

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/265

C12N 15/11

C12N 15/70

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94192440.8

[45]授权公告日 2000年12月6日

[11]授权公告号 CN 1059214C

[22]申请日 1994.4.14 [24]颁证日 2000.7.21

[21]申请号 94192440.8

[30]优先权

[32]1993.4.14 [33]US [31]08/048,164

[86]国际申请 PCT/US94/04132 1994.4.14

[87]国际公布 WO94/24158 英 1994.10.27

[85]进入国家阶段日期 1995.12.14

[73]专利权人 加州大学评议会

地址 美国加利福尼亚州

共同专利权人 耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究发展公司

[72]发明人 O·索塞耶夫 I·施皮尔
M·A·戈斯坦 R·H·多伊

[56]参考文献

US5137819 1992.8.11 C12N11/12

FEMS MICROBIOLOGY LETTERS VOL. 99

1992. 1. 1 POOLE 等," Identification of the cellulose-binding domain of the cellulose s

MOLECULAR AND GENERAL GENETICS,

VOL. 223 1990. 1. 1 Jauris 等," Sequence analysis of the clostridium stercorarium celz gene enco

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴玉和

审查员 黄 赤

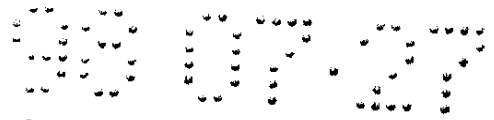
权利要求书 2 页 说明书 58 页 附图页数 26 页

[54]发明名称 纤维素结合区域

[57]摘要

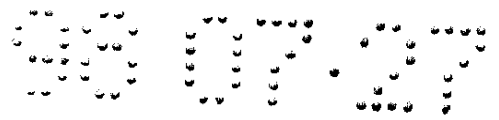
公开了对结晶纤维素和壳多糖有高亲和性的纤维素结合区域(CBD),及其分子克隆和重组体生产方法。还描述了包括 CBD 和第二种蛋白质的融合产物。预期 CBD 和融合产物具有药物释放、亲和分离及诊断技术等多方面的应用。

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



权 利 要 求 书

1. 由图 1 A - 1 B 中所示氨基酸序列组成的分离的纤维素结合区域。
2. 分离的纤维素结合区域, 其氨基酸序列与图 1 A - 1 B 中所示的氨基酸序列至少有 80% 氨基酸序列相似性。
3. 根据权利要求 2 的纤维素结合区域, 其对纤维素或壳多糖具有结合亲和力, 特征在于 K_d 值范围从 $1.5 \mu M$ 至 $0.5 \mu M$ 。
4. 根据权利要求 3 的纤维素结合区域, 其中所说的纤维素或壳多糖是结晶态的。
5. 根据权利要求 4 的纤维素结合区域, 其具有 $1.2 \mu M$ 或更小的 K_d 值。
6. 根据权利要求 4 的纤维素结合区域, 其具有 $1.0 \mu M$ 或更小的 K_d 值。
7. 根据权利要求 2 的纤维素结合区域, 其具有与图 1 A - 1 B 所示的氨基酸序列有大于 80% 氨基酸序列相似性的至少 100 个氨基酸。
8. 根据权利要求 2 的纤维素结合区域, 其具有与图 1 A - 1 B 所示的氨基酸序列有大于 80% 氨基酸序列相似性的至少 50 个氨基酸。
9. 根据权利要求 7 的纤维素结合区域, 其与图 1 A - 1 B 所示的氨基酸序列有大于 90% 的氨基酸序列相似性。
10. 分离的纤维素结合区域 (CBD), 其氨基酸序列由具有 ATCC 登记号 No.75444 的载体表达的 CBD 氨基酸序列组成。
11. 编码纤维素结合区域的重组核酸, 其由图 1 A - 1 B 所示的核酸序列或其互补序列组成。
12. 一种重组核酸, 它含有编码纤维素结合区域的核酸序列或其互补序列, 所述核酸序列包含于质粒 pET-CBD 中, 该质粒以登记号 No.75444 保藏于 ATCC。



1 3. 编码纤维素结合区域的分离的重组核酸，其包含一段核酸序列，该序列与图 1 A — 1 B 所示核酸序列，或与包含在质粒 pET-CBD 中的编码纤维素结合区域的核酸序列，或与上述两种核酸序列的互补序列至少有 8 0 % 的序列相似性，所述质粒 pET-CBD 以登记号 No.75444 保藏于 ATCC。

1 4. 根据权利要求 11 或 12 的重组核酸，其为 DNA 多核苷酸。

1 5. 根据权利要求 11 或 12 的重组核酸，其为 RNA 多核苷酸。

1 6. 分离的重组核酸，其包含与图 1 A — 1 B 中所示纤维素结合区域核苷酸序列或其互补序列具有 8 0 % 以上序列相似性的至少 300 个核苷酸的序列，所述核苷酸序列编码能以高亲和力与纤维素或壳多糖结合的蛋白。

1 7. 分离的重组核酸，其包含与图 1 A — 1 B 中所示纤维素结合区域核苷酸序列或其互补序列具有 8 0 % 以上序列相似性的至少 150 个核苷酸的序列，所述核苷酸序列编码能以高亲和力与纤维素或壳多糖结合的蛋白。

1 8. 以登记号 No.75444 保藏于 ATCC 的质粒 pET—CBD。

1 9. 一种重组载体，它包含编码权利要求 1、2、8、9 或 1 0 的纤维素结合区域的核苷酸序列，或图 1A—1B 的核苷酸序列，或其互补序列。

2 0. 用权利要求 1 9 的重组载体转染的宿主细胞。

2 1. 根据权利要求 2 0 的宿主细胞，其为细菌宿主细胞。

2 2. 根据权利要求 2 0 的宿主细胞，其为哺乳动物宿主细胞。

2 3. 以登记号 No. 69282 在 ATCC 保藏的重组大肠杆菌 pET—CBD/BL21 (DE3)。

2 4. 纤维素结合区域 (CBD) 化学衍生物，其氨基酸序列由图 1 A — 1 B 的氨基酸序列，或 ATCC 登记号为 No.75444 的载体表达的 CBD 氨基酸序列组成。

2 5. 根据权利要求 24 的 CBD 化学衍生物，其中 CBD 是生物素化的。

说明书

纤维素结合区域

本申请是1993年4月14日提交的美国专利申请序号No.08/048,164的部分后续申请。

1. 引言

本发明涉及以显著高的亲和力和可逆方式与非水溶性形式的，包括晶体形式的纤维素和壳多糖结合的纤维素结合区域（CBD）。已分离了本发明的CBD。本发明的CBD基本上不含天然与之联系的其他蛋白质，并发现其可用于将多种物质，特别是生物学活性分子以生物法固定于纤维素上。还公开了包括CBD和第二种感兴趣的蛋白质的融合产物，包括其制剂在多种方法中的应用。这些融合蛋白质具有包括应用于分离、纯化及诊断方法的多种有益应用。

2. 发明的背景

2.1. 蛋白质的固定化

包括生物学活性蛋白质在内的化学物质的固定化在工业生产上是十分重要的。近年来已发展了多种固相化方法。然而，其中大多数方法都需要对固定基质进行修饰。一般说来，这些修饰都需要将配体共价结合到基质上，如此在许多情况下导致配体活性的丢失，以及掺杂某些必须事先除掉后方将基质用于药品或食品加工中的有毒有机化合物。广泛使用的产品的一个典型例子是蛋白A - Sepharose。这种十分昂贵的产品可以亲和层析法纯化IgG，以及用于诊断方法。

使用那些含有功能性区域（催化或其他功能）连同结合区域的嵌

合蛋白质是相对新的技术，但已证实作为蛋白质纯化方法是特别有用的。例如，设计谷胱甘肽 S-转移酶基因融合系统以表达融合到谷胱甘肽 S-转移酶之 C 末端上的有用基因。该重组蛋白质是使用谷胱甘肽-Sepharose 柱以亲和层析法纯化的。

具有功能区域和结合区域的嵌合蛋白质的另一个例子是蛋白 A 基因融合载体，可使用该融合载体在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞中高水平表达融合蛋白质 (B. Nilsson, et al. (1985) EMBO J. 4 (4) : 1075 - 1080)。蛋白 A 的 IgG 结合区域提供了一种使用 IgG-Sepharose 柱迅速纯化融合蛋白质的方法。已发展基于在 IPTG-Sepharose 或金属螯合层析柱上纯化的 β -半乳糖苷酶融合蛋白质的或使用 Ni-树脂柱纯化的组氨酸六聚体蛋白质的相似系统。所有这些方法都要使用很贵的基质，如 Sepharose、丙烯酸树脂小珠或玻璃珠，这些基质都需要进行高成本的化学修饰并且在许多情况下还要使用高毒性化合物。另一方面，纤维素则具有极好的物理性质并且价格便宜，因而为蛋白质固定化提供了一种很大应用前途的固定基质。

2. 2. 纤维素

纤维素很适于用来固定一种用于处理果酒和果汁的酶，即内切- β -糖苷酶 (Shoseyov et al., J. Agric. Food Chem. 38 : 1387 - 1390 (1990))。但固定化时需要对纤维素进行化学修饰，并产生一种松软易压碎的，并且不适于装柱应用的材料。

可以在没有借助化学修饰的情况下结合上某种配体的 (即“生物固定化的”) 纤维素，应具有某些优点，特别是所得到的固相基质是天然的而且是无毒性的 (没有进行“弄脏的化学修饰”)。其他优点可能包括所得到的固相基质保留了它的物理性质，以及其相对低的价格。目前，纤维素价格比谷胱甘肽-Sepharose 和 IPTG-Sepharose 低

100-500倍，使得纤维素成为一种可以在食品和医药工业中安全使用的，具有吸引力的、低花费的基质材料。最近，Greenwood 等人 (FEBS Lett. 224 (1) : 127 - 131 (1989)) 将粪纤维单胞 (*Cellulomonas fimi*) 内切糖苷酶的纤维素结合区域融合到碱性磷酸酶上。重组融合蛋白质保留了其磷酸酶活性和与纤维素结合的能力 (另外参见Kilburn 等人的美国专利No. 5, 137, 819)。

但令人遗憾的是，粪纤维单胞 (*Cellulomonas fimi*) 纤维素结合区域对纤维素只表现有相对低的亲和力。例如，用加在0.5M NaCl 中的50 mM Tris - HCl (pH 7.5) 将洗掉30%以上的融合蛋白质。粪纤维单胞 (*C. fimi*) 纤维素结合区域的第二个缺点是在纤维素纤维在结合到*C. fimi*结合区域上之后受到破坏 (Din et al., Bio/Technology 9 : 1096 - 1098 (1991))。因此，即使*C. fimi* 纤维素结合区域可能没有表现出直接的纤维素酶活性，但对纤维素底物纤维的这种破坏作用 (其相当于固相基质形态学的物理改变) 同样是有问题和不期望有的 (参见下文第7.3节的讨论)。

2.3. 纤维素酶

许多纤维素酶及其他水解酶，如壳多糖酶都对它们的底物具高的亲和力 (Shoseyov, et al., PNAS, USA 87 : 2192 - 2195 (1990); Cabib, Methods Enzymol, 161, pp. 460 - 462 (1988))。前已证明，结晶纤维素和纤维素酶之间的强有力结合与纤维素酶降解结晶纤维素的能力直接相关 (Klyosov, Biochemistry 29 : 10577 - 10585 (1990))，而强有力结合对于纤维素酶降解非晶态纤维素的能力则不是必要的。

Shoseyov等人 (PNAS, USA 87 : 2192 - 2195 (1990)) 报导了从溶纤维梭菌 (*Clostridium cellulovorans*) 中纯化了纤维素酶

“复合物”。该纤维素酶“复合物”对结晶态纤维素及羧甲基纤维素表现有纤维素酶活性，并且是一种由几个不同的多肽组成的大的蛋白质复合物。已发现为了使催化酶分解结晶纤维素，必须有一个大的（约200kD）没有明显酶活性的主要纤维素结合蛋白质（CbpA）与催化酶一起参与。然而，为了酶促降解非晶态纤维素则不必有这种CbpA的参与。Shoseyov等人（PNAS, USA 89 : 3483 - 3487 (1992)）报导了CbpA基因的克隆和DNA序列测定，其中还描述了CbpA内的4个分离的“推测的”纤维素结合区域。

2. 4. 热激蛋白（HSP）

在处于各种压力条件下的原核和真核生物体中可诱导产生热激蛋白（HSP）。基于其分子量，HSP被分成几个同源蛋白质家族。

在进化期间保留了异常高水平的序列保守性的60kD HSP (hsp 60) 家族是用作自家免疫病中之潜在抗原的关注焦点(W. Van Eden(1991) Immunol. Rev. 121 : 1; W. Van Eden, Thole R. Van der Zee, A. Noordzij, J. D. A. Van Einbden, E. J. Hensen and I. R. Cohen (1988) Nature 331 : 171; M. B. J. Billingham S. Carney, R. Bulter, and M. J. Colston (1990) J. Exp. Med. 171 : 339)。

有实验证据表明，对hsp 60的反应须受调节性T细胞控制。已有证据提示，T细胞反应性至少部分地针对哺乳动物内源性HSP (B. Herman et al., (1991) Eur. J. Immunol. 21 : 2139)。

已经克隆了来自许多不同种生物体，包括结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、麻疯分枝杆菌（*Microbacterium leprae*）、牛分枝杆菌（*Mycobacterium bovis* BCG）、大肠杆菌（*E. coli*）、中国仓鼠及人细胞的hsp 60蛋白质家族，并测定了它们的序列（V. Mera et al., (1986) PNAS, USA 83 : 7013; S.

Jindal et al., (1989) Mol. Cell Biol. 9 : 2279; O. J. Picketts et al., (1989) J. Biol. Chem. 264 : 12001; T. M. Shinnick (1987) J. Bacteriol. 169 : 1080; T. M. Shinnick et al., (1988) Infect. Immun. 56 : 446; T. J. Venner and R. S. Gupta (1990) Nucl. Acids. Res., 18 : 5309)。

如下文所描述的，根据本发明，可将热激蛋白 (HSP) 或其部分、抗HSP抗体或其部分用于CBD-融合体产物中。

对分枝杆菌和人hsp 60的免疫反应已牵涉到人和动物模型中自家免疫性糖尿病的发生。

除了免疫优势抗原外，已显示在各种系统中蛋白质的hsp 60家族，在新合成的多肽链以及许多情况下，它们组装成的蛋白质复合物的适当折叠中执行“分子伴侣蛋白”作用。(S. M. Memmingsen et al., Nature 333 : 330; R. J. Ellis (1990) Sem, Cell Biol., 1 : 1 - 9)。

在小鼠胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM) 模型系统中—在胰岛炎 (insulibis) 发作时可检测到对hsp 60抗原有反应的T淋巴细胞，并且很可能是这些T淋巴细胞也能识别 β 细胞hsp 65交叉反应性抗原 (D. Elias et al., (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87 : 1576 - 1580)。

因此，仍有必要发现一种对纤维素，特别是结晶态纤维表现有高的但可逆的亲合性，而且即未显示有纤维素酶活性又不能破坏结晶态纤维底物之纤维 (即未表现有“非晶形发生”作用) 的纤维素结合蛋白质。

3. 发明的概要

本发明人在本文中描述了新的纤维素结合区域 (CBD) 蛋白质的

鉴定、分子克隆及其纤维素结合特性。另外，还公开了用于生产包含CBD及第二种有用蛋白质之融合产物的表达系统的构建方法。

本发明涉及到发现CBD能够执行不依赖于与之天然联系的其他蛋白质或多肽的功能。此外，还不可预见地发现CBD对结晶纤维素和壳多糖具有高亲和力，Kd值范围约为 $1.5\mu\text{M}$ 到 $0.5\mu\text{M}$ ，较好约为 $1.4\mu\text{M}$ 至 $0.8\mu\text{M}$ 。具体地说，就各种结晶态纤维素样品来说，CBD表现有大约 $1.2\mu\text{M}$ 或较小的Kd值。CBD的其他特征是其真正地不具有纤维素酶活性，并且特别令人惊奇的是，CBD未表现有形态学改变特征（即没有非晶形发生作用）。还发现包含CBD和第二种蛋白质的CBD-融合体产物保留了CBD与纤维素的结合能力。

本发明还涉及到发现CBD能够在宽pH范围内和不同的缓冲条件下不受限制地结合纤维素，大量的CBD与结晶态纤维素结合，并且接触到水时没有从纤维素上释出CBD。形成明显对照的是，主要CbpA蛋白质以及来自*C. fimi*的结合区在暴露于水之后很容易从纤维素解离下来。为从纤维素上释放掉CBD需要使之与6M盐酸胍、6M尿素或非离子表面活性剂等变性溶液接触。因此，CBD蛋白质的功能和行为完全不依赖于在其与纤维素结合中与之天然联系的其他蛋白质。

因此，本发明提供了一种分离的、能够以高亲和力结合纤维素，并且基本上不含与之天然联系的其他蛋白质的CBD蛋白质。

在本发明的一个实施方案中，CBD蛋白质包含图1A-1B中所示的氨基酸序列。在本发明的另一个实施方案中，CBD蛋白质包含与图1A-1B中公开的氨基酸序列至少有70%序列相似性，较好的有80%序列相似性的氨基酸序列。在本发明的另一个实施方案中，期望核苷酸序列与图1A-1B中所示的核苷酸序列至少有60%序列相似性，较好的有70-80%序列相似性。

在本发明的另一个实施方案中，CBD对纤维素具有高的亲和性。

本发明的CBD较好的有大约 $1.5\mu\text{M}$ 或更小的Kd值，且最好的有大约 $1.0\mu\text{M}$ 或更小的Kd值。

在另一实施方案中，本发明提供包括能够以高亲和力结合纤维素的CBD蛋白质及第二种蛋白质的CBD融合蛋白质，其中当所说的CBD蛋白质是天然产生的蛋白质时，所说的CBD蛋白质基本上不含天然与之联系的其他蛋白质。在本发明的一个特定实施方案中，第二种蛋白质是蛋白A。在本发明的另一个实施方案中，第二种蛋白质是HSP蛋白质。在本发明的再一个实施方案中，与CBD融合的第二种蛋白质可由两个或多个多肽区组成。例如，CBD可与抗体或其功能部分的可变轻链（ V_L ）及可变重链（ V_H ）融合。

本发明的另一个实施方案提供了生产CBD或CBD融合产物的方法。一个可施用于单独CBD或CBD融合产物，但在本文列举来用于CBD融合产物的方法可包括下列步骤：提供编码CBD融合产物的核酸，其中所说的CBD融合产物包含CBD和第二种蛋白质，所说的CBD能够以高亲和力结合纤维素或壳多糖并且基本上不含天然与之联系的其他蛋白质；用该核酸转化宿主细胞或使用等同手段将该核酸导入宿主细胞；以及在适合于表达CBD融合蛋白质的条件下培养被转化的宿主细胞。在上述方法中，第二种蛋白质可进一步包含N末端氨基酸和C末端氨基酸。可用本领域技术人员熟知的多种方法转化宿主细胞，其中包括但不限于电穿孔、注射、氯化钙沉淀及反转录病毒导入等。再者，核酸可以是与宿主细胞的基因组整合的或未整合的。

在本发明的另一个方面，提供了纯化CBD融合产物的方法，其中包括使含有重组CBD融合产物的混合物在适于形成包含纤维素及重组体融合产物之不溶性结合复合物的条件下与有效量的纤维素接触；从混合物中分离不溶性纤维素-CBD融合产物结合复合物；以及从纤维素

-CBD融合产物结合复合物中回收CBD融合蛋白质。

在本发明的一个特定实施方案中，纯化本发明之CBD融合蛋白质的方法进一步包括提供编码位于CBD融合产物之第二种蛋白质的N末端氨基酸上游的裂解位点的核酸。

在本发明的另一个实施方案中，纯化CBD融合蛋白质的方法还包括提供编码CBD融合蛋白质之第二种蛋白质的C末端氨基酸下游裂解位点的核酸。

在本发明的再一个实施方案中，纯化本发明CBD融合蛋白质的方法还包括提供编码CBD融合蛋白质之第二种蛋白质的N末端氨基酸第一裂解位点上游和第二种蛋白质之C末端氨基酸的第二裂解位点下游的核酸。

同样，使包含CBD的混合物与有效量的纤维素接触以纯化CBD。分离所得到的不溶性CBD纤维素结合复合物，然后用释放试剂处理该结合复合物以得到纯化的CBD。

本发明的另一个方面是提供编码能够以高亲和力结合纤维素之CBD蛋白质的并基本上不含天然与之联系的其他核酸的分离的核酸。一种分离的编码本发明蛋白质的核酸可用作筛选与cbd基因有同源性之序列的cDNA或基因组文库的探针。

在另一个实施方案中，本发明提供包含编码本发明之CBD的核酸的宿主细胞。

本发明的另一个方面涉及检测感兴趣物质的诊断药盒，其包含：
(a) CBD融合产物，包括 (i) 能够以高亲和力与纤维素结合并且基本上不含其他与之天然联系的蛋白质的CBD，和 (ii) 能够与感兴趣的物质结合的第二种蛋白质；(b) 可检测的标记；以及 (c) 纤维素。在这样一个药盒中可用壳多糖代替纤维素。在本发明的特定实

实施方案中，CBD融合产物的第二种蛋白质可以是蛋白A、HSP蛋白质、HSP抗体、HSP相关蛋白质、肽或其抗原性部分。术语“肽”包括由2-20个氨基酸组成的分子。上文所述诊断药盒中的CBD融合产物还可包括与第二种蛋白质亲和结合的配体，该配体能够结合感兴趣的物质。“配体”是指能够借助非共价方式与第二种分子结合的任何分子。例如，初级IgG可以亲和结合到与CBD融合的蛋白A上。然后IgG即可用作特定蛋白质、肽或激素的配体。

