

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/55

C12N 9/80 C12N 15/70

C12N 1/21 C12P 35/02

// (C12N 1/21, C12R 1:19)

[21] 申请号 94194758.0

[43]公开日 1997年5月28日

[11] 公开号 CN 1150823A

[22]申请日 94.10.26

[30]优先权

[32]93.11.1 [33]GB[31]9322508.4

[32]93.12.29[33]GB[31]9326519.7

[86]国际申请 PCT/JP94/01799 94.10.26

[87]国际公布 WO95/12680 英 95.5.11

[85]进入国家阶段日期 96.7.1

[71]申请人 藤泽药品工业株式会社

地址 日本大阪府大阪市

[72]发明人 丹羽峰雄 高藤善正 藤村高穗

石井芳则 野口/嗣

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 34 页 附图页数 40 页

[54]发明名称 一种新的头孢菌素C酰基转移酶

[57]摘要

一种突变体 CC 酰基转移酶, 其中天然 CC 酰基转移酶氨基酸序列的 Ala⁴⁹、Met¹⁶⁴、Ser¹⁶⁶、Met¹⁷⁴、Glu³⁵⁸、Met⁴⁶⁵、Met⁵⁰⁶ 或 Met⁷⁵⁰ 位置上至少一个氨基酸被一种不同的氨基酸取代, 一种为此编码的 DNA, 一种含有所述 DNA 的表达载体, 一种用所述表达载体转化的微生物, 通过培养所述转化体生产 CC 酰基转移酶, 并将其用于化合物生产。本发明的突变体 CC 酰基转移酶在酶促效力, pH 分布型的改变, 加工效率等, 具有优良的性质。

权利要求书

1. 一种突变体CC酰基转移酶，其中在天然CC酰基转移酶氨基酸序列的Ala⁴⁹、Met¹⁶⁴、Ser¹⁶⁶、Met¹⁷⁴、Glu³⁵⁸、Met⁴⁶⁵、Met⁵⁰⁶或Met⁷⁵⁰位置上至少一个氨基酸被一种不同的氨基酸取代。

2. 权利要求1的突变体头孢菌素C酰基转移酶，在其被加工成 α -亚基和 β -亚基之前，其前体形式用下列式子表示：

A1-48-X1-A50-163-X2-Gly-X3-A167-173-X4-A175-357-X5-A359-464-X6-A466-505-X7-A507-749-X8-A751-773

其中A1-48与天然CC酰基转移酶的Thr¹到Glu⁴⁸的氨基酸序列相同，

A50-163与天然CC酰基转移酶的Asp⁵⁰到Leu¹⁶³的氨基酸序列相同，

A167-173与天然CC酰基转移酶的Val¹⁶⁷到Arg¹⁷³的氨基酸序列相同，

A175-357与天然CC酰基转移酶的Leu¹⁷⁵到Val³⁵⁷的氨基酸序列相同，

A359-464与天然CC酰基转移酶的Thr³⁵⁹到Ala⁴⁶⁴的氨基酸序列相同，

A464-505与天然CC酰基转移酶的Pro⁴⁶⁶到Ile⁵⁰⁵的氨基酸序列相同，

A507-749与天然CC酰基转移酶的Lys⁵⁰⁷到Ala⁷⁴⁹的氨基酸序列相同，

A751-773与天然CC酰基转移酶的Val⁷⁵¹到Ala⁷⁷³的氨基酸序列相同，

X1是丙氨酸或一种不同的氨基酸，

X2、X4、X6、X7和X8各为蛋氨酸或一种不同的氨基酸，

X3为丝氨酸或一种不同的氨基酸，以及

X5为谷氨酸或一种不同的氨基酸，

条件是上式中Met²⁶⁹和/或Cys³⁰⁵可被不同的氨基酸取代，且当X1是丙氨酸，X2、X4、X6、X7和X8均为蛋氨酸时，X3为丝氨酸及X5是谷氨酸以外的一种氨基酸。

3. 权利要求2的突变体头孢菌素C酰基转移酶，其中X1为亮氨酸，X3为丙氨酸，Mey²⁶⁹被酪氨酸取代。

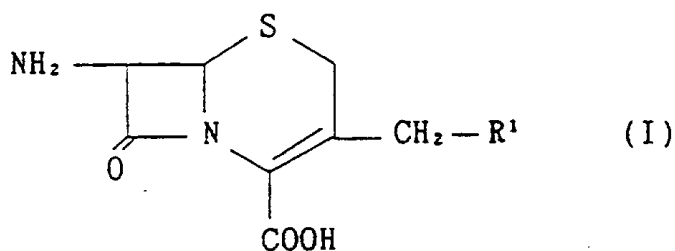
4. 编码权利要求1的头孢菌素C酰基转移酶的DNA。

5. 含有权利要求4的DNA的表达载体。

6. 由权利要求5的表达载体转化的宿主细胞。

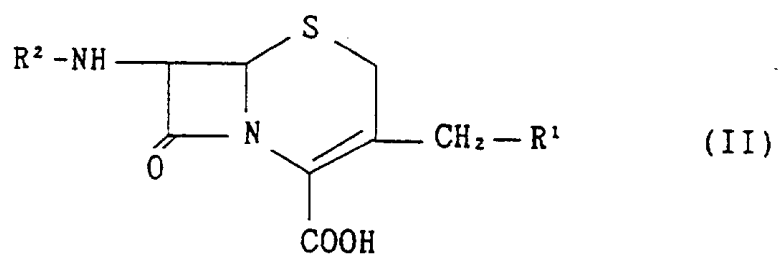
7. 生产权利要求1的突变体头孢菌素C酰基转移酶的方法，包括在一种水性营养介质中培养权利要求6的宿主细胞，并从经培养的液体培养基中回收突变体头孢菌素C酰基转移酶。

8. 制备式(I)的化合物或其盐的方法：



其中R¹是乙酰氧基，羟基或氢，

该方法包括将式(II)的化合物或其盐：



其中 R^1 与上面定义的相同， R^2 是羧酸酰基，
与权利要求 6 的转化体的经培养的液体培养基或其加工材料接触。

说明书

一种新的头孢菌素 C 酰基转移酶

本发明涉及一种新的头孢菌素 C 酰基转移酶（此后简称为“C C 酰基转移酶”）。本发明特别涉及一种新的由蛋白质工程产生的突变体 C C 酰基转移酶，其编码 DNA，含有所述 DNA 的表达载体，一种用所述的表达载体转化的微生物以及经培养所述转化体得到的 C C 酰基转移酶的产物。

头孢菌素 C 酰基转移酶是一种酶的总称，它们都能水解头孢菌素 C 产物 7 - 氨基头孢烷酸（7 - ACA）。

迄今为止，已发现了三种酶可被归类为 C C 酰基转移酶，即头孢菌素 C 酰基转移酶 SE83、N176 和 V22，它们的氨基酸序列已在 Journal of Fermentation 和 Bioengineering Vol 72, 232-243 (1991) 上公开。此文献中，C C 酰基转移酶的氨基酸序列编号是从其 N - 末端部分的蛋氨酸基团开始。然而，在本说明书中，C C 酰基转移酶的氨基酸序列编号是从其 N - 末端部分蛋氨酸基团相邻的苏氨酸基团开始，因为通过原核生物来表达 C C 酰基转移酶基因所得到的成熟 C C 酰基转移酶的 α - 亚基的 N - 端蛋氨酸被酶（如氨肽酶）去掉，生成一以苏氨酸基团做为其 N - 末端氨基酸的成熟 C C 酰基转移酶。通过重组 DNA 技术得到的天然型 C C 酰基转移酶的产物也已在所述的文章中公开，并发现表达的 C C 酰基转移酶在细胞内部被加工成一包含 α - 亚基和 β - 亚基的活化形式。然而，在大肠杆菌中，加工效率通

常不高。从广泛的研究结果来看，本发明的发明人在产生突变体 C C 酰基转移酶上是成功的，这些酶具有满意的性质，可归纳为高的酶效力、pH分布型 (profile) 改变、加工效率高等等。

本发明的新突变体 C C 酰基转移酶的特性可归纳如下：

一种突变体 C C 酰基转移酶，其中在天然 C C 酰基转移酶的氨基酸序列的Ala⁴⁹、Met¹⁶⁴、Ser¹⁶⁶、Met¹⁷⁴、Glu³⁵⁸、Met⁴⁶⁵、Met⁵⁰⁶或Met⁷⁵⁰位置上至少有一个氨基酸被不同的 氨基酸取代。

优选的取代Met¹⁶⁴的不同氨基酸的实例包括中性氨基酸，如甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸等等。

取代Ser¹⁶⁶、Met¹⁷⁴、Met⁴⁶⁵、Met⁵⁰⁶和 / 或Met⁷⁵⁰的不同氨基酸的优选实例可包括中性氨基酸如丙氨酸等。

取代Glu³⁵⁸的不同氨基酸的优选实例可包括中性氨基酸（如异亮氨酸等），碱性氨基酸（如赖氨酸等）等等。

取代的Ala⁴⁹的不同氨基酸的最优选实例是亮氨酸。

本发明的突变体 C C 酰基转移酶也可以通过用一个不同的氨基酸，取代天然 C C 酰基转移酶的氨基酸序列其它位置的至少一个氨基酸制备的。例如，用一个或多个不同的氨基酸取代突变体 C C 酰基转移酶的Met²⁶⁹和 / 或Cys³⁰⁵。

突变体 C C 酰基转移酶的一个优选实例可用下面的式子代表，此式是 C C 酰基转移酶加工成其 α - 亚基和 β - 亚基前的前体形式：

A1-48-X1-A50-163-X2-Gly-X3-A167-173-X4-A175-357
-X5-A359-464-X6-A466-505-X7-A507-749-X8-A751-773

其中A1-48与天然 C C 酰基转移酶的Thr¹ 到Glu⁴⁸具有相同的氨基酸序列。

A50-163与天然 C C 酰基转移酶的Asp⁵⁰到Leu¹⁶³具有相同的氨基酸序列。

A167-173与天然 C C 酰基转移酶的Val¹⁶⁷到Arg¹⁷³具有相同的氨基酸序列。

A175-357与天然 C C 酰基转移酶的Leu¹⁷⁵到Val³⁵⁷具有相同的氨基酸序列。

A359-464与天然 C C 酰基转移酶的Thr³⁵⁹到Ala⁴⁶⁴具有相同的氨基酸序列。

A466-505与天然 C C 酰基转移酶的Pro⁴⁶⁶到Ile⁵⁰⁵具有相同的氨基酸序列。

A507-749与天然 C C 酰基转移酶的Lys⁵⁰⁷到Ala⁷⁴⁹具有相同的氨基酸序列。

A751-773与天然 C C 酰基转移酶的Val⁷⁵¹到Ala⁷⁷³具有相同的氨基酸序列。

X1是丙氨酸或一种不同的氨基酸，

X2、X4、X6、X7和X8各为蛋氨酸或一种不同的氨基酸，

X3是丝氨酸或一种不同的氨基酸，以及

X5是谷氨酸或一种不同的氨基酸，

条件是Met²⁶⁹和/或Cys³⁰⁵可由一个或多个不同的氨基酸取代，当X1是丙氨酸，X2、X4、X6、X7及X8均为蛋氨酸，X3是丝氨酸以及X5是谷氨酸以外的一种氨基酸。

在本说明书中，给特定的突变体 C C 酰基转移酶的名称采用方便的命名法，例如根据此命名，通过用亮氨酸取代天然 C C 酰基转移酶的氨基酸序列第164位的蛋氨酸制得的突变体 C C 酰基转移酶，称为

突变体 C C 酰基转移酶 M164L，其中 M 是被取代的蛋氨酸（一种氨基酸）残基的单字母缩写，164 是天然 C C 酰基转移酶氨基酸序列的位置号，L 是用来取代蛋氨酸（前氨基酸）残基的亮氨酸（不同的氨基酸）的单字母缩写。另外，再如突变体 C C 酰基转移酶 M164L 和 M164A 分别是用亮氨酸和丙氨酸取代天然 C C 酰基转移酶氨基酸序列的 164 位的蛋氨酸残基后得到的。突变体 C C 酰基转移酶 M164L/M174A/M269Y 是通过以下方式得到的，用亮氨酸取代天然 C C 酰基转移酶氨基酸序列 164 位的蛋氨酸残基，用丙氨酸取代天然 C C 酰基转移酶氨基酸序列 174 位的蛋氨酸残基和用酪氨酸取代天然 C C 酰基转移酶氨基酸序列 269 位的蛋氨酸残基。

本发明的突变体 C C 酰基转移酶可以通过重组 DNA 技术，多肽合成等方法制备。

即，新的 C C 酰基转移酶可以通过在营养介质中培养宿主细胞并从液体培养基中回收新 C C 酰基转移酶来制备。此宿主细胞是用含编码新 C C 酰基转移酶氨基酸序列的 DNA 的表达载体转化了的。

此过程的细节在下面有更详细的解释。

宿主细胞可以是微生物 [细菌（如大肠杆菌、枯草杆菌等），酵母菌（如啤酒酵母菌等），动物细胞系以及培养的植物细胞]。优选的微生物实例包括细菌（特别是属于埃希杆菌属的菌株（如 E. coli JM109 ATCC 53323, E. coli HB101 ATCC 33694, E. coli HB101-16 FERM BP-1872, E. coli 294 ATCC 31446 等））、酵母菌（特别是属于酵母菌属的菌株，如啤酒酵母菌 AH 22）、动物细胞系（如小鼠 L929 细胞，中国仓鼠卵巢细胞（CHO）等）等等。

当一种细菌，特别是 E. coli 被用作宿主细胞时，表达载体通常

至少包括启动子—操纵基因区，起始密码子，编码新 C C 酰基转移酶氨基酸的 DNA，终止密码子、终止子区以及可复制单位。当酵母菌或动物细胞被用做宿主细胞时，表达载体优选的至少包含启动子，起始密码子，编码信号肽和新 C C 酰基转移酶氨基酸序列的 DNA，以及终止密码子，将增强子序列，新 C C 酰基转移酶的 5'—和 3'—非编码区，剪接接界，聚腺苷酸化位点以及可复制单位也可插入表达载体。

启动子—操纵基因区由启动子、操纵基因和 Shine-Dalgarno (SD) 序列（例如 AAGG 等）组成。优选的启动子—操纵基因区可包括常规使用的启动子—操纵基因区（如 *E. coli* 的 PL—启动子和 *trp*—启动子）和 C C 酰基转移酶 N—176 染色体基因的启动子。用于酵母菌的新 C C 酰基转移酶表达的启动子可包括 TRP1 基因的启动子、ADHI 或 ADHII 基因以及啤酒酵母菌的酸性磷酸酶（pH 05）基因。用于哺乳动物细胞新 C C 酰基转移酶表达的启动子可包括 SV40 早期和晚期启动子，HTLV—LTR—启动子，鼠金属硫蛋白 I（MMI）—启动子，痘苗—启动子等等。

优选的起始密码子可包含蛋氨酸密码子（ATG）。

信号肽可包含常规使用的其它酶的信号肽（天然 t—PA 信号肽，天然纤溶酶原的信号肽）等等。

编码新 C C 酰基转移酶氨基酸序列的 DNA 可采用常规方法制备，如用 DNA 合成仪部分或全部合成 DNA 和 / 或处理来自转化体的插入—合适的载体的编码天然 C C 酰基转移酶的完整 DNA 序列（如 PCCN 176—2）而得，此载体除了用一种合适的酶（如限制性酶、碱性磷酸酶、聚核苷酸激酶、DNA 连接酶、DNA 聚合酶等）处理外，采用合适的方法如常规突变方法（如暗盒突变法（cf. Tokunaga, T. et al., Eur.

J. Biochem. 153, 445-449 (1985)), PCR 突变方法 (cf. Higuchi, R. et al., Nucleic Acids Res. 16, 7351-7367(1988)), Kunkel's 方法 (cf. Kunkel, T. A. et al., Methods Enzymol, 154, 367(1987) 等)。

终止密码子可包括常规使用的终止密码子 (如TAG, TGA等)。

终止子区可包括天然或合成的终止子 (如合成的fd噬菌体终止子等)。

可复制单位是一个DNA 化合物, 它能在宿主细胞中复制属于此处的整个DNA 序列, 并且可以包含天然质粒, 人工修饰的质粒 (如从天然质粒制备的DNA 片段) 和合成质粒。质粒的优选实例对E. coli 可包括质粒pBR 322和它的人工修饰质粒 (从适当的限制酶处理PBR 322而得到的DNA 片段), 对酵母菌来说可是酵母 2 μ 质粒和酵母染色体DNA, 对哺乳动物细胞可以是质粒pRSVneo ATCC 37198, 质粒pSV2dhfr ATCC 37145, 质粒pdBPV-MMTneo ATCC 37224和质粒pSV2neo ATCC 37149。

增强子序列可包含SV40的增强子 (72 b.p.)。

聚腺苷酸化位点可包含SV40的聚腺苷酸化位点。

剪接接界可包含SV40的剪接接界。

启动子、起始密码子、编码新C C酰基转移酶氨基酸序列的DNA、终止密码子和终止子区可连续地环化地与一个适当的可复制单位 (质粒) 连接, 如果需要, 用适当的DNA 片段 (如接头, 其它限制位点等) 用常规方式 (如用限制酶消化, 用T₄ DNA连接酶连接) 以得到一个表达载体。

宿主细胞能被表达载体转化 (转染)。转化 (转染) 可用一常规

方式（如用于E. coli 的Kushner 方法，用于哺乳动物细胞的磷酸钙法，显微注射等）进行以产生转化体（转染体）。

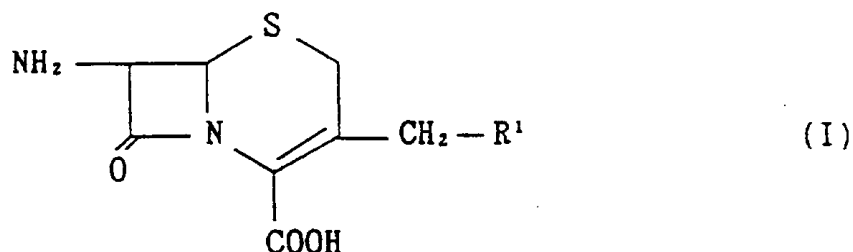
对于通过本发明方法产生新CC酰基转移酶，如此获得的含有表达载体的转化体在水溶性营养介质中培养。

所用的营养介质含有碳源（如葡萄糖、甘油、甘露糖醇、果糖、乳糖等）和无机或有机氮源（如硫酸铵、氯化铵、酪蛋白水解液、酵母膏、聚蛋白胨、细菌用胰化胨、牛肉膏等）。如果需要，其它营养源〔如无机盐（像磷酸二氢钠、钾、磷酸氢二钾、氯化镁、硫酸镁、氯化钙），维生素（如维生素B₁），抗生素（如氨苄青霉素，卡那霉素）等等〕可以加入到培养基中。对于哺乳动物细胞二培养，常用加有胎牛血清和一种抗生素的Dulbecco's Modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM) 培养基。

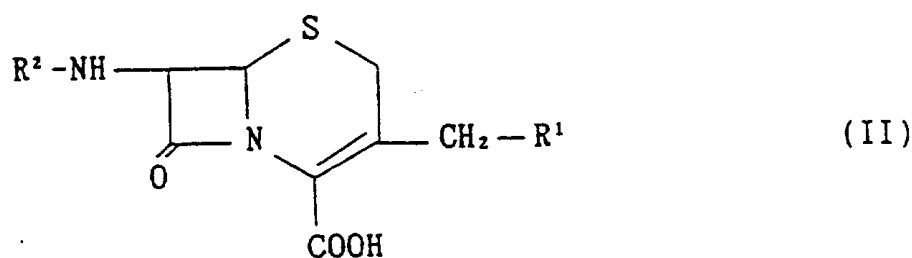
转化体（包括转染体）的培养通常是在pH 5.5-8.5（优选pH 7-7.5）和18-40℃（优选20-30℃）进行5-50小时。

当经如此产生的新CC酰基转移酶存在于培养液中，培养滤液（上清液）通过过滤或离心液体培养基得到。从培养滤液中，新CC酰基转移酶可以用一般用来纯化和分离天然或合成蛋白的的常规方法来纯化（如透析、凝胶过滤、采用抗-CC酰基转移酶单克隆抗体的亲和柱层析、在合适吸附剂上的柱层析、高效液相色谱等等）。如果产生的新CC酰基转移酶存在于培养转化体的外周质和细胞质中，用过滤或离心来收集细胞，其细胞壁或细胞膜用如超声波和/或溶菌酶处理加以破坏产生碎片和/或裂解物。此碎片和/或裂解物可溶于适当水溶液中（如8 M水溶尿素，6 M水溶guanidium 盐）。新CC酰基转移酶可从该溶液中用上面举例的常规方法加以纯化。

本发明进一步提供了一个制备如下 式的化合物或其盐的方法：



此处 R^1 是乙酰氧基、羟基或氢，该方法包含 式如下的一个化合物或其盐：



此处 R^1 如上面所定义， R^2 是羧酸酰基，与由包含编码本发明的新 C C 酰基转移酶 DNA 的表达载体转化的微生物的培养基或其加工材料接触。

R^2 的羧酸酰基可以是脂肪、芳香或杂环羧酸酰基，其适宜的实例是 $C_1 - C_8$ 链烷酰基，它可以带有选自氨基、羟基、羰基、 $C_1 - C_6$ 链烷酰氨、苯甲酰氨基、噻吩基等等的一或二个合适的取代基。

化合物 (I) 和 (II) 的适宜的盐可以是碱金属盐 (如钠盐、钾盐、锂盐)。

如果 C C 酰基转移酶活性通常存在于转化细胞中，下面的制备方法可做为液体培养基的加工物质的例证。

(1) 原始细胞：用常规方式，如过滤、离心，从液体培养基中分离；

(2) 干燥细胞：用常规方式，如冷冻干燥和真空干燥，干燥所述原始细胞而得到；

(3) 无细胞抽提物：用常规方式（如用有机溶剂使细胞自溶，用氧化铝、海沙等研磨细胞，或用超声波处理细胞），通过破坏所述原始细胞或干燥细胞获得。

(4) 酶溶液：用常规方式（如柱层析），通过纯化或部分纯化所述的无细胞提取物获得；

(5) 固定细胞或酶：用常规方式（如丙烯酰胺、玻璃珠、离子交换树脂等方法），通过固定所述的细胞和酶来制备。

包含化合物(II)与酶接触的反应可以在水性介质，如水或缓冲液中进行，也就是说，常常通过把培养基或其加工物质溶于或悬浮于像水或缓冲液那样的含有化合物(II)的水性介质中来进行反应。

优选的反应混合物的pH，化合物(II)的浓度，反应时间及反应温度可随所用的培养基或其加工物质的性质有所变化。一般地，反应在pH 6到10，优选pH 7到9；在5到40℃，优选5到37℃下进行0.5到50小时。

在反应混合物作为底物的化合物(II)的浓度可优选自从1到100mg/ml范围。

以常规方式，可从反应混合物中分离纯化由此得到的化合物(I)。

根据下面提到的步骤测定突变酰基转移酶的比活。

i) GL-7ACA酰基转移酶活性：在预先在37℃温育10分钟的500 μl GL-7ACA溶液[10mg/ml，于0.15M Tris·HCl(pH 7.5)]中，加入20ml酰基转移酶样品，混合物于37℃保温5分钟。加入550 μl 5%乙酸中止反应。所得混合物离心后（在环境温度下10,000 rpm离

心 5 分钟)，上清液用于测定 7ACA 形成。

HPLC 条件：柱：TSKgel ODS-80 TMCTR 4.4mm×100mm (TOSOH)；
洗脱液：100mM 柠檬酸，14.3% (v/v) 乙腈中的 5.0mM 正己烷-1-
磷酸钠；流速：1.0ml/min；进样体积：10μl；检测器：254nm。

一个活力单位定义为在 37℃，每分钟能从 GL-7ACA 合成 1.0 μmol
7ACA 的活性。

ii) CC 酰基转移酶活性：在 37℃ 预保温 10 分钟的 500 μl
CC 溶液中 [10mg/ml，在 0.15M Tris·HCl (pH 8.7) 中的头孢菌
素 C 钠盐，用 1N NaOH 重调 pH 至 8.7)，加入 20 μl 酰基转移酶样品，
并将混合物于 37℃ 温育 10 分钟。加入 550 μl 5% 乙酸终止反
应。离心（在环境温度下 10,000 rpm 5 分钟）所得混合物，上清液
用于 7ACA 形成的测定。

