

10 中华人民共和国专利局



12 发明专利申请公开说明书

11 CN 85 1 06190 A

61 Int Cl³

A61K 39 29

C12N 15 00

(C12N 17 00)

C12R 1 19

1:865)

CN 85 1 06190 A

43 公开日 1986年6月10日

21 申请号 85 1 06190

22 申请日 85.7.12

30 优先权 3284.12.12 33 摩纳哥 (MC) 31 PCT JP84 00585

85.6.3 摩纳哥 (MC) PCT JP85 00306

71 申请人 武田药品工业株式会社

地址 日本大阪府大阪市东区道修町2-1月27
番地

72 发明人 菊池正和 藤泽幸夫 池山崇一
西村纪

74 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 陶令霞

54 发明名称 乙型肝炎病毒表面抗原的生产

57 摘要

乙型肝炎病毒表面抗原P31可用培养承载DNA重组的转化株来生产,其中对乙型肝炎病毒表面抗原P31的DNA密码是插入于启动子区的3'末端。

权 利 要 求 书

- 1 · DNA 重组体其对乙型肝炎病毒表面抗原 P31 是插入启动子区的 3' 末端。
- 2 · 根据权利要求 1，重组体 DNA 其启动子之一是色氨酸启动子。
- 3 · 根据权利要求 1，重组体 DNA 其启动子之一是阻遏酸性磷酸酶启动子。
- 4 · 根据权利要求 1，重组体 DNA 其启动子之一是甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子。
- 5 · 根据权利要求 1，重组体 DNA 其启动子之一是 3-磷酸甘油酯激酶启动子。
- 6 · 根据权利要求 1，重组体 DNA 其乙型肝炎病毒表面抗原 P31 之一是 adr 乙型肝炎病毒表面抗原 P31。
- 7 · 根据权利要求 1，DNA 重组体其乙型肝炎病毒表面抗原 P31 之一是 adw 乙型肝炎病毒表面抗原 P31。
- 8 · 根据权利要求 1，DNA 重组体其乙型肝炎病毒表面抗原 P31 之一是 adr 乙型肝炎病毒表面抗原 P31 而其启动子是色氨酸启动子。
- 9 · 根据权利要求 1，DNA 重组体其乙型肝炎病毒表面抗原 P31 之一是 adr 乙型肝炎病毒表面抗原 P31，而其启动子是阻遏酸性磷酸酶启动子。
- 10 · 根据权利要求 1，DNA 重组体，其中之一为 P_{TRP} P31-R。

11 · 根据权利要求 1，DNA 重组体，其中之一为 pPHO P31—R。
12 · 根据权利要求 1，DNA 重组体，其中之一为 pTRP P31—W。
13 · 根据权利要求 1，DNA 重组体，其中之一为 pPHO P31—W。
14 · 根据权利要求 1，DNA 重组体，其中之一为 pGLD P31—R。
15 · 根据权利要求 1，DNA 重组体，其中之一为 pPKT P31—R。
16 · 转化株承载具有对乙型肝炎病毒表面抗原 P31 的 DNA 密码的重组体 DNA，密码插入于启动子区的 3' 末端。

17 · 根据权利要求 16，转化株其微生物之一属于大肠杆菌。
18 · 根据权利要求 16，转化株其微生物之一属于酒酵母。
19 · 根据权利要求 16，转化株其微生物之一属于大肠杆菌 294。
20 · 根据权利要求 16，转化株其微生物之一属于大肠杆菌 C600。
21 · 根据权利要求 16，转化株之一是大肠杆菌 294/pTRP
P31—R。

22 · 根据权利要求 16，转化株之一是大肠杆菌 294/pTRP
P31—W2。

23 · 根据权利要求 16，转化株之一是大肠杆菌 C600/pTRP
P31—R。

24 · 根据权利要求 16，转化株之一是大肠杆菌 AH22R⁻/pPHO
P31—R。

25 · 根据权利要求 16，转化株之一是大肠杆菌 AH22R⁻/pPHO
P31—W。

26 · 根据权利要求 16，转化株之一是大肠杆菌 AH22R⁻/pGLD
P31—R。

27 · 根据权利要求 16，转化株之一是酒酵母 AH22R /pPKT P31-R。

28 · 生产 DNA 重组体方法中对乙型肝炎病毒表面抗原 P31 的 DNA 密码是插入于某一个启动子区的 3' 末端，包括上述密码插入该启动子区的 3' 末端。

29 · 生产承载重组体 DNA 的转化株的方法，其对乙型肝炎病毒表面抗原 P31 的 DNA 密码是插入于启动子区的 3' 末端，如上文规定包括转化带有 DNA 重组体的寄主。

30 · 乙型肝炎病毒表面抗原 P31 的生产方法包括 (a) 培养承载 DNA 重组体的转化株，而对乙型肝炎病毒表面抗原 P31 的 DNA 密码是插入于某一个启动子区的 3' 末端；(b) 在培养中富集乙型肝炎病毒表面抗原 P31；(c) 回复同一(过程)。

31 · 乙型肝炎病毒表面抗原 P31 蛋白质的生产方法包括 (a) 培养承载 DNA 转化株，其 DNA 具有对乙型肝炎病毒表面抗原 P31 的碱基顺序密码。(b) 在培养中富集乙型肝炎病毒表面抗原 P31；(c) 收集含 P31 溶液和 (d) 提纯含 P31 溶液，包括亲和色谱处理。

32 · 根据权利要求 33，其提纯方法包括利用聚合的人的血清清蛋白作配体的亲和色谱处理。

乙型肝炎病毒表面抗原的生产

技术范围

本发明是有关乙型肝炎病毒表面抗原及其生产，更具体地说本发明涉及（1）对乙型肝炎病毒表面抗原 P 31 的 DNA 重组体中的 DNA 密码是插入 3' 的启动子终端；（2）上述 DNA 重组体的生产；（3）转化株承载 DNA 重组体；（4）上述转化株的生产；（5）非糖基的乙型肝炎病毒表面抗原 P 31 蛋白质，和（6）乙型肝炎病毒表面抗原的生产。

工艺背景

乙型肝炎是一种病毒性疾病，特别是热带的非洲、东南亚和远东经常遭遇和流行这种疾病。它暗示乙型肝炎可转变为慢性肝炎，肝硬变和进一步演变为早期的肝癌。乙型肝炎病毒（下文均简称为 HBV）属类病毒，这是一种 DNA 病毒，它是以球状颗粒存在，直径为 42 nm，在发现者之后，称为戴恩颗粒。上述颗粒的外层存在着 HBV 表面抗原（下文均简称为 HBSAg），根据不同的抗原性，HBSAg 可分为 adr、adw、ayr 和 ayw 几种附属型，其中的 adw 和 adr 流行于日本。

把乙型肝炎病人的血液加到戴恩颗粒上可以检测到微细的和管状的颗粒。这些颗粒被视为在戴恩颗粒上发现的 HBSAg 属同一类型。

众所周知，带有其他病的抗体对病毒的表面抗原可以预防感染，HBV

的情况也是这样。由此看来，以 HBsAg 作依据似乎有可能生产疫苗以对抗乙型肝炎。然而，唯有人类和黑猩猩能够受 HBV 感染，所以到目前为止所有用培养细胞受 HBV 感染的尝试均告失败。所以暂时 HBsAg 的唯一可以得到的来源是从受感染的病人血液取得，而微细颗粒也能满意的获取，但这只作为检定试剂使用，而无法满足大规模的疫苗生产。

近期分子生物学的进展可以在非细菌的蛋白质引入 DNA 密码使其转化为细菌。如果对细菌中的 HBsAg 结构基因（下文均简称为 HBsAg 基因）的表达能成为运用 DNA 重组体技术的结果，那么，摆脱 HBV 感染危险而大量的生产 HBsAg 将可能实现，这将为乙型肝炎疫苗的实际应用开拓一条通路。

至于 ayw 型，那是在当前已知的 adw、adr、ayw 和 ayr 中最流行于欧洲和美洲的一种。HBsAg 基因的位置和碱基顺序已经测定 [Galibert, F. et al; Nature, 281, 646 (1979); Charnay, P. et al; Nucleic Acids Res; 7, 335 (1979)]，而上述基因在《大肠杆菌》报告 (Chanay, P. et al; Nature, 286, 893 (1980); Edman, J. C. et al; Nature, 291, 503 (1981)) 中则表达为杂种蛋白质。

至于 adw 和 adr 则流行于日本。一些本发明者成功地创造了一种含有 HBsAg 的 DNA，并在基因组中测定了上述基因的 DNA 碱基顺序和位置，进一步开创了用栽培的转化株承载 DNA 的方法大量生产 HBsAg (Japanese published unexamined patent applications Nos. 194897/1983, 201796/1983 and 74985/1984)。

最近, Machida, A. et al. (Gastroenterology,

85, 268 (1983); *ibid.*, 86, 910 (1984))证实以病人血浆中取得的 HBsAg 微细颗粒对乙型肝炎病毒抗原起正反应, HBsAg 颗粒中有 P 31 蛋白质(分子重为 31 千道尔顿)和 P 35 蛋白质(是糖结合 P 31 而形成的结合蛋白,其分子重为 35 千道尔顿)。另外,迄今为止,认为主要的肽为 P—I (分子重为 22—24 千道尔顿)和 P—II (分子重 25—29.5 千道尔顿) [Peterson, D. E. *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1530 (1977)]。

P 31 是由 P—I 和前 S 期区中的氨基酸残基所合成,当加入于 P—I 的 N 末端时证实聚合的人的血清清蛋白(聚—HSA)受体也在上述区域中出现。而且,1984 年的报告引证了上述 P 31 蛋白质有糖链的陈述。另一方面,可以这样考虑,由于在肝细胞上也发现上述受体,所以通过聚—HSA 增生取代了戴因颗粒的粘附力。因而,如果在 P 31 上能以抗体掩蔽在戴因颗粒上的聚—HSA 受体,那么可以期望能够更有效的避免 HVB 感染,因为上述颗粒已不能再粘台肝细胞。

本发明涉及乙型肝炎病毒表面抗原及其生产,更具体地说,本发明提供(1)在 DNA 重组体中对乙型肝炎病毒表面抗原 P 31 的 DNA 密码是插入启动子 3' 终端;(2)DNA 重组体的生产;(3)转化株承载上述 DNA 重组体;(4)上述转化株的生产;(5)非糖基的乙型肝炎病毒表面抗原 P 31 蛋白质;(6)乙型肝炎病毒表面抗原 P 31 的生产,而且本发明提供生产乙型肝炎病毒表面抗原 P 31 蛋白质的生产方法。方法包含培养转化株以承载一种对乙型肝炎病毒表面抗原 P 31 有碱基顺序密码的 DNA,在培养中富集乙型肝炎病毒抗原 P 31,收集含有 P 31 的溶液,并用提纯法,包括亲和色谱法处理含 P 31 溶液。

端插入编码 P 31 的 DNA 使每个受体都能起作用（例如大肠杆菌、精细杆菌、酵母和动物细胞）。启动子区可以是任何含有 RNA 聚合酶结合部位或 mRNA 合成的起始部位。

大肠杆菌品系的使用，例如作为受体。DNA 重组体可以表达为编码 P 31 DNA 的构成是由于编码 P 31 DNA 插入于启动子区 3' 末端而在大肠杆菌中起作用。举例说，在日本版的 Unexamined patent application NO. 201796/1983，关于 T4 DNA 连接酶助剂中曾述及编码 P 31 DNA 可插入象 pTRP601 或 pTRP771 载体中。大肠杆菌（如菌株 C600，294，W3110，RRI 或 PR13）用已知方法随其混合物（Cohen, S. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)）或其变更而转化。

启动子的应用不限于 trp 启动子（trp—p），其他象 recA 启动子（日文版的 Unexamined patent application No. 65099/1984），lac 启动子和 λ P_L 启动子也可以用。转化株承载含编码 P 31 DNA 新的重组体 DNA，而编码 P 31 DNA 可选用上述方法取得象安苳青霉素抗性和四环素抗性的表现型那样。

为了找出承载含有由抗药性转化株中取得的编码 P 31 DNA 的新的重组体的质粒的株菌，可用下述技术，例如上述 5' AATTCCTACTGCATTGTAT 3' 接合体的链之一是用 γ -³²P—ATP 和 T4 聚核苷酸激酶标记放射性同位素作用，用此作为探查物和用已知的菌落杂交方法（Grunstein, M. and Hogness, D. S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961 (1975)），从已经取得的抗药性转化株中必然地可以找出正反应的无性繁殖系（纯系）。

这样选择的转化株是在已知培养基中培养。作为培养基的如 L 液体培养基、Penassay 液体培养基和 M—9 培养基并补充以葡萄糖和酪蛋白氨基酸〔Miller, J., Experiments in Molecular Genetics, 431—433 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972)〕。当有需要的时候, 为了有效的启动子功能可加入 3 β -吡啶丙烯酸。

上述转化株的培养通常是在 15 $^{\circ}$ —43 $^{\circ}$ C 之间进行, 而以 28 $^{\circ}$ —40 $^{\circ}$ C 之间较好, 培养时间 2—24 小时之间, 而以 4—16 小时之间较好。若需要可通气和 (或) 搅拌。

当酵母用作受体, 可以下列方法制备酵母转化株。大肠杆菌—酵母往复载体 YEp13〔Broach, J. R. et al., Gene, 8, 121 (1979)〕, pSH15 或 pSH19〔Harashima, S. et al., Mol. Cell. Biol., 4, 771 (1984)〕, 有插入的一个酵母启动子区, 如可阻遏的酸性磷酸酶基因启动子区 (Meyhack, B. et al., EMBO J., 6, 675 (1982)〕, 甘油醛—3—磷酸脱氢酶基因的启动子区〔Holland, J. P. and Holland, M. J., J. Biol. Chem., 255, 2596 (1980)〕或 3—磷酸甘油酯激酶基因的启动子区〔Dobson, M. J. et al., Nucleic Acid Res., 10, 2625 (1982)〕, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 编码 P 31 DNA 正联接于上述区之后部。利用反应混合物, 上述大肠杆菌受体系是用上面举出的 Cohen et al 方法进行转化。这样产生的转化株承载含编码 P 31 DNA 的新重组体 DNA 可以用安苄青霉素抗性作为表现型加以选择。为了找出承载由抗性中取得编码

P 31 新的 DNA 重组体质粒的品系，同样的可用上述方法。

质粒 DNA 是由转化株分离出来的，而转化株则以碱萃取方法加以选择 [Birnboim, H · C · and Doly, J ·, Nucleic Acid Res ·, 7, 1513 (1979)] 并应用于酵母的转化，例如亮氨酸需要的酒酵母菌系象 AH22R⁻ (leu2 his4 can1 cir⁺ pho80) [Proc · Natl · Acad · Sci · USA, 80, 1 (1983)] 或 AH22R⁻ 衍生的 K33 - 7B (pho80 - AH22, pho8 - 2) 或 K33 - 8D (pho80 - AH22, pho8 - 2 trp1) 用已知方法 [Hinnen, A · et al ·, Proc · Natl · Acad · Sci · USA, 75, 1927 (1978)] 或其变更。酵母作为受体并不限于这些，不过以酒酵母菌系为佳。

