

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

C12N 15/81

# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 88104680.9

[45]授权公告日 1999年10月13日

[11]授权公告号 CN 1045620C

[22]申请日 88.7.28 [24]颁证日 99.7.30

[21]申请号 88104680.9

[30]优先权

[32]87.7.28 [33]US[31]078,551

[73]专利权人 DSM公司

地址 荷兰海尔伦

共同专利权人 奇隆公司

[72]发明人 安东尼·J·布拉克

约翰内斯·A·万·登·伯格

审查员 潘爱群

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 辛敏忠

权利要求书 5 页 说明书 16 页 附图页数 17 页

[54]发明名称 含有克鲁维酵母  $\alpha$ -因子前导顺序的 DNA 组建物的制备方法

[57]摘要

用于在酵母中分泌表达异源多肽的 DNA 组建物,包括通过酵母加工信号将克鲁维酵母  $\alpha$ -因子前导序列连接到异源多肽上去。组建物用乳酸克鲁维酵母  $\alpha$ -因子前导和加工信号序列,有或无间隔,将其与前凝乳酶连接作为一个实例。

ISSN 1008-4274

## 权 利 要 求 书

---

1.含有用以在酵母中指导异源多肽表达的克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导序列的DNA组合物制备方法,其特征在于,所述编码克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导序列的DNA序列为附图2中所述序列或为在相当于42℃在2xSSC、0.1% SDS中两次冲洗的严谨条件下利用附图1中所述探针能够杂交的DNA序列,且该序列与编码异源多肽的DNA序列可操作地连接。

2.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,编码克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导序列的该DNA序列通过酵母加工信号序列连接到编码该异源多肽的该DNA序列上。

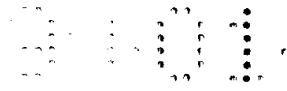
3.根据权利要求1所述的方法,其中DNA组合物还包含一酵母启动子,该启动子被可操作地连接于编码克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导序列的DNA序列的5'末端。

4.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,将野生型克鲁维酵母 $\alpha$ -因子的全长前导序列作为克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导序列连接。

5.根据权利要求4所述的方法,其特征在于,将图2中所示克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导序列作为克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导序列连接。

6.根据权利要求1所述的方法,将图2中所示的DNA序列作为全长前导序列连接。

7.根据权利要求1所述的方法,将乳酸克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前



导序列作为克鲁维酵母 $\alpha$  - 因子前导序列连接。

8.根据权利要求 2 所述的方法, 克鲁维酵母 $\alpha$  - 因子前导序列通过包括碱性二肽裂解点和间隔的酵母加工信号构成的 DNA 序列进行连接。

9.根据权利要求 2 所述的方法, 克鲁维酵母 $\alpha$  - 因子前导序列通过包括碱性二肽裂解点和缺失一个间隔的酵母加工信号序列直接与编码异源多肽的 DNA 序列连接。

10.根据权利要求 8 所述的方法, 克鲁维酵母 $\alpha$  - 因子前导序列通过包括赖 - 精或精 - 精裂解点的酵母加工信号序列连接。

11.根据权利要求 9 所述的方法, 克鲁维酵母 $\alpha$  - 因子前导序列通过包括赖 - 精或精 - 精裂解点的酵母加工信号序列连接。

12.根据权利要求 3 所述的方法,  $\alpha$  - 因子启动子或 GAP 启动子融合到克鲁维 $\alpha$  - 因子前导序列的 5' 端, 而该 DNA 组建物通过包括赖 - 精裂解点和间隔的酵母加工信号序列连接。

13.根据权利要求 12 所述的方法, 包括克鲁维 $\alpha$  - 因子前导序列和含赖 - 精或精 - 精裂解点的酵母加工信号序列的 DNA 组建物与前凝乳酶连接。

14.根据权利要求 3 所述的方法,  $\alpha$  - 因子启动子或 GAP 启动子序列融合到乳酸克鲁维酵母 $\alpha$  - 因子前导序列的 5' 端, 而该 DNA 组建物通过包括赖 - 精裂解点的酵母加工前导序列直接与编码异源多肽的 DNA 序列连接。

15.根据权利要求 14 所述的方法, 包括 $\alpha$  - 因子启动子或 GAP 启动子序列, 乳酸克鲁维 $\alpha$  - 因子前导序列和含赖 - 精裂解点的酵母加工信号序列的 DNA 组建物直接与编码前凝乳酶的 DNA 序



列连接。

16.可在酵母中表达异源多肽的表达载体制备方法，其特征是权利要求1制备的DNA组建物插入包括复制或整合系统以在酵母中达到稳定保持的质粒中。

17.可在酵母中表达异源多肽的表达载体制备方法，其特征是权利要求2制备的DNA组建物插入包括复制或整合系统以在酵母中达到稳定保持的质粒中。

18.可在酵母中表达异源多肽的表达载体制备方法，其特征是权利要求3制备的DNA组建物插入包括复制或整合系统以在酵母中达到稳定保持的质粒中。

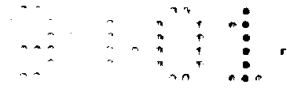
19.可在酵母中表达异源多肽的表达载体制备方法，其特征是权利要求12制备的DNA组建物插入包括复制或整合系统以在酵母中达到稳定保持的质粒中。

20.可在酵母中表达异源多肽的表达载体制备方法，其特征是权利要求13制备的DNA组建物插入包括复制或整合系统以在酵母中达到稳定保持的质粒中。

21.可在酵母中表达异源多肽的表达载体制备方法，其特征是权利要求14制备的DNA组建物插入包括复制或整合系统以在酵母中达到稳定保持的质粒中。

22.可在酵母中表达异源多肽的表达载体制备方法，其特征是权利要求15制备的DNA组建物插入包括复制或整合系统以在酵母中达到稳定保持的质粒中。

23.在酵母中表达异源多肽的方法，其中该方法包括以下步骤：  
骤：



- a.培养用权利要求 16 的方法制备的表达载体转化的酵母;
- b.回收至少被部分加工的分泌的异源多肽。

24. 在酵母中表达异源多肽的方法, 其中该方法包括以下步骤:

- a.培养用权利要求 17 的方法制备的表达载体转化的酵母;
- b.回收至少被部分加工的分泌的异源多肽。

25.在酵母中表达异源多肽的方法, 其中该方法包括以下步骤:

- a.培养用权利要求 18 的方法制备的表达载体转化的酵母;
- b.回收至少被部分加工的分泌的异源多肽。

26.在酵母中表达异源多肽的方法, 其中该方法包括以下步骤:

- a.培养用权利要求 19 的方法制备的表达载体转化的酵母;
- b.回收至少被部分加工的分泌的异源多肽。

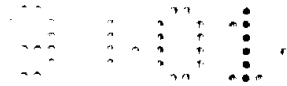
27.在酵母中表达异源多肽的方法, 其中该方法包括以下步骤:

- a.培养用权利要求 20 的方法制备的表达载体转化的酵母;
- b.回收至少被部分加工的分泌的异源多肽。

28.在酵母中表达异源多肽的方法, 其中该方法包括以下步骤:

- a.培养用权利要求 21 的方法制备的表达载体转化的酵母;
- b.回收至少被部分加工的分泌的异源多肽。

29.在酵母中表达异源多肽的方法, 其中该方法包括以下步骤:



- a. 培养用权利要求 22 的方法制备的表达载体转化的酵母;
- b. 回收至少被部分加工的分泌的异源多肽。

30. 在克鲁维酵母中表达异源多肽的方法, 其中该方法包括以下步骤:

- a. 培养用权利要求 16 的方法制得的表达载体转化的克鲁维酵母菌株;

- b. 回收至少部分加工的分泌的异源多肽。

31. 根据权利要求 30 所述的方法, 其特征是包括乳酸克鲁维 $\alpha$ -因子前导序列作为克鲁维 $\alpha$ -因子前导序列的表达载体转化的酵母进行培养。

# 说明书

## 含有克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导顺序的 DNA 组建物的制备方法

本发明属重组 DNA 领域，更确切地说是有关用克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*)  $\alpha$ -因子前导顺序指导在酵母中分泌异源多肽。

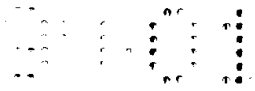
美国专利 No. 4,562,082 叙述了酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的  $\alpha$ -因子前体基因，旨在说明用酿酒酵母前导顺序的 DNA 且建物和异源基因来分泌表达该异源基因。

欧洲专利 0116201 叙述了在酵母中用酿酒酵母的  $\alpha$ -因子前导顺序得到了分泌表达的人表皮生长因子。1983 年 8 月 12 日提交的美国共同未决专利申请 No. 522,909 叙述了用无间隔 (“Spacerless”) 酿酒酵母  $\alpha$ -因子前导顺序得到异源基因更有效的分泌表达。

“科学” 1985 年 229: 1219 - 1244 页报道了用酿酒酵母  $\alpha$ -因子顺序指导前凝乳酶的分泌，报道了产生的大部分前凝乳酶是在细胞内以不溶形式存在而不是分泌到胞外的。虽然转化酶前导物可有效地使能激活的前凝乳酶分泌出去，但必须筛选出能分泌足够量前凝乳酶的突变株。

以前从未有人叙述过用乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 细胞或其他种克鲁维酵母的菌株生产偶配外激素 ( $\alpha$ -因子和  $\alpha$ -因子)。主要是由于不能在 *k. lactis* 中鉴定这些肽，在一定程度上是由于在乳酸克鲁维酵母中偶配外激素是可诱导的，而在酿酒酵母中偶配外激素是不需诱导即可产生的。

由于越来越需要得到上述指导在酵母中分泌表达外源基因的前导顺序，还需要更多能方便而有效地生产特定多肽的其他顺序。据此，申请人力求证实一种酿酒  $\alpha$  酵母-因子是否存在。如果存在，



