

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 9/16

C12N 15/63 C12N 15/81

C12N 1/16

/(C12N9/16,C12R1 : 84,
1 : 78)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 01123246.3

[45] 授权公告日 2004 年 8 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1161461C

[22] 申请日 2001.7.20 [21] 申请号 01123246.3

[30] 优先权

[32] 2000. 7.25 [33] DE [31] 10036491.8

[71] 专利权人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 R·米勒 J·P·塔尔霍菲

F·盖佩 W·赫尔克 S·格拉泽

H·埃克斯坦 T·基尔施鲍姆

B·波马里乌斯

审查员 徐益君

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 3 页

[54] 发明名称 碱性磷酸酶在酵母中的表达

[57] 摘要

本发明涉及在酵母细胞中重组生产和表达真核碱性磷酸酶的方法, 其中使用编码比活性高于 3000U/mg 的高活性真核碱性磷酸酶的 DNA。 本发明还涉及将相应核酸序列插入在甲基营养型酵母菌株中表达的载体中的方法, 以及合适的载体和宿主菌株。

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

1. 在酵母细胞中生产真核碱性磷酸酶的方法，包括以下步骤：
 - a) 克隆一种为在酵母中表达而进行了密码子优化的基因序列进入不同的载体，该基因序列编码比活性高于 3000U/mg 的真核碱性磷酸酶，
 - b) 转化酵母，
 - c) 表达，以及
 - d) 纯化碱性磷酸酶，其中
 - 第一载体具有针对第一选择标记的抗性基因，
 - 通过在含有低浓度第一选择标记的营养培养基中生长来选择抗性基因和基因序列已经整合到基因组的转化子，
 - 通过多重转化增加基因拷贝数，其中多重转化子通过在选择压力增加的营养培养基中生长来选择，
 - 加入具有针对第二选择标记的抗性基因的第二载体，
 - 通过第二载体的多重转化增加基因拷贝数，其中多重转化子通过在选择压力增加的营养培养基中生长来选择，
 - 选择已经以稳定方式整合了几个拷贝的基因序列和选择标记抗性基因的克隆。
2. 权利要求 1 的方法，其中基因序列相应于 SEQ ID NO: 5。
3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中使用甲基营养型酵母细胞。
4. 权利要求 3 的方法，其中使用巴斯德毕赤酵母或多形汉逊酵母作为酵母菌株。
5. SEQ ID NO: 5 的 DNA。
6. 含有 SEQ ID NO: 5 的载体。
7. 权利要求 6 的载体，其基本上相应于 pHAP10-3。
8. 含有来自 pHAP10-3 的完整表达盒的载体。
9. 权利要求 8 的载体，其基本上相应于 pHAP10-3/9K。
10. 用权利要求 8 或 9 的载体转化的宿主菌株。
11. 用载体 pHAP10-3/9K 和/或权利要求 6 或 7 的载体转化的宿主菌株。
12. 权利要求 11 的宿主菌株，其中巴斯德毕赤酵母或多形汉逊酵母被用作宿主菌株。

13. 用权利要求 7 到 9 任一项的载体转化的巴斯德毕赤酵母 X-33 菌株。

14. 生产高活性真核碱性磷酸酶的方法，其中所述酶在权利要求 10 到 13 任一项的宿主菌株中表达。

5

碱性磷酸酶在酵母中的表达

技术领域

- 5 本发明涉及重组生产和表达真核碱性磷酸酶的方法。本发明还涉及密码子优化的 DNA，其编码比活性在 3000 U/mg 以上的高活性真核碱性磷酸酶。另外，本发明也涉及将 DNA 插入在酵母细胞中表达的载体中的方法。

10 背景技术

- 碱性磷酸酶 (AP) 是二聚体、含锌的非特异性磷酸单酯酶，在诸如大肠杆菌和哺乳动物的原核及真核生物中均存在 (McComb et al., 《碱性磷酸酶》Plenum Press, New York)。多种碱性磷酸酶的一级结构比较显示了高度同源性 (大肠杆菌和哺乳动物 AP 间的同源性为 25
15 - 30%；Millan, 1988 Anticancer Res. 8, 995-1004; Harris, 1989 Clin. Chim. Acta 186, 133-150)。

- 在人和高等动物中，AP 家族包括位于不同基因座的四个成员 (Millan, 1988 Anticancer Res. 8, 995-1004; Harris 1989 Clin. Chim. Acta 186, 133-150)。碱性磷酸酶家族包括组织特异性 AP (胎盘 AP(PLAP),
20 生殖细胞 AP(GCAP)和肠 AP(IAP)) 和主要位于肝脏、肾脏和骨骼的非组织特异性 AP (TnAP)。

- 已知的 AP 的一个决定性的特征是哺乳动物 AP 催化活性的高可变性，其 k_{cat} 值高于大肠杆菌 AP 的 10 到 100 倍。在哺乳动物 AP 中，来自牛肠 (bIAP) 的 AP 具有最高的比活性。该特性使得 bIAP 对于生化
25 应用颇具吸引力，如使用相应的酶缀合物作为诊断试剂，或使 DNA 脱磷酸化。在 EP 0 955 369 和 Manes 等 (Manes et al. (1998), J. Biol. Chem. 273 No. 36, 23353-23360) 的文章中报导，存在各种具有不同比活性的牛肠碱性磷酸酶。目前，重组表达低活性 (最高 3000 U/mg) 真核碱性磷酸酶已经在 CHO 细胞 (bIAP I/WO 93/18139; Weissig et al. 1993,
30 Biochem. J. 260, 503-508) 和 COS 细胞 (人胎盘 AP/Berger et al., 1987, Biochemistry 84, 4885-4889) 等多种真核细胞系或杆状病毒表达系统 (人胎盘 AP/Davis et al. 1992, Biotechnology 10, 1149-1150) 中实现。在 CHO

细胞中表达更高活性牛肠 AP(比活性大于 3000 U/mg)也有报导(bIAP II, III 和 IV/Manes et al. 1998, J. Biol. Chem. 273 No.36, 23353-23360)。但是,在这些表达系统中表达碱性磷酸酶的缺点是低表达量,这使得重组生产高活性 AP 尤为不经济。

- 5 尽管,从理论上说,可以在大肠杆菌等原核宿主中表达真核碱性磷酸酶(人胎盘 AP/Beck and Burtscher, 1994 蛋白表达和纯化 5, 192-197),但在原核生物中表达的碱性磷酸酶没有糖基化,而这对制备酶缀合物尤为重要。

10 发明内容

因此,本发明的目的是发展一种高效稳定的表达方法,用以生产具有高比活性的糖基化真核碱性磷酸酶,由于该方法的表达量高,可以经济地生产这种碱性磷酸酶,并且产生比活性和热稳定性等特性与天然高活性或低活性碱性磷酸酶(可向 Roche Diagnostics GmbH, Biozyme,

- 15 Oriental Yeast 等商购)相当的酶。

本发明的目的通过在酵母特别是甲基营养型酵母中生产高比活性真核碱性磷酸酶的方法得以实现,该方法包括如下步骤:

- 20 a) 克隆一种基因序列进入不同的载体
 b) 转化酵母
 c) 表达, 以及
 d) 纯化碱性磷酸酶,
 其特征在于
 (i) 第一载体具有针对第一选择标记的抗性基因,
25 (ii) 抗性基因和基因序列已经整合到基因组的转化子通过在含有低浓度第一选择标记的营养培养基中生长来选择,
 (iii) 基因拷贝数通过多重转化增加, 其中多重转化子通过在选择压力增加的营养培养基中生长来选择,
 (iv) 加入除基因序列外还有针对第二选择标记的抗性基因的第二
30 载体,
 (v) 基因拷贝数通过第二载体的多重转化增加, 其中多重转化子通过在选择压力增加的营养培养基中生长来选择,