酵母是在本来知道的培养基中取得转化。Burkholder 在《minimum medium》中举例说明培养基问题 [Bostian, K · L · et al ·, Proc · Natl · Acad · Sci · USA, 77, 4505 (1980)]。

培养的酵母菌转化通常是在 15⁰ — 40°C 之间，而以 24°C — 37°C 之间较好，时间为 10 — 96 小时，而以 24 — 72 小时较好，若需要可通气和 (或) 搅拌。

对于精细杆菌的使用，例如作为受体是把编码 P 31 的 DNA 插入于启动子区的 3' 末端，使其在精细杆菌或动物细胞中能有功能作用，同时受体是随着生成物 DNA 重组体而转化。P 31 可以用培养转化株的方法生产。不过大肠杆菌和酵母是更适宜作受体。

P 31 的生产可以糖基的形式或非糖基形式。由大肠杆菌转化获得的 P 31 是直实非糖基物，但糖酶的一个分子要联接到一个 P 31 分子上。

一般众所周知的HBsAg DNA承载转化株的生长是受到表面抗原基因产物的产生的抑制。不过，根据本发明移去生长的抑制作用则P31的产率增高，这和使用编码P31 DNA的结果相同。

P31产物的活性可以用直接免疫测定方法测得〔Fujisawa, Y. et al., Nucleic Acid Res., 11, 3581 (1983)〕, 这方法包含把样品结合到溴化氰活性纤维素酶纸上随着与Ausria II-125 (Dainabolt)的¹²⁵I—反式—HBsAg抗体起反应。

细胞栽培后，以常规方法收集。就大肠杆菌的转化株来说，其细胞可适当处理，这可以把细胞悬浮于含有如尿素或胍氯化物的蛋白质性变剂中。而悬浮液置于凉处并加以搅拌，然后用离心方法分离出含P31上清液或让细胞悬浮于缓冲剂中，然后以声处理，溶菌酶使其破裂和（或）经过冻结和解冻再用离心法分离出含P31的上清液。这是其他方法中最理想的施例，不过要悬浮细胞并采集于缓冲剂中，加溶菌酶，搅匀以引起溶胞作用。再加含尿素（3—10 M），搅拌混和物（在0—10℃，0.5—8小时）然后用离心法收集上清液。

就酵母转化株来说，细胞是用裂合酶（Kirin Brewery CO.）或用玻璃珠的机械方法。上述方法可加入表面活化剂如Triton（表面活化剂商品名）X-100或脱氧胆酸盐或加入象胍氢氯化物蛋白质变性剂，由此，可以更有利地萃取P31。

上述方法萃取的P31蛋白质的分离和提纯是在提纯方法包括亲和色谱法处理的指导下进行。

亲和色谱法可以说是用聚合的人的血清蛋白（聚-HSA）作为配

体或抗体柱处理，用抗体于 HBSAg，特别用单无性繁殖系抗体于 HBSAg。

亲和色谱法用聚—HSA 作为配体对 P 31 蛋白质的提纯最有利作为亲和色谱法中的载体可用的如甲酰—Cellulofine (Seikagaku Kogyo) 或 Affi—胶凝 15 (Bio—Rad)，而甲酰—Cellulofine 是理想的施例。

利用交联剂 (例如戊二醛) 可由聚合的人的血清蛋白生产聚—HSA。利用还原剂 (例如 NaCNBH_3) 可以把聚—HSA 结合到上面的载体上，如偶联产物聚—HSA 载体的取得洗涤后，若需要，通常为方便其使用而挤入柱管中。

用聚—HSA 作配体的亲和色谱法提纯 P 31 蛋白质，上述含 P 31 溶液 (细胞抽提物上清液) 可以被吸收于上述的管柱中以平衡予置的缓冲剂 [例如磷酸盐]，然后再以缓冲剂洗脱。上面所说的缓冲剂含有适量的表面活性剂 (例如特威恩 20) 或蛋白质变性剂 (尿素)。改变这些添加剂的组合及其浓度就可以用作适当的洗脱剂。含 P 31 蛋白质洗脱物收集后若需要可利用超滤作用加以浓缩，此是一例。

上述浓缩作用更理想的施例是以二硫苏糖醇还原后进一步经用疏水管柱的色谱处理如同高性能液相色谱利用反相管柱或疏水色谱法一样。

在上述高性能液相色谱法中作为载体的，可能提到的有烷基化了的 (C_1 至 C_{18} 左右) (聚) 硅氧烷型载体，例如 AP—202 300 Å (C_8) 和 AP—224 300 Å (C_8) (YMC—Shimadzu)，超孔 RPSC (Beckman) 和高孔 RP—34 (Bio—Rad)。其中 AP—202 300 Å (C_8) 和 AP—224 300 Å (C_8) 都是理想的，而 AP—224 300 Å (C_8) 则更为理想。

在疏水色谱中提到的载体可能有丁基—Toyo真珠650 M (Toyo 苏打生产的) 和辛基琼脂糖 (凝胶) CL—4B (Pharmacia) · 利用反相管柱特别有利于高性触液相的应用。

上述高性能液相色谱使用反相管柱、水、 C_1 至 C_6 低级链烷醇 (例如乙醇、丙醇)、乙腈等等。用作洗脱液,理想的施例是用三氟乙酸调节PH为1.2—5.0之间,而流出速率以0.1—100毫升/分为理想,0.5—30毫升/分则更理想。

由于要求产生的为白色粉末,这样取得的含P 31蛋白质部份可能是冻干的。

这样产出的P 31蛋白质,其纯度 (比活性) 的检验可以用的方法如酶的免疫测定法,这方法包括使样品与带有塑料外壳的聚—HSA起反应和检测聚—HSA结合P 31蛋白质。这检测方法是使用辣根的过氧化物酶 (HRP) 偶联反式HB₂Ag单无性繁殖系抗体或放射免疫测定法,该方法包括用Ausria II—125 (Dainabbot, USA) 的¹²⁵I—反式—HBsAg检测聚HSA偶联P 31蛋白质。

根据本发明使用生产方法能获得高纯的P 31蛋白质,适于作药物用,此是实例。

举例,用本发明的方法在大肠杆菌承载一个对HBsAg P 31有碱基顺序密码的DNA里生产纯化的P 31可以获得HBsAg P 31蛋白质,它是真实的纯且具有下列特性:

- (1) 在SDS—聚丙烯酰胺切片的凝胶电泳中,它是纯系的而用上述电泳 (在还原的条件下) 测得其分子重为 $32,000 \pm 1,000$ 道尔顿。
- (2) 它含有蛋氨酸 (或甲酰基盐蛋氨酸)。

(3) 它含有异亮氨酸如羧基末端氨基酸。

(4) 它使聚HSA坚固。

(5) 它的比活性不少于 1×10^6 单位/毫克。

用本发明的方法生产的真纯P31蛋白质与产自以感染HBV病人的血液作原料的已知HBsAg细颗粒有相同的生物效能如上述HBsAg细颗粒同一方法，可用作检定，预防和（或）治疗HBV感染。

在此所说的为测定蛋白质纯度而作的P31蛋白质活性（比活性）的测定是由ELISA法完成。所以把试液（含P31蛋白质溶液）分为若干分，每分100 ml，使进入带有HSA的免疫平皿Ⅱ（Nunc）的凹处，而其中聚HSA是参照例4—（1）在那里予作物理吸附。在4℃，反应过夜，平皿用含有5%牛血清和0.05%特威恩20的PBS洗涤，然后100 μl的辣根过氧化物酶结合反式—HBsAg单无性繁殖系抗体溶液加入每个平皿的凹处。反应两个小时以后，平皿再以上述的缓冲剂洗涤。接着加入100 μl的柠檬酸盐—磷酸盐缓冲液（pH 5.0），其中含有苯二胺（4 mg/10 ml）和过氧化氢水溶液（4 μl/10 ml）。在室温下反应30分钟，加50 μl 2 N硫酸则酶的反应被终止，用Titertek Multiskan MC于492 nm吸光率测定。此试验的纯净样品是由例7取得并用作标准，而测得结果以单位数目的术语表示即吸光率（0.05光出度）以标准的1 ng表示为1单位。

本说明书的图样和规定，碱、氨基酸等当用缩写表示时，该缩写是根据IUPAC—IUB委员会关于生物化学命名法或在有关范围的惯用缩写。下面列的是这些缩写的例子。这有可能牵涉氨基酸的旋光异构现象，必须注意，除非有别的说明，否则上述氨基酸都是指L型。

DNA	脱氧核糖核酸
RNA	核糖核酸
mRNA	信使RNA
A	腺嘌呤
T	胸腺嘧啶
G	鸟嘌呤
C	胞嘧啶
dATP	脱氧腺苷三磷酸
dTTP	脱氧胸苷三磷酸
dGTP	脱氧鸟苷三磷酸
dCTP	脱氧胞苷三磷酸
ATP	腺苷三磷酸
EDTA	乙二胺四乙酸
SDS	十二烷基硫酸钠
DTT	二巯基糖醇
Gly	甘氨酸
Ala	丙氨酸
Val	缬氨酸
Leu	亮氨酸
Ile	异亮氨酸
Ser	丝氨酸
Thr	苏氨酸
Cys	半胱氨酸

1/2Cys	半胱氨酸
Met	甲硫氨酸, 蛋氨酸
Glu	谷氨酸
Asp	天冬氨酸
Lys	赖氨酸
Arg	精氨酸
His	组氨酸
Phe	苯丙氨酸
Tyr	酪氨酸
Trp	色氨酸
Pro	脯氨酸
Asn	天冬酰胺
Gln	谷氨酰胺
Ap ^r	氨苄青霉素抗性基因
Tc ^r	四环素抗性基因
P _R	λ P _R 启动子
ars 1	自发复即顺序 1
IR	转化重复

附图简述

图 1 表示对 adr HBsAg P 31 型的 DNA 顺序密码 (上排) 和相应氨基酸顺序 (下排)

图 2 表示对 adw HBsAg P 31 型的 DNA 顺序密码 (上排) 和相应的氨基酸顺序 (下排)

图3是质粒 pPHO17—1的图解：而符号 E，S，B，H和X分别代表 EcoRI，SalI，BamHI，HindIII和XhoI

图4是质粒 pPKT700—1的图解，而符号 E，S，B，H和X分别代表 EcoRI，SalI，BamHI，HindIII和XhoI

图5是质粒 pGLD906—1的图解，而符号 E，S，B，H和X分别代表 EcoRI，SalI，BamHI，HindIII和XhoI

图6是质粒 pTRP P 31—1提供附属型 adr HBsAg P 31在大肠杆菌表现度的图解，而符号 E，B，C和P分别代表 EcoRI，BamHI，ClaI和PstI

图7是质粒 pTRP P 31—W2提供附属型 adw HBsAg P 31在大肠杆菌的表现度的图解，而符号 E，B，C，和P分别代表 EcoRI，BamHI，ClaI和PstI

图8是质粒 pGLD P 31—R，pPHO P 31—R和 pPKT P 31—R提供附属型 HBsAg P 31在酵母中表现度的图解，而符号 E，B，S，H，X和C分别代表 EcoRI，BamHI，SalI，HindIII和ClaI

图9和图10每个均表示质粒 pPHO P 31—W提供附属型 adw HBsAg P 31在酵母中表现度的图解而符号 E，P，B，C，S和H分别代表 EcoRI，PstI，BamHI，ClaI，SalI和HindIII

图11表示在 SDS—聚丙烯酰胺粘的胶凝电泳结果，如同第(1)和(2)段例7的本尾部分。

执行本发明的最好方式

参考例1

制备含有酵母衍生的阻遏醇/磷酸酶启动子 (PHC5—7)的表现运载体。

大肠杆菌质粒 pJA1' (50 μ g) 含酒酵母 S288 C 和其衍生的阻过磷酸酶基因 (PHO5) 和组成酸磷酸酶和 7.9kb DNA 断片 [Kramer, R. A. and Anderson, N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6541 (1980)] 这样进行处理, 即以 20 单位的限制性内切酶 BamHI [Takara Shuzo] 和 20 单位的限制性内切酶 SalI [Takara Shuzo] 在 100 μ l 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH8.0), 7mM MgCl₂, 100mM NaCl, 2 mM 2—巯基乙醇] 在 37°C 反应 3 小时, 接着用 1.0% 琼脂糖 (Sigma) 切片胶凝电泳于缓冲液 [100 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸, 100 mM 硼酸, 2 mM EDTA (pH 8.3)] 在 140 V 起反应 2 小时。此后, 凝胶部份含有 0.63 kb 的 DNA 断片封接于渗析管, 将管浸入缓冲液中电泳, 而上述的 DNA 断片从凝胶中电动地洗脱 [McDonnell, M. W. et al., J. Mol. Biol., 110, 119 (1977)]。在渗析管里的液体用酚萃取, 接着用乙醚萃取并补充 NaCl 至浓度为 0.2 M。然后加入 2 体积的冷的乙醇, 在 -20°C 时 DNA 则产生沉淀。

质粒 pSH19 (1 μ g) 是送样处理的, 即以 2 单位的限制性内切酶 BamHI 和 2 单位限制性内切酶 SalI 置于 20 μ l 的反应混和物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 8.0), 7 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 2 mM 2—巯基乙醇), 于 37°C 时反应 2 小时。反应混和物是根据使用 0.8% 琼脂糖切片的电泳在与上述相同的条件下可以产生电泳。电泳后, 8.0 kb 的 DNA 断片用上述方法从凝胶中分离出来。接着与酚发生去蛋白作用, 用冷的乙醇使 DNA 沉淀 (参看图 3)。400 ng 上述 8.0 kb DNA 断片和 0.63 kb DNA 断片在 20 μ l 反应

混合物〔 66 mM 三羟基甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.6) , 6.6 mM $MgCl_2$, 10 mM 二硫苏糖醇 1 mM ATP , 2 单位的 T4 DNA 连接酶 (Takara Shuzo) 〕中, 在 14 °C 时混合和连接在一起, 经过一夜反应后, 以上述科恩等人的方法这反应混合物可用于转化大肠杆菌 294。质粒 DNA 以上述碱萃取方法从每一转化株中分离出来。而转化株的选择是基于对氨苄青霉素的抗性而用作指示者, 测定分子重量及限制性内切酶卵裂型。这方法的 pPHO12 质粒, 其中 0.63 kb DNA 断片由 pJA1 中分离出来。而 pJA1 曾插入 pSH19 的 BamHI—SalI 部位而被分离 (参看图 3)。

质粒 pPHO12 DNA 的 3— μg 部份是这样处理的, 即以 2 单位的限制性内切酶 SalI 在 20 μl 的反应混合物〔 10 mM 三羟基甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5) , 7 mM $MgCl_2$, 175 mM NaCl , 0.2 M EDTA , 7 mM 2—巯基乙醇〕中在 37 °C 时反应 2 小时, 接着与酚发生去蛋白作用, 用冷的乙醇使 DNA 沉淀。而这 DNA 的 3 μg 部分是这样处理的, 以 12 单位的 BAL 31 核酸酶 (Bethesda 研究实验室) 在 50 μl 的反应混合物〔 20 mM 三羟基甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 8.1) , 12 mM $CaCl_2$, 12 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA 〕中, 在 30 °C 时反应 2 分钟, 接着与酚发生去蛋白作用, 再以冷的乙醇使 DNA 沉淀 (参看图 3)。

