〔19〕中华人民共和国专利局

〔51〕Int.Cl.⁴
C12N 15/00
C12P 21/00

〔12〕发明专利申请公开说明书

〔11〕CN 88 1 01209 A

〔43〕公开日 1988 年 12 月 21 日

[21]申请号 88 1 01209
[22]申请日 88.3.10
[30]优先权
[32]87.3.10 [33]US [31]024053
[71]申请人 新英格兰生物实验室公司
地址 美国马萨诸塞州
共同申请人 坦普尔大学
[72]发明人 灌珠迪 井上弘
[74]专利代理机构 中国专利代理有限公司
代理人 杨九昌

[54]发明名称 与结合蛋白相融合的蛋白质的生产及纯化

[57]摘要

利用 DNA 重组技术生产和/或纯化几乎所有杂交多肽分子的方法和产品。将一个编码蛋白质分子的 DNA 片段与一个编码结合蛋白的 DNA 片段相融合，然后被插入克隆载体中并用来转化合适的宿主。表达后产生一种杂交多肽，它能通过与结合蛋白对其具有专一亲和性的配体或底物接触而纯化。纯化的杂交多肽能以其杂交形式使用，或切割后得到蛋白质分子本身，即通过用编码一种由蛋白水解酶识别并切割的肽段的 DNA 片段连接编码靶蛋白和结合蛋白的 DNA 片段。本发明还涉及实施上述方法的某些载体，以及利用结合的杂交多肽的生物反应器和方法。

CN 88 1 01209 A

881A07390/02-378

(BJ)第1456号

权　利　要　求　书

1. 一种生产和纯化蛋白质分子的方法，包括：

（a）构建在转化的宿主细胞中表达杂交多肽的DNA表达载体，该杂交多肽包括蛋白质分子和对一种底物具有专一亲和性的结合蛋白或其部分；

（b）将表达载体导入合适的宿主细胞中并使杂交多肽表达；

（c）使转化细胞产生的杂交多肽和结合蛋白能与之结合的底物接触；

（d）回收蛋白质分子。

2. 权利要求1的方法，其中编码杂交多肽的DNA含有一个连接DNA片段，它将编码蛋白质分子的DNA和编码结合蛋白的DNA连在一起。

3. 权利要求1或2的方法，其中的底物是交联的直链淀粉。

4. 前述权利要求中任何一项的方法，进一步包括从底物上释放杂交多肽的步骤，即使结合的杂交多肽与一种取代杂交多肽的物质相接触。

5. 前述权利要求中任何一项的方法，进一步包括从杂交多肽上切下蛋白质分子的步骤。

6. 一种用于构建表达载体的融合载体，该表达载体表达一种与待纯化的蛋白质分子融合的结合蛋白，包括：

（a）一个编码结合蛋白或其具有生物活性的部分的DNA片段，该结合蛋白与一种底物具有专一亲和性；

（b）一个编码连接顺序的DNA片段，它将编码结合蛋白的

DNA和编码蛋白质分子的DNA连在一起。

7. 权利要求6的融合载体，它含有质粒 $_{p}$ CG150。

8. 一种用于生产纯化的蛋白质分子的DNA表达载体，它在表达时产生与蛋白质分子相融合的结合蛋白，包括：

（a）一个编码结合蛋白或其部分的DNA片段，该结合蛋白对于一种底物具有专一亲和性；

（b）一个编码待纯化的蛋白质分子的DNA片段。

9. 权利要求1至5中任何一项的方法或权利要求6至8中任何一项的载体，其中的结合蛋白是糖结合蛋白、受体蛋白、氨基酸结合蛋白、硫酸盐结合蛋白、维生素结合蛋白、金属结合蛋白、磷酸盐结合蛋白、外源凝集素结合蛋白或核酸结合蛋白中的任意一种。

10. 权利要求9的方法或载体，其中的糖结合蛋白是麦芽糖结合蛋白。

11. 权利要求8的载体，其中编码连接顺序的DNA片段插在编码结合蛋白的DNA和编码蛋白质分子的DNA之间。

12. 权利要求6或11任一个的载体，其中的连接顺序包括一个或多个限制位点。

13. 权利要求6或11任一个的载体，其中的连接顺序编码的多肽由一种蛋白水解剂识别和切割。

14. 权利要求6或11任一个的载体，其中的连接顺序编码一种间隔多肽，它将结合蛋白与由表达载体表达的蛋白质分子分离开来。

15. 一种生物反应器，包括：

（a）一种杂交多肽，包括一种可与一种物质相互作用产生所需结果的蛋白质分子，和一种对一种底物具有专一亲和性的结合蛋白或

其部分；

（ｂ）底物，其中杂交多肽中的结合蛋白成分与此底物结合。

16. 一种制备生物反应器的方法，包括：

（ａ）构建一种在转化的宿主细胞中表达杂交多肽的ＤＮＡ表达载体，该杂交多肽包括一种与一种物质相互作用而产生所需结果的蛋白质分子和一种对一种底物具有专一亲和性的结合蛋白或其部分；

（ｂ）将表达载体导入合适的宿主细胞中并表达杂交多肽；

（ｃ）使转化细胞产生的杂交多肽和结合蛋白与之结合的底物接触。

17. 一种使一种物质和一种与之相互作用的蛋白质分子反应而产生所需结果的方法，包括：

（ａ）使含有蛋白质分子和一种对底物具有专一亲和性的结合蛋白或其部分的杂交多肽结合在底物上；

（ｂ）使该物质与结合的杂交多肽接触。

18. 权利要求１、１５、１６和１７中任何一项的方法，其中的底物包含在亲和层析柱中。

与结合蛋白相融合的蛋白质的生产及纯化

本发明涉及利用DNA重组技术生产和/或纯化几乎所有的杂交多肽或融合的蛋白质分子的方法。更具体地说，编码一种蛋白质分子（如一种多肽或其一部分）的DNA片段与编码一种结合蛋白的DNA片段（例如编码麦芽糖结合蛋白的基因）相融合。将融合的DNA插入一个克隆载体中，以此转化一种合适的宿主。表达以后，产生一种杂交多肽或融合的蛋白质分子，可通过使杂交多肽与结合蛋白对其具有专一亲和性的配体或底物接触而进行纯化，例如通过亲和层析纯化。在某些情况下，这样纯化的杂交多肽可以其杂交形式使用，或也可以进行切割以得到蛋白质分子本身，例如，将编码蛋白质分子和结合蛋白的DNA片段与编码一种肽的DNA片段相连接，这种肽能由一种蛋白水解酶识别和切割。本发明还涉及用以实施上述方法的某些载体，以及生物反应器和利用结合的杂交多肽的方法，例如使结合的融合多肽与一种底物接触并反应，该底物能与结合的蛋白质分子相互作用产生预期的效果。

近来发展的技术已能够利用能迅速而大量生长的微生物来合成商业上有用的蛋白质和肽。利用这些技术，能够使一种合适的微生物具有合成通常由其他生物生产的蛋白质或肽的能力。简言之，使编码蛋白质的DNA片段连接到克隆载体如质粒中。用克隆载体转化合适的

宿主，鉴定、分离和培养转化宿主，以启动所需蛋白质的表达。然后从培养基中分离如此产生的蛋白质并进行纯化。

已有多种纯化技术被用来收集由DNA重组技术产生的蛋白质。这些技术通常包括根据分子的不同性质分离所需蛋白质，例如，通过透析、密度梯度离心和液相柱层析法分离。这些技术没有普遍的适用性，并通常要消耗比待纯化的蛋白质贵重得多的纯化物质，在需要大量高度纯化的蛋白质时更是如此。

根据蛋白质的溶解度特性，发展了其他一些方法以纯化蛋白质。例如，业已采用等电点沉淀纯化蛋白质，因为蛋白质的溶解度作为pH的函数而变化。同样，蛋白质的溶剂分级分离技术是基于蛋白质的溶解度作为基质介电常数的函数而变化。溶剂分级分离法虽然产率不错，但通常导致蛋白质分子的变性。等电沉淀和溶剂分级分离都不能用来制取高度纯化的蛋白质。这些技术一般都是与其他方法结合使用。

亦已根据离子性质分离蛋白质，例如利用电泳、离子交换层析等。但这些电泳技术一直是作为分析手段使用的，不适于作为大规模纯化蛋白质的方法。而且，在这种技术中，很难通过单个步骤就得到高度纯化的高产率蛋白质。

亲和层析也被用来纯化生物聚合物如蛋白质。亲和层析涉及一种选择性吸附剂，使它与含有几种物质（包括待纯化的所需分子在内）的溶液接触。例如，当用于蛋白质纯化时，亲和层析一般使用一种与待纯化的蛋白质专一结合的配体。一般使配体偶联或连接于载体或基质上，再使偶联配体与含有杂蛋白的溶液接触。通过洗涤除去未结合的分子，通过用专一性解吸附剂进行洗脱回收所需蛋白质。亲和层析

虽然能产生较高水平的纯化蛋白，但此技术需要大量专一于蛋白的配体用于纯化。而且，每一种待纯化的蛋白质需要不同的配体，这必然使得纯化过程既耗时又费力。此外，还发现并不是对于所有类型的蛋白质分子（例如某些酶类）都存在有专一性配体。其结果是，亲和层析法并未被成功地用作普遍适用的蛋白质分子的分离纯化技术。

0，150，126号欧洲专利申请（Hopp）描述了一种使亲和层析普遍适用于所有蛋白质的方法。公开了制备通过DNA重组技术使基因融合而产生的杂交分子的方法。一个基因编码待纯化的所需蛋白，而另一个基因则编码一个鉴别或标记肽。标记肽含有一个具有高度抗原性的N－末端部分（以此制备抗体），以及一个使标记肽和待纯化蛋白质连接的连接部分。利用专一性的蛋白水解剂，可将标记肽的连接部分在邻接待纯化蛋白质的专一氨基酸残基处切断。用专一于标记肽中抗原部分的固定化抗体建立亲和柱，分离融合或杂交的蛋白质。抗体与融合蛋白质结合，然后，后者可用解吸附剂从柱中释放。然后，利用蛋白水解剂可将标记肽从所需的蛋白质分子上切下。

Hopp的方法虽然试图克服上述蛋白纯化方法中的某些问题，但该方法需要大量专一于标记肽抗原部分的抗体。而且，释放靶蛋白所需的解吸附剂（在该例中是一种小肽）的量很大，也是耗费很大的一个因素。另外，还必须从靶蛋白中通过纯化去掉解吸附剂。因此，使此系统扩大规模不是切实可行的。进一步，层析柱的再生可能极为困难，因为使用后洗涤柱子所用的条件是不稳定的，它实际上会破坏层析柱。另外有人提议使用低亲和性的抗体柱。然而，低亲和柱常导致非专一性结合，这对于任何大规模纯化来说都需要大量费用。

因此，一直需要能对DNA重组法产生的蛋白质进行大规模纯化，

又不存在上述问题的技术。尤其希望提供这样一种亲和纯化方法，它所利用的用来结合融合蛋白的配体大量而廉价，解吸附剂也同样大量而廉价。

本发明提供了一种以一步亲和层析生产和高度纯化几乎所有由ＤＮＡ重组技术产生的蛋白质分子的方法。更具体地说，通过ＤＮＡ重组技术产生杂交多肽或融合蛋白质，杂交多肽包括一个蛋白质分子和一个结合蛋白。杂交多肽可以从例如细胞粗提物或培养基中直接分离纯化，即简单地使含有杂交多肽的提取液与对结合蛋白具有专一亲和性的底物接触，例如利用亲和层析法。利用使结合的结合蛋白选择性解吸附的解吸附剂，可使结合的杂交多肽很容易地以高度纯化的形式从柱中释放。靶蛋白虽然可以其杂交形式使用，但在某些较好的实施方案中，最好是从靶蛋白中分离出或切掉结合蛋白。这可通过多种途径来实现。例如，可使用一种编码预定肽的ＤＮＡ片段（例如连接顺序），使编码结合蛋白和靶蛋白的ＤＮＡ片段连接起来。预定的肽最好能由一种蛋白水解剂识别和切割，这样，它在靶蛋白处或其附近切断杂交多肽，而不影响靶蛋白的生物活性。连接顺序除了提供一个方便的蛋白水解切割位点外，还可作为多连接子，即提供多个ＤＮＡ限制位点，以利于编码靶蛋白和结合蛋白的ＤＮＡ片段的融合，和／或作为分离靶蛋白和结合蛋白的间隔子，使得蛋白水解剂接近并切断融合多肽。