HPLC 条件：柱：TSKgel ODS-80 TMCTR 4.4mm×100mm (TOSOH)；
洗脱液：100mM 柠檬酸，14.3% (v/v) 乙腈中 5.0mM 正己烷-1-
磷酸钠；流速：1.0ml/min；进样体积：20 μl，检测器：254nm。

一个活力单位定义为在 37℃，每分钟能从头孢菌素 C 钠盐合成
1.0 μmol 7ACA 的活性。

附图的简要解释如下：

图 1 表示用于本说明书工作实施例的 DNA 寡聚体。

图 2 是构建 pCC001A 的图示。

图 3 是构建 pCC002A 的图示。

图 4 是构建 pCK002 的图示。

图 5 是构建 pCC007A 和 pCCnt013 的图示。

图 6 是构建 pCC013A 的图示。

图 7 是构建 p Δ N176 和 pCK013 的图示。

图 8 是制备 mp18p181 和 mp18p183 的图示。

图 9 是制备 mp18p181M164A、mp18p181M174A、pCKM174A 和 pCKM164A 的图示。

图 10 是制备 pCKS166A 的图示。

图 11 是制备 pCKM164L 和 pCKM164G 的图示。

图 12 是构建 mp19pfu62 的图示。

图 13 是制备 RF DNAs (mp19pfu62M465A、mp19pfu62M506A 和 mp19pfu62M750A) 和表达载体 (pCKM465A、pCKM506A 和 pCKM750A) 的图示。

图 14 是制备 p269I358K、p269I358S 和 p269I358L 的图示。

图 15 是制备 pCCE358R 和 pCCE358T 的图示。

图 16 是制备 p164L269Y、p164L269F 和 p164L269Y305S 的图示。

图 17 是制备 p164L174A 和 p164A174A 的图示。

图 18 是制备 p164A269Y、p164L174A269Y、p164L174A269F 和 p164A174A269Y305S 的图示。

图 19 是制备 p164L174A269Y305S750A 的图示。

图 20 是制备 pCKA49L 的图示。

图 21 是制备 p49L164L174A269Y 的图示。

图 22 表示突变体 C C 酰基转移酶 M164A 的核苷酸及氨基酸序列。

图 23 表示突变体 C C 酰基转移酶 S166A 的核苷酸及氨基酸序列。

图 24 表示突变体 C C 酰基转移酶 M269I / E358K 的核苷酸及氨基酸序列。

图 25 表示突变体 C C 酰基转移酶 M164L / M174A / M269Y 的核苷

酸及氨基酸序列。

图 2 6 表示突变体 C C 酰基转移酶 A49L 的核苷酸及氨基酸序列。

下面的实施例中，一些质粒、酶（如限制性酶，T4 DNA 连接酶）及其它材料是从商业途径获得，并参照供应商的说明使用。特别地，在实施例中用作起始材料的质粒 pCCN176-2 和质粒 pTQiPA Δ trp 已保藏于一个国际性保藏单位 - National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology in Japan，分别做为转化体 E. coli JM109(pCCN176-2) FERM BP-3047 和转化体 E. coli HB101-16(pTQiPA Δ trp) FERM BP-1870，根据 USP 5,192,678 和欧洲专利申请公布 No.302456 很易得到。其它质粒等可根据说明书的描述，从所述 pCCN176-2，pTQiPA Δ trp 和可购得的质粒容易地制备。用于 DNA 克隆，宿主细胞转化、转化体的培养、从培养基中回收新 C C 酰基转移酶等操作在技术上是共知的，或可由文献改动。

下列实施例其目的是为了了解释本发明，而本发明不只限于此。

实施例 1（寡脱氧核糖核苷酸的合成）

DNA 寡聚体 SO-M164A [如图 1(a) 所列] 是用 381A DNA 合成仪 (Applied Biosystems Inc.) 合成的。此 DNA 用 28% 氨水从 CPG 聚合物载体 (CPG: 可控多孔玻璃) 上释放出来，随后在 60℃ 加热 9 小时以脱除所有保护基团。反应混合物真空蒸干，残留物溶于 200 μ l TE 缓冲液 [10mM Tris·HCl (pH 7.4) - 1mM EDTA] 中，所得粗 DNA 溶液用反相 HPLC 分离 [柱子: COSMOSIL C18 4.6mm $\times$ 150mm (Nacalai Tesque)], 洗脱液 A: 0.1M 乙酸三乙胺缓冲液 (pH 7.2-7.4), B: 乙腈, 梯度: 起始 A (100%), 终止 A (60%) +

B (40%), 25分钟内线性梯度, 流速: 1.2ml/min]。收集含有目的DNA寡聚体的洗脱液并真空蒸干。纯化的DNA溶于200μl TE缓冲液, 使用前贮存于-20℃。

图1所列所有其它DNA寡聚体用上述相似方式合成和纯化。

实施例2 (在trp启动子控制下的天然CC酰基转移酶N176的表达载体的制备)

(1) 构建pCC002A, 它是天然CC酰基转移酶N176的氨苄青霉素抗性表达载体:

(i) 构建pCC001A: 质粒pCCN176-3 [从质粒pCCN176-2 (用常规方法从转化体E. coli JM109 (pCCN176-2) FERM BP-3047 得到) 制备该质粒的方法在JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING Vol 72, 1991的235页公开] (1.0μg) 用EcoRI和HindIII 消化, 含有CC酰基转移酶N176全部编码区的2.9kb片段通过琼脂糖凝胶电泳分离。另外, 突变体t-PA [用常规方式及在欧洲专利申请公布No. 302456中公开的制备方法可从转化体E. coli HB101-16 CpTQiPAΔtrp) FERM BP-1870获得] 的表达载体pTQiPAΔtrp (1.0μg) 用XmaI和XhoI消化, 并分离较大的DNA (5113bp)。合成的DNA寡聚体CT-1 (5'-

CCGGGTGTGTACACCAAGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGACCGTGA),

CT-2 (5'-

AGCTTCACGGTCGCATGTTGTACGAATCCAGTCTAGGTAGTTGGTAACCTTGGTGTACACAC),

TR-1 (5'-

AGCTTGTCCTCGAGATCAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTT) and TR-2

(5'-

TCGACAAAAAAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTAATTGATCTCGAGGACA)

用 T_4 聚核苷酸激酶磷酸化并用 T_4 DNA 连接酶连接得到 $XmaI/SalI$ DNA 片段 (114bp)，得到的 DNA 片段与 $XmaI/XhoI$ DNA 连接从而得到 pTQiPAdtrp。pTQiPAdtrp (1.0 μg) 用 $EcoRI$ 和 $HindIII$ 消化。分离得到的 4.3kb DNA 含 trp 启动子的 t-PA 编码区的一部分 (Cys92 到 Trp113) 及 fd 噬菌体中央终止子的复制序列。将 2.9kb 和 4.3kb DNA 片段混合，在 16 $^{\circ}C$ 及 T_4 DNA 连接酶 (300 单位，Takara Shuzo) 存在情况下，于 50mM Tris $\cdot$ HCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM 二硫苏糖醇和 1 mM ATP 组成的 40 μl 连接缓冲液中连接 5 小时。连接混合物用于转化 *E. coli* JM109。从抗氨苄青霉素的转化体可以得到称作 pCC001A 的目的质粒，并通过限制酶切作图鉴定。

(ii) 构建 pCC002A: 质粒 pCC001A 含有 t-PA 基因在 trp 启动子和酰基转移酶基之间的一部分 (Cys92 到 Trp113)。为了除去这个区域，pCC001A (1.0 μg) 用 $ClaI$ 和 $MluI$ 消化，并分离得到的 6.1kb DNA 片段，另外，pCCN176-3 (1 μg) 用 $MluI$ 和 $Sau3AI$ 消化来分离编码酰基转移酶 Asp 7 到 Arg71 的 189bp DNA。合成的 DNA 寡聚体 002a 和 002b (分别与 0.5nmol，见下面表 1) 在 37 $^{\circ}C$ 10 μl 缓冲液 (Kination 缓冲液: 50mM Tris $\cdot$ HCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 1.0mM ATP) 中用 T_4 聚核苷酸激酶磷酸化 1 小时，反应混合物在 55 $^{\circ}C$ 加热 20 分钟以使酶失活。得到的混合物在 15 $^{\circ}C$ 20 μl 连接缓冲液中，在 T_4 连接酶存在下与 189bp $Sau3AI/MluI$ DNA 连接 3 小时。6.1kb $ClaI/MluI$ DNA 片段加入得到的连接混合物中，在加入 T_4 DNA 连接酶 (300 单位) 后于 4 $^{\circ}C$ 保温 16 小时。得到的连接混合物用于转化 *E. coli* JM109。所需 CC 酰基转移酶 N176 的表达载体质粒 pCC002A 从某转化体分离到并通过限制酶切作图鉴定。

表 1：为 C C 酰基转移酶 N176 的 N-末端盒式突变而合成的 DNA 寡聚体。

各末端的限制 酶切位点	合成的 DNA 寡聚体的序列	
	上链：5' → 3' 下链：3' → 5'	名称/长度
EcoRI/MluI	AATTCGGATCCAAGCTTA GCCTAGGTTCGAATGCGC	007a/18 007b/18
ClaI/Sau3AI	fMetThrMetAlaAlaAsnThr CGATAAAATGACTATGGCGGCCAACACC TATTTTACTGATACCGCCGTTGTGGCTAG	002a/28 002b/30
ClaI/BamHI	fMetThrMetAlaAlaAsnThr CGATAAAATGACTATGGCAGCTAATACG TATTTTACTGATACCGTCGATTATGCCTAG	013a/28 013b/30

(2) C C 酰基转移酶 N176 的卡那霉素抗性表达载体 pCK002 的构建：

质粒 pCC002A 用 DraI (TOYOBO) 消化。生成混合物用酚处理以除去酶，并用乙醇沉淀。回收的 DNA 悬浮在 20 μl 连接缓冲液中，并与磷酸化的 EcoRI 接头 (2 μg, Pharmacia) 混合，然后在 4 °C 与 T₄ DNA 连接酶 (300 单位) 保温 16 小时。反应混合物用酚抽提并乙醇沉淀。回收的 DNA 用 EcoRI 消化，并用琼脂糖凝胶电泳分离生成的 5.6kb 缺乏氨苄青霉素抗性基因的 DNA。另外，质粒 pA097 [从转化体 E. coli JM109 (pA097) FERM BP-3772 获得] 用 EcoRI 消化，

并分离得到的1.2kb 卡那霉素抗性DNA。该1.2kb EcoRI DNA 在16℃ 50 μl 连接缓冲液中用T₄ DNA 连接酶（300 单位）与5.6kb EcoRI DNA 连接 2 小时。连接混合物用于转化E. coli JM109得到带有以卡那霉素抗性基因为抗生素标记的目的质粒pCK002。

实施例 3：CC 酰基转移酶N176的高表达载体（pCK013的构建）：

（1）pCC013A 的构建：

(i) pCC007A 的构建：质粒pCC001A 用EcoRI和MluI 消化，并用琼脂糖凝胶电泳分离生成的6.4kb DNA 片段。回收的DNA 在16℃用T₄ DNA 连接酶（300 单位）与合成的DNA 寡聚体007a和007b（各0.5 μg表 1）连接 5 小时，007a和007b在连接反应前均被磷酸化。生成混合物用来转化E. coli JM109以获得目的质粒pCC007A。

(ii) pCCNt013的构建：质粒pCC007A（1.0 μg）用ClaI和BamHI消化，生成的6.1kb DNA 用 5 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。该DNA 在T₄ DNA连接酶（300单位）作用下与合成的寡聚体013a和013b（各0.5 μg，均已磷酸化，表 1）连接。连接混合物用来转化E. coli JM109，目的质粒pCCNt013从氨苄抗性转化体中分离。

(iii) pCC013A 的构建：质粒pCCNt013用BamHI和MluI消化，并分离生成的6.1kb DNA。此外，pCC002A（1.0 μg）用MluI和Sau3AI 消化得到189bp DNA 片段。生成的DNA在T₄ DNA连接酶（300 单位）作用下与6.1kb BamHI/MluI DNA 片段连接，连接混合物用于转化E.coli JM109。从抗氨苄青霉素的转化体之一，分离具有AT—丰富的NH₂ 末端DNA 序列（编码与天然CC 酰基转移酶N176相同的氨基酸序列）的目的质粒pCC013A。

（2）天然CC 酰基转移酶N176的卡那霉素抗性表达载体pCK013的构

建。

(i) p Δ N176的构建：质粒pCK002 (1.0 μ g) 用AakII (TOYOBO) 消化，生成的DNA 用T₄ DNA 连接酶 (150 单位) 处理以自连接。连接混合物用来转化E. coli JM109，以得到含单一AatII限制性内切酶位点的质粒p Δ N176。

(ii) pCK013的构建：质粒p Δ N176 (1.0 μ g) 用AatII消化，此线性化DNA 在42 $^{\circ}$ C 100mM Tris·HCl (pH 8.0) 缓冲液中用细菌碱性磷酸酶 (1 单位, Takara Shuzo) 处理 1 小时。分离脱磷酸化的DNA 并在T₄ DNA 连接酶作用下与pCC013A的2.5kb AatII DNA连接。连接混合物用来转化E. coli JM109，得到含卡那霉素抗性基因作标志的目的质粒pCK013。

实施例 4 (用Kunkel's法对编码CC酰基转移酶N176的DNA 进行点突变)

(1) 编码CC酰基转移酶N176的DNA 亚克隆到M13 噬菌体：

(i) 制备mp18p181：质粒pCC013A (一种含氨苄青霉素抗性标志的天然CC酰基转移酶N176的表达载体，该质粒的构建在欧洲专利申请公布No. 558,241, p. 8 中公开) 用HpaI和SmaI消化。分离编码CC酰基转移酶N176 Met¹ 至Pro²⁶⁷的842bp DNA。该DNA在T₄ DNA 连接酶存在下与被SmaI消化的7250bp M13mp18 连接，连接混合物用来转化E. coli JM109。从一个噬菌斑分离到目的RF DNA mp18p181，在该质粒中，部分酰基转移酶以与M13 的正向ori 相反之方向插入，用限制性酶切图谱鉴定RF DNA mp18p181。制备RF DNA mp18p181的噬菌体溶液在使用前贮存于4 $^{\circ}$ C。

从来自pCC013A 的编码CC酰基转移酶N176 Met¹ 至Ala⁴¹⁴ 的

1162bp HpaI/Eco47III DNA制备RF DNA mp18p183, 并用与上述相似的方法将7250bp M13mp18用HincII 消化。

(ii) 制备单链U-mp18p181-SS (cf. Kunkel, T.A. et al. Methods Enzymol. 154, 367): E. coli CJ236 (dut^- , ung^- , F') (Bio-Rad Lab.) 的单克隆在37℃含有氯霉素 ($30 \mu\text{g}/\text{ml}$) 的2 ml 2XTY培养基中培养16小时。将细胞 (0.1 ml) 转到含 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 氯霉素的新鲜2XTY培养基 (50 ml) 中, 并继续在37℃培养。当在600nm 吸光度达0.3 时, 将mp18p181的噬菌体溶液 ($\text{MOI} < 0.2$) 加入培养基。再继续培养5 小时。4℃ 17000xg 离心15分钟后, 将上清液再离心。得到的上清液 (30 ml) 于室温用RNase ($150 \mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) 处理30min, 然后加入7.5 ml PEG溶液 (3.5M NH_4OAC 溶于20%聚乙二醇8000)。离心 ($17,000\text{xg}$, 15分钟, 4℃) 后, 残留物重悬于200 μl 含300mM NaCl, 100mM Tris·HCl (pH 8.0) 和0.1mM EDTA 的缓冲液中。得到的溶液顺次用200 μl 酚和200 μl 酚/氯仿 (1:1) 抽提, 并用氯仿 (200 μl) 洗两次。将7.5M NH_4OAC (100 μl) 和乙醇 (600 μl) 加入溶液中以沉淀噬菌体DNA。离心收集DNA, 用700 μl 冰冷的90%乙醇洗涤并真空干燥, 将纯化的单链U-DNA (U-mp18p181SS) 悬于20 μl TE 缓冲液中使用前贮于4℃。

用与上述相似的方法制备其它的用于Kunkel's突变法的单链U-DNAs。

(2) 制备用于突变体CC酰基转移酶M164A的mp18p181M164A: 寡聚脱氧核糖核苷酸SO-M164A (0.2nmol) 在37℃ 15ml缓冲液 (含1.3mM ATP, 10mM二硫苏糖醇 (DTT), 50mM Tris·HCl, 6.6mM 于5%聚乙二醇 (PEG) 6000) 中与T₄ DNA连接酶 (10单位) 保温60分钟。在

20 μ l 含 10mM Tris·HCl (pH 8.0), 6 mM 及 40mM NaCl 的缓冲液中将磷酸化引物 (1.5 μ l, 20pmol) 与 mp18p181 SS-U-DNA (1 μ l, 0.1pmol) 混合。混合物于 75℃ 加热 5 分钟, 然后冷却至室温超过 40 分钟, 然后将混合物置于 0℃。向混合物中加入 T₄ DNA 聚合酶 (15 单位), T₄ DNA 连接酶 (600 单位), 100mM 二硫苏糖醇 (DTT, 6 μ l), 10mM ATP (2 μ l) 及 5 mM dNTP (dATP、dCTP、dGTP 及 dTTP, 2 μ l)。得到的混合物相继在室温孵育 5 分钟及 37℃ 保温 1.5 小时。部分反应混合物 (1.0 μ l) 加入根据 Sigesada's 方法 [Sigesada, K. (1983) SAIBO-KOUGAKU (Japanese) 2,616-626] 制备的 E. coli JM109 的感受态细胞, 该细胞在湿冰上孵育 30 分钟。将在 L 培养基 (A₆₀₀=0.8, 200 μ l) 中培养的 E. coli JM109 加入转化细胞中, 并将此细胞混合物加入 55℃ 预热的 3 ml H 顶层琼脂 (1% 菌胰蛋白胨, 0.8% NaCl, 0.8% 琼脂) 中。将混合物铺在 H 平板 (1% 菌胰蛋白胨, 0.8% NaCl, 1.5% 琼脂) 上, 平板于 37℃ 保温 16 小时。从平板上噬菌斑中分离目的 RF DNA (mp18p181M164A), 并通过 BamHI 消化鉴定。

(3) 制备用于突变体 CC 酰基转移酶 M164A 的 pCKM164A:

mp18p181M164A 用 MluI 及 BstBI 消化, 用琼脂糖凝胶电泳分离 582bp DNA 片段。pCK013 (一种带有卡那霉素抗性标记的天然 CC 酰基转移酶 N176 表达载体) 也用 MluI 及 BstBI 消化, 并分离较大的 DNA 片段。生成的 DNA (0.03pmol) 在 10 μ l 连接缓冲液 (66mM Tris·HCl (pH 7.6), 6.6mM, 10mM β -巯基乙醇, 0.5mM ATP) 于环境温度在 T₄ DNA 连接酶 (300 单位) 作用下与 582bp MluI/BstBI DNA (0.15pmol) 连接 5 小时。连接混合物用于转化 E. coli JM109。从

一个卡那霉素抗性转化体中分离目的质粒pCKM164A，并用限制性酶切作图鉴定。转化体称作E. coli JM190/pCKM164A，其甘油贮存液用常规方式制备。

(4) 制备用于突变体CC酰基转移酶M174A的mp18p181M174A：

用与上述相似的方法从mp18p181的SS-U-DNA和DNA寡聚体SO-M174A制备mp18p181M174A。

(5) 用于突变体CC酰基转移酶M174A的表达载体pCKM174A的制备：

用与上述相似的方法制备突变体CC酰基转移酶M174A表达载体及其转化体，分别称作pCKM174A和E. coli JM109/pCKM174A。用常规方法制备转化体的甘油贮存液。

(6) 用于突变体CC酰基转移酶S166A的表达载体pCKS166A的制备：

用类似于上述方法，从mp18p183和DNA寡聚体SO-S166A(5'-CATCCGCCAAAGCTTGAACACACCGCACCCATAAG)制备突变体CC酰基转移酶S166A的mp18p183S166A。mp18p183S166A用MluI和BetBI消化。分离较小的DNA片段与被MluI及BstBI消化的pCK013的较大DNA片段连接，得到pCKS166A。用它转化E. coli JM109得到转化体E. coli JM109/pCKS166A，其甘油贮存液用常规方法制备。

实施例5 (用PCR法对编码CC酰基转移酶N176的DNA的点突变)

(1) 突变体CC酰基转移酶M164L的表达载体pCKM164L的制备：

pCK013(模板DNA, 0.5fmol), DNA寡聚体SO-MluFor[引物#1, 125pmol, 图1(b)]及SO-M164L[引物#2, 125pmol, 图1(b)]在100 μ l含10mM Tris·HCl(pH 9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.5mM和0.2mM dNTP的缓冲液中与Taq DNA聚合酶(Kurabo, 1单位)混合。混合物用矿物油封并如下进行PCR

(聚合酶链式反应)。初始变性(96℃ 0.5分钟)后,反应完成30个循环的扩增(97℃ 1.5分钟, 50℃ 2.5分钟及72℃ 2.5分钟)。然后终延伸(72℃ 7分钟)。生成混合物用酚抽提,乙醇沉淀并用BamHI及MluI消化。285bp BamHI/MluI DNA与被BamHI及MluI消化的pCKM164A的较大DNA片段连接。连接反应混合物用于转化E. coli JM190。从一个卡那霉素抗性转化体中分离目的质粒pCKM164L,并通过限制酶切作图鉴定。E. coli JM109用pCKM164L转化得到转化体E. coli JM109/pCKM164L,其甘油贮存液用常规方法制备。

(2) 突变体CC酰基转移酶M164G 表达载体pCKM164G的制备:

以与上述类似的方法,用pCK013(模板DNA),DNA寡聚体SO-MluFor[引物#1,图1(b)]及SO-M164G[图1(b)]进行突变体CC酰基转移酶M164G的DNA片段的突变和扩增。生成的285bp BamHI/MluI DNA与被MluI及BamHI消化的pCKM164A的较大DNA片段连接,得到pCKM164G。用pCKM164G转化E. coli JM109得到转化体E. coli JM109/pCKM164G,其甘油贮存液用常规方法制备。

(3) 其它M164突变体CC酰基转移酶的表达载体:M164X突变酰基转移酶(X=C、D、E、F、H、I、K、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y)的表达载体及其转化体用与上述相似的方法制备。

实施例6(其它突变体CC酰基转移酶表达载体的制备)

(1) mp19pfu62的构建:

M13mp19(1.0μg)用SmaI(5单位)和HindIII(5单位)消化,并用琼脂糖凝胶电泳分离得到的7.2kb DNA。此外,pCK002(此质粒的构建公开在欧洲专利申请公布No. 558,241, p.7)用SmaI和HindIII消化,分离到1.6kb DNA。得到和DNA在20μl连接缓冲液中于15℃

并有T₄ DNA 连接酶(300 单位)存在下与7.2kb SmaI/HindIII DNA 连接2小时。连接混合物用来转化E. coli JM109得到目的RF DNA mp19pfu62。mp19pfu62单链U-DNA(SS-U-DNA)以与实施例2(1)(ii)所述相似的方法制备。

(2) 突变体CC酰基转移酶M465A的mp19pfu62M465A的制备:

以与上述相似的方法从mp19pfu62的SS-U-DNA 和DNA 寡聚体SO-M465A[图1(a)]制备mp19pfu62M465A。

(3) 突变体CC酰基转移酶M506A的mp19pfuM506A的制备:

以与上述相似的方法从mp19pfu62的SS-U-DNA 和DNA 寡聚体SO-M506A[图1(a)]制备mp19pfu62M506A。

(4) 突变体CC酰基转移酶M750A的mp19pfu62M750A的制备:

以与上述相似的方法从mp19pfu62 的SS-U-DNA和DNA 寡聚体SO-M750A[图1(a)]制备mp19pfu62M750A。

(5) 突变体CC酰基转移酶M465A的表达载体pCKM465A的制备:

mp19pfu62M465A用PstI和NcoI消化,用琼脂糖凝胶电泳分离较小的DNA 片段(1271bp)。PCK013也用PstI和NcoI消化。分离较大的DNA,在含有50mM Tris·HCl, 10mM, 1.0mM DTT及5% PEG 6000的缓冲液中,用T₄ DNA 连接酶将其与1271bp PstI/NcoI DNA 连接。连接反应混合物用于转化E. coli DH10B。从卡那霉素抗性转化体中,分离目的质粒pCKM465A,并通过限制性酶切作图鉴定。E. coli JM109 用pCKM465A转化得到转化体E. coli JM109/pCKM465A,其甘油贮存液用常规方法制备。

