

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12N 15/55

C12N 15/09

C12N 9/14 C12P 21/02

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 91103234.7

[45]授权公告日 1999 年 12 月 8 日

[11]授权公告号 CN 1047202C

[22]申请日 91.4.27 [24]颁证日 99.7.30
[21]申请号 91103234.7
[30]优先权
[32]90.4.27 [33]JP [31]113483/90
[73]专利权人 盐野义制药株式会社
地址 日本大阪府
[72]发明人 光岛健二 泷本明生
八木滋雄 园山高康
[56]参考文献
EP322032 1989. 6.28 C12N9/14
JP59108790 1984. 6.23 C12N9/14
PNAS, V01, 78. NO. 11, NOV, 1981 P. 6613 - 6617
1981. 11. 1 SUGGS ET AL
审查员 潘爱群

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 曹恒兴

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图页数 12 页

[54]发明名称 由头孢菌素乙酰水解酶基因编码的蛋白质的制备方法

[57]摘要

本发明提供了头孢菌素乙酰水解酶基因、将所说的基因插入用于大肠杆菌宿主—载体系统之载体内而制得的重组 DNA 分子、用所说的重组 DNA 分子转化的大肠杆菌细胞、具有由所说之基因编码的氨基酸序列的蛋白质、由所说之蛋白质的多聚体组成的酶、以及制备所说的蛋白质或酶的方法,所说的头孢菌素 C 和 7-ACA 转化为其脱乙酰化产物如脱乙酰头孢菌素 C 和脱乙酰 7-ACA 的酶,这些脱乙酰化产物可用作制备各种衍生之头孢菌素抗生素的中间体。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1.一种制备含有在本申请的图 1 中所描述的氨基酸序列的蛋白质的方法，该方法的特征在于在一种培养基中培养用重组体 DNA 分子转化的大肠杆菌细胞并从培养液中回收所说的蛋白质，其中所说的重组体 DNA 分子是通过将编码在该图 1 中描述的氨基酸序列的 DNA 碱基序列引入用于大肠杆菌宿主-载体系统的一种载体而制备成的重组体 DNA 分子。

说明书

由头孢菌素乙酰水解酶基因编码的 蛋白质的制备方法

本发明涉及头孢菌素乙酰水解酶基因、将所说的基因引入适用于大肠杆菌宿主—载体系统的载体中所制备的重组DNA分子、用所说的重组DNA分子转化的大肠杆菌细胞、具有由所说的基因编码之氨基酸序列的蛋白质、含有所说蛋白质之多聚体，最好是四聚体或多聚体的酶，以及制备所说的蛋白质或酶的方法。

头孢菌素类如头孢菌素C和7—氨基头孢烷酸（下称7—ACA）迄今是通过去掉连接到3位羟甲基上的乙酰基（下称脱乙酰化作用）而衍生的脱乙酰化合物，如脱乙酰头孢菌素C和脱乙酰7—ACA，这些化合物可用作起始材料，以合成各种头孢菌素抗生素，包括已在市场上销售的头孢菌素抗生素。

作为头孢菌素脱乙酰化的方法，可以有化学和酶学方法，两种方法中以后者更具优越性，这一方面是因为该方法可在大约中性pH和温和温度下完成，另一方面是因为它伴有较少的付反应。已经公开了几种酶学方法（如日本专利公开108,790/1984、132,294/1974和67,489/1986号，以及美国专利3,304,236号）。

本发明人已发现从土壤中分离的一株枯草芽胞杆菌菌株可产生头孢菌素乙酰水解酶，并借助对头孢菌素的脱乙酰化作用而有效地产生脱乙酰头孢菌素。这一发现使本发明人产生这样一个设想，即用DNA重组技术构建一株能优先产生头孢菌素乙酰水解酶的微生物，

对于工业上制备脱乙酰头孢菌素将是很有利的。到目前为止，还没有公开过这样一种能够只大量产生头孢菌素乙酰水解酶的微生物。

本发明人经过深入地研究，已经成功地从最近由土壤内分离的枯草芽胞杆菌中分离到携带头孢菌素乙酰水解酶基因的DNA片段，并将其克隆到大肠杆菌中。他们还发现，用其中已插入了所说之片段的质粒DNA载体转化的大肠杆菌，产生了大量的头孢菌素乙酰水解酶。已基于上述发现完成了本发明。

因此，本发明提供了头孢菌素乙酰水解酶基因、含有所说之基因的重组DNA分子、用所说之重组DNA分子转化的大肠杆菌细胞、具有由所说之基因编码之氨基酸序列的蛋白质、含有所说之蛋白质的多聚体酶，以及制备所说之蛋白质或酶的方法。

可按照本发明从中得到头孢菌素乙酰水解酶基因的新分离菌株，即枯草芽胞杆菌SHS0133根据布达佩斯条约保藏在

Fermentation Research Institute, Agency
of Industrial Science and Technology,
1-3, Higashi 1 Chome, Tsukuba-shi,
Ibaraki-Ken, 305, Japan, 保藏登记号为FERM
BP-2755(日期:1990年2月15日)。该菌已于1991年4月26日保藏
在中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏号为CCTCC No.M91037。

图1显示头孢菌素乙酰水解酶的氨基酸序列。

图2显示头孢菌素乙酰水解酶基因的碱基序列(下排)和由之推测出的氨基酸序列(上排)。

图3显示头孢菌素乙酰水解酶的已部分确定的氨基酸序列(34个氨基酸残基)。

图4显示包括由图3中划下线之氨基酸序列推断的所有遗传上

可能DNA碱基的四个合成寡核苷酸探针。

图5显示重组质粒pCAH01的限制性酶切图及其中DNA探针杂交的位置。

图6显示重组质粒pCAH03的限制性酶切图。

图7显示克隆之头孢菌素乙酰水解酶基因的DNA序列及侧翼区域。

图8显示小型化质粒pCAH10的构建，该质粒相当于pCAH03，但删去了头孢菌素乙酰水解酶基因的下游区域。

图9显示用于大肠杆菌中之表达质粒pCAH21的构建。

图10显示用于大肠杆菌中之表达质粒pCAH211和pCAH212的构建。

枯草芽胞杆菌SHS0133的特征

1. 染色体DNA的G+C摩尔百分比(%)：43.4

2. 形态学特征

该菌株为革兰氏阳性、大小为 $0.7-0.8 \times 1.8-2.6 \mu\text{m}$ ，有周毛。该菌株在有氧条件下生长良好，而在无氧条件下于含葡萄糖的中性培养基则生长较差。在细胞的中心部分形成大小为 $0.8 \times 1.3-1.7 \mu\text{m}$ 的孢子。

3. 培养特征

(1) 肉汁琼脂平皿培养(30℃培养7天)

菌落形成：接种后24小时

形状：不规则

表面：有褶折

边缘：波纹状

隆起：凸状

颜色：乳白

光泽：浑浊

光学特性：不透明

(2) 肉汁琼脂斜面培养 (30℃培养7天)

生长：良好

形状：丝状

表面：褶折

颜色：乳白

光泽：浑浊

光学特性：不透明

稠度：干酪样

(3) 肉汁液体培养 (30℃培养7天)

表面生长：形成厚膜

混浊：轻度

气味：稍带芳香味

沉淀：可见

沉淀量：很少

(4) 肉汁明胶穿刺培养 (24℃下培养30天)

生长：沿穿刺线均匀生长

穿刺线：丝状

液化形式：24℃下第7天时液化形成0.5 mm的液化层(层状)

(5) 石蕊牛乳培养

石蕊被还原。没有凝固而快速消化酪蛋白。

4. 生物化学特性

(1) 硝酸盐还原: 阳性

(2) 脱氮作用: 阳性

(3) MR 试验: 阴性

(4) VP 试验: 阳性

(5) 吲哚生成: 阴性

(6) H_2S 生成: 醋酸铅纸: 阴性

TSI: 阴性

Krigler: 阴性

(7) 淀粉水解: 阳性

(8) 柠檬酸盐的利用: Koser: 阳性

Christensen: 阳性

(9) 无机氮源的利用: 硝酸盐: 阳性

铵: 阳性

(10) 色素生成: 形成褐色色素

(11) 脲酶试验: 阳性

(12) 氧化酶试验: 阳性

(13) 过氧化氢酶试验: 阳性

(14) PH: 生长范围: 1.5—8.8

最适: 6.0—8.8

(15) 温度: 生长范围: 16.5℃—50.5℃

最适: 26.0℃—36.0℃

(16) OF 试验: D—葡萄糖: 发酵产酸不产气

乳糖: 发酵产酸不产气

(17) 由糖生成酸和气体:

1) 在L阿拉伯糖、D-木酮糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、D-果糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、D-甘露醇、甘油和淀粉中产酸不产气。

11) 在D-半乳糖、乳糖、D-山梨醇和肌醇中既不产酸也不产气。

(18) 营养要求: 无

(19) 果胶降解: 阳性

(20) 马尿酸降解: 阴性

(21) 果聚糖生成(由蔗糖、棉子糖): 阳性

(22) 精氨酸水解酶: 阴性

(23) 卵磷脂酶: 阴性

(24) 厌氧条件下生长: 在含D-葡萄糖的中性培养基中生长较差。

根据上述结果, 基于Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. II, 1986将该菌株鉴定为枯草芽胞杆菌, 并定名为枯草芽胞杆菌SHSO133。