(vi) 选择几个拷贝的基因序列和选择标记抗性基因已经以稳定方式整合进基因组的克隆。

优选的基因序列是编码比活性超过 3000 U/mg、特殊情况下超过 5 7000 U/mg 到约 10000 U/mg 的真核碱性磷酸酶的 DNA 序列。例如，已经证实 SEQ ID NO: 1 的 DNA 序列适合用于本发明。在氨基酸水平上相应于 SEQ ID NO: 1 的密码子优化的 DNA 序列是特别优选的。密码子优化是指 SEQ ID NO: 1 的每个密码子已经通过静默突变优化，根据选定表达宿主增加翻译，从而产生 SEQ ID NO: 5 的序列，静默突变是指 DNA 水平改变但氨基酸水平没有改变。但是，也可以将与 SEQ ID NO: 1 不同、编码碱性磷酸酶的序列插入载体，所述序列可选地是密码子优化的，如 bIAP1, III, IV (DE 198 19 962 和 EP 0 955 369)。本发明的方法特别优选使用 SEQ ID NO: 5 的密码子优化的基因序列。相应基因序列然后被克隆进一个或几个载体，载体根据待转化的宿主选择。

15 甲基营养型酵母如巴斯德毕赤酵母、多形汉逊酵母以及其它酵母如酿酒酵母、*Yarrowia lipolytica* 或粟酒裂殖酵母特别适合作为酵母宿主。合适的载体对本领域技术人员是已知的，如 pPICZ α A, pIIC9K, Yes 载体, pTEF1/Zeo, pYDI (如 Invitrogen)。优选以此方式形成的表达载体以稳定方式转化进巴斯德毕赤酵母的各种菌株并整合进基因组。稳定整合进酵母基因组的优势在于在随后大体积发酵生产例如真核高活性碱性磷酸酶时无需选择压力。稳定整合进基因组是指表达载体通过同源重组等插入例如巴斯德毕赤酵母的基因组中，从而作为永久性成分通过遗传代代相传 (Cregg, J. M. et al., Mol. Cell. Biol. 5 (1985), 3376-3385)。

25 基因拷贝数在甲基营养型酵母中通过多重转化增加，同时以合适的选择标记如 Zeocin[®]或遗传霉素(G418)或营养缺陷型标记增加选择压力，然后，只有几个拷贝的表达载体稳定整合进基因组的克隆可以存活。要对较高浓度的用作选择标记的抗生素有抗性，该克隆必须产生更多的抗性蛋白。这可以通过表达载体的多重整合实现，所述表达载体含有高活性碱性磷酸酶表达盒和用作选择标记的抗生素的抗性基因。

30 以具有高表达量的高效稳定的表达方法经济地生产真核碱性磷酸酶的目的只有同时采取(i)到(vi)的措施才可实现。因此，不采取这些措施用含有 SEQ ID NO: 1 的 bIAP1 基因的表达式载体转化巴斯德毕赤酵

母菌株 X-33 (见实施例 1 和 2) 不会得到所需的结果。尽管该方法使得表达量相对于在 CHO 细胞中表达 bIAP^{II} (Manes et al., 1998, J. Biol. Chem. 273 No. 36, 23353-23360) 有显著增加, 但该方法仍无法经济地生产重组碱性磷酸酶。

- 5 本发明的方法的一个必需措施是合成密码子优化的基因序列。为了优化酵母中表达的每个密码子, 需要全部从头合成编码高活性真核碱性磷酸酶的约 1.5 kbp 长的基因。可以通过重新翻译 SEQ ID NO: 4 的高活性真核碱性磷酸酶 (bIAP-II) 的氨基酸序列并使用简并密码优化需要优化的每个密码子。为此目的, 该基因被分成长度为 54 到 82 个核苷酸的 28 个寡核苷酸。寡核苷酸被设计成 5' 和 3' 末端彼此以互补方式与相邻寡核苷酸重叠的有义链和反义链片段的交替序列。各例中重叠区域经过选择, 使得在随后的 PCR 反应中退火过程中非特异性结合大部分被阻止。基因 5' 和 3' 末端的寡核苷酸有编码区上游和下游的限制性内切酶的识别位点, 它可以用于随后将 SEQ ID NO: 5 的合成基因插入表达
- 10 载体中。因此, 限制性内切酶 EcoRI 的识别位点插入上游, 限制性内切酶 Asp718 的识别位点插入下游。寡核苷酸序列示于 SEQ ID NO: 6 到 33。

- 基因合成通过 PCR 反应进行。为此目的, 编码区首先被分成 3 个区段 (寡核苷酸 6 到 15, 16 到 23, 24 到 33), 这些区段在独立的 PCR
- 20 反应中产生。在使用重叠互补寡核苷酸通过 PCR 反应进行基因合成时, 基因片段逐步延长, 以形成全长产物, 在随后的循环中该产物再扩增。该方法中的退火温度取决于融解温度最低的重叠区。

- 3 个区段然后通过琼脂糖凝胶电泳分析, 具有预期长度的产物通过 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从凝胶中分离, 在随后的 PCR 反
- 25 应中合成, 以形成完整的基因产物。在该方法中, 前 5 个循环的 PCR 反应中不加入完整基因的 5' 和 3' 末端引物, 使得只有一些具有预期长度的基因产物的片段首先从 3 个区段形成。退火温度取决于融解温度最低的重叠区。随后, 加入终末引物, 相应于融解温度最低的引物的退火温度增加退火温度。具有预期长度的基因片段在随后的 25 个循环中高度
- 30 扩增。

PCR 混合物通过琼脂糖凝胶电泳分析, 分离出具有预期到大小的基因片段 (QIAquick 凝胶提取试剂盒/Qiagen)。

这种 PCR 片段的克隆、转化进巴斯德毕赤酵母和表达如实施例 3 所述。

高活性碱性磷酸酶的密码子优化的基因使得表达量相对于以野生型基因进行的第一次实验增加了 3 倍。

5 但是, 这些克隆并未提供生产高活性碱性磷酸酶的经济方法。

增加巴斯德笔触毕赤酵母中异源和同源蛋白的表达量的一个措施是通过多重转化增加细胞中的基因拷贝数。该措施可增加靶基因的转录产物即 mRNA。基因拷贝数通过含有表达载体的克隆的多重转化同时在随后转化子在含有浓度更高的用作选择标记的抗生素的营养平板上
10 生长时增加选择压力而增加。在该方法中, 由第一轮转化中获得了至少一个拷贝的表达载体的表达克隆再次成为感受态(见实施例 1), 再次用表达载体转化。通过涂布于含有更高浓度选择压力的营养平板即含有比第一轮转化更高浓度的作为选择标记的抗生素(如 Zeocin®)的平板上来选择已经有几个拷贝的表达载体整合进基因组的转化子。为此, 确
15 定由第一轮转化获得的克隆仍能生长的作为选择标记的抗生素的最高浓度, 再次转化后, YPDS 琼脂平板中作为选择标记的抗生素的浓度相应增加到高于确定的阈值。增加表达载体的拷贝数也同时增加了作为表达载体一种成分的抗性基因的拷贝数, 因此也增加了对更高浓度作为选择标记的抗生素的抗性。也可以通过改变营养平板中作为选择标记的抗
20 生素的浓度来选择基因组中含有不同拷贝数表达载体的克隆(约 100 到 2000 µg/ml, 见实施例 4)。