(6) 突变体CC酰基转移酶M506A 的表达载体pCKM506A的制备:

以与上述相似的方法从pCK013和mp19pfu62 M506A 构建pCKM506A。

E. coli JM109用pCKM506A转化，从而得到转化体E. coli JM109/pCKM506A，其甘油贮存液用常规方法制备。

(7) 突变体CC酰基转移酶M750A的表达载体pCKM750A的制备：

以与上述相似的方法从pCK013和mp19pfu62 M750A 构建pCKM750A。
E. coli JM109用pCKM750A转化，从而得到转化体E. coli JM109/pCKM750A，其甘油贮存液用常规方法制备。

实施例7 (E358突变体CC酰基转移酶的表达载体的制备)

(1) 突变体CC酰基转移酶M269I/E358的表达载体的制备：

(i) 突变体CC酰基转移酶M269I/E358K 表达载体p269I358K的制备：

pCK013用HpaI和MluI (0.5fmol) 消化后的较大的DNA片段，DNA寡聚体SO-E358K [5' - TAACCGGGCCATGGCGCGTCTTGACTATATCGAACT, 125pmol, 列于图1(b)(ii)] 和SO-BstFor [5' - ATCGCGTCTTCGAAATACCGGGCATC, 125pmol, 列于图1(b)(ii)] 在100μl含有10mM Tris·HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 0.1% 明胶, 1.5mM和0.2mM dNTP的缓冲液中与Taq DNA聚合酶 (TaKaRa, 1单位) 混合。混合物用矿物油封并初变性 (96℃ 0.5分钟)，进行25个循环扩增 (97℃ 1.5分钟, 50℃ 2.5分钟, 72℃ 2.5分钟) 并终延伸 (72℃ 7分钟)。反应混合物经酚抽提，乙醇沉淀，然后用NcoI和BstBI消化。得到的DNA (290bp) 连接到被NcoI及BstBI 消化的pCK013的较大DNA片段上。用连接混合物转化E. coli DH10B (购自Gibco-BRL)。从卡那霉素抗性转化体中分离目的的质粒p269I358K，并用限制性酶切作图鉴定。E. coli JM109用p269I358K转化得到转化体E. coli JM109/p269I358K，其甘油贮存液用常规方法制备。

(ii) 突变体 C C 酰基转移酶 M269I/E358S 和 M269I/E358L 的表达载体 p269I358S 和 p269I358L 的制备：

以与上述相似的方法从 pCK013 及 DNA 寡聚体 SO-BstFor 和 SO-E358S [或 SO-E358L, 见图 1(b)(ii)] 制备 M269I/E358S (或 M269I/E358L) 的表达载体。用 p269I358S (或 p269I358L) 转化 E. coli JM109 得到转化体 E. coli JM109/p269I358S (或 E. coli JM109/p269I358L), 其甘油贮存液用常规方法制备。

(2) 其它突变体 C C 酰基转移酶 E358 表达载体的制备：

(i) 突变体 C C 酰基转移酶 E358R 表达载体 pCCE358R 的制备：

用与实施例 2 中所述相似的方法从 mp18p183 和 DNA 寡聚体 SO-E358R [图 1(b)(ii)] 制备突变体 CC 酰基转移酶 E358R 的 mp18p183E358R。mp18p183E358R 用 MluI 和 NcoI 消化后的较小 DNA 与经 MluI 和 NcoI 消化后的 pCC013A 的较大 DNA 连接, 得到 pCCE358R。E. coli JM109 用 pCCE358R 转化, 得到转化体 E. coli JM109/pCCE358R, 其甘油贮存液用常规方法制备。

(ii) 突变体 C C 酰基转移酶 E358T 的表达载体 pCCE358T 的制备：

以与实施例 2 中所述相似的方法从 mp18p183 和 DNA 寡聚体 SO-E358T [图 1(b)(ii)] 制备突变体 CC 酰基转移酶 E358T 的 mp18p183E358T。mp18p183E358T 经 MluI 和 NcoI 消化后的较小的 DNA 与 pCC013A 经 MluI 和 NcoI 消化后的较大的 DNA 连接得到 pCCE358T。E. coli JM109 用 pCCE358T 转化得到转化体 E. coli JM109/pCCE358T, 其甘油贮存液用常规方法制备。

实施例 8 (多突变体 C C 酰基转移酶的制备)

(1) M164L 或 M164A 与另一种突变体 C C 酰基转移酶的组合：

(i) 突变体 C C 酰基转移酶 M164L/M269Y 的表达载体 p164L269Y 的制备:

pCKM164L 用 MluI 和 BstBI 消化, 分离较小的 DNA (582bp)。另外, pCKM269Y (此质粒的构建方法公开在欧洲专利申请公布 No. 558,241, p. 10 上) 用 MluI 和 BstBI 消化。分离生成的 DNA (ca 6.2 kb) 并连接到 582bp MluI/BstBI DNA 上。连接混合物用于转化 E. coli DH10B。从卡那霉素抗性转化体中分离目的 p164L269Y, 并经限制性酶切作图鉴定。E. coli JM109 用 p164L269Y 转化得到转化体 E. coli JM109/p164L269Y, 其甘油贮存液用常规方法制备。

(ii) 突变体 C C 酰基转移酶 M164L/M269F 的表达载体 p164L269F 的制备:

pCKM164L 用 MluI 和 BstBI 消化并分离较小的 DNA (582bp)。此外, pCKM269F (此质粒的构建方法公开在欧洲专利申请公布 No. 558,241, p. 15-16 上) 被 MluI 和 BstBI 消化。分离较大的 DNA 片段 (ca 6.2 kb) 与 582bp MluI/BstBI DNA 连接。连接混合物用于转化 E. coli DH10B。从卡那霉素抗性转化体中分离目的 p164L269F, 并用限制性酶切作图鉴定。E. coli JM109 用 p164L269F 转化得到转化体 E. coli JM109/p164L269F, 其甘油贮存液用常规方法制备。

(iii) 突变体 C C 酰基转移酶 M164L/M269Y/C305S 的表达载体 p164L269Y305S 的制备

用与上述相似的方法从 pCKM164L 和 p269Y305S (此质粒的构建方法公开在欧洲专利申请公布 No. 558,241, p. 10 上) 制备 p164L269Y305S。E. coli JM109 用 p164L269Y305S 转化得到转化体 E. coli JM109/p164L269Y305S, 其甘油贮存液用常规方法制备:

(iv) 突变体 C C 酰基转移酶 M164L / M174A 的表达载体 p164L174A 的制备：

将来自 pCKM164L (模板 DNA, 0.5 fmol) 的 HpaI / NcoI DNA (1122 bp), DNA 寡聚体 SO-MluFor [引物 # 1, 125 pmol, 图 1(b)(i)] 和 SO-M174A2 (5' - GACCGGCAGCGCTAGCGCCCGCCAGAGCTTGA, 引物 # 2, 125 pmol) 在 100 μ l 含有 10 mM Tris · HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.1% 明胶, 1.5 mM 和 0.2 mM dNTP 的缓冲液中与 Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa, 1 单位)。混合。混合物用矿物油封并进行初变性 (96°C 0.5 分钟), 25 个循环的扩增 (97°C 1.5 分钟, 50°C 2.5 分钟及 72°C 2.5 分钟) 和终延伸 (72°C 7 分钟)。生成混合物用酚抽提、乙醇沉淀, 并用 MluI 和 NheI 消化。生成的 DNA 与 pCKM174A 经 MluI 和 NheI 消化后较大的 DNA 片段连接, 得到目的质粒 p164L174A。E.coli JM109 用 p164L174A 转化得到转化体 E.coli JM109 / p164L174A, 其甘油贮存液用常规方法制备。

(v) 突变体 C C 酰基转移酶 M164A / M174A 的表达载体 p164A174A 的制备：

用与上述相似的方法从 pCKM164A (模板 DNA), SO-MluFor [引物 # 1, 图 1(b)(i)]、SO-M174A [引物 # 2, 图 1(a)] 和 pCKM174A (载体 DNA) 制备 164A174A。E.coli JM109 用 p164A174A 转化得到转化体 E.coli JM109 / p164A174A, 其甘油贮存液用常规方法制备。

(vi) 突变体 C C 酰基转移酶 M164A / M269Y 的表达载体 p164A269Y 的制备：

M164A 用 MluI 和 BstBI 消化并分离较小的 DNA (582 bp)。此外, pCKM269Y 用 MluI 及 BstBI 消化。生成的较大的 DNA 片段连接到 582 bp

MluI/BstBI DNA, 而且连接混合物用来转化E. coli DH10B。从卡那霉素抗性转化体分离目的质粒p164A269Y, 并经限制性酶切作图鉴定。E. coli JM109用p164A269Y 转化得到转化体E. coli JM109/p164A269Y, 其甘油贮存液用常规方法制备。

(vii) 突变体 C C 酰基转移酶M164L/M174A/M269Y, M164L/M174A/M269F, 和M164A/M174A/M269Y/C305S的表达载体的制备:

p164L174A用MluI和BstBI消化后的较小的DNA 与pCKM269Y (或pCKM269F 或p269Y305S) 经MluI及BstBI 消化后的较大DNA 片段连接, 得到目的载体p164L174A269Y(或p164L174A269F或p164A174A269Y305S)。E. coli JM109用p164L174A269Y(或p164L174A269F或p164A174A269Y305S) 转化得到转化体E. coli JM109/p164L174A269Y (或E. coli JM109/p164L174A269F或E. coli JM109/p164A174A269Y305S), 其甘油贮存液用常规方法制备。

(viii) 突变体 C C 酰基转移酶M164L/M174A/M269Y/C305S/M750A 的表达载体p164L174A269Y305S750A 的制备:

pCKM750A用PstI及NcoI消化。分离较小的DNA与p174L174A269Y305S 经PstI 及NcoI 消化后的较大的DNA 连接, 得到目的质粒。E. coli JM109用p164L174A269Y305S750A转化, 得到转化体E. coli JM109/p164L174A269Y305S750A, 其甘油贮存液用常规方法制备。

(2) A49L与其它突变体酰基转移酶的组合

(i) 突变体 C C 酰基转移酶A49L的mp18p181A49L的制备:

以与实施例 2 所述相似的方法从mp18p181的SS-U-DNA和DNA 寡聚体S0-A49L制备的mp18p181A49L。

(ii) 突变体 C C 酰基转移酶A49L的表达载体pCKA49L的制备:

mp18p181A49L 用ClaI 及MluI 消化并分离218bp DNA。另外，pCCO13A 用ClaI及MluI消化。分离生成的较大的DNA 并连接到218bp ClaI/MluI DNA上。连接混合物用于转化E.coli JM109。从抗氨苄青霉素抗性转化体中，分离突变体CC酰基转移酶A49L的表达载体pCCA49L，并有限制性酶切图谱鉴定。pCCA49L的250bp HpaI/MluI DNA 片段与pCKO13经HpaI及MluI消化后的较大DNA 片段连接，得到pCKA49L。

(iii) 天然CC酰基转移酶和突变体CC酰基转移酶A49L的表达比较：

用常规方法，通过质粒pCKA49L（或pCKO13）转化E.coli JM109制得的E. coli JM109/pCKA49L（或JM109/pCKO13）的甘油贮存液（1ml）转入100ml 含50 μ g/ml 卡那霉素的L液体培养基中，该混合物在30℃培养8小时。经培养的液体培养基（3.75ml）加入25ml含25 μ g/ml卡那霉素的N-3培养基（成分：5%大豆汁，1%甘油，1.25% K_2HPO_4 ，0.38% KH_2PO_4 ，50 μ g/ml盐酸硫胺，2mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，0.2mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ，0.05mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ），该混合物在22.5℃培养16小时。在第16小时，向培养基中加入终浓度为20 μ g/ml的3-吲哚丙烯酸（IAA）再继续培养56小时。离心收集细胞（于4℃，14000rpm，15分钟），悬浮于40ml TE 缓冲液（pH 8.0）并超声裂解。裂解物于4℃ 14000rpm离心20分钟，得到上清液（称作“汤”部分）。残留物重悬于40ml含100mM Tris·HCl（pH 8.0），1mM EDTA 及8M 尿素的缓冲液中，并超声裂解。离心除去不溶物质，收集上清（称作“ppt”部分）。用15% SDS-PAGE 分析突变体CC酰基转移酶A49L和天然CC酰基转移酶N176的“汤”及“ppt”部分。通过天然CC酰基转移酶突变为突变体CC酰基转移酶A49L，

细胞不溶性前体蛋白大大减少。通过反相HPLC测定了“汤”中相应于成熟酰基转移酶（天然C C酰基转移酶或突变体C C酰基转移酶A49L）总量的结果（下表）。

A49L（单位／ml培养基）	天然（单位／ml培养基）
72.6	35.6

(iv) 突变体C C酰基转移酶A49L／M164L／M174A／M269Y的表达载体p49L164L174A269Y的制备：

p164L174A269Y的772bp MluI／NcoI DNA 与pCKA49L 经MluI和NcoI消化后的较大DNA 连接，得到目的质粒p49L164L174A269Y。
E.coli JM109 用p49L164L174A269Y转化得到转化体E.coli JM109／p49L164L174A269Y，其甘油贮存液用常规方法制备。

实施例9（突变体C C酰基转移酶的表达和纯化）

（1）突变体C C酰基转移酶M164A的表达：

将E. coli JM109／pCKM164A（0.5ml）的甘油贮存液加入50ml含50 μ g／ml 卡那霉素的L培养基，混合物在30℃培养8小时。然后将经培养的液体培养基（3.75ml）转入25ml含1%甘油和12.5 μ g／ml 卡那霉素的N-3培养基（5.0%大豆浸液（Osaka Shokuhinn Kagaku），0.608% Na₂HPO₄，0.7% KH₂PO₄，0.7% K₂HPO₄，0.12% (NH₄)₂SO₄，0.02% NH₄Cl，0.0011% FeSO₄·7H₂O，0.0011% CaCl₂·2H₂O，0.000276% MnSO₄·nH₂O，0.000276% AlCl₃·6H₂O，0.00011% CoCl₂·6H₂O，0.0000552% ZnSO₄·7H₂O，0.0000552%

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0000276% $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0000138% H_3BO_3 , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vitamin B1, 0.048% MgSO_4) 中。混合物于20-22℃温育88小时, 并在开始培养后16小时加入 β -吡啶丙烯酸(终浓度20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 16及24小时加入甘油(终浓度1.0%)。离心(4℃, 8000rpm 10分钟)收集细胞, 悬浮于10ml TE 缓冲液(10mM Tris·HCl(pH 8.0), 1.0mM EDTA)并超声裂解。离心(4℃, 15000rpm, 20分钟)后, 上清液(粗裂解物)在贮存于4℃备用。

(2) M164A的纯化:

用0.45 μm column guarb (Millipore) 过滤粗裂解物(1.0ml) 并上样到TSK-gelTM DEAE-5PW (TOSOH, 4.6 $\times$ 50 mm) 高压液相色谱柱。洗脱为30分钟内从80% A 缓冲液[25mM Tris·HCl(pH 8.0)] + 20% B 缓冲液[0.5M NaCl-25mM Tris·HCl(pH 8.0)] 到50% A 缓冲液+50% B 缓冲液的凹型梯度洗脱, 流速1.0ml/min。用230nm 处吸光率监测洗脱过程。收集用约0.16M NaCl洗脱的最后一个主峰, 得到突变体CC 酰基转移酶M164A的纯品。

(3) 其它突变体CC 酰基转移酶的表达:

以与上述相似的方法, 培养带有另一表达载体(如 pCKM164L, pCKM164G, pCKM174A, pCKM465A, pCKM506A, pCKM750A, p164L/269Y, p164L/269Y/305S, p164L/174A/269Y/305S, p269I/358K, p269I/358S, p164L/269F, p164L/174A/269F, pCKS166A, p164L/174A/269Y/305S/750A, p164A/269Y, pCK49L 和 p49L/164L/174A) 的E.coli JM109, 并制备其粗裂解物。

(4) 其它突变体CC 酰基转移酶的纯化:

以与上述相似的方法，其它突变体 C C 酰基转移酶（如 M164L、M164G、M174A、M465A、M506A、M750A、M164L/M269Y、M164L/M269Y/C305S、M164L/M174A/M269Y/S305S、M269I/E358K、M269I/E358S、M164L/M269F、M164L/M174A/M269F、S166A、M164L/M174A/M269Y/C305S/M750A、M164A/269Y、和 A49L/M164L/M174A）从各自的粗裂解物纯化。

（5）突变体 C C 酰基转移酶的鉴定：

通过 12.5% SDS-PAGE 分析和反相 HPLC 鉴定纯化的突变体 C C 酰基转移酶如 M164A, M164L, M164G, M174A, M465A, M506A, M750A, M164L/M269Y, M164L/M269Y/C305S, M164L/M174A/M269Y/S305S, M269I/E358K, M269I/E358S, M164L/M269F, M164L/M174A/M269F, S166A, M164L/M174A/M269Y/C305S/M750A, M164A/269Y, 和 A49L/M164L/M174A。在 β -巯基乙醇存在下进行 SDS-PAGE 分析，证实每种纯化的酰基转移酶由 2 个独立亚基组成， α 和 β 亚基分别对应 25.4KDa 和 58.4KDa 的肽，通过它们在凝胶电泳上的迁移率来计算其分子量。在 HPLC 分析中，每种纯化的酰基转移酶解离为 2 个独立的肽—— α 和 β 亚基，分别在大约 8.7 和 5.8 分钟被洗脱下来 [HPLC 条件下，柱：5C4-AR-300, $4.6 \times 50\text{mm}$ ；洗脱：10 分钟内从 35% 到 70% 含 0.05% 三氟乙酸的乙腈水溶液的线性梯度；检测：214nm]。每种突变体酰基转移酶的两个亚基通过反相 HPLC 系统分离，并用 473A 蛋白测序仪（应用生物系统）通过氨基末端序列分析确定其与天然酰基转移酶序列相同。

实施例 10（DNA 序列分析）

用 373A DNA 测序仪（应用生物系统）测定突变体酰基转移酶，如

M164A, M164L, M164G, M174A, M465A, M506A, M750A, M164L/M269Y, M164L/M269Y/C305S, M164L/M174A/M269Y/S305S, M269I/E358K, M269I/E358S, M164L/M269F, M164L/M174A/M269F, S166A, M164L/M174A/M269Y/C305S/M750A, M164A/269Y, and A49L/M164L/M174A 的载体的DNA 序列, 并证实其与预期的相同。

实施例11 (C C 酰基转移酶活性)

用与上述相同的方法测定各突变体酰基转移酶在pH 8.7的 C C 酰基转移酶活性, 列于表 2 。结果见表 2 。

表 2

C C 酰基转移酶的相对活性：

(*：将天然型视为100%)

突变酰基转移酶	C C 酰基转移酶活性
天然 (N176)	100*
M164L	122
M174A	123
M465A	136
M506A	140
M750A	142
M164L/M269Y	161
M164L/M269Y/C305S	141
M164L/M174A/M269Y/C305S	155
M269I/E358K	153
M269I/E358S	184
M164L/M269F	193
M164L/M174A/M269F	184
S166A	186
M164L/M174A/M269Y	245
M164L/M174A/M269Y/C305S/M750A	192
M164A/M269Y	172
A49L/M164L/M174A/M269Y	226

实施例12 (GL-7ACA酰基转移酶活性)

用与上述相同的方法测定各突变体酰基转移酶在pH 7.5的GL-7ACA酰基转移酶活性，列于表 3。结果见表 3。

表 3

GL-7ACA酰基转移酶的相对活性：

(*：将天然型视为100%)

突变体酰基转移酶	GL-7aca酰基转移酶活性
天然 (N176)	100*
M164A	167
M164G	162

说明书附图

FIG. 1A

寡聚脱氧核糖核酸表:

(a) 用于 Kunkel's 法的 DNA 寡聚体

1. 164
GlyLeuLeuAlaGlySerValTrpPhe
SO-M164A (29) 5' GGGCCTGCTTGCGGGATCCGTGTGGTTCA
(BamHI)
2. 174
LeuTrpArgAlaLeuAlaLeuPro
SO-M174A (26) 5' GCTCTGGCGGGCGCTAGCGCTGCCGG
(Eco47III)
3. 465
HisGluAlaAlaProArgValIle
SO-M465A (26) 5' GCACGAGGCGGCGCCACGCGTGATCG
(NarI) (MluI)
4. 506
GluArgIleAlaLysArgLeuValAla
SO-M506A (28) 5' GAGCGCATCGCGAAGCGCTTGGTCGCCA
(Eco47III)
5. 750
AspCysAlaAlaValProMetLeu
SO-M750A (26) 5' CGACTGTGCGGCGGTACCGATGCTCT
(KpnI)

图 1 B

6. 49
AlaSerGlyGluLeuAspAlaTyrArg
SO-A49L (27) 5' GCCTCGGGCGAGCTCGATGCCTATCGG
(*Sac*I)
7. SO-S166A (36) 5' CATCCGCCAAAGCTTGAACCACACCGCACCCATAAG
(*Hind*III)
- (b) 用于 PCR 突变的寡聚体
- (i) 用于突变体酰基转移酶 m164
1. 70
MetGluLeuThrArgArgLysAlaLeuGlyArg
SO-MluFor (33) 5' ATGGAGCTGACGCGTCGCAAAGCGCTGGGACG
(*Mlu*I) (*Eco*47III)
2. 164
ValMetArgArgLeuGlyLeuLeuCysGlySerVal
SO-M164C (38) CGGTGATGCGTCGACTCGGCCTGCTTTGCGGATCCGTG
3' GCCACTACGCAGCTGAGCCGGACGAAACGCCTAGGCAC
(*Sal*I) (*Bam*HI)
3. SO-M164D (38) 5' CACGGATCCATCAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
4. SO-M164E (38) 5' CACGGATCCTTCAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
5. SO-M164F (38) 5' CACGGATCCGAAAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG

图 1 C

6. SO-M164G (38) 5' CACGGATCCGCCAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
7. SO-M164H (38) 5' CACGGATCCATGAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
8. SO-M164I (38) 5' CACGGATCCGATAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
9. SO-M164K (38) 5' CACGGATCCCTTAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
10. SO-M164L (38) 5' CACGGATCCCAGAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
11. SO-M164N (38) 5' CACGGATCCGTTAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
12. SO-M164P (38) 5' CACGGATCCCGGAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
13. SO-M164Q (38) 5' CACGGATCCCTGAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
14. SO-M164R (38) 5' CACGGATCCACGAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
15. SO-M164S (38) 5' CACGGATCCCGAAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
16. SO-M164T (38) 5' CACGGATCCCGTAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
17. SO-M164V (38) 5' CACGGATCCCACAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
18. SO-M164W (38) 5' CACGGATCCCCAAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG
19. SO-M164Y (38) 5' CACGGATCCATAAAGCAGGCCGAGTCGACGCATCACCG

(ii) 用于突变体酰基转移酶 E358

1. 265
ArgValPheGluIleProGlyIle
SO-BstFor (26) 5' ATCGCGTCTTCGAAATACCGGGCATC
(BstBI)

图 1 D

2.