它是否可用以指导酵母中异源多肽，如前凝乳酶的分泌。

本发明提供指导在酵母中分泌外源多肽的基于克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导顺序的 DNA 组建物。含有这些组建物的克鲁维酵母转化体有效地分泌诸如前凝乳酶等多肽。

因此，本发明的一个方面是为一种蛋白编码的 DNA 组建物，该蛋白的氨基酸序列包括指导分泌的克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导顺序及通过酵母加工信号与其连接的一种异源多肽，该加工信号可使上述蛋白加工成所述异源多肽。本发明还涉及该 DNA 组建物的制备方法及其相关方法。

本发明的另一方面是一种表达载体，它包括在酵母宿主中有功能的复制或整合系统，为一种蛋白编码的 DNA 组建物，该蛋白的氨基酸序列包括指导分泌的克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导顺序及通过酵母加工信号与其连接的一种异源多肽，该加工信号可使上述蛋白加工成所述异源多肽。

本发明另一方面是在酵母中生产异源多肽的方法，包括在培养基中培养含上述表达载体的酵母。该培养基及培养条件下该酵母能以前肽形式表达该异源多肽并分泌出来。而该前肽至少可部分加工成所述多肽。

图 1 表示设计用于鉴定乳酸克鲁维酵母 $\alpha$ -因子 DNA 的寡核苷酸探针的方案。

图 2 是乳酸克鲁维酵母 $\alpha$ -因子编码 DNA 片段的完整序列。

图 3 比较乳酸克鲁维酵母和酿酒酵母 $\alpha$ -因子蛋白序列。

图 4 图解乳酸克鲁维酵母和酿酒酵母 $\alpha$ -因子。

图 5 比较乳酸克鲁维酵母和酿酒酵母 $\alpha$ -因子编码 DNA 序列。

图 6 图解三种在实施例中详述的质粒的组建过程。

图 7 图示了如何将乳酸克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导 DNA 序列连接到前凝乳酶 DNA 序列。

图 8 表示 P A B309 Bam HI/Sal I 序列插入 PU C18 中。

图 9 图示质粒 PGB901。

图10图示质粒 P G B T e G418 。

图11表示用于使乳酸克鲁维酵母  $\alpha$ - 因子前导 DNA 突变的引物序列。

图12表示在乳酸克鲁维酵母中  $\alpha$ - 因子前导区 / 前凝乳酶 DNA 融合区附近的 DNA 序列。

根据本发明，酵母可用于生产成熟的外源多肽，而且这些多肽可直接从培养基中收集。所用 DNA 组建物是将克鲁维酵母  $\alpha$ - 因子前导区和加工信号序列连接到所需异源多肽编码序列得到的。所需异源多肽可以是单个异源多肽或被加工信号分开的多个异源多肽。所得组建物为一种前多肽原编码，它含该前多肽原分泌信号和加工信号，可在细胞内和细胞外将其加工成成熟多肽。

本发明组建物包括如下式表示的为一种前多肽编码的 DNA 序列：

( X Y - ( Z W )<sub>n</sub> - 所需基因 ) Y

其中 X 是赖氨酸或精氨酸的编码；

Y 是精氨酸的编码；

W 是丙氨酸或脯氨酸的编码；

Z 是某一氨基酸的编码，当 W 是脯氨酸码时，Z 最好是丝氨酸，赖氨酸或天冬酰胺编码；而当 W 是丙氨酸码时，Z 最好是谷氨酸，天冬酰胺，天冬氨酸或丝氨酸编码。

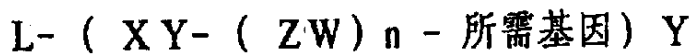
Y 为 1 — 10，通常小于 4，是指该序列为单体或多体。

所需基因是指非野生型克鲁维酵母  $\alpha$ - 因子基因，它是将该因子基因与非酵母来源的前导顺序连接的人工基因，通常该前导顺序来自植物或人基因。

n 是 0 — 8，通常为 3 — 7，最好为 0。

在上式中用 X, Y, Z 和 W 编码的氨基酸序列定义了  $\alpha$ - 因子加工信号, 其中 X 和 Y 编码的氨基酸是二肽断裂点, Z 和 W 编码区为一个寡肽间隔。从 n 可以是 0 这一事实说明有无间隔是任选的。如果有间隔, 组建物将典型地包括可除去由间隔决定的 N 端残基的附加序列, 从而得到所需基因编码的成熟蛋白。

大多数情况下, 本发明组建物至少有下列分子式:



它编码前多肽原, 其中 L 是分泌前多肽原的克鲁维酵母前导序列, 其他符号如上定义。可用有分泌功能的任何克鲁维酵母前导序列, 它一般为 20—120 氨基酸, 通常是 30—100 个氨基酸, 具有疏水区, N 端有一个蛋氨酸。

L 可以是克鲁维酵母属任何种的全长  $\alpha$ - 因子前导序列, 如乳酸克鲁维酵母和脆弱克鲁维酵母 (K. fragilis), 或是它们的一段功能片段 (能指导分泌的), 突变, 保导或不保导的, 即一般不多于 5 个, 通常不多于 3 个不同的氨基酸, 及它们的类似物。通过制备含不同长度野生型序列, 再看其有无分泌机能来筛选, 鉴定出各种功能片段。图 2 表示为野生型乳酸克鲁维酵母  $\alpha$ - 因子编码序列, 包括为 1—83 氨基酸编码的 DNA 前导顺序。图 2 的 DNA 序列不是必需的, 任何为有功能克鲁维酵母前导寡肽编码的序列都是可用的。不同序列多少都有效地被转译。理想的是至少有大部酵母优选编码可包括在顺序内。

下列式子通常用作描述作为表达暗盒的 DNA 序列:



其中：Tr 为转录调节信号，特别是启动子及其他诸如操作子，激活子，帽信号等其他调节信号，或涉及转录和转译控制的其他序列，

d 是0 或1，当 Y 大于1 时d 为1；

Tr 序列一般至少为100 bp—2000bp。特别有用的是所用 Tr 序列与前导序列 L 连在一起，从而可用一个包含与宿主内源信号序列相连的转录和转译信号的序列的 DNA 片段。这样彼此可利用转录和转译信号从而加强表达产物的产率。

其他符号如前定义。

所需基因的3'端可相当容易以一个组建物形式操作，该组建物可使所需基因插入到组建物的单一限制酶切点。这样的组建物可为所需基因从起始读码方向的插入提供限制点，这样的组建物用下式表示：

$$(Tr)_a - L - XY - (ZW)_n - (SC)_b - Te$$

其中：上面原有符号与前定义相同。

a 是0 或1，即该组建物可以有或无转录和转译信号。

SC 表示终止信号；

Te 是转录终止序列，还可包括其他如多聚腺苷化等信号；

b 是从0—4 的整数，通常为0—3，即所需基因也可有其自己终止码。

可设计所需基因上游序列以提供方便的限制酶切点从而使得所需特定基因可被其他基因取代。需要时可用连锁子和连接物完成这种取代。

该组建物为插入载体提供一个方便的序列，它们提供所需的复制系统。如前述，有时需要用带有不同启动子取代与信号序列连接的野生型启动子。在酵母中，涉及糖酵解途径的一些酶的启动子可使其高效转录。这

些启动子是与诸如磷酸葡萄糖异构酶，磷酸果糖激酶，磷酸丙糖异构酶，葡萄糖磷酸变位酶，烯醇酶，丙酮酸激酶，3-磷酸甘油醛脱氢酶和乙醇脱氢酶等有关的。这些启动子可插入信号顺序的上游。前导序列的5'-端侧区可保留或被选择的启动子3'端序列取代。可制备载体。该载体的启动子具有从其下游插入上述组建物的限制酶切点。

最终的表达载体包括表达暗盒和在酵母宿主中有功能并能稳定保持的复制和整合系统。该载体可随意包含复制系统，该系统使其能在原核生物中克隆。此外，要包括1个或多个选样标记，它们能在宿主中保持。进而，载体可有高或低拷贝数。一般为1—200。高拷贝数载体一般至少为10个，优选的为至少20个，但不超过150个，通常不超过100个。根据所需基因及载体在宿主中作用选择高或低拷贝载体。有时载体表达的产物可能影响宿主的活力，这时就需低拷贝载体。

可采用不同宿主，特别是具所需性质的突变性。根据组建体表达产物的产率及加工酶在该产率水平下是否足够等因素考虑。可通过载体使突变体增强加工酶生产能力（如：二肽基-氨基肽酶A和/或赖-精肽链内切酶）。通常该酶产率低于所需表达产物的产率。

此外，细胞内加工是不理想的，最好用一种突变体，其产品不经加工就已分泌出胞外，然后在体外加工成成熟产品。

最好用能控制调节表达的突变体。如，具有本发明的组建物的宿主，表达一种融合蛋白，但可能是由于融合蛋白的毒性使转化体生长缓慢。这时可在生长期抑制其表达，使其高密度生长，再改变条件让其表达。

如上所述，所需基因可有随机排列的多个序列，或相同或有差异，并具有干预加工的信号。这种方式，产品可以整体或部分加工，其结果既可自身得到不同序列又可随后随机的加工。很多情况下是需要不同序列的产品，每种序列都是特定蛋白产品的亚单位。

所需基因可以编码任何类型的所需多肽。这些多肽小则只有8个氨基

酸(或100,000道尔顿)或稍高。通常单链均低于300,000道尔顿,大部分低于150,000道尔顿。最令人感兴趣的是5,000—150,000道尔顿的多肽,特别是5000—100,000的。范围的多肽包括激素,生长因子,生长调节素,表皮生长因子,内分泌物如:促单体激素,甲状腺刺激激素,催产素,胰岛素,加压素,肾素,降钙素,促滤泡素,促乳素等;促红细胞生成素如:红细胞生成素,集落刺激因子等;淋巴因子;珠蛋白;球蛋白如:免疫球蛋白;清蛋白如:人血清白蛋白;干扰素如: $\alpha$ ,  $\beta$ 和 $\delta$ ;阻遏物;酶诸如:凝乳酶或其酶原, $\alpha$ 和 $\beta$ -淀粉酶,葡萄糖淀粉酶,支链淀粉酶,木聚糖酶,葡糖异构酶,纤维素酶,脂酶,磷脂酶等;内啡肽如: $\beta$ -内啡肽,脑啡肽, dynorphin 等。