这 XhoI 衍接物 d (CCTCGAGG) (200 ng)〔 新英格兰生物实验室〕是在 50 μl 的反应混合物 (50 mM 三羟基甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.6) , 10 mM $MgCl_2$, 10 mM 2—巯基乙醇, 100 μM ATP) 在 37 °C 时以 5 单位的 T4 多核苷酸激酶〔 Takara Shuzo 〕在

衔接末端 5'使其磷酸化 1 小时。

40 ng 末端 5'磷酸化了的衔接物 (5'-P-d (CCTCGAGG)) 和 400 ng 上述 BAL 31 处理的 pPHO12 DNA 在与上述相同的条件在 T4 DNA 连接酶的作用下混合和连接在一起。利用这反应混合物以科恩等人的方法, 大肠杆菌可被转化。质粒 DNA 以上述碱萃取方法从每一转化株中分离出来。而转化株的选择是基于对氨苄青霉素的抗性而作为指示者和质粒 pPHO17 在与已选择的 BamHI 和 XhoI 进行双消化作用下而给出 0.55 碎片, DNA 碱基顺序的分析是用双脱氧核苷酸方法 [Sanger 等人的 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)], 此方法揭示 BAL 31 核酸酶处理的结果从 PHO5 中的起始密码子 ATG 消除逆流的 20 bp (参看图 3)。

2 μg 上述 pPHO17 质粒是这样的处理, 即在 20 μl 反应混和物 {6 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (PH 7.9), 150 mM MgCl₂, 5 mM 2-巯基乙醇} 在 37 °C 时以 4 单位的限制性内切酶 XhoI [Takara Shuzo] 反应 2 小时, 接着与酚起去蛋白作用并用冷的乙醇使 DNA 沉淀。

1 μg DNA 沉淀是这样处理的, 即 30 μl 的反应混合物 {40 mM 磷酸钾缓冲液 (PH 7.5), 6.6 mM MgCl₂, 1 mM 2-巯基乙醇, 33 μM dATP, 33 μM dGTP, 33 μM dTTP, 33 μM dCTP} 中在 12 °C 时以 5 单位的 DNA 聚合酶 I 大碎片 (新英格兰实验室) 作用 30 分钟使粘性末端转化为园钝, 接着与酚起去蛋白作用并用冷的乙醇沉淀 DNA。500 ng 上述 DNA 碎片和在上述 {5'-P-d (GGTCGACC)} 条件下磷酸了的衔接物 SalI, 按上述条件, 在 T4 DNA 逆接酶的作用

下混合和连接在一起。利用反应混合物以科恩等人的方法使大肠杆菌转化。从氨苄青霉素转化株中 pPHO17-1 质粒其 pPHO17 质粒的 XhoI 部位转化为已选择的 SalI 部位。

参考例 2

制备含有酵母磷酸甘油酸激酶启动子 (PGK--P)。

(1) 磷酸甘油酸激酶基因 (PGK) 的无性繁殖。

以 Cryer, D. R. 等人的方法 [Methods in Cell Biology, Vol. **IX**, Page 39—44 (1975)] 制取的 350 μ g 酒酵母菌株 Kyokai 3 (可从 IFO 得到) 的染色体 DNA 是这样处理的即在 1 ml 反应混合物 [10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5), 7 mM $MgCl_2$, 60 mM NaCl] 在 37 °C 时与 200 单位的限制性内切酶 Hind III [Takara Shuzo] 作用 3 小时, 接着在参考例一所述的条件下进行 1 % 琼脂糖切片的凝胶电泳。电泳后, 依 DNA 断片的大小可分为 1 至 10 份。每份中的琼脂糖凝胶块封于渗析管, 在参考例一的条件, DNA 从凝胶块电动地洗脱出来。洗脱物以酚处理, 并加入冷的乙醇将 DNA 沉淀。来自每一份的 DNA 0.5 μ g 在参考例一所述条件下进行电泳, 即以 1 % 琼脂糖切片凝胶并用萨瑟恩方法 [Southern, E. M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975)] 让 DNA 吸收于硝化纤维过滤器上面 (施来歇尔和舒尔)。从 PKG 的 N 末端给氨基酸以补充到低核苷酸密码 5' — TGAAGATAAAGACAT—3' [Dobson, M. J. et al., Nucleic Acid Res., 10, 2625 (1982)], 用克雷 R. 等人的方法合成 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978)] 而上述低核苷酸是在 37 °C 时 30 μ l 的反应

混合物〔50 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.6), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM 2—巯基乙醇〕以10 μCi 的 γ —〔 ^{32}P 〕ATP (Amersham) 和10单位的低核苷酸激酶作用30分钟因而标记5'末端与 ^{32}P 结合在一起。以一个体积的酚与反应物中存在着的10 μl 200 mM EDTA (pH 8.0) 起去蛋白作用然后应用于琼脂糖4B (Pharmacia) 柱(0.25 $\times$ 25 cm) 并以TEN (总排泄氮) 缓冲液〔10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 8.0), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA〕平衡之。标记低核苷酸洗出于空柱体积附近而被收集并用作对PGK基因筛选的探查物。以序瑟恩方法利用上述硝化纤维过滤器和探查物来完成吸除作用, 因此, 探查物与含2.6 kb至2.9 kb DNA断片的第二部分样品起强烈的杂交作用。

再者, 10 μg 无性繁殖载体 pTR262 (Roberts, T. M. et al., Gene, 12, 123 (1980)) 的处理是在37°C时在50 μl 的反应混合物〔10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5), 7 mM $MgCl_2$, 60 mM NaCl〕中与10单位的限制性内切酶HindIII作用2小时, 接着与酚起去蛋白作用并以冷的乙醇(消化了的HindIII pTR262) 沉淀DNA。在参考例一所述的条件下0.1 μg 消化了的HindIII pTR262与第三部分的DNA混合在T4联接酶的作用下, 它们联接在一起。利用反应混合物, 大肠杆菌DH1 (Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 254—255 (1982)) 可以被转化并获得显示四环素抗性的1,300转化株。在它们之中, 利用上面说的标记 ^{32}P 合成探查物的群体杂交作用选择了PGK基因承载转化株。[Suggs, S. V. et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6613 (1981)] 从转化株给出的强烈的放射自显影信号, 说明质粒 pPKT3 已被上述碱萃取方法所分离。与 HindIII 的消化作用导致 2.95 kb DNA 插入的检出并用萨瑟恩确认的与探查物的插入杂交的方法进行测试。

(2) PGK 启动子断片的分离

50 μ g pPKT3 DNA 质粒的处理是在 37 °C 时, 在 100 μ l 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 60 mM NaCl) 与 50 单位的限制性内切酶 HindIII 作用 2 小时, 接着在参考例一所述的条件下以 1% 琼脂糖切片凝胶电泳。电泳后, 以参考例一所述方法从凝胶中分离出 2.95 kb DNA 断片 (参看图 4)。

5 μ g 上述 2.95 kb DNA 断片的处理是在 37 °C 时, 在 20 μ l 的反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 175 mM NaCl, 7 mM 2-巯基乙醇) 与 5 单位的限制性内切酶作用 3 小时, 而消化混合物根据 1.2% 琼脂糖切片凝胶电泳, 在参考例一的条件下传导。电泳后, 以参考例一所述方法将 2.1 kb DNA 断片从凝胶中分离出来。0.5 μ g 上述 2.1 kb DNA 断片和由质粒 pBR322 与 HindIII 和 SalI 起消化作用而得的 0.5 μ g 的 3.74 kb DNA 按参考例一的条件在 T4 DNA 连接酶的作用下连接在一起。利用反应混合物, 大肠杆菌 DH1 可被转化, 而所希望得到的质粒 pPKT101 则可以氨苄青霉素抗性转化株中获得。

接着, 消除 PGK 基因的结构基因区, 即将 10 μ g 上述 pPKT101 DNA 质粒在 37 °C 时, 在 30 μ l 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5) 7 mM MgCl₂, 175 mM NaCl, 0.2 M EDTA,

7 mM 2-巯基乙醇) 先以 10 单位限制性内切酶处理 3 小时, 消化混合物与酚起去蛋白作用而冷的乙醇使 DNA 产生沉淀 (SalI—消化了的 pPTK101)。1 μ g 的 SalI—消化了的 pPTK101, 在室温时, 在 20 μ l 反应混合物 (20 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 8.1), 12 mM CaCl_2 , 12 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA) 中以 10 单位的 BAL 31 核酸酶处理 5 分钟。此后, 随即加入 1 体积酚以终止反应, 接着以冷乙醇沉淀 DNA (BAL—消化了的—pPTK101)。50 μ g 如参考例一所述磷酸化了的 XhoI 衔接物和 0.2 μ g 的 BAL—消化了的 pPTK101 按参考例一的条件在 T4 连接酶的作用下混合和连接在一起。此后, 利用反应混合物转化大肠杆菌 DH1 而且是从氨苄青霉素抗性转化株中取得。而 0.69 kb pPKT567 质粒则以启动子区 pPKT101 消除方向的 SalI 部位取得。用双脱氧核苷酸的方法分析 DNA 碱基顺序证实 pPKT567 在 BAL 31 处理中已消除 PGK 结构基因而且是在 5'—邻区—24 内 (参看图 4)。

(3) 表现载体的结构

5 μ g 大肠杆菌—酵母往复机制载体 pSH19 的处理是在 37 °C 时, 在 20 μ l 的反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5), 7 mM MgCl_2 , 175 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 7 mM 2-巯基乙醇) 以限制性内切酶 SalI 处理 2 小时, 接着与酚起去蛋白作用并与冷乙醇起沉淀作用。1 μ g DNA 按参考例一所说混合和把粘性末端连接到园钝末端的条件以 DNA 聚合酶 I 大断片处理。500 ng DNA 断片和 50 ng 磷酸化的 XhoI 衔接物在参考例一所述条件下, 利用 T4 DNA 连接酶使之混合和连接在一起。大肠杆菌 DH1 随反应混合物转化并从氨苄青霉素

抗性中获得，转化株承载质粒 pSH19—1，其中 pSH19 的 SalI 部位转换为已获得的 XhoI 部位（参看图 4）。

15 μ g 上述 pSH19—1 DNA 在 37℃ 时，在 100 μ l 的混合物〔10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸（pH 7.5），7 mM MgCl₂，60 mM NaCl〕中，以 24 单位限制性内切酶 HindIII 处理 10 分钟。随后立即加入 10 μ l 0.2 M EDTA 以终止反应。反应混合物按参考例 1 所述条件用 0.7% 琼脂糖切片凝进行电泳，8.3 kb DNA 断片在 HindIII 位置上裂开，按参考例 1 所述方法从凝胶中分离出来。3 μ g 的上述 8.3 kb DNA 断片在 37℃ 时，在 30 μ l 反应混合物〔10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸（pH 7.5），7 mM MgCl₂，100 mM NaCl，7 mM 2—巯基乙醇〕中以 10 单位的限制性内切酶 XhoI〔Takara Shuzo〕处理 2 小时。在参考例一所述条件下，用 0.7% 琼脂糖切片凝胶进行电泳。电泳后，以参考例一所述的方法从凝胶中分离出 7.7 kb DNA 断片（参看图 4）。

参考例 2—（2.）所述的 pPKT567 DNA 质粒于 37℃ 时，在 50 μ l 反应混合物（50 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐（pH 7.6），50 mM NaCl，1 mM 二硫苏糖酸）中，以每种 10 单位的限制性内切酶 HindIII 和 XhoI 处理 2 小时。以后按参考例所述以 1.2% 琼脂糖切片凝胶进行电泳，而 1.4 kb DNA 断片则从凝胶中分离出来（参看图 4）。

0.2 μ g 的上述 1.40 kb DNA 断片和 0.5 μ g 的上述 7.7 kb DNA 断片依参考例 1 所述条件，在 T4 DNA 连接酶的作用下混合和连接在一起。大肠杆菌 DH 1 随着反应混合物而转化并在氨苄青霉素抗性转化株中取得，且曾获得转化株承载的理想 pPKT 700 质粒。然后，上述

pPKT700质粒的XhoI位置上的质粒pPKT700—1以参考例1所述方法转化为SalI位置(参看图4)。

参考例3

表现载体的结构包含酵母甘油醛—3—磷酸脱氢酶基因(GLD—P)

(1) 甘油醛—3—磷酸脱氢酶基因(GLD)的无性繁殖

将5'—AGCAACTCTAACCAT—3'补充到GLD的pgap491

(Holland, J. P. et al., J. Biol. Chem., 258, 5291 (1983))的低核苷酸上,则此密码可使氨基酸以克雷R等人的方法从N末端加以合成。以参考例2—(1)所述方法标记 ^{32}P 用作探查物。萨瑟恩吸除作用按参考例2—(1)所述用硝化纤维过滤器和上述探查物来完成。因此,探查物与含有2.0—2.3 kb DNA断片的第七部分样品强烈的杂交。

在参考例1的条件下,参考例2—(1)所述的0.1 μg Hind—消化了的pTR262与0.2 μg 第七部份样品中的DNA利用T4 DNA连接酶而联接在一起。利用反应混和物,以参考例2—(1)所述方法转化大肠杆菌DH1,并可从大约1,200四环素抗性转化株中取得,转化株与用菌落杂交作用分离出来的标记 ^{32}P 探查物有很强的杂交能力。用上述碱萃取法可以从转化株中分离出质粒pGLD9,当与HindIII记消化作用时,可以检出2.2 kb插入DNA,而用萨瑟恩方法测试显示此插入DNA确与上述探查物杂交(参看图5)。

(2) GLD启动子断片的分离

100 μg pGLD9 DNA质粒于37°C时,在200 μl 反应混合物

(10 mM三羟甲基氨基甲烷—盐酸(pH 7.5), 7 mM MgCl_2 ,

60 mM NaCl) 用 50 单位的限制性内切酶 HindIII 处理 3 小时, 接着用 1.0 % 琼脂糖切片凝胶在参考例 1 所述条件下电泳。电泳后, 用参考例 1 所述方法从凝胶中分离出 2.2 kb DNA 断片。10 μ g 的上述 2.2kb DNA 断片于 37 °C 时, 在 50 μ l 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基烷一盐酸 (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 7 mM 2-巯基乙醇) 中以 10 单位的限制性内切酶 HinfI (Takara Shuzo) 处理 2 小时然后以萨瑟恩利用 GLD 探查物的方法来完成杂交作用, 因此, 上述探查物被结合到 0.5 kb DNA 断片上 (参看图 5)。

5 μ g 的上述 0.5 kb DNA 断片于 37 °C 时, 在 30 μ l 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基烷一盐酸 (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM 二硫苏糖醇) 中, 以限制性内切酶 HhaI (Takara Shuzo) 和 TaqI (New England Biolabs) 各 10 单位处理 3 小时。接着以 1.5 % 琼脂糖切片凝胶电泳, 其在参考例 1 的条件下发生传导作用。之后, 以参考例 1 所述方法从凝胶中分离出 0.36 kb DNA 断片 (参看图 5)。