358

PheAspIleValLysThrArgHisGlyProVal

AGTTCGATATAGTCAAGACGCGCCATGGCCCGGTTA

SO-E358K (36) 3' TCAAGCTATATCAGTTCTGCGCGGTACCGGGCCAAT

(NcoI)

3. SO-E358L (36) 5' TAACCGGGCCATGGCGCGTCAGGACTATATCGAACT

4. SO-E358R (36) 5' TAACCGGGCCATGGCGCGTGCGGACTATATCGAACT

5. SO-E358S (36) 5' TAACCGGGCCATGGCGCGTCGAGACTATATCGAACT

6. SO-E358T (36) 5' TAACCGGGCCATGGCGCGTGGTGAAGTATATCGAACT

图 2 A

E.coli HB101-16 (pTQiPA Δ trp) FERM BP-1870

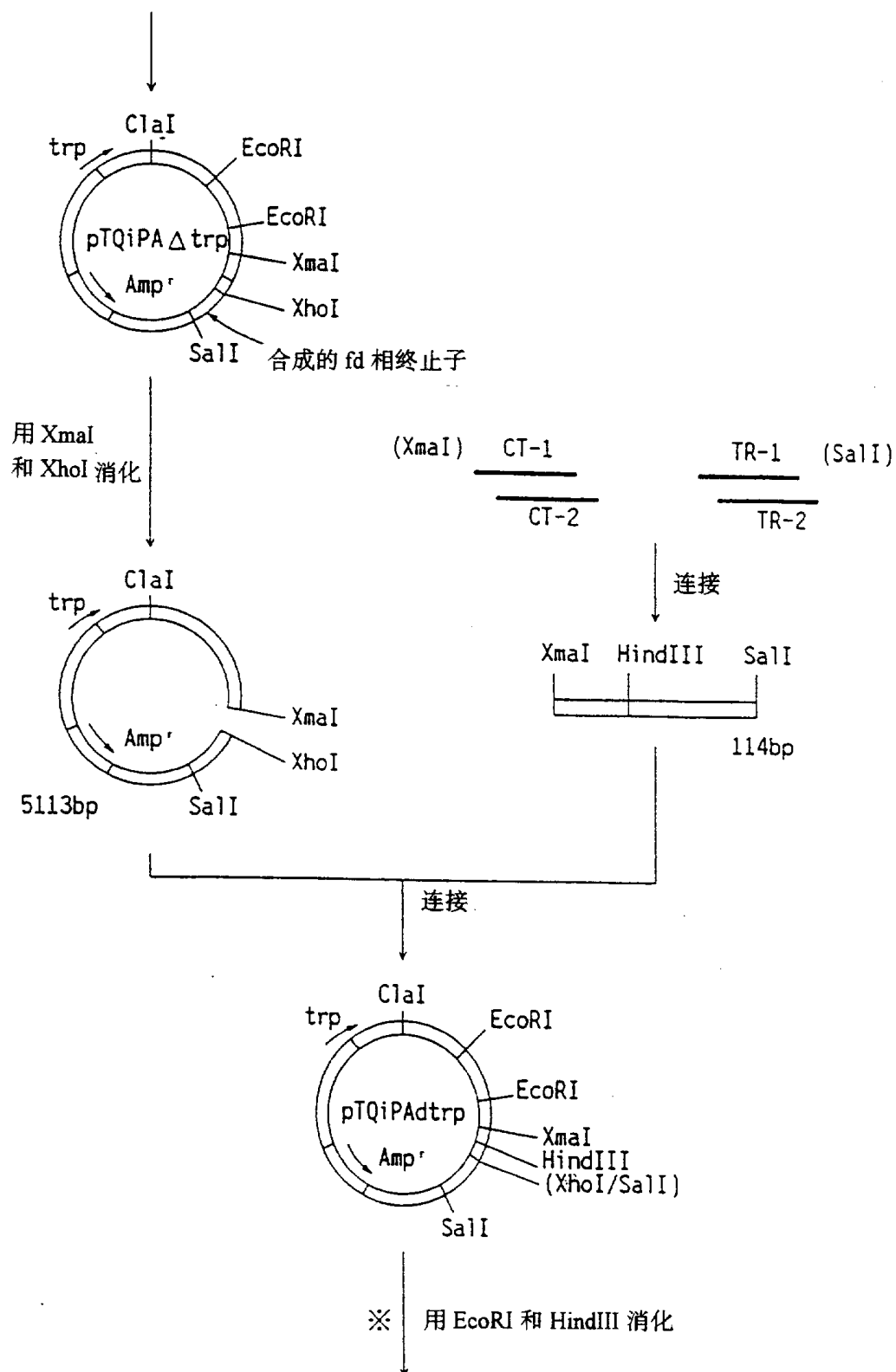


图 2 B

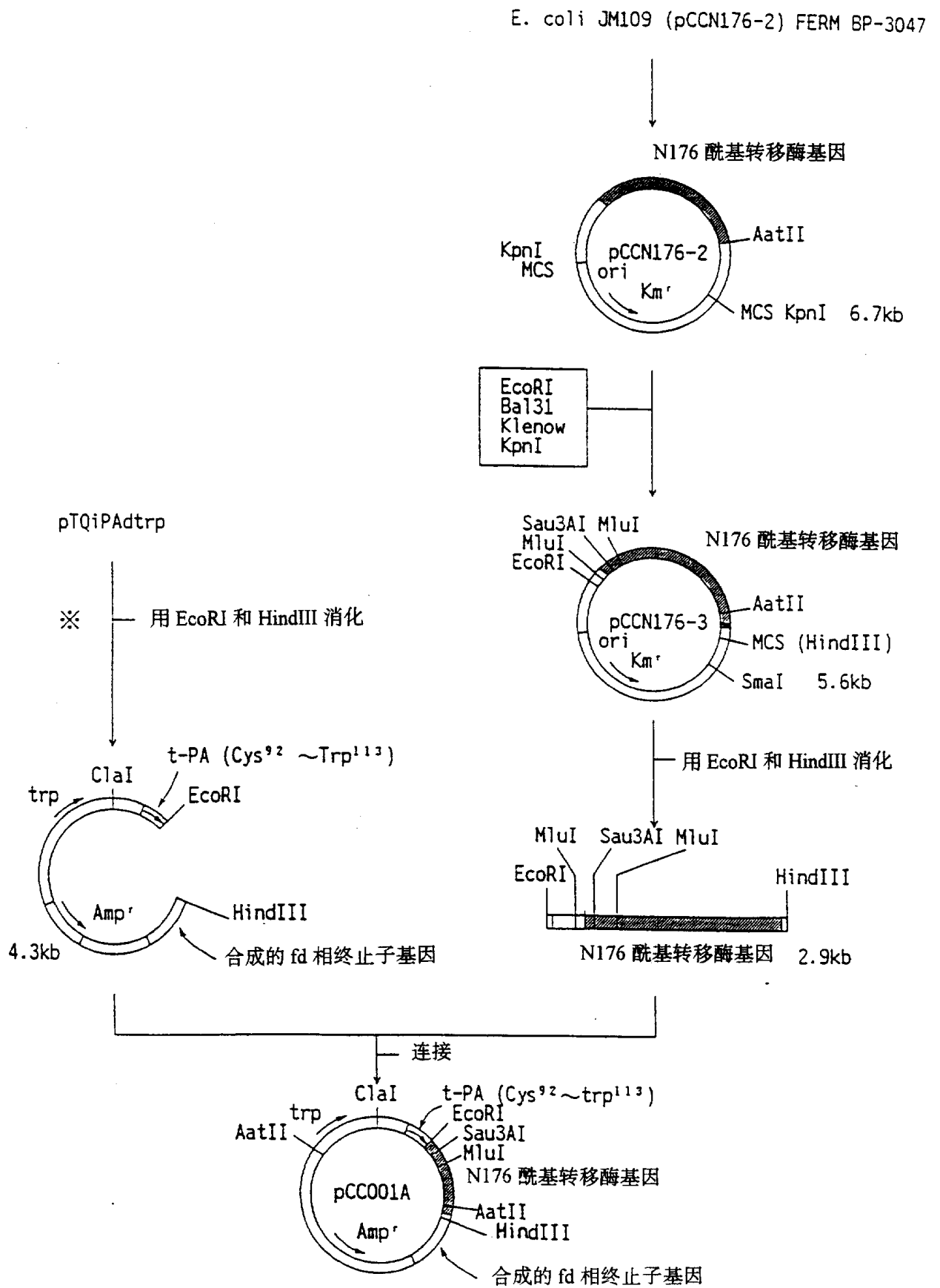


图 3