先制备含本发明组建物的载体,然后再将其引入酵母宿主。酵母的属和种不严格要求。作为酵母宿主的例子是克鲁维酵母和酿酒酵母。引入的方式是常规的,有一系列方法可选用。如Hiunen等人(见Proc. Acad. Natl. Sci. U S A (1978) 75: 1919—1933)或Das等人, J. Bacteriol (1983) 58: 1165—1167或Stinchcomb等人., E P A 0045574。在合适培养基中培养转化体,使其保持充足的选择压力,当表达是可诱导的,先令其高密度生长,再诱导表达。这时,产品的核心部分保留在周围胞质部分,可通过诸如:酵解酶(Zymolase)或溶菌酶处理酵母细胞使其释放产品。

用常规方法收获产品,包括用层析,电泳,透析,溶剂萃取等方法分离纯化。

为得到编码克鲁维酵母种的 $\alpha$ -因子基因,下面举出实例。制备具有图1结构的放射标记寡核苷酸,用其探测其他菌株基因组DNA的酶解物。还可将酿酒酵母 $\alpha$ -因子基因的切口转译片段用作探针。一种有用的技术是将基因组DNA核酸内切酶产物插入到质粒中,用这些质粒转化大肠杆菌或其他菌株,从而得到质粒库,从菌落得到的DNA用常规方法在硝酸

纤维素滤低<sup>上</sup>与探针杂交。

将与探针杂交鉴定的DNA片段用不同限制酶解，再将用 Southern 吸印法或用同样杂交探针的相似分析方法分析所得片段，以选择适合作DNA序列分析的大小适度的片段。纯化所选片段，用合适载体克隆该片段，以得到足够量作DNA序列分析的片段。

用上述技术可从其他菌株得到克鲁维酵母  $\alpha$ - 因子基因。

根据本发明的方法可生产很多种多肽，并分泌到细胞外，从而提高了收获率，简化了纯化手续。以最小的降解量生产所需产品，并简化工艺设备和工程要求。此外，用酵母可避免很多内毒素的产生，而先有技术中使用原核生物则不可避免内毒素，此外，使用酵母也可沿用前人发酵生产的很多经验如：工业分离和提纯工艺等。

下列例证进一步阐述了本发明。这些例子都不是对本发明范围的限制。

### 例子

乳酸克鲁维酵母  $\alpha$ - 因子的鉴定和分离：

培养物上清液的生物学检测试验按 Julius 等所述 ( Cell. 1983 , 32: 829 ) 执行，使用酿酒酵母 Mat a sst 2- 3 菌株 R C687 作为实验株。乳酸克鲁维酵母菌株 C B S141 (  $\alpha$  ) 生长于含 0.5 % 葡萄糖，无硫酸铵氮源的 0.17% 酵母浸膏，0.002 % 硫酸铵的培养基中。离心弃除细胞后，向培养物上清液中加入醋酸，使终浓度为 0.1 M，然后将该上清液过 Bio- Rex 70 ( Biorad 公司出品 ) 柱。用 0.1 M 醋酸液洗，再以 80% Et OH / 10m M HCl 液洗脱  $\alpha$ - 因子。洗脱物蒸发干燥，然后再复溶于 0.1 % TFA / 20% 乙腈液中并加于反相 HPLC 保护柱之中。以含 0.1 % TFA 和 20% , 40% , 60% , 和 80% 乙腈的溶液分段洗脱。其中具有  $\alpha$ - 因子活性的 60% 区段收集液再加入于分析性 C- 18 HPLC 柱之中，

以含0.1% TFA和乙腈20%—80%的梯度液进行洗脱。分区段收集并检测 $\alpha$ -因子活性。含 $\alpha$ -因子区段液被干燥，使用470 A型实用生物系统气相蛋白质定序器及其相联的120 A型PTH分析仪对其进行氨基酸序列分析。

质粒库的杂交筛选：

用 $\gamma$  [ $^{32}$ P]-ATP和T<sub>4</sub>聚核苷酸激酶标记寡核苷酸池。这些寡核苷酸探针被用于探查42℃下在下列杂交溶液中的细菌菌落：

4 X S S C, 50m M K H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub> PH7, 1% 肌酸盐, 10% 葡聚糖硫酸盐, 200  $\mu$ g/ml超声变性的鲑精子DNA。滤液在42℃下以2 X S S C和0.1% S D S冲洗。

在含有来自于K. lactis菌株SD11的基因组DNA的限制酶

Sau3 A I降解片段的插入序列的克隆载体P J S109（其他标准化的克隆载体如P U C18, 和P B R322也可代替P J S109使用）中建质粒库。将分级得到的分子大小为> 5000bp的片段，用上述探针进行筛选，筛选通过大肠杆菌菌株H B101的平板转化法进行，在含100  $\mu$ g/ml氨苄青霉素的80mm L-琼脂平板中密度为500—2000个菌落。DNA由菌落转移到硝基纤维素滤膜上，这些滤膜按上述方法杂交。原始平板上与杂交信号显示区相应的区域细菌被集中和再接种，然后经杂交法再检验以分离出带有含杂交序列的质粒的单个菌落。阳性菌落用由小培养纯化得到的DNA作Southern blot分析来进一步检验。

将杂交后阳性菌落中纯化的质粒用各种限制酶降解，所得片段用同样的杂交探针经Southern吸印分析法做序列分析以便鉴定出大小适于DNA顺序分析的限制性片段。所得片段经琼脂糖凝胶电泳纯化，再克隆于适宜的M P18和M P19载体之中，再做DNA顺序分析。

培养物上清液的凝乳酶检验：

离心去除培养物中的细胞，向得到的上清液中加入1 M H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub>使酸

化到 PH2 , 然后室温下温育2 小时。再向溶液中加入2 M Tris 碱中和至 PH6 。取适度稀释液50  $\mu$ l 加入含有12% 脱脂干燥牛奶的10m M Ca Cl<sub>2</sub> 混悬液200  $\mu$ l 之中, 37 $^{\circ}$ C下温育直到凝块形成。1 单位凝乳酶活性规定为在上述条件下10分钟内产生凝块所需要的活性凝乳酶量。

## 结果

乳酸克鲁维酵母  $\alpha$ - 因子最初的10个氨基酸表现出与酿酒酵母6 个残基是明显同质的。这一顺序表示如下:

Trp- Ser- Trp- Ile- Thr- Leu- Arg- Pro- Gly- Gln

用该蛋白顺序设计一套推断与图1 所示结构基因互补的寡核苷酸链。包含了可能是  $\alpha$ - 因子肽链全部密码的寡核苷酸链分别按96和48个不同分子的两个文库合成。

这两个基因库用 $\gamma$  [ <sup>32</sup>P ] - A T P和 T<sub>4</sub> 聚核苷酸激酶放射标记, 并分别用 Southern 吸印法来探查乳酸克鲁维酵母 DNA 限制酶片段。发现基因库2 对各种不同的酶解片段中一个单一片段表现强烈杂交倾向。从而选择基因库2 作为筛选乳酸克鲁维酵母基因 DNA 的质粒文库。

使用这些探针筛选质粒库以分离大量杂交克隆。这些克隆其中之一,  $\alpha$ fk18b 的 DNA 序列分析表明它编码与酿酒酵母  $\alpha$ - 因子肽链前体极为相近的  $\alpha$ - 因子关联肽链。发现杂交片段位于大约1000bp的 Pst I- Eco R I降解段上。该片段的序列显示于图2 。

该片段推断出的  $\alpha$ - 因子前体的比较示于图3 和4 。可以看出, 它们具有相当的序列同源性的同一长度( 氨基酸1 —83图3 ) 的前导序列。然而, 乳酸克鲁维酵母前体仅包括两个位点来补加 N端连接的碳水化合物链( 图4 ) 。此外, 乳酸克鲁维酵母重复区的距离比酿酒酵母重复区更长,

并表现出与酿酒酵母的 X- Ala/pro 图形而不是 Glu/ Asp- Ala 顺序更加不一样的顺序。DNA 序列的相似物(图5)也表现出全部编码区域的强烈的同源性。

图6所示的一系列质粒被组建,以便使乳酸克鲁维酵母  $\alpha$ - 因子前导物与强启动子的转录控制下表达的前凝乳酶融合。首先,来自 dfk 18b 的一个 673 bp S S P I- Eco R I 片段经过 Klenow 酶作用来充满 Eco R I 伸出部分,再加上 Bg I II 连接体于平钝末端。将此片段插入于连接酿酒酵母三磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAp)的启动子和终止区的 Bgl II 位点之中。这一暗盒作为 PUC18 中的 BamH I 片段被克隆,造成 P A B 307。

编码  $\alpha$ - 前导物和牛前凝乳酶的序列完成融合。先将 P A B307 以 Nco I 酶解,用 mung 豆核酸酶使粘性末端成平钝端。该产物再以 Sal I 处理并连接为含有编码前凝乳酶序列和酿酒酵母 G A P 转录终止区的一个 2000bp Eco R V- Sal I 片段(序列显示于图7和8)。该片段衍生于质粒 P J S111,在该质粒中, Xba I- BamH I 连接物已被加于包括了融合在酿酒酵母 G A P 转录终止区的前凝乳酶 cDNA 的一个片段的 5 末端。这一连接混液被用于转化大肠杆菌 H B101 株,带有质粒 P A B309 的转化体被分离。融合接合点周围序列示于图7, p A B309 完整的 BamH I- Sal I 插入段序列见图8。

为使乳酸克鲁维酵母菌株得以转化,包含了在已插入于乳酸克鲁维酵母 L A C 基因 3' 区域的酿酒酵母 ADH1 启动子转录控制下的大肠杆菌卡那霉素抗性基因的一个 3560 bp Hind III 片段被插入于 P A B309 之中得到质粒 P A B312。对插入效果的筛选使用限制酶酶解物分析法,并检测正确的方向。

该 3560 bp Hind III 片段来源于质粒 P G B901,其图解示于图9。质粒 P G B901 的组建是通过连接(1)含有乳糖酶启动子的 3.6 kb Xba. I

- Hae II 片段于由 PUC1a56 ( 下述 ) 分离的乳糖酶 A T G 起始密码中大约第-90 位, (2) 具有下列核苷酸序列的 Hae II - Sal I 片段:

5' TTAAC ACTTGAAATT TAGGAAAGAGCA  
GAATTTGG CAAAAAAAT AAAAAAAAAATA  
AACACG 3'

3' CGCGAATTG TGAAC TTAA ATCCTTTC  
TC GTCTTAAACC GTTTTTTTTA TTTTTT  
TTT ATTTGTGCAG CT 5'

(3) 编码前凝乳酶的 5.1 kb Sal I - Xba I 片段和来自于 PGB 900 ( 下述 ) 提供抗生素抗性基因 G418 , 以及 (4) 用 Xba I 裂解的 PUC19.