一般说来，可用于实施本发明的较好的亲和柱包括含有固定化配体或底物的柱，所述配体或底物与结合蛋白具有专一亲和性。普通专业人员将会认识到，结合蛋白对特定底物的专一亲和性不仅依赖于所采用的特殊的结合蛋白，还依赖于柱中所用的底物。一般说来，柱中

所用的底物应当基本上结合所有特殊的结合蛋白质，而不结合与之接触的其他蛋白质。但在某些情况下，根据特殊的应用（例如是用柱子纯化蛋白质分子，还是作为生物反应器使蛋白质分子和与之相互作用的物质反应以产生所需结果），可以使用仅与结合蛋白的一部分相结合的底物。此外，所用的特殊底物应当能够用合适的解吸附剂使结合的结合蛋白选择性解吸附。

显然，这样制备的层析柱能用来分离纯化几乎所有的通过DNA重组技术连接在结合蛋白上形成了杂交多肽的蛋白质。可用合适的解吸附剂使杂交多肽从柱中释放，和／或可用蛋白水解剂切断杂交多肽以从结合蛋白中分离靶蛋白。另外，根据本发明的另一个具体方案，结合的杂交多肽可用作生物反应器，使（例如）蛋白质分子（可以是酶、限制性核酸内切酶等）的生物活性部分和与靶蛋白相互作用的底物反应。例如，如果靶蛋白是一种酶，则亲和柱可用作固定该酶的手段，即，使杂交多肽的结合蛋白部分与层析柱结合。然后，使与酶作用的底物过柱以达到所需结果。

图1和2说明与麦芽糖结合蛋白相融合的克隆载体 $_{p}$CG150的构建。

图3说明克隆载体$_{p}$ CG150的多连接子区的DNA顺序。

图4说明具有mal E-Lac Z融合基因的质粒$_{p}$ CG325的构建。

图5说明对含有mal E-Lac Z融合基因的SF1362／$_{p}$CG325粗提物进行亲和层析产生的蛋白质洗脱曲线。

图6说明对含有mal E-Lac Z融合基因的SF1362／$_{p}$CG325粗提物进行亲和层析产生的蛋白质活性曲线。

图 7显示了mal E-Lac Z融合产物的ＳＤＳ聚丙烯酰胺凝胶电泳。

图 8显示了mal E-Lac Z融合产物的天然聚丙烯酰胺凝胶电泳。

图 9和１０表明具有mal E-Pst I限制性核酸内切酶融合基因的质粒pＣＧ４１０的构建。

图１１显示了mal E-Pst I融合产物的ＳＤＳ聚丙烯酰胺凝胶电泳。

本发明提供了一种生产并纯化几乎所有由ＤＮＡ重组技术得到的多肽或蛋白质分子的新方法。蛋白质分子是这样产生的：构建一个含有融合基因的克隆载体，该融合基因包括一个编码蛋白质分子的基因和一个编码结合蛋白或其部分的基因，该结合蛋白与一种配体或底物具有专一亲和性；然后在合适的宿生中表达融合基因。在分离／纯化技术中用底物作为基质（例如亲和柱）以回收融合基因的表达产物，即杂交多肽。可以使用一个编码预定多肽的ＤＮＡ片段，例如使其邻接于编码结合蛋白的基因，从而调节所需融合基因的读码和／或在杂交多肽中引入一个由蛋白水解剂识别和切割的肽顺序，使得在需要时能从结合蛋白中分离出蛋白质分子。如上所述，结合的杂交多肽还可以用作生物反应器，使蛋白质分子的生物活性部分和与蛋白质分子相互作用的底物反应。

本文所述的以优选方式克隆、表达及纯化编码杂交多肽的ＤＮＡ的方法，包括下述步骤：

Ⅰ．融合载体的制备。

Ａ）纯化编码所需结合蛋白的ＤＮＡ。

B）将DNA插入克隆载体如pBR322中，用该混合物转化合适的宿主如大肠杆菌（E. coli）。

C）用例如抗生素选择或其他表型选择来选择转化体。

D）由选择的转化体制备质粒DNA。

E）确定蛋白质的结合活性域，通过图谱测定以鉴别或通过标准的基因工程方法以产生方便的限制性核酸内切酶位点。

Ⅱ. 将编码蛋白质分子的DNA插入融合载体中。

A）通过标准的基因工程方法克隆蛋白质分子的基因。

B）通过（例如）限制性图谱的测定，确定蛋白质分子基因的特性。

C）制备编码蛋白质分子的DNA限制片段。

D）将蛋白质分子的DNA片段插入结合蛋白的融合载体中，使编码结合蛋白的DNA片段和编码蛋白质分子的DNA片段之间形成蛋白质的框内融合。

E）将含有此杂交DNA分子的载体导入合适的宿主中。

Ⅲ. 杂交多肽的表达和纯化。

A）培养含有融合载体的宿主细胞。

B）通过常规技术诱导融合基因的表达。

C）制备含有表达的融合多肽的细胞提取物。

D）利用亲和柱从其他细胞组分中分离杂交多肽，该亲和柱中作为基质的物质与杂交多肽的结合蛋白部分有专一亲和性。

E）结合的纯化的杂交多肽可以回收和／或通过下述方法使用：

（1）如果在其杂交或融合构型中保留有蛋白质分子的生物活性，则可用解吸附剂将杂交多肽从柱中洗脱回收，并在洗脱后以其杂交形

式直接使用；

（2）在从柱中洗脱之前或之后，可通过蛋白水解酶或化学断裂法从结合蛋白中分离蛋白质分子；

（3）柱上固定有融合蛋白的柱可作为生物反应器使用，例如，使结合的融合蛋白和与蛋白质分子的生物活性部分相互作用的底物接触并反应。

结合蛋白

可根据本发明利用的结合蛋白包括糖（如单糖、双糖或多糖）结合蛋白，例如麦芽糖或 阿拉伯糖结合蛋白、外源凝集素结合蛋白、维生素结合蛋白如抗生物素蛋白、核酸结合蛋白、氨基酸结合蛋白、金属结合蛋白、受体蛋白、硫酸盐结合蛋白、磷酸盐结合蛋白等等。优选糖和多糖结合蛋白。实施本发明的较好的糖结合蛋白是麦芽糖结合蛋白。

大肠杆菌mal E基因的产物，即麦芽糖结合蛋白（MBP），是一种可渗压休克的周质蛋白。MBP对麦芽糖和麦芽糊精表现出专一的结合亲和性。也能以高度亲和性与大分子的α（1－4）连接的葡聚糖结合（Ferenci，T.和Klotz，U. Escherichia Coli. FEBS Letters 94(2)：213-217，1978，此公开列入本文参考文献中）。解离常数为大约1μM（Kellermann et al.，Coli Eur. J. Biochem. 47：139-149，1974，此公开列入本文参考文献中）。MBP通常被认为以单体存在，但它也能以二聚体的形式存在。麦芽糖诱导二聚体至单体的转化（Gilbert，Biochem. Biophys. Res. Commun. 105(2)：476-481，1982，此公开列入本文参考文献中）。MBP

是一种分泌蛋白，它是在细胞质中以具有２６个氨基酸的Ｎ末端信号肽的前体合成的（ Dupley et al.，J. Biol. Chem. 259:10606-10613，1984，此公开列入本文参考文献中）。信号肽在穿越细胞质膜时被去掉，成熟的ＭＢＰ释放入周质空间。成熟的ＭＢＰ含有３７０个氨基酸，分子量相当于４０，６６１道尔顿（ Dupley et al.，出处同上）。ＭＢＰ在诱导培养下大量生成（每个细胞２－４×１０⁴ 单体）。已经确定，ＭＢＰ和至少四种其他蛋白质构成了大肠杆菌的麦芽糖转运系统（ Shuman ，J. Biol. Chem. 257：5455-5461，1982，此公开列入本文参考文献中）。ＭＢＰ除了是麦芽糖转运系统的重要组分外，还是细菌对于麦芽糖和麦芽糊精的专一化学受体。已经克隆了mal E基因并测定了其顺序（ Dupley et al.，出处同上）。

连接顺序

可以利用一个编码预定肽的ＤＮＡ片段连接编码结合蛋白和蛋白质分子的ＤＮＡ片段。预定肽最好能由一种蛋白水解剂所识别和切割，使其在蛋白质分子处或其附近切断杂交多肽而不影响蛋白质分子的生物活性。这样一种编码预定多肽的ＤＮＡ参见Ｎagai等人所述（ Nature 309：810-812，1984，此公开列入本文参考文献中）。此ＤＮＡ片段的寡核苷酸顺序为：ATCGAGGGTAGG，它编码的多肽为 Ile-Glu-Gly-Arg。用凝血因子Ｘａ在精氨酸残基的羧基侧切断此多肽。如上所述，连接顺序不仅提供一个方便的切割位点，还可作为多连接子使用，即提供多个限制位点以利于编码靶蛋白和结合蛋白的ＤＮＡ片段的融合，和／或作为间隔手段使靶蛋白和结合蛋白分开，从而使（例如）蛋白水解剂能够接近并切断杂交多肽。

蛋白质分子

本发明可以有利地用来生产几乎所有能够在转化的宿主细胞中通过载体表达的原核或真核的、简单的或结合的蛋白质。这些蛋白质包括酶，包括核酸内切酶、甲基化酶、氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶或连接酶。

本发明还意图生产贮存蛋白，例如铁蛋白或卵清蛋白或转运蛋白，例如血红蛋白、血清蛋白或血浆铜蓝蛋白。还包括在收缩和运动系统中起作用的各类蛋白质，例如肌动蛋白和肌球蛋白。

本发明还意图生产抗原和抗原决定簇，它们可用来制备疫苗或诊断试剂。

本发明还意图生产起保护或防御作用的蛋白质，例如血液蛋白凝血酶和血纤维蛋白原。其他的保护蛋白包括结合蛋白，例如与抗原结合并因此使其中和的抗体或免疫球蛋白。

本发明生产的蛋白质还可包括各种激素如人生长激素、生长激素抑制素、促乳素、雌酮、孕酮、黑素细胞、促甲状腺激素、降钙素、促性腺激素和胰岛素。其他这类激素包括那些已确定为与免疫系统有关者，例如白细胞间素 1、白细胞间素 2、集落促进因子、巨噬细胞活化因子和干扰素。

本发明还可用于生产毒性蛋白质，例如来自蓖麻籽的蓖麻蛋白或来自棉亚麻子的 grossypin。

作为结构成分的蛋白也可由本发明生产，这种蛋白包括纤维蛋白胶原、弹性蛋白和α－角蛋白。其他的结构蛋白包括糖蛋白、病毒蛋白和粘蛋白。

除了上述的天然存在的蛋白质外，本发明还可用来生产合成蛋白

质，它们通常被定义为任何自然界中不存在的氨基酸顺序。

编码上述各类蛋白质分子的基因可从多种原核或真核细胞来源获得，例如植物或动物细胞或细菌细胞。利用公知的标准技术，可从这些细胞的染色体物质或原核细胞的质粒中分离基因。目前，通过商业途径可从多种来源得到各种具有许多不同蛋白质分子编码基因的天然存在的和合成的质粒。利用逆转录酶，也能从mRNA产生所需要的DNA。这种酶能由RNA模板合成DNA。