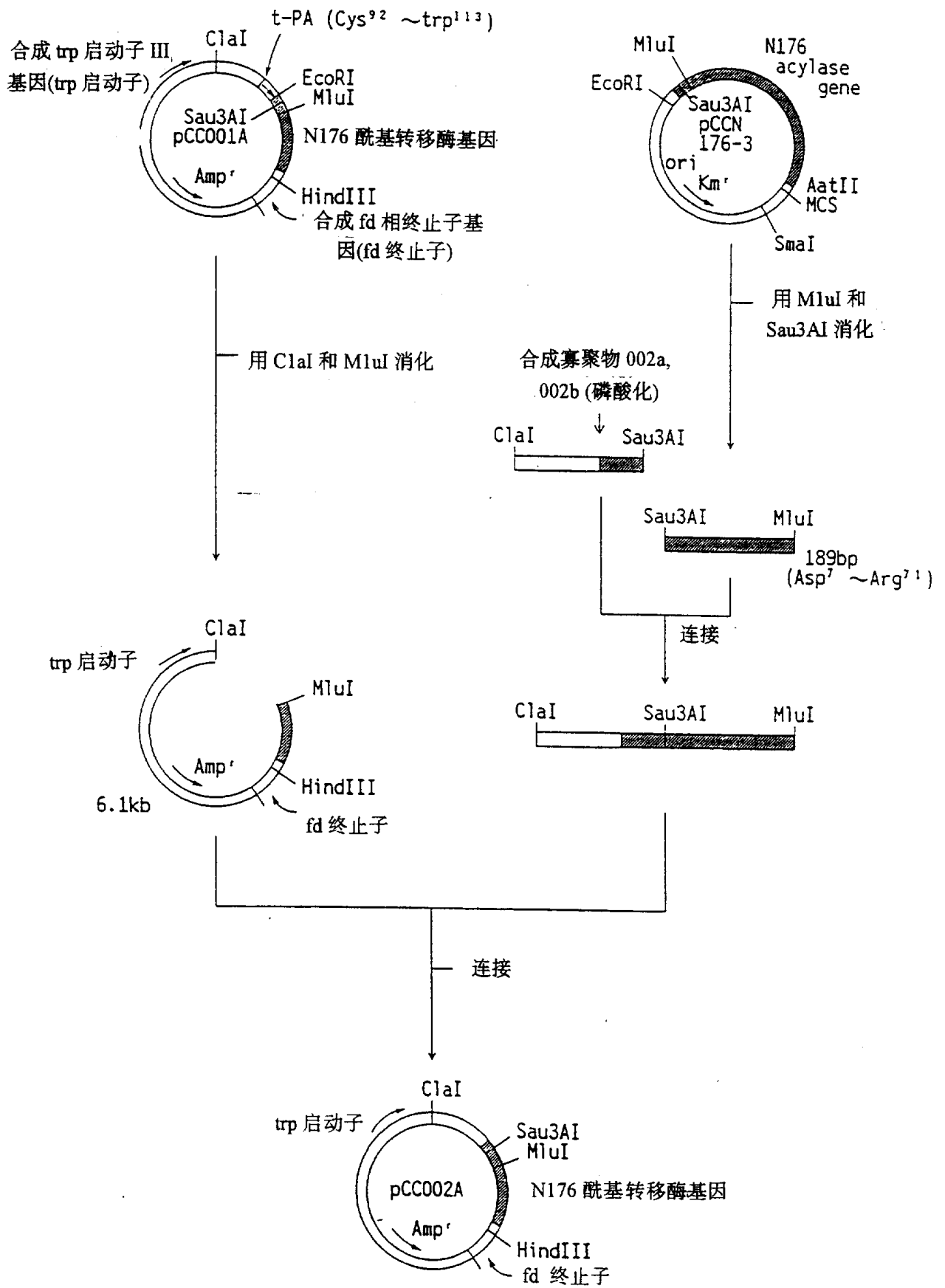


图 4

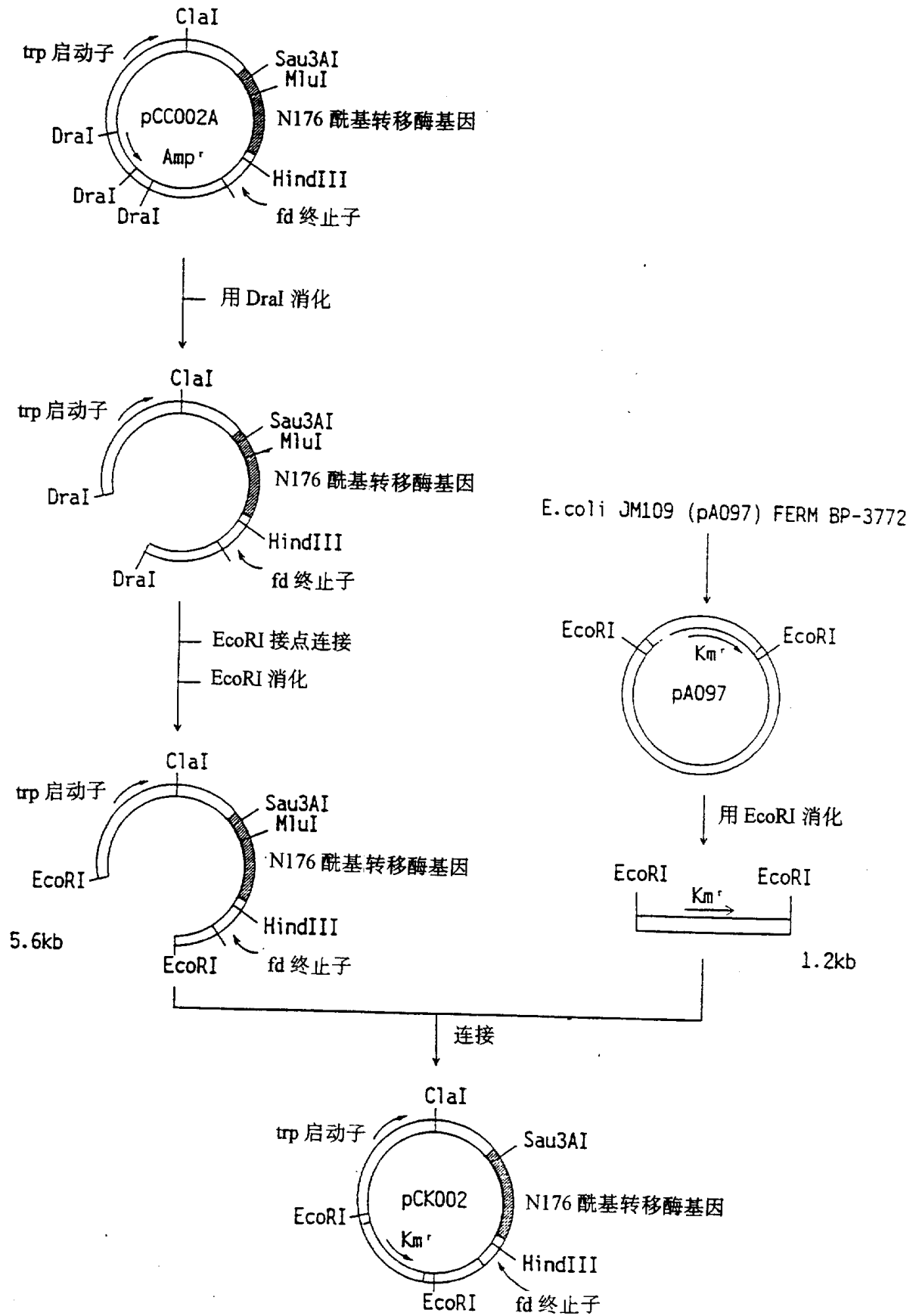


图 5

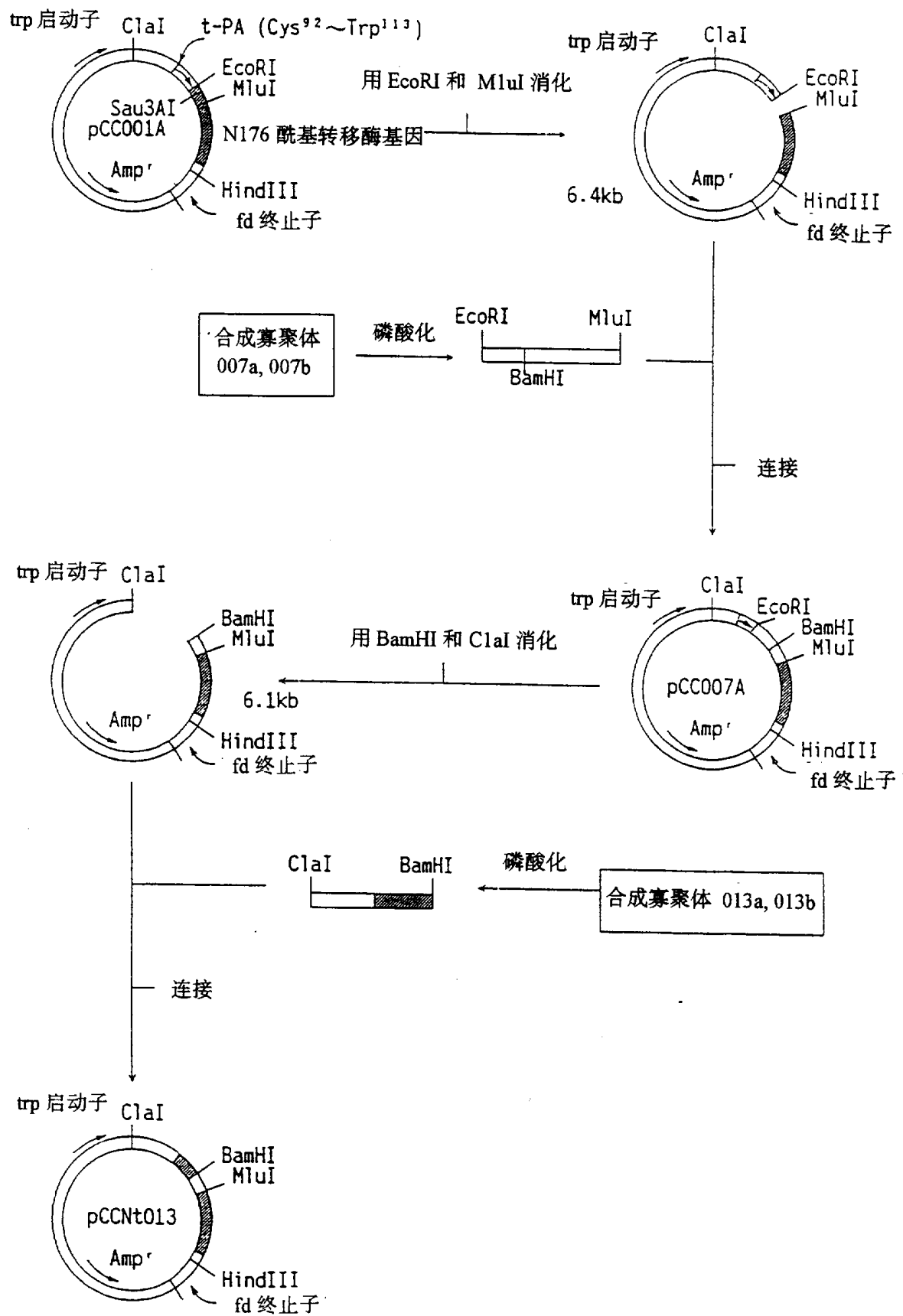


图 6

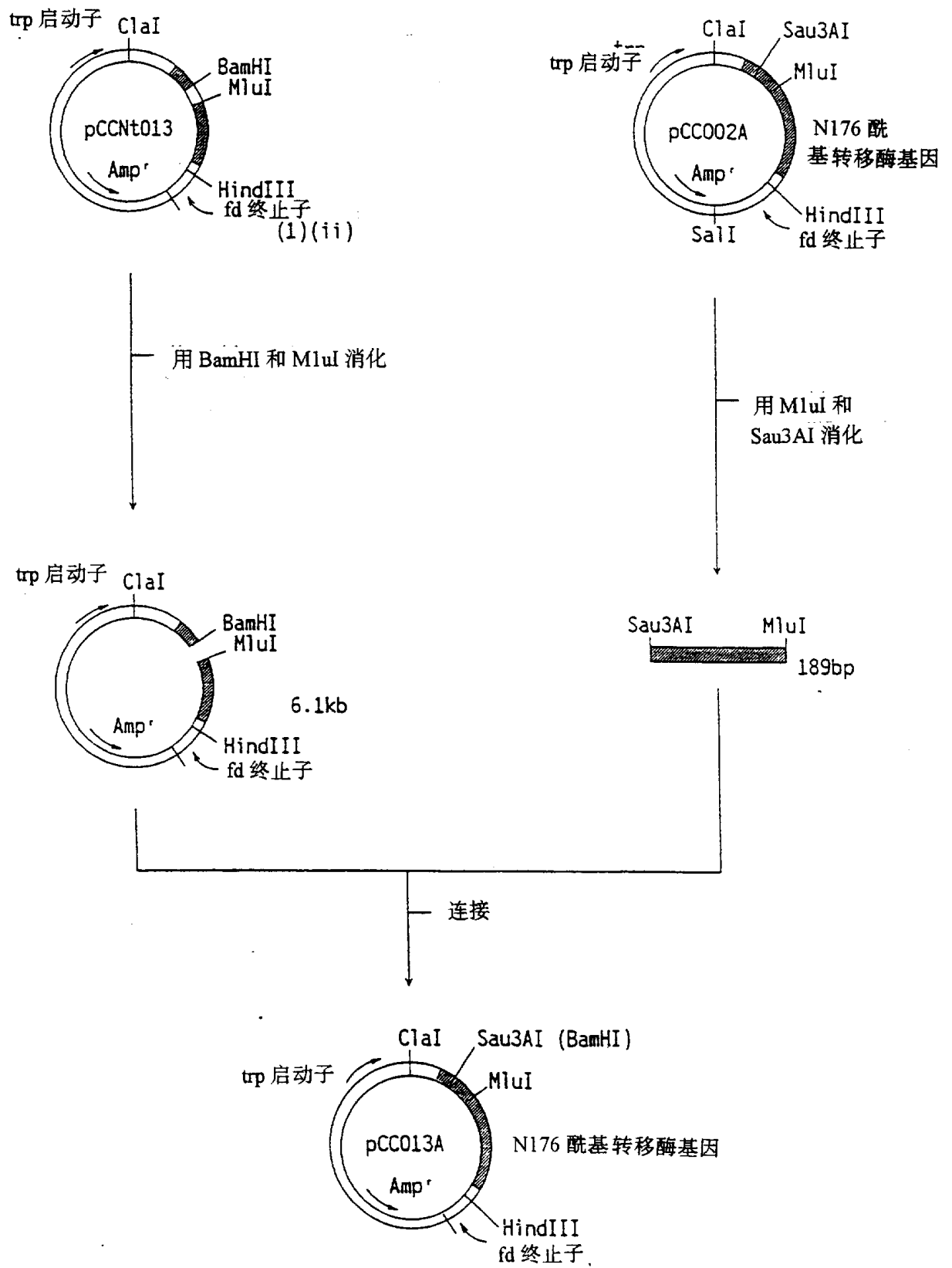


图 7

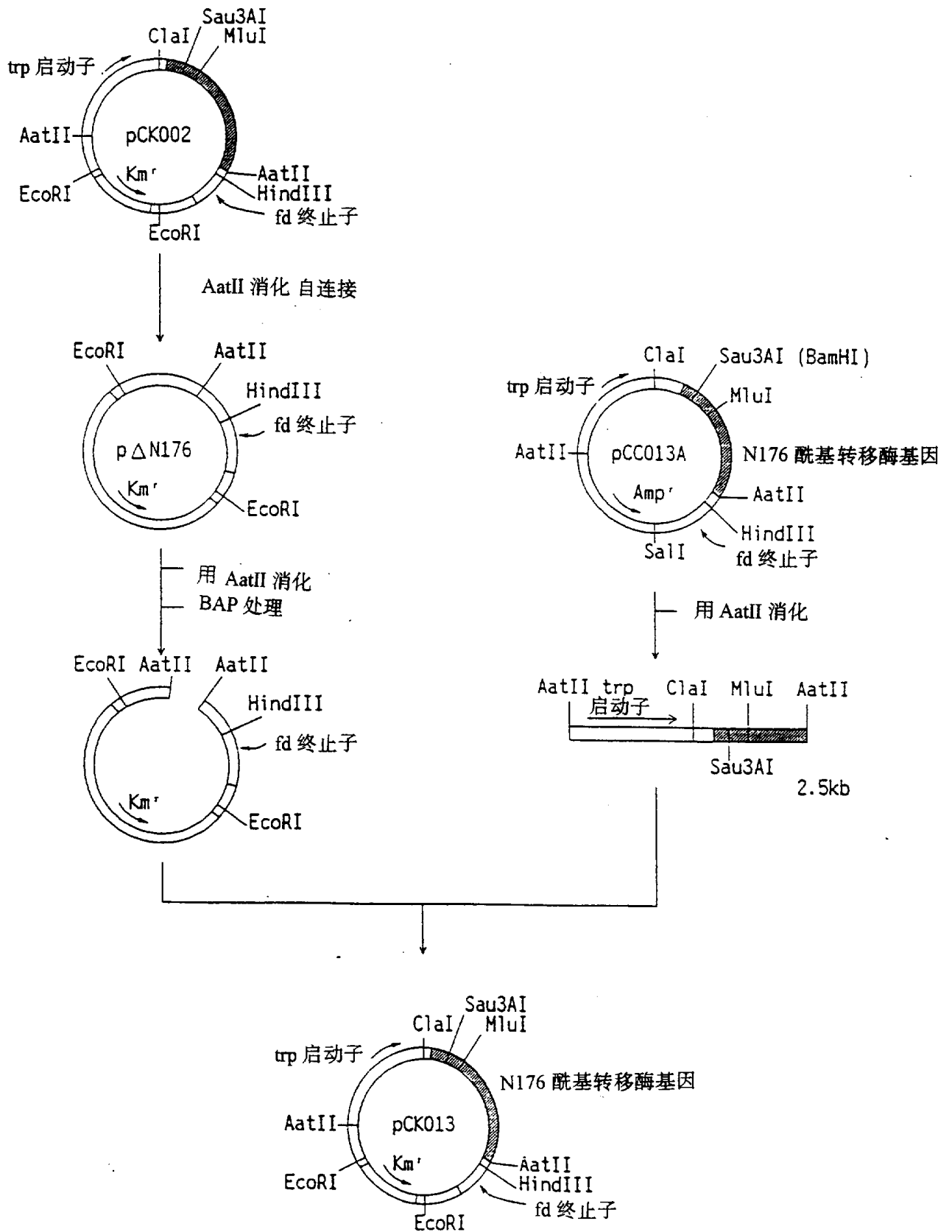


图 8

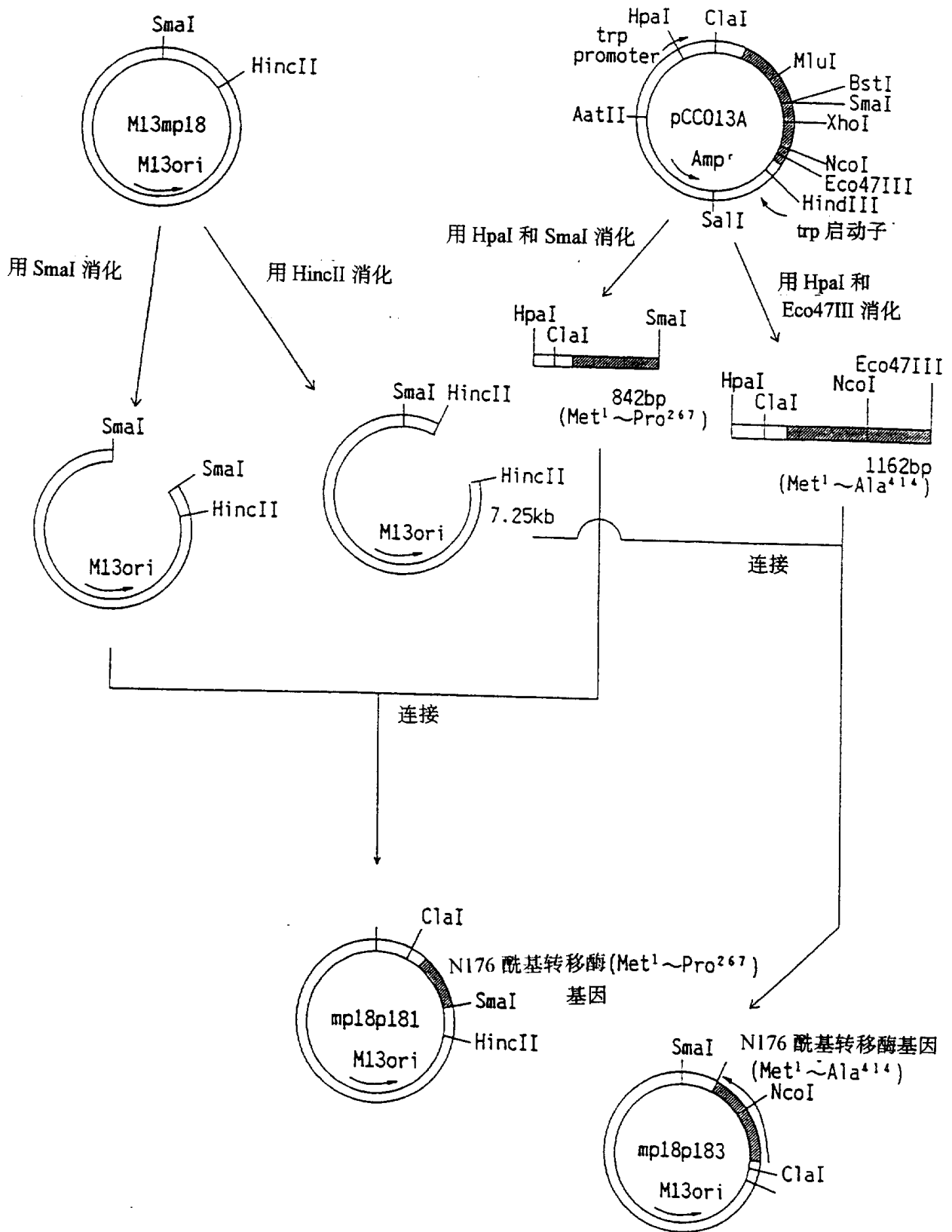


图 9

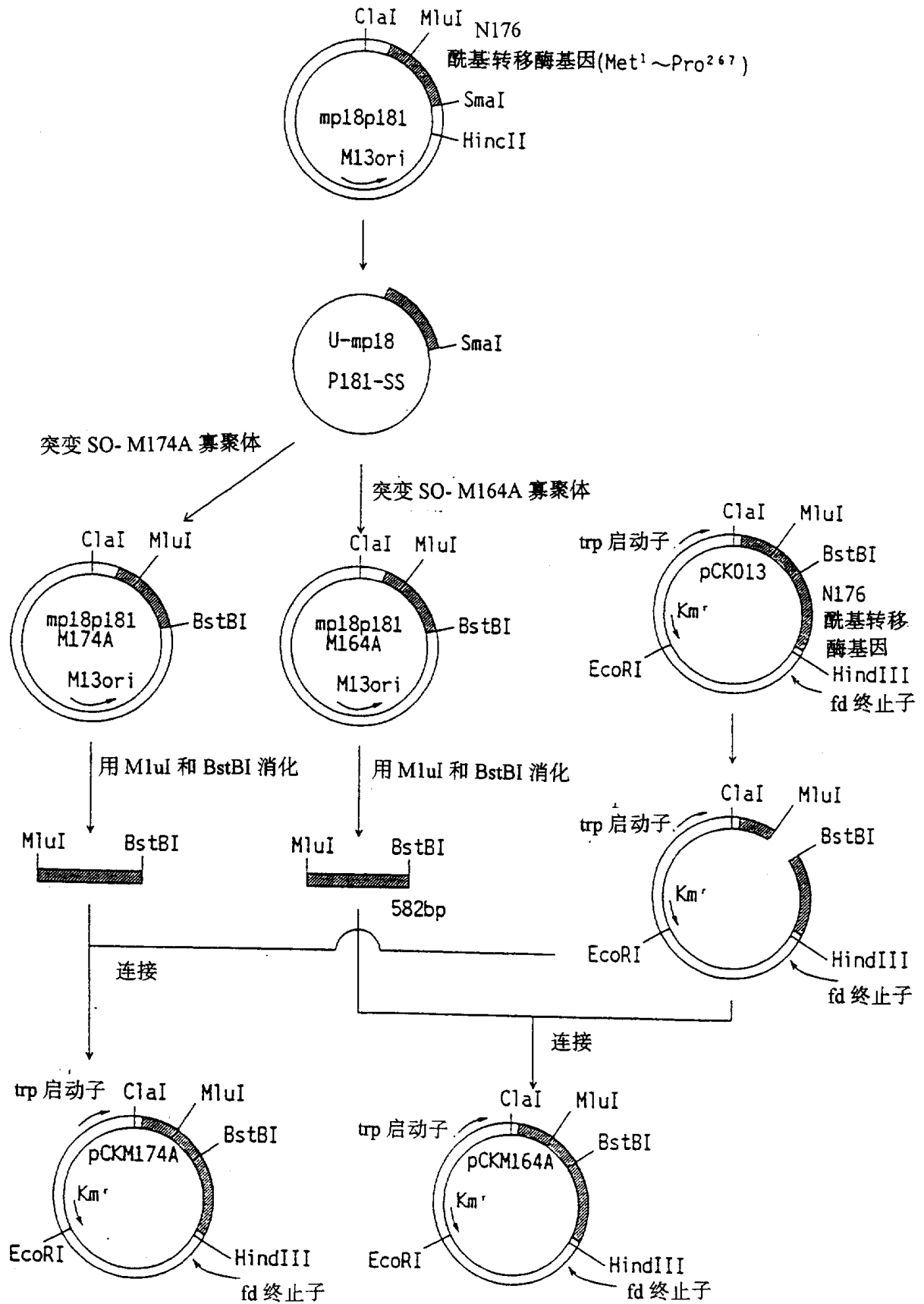


图 1 ○

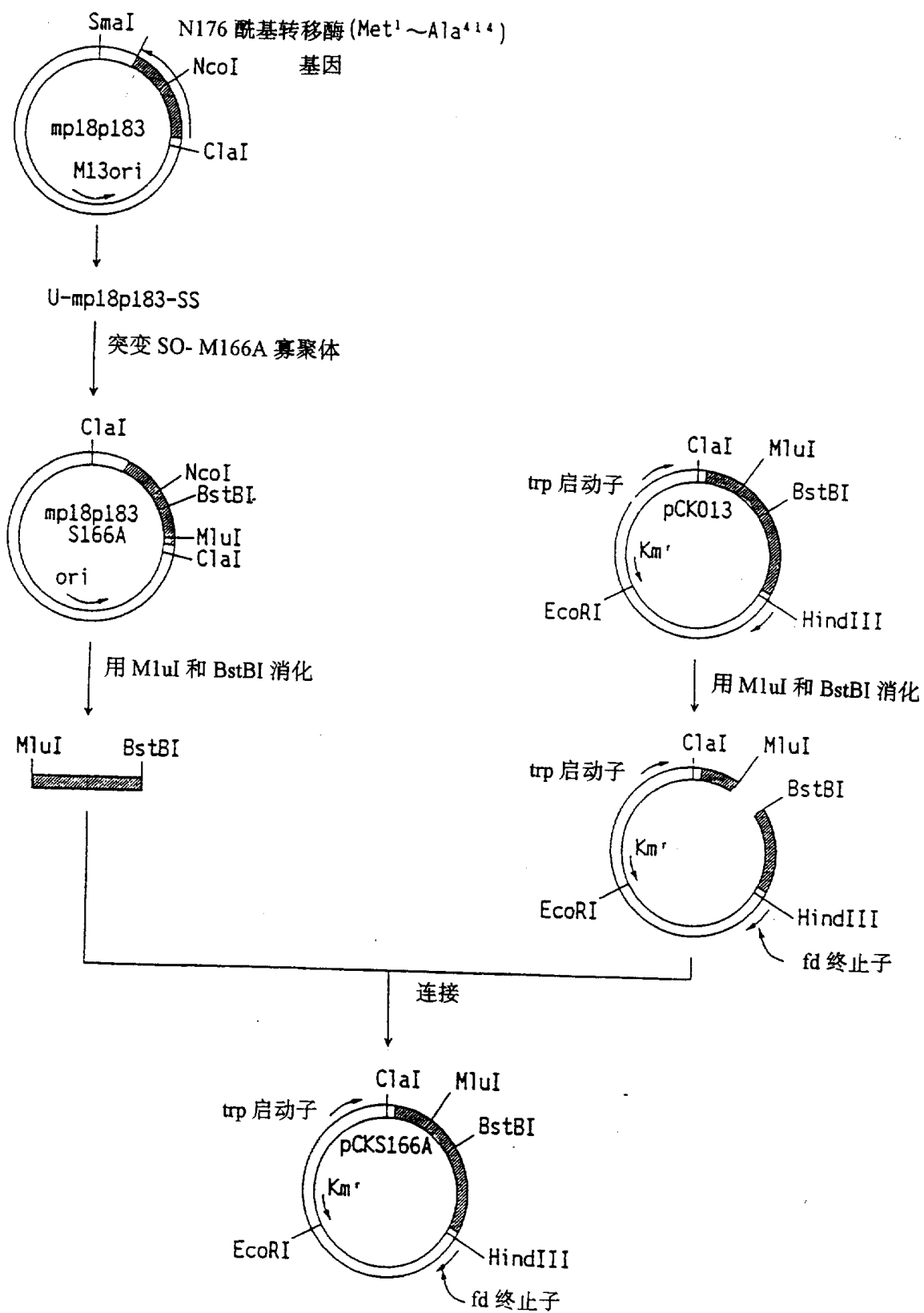
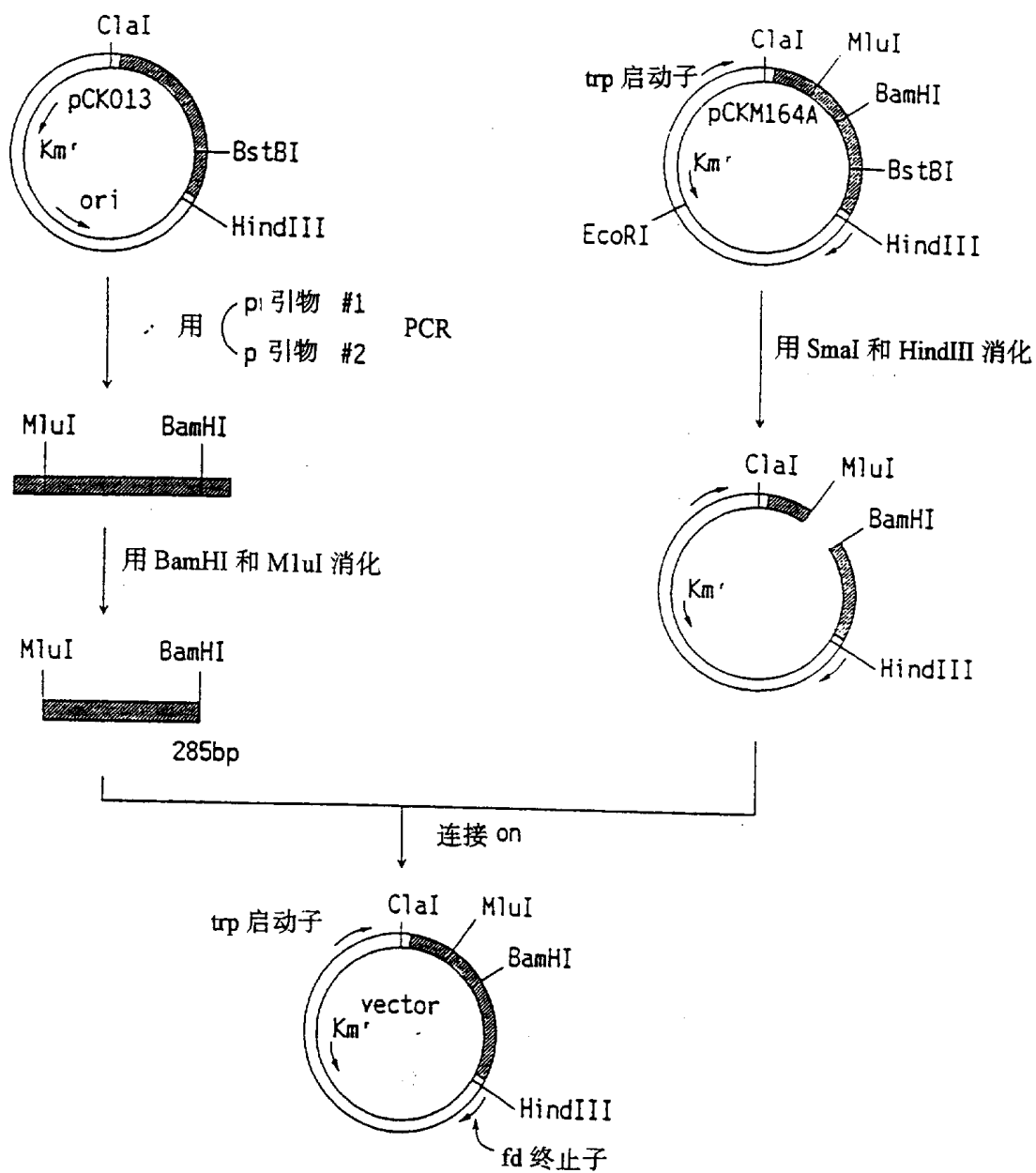
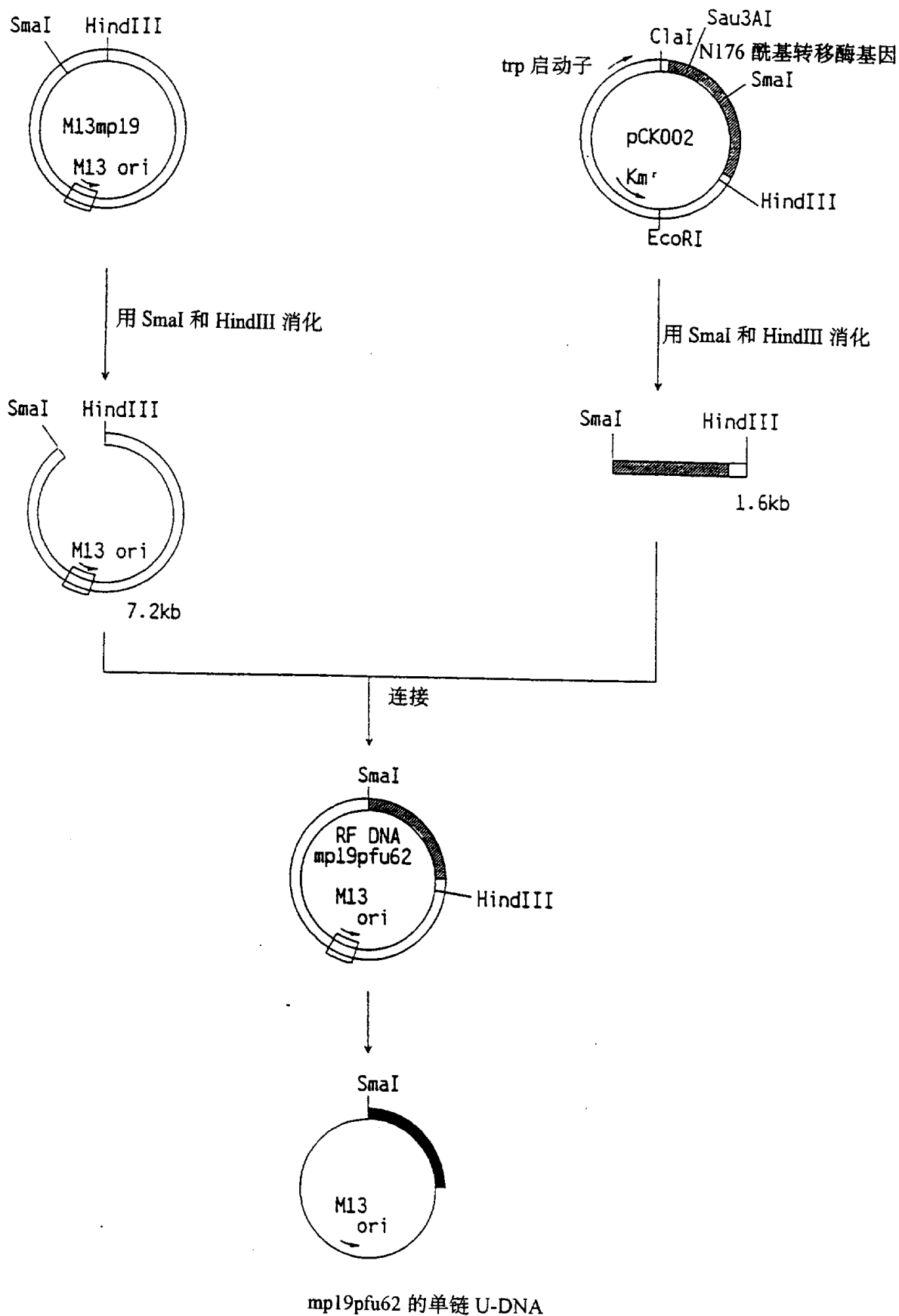


图 1 1



实施例 5	引物 #1	引物 #2	载体
(1)	S0-MluFor	S0-M164L	pCKM164L
(2)	S0-MluFor	S0-M164G	pCKM164G

