[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12P 19/40 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480005868.5

[43] 公开日 2007 年 4 月 25 日

[11] 公开号 CN 1954080A

[22] 申请日 2004.2.27
[21] 申请号 200480005868.5
[30] 优先权
[32] 2003. 3. 4 [33] US [31] 60/451,842
[86] 国际申请 PCT/US2004/006103 2004.2.27
[87] 国际公布 WO2004/078993 英 2004.9.16
[85] 进入国家阶段日期 2005.9.2
[71] 申请人 布里斯托尔 - 迈尔斯斯奎布公司
地址 美国新泽西州
[72] 发明人 P·M·斯科内兹尼 M·波利蒂诺
S·W·刘 A·W·博伊尔
J·G·陈 G·L·斯泰因
T·弗兰西施尼 W·L·安德逊
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李 波 王景朝
权利要求书 2 页 说明书 19 页 序列表 5 页

[54] 发明名称

利用腺苷脱氨酶制备双脱氧肌苷的方法

[57] 摘要

一种制备双脱氧肌苷(ddI)的方法，包括以下的步骤：(a)获得表达 ddA 脱氨酶活性的酶；(b)将酶固定到不溶的支持物上；(c)于产生 ddI 溶液的时间内和条件下使酶与双脱氧腺苷(ddA)溶液接触，所述双脱氧腺苷溶液的浓度至少为在水中的约 4% 重量体积；以及(d)从 ddI 溶液中分离 ddI。 任选地，将产生的 ddI 母液再利用于后续的程序中以改良产率。

1.一种制备 2′,3′-双脱氧肌苷(ddI)的方法，其包含以下步骤:

(a)获得表达 ddA 脱氨酶活性的酶;

(b)将此酶固定至不溶的支持物上;

(c)于产生 ddI 溶液的时间内和条件下使酶与双脱氧腺苷(ddA)溶液接触，所述双脱氧腺苷溶液的浓度至少为在水中的约 1%重量体积;及

(d)从 ddI 溶液分离 ddI。

2.如权利要求 1 的方法，其中接触步骤中的 ddA 溶液为约 2%至约 10%重量体积的 ddA 水溶液。

3.如权利要求 1 的方法，其中接触步骤中 pH 是约 8.0 至约 9.5。

4.如权利要求 3 的方法，其中在接触步骤中基本上所有的 ddI 抵抗从 ddI 溶液中沉淀出来。

5.如权利要求 1 的方法，其中不溶的支持物经官能化以允许酶与其附着。

6.如权利要求 5 的方法，其中使用活化剂使酶附着在该不溶的支持物上。

7.如权利要求 1 的方法，其中该酶是人类腺苷脱氨酶(ADA)。

8.如权利要求 7 的方法，其中 ADA 的氨基酸序列是 SEQ ID NO: 1 或其保守变体。

9.如权利要求 7 的方法，其中 ADA 由具有 SEQ ID NO: 2、3 或其保守变体的核苷酸编码。

10.如权利要求 1 的方法，其中获得步骤包括在转化的生物体内表达人类腺苷脱氨酶(ADA)或其保守变体，并从该生物体分离 ADA。

11.如权利要求 10 的方法，其中转化的生物体是大肠杆菌。

12.如权利要求 10 的方法，其中不溶的支持物经官能化以允许酶与其附着。

13.如权利要求 12 的方法，其中使用活化剂使酶附着在该不溶的支持物上。

14.如权利要求 10 的方法，其中固定于该不溶的支持物上的酶的活性为至少约 40U/克。

15.如权利要求 10 的方法，其中接触步骤中 pH 为约 7.5 至约 9.5。

16.如权利要求 10 的方法，其中该接触步骤是利用装填的柱进行的连续方法。

17.如权利要求 10 的方法，其中接触步骤中 ddA 溶液是约 4%至约 15%重量体积的 ddA 水溶液。

18.如权利要求 17 的方法，其中该 ddA 溶液是约 5%至约 8%重量体积的 ddA 水溶液。

19.如权利要求 10 的方法，其中分离步骤包括依序地蒸馏 ddI 溶液并且添加水直到获得水性母液中的 ddI 浆且 pH 低于大约 8。

20.如权利要求 10 的方法，进一步包含以下步骤:

(a)分离步骤后保留反应母液；及

(b)使用此反应母液重复接触步骤至少一次以制备 ddA 溶液；及

(c)重复此分离步骤至少一次。

21.如权利要求 20 的方法，其中此分离步骤的产率为至少约 96%ddI，ddI 纯度为至少约 99%。

利用腺苷脱氨酶制备双脱氧肌苷的方法

本申请要求美国临时申请 No.60/451,842 的优先权，该申请的全部公开内容在此引入作为参考。

发明领域

本发明总体涉及从 2′,3′-双脱氧腺苷(ddA)制备 2′,3′-双脱氧肌苷(ddI)的方法，更具体地，本发明涉及利用源自人类 ADA 核苷酸序列的腺苷脱氨酶(ADA)制备 ddI 的方法。

背景技术的描述

双脱氧核苷是相对稳定的核苷类似物。双脱氧核苷 2′,3′-双脱氧肌苷(ddI)已展示有作为抗病毒剂的有用的药理学活性。Hartman, et al., Clin. Pharmacol. Ther. 47:647(1990)。具体地，ddI 已展示可单独使用或联合 3′-叠氮基-2′,3′-双脱氧胸苷(AZT)治疗爱滋病。随着人类免疫缺陷病毒 AZT 抗性菌株的产生，ddI 的利用越来越重要。

在实验室内合成双脱氧核苷的努力已有报道，例如在 2′或 3′位置的核苷的脱氧。Chem. Pharm. Bull., 22:128(1974)。然而，在通常需要用来驱动反应的温度以及 pH 条件下，由于空间阻碍及核苷的不稳定，化学合成是困难的。此外，用于合成的起始材料是昂贵的，并且不可大量供应。到目前为止，无法按比例增加实验室合成双脱氧核苷的规模至此类化合物工业规模的商业化生产。

已知可以用多种方法通过腺苷脱氨酶由双脱氧腺苷(ddA)的酶促脱氨作用进行工业规模的 ddI 生产。已报导利用牛腺苷脱氨酶使 2′,3′-双脱氧腺苷脱氨基，从而合成 ddI。Webb et al., Nucleosides & Nucleotides, 7(2):147-153(1988).亦有报导利用牛腺苷脱氨酶按比例放大合成 ddI 的过程，包括溶剂以及缓冲液等参数的优化。Nucleosides & Nucleotides, 10(7):1499-1505(1991)。

