



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110591991 A

(43)申请公布日 2019.12.20

(21)申请号 201910693072.1

C12N 15/70(2006.01)

(22)申请日 2013.05.13

C07K 16/28(2006.01)

(30)优先权数据

C12N 9/52(2006.01)

1208367.1 2012.05.14 GB

C12R 1/19(2006.01)

(62)分案原申请数据

201380025191.0 2013.05.13

(71)申请人 UCB医药有限公司

地址 比利时布鲁塞尔

(72)发明人 P·J·巴塞特 D·P·哈姆费雷斯

P·M·帕特尔

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51)Int.Cl.

C12N 1/21(2006.01)

权利要求书2页 说明书32页

序列表55页 附图24页

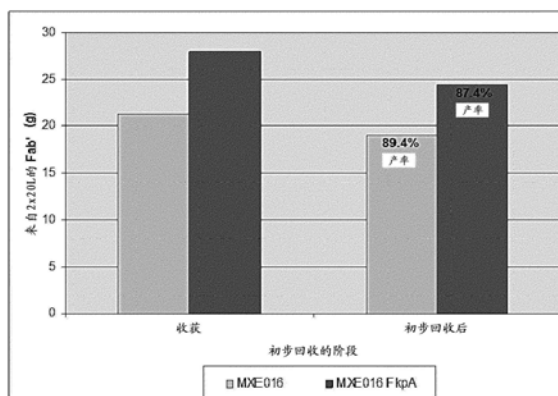
(54)发明名称

用于蛋白质表达的重组细菌宿主细胞

(57)摘要

本公开内容涉及重组革兰阴性细菌细胞,所述细胞包含:a.)编码在选自D133、H145、H157、N31、R62、I70、Q73、C94、S95、V98、Q99、R100、L108、Y115、V135、L136、G140、R144和G147的一个或多个氨基酸上具有突变的spr蛋白的突变spr基因,和b.)能够表达或过表达一种或多种能够促进蛋白质折叠的蛋白例如FkpA、Skp、SurA、PPiA和PPiD的基因,其中细胞相较于野生型细胞具有降低的Tsp蛋白活性,使用所述细胞的方法,细胞用于表达蛋白特别是抗体,例如抗FcRn抗体的用途,以及通过本文中描述的方法产生的蛋白。

“MXE016”细胞系的来自20升中试生产的收获以及初步回收



1. 一种重组革兰阴性细菌细胞,其包含:
 - a. 编码在选自D133、H145、H157、N31、R62、I70、Q73、C94、S95、V98、Q99、R100、L108、Y115、V135、L136、G140、R144和G147的一个或多个氨基酸上具有突变的spr蛋白的突变spr基因和
 - b. 能够表达或过表达一种或多种能够促进蛋白质折叠的蛋白例如FkpA、Skp、SurA、PPiA和PPiD的基因其中所述细胞相较于野生型细胞具有降低的Tsp蛋白活性。
2. 权利要求1的细胞,其中所述突变spr基因编码具有选自D133A、H145A、H157A、N31Y、R62C、I70T、Q73R、C94A、S95F、V98E、Q99P、R100G、L108S、Y115F、V135D、V135G、L136P、G140C、R144C和G147C的一个或多个突变的spr蛋白。
3. 权利要求2的细胞,其中所述突变spr基因编码具有选自S95F、V98E、Y115F、D133A、V135D、V135G和G147C的一个或多个突变的spr蛋白。
4. 权利要求3的细胞,其中所述突变spr基因编码具有突变C94和H145A例如C94的spr蛋白。
5. 权利要求2的细胞,其中所述突变spr基因编码具有选自D133A、H145A和H157A的突变的spr蛋白。
6. 权利要求1的细胞,其中所述突变spr基因编码具有选自C94A的突变的spr蛋白。
7. 任何前述权利要求的细胞,其中将所述突变spr基因整合入细胞的基因组。
8. 任何前述权利要求的细胞,其中将编码能够促进蛋白质折叠的蛋白的基因例如在质粒上瞬时转染入细胞。
9. 权利要求1至7的任一项的细胞,其中将编码能够促进蛋白质折叠的蛋白的基因整合进入细胞基因组。
10. 任何前述权利要求的细胞,其中所述能够促进蛋白质折叠的蛋白为FkpA、Skp或FkpA与Skp的组合,特别是FkpA。
11. 任何前述权利要求的细胞,其中所述细胞还包含下列突变的基因的一个或多个:
 - a. 编码具有伴侣蛋白活性和降低的蛋白酶活性的DegP蛋白的突变的DegP基因;
 - b. 突变的ptr基因,其中所述突变的ptr基因编码具有降低的蛋白酶活性的蛋白酶III蛋白或为敲除突变的ptr基因;和
 - c. 突变的OmpT基因,其中所述突变的OmpT基因编码具有降低的蛋白酶活性的OmpT蛋白或为敲除突变的OmpT基因。
12. 任何前述权利要求的细胞,其中所述细胞包含编码具有降低的蛋白酶活性的Tsp蛋白的突变的Tsp基因,或为敲除突变的Tsp基因。
13. 权利要求12的细胞,其中所述细胞的基因组,除突变的spr基因和突变的Tsp基因外,与野生型细菌细胞是同基因的。
14. 任何前述权利要求的细胞,其中所述细胞不包含编码DsbC的基因。
15. 一种重组革兰阴性细菌细胞,其相较于野生型细胞具有降低的Tsp蛋白活性,并且具有编码能够抑制包含突变的Tsp基因的细胞的表型的spr蛋白的突变spr基因,和适合于表达能够促进蛋白质折叠的蛋白的编码FkpA、Skp或FkpA与Skp的组合,特别是FkpA的基因,其中除相较于野生型细胞降低Tsp蛋白活性所需的修饰和突变的spr基因外,所述细胞

的基因组与野生型细菌细胞是同基因的。

16. 权利要求15的细胞,其中所述突变spr基因编码具有选自N31Y、R62C、I70T、Q73R、C94A、S95F、V98E、Q99P、R100G、L108S、Y115F、D133A、V135D、V135G、L136P、G140C、R144C、H145A、G147C、H157A和W174R的一个或多个突变的spr蛋白。

17. 权利要求15的细胞,其中所述突变spr基因编码具有一个或多个权利要求1至6的任一项中定义的突变的spr蛋白。

18. 任何前述权利要求的细胞,其中所述细胞具有敲除突变的Tsp基因,所述基因包含针对基因起始密码子的突变和/或位于基因起始密码子下游和基因终止密码子上游的一个或多个终止密码子。

19. 权利要求18的细胞,其中所述敲除突变的Tsp基因包含通过针对基因起始密码子的错义突变产生的限制性标记位点和任选地一个或多个其它点突变。

20. 权利要求19的细胞,其中所述敲除突变的Tsp基因包含SEQ ID NO:3。

21. 任何前述权利要求的细胞,其中所述细胞是大肠杆菌,例如其中所述大肠杆菌是菌株K12或W3110。

22. 任何前述权利要求的细胞,其中所述细胞包含编码目标蛋白的多核苷酸序列。

23. 权利要求21的细胞,其中所述目标蛋白为抗体或其抗原结合片段。

24. 权利要求22的细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段特异于FcRn。

25. 一种重组革兰阴性细菌细胞,其相较于野生型细胞具有降低的Tsp蛋白活性并且包含编码突变spr蛋白的突变spr基因,以及编码适合用于表达能够促进蛋白质折叠的蛋白的基因的基因和编码特异于FcRn的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列。

26. 权利要求25的细胞,其中所述细胞包含编码具有降低的蛋白酶活性的Tsp蛋白的突变的Tsp基因或敲除突变的Tsp基因。

27. 一种用于产生目标蛋白的方法,包括在对于表达目标重组蛋白是有效的条件下于培养基中培养权利要求1至26的任一项中定义的重组革兰阴性细菌细胞,和从重组革兰阴性细菌细胞的周质和/或培养基回收目标重组蛋白。

28. 权利要求27的方法,其中所述方法还包括从细胞回收目标蛋白。

29. 权利要求28的方法,其中从周质和/或上清液回收目标蛋白。

用于蛋白质表达的重组细菌宿主细胞

[0001] 本申请是申请日为2013年5月13日、发明名称为“用于蛋白质 表达的重组细菌宿主细胞”的中国发明专利申请No.201380025191.0 的分案申请。

[0002] 本发明涉及重组细菌宿主菌株,特别是大肠杆菌 (*E.coli*)。本发明 还涉及用于在这样的细胞中产生目标蛋白的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 细菌细胞例如大肠杆菌通常用于产生重组蛋白。特别地由于细菌 细胞作为宿主细胞允许通过质粒进行基因插入的通用性质,将细菌细 胞例如大肠杆菌用于产生重组蛋白有许多有利方面。大肠杆菌已被用 于产生许多重组蛋白,包括人胰岛素。

[0005] 尽管使用细菌细胞来产生重组蛋白存在许多有利方面,但仍然存 在显著的缺陷,包括难以产生蛋白酶敏感性蛋白质。蛋白酶在代谢回 转大肠杆菌周质和细胞质中老旧的、受损的或错误折叠的蛋白质中起 着重要作用。细菌蛋白酶对目标重组蛋白进行降解,从而通常显著地 减少活性蛋白的产率。

[0006] 许多细菌蛋白酶已被鉴定。在大肠杆菌中,已鉴定了蛋白酶,包 括蛋白酶III (ptr)、DegP、OmpT、Tsp、prlC、ptrA、ptrB、pepA-T、 tsh、espc、eatA、clpP和lon。

[0007] Tsp(也称为Prc)为60kDa的周质蛋白酶。Tsp的第一种已知底物 为青霉素结合蛋白-3 (PBP3) (Determination of the cleavage site involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*; Nagasawa H, Sakagami Y, Suzuki A, Suzuki H, Hara H, Hirota Y. *J Bacteriol.* 1989 Nov; 171 (11) : 5890-3 和 Cloning, mapping and characterization of the *Escherichia coli* Tsp gene which is involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3; Hara H, Yamamoto Y, Higashitani A, Suzuki H, Nishimura Y. *J Bacteriol.* 1991 Aug; 173 (15) : 4799-813), 但后来发现Tsp还能够切割噬 菌体尾部蛋白,从而其被更名为尾特异性蛋白酶 (Tsp) (Silber等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:295-299 (1992))。Silber等人 (Deletion of the prc (tsp) gene provides evidence for additional tail-specific proteolytic activity in *Escherichia coli* K-12; Silber, K.R., Sauer, R.T.; *Mol Gen Genet* 1994 242:237-240) 描述了prc缺失株 (KS1000), 其中通 过用包含Kan^r标记物的片段替代prc基因的区段来产生突变。

[0008] 期望降低Tsp (prc) 活性以减少目标蛋白的蛋白水解。然而,发现 不存在蛋白酶 prc的细胞在低同渗容摩下显示热敏生长。Hara等人分 离了包含基因外抑制子 (spr) 突变的抗热回复体 (Hara等人, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996))。Spr是18kDa的膜 结合周质蛋白酶, 并且spr的底物为Tsp和外膜中在细胞分裂过程中参与细胞壁水解的 肽聚糖。Spr基因被命名为 UniProtKB/Swiss-Prot P0AFV4 (SPR_ECOLI)。

[0009] 已描述了包含突变的spr基因的改良蛋白酶缺陷型菌株。Chen等 人描述了具有 prc (Tsp) 和另一种蛋白酶DegP的突变的不同组合的大 肠杆菌菌株的构建,其通过扩增基因的上下游区域,随后将这些区域 一起连接在包含选择标记和sprW174R突变 (重组抗体片段在大肠杆 菌 (*Escherichia coli*) 周质中的高水平积累需要三重突变 (Δ DegP Δ prc

sprW174R) 宿主菌株) 的载体上来产生 (Chen C, Snedecor B, Nishihara JC, Joly JC, McFarland N, Andersen DC, Battersby JE, Champion KM. Biotechnol Bioeng. 2004 Mar 5; 85 (5) : 463-74)。已发现 Δ DegP、 Δ prc 和 sprW174R 突变的组合提供最高水平的抗体轻链、抗体重链和 F(ab')₂-LZ。EP1341899 公开了一种大肠杆菌菌株, 其缺乏分别编码蛋白酶 DegP 和 Prc 的染色体 DegP 和 prc, 并且具有突变 spr 基因, 所述基因编码抑制由具有 prc 突变体的菌株显示的生长表型的蛋白。

[0010] 包含 Tsp 和 spr 的突变的其它改良蛋白酶缺陷型菌株已描述于 W02011/086136 中。

[0011] W002/48376 中公开的菌株为 lac⁻, 其不能在其中将胸苷、岩藻糖 或麦芽糖用作碳源的培养物中生长。这对于期望以商业规模使用的菌株可以是严重的不利方面。还存在与所述菌株相关的其它不利方面, 例如缺乏碱性磷酸酶的产生。后者是参与利用来自培养基的磷酸盐的周质蛋白。

[0012] 某些蛋白显示肽酰脯氨酰异构酶和/或异构酶活性和/或伴侣蛋白活性, 并且已被发现当在用于重组蛋白表达的细胞系中使用时提供有利性质。

[0013] 本发明提供了具有 Tsp 和 spr 突变以及至少一个编码能够促进蛋白质折叠的蛋白的基因的新型细菌菌株, 这为产生重组蛋白提供了有利的工具。

[0014] 发明概述

[0015] 在本发明的第一方面, 提供了重组革兰阴性细菌细胞, 其包含:

[0016] a. 编码在选自 D133、H145、H157、N31、R62、I70、Q73、C94、S95、V98、Q99、R100、L108、Y115、V135、L136、G140、R144 和 G147 的一个或多个氨基酸上具有突变的 spr 蛋白的突变 spr 基因, 和

[0017] b. 能够表达或过表达一种或多种能够促进蛋白质折叠的蛋白例如 FkpA、Skp、SurA、PPiA 和 PPiD 的基因,

[0018] 其中细胞相较于野生型细胞具有降低的 Tsp 蛋白活性。

[0019] 在本发明的一个实施方案中, 提供了重组革兰阴性细菌细胞, 其编码:

[0020] a. 编码在选自 D133、H145、H157、N31、R62、I70、Q73、C94、S95、V98、Q99、R100、L108、Y115、V135、L136、G140、R144 和 G147 的一个或多个氨基酸上具有突变的 spr 蛋白的突变 spr 基因,

[0021] b. 能够表达或过表达一种或多种能够促进蛋白质折叠的蛋白例如 FkpA、Skp、SurA、PPiA 和 PPiD 的基因,

[0022] c. 能够表达目标蛋白例如抗体或其结合片段的基因

[0023] 其中细胞相较于野生型细胞具有降低的 Tsp 蛋白活性, 并且细胞基因组 DNA 的其余部分与重组细胞所源自的野生型细胞是同基因的。

[0024] 在一个实施方案中, 细胞的基因组与野生型细菌细胞是同基因的, 除了突变的 spr 基因、相较于野生型细胞降低 Tsp 蛋白活性所需的修饰和表达能够促进蛋白质折叠的蛋白的基因以外。

[0025] 在第二方面, 本发明提供了重组革兰阴性细菌细胞, 其相较于野生型细胞具有降低的 Tsp 蛋白活性并且包含编码 spr 蛋白的突变 spr 基因, 其中细胞的基因组与野生型细菌细胞是同基因的, 除了相较于野生型细胞降低 Tsp 蛋白活性所需的修饰、突变的 spr 基因和被引入来表达能够促进蛋白质折叠的蛋白的基因以外。

[0026] 本发明的第一和第二方面提供的细胞显示有利的生长和蛋白质产生表型。

[0027] 在第三方面,本发明提供了用于产生目标蛋白的方法,包括在如上定义的重组革兰阴性细菌细胞中表达目标蛋白。

[0028] 在第四方面,本发明还扩展至从本文中描述的方法表达的蛋白质。

[0029] 附图概述

[0030] 图1显示在5L规模上利用宿主细胞和“伴侣蛋白”的不同组合进行的发酵的结果。W3110为野生型大肠杆菌菌株。不同的组合是:不具有伴侣蛋白的野生型;具有FkpA和Skp的野生型;如在W02011/086136中公开的MXE016突变体spr和 Δ Tsp;MXE016和FkpA;MXE016和Skp;MXE016和FkpA以及Skp;W02011/086136中公开的MXE017;MXE017和FkpA以及Skp

[0031] 图2显示了以诱导后补料速率5.4、6.0和7.0g/h进行的补料速率变化实验的结果,对于MXE016,在更高补料速率下产生的额外Fab'的大部分丢失在上清液中。

[0032] 图3A,B显示MXE016+/-FkpA的细胞活力(3A)和Fab'的滴度(3B)。

[0033] 图4显示20L中试生产的初步回收数据。

[0034] 图5显示20L中试生产在非还原条件下在SDS-PAGE染色凝胶上的初步回收。除FkpA相关条带外,蛋白谱在两个菌株间显得非常相似。

[0035] 图6显示20L中试规模工艺的非还原条件下的His-标记western印迹。检测到全长FkpA,其对应于~30kDa的条带,如所预期的,在单独的MXE016中未检测到信号。

[0036] 图7A-C显示不同基因的不同突变。

[0037] 图7D显示包含编码抗体的轻链(LC)、抗体的重链(HC)的多核苷酸序列、FkpA多核苷酸序列和/或Skp多核苷酸的载体的产生的图示。

[0038] 图8显示不同的多核苷酸和氨基酸序列。

[0039] 序列概述

[0040] SEQ ID NO:1为在起始密码子上游包括6个核苷酸ATGAAC的野生型Tsp基因的DNA序列。

[0041] SEQ ID NO:2为野生型Tsp蛋白的氨基酸序列。

[0042] SEQ ID NO:3为在起始密码子上游包括6个核苷酸ATGAAT的突变敲除Tsp基因的DNA序列。

[0043] SEQ ID NO:4为野生型蛋白酶III基因的DNA序列。

[0044] SEQ ID NO:5为野生型蛋白酶III蛋白的氨基酸序列。

[0045] SEQ ID NO:6为突变敲除蛋白酶III基因的DNA序列。

[0046] SEQ ID NO:7为野生型DegP基因的DNA序列。

[0047] SEQ ID NO:8为野生型DegP蛋白的氨基酸序列。

[0048] SEQ ID NO:9为突变的DegP基因的DNA序列。

[0049] SEQ ID NO:10为突变的DegP蛋白的氨基酸序列。

[0050] SEQ ID NO:11为用于包含Ase I限制性位点的突变的DegP基因的区域5'寡核苷酸引物的序列。

[0051] SEQ ID NO:12为用于包含Ase I限制性位点的突变的DegP基因的区域3'寡核苷酸引物的序列。

- [0052] SEQ ID NO:13为用于包含Ase I限制性位点的突变的Tsp基因 的区域的5' 寡核苷酸引物的序列。
- [0053] SEQ ID NO:14为用于包含Ase I限制性位点的突变的蛋白酶III 基因的区域的3' 寡核苷酸引物的序列。
- [0054] SEQ ID NO:15为用于包含Ase I限制性位点的突变的蛋白酶III 基因的区域的5' 寡核苷酸引物的序列。
- [0055] SEQ ID NO:16为用于包含Ase I限制性位点的突变的Tsp基因 的区域的3' 寡核苷酸引物的序列。
- [0056] SEQ ID NO:17为野生型spr基因的DNA序列。
- [0057] SEQ ID NO:18为包含作为前26个氨基酸残基的信号序列的野生 型spr基因的序列。
- [0058] SEQ ID NO:19为不具有信号序列的非突变的spr基因的序列。
- [0059] SEQ ID NO:20为包含D210A和H212A突变的突变的OmpT序 列的核苷酸序列。
- [0060] SEQ ID NO:21为包含D210A和H212A突变的突变的OmpT序 列的氨基酸序列。
- [0061] SEQ ID NO:22为突变敲除OmpT序列的核苷酸序列。
- [0062] SEQ ID NO:23显示OmpA寡核苷酸接头的序列。
- [0063] SEQ ID NO:24显示编码用于大肠杆菌Fab表达的基因间序列 1 (IGS1)的寡核苷酸盒。
- [0064] SEQ ID NO:25显示编码用于大肠杆菌Fab表达的基因间序列 2 (IGS2)的寡核苷酸盒。
- [0065] SEQ ID NO:26显示编码用于大肠杆菌Fab表达的基因间序列 3 (IGS3)的寡核苷酸盒。
- [0066] SEQ ID NO:27显示编码用于大肠杆菌Fab表达的基因间序列 4 (IGS4)的寡核苷酸盒。
- [0067] SEQ ID NO:28为野生型FkpA基因的DNA序列。
- [0068] SEQ ID NO:29为野生型FkpA基因的蛋白质序列。
- [0069] SEQ ID NO:30为FkpA his标记的基因的DNA序列。
- [0070] SEQ ID NO:31为FkpA his标记的基因的蛋白质序列。
- [0071] SEQ ID NO:32为野生型skp基因的DNA序列。
- [0072] SEQ ID NO:33为野生型skp基因的蛋白质序列。
- [0073] SEQ ID NO:34为skp his标记的基因的DNA序列。
- [0074] SEQ ID NO:35为skp his标记的基因的蛋白质序列。
- [0075] SEQ ID NO:36至74显示FcRn抗体或其片段的不同氨基酸和 DNA序列,其适合用于在本发明的细胞系中表达。特别地,SEQ ID NO: 50为抗-FcRn抗体轻链1519gH20的轻链可变区的氨基酸序列,SEQ ID NO:58为抗-FcRn抗体重链1519gH20的重链可变区的氨基酸序列。
- [0076] 本发明的优选实施方案的详述
- [0077] 本发明人已提供了适合用于表达目标重组蛋白的改良重组革兰阴 性细菌细胞。
- [0078] 在一个实施方案中,蛋白质为抗体或其结合片段,特别地治疗性 抗体。

[0079] 特别地,本发明人已通过将一或多个编码用于促进蛋白质折叠的蛋白的基因整合入具有突变的Tsp基因和突变的spr基因的革兰阴性细菌细胞,来提供适合用于表达目标重组蛋白的改良重组革兰阴性细菌细胞。

[0080] 在一个实施方案中,将编码用于促进蛋白质折叠的蛋白的基因整合入细胞基因组,例如以提供稳定的细胞系。在一个实施方案中,将待表达的重组蛋白(例如治疗性蛋白)转染入稳定的细胞系以提供期望的重组蛋白的表达。

[0081] 在一个实施方案中,将编码用于促进蛋白质折叠的蛋白的基因提供一个或多个质粒上,例如将质粒瞬时转染入细胞以提供本公开内容的细胞系。

[0082] 在一个实施方案中,在也包含目标重组蛋白的编码序列的质粒上提供编码用于促进蛋白质折叠的蛋白的基因。

[0083] 在一个实施方案中,在不包含目标重组蛋白的编码序列的质粒上提供编码用于促进蛋白质折叠的蛋白的基因。

[0084] 在一个实施方案中,本发明提供了相较于野生型细菌细胞和仅具有突变的Tsp基因或突变的Tsp和突变的spr基因的细胞,具有改良的细胞生长表型的新型菌株。

[0085] 本发明的细胞具有许多有利方面。本发明已令人惊讶地发现,根据本公开内容的细胞相较于野生型细胞或包含突变的Tsp基因和突变的spr基因的细胞可显示增强的细胞活力。

[0086] 细胞活力在实用方面具有特别的重要性,因为无活力的细胞在培养中倾向于裂解和产生DNA碎片。该DNA碎片增加纯化期望蛋白质的困难、成本和消耗。因此,使来自裂解的无活力细胞的DNA碎片降至最低是高效地生产重组蛋白的重要问题,参见例如US6,258,560。

[0087] 细胞活力可通过许多常规技术的任一技术,例如使用荧光染料和FACS分析或类似方法来测量。

[0088] 特别地,根据本公开内容的细胞相较于具有突变的Tsp基因和突变的spr基因的细胞通常显示减少的细胞裂解表型。

[0089] 此外,相较于具有突变的Tsp基因和突变的spr基因的细胞,新型菌株可减少蛋白质从细胞渗漏并且允许延长的周质积累。这是特别重要的,因为例如当靶蛋白的总表达水平相似,而由于菌株具有更少的渗漏,更多的蛋白质被积累至周质中或更少的蛋白质被积累在上清液中,那么具有这些更少渗漏性质的细胞将通常更适合于工厂规模生产,因为它们促进蛋白质回收。

[0090] 此外,,相较于野生型细菌细胞或在编码蛋白例如FkpA的基因不存在的情况下包含突变的Tsp基因和突变的spr基因的细胞,根据本公开内容的细胞可显示增加的目标蛋白的产率。改良的蛋白质产率可以是周质蛋白产率和/或上清液蛋白质产率。在一个实施方案中,本发明的细胞因减少从细胞的渗漏而相较于具有突变的Tsp基因和突变的spr基因的细胞显示改良的周质蛋白质产率。

[0091] 重组细菌细胞可以能够具有更快的目标蛋白生产速率,从而相较于野生型细菌细胞或包含突变的Tsp基因和突变的spr基因的细胞,可以在更短的时间内产生相同量的目标蛋白。目标蛋白的更快速的生产速率在细胞生长的初始期,例如在诱导蛋白质表达后的前5、10、20或30小时内可以是特别显著的。

[0092] 根据本发明的细胞优选在周质和/或培养基中表达约1.0g/L、1.5g/L、1.8g/L、2.0g/L、2.4g/L、2.5g/L、3.0g/L、3.5g/L或4.0g/L的最大产率的目标蛋白。

[0093] 此外,促进折叠的蛋白质的表达通过使以正确折叠提供的蛋白质最大化来进一步优化表达。本领域技术人员充分意识到适当的折叠是生物功能所必需的,从而分离具有期望的折叠的蛋白质是至关重要的。当蛋白质在革兰阴性细胞中表达时这是特别重要的,因为表达的蛋白质对于细胞是非天然的,从而细胞不可以自主地表达具有适当折叠的蛋白质。不恰当的折叠可将自身表达为聚集体或其它杂质。期望的蛋白质的分离可能需要广泛的纯化,这具有成本的影响,并且还可导致低产率的期望的蛋白质。使表达的恰当折叠的蛋白的量最大化使得需要纯化的量降至最低,并且可最优化可使用的产率,从而是有利的。

[0094] 与促进折叠的蛋白质的表达相关的有利方面包括下列方面的一个或多个方面:更高的滴度(例如相较于野生型的0.5g/L增加至约1.05g/L);收获时更高的活力(例如>95%);随补料速率增加而增加的滴度(更好的工艺开发前景);在商业生产规模例如20L规模上更高的滴度和收获时更高的活力;和更容易纯化提取物(特别是在20L规模上)。

[0095] 由本发明提供的细胞相较于野生型细胞具有减弱的Tsp蛋白酶活性,这可减少目标蛋白,特别是在蛋白水解上对Tsp敏感的目标蛋白的蛋白水解。因此,本发明提供的细胞相较于野生型细菌细胞,可提供更高的完整蛋白质优选目标蛋白的产率和更低的蛋白质优选目标蛋白的蛋白水解片段的产率或优选无蛋白水解片段。

[0096] 在本发明的一个实施方案中,细胞仅具有引入根据本公开内容的修饰所需的对基因组的最少突变。细菌细胞可与野生型细菌细胞仅相异于一个或多个针对spr基因的突变和相较于野生型细胞降低Tsp蛋白活性所需的修饰,因为例如编码用于促进蛋白质折叠的蛋白的基因可以例如在质粒上被瞬时引入细胞。在一个实施方案中,细胞不具有任何其它的可对细胞的生长和/或表达目标蛋白的能力具有有害作用的突变。

[0097] 因此,本发明的一种或多种重组宿主细胞相较于包含其它的针对基因组序列的基因工程突变的细胞可显示增加的蛋白质表达和/或改善的生长特征。本发明提供的细胞相较于包含其它的对细胞基因组的破坏的细胞,也更适合用于产生治疗性蛋白。

[0098] 本领域技术人员通过使用本领域公知的方法(包括发酵法、ELISA和蛋白G HPLC)能够容易地测试候选细胞克隆以判断其是否具有期望的目标蛋白产率。适当的发酵法描述于Humphreys D P,等人(1997). Formation of dimeric Fabs in E.coli:effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond,Fab' expression levels,tail piece sequences and growth conditions.J.IMMUNOL.METH.209: 193-202;Backlund E.Reeks D.Markland K.Weir N.Bowering L. Larsson G.Fedbatch design for periplasmic product retention in Escherichia coli,Journal Article.Research Support,Non-U.S.Gov't Journal of Biotechnology.135(4):358-65,2008Jul 31;Champion KM. Nishihara JC.Joly JC.Arnett D.Similarity of the Escherichia coli proteome upon completion of different biopharmaceutical fermentation processes.[Journal Article]Proteomics.1(9):1133-48, 2001Sep;和Horn U.Strittmatter W.Krebber A.Knupfer U.Kujau M.Wenderoth R.Muller K.Matzku S.Pluckthun A.Riesenberg D. High volumetric yields of functional dimeric

miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions, Journal Article. Research Support, Non-U.S. Gov't Applied Microbiology & Biotechnology. 46 (5-6): 524-32, 1996 Dec 中。本领域技术人员通过使用本领域公知的方法例如蛋白G HPLC、圆二色性、NMR、X射线晶体学和表位亲和力测量法, 还能够容易地测试分泌的蛋白质以判断蛋白质是否正确折叠。

[0099] 现将更详细地描述本发明。

[0100] 除非上下文另有所指, 否则术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。“肽”意指指10个或更少的氨基酸。

[0101] 除非上下文另有所指, 否则术语“多核苷酸”包括基因、DNA、cDNA、RNA、mRNA等。

[0102] 如本文中所用, ‘降低的活性’意指‘当在适当的测定中在可比较的条件下测量时, 相较于野生型菌株中对应的酶促活性更低水平的酶促活性, 例如Tsp酶促活性’。在一个实施方案中, 降低的活性为野生型比较物的酶促活性的50%或更少、40%或更少、30%或更少、20%或更少、10%或更少或5%或更少。在一个实施方案中, 当结果将用于直接比较时, 并行地进行测定酶促活性的水平的分析。

[0103] 如本文中所用, 直接比较是指在其中为了评价是否存在本文中定义的降低的活性或将获自测定的活性结果进行分级的目的而比较两个或更多个结果的数值。

[0104] 如本文中所用, 在本说明书的上下文中, 术语“包含”应当解释为“包括”。

[0105] 本文中使用的野生型细胞可与非突变的细胞或对照细胞互换使用。

[0106] 本发明的上下文中的非突变细胞或对照细胞意指与本发明的重组革兰阴性细胞的类型相同的细胞, 其中该细胞未被修饰来具有上述降低的Tsp蛋白活性和具有突变spr基因。例如, 非突变细胞可以是野生型细胞, 并可来源于与引入任何突变的修饰之前的本发明的细胞相同的宿主细胞群体。

[0107] 表述“细胞”、“细胞系”、“细胞培养物”和“菌株”可互换使用。

[0108] 在本发明的上下文中, 表述“包含突变的Tsp基因的细胞的表型”意指由具有突变Tsp基因的细胞显示的表型。通常地, 包含突变Tsp基因的细胞可裂解(特别是在高细胞密度下)。这些细胞的裂解导致任何重组蛋白渗漏至上清液中。具有突变的Tsp基因的细胞在低同渗容摩下还可显示热敏生长。例如, 在低渗培养基中, 细胞在高温例如40℃或更高温度下不显示生长速率或显示减小的生长速率或死亡。

[0109] 在本发明的上下文中, 术语“同基因的”意指除突变的spr基因和相较于野生型细胞降低Tsp蛋白活性所需的修饰外, 本发明的细胞的基因组相较于细胞所源自的野生型细胞具有大体上相同或相同的基因组序列。在本实施方案中, 细胞的基因组不包含其它非天然存在或基因工程化的突变。在一个实施方案中, 除突变的spr基因和相较于野生型细胞降低Tsp蛋白活性所需的修饰以及任何天然存在的突变以外, 根据本发明的细胞相较于野生型细胞可具有大体上相同的基因组序列。在一个实施方案中, 除突变的spr基因和相较于野生型细胞降低Tsp蛋白活性所需的修饰外, 根据本发明的细胞相较于野生型细胞可具有完全相同的基因组序列。

[0110] 本发明的上下文中的术语“野生型”意指革兰阴性细菌细胞的菌株, 其可天然地存在或可从环境分离, 其不具有任何基因工程突变。大肠杆菌的野生型菌株的实例为

W3110例如W3110K-12菌株。

[0111] 任何适当的革兰阴性细菌可用作用于产生本发明的重组细胞的亲代细胞。适当的革兰阴性细菌包括鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*)、志贺菌属 (*Shigella*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、嗜肺军团病杆菌 (*Legionella pneumophila*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 和大肠杆菌。优选地,亲代细胞是大肠杆菌。大肠杆菌的任何适当菌株可用于本发明,但优选使用野生型W3110菌株例如K-12 W3110。

[0112] 与先前产生的用于表达重组蛋白的蛋白酶缺陷型细菌菌株相关的缺点是,它们包含另外的参与细胞代谢和DNA复制的基因(例如大肠杆菌菌株中的phoA, fhuA, lac, rec, gal, ara, arg, thi和pro)的突变。这些突变可对宿主细胞具有许多不利影响,包括对细胞生长、稳定性、重组蛋白表达产率和毒性的影响。具有一种或多种这些基因组突变的菌株,特别是具有大数量的这些突变的菌株可显示适合性(fitness)的损失,这使细菌生长速率降至不适合用于工业蛋白质生产的水平。此外,上述基因组突变的任何突变可以以不可预测的有害方式顺式和/或反式地影响其它基因,从而改变菌株的表型、适合性和蛋白质特征谱。此外,严重突变的细胞的使用通常不适合用于产生用于商业用途特别是治疗学的重组蛋白,因为这样的菌株通常具有有缺陷的代谢途径,从而在基本培养基或化学成分确定的培养基中可能生长不良或根本不生长。

[0113] 在一个实施方案中,根据本发明的细胞与野生型细菌细胞是同基因的,除突变的spr基因和相较于野生型细胞降低Tsp蛋白活性所需的修饰外。仅对细胞的基因组产生最少的突变来引入突变。细胞不具有可对细胞的生长和/或表达目标蛋白的能力具有有害作用的任何其它突变。因此,本发明的一种或多种重组宿主细胞相较于包含其它的针对基因组序列的基因工程突变的细胞可显示增加的蛋白质表达和/或改善的生长特征。本发明提供的细胞相较于包含其它的针对细胞基因组的破坏的细胞也更适合用于产生治疗性蛋白。

[0114] 在优选实施方案中,细胞与野生型大肠杆菌细胞例如菌株W3110是同基因的,除突变的spr基因和相较于野生型细胞降低Tsp蛋白活性所需的修饰外。

[0115] 本发明的细胞可通过包含编码目标蛋白的多核苷酸而与野生型细胞进一步不同。编码目标蛋白的多核苷酸序列可以是外源的或内源的。编码目标蛋白的多核苷酸可包含在被转化入细胞和/或整合入宿主细胞的基因组的适当表达载体内。在其中编码目标蛋白的多核苷酸被插入宿主的基因组的实施方案中,本发明的细胞还将因插入的编码目标蛋白的多核苷酸序列而与野生型细胞不同。优选地,多核苷酸在细胞中存在于表达载体中,从而对宿主细胞的基因组导致最小的破坏。

[0116] Spr蛋白是大肠杆菌膜结合周质蛋白酶。

[0117] Spr蛋白的野生型氨基酸序列示于SEQ ID NO:21(具有位于N末端信号序列)和SEQ ID NO:22(不具有26个氨基酸的信号序列)(根据UniProt登录号P0AFV4)中。本发明中spr蛋白序列的氨基酸编号包括信号序列。因此,spr蛋白的氨基酸1是SEQ ID NO:21中显示的第1个氨基酸(Met)。

[0118] 被突变的spr基因优选为细胞的染色体spr基因。

[0119] 突变的spr基因编码能够抑制还包含突变的Tsp基因的细胞的表型的spr蛋白。具有突变的Tsp基因的细胞可具有良好的细胞生长速率但这些细胞的一个缺陷是它们倾向于裂解,特别在高细胞密度下。因此,包含突变的Tsp基因的细胞的表型为倾向于裂解,特别在高细胞密度下。具有突变的Tsp基因的细胞还在低同渗容摩下显示热敏性生长。然而,本发明的细胞具有的spr突变,当被引入具有降低的Tsp活性的细胞时,抑制降低的Tsp表型,从而细胞显示减少的裂解,特别在高细胞密度下。细胞的生长表型可在摇瓶或高细胞密度发酵技术过程中由本领域技术人员来容易地测量。可根据由具有spr突变体和具有降低的Tsp活性的细胞相较于具有Tsp突变体和野生型spr的细胞而显示的增加的生长速率和/或重组蛋白产量(特别是周质中的)判断细胞裂解表型的抑制。

[0120] 根据本发明的细胞包含编码spr蛋白的突变spr基因,所述spr蛋白在选自N31、R62、I70、Q73、C94、S95、V98、Q99、R100、L108、Y115、D133、V135、L136、G140、R144、H145、G147和H157的一个或多个氨基酸上具有突变,优选选自C94、S95、V98、Y115、D133、V135、H145、G147和H157的一个或多个氨基酸上的突变。在该实施方案中,spr蛋白优选不具有任何其它突变。

[0121] 上述氨基酸的一个或多个的突变可以是针对编码氨基酸的核苷酸的1、2或3个核苷酸的任何适当的错义突变。突变将氨基酸残基改变成导致能够抑制包含突变的Tsp基因的细胞的表型的突变的spr蛋白的任何适当的氨基酸。错义突变可将氨基酸改变成相较于野生型氨基酸尺寸不同和/或具有不同化学性质的氨基酸。

[0122] 在一个实施方案中,突变spr基因编码具有选自C94A,S95F,V98E,Y115F,D133A,V135D或G,H145A,G147C和H157A的一个或多个突变的spr蛋白。

[0123] 在一个实施方案中,突变是针对C94、H145和H157的氨基酸残基的催化三联体的1、2或3个氨基酸的(Solution NMR Structure of the NlpC/P60Domain of Lipoprotein Spr from Escherichia coli Structural Evidence for a Novel Cysteine Peptidase Catalytic Triad, Biochemistry,2008,47,9715-9717)。

[0124] 因此,突变的spr基因可包含:针对C94的突变;或针对H145的突变;或针对H157的突变;或针对C94和H145的突变;或针对C94和H157的突变;或针对H145和H157的突变;或针对C94、H145和H157的突变。

[0125] 在该实施方案中,spr蛋白优选不具有任何其它突变。

[0126] C94、H145和H157的1、2或3个可被突变成导致能够抑制包含突变的Tsp基因的细胞的表型的spr蛋白的任何适当的氨基酸。例如,C94、H145和H157的1、2或3个可被突变成小的氨基酸例如Gly或Ala。因此,spr蛋白可具有突变C94A、H145A和H157A的1、2或3个。在一个实施方案中,spr基因包含错义突变C94A,已发现其产生能够抑制包含突变的Tsp基因的细胞的表型的spr蛋白。在另一个实施方案中,spr基因包含错义突变H145A,已发现其产生能够抑制包含突变的Tsp基因的细胞的表型的spr蛋白。