图 1 2



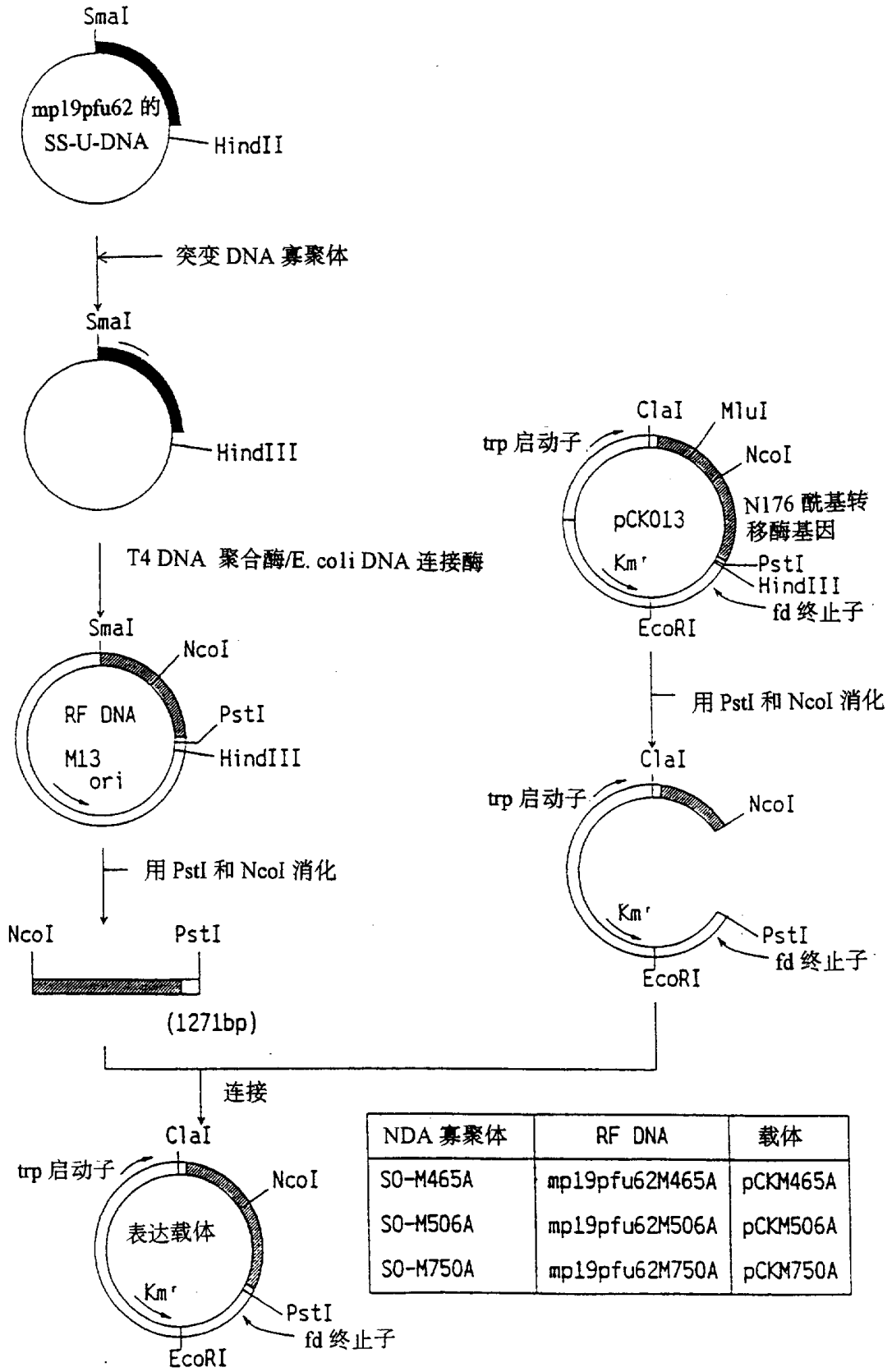


图 1 4

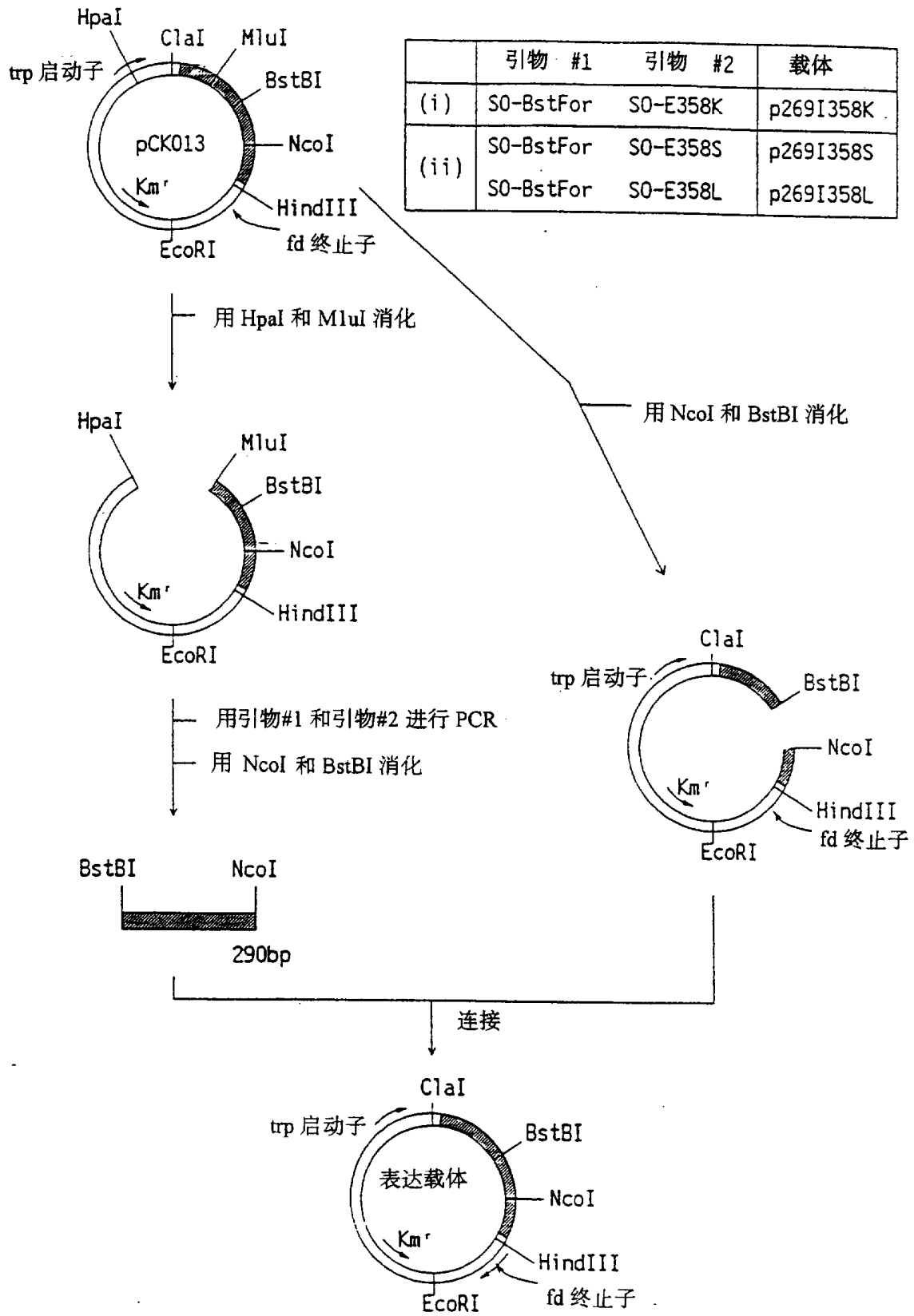
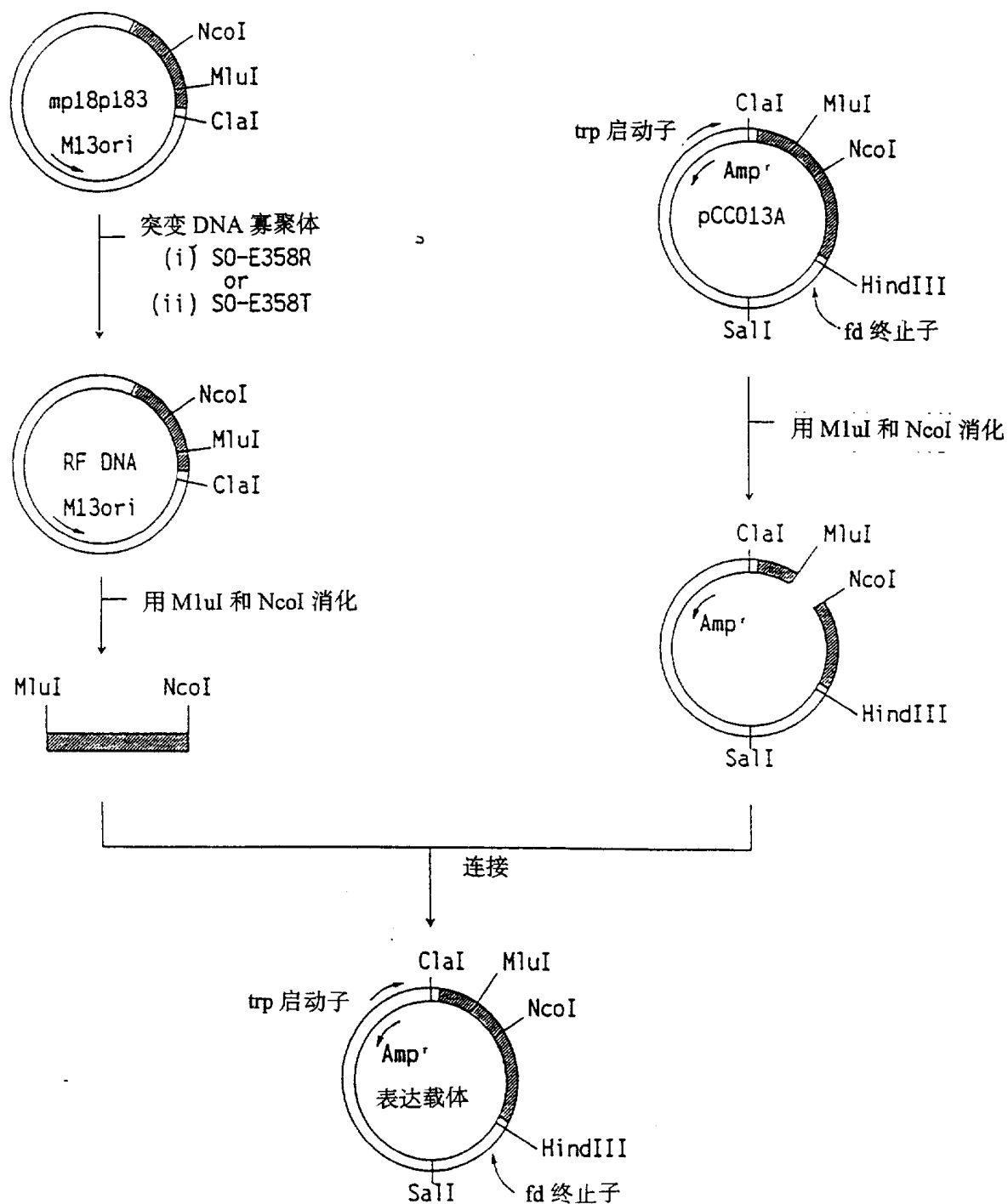
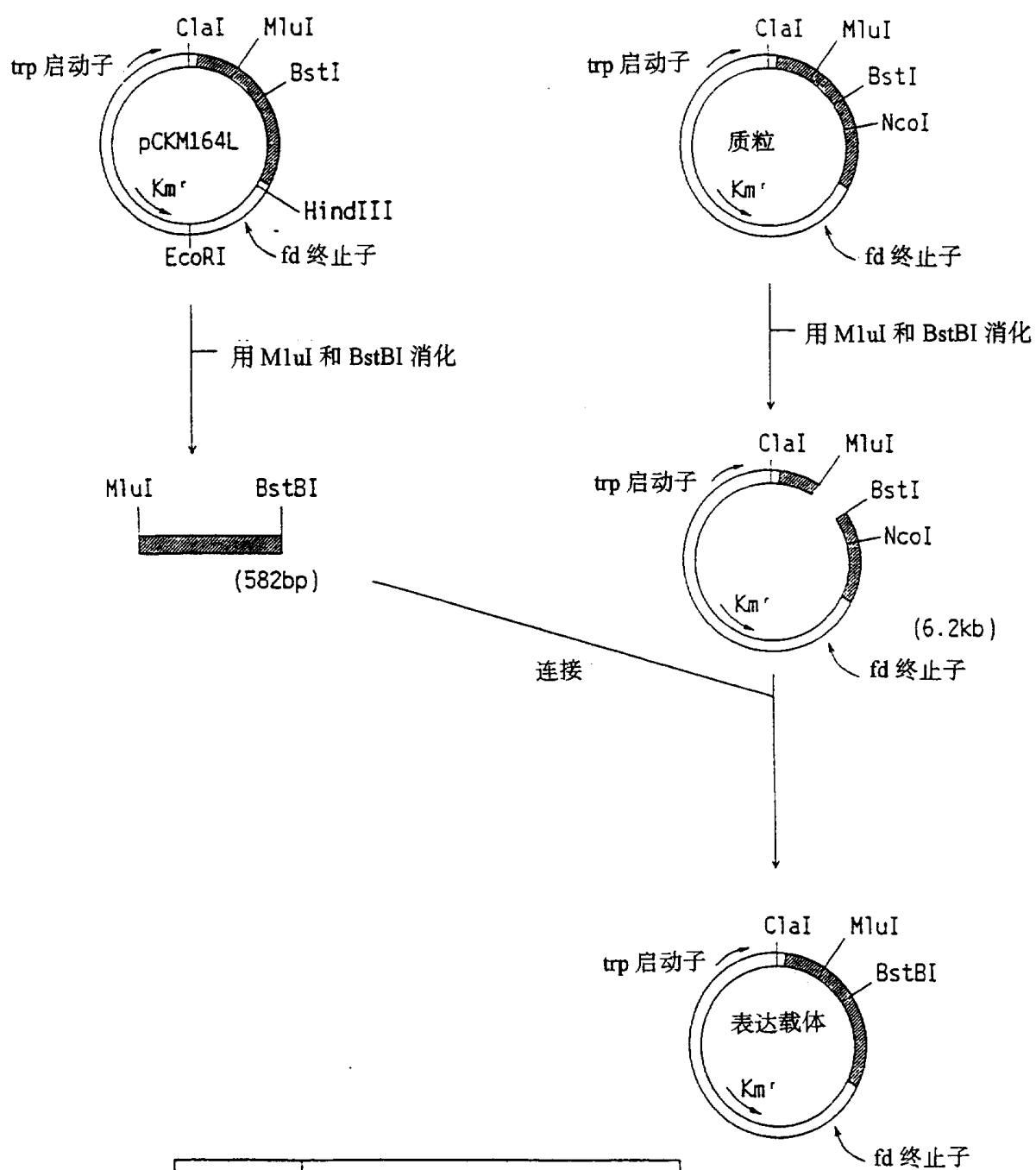


图 1 5



	RF DNA	载体
(i)	mp18p183E358R	pCCE358R
(ii)	mp18p183E358T	pCCE358T

图 1 6



实施例 8	质粒	载体
(1)(i)	pCKM269Y	p164L269Y
(ii)	pCKM269F	p164L269F
(iii)	p269Y305S	p164L269Y305S

图 1 7

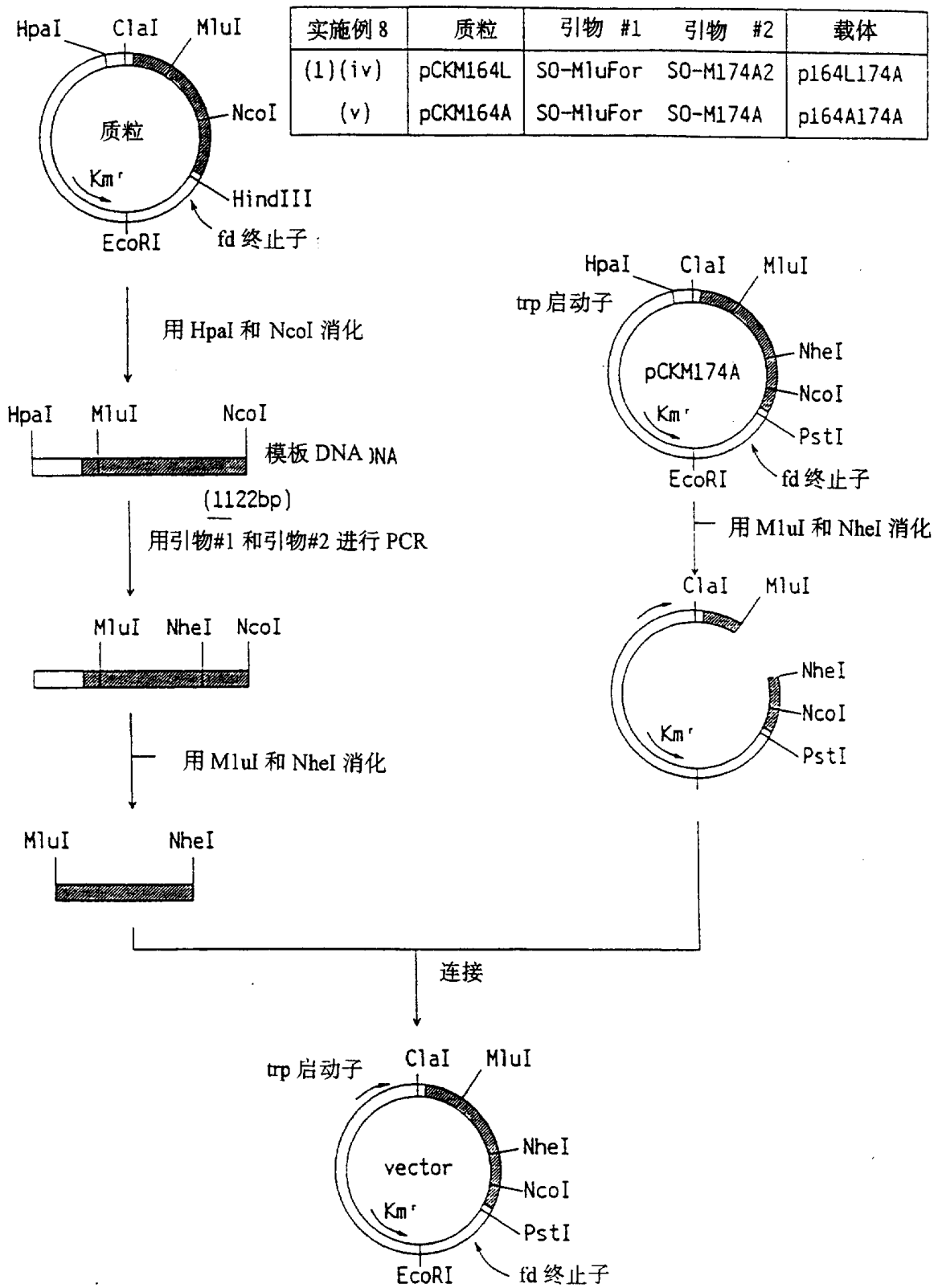
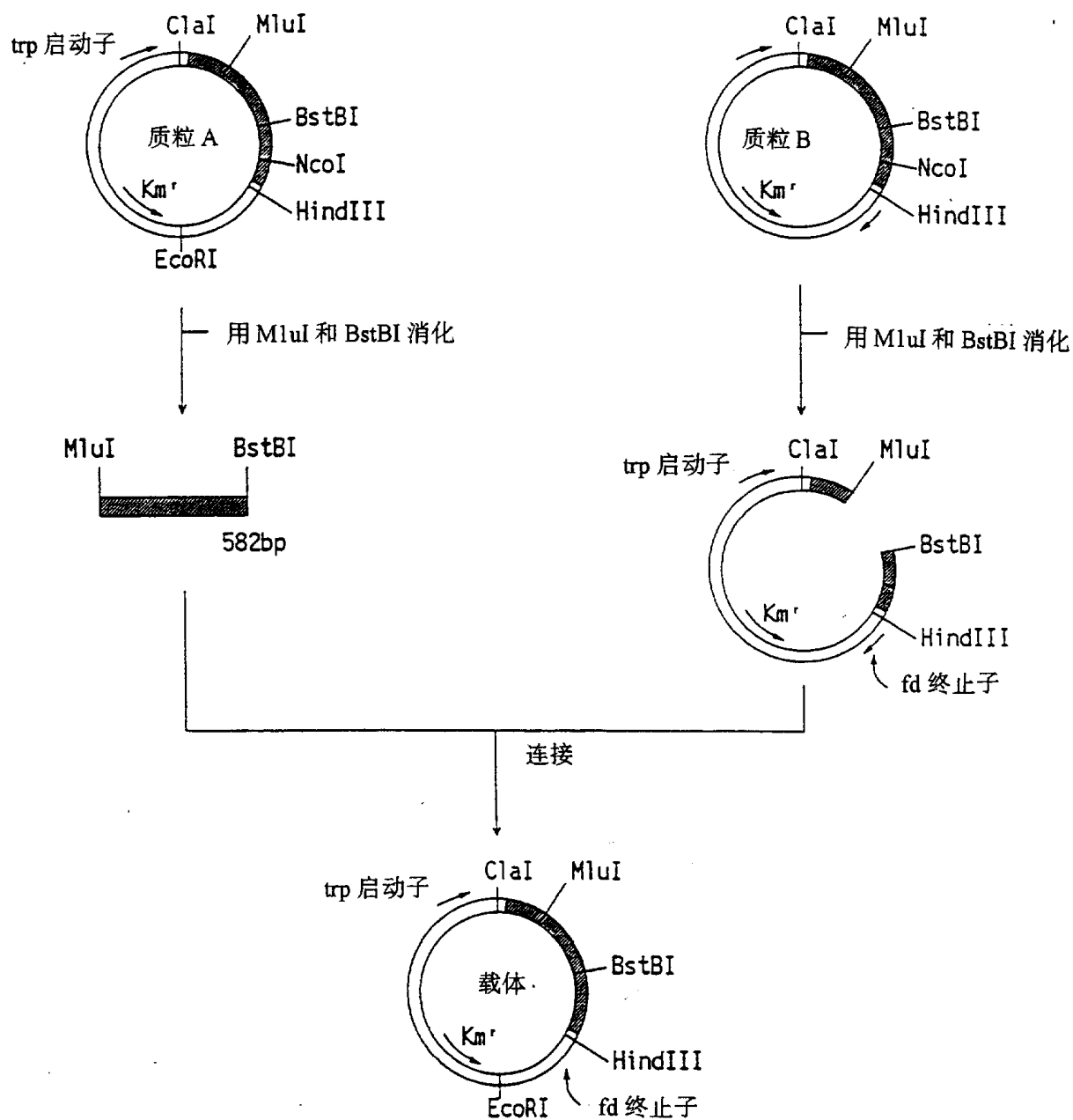


图 1 8



	质粒 A	质粒 B	载体
(vi)	pCKM164A	pCKM269Y	p164A269Y
(vii)	p164L174A	pCKM269Y	p164L174A269Y
	"	pCKM269F	p164L174A269F
	"	p269Y305S	p164A174A269Y305S