在组建该质粒时, 来自 Hae II 位点的 CG 序列粗心地被去除了, 以至在这一位置上建立了 Hind III 位点。

质粒 PUC1a 56 按下述组建。由乳酸克鲁维酵母 C B S2360 株分离染色体 DNA, 用 Xho I 裂解, 按蔗糖梯度上的大小来分离。含乳糖酶基因的部分在置 DNA 于硝基纤维素滤膜上之后用 LAC4 探针来检测。含 LAC 基因的 DNA 被克隆于质粒 pPA153 - 215 的 Xho I 位点 ( 见 P. M. Andredi, Mol. Gen. Genet. ( 1985 ) 199 : 372 - 380 ) 制备出质粒 pPA31。含乳糖酶基因的 pPA31 的 Xba I 片段被亚克隆于产质粒 PUC1a 56 的 PUC19 的 Xba I 位点 ( 见 Yanisch-peron 等, Gene ( 1985 ) 33 : 103 - 119 ) 。

质粒 PGB900 的组建过程为连接 (1) 来自于含 G418 抗药基因的质粒 PGB Te G418 ( 见图 10 及后述 ) 的一个 3.6 kb Hind III - Xba I 片段和 (2) 来自含前凝乳酶基因于被 Sal I 和 Xba I 裂解后的 PUC19 之

中的质粒 P G B 123 的一个 Sal I- Hind III 片段。质粒 P G B 123 在欧洲专利申请 E P A 0096430 中介绍。

质粒 P G B T e G 418 ( 图10) 包含有如 Andreoli 所述( 见 Mol. Gen. Genet. 1985, 199 : 372 —380 ) 的质粒 P A 215 和具有 3.7 kb BamH I 乳酸克鲁维酵母乳糖酶终止子片段的一个 5.6 kb 片段( 见 Breunig 等 Nucleic Acids Res. ( 1984) 12: 2327—2341) 以及在酵母乙醇脱氢酶 I ( A D H I ) 启动子指导下( 同样见于 Bennetzen 和 Hall , J. Biol. Chem. ( 1982) 257 : 3018—3025) 的授予抗药 G 418 的 Tn 5 基因( 见 Reiss 等, EM B O J. ( 1984) 3 : 3317—3322) 。质粒 P G B T e G 418 已于 1987 年 2 月 26 日贮存于编号 C B S 184.87 下。

质粒 P A B 312 用 Eco R V 降解( 目标是对乳酸克鲁维酵母基因 L A C 区域的结合) 然后用以转化乳酸克鲁维酵母 2 U V 21 株( a u r a 3 t r p 1 l a c 4 [ k i l ' ] ) 对 G 418 有抗性, 它使用了 Licl 技术( 见 Das 等, J. Bacteriol. ( 1984) 158 : 1165—1167) 。

大量的转化体, 与未转化的对照菌株一样, 在由 1 % 酵母浸膏, 2 % 胨, 2 % 葡萄糖, 0.17% 酵母氮源, 50  $\mu$ g/ml 色氨酸和 50%  $\mu$ g/ml 尿嘧啶组成的培养基 1 ml 中培养 36 小时。培养物上清液在经酸性活化后检验凝乳酶活性。发现所有的转化体均分泌 100 —200 单位/毫升的活性凝乳酶。

#### 经体外突变移除间隔密码

从 P A B 309 中分离出一个 1900 bp 的 Sac I- Hind III 片段, 并克隆于 M P 19 ( 详见 yanisch- perron 等, Gene ( 1985) 33: 103 ) 。分离单股噬菌体 D N A 并作为体外具有寡核苷酸引物的突变所需的模板使用, 见图 11。M 13 噬菌体 M P 19  $\alpha$  k 1.5 和 M P 19 /  $\alpha$  k 1 2.2 用引物 # 1 和引物 # 2 分别制备。

从这些噬菌体中制备双股 R F D N A , 并从每个中分离出 7700 bp

和 Sac I- Stu I 片段。这些片段连接于 P A B312 的一个 7100 bp Sac I- Stu I 片段上。所得质粒 P A B313 和 P A B314 由于其序列改变被分离，见图12。

质粒 P A B313 和 P A B314 被用于转化对 G418 有抗性的 2 U V21。转化体 2 U V21:: P A B312，2 U V21:: P A B313，和 2 U V21:: P A B314 被培养，培养物上清液按上述步骤检验凝乳酶活性。检验结果报告于表1，如下

表 1

菌 株	宿 主	质 粒	凝乳菌活性 (单位/毫升培养物)
2 U V21	2 U V21	—	< 2
K R N303-1	2 U V21	P A B312	256
K R N304-4	2 U V21	P A B313	175
K R N305-2	2 U V21	P A B314	206

使用三氯醋酸沉淀培养物上清液的 S D S 聚丙烯酰胺凝胶电泳判定发现每一转化体平均分泌单一前凝乳酶有关产品。经电泳转移率确定由 P A B312 转化体分泌的前凝乳酶有关蛋白表现出比 P A B313 和 P A B314 转化体所分泌者明显高的分子量。

用上述菌株的沉淀作凝乳酶活性分析，发现活性在上清液测定值的 2 %



菌株名	保藏号	保藏日
<b>Kluyveromyces lactis KRN 201-6</b>	<b>CCTCC M88067</b>	<b>1988.7.22</b>
<b>Kluyveromyces lactis 2UV21</b>	<b>CCTCC M88068</b>	<b>1988.7.22</b>
<b>E. Coli HB101(pAB307)</b>	<b>CCTCC M88069</b>	<b>1988.7.22</b>
<b>E. Coli HB101(pAB312)</b>	<b>CCTCC M88070</b>	<b>1988.7.22</b>
<b>E. coli pGBTcG418</b>	<b>CCTCC M88084</b>	<b>1988.8.3</b>
<b>E. coli pUC-G418</b>	<b>CCTCC M88085</b>	<b>1988.8.3</b>

虽然为便于理解，我们已通过说明和例证的方式对本发明予以详细介绍，但显然在附加权利要求的范围内可以实行某些改变或修正。



1 CTGCAGTTTGTGAATCGTAAGACAGTGACATTTTATAGAGGTTGTTATCTGTTTAAGACGAAA  
GACGTCAAACACTTAGCATTTCTGTCAGTGTAAAAATCTCCAACAATAGACAAATTTCTGCTTT  
1 PSTI

63 TGGTTTGCTGTTCAAGCTCACTGGGTGATCGGATTTCTGGGAAAATTCATATATAAAGGAC  
ACCAAACGACAAGTTCGAGTGACCCACTAGCCTAAAGCCCTTTTAAGTATATATTTCCCTG  
81 DRA3

123 CCTTGATTGATAGGATGTTATGGTATTGTTCTAAGTTTGTTC AATAGTAATTTCAATAT  
GGAAC TAACTATCCTACAATACCATAACAAGATTCAAACAAAGTTATCATTAAGTTATA

183 AGTATATTAGAACAAGCAAACCAGAGCATCTAAAGCCCAACTCGTCTGATCTTTTCTGT  
TCATATAATCTTGTTCGTTTGGTCTCGTAGATTTCTGGGTTGAGCAGACTAGAAAAAGACA

243 CTTTATTATCCTGAACTTCACCTTAATCTAAATFATACAAACCCAACTATCCAATTTGAA  
GAAATAATAGGACTTGAAGTGAATFAGATTTAATATGTTTGGGTTGATAGGTTAAACTT  
MetLysPheSerThrIleLeuAlaAlaSerThrAlaLeuIleSerVal  
303 CTATCCAATATTATGAAATCTCTACTATATTAGCCGCATCTACTGCTTTAATTTCCGTT  
GATAGGTTATAATACTTTAAGAGATGATATAATCGGCGTAGATGACGAAATTAAGGC AA  
309 SSPI

ValMetAlaAlaProValSerThrGluThrAspIleAspAspLeuProIleSerValPro  
363 GTTATGGCTGCTCCAGTTTCTACCGAAACTGACATCGACGATCTTCCAATTTCCGTTCCA  
CAATACCGACGAGGTCAAAGATGGCTTTGACTGTAGCTGCTAGAAGGTTAAAGCCAAGT  
GluGluAlaLeuIleGlyPheIleAspLeuThrGlyAspGluValSerLeuLeuProVal  
423 GAAGAAGCCTTGATTGGATTCAATGACTTAACCGGGGATGAAGTTTCTTGTTCCTGTT  
CTTCTTCGGAAC TAACTAAGTAACTGAATTTGGCCCC TACTTCAAAGGAACAACGGACAA  
AsnAsnGlyThrHisThrGlyIleLeuPheLeuAsnThrThrIleAlaGluAlaAlaPhe  
483 AATAACGGAACCCACACTGGTATTCTATTCTTAAACACCACCATCGCTGAAGCTGCTTTC  
TTATTGCCTTGGGTGTGACCATAAGATAAGAATTTGTGGTGGTAGCGACTTCGACGAAAG  
492 HGIE2

