

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02804774.5

[51] Int. Cl.

C12N 9/58 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/80 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 10 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 100549169C

[22] 申请日 2002.2.5 [21] 申请号 02804774.5

[30] 优先权

[32] 2001. 2. 9 [33] DE [31] 10105911.6

[86] 国际申请 PCT/EP2002/001144 2002.2.5

[87] 国际公布 WO2002/064760 德 2002.8.22

[85] 进入国家阶段日期 2003.8.8

[73] 专利权人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 R·米勒 J·-P·塔尔霍菲

F·盖佩尔 S·格拉泽尔

W·赫尔克 H·舍恩

T·柯施鲍姆

[56] 参考文献

WO8807581A 1988.10.6

Cloning and expression of the gene encoding a novel proteinase from *Tritirachium album limber.* . SAMAL B 等. ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, Vol. 379 . 1996

Purification and characterization of a soybean root nodule phosphatase expressed in *Pichia pastoris.* . PENHEITER ALAN 等. Protein expression and purification, Vol. 14 No. 1. 1998

审查员 吴汀晨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠 孟凡宏

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 2 页

[54] 发明名称

酵母中来自 *Tritirachium album* 的重组蛋白酶 K 的表达

[57] 摘要

本发明涉及在酵母中例如在巴斯德毕赤氏酵母中表达编码可溶性蛋白酶 K 的基因并接着分泌到培养基中的方法。 本发明另外描述了异源表达和分泌的蛋白酶 K 的纯化方法。

1. 制备重组蛋白酶 K 的方法，包括步骤：

a) 用包含编码蛋白酶 K 的酶原母体的 DNA 的载体转化宿主细胞，其中所述编码序列的 DNA 在读框中与编码信号肽的序列向上游融合并且处于该宿主细胞的合适的启动子的调控之下，

b) 蛋白酶 K 的酶原母体的表达，

c) 蛋白酶 K 的分泌和自动催化激活，

其特征在于编码酶原母体的 DNA 是用于在酵母中表达的密码子优化核酸序列，信号肽是来自啤酒糖酵母的 α -因子的信号肽或者前蛋白酶 K 的天然信号肽，启动子是甲醇可诱导的来自巴斯德毕赤氏酵母的醇氧化酶 1 的启动子 (AOX-1 启动子)，宿主细胞是酵母细胞，由表达宿主分泌可溶形式的酶原母体，并且在培养基中自动催化激活形成活性蛋白酶 K。

2. 根据权利要求 1 要求的方法，其特征不在于编码酶原母体的 DNA 编码 SEQ ID NO: 1。

3. 根据权利要求 2 要求的方法，其特征不在于编码酶原母体的 DNA 是 SEQ ID NO: 2。

4. 根据权利要求 3 要求的方法，其特征不在于载体含有 SEQ ID NO: 21 的 DNA 序列。

5. 根据权利要求 1 要求的方法，其特征不在于表达宿主在将蛋白酶 K 以可溶和活性形式分泌到培养基中时继续生长。

6. 根据权利要求 1 要求的方法，其中所述宿主细胞选自：毕赤氏酵母属，汉逊氏酵母属，糖酵母属，裂殖糖酵母属，Yarrowia 属和克鲁维氏酵母属。

7. 根据权利要求 1 至 6 之一要求的方法，其中所述宿主细胞是巴斯德毕赤氏酵母。

8. 根据权利要求 7 要求的方法，其中编码蛋白酶 K 的酶原母体的基因克隆到下面的载体之一中：pPICZ，pPICZ α ，pGAPZ，pGAPZ α ，pPICZ α A 和 pPIC9K。

9. 根据权利要求 7 要求的方法，其中用下面的载体之一转化所述宿主细胞：如附图 1 中的 pPICPK-1 和如附图 2 中的 pPICPK-2。

10. 根据权利要求 1 至 6 之一要求的方法，其中甲醇诱导蛋白酶 K

的酶原母体的表达。

11. 根据权利要求 1 至 6 之一要求的方法, 其中来自啤酒糖酵母的 α -因子的信号肽的 N-末端融合引发蛋白质的分泌。

12. 根据权利要求 1 至 6 之一要求的方法, 其中用包含编码蛋白酶 K 的酶原母体的 DNA 的表达载体 pPICZ α A 转化宿主细胞巴斯德毕赤氏酵母并且该基因处于 AOX1 启动子的控制下。

13. 包含编码蛋白酶 K 的酶原母体的 DNA 的载体, 其中编码序列的这种 DNA 在读框中与编码合适的信号肽的序列向上游融合, 并且该编码基因处于对于该宿主细胞合适的启动子的控制之下, 并且该载体适合酵母的转化, 并且由此编码酶原母体的 DNA 是用于在酵母中表达的密码子优化核酸序列, 信号肽是来自啤酒糖酵母的 α -因子的信号肽或者前蛋白酶 K 的天然信号肽, 启动子是甲醇可诱导的来自巴斯德毕赤氏酵母的醇氧化酶 1 的启动子 (AOX-1 启动子)。

14. 权利要求 13 要求的载体, 特征在于其适合于巴斯德毕赤氏酵母的转化。

15. 权利要求 13 或 14 要求的载体, 其中所述载体是 pPICZ α A。

16. 权利要求 13 或 14 要求的载体, 其中所述包含编码蛋白酶 K 的酶原母体的 DNA 的载体是如附图 1 中的 pPICPK-1 或如附图 2 中的 pPICPK-2。

17. 用权利要求 13 或 14 要求的载体转化的宿主细胞, 其中所述宿主是酵母。

18. 权利要求 17 要求的宿主细胞, 其中所述宿主细胞选自: 毕赤氏酵母属, 汉逊氏酵母属, 糖酵母属, 裂殖糖酵母属, Yarrowia 属和克鲁维氏酵母属。