在本发明的另一个方面，公开了检测是否存在感兴趣之物质的免疫检测方法，该方法包括：(a)将可能含有感兴趣之物质的试验样品与足够量的CBD融合产物一起保温，所说的融合产物包括(i)能够以高亲和力与纤维素结合并基本上不含天然与之联系的其他蛋白质的CBD，及(ii)能够在允许感兴趣的物质与CBD融合产物中的第二种蛋白质结合的条件下结合感兴趣之物质的第二种蛋白质；(b)加入一定量的有效地与步骤(a)中所用的特定量CBD融合产物结合的纤维素，以得到不溶性纤维素-CBD融合产物结合复合物；(c)从未结合的成分中分离出不溶性的纤维素-CBD融合产物结合复合物；(d)将不溶性纤维素-CBD融合产物结合复合物与足够量的可检测标记物一起保温，其中所说的标记物能够与感兴趣的待检测物质结合；以及(e)从未结合的成分中分离出步骤(d)的不溶性纤维素-CBD融合产物结合复合物并检测是否存在可检测标记，以鉴定试验样品中是否存在感兴趣的待检物质。

还公开了另一种检测试验样品中待检物质的方法，该方法包括：(a)使可能含有待检物质的试验样品与能够固定待检物质的不溶性基质接触；(b)将不溶性基质与足够量的CBD融合产物一起保温，其中所说的融合产物包括(i)能够以高亲和力与纤维素结合并

基本上不含天然与之联系的其他蛋白质的CBD，和 (ii) 能够在允许固定化的待检物质结合到CBD融合产物的第二种蛋白质上的条件下结合固定化待检物质的第二种蛋白质；(c) 从未结合的成分中分离出步骤 (b) 的不溶性基质；(d) 将步骤 (c) 的不溶性基质与能够在允许标记物与感兴趣的物质或CBD融合产物结合的条件下，与感兴趣的物质或CBD融合产物结合的可检测标记物一起保温；以及 (e) 从未被结合的成分中分离步骤 (d) 的不溶性基质并检测是否有标记物存在，以提供试验样品中是否存在感兴趣的待检物质的指征。

该方法还可包括 (i) 在允许纤维素与CBD融合产物结合以形成纤维素-CBD融合产物结合复合物的条件下，使步骤 (c) 的不溶性基质与足够量的纤维素接触，及 (ii) 从包括未结合的纤维素在内的未被结合的成分中分离出步骤 (i) 的不溶性基质。该方法可使用一种能够结合感兴趣的物质或纤维素-CBD融合蛋白质结合复合物，特别是纤维素-CBD融合蛋白质结合复合物中之纤维素的标记物。试验样品可以是体液，其中包括但不只限于血液、尿液、精液、唾液、粘液、泪液、阴道分泌物等等。通常可用壳多糖代替纤维素。另外，不溶性基质可以是电泳凝胶印迹。

在本发明的一个特定实施方案中，设计了检测蛋白质或肽的方法；因此，CBD融合产物的第二种蛋白质可以是抗该蛋白质或肽的抗体。抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。或者，本发明的CBD可以直接或通过接头部分连接到感兴趣的抗体上。

感兴趣的待检物质还可包括与蛋白质、肽、激素、核酸结合的生物素化的探针或其他可用作靶的探针的分子。在这种情况下，优选的第二种蛋白质是链霉抗生物素蛋白。当标记物包括酶时，该方法还包

括加入足够量的酶底物，其中所说的底物被酶转化成可检测的化合物。

可以以竞争方式进行检测。因此，可以改动上述方法，以便通过将不溶性纤维素-CBD融合产物结合复合物与足够量的包括被标记之感兴趣物质的可检测标记物一起保温来完成步骤（d），其中标记物能够与未结合到感兴趣之物质上的CBD融合产物中的任何第二种蛋白质结合；并且通过从未结合的成分中分离步骤（d）的不溶性纤维素-CBD融合产物结合复合物，并将由试验样品测得的信号与由对照样品测得的信号相比较来完成步骤（e）。

在本发明的一个优选实施方案中，在蘸液棒(dip stick)中包含CBD融合产物。因此，本发明的目的还包括提供用于检测包含CBD融合产物之试验样品中感兴趣物质的蘸液棒，其中CBD融合产物包括有(i)能够以高亲和力与纤维素结合并且基本上不含天然与之联系的其他蛋白质的CBD，和(ii)能够与感兴趣的物质结合的第二种蛋白质。第二种蛋白质较好选自蛋白A、HSP蛋白质、HSP抗体、交叉反应性HSP相关蛋白质或肽或其抗原部分、酶、激素、抗原及抗体。

同样，本发明的目的还包括提供信号扩增系统，该系统中包含：
(a)第一种CBD融合产物，包括(i)能够以高亲和力与纤维素结合并且基本上不含天然与之联系的其他蛋白质的CBD，和(ii)能够与可进一步结合感兴趣之物质的嵌合探针结合的第二种蛋白质；以及
(b)第二种CBD融合产物，包括(i)能够以高亲和力与纤维素结合并且基本上不含天然与之联系的其他蛋白质的CBD，和(ii)能够作用于一种底物以产生可检测化合物的酶。

在另一实施方案中，提供了包括下列组分的信号扩增系统：(a)一种CBD融合产物，包括(i)能够以高亲和力与纤维素结合并且基本上不含天然与之联系的其他蛋白质的CBD，和(ii)能够与可进一步结合感

兴趣之物质的嵌合探针结合的第二种蛋白质；以及（b）被标记的CBD，该CBD保留了其以高亲和力与纤维素结合的能力，并且基本上不含天然与之联系的其他蛋白质。

这些信号扩增系统可包含嵌合体探针，并且还可包含纤维素基质，较好的是砾石研磨的纤维素。

这些信号扩增系统可以包括设计用来鉴定细胞或组织中核酸的系统，和设计利用缺失序列的寡核苷酸指导的热循环DNA扩增方法在每个方向上延伸被鉴定之核酸的长度的系统，其中可联合使用DNA特异性引物和简并的、载体特异性的、或oligo-dT结合的第二个寡核苷酸来引导特异性序列合成。

最后，本发明的再一个目的是提供包括与药物结合之CBD的药物释放系统，其中CBD保留其以高亲和力与纤维素结合的能力，并且基本上不含天然与之联系的其他蛋白质。在这样一个药物释放系统中，药物直接或通过接头部分连接到CBD上。已有许多连接方法并且是本领域中已知的。例如，可使用已有的环己碳二酰亚胺等酰基活化剂以形成酰胺或酯键。因此，具有氨基或羟基等亲核基团的药物可以连接到CBD的羧基末端上。在一个实施方案中，这种药物释放系统可以是缓慢的或持久的药物释放系统，其中感兴趣的药物从结合到纤维素上的CBD上被缓慢释放。

在一个实施方案中，被释放的药物是抗真菌剂。优选的药剂包括但不仅限于两性霉素B、制霉菌素和十一碳烯酸。药物通常可以是一种咪唑，如克霉唑（Clotrimazole）。可期望将这一药物释放系统掺入可经非胃肠道、口服、局部或吸入给药的组合物中。具体地说，给药途径包括但不只限于鼻内、眼内或阴道内给药。此外，该制剂可以是固体、凝胶、液体或气雾剂。

本文所描述的药物释放系统适用于释放药物对抗感染或致病因子，如对细胞膜中含有纤维素或壳多糖物质的酵母或真菌，这些因子包括但不只限于烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）、念珠菌属（*Candida*）或丛梗孢属（*Monilia*）的成员，或表皮细胞。使用本发明的药物释放系统，预期将大大减少为有效地治疗疾病或感染所需要的剂量，从而改善这些通常也相当有毒性的抗真菌或抗霉菌药物的使用效果。因希望使药物的副作用减到最小或消除副作用。

本发明的另一个方面涉及CBD改变植物组织生长的能力。这种能力可应用于农业中，例如可望用于促进花粉管生长和/或根生长。另外，因为高浓度的CBD具有抑制根生长的能力，故其可用于阻止不希望有的植物，例如“杂草”植物的发育。在另一实施例中，CBD被应用于促进真菌如蘑菇的生长，其中CBD结合于壳多糖上并刺激发育中的担子果或子实体的生长和/或发育。

本发明的再一个方面涉及CBD与昆虫外骨骼及其他昆虫部位包括中肠的壳多糖结合的能力。CBD的这种能力适于将其用作生物杀虫剂，其中CBD连接到用于防治害虫的微生物，如苏云金芽孢杆菌（BT）或表达BT毒素基因的其他微生物，或分泌壳多糖酶的微生物或真菌上。CBD使微生物结合到昆虫的壳多糖部分上，其中微生物产生的毒素或酶导致害虫死亡。表现有壳多糖酶活性的微生物包括肠细菌和链霉菌属的细菌菌株，以及曲霉、青霉和木霉等属的真菌菌株。在本发明该实施方案的一种形式中，可将CBD-微生物复合体直接施用可疑受害虫感染或有被感染危险的植物部分，或者也可将CBD-微生物复合体固定于设在被感染田地中的饵站上或被害虫侵害的植物上。在本发明该实施方案的另一形式中，将CBD-微生物复合体施用于林木或含纤维素的产品上，以防止或防治由破坏木材的害虫引起的感染。例

如，将CBD-微生物复合体施用于电话线杆和木材或含纤维素的建筑构件上，其中CBD成分紧密地结合到侵入的昆虫上，复合体中的微生物则可有效地防治害虫。

本发明再一个方面涉及CBD与真菌包括适用于生物除污或降解毒性环境污染物的真菌中的壳多糖结合的能力。根据该实施方案的一种形式，使用其中第二种成分是降解环境污染物的酶的CBD融合蛋白质。可将CBD-酶融合蛋白质固定在纤维素底物上并用此工具经酶促降解作用除去环境中的污染物，例如可将此工具放在地表或地下水的水流中。根据本发明该实施方案的另一个可代用的实施方式，CBD被结合到能产生生物除污的酶的真菌上，即用真菌分泌的酶降解环境污染物如杀害虫剂。然后将CBD-真菌复合体固定在纤维素底物上，并提供适用于酶促降解环境污染物（如包括DDT在内的杀害虫剂，或伐木或锯木操作余留下的含木材产物）的工具。在一个举例说明性实施例中，CBD与白色腐败真菌如黄孢展齿草菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 复合在一起，借以产生木素过氧化物酶、锰过氧化物酶并降解杀害虫剂DDT。CBD-真菌复合体适用于生物除污，例如从环境中除去DDT等杀害虫剂。

4. 附图说明

图 1 A - 1 B : 核苷酸 (上行, 原链; 第二行, 互补链) 和推测的CBD的氨基酸序列。

图 2 A - 2 C : 编码CBD之基因片段的制备和克隆。

2 A . 对CbpA之一级结构的分析, 其含有N末端信号肽, 独特的CBD区, 4个亲水重复序列 (白色箭头) 和9个疏水重复段 (黑色箭头)。

2 B . 沿着CbpA基因安排的PCR引物。为清楚起见其中包括了CBD

侧翼区的引物序列和CbpA DNA序列。PCR产物包含NcoI和BamHI位点（划下划线部分）。还注明基因片段的ATG起始密码子位于NcoI位点内，并且TAG终止密码子与BamHI位点相邻接。

2 C. 图解说明含有克隆到pET-8c载体中之CBD基因片段的pET-CBD。载体含有为可诱导性CBD产生的必要的转录和转译信号。

图 3 : CBD蛋白质的表达和纯化

图中各泳道分别显示加在15%丙烯酰胺凝胶中的携带pET-8c之细胞的全细胞蛋白质（泳道2）、携带pET-CBD之细胞的全细胞蛋白质（泳道3）、溶胞的pET-CBD细胞的胞质部分（泳道4）、溶胞的pET-CBD细胞的盐酸胍溶解的膜/包涵体部分（泳道5）、Avicel®沉淀物的最后的PC缓冲液洗出液（泳道6）、以及纯化的CBD蛋白质（泳道7）。各泳道均以各部分的0.005%总蛋白质上样，但泳道6使用高出10倍的蛋白质浓度。预染色的分子量标准参照物（泳道1, 8）具有大约2.6、5、12.7、18.1、29和44 kDa的迁移率。

图 4 : CBD-Avicel® 结合的时间过程。按下文第7部分中所述方法平衡CBD（2.0 μmol总蛋白质）和Avicel®（1 mg/ml），不同的是使用较大的总体积以提供在不同时间点上取出的样品。按第7部分中所述方法洗各时间点的样品并进行检测。还参见下文表 I 或图 9。

图 5 A-5 B: CBD与Avicel® 结合的双倒数图。黑方块代表0.5mg Avicel®（B），黑圆圈代表1 mg Avicel®（J）、黑三角代表2mg（H）。插入图：PCmax对所使用的Avicel® 的量。检测值为1.0ml。

图 6 : CBD与Avicel® 结合的Scatchard作图。图示3种不同量Avicel® 时 [PC] / [P] 对 PC 的作图。[PC] / [P] 表示的无量纲比例，[PC] 以 μM 为单位表示。黑圆圈代表 1 mg Avicel®，空圆圈代表 2 mg Avicel®，黑方块代表 3 mg。

图 7 : CBD结合Cellulon® 的双倒数图。保温混合物含有每ml 0.5mg Cellulon® 。

图 8 : CBD-蛋白 A 融合蛋白质与纤维素及IgG结合。1 M乙酸选择性地释放CBD-蛋白 A : IgG“键合”，但不是CBD-蛋白 A : 纤维素“键合”。

图 9 : CBD蛋白质对非水溶性底物的吸附作用。

图 1 0 : CBD的过表达和纯化。

图 1 1 : 图解说明信号扩增系统，其中标记的CBD-检测结合了CBD融合产物的纤维素或壳多糖。感兴趣的物被结合，其本身又与嵌合探针结合。

图 1 2 : 图解显示其中感兴趣的物质结合到三元CBD融合产物：CBD-蛋白 A (IgG) 上的信号扩增系统。

图 1 3 : 如根据凝胶电泳检测样品所证明的用CBD-蛋白 A - 纤维素纯化IgG。泳道 a 是人血清。泳道 b 是不与CBD-蛋白 A - 纤维素结合的人血清蛋白质。泳道 c 是IgG已结合到蛋白 A 上之后，显示未被结合之蛋白质的样品的第一PBS洗出液。泳道 d 是经用乙酸洗而回收的IgG部分。

图 1 4 A 和 1 4 B : 证明CBD处理的纤维素纤维仍保持完整，即CBD没有纤维素破坏非晶形发生活性。图 1 4 A 显示用CBD处理的棉纤维。图 1 4 B 显示未被处理的棉纤维（对照）。

图 1 5 : 证明 p H 和NaCl浓度对CBD-蛋白 A 结合纤维素之能力的影响。

图 1 6 : 证明CBD与黑曲霉的结合。泳道 a 是加有CBD的黑曲霉。泳道 b 是没有CBD的黑曲霉（对照）。泳道 c 是单一CBD。

图 1 7 : 证明CBD与Spodoptera Littoralis的结合。泳道 a 是

没有CBD的*Spodoptera littoralis*的中肠膜（对照）。泳道 b 是加有CBD的*Spodoptera littoralis*的中肠膜。

图 1 8：证明CBD与*Heliothis armigera*的结合。泳道 a 是没有CBD的*Heliothis armigera*的中肠膜（对照）。泳道 b 是加有CBD的*Heliothis armigera*的中肠膜。

图 1 9：证明CBD和BSA（作为对照）对花粉管生长的影响。

图 2 0：证明CBD对用白色荧光增亮剂（calcofluor）染色的花粉管之晶细胞壁成分的影响。图 2 0 A 显示如根据在顶端区带上没有亮颜色所表明的，CBD处理的花粉管产生了非结晶花粉管顶端。图 2 0 B 显示如根据亮颜色所表明的，对照花粉管顶端含有较多的结晶细胞壁成分。

图 2 1 A 和 2 1 B：证明对CBD处理的花粉管的金免疫标记。图 2 1 A 证明在用CBD处理的花粉中，如由顶端区带上的强暗点所表明的，金标记是沿着花粉管但优选出现在顶端区带。图 2 1 B 显示对照组即没有经CBD处理的花粉。

图 2 2：证明CBD对拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）籽苗的根生长的影响。不同的字母标出根长度值间的统计学上的显著差异（ $p \leq 0.05$ ）。

图 2 3：证明CBD处理的拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）籽苗的金免疫标记。该图显示金标记限于根部而茎干则未显示标记。

图 2 4：证明白色荧光增亮剂（calcofluor）对拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）籽苗的着染情况。该图证明只有根部着染，表明其易接近纤维素。

5. 发明的详细描述和定义

本发明涉及鉴定能够以高亲和力和可逆方式与纤维素结合的纤维

素结合区域（CBD）蛋白质。本发明的CBD例如可用于生物活性分子在纤维素上的生物法固定化。本发明的CBD可与第二种蛋白质融合以形成CBD融合蛋白质。CBD融合蛋白质中存在CBD蛋白质可与纤维素保温而容易地和选择性地纯化CBD融合蛋白质。第二种蛋白质的例子包括：A蛋白、G蛋白、链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、Taq聚合酶和其他聚合酶、碱性磷酸酶、核糖核酸酶（RNase）、脱氧核糖核酸酶（DNase）、各种限制性酶、过氧化物酶、葡聚糖酶如内-1, 4- β -葡聚糖酶、内-1, 3- β -葡聚糖酶、壳多糖酶、以及 β 和 α 葡糖苷酶、 β 和 α -glucuronidase、淀粉酶、转移酶如葡糖基转移酶、磷酸转移酶、氯霉素-乙酰转移酶、 β -内酰胺酶及其他抗生素修饰和降解酶、虫荧光素酶、酯酶、脂酶、蛋白酶、细菌素、抗生素、酶抑制剂、不同的生长因子、激素、受体、膜蛋白质、核蛋白质、转录和转译因子及核酸修饰酶。特别是CBD可与抗体或抗原因子融合，以形成用于诊断药盒和免疫检测的CBD融合产物。

因此，例如可利用CBD和HSP抗原因子检验体液中是否存在特定抗体（如热激蛋白（HSP）抗体）。相反，可使用CBD-HSP抗体融合蛋白质检测HSP蛋白质、交叉反应性HSP相关蛋白质或其抗原性蛋白质。

术语“CBD”或“CBD蛋白质”或“纤维素结合区域蛋白质”是指含有图1A-1B所示氨基酸序列的蛋白质，并包括其功能性同系物及功能性衍生物，条件是功能性同系物或功能性衍生物具有以高亲和力和可逆方式与纤维素结合的能力。本发明的CBD基本上不含天然与之联系的其他蛋白质，例如上文讨论的主要CbpA蛋白质的剩余部分。另外，例如可以取代、插入或删除多肽中的一个或多个预定的氨基酸残基，借以产生具有改善了生物学性质的CBD，或使之达到不同的结合和表达水平。某些落入本发明范围内的所需CBD蛋白质可以具有对天

然产生之分子的共价或非共价修饰，其中包括但不只限于糖基化修饰。可通过使用重组DNA技术，经改变其编码核酸制备具有残基缺失、取代和/或插入的本发明的CBD蛋白质。可在编码本发明CBD的DNA水平上的修饰和突变不一定改变阅读框架，并且最好不会造成将产生次级mRNA结构的互补区（参见欧洲专利公开No. EP 75, 444）。

本发明的CBD蛋白质与图1A-1B中所示的氨基酸序列至少有70%序列相似性，较好有80%序列相似性，更好有至少90%序列相似性，且最好有至少95%序列相似性。术语“X%序列相似性”不是只限于在蛋白质的整个长度范围内有X%序列相似性的序列。70%序列相似性还包括在图1A-1B所示CBD蛋白质内的已鉴定的功能性区域中出现的X%序列相似性。功能性区域的例子可以是限定的一组具有以高亲和力和以可逆方式结合纤维素之能力的氨基酸。这种蛋白质同系物在本文中也称为“CBD功能性同系物”。在本发明的一个实施方案中，这种功能区域可以有大约100个氨基酸。在本发明的另一实施方案中，这种功能区域可以有大约50个氨基酸。本发明的最理想的CBD蛋白质是由图1A-1B所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

术语“CBD功能衍生物”在本文中是指图1A-1B所示CBD蛋白质氨基酸序列的任何“片段”、“变异性”、“类似物”、或“化学衍生物”，其保留了以高亲和力和以可逆方式与纤维素结合的能力，并且其较好长度在大约2至160个氨基酸之间，更好在大约25至125个氨基酸之间，最好在大约50至100个氨基酸之间。

术语“片段”是指由图1A-1B所示CBD蛋白质衍生的，并且具有天然存在之序列的CBD蛋白质。可经蛋白水解性裂解全长度蛋白质而产生这样的片段。或者，可经适当地修饰编码CBD蛋白质的DNA序列，以在天然序列的C末端、N末端、及序列内的一个或多个位点删除一个或

多个氨基酸而重组产生所说的片段。可根据其以高亲和力和以可逆方式结合纤维素的能力，确定功能性衍生物的同性或实用性，以筛选CBD蛋白质的片段。

术语“变异体”在本文中是指其中天然分子的氨基酸序列、糖基化方式或其他特征已受到共价或非共价修饰的分子，并倾向于包括突变体。有些落入本发明范围内的变异体具有氨基酸取代、缺失和/或插入，条件是最后的构建体具有以高亲和力和以可逆方式结合纤维素的所需能力。可基于所涉及之残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性物质的相似性进行CBD蛋白质中的氨基酸取代。例如，带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸；带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸；有不带电荷的极性中心集团或具相似亲水性数值之非极性关键基团的氨基酸包括：亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸；甘氨酸、丙氨酸；天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸；苯丙氨酸、酪氨酸。在变异体的定义内还包括在N末端、C末端及天然CBD序列内的一个或多个位点上具有附加氨基酸的那些蛋白质，条件是这些变异体保留有以高亲和力和以可逆方式结合纤维素的能力。