融合DNA和表达载体的制备

制备重组载体的多种方法和材料，用载体转化宿主细胞，载体的复制以及多肽和蛋白质的表达都是本领域专业人员已知的，Maniatis等人对此进行了一般的讨论（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH 1982，此公开列入本文参考文献中）。

实施本发明时可使用各种克隆载体。虽然优选的载体是质粒，但专业人员将认识到载体可以是噬菌体。如果在哺乳动物或植物细胞中进行克隆，则也可使用病毒作为载体。如果使用质粒，它可从天然来源得到或进行人工合成。选择的具体质粒应当与用作宿主的具体细胞具有相容性，不论宿主是细菌（如大肠杆菌）、酵母还是其他单细胞微生物。对于所选择的具体的宿主细胞来说，质粒还应当具有合适的复制起点（复制子）。此外，载体的容量必须足以容纳编码所需蛋白质分子和结合蛋白的融合基因。

对于质粒克隆载体的另一个要求是存在有限制性酶切位点，用限制性酶切割质粒后与外源基因连接时不使复制子失活，同时还提供合适的与插入的外源基因的末端互补的可连接末端。对于这一末端，质

粒最好对于许多限制性核酸内切酶具有单一的作用位点。

另外，质粒应当有一个表型特性，使得转化的宿主细胞很容易得到鉴定并从未转化的细胞中分离出来。这种表型选择基因可包括提供生长抑制物质（如抗生素）的抗性的基因。目前，含有各种抗生素抗性基因的质粒随处可得，这些抗生素有例如四环素、链霉素、磺胺药物和氨苄青霉素等。当宿主细胞在含有这些抗生素之一的培养基中培养时，只有含有合适的抗性基因的转化体能够存活。

如果用大肠杆菌作宿主细胞，则实施本发明的优选质粒是pCG150。图2给出了此质粒的部分限制性核酸内切酶切割图谱。另一种在大肠杆菌中高水平表达的质粒是pCG806。

为了制备用于连接的选定的质粒，最好用限制性核酸内切酶消化以以产生线性片段，其中，两条DNA链在紧密相邻的位点被切断，产生具有5'-磷酸和3'-羟基的粘性末端，这样便利于与外源基因相连接。对于上面提及的质粒，限制性核酸内切酶将产生这种结果。

某些限制性酶（PvuⅡ，Bal Ⅰ）可导致平末端的形成。质粒的平末端可用T4 DNA连接酶与外源基因连接。进行有效的切割和连接的方法及材料都是本领域内公知的。

在与选定的克隆载体连接之前，最好是首先将编码结合蛋白和蛋白质分子的外源基因连在一起。用来处理编码蛋白质分子的基因的限制性核酸内切酶最好与用来切割质粒载体的酶相同，以便使基因具有合适的末端与质粒的相应末端互补。此基因也可用第二种不同的限制性核酸内切酶处理，以形成与结合蛋白基因连接的另一个末端。

然后，使整合的基因在DNA连接酶溶液中与线性化的质粒片段相连接。保温后，用标准技术例如凝胶电泳，鉴别具有正确定向的整

合基因的再环化的质粒。

重组DNA质粒的转化

用上述制备的重组DNA质粒转化宿主细胞。虽然宿主细胞可以是任何合适的原核或真核细胞，但它最好是了解详细的细菌，例如大肠杆菌或酵母菌株。这两种宿主都容易转化，而且能够在发酵培养中迅速生长。可用其他的单细胞微生物代替大肠杆菌，例如真菌和藻类。另外，其他类型的细菌也可以取代大肠杆菌，例如沙门氏菌（Salmonella）或肺炎球菌（Pneumococcus）。无论选择哪一种宿主，它都应当具有表型表达所必需的生化途径和使杂交多肽进行正常表达的其他功能。在大肠杆菌菌株中转化重组质粒的技术是众所周知的。Maniatis等人给出了一个典型的方法（出处同上）。

在进行转化时，由于细胞摄取的质粒有限，被转化的宿主细胞实际上只有一小部分。因此，在分离转化体之前，一般要使用于转化的宿主细胞在合适的培养基中扩增。确实已被转化的细胞可通过将原初培养物置于含有合适的生长培养基的琼脂平皿上进行鉴别，该培养基中含有表型鉴别物质，例如抗生素。只有那些具有合适的抗性基因的细胞能够存活。可使来自存活菌落的细胞溶解，然后从溶解物中分离质粒。可通过限制性核酸内切酶消化及随后的凝胶电泳，或通过其他标准方法，测定这样分离的质粒的特性。

鉴别出转化细胞后，可通过已建立的技术（例如通过发酵）使其扩增。另外，回收到的克隆的重组质粒可用来转化其他细菌株或其他类型的宿主细胞，以使融合蛋白进行大规模复制和表达。

融合蛋白的纯化

由转化的宿主细胞表达的杂交多肽，最好通过亲和层析法从所有

其他细胞组分和生长培养基中分离出来。柱基质可简单地是任何与结合蛋白具有专一亲和性的底物。例如，如果结合蛋白是MBP，则柱基质可以是交联的直链淀粉。由表氯醇法制备的交联直链淀粉可满足MBP的底物专一性要求，并提供了一种快速的一步层析法从渗压休克液（Ferenci，T. et al.，出处同上）、完整细胞提取液或培养基中纯化MBP。

使转化的宿主细胞提取液与柱接触以分离杂交多肽。然后，通过（例如）加入一种解吸附剂的稀溶液以取代杂交多肽，从而将杂交多肽从柱上洗脱。

从杂交多肽中分离蛋白质分子

由上述亲和柱纯化的杂交多肽可用具有顺序专一性的蛋白酶（如因子Xa）或非连续的化学断裂（如溴化氰）进行切割。

下述实例是作为优选方案给出的，以进一步说明本发明的具体方案。应当认识到这些实例是说明性的，不应认为本发明受到它们的限制，本发明由所附的权利要求书限定。

实例1

实例1描述作为malE-LacZ融合基因的产物的β-半乳糖苷酶的克隆、表达和纯化。

结合蛋白融合载体的制备

质粒pPL-5A是MalE的编码DNA片段的来源，制备该片断时首先去掉MalE的启动子和信号顺序，以产生pPL-5A的缺失衍生物。此质粒即pCG810。然后再从pCG810上切下编码MalE的基因，插入M13mp18中产生重组噬菌体pCG580，其中已加入多重克隆位点以利于蛋白质分子的编码DNA的

插入。现在携有外加克隆位点的Mal E基因再从pCC580上切下，插入pUC18中，以产生另外的克隆位点和携取用于选择的抗生素抗性基因。产生的质粒是蛋白质融合载体pCC150，它含有Mal E基因和外加的克隆位点，并被用来构建同时含有编码所需蛋白质分子的DNA的载体（参见下面）。pCC150的样品已寄存于ATCC，寄存号为ATCC 67345。图1和2说明了质粒pCC150的构建。

根据已发表的大肠杆菌Mal E基因的顺序，在此基因中有5个TaqI识别位点。一个位于83－86号碱基处（Gupley et al.，出处同上），相应于成熟的麦芽糖结合蛋白（MBP）编码顺序的第二和第三密码子。在此TaqI位点中，插入邻接有多连接子的决定卡那霉素抗性的片段。得到的质粒是pPL－5A。

5－10μg pPL－5A的质粒DNA和10单位EcoR I限制性酶在100μl EcoR I消化缓冲液中于37℃保温2小时。加入20μl DNA上凝胶缓冲液（0·25%溴酚蓝、40mM EDTA pH8·0、30%甘油）并混合。消化后的样品加到1%的低胶凝温度的琼脂糖凝胶（Seaplaque）上。以小电流（20mA）进行凝胶电泳4小时。使用TEA凝胶电泳缓冲液（40mM Tris－乙酸pH8·0，2mM EDTA）。凝胶在室温下用含有0·5μg／ml溴化乙锭的TEA缓冲液染色30分钟。凝胶在紫外光下观察到3个DNA带。从凝胶上切下最大的片段并置于1.5ml的微量离心管中。离心管在65℃水浴中保温5分钟。如Maniatis等人所述（出处同上，见170页，此公开列入本文参考文献中），用等体积的苯酚和苯酚／氯仿和氯仿萃取融化的凝胶

（大约１００μｌ）。保留水相，加入１／１０体积的ｐＨ５．５的３Ｎ乙酸钠并混合。加入２．５倍体积的乙醇。乙醇沉淀的混合物置于－７０℃冰箱中２０分钟（或－２０℃冰箱中过夜），然后用微量离心机于4℃下离心１５分钟。弃去上清液，沉淀用０．５ｍｌ70%乙醇洗涤两次。使离心管敞开置于室温下以除去残余的乙醇。将ＤＮＡ沉淀溶于１９μｌ水中，然后加入４μｌ ６×连接缓冲液（３００ｍＭ Tris-HCl pH7.4 、60mM $MgCl_2$、６０ｍＭ二硫苏糖醇、６ｍＭ ATP、600μg BSA）和１μｌ Ｔ４ＤＮＡ连接酶（１０单位），于１６℃保温过夜。用连接溶液转化感受态的大肠杆菌ＳＦ１３６２株的细胞。感受态细胞的制备和转化根据Ｔ．Ｊ．Silhavy等人所述进行（Experiments With Gene Fusions，CSH 169-170，1984，此公开列入本文参考文献中）。热休克后，转化混合物与５ｍｌ ＬＢ培养基于３７℃保温４５分钟。以3000rpm离心５分钟收集细胞，再悬浮于０．５ｍｌＬＢ培养基中。将０．０５－０．２ｍｌ细胞涂在含有１００μｇ／ｍｌ氨苄青霉素的ＬＢ平皿上。于３７℃保温过夜后，得到总共大约１０００个转化体。在同样的平皿上纯化１６个转化体。根据Silhavy等人所述（出处同上），从纯化的转化体中制备微量的质粒ＤＮＡ。还进行质粒ＤＮＡ的限制性酶分析。选择到一个质粒ｐＣＧ８１０，其中，决定卡那霉素抗性的顺序和mal Ｅ的启动子及信号顺序区域已经缺失，而保留了单一的EcoRⅠ、BglⅡ、BssHⅡ和NcoⅠ切割位点。

通过Gamper等人所述的ＢＮＤ纤维素法（ＤＮＡ，４（２），1985，此公开列入本文参考文献中），制备和纯化１０－２０μｇ

质粒pCG810的DNA，然后如上所述，使之与20单位的HinfⅠ限制性酶在100μl HinfⅠ消化缓冲液（由N. E. B. 推荐）中于37℃保温2小时，然后用苯酚和氯仿萃取并用乙醇沉淀。使DNA溶于50μl填充反应缓冲液中（50mM Tris pH7·4，10mM $MgCl_2$，1mM二硫苏糖醇，0·1mM dATP，0·1mM dCTP，0·1mM dGTP和0·1mM dTTP，并含有5单位DNA聚合酶Ⅰ的大片段），于室温下保温20分钟。加入50μl TE缓冲液（10mM Tris pH8·0，1mM EDTA），用苯酚和氯仿萃取，水相用乙醇沉淀。在100μl EcoRⅠ消化缓冲液中用EcoRI限制性酶切割DNA，然后进行乙醇沉淀。将DNA再溶于50μl TE缓冲液中，加入10μl DNA上凝胶缓冲液，然后加到1%的低胶凝温度的琼脂糖凝胶上。如上述进行凝胶电泳并从凝胶中提取DNA。纯化得到1·1kb的EcoRI-HinfI片段，它含有几乎完整的MBP编码顺序，将它溶于10μl DNA缓冲液中（10mM Tris pH8·0，0·1mM EDTA），于-20℃贮存。