本发明包括制备头孢菌素乙酰水解酶的方法, 该方法是使用被重组DNA分子转化的重组微生物, 所说的重组DNA分子是将编码图1所示氨基酸序列的分离的DNA碱基序列, 最好是图2所示DNA碱基序列引入到适用于大肠杆菌宿主-载体系统的载体中制备的。该方法可按照代表本发明发展历史的七个步骤来实现, 但由于本发明已揭示了编码头孢菌素乙酰水解酶的DNA碱基序列, 所以可用更简单的程序完成本方法。

(1) 在适当的培养基中培养枯草芽胞杆菌 (FERM BP-2755) 使之产生头孢菌素乙酰水解酶, 从培养基中分离所产生的头孢菌素乙酰水解酶并纯化之。用适于将蛋白质切成片段的蛋白酶消化已纯化的酶, 分离所得到的肽片段, 然后由氨基末端检测肽片段之一的氨基酸序列。

(2) 推断与所确定的部分氨基酸序列相对应的可能的 DNA 碱基序列, 并用化学方法合成一组具有推测之碱基序列的寡核苷酸, 用 ^{32}P 标记该寡核苷酸的 5' 端。用该被标记的寡核苷酸作为基因克隆的探针。

(3) 从枯草芽胞杆菌 (CCTCC No.M91037) 中提取并纯化染色体 DNA, 用各种限制性酶消化, 在琼脂糖凝胶上电泳, 并将分离出的 DNA 片段转移到硝酸纤维素膜上。使用硝酸纤维素膜和上述步骤 (2) 制备的 ^{32}P 标记的探针 Southern 杂交, 以选择与探针有同源性的 DNA 片段。从这些 DNA 片段中选择比根据头孢菌素乙酰水解酶蛋白质分子推测之所需基因稍大的片段, 在含有该 DNA 片段的琼脂糖凝胶上切下相关区域, 并提取 DNA。

(4) 将上述步骤 (3) 中得到的 DNA 片段插入大肠杆菌克隆载体中, 并将所得到的重组质粒转化到大肠杆菌细胞内。将转化体接种到琼脂培养基上以形成菌落, 并与 ^{32}P 标记的探针进行菌落杂交。选择与探针有同源性的 大肠杆菌菌落并分离之。

(5) 由选择的大肠杆菌细胞中提取重组质粒 DNA 并构建限制性酶切图。然后除去与头孢菌素乙酰水解酶无关的区域。测定枯草芽胞杆菌衍生之编码头孢菌素乙酰水解酶的 DNA 片段之碱基序列。然后将根据已测定之 DNA 碱基序列推断的氨基酸序列与头孢菌素乙

酰水解酶的部分氨基序列、分子量、末端氨基酸分析及氨基酸组成分析结果相比较，并确定头孢菌素乙酰水解酶的结构基因。

(6) 对含有头孢菌素乙酰水解酶的DNA片段作适当修饰，然后引入大肠杆菌的基因表达载体中，以便使该结构基因连接到得自大肠杆菌的启动子之后，以构建用于表达的重组质粒。

(7) 将上面得到的重组表达质粒引入大肠杆菌宿主内，以制备可产生头孢菌素乙酰水解酶的新的大肠杆菌菌株。

用于上述步骤的方法是本领域技术人员已知的，且可按照标准教科书中已公开的实验程序完成之（如参见“Molecular Cloning”，T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory (1982)）。所使的材料，如酶和试剂均可从商业途径得到并可按照说明书使用之。

用作宿主的大肠杆菌可以是大肠杆菌的衍生株，如HB101、DH1、C600、JM103、JM105和JM109。作为克隆过程中使用的大肠杆菌载体，可使用质粒载体如pUC13、pBR322和PAT153以及噬菌体载体如 λ gt10。上述宿主和载体可从商业途径得到。

上述步骤(1)中，测定蛋白质之氨基酸序列的方法是已知的（如可使用可由商业途径购得的自动氨基酸序列测定仪）。上述步骤(2)中，可按照制造者推荐的使用方法，使用可购得的DNA合成仪合成寡核苷酸。上述步骤(5)中，在使用已知的M13载体系统的情况下，可按照Sanger等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463—5467 (1977))的方法进行DNA碱基序列测定。

上述步骤(6)中,为构建用于指导在大肠杆菌内有效地表达所需基因的质粒,可将含有所需头孢菌素乙酰水解酶结构基因的DNA片段插入一含有在宿主内有功能之适当启动子(Lac、Tac、Trc、Trp、P_L等)和Shine—Dalgarno(SD)序列的表达载体(pKK223—3、pBS、pDR540、pPL—λ等)内,或插入还另外含有转译起始密码子ATG的ATG载体(pKK233—2等)内。将表达质粒引入适当宿主(如大肠杆菌JM103、JM109、HB101和C600)内即可得到能有效地表达头孢菌素乙酰水解酶的微生物。

可按照常规纯化方法,如合用离心、柱层析法等纯化被表达的头孢菌素乙酰水解酶。

下列实施例旨在进一步举例说明而不是限制本发明。

实施例1

1. 头孢菌素乙酰水解酶的分离和纯化以及部分氨基酸序列的测定

(1) 头孢菌素乙酰水解酶的分离和纯化

将由2.5%葡萄糖、0.75%玉米浆、1.0%氨基酸混合物、0.3%KH₂PO₄和0.8ppm MnSO₄·4H₂O, (pH 7.0)组成的培养基(20升)加入一个30升体积的罐式发酵器内。灭菌后,将预先在含0.5%葡萄糖、0.75%玉米浆、0.5%氨基酸混合物和0.02%KH₂PO₄ (pH 7.0)之培养基中培养过的枯草芽胞杆菌(FERM BP—2755)倒入培养基内达到6%的接菌体积。于28℃下保温48小时后,向培养液内加入活性炭至1%,并搅拌2小时。过滤后即得到作为滤液的粗酶溶液。向粗酶溶液内加入DEAE Sephadex A—50

(Pharmacia) 至 0.7%, 用 2 N NaOH 将混合物调到 pH 8.0 并搅拌 1 小时。过滤后, 用含有 0.1 M NaCl 的 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) (4 升) 洗已吸附了头孢菌素乙酰水解酶活性的 DEAE Sephadex A-50, 然后用含有 0.4 M NaCl 的同样缓冲液洗脱活性材料。用超滤装置 (Tosoh) 浓缩并脱盐后, 使活性材料吸附到预先已用同样缓冲液平衡过的充满 DEAE Sepharose CL-6B (Pharmacia) 的柱上。用同样缓冲液洗柱, 再用含 0.15 M NaCl 的相同缓冲液洗柱, 然后用含有 0.2 M NaCl 的相同缓冲液洗脱活性材料。经超滤浓缩并脱盐后, 用高效液相层析法 (下称 HPLC) 进行纯化。用 DEAE Toyopearlpack 650 M (Tosoh) 装柱。用渐增盐浓度的浓度梯度洗脱法洗脱活性材料。为此, 由含有 0.15 M NaCl 的相同缓冲液开始, 其后使 NaCl 浓度逐渐增加到 0.5 M。收集含被洗脱之活性的部分、超滤浓缩、然后用分子筛柱以 HPLC 纯化。用 TSK-G3000 (Tosoh) 作柱并用 0.2 M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 作流动相。收集被洗脱的活性部分、超滤浓缩, 然后用反相柱经 HPLC 纯化。用 Microbondapak C₁₈ (Waters) 作柱并用渐增乙腈浓度的浓度梯度洗脱法进行洗脱。为此, 以含有 0.1% 三氟乙酸的水溶液系统开始, 使乙腈浓度逐步升至 98% (终浓度)。于 50℃ 减压条件下浓缩含被洗脱之头孢菌素乙酰水解酶的部分, 并将残留物溶解于含 6 M 盐酸胍的 0.5 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中。向溶液内加入 EDTA (乙二胺四乙酸) 到浓度为 2 mM, 再向溶液内加入相对于头孢菌素乙酰水解酶 200 倍摩尔量的 2-巯基乙醇,

并于氮气环境下于37℃还原4小时。然后，向溶液内加入相对于头孢菌素乙酰水解酶190倍摩尔量的碘乙酸钠，于37℃避光反应10分钟以完成还原性羧甲基化作用。然后再按上述方法用反相柱经HPLC进行纯化。按照Laemmli (Nature, 227, 680—685 (1970))所述的SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS—PAGE)分析所得的头孢菌素乙酰水解酶部分。只在分子量为35KD的位置上检测到一条单一的带，此表明纯化达到均质程度。此外，基于对溶解于含7M尿素之0.1M Tris—HCl缓冲液(pH8.0)中的纯化之头孢菌素乙酰水解酶用0.1M磷酸盐缓冲液(pH7.0)作10倍稀释后可使之再活化，以及使用上述HPLC经分子筛柱层析可在分子量为280KD的位置上洗脱该活性材料的事实，表明该以天然形式存在的头孢菌素水酰水解酶是由同源亚单位组成的八聚体。

另一方面，使用Hedrick等人(Arch. Biochem. Biophys., 126, 155—164 (1968))的方法测知分子量约为150KD，且在相关位置上检测到该活性，提示四聚体也是有活性的。

