



(12) 发明专利

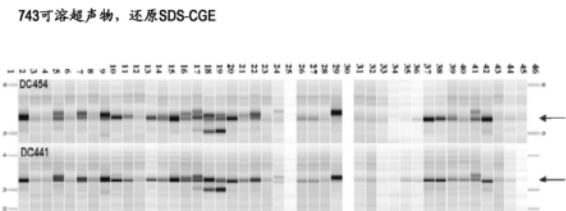
(10) 授权公告号 CN 111278852 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 16

(21) 申请号 201880069961.4	(72) 发明人 R • J • 科尔曼 T • 布鲁克
(22) 申请日 2018.10.17	(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111278852 A	专利代理师 王玮玮 郑霞
(43) 申请公布日 2020.06.12	(51) Int.Cl.
(30) 优先权数据 62/578,305 2017.10.27 US	C07K 14/535 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.04.26	C07K 14/62 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2018/056374 2018.10.17	C07K 14/635 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/083793 EN 2019.05.02	(56) 对比文件
(73) 专利权人 菲尼克斯公司 地址 美国加利福尼亚州	CN 101031655 A,2007.09.05
	CN 102869778 A,2013.01.09
	EP 0211639 B1,1993.12.29
	审查员 殷岑楠
	权利要求书2页 说明书47页
	序列表45页 附图6页

(54) 发明名称
重组欧氏杆菌天冬酰胺酶的生产方法

(57) 摘要
本文提供了生产重组欧氏杆菌天冬酰胺酶的方法。本文的方法生产在宿主细胞的周质或细胞质中具有高表达水平的天冬酰胺酶,其活性与可商购的天冬酰胺酶制剂相当。



1. 一种用于生产重组II型天冬酰胺酶的方法,所述方法包括:

在培养基中培养缺乏一种或多种天然天冬酰胺酶的表达的荧光假单胞菌宿主细胞并用包含编码所述重组II型天冬酰胺酶的核酸的表达构建体在所述荧光假单胞菌宿主细胞的细胞质中表达所述重组II型天冬酰胺酶,其中所述重组II型天冬酰胺酶包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列,并且其中所述重组II型天冬酰胺酶在所述细胞质中以20%至40%的可溶形式的总细胞蛋白(TCP)的产率产生。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述重组II型天冬酰胺酶在所述细胞质中以10 g/L至25 g/L的产率产生。

3. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括使用活性试验测量所产生的一定量的可溶重组II型天冬酰胺酶的活性。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述重组II型天冬酰胺酶是菊欧氏杆菌L-天冬酰胺酶II型。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中编码所述重组II型天冬酰胺酶的所述核酸包含与SEQ ID NO: 2至少85%同源的序列。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述重组II型天冬酰胺酶由SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列组成。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一种或多种天然天冬酰胺酶选自:I型天冬酰胺酶;II型天冬酰胺酶;及其组合。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述宿主细胞:缺乏一种或多种蛋白酶的表达;过表达一种或多种折叠调节体;或两者。

9. 一种用于生产重组II型天冬酰胺酶的方法,所述方法包括:

在培养基中培养缺乏一种或多种天然天冬酰胺酶的表达的荧光假单胞菌宿主细胞并用包含编码所述重组II型天冬酰胺酶的核酸和编码分泌前导体的序列的表达构建体在所述宿主细胞的周质中表达所述重组II型天冬酰胺酶,所述分泌前导体指导所产生的所述重组II型天冬酰胺酶转移至所述宿主细胞的周质,其中所述重组II型天冬酰胺酶包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列,并且其中所述重组II型天冬酰胺酶在所述周质中以20%至40%可溶形式的TCP的产率产生。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述重组II型天冬酰胺酶在所述周质中以5 g/L至30 g/L的产率产生。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述方法进一步包括使用活性试验测量所产生的一定量的所述重组II型天冬酰胺酶的活性。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述重组II型天冬酰胺酶是菊欧氏杆菌L-天冬酰胺酶II型。

13. 根据权利要求9所述的方法,其中编码所述重组II型天冬酰胺酶的所述核酸包含与SEQ ID NO: 2至少85%同源的序列。

14. 根据权利要求9所述的方法,其中所述重组II型天冬酰胺酶由SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列组成。

15. 根据权利要求9所述的方法,其中所述一种或多种天然天冬酰胺酶选自:I型天冬酰胺酶、II型天冬酰胺酶、或两者。

16. 根据权利要求9的方法,其中所述分泌前导体选自FlgI、Ibps31A、PbpA20V、DsbC、SEQ ID NO: 33和SEQ ID NO: 31。

17. 根据权利要求3或11所述的方法,其进一步包括使用同一活性试验将所产生的所述重组II型天冬酰胺酶的测量的活性与相同量的对照II型天冬酰胺酶的测量的活性进行比较,其中所述对照II型天冬酰胺酶为来自Sigma的天冬酰胺酶,所产生的所述重组II型天冬酰胺酶的测量的活性与所述对照II型天冬酰胺酶的活性相当。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述重组II型天冬酰胺酶被修饰以增加在患者中的半衰期。

19. 根据权利要求9所述的方法,其中所述宿主细胞:缺乏一种或多种蛋白酶的表达;过表达一种或多种折叠调节体;或两者。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述宿主细胞:缺乏HslUV蛋白酶;缺乏PrtB蛋白酶;缺乏Prc蛋白酶;缺乏DegP蛋白酶;缺乏AprA蛋白酶;缺乏Lon蛋白酶;缺乏La蛋白酶;缺乏DegP1;缺乏DegP2;过表达DegP S219A;或其组合。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中所产生的所述重组II型天冬酰胺酶用于治疗患有急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病或非霍奇金淋巴瘤的患者。

22. 根据权利要求18所述的方法,其中所述重组II型天冬酰胺酶被聚乙二醇化修饰。

23. 根据权利要求9所述的方法,其中所述重组II型天冬酰胺酶经修饰以增加在患者中的半衰期。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述重组II型天冬酰胺酶经聚乙二醇化修饰。

25. 根据权利要求8所述的方法,其中所述宿主细胞:缺乏HslUV蛋白酶;缺乏PrtB蛋白酶;缺乏Prc蛋白酶;缺乏DegP蛋白酶;缺乏AprA蛋白酶;缺乏Lon蛋白酶;缺乏La蛋白酶;缺乏DegP1;缺乏DegP2;过表达DegP S219A;或其组合。

重组欧氏杆菌天冬酰胺酶的生产方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年10月27日提交的美国临时申请号62/578,305的权益,其通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,其已经以ASCII格式电子提交,并且通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2018年10月16日,文件名为38194-749_601_SL.txt,大小为71,228字节。

背景技术

[0005] 来自细菌菊欧氏杆菌的L-天冬酰胺酶II型(也称为菊天冬酰胺酶(crisantaspase))被指出与其他化疗剂联合用于治疗急性淋巴细胞白血病(ALL)的患者,其已发展出针对源自大肠杆菌的天然或聚乙二醇化的天冬酰胺酶的超敏反应或沉默失活。它也可用于治疗其他肿瘤性疾病。菊天冬酰胺酶是通过发酵菊欧氏杆菌以产生细胞糊状物而制备,细胞糊状物经过处理以产生酶制剂,该酶制剂通过一系列色谱法和其他方法进一步纯化以产生药物。当在欧氏杆菌中表达时,菊天冬酰胺酶前蛋白利用其在N-末端存在的天然分泌信号序列分泌到细胞的周质空间。一旦定位在周质空间内,信号序列被切割掉以产生能够自发地融合成四聚体或或活性形式的菊天冬酰胺酶的成熟单体。在某些情况下,使用具有来自异源的各种分泌信号肽的融合体,在大肠杆菌中表达重组菊天冬酰胺酶。

发明内容

[0006] 本文提供了用于生产重组II型天冬酰胺酶的方法。在一些实施方式中,该方法包括:在培养基中培养假单胞菌目(Pseudomonadales)宿主细胞并从包含编码所述重组天冬酰胺酶的核酸的表达构建体在所述假单胞菌目宿主细胞的细胞质中表达所述重组天冬酰胺酶,其中所述重组天冬酰胺酶在所述细胞质中以约20% TCP至约40% TCP可溶天冬酰胺酶的产率产生。在一些实施方式中,重组天冬酰胺酶在细胞质中以约10g/L至约25g/L的产率产生。在一些实施方式中,该方法进一步包括使用活性试验测量所产生的一定量的可溶重组II型天冬酰胺酶的活性。在一些实施方式中,编码重组天冬酰胺酶的核酸被优化用于在宿主细胞中表达。在一些实施方式中,重组天冬酰胺酶是菊欧氏杆菌L-天冬酰胺酶II型(菊天冬酰胺酶)。在一些实施方式中,编码重组天冬酰胺酶的核酸包含与SEQ ID NO:1至少85%同源的序列。在一些实施方式中,重组天冬酰胺酶具有与SEQ ID NO:2至少85%同源的氨基酸序列。在一些实施方式中,重组天冬酰胺酶的表达通过向培养基中添加IPTG来诱导。在一些实施方式中,IPTG在培养基中的浓度为约0.05mM至约2.5mM。在一些实施方式中,当假单胞菌(Pseudomonad)宿主细胞已生长至约0.1g/g至约0.5g/g的湿细胞重量时,诱导重组天冬酰胺酶的表达。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞在约5.0至约8.0的pH下培养。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞在22°C至约33°C的温度下培养。在本文的任何实施方式中,假单胞菌目宿主细胞是荧光假单胞菌细胞。在一些实施方式中,假单胞菌目宿

主细胞缺乏一种或多种天冬酰胺酶的表达。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞缺乏一种或多种天然天冬酰胺酶的表达。在一些实施方式中,缺乏表达的天然天冬酰胺酶是I型天冬酰胺酶。在一些实施方式中,缺乏表达的天然天冬酰胺酶是II型天冬酰胺酶。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞缺乏一种或多种蛋白酶的表达。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞过表达一种或多种折叠调节体。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞缺乏一种或多种天然天冬酰胺酶的表达,缺乏一种或多种蛋白酶的表达和/或过表达一种或多种折叠调节体。

[0007] 在实施方式中,该方法包括:在培养基中培养假单胞菌目宿主细胞并从包含编码重组天冬酰胺酶的核酸的表达构建体在假单胞菌目宿主细胞的周质中表达所述重组天冬酰胺酶;其中所述重组天冬酰胺酶在所述周质中以约20%至约40% TCP可溶天冬酰胺酶(例如单体天冬酰胺酶)的产率产生。在一些实施方式中,重组天冬酰胺酶在周质中以约5g/L至约20g/L的产率产生。在一些实施方式中,该方法进一步包括使用活性试验测量所产生的一定量的重组II型天冬酰胺酶的活性。在一些实施方式中,编码重组天冬酰胺酶的核酸被优化用于在宿主细胞中表达。在一些实施方式中,重组天冬酰胺酶是菊欧氏杆菌L-天冬酰胺酶II型(菊天冬酰胺酶)。在一些实施方式中,编码重组天冬酰胺酶的核酸包含与SEQ ID NO:1至少85%同源的序列。在一些实施方式中,重组天冬酰胺酶具有与SEQ ID NO:2至少85%同源的氨基酸序列。在一些实施方式中,重组天冬酰胺酶的表达通过向培养基中添加IPTG来诱导。在一些实施方式中,IPTG在培养基中的浓度为约0.05mM至约2.5mM。在一些实施方式中,当假单胞菌目宿主细胞已生长至约0.05g/g至约0.5g/g的湿重量时,诱导重组天冬酰胺酶的表达。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞在约5.0至约8.0的pH下培养。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞在22°C至约33°C的温度下培养。在一些实施方式中,假单胞菌宿主细胞是荧光假单胞菌细胞。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞缺乏一种或多种天然天冬酰胺酶的表达。在一些实施方式中,缺乏表达的天然天冬酰胺酶是I型天冬酰胺酶。在一些实施方式中,缺乏表达的天然天冬酰胺酶是II型天冬酰胺酶。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞缺乏一种或多种蛋白酶的表达。在一些实施方式中,假单胞菌目宿主细胞过表达一种或多种折叠调节体。在一些实施方式中,表达构建体包含分泌前导体。在一些实施方式中,分泌前导体选自假单胞菌目分泌前导体FlgI、Ibps31A、PbpA20V、DsbC、8484和5193。在一些实施方式中,分泌前导体指导所产生的重组天冬酰胺酶转移至假单胞菌宿主细胞的周质。在一些实施方式中,该方法进一步包括使用相同的活性试验将产生的重组II型天冬酰胺酶的测量的活性与相同量的对照II型天冬酰胺酶的测量的活性进行比较。在一些实施方式中,对照II型天冬酰胺酶包含已在至少一个国家被商业批准用于患者的欧氏杆菌II型天冬酰胺酶。在一些实施方式中,当产生的重组II型天冬酰胺酶具有II型天冬酰胺酶对照样品的约80%至约120%的活性时,选择所述产生的重组II型天冬酰胺酶用于患者。在一些实施方式中,重组II型天冬酰胺酶被修饰以增加在患者中的半衰期。在实施方式中,宿主细胞选自以下中的至少一种:缺乏Hs1UV蛋白酶的宿主细胞、缺乏PrfB蛋白酶的宿主细胞、缺乏Prc蛋白酶的宿主细胞、缺乏DegP蛋白酶的宿主细胞、缺乏AprA蛋白酶的宿主细胞、缺乏Lon蛋白酶的宿主细胞、缺乏La蛋白酶的宿主细胞、缺乏Deg P1的宿主细胞、缺乏Deg P2的宿主细胞和过表达DegP S219A的宿主细胞。

[0008] 通过引用并入

[0009] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都以如同每个单独的出版物，专利或专利申请被明确地并单独地指出通过引用并入的相同程度通过引用并入本文。

附图说明

[0010] 在所附权利要求中具体阐述了本公开的新颖特征。通过参考以下阐述在其中利用了本公开的原理的说明性实施例的详细描述并结合附图，将获得对本公开的特征和优点的更好的理解：

[0011] 图1.SDS-CGE凝胶样图像——Tier 1表达质粒筛选。通过还原SDS-CGE分析来自DC454(上图)和DC441(下图)的菊天冬酰胺酶小规模生长全肉汤超声可溶样品。最左侧的泳道显示分子量标记梯1(上图MW梯48KD,29KD;下图MW梯48KD,29KD,21KD),最右侧的泳道显示相同的梯。从左到右(第1到46道),从梯1的右侧开始的泳道是显示将以下分泌前导体肽融合到菊天冬酰胺酶蛋白的N端时观察到的表达模式(高RBS,除非另有说明)的泳道:无前导体;DsbD;前导体A;DsbA;DsbA-中RBS;Azu;Azu-中RBS;Lao;Ibp-S31A;To1B;DC432null(野生型宿主菌株,其携带仅为载体的质粒);Tpr;Ttg2C;FlgI;CupC2;CupB2;Pbp;PbpA20V;DsbC;前导体B;前导体C;DC432null;前导体D;前导体E;前导体F;前导体G;前导体H;PorE;前导体I;前导体J;前导体K;前导体L;DC432null;前导体M;前导体N;前导体O;5193;前导体P;前导体Q;前导体R;8484;前导体S;前导体T;DC432null。凝胶图像右侧的箭头表示菊天冬酰胺酶靶蛋白(35KDa)的迁移。

[0012] 图2.菊天冬酰胺酶示例序列。显示了编码菊天冬酰胺酶的示例性核酸序列(SEQ ID NO:2)和相应的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。还显示了包含SapI限制位点的完整核酸序列(SEQ ID NO:63)。

[0013] 图3.表达质粒地图。该地图显示了在荧光假单胞菌中表达菊天冬酰胺酶的质粒的实例。

[0014] 图4.SDS-CGE凝胶样图像——摇瓶表达分析。显示了通过可溶还原毛细管凝胶电泳(SDS-CGE)测量的在不同生长条件下的表达。从左至右是显示了在以下样品中观察到的表达模式的泳道:梯1(分子量标记68、48、29、21和16KD);I0时的STR55987(无前导体的胞质表达);I24时的STR55987(无前导体的胞质表达);I24时的STR55987(无前导体的胞质表达);I24时的STR55987(无前导体的胞质表达);I0时的STR55979(前导体O);I24时的STR55979(前导体O);I24时的STR55979(前导体O);I24时的STR55979(前导体O);I0时的STR55980(8484前导体);I24时的STR55980(8484前导体);I24时的STR55980(8484前导体);I24时STR55980(8484前导体);I24时STR55980(8484前导体);I0时的STR55982(Nu11质粒);I24时的STR55982(Nu11质粒);I24时的STR55982(Nu11质粒);I24时的STR55982(Nu11质粒);梯2(与梯1中相同的标记);Sigma大肠杆菌AspG 1,000ug/ml(标准大肠杆菌Asp2);Sigma大肠杆菌AspG 500ug/ml;Sigma大肠杆菌AspG 250ug/ml;Sigma大肠杆菌AspG 125ug/ml;Sigma大肠杆菌AspG 62.5ug/ml;和梯3(与梯1中相同的标记),其中在诱导时采集I0样品,在诱导后24小时采集I24样品。右边的箭头表示大肠杆菌L-Asp2(35KD)的迁移。

[0015] 图5.STR55978的生长——2升发酵。在不同生长条件(条件1-8)下,通过湿细胞重量测量的生长显示为发酵时间的函数。

[0016] 图6.STR55978蛋白质生产——2升发酵。显示了通过还原可溶SDS-CGE测量的重组

天冬酰胺酶滴度。

[0017] 图7.质谱数据——摇瓶表达分析。显示了所表达的重组天冬酰胺酶的完整质量。

具体实施方式

[0018] 总览

[0019] 本文公开了在假单胞菌宿主细胞中从菊欧氏杆菌产生可溶重组L-天冬酰胺酶II型(也称菊天冬酰胺酶)的方法。本文描述了作为总细胞蛋白的百分比的高水平的菊天冬酰胺酶生产,例如高达40% TCP菊天冬酰胺酶,例如菊天冬酰胺酶单体,没有可检测的降解,能够形成活性四聚体。使用本发明的方法获得了高滴度的菊天冬酰胺酶生产,例如高达每升20克菊天冬酰胺酶,例如菊天冬酰胺酶单体,没有可检测的降解,能够形成活性四聚体。用于产生菊天冬酰胺酶的宿主细胞包括但不限于假单胞菌,例如荧光假单胞菌。菊天冬酰胺酶表达构建体可以根据选择的宿主菌株进行密码子优化。

[0020] 可用于本发明方法中的核酸构建体可以编码与编码分泌信号(分泌前导体)的核酸序列可操作地连接的菊天冬酰胺酶基因,例如对于荧光假单胞菌天然的周质分泌前导体,其导致分泌前导体-菊天冬酰胺酶融合蛋白的表达。在一些实施方式中,周质分泌前导体包括F1gI、8484、DsbC、Ibp-S31A或5193中的一种或多种。在实施方式中,宿主细胞具有在一种或多种蛋白酶编码基因中的突变,其导致蛋白酶的失活。应当理解,导致蛋白酶或任何其他基因产物失活的突变可以是本领域已知引起蛋白失活或阻止蛋白表达的任何类型的突变,其包括但不限于基因的编码序列或调控序列中的置换、插入或缺失突变。应当理解,可以使用本领域已知的任何方法,例如通过折叠调节体基因的质粒表达或染色体整合来实现折叠调节体的过表达。在实施方式中,宿主细胞具有至少一种蛋白酶失活并过表达至少一种折叠调节体。

[0021] 如本领域技术人员已知的,由于遗传密码的冗余性,氨基酸序列可以由不同的核苷酸序列编码。因此本发明包括具有相同氨基酸序列但由不同核苷酸序列编码的肽或蛋白质的使用。

[0022] 在实施方式中,分泌前导体将可溶菊天冬酰胺酶运输至宿主细胞的周质中。在其他实施方式中,菊天冬酰胺酶留在细胞质中。在实施方式中,菊天冬酰胺酶纯化过程不需要菊天冬酰胺酶溶解和随后的再折叠。在实施方式中,至少一部分的菊天冬酰胺酶不在包涵体中表达。在实施方式中,重组菊天冬酰胺酶表达为不含用于纯化的任何肽标签并且纯化时不需要额外的处理。在其中分泌前导体与天冬酰胺酶蛋白融合的实施方式中,分泌前导体是从可溶解地表达的菊天冬酰胺酶有效地加工的。在其他实施方式中,用于菊天冬酰胺酶的周质生产的表达质粒未利用任何抗生素抗性标记基因进行选择 and 维持,因此消除了随后去除生物药物生产期望的质粒DNA的复杂过程。在其他实施方式中,发酵条件是可扩展的以用于大量生产。本文提供的方法产生高水平的可溶和/或活性菊天冬酰胺酶。

[0023] 在实施方式中,本发明提供了用于高产率的可溶形式的重组蛋白的细胞质生产的方法,其中重组蛋白在其天然宿主中以较低产率周质地产生。在其天然宿主菊欧氏杆菌中,菊天冬酰胺酶在周质中产生。本发明提供了允许在宿主细胞的细胞质中产生高水平的可溶和/或活性菊天冬酰胺酶的方法。在实施方式中,本文提供的方法在假单胞菌目(Pseudomonadales)、假单胞菌(Pseudomonad)、假单胞菌属(Pseudomonas)或荧光假单胞菌

(*Pseudomonas fluorescens*) 宿主细胞的细胞质中产生高水平的可溶和/或活性菊天冬酰胺酶。

[0024] 重组蛋白的细胞质生产可便利纯化。对于较大的蛋白质(菊天冬酰胺酶四聚体是 $35\text{KD} \times 4$, 即 140KD 复合物), 预期使用周质释放从周质空间中与从细胞质中的总释放相比更低的回收百分比。而且, 周质表达的蛋白中的分泌前导体的不完全或不当处理导致不想要的、与产物相关的杂质, 其必须与目标蛋白分离, 从而导致总体上更低的工艺收率。

[0025] 天冬酰胺酶

[0026] 天冬酰胺酶(包括II型L-天冬酰胺酶)是催化L-天冬酰胺水解为L-天冬氨酸和氨的酶($\text{L-天冬酰胺} + \text{H}_2\text{O} = \text{L-天冬氨酸} + \text{NH}_3$)。II型L-天冬酰胺酶用作治疗ALL和一些其他癌症的多药物化疗方案的一部分。某些癌细胞由于缺乏天冬酰胺合成酶而不能合成天冬酰胺, 而正常细胞可以合成天冬酰胺。因此, 向患者施用天冬酰胺酶导致可溶性天冬酰胺的水解和循环天冬酰胺的减少。这可导致癌细胞死亡, 而对正常细胞的影响较小。天冬酰胺酶描述于例如Pritsa和Kyriakidis, 2002, “Drug Discovery and Design: Medical Aspects”中的“L-Asparaginase: Structure, Properties, and Anti-Tumor Activity”, IOS Press, Matsoukas, J. 和Mavromoustakos, T. 编辑, 通过引用并入本文。

[0027] **Erwinaze®** (生物许可证申请125359) 是在美国商业批准用于在患者中治疗ALL的II型菊欧氏杆菌L-天冬酰胺酶产品。它的活性成分是II型菊欧氏杆菌L-天冬酰胺酶(参见**Erwinaze®** 包装说明, 通过引用并入本文)。

[0028] 在实施方式中, 使用本发明的方法生产II型菊欧氏杆菌天冬酰胺酶(例如本文SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列, 或SEQ ID NO:35-49中的任一个, 其包含分泌前导体序列)。在一些实施方式中, II型菊欧氏杆菌天冬酰胺酶具有与SEQ ID NO:1至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列。该天冬酰胺酶描述于例如美国专利申请号2016/0060613, “Pegylated L-asparaginase”, 其通过引用整体并入本文, 其包括细菌来源的已知L-天冬酰胺酶的常见结构特征。根据US 2016/0060613, 所有都是同四聚体, 在两个相邻单体的N端和C端结构域之间具有四个活性位点, 它们的三级和四级结构都具有高度相似性, 并且L-天冬酰胺酶的催化位点的序列在菊欧氏杆菌、*Erwinia carotovora* 和大肠杆菌L-天冬酰胺酶II之间高度保守。在实施方式中, 蛋白是具有SEQ ID NO:1序列的菊欧氏杆菌的L-天冬酰胺酶。该L-天冬酰胺酶公开为菊欧氏杆菌NCPB 1066 (Genbank登录号CAA32884, 描述于Minton等, 1986, “Nucleotide sequence of the *Erwinia chrysanthemi* NCPB 1066L-asparaginase gene,” Gene 46(1), 25-35, 各自通过引用整体并入本文), 有或没有信号肽和/或前导体序列。

[0029] 在实施方式中, 使用本发明的方法产生的菊天冬酰胺酶是菊欧氏杆菌天冬酰胺酶L-天冬酰胺酶II型酶的变体, 其中该变体具有菊欧氏杆菌L-天冬酰胺酶II型酶的L-天冬酰胺酶II型活性的至少约80%至约120%, 或更高, 约85%至约120%, 约90%至约120%, 约95%至约120%, 约98%至约120%, 约100%至约120%, 约80%至约100%, 约80%至约90%, 约85%至约115%, 约90%至约110%, 约95%至约155%, 至少约80%, 至少约85%, 至少约90%, 至少约95%, 至少约98%, 或至少约100%。

[0030] 在实施方式中, II型菊欧氏杆菌天冬酰胺酶由具有其中密码子被优化以用于在根据需要的宿主细胞中表达的序列的核酸编码。在一些实施方式中, II型菊欧氏杆菌天冬酰

胺酶由具有SEQ ID NO:2的序列的核酸编码。在一些实施方式中,II型菊欧氏杆菌天冬酰胺酶由具有与SEQ ID NO:2至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列的核酸编码。

[0031] 在实施方式中,使用本发明的方法产生的II型天冬酰胺酶由与野生型菊欧氏杆菌天冬酰胺酶基因至少约70%同一的核酸序列编码。在实施方式中,天冬酰胺酶具有与野生型菊欧氏杆菌天冬酰胺酶至少约70%同一的氨基酸序列。在一些实施方式中,重组天冬酰胺酶具有与野生型菊欧氏杆菌天冬酰胺酶核酸序列至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。在一些实施方式中,重组天冬酰胺酶具有由核酸编码的氨基酸序列,所述核酸与野生型菊欧氏杆菌天冬酰胺酶核酸序列至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一。本文中作为百分比表示的“同一性”或“同源性”描述了在两个序列之间的相似性的量度。在一些实施方式中,使用本领域已知的计算机程序和数学算法确定两个序列之间的同一性程度。这样的计算百分比序列同一性(同源性)的算法通常考虑在比较区域上的序列缺口(gap)和错配。例如,BLAST(例如BLAST 2.0)搜索算法(参见例如Altschul等,J.Mol.Biol.215:403(1990),可通过NCBI公开获得)具有如下示例性搜索参数:Mismatch-2;缺口开放5;缺口延伸2。对于多肽序列比较,通常将BLASTP算法与评分矩阵(例如PAM100、PAM 250、BLOSUM 62或BLOSUM 50)结合使用。FASTA(例如FASTA2和FASTA3)和SSEARCH序列比较程序也用于量化同一性程度(Pearson等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444(1988);Pearson,Methods Mol Biol.132:185(2000);和Smith等,J.Mol.Biol.147:195(1981))。

[0032] 来自菊欧氏杆菌的重组II型天冬酰胺酶菊天冬酰胺酶也称为 **Erwinase®**和 **Erwinaze®**。源自大肠杆菌的重组天冬酰胺酶以名称

Colaspase®、**Elspar®**、**Kidrolase®**、**Leunase®**和**Spectrila®**而为人所知。

Pegaspargase®是聚乙二醇化版本的大肠杆菌天冬酰胺酶的名称。菊天冬酰胺酶是通过静脉内、肌内或皮下注射施用于患有急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病和非霍奇金淋巴瘤的患者。

[0033] 可以通过访问可获自各国药物批准机构的天冬酰胺酶产品的产品信息来确定商业批准用于患者的II型天冬酰胺酶产品。例如,产品信息和批准记录可在美国公开获得,例如Elspar(大肠杆菌L-天冬酰胺酰胺水解酶,EC-2型;BLA#101063)和**Erwinaze®**(天冬酰胺酶菊欧氏杆菌,BLA#125359)的可公开获自美国食品和药品管理局并通过引用并入本文(10903New Hampshire Avenue,Silver Spring,MD 20993和FDA网站在线)。欧洲的产品信息可从欧洲药品管理局获得(30Churchill Place,Canary Wharf,London E14 5EU,United Kingdom和EMA网站在线)(参见例如Oncaspar:EPAR产品信息,首次发布于2016年1月19日,与聚乙二醇化大肠杆菌L-天冬酰胺酶有关;Spectrila:EPAR产品信息,首次发布于2016年1月28日;和国家授权药品目录,2016年4月27日,欧洲药品管理局,各自通过引用并入本文)。