将5μg M13mp18双链DNA（Yanisch-Perron et al.，Gene 33：103-119，1985，参见第104页，此公开列入本文参考文献中）和10单位SmaⅠ限制性酶在50μl SmaⅠ消化缓冲液中于37℃保温30分钟，然后如上述进行苯酚萃取和乙醇沉淀。使消化的DNA溶于50μl含有10单位EcoRⅠ限制性酶的EcoRⅠ消化缓冲液中保温1小时，然后如上述用苯酚和氯仿萃取，用乙醇沉淀。将DNA沉淀溶于10μl DNA缓冲液中。

合并两种ＤＮＡ制备物，即1.1kb的EcoRⅠ-HinfⅠ片段及EcoRⅠ和SmaⅠ消化的Ｍ１３ｍｐ１８载体，如上述进行连接。用连接溶液转化JM101或７１－１８感受态细胞（Yanisch-Peron et al.，出处同上）。如上述进行转化。热休克后，使细胞与ＪＭ１０１或７１－１８的指数生长细胞和保持在４７℃的融化的软琼脂混合，涂布在含有ＸＧ和IPTG的ＬＢ平皿上（见J. Messing所述，NIH Publicatior NO. ７９－９９，Vol. 2，１９７９，参见其中的４３－４８页，此公开列入本文参考文献中）。平皿上出现大约５００至1000个空斑；６０%是白色，40%是蓝色的。用无菌吸液管挑出大约１００个白色空斑，加至含有2mlJM１０１或７１－１８的早对数期培养物的５ｍｌ培养管中。管子于３７℃振荡培养５－６小时。每种培养物取１ｍｌ转移至微量离心管中，在室温下用微型离心机离心１０分钟。从而从细胞中分离出含有噬菌体的上清液。抽取２０μｌ上清液与１μｌ　2%ＳＤＳ和４μｌ　ＤＮＡ上凝胶缓冲液混合。样品在４×ＴＡＥ缓冲液中通过０．８%琼脂糖凝胶电泳过夜。与噬菌体M13mp18的单链ＤＮＡ相比较，重组噬菌体通过凝胶迁移的速度较慢而得以鉴别。由重组噬菌体制备双链ＤＮＡ，进行限制性酶分析。选择一个重组噬菌体ｐＣＧ５８０，它具有Mal E基因顺序的插入　其插入方向与M13mp18上的Lac Z基因相同，其中再生了EcoRⅠ切割位点。BamHⅠ-XbaⅠ-SalⅠ-PstⅠ-SphⅠ-HindⅢ多连接子被保留。通过插入mal E顺序导入了BglⅡ、BssHⅡ和NcoⅠ切割位点。

如上所述，将５μｇ用ＢＮＤ纤维素纯化的ｐＣＧ５８０双链ＤＮＡ，用EcoRⅠ限制性酶切割，然后用ＤＮＡ聚合酶Ⅰ大片段填平

粘性末端。使ＤＮＡ再连接并用来转化ＪＭ１０１或７１－１８。只有不到５％的转化体呈蓝色。EcoRI切割位点的填充似乎产生一个框内ＴＡＡ密码子，它不能被ＪＭ１０１所携的Sup E所抑制。蓝色转化体的比例很少可通过ＤＮＡ操作过程中粘性末端的碱基缺失得到解释，并表明插入的Mal E顺序与下游的Lac Z顺序位于同一读码中，因为对由蓝色转化体制备的质粒进行限制性酶分析检测不到ＤＮＡ的缺失。

将用ＢＮＤ纤维素纯化的１０－２０μｇ pCG580双链ＤＮＡ用EcoRI切割。苯酚萃取和乙醇沉淀后，将ＤＮＡ沉淀溶于100μl含有大约５单位绿豆核酸外切酶的绿豆核酸外切酶缓冲液中，于３７℃保温２０分钟，然后进行苯酚萃取和乙醇沉淀。然后在50μl HindⅢ消化缓冲液中用HindⅢ限制性酶切割平末端ＤＮＡ。此样品通过１％低胶凝温度的琼脂糖凝胶进行电泳。含有ＭＢＰ编码顺序的1.1kb DNA片段用多连接子加尾，并如上述从凝胶中纯化。纯化的ＤＮＡ片段于－２０℃贮存在１０μl ＤＮＡ缓冲液中。

将１０μｇ pUC－１８质粒ＤＮＡ和２０单位BamHI限制性酶在100μl BamHI消化缓冲液中于３７℃保温１－２小时。苯酚萃取和乙醇沉淀后，消化的ＤＮＡ如上述用绿豆核酸外切酶处理以填平粘性末端。苯酚萃取和乙醇沉淀后，将ＤＮＡ溶于10μl DNA缓冲液中。

合并两种ＤＮＡ制备物，即来自pCG580的1.1kb片段和BamHI切割的pUC－１８，加入４μl ６×连接缓冲液和１μl Ｔ４连接酶（５－１０单位）并混合。连接酶溶液于１６℃保温过夜，然后在室温下保温４小时，用来转化ＪＭ１０３或７１－

18。在含有100μg/ml氨苄青霉素的LB平皿上选择转化体。根据Shinmick等人所述的牙签法（Nucl. Acids Res. 2：1911，此公开列入本文参考文献中），由DNA大小来鉴定重组质粒。计数到大约12个转化质粒，其中有3个在XG和IPTG存在下在LB氨苄青霉素平皿上产生蓝色。选择其中一个即质粒pCG150用BND纤维素纯化5μg pCG150质粒DNA并用EcoRI限制性酶切割，再用DNA聚合酶I大片段填平粘性末端，然后用T4连接酶连接。用此DNA转化JM101或71-18时，在XG和IPTG存在下有多于95%的转化体呈白色。这表明在下游MalE基因区不存在翻译的重新开始。

测定质粒pCG150上的MalE基因连接区的顺序，其结果示于图3中。

如下述构建图4给出的MalE-β-半乳糖苷酶融合蛋白质粒pCG325。根据Silhavy等人（出处同上）的方法构建质粒pMLB1034。此质粒含有编码β-半乳糖苷酶的Lac Z基因，但没有该蛋白的启动子或前面的8个密码子，以及含有EcoRI、SmaI和BamHI限制性位点的多连接子。将5μg pMLB1034用EcoRI限制性酶切割，然后用DNA聚合酶大片段填平粘性末端，再用BamHI切割。苯酚萃取和乙醇沉淀后，将DNA溶于10μl DNA缓冲液中，于-20℃下贮存。

将5μg pCG150 DNA用BamHI和PvuII限制性酶切割，用苯酚氯仿萃取，用乙醇沉淀。将DNA溶于10μl DNA缓冲液中。合并pCG150和pMLB1034的两种DNA制备物并如上述连接。用连接溶液转化由大肠杆菌MC4100株（Silhavy, T. J.

et al.，出处同上）制备的感受态细胞，涂布在含有100μg/ml氨苄青霉素和20μg/ml XG的LB平皿上。保温过夜后，平皿上出现数百个转化体，其中有20－30%是蓝色的。纯化大约24个蓝色的转化体，根据Silhavy所述的快速分离法（出处同上）从中分离质粒DNA。对这些质粒DNA进行限制性酶分析。

选择一个重组质粒pCG325并测定其特性。此质粒含有来自pCG150的1.3kb Mal E基因顺序，它被插入pMLB1034的EcoRI-BamHI位点中。

亲和层析

在含有100μg/ml氨苄青霉素的加富培养基中，使双重缺失的（－Lac－mal B）携有pCG325的大肠杆菌SF1362株生长至晚对数期。用Beckman离心机于4℃下以5000rpm离心15分钟收集细胞。将5g收集的细胞用100ml 10mM Tris pH7.2于4℃下洗涤，然后再悬浮于50ml同样的缓冲液中。于4℃下用超声处理破碎细胞。用Beckman离心机以16000rpm离心30分钟分离细胞碎片。上清液在1升同样的缓冲液中于4℃透析3－4小时。将一份样品加到根据Ferenci等人所述（出处同上，459－463页）制备的3×5cm交联直链淀粉柱上。

洗脱至大约20－30ml时，280mμ的主吸收峰通过，此后用10－20倍柱体积的10mM Tris pH7.2充分洗涤柱子。柱子用含有10mM麦芽糖的10mM Tris pH7.2洗脱。测定每一组分中的OD_{280}和β－半乳糖苷酶活性（Miller，Experiments in Molecular Genetics，CSH，1972，325－355，此公开列入本文参考文献中）。图5给出了洗脱曲

线。图6表明通过柱子的粗提物中有多于95%的OD_{280}吸收物质。只有不到1%被保留在柱中并可用10mM麦芽糖缓冲液洗脱。与此相反，多于70%的β－半乳糖苷酶活性被保留在柱中并被10mM麦芽糖洗脱（图5和6）。当合并过柱组分并再上到另一个交联直链淀粉柱上时，这些组分中存在的β－半乳糖苷酶活性不被保留。这表明只有少部分杂交多肽被降解到这样的程度，即降解产物丧失了与交联直链淀粉结合的活性，但仍保留了一些β－半乳糖苷酶活性。将麦芽糖洗脱的组分透析并合并后，再上到另一个交联直链淀粉柱上时，这些组分中的β－半乳糖苷酶活性被保留并可用10mM麦芽糖缓冲液洗脱。

聚丙烯酰胺凝胶电泳

分别收集亲和层析的峰组分。使麦芽糖洗脱的峰浓缩25－50倍。将20－40μl浓缩样品与双倍强度的上凝胶缓冲液（0·5M Tris-HCl pH6·8，30%甘油，4%SDS，6%β－巯基乙醇，0·4%溴酚蓝）混合并沸腾2分钟。将样品加到7%或10%的聚丙烯酰胺凝胶上（29：1）。所用电泳缓冲液系统如Laemmli所述（Nature 227：680-685，1970，此公开列入本文参考文献中）。凝胶电泳的条件为7－10V／cm或20mA，5－7小时，然后用考马斯亮蓝R250染色（0·1%考马斯蓝，50%甲醇，10%乙酸。凝胶的脱色用10%乙酸和10%甲醇的脱色液进行）。

SDS凝胶电泳的结果示于图7中。似乎粗提物中的几乎所有的蛋白都通过了柱子。只有杂交多肽及其小片段降解产物被柱保留并用麦芽糖缓冲液洗脱。凝胶上的主带代表杂交多肽，其分子量估计为

156k，与从融合的基因顺序推测的一致。

对天然蛋白质也进行了凝胶分析。对于天然凝胶，从电泳缓冲液系统中去掉SDS，电泳凝胶用水洗涤后浸没在含有20μg/ml XG的Z缓冲液（0·1M $NaPO_4$ pH7·0，KCl 0·01M，Mg_2SO_4 0·001M，β-巯基乙醇0·05M）中，于37℃下静置保温4小时。凝胶上出现蓝色带时弃去缓冲液。它表明，比天然β-半乳糖苷酶迁移更慢的杂交多肽，代表了麦芽糖缓冲液洗脱的组分中的β-半乳糖苷酶活性（图8）。

免疫扩散实验

在10mM Tris pH7·2 和 150mM NaCl 的缓冲液中在1%琼脂糖凝胶上进行双向免疫扩散（Ouchterlony）实验。使用5-10μg样品蛋白（抗MBP血清得自哈佛医学院的Jon BeckWith。抗β-半乳糖苷酶血清得自Promega Biotech，WI）。纯化的杂交多肽与抗MBP血清和抗β-半乳糖苷酶血清二者都形成沉淀线。纯的β-半乳糖苷酶只与抗β-半乳糖苷酶血清形成沉淀线，而麦芽糖结合蛋白只与抗MBP血清形成沉淀线。

实例2

实例2描述作为Mal E-PstI限制基因融合产物的PstI限制性核酸内切酶的克隆、表达和纯化。

重组DNA

图9和10概要说明了质粒pCG410的构建。

根据已发表的Walder等人所述的PstI限制和修饰系统的DNA顺序（J. Biol. Chem. 259(12)：8015-8026，1984，此公开列入本文参考文献中），由两个基因间的启动子区分叉转录限制基因和甲基化酶基因。在PstI限制基因的第8个密码子

