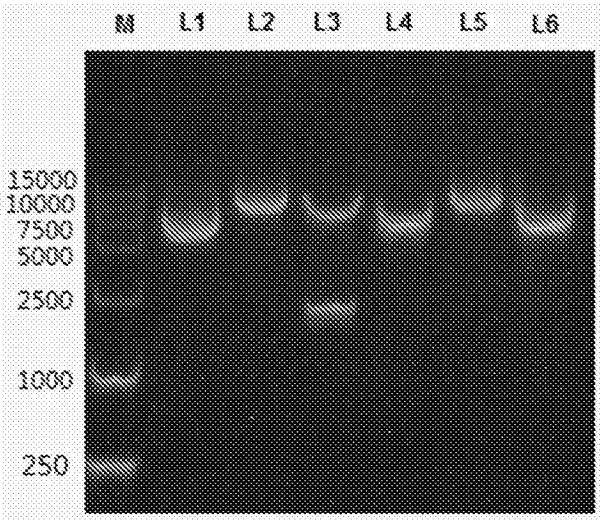


图 9

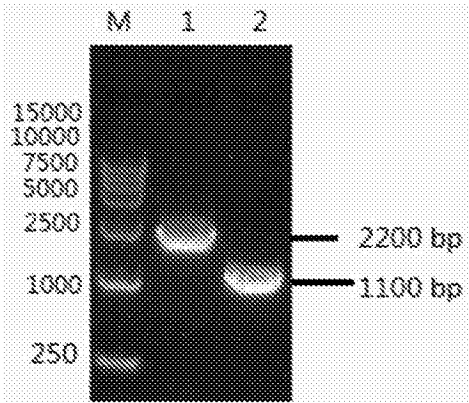