[0127] 本文中的置换突变体的名称由字母后跟数字后跟字母组成。第一个字母表示野生型蛋白中的氨基酸。数字是指在其上产生氨基酸置换的氨基酸位置,第二个字母表示用于替代野生型氨基酸的氨基酸。在一个实施方案中,突变spr蛋白在选自N31、R62、I70、Q73、S95、V98、Q99、R100、L108、Y115、D133、V135、L136、G140、R144和G147的一个或多个氨基酸上包含突变,优选选自S95、V98、Y115、D133、V135和G147的一个或多个氨基酸上的突

变。在该实施方案中，spr蛋白优选不具有任何其它突变。因此，突变的spr基因可包含：针对N31的突变；或针对R62的突变；或针对I70的突变；或针对Q73的突变；或针对S95的突变；或针对V98的突变；或针对Q99的突变；或针对R100的突变；或针对L108的突变；或针对Y115的突变；或针对D133的突变；或针对V135的突变；或针对L136的突变；或针对G140的突变；或针对R144的突变；或针对G147的突变。

[0128] 在一个实施方案中，突变spr蛋白包含针对氨基酸：S95和Y115；或N31、Q73、R100和G140；或Q73、R100和G140；或R100和G140；或Q73和G140；或Q73和R100；或R62、Q99和R144；或Q99和R144的多重突变。

[0129] 可将氨基酸N31、R62、I70、Q73、S95、V98、Q99、R100、L108、Y115、D133、V135、L136、G140、R144和G147的一个或多个突变导致能够抑制包含突变的Tsp基因的细胞的表型的spr蛋白的任何适当的氨基酸。例如，N31、R62、I70、Q73、S95、V98、Q99、R100、L108、Y115、D133、V135、L136、G140和R144的一个或多个可被突变成小的氨基酸例如Gly或Ala。

[0130] 在一个实施方案中，spr蛋白包含下列突变的一个或多个：N31Y、R62C、I70T、Q73R、S95F、V98E、Q99P、R100G、L108S、Y115F、D133A、V135D或V135G、L136P、G140C、R144C和G147C。在一个实施方案中，spr蛋白包含下列突变的一个或多个：S95F、V98E、Y115F、D133A、V135D或V135G和G147C。在该实施方案中，spr蛋白优选不具有任何其它突变。

[0131] 在一个实施方案中，spr蛋白具有选自N31Y、R62C、I70T、Q73R、S95F、V98E、Q99P、R100G、L108S、Y115F、D133A、V135D或V135G、L136P、G140C、R144C和G147C的一个突变。在该实施方案中，spr蛋白优选不具有任何其它突变。

[0132] 在其它实施方案中，spr蛋白具有选自S95F和Y115F；N31Y、Q73R、R100G和G140C；Q73R、R100G和G140C；R100G和G140C；Q73R和G140C；Q73R和R100G；R62C、Q99P和R144C；或Q99P和R144C的多重突变。

[0133] 在一个实施方案中，突变的spr基因编码具有突变C94A的spr蛋白。

[0134] 在一个实施方案中，突变的spr基因编码具有突变V103E的spr蛋白。

[0135] 在一个实施方案中，突变的spr基因编码具有突变D133A的spr蛋白。

[0136] 在一个实施方案中，突变的spr基因编码具有突变V135D的spr蛋白。

[0137] 在一个实施方案中，突变的spr基因编码具有突变V135A的spr蛋白。

[0138] 在一个实施方案中，突变的spr基因编码具有突变H145A的spr蛋白。

[0139] 在一个实施方案中，突变的spr基因编码具有突变G147C的spr蛋白。

[0140] 在一个实施方案中，突变的spr基因编码具有突变H157A的spr蛋白。

[0141] 在一个实施方案中，突变spr基因编码具有选自H145A、H157A和D133A的突变的spr蛋白。

[0142] 在本发明的一个实施方案中，可对spr基因产生任何适当的突变以导致能够抑制包含突变的Tsp基因的细胞的表型的spr蛋白。优选地，spr蛋白可具有下列突变的一个或多个：N31Y、R62C、I70T、Q73R、C94A、S95F、V98E、Q99P、R100G、L108S、Y115F、D133A、V135D、V135G、L136P、G140C、R144C、H145A、G147C、H157A和W174R。在一个实施方案中，spr蛋白不包含突变W174R。优选地，spr基因包含上述一个或多个突变。

[0143] 根据本发明的细胞相较于野生型细胞具有降低的Tsp蛋白活性。表述“相较于野生型细胞降低的Tsp蛋白活性”意指相较于野生型细胞的Tsp活性，细胞的Tsp活性降低。可

通过任何适当的方法修饰细胞 以降低Tsp的活性。

[0144] 在一个实施方案中,降低的Tsp活性来自编码Tsp的内源多核苷酸和/或相关的调控表达序列的修饰。修饰可减少或终止Tsp基因转录和翻译,或可提供相较于野生型Tsp蛋白具有降低的蛋白酶活性的表达的Tsp蛋白。

[0145] 在一个实施方案中,相关的调控表达序列被修饰以减少Tsp表达。例如,可突变Tsp基因的启动子以阻止基因的表达。

[0146] 在优选实施方案中,根据本发明的细胞具有编码具有降低的蛋白酶活性的Tsp蛋白的突变的Tsp基因或敲除突变的Tsp基因。

[0147] 优选地染色体Tsp基因被突变。

[0148] 如本文中所用,“Tsp基因”意指编码蛋白酶Tsp(也称为Prc)的基因,所述蛋白酶Tsp是能够作用于青霉素结合蛋白-3(PBP3)和噬菌体尾蛋白的周质蛋白酶。野生型Tsp基因的序列示于SEQ ID NO:1中,野生型Tsp蛋白的序列示于SEQ ID NO:2中。

[0149] 除非另有所指,否则突变的Tsp基因或编码Tsp的突变的Tsp基因是指编码具有降低的蛋白酶活性的Tsp蛋白的突变的Tsp基因或敲除突变的Tsp基因。

[0150] 表述“编码具有降低的蛋白酶活性的Tsp蛋白的突变的Tsp基因”在本发明的上下文中意指突变的Tsp基因相较于野生型非突变的Tsp基因不具有完全的蛋白酶活性。

[0151] 优选地,突变的Tsp基因编码具有50%或更少、40%或更少、30%或更少、20%或更少、10%或更少或5%或更少的野生型非突变的Tsp蛋白的蛋白酶活性的Tsp蛋白。更优选地,突变的Tsp基因编码不具有蛋白酶活性的Tsp蛋白。在该实施方案中,细胞不缺乏染色体Tsp,即Tsp基因序列未被删除或突变以阻止任何形式的Tsp蛋白的表达。

[0152] 可将任何适当的突变引入Tsp基因以产生具有降低的蛋白酶活性的蛋白。从革兰阴性细菌表达的Tsp蛋白的蛋白酶活性可由本领域技术人员通过本领域的任何适当方法,例如Keiler等人(Identification of Active Site Residues of the Tsp Protease*THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY第270卷,No.48,Issue of December 1, pp.28864-28868,1995Kenneth C.Keiler和Robert T.Sauer)中描述的方法(其中测试了Tsp的蛋白酶活性)来容易地测试。

[0153] 在Keiler等人(同上)中已报导Tsp具有包含残基S430、D441和K455的活性部位,并且残基G375、G376、E433和T452对于维持Tsp的结构是非常重要的。Keiler等人(同上)报导了如下发现:突变的Tsp基因S430A、D441A、K455A、K455H、K455R、G375A、G376A、E433A和T452A不具有可检测的蛋白酶活性。还报导了突变的Tsp基因S430C显示约5-10%的野生型活性。因此,产生具有降低的蛋白酶活性的蛋白的Tsp突变可包含针对残基S430、D441、K455、G375、G376、E433和T452的一个或多个突变,例如错义突变。优选地,产生具有降低的蛋白酶活性的蛋白的Tsp突变可包含针对活性部位残基S430、D441和K455的1、2或全部3个的突变,例如错义突变。

[0154] 因此,突变的Tsp基因可包含:针对S430的突变;或针对D441的突变;或针对K455的突变;或针对S430和D441的突变;或针对S430和K455的突变;或针对D441和K455的突变;或针对S430、D441和K455的突变。

[0155] S430、D441、K455、G375、G376、E433和T452的一个或多个可被突变成导致具有降低的蛋白酶活性的蛋白的任何适当的氨基酸。适当的突变的实例为S430A、S430C、D441A、

K455A、K455H、K455R、G375A、G376A、E433A和T452A。突变的Tsp基因可包含针对活性部位残基的1、2或3个突变,例如基因可包含:S430A或S430C;和/或D441A;和/或K455A或K455H或K455R。

[0156] 优选地,Tsp基因具有点突变S430A或S430C。

[0157] 表述“敲除突变的Tsp基因”在本发明的上下文中意指基因包含一个或多个突变,其阻止由野生型基因编码的Tsp蛋白的表达以提供缺乏Tsp蛋白的细胞。敲除基因可被部分或完全转录但不被翻译成编码的蛋白质。可以以任何适当的方式,例如通过一个或多个缺失突变、插入突变、点突变、错义突变、无义突变和移码突变来突变敲除突变的Tsp基因,以使蛋白质不表达。例如,可通过将外来DNA序列例如抗生素抗性标记插入基因编码序列来敲除基因。

[0158] 在优选实施方案中,不通过将外来DNA序列例如抗生素抗性标记插入基因编码序列来突变Tsp基因。在该实施方案中,Tsp基因可包含针对基因起始密码子的突变和/或一个或多个位于基因起始密码子下游和基因终止密码子上游的终止密码子,从而阻止Tsp蛋白表达。针对起始密码子的突变可以是起始密码子的1、2或全部3个核苷酸的错义突变。可选择地或另外地,起始密码子可通过插入或缺失移码突变来进行突变。Tsp基因在编码序列的5'末端上包含两个ATG密码子,ATG密码子的一个或两个可通过错义突变来进行突变。可在第二ATG密码子(密码子3)上将Tsp基因突变成TCG。Tsp基因可以选择地或另外地包含一个或多个位于基因起始密码子下游和基因终止密码子上游的终止密码子。优选地,敲除突变的Tsp基因包含针对起始密码子的错义突变和一个或多个插入的终止密码子。在优选实施方案中,Tsp基因被突变来从第5密码子删除“T”,从而产生在密码子11和16上导致终止密码子的移码。在优选实施方案中,Tsp基因被突变来插入Ase I限制性位点以在密码子21上产生第3个框内终止密码子。

[0159] 在优选实施方案中,敲除突变的Tsp基因具有SEQ ID NO:3的DNA序列,其包括起始密码子上游的6个核苷酸ATGAAT。在一个实施方案中,突变的Tsp基因具有SEQ ID NO:3的核苷酸7至2048的DNA序列。

[0160] 在本发明中,细胞还具有一个或多个能够表达或过表达一种或多种能够促进蛋白质折叠的蛋白的基因。实例包括蛋白例如FkpA、Skp、SurA、PPiA和PPiD。

[0161] 在一个实施方案中,用于促进蛋白质折叠的蛋白为FkpA、Skp或其组合。

[0162] 在一个实施方案中,用于促进蛋白质折叠的蛋白选自FkpA,或FkpA与Skp的组合。

[0163] FkpA是肽酰-脯氨酰-顺反式异构酶,其具有Swiss-Prot编号P45523。

[0164] Skp是伴侣蛋白,其具有Swiss-Prot编号P0AEU7。

[0165] 视情况而定,用于促进蛋白质折叠的蛋白可由细胞基因组中或例如在质粒或所述质粒的组合上被瞬时转染入其中的基因编码。

[0166] 在一个实施方案中,重组革兰阴性细菌细胞不包含编码DsbC的重组多核苷酸。

[0167] 在本发明的一个实施方案中,重组革兰阴性细菌细胞还包含编码具有伴侣蛋白活性和降低的蛋白酶活性的DegP蛋白的突变的DegP基因和/或突变的ptr基因,其中突变的ptr基因编码具有降低的蛋白酶活性的蛋白酶III蛋白或为敲除突变的ptr基因,和/或突变的OmpT基因,其中突变的OmpT基因编码具有降低的蛋白酶活性的OmpT蛋白或为敲除突变的OmpT基因。

[0168] 优选地在该实施方案中,除上述突变外,细胞的基因组与野生型 细菌细胞是同基因的。

[0169] 如本文中所用,“DegP”意指编码DegP蛋白(也称为HtrA)的基因,所述蛋白具有作为伴侣蛋白和蛋白酶的双重功能(Families of serine peptidases;Rawlings ND, Barrett AJ.Methods Enzymol.1994; 244:19-61)。非突变的DegP基因的序列示于SEQ ID NO:7中,非突变的DegP蛋白的序列示于SEQ ID NO:8中。

[0170] 在低温下,DegP用作伴侣蛋白,在高温下DegP偏向于用作蛋白酶(A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein.Cell,第97卷,Issue 3,Pages 339-347.Spiess C,Beil A,Ehrmann M和The proteolytic activity of the HtrA(DegP)protein from Escherichia coli at low temperatures, Skorko-Glonek J等人Microbiology 2008,154,3649-3658)。

[0171] 在其中细胞包含DegP突变的实施方案中,细胞中的DegP突变提供了编码具有伴侣蛋白活性但不具有完全蛋白酶活性的DegP蛋白的 突变的DegP基因。

[0172] 表述“具有伴侣蛋白活性”在本发明的上下文中意指突变的DegP 蛋白相较于野生型非突变的DegP蛋白具有相同或大体上相同的伴侣 蛋白活性。优选地,突变的DegP基因编码具有50%或更高,60%或 更高,70%或更高,80%或更高,90%或更高,或95%或更高的野生 型非突变的DegP蛋白的伴侣蛋白活性的DegP蛋白。更优选,突变的 DegP基因编码具有与野生型DegP相同的伴侣蛋白活性的DegP蛋白。

[0173] 表述“具有降低的蛋白酶活性”在本发明的上下文中意指突变的 DegP蛋白相较于野生型非突变的DegP蛋白不具有完全蛋白酶活性。优选地,突变的DegP基因编码具有50%或更少、40%或更少、30% 或更少、20%或更少、10%或更少或5%或更少的野生型非突变的DegP 蛋白的蛋白酶活性的DegP蛋白。更优选地,突变的DegP基因编码不 具有蛋白酶活性的DegP蛋白。细胞不缺乏染色体DegP,即DegP基 因序列未被删除或突变以阻止任何形式的DegP蛋白的表达。

[0174] 任何适当的突变可被引入DegP基因,以产生具有伴侣蛋白活性 和降低的蛋白酶活性的蛋白。从革兰阴性细菌表达的DegP蛋白的蛋 白酶和伴侣蛋白活性可由本领域技术人员通过任何适当的方法,例如 Spiess等人(A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein.Cell,第97卷, Issue 3,Pages 339-347.Spiess C,Beil A,Ehrmann M)中描述的方法(其中在DegP的天然底物MalS上测试DegP的蛋白酶和伴侣蛋白活 性)以及还有The proteolytic activity of the HtrA(DegP)protein from Escherichia coli at low temperatures,Skorko-Glonek J等人 Microbiology 2008,154,3649-3658中描述的方法来容易地测试。

[0175] DegP是丝氨酸蛋白酶,并且具有由氨基酸残基His105、Asp135 和Ser210的催化三联体组成的活性中心(Families of serine peptidases, Methods Enzymol.,1994,244: 19-61Rawlings N和Barrett A)。产生具 有伴侣蛋白活性和降低的蛋白酶活性的蛋白的 DegP突变可包含针对 His105、Asp135和Ser210的1、2或3个的突变,例如错义突变。

[0176] 因此,突变的DegP基因可包含:针对His105的突变;或针对 Asp135的突变;或针对 Ser210的突变;或针对His105和Asp135的 突变;或针对His105和Ser210的突变;或针对 Asp135和Ser210的 突变;或针对His105、Asp135和Ser210的突变。

[0177] His105、Asp135和Ser210的1、2或3个可被突变成导致具有伴侣蛋白活性和降低的蛋白酶活性的蛋白的任何适当的氨基酸。例如，His105、Asp135和Ser210的1、2或3个可被突变成小的氨基酸例如Gly或Ala。其它适当的突变是将His105、Asp135和Ser210的1、2或3个改变成具有相反性质的氨基酸，例如将Asp135突变成Lys或Arg，将极性His105突变成非极性氨基酸例如Gly,Ala,Val或Leu，以及将小的亲水性Ser210突变成大的或疏水性残基例如Val,Leu, Phe或Tyr。优选地，DegP基因包含点突变S210A，如图7C中显示的，已发现其产生具有伴侣蛋白活性但不具有蛋白酶活性的蛋白(A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein.Cell,第97卷,Issue 3,Pages 339-347.Spiess C,Beil A,Ehrmann M)。

[0178] DegP具有2个PDZ结构域，PDZ1(残基260-358)和PDZ2(残基 359-448)，所述结构域介导蛋白质间相互作用(A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein.Cell,第97卷,Issue 3,Pages 339-347.Spiess C,Beil A,Ehrmann M)。在本发明的一个实施方案中，DegP基因被突变来删除PDZ1结构域和/或PDZ2结构域。PDZ1和PDZ2的删除导致DegP蛋白的蛋白酶活性的完全丢失和相较于野生型DegP蛋白降低的伴侣蛋白活性，然而PDZ1或PDZ2的缺失导致5%的蛋白酶活性和与野生型DegP蛋白相似的伴侣蛋白活性(A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein.Cell,第97卷,Issue 3,Pages 339-347.Spiess C,Beil A,Ehrmann M)。

[0179] 突变的DegP基因还可包含沉默的非天然存在的限制性位点例如Ase I以帮助鉴定和筛选方法，例如如图7C中显示的。

[0180] 包含点突变S210A和Ase I限制性标记位点的突变的DegP基因的优选序列提供于SEQ ID NO:9中，编码的蛋白质序列示于SEQ ID NO:10中。

[0181] 在其中细胞包含编码具有伴侣蛋白活性和降低的蛋白酶活性的DegP蛋白的突变的DegP基因的本发明的实施方案中，本发明提供一种或多种细胞相对于其中DegP基因已被突变来敲除DegP从而阻止DegP表达(例如染色体缺陷DegP)的突变的细胞，可提供增加的来自细胞的正确折叠的蛋白质的产率。在包含敲除突变的DegP基因从而阻止DegP表达的细胞中，DegP的伴侣蛋白活性完全丢失，然而在根据本发明的细胞中，DegP的伴侣蛋白活性得到保持，同时完全蛋白酶活性丢失。在这些实施方案中，根据本发明的一种或多种细胞具有更低的蛋白酶活性，从而阻止蛋白质的蛋白水解，同时维持伴侣蛋白活性以允许蛋白质在宿主细胞中正确折叠和运输。

[0182] 在这些实施方案中，根据本发明的一种或多种细胞相较于具有突变敲除DegP基因从而阻止DegP表达的细胞具有增强的细胞生长。不希望受理论束缚，因为DegP蛋白酶保留伴侣蛋白活性，这可增强细胞加工所有蛋白质的能力，所述能力需要伴侣蛋白活性，而可能显示增强的细胞生长。因此，细胞生长和繁殖所必需的正确折叠的蛋白质的产量在本发明的一种或多种细胞中相较于具有DegP敲除突变的细胞增加，从而改善调节生长的细胞途径。此外，已知的DegP蛋白酶缺陷株通常是温度敏感性的并且通常在高于约28℃的温度不生长。然而，根据本发明的细胞不是温度敏感性的，并且可在28℃或更高的温度生长，包括约30℃至约37℃的温度，其通常用于蛋白质从细菌的工业规模生产。

[0183] 在本发明的一个实施方案中，细胞具有突变的ptr基因。如本文中所用，“ptr基

因”意指编码蛋白酶III(降解高分子量蛋白的蛋白酶)的基因。非突变的ptr基因的序列示于SEQ ID NO:4中,非突变的蛋白酶III蛋白的序列示于SEQ ID NO:5中。

[0184] 除非另有所指,否则突变的ptr基因或编码蛋白酶III的突变的 ptr基因,是指编码具有降低的蛋白酶活性的蛋白酶III蛋白的突变的 ptr基因或敲除突变的ptr基因。

[0185] 表述“编码具有降低的蛋白酶活性的蛋白酶III蛋白的突变的ptr 基因”在本发明的上下文中意指突变的ptr基因相较于野生型非突变的ptr基因不具有完全蛋白酶活性。

[0186] 优选地,突变的ptr基因编码具有50%或更少、40%或更少、30% 或更少、20%或更少、10%或更少或5%或更少的野生型非突变的蛋白酶III蛋白的蛋白酶活性的蛋白酶III。更优选,突变的ptr基因编 码不具有蛋白酶活性的蛋白酶III蛋白。在该实施方案中,细胞不缺 乏染色体ptr,即ptr基因序列未被删除或突变以阻止任何形式的蛋白酶III蛋白的表达。

[0187] 可将任何适当的突变引入ptr基因以产生具有降低的蛋白酶活性 的蛋白酶III蛋白。从革兰阴性细菌表达的蛋白酶III蛋白的蛋白酶活 性可由本领域技术人员通过本领域的任何适当方法来容易地测试。

[0188] 表述“敲除突变的ptr基因”在本发明的上下文中意指基因包含一 个或多个突变,从而使得由基因编码的蛋白不表达,以提供缺乏由敲 除突变的基因编码的蛋白质的细胞。敲除基因可被部分或完全转录但 不翻译成编码的蛋白质。可以以任何适当的方式,例如通过一个或多 个缺失突变、插入突变、点突变、错义突变、无义突变和移码突变来 对敲除突变的ptr基因进行突变,以使蛋白质不表达。例如,可通过 外来DNA序列例如抗生素抗性标记至基因编码序列的插入来敲除基 因。

[0189] 在优选实施方案中,不通过外来DNA序列例如抗生素抗性标记 至基因编码序列的插入来突变基因。优选地,蛋白酶III基因包含针 对基因起始密码子的突变和/或位于基因起始密码子下游和基因终止 密码子上游的一个或多个终止密码子,从而阻止蛋白酶III蛋白表达。

[0190] 针对靶敲除基因起始密码子的突变使得起始密码子的功能丢失,从而确保靶基 因在编码序列的起始部分不包含适当的起始密码子。针 对起始密码子的突变可以是起始密码子的1、2或全部3个核苷酸的错 义突变。可选择地或另外地,起始密码子可通过插入或缺失移码突变 来进行突变。

[0191] 在优选实施方案中,ptr基因被突变来将ATG起始密码子改变成 ATT。

[0192] 敲除突变的ptr基因可以可选择地或另外地包含位于基因起始密 码子下游和基因终止密码子上游的一个或多个终止密码子。优选地, 敲除突变的ptr基因包含针对起始密码子的错义突变和一个或多个插 入的终止密码子。

[0193] 一个或多个插入的终止密码子优选为框内终止密码子。然而,一 个或多个插入的终止密码子可以可选择地或另外地为框外终止密码 子。可能需要一个或多个框外终止密码子来终止其中通过插入或缺失 移码突变将框外起始密码子改变成框内起始密码子的翻译。可通过任 何适当的突变包括无义点突变和移码突变来引入一个或多个终止密 码子。优选通过移码突变和/或插入突变,优选通过用包含终止密码子的 序列替代基因序列的区段来引入一个或多个终止密码子。例如,可插 入Ase I限制性位点,其包含终止密码子TAA。

[0194] 在优选实施方案中,通过插入Ase I限制性位点来突变ptr基因以 插入框内终止

密码子,如图7A中显示。在优选实施方案中,敲除突变的ptr基因具有SEQ ID NO:6的DNA序列。

[0195] 上述敲除突变是有利的,因为它们引起最小的对靶敲除基因位点的上游或下游的染色体DNA的破坏或对所述DNA无破坏,并且不需要外来DNA例如抗生素抗性标记的插入和保留,所述破坏或外来DNA的插入和保留可影响细胞用于表达目标蛋白,特别是治疗性蛋白的适合性。因此,根据本发明的一种或多种细胞,相较于其中已通过外来DNA至基因编码序列的插入来敲除蛋白酶基因的细胞,可显示改善的生长特征和/或蛋白质表达。

[0196] 在一个实施方案中,根据本发明的细胞具有突变的OmpT基因。如本文中所用,“OmpT基因”意指编码蛋白酶OmpT(外膜蛋白酶T)的基因,所述蛋白酶是外膜蛋白酶。野生型非突变的OmpT基因的序列为SWISS-PROT P09169。

[0197] 除非另有所指,否则突变的OmpT基因或编码OmpT的突变的OmpT基因是指编码具有降低的蛋白酶活性的OmpT蛋白的突变的OmpT基因,或敲除突变的OmpT基因。

[0198] 表述“编码具有降低的蛋白酶活性的OmpT蛋白的突变的OmpT基因”在本发明的上下文中意指突变的OmpT基因相较于野生型非突变的OmpT基因不具有完全蛋白酶活性。突变的OmpT基因可编码具有50%或更少、40%或更少、30%或更少、20%或更少、10%或更少,或5%或更少的野生型非突变的OmpT蛋白的蛋白酶活性的OmpT蛋白。突变的OmpT基因可编码不具有蛋白酶活性的OmpT蛋白。在该实施方案中,细胞不缺乏染色体OmpT,即OmpT基因序列未被删除或突变来阻止任何形式的OmpT蛋白的表达。

[0199] 可将任何适当的突变引入OmpT基因以产生具有降低的蛋白酶活性的蛋白。从革兰阴性细菌表达的OmpT蛋白的蛋白酶活性可由本领域技术人员通过本领域中的任何适当方法,例如Kramer等人(Identification of essential acidic residues of outer membrane protease OmpT supports a novel active site,FEBS Letters 505(2001) 426-430)和Dekker等人(Substrate Specificity of the Integral Membrane Protease OmpT Determined by Spatially Addressed Peptide Libraries, Biochemistry 2001,40,1694-1701)中描述的方法来容易地测试。

[0200] OmpT在Kramer等人(Identification of active site serine and histidine residues in Escherichia coli outer membrane protease OmpT FEBS Letters 2000 468,220-224)中已有报导,该文献公开了:丙氨酸对丝氨酸、组氨酸和酸性残基的置换导致降低至约1/10的活性(对于Glu27、Asp97、Asp208或His101的置换)、降低至约1/500的活性(对于Ser99的置换)和降低至约1/10000的活性(对于Asp83、Asp85、Asp210或His212的置换)。Vandeputte-Rutten等人(Crystal Structure of the Outer Membrane Protease OmpT from Escherichia coli suggests a novel catalytic site,The EMBO Journal 2001,第20卷No 18 5033-5039)报道OmpT具有包含Asp83-Asp85对和His212-Asp210对的活性部位。此外,Kramer等人(Lipopolysaccharide regions involved in the activation of Escherichia coli outer membrane protease OmpT, Eur.J.Biochem.FEBS 2002,269,1746-1752)公开了环L4中的突变D208A、D210A、H212A、H212N、H212Q、G216K/K217G、K217T和R218L全都导致酶促活性的部分或实际上完全丢失。

[0201] 因此,产生具有降低的蛋白酶活性的蛋白的OmpT突变可包含针对残基E27、D43、D83、D85、D97、S99、H101E111、E136、E193、D206、D208、D210、H212G216、K217、R218和E250的

一个或多个的突变,例如错义突变。

[0202] E27、D43、D83、D85、D97、S99、H101E111、E136、E193、D206、D208、D210、H212G216、K217、R218和E250的一个或多个可被突变成导致具有降低的蛋白酶活性的蛋白的任何适当的氨基酸。例如,E27、D43、D83、D85、D97、S99、H101E111、E136、E193、D206、D208、D210、H212G216、K217、R218和E250的一个或多个可被突变成丙氨酸。适当的突变的实例为E27A、D43A、D83A、D85A、D97A、S99A、H101A E111A、E136A、E193A、D206A、D208A、D210A、H212A、H212N、H212Q、G216K、K217G、K217T、R218L和E250A。在一个实施方案中,突变的OmpT基因包含D210A和H212A突变。包含D210A和H212A突变的适当的突变的OmpT序列示于SEQ ID NO: 23中。

[0203] 表述“敲除突变的OmpT基因”在本发明的上下文中意指基因包含一个或多个突变,从而使得由基因编码的蛋白质不表达,以提供缺乏由敲除突变的基因编码的蛋白质的细胞。敲除基因可被部分或完全转录但不翻译成编码的蛋白质。可以以任何适当的方式,例如通过一个或多个缺失突变、插入突变、点突变、错义突变、无义突变和移码突变来对敲除突变的OmpT基因进行突变,以使蛋白质不表达。例如,可通过外来DNA序列例如抗生素抗性标记至基因编码序列的插入来敲除基因。

[0204] 在一个实施方案中,OmpT基因包含针对基因起始密码子的突变和/或位于基因起始密码子的下游和基因终止密码子的上游的一个或多个终止密码子,从而阻止OmpT蛋白表达。针对起始密码子的突变可以是起始密码子的1、2或全部3个核苷酸的错义突变。适当的突变的敲除OmpT序列示于SEQ ID NO: 24中。可选择地或另外地起始密码子可通过插入或缺失移码突变来进行突变。

[0205] 在一个实施方案中,根据本发明的革兰阴性细菌细胞不具有敲除突变的ompT基因,例如缺乏染色体ompT。

[0206] 在一个实施方案中,根据本发明的革兰阴性细菌细胞不具有敲除突变的degP基因,例如缺乏染色体degP。在一个实施方案中,根据本发明的革兰阴性细菌细胞不具有突变的degP基因。

[0207] 在一个实施方案中,根据本发明的革兰阴性细菌细胞不具有敲除突变的ptr基因,例如缺乏染色体ptr。

[0208] 许多基因工程突变包括敲除突变牵涉抗生素抗性标记的使用,所述标记使得能够选择和鉴定成功突变的细胞。然而,如上所述,使用抗生素抗性标记存在许多不利方面。

[0209] 在本发明的其它实施方案中,细胞不包含抗生素抗性标记并且克服使用抗生素抗性标记的上述不利方面,其中突变的Tsp基因、突变的spr基因和任选地突变的DegP基因和/或突变的ptr基因和/或突变的OmpT基因被突变以包含一个或多个限制性标记位点。限制性位点被基因工程化入基因,并且是非天然存在的。限制性标记位点是有利的,因为它们允许筛选和鉴定正确修饰的细胞,所述修饰细胞包含所需要的染色体突变。已被修饰来具有一个或多个突变的蛋白酶基因的细胞可使用寡核苷酸对(该寡核苷酸对被设计来扩增包含非天然存在的限制性标记位点的基因组DNA的区域),通过来自细胞裂解物的基因组DNA的PCR来进行分析。随后可在利用能够在非天然存在的限制性标记位点上消化DNA的适当的限制性内切酶温育之前和之后,通过琼脂糖凝胶电泳分析扩增的DNA。在用限制性内切酶温育后DNA片段的的存在确认了细胞已被成功地修饰来具有一个或多个突变的基

因。

[0210] 在其中细胞拥有具有SEQ ID NO:6的DNA序列的敲除突变的 ptr基因的实施方案中,SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18中显示的寡核苷酸引物可用于扩增来自转化细胞的基因组DNA的包含非天然存在的Ase I限制性位点的DNA的区域。随后可用Ase I限制性内切酶温育扩增的基因组DNA,并通过凝胶电泳对其进行分析以确认突变的ptr基因在基因组DNA中的存在。

[0211] 在其中细胞包含具有SEQ ID NO:3的DNA序列或SEQ ID NO:3 的核苷酸7至2048的敲除突变的Tsp基因的实施方案中,SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO:16中显示的寡核苷酸引物序列可用于扩增来自转化细胞的基因组DNA的包含非天然存在的Ase I限制性位点的DNA的区域。随后用Ase I限制性内切酶温育扩增的基因组DNA,并利用凝胶电泳对其进行分析以确认突变的Tsp基因在基因组DNA中的存在。

[0212] 在其中细胞包含具有SEQ ID NO:9的DNA序列的突变的DegP 基因的实施方案中,可将SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20中显示的寡核苷酸引物序列用于扩增来自转化细胞的基因组DNA的包含非天然存在的Ase I限制性位点的DNA的区域。随后用Ase I限制性内切酶温育扩增的基因组DNA,并通过凝胶电泳对其进行分析以确认突变的DegP基因在基因组DNA中的存在。

[0213] 可通过任何适当的突变,包括一个或多个缺失突变、插入突变、点突变、错义突变、无义突变和移码突变来引入一个或多个限制性位点。可通过起始密码子的突变和/或引入一个或多个终止密码子的突变来引入限制性位点,如上文中描述的。该实施方案是有利的,因为限制性标记位点是引入的敲除突变的直接和独特的标记。

[0214] 可插入包含框内终止密码子的限制性标记位点例如Ase I限制性位点。这是特别有利的,因为插入的限制性位点用作限制性标记位点和终止密码子以阻止基因编码序列的完全转录。例如,在其中通过引入Ase I位点来将终止密码子引入ptr基因的实施方案中,这也产生了限制性位点,如图7A中显示的。例如,在其中通过引入Ase I位点来将终止密码子在密码子21上引入Tsp基因的实施方案中,这也产生限制性位点,如图7B中显示的。

[0215] 可通过针对起始密码子的突变和任选地一个或多个其它点突变来插入限制性标记位点。在该实施方案中,限制性标记位点优选为EcoR I限制性位点。这是特别有利的,因为针对起始密码子的突变还产生限制性标记位点。例如,在其中ptr基因的起始密码子被改变成ATT的实施方案中,这产生了EcoR I标记位点,如图7A中显示的。例如,在其中将Tsp基因的起始密码子(密码子3)从ATG变成TCG的实施方案(如图7B中显示的)中,进一步的密码子2从AAC至AAT的点突变和密码子3从ATG至TCG的突变产生了EcoR I限制性标记位点,如图7B中显示的。

[0216] 在其中细胞具有突变的OmpT基因的本发明的实施方案中,可通过任何适当的突变,包括通过一个或多个缺失突变、插入突变、点突变、错义突变、无义突变和移码突变来引入一个或多个限制性位点。例如,在其中OmpT基因包含突变D210A和H212A的实施方案中,这些突变引入可用作选择标记的沉默HindIII限制性位点。

[0217] 在DegP基因或spr基因中,可使用沉默密码子变化引入标记限制性位点。例如,Ase I位点可用作沉默限制性标记位点,其中如图7C中显示的,对于突变的DegP基因,TAA终止密码子在框外。

[0218] 在本发明的实施方案中,其中ptr基因和/或Tsp基因被突变来编码具有降低的蛋白酶活性的蛋白酶III或Tsp,可使用沉默密码子变化来引入一个或多个标记限制性位点。

[0219] 根据本发明的重组革兰阴性细菌细胞可通过任何适当的方法来产生。本领域技术人员知道可用于使用突变的基因序列替代染色体基因序列的适当技术。可使用允许通过同源重组整合至宿主染色体内的适当的载体。

[0220] 适当的基因替代法描述于例如Hamilton等人(New Method for Generating Deletions and Gene Replacements in Escherichia coli, Hamilton C.M.等人, Journal of Bacteriology Sept.1989,第171卷, No.9p 4617-4622),Skorupski等人(Positive selection vectors for allelic exchange,Skorupski K和Taylor R.K., Gene,1996,169,47-52), Kiel等人(A general method for the construction of Escherichia coli mutants by homologous recombination and plasmid segregation, Kiel J.A.K.W.等人,Mol Gen Genet 1987,207:294-301),Blomfield等人(Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature sensitive pSC101replicon,Blomfield I.C.等人,Molecular Microbiology 1991,5 (6),1447-1457)和Ried等人(An nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed,unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis,Ried J.L.和Collmer A.,Gene 57(1987) 239-246)中。使得能够进行同源重组/替代的适当的质粒为pK03质粒(Link等人,1997, Journal of Bacteriology,179,6228-6237)。

[0221] 成功突变的菌株可使用本领域公知的方法,包括菌落PCR DNA 测序和菌落PCR限制性内切酶图谱法来鉴定。

[0222] 在其中细胞包含两个或更多个突变的染色体基因的实施方案中,可将突变的基因在相同或不同的载体上引入革兰阴性细菌。

[0223] 在一个实施方案中,根据本发明的革兰阴性细菌细胞不具有敲除突变的ompT基因,例如缺乏染色体ompT。

[0224] 在一个实施方案中,根据本公开内容的细胞仅包含3个表征突变:突变的spr、减少的Tsp以及FkpA、Skp或FkpA与Skp的组合的表达。

[0225] 在一个实施方案中,根据公开内容的细胞系由突变的Tsp基因和突变的spr基因以及FkpA基因组成。

[0226] 在一个实施方案中,根据公开内容的细胞系由突变的Tsp基因和突变的spr基因以及Skp基因组成。

[0227] 在一个实施方案中,根据公开内容的细胞系由突变的Tsp基因和突变的spr基因以及FkpA基因和Skp基因组成。

[0228] 在一个实施方案中,将能够表达或过表达一种或多种能够促进蛋白质折叠的蛋白例如FkpA、Skp、SurA、PPiA和PPiD的基因例如在表达载体上瞬时转化入细胞,所述载体任选地包含编码抗体或其结合片段的多核苷酸序列。

[0229] 在一个实施方案中,将编码抗体的多核苷酸序列和编码FkpA和/或Skp的多核苷酸插入分开的表达载体。

[0230] 为了产生包含重链和轻链的产物,可用两个载体转化细胞系,第一载体编码轻链

多肽,第二载体编码重链多肽。或者,可使用单个载体,所述载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

[0231] 或者,将编码抗体的多核苷酸序列和编码FkpA和/或Skp的多核苷酸插入一个载体。优选地,载体包含编码抗体的轻链和重链多肽的序列。

[0232] 本发明还提供了包含编码FkpA和/或Skp和对于人FcRn是特异性的抗体或其抗原结合片段的重组多核苷酸的表达载体。表达载体是包含编码FkpA和/或Skp的多核苷酸序列和编码抗体的多核苷酸序列的多顺反子载体。

[0233] 多顺反子载体可通过有利的克隆法来产生,所述方法允许多核苷酸序列至载体内的重复连续克隆。方法使用一对限制性位点的相容性粘性末端,例如Ase I和Nde I限制性位点的“AT”末端。可将包含编码序列和具有相容性粘性末端的多核苷酸序列,例如AseI-NdeI片段,克隆入载体的限制性位点例如Nde I内。多核苷酸序列的插入破坏5'限制性位点但产生新的3'限制性位点,例如NdeI,随后可将其用于插入包含相容性粘性末端的另外的多核苷酸序列。随后可重复该方法以插入另外的序列。插入载体的每一个多核苷酸序列包含位于终止密码子3'端的非编码序列,所述非编码序列可包含用于筛选的Ssp I位点、Shine Dalgarno核糖体结合序列、富含A的间隔子和编码起始密码子的NdeI位点。

[0234] 包含编码抗体的轻链(LC)、抗体的重链(HC)的多核苷酸序列、FkpA多核苷酸序列和其它多核苷酸序列的载体的产生的图示显示于图7d中。

[0235] 根据本发明的细胞优选包含如上定义的表达载体。

[0236] 在其中细胞还表达如下的一种或多种其它的蛋白质:一种或多种能够促进蛋白质折叠的蛋白,例如skp、SurA、PPIa和PPIb;和任选地一种或多种能够促进蛋白质分泌或转运的蛋白例如SecY、SecE、SecG、SecYEG、SecA、SecB、FtsY和Lep的实施方案中,可从一个或多个插入与编码FkpA的多核苷酸和/或编码抗体的多核苷酸序列相同的载体内的多核苷酸表达一种或多种其它蛋白质。或者,可将一个或多个多核苷酸插入分开的载体。