术语“化学衍生物”在本文中是指经化学修饰天然存在的CBD蛋白质或其变异体而产生的CBD蛋白质。举例说明的化学修饰的例子应是由烷基、酰基或氨基基团替代H的。

短语“以高亲和力结合纤维素”在本文中是指CBD蛋白质结合纤维素的能力，其以 μM 为单位的Kd值范围为大约1.5至0.5，较好大约1.4至0.8。更优选的是，高亲和力结合是指现成CBD以大约1.1或更小，最好以大约1.0或更小的Kd值结合结晶态纤维素的能力。

短语“以可逆方式结合纤维素”在本文中是指借助释放剂或溶液，如6 M尿素、6 M盐酸胍及包括非离子表面活性剂在内的其他变性试

剂从纤维素-CBD蛋白质结合复合物上释放CBD蛋白质的能力。但最好使用那些允许被释放的CBD或融合产物将得以重新构成的变性试剂。例如，可使变性的蛋白质经受如下文6.1.4、7.1.1、7.2.1和8.1.4节中所述复性条件，从用6 M尿素或6 M盐酸胍处理得到的材料重新构成CBD。

本文所用的术语“CBD融合蛋白质”是指将至少两种蛋白质，即CBD蛋白质和第二种蛋白质连接在一起。在本发明某些实施方案中，第二种蛋白质的例子包括酶，如核酸修饰酶、蛋白酶、激素或激素前体，多肽，肽，抗体，抗原，抗原决定基和其变异体。在本发明的某些优选实施方案中，第二种蛋白质是蛋白A；在本发明的其他优选实施方案中，第二种蛋白质是HSP蛋白质。本发明的一个优选实施方案是由CBD蛋白质、蛋白A或抗HSP重组IgG组成的融合蛋白质。本发明的CBD融合蛋白质可包含酶促或化学裂解位点上游并最好与第二种蛋白质的N末端相邻，和/或酶促或化学裂解位点下游并最好与第二种蛋白质的C末端相邻，从而为使用裂解试剂从CBD融合蛋白质中回收第二种蛋白质提供手段。

本文所使用的术语“CBD融合蛋白质-纤维素结合复合物”是指当纤维素结合CBD融合蛋白质中的CBD蛋白质时所形成的复合物。

“核酸”是指含有在5'至3'方向以磷酸二酯键连接的一系列核酸的，可以是RNA或DNA序列的核苷酸序列。如果核酸是DNA，核苷酸序列是单股或双股的。编码CBD蛋白质的核酸是编码能够以高亲和力结合纤维素之CBD蛋白质的，是与编码这种CBD蛋白质的核酸序列互补的，或与编码这种CBD蛋白质的核酸序列杂交的，并在严格条件下仍与其稳定结合的RNA或DNA。

短语“编码本发明CBD蛋白质的核酸”包括根据其来源或操作，

与天然与之联系的任何多核苷酸部分无关的，并且可以与天然与之连接的多核苷酸以外的多核苷酸连接的基因组，cDNA的核酸，以及合成和半合成来源的核酸，并且包括核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、核苷酸类似物或其组合的单股或双股聚合物，只要其所编码的CBD保留其以高亲和力结合纤维素的能力即可。该短语还包括本领域中已知的各种不同的修饰，其中包括但不只限于放射活性和化学标记、甲基化、加帽、核苷酸内修饰如经带电荷键合（如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等）和不带电荷的键合（如磷酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、carbamites等）的修饰，以及含有侧接部分、嵌入部分、整合体等的修饰，条件是由核酸编码的CBD保留有以高亲和力和以可逆方式结合纤维素的能力。

可使用编码CBD的核酸构建能够表达本发明之CBD蛋白质或CBD融合蛋白质的重组表达载体。如果一个核酸构建体含有包括转录和转译调节信息的核苷酸序列并且该序列被“可操作地连接”到核苷酸编码序列上，则它能够表达某种蛋白质。“可操作地连接”是指一种键合，其中调节DNA序列和待表达的DNA序列以一种允许转录和最终转录的方式相连接。

在构建CBD融合蛋白质表达载体中，编码CBD蛋白质的核酸将被连接到编码第二种蛋白质的核酸上，从而使CBD蛋白质和第二种蛋白质的开放阅读框架保持完整，以允许转译CBD融合蛋白质。可从各种产生纤维素结合区域的或产生CBD编码mRNA的细胞来源得到CBD核酸，其中所说的结合区域能够以高亲和力并以可逆方式与纤维素结合。CBD编码核酸的优选来源是溶纤维梭菌（*Clostridium cellulovorans*）。可按6.1节中所述方法制得编码CBD的核酸。

可从分离的和纯化的细胞来源的DNA制得，或经基因组克隆制得本

发明的编码CBD蛋白质的核酸。可使用本领域已知的技术制备克隆的cDNA或基因组库，并可用基本上互补于基因之任何部分的核苷酸探针筛选特定的CBD编码核酸。如果期望检测编码CBD蛋白质的保守的核苷酸区，核苷酸探针应是基于种间保守的CBD核苷酸序列的。如想要检测编码CBD蛋白质的独特的核苷酸区，核苷酸探针应是基于独特的CBD核苷酸序列的。或者，也可使用cDNA或基因组DNA作为以适应的寡核苷酸引物进行PCR克隆的模板。可以筛选用于构建表达载体的全长克隆，即含有所需CBD蛋白质之整个编码区的克隆，或者可将交迭cDNA连接在一起以形成完整的编码序列。另外，也可以使用本领域已知的标准技术，经化学合成法整个地或部分地合成编码CBD的DNA序列。

有许多载体均可利用，并可以依据下述几个因素来选择适当的载体：1)它是用于核酸扩增还是核酸表达，2)将被插入载体中的核酸的大小，以及3)将被载体转化的宿主细胞属于何种细胞。每种载体都依据其功能(扩增核酸或表达核酸)及与其宿主细胞的相容性而含有不同的组分。

术语“宿主细胞”是指能够在培养物中生长并能够表达CBD蛋白质或CBD融合蛋白质的细胞。本发明的宿主细胞包括体外培养物中的细胞并包括原核、真核、及昆虫细胞。可以选择那些调节被插入之序列表达的，或以所期望的特殊方式修饰与加工基因产物的宿主细胞株。可在某些诱导剂(如用于金属硫蛋白启动子的锌和镉离子)提高某些启动子驱动的表达。因此可以控制CBD蛋白质或CBD融合蛋白质的表达。如果CBD蛋白质或CBD融合蛋白质对于宿主细胞是致死性的，则控制表达的能力将是很重要的。修饰和加工蛋白质产物对于蛋白质的功能来说是很重要的。不同的宿主细胞都具有其特征性或特异性转译后加工与修饰蛋白质的机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统，以保证正

确修饰和加工所表达的CBD蛋白质或CBD融合蛋白质。宿主细胞应分泌最小量的蛋白水解酶。

在本发明中，所提供的宿主细胞含有编码能够以高亲和力结合纤维素之本发明CBD蛋白质或CBD融合蛋白质的核酸。优选的用于克隆和表达本发明CBD蛋白质的宿主细胞是原核细胞。原核细胞特别适用于迅速产生大量核酸、产生用于位点特异性诱变的单股核酸模板、同时筛选许多突变体、以及测定所产生之突变体的核酸序列。用于克隆和表达本发明CBD蛋白质的原核细胞的例子是由Stratagene提供的大肠杆菌X L 1 - 兰菌株。用于克隆和表达CBD融合蛋白质的原核细胞的另一个例子是金黄色葡萄球菌。用于克隆和表达CBD蛋白质或CBD融合蛋白质的系统的再一个例子是Invitrogen Corporation(San Diego, CA) 的毕赤酵母(Pichia)表达试剂盒。

为了重组表达CBD蛋白质及CBD融合蛋白质，本领域技术人员可以同样有效地利用各种表达载体/宿主系统。这些系统包括但不只限于微生物，如用包含所需CBD编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘性质粒DNA表达载体转化的细菌；用包含所需CBD编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母；用包含所需CBD编码序列的重组病毒表达载体（如杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；用包含所需CBD编码序列的重组病毒表达载体（如花柳菜花叶病毒CaMV，烟草花叶病毒TMV）感染的，或用包含所需CBD编码序列的重组质粒表达载体（如Ti质粒）转化的植物细胞系统；或用重组病毒表达系统（如腺病毒、牛痘病毒）感染的动物细胞系统，其中包括经基因工程处理而含有稳定扩增之CBD核酸的多拷贝的细胞系（如CHO/dnfr，CHO/谷氨酰胺合成酶）或含有在双小片染色体中未稳定扩增之CBD核酸之多拷贝的细胞系（如小鼠细胞系）。

载体成分一般包括但不只限于下列的一个或多个成分：信号序列、复制原点、一个或多个标志基因、增强子元件、启动子、以及转录终止序列。这些载体的表达元件在其长度和特异性上均有所不同。依据所利用的宿主/载体系统，可以使用任何一种适当的转录和转译元件。例如，当在原核细胞系统中克隆时，可使用从原核细胞的基因组中分离的启动子（如细菌色氨酸启动子）。也可以使用以重组DNA或合成技术产生的启动子以驱动被插入之序列的转录。

信号序列可以是载体的成分，或者可以是被插入载体中之CBD核酸的一部分。信号序列可以是CBD序列前面的天然存在的序列，或是非天然存在的序列。信号序列应是由宿主细胞识别并加工的。复制原点是指宿主生物体的复制起始的独特位点。期望克隆和表达载体包含有选择基因，也称为可选择标志。该基因编码被转化的宿主细胞在选择性培养基中存活或生长所必需的蛋白质。没有被含有选择基因的载体转化的宿主细胞不能在此培养基中存活。典型的选择基因编码赋予抗生素或其他毒素抗性的蛋白质，例如抗氨基青霉素、补充营养缺陷型缺陷；或提供不能从复合培养基中得到的重要营养素。选择方案的一个例子是利用某种药物阻止宿主细胞的生长。这些被异源基因成功地转化的细胞可表达赋予药物抗性的蛋白质，并因此能经受得住此选择体系。

表达和克隆载体通常含有可被宿主生物体识别的并且被可操作地连接到编码有用多肽之核酸上的启动子。启动子是位于结构基因起始密码子上游（5'）的非转译的序列（通常在大约100至1000bp范围内），其可控制与之可操作地连接的特定核酸序列，如编码CBD蛋白质或CBD融合蛋白质之核酸序列的转录和转译。这样的启动子一般分为两类，即可诱导的和结构性的。可诱导启动子是在对某些培养条件

改变如存在或不存在某种营养素，或温度改变的反应中，启动处于它们的控制下之核酸的渐增转录水平的启动子。目前，有许多被各种潜在的宿主细胞识别的启动子都是已知的。可用限制性内切酶除去原料核酸中的启动子并将分离的启动子序列插入载体中，以将这些启动子可操作地连接到编码感兴趣多肽的核酸上。可使用天然存在的启动子序列和许多异源启动子指引感兴趣之多肽的扩增和/或表达。但最好是使用异源启动子，因为与天然存在的启动子相比，它们通常允许更大强度地转录和更高水平地产生被表达的有用多肽。就这些宿主来说，通常是使用含有衍生于与该宿主细胞相容之物种的启动子和控制序列的质粒载体。该载体通常都携带有复制原点及能够在被转化的细胞中提供表型选择的标志序列。例如，一般是使用衍生于大肠杆菌质粒 pBR322 (Bolivar, et al, Genen 2 : 95 [1977]) 转化大肠杆菌。pBR322质粒含有氨苄青霉素和四环素抗性基因，因而为鉴定被转化的细胞提供了容易的工具。pBR322质粒或其他微生物质粒还必须含有或经修饰后含有常用于重组DNA构建的启动子及其他控制元件。

适于与原核宿主使用的启动子包括 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统 (Chang et al., Nature, 275 : 615 (1978); Goeddel et al., Nature 281 : 544 (1979)) ; 碱性磷酸酶、色氨酸 (trp) 启动子系统 (Goeddel, Nucleic Acids Res, 8 : 4057 (1980)) 和EPO申请No. 36, 776) 及杂合启动子如tac启动子 (H. de Boer et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 80 : 21 - 25 (1983)) 。但其他一些功能性细菌启动子也是适用的。它们的核苷酸序列一般是已知的，从而使熟练技术人员能够使用接头或衔接子提供任何所需的限制性位点，将它们可操作地连接到编码前松弛素的核酸上 (Siebenlist et al., Cell 20 : 269 (1980)) 。用于细菌系统

的启动子还将含有与编码前松弛素的核酸可操作地连接的Shine - Dalgarno (S. D.) 序列。

用于原核宿主细胞的表达载体还将含有终止转录和稳定mRNA所需的序列。利用常规连接技术构建含有一个或多个上述成分并包括所需的编码和控制序列的适当载体。切割分离的质粒或核酸片段，剪接、并再连接成所需形式以产生所需的质粒。

本发明实践中特别有用的是适于在原核细胞中表达编码CBD蛋白质之核酸的表达载体。一般说来，表达包括使用能够在宿主细胞中有效复制的表达载体，以使宿主细胞中集聚许多这样的表达载体的拷贝，并由其合成与水平的由该表达载体编码的所需多肽。

用上述本发明的表达或克隆载体转染并较好是转化宿主细胞，并在为了诱导启动子而适当改变成份的常规营养培养基中培养之，选择转化体，或扩增编码所需序列的基因。

“转化”是指将核酸导入生物体中，从而使核酸作为染色体外元件或经染色体整合而得以复制。除非另外指出，本文使用的转化宿主细胞的方法都是如Cohen, F. N.等人(Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69 : 2110 (1972))所述的使用氯化钙的钙处理方法。

为了分析证明所构建的质粒上存在正确插入的序列，用连接混合物转化大肠杆菌K12菌株294 (ATCC 31446)并根据氨苄青霉素或四环素抗性选择成功获得的转化株。制备这些转化体的质粒，进行限制性酶切分析和/或用Messing等人(Nucleic Acids Res. 9 : 309 (1981))或Maxam等人(Methods in Enzymology 65 : 499 (1986))所述的方法进行序列测定。

可用本发明的表达载体转化宿主细胞并在适于诱导启动子的改动的常规营养培养基中培养之，然后选择转化体或扩增基因。温度、

pH等培养条件是以前为进行表达而选择的宿主细胞所适用的，并且对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。

在Sambrook等人(1989) *Electrophoresis buffers in Molecular Cloning* (Nolan, C. ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp. B. 23 - 24; Sambrook et al. (1989) *Bacterial Media in Molecular Cloning* (Nolan, C. ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp. A. 1 - 4)所述的适当培养基中培养用于产生本发明多肽的原核细胞。

可用至少4种一般方法鉴定对产生本发明CBD蛋白质或CBD融合蛋白质之宿主细胞的选择：

(a) DNA-DNA、DNA-RNA或RNA-反义RNA杂交：可使用包含与CBD编码序列同源之核苷酸的杂交探针和/或PCR反应引物，以核酸杂交法检测是否存在编码本发明CBD蛋白质的核酸。

(b) 存在或没有“标志”基因功能：可基于是否存在某些标志基因功能，如抗生素抗性来鉴定和选择携带有编码本发明CBD蛋白质之核酸的宿主细胞。例如，如果编码CBD的序列被插入克隆或表达载体的标志基因序列内，则可根据标志基因功能的消失来鉴定含有该编码序列的转化体。另外也可以将标志基因与CBD核酸序列串联，其中所说的核酸序列处于用来控制CBD编码序列之表达的相同或不同启动子的控制之下。在对诱导或选择的反应中表达标志基因即表明编码CBD之序列的表达。

(c) 经检测宿主细胞中CBD蛋白质或CBD融合蛋白质mRNA转录本的表达，估计转录水平：可用杂交检测法估测CBD编码区的转录活性。例如，可以分离聚腺苷酸化的RNA并使用与CBD编码序列或相特定部分同源的探针以Northern印迹法分析之。另外，也可以提取宿主细

胞的总核酸并检测与这些探针的杂交情况；以及

(d) 以免疫检测法检测，或根据蛋白质以高亲和力及可逆水方式结合纤维素的能力确定CBD蛋白质或CBD融合蛋白质。可以用免疫学方法，例如用Western印迹法或免疫检测法如RIA法估计CBD蛋白质的表达。可以根据所表达的蛋白质以高亲和力及可逆方式结合纤维素的能力来估计CBD蛋白质的表达。

“细胞”和“细胞培养物”两词可以互换使用，并且所有这些都包括其后代和祖先。还应明确的是，所有后代的DNA含量不可能是完全相同的，因此可能存在预有准备的或偶然发生的突变。当筛选细胞时可得到具有同样功能或生物学活性的突变体后代。

本文所用的术语“严格条件”是指这样的杂交条件：(1) 利用低离子强度和高洗涤温度，例如于50℃在0.015M NaCl/0.0015M 柠檬酸钠/0.1% SDS中；(2) 杂交期间利用变性剂如甲酰胺，如50% (v/v) 甲酰胺与0.1%牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液(pH6.5)并加有750mM NaCl、75mM柠檬酸钠，温度以42℃；或者(3) 在42℃下利用50%甲酰胺、5×SSC(0.75M NaCl、0.075M焦磷酸钠)5×Denhardt's溶液、超声波处理的鲑精子DNA(50 μg/ml)、0.1% SDS和10%硫酸葡聚糖，并在42℃于0.2×SSC和0.1% SDS中洗涤。

本文所用的术语“回收”是指在一定条件下从纤维素-CBD蛋白质结合复合物中释放CBD蛋白质的能力，所说的条件包括使用释放剂，例如6M尿素或6M盐酸胍等变性试剂。可使用任何一种具有从纤维素-CBD蛋白质结合复合物中释放CBD蛋白质之能力的释放剂。CBD最好是暂时变性的并且不会因用释放剂处理而被不可逆地降解。因此，可按7.1.1、7.2.1.和8.1.4.节中所述方法经重新

构成被洗脱的蛋白质来回收CBD。

本文所述的术语“裂解剂”是指特异性地裂解CBD蛋白质或CBD融合蛋白质以便根据需要释放或切掉某些成分。例如CBD融合蛋白质的第二种蛋白质。适当的裂解剂包括酶，如蛋白内切酶、激素原转化酶、例如PC1、PC2、弗林蛋白酶 (furin)、Kex2、枯草蛋白酶、或其突变体；以及化学试剂，如有机酸和无机酸、羟胺、N-溴琥珀酰亚胺及溴化氰。下列文献中教导了用各种蛋白水解酶催化肽键水解的方法：The Enzymes, 3rd Edition, Boyer, Ed., Academic Press, Vol. III (1971); Meth. Enzymology, Vol. XIX, Perlman and Lorand, Ed., New York: Academic Press (1970); Meth. Enzymol., Vol. XLV, Lorand, Ed., New York: Academic Press (1976); Drapeau, J. Biol. Chem., 253 : 5899 - 5901 (1978) 和Drapeau, Meth. Enzymology, 47 : 89 - 91 (1977)。更广泛列举化学裂解剂的文献，可参见Witcop, Advances in Protein Chemistry, Anfinsen et al., ed., 16 : 221 - 321, Academic Press, New York (1961), 包括其226页上的表III。适用于本发明的其他裂解剂是本领域技术人员可以了解的，并可根椐裂解需要以及制剂是否可作用还原态或氧化态CBD融合蛋白质而选用之。用于裂解CBD融合蛋白质的条件将取决于所用的裂解剂，并且本领域技术人员可根据所使用的裂解剂来确定裂解条件。

设计并构建本发明的CBD融合蛋白质，以使之包括为在所期望的位置（即在上游，优选在相邻CBD融合蛋白质中第二种蛋白质的N末端处；或在下游，优选在相邻第二种蛋白质的C末端处；或者当融合蛋白质中的第二种蛋白质是融合蛋白质的内部氨基酸时则在相邻两末端处）用所期望的裂解剂完成裂解所必需的密码子。

本文所用的术语“糖基化”和语法上的派生术语是指在转译后经在蛋白质上加入一系列糖残基而产生糖蛋白的修饰过程。糖基化可以发生在哺乳动物的胞质、内质网或高尔基氏器中。另外，也可以以合成方法完成糖基化，例如提供适当的糖基供体（例如参见Kahne et al., J. Am. Chem. Soc., 111 : 6881 - 2 (1989)）。

本发明还涉及使用本发明的CBD融合蛋白质，诊断检测试验样品，特别是组织提取物等生物样品，或血清或尿等体液中的感兴趣的蛋白质。生物样品较好的是哺乳动物来源的，且最好是人来源的。待检测的哺乳动物生物样品中的优选感兴趣蛋白质是HSP蛋白质、HSP抗体、交叉反应性HSP相关蛋白质、或其抗原部分。哺乳动物生物样品中存在HSP抗体，可能是胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）的预兆或指征。在本发明的一个实施方案中，例如借助本领域中已知的各种免疫检测法，使用包含第三种蛋白质，例如抗HSP之IgG抗体的CBD-蛋白A融合蛋白质检测生物样品中抗原，例如HSP的存在。或者，可用包含抗原决定基之CBD融合蛋白质的第二种蛋白质检测可识别该抗原决定基的抗体。优选的抗原决定基是HSP蛋白质。

蛋白A是一种见于金黄色葡萄球菌胞壁中的，与IgG分子的F_c部分结合并因而可沉淀抗体的蛋白质。蛋白质在免疫检测法例如RIA或ELISA中具有实用性，其可用于分离抗体或抗原-抗体复合物。

在本发明中，蛋白A是CBD融合蛋白质的优选的第二种蛋白质。CBD-蛋白A融合蛋白质可用于诊断性免疫检测法，以检测抗体或抗体-抗原复合物的存在，或测定抗体或抗体-抗原复合物的量或浓度。