图 10

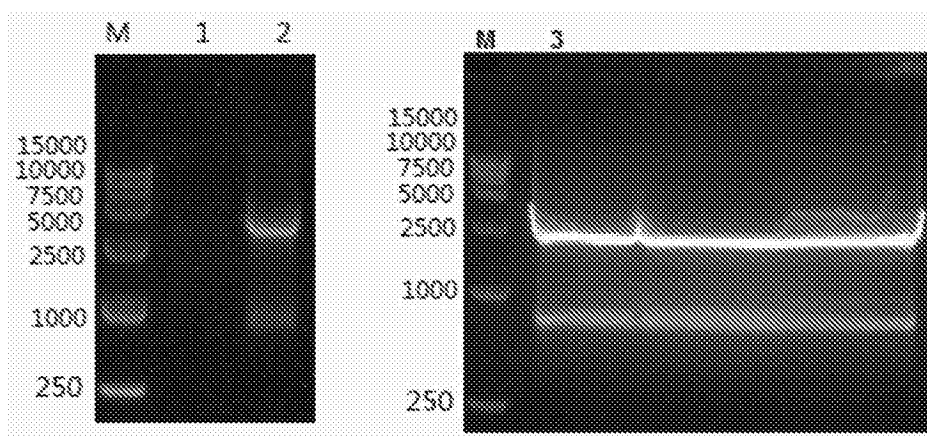


图 11

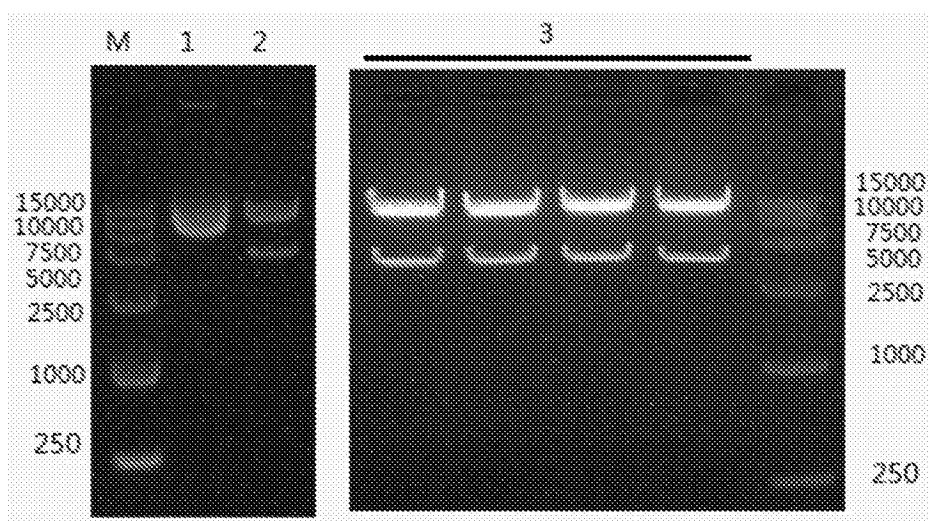