[0034] 在一些实施方式中,产生了菊天冬酰胺酶的修饰形式。通常,关于氨基酸序列,术语“修饰”包括单独或组合的置换、插入、延伸、缺失和衍生。在某些实施方式中,当施用于患者时,菊天冬酰胺酶的修饰形式具有增强的性质,例如增加的半衰期。在一些实施方式中,具有增加的半衰期的菊天冬酰胺酶的修饰形式是聚乙二醇化的。在一些实施方式中,菊天

冬酰胺酶可以包含“非必需”氨基酸残基的一个或多个修饰。在本文中,“非必需”氨基酸残基是可以在新氨基酸序列中被改变,例如缺失、置换或衍生,而不消除或实质性降低菊天冬酰胺酶(例如菊天冬酰胺酶类似物)的活性(例如酶活性)的残基。在一些实施方式中,菊天冬酰胺酶可以包含“必需”氨基酸残基的一个或多个修饰。在本文中,“必需”氨基酸残基是当在新氨基酸序列中被改变,例如缺失、置换或衍生时,参比菊天冬酰胺酶的活性被实质性降低或消除的残基。在这样的其中必需氨基酸残基被改变实施方式中,修饰的菊天冬酰胺酶可以具有在所提供的方法中感兴趣的菊天冬酰胺酶的活性。置换、插入和缺失可以是在蛋白质的N端或C端处,或可以在蛋白质的内部位置处。举例来说,蛋白质可以以连续方式或在肽分子各处间隔开,包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个置换。单独或与置换组合,肽可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个插入,再次地是以连续方式或在肽分子各处间隔开。单独或与置换和/或插入组合,肽也可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个缺失,再次地是以连续方式或在肽分子各处间隔开。单独或与置换、插入和/或缺失组合,肽还可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸添加。

[0035] 置换包括保守氨基酸置换。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有相似侧链或理化特性(例如静电、氢键、等排、疏水性特征)的氨基酸残基代替的氨基酸置换。氨基酸可以是天然存在的或非天然的。具有相似侧链的氨基酸残基的家族是本领域已知的。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)、 β -支链侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。置换也可以包括非保守变化。

[0036] 表达系统

[0037] 在某些情况下,本文的方法包括在假单胞菌属宿主细胞中从表达构建体表达重组菊天冬酰胺酶。在某些情况下,表达构建体是质粒。在一些实施方式中,编码菊天冬酰胺酶序列的质粒包含选择标记,并且维持该质粒的宿主细胞在选择性条件下生长。在一些实施方式中,质粒不包含选择标记。在一些实施方式中,表达构建体被整合到宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,表达构建体编码融合至将菊天冬酰胺酶导向周质的分泌信号的菊天冬酰胺酶。在一些实施方式中,分泌信号在宿主细胞中被切割。在一些实施方式中,表达构建体不编码分泌信号,而菊天冬酰胺酶被导向细胞质。

[0038] 用于在宿主菌株(包括假单胞菌属宿主菌株)中表达异源蛋白质的方法,所述异源蛋白质包括可用于本发明方法的调节序列(例如启动子、分泌前导体和核糖体结合位点),描述于例如美国专利7,618,799,“Bacterial leader sequences for increased expression”、美国专利7,985,564,“Expression systems with Sec-system secretion”,和美国专利9,394,571和9,580,719,标题均为“Method for Rapidly Screening Microbial Hosts to Identify Certain Strains with Improved Yield and/or Quality in the Expression of Heterologous Proteins”、美国专利9,453,251,“Expression of Mammalian Proteins in Pseudomonas fluorescens”、美国专利8,603,824,“Process for Improved Protein Expression by Strain Engineering”、和美国专利No.8,530,171,“High Level Expression of Recombinant Toxin Proteins”,各自通过

引用整体并入本文。在实施方式中,在本发明的上下文中使用的分泌前导体是如美国专利7,618,799、7,985,564、9,394,571、9,580,719、9,453,251、8,603,824和8,530,171中任一公开的分泌前导体。这些专利还描述了可用于实施本文方法的细菌宿主菌株,其已被工程化以过表达折叠调节体或已引入蛋白酶突变以增加异源蛋白表达。

[0039] 启动子

[0040] 根据本文方法使用的启动子可以是组成型启动子或调节型启动子。有用的调节型启动子的常见实例包括衍生自lac启动子(例如lacZ启动子)的家族的那些,特别是DeBoer的美国专利4,551,433所述的tac和trc启动子,以及Ptac16、Ptac17、PtacII、PlacUV5和T7lac启动子。在一个实施方式中,启动子不衍生自宿主细胞生物。在某些实施方式中,启动子衍生自大肠杆菌生物。

[0041] 诱导型启动子序列用于调节根据本文的方法的菊天冬酰胺酶的表达。在实施方式中,可用于本文方法的诱导型启动子包括衍生自lac启动子(例如lacZ)的家族的那些,特别是DeBoer的美国专利4,551,433所述的tac和trc启动子,以及Ptac16、Ptac17、PtacII、PlacUV5和T7lac启动子。在一个实施方式中,启动子不衍生自宿主细胞生物。在某些实施方式中,启动子衍生自大肠杆菌生物。在一些实施方式中,lac启动子用于调节从质粒表达菊天冬酰胺酶。在lac启动子衍生物或家族成员例如tac启动子的情况下,诱导剂是IPTG(异丙基- β -D-1-硫代半乳糖苷,也称为“异丙基硫代半乳糖苷”)。在某些实施方式中,将IPTG添加至培养物中以诱导在假单胞菌属宿主细胞中从lac启动子表达菊天冬酰胺酶。

[0042] 可用于根据本文方法的表达系统的非lac型启动子的常见实例包括例如表1中所列的那些。

[0043] 表1.非lac启动子的实例

[0044]	启动子	诱导剂
	P_R	高温
	P_L	高温
	P_m	烷基或卤代苯甲酸酯
	Pu	烷基或卤代甲苯
	Psal	水杨酸盐
	P_{BAD}	阿拉伯糖

[0045] 参见例如:J.Sanchez-Romero&V.De Lorenzo,1999,Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (A.Demain&J.Davies,eds.) pp.460-74 (ASM Press, Washington,D.C.);H.Schweizer,2001,Current Opinion in Biotechnology,12:439-445;R.Slater&R.Williams,2000,Molecular Biology and Biotechnology (J.Walker&R.Rapley,eds.) pp.125-54 (The Royal Society of Chemistry,Cambridge,UK),和L.-M.Guzman等,1995,J.Bacteriol.177(14):4121-4130,全部通过引用并入本文。具有对于所选择的细菌宿主细胞天然的启动子的核苷酸序列的启动子也可用于控制编码靶多肽的转基因的表达,例如假单胞菌属邻氨基苯甲酸酯或苯甲酸酯操纵子启动子(Pant、Pben)。也可以使用串联启动子,其中一个以上的启动子与另一个启动子共价地连接,无论序列相同或不同,例如Pant-Pben串联启动子(启动子间杂交体)或Plac-Plac串联启动子,或无论衍生自相同或不同的生物。

[0046] 调节型启动子利用启动子调节蛋白以控制该启动子是其一部分的基因的转录。在本文中调节型启动子的情况下,相应的启动子调节蛋白也将是根据本文方法的表达系统的一部分。启动子调节蛋白的实例包括:激活蛋白,例如大肠杆菌分解代谢物激活蛋白,MaIT蛋白;AraC家族转录激活因子;阻遏蛋白,例如大肠杆菌LacI蛋白;和双重功能调控蛋白,例如大肠杆菌NagC蛋白。许多调节型启动子/启动子调节蛋白对是本领域已知的。在一个实施方式中,用于靶蛋白和感兴趣的异源蛋白的表达构建体是在同一调节元件的控制下。

[0047] 启动子调节蛋白与效应子化合物,即与调节蛋白可逆或不可逆地相关联的化合物相互作用,以便使该蛋白能够释放或结合在该启动子的控制下的基因的至少一个DNA转录调节区域,从而允许或阻断转录酶在启动基因转录方面的作用。效应子化合物被分类为诱导物或协阻遏物,并且这些化合物包括天然效应子化合物和安慰诱导物(gratuitous inducer)化合物。许多调节型启动子/启动子调节蛋白/效应子化合物三重组合是本领域已知的。尽管在某些情况下,效应子化合物用于整个细胞培养或发酵,在一个其中使用调节型启动子的实施方式中,在期望量或密度的宿主细胞生物量的生长后,将合适的效应子化合物加入培养物中以直接地或间接地导致编码感兴趣的蛋白质或多肽的期望基因的表达。

[0048] 在其中使用lac家族启动子的实施方式中,lacI基因有时存在于系统中。lacI基因通常是组成性表达的基因,编码Lac阻遏蛋白LacI蛋白,其结合lac家族启动子的lac操纵子。因此,在使用lac家族启动子的情况下,lacI基因有时还包括在且表达在表达系统中。

[0049] 可用于假单胞菌属的启动子系统描述于文献例如美国专利申请公布号2008/0269070中,也在上文中提到。

[0050] 其他调节元件

[0051] 在实施方式中,可溶重组菊天冬酰胺酶在生产过程中存在于细胞的细胞质或周质中。可用于靶向蛋白(例如菊天冬酰胺酶)的分泌前导体描述于本文的其他地方和美国专利申请公布号2008/0193974、美国专利申请公布号2006/0008877和美国专利序列号12/610,207中,在上文中提到。在一些实施方式中,提供了表达构建体,其编码融合至分泌前导体的菊天冬酰胺酶,所述分泌前导体将菊天冬酰胺酶转运至假单胞菌或假单胞菌属细胞的周质。在一些实施方式中,分泌前导体被从菊天冬酰胺酶蛋白切掉。在一些实施方式中,分泌前导体促进可溶菊天冬酰胺酶的产生。

[0052] 在实施方式中,表达载体含有最佳核糖体结合序列。通过改变感兴趣的蛋白的翻译起始区来调节翻译强度,可用于改善异源细胞质蛋白的生产,所述异源细胞质蛋白由于太快的翻译速率而主要作为包涵体积累。还可以通过优化而不是最大化蛋白翻译水平使得翻译速率与蛋白质分泌速率同步,增强异源蛋白向细菌细胞的周质空间的分泌。

[0053] 翻译起始区已被定义为在核糖体结合位点(RBS)的上游立即延伸到起始密码子的下游约20个核苷酸的序列(McCarthy等(1990)Trends in Genetics 6:78-85,通过引用整体并入本文)。在原核生物中,通过提供使用Shine和Dalgarno(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71:1342-1346,1974)描述的规范的或共有的RBS序列(AGGAGG;SEQ ID NO:50)提供相对于翻译水平降低的翻译速率,可以利用替代性RBS序列以优化异源蛋白的翻译水平。“翻译速率”或“翻译效率”是指mRNA在细胞内翻译成蛋白质的速率。在大多数原核生物中,Shine-Dalgarno序列通过与16S核糖体RNA的富嘧啶区域相互作用而协助30S核糖体组分相对于

mRNA上的起始密码子的结合和定位。RBS (在本文中也称为Shine-Dalgarno序列) 位于转录的起点的下游和翻译的起点的上游的mRNA上, 通常在起始密码子上游4至14个核苷酸, 更通常在起始密码子上游8至10个核苷酸。由于RBS序列在翻译中的作用, 在翻译效率和RBS序列的效率(或强度)之间存在直接关系。

[0054] 在一些实施方式中, RBS序列的修饰导致异源蛋白翻译速率降低。这种翻译速率降低可对应于每克所产生的蛋白或每克宿主蛋白的适当加工的蛋白或多肽的水平的提高。降低的翻译速率还可以与每克重组或每克宿主蛋白产生的可回收蛋白或多肽的水平的提高的水平相关。降低的翻译速率还可以对应于增加的表达、增加的活性、增加的溶解度或增加的异位(例如向周质区室或分泌到细胞外空间)的任何组合。在该实施方式中, 术语“增加”是相对于当在相同条件下或基本上相同条件下表达感兴趣的蛋白或多肽时产生的、适当加工的、可溶的和/或可回收的蛋白质或多肽的水平, 并且其中编码多肽的核苷酸序列包含规范RBS序列。类似地, 术语“降低”是相对于感兴趣的蛋白或多肽的翻译速率, 其中编码蛋白或多肽的基因包含规范RBS序列。翻译速率可以降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、至少约75%或更高, 或至少约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍或更高。

[0055] 在一些实施方式中, 本文所述的RBS序列变体可以分为导致高、中、或低翻译效率。在一个实施方式中, 根据与规范RBS序列的翻译活性相比的翻译活性的水平对序列进行分等。高RBS序列具有约60%至约100%的规范序列的活性。中RBS序列具有约40%至约60%的规范序列的活性。低RBS序列具有小于40%的规范序列的活性。

[0056] RBS序列的实例在表2中显示。使用COP-GFP作为报告基因筛选序列的翻译强度, 并根据共有RBS荧光的百分比进行分等。每个RBS变体被置于以下三个一般性荧光等级之一: 高(“Hi”-100%的共有RBS荧光)、中(“Med”-46-51%的共识RBS荧光)、和低(“Lo”-16-29%的共有RBS荧光)。

表 2. RBS 序列			
RBS	序列	结合强度	SEQ ID NO:
共有	AGGAGG	高	50
RBS2	GGAGCG	中	51
RBS34	GGAGCG	中	52
RBS41	AGGAGT	中	53
RBS43	GGAGTG	中	54
RBS48	GAGTAA	低	55
RBS1	AGAGAG	低	56
RBS35	AAGGCA	低	57
RBS49	CCGAAC	低	58

[0058] 除蛋白编码序列外, 可用于实施本文方法的表达构建体包括与其可操作地连接的以下调节元件: 启动子、核糖体结合位点(RBS)、转录终止子、以及翻译起始和终止信号。有

用的RBS是获自可用作根据例如美国专利申请公布号2008/0269070和美国专利申请序列号12/610,207的表达系统中的宿主细胞的任何物种。许多特定的和各种各样的共有RBS是已知的,例如由以下描述和提到的那些:D.Frushman等, *Gene* 234 (2):257-65 (1999年7月8日);和B.E.Suzek等, *Bioinformatics* 17 (12):1123-30 (2001年12月)。此外,可以使用天然或合成的RBS,例如描述于EP 0207459 (合成RBS);O.Ikehata等, *Eur. J. Biochem.* 181 (3):563-70 (1989)的那些。方法、载体、以及翻译和转录元件、以及可用于本文方法的其他元件的另外的实例描述于例如Gilroy的美国专利号5,055,294和Gilroy等的美国专利号5,128,130;Rammler等的美国专利号5,281,532;Barnes等的美国专利号4,695,455和4,861,595;Gray等的美国专利号4,755,465;和Wilcox的美国专利号5,169,760。

[0059] 宿主菌株

[0060] 细菌宿主(包括假单胞菌)和密切相关的细菌生物体被预期用于实施本文的方法。在某些实施方式中,假单胞菌宿主细胞是荧光假单胞菌。在某些情况下,宿主细胞是大肠杆菌细胞。

[0061] 使用本领域已知的和文献中(例如美国专利申请公布号2009/0325230, "Protein Expression Systems", 通过引用整体并入本文)描述的试剂和方法鉴定或制备可用于实施本文方法的宿主细胞和构建体。该公布描述了通过将核酸构建体引入包含染色体lacI基因插入物的营养缺陷型荧光假单胞菌宿主细胞中来生产重组多肽。核酸构建体包含可操作地连接至能够指导核酸在宿主细胞中表达的启动子的编码重组多肽的核酸序列,还包含编码营养缺陷型选择标记的核苷酸序列。营养缺陷型选择标记是将原养型(protothrophy)恢复到营养缺陷型宿主细胞的多肽。在实施方式中,细胞对于脯氨酸、尿嘧啶或其组合是营养缺陷型的。在实施方式中,宿主细胞衍生自MB101(ATCC保藏号PTA-7841)。美国专利申请公布号2009/0325230, "Protein Expression Systems", 和Schneider等, 2005, "Auxotrophic markers pyrF and proC, in some cases, replace antibiotic markers on protein production plasmids in high-cell-density *Pseudomonas fluorescens* fermentation," *Biotechnol. Progress* 21 (2):343-8 (均通过引用整体并入本文), 描述了通过使菌株MB101中的pyrF基因缺失而构建的对于尿嘧啶为营养缺陷型的宿主菌株。从菌株MB214(ATCC保藏号PTA-7840)克隆pyrF基因以产生与pyrF缺失互补的质粒以恢复原养型。在特定的实施方式中,使用荧光假单胞菌宿主细胞中的双重pyrF-proC双重营养缺陷型选择标记系统。如所述的pyrF缺失生产宿主菌株通常用于引入其他期望基因组变化的背景,其包括本文所述的可用于实施本文方法的那些。

[0062] 在实施方式中,可用于本发明的方法的宿主细胞缺乏至少一种蛋白酶的表达,过表达至少一种折叠调节体,或两者。在实施方式中,宿主细胞不缺乏蛋白酶的表达并且不过表达折叠调节体,因此就蛋白酶和折叠调节体表达而言是野生型。在任何这些实施方式中,宿主细胞还缺乏天然L-天冬酰胺酶。在实施方式中,天然L-天冬酰胺酶的缺乏是通过使用本领域已知的任何合适的方法进行缺失或以其他方式使天然L-天冬酰胺酶基因失活而产生。在实施方式中,宿主细胞缺乏天然I型L-天冬酰胺酶、天然II型L-天冬酰胺酶或两者。在实施方式中,就蛋白酶和折叠调节体表达而言,宿主细胞是野生型,并且缺乏天然I型L-天冬酰胺酶和天然II型L-天冬酰胺酶。例如,可用于本发明的方法的宿主细胞可以由本领域技术人员使用已知方法从MB101产生。在实施方式中,宿主细胞是通过在MB101中进行缺失

或以其他方式使天然I型L-天冬酰胺酶基因、天然II型L-天冬酰胺酶基因或两者失活来产生。

[0063] 本领域技术人员将理解,可用于本发明方法的生产宿主菌株可以使用本领域已知的和文献中描述的许多合适方法中的任一种,例如通过使pyrF基因,和/或天然I型L-天冬酰胺酶基因,和/或天然II型L-天冬酰胺酶基因失活,使用可公开获得的宿主细胞如荧光假单胞菌MB101来产生。还应理解,可以使用本领域已知的和文献中描述的许多合适方法中的任一种,将原养型恢复质粒转化到菌株中,例如,携带来自菌株MB214的pyrF基因的质粒。另外,在这样的菌株中,可以使用本领域众所周知的方法,使蛋白酶失活,并引入折叠调节体过表达构建体。

[0064] 在实施方式中,宿主细胞属于假单胞菌目。在宿主细胞属于假单胞菌目的情况下,它可以是假单胞菌科的成员,其包括假单胞菌属。 γ 变形菌门宿主包括大肠杆菌种的成员和荧光假单胞菌种的成员。属于假单胞菌目、假单胞菌科、或假单胞菌属的宿主细胞可由本领域技术人员鉴定并在文献中描述(例如Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria(在线公开,2015))。

[0065] 其他假单胞菌生物也可以是有用的。假单胞菌和密切相关的物种包括革兰氏阴性变形菌门亚组1,其包括属于Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria(在线公开,2015)中所述的科和/或属的变形菌门的组。表3列出了这些生物的科和属。

表 3. 在“Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci” (Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (在线公开, 2015))部分列出的科和属

[0066]

科 I. 假单胞菌科 (Pseudomonaceae)	葡糖杆菌属 (Gluconobacter) 假单胞菌属 (Pseudomonas) 黄单胞菌属 (Xanthomonas) 动胶菌属 (Zoogloea)
科 II. 固氮菌科 (Azotobacteraceae)	氮单胞菌属 (Azomonas) 固氮菌属 (Azotobacter) 拜叶林克氏菌属 (Beijerinckia) 德克斯氏菌属 (Derrxia)
科 III. 根瘤菌科 (Rhizobiaceae)	农杆菌属 (Agrobacterium) 根瘤菌属 (Rhizobium)
科 IV. 甲基单胞菌科 (Methylomonadaceae)	甲基球菌属 (Methylococcus) 甲基单胞菌属 (Methylomonas)
科 V. 盐杆菌科 (Halobacteriaceae)	盐杆菌属 (Halobacterium) 盐球菌属 (Halococcus)
其他属	醋酸杆菌属 (Acetobacter) 产碱杆菌属 (Alcaligenes) 博德特菌属 (Bordetella) 布鲁氏菌属 (Brucella) 弗朗西斯氏菌属 (Francisella) 栖热菌属 (Thermus)

[0067] 假单胞菌属和密切相关的细菌通常是被定义为“革兰氏(-)变形菌门亚组1”或“革兰氏阴性有氧杆菌和球菌”(Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria(在线公开,2015))的组的一部分。假单胞菌属宿主细胞在文献中描述,例如美国专利申请公布号2006/0040352,在上文中引用。

[0068] “革兰氏阴性变形菌门亚组1”还包括根据分类中使用的标准将分类在该标题中的变形菌门。该标题还包括先前分类在本节中但不再分类在本节中的组,例如Acidovorax、Brevundimonas、Burkholderia、Hydrogenophaga、Oceanimonas、Ralstonia和Stenotrophomonas属;Sphingomonas属(和Blastomonas属,从其衍生),其是通过将属于(且以前称为其的种)Xanthomonas属的生物重新编组而建立;Acidomonas属,其是通过将属于如Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria(在线公开,2015)定义中的Acetobacter属的生物重新编组而建立。另外,宿主包括来自Pseudomonas属、Pseudomonas enalia(ATCC 14393)、Pseudomonas nigrifaciens(ATCC 19375)、和Pseudomonas putrefaciens(ATCC 8071)的细胞,其已分别重新分类为Alteromonas haloplanktis、Alteromonas nigrifaciens、和Alteromonas putrefaciens。类似地,例如,Pseudomonas acidovorans(ATCC 15668)和Pseudomonas testosteroni(ATCC 11996)已分

别重新分类为 *Comamonas acidovorans* 和 *Comamonas testosteroni*; 以及 *Pseudomonas nigrifaciens* (ATCC 19375) 和 *Pseudomonas piscicida* (ATCC 15057) 已分别重新分类为 *Pseudoalteromonas nigrifaciens* 和 *Pseudoalteromonas piscicida*。”革兰氏阴性变形菌门亚组1”还包括分类为属于任何以下科的变形菌:假单胞菌科、固氮菌科(现在经常被称为同义词:假单胞菌科的固氮菌组)、根瘤菌科、和甲基单胞菌科(现在经常被称为同义词:“甲基球菌科(*Methylococcaceae*)”)。因此,除了本文另外描述的那些属之外,属于“革兰氏阴性变形菌门亚组1”的另外的变形菌属包括:1)嗜氮菌属的固氮菌组细菌;2) *Cellvibrio*、*Oligella* 和 *Teredinibacter* 属的假单胞菌科细菌;3) *Chelatobacter*、*Ensifer*、*Liberibacter* (也称为“*Candidatus Liberibacter*”) 和 *Sinorhizobium* 属的根瘤菌科细菌;和4) 甲基细菌属 (*Methylobacter*)、甲基暖菌属 (*Methylocaldum*)、甲基微菌属 (*Methylomicrobium*)、甲基八叠球菌属 (*Methylosarcina*) 和甲基球形菌属 (*Methylosphaera*) 的甲基球菌科细菌。

[0069] 在某些情况下,宿主细胞选自“革兰氏阴性变形菌门亚组16”。“革兰氏阴性变形菌门亚组16”定义为以下假单胞菌属物种的变形菌的组(具有括号中显示的示例性菌株的 ATCC 或其他保藏号): *Pseudomonas abietaniphila* (ATCC 700689); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145); *Pseudomonas alcaligenes* (ATCC 14909); *Pseudomonas anguilliseptica* (ATCC 33660); *Pseudomonas citronellolis* (ATCC 13674); *Pseudomonas flavescens* (ATCC 51555); *Pseudomonas mendocina* (ATCC 25411); *Pseudomonas nitroreducens* (ATCC 33634); *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 8062); *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (ATCC 17440); *Pseudomonas resinovorans* (ATCC 14235); *Pseudomonas straminea* (ATCC 33636); *Pseudomonas agarici* (ATCC 25941); *Pseudomonas alcaliphila*; *Pseudomonas alginovora*; *Pseudomonas andersonii*; *Pseudomonas asplenii* (ATCC 23835); *Pseudomonas azelaica* (ATCC 27162); *Pseudomonas beyerinckii* (ATCC 19372); *Pseudomonas borealis*; *Pseudomonas boreopolis* (ATCC 33662); *Pseudomonas brassicacearum*; *Pseudomonas butanovora* (ATCC 43655); *Pseudomonas cellulosa* (ATCC 55703); *Pseudomonas aurantiaca* (ATCC 33663); *Pseudomonas chlororaphis* (ATCC 9446, ATCC 13985, ATCC 17418, ATCC 17461); *Pseudomonas fragi* (ATCC 4973); *Pseudomonas lundensis* (ATCC 49968); *Pseudomonas taetrolens* (ATCC 4683); *Pseudomonas cissicola* (ATCC 33616); *Pseudomonas coronafaciens*; *Pseudomonas diterpeniphila*; *Pseudomonas elongata* (ATCC 10144); *Pseudomonas flectens* (ATCC 12775); *Pseudomonas azotoformans*; *Pseudomonas brenneri*; *Pseudomonas cedrella*; *Pseudomonas corrugata* (ATCC 29736); *Pseudomonas extremorientalis*; *Pseudomonas fluorescens* (荧光假单胞菌) (ATCC 35858); *Pseudomonas gessardii*; *Pseudomonas libanensis*; *Pseudomonas mandelii* (ATCC 700871); *Pseudomonas marginalis* (ATCC 10844); *Pseudomonas migulae*; *Pseudomonas mucidolens* (ATCC 4685); *Pseudomonas orientalis*; *Pseudomonas rhodesiae*; *Pseudomonas synxantha* (ATCC 9890); *Pseudomonas tolaasii* (ATCC 33618); *Pseudomonas veronii* (ATCC 700474); *Pseudomonas frederiksbergensis*; *Pseudomonas geniculata* (ATCC 19374); *Pseudomonas gingeri*; *Pseudomonas graminis*; *Pseudomonas grimontii*; *Pseudomonas halodenitrificans*;

Pseudomonas halophila; *Pseudomonas hibiscicola* (ATCC 19867); *Pseudomonas huttiensis* (ATCC 14670); *Pseudomonas hydrogenovora*; *Pseudomonas jessenii* (ATCC 700870); *Pseudomonas kilonensis*; *Pseudomonas lanceolata* (ATCC 14669); *Pseudomonas lini*; *Pseudomonas marginata* (ATCC 25417); *Pseudomonas mephitica* (ATCC 33665); *Pseudomonas denitrificans* (ATCC 19244); *Pseudomonas pertucinogena* (ATCC 190); *Pseudomonas pictorum* (ATCC 23328); *Pseudomonas psychrophila*; *Pseudomonas filva* (ATCC 31418); *Pseudomonas monteilii* (ATCC 700476); *Pseudomonas mosselii*; *Pseudomonas oryzihabitans* (ATCC 43272); *Pseudomonas plecoglossicida* (ATCC 700383); *Pseudomonas putida* (ATCC 12633); *Pseudomonas reactans*; *Pseudomonas spinosa* (ATCC 14606); *Pseudomonas balearica*; *Pseudomonas luteola* (ATCC 43273); *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 17588); *Pseudomonas amygdali* (ATCC 33614); *Pseudomonas avellanae* (ATCC 700331); *Pseudomonas caricapapayae* (ATCC 33615); *Pseudomonas cichorii* (ATCC 10857); *Pseudomonas ficuserectae* (ATCC 35104); *Pseudomonas fuscovaginae*; *Pseudomonas meliae* (ATCC 33050); *Pseudomonas syringae* (ATCC 19310); *Pseudomonas viridiflava* (ATCC 13223); *Pseudomonas thermocarboxydovorans* (ATCC 35961); *Pseudomonas thermotolerans*; *Pseudomonas thivervalensis*; *Pseudomonas vancouverensis* (ATCC 700688); *Pseudomonas wisconsinensis*; 和 *Pseudomonas xiamenensis*。在一个实施方式中,用于菊天冬酰胺酶的表达的宿主细胞是荧光假单胞菌。