Farina 等的美国专利 No.5,011,774 号公开了一种方法，其中

(D)-2′,3′-双脱氧腺苷的端基异构混合物在有利 ddI 更具活性的 β 端基异构体酶促脱氨的速率的适当的溶剂内与 ADA 反应。此方法使用的市售 ADA 源自小牛脾脏。这个方法避免了分离出不需要的 α-端基异构体所需的层析以及结晶技术的步骤。然而，利用此方法可能的缺点是当用牛来源的酶时，有传播传染性海绵状脑病(TSE)的危险。

Yokozeki 等的美国专利 No.4,970,148 公开了一种方法，其中将 2′,3′-双脱氧腺苷(ddA)与含有能将 ddA 转化为 ddI 的 ADA 酶的微生物培养液接触。此方法使用全部微生物、细胞匀浆物、或溶菌酶、盐、表面活性剂等处理的细胞产物的培养液做为 ADA 的来源。此方法的一个缺点是酶的天然来源在超过 8 的 pH 下是固有不稳定的，并且要求严格的 pH 控制。当在小于 8 的 pH 下进行时，产物 ddI 仅在非常稀的浓度(重量体积<1%)下是可溶的。结果此方法每批产生非常少的 ddI。此外，如此产生的 ddI 必须进行广泛的纯化步骤以去除残留的蛋白质污染物以获得纯化的 ddI 产物。此类纯化步骤是昂贵的，并且可导致产物的损伤以及降低产量。

Noguchi 等的日本专利申请 No.5-219978 公开了生产核酸相关物质例如 ddI 的方法，包括克隆编码适当酶的基因，构建具有导致此基因高表达的调控序列的表达载体，用此表达载体转化微生物以形成转化体，诱导克隆基因的表达，以及提取和分离如此表达的酶。然后用分离的酶和适当的起始材料例如 ddA 反应，产生所需要的核酸相关物质。与 Yokozeki 专利相比，此方法产生的可用的酶量增加 100 倍。然而，依据此方法分离的酶是微生物酶。因此，至少对于 ADA，此酶在 pH 值大于 8 时缺少稳定性。结果，为了获得可接受的产量，必须严密调控 pH。此外，此方法产生的产物和 ADA 紧密接触。反应混合物受到杂质例如未反应的 ddA、核酸副产物以及 ADA 和产物的污染。因此，必须进行广泛的纯化方法从反应混合物中分离 ddI。该纯化方法典型地需要重复的液相层析或薄层层析。此类纯化步骤不易用于商业性的规模放大。

Yokozeki 等的美国专利 No.4,962,193 公开了由采用酶的方法纯化 ddI 的方法，其中使用多孔的、非极性树脂吸附 ddI 到树脂上，分离树脂与溶液，并且分级洗脱吸附的 ddI 以获得纯化的产物。然而，此方法在最终纯化步骤之前要先经前处理以去除蛋白质和浓缩物并且

过滤含产物的溶液。因此，此方法既昂贵且耗时。

因此目前需要一种工业规模的方法来制备 ddI，该方法提供令人满意的产率而无传播 TSE 的危险或无须进行广泛的纯化程序以去除残留蛋白质，而且使用在宽的 pH 范围稳定的酶。

发明概述

本发明总体涉及通过使 ddA 与固定在不溶的支持物上的具有 ddA 脱氨酶活性的酶接触而制备 ddI 的方法。本发明提供制备双脱氧肌苷(ddI)的方法，包括以下的步骤：(a)获得表达 ddA 脱氨酶活性的酶；(b)将酶固定到不溶的支持物上；(c)于产生 ddI 溶液的时间内和条件下使酶与双脱氧腺苷(ddA)溶液接触，所述双脱氧腺苷溶液的浓度至少为在水中的约 4%重量体积；以及(d)从 ddI 溶液中分离 ddI。任选地，将产生的 ddI 母液再利用于后续的程序中以改良产率。

发明详述

本发明涉及以经济和可靠的方式从 ddA 制备 ddI 的方法，其可避免现有技术的方法的缺点。

以前从 ddA 制备 ddI 的方法包括利用市售的 ADA，例如牛 ADA(可购自 Sigma)或源自培养用微生物 ADA 转化的大肠杆菌的 ADA。此方法包括在溶液中混合酶和 ddA，将 ddA 转化成 ddI。接着，必须从含各种污染物，包括酶的溶液中移出 ddI。这要求大量纯化和分离以从污染的反应混合物中获得 ddI。

与现有技术的方法相反，本发明使用 ADA，或其它能使 ddA 脱氨基的固定化状态的酶。固定化有利于改进酶在反应混合物中的稳定性。更重要的，固定化允许从反应混合物中容易地分离 ddI 终产物，因为主要的污染物，即酶保持固定于不溶的支持物上。

本发明进一步提供新的 ADA 来源。在本发明的优选实施方案中，是利用使人 ADA 或其保守衍生物转化的生物生长而获得的 ADA，从 ddA 制备 ddI。本发明方法的优点之一是人 ADA 在更宽的 pH 范围内比微生物的 ADA 更稳定。当反应在超过大约 8 的 pH 下进行时，ddA 保持稳定且改进了转化为 ddI 的效率。其它优点是在这些 pH 下 ddI 比 pH 低于大约 8 时更易保持在溶液内。产物 ddI 在高 pH 值(>8)下改进的

溶解度的特性可使反应在更高的浓度下进行，由此改进 ddI 的产率。

本发明方法利用固定于不溶的支持物上的人类 ADA 酶或者具有 ddA 脱氨酶能力的其它酶。本发明是利用由所述固定化导致的酶的稳定性改进的优点。因此，可在典型地变性或以其它方式干扰酶活性的 pH 范围下进行从 ddA 产生 ddI 的反应。此外，固定 ADA 给 ADA 赋予了方便的特性，即，经简单过滤方法从反应产物分离酶的能力。

制备腺苷脱氨酶(ADA)

本发明特别感兴趣的 ADA 是人类 ADA 或其保守变体，其具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1(Genebank 编号 gi114043373)。选择此人类形式的 ADA 是由于它比微生物来源的 ADA 有更优越的结构稳定性。特定言的，与微生物的 ADA 相比，人类 ADA 在相对宽的 pH 范围内维持显著的活性。此外，与微生物的 ADA 相比，人类 ADA 在升高的温度下对降解更具抗性。人类 ADA 的 DNA 序列公布为源自人类 mRNA 的 cDNA 序列，它是 1,533 个碱基的序列。参阅 Gwendolyn, S. et al., Mol. and Cellular Biology, 4(9):1712-1717(1984)。