图 12

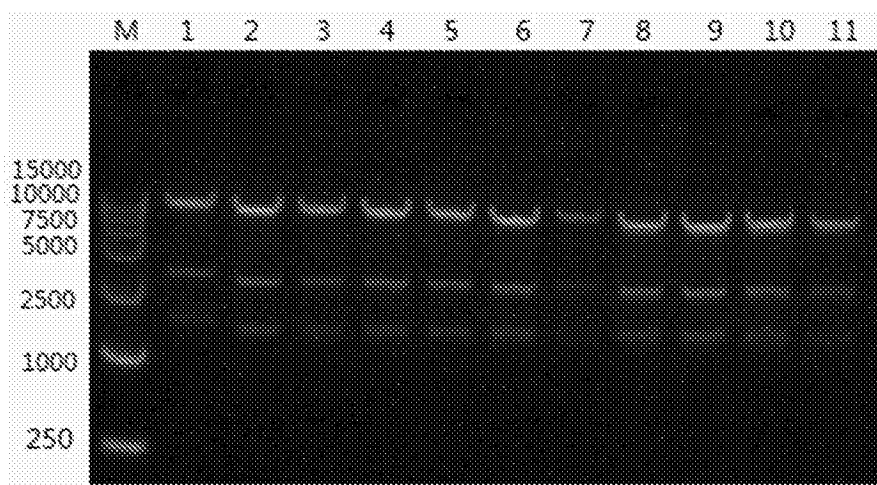


图 13

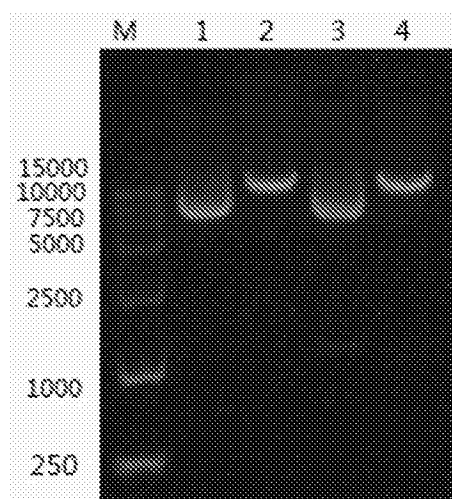