用Edman降解法和胍水解法对纯化的头孢菌素乙酰水解酶作氨基酸末端分析，鉴定出其氨基末端是蛋氨酸，羧基末端是甘氨酸。

(2) 头孢菌素乙酰水解酶的部分氨基酸序列测定

将纯化的头孢菌素乙酰水解酶(1mg)溶解于含有2M尿素的0.1M Tris—HCl缓冲液(pH8.8)(1.0ml)中，向溶液内加入赖氨酰肽链内切酶(0.01mg)并使混合物于37℃反应4小时。然后以HPLC分离反应混合物。用

Microbondapak C₁₈ (Waters) 作柱并用渐增乙腈浓度的浓度梯度洗脱法进行洗脱。为此, 以含 0.1% 三氟乙酸的水溶液系统开始, 并使乙腈浓度增加到 98% 终浓度。于 214 nm 处进行检测。在分离的峰值中, 收集有长滞留时间的不同部分, 再次使用同样的反相柱纯化, 并使用气相自动氨基酸序列分析仪 (Applied Biosystems) 分析该肽的氨基酸序列以确定出如图 3 所示的从该肽片段之氨基末端到第 34 个氨基酸的氨基酸序列。

2. 合成 DNA 探针并标记 5' 末端

选择按上述步骤 1 制得的图 3 中划下线的氨基酸序列, 并合成相当于由该氨基酸序列推断之遗传上可能之 DNA 碱基序列的寡核苷酸池。如图 4 所示, 合成了四组分别定名为探针 CAH—RM1、CAH—RM2、CAH—RM3 和 CAH—RM4 的寡核苷酸。寡核苷酸的合成是使用自动 DNA 合成仪 ZEON—GENET A—11 (Nihon Zeon) 进行的。

使用 T4 多核苷酸激酶和 [γ —³²P] ATP, 按照 Wallace 等人 (Nucleic Acids Res., 6, 3543—3557 (1979)) 的方法标记所得 DNA 探针的 5' 末端。

3. 由枯草芽胞杆菌中提取和纯化染色体 DNA 并进行 Southern 杂交

先用溶菌酶, 再用 N-月桂酰肌氨酸钠处理枯草芽胞杆菌细胞 (CCTCC No.M91037), 并按照 Harris-Warrick 等人 (Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A., 72, 2207—2211 (1975)) 的方法经 CsCl—溴化乙锭平衡密度梯度超离心法由所得溶胞产物中提取和纯化染色体 DNA。用各种限制酶 (各约 10 单位) 在适当条件下

消化 DNA ($1\mu\text{g}$), 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离所得反应物。分析限制性酶切片段的电泳图形后, 按 Southern 等人 (J. Mol. Biol., 98, 503—517 (1975)) 的方法对凝胶作 Southern 杂交。室温下用含有 0.5 N NaOH 的 1.5 M NaCl 溶液处理该凝胶 1 小时, 以使 DNA 变性, 然后在含有 1.5 M NaCl 的 1 M Tris—HCl 缓冲液 (pH 7.0) 中室温下中和 1 小时。将一片硝酸纤维素膜放在凝胶上, 以使 DNA 由凝胶中转移到膜上。使用转移了 DNA 的硝酸纤维素膜与标记的探针杂交。使用 4 倍浓度的 SSC (1 X SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M 柠檬酸钠, pH 7.0)、10 倍浓度的 Denhardt's 溶液 (1 X Denhardt's 溶液: 0.02% Ficoll, 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮、0.02% 牛血清白蛋白) 与大约 1×10^6 cpm/ml 标记的探针于 38℃ 下杂交过夜。室温下用 4 倍浓度的 SSC 将膜洗几次, 然后进行放射自显影。另外, 逐步升高洗膜的温度并于每次洗膜后重复进行放射自显影。发现尽管在较高洗膜温度如 48℃ 和 53℃ 下, 仍有几条带显示出阳性信号, 而且杂交带的大小依据所用限制酶而彼此不同。显示阳性信号的 DNA 片段中, 2.5—3 Kb Dra I 消化的和 4—4.5 Kb Hind III 消化的片段更适于进行基因克隆, 因为它们比预期的基因更大些。

4. 克隆头孢菌素乙酰水解酶基因

(1) 构建基因库

向按上述步骤 3 提取并纯化的枯草芽胞杆菌染色体 DNA 中加入限制酶 Dra I (约 120 单位) 并于 37℃ 保温 90 分钟。然后用等体积苯酚提取反应物, 并向所得水相内加入乙醇以沉淀 DNA。将

所得DNA溶解在TE缓冲液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)(60 μ l), 在琼脂糖凝胶上电泳分离所得溶液, 并切下相当于2—4 Kb大小的凝胶区域。使用可由市场上购得的试剂盒(Bio 101, GENE CLEAN)由凝胶中洗脱并回收DNA片段, 然后溶解于TE缓冲液(30 μ l)中。

另一方面, 使用pUC13作为构建基因文库的载体。将pUC13(10 μ g)与限制酶Sma I(约100单位)混合, 于37℃保温140分钟, 然后于65℃下处理10分钟。向该混合物内加入磷性磷酸酶(BAP)(约20单位)并于65℃下继续反应80分钟。按上述方法用苯酚提取并用乙醇沉淀DNA, 最后将DNA溶解于TE缓冲液(50 μ l)中。

将含有Dra I消化之枯草芽胞杆菌染色体DNA片段的溶液(7.5 μ l)与含有Sma I—BAP处理之载体pUC13片段的溶液(2.5 μ l)合并, 并将混合物与T4 DNA连接酶于6℃下保温20小时, 以连接各片段, 得到重组DNA。按照Hanahan等人(J. Mol. Biol., 166, 557—580 (1983))的方法用所得重组DNA转化大肠杆菌HB101菌株。然后在置于含40 μ g/ml氨苄青霉素之L—肉汁(1% bacto—胰蛋白胨、0.5%酵母浸膏、0.5% NaCl (pH 7.3))琼脂培养基上的硝酸纤维素膜上形成菌落。以这些菌落作为枯草芽胞杆菌的基因库。

(2) 经菌落杂交选择头孢菌素乙酰水解酶阳性克隆

将上述步骤(1)中在硝酸纤维素膜上形成的菌落复制到另一片硝酸纤维素膜上。将该复制膜置于含有40 μ g/ml氨苄青霉素的L—肉汁琼脂培养基上并于37℃保温3小时。然后, 将膜转移到含

250 μ g/ml 氯霉素 的 L-肉汁琼脂培养基上并于 37 $^{\circ}$ C 保温过夜。然后基本上按照 Grunstein 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 3961—3965 (1975)) 的方法进行菌落杂交。为此, 用 0.5 N NaOH 处理该膜 (10—15 分钟) 以溶解菌落并使 DNA 变性。然后, 用 1 M Tris—HCl 缓冲液 (pH 7.2) 将膜中和 5—10 分钟并继续用含有 1.5 M NaCl 的 1 M Tris—HCl 缓冲液 (pH 8.0) 处理 10—15 分钟。将膜于减压下 80 $^{\circ}$ C 烘烤 2 小时以使 DNA 固定在膜上, 之后使固定的 DNA 与标记的探针 CAH—RM2 杂交。该反应于 38 $^{\circ}$ C 下在含有 4 倍浓度的 SSC、10 倍浓度的 Denhardt 溶液和大约 2×10^6 cpm/ml 标记之探针的溶液中进行 16 小时。然后于室温下将该膜用 4 倍浓度的 SSC 洗 3—4 次, 再于 38 $^{\circ}$ C 下洗 2 分钟并进行放射自显影 (曝光条件: -80 $^{\circ}$ C, 3 小时)。为了检测洗涤温度与放射自显影图谱上信号之强度的相关性, 逐渐升高洗涤温度并在不同温度下记录放射自显影结果。分别在 43 $^{\circ}$ C、48 $^{\circ}$ C 和 53 $^{\circ}$ C 下各洗 2 分钟。

结果发现, 30,000 个菌落中有 3 个即使在高洗涤温度下仍表现出阳性信号。将这些菌落在含 40 μ g/ml 氨基青霉素的 L-肉汁 (5 ml) 培养液中 37 $^{\circ}$ C 保温过夜并按照 Birnboim 等人 (Nucleic Acids Res., 7, 1513—1523 (1979)) 的方法制备重组质粒。用在载体 DNA (pUC13) 上有

其切割位点的限制酶如 EcoRI、Hind III 和 Pvu II 切割这些质粒。然后在琼脂凝胶上电泳分离被切割的各片段, 并与标记的探针进行 Southern 杂交。结果发现, 这三个重组质粒中的两个含有与

DNA 探针清晰杂交的限制酶消化的片段。两个阳性质粒间杂交片段的大小不同，因此被插入到载体 DNA 中的 DNA 片段也彼此不同。据此可区分这两个重组质粒并分别定名为 PCAH01 和 PCAH02。

5. 鉴定阳性克隆及检测碱基序列

(1) 鉴定阳性克隆

在试图用各种限制酶裂解，以制备重组质粒 PCAH01 和 PCAH02 之限制性酶切图的过程中，发现质粒 PCAH01 具有两个不同的 Dra I 消化的片段，而质粒 PCAH02 至少有三个已插入到载体 DNA 之 Sma I 位点中的不同的 Dra I 消化的片段，并且 DNA 探针与三个 Dra I 片段中的一个杂交。因此，将重组质粒 PCAH01 用于下一步骤中。图 5 中显示了质粒 PCAH01 的限制性酶切图及 DNA 探针杂交的位置。