图 1 9

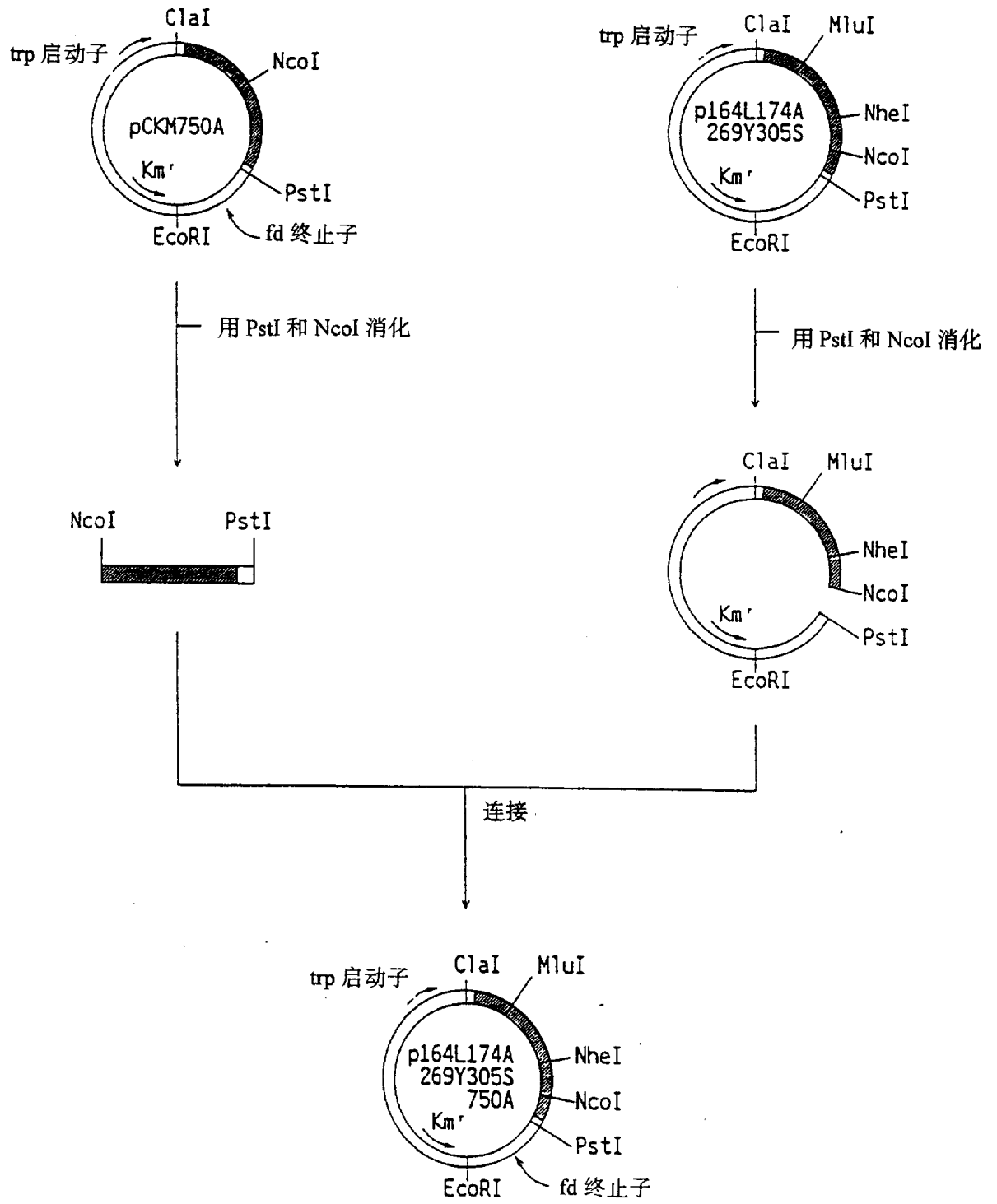


图 20

mp18p181 的 SS-U-DNA
DNA 寡聚体 SO-A49L

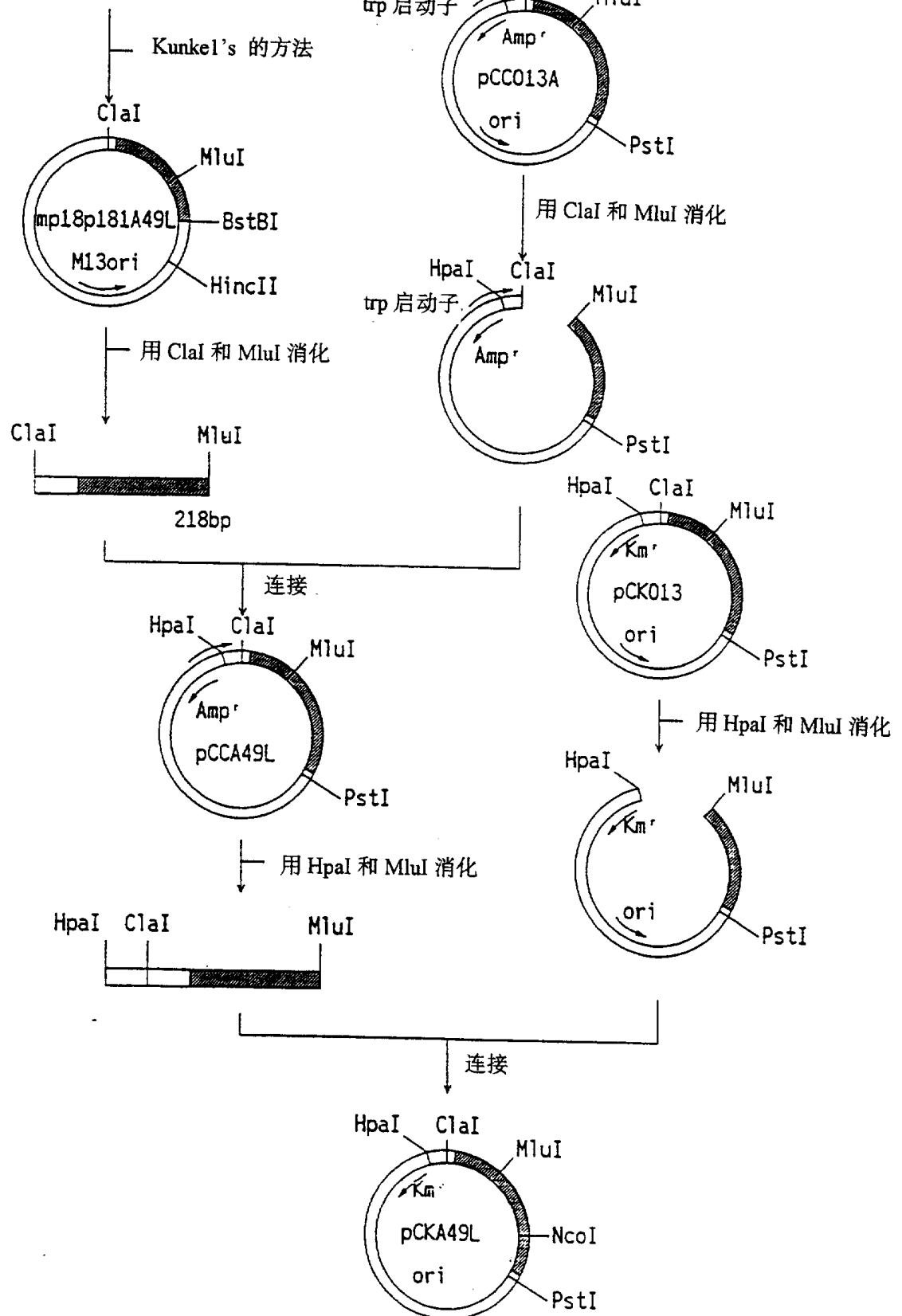


图 2 1

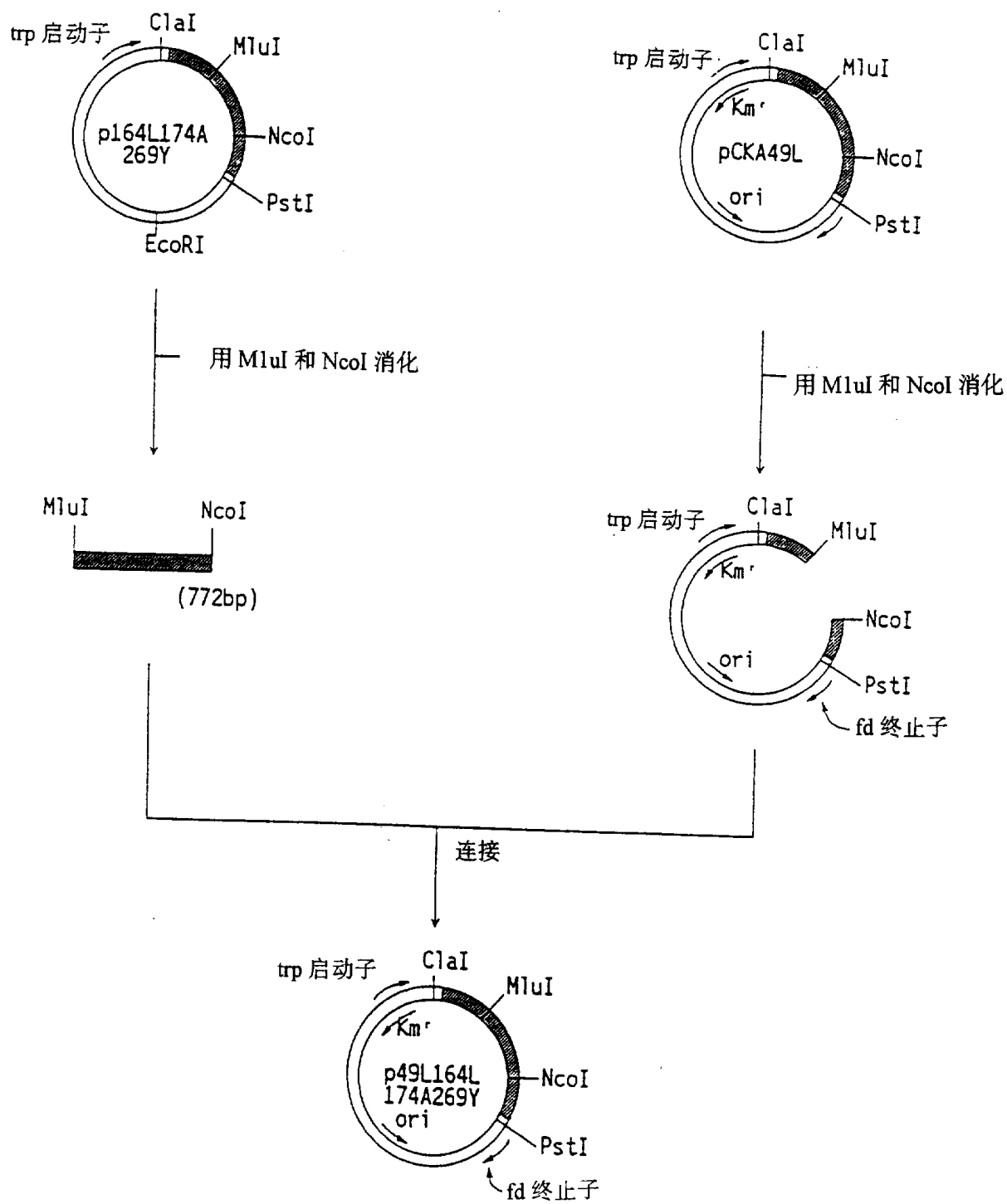


图 2 2 A

DNA 序列名称(1): M164A (1-2325)

```

      10      20      30      40      50      60
ATGACTATGGCAGCTAATACGGATCGCGCGGTCTTGCAGGCGGCGCTGCCGCCGCTTTCC
M T M A A N T D R A V L Q A A L P P L S

      70      80      90     100     110     120
GGCAGCCTCCCCATTCCCGGATTGAGCGCGTCCGTCCGCGTCCGGCGCGATGCCTGGGGC
G S L P I P G L S A S V R V R R D A W G

     130     140     150     160     170     180
ATCCCGCATATCAAGGCCTCGGGCGAGGCCGATGCCTATCGGGCGCTGGGCTTCGTCCAT
I P H I K A S G E A D A Y R A L G F V H

     190     200     210     220     230     240
TCGCAGGACCGTCTTTTCCAGATGGAGCTGACGCGTCGCAAGGCGCTGGGACGCGCGGCC
S Q D R L F Q M E L T R R K A L G R A A

     250     260     270     280     290     300
GAATGGCTGGGCGCCGAGGCCGCGAGGCCGATATCCTCGTGCGCCGGCTCGGAATGGAA
E W L G A E A A E A D I L V R R L G M E

     310     320     330     340     350     360
AAAGTCTGCCGGCGCGACTTCGAGGCCTTGGGCGTCGAGGCGAAGGACATGCTGCGGGCT
K V C R R D F E A L G V E A K D M L R A

     370     380     390     400     410     420
TATGTCGCCGGCGTGAACGCATTCTGGCTTCCGGTGCTCCCCTGCCTGTCTGAATACGGA
Y V A G V N A F L A S G A P L P V E Y G

     430     440     450     460     470     480
TTGCTCGGAGCAGAGCCGGAGCCCTGGGAGCCTTGGCACAGCATCGCGGTGATGCGCCGG
L L G A E P E P W E P W H S I A V M R R

     490     500     510     520     530     540
CTGGGCCTGCTTGCGGGATCCGTGTGGTTCAAGCTCTGGCGGATGCTGGCGCTGCCGGTG
L G L L A G S V W F K L W R M L A L P V

     550     560     570     580     590     600
GTCGGAGCCGCGAATGCGCTGAAGCTGCGCTATGACGATGGCGGCCGGGATTTGCTCTGC
V G A A N A L K L R Y D D G G R D L L C

     610     620     630     640     650     660
ATCCCGCCGGGCGCCGAAGCCGATCGGCTCGAGGCGGATCTCGCGACCCTGCGGCCCGCG
I P P G A E A D R L E A D L A T L R P A

     670     680     690     700     710     720
GTCGATGCGCTGCTGAAGGCGATGGGCGGCGATGCCTCCGATGCTGCCGGCGGCGGCGAGC
V D A L L K A M G G D A S D A A G G G S

     730     740     750     760     770     780
AACAACTGGGCGGTCTGCTCCGGGCGCGACGGCGACCGGCAGGCCGATCCTCGCGGGCGAT
N N W A V A P G R T A T G R P I L A G D

```

图 2 2 B

790 800 810 820 830 840
CCGCATCGCGTCTTCGAAATCCCGGGCATGTATGCGCAGCATCATCTGGCCTGCCACCGG
P H R V F E I P G M Y A Q H H L A C D R

850 860 870 880 890 900
TTCGACATGATCGGCCTGACCGTGCCGGGCGTGCCGGGCTTCCCGCACTTCGCGCATAAC
F D M I G L T V P G V P G F P H F A H N

910 920 930 940 950 960
GGCAAGGTCGCCTATTGCGTCACCCATGCCTTCATGGACATCCACGATCTCTATCTCGAG
G K V A Y C V T H A F M D I H D L Y L E

970 980 990 1000 1010 1020
CAGTTCGCGGGGAGGGCCGCACTGCGCGGTTTCGGCAACGATTTTCGAGCCCGTCGCCTGG
Q F A G E G R T A R F G N D F E P V A W

1030 1040 1050 1060 1070 1080
AGCCGGGACCGTATCGCGGTCCGGGGTGCGCGCGATCGCGAGTTTCGATATCGTCGAGACG
S R D R I A V R G G A D R E F D I V E T

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CGCCATGGCCCGGTTATCGCGGGCGATCCGCGCGATGGCGCAGCGCTCACGCTGCGTTTCG
R H G P V I A G D P R D G A A L T L R S

1150 1160 1170 1180 1190 1200
GTCCAGTTCGCCGAGACCGATCTGTCCTTCGACTGCCTGACGCGGATGCCGGGCGCATCG
V Q F A E T D L S F D C L T R M P G A S

1210 1220 1230 1240 1250 1260
ACCGTGGCCAGCTCTACGACGCGACGCGCGGCTGGGGCCTGATCGACCATAACCTCGTC
T V A Q L Y D A T R G W G L I D H N L V

1270 1280 1290 1300 1310 1320
GCCGGGGATGTCGCGGGCTCGATCGGCCATCTGGTCCGCGCCCGCGTTCCGTCCCGTCCG
A G D V A G S I G H L V R A R V P S R P

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CGCGAAAACGGCTGGCTGCCGGTGCCGGGCTGGTCCGGCGAGCATGAATGGCGGGGCTGG
R E N G W L P V P G W S G E H E W R G W

1390 1400 1410 1420 1430 1440
ATTCGCGACGAGGCGATGCCGCGGTGATCGATCCGCCGGGCGGCATCATCGTCACGGCG
I P H E A M P R V I D P P G G I I V T A

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AATAATCGCGTCGTGGCCGATGACCATCCCGATTATCTGTGCACCGATTGCCATCCGCCC
N N R V V A D D H P D Y L C T D C H P P

1510 1520 1530 1540 1550 1560
TACCGCGCCGAGCGCATCATGAAGCGCCTGGTCCGCAATCCGGCTTTTCGCCGTCGACGAT
Y R A E R I M K R L V A N P A F A V D D

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GCCGCGCGATCCATGCCGATACGCTGTCGCCCCATGTCGGGTTGCTGCGCCGGAGGCTC
A A A I H A D T L S P H V G L L R R R L

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GAGGCGCTTGAGCCCGCGACGACTCCGCGGCCGAAGGGCTGAGGCAGATGCTCGTCGCC
 E A L G A R D D S A A E G L R Q M L V A
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 TGGGACGGCCGCATGGATGCGGCTTCGGAGGTGCGCTCTGCCTACAATGCGTTCCGCAGG
 W D G R M D A A S E V A S A Y N A F R R
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GCGCTGACGCGGCTGGTGACGGACCGCAGCGGGCTGGAGCAGGCGATATCGCATCCCTTC
 A L T R L V T D R S G L E Q A I S H P F
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 GCGGCTGTCGCGCCGGGCGTCTCACCGCAAGGCCAGGTCTGGTGGGCCGTGCCGACCCTG
 A A V A P G V S P Q G Q V W W A V P T L
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 CTGCGCGACGACGATGCCGAATGCTGAAGGGCTGGAGCTGGGACCAGGCCTTGTCTGAG
 L R D D D A G M L K G W S W D Q A L S E
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 GCCCTCTCGGTGCGCTCGCAGAACCTGACCGGGCGAAGCTGGGGCGAAGAGCATCGGCCG
 A L S V A S Q N L T G R S W G E E H R P
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CGCTTCACGCATCCGCTTGCCACGCAATTCCCGGCCTGGGCGGGGCTGCTGAATCCGGCT
 R F T H P L A T Q F P A W A G L L N P A
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TCCCGTCCGATCGGTGGCGATGGCGATACCGTGCTGGCGAACGGGCTCGTCCCGTCAGCC
 S R P I G G D G D T V L A N G L V P S A
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 GGGCCGCAGGCGACCTATGGTGCCCTGTCGCGCTACGTCTTCGATGTGCGGCAATTGGGAC
 G P Q A T Y G A L S R Y V F D V G N W D
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 AATAGCCGCTGGGTGCTCTTCCACGGCGCCTCCGGGCATCCGGCCAGCGCCCATATTGCC
 N S R W V V F H G A S G H P A S A H Y A
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 GATCAGAATGCGCCCTGGAGCGACTGTGCGATGGTGCCGATGCTCTATAGCTGGGACAGG
 D Q N A P W S D C A M V P M L Y S W D R
 2290 2300 2310 2320
 ATCGCGGCAGAGGCCGTGACGTGCGAGGAACCTCGTCCCGGCCTGA
 I A A E A V T S Q E L V P A *

图 2 3 A

DNA 序列名称(1): S166A (1-2325)

```

      10      20      30      40      50      60
ATGACTATGGCAGCTAATACGGATCGCGCGGTCTTGCAGGCGGCGCTGCCGCCGCTTTCC
M T M A A N T D R A V L Q A A L P P L S

      70      80      90     100     110     120
GGCAGCCTCCCCATTCCCGGATTGAGCGCGTCCGTCCGCGCGATGCCTGGGGC
G S L P I P G L S A S V R V R R D A W G

     130     140     150     160     170     180
ATCCCGCATATCAAGGCCTCGGGCGAGGCCGATGCCTATCGGGCGCTGGGCTTCGTCCAT
I P H I K A S G E A D A Y R A L G F V H

     190     200     210     220     230     240
TCGCAGGACCGTCTTTTCCAGATGGAGCTGACGCGTCGCAAGGCGCTGGGACGCGCGGCC
S Q D R L F Q M E L T R R K A L G R A A

     250     260     270     280     290     300
GAATGGCTGGGCGCCGAGGCCGCGGAGGCCGATATCCTCGTGCGCCGGCTCGGAATGGAA
E W L G A E A A E A D I L V R R L G M E

     310     320     330     340     350     360
AAAGTCTGCCGCGCGACTTCGAGGCCTTGGGCGTCGAGGCGAAGGACATGCTGCGGGCT
K V C R R D F E A L G V E A K D M L R A

     370     380     390     400     410     420
TATGTCGCCGCGCTGAACGCATTCCTGGCTTCCGGTGCTCCCCTGCCTGTCTGAATACGGA
Y V A G V N A F L A S G A P L P V E Y G

     430     440     450     460     470     480
TTGCTCGGAGCAGAGCCGAGCCCTGGGAGCCTTGGCACAGCATCGCGGTGATGCGCCGG
L L G A E P E P W E P W H S I A V M R R

     490     500     510     520     530     540
CTGGGCCTGCTTATGGGTGCGGTGTGGTTCAAGCTTTGGCGGATGCTGGCGCTGCCGGTG
L G L L M G A V W F K L W R M L A L P V

     550     560     570     580     590     600
GTCGGAGCCGCGAATGCGCTGAAGCTGCGCTATGACGATGGCGGCCGGGATTGCTCTGC
V G A A N A L K L R Y D D G G R D L L C

     610     620     630     640     650     660
ATCCCGCCGGGCGCCGAAGCCGATCGGCTCGAGGCGGATCTCGCGACCCTGCGGCCCGCG
I P P G A E A D R L E A D L A T L R P A

     670     680     690     700     710     720
GTCGATGCGCTGCTGAAGGCGATGGGCGGCGATGCCTCCGATGCTGCCGGCGGCGGCAGC
V D A L L K A M G G D A S D A A G G G S

     730     740     750     760     770     780
AACAACTGGGCGGTCTGCTCCGGGCCGACGGCGACCGGCAGGCCGATCCTCGCGGGCGAT
N N W A V A P G R T A T G R P I L A G D -

```

2 3 B

790 800 810 820 830 840
CCGCATCGCGTCTTCGAAATCCCGGGCATGTATGCGCAGCATCATCTGGCCTGCGACCGG
P H R V F E I P G M Y A Q H H L A C D R

850 860 870 880 890 900
TTCGACATGATCGGCCTGACCGTGCCGGGCGTGCCGGGCTTCCCGCACTTCGCGCATAAC
F D M I G L T V P G V P G F P H F A H N

910 920 930 940 950 960
GGCAAGGTGCGCTATTGCGTCACCCATGCCTTCATGGACATCCACGATCTCTATCTCGAG
G K V A Y C V T H A F M D I H D L Y L E

970 980 990 1000 1010 1020
CAGTTCGCGGGGGAGGGCCGCACTGCGCGGTTGCGCAACGATTTGAGCCCGTCGCTGG
Q F A G E G R T A R F G N D F E P V A W

1030 1040 1050 1060 1070 1080
AGCCGGGACCGTATCGCGGTCCGGGGTGGCGCCGATCGCGAGTTCGATATCGTCGAGACG
S R D R I A V R G G A D R E F D I V E T

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CGCCATGGCCCGGTTATCGCGGGCGATCCGCGCGATGGCGCAGCGCTCACGCTGCGTTCC
R H G P V I A G D P R D G A A L T L R S

1150 1160 1170 1180 1190 1200
GTCCAGTTGCGCCGAGACCGATCTGTCCTTCGACTGCCTGACGCGGATGCCGGGGCGCATCG
V Q F A E T D L S F D C L T R M P G A S

1210 1220 1230 1240 1250 1260
ACCGTGGCCAGCTCTACGACGCGACGCGGGCTGGGGCCTGATCGACCATAACCTCGTC
T V A Q L Y D A T R G W G L I D H N L V

1270 1280 1290 1300 1310 1320
GCCGGGGATGTGCGGGGCTCGATCGGCCATCTGGTCCGCGCCCGCGTTCCGTCCCGTCCG
A G D V A G S I G H L V R A R V P S R P

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CGCGAAAACGGCTGGCTGCCGGTGCCGGGCTGGTCCGGCGAGCATGAATGGCGGGGCTGG
R E N G W L P V P G W S G E H E W R G W

1390 1400 1410 1420 1430 1440
ATTCCGCACGAGGCGATGCCGCGCGTGATCGATCCGCGGGCGGCATCATCGTCACGGCG
I P H E A M P R V I D P P G G I I V T A

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AATAATCGCGTCGTGGCCGATGACCATCCCGATTATCTCTGCACCGATTGCCATCCGCCC
N N R V V A D D H P D Y L C T D C H P P

1510 1520 1530 1540 1550 1560
TACCGCGCCGAGCGCATCATGAAGCGCCTGGTCCGCAATCCGGCTTTCGCCGTCGACGAT
Y R A E R I M K R L V A N P A F A V D D

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GCCGCGCGATCCATGCCGATACGCTGTGCCCCATGTGCGGGTTGCTGCGCCGGAGGCTC
A A A I H A D T L S P H V G L L R R R L

图 2 3 C

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GAGGCGCTTGGAGCCCCGCGACGACTCCGCGGCCGAAGGGCTGAGGCAGATGCTCGTCGCC
 E A L G A R D D S A A E G L R Q M L V A
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 TGGGACGGCCGCATGGATGCGGCTTCGGAGGTGCGCTCTGCCTACAATGCGTTCCGCGAGG
 W D G R M D A A S E V A S A Y N A F R R
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GCGCTGACGCGGCTGGTGACGGACCGCAGCGGGCTGGAGCAGGCGATATCGCATCCCTTC
 A L T R L V T D R S G L E Q A I S H P F
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 GCGGCTGTGCGCGCCGGGCGTCTCACCGCAAGGCCAGGTCTGGTGGGCGCGTGCCGACCCCTG
 A A V A P G V S P Q G Q V W W A V P T L
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 CTGCGCGACGACGATGCCGGAATGCTGAAGGGCTGGAGCTGGGACCAGGCCTTGTCTGAG
 L R D D D A G M L K G W S W D Q A L S E
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 GCCCTCTCGGTGCGCTGCGAGAACCTGACCGGGCGAAGCTGGGGCGAAGAGCATCGGCGCG
 A L S V A S Q N L T G R S W G E E H R P
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CGCTTCACGCATCCGCTTGCCACGCAATTCCCGGCCTGGGCGGGGCTGCTGAATCCGGCT
 R F T H P L A T Q F P A W A G L L N P A
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TCCCGTCCGATCGGTGGCGATGGCGATAACCGTGCTGGCGAACGGGCTCGTCCCGTCAGCC
 S R P I G G D G D T V L A N G L V P S A
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 GGGCCGCGAGGCGACCTATGGTGCCCTGTGCGGCTACGTCTTCGATGTGCGCAATTGGGAC
 G P Q A T Y G A L S R Y V F D V G N W D
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 AATAGCCGCTGGGTGCTCTTCCACGGCGCCTCCGGGCATCCGGCCAGCGCCCATATTATGCC
 N S R W V V F H G A S G H P A S A H Y A
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 GATCAGAATGCGCCCTGGAGCGACTGTGCGATGGTGCCGATGCTCTATAGCTGGGACAGG
 D Q N A P W S D C A M V P M L Y S W D R
 2290 2300 2310 2320
 ATCGCGGCAGAGGCCGTGACGTGCGCAGGAACCTCGTCCCGGCCTGA
 I A A E A V T S Q E L V P A *