AlaAspLysAspAspLeuLysLysArgGluAlaAspAlaSerProTrpSerTrpIleThr  
543 GCTGACAAGGATGATTTGAAGAAAAGAGAAGCCGATGCTTCCCCATGGAGTTGGATTACT  
CGACTGTTCTACTAAACTTCTTTCTCTTCGGCTACGAAGGGGTACCTCAACCTAATGA  
585 BSTXI, NCOI

LeuArgProGlyGlnProIlePheLysArgGluAlaAsnAlaAspAlaAsnAlaGluAla  
603 CTAAGACCTGGTCAACCAATCTTTAAAAGAGAAGCCAACGCTGACGCTAATCCTGAAGCA  
GATTCTGGACCAGTTGGTTAGAAATTTTCTCTTCGGTTGCGACTGCGATTACGACTTCGT  
607 TTH3I, 624 AHA3

图 2 (图 2 第 1 页)

SerProTrpSerTrpIleThrLeuArgProGlyGlnProIlePheLysArgGluAlaAsn  
 663 TCCCATGGAGCTGGATTACTCTAAGACCTGGTCAACCGATCTTTAAGAGAGAGGCTAAT  
 AGGGTACCTCGACCTAATGAGATTCTGGACCAGTTGGCTAGAAATTCTCTCTCCGATTA  
 666 BSTXI, NCOI, 688 TTH3I  
 AlaAspAlaAsnAlaAspAlaSerProTrpSerTrpIleThrLeuArgProGlyGlnPro  
 723 GCTGATGCCAATGCAGATGCCCTCCCATGGAGCTGGATCACTCTAAGACCTGGTCAACCA  
 CGACTACGGTTACGTCTACGGAGGGGTACCTCGACCTAGTGAGATTCTGGACCAGTTGGT  
 747 BSTXI, NCOI, 769 TTH3I  
 IlePheLysArgGluAlaAsnProGluAlaGluAlaAspAlaLysProSerAlaTrpSer  
 783 ATCTTTAAAAGAGAAGCCAACCCTGAGGCCGAGGCTGATGCCAACCTAGTGCTTGGAGT  
 TAGAAATTTTCTCTTCGGTTGGGACTCCGGCTCCGACTACGGTTTGGATCACGAACCTCA  
 786 AHA3, 804 MST2  
 TrpIleThrLeuArgProGlyGlnProIlePheOP  
 843 TGGATTACATTAAGACCTGGCCAACCAATTTTCTGAATTAGAAGGAAATGACTTTTGA  
 ACCTAATGTAATTCTGGACCGGTTGGTTAAAAGACTTAATCTTCCTTTAACTGAAAACT  
 860 BALI  
 CTCGTTTTCCAATGCGTCTATCTAATTTCTTCCAAAAGACAATACCCATCTTCCTTATAC  
 903 GAGCAAAAGGTTACGCAGATAGATTAAGAAGGTTTTCTGTTATGGGTAGAAGGAATATG  
 963 TTTTTTTATTTATCCAAACGAATTC  
 AAAAAATAAATAGGTTTGCTTAAG  
 982 ECORI

图2 (图2第2页)

K. lactis Met: Lys Phe Ser Thr Ile Leu Ala Ala Ser Thr Ala Leu Ile Ser Val Val Met Ala Ala Pro Val Ser Thr Glu Thr Asp  
 10 20  
S. cere. Met: Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu  
 1 20

Ile Asp Asp Leu Pro Ile Ser Val Pro Glu Glu Ala Ala Leu Ile Asp Leu Thr Gly Asp - Glu Val Ser Leu Leu Pro  
 20 40 50  
 Asp Glu Thr Ala Gln Ile - Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro  
 30 40 50

Val Asn Asn Gly Thr His Thr Gly Ile Leu Phe Leu Asn Thr Thr Ile Ala - Glu Ala Ala Phe Ala Asp Lys Asf Asp Leu Lys  
 60 70 80  
 Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Gly Val Ser Leu Asp  
 60 70 80

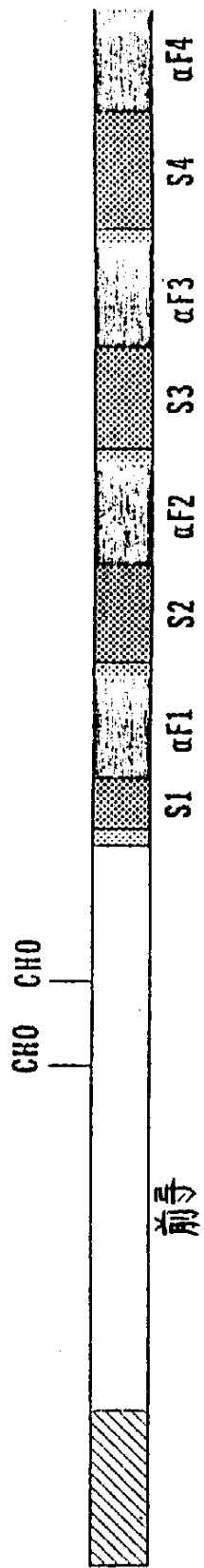
Lys Arg Glu Ala Asp Ala Ser Pro - - - Trp Ser Trp Ile Thr Leu Arg Pro Gly Gln Pro Ile Phe  
 90 100  
 Lys Arg Glu Ala Glu Ala - - - Trp His Trp Leu Lys Pro Gly Gln Pro Met Tyr  
 90 100

Lys Arg Glu Ala Asn Ala Asp Ala Asn Ala Glu Ala Ser Pro - - - Trp Ser Trp Ile Thr Leu Arg Pro Gly Gln Pro Ile Phe  
 110 120 130  
 Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Ala - - - Trp His Trp Leu Gln Leu Lys Pro Gly Gln Pro Met Tyr  
 110 120 130

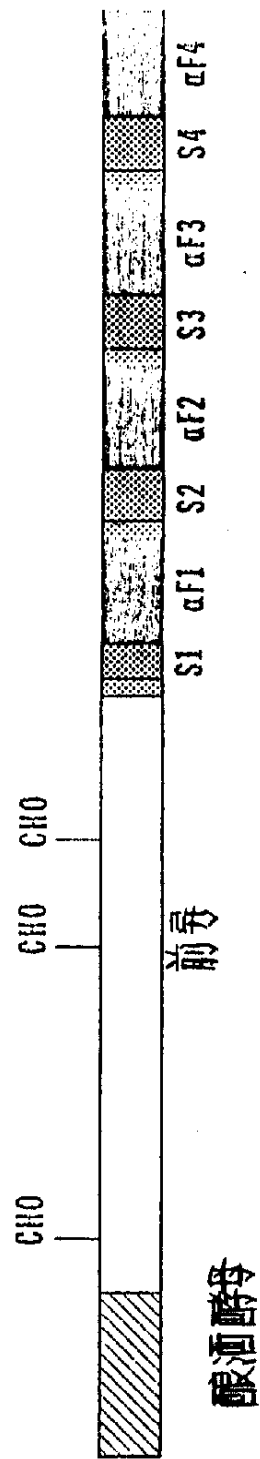
Lys Arg Glu Ala Asn Ala Asp Ala Asn Ala Asp Ala Ser Pro - - - Trp Ser Trp Ile Thr Leu Arg Pro Gly Gln Pro Ile Phe  
 140 150  
 Lys Arg Glu Ala Asp Ala Glu Ala - - - Trp His Trp Leu Gln Leu Lys Pro Gly Gln Pro Met Tyr  
 140 150

Lys Arg Glu Ala Asn Pro Glu Ala Glu Ala Asp Ala Lys Pro Ser Ala Trp Ser Trp Ile Thr Leu Arg Pro Gly Gln Pro Ile Phe  
 160 170 180  
 Lys Arg Glu Ala Asp Ala Glu Ala - - - Trp His Trp Leu Gln Leu Lys Pro Gly Gln Pro Met Tyr  
 160 170 180

3



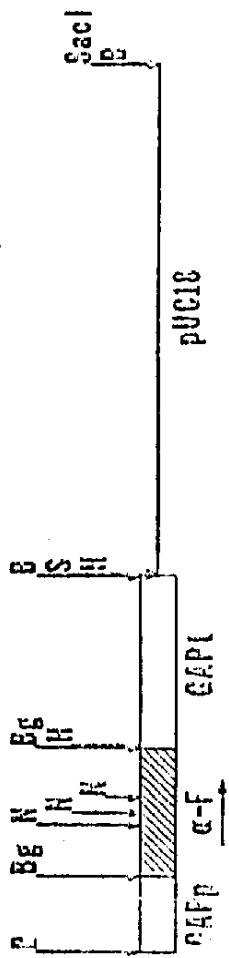
乳糖酵母



酿酒酵母

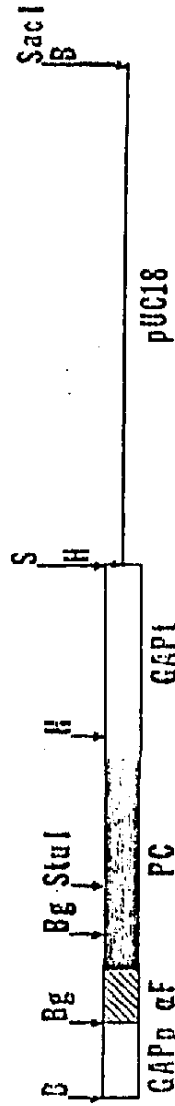
图4

K. 1. 1 ATGAAATTCTACTATATTAGCCGCATCTACTGCTTTAAATTTCCGTTGTTATGGCTGCTCCAGTTTCTACCGAAACTGAC  
S. 9. 1 ATGAGATTTCCCTTCAATTTTACTGCGATTTTATTCGACGATCCTCCGCAATTAGCTGCCAGTCAACACTACAA CAGAA  
  