另一个可以用来增加巴斯德毕赤酵母等酵母中的异源和同源蛋白的表达量的措施时通过多重选择来增加基因拷贝数。为此, 已经通过含有靶基因表达盒(例如 SEQ ID NO: 5 的编码高活性碱性磷酸酶的基
25 因)和用作选择标记的第一种抗生素(如 Zeocin®)的抗性基因的表达载体的多重转化优化的表达克隆用第二种表达载体转化, 第二种载体含有靶基因(例如 SEQ ID NO: 5 的编码高活性碱性磷酸酶的基因)和用作选择标记的第二种抗生素(如遗传霉素(G418))的抗性基因。当转化子随后在含有用作选择标记的第二种抗生素的异源平板上铺平板时, 选
30 择出来的克隆除了含有用作选择标记的第一种抗生素的抗性基因的表达载体的拷贝外, 也获得了至少一个拷贝含有作为选择标记的第二种抗生素的抗性基因的表达载体。这些表达克隆然后就可以用含有作为选择

标记的第二种抗生素的抗性基因的表达载体进一步进行多重转化(见实施例 5)。

通过综合多重转化和双重选择,可以使表达量相对于含有密码子优化基因的第一轮转化克隆增加 4 倍。

- 5 重组进行磷酸酶可以通过本领域技术人员已知的提取方法由生物体中提取,提取方法例见《蛋白纯化》, Springer Verlag, 编辑 Robert Scopes (1982)。比活性大于 7000 U/mg 的纯化带产物通过色谱分离方法获得,特别是使用疏水柱材料和阳离子交换剂的方法。

纯化产物进行 N 末端测序,以鉴定重组的高活性碱性磷酸酶。

- 10 确定的主要序列是 EAEAEFLIPA (SEQ ID NO: 36)。该序列明显与 AP"LIPA" (SEQ ID NO: 37) 的 N 末端序列和构建体 EAEAEF 连接肽 (SEQ ID NO: 38) 有关,所述构建体是通过克隆基因序列至载体中的策略和通过 Kex2 信号肽酶(如 Invitrogen)切割 α 因子信号肽而形成。

- 15 重组碱性磷酸酶产物的稳定性与天然碱性磷酸酶进行比较。当溶液经受热胁迫时(55°C),样品产生相当的结果。

因此,本发明首次公开了一种方法,它可以由哺乳动物细胞如牛肠经济地生产重组碱性磷酸酶,所述重组酶具有与来自牛肠的天然高活性碱性磷酸酶相当的特性,并被糖基化。

- 20 本发明也涉及 SEQ ID NO: 5 的 DNA 序列,其用作在巴斯德毕赤酵母中表达高活性碱性磷酸酶基因的密码子优化基因序列。

本发明的另一个主题是含有 SEQ ID NO: 5 的载体,特别优选的是图 2 的 pHAP10-3 载体。pHAP10-3 载体时可商购的载体 pPICZ α A,含有 AOX1 启动子控制下的 SEQ ID NO: 5 的本发明基因。

- 25 本发明的另一个主题是已用本发明的载体转化的宿主菌株。特别优选的是用载体 pHAP10-3 转化的巴斯德毕赤酵母 X-33 菌株。

- 30 另一种优选的载体是含有来自 pHAP10-3 的整个表达盒的载体,它基本上含有 AOX1 启动子;来自酿酒酵母的 α 因子的信号肽,它以正确的读框克隆在信号肽之后;SEQ ID NO: 5 的密码子优化的靶基因,它编码高活性碱性磷酸酶;以及 AOX1 转录终止区(见图 3)。载体 pHAP10-3/9K 是特别优选的,它含有可商购的载体 pPIC9K (Invitrogen)和来自 pHAP10-3 的表达盒,包括 SEQ ID NO: 5 的合成基因。

载体 pHAP 10-3 和 pHAP 10-3/9K 同等相关, 因为最终生产克隆含有两个载体的拷贝。

本发明的另一个主题是已经用 pHAP 10-3/9K 载体转化的宿主菌株。但是, 本领域技术人员已知的其它载体和宿主对本发明也是合适的, 如 YES 载体、pYD1、pTEF 1/ZEO (Invitrogen) 和酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、多形汉逊酵母、*Yarrowia lipolytica*, 特别是巴斯德毕赤酵母 X-33。本发明特别优选载体 pHAP 10-3/9K 转化的巴斯德毕赤酵母 X-33 菌株。

因此, 本发明的另一个主题是生产高活性真核碱性磷酸酶的方法, 通过在已经用本发明的一个或几个载体特别是用 pHAP 10-3 或 pHAP 10-3/9K 载体转化的宿主菌株表达蛋白来生产。已经用本发明的载体转化的巴斯德毕赤酵母菌株对本发明的方法是特别优选的。已经用 pHAP 10-3 和 pHAP 10-3/9K 载体转化的巴斯德毕赤酵母菌株 X-33 尤为优选。

附图说明

图 1

在 pICZ α A (Invitrogen) 中含有 bIAP^{II} 基因的表达载体 pHAP 1 的质粒图。

图 2

在 pPIC9K (Invitrogen) 中含有合成基因的表达载体 pHAP 10-3 的质粒图。

图 3

在 pPIC9K (Invitrogen) 中含有合成基因的表达载体 pHAP 10-3/9K 的质粒图。

缩写

YPD: 酵母蛋白胨葡萄糖

YPDS: 酵母蛋白胨葡萄糖山梨糖醇

BMGY: 缓冲甘油复合培养基

BMMY: 缓冲甲醇复合培养基

具体实施方式

实施例 1:

克隆 bIAPII 基因

首先在 SEQ ID NO: 1 的 bIAPII 基因 (EP 0955 369; Manes et al., 1989, J. Biol. Chem. 273 No. 36, 23353-23360) 的上游和下游提供限制性内切酶切割位点, 该切割位点适合用于通过 PCR 和选择 SEQ ID NO: 2 和 3 的合适引物克隆进巴斯德毕赤酵母表达载体。因此, EcoRI 限制性内切酶切割位点连接在上游, Asp718 I 限制性内切酶切割位点连接在下游。

PCR 片段用 EcoRI 和 Asp718 I (Roche Diagnostics GmbH) 重新切割, 再次分离 (QIAquick 凝胶提取试剂盒/Qiagen), 然后再连接至已经用 EcoRI 和 Asp718 I (Roche Diagnostics GmbH) 线性化的表达载体 pPICZ α A (Invitrogen) 的载体片段, 并分离 (QIAquick 凝胶提取试剂盒/Qiagen)。在该载体中, bIAPII 基因处于 AOX 1 (巴斯德毕赤酵母醇氧化酶 1 启动子, 可以用甲醇诱导) 启动子控制之下, 并以正确的读框克隆在酿酒酵母 α 因子信号肽之后。然后, 通过限制性内切酶分析和测序分析以此方式插入的基因片段是否无误。以此方式形成的含有编码高活性真核碱性磷酸酶的 bIAPII 基因的表达载体被称为 pHAP-1 (见图 1)。

在巴斯德毕赤酵母中 pHAP-1 的转化

为了在巴斯德毕赤酵母 X-33 中转化 pHAP-1 并随后整合进基因组中, 载体首先用 SacI (Roche Diagnostics GmbH) 线性化。转化使用 Gene Pulser II (Biorad) 通过电穿孔进行。