[0070] 在某些情况下,宿主细胞选自“革兰氏阴性变形菌门亚组17”。“革兰氏阴性变形菌门亚组17”定义为本领域中称为“荧光假单胞菌”的变形菌门的组,其包括属于例如以下假单胞菌种的那些:*Pseudomonas azotoformans*; *Pseudomonas brenneri*; *Pseudomonas cedrella*; *Pseudomonas cedrina*; *Pseudomonas corrugata*; *Pseudomonas extremorientalis*; *Pseudomonas fluorescens* (荧光假单胞菌); *Pseudomonas gessardii*; *Pseudomonas libanensis*; *Pseudomonas mandelii*; *Pseudomonas marginalis*; *Pseudomonas migulae*; *Pseudomonas mucidolens*; *Pseudomonas orientalis*; *Pseudomonas rhodesiae*; *Pseudomonas synxantha*; *Pseudomonas tolaasii*; 和 *Pseudomonas veronii*。

[0071] 蛋白酶

[0072] 在一个实施方式中,本文提供的方法包括使用假单胞菌属宿主细胞,其包含在一个或多个蛋白酶基因中的一个或多个突变(例如部分或完全缺失)以产生重组菊天冬酰胺酶蛋白。在一些实施方式中,蛋白酶基因中的突变促进重组菊天冬酰胺酶蛋白的产生。

[0073] 示例性靶蛋白酶基因包括归类为氨肽酶;二肽酶;二肽基肽酶和三肽基肽酶;肽基二肽酶;丝氨酸型羧肽酶;金属羧肽酶;半胱氨酸型羧肽酶; Ω 肽酶;丝氨酸蛋白酶;半胱氨酸蛋白酶;天冬氨酸蛋白酶;金属蛋白酶;或未知机制的蛋白酶的那些蛋白酶。

[0074] 氨肽酶包括胞质溶胶氨肽酶(亮氨酰氨肽酶)、膜丙氨酰氨肽酶、胱氨酰氨肽酶、三肽氨肽酶、脯氨酰氨肽酶、精氨酰氨肽酶、谷氨酰氨肽酶、x-pro氨肽酶、细菌性亮氨酰氨肽酶、嗜热氨肽酶、梭菌氨肽酶、胞质溶胶丙氨酰氨肽酶、赖氨酰氨肽酶、x-trp氨肽酶、色氨酰氨肽酶、甲硫氨酰氨基酸、d-立体特异性氨肽酶、氨肽酶ey。二肽酶包括包括x-his二肽酶、x-arg二肽酶、x-甲基his二肽酶、cys-gly二肽酶、glu-glu二肽酶、pro-x二肽酶、x-pro二肽

酶、met-x二肽酶、非立体特异性二肽酶、胞质溶胶非特异性二肽酶、膜二肽酶、 β -ala-his二肽酶。二肽基肽酶和三肽基肽酶包括二肽基肽酶i、二肽基肽酶ii、二肽基肽酶iii、二肽基肽酶iv、二肽基二肽酶、三肽基肽酶I、三肽基肽酶II。肽基二肽酶包括肽基二肽酶a和肽基二肽酶b。丝氨酸型羧肽酶包括溶酶体pro-x羧肽酶、丝氨酸型D-ala-D-ala羧肽酶、羧肽酶C、羧肽酶D。金属羧肽酶包括羧肽酶a、羧肽酶B、赖氨酸(精氨酸)羧肽酶、gly-X羧肽酶、丙氨酸羧肽酶、胞壁酰五肽羧肽酶、羧肽酶h、谷氨酸羧肽酶、羧肽酶M、胞壁酰四肽羧肽酶、锌d-ala-d-ala羧肽酶、羧肽酶A2、膜pro-x羧肽酶、微管蛋白基-tyr羧肽酶、羧肽酶t。 Ω 肽酶包括酰基氨基酰基肽酶、肽基甘胺酰胺酶、焦谷氨酰肽酶I、 β -天冬氨酰肽酶、焦谷氨酰肽酶II、正甲酰基甲硫氨酰肽酶、蝶酰基聚-[γ]-谷氨酸羧肽酶、 γ -glu-X羧肽酶、酰基胞壁酰-ala肽酶。丝氨酸蛋白酶包括胰凝乳蛋白酶、胰凝乳蛋白酶C、metridin、胰蛋白酶、凝血酶、凝血因子Xa、纤溶酶、肠肽酶、顶体酶、 α 分解蛋白酶、谷氨酰、内肽酶、组织蛋白酶G、凝血因子VIIa、凝血因子IXa、cucumisi、脯氨酰寡肽酶、凝血因子XIa、速尿素、血浆激肽释放酶、组织激肽释放酶、胰弹性蛋白酶、白细胞弹性蛋白酶、凝血因子XIIa、糜酶、补体成分c1r55、补体成分c1s55、经典补体途径c3/c5转化酶、补体因子I、补体因子D、替代补体途径c3/c5转化酶、干酵母菌、次蛋白C、赖氨酰内肽酶、内肽酶1a、gamma-teni、毒蛋白单抗、亮氨酰内肽酶、类胰蛋白酶、鞘氨醇、kexin、枯草杆菌蛋白酶、oryzin、内肽酶k、嗜热霉素、热酶、内肽酶S0、T-纤溶酶原激活剂、蛋白C、胰内肽酶E、胰弹性蛋白酶ii、IGA特异性丝氨酸内肽酶、U-纤溶酶原、激活剂、毒蛋白A、弗林蛋白酶、成髓细胞素、精原酶、颗粒酶A或细胞毒性T淋巴细胞蛋白酶1、颗粒酶B或细胞毒性T淋巴细胞蛋白酶2、链球菌素A、链霉素B、谷氨酰内肽酶II、寡肽酶B、鲨凝血因子c、鲨凝血因子、显著抑制鲨凝集酶、omptin、阻遏物lexa、细菌前导肽酶I、togavirin、黄素蛋白。半胱氨酸蛋白酶包括组织蛋白酶B、木瓜蛋白酶、丝蛋白、乳糜蛋白酶、asclepain、梭菌肽、链菌素、铜系元素、组织蛋白酶1、组织蛋白酶H、钙蛋白酶、组织蛋白酶t、甘氨酰、内肽酶、癌促凝剂、组织蛋白酶S、picornain 3C、picornain2A、caricain、ananain、凤梨茎酶、果菠萝蛋白酶、legumain、组织溶菌素、白介素1- β 转化酶。天冬氨酸蛋白酶包括胃蛋白酶A、胃蛋白酶B、胃蛋白酶、凝乳酶、组织蛋白酶D、neopenthesin、肾素、胃蛋白酶、阿魏黑素皮质素原转化酶、曲霉菌素I、曲霉菌素II、青霉素、根霉胃蛋白酶、内毒素、粘膜蛋白酶、念珠菌素、糖蛋白酶、红酵母胃蛋白酶、藻磷脂、土霉素、多菌素、比索氏蛋白酶、鞘脂素a、鞘脂素b、黄单胞菌胃蛋白酶、组织蛋白酶e、barrierpepsin、细菌前导肽酶I、假单胞菌胃蛋白酶、纤溶酶。金属蛋白酶包括大响尾蛇金属内肽酶a、微生物胶原酶、白细胞溶素、间质胶原酶、肾胰岛素残基溶酶、envelysin、iga特异性金属内肽酶、前胶原N-内肽酶、硫柳糖寡肽酶、神经溶素、溶基质素1、甲基多巴A、前胶原C-内肽酶、肽基赖氨酸金属内肽酶、虾红素、溶基质素2、基质溶素明胶酶、气溶素、pseudolysin、嗜热菌素、溶杆菌素、金属蛋白酶、球菌溶素、溶菌酶、 β -裂解性金属内肽酶、肽基asp金属内肽酶、中性粒细胞胶原酶、明胶酶B、利什曼原酶、糖溶素、自溶素、氘溶素、溶血素、溶血素B、溶血素C、atroxase、溶血素E、溶血素F、adamalysin、激素溶素、红细胞溶素、bothropasin、溶脂素、ophiolysin、甘油溶素I、甘油溶素II、黏溶素、脂溶素、胰岛素、O-唾液糖蛋白内肽酶、罗素溶素、线粒体、中间、肽酶、dactylisin、纳迪溶素、magnolysin、甲蛋白B、线粒体加工肽酶、巨噬细胞弹性蛋白酶、绒毛膜溶素、毒素。未知机制的蛋白酶包括热蛋白酶(thermopsin)和多催化内肽酶复合物。

[0075] 某些蛋白酶具有蛋白酶和伴侣(chaperone)样活性两者。当这些蛋白酶对蛋白质的产率和/或质量产生负面影响时,使其蛋白酶活性特异性缺失经常是有用的,并且当它们的伴侣活性可对蛋白质的产率和/或质量产生积极影响时,它们被过表达。这些蛋白酶包括但不限于:Hsp100(Clp/Hsl)家族成员RXF04587.1(c1pA)、RXF08347.1、RXF04654.2(c1pX)、RXF04663.1、RXF01957.2(hs1U)、RXF01961.2(hs1V);肽基脯氨酰顺反异构酶家族成员RXF05345.2(ppiB);金属肽酶M20家族成员RXF04892.1(氨基水解酶);金属肽酶M24家族成员RXF04693.1(蛋氨酸氨肽酶)和RXF03364.1(蛋氨酸氨肽酶);和丝氨酸肽酶S26信号肽酶I家族成员RXF01181.1(信号肽)。

[0076] 在实施方式中,在本发明的方法中可用于表达菊天冬酰胺酶的宿主菌株是假单胞菌属宿主菌株,例如荧光假单胞菌,其具有蛋白酶缺乏或失活(由于例如缺失、部分缺失或敲除导致)和/或过表达折叠调节体,例如从质粒或细菌染色体过表达。在实施方式中,宿主细胞缺乏选自Lon、HslUV、DegP1、DegP2、Prc、AprA、DegP2S219A、Prc1和AprA的至少一种蛋白酶。在实施方式中,宿主菌株过表达选自LepB、Tig和DsbAC-Skp(即,DsbA、DsbC和Skp的组合;Skp是OmpH RXF4702.1,如本文的SEQ ID NO:59所示,编码序列的实例如SEQ ID NO:60所示)的折叠调节体。在DsbAC-Skp过表达宿主中,折叠调节体DsbA、DsbC和Skp(分别是美国专利号9,394,571的SEQ ID NO:25和26,和本文的SEQ ID NO:60)可以从操纵子表达。在实施方式中,宿主菌株缺乏选自Lon、HslUV、DegP1、DegP2、Prc、AprA、DegP2S219A、Prc1和AprA的至少一种蛋白酶,并且过表达选自LepB、Tig和DsbAC-Skp的折叠调节体。在任一上述实施方式中,宿主菌株表达营养缺陷型标记pyrF和proC,并且具有蛋白酶缺乏和/或过表达折叠调节体。在实施方式中,宿主菌株表达本领域已知的任何其他合适的选择标记。在任一上述实施方式中,天冬酰胺酶例如天然I型和/或II型天冬酰胺酶在宿主菌株中被失活。在实施方式中,宿主菌株是假单胞菌目宿主细胞,其:缺乏Lon和HslU/V;缺乏Lon、DegP1、DegP2、Prc和AprA;缺乏Lon、DegP1、DegP2S219A、Prc1和AprA,并且过表达DsbAC-Skp;缺乏AspG1和/或AspG2;缺乏AspG1和/或AspG2,并且过表达Tig;缺乏AspG1和/或AspG2,并且过表达LepB;缺乏AspG1和/或AspG2,并且缺乏Lon和HslU/V;或缺乏AspG1和/或AspG2,并且缺乏Lon、DegP1、DegP2、Prc和AprA的宿主细胞;或缺乏AspG1和/或AspG2、Lon、DegP1、DegP2、Prc1和AprA,并且过表达DsbAC-Skp的宿主细胞。

[0077] 这些和其他蛋白酶和折叠调节体是本领域已知的并且描述在文献中,例如美国专利号8,603,824。例如,该专利的表D描述了Tig(tig、触发因子、FKBP型ppiase(ec 5.2.1.8)RXF04655、UniProtKB-P0A850(TIG_ECOLI))。WO 2008/134461和美国专利号9,394,571,名为“Method for Rapidly Screening Microbial Hosts to Identify Certain Strains with Improved Yield and/or Quality in the Expression of Heterologous Proteins”并通过引用整体并入本文,描述了Tig(RXF04655.2,其中的SEQ ID NO:34)、LepB(RXF01181.1,其中的SEQ ID NO:56)、DegP1(RXF01250,其中的SEQ ID NO:57)、AprA(RXF04304.1,其中的SEQ ID NO:86)、Prc1(RXF06586.1,其中的SEQ ID NO:120)、DegP2(RXF07210.1,其中的SEQ ID NO:124)、Lon(RXF04653,其中的SEQ ID NO:92);DsbA(RXF01002.1,其中的SEQ ID NO:25),和DsbC(RXF03307.1,其中的SEQ ID NO:26)。这些序列以及用于其他蛋白酶和折叠调节体的那些也在美国专利号9,580,719中示出(其中第93-98列中的SEQ ID NO的表)。例如,美国专利号9,580,719提供了分别编码HslU(RXF01957.2)

和Hs1V (RXF01961.2) 为SEQ ID NO:18和19的序列。

[0078] 密码子优化

[0079] 在一个实施方式中,本文的方法包括在感兴趣的菌株中从已优化密码子使用的构建体表达重组菊天冬酰胺酶。在实施方式中,菌株是假单胞菌属宿主细胞,例如荧光假单胞菌。用于优化密码子以改善在细菌宿主中的表达的方法是本领域已知的并且在文献中描述。例如,用于在假单胞菌属宿主细胞中的表达的密码子优化描述于例如美国专利申请公布号2007/0292918,“Codon Optimization Method”,其通过引用整体并入本文。

[0080] 在异源表达系统中,优化步骤可以改善宿主生产外源蛋白质的能力。蛋白质表达受多种因素控制,包括影响转录、mRNA加工以及翻译的稳定性和起始的那些。多核苷酸优化步骤可以包括改善宿主产生外源蛋白质的能力的步骤,以及协助研究人员有效地设计表达构建体的步骤。优化策略可以包括例如翻译起始区的修饰、mRNA结构元件的改变以及不同密码子偏好的使用。优化核酸序列以改善异源蛋白在细菌宿主中的表达的方法是本领域已知的并且在文献中描述。例如,用于在假单胞菌属宿主细胞中的表达的密码子优化描述于例如美国专利申请公布号2007/0292918,“Codon Optimization Method”,其通过引用整体并入本文。

[0081] 优化解决了异源基因的许多序列特征中的任一个。作为一个具体实例,罕见的密码子诱导的翻译暂停经常导致降低的异源蛋白表达。罕见的密码子诱导的翻译暂停包括在宿主生物中很少使用的密码子在感兴趣的多核苷酸中的存在可以由于它们在可用tRNA池中的稀缺性而对蛋白质翻译产生负面影响。一种改善宿主生物中的最佳翻译的方法包括进行密码子优化,这有时导致罕见宿主密码子被从合成多核苷酸序列中去除。

[0082] 替代性翻译起始有时也导致降低的异源蛋白表达。替代性翻译起始包括无意地含有能够作为核糖体结合位点(RBS)起作用的基序的合成多核苷酸序列。在某些情况下,这些位点导致从基因内部位点开始截短蛋白的翻译。一种减少产生在纯化过程中经常难以去除的截短蛋白的可能性的方法包括从优化的多核苷酸序列中消除推定的内部RBS序列。

[0083] 重复序列诱导的聚合酶滑移(slippage)经常导致降低的异源蛋白表达。重复序列诱导的聚合酶滑移涉及核苷酸序列重复序列,其已显示导致DNA聚合酶的滑移或口吃(stuttering),其有时导致移码突变。这样的重复序列也经常引起RNA聚合酶的滑移。在具有高G+C含量偏移的生物中,有时有更高程度的G或C核苷酸重复序列组成的重复序列。因此,一种减少诱导RNA聚合酶滑移的可能性的方法包括改变G或C核苷酸的延伸重复序列。

[0084] 干扰二级结构有时也导致降低的异源蛋白表达。二级结构经常使RBS序列或起始密码子隔绝,并且已经与蛋白质表达的降低相关。茎环结构也经常涉及翻译暂停和减弱。优化的多核苷酸序列通常含有在核苷酸序列的RBS和基因编码区中的最小二级结构以允许改善的转录和翻译。

[0085] 有时影响异源蛋白表达的另一个特征是限制性位点的存在。通过去除可以干扰转录单位随后亚克隆到宿主表达载体中的限制性位点来优化多核苷酸序列。

[0086] 例如,优化过程经常开始于确定有待由宿主异源表达的期望氨基酸序列。从该氨基酸序列设计候选多核苷酸或DNA。在合成DNA序列的设计过程中,密码子使用的频率经常与宿主表达生物的密码子使用相比较,并从合成序列中去除罕见的宿主密码子。另外,有时对合成候选DNA序列进行修饰以去除不期望的酶限制性位点并添加或去除任何期望的信号

序列、接头或非翻译区。经常分析合成DNA序列中可干扰翻译过程的二级结构存在,例如G/C重复序列和茎环结构。在合成候选DNA序列之前,经常检查优化的序列设计以验证序列正确地编码了期望的氨基酸序列。最后,使用DNA合成技术例如本领域已知的那些合成候选DNA序列。

[0087] 在本文的另一个实施方式中,经常利用宿主生物例如荧光假单胞菌中的通用密码子使用以优化异源多核苷酸序列的表达。评价在宿主表达系统中很少被认为是对于特定氨基酸优选的密码子的百分比和分布。5%和10%使用率的值通常用作确定罕见密码子的临界值。例如,表4中所列的密码子在荧光假单胞菌MB214基因组中具有小于5%的计算出现率,并且通常在荧光假单胞菌宿主中表达的优化基因中避免。

表 4. 在荧光假单胞菌 MB214 中以少于 5%出现的密码子

	氨基酸	所用的密码子	出现率%
[0088]	G Gly	GGA	3.26
	I Ile	ATA	3.05
	L Leu	CTA	1.78
		CTT	4.57
		TTA	1.89
	R Arg	AGA	1.39
		AGG	2.72
		CGA	4.99
	S Ser	TCT	4.28

[0089] 本公开预期使用任何菊天冬酰胺酶编码序列,包括已经针对在所使用的假单胞菌属宿主细胞中的表达进行了优化的任何序列。经常将预期使用的序列按照需要优化至任何程度,其包括但不限于优化以消除:在假单胞菌属宿主细胞中以少于5%出现的密码子、在假单胞菌属宿主细胞中以少于10%出现的密码子、罕见的密码子诱导的翻译暂停、推定的内部RBS序列、G或C核苷酸的延伸重复序列、干扰性二级结构、限制位点、或其组合。

[0090] 此外,可用于实施本文提供的方法的任何分泌前导体的氨基酸序列是由任何合适的核酸序列编码。用于在大肠杆菌中的表达的密码子优化由例如Welch等,2009,PLoS One, “Design Parameters to Control Synthetic Gene Expression in Escherichia coli,” 4(9):e7002;Ghane等,2008,Krishna R.等,(2008)Mol Biotechnology “Optimization of the AT-content of Codons Immediately Downstream of the Initiation Codon and Evaluation of Culture Conditions for High-level Expression of Recombinant Human G-CSF in Escherichia coli,” 38:221-232描述。

[0091] 高通量筛选

[0092] 在一些实施方式中,经常进行高通量筛选以确定用于表达可溶重组菊天冬酰胺酶的最佳条件。在筛选中变化的条件包括例如宿主细胞、宿主细胞的基因背景(例如不同蛋白酶的缺失)、表达构建体中启动子的类型、与编码的菊天冬酰胺酶融合的分泌前导体的类型、生长温度、使用诱导型启动子时的诱导的OD、诱导剂添加量(例如使用lacZ启动子或其衍生物时用于诱导的IPTG的量)、蛋白质诱导的持续时间、向培养物中添加诱导剂后的生长温度、培养物的搅动速度、质粒维持的选择方法、容器中的培养物的体积、和细胞裂解方法。

[0093] 在一些实施方式中,提供了宿主菌株的文库(或“阵列”),其中已对文库中的每个菌株(或“宿主细胞群”)进行遗传修饰以调节一个或多个靶基因在宿主细胞中的表达。“最佳宿主菌株”或“最佳表达系统”经常是基于感兴趣的表达的蛋白与阵列中的表型上不同的宿主细胞的其他群体相比的数量、质量和/或位置来确定或选择。因此,最佳宿主菌株是根据期望规范产生感兴趣的多肽的菌株。尽管期望规范将根据所产生的多肽而变化,但该规范包括蛋白的质量和/或数量、蛋白质是否被隔离(例如在包涵体中)或被分泌、蛋白折叠等。例如,最佳宿主菌株或最佳表达系统生产率,其特征在于相对于指示菌株(即用于比较的菌株)产生的、一定绝对水平或一定水平的可溶异源蛋白的量、可回收异源蛋白的量、适当加工的异源蛋白的量、适当折叠的异源蛋白的量、活性异源蛋白的量、和/或异源蛋白的总量。

[0094] 筛选微生物宿主以鉴定在异源蛋白的表达方面具有改善的产率和/或质量的菌株的方法描述于例如美国专利申请公布号20080269070。

[0095] 细菌生长条件

[0096] 可用于本文方法的生长条件通常包括约4°C至约42°C的温度和约5.7至约8.8的pH。当使用具有lacZ启动子或其衍生物的表达构建体时,表达通常通过以约0.01mM至约1.0mM终浓度添加IPTG至培养物中来诱导。

[0097] 有时使用pH缓冲剂和本领域技术人员已知的方法来维持培养物的pH。通常也使用氨水来实现培养期间对pH的控制。在实施方式中,培养物的pH是约5.7至约8.8。在某些实施方式中,pH是约5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7或8.8。在其他实施方式中,pH是约5.7至5.9、5.8至6.0、5.9至6.1、6.0至6.2、6.1至6.3、6.2至6.5、6.4至6.7、6.5至6.8、6.6至6.9、6.7至7.0、6.8至7.1、6.9至7.2、7.0至7.3、7.1至7.4、7.2至7.5、7.3至7.6、7.4至7.7、7.5至7.8、7.6至7.9、7.7至8.0、7.8至8.1、7.9至8.2、8.0至8.3、8.1至8.4、8.2至8.5、8.3至8.6、8.4至8.7或8.5至8.8。在又一些实施方式中,pH是约5.7至6.0、5.8至6.1、5.9至6.2、6.0至6.3、6.1至6.4或6.2至6.5。在某些实施方式中,pH是约5.7至约6.25。在一些实施方式中,pH是约5.0至约8.0。

[0098] 在实施方式中,生长温度维持在约4°C至约42°C。在某些实施方式中,生长温度是约4°C、约5°C、约6°C、约7°C、约8°C、约9°C、约10°C、约11°C、约12°C、约13°C、约14°C、约15°C、约16°C、约17°C、约18°C、约19°C、约20°C、约21°C、约22°C、约23°C、约24°C、约25°C、约26°C、约27°C、约28°C、约29°C、约30°C、约31°C、约32°C、约33°C、约34°C、约35°C、约36°C、约37°C、约38°C、约39°C、约40°C、约41°C或约42°C。在其他实施方式中,生长温度维持在约25°C至约27°C、约25°C至约28°C、约25°C至约29°C、约25°C至约30°C、约25°C至约31°C、约25°C至约32°C、约25°C至约33°C、约26°C至约28°C、约26°C至约29°C、约26°C至约30°C、约26°C至约31°C、约26°C至约32°C、约27°C至约29°C、约27°C至约30°C、约27°C至约31°C、约27°C至约32°C、约27°C至约33°C、约28°C至约30°C、约28°C至约31°C、约28°C至约32°C、约29°C至约31°C、约29°C至约32°C、约29°C至约33°C、约30°C至约32°C、约30°C至约33°C、约31°C至约33°C、约31°C至约32°C、约30°C至约33°C、或约32°C至约33°C。在实施方式中,生长温度维持在约22°C至约33°C。在其他实施方式中,温度在培养期间改变。在某些实施方式中,在将诱导编码感兴趣的多肽或蛋白的构建体的表达的试剂加入培养物中之前,将温度维持在约30°C

至约32℃,并且在加入诱导表达的试剂后(例如将IPTG加入培养物中),将温度降至约25℃至约27℃。在一个实施方式中,在将诱导编码感兴趣的多肽或蛋白的构建体的表达的试剂加入培养物中之前,将温度维持在约30℃,并且在向培养物加入诱导表达的试剂后将温度降至约25℃。

[0099] 诱导

[0100] 如本文其他地方所述,诱导型启动子通常用于表达构建体中以控制重组菊天冬酰胺酶的表达,例如lac启动子。在lac启动子衍生物或家族成员例如tac启动子的情况下,效应子化合物是诱导剂,例如安慰诱导剂,如IPTG(异丙基-β-D-1-硫代半乳糖苷,也称为“异丙基硫代半乳糖苷”)。在实施方式中,使用lac启动子衍生物,并且当细胞密度达到OD₅₇₅所确定的约25至约160的水平时,菊天冬酰胺酶表达是通过添加IPTG至终浓度约0.01mM至约1.0mM来诱导。在实施方式中,在用于菊天冬酰胺酶的培养物诱导时的OD₅₇₅是约25、约50、约55、约60、约65、约70、约80、约90、约100、约110、约120、约130、约140、约150、约160、约170、约180。在其他实施方式中,OD₅₇₅是约80至约100、约100至约120、约120至约140、约140至约160。在其他实施方式中,OD₅₇₅是约80至约120、约100至约140、或约120至约160。在其他实施方式中,OD₅₇₅是约80至约140、或约100至160。细胞密度通常通过其他方法测量并以其他单位表示,例如以每单位体积的细胞表示。例如,荧光假单胞菌培养物的OD₅₇₅为约25至约160相当于每毫升约 2.5×10^{10} 至约 1.6×10^{11} 集落形成单位或11至70g/L干细胞重量、或约0.05g/g至约0.4g/g湿细胞重量。在实施方式中,OD₅₇₅的细胞密度的测量值转换为CFU的测量值,其中OD₅₇₅为1转换等于 1×10^9 ;转换为湿细胞重量的测量值,其中OD₅₇₅为1转换等于0.002g/g;转换为干细胞重量的测量值,其中OD₅₇₅为1转换等于0.44g/L。在实施方式中,当细胞密度达到约0.05g/g至约0.4g/g的湿重时,菊天冬酰胺酶表达通过添加IPTG至终浓度约0.01mM至约1.0mM来诱导。在实施方式中,湿细胞重量是约0.05g/g、约0.1g/g、约0.15g/g、约0.2g/g、约0.25g/g、约0.30g/g、约0.35g/g、约0.40g/g、约0.05g/g至约0.1g/g、约0.05g/g至约0.15g/g、约0.05g/g至约0.20g/g、约0.05g/g至约0.25g/g、约0.05g/g至约0.30g/g、约0.05g/g至约0.35g/g、约0.1g/g至约0.40g/g、约0.15g/g至约0.40g/g、约0.20g/g至约0.40g/g、约0.25g/g至约0.40g/g、约0.30g/g至约0.40g/g、或约0.35g/g至约0.40g/g。在实施方式中,湿细胞重量是约0.1g/g至约0.5g/g。在实施方式中,培养物诱导时的细胞密度等于如本文在OD₅₇₅处的吸光度所指定的细胞密度,不论用于确定细胞密度的方法或测量单位如何。本领域技术人员将知道如何对任何细胞培养物进行适当的转化。

[0101] 在实施方式中,培养物的最终IPTG浓度是约0.01mM、约0.02mM、约0.03mM、约0.04mM、约0.05mM、约0.06mM、约0.07mM、约0.08mM、约0.09mM、约0.1mM、约0.2mM、约0.3mM、约0.4mM、约0.5mM、约0.6mM、约0.7mM、约0.8mM、约0.9mM、或约1mM。在其他实施方式中,培养物的最终IPTG浓度为约0.08mM至约0.1mM,约0.1mM至约0.2mM,约0.2mM至约0.3mM,约0.3mM至约0.4mM,约0.2mM至约0.4mM,约0.08mM至约0.2mM,或约0.1mM至约1mM。在实施方式中,IPTG在培养基中的浓度为约0.05mM至约2.5mM。