19. 权利要求 17 要求的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是巴斯德毕赤氏酵母。

酵母中来自 *Tritirachium album* 的重组蛋白酶 K 的表达

本发明涉及以经济适当量制备可溶且活性形式的重组蛋白酶 K 的方法。

蛋白酶 K (E. C. 3.4.21.64, 也已知为内肽酶 K) 是真菌 *Tritirachium album* Limber 合成的胞外内肽酶。它是具有典型催化三元组 Asp³⁹-His⁶⁹-Ser²²⁴ 的丝氨酸蛋白酶类中的一员 (Jany, K. D. 等, (1986) FEBS Letters Vol. 199(2), 139-144)。因为其长度为 279 个氨基酸的多肽链的序列 (Gunkel, F. A. 和 Gassen, H. G. (1989), 欧洲生物化学杂志 (Eur. J. Biochem.) Vol. 179(1), 185-194) 和三维结构 (Betzel, C. 等 (1988), Eur. J. Biochem. Vol. 178(1), 155-71) 与细菌枯草杆菌蛋白酶具有高度同源性, 因此将蛋白酶 K 分类为枯草杆菌蛋白酶家族 (Pahler, A. 等 (1984) EMBO J. Vol. 3(6), 1311-1314; Jany, K. D. 和 Mayer, B. (1985). Biol. Chem. Hoppe-Seyler, Vol. 366(5), 485-492)。以其水解天然角蛋白的能力为基础对蛋白酶 K 命名, 而真菌在角蛋白上生长使角蛋白作为唯一碳源和氮源 (Ebeling, W. 等 (1974) 欧洲生物化学杂志 (Eur. J. Biochem.) Vol. 47(1), 91-97)。蛋白酶 K 具有高于 30 U/mg 的特异活性, 是已知的内肽酶中最有活性的之一 (Betzel, C. 等 (1986) /FEBS Lett. Vol. 197(1-2), 105-110), 并且非特异性水解天然的和变性的蛋白质。

来自 *Tritirachium album* Limber 的蛋白酶 K 在其天然宿主中翻译成前蛋白酶原。1989 年 Gunkel, F. A. 和 Gassen, H. G. (1989) Eur. J. Biochem. Vol. 179(1), 185-194 解码了编码蛋白酶 K 的基因的 cDNA 的序列。据此前蛋白酶 K 原基因由两个外显子组成, 并且编码 15 个氨基酸长度的信号序列, 90 个氨基酸长度的序列原和 279 个氨基酸长度的成熟蛋白酶 K。63 bp 内含子位于序列原区。前肽在易位过程中裂解为内质网 (ER)。迄今, 有关用肽原裂解形成成熟蛋白酶 K 的后加工还知之甚少。

结果成熟蛋白酶 K 由 279 个氨基酸组成。两个二硫桥和两个键合的钙离子使得紧密结构稳定。这解释了为什么与其他枯草杆菌蛋白酶

相比蛋白酶 K 对极端 pH 值, 高温, 离液剂和去污剂具有高得多的稳定性(Dolashka, P. 等(1992) Int. J. Pept. Protein. Res. Vol. 40(5), 465-471)。蛋白酶 K 特征在于高热稳定性(达 65℃, Bajorath 等(1988), Eur. J. Biochem. Vol. 176, 441-447)和宽 pH-范围(pH 7.5-12.0, Ebeling, W. 等(1974) Eur. J. Biochem. Vol. 47(1), 91-97)。在变性剂例如脲或 SDS 存在下其活性得以提高(Hilz, H. 等(1975) J. Biochem. Vol. 56(1), 103-108; Jany, K. D. 和 Mayer, B. (1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler, Vol. 366(5), 485-492)。

上述性质使得蛋白酶 K 在其中要求非特异性蛋白质降解的生物技术应用中特别令人感兴趣。特别例举的是从粗提取液中分离核酸(DNA 或 RNA)以及在 DNA 分析中预制备样品(Goldenberger, D. 等(1995) PCR Methods Appl. Vol. 4(6), 368-370; US 5,187,083; US 5,346,999)。其他应用是在蛋白质分析领域, 例如结构释析。

通过真菌 *Tritirachium album* Limber 发酵商业上大量获得蛋白酶 K (例如 CBS 348.55, Merck 菌株 No. 2429 或菌株 ATCC 22563)。但是在该过程中, 葡萄糖或游离氨基酸抑制蛋白酶 K 的产生。因为含有蛋白质的介质也诱导蛋白酶的表达, 所以需要使用蛋白质例如 BSA, 奶粉或大豆粉作为唯一氮源来源。一旦达到生长稳定期就开始分泌蛋白酶(Ebeling, W. 等 (1974) Eur. J. Biochem. Vol. 47(1), 91-97)。

所以因为 *Tritirachium album* Limber 不适合大规模发酵, 而且难以进行基因操作, 曾进行过在其他宿主细胞中过量表达重组蛋白酶 K 的尝试。但是, 由于没有表达, 发生失活“包涵体”或者与复性有关的问题, 在这些实验中没有检测到显著活性(Gunkel, F. A. 和 Gassen, H. G. (1989) Eur. J. Biochem. Vol. 179(1), 185-194; Samal, B. B. 等(1996) Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 379, 95-104)。

Tritirachium album Limber 是缓慢生长着的真菌, 其只向培养基中分泌少量蛋白酶。缺点是与酵母相比更短的细胞周期和在发酵罐中能实现的更低的光密度。另外, 已知 *T. album* 除了蛋白酶 K 之外还产生污染制备的其他蛋白酶(Samal, B. B. 等 (1991). Enzyme Microb. Technol. Vol. 13, 66-70)。

虽然原理上能在大肠杆菌中表达蛋白酶 K, 其不以可溶形式表达

而是以所谓“包涵体”表达，其中酶接着用一定方法溶解并且复性。该方法的缺点是在溶解和复性过程中损失很多蛋白质。

因此本发明的目的是提供以经济适当量制备重组蛋白酶 K 的方法。

令人惊奇地发现有可能在酵母中表达和分泌作为可溶形式的酶原母体 (zymogene Vorstufe) 的重组蛋白酶 K，其中自动催化激活形成活性蛋白酶 K。本发明的另一个主题是从培养基上清液纯化活性蛋白酶 K。

因此本发明涉及制备重组蛋白酶 K 的方法，包括步骤：

a) 用包含编码蛋白酶 K 的酶原母体的 DNA 的载体转化宿主细胞，其中所述编码序列的 DNA 在读框中与编码信号肽的序列向上游 (stromaufwärts) 融合并且处于该宿主细胞的合适的启动子的调控之下，

b) 蛋白酶 K 的酶原母体的表达，

c) 蛋白酶 K 的分泌和自动催化激活，

d) 蛋白酶 K 的分离和纯化

其特征在于宿主细胞是酵母细胞，并且这种表达宿主分泌可溶形式的蛋白质。

在根据本发明方法的一个具体实施方案中，宿主细胞选自：毕赤氏酵母属 (*Pichia*) 的种，汉逊氏酵母属 (*Hansenula*) 的种，例如多形汉逊氏酵母 (*Hansenula polymorpha*)，糖酵母属 (*Saccharomyces*) 的种，裂殖糖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 的种，*Yarrowia* 属的种，例如 *Yarrowia lipolytica*，克鲁维氏酵母属 (*Kluyveromyces*) 的种和曲霉属 (*Aspergillus*) 的种。根据本发明特别优选的是巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 被用作宿主细胞。