[0237] 可通过将一个或多个如上定义的表达盒插入适当的载体来产生表达载体。或者,可在表达载体中包含用于指导多核苷酸序列表达的调控表达序列,从而可仅需多核苷酸的编码区来完成表达载体。

[0238] 适当地将编码FkpA和/或Skp的多核苷酸和/或编码抗体的多核苷酸插入可复制载体,通常地自主复制表达载体,以在细胞的适当启动子的控制下在细胞中表达。用于该目的许多载体在本领域是已知的,适当的载体的选择可取决于核酸的大小和特别地细胞类型。

[0239] 可用于与根据本发明的多核苷酸一起转化宿主细胞的表达载体的实例包括:

[0240] • 质粒,例如pBR322或pACYC184,和/或

[0241] • 病毒载体例如细菌噬菌体

[0242] • 转座遗传元件例如转座子

[0243] 这样的表达载体通常包含DNA复制的质粒起始点、抗生素选择标记、通过多克隆位点分开的启动子和转录终止子(表达盒)和编码核糖体结合位点的DNA序列。

[0244] 用于本发明的启动子可直接连接于相关多核苷酸,或可选择地位于适当的位置中,例如位于载体中,以便当相关多肽被插入时,相关启动子可作用于其。在一个实施方案中,启动子位于其所作用的多核苷酸的编码部分之前,例如相关启动子位于多核苷酸的每

一个编码部分之前。如本文中所用,“……之前”意欲指启动子位于相对于编码多核苷酸部分的5'末端。

[0245] 启动子对于宿主细胞可以是内源的或外源的。适当的启动子包括 lac、tac、trp、phoA、Ipp、Arab、tet和T7。

[0246] 使用的一个或多个启动子可以是诱导型启动子。在其中编码FkpA 和/或Skp的多核苷酸和编码抗体的多核苷酸被插入一个载体的实施方案中,编码FkpA和抗体的核苷酸序列可处于单个启动子或分开的启动子的控制之下。在其中编码FkpA和/或Skp和抗体的核苷酸序列处于分开的启动子的控制之下的实施方案中,启动子可以是独立的诱导型启动子。

[0247] 用于细菌系统的启动子通常还包含可操作地连接于编码目标多肽的DNA的Shine-Dalgarno (S.D.) 序列。可通过限制性内切酶消化从细菌来源的DNA取出启动子,将其插入包含期望的DNA的载体。

[0248] 表达载体优选还包含用于产生抗体或其抗原结合片段的双顺反子信使,如W003/048208或W02007/039714(将其内容通过引用并入本文)中描述的。优选地,上游顺反子包含编码抗体的轻链的DNA,下游顺反子包含编码对应的重链的DNA,双顺反子基因间序列(IGS)优选包含选自IGS1 (SEQ ID NO:23)、IGS2 (SEQ ID NO:24)、IGS3 (SEQ ID NO:25)和IGS4 (SEQ ID NO:26)的序列。

[0249] 终止子对于宿主细胞可以是内源的或外源的。适当的终止子是 rrnB。

[0250] 其它适当的转录调控子包括启动子和终止子以及蛋白质靶向法可见于“Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia coli” Savvas C.Makrides, Microbiological Reviews, Sept 1996, p 512-538中。

[0251] 插入表达载体的FkpA多核苷酸优选包含编码FkpA信号序列和 FkpA编码序列的核酸。载体优选地包含使得载体能够在一个或多个选择的宿主细胞中复制,优选地独立于宿主染色体复制的核酸序列。对于各种细菌,这样的序列是公知的。

[0252] 在一个实施方案中,FkpA和/或Skp和/或目标蛋白在N末端和/或C末端包含组氨酸-标记。

[0253] 抗体分子可通过适当的信号序列从细胞分泌或被靶向周质。或者,抗体分子可在细胞的细胞质内积累。优选地,抗体分子被靶向周质。

[0254] 编码抗体的多核苷酸可表达为与另一种多肽,优选信号序列的融合蛋白或在成熟多肽的N末端上具有特定切割位点的其它多肽。选择的异源信号序列应当是被宿主细胞识别和加工的信号序列。对于不识别和加工天然或真核多肽信号序列的原核宿主细胞,利用原核信号序列替换信号序列。适当的信号序列包括OmpA、PhoA、LamB、PelB、DsbA和DsbC。在其中细胞包含编码抗体的重链的多核苷酸序列和编码抗体的轻链的多核苷酸序列的实施方案中,每一个多核苷酸可包含信号序列例如OmpA。

[0255] 包含一种或多种上文所列组件的适当的载体的构建使用标准连接技术。对分离的质粒或DNA片段以期望的形式进行切割、裁剪、和再连接以产生需要的质粒。可籍以构建载体的一般方法、转染法和培养法对于本领域技术人员来说是公知的。在这方面,参考“Current Protocols in Molecular Biology”,1999,F.M.Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor

Publishing。

[0256] 分子生物学的标准技术可用于制备编码抗体的DNA序列。可使用寡核苷酸合成技术完全或部分地合成期望的DNA序列。适当时，可使用定点诱变和聚合酶链式反应(PCR)技术。

[0257] 本文中针对多核苷酸描述的本发明的实施方案同样地用于本发明的可选择的实施方案，例如包含本文中使用的组分的载体、表达盒和/或宿主细胞，只要相关方面可用于所述可选择的实施方案。

[0258] 根据本发明的细胞还可包含编码目标蛋白的多核苷酸序列。编码目标蛋白的多核苷酸序列可以是外源的或内源的。编码目标蛋白的多核苷酸序列可被整合入宿主的染色体或可非整合地存在于载体，通常质粒中。

[0259] 在一个实施方案中，根据本发明的细胞表达目标蛋白。“目标蛋白”在本说明书的上下文中意欲指用于表达的多肽，通常重组多肽。然而，目标蛋白可以是来自宿主细胞的内源基因表达的内源蛋白。

[0260] 如本文中所用，“重组多肽”是指使用重组DNA技术构建或产生的蛋白。目标蛋白可以是来自外源载体表达的，与内源蛋白或其突变形式(例如具有减弱的生物活性)相同的外源序列或其片段。或者，目标蛋白可以是通常不由宿主细胞表达的异源蛋白。

[0261] 目标蛋白可以是任何适当的蛋白，包括治疗性、预防性或诊断性蛋白。

[0262] 本领域技术人员通过使用本领域公知的方法，例如蛋白G HPLC、圆二色性、NMR、x射线晶体学和表位亲和力测量法，能容易地测试分泌的蛋白以判断蛋白质是否被正确折叠。

[0263] 在一个实施方案中，目标蛋白用于疾病或障碍包括免疫障碍和/或自身免疫疾病的治疗。

[0264] 在一个实施方案中，自身免疫疾病选自急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、急性坏死性出血性白质脑炎、阿狄森病、丙种球蛋白缺乏血症、斑秃、淀粉样变性、ANCA相关性脉管炎、强直性脊柱炎、抗-GBM/抗-TBM肾炎、抗磷脂综合征(APS)、自身免疫性血管性水肿、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性家族性自主神经异常、自身免疫性肝炎、自身免疫性高脂血症、自身免疫性免疫缺乏症、自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性视网膜病变、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、自身免疫性甲状腺病、自身免疫性荨麻疹、轴突和神经元神经病、巴洛病、贝赫切特病(Behcet's disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、Castleman病、乳糜泻、美洲锥虫病(Chagas disease)、慢性疲劳综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、慢性复发性多灶性骨髓炎(CRMO)、变应性肉芽肿性血管炎(Churg-Strauss syndrome)、瘢痕性类天疱疮/良性粘膜类天疱疮、克罗恩病、Cogans综合征、冷凝集素疾病、先天性心脏传导阻滞、柯萨奇病毒性心肌炎、CREST病、特发性混合性冷球蛋白血症、脱髓鞘性神经病、疱疹样皮炎、皮炎、德维克病(视神经脊髓炎)、扩张型心肌病、盘状狼疮、Dressler综合征、子宫内膜异位症、嗜酸性血管中心性纤维变性、嗜酸性筋膜炎、结节性红斑、实验性过敏性脑脊髓炎、伊文思综合征、纤维肌痛、纤维化肺泡炎、巨细胞动脉炎(颞动脉炎)、肾小球肾炎、肺出血性肾炎综合征、肉芽肿性血管炎(GPA)参见韦格纳氏病和格雷夫斯病、格-巴二氏综合征、Hashimoto脑炎、Hashimoto甲状腺炎、溶血性贫血、亨诺-许兰氏紫癜、妊娠疱疹、低丙

球蛋白血症、特发性低补体血肾小管间质性肾炎 (Idiopathic hypocomplementemic tubulointestinal nephritis)、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA肾病、IgG4相关疾病、IgG4相关硬化性疾病、免疫调节性脂蛋白、炎性主动脉瘤、炎性假瘤、包涵体肌炎、胰岛素依赖性糖尿病 (1型)、间质性膀胱炎、少年关节炎、青少年糖尿病。川崎综合征、Kuttner肿瘤、朗-伊二氏综合征、白细胞分裂性血管炎、扁平苔癣、硬化性苔癣、木样结膜炎、线性IgA疾病 (LAD)、狼疮 (SLE)、莱姆病、慢性、纵隔纤维变性、梅尼埃病、显微镜下多血管炎、米库利兹综合征、混合性结缔组织病 (MCTD)、莫伦溃疡、穆-哈二氏病、多灶性纤维硬化、多发性硬化、重症肌无力、肌炎、发作性睡病、视神经脊髓炎 (Devic氏)、中性粒细胞减少、眼瘢痕性类天疱疮、视神经炎、奥蒙德病 (腹膜后纤维化)、复发性风湿病、PANDAS (与链球菌相关的儿童自身免疫性神经精神性障碍)、副肿瘤性小脑变性、副蛋白血症多发性神经病 (Paraproteinemic polyneuropathy)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH)、帕-罗二氏综合征、Parsonnage-Turner综合征、睫状体扁平部炎 (周边葡萄膜炎)、寻常天疱疮、主动脉周围炎、动脉周围炎、周围神经病、静脉周围脑脊髓炎、恶性贫血、POEMS综合征、结节性多发性动脉炎、I、II和III型自身免疫性多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎、心肌梗塞后综合征、心包切开后综合征、黄体酮皮炎、原发性胆汁性肝硬变、原发性硬化性胆管炎、银屑病、银屑病关节炎、特发性肺纤维化、坏疽性脓皮病、单纯红细胞再生障碍、雷诺现象、反射性交感神经营养障碍、莱特尔氏综合征、复发性多软骨炎、不宁腿综合征、腹膜后纤维化 (奥蒙德病)、风湿热、风湿性关节炎、里德耳甲状腺炎、结节病、施密特综合征、巩膜炎、硬皮病、干燥综合征、精子和睾丸自身免疫、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎 (SBE)、Susac综合征、交感性眼炎、高安动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、托-亨二氏综合征、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病 (UCTD)、葡萄膜炎、血管炎、水疱大疱性皮肤病、白癜风、Waldenstrom巨球蛋白血症、温暖性特发性溶血性贫血和韦格纳氏肉芽肿 (现在称作肉芽肿性血管炎 (GPA))。

[0265] 在一个实施方案中,神经障碍选自慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病 (CIDP)、格-巴二氏综合征、副蛋白血症多发性神经病、视神经脊髓炎 (NMO、NMO谱群障碍或NMO谱群疾病) 和重症肌无力。

[0266] 在一个实施方案中,免疫学血液学障碍选自特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、温暖性特发性溶血性贫血、肺出血肾炎综合征和因抗-HLA抗体引起的移植供体不匹配。

[0267] 在一个实施方案中,疾病选自重症肌无力、视神经脊髓炎、CIDP、格-巴二氏综合征、副蛋白血症多发性神经病、顽固性癫痫、ITP/TTP、溶血性贫血、肺出血肾炎综合征、ABO不匹配、狼疮肾炎、肾血管炎、硬皮病、纤维化肺泡炎、扩张型心肌病、格雷夫斯病、1型糖尿病、自身免疫性糖尿病、天疱疮、硬皮病、狼疮、ANCA脉管炎、皮肌炎、干燥综合征和风湿性关节炎。

[0268] 在一个实施方案中,皮肤科障碍选自大疱性类天疱疮、寻常天疱疮、ANCA相关性脉管炎和扩张型心肌病。

[0269] 在一个实施方案中,根据本公开内容的抗体或片段可用于与同种异体器官或组织移植或某些新生儿病况相关的同种免疫疾病的预防或治疗。

[0270] 蛋白质可以是蛋白水解敏感性多肽,即在天然状态或在分泌过程中易于被切割,

对切割易感,或被一种或多种革兰阴性细菌例如大肠杆菌蛋白酶切割的蛋白质。在一个实施方案中,目标蛋白对选自DegP、蛋白酶III和Tsp的蛋白酶是蛋白水解敏感性的。在一个实施方案中,目标蛋白对蛋白酶Tsp是蛋白水解敏感性的。在一个实施方案中,目标蛋白对蛋白酶DegP和蛋白酶III是蛋白水解敏感性的。在一个实施方案中,目标蛋白对蛋白酶DegP和Tsp是蛋白水解敏感性的。在一个实施方案中,目标蛋白对蛋白酶Tsp和蛋白酶III是蛋白水解敏感性的。在一个实施方案中,目标蛋白对蛋白酶DegP、蛋白酶III和Tsp是蛋白水解敏感性的。

[0271] 优选地蛋白为真核生物多肽。

[0272] 根据本发明的细胞表达的目标蛋白可以例如是免疫原、包含两种 异源蛋白的融合蛋白或抗体。用作目标蛋白的抗体包括单克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体、人源化抗体、完全人抗体或嵌合抗体。抗 体可以来自任意种类,但优选来源于单克隆抗体、人抗体或人源化片 段。抗体可来源于免疫球蛋白分子的任何种类(例如IgG、IgE、IgM、IgD或IgA)或亚类,以及可获自任何物种包括例如小鼠、大鼠、鲨鱼、兔、猪、仓鼠、骆驼、骆马、山羊或人。抗体片段的部分可获自超过 一个物种,例如抗体片段可以是嵌合的。在一个实例中,恒定区来自 一个物种并且可变区来自另一个物种。

[0273] 抗体可以是具有全长重链和轻链的完整抗体分子或其片段例如 VH、VL、VHH、Fab、修饰的Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv片段，或双特异性抗体例如Fab-dAb或Fab-Fv，如W02009/040562和 W02010/035012中描述的。

[0274] 在一个实施方案中,蛋白是Fab'。

[0275] 抗体可以特异于任何靶抗原。抗原可以是细胞结合的蛋白,例如 细胞例如细菌细胞、酵母细胞、T细胞、内皮细胞或肿瘤细胞上的细 胞表面蛋白,或其可以是可溶性蛋白。目标抗原还可以是任何医学相 关蛋白例如在疾病或感染过程中被上调的那些蛋白,例如受体和/或它 们的对应配体。细胞表面蛋白的具体实例包括粘附分子,例如整联蛋 白例如B1整联蛋白例如VLA-4、E-选择蛋白、P选择蛋白或L-选择 蛋白、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD11a、CD11b、CD18、CD19、CD20、CD23、CD25、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD45、CDW52、CD69、CD134 (OX40)、ICOS、BCMP7、CD137、CD27L、CD30、CD31、CD32、CD34、CD36、CD37、CD39、CD41、CD42、CD44、CD47、CD54、CD56、CD58、CD59、CD61、CD63、CD64、CD66、CD68、CD69、CD71、CD74、CD77、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD93、CD94、CD95、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120、CD121、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD128、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140、CD141、CD142、CD143、CD144、CD145、CD146、CD147、CD148、CD149、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156、CD157、CD158、CD159、CD160、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172、CD173、CD174、CD175、CD176、CD177、CD178、CD179、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD187、CD188、CD189、CD190、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CD198、CD199、CD200、CD201、CD202、CD203、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210、CD211、CD212、CD213、CD214、CD215、CD216、CD217、CD218、CD219、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235、CD236、CD237、CD238、CD239、CD240、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD250、CD251、CD252、CD253、CD254、CD255、CD256、CD257、CD258、CD259、CD260、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD285、CD286、CD287、CD288、CD289、CD290、CD291、CD292、CD293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、CD306、CD307、CD308、CD309、CD310、CD311、CD312、CD313、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319、CD320、CD321、CD322、CD323、CD324、CD325、CD326、CD327、CD328、CD329、CD330、CD331、CD332、CD333、CD334、CD335、CD336、CD337、CD338、CD339、CD340、CD341、CD342、CD343、CD344、CD345、CD346、CD347、CD348、CD349、CD350、CD351、CD352、CD353、CD354、CD355、CD356、CD357、CD358、CD359、CD360、CD361、CD362、CD363、CD364、CD365、CD366、CD367、CD368、CD369、CD370、CD371、CD372、CD373、CD374、CD375、CD376、CD377、CD378、CD379、CD380、CD381、CD382、CD383、CD384、CD385、CD386、CD387、CD388、CD389、CD390、CD391、CD392、CD393、CD394、CD395、CD396、CD397、CD398、CD399、CD400、CD401、CD402、CD403、CD404、CD405、CD406、CD407、CD408、CD409、CD410、CD411、CD412、CD413、CD414、CD415、CD416、CD417、CD418、CD419、CD420、CD421、CD422、CD423、CD424、CD425、CD426、CD427、CD428、CD429、CD430、CD431、CD432、CD433、CD434、CD435、CD436、CD437、CD438、CD439、CD440、CD441、CD442、CD443、CD444、CD445、CD446、CD447、CD448、CD449、CD450、CD451、CD452、CD453、CD454、CD455、CD456、CD457、CD458、CD459、CD460、CD461、CD462、CD463、CD464、CD465、CD466、CD467、CD468、CD469、CD470、CD471、CD472、CD473、CD474、CD475、CD476、CD477、CD478、CD479、CD480、CD481、CD482、CD483、CD484、CD485、CD486、CD487、CD488、CD489、CD490、CD491、CD492、CD493、CD494、CD495、CD496、CD497、CD498、CD499、CD500、CD501、CD502、CD503、CD504、CD505、CD506、CD507、CD508、CD509、CD510、CD511、CD512、CD513、CD514、CD515、CD516、CD517、CD518、CD519、CD520、CD521、CD522、CD523、CD524、CD525、CD526、CD527、CD528、CD529、CD530、CD531、CD532、CD533、CD534、CD535、CD536、CD537、CD538、CD539、CD540、CD541、CD542、CD543、CD544、CD545、CD546、CD547、CD548、CD549、CD550、CD551、CD552、CD553、CD554、CD555、CD556、CD557、CD558、CD559、CD560、CD561、CD562、CD563、CD564、CD565、CD566、CD567、CD568、CD569、CD570、CD571、CD572、CD573、CD574、CD575、CD576、CD577、CD578、CD579、CD580、CD581、CD582、CD583、CD584、CD585、CD586、CD587、CD588、CD589、CD590、CD591、CD592、CD593、CD594、CD595、CD596、CD597、CD598、CD599、CD600、CD601、CD602、CD603、CD604、CD605、CD606、CD607、CD608、CD609、CD610、CD611、CD612、CD613、CD614、CD615、CD616、CD617、CD618、CD619、CD620、CD621、CD622、CD623、CD624、CD625、CD626、CD627、CD628、CD629、CD630、CD631、CD632、CD633、CD634、CD635、CD636、CD637、CD638、CD639、CD640、CD641、CD642、CD643、CD644、CD645、CD646、CD647、CD648、CD649、CD650、CD651、CD652、CD653、CD654、CD655、CD656、CD657、CD658、CD659、CD660、CD661、CD662、CD663、CD664、CD665、CD666、CD667、CD668、CD669、CD670、CD671、CD672、CD673、CD674、CD675、CD676、CD677、CD678、CD679、CD680、CD681、CD682、CD683、CD684、CD685、CD686、CD687、CD688、CD689、CD690、CD691、CD692、CD693、CD694、CD695、CD696、CD697、CD698、CD699、CD700、CD701、CD702、CD703、CD704、CD705、CD706、CD707、CD708、CD709、CD710、CD711、CD712、CD713、CD714、CD715、CD716、CD717、CD718、CD719、CD720、CD721、CD722、CD723、CD724、CD725、CD726、CD727、CD728、CD729、CD730、CD731、CD732、CD733、CD734、CD735、CD736、CD737、CD738、CD739、CD740、CD741、CD742、CD743、CD744、CD745、CD746、CD747、CD748、CD749、CD750、CD751、CD752、CD753、CD754、CD755、CD756、CD757、CD758、CD759、CD760、CD761、CD762、CD763、CD764、CD765、CD766、CD767、CD768、CD769、CD770、CD771、CD772、CD773、CD774、CD775、CD776、CD777、CD778、CD779、CD780、CD781、CD782、CD783、CD784、CD785、CD786、CD787、CD788、CD789、CD790、CD791、CD792、CD793、CD794、CD795、CD796、CD797、CD798、CD799、CD800、CD801、CD802、CD803、CD804、CD805、CD806、CD807、CD808、CD809、CD810、CD811、CD812、CD813、CD814、CD815、CD816、CD817、CD818、CD819、CD820、CD821、CD822、CD823、CD824、CD825、CD826、CD827、CD828、CD829、CD830、CD831、CD832、CD833、CD834、CD835、CD836、CD837、CD838、

[0276] 可溶性抗原包括白细胞介素例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-13、IL-14、IL-16或IL-17,例如IL17A和 /或IL17F,病毒抗原例如呼吸道合胞病毒或巨细胞病毒抗原、免疫球蛋白例如IgE、干扰素例如干扰素 α 、干扰素 β 或干扰素 γ 、肿瘤坏死因子TNF(以前称为肿瘤坏死因子- α)、肿瘤坏死因子- β 、集落刺激因子例如G-CSF或GM-CSF,以及血小板衍生生长因子例如PDGF- α 和 PDGF- β ,和适当其受体。其它抗原包括细菌细胞表面抗原、细菌毒素、病毒例如流感病毒、EBV、HepA、B和C、生物恐怖剂、放射性核素和重金属以及蛇和蜘蛛毒液和毒素。

[0277] 在一个实施方案中,抗原为FcRn。

[0278] 用于本公开内容的抗体可使用本领域已知的任何适当的方法来获 得。FcRn多肽/

蛋白包括融合蛋白和其突变体,包括(重组地或天然地)表达多肽的细胞(例如活化T细胞)可用于产生特异性识别FcRn的抗体。多肽可以是‘成熟’多肽或其生物活性片段或衍生物。人蛋白以编号P55899注册于Swiss-Prot中。在一个实施方案中,免疫原是FcRn α 链或其片段。

[0279] 用于免疫宿主的多肽可通过本领域公知的方法从包含表达系统的遗传工程宿主细胞来制备,或可从天然生物来源回收它们。在本申请中,术语“多肽”包括肽、多肽和蛋白质。除非另有所指,否则这些术语可互换使用。FcRn多肽在一些情况下可以为更大的蛋白质例如融合蛋白的部分,例如融合至亲和标记。

[0280] 可使用公知的常规方案(参见例如Handbook of Experimental Immunology, D.M.Weir(ed.),第4卷,Blackwell Scientific Publishers, Oxford,England,1986),通过将多肽给动物,优选非人动物施用来获得针对FcRn多肽产生的抗体,其中动物的免疫是必需的。可免疫许多温血动物,例如兔、小鼠、大鼠、绵羊、牛、骆驼或猪。然而,小鼠、兔、猪和大鼠通常是最适当的。

[0281] 在一个实施方案中,抗体可用于功能性改变目标抗原的活性。例如,抗体可直接或间接中和、拮抗或激动所述抗原的活性,或仅阻断正常配体对其的结合。

[0282] 本发明还提供了包含突变的Tsp基因、编码突变的spr的突变spr基因、能够表达或过表达一种或多种能够促进蛋白质折叠的蛋白的基因以及编码特异于FcRn的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列的重组革兰阴性细菌细胞,其中突变的Tsp基因编码具有降低的蛋白酶活性的Tsp蛋白或为敲除突变的Tsp基因。

[0283] 各种抗-FcRn抗体和片段示于序列36至74中。

[0284] 在一个实施方案中,重链包含独立地选自SEQ ID NO:36、37和38的1、2或3个CDR。

[0285] 在一个实施方案中,轻链包含独立地选自SEQ ID NO:39、40和41的1、2或3个CDR。

[0286] 在一个实施方案中,抗体重链包含SEQ ID NO:36所示的CDR-H1的序列、SEQ ID NO:37所示的CDR-H2的序列和SEQ ID NO:38所示的CDRH3的序列。

[0287] 在一个实施方案中,抗体轻链包含SEQ ID NO:39所示的CDR-L1的序列、SEQ ID NO:40所示的CDR-L2的序列和SEQ ID NO:41所示的CDRL3的序列。

[0288] 在一个实施方案中,抗体重链包含SEQ ID NO:36所示的CDR-H1的序列、SEQ ID NO:37所示的CDR-H2的序列、SEQ ID NO:38所示的CDRH3的序列、SEQ ID NO:39所示的CDR-L1的序列、SEQ ID NO:40所示的CDR-L2的序列和SEQ ID NO:41所示的CDRL3的序列。

[0289] 在一个实施方案中,细胞表达具有本文中公开的序列的抗体分子。

[0290] 抗体分子包括抗体及其结合片段。

[0291] 适当地,根据本发明的人源化抗体具有包含人受体构架区以及一个或多个本文中特别提供的CDR的可变结构域。因此,在一个实施方案中提供了结合人FcRn的人源化抗体,其中可变结构域包含人受体构架区和非人供体CDR。在一个实例中,轻链可变结构域包含SEQ ID NO:50所示的序列,重链可变结构域包含SEQ ID NO:58所示的序列。在一个实例中,轻链包含SEQ ID NO:54所示的序列,重链包含SEQ ID NO:62所示的序列。

[0292] 表达后,可以例如通过缀合于另一个实体例如效应分子来进一步加工抗体片段。

[0293] 如本文中所用,术语效应分子包括例如抗肿瘤剂、药物、毒素(例如细菌或植物来源的酶促活性毒素及其片段,例如蓖麻毒素及其片段)生物活性蛋白例如酶、其它抗体或

抗体片段、合成或天然存在的聚合物、核酸及其片段例如DNA、RNA及其片段、放射性核素、特别是放射性碘化物、放射性同位素、螯合金属、纳米颗粒和报道基团例如荧光化合物或可通过NMR或ESR光谱学检测的化合物。可通过任何适当的方法将效应分子连接于抗体或其片段,例如抗体片段可被修饰来连接至少一种效应分子,如W005/003171或W005/003170(将其内容通过引用并入本文)中描述的。W005/003171或W005/003170还描述了适当的效应分子。

[0294] 在一个实施方案中,如需要,可将抗体或其片段例如Fab进行PEG化,以产生具有期望的性质(例如与完整抗体相似)的产物。例如,抗体可以是PEG化的抗-TNF- α Fab',如W001/094585中描述的,优选地重链的C末端上的半胱氨酸残基之一连接于赖氨酰-马来酰亚胺-衍生基团,其中赖氨酰残基的两个氨基的每一个共价连接于具有约20,000Da的分子量的甲氧基聚(乙二醇)残基,以便甲氧基聚(乙二醇)残基的总的平均分子量为约40,000Da,更优选赖氨酰-马来酰亚胺-衍生基团为[1-[[[2-[[3-(2,5-二氧-1-吡咯烷基)-1-氧丙基]氨基]乙基]氨基]-羰基]-1,5-戊二基]双(亚氨基羰基)。

[0295] 在一个实施方案中,根据本公开内容的Fab或Fab'缀合于人血清白蛋白分子或淀粉分子。

[0296] 细胞还可包含其它的编码一种或多种其它目标蛋白的多核苷酸序列。

[0297] 在一个实施方案中,已知在野生型中在纯化过程中与目标重组蛋白共纯化的一种或多种大肠杆菌宿主蛋白被选择用于遗传修饰,如Humphreys等人“Engineering of *Escherichia coli* to improve the purification of periplasmic Fab' fragments: changing the pI of the chromosomally encoded PhoS/PstS protein”,*Protein Expression and Purification* 37 (2004) 109-118和W004/035792(将其内容通过引用并入本文)描述的。通过改变选择的大肠杆菌蛋白的物理性质以便它们不再与重组抗体共纯化,这样的修饰宿主蛋白的使用改进了用于在大肠杆菌中产生的目标蛋白,特别是抗体的纯化方法。优选地,被改变的大肠杆菌蛋白选自磷酸盐结合蛋白(PhoS/PstS)、二肽结合蛋白(DppA)、麦芽糖结合蛋白(MBP)和硫氧还蛋白的一种或多种。

[0298] 在一个实施方案中,通过氨基酸标记至C末端或N末端的添加来改变污染性宿主蛋白的物理性质。在优选实施方案中,被改变的物理性质是等电点,氨基酸标记是连接于C末端的聚天冬氨酸标记。在一个实施方案中,通过添加所述标记改变的大肠杆菌蛋白是二肽结合蛋白(DppA)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、硫氧还蛋白和磷酸盐结合蛋白(PhoS/PstS)。在一个具体实施方案中,通过添加包含包含6个天冬氨酸残基的聚天冬氨酸标记(polyD)至C末端,使大肠杆菌磷酸盐结合蛋白(PhoS/PstS)的pI从7.2降至5.1。

[0299] 还优选的是单独地或与N或C末端标记的添加组合地修饰污染性大肠杆菌蛋白的特定残基以改变其物理性质的。这样的变化可包括插入或缺失以改变蛋白的大小或氨基酸置换以改变pI或疏水性。在一个实施方案中,这些残基位于蛋白的表面。在优选实施方案中,改变PhoS蛋白的表面残基以降低蛋白的pI。优选地,避开已表明在磷酸盐结合中非常重要的残基(Bass, US5,304,472)以维持功能性PhoS蛋白。优选地,靶向远远伸出蛋白质表面或存在于大群碱性残基中或附近的赖氨酸残基。在一个实施方案中,PhoS蛋白具有连接于C末端的六聚天冬氨酸标记,同时分子的相对末端上的表面残基被靶向用于置换。优选地,选择的赖氨酸残基被谷氨酸或天冬氨酸置换以赋予比当将中性残基改变成酸性残

基时更大的潜在pI变化。本文中的置换突变体的命名由字母后跟数字后跟字母组成。第一个字母表示野生型蛋白中的氨基酸。数字是指在其上进行氨基酸置换的氨基酸位置，第二个字母表示用于替代野生型氨基酸的氨基酸。在本发明的PhoS的优选突变中，赖氨酸残基(K) 275、107、109、110、262、265、266、309、313作为单个突变或组合突变被谷氨酸(E)或谷氨酰胺(Q)置换，此外赖氨酸(K) 318可以作为单个或组合突变被天冬氨酸(D)置换。优选地单个突变为K262E、K265E和K266E。优选地，组合突变为K265/266E和K110/265/266E。更优选，将所有突变与在C末端上连接的聚天冬氨酸(polyD)以及任选地还与K318D置换组合。在优选实施方案中，突变导致至少pI降低2个单位。优选地，本发明的突变使PhoS的pI从7.2降至约4与约5.5之间。在本发明的一个实施方案中，通过使用突变polyD K318D、polyD K265/266E和polyD K110/265/266E使大肠杆菌的PhoS蛋白的pI从7.2分别降至约4.9，约4.8和约4.5。

[0300] 编码目标蛋白的多核苷酸可表达为与另一种多肽，优选信号序列的融合蛋白或在成熟多肽的N末端上具有特定切割位点的其它多肽。选择的异源信号序列应当是被宿主细胞识别和加工的信号序列。对于不识别和加工天然或真核多肽信号序列的原核宿主细胞，用原核信号序列替换信号序列。适当的信号序列包括OmpA、PhoA、LamB、PelB、DsbA和DsbC。

[0301] 包含一种或多种上文所列组分的适当的载体的构建使用标准连接技术。以期望的形式切割、裁剪和再连接分离的质粒或DNA片段，以产生需要的质粒。

[0302] 在一个实施方案中，将表达盒用于本发明以携带编码目标蛋白的多核苷酸，所述表达盒通常包含编码一种或多种目标蛋白的一个或多个蛋白质编码序列和一个或多个调控表达序列。一个或多个调控表达序列可包括启动子。一个或多个调控表达序列还可包括3'非翻译区例如终止序列。在下文中更详细地描述适当的启动子。

[0303] 在一个实施方案中，根据本发明的细胞包含载体例如质粒。载体优选包含如上定义的一个或多个表达盒。

[0304] 在其中目标蛋白是包含重链和轻链的抗体的实施方案中，可用两个载体来转染细胞系，第一载体编码轻链多肽，第二载体编码重链多肽。或者，可使用单个载体，载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

[0305] 用于本发明的载体可通过将上文中定义的表达盒插入适当的载体来产生。或者，可在载体中包含用于指导编码目标蛋白的多核苷酸序列表达的调控表达序列，从而可仅需要多核苷酸的编码区来完成载体。

[0306] 可用于与根据本发明的多核苷酸一起转化宿主细胞的载体的实例包括质粒例如pBR322或pACYC184，和/或病毒载体例如细菌噬菌体、转座遗传元件例如转座子。

[0307] 可获得许多形式的表达载体。这样的载体通常包含DNA复制的质粒起始点、抗生素选择标记、通过多克隆位点分隔的启动子和转录终止子(表达盒)和编码核糖体结合位点的DNA序列。

[0308] 用于本发明的启动子可直接连接于相关多核苷酸或可选择地位于适当的位置，例如位于载体中，以便当插入相关多肽时，相关启动子可对作用于其。在一个实施方案中，启动子位于其所作用的多核苷酸的编码部分之前，例如在多核苷酸的编码部分之前的每一个相关启动子。如本文中所用，“……之前”意欲指启动子相对于编码多核苷酸部分位

于5'末端。

[0309] 启动子对于宿主细胞可以是内源性的或外源性的。适当的启动子 包括lac、tac、trp、phoA、Ipp、Arab、tet和T7。

[0310] 使用的一个或多个启动子可以是诱导型启动子。

[0311] 用于细菌系统的表达单元通常还包含可操作地连接于编码目标多 肽的DNA的Shine-Dalgarno (S.D.) 核糖体序列。

[0312] 表达载体优选地还包含用于产生抗体或其抗原结合片段的双顺反 子信使,如W03/048208或W02007/039714 (将其内容通过引用并入 本文) 中描述的。优选地,上游顺反子包含编码抗体的轻链的DNA,下游顺反子包含编码对应的重链的DNA,双顺反子基因间序列 (IGS) 优选地包含选自IGS1 (SEQ ID NO:38)、IGS2 (SEQ ID NO:39)、IGS3 (SEQ ID NO:40) 和IGS4 (SEQ ID NO:41) 的序列。

[0313] 终止子可对于宿主细胞可以是内源性的或外源性的。适当的终止 子是rrnB。

[0314] 其它适当的转录调控因子包括启动子和终止子以及蛋白质靶向法 可见于“Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia coli” Savvas C.Makrides, Microbiological Reviews, Sept 1996, p 512-538中。

[0315] 抗体分子可通过适当的信号序列从细胞分泌或被靶向周质。或者, 抗体分子可在细胞的细胞质中积累。优选地抗体分子被靶向周质。

[0316] 本文中针对多核苷酸描述的本发明的实施方案同样地用于本发明 的可选择的实施方案,例如包含本文中使用的组分的载体、表达盒和/ 或宿主细胞,只要相关方面可用于所述实施方案。

[0317] 本发明还提供了用于产生目标重组蛋白的方法,包括在重组革兰 阴性细菌细胞中表达目标重组蛋白,如在上文中在本发明的第一或第 二方面中描述的。

[0318] 优选地用于本发明的方法的革兰阴性细菌细胞和目标蛋白在上文 中进行了详细描述。

[0319] 当编码目标蛋白的多核苷酸是外源性多核苷酸时,可使用本领域 已知的任何适当方法将多核苷酸整合入宿主细胞。通常地,将多核苷 酸作为被转化入细胞的表达载体的部分进行整合。因此,在一个方面, 根据本发明的细胞包含含有编码目标蛋白的多核苷酸的表达盒。

[0320] 可使用标准技术,例如使用氯化铷、PEG或电穿孔将多核苷酸序 列转化进入细胞。

[0321] 根据本发明的方法还可使用选择系统来帮助选择已用编码目标 蛋白的多核苷酸成功转化的稳定细胞。选择系统通常使用编码选择标 记的多核苷酸序列的共转化。在一个实施方案中,每一个转化入细胞 的多核苷酸还包含编码一个或多个选择标记的多核苷酸序列。因此, 编码目标蛋白的多核苷酸和一个或多个编码标记的多核苷酸的转化一 起进行,并且选择系统可用于选择产生期望的蛋白的那些细胞。

[0322] 能够表达一个或多个标记的细胞因整合在其中的选择系统的多 肽/基因或多肽组分赋予的性质 (例如抗生素抗性) 而能够在某些人为施 加的条件 (例如毒素或抗生素的添加) 下存活/生长/繁殖。不能表达一个 或多个标记的那些细胞不能在人为施加的条件下存活/生长/繁殖。可 按需要选择更强烈的或不太强烈的人为施加的条件。

[0323] 可将任何适当的选择系统用于本发明。通常地,选择系统可基于 在载体中包含一

个或多个提供针对已知抗生素的抗性的基因,例如四环素、氯霉素、卡那霉素或氨苄青霉素抗性基因。可将在相关抗生素存在的情况下生长的细胞选择为表达提供针对抗生素的抗性的基因和期望的蛋白。

[0324] 在一个实施方案中,根据本发明的方法还包括在培养基中培养转化细胞,从而表达目标蛋白的步骤。

[0325] 可在本发明中使用诱导型表达系统或组成型启动子来表达目标蛋白。适当的诱导型表达系统和组成型启动子在本领域中是公知的。

[0326] 任何适当的培养基可用于培养转化细胞。培养基可被改造来适用于特定的选择系统,例如培养基可包含抗生素,以仅允许已被成功地转化的那些细胞在培养基中生长。

[0327] 可按需要将从培养基获得的细胞经历进一步筛选和/或纯化。方法还可按需要包括一个或多个提取和纯化目标蛋白的步骤。

[0328] 可从菌株,包括从细胞质、周质或上清液回收多肽。

[0329] 在一个实施方案中,从周质分离抗体。

[0330] 在一个实施方案中,诱导后补料速率在5至7.5g/h的范围内,例如约7g/h。

[0331] 用于纯化蛋白质的具体方法取决于蛋白质的类型。适当的方法包括在免疫亲和柱或离子交换柱上进行的分级分离;乙醇沉淀;反相HPLC;疏水相互作用层析;在硅土上进行的层析;在离子交换树脂例如S-SEPHAROSE和DEAE上进行的层析;层析聚焦;硫酸铵沉淀;和凝胶过滤。

[0332] 可利用常规抗体纯化法例如蛋白A-Sepharose、蛋白G层析、蛋白L层析、嗜硫、混合模式树脂、His-标记、FLAG标记、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、亲和层析、硫酸铵、乙醇或PEG分级分离/沉淀、离子交换膜、膨胀床吸附层析(EBA)或模拟移动床层析,将抗体适当地与培养基和/或细胞质提取物和/或周质提取物分离。