1 μ g 的上述 0.36 kb DNA 断片在参考例 1 所述条件下, 以 DNA 聚合酶 I 大断片处理, 从而使得 TaqI 粘性末端钝。然后, 1 μ g 这种断片和 50 ng 参考例所说的磷酸化的 XhoI 衔接物在参考例 1 所述的条件下利用 T4 DNA 连接酶而联接在一起。反应后, 加入过量的 XhoI, 在温度 37 °C 反应 4 小时后, 在参考例 2 — (1) 所述的条件下, 用 Sepharose (琼脂糖商品名) 4B 柱分离出结合 0.36 kb DNA 断片的衔接物。

10 μ g 上述的 2.2 kb DNA 断片在参考例一的条件下用 DNA 聚

合酶 I 大断片处理，使其粘性末端园钝。在参考例 1 所述的条件下利用 T4 DNA 连接酶与参考例 1 所说的 50 ng 的磷酸化的衔接物 (5' — P — d (CGCGGATCCGG) (new England BioLabs) 相连接。反应后，加入 20 单位的 BamHI，于 37℃，反应 3 小时后，在参考例 2 — (1) 所述条件下，利用 Sepharose (琼脂糖商品名) 4B 柱分离出结合 2.2 kb DNA 断片的衔接物。6 μg 的上述 DNA 断片，于 37℃，在 50 μl 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5)，50 mM NaCl，10 mM MgCl₂，1 mM 二巯基乙醇) 中，以 2 单位的限制性内切酶 HhaI 处理 2 小时。此后，在参考例 1 条件下，用 1.0% 琼脂糖切片凝胶电泳。电泳后，以参考例 1 所述方法，把 0.75 kb DNA 从凝胶中分离出来 (参看图 5)。

(3) 表现载体的结构

10 μg 参考例 2 — (3) 所说的 pSH19—1 质粒，于 37℃，在 50 μl 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5)，7 mM MgCl₂，100 mM NaCl，7 mM 2—巯基乙醇) 中以限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 各 10 单位处理 2 小时。接着在参考例 1 所说的条件下以 1.0% 琼脂糖切片凝胶电泳，以后用参考例 1 所说方法，从凝胶中分离出 8.0 kb DNA 断片。

500 ng 上述的 8.0 kb DNA 断片，200 ng 例 3 — (2) 所说的 0.36 kb DNA 断片和 200 ng 例 3 — (2) 所说的 0.75 kb DNA 在参考例 1 的条件下利用 T4 DNA 联接酶将它们联接在一起。利用反应混合物，转化大肠杆菌 DH 1 并从氨苄青霉素抗性转化株中取得，转化株承载由三种 DNA 断片连接在一起而组成的 pGLD906 质粒则被分离。接

着转换上述 pGLD906 质粒的 XhoI 部位为 SalI 部位而构成 pGLD906—1 质粒 (参看图 5)。

参考例 4

聚 HSA—Cellulofine 柱的生产

(1) 聚合的人血清清蛋白的生产

于 20 ml 的人血清清蛋白 (Albumin—Nichiyaku; Nippon Seiyaku, Tokyo) 溶液 (含 4 g 人血清清蛋白) 加入 180 ml 磷酸盐缓冲盐水 (PBS; 8.1 mM NaH_2PO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.2) 和 60 ml 戊二醛水溶液。搅拌混合物至均匀, 然后在室温下静置 1 小时。于 5℃ 时, 上面的混合溶液对 10 升蒸馏水的透析作用终止聚合反应。此后, 更换三次透析流体, 这样, 余留的戊二醛便从反应混合物彻底的移除。由此而取得 275 ml 聚合人血清清蛋白 (聚 HSA) 溶液。

(2) 聚 HSA—Cellulofine 柱的生产

于上法取得的 90 ml 聚 HSA 溶液, 加入 10 ml 10 倍浓度的 PBS, 接着再加入 40 ml 甲酰—Cellulofine。搅拌后, 反应可以在室温下进行 30 分钟。然后于混合物中加入 1.6 g NaCNBH_3 , 盖紧塞子后, 整个混合物在室温下振动 18 小时。将混合物转移到玻璃过滤器上, 凝胶则用 PBS 洗涤, 从而移去仍未与甲酰—Cellulofine 结合的聚 HSA 部份。上述方法中, 聚—HSA 粘合到 Cellulofine 的百分率约为 73% 并取得 40 ml 聚—HSA—Cellulofine, 其中约含 24 mg 聚—HSA 结合到每 ml 的 Cellulofine。此凝胶悬浮于含有 0.1 M 乙醇胺的 PBS 中, 并加入 NaCNBH_3 (200 mg), 混合物在室

温下振动3小时，然后凝胶转移到玻璃过滤上，按顺序以PBS，3 M尿素、6 M胍氢氯化物和25 mM磷酸钠缓冲液（pH 7.5）洗涤，再装入直径为5 cm的柱而产生聚—HSA—Cellulofine柱。

例1

重组体DNA分子供附属型adr的乙型肝炎表面抗原P31基因表现，并使大肠杆菌进行转化。

如1984年日文版的《未检定的蛋白质的应用》第74985号和1983年的《核酸研究》第11，1747页所述的pBR322—BamHI/HBr330质粒（也称其简写为pHBr330）是用1983年日文版的《未检定的蛋白质的应用》第201796号其所举参考例1所述方法制备。50 μg的上述pHBr330质粒，于37℃时，在100 μl的反应混和物〔100 mM三羟甲基氨基甲烷—盐酸（pH 7.5），7 mM MgCl₂，50 mM NaCl，7 mM 2—巯基乙醇中用限制性内切酶EcoRI〔Takara Shuzo〕和BamHI各20单位处理3小时，接着在参考例1所述条件下，以1.0%琼脂糖切片凝胶进行电泳。电泳后，以参考例1所述方法从凝胶中分离出1.4 kb DNA断片（参看图6）。

2 μg的pBr322 DNA质粒于37℃时，20 μl反应混合物〔10 mM三羟基甲基氨基甲烷—盐酸（pH 8.0），7 mM MgCl₂，100 mM NaCl，2 mM 2—巯基乙醇〕中，以限制性内切酶BamHI和ClaI（New England BioLabs）各2单位处理2小时，接着以0.8%琼脂糖切片凝胶进行电泳，其在参考例1所述条件下受传导。此后，以参考例1所述方法从凝胶中分离出4.01 kb DNA断片。

500 ng的上述4.01 kb DNA断片，500 ng的上述1.4 kb

DNA断片和50 ng的在5'末端磷酸化的合成接合体d

5' CGATACAATGCAGTGG 3'
() 以参考例1所述方法和条件
3' TATGTTACGTCACCTTAA 5'

下,利用T4 DNA连接酶连接在一起。上述接合体是用磷酸三酯方法 [Crea, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978)] 化学合成。利用上述反应混合物,大肠杆菌294被转化并在氨苄青霉素抗原中获得包含有上面三种DNAs连接在一起的 pHB rP31 DNA质粒(参看图6)。

1 μ g的 pHB rP31 DNA质粒,于37℃时,在20 μ l的反应混合物 [10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 8.0), 7 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 2 mM 2-巯基乙醇] 中以2单位限制性内切酶 BamHI 处理2小时,接着与酚起去蛋白作用,再加入冷乙醇沉淀DNA (BamHI—消化的 pHB rP31)。

500 ng的 BamHI—消化的 pHB rP31 在参考例1所述条件下以DNA聚合酶I大断片处理,使粘性的末端园钝,接着与酚起去蛋白作用而与冷乙醇起沉淀作用。取得的300 ng DNA断片和50 ng以参考例1所说的在5'末端磷酸化的 PstI 衔接物 (5'—P—d (GCTGCAGC)) (New England BioLabs) 在参考例1所述条件下利用T4 DNA连接酶而连接在一起。利用反应混合物转化大肠杆菌294,而转化株是用参考例所述方法筛选而得,而 pHB rP31—17 质粒其 pHB rP31 质粒的 BamHI 部位已转换为 PstI 部位而被分离(参看图6)。

50 μ g的上述 pHB rP31—17 于37℃时,在100 μ l 反应混合物 [20 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5), 10 mM MgCl₂,

50 mM (NH_4) $_2$ SO_4) 中, 以限制性内切酶 ClaI 和 PstI (Takara Shuzo) 各 20 单位处理 3 小时, 接着在参考例 1 所述条件下以 1.0% 琼脂糖切片凝胶进行电泳。电泳后, 以参考例 1 所述方法从凝胶中分离出 1.42 kb DNA 断片。

50 μg 如 1983 年日文版的《未检定的蛋白质的应用》第 201796 号和 1983 年的《核致研究》第 11, 3581 页所说的 pTRP771 表现载体是在 100 μl 上述反应混合物中以同样的条件用限制性内切酶处理, 然后反应混合物在参考例 1 所述的条件下受 1.0% 琼脂糖凝胶切片的电泳, 电泳后, 以参考例所述方法从凝胶中分离出 3.3 kb DNA 断片。

200 ng 的上述 1.42 kb DNA (给 P 31 的 DNA 密码) 和 3.3 kb DNA 在参考例 1 所述条件下, 利用 T4 DNA 连接酶而连接在一起。上述反应混合物用作转化大肠杆菌 294 并由大肠杆菌株 (294 / pTRP P 31 — R) 承载 pTRP P 31 — R 质粒, 其中所说编码 P 31 的 DNA 已插入表现载体而以参考例 1 的方法分离出来 (参看图 6)。

例 2

给以附属型 adw 的乙型肝炎病毒表面抗原 P 31 基因表现的重组体 DNA 分子结构及以上述 DNA 分子转化大肠杆菌。

1983 年在日文版的《未检定蛋白质的应用》第 194897 号和 201796 号和 1983 年的《核酸研究》第 11, 1747 页所说的 pBR—EcoRI / HBV933 DNA 质 (简称为 pHBV933) 是以 1983 年日文版的《未检定的蛋白质的应用》第 201796 号参考例 1 所述方法制备。

2 μg 的上述质粒, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, 在 20 μl 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基烷—盐酸 (pH 7.5), 7 mM MgCl_2 , 100 mM KCl , 7 mM

2-巯基乙醇)中,以2单位的限制性内切酶HpaI (Takara Shuzo)处理2小时,接着与酚起去蛋白作用并用冷的乙醇沉淀DNA。300 ng的上述DNA和50 ng的磷酸化的PstI衔接物(5'-P-(GCTGCAGC))在参考例1的条件下连接在一起。大肠杆菌的转化是用反应混合物,而转化株是以参考例1所述方法筛选取得,而pHBV933-5质粒中pHBV933的HpaI部位已转换为已获得的PstI部位(参看图7)。

500 μg的上述pHBV933-5 DNA质粒,于37℃时,在800 μl的反应混合物(20 mM三羟甲基氨基甲烷-盐酸(pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 50 mM (NH₄)₂SO₄)中以500单位的限制性内切酶PstI处理20分钟,随即与酚起去蛋白作用。上述反应产物是以参考例1所述的条件下用0.1%琼脂糖切片凝胶电泳为条件。此后,以参考例1所述方法从凝胶中分离出1.7 kb DNA断片一部分消化的PstI(参看图7)。

3 μg的上述1.7 kb DNA于37℃时,在20 μl的反应混合物(100 mM三羟甲基氨基甲烷-盐酸(pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 7 mM 2-巯基乙醇)中,以6单位的限制性内切酶EcoRI处理1小时,接着以1.0%琼脂糖切片凝胶进行电泳,其在参考例1所述条件下可传导。此后以参考例1所述方法从凝胶中分离出0.97 kb DNA断片(参看图7)。

500 ng的上述0.97 kb DNA断片, 500 ng例1所说的3.3 kb DNA (pTRP771的消化ClaI-PstI)和50 ng例一所说的磷酸

5' CGATACAATGCAGTGG 3'
化的接合体d(3' TATGTTACGTCACCTTAA 5')在参考例1所述

的条件下利用 T4 DNA 连接酶而连接在一起。反应混合物用来转化大肠杆菌 294 并从四环素抗性转化株获得由上面连接在一起的三种 DNAs 所组成的 pTRP P 31—W 质粒，它是用参考例一所述方法而被分离。用插入法在上述质粒的 ClaI 部位插入含有大约 330 bp 断片的启动子，其中断片是的取得如同 1983 年日文版的《未检定的蛋白质的应用》第 201796 号和 ClaI 与 HpaII (Takara Shuzo) 所说的以消化质粒 pTRP601 而完成了 pTRP P31—W2 (参看图 7)。

例 3

给以附属型 adr 的乙型肝炎病毒表面抗原 P 31 基因在酵母中表现的重组体 DNA 分子的结构及以所述 DNA 分子转化酵母。

(1) 50 μ g 例一所说的 pHBrP31 DNA 质粒于 37 °C 时，在 100 μ l 的反应混合物 (100 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 8.0)，7 mM MgCl₂，100 mM NaCl，2 mM 2—巯基乙醇) 中，以限制性内切酶 ClaI 和 Bam HI 各 20 单位，处理 3 小时。而反应混合物在参考例 1 所述条件下以 1.0 % 琼脂糖切片凝胶进行电泳。电泳后，以参考例一所述方法从凝胶中分离出 1.42 kb DNA 断片。

2 μ g 的上述 1.42 kb DNA 断片按参考例 1 的条件以 DNA 聚合酶 I 大断片处理使粘性末端园钝，接着与酚起去蛋白作用和以冷乙醇沉淀 DNA。1.5 μ g 的上述 DNA 和 50 ng 参考例 1 所述的磷化的 SalI 衔接物在参考例 1 所述条件下，利用 T4 DNA 连接酶而联接在一起。将 10 单位的限制性内切酶加入反应混合物中，于 37 °C 进行反应 3 小时使得末端有粘性。反应使与酚起去蛋白作用，而样品须在参考例 2—(1)

的条件下通过 Sepharose (琼脂糖的商品名) 4B 柱。1.43 kb DNA 断片 (附属型 *adr* 编码 P 31 DNA) 包含收集洗脱于空柱体积附近的部分和以冷乙醇沉淀 DNA (参看图 8)。

1 μ g 在参例一所述的 pPHO17—1 DNA 表现载体, 于 37 °C 时, 在 20 μ l 反应混合物 [6 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 6 mM 2-巯基乙醇] 中, 以 2 单位的限制性内切酶 SalI 处理 2 小时, 然后接着加入 0.1 单位的碱性磷酸酶, 使在 65 °C 时继续反应 30 分钟。此后, 与酚进行去蛋白作用并加冷乙醇沉淀 DNA (SalI—消化的 pPHO17—1)。接着, 200 ng 的上述的 1.43 kb DNA 断片和 200 ng 的 SalI—消化的 pPHO17—1 在参考例 1 所述条件下利用 T4 DNA 连接酶而连接在一起。利用反应混合物转化大肠杆菌 294, 以参考例 1 所述方法筛选而取得转化株。而转化株 (大肠杆菌 294/pPHO P31—R) 承载 pPHO P31—R 质粒, 其中含附属型 *adr* 编码 P31 的 DNA 已被插入与被分离的 PHO 5 启动子同一方位, 用碱萃取法从转化株中分离出上述质粒, 此法用作转化寄主酵母酒酵母 AH22R⁻ 则用上面提到的欣纳恩等人的方法, 转化株酵母 (AH22R⁻/pPHO P31—R), 承接上述质粒而被分离 (参看图 8)。