此外还证明当用编码酶原母体的 DNA 转化宿主细胞并且在分泌到培养基期间或分泌到培养基中之后马上自动催化激活蛋白酶 K 时根据本发明的方法的优点。

当使用巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 作宿主细胞时，优选将编码蛋白酶 K 的酶原母体的基因克隆到下面的载体中：pPICZ，pPICZ α ，pGAPZ，pGAPZ α ，pPICZ α A 和 pPIC9K。在这种情况下，特别优选载体 pPICZ α A 和 pPIC9K。根据本发明，载体 pPICZ α A

是特别优选。上述载体可商业购得 (Invitrogen)。

此外,当用甲醇诱导蛋白酶 K 或蛋白酶 K 的酶原母体的表达 (pPIC 载体) 时, 优选根据本发明方法制备重组蛋白酶 K。另一种方法是甘油醛磷酸诱导表达 (pGAP 载体)。

在制备重组蛋白酶 K 的本发明方法中, 优选的是通过来自啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 α -因子的信号肽的 N-末端融合引发蛋白质分泌。这意味着例如上述 α -标记的载体具有用于来自啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 α -因子的信号肽的核苷酸序列。然后在翻译过程中产生得自 N-末端的信号肽和目标蛋白质的融合蛋白。另一种可能的信号肽会是蛋白酶 K 的天然信号序列。

此外对于制备重组蛋白酶 K 特别有利的是用包含编码酶原母体的 DNA 的表达载体 pPICZ α A 和 pPIC9K 转化宿主细胞巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 并且该基因受 AOX1 启动子的调控并且任选地有 AOX1 中止子。

本发明还涉及包含编码蛋白酶 K 的酶原母体的 DNA 的载体, 其中所述编码序列在读框中与编码合适的信号肽的序列向上游融合并且其中编码基因处于该宿主细胞的合适的启动子和任选的中止子的调控之下, 并且其中该载体适合这种宿主细胞的转化。根据本发明, 所述宿主细胞是酵母。

因此本发明还涉及包含上面定义的重组 DNA 的一个或多个拷贝的重组载体。所述载体优选是具有宿主细胞的强启动子和宿主细胞用于分泌蛋白质的合适信号肽的质粒。此外还可以使前蛋白酶 K 原的天然信号肽与如在 SEQ. ID. NO.: 21 (信号序列 1-15 (15 个氨基酸); 序列原 16-104 (90 个氨基酸, 成熟蛋白酶 K 的序列 106 - 384 (279 个氨基酸)) 中所示的肽原的 N-末端融合。用来产生表达载体的方法是本领域技术人员公知的, 并且例如 Sambrook 等 (1989) 有所描述。

本发明的另一个主题是用上面列出的载体之一转化的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是酵母。宿主细胞优选选自: 毕赤氏酵母属 (*Pichia*) 的种, 汉逊氏酵母属 (*Hansenula*) 的种, 例如多形汉逊氏酵母 (*Hansenula polymorpha*), 糖酵母属 (*Saccharomyces*) 的种, 裂殖糖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 的种, *Yarrowia* 属的种, 例如 *Yarrowia lipolytica*, 克鲁维氏酵母属

(*Kluyveromyces*) 的种和曲霉属 (*Aspergillus*) 的种。巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 特别优选被用作宿主细胞。当几个载体 (每一个都有一个 ppK 基因的拷贝) 被整合到基因组中时它是特别优选的。

另外, 本发明涉及纯化蛋白酶 K 的方法。为了纯化蛋白酶, 在第一步骤中通过微量过滤法或离心去除酵母细胞。得到的澄清溶液含有蛋白酶。接着为了使产物与阳离子交换剂结合而利用超滤再次缓冲, 所述阳离子交换剂是例如 SP-Sepharose 或 SP-Sephadex (Pharmacia) 或 SP-Toyopearl (Tosoh Corporation)。洗脱之后, 利用超滤再次缓冲并且与阴离子交换剂结合, 所述阴离子交换剂是例如 DEAE-Sepharose 或 Q-Sepharose (Pharmacia) 或 DEAE-Fraktogel (Merck)。再次洗脱之后, 利用超滤将纯蛋白酶转移到稳定的缓冲体系中 (蛋白质纯化, 原理和实验 (Protein Purification, Principles and Practice), Robert K. Scopes, Springer Verlag, 1982)。然而本领域技术人员能使用现有技术中其他纯化方法。

令人惊奇地, 根据本发明的方法使能够制备重组蛋白酶 K, 其中异源宿主细胞产生可溶和活性形式的酶。表达蛋白酶 K, 接着将酶分泌到培养基中是特别有利的, 这样防止了蛋白酶 K 对宿主细胞的细胞溶胶产生强毒性作用。此外, 这保证正确形成二硫桥, 而这在细胞溶胶还原环境下不太容易发生。因此, 根据本发明的方法的一个重要的优点是提供了产生可溶和活性形式的重组蛋白酶 K。非常令人吃惊而意料不到的是分泌的蛋白酶 K 不水解根据本发明的表面蛋白。这样的预期的蛋白酶 K 对表面蛋白的水解会干扰宿主细胞的生命周期。

用根据本发明的方法获得蛋白酶 K, 它是同源的并因此特别适合分析和诊断应用。根据本发明的蛋白酶 K 的酶原母体能任选地含有另外的 N-末端修饰, 特别是有利于目标蛋白质纯化的序列 (“亲和性标记”)。另外, 酶原母体能包含提高翻译效率, 提高折叠效率的序列, 和 / 或导致目标蛋白质分泌到培养基中的序列 (天然前序列和其他信号肽)。

就本发明意义来说, 蛋白酶 K 意指 SEQ. ID. NO.: 1 所示的 Gassen 等人 (1989) 的序列, 以及来自 *Tritirachium album* Limber 的蛋白酶 K 的其他变体, 如 Ch. Betzel 等 (生物化学 (Biochemistry) 40

(2001), 3080-3088) 公开的氨基酸序列, 特别是蛋白酶 T (Samal, B. B. 等(1989) *Gene* Vol. 85(2), 329-333; Samal, B. B. 等 (1996) 高级实验药物生物学 (*Adv. Exp. Med. Biol.*) Vol. 379, 95-104) 和蛋白酶 R (Samal, B. B. 等(1990) 分子微生物学 (*Mol. Microbiol.*) Vol. 4(10), 1789-1792; US 5,278,062), 和重组方法产生的另外的变体(例如如 WO 96/28556 中所述)。SEQ. ID. NO.: 1 包括序列原(1-90; 90 个氨基酸)和成熟蛋白酶 K 的序列(91-368; 279 个氨基酸)。Betzel 等(生物化学 (*Biochemistry*) 40 (2001), 3080-3088) 公开的蛋白酶 K 氨基酸序列特别在活性蛋白酶的 207 位具有代替丝氨酸残基的特定天冬氨酸。