图 14

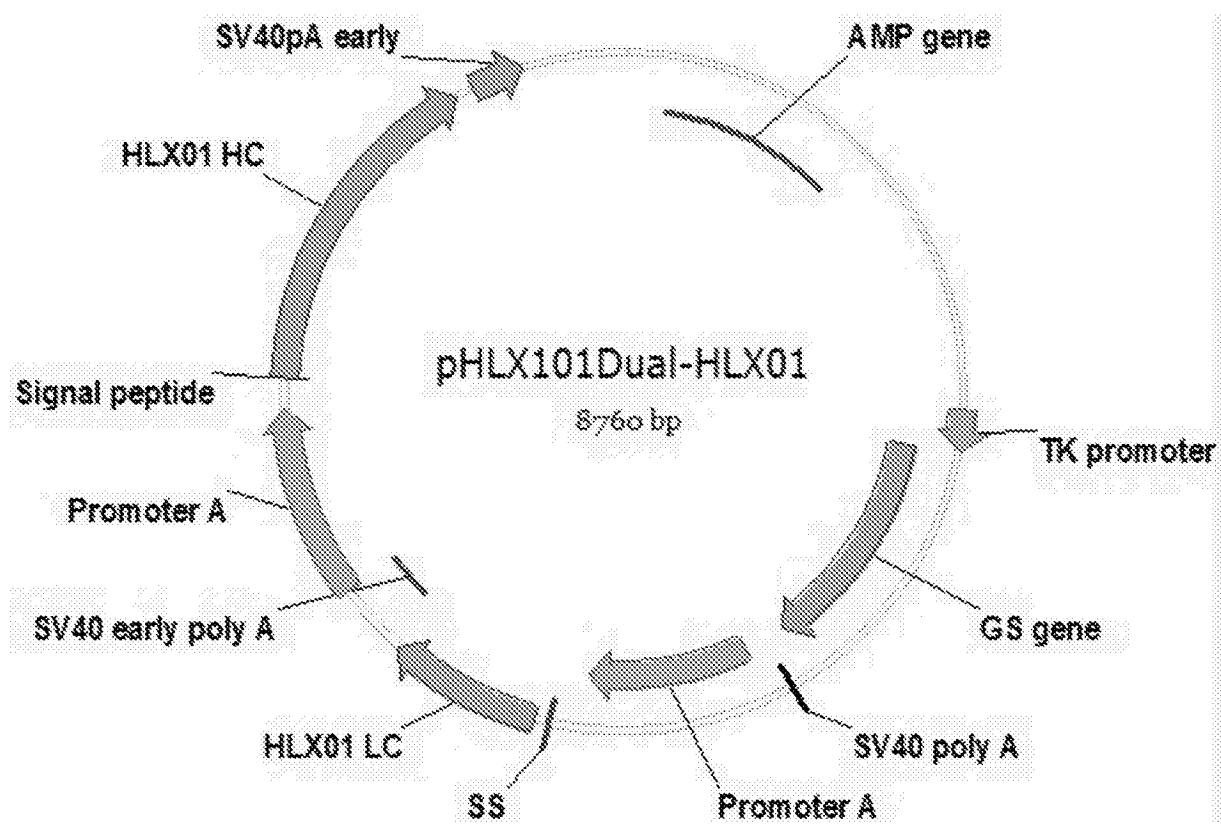


图 15