公布的序列,或其某些保守变体,可用以编码和获得所需要的 ADA。SEQ ID NO:2(Genebank 编号 giI14043372)是公布的人类 cDNA 序列。理想地,尤其是当利用大肠杆菌作宿主时,使用 SEQ ID NO:3(Genebank 编号 gi1140433732)。SEQ ID NO:3 为公布的人类 cDNA 的保守变体，其中对精氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸以及脯氨酸进行了密码子优先取代。由于遗传密码是简并的，这些密码子取代不会导致序列编码的氨基酸改变。这些取代反而可改进大肠杆菌对密码子的识别。可使用下列的密码子优先取代:

表 1-密码子优先取代

氨基酸	哺乳动物的密码子	取代密码子
精氨酸	AGG	CGT
精氨酸	AGG	CGC
精氨酸	CGG	CGC
精氨酸	CGG	CGT
精氨酸	AGA	CGC
甘氨酸	GGA	GGT
甘氨酸	GGG	GGT
甘氨酸	GGG	GGC
异亮氨酸	ATA	ATT
亮氨酸	TTA	CTG
亮氨酸	CTA	CTC
亮氨酸	CTC	CTG
亮氨酸	CTT	CTG
脯氨酸	CCC	CCG
脯氨酸	CCA	CCG
脯氨酸	CCT	CCG
脯氨酸	CCA	CCG

本发明进一步包括使用包括 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的其它小的修饰以及所有天然等位基因的序列，所述序列产生基本上具有等同活性的酶。修饰可以是特意的，例如经定点诱变，或可以是自发突变。等位基因可来自任何物种。优选的等位基因是人类来源。本发明包括利用所有这些多肽，只要仍保持酶使 ddA 脱氨基的活性。

例如，本发明亦包括 SEQ ID NO:1 的保守变体或等同变体。此处用到的术语"保守变体"以及"等同变体"代表用具有相似的化学和生物的性质或一般而言考虑为等同的其它氨基酸取代氨基酸。

例如，本领域已知以等同的氨基酸取代序列内的氨基酸，即保守变体。通常考虑为等同的氨基酸的基团是:

Ala(A)、Ser(S)、Thr(T)、Pro(P)、Gly(G);

Asn(N)、Asp(D)、Glu(E)、Gln(Q);

His(H)、Arg(R)、Lys(K);

Met(M)、Leu(L)、He(I)、Val(V); 和

Phe(F)、Tyr(Y)、Trp(W)。

可在酶序列内进行取代、添加、及/或缺失，只要保持本发明方法中所用 ADA 的功能。等同的酶通常具有与天然酶基本上相同的氨基酸序列。基本上与另一序列相同，但经一个或多个取代、添加及/或缺失而与其它序列不同的氨基酸序列，被认为是等同的序列、等同变体或保守变体。本发明蛋白质序列内氨基酸残基数目的优选少于 25%，更优选少于 10%经取代、添加、或缺失。

人类 ADA 可经本领域已知的方法制备。所述方法包括生物合成和化学合成。在生物合成中，酶可直接分离自细胞。此外，已知可以通过提供编码酶的 DNA,扩增或克隆 DNA,在适当的宿主的内表达此 DNA，以及收获酶而制备酶。例如，此酶可直接或间接翻译自编码酶氨基酸序列的 cDNA。在化学合成时，用四种碱基作原料来组装已知的氨基酸序列。

A. 获得编码 ADA 的核酸序列

编码 ADA 的 DNA 可通过本领域已知的方法源自适当的 cDNA 文库。参阅例如 Gwendolyn, S. et al., Molecular and Cellular Biology, 4(9):1712-1717(1984)，全文在此引入作为参考。此序列已指定为 Genebank 编号 GI: 14043372。

一般而言，完整的 DNA 链或 DNA 的其它片段可经利用公知的 DNA 或其片段作为探针而加以分离。为此，来自基因组或 cDNA 文库的限制片段可利用标记的寡核苷酸探针经 Southern 杂交而鉴定。例如，可通过利用已知序列的片段从人类匀浆的组织分离编码酶的 DNA，从而制备一个或多个寡核苷酸探针。探针是标记的，并且用于筛选在适当载体例如噬菌体 λ 内的基因组或 cDNA 文库。cDNA 文库可经已知的方法，例如描述于 Gubler and Hoffman, Gene, 25:263-270(1983)中的方法，从 mRNA 制备。寡核苷酸探针可用于从不同组织筛选 cDNA 文库。这些寡核苷酸探针应进行标记，从而可在杂交至筛选的文库中的 DNA 时被检测。这些方法是本领域公知的。对分离的 DNA 进行测序，并且用此序列制备额外的寡核苷酸探针。可重复此步骤以获得重叠

片段直到制备出完全的可读框。

扩增以及克隆DNA的方法是本领域公知的。参阅例如Sambrook and Russel, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York(2001)，全文在此引入作为参考。利用λ-gt10或λ-gt11-特异性寡聚体作扩增引物(可购自Clontech, Palo Alto, CA)，扩增 λ-gt10 或 λ-gt11 载体内的克隆是方便的。其它扩增程序是本领域公知的，例如连接酶链反应(LCR)、修复链反应(RCR)、以及 PCR 寡核苷酸连接分析(PCR-OLA)亦可用于扩增本发明的核酸。

作为上述的基因生物合成的替代方案，基于报道 DNA 序列，利用本领域已知的方法可化学地合成此基因。该方法包含描述于"Modern machine-aided methods of oligonucleotide synthesis", Brown T and Dorcas, J.S., In Oligonucleotide and Analogues a Practical Approach, Ed. F. Eckstern, IRL Press, Oxford UK(1995)中的方法，全文在此引入作为参考。也可以通过制备重叠的双链寡核苷酸、填充空位和将末端连接在一起而合成DNA。一般而言参阅 Sambrook et al., and Glover, D.M. and Hames, B.D., eds.Cloning, 2nd Ed., Vols. 1-4, IRL Press, Oxford, UK(1995)。

如果关注与人类来源的 DNA 相关的潜在病毒污染的风险，例如为了符合管理的要求，那么获得DNA的化学合成方法是优选的。

B.表达ADA

按上文描述得到的重组 DNA 分子，含有编码人类 ADA 的多核苷酸序列。此重组 DNA 可克隆于适当的宿主细胞并且经本领域已知的方法表达。一般而言，给克隆的基因提供表达载体，它指导酶在适当的宿主细胞中表达。然后可自宿主细胞中回收此酶。参阅 Sambrook et al.(2001)关于制备和操作核酸的方法。