处，有一个HincⅡ限制性酶切位点。在质粒pBR322的HindⅢ位点中已克隆了含有PstⅠ限制和修饰基因的HindⅢ DNA片段（4.0kb）。此质粒是pGW4400。

将30μg质粒pGW4400 DNA在200μl HindⅢ消化缓冲液中用30单位HindⅢ限制性酶和30单位PvuⅡ限制性酶切割，然后进行苯酚／氯仿萃取和乙醇沉淀。将DNA溶于50μl TE缓冲液中，然后与10μl上凝胶缓冲液混合。一份样品通过1%低胶凝温度的琼脂糖进行电泳。电泳后用溴化乙锭染色凝胶，如实施1所述用紫外光观察DNA带。凝胶上出现3个带。切下最上面的一个(4.0kb)，如实例1所述从凝胶上提取DNA。纯化的DNA片段在0.5ml连接缓冲液中用50单位T4 DNA连接酶连接，然后进行苯酚／氯仿萃取和乙醇沉淀。将DNA在100μl HincⅡ消化缓冲液中用30单位HincⅡ限制性酶切割，然后进行苯酚／氯仿萃取和乙醇沉淀。将DNA溶于20μl DNA缓冲液中。

将5μg质粒pUC18 DNA用10单位HincⅡ限制性酶切割，然后进行苯酚／氯仿萃取和乙醇沉淀。将DNA溶于10μl DNA缓缓冲液中。

合并两种DNA制备物，即来自pGW4400的4.0kb片段和HincⅡ切割的pUC18，然后加入5μl 6×连接缓冲液和2μl（或10单位）T4连接酶，在室温下保温过夜。如实例1所述，用连接溶液转化JM101的感受态细胞。将转化混合物涂在含有100μg/ml 氨苄青霉素、20μg/ml XG和10^{-4} M IPTG的LB平皿上。保温过夜后得到大约100个转化体。其中20%是白色的。纯化32个白色转化体，如实例1所述由白色转化体制备微量

DNA。通过限制性酶分析鉴定重组质粒。选择到一个重组质粒 $p^{CG}228$，其结构示于图9中。

用BND纤维素纯化10－20μg质粒 $p^{CG}228$ DNA，在100μl BamHⅠ-HindⅢ双重消化缓冲液（10mM NaCl，3mM二硫苏糖醇，10mM $MgCl_2$）中，用20单位BamHⅠ限制性酶和20单位HindⅢ限制性酶切割。1.6kb的BamHⅠ-HindⅢ DNA片段含有PstⅠ限制基因，其启动子和前面7个密码子已由BamHⅠ-XbaⅠ-SalⅠ多连接子取代。如实例1所述，用低胶凝温度的琼脂糖凝胶纯化此片段。将纯化的DNA片段溶于10μl DNA缓冲液中。

将10μg质粒 $p^{CG}150$ 用BamHⅠ和HindⅢ限制性酶切割，然后如上述进行苯酚／氯仿萃取和乙醇沉淀。将DNA溶于10μl DNA缓冲液中。

合并两种DNA制备物，即1.6kb的BamHⅠ-HindⅢ片段和切割的 $p^{CG}150$ 载体，在30μl连接缓冲液中用10单位T4 DNA连接酶通过于16℃保温过夜而连接。用连接溶液转化携有质粒 $p^{ACYC}184$（LacⅠ）的MC4100的感受态细胞。p^{ACYC} 184(LacⅠ)（Chang et al.，J. Bact. 134(3)：1141-1156，1978，此公开列入本文参考文献中）是一种多拷贝质粒，它与大肠杆菌k12中的质粒 $p^{BR}322$ 具有相容性。将含有LacⅠ基因的DNA片段插入 $p^{ACYC}184$ 的EcoRⅠ切割位点中。此质粒即 $p^{ACYC}184$（LacⅠ）。为了制备携有 $p^{ACYC}184$（LacⅠ）的MC4100感受态细胞，首先用质粒 $p^{ACYC}184$（LacⅠ）转化MC4100。然后如实例1所述用转化体（四环素抗性）

制备感受态细胞。它们即是携有 pACYC184(LacI) 的 MC4100 感受态细胞。将转化混合物涂在含有 100μg/ml 氨苄青霉素和 20μg/ml 四环素的 LB 平皿上。保温过夜后每个平皿上出现大约 50－100 个转化体。将平皿复制到含有 100μg/ml 氨苄青霉素、20μg/ml 四环素和 4×10^{-4} M IPTG 的 LB 平皿上。将此复制平皿于 37℃保温过夜。选取能在 LB－氨苄青霉素－四环素平皿上生长但不能在 LB－氨苄青霉素－四环素－IPTG 平皿上生长的转化体，并在 LB－氨苄青霉素－四环素平皿上纯化。由 IPTG 敏感型转化体制备微量 DNA，并用来转化 JM103 或 71－18。选取对氨苄青霉素有抗性但对四环素和 10^{-5} M IPTG 敏感的转化体。由这些 IPTG 敏感型转化体制备微量 DNA 并通过限制性酶消化进行分析。选择到一个重组质粒 pCG410，其结构示于图 10 中。

PstI-Mal E 融合物的亲和层析

在含有 100μg/ml 氨苄青霉素和 20μg/ml 四环素的加富培养基中，于 37℃下将携有质粒 pCG410 和 pACYC184 (LacI) 的大肠杆菌 MC4100 株培养至晚对数期。加入 IPTG 至 4×10^{-4} M，将培养物于 37℃再保温 1·5 小时。如实例 1 所述收集细胞并制备细胞粗提物。如实例 1 所述，将细胞提取物加到交联的直链淀粉柱上并进行亲和层析。细胞粗提物中，有 99% 以上的吸收物质（OD_{280}）穿过了交联直链淀粉柱。不到 1% 的 OD_{280} 吸收物质结合在柱上，并能用麦芽糖缓冲液洗脱。在过柱组分和麦芽糖缓冲液洗脱的组分中，发现有 PstI 限制性酶活性。在过柱组分中发现有高水平的非专一性 DNA 酶，但在麦芽糖缓冲液洗脱的组分中

没有。合并由主蛋白峰组成的过柱组分，上到另一个交联的直链淀粉柱中。发现蛋白质和ＤＮＡ酶活性（包括类似PstⅠ的限制活性）都不被柱子保留。与此相反，将麦芽糖洗脱组分中的类似PstⅠ的限制性酶活性合并、透析并上到另一个交联直链淀粉柱上时，所有活性都被柱子保留并能用麦芽糖缓冲液洗脱。

聚丙烯酰胺凝胶电泳

分别合并由主蛋白峰和麦芽糖洗脱峰组成的组分。将麦芽糖洗脱液如实例1所述浓缩２５－５０倍。上述合并的样品如实例1所述用来进行ＳＤＳ聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果示于图１１中。用ＳＤＳ凝胶进行测定，发现用麦芽糖缓冲液洗脱出三种蛋白质。最上面的带代表的蛋白其分子量估计为７８ｋ道尔顿，这与从Mal E-Pst Ⅰ融合基因顺序所作的推测一致。最低的带与天然的麦芽糖结合蛋白一起迁移，被认为代表宿主细胞中Mal E基因的产物。它也可能代表杂交多肽的降解产物，作为杂交多肽中的蛋白酶抗性结构域而形成。第三条带的迁移比ＭＢＰ和PstⅠ蛋白都稍慢，它可能是降解产物。

实例3

固定化蛋白生物反应器的制备

离心收集１０毫升培养至晚对数期的携有质粒ｐＣＧ３２５的SF1362菌株。将细胞沉淀悬浮于２ｍｌ缓冲液中（10mM Tris-HCl pH7.2）。如实例1所述制备粗提物。将细胞提取物上到０.６×２.５ｃｍ交联直链淀粉柱上，如实例1用缓冲液洗涤。

用生物反应器切割ONPG

如实例1所述，生物反应器柱在室温下用Z缓冲液平衡。将５００ｍｌ含有０.１％ONPG的Z缓冲液于室温下以０.５ｍｌ／

分的流速加到柱上。收集过柱组分，测得的ONPG至ONP和游离糖的转化大于95%。生物反应器在使用后可用Z缓冲液洗涤，于4℃下贮存。此生物反应器可进行多次重复使用。

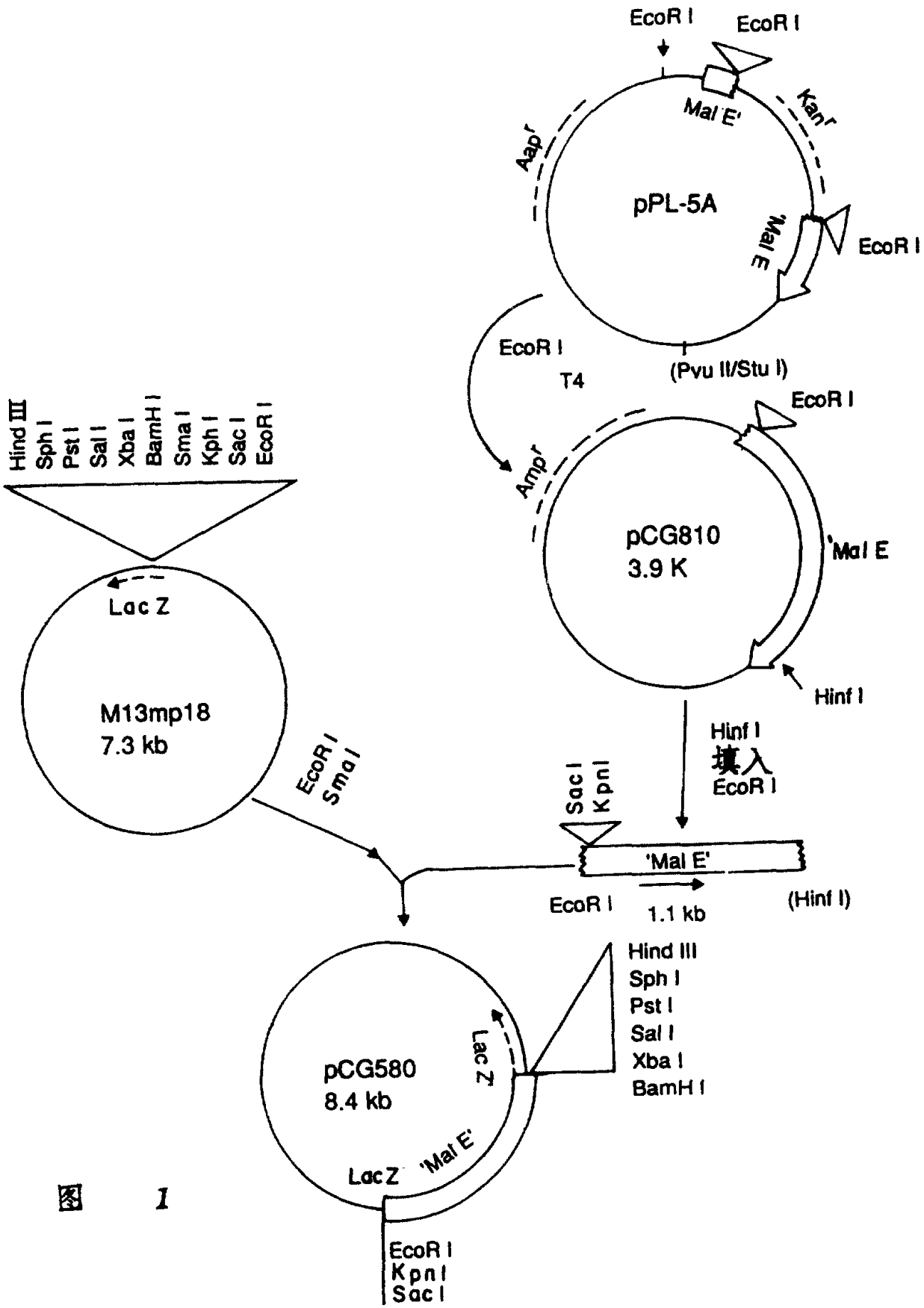

EcoR I
EcoR I
Mal E'
Kan'
Amp'
pPL-5A
'Mal E
EcoR I
EcoR I
T4
(Pvu II/Stu I)
EcoR I
Amp'
pCG810
3.9 K
'Mal E
Hinf I
Hind III
Sph I
Pst I
Sal I
Xba I
BamH I
Sma I
Kph I
Sac I
EcoR I
Lac Z
M13mp18
7.3 kb
EcoR I
Sma I
Hinf I
填入
EcoR I
Sac I
Kpn I
'Mal E'
EcoR I
1.1 kb
(Hinf I)
Hind III
Sph I
Pst I
Sal I
Xba I
BamH I
Lac Z
pCG580
8.4 kb
Lac Z
'Mal E'
EcoR I
Kpn I
Sac I