[0333] 方法还可包括进一步的测量目标蛋白的表达的量和选择具有高表达水平的目标蛋白的细胞的步骤。

[0334] 方法还包括一个或多个其它下游加工步骤例如目标蛋白例如抗体或抗体片段的PEG化。

[0335] 可在适当的容器例如生物反应器中组合地进行本文中描述的一个或多个方法步骤。

[0336] 根据本公开内容的抗体和片段可用于治疗或预防。

[0337] 当技术上适当时可组合本发明的实施方案。实施方案在本文中描述为包含某些特征/成分。公开内容还扩展至由所述特征/成分组成或基本上由其组成的单独的实施方案。将本文中的技术参考资料例如专利和申请通过引用并入本文。

[0338] 仅在下列实施例例中通过举例说明的方式进一步描述本发明,所述实施例参考附图。

实施例

[0339] 实施例1:细胞系的产生

[0340] WO2011/086136中给出了MXE016和MXE017的产生。

[0341] 用于抗-FcRn Fab' 表达和抗-FcRn Fab' 与FkpA、抗-FcRn Fab' 与skp以及抗-

FcRn Fab与FkpA和skp的表达的质粒的产生

[0342] 构建包含抗-FcRn Fab的重链和轻链序列(分别地SEQ ID NO:63 和55)的质粒。使用常规限制性克隆法构建质粒pTTOD 1519.g57 Fab',所述克隆法可见于Sambrook等人1989,Molecular cloning:a laboratory manual.CSHL press,N.Y.中。质粒pTTOD 1519.g57Fab' 包含下列特性:强tac启动子和lac操纵子序列。质粒在Fab' 重链的 编码区之后包含唯一的EcoRI限制性位点,随后是包含强核糖体结合 位点的非编码序列和随后唯一的NdeI限制性位点。

[0343] Fab轻链、重链基因被转录为单个多顺反子信使。将编码来自大肠杆菌OmpA蛋白的信号肽的DNA融合于轻链和重链基因序列的5' 末端,所述信号肽指导多肽至大肠杆菌周质的转运。使用双重转录终止子rrnB t1t2终止转录。lacIq基因编码组成型表达的Lac I阻遏蛋白。这阻遏从tac启动子的转录直至通过异乳糖或IPTG的存在诱导去阻遏。使用的复制起始点为p15A,其维持低拷贝数。质粒包含用于抗生素选择的四环素抗性基因。

[0344] 通过使用EcoRI和NdeI位点将FkpA连接于pTTOD 1519.g57 Fab'的Fab' 序列的3' 末端来构建质粒pTTOD 1519.g57Fab'FkpA(用于抗-FcRn Fab和FkpA(周质多肽)的表达载体)(参见图7d)。合成地构建FkpA(SEQ ID NO:30)以除去2个Puv II位点、SfuI位点、BamHI位点和EcoRI,以便新构建体编码5' EcoRI位点,随后强核糖体结合 位点,随后FkpA的天然起始密码子、信号序列和成熟序列,终止于C末端His标记以及最后的强核糖体结合位点和之后的非编码NdeI 位点。将EcoRI-NdeI限制性片段进行限制性内切酶消化,随后连接入表达载体,以便在单个多顺反子mRNA上编码所有3个多肽:Fab' 轻链、Fab' 重链和FkpA。

[0345] 通过使用EcoRI和NdeI位点将skp连接于质粒pTTOD 1519.g57 Fab'的Fab' 序列的3' 末端来构建质粒pTTOD 1519.g57 Fab'Skp(用于 抗-FcRn Fab和Skp(周质多肽)的表达载体)。合成地构建skp(SEQ ID NO:34)以除去4个Pst I位点和EcoRV位点,以便新构建体编码5' EcoRI位点,随后强核糖体结合位点,随后Skp的天然起始密码子、信号序列和成熟序列,终止于C末端His标记以及最后的强核糖体结合位点和之后的非编码NdeI位点。将EcoRI-NdeI限制性片段进行限制性内切酶消化,随后连接入表达载体,以便在单个多顺反子mRNA 上编码所有3个多肽:Fab' 轻链、Fab' 重链和skp。

[0346] 通过使用NdeI位点将skp在FkpA序列的3' 末端连接入质粒 pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA来构建质粒pTTOD 1519.g57 Fab'FkpA Skp(用于抗-FcRn Fab、FkpA和Skp(两者为周质多肽)的表达载体)。合成地构建Skp(SEQ ID NO:34)以除去4个Pst I位点和EcoRV位点,以便构建体编码5' Ase I位点,包括skp的天然起始密码子、信号序列和成熟序列,终止于C末端His标记以及最后非编码NdeI位点。将AseI-NdeI限制性片段进行限制性内切酶消化,随后连接入表达载体,以便在单个多顺反子mRNA上编码所有4个多肽:Fab' 轻链、Fab' 重链、FkpA和Skp。

[0347] pTTOD 1519.g57 Fab'、pTTOD 1519.g57 Fab'FkpA、pTTOD 1519.g57 Fab'Skp和pTTOD 1519.g57 Fab'FkpA skp在大肠杆菌 W3110、MXE012(大肠杆菌W3110spr H145A)、MXE016(大肠杆菌 W3110 Δ Tsp,spr C94A)和MXE017(大肠杆菌W3110 Δ Tsp,spr H145A)中的发酵

[0348] 用实施例1中产生的质粒pTTOD 1519.g57 Fab'、pTTOD 1519.g57 Fab'FkpA、pTTOD 1519.g57Fab'Skp和pTTOD 1519.g57 Fab'FkpA Skp转化大肠杆菌菌株W3110、

MXE012、MXE016和 MXE017。使用Chung C.T等人Transformation and storage of bacterial cells in the same solution.PNAS 86:2172-2175(1989)中发 现的方法进行菌株的转化。通过发酵测试这些转化菌株的表达。

[0349] 实施例2:伴侣蛋白对Fab' 表达的作用:在1L和2.5L发酵实验 中比较Fab' 的表达来测试图1中显示的菌株:

[0350] 生长培养基、接种物和发酵步骤。在接种生产发酵罐之前,通过 从1小瓶细胞库制备接种物和通过数个预培养阶段(培养瓶和反应器) 的扩增开始发酵过程。在生产发酵罐中,以分批和补料分批模式将细 胞在成分确定的培养基中生长至高密度。当达到期望的细胞密度时, 通过添加IPTG诱导Fab' 的表达。Fab' 表达被靶向至大肠杆菌周质空 间,其中 Fab' 在整个诱导期的过程中积累。在诱导期中施用碳源补料 以控制表达和细胞生长。控制温度、溶解氧(pO₂)和pH以将培养物维 持在最佳培养条件中。

[0351] 生物质浓度和生长速率的测量。通过测量600nm处培养物的光 密度来测定生物质浓度。

[0352] 周质提取。通过离心从培养物样品收集细胞。保留(在-20℃)上清 液级分以进行进一步分析。将细胞沉淀级分于提取缓冲液(100mM Tris-HCl,10mM EDTA;pH 7.4)中重悬 浮至原始培养体积。在于60℃ 温育约10至12小时后,通过离心澄清提取物,将上清液级分 立即用 于分析或贮存(在-20℃)以待分析。

[0353] Fab' 定量。通过使用蛋白G HPLC测定周质提取物和培养上清液 中的Fab' 浓度。将分析物(大致中性pH,30℃,0.2μm过滤的)以 2ml/min加载至HiTrap Protein-G HP 1ml柱 (GE-Healthcare或相当 的),用20mM磷酸盐,50mM NaCl pH 7.4洗涤柱子,随后使用50mM 甘氨酸/HCl pH 2.7的注射液洗脱Fab'。在Agilent 1100或1200HPLC 系统上通过A280测量 洗脱的Fab',通过参照具有已知浓度的纯化的 Fab' 蛋白的标准曲线来进行定量。

[0354] 图1显示利用宿主细胞与“伴侣蛋白”的各种组合进行的46个5L 规模的发酵的结果。W3110是野生型大肠杆菌菌株。各种组合是:野 生型但无伴侣蛋白、野生型与FkpA和 Skp、W02011/086136中公开 的MXE016突变spr和 Δ Tsp、MXE016与FkpA、MXE016与Skp、 MXE016与FkpA和Skp、W02011/086136中公开的MXE017、MXE017与FkpA和Skp。

[0355] 结果显示MXE016、MXE016与FkpA、MXE016与FkpA和Skp, 以及MXE017与FkpA和Skp 显示最好水平的表达。

[0356] 实施例3:诱导后补料速率的作用

[0357] 对MXE016和MXE016+FkpA测试3个不同的诱导后补料速率 5.4、6.0和7.0g/h的作用。

[0358] 生长培养基、接种物和发酵步骤。在接种生产发酵罐之前,通过 从一小瓶细胞库制备接种物和通过数个预培养阶段(培养瓶和反应器) 的扩增开始发酵过程。在生产发酵罐中,以分批和补料分批模式将细 胞在成分确定的培养基中生长至高密度。当达到期望的细胞密度时, 通过添加IPTG诱导Fab' 表达。Fab' 表达被靶向至大肠杆菌周质空间, 其中 Fab' 在整个诱导期的过程中积累。在接种期中施用碳源补料以控 制表达和细胞生长,在该 实验中将补料速率设置为3个单独的设定值(图中显示的)。控制温度、溶解氧(pO₂)和pH以 将培养物维持在最佳 培养条件中。

[0359] 图2显示利用不表达伴侣蛋白或表达FkpA的质粒转化的菌株 MXE016。该图显示递

增的诱导后补料速率在具有和不具有FkpA的情况下对Fab'的产生和周质中的保留的作用。数据显示当在不具有FkpA的情况下增加补料速率时,额外产生的Fab'丢失至上清液。对于FkpA的表达,情况并非这样,其中在更高的补料速率下产生的额外的Fab'保留在周质内,从而导致更高的滴度。

[0360] 实施例4:产率和细胞活力的分析

[0361] 图3A和B显示在20L规模上对利用不表达伴侣蛋白或表达FkpA的质粒转化的MXE016的细胞活力和Fab'滴度的作用。图3A显示细胞活力在无FkpA存在的情况下更低。3b显示对于MXE016+FkpA, Fab'滴度更高并且变化较小。

[0362] 图4显示利用MXE016+FkpA产生的更高滴度导致初步Fab产物回收后30%更多的Fab'。

[0363] 图5和6显示来自无伴侣蛋白的MXE016和具有FkpA表达的MXE016的初步回收的样品的SDS-PAGE和抗-his标记western印迹。

[0364] 根据Fab'浓度以每泳道加载100g Fab'来加载样品。凝胶为4-20%Tris-Glycine Novex并且在非还原条件下于125V电泳2小时。利用Sypro Ruby染色对凝胶进行染色,随后成像。使用Invitrogen iBlot系统将western印迹转移至PVDF膜,随后用1%酪蛋白溶液进行封闭。随后用抗-his HRP缀合物抗体(Novagen)探测膜。随后用ECL溶液对印迹进行显影,使用Amersham Life Sciences HyperProcessor进行成像。

[0365] 虽然已参考优选实施方案特别地显示和描述了本发明,但本领域技术人员应理解,可产生形式和内容的各种变化而不背离由所附权利要求定义的本发明的范围。

序列表

<110> UCB Pharma S.A

<120> 用于蛋白质表达的重组细菌宿主细胞

<130> G0164-W0

<150> GB1208367.1

<151> 2012-05-14

<160> 82

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2049

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<400> 1

```
atgaacatgt tttttaggct taccgcgtta gctggcctgc ttgcaatagc aggccagacc 60
ttcgtctgtag aagatatcac gcgtgctgat caaattccgg tattaagga agagacgcag 120
catgcgacgg taagtgagcg cgtaacgtcg cgcttcaccc gttctcatta tcgccagttc 180
gacctcgatc aggcattttc ggccaaaatc tttgaccgct acctgaatct gctcgattac 240
agccacaacg tgctgctggc aagcgatggt gaacagttcg cgaaaaagaa aaccgagtta 300
ggcgatgaac tgcgttcagg caaactcgac gttttctacg atctctacaa tctggcgcaa 360
aagcgccggt ttgagcggtta ccagtacgct ttgtcgttac tggaaaagcc gatggatttc 420
accggcaacg acacttataa ccttgaccgc agcaaagcgc cctggccgaa aaacgaggct 480
gagttgaacg cgctgtggga cagtaaagtc aaattcgacg agttaagcct gaagctgaca 540
ggaaaaacgg ataaagaaat tcgtgaaacc ctgactcgcc gctacaaatt tgccattcgt 600
cgtctggcgc aaaccaacag cgaagatggt ttctcgctgg caatgacggc gtttgcgctg 660
gaaatcgacc cgcatacca ctatctttcc ccgcgtaata ccgaacagtt caacactgaa 720
atgagtttgt cgctggaagg tattggcgca gtgctgcaa tggatgatga ctacaccggt 780
atcaattcga tgggtggcagg tgggccggca gcgaagagta aagctatcag cgttgggtgac 840
aaaattgtcg gtgttggtca aacaggcaag ccgatgggtg acgtgattgg ctggcgtctt 900
gatgatgtgg ttgccttaat taaagggccg aagggcagta aagttcgtct ggaaatttta 960
cctgctggta aagggaacaa gaccctact gtaacgttga cccgtgaacg tattcgtctc 1020
gaagaccgcg cggttaaaat gtcggtgaag accgtcggtg aagagaaagt cggcgtgctg 1080
gatattccgg gcttctatgt gggtttgaca gacgatgtca aagtgcaact gcagaaactg 1140
gaaaaacaga atgtcagcag cgtcatcatc gacctgcgta gcaatggcgg tggggcggtta 1200
actgaagccg tatcgctctc cggtctgttt attcctgcgg gtccattgtg tcaggtccgc 1260
gataacaacg gcaaggttcg tgaagatagc gataccgacg gacaggtttt ctataaaggc 1320
ccgctgggtg tgctgggtga ccgcttcagt gcttcggctt cagaaatctt tgccgcggca 1380
atgcaggatt acggtcgtgc gctggttgtg ggtgaaccga cgtttggtta aggcaccggt 1440
cagcaatacc gttcattgaa ccgtatttac gatcagatgt tacgtcctga atggccagcg 1500
```

ctgggttctg tgcagtacac gatccagaaa ttctatcgcg ttaacggcgg cagtagcaa 1560
 cgtaaaggcg taacgccaga catcatcatg ccgacgggta atgaagaaac ggaaacgggt 1620
 gagaaattcg aagataacgc gctgccgtgg gatagcattg atgccgcgac ttatgtgaaa 1680
 tcaggagatt taacggcctt tgaaccggag ctgctgaagg aacataatgc gcgtatcgcg 1740
 aaagatcctg agttccagaa catcatgaag gatatcgcg gcttcaacgc tatgaaggac 1800
 aagcgcaata tcgttttctt gaattacgct gtgcgtgaga aagagaataa tgaagatgat 1860
 gcgacgcgtc tggcgcgttt gaacgaacgc tttaaacgcg aaggtaaacc ggagttgaag 1920
 aaactggatg atctaccgaa agattaccag gagccggatc cttatctgga tgagacgggtg 1980
 aatatcgcac tcgatctggc gaagcttgaa aaagccagac ccgcggaaca acccgctccc 2040
 gtcaagtaa 2049

<210> 2

<211> 680

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 2

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

Tyr	Lys	Phe	Ala	Ile	Arg	Arg	Leu	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Glu	Asp	Val	195	200	205
Phe	Ser	Leu	Ala	Met	Thr	Ala	Phe	Ala	Arg	Glu	Ile	Asp	Pro	His	Thr	210	215	220
Asn	Tyr	Leu	Ser	Pro	Arg	Asn	Thr	Glu	Gln	Phe	Asn	Thr	Glu	Met	Ser	225	230	235
Leu	Ser	Leu	Glu	Gly	Ile	Gly	Ala	Val	Leu	Gln	Met	Asp	Asp	Asp	Tyr	245	250	255
Thr	Val	Ile	Asn	Ser	Met	Val	Ala	Gly	Gly	Pro	Ala	Ala	Lys	Ser	Lys	260	265	270
Ala	Ile	Ser	Val	Gly	Asp	Lys	Ile	Val	Gly	Val	Gly	Gln	Thr	Gly	Lys	275	280	285
Pro	Met	Val	Asp	Val	Ile	Gly	Trp	Arg	Leu	Asp	Asp	Val	Val	Ala	Leu	290	295	300
Ile	Lys	Gly	Pro	Lys	Gly	Ser	Lys	Val	Arg	Leu	Glu	Ile	Leu	Pro	Ala	305	310	315
Gly	Lys	Gly	Thr	Lys	Thr	Arg	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Arg	Glu	Arg	Ile	325	330	335
Arg	Leu	Glu	Asp	Arg	Ala	Val	Lys	Met	Ser	Val	Lys	Thr	Val	Gly	Lys	340	345	350
Glu	Lys	Val	Gly	Val	Leu	Asp	Ile	Pro	Gly	Phe	Tyr	Val	Gly	Leu	Thr	355	360	365
Asp	Asp	Val	Lys	Val	Gln	Leu	Gln	Lys	Leu	Glu	Lys	Gln	Asn	Val	Ser	370	375	380
Ser	Val	Ile	Ile	Asp	Leu	Arg	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	385	390	395
Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Ile	Pro	Ala	Gly	Pro	Ile	Val	Gln	405	410	415
Val	Arg	Asp	Asn	Asn	Gly	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Ser	Asp	Thr	Asp	Gly	420	425	430
Gln	Val	Phe	Tyr	Lys	Gly	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Val	Asp	Arg	Phe	Ser	435	440	445
Ala	Ser	Ala	Ser	Glu	Ile	Phe	Ala	Ala	Ala	Met	Gln	Asp	Tyr	Gly	Arg	450	455	460
Ala	Leu	Val	Val	Gly	Glu	Pro	Thr	Phe	Gly	Lys	Gly	Thr	Val	Gln	Gln	465	470	475
Tyr	Arg	Ser	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr	Asp	Gln	Met	Leu	Arg	Pro	Glu	Trp	485	490	495
Pro	Ala	Leu	Gly	Ser	Val	Gln	Tyr	Thr	Ile	Gln	Lys	Phe	Tyr	Arg	Val			

500	505	510
Asn Gly Gly Ser Thr Gln Arg Lys Gly Val Thr Pro Asp Ile Ile Met		
515	520	525
Pro Thr Gly Asn Glu Glu Thr Glu Thr Gly Glu Lys Phe Glu Asp Asn		
530	535	540
Ala Leu Pro Trp Asp Ser Ile Asp Ala Ala Thr Tyr Val Lys Ser Gly		
545	550	555
Asp Leu Thr Ala Phe Glu Pro Glu Leu Leu Lys Glu His Asn Ala Arg		
565	570	575
Ile Ala Lys Asp Pro Glu Phe Gln Asn Ile Met Lys Asp Ile Ala Arg		
580	585	590
Phe Asn Ala Met Lys Asp Lys Arg Asn Ile Val Ser Leu Asn Tyr Ala		
595	600	605
Val Arg Glu Lys Glu Asn Asn Glu Asp Asp Ala Thr Arg Leu Ala Arg		
610	615	620
Leu Asn Glu Arg Phe Lys Arg Glu Gly Lys Pro Glu Leu Lys Lys Leu		
625	630	635
Asp Asp Leu Pro Lys Asp Tyr Gln Glu Pro Asp Pro Tyr Leu Asp Glu		
645	650	655
Thr Val Asn Ile Ala Leu Asp Leu Ala Lys Leu Glu Lys Ala Arg Pro		
660	665	670
Ala Glu Gln Pro Ala Pro Val Lys		
675	680	

<210> 3

<211> 2048

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变敲除Tsp基因

<400> 3

```

atgaattcgt ttttaggctt accgcgtag ctggcctgct tgcaatagca ggccagacat 60
taattgtaga agatatcacg cgtgctgata aaattccggt attaaaggaa gagacgcagc 120
atgcgacggg aagtgagcgc gtaacgtcgc gttcaccgg ttctcattat cgccagttcg 180
acctgatca ggcatTTTTG gccaaaatct ttgaccgcta cctgaatctg ctcgattaca 240
gccacaacgt gctgctggca agcgatgttg aacagttcgc gaaaaagaaa accgagttag 300
gcgatgaact gcgttcaggc aaactcgacg ttttctacga tctctacaat ctggcgcaaa 360
agcgccgttt tgagcggttac cagtacgctt tgtcggtact ggaaaagccg atggatttca 420
ccggcaacga cacttataac cttgaccgca gcaaagcgcc ctggccgaaa aacgaggctg 480
agttgaacgc gctgtgggac agtaaagtca aattcgacga gttaagcctg aagctgacag 540

```

gaaaaacgga taaagaaatt cgtgaaaccc tgactcgccg ctacaaattt gccattcgtc 600
 gtctggcgca aaccaacagc gaagatgttt tctcgctggc aatgacggcg tttgcgcgtg 660
 aaatcgaccc gcataccaac tatctttccc cgcgtaatac cgaacagttc aacactgaaa 720
 tgagtttgtc gctggaaggt attggcgagc tgctgcaaat ggatgatgac tacaccgtta 780
 tcaattcgat ggtggcaggt ggtccggcag cgaagagtaa agctatcagc gttggtgaca 840
 aaattgtcgg tgttggtcaa acaggcaagc cgatggttga cgtgattggc tggcgtcttg 900
 atgatgttgt tgccctaatt aaagggccga agggcagtaa agttcgtctg gaaattttac 960
 ctgctggtaa agggaccaag acccgtagt taacgttgac ccgtgaacgt attcgtctcg 1020
 aagaccgcgc ggttaaaatg tcggtgaaga ccgtcggtta agagaaagtc ggcgtgctgg 1080
 atattccggg cttctatgtg ggtttgacag acgatgtcaa agtgcaactg cagaaactgg 1140
 aaaaacagaa tgtcagcagc gtcacatcgc acctgcgtag caatggcggg ggggcgttaa 1200
 ctgaagccgt atcgctctcc ggtctgttta ttctgctggg tcccattgtt caggtccgcg 1260
 ataacaacgg caaggttcgt gaagatagcg ataccgacgg acaggttttc tataaaggcc 1320
 cgctgggtgt gctggttgac cgcttcagtg cttcggttc agaaatcttt gccgcggcaa 1380
 tgcaggatta cggctcgtgcg ctggttgttg gtgaaccgac gtttggtaaa ggcaccgttc 1440
 agcaataccg ttcatgaac cgtatttacg atcagatgtt acgtcctgaa tggccagcgc 1500
 tgggttctgt gcagtacacg atccagaaat tctatcgctg taacggcggc agtacgcaac 1560
 gtaaaggcgt aacgccagac atcatcatgc cgacgggtaa tgaagaaacg gaaacgggtg 1620
 agaaattcga agataacgcg ctgccgtggg atagcattga tgccgcgact tatgtgaaat 1680
 caggagattt aacggccttt gaaccggagc tgctgaagga acataatgcg cgtatcgca 1740
 aagatcctga gttccagaac atcatgaagg atatcgcgcg cttcaacgct atgaaggaca 1800
 agcgcaatat cgtttctctg aattacgctg tgctgagaa agagaataat gaagatgatg 1860
 cgacgcgtct ggcgctttg aacgaacgct ttaaacgcga aggtaaaccg gagttgaaga 1920
 aactggatga tctaccgaaa gattaccagg agccggatcc ttatctggat gagacggtga 1980
 atatcgcaact cgatctggcg aagcttgaag aagccagacc cgcggaacaa cccgctccc 2040
 tcaagtaa 2048

<210> 4

<211> 2889

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<400> 4

atgccccgca gcacctggtt caaagcatta ttgttgttag ttgccctttg ggcaccctta 60
 agtcaggcag aaacgggatg gcagccgatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat 120
 aaccgccagt atcaggctat acgtctggat aacggtatgg tggctcttgc ggtttctgat 180
 ccgcaggcag ttaaactcgt ctcggcgctg gtggtgcccc ttgggtcgct ggaagatccc 240
 gaggcgtacc aggggctggc acattacctt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaaag 300
 taccgcagg ctgacagtct ggccgaatat ctcaaatgc acggcggtag tcacaatgcc 360
 agcactgcgc cgtatcgac ggctttctat ctggaagttg agaacgacgc cttgcctggt 420
 gcggtagacc gcctggccga tgctattgct gaacctttgc tcgacaagaa atatgccgaa 480

cgtgagcgta atgcggtgaa cgctgaatta accatggcgc gtacgcgtga cgggatgcgc 540
 atggcacagg tcagcgcaga aaccattaac ccggcacacc ccggttcaaa gttttctggt 600
 ggtaacctcg aaactttaag cgacaaacct ggtaatccgg tgcagcaggc gctgaaagat 660
 ttccacgaga agtactattc cgccaatttg atgaaggcgg ttattttacag taataaacgg 720
 ctgccggagt tggcaaaaat ggcgggcgac acctttggtc gcgtgccgaa caaagagagc 780
 aaaaaaccgg aaatcaccgt gccggtagtc accgacgcgc aaaaggcat tatcattcat 840
 tacgtccctg cgctgccgcg taaagtgttg cgcgttgagt ttcgcatcga taacaactca 900
 gcgaagtcc gtagtaaaac cgatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca 960
 ggtacacttt ctgactggct gcaaaagcag ggattagttg agggcattag cgccaactcc 1020
 gatcctatcg tcaacggcaa cagcggcgta ttagcgatct ctgcgtcttt aaccgataaa 1080
 ggcttggtta atcgcgatca ggttggtggc gcaattttta gctatctcaa tctgttacgt 1140
 gaaaaaggca ttgataaaca ataactcgat gaactggcga atgtgctgga tatcgacttc 1200
 cgttatccgt cgatcacccg tgatatggat tacgtcgaat ggctggcaga taccatgatt 1260
 cgcgttcctg ttgagcatac gctggatgca gtcaatattg ccgatcggta cgatgctaaa 1320
 gcagtaaagg aacgtctggc gatgatgacg ccgcagaatg cgcgtatctg gtatatcagc 1380
 ccgaaagagc cgcacaacaa aacggcttac tttgtcgatg cgccgtatca ggtcgataaa 1440
 atcagcgcac aaactttcgc cgactggcag aaaaaagccg ccgacattgc gctctctttg 1500
 ccagagctta acccttatat tcctgatgat ttctcgctga ttaagtcaga gaagaaatac 1560
 gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgcgcg tgggtgatgc gccaaagcgt 1620
 tattttgcca gcgagcccaa agctgatgtc agcctgattt tgcgtaatcc gaaagccatg 1680
 gacagcgccc gcaatcaggt gatgtttgcg ctcaatgatt atctcgagg gctggcgctt 1740
 gatcagttaa gcaaccaggc gtcggttggt ggcataagtt tttccaccaa cgctaacaac 1800
 ggcccttatg ttaatgctaa tggttacacc cagcgtctgc cgcagctggt ccaggcattg 1860
 ctcgaggggt actttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtcctgg 1920
 tataaccaga tgatggattc cgcagaaaag ggtaaagcgt ttgagcaggc gattatgccc 1980
 gcgcagatgc tctcgcaagt gccgtacttc tcgcgagatg aacggcgtaa aattttgccc 2040
 tccattacgt tgaaagaggt gctggcctat cgcgacgcct taaaatcagg ggctcgacca 2100
 gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gccaggcaa caacgctggc acgcgatgtg 2160
 caaaaacagt tgggcgctga tggttcagag tgggtgctgaa acaaagatgt agtggtcgat 2220
 aaaaaacaat ccgtcatctt tgaaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg 2280
 gtattttgtac cgactggcta cgatgaatac accagctcag cctatagctc tctgttgggg 2340
 cagatcgta agccgtggtt ctacaatcag ttgcgtaccg aagaacaatt gggctatgcc 2400
 gtgtttgcgt ttccaatgag cgtggggcgt cagtggggca tgggcttcct tttgcaaagc 2460
 aatgataaac agccttcatt cttgtgggag cgttacaagg cgtttttccc aaccgcagag 2520
 gcaaaattgc gagcgatgaa gccagatgag tttgcgcaa tccagcaggc ggtaattacc 2580
 cagatgctgc aggcaccgca aacgctcggc gaagaagcat cgaagttaag taaagatttc 2640
 gatcgcggca atatgcgctt cgattcgcgt gataaaatcg tggcccagat aaaactgctg 2700
 acgccgcaaa aacttgctga tttcttccat caggcggtag tcgagccgca aggcattggc 2760
 attctgtcgc agatttccgg cagccagaac gggaaagccg aatatgtaca ccctgaaggc 2820

tggaaagtgt gggagaacgt cagcgcgttg cagcaaacia tgcccctgat gaggtaaaag 2880
 aatgagtga 2889
 <210> 5
 <211> 962
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌
 <400> 5
 Met Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Trp Ala Pro Leu Ser Gln Ala Glu Thr Gly Trp Gln Pro Ile Gln Glu
 20 25 30
 Thr Ile Arg Lys Ser Asp Lys Asp Asn Arg Gln Tyr Gln Ala Ile Arg
 35 40 45
 Leu Asp Asn Gly Met Val Val Leu Leu Val Ser Asp Pro Gln Ala Val
 50 55 60
 Lys Ser Leu Ser Ala Leu Val Val Pro Val Gly Ser Leu Glu Asp Pro
 65 70 75 80
 Glu Ala Tyr Gln Gly Leu Ala His Tyr Leu Glu His Met Ser Leu Met
 85 90 95
 Gly Ser Lys Lys Tyr Pro Gln Ala Asp Ser Leu Ala Glu Tyr Leu Lys
 100 105 110
 Met His Gly Gly Ser His Asn Ala Ser Thr Ala Pro Tyr Arg Thr Ala
 115 120 125
 Phe Tyr Leu Glu Val Glu Asn Asp Ala Leu Pro Gly Ala Val Asp Arg
 130 135 140
 Leu Ala Asp Ala Ile Ala Glu Pro Leu Leu Asp Lys Lys Tyr Ala Glu
 145 150 155 160
 Arg Glu Arg Asn Ala Val Asn Ala Glu Leu Thr Met Ala Arg Thr Arg
 165 170 175
 Asp Gly Met Arg Met Ala Gln Val Ser Ala Glu Thr Ile Asn Pro Ala
 180 185 190
 His Pro Gly Ser Lys Phe Ser Gly Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ser Asp
 195 200 205
 Lys Pro Gly Asn Pro Val Gln Gln Ala Leu Lys Asp Phe His Glu Lys
 210 215 220
 Tyr Tyr Ser Ala Asn Leu Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Asn Lys Pro
 225 230 235 240
 Leu Pro Glu Leu Ala Lys Met Ala Ala Asp Thr Phe Gly Arg Val Pro
 245 250 255

Asn Lys Glu Ser Lys Lys Pro Glu Ile Thr Val Pro Val Val Thr Asp		
260	265	270
Ala Gln Lys Gly Ile Ile Ile His Tyr Val Pro Ala Leu Pro Arg Lys		
275	280	285
Val Leu Arg Val Glu Phe Arg Ile Asp Asn Asn Ser Ala Lys Phe Arg		
290	295	300
Ser Lys Thr Asp Glu Leu Ile Thr Tyr Leu Ile Gly Asn Arg Ser Pro		
305	310	315
Gly Thr Leu Ser Asp Trp Leu Gln Lys Gln Gly Leu Val Glu Gly Ile		
325	330	335
Ser Ala Asn Ser Asp Pro Ile Val Asn Gly Asn Ser Gly Val Leu Ala		
340	345	350
Ile Ser Ala Ser Leu Thr Asp Lys Gly Leu Ala Asn Arg Asp Gln Val		
355	360	365
Val Ala Ala Ile Phe Ser Tyr Leu Asn Leu Leu Arg Glu Lys Gly Ile		
370	375	380
Asp Lys Gln Tyr Phe Asp Glu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Phe		
385	390	395
Arg Tyr Pro Ser Ile Thr Arg Asp Met Asp Tyr Val Glu Trp Leu Ala		
405	410	415
Asp Thr Met Ile Arg Val Pro Val Glu His Thr Leu Asp Ala Val Asn		
420	425	430
Ile Ala Asp Arg Tyr Asp Ala Lys Ala Val Lys Glu Arg Leu Ala Met		
435	440	445
Met Thr Pro Gln Asn Ala Arg Ile Trp Tyr Ile Ser Pro Lys Glu Pro		
450	455	460
His Asn Lys Thr Ala Tyr Phe Val Asp Ala Pro Tyr Gln Val Asp Lys		
465	470	475
Ile Ser Ala Gln Thr Phe Ala Asp Trp Gln Lys Lys Ala Ala Asp Ile		
485	490	495
Ala Leu Ser Leu Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Ile Pro Asp Asp Phe Ser		
500	505	510
Leu Ile Lys Ser Glu Lys Lys Tyr Asp His Pro Glu Leu Ile Val Asp		
515	520	525
Glu Ser Asn Leu Arg Val Val Tyr Ala Pro Ser Arg Tyr Phe Ala Ser		
530	535	540
Glu Pro Lys Ala Asp Val Ser Leu Ile Leu Arg Asn Pro Lys Ala Met		
545	550	555
Asp Ser Ala Arg Asn Gln Val Met Phe Ala Leu Asn Asp Tyr Leu Ala		

565																570																575																															
Gly	Leu	Ala	Leu	Asp	Gln	Leu	Ser	Asn	Gln	Ala	Ser	Val	Gly	Gly	Ile																																																
580																585																590																															
Ser	Phe	Ser	Thr	Asn	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu	Met	Val	Asn	Ala	Asn	Gly																																																
595																600																605																															
Tyr	Thr	Gln	Arg	Leu	Pro	Gln	Leu	Phe	Gln	Ala	Leu	Leu	Glu	Gly	Tyr																																																
610																615																620																															
Phe	Ser	Tyr	Thr	Ala	Thr	Glu	Asp	Gln	Leu	Glu	Gln	Ala	Lys	Ser	Trp																																																
625																630																635																640															
Tyr	Asn	Gln	Met	Met	Asp	Ser	Ala	Glu	Lys	Gly	Lys	Ala	Phe	Glu	Gln																																																
645																650																655																															
Ala	Ile	Met	Pro	Ala	Gln	Met	Leu	Ser	Gln	Val	Pro	Tyr	Phe	Ser	Arg																																																
660																665																670																															
Asp	Glu	Arg	Arg	Lys	Ile	Leu	Pro	Ser	Ile	Thr	Leu	Lys	Glu	Val	Leu																																																
675																680																685																															
Ala	Tyr	Arg	Asp	Ala	Leu	Lys	Ser	Gly	Ala	Arg	Pro	Glu	Phe	Met	Val																																																
690																695																700																															
Ile	Gly	Asn	Met	Thr	Glu	Ala	Gln	Ala	Thr	Thr	Leu	Ala	Arg	Asp	Val																																																
705																710																715																720															
Gln	Lys	Gln	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Glu	Trp	Cys	Arg	Asn	Lys	Asp																																																
725																730																735																															
Val	Val	Val	Asp	Lys	Lys	Gln	Ser	Val	Ile	Phe	Glu	Lys	Ala	Gly	Asn																																																
740																745																750																															
Ser	Thr	Asp	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Val	Phe	Val	Pro	Thr	Gly	Tyr	Asp																																																
755																760																765																															
Glu	Tyr	Thr	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Ile	Val	Gln																																																
770																775																780																															
Pro	Trp	Phe	Tyr	Asn	Gln	Leu	Arg	Thr	Glu	Glu	Gln	Leu	Gly	Tyr	Ala																																																
785																790																795																800															
Val	Phe	Ala	Phe	Pro	Met	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	Trp	Gly	Met	Gly	Phe																																																
805																810																815																															
Leu	Leu	Gln	Ser	Asn	Asp	Lys	Gln	Pro	Ser	Phe	Leu	Trp	Glu	Arg	Tyr																																																
820																825																830																															
Lys	Ala	Phe	Phe	Pro	Thr	Ala	Glu	Ala	Lys	Leu	Arg	Ala	Met	Lys	Pro																																																
835																840																845																															
Asp	Glu	Phe	Ala	Gln	Ile	Gln	Gln	Ala	Val	Ile	Thr	Gln	Met	Leu	Gln																																																
850																855																860																															
Ala	Pro	Gln	Thr	Leu	Gly	Glu	Glu	Ala	Ser	Lys	Leu	Ser	Lys	Asp	Phe																																																
865																870																875																880															

Asp Arg Gly Asn Met Arg Phe Asp Ser Arg Asp Lys Ile Val Ala Gln		
885	890	895
Ile Lys Leu Leu Thr Pro Gln Lys Leu Ala Asp Phe Phe His Gln Ala		
900	905	910
Val Val Glu Pro Gln Gly Met Ala Ile Leu Ser Gln Ile Ser Gly Ser		
915	920	925
Gln Asn Gly Lys Ala Glu Tyr Val His Pro Glu Gly Trp Lys Val Trp		
930	935	940
Glu Asn Val Ser Ala Leu Gln Gln Thr Met Pro Leu Met Ser Glu Lys		
945	950	955
		960

Asn Glu

<210> 6

<211> 2889

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变敲除蛋白酶III基因

<400> 6

```

attccccgca gcacctggtt caaagcatta ttgttgtag ttgccctttg ggcacattaa 60
tgtcaggcag aaacgggatg gcagccgatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat 120
aaccgccagt atcaggctat acgtctggat aacggtatgg tggctcttgct ggtttctgat 180
ccgcaggcag ttaaatacgt ctcggcgctg gtgggtgccc ttgggtcgct ggaagatccc 240
gaggcgtagc aggggctggc acattacatt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaaag 300
taccgcaggc ctgacagtct ggccgaatat ctcaaaatgc acggcggtag tcacaatgcc 360
agcactgcgc cgtatcgcac ggctttctat ctggaagttg agaacgacgc cttgcctggt 420
gcggtagacc gcctggccga tgctattgct gaacctttgc tcgacaagaa atatgccgaa 480
cgtgagcgta atgcggtgaa cgctgaatta accatggcgc gtacgcgtga cgggatgcgc 540
atggcacagg tcagcgcaga aaccattaac ccggcacacc ccggttcaaa gttttctggt 600
ggtaacctcg aaactttaag cgacaaacct ggtaatccgg tgcagcaggc gctgaaagat 660
ttccacgaga agtactattc cgccaatttg atgaaggcgg ttatttacag taataaacgg 720
ctgccggagt tggcaaaaat ggcggcggac acctttggtc gcgtgccgaa caaagagagc 780
aaaaaacggg aaatcaccgt gccggtagtc accgacgcgc aaaaggcat tatcattcat 840
tacgtccctg cgctgccgcg taaagtgttg cgcgttgagt ttcgcacga taacaactca 900
gcgaagttcc gtagtaaaac cgatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca 960
ggtacacttt ctgactggct gcaaaagcag ggattagttg agggcattag cgccaactcc 1020
gatcctatcg tcaacggcaa cagcggcgta ttagcgatct ctgcgtcttt aaccgataaa 1080
ggcctggcta atcgcgatca ggttggtggc gcaattttta gctatctcaa tctgttacgt 1140
gaaaaaggca ttgataaaca atacttcgat gaactggcga atgtgctgga tatcgacttc 1200
cgttatccgt cgatcaccgg tgatatggat tacgtcgaat ggctggcaga taccatgatt 1260