本发明意义的蛋白酶 K 原特别指其 N-末端与其根据 SEQ. ID. NO.: 1 的序列原连接的蛋白酶 K。在与蛋白酶 K 紧密相关的枯草杆菌蛋白酶 E 和相应变体情况下, 序列原对活性蛋白酶的折叠和形成有重要影响(Ikemura, H. 等(1987) 生物化学 (*Biol. Chem.*) Vol. 262(16), 7859-7864)。特别地假设序列原作为分子内陪伴分子而起作用(Inouye, M. (1991) 酶 (*Enzyme*) Vol. 45, 314-321)。折叠之后, 通过前肽自身催化裂解将其加工成成熟枯草杆菌蛋白酶(Ikemura, H. 和 Inouye, M. (1988) 生物化学杂志(*J. Biol. Chem.*) Vol. 263(26), 12959-12963)。这个过程在分子内发生在枯草杆菌蛋白酶 E. (Samal, B. B. 等(1989) *Gene* Vol. 85(2), 329-333; Volkov, A. 和 Jordan, F. (1996) *J. Mol. Biol.* Vol. 262, 595-599), 枯草杆菌蛋白酶 BPN' (Eder, J. 等(1993) 生物化学(*Biochemistry*) Vol. 32, 18-26), 木瓜蛋白酶(Vernet, T. 等 (1991) *J. Biol. Chem.* Vol. 266(32), 21451-21457) 和嗜热芽孢杆菌蛋白酶 (Marie-Claire, C. (1998) *J. Biol. Chem.* Vol. 273(10), 5697-5701) 的情况下。

只有通常是疏水性的序列原的一定的核心区显示对于作为陪伴分子的功能是必需的, 因为很多区域的突变对活性没有影响(Kobayashi, T. 和 Inouye, M. (1992) *J. Mol. Biol.* Vol. 226, 931-933)。另外, 已知前肽可以在各种枯草杆菌蛋白酶变体之间互换。因此例如枯草杆菌蛋白酶 BPN' 也识别枯草杆菌蛋白酶 E 的序列原 (Hu, Z. 等 (1996) *J. Biol. Chem.* Vol. 271(7), 3375-3384)。

因此本发明涉及长度是 90 个氨基酸的根据 SEQ. ID. NO.: 1 的序

列原, 和促进折叠功能的其他变体。还涉及为成熟蛋白酶 K 折叠而外源加入的并促进上述功能的前肽。

因此, 根据本发明的方法的重要的优点是表达宿主将重组蛋白酶 K 以可溶和活性形式分泌到培养基中。此外, 非常有活性和非特异蛋白酶不损害或其以其它方式负面影响在根据本发明的方法中使用的表达宿主, 即特别地, 其连续生长没有问题, 并且没有发现增加的细胞溶胞作用。此外, 与 *Tritirachium album* 相比, 根据本发明的表达宿主更容易操作, 并且特征在于更高的生长速度。

附图说明

图 1 是表达质粒 pPICPK-1。克隆到起始载体 pPICZα A (Invitrogen) 中的对于蛋白酶 K 的酶原前体编码的序列。

图 2 是表达质粒 pPICPK-2。克隆到起始载体 pPIC9K (Invitrogen) 中的对于蛋白酶 K 的酶原前体编码的序列。

实施例

实施例 1

基因合成

利用基因合成的方法制备用于没有信号序列和没有内含子的来自 *Tritirachium album* Limber 的成熟蛋白酶 K 的基因。Gunkel 和 Gassen, 1989 的 368 个氨基酸长度的序列 (没有天然信号肽) 被用作模板。通过再次翻译氨基酸序列获得用于在大肠杆菌和酵母中表达的密码子优化核酸序列。SEQ. ID. NO.: 1 给出氨基酸序列, SEQ. ID. NO.: 2 给出核苷酸序列。

关于基因合成, 将基因分为有义和反义, 交替序列中互补配对寡核苷酸的 18 个片段 (SEQ. ID. NO.: 3-20)。分别至少 15 bp 区连接 5'-端和连接 3'-端, 在各种情况下相邻的寡核苷酸重叠。限制性内切核酸酶的识别位点与用来接着克隆到表达载体中的编码区外部的合成基因的 5'-和 3'-端连接。包含 EcoRI 切割位点的 SEQ. ID. NO.: 3 中所示寡核苷酸被用作克隆蛋白酶 K 原基因的 5' 引物。SEQ. ID. NO.: 20 是包含 HindIII 切割位点的 3'-引物。3' 引物在天然终止密码子之后包含另外的终止密码子, 以保证翻译的安全终止。

利用 PCR 反应将寡核苷酸彼此连接并且扩增得到的基因。为此, 首先将基因分为各自 6 个寡核苷酸的三个片段, 在第二轮 PCR 循环中

将这三个片段彼此连接。

片段 1 由如 SEQ. ID. NO.: 3-8 中所示的寡核苷酸组成, 片段 2 由如 SEQ. ID. NO.: 9-14 中所示的寡核苷酸组成, 片段 3 由如 SEQ. ID. NO.: 15-20 中所示的寡核苷酸组成。

使用下面的 PCR 参数:

PCR 反应 1 (三个片段的产生)

5分钟	95°C	热起始
2分钟	95°C	30次循环
2分钟	42°C	
1.5分钟	72°C	
7分钟	72°C	最后延伸

PCR 反应 2 (连接片段形成全长基因)

5分钟	95°C	}	热起始
1.5分钟	95°C		6次循环（没有末端引物）
2分钟	48°C		
2分钟	72°C		
加入末端引物			
1.5分钟	95°C	}	25次循环（有末端引物）
1.5分钟	60°C		
2分钟	72°C		
7分钟	72°C		最后延伸

实施例 2

克隆由基因合成得到的合成的蛋白酶 K 片段

对琼脂糖凝胶施用 PCR 混合物, 并且从琼脂糖凝胶 (Bio 101, Inc. CA USA 的 Geneclean II 试剂盒) 分离大约 1130 bp PCR 片段。用 EcoRI 和 HindIII 限制性内切核酸酶 (Roche Diagnostics GmbH, 德国) 在 37°C 下将片段切割 1 小时。同时用 EcoRI 和 HindIII 限制性内切核酸酶在 37°C 下将 pUC18 质粒切割 1 小时, 通过琼脂糖凝胶电泳分离混合物, 并且分离 2635 bp 载体片段。接着使用 T4-DNA 连接酶将