[0102] 如本文和文献中所述,在其中使用非lac型启动子的实施方式中,通常使用其他诱导剂或效应子。在一个实施方式中,启动子是组成型启动子。

[0103] 在添加诱导剂后,培养物通常生长一段时间,例如约24小时,在此期间表达重组菊

天冬酰胺酶。在添加诱导剂后,培养物通常生长约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、约36小时、或约48小时。在将诱导剂添加到培养物后,培养物生长约1至48小时、约1至24小时、约10至24小时、约15至24小时、或约20至24小时。细胞培养物通常通过离心浓缩,并将培养物沉淀重悬于适合后续裂解程序的缓冲液或溶液中。

[0104] 在实施方式中,使用用于高压机械细胞破坏的设备(其是可商购的,例如微流控微流控器、恒定细胞破坏器、Niro-Soavi均质器或APV-Gaulin均质器)破坏细胞。表达菊天冬酰胺酶的细胞通常被破坏,例如使用超声处理。通常使用本领域已知的用于裂解细胞的任何合适方法以释放可溶性级分。例如,在实施方式中,经常使用化学和/或酶促细胞裂解剂,例如细胞壁裂解酶和EDTA。在本文的方法中也考虑冷冻的或之前储存的培养物的使用。有时在裂解前将培养物进行OD标准化。例如,细胞通常被标准化至OD₆₀₀为约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19或约20。

[0105] 使用任何合适的设备和方法进行离心。为了从不溶级分中分离出可溶级分的目的,细胞培养物或裂解物的离心是本领域众所周知的。例如,裂解的细胞有时以20,800×g离心20分钟(4°C下),并且使用手动或自动液体处理去除上清液。将沉淀(不溶的)级分重悬于缓冲溶液中,例如磷酸盐缓冲盐水(PBS),pH 7.4。重悬通常使用例如连接至顶置式混合器的叶轮、磁力搅拌棒、摇床等设备进行。

[0106] “可溶级分”,即裂解物离心后获得的可溶上清液,和“不溶级分”,即裂解物离心后获得的沉淀,是通过将培养物裂解和离心得到的。

[0107] 发酵形式

[0108] 在一个实施方式中,发酵用于生产重组菊天冬酰胺酶的方法。根据本公开的表达系统以任何发酵形式培养。例如,本文可采用分批、补料分批、半连续和连续发酵模式。

[0109] 在实施方式中,发酵培养基可选自富培养基、基本培养基和无机盐培养基。在其他实施方式中,选择基本培养基或无机盐培养基。在某些实施方式中,选择无机盐培养基。

[0110] 无机盐培养基由无机盐和碳源组成,例如葡萄糖、蔗糖或甘油。无机盐培养基的实例包括例如M9培养基、假单胞菌培养基(ATCC 179)、和Davis and Mingioli培养基(参见B D Davis&E S Mingioli(1950)J.Bact.60:17-28)。用于制造无机盐培养基的无机盐包括选自以下的那些:例如,钾磷酸盐、硫酸铵或氯化铵、硫酸镁或氯化镁、以及微量矿物质例如氯化钙、硼酸盐、以及铁、铜、锰和锌的硫酸盐。通常,没有有机氮源例如蛋白胨、胰蛋白胨、氨基酸或酵母提取物包含在无机盐培养基中。而是使用无机氮源,这可以选自例如铵盐、氨水和气态氨。无机盐培养基通常包含葡萄糖或甘油作为碳源。与无机盐培养基相比,基本培养基通常包含无机盐和碳源,但通常补充有例如低含量的氨基酸、维生素、蛋白胨或其他成分,尽管这些是以非常低的含量添加。通常使用本领域描述的方法制备培养基,例如在美国专利申请公布号2006/0040352中描述的,其在上文提到并通过引用并入。可用于本文方法的培养程序和无机盐培养基的细节由Riesenberg,D等,1991,“High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate,”J.Biotechnol.20(1):17-27描述。

[0111] 发酵可以以任何规模进行。根据本公开的表达系统可用于任何规模的重组蛋白表

达。因此,例如,可以使用微升规模、毫升规模、厘升规模和分升估摸的发酵体积,并且经常使用1升规模或更大的发酵体积。

[0112] 在实施方式中,发酵体积是或高于约1升。在实施方式中,发酵体积是约0.5升至约100升。在实施方式中,发酵体积是约0.5升、约1升、约2升、约3升、约4升、约5升、约6升、约7升、约8升、约9升或约10升。在实施方式中,发酵体积是约0.5升至约2升、约0.5升至约5升、约0.5升至约10升、约0.5升至约25升、约0.5升至约50升、约0.5升至约75升、约10升至约25升、约25升至约50升、或约50升至约100升。在其他实施方式中,发酵体积是或高于5升、10升、15升、20升、25升、50升、75升、100升、200升、500升、1,000升、2,000升、5,000升、10,000升或50,000升。

[0113] 蛋白质分析

[0114] 在实施方式中,分析了通过本文提供的方法产生的重组菊天冬酰胺酶蛋白。重组菊天冬酰胺酶有时例如通过生物层干涉测定法、SDS-PAGE、蛋白质印迹、远蛋白质印迹、ELISA、吸光度或质谱法(例如串联质谱法)分析。

[0115] 在一些实施方式中,例如通过Bradford测定、吸光度、Coomassie染色、质谱法等确定所产生的重组菊天冬酰胺酶蛋白的浓度和/或量。

[0116] 本文所述的不溶和可溶级分中的蛋白质产率通常通过本领域技术人员已知的方法来确定,例如通过毛细管凝胶电泳(CGE)和蛋白质印迹分析。通常使用生物层干涉来评估可溶级分。

[0117] 天冬酰胺酶单体能够形成活性四聚体,例如在细胞裂解物中,细胞超声物中以及进一步纯化时。在细菌表达系统中例如在大肠杆菌或假单胞菌属宿主细胞中表达重组天冬酰胺酶后,可以使用本领域已知的任何合适方法纯化重组蛋白例如以去除宿主细胞蛋白。纯化方法可以包括例如阳离子交换色谱、阴离子交换色谱、尺寸排除色谱法、高效液相色谱(HPLC)或这些和/或其他已知方法的组合。天冬酰胺酶蛋白纯化在文献中描述,例如在美国专利号5,310,670,“Method for the purification of *Erwinia* L-asparaginase”,和美国专利号8,323,948,“Asparaginases and uses thereof”,各自通过引用整体并入本文。基于我们的表达实验,在荧光假单胞菌中表达的II型天冬酰胺酶作为活性四聚体天冬酰胺酶存在于超声处理物中。

[0118] 在实施方式中,将一定量的未纯化或纯化的天冬酰胺酶样品的可测量特征(例如活性、大小、长度、或其他指示活性和/或完整蛋白的特征)与相同量的天冬酰胺酶标准样品(例如商业获得的天冬酰胺酶)的可测量特征进行比较。应当理解,样品中天冬酰胺酶蛋白的量可以通过本领域已知用于蛋白质测量的任何合适测定法来确定,并且活性可以通过任何合适测定法例如本文所述的来确定。

[0119] 蛋白质产率的有用测量包括例如每培养物体积的重组蛋白的量(例如克或毫克蛋白/升培养物)、裂解后获得的不溶沉淀物中测得的重组蛋白的百分比或分数(例如提取物上清液中重组蛋白的量/不溶级分中的蛋白的量)、可溶重组蛋白的百分比或分数、活性蛋白的百分比或分数(例如活性蛋白的量/测定中使用的蛋白的量)、总细胞蛋白(tcp)的百分比或分数、蛋白的量/细胞、和干生物量百分比。

[0120] 在实施方式中,本文的方法用于获得约20%至约90%总细胞蛋白的可溶重组菊天冬酰胺酶蛋白(例如单体或四聚体)的产率。在某些实施方式中,可溶重组菊天冬酰胺酶的

产率是约20%总细胞蛋白、约25%总细胞蛋白、约30%总细胞蛋白、约31%总细胞蛋白、约32%总细胞蛋白、约33%总细胞蛋白、约34%总细胞蛋白、约35%总细胞蛋白、约36%总细胞蛋白、约37%总细胞蛋白、约38%总细胞蛋白、约39%总细胞蛋白、约40%总细胞蛋白、约41%总细胞蛋白、约42%总细胞蛋白、约43%总细胞蛋白、约44%总细胞蛋白、约45%总细胞蛋白、约46%总细胞蛋白、约47%总细胞蛋白、约48%总细胞蛋白、约49%总细胞蛋白、约50%总细胞蛋白、约51%总细胞蛋白、约52%总细胞蛋白、约53%总细胞蛋白、约54%总细胞蛋白、约55%总细胞蛋白、约56%总细胞蛋白、约57%总细胞蛋白、约58%总细胞蛋白、约59%总细胞蛋白、约60%总细胞蛋白、约65%总细胞蛋白、约70%总细胞蛋白、约75%总细胞蛋白、约80%总细胞蛋白、约85%总细胞蛋白、或约90%总细胞蛋白。在一些实施方式中,可溶重组菊天冬酰胺酶的产率是约20%至约25%总细胞蛋白、约20%至约30%总细胞蛋白、约20%至约35%总细胞蛋白、约20%至约40%总细胞蛋白、约20%至约45%总细胞蛋白、约20%至约50%总细胞蛋白、约20%至约55%总细胞蛋白、约20%至约60%总细胞蛋白、约20%至约65%总细胞蛋白、约20%至约70%总细胞蛋白、约20%至约75%总细胞蛋白、约20%至约80%总细胞蛋白、约20%至约85%总细胞蛋白、约20%至约90%总细胞蛋白、约35%至约90%总细胞蛋白、约40%至约90%总细胞蛋白、约45%至约90%总细胞蛋白、约50%至约90%总细胞蛋白、约55%至约90%总细胞蛋白、约60%至约90%总细胞蛋白、约65%至约90%总细胞蛋白、约70%至约90%总细胞蛋白、约75%至约90%总细胞蛋白、约80%至约90%总细胞蛋白、约85%至约90%总细胞蛋白、约20%至约40%总细胞蛋白、约25%至约40%总细胞蛋白、约35%至约40%总细胞蛋白、约20%至约35%总细胞蛋白、约20%至约30%总细胞蛋白、或约20%至约25%总细胞蛋白。在一些实施方式中,可溶重组菊天冬酰胺酶的产率是约20%至约40%总细胞蛋白。

[0121] 在实施方式中,本文的方法用于获得约1克/升至约50克/升的可溶重组菊天冬酰胺酶蛋白(例如单体或四聚体)的产率。在某些实施方式中,可溶重组菊天冬酰胺酶的产率是约1克/升、约2克/升、约3克/升、约4克/升、约5克/升、约6克/升、约7克/升、约8克/升、约9克/升、约10克/升、约11克/升、约12克/升、约13克/升、约14克/升、约15克/升、约16克/升、约17克/升、约18克/升、约19克/升、约20克/升、约21克/升、约22克/升、约23克/升、约24克/升、约25克/升、约26克/升、约27克/升、约28克/升、约30克/升、约35克/升、约40克/升、约45克/升、约50克/升、约1克/升至约5克/升、约1克/升至约10克/升、约10克/升至约12克/升、约10克/升至约13克/升、约10克/升至约14克/升、约10克/升至约15克/升、约10克/升至约16克/升、约10克/升至约17克/升、约10克/升至约18克/升、约10克/升至约19克/升、约10克/升至约20克/升、约10克/升至约21克/升、约10克/升至约22克/升、约10克/升至约23克/升、约10克/升至约24克/升、约10克/升至约25克/升、约10克/升至约30克/升、约10克/升至约40克/升、约10克/升至约50克/升、约10克/升至约12克/升、约12克/升至约14克/升、约14克/升至约16克/升、约16克/升至约18克/升、约18克/升至约20克/升、约20克/升至约22克/升、约22克/升至约24克/升、约23克/升至约25克/升、约10克/升至约25克/升、约11克/升至约25克/升、约12克/升至约25克/升、约13克/升至约25克/升、约14克/升至约25克/升、约15克/升至约25克/升、约16克/升至约25克/升、约17克/升至约25克/升、约18克/升至约25克/升、约19克/升至约25克/升、约20克/升至约25克/升、约21克/升至约25克/升、约22克/升至约25克/升、约23克/升至约25克/升、或约24克/升至约25克/升。在实施方式中,可溶重组蛋

白产率是约10克/升至约13克/升、约12克/升至约14克/升、约13克/升至约15克/升、约14克/升至约16克/升、约15克/升至约17克/升、约16克/升至约18克/升、约17克/升至约19克/升、约18克/升至约20克/升、约20克/升至约22克/升、约22克/升至约24克/升、约23克/升至约25克/升。在实施方式中,可溶重组蛋白产率是约10克/升至约25克/升、约12克/升至约24克/升、约14克/升至约22克/升、约16克/升至约20克/升、或约18克/升至约20克/升。在实施方式中,提取的蛋白产率是约5克/升至约15克/升、约5克/升至约25克/升、约10克/升至约15克/升、约10克/升至约25克/升、约15克/升至约20克/升、约15克/升至约25克/升、或约18克/升至约25克/升。在某些实施方式中,可溶重组菊天冬酰胺酶的产率是约10克/升至约25克/升。

[0122] 在实施方式中,在可溶级分中检测到的重组菊天冬酰胺酶例如单体或四聚体的量是所产生的总重组菊天冬酰胺酶的量的约10%至约100%。在实施方式中,该量是所产生的总重组菊天冬酰胺酶的量的约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约99%、或约100%。在实施方式中,该量是所产生的总重组菊天冬酰胺酶的量的约10%至约20%、约20%至约50%、约25%至约50%、约25%至约50%、约25%至约95%、约30%至约50%、约30%至约40%、约30%至约60%、约30%至约70%、约35%至约50%、约35%至约70%、约35%至约75%、约35%至约95%、约40%至约50%、约40%至约95%、约50%至约75%、约50%至约95%、约70%至约95%、或约80至约100%。

[0123] 在一些实施方式中,可溶重组天冬酰胺酶的量表示为培养物中产生的总可溶蛋白的百分比。可以将在给定细胞密度下以重组天冬酰胺酶蛋白重量/细胞培养物体积表示的数据转换为总细胞蛋白中重组蛋白的百分比表示的数据。将体积蛋白产率转换为%总细胞蛋白,例如知晓在给定细胞密度下每细胞培养物体积的总细胞蛋白的量,是在技术人员的能力之内。如果知道1) 给定细胞密度下的细胞重量/培养物体积,和2) 总蛋白所占细胞重量的百分比,则可以确定该数字。例如,在OD550为1.0时,大肠杆菌的干细胞重报告为0.5克/升(“Production of Heterologous Proteins from Recombinant DNA *Escherichia coli* in Bench Fermentors,”Lin,N.S.和Swartz,J.R.,1992,METHODS:A Companion to Methods in Enzymology 4:159-168)。细菌细胞由多糖、脂质和核酸以及蛋白质组成。据文献报道,大肠杆菌细胞含有约52.4至55%的蛋白质,包括但不限于Da Silva,N.A.等,1986,“Theoretical Growth Yield Estimates for Recombinant Cells,”Biotechnology and Bioengineering,Vol.XXVIII:741-746,估计蛋白质构成大肠杆菌细胞的52.4重量%,和“*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology,”1987,Ed.Chief Frederick C.Neidhardt,Vol.1,pp.3-6,报道大肠杆菌中的蛋白质含量为55%干细胞重量。使用上述测量值(即,干细胞重量为0.5克/升,蛋白质为55%细胞重量),大肠杆菌在A550为1.0时每细胞培养物体积的总细胞蛋白的量计算为275 μ g总细胞蛋白/ml/A550。基于湿细胞重量的每细胞培养物体积的总细胞蛋白的计算可以使用例如Glazyrina等(Microbial Cell Factories 2010,9:42,通过引用并入本文)的测定:对于大肠杆菌,A600为1.0导致湿细胞重量为1.7克/升且干细胞重量为0.39克/升。例如,使用该湿细胞重量与干细胞重量的比较,以及如上所述蛋白质为55%干细胞重量,则对于大肠杆菌,在A600为1.0时,每细胞培养物体积的总细胞蛋白的量可以计算为215 μ g总细胞蛋白/ml/

A600。对于荧光假单胞菌,在给定细胞密度下,每细胞培养物体积的总细胞蛋白的量与对大肠杆菌发现的相似。荧光假单胞菌类似于大肠杆菌,是革兰氏阴性的杆状的细菌。如Edwards等,1972,“Continuous Culture of *Pseudomonas fluorescens* with Sodium Maleate as a Carbon Source,”*Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XIV, 第123-147页报道的,荧光假单胞菌ATCC 11150的干细胞重量是0.5克/升/A500。这是与Lin等对大肠杆菌在A550为1.0时报道的相同的重量。在500nm和550nm处进行的光散射测量被预期是非常相似的。对于荧光假单胞菌HK44,总细胞蛋白所占的细胞重量的百分比由例如Yarwood等,2002年7月,“Noninvasive Quantitative Measurement of Bacterial Growth in Porous Media under Unsaturated-Flow Conditions,”*Applied and Environmental Microbiology* 68(7):3597-3605描述为55%。该百分比与上述参考文献对大肠杆菌给出的那些相似或相同。

[0124] 在实施方式中,产生的可溶重组菊天冬酰胺酶例如单体或四聚体的量是培养物中产生的总可溶蛋白的约0.1%至约95%。在实施方式中,该量大于培养物中产生的总可溶蛋白的0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%。在实施方式中,该量是培养物中产生的总可溶蛋白的约0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%。在实施方式中,该量是培养物中产生的总可溶蛋白的约5%至约95%、约10%至约85%、约20%至约75%、约30%至约65%、约40%至约55%、约1%至约95%、约5%至约30%、约1%至约10%、约10%至约20%、约20%至约30%、约30%至约40%、约40%至约50%、约50%至约60%、约60%至约70%、约80%至约90%。

[0125] 在实施方式中,产生的可溶重组菊天冬酰胺酶例如单体或四聚体的量是干细胞重量(DCW)的约0.1%至约50%。在实施方式中,该量大于DCW的约0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、或50%。在实施方式中,该量是DCW的约0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、或50%。在实施方式中,该量是培养物中产生的总可溶蛋白的约5%至约50%、约10%至约40%、约20%至约30%、约1%至约20%、约5%至约25%、约1%至约10%、约10%至约20%、约20%至约30%、约30%至约40%、或约40%至约50%。

[0126] 在实施方式中,细胞质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶的产率和量,如任何这些蛋白指标所描述的(例如每培养物体积的重组蛋白的量(例如克或毫克蛋白/升培养物)、裂解后获得的不溶沉淀物中测得的重组蛋白的百分比或分数(例如提取物上清液中重组蛋白的量/不溶级分中的蛋白的量)、可溶重组蛋白的百分比或分数、活性蛋白的百分比或分数(例如活性蛋白的量/测定中使用的蛋白的量)、总细胞蛋白(tcp)的百分比或分数、蛋白的量/细胞、和干生物量百分比),等于或相对于在相似或基本上相似的条件(条件包括例如宿主细胞、宿主细胞的遗传背景(例如不同蛋白酶的缺失)、表达构建体中启动子的类型、生长温度、使用诱导型启动子时的诱导的OD、诱导剂的添加量(例如,使用lacZ启动子或其衍生物时用于诱导的IPTG的量)、蛋白诱导的持续时间、向培养物中添加诱导剂后的生长温度、培养物的搅拌速率、质粒维持的选择方法、容器中培养物的体积和细胞裂解方法)获得的周质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶的量增加。在实施方式中,在相似或基本上相似条件下获得的细胞质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶与周质地产生的可溶重组菊天冬酰胺

酶的产率比是约1:1(即1)至约5:1(即5)。在实施方式中,在相似或基本上相似条件下获得的细胞质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶与周质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶的产率比是约1至约5。在实施方式中,在相似或基本上相似条件下获得的细胞质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶与周质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶的产率比是至少约1。在实施方式中,在相似或基本上相似条件下获得的细胞质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶与周质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶的产率比是至多约5。在实施方式中,在相似或基本上相似条件下获得的细胞质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶与周质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶的产率比是约1至约1.25、约1至约1.5、约1至约1.75、约1至约2、约1至约2.5、约1至约3、约1至约3.5、约1至约4、约1至约4.5、约1至约5、约1.25至约1.5、约1.25至约1.75、约1.25至约2、约1.25至约2.5、约1.25至约3、约1.25至约3.5、约1.25至约4、约1.25至约4.5、约1.25至约5、约1.5至约1.75、约1.5至约2、约1.5至约2.5、约1.5至约3、约1.5至约3.5、约1.5至约4、约1.5至约4.5、约1.5至约5、约1.75至约2、约1.75至约2.5、约1.75至约3、约1.75至约3.5、约1.75至约4、约1.75至约4.5、约1.75至约5、约2至约2.5、约2至约3、约2至约3.5、约2至约4、约2至约4.5、约2至约5、约2.5至约3、约2.5至约3.5、约2.5至约4、约2.5至约4.5、约2.5至约5、约3至约3.5、约3至约4、约3至约4.5、约3至约5、约3.5至约4、约3.5至约4.5、约3.5至约5、约4至约4.5、约4至约5、或约4.5至约5。在实施方式中,在相似或基本上相似条件下获得的细胞质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶与周质地产生的可溶重组菊天冬酰胺酶的产率比是约1、约1.25、约1.5、约1.75、约2、约2.5、约3、约3.5、约4、约4.5或约5。

[0127] 溶解度和活性

[0128] 蛋白质的“溶解度”和“活性”虽然是相关的性质,但通常由不同的方法来确定。蛋白质的溶解度,特别是疏水性蛋白质,指示疏水性氨基酸残基不适当地位于折叠蛋白的外侧。蛋白质活性,其通常使用例如如下所述的不同方法评估,是适当的蛋白质构象的另一指标。如在本文中所使用的“可溶的、有活性的,或两者”是指通过本领域技术人员已知的方法测定为可溶的、有活性的、或可溶且有活性的蛋白质。

[0129] 活性测定法

[0130] 用于评估菊天冬酰胺酶活性的测定法是本领域已知的,包括但不限于荧光测定法、比色测定法、化学发光测定法、分光光度测定法和本领域技术人员可用的其他酶测定法。这些测定法可用于比较菊天冬酰胺酶制剂与商业或其他菊天冬酰胺酶制剂的活性或效价。

[0131] 在实施方式中,活性或效价由提取物上清液中的活性蛋白与测定的总量相比的百分比表示。这是基于通过测定法确定为有活性的蛋白质的量相对于测定法中所用蛋白质的总量。在其他实施方式中,活性或效价由与标准或对照蛋白相比的蛋白的活性或效价水平%表示。这是基于上清液提取样品中活性蛋白的量相对于标准样品中活性蛋白的量(其中在测定法中从每个样品中使用相同量的蛋白)。

[0132] 在实施方式中,用于活性或效价测定法中用于与产生的菊天冬酰胺酶进行比较的标准或对照蛋白质是 **Erwinaze®** 中的活性成分,或批准用于临床使用且本领域已知的任何菊天冬酰胺酶产品中的活性成分。在实施方式中,使用用于测量菊天冬酰胺酶活性或效价的相同方法,将产生的菊天冬酰胺酶的测量的活性或效价与相同量的标准或对照菊天冬酰胺酶中测量的活性或效价进行比较。

[0133] 在实施方式中,本文的方法进一步包括使用活性或效价测定法来测量一定量的重组菊天冬酰胺酶蛋白的活性或效力。在实施方式中,约40%至约100%的重组菊天冬酰胺酶蛋白被确定为是有活性的、可溶的或两者。在实施方式中,约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、或约100%的重组菊天冬酰胺酶蛋白被确定为是有活性的、可溶的或两者。在实施方式中,约40%至约50%、约50%至约60%、约60%至约70%、约70%至约80%、约80%至约90%、约90%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约40%至约90%、约40%至约95%、约50%至约90%、约50%至约95%、约50%至约100%、约60%至约90%、约60%至约95%、约60%至约100%、约70%至约90%、约70%至约95%、约70%至约100%、或约70%至约100%的重组菊天冬酰胺酶蛋白被确定为是有活性的、可溶的或两者。

[0134] 在实施方式中,约75%至约100%的重组菊天冬酰胺酶被确定为是有活性的、可溶的或两者。在实施方式中,约75%至约80%、约75%至约85%、约75%至约90%、约75%至约95%、约80%至约85%、约80%至约90%、约80%至约95%、约80%至约100%、约85%至约90%、约85%至约95%、约85%至约100%、约90%至约95%、约90%至约100%、或约95%至约100%的重组菊天冬酰胺酶被确定为是有活性的、可溶的或两者。

[0135] 在实施方式中,如本文所述的产生或表达重组II型天冬酰胺酶的方法进一步包括测量产生的重组II型天冬酰胺酶的活力或效价,和比较所产生的重组II型天冬酰胺酶的测量的活性或效价与使用相同测定法测量的相同量的对照II型天冬酰胺酶的活性或效价,其中产生的重组II型天冬酰胺酶的活性或效价与对照II型天冬酰胺酶的活性或效价是相当的。在实施方式中,相当的活性或效力定义为100% (其也可以表示为1.0),即,当产生的重组II型天冬酰胺酶和对照II型天冬酰胺酶的活性或效力相等时。在实施方式中,与对照II型天冬酰胺酶相比,产生的重组II型天冬酰胺酶的活性或效价是约80%至约120%。在实施方式中,活性或效价是约85%至约115%。在实施方式中,活性或效价是约90%至约110%。在实施方式中,活性或效价是约70%至约130%。在实施方式中,活性或效价是约65%至约135%。在实施方式中,与对照II型天冬酰胺酶相比,产生的重组II型天冬酰胺酶的活性或效价为约或至少约65%、约或至少约66%、约或至少约67%、约或至少约68%、约或至少约69%、约或至少约70%、约或至少约71%、约或至少约72%、约或至少约73%、约或至少约74%、约或至少约75%、约或至少约76%、约或至少约77%、约或至少约78%、约或至少约79%、约或至少约80%、约或至少约81%、约或至少约82%、约或至少约83%、约或至少约84%、约或至少约85%、约或至少约86%、约或至少约87%、约或至少约88%、约或至少约89%、约或至少约90%、约或至少约91%、约或至少约92%、约或至少约93%、约或至少约94%、约或至少约95%、约或至少约96%、约或至少约97%、约或至少约98%、约或至少约99%、约或至少约100%、约或至少约101%、约或至少约102%、约或至少约103%、约或至少约104%、约或至少约105%、约或至少约106%、约或至少约107%、约或至少约108%、约或至少约109%、约或至少约110%、约或至少约111%、约或至少约112%、约或至少约113%、约或至少约114%、约或至少约115%、约或至少约116%、约或至少约117%、约或至少约118%、约或至少约119%、约或至少约120%、约或至少约121%、约或至少约122%、约或至少约123%、约或至少约124%、约或至少约125%、约或至少约126%、约或至少约127%、约或至少约128%、约或至少约129%、约或至少约130%、约或至少约131%、约或至少约

132%、约或至少约133%、约或至少约134%、约或至少约135%。在实施方式中,与对照II型天冬酰胺酶相比,产生的重组II型天冬酰胺酶的活性或效价为约68%至约132%、约70%至约130%、约72%至约128%、约75%至约125%、约80%至约120%、约85%至约115%、约65%至约110%、约68%至约110%、约70%至约110%、约72%至约110%、约78%至约110%、约80%至约110%、约90%至约110%、约95%至约105%、约85%至约110%、约90%至约110%、约95%至约110%、约96%至约110%、约97%至约110%、约98%至约110%、约99%至约110%、约100%至约110%、约65%至约105%、约68%至约105%、约70%至约105%、约72%至约105%、约80%至约105%、约85%至约105%、约90%至约105%、约95%至约105%、约96%至约105%、约97%至约105%、约98%至约105%、约99%至约105%、约100%至约105%、约65%至约100%、约68%至约100%、约70%至约100%、约72%至约100%、约75%至约100%、约78%至约100%、约80%至约100%、约81%至约100%、约82%至约100%、约83%至约100%、约84%至约100%、约85%至约100%、约86%至约100%、约87%至约100%、约88%至约100%、约89%至约100%、约90%至约100%、约91%至约100%、约92%至约100%、约93%至约100%、约94%至约100%、约95%至约100%、约96%至约100%、约97%至约100%、约98%至约100%、约99%至约100%、约75%至约135%、约80%至约135%、约85%至约135%、约90%至约135%、约75%至约130%、约80%至约130%、约85%至约130%、约90%至约130%、约80%至约125%、约85%至约125%、约90%至约125%、约85%至约120%、约90%至约120%、或约95%至约120%。