 82 ATCGACGATCTTCCAATTTCCGGTTCAGAGAAGCCCTTGATGGATTCAATTGACTTAAACGGGGAT---GAAGTTTCCCTTGTTCCTT  
 82 GATGAAACGGCACAAATTT---CCGGCTGAAGCTGTCTCATCGGTTACTTAGATTAGAAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTGTTTGCCA  
  
 166 GTTAA TAACGGAA CCCACACTGGTATTCTATTCTTAAACACCAACCAATCGCT---GAAGCTGCTTTCGCTGACAAGGATGATTTGAAG  
 163 TTTTCCAACAGCAAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCAATTGCTGTAAAGAAAGAGGGGTATCTTTGGAT  
  
 250 AAAAGAGAAGCCGATGCTTCCCCA-----TGGAGTTGGATTACTCTAAGACCCTGGTCAACCAATCTTT  
 250 AAAAGAGAGGCTGAAGCT-----TGGCATTGGTTGCAACTAAACCTTGGCCCAACCAATGTAC  
  
 313 AAAAGAGAAGCCCAACCGCTGACCGCTAATGCTGAAGCATCCCCA-----TGGAGCTGGATTACTCTAAGACCCTGGTCAACCGATCTTT  
 307 AAGAGAGAAGCCGAGCTGAAGCT-----TGGCATTGGCTGCAACTAAAGCCCTGGCCCAACCAATGTAC  
  
 394 AAGAGAGAGGCTAATGCTGATGCCAATGCCAGATGCCCTCCCCA-----TGGAGCTGGATCACTAAGACCCTGGTCAACCAATCTTT  
 370 AAAAGAGAAGCCGACCGCTGAAGCT-----TGSCATTGGCTGCAACTAAAGCCCTGGCCCAACCAATGTAC  
  
 475 AAAAGAGAAGCCCAACCGCTGAGCCGAGGCTGATGCCAAACCTAGTCTGGAGTTGGATTACATTAAGACCCTGGCCCAACCAATTTTC  
 433 AAAAGAGAAGCCGACCGCTGAAGCT-----TGGCATTGGTTGCAAGTTAAACCCCGCCCAACCAATGTAC

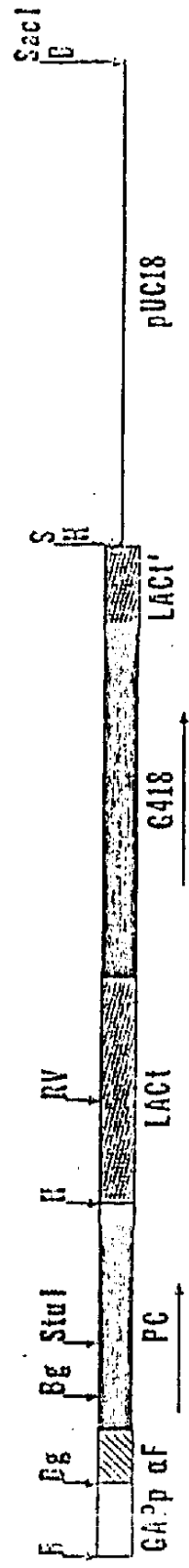


pAB307

图 6



pAB309



pAB312

1000bp

乳掷孢酵母 $\alpha$ -因子前导 (pAB307)

前凝乳酶 (pJS111)

LysLysArgGluAlaAspAlaSerProTrp  
 AAGAAAAGAGAAGCCGATGCTTCCC  
 TTCTTTTCTCTTCGGCTACGAAGGGTAC  
 NcoI

MetAlaGlu  
 ATCATATGGCTGAG  
 TAGTATACCGACTC  
 EcoRV

+ Mung Bean Nuclease

GAAGCCGATGCTTCCC  
 CTTCGGCTACGAAGGG

...  $\alpha$ -Factor Leader || (Spacer) || Prochymosin ...  
 .....LysLysArgGluAlaAspAlaSerHisHisMetAlaGlu...  
 AAGAAAAGAGAAGCCGATGCTTCCCATCATATGGCTGAG  
 TTCTTTTCTCTTCGGCTACGAAGGGTAGTATACCGACTC

pAB309

图 7

pAB309 BamHI/SalI 插入 in pUC18

1 GGATCCCCAGCTTAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCAC  
CCTAGGGGTCGAATCAAGTATCCAGGTAAGAGAATCGCGTTGATGTCTCTTGTCCCCGTG  
1 BAMHI,  
61 AAACAGGCCAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGA  
TTTGTCCGTTTTTTGCCCCGTGTGGAGTTACCTCACTACGTTGGACGGACCTCATTACT  
121 TGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTCCTTACACCTTCTATTACC  
ACTGTGTTCCGTTAACTGGGTGCGTACATAGATAGAGTAAAAGAATGTGGAAGATAATGG  
181 TTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAAT  
AAGACGAGAGAGACTAAACCTTTTTTCGACTTTTTTTTCCAACCTTGGTCAAGGGACTTFA  
236 XMNI,  
241 TATTCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAA  
ATAAGGGGATGAACTGATTATTTCATATATTTCTGCCATCCATAACTAACATTAAGACATT  
301 ATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACTTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAACTTTTAAA  
TAGATAAAGAATTTGAAGAATTTAAGATGAAAATATCAATCAGAAAAAAAATCAAAATTT  
355 AHA3,  
361 ACACCAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAACAGATCTTCATTATGAAATTCCTCT  
TGTGGTTCTTGAATCAAAGCTTATTTGTGTGTATTTGTCTAGAAGTAATACTTTAAGAGA  
MetLysPheSer  
377 ASU2, 398 BGL2,  
421 ThrIleLeuAlaAlaSerThrAlaLeuIleSerValValMetAlaAlaProValSerThr  
ACTATATTAGCCGCATCTACTGCTTTAATTTCCGTTGTTATGGCTGCTCCAGTTTCTACC  
TGATATAATCGGCGTAGATGACGAAATTAAGGCAACAATACCGACGAGGTCAAAGATGG  
481 GluThrAspIleAspAspLeuProIleSerValProGluGluAlaLeuIleGlyPheIle  
GAACTGACATCGACGATCTTCCAATTTCCGTTCCAGAAGAAGCCTTGATTGGATTCATT  
CTTTGACTGTAGCTGCTAGAAGGTTAAAGCCAAGGTCTTCTTCGGAACCTAACCTAAGTAA  
541 AspLeuThrGlyAspGluValSerLeuLeuProValAsnAsnGlyThrHisThrGlyIle  
GACTTAACCGGGGATGAAGTTTCCTTGTTGCCGTGTTAATAACGGAACCCACACTGGTATT  
CTGAATTTGGCCCCTACTTCAAAGGAACAACGGACAATTATTCCTTGGGTGTGACCATAA  
586 HGIE2,

图 8 (第 8 图第 1 页)

601 LeuPheLeuAsnThrThrIleAlaGluAlaAlaPheAlaAspLysAspAspLeuLysLys  
 CTATTCTTAAACACCACCATCGCTGAAGCTGCTTTCGCTGACAAGGATGATTTGAAGAAA  
 GATAAGAATTTGTGGTGGTAGCGACTTCGACGAAAGCGACTGTTCTACTAAACTTCTTT

661 ArgGluAlaAspAlaSerHisHisMetAlaGluIleThrArgIleProLeuTyrLysGly  
 AGAGAAGCCGATGCTTCCCATCATATGGCTGAGATCACCAGGATCCCTCTGTACAAAGGC  
 TCTCTTCGGCTACGAAGGGTAGTATACCGACTCTAGTGGTCTTAGGGAGACATGTTTCCG

682 NDEI, 701 BAMHI,

721 LysSerLeuArgLysAlaLeuLysGluHisGlyLeuLeuGluAspPheLeuGlnLysGln  
 AAGTCTCTGAGGAAGGCGCTGAAGGAGCATGGGCTTCTGGAGGACTTCTGCAGAAACAG  
 TTCAGAGACTCCTTCCGCGACTTCTCTGACCCGAAGACCTCCTGAAGGACGTCTTTGTC

769 PSTI,

781 GlnTyrGlyIleSerSerLysTyrSerGlyPheGlyGluValAlaSerValProLeuThr  
 CAGTATGGCATCAGCAGCAAGTACTCCGGCTTCGGGGAGGTGGCCAGCGTCCCCCTGACC  
 GTCATACCGTAGTCGTTCATGAGGCCGAAGCCCTCCACCGGTCCGAGGGGGACTGG

800 SCAI, 821 BALI, 839 BSTXI,

841 AsnTyrLeuAspSerGlnTyrPheGlyLysIleTyrLeuGlyThrProProGlnGluPhe  
 AACTACCTGGACAGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACCTCGGGACCCCCGCCCCAGGAGTTC  
 TTGATGGACCTGTCTAGTCATGAAACCCTTCTAGATGGAGCCCTGGGGCGGGTCTCTCAAG

857 SCAI, 869 BGL2,

901 ThrValLeuPheAspThrGlySerSerAspPheTrpValProSerIleTyrCysLysSer  
 ACCGTGCTGTTTGACACTGGCTCCTCTGACTTCTGGGTACCCTCTATCTACTGCAAGAGC  
 TGGCAGGACAAACTGTGACCGAGGAGACTGAAGACCCATGGGAGATAGATGACGTTCTCG