DNA 序列名称(1): M269I/E358K (1-2325)

```

      10      20      30      40      50      60
ATGACTATGGCAGCTAATACGGATCGCGCGGTCTTGCAGGCGGCGCTGCCGCCGCTTTCC
M T M A A N T D R A V L Q A A L P P L S

      70      80      90     100     110     120
GGCAGCCTCCCCATTCCCGGATTGAGCGCGTCCGCTCCGCGTCCGGCGCGATGCCTGGGGC
G S L P I P G L S A S V R V R R D A W G

     130     140     150     160     170     180
ATCCCGCATATCAAGGCCTCGGGCGAGGCCGATGCCTATCGGGCGCTGGGCTTCGTCCAT
I P H I K A S G E A D A Y R A L G F V H

     190     200     210     220     230     240
TCGCAGGACCGTCTTTTCCAGATGGAGCTGACGCGTCGCAAGGCGCTGGGACGCGCGGCC
S Q D R L F Q M E L T R R K A L G R A A

     250     260     270     280     290     300
GAATGGCTGGGCGCCGAGGCCGCGAGGCCGATATCCTCGTGCGCCGGCTCGGAATGGAA
E W L G A E A A E A D I L V R R L G M E

     310     320     330     340     350     360
AAAGTCTGCCGGCGCGACTTCGAGGCCTTGGGCGTCGAGGCGAAGGACATGCTGCGGGCT
K V C R R D F E A L G V E A K D M L R A

     370     380     390     400     410     420
TATGTCGCCGGCGTGAACGCATTCTGGCTTCCGGTGCTCCCCTGCCTGTCAATACGGA
Y V A G V N A F L A S G A P L P V E Y G

     430     440     450     460     470     480
TTGCTCGGAGCAGAGCCGAGCCCTGGGAGCCTTGGCACAGCATCGCGGTGATGCGCCGG
L L G A E P E P W E P W H S I A V M R R

     490     500     510     520     530     540
CTGGGCCTGCTTATGGGTTTCGGTGTGTTCAAGCTCTGGCGGATGCTGGCGCTGCCGGTG
L G L L M G S V W F K L W R M L A L P V

     550     560     570     580     590     600
GTCGGAGCCGCGAATGCGCTGAAGCTGCGCTATGACGATGGCGGCCGGGATTTGCTCTGC
V G A A N A L K L R Y D D G G R D L L C

     610     620     630     640     650     660
ATCCCGCCGGGCGCCGAAGCCGATCGGCTCGAGGCGGATCTCGCGACCCTGCGGCCCGCG
I P P G A E A D R L E A D L A T L R P A

     670     680     690     700     710     720
GTCGATGCGCTGCTGAAGGCGATGGGCGGCGATGCCTCCGATGCTGCCGGCGGCGGCAGC
V D A L L K A M G G D A S D A A G G G S

     730     740     750     760     770     780
AACAACTGGGCGGTCTGCTCCGGGCCGACGGCGACCGGCAGGCCGATCCTCGCGGGCGAT
N N W A V A P G R T A T G R P I L A G D

```

图 2 4 B

790 800 810 820 830 840
CCGCATCGCGTCTTCGAAATACCGGGCATCTATGCGCAGCATCATCTGGCCTGCGACCGG
P H R V F E I P G I Y A Q H H L A C D R

850 860 870 880 890 900
TTCGACATGATCGGCCTGACCGTGCCGGGCGTGCCGGGCTTCCCGCACTTCGCGCATAAC
F D M I G L T V P G V P G F P H F A H N

910 920 930 940 950 960
GGCAAGGTGCGCTATTGCGTCACCCATGCCTTCATGGACATCCACGATCTCTATCTCGAG
G K V A Y C V T H A F M D I H D L Y L E

970 980 990 1000 1010 1020
CAGTTCGCGGGGGAGGGCCGCACTGCGCGGTTTCGGCAACGATTTTCGAGCCCGTCGCTGG
Q F A G E G R T A R F G N D F E P V A W

1030 1040 1050 1060 1070 1080
AGCCGGGACCGTATCGCGGTCCGGGGTGCGCGCGATCGCGAGTTCGATATAGTCAAGACG
S R D R I A V R G G A D R E F D I V K T

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CGCCATGGCCCGGTTATCGCGGGCGATCCGCGCGATGGCGCAGCGCTCACGCTGCGTTTCG
R H G P V I A G D P R D G A A L T L R S

1150 1160 1170 1180 1190 1200
GTCCAGTTCGCGGAGACCGATCTGTCTTCGACTGCCTGACGCGGATGCCGGGCGCATCG
V Q F A E T D L S F D C L T R M P G A S

1210 1220 1230 1240 1250 1260
ACCGTGGCCAGCTCTACGACGCGACGCGCGGCTGGGGCCTGATCGACCATAACCTCGTC
T V A Q L Y D A T R G W G L I D H N L V

1270 1280 1290 1300 1310 1320
GCCGGGGATGTGCGGGGCTCGATCGGCCATCTGGTCCGCGCCCGCGTTCCGTCCCGTCCG
A G D V A G S I G H L V R A R V P S R P

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CGCGAAAACGGCTGGCTGCCGGTGCCGGGCTGGTCCGGCGAGCATGAATGGCGGGGCTGG
R E N G W L P V P G W S G E H E W R G W

1390 1400 1410 1420 1430 1440
ATTCCGCACGAGGCGATGCCGCGCGTGATCGATCCGCCGGGCGGCATCATCGTCACGGCG
I P H E A M P R V I D P P G G I I V T A

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AATAATCGCGTCGTGGCCGATGACCATCCCGATTATCTCTGCACCGATTGCCATCCGCCC
N N R V V A D D H P D Y L C T D C H P P

1510 1520 1530 1540 1550 1560
TACCGCGCCGAGCGCATCATGAAGCGCCTGGTCCGCAATCCGGCTTTTCGCCGTGACGAT
Y R A E R I M K R L V A N P A F A V D D

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GCCGCCGCGATCCATGCCGATACGCTGTGCCCCATGTGCGGGTTGCTGCGCCGGAGGCTC
A A A I H A D T L S P H V G L L R R R L

图 2 4 C

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GAGGCGCTTGGAGCCCGCGACGACTCCGCGGCCGAAGGGCTGAGGCAGATGCTCGTCGCC
 E A L G A R D D S A A E G L R Q M L V A
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 TGGGACGGCCGCATGGATGCGGCTTCGGAGGTGCGGTCTGCCTACAATGCGTTCCGCAGG
 W D G R M D A A S E V A S A Y N A F R R
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GCGCTGACGCGGCTGGTGACGGACCGCAGCGGGCTGGAGCAGGCGATATCGCATCCCTTC
 A L T R L V T D R S G L E Q A I S H P F
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 GCGGCTGTGCGCGCGGGCGTCTCACCGCAAGGCCAGGTCTGGTGGGCGGTGCCGACCCTG
 A A V A P G V S P Q G Q V W W A V P T L
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 CTGCGCGACGACGATGCCGGAATGCTGAAGGGCTGGAGCTGGGACCAGGCCTTGTCTGAG
 L R D D D A G M L K G W S W D Q A L S E
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 GCCCTCTCGGTGCGCTCGCAGAACCTGACCGGGCGAAGCTGGGGCGAAGAGCATCGGCCG
 A L S V A S Q N L T G R S W G E E H R P
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CGCTTCACGCATCCGCTTGCCACGCAATTCCTCGGCGCTGGGCGGGGCTGCTGAATCCGGCT
 R F T H P L A T Q F P A W A G L L N P A
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TCCCGTCCGATCGGTGGCGATGGCGATAACCGTGCTGGCGAACGGGCTCGTCCCGTCAGCC
 S R P I G G D G D T V L A N G L V P S A
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 GGGCCGCAGGCGACCTATGGTGCCCTGTGCGCTACGTCTTCGATGTGCGGCAATTGGGAC
 G P Q A T Y G A L S R Y V F D V G N W D
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 AATAGCCGCTGGGTCGTCTTCCACGGCGCCTCCGGGCATCCGGCCAGCGCCCATTATGCC
 N S R W V V F H G A S G H P A S A H Y A
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 GATCAGAATGCGCCCTGGAGCGACTGTGCGATGGTGCCGATGCTCTATAGCTGGGACAGG
 D Q N A P W S D C A M V P M L Y S W D R
 2290 2300 2310 2320
 ATCGCGGCAGAGGCCGTGACGTGCGCAGGAACCTCGTCCCGGCCTGA
 I A A E A V T S Q E L V P A *

图 25A

DNA 序列名称(1): M164L/M174A/M269Y (1-2325)

```

      10      20      30      40      50      60
ATGACTATGGCAGCTAATACGGATCGCGCGGTCTTGCAGGCGGCGCTGCCGCCGCTTTCC
M T M A A N T D R A V L Q A A L P P L S

      70      80      90     100     110     120
GGCAGCCTCCCCATTCCCGGATTGAGCGCGTCGGTCCGCGTCCGGCGCGATGCCTGGGGC
G S L P I P G L S A S V R V R R D A W G

      130     140     150     160     170     180
ATCCCGCATATCAAGGCCTCGGGCGAGGCCGATGCCTATCGGGCGCTGGGCTTCGTCCAT
I P H I K A S G E A D A Y R A L G F V H

      190     200     210     220     230     240
TCGCAGGACCGTCTTTTCCAGATGGAGCTGACGCGTCGCAAGGCGCTGGGACGCGCGGCC
S Q D R L F Q M E L T R R K A L G R A A

      250     260     270     280     290     300
GAATGGCTGGGCGGCGAGGCCGCGAGGCCGATATCCTCGTGCGCGGCTCGGAATGGAA
E W L G A E A A E A D I L V R R L G M E

      310     320     330     340     350     360
AAAGTCTGCCGGCGCGACTTCGAGGCCTTGGGCGTCGAGGCCAAGGACATGCTGCGGGCT
K V C R R D F E A L G V E A K D M L R A

      370     380     390     400     410     420
TATGTCGCCGGCGTGAACGCATTCTGGCTTCCGGTGCTCCCCTGCCTGTCTGAATACGGA
Y V A G V N A F L A S G A P L P V E Y G

      430     440     450     460     470     480
TTGCTCGGAGCAGAGCCGGAGCCCTGGGAGCCTTGGCACAGCATCGCGGTGATGCGTCTGA
L L G A E P E P W E P W H S I A V M R R

      490     500     510     520     530     540
CTCGGCCTGCTTCTGGGATCCGTGTGGTTCAAGCTCTGGCGGGCGCTAGCGCTGCCGGTG
L G L L L G S V W F K L W R A L A L P V

      550     560     570     580     590     600
GTCGGAGCCGCGAATGCGCTGAAGCTGCGCTATGACGATGGCGGCCGGGATTTGCTCTGC
V G A A N A L K L R Y D D G G R D L L C

      610     620     630     640     650     660
ATCCCGCCGGGCGCCGAAGCCGATCGGCTCGAGGCGGATCTCGCGACCCTGCGGCCCGCG
I P P G A E A D R L E A D L A T L R P A

      670     680     690     700     710     720
GTCGATGCGCTGCTGAAGGCGATGGGCGGCGATGCCTCCGATGCTGCCGGCGGCGGCAGC
V D A L L K A M G G D A S D A A G G G S

      730     740     750     760     770     780
AACAACTGGGCGGTCTGCTCCGGGCGGCACGGCGACCGGCAGGCCGATCCTCGCGGGCGAT
N N W A V A P G R T A T G R P I L A G D

```

图 2 5 B

790 800 810 820 830 840
CCGCATCGCGTCTTCGAAATCCCTGGCTATTATGCGCAGCATCATCTGGCCTGCGACCGG
P H R V F E I P G Y Y A Q H H L A C D R

850 860 870 880 890 900
TTCGACATGATCGGCCTGACCGTGCCGGGCGTGCCGGGCTTCCCGCACTTCGCGCATAAC
F D M I G L T V P G V P G F P H F A H N

910 920 930 940 950 960
GGCAAGGTCGCCTATTGCGTCACCCATGCCTTCATGGACATCCACGATCTCTATCTCGAG
G K V A Y C V T H A F M D I H D L Y L E

970 980 990 1000 1010 1020
CAGTTCGCGGGGGAGGGCCGCACTGCGCGGTTGCGCAACGATTTTCGAGCCCGTCGCCTGG
Q F A G E G R T A R F G N D F E P V A W

1030 1040 1050 1060 1070 1080
AGCCGGGACCGTATCGCGGTCCGGGGTGGCGCCGATCGCGAGTTCGATATCGTCGAGACG
S R D R I A V R G G A D R E F D I V E T

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CGCCATGGCCCGGTTATCGCGGGCGATCCGCGCGATGGCGCAGCGCTCACGCTGCGTTTCG
R H G P V I A G D P R D G A A L T L R S

1150 1160 1170 1180 1190 1200
GTCCAGTTCGCCGAGACCGATCTGTCTTCGACTGCCTGACGCGGATGCCGGGCGCATCG
V Q F A E T D L S F D C L T R M P G A S

1210 1220 1230 1240 1250 1260
ACCGTGGCCCAGCTCTACGACGCGACGCGCGGCTGGGGCCTGATCGACCATAACCTCGTC
T V A Q L Y D A T R G W G L I D H N L V

1270 1280 1290 1300 1310 1320
GCCGGGGATGTCGCGGGCTCGATCGGCCATCTGGTCCGCGCCCGCGTTCCTGTCCTCCG
A G D V A G S I G H L V R A R V P S R P

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CGCGAAAACGGCTGGCTGCCGGTGCCGGGCTGGTCCGGCGAGCATGAATGGCGGGGCTGG
R E N G W L P V P G W S G E H E W R G W

1390 1400 1410 1420 1430 1440
ATTCCGCACGAGGCGATGCCGCGCGTGATCGATCCGCCGGGCGGCATCATCGTCACGGCG
I P H E A M P R V I D P P G G I I V T A

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AATAATCGCGTCGTGGCCGATGACCATCCCGATTATCTCTGCACCGATTGCCATCCGCCC
N N R V V A D D H P D Y L C T D C H P P

1510 1520 1530 1540 1550 1560
TACCGCGCCGAGCGCATCATGAAGCGCCTGGTCGCCAATCCGGCTTTCGCCGTCGACGAT
Y R A E R I M K R L V A N P A F A V D D

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GCCGCGCGATCCATGCCGATACGCTGTGCCCCATGTCCGGTTGCTGCGCCGGAGGCTC
A A A I H A D T L S P H V G L L R R R L

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GAGGCGCTTGGAGCCCGCGACGACTCCGCGGCCGAAGGGCTGAGGCAGATGCTCGTCGCC
 E A L G A R D D S A A E G L R Q M L V A

 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 TGGGACGGCCGCATGGATGCGGCTTCGGAGGTCGCGTCTGCCTACAATGCGTTCCGCAGG
 W D G R M D A A S E V A S A Y N A F R R

 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GCGCTGACGCGGCTGGTGACGGACCGCAGCGGGCTGGAGCAGGCGATATCGCATCCCTTC
 A L T R L V T D R S G L E Q A I S H P F

 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 GCGGCTGTCGCGCCGGGCGTCTCACC GCAAGGCCAGGTCTGGTGGGCCGTGCCGACCCTG
 A A V A P G V S P Q G Q V W W A V P T L

 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 CTGCGCGACGACGATGCCGGAATGCTGAAGGGCTGGAGCTGGGACCAGGCCTTGTCTGAG
 L R D D D A G M L K G W S W D Q A L S E

 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 GCCCTCTCGGTCTCGTCTGCAGAACCTGACCGGGCGAAGCTGGGGCGAAGAGCATCGGCCG
 A L S V A S Q N L T G R S W G E E H R P

 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CGCTTCACGCATCCGCTTGCCACGCAATTCCCGGCCTGGGCGGGGCTGCTGAATCCGGCT
 R F T H P L A T Q F P A W A G L L N P A

 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TCCCGTCCGATCGGTGGCGATGGCGATACCGTGCTGGCGAACGGGCTCGTCCCGTCAGCC
 S R P I G G D G D T V L A N G L V P S A

 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 GGGCCGACGGCGACCTATGGTGCCGTGTCGCGCTACGTCTTCGATGTCGGCAATTGGGAC
 G P Q A T Y G A L S R Y V F D V G N W D

 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 AATAGCCGCTGGGTCGTCTTCCACGGCGCCTCCGGGCATCCGGCCAGCGCCCATATGCC
 N S R W V V F H G A S G H P A S A H Y A

 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 GATCAGAATGCGCCCTGGAGCGACTGTGCGATGGTGCCGATGCTCTATAGCTGGGACAGG
 D Q N A P W S D C A M V P M L Y S W D R

 2290 2300 2310 2320
 ATCGCGGCAGAGGCCGTGACGTGCGCAGGAACCTCGTCCCGGCCTGA
 I A A E A V T S Q E L V P A *

图 2 6 A

DNA 序列名称(1): A49L (1-2325)

```

      10      20      30      40      50      60
ATGACTATGGCAGCTAATACGGATCGCGCGGTCTTGACAGGCGGCGCTGCCGCCGCTTTCC
M T M A A N T D R A V L Q A A L P P L S

      70      80      90     100     110     120
GGCAGCCTCCCCATTCCCGGATTGAGCGCGTCCGTCCGCGTCCGGCGCGATGCCTGGGGC
G S L P I P G L S A S V R V R R D A W G

     130     140     150     160     170     180
ATCCCGCATATCAAGGCCTCGGGCGAGCTCGATGCCTATCGGGCGCTGGGCTTCGTCCAT
I P H I K A S G E L D A Y R A L G F V H

     190     200     210     220     230     240
TCGCAGGACCGTCTTTTCCAGATGGAGCTGACGCGTCCGCAAGGCGCTGGGACGCGCGGCC
S Q D R L F Q M E L T R R K A L G R A A

     250     260     270     280     290     300
GAATGGCTGGGCGCCGAGGCCGCGGAGGCCGATATCCTCGTGCGCCGGCTCGGAATGGAA
E W L G A E A A E A D I L V R R L G M E

     310     320     330     340     350     360
AAAGTCTGCCGGCGCGACTTCGAGGCCTTGCGCGTCCGAGGCGAAGGACATGCTGCGGGCT
K V C R R D F E A L G V E A K D M L R A

     370     380     390     400     410     420
TATGTCGCCGGCGTGAACGCATTCTTGCTTCCGGTGCTCCCCTGCCTGTCGAATACGGA
Y V A G V N A F L A S G A P L P V E Y G

     430     440     450     460     470     480
TTGCTCGGAGCAGAGCCGGAGCCCTGGGAGCCTTGGCACAGCATCGCGGTGATGCGCCGG
L L G A E P E P W E P W H S I A V M R R

     490     500     510     520     530     540
CTGGGCCTGCTTATGGGTTCCGGTGTGGTTCAAGCTCTGGCGGATGCTGGCGCTGCCGGTG
L G L L M G S V W F K L W R M L A L P V

     550     560     570     580     590     600
GTCGGAGCCGCGAATGCGCTGAAGCTGCGCTATGACGATGGCGGCCGGGATTTGCTCTGC
V G A A N A L K L R Y D D G G R D L L C

     610     620     630     640     650     660
ATCCCGCCGGGCGCCGAAGCCGATCGGCTCGAGGCGGATCTCGCGACCTGCGGCCCGCG
I P P G A E A D R L E A D L A T L R P A

     670     680     690     700     710     720
GTCGATGCGCTGCTGAAGGCGATGGGCGGCGATGCCTCCGATGCTGCCGGCGGCGGCAGC
V D A L L K A M G G D A S D A A G G G S

     730     740     750     760     770     780
AACAACTGGGCGGTGCTCCGGGCCGACGGCGACCGGCAGGCCGATCCTCGCGGGCGAT
N N W A V A P G R T A T G R P I L A G D

```

图 26B

790 800 810 820 830 840
CCGCATCGCGTCTTCGAAATCCCGGGCATGTATGCGCAGCATCATCTGGCCTGCGACCGG
P H R V F E I P G M Y A Q H H L A C D R

850 860 870 880 890 900
TTCGACATGATCGGCCTGACCGTGCCGGGCGTGCCGGGCTTCCCGCACTTCGCGCATAAC
F D M I G L T V P G V P G F P H F A H N

910 920 930 940 950 960
GGCAAGGTGCGCTATTGCGTCACCCATGCCTTCATGGACATCCACGATCTCTATCTCGAG
G K V A Y C V T H A F M D I H D L Y L E

970 980 990 1000 1010 1020
CAGTTCGCGGGGGAGGGCCGCACTGCGCGGTTTCGGCAACGATTTTCGAGCCCGTCGCGCTGG
Q F A G E G R T A R F G N D F E P V A W

1030 1040 1050 1060 1070 1080
AGCCGGGACCGTATCGCGGTCCGGGGTGGCGCCGATCGCGAGTTCGATATCGTCGAGACG
S R D R I A V R G G A D R E F D I V E T

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CGCCATGGCCCCGGTTATCGCGGGCGATCCGCGCGATGGCGCAGCGCTCACGCTGCGTTCCG
R H G P V I A G D P R D G A A L T L R S

1150 1160 1170 1180 1190 1200
GTCCAGTTCGCGGAGACCGATCTGTCCTTCGACTGCCTGACGCGGATGCCGGGCGCATCG
V Q F A E T D L S F D C L T R M P G A S

1210 1220 1230 1240 1250 1260
ACCGTGGCCCAGCTCTACGACGCGACGCGCGGCTGGGGCCTGATCGACCATAACCTCGTC
T V A Q L Y D A T R G W G L I D H N L V

1270 1280 1290 1300 1310 1320
GCCGGGGATGTGCGGGGCTCGATCGGCCATCTGGTCCGCGCCCGCGTTCCGTCCCGTCCG
A G D V A G S I G H L V R A R V P S R P

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CGCGAAAACGGCTGGCTGCCGGTGCCGGGCTGGTCCGGCGAGCATGAATGGCGGGGCTGG
R E N G W L P V P G W S G E H E W R G W

1390 1400 1410 1420 1430 1440
ATTCCGCACGAGGCGATGCCGCGCGTGATCGATCCGCCGGGCGGCATCATCGTCACGGCG
I P H E A M P R V I D P P G G I I V T A

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AATAATCGCGTCGTGGCCGATGACCATCCCGATTATCTCTGCACCGATTGCCATCCGCCC
N N R V V A D D H P D Y L C T D C H P P

1510 1520 1530 1540 1550 1560
TACCGCGCCGAGCGCATCATGAAGCGCCTGGTCGCCAATCCGGCTTTCGCCGTGACGAT
Y R A E R I M K R L V A N P A F A V D D

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GCCGCCGCGATCCATGCCGATACGCTGTGCCCCATGTGCGGTTGCTGCGCCGGAGGCTC
A A A I H A D T L S P H V G L L R R R L

1630 1640 1650 1660 1670 1680
GAGGCGCTTGAGCCCGCGACGACTCCGCGGCCGAAGGGCTGAGGCAGATGCTCGTCGCC
E A L G A R D D S A A E G L R Q M L V A

1690 1700 1710 1720 1730 1740
TGGGACGGCCGCATGGATGCGGCTTCGGAGGTGCGGTCTGCCTACAATGCGTTCCGCAGG
W D G R M D A A S E V A S A Y N A F R R

1750 1760 1770 1780 1790 1800
GCGCTGACGCGGCTGGTGACGGACCGCAGCGGGCTGGAGCAGGCGATATCGCATCCCTTC
A L T R L V T D R S G L E Q A I S H P F

1810 1820 1830 1840 1850 1860
GCGGCTGTCGCGCCGGGCGTCTCACCGCAAGGCCAGGTCTGGTGGGCGGTGCCGACCCTG
A A V A P G V S P Q G Q V W W A V P T L

1870 1880 1890 1900 1910 1920
CTGCGCGACGACGATGCCGGAATGCTGAAGGGCTGGAGCTGGGACCAGGCCTTGTCTGAG
L R D D D A G M L K G W S W D Q A L S E

1930 1940 1950 1960 1970 1980
GCCCTCTCGGTGCGGTGCGCAGAACCTGACCGGGCGAAGCTGGGGCGAAGAGCATCGGCCG
A L S V A S Q N L T G R S W G E E H R P

1990 2000 2010 2020 2030 2040
CGCTTCACGCATCCGCTTGCCACGCAATTCCCGGCCTGGGCGGGGCTGCTGAATCCGGCT
R F T H P L A T Q F P A W A G L L N P A

2050 2060 2070 2080 2090 2100
TCCCGTCCGATCGGTGGCGATGGCGATAACGTGCTGGCGAACGGGCTCGTCCCGTCAGCC
S R P I G G D G D T V L A N G L V P S A

2110 2120 2130 2140 2150 2160
GGGCGCAGGCGACCTATGGTGCCCTGTCGCGCTACGTCTTCGATGTCGGCAATTGGGAC
G P Q A T Y G A L S R Y V F D V G N W D

2170 2180 2190 2200 2210 2220
AATAGCCGCTGGGTGCTCTTCCACGGCGCCTCCGGGCATCCGGCCAGCGCCCATTATGCC
N S R W V V F H G A S G H P A S A H Y A

2230 2240 2250 2260 2270 2280
GATCAGAATGCGCCCTGGAGCGACTGTGCGATGGTGCCGATGCTCTATAGCTGGGACAGG
D Q N A P W S D C A M V P M L Y S W D R

2290 2300 2310 2320
ATCGCGGCAGAGGCCGTGACGTGCGCAGGAAGCTCGTCCCGGCCTGA
I A A E A V T S Q E L V P A *