由于质粒 PCAH01 含有两个衍生于枯草芽胞杆菌染色体 DNA 的外源 Dra I 片段 (1.8 Kb 和 2.5 Kb)，而且只有 2.5 Kb 片段与 DNA 探针杂交，因此由质粒中删除 1.8 Kb Dra I 片段。由质粒 PCAH01 中除去含有 2.5 Kb 片段的 Dra I—Pst I 片段 (2.6 Kb)，并插入到载体质粒 pUC13 的 Sma I—Pst I 位点上，以得到一小型化的重组质粒 PCAH03 (5.3 Kb)。重组质粒 PCAH03 的限制性酶切图示于图 6 中。

(2) 测定碱基序列

由重组质粒 PCAH03 中除去已与 DNA 探针杂交的 0.24 Kb EcoRI—Hind III 片段，并按照 Sanger 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463—5467

(1977))的方法测定其碱基序列。结果发现该EcoRI—Hind III片段中有与上述步骤1中得到头孢菌素乙酰水解酶之部分氨基酸序列相对应的碱基序列,此表明该片段含有头孢菌素乙酰水解酶基因的一部分。基于质粒pCAH03的限制性酶切图谱进一步测定Dra I和Hind III位点间(0.38 Kb)及EcoRI和EcoRI位点间(1.45 Kb)的碱基序列,而揭示出如图7所示的Dra I和EcoRI位点间约2 Kb的碱基序列。这一点证明了存在编码含318个氨基酸残基之蛋白质的碱基序列,且所说的氨基酸序列中含有由转译起始密码子ATG编码的蛋氨酸。另外,由上述碱基序列编码的假定蛋白质在其分子量、氨基末端和羧基末端氨基酸、以及经赖氨酰胺链内切酶消化之片段的氨基酸组成上均与头孢菌素乙酰水解酶有良好的一致性,因此可以相信该蛋白质必定是头孢菌素乙酰水解酶。据此证明了头孢菌素乙酰水解酶的结构基因完全包含在质粒pCAH03上的枯草芽胞杆菌衍生的DNA片段中。

6. 构建表达质粒

已克隆的质粒pCAH03上的得自枯草芽胞杆菌的DNA片段含有一个头孢菌素乙酰水解酶以外的区域,因此按照图8中所图示的方法删除此被认为与基因之表型表达无关的区域。

为了驱动在大肠杆菌中有效地高表达外源性基因,一般是构建一个其中所需结构基因直接被连接在由具有高表达效率之启动子、SD序列和转译起始密码子ATG组成之序列后面的表达质粒。因此,为了在大肠杆菌内产生大量头孢菌素乙酰水解酶,可按照图9中图示的方法,使用含有启动子、SD序列和ATG的载体来构建表达质粒。构建过程中,可按下述方法制备头孢菌素乙酰水解酶结构基因。将含有

整个所需基因的区域克隆到 M13mp 系列的载体中, 以得到一单股 DNA。按照所谓的引物扩展方法, 使用指定编码头孢菌素乙酰水解酶之氨基末端序列上除蛋氨酸外之几个氨基酸的寡核苷酸作为引物, 得到一个其中只有头孢菌素乙酰水解酶结构基因部分为双链的 DNA 片段。

图 10 显示构建经修饰之表达质粒的方法, 所说的质粒与按图 9 所示方法制备的表达质粒相比, 表现提高了拷贝数, 且携带四环素 (Tc^r) 抗性标志而不是氨苄青霉素 (Ap^r) 抗性标志。

下面对各步骤作更为详细地描述。

(1) 构建小型化质粒

为了缩短头孢菌素乙酰水解酶结构基因 (图 8 中缩写为 CAH) 的下游区, 用 EcoRV 和 BamHI 切割质粒 PCAH03, 纯化所得到的约 4.1 Kb DNA 片段, 然后使用 DNA 聚合酶 Klenow 片段填充因 BamHI 消化所产生的 3' 短缩之末端 (图 8)。进一步纯化之后, 用 T4 DNA 连接酶连接, 以构建含有头孢菌素乙酰水解酶基因的小型化质粒 PCAH10。

(2) 制备用于构建表达质粒的单股 DNA

用 SacI 和 SalI 切割上述步骤 (1) 中制得的小型化质粒 PCAH10, 纯化所得到的约 1.5 Kb 片段并作为 SacI—SalI 片段回收之。另一方面, 用 SacI 和 SalI 切割双股噬菌体 M13mp11 DNA。然后将上述 SacI—SalI 片段加到后者中, 用 T4 DNA 连接酶连接, 以构建含有完整头孢菌素乙酰水解酶基因的双股噬菌体 M13—CAH DNA。继之, 按 Messing (Methods in Enzymology, 101. 20—78

(1983))的方法制备其单股DNA。

(3) 引物延伸

基本上按照 Goeddel 等人 (Nucleic Acids Res., 8, 4057—4074 (1980)) 的方法, 除去位于头孢菌素乙酰水解酶起始位点 (ATG) 上游的、得自枯草芽胞杆菌的蛋白质非编码区, 以制备一个含有头孢菌素乙酰水解酶结构基因的区域。合成一条具有相当于头孢菌素乙酰水解酶氨基末端第二个氨基酸谷氨酸至第7个氨基酸脯氨酸之碱基序列的寡核苷酸, 以其作为用于引物延伸的引物并定名为 CAH—P1。然后将引物 CAH—P1 (3 pmole) 加到上述步骤 (2) 中制备的噬菌体 M13—CAH 的单股 DNA 中, 将此混合物加热到 60℃ 保持 20 分钟, 然后放置至室温。继之向混合物中加入 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP (各 0.25 mM) 和 DNA 聚合酶 Klenow 片段 (2 单位), 并在含 7 mM Tris—HCl 缓冲液 (pH 7.5)、7 mM MgCl₂、0.1 mM EDTA 和 20 mM NaCl 的反应混合物 (20 μl) 中, 于 37℃ 使引物延伸进行 2 小时。反应后进行苯酚提取和乙醇沉淀。将 DNA 溶解于小量蒸馏水中, 向其中加入 S1 核酸酶 (4 单位), 并在含有 30 mM 乙酸钠 (pH 4.6)、100 mM NaCl 和 1 mM ZnSO₄ 的反应混合物 (40 μl) 中 37℃ 保温 30 分钟, 以消化剩余的单股 DNA。对含所得双股 DNA 片段的溶液进行苯酚提取, 然后用乙醇沉淀, 并按照上述方法用 DNA 聚合酶 Klenow 片段处理该 DNA, 以进行末端修复反应。

(4) 构建表达质粒

本实施例用于构建表达质粒的载体 pKK233—2 (氨苄青霉

素抗性)购自Pharmacia公司。该载体是ATG载体的成员,它含有Trc启动子并可经限制酶Nco I消化和充填3'短缺末端后直接在起始密码子ATG之后被切割。如图9所示,用Pst I切割上述步骤(3)中制得的含头孢菌素乙酰水解酶结构基因的DNA片段,并分离和纯化1.27 Kb DNA片段。另一方面,用Nco I切割含Trc启动子的pKK233-2并用DNA聚合酶Klenow片段处理。然后用Pst I切割所得片段,得到约4.6 Kb的DNA片段。混合上述两片段并用T4 DNA连接酶连接之,用所得混合物转化大肠杆菌JM103菌株,并选择在含40 µg/ml氨苄青霉素之L-肉汁琼脂培养基上形成的菌落。将这些菌落在L-肉汁培养液中培养过夜,收集细胞,从细胞中提取质粒DNA,并测定ATG载体与含头孢菌素乙酰水解酶基因之片段的接合处附近的碱基序列。结果得到一个某中不包括氨基末端蛋氨酸之头孢菌素乙酰水解酶的结构基因已紧接ATG密码子后面被插入的表达质粒,并定名为pCAH21。并将携带该表达质粒的大肠杆菌定名为大肠杆菌JM103/pCAH21。

表达质粒pCAH21的复制系统得自pBR322。因此,为了增加该质粒的拷贝数以提高在大肠杆菌中的表达水平,将其复制区域(ori)换成得自PAT153的相应区域。同时将抗药标志由氨苄青霉素抗性(Ap^r)换成四环素抗性(Tc^r)。图10中图解显示了修饰该质粒的过程。首先用BamH I切割质粒pCAH21并用DNA聚合酶Klenow片段处理。然后用Sco I切割所得片段,得到含Trc启动子、头孢菌素乙酰水解酶基因和5S核糖体RNA之T₁ T₂终止子(5SrrnBT₁ T₂)的约2.4 Kb DNA