[0136] 实施例

[0137] 给出以下实施例是出于说明本公开的各种实施方式的目的,并不意味着以任何方式限制本公开。本实施例以及本文所述的方法是当前代表性实施方式,是示例性,而不意在作为对范围的限制。本领域技术人员将想到其中的改变和包含在由权利要求的范围所限定的本公开的精神内的其他用途。

[0138] 实施例1:项目概述

[0139] 该项目通过构建表达菌株而启动。编码菊天冬酰胺酶蛋白的基因被优化以在荧光假单胞菌中表达,然后合成并连接到40个表达载体中的每个以促进一种胞质和39种周质菊天冬酰胺酶蛋白表达策略。将质粒转化到二十四个荧光假单胞菌宿主菌株(由蛋白酶缺失(PD)菌株、折叠调节体过表达(FMO)菌株、蛋白酶缺失加折叠调节体过表达(PD/FMO)菌株和野生型(WT)菌株组成),产生240种独特的表达菌株。

[0140] 根据高通量(HTP)生长和表达方案,每种菌株均以96孔形式一式两份生长并诱导。以96孔规模初步筛选240种表达菌株显示实现了可溶菊天冬酰胺酶蛋白单体的高表达。基于对96孔筛选中确定的前15种菌株的样品的SDS-CGE分析,当与大肠杆菌L-天冬酰胺酶(Sigma)标准曲线相比时,可溶菊天冬酰胺酶单体的估计滴度范围为约0.7至1.9g/L。进一步分析来自选择的表达菌株的摇瓶生长样品以确认活性(使用可商购活性测定试剂盒)以及完整质量(通过LC-MS)。基于高滴度的单体菊天冬酰胺酶蛋白和SDS-CGE分析确定的不可检测的降解,选择表达菌株STR55978进行2L规模的发酵评估。

[0141] 在2L发酵规模下,在八种不同的诱导条件下培养所选择的STR55978表达菌株。诱导变量包括湿细胞重量、IPTG浓度、诱导时的pH和温度。对来自选择的发酵糊的裂解样品进行捕获色谱,然后使用多种方法分析产生的捕获洗脱液以评估蛋白同一性、活性和纯度。

[0142] 实施例2:材料和方法

[0143] 用于最佳表达的合成菊天冬酰胺酶基因的设计

[0144] 设计编码菊天冬酰胺酶肽序列的DNA (图2, SEQ ID NO:2) 以反映荧光假单胞菌的合适密码子使用。将含有独特限制性酶切位点 (SapI或LguI) 的DNA区域添加到设计用于与表达载体中存在的分泌前导体编码序列框内直接融合的菊天冬酰胺酶编码序列的上游。将包含3个终止密码子和一个独特限制性酶切位点 ((SapI) 的DNA区域添加到编码序列的下游。合成基因命名为pJ201:226734, 由DNA2.0Inc生产。

[0145] 菊天冬酰胺酶蛋白表达质粒的构建

[0146] 标准克隆方法用于构建用于HTP Tier 1表达策略 (或质粒) 筛选的表达质粒。包含优化的菊天冬酰胺酶蛋白编码序列的质粒pJ201-226734是从DNA2.0获得。用限制性酶SapI消化pJ201-226734质粒, 并将含有优化的菊天冬酰胺酶基因的993bp片段亚克隆至40个总表达载体中以促进一种细胞质和39种周质表达策略。周质表达载体包括37种不同的周质前导体和两种核糖体结合位点 (RBS) 亲和性。将插入物和载体用T4DNA连接酶 (New England Biolabs, M0202S) 连接过夜, 并以96孔形式电穿孔至感受态荧光假单胞菌宿主菌株中。所得质粒命名为p743-001至p743-040, 如表5所示。宿主菌株筛选中还包括另外两个质粒p743-041和p743-042。p743-042质粒类似于p743-001质粒, 设计用于细胞质菊天冬酰胺酶蛋白的表达。然而, 稍后使用基于PCR的方法构建p743-042质粒以去除质粒p743-001的菊天冬酰胺酶编码序列中紧接在引发剂蛋氨酸密码子之后存在的额外的丙氨酸密码子。

表 5: 表达质粒

质粒 ID	RBS 强度	分泌前导体	RpC 载体
p743-001	高	无额外 Ala	pDOW5277-ala
p743-002	高	DsbD	pDOW3949
p743-003	高	前导体 A	pFNX3952
p743-004	高	DsbA	pDOW5206
p743-005	中	DsbA	pDOW5207
p743-006	高	Azu	pDOW5209
p743-007	中	Azu	pDOW5210
p743-008	高	Lao	pDOW5217
p743-009	高	Ibp-S31A	pDOW5220
p743-010	高	TolB	pDOW5223

[0147]

[0148]

p743-011	高	Tpr	pDOW5226
p743-012	高	Ttg2C	pDOW5232
p743-013	高	FlgI	pDOW5235
p743-014	高	CupC2	pDOW5238
p743-015	高	CupB2	pDOW5241
p743-016	高	Pbp	pDOW5201
p743-017	高	PbpA20V	pDOW5259
p743-018	高	DsbC	pDOW5262
p743-019	高	前导体 B	pFNX3941
p743-020	高	前导体 C	pFNX3942
p743-021	高	前导体 D	pFNX3943
p743-022	高	前导体 E	pFNX3944
p743-023	高	前导体 F	pFNX3947
p743-024	高	前导体 G	pFNX3948
p743-025	高	前导体 H	pFNX3950
p743-026	高	PorE	pDOW5256
p743-027	高	前导体 I	pFNX3959
p743-028	高	前导体 J	pFNX3957
p743-029	高	前导体 K	pFNX3958
p743-030	高	前导体 L	pFNX4202
p743-031	高	前导体 M	pFNX4203
p743-032	高	前导体 N	pFNX4204
p743-033	高	前导体 O	pFNX4205
p743-034	高	5193	pFNX4206
p743-035	高	前导体 P	pFNX4207
p743-036	高	前导体 Q	pFNX4208
p743-037	高	前导体 R	pFNX4209
p743-038	高	8484	pFNX4210
p743-039	高	前导体 S	pFNX4211
p743-040	高	前导体 T	pFNX4212
p743-041	高	AnsB	pFNX3968
p743-042	高	无	pDOW5271

[0149] 96孔格式的生长和表达

[0150] 对于表达质粒筛选 (HTP Tier 1), 将每个菊天冬酰胺酶表达质粒 (表5) 的连接混合物转化至荧光假单胞菌宿主菌株DC454 (PyrF缺陷型、对于蛋白酶为野生型 (WT)) 和DC441 (pyrF、Lon和HslUV缺陷型 (PD)) 细胞中。解冻25微升感受态细胞并转移至96孔板 **Nucleovette®** (Lonza VHNP-1001) 中, 并将连接混合物加入至每孔中。使用 Nucleofector™96孔Shuttle™系统 (Lonza AG) 对细胞进行电穿孔。然后将细胞转移至装有 400μl M9盐、1%葡萄糖培养基和微量元素 (Teknova) 的96孔深孔板中。将96孔板 (种子板) 在30°C振荡孵育48小时。将十微升种子培养物一式两份转移到96孔深孔板中, 每孔含有500 μl HTP培养基 (Teknova), 补充有微量元素和5%甘油, 并像以前一样孵育24小时。在24小时

的时间点向每孔添加异丙基- β -D-1-硫代半乳吡喃糖苷 (IPTG) 至终浓度0.3mM,以诱导靶蛋白的表达。将甘露醇 (Sigma, M1902) 添加到每孔至终浓度1%以诱导折叠调节体在折叠调节体过表达菌株中的表达。诱导后24小时通过600nm处的光密度 (OD600) 测量细胞密度以监测生长。诱导后24小时收获细胞,在1X PBS中1:3稀释至终体积400 μ l,然后冷冻。

[0151] 对于宿主菌株筛选 (HTP Tier 2),将来自10个HTP Tier 1选择的表达质粒 (表6) 的DNA转化到24种荧光假单胞菌宿主菌株 (表7) 中,其包括野生型 (母体) DC454 (WT) 菌株、蛋白酶缺失 (PD) 菌株、折叠调节体过表达 (FMO) 菌株和蛋白酶缺失加折叠调节体过表达 (PD/FMO) 菌株。折叠调节体当存在时编码在第二个质粒上,并由荧光假单胞菌天然甘露醇诱导型启动子驱动表达。如下进行240个宿主菌株筛选转化:将25微升的荧光假单胞菌宿主菌株感受态细胞解冻并转移至96多孔板 Nucleovette®板中,并将10 μ l质粒DNA (10ng) 加入至每孔中。如上文对质粒表达筛选描述的,对细胞进行电穿孔、培养、以HTP形式诱导并收获。

表 6: 选择用于菌株筛选的表达质粒

质粒 ID	RBS 强度	分泌前导体
p743-042	高	无
p743-009	高	Ibp-S31A
p743-017	高	Pbp-A20V
p743-013	高	FlgI
p743-018	高	DsbC
p743-020	高	前导体 C
p743-033	高	前导体 O
p743-034	高	5193
p743-038	高	8484
p743-041	高	AnsB

[0152]

表 7: 用于菌株筛选的宿主菌株 (WT=野生型; PD=蛋白酶缺失; FMO=折叠调节体过表达)

宿主菌株 ID	表型
DC454	WT
DC488	PD
DC489	PD
DC496	PD
DC510	PD
DC1029	PD
DC1084	PD
DC977	PD
DC441	PD
DC549	FMO
PF1201.14	PD/FMO
DC1051	PD
DC1102	PD/FMO
DC1103	PD/FMO
PF1202.11	PD/FMO
PF1345.1	PD/FMO
PF1345.5	PD/FMO
DC1100	PD/FMO
DC1101	PD/FMO
PF1285	PD
PF1332	PD
DC544	FMO
DC974	FMO
DC542	FMO

[0153]

[0154] 荧光假单胞菌天冬酰胺酶缺陷型宿主菌株的构建/基因敲除质粒的构建

[0155] 使用菊天冬酰胺酶蛋白氨基酸序列 (图2) 作为输入,对荧光假单胞菌MB214基因组序列进行BLAST搜索,产生显示显著对齐的两个蛋白编码基因 (pegs) 的输出:peg.3886 (L-天冬酰胺酶EC 3.5.1.1III型,SEQ ID NO:62);E值5e-85和peg.5048 (L-天冬酰胺酶EC 3.5.1.1,SEQ ID NO:61);E值3e-05。每个天然L-天冬酰胺酶基因的克隆缺失构建体是通过合成DNA序列片段而启动,其包含每个基因的上游和下游侧翼区的融合体,仅留下被靶向以进行缺失的基因的起始和终止密码子.Genewiz Inc. (South Plainfield,NJ) 完成序列片段delPEG3886 (1,107bp) 和delPEG5048 (801bp) 的合成,其随后被钝端连接至载体pDOW1261-24的SrfI位点中以分别产生缺失质粒pFNX3970和pFNX3969。

[0156] 天然L-天冬酰胺酶缺陷型宿主菌株的构建

[0157] 使用以下方法在选择的宿主菌株中依次进行每个基因的染色体缺失:将缺失质粒电穿孔至荧光假单胞菌宿主细胞中,其含有在尿嘧啶 (嘧啶) 生物合成中涉及的pyrF基因中的染色体组缺失。缺失质粒包含PyrF编码序列但不能在荧光假单胞菌细胞中复制。将电穿孔的细胞铺板到补充有1%葡萄糖和250ug/mL脯氨酸 (如果宿主菌株是脯氨酸营养缺陷型) 的M9盐琼脂板上。由于将整个缺失质粒在基因组内的两个同源区域之一处重组到染色体中的整合事件,所得克隆能够合成尿嘧啶。为了选择已在整合质粒和染色体之间进行第二次

同源重组并因此留下缺失的细胞,将质粒整合菌株在补充有250ug/mL尿嘧啶和250ug/mL脯氨酸(如果宿主菌株是脯氨酸营养缺陷型)的3mL LB培养基中生长至静止期。然后将细胞铺板到LB尿嘧啶(250ug/mL)加250ug/mL脯氨酸(如果宿主菌株是脯氨酸营养缺陷型)琼脂板上,该琼脂板还包含500ug/mL 5-氟乳清酸(5-FOA) (Zymo Research)。通过重组失去整合质粒的细胞也失去pyrF基因,因此被预期对5-FOA有抗性,否则5-FOA将被转化为阻止细胞生长的有毒化合物。然后挑出在5-FOA(500ug/mL)存在下表现出良好生长的单菌落并将其生长在含有1%葡萄糖、补充有250μg/mL尿嘧啶和250μg/mL脯氨酸(如果宿主菌株是脯氨酸营养缺陷型)的3mL液体M9基本培养基中以产生储存作为甘油储备液和作为诊断性PCR和测序反应的模板的培养物。

[0158] 天然L-天冬酰胺酶基因的染色体缺失的确认

[0159] 利用退火至克隆到敲除质粒中的合成基因缺失序列之外的染色体区域的引物,使用诊断性PCR反应筛选期望的天然L-天冬酰胺酶基因染色体缺失。产生的PCR产物的DNA序列被用于确定期望的天然L-天冬酰胺酶基因缺失已如期发生,而没有不期望的突变或DNA重排。

[0160] 摇瓶中菊天冬酰胺酶表达菌株的生长和表达

[0161] 选择三个菊天冬酰胺酶表达菌株和两个null菌株(荧光假单胞菌野生型菌株DC454null和荧光假单胞菌天然L-天冬酰胺酶I型和II型缺陷型菌株PF1433null)用于摇瓶表达放大试验。null菌株具有缺乏蛋白菊天冬酰胺酶编码序列的表达载体。PF1433(PyrF、AspG1和AspG2缺陷型)是通过在宿主菌株DC454(PyrF缺陷型)中相继缺失aspG2和aspG1基因而构建。

[0162] 将每个表达菌株接种到2mL M9盐1%葡萄糖(Teknova)中。将培养物在30°C振荡孵育24小时。将每种表达菌株的过夜生长培养物的2%接种物在补充有微量元素(Teknova)的2×200mL HTP-YE培养基中进行亚培养。将烧瓶在30°C振荡孵育24小时。诱导前,通过将20μL稀释到980μL水中来记录烧瓶的OD600。将异丙基-β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)加入至每个烧瓶至终浓度0.3mM以诱导菊天冬酰胺酶蛋白的表达。将烧瓶在30°C振荡孵育24小时。对于每个菌株,合并两个培养烧瓶以收获,并记录烧瓶的OD600。诱导后,将400μL在1X PBS中按1:3稀释,然后冷冻用于还原SDS-CGE和另外的分析。对于每个菌株,将约400mL培养物离心(4°C下15,900×g离心30分钟)。记录湿重后,将沉淀物在-80°C冷冻。

[0163] 2L规模的发酵和采样

[0164] 用于2L规模发酵(约1L最终发酵体积)的接种物是通过接种含有600mL的化学确定培养基、补充有酵母提取物和甘油以及所选菌株的冷冻培养储备液的摇瓶而产生。在30°C下振荡孵育16至24小时后,然后将每个摇瓶培养物的相等部分无菌地转移到8单元多重发酵系统的每一个中,其含有设计用于支持高生物量的化学确定培养基。在2L发酵罐中,在甘油补料分批模式中对pH、温度和溶解氧的受控条件下对培养物进行操作。该补料分批高细胞密度发酵过程由生长阶段和之后的诱导阶段组成,一旦培养物达到目标生物量(湿细胞重量),则通过添加IPTG来启动。诱导阶段期间的条件根据实验设计而变化。发酵的诱导阶段允许进行约24小时。从发酵罐中取出分析样品以确定细胞密度(在575nm处的光密度),然后冷冻用于后续分析以确定靶基因表达的水平。在诱导后24小时的最后时间点,通过以15,900×g离心60至90分钟收获每个容器的整个发酵液。分离细胞糊状物和上清液,并将糊状

物保留并在-80℃冷冻。

[0165] 样品制备

[0166] 通过超声处理然后离心来制备可溶级分。将培养液样品(400μL)用带有24个探针尖角的细胞裂解自动超声处理系统(CLASS, Scinomix)在以下设置下超声处理:每孔20脉冲,每个脉冲10秒,60%功率,每个脉冲之间10秒(Sonics Ultra-Cell)。将裂解物在5,500×g下离心15分钟(4℃)并收集上清液(可溶级分)。

[0167] SDS-CGE分析

[0168] 使用带有HT蛋白表达芯片和相应试剂(分别为部件号760528和CLS760675, PerkinElmer)的LabChip GXII仪器(PerkinElmer),通过微芯片SDS毛细管凝胶电泳分析蛋白样品。按照制造商方案(Protein User Guide Document No.450589, Rev.3)制备样品。简而言之,在96孔聚丙烯锥形孔PCR板中,将4μL样品与14μL样品缓冲液和70mM DTT还原剂混合,在95℃加热5分钟并且通过加入70μL DI水来稀释。Null菌株裂解物与测试样品平行运行。LabChip GX v.4.0.1425.0用于分析数据并产生凝胶状图像。

[0169] SDS-PAGE分析

[0170] SDS-PAGE分析用于确定天冬酰胺酶的身份和纯度。将测试样品用PBS和上样缓冲液加25mM DTT稀释,然后在70℃加热10分钟。将样品以2或4μg/孔加载到12%Bis-Tris凝胶上。将样品在200V恒定电压下用1x MOPS运行缓冲液分离,直至染料前沿向下迁移凝胶长度(约1小时)。电泳后,具有1或2μg/孔的凝胶用Oriole荧光凝胶染料(Bio-Rad)染色1小时,具有4μg/孔加载的凝胶用GelCode Blue(ThermoFisher)染色过夜。染色后,将荧光染色凝胶转移到水中,然后使用GelDoc EZ系统(Bio-Rad)成像。将蓝色染色凝胶转移到水中脱色约1.5至2小时,然后使用GelDoc EZ成像。

[0171] 蛋白质印迹

[0172] 蛋白质印迹用于确定天冬酰胺酶的身份。将测试样品用PBS和具有还原剂DTT的上样缓冲液稀释,然后在70℃下加热10分钟。然后将样品以1μg/孔的量加载并在12%Bis-Tris凝胶上分离,与SDS-PAGE运行条件相同。电泳后,将蛋白质在25V、125mA的条件下转移到硝酸纤维素膜上90分钟。阻断剂酪蛋白(Thermo)用于在2-8℃阻断过夜,然后用PBST(Sigma)洗涤3次。然后将膜与兔抗菊天冬酰胺酶多克隆抗体在室温、50rpm下一起孵育1小时,所述兔抗菊天冬酰胺酶多克隆抗体在9份PBST和1份阻断剂酪蛋白中1:5000稀释。三次PBST洗涤后,将与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的山羊抗兔IgG在9:1PBST:酪蛋白溶液中以1:5000稀释,并在室温、50rpm下孵育1小时。在再洗涤三次后,通过添加DAB底物(ThermoFisher)揭示抗原-抗体复合物。在条带清晰可见后,通过转移膜到水中来终止反应,并且使用GelDoc EZ成像系统(Bio-Rad)对膜进行成像。

[0173] SE-HPLC

[0174] 用于样品的SE-HPLC在配备有DAD UV检测器的Agilent Technologies 1100HPLC系统上进行。流动相是50mM磷酸钠、200mM NaCl pH 7.0。将原料药产品在1×PBS中稀释至1mg/mL,允许50μg的每个样品上样到具有Phenomenex SEC-s4000HPLC保护盒的Phenomenex BioSep SEC s4000(7.8mm ID×300mm, 5μm)HPLC分析柱上。在215nm处以1.0mL/min的流速监测UV吸光度。柱和样品温度未加控制,总运行时间18分钟。使用OpenLab软件计算面积%纯度。使用标准切线撇取(skim)模式和用于所有撇取积分事件的零值进行峰积分。基线校

正设置为无突破,峰谷比为500。初始积分事件包括斜率灵敏度为1、峰宽为0.25、面积拒绝为1、高度拒绝为10和肩峰积分设置为DROP。从0至7分钟和从11.15分至运行结束,积分被抑制。基线也设置为第9分钟的基线保持。

[0175] 靶蛋白的完整质量分析

[0176] 在通过液相色谱偶联质谱(LC-MS)进行完整质量分析之前,将可溶裂解物样品过滤/脱盐至PBS中。已通过一或两个柱步骤纯化的样品不加水运行。

[0177] 使用偶联至带有电喷雾接口的Q-Tof微型质谱仪(Waters Xevo)的互联自动进样器、柱加热器、UV检测器和HPLC(Waters Acquity),对样品进行LC-MS分析。使用装有保护柱(Zorbax 5 μ m, 300SB-CN, 4.6 $\times$ 12.5mm, Agilent)的CN柱(Zorbax 5 μ m, 300SB-CN, 2.1 $\times$ 150mm, Agilent)在50 $^{\circ}$ C进行分离。所用的HPLC缓冲液是缓冲液A(0.1%甲酸)和缓冲液B(100%乙腈0.1%甲酸)。使用通用梯度。在5%缓冲液B和95%缓冲液A下上样后,蛋白质样品以0.2mL/min进行以下反相梯度:将柱进行5-60%B梯度45分钟,然后是60%至95%B的2分钟梯度,然后是95%B 3分钟,以5%B 5分钟结束(60分钟总方法时间)。

[0178] 在MS之前,从180-500nm收集UV吸收。MS源以正向使用。MS扫描使用600-2600m/z范围进行,每秒2次扫描。使用MassLynx软件(Waters)分析MS和UV数据。产生MS总离子流(TIC)色谱图的UV色谱图。加合目标峰的MS谱图。在每通道1Da的分辨率下,对30,000-40,000的分子量范围,使用MaxEnt 1(Waters)扫描对这些光谱进行去卷积。

[0179] 实施例3:96孔形式的菊天冬酰胺酶Tier 1表达质粒筛选

[0180] 对于表达质粒筛选,如实施例2中所述设计和合成了用于在荧光假单胞菌中表达的优化的菊天冬酰胺酶蛋白编码序列(图2)。构建携带优化的菊天冬酰胺酶基因的质粒,该基因与37种不同的荧光假单胞菌分泌前导体和两个核糖体结合位点(RBS)亲和力融合(表5)。构建另外的质粒以表达不带周质前导体的菊天冬酰胺酶蛋白,以将菊天冬酰胺酶蛋白定位在细胞质内。代表性质粒地图(p743-042)显示在图3中。靶标的表达是从Ptac启动子驱动,翻译是从高活性核糖体结合位点(RBS)开始。将所得40种质粒转化到两种荧光假单胞菌宿主菌株DC454(WT)和DC441(PD)中,以产生80种表达菌株用于Tier 1(表达策略)筛选。表达策略的分等是基于SDS-CGE估计的菊天冬酰胺酶单体的滴度。

[0181] 如实施例2所述,将来自80种转化的所得培养物(40种表达策略 $\times$ 2种宿主菌株)生长在96孔板中。在通过SDS-CGE分析诱导后24小时收获来自全肉汤培养物的超声级分样品。对与菊天冬酰胺酶单体的预期分子量(35kDa)一致的诱导的蛋白质的表达进行定量,其也与大肠杆菌L-Asp(Sigma Product)一起迁移。通过将诱导条带与大肠杆菌L-Asp标准曲线进行比较,完成了还原样品的SDS-CGE定量分析。基于估计的可溶菊天冬酰胺酶单体滴度,对来自DC454和DC441宿主菌株两者的20种最高出产的样品进行了分级(表8)。图1显示了SDS-CGE凝胶状图,其是从96孔培养物可溶超声样品的分析产生。表8显示了诱导后24小时(I24)滴度,如通过还原可溶超声物的SDS-CGE分析(单次重复)来评估的和通过用于DC454(表左侧)和DC441(表右侧)宿主菌株中表达的质粒的Labchip $^{\circledR}$ 内部梯来定量的。还显示了由每个p743表达质粒产生的分泌前导体融合。

表 8: 来自 Tier 1 筛选的前 20 种表达菌株(**在来自宿主菌株两者的前 10 种最高出产的质粒中观察到的六种分泌前导体)

菌株 ID (DC454 宿主)	质粒	分泌前导 体	I24 可溶 ($\mu\text{g/mL}$)	菌株 ID (DC441 宿主)	质粒	分泌前导 体	I24 可溶 ($\mu\text{g/mL}$)
STR55337	p743-001	无	1482	STR55429	p743-013	FlgI**	1523
STR55349	p743-013	FlgI**	1314	STR55417	p743-001	无	1369
STR55369	p743-033	前导体 O	969	STR55424	p743-008	Lao	1329
STR55374	p743-038	8484**	966	STR55442	p743-026	PorE	1136
STR55356	p743-020	前导体 C**	852	STR55434	p743-018	DsbC**	946
STR55354	p743-018	DsbC**	832	STR55436	p743-020	前导体 C**	727
STR55345	p743-009	Ibp-S31A **	810	STR55454	p743-038	8484**	639
STR55370	p743-034	5193**	674	STR55425	p743-009	Ibp-S31A**	600
STR55347	p743-011	Tpr	657	STR55450	p743-034	5193**	532
STR55348	p743-012	Ttg2C	567	STR55432	p743-016	Pbp	525
STR55371	p743-035	前导体 P	439	STR55427	p743-011	Tpr	492
STR55351	p743-015	CupB2	433	STR55449	p743-033	前导体 O	477
STR55346	p743-010	TolB	431	STR55428	p743-012	Ttg2C	384
STR55360	p743-024	前导体 G	279	STR55426	p743-010	TolB	363
STR55359	p743-023	前导体 F	273	STR55435	p743-019	前导体 B	342
STR55340	p743-004	DsbA	270	STR55431	p743-015	CupB2	248
STR55355	p743-019	前导体 B	249	STR55433	p743-017	PbpA20V	225
STR55353	p743-017	PbpA20V	239	STR55451	p743-035	前导体 P	223
STR55373	p743-037	前导体 R	223	STR55420	p743-004	DsbA	222
STR55350	p743-014	CupC2	220	STR55452	p743-036	前导体 Q	190

[0182] 在来自 DC454 和 DC441 宿主菌株两者的前 10 种最高出产的表达菌株中观察到的六种质粒和引入的分泌前导体 (p743-013 (FlgI 前导体)、p743-038 (8484)、p743-020 (LolA)、p743-018 (DsbC)、p743-009 (Ibp-S31A) 和 p743-034 (5193)) 在表 8 中用 ** 标记。此外,设计用于菊天冬酰胺酶蛋白的细胞质表达的 p743-001 表达质粒分等在两种宿主的前 2 个最高可溶产率中。从结合两种宿主菌株来看,前 10 个最高可溶滴度范围为 525 至 1523 $\mu\text{g/mL}$ 。对于使用 p743-013 质粒的所有观察到有达到 230 $\mu\text{g/mL}$ 的最高不溶产率的表达,不溶产率较低。SDS-CGE 条带模式的观察 (图 1) 显示,使用 p743-013、p743-033 (前导体 O)、p743-038、p743-009 和 p743-018 表达质粒,发生最完整的分泌前导体加工 (在输出至周质后去除),而观察到 p743-016 和 p743-017 质粒产生明显的较低分子量截短产物。基于 SDS-CGE 估计的高可溶滴度,选择表 6 中所示的 10 种表达质粒用于 96 孔 HTP 规模的后续宿主菌株筛选。然后将十种选择的表达策略与 24 种独特的宿主菌株组合,其可以进一步影响菊天冬酰胺酶蛋白滴度和质量。

[0184] 实施例 4: 96 孔形式的菊天冬酰胺酶 Tier 2 宿主菌株筛选

[0185] 在 Tier 1 表达策略筛选中鉴定的 10 种选择的菊天冬酰胺酶表达策略或质粒各自转化到 24 种荧光假单胞菌宿主菌株 (表 7) 中,其包括 11 种蛋白酶缺失 (PD) 菌株、8 种蛋白酶缺失加折叠调节体过表达 (PD/FMO) 菌株、4 种 FMO 菌株和一个野生型菌株,以产生 240 种表达菌株。折叠调节体当存在时编码在第二个质粒上,并且表达是由荧光假单胞菌天然甘露醇诱导型启动子驱动。选择 24 种宿主菌株的集合以减少蛋白水解降解和/或提升蛋白溶解度。在表达策略筛选中用作两种宿主菌株的 DC454 (WT) 和 DC441 (PD) 菌株也包括在 24 种宿主菌株筛选中。

[0186] 如实施例 2 所述,携带 10 种选择的菊天冬酰胺酶表达质粒中的每一个的 24 种宿主菌株 (总共 240 种表达菌株) 以 96 孔形式 (HTP) 一式两份生长。诱导后 24 小时收获的样品通过