```

cgcggttcctg ttgagcatac gctggatgca gtcaatattg ccgatcggta cgatgctaaa 1320
 gcagtaaagg aacgtctggc gatgatgacg ccgcagaatg cgcgatatctg gtatatcagc 1380
 ccgaaagagc cgcacaacaa aacggcttac tttgtcgatg cgccgtatca ggctcgataaa 1440
 atcagcgcac aaactttcgc cgactggcag aaaaaagccg ccgacattgc gctctctttg 1500
 ccagagctta acccttatac tcctgatgat ttctcgctga ttaagtcaga gaagaaatac 1560
 gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgcgcg tgggtgatgc gccaaagccgt 1620
 tattttgcca gcgagcccaa agctgatgtc agcctgattt tgcgtaatcc gaaagccatg 1680
 gacagcgccc gcaatcaggt gatgtttgcg ctcaatgatt atctcgcagg gctggcgctt 1740
 gatcagttaa gcaaccaggc gtcggttggt ggcataagtt tttccaccaa cgctaacaac 1800
 ggccttatgg ttaatgctaa tggttacacc cagcgtctgc cgagctgtt ccaggcattg 1860
 ctcgaggggt actttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtctctg 1920
 tataaccaga tgatggattc cgcagaaaag ggtaaagcgt ttgagcaggc gattatgccc 1980
 gcgcagatgc tctcgcaagt gccgtacttc tcgcgagatg aacggcgtaa aattttgccc 2040
 tccattacgt tgaaagaggt gctggcctat cgcgacgcct taaaatcagg ggctcgacca 2100
 gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gcccaggcaa caacgctggc acgcgatgtg 2160
 caaaaacagt tgggcgctga tggttcagag tgggtgctga acaaagatgt agtggtcgat 2220
 aaaaaacaat ccgtcatctt tgaaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg 2280
 gtatttgtag cgactggcta cgatgaatac accagctcag cctatagctc tctgttgggg 2340
 cagatcgtag agccgtgggt ctacaatcag ttgcgtaccg aagaacaatt gggctatgcc 2400
 gtgtttgcgt ttccaatgag cgtggggcgt cagtggggca tgggcttcct tttgcaaagc 2460
 aatgataaac agccttcatt cttgtgggag cgttacaagg cgtttttccc aaccgcagag 2520
 gcaaaattgc gagcgatgaa gccagatgag tttgcgcaa tccagcaggc ggtaattacc 2580
 cagatgctgc aggcaccgca aacgctcggc gaagaagcat cgaagttaag taaagatttc 2640
 gatcgcgcca atatgcgctt cgattcgcgt gataaaatcg tggcccagat aaaactgctg 2700
 acgccgcaaa aacttgctga tttcttccat caggcgggtg tcgagccgca aggcattggc 2760
 attctgtcgc agatttccgg cagccagaac gggaaagccg aatatgtaca ccctgaaggc 2820
 tggaaagtgt gggagaacgt cagcgcgttg cagcaacaa tgcccctgat gaggtaaaag 2880
 aatgagtga 2889

<210> 7

<211> 1425

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<400> 7

atgaaaaaaa ccacattagc actgagtgca ctggctctga gtttaggttt ggcgttatct 60
 ccgtctcttg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaagc 120
 cttgcaccga tgctcgaaaa ggtgatgcct tcagtgtgca gcattaacgt agaaggtagc 180
 acaaccgtta atacgccgcg tatgccgctt aatttccagc agttcttcgg tgatgattct 240
 ccgttctgcc aggaagggtc tccgttccag agctctccgt tctgccaggg tggccagggc 300
 ggtaatgggt gcggccagca acagaaattc atggcgctgg gttccggcgt catcattgat 360

gccgataaag gctatgtcgt caccaacaac cagttgttg ataacgcgac ggtcattaaa 420
 gttcaactga gcgatggccg taagttcgac gcgaagatgg ttggcaaaga tccgcgctct 480
 gatatcgcg c tgatccaaat ccagaacccg aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat 540
 tctgatgcac tgcgcgtggg tgattacacc gtagcgattg gtaacccgtt tggctctgggc 600
 gagacggtaa cttccgggat tgtctctgcg ctggggcgta gcggcctgaa tgccgaaaaa 660
 tacgaaaact tcatccagac cgatgcagcg atcaaccgtg gtaactccgg tggcgcgctg 720
 gttaacctga acggcgaaact gatcggatc aacaccgcga tcctcgcacc ggacggcggc 780
 aacatcggtg tgggttttgc tatcccagat aacatgggtg aaaacctgac ctgcgagatg 840
 gtggaatacg gccaggtgaa acgcggtgag ctgggtatta tggggactga gctgaactcc 900
 gaactggcga aagcgatgaa agttgacgcc cagcgcggtg ctttcgtaag ccagggttctg 960
 cctaattcct ccgctgcaaa agcggggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctactgaac 1020
 ggtaagccga tcagcagctt tgccgcactg cgtgctcagg tgggtactat gccggtaggc 1080
 agcaaactga ccctgggctt actgcgcgac ggtaagcagg ttaacgtgaa cctggaactg 1140
 cagcagagca gccagaatca ggttgattcc agctccatct tcaacggcat tgaaggcgt 1200
 gagatgagca acaaaggcaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcact 1260
 ccggctgcgc agatcggcct gaagaaaggt gatgtgatta ttggcgcgaa ccagcaggca 1320
 gtgaaaaaca tcgctgaact gcgtaaagtt ctgcacagca aaccgtctgt gctggcactc 1380
 aacattcagc gcggcgacag caccatctac ctgttaatgc agtaa 1425

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 8

Met	Lys	Lys	Thr	Thr	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		
Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Ala	Glu	Thr	Ser	Ser	Ala
			20					25					30		
Thr	Thr	Ala	Gln	Gln	Met	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Met	Leu	Glu	Lys	Val
		35					40					45			
Met	Pro	Ser	Val	Val	Ser	Ile	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Thr	Thr	Val	Asn
		50				55					60				
Thr	Pro	Arg	Met	Pro	Arg	Asn	Phe	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Asp	Asp	Ser
65					70				75					80	
Pro	Phe	Cys	Gln	Glu	Gly	Ser	Pro	Phe	Gln	Ser	Ser	Pro	Phe	Cys	Gln
			85					90					95		
Gly	Gly	Gln	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Gly	Gln	Gln	Gln	Lys	Phe	Met	Ala
			100					105				110			
Leu	Gly	Ser	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	Val	Val	Thr
			115					120					125		

Asn Asn His Val Val Asp Asn Ala Thr Val Ile Lys Val Gln Leu Ser		
130	135	140
Asp Gly Arg Lys Phe Asp Ala Lys Met Val Gly Lys Asp Pro Arg Ser		
145	150	155 160
Asp Ile Ala Leu Ile Gln Ile Gln Asn Pro Lys Asn Leu Thr Ala Ile		
165	170	175
Lys Met Ala Asp Ser Asp Ala Leu Arg Val Gly Asp Tyr Thr Val Ala		
180	185	190
Ile Gly Asn Pro Phe Gly Leu Gly Glu Thr Val Thr Ser Gly Ile Val		
195	200	205
Ser Ala Leu Gly Arg Ser Gly Leu Asn Ala Glu Asn Tyr Glu Asn Phe		
210	215	220
Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Arg Gly Asn Ser Gly Gly Ala Leu		
225	230	235 240
Val Asn Leu Asn Gly Glu Leu Ile Gly Ile Asn Thr Ala Ile Leu Ala		
245	250	255
Pro Asp Gly Gly Asn Ile Gly Ile Gly Phe Ala Ile Pro Ser Asn Met		
260	265	270
Val Lys Asn Leu Thr Ser Gln Met Val Glu Tyr Gly Gln Val Lys Arg		
275	280	285
Gly Glu Leu Gly Ile Met Gly Thr Glu Leu Asn Ser Glu Leu Ala Lys		
290	295	300
Ala Met Lys Val Asp Ala Gln Arg Gly Ala Phe Val Ser Gln Val Leu		
305	310	315 320
Pro Asn Ser Ser Ala Ala Lys Ala Gly Ile Lys Ala Gly Asp Val Ile		
325	330	335
Thr Ser Leu Asn Gly Lys Pro Ile Ser Ser Phe Ala Ala Leu Arg Ala		
340	345	350
Gln Val Gly Thr Met Pro Val Gly Ser Lys Leu Thr Leu Gly Leu Leu		
355	360	365
Arg Asp Gly Lys Gln Val Asn Val Asn Leu Glu Leu Gln Gln Ser Ser		
370	375	380
Gln Asn Gln Val Asp Ser Ser Ser Ile Phe Asn Gly Ile Glu Gly Ala		
385	390	395 400
Glu Met Ser Asn Lys Gly Lys Asp Gln Gly Val Val Val Asn Asn Val		
405	410	415
Lys Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gln Ile Gly Leu Lys Lys Gly Asp Val		
420	425	430
Ile Ile Gly Ala Asn Gln Gln Ala Val Lys Asn Ile Ala Glu Leu Arg		

435	440	445
Lys Val Leu Asp Ser Lys Pro Ser Val Leu Ala Leu Asn Ile Gln Arg		
450	455	460
Gly Asp Ser Thr Ile Tyr Leu Leu Met Gln		
465	470	

<210> 9
 <211> 1425
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 突变的DegP
 <400> 9

```

atgaaaaaaaa ccacattagc actgagtgc ctggctctga gtttaggttt ggcgttatct 60
ccgctctctg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaagc 120
cttgaccgga tgctcgaaaa ggtgatgcct tcagtgtgca gcattaacgt agaaggtagc 180
acaaccgtta atacgccgcg tatgccgcgt aatttccagc agttcttcgg tgatgattct 240
ccgttctgcc aggaagggtc tccgttccag agctctccgt tctgccaggg tggccagggc 300
ggtaatgggtg gcggccagca acagaaattc atggcgctgg gttccggcgt catcattgat 360
gccgataaag gctatgtcgt caccaacaac cagttgttg ataacgcgac ggtcattaaa 420
gttcaactga gcgatggccg taagtctgac gcgaagatgg ttggcaaaga tccgcgctct 480
gatatcgcg tgatccaaat ccagaacccg aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat 540
tctgatgcac tgcgcgtggg tgattacacc gtagcgattg gtaaccggtt tggctctgggc 600
gagacggtaa cttccgggat tgtctctgcg ctggggcgta gcggcctgaa tgccgaaaac 660
tacgaaaact tcatccagac cgatgcagcg attaatcgtg gtaacgccgg tggcgcgctg 720
gttaacctga acggcgaaact gatcggatat aacaccgcga tcctcgcacc ggacggcggc 780
aacatcggtg tcggttttgc tatcccagat aacatggtga aaaacctgac ctgcgagatg 840
gtggaatacg gccaggtgaa acgcggtgag ctgggtatta tggggactga gctgaactcc 900
gaactggcga aagcgatgaa agttgacgcc cagcgcggtg ctttcgtaag ccaggttctg 960
cctaattcct ccgctgcaaa agcgggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctactgaac 1020
ggtaagccga tcagcagctt tgccgcactg cgtgctcagg tgggtactat gccggtaggc 1080
agcaaaactga ccctgggctt actgcgcgac ggtaagcagg ttaacgtgaa cctggaactg 1140
cagcagagca gccagaatca ggttgattcc agtccatct tcaacggcat tgaaggcgct 1200
gagatgagca acaaaggcaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcact 1260
ccggctgcgc agatcggcct gaagaaaggt gatgtgatta ttggcgcgaa ccagcaggca 1320
gtgaaaaaca tcgctgaact gcgtaaagtt ctcgacagca aaccgtctgt gctggcactc 1380
aacattcagc gcggcgacag caccatctac ctgttaatgc agtaa 1425
  
```

<210> 10
 <211> 474
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的DegP

<400> 10

```

Met Lys Lys Thr Thr Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Leu Ser Leu Gly
1           5           10           15
Leu Ala Leu Ser Pro Leu Ser Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ser Ser Ala
          20           25           30
Thr Thr Ala Gln Gln Met Pro Ser Leu Ala Pro Met Leu Glu Lys Val
          35           40           45
Met Pro Ser Val Val Ser Ile Asn Val Glu Gly Ser Thr Thr Val Asn
          50           55           60
Thr Pro Arg Met Pro Arg Asn Phe Gln Gln Phe Phe Gly Asp Asp Ser
65           70           75           80
Pro Phe Cys Gln Glu Gly Ser Pro Phe Gln Ser Ser Pro Phe Cys Gln
          85           90           95
Gly Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gln Gln Gln Lys Phe Met Ala
          100          105          110
Leu Gly Ser Gly Val Ile Ile Asp Ala Asp Lys Gly Tyr Val Val Thr
          115          120          125
Asn Asn His Val Val Asp Asn Ala Thr Val Ile Lys Val Gln Leu Ser
          130          135          140
Asp Gly Arg Lys Phe Asp Ala Lys Met Val Gly Lys Asp Pro Arg Ser
145          150          155          160
Asp Ile Ala Leu Ile Gln Ile Gln Asn Pro Lys Asn Leu Thr Ala Ile
          165          170          175
Lys Met Ala Asp Ser Asp Ala Leu Arg Val Gly Asp Tyr Thr Val Ala
          180          185          190
Ile Gly Asn Pro Phe Gly Leu Gly Glu Thr Val Thr Ser Gly Ile Val
          195          200          205
Ser Ala Leu Gly Arg Ser Gly Leu Asn Ala Glu Asn Tyr Glu Asn Phe
          210          215          220
Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Arg Gly Asn Ala Gly Gly Ala Leu
225          230          235          240
Val Asn Leu Asn Gly Glu Leu Ile Gly Ile Asn Thr Ala Ile Leu Ala
          245          250          255
Pro Asp Gly Gly Asn Ile Gly Ile Gly Phe Ala Ile Pro Ser Asn Met
          260          265          270
Val Lys Asn Leu Thr Ser Gln Met Val Glu Tyr Gly Gln Val Lys Arg

```

275	280	285
Gly Glu Leu Gly Ile Met Gly Thr Glu Leu Asn Ser Glu Leu Ala Lys		
290	295	300
Ala Met Lys Val Asp Ala Gln Arg Gly Ala Phe Val Ser Gln Val Leu		
305	310	315
Pro Asn Ser Ser Ala Ala Lys Ala Gly Ile Lys Ala Gly Asp Val Ile		
325	330	335
Thr Ser Leu Asn Gly Lys Pro Ile Ser Ser Phe Ala Ala Leu Arg Ala		
340	345	350
Gln Val Gly Thr Met Pro Val Gly Ser Lys Leu Thr Leu Gly Leu Leu		
355	360	365
Arg Asp Gly Lys Gln Val Asn Val Asn Leu Glu Leu Gln Gln Ser Ser		
370	375	380
Gln Asn Gln Val Asp Ser Ser Ser Ile Phe Asn Gly Ile Glu Gly Ala		
385	390	395
Glu Met Ser Asn Lys Gly Lys Asp Gln Gly Val Val Val Asn Asn Val		
405	410	415
Lys Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gln Ile Gly Leu Lys Lys Gly Asp Val		
420	425	430
Ile Ile Gly Ala Asn Gln Gln Ala Val Lys Asn Ile Ala Glu Leu Arg		
435	440	445
Lys Val Leu Asp Ser Lys Pro Ser Val Leu Ala Leu Asn Ile Gln Arg		
450	455	460
Gly Asp Ser Thr Ile Tyr Leu Leu Met Gln		
465	470	

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于包含Ase I限制性位点的突变的 DegP基因的区域5' 寡核苷酸引物

<400> 11

ctgcctgcga ttttcgccgg aacg 24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于包含Ase I限制性位点的突变的DegP基因的区域3' 寡核苷酸引物

<400> 12
cgcatggtac gtgccacgat atcc 24
<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于包含Ase I限制性位点的突变的Tsp基因的区域5' 寡核苷酸引物
<400> 13
gggaaatgaa cctgagcaaa acgc 24
<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于包含Ase I限制性位点的突变的蛋白酶III基因的区域3' 寡核苷酸引物
<400> 14
gggaaaggcg gcggaaccgc ctag 24
<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于包含Ase I限制性位点的突变的蛋白酶III基因的区域5' 寡核苷酸引物
<400> 15
ctactgtgcc agcgggtggta atgg 24
<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于包含Ase I限制性位点的突变的Tsp基因的区域3' 寡核苷酸引物
<400> 16
gcatcataat tttcttttta cctc 24
<210> 17
<211> 564
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 野生型spr基因

<400> 17

atgggtcaaat ctcaaccgat tttagatat atcttgcgcg ggattcccg c gattgcagta 60
 gcggttctgc tttctgcatg tagtgcaa ataacaccgcaa aga atatgca tcctgagaca 120
 cgtgcagtgg gtagtgaaac atcatcactg caagcttctc aggatgaatt tgaaaacctg 180
 gttcgtaatg tcgacgtaaa atcgcgaa attgatcagt atgctgactg gaaaggcgta 240
 cgttatcgtc tgggcggcag cactaaaaaa ggtatcgatt gttctggttt cgtacagcgt 300
 acattccgtg agcaatttgg cttagaactt ccgcgttcga cttacgaaca gcaggaaatg 360
 ggtaa atctg tttcccgag taatttgcgt acgggtgatt tagttctgtt ccgtgccggt 420
 tcaacgggac gccatgtcgg tatttatatc ggcaacaatc agtttgtcca tgcttccacc 480
 agcagtgggtg ttattatttc cagcatgaat gaaccgtact ggaagaagcg ttacaacgaa 540
 gcacgccggg ttctcagccg cagc 564

<210> 18

<211> 188

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 18

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

Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser Arg Ser
180 185

<210> 19

<211> 162

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 19

Cys Ser Ala Asn Asn Thr Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg Ala
1 5 10 15

Val Gly Ser Glu Thr Ser Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu
20 25 30

Asn Leu Val Arg Asn Val Asp Val Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr
35 40 45

Ala Asp Trp Lys Gly Val Arg Tyr Arg Leu Gly Gly Ser Thr Lys Lys
50 55 60

Gly Ile Asp Cys Ser Gly Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg Glu Gln Phe
65 70 75 80

Gly Leu Glu Leu Pro Arg Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys
85 90 95

Ser Val Ser Arg Ser Asn Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg
100 105 110

Ala Gly Ser Thr Gly Arg His Val Gly Ile Tyr Ile Gly Asn Asn Gln
115 120 125

Phe Val His Ala Ser Thr Ser Ser Gly Val Ile Ile Ser Ser Met Asn
130 135 140

Glu Pro Tyr Trp Lys Lys Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser
145 150 155 160

Arg Ser

<210> 20

<211> 954

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含D210A和H212A突变的突变的OmpT序列的核苷酸序列

<400> 20

atgcgggcga aacttctggg aatagtctctg acaacccta ttgcgatcag ctcttttgcg 60
tctaccgaga ctttatcggt tactcctgac aacataaatg cggacattag tcttggaact 120
ctgagcggaa aaacaaaaga gcgtgtttat ctagccgaag aaggaggccg aaaagtcagt 180
caactcgact ggaaattcaa taacgctgca attattaaag gtgcaattaa ttgggatttg 240

atgccccaga tatctatcgg ggctgctggc tggacaactc tcggcagccg aggtggcaat 300
 atgggtcgatc aggactggat ggattccagt aacccccgaa cctggacgga tgaaagtaga 360
 caccctgata cacaactcaa ttatgccaac gaatttgatc tgaatatcaa aggctggctc 420
 ctcaacgaac ccaattaccg cctgggactc atggccggat atcaggaaag ccgttatagc 480
 tttaacagcca gaggtgggtc ctatatctac agttctgagg agggattcag agatgatatc 540
 ggctccttcc cgaatggaga aagagcaatc ggctacaaac aacgttttaa aatgccttac 600
 attggcttga ctggaagtta tcgttatgaa gattttgaac tcggtggcac atttaaatac 660
 agcggctggg tggaatcatc tgataacgct gaagcttatg acccgggaaa aagaatcact 720
 tatcgagcagta aggtcaaaga ccaaaattac tattctgttg cagtcaatgc aggttattac 780
 gtcacaccta acgcaaaaagt ttatgttgaa ggcgcattgga atcgggttac gaataaaaaa 840
 ggtaataactt cactttatga tcacaataat aacacttcag actacagcaa aaatggagca 900
 ggtatagaaa actataactt catcactact gctggtctta agtacacatt ttaa 954

<210> 21

<211> 317

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含D210A和H212A突变的突变的OmpT序列

<400> 21

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

Phe Thr Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Gly Phe		
165	170	175
Arg Asp Asp Ile Gly Ser Phe Pro Asn Gly Glu Arg Ala Ile Gly Tyr		
180	185	190
Lys Gln Arg Phe Lys Met Pro Tyr Ile Gly Leu Thr Gly Ser Tyr Arg		
195	200	205
Tyr Glu Asp Phe Glu Leu Gly Gly Thr Phe Lys Tyr Ser Gly Trp Val		
210	215	220
Glu Ser Ser Asp Asn Ala Glu Ala Tyr Asp Pro Gly Lys Arg Ile Thr		
225	230	235
Tyr Arg Ser Lys Val Lys Asp Gln Asn Tyr Tyr Ser Val Ala Val Asn		
245	250	255
Ala Gly Tyr Tyr Val Thr Pro Asn Ala Lys Val Tyr Val Glu Gly Ala		
260	265	270
Trp Asn Arg Val Thr Asn Lys Lys Gly Asn Thr Ser Leu Tyr Asp His		
275	280	285
Asn Asn Asn Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Asn Gly Ala Gly Ile Glu Asn		
290	295	300
Tyr Asn Phe Ile Thr Thr Ala Gly Leu Lys Tyr Thr Phe		
305	310	315

<210> 22

<211> 954

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变敲除OmpT序列

<400> 22

```

attcgggcga aacttctggg aatagtcctg acaacccta ttgcgatcag ctcttttgct 60
tctaccgaga ctttatcggt tactcctgac aacataaatg cggacattag tcttggaact 120
ctgagcggaa aaacaaaaga gcggtgtttat ctagccgaag aaggaggccg aaaagtcagt 180
caactcgact ggaaattcaa taacgctgca attattaaag gtgcaattaa ttgggatttg 240
atgccccaga tatctatcgg ggctgctggc tggacaactc tcggcagccg aggtggcaat 300
atggctgatc aggactggat ggattccagt aaccccgga cctggacgga tgaaagtaga 360
caccctgata cacaactcaa ttatgccaac gaatttgatc tgaatatcaa aggctggctc 420
ctcaacgaac ccaattaccg cctgggactc atggccgat atcaggaaag ccgttatagc 480
tttacagcca gagtggttc ctatatctac agttctgagg agggattcag agatgatatc 540
ggctccttcc cgaatggaga aagagcaatc ggctacaaac aacgttttaa aatgccttac 600
attggcttga ctggaagtta tcgttatgaa gattttgaac tcggtggcac atttaaatac 660
agcggctggg tggaatcatc tgataacgat gaacactatg acccgggaaa agaatacact 720

```

tatcgcagta aggtcaaaga ccaaaattac tattctgttg cagtcaatgc aggttattac 780
gtcacaccta acgcaaaagt ttatgttgaa ggcgcatgga atcgggttac gaataaaaaa 840
ggtaatactt cactttatga tcacaataat aacacttcag actacagcaa aaatggagca 900
ggtatagaaa actataactt catcactact gctggtctta agtacacatt ttaa 954

<210> 23

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> OmpA寡核苷酸接头

<400> 23

cgattgaatg gagaacttga attcgggcga aacttctggg aatag 45

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码用于大肠杆菌 Fab表达的基因间序列1 (IGS1) 的寡核苷酸盒

<400> 24

aagttttaat agaggagagt gttaatgaag aag 33

<210> 25

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码用于大肠杆菌 Fab表达的基因间序列2 (IGS2) 的寡核苷酸盒

<400> 25

aagttttaat agaggggagt gttaaaatga agaag 35

<210> 26

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码用于大肠杆菌 Fab表达的基因间序列3 (IGS3) 的寡核苷酸盒

<400> 26

aagctttaat agaggagagt gttgaggagg aaaaaaaaaat gaagaaa 47

<210> 27

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码用于大肠杆菌 Fab表达的基因间序列4 (IGS4) 的寡核苷酸盒

<400> 27

aagctttaat agaggagagt gttgacgagg attatataat gaagaaa 47

<210> 28

<211> 810

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<400> 28

```
atgaaatcac tgtttaaagt aacgctgctg gcgaccacaa tggccgttgc cctgcatgca 60
ccaatcactt ttgctgctga agctgcaaaa cctgctacag ctgctgacag caaagcagcg 120
ttcaaaaatg acgatcagaa atcagcttat gcactgggtg cctcgctggg tcgttacatg 180
gaaaactctc taaaagaaca agaaaaactg ggcatcaaac tggataaaga tcagctgac 240
gctgggtgtt aggatgcatt tgctgataag agcaaactct ccgaccaaga gatcgaacag 300
actctacaag cattcgaagc tcgctgaag tcttctgctc aggcgaagat ggaaaaagac 360
gcggctgata acgaagcaaa aggtaaagag taccgcgaga aatttgccaa agagaaaggt 420
gtgaaaacct cttcaactgg tctggtttat caggtagtag aagccggtaa aggcgaagca 480
ccgaaagaca gcgatactgt tgtagtgaaac tacaaagta cgctgatcga cggtaaagag 540
ttcgacaact cttacacccg tggatgaaccg ctttctttcc gtctggacgg tgttatcccg 600
ggttggacag aaggctctgaa gaacatcaag aaaggcggtg agatcaaact ggttattcca 660
ccagaactgg cttacggcaa agcgggtgtt ccggggatcc caccgaattc taccctgggtg 720
tttgacgtag agctgctgga tgtgaaacca gcgccgaagg ctgatgcaaa gccggaagct 780
gatgcgaaag ccgcagattc tgctaaaaaa 810
```

<210> 29

<211> 270

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 29

```
Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
1           5           10           15
Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
20           25           30
Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
35           40           45
Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
50           55           60
Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
65           70           75           80
```

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

<210> 30

<211> 828

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> FkpA标记基因

<400> 30

```

atgaaatcac tgtttaaagt aacgtgctg gcgaccacaa tggccgttgc cctgcacgca 60
ccaatcactt ttgctgctga agctgcaaaa cctgctactg ctgctgacag caaagcagcg 120
ttcaaaaatg acgatcagaa atcagcttat gcactgggtg cctcgctggg tcgttacatg 180
gaaaactctc taaaagaaca agaaaaactg ggcacaaac tggataaaga tcaactgatc 240
gctggtgttc aggatgcatt tgctgataag agcaaactct cgcaccaaga gatcgaacag 300
actctacaag catttgaagc tcgctgaag tcttctgctc aggcaagat ggaaaaagac 360
gcggctgata acgaagcaaa aggtaaagag taccgcgaga aatttgccaa agagaaaggt 420
gtgaaaacct cttcaactgg tctggtttat caggtagtag aagccggtaa aggcaagca 480

```

ccgaaagaca gcgatactgt tgtagtgaac tacaaaggta cgctgatcga cggtaaagag 540
 ttcgacaact cttacacccg tggatgaaccg ctttctttcc gtctggacgg tggtatcccg 600
 ggttggacag aaggtctgaa gaacatcaag aaaggcggta agataaaact ggttattcca 660
 ccagaactgg cttacggcaa agcgggtgtt ccggggattc caccaaattc taccctgggtg 720
 tttgacgtag agctgctgga tgtgaaacca gcgccgaagg ctgatgcaaa gccggaagct 780
 gatgcgaaaag ccgcagattc tgctaaaaaa caccatcacc atcaccac 828

<210> 31

<211> 276

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FkpA his标记的基因

<400> 31

Met	Lys	Ser	Leu	Phe	Lys	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	Thr	Thr	Met	Ala	Val
1				5						10				15	
Ala	Leu	His	Ala	Pro	Ile	Thr	Phe	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Pro	Ala
				20						25				30	
Thr	Ala	Ala	Asp	Ser	Lys	Ala	Ala	Phe	Lys	Asn	Asp	Asp	Gln	Lys	Ser
				35						40				45	
Ala	Tyr	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Leu	Gly	Arg	Tyr	Met	Glu	Asn	Ser	Leu
				50						55				60	
Lys	Glu	Gln	Glu	Lys	Leu	Gly	Ile	Lys	Leu	Asp	Lys	Asp	Gln	Leu	Ile
65				70						75				80	
Ala	Gly	Val	Gln	Asp	Ala	Phe	Ala	Asp	Lys	Ser	Lys	Leu	Ser	Asp	Gln
				85						90				95	
Glu	Ile	Glu	Gln	Thr	Leu	Gln	Ala	Phe	Glu	Ala	Arg	Val	Lys	Ser	Ser
				100						105				110	
Ala	Gln	Ala	Lys	Met	Glu	Lys	Asp	Ala	Ala	Asp	Asn	Glu	Ala	Lys	Gly
				115						120				125	
Lys	Glu	Tyr	Arg	Glu	Lys	Phe	Ala	Lys	Glu	Lys	Gly	Val	Lys	Thr	Ser
				130						135				140	
Ser	Thr	Gly	Leu	Val	Tyr	Gln	Val	Val	Glu	Ala	Gly	Lys	Gly	Glu	Ala
145				150						155				160	
Pro	Lys	Asp	Ser	Asp	Thr	Val	Val	Val	Asn	Tyr	Lys	Gly	Thr	Leu	Ile
				165						170				175	
Asp	Gly	Lys	Glu	Phe	Asp	Asn	Ser	Tyr	Thr	Arg	Gly	Glu	Pro	Leu	Ser
				180						185				190	
Phe	Arg	Leu	Asp	Gly	Val	Ile	Pro	Gly	Trp	Thr	Glu	Gly	Leu	Lys	Asn
				195						200				205	

Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
 210 215 220
 Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
 225 230 235 240
 Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
 245 250 255
 Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys His His
 260 265 270
 His His His His
 275

<210> 32

<211> 486

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<400> 32

gtgaaaaagt ggttattagc tgcaggtctc ggttttagcac tggcaacttc tgctcaggcg 60
 gctgacaaaa ttgcaatcgt caacatgggc agcctgttcc agcaggtagc gcagaaaacc 120
 ggtgttttcta acacgctgga aatgagttc aaaggccgtg ccagcgaact gcagcgtatg 180
 gaaaccgatc tgcaggctaa aatgaaaaag ctgcagtcca tgaaagcggg cagcgatcgc 240
 actaagctgg aaaaagacgt gatggctcag cgccagactt ttgctcagaa agcgcaggct 300
 tttgagcagg atcgcgcacg tcgttccaac gaagaacgcg gcaaactggg tactcgtatc 360
 cagactgctg tgaaatccgt tgccaacagc caggatatcg atctggttgt tgatgcaaac 420
 gccgttgctt acaacagcag cgatgtaaaa gacatcactg ccgacgtact gaaacaggtt 480
 aaataa 486

<210> 33

<211> 161

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 33

Met Lys Lys Trp Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gly Leu Ala Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu
 20 25 30
 Phe Gln Gln Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn
 35 40 45
 Glu Phe Lys Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu
 50 55 60
 Gln Ala Lys Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg
 65 70 75 80

Thr Lys Leu Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln
85 90 95
Lys Ala Gln Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu
100 105 110
Arg Gly Lys Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala
115 120 125
Asn Ser Gln Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr
130 135 140
Asn Ser Ser Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val
145 150 155 160

Lys

<210> 34

<211> 501

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> skp his标记的基因

<400> 34

atgaaaaagt gggtatttagc cgcaggtctc gggttagcac tggcaacttc tgctcaggcg 60
gctgacaaaa ttgcaatcgt caacatgggc agcctgttcc agcaggtagc gcagaaaacc 120
gggtgttttcta acacgctgga aaatgagttc aaaggccgtg ccagcgaact ccagcgtatg 180
gaaaccgatc tccaggctaa aatgaaaaag ctgcaatcca tgaaagcggg cagcgcgatgc 240
actaagctgg aaaaagacgt gatggctcag cgccagactt ttgctcagaa agcgcaggct 300
tttgagcagg atcgcgcacg tcgttccaac gaagaacgcg gcaaactggg tactcgtatc 360
cagactgctg tgaaatccgt tgccaacagc caggaaatcg atctggttgt tgatgcaaac 420
gccgttgctt acaacagcag cgatgtaaaa gacatcactg ccgacgtact gaaacaggtt 480
aaacaccatc accatcacca c 501

<210> 35

<211> 167

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> skp his标记的基因

<400> 35

Met Lys Lys Trp Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gly Leu Ala Leu Ala Thr
1 5 10 15
Ser Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu
20 25 30
Phe Gln Gln Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn

35	40	45
Glu Phe Lys Gly Arg Ala Ser	Glu Leu Gln Arg Met	Glu Thr Asp Leu
50	55	60
Gln Ala Lys Met Lys Lys Leu	Gln Ser Met Lys Ala Gly	Ser Asp Arg
65	70	75
Thr Lys Leu Glu Lys Asp Val	Met Ala Gln Arg Gln Thr	Phe Ala Gln
85	90	95
Lys Ala Gln Ala Phe Glu Gln	Asp Arg Ala Arg Arg Ser	Asn Glu Glu
100	105	110
Arg Gly Lys Leu Val Thr Arg	Ile Gln Thr Ala Val Lys	Ser Val Ala
115	120	125
Asn Ser Gln Glu Ile Asp Leu	Val Val Asp Ala Asn Ala	Val Ala Tyr
130	135	140
Asn Ser Ser Asp Val Lys Asp	Ile Thr Ala Asp Val Leu	Lys Gln Val
145	150	155
Lys His His His His His His		
165		

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA170 1519 Ab CDRH1

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val

1 5 10

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRH2

<400> 37

Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRH3

<400> 38

Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr

1 5

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRL1

<400> 39

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRL2

<400> 40

Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRL3

<400> 41

Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr

1 5

<210> 42

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 大鼠 Ab 1519 VL区

<400> 42

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
 20 25 30
 Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Arg Ser Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 43

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 大鼠 Ab 1519 VL区

<400> 43

gatgttgtga tgaccagac tccactgtct ttgtcggttg cccttggaca accagcctcc 60
 atctcttgca agtcaagtca gagcctcgta ggtgctagtg gaaagacata tttgtattgg 120
 ttattttcaga ggtccggcca gtctccaaag cgactaatct atctgggtgtc cacactggac 180
 tctggaattc ctgatagggt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc 240
 cgcagagtgg aagccgatga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac acattttcct 300
 cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa 336

<210> 44

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 大鼠 Ab 1519 VL区

<400> 44

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Met Leu Trp Ile Gln
 1 5 10 15
 Gly Thr Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
 20 25 30

Val Ala Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Arg
 50 55 60
 Ser Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp
 65 70 75 80
 Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Glu Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Leu Lys
 130

<210> 45

<211> 396

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 大鼠 Ab 1519 VL区

<400> 45

atgatgagtc ctgccagtt cctgtttctg ctgatgctct ggattcaggg aaccagtgg 60
 gatgttgtga tgaccagac tccactgtct ttgtcggttg cccttggaca accagcctcc 120
 atctcttgca agtcaagtca gagcctcgta ggtgctagt gaaagacata tttgtattgg 180
 ttatttcaga ggtccggcca gtctccaaag cgactaatct atctggtgtc cacactggac 240
 tctggaattc ctgatagggt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc 300
 cgcagagtgg aagccgatga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac acattttcct 360
 cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa 396

<210> 46

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 大鼠 Ab 1519 VH区

<400> 46

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser
 115

<210> 47

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 大鼠 Ab 1519 VH区

<400> 47

gaggtgccgc tgggtggagtc tgggggcggc tcagtgcagc ctgggaggtc catgaaactc 60
 tctctgttag tctcaggatt cactttcagt aattatggca tgggtctgggt ccgccaggct 120
 ccaaagaagg gtctggagtg ggtcgcatat attgattctg atggtgataa tacttactac 180
 cgagattccg tgaagggccg attcactatc tccagaaata atgcaaaaag caccctatat 240
 ttgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtac aacagggatt 300
 gtccggccct ttctctattg gggccaagga accacggcca ccgtctcg 348

<210> 48

<211> 135

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 大鼠 Ab 1519 VH区

<400> 48

Met Asp Ile Ser Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Arg Cys Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu

50	55	60
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg		
65	70	75
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Ser		
85	90	95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr		
100	105	110
Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln		
115	120	125
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser		
130	135	

<210> 49

<211> 405

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 大鼠 Ab 1519 VH区

<400> 49

atggacatca gtctcagctt ggctttcctt gtccttttca taaaaggtgt ccggtgtgag 60
 gtgccgctgg tggagtctgg gggcggctca gtgcagcctg ggaggtccat gaaactctcc 120
 tgtgtagtct caggattcac tttcagtaat tatggcatgg tctgggtccg ccaggctcca 180
 aagaagggtc tggagtgggt cgcatatatt gattctgatg gtgataatac ttactaccga 240
 gattccgtga agggccgatt cactatctcc agaaataatg caaaaagcac cctatatattg 300
 caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtacaac agggtattgtc 360
 cggccctttc tctattgggg ccaaggaacc acggtcaccg tctcg 405

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gL20 V-区

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
20 25 30
Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro

50	55	60
Ser Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly Thr Glu	Phe Thr Leu Thr Ile
65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu	Asp Phe Ala Thr Tyr	Tyr Cys Leu Gln Gly
85	90	95
Thr His Phe Pro His Thr	Phe Gly Gln Gly Thr	Lys Leu Glu Ile Lys
100	105	110

<210> 51

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gL20 V-区

<400> 51

```

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg gcaaaaccta cctgtactgg 120
ctcttccaga aaccgggcaa agctccgaaa cgctgatct atctggtgtc taccctggat 180
agcggatttc cgtctcggtt ctccggtagc ggtagcggtt ccgaattcac gctgaccatt 240
agctccctcc agccggagga ctttgctacc tattactgcc tccagggcac tcattttccg 300
cacactttcg gccagggtac caaactggaa atcaaa 336

```

<210> 52

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gL20 V-区

<400> 52

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20 25 30
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln
35 40 45
Ser Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln
50 55 60
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu
65 70 75 80
Asp Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Lys Leu Glu Ile Lys
 130

<210> 53

<211> 399

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gL20 V-区

<400> 53

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
 gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
 actattacct gtaaaagctc ccagtccctg gtgggtgcaa gcggcaaaac ctacctgtac 180
 tggctcttcc agaaaccggg caaagctccg aaacgcctga tctatctggt gtctaccctg 240
 gatagcggta ttccgtctcg tttctccggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc 300
 attagctccc tccagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg cactcatttt 360
 ccgcacactt tcggccaggg taccaaactg gaaatcaaa 399

<210> 54

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gL20 轻链 (V + 恒定区)

<400> 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
 20 25 30
 Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
115	120	125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
130	135	140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
145	150	155
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	

<210> 55

<211> 657

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gL20 轻链 (V + 恒定区)

<400> 55

```

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg gcaaaccta cctgtactgg 120
ctcttccaga aaccgggcaa agctccgaaa cgctgatct atctggtgtc taccctggat 180
agcgggtattc cgtctcgttt ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt 240
agctccctcc agccggagga ctttgctacc tattactgcc tccagggcac tcattttccg 300
cacactttcg gccagggtac caaactggaa atcaaagta cggtagcggc cccatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
gtcaccatc agggcctgag ctaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgt 657

```

<210> 56

<211> 240

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gL20 轻链

<400> 56

Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala
1				5					10					15	
Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
			20					25						30	
Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln
			35					40						45	
Ser	Leu	Val	Gly	Ala	Ser	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Leu	Phe	Gln
			50					55						60	
Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Thr	Leu
65						70				75					80
Asp	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu
						85				90					95
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
								100						105	
Tyr	Cys	Leu	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
								115						120	
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe
								130						135	
Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys
145								150						155	
Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
								165						170	
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln
								180						185	
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser
								195						200	
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His
								210						215	
Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
225								230						235	