片段。用可从市场上购得的质粒 p A T 1 5 3 作为载体质粒。用 E c o R I 切割质粒 p A T 1 5 3，用 D N A 聚合酶 K l e n o w 片段处理，然后再用 D r a I 切割之。再者，为了防止载体的自身连接，可用碱性磷酸酶处理，并制备含有源于 p A T 1 5 3 之复制区域和四环素抗性基因的约 2.5 K b D N A 片段。然后混合上述两个 D N A 片段并用 T 4 D N A 连接酶连接之，用所得混合物转化大肠杆菌 J M 1 0 3 菌株，并选择在含 20 μ g / m l 四环素之 L-肉汁琼脂培养基上形成的菌落。这些菌落在 L-肉汁中培养过夜后收集细胞，由细胞中提取质粒 D N A 并经限制酶裂解法分析之。结果得到连接方向不同的两种重组质粒。将其中头孢菌素乙酰水解酶基因的方向与四环素抗性基因方向相同的质粒定名为 p C A H 2 1 1，并将另一个其中两基因之插入方向相反的质粒定名为 p C A H 2 1 2。另外，将携带这些重组表达质粒的大肠杆菌菌株分别定名为大肠杆菌 J M 1 0 3 / p C A H 2 1 1 和大肠杆菌 J M 1 0 3 / p C A H 2 1 2。

7. 在大肠杆菌中表达头孢菌素乙酰水解酶基因

(1) 表达头孢菌素乙酰水解酶基因

将大肠杆菌 J M 1 0 3 / p C A H 2 1 1 或大肠杆菌 J M 1 0 3 / p C A H 2 1 2 接种在含 20 μ g / m l 四环素的 2 倍浓度之 L-肉汁培养液 (50 m l) (在 0.5 L 体积的烧瓶中) 上，并于 37℃ 振荡培养 24 小时。取一等份培养液 (0.5 m l) 离心收集细胞。将细胞悬浮于 0.1 M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) (0.5 m l) 中并用超声波发生器破碎之。离心该溶液得到的上清液用作含所需酶的样品溶液。另一方面，将离心上述步骤 1 中制得的枯草芽胞杆菌 (CCTCC No.M91037) 之培养液所得上清液用作进行比较所需的酶溶液。

头孢菌素乙酰水解酶不仅作用于头孢菌素 C 和 7-ACA, 而且还可作用于醋酸对位硝基酚(下称 pNPA), 以生成有色物质对硝基苯酚(下称 PNP)。可用分光光度法检测 PNP, 因而可采用以 pNPA 为底物的方法作为检测头孢菌素乙酰水解酶活性的简单方法。反应于 30℃ 下在含有 0.02% pNPA、0.1 M 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 和上述酶溶液的混合物 (3 ml) 中进行, 并用分光光度计检测 400 nm 吸光率以确定酶活性。在 pH 6.8、30℃ 温度条件下, 每分钟产生 1 μM PNP 所需的酶量被定义为 1 单位 (U)。结果发现, 每份大肠杆菌 JM103 / PCAH211 和大肠杆菌 JM103 / PCAH212 之培养液的酶活性分别为 9.9 U/ml 和 12.4 U/ml。而枯草芽胞杆菌的酶活性为 0.36 U/ml。

此外, 构建了一个其中以衍生于大肠杆菌色氨酸操纵子的 Trp 启动子和 SD—ATG 序列代替表达质粒 PCAH211 之 Trc 启动子和 SD—ATG 序列的质粒。经转化作用将该质粒插入大肠杆菌 JM109 中之后, 按上述相似方法培养所得到的转化体, 测得每份培养液的酶活性为 75.5 U/ml。

使用大规模培养装置如发酵罐, 在适当培养条件下, 于适当培养基中培养携带这些表达质粒的大肠杆菌, 可使头孢菌素乙酰水解酶的产量得以增加。

(2) 头孢菌素 C 和 7-ACA 的脱乙酰化作用

以头孢菌素 C 或 7-ACA 作为底物, 用大肠杆菌 JM103 / PCAH212 产生的酶溶液使之脱乙酰化。向含有 10 mM 底物的 0.1 M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) (1.0 ml) 内加入酶溶液

(0.2 ml)后,使反应于37℃下进行40分钟,并加入0.2 M醋酸盐缓冲液(pH 4.0)(1.2 ml)终止反应。所得溶液过HPLC柱后,检测脱乙酰头孢菌素C或脱乙酰--7-ACA。用Cosmosil 5 C₈ (Nacalaitesque)作柱并用逐渐增加甲醇浓度的浓度梯度洗脱法洗脱。为此,使用含20 mM NaH₂PO₄和5 mM四正丁基氢氧化铵(TBAH),甲醇浓度升高至20%的溶液。在254 nm处检测脱乙酰化产物。头孢菌素乙酰水解酶的活定义如下:于37℃和pH 7.0条件下,每分钟产生1微摩尔产物所需要的酶量定义为1个单位(U)。结果发现,对于头孢菌素C和7-ACA来说,每份大肠杆菌JM103/PCA H212之酶溶液的培养液酶活性为7.4 U/ml。

(3) 重组头孢菌素乙酰水解酶的结构

经检测大肠杆菌中所产生之头孢菌素乙酰水解酶活性形式和亚单位的分子量,得到与上述步骤1中相同的结果,表明重组头孢菌素乙酰水解酶也以与天然形式相似的八聚体形式存在。

此外还用反相柱以HPLC纯化该重组头孢菌素乙酰水解酶。以Edman降解和胍水解法进行末端分析,揭示该酶的氨基和羧基末端分别是蛋氨酸和甘氨酸,此与其天然形式的末端氨基酸相同。另外用自动氨基酸序列分析仪检测氨基酸序列,表明直到第25个氨基酸的氨基酸序列与根据结构基因推断者(图2)完全相同。

如上面实施例中所详细描述,本发明人已进一步证实,经克隆由枯草芽胞杆菌产生之编码头孢菌素乙酰水解酶的基因,并使用可在大肠杆菌内表达的载体构建含该基因的重组质粒,可以更为有效地产生头孢菌素乙酰水解酶。这就为该酶的广泛应用提供了前提条件。另

外，含有已克隆之头孢菌素乙酰水解酶基因的 D N A 片段为更有利地利用头孢菌素乙酰水解酶的功能提供了一个极为有力的工具。

Gln-Leu-Phe-Asp-Leu-Pro-Leu-Asp-Gln-Leu-Gln-Thr-Tyr-Lys-Pro-Glu-Lys-Thr-Ala-Pro-Lys-Asp-Phe-Ser-Glu-Phe-Trp-Lys-Leu-Ser-Leu-Glu-Glu-Ala-Lys-Val-Gln-Ala-Glu-Pro-Asp-Leu-Gln-Pro-Val-Asp-Tyr-Pro-Ala-Asp-Gly-Val-Lys-Val-Tyr-Arg-Leu-Thr-Tyr-Lys-Ser-Phe-Gly-Asn-Ala-Arg-Ile-Thr-Gly-Trp-Tyr-Ala-Val-Pro-Asp-Lys-Gln-Gly-Pro-His-Pro-Ala-Ile-Val-Lys-Tyr-His-Gly-Tyr-Asn-Ala-Ser-Tyr-Asp-Gly-Glu-Ile-His-Glu-Met-Val-Asn-Trp-Ala-Leu-His-Gly-Tyr-Ala-Ala-Phe-Gly-Met-Leu-Val-Arg-Gly-Gln-Ser-Ser-Glu-Asp-Thr-Ser-Ile-Ser-Leu-His-Gly-His-Ala-Leu-Gly-Trp-Met-Thr-Lys-Gly-Ile-Leu-Asp-Lys-Asp-Thr-Tyr-Tyr-Arg-Gly-Val-Tyr-Leu-Asp-Ala-Val-Arg-Ala-Leu-Glu-Val-Ile-Ser-Ser-Phe-Asp-Glu-Val-Asp-Glu-Thr-Arg-Ile-Gly-Val-Thr-Gly-Gly-Ser-Gln-Gly-Gly-Leu-Thr-Ile-Ala-Ala-Ala-Leu-Ser-Asp-Ile-Pro-Lys-Ala-Ala-Val-Ala-Asp-Tyr-Pro-Tyr-Leu-Ser-Asn-Phe-Glu-Arg-Ala-Ile-Asp-Val-Ala-Leu-Glu-Gln-Pro-Tyr-Leu-Glu-Ile-Asn-Ser-Phe-Phe-Arg-Arg-Asn-Gly-Ser-Pro-Glu-Thr-Glu-Val-Gln-Ala-Met-Lys-Thr-Leu-Ser-Tyr-Phe-Asp-Ile-Met-Asn-Leu-Ala-Asp-Arg-Val-Lys-Val-Pro-Val-Leu-Met-Ser-Ile-Gly-Leu-Ile-Asp-Lys-Val-Thr-Pro-Pro-Ser-Thr-Val-Phe-Ala-Ala-Tyr-Asn-His-Leu-Glu-Thr-Glu-Lys-Glu-Leu-Lys-Val-Tyr-Arg-Tyr-Phe-Gly-His-Glu-Tyr-Ile-Pro-Ala-Phe-Gln-Thr-Glu-Lys-Leu-Ala-Phe-Phe-Lys-Gln-His-Leu-Lys-Gly

