(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1798836 B
(45)授权公告日 2011.04.27

(21)申请号 200480012154.7

(22)申请日 2004.03.04

(30)优先权数据
60/451,686 2003.03.04 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2005.11.04

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2004/006507 2004.03.04

(87)PCT申请的公布数据
WO2004/078936 EN 2004.09.16

(73)专利权人 史密丝克莱恩比彻姆公司
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 艾伦·R·加德纳
托马斯·D·斯韦策
亚历山大·H·泰勒
普拉马西什·S·帕特尔

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 巫肖南 封新琴

(51)Int.Cl.
C12N 9/14(2006.01)
C12N 9/16(2006.01)
C12N 1/20(2006.01)
C12N 15/00(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)

(56)对比文件
US 5643758 A,1997.07.01, 摘要,权利要求1-24.
KUPER ET AL.6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE MUTANTS OFESCHERICHIA COLI AND A MALTOSE BLUE GENE.J.BACTERIOL100 3.1969,100(3),1296-1301.

审查员 李美宣

权利要求书 1 页 说明书 24 页 序列表 14 页
附图 12 页

(54)发明名称

防止蛋白质葡糖酰化的方法

(57)摘要

本发明涉及防止在微生物中所产生多肽的葡糖酰化的方法。

CN 1798836 B

1. 防止大肠杆菌 B 菌株中所表达的异源多肽的葡糖酰化的方法，其中所述大肠杆菌 B 菌株已被编码所述异源多肽的重组 DNA 分子转染，所述方法包括使所述大肠杆菌 B 菌株在丰富培养基中生长。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述的微生物在基本培养基中生长时，不显示明显的 6- 磷酸葡糖酸内酯酶活性。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述大肠杆菌 B 菌株是大肠杆菌 B21(DE3)。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述的丰富培养基包括复合氮源。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述的复合氮源包含胰蛋白胨。

6. 权利要求 4 的方法，其中所述的复合氮源包含蛋白胨。

7. 权利要求 4 的方法，其中所述的复合氮源包含酵母提取物。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述的培养基是超级肉汤。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述的超级肉汤培养基是双倍浓缩的。

10. 权利要求 1 的方法，其中所述的大肠杆菌 B 菌株由编码异源多肽的重组 DNA 分子转染。

11. 防止在大肠杆菌中所表达的多肽的葡糖酰化的方法，包括将大肠杆菌 K-12 菌株发酵以表达所述的多肽。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述的 K-12 菌株显示的磷酸葡糖酸内酯酶活性比在同样条件下生长的 B 菌株高 100 倍。

13. 防止在微生物中所表达的多肽的葡糖酰化的方法，包括将 DNA 导入该微生物，其中所述的 DNA 编码 SEQ ID NO :8 的多肽。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述的微生物是大肠杆菌。

15. 权利要求 13 的方法，其中的 DNA 来自假单胞菌。

16. 权利要求 13 的方法，其中的 DNA 是 SEQ ID NO :7 中列出的序列。

17. 权利要求 13 的方法，其中所述的 DNA 是重组 DNA。

18. 权利要求 13 的方法，其中所述的 DNA 被转化入所述微生物的基因组 DNA。

19. 大肠杆菌 B 菌株，其能够防止多肽的葡糖酰化，所述大肠杆菌 B 菌株包含编码 SEQ ID NO :8 的多肽的 DNA。

20. 权利要求 19 的大肠杆菌 B 菌株，其 DNA 是 SEQ ID NO :7。

21. 改善多肽晶体形成的方法，包括根据权利要求 1 的方法表达所述的多肽。

22. 改善多肽晶体形成的方法，包括根据权利要求 13 的方法表达所述的多肽。

23. 权利要求 1 的方法，进一步包括提高生长效率，其中所述的多肽与葡糖酰化的多肽相比，在发酵阶段显示出增加的效价收率。

24. 权利要求 13 的方法，进一步包括提高生长效率，其中所述的多肽与葡糖酰化的多肽相比，在发酵阶段显示出增加的效价收率。

25. 权利要求 14 和 16-18 之一的方法，其中所述大肠杆菌是大肠杆菌 B21(DE3)。

防止蛋白质葡糖酰化的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学工程领域。更具体地，本发明涉及用于产生多肽的发酵工艺。