<210> 57

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gL20 轻链

<400> 57

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
 gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
 actattacct gtaaaagctc ccagtccctg gtgggtgcaa gcggcaaaac ctacctgtac 180
 tggctcttcc agaaaccggg caaagctccg aaacgcctga tctatctggt gtctaccctg 240
 gatagcggta ttccgtctcg tttctccggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc 300
 attagctccc tccagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg cactcatttt 360
 ccgcacactt tcggccaggg taccaaactg gaaatcaaac gtacggtagc ggccccatct 420
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgccctc 540
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggggagtg 720

<210> 58

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gH20 V-区

<400> 58

Glu	Val	Pro	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20						25					30	
Gly	Met	Val	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40							45	
Ala	Tyr	Ile	Asp	Ser	Asp	Gly	Asp	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val
			50				55					60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Ser	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95
Thr	Thr	Gly	Ile	Val	Arg	Pro	Phe	Leu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
					100					105					110
Val	Thr	Val	Ser												

<210> 59

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gH20 V-区

<400> 59

gaggttccgc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag tatctggctt cacgttctcc aactacggta tgggtgtgggt tcgtcaggct 120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgtat attgactccg acggcgacaa cacctactat 180
cgcgactctg tgaaaggctg cttcaccatt tcccgcgata acgccaatc cagcctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg tgctgaagat actgcggtgt actattgcac cactggcatc 300
gtgcgtccgt ttctgtattg gggtcagggt accctcgta ctgtctcg 348

<210> 60

<211> 137

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gH20 V-区

<400> 60

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe
35 40 45
Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95
Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135

<210> 61

<211> 411

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gH20 V-区

<400> 61

```
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgagggttc cgctggtcga gtctggaggc gggcttgtcc agcctggagg gaggctgcgt 120
ctctcttgtg cagtatctgg cttcacgttc tccaactacg gtatggtgtg ggttcgtcag 180
gctccaggta aaggtctgga atgggtggcg tatattgact cgcacggcga caacacctac 240
tatcgcgact ctgtgaaagg tcgcttcacc atttcccgcg ataacgcaa atccagcctg 300
tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgaa gatactgcgg tgtactattg caccactggc 360
atcgctgcgtc cgtttctgta ttggggtcag ggtaccctcg ttactgtctc g 411
```

<210> 62

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519gH20 Fab' 重链 (V + 人 γ -1 CH1 + 铰链)

<400> 62

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


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

<210> 65

<211> 747

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519 gH20 Fab' 重链

<400> 65

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
 gctgagggttc cgctggtcga gtctggaggc gggcttgtcc agcctggagg gaggctgcgt 120
 ctctcttgtg cagtatctgg cttcacgttc tccaactacg gtatggtgtg ggttcgtcag 180
 gctccaggta aaggctctgga atgggtggcg tatattgact ccgacggcga caacacctac 240
 tatcgcgact ctgtgaaagg tcgcttcacc atttcccgcg ataacgcaa atccagcctg 300
 tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgaa gatactgcgg tgtactattg caccactggc 360

atcgtgcgtc cgtttctgta ttgggggtcag ggtaccctcg ttactgtctc gagcgcttct 420
 acaaagggcc catcggctctt cccctctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
 gcggcccttg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 600
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 660
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagttga gcccaaattct 720
 tgtgacaaaa ctcacacatg cgccgcg 747

<210> 66

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519gH20 IgG4 重链 (V + 人 γ -4P 恒定区)

<400> 66

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

195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro		
210	215	220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
225	230	235
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
275	280	285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
290	295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
305	310	315
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
325	330	335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln		
340	345	350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
355	360	365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
370	375	380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
385	390	395
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		
405	410	415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
420	425	430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	

<210> 67

<211> 1939

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519gH20 IgG4 重链 (V + 人 γ -4P 恒定区, 外显子)

<400> 67

gaggtaccac ttgtggaaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggaggaag tttacgtctc 60

tcttgtgctg tgtctggcctt caccttctcc aattacggaa tggctctgggt cagacaagca 120
cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcctat attgactctg acggggacaa cacctactat 180
cgggattccg tgaaaggacg cttcacaatc tcccagata acgccaagag ctcactgtac 240
ctgcagatga atagcctgag agccgaggat actgccgtgt actattgcac aacgggaatc 300
gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accttggtta ctgtctcgag cgcttctaca 360
aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtcc tacagtccctc aggactctac 540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 600
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttggtga gaggccagca 660
cagggaggga ggggtgtctgc tggaagccag gctcagccct cctgcctgga cgcaccccg 720
ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggc atgccccatc tgtctctctca cccggaggcc 780
tctgaccacc ccaactcatgc ccagggagag ggtcttctgg atttttccac caggctccgg 840
gcagccacag gctggatgcc cctaccccag gccctgcgca tacaggggca ggtgctgcgc 900
tcagacctgc caagagccat atccgggagg acctgcccc tgacctaac ccaccccaaa 960
ggccaaactc tccactccct cagctcagac accttctctc ctcccagatc tgagtaactc 1020
ccaatcttct ctctgcagag tccaaatatg gtcccccatg cccaccatgc ccaggtaagc 1080
caaccaggc ctcgccctcc agtcaaggc gggacaggtg ccctagagta gcctgcatcc 1140
agggacaggc ccagccggg tgctgacgca tccacctcca tctcttctc agcacctgag 1200
ttcctggggg gaccatcagt cttcctgttc cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc 1260
tcccggacct ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc 1320
cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1380
gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctctc ccgtcctgca ccaggactgg 1440
ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag 1500
aaaaccatct ccaaagccaa aggtggggacc cacggggtgc gagggccaca tggacagagg 1560
tcagctcggc ccacctctg ccctgggagt gaccgctgtg ccaacctctg tccctacagg 1620
gcagccccga gagccacagg tgtacacct gcccccattc caggaggaga tgaccaagaa 1680
ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagt 1740
ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga 1800
cggctccttc ttctcttaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa 1860
tgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaa cactacacac agaagagcct 1920
ctccctgtct ctgggtaaa 1939

<210> 68

<211> 347

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519gL20 FabFv 轻链

<400> 68

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Gly	Ala
			20					25					30		
Ser	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Leu	Phe	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala
		35					40					45			
Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Thr	Leu	Asp	Ser	Gly	Ile	Pro
		50				55					60				
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
65				70						75					80
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Gly
			85						90					95	
Thr	His	Phe	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105						110	
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
		115						120					125		
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
		130				135					140				
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
145					150					155					160
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
				165					170					175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
			180					185					190		
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		210				215					220				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr
225					230					235					240
Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile
				245					250					255	
Thr	Cys	Gln	Ser	Ser	Pro	Ser	Val	Trp	Ser	Asn	Phe	Leu	Ser	Trp	Tyr
			260					265					270		
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Glu	Ala	Ser
		275					280					285			
Lys	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
		290					295				300				
Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala

305		310		315		320
Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe						
		325		330		335
Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr						
		340		345		

<210> 69

<211> 1041

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519gL20 FabFv 轻链

<400> 69

```

gatatccaga tgacccagag cccatctagc ttatccgctt ccgttggtga tcgcgtgaca 60
attacgtgta agagctccca atctctcgtg ggtgcaagt gcaagaccta tctgtactgg 120
ctctttcaga agcctggcaa ggcaccaaaa cggctgatct atctggtgtc tacccttgac 180
tctgggatac cgtcacgatt ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt 240
tcacgcgtgc aacccgagga ctttgcctacc tactactgcc tgcaaggcac tcatttcctt 300
cacactttcg gccaggggac aaaactcgaa atcaaacgta cggtagcggc cccatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctg 540
agcagcaccc tgacgctgtc taaagcagac tacgagaaac acaaagtgtg cgcctgcgaa 600
gtcacccatc agggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgtagc 660
gggtggcggg gcagtgggtg gggaggctcc ggaggtggcg gttcagacat acaaatgacc 720
cagagtcctt catcggatc cgcgtccgtt ggcatagagg tgactattac atgtcaaagc 780
tctcctagcg tctggagcaa ttttctatcc tggtatcaac agaaaccggg gaaggctcca 840
aaacttctga tttatgaagc ctcgaaactc accagtggag ttccgtcaag attcagtggc 900
tctggatcag ggacagactt cacgttgaca atcagttcgc tgcaaccaga ggactttgcg 960
acctactatt gtgggtggagg ttacagtagc ataagtgata cgacatttgg gtgcggtact 1020
aaggtggaaa tcaaacgtac c 1041

```

<210> 70

<211> 367

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519gL20 FabFv 轻链

<400> 70

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp	Ala	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser
			20					25					30		
Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser
		35					40					45			
Leu	Val	Gly	Ala	Ser	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Leu	Phe	Gln	Lys
		50				55					60				
Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Thr	Leu	Asp
65					70					75				80	
Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe
				85				90						95	
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr
			100					105					110		
Cys	Leu	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
		115					120					125			
Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
		130					135					140			
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
145					150					155				160	
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
				165					170					175	
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp
			180					185					190		
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys
		195					200						205		
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln
		210					215				220				
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Ser
225					230					235				240	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp
				245					250					255	
Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp
			260					265					270		
Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ser	Ser	Pro	Ser	Val	Trp	Ser	Asn	Phe
		275					280						285		
Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		290				295				300					
Tyr	Glu	Ala	Ser	Lys	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
305					310					315				320	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro

	325		330		335
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser					
	340		345		350
Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr					
	355		360		365
<210> 71					
<211> 1101					
<212> DNA					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 1519gL20 FabFv 轻链					
<400> 71					
atgtctgtcc ccacccaagt cctcggactc ctgctactct ggcttacaga tgccagatgc 60					
gatatccaga tgaccagag cccatctagc ttatccgctt ccgttggtga tcgcgtgaca 120					
attacgtgta agagctccca atctctcgtg ggtgcaagtg gcaagaccta tctgtactgg 180					
ctctttcaga agcctggcaa ggcacaaaaa cggctgatct atctggtgtc tacccttgac 240					
tctgggatac cgtcacgatt ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt 300					
tcacgcctgc aacccgagga ctttgctacc tactactgcc tgcaaggcac tcatttcctt 360					
cacactttcg gccaggggac aaaactcgaa atcaaacgta cggtagcggc cccatctgtc 420					
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480					
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540					
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctg 600					
agcagcaccc tgacgctgtc taaagcagac tacgagaaac acaaagtgtg cgcctgcgaa 660					
gtcacccatc agggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgtagc 720					
gggtggcggg gcagtgggtg gggaggctcc ggaggtggcg gttcagacat acaaatgacc 780					
cagagtcctt catcggatc cgcgtccgtt ggcatagagg tgactattac atgtcaaagc 840					
tctcctagcg tctggagcaa ttttctatcc tggtatcaac agaaaccggg gaaggctcca 900					
aaacttctga tttatgaagc ctcgaaactc accagtggag ttccgtcaag attcagtggc 960					
tctggatcag ggacagactt cacgttgaca atcagttcgc tgcaaccaga ggactttgcg 1020					
acctactatt gtggtggagg ttacagtagc ataagtgata cgacatttgg gtgcggtact 1080					
aaggtggaaa tcaaacgtac c 1101					
<210> 72					
<211> 357					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 1519gH20 FabFv 重链					
<400> 72					
Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
100	105	110	
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
115	120	125	
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
130	135	140	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
165	170	175	
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
180	185	190	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
195	200	205	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly			
210	215	220	
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu			
225	230	235	240
Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu			
245	250	255	
Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp			
260	265	270	
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp			
275	280	285	
Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr			
290	295	300	
Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser			
305	310	315	320

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro
 325 330 335
 Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 340 345 350
 Val Thr Val Ser Ser
 355

<210> 73

<211> 1071

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519gH20 FabFv 重链

<400> 73

gaggtaccac ttgtggaaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggaggaag tttacgtctc 60
 tcttgtgctg tgtctggcctt caccttctcc aattacggaa tggctctgggt cagacaagca 120
 cctggaaagg gtcttgaatg ggtggcctat attgactctg acggggacaa cacctactat 180
 cgggattccg tgaaaggacg cttcacaatc tcccagata acgccaagag ctactgtac 240
 ctgcagatga atagcctgag agccgaggat actgccgtgt actattgcac aacgggaatc 300
 gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accttggtta ctgtctcgag cgcgtccaca 360
 aagggcccat cggctctccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccag tgacggtgtc gtggaactca 480
 ggtgccctga ccagcggcgt tcacaccttc ccggtgtcc tacagtcttc aggactctac 540
 tccttgagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 600
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtcgataaga aagttgagcc caaatcttgt 660
 agtggaggtg ggggctcagg tggaggcggg accggtggag gtggcagcga ggttcaactg 720
 cttgagtctg gaggaggcct agtccagcct ggaggagacc tgcgtctctc ttgtgcagta 780
 agcggcatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaagctcc ggggaagtgt 840
 ttagaatgga tcggtataat atgggccagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaaa 900
 ggaaggttta caattagccg ggacaatagc aaaaacaccg tgtatctcca aatgaactcc 960
 ttgcgagcag aggacacggc ggtgtactat tgtgtctgca ctgtcccagg ttatagcact 1020
 gcaccctact tcgatctgtg gggacaaggg accctgggtga ctgtttcaag t 1071

<210> 74

<211> 376

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1519gH20 FabFv 重链

<400> 74

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1	5	10	15
Val His Ser Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln			
20	25	30	
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe			
35	40	45	
Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
50	55	60	
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg			
65	70	75	80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser			
85	90	95	
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln			
115	120	125	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
130	135	140	
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
145	150	155	160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
165	170	175	
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
180	185	190	
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
195	200	205	
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
210	215	220	
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser			
225	230	235	240
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu			
245	250	255	
Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser			
260	265	270	
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala			
275	280	285	
Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly			
290	295	300	
Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly			
305	310	315	320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
325 330 335
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
340 345 350
Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln
355 360 365
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375

<210> 75

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 野生型 Tsp 5'

<400> 75

Met Asn Met Phe Phe Arg Leu Thr Ala Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ile
1 5 10 15
Ala Gly Gln Thr Phe Ala
20

<210> 76

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 野生型 Tsp 5'

<400> 76

atgaacatgt tttttaggct taccgcgtta gctggcctgc ttgcaatagc aggccagacc 60
ttcgct 66

<210> 77

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的 Tsp 5' 片段

<400> 77

Met Asn Ser Phe Leu Gly Leu Pro Arg Leu Ala Cys Leu Gln Gln Ala
1 5 10 15
Arg His Leu
<210> 78

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的 Tsp 5' 片段

<400> 78

atgaattcgt ttttaggctt accgcgtag ctggcctgct tgcaatagca ggccagacat 60
taattg 66

<210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 突变的 Δ ptr (蛋白酶III) 5'

<400> 79

Ile Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala Leu Leu Leu Val Ala Leu

1 5 10 15

Trp Ala His Cys

20

<210> 80

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 突变的 Δ ptr (蛋白酶III) 5'

<400> 80

tgaattcccc gcagcacctg gttcaaagca ttattgttgt tagttgccct ttgggcacat 60
taatgt 66

<210> 81

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 野生型 ptr (蛋白酶III) 5'

<400> 81

Met Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala Leu Leu Leu Val Ala Leu

1 5 10 15

Trp Ala Pro Leu Ser

20

<210> 82

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 野生型 ptr (蛋白酶III) 5'

<400> 82

tgaatgcccc gcagcacctg gttcaaagca ttattgttgt tagttgccct ttgggcaccc 60

ttaagt 66

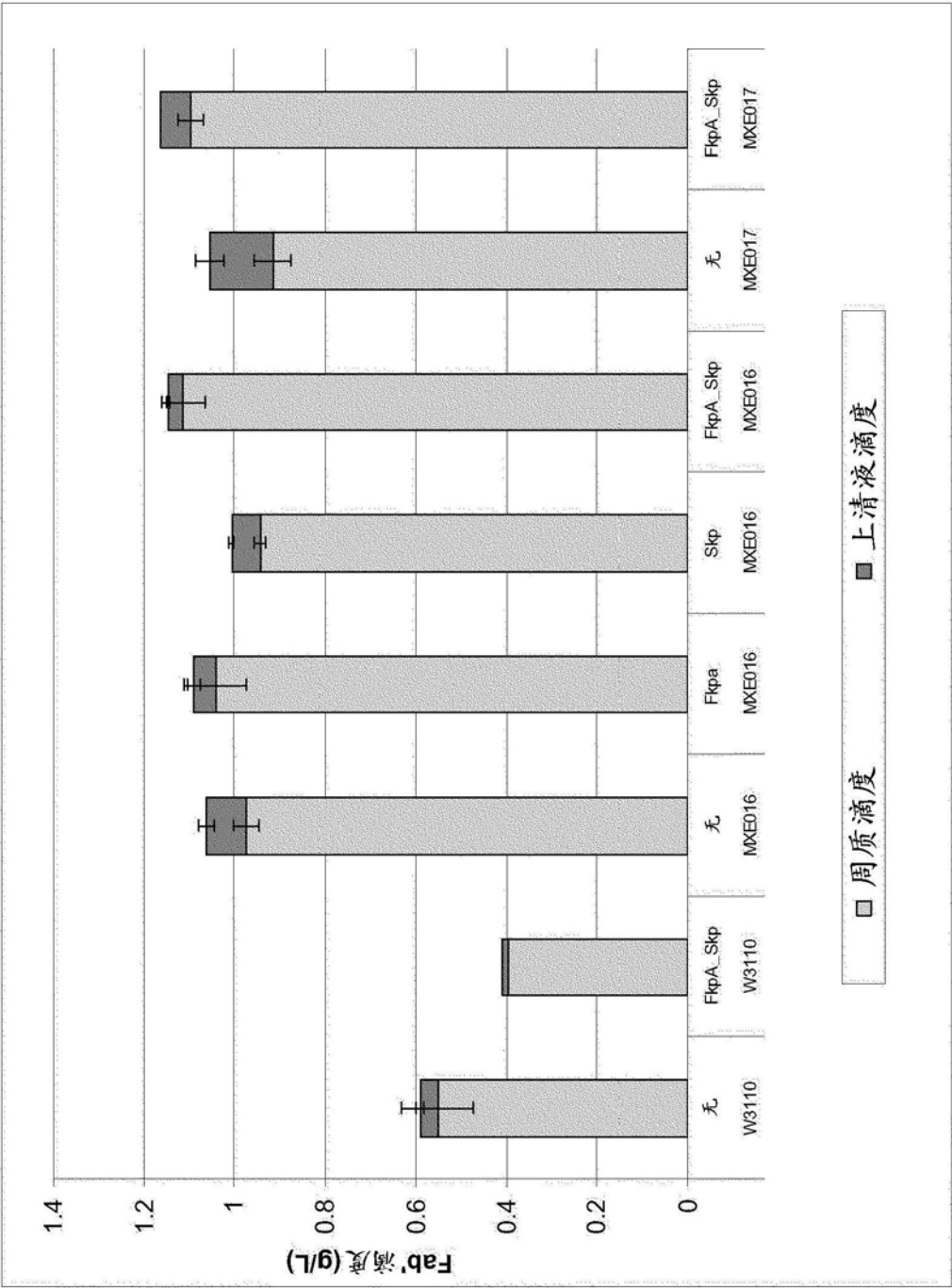


图1

补料速率变化实验

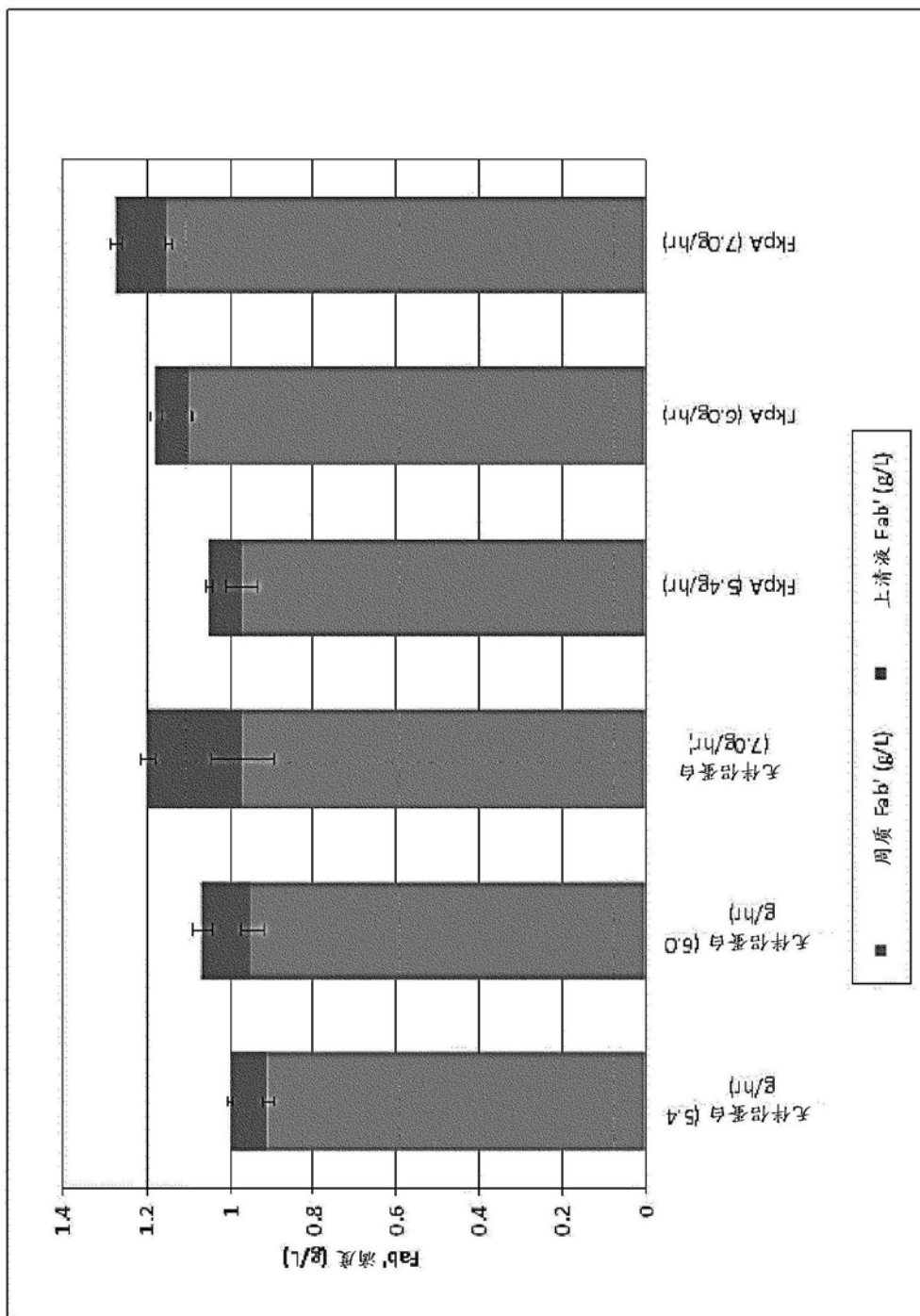


图2

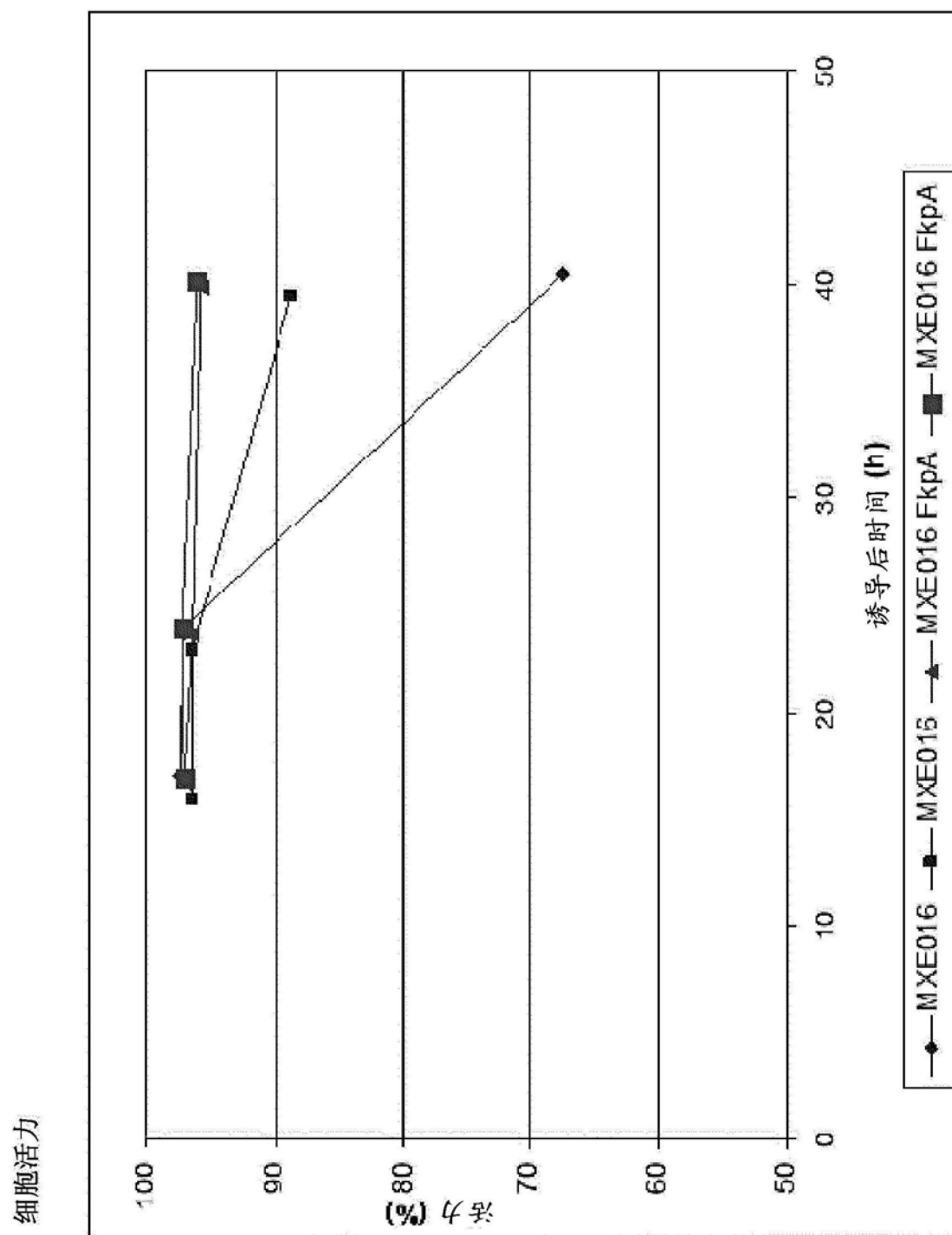


图3A

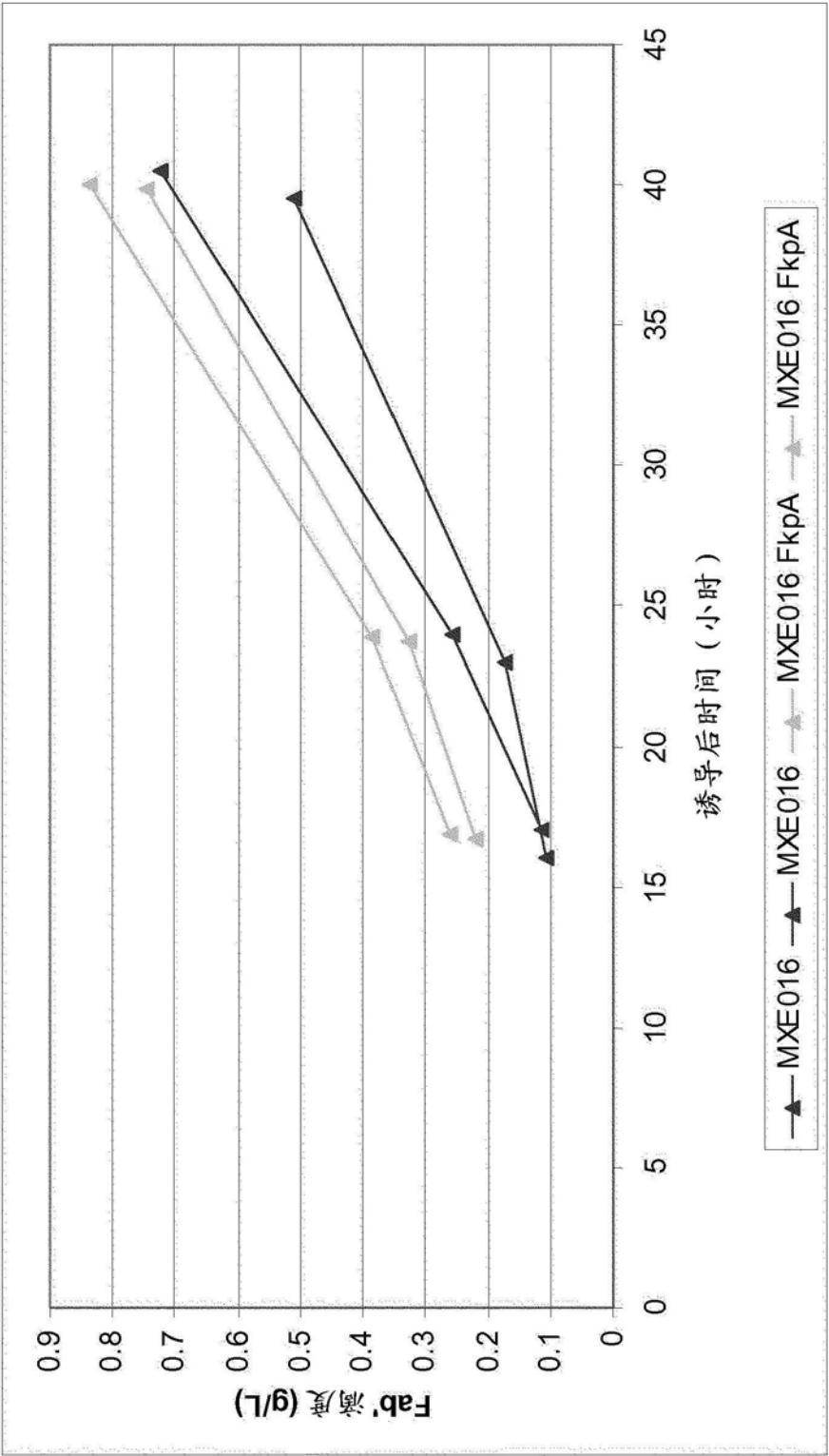


图3B

“MXE016”细胞系的来自 20 升中试生产的收获以及初步回收

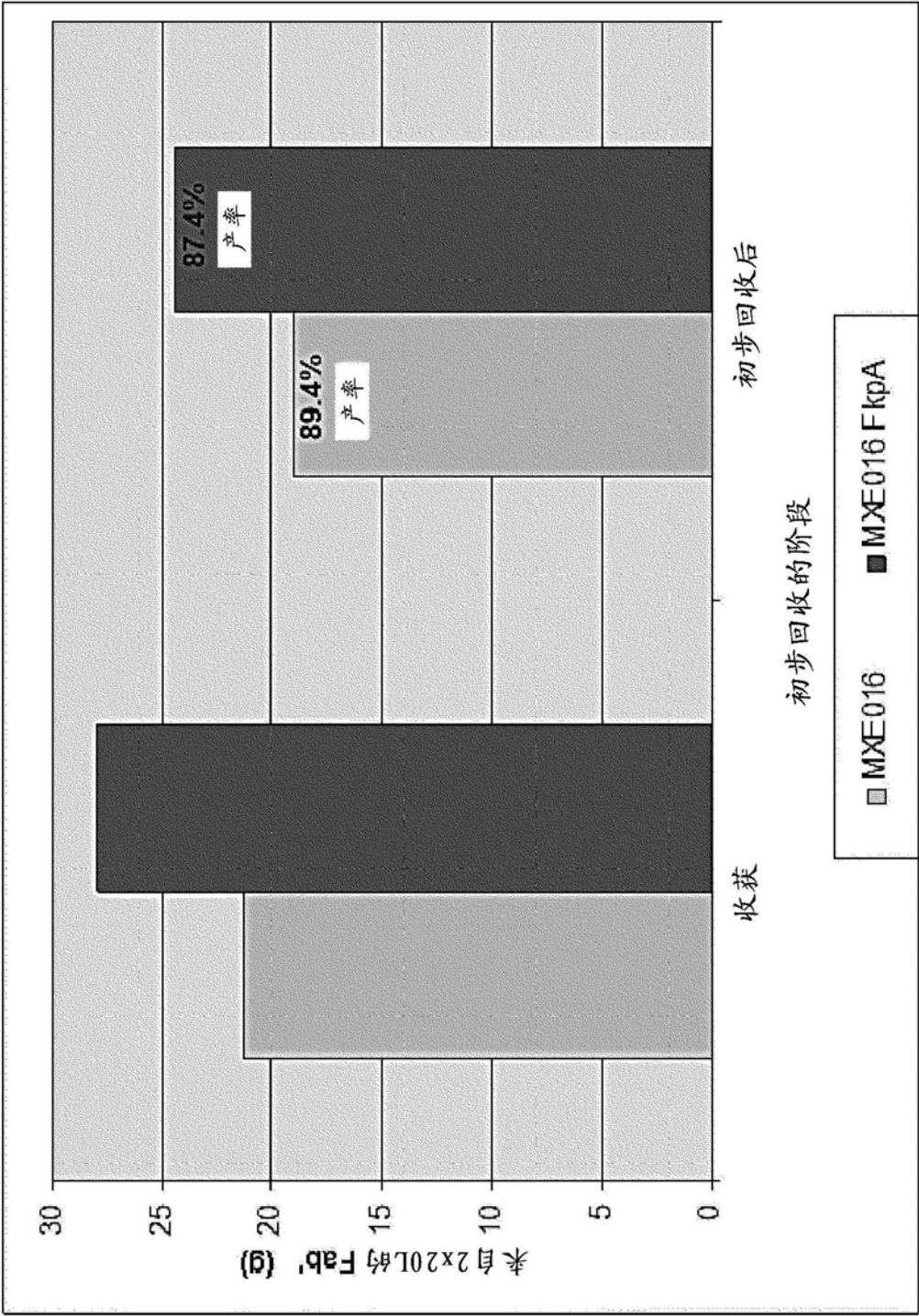
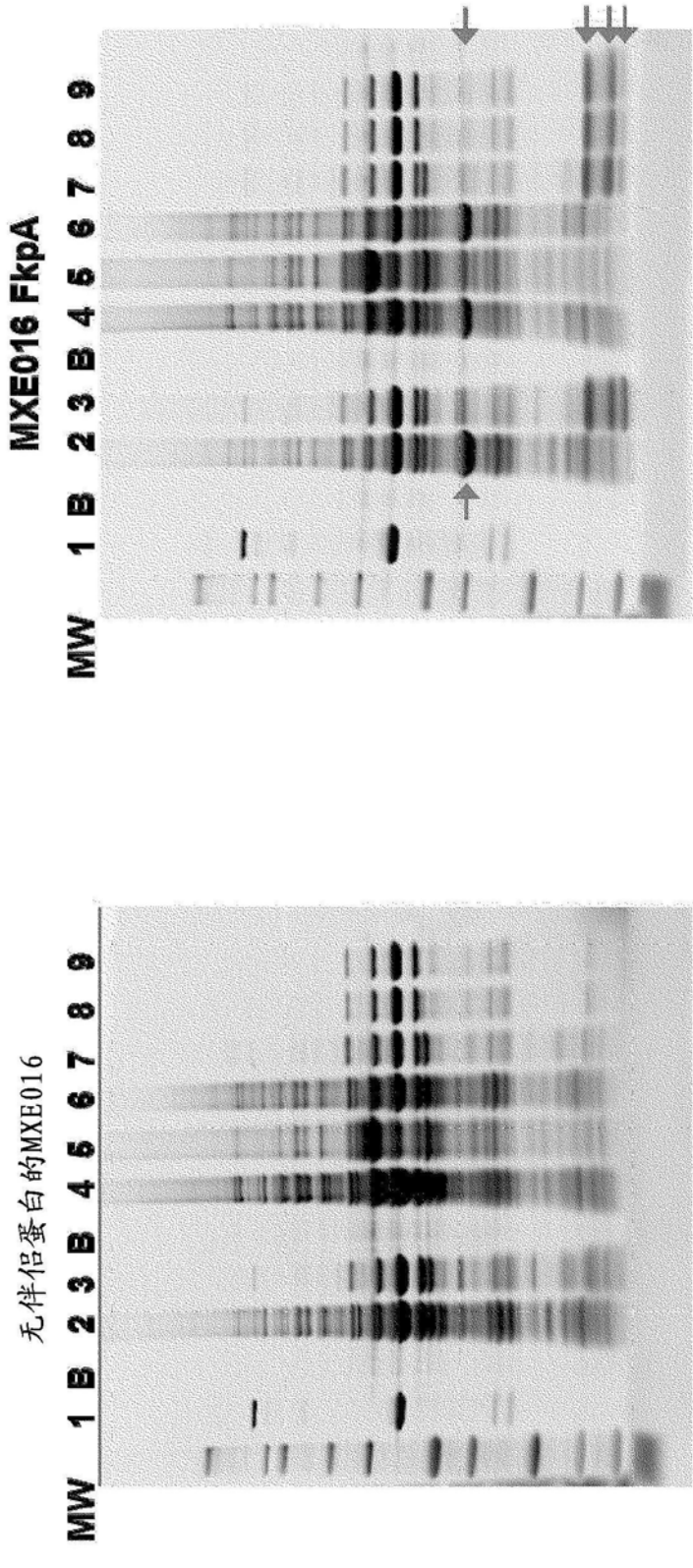


图4

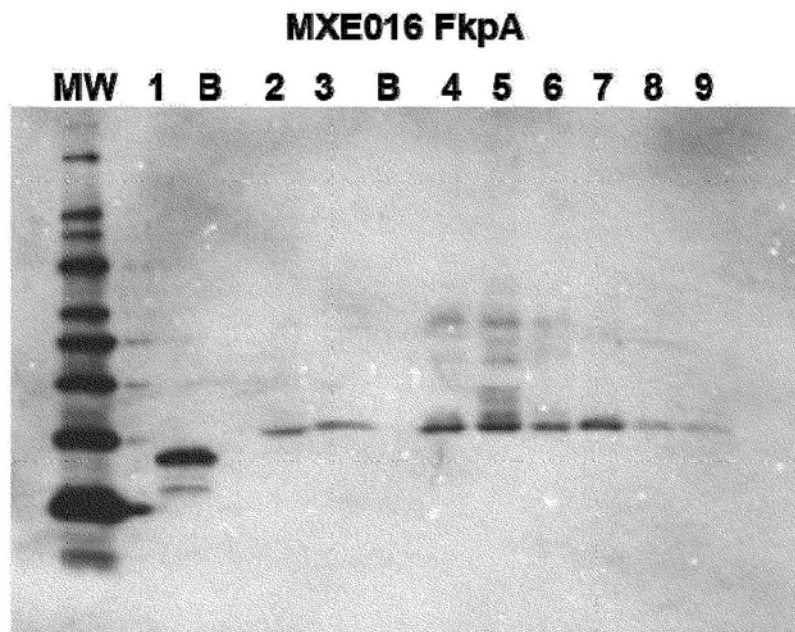
非还原条件下在 SDS-PAGE 染色凝胶上进行电泳的来自 20L 批次的初步回收