扩增的或克隆的 DNA 可经本领域已知的方法在适当的载体中表达，优选在表达载体中表达。一般而言参阅 Sambrook et al.(2001)。表达载体能指导与其可操作性连接的基因的表达。用于重组 DNA 技术中的表达载体通常为质粒的形式。然而，本发明可以包括其它形式的表达载体，例如具有等同功能的病毒载体(例如：复制缺陷的逆转录

病毒、腺病毒等)。优选地，此表达载体是质粒，如公开于美国专利No.6,068,991中的那些，全文在此引入作为参考。

载体DNA，优选地为包括调控序列的表达载体形式，可经由常规的转化或转染技术引入原核的或真核的宿主细胞。本文中使用的术语“转化”及“转染”意指多种本领域公知的可将外来的核酸引入宿主细胞的技术，包括：磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE－右旋糖苷介导的转染、脂质粒介导的转染(脂转染)或电穿孔。转化或转染宿主细胞的适当方法可参见Sambrook, et al.(supra)，以及其它实验室手册。

表达载体优选含有至少一种表达控制序列，它可操作性连接至DNA序列或要表达的片段。此控制序列是基于用于表达的宿主细胞加以选择，并且插入载体内以控制和调节克隆的DNA序列的表达。

在重组表达载体中，“可操作性连接”是指将目的核苷酸序列以允许核苷酸序列表达的方式(例如在体内转录/翻译系统内，或当将载体导入宿主细胞时，在宿主细胞内)连接于调控序列。

术语"调控序列"包括启动子、增强子以及其它表达控制元件(例如：聚腺苷酸化信号)。所述调控序列描述于例如：Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 185, Academic Press, San Diego, CA(1990)。调控序列包括在许多类型的宿主细胞内指导核苷酸序列组成型表达的那些，以及仅在某些宿主细胞内指导核苷酸序列表达的那些(例如：组织特异的调控序列)。

适用的表达控制序列的实例是lac系统、trp系统、tac系统、trc系统、噬菌体λ的主操纵子以及启动子区、fd外被蛋白的控制区、酵母的糖酵解启动子，例如：3-磷酸甘油激酶的启动子、酵母酸性磷酯酶的启动子(例如Pho5)、酵母α-交配因子的启动子、以及源自多瘤、腺病毒、逆转录病毒、以及猿猴病毒的启动子，例如早和晚期启动子或SV40，以及其它已知的控制原核或真核细胞及其病毒的基因表达的序列或其组合。

适当的可诱导的非融合大肠杆菌表达载体的实例包括调控序列，例如：pTrc(Amann et al.,(1988) Gene 69:301-315)以及pET 11d(Studier et al., Gene Expression Technology:Methods to Enzvmolov 185, Academic Press, San Diego, California(1990))。由pTrc载体表达目标基因，是依赖于由杂交体trp-lac融合启动

子转录宿主 RNA 聚合酶。由 pET 11d 载体表达目标基因，是依赖于共同表达的病毒 RNA 聚合酶(T7 gn1)介导的 T7 gn10－lac 融合启动子进行的转录。该病毒聚合酶可由宿主株 BL21(DE3)或 HMS 174(DE3)提供，它们来自于具有在 lacUV 5 启动子控制转录下的 T7 gn1 基因的停留的λ原噬菌体。

适当的宿主细胞可为任何原核(例如大肠杆菌)或真核细胞(例如昆虫细胞、酵母或者哺乳动物的细胞)。一些适当的原核宿主包括，例如：大肠杆菌，例如大肠杆菌 SG-936、大肠杆菌 HB 101、大肠杆菌 DH5α、大肠杆菌 X2282、大肠杆菌 DHI、以及大肠杆菌 MRC1、大肠杆菌 BL21、假单胞菌物种、芽孢杆菌物种，例如：枯草芽孢杆菌、以及链霉菌物种。适当的真核细胞包括酵母以及其它真菌、昆虫、动物细胞，例如 COS 细胞以及 CHO 细胞、组织培养中的人类细胞以及植物细胞。优选地，宿主细胞是大肠杆菌。

本领域技术人员可以理解，表达载体的设计可以取决于以下因素，如要转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平等。本发明的表达载体可导入宿主细胞，从而产生由在此描述的核酸编码的 ADA，包括融合蛋白或肽。

融合表达载体中经常在融合部份与重组蛋白质的接合处引入蛋白水解切割位点，以便在纯化融合蛋白质后可从融合部份分离重组蛋白质。所述酶，及其相关识别序列包括因子 Xa、凝血酶以及肠激酶。典型的融合表达载体包括分别将谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、麦芽糖 E 结合蛋白质、或蛋白质 A 与目标重组蛋白质融合的 pGEX(Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson(1988) Gene 67:31-40)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, MA)以及 pRIT5(Pharmacia, Piscataway, NJ)。

在大肠杆菌中使重组蛋白质表达最大化的策略之一是在通过蛋白水解而切割重组蛋白质的能力受损的宿主细菌中表达蛋白质(Gottesman, Gene Expression Technology: Technology: Methods in Enzvmology 185, Academic Press, San Diego, California(1990) pp.119-128)。另一策略是改变要插入表达载体的核酸的核酸序列，从而使各氨基酸的各个密码子是大肠杆菌优先利用的密码子(Wads et al., Nucleic Acids Res(1992) 20:2111－2118)。本发明的核酸序

列的所述改变可用标准 DNA 合成技术或定点诱变进行。

细胞是在本领域公知的条件下生长。诱导克隆基因的表达，以表达大量的酶。优选地，利用的大肠杆菌表达载体包括 lac 系统启动子系统。ADA 的表达优选利用 IPTG 诱导。

C. 分离以及纯化 ADA

一般而言，可从溶解的细胞级分经标准方法分离酶。一些适当的方法包括沉淀以及液相色谱方案，例如离子交换、疏水相互作用、以及凝胶过滤。参阅例如，Methods Enzymol.- Guide to Protein Chemistry, Deutscher, Ed., Section VII pp.182-309(1990)；以及 Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, New York(1987)，全文在此引入作为参考。

此外，根据本领域已知的方法在制备性 SDS- PAGE 凝胶上分离酶，切出目的条带并且从聚丙烯酰胺基质上电泳洗脱蛋白质，可得到纯化的材料。经已知的方法从蛋白质移除洗涤剂 SDS，例如经透析或利用适当的柱，例如 Pierce 的 Extracti-Gel 柱。酶的混合物可依据 Laemmli, Nature 227:680-685(1970)的方法，经例如 SDS- PAGE 分离。此类方法是本领域公知的。