936 KPNI,

961 AsnAlaCysLysAsnHisGlnArgPheAspProArgLysSerSerThrPheGlnAsnLeu  
 AATGCCTGCAAAAACCACCAGCGCTTCGACCCGAGAAAGTCGTCCACCTTCCAGAACCTG  
 TTACGGACGTTTTTGGTGGTCCGGAAGCTGGGCTCTTTCAGCAGGTGGAAGGTCTTGGAC

1021 GlyLysProLeuSerIleHisTyrGlyThrGlySerMetGlnGlyIleLeuGlyTyrAsp  
 GGCAAGCCCCGTGTCTATCCACTACGGGACAGGCAGCATGCAGGGCATCCTGGGCTATGAC  
 CCGTTCGGGGACAGATAGGTGATGCCCTGTCCGTCGTACGTCCCGTAGGACCCGATACTG

1055 SPHI, 1078 TTH3I,

1081 ThrValThrValSerAsnIleValAspIleGlnGlnThrValGlyLeuSerThrGlnGlu  
 ACCGTCACTGTCTCCAACATTGTGGACATCCAGCAGACAGTAGGCCTGAGCACCCAGGAG  
 TGGCAGTGACAGAGGTTGTAACACCTGTAGGTCTGTCTGTCATCCGGACTCGTGGGTCCTC

1094 BSTXI, 1122 STUI,

图 8 (第 8 图第 2 页)

1141 ProGlyAspValPheThrTyrAlaGluPheAspGlyIleLeuGlyMetAlaTyrProSer  
 CCGGGGACGTCCTCACCTATGCCGAATTCGACGGGATCCTGGGGATGGCCATACCCCTCG  
 GGGCCCCTGCAGAAAGTGGATACGGCPTAAGCIGCCCTAGGACCCCTACCGGATCGGGACC  
 1141 SMAI, 1147 AAT2, 1165 ECORI, 1175 BAMHI,

1201 LeuAlaSerGluTyrSerIleProValPheAspAsnMetMetAsnArgHisLeuValAla  
 CTCGCCTCAGAGTACTCGATACCCGTGTTTGGACAAACATGATGAACAGGCACCTGGTGGCC  
 GAGCGGAGTCTCATGAGCTATGGGCACAAACTGTTGTACTACTTGTCCGTGGACCACCGG  
 1211 SCAI,

1261 GlnAspLeuPheSerValTyrMetAspArgAsnGlyGlnGluSerMetLeuThrLeuGly  
 CAAGACCTGTTCTCGGTTTACATGGACAGGAATGGCCAGGAGAGCATGCTCACCGCTGGGG  
 GTTCTGGACAAGAGCCAAATGTACCTGTCTTACCGGTCTCTCGTACGAGTGGGACCCC  
 1293 BALI, 1304 SPHI,

1321 AlaIleAspProSerTyrTyrThrGlySerLeuHisTrpValProValThrValGlnGln  
 GCCATCGACCCGTCCTACTACACAGGGTCCCTGCATTGGGTGCCCCGTGACAGTGCAGCAG  
 CGGTAGCTGGGCAGGATGATGTGTCCCAGGGACGTAACCCACGGGCACTGTACCGTCCGT  
 1379 SCAI,

1381 TyrTrpGlnPheThrValAspSerValThrIleSerGlyValValValAlaCysGluGly  
 TACTGGCAGTTCCTGTGGACAGTGTACCATCAGCGGTGTGGTGTGGCCTGTGAGGGT  
 ATGACCGTCAAGTGACACCTGTACAGTGGTAGTCGCCACACCAACACCGGACACTCCCA  
 1399 TTH3I, 1408 HGIE2,

1441 GlyCysGlnAlaIleLeuAspThrGlyThrSerLysLeuValGlyProSerSerAspIle  
 GGCTGTCAGGCCATCCTGGACACGGGCACCTCCAAGCTGCTCGGGCCCAGCAGCGACATC  
 CCGACAGTCCGGTAGGACCTGTGCCCGTGGAGGTTCGACCAGCCCGGGTCTGCTGATG  
 1483 APAI,

1501 LeuAsnIleGlnGlnAlaIleGlyAlaThrGlnAsnGlnTyrGlyGluPheAspIleAsp  
 CTCAACATCCAGCAGGCCATTTGGAGCCACACAGAACCAGTACGGTGAGTTTGACATCGAC  
 GAGTTGTAGGTCGTCCGGTAACCTCGGTGTGTCTTGGTCATGCCACTCAAACGTAGCTG  
 1561 CysAspAsnLeuSerTyrMetProThrValValPheGluIleAsnGlyLysMetTyrPro  
 TGGGACAACCTGAGCTACATGCCACTGTGGTCTTTGAGATCAATGGCAAATGTACCCA  
 ACCGTGTTGGACTCGATGTACGGGTGACACCAGAACTCTAGTTACCGTPTTACATGGGT  
 1621 LeuThrProSerAlaTyrThrSerGlnAspGlnGlyPheCysThrSerGlyPheGlnSer  
 CTGACCCCTCCGCCTATACCAGCCAGGACCAGGGCTTCTGTACCAGTGGCTTCCAGAGT  
 GACTGGGGGAGGCGGATATGGTCCGTCCCGAAGACATGGTCAACCGAAGGTCTCA

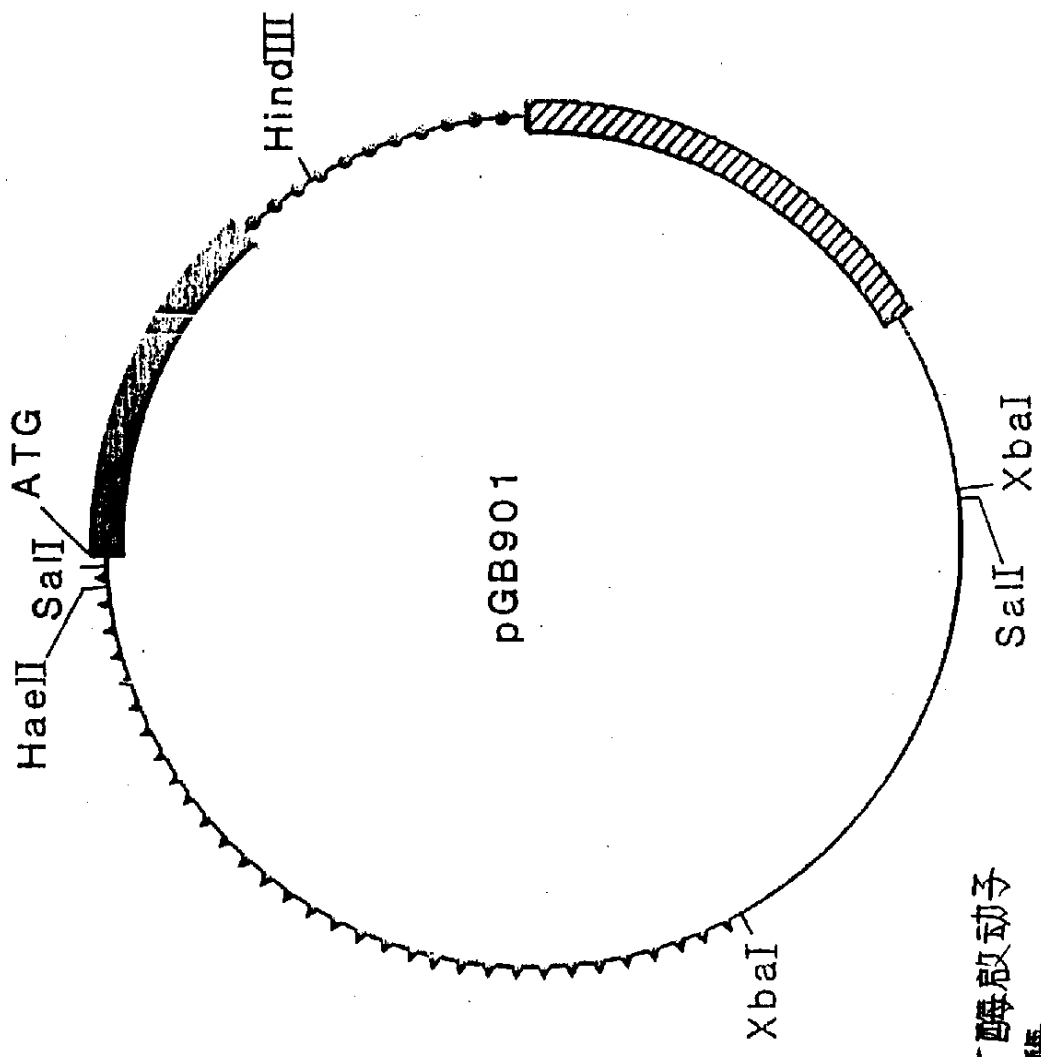
图 8 (第 8 图第 3 页)