图 2-1

1	Met	Gln	Leu	Phe	Asp	Leu	Pro	Leu	Asp	Gln	Leu	Gln	Thr	Tyr	Lys	Pro	16
1	ATG	CAA	CTA	TTC	GAT	CTG	CCG	CTC	GAC	CAA	TTG	CAA	ACA	TAT	AAG	CCT	48
17	Glu	Lys	Thr	Ala	Pro	Lys	Asp	Phe	Ser	Glu	Phe	Trp	Lys	Leu	Ser	Leu	32
49	GAA	AAA	ACA	GCA	CCG	AAA	GAT	TTT	TCT	GAG	TTT	TGG	AAA	TTG	TCT	TTG	96
33	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Val	Gln	Ala	Glu	Pro	Asp	Leu	Gln	Pro	Val	Asp	48
97	GAG	GAA	CTT	GCA	AAA	GTC	CAA	GCA	GAA	CCT	GAT	CTA	CAG	CCG	GTT	GAC	144
49	Tyr	Pro	Ala	Asp	Gly	Val	Lys	Val	Tyr	Arg	Leu	Thr	Tyr	Lys	Ser	Phe	64
145	TAT	CCT	GCT	GAC	GGA	GTA	AAA	GTG	TAC	CGT	CTC	ACA	TAT	AAA	AGC	TTT	192
65	Gly	Asn	Ala	Arg	Ile	Thr	Gly	Trp	Tyr	Ala	Val	Pro	Asp	Lys	Gln	Gly	80
193	GGA	AAC	GCC	CGC	ATT	ACC	GGA	TGG	TAC	GCG	GTG	CCT	GAC	AAG	CAA	GGC	240
81	Pro	His	Pro	Ala	Ile	Val	Lys	Tyr	His	Gly	Tyr	Asn	Ala	Ser	Tyr	Asp	96
241	CCG	CAT	CCG	GCG	ATC	GTG	AAA	TAT	CAT	GGC	TAC	AAT	GCA	AGC	TAT	GAT	288
97	Gly	Glu	Ile	His	Glu	Met	Val	Asn	Trp	Ala	Leu	His	Gly	Tyr	Ala	Ala	112
289	GGT	GAG	ATT	CAT	GAA	ATG	GTA	AAC	TGG	GCA	CTC	CAT	GGC	TAC	GCC	GCA	336
113	Phe	Gly	Met	Leu	Val	Arg	Gly	Gln	Gln	Ser	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Ile	128
337	TTC	GGC	ATG	CTT	GTG	CGC	GGC	CAG	CAG	AGC	AGC	GAG	GAT	ACG	AGT	ATT	384
129	Ser	Leu	His	Gly	His	Ala	Leu	Gly	Trp	Met	Thr	Lys	Gly	Ile	Leu	Asp	144
385	TCA	CTG	CAC	GGT	CAT	GCT	TTG	GGC	TGG	ATG	ACG	AAA	GGA	ATT	CTT	GAT	432
145	Lys	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Val	Tyr	Leu	Asp	Ala	Val	Arg	Ala	160
433	AAA	GAT	ACA	TAC	TAT	TAC	CGC	GGT	GTT	TAT	TTG	GAC	GCC	GTC	CGC	CGC	480

图 3

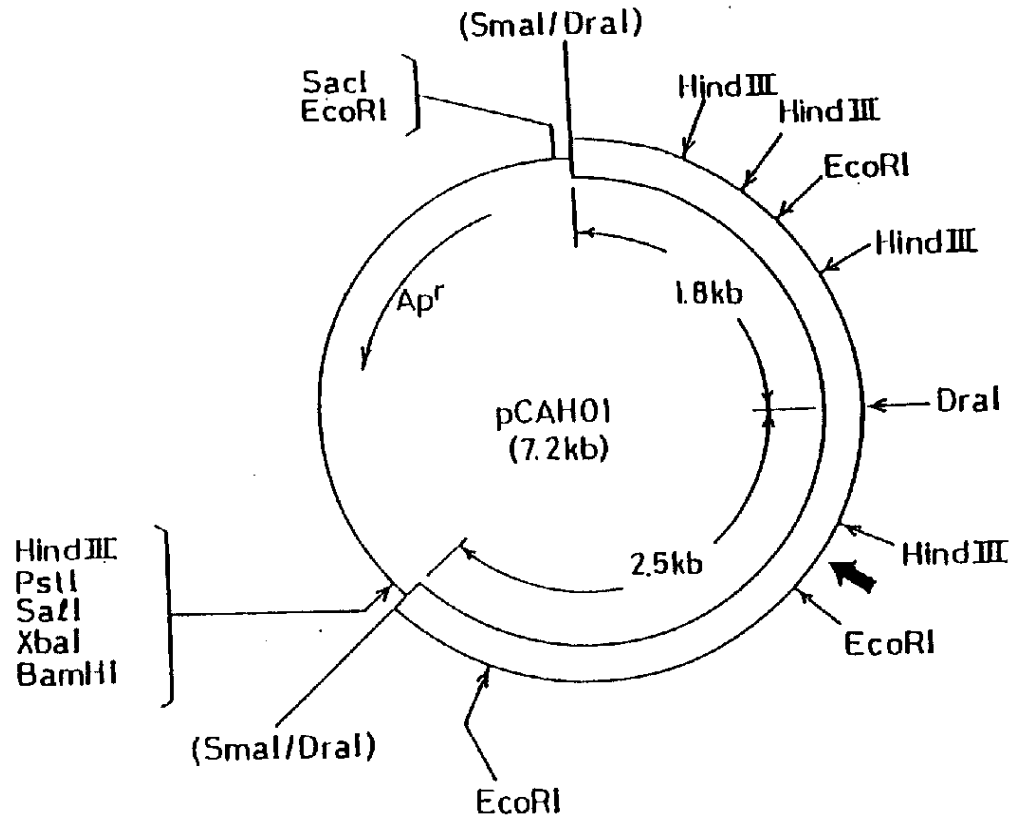
Tyr-His-Gly-Tyr-Asn-Ala-Ser-Tyr-Asp-Gly-
 Glu-Ile-His-Glu-Met-Val-Asn-Trp-Ala-Leu-
 His-Gly-Tyr-Ala-Ala-Phe-Gly-Met-Leu-Val-
 X -Gly-Gln-Gln-

X :

:

-Glu-Met-Val-Asn-Trp-Ala-			
5'-	G A A	A T G G T C G	T A A C T G G G C -3'
3'-	C T T	T A C C A G C	A T T G A C C C G -5'
CAH-RM1	3' C T T	T A C C A A T T G	A A C C C G 5'
CAH-RM2	3' C T T	T A C C A T T T G	A A C C C G 5'
CAH-RM3	3' C T T	T A C C A G T T G	A A C C C G 5'
CAH-RM4	3' C T T	T A C C A C T T G	A A C C C G 5'