- 1 - X Fab'标准;
- 2 - 30°C 小规模提取物;
- 3 - 60°C 小规模提取物;
- 4 - 重相的上清液;
- 5 - 轻相
- 6 - 缓冲液添加后;
- 7 - 提取后;
- 8 - 提取物离心后
- 9 - 过滤后

图5

20 L 中试规模批次在非还原条件下的 Western 印迹



1 - His-标记阳性对照(DsbC)

2 - 30°C 小规模提取物

3 - 60°C 小规模提取物

4 - 重相的上清液

5 - 轻相

6 - 缓冲液添加后

7 - 提取后

8 - 提取物离心后

9 - 过滤后

图6

不同基因中的突变

野生型ptr (蛋白酶III) 5' (SEQ ID NO 81和82)

```

      *   M   P   R   S   T   W   F   K   A   L   LLL   V
TGA ATGCCC CGC AGC ACC TGG TTC AAA GCA TTA TTG TTG TTA GTT

      A   L   W   A   P   L   S
GCC CTT TGG GCA CCC TTA AGT

```

突变的Δ ptr (蛋白酶III) 5' (SEQ ID NO 79和 80)

```

EcoR I
~~~~~
      *   I   P   R   S   T   W   F   K   A   L   LLL   V
TGA ATTCCC CGC AGC ACC TGG TTC AAA GCA TTA TTG TTG TTA GTT

Ase I           Ase I
                ~~~~~
      A   L   W   A   H   *   C
GCC CTT TGG GCA CAT TAA TGT

```

图7A

野生型 Tsp 5' (SEQ ID NO 75 和 76)

```

      M   N   M   F   F   R   L   T   A   L   A   G   L   L   A
ATGAAC ATGTTT TTTAGG CTT ACC GCG TTA GCT GGC CTG CTT GCA

      I   A   G   Q   T   F   A
ATA GCA GGC CAG ACC TTC GCT

```

突变的Δ Tsp 5' (SEQ ID NO 77和78)

```

EcoR I
~~~~~
      M   N   S   F   L   G   L   P   R   *   L   A   C   L   Q
ATGAAT TCGTTT TTA GGC TTA CCG CGT TAG CTG GCC TGC TTG CAA

Ase I           Ase I
                ~~~~~
      *   Q   A   R   H   *   L
TAG CAG GCC AGA CAT TAA TTG

```

图7B

野生型 **DegP**

202 D A A I N R G N **S** G G
 949 GAT GCA GCG ATC AAC CGT GGT AAC **TCC** GGT GGT

突变的 **DegP S210A**

Ase I *Ase I*
 202 D A A I N R G N **A** G G
 949 GAT GCA GCG **ATT AAT** CGT GGT AAC **GCC** GGT GGT

图7C

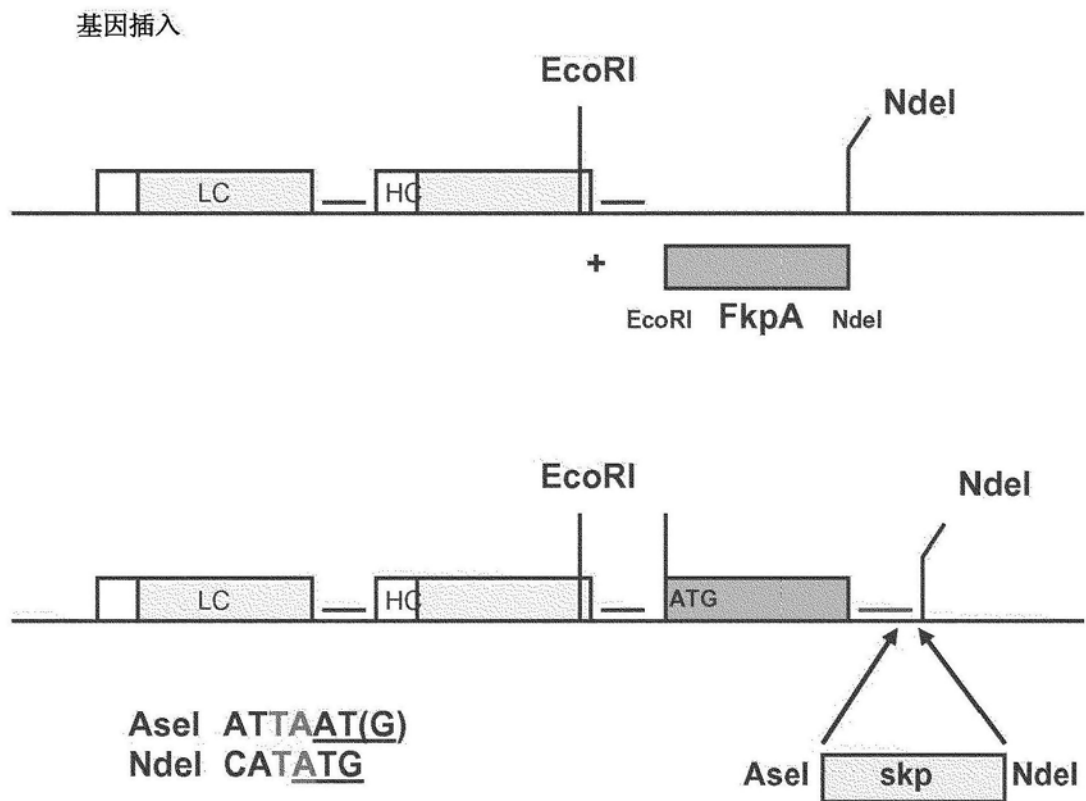


图7D

SEQ ID NO:1 为在起始密码子上游包含 6 个核苷酸 ATGAAC 的野生型 Tsp 基因的 DNA 序列。

```
ATGAACATGTTTTTTAGGCTTACCGCGTTAGCTGGCCTGCTTGCAATAGCAGGCCAGACCTTCGCTGTAGAA
GATATCACGCGTGCTGATCAAATTCCGGTATTAAAGGAAGAGACGCAGCATGCGACGGTAAGTGAGCGCGTA
ACGTCGCGCTTCACCCGTTCTCATTATCGCCAGTTTCGACCTCGATCAGGCATTTTCGGCCAAAATCTTTGAC
CGCTACCTGAATCTGCTCGATTACAGCCACAACGTGCTGCTGGCAAGCGATGTTGAACAGTTCGCGAAAAAG
AAAACCGAGTTAGGCGATGAACTGCGTTCAGGCAAACCTCGACGTTTTCTACGATCTCTACAATCTGGCGCAA
AAGCGCCGTTTTTGAGCGTTACCAGTACGCTTTGTCTGGTACTGGAAAAGCCGATGGATTTACCGGCAACGAC
ACTTATAACCTTGACCGCAGCAAAGCGCCCTGGCCGAAAAACGAGGCTGAGTTGAACGCGCTGTGGGACAGT
AAAGTCAAATTCGACGAGTTAAGCCTGAAGCTGACAGGAAAAACGGATAAAGAAATTCGTGAAACCCCTGACT
CGCCGCTACAAATTTGCCATTTCGTCTGCTGGCGCAAACCAACAGCGAAGATGTTTTCTCGCTGGCAATGACG
GCGTTTTCGCGCTGAAATCGACCCGCATACCAACTATCTTTCCCGCGTAATACCGAACAGTTCAACACTGAA
ATGAGTTTGTCTGCTGGAAGGTATTGGCGCAGTGCTGCAAATGGATGATGACTACACCGTTATCAATTCGATG
GTGGCAGGTGGTCCGGCAGCGAAGAGTAAAGCTATCAGCGTTGGTGACAAAATTGTCGGTGTGGTCAAACA
GGCAAGCCGATGGTTGACGTGATTGGCTGGCGTCTTGATGATGTGGTTGCCTTAATTAAAGGGCCGAAGGGC
AGTAAAGTTTCGTCTGGAAATTTTACCTGCTGGTAAAGGGACCAAGACCCGTACTGTAACGTTGACCCGTGAA
CGTATTCGTCTCGAAGACCGCGCGGTTAAAATGTCTGGTGAAGACCGTCGGTAAAGAGAAAGTCGGCGTGCTG
GATATTCGGGCTTCTATGTGGGTTTGACAGACGATGTCAAAGTGCAACTGCAGAACTGGAAAAACAGAAT
GTCAGCAGCGTCATCATCGACCTGCGTAGCAATGGCGGTGGGGCGTTAACTGAAGCCGTATCGCTCTCCGGT
CTGTTTATTCTGCGGGTCCCATTGTTTCAGGTCCGCGATAACAACGGCAAGGTTTCGTGAAGATAGCGATACC
GACGGACAGGTTTTCTATAAAGGCCCGCTGGTGGTGCTGGTTGACCGCTTCAGTGCTTCGGCTTCAGAAATC
TTTGCCGCGGCAATGCAGGATTACGGTCGTGCGCTGGTTGTGGGTGAACCGACGTTTGGTAAAGGCACCGTT
CAGCAATACCGTTCATTGAACCGTATTTACGATCAGATGTTACGTCCTGAATGGCCAGCGCTGGGTTCTGTG
CAGTACACGATCCAGAAATCTATCGCGTTAACGGCGGCAGTACGCAACGTAAAGGCGTAACGCCAGACATC
ATCATGCCGACGGGTAATGAAGAAACGGAAACGGGTGAGAAATTCGAAGATAACGCGCTGCCGTGGGATAGC
ATTGATGCCGCGACTTATGTGAAATCAGGAGATTTAACGGCCTTTGAACCGGAGCTGCTGAAGGAACATAAT
GCGCGTATCGCGAAAGATCCTGAGTCCAGAACATCATGAAGGATATCGCGCGCTTCAACGCTATGAAGGAC
AAGCGCAATATCGTTTTCTCTGAATTACGCTGTGCGTGAGAAAGAGAATAATGAAGATGATGCGACGCGTCTG
GCGCGTTTGAACGAACGCTTTAAACGCGAAGGTAAACCGGAGTTGAAGAACTGGATGATCTACCGAAAGAT
TACCAGGAGCCGGATCCTTATCTGGATGAGACGGTGAATATCGCACTCGATCTGGCGAAGCTTGAAAAAGCC
AGACCCGCGGAACAACCCGCTCCCGTCAAGTAA
```

图8A

SEQ ID NO:2 为野生型 Tsp 蛋白的氨基酸序列。

```
MFFRLTALAGLLAIAGQTFAVEDITRADQIPVLKEETQHATVSESVTSRFRSHYRQFDLDQAFSAKIFDRY
LNLLDYSHNVLLASDVEQFAKKKTELGDELRSGLDVFYDLYNLAQKRRFERYQYALSVLEKPMDFGTNDY
NLDRSKAPWPKNEAELNALWDSKVKFDELSTLTKGTDKEIRETLTRRYKFAIRRLAQTNSEDVFSLAMTAF
AREIDPHTNYLSRPNTEQFNTEMSLSLEGIGAVLQMDDDYTVINSMVAGGPAAKSKAISVGDKIVGVGQTKG
PMVDVIGWRLDDVVALIKGPKGSKVRLEILPAGKGTKTRTVTLTRERIRLEDRAVKMSVKTGKEKVGVLDI
PGFYVGLTDDVKVQLQKLEKQNVSSVIDLRSNGGGALTEAVSLSGLFIPAGPIVQVRDNNGVKVEDSDTDG
QVFYKGPLVVLVDRFSASASEIFAAMQDYGRALVVGEPFTFGKGTQQYRSLNRIYDQMLRPEWPALGVSQY
TIQKFYRVNGGSTQRKGVTPDIIMPTGNEETETGEKFEDNALPWDSIDAATYVKSGDLTAFEPELLKEHNAR
IAKDPEFQNMKDIARFNAMKDKRNIVSLNYAVREKENNEDDARLARLNERFKREGKPELKKLDDLPKDYQ
EPDPYLDETVNIALDLAKLEKARPAEQPAPVK*
```

图8B

SEQ ID NO:3 为在起始密码子上游包含 6 个核苷酸 ATGAAT 的突变敲除 Tsp 基因的 DNA 序列。

```
ATGAATTCGTTTTTAGGCTTACCGCGTTAGCTGGCCTGCTTGCAATAGCAGGCCAGACATTAATTGTAGAAG
ATATCACGCGTGCTGATCAAATTCGGGTATTAAAGGAAGAGACGCAGCATGCGACGGTAAGTGAGCGCGTAA
CGTCGCGCTTACCCGTTCTCATTATCGCCAGTTCGACCTCGATCAGGCATTTTCGGCCAAAATCTTTGACC
GCTACCTGAATCTGCTCGATTACAGCCACAACGTGCTGCTGGCAAGCGATGTTGAACAGTTCGCGAAAAAGA
AAACCGAGTTAGGCGATGAAGTGCCTTCAGGCAAACTCGACGTTTTCTACGATCTCTACAATCTGGCGCAAA
AGCGCCGTTTTTGAGCGTTACCAGTACGCTTTGTGCGTACTGGAAGGCCGATGGATTTACCGGCAACGACA
CTTATAACCTTGACCGCAGCAAAGCGCCCTGGCCGAAAAACGAGGCTGAGTTGAACGCGCTGTGGGACAGTA
AAGTCAAATTCGACGAGTTAAGCCTGAAGCTGACAGGAAAAACGGATAAAGAAATTCGTGAAACCCCTGACTC
GCCGCTACAAATTTGCCATTCTGCTGCTTGGCGCAAACCAACAGCGAAGATGTTTTCTCGCTGGCAATGACGG
CGTTTGCGCGTGAAATCGACCCGCATACCAACTATCTTTCCCCGCGTAATACCGAACAGTTCAACACTGAAA
TGAGTTTGTGCTGGAAGGTATTGGCGCAGTGCTGCAAATGGATGATGACTACACCGTTATCAATTCGATGG
TGGCAGGTGGTCCGGCAGCGAAGAGTAAAGCTATCAGCGTTGGTGACAAAATTGTCGGTGTGGTCAAACAG
GCAAGCCGATGGTTGACGTGATTGGCTGGCGTCTTGATGATGTGGTTGCCTTAATTAAAGGGCCGAAGGGCA
GTAAAGTTCGTCTGAAAATTTTACCTGCTGGTAAAGGGACCAAGACCCGTAAGTGAACGTTGACCCGTGAAC
GTATTCGTCTCGAAGACCGCGCGGTTAAAATGTCGGTGAAGACCGTCCGTAAGAGAAAGTCGGCGTGCTGG
ATATTCGGGGCTTCTATGTGGGTTTGACAGACGATGTCAAAGTGCAACTGCAGAACTGGAAAAACAGAATG
TCAGCAGCGTCATCATCGACCTGCGTAGCAATGGCGGTGGGGCGTTAACTGAAGCCGTATCGCTCTCCGGTC
TGTTTTATTCTGCGGGTCCCATTTGTTTCAAGTCCGCGATAACAACGGCAAGGTTTCGTGAAGATAGCGATACCG
ACGGACAGGTTTTCTATAAAGGCCCGCTGGTGGTGCTGGTTGACCGCTTCAGTGCTTCGGCTTCAGAAATCT
TTGCCGCGGAATGCAGGATTACGGTCGTGCGCTGGTTGTGGGTGAACCGACGTTTGGTAAAGGCACCGTTC
AGCAATACCGTTCATTGAACCGTATTTACGATCAGATGTTACGTCTGAATGGCCAGCGCTGGGTTCTGTGC
AGTACACGATCCAGAAATTCATCGCGTTAACGGCGGCAGTACGCAACGTAAAGGCGTAACGCCAGACATCA
TCATGCCGACGGGTAATGAAGAAACGGAACGGGTGAGAAATTCGAAGATAACGCGCTGCCGTGGGATAGCA
TTGATGCCGCGACTTATGTGAAATCAGGAGATTTAACGGCCTTTGAACCGGAGCTGCTGAAGGAACATAATG
CGCGTATCGCGAAAGATCCTGAGTTCCAGAACATCATGAAGGATATCGCGCGCTTCAACGCTATGAAGGACA
AGCGCAATATCGTTTTCTCTGAATTACGCTGTGCGTGAGAAAGAGAATAATGAAGATGATGCGACGCGTCTGG
CGCGTTTGAACGAACGCTTTAAACGCGAAGGTAAACCGGAGTTGAAGAAACTGGATGATCTACCGAAAAGATT
ACCAGGAGCCGGATCCTTATCTGGATGAGACGGTGAATATCGCACTCGATCTGGCGAAGCTTGAAAAAGCCA
GACCCGCGGAACAACCCGCTCCCGTCAAGTAA
```

SEQ ID NO:4 野生型蛋白酶 III 基因的 DNA 序列。

```
ATGCCCCGAGCACCTGGTTCAAAGCATTATTGTTGTTAGTTGCCCTTTGGGCACCCTTAAGTCAGGCAGAA
ACGGGATGGCAGCCGATTCAGGAAACCATCCGTAAAAGTGATAAAGATAACCGCCAGTATCAGGCTATACGT
CTGGATAACGGTATGGTGGTCTTGCTGGTTTTCTGATCCGCAGGCAGTTAAATCGCTCTCGGCGCTGGTGGTG
CCCGTTGGGTGCTGGAAGATCCCGAGGCGTACCAGGGGCTGGCACATTACCTTGAACATATGAGTCTGATG
GGGTCGAAAAAGTACCCGCAGGCTGACAGTCTGGCCGAATATCTCAAAATGCACGGCGGTAGTCACAATGCC
AGCACTGCGCCGTATCGCACGGCTTTCTATCTGGAAGTTGAGAACGACGCTTGCCTGGTGCGGTAGACCGC
CTGGCCGATGCTATTGCTGAACCTTTGCTCGACAAGAAATATGCCGAACGTGAGCGTAATGCGGTGAACGCT
GAATTAACCATGGCGCGTACGCGTGACGGGATGCGCATGGCACAGGTGAGCGCAGAAACCATTAACCCGGCA
CACCCCGGTTCAAAGTTTTCTGGTGGTAACCTCGAACTTTAAGCGACAAACCTGGTAATCCGGTGCAGCAG
GCGCTGAAAGATTTCCACGAGAAGTACTATTCCGCCAATTTGATGAAGGCGGTTATTTACAGTAATAAACCG
CTGCCGGAGTTGGCAAAAAATGGCGGCGGACACCTTTGGTTCGCGTGCCGAACAAAGAGAGCAAAAAACCGGAA
ATCACCGTGCCGGTAGTCACCGACGCGCAAAAGGGCATTATCATTACATTACGTCCCTGCGCTGCCGCGTAAA
GTGTTGCGCGTTGAGTTTCGCATCGATAACAACCTCAGCGAAGTTCCGTAGTAAAACCGATGAATTGATTACC
TATCTGATTGGCAATCGCAGCCCAGGTACACTTTCTGACTGGCTGCAAAAGCAGGGATTAGTTGAGGGCATT
```

图8C

GATAACAATACTTCGATGAACTGGCGAATGTGCTGGATATCGACTTCCGTTATCCGTCGATCACCCGTGAT
ATGGATTACGTCGAATGGCTGGCAGATACCATGATTCCGCTTCTGTTGAGCATAACGCTGGATGCGTCAAT
ATTGCCGATCGGTACGATGCTAAAGCAGTAAAGGAACGTCTGGCGATGATGACGCCGAGAATGCGCGTATC
TGGTATATCAGCCCCGAAAGAGCCGCACAAACAAACGGCTTACTTTGTTCGATGCGCCGTATCAGGTCGATAAA
ATCAGCGCACAACTTTCGCCGACTGGCAGAAAAAGCCGCCGACATTGCGCTCTCTTTGCCAGAGCTTAAC
CCTTATATTCCTGATGATTTCTCGCTGATTAAGTCAGAGAAGAAATACGACCATCCAGAGCTGATTGTTGAT
GAGTCGAATCTGCGCGTGGTGTATGCGCCAAGCCGTTATTTTGCCAGCGAGCCCAAAGCTGATGTCAGCCTG
ATTTTGCGTAATCCGAAAGCCATGGACAGCGCCCGCAATCAGGTGATGTTTGCGCTCAATGATTATCTCGCA
GGGCTGGCGCTTGATCAGTTAAGCAACCAGGCGTCGGTTGGTGGCATAAGTTTTTCCACCAACGCTAACAAC
GGCCTTATGGTTAATGCTAATGGTTACACCCAGCGTCTGCCGAGCTGTTCCAGGCATTGCTCGAGGGGTAC
TTTAGCTATACCGCTACGGAAGATCAGCTTGAGCAGGCGAAGTCCTGGTATAACCAGATGATGGATTCCGCA
GAAAAGGGTAAAGCGTTTGAGCAGGCGATTATGCCCGCGCAGATGCTCTCGCAAGTGCCGTACTTCTCGCGA
GATGAACGGCGTAAATTTTGGCCTCCATTACGTTGAAAGAGGTGCTGGCCTATCGCGACGCCTTAAATCA
GGGGCTCGACCAGAGTTTATGGTTATCGGCAACATGACCGAGGCCCAGGCAACAACGCTGGCACGCGATGTG
CAAAAACAGTTGGGCGCTGATGGTTCAGAGTGGTGTGCAAAACAAAGATGTAGTGGTCGATAAAAAACAATCC
GTCATCTTTGAAAAAGCCGGTAACAGCACCGACTCCGCACTGGCAGCGGTATTTGTACCGACTGGCTACGAT
GAATACACCAGCTCAGCCTATAGCTCTCTGTTGGGGCAGATCGTACAGCCGTGGTTCTACAATCAGTTGCGT
ACCGAAGAACAATTGGGCTATGCCGTGTTTGCCTTCCAATGAGCGTGGGGCGTCAGTGGGGCATGGGCTTC
CTTTTGCAAGCAATGATAAACAGCCTTCTTCTGTGGGAGCGTTACAAGGCGTTTTTCCCAACCGCAGAG
GCAAAATTGCGAGCGATGAAGCCAGATGAGTTTGCGCAATCCAGCAGGCGGTAATTACCCAGATGCTGCAG
GCACCGCAAACGCTCGGCGAAGAAGCATCGAAGTTAAGTAAAGATTTCGATCGCGGCAATATGCGCTTCGAT
TCGCGTGATAAAATCGTGCCCCAGATAAACTGCTGACGCCGCAAAAACCTTGCTGATTTCTTCCATCAGGCG
GTGGTCGAGCCGCAAGGCATGGCTATTCTGTGCGAGATTTCCGGCAGCCAGAACGGGAAAGCCGAATATGTA
CACCTGAAGGCTGGAAAGTGTGGGAGAACGTGAGCGGTTGCAGCAACAATGCCCTGATGAGTGAAAAG
AATGAGTGA

SEQ ID NO:5 为野生型蛋白酶 III 蛋白的氨基酸序列。

MPRSTWFKALLLLVALWAPLSQAETGWQPIQETIRKSDKDNROYQAIRLDNGMVVLLVSDPQAVKSLSALVV
PVGSLDPEAYQGLAHYLEHMSLMGSKKYPQADSLAEYLKMHGGSHNASTAPYRTAFYLEVENDALPGAVDR
LADAI AEPLLDKKYAERERNAVNAELTMARTRDGMMAQVSAETINPAHFGSKFSGGNLETLSDKPGNPVQQ
ALKDFHEKYYSANLMKAVIYSNKPLPELAKMAADTFGRVPNKESKKPEITVPVVTDAQKGI I IHVVPALPRK
VLRVEFRIDNNSAKFRSKTDELITYLIGNRSPGTLSDWLQKQGLVEGISANSDFIVNGNSGVLAISASLTDK
GLANRDQVVAIFSYLNLLEKIDKQYFDELANVLIDFRYPSITRDMDYVEWLADTMIRVPVEHTLDAVN
IADRYDAKAVKERLAMMTPQNARIWYISPKEPHNKTAIFVDAPYQVDKISAQTFADWQKKAADIALSLPELN
PYIPDDFSLIKSEKKYDHP ELIVDES NLRVYAPSRYFASEPKADVSLILRNPKAMDSARNQVMFALNDYLA
GLALDQLSNQASVGGISFSTNANNGLMVNANGYTQRLPQLFQALLEGYFSYTATEDQLEQAKSWYNQMMDSA
EKGKAFEQAIMPAQMLSQVPYFSRDERRKILPSITLKEVLAYRDALKSGARPEFMVIGNMTEAQATT LARDV
QKQLGADGSEWCRNKDVVDKKQSVIFEKAGNSTDSALAAVFVPTGYDEYTSAYSSLLGQIVQPFYFNQLR
TEEQLGYAVFAFPMSVGRQWGMGFLLOSNDKQPSFLWERYKAFFPTAEAKLRAMKPDEFAQIQQAVITQMLQ
APQTLGEEASKLSKDFDRGNMRFDSRDKIVAQIKLLTPQKLADFFHQAVVEPQGMAILSQISGSQNGKAEYV
HPEGWKVWENVSA LQQTMPLMSEKNE*

图8C续

SEQ ID NO:6 为突变敲除蛋白酶 III 基因的 DNA 序列。

ATTCCCCGCAGCACCTGGTTCAAAGCATTATTGTTGTTAGTTGCCCTTTGGGCACATTAATGTCAGGCAGAA
ACGGGATGGCAGCCGATTACAGGAAACCATCCGTAAAAGTGATAAAGATAACCGCCAGTATCAGGCTATACGT
CTGGATAACGGTATGGTGGTCTTGCTGGTTTCTGATCCGCAGGCAGTTAAATCGCTCTCGGCGCTGGTGGTG
CCCGTTGGGTCTGCTGGAAGATCCCGAGGCGTACCAGGGGCTGGCACATTACCTTGAACATATGAGTCTGATG
GGGTGCAAAAAGTACCCGCAGGCTGACAGTCTGGCCGAATATCTCAAAATGCACGGCGGTAGTCACAATGCC
AGCACTGCGCCGTATCGCACGGCTTTCTATCTGGAAGTTGAGAACGACGCCTTGCCTGGTGCGGTAGACCGC
CTGGCCGATGCTATTGCTGAACCTTTGCTCGACAAGAAATATGCCGAACGTGAGCGTAATGCGGTGAACGCT
GAATTAACCATGGCGCGTACGCGTGACGGGATGCGCATGGCACAGGTCAGCGCAGAAACCATTAACCCGGCA
CACCCCGGTTCAAAGTTTTTCTGGTGGTAACCTCGAAACTTTAAGCGACAAACCTGGTAATCCGGTGCAGCAG
GCGCTGAAAGATTTCCACGAGAAGTACTATTCCGCCAATTTGATGAAGGCGGTTATTTACAGTAATAAACCG
CTGCCGGAGTTGGCAAAAATGGCGGCGGACACCTTTGGTTCGCGTGCCGAACAAAGAGAGCAAAAAACCGGAA
ATCACCGTGCCGGTAGTCACCGACGCGCAAAAGGGCATTATCATTACATTACGTCCCTGCGCTGCCGCGTAAA
GTGTTGCGCGTTGAGTTTCGCATCGATAACAACCTCAGCGAAGTTCCGTAGTAAAACCGATGAATTGATTACC
TATCTGATTGGCAATCGCAGCCCAGGTACACTTTCTGACTGGCTGCAAAAGCAGGGATTAGTTGAGGGCATT
AGCGCCAACCTCCGATCCTATCGTCAACGGCAACAGCGGCGTATTAGCGATCTCTGCGTCTTTAACCGATAAA
GGCCTGGCTAATCGCGATCAGGTTGTGGCGGCAATTTTTAGCTATCTCAATCTGTTACGTGAAAAAGGCATT
GATAACAATACTTCGATGAACCTGGCGAATGTGCTGGATATCGACTTCCGTTATCCGTCGATCACCCGTGAT
ATGGATTACGTCGAATGGCTGGCAGATACCATGATTTCGCGTTCCGTGTTGAGCATACGCTGGATGCAGTCAAT
ATTGCCGATCGGTACGATGCTAAAGCAGTAAAGGAACGTCTGGCGATGATGACGCCGAGAATGCGCGTATC
TGGTATATCAGCCCCGAAAGAGCCGCAACAACAAACGGCTTACTTTGTCGATGCGCCGTATCAGGTCGATAAA
ATCAGCGCACAAACTTTTCGCCGACTGGCAGAAAAAAGCCGCCGACATTGCGCTCTCTTTGCCAGAGCTTAAC
CCTTATATTCTGATGATTTCTCGCTGATTAAGTCAGAGAAGAAATACGACCATCCAGAGCTGATTGTTGAT
GAGTCGAATCTGCGCGTGGTGTATGCGCCAAGCCGTTATTTTGCCAGCGAGCCCAAAGCTGATGTCAGCCTG
ATTTTGCGTAATCCGAAAGCCATGGACAGCGCCCGCAATCAGGTGATGTTTGCGCTCAATGATTATCTCGCA
GGGCTGGCGCTTGATCAGTTAAGCAACCAGGCGTCGTTGGTGGCATAAGTTTTTCCACCAACGCTAACAAAC
GGCCTTATGGTTAATGCTAATGGTTACACCCAGCGTCTGCCGACGCTGTTCCAGGCATTGCTCGAGGGGTAC
TTTAGCTATACCGCTACGGAAGATCAGCTTGAGCAGGCGAAGTCTGGTATAACCAGATGATGGATTCCGCA
GAAAAGGGTAAAGCGTTTGAGCAGGCGATTATGCCCGCGCAGATGCTCTCGCAAGTGCCGTACTTCTCGCGA
GATGAACGGCGTAAAATTTTGCCCTCCATTACGTTGAAAGAGGTGCTGGCCTATCGCGACGCCTTAAAATCA
GGGGCTCGACCAGAGTTTATGGTTATCGGCAACATGACCGAGGCCAGGCAACAACGCTGGCACGCGATGTG
CAAAAACAGTTGGGCGCTGATGGTTCAGAGTGGTGTGCAAAACAAAGATGTAGTGGTCGATAAAAAACAATCC
GTCATCTTTGAAAAAGCCGGTAACAGCACCGACTCCGCACTGGCAGCGGTATTTGTACCGACTGGCTACGAT
GAATACACCAGCTCAGCCTATAGCTCTCTGTTGGGGCAGATCGTACAGCCGTGGTTCTACAATCAGTTGCGT
ACCGAAGAACAATTGGGCTATGCCGTGTTTGCCTTTCCAATGAGCGTGGGGCGTCAGTGGGGCATGGGCTTC
CTTTTGCAAAGCAATGATAAACAGCCTTCATTCTTGTGGGAGCGTTACAAGGCGTTTTTCCCAACCGCAGAG
GCAAAATTGCGAGCGATGAAGCCAGATGAGTTTGCGCAATCCAGCAGGCGGTAATTACCCAGATGCTGCAG
GCACCGCAAACGCTCGGCGAAGAAGCATCGAAGTTAAGTAAAGATTTTCGATCGCGGCAATATGCGCTTCGAT
TCGCGTGATAAAATCGTGGCCAGATAAACTGCTGACGCCGCAAAAACCTTCTGATTTCTTCCATCAGGCG
GTGGTCGAGCCGCAAGGCATGGCTATTCTGTGCGAGATTTCCGGCAGCCAGAACGGGAAAGCCGAATATGTA
CACCTGAAGGCTGGAAAGTGTGGGAGAACGTCAGCGCGTTGCAGCAAACAATGCCCCGTGATGAGTGAAAAG
AATGAGTGA

图8D

SEQ ID NO:7 为野生型 DegP 基因的 DNA 序列。

```
ATGAAAAAACCACATTAGCACTGAGTGCCTGGCTCTGAGTTTAGGTTTGGCGTTATCTCCGCTCTCTGCA
ACGGCGGCTGAGACTTCTTCAGCAACGACAGCCCAGCAGATGCCAAGCCTTGCACCGATGCTCGAAAAGGTG
ATGCCTTCAGTGGTCAGCATTAAACGTAGAAGGTAGCACAAACCGTTAATACGCCGCGTATGCCGCGTAATTTT
CAGCAGTTCTTCGGTGATGATTCTCCGTTCTGCCAGGAAGGTTCTCCGTTCCAGAGCTCTCCGTTCTGCCAG
GGTGGCCAGGGCGGTAATGGTGGCGGCCAGCAACAGAAATTCATGGCGCTGGGTTCGGGCGTCATCATTGAT
GCCGATAAAGGCTATGTCGTCACCAACAACCACGTTGTTGATAACGCGACGGTCATTAAAGTTCAACTGAGC
GATGGCCGTAAGTTCGACGCGAAGATGGTTGGCAAAGATCCGCGCTCTGATATCGCGCTGATCCAAATCCAG
AACCCGAAAAACCTGACCGCAATTAAGATGGCGGATTCTGATGCACTGCGCGTGGGTGATTACACCGTAGCG
ATTGGTAACCCGTTTGGTCTGGGCGAGACGGTAACTTCCGGGATTGTCTCTGCGCTGGGGCGTAGCGGCCTG
AATGCCGAAAACTACGAAAACTTCATCCAGACCGATGCAGCGATCAACCGTGGTAACCTCCGGTGGTGCGCTG
GTAAACCTGAACGGCGAAGTATCGGTATCAACACCGCGATCCTCGCACCGGACGGCGGCAACATCGGTATC
GGTTTTGCTATCCCGAGTAACATGGTGAAAAACCTGACCTCGCAGATGGTGGAATACGGCCAGGTGAAACGC
GGTGAGCTGGGTATTATGGGGACTGAGCTGAACTCCGAACCTGGCGAAAGCGATGAAAGTTGACGCCAGCGC
GGTGCTTTCGTAAGCCAGGTTCTGCCTAATTCCTCCGCTGCAAAAGCGGCATTAAAGCGGGTGATGTGATC
ACCTCACTGAACGGTAAGCCGATCAGCAGCTTTGCCGCACTGCGTGCTCAGGTGGGTACTATGCCGGTAGGC
AGCAAACTGACCCTGGGCTTACTGCGCGACGGTAAGCAGGTTAAGTGAACCTGGAACCTGCAGCAGAGCAGC
CAGAATCAGGTTGATTCCAGCTCCATCTTCAACGGCATTGAAGGCGCTGAGATGAGCAACAAAGGCAAAGAT
CAGGGCGTGGTAGTGAACAACGTGAAAACGGGCACTCCGGCTGCGCAGATCGGCCTGAAGAAAGGTGATGTG
ATTATTGGCGCGAACCAGCAGGCAGTGAAAAACATCGCTGAACTGCGTAAAGTTCTCGACAGCAAACCGTCT
GTGCTGGCACTCAACATTCAGCGCGGCGACAGCACCATCTACCTGTTAATGCAGTAA
```

SEQ ID NO:8 为野生型 DegP 蛋白的氨基酸序列。

```
MKKTTLALSALSLGLALSPLSATAAETSSATTAQQMPSLAPMLEKVMPSVVSINVEGSTTVNTPRMPRNF
QQFFGDDSPFCQEGSPFQSSPFCQGGQGGNGGGQQQKFMALGSGVIIDADKGYVVTNNHVVDNATVIKVL
DGRKFDKAMVGKDPKSDIALIQIQNPKNLTAIKMADSDALRVGDYTVAGNPFGLGETVTSIVSALGRSGL
NAENYENFIQTDAAINRGNSSGALVNLNGLIGINTAILAPDGGNIGIGFAIPSNMVKNLTSQMVEYGQVKR
GELGIMGTELNSELAKAMKVDAQRGAFVSQVLPNSSAAKAGIKAGDVITSLNGKPISSFAALRAQVGTMPVG
SKLTGLLLRDGKQVNVNLELQSSQNQVDSSSIFNGIEGAEMSNKGDQGVVNVNVTGTGTPAAQIGLKKGDV
IIGANQQAVKNIAELRKVLDSKPSVLALNIQRGDSTIYLLMQ
```

SEQ ID NO:9 为突变的 DegP 基因的 DNA 序列。

```
ATGAAAAAACCACATTAGCACTGAGTGCCTGGCTCTGAGTTTAGGTTTGGCGTTATCTCCGCTCTCTGCA
ACGGCGGCTGAGACTTCTTCAGCAACGACAGCCCAGCAGATGCCAAGCCTTGCACCGATGCTCGAAAAGGTG
ATGCCTTCAGTGGTCAGCATTAAACGTAGAAGGTAGCACAAACCGTTAATACGCCGCGTATGCCGCGTAATTTT
CAGCAGTTCTTCGGTGATGATTCTCCGTTCTGCCAGGAAGGTTCTCCGTTCCAGAGCTCTCCGTTCTGCCAG
GGTGGCCAGGGCGGTAATGGTGGCGGCCAGCAACAGAAATTCATGGCGCTGGGTTCGGGCGTCATCATTGAT
GCCGATAAAGGCTATGTCGTCACCAACAACCACGTTGTTGATAACGCGACGGTCATTAAAGTTCAACTGAGC
GATGGCCGTAAGTTCGACGCGAAGATGGTTGGCAAAGATCCGCGCTCTGATATCGCGCTGATCCAAATCCAG
AACCCGAAAAACCTGACCGCAATTAAGATGGCGGATTCTGATGCACTGCGCGTGGGTGATTACACCGTAGCG
ATTGGTAACCCGTTTGGTCTGGGCGAGACGGTAACTTCCGGGATTGTCTCTGCGCTGGGGCGTAGCGGCCTG
AATGCCGAAAACTACGAAAACTTCATCCAGACCGATGCAGCGATTAATCGTGGTAACGCCGGTGGTGCGCTG
GTAAACCTGAACGGCGAAGTATCGGTATCAACACCGCGATCCTCGCACCGGACGGCGGCAACATCGGTATC
GGTTTTGCTATCCCGAGTAACATGGTGAAAAACCTGACCTCGCAGATGGTGGAATACGGCCAGGTGAAACGC
GGTGAGCTGGGTATTATGGGGACTGAGCTGAACTCCGAACCTGGCGAAAGCGATGAAAGTTGACGCCAGCGC
GGTGCTTTCGTAAGCCAGGTTCTGCCTAATTCCTCCGCTGCAAAAGCGGCATTAAAGCGGGTGATGTGATC
ACCTCACTGAACGGTAAGCCGATCAGCAGCTTTGCCGCACTGCGTGCTCAGGTGGGTACTATGCCGGTAGGC
AGCAAACTGACCCTGGGCTTACTGCGCGACGGTAAGCAGGTTAAGTGAACCTGGAACCTGCAGCAGAGCAGC
CAGAATCAGGTTGATTCCAGCTCCATCTTCAACGGCATTGAAGGCGCTGAGATGAGCAACAAAGGCAAAGAT
CAGGGCGTGGTAGTGAACAACGTGAAAACGGGCACTCCGGCTGCGCAGATCGGCCTGAAGAAAGGTGATGTG
ATTATTGGCGCGAACCAGCAGGCAGTGAAAAACATCGCTGAACTGCGTAAAGTTCTCGACAGCAAACCGTCT
GTGCTGGCACTCAACATTCAGCGCGGCGACAGCACCATCTACCTGTTAATGCAGTAA
```

图8E

SEQ ID NO:10 为突变的 DegP 蛋白的氨基酸序列。

MKKTTLALSALALSGLALSPLSATAAETSSATTAQQMPSLAPMLEKVMPSVVSINVEGSTTVNTPRMPRNF
QQFFGDDSPFCQEGSPFQSSPFCQGGQGGNGGGQQQKFMALGSGVIIDADKGYVVTNNHVVDNATVIKVQLS
DGRKFDAMVGKDPKSDIALIQIQNPKNLTAIKMADSDALRVGDYTVAGNPFGLGETVTSIVSALGRSGL
NAENYENFIQTDAAINRGNAGGALVNLNGELIGINTAILAPDGGNIGIGFAIPSNMVKNLTSQMVEYGQVKR
GELGIMGTELNSELAKAMKVDAQRGAQVSVQVLPNSSAAKAGIKAGDVITSLNGKPISSFAALRAQVGTMPVG
SKLTLGLLRDQKQVNVNLELQSSQNQVDSSSIFNGIEGAEMSNKGDQGVVNVNKTGTTPAAQIGLKKGDV
IIGANQQAVKNIAELRKVLDSKPSVLALNIQRGDSTIYLLMQ