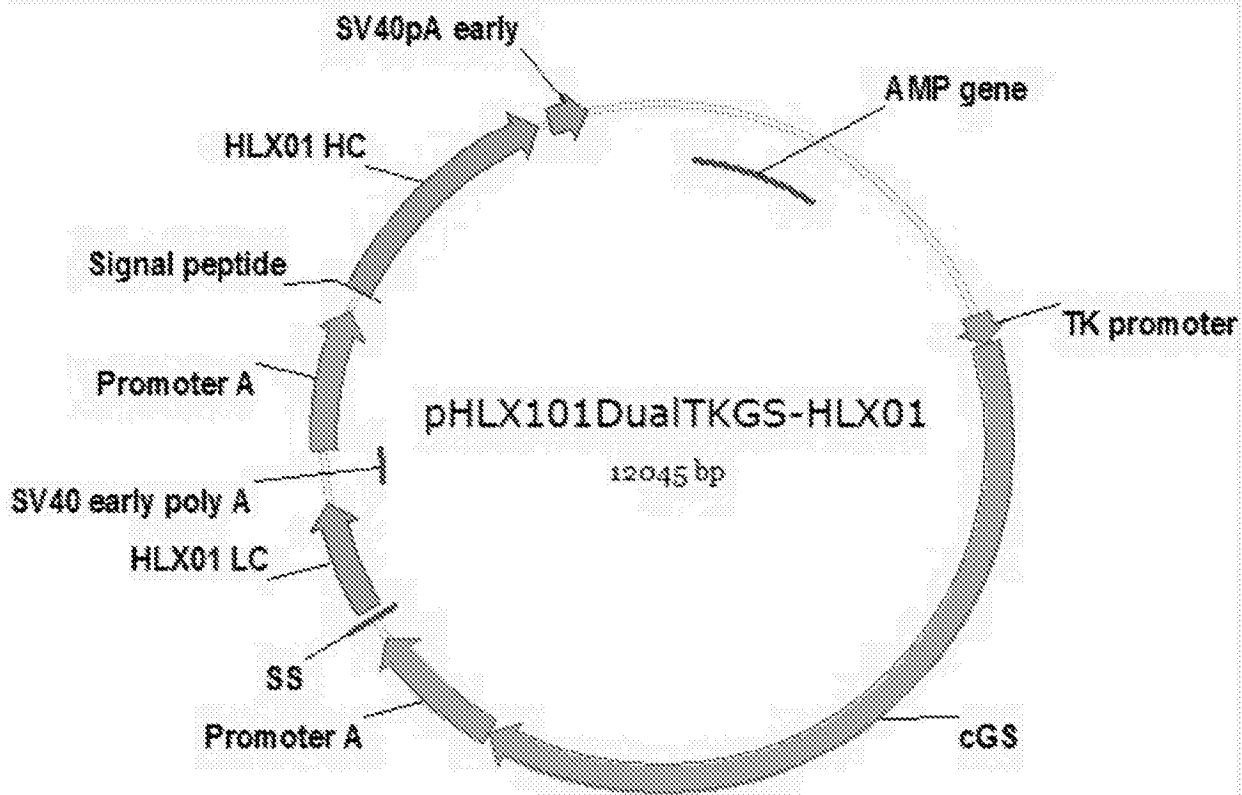


图 16

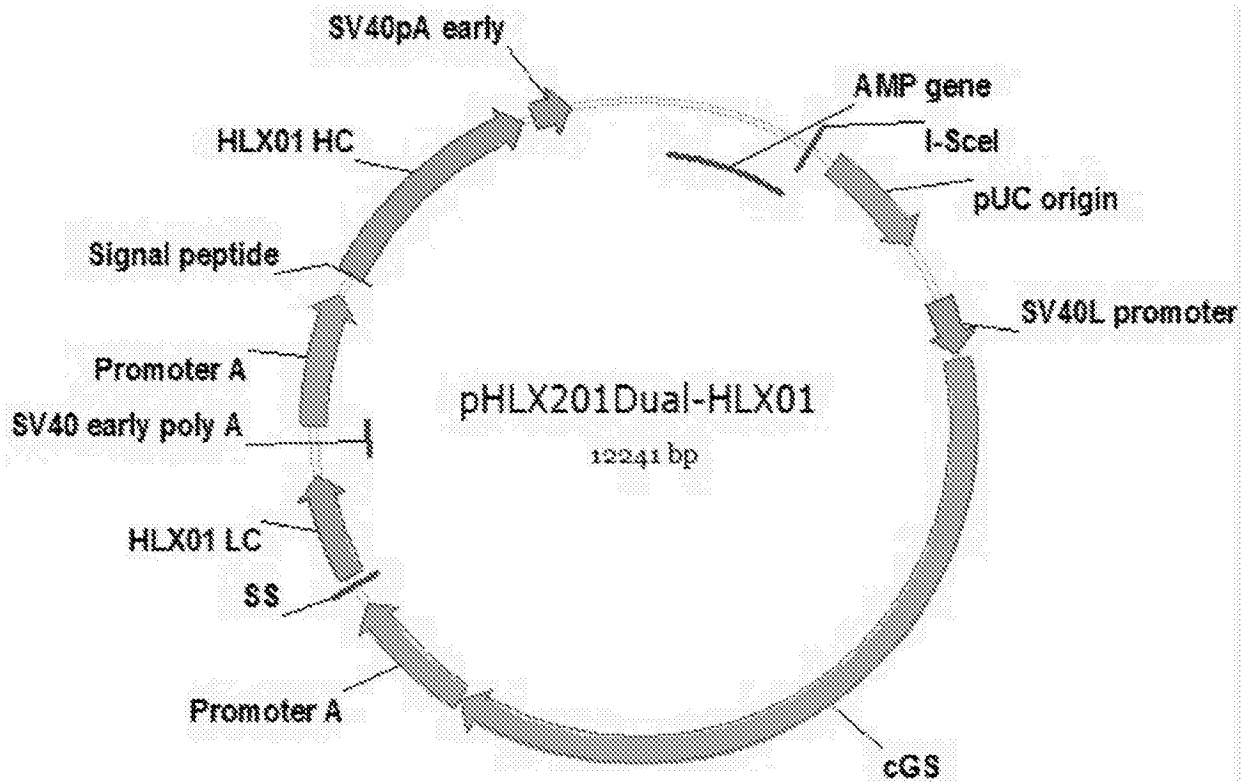


图 17