将 5 毫升 YPD 培养基 (Invitrogen) 中接种巴斯德毕赤酵母野生型菌株菌落, 30°C 振荡温育过夜。然后用过夜培养物以 1: 2000 接种 200 毫升新鲜 YPD 培养基 (Invitrogen), 30°C 振荡温育过夜, 直至 OD₆₀₀ 达到 1.3 到 1.5。将细胞离心 (1500×g/5 分钟), 沉淀重悬于 200 毫升冰冷无菌水中 (0°C)。细胞再次离心 (1500×g/5 分钟), 重悬于 100 毫升冰冷无菌水中 (0°C)。细胞再次离心并重悬于 10 毫升冰冷 (0°C) 的 1M 山梨糖醇 (ICN) 中。以此方式获得的细胞保持在冰上, 立即用于转化。

约 1 μ g 线性化 pHAP-1 载体 DNA 加入 80 μ l 细胞, 将整个混合物转移到冰冷 (0°C) 的电穿孔池中, 冰上温育 5 分钟。随后, 将电穿孔

池转移到 Gene Pulser II (Biorad)中, 在 1 kV/1 kΩ/25 μF 下进行转化。电穿孔后, 将 1 毫升 1 M 山梨糖醇 (ICN) 加入混合物, 然后取 100 到 150 μl 涂布于含有 100 μg/ml Zeocin®(Invitrogen)的 YPDS 琼脂平板 (Invitrogen)上。平板然后在 30°C 温育 2 - 4 天。

- 5 Raster MD (基本葡萄糖) 平板用克隆接种, 然后进一步进行分析。选出生长的克隆, 重悬于 20 μl 无菌水中, 用 17.5 U 溶细胞酶(Roche Diagnostics GmbH) (1 h, 37°C)裂解, 通过 PCR 直接检查 bIAPH 表达盒是否正确整合。

转化过程中完整表达盒整合进基因组的克隆用于表达实验。

10 高活性碱性磷酸酶的表达

3 ml BMGY 培养基(Invitrogen)用阳性克隆接种, 30°C 振荡温育过夜。随后, 在 600 nm 处确定 OD, 转接 10 毫升 BMMY 培养基(Invitrogen)使其 OD₆₀₀ 为 1。BMMY 培养基(Invitrogen)含有甲醇(Mallinckrodt Baker B.V.), 它通过 AOX 1 启动子诱导高活性碱性磷酸酶的表达。

- 15 摇瓶 30°C 振荡温育, 每 24 小时取样, 确定 OD₆₀₀, 测定高活性碱性磷酸酶的表达活性, 加入 0.5% 甲醇 (Mallinckrodt Baker B.V.) 进行进一步诱导。表达实验进行 96 小时。

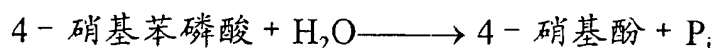
实施例 2

20 高活性碱性磷酸酶活性测定

- 取出 500 μl 实施例 1 的表达混合物, 确定 OD₆₀₀, 将细胞离心。储存上清, 细胞沉淀重悬, 以相应于 OD₆₀₀ 的一定量 Y-PER™ (50 到 300 μl/Pierce) 裂解, 室温振荡 1 小时。随后, 裂解物离心除去细胞沉淀 (15000×g/5 分钟), 上清转移到新鲜反应容器中。5 μl 裂解物用于活
- 25 性检测。

活性检测的原理如下:

AP



- 30 测定 405 纳米的吸光度增加值。

50 μl 4 - 硝基苯磷酸溶液 (0.67 mol/l 4 - 硝基苯磷酸, 钠盐(Roche Diagnostics GmbH)) 加入至 3 毫升二乙醇胺缓冲液 (1 mol/l 二乙醇胺

(Merck) pH9.8, 0.5 mmol/l MgCl₂ (Riedel de Haen)), 混合物于 37°C 温育。然后加入 5μl 裂解物起始反应, 持续 3 分钟测定 37°C 吸光度变化, 由此计算 ΔA/min.

根据下式计算活性:

$$\text{活性} = \frac{3.10}{\epsilon \times 0.005 \times 1} \times \Delta A / \text{min} \times \frac{1}{\text{因子 X}} [\text{U/ml 样品溶液}]$$

$$\epsilon = 18.2 [1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

因子 X = 细胞裂解后浓度因子

表达培养物培养基上清的活性以类似方式确定。这种情况下反应也通过加入 5μl 上清起始, 另外还加入 0.5 mM ZnCl₂。计算时不考虑因子 X。

实施例 3

克隆基因合成的 PCR 片段

用 EcoRI 和 Asp718 (Roche Diagnostics GmbH) 再次切割 PCR 片段, 再次分离 (QIAquick 凝胶提取试剂盒/Qiagen), 然后连接至已用 EcoRI 和 Asp718 (Roche Diagnostics GmbH) 线性化处理的表达载体 pPICZαA (Invitrogen) 的载体片段, 再分离 (QIAquick 凝胶提取试剂盒/Qiagen)。在此载体中, 合成基因处于 AOX 1 启动子 (巴斯德毕赤酵母醇氧化酶 1 启动子, 可用甲醇诱导, Malinckrodt Baker B.V.) 控制之下, 以正确的读框克隆在酿酒酵母 α 因子的信号肽之后。然后通过限制性分析和测序检查以此方式插入的基因片段是否无误。以此方式形成的含有编码高活性真核碱性磷酸酶的合成基因的表达载体被称为 pHAP 10-3 (见图 2)。

在巴斯德毕赤酵母中 pHAP 10-3 的转化

为了在巴斯德毕赤酵母中进行 pHAP 10-3 的转化并整合进基因组中, 载体首先用 SacI (Roche Diagnostics GmbH) 线性化处理。使用 Gene Pulser II (Biorad) 通过电穿孔进行转化。将 5 毫升 YPD 培养基 (Invitrogen) 接种巴斯德毕赤酵母菌落, 30°C 振荡温育过夜。然后用过夜培养物以 1: 2000 转接 200 毫升新鲜 YPD 培养基 (Invitrogen), 30°C 振荡温育过

夜,直至 OD_{600} 达到 1.3 到 1.5。将细胞离心 ($1500\times g/5$ 分钟),沉淀重悬于 200 毫升冰冷无菌水中 ($0^{\circ}C$)。细胞再次离心 ($1500\times g/5$ 分钟),重悬于 100 毫升冰冷无菌水中 ($0^{\circ}C$)。细胞再次离心并重悬于 10 毫升冰冷 ($0^{\circ}C$) 的 1M 山梨糖醇 (ICN) 中。以此方式获得的细胞保持
5 在冰上,立即用于转化。

约 $1\mu g$ 线性化 pHAP 10-3 载体 DNA 加入 $80\mu l$ 细胞,将整个混合物转移到冰冷 ($0^{\circ}C$) 的电穿孔池中,冰上温育 5 分钟。随后,将电穿孔池转移到 Gene Pulser II (Biorad) 中,在 $1\text{ kV}/1\text{ k}\Omega/25\mu F$ 下进行转化。电穿孔后,将 1 毫升 1 M 山梨糖醇 (ICN) 加入混合物,然后取 100 到
10 150 μl 涂布于含有 $100\mu g/ml$ Zeocin[®] (Invitrogen) 的 YPDS 琼脂平板 (Invitrogen) 上。平板然后在 $30^{\circ}C$ 温育 2-4 天。

Raster MD (基本葡萄糖) 平板用克隆接种,然后进一步进行分析。选出生长的克隆,重悬于 $20\mu l$ 无菌水中,用 17.5 U 溶细胞酶 (Roche Diagnostics GmbH) ($1\text{ h}, 37^{\circ}C$) 裂解,通过 PCR 直接检查合成 AP 表达盒
15 是否正确整合。