只要可有效地移除不需要的污染，纯化蛋白质的方法无特定的限制。一个经济的方法是将发酵液通过微型流化床而破碎细胞，以从细胞释放出酶。添加助滤器以及植绒剂(例如 PEI，可购自 VWR International, South Plainfield, NJ)到搅拌的培养液中，使污染物例如蛋白质以及其它细胞碎片不溶。适当的助滤器是 CELITE(可购自 World Minerals, Inc., Santa Barbara, CA)。然后可从培养液经适当大小的过滤器过滤而移除可溶的酶。理想地，过滤器将允许可溶的活性酶通过，而细胞蛋白质以及其它污染物的不溶级分被过滤器保留。然后可利用超滤器在溶液内浓缩酶。为此目的，使用 30,000 分子量截止(MWCO)的滤器。

ADA 活性分析

如此得到的酶应测定活性。本文中酶活性单位(U)是 37℃下每分钟使 1μmol ddA 脱氨基的酶量。理想地，最终酶效价是约 650-750 U/

毫升。可经添加酶至 2.4% ddA 溶液中在 37℃下进行分析。使反应在轻柔搅拌下进行 15 分钟。加入四氢呋喃停止反应。取样并进行 HPLC，以测定 ddI 的形成量。

固定 ADA

一旦纯化酶，需要用合适的缓冲液处理酶溶液至 pH 约 7.3 至约 7.6。虽然磷酸盐缓冲液是优选的，但使用的缓冲液的类型无特定的限制。理想地，溶液是用缓冲液稀释至活性约 250 至约 350 U/ml。

纯化的酶先固定于支持物上，支持物在和 ddA 反应前不溶于反应溶液。只要酶可固定在其上，支持物的类型无特定的限制。一般而言，将上述缓冲酶的稀释溶液加入含不溶支持物的溶液中，某些支持物需要经活化剂例如交联剂活化。交联剂经由 ADA 上的胺基团将 ADA 共价键合至支持物。

反应期间支持物保持不溶，并且在反应溶液内保持酶不溶。理想地，支持物是固态树脂材料，其直径约 250-600 微米。适当的支持物包括，例如 IPS-400(可购自 U.O.P., Des Plaines, IA)或 EUPERGIT(可购自 Rohm America Inc, Piscataway, NJ)。

交联剂无特定的限制，只要它能将酶共价连接至支持物。交联剂的选择将取决于选择的支持物，并且对本领域技术人员而言是容易明确的。树脂支持物以及交联剂适当的组合是硅藻土和戊二醛、IPS-400 和戊二醛、琼脂糖和 CNBr、以及伯胺或羧基官能化的树脂支持物和碳二亚胺。固态支持物和交联剂其它适当的组合，对本领域技术人员而言是容易明确的。

可以分批或连续方法固定酶到支持物上。例如，通过将缓冲的酶溶液与活化的支持物混合数小时而进行分批法。然后利用简单过滤技术收集固定化的酶。通过固态支持物的大小测定颗粒保留尺寸。对于 IPS-400，使用具有约 20 微米至约 30 微米的颗粒保留尺寸的过滤器。高速回收可施加真空，然而支持物不应被干燥。

此外，可在颗粒保留尺寸足以保持固态支持物的过滤器上收集活化的支持物。然后使缓冲的酶溶液通过支持物。将过滤的酶母液重复地通过过滤器以使酶的固定最大化。在连续法中，可使固态支持物成为浆，并且倒入层析柱。回收后，用水冲洗固定化的酶以去除任何杂

质或未结合的酶。优选地，固定化的酶的效价为至少约 40U。

使 ddA 与 ADA 反应

然后将固定化的 ADA 与 ddA 溶液混合以获得 ddI。ddA 至 ddI 的反应期间产生氨。由于 ddA 是在比现有技术更浓的浓缩溶液中加入酶中，混合物中的氨副产物可导致 pH 升高，范围是约 9.2 升至约 9.5。不预期在这些条件下使用微生物的 ADA 或未结合的 ADA 可完成反应，因为酶将在这些升高的 pH 下失活。然而，使用固定于固态支持物的人类形式的 ADA 可减少该降解。结果，ADA 保留活性，并且以比以前更快、产量更高的进度进行反应。

进行反应的温度为约 20℃至约 50℃。理想地，反应是维持在约 25-30℃的温度。反应可在更低的温度下进行，然而这将导致更长的反应时间。在超过约 50℃的温度下进行反应可导致酶的活性受损及/或变性。

以分批或连续法添加市售的 ddA(可购自 Ajinomoto, Tokyo, Japan)至固定化的 ADA 的水溶液。可利用比 ADA 未经固定化的方法中使用的浓度高得多的 ddA 浓度进行反应。反应溶液中 ddA 可接受的浓度范围为约 1%至约 15%。理想地，向固定化 ADA 中添加约 4%至 10%的 ddA 水溶液，更优选约 5-6% ddA 的水溶液。在允许反应进行的条件下进行反应，并且持续一段时间直到保留约 1%或更少的 ddA。

在分批法中，将 ddA 添加入固定化 ADA 在水中的悬浮液并使得反应进行。完全反应应该进行约 5 至 8 小时。一旦完成反应，可过滤回收固定化的 ADA 以便再利用，接着用水洗涤。此外，去除 ddI 产物后，母液可再利用以使产率最大化。

在连续法中，可将 ddA 溶液加入固定化 ADA 装填的柱。理想地，高度与直径比为大约 6，但该比例并不重要。以一定的速率和时间加入 ddA 溶液，以便保留约 1%或更少的 ddA。完全反应应该进行约 120 小时。流速取决于柱的尺寸、ddA 的浓度、以及反应的温度。此外，可使用连续法，其中经由装填的柱使 ddA 溶液再循环。以一定的速率和时间再循环 ddA 溶液，以便保留约 1%或更少的 ddA。流速取决于柱的尺寸、ddA 的浓度、以及反应的温度。对本领域技术人员而言，引入 ddA 溶液的速率的选择是容易明确的。

回收 ddI

ddA 反应至 ddI 后，ddI 在高 pH 值(>8)下是以铵盐的形式存在于溶液。在回收步骤中，从溶液移除 ddI。这是通过将 ddI 从溶液结晶出来而完成的。可利用简单蒸馏方法去除反应的副产品氨，并且产生游离酸形式的 ddI。蒸馏可依序地进行，第一次蒸馏使溶液的浓度为约 10-12%(基于起始 ddA)，接着添加水并且进一步蒸馏直到浓度再一次到达约 10-12%并且 ddI 浆的 pH 低于大约 8。然后可冷却悬浮液至约 0-5℃并且保持至少一个小时。

此 ddI 可过滤并且用丙酮洗涤滤饼。然后可在例如真空、约 45-50℃下干燥固体至恒重。理想地，保留反应母液以便再利用于分批或连续法中，将 ddA 反应至 ddI。此外，亦可再利用水洗涤。