(2) 1 μ g 参考例 2—(3) 所述的表现载体 pPKT700—1 DNA, 于 37 °C 时, 以 2 单位的限制性内切酶 SalI 处理 2 小时, 然后进一步在例 3—(1) 所述条件下以 0.1 单位的碱性磷酸酶处理。此后, 以冷的乙醇沉淀 DNA (SalI—消化的 pPKT700—1)。

接着 200 ng 例 3—(1) 所述的 1.43 kb DNA 和 200 ng SalI—消化的 pPKT700—1 在参考例 1 所述条件下利用 T4 DNA 连接酶而

连接在一起。利用反应混合物和下列例 3 — (1) 所述的步骤菌株 (294 / pPKT P31 — R) 承载带有 1.43 kb DNA 断片的 pPKT P31 — R 质粒而断片含有附属型 *adr* 编码 P 31 DNA 插入的那点如同被分离的 PGK 启动子同一方位。寄主酵母菌株随上述质粒转化而酵母转化株 (K33 — 8D / pPKT P31 — R) 则被分离 (参看图 8)。

(3) 1 μ g 参考例 3 — (3) 所述的 pGLD906 — 1 表现载体在 37°C 时以 2 单位的限制性内切酶处理 2 小时, 然后以例 3 — (1) 所述的条件用 0.1 单位的碱性磷酸酶进一步处理, 随后以冷的乙醇沉淀 DNA (SalI — 消化的 pGLD906 — 1)。

接着, 200 ng 例 3 — (1) 所述的 1.43 kb DNA 断片和 SalI — 消化的 pGLD906 — 1 在参考例 1 所述条件下利用 T4 DNA 连接酶而连接在一起。以例 3 — (1) 所述的方法利用反应混合物, 菌株 (294 / pGLD P31 — R) 承载带有 1.43 kb DNA 断片的 pGLD P31 R 质粒, 其中的断片含有附属型 *adr* 编码 P 31 DNA 插入的那一点与被分离的 GLD 启动子同一方位。寄主酵母 K33 — 7B 随上述质粒转化并取得酵母转化株 (K33 — 7B / pGLD P31 — R) (参看图 8)。

当这些转化株用常规方法培养, 可取得理想的 P31。

例 4

重组体 DNA 分子的结构给以附属型 *adw* 的乙型肝炎病毒表面抗原 P31 基因在酵母中的表现及用上述 DNA 分子进行酵母的转化。

(1) 2 μ g 例 2 所述的 pEBV933 DNA 质粒于 37°C 时, 在 20 μ l 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷 — 盐酸 (pB 7.5), 7 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 7 mM 2 — 巯基乙醇) 中, 以 2 单位的限制性

内切酶 HpaI 处理 2 小时，接着与酚起去蛋白作用并以冷乙醇沉淀 DNA。300 ng 的上述 DNA 和 50 ng 参考例 1 所述的磷酸化的 SalI 衔接物，在参考例 1 所述条件下利用 T4 DNA 连接酶而混合和连接在一起。反应混合物用来转化大肠杆菌 294 并从氨苄青霉素抗性转化株中获得 pHBV933-8 质粒，此质粒具有 SalI 部位以代替已取得的 pHE933 质粒的 HpaI 部位（参看图 9）。

100 μ g 上述 pHBV933-8 质粒于 37 $^{\circ}$ C 时，在 200 μ l 反应混合物（100 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸（pH 7.5），7 mM MgCl₂，50 mM NaCl，7 mM 2-巯基乙醇）中以限制性内切酶 EcoRI 和 SalI 各 100 单位处理 2 小时。而反应混合在参考例 1 所述条件下受到以 1.2% 琼脂糖切片凝交的电泳。电泳后，以参考例 1 所述的方法从凝胶中分离出含有附属型 adw 编码 P31 DNA 断片的 0.96 kb DNA 断片（参看图 9）。

20 μ g pBR322 DNA 质粒于 37 $^{\circ}$ C 时，在 100 μ l 反应混合物（6 mM 三羟甲基氨基甲烷—HCl（pH 7.9），150 mM NaCl，6 mM MgCl₂，6 mM 2-巯基乙醇）中以限制性内切酶 ClaI 和 SalI 各 20 单位处理 2 小时，接着以 1.0% 琼脂糖切片凝胶进行电泳，此步骤在参考例 1 所述条件下得以传导。此后，以参考例 1 所述方法从凝胶中分离出 3.74 kb DNA 断片。

500 ng 的上述 3.74 kb DNA 断片，500 ng 的上述 0.96 kb DNA 断片和 50 ng 例一所述的磷酸化的接合体 d

5' CGATACAATGCAGTGG 3'
(3' TATGTTACGTCACCTTAA 5') 在参考例 1 所述的条件下利

用 T4 DNA 连接酶而连接在一起。反应混合物用来转化大肠杆菌 294 并从氨苄青霉素抗性转化株中取得由上述三种 DNAs 连接在一起组成的 pHBV P31 DNA 质粒（参看图 9）。

50 μ g 的上述 pHBV P31 质粒于 37 °C 时，在 100 μ l 的反应混合物〔10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸（pH 7.5），7 mM MgCl₂，175 mM NaCl，0.2 mM EDTA，7 mM 2-巯基乙醇〕中，以限制性内切酶 SalI 和 ClaI 各 20 单位处理 3 小时，而反应混合物受到用 1.0% 琼脂糖切片凝胶在参考例一所述条件下能传导的电泳。此后，以参考例一所述方法从凝胶中分离出 0.98 kb DNA 断片（参看图 9）。

2 μ g 的上述 0.98 kb DNA 断片在参考例 1 所述条件下以 DNA 聚合酶 I 大断片处理使得粘性末端园钝，接着与酚起去蛋白作用并以冷醇沉淀 DNA。至于被连接于 SalI 衔接物〔5'—P—d (CGTCGACG)，Bethesda 研究〕的 0.98 kb DNA 断片接着以 SalI 处理使得粘性的末端园钝。利用 Sepharose（琼脂糖商品名）4B 柱收集含有 0.99kb DNA 断片（附属型 adw 编码 P31 DNA），而上述的 DNA 则以冷乙醇沉淀（参看图 9）。

200 ng 例 3—(1) 所述的 SalI—消化的 pPHO17—1 和 200ng 上面的 0.99 kb DNA 断片，在参考例 1 所述条件下利用 T4 DNA 连接酶连接在一起。利用反应混合物转化大肠杆菌 294 而以参考例 1 所述方法筛选取得转化株。菌株承载带有 0.99 kb DNA 的 pPHO P31—W 质粒。此质粒含有附属型 adw 编码 P31 DNA，其插入方位与被分离的 PHO 5 启动子相同。用碱萃取法从转化株中分离上述质粒。用欣纳恩等人的方法转化寄主酵母 AH22R⁻，而承载上述质粒的酵母转化株（酒酵

母 AH22R⁻/PPHO P31W) 则被分离 (参看图 9)。

上面含附属型 adw 编码 P31 DNA 的质粒和 PGK 启动子或 GLD 启动子也可用上面的步骤建造。

例 5

重组体 DNA 的结构给以附属型 adw 的乙型肝炎病毒表面抗原 31 基因表现, 而酵母则随着上述 DNA 而转化。

50 μ g 的上述 pTRP P31—W2 质粒于 37 $^{\circ}$ C 时, 在 100 μ l 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM 二硫苏糖醇) 中, 以 20 单位的限制性内切酶处理 20 分钟供部分的消化作用, 而反应混合物受参考例 1 所述的条件下以 0.8% 琼脂糖切片凝胶电泳。据此, 4.6 kb 线状 DNA 分子是 PstI 卵裂的产物, 以参考例一所述方法只是在一个部位从凝胶中分离出来 (参看图 10)。

5 μ g 的上述 4.6 kb DNA 分子于 37 $^{\circ}$ C 时, 在 30 μ l 反应混合物 (10 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 10 mM NaCl) 中以 5 单位的限制性内切酶 ClaI 处理 3 小时, 而反应混合物受参考例 1 所说条件下的 1.0% 琼脂糖切片凝胶电泳。此后, 以参考例 1 所述方法从凝胶中分离出 0.98 kb DNA 断片。

0.8 μ g 的上述 0.98 kb DNA 断片于 37 $^{\circ}$ C 时在 20 μ l 反应混合物 (33 mM 三羟甲基氨基甲烷—盐酸 (pH 7.9), 66 mM 醋酸钾, 10 mM 醋酸镁, 5 mM 二硫苏糖醇) 中以 2.5 单位的 T4 DNA 聚合酶处理 15 分钟使得粘性的末端园钝, 接着与酚起去蛋白作用并用冷乙醇沉淀 DNA。利用例 3—(1) 所述方法, SalI 衔接物联接到 0.98 kb

DNA断片，接着以 SalI 处理使得粘性的末端园钝。利用 Sepharose (琼脂糖的商品名) 4B 柱，把含有 0.99 kb DNA 断片 (附属型 adw 编码 P31 DNA) 这部份加以收集而上述 DNA 则以冷乙醇沉淀。

200 ng 例 3 — (1) 所述的 SalI — 消化的 pPHO17 — 1 和 200 ng 上面 0.99 kb DNA 断片在参考例 1 所述条件下利用 T4 DNA 连接酶而联接在一起。利用反应混合物转化大肠杆菌 294，而转化株是以参考例 1 所述方法筛选而取得。菌株 (294 / pPHO P31 — W) 承载带有 0.99 kb DNA 断片的 pPHO P31 — W 质粒，此质粒含有附属型 adw 编码 P31 DNA，其插入部位与被分离的 PHO 5 启动子相同。上述 pPHO P31 — W 质粒是以碱萃取法从转化株中分离出来，以上述欣纳恩等人的方法用作转化寄主酵母 AH22R⁻，而以酵母转化株 (AH22R⁻ / pPHO P31 — W) 承载已被分离的上述质粒 (参看图 10)。

如果转化株用常规方法培养便可取得理想的 P31。

例 6 (1)

P31 基因在大肠杆菌的表现

每一转化株承载由例 1 或 2 所得的一个 P31 基因表现质粒于 37 °C 时，在含有 1.0 % 葡萄糖和 1.0 % 酪蛋白氨基酸的 M — 9 培养基中培养 6 小时，然后细胞便可收获并以缓冲液 (30 mM 三羟甲基氨基甲烷 — 盐酸 (pH 8.0)，50 mM NaCl，5 mM EDTA)。洗涤细胞悬浮于含有 10 mM 三羟甲基氨基甲烷 — 盐酸 (pH 8.0)，5 mM EDTA，1 mM 苯基甲基硫酰氟和 5 mg / ml 溶菌酶的溶解溶液中，溶胞作用即生效。在上述溶胞产物中加胍氢氯化物至最后浓度为 5 M。在 37 °C 保温 2 小时后，溶胞产物于室温下，用 15,000 rpm 离心 15 分钟至产生

上清液。上清液的 P31 活性是用上文所述的直接免疫测定法测定。这样测得的结果示于表 2。P31 每次获得产量是按照每毫升液体培养基的产量（计算）。我们可以发现这样计标的产量比 1983 年日文版《未检定蛋白质的应用》第 201796 所说表面抗原产量更高。

表 2

转化株	HBsAg (单位/毫升 液体 培养基)
大肠杆菌 294/pTRP P31-R	220
大肠杆菌 294/pTRP P31-W2	300

一个单位 HBsAg 相当于 ^{125}I —反—HBsAg 抗体附着于 Ausria II-125 Kit 的数量，而 Ausria II-125 是结合于 1 ng 的 HBsAg 的小颗粒上。

例 6 (2)

P 31 基因在酵母中的表现

在例 3 或 4 获得的每一酵母转化株和承载 P31 基因表现质粒于 30℃ 时，在 Burkholder 培养基或其变更能级的低磷酸盐中培养两天，此后收集细胞并洗以生理盐水。

按照 Miyanohara, A. 等人的方法，细胞以裂合酶 (Seikagaku Kogyo) 处理后转变为原生质球状态。此外，加入 0.1% Triton (表面活化剂商品名) X-100 以萃取 P31。溶胞产物于室温下，用 15,000 rpm 离心 15 分钟以产生上清液，并用 Auszyme II (Abbott) 测定上清液的 P31 活性，而取得的结果表示于表 3。每次计标的 P 31 的产量均按照每升液体培养基的产量（计标）。

表 3

	P 31 ($\mu\text{g}/\text{l}$ 液体培养基)
酒酵母 AH22R ⁻ /pPHO P31—R	1200
酒酵母 AH22R ⁻ /pPHO P31—W	1100

以 HBSAG 颗粒作标准, 用 Auszyme II 测定 P 31。

例 7

高纯 P 31 蛋白质的生产

(1) 萃取自细胞

100 g 以例 6 所述方法培养而得的大肠杆菌 294 / pTRP P31—R 细胞在 -20°C 冻结并保存于冷冻状态, 而此冷冻状态已均匀地悬浮于含有 10 mM EDTA 和 25 mM 磷酸钠的 200 ml 的缓冲液 (pH 7.5) 中。在此悬浮液中加入 696 mg 苯基甲基硫酰氟和 100 mg 溶菌酶, 此混合物于 37°C 时加热 15 分钟。再于混合物中加入 200 ml 含有尿素的 25 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5), 整个混合物用全混合器 (Servall) 以 4,000 rpm 处理 30 秒使之均匀。此后于匀浆中再加 600 ml 含 8 M 尿素的 25 mM 磷酸钠缓冲液, 整个混合物于 4°C 搅拌 4 小时。于此溶胞产物再加 3,000 ml 25 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5), 综合混合物再搅拌 1 小时。然后用 18,900 rpm (原文可能误写为 xg) 离心 70 分钟生成 3,900 ml 上清液 (9.7×10^3 单位/毫升)。

(2) 用聚—HSA—Cellulofine 柱提纯

把上面获得的上清液通过例 4 所得的聚—HSA—Cellulofine 柱 ($5 \times 2\text{ cm}$) 并用 25 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 平衡以便在它上面吸收 P 31 蛋白质。柱按顺序用 300 ml 含 0.05 % 特威恩 20 的

PBS, 220 ml 含 0.05 % 物威恩 20 和 0.5 M NaCl 的 PBS, 80 ml 含 0.05 % 特威恩 20 的 PBS 和 300 ml 含 4 M 尿素的 25 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 洗涤, 然后以 300 ml 含有 7.5 M 尿素的磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 洗出 P 31。将活性部份 (250 ml) 用 YM—5 膜 (Amicon, USA) 浓缩为 7.2 ml (2.3×10^6 单位/毫升)。于 7 毫升所得的浓缩物中加入 140 毫克 DTT, 于 80 °C 还原 15 分钟以后, 浓缩物通过薄膜过滤器 (ACRODISC; 孔尺寸为 0.2 μ m; Gelman)。

(3) 用高性能液相色谱法以反相柱提纯

500 μ l 上面获得滤液可以被 AP202 300 $\text{\AA}$ (C_8) 反相柱 (YMC—Shimadzu) 吸收, 而高性能液相色谱则利用三氟乙酸—乙腈—正丙醇系统作为洗脱液系统而进行工作。