PCR 片段和载体片段相互连接在一起。对于 1 微升 (20 ng) 载体片段和 3 微升 (100 ng) PCR 片段, 用移液管加入 1 微升 10 x 连接酶缓冲液 (Maniatis 等, 1989 B. 27), 1 微升 T4 DNA 连接酶, 4 微升无菌 H₂O, 小心混合并且在 16 °C 下温育过夜。

通过限制性 (内切核酸酶酶切) 分析并且通过两条链的多次测序来检查克隆的基因。

实施例 3

载体构建

首先从 pUC 质粒再次分离合成基因。为此目的, 1 微克质粒 DNA 首先根据生产商说明与限制性内切核酸酶 HindIII (Roche Diagnostics GmbH) 温育, 接着通过加热至 65°C 维持 20 分钟将限制性内切核酸酶灭活。然后用 Klenow 聚合酶根据生产商说明 (Roche Diagnostics GmbH) 补平得到的 DNA 突出端, 并且通过在 75°C 温育 10 分钟将 Klenow 聚合酶灭活。最后用限制性内切核酸酶 EcoRI (Roche Diagnostics GmbH) 根据生产商说明切割现在线性化的上述 pUC 质粒的载体片段, 将反应混合物施加给 1% 琼脂糖凝胶, 并且通过施加电流 (100 V/150 mA) 根据大小相互分离片段。从琼脂糖凝胶 (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) 分离包含对于蛋白酶 K 原的基因 (ppk 基因) 的大约 1120bp 片段。

用限制性内切核酸酶 Asp718I (Roche Diagnostics GmbH) 根据生产商说明切割 pPICZαA 载体 (Invitrogen), 并且通过将温育混合物加热至 65°C 维持 20 分钟将限制性内切核酸酶灭活。然后用 Klenow 聚合酶根据生产商说明 (Roche Diagnostics GmbH) 补平得到的 DNA 突出端, 并且然后通过 75°C 温育 10 分钟将 Klenow 聚合酶灭活。最后用限制性内切核酸酶 EcoRI (Roche Diagnostics GmbH) 根据生产商说明切割现在线性化的 pPICZαA 的载体片段, 将反应混合物施加给 1% 琼脂糖凝胶, 并且通过施加电流 (100 V/150 mA) 根据大小分离片段。从琼脂糖凝胶 (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) 分离大约 3550bp 载体片段。

通过标准方法 (Sambrook 等, 1989) 将用这种方法获得的片段彼此连接在一起。在该载体中, ppk 基因受 AOX 1 启动子 (甲醇可诱导的来自巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 的醇氧化酶 1 的启动子)

的控制, 并且利用这种克隆策略在来自啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 α -因子的信号肽后面的正确的读框(leserahmen)中克隆。然后用限制性(内切核酸酶酶切)分析和测序对用这种方法插入的基因片段检查没有错误的基础序列。得到的包含编码蛋白酶 K 原的 ppk 基因的表达式载体命名为 pPICPK-1 (参见图 1)。

随后也将 ppk 基因克隆到 pPIC9K (Invitrogen) 中。为此目的, 使用限制性内切核酸酶 PmeI 和 NotI (Roche Diagnostics GmbH) 根据生产商说明切割载体 pPICPK-1。在 1%琼脂糖凝胶中根据大小从限制性(酶切)混合物中分离片段, 从凝胶上分离含有 AOX1-启动子区的 3'-部分的大约 1960 bp 片段, α -因子信号肽序列和 ppk 基因 (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen)。同时使用限制性内切核酸酶 PmeI 和 NotI (Roche Diagnostics GmbH) 根据生产商说明切割载体 pPIC9K, 在 1%琼脂糖凝胶中根据大小从限制性酶切混合物中分离片段, 从凝胶上分离大约 8450 bp 载体片段 (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen)。

接着通过标准方法 (Sambrook 等, 1989) 将用这种方法获得的片段彼此连接在一起。在该载体中, ppk 基因也受 AOX 1 启动子(甲醇可诱导的来自巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 的醇氧化酶 1 的启动子)的控制。通过筛选标记物并且通过本领域公知的在转化之前基于载体线性化将其整合到毕赤氏酵母基因组中的三种可能性来区别载体 pPIC9K 与载体 pPICZ α A, 而 pPICZ α A 整合到 AOX1 位点的整合作用是固定的。然后用限制性(内切核酸酶酶切)分析和测序对插入的基因片段检查没有错误的基础序列。

得到的包含编码蛋白酶 K 原的 ppk 基因的表达式载体命名为 pPICPK-2 (参见图 2)。

实施例 4

在巴斯德毕赤氏酵母中转化 pPICPK-1

为了在巴斯德毕赤氏酵母 X-33 中转化 pPICPK-1 并且接着整合到基因组中, 首先用 PmeI (Roche Diagnostics GmbH) 将载体线性化。利用电穿孔使用 Gene Pulser II (Biorad) 进行转化作用。

为此目的, 用巴斯德毕赤氏酵母野生型菌株的菌落接种 5 毫升 YPD 培养基, 并且振荡下在 30°C 下温育过夜。接着在 200 毫升新鲜 YPD 培

培养基（根据 Invitrogen 目录）中以 1: 2000 比例再接种过夜培养物，并且振荡下在 30℃ 下温育过夜，直到 OD₆₀₀ 达到 1.3-1.5。将细胞离心 (1500 x g/5 分钟) 并且将沉积物 (pellet) 重新悬浮于 200 ml 冰冷无菌水 (0℃) 中。再次离心细胞 (1500 x g/5 分钟) 并且再次悬浮于 100 ml 冰冷无菌水 (0℃) 中。再次离心细胞并且再次悬浮于 10 毫升冰冷 (0℃) 1M 山梨糖醇 (ICN) 中。再次离心细胞并且再次悬浮于 0.5 毫升冰冷 (0℃) 1M 山梨糖醇 (ICN) 中。用这种方法得到的细胞保存在冰上并且立即用于转化。

向 80 微升的细胞加大约 1 微克线性化 pPICPK-1 载体 DNA，并且将全部混合物转移到冰冷 (0℃) 的电穿孔小池 (kuvette) 中并且在冰上又温育 5 分钟。接着将小池转移给 Gene Pulser II (Biorad)，在 1 kV, 1 kΩ 和 25μF 下进行转化作用。电穿孔之后，向混合物加入 1 毫升 1 M 山梨糖醇 (ICN)，并且接着在含有 100 微克/毫升 Zeocin® (Invitrogen) 的 YPDS 琼脂板（根据 Invitrogen 目录）上平板培养 100-150 微升。平板接着在 30℃ 下温育 2-4 天。