转化过程中完整表达盒整合进基因组的克隆用于表达实验。

高活性碱性磷酸酶的表达

3 ml BMGY 培养基 (Invitrogen) 用阳性克隆接种, $30^{\circ}C$ 振荡温育过夜。随后,在 600 nm 处确定 OD , 转接 10 毫升 BMMY 培养基 (Invitrogen) 使其 OD_{600} 为 1。BMMY 培养基 (Invitrogen) 含有甲醇 (Mallinckrodt Baker B.V.), 它通过 AOX 1 启动子诱导高活性碱性磷酸酶的表达。
20

摇瓶 $30^{\circ}C$ 振荡温育, 每 24 小时取样, 确定 OD_{600} , 测定高活性碱性磷酸酶的表达活性, 加入 0.5% 甲醇 (Mallinckrodt Baker B.V.) 进行进一步诱导。表达实验进行 96 小时。

高活性碱性磷酸酶活性测定

25

取出 $500\mu l$ 表达混合物, 确定 OD_{600} , 将细胞离心。储存上清, 细胞沉淀重悬, 以相应于 OD_{600} 的一定量 Y-PER[™] (50 到 $300\mu l$ /Pierce) 裂解, 室温振荡 1 小时。随后, 裂解物离心除去细胞沉淀 ($15000\times g/5$ 分钟), 上清转移到新鲜反应容器中。 $5\mu l$ 裂解物用于活性检测。

30 活性检测如上所述进行。

实施例 4

通过多重转化增加表达量

制备表达实验的最佳克隆用于如上所述的外推法，并以 1 μ g 线性化 pHAP 10-3 载体 DNA 再次转化，转化混合物涂布于含有 1000 到 2000 μ g/ml Zeocin[®] (Invitrogen) 的 YPDS 琼脂平板 (Invitrogen) 上。结果，选择压力增加，使得只有基因组中整合了几个拷贝的表达载体 pHAP 10-3 因而也有几个拷贝的相应抗性基因（本例中为 Zeocin[®]）的克隆才能生长。Zeocin[®] 抗性蛋白是印度斯坦链异壁菌的博来霉素基因产物（Chalmers, T. et al., Curr. Genet. 20(1991), 309-314; Drocourt, D. et al., Nucleic Acid Research 18 (1990), 4009），它以化学计量浓度比结合 Zeocin[®]，因此使细胞对 Zeocin[®] 有抗性。YPDS 琼脂平板中 Zeocin[®] 的浓度越高，为了定量结合 Zeocin[®] 从而能够生长，细胞需要产生更多的抗性蛋白。例如当多个拷贝的抗性基因整合进基因组时，这就有可能。如上所述，光栅 (raster) MD 平板用克隆转接，如上所述通过 PCR 分析再次检查 haAP 表达盒是否正确整合。随后，这些克隆如上所述测定 haAP 活性。

实施例 5

通过使用第二种选择压力增加表达量

增加 Zeocin[®] 浓度到高于 2000 μ g/ml 不会导致高活性进行磷酸酶的表
20 表达量增加。为了进一步增加表达克隆中 SEQ ID NO: 5 的基因的拷贝数，通过第二种选择压力（优选为 G418 (Roche Diagnostics GmbH)）由实施例 3 和 4 产生的克隆中选择有其它表达载体整合进基因组、表达量最高的克隆，所述 SEQ ID NO: 5 的基因编码高活性进行磷酸酶，为在酵母中表达已经过密码子优化。为此，来自 pHAP10-3 的完整表达盒被
25 克隆进载体 pIC9K，通过 G418 (Roche Diagnostics GmbH) 选择该载体整合进基因组中的克隆，所述 pHAP10-3 表达盒包括 AOX1 启动子、酿酒酵母 α 因子的信号肽、SEQ ID NO: 5 的高活性碱性磷酸酶的密码子优化的基因、和如下所述使用合适的引物通过 PCR 分离的 AOX 1 转录终止区。引物示于 SEQ ID NO: 34 和 35。

30 PCR 混合物通过琼脂糖凝胶电泳分析，分离具有预期大小的基因片段（QIAquick 凝胶提取试剂盒/Qiagen），用 SacI 和 NotI (Roche Diagnostics GmbH) 再次切割，然后再从琼脂糖凝胶中分离（QIAquick

凝胶提取试剂盒/Qiagen), 连接至由 pIC9K 分离的、已经用 SacI/NotI (Roche Diagnostics GmbH)线性化的载体片段。这确保来自 pHAP10-3 的完整表达盒以 pPIC9K 的相同形式存在。通过限制性分析和旁侧区测序检查插入的片段。以此方式形成的表达载体被称为 pHAP10-3/9K(见图 3)。

如上所述制备来自 pHAP10-3 (Zeocin 抗性) 的多重转化、具有最高 haAP 表达量的克隆用于电穿孔, 如上所述用来自 SacI (Roche Diagnostics GmbH)线性化处理的 pHAP10-3/9K 的载体片段 1 μ g 转化。转化混合物随后在 4°C 下在 1M 山梨糖醇 (ICN) 中储存 1 到 3 天 (以形成 G418 抗性), 取 100 到 200 μ l 涂布于含有 1、2 和 4 mg/ml G418 (Roche Diagnostics GmbH)的 YPD 平板(Invitrogen)上, 30°C 温育 3 到 5 天。如上所述通过活性检测再次检查所得克隆的高活性真核碱性磷酸酶的表达增加。

序列表

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> 碱性磷酸酶在酵母中的表达

<130> 5387/00/

<140>

<141>

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1476

<212> DNA

<213> 牛

<400> 1

```

gaattcctca tcccagctga ggaggaaaac cccgccttct ggaaccgcca ggcagcccag 60
gcccttgatg tagccaagaa gttgcagccg atccagacag ctgccaagaa tgtcatcctc 120
ttcttggggg atgggatggg ggtgcctacg gtgacagcca ctcgatcct aaaggggcag 180
atgaatggca aactgggacc tgagacaccc ctggccatgg accagttccc atacgtggct 240
ctgtccaaga catacaacgt ggacagacag gtgccagaca gcgcaggcac tgccactgcc 300
tacctgtgtg ggggtcaagg caactacaga accatcggtg taagtgcagc cgcccgcctac 360
aatcagtgca acacgacacg tgggaatgag gtcacgtctg tgatcaaccg ggccaagaaa 420
gcagggaagg ccgtgggagt ggtgaccacc accagggtgc agcatgcctc cccagccggg 480
gcctacgcgc acacggtgaa ccgaaactgg tactcagacg ccgacctgcc tgctgatgca 540
cagaagaatg gctgccagga catcgccgca cagctggtct acaacatgga tattgacgtg 600
atcctgggtg gaggccgaat gtacatgttt cctgagggga cccagaccc tgaataccca 660
gatgatgccg gtgtgaatgg agtccggaag gacaagcaga acctggtgca ggaatggcag 720
gccaaagcacc agggagccca gtatgtgtgg aaccgcactg cgctccttca ggcggccgat 780
gactccagtg taacacacct catgggcctc tttgagccgg cagacatgaa gtataatgtt 840
cagcaagacc acaccaagga cccgacctg gcggagatga cggaggcggc cctgcaagtg 900
ctgagcagga acccccggg cttctacctc ttctgtggagg gaggcgcat tgaccacgt 960
caccatgacg gcaaagctta tatggcactg actgaggcga tcatgtttga caatgccatc 1020
gccaaaggcta acgagctcac tagcgaactg gacacgciga tccttgtcac tgcagaccac 1080
tcccatgtct tctcttttgg tggctacaca ctgcgtggga cctccatttt cggctctggcc 1140
cccggaagg ccttagacag caagtcctac acctccatcc tctatggcaa tggcccaggc 1200
tatgcgcttg gcgggggctc gagggccgat gttaatggca gcacaagcga ggaaccctca 1260
taccggcagc agggggccgt gcccctggct agcgagaccc acgggggcca agacgtggcg 1320
gtgttcgcgc gagggccgca ggcgcacctg gtgcacggcg tgcaggagga gaccttcgtg 1380
gcgcacatca tggcctttgc gggctgcgtg gagccctaca ccgactgcaa tctgccagcc 1440
cccgccaccg ccaccagcat ccccgactag ggtacc 1476