SDS-CGE进行分析以检测和定量可溶和不溶菊天冬酰胺酶蛋白表达。通过SDS-CGE筛选还原可溶和不溶级分,对所有240种菌株进行单一重复。SDS-CGE检测到与大肠杆菌L-Asp标准(Sigma)共迁移的诱导条带,并且从大肠杆菌L-Asp标准曲线中插入相对滴度。表9列出了15个样品,其显示出最高的估计的菊天冬酰胺酶全细胞(可溶加不溶)单体滴度,范围为1,453至2,362 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0187] 表9显示了单一HTP生长复制的SDS-CGE筛选结果。每行标识了菊天冬酰胺酶表达菌株ID、所用宿主菌株、宿主菌株表型(PD=蛋白酶缺失;FMO=折叠调节体过表达)和所用表达质粒。报告的滴度是基于与大肠杆菌L-Asp(Sigma)标准曲线的比较,并基于全细胞(可溶加不溶)菊天冬酰胺酶蛋白估计的滴度进行排序。

表 9. 来自 Tier 2 筛选的前 15 种表达菌株

				还原 HTP 超声物的 SDS-CGE		
				可溶	不溶	全细胞
菌株 ID	宿主菌株	表型	质粒	I24 ($\mu\text{g/mL}$)	I24 ($\mu\text{g/mL}$)	I24 ($\mu\text{g/mL}$)
STR55876	DC1100	PD/FMO	p743-038	1903	459	2362
STR55880	DC1101	PD/FMO	p743-017	1746	383	2130
STR55871	DC1100	PD/FMO	p743-013	1723	367	2090
STR55978	PF1433	WT	p743-042	1723	361	2084
STR55901	PF1332	PD	p743-013	1432	588	2020
STR55891	PF1285	PD	p743-013	1504	451	1955
STR55896	PF1285	PD	p743-038	1092	680	1772
STR55906	PF1332	PD	p743-038	1290	464	1754
STR55881	DC1101	PD/FMO	p743-013	1391	355	1746
STR55872	DC1100	PD/FMO	p743-018	1233	380	1613
STR55895	PF1285	PD	p743-034	934	595	1529
STR55905	PF1332	PD	p743-034	824	677	1501
STR55869	DC1100	PD/FMO	p743-009	1480	0	1480
STR55736	DC496	PD	p743-038	1071	391	1461
STR55892	PF1285	PD	p743-018	749	704	1453

[0189] 菌株STR55978在野生型荧光假单胞菌宿主菌株背景中携带胞质菊天冬酰胺酶表达质粒p743-042,该菌株含有天然L-天冬酰胺酶1型和2型的染色体缺失(PF1433宿主菌株)。菌株STR55901、STR55891、STR55896和STR55906是从携带p743-013或p743-038表达质粒的PF1285(PD)或PF1332(PD)宿主菌株构建。基于观察到的高可溶和总菊天冬酰胺酶滴度,将这四种菌株重建为天然L-天冬酰胺酶缺陷型版本。选择STR55978菊天冬酰胺酶表达菌株用于2L发酵规模的筛选诱导条件,该菌株在L-天冬酰胺酶缺陷型宿主菌株PF1433中的质粒p743-042中表达野生型菊天冬酰胺酶。

[0190] 实施例5:菊天冬酰胺酶摇瓶表达

[0191] 在将选择的表达质粒p743-042、p743-033和p743-038转化到天冬酰胺酶缺陷型宿主菌株PF1433中以分别产生表达菌株STR55978、STR55979和STR55980后,进行摇瓶表达(200mL)。摇瓶表达工作与天冬酰胺酶缺陷型菊天冬酰胺酶表达宿主菌株的构建(参见实施例4)平行完成,以评估从荧光假单胞菌染色体中使内源性天冬酰胺酶基因缺失是否产生可观察到的生长惩罚。此外,从摇瓶样品产生的裂解物用于初始活性分析和通过LC-MS分析进

行的完整质量的确认。表10显示了从摇瓶表达分析产生的还原可溶或不溶超声物的SDS-CGE分析结果。

[0192]

表 10: 摇瓶表达结果					
菌株	质粒	平均可溶还原 ($\mu\text{g/ml}$)	%CV	平均不溶还原 ($\mu\text{g/ml}$)	%CV
STR55978	p743-042	1464	7	181	30
STR55979	p743-033	743	13	195	42
STR55980	p743-038	908	2	180	48

[0193] 表10显示了通过使用在200mL工作体积摇瓶规模下分析的PF1433宿主菌株(天然天冬酰胺缺陷型野生型菌株)构建的三种菊天冬酰胺酶表达菌株的可溶和不溶超声物级分(十个不同重复)的SDS-CGE分析确定的平均估计滴度。基于与大肠杆菌L-Asp(Sigma)标准曲线的比较,估计SDS-CGE滴度。从每种菌株的可溶和不溶超生物分析两者获取的SDS-CGE凝胶状图像如图4所示。

[0194] 分析中包括来自两种null菌株的摇瓶生长:STR55982和DC432。DC432菌株在野生型荧光假单胞菌宿主菌株中携带质粒pDOW1169,其不包含菊天冬酰胺酶编码区。STR55982在宿主菌株PF1433中携带质粒pDOW1169,其包含天然天冬酰胺酶编码序列两者的染色体缺失。所有三种菊天冬酰胺酶表达菌株均主要产生可溶菊天冬酰胺酶蛋白表达,菌株STR55978实现高达14g/L的最高可溶滴度。此外,没有观察到生长惩罚,因为当与STR55982和DC432null菌株(其给出诱导后24小时分别为21.7和23.7的 OD_{600})相比时,所有三种菊天冬酰胺酶表达菌株在诱导后24小时达到相似细胞密度($\text{OD}_{600}=23.0$ 、27.0和27.8)。

[0195] 使用购自Sigma的商业试剂盒(天冬酰胺酶活性测试试剂盒),根据制造商的说明书分析了从五种摇瓶表达菌株各自产生的可溶超声物样品的天冬酰胺酶活性。该试剂盒使用偶联酶反应测量活性,其产生与产生的天冬氨酸成比例的比色最终产物。将从Sigma获得的II型大肠杆菌天冬酰胺酶掺入STR55982null裂解物中作为阳性对照(表11最后一行)。

[0196] 活性结果显示于表11中。

[0197]

表 11. 摇瓶培养物超声物样品的天冬酰胺酶活性测试						
样品描述	质粒 ID	样品 ID	天冬酰胺酶滴度 (mg/ml)*	样品稀释因子	产生的天冬氨酸 (nmol)	ΔA570 (TF-T0) 20 min
细胞质地表达的菊天冬酰胺酶	p743-042	STR55978	0.29	25,000	0.89	0.04
前导体 O-菊天冬酰胺酶	p743-033	STR55979	0.15	25,000	0.86	0.04
8484 前导体-菊天冬酰胺酶	p743-038	STR55980	0.18	25,000	0.88	0.04
L-Asp-null	空质粒	STR55982	0.00	25,000	0.00	0.00
L-asp+null	空质粒	DC432	0.00	25,000	0.00	0.00
Null 掺入至 250 $\mu\text{g/ml}$ **	N/A	L-Asp2 Sigma	0.25	25,000	0.53	0.03
*通过 SDS-CGE 确定						
**Sigma-A3809 <i>E. coli</i> AspG2 掺入到 STR55982 (AspG 缺陷型 Null) 裂解物中						

[0198] 尽管两个null样品在1:25000稀释因子下均显示不可测量的活性,但来自菌株STR55978、STR55979和STR55980的1:25000稀释的可溶超声物样品显示出的活性与掺有来

自Sigma的250 μ g/mL大肠杆菌天冬酰胺酶的类似稀释的STR55982null菌株样品相当。使用可商购试剂盒的这些活性结果表明在荧光假单胞菌中表达的菊天冬酰胺酶蛋白可以很容易地在产生的超声物内形成有活性的四聚体天冬酰胺酶。

[0199] 表12显示LC-MS完整质量,其是通过分析摇瓶中菌株STR55978、STR55979和STR55980产生的可溶超声物中的菊天冬酰胺酶蛋白而得出。来自每种菌株的菊天冬酰胺酶蛋白的观察到的分子量(35,053Da)与理论分子量(35054.2Da)一致,表明所有三种菌株都产生预期的氨基酸序列并完整加工或去除分泌前导体(如果存在)。分析Sigma大肠杆菌L-Asp作为对照。图7显示了STR55978的质谱读出结果。

表 12. 摇瓶培养物超声物样品的 LC-MS 分析				
样品名	理论 MW (Da) - 信号	观察到的 MW (Da)	观察-理论 MW (Da)	
菊天冬酰胺酶 STR55978	35054.2	35053		-1.2
菊天冬酰胺酶 STR55979		35053		-1.2
菊天冬酰胺酶 STR55980		35053		-1.2
Sigma L-Asp A3809	34591.96	34591	-0.96	

[0201] 实施例6:2L发酵评估

[0202] 以实验设计(DOE)形式在八种不同发酵诱导条件下评估胞质表达菌株STR55978,其是内源性天冬酰胺酶缺陷型菌株。变化的条件包括WCW(g/g)、IPTG浓度、诱导时的pH和温度。该部分分析因DOE中靶向的诱导设定点包括0.2-0.4g/g湿细胞重量的细胞密度、0.08-0.2mM IPTG、6.5-7.2的诱导后pH和25-32°C的诱导后培养温度。每种条件下通过湿细胞重量测量的生长显示于图5。可溶菊天冬酰胺酶的滴度范围为10-24g/L或20-40%总细胞蛋白(表13)。通过还原可溶SDS-CGE测量的重组菊天冬酰胺酶表达显示于图6。

表 13: STR55978 2 升发酵的菊天冬酰胺酶蛋白表达的总结

Expt Unit	菌株(条件)	8 小时诱导滴度 (mg/L)	24 小时诱导滴度(mg/L)	诱导后 24 小时的 A575	诱导后 24 小时的总细胞蛋白质 (mg/L)	24 小时诱导滴度 (%TCP)
1	STR55978 (1)	9068	10116	176	48400	20.9
2	STR55978 (2)	12594	19072	230	63250	30.2
3	STR55978 (3)	4952	15895	234	64350	24.7
4	STR55978 (4)	9610	20703	272	74800	27.7
6	STR55978 (6)	16691	22488	220	60500	37.2
7	STR55978 (7)	11365	23301	230	63250	36.8
8	STR55978 (8)	11371	23756	222	61050	38.9

[0203]

表 14. 所列序列的表

序列		SEQ ID NO:
欧氏杆菌菊天冬酰胺酶氨基酸	ADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEV KKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVIT HGTDTVEESAYFLHLTVKSDKPVVFVAAMRPATAISADGPMNLLEA VRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNASTLDTFKANEEGY LGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVDVRGLTSLPKVDILYGYQDDP EYLYDAAIQHGKGIYVAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRS TRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKVIE YFHTY	1
针对荧光假单胞菌优化的核酸序列, 其编码 SEQ ID NO: 1 的欧氏杆菌菊天冬酰胺酶	GCAGACAAACTCCCTAACATCGTAATCCTCGCAACTGGTGGTACCA TCGCAGGCAGCGCCGCCACCGGCACGCAGACCACTGGCTACAAGGC CGGCGCGCTGGGCGTAGACACGCTGATCAACGCCGTCCCGGAAGTG AAGAACTGGCCAACGTCAAGGGTGAGCAATTCTCCAACATGGCCA GCGAGAACATGACTGGCGATGTGGTACTGAAGCTCTCGCAGCGCGT GAACGAACTGCTCGCCCGCGACGACGTGGACGGCGTGGTGATCACC CACGGCACTGATACCGTCAAGAGTCGGCGTACTTTCTCCACCTGA CCGTGAAGTCCGATAAGCCCGTGGTGT'TGTGCGCCGCGATGCGCCC GGCGACCGCCATCAGCGCCGACGGGCGGATGAATCTGTTGGAAGCC GTGCGCGTGGCGGGTGACAAGCAAAGCCGCGGTGCGGGCGTAATGG TCGTCCTGAACGATCGGATCGGTAGCGCGCGGTACATCACCAAGAC GAACGCCTCCACGCTGGACACCTTCAAGGCGAACGAAGAGGGGTAC CTGGGGGTGATCATTGGCAATCGTATCTATTACCAGAACCGCATCG ACAAGCTGCACACCACCCGCTCGGTGTTTCGACGTGCGCGGTCTGAC TAGCCTGCCCCAAGGTCGACATCCTGTACGGCTACCAAGACGACCCG GAGTACCTCTACGACGCGCGGATCCAGCATGGCGTGAAGGGCATCG TCTACGCCGGTATGGGTGCCGGCTCGGTGTCGGTCCGCGGCATCGC GGGTATGCGCAAGGCCATGAGAGAAAGCGTGCTCGTGATTTCGCTCG ACCCGGACTGGCAATGGCATCGTACCGCCCGATGAAGAACTCCCGG GGCTCGTGAGCGATAGCCTCAACCCCGCGCACGCGCGGATCCTGCT GATGCTGGCGCTCACGCGGACCAGCGACCCCAAGGTCATTCAAGAG TACTTCCACACCTAC	2
DsbA 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MRNLILSAALVTASLFGMTAQA	3
DsbA 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGCGTAATCTGATCCTCAGCGCCGCTCTCGTCACTGCCAGCCTCT TCGGCATGACCGCACAAAGCT	4
Azurin 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MFAKLVAVSLLTLASGQLLA	5
Azurin 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGTTTGCCAAACTCGTTGCTGTTTCCCTGCTGACTCTGGCGAGCG GCCAGTTGCTTGCT	6
LAO 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MQNYKKFLLAADVSMAFSATAMA	7
LAO 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGCAGAACTATAAAAAATTCCTTCTGGCCGCGCCGTCTCGATGG CGTTCAGCGCCACGGCCATGGCA	8
Ibp-S31A 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MIRDNRLKTSLLRGLTLTLLSLTLLSPAHA	9

[0204]

[0205]

Ibp-S31A 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGATCCGTGACAACCGACTCAAGACATCCCTTCTGCGCGGCCTGACCTCACCCTACTCAGCCTGACCCTGCTCTCGCCCCGCGGCCATGCC	10
TolB 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MRNLLRGMLVVICCMAGIAAA	11
TolB 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGAGAAACCTTCTTCGAGGAATGCTTGTCGTTATTTGCTGTATGGCAGGGATAGCGGCGGCC	12
Tpr 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MNRSSALLLAFVFLSGCQAMA	13
Tpr 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGAATAGATCTTCCGCGTTGCTCCTCGCTTTTGTCTTCCTCAGCGGCTGCCAGGCCATGGCC	14
Ttg2C 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MQNRTVEIGVGLFLLAGILALLLLALRVSGLSA	15
Ttg2C 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGCAAAACCGCACTGTGGAAATCGGTGTCGGCCTTTTCTTGCTGGCTGGCATCCTGGCTTTACTGTTGTTGGCCCTGCGAGTCAGCGGCCTTTCGGCC	16
FlgI 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MKFKQLMAMALLLSAVAQA	17
FlgI 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGAAGTTCAAACAGCTGATGGCGATGGCGCTTTTGTGTCCTTGA GCGCTGTGGCCAGGCC	18
CupC2 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MPPRSIAACLGLLGLLMATQAAA	19
CupC2 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGCCGCTCGTTCTATCGCCGATGTCTGGGGCTGCTGGGCTTGC TCATGGCTACCCAGGCCGCCGCC	20
CupB2 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MLFRTL LASLTF AVIAGLPSTAHA	21
CupB2 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGCTTTTTTCGCACATTACTGGCGAGCCTTACCTTTGCTGTCATCG CCGGCTTACCGTCCACGGCCACGCG	22
Pbp 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MKLKRLMAAMTFVAAGVATANAVA	23
Pbp 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGAAACTGAAACGTTTGATGGCGGCAATGACTTTTGTGCTGCTG GCGTTGCGACCGCCAACGCGGTGGCC	24
PbpA20V 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MKLKRLMAAMTFVAAGVATVNAVA	25
PbpA20V 分泌前导体核酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGAAACTGAAACGTTTGATGGCGGCAATGACTTTTGTGCTGCTG GCGTTGCGACCGTCAACGCGGTGGCC	26
DsbC 分泌前导体氨基酸序列 (荧光假单胞菌)	MRLTQIIAAAAIALVSTFALA	27

[0206]

胞菌)		
DsbC 分泌前导核 酸序列 (荧光假单胞 菌)	ATGCGCTTGACCCAGATTATTGCCGCCGAGCCATTGCGTTGGTTT CCACCTTTGCGCTCGCC	28
PorE 分泌前导氨基 酸序列 (荧光假单胞 菌)	MKKSTLAVAVTLGAIAQQAGA	29
PorE 分泌前导核 酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGAAGAAGTCCACCTTGGCTGTGGCTGTAACGTTGGGCGCAATCG CCCAGCAAGCAGGCGCT	30
5193 分泌前导氨基 酸序列 (荧光假单胞 菌)	MQSLPFSALRLLGLVAVMVCVLLTTPARA	31
5193 分泌前导核 酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGCAAAGCCTGCCGTTCTCTGCGTTACGCCTGCTCGGTGTGCTGG CAGTCATGGTCTGCGTGCTGTTGACGACGCCAGCCCGTGCC	32
8484 分泌前导氨基 酸序列 (荧光假单胞 菌)	MRQLFFCLMLMVSLTAHA	33
8484 分泌前导核 酸序列 (荧光假单胞菌)	ATGCGACAACATTTTTTCTGTTTGATGCTGATGGTGTGCTCACGG CGCACGCC	34
FlgI-菊天冬酰胺酶 氨基酸	MKFKQLMAMALLLALSAVAQAADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQ TTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVL KLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVVF VAAMRPATAISADGPMNLLAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSA RYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTRSVF DVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGKGI VYAGMGAGSV SVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRTGNGI VPPDEELPGLVSDSLNPA HARILLMLALTRTSDPKVIEYFHTY	35
8484-菊天冬酰胺酶 氨基酸	MRQLFFCLMLMVSLTAHAADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTG YKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLS QRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVVFVA MRPATAISADGPMNLLAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYI TKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTRSVFDVR GLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGKGI VYAGMGAGSVSVR GIAGMRKAMEKGVVIRSTRTGNGI VPPDEELPGLVSDSLNPAHAR ILLMLALTRTSDPKVIEYFHTY	36
DsbC-菊天冬酰胺酶 氨基酸	MRLTQIIAAAAIALVSTFALAADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQ TTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVL KLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVVF VAAMRPATAISADGPMNLLAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSA RYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTRSVF DVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGKGI VYAGMGAGSV SVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRTGNGI VPPDEELPGLVSDSLNPA HARILLMLALTRTSDPKVIEYFHTY	37
Ibp-S31A-菊天冬酰胺 酶氨基酸	MIRDNRKTSLLRGLTLLSLTLLSPAHAADKLPNIVILATGGT IAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMA SENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHL TVKSDKPVVFVAAMRPATAISADGPMNLLAVRVAGDKQSRGRGVM VVLNDRIGSARYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNR IDKLHTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGKGI VYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRTGNGI VPPDEELP GLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKVIEYFHTY	38
5193-菊天冬酰胺酶 氨基酸	MQSLPFSALRLLGLVAVMVCVLLTTPARAADKLPNIVILATGGTIA GSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASE NMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTV KSDKPVVFVAAMRPATAISADGPMNLLAVRVAGDKQSRGRGVMV LNDRIGSARYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDK	39

[0207]

	LHTTRSVFVDRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRGTNGI VPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKV IQEYFHTY	
Tpr-菊天冬酰胺酶氨基酸	MNRSSALLLAFVFLSGCQAMAADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVFVAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNA STLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRGTNGI VPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKV IQEYFHTY	40
Ttg2C-菊天冬酰胺酶氨基酸	MQNRTVEIGVGLFLLAGILALLLALRVSGLSAADKLPNIVILATGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVFVAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNA STLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFVDRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRGTNGI VPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKV IQEYFHTY	41
CupB2-菊天冬酰胺酶氨基酸	MLFRTLLASLTFAVIAGLPSTAHADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVFVAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNA STLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRGTNGI VPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKV IQEYFHTY	42
TolB-菊天冬酰胺酶氨基酸	MRNLLRGM LVVICMAGIAAADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVFVAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNA STLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRGTNGI VPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKV IQEYFHTY	43
DsbA-菊天冬酰胺酶氨基酸	MRNLILSAALVTASLFGMTAQAADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVFVAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNA STLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRGTNGI VPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKV IQEYFHTY	44
PbpA20V-菊天冬酰胺酶氨基酸	MKLKRLMAAMTFVAAGVATVNAVAADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVFVAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNA STLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRGTNGI VPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKV IQEYFHTY	45
CupC2-菊天冬酰胺酶氨基酸	MPPRSIAACGLGLLLMATQAAAADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVFVAAMRPATAISADGPMNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSARYITKTNA STLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRGTNGI VPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKV IQEYFHTY	46
Lao-菊天冬酰胺酶氨基酸	MQNYKKFLLAAAVSMAFSATAMAADKLPNIVILATGGTIAGSAATG	47

[0208]

氨基酸	TQTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDV VLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPV VFVAAMRPATAISADGPMNLLAEVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIG SARYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRS VFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIYAGMGAG SVSVIRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLN PAHARILLMLALTRTSDPKVIEYFHTY	
PorE-菊天冬酰胺酶 氨基酸	MKKSTLAVAVTLGAIAQQAGAADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQ TTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVL KLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVVF VAAMRPATAISADGPMNLLAEVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIGSA RYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVF DVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIYAGMGAGSV SVIRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLNPA HARILLMLALTRTSDPKVIEYFHTY	48
Pbp-菊天冬酰胺酶氨 基酸	MKLKRLMAAMTFVAAGVATANAVAADKLPNIVILATGGTIAGSAAT GTQTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGD VVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPV VFVAAMRPATAISADGPMNLLAEVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDRIG SARYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSV FDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIYAGMGAGSV SVIRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLNPA HARILLMLALTRTSDPKVIEYFHTY	49
共有 RBS (高结合强 度)	AGGAGG	50
RBS2	GGAGCG	51
RBS34	GGAGCG	52
RBS41	AGGAGT	53
RBS43	GGAGTG	54
RBS48	GAGTAA	55
RBS1	AGAGAG	56
RBS35	AAGGCA	57
RBS49	CCGAAC	58
Skp (OmpH RXF4702.1)	MRKLTQLVLLATVLVTTTFAEMKIAVLNYQMALLESDAAKRYAVD AEKKFGPQLTKLKTLLESSAKGIQDRLVAGGDKMQQGERERLELEFK QKARDYQFQSKELNEAKAVADREMLKQLKPKLDSAVEEVIKKGAFFD LVFERGAVIDVKPQYDITRQVIERMNQLK	59
Skp (ompH) RXF04702.1 核酸序列 (荧光假单 胞菌)	GTGCGTAAGTTGACTCAATTGGTCTTGCTGGCCACTGTGCTGGTCA CCACCCCGGCCTTCGCCGAAATGAAATCGCCGTTCTGAACATATCA GATGGCCCTGCTGGAATCCGATGCGGCCAAGCGATACGCCGTGGAT GCCGAGAAGAAGTTCCGTCGCAACTGACCAAGCTCAAGACACTGG AAAGCAGCGCCAAAGGCATCCAGGACCGCCTGGTAGCCGGTGGCGA CAAGATGCAGCAAGCGAGCGCGAGCGTCTGGAGCTTGAATTCAAG CAAAAGGCCCGTGACTACCAGTTCCAATCCAAGGAGCTGAACGAAG CCAAGGCTGTGGCCGACCGCGAAATGCTCAAGCAGCTCAAGCCTAA ATTGGACAGCGCTGTGGAAGAAGTCATCAAGAAGGGTGCCTTTGAC CTGGTGTTCGAGCGTGGCGCCGTGATCGACGCTCAAGCCTCAATACG ACATCACCCGCCAGGTGATCGAGCGCATGAACCAGCTGAAGTGA	60
AspG1 (荧光假单胞 菌; RXF08567; peg5048)	MQSANNVMVLYTGGTIGMQASANGLAPASGFVVRMREQFAGADLPA WRFQEMSP LIDSANMNPAYWQRLRSVAVVEAVDAGCDAVLILHGTDT LAYSAAAMSFQLLGLPAPVVF TGSMLPAGVPDSDAWENVSGALTAL GEG LKPGVHLYFHGALMAPTRCAKIRSFGRNPFALQRNGGVALAD KLPAALAYRNDKAPANVGVLPLVPGIAAAQLDALIDSGIQALVLEC FGSGTGPSDNPAFLASLKRAQDQEVVVVAITQCHEGGVELDVYEAG SRLRSVGVLSGGGMTRAAFGKLNALIGAGLDSAEIRRLVELDLGCG ELS	61
AspG2 (荧光假单胞 菌; RXF05674;	MKSALKNVI PGALALLLLFPVAAQAKEVESKTKLSNVVILATGGTI AGAGASAANSATYQAAKVGIEQLIAGVPELSQIANVRGEQVMQIAS	62

	peg3886)	ESINNENLLQLGRRVAELADNKDVGIVITHGTDLTLEETAYFLNLV EKTDKPIVVVGSMRPGTAMSADGMLNLNAVAVAGSKEARGKGVLV TMNDEIQSGRDVSKMINIKTEAFKSPWGPMPGMVVEGKSYWFRLLPAK RHTMDSEFDIKTIKSLPDVEIAYGYGNVSDTAYKALAQAGAKAI IH AGTGNGSVSSKVV PALVELRKQGVQI IRSSHVNAGGMVLRNAEQPD DKYDWVAALDLNFPQKARILAMVALTKTQDSKELQRI FWEY	
[0209]	针对荧光假单胞菌优化的核酸序列，其编码 SEQ ID NO: 1 的欧氏杆菌菊天冬酰胺酶，包括如图 2 所示的限制性位点	ATATGCTCTTCAGCCGCAGACAAACTCCCTAACATCGTAATCCTCG CAACTGGTGGTACCATCGCAGGCAGCGCCGCCACCGGCACGCAGAC CACTGGCTACAAGGCCGCGCGCTGGGCGTAGACACGCTGATCAAC GCCGTCCCAGGAAGTGAAGAACTGGCCAACGTCAAGGGTGAGCAAT TCTCCAACATGGCCAGCGAGAACATGACTGGCGATGTGGTACTGAA GCTCTCGCAGCGCGTGAACGAACGTCTCGCCCGCGACGACGTGGAC GGCGTGGTGTATCACCACGGCACTGATACCGTCAAGAGTCGGCGT ACTTTCTCCACCTGACCGTGAAGTCCGATAAGCCCGTGGTGTGTGT CGCCGCGATGCGCCCGCGACCGCCATCAGCGCCGACGGGCCGATG AATCTGTTGGAAGCCGTGCGCGTGGCGGGTGACAAGCAAAGCCGCG GTCGGGGCGTAATGGTTCGTCTTGAACGATCGGATCGGTAGCGCGCG GTACATCACCAAGACGAACGCCCTCCACGCTGGACACCTTCAAGGCG AACGAAGAGGGGTACCTGGGGGTGATCATTGGCAATCGTATCTATT ACCAGAACCGCATCGACAAGCTGCACACCACCGCTCGGTGTTTCGA CGTGCGCGGTCTGACTAGCCTGCCCAAGGTGACATCCTGTACGGC TACCAAGACGACCCGGAGTACCTCTACGACGCGCGCATCCAGCATG GCGTGAAGGGCATCGTCTACGCCGGTATGGGTGCCGGCTCGGTGTC GGTCCGCGGCATCGCGGGTATGCGCAAGGCCATGGAGAAAGGCGTG GTCGTGATTTCGCTCGACCCGGACTGGCAATGGCATCGTACCGCCCG ATGAAGAACTCCCGGGGCTCGTGAGCGATAGCCTCAACCCCGCGCA CGCCCGGATCCTGCTGATGCTGGCGCTCACGCGGACAGCGACCCC AAGGTCATTCAAGAGTACTTCCACACCTACTGATAATAGTTCAGAA GAGCATAT	63

[0210] 尽管已经在本文中显示和描述了本公开的优选实施方式，但是这样的实施方式仅通过举例的方式提供。本领域技术人员现在将想到许多变体、变化和代替而不脱离本公开。应理解的是，本文所述的本公开的实施方式的各种替代方案可以用于实施本文的方法。意图是所附权利要求限定本发明的范围，并且由此涵盖这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同方式。