本发明的CBD-蛋白A融合蛋白质还可用于包含有纤维素和CBD融合蛋白质的诊断试剂盒中，其中CBD融合蛋白质成分保留其与纤维素和第二种成分的IgG，例如抗原-抗体复合物或抗体结合的能力。本

发明的CBD融合蛋白质还可用作亲和纯化抗体或抗原决定基的工具。本发明的优选抗原决定基是HSP蛋白质、其相关蛋白质或抗原部分。优选的CBD融合蛋白质的第二种蛋白质包括HSP蛋白质或抗HSP IgG。在本发明中，CBD-HSP抗原决定基融合蛋白质可用于定量检测人血清中HSP抗体的免疫检测法中。

在本发明的另一个实施方案中，CBD融合蛋白质包括保留其结合纤维素或壳多糖的能力的CBD成分，以及作为保留其催化活性的酶的第二种成分。该实施方案的CBD融合蛋白质可用作在纤维素或壳多糖固相底物上进行酶催化反应的工具。如上所述，可以用常规化学方法将纯化的CBD与纯化的酶制剂连接，或者用重组方法表达编码CBD和酶的核酸，以制备CBD-酶融合蛋白质。在本发明之该实施方案的一个例子中，CBD融合蛋白质的第二种成分是肝素酶（heparanase）。可将CBD-肝素酶固定在纤维素基质上并催化肝素转化成糖成分。

本发明的另一个方面涉及CBD改变植物组织的生长的能力，基于这种能力适于将其用于农业中，例如可望用于促进花粉管生长和/或根生长。另外，因为高浓度CBD具有抑制根生长的能力，故可用于阻止不希望有的植物，例如“杂草”的生长发育。在另一个实例中，CBD可用于增进真菌如蘑菇的生长，其中CBD结合壳多糖并刺激发育中的担子果或结果体的生长和/或发育。

本发明的再一个方面涉及CBD与昆虫外骨骼或包括中肠在内的其他昆虫部分的壳多糖结合的能力。这种能力适于将CBD用作生物杀虫剂，其中使CBD连接到用于控制害虫的微生物如苏云金芽孢杆菌（B T）或表达B T毒素基因的微生物上，或者连接到分泌壳多糖酶的真菌上。CBD的功能是使微生物结合到昆虫的壳多糖部分上，其中微生物产生的毒素或酶导致害虫的死亡。在本发明该实施方案的一个

例子中，可将CBD-微生物复合体直接施用于可能受害虫侵害或有侵害危险的植物部分上，或者可将CBD-微生物复合体固定在设置于被侵害农田中的饵料站上，或被害虫侵害的植物上。在本发明该实施方案的另一个实例中，将CBD-微生物复合体施用于木材或纤维素基产品，以防止或控制由破坏木材的害虫的侵害。例如，将CBD-微生物复合体施用于电话线杆或木材或含纤维素的建筑构件上，其中CBD成分紧密地结合到侵入的昆虫上，并且复合体中的微生物对于控制害虫是有效的。

本发明的再一个方面涉及CBD与真菌，包括适用于生物除污或降解毒性环境污染物之真菌的壳多糖结合的能力。根据该实施方案的一个实例，使用其中第二种成分是降解环境污染物之酶的CBD融合蛋白质。可将CBD-酶融合蛋白质固定在纤维素底物上并用此工具经酶促降解作用除去环境中的污染物，例如可将此工具放在地表或地下水的水流中。根据本发明之该实施方案另一个可代用的实施方式，CBD被结合到分泌用于生物除污即降解环境污染物如杀害虫剂之酶的真菌上。然后将CBD-真菌复合体固定于纤维素底物上并提供适用于酶促降解环境污染物（如包括DDT在内的杀害虫剂，或伐木或锯木操作余留下来的含木材产物）的工具。在一个举例说明性的实施例中，CBD与白色腐败真菌如*Phanerochaete chrysosporium*复合在一起，借以产生木素过氧化物酶、锰过氧化物酶并降解杀害虫剂DDT。CBD-真菌复合体适用于生物除污，例如从环境中除去DDT等杀虫剂。

本文所用的术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体（MAb）、人源化或嵌合抗体、单链抗体、抗独特型（抗Id）抗体，以及这些抗体的抗原表位结合片段。抗原表位是指抗原分子的抗原性决定基。

术语“IgG”是指一类抗体。IgG是含有代表所有免疫球蛋白之

80% 的两条轻链和两条重链的四聚体。

本文所用的术语“可检测标记”是指任何直接或间接提供可检测之信号的标记，并包括酶、放射标记的分子、荧光素、颗粒、化学发光剂、酶底物或辅因子、酶抑制剂、磁性颗粒。本发明中用作可检测标记的酶包括碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶。可用多种方法将可检测标记连接到感兴趣的蛋白质上，例如可使用双功能试剂，如4,4'-二氟-3,3'-二硝基-二苯砒，将酶例如辣根过氧化物酶连接到感兴趣的蛋白质上。然后使所连接的酶与底物反应，以产生可检测的反应产物。

本发明范围内还包括信号扩增方法，其中使用由允许检测毫微微克量感兴趣物质的CBD蛋白质组成的可检测标记。该方法中，在适于形成纤维素-CBD融合产物结合复合物的条件下，将作为CBD融合产物之一部分的第一种CBD蛋白质与纤维素纤维保温。在适于过量标记的CBD结合的条件下，将过量标记的CBD，例如与酶如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶或荧光素或化学染料融合或结合的CBD，与纤维素-CBD融合产物结合复合物一起保温。过量标记的CBD与纤维素-CBD融合产物结合复合物的有效结合得以检测很低量的感兴趣的物质。在本发明的信号扩增方法中，优选的纤维素纤维是卵石磨碎的纤维素纤维。可用各种化学染料着染卵石磨碎的纤维素纤维或与荧光增白剂calcofluor混合，借以结合纤维素并在紫外光照射后产生强的亮兰色荧光。

本发明的范围内还包括固相聚合酶链反应（PCR），其中在适于形成纤维素-CBD融合产物结合复合物的条件下，将作为CBD融合产物之一部分的第一CBD蛋白质与纤维素纤维一起保温，并且其中在结合复合物上发生热循环扩增反应。

本发明的范围内还包括使用链霉抗生物素蛋白/生物素检测系统。

生物素能够与链霉抗生物素蛋白形成紧密的，基本上不可逆的复合物。在本发明的这个方面中，提供了包含上链霉抗生物素蛋白融合之CBD蛋白质的CBD融合产物。使用本领域技术人员已知的技术使核苷酸或蛋白质生物素化，以形成能够结合感兴趣的物质的生物素化的嵌合探针。将生物素化的探针与感兴趣的物质一起保温，将CBD-链霉抗生物素蛋白与生物素化的探针一起保温，并用可检测标记检测生物素化的探针继而检测感兴趣的物质。可检测标记可以是如上文信号扩增方法中所述的标记，或者是其他任何标记如荧光素或化学染料。

本发明的范围内还包括CBD融合产物的治疗或诊断应用，其中CBD融合对象是单克隆抗体。例如，可在以药物/纤维素复合物或针对产生抗原之癌细胞的影象剂/纤维素复合物为靶标的方法，使用包含 (i) 能够以高亲和力结合纤维素并且基本上不含天然与之联系的其他蛋白质的CBD，和 (ii) 能够结合抗原的单克隆抗体的CBD融合产物。在该实施方案中，给哺乳动物使用CBD-单克隆抗体（或其同功抗体片段、scFv片段或抗原结合区）融合产物。同时或在使用CBD融合产物后，使用药/纤维素或影象剂/纤维素复合物。药物/纤维素或影象剂/纤维素复合物与CBD融合产物的结合定位在抗原靶的部位，药物或影象剂在相关部位发挥预期的治疗或诊断活性。

6. 实施例：克隆推断的纤维素结合区域的实验

6. 1. 材料和方法

6. 1. 1. 细菌菌株和质粒

所有的克隆实验都使用得自StrateGene (La Jolla, CA) 的大肠杆菌Xll兰菌株。Studier等人 (J. Mol. Biol., 189 : 113 - 130 (1986)) 描述了大肠杆菌BL21 (DE3) 和pET-8c。

6. 1. 2. 材料

PC缓冲液, pH7, 含有50mM KH_2PO_4 、10mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (柠檬酸钠) 和1mM NaN_3 。TEDG缓冲液 (Chang et al., J. Bacteriol. 172 : 3257 - 3263 (1990)) 含有10mM Tris, pH 7, 0.1mM EDTA, 0.1mM 二硫苏糖醇, 和5% (v/v) 甘油。虽然Tris在pH7条件下有低的缓冲能力, 但因为既没有产生也没有使用氢离子, 所以该缓冲液是适用的。限制性核酸内切酶得自BRL (Bethesda, MD) 所使用的所有其他化学试剂都是有最高纯度的商品试剂。结晶纤维 Avicel® PH101 (批号*1117) 得自FMC公司 (Philadelphia, PA)。脱脂棉花得自Seamless Rubber Co. (New Haven CT)。Cellulon® 纤维由Weyerhaeuser (Tacoma, WA) 提供。蟹壳的颗粒壳多糖购自Sigma公司。所有其他结合底物均购自Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。每种多糖均在使用前用PC缓冲液洗两次。除黑曲霉多糖、Cellulon® 和棉花外, 多糖的质量都是指它们的由制造商提供时的干重。这三种结合底物都有大的干扰检测的颗粒大小。将黑曲霉多糖的固体溶解在热水中, 过滤并在冰上冷却, 以得重结晶体。用Gifford - Wood 磨碎5分钟以降低Cellulon® 和棉纤维的大小。

6. 1. 3. 克隆推断的纤维素结合区域

用Gene Assembler Plus (Pharmacia) 合成互补于侧接推断的CBD (cbpA残基28-189) 之cbpA区域 (Shoseyov et al., PNAS, USA 89 : 3483 - 3487 (1992)) 的DNA引物。正向引物含有NcoI识别位点 (识别序列: CCATGG), 其中有与基因片段片同在读码内的ATG, 以在基因克隆到pET-8c载体克隆位点内时起到转录起始密码子的作用。反向引物含有终止密码子和BamHI位点。使用各20pmol引物、200 μM dNTP和作为模板的1ng cbpA DNA [克隆到载体pGEMEX-1 (Promega)]

中 (Shoseyov et al., 1992, 文献出处同上)] , 以100 μ l 的总体积完成聚合酶链反应 (PCR) 。其中Taq聚合酶购自Amersham, 并使用制造商推荐的缓冲条件。PCR按已述条件 (Innis et al., Optimization of PCRs, PCR Protocols Ed. Innis et al., Pub. Academic Press, San Diego, pp. 3 - 12 (1990)) 进行40次循环。经用苯酚/氯仿提取, 再用乙醇沉降并用70%乙醇洗涤以纯化PCR产物, 然后真空干燥并重新悬浮在27 μ l 蒸馏水中。然后用NcoI和BamHI切割DNA, 于TBE缓冲液中在2.5%低熔点琼脂糖 (Nuseieve GTG, FMC) 凝胶上电泳 (Sambrook et al., (1989) Electrophoresis buffers in Molecular Cloning (Nolan, C. ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp. B. 23 - 24) 。在长波紫外光下肉眼观察用溴乙锭着染的DNA带并从凝胶上切下之。经用NcoI/BamHI切割1 μ g pET-8c DNA并从凝胶上切下线性化的DNA带以制备载体质粒pET-8c。使用Takara连接试剂盒和100 ng 载体DNA及300 ng 插入片段将载体与插入段DNA连接在一起。用连接的质粒转化感受态大肠杆菌XL1-Blue菌株, 然后将其铺敷在含有100 μ g/ml 氨苄青霉素和12.5 μ g/ml 四环素的LB平板上 (Sambrook et al., (1989) Bacterial Media in Molecular Cloning (Nolan, C. ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp. A. 1 - 4) 。37 $^{\circ}$ C过夜保温后, 收集菌落并培养在含氨苄青霉素和四环素的液体LB培养基中。按已述方法从各培养物中得到质粒DNA (Sambrook et al., (1989), Molecular Cloning (Nolan, C. ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) 并用限制酶切割以证实基因片段的插入。使用Shoseyov等人 [(1992) PNAS, USA 89 : 3483 - 87] 报导的方法经DNA序列分析进一步证实插入段

序列。

6. 1. 4. CBD的表达

过表达载体 (pET-CBD) 可以使我们在大肠杆菌菌株BL21(DE3) 中过量产生 17 kDa CBD。CBD积聚在包涵体内可达至少 70 mg/升。但可从大肠杆菌的水溶性声波提取物中回收到约 20 mg/升额外量的水溶性CBD。将澄清的提取物与 (Sigma cell 20) 纤维素混合; 然后用 1 M NaCl 溶液及蒸馏水洗CBD-纤维素复合物以除去非特异性蛋白质, 然后用 6 M 盐酸胍洗脱纯的CBD。经在室温下缓慢透析使CBD完全复性并重新恢复其与纤维素结合的能力。(图 10, 泳道 2)

7. 实施例: CBD蛋白质的纯化

7. 1. CBD蛋白质的制备

7. 1. 1. CBD蛋白质的纯化

用含有插入段的质粒DNA转化大肠杆菌BL21(DE3)。37℃下, 在含有氨苄青霉素 (100 μg/ml) 的NZCYM (Sambrook et al., (1989); Molecular Cloning (Nolan, C. ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) 培养基中将含质粒的培养物振荡培养到Klett读数为160 (绿色滤光片)。此时, 加入IPTG至终浓度 1 mM。4小时后, 离心收获细胞, 重新悬浮在含有RNase A (10 μg/ml) 和DNase I (1 μg/ml) 的 50 mM磷酸盐 / 12 mM柠檬酸盐pH 7 (PC) 缓冲液中, 并在冰上经用Biosonic II超声波发生器以最大功率超声波处理 45 秒; 再冷却 15 秒以溶解细胞, 此处理过程重复 4 次。离心 (4℃, 12,000 g, 30 分钟) 收集 1 升细胞培养物的非可溶部分并将其重新悬浮在 20 ml 6 M 盐酸胍中。将此悬液在冰上放置 30 分钟, 同时间断搅动以分离沉淀团块。离心 (4℃, 12,000 g, 30 分钟) 除去不溶性碎片, 4℃下, 在 2 小时期间里用TEDG复性缓

冲液将可溶性盐酸胍提取物逐步稀释到总体积400ml。加入硫酸铵至80%饱和度。4℃下放置4小时后，离心（4℃，12,000g，30分钟）收集沉淀的蛋白质，重新悬浮在40ml PC缓冲液中，并对PC缓冲液透析。

经在纤维素柱上亲和层析进一步纯化cbpA的CBD蛋白质片段：三次加入1.0g Avicel® PH101微晶纤维素从溶液中除去CBD蛋白质。每次加入之后均要使悬浮液恢复平衡（室温下缓慢旋转1小时）。然后离心收集纤维素并在下次加入前除去之。3克纤维素先用1M NaCl/PC缓冲液洗1次，再用PC缓冲液洗2次。经用10ml 6M尿素洗3次从纤维素上洗脱纯化的CBD。合并尿素洗脱部分并对PC缓冲液透析（4℃至室温）。使用Micro BCA蛋白质检测试剂盒（Pierce, Rockford, IL），用牛血清白蛋白（BSA）作标准品，以比色法分析最终纯化的部分中的蛋白质浓度。

7.1.2. CBD-纤维素解离常数和

纤维素结合容量的检测

向含有添加了1mg/ml BSA和所需量纤维素（一般加入1ml含有10mg/ml纤维素和1mg/ml BSA（在PC缓冲液中）的储备溶液）之PC缓冲液的1.5ml微量离心管内加入CBD蛋白质的样品（一般为0至100μg）。经加入200μl的20mg/ml储备溶液（在PC/BSA缓冲液中）而使其中包含可能的竞争剂，如纤维素（4mg/ml）或羧甲基纤维素（CMC，4mg/ml）。终体积一直是1ml。除非另外注明，缓冲液的pH均为7.0。如在其他pH值下进行实验，可加入浓盐酸或NaOH来调节PC/BSA缓冲液的pH。

在37℃下将检测试管缓慢旋转（30RPM）1小时以混合内容物。然后在微量离心机中将样品离心1分钟以沉淀纤维素和纤维素-

蛋白质复合物。除去缓冲液后，经重新悬浮在 1 ml P C 缓冲液中洗涤沉淀。离心分离洗液并弃去之。然后将沉淀重新悬浮在终体积 1 ml 的 P C 缓冲液中（因为 [C] 和 [P C] 被浓缩到同样的程度，故预期浓缩步骤不会扰乱平衡）。

洗涤步骤后，在检测试管内的原有 BSA 中（约 1 mg/ml）只保留约 0.1 μg 不是非特异吸附的材料，并且在沉淀团块中留有 10 μl 液体。以对照管为 0 CBD，计算由于此残留 BSA 所致的任何显色。分取该充分混合之悬液的等分试品，用 Micro BCA 试剂盒进行蛋白质检测。按照制造商提供的说明书进行检测，但其中用 P C 缓冲液将样品体积调到 0.5 ml，再向其中加入 0.5 ml BCA 工作试剂。将检测混合物于 60°C 保温 30 分钟。在 Shimadzu 160U 型分光光度计中在 562 nm 处以分光光度法检测澄清之上清液的蛋白质浓度。使用其中没有加 CBD 蛋白质的检测试管校正由纤维素和残留 BSA 引起的小量显色。将所得数据与 BSA 标准品相比较，并调整到与用来确定各样品中结合到纤维素上之蛋白质量相适应的稀释度。该检测法的实际检测限度约为 0.2 μg/ml。校正稀释度后，即相当于检测试管中结合到纤维素上的约 0.034 nmol CBD。从加到试管中的总 CBD 浓度 [P]_t 减去结合的蛋白质浓度 [P C] 算出游离 CBD 蛋白质浓度 [P]：

$$[P] = [P]_t - [PC] \quad (1)$$

假定一种简单的平衡关系（Segel, 1975）来分析该系统：



其中解离常数 K_d 定义为：

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[P][C]}{[PC]} \quad (3)$$

方程式 (4) 和 W 在纤维素的不同的固定水平上借助 $1/[PC]$ 对 $1/[P]$ 的双倒数作图：

$$\frac{1}{[PC]} = \frac{K_d}{[PC]_{\max}} \cdot \frac{1}{[P]} + \frac{1}{[PC]_{\max}} \quad (4)$$

和 $[PC]/[P]$ 对 $[PC]$ 的 Scatchard 作图：

$$\frac{[PC]}{[P]} = \frac{-1}{K_d} [PC] + \frac{[PC]_{\max}}{K_d} \quad (5)$$

分析这些数据。

必须说明的是，纤维素不是可溶性成分，并且 $[C]$ 代表每单位体积暴露于缓冲液的纤维素表面上结合位点的浓度。同样， $[PC]$ 则代表每单位体积结合位点-蛋白质复合物的浓度。使用 DeltaGraphProfessional plotting application (Deltapoint, Inc., Monterey, CA)，以最小二乘方法绘出与各数据点配合的直线。每个点都是从同一结合试验管得到的三个独立的蛋白质检测数据的平均值。以一式两份进行实验。至少使用两个不同的纤维素量确定 K_d 和 PC_{\max} 。g 纤维素。求出这些值的平均数以得到表 1、图 9 中列出的数值。

进行实验以确定温度对 CBD 结合纤维素的影响。向 300 μ l 的 50mM P C 缓冲液 (pH 6)、1 M NaCl (终浓度) 和 1 mg 纤维素中加入 200 μ l CBD (40 μ g)。在不同温度 (16 至 60 $^{\circ}$ C) 下将 CBD/

纤维素混合物的几种混合物保温 1 小时并不时地混合之，然后以 10,000 g 离心 5 分钟。用含有 NaCl 的 P-C 缓冲液 pH 6 将沉淀团块洗 2 次。向离心沉淀物中加入 40 μ l 6 M 盐酸胍，悬浮后于室温下继续保温 30 分钟。离心后，将 20 μ l 样品稀释在 780 μ l ddH₂O 中并使用 Bio Rad 试剂盒测定蛋白质浓度。

7. 1. 3. 检测与其他多糖的结合

在检测法使用木聚糖、黑曲霉多糖、Sephadex[®] G - 75 及壳多糖，以确定它们是否为 CBD 蛋白质的结合底物。在所有例子中，均使用检测与纤维素结合的相同方法。在 MicroBCA 检测法中壳多糖表现出很高的本底，其中按比例增加到 60 °C 的保温时间，从而颜色展现时间减少到 15 分钟。因为壳多糖的高本底，所以只使用两个宽的不同的蛋白质浓度。

7. 2. 结果

7. 2. 1. 用于结合分析的 CBD 的纯化

为了选择性地产生推测的 cbpA 的 CBD 区域（残基 28 - 189），设计互补于 cbpA 之碱基 67 至 86 和 558 至 579 的寡核苷酸引物（图 1A - 1B）。如图 2A - 2C 中所示，设计这些有错配的引物以在 PCR 产物的一个末端造成一个 NcoI 位点和一个 ATG 起始密码子，并在另一端造成一个 TAG 终止密码子，然后是 BamHI 位点。然后将此基因片段克隆到 T7 RNA 聚合酶表达载体 pET-8c 中，得到质粒 pET - CBD（参见 Studier, F., and B. A. Moffatt (1986) J. Mol. Biol. 189 : 113 - 130）。克隆的基因片段编码 CBD 之 N 末端上的蛋氨酸，但 CBD 氨基酸序列的其余部分相当于 CbpA 的残基 28 至 189。该蛋白质片段分子量为 17634。经 DNA 序列分析证实已被插入。由携带 pET - CBD 的大肠杆菌 EL21 (DE3) 细胞产生 CBD 蛋白质。加入 IPTG 后，该宿主菌株产生可识别 pET 载体中 T7