用克隆接种最小葡萄糖格板并且进一步分析克隆。

取生长的克隆，重新悬浮于 20 微升无菌水中并且用 17.5U 溶细胞酶 (Roche Diagnostics GmbH) 溶解 (1 小时, 37℃) 并且通过 PCR 方法直接检查 ppk 表达盒的正确整合作用。

然后在表达实验中使用转化到基因组的过程中整合了完整表达盒的克隆。

实施例 5

在巴斯德毕赤氏酵母中转化 pPICPK-2

为了在巴斯德毕赤氏酵母 GS115 中转化 pICPK-2 并且接着整合到基因组中，首先针对变体 I 用 PmeI (Roche Diagnostics GmbH) 将载体线性化，将它整合到 AOX1-位置，并且针对变体 II 用 SaII (Roche Diagnostics GmbH) 线性化，将它整合到 His4 位置。利用电穿孔使用 Gene Pulser II (Biorad) 进行转化作用。

为此目的，用巴斯德毕赤氏酵母 GS115 野生型菌株的菌落接种 5 毫升 YPD 培养基（根据 Invitrogen 目录），并且振荡下在 30℃ 下温育过夜。接着在 200 毫升新鲜 YPD 培养基（根据 Invitrogen 目录）中以 1: 2000 比例再接种过夜培养物，并且振荡下在 30℃ 下温育过夜，

直到 OD_{600} 达到 1.3–1.5。将细胞离心 ($1500 \times g/5$ 分钟) 并且将沉积物重新悬浮于 200 ml 冰冷无菌水 (0°C) 中。再次离心细胞 ($1500 \times g/5$ 分钟) 并且再次悬浮于 100 ml 冰冷无菌水 (0°C) 中。再次离心细胞并且再次悬浮于 10 毫升冰冷 (0°C) 1M 山梨糖醇 (ICN) 中。再次离心细胞并且再次悬浮于 0.5 毫升冰冷 (0°C) 1M 山梨糖醇 (ICN) 中。用这种方法得到的细胞保存在冰上并且立即用于转化。

向 80 微升的细胞加大约 1 微克线性化 pPICPK-2 载体 DNA, 并且将全部混合物转移到冰冷 (0°C) 的电穿孔小池并且在冰上又温育 5 分钟。接着将小池转移给 Gene Pulser II (Biorad) 中, 在 1 kV, 1 k Ω 和 25 μF 下进行转化作用。电穿孔之后, 向混合物加入 1 毫升 1 M 山梨糖醇 (ICN), 并且接着在没有组氨酸的 MM 琼脂板 (根据 Invitrogen 目录的最小培养基) 上平板培养 100–150 微升。平板接着在 30°C 下温育 2–4 天。当它们已整合带有具有功能 His4 基因作为插入物的载体 pPICPK-2 时, 具有突变 (组氨酸脱氢酶) 引起的缺损 His4 基因的巴斯德毕赤氏酵母 GS115 克隆只能在这些板上生长, 而且因此能补偿 (aufhebt) 组氨酸合成中的缺陷。

用克隆接种最小葡萄糖格板并且进一步分析克隆。取生长的克隆, 重新悬浮于 20 微升无菌水中并且用 17.5U 溶细胞酶 (Roche Diagnostics GmbH) 溶解 (1 小时, 37°C), 并且通过 PCR 方法直接检查 ppk 表达盒的正确整合作用。

然后在表达实验中使用转化到基因组的过程中整合了完整表达盒的克隆。

实施例 6

蛋白酶 K 的表达

用阳性克隆接种 10 毫升 BMGY 培养基 (根据 Invitrogen 目录), 并且振荡下在 30°C 下温育过夜。接着测定 600 nm 下的光密度 (OD), 并且用这样一种方式接种 10 毫升 BMMY 培养基 (根据 Invitrogen 目录), 使 OD_{600} 达到 1。BMMY 培养基 (根据 Invitrogen 目录) 含有甲醇 (Mallinckrodt Baker B. V.), 它通过 AOX 1 启动子诱导蛋白酶 K 的表达。

振荡下在 30°C 下温育振荡瓶, 每 24 小时取样, 测定 OD_{600} , 对蛋白酶 K 的表达进行活性测定, 并且每一次再次添加 0.5% 甲醇

(Mallinckrodt Baker B. V.)用于进一步诱导。表达实验进行168小时。

实施例 7

分泌的重组蛋白酶 K 的活性测定

对于重组蛋白酶 K 的活性测定, 需要 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck ID- No. 102382), DMSO (Merck ID-No. 109678), 底物 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Roche Diagnostics ID-No. 0716766) 和 Tris-Base (Roche Diagnostics ID-No. 0153265)。

溶液组成如下:

溶液 1: 50 毫摩尔/升 Tris-Base; 10 mmol/L CaCl_2 pH 8.2

溶液 2: 溶解于 1 毫升 DMSO 中的 125 毫克 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

将细胞离心(10000 rpm, 5 分钟, Eppendorf-Tisch 离心机), 并且在溶液 1 中以 1 : 500 稀释上清液。

用移液管将 2 毫升溶液 1 吸移到小池中并且加入 0.02 毫升的溶液 2。混合两种溶液, 并且在 25℃ 的反应温度下温育。通过加入 0.05 毫升如上所述的稀释的上清液并且反复混合开始反应, 测定 405 nm 下的吸收变化并且测定线性区域中 $\Delta A/\text{分钟}$ 。然后用下式计算:

$$\text{活性} = \frac{2.07}{\epsilon \times l \times 0.05} \Delta A/\text{min} [\text{U/ml 样品溶液}]$$

2.07 = 样品体积

$\epsilon_{405} = 10.4 [\text{mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}]$

1 = 小池路径长度

0.05 = 加入的样品的体积

序列表

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> 来自酵母中Tritirachium album的重组蛋白酶K的表达