序列表

<110> 菲尼克斯公司

<120> 重组欧氏杆菌天冬酰胺酶的生产方法

<130> 38194-749.601

<140>

<141>

<150> 62/578,305

<151> 2017-10-27

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 327

<212> PRT

<213> 菊欧氏杆菌

[0001]

<400> 1

Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
1 5 10 15

Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly
20 25 30

Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys
35 40 45

Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn
50 55 60

Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu
65 70 75 80

Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
85 90 95

Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
100 105 110

	Lys	Pro	Val	Val	Phe	Val	Ala	Ala	Met	Arg	Pro	Ala	Thr	Ala	Ile	Ser	
	115							120						125			
	Ala	Asp	Gly	Pro	Met	Asn	Leu	Leu	Glu	Ala	Val	Arg	Val	Ala	Gly	Asp	
	130						135						140				
	Lys	Gln	Ser	Arg	Gly	Arg	Gly	Val	Met	Val	Val	Leu	Asn	Asp	Arg	Ile	
	145					150						155				160	
	Gly	Ser	Ala	Arg	Tyr	Ile	Thr	Lys	Thr	Asn	Ala	Ser	Thr	Leu	Asp	Thr	
					165					170						175	
	Phe	Lys	Ala	Asn	Glu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Gly	Val	Ile	Ile	Gly	Asn	Arg	
				180					185						190		
	Ile	Tyr	Tyr	Gln	Asn	Arg	Ile	Asp	Lys	Leu	His	Thr	Thr	Arg	Ser	Val	
		195					200							205			
	Phe	Asp	Val	Arg	Gly	Leu	Thr	Ser	Leu	Pro	Lys	Val	Asp	Ile	Leu	Tyr	
	210						215						220				
[0002]	Gly	Tyr	Gln	Asp	Asp	Pro	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ala	Ile	Gln	His	
	225					230					235					240	
	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Val	Tyr	Ala	Gly	Met	Gly	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	
					245					250						255	
	Val	Arg	Gly	Ile	Ala	Gly	Met	Arg	Lys	Ala	Met	Glu	Lys	Gly	Val	Val	
				260					265						270		
	Val	Ile	Arg	Ser	Thr	Arg	Thr	Gly	Asn	Gly	Ile	Val	Pro	Pro	Asp	Glu	
		275							280					285			
	Glu	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Ser	Asp	Ser	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Ala	Arg	
		290					295					300					
	Ile	Leu	Leu	Met	Leu	Ala	Leu	Thr	Arg	Thr	Ser	Asp	Pro	Lys	Val	Ile	
	305					310					315					320	
	Gln	Glu	Tyr	Phe	His	Thr	Tyr										
					325												
<210>	2																

<211> 981

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 2

gcagacaaac tccctaacat cgtaatcctc gcaactgggtg gtaccatcgc aggcagcgcc 60

gccaccggca cgcagaccac tggctacaag gccggcgcgc tgggcgtaga cacgctgac 120

aacgccgtcc cggaagtga gaaactggcc aacgtcaagg gtgagcaatt ctccaacatg 180

gccagcgaga acatgactgg cgatgtggta ctgaagctct cgcagcgcg gtacgaactg 240

ctcgcccgcg acgacgtgga cggcggtgtg atcacccacg gcactgatac cgtcgaagag 300

tcggcggtact ttctccacct gaccgtgaag tccgataagc ccgtggtgtt tgcgcccgcg 360

atgcgcccgg cgaccgcat cagcgccgac gggccgatga atctgttga agccgtgcgc 420

[0003]

gtggcggtg acaagcaaag ccgcggtcgg ggcgtaatgg tcgtcctgaa cgatcggatc 480

ggtagcgcgc ggtacatcac caagacgaac gcctccacgc tggacacatt caaggcgaac 540

gaagaggggt acctgggggt gatcattggc aatcgatatc attaccagaa ccgcatcgac 600

aagctgcaca ccaccgctc ggtgttcgac gtgcgcggtc tgactagcct gccaaggtc 660

gacatcctgt acggtacca agacgaccg gactacctc acgacgcgc gatccagcat 720

ggcgtgaagg gcatcgtcta cgcgggtatg ggtgccggct cgggtgcggc ccgcggcatc 780

gcgggtatgc gcaagccat ggagaaaggc gtggtcgtga ttcgctcgac ccgactggc 840

aatggcatcg taccgcccga tgaagaactc ccggggctcg tgagcgatag cctcaacccc 900

gcgcacgccc ggatcctget gatgctggcg ctacgcgga ccagcgacce caaggtcatt 960

caagagtact tccacaccta c 981

<210> 3

<211> 22

[0004]

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

<400> 3

Met Arg Asn Leu Ile Leu Ser Ala Ala Leu Val Thr Ala Ser Leu Phe
1 5 10 15

Gly Met Thr Ala Gln Ala
20

<210> 4

<211> 66

<212> DNA

<213> 荧光假单胞菌

<400> 4

atgcgtaatc tgatcctcag cgccgctctc gtcactgcca gcctcttcgg catgaccgca 60

caagct 66

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

<400> 5

Met Phe Ala Lys Leu Val Ala Val Ser Leu Leu Thr Leu Ala Ser Gly
1 5 10 15

Gln Leu Leu Ala
20

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> 荧光假单胞菌

<400> 6

atgtttgcca aactcgttgc tgtttccctg ctgactctgg cgagcggcca gttgcttget 60

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

<400> 7

Met Gln Asn Tyr Lys Lys Phe Leu Leu Ala Ala Ala Val Ser Met Ala

1 5 10 15

Phe Ser Ala Thr Ala Met Ala

20

<210> 8

<211> 69

<212> DNA

<213> 荧光假单胞菌

<400> 8

atgcagaact ataaaaaatt ctttctggcc gcggccgtct cgatggcggt cagcgccacg 60

gccatggca 69

<210> 9

<211> 31

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

[0005]

<400> 9

Met Ile Arg Asp Asn Arg Leu Lys Thr Ser Leu Leu Arg Gly Leu Thr

1 5 10 15

Leu Thr Leu Leu Ser Leu Thr Leu Leu Ser Pro Ala Ala His Ala

20 25 30

<210> 10

<211> 93

<212> DNA

<213> 荧光假单胞菌

<400> 10

atgatccgtg acaaccgact caagacatcc cttctgcgcg gcctgaccct caccctactc 60

agcctgaccc tgctctcgcc cgcggcccat gcc 93

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

<400> 11

Met Arg Asn Leu Leu Arg Gly Met Leu Val Val Ile Cys Cys Met Ala

1 5 10 15

Gly Ile Ala Ala Ala

20

<210> 12

<211> 63

<212> DNA

<213> 荧光假单胞菌

<400> 12

atgagaaacc ttcttcgagg aatgcttgct gttatttgct gtatggcagg gatagcggcg 60

gcc 63

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

[0006]

<400> 13

Met Asn Arg Ser Ser Ala Leu Leu Leu Ala Phe Val Phe Leu Ser Gly

1 5 10 15

Cys Gln Ala Met Ala

20

<210> 14

<211> 63

<212> DNA

<213> 荧光假单胞菌

<400> 14

atgaatagat cttccgcgtt gctcctcgct tttgtcttcc tcagcggctg ccaggccatg 60

gcc 63

<210> 15

<211> 33

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

	<400> 15	
	Met Gln Asn Arg Thr Val Glu Ile Gly Val Gly Leu Phe Leu Leu Ala	
	1 5 10 15	
	Gly Ile Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu Arg Val Ser Gly Leu Ser	
	20 25 30	
	Ala	
	<210> 16	
	<211> 99	
	<212> DNA	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 16	
	atgcaaaacc gcactgtgga aatcggtgtc ggccttttct tgctggctgg catcctggct	60
	ttactgttgt tggccctgcg agtcagcggc ctttcggcc	99
[0007]	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> PRT	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 17	
	Met Lys Phe Lys Gln Leu Met Ala Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser	
	1 5 10 15	
	Ala Val Ala Gln Ala	
	20	
	<210> 18	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 18	
	atgaagttca aacagctgat ggcgatggcg cttttgttgg ccttgagcgc tgtggcccag	60
	gcc	63
	<210> 19	

	<211> 23	
	<212> PRT	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 19	
	Met Pro Pro Arg Ser Ile Ala Ala Cys Leu Gly Leu Leu Gly Leu Leu	
	1 5 10 15	
	Met Ala Thr Gln Ala Ala Ala	
	20	
	<210> 20	
	<211> 69	
	<212> DNA	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 20	
	atgccgcctc gttctatcgc cgcattgtctg gggctgctgg gcttgetcat ggctaccag	60
	gccgccgcc	69
[0008]	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> PRT	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 21	
	Met Leu Phe Arg Thr Leu Leu Ala Ser Leu Thr Phe Ala Val Ile Ala	
	1 5 10 15	
	Gly Leu Pro Ser Thr Ala His Ala	
	20	
	<210> 22	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 22	
	atgctttttc gcacattact ggcgagcctt acctttgctg tcatcgccgg cttaccgtcc	60
	acggccacg cg	72
	<210> 23	

	<211> 24	
	<212> PRT	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 23	
	Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly	
	1 5 10 15	
	Val Ala Thr Ala Asn Ala Val Ala	
	20	
	<210> 24	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 24	
	atgaaactga aacgtttgat ggcggcaatg acttttgtcg ctgctggcgt tgcgaccgcc	60
	aacgcggtgg cc	72
[0009]	<210> 25	
	<211> 24	
	<212> PRT	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 25	
	Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly	
	1 5 10 15	
	Val Ala Thr Val Asn Ala Val Ala	
	20	
	<210> 26	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 26	
	atgaaactga aacgtttgat ggcggcaatg acttttgtcg ctgctggcgt tgcgaccgtc	60
	aacgcggtgg cc	72
	<210> 27	

	<211> 21	
	<212> PRT	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 27	
	Met Arg Leu Thr Gln Ile Ile Ala Ala Ala Ala Ile Ala Leu Val Ser	
	1 5 10 15	
	Thr Phe Ala Leu Ala	
	20	
	<210> 28	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 28	
	atgcgcttga cccagattat tgccgccgca gccattgcgt tggtttccac ctttgcgctc	60
	gcc	63
[0010]	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> PRT	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 29	
	Met Lys Lys Ser Thr Leu Ala Val Ala Val Thr Leu Gly Ala Ile Ala	
	1 5 10 15	
	Gln Gln Ala Gly Ala	
	20	
	<210> 30	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 30	
	atgaagaagt ccaccttggc tgtggctgta acgttgggcg caatcgccca gcaagcaggc	60
	gct	63
	<210> 31	

<211> 29

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

<400> 31

Met Gln Ser Leu Pro Phe Ser Ala Leu Arg Leu Leu Gly Val Leu Ala

1 5 10 15

Val Met Val Cys Val Leu Leu Thr Thr Pro Ala Arg Ala

20 25

<210> 32

<211> 87

<212> DNA

<213> 荧光假单胞菌

<400> 32

atgcaaagcc tgccgttctc tgcgttacgc ctgctcggtg tgctggcagt catggtctgc 60

gtgctgttga cgacgccagc ccgtgcc 87

[0011]

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

<400> 33

Met Arg Gln Leu Phe Phe Cys Leu Met Leu Met Val Ser Leu Thr Ala

1 5 10 15

His Ala

<210> 34

<211> 54

<212> DNA

<213> 荧光假单胞菌

<400> 34

atgcgacaac tatTTTTctg ttgatgctg atggtgtcgc tcacggcgca cgcc 54

<210> 35

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 35

Met Lys Phe Lys Gln Leu Met Ala Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser
1 5 10 15

Ala Val Ala Gln Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala
20 25 30

Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr
35 40 45

Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val
50 55 60

Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn
65 70 75 80

[0012]

Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln
85 90 95

Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile
100 105 110

Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu
115 120 125

Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro
130 135 140

Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val
145 150 155 160

Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val
165 170 175

Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala
180 185 190

Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val
195 200 205

	Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His	
	210	215 220
	Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys	
	225	230 235 240
	Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp	
		245 250 255
	Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly	
		260 265 270
	Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met	
		275 280 285
	Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile	
		290 295 300
	Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn	
	305	310 315 320
[0013]	Pro Ala His Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser	
		325 330 335
	Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr	
		340 345
	<210> 36	
	<211> 345	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成多肽	
	<400> 36	
	Met Arg Gln Leu Phe Phe Cys Leu Met Leu Met Val Ser Leu Thr Ala	
	1	5 10 15
	His Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly	
		20 25 30
	Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys	

	35	40	45
	Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val		
	50	55	60
	Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser		
	65	70	75 80
	Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn		
	85	90	95
	Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly		
	100	105	110
	Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys		
	115	120	125
	Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala		
	130	135	140
[0014]	Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala		
	145	150	155 160
	Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp		
	165	170	175
	Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu		
	180	185	190
	Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly		
	195	200	205
	Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg		
	210	215	220
	Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile		
	225	230	235 240
	Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile		
	245	250	255
	Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Ser		
	260	265	270

Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly
275 280 285

Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro
290 295 300

Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His
305 310 315 320

Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys
325 330 335

Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
340 345

<210> 37

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0015]

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 37

Met Arg Leu Thr Gln Ile Ile Ala Ala Ala Ala Ile Ala Leu Val Ser
1 5 10 15

Thr Phe Ala Leu Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala
20 25 30

Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr
35 40 45

Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val
50 55 60

Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn
65 70 75 80

Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln
85 90 95

Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile
100 105 110

	Thr	His	Gly	Thr	Asp	Thr	Val	Glu	Glu	Ser	Ala	Tyr	Phe	Leu	His	Leu	
								115									120
																	125
	Thr	Val	Lys	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Val	Phe	Val	Ala	Ala	Met	Arg	Pro	
																	130
																	135
																	140
	Ala	Thr	Ala	Ile	Ser	Ala	Asp	Gly	Pro	Met	Asn	Leu	Leu	Glu	Ala	Val	
																	145
																	150
																	155
																	160
	Arg	Val	Ala	Gly	Asp	Lys	Gln	Ser	Arg	Gly	Arg	Gly	Val	Met	Val	Val	
																	165
																	170
																	175
	Leu	Asn	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Ala	Arg	Tyr	Ile	Thr	Lys	Thr	Asn	Ala	
																	180
																	185
																	190
	Ser	Thr	Leu	Asp	Thr	Phe	Lys	Ala	Asn	Glu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Gly	Val	
																	195
																	200
																	205
	Ile	Ile	Gly	Asn	Arg	Ile	Tyr	Tyr	Gln	Asn	Arg	Ile	Asp	Lys	Leu	His	
																	210
																	215
																	220
[0016]	Thr	Thr	Arg	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Arg	Gly	Leu	Thr	Ser	Leu	Pro	Lys	
																	225
																	230
																	235
																	240
	Val	Asp	Ile	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Asp	Asp	Pro	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Asp	
																	245
																	250
																	255
	Ala	Ala	Ile	Gln	His	Gly	Val	Lys	Gly	Ile	Val	Tyr	Ala	Gly	Met	Gly	
																	260
																	265
																	270
	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Val	Arg	Gly	Ile	Ala	Gly	Met	Arg	Lys	Ala	Met	
																	275
																	280
																	285
	Glu	Lys	Gly	Val	Val	Val	Ile	Arg	Ser	Thr	Arg	Thr	Gly	Asn	Gly	Ile	
																	290
																	295
																	300
	Val	Pro	Pro	Asp	Glu	Glu	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Ser	Asp	Ser	Leu	Asn	
																	305
																	310
																	315
																	320
	Pro	Ala	His	Ala	Arg	Ile	Leu	Leu	Met	Leu	Ala	Leu	Thr	Arg	Thr	Ser	
																	325
																	330
																	335
	Asp	Pro	Lys	Val	Ile	Gln	Glu	Tyr	Phe	His	Thr	Tyr					

340

345

<210> 38

<211> 358

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 38

Met Ile Arg Asp Asn Arg Leu Lys Thr Ser Leu Leu Arg Gly Leu Thr
1 5 10 15

Leu Thr Leu Leu Ser Leu Thr Leu Leu Ser Pro Ala Ala His Ala Ala
20 25 30

Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala
35 40 45

[0017] Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala
50 55 60

Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys Leu
65 70 75 80

Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn Met
85 90 95

Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu Leu
100 105 110

Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr
115 120 125

Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp Lys
130 135 140

Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala
145 150 155 160

Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp Lys
165 170 175

Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile Gly
180 185 190

Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr Phe
195 200 205

Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg Ile
210 215 220

Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val Phe
225 230 235 240

Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr Gly
245 250 255

Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His Gly
260 265 270

Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser Val
275 280 285

[0018] Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val Val
290 295 300

Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu Glu
305 310 315 320

Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg Ile
325 330 335

Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile Gln
340 345 350

Glu Tyr Phe His Thr Tyr
355

<210> 39

<211> 356

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 39

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

Val Met Val Cys Val Leu Leu Thr Thr Pro Ala Arg Ala Ala Asp Lys
20 25 30

Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser
35 40 45

Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly
50 55 60

Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn
65 70 75 80

Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly
85 90 95

Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg
100 105 110

[0019]

Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu
115 120 125

Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val
130 135 140

Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly
145 150 155 160

Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser
165 170 175

Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala
180 185 190

Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala
195 200 205

Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr
210 215 220

Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val

225	230	235	240
Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln			
245	250	255	
Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys			
260	265	270	
Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly			
275	280	285	
Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg			
290	295	300	
Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro			
305	310	315	320
Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg Ile Leu Leu			
325	330	335	
Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr			
[0020] 340	345	350	
Phe His Thr Tyr			
355			
<210> 40			
<211> 348			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成多肽			
<400> 40			
Met Asn Arg Ser Ser Ala Leu Leu Leu Ala Phe Val Phe Leu Ser Gly			
1 5 10 15			
Cys Gln Ala Met Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala			
20 25 30			
Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr			
35 40 45			

[0021]	Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val		
	50	55	60
	Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn		
	65	70	75 80
	Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln		
		85	90 95
	Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile		
		100	105 110
	Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu		
		115	120 125
	Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro		
		130	135 140
	Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val		
		145	150 155 160
	Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val		
		165	170 175
	Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala		
		180	185 190
	Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val		
		195	200 205
	Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His		
		210	215 220
	Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys		
		225	230 235 240
	Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp		
		245	250 255
	Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly		
		260	265 270
	Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met		
		275	280 285

Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile
290 295 300

Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn
305 310 315 320

Pro Ala His Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser
325 330 335

Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
340 345

<210> 41

<211> 360

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 41

[0022] Met Gln Asn Arg Thr Val Glu Ile Gly Val Gly Leu Phe Leu Leu Ala
1 5 10 15

Gly Ile Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu Arg Val Ser Gly Leu Ser
20 25 30

Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr
35 40 45

Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala
50 55 60

Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys
65 70 75 80

Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu
85 90 95

Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu
100 105 110

Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr

	115	120	125
	Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser		
	130	135	140
	Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile		
	145	150	155 160
	Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly		
	165	170	175
	Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg		
	180	185	190
	Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp		
	195	200	205
	Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn		
	210	215	220
[0023]	Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser		
	225	230	235 240
	Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu		
	245	250	255
	Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln		
	260	265	270
	His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Ser Val		
	275	280	285
	Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val		
	290	295	300
	Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp		
	305	310	315 320
	Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala		
	325	330	335
	Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val		
	340	345	350

Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
355 360

<210> 42

<211> 351

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 42

Met Leu Phe Arg Thr Leu Leu Ala Ser Leu Thr Phe Ala Val Ile Ala
1 5 10 15

Gly Leu Pro Ser Thr Ala His Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val
20 25 30

Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr
35 40 45

[0024]

Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile
50 55 60

Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln
65 70 75 80

Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys
85 90 95

Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly
100 105 110

Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe
115 120 125

Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala
130 135 140

Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu
145 150 155 160

Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val
165 170 175

	Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys	
	180	185 190
	Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr	
	195	200 205
	Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp	
	210	215 220
	Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser	
	225	230 235 240
	Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr	
	245	250 255
	Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala	
	260	265 270
	Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg	
	275	280 285
[0025]	Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly	
	290	295 300
	Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp	
	305	310 315 320
	Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr	
	325	330 335
	Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr	
	340	345 350
	<210> 43	
	<211> 348	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成多肽	
	<400> 43	
	Met Arg Asn Leu Leu Arg Gly Met Leu Val Val Ile Cys Cys Met Ala	

1	5	10	15
Gly Ile Ala Ala Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala			
20	25	30	
Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr			
35	40	45	
Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val			
50	55	60	
Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn			
65	70	75	80
Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln			
85	90	95	
Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile			
100	105	110	
Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu			
[0026] 115	120	125	
Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro			
130	135	140	
Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val			
145	150	155	160
Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val			
165	170	175	
Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala			
180	185	190	
Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val			
195	200	205	
Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His			
210	215	220	
Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys			
225	230	235	240

Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp
245 250 255

Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly
260 265 270

Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met
275 280 285

Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile
290 295 300

Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn
305 310 315 320

Pro Ala His Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser
325 330 335

Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
340 345

[0027]

<210> 44

<211> 349

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 44

Met Arg Asn Leu Ile Leu Ser Ala Ala Leu Val Thr Ala Ser Leu Phe
1 5 10 15

Gly Met Thr Ala Gln Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu
20 25 30

Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr
35 40 45

Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala
50 55 60

Val Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser
65 70 75 80

	Asn Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser	
	85	90 95
	Gln Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val	
	100	105 110
	Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His	
	115	120 125
	Leu Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg	
	130	135 140
	Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala	
	145	150 155 160
	Val Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val	
	165	170 175
	Val Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn	
	180	185 190
[0028]	Ala Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly	
	195	200 205
	Val Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu	
	210	215 220
	His Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro	
	225	230 235 240
	Lys Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr	
	245	250 255
	Asp Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met	
	260	265 270
	Gly Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala	
	275	280 285
	Met Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly	
	290	295 300
	Ile Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu	

	305	310	315	320
	Asn Pro Ala His	Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr		
	325	330	335	
	Ser Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr			
	340	345		
	<210> 45			
	<211> 351			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 人工序列的描述: 合成多肽			
	<400> 45			
	Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly			
	1	5	10	15
[0029]	Val Ala Thr Val Asn Ala Val Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val			
	20	25	30	
	Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr			
	35	40	45	
	Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile			
	50	55	60	
	Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln			
	65	70	75	80
	Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys			
	85	90	95	
	Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly			
	100	105	110	
	Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe			
	115	120	125	
	Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala			
	130	135	140	

	Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu	
	145	150 155 160
	Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val	
		165 170 175
	Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys	
		180 185 190
	Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr	
		195 200 205
	Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp	
		210 215 220
	Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser	
		225 230 235 240
	Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr	
		245 250 255
[0030]	Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala	
		260 265 270
	Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg	
		275 280 285
	Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly	
		290 295 300
	Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp	
		305 310 315 320
	Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr	
		325 330 335
	Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr	
		340 345 350
	<210> 46	
	<211> 350	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 46

Met Pro Pro Arg Ser Ile Ala Ala Cys Leu Gly Leu Leu Gly Leu Leu
1 5 10 15

Met Ala Thr Gln Ala Ala Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile
 20 25 30

Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln
 35 40 45

Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn
 50 55 60

Ala Val Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe
65 70 75 80

Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu
 85 90 95

[0031]

Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val
 100 105 110

Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu
 115 120 125

His Leu Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met
 130 135 140

Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu
145 150 155 160

Ala Val Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met
 165 170 175

Val Val Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr
 180 185 190

Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu
 195 200 205

Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys

210	215	220	
Leu His Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu			
225	230	235	240
Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu			
	245	250	255
Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly			
	260	265	270
Met Gly Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys			
	275	280	285
Ala Met Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn			
	290	295	300
Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser			
305	310	315	320
Leu Asn Pro Ala His Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg			
[0032]	325	330	335
Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr			
	340	345	350
<210> 47			
<211> 350			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成多肽			
<400> 47			
Met Gln Asn Tyr Lys Lys Phe Leu Leu Ala Ala Ala Val Ser Met Ala			
1	5	10	15
Phe Ser Ala Thr Ala Met Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile			
	20	25	30
Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln			
	35	40	45

[0033]	Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn		
	50	55	60
	Ala Val Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe		
	65	70	75 80
	Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu		
		85	90 95
	Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val		
		100	105 110
	Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu		
		115	120 125
	His Leu Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met		
		130	135 140
	Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu		
	145	150	155 160
	Ala Val Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met		
		165	170 175
	Val Val Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr		
		180	185 190
	Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu		
		195	200 205
	Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys		
	210	215	220
	Leu His Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu		
	225	230	235 240
	Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu		
		245	250 255
	Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly		
		260	265 270
	Met Gly Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys		
		275	280 285

Ala Met Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn
290 295 300

Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser
305 310 315 320

Leu Asn Pro Ala His Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
340 345 350

<210> 48

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 48

[0034]

Met Lys Lys Ser Thr Leu Ala Val Ala Val Thr Leu Gly Ala Ile Ala
1 5 10 15

Gln Gln Ala Gly Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala
20 25 30

Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr
35 40 45

Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val
50 55 60

Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn
65 70 75 80

Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln
85 90 95

Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile
100 105 110

Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu

	115	120	125	
	Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro			
	130	135	140	
	Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val			
	145	150	155	160
	Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val			
	165	170	175	
	Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala			
	180	185	190	
	Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val			
	195	200	205	
	Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His			
	210	215	220	
[0035]	Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys			
	225	230	235	240
	Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp			
	245	250	255	
	Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly			
	260	265	270	
	Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met			
	275	280	285	
	Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile			
	290	295	300	
	Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn			
	305	310	315	320
	Pro Ala His Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser			
	325	330	335	
	Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr			
	340	345		

<210> 49
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 49

Met Lys Leu Lys Arg Leu Met Ala Ala Met Thr Phe Val Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Val Ala Thr Ala Asn Ala Val Ala Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val
 20 25 30

Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr
 35 40 45

Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile
 50 55 60

[0036]

Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln
 65 70 75 80

Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys
 85 90 95

Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly
 100 105 110

Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe
 115 120 125

Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala
 130 135 140

Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu
 145 150 155 160

Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val
 165 170 175

Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys
 180 185 190

	Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr	
	195	200 205
	Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp	
	210	215 220
	Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser	
	225	230 235 240
	Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr	
		245 250 255
	Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala	
		260 265 270
	Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg	
		275 280 285
	Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly	
		290 295 300
[0037]	Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp	
	305	310 315 320
	Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr	
		325 330 335
	Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr	
		340 345 350
	<210> 50	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成共有 RBS 序列	
	<400> 50	
	aggagg	6
	<210> 51	
	<211> 6	

[0038]	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: RBS2 序列	
	<400> 51	
	ggagcg	6
	<210> 52	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: RBS34 序列	
	<400> 52	
	ggagcg	6
	<210> 53	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: RBS41 序列	
	<400> 53	
	aggagt	6
	<210> 54	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: RBS43 序列	
	<400> 54	
	ggagtg	6
	<210> 55	
	<211> 6	

[0039]	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: RBS48 序列	
	<400> 55	
	gagtaa	6
	<210> 56	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: RBS1 序列	
	<400> 56	
	agagag	6
	<210> 57	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: RBS35 序列	
	<400> 57	
	aaggca	6
	<210> 58	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: RBS49 序列	
	<400> 58	
	ccgaac	6
	<210> 59	
	<211> 167	

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

<400> 59

Met Arg Lys Leu Thr Gln Leu Val Leu Leu Ala Thr Val Leu Val Thr
 1 5 10 15

Thr Pro Ala Phe Ala Glu Met Lys Ile Ala Val Leu Asn Tyr Gln Met
 20 25 30

Ala Leu Leu Glu Ser Asp Ala Ala Lys Arg Tyr Ala Val Asp Ala Glu
 35 40 45

Lys Lys Phe Gly Pro Gln Leu Thr Lys Leu Lys Thr Leu Glu Ser Ser
 50 55 60

Ala Lys Gly Ile Gln Asp Arg Leu Val Ala Gly Gly Asp Lys Met Gln
 65 70 75 80

Gln Gly Glu Arg Glu Arg Leu Glu Leu Glu Phe Lys Gln Lys Ala Arg
 85 90 95

[0040]

Asp Tyr Gln Phe Gln Ser Lys Glu Leu Asn Glu Ala Lys Ala Val Ala
 100 105 110

Asp Arg Glu Met Leu Lys Gln Leu Lys Pro Lys Leu Asp Ser Ala Val
 115 120 125

Glu Glu Val Ile Lys Lys Gly Ala Phe Asp Leu Val Phe Glu Arg Gly
 130 135 140

Ala Val Ile Asp Val Lys Pro Gln Tyr Asp Ile Thr Arg Gln Val Ile
 145 150 155 160

Glu Arg Met Asn Gln Leu Lys
 165

<210> 60

<211> 504

<212> DNA

<213> 荧光假单胞菌

<400> 60

gtgcgtaagt tgactcaatt ggtcttgctg gccactgtgc tggtcaccac cccggccttc

60

```

gccgaaatga aaatgccgt tctgaactat cagatggccc tgctggaatc cgatgcggcc 120
aagcgatacg ccgtggatgc cgagaagaag ttcggtccgc aactgaccaa gctcaagaca 180
ctggaaagca gcgccaaagg catccaggac cgcctggtag ccggtggcga caagatgcag 240
caaggcgagc gcgagcgtct ggagcttgaa ttcaagcaaa aggcccgtga ctaccagttc 300
caatccaagg agctgaacga agccaaggct gtggccgacc gcgaaatgct caagcagctc 360
aagcctaaat tggacagcgc tgtggaagaa gtcataaga aggggtgcctt tgacctggtg 420
ttcgagcgtg gcgccgtgat cgacgtcaag cctcaatacg acatcaccgc ccaggtgatc 480
gagcgcatga accagctgaa gtga 504