```

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 2

gcgcgaattc ctcattcccag ctgaggagga aaacccccgcc

40

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 3

cgcggtacc ctagtcgggg atgctggtgg cggtgg

36

<210> 4

<211> 487

<212> PRT

<213> 牛

<400> 4

Leu Ile Pro Ala Glu Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala
 1 5 10 15

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

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

Val Thr Ala Thr Arg Ile Leu Lys Gly Gln Met Asn Gly Lys Leu Gly
 50 55 60

Pro Glu Thr Pro Leu Ala Met Asp Gln Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser
 65 70 75 80

Lys Thr Tyr Asn Val Asp Arg Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr Ala
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Tyr Arg Thr Ile Gly Val
 100 105 110

Ser Ala Ala Ala Arg Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu

115	120	125
Val Thr Ser Val Ile Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ala Val Gly		
130	135	140
Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Ala Tyr		
145	150	155
Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Leu Pro Ala		
	165	170
		175
Asp Ala Gln Lys Asn Gly Cys Gln Asp Ile Ala Ala Gln Leu Val Tyr		
	180	185
		190
Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Met Tyr Met Phe		
	195	200
		205
Pro Glu Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Ala Ser Val Asn		
	210	215
		220
Gly Val Arg Lys Asp Lys Gln Asn Leu Val Gln Glu Trp Gln Ala Lys		
225	230	235
		240
His Gln Gly Ala Gln Tyr Val Trp Asn Arg Thr Ala Leu Leu Gln Ala		
	245	250
		255
Ala Asp Asp Ser Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Ala		
	260	265
		270
Asp Met Lys Tyr Asn Val Gln Gln Asp His Thr Lys Asp Pro Thr Leu		
	275	280
		285
Ala Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Arg		
	290	295
		300
Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His		
305	310	315
		320
Asp Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Ile Met Phe Asp Asn		
	325	330
		335
Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile		
	340	345
		350
Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr		
	355	360
		365
Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp		
	370	375
		380

Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala
385 390 395 400

Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu
405 410 415

Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His
420 425 430

Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
435 440 445

Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe
450 455 460

Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala
465 470 475 480

Thr Ala Thr Ser Ile Pro Asp
485

<210> 5

<211> 1476

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 5

```

gaattcttga ttccagctga agaagaaaat ccagcttttt ggaatagaca agctgctcaa 60
gctttggatg ttgctaagaa gttgcaacca attcaaactg ctgctaagaa tgttattttg 120
tttttgggtg atggatatggg tgttccaact gttactgcta ctagaatttt gaagggtcaa 180
atgaatggta agttgggtcc agaaactcca ttggctatgg atcaattttc atacgttgct 240
ttgtcctaaga cttacaatgt tgatagacaa gttccagatt ctgctggtac tgctactgct 300
tacttgtgtg gtgttaaggg taattacaga actattgggtg tttctgctgc tgctagatac 360
aatcaatgta atactactag aggtaatgaa gttacttctg ttattaatag agctaagaag 420
gctggttaagg ctgttggtgt tgttactact actagagttc aacatgcttc tccagctggt 480
gcttacgctc atactgttaa tagaaattgg tactctgatg ctgatttgcc agctgatgct 540
caaaagaatg gttgtcaaga tattgctgct caattgggtt acaatatgga tattgatgtt 600
attttgggtg gtggtagaat gtacatgttt ccagaaggta ctccagatcc agaataccca 660
gatgatgctt ctgttaatgg tgttagaaaag gataagcaaa atttgggttca agaatggcaa 720
gctaagcatc aagggtgctca atatgttttg aatagaactg ctttgttgca agctgctgat 780
gattctagtg ttactcattt gatgggtttg tttgaaccag ctgatatgaa gtataatgtt 840
caacaagatc atactaagga tccaactttg gctgaaatga ctgaagctgc tttgcaagtt 900
ttgtctagaa atccaagagg tttttacttg tttgttgaag gtggtagaat tgatcatggt 960
catcatgatg gtaaggctta tatggctttg actgaagcta ttatgtttga taatgctatt 1020

```

```

gctaaggcta atgaattgac ttctgaattg gatactttga ttttggttac tgctgatcat 1080
agtcattgttt tttcttttgg tggttacact ttgagaggta cttctatatt tggtttggct 1140
ccaggtaagg ctttgatag taagtcctac acttctatatt tgtatggtaa tgggccaggt 1200
tatgctttgg gtggtgggtc tagaccagat gttaatggta gtactagtga agaaccatct 1260
tacagacaac aagctgctgt tccattggct agtgaaactc atggtgggtga agatgttgct 1320
gtttttgcta gaggtccaca agctcatttg gttcatgggtg ttcaagaaga aacttttggt 1380
gctcatatta tggcttttgc tggttgtgtt gaaccataca ctgattgtaa tttgccagct 1440
ccagctactg ctactagtat tccagattaa ggtacc 1476

```

<210> 6

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 6

```

gcgcgaattc ttgattccag ctgaagaaga aaatccagct ttttggtaata gacaagctgc 60
tcaagctttg gatgttgc 78

```

<210> 7

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 7

```

ccaaaaacaa aataacattc ttagcagcag ttggaattgg ttgcaacttc ttagcaacat 60
ccaaagcttg 70

```

<210> 8

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 8

```

gaatgttatt ttgttttgg gtgatggat ggggtgtcca actgttactg ctactagaat 60
tttgaaggg 69

```

<210> 9

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 9

ggaaattgat ccatagccaa tggagtttct ggacccaact taccattcat ttgacccttc 60
aaaattctag 70

<210> 10

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 10

gctatggatc aatttcata cgttgctttg tctaagactt acaatgttga tagacaagtt 60
ccagattctg c 71

<210> 11

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 11

ccaatagtgc tgtaattacc cttaacacca cacaagtaag cagtagcagt accagcagaa 60
tctggaactt g 71

<210> 12

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 12

gtaattacag aactattggc gtttctgctg ctgctagata caatcaatgt aatactacta 60
gaggtaatga ag 72

<210> 13

<211> 74

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 13

agtaacaaca ccaacagcct taccagcctt cttagctcta ttaataacag aagtaacttc 60
attacctcta gtag 74

<210> 14

<211> 74

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 14

gctgttggtg ttgttactac tactagagtt caacatgctt ctccagctgg tgcttacgct 60
catactgtta atag 74

<210> 15

<211> 68

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 15

caaccattct tttgagcatc agctggcaaa tcagcatcag agtaccaatt tctattaaca 60
glatgagc 68

<210> 16

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 16

gatgctcaaa agaatgggtg tcaagatatt gctgctcaat tggtttaca tatgg 55

<210> 17

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 17
ccttctggaa acatgtacat tctaccacca cccaaaataa catcaatatc catattgtaa 60
accaattgag ca 72