<130> 5441/00/DE

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 369

<212> PRT

<213> Tritirachium album Limber

<400> 1

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

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

Ala

<210> 2
 <211> 1124
 <212> DNA
 <213> Tritirachium album Limber

<400> 2
 gaattcgctc ctgccgttga gcagcgctcc gaggtgctc ctctgatoga ggcccgcggc 60
 gagatgggtt ccaacaagta catcgtaag ttcaaggagg gtagcgctct ttccgctctg 120
 gatgctgcca tggagaagat ctctggcaag cccgaccacg tctacaagaa cgtcttcagc 180
 ggtttcgcgt cgaccctgga cgagaacatg gttcgggttc tccgcgcca cccgatgtt 240
 gagtacatcg agcaggatgc tgttgtaacc atcaacgctg cgcagaccaa cgctccctgg 300
 ggcttggtc gcatctccag caccagcccc ggtacctcta cctactacta tgacgaatct 360
 gccggccaag gctcctgcgt ctaogtgatc gacaccggtg tcgaggcatc gcaccccgag 420
 ttcgagggtc gtgcccagat ggtcaagacc tactactact ccagtcgoga cggtaacggt 480
 cacggcacc actgcgctgg taccgttggc tccgtacct acggtgtcgc caagaagacc 540
 cagctgttcg gtgtcaagggt cctggatgac aacggcagtg gccagtact caccatcatc 600
 gccggtatgg acttcgttgc cagcgacaag aacaacgca actgccccaa aggtgtcgtt 660
 gcctccttat cctggggcgg tggttactcc tccctcgtga acagcgccgc tgcccgcctc 720
 cagagctctg gtgtcatggt cgcgctcgct gccggtaaca acaacgctga cgcgcgcaac 780
 tactccctg cttctgagcc ctcggtctgc accgtcggtg cttctgaccg ctacgaccgc 840
 cgctccagct tctccaacta cggcagcgtt ttggacatct tcggccctgg taccagcatc 900
 ctctccacct ggatcggcgg cagcaaccgc tccatctctg gtacctccat ggctaactcc 960

```

cacgttgccg gtctcgetgc ctacctcatg actcttggaa agactaccgc cggcagcgct 1020
tgccgataca ttgccgacac cgccaacaag ggcgacttaa gcaacattcc cttcggcact 1080
gtcaacttgc ttgcctacaa caactaccag gcttaatgaa gctt 1124

```

<210> 3
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 引物

```

<400> 3
cgcgattcg ctctgcggt tgagcagcgc tccgaggctg ctctctgat cgaggccgc 60
ggcgagatgg ttgccaaca 79

```

<210> 4
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 引物

```

<400> 4
atcttctcca tggcagcatc cagagcggaa agagcgctac cctccttgaa ottgaogatg 60
tacttgttgg caaccatctc 80

```

<210> 5
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 引物

```

<400> 5
tgccatggag aagatctctg gcaagcccga ccacgtctac aagaacgtct tcagcggttt 60
cgctgcgacc ctggacgaga 80

```

<210> 6
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 引物

```

<400> 6
tgctcgatgt actcaacatc ggggtgggcg cggagaaccc gaaccatgtt ctcgccagg 60
gtcg 64

```

<210> 7
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 引物

<400> 7
tgagtacatc gagcaggatg ctggtgtcac catcaacgt ggcgagaccg ctgctgagac 60
caacg 65

<210> 8
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 引物

<400> 8
agtaggtaga ggtaccgggg ctggtgctgg agatgctgagc caggccccag ggagcgttgg 60
tctgctgagc 70

<210> 9
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 引物

<400> 9
gtacctctac ctactactat gacgaatctg ccggccaagg ctctgctgc tacgtgatcg 60
acaccggtat cgaggcatcg 80

<210> 10
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 引物

<400> 10
ttaccgtcgc gactggagta gtagtaggtc ttgaccatct gggcacgacc ctcgaaactcg 60
gggtgcgatg cctcgatacc g 81

<210> 11
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 引物

<400> 11
ccagtcgcga cggtaacggt caccggcacc actgcgctgg taccgttggc tccgtacct 60
acggtgtcgc caagaaga 78

<210> 12
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 引物

<400> 12
atggtggagt actggccact gccgttgtca tccaggacct tgacaccgaa cagctgggtc 60
ttcttggcga cac 73

<210> 13
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 引物

<400> 13
ggccagtact ccaccatcat cgcgggtatg gacttcgttg ccagcgadaa gaacaaccgc 60
aactgcccc aaggtgtcgt t 81

<210> 14
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 引物

<400> 14
gctctggagg cgggcagcgg cgtctgttcac ggaggaggag taaccaccgc ccagggataa 60
ggaggcaacg acacctttgg g 81

<210> 15
<211> 82
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 引物

<400> 15
gcccgctcc agagctctgg tgtcatggtc gccgtcgtg ccggtaacaa caacgctgac 60
gcccgcaact actccctgc tt 82

<210> 16
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 引物

<400> 16
gttggaaga ctggagcggc ggtcgtagcg gtcagaagca ccgacgggtgc agaccgaggg 60
ctcagaagca ggggagtagt 80

<210> 17
<211> 83
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 引物

<400> 17

ctccagcttc tccaactacg gcagcggtttt ggacatotto ggccctggta ccagcatcct 60
ctccacctgg atcggcggca gca 83

<210> 18

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400>

tcatgaggta ggcagcgaga ccggcaacgt ggggagtagc catggaggta ccagagatgg 60
agcgggtgct gccgccgatc c 81

<210> 19

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400> 19

ctgcctacct catgacctta ggaaagacca ccgccgccag cgtttgccgt tacatcgccg 60
acaccgccaa caagggcgac t 81

<210> 20

<211> 87

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400> 20

atataagctt ctattaagcc tggtagttgt tgtaggctaa caggttgacg gtgccgaagg 60
gaatgttgct taagtcgccc ttgttgg 87