启动子的 T 7 RNA聚合酶。cbd基因片段处于该可诱导启动子的控制下，并且在诱导后大量合成CBD蛋白质（图 3）。4 小时生产阶段后，来自溶解之细胞的可溶性提取物只含有小量的CBD蛋白质，而大多数CBD蛋白质是见于非可溶性部分中。该蛋白质很容易溶解在浓缩的盐酸胍中，并且可在TEDG缓冲液中经缓慢稀释后复性。已发现以这种分离的蛋白质可结合Avicel[®]，从而证实其为推测的CBD。虽然该部分基本上都是CBD蛋白质，但所述的检测法要求蛋白质是高纯度的。用 7.1.1. 小节中所述方法，经一次纤维素亲和结合纯化步骤即可达到这一纯度。当用考马斯亮兰染色时，亲和纯化的CBD蛋白质即作为单一带呈现在丙烯酰胺凝胶上。可从 1 升培养物中的细胞内回收到大约 70 mg CBD蛋白质。

7.2.2. CBD与纤维素结合的时间

过程及温度对结合的影响

Avicel[®] 与CBD相互作用的时间过程（图 4）揭示了该过程的以下几个特征：

(a) 在1.0mg/ml Avicel[®] 和2.0 μ M CBD的起始浓度(即[P]₀)下，经60分钟达到1.2 μ M复合物的平台值。单独的实验证实，纤维素样品的最大CBD结合容量为2.1 μ mole \times g⁻¹，相当于2.1 μ M总纤维素位点的有效浓度(即[C]₀)。假定平衡确立(如下证实的)，则限定为[P][C]/[PC]的K_d约为0.6 μ M。

(b) 由可逆Bi Uni反应的综合速度方程式(Capellos & Bielski, 1980; Wilkinson, 1980)计算的结合的二级速度常数约为2.7 \times 10⁻⁴ M⁻¹ \times min⁻¹ (5-60分钟各点的平均值)。作为K⁻¹/K_d计算的复合物解离的速度常数为1.6 \times 10⁻² \times min⁻¹ (t_{1/2} = 4.3分钟)。相对长的复合物解离的t_{1/2}允许一次洗出C + PC

沉淀团块而没有明显地丢失结合的CBD（最初沉淀团块的重新悬浮和再离心于1分钟内完成。在此期间，将丢失不到3%的结合的CBD）。还观察到，在延长保温后所测得的[PC]降低，18小时后降低到最大值的约50%的水平。这种[PC]降低可因蛋白质的逐步变性而引起。为了减小因这些影响造成的假象，我们使用了对其平衡似乎是“完全的”最短保温时间（60分钟以后结合的进一步增加可因实验误差而不易看清）。与纤维素结合的CBD量为 $4.5 \pm 0.5 \text{ mg/克}$ 纤维素，并且在大约16至60℃温度范围内不受温度的影响。

7. 2. 3. CBD-纤维素结合亲和力和结合容量分析

图5A-5B显示了纯CBD与Avicel®微晶纤维素结合的典型诊断标示图。在实验误差范围内，该图是线性的，所得Kd值约为 $0.6 \mu\text{M}$ ，每克Avicel®结合CBD的[PC]_{max}为 $2.1 \mu\text{moles}$ 。后一数值相当于大约每克Avicel® 3.7 mg CBD蛋白质。诊断图的线性提示只呈现一种类型的CBD-纤维素相互作用。

还研究了CBD与Avicel®以外的其他类型纤维素结合的能力。表1，图9显示用各不同底物测得的Kd和PC_{max}的数值。Sigmacell 20和50被描述为微晶形式的纤维素；发现这些材料也与CBD结合。高结晶形式的纤维素如脱脂棉和Cellulon®纤维（得自Acetobacter xylinum的结晶纤维素）能够结合实质上更多的CBD（多达每克底物结合 $6.4 \mu\text{mol}$ CBD）。然而，发现经过更多加工的并因此而含有较少天然结晶形式纤维素的纤维状或微颗粒纤维素则结合较小量的CBD。所有形式的纤维素的CBD-纤维素解离常数都大致相同，而PC_{max}值则相差达30倍。

7. 2. 4. 结合位点竞争

为了确定是否可溶性碳水化合物与Avicel[®] 竞争结合CBD蛋白质, 在某些试验中包含4倍(w/v)于Avicel[®] 量的纤维素二糖(β -1,4键连接的葡萄糖二聚体)和CMC(一种纤维素的可溶性衍生物)(每毫升试验样品含1mg Avicel[®], 4mg纤维素二糖或CMC)。如表1, 图9所示, 没有观察到K_d和PC_{max}的明显差异, 表明这些可溶性碳水化合物没有影响CBD与Avicel[®] 的结合。

7. 2. 5. pH对解离常数的影响

溶纤维梭菌(*C. Cellulovorans*)是一种只在pH7左右生长旺盛的嗜中性生物体(Sleat et al., 1984), 所以大多数结合试验中使用这一pH。在pH5.0至8.0范围内, PC_{max}没有随pH改变而发生明显的变化。另外, 应提到的是, 偏酸达pH3.5或偏碱达pH9.5的PC缓冲液在1分钟洗涤期间不会从Avicel[®] 上洗掉CBD。

7. 2. 6. CBD与其他多糖的结合

使用木聚糖、Sephadex[®] G-75、黑曲霉多糖、和壳多糖检验CBD的结合特异性。这些多糖中, 只有壳多糖显示有可检测的CBD肽结合(表1, 图9)。壳多糖-CBD K_d和结合容量相似于Avicel[®] -CBD结合容量值。

7. 3. 结果

我们实验结果显示, cbpA含有可靠的结合纤维素的区域, 并且显示该区域可独立于cbpA的其他区域发挥功能。因为纯化方法中包括了变性和复性步骤, 所以纯化的蛋白质是功能性的这一事实即表明CBD蛋白质序列是可保证该蛋白质片段的适当折迭。

我们已发现, 在进行平衡结合实验中CBD与检测试管的非特异性结合是一个问题, 并建立了一种在过量BSA存在下平衡CBD和纤维素的

检测法。BSA可有效地消除CBD与试管的非特异性相互作用。达到平衡后，收集并洗涤纤维素和纤维素-蛋白质复合物，然后检测结合的蛋白质。如前所述，因为CBD-纤维素的解离缓慢，所以在快速洗涤步骤中没有除去可检测量的CBD。

用蛋白质检测法直接检测结合的CBD，并按第7.1.2.节方程式1中所示，从总CBD中减去结合的CBD以计算游离CBD。该方法的优点是，可经洗涤步骤除掉以低亲和力非特异地吸附到纤维素上的CBD分子，从而得到更准确地反映CBD与纤维素表面之间特异的、高亲和力相互作用的数据。如图5A-5B中所示，使用这种类型的检测法采集的数据构成了(在实验误差内)线性诊断图。双倒数作图对于可逆的Bi Uni系统来说是一种确定结合亲和力及容量的方便的、常规的方法。PC_{max}随着所用纤维素的量呈线性增加，而K_d值则不依赖于纤维素量这一观察结果支持该检测法的有效性。表1，图9显示了用各种形式的纤维素及其他碳水化合物获得的实验结果。这些结果表明，描述为“结晶”类型的纤维素比因经过较多加工处理而丧失了其大部分结晶性的纤维素有更高的CBD结合容量。纤维素样品的PC_{max}因纤维素类型不同有宽范围的变化，而K_d则保持恒定这一事实表明，我们已检测到了发生在CBD和纤维素之间的一种类型的强的蛋白质-纤维素相互作用。经高度加工的纤维素的较低PC_{max}反映了样品中存在较小数目的潜在蛋白质相互作用位点，并且似乎与样品的结晶性相关。虽然不希望拘泥于理论，但这一结果将表明结晶纤维素具有某些特殊的性质使之可被接受为结合底物，而非结晶纤维素则没有这样的性质。

为了进一步确定CBD的底物特异性，我们检测了所加入的可溶性底物(纤维素二糖或CMC)对纤维素结合的影响。如表1，图9中所示，过量的纤维素或CMC对CBD-Avicel® K_d或PC_{max}没有影响。这

一缺乏竞争的事实提示，CBD识别位点是对比简单重复的葡萄糖或纤维素二糖部分更复杂的结构特异的，并进一步提示也许需要纤维素链的特定三维空间排布。

CBD对结晶纤维素的特异性提示考虑壳多糖酶，已知该酶可与壳多糖——一种以 $\beta - 1, 4$ 键连接的乙酰葡糖胺的聚合物——紧密结合。与纤维素一样，壳多糖也可根据其来源和其分离中所使用的纯化方法分为多种不同的形式 (Cabib (1988) *Methods Enzymol.* 161 : 460 - 462; Blackwell (1988) *Methods Enzymol.* 161 : 435 - 442)。用于亲和纯化壳多糖酶的壳多糖是 α -壳多糖，其中链间是以反平行的方式排列的。这种形式的壳多糖是结晶态的，其结构相似于天然结晶纤维素 (通常称为纤维素 I)。与其中各链以反平行构象排列的纤维素 II 相反，纤维素 I 是其中纤维素链以平行束排列的形式的。在苛刻条件下加工纤维素 I 可致使其破坏而产生纤维素 II。由于广泛的氢键形成，所以这两种形式都是结晶态的。因为我们的分离的 CBD 与受到较少处理的纤维素结晶，即主要与纤维素 I 结合，所以我们有兴趣了解 CBD 是否也可与具有相似晶体结晶，但链的排列方向相反的 α -壳多糖结合。令人惊奇的是，我们发现 CBD 接受壳多糖为结合底物，其 K_d 近似于对纤维素结合的 K_d 值。还试验了木聚糖 ($\beta - 1, 4$ 木糖)、黑曲霉多糖 (交替的 $\alpha - 1, 4$ 和 $\alpha - 1, 3$ 葡萄糖)、及 Sephadex[®] G - 75 (有 $\alpha - 1, 3$ 分支的 $\alpha - 1, 6$ 葡萄糖) (Coutinho et al. (1992) *Mol. Microbiol.* 6 : 1243 - 1252)，但在未检测法条件下 CBD 没有显示出与它们之中任何一种多糖有可检测的结果。因为壳多糖只是这些结晶的底物中的一种，所以我们感到这一实验结果证明底物的结晶性是很重要的。

虽然这旨定是有利于紧密地纤维素结合的部分因素，但最近的研究

究 (Din et al. (1991) Bio/Technol. 9 : 1096 - 1099) 已表明分离的、非酶促的CBD对纤维素的结合导致了以非水解方式破坏纤维素纤维。据信蛋白质-纤维素结合降低了晶体表面附近链内氢键结合的程度。进而导致这些纤维素链的广泛水合作用。最终结果是降低了结晶性。这一称为“非晶态发生”的过程使纤维素纤维更易接近内- β -1,4-壳多糖酶。正如我们已发现的, CBD没有表现出这种非晶形化作用。

7.4. 与Aspergillus niger、Spodoptera littoralis及Heliothis armigera结合的CBD

室温下将黑曲霉菌丝体(约20mg)与400 μ l CBD(120 μ g)在20mM Tris-HCl(pH7)中保温1小时。用同样缓冲液将菌丝体洗两次,然后将沉淀物再悬浮于含有 β -巯基乙醇和SDS的SDS-PAGE上样缓冲液中。将混合物煮沸5分钟并经SDS-PAGE分样蛋白质。图16显示CBD与黑曲霉的菌丝体结合。

在显微镜下分离Spodoptera littoralis和Heliothis armigera(农业中的主要昆虫病原体)的中肠膜,取大约20mg与400 μ l含CBD(120 μ g)的20mM Tris-HCl(pH7)在室温下保温1小时。在同样缓冲液中用1M NaCl将含壳多糖的膜洗一次,再用没有NaCl的同样缓冲液洗两次,然后用含有 β -巯基乙醇和SDS的SDS-PAGE上样缓冲液重新悬浮沉淀物。将混合物煮沸4分钟并经SDS-PAGE分析蛋白质。所得结果示于图17和18中。结果表明CBD与Spodoptera littoralis和Heliothis armigera的中肠结合。

8. CBD-ProtA基因的构建和其在大肠杆菌中的表达

8.1. 材料和方法

8.1.1. 酶和化学试剂

除特别说明者外，化学试剂均购自Sigma Chemicals Inc.。限制酶购自 New England Biolabs Inc.。Taq聚合酶购自Promega, Inc.。

8.1.2. 质粒和细菌

使用携带cbpA的质粒pCB1 (Shoseyov et al., 1992) 以PCR方法扩增cbd。使用表达载体pRIT2 (Nilsson et al. (1985) EMBO J. 4 (4) : 1075 - 1080) 构建融合体基因。使用大肠杆菌菌株XL1-blue (Stratagene) 进行最初的转化。在含有温度敏感性阻遏蛋白的菌株，2097中表达CBD-ProtA。另外大肠杆菌菌株N4830-1 携带温度敏感性阻遏蛋白ci857，等同于大肠杆菌菌株2097。大肠杆菌菌株N4830-1 可购自Pharmacia, Inc.

8.1.3. CBD-ProtA的克隆

CBD是使用cbpA基因作模板经PCR扩增的。引物A (N末端引物：5' - GGGGAATTCCATGGCAGCGACAT - 3') 含有EcoRI位点，引物B (C末端引物：5' - GGGGGGATCCTATGGTGCT - 3') 含有终止密码子，之后是BamHI位点。设计并以一种能够强制EcoRI/BamHI 500bp DNA片段克隆到“读码内”与蛋白A基因之C末端部分融合的质粒pRIT2中的方式合成这些引物。PCR条件如Innis 和Gelfand (1990) 所述，但作了如下改动：反应混合物中使用2 ng 模板DNA (cbpA) 和1 mM MgCl₂。使用可编程的热控制器(M & J Research Inc.) 进行反应。按照Sambrook等人在Molecular Cloning (Nolan, C. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) 中所述方法进行标准的DNA操作。用EcoRI和BamHI消化PCR扩增的产物，并使用QIAEX凝胶提取试剂盒 (Qiagen Inc.) 从1.5%琼脂糖凝胶中分离期望的500bp DNA片段(图1A-1B)。使用T4连接酶将此EcoRI/BamHI片段连

接到已用EcoRI/BamHI切成线性的pRIT2中。用连接混合物转化XL1 - Blue感受态细胞并在含有100mg/L氨苄青霉素的LB琼脂平板上选择已被转化的菌落。将含有DNA插入段的成功地得到的构建体定名为pCBD - ProtA1。

8. 1. 4. CBD-ProtA的表达和纯化

按文献中描述的方法 (Nilsson et al. (1985) EMBO J. 4 (4) : 1075 - 1080) 进行融合蛋白质的表达。将400ul含有pCBD - ProtA1的大肠杆菌菌株2097培养过夜接种到40ml含有50mg/L氨苄青霉素的LB中。使培养物于30℃下生长至100 Klett (绿色滤光片), 改变温度至42℃培养45分钟, 然后于40℃继续培养2小时。以2,000g离心10分钟以收获细胞, 然后将细胞重新悬浮在10ml 20mM Tris - HCl缓冲液 (pH 7) 中。使用W - 385超声波发生器 (Heat Systems - Ultrasonic, Inc.) 以最大功率超声处理1分钟, 然后冷却30秒钟, 如此重复3次以破碎细胞。溶胞产物离心 (4,000g, 10分钟) 得到澄清液并加入500mg纤维素颗粒 (Sigmacell 20, 平均粒度20微米)。室温下将悬浮液保温10分钟并离心 (2,000g, 10分钟)。除去上清, 并用5ml 1M NaCl将沉淀洗1次以除去非特异性结合的蛋白质, 然后用10ml去离子水洗2次。用5ml 6M盐酸胍从纤维素中除去CBD - ProtA。离心 (2,000g, 10分钟) 后, 在20mM Tris - HCl缓冲液 (pH 7) 中透析所得溶液, 按照Laemmli (1970)所述方法在12.5% SDS - PAGE上分析蛋白质。

8. 1. 5. CBD-ProtA的结合分析

按下述方法检验CBD - ProtA与IgG的结合: 将已用PBS (磷酸盐缓冲盐水 pH 7.4) 预洗过的兔IgG (H + L) - Sepharose (8mg/ml,

Bio - Makor Inc.) 的 $100\ \mu\text{l}$ 悬浮液与 $1\ \text{ml}$ 分离的 CBD-ProtA ($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 混合。将混合物于 $8\ ^\circ\text{C}$ 下保温 1 小时, 然后离心 ($2,000\ \text{g}$, 5 分钟)。除去上清并用 $500\ \mu\text{l}$ PBS 将沉淀物洗两次。然后, 用 $200\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ 乙酸洗脱 CBD-ProtA。将沉淀物与 $15\ \mu\text{l}$ 上样缓冲液 (SAB; $125\ \text{mM}$ Tris - HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% 甘油和 0.002% 溴酚兰) 混合, 将 $15\ \mu\text{l}$ 不同洗脱部分的样品与 $15\ \mu\text{l}$ SAB 混合, 然后煮沸 5 分钟并在 SDS - PAGE 上分析。

按下述方法检验 CBD-ProtA 与纤维素的结合: 将 $20\ \text{mg}$ 纤维素 (Sigma cell 20) 与 $200\ \mu\text{l}$ 分离的 CBD-ProtA ($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 混合。将混合物于室温下保温 15 分钟并以 $2,000\ \text{g}$ 离心 5 分钟。用 $200\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ 乙酸洗沉淀物后, 重新悬浮于 $40\ \mu\text{l}$ SAB 中。将悬液与 $15\ \mu\text{l}$ 乙酸洗液 (与 $15\ \mu\text{l}$ SAB 混合的) 一起煮沸并在 SDS - PAGE 上分析。

8. 1. 6. 结果

结果显示可以在大肠杆菌中表达 CBD-ProtA, 并可以使用纤维素以一步骤纯化法纯化之。融合蛋白质具有期望的分子大小, 即 $45\ \text{kDa}$ (图 8)。CBD-ProtA 保留了其对纤维素及 IgG 的亲合性。已表明 $1\ \text{M}$ 乙酸可分离 CBD-ProtA: IgG 键但不能分离 CBD-ProtA: 纤维素键。

使用表达载体, 我们每升培养物能生产 $6\ \text{mg}$ CBD-ProtA, 我们使用 T7 过表达系统的经验能够生产 10 倍以上的纯 CBD ($70\ \text{mg}/\text{L}$, 图 9)。

9. CBD-HSP 融合蛋白质的克隆

克隆 CBD-HSP 融合蛋白质的一个实例如下所述: 使用质粒 SJ60 作为模板制备扩增 HSP 基因的 PCR 引物。Jindal 等人 (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 2279) 描述了该质粒。引物含有 HSP 之 N 末端上的 KpnI 位

点和C末端上的终止密码子，其后是BamHI位点。

正向引物：5'-ACGGTACCACTTCGGTTACCCACAGTC-3'

反向引物：5'-GGGGATCCTACATGCCACCTCCCATTAG-

为了能使CBD的C末端转录融合到HSP的N-末端上，我们在3'末端引入了一个KpnI位点，这个引入用PET-CBD作为模板和下列引物完成了cbd的PCR扩增：

正向引物：5'-GTATACCAGCCATGGCAGCG-3'

反向引物：5'-GTACATCTGGATCCTATGGTACCGT-3'

用NcoI和BamHI消化扩增的DNA，然后将其连接到NcoI/BamHI预消化的pET-8c载体中。然后用连接混合物转化XL1-Blue并将新的质粒定名为pET-CBDK。用KpnI/BamHI消化该质粒，并与用KpnI/BamHI限制性消化的HSP-PCR扩增的片段连接；转化到XL1-Blue中，并在进一步证实后用该构建体转化BL21(DE3)，以过量产生CBD-HSP。

10. NH₂-V_H-V_L-CBD-CO₂的构建

使用“重组相抗体系统”（“Recombinant Phase Antibody System”）（Pharmacia Inc.）克隆所需的V_H-V_L完成CBD与重组抗体的融合。使用所得到的携带V_H-V_L的pCANTAB5质粒作为模板，借助下列引物进行PCR扩增：

正向引物：5'-AGCCATGGCGGCCAGC-3'

反向引物：5'-GGGGTACCAACAGTTTGTGCGGCC-3'

这些引物在V_H-V_L的5'末端导入NcoI位点，并在3'末端导入KpnI位点。用NcoI和KpnI消化经扩增的片段并按下述方法用于CBD C末端融合的表达载体中。

为了使CBD的N末端部分转录融合到V_H-V_L的C末端部上，我们在cbd基因的3'末端导入一个KpnI位点。使用作为模板的pET-CBD

和下列引物，经PCR扩增cbd完成这一导入：

正向引物：5'-GGGCCATGGCAGGTACCTCATCA-3'

反向引物：5'-GTACATCTGGATCCTATGGTGCTGT-3'

这些引物使KpnI位点导入至5'末端NcoI位点之后的cbd基因，并保留了3'末端的终止密码子，其后为BamHI位点，扩增DNA经NcoI和BamHI酶切后，再连接到经NcoI/BamHI酶切的pETSC载体上。该连接混合物用来转化XL1Blue，并将这个新质粒定名为pET-KCBD。该质粒经NcoI和KpnI酶切与NcoI/KpnI限制性酶切V_H-V_L扩增片段连接，转变为XL1Blue。该结构一经证实，便可用来转化BL21(DE3)，以产生过量V_H-V_L-CBD融合蛋白质。