```

<210> 61

<211> 325

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

[0041]

<400> 61

```

Met Gln Ser Ala Asn Asn Val Met Val Leu Tyr Thr Gly Gly Thr Ile
1           5           10           15

```

```

Gly Met Gln Ala Ser Ala Asn Gly Leu Ala Pro Ala Ser Gly Phe Glu
          20           25           30

```

```

Val Arg Met Arg Glu Gln Phe Ala Gly Ala Asp Leu Pro Ala Trp Arg
          35           40           45

```

```

Phe Gln Glu Met Ser Pro Leu Ile Asp Ser Ala Asn Met Asn Pro Ala
50           55           60

```

```

Tyr Trp Gln Arg Leu Arg Ser Ala Val Val Glu Ala Val Asp Ala Gly
65           70           75           80

```

```

Cys Asp Ala Val Leu Ile Leu His Gly Thr Asp Thr Leu Ala Tyr Ser
          85           90           95

```

```

Ala Ala Ala Met Ser Phe Gln Leu Leu Gly Leu Pro Ala Pro Val Val
          100          105          110

```

	Phe Thr Gly Ser Met Leu Pro Ala Gly Val Pro Asp Ser Asp Ala Trp	
	115	120 125
	Glu Asn Val Ser Gly Ala Leu Thr Ala Leu Gly Glu Gly Leu Lys Pro	
	130	135 140
	Gly Val His Leu Tyr Phe His Gly Ala Leu Met Ala Pro Thr Arg Cys	
	145	150 155 160
	Ala Lys Ile Arg Ser Phe Gly Arg Asn Pro Phe Ala Ala Leu Gln Arg	
	165	170 175
	Asn Gly Gly Val Ala Leu Ala Asp Lys Leu Pro Ala Ala Leu Ala Tyr	
	180	185 190
	Arg Asn Asp Lys Ala Pro Ala Asn Val Gly Val Leu Pro Leu Val Pro	
	195	200 205
	Gly Ile Ala Ala Ala Gln Leu Asp Ala Leu Ile Asp Ser Gly Ile Gln	
	210	215 220
[0042]	Ala Leu Val Leu Glu Cys Phe Gly Ser Gly Thr Gly Pro Ser Asp Asn	
	225	230 235 240
	Pro Ala Phe Leu Ala Ser Leu Lys Arg Ala Gln Asp Gln Glu Val Val	
	245	250 255
	Val Val Ala Ile Thr Gln Cys His Glu Gly Gly Val Glu Leu Asp Val	
	260	265 270
	Tyr Glu Ala Gly Ser Arg Leu Arg Ser Val Gly Val Leu Ser Gly Gly	
	275	280 285
	Gly Met Thr Arg Glu Ala Ala Phe Gly Lys Leu Asn Ala Leu Ile Gly	
	290	295 300
	Ala Gly Leu Asp Ser Ala Glu Ile Arg Arg Leu Val Glu Leu Asp Leu	
	305	310 315 320
	Cys Gly Glu Leu Ser	
	325	
	<210> 62	
	<211> 362	

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

<400> 62

Met Lys Ser Ala Leu Lys Asn Val Ile Pro Gly Ala Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Val Ala Ala Gln Ala Lys Glu Val Glu Ser Lys Thr
20 25 30

Lys Leu Ser Asn Val Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly
35 40 45

Ala Gly Ala Ser Ala Ala Asn Ser Ala Thr Tyr Gln Ala Ala Lys Val
50 55 60

Gly Ile Glu Gln Leu Ile Ala Gly Val Pro Glu Leu Ser Gln Ile Ala
65 70 75 80

Asn Val Arg Gly Glu Gln Val Met Gln Ile Ala Ser Glu Ser Ile Asn
85 90 95

[0043]

Asn Glu Asn Leu Leu Gln Leu Gly Arg Arg Val Ala Glu Leu Ala Asp
100 105 110

Asn Lys Asp Val Asp Gly Ile Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Leu
115 120 125

Glu Glu Thr Ala Tyr Phe Leu Asn Leu Val Glu Lys Thr Asp Lys Pro
130 135 140

Ile Val Val Val Gly Ser Met Arg Pro Gly Thr Ala Met Ser Ala Asp
145 150 155 160

Gly Met Leu Asn Leu Tyr Asn Ala Val Ala Val Ala Gly Ser Lys Glu
165 170 175

Ala Arg Gly Lys Gly Val Leu Val Thr Met Asn Asp Glu Ile Gln Ser
180 185 190

Gly Arg Asp Val Ser Lys Met Ile Asn Ile Lys Thr Glu Ala Phe Lys
195 200 205

Ser Pro Trp Gly Pro Met Gly Met Val Val Glu Gly Lys Ser Tyr Trp

210	215	220
Phe Arg Leu Pro Ala Lys Arg His Thr Met Asp Ser Glu Phe Asp Ile		
225	230	235 240
Lys Thr Ile Lys Ser Leu Pro Asp Val Glu Ile Ala Tyr Gly Tyr Gly		
	245	250 255
Asn Val Ser Asp Thr Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Gln Ala Gly Ala Lys		
	260	265 270
Ala Ile Ile His Ala Gly Thr Gly Asn Gly Ser Val Ser Ser Lys Val		
	275	280 285
Val Pro Ala Leu Val Glu Leu Arg Lys Gln Gly Val Gln Ile Ile Arg		
	290	295 300
Ser Ser His Val Asn Ala Gly Gly Met Val Leu Arg Asn Ala Glu Gln		
305	310	315 320
Pro Asp Asp Lys Tyr Asp Trp Val Ala Ala Leu Asp Leu Asn Pro Gln		
[0044]	325	330 335
Lys Ala Arg Ile Leu Ala Met Val Ala Leu Thr Lys Thr Gln Asp Ser		
	340	345 350
Lys Glu Leu Gln Arg Ile Phe Trp Glu Tyr		
	355	360

<210> 63

<211> 1020

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸

<400> 63

atatgctctt cagccgcaga caaactccct aacatcgtaa tcctcgcaac tgggtgtacc 60

atcgcaggca gcgcgccac cggcacgcag accactggct acaaggccgg cgcgctgggc 120

gtagacacgc tgatcaacgc cgtcccggaa gtgaagaaac tggccaacgt caagggtgag 180

	caattctcca acatggccag cgagaacatg actggcgatg tggactgaa gctctcgag	240
	cgcgtaacg aactgctgc ccgcgacgac gtggacggcg tggatcac ccacggcact	300
	gataccgtcg aagagtcggc gtactttctc cacctgaccg tgaagtcga taagcccgtg	360
	gtgtttgtcg ccgcgatgcg cccggcgacc gccatcagcg ccgacgggcc gatgaatctg	420
	ttggaagccg tgcgcgtggc gggtgacaag caaagccgcg gtcggggcgt aatggctgc	480
	ctgaacgac ggatcggtag cgcgcggtac atcaccaaga cgaacgcctc cacgctggac	540
	accttcaagg cgaacgaaga ggggtacctg ggggtgatca ttggcaatcg tatctattac	600
[0045]	cagaaccgca tcgacaagct gcacaccacc cgctcggtgt tcgacgtgc cggtctgact	660
	agcctgccc aagtcgacat cctgtacggc taccaagacg acccgagta cctctacgac	720
	gcggcgatcc agcatggcgt gaagggcac gtctacccg gtatgggtgc cggctcggtg	780
	tcggtcgcg gcatcgcggt tatgcgcaag gccatggaga aaggcgtggt cgtgattcgc	840
	tcgaccgga ctggcaatgg catcgtaccg ccgatgaag aactcccgg gctcgtgagc	900
	gatagcctca accccgcgca cggccggatc ctgctgatgc tggcgctcac gcggaccagc	960
	gacccaagg tcattcaaga gtacttcac acctactgat aatagttcag aagagcatat	1020

743可溶超声物，还原SDS-CGE

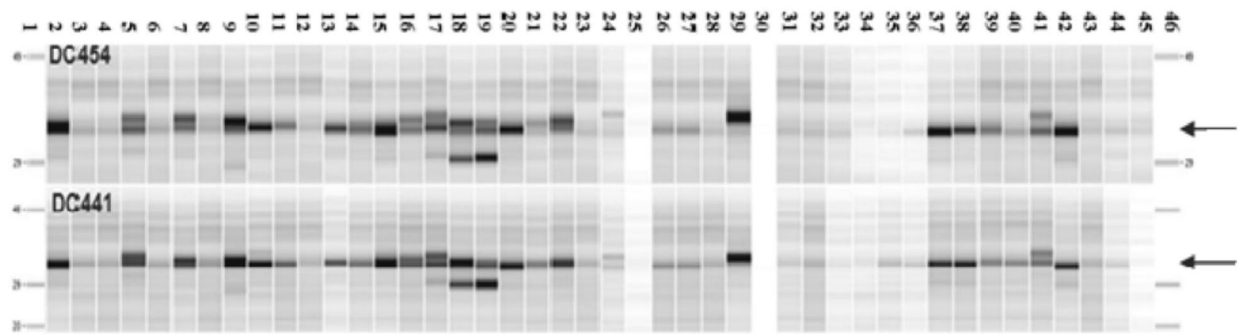


图1

		SapI	
		~~~~~	
1	ATATGCTCTT	CAGCCGCAGA	CAAACTCCCT AACATCGTAA TCCTCGCAAC TGGTGGTACC ATCGCAGGCA GCGCCGCCAC
	TATACGAGAA	GTCGGCGTCT	GTTTGAGGGA TTGTAGCATT AGGAGCGTTG ACCACCATGG TAGCGTCCGT CGCGGCGGTG
81	CGGCACGCAG	ACCACTGGCT	ACAAAGGCCGG CGCGCTGGGC GTAGACACGC TGATCAACGC CGTCCCGGAA GTGAAGAAAC
	GCCGTGCGTC	TGGTGACCGA	TGTTCCGGCC GCGCGACCCG CATCTGTGCG ACTAGTTGCG GCAGGGCCIT CACTTCITTG
161	TGGCCAAAGT	CAAGGGTGAG	CAATTCTCCA ACATGGCCAG CGAGAACATG ACTGGCGATG TGGTACTGAA GCTCTCGCAG
	ACCGGTTGCA	GTTCCCACTC	GTTAAGAGGT TGTACCGGTC GCTCTGTGAC TGACCGCTAC ACCATGACTT CGAGAGCGTC
241	CGCGTGAACG	AACCTGCTCG	CCGCGACGAC GTGGACGGCG TGGTGATCAC CCACGGCACT GATACCGTCG AAGAGTCGGC
	GCGCACTTGC	TTGACGAGCG	GGCGCTGCTG CACCTGCCGC ACCACTAGTG GGTGCCGTGA CTATGGCAGC TTCTCAGCCG
321	GTACTTTTLC	CACCTGACCG	TGAAGTCCGA TAAGCCCGTG GTGTTTGTG CCGCGATGCG CCCGCCGACC GCTCTCAGCA
	CATGAAAGAG	GTGGACTGGC	ACTTCAGGCT ATTCGGGCAC CACAAACAGC GCGCTACGC GGGCCGCTGG CGGTAGTCGC
401	CGACGGGGCC	GATGAATCTG	TTGGAAGCCG TGCGCGTGGC GGGTGACAAG CAAAGCCGCG GTCGGGGCGT AATGGTCGTC
	GGCTGCCCGG	CTACTTAGAC	AACCTTCGGC ACGCGCACCG CCCACTGTTC GTTTCGGCGC CAGCCCCGCA TTACCAGCAG
481	CTGAACGATC	GGATCGGTAG	CGCGCGGTAC ATCACCAGA CGAACGCCTC CACGCTGGAC ACCTTCAGG CGAACGAAGA
	GACTTGCTAG	CCTAGCCATC	GCGCGCCATG TAGTGGTCT GCTTGCAGG GTGCGACCTG TGAAGTTCC GCTTGCITCT
561	GGGTACCTG	GGGGTGATCA	TTGGCAATCG TATCTATTAC CAGAACCAGCA TCGACAAGCT GCACACCACC CGCTCGGTGT
	CCCCATGGAC	CCCCACTAGT	AACCGTTAGC ATAGATAATG GTCITGGCGT AGCTGTTTCA CGTGTGGTGG GCGAGCCACA
641	TCGACGTGCG	CGGTCTGACT	AGCCTGCCCA AGGTGACAT CCTGTACGGC TACCAAGACG ACCCGGAGTA CCTCTACGAC
	AGCTGCACGC	GCCAGACTGA	TCGGACGGGT TCCAGCTGTA GGACATGCCG ATGGTTCTGC TGGGCTCAT GGAGATGCTG
721	GCGGCGATCC	AGCATGGCGT	GAAGGGCATC GTCTACGCGG GTATGGGTGC CGGCTCGGTG TCGGTCCGCG GCATCGCGGG
	CGCCGCTAGG	TCGTACCGCA	CTTCCCGTAG CAGATGCGGC CATACCCACG GCCGAGCCAC AGCCAGGCGC CGTAGCGCCC
801	TATGCGCAAG	GCCATGGAGA	AAGGCGTGGT CGTGATTCGC TCGACCCGGA CTGGCAATGG CATCGTACCG CCCGATGAAG
	ATACGCGTTC	CGGTACTCTT	TTCCGCACCA GCACTAAGCG AGCTGGGCGT GACCGTACC GTAGCATGGC GGGCTACTTC
881	AACCTCCGGG	GCTCGTGAGC	GATAGCCTCA ACCCCGCGCA CGCCCGGATC CTGCTGATGC TGGCGCTCAC GCGGACGAGC
	TTGAGGGCCC	CGAGCACTCG	CTATCGAGT TGGGGCGCGT GCGGGCTAG GACGACTACG ACCGCGAGTG CGCCTGGTGC
961	GACCCCAAGG	TCATTCAAGA	GTACTTCCAC ACCTACTGAT AATAGTTCAG AAGAGCATAT
	CTGGGGTTCC	AGTAAGTTCT	CATGAAGGTG TGGATGACTA TTATCAAGTC TTCTCGTATA
		~~~~~	
		SapI	

图2

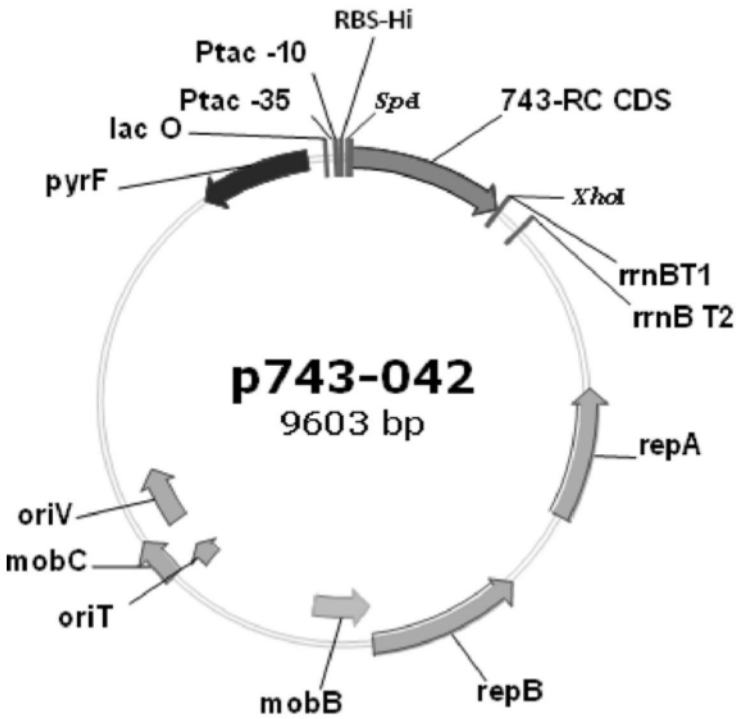


图3

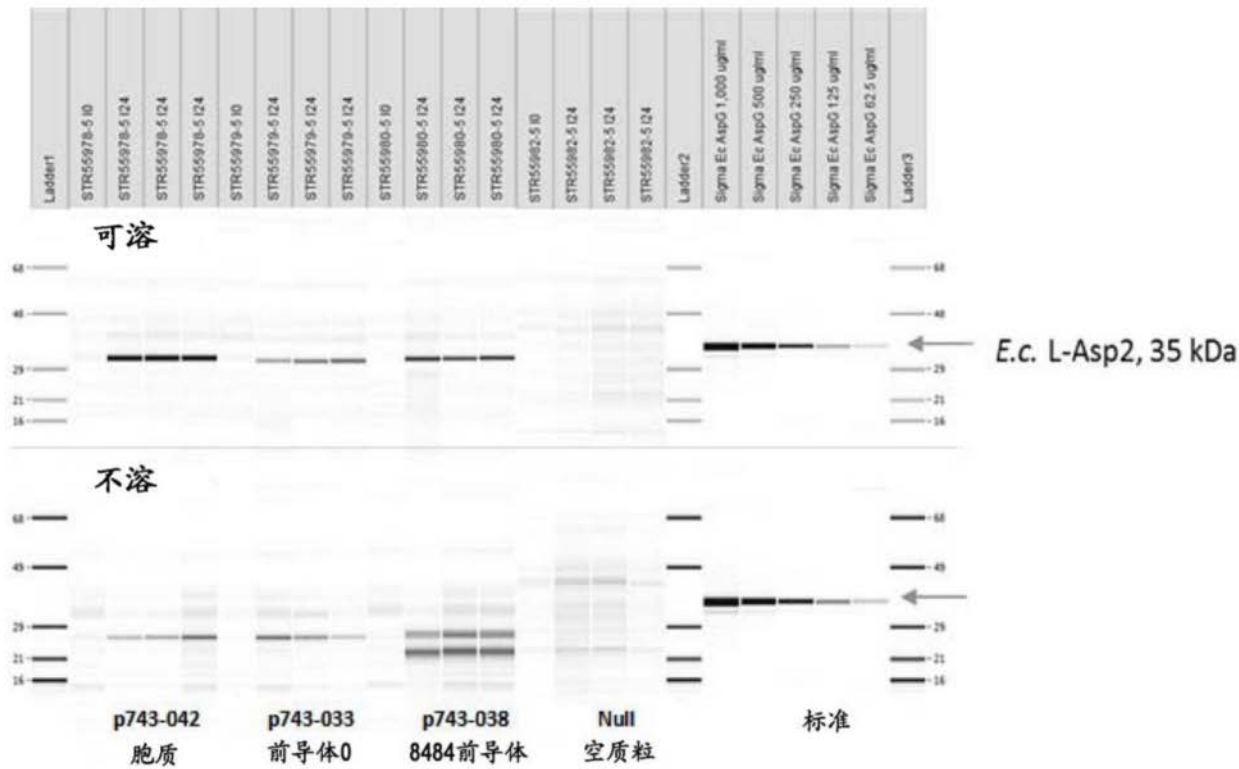


图4

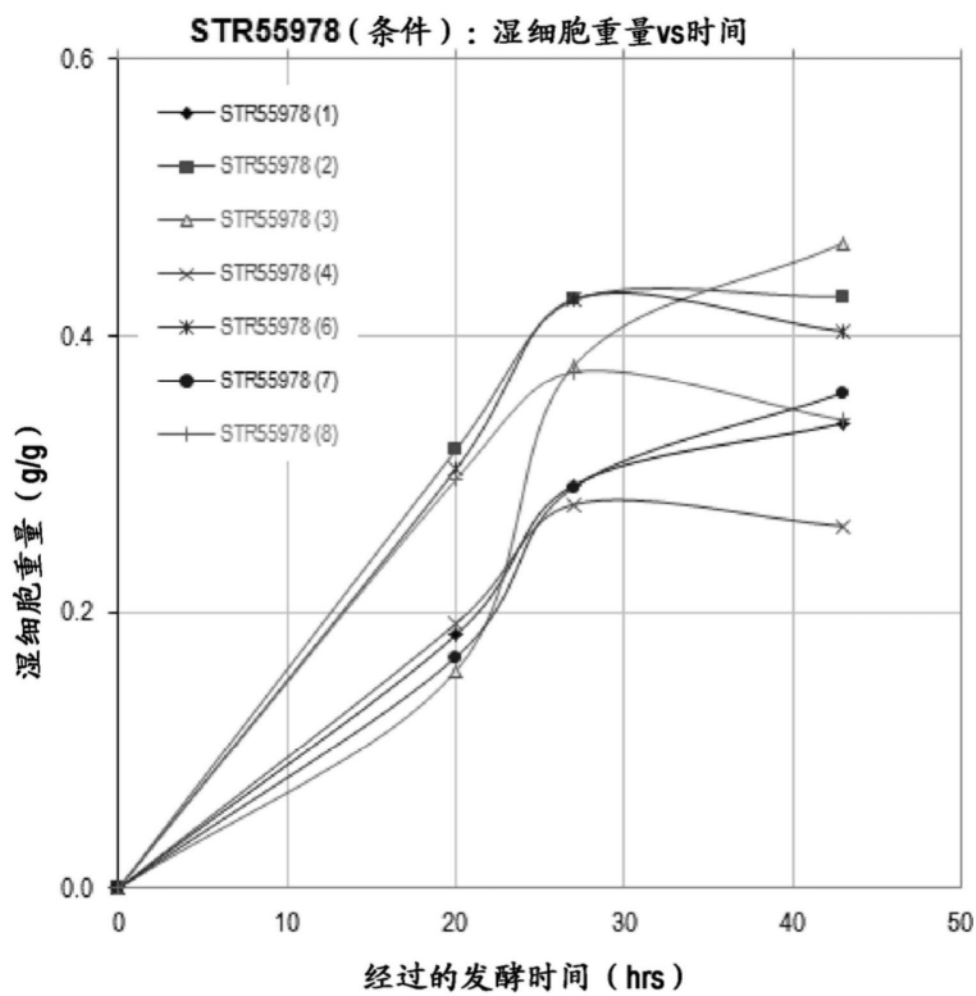


图5

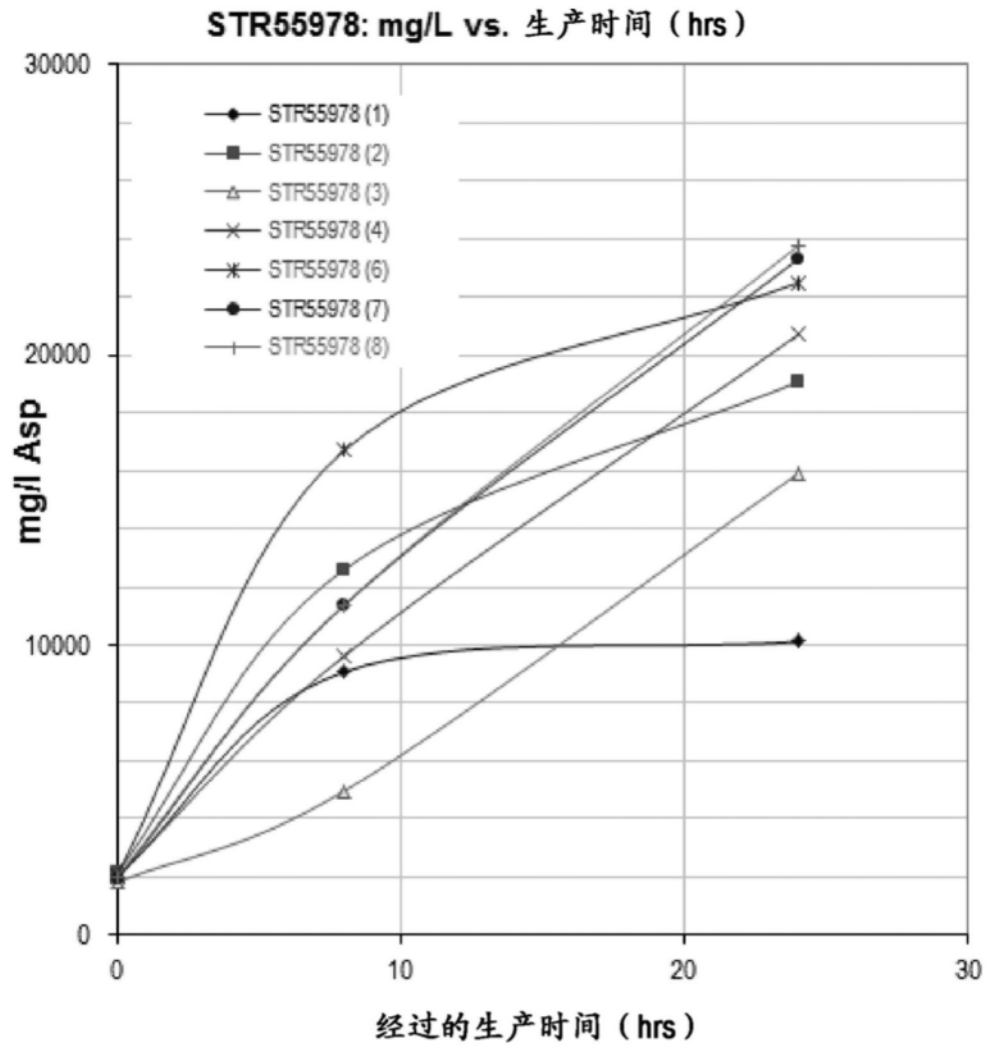


图6

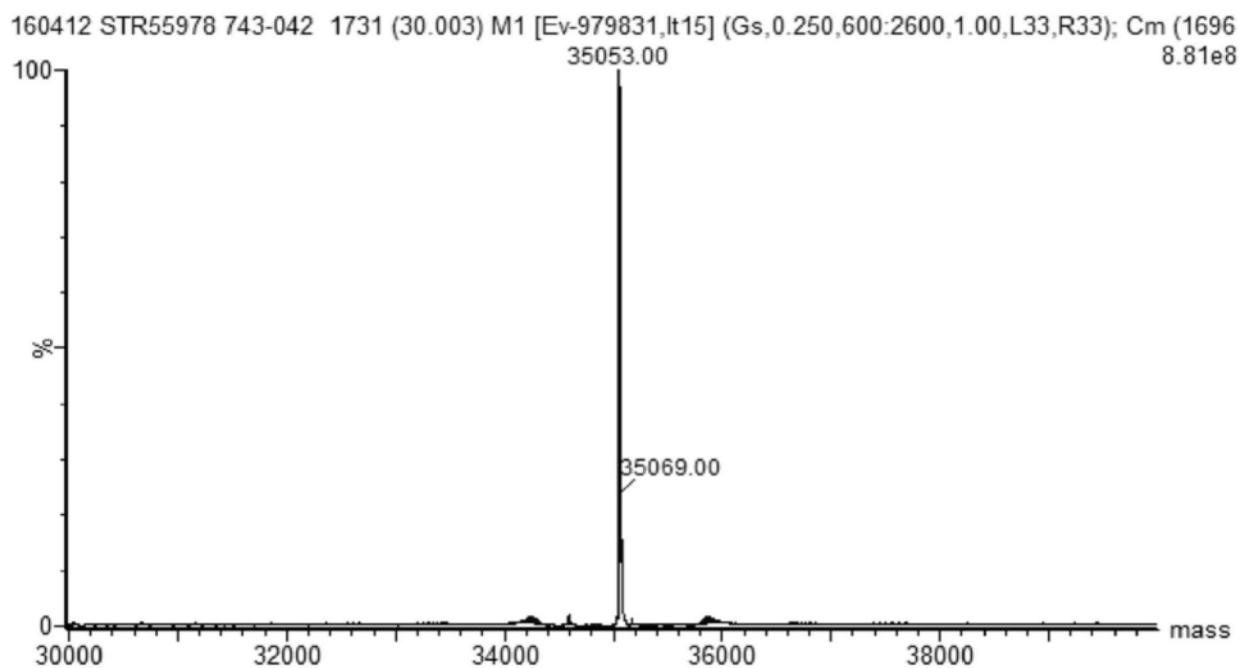


图7