SEQ ID NO: 11 为用于包含 Ase I 限制性位点的突变的 DegP 基因的区域 5' 寡核苷酸引物的序列。

CTGCCTGCGATTTTCGCCGAACG

SEQ ID NO: 12 为用于包含 Ase I 限制性位点的突变的 DegP 基因的区域 3' 寡核苷酸引物的序列。

CGCATGGTACGTGCCACGATATCC

SEQ ID NO: 13 为用于包含 Ase I 限制性位点的突变的 Tsp 基因的区域 5' 寡核苷酸引物的序列。

GGGAAATGAACCTGAGCAAAACGC

SEQ ID NO: 14 为用于包含 Ase I 限制性位点的突变的蛋白酶 III 基因的区域 3' 寡核苷酸引物的序列。

GGGAAAGGCGGCGGAACCGCCTAG

SEQ ID NO: 15 为用于包含 Ase I 限制性位点的突变的蛋白酶 III 基因的区域 5' 寡核苷酸引物的序列。

CTACTGTGCCAGCGGTGGTAATGG

SEQ ID NO: 16 为用于包含 Ase I 限制性位点的突变的 Tsp 基因的区域 3' 寡核苷酸引物的序列。

GCATCATAATTTCTTTTACCTC

SEQ ID NO: 17 为野生型 spr 基因的 DNA 序列。

ATGGTCAAATCTCAACCGATTTTGAGATATATCTTGCGCGGGATTCCCGCGATTGCAGTAGCGGTTCTGCTT
TCTGCATGTAGTGCAAATAACACCGCAAAGAATATGCATCCTGAGACACGTGCAGTGGGTAGTGAAACATCA
TCACTGCAAGCTTCTCAGGATGAATTTGAAAACCTGGTTTCGTAATGTCGACGTAAATCGCGAATTATGGAT
CAGTATGCTGACTGGAAAGGCGTACGTTATCGTCTGGGCGGCAGCACTAAAAAGGTATCGATTGTTCTGGT
TTCGTACAGCGTACATTCGTGAGCAATTTGGCTTAGAACTCCGCGTTCGACTTACGAACAGCAGGAAATG
GGTAAATCTGTTTCCCGCAGTAATTTGCGTACGGGTGATTAGTTCTGTTCCGTGCCGGTTCAACGGGACGC
CATGTCGGTATTTATATCGGCAACAATCAGTTTGTCATGCTTCACCAGCAGTGGTGTATTATTATTTCCAGC
ATGAATGAACCGTACTGGAAGAAGCGTTACAACGAAGCACGCCGGTTCTCAGCCGCAGC

图8F

SEQ ID NO: 18 为包含作为前 26 个氨基酸残基的信号序列的野生型 *spr* 基因的氨基酸序列。

MVKSQPILRYILRGIPAI AVAVLLSACSANNTAKNMHPETRAVGSETSSLQASQDEFENLVRNVDVKSRI MD
QYADWKGVRYRLGGSTKKGIDCSGFVQRTFREQFGLLELPSTYEQQEMGKSVSRNLRTGDLVLFragSTGR
HVGIIYIGNNQFVHASTSSGVIISMNPEYWKRYNEARRVLSRS

SEQ ID NO: 19 为不具有信号序列的非突变的 *spr* 基因。

CSANNTAKNMHPETRAVGSETSSLQASQDEFENLVRNVDVKSRI MDQYADWKGVRYRLGGSTKKGIDCSGFV
QRTFREQFGLLELPSTYEQQEMGKSVSRNLRTGDLVLFragSTGRHVGIYIGNNQFVHASTSSGVIISMN
EPYWKRYNEARRVLSRS

SEQ ID NO: 20 为包含 D210A 和 H212A 突变的突变的 *OmpT* 序列。

ATGCGGGCGAAACTTCTGGAATAGTCCTGACAACCCCTATTGCGATCAGCTCTTTTGGCTTCTACCGAGACT
TTATCGTTTACTCCTGACAACATAAATGCGGACATTAGTCTTGGAACCTCTGAGCGGAAAAACAAAAGAGCGT
GTTTATCTAGCCGAAGAAGGAGGCCGAAAAGTCAGTCAACTCGACTGGAAATTCAATAACGCTGCAATTATT
AAAGGTGCAATTAATTGGGATTTGATGCCCCAGATATCTATCGGGGCTGCTGGCTGGACAACCTCTCGGCAGC
CGAGGTGGCAATATGGTCGATCAGGACTGGATGGATTCCAGTAACCCCGGAACCTGGACGGATGAAAGTAGA
CACCTGATACACAACCTCAATTATGCCAACGAATTTGATCTGAATATCAAAGGCTGGCTCCTCAACGAACCC
AATTACCGCTGGGACTCATGGCCGGATATCAGGAAAAGCCGTTATAGCTTTACAGCCAGAGGTGGTTCCTAT
ATCTACAGTTCTGAGGAGGGATTGAGAGATGATATCGGCTCCTTCCCGAATGGAGAAAGAGCAATCGGCTAC
AAACAACGTTTTTAAATGCCCTACATTGGCTTGACTGGAAGTTATCGTTATGAAGATTTTGAACCTCGGTGGC
ACATTTAAATACAGCGGCTGGGTGGAATCATCTGATAACGCTGAAGCTTATGACCCGGGAAAAAGAATCACT
TATCGCAGTAAGGTCAAAGACCAAAATTACTATTCTGTTGCAGTCAATGCAGGTATTACGTCACACCTAAC
GCAAAAGTTTATGTTGAAGGCGCATGGAATCGGGTTACGAATAAAAAAGGTAATACTTCACTTTATGATCAC
AATAATAACACTTCAGACTACAGCAAAATGGAGCAGGTATAGAAACTATAACTTCATCACTACTGCTGGT
CTTAAGTACACATTTTAA

SEQ ID NO: 21 为包含 D210A 和 H212A 突变的突变的 *OmpT* 序列。

MRALLGIVLTTPIAISSFASTETLSFTPDNINADISLGLSGKTKERVYLAEEGGRKVSQLDWKFNNAAII
KGAINWDLMPQISIGAAGWTTLGSRGNMVDQDWMSSNPGTWTDSESRHPTQLNYANEFDLNKGWLLNEP
NYRLGLMAGYQESRYSFTARGGSYIYSSEEGFRDDIGSFPNGERAIGYKQRFKMPYIGLTGSYRYEDFELGG
TFKYSGWVSSDNAEAYDPGKRITYRSKVKDQNYYSVAVNAGYYVTPNAKVYVEGAWNVRVTNKKGNTSLYDH
NNNTSDYSKNGAGIENYNFITTAGLKYTF

SEQ ID NO: 22 为突变敲除 *OmpT* 序列的核苷酸序列。

ATTCGGGCGAAACTTCTGGAATAGTCCTGACAACCCCTATTGCGATCAGCTCTTTTGGCTTCTACCGAGACT
TTATCGTTTACTCCTGACAACATAAATGCGGACATTAGTCTTGGAACCTCTGAGCGGAAAAACAAAAGAGCGT
GTTTATCTAGCCGAAGAAGGAGGCCGAAAAGTCAGTCAACTCGACTGGAAATTCAATAACGCTGCAATTATT
AAAGGTGCAATTAATTGGGATTTGATGCCCCAGATATCTATCGGGGCTGCTGGCTGGACAACCTCTCGGCAGC
CGAGGTGGCAATATGGTCGATCAGGACTGGATGGATTCCAGTAACCCCGGAACCTGGACGGATGAAAGTAGA
CACCTGATACACAACCTCAATTATGCCAACGAATTTGATCTGAATATCAAAGGCTGGCTCCTCAACGAACCC
AATTACCGCTGGGACTCATGGCCGGATATCAGGAAAAGCCGTTATAGCTTTACAGCCAGAGGTGGTTCCTAT
ATCTACAGTTCTGAGGAGGGATTGAGAGATGATATCGGCTCCTTCCCGAATGGAGAAAGAGCAATCGGCTAC
AAACAACGTTTTTAAATGCCCTACATTGGCTTGACTGGAAGTTATCGTTATGAAGATTTTGAACCTCGGTGGC
ACATTTAAATACAGCGGCTGGGTGGAATCATCTGATAACGATGAACACTATGACCCGGGAAAAAGAATCACT
TATCGCAGTAAGGTCAAAGACCAAAATTACTATTCTGTTGCAGTCAATGCAGGTATTACGTCACACCTAAC
GCAAAAGTTTATGTTGAAGGCGCATGGAATCGGGTTACGAATAAAAAAGGTAATACTTCACTTTATGATCAC
AATAATAACACTTCAGACTACAGCAAAATGGAGCAGGTATAGAAACTATAACTTCATCACTACTGCTGGT
CTTAAGTACACATTTTAA

图8G

SEQ ID NO: 23 显示 OmpA 寡核苷酸接头的序列。

CGATTGAATGGAGAACTTGAATTCGGGCGAACTTCTGGGAATAG

SEQ ID NO: 24 显示编码用于大肠杆菌 Fab 表达的基因间序列 1 (IGS1) 的盒。

AAGTTTAAATAGAGGAGAGTGTTAATGAAGAAG

SEQ ID NO: 25 显示编码用于大肠杆菌 Fab 表达的基因间序列 2 (IGS2) 的寡核苷酸盒。

AAGTTTAAATAGAGGGGAGTGTTAAAATGAAGAAG

SEQ ID NO: 26 显示编码用于大肠杆菌 Fab 表达的基因间序列 3 (IGS3) 的盒。

AAGCTTTAAATAGAGGAGAGTGTTGAGGAGGAAAAAATGAAGAA

SEQ ID NO: 27 显示编码用于大肠杆菌 Fab 表达的基因间序列 4 (IGS4) 的盒。

AAGCTTTAAATAGAGGAGAGTGTTGACGAGGATTATATAATGAAGAA

SEQ ID NO: 28 为野生型 FkpA 基因的 DNA 序列。

ATGAAATCACTGTTTAAAGTAACGCTGCTGGCGACCACAATGGCCGTTGCCCTGCATGCACCAATCACTTTT
GCTGCTGAAGCTGCAAAACCTGCTACAGCTGCTGACAGCAAAGCAGCGTTCAAAAATGACGATCAGAAATCA
GCTTATGCACTGGGTGCCTCGCTGGGTGCTTACATGGAAAACCTCTCTAAAAGAACAAGAAAACTGGGCATC
AACTGGATAAAGATCAGCTGATCGCTGGTGTTCAGGATGCATTTGCTGATAAGAGCAAACCTCTCCGACCAA
GAGATCGAACAGACTCTACAAGCATTCTGAAGCTCGCGTGAAGTCTTCTGCTCAGGCGAAGATGGAAAAAGAC
GCGGCTGATAACGAAGCAAAAGGTAAAGAGTACCGCGAGAAATTTGCCAAAGAGAAAGGTGTGAAAACCTCT
TCAACTGGTCTGGTTTATCAGGTAGTAGAAGCCGGTAAAGGCGAAGCACCAGAAAGACAGCGATACTGTTGTA
GTGAATACAAAGGTACGCTGATCGACGGTAAAGAGTTCGACAACCTCTTACACCCGTGGTGAACCGCTTTCT
TTCCGTCTGGACGGTGTATCCCGGGTTGGACAGAAGGTCTGAAGAACATCAAGAAAGGCGGTAAGATCAAA
CTGGTTATTCCACCAGAAGTGGCTTACGGCAAAGCGGGTGTTCGGGGATCCCACCGAATTCTACCCTGGTG
TTTGACGTAGAGCTGCTGGATGTGAAACCAGCGCCGAAGGCTGATGCAAAGCCGGAAGCTGATGCGAAAGCC
GCAGATTCTGCTAAAAA

SEQ ID NO: 29 为野生型 FkpA 基因的蛋白质序列。

MKSLFKVTLTATTMAVALHAPITFAAEAAKPATAADSKAAFKNDDQKSAYALGASLGRYMENSLKEQEKLG
KLDKDLIAGVQDAFADKSKLSDDQIEQTLQAFEARVKSSAQAKMEKDAADNEAKGKEYREKFAKEKGVKTS
STGLVYQVVEAGKGEAPKSDTVVNYKGTLLIDGKEFDNSYTRGEPLSFRLDGVI PGWTEGLKNIKKGGKIK
LVIPPELAYGKAGVPGIPPNSTLVFDVELLDVKPAPKADAKPEADAKAADSARK

SEQ ID NO: 30 为 FkpA his 标记基因的 DNA 序列。

ATGAAATCACTGTTTAAAGTAACGCTGCTGGCGACCACAATGGCCGTTGCCCTGCACGCACCAATCACTTTT
GCTGCTGAAGCTGCAAAACCTGCTACTGCTGCTGACAGCAAAGCAGCGTTCAAAAATGACGATCAGAAATCA
GCTTATGCACTGGGTGCCTCGCTGGGTGCTTACATGGAAAACCTCTCTAAAAGAACAAGAAAACTGGGCATC
AACTGGATAAAGATCAACTGATCGCTGGTGTTCAGGATGCATTTGCTGATAAGAGCAAACCTCTCCGACCAA
GAGATCGAACAGACTCTACAAGCATTGTAAGCTCGCGTGAAGTCTTCTGCTCAGGCGAAGATGGAAAAAGAC
GCGGCTGATAACGAAGCAAAAGGTAAAGAGTACCGCGAGAAATTTGCCAAAGAGAAAGGTGTGAAAACCTCT
TCAACTGGTCTGGTTTATCAGGTAGTAGAAGCCGGTAAAGGCGAAGCACCAGAAAGACAGCGATACTGTTGTA
GTGAATACAAAGGTACGCTGATCGACGGTAAAGAGTTCGACAACCTCTTACACCCGTGGTGAACCGCTTTCT
TTCCGTCTGGACGGTGTATCCCGGGTTGGACAGAAGGTCTGAAGAACATCAAGAAAGGCGGTAAGATAAAA
CTGGTTATTCCACCAGAAGTGGCTTACGGCAAAGCGGGTGTTCGGGGATTCCACCAAATCTACCCTGGTG
TTTGACGTAGAGCTGCTGGATGTGAAACCAGCGCCGAAGGCTGATGCAAAGCCGGAAGCTGATGCGAAAGCC
GCAGATTCTGCTAAAAAACACCATCACCATCACCAC

图8H

SEQ ID NO: 31 为 FkpA his 标记基因的蛋白质序列。

MKSLFKVTLTLLATTMAVALHAPITFAAEAAKPATAADSKAAFKNDDQKSAYALGASLGRYMENSLKEQEKLGI
KLDKQQLIAGVQDAFADKSKLSDQEIEQTLQAFEARVKSSAQAKMEKDAADNEAKGKEYREKFAKEKGVKTS
STGLVYQVVEAGKGEAPKDSDTVNVNYKGTLDGKEFDNSYTRGEPLSFRLDGVIPGWTEGLKNIKKGGKIK
LVIPPELAYGKAGVPGIPPNSTLVFDVELLDVKPAPKADAKPEADAKAADS AKKHHHHH

SEQ ID NO: 32 为野生型 *skp* 基因的 DNA 序列。

GTGAAAAAGTGGTTATTAGCTGCAGGTCTCGGTTTAGCACTGGCAACTTCTGCTCAGGCGGCTGACAAAATT
GCAATCGTCAACATGGGCAGCCTGTTCCAGCAGGTAGCGCAGAAAACCGGTGTTTCTAACACGCTGGAAAAT
GAGTTCAAAGGCCGTGCCAGCGAACTGCAGCGTATGGAAACCGATCTGCAGGCTAAAATGAAAAAGCTGCAG
TCCATGAAAGCGGGCAGCGATCGCACTAAGCTGGAAAAAGACGTGATGGCTCAGCGCCAGACTTTTGCTCAG
AAAGCGCAGGCTTTTGAGCAGGATCGCGCACGTCTGTTCCAACGAAGAACGCGGCAAACTGGTTACTCGTATC
CAGACTGCTGTGAAATCCGTTGCCAACAGCCAGGATATCGATCTGGTTGTTGATGCAAACGCCGTTGCTTAC
AACAGCAGCGATGTAAAAGACATCACTGCCGACGTAAGTAAACAGGTTAAATAA

SEQ ID NO: 33 为野生型 *skp* 基因的蛋白质序列。

MKKWLLAAGLGLALATSAQAADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFKGRASELQRMETDLQAKMKKLQ
SMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFEQDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQDIDLVDANAVAY
NSSDVKDITADV LKQVK

SEQ ID NO: 34 为 *skp* his 标记基因的 DNA 序列。

ATGAAAAAGTGGTTATTAGCCGCGAGGTCTCGGTTTAGCACTGGCAACTTCTGCTCAGGCGGCTGACAAAATT
GCAATCGTCAACATGGGCAGCCTGTTCCAGCAGGTAGCGCAGAAAACCGGTGTTTCTAACACGCTGGAAAAT
GAGTTCAAAGGCCGTGCCAGCGAACTCCAGCGTATGGAAACCGATCTCCAGGCTAAAATGAAAAAGCTGCAA
TCCATGAAAGCGGGCAGCGATCGCACTAAGCTGGAAAAAGACGTGATGGCTCAGCGCCAGACTTTTGCTCAG
AAAGCGCAGGCTTTTGAGCAGGATCGCGCACGTCTGTTCCAACGAAGAACGCGGCAAACTGGTTACTCGTATC
CAGACTGCTGTGAAATCCGTTGCCAACAGCCAGGAAATCGATCTGGTTGTTGATGCAAACGCCGTTGCTTAC
AACAGCAGCGATGTAAAAGACATCACTGCCGACGTAAGTAAACAGGTTAAACACCATCACCATCACCAC

SEQ ID NO: 35 为 *skp* his 标记基因的蛋白质序列。

MKKWLLAAGLGLALATSAQAADKIAIVNMGSLFQQVAQKTGVSNTLENEFKGRASELQRMETDLQAKMKKLQ
SMKAGSDRTKLEKDVMAQRQTFAQKAQAFEQDRARRSNEERGKLVTRIQTAVKSVANSQEIDLVDANAVAY
NSSDVKDITADV LKQVKHHHHH

CA170_1519 Ab 序列

CDRH1

GFTFSNYGMV

SEQ ID NO: 36

CDRH2

YIDSDDGNTYYRDSVKG

SEQ ID NO: 37

CDRH3

GIVRPFLY

SEQ ID NO: 38

CDRL1

KSSQSLVGASGKTYLY

SEQ ID NO: 39

CDRL2

LVSTLDS

SEQ ID NO: 40

CDRL3

LQGTHFPHT

SEQ ID NO: 41

图8I

大鼠 Ab 1519 VL 区

SEQ ID NO: 42

DVVMTQTPLS LSVALGQPAS ISCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQRSGQSPK RLIYLVSTLD
SGIPDRFSGS GAETDFTLKI RRVEADDLGV YYCLQGTHFP HTFGAGTKLE LK

大鼠 Ab 1519 VL 区

SEQ ID NO: 43

gatgttgatga tgaccagac tccactgtct ttgtcggttg cccttgagaca accagcctcc
atctcttgca agtcaagtca gagcctcgta ggtgctagtg gaaagacata tttgtattgg
ttatttcaga ggtccggcca gtctccaaag cgactaatct atctggtgac cacactggac
tctggaattc ctgataggtt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc
cgcagagtgg aagccgatga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac acattttcct
cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa

大鼠 Ab 1519 VL 区, 信号序列加以下划线并以斜体字表示

SEQ ID NO: 44

MMSPAQFLFLMLWIQGTSGDVVMTQTPLSLSVALGQPASISCKSSQSLVGASGKTYLYWLFQRSGQSPK
RLIYLVSTLD SGIPDRFSGSGAETDFTLKI RRVEADDLGVYYCLQGTHFPHTFGAGTKLELK

大鼠 Ab 1519 VL 区, 信号序列加以下划线并以斜体字表示

SEQ ID NO: 45

atgatgagtc ctgcccagtt cctgtttctg ctgatgctct ggattcaggg aaccagtgg
gatgttgatga tgaccagac tccactgtct ttgtcggttg cccttgagaca accagcctcc
atctcttgca agtcaagtca gagcctcgta ggtgctagtg gaaagacata tttgtattgg
ttatttcaga ggtccggcca gtctccaaag cgactaatct atctggtgac cacactggac
tctggaattc ctgataggtt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaaatc
cgcagagtgg aagccgatga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac acattttcct
cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa

大鼠 Ab 1519 VH 区

SEQ ID NO: 46

EVPLVESGGG SVQPGRSMKL SCVVSGETFS NYGMVWVRQA PKKGLEWVAY IDSDGDNTYY
RDSVKGRFTI SRNNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCTTGI VRPFLYWGQG TTVTVS

大鼠 Ab 1519 VH 区

SEQ ID NO: 47

gaggtgccgc tgggtggagtc tggggggcgc tcagtgcagc ctgggaggtc catgaaactc
tctgtgttag tctcaggatt cactttcagt aattatggca tgggtctgggt ccgccaggct
ccaaagaagg gtctggagtg ggtcgcatat attgattctg atggtgataa tacttactac
cgagattccg tgaagggccg attcactatc tccagaaata atgcaaaaag caccctatat
ttgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtac aacagggatt
gtccggccct ttctctattg gggccaagga accacgggtc ccgtctcg

大鼠 Ab 1519 VH 区, 信号序列加以下划线并以斜体字表示

SEQ ID NO: 48

MDISLSLAFL VLFIKVRCE VPLVESGGGS VQPGRSMKLS CVVSGFTFSN YGMVWVRQAP
KKGLEWVAYI DSDGDNTYYR DSVKGRFTIS RNNNAKSTLYL QMDSLRSED TATYYCTTGIV
RPFLYWGQG TTVTVS

大鼠 Ab 1519 VH 区, 信号序列加以下划线并以斜体字表示

SEQ ID NO: 49

atggacatca gtctcagctt ggcttttcctt gtccttttca taaaaggtgt ccggtgtgag
gtgccgctgg tggagtctgg gggcggtcga gtgcagcctg ggaggtccat gaaactctcc
tgtgtagtct caggattcac tttcagtaat tatggcatgg tctgggtccg ccaggctcca
aagaagggtc tggagtgggt cgcatatatt gattctgatg gtgataatac ttactaccga
gattccgtga agggccgatt cactatctcc agaaataatg caaaaagcac cctatatattg
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtacaac agggattgtc
cggccctttc tctattgggg ccaaggaacc acggtcaccg tctcg

图8J

1519 gL20 V-区 SEQ ID NO: 50

DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQKPGKAPK RLIYLVSTLD
SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLOGTHFP HTFGQGTKLE IK

1519 gL20 V-区 SEQ ID NO: 51

gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact
attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg gcaaaaccta cctgtactgg
ctcttccaga aaccgggcaa agctccgaaa cgctgatct atctggtgtc taccctggat
agcggatttc cgtctcgttt ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt
agctccctcc agccggagga ctttgctacc tattactgcc tccagggcac tcattttccg
cacactttcg gccagggtac caaactggaa atcaaa

1519 gL20 V-区, 信号序列加以下划线并以斜体字表示 SEQ ID NO: 52

MKKTAIAIAVALAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKSSQSLVGASGKTYLYWLFQKPGKAPKR
LIYLVSTLD SGIPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLOGTHFPHTFGQGTKLEIK

1519 gL20 V-区, 信号序列加以下划线并以斜体字表示 SEQ ID NO: 53

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa
gctgatatcc agatgacca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg
actattacct gtaaaagctc ccagtccttg gtgggtgcaa gcggcaaac ctacctgtac
tggtcttcc agaaaccggg caaagctccg aaacgcctga tctatctggt gtctacctg
gatagcggta ttccgtctcg tttctccggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc
attagctccc tccagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg cactcathtt
ccgcacactt tcggccaggg taccaactg gaaatcaaa

1519 gL20 轻链(V + 恒定区) SEQ ID NO: 54

DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQKPGKAPK RLIYLVSTLD
SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLOGTHFP HTFGQGTKLE IKRTVAAPSV
FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC

1519 gL20 轻链(V + 恒定区) SEQ ID NO: 55

gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact
attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg gcaaaaccta cctgtactgg
ctcttccaga aaccgggcaa agctccgaaa cgctgatct atctggtgtc taccctggat
agcggatttc cgtctcgttt ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt
agctccctcc agccggagga ctttgctacc tattactgcc tccagggcac tcattttccg
cacactttcg gccagggtac caaactggaa atcaaacgta cggtagcggc cccatctgtc
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa
gtcaccatc agggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgt

1519 gL20 轻链, 信号序列加以下划线并以斜体字表示 SEQ ID NO: 56

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ ADIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKSSQSL VGASGKTYLY
WLFQKPGKAP KRLIYLVSTL DSGIPSRFSG SSGTEFTLT ISSLQPEDFA TYYCLOGTHF
PHTFGQGTKL EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL
QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

图8K

1519 gL20 轻链, 信号序列加以下划线并以斜体字表示 SEQ ID NO: 57

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtcg gtttcgctac cgtagcgcaa
gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcggtg
 actattacct gtaaaagctc ccagtcctcg gtgggtgcaa gcggcaaac ctacctgtac
 tggctcttcc agaaaccggg caaagctccg aaacgcctga tctatctggt gtctacctg
 gatagcggtg ttccgtctcg tttctccggt agcggtagcg gtaccgaatt cagctgacc
 attagctccc tccagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg cactcatttt
 ccgcacactt tcggccaggg taccaaactg gaaatcaaac gtacggtagc ggccccatct
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttggtgtc
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgcctc
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc
 ctacgcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggggagtg

1519 gH20 V-区 SEQ ID NO: 58

EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWRQA PGKGLEWVAY IDSDDNTYY
 RDSVKGRFTI SRDPAKSSLY LQMNSLRAED TAVYYCTGI VRPFLYWGQG TLVTVS

1519 gH20 V-区 SEQ ID NO: 59

gaggttccgc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
 tcttggtcag tatctggctt caggttctcc aactacggtg tgggtgtgggt tcgtcaggt
 ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgat attgactccg acggcgacaa cacctactat
 cgcgactctg tgaaaggctg cttcaccatt tcccgcgata acgccaatc cagcctgtac
 ctgcagatga acagcctgcg tgctgaagat actgcggtgt actattgcac cactggcatc
 gtgcgtccgt ttctgtattg gggtcagggt accctcgta ctgtctcg

1519 gH20 V-区, 信号序列加以下划线并以斜体字表示

SEQ ID NO: 60

MKKAIAIAV ALAGFATVAQ AEVPLVESGG GLVQPGGSLR LSCAVSGFTF SNYGMVWRQA
APKGLEWVA YIDSDDNTY YRDSVKGRFT ISRDNKSSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTTG
 IVPFLYWGQ GTLVTVS

1519 gH20 V-区, 信号序列加以下划线并以斜体字表示

SEQ ID NO: 61

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa
gctgaggttc cgctggcga gtctggaggc gggctgtcc agcctggagg gagcctgcgt
 ctctcttggt cagtatctgg cttcacgttc tccaactacg gtatggtgtg ggttcgtcag
 gctccaggta aaggctctga atgggtggcg tatattgact ccgacggcga caacacctac
 tatcgcgact ctgtgaaagg tcgcttcacc atttcccgcg ataacgcaa atccagcctg
 tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgaa gatactgcg tgtactattg caccactggc
 atcgtgcgtc cgtttctgta ttggggtcag ggtaccctcg ttactgtctc g

1519gH20 Fab'重链(V + 人 γ -1 CH1 + 铰链)

SEQ ID NO: 62

EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWRQA PGKGLEWVAY IDSDDNTYY
 RDSVKGRFTI SRDPAKSSLY LQMNSLRAED TAVYYCTGI VRPFLYWGQG TLVTSSAST
 KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSQVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTTCAA

图8L

1519gH20 Fab'重链(V + 人 γ -1 CH1 + 铰链)

SEQ ID NO: 63

gaggttccgc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
 tcttgtgcag tatctggctt cagtttctcc aactacggtg tgggtgtgggt tcgtcaggct
 ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgtat attgactccg acggcgacaa cacctactat
 cgcgactctg tgaagagtcg cttcaccatt tcccgcgata acgccaatc cagcctgtac
 ctgcagatga acagcctgcg tgctgaagat actgcggtgt actattgcac cactggcatc
 gtgcgtccgt ttctgtattg gggtcagggt accctcgta ctgtctcgag cgcttctaca
 aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg
 gccctgggct gectgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgttc tacagtcctc aggactctac
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgcctcc agcagcttg gcacccagac ctacatctgc
 aacgtgaatc acaagccag caacaccaag gtcgacaaga aagttgagcc caaatcttgt
 gacaaaactc acacatgcgc cgcg

1519gH20 Fab'重链, 信号序列加以下划线并以斜体字表示

SEQ ID NO: 64

MKKTAIIAV ALAGFATVAQ AEVPLVESGG GLVQPGGSLR LSCAVSGFTF SNYGMVWVRQ APGKGLEWVA
 YIDSDGDNTY YRDSVKGRFT ISRDNAKSSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTTG IVRPFLYWGQ GTLTVSSAS
 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP
 SSSLTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKHTTCAA

1519gH20 Fab'重链, 信号序列加以下划线并以斜体字表示

SEQ ID NO: 65

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa
gctgaggttc cgctggctga gtctggaggc gggctgttc agcctggag gagcctgcgt
 ctctcttggtg cagtatctgg cttcacgttc tccaactacg gtatggtgtg ggttcgtcag
 gctccaggta aaggtctgga atgggtggcg tatattgact ccgacggcga caacacctac
 tatcgcgact ctgtgaaagg tcgcttcacc atttcccgcg ataacgccaa atccagcctg
 tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgaa gatactgcgg tgtactattg caccactggc
 atcgtgcgtc cgtttctgta ttgggggtcag ggtaccctcg ttactgtctc gagcgcttct
 acaaagggcc catcggtctt cccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttcccgaac cgggtgacggt gtcgtggaac
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagttga gcccaaactc
 tgtgacaaaa ctcacacatg cgccgcg

1519gH20 IgG4 重链(V + 人 γ -4P 恒定区)

SEQ ID NO: 66

EVPLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFTFS NYGMVWVRQA PGKGLEWVAY IDSDGDNTYY
 RDSVKGRFTI SRDNAKSSLY LQMNSLRAED TAVYYCTTGI VRPFLYWGQG TLTVSSAST
 KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTWSNS GALTSVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVTVPS SSLGKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV
 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV
 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF
 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

图8M

1519gH20 IgG4 重链(V + 人 γ -4P 恒定区、外显子加以下划线)SEQ ID NO:67

gaggtaccacttgtggaagcggaggaggtcttgtgcagcctggaggaagtttacgtctctcttgtgctgtgtctggtt
caccttctccaattacggaatggtctgggtcagacaagcacctggaaagggcttgaatgggtggcctatatgactctg
acggggacaacacctactatcgggattccgtgaaaggacgcttcacaatctcccagagataacgccaaagagctcactgtac
ctgcagatgaatagcctgagagccgaggatactgccgtgtactattgcacaacgggaatcgttaggcctttctgtactg
gggacagggcaccttgggtactgtctcgagcgtctctacaaagggccatccgtcttccccctggcgccctgctccagga
gcacctccgagagcacagccgcccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactca
ggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtctctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgac
cgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttggtga
gaggccagcacagggagggaggtgtctgtggaagccaggtcagccctcctgctggacgcaccccggtgtgcagcc
ccagcccagggcagcaaggcatgccccatctgtctcctcacccgaggcctctgaccacccactcatgcccagggagag
ggtcttctggatttttccaccaggtccgggcagccacaggtggatgccctaccccaggccctgcgcatacagggga
ggtgtctgcgtcagacctgccaagagccatatccgggaggacctgcccctgacctaaagccaccccaaggccaaactc
tccactccctcagctcagacaccttctctcctccagatctgagtaactccaatcttctctctgcagagtcctcaaatatg
gtccccatgccaccatgccaggttaagccaaccaggcctcgccctccagctcaaggcgggacaggtgccctagagta
gctgcattccagggacagggccccagccgggtgtgacgcattccacctccatctcttctcagcacctgagttcctggggg
gacctcagttctctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggaaccctgaggtcacgtgcgtggtg
gtggacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa
gccgcgggagggagcagttcaacagcacgtacggtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggca
aggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgctcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggtgggacc
cacggggtgcgagggccacatggacagaggtcagctcgcccccacctctgcccctgggagtgaccgctgtgccaacctctg
tccctacagggcagccccgagagccacaggtgtacaccttgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagagaacaaacta
caagaccacgcctcccgctgctggactccgacggctccttctctctacagcaggtctaacggtggacaagagcaggtggc
aggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgaggtctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtct
ctgggtaaa

1519gL20 FabFv 轻链 SEQ ID NO: 68

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCKSSQSLV GASGKTYLYW LFQKPGKAPK RLIYLVSTLD
 SGIPSRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQGTHFP HTFGQGKLE IKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGCS GGGGSGGGGS GGGGSDIQMT
 QSPSSVSASV GDRVITITCQS SPSVWSNFLS WYQQKPGKAP KLLIYEASKL TSGVPSRFSG
 SGSGTDFTLT ISSLPEDFA TYYCGGGYSS ISDTTFCGT KVEIKRT

1519gL20 FabFv 轻链 SEQ ID NO: 69

gatattcaga tgaccagag cccatctagc ttatccgctt ccgttggtga tcgctgaca
 attacgtgta agagctccca atctctcgtg ggtgcaagt gcaagacct tctgtactgg
 ctctttcaga agcctggcaa ggcacaaaaa cggctgatct atctggtgtc tacccttgac
 tctgggatac cgtcacgatt ttccggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt
 tcatcgtgc aaccgagga ctttgtacc tactactgcc tgcaaggcac tcatttccct
 cacactttcg gccaggggac aaaactcgaa atcaaacgta cggtagcggc cccatctgtc
 ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa
 tcgggtaact ccagggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctg
 agcagcacc tgacgctgtc taaagcagac tacgagaaac acaaagtgtg cgctgcgaa
 gtcacccatc agggcctgag ctaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgtagc
 ggtggcgggtg gcagtgggtg gggaggctcc ggaggtggcg gttcagacat acaaatgacc
 cagagtcctt catcggtatc cgcgtccgtt ggcgataggg tgactattac atgtcaaagc
 tctcctagcg tctggagcaa ttttctatcc tggatcaac agaaaccggg gaaggctcca
 aaacttctga tttatgaagc ctcgaaactc accagtggag ttccgtcaag attcagtggc
 tctggatcag ggacagactt cacgttgaca atcagttcgc tgcaaccaga ggactttgcg
 acctactatt gtggtggagg ttacagtagc ataagtata cgacatttgg gtgcggtact
 aagggtgaaa tcaaacgtac c

图8N

1519gL20 FabFv 轻链, 信号序列加以下划线并以斜体字表示 **SEQ ID NO: 70**

MSVPTQVLGLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLVGASGKTYLYWLFQKPGKAPKRLIYLV
STLDGIPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLOGTHFPHFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGECSSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLI
YEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAGGYSSISDITFGCGTKVEIKRT

1519gL20 FabFv 轻链, 信号序列加以下划线并以斜体字表示 **SEQ ID NO: 71**

atgtctgtccccaccaagtccctcgactcctgctactctggcttacagatgccagatgccgatatccagatg
accagagcccatctagcttatccgcttccgttggtgatcgctgacaattacgtgtaagagctcccaatct
ctcgtgggtgcaagtggcaagacctatctgtactggctctttcagaagcctggcaaggcaccaaaacggctg
atctatctggtgtctacccttgactctgggataccgtcacgattttccgcatctgggagcggaactgagtc
acactcacgatttcatcgctgcaaccgaggaactttgtacctactactgctgcaaggcactcatttcct
cacactttcgccagggggacaaaactcgaaatcaaacgtacggtagcgccccatctgtcttcatcttccg
ccatctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgttggtgctgaataacttctatcccagagag
gccaaagtacagtggaaagtgataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggac
agcaaggacagcacctacagcctgagcagcacctgacgctgtctaaagcagactacgagaaacacaaagt
tacgctgcaagtcacccatcaggcctgagctcaccagtaacaaaagttttaatagaggggagtgtagc
ggtggcggtggcagtggtgggggaggctccggagggtggcggttcagacatacaaatgaccagagtccttca
tcggtatccgctccgttggtgagatagggtgactattacatgtcaaagctctcctagcgtctggagcaatttt
ctatcctggtatcaacagaaaccggggaaggctccaaaacttctgatttatgaagcctcgaaactcaccagt
ggagttccgtcaagattcagtggtctctggatcaggacagacttcacgttgacaatcagttcgctgcaacca
gaggactttgcgacctactattgtggtggaggttacagtagcataagtatacgacatttggtgctgaggtact
aaggtggaatcaaacgtacc

1519gH20 FabFv 重链 **SEQ ID NO: 72**

EVPLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYGMVWVRQAPGKGLEWVAYIDSDGDNITYYRDSVKGRFTISR
DNAKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTGIVRPFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCSGGGGSGGGGTGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGI IW
ASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

1519gH20 FabFv 重链 **SEQ ID NO: 73**

gaggtaccacttgtggaagcggaggaggtcttgtgcagcctggaggaaagtttacgtctctcttctgtgctgtg
tctggcttcaccttctccaattacggaatggtctgggtcagacaagcacctggaaagggcttgaatgggtg
gcctatatgtactctgacggggacaacacctactatcgggattccgtgaaaggacgcttcacaatctccga
gataacgccaagagctcactgtacctgcagatgaatagcctgagagccgaggatactgccgtgtactattgc
acaacgggaatcggttaggccttttctgtactggggacagggcaccttggttactgtctcgagcgcggtccaca
aagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggtctgc
ctggtcaaggactacttccccgaaccagtgcaggtgtcgtggaactcaggtgccctgaccagcggttcac
accttccccggtgtcctacagtcttcaggactctactccctgagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagc
ttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtcgataagaaagttgag
cccaaatctttagtgagggtgggggtcaggtggaggcggaacgggtggaggtggcagcgaggttcaactg
cttgagtctggaggaggcctagtcacgcctggaggagcctgcgtctctcttctgtgcagtaagcggcatcgac
ctgagcaattacgcatcaactgggtgagacaagctccggggaagtggttagaatggatcggtataatatgg
gccagtgggacgaccttttatgtctacatgggcgaaaggaaggtttacaattagccgggacaatagcaaaaac
accgtgtatctccaaatgaactccttgcgagcagaggacacggcggtgtactattgtgctcgactgtccca
ggttatagcactgcaccctacttcgatctgtggggacaagggaacctggtgactgtttcaagt

1519gH20 FabFv 重链, 信号序列加以下划线并以斜体字表示 **SEQ ID NO: 74**

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVPLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYGMVWVRQAPGKGLEWVAYIDS
DGDNTYYRDSVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTGIVRPFYWGQGLTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGGSGGGGTGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYA
INWVRQAPGKCLEWIGI IWASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTA
PYFDLWGQGLTVTVSS

图80