AP 202 300 $\text{\AA}$ (C_8) (4.6 $\times$ 150 mm); 柱温为 30 °C; 洗脱剂 A 为 0.1 % 三氟乙酸—99.9 % 水; 洗脱剂 B 为 0.1 % 三氟乙酸—49.95 % 乙腈—49.95 % 正丙醇; 洗出程序分为 0 (45%A+55%B)—分为 2.5 (25%A+75%B)—分为 4.7 (25%A+75%B)—分为 4.9 (5%A+95%B)—分为 5.0 分 (45%A+55%B); 流速为 1 毫升/分; 检测波长为 280 nm。一个分数率显示在这些条件 (4.8 毫升; 3.1×10^4 单位/毫升) 下保留时间约为 4.1 分钟。便可收集和冻干这样取得的是含有 149 μ g (1×10^6 单位/毫克) 高纯 P 31 蛋白质 (附属型 adr) 的白色粉末。

用上述方法生产的高纯 P 31 蛋白质 (附属型 adr) 有下列特性:

(1) 均匀性

SDS—聚丙烯酰胺切片凝胶电泳是以 Laemmli 方法完成 (Nature, 227, 680 (1970)), 接着用银染色试剂 " Daiichi " (Daiichi Kagaku, Tokyo) 染色并检出 P 31 蛋白质是单带 (参看图 11)。

(2) 分子重量

以 SDS—聚丙烯酰胺切片凝胶电泳的结果作为根据, 计算出 P 31 蛋白质分子重约为 32, 000 道尔顿 (参看图 11)。

(3) 氨基酸的成分

在作为水解的玻璃管中置入 20 μ g P 31 蛋白质。在加入含 4 % 基乙酸的恒沸点盐酸后, 玻璃管在减压下密封, 而水解作用是在 110°C 经过 24, 48, 72, 或 96 小时完成。水解后, 打开玻璃管, 在减压下移去盐酸, 残迹溶于 0.02 N 盐酸中而氨基酸的分析是用日立牌 835 型氨基酸分析仪来完成。根据 Hirs' 方法 (Methods in Enzymol., 11, 197 (1967)) 当磺基丙氨酸在氨基酸分析仪里存在时, 在过甲酸氧化 P 31 蛋白质后可以测得胱氨酸和半胱氨酸并在减压下在恒沸点盐酸中水解 24 小时。氨基酸的分析数据是取水解 24, 48 和 72 小时结果的平均值。而对于异亮氨酸、亮氨酸和苯基丙氨酸则在使用水解 96 小时后取得数值; 对于丝氨酸和苏氨酸的数值是用外推法推算到水解时间为 0 (零)。这样取得的结果表示表 4。

表 4

氨基酸	分子 %
Asp/Asn	5.8
Thr	7.8
Ser	9.6
Glu/Gln	5.3
Pro	11.5
Gly	7.0
Ala	4.7
1/2Cys	3.9
Val	5.2
Met	2.5
Ile	5.2
Leu	12.7
Tyr	2.4
Phe	6.4
Lys	1.5
His	1.0
Arg	3.8
Trp	3.6

(4) N 末端氨基酸顺序

N 末端氨基酸顺序的分析, 自动的埃德曼降解法是利用气相蛋白质顺序分析仪 (应用生物体系 470A 型, 美国)。乙内酰苯硫脲—氨基酸 (PTH—氨基酸) 是以高性能液相色谱利用 Micro Pak C18—3 SP—DS 柱 (Varian, USA) 来鉴定。在各个步骤检测的 PTH—氨基酸表示于表 5。

表 5

步骤	检测的 PTH—氨基酸
1	甲硫氨基酸
2	谷氨酰胺
3	色氨酸
4	天冬酰胺
5	X ¹⁾
6	苏氨酸

1) 未能查明的氨基酸

(5) C 末端氨基酸

将 620 μ g 上述的 P 31 蛋白质置于玻璃管中以肼降解并加入 0.1 毫升无水肼。在减压下密封管子, 并于 100 °C 整个加热 6 小时。取得的降解产物是冻干的并溶于蒸馏水中。在此溶液中加入苯甲醛形成的混合物在室温下搅拌 1 小时然后进行离心至产生上清液。这上清液是冻干的并且氨基酸的分析要在使用日立牌 835 型氨基酸分析仪的条件下进行。从而检测得 4.7 毫微摩尔异亮氨酸。

用例 6 所述方法培养上述菌株而取得大肠杆菌 294/pTRP P31-W2

细胞的应用而导致在上述同样方法中产生高纯型的 P 31 蛋白质（附属型 adw）。

例 8

1 μ g 参考例 2 — (3) 所述的表现载体 pPKT700 — 1 DNA 于 37 °C 时，以 2 单位限制性内切酶 SalI 处理 2 小时，然后在例 3 — (1) 所述条件下进一步以 0.1 单位的碱性磷酸酶处理。然后以冷乙醇沉淀 DNA (SalI — 消化的 pPKT700 — 1)。

接着，200 ng 例 3 — (1) 所述的 1.43 kb DNA 断片和 200 ng SalI — 消化的 pPKT700 — 1 在参考例 1 所述条件下利用 T4 DNA 连接酶而连接在一起。利用反应混合物和按例 3 — (1) 所述的方法，菌株 (294/pPKT P31 — R) 承载含有附属型 adr 编码 P31 DNA，带有 1.43 kb DNA 断片的 pPKT P31 — R 质粒其插入方位与被分离的 PGK 启动子相同。上述质粒转化寄主酵母菌株 AH22R⁻，而酵母转化株 (AH22R⁻/pPKT P31 — R) 则被分离 (参看图 8)。

例 9

1 μ g 参考例 3 — (1) 所述表现载体 pGLD906 — 1 DNA 在 37 °C 时，以 2 单位限制性内切酶 SalI 处理 2 小时，然后在例 3 — (1) 所述条件下以 0.1 单位碱性磷酸酶进一步处理。随后，以冷乙醇沉淀 DNA (SalI — 消化的 — pGLD906 — 1)。

接着，200 ng 例 3 — (1) 所述的 1.43 kb DNA 和 SalI — 消化的 pGLD906 — 1 在参考例 1 所述条件下，利用 T4 DNA 连接酶而连接在一起。以例 3 — (1) 所述方法利用反应混合物菌株 (294/pGLD P31 — R) 承载含有附属型 adr 编码 P 31 DNA，带有 1.43 kb DNA

的 pGLD P31—R 质粒其插入方位与被分离的 GLD 启动子相同。上述质粒转化寄主酵母 AH22R⁻ 而获得酵母转化株 (AH22R⁻/pGLD P31—R) (参看图 8)。

例 10

P 31 基因在酵母中的表现

在例 8 或 9 获得每一酵母转化株和承载 P 31 基因表现质粒于 30°C 时在 Burkholder 培养基或其变更能级的低磷酸盐中培养 2 天, 此后收集细胞并洗以生理盐水。

按照 Miyano-hara, A 等人的方法, 细胞以裂合酶 [Seikagaku Kogyo] 处理后转变为原生质球状态。此后, 加入 0.1% Triton (表面活化剂商品名) X—100 以萃取 P31。溶胞产物于室温下, 用 15,000 rpm 离心以产生上清液, 并用 Auszyme II [Abbott] 测定上清液的 P31 活性而取得结果表示于表 6, 每次计标的 P 31 的产量均按照每升液体培养基的产量 (计标)。

表 6

	P 31 ($\mu\text{g} / \text{l}$ 液体培养基)
酒酵母 AH22R ⁻ /pGLD P31—R	2400
酒酵母 AH22R ⁻ /PPHO P 31—W	350

以 HBSAg 颗粒作标准, 用 Auszyme II 测定 P31。

例 11

从例 1 和例 2 取得的承载表现 P 31 基因表现质粒的大肠杆菌 294 中萃取质粒, 以此质粒转化大肠杆菌 C600 取得大肠杆菌 C600/pTRF P31—R 和大肠杆菌 C600/pTRF P31—W2。

例 12

大肠杆菌 C 600 菌株承载从例 11 取得的 P 31 基因表现质粒于 37 °C 时在含有 2.0 % 葡萄糖和 1.0 % 酪蛋白氨基酸的 M—9 培养基中培养 8 小时然后收集细胞并洗以缓冲液〔 30 mM 三羟基甲氨基甲烷—盐酸 (pH 8.0), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA)〕。细胞悬浮于由 10 mM 三羟基甲氨基甲烷—盐酸 (pH 8.0), 5 mM EDTA, 1 mM 苯基甲基硫酰氟和 5 mg/ml 溶菌酶的溶液中, 溶胞作用即生效。在上述溶胞产物中加胍氢氯化物至最后浓度为 7 M, 在 37 °C 保温 2 小时后, 溶胞产物在室温下以 15,000 rpm 离心 15 分钟至产生上清液。上清液的 P31 活性是用上文所述的直接免疫法测定。这样测得的结果表示于表 7。P 31 每次获得的产量是按照每毫升液体培养基的产量 (计算)。

表 7

转化株	HBsAg (单位/毫升 液体培养基)
大肠杆菌 C600/pTRP P31—R	1500
大肠杆菌 C600/pTRP P31—W2	1300

一个单位 HBsAg 相当于 ^{125}I —反—HBsAg 抗体附着于 Ausria II—125 kit 的数量, 而 Ausria II—125 是结合于 1 ng 的 HBsAg 的小颗粒上。

例 13

高纯 P 31 蛋白质的生产

以例 7 所述方法用大肠杆菌 C600 / pTRP P31—R 取得的从聚—HSA—Cellulofine 柱洗出的浓缩物中加入 6 mg DTT, 反还后在 37 °C 时 (静置) 1 小时, 混合物通过薄膜过滤器过滤。500 μl 滤

液可以被 AP224 300A (C₈) 反相柱 (YMC—Shimadzu) 吸收, 而高性能液相色谱则利用三氟乙酸—乙腈—正丙醇系统作为洗脱液系统而进行工作。

AP 224 300A (C₈) (1 × 30 cm); 柱温为 30 °C; 洗脱剂 A 为 0.1% 三氟乙酸—99.9% 水; 洗脱剂 B 为 0.1% 三氟乙酸—49.95% 乙腈—49.95% 正丙醇; 洗脱程序, 分为 0 (70% A + 30% B) —分为 10 (28% A + 72% B) —分为 30 (24% A + 76% B) —分为 50 (14% A + 86% B) 分为 55 (5% A + 95% B) —分为 58 (5% A + 95% B) —分为 59 (70% A + 30% B); 流速为 2.5 毫升/分; 检测波长为 280 nm。一个分数率显示在这些条件 (20 ml) 1.7 × 10⁴ 分/毫升) 下保留时间约为 42 分钟便可收集和保存于 -20 °C。

用上述方法生产的高纯蛋白质 (附属型 adr) 与例 7 所取得的 P31 蛋白质 (附属型为 adr) 具有同样的特性。

例 14

(1) 1 mg 例 13 取得的 P31 蛋白质置入玻璃管中并在减压下移去溶剂。按照酚硫酸法 (Analytical Chemistry 28, 350 (1956)) 以葡萄糖作为标准来完成碳水化合物的定量分析。结果是在样品不大于 0.3 摩尔而检出碳水化合物, P31 蛋白质分子重量的计算是以每摩尔 P31 蛋白质为 31,000 道尔顿。所以获得的蛋白质似乎没有碳水化合物。

(2) 在玻璃管中置入由例 13 获得的 30 μg P31 蛋白质进行水解, 接着移去溶剂。加入三氟乙酸/恒沸点盐酸 [1:2 (V/V)] 后, 在

减压下密封管子，在 170 °C 下经过 25、50 和 180 分钟时间完成水解作用。水解后，管子启封，移去三氟乙酸和盐酸，残迹溶于 0.02 N 盐酸中，用日立牌 835 型氨基酸分析仪完成氨基酸分析。根据 Hir's 方法当磺基丙氨酸存在于氨基酸分析仪里时，在过甲酸氧化 P31 蛋白质后可以测得胱氨酸和半胱氨酸并在减压下在恒沸点盐酸中水解 24 小时。苏氨酸、丝氨酸和色氨酸的定量分析是 P31 蛋白质在含有 4% 亚基乙酸的恒沸点盐酸中水解后，在减压情况下，分别以 16、20、24 和 30 小时进行的。氨基酸的分析数据是计算由水能 25、50 和 180 分钟取得的每一个数值的平均值。对于色氨酸是采用其水解 24 小时后的数值而对于丝氨酸和苏氨酸数值是用外推法推算至水能时为 0（零）而测得的。这样获得的结果表于表 8。

表 8

氨基酸	分子 %
Asp/Asn	5.5
Thr	7.9
Ser	10.3
Glu/Gln	4.7
Pro	11.9
Gly	7.3
Ala	4.4
1/2 Cys	3.8
Val	4.7
Met	2.5
Ile	5.1
Leu	13.5
Tyr	2.3
Phe	6.7
Lys	1.2
His	0.9
Arg	3.4
Trp	3.7

对这些微生物的研究已有了累积而其增长的数字表示于表 9。

在表中，" IFO " 和 " FRI " 各代表 " 对发酵作用的研究，Osaka " (日本) 和 " 发酵研究院，工业科学和工艺代理，日本国际贸易和工业部 "。E · Coli 和 S · cerevisiae 分别代表大肠杆菌和酒酵母，" FERM BP " 数字代表在布达佩斯协议下累积的增长数字而 " FERM P " 项在括弧里的数字代表在布达佩斯协议下未转变成累积前的增长数字

表 9

微生物	IFO	FRI
	IFO No.	FERM No.
E. coli 294	14171	_____
E. coli 294/pTRP P31-R	14355	BP-802 (P-7709)
E. coli 294/pTRP P31-W2	14356	BP-803 (P-7710)
S. cerevisiae AH22R ⁻	10134	BP-804 (P-7824)
S. cerevisiae AH22R ⁻ /pPHO P31-R	10135	BP-805 (P-7825)
S. cerevisiae AH22R ⁻ /pPHO P31-W	10136	BP-806 (P-7826)
E. coli C600/pTRP P31-R	14425	BP-807 (P-8145)
S. cerevisiae AH22R ⁻ /pGLD P31-R	10145	BP-800
S. cerevisiae AH22R ⁻ /pPKT P31-R	10146	BP-801
E. coli C600	14410	BP-808 (P-8154)

E. coli 294 是众所周知的菌株 (Backman, K. et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4174(1974))。

按照这项发明 HBSAG P31 是用作检定和预防 HBV 感染的疫苗。

说 明 书 附 图

1

1 CCTCTAAGAGACAGTCATCCTCAGGCCATG CAG TGG AAT TCC ACA ACA TTC CAC CAA GCT
 Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala
 12 CTG CTA GAT CCC AGA GTG AGG GGC CTA TAT TTT CCT GCT GGT GGC TCC AGT TCC
 Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser
 30 GGA ACA GTA AAC CCT GTT CCG ACT ACT GCC TCA CCC ATA TCG TCA ATC TTC TCG
 Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Ser Ile Phe Ser
 48 AGG ACT GGG GAC CCT GCA CCG AAC ATG GAG AAC ACA ACA TCA GGA TTC CTA GGA
 Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly
 66 CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA
 Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
 84 CCA CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT TTT CTA GGG GGA GCA CCC
 Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro
 102 ACG TGT CCT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC TCA CCA ACC TCT
 Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
 120 TGT CCT CCA ATT TGT CCT GGC TAT CSC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT ATC ATA
 Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile
 138 TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GTT CTT CTG GAC TAC
 Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr
 156 CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA CTT CCA GGA ACA TCA ACC ACC AGC ACG
 Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr
 174 GGG CCA TGC AAG ACC TGC ACG ATT CCT GCT CAA GGA ACC TCT ATG TTT CCC TCT
 Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser
 192 TGT TGC TGT ACA AAA CCT TCG GAC GGA AAC TGC ACT TGT ATT CCC ATC CCA TCA
 Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser
 210 TCC TGG GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CST TTC TCC TGG
 Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
 228 CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT
 Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val
 246 TGG CTT TCA GTT ATA TGG ATG ATG TGG TAT TGG GGG CCA AGT CTG TAC AAC ATC
 Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile
 264 TTG AGT CCC TTT TTA CCT CTA TTA CCA ATT TTC TTT TGT CTT TGG GTA TAC ATT
 Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 282 TAA ACCCT