无任何再循环可以获得约 82%的产率。然而，当再循环反应母液时，产率可增加至约 96-99%。产生的 ddI 纯度大于 99%。

下列实施例旨在显示本发明的实施，并不旨在限制本发明的范围。除非特别说明，所有百分比是重量/体积。

在此引入在发明背景、详细描述、附图简述、以及实施例内引用的各文件(包括专利、专利申请案、期刊、摘要、实验手册、书籍、Genebank 编号、SWISS-PROT 编号、或其它公开内容)的完整公开内容作为参考。进一步，在此引入提交的序列表纸件和它的对应的计算机可读形式的全文作为参考。

实施例 1

制备人类腺苷脱氨酶(ADA)基因转化的重组大肠杆菌

用限制酶 BspHI 和 BamHI 消化大肠杆菌表达质粒 pBMS2000，并且在 0.7%琼脂糖凝胶上分级分离。从凝胶中切出相当于 4.5Kb 的片段、洗脱、经乙醇沉淀浓缩。用限制酶 Nco I 和 BamHI 从含有编码人类 ADA 基因的质粒切出合成的人类 ADA DNA。将含有合成的人类 ADA 基因的 Nco1-Bam HI 片段与经限制酶 BspHI 和 BamHI 消化获得的 pBMS2000 的 4.5Kb 片段连接。将连接的 DNA 转化到大肠杆菌宿主 BL21 中。将转化的细胞铺板到补充了 30 微克硫酸新霉素的 Lauria 培养液琼脂平板。在某些菌落上进行限制酶分析与 SDS-PAGE 分析。选择一个具有正确

的限制分析以及酶活性的菌落进行分析。

实施例 2

含有合成的人类腺苷脱氨酶基因的重组大肠杆菌的发酵

发酵培养基的配方

接种培养基(每 100 毫升)

试剂	含量
Soytone	1 克
酵母提取物	0.5 克
NaCl	0.16 克
硫酸新霉素(657 毫克/克)	2.0 毫克

基础培养基(每升)

试剂	含量
K_2HPO_4	14 克
柠檬酸	2 克
酵母提取物	3.2 克
NaCl	1.6 克
$MgSO_4$-$7H_2O$	2.2 克
硫酸新霉素	18 毫克
甘油	3.4 毫升
PPG	0.2 毫升

补料培养基(每升)

试剂	含量
Cerelose	200 克
酵母提取物	100 克
硫酸新霉素	18 毫克

PH 对照-碱

试剂	含量
浓缩的 NH_4OH	250 毫升
H_2O	750 毫升

PH 对照-酸

试剂	含量
85%磷酸	200 毫升
水	800 毫升

A. 制备接种母液

将 0.2 毫升解冻的重组大肠杆菌接种到含有 100 毫升上述接种培养基的 500 毫升 Erlenmeyer 烧瓶中。在旋转式孵育箱中 300 rpm、28℃下振荡烧瓶 24 小时，以制备接种物。

B. 发酵

将 50 毫升的接种物接种到具有 1 升工作体积的 5 升发酵器。操作条件是：温度 28℃，1000 rpm 搅拌；1 vvm 的通气；记录溶解氧（DO）设置并且确定为 100%； pH 用 NH_4OH 以及磷酸控制为 pH6.8－7.2。

2 升的补料培养基如下制备。6 小时后起始 Ramp 补料，补料速率为 5 毫升/小时，以 1.2 ml/小时/小时增加。细胞在监测下生长 24 小时。根据需要调整空气流动、补料速率、以及温度，以控制 DO 大于或等于起始设置的 20%。然后将培养温度减低至 16℃。接种后 16-18 小时，用异丙基β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导细胞至 80 微克/毫升的终浓度。在 600 纳米的光密度是 20-30。监测以及补料总共持续 40-48 小时或直到补料用尽。培养液含有 84 单位/毫升的溶液。(1 单位(U)=37℃下，1 微摩尔脱氨的 ddA/分钟)。

实施例 3

从重组大肠杆菌发酵物中分离并固定人类 ADA

将 10 升的发酵培养液通过微型流化床(M-110Y 型，可购自

Microfluidics, Newton, MA)。操作压力是 12,000-20,000 psi 直到至少 90%的活性自细胞释放出来。通过取出部分微流化的培养液、离心样品、并且测量上清液部分的活性而测量活性。上清液活性量代表释放出的活性量。通常须要通过微流化床一次。

于 10 L 充分搅拌的微流化的培养液中添加 1.5 千克的 CELITE(最终浓度 15%w/v)。然后加入 0.30 L 的 10%水溶性聚乙烯亚胺(PEI)(最终浓度 0.3%v/v)。搅拌至少 30 分钟然后过滤去除不溶物。滤饼用 3.0-4.0 L 的水洗涤。

澄清的滤液经由 30,000 MWCO 过滤盒(Pellicon 2 单位，聚醚砜低蛋白质结合盒，0.5 m^2 过滤区，可购自 Millipore, Bedford, MA)超滤至最终酶效价为 650-750 U/毫升。样品经 1.25 L 的 50mM 磷酸盐缓冲液 pH7.3-7.6 稀释(至酶活性为 250-350 U/毫升)。

于 550 克 IPS-400 蛋白质固定支持物中加入 2.75 升的 2.5%戊二醛。在室温下轻柔搅拌 2 小时并且倾析或过滤到尺寸 60 目的滤器上。活化的支持物用 4 升水洗涤 10 次。

于稀释的酶溶液(约 0.95L)中加入 1.10 千克活化的 IPS-400 固定支持物，在 20-25℃下轻柔地搅拌 2 小时。在具有有效的孔径足以保留固定支持物的滤器收集固定化的酶，并且用 5 倍体积的水洗涤。

此外，在自来水中使 IPS-400 成为浆，并且在装有具有 20 至 30 微米粒度保留(等级 604 或 415)的快速流动滤纸的 Buchner 漏斗上收集。施加真空以去除过量的水，但不干燥支持物。将稀释的酶加入树脂中，施加真空(20" Hg)并且收集母液。停止真空，对母液取样(通过#1)测量活性，然后添加回支持物中，再度施加真空。在重复四次，总共通过 IPS-400 五次。通过第 5 次后，在树脂中加入 1.5 L 水并且施加真空以洗涤固定化的酶。

作为另一种替代，在自来水中使 IPS-400 成为浆，并且倒入层析柱。静置流化床，然后使水通过柱(向上流动)以冲洗支持物。稀释的酶溶液经由泵通过柱(1 至 25 ml/分钟)。添加酶后，向柱上泵入 1.5 L 的水以洗涤固定化的酶。