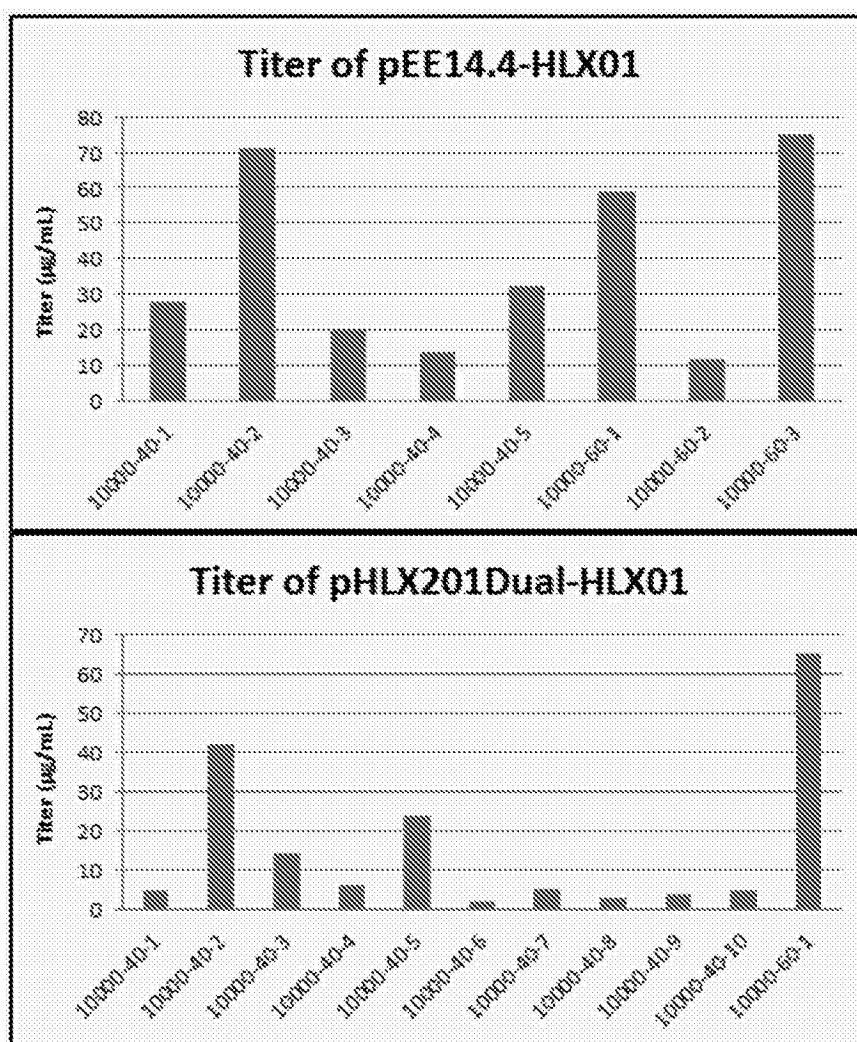


图 18

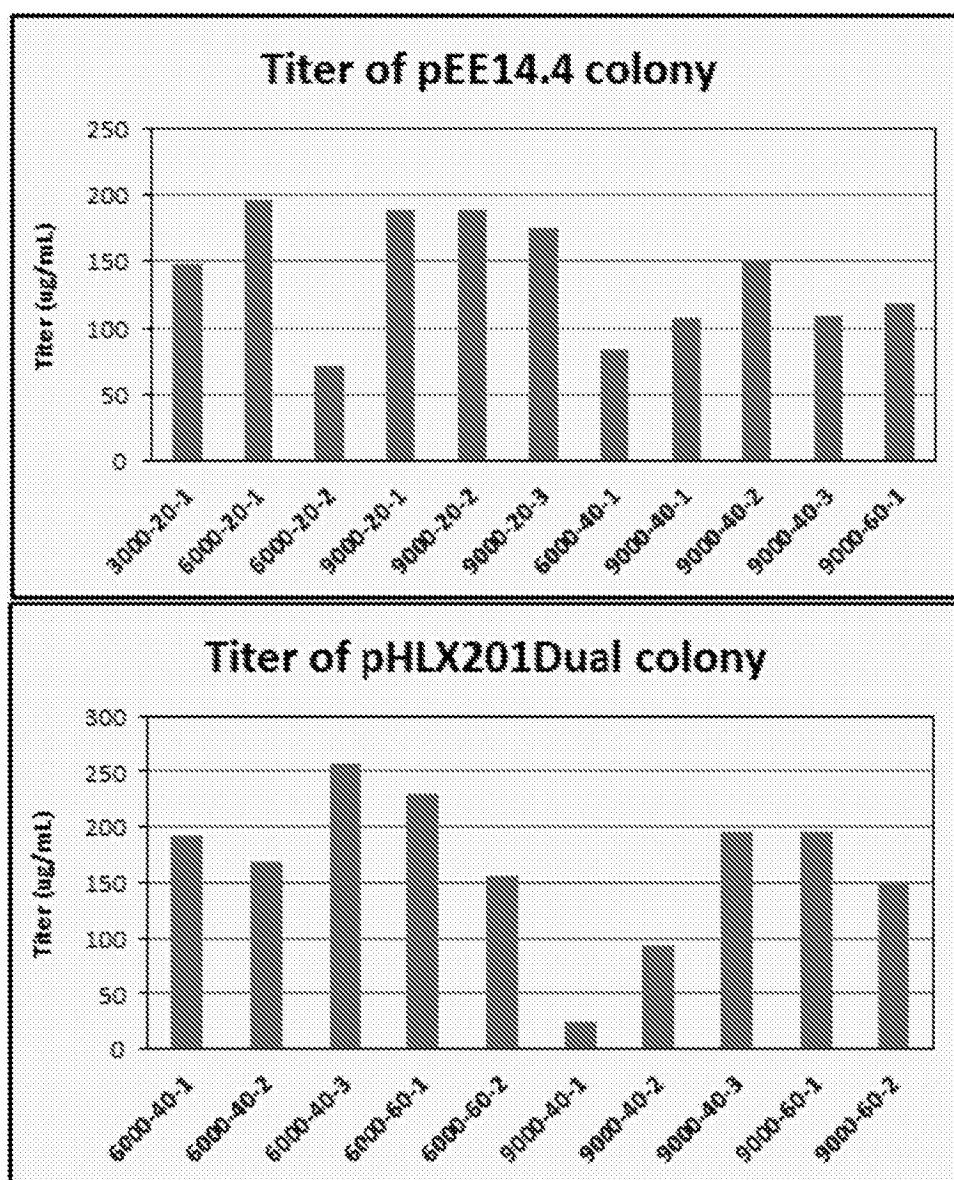


图 19