从上文公开的和本领域普通已知的观点看，本领域普通人员显然可以制备包含CBD和第二种已知序列的蛋白质的各种CBD融合产物。

1.1. 用CBD-ProtA纤维素纯化IgG

本实施例证明使用CBD纯化IgG。将在磷酸盐缓冲盐水(PBS)(pH 7.4)中稀释的人血清(500 μ l, 1:10)加到20mg CBD-ProtA-纤维素悬浮液(4 μ g/mg)中。将混合物于8 $^{\circ}$ C下保温1小时，然后快速离心和两次500 μ l PBS洗涤除去未结合的蛋白质。经用200 μ l 1M乙酸洗涤(室温下15分钟)回收IgG，而CBD-ProtA则仍与纤维素结合。

1.2. CBD的特征鉴定

本实施例证明CBD并不破坏纤维素。CBD没有纤维素破坏/非晶形发生的活性。在20mM Tris-HCl缓冲液pH 7中将大约1mg CBD与各10mg两种不同类型的纤维素(棉花和Cellulon[®])于37 $^{\circ}$ C保温过夜。在扫描电子显微下用金涂包并观察纤维素样品。图1.4A和1.4B清楚地证明，与对照组未经处理的棉花相比，CBD处理的纤维

素纤维仍保持完整。

检测 pH 和 NaCl 浓度对 CBD-ProtA 对纤维素之结合容量的影响。将 450 μ l CBD-ProtA (100 μ g) 加到含有 550 μ l 含有不同缓冲液 (含有不同浓度 NaCl, 即 0、0.25、0.5、1 M NaCl、1 mg 纤维素 (Sigmacell 20) 和 1 mg BSA) 的试管中。在不时地混合的同时将试管于 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时, 并以 10,000g 离心 5 分钟。用它们的相应缓冲液将沉淀物洗两次。将 40 μ l 6 M 盐酸胍加到经悬浮的沉淀中并于室温下继续保温 30 分钟。离心后, 用 780 μ l ddH₂O 稀释 20 μ l 样品并使用 BioRad 试剂盒测定蛋白质浓度。图 15 显示低 pH, 渐增 NaCl 浓度可增加 CBD-ProtA 与纤维素的结合, 以致达到 70 mg/g 纤维素。

1.3. CBD 改变植物组织的生长

1.3.1 材料和方法

1.3.1.1. 植物材料

从 Rehovot 的苗圃得到桃 (*Prunus persica* CV. Texas) 的花。在开花期的第 1 天从花丝上切掉从花上出集的花药, 并在 30 $^{\circ}$ C 至少脱水 24 小时。所释放的花粉可以新鲜使用或者储存在 -20 $^{\circ}$ C 下。*Arabidopsis thaliana* 的种子得自 University Stock。

1.3.1.2. 体外花粉萌发

使花粉粒在各含 100 μ l 生长培养基之液体培养物的 Eppendorf 试管中发芽。按下述方法制得生长培养基: 使桃花粉粒在含有 1.5% (w/v) 蔗糖、100 μ g/ml H₃BO₃、200 μ g/ml MgSO₄·7H₂O 和 200 μ g/ml Ca(NO₃)₂·4H₂O 的生长培养基中发芽。向试管内加入不同浓度的 CBD 或 BSA。各试管中花粉粒的数量约为 1,000 个。每份处理作三次重复。在暗的小室内 25 $^{\circ}$ C 保温过夜后,

各标品中以最少100个花粉粒的群体检验花粉（每份处理300粒）。

1 3 . 1 . 3 . 种子萌发

在蒸馏水中洗 *Arabidopsis thaliana* 的种子。将每种处理的约100粒种子浸在加于直径2 cm和长1 0 cm玻璃培养管内的1 ml蒸馏水中。将培养管放在温度恒定在2 5 °C的生长小室中并施加光/暗分别为1 6 / 8小时的光照周期。4天后，测出籽苗、茎、根和根毛（各籽苗中最长）的长度，以检查不同处理对植物器官的影响。

1 3 . 1 . 4 . 组织化学研究

以10,000 g离心于0.1M磷酸盐缓冲液（p H 7.4）中含4 %戊二醛固定过夜的生长培养基1分钟，从此生长培养基中洗出加或不加CBD培养的桃花粉管。用同样缓冲液洗花粉管，然后小心悬浮在加于同样缓冲液内的同体积的4 %戊二醛中，并于4 °C保留过夜。再次离心分离花粉管，用同样缓冲液洗，再用蒸馏水洗，然后用荧光增白剂（calcofluor, 0.1%在0.1M $K_3 PO_4$ ）染色，以显示结晶细胞壁成分。用黄光显微镜（RA Zeiss Oberkochen）进行显微观察。以同样方式处理拟南芥（*Arabidopsis*）籽苗，但其中改变了溶液使其不产生沉淀。

以免疫金-银染色法（IGGSS）检验桃花粉管和 *Arabidopsis* 籽苗，以证明CBD与纤维素的结合。首先用加在PBST（磷酸盐缓冲盐水 TWEEN 2™）中的4 %戊二醛将植物材料固定过夜。用PBST洗样品洗1小时，在1 %脱脂乳中浸1小时，然后与在PBST中以1 : 500稀释的多克隆兔抗CBD抗体保温1小时。在PBST中将样品洗3 × 1 0分钟，然后与在PBST中以1 : 100倍稀释的连接有5 nm金颗粒的羊抗兔IgG一起保温1小时。用PBST将样品洗2 × 1 0分钟，然后在水中洗1次。使用银染色药盒（BioCell Research Laboratories）使反应最后

显色。将样品置于药盒的合并的溶液中浸大约 10 分钟，然后用足够的蒸馏水洗。在光学显微镜下观察样品。

1 3 . 2 . 结果

1 3 . 2 . 1 . CBD对花粉管生长的影响

图 1 9 显示与BSA（对照蛋白质）比较的CBD对花粉管长度的影响。不同的字母指示花粉管长度值之间的实质上显著的不同（ $P \leq 0.05$ ）。此证明CBD促进花粉管生长。BSA可能是借助渗透作用抑制花粉管生长。在这方面，以 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度获得的结果最为明显，其中，CBD处理的花粉产生的花粉管增长几乎是用 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ BSA处理之花粉增长的 2 倍。

在检测CBD之作用方式的尝试中，用荧光增白剂（calcofluor）着染花粉管（CBD处理组和对照组）以显示结晶细胞壁成分。图 20 A 和 20 B 证明，如由在顶芽区没有亮颜色所显示的，CBD处理的花粉管产生了非结晶花粉管顶芽。顶芽区没有坚质的结晶细胞壁可能有利于花粉管延长。对CBD处理的花粉管的金-免疫标记证明，如由顶芽区上的密集的暗点所显的，CBD沿着花粉管被结合。另外，还强有力地表明，在顶芽区没有坚硬的结晶细胞壁是由于CBD造成的。一个可能的机制是，CBD随所形成的纤维素纤维插入，从而抑制结晶化过程。

1 3 . 2 . 2 . CBD对根和根发生长的影响

检测CBD对拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）幼苗之根生长的影响，结果如图 2 2 所示。在高浓度时，CBD显著地降低根长度，而较小浓度（ $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）的BSA则没有影响。不同的字母指示根长度值之间的实质性显著差异（ ≤ 0.05 ）。对茎干长度的影响显示有相似的趋势，但不象对根影响那么显著，并且没有实质上的显著性。对CBD处理的*Arabidopsis thaliana*幼苗的金-免疫标记（图 2 3）显示

金标记只限于根，而在茎干上则没有显示出标记。用荧光增白剂（calcofluor）着染拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）籽苗显示出只表明可接近纤维素的根被着染（图 2 4）。在茎上没有亮颜色表明染色不能穿透腊质表皮，则解释了为什么CBD对根有效，而对茎干无效。

高浓度（ 1×10^{-6} 至 $1 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$ ）CBD对根延长的抑制作用可解释为纤维素的空间阻碍，从而通过松解坚质纤维素纤维网状结构而阻止其接近酶如内-葡聚糖酶或木糖葡聚糖转移酶或调节细胞伸长的蛋白质。在低浓度时，CBD可增加细胞壁的结晶性，或者干扰木糖葡聚糖纤维素相互作用，从而阻止纤维素网状结构的交联。

本申请所描述的这些结果清楚地证明，可使用纤维素作为可溶性固相基质，将CBD融合蛋白质用于亲和纯化蛋白质和酶。此外，基于上文的公开内容，本领域普通技术人员显然可以了解到CBD融合产物具有广泛的潜在应用，其中包括但不只限于亲和纯化方法及用于诊断试剂盒中。

1 4 . 微生物的寄存

下列微生物于1993年4月12日寄存在美国典型培养物保藏中心（ATCC）（12301 Parklawn Drive, Rockville, MD）并给出如下指出的登记号：

微生物	登记号
E. coli pCBD-ProtA1/2097	69283
E. coli pET-CBD/BL21 (DE3)	69282
E. coli pCBD-ProtA1	75443
E. coli pET-CBD	75444

本文描述并提出权利要求的发明不只限于特定实施方案的范围内，因为这些实施方案旨在举例说明本发明的几个方面。任何等同的实施方案也将落入本发明范围内。除了本文显示和所描述的这些实例外，本领域技术人员显然可以根据上文的描述作出各种改动。这些改动也将落入本发明待批权利要求范围之内。

还应了解的是，所有给定的核苷酸和肽的碱基对和氨基酸残基编号及大小都是近似的，并且只用于描述的目的。

本文所引用的许多参考文献，均以其全文公开的方式插入本文作为本文参考文献。

说 明 书 附 图

	10	20	30	40	50	
GCA GCG ACA TCA TCA ATG TCA GTT GAA TTT TAC AAC TCT AAC AAA TGA GCA CAA CGT CGC TGT AGT AGT TAC AGT CAA CTT AAA ATG TTG AGA TTG TTT AGT CGT GTT Ala Ala Thr Ser Ser Met Ser Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Lys Ser Ala Gln>			10			
	60	70	80	90	100	
ACA AAC TCA ATT ACA CCA ATA ATC AAA ATT ACT AAC ACA TCT GAC AGT GAT TTA TGT TTG AGT TAA TGT GGT TAT TAG TTT TAA TGA TTG TGT AGA CTG TCA CTA AAT Thr Asn Ser Ile Thr Pro Ile Ile Lys Ile Thr Asn Thr Ser Asp Ser Asp Leu>	20			30		
110	120	130	140	150	160	
AAT TTA AAT GAC GTA AAA GTT AGA TAT TAT TAC ACA AGT GAT GGT ACA CAA GGA TTA AAT TTA CTG CAT TTT CAA TCT ATA ATA ATG TGT TCA CTA CCA TGT GTT CCT Asn Leu Asn Asp Val Lys Val Arg Tyr Tyr Tyr Thr Ser Asp Gly Thr Gln Gly>		40		50		
	170	180	190	200	210	
CAA ACT TTC TCG TGT GAC CAT GCT GGT GCA TTA TTA GGA AAT AGC TAT GTT GAT GTT TGA AAG ACC ACA CTG GTA CGA CCA CGT AAT AAT CCT TTA TCG ATA CAA CTA Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser Tyr Val Asp>			60		70	
	220	230	240	250	260	270
AAC ACT AGC AAA GTG ACA GCA AAC TTC GTT AAA GAA ACA GCA AGC CCA ACA TCA TTG TGA TCG TTT CAC TGT CGT TTG AAG CAA TTT CTT TGT CGT TCG GGT TGT AGT Asn Thr Ser Lys Val Thr Ala Asn Phe Val Lys Glu Thr Ala Ser Pro Thr Ser>			80			90

	280	290	300	310	320												
ACC	TAT	GAT	ACA	TAT	GTT	GAA	TTT	GGA	TTT	GCA	AGC	GGA	GCA	GCT	ACT	CTT	AAA
TGG	ATA	CTA	TGT	ATA	CAA	CTT	AAA	CCT	AAA	CGT	TCG	CCT	CGT	CGA	TGA	GAA	TTT
Thr	Tyr	Asp	Thr	Tyr	Val	Glu	Phe	Gly	Phe	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Lys>
									100								

	330	340	350	360	370												
AAA	GGA	CAA	TTT	ATA	ACT	ATT	CAA	GGA	AGA	ATA	ACA	AAA	TCA	GAC	TCG	TCA	AAC
TTT	CCT	GTT	AAA	TAT	TGA	TAA	GTT	CCT	TCT	TAT	TGT	TTT	AGT	CTG	ACC	AGT	TTG
Lys	Gly	Gln	Phe	Ile	Thr	Ile	Gln	Gly	Arg	Ile	Thr	Lys	Ser	Asp	Trp	Ser	Asn>
	110										120						

380	390	400	410	420	430												
TAC	ACT	CAA	ACA	AAT	GAC	TAT	TCA	TTT	GAT	GCA	AGT	AGT	TCA	ACA	CCA	GTT	GTA
ATG	TGA	GTT	TGT	TTA	CTG	ATA	AGT	AAA	CTA	CGT	TCA	TCA	AGT	TGT	GGT	CAA	CAT
Tyr	Thr	Gln	Thr	Asn	Asp	Tyr	Ser	Phe	Asp	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Val	Val>
		130												140			

	440	450	460	470	480												
AAT	CCA	AAA	GTT	ACA	GGA	TAT	ATA	GGT	GGA	GCT	AAA	GTA	CTT	GGT	ACA	GCA	CCA
TTA	GGT	TTT	CAA	TGT	CCT	ATA	TAT	CCA	CCT	CGA	TTT	CAT	GAA	CCA	TGT	CGT	GGT
Asn	Pro	Lys	Val	Thr	Gly	Tyr	Ile	Gly	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Thr	Ala	Pro>
					150												160