固定化的酶分析显示酶活性约为 100U/克。(1 单位=37℃下，1 微摩尔脱氨的 ddA/分钟)。

实施例 4

利用重组的人类 ADA 固定的酶从 ddA 制备 ddI(分批)

在 30℃下于 1900 毫升的水中加入 100.0 克 ddA(亦可使用来自前面的步骤的母液)。加入 ddA 后(不需要完全的溶解),加入 4000 U 固定化的重组人类腺苷脱氨酶。搅拌下将反应维持在 30℃。当残留 ddA 的水平少于或等于 1%的最初添加的 ddA 量时反应完成(大约 5-8 小时)。经过滤(20-30 微米介质)移除酶固体并且用 100 毫升水洗涤酶滤饼。在 0-5℃下维持使用的酶为湿滤饼(多至 72 小时)并且可再循环至另一批。经由 CUNO 过滤垫(0.4 至 1 微米),然后经由 0.2 微米过滤介质过滤 ddI 溶液。

实施例 5

利用重组的人类 ADA 固定的酶从 ddA 制备 ddI(连续柱)

以 380 U 固定化的重组人类腺苷脱氨酶,用水对柱子(h/d 比=6)进行浆装填。用 30mM 的 NH_4OH 洗涤柱至 pH9.5,然后用水洗涤至 pH6.5-7.5。维持温度于 20℃下,使 4%的 ddA 水溶液通过柱,速率为 7.2 毫升/分钟,进行 120 小时。柱流出物的 pH 是 9.2-9.5 并且含有>99% ddI,残留<1%的 ddA。在最终分离前,产生的 ddI 溶液经由 CUNO 垫和 0.2 微米滤器过滤。

实施例 6

利用重组的人类 ADA 固定的酶从 ddA 制备 ddI(再循环柱)

以 1000U 固定化的重组人类腺苷脱氨酶,用水对柱子(h/d 比=2.7)进行浆装填。在 30℃下于装有机械搅拌器的 3-颈圆底烧瓶中将 25.0 克的 ddA 溶于 475 毫升的水(或来自前面批次的母液,用水稀释至 475 毫升)。在 30℃下将 ddA 溶液以约 50 毫升/分钟通过酶柱而循环(根据需要,循环速度可变化)。

当通过 HPLC 分析出残留 ddA 少于或等于 1%的最初添加的 ddA 量时,反应是完全的(大约 3-9.5 小时)。然后用 25 毫升的水洗涤柱并且可以维持在 0-5℃(多至 72 小时),以便再利用。在最终分离前,产生的 ddI 溶液经由 CUNO 垫和 0.2 微米滤器过滤。

实施例 7

分离 ddI

在真空、内部批次温度 20-40℃下蒸馏 ddI 溶液。当 ddI 的浓度到达起始 ddA 的 10-12%w/v 时停止蒸馏。此时的 pH 一般是 8.1-8.3。加入额外的水，然后继续蒸馏直到浓度再一次到达 10-12%，并且 ddI 浆的 pH 小于 8(典型地 7.8-7.9)。将 ddI 悬浮液冷却至 0-5℃并且维持至少 1 小时。过滤此冷浆并且用 0-5℃的水洗涤滤饼。可保持母液以及水洗涤，以便在另一批中再循环。

滤饼用 0-5℃丙酮洗涤。在真空、45-50℃下干燥固体至恒重。在母液再循环情况下，预期第一轮的产率为约 82%，随后的四轮以后的产率为 96-99%(总体>96%)。产生的 ddI 纯度大于 99%。

比较实施例 1

比较大肠杆菌 ADA 和重组的人类固定化 ADA 的活性

将来自重组大肠杆菌的微生物 ADA 部分纯化及分离为硫酸铵悬浮液。离心大肠杆菌发酵培养液(42U ADA/毫升，2 升)，收集细胞沉淀物并且用 1 升 100mM 的磷酸盐缓冲液 pH7.5 洗涤。再一次离心细胞并且重新悬浮于 2 升的补充 20%甘油的上述缓冲液。细胞通过微型流化床一次。经离心移除细胞碎片，将产生的上清液经 30,000 MWCO 盒超滤浓缩。酶浓缩至最终效价 390U/毫升。加入硫酸铵至 50%饱和，产生的沉淀经离心收集并且重新悬浮于 100 毫升去离子水。浆的最终效价是 740U/毫升；浆的蛋白质含量是约 75 毫克/毫升。

下表描述利用上述的微生物腺苷脱氨酶与利用按照实施例 4 的一般程序获得的重组的人类 ADA 固定化的酶，导致 52-60 克/升的 ddA 水溶液转化至 ddI。从表 2 的结果可以看出，重组的人类固定化酶比微生物的酶显著更稳定，并且允许在较少单位的酶和短时间内完成反应。

表 2-比较大肠杆菌与重组的人类 ADA 的 ddA 产量

ADA 的来源	酶活性 (U/克 ddA)	反应温度 (℃)	反应时间 (小时)	ddA 转化至 ddI (%)
大肠杆菌 $(NH_4)_2SO_4$ 悬浮液	87.5	40	16	16
大肠杆菌 $(NH_4)_2SO_4$ 悬浮液	125	37	24	26
重组的人类固定化 ADA	40	30	4.5	100
重组的人类固定化 ADA	40	40	1.5	100

因此，尽管描述的是本发明的优选实施方案，其它和进一步的实施方案、修改和改进也是本领域技术人员公知的， 并且权利要求的范围中包括所述进一步的实施方案、修改和改进。

<110> Skonezny, Paul M.
Politino, Michael
Liu, Suo-Win
Alfred, Boyle
Chen, Jason
Stein, Gregory
Franceschini, Thomas
Anderson, Wendy

<120> 利用腺苷脱氨酶制备双脱氧肌苷的方法

<130> GY0111 PCT

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 363
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(363)
<223> gi 14043373

<400> 1

Met Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asp Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val
1 5 10 15

His Leu Asp Gly Ser Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg
20 25 30

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

Val Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Thr Leu Pro Asp Phe Leu Ala Lys
50 55 60

Phe Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Cys Arg Glu Ala Ile Lys
65 70 75 80