<210> 18
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 18
gtacatgttt ccagaaggta ctccagatcc agaataccca gatgatgctt ctgttaatgg 60
tgtagaaag g 71

<210> 19
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 19
catattgagc accitgatgc ttagcttgcc attcttgaac caaattttgc ttatcctttc 60
taacaccatt aac 73

<210> 20
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 20
gcatcaaggt gctcaatatg tttggaatag aactgctttg ttgcaagctg ctgatgattc 60
tagtgttact c 71

<210> 21
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 21
cttcataatca gctgggttcaa acaaaccat caaatgagta acactagaat catc 54

<210> 22
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 22
gaaccagctg atatgaagta taatgttcaa caagatcata ctaaggatcc aactttggc 59

<210> 23
<211> 67
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 23
cctcttggat ttctagacaa aacttgcaaa gcagcttcag tcatttcagc caaagttigga 60
tccttag 67

<210> 24
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 24
gtctagaaat ccaagagggt tttacttggt tgttgaagggt ggtagaattg atcatgggtca 60
tcatgatgg 69

<210> 25
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 25
ccttagcaat agcattatca aacataatag cttcagtcaa agccatataa gccttaccat 60

catgatgacc atg 73

<210> 26

<211> 74

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 26

gataatgcta ttgctaaggc taatgaattg acttctgaat tggatacttt gatatttggtt 60
actgctgatac atag 74

<210> 27

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 27

ccaaacccaaa aatagaagta cctctcaaag tgtaaccacc aaaagaaaaa acatgactat 60
gatcagcagt aac 73

<210> 28

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 28

cttctattttt tggtttggct ccaggtaagg ctttggatag taagtcttac acttctatatt 60
tgtatggtaa tgg 73

<210> 29

<211> 76

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 29

ctagtactac cattaacatc tggctctagaa ccaccaccca aagcataacc tggaccatta 60
ccatacaaaa lagaag 76

<210> 30

<211> 77

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 30

gatgttaatg gtagtactag tgaagaacca tcttacagac aacaagctgc tgttcattg 60
gctagtgaac ctcattgg 77

<210> 31

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 31

caccatgaac caaatgagct tgtggacctc tagcaaaaac agcaacatct tcaccacat 60
gagtttcact agc 73

<210> 32

<211> 74

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 32

gctcatttgg ttcattggtg tcaagaagaa acttttgttg ctcattattat ggcttttgct 60
ggttgtgttg aacc 74

<210> 33

<211> 82

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 33

gcgcggtacc ttaatctgga atactagtag cagtagctgg agctggcaaa ttacaatcag 60
tgtatggttc aacacaacca gc 82

<210> 34
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 34
gcg'gcctag gagatctaac atccaaagac g 31

<210> 35
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明: 人工的

<400> 35
cgcgcgctag cggatccgca caaacgaag 29

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 酿酒酵母

<400> 36
Glu Ala Glu Ala Glu Phe Leu Ile Pro Ala
1 5 10

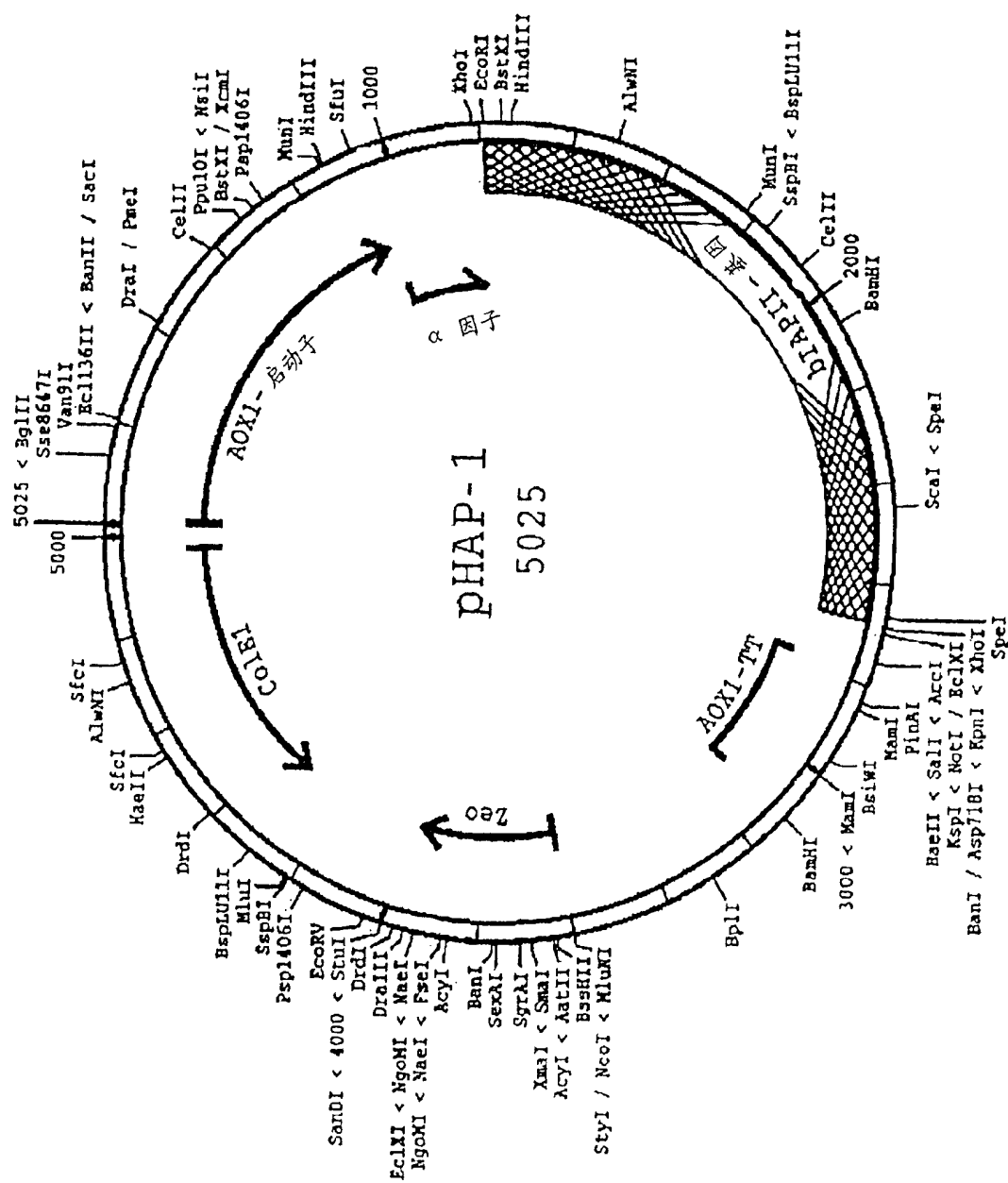
<210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> 酿酒酵母