图　1

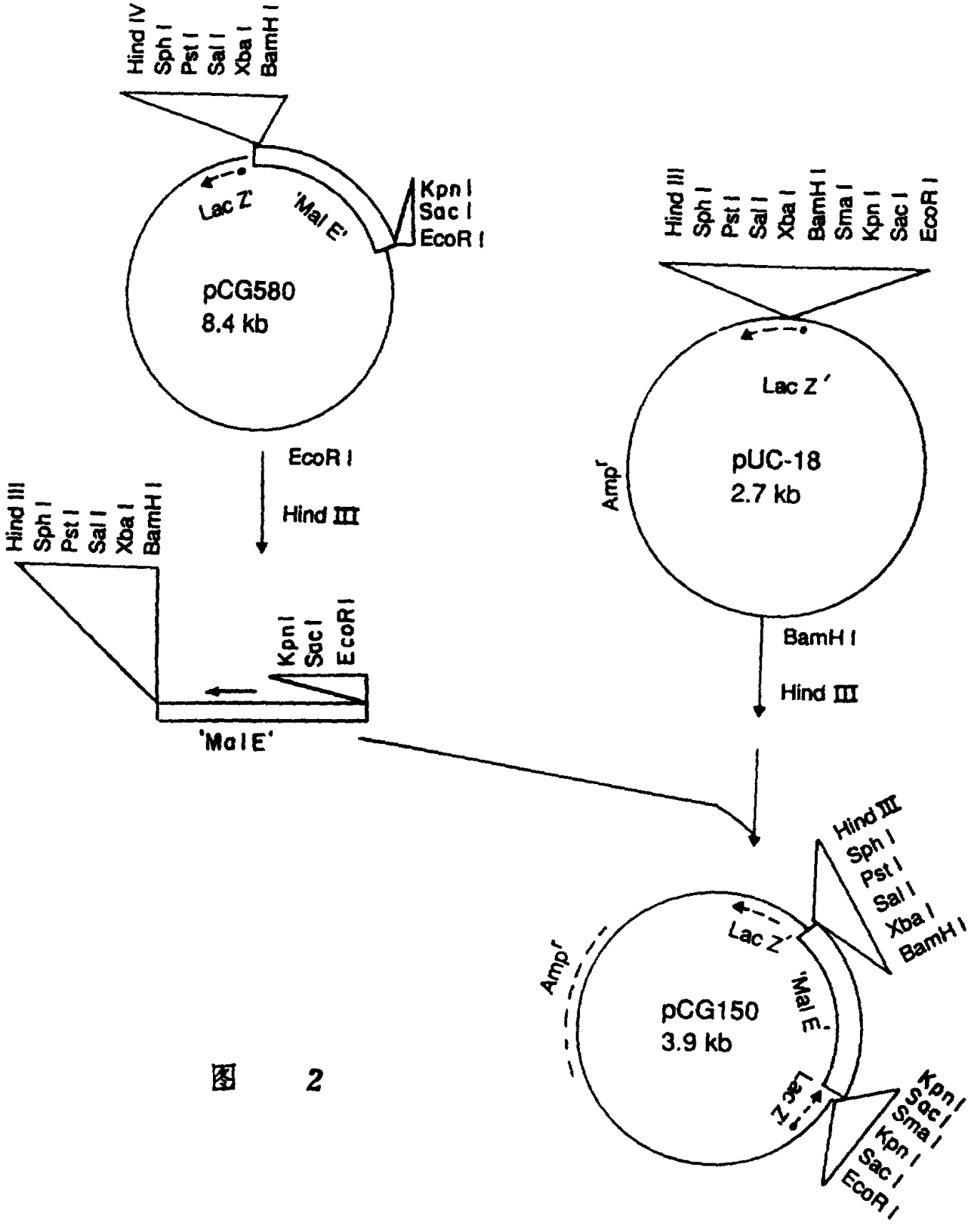

Hind IV
Sph I
Pst I
Sal I
Xba I
BamH I
Lac Z'
'Mal E'
Kpn I
Sac I
EcoR I
pCG580
8.4 kb
EcoR I
Hind III
Hind III
Sph I
Pst I
Sal I
Xba I
BamH I
Kpn I
Sac I
EcoR I
'Mal E'
Hind III
Sph I
Pst I
Sal I
Xba I
BamH I
Sma I
Kpn I
Sac I
EcoR I
Lac Z'
Amp'
pUC-18
2.7 kb
BamH I
Hind III
Hind III
Sph I
Pst I
Sal I
Xba I
BamH I
Lac Z'
'Mal E'
Amp'
pCG150
3.9 kb
Kpn I
Sac I
Sma I
Kpn I
Sac I
EcoR I

图 2

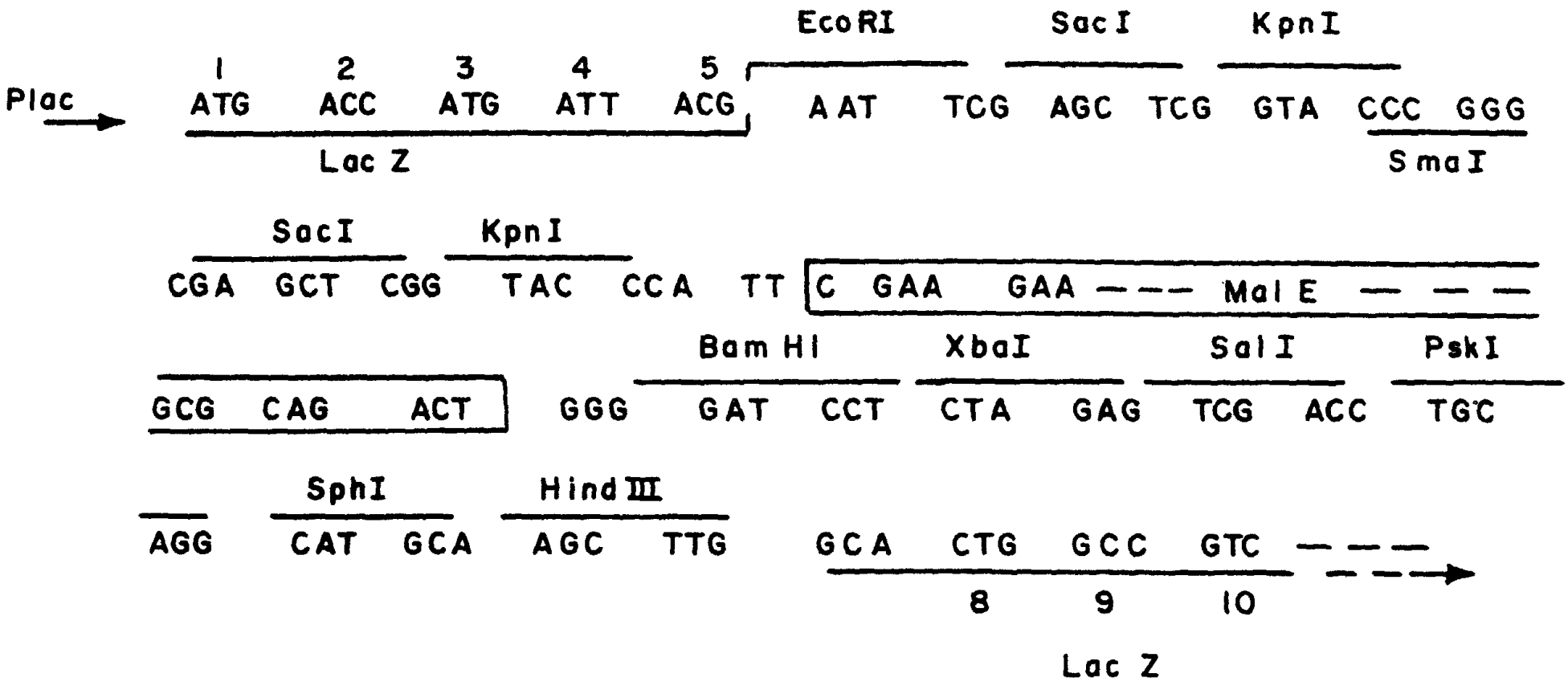

EcoRI
SacI
KpnI
Plac
1 2 3 4 5
ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG
Lac Z
SmaI
SacI
KpnI
CGA GCT CGG TAC CCA TT C GAA GAA --- MalE - - -
BamHI
XbaI
SalI
PskI
GCG CAG ACT GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC
SphI
HindIII
AGG CAT GCA AGC TTG GCA CTG GCC GTC - - -
8 9 10
Lac Z