Arg Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
85 90 95

Tyr Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val

```
            100                 105                 110

Glu Pro Ile Pro Trp Asn Gln Ala Glu Gly Asp Leu Thr Pro Asp Glu
        115                 120                 125

Val Val Ala Leu Val Gly Gln Gly Leu Gln Glu Gly Glu Arg Asp Phe
    130                 135                 140

Gly Val Lys Ala Arg Ser Ile Leu Cys Cys Met Arg His Gln Pro Asn
145                 150                 155                 160

Trp Ser Pro Lys Val Val Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Gln Gln Gln Thr
                165                 170                 175

Val Val Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Glu Thr Ile Pro Gly Ser Ser
            180                 185                 190

Leu Leu Pro Gly His Val Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Val Lys Ser Gly
        195                 200                 205

Ile His Arg Thr Val His Ala Gly Glu Val Gly Ser Ala Glu Val Val
    210                 215                 220

Lys Glu Ala Val Asp Ile Leu Lys Thr Glu Arg Leu Gly His Gly Tyr
225                 230                 235                 240

His Thr Leu Glu Asp Gln Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Gln Glu Asn
                245                 250                 255

Met His Phe Glu Ile Cys Pro Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Trp
            260                 265                 270

Lys Pro Asp Thr Glu His Ala Val Ile Arg Leu Lys Asn Asp Gln Ala
        275                 280                 285

Asn Tyr Ser Leu Asn Thr Asp Asp Pro Leu Ile Phe Lys Ser Thr Leu
    290                 295                 300

Asp Thr Asp Tyr Gln Met Thr Lys Arg Asp Met Gly Phe Thr Glu Glu
305                 310                 315                 320

Glu Phe Lys Arg Leu Asn Ile Asn Ala Ala Lys Ser Ser Phe Leu Pro
                325                 330                 335
```

Glu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly
340 345 350

Met Pro Pro Ser Ala Ser Ala Gly Gln Asn Leu
355 360

<210> 2
<211> 1559
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> gi 14043372

<400> 2
ggcacgaggc gtggccggcc gcggccaccg ctggccccag ggaaagccga gcggccaccg 60

agccggcaga gacccaccga gcggcggcgg agggagcagc gccggggcgc acgagggcac 120

catggcccag acgcccgcct tcgacaagcc caaagtagaa ctgcatgtcc acctagacgg 180

atccatcaag cctgaaacca tcttatacta tggcaggagg agagggatcg ccctcccagc 240

taacacagca gaggggctgc tgaacgtcat tggcatggac aagccgctca cccttccaga 300

cttcctggcc aagtttgact actacatgcc tgctatcgcg ggctgccggg aggctatcaa 360

aaggatcgcc tatgagtttg tagagatgaa ggccaaagag ggcgtggtgt atgtggaggt 420

gcggtacagt ccgcacctgc tggccaactc caaagtggag ccaatcccct ggaaccaggc 480

tgaaggggac ctcaccccag acgaggtggt ggccctagtg ggccagggcc tgcaggaggg 540

ggagcgagac ttcggggtca aggcccggtc catcctgtgc tgcatgcgcc accagcccaa 600

ctggtccccc aaggtggtgg agctgtgtaa gaagtaccag cagcagaccg tggtagccat 660

tgacctggct ggagatgaga ccatcccagg aagcagcctc ttgcctggac atgtccaggc 720

ctaccaggag gctgtgaaga gcggcattca ccgtactgtc cacgccgggg aggtgggctc 780

ggccgaagta gtaaaagagg ctgtggacat actcaagaca gagcggctgg gacacggcta 840

ccacaccctg gaagaccagg ccctttataa caggctgcgg caggaaaaca tgcacttcga 900

gatctgcccc tggtccagct acctcactgg tgcctggaag ccggacacgg agcatgcagt 960

cattcggctc aaaaatgacc aggctaacta ctcgctcaac acagatgacc cgctcatctt 1020

caagtccacc ctggacactg attaccagat gaccaaacgg gacatgggct ttactgaaga 1080

ggagtttaaa aggctgaaca tcaatgcggc caaatctagt ttcctcccag aagatgaaaa 1140

gagggagctt ctcgacctgc tctataaagc ctatgggatg ccaccttcag cctctgcagg 1200

gcagaacctc tgaagacgcc actcctccaa gccttcaccc tgtggagtca ccccaactct 1260

gtggggctga gcaacatttt tacatttatt ccttccaaga agaccatgat ctcaatagtc 1320

agttactgat gctcctgaac cctatgtgtc catttctgca cacacgtata cctcggcatg 1380

gccgcgtcac ttctctgatt atgtgccctg gccagggacc agcgcccttg cacatgggca 1440

tggttgaatc tgaaaccctc cttctgtggc aacttgtact gaaaatctgg tgctcaataa 1500

agaagcccat ggctggtggc atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 1559

<210> 3
<211> 1103
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> gi 14043372的序列变体

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> NCO I 限制位点

<220>
<221> misc_feature
<222> (1098)..(1103)
<223> BAM HI 限制位点

<400> 3
ccatggccca gacgccggcc ttcgacaagc cgaaagtaga actgcatgtc cacctggacg 60

gttccatcaa gccggaaacc atcctgtact atggccgtcg tcgcggtatc gccctgccgg 120

ctaacacagc agagggtctg ctgaacgtca ttggcatgga caagccgctg accctgccgg 180

acttcctggc caagtttgac tactacatgc ctgctatcgc gggctgccgt gaggctatca 240

aacgtatcgc ctatgagttt gtagagatga aggccaaaga gggcgtggtg tatgtggagg 300

tgcgctacag tccgcacctg ctggccaact ccaaagtgga gccaatcccg tggaaccagg 360

ctgaagggga cctcaccccg gacgaggtgg tagccctcgt gggccagggc ctgcaggagg 420

gtgagcgtga cttcggcgtc aaggcccgct ccatcctgtg ctgcatgcgc caccagccga 480

actggtcccc gaaggtggtg gagctgtgta agaagtacca gcagcagacc gtggtggcca 540

ttgacctggc tggtgatgag accatcccag gcagcagcct cttgccgggt catgtccagg 600

cctaccagga ggctgtgaag agcggcattc accgtactgt ccacgccggt gaggtgggct 660

cggccgaagt agtaaaagag gctgtggaca ttctcaagac agagcgcctg ggtcacggct 720

accacaccct ggaagaccag gccctctata accgtctgcg ccaggaaaac atgcacttcg 780

agatctgccc gtggtccagc tacctcactg gtgcctggaa gccggacacg gagcatgcag 840

tcattcgcct caaaaatgac caggctaact actcgctcaa cacagatgac ccgctcatct 900

tcaagtccac cctggacact gattaccaga tgaccaaacg tgacatgggc tttactgaag 960

aggagtttaa acgtctgaac atcaatgcgg ccaaatctag tttcctccca gaagatgaaa 1020

agcgcgagct gctcgacctg ctctataaag cctatggcat gccaccgtca gcctctgcag 1080

gtcagaacct ctgataagga tcc 1103