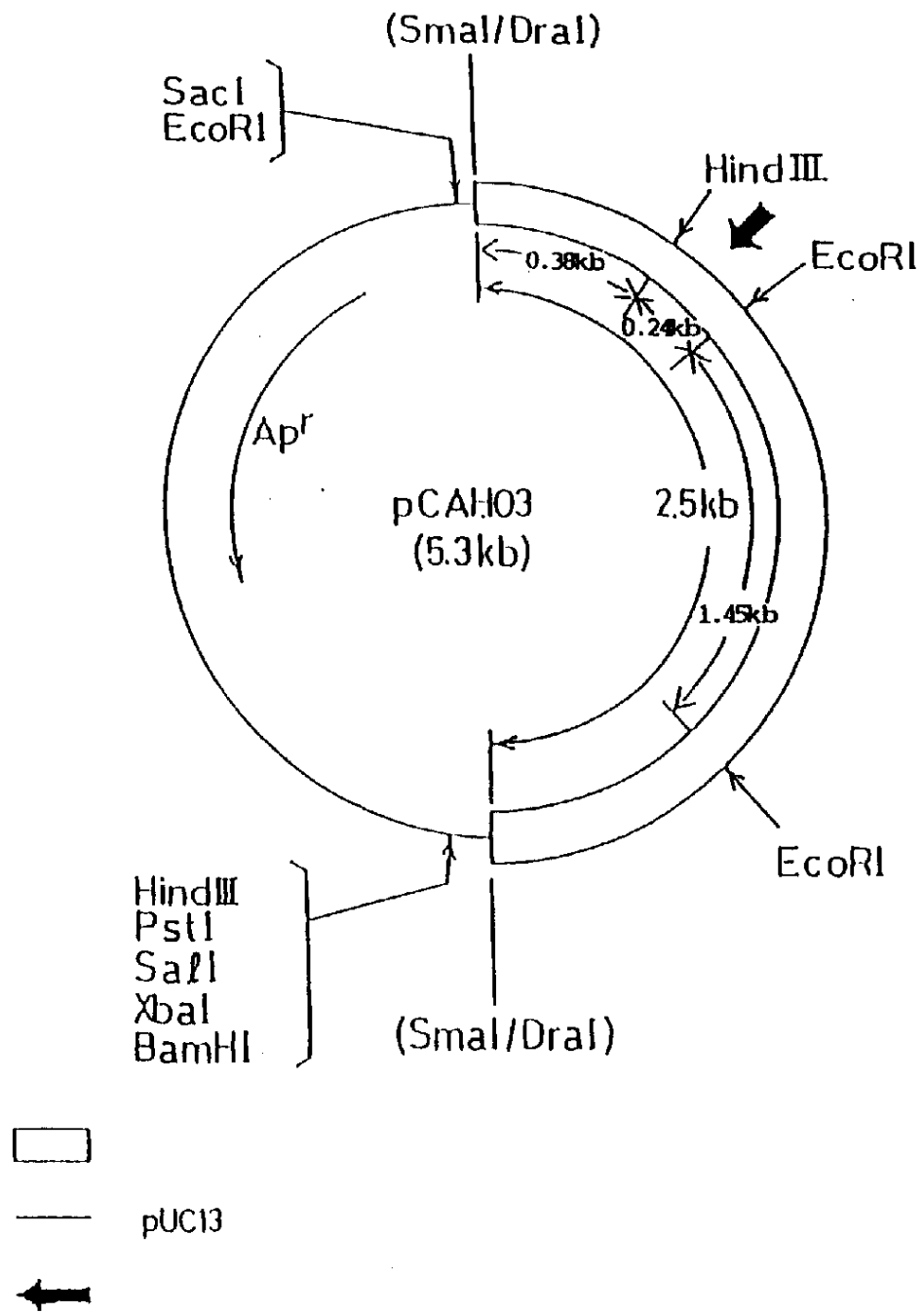
图 5



— pUC13



图 6



(DraI) 10 20 30 40 50 60 70 80 90
AAAGAACCGCTATGTCAGTCTGACGGCCAGGCCCTTATGGAACTAAGCCGGGAAGTCTTAAACAAACGTTTGATGAAGGCTGTCTGGG
AAACAAAGATGMAAATATTTAGAAAACAAAGACGAAACGTTGGTAGTATAGGAATACAAACTAAATCTTTATAAACAAAGGGGAATAATCG
GAAATGCAACTATTGCGATCTGCCGCTCGACCAATTGCAACATATAAGCCTGAAAAACAGCACCGAAGATTTTTCTGAGTTTTTGGAAA
MetGlnLeuPheAspLeuProLeuAspGlnLeuGlnThrTyrLysProGluLysThrAlaProLysAspPheSerGluPheTrpLys
TTGTCTTTGGAGGAACCTTGCAAAAGTCCAAAGCAGAACCTGATCTACAGCCGGTTGACTATCCTGCTGACGGAGTAAAGTGTAACCGTCTC
LeuSerLeuGluGluLeuAlaLysValGlnAlaGluProAspLeuGlnProValAspTyrProAlaAspGlyValLysValTyrArgLeu
ACATATAAAGCTTCGGAAACGCCCGCATTTACGGATGGTACGGGTGCTGACAAAGCAAGGCCCGCATCCGGCGGATCGTGAAATATCAT
ThrTyrLysSerPheGlyAsnAlaArgIleThrGlyTrpTyrAlaValProAspLysGlnGlyProHisProAlaIleValLysTyrHis
GGCTACAAATGCAAGCTATGATGGTGAGATTTCATGAATGGTAAACTGGGCACTCCATGGCTACGCCGCATTCGGGCATGCTTGTCCGGCGG
GlyTyrAsnAlaSerTyrAspGlyGluIleHisGluMetValAsnTrpAlaLeuHisGlyTyrAlaAlaPheGlyMetLeuValArgGly
CAGCAGACGACGAGGATACGAGTATTTCACTGCACGGTCAATGCTTTGGGCTGGATGACGAAAGGAATTTCTTGATAAAGATACATACTAT
GlnGlnSerSerGluAspThrSerIleSerLeuHisGlyHisAlaLeuGlyTrpMetThrLysGlyIleLeuAspLysAspThrTyrTyr
TACCGCGGTGTTTATTGACGCGGTCGGCGCTTGAGGTCAATCAGCAGCTTCGACGAGGTTGACGAAACAAAGGATCGGTGTGACAGGA
TyrArgGlyValTyrLeuAspAlaValArgAlaLeuGluValIleSerSerPheAspGluValAspGluThrArgIleGlyValThrGly
GGAAGCCAAAGCGGAGGTTTAAACCATTTGCCGACGACGGCTGTACAGACATTTCCAAAGCCCGGTTGCCGATTAATTCCTTATTTAAGCAAC
GlySerGlnGlyGlyLeuThrIleAlaAlaAlaAlaLeuSerAspIleProLysAlaAlaValAlaAspTyrProTyrLeuSerAsn

TTCGAACGGGCCATTGATGTGGCGCTTGAACAGCCGTACCTTGAATCAATTCCTTCTTCAGAAAGAAATGGCAGCCCGGAAACAGAAAGTG
 PheGluArgAlaIleAspValAlaLeuGluGlnProTyrLeuGluIleAsnSerPhePheArgArgAsnGlySerProGluThrGluVal

 CAGCGGATGAAGACACTTTTCATATATTCGATATATGAATCTCGCTGACCGAGTGAAGTGCCCTGTCTGTCAATCGGCCTGATTGAC
 GlnAlaMetLysThrLeuSerTyrPheAspIleMetAsnLeuAlaAspArgValLysValProValLeuMetSerIleGlyLeuIleAsp

AAGCTCACGGCGCGCTCCACCGTGTTTGGCGCTACAAATCATTTTGGAAACAGAGAGCTGAAGGTGTACCGCTACTTCGGACATGAG
 LysPheThrProSerThrValPheAlaAlaIleTyrAsnHisLeuGluThrGluLysGluLeuLysValTyrArgTyrPheGlyHisGlu

 TATATCCCTGCTTTTCAAACGGGAAAACTTGCTTTCTTTAAGCAGCATCTTAAMGGCTGATAAATGTGAAAGCGCGCATATCATCAG
 TyrIleProAlaPheGlnThrGluLysLeuAlaPhePheLysGlnHisLeuLysGly***

 GCGGTTTTTTTCTGCAGAACTGCCGGGAATGAGAACAGACTGGAGACGAATAGATATGAACAAAGAAATCATTAAATGAATTAAACGGATCG
 ACCAGTCAACGGAGTCAAAATCGTGATGCCGTGAGTCAGGAAGCCCGCATGGGATTTCCCTCGCAGGATAGTGATTAACGACGTCC
 GCITTAATTAATGTCCGAAAGAGAGTGGTACTTTTCAATTGAGCAGGAGCGTGATGTCAATTGAGGAACCGATTCAAGATTTGCTGGATA
 TCAGCGCTGGAGCTGAGAAAGCGCTTCGGCTTTTCAAAAGTCAAAACCCCTCCCTCGAATGGCTGTCTCAGACATTGTGTATT
 ACGAAGCATTTACGACCGCAGAGCAGTTAAGAAACTGCGACGGAGGCAATTAAGCCTGAAGCAAGCGTGTATCACTATATCAATATGG
 CGAAGGAACGTCAAAGATTATCTACAGGACAAGAGGTCAAAATTAAGTACTTCTACGTTCTCGGCCTATTTTGGCTGCAATGG
 ATTGAAGCACGGAAACCATACCGCCAAATGGACTTTACTGTTTGTGAATGAATGAACCTTGTGAACCCGAGCTGAAGGCTGAATGGAAA
 CCTTGCTTGACGGAAAGAGAGGGGAAGAGATTGACCTCGAATCAAGAACTGATGTAAATTCACCAATTCATTGAACGGAAATCGAA
 AGAATCATGGAGCACAAAGAACTGAAGGCAGAGAAAGATATGACATCTGAATTGAAACCGGTTACTTTTGTGAATACGGTTGAAGAA
 GTGTGGAAGGATGGAGGAAGCTGATGTTTTTTGTGGCTTCCTTTCTCCTTTATTCGACAGAAATTC