图 3

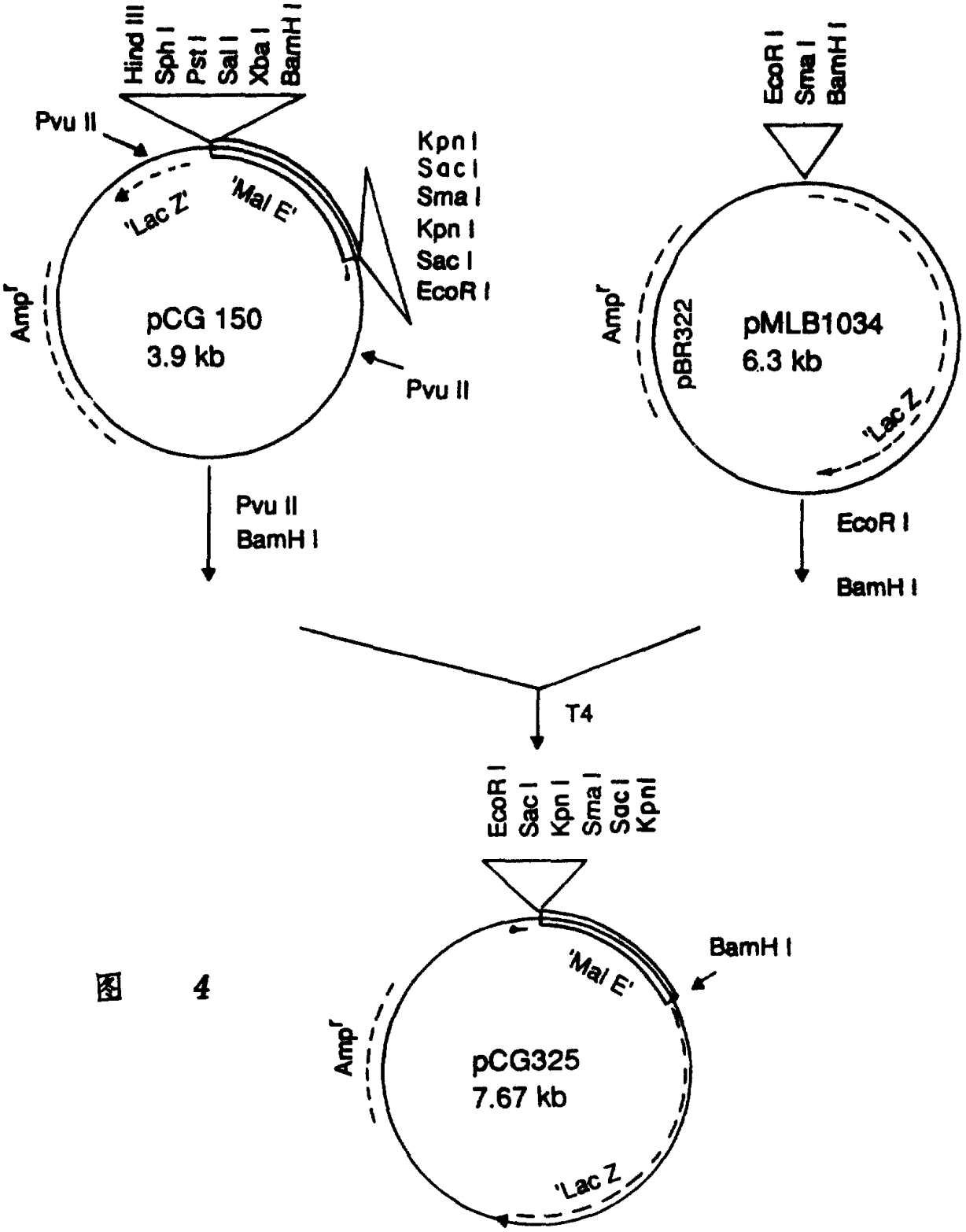

Hind III
Sph I
Pst I
Sal I
Xba I
BamH I
Pvu II
'Lac Z'
'Mal E'
Amp^r
pCG 150
3.9 kb
Kpn I
Sac I
Sma I
Kpn I
Sac I
EcoR I
Pvu II
Pvu II
BamH I
EcoR I
Sma I
BamH I
Amp^r
pBR322
pMLB1034
6.3 kb
'Lac Z
EcoR I
BamH I
T4
EcoR I
Sac I
Kpn I
Sma I
Sac I
KpnI
BamH I
'Mal E'
Amp^r
pCG325
7.67 kb
'Lac Z