1
10
1 CCTCAGGCCATG CAG TGG AAT TCC ACT GCC TTG CAC CAA GCT CTG CAG GAT CCC AGA
Met Gln Trp Asn Ser Thr Ala Leu His Gln Ala Leu Gln Asp Pro Arg

17 GTC AGG GGT CTG TAT CTT CCT GCT GGT GGC TCC AGT TCA GGA ACA GTA AAC CCT
Val Arg Gly Leu Tyr Leu Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro

35 GCT CCG AAT ATT GCC TCT CAC ATC TCG TCA ATC TCC GCG AGG ACT GGG GAC CCT
Ala Pro Asn Ile Ala Ser His Ile Ser Ser Ile Ser Ala Arg Thr Gly Asp Pro

53 GTG ACG ATC ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA
Val Thr Ile Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu

71 CAG GCG GGG TTT TTC TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC
Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp

89 TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT TTT CTA GGG GGA TCA CCC GTG TGT CTT GGC CAA
Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln

107 AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ATT TGT
Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys

125 CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CCG CGT TTT ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG
Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu

143 CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTA TTG GTT CTT CTG GAT TAT CAA GGT ATG TTG CCC
Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro

161 GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA ACA ACA ACC AGT ACG GGA CCA TGC AAA ACC
Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr

179 TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGC AAC TCT AAG TTT CCC TCA TGT TGC TGT ACA AAA
Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Lys Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys

197 CCT ACG GAT GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCG TCC TGG GCT TTC GCA
Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala

215 AAA TAC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG
Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val

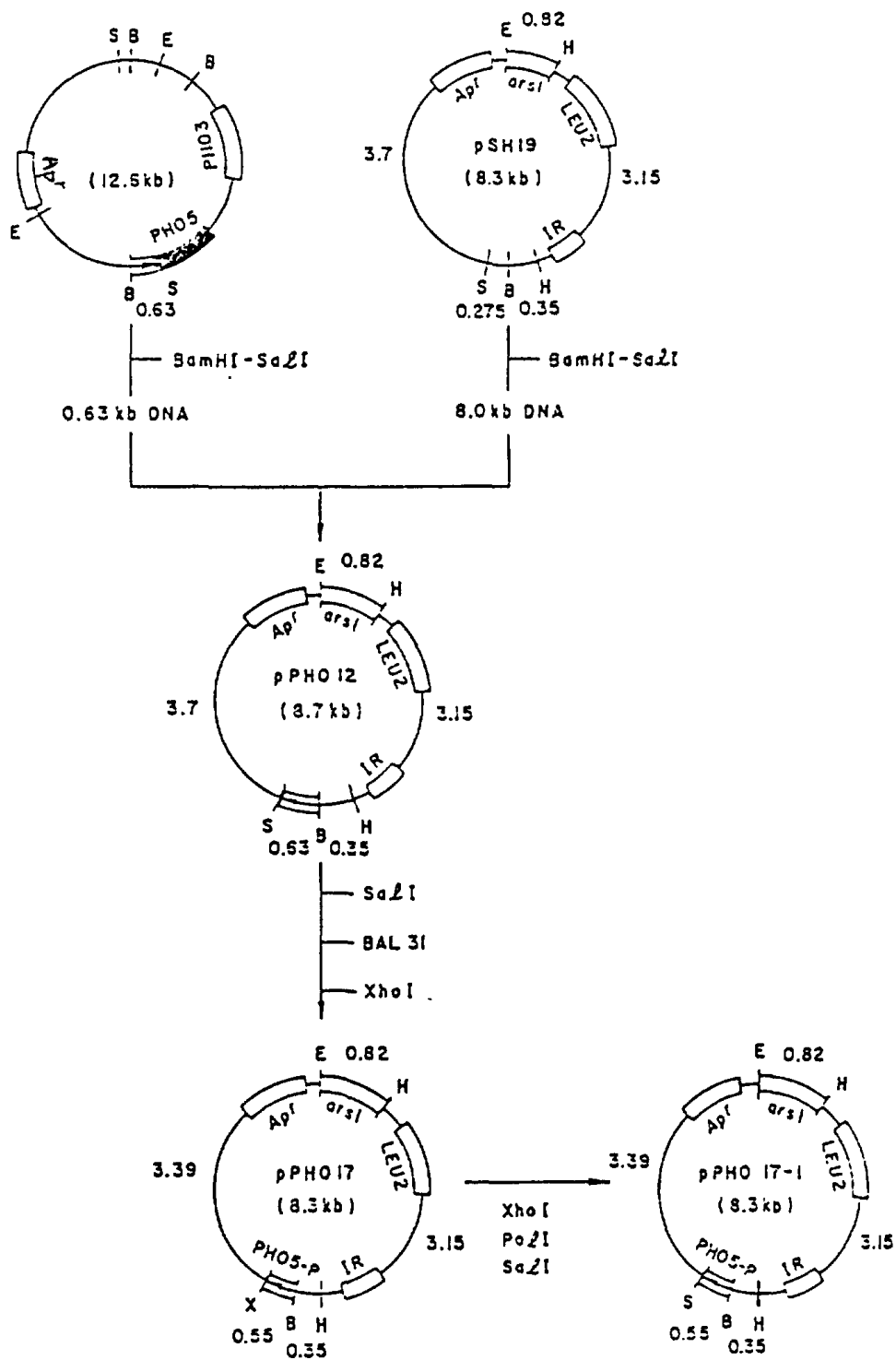
233 CCA TTT GTT CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GCT ATA
Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile

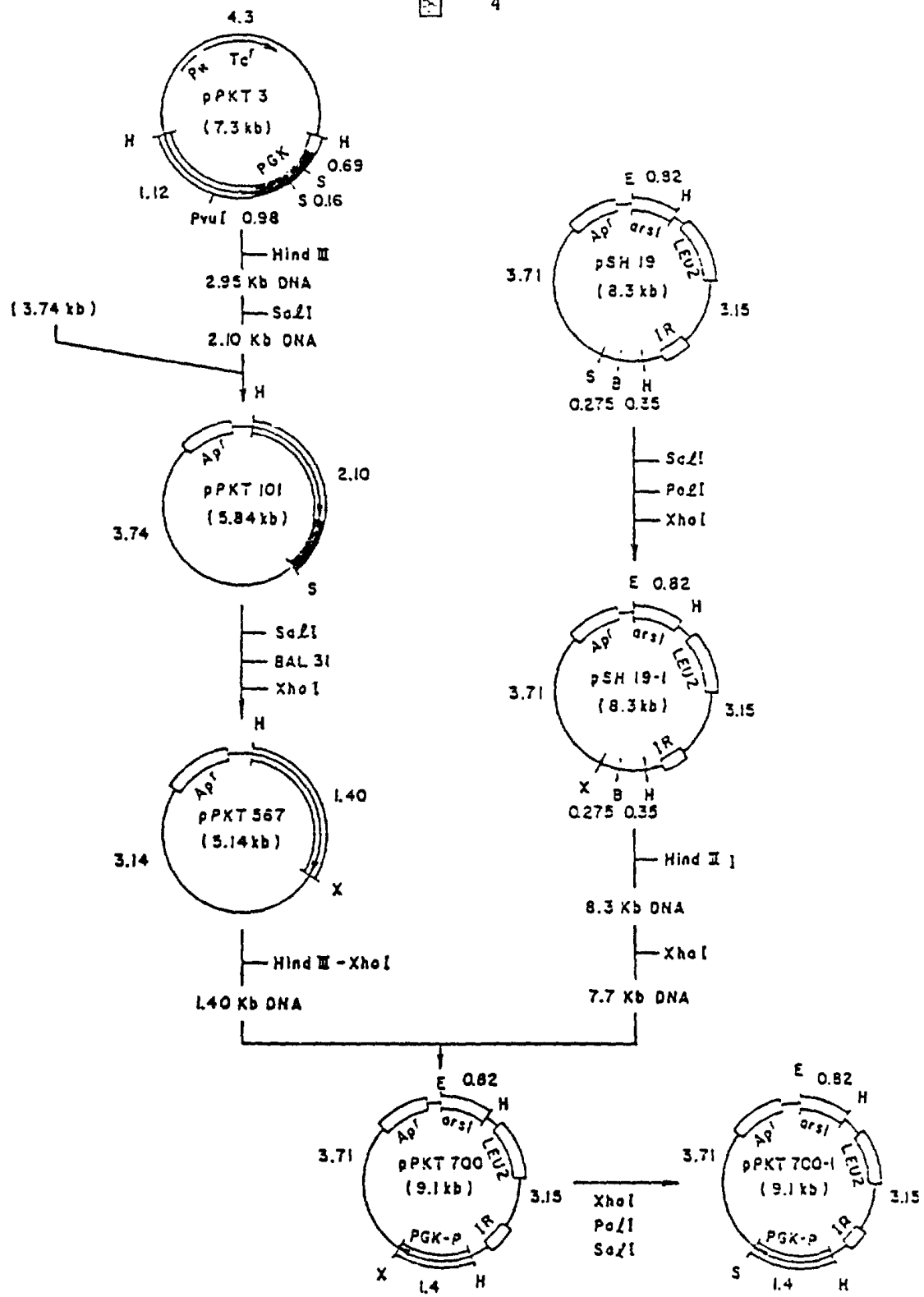
251 TGG ATG ATG TGG TAT TGG GGG CCA AGT CTG TAC AGC ATC GTG AGT CCC TTT ATA
Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile

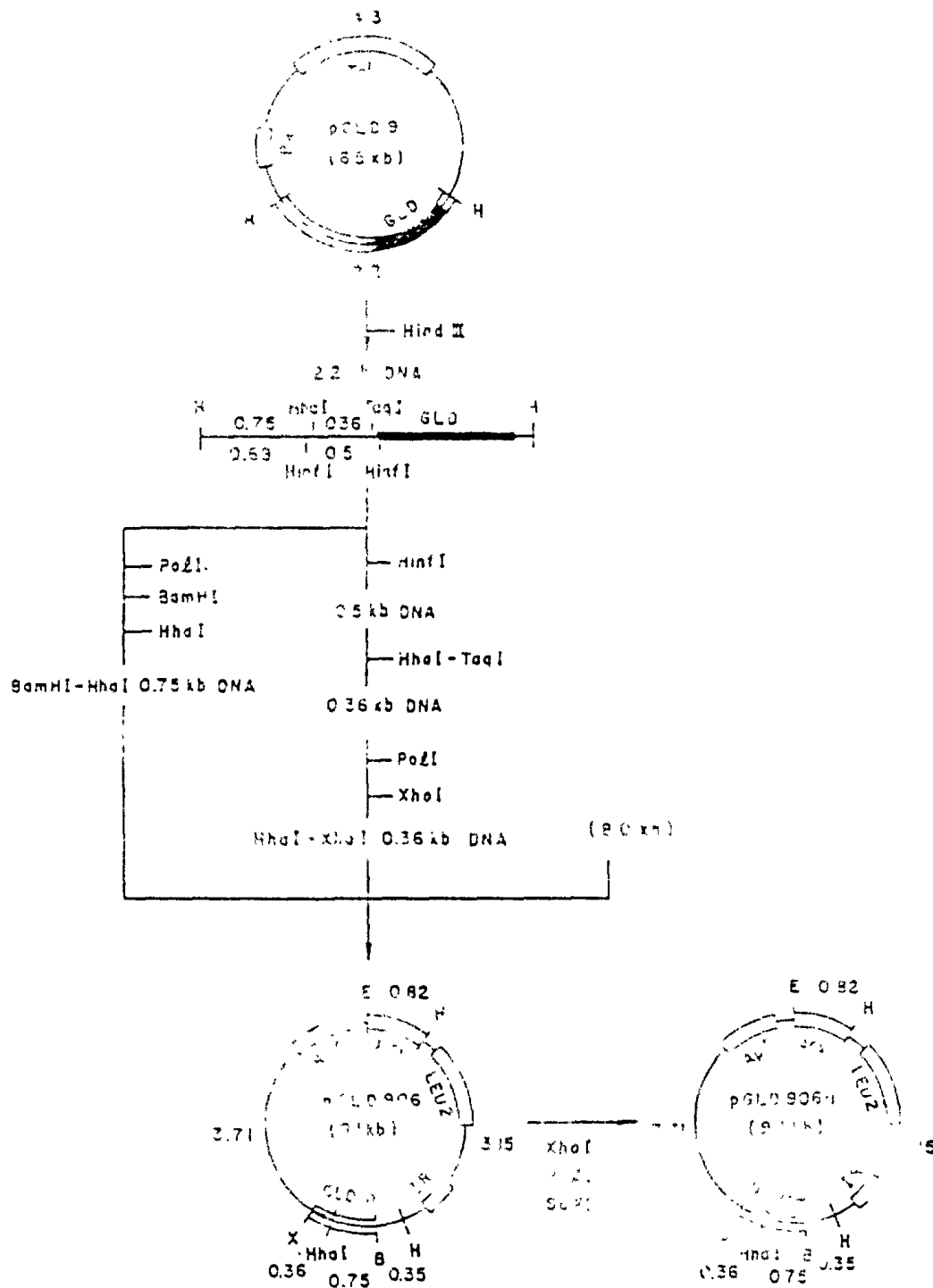
269 CCG CTG TTA CCA ATT TTC TTT TGT CTC TGG GTA TAC ATT TAA ACCCT
Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile ***