图 1B

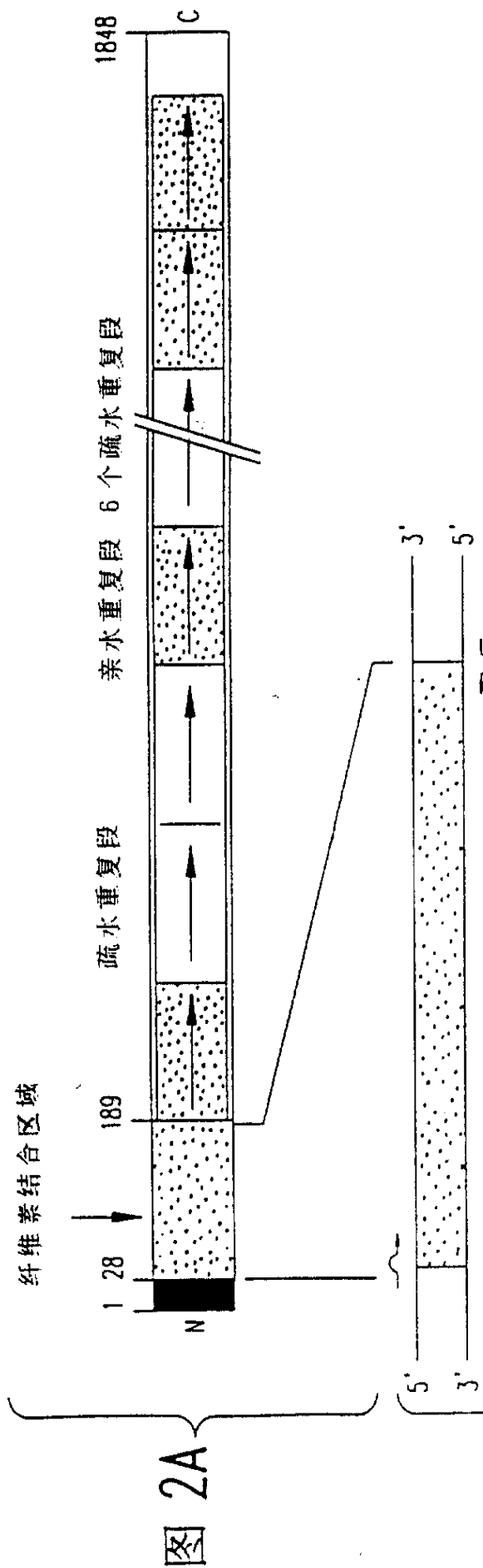


图 2A

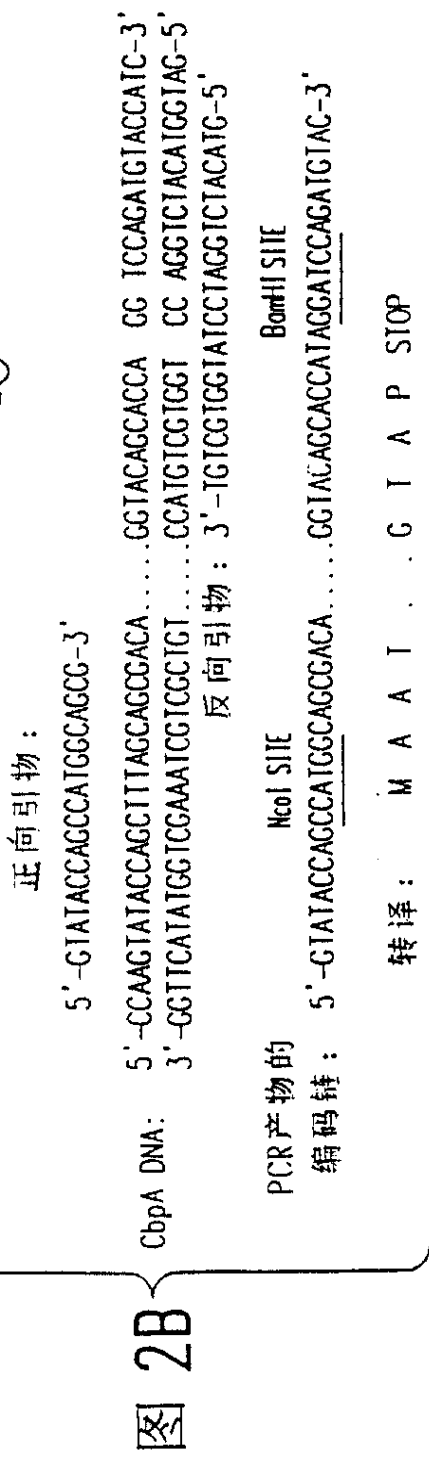


图 2B

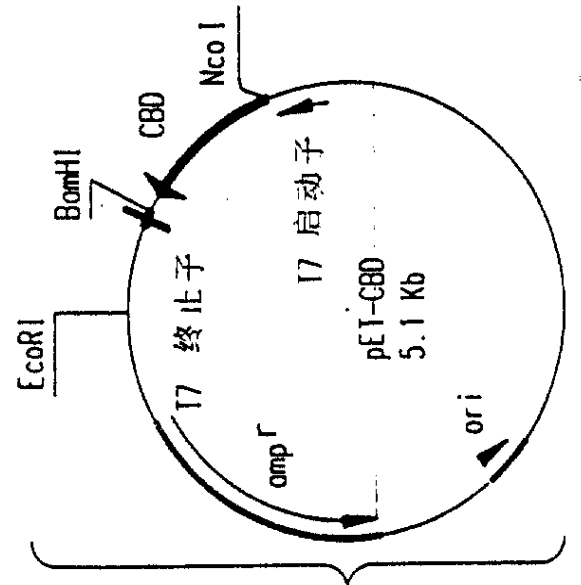


图 2C

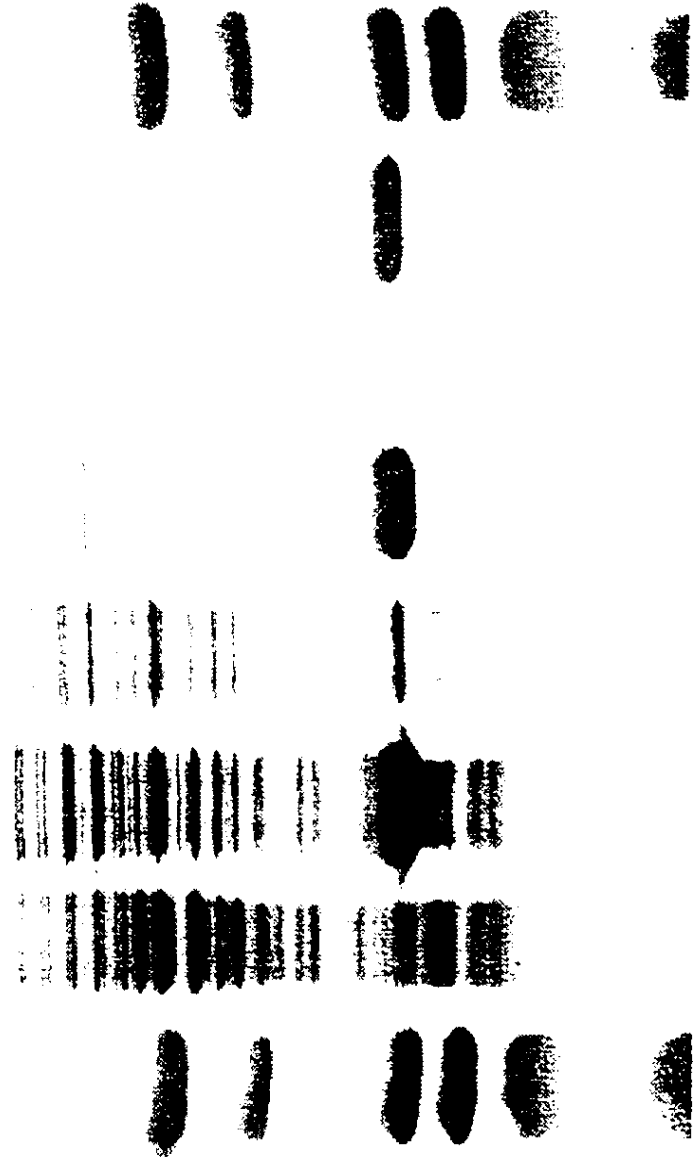


图 3

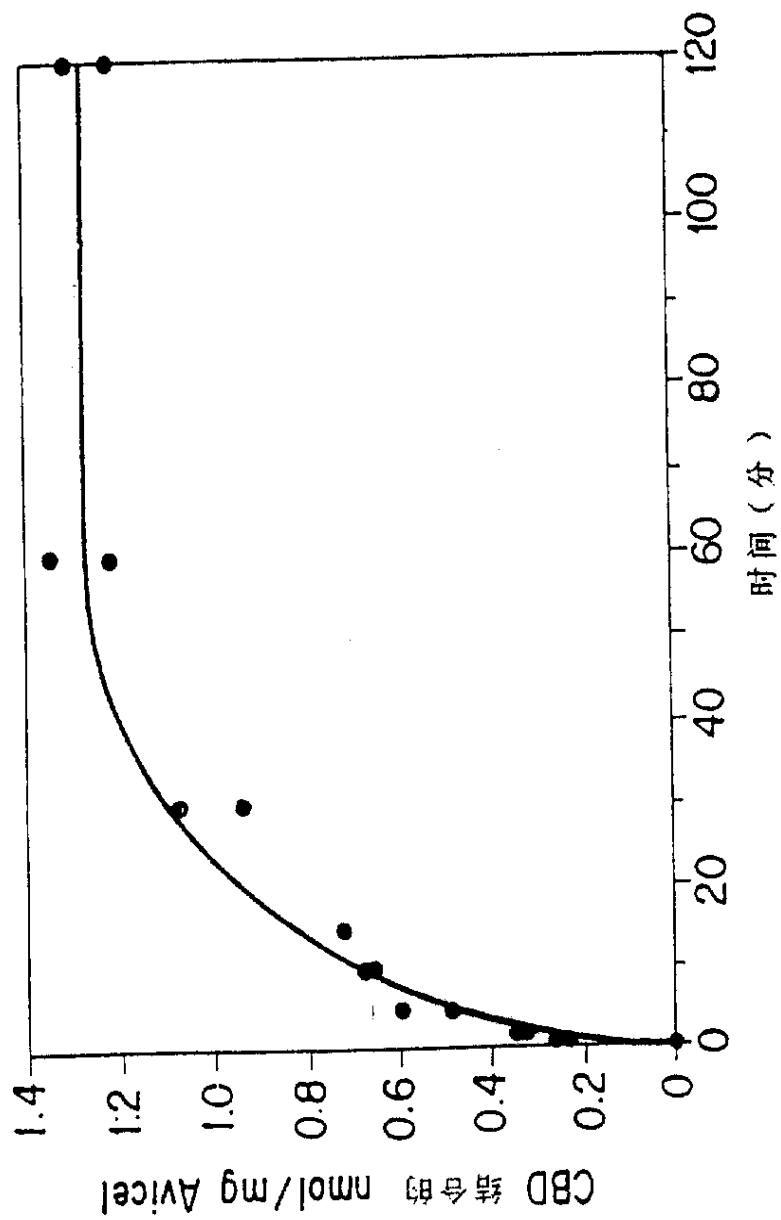


图 4

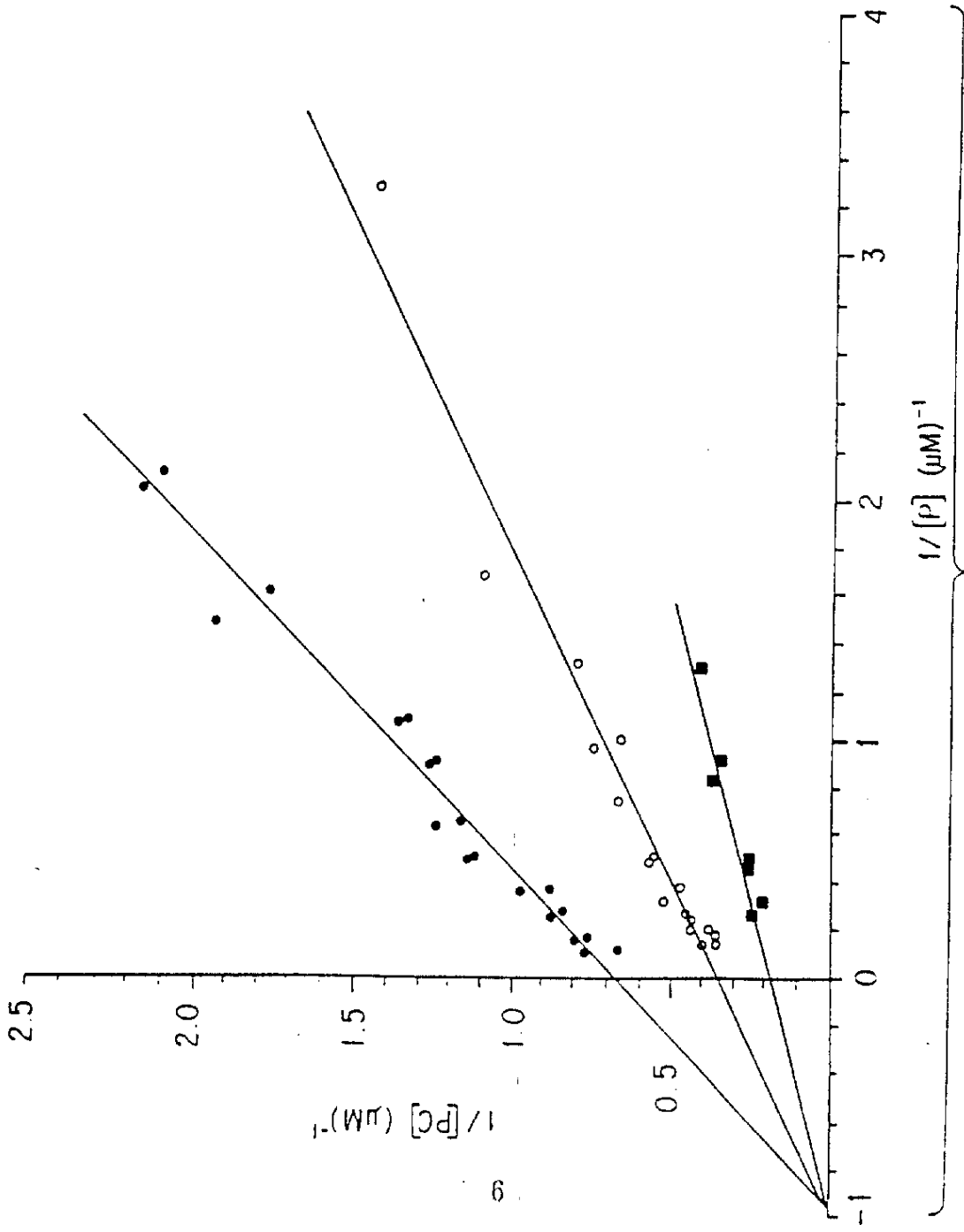


图 5A

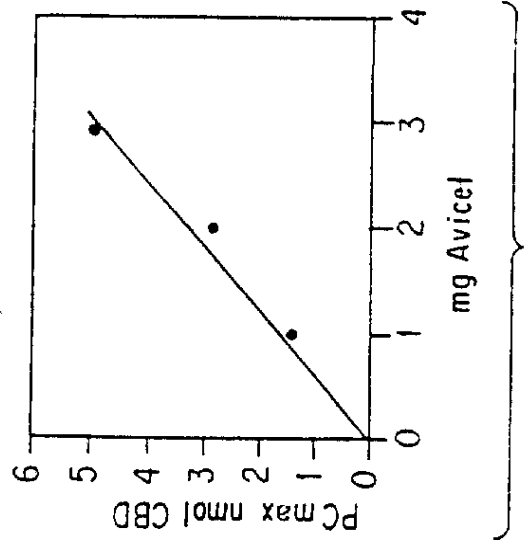


图 5B

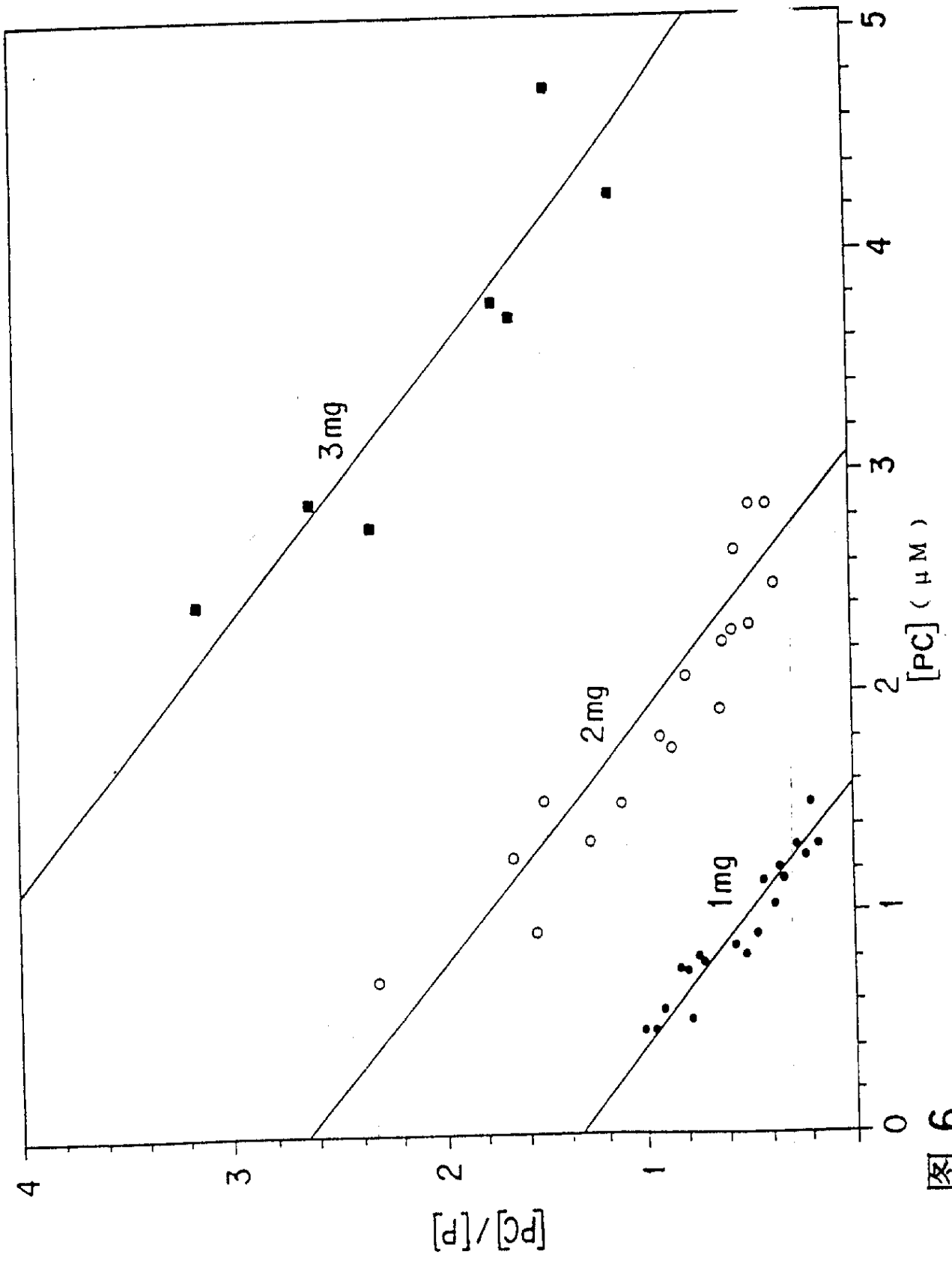


图 6

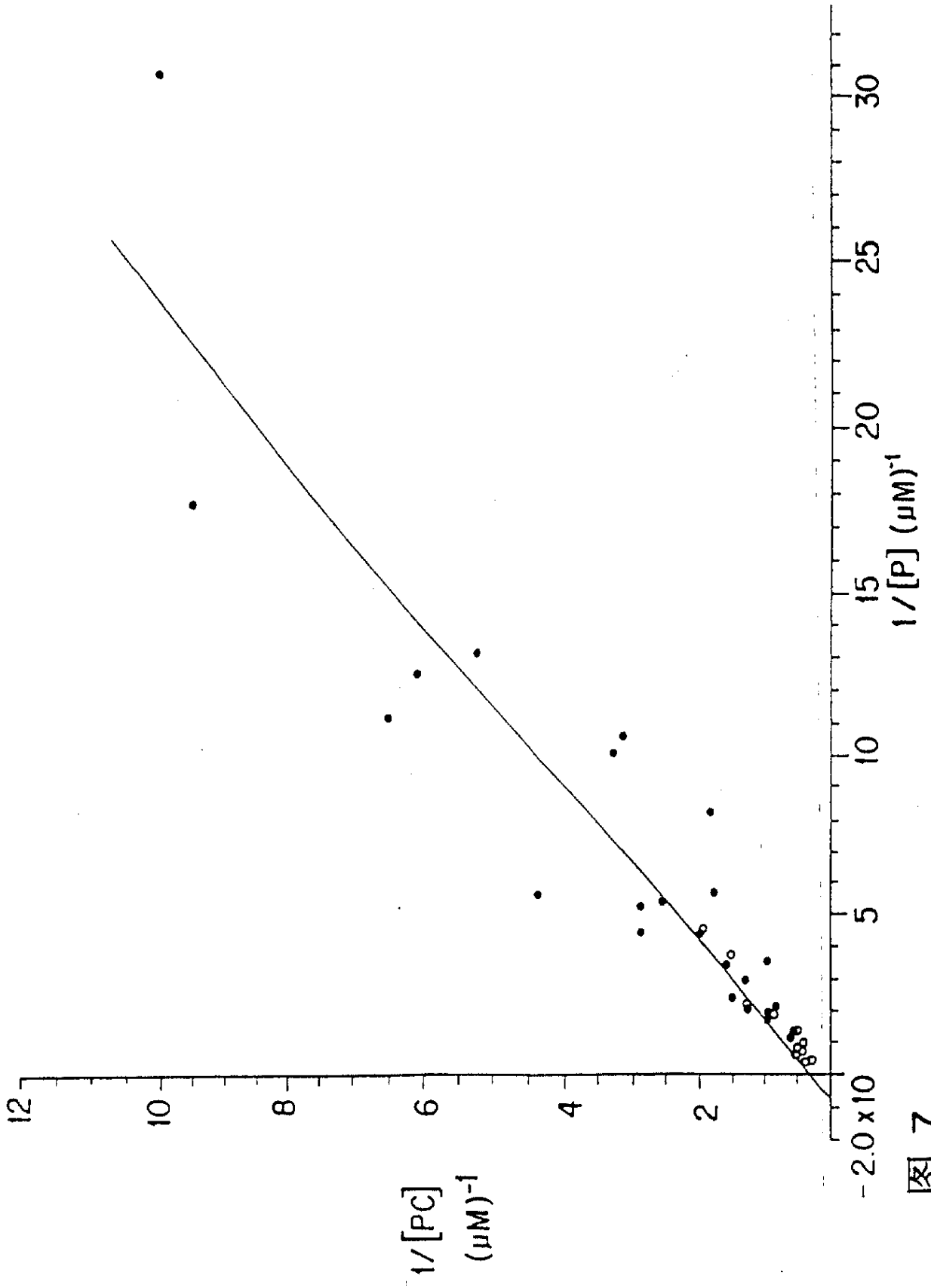


图 7

纯的 CBD-ProtA.

1M 乙酸洗液

CBD-ProtA+ 纤维素 (沉淀团块)

对纤维素的亲和性

1M 乙酸洗液

PELLET

CBD ProtA IgG Seph. (上清液)

对IgG的亲和性

标志

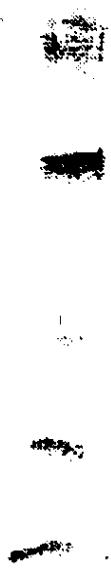


图 8

底物：	测得的Kd (μM)	测得的PC _{max} ($\mu\text{mol CBD/g}$)
AVICEL PH101	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.3
SIGMACELL 20	1.1	1.2
SIGMACELL 50	1.4	1.7
SIGMACELL 100	1.3	0.5
微晶纤维素	1.0	0.4
纤维状纤维素	1.4	0.2
棉花	0.8	6.4
CELLULON	1.2	5.3
木聚糖	-	0
SEPHADEX G-75	-	0
黑曲霉多糖	-	0
壳多糖	1.0	1.6
AVICEL PH101 +CMC (4mg/ml)	1.1	1.1
+ 纤维二糖 (4mg/ml)	1.0	1.5