图 4

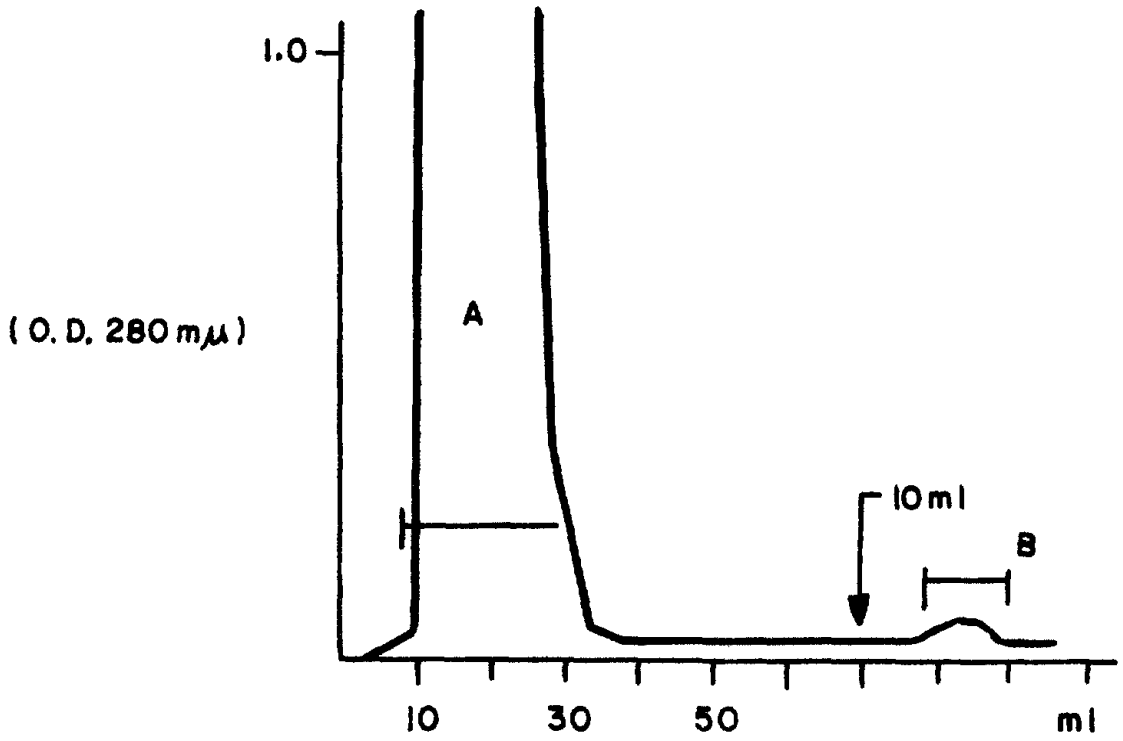


图 5

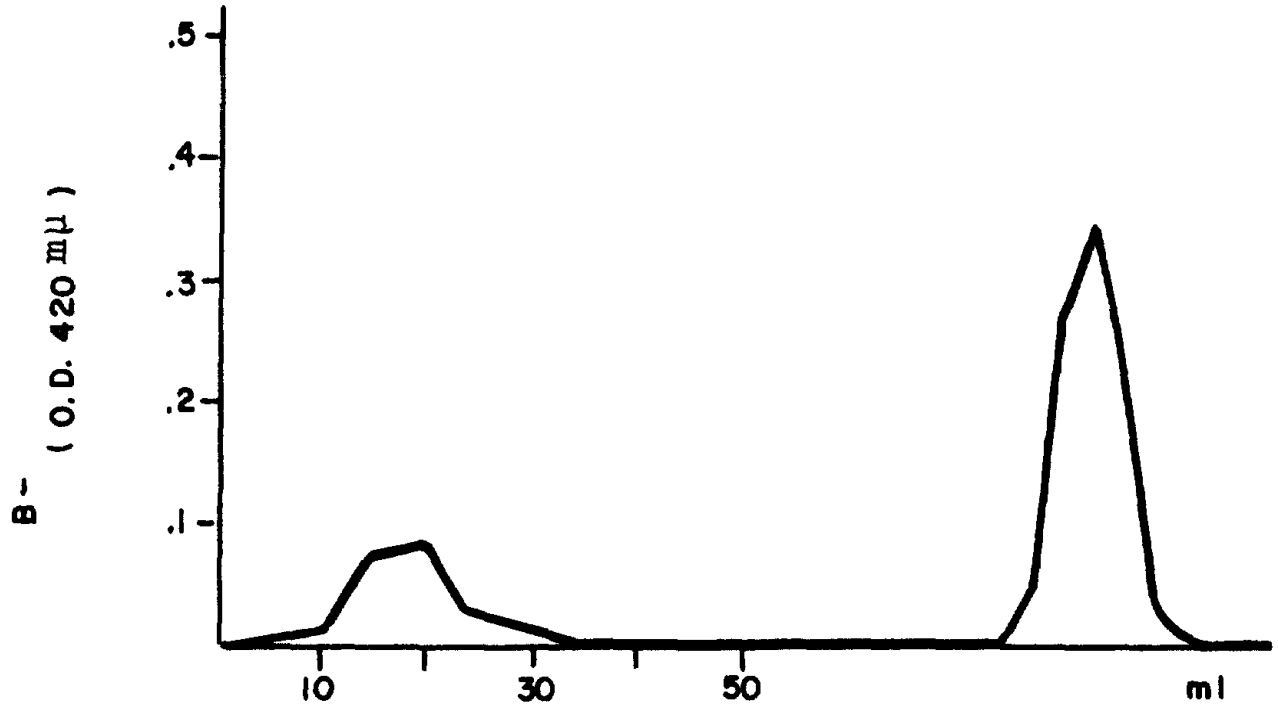


图 6

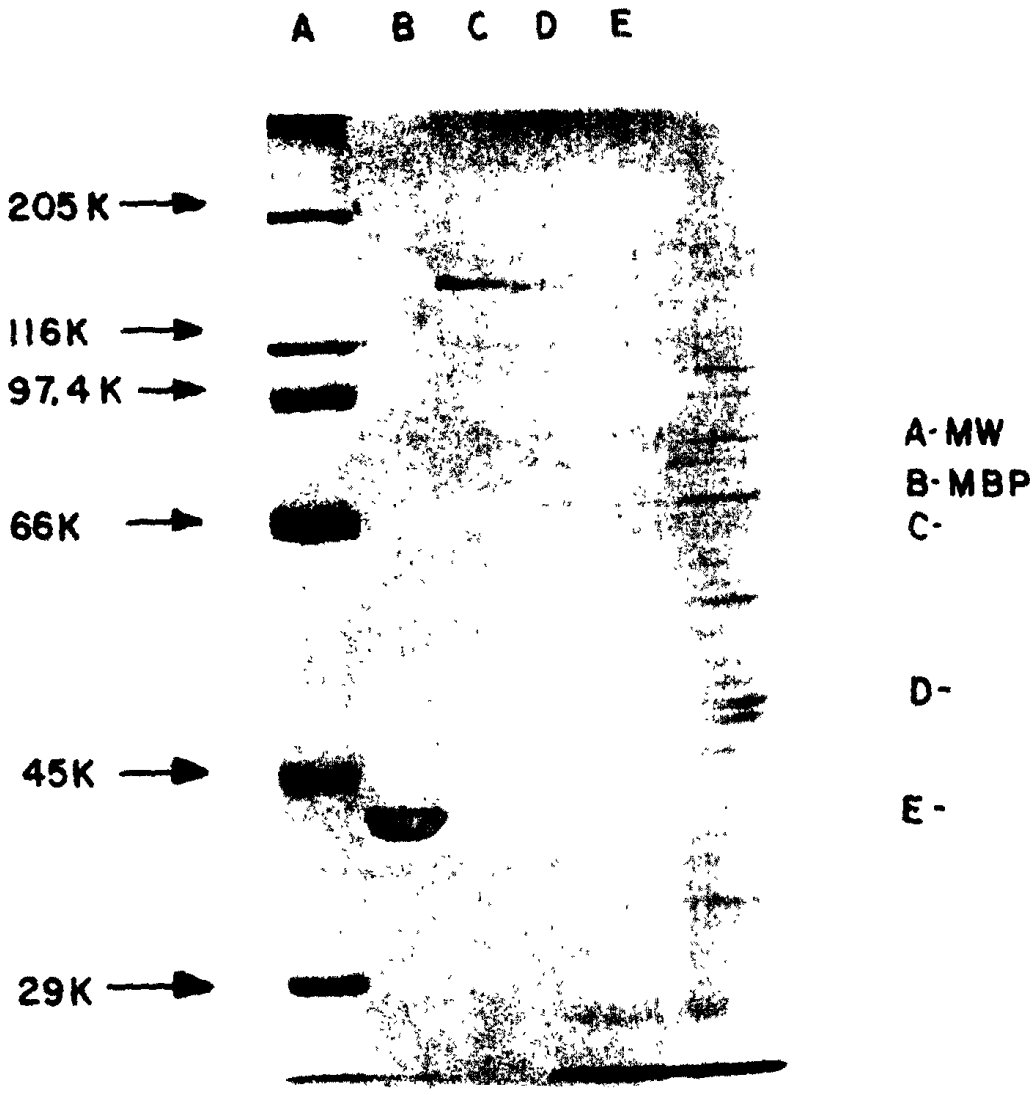


图 7

A B



A.- Mal E - LacZ

B.- β -

图 8

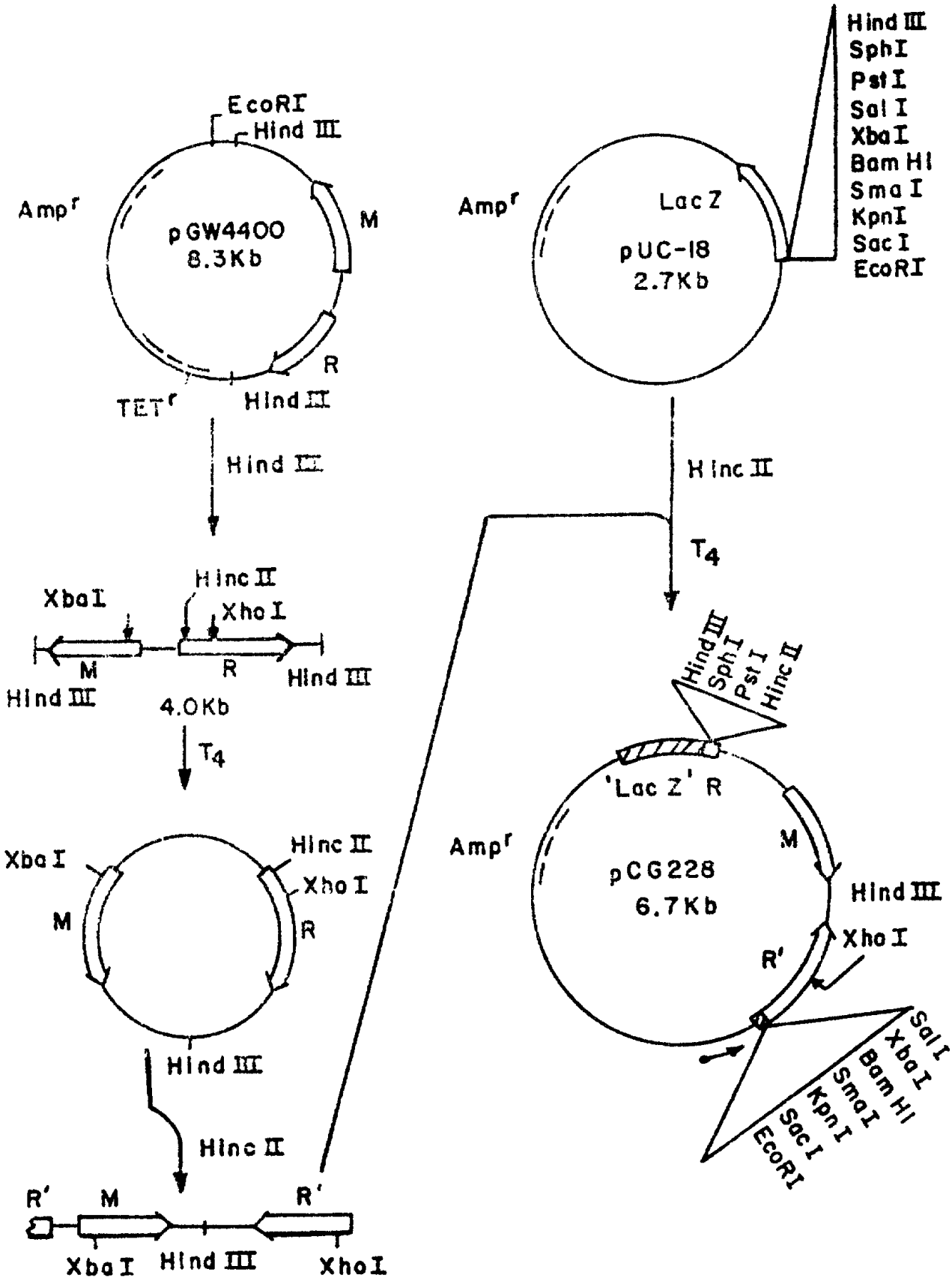

EcoRI
Hind III
Amp^r
pGW4400
8.3Kb
M
R
TET^r
Hind III
Hind III
Xba I
Hinc II
Xho I
M
R
Hind III
Hind III
4.0Kb
T4
Xba I
Hinc II
Xho I
M
R
Hind III
Hinc II
R'
M
R'
Xba I
Hind III
Xho I
Amp^r
Lac Z
pUC-18
2.7Kb
Hind III
Sph I
Pst I
Sal I
Xba I
Bam HI
Sma I
Kpn I
Sac I
EcoRI
Hinc II
T4
Hind III
Sph I
Pst I
Hinc II
'Lac Z' R
Amp^r
M
pCG228
6.7Kb
Hind III
R'
Xho I
Sal I
Xba I
Bam HI
Sma I
Kpn I
Sac I
EcoRI

図　9

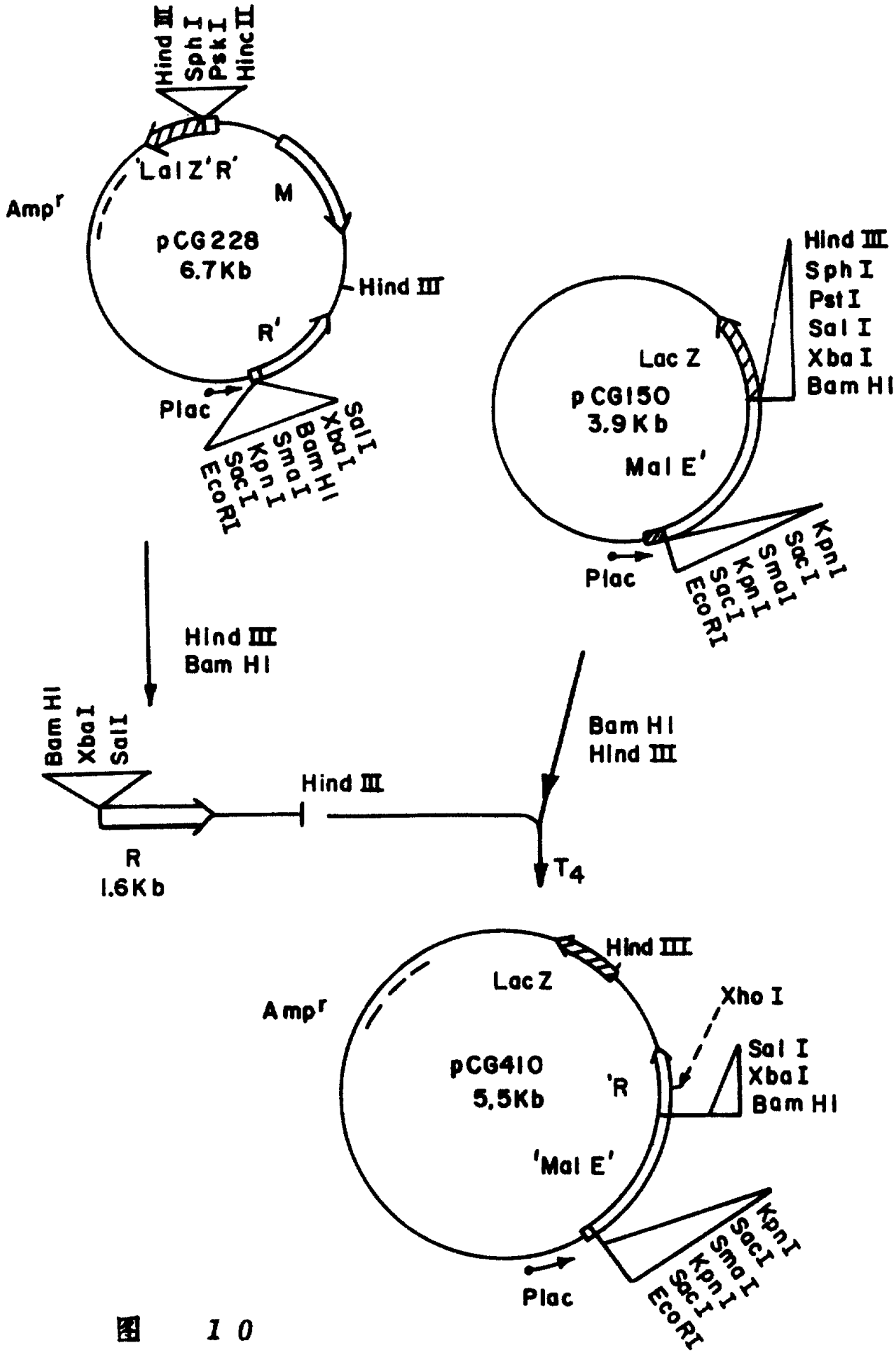

Hind III
Sph I
Pst I
Hinc II
'LacZ'R'
Amp^r
M
pCG228
6.7Kb
Hind III
R'
Plac
Sal I
Xba I
Bam HI
Kpn I
Sma I
Sac I
EcoRI
Hind III
Sph I
Pst I
Sal I
Xba I
Bam HI
Lac Z
pCG150
3.9Kb
Mal E'
Plac
Kpn I
Sac I
Sma I
Kpn I
Sac I
EcoRI
Hind III
Bam HI
Bam HI
Xba I
Sal I
Hind III
R
1.6Kb
Bam HI
Hind III
T4
Hind III
Lac Z
Xho I
Amp^r
pCG410
5.5Kb
'R
Sal I
Xba I
Bam HI
'Mal E'
Plac
Kpn I
Sac I
Sma I
Kpn I
Sac I
EcoRI

図　10

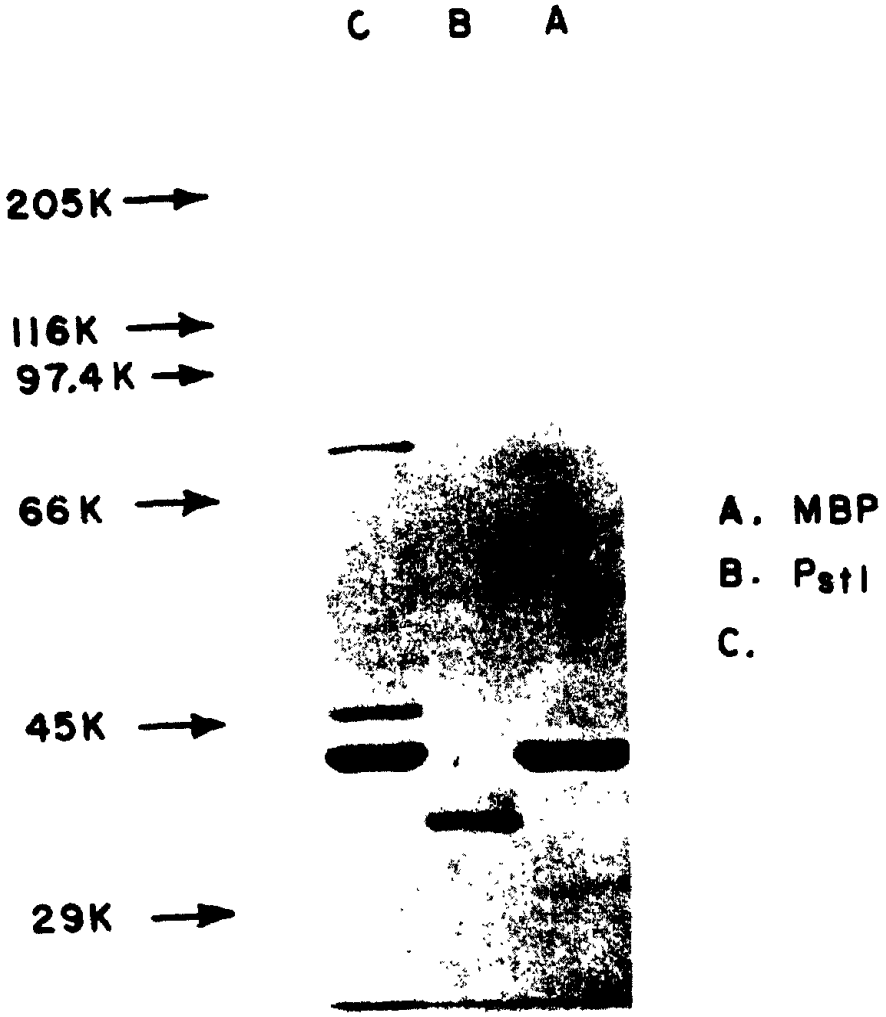


图 11