EcoRI

***:

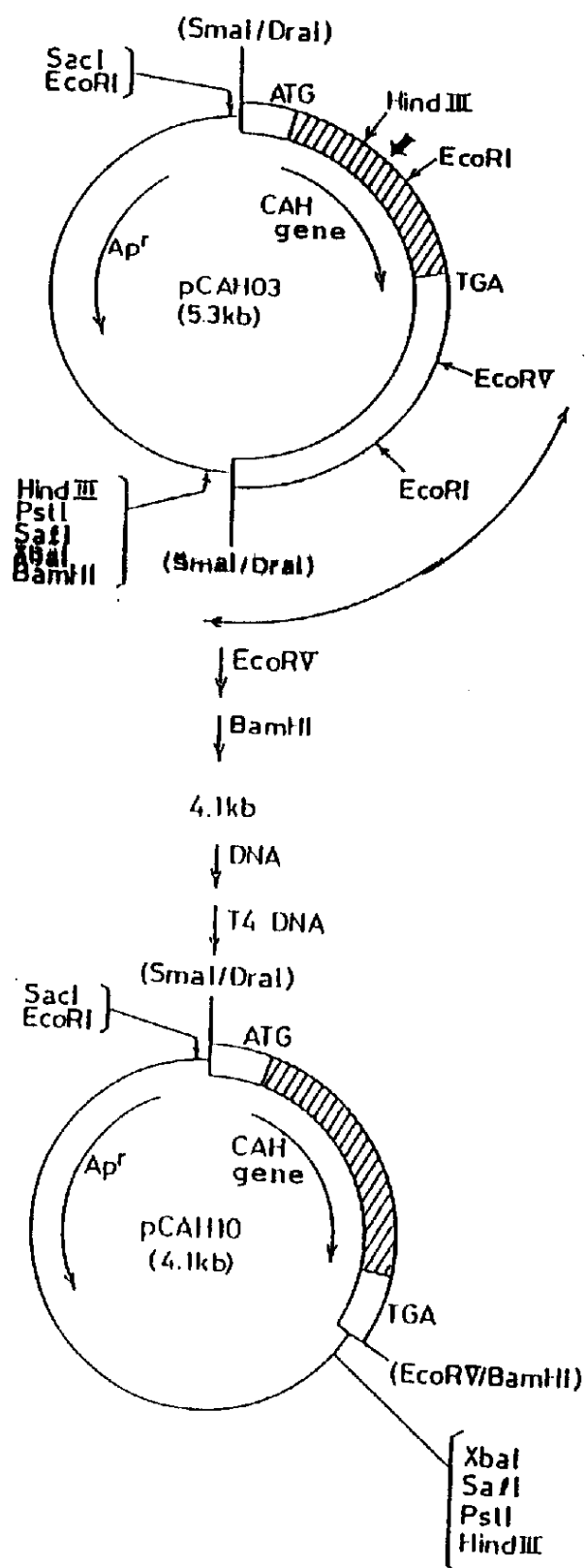
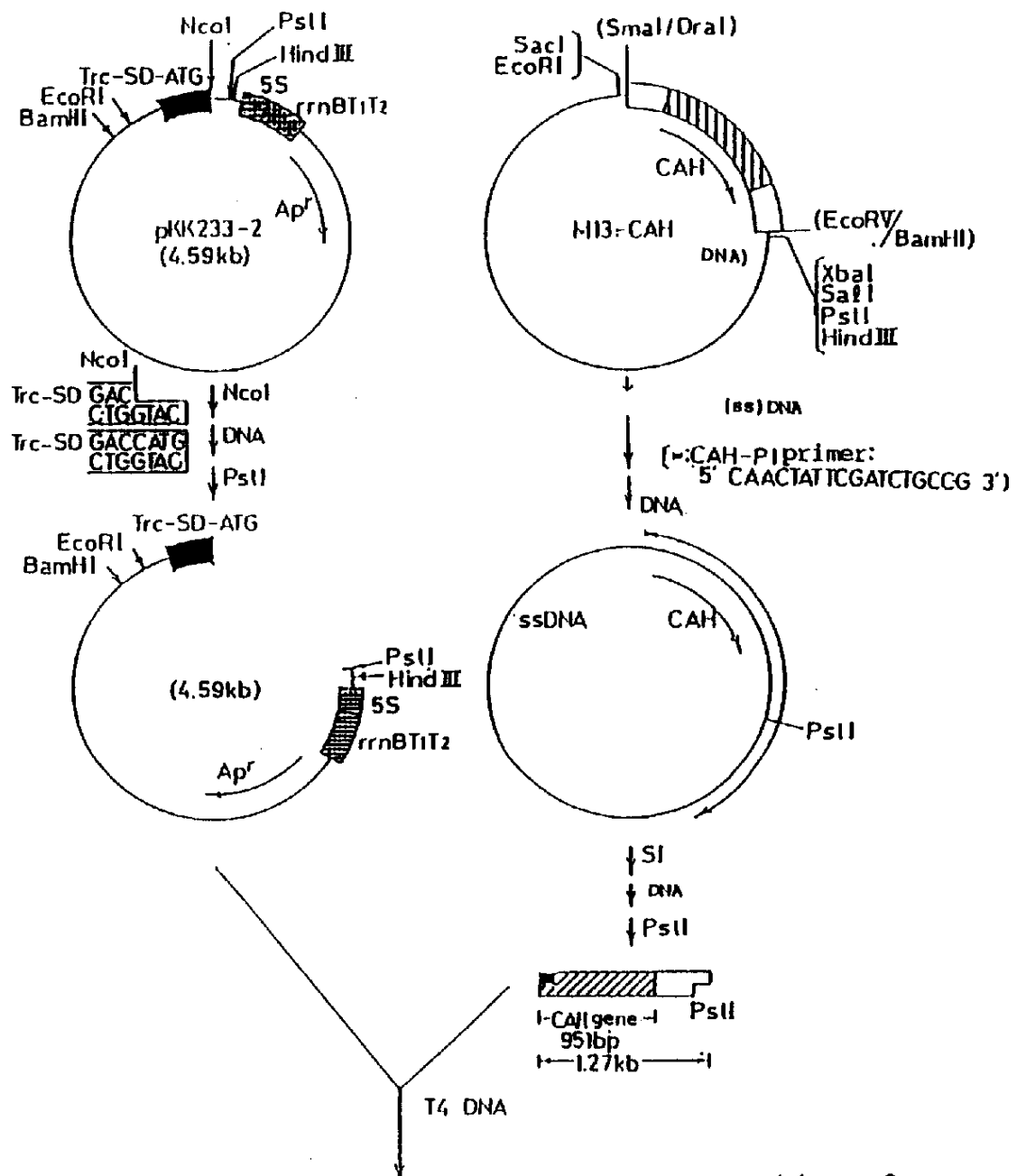
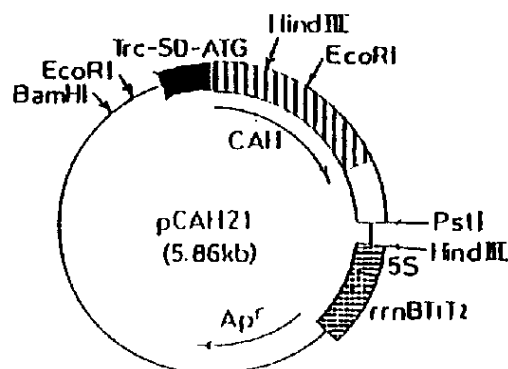


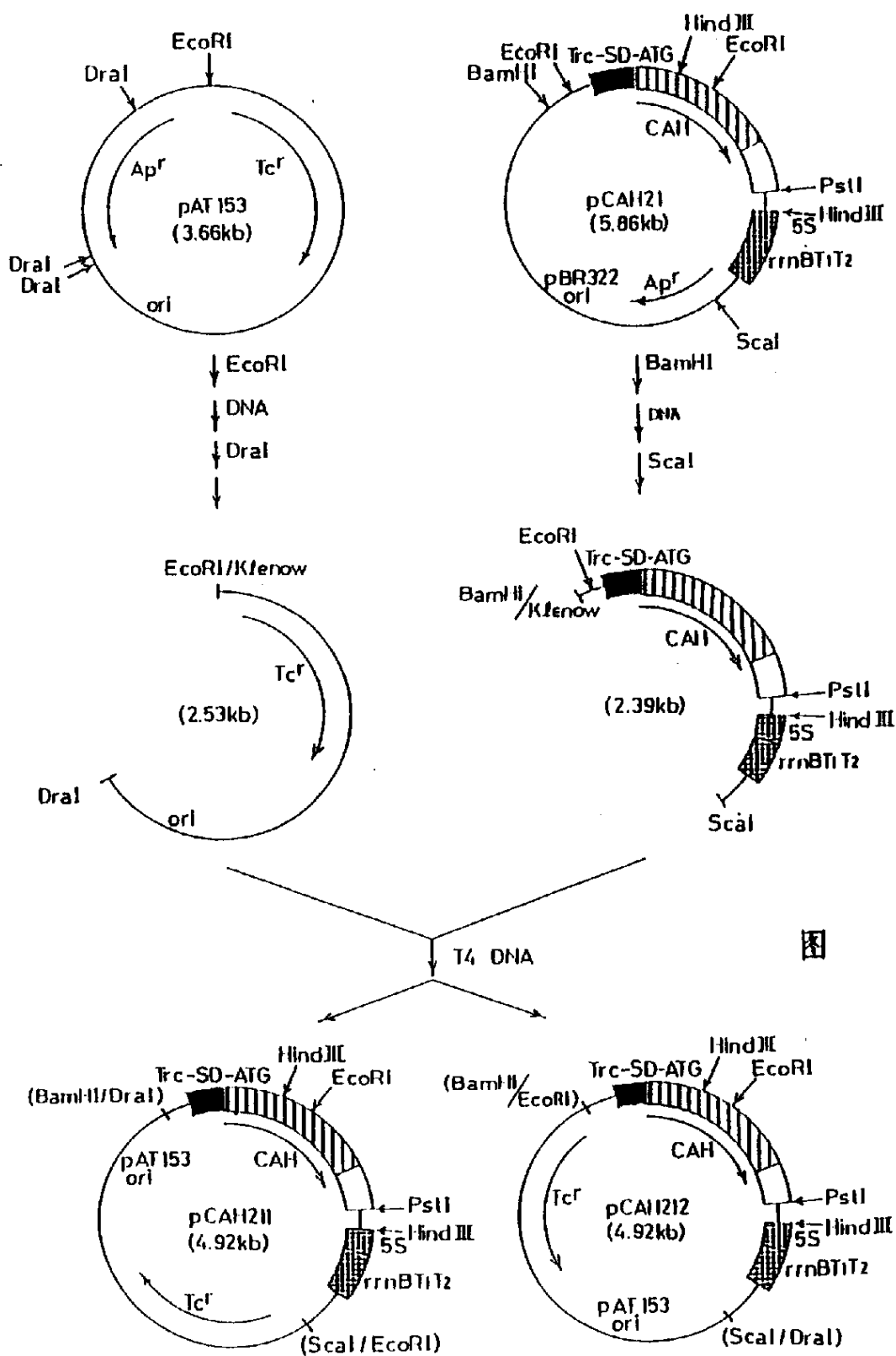
图 8



9



11



10