图 9

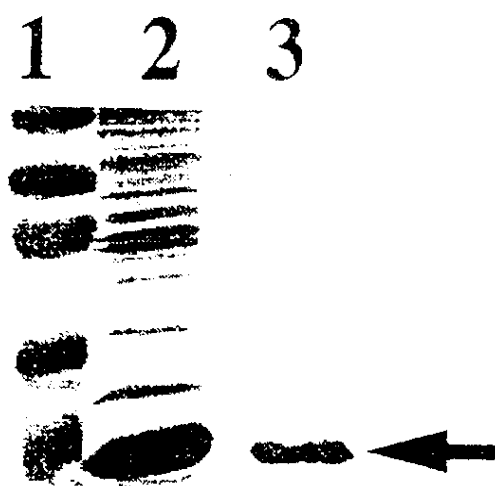


图 10

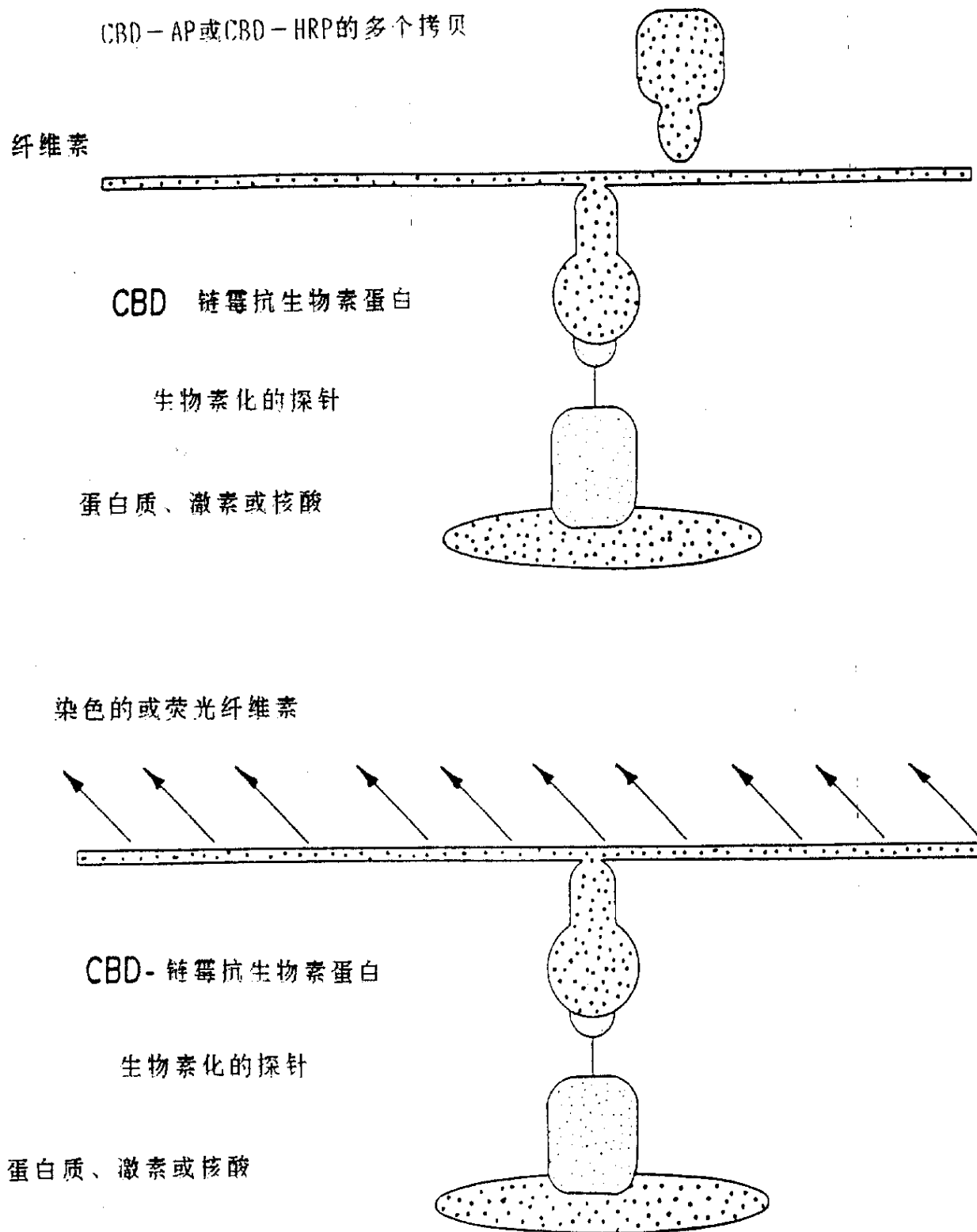


图 11

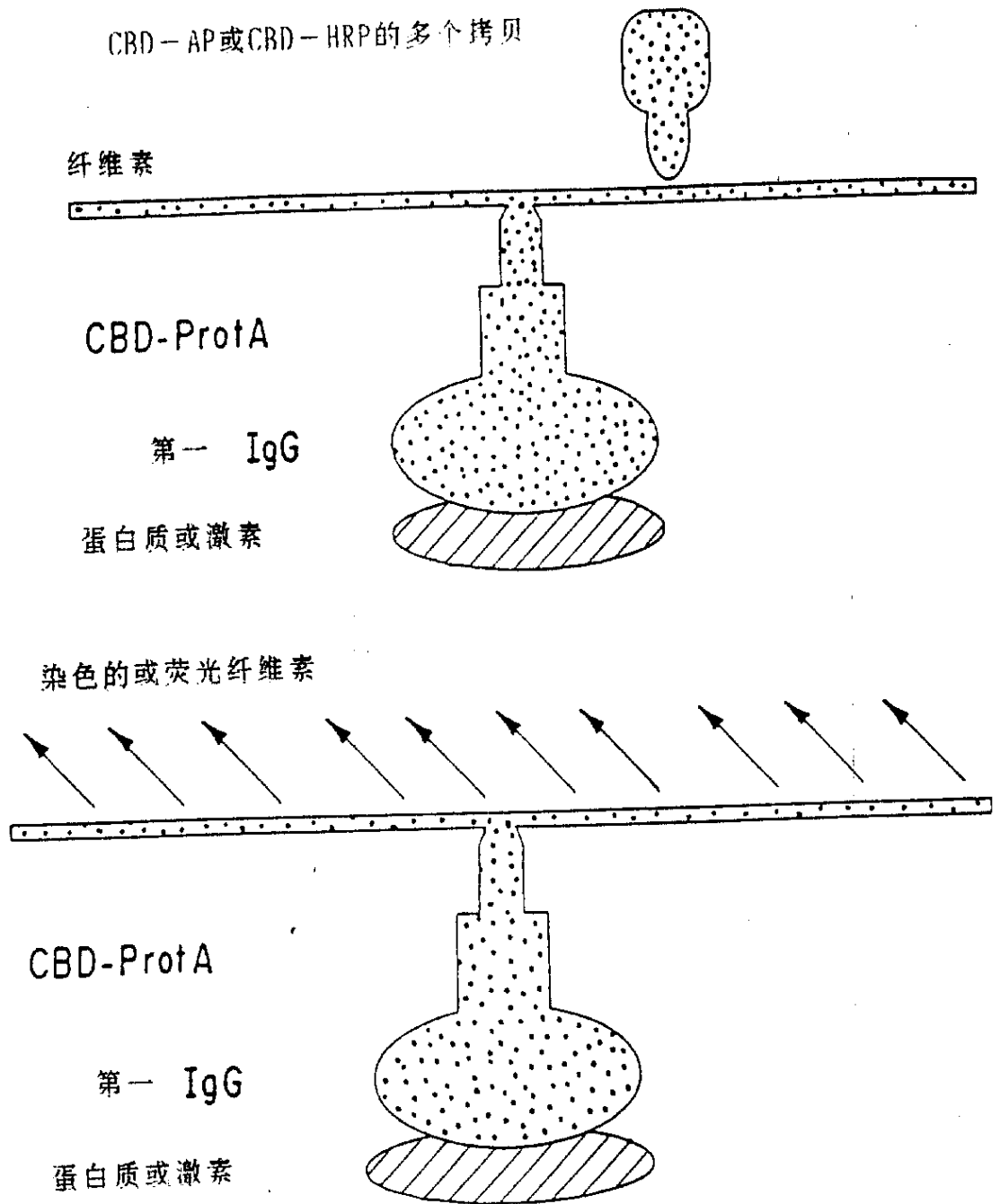


图 12

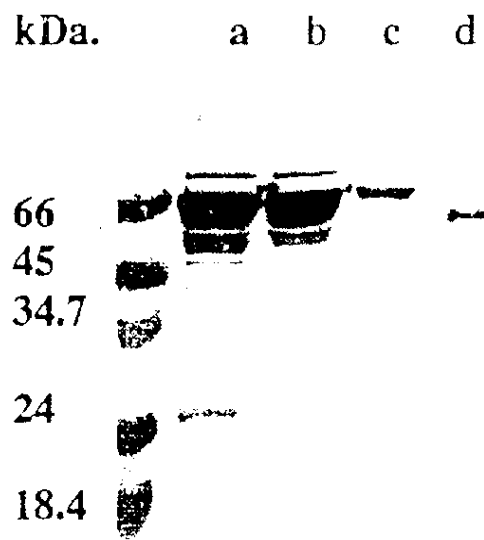


图 13



图 14A

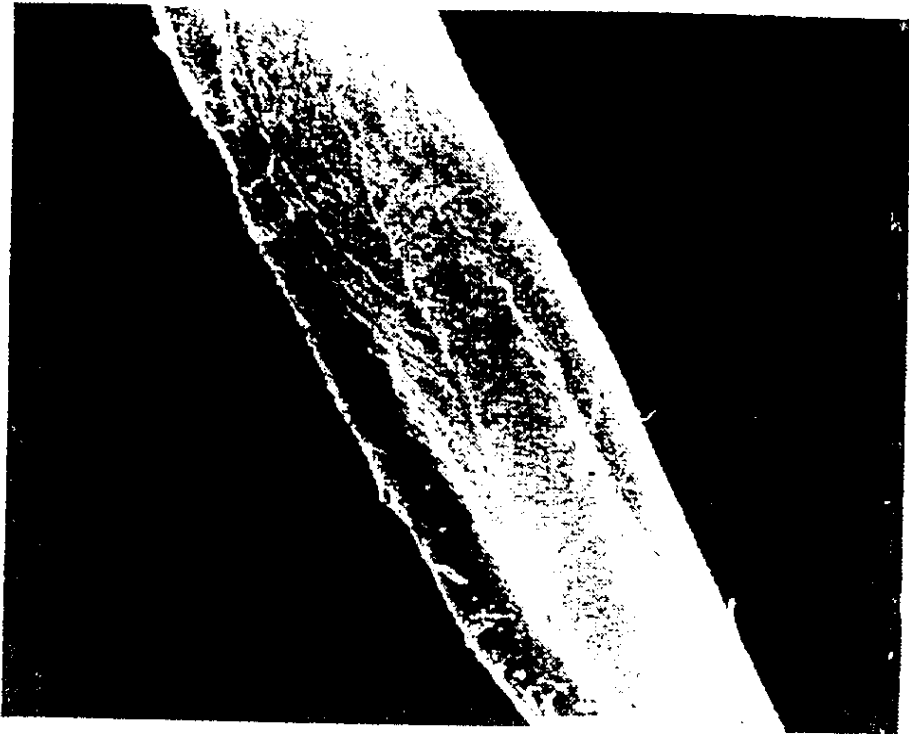


图 14B

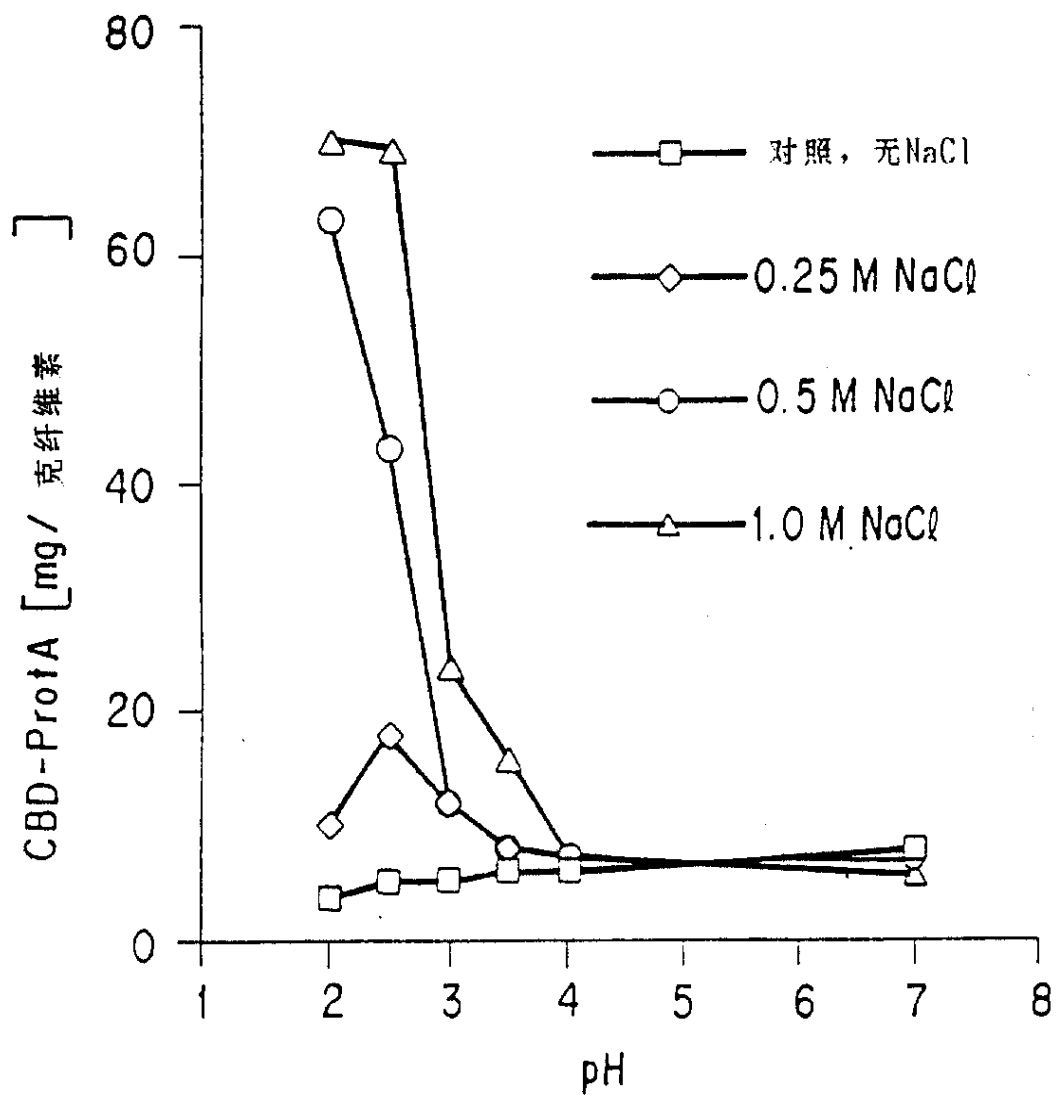


图 15

a b c

CBD



图 16

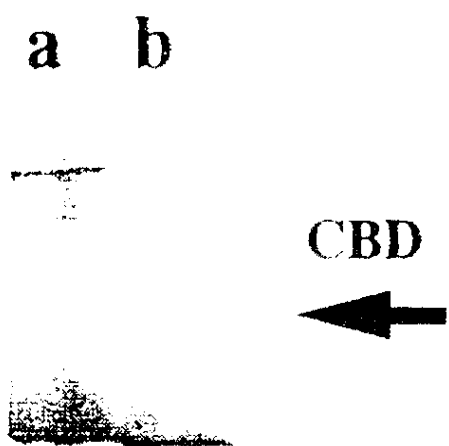


图 17

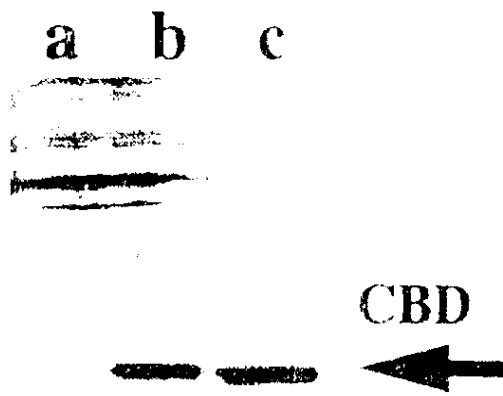


图 18

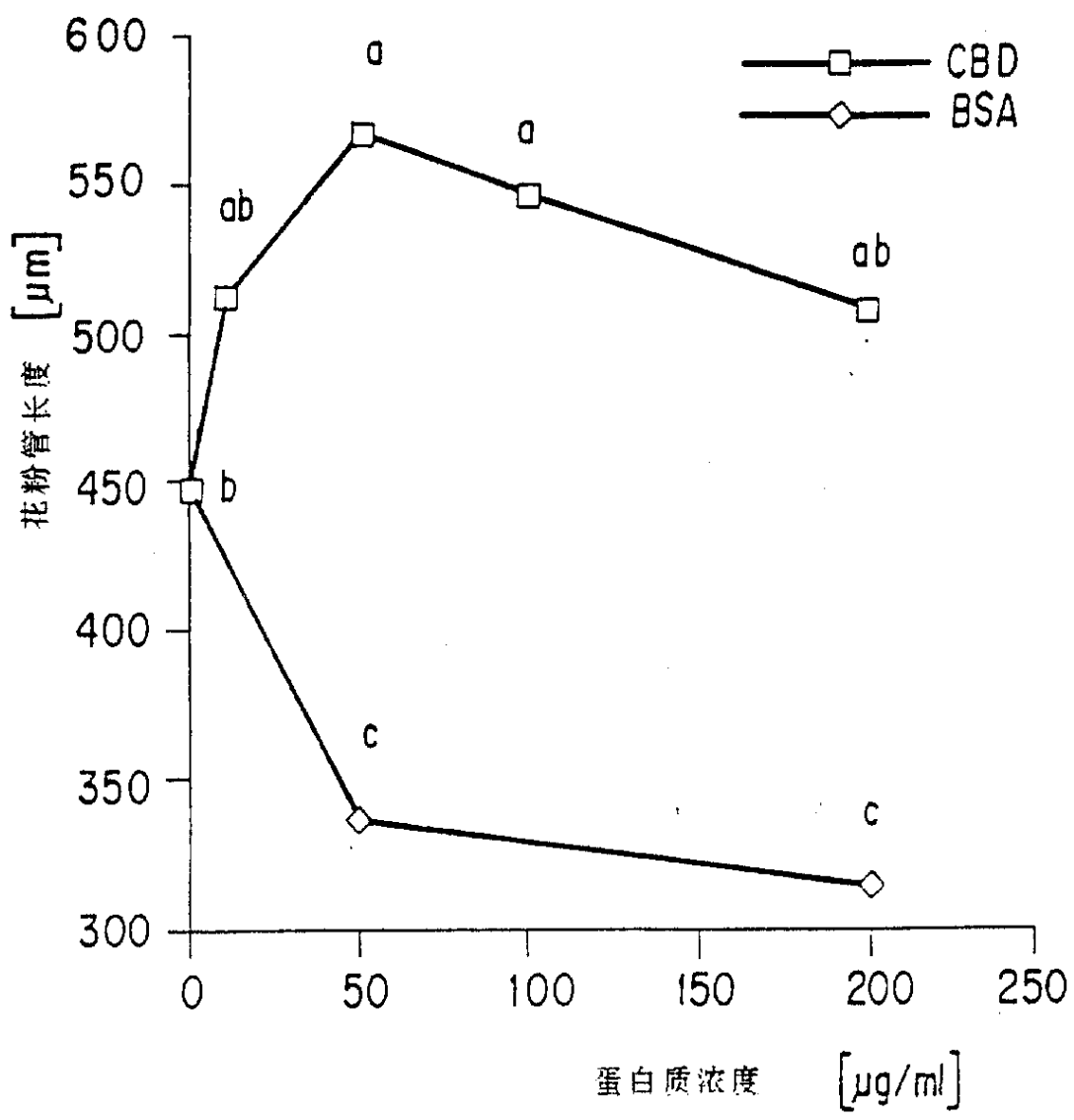


图 19

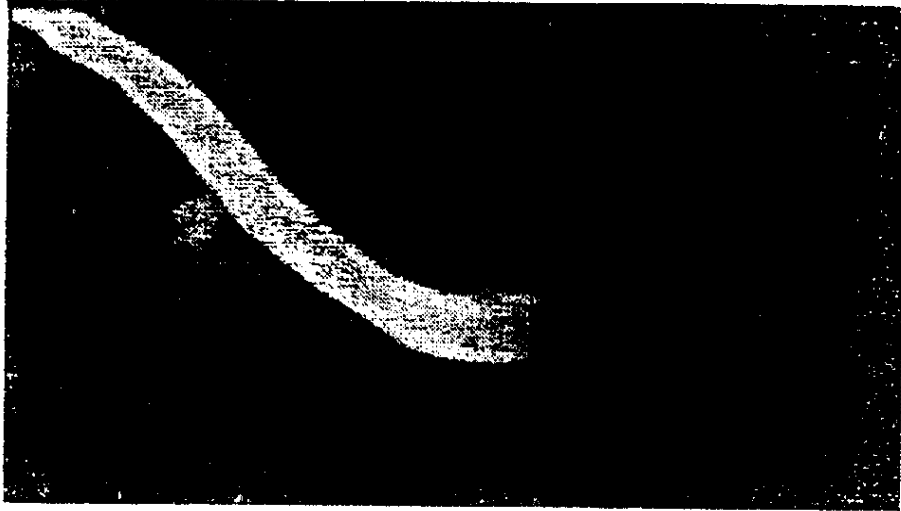


图 20A

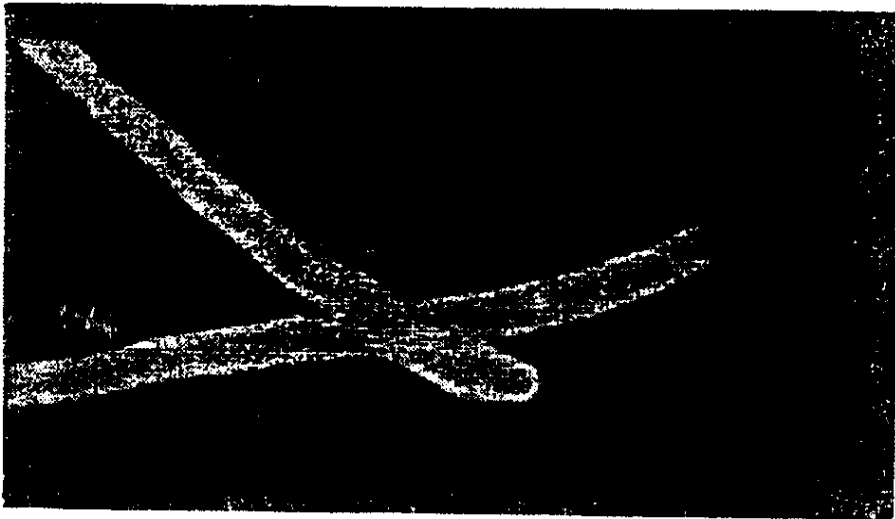


图 20B



图 21A



图 21B

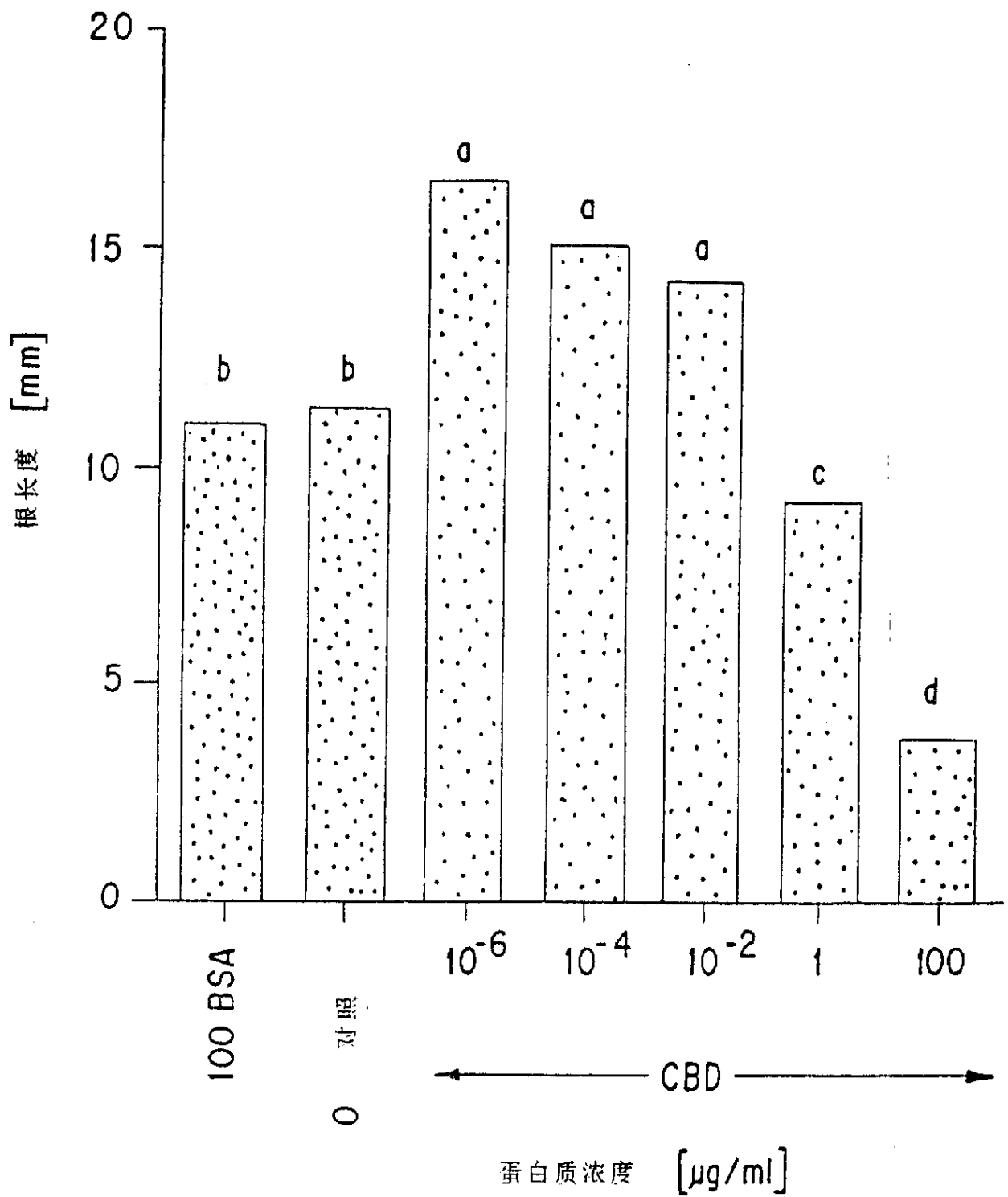


图 22



图 23



图 24