1681 GluAsnHisSerGlnLysTrpIleLeuGlyAspValPheIleArgGluTyrTyrSerVal  
 GAAAATCATTCCCAGAAATGGATCCTGGGGGATGTTTTCATCCGAGAGTATTACAGCGTC  
 CTTTTAGTAAGGGTCTTTACCTAGGACCCCTACAAAAGTAGGCTCTCATAATGTCGCAG  
 1700 BAMHI,  
 PheAspArgAlaAsnAsnLeuValGlyLeuAlaLysAlaIleOP  
 1741 TTTGACAGGGCCAACAACCTCGTGGGGCTGGCCAAAGCCATCTGATCTCGACTTGGTTGA  
 AAACGTGCCCGGTTGTTGGAGCACCCCGACCGGTTTCGGTAGACTAGAGCTGAACCAACT  
 1769 BALI,  
 1801 ACACGTTGCCAAGGCTTAAGTGAATTTACTTTAAAGTCTTGCATTTAAATAAATTTTCTT  
 TGTGCAACGGTTCGGAATTCACCTAAATGAAATTTCAGAACGTAAATTTATTTAAAGAA  
 1815 AFL2, 1830 AHA3, 1844 AHA3,  
 1861 TTTATAGCTTTATGACTTAGTTTCAATTTATATACTATTTTAAATGACATTTTCGATTCA  
 TAAATATCGAAATACTGAATCAAAGTTAAATATATGATAAAATTTACTGTAAAAGCTAAGTA  
 1921 TGATTGAAAGCTTTGTGTTTPTTTCTTGATGCGCTATTGCATTGTTCTTGTCTTTTTTCGCC  
 ACTAACCTTCGAAACACAAAAAGAACACGCGATAACGTAACAAGAACAGAAAAAGCGG  
 1928 HIND3,  
 1981 ACATGTAATATCTGTAGTAGATACCTGATACATTGTGGATGCTGAGTGAAATTTTAGTTA  
 TGTACATTATAGACATCATCTATGGACTATGTAACACCTACGACTCACTTTAAAATCAAT  
 2041 ATAATGGAGGCGCTCTTAATAATTTGGGGATATTGGCTTTTTTTTTTAAAGTTTACAAA  
 TATTACCTCCGCGAGAATTATTAACCCCTATAACCGAAAAAAAAAATTTCAAATGTTT  
 2086 AHA3,  
 2101 TGAATTTTTTCCGCCAGGATAACGATTCTGAAGTACTCTTAGCGTTCCTATCGGTACAG  
 ACTTAAAAAAGGCGGTCCCTATTGCTAAGACTTCAATGAGAATCGCAAGGATAGCCATGTC  
 2102 XMNI,  
 2161 CCATCAAATCATGCCTATAAATCATGCCTATATTTGCGTGCAGTCAGTATCATCTACATG  
 GGTAGTTTAGTACGGATATTTAGTACGGATAATAACGCACGTCAGTCATAGTAGATGTC  
 2221 AAAAAAATCCCGCAATTTCTTATAGAATACGTTGAAAATTAATGTACGCGCCAAGATA  
 TTTTTTTGAGGGCGTTAAAGAATATCTTATGCAACTTTTAAATTTACATGCGCGGTTCTAT  
 2281 AGATAACATATATCTAGCTAGATGCAGTAATATACACAGATTCGCGCGGACGTGGGAAGG  
 TCTATTGTATATAGATCGATCTACGTCATTATATGTGTCTAAGGGCGCCTGCACCCCTCC  
 2324 SAC2,

图 8 (第 8 图第 4 页)

2341 AAAAAATTAGATAACAAAATCTGAGTGATATGGAAATTCCGCTGTATAGCTCATATCTTT  
 TTTTTAATCTATTGTTTTAGACTCACTATACCTTTAAGGCGACATATCGAGTATAGAAA  
 2401 CCCTTCAACACCAGAAATGTAAAAATCTTGTACGAAGGATCTTTTGCTAAATGTTTCTC  
 GGAAGTTGTGGTCTTTACATTTTTAGAACAAATGCTTCTAGAAAAAGATTCAAAAGAG  
 2461 GCTCAATCCTCATTTCTTCCCTACGAAGAGTCAAATCTACTTGTTTTCTGCCGSTATCAA  
 CGAGTTAGGAGTAAAGAAGGGATGCTTCTCAGTTTAGATGAACAAAAGACGSCCATAGTT  
 2521 GATCCATATCTTCTAGTTTCACCATCAAAGTCCAATTTCTAGTATACAGTTTATGTCCCA  
 CTAGGTATAGAAGATCAAAGTGGTAGTTTCAGGTTAAAGATCATATGTCAAATACAGGGT  
 2562 SNAI,  
 2581 ACGTAACAGACAATCAAAATTGGAAAGGATAAGTATCCTTCAAAGAATGATTTCTGCCGTG  
 TGCATTGTCTGTAGTTTTAACCTTTCCTATTTCATAGGAAGTTTCTTACTAAGACGCGAC  
 2641 GCTCCTGAACCGCCTAATGGGAACAGAGAAGTCCAAAACGATGCTATAAGAACCAGAAAT  
 CGAGGACTTGGCGGATTACCCTTGTCTTTCAGGTTTTGCTACGATATTCCTTGGTCTTTA  
 2701 AAAACGATAAAACCATACCAGGATCC  
 TTTTGCTATTTTGGTATGGTCTTAGG  
 2721 BAMHI,

图 8 (第 8 图第 5 页)



- 乳糖酶启动子
- 绿乳酶
- - - - 乳糖酶终止子
- pUC19
- ▨ G418

图9

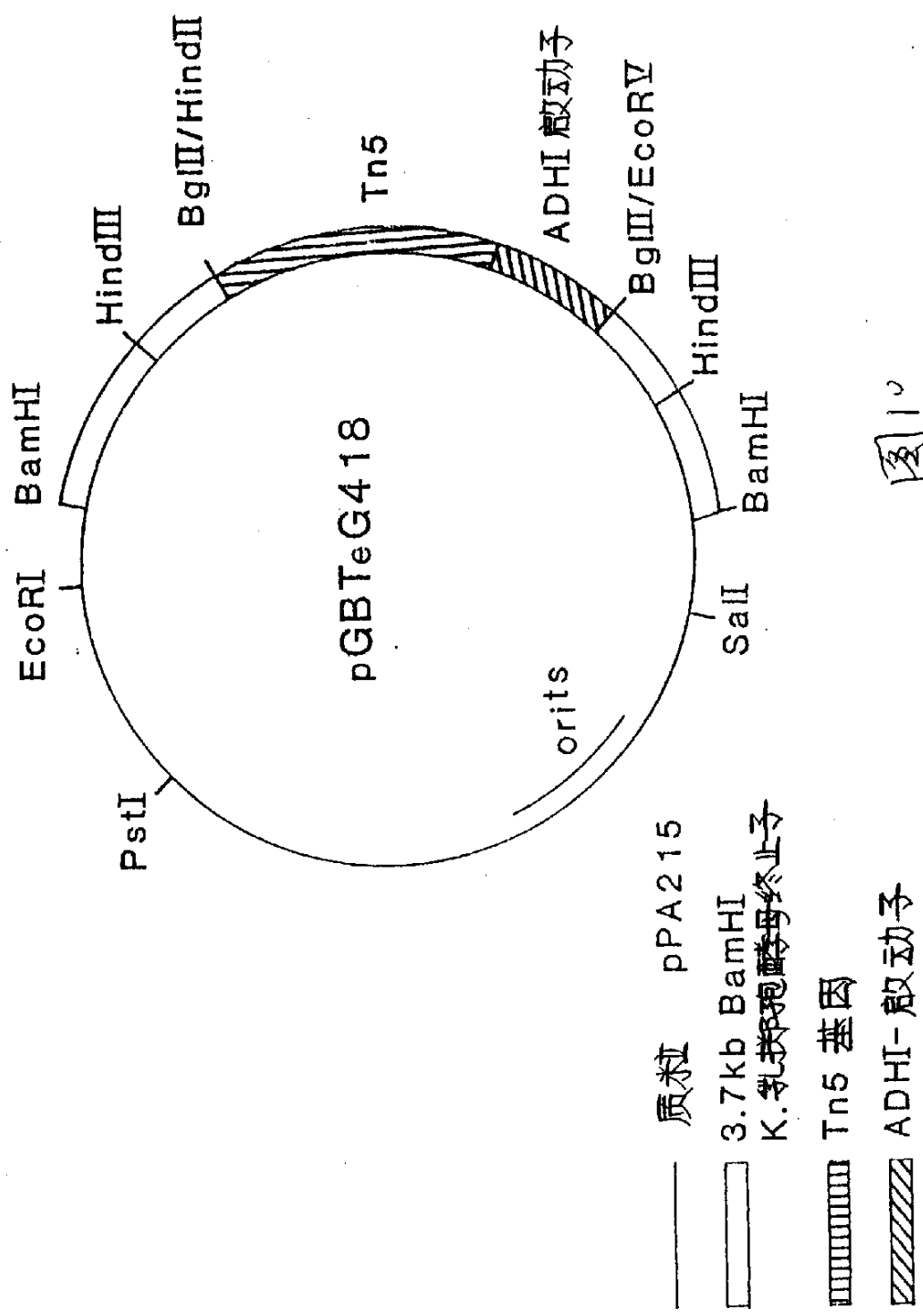


图 10

引物 #1: 删掉间隔

5' 3'  
GATTTGAAGAAAAGAGCTGAGATCACCAGG

引物 #2: 删掉间隔 + BssHII 突

5' 3'  
GATTTGAAGAAGCGCGCTGAGATCACCAGG  
BssHII

为突变乳杆菌酵母 $\alpha$ -因子前导的引物

图 11

<--- $\alpha$ - $\alpha$ -因子前导 ---><----(间隔)-前凝乳酶----->

pAB309, AspAspLeuLysLysArgGluAlaAspAlaSerHisHisMetAlaGluIleThrArgIle  
 pAB312 GATGATTTGAAGAAAAGAGAAGCCGATGCTTCCCATCATATGGCTGAGATCACCAGGATC  
 CTACTAAACTTCTTTTCTCTTCGGCTACGAAGGGTAGTATACCGACTCTAGTGGTCCTAG

pAB313 AspAspLeuLysLysArgAlaGluIleThrArgIleProLeuTyrLysGly  
 GATGATTTGAAGAAAAGAGCTGAGATCACCAGGATCCCTCTGTACAAAGGC  
 CTACTAAACTTCTTTTCTCGACTCTAGTGGTCCTAGGGAGACATGTTTCCG

pAB314 AspAspLeuLysLysArgAlaGluIleThrArgIleProLeuTyrLysGly  
 GATGATTTGAAGAAGCGCGCTGAGATCACCAGGATCCCTCTGTACAAAGGC  
 CTACTAAACTTCTTCGCGGACTCTAGTGGTCCTAGGGAGACATGTTTCCG  
 BssHII

图 1 2  $\alpha$ -因子前导/前凝乳酶乳合结合位附近的序列