<400> 37
Leu Ile Pro Ala
1

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> 酿酒酵母

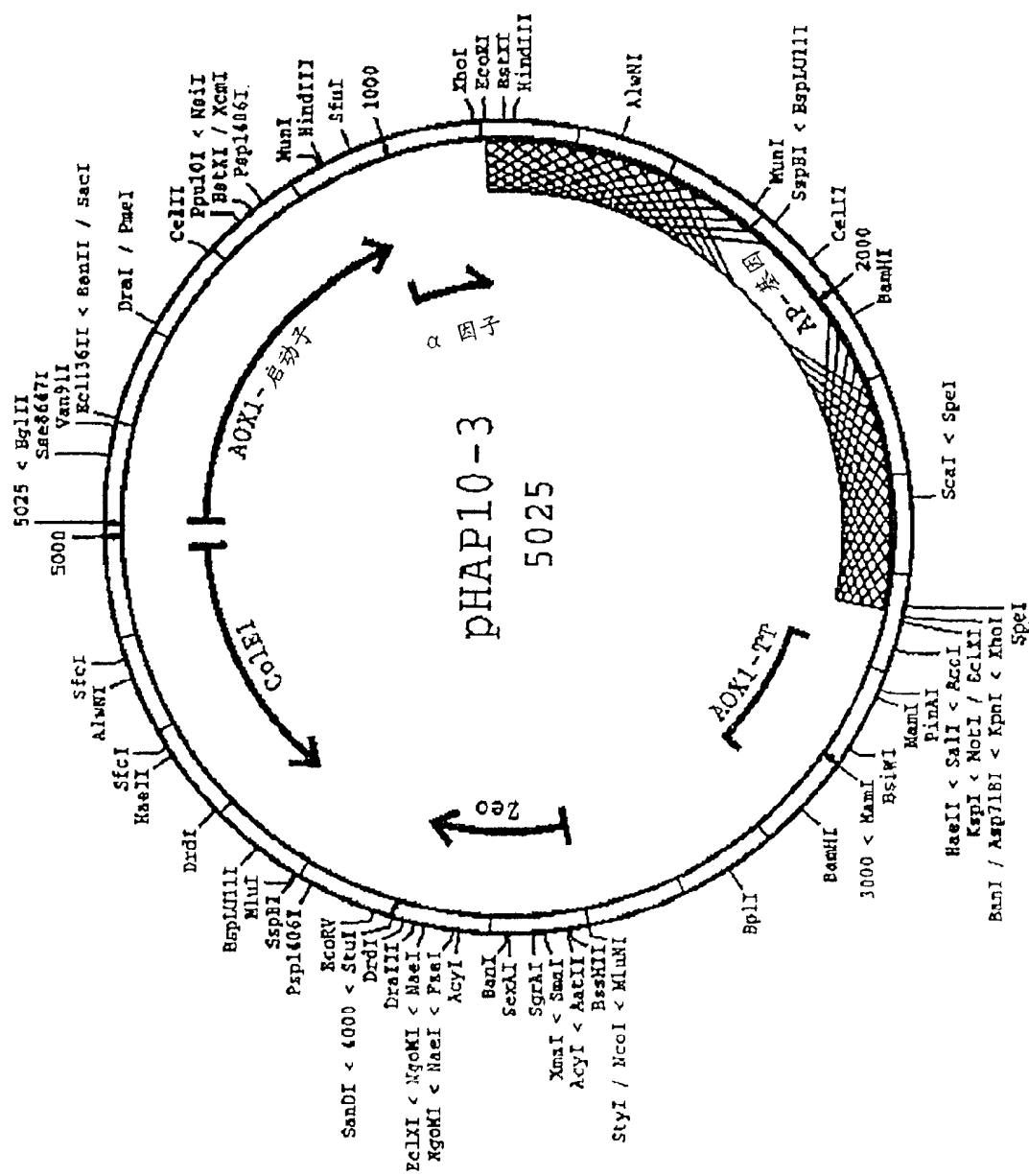
<400> 38
Glu Ala Glu Ala Glu Phe

1	5
---	---



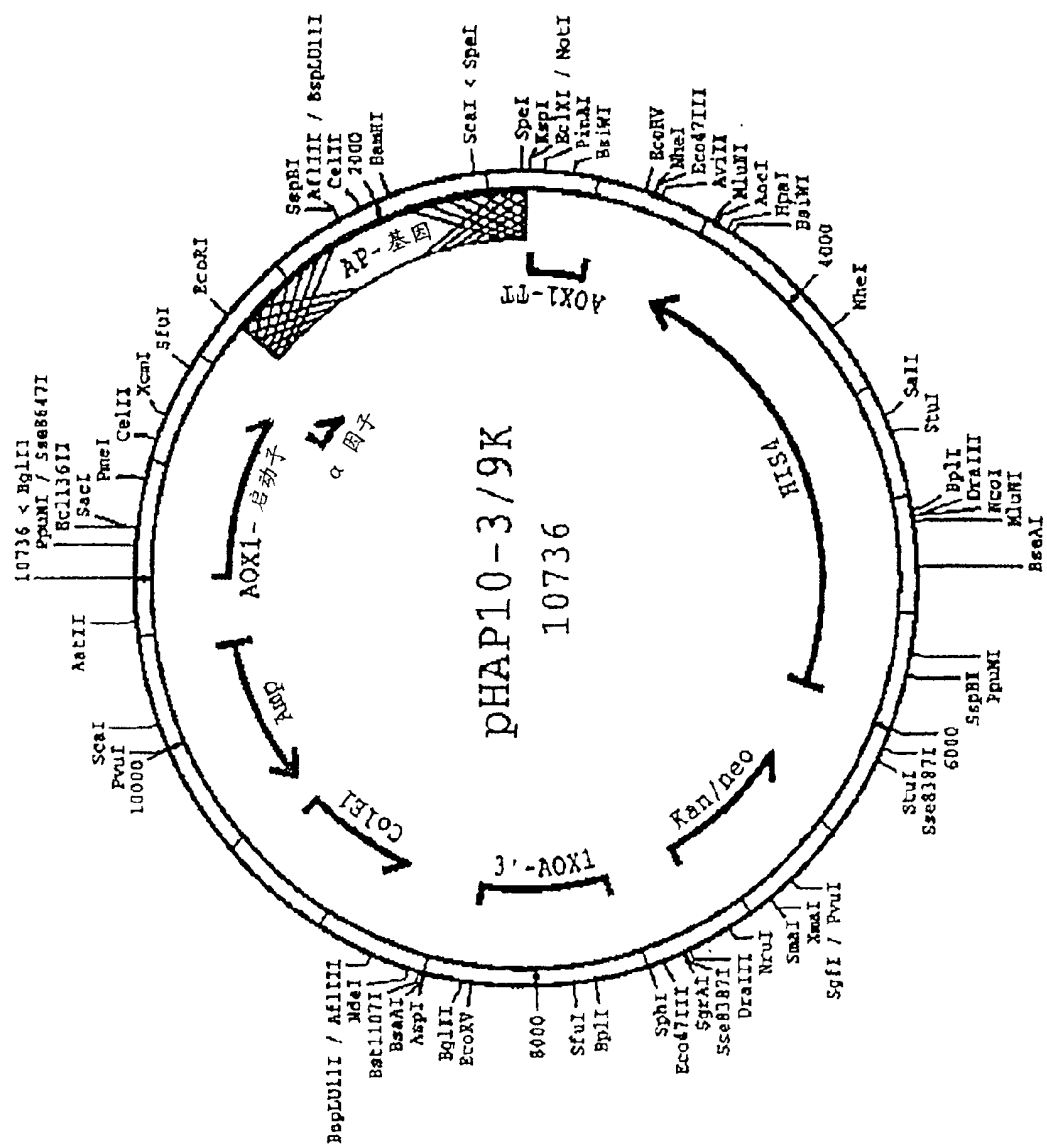
高活性AP bIAP I 基因通过EcoRI/Asp718插入pICZ α

一
圖



高活性AP合成基因通过EcoRI/Asp718插入pPICZ α

2
[X]



PCR产物hAPI0-3(JM105)/PIC5a3a通过SacI/NotI插入pPIC9K

错配: 0小切口=1大切口: 2

198种酶

3
[X]