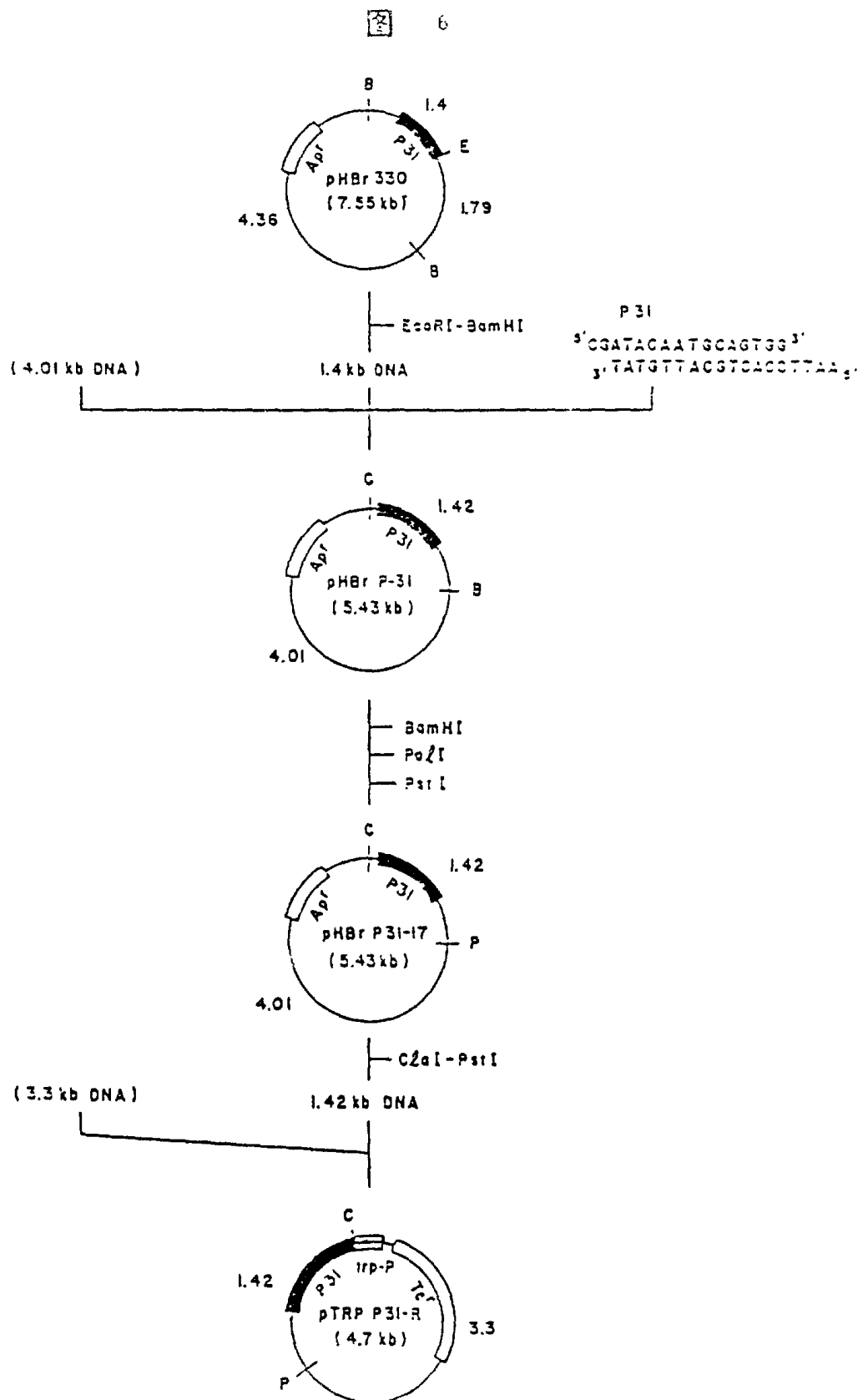


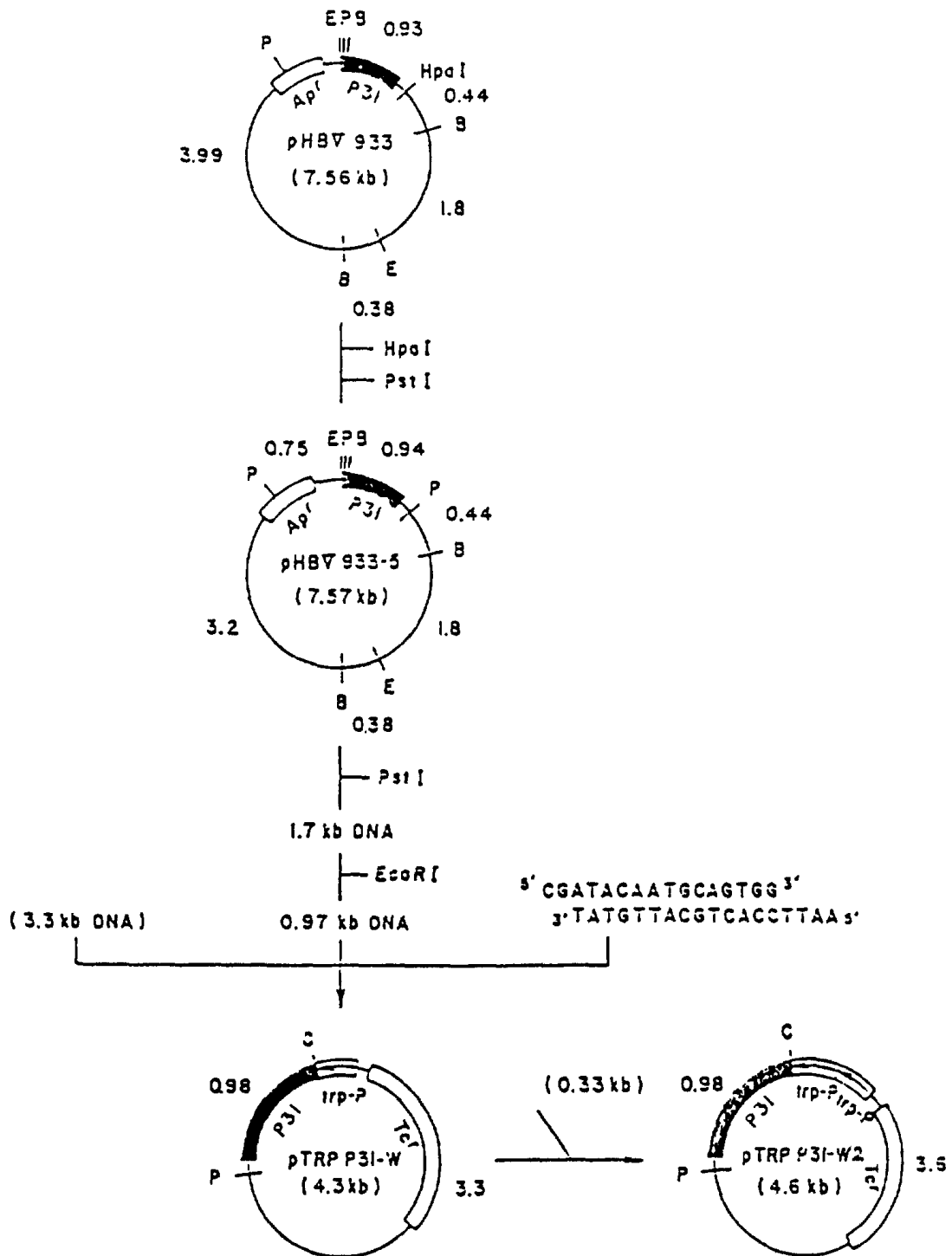
3

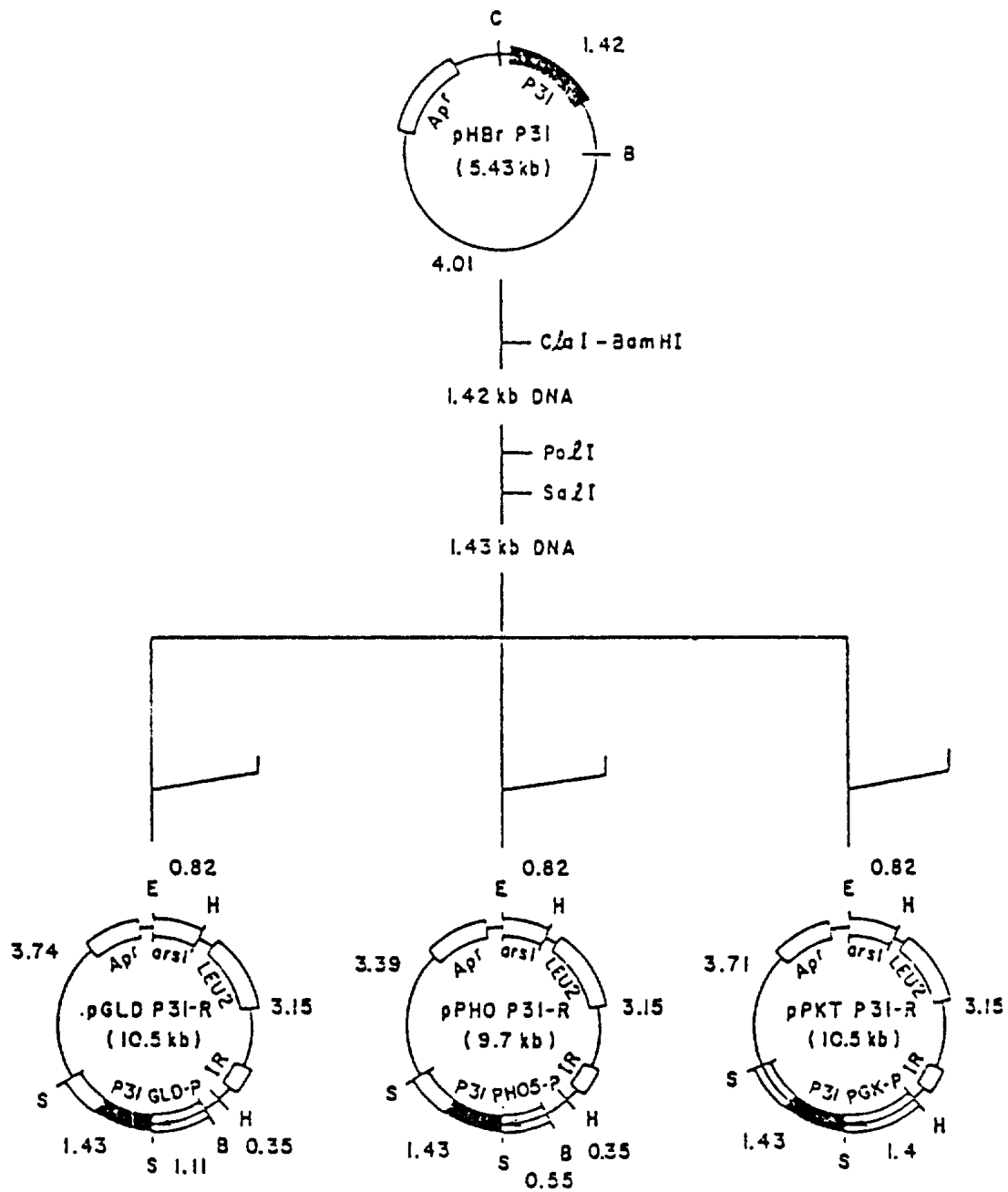


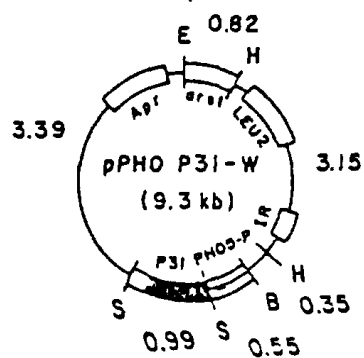
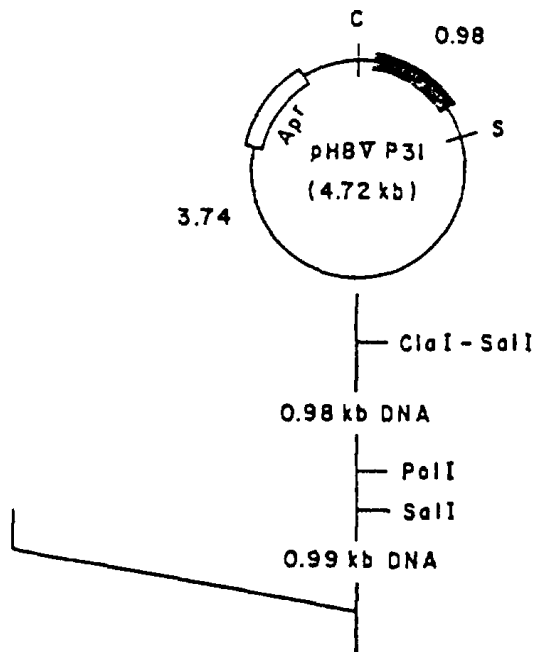
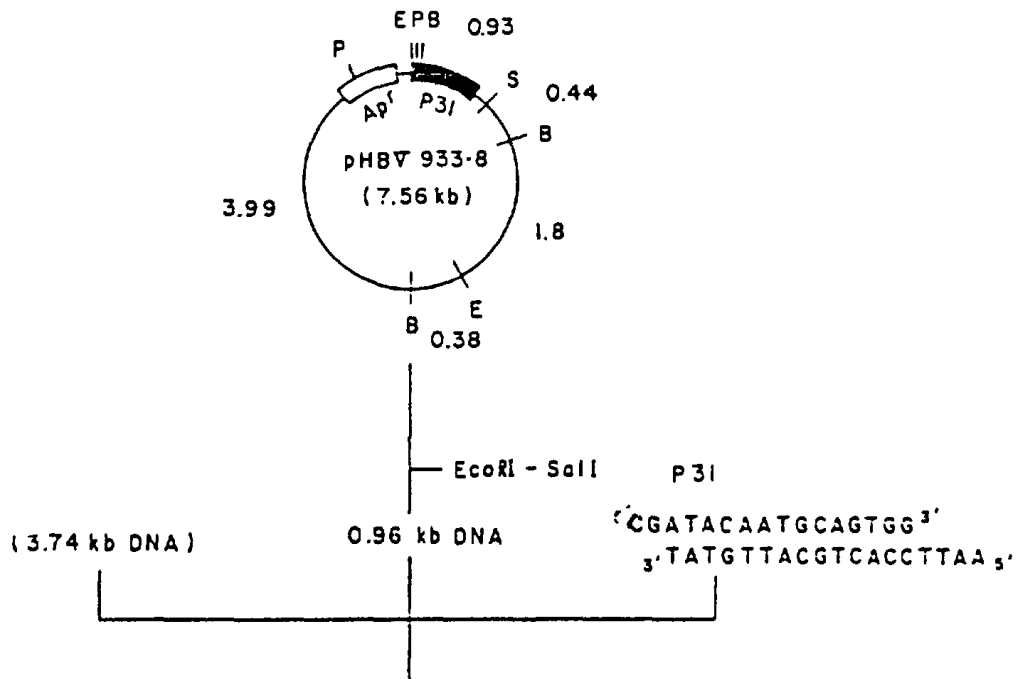






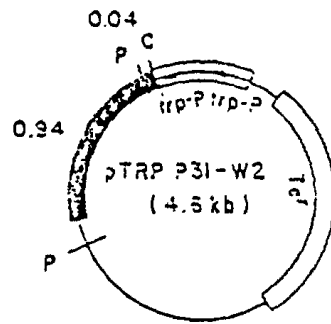








10



— Pst I
4.6 kb DNA

— Cla I
0.98 kb DNA

— T4 DNA
— Sal I
0.99 kb DNA

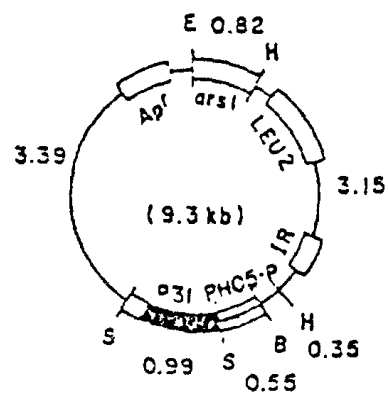


图 11