<210> 21

<211> 384

<212> PRT

<213> Tritirachium album Limber

<400> 21

Met Arg Leu Ser Val Leu Leu Ser Leu Leu Pro Leu Ala Leu Gly Ala
1 5 10 15

Pro Ala Val Glu Gln Arg Ser Glu Ala Ala Pro Leu Ile Glu Ala Arg
20 25 30

Gly Glu Met Val Ala Asn Lys Tyr Ile Val Lys Phe Lys Glu Gly Ser
35 40 45

Ala Leu Ser Ala Leu Asp Ala Ala Met Glu Lys Ile Ser Gly Lys Pro
50 55 60

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

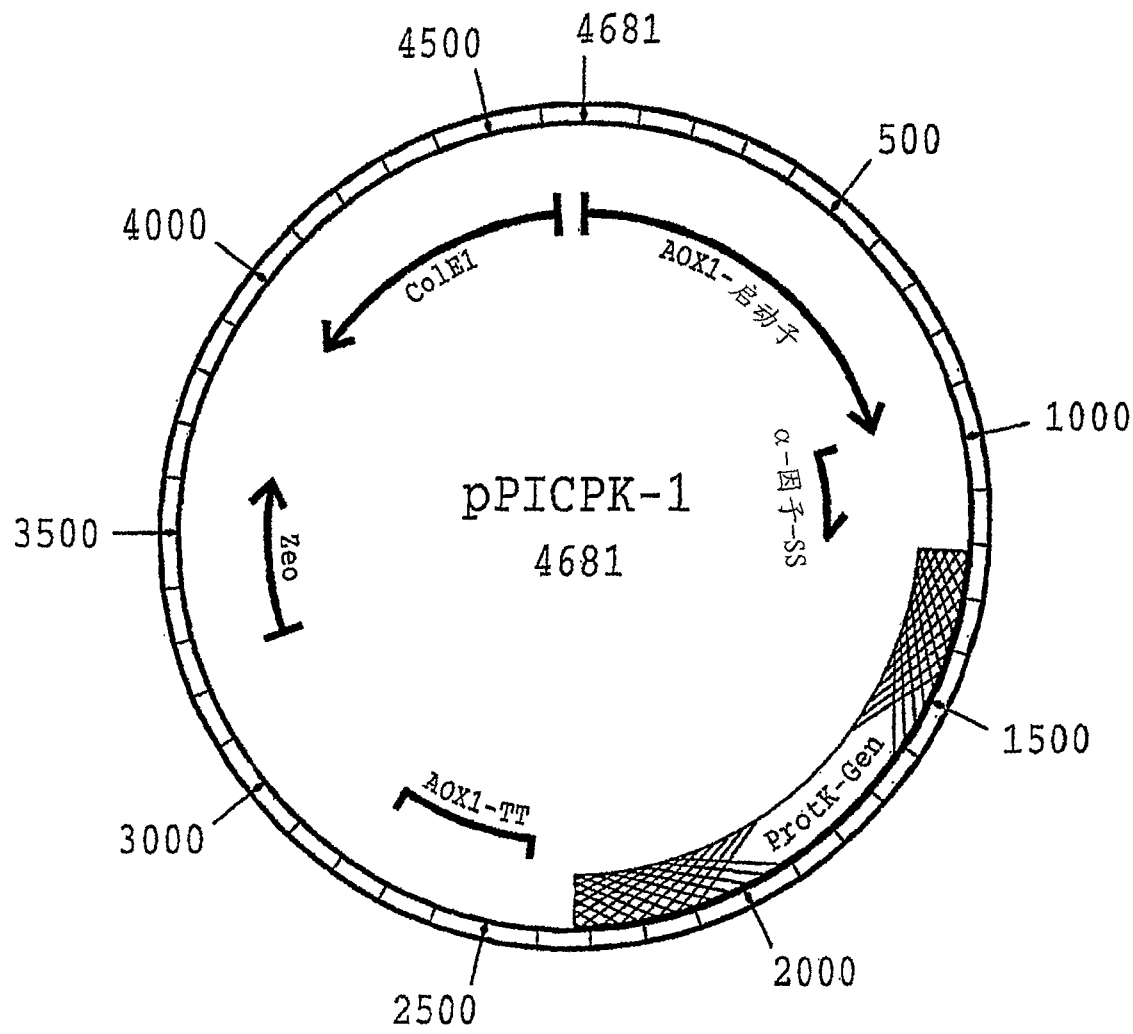


图 1

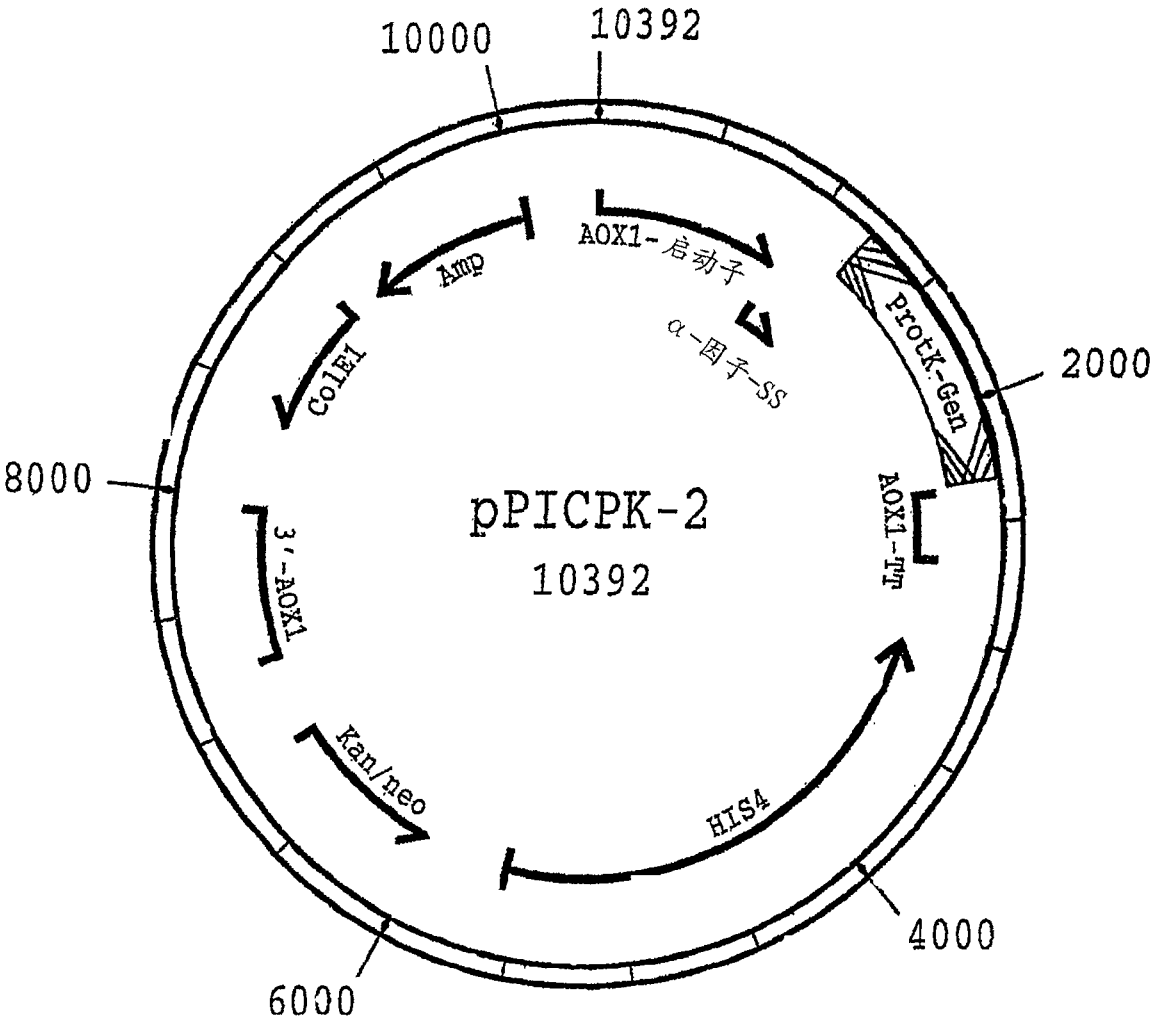


图 2