背景技术

[0002] 大肠杆菌（“E.coli”）是常用的蛋白质表达宿主，用于研究、诊断、治疗和工业目的。现代表达系统能够获得高水平的多种蛋白质(Baneyx，CurrentOpinion in Biotechnology 10:411-421(1999))。然而，表达的蛋白质的质量常常是与数量一样重要或比数量更加重要。在大肠杆菌中表达的蛋白质可形成不可溶的聚集体，或者它们可具有错误掺入的氨基酸(Bogosian，et al.，Journal ofBiological Chemistry 264:531-539(1989))或保持N-末端甲硫氨酸(Chaudhuri，etal，Journal of Molecular Biology 285:1179-1194(1999);Vassileva-Atanassova，etal.，Journal of Biotechnology 69:63-67(1999);Yamashita，et al.，ProteinExpression & Purification 16:47-52(1999))。此外，会发生所不希望的翻译后修饰，诸如氧化(Berti，et al.，Protein Expression & Purification 11:111-118(1997);Konz，et al.，Biotechnology Progress 14:393-409(1998))或α-N-6-磷酸葡糖酰化(Geoghegan，et al.，Anal.Biochem.267:169-184(1999);Kim et al.，ActaCrystallographica Section D-Biological Crystallography 57:759-762(2001);Yan，et al.Biochemical & Biophysical Research Communications 262:793-800(1999)“Yan et al.I；”Yan，et al.，Biochemical & Biophysical Research Communications259:271-282(1999)“Yan et al.II”)等。这些修饰会不利于实现所表达的蛋白质的活性、稳定性、结构或免疫原性，极大地缩减了大肠杆菌作为多肽表达的宿主的效用。

[0003] 已经描述了融合于六组氨酸亲和标记（“hexa His-Tag”）的数种重组蛋白的Alpha(α)-N-6-磷酸葡糖酰化(phosphogluconoylation)(Geoghegan等;Kim等;Yan等I;Yan等II)。在这些研究中，发现葡萄糖酸衍生物与重组蛋白的末端相连。所有这些蛋白质在大肠杆菌的B菌株中应用基于pET的载体(Novagen)进行表达。其中的报道中采用了LB培养基。该加合物作为与258道尔顿（“Da”）的多肽或者178Da的多肽相连接的附加质量而被检测到，其中前一种多肽代表加入6-磷酸葡糖酸内酯(6-PGL)，后一种多肽代表存在葡糖酸内酯而无磷酸。公知磷酸葡糖酰化通过与磷酸戊糖支路的中间体即内源6-PGL反应，发生在α氨基N-末端。认为+178Da加合物是作用于+258Da加合物以除去磷酸(phosphate)的酶活性的结果。加合物的形成显示对于邻近His-标记的N末端氨基酸序列是特异性的。GXXHHHH的多肽序列，其中XX为SS、SA、AS或AA，最易于发生α-N-6-磷酸葡糖酰化，然而SHHHHHH则较不容易，而PHHHHHH和PFHHHHHH则完全不被修饰(Geoghegan，et al.)。在蛋白其它位置的其它氨基上的修饰未在应用高水平添加的葡糖酸内酯的体内或体外实验中检测到(Geoghegan，et al.)。

[0004] 已经显示N-末端磷酸葡糖酰化抑制蛋白质的结晶(Kim，et al.)，但关于其对蛋白功能、稳定性和免疫原性的影响的了解相对较少。可以预期，6-PGL作为强的亲电子试剂，

可参与体内的糖化反应 (Rakitzis and Papandreou, Chemico-Biological Interactions 113 :205-216(1998))。蛋白质的糖化已被广泛地研究并已知在老化过程及与糖尿病并发症有关的疾病状态中起主要的作用 (Baynes and Monnier, The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition. Alan R. Liss, New York(1989))。已经显示外源添加的 delta- 葡糖酸内酯引起血红蛋白的糖化,其可为糖尿病的血管并发症中的一个因素 (Lindsay, et al., Clinica Chimica Acta 263 :239-247(1997))。此外,丙氨酸氨基转移酶在 Lys313epsilon- 氨基的糖化显著地降低其催化活性 (Beranek, et al., Molecular &Cellular Biochemistry 218 :35-39(2001))。

[0005] 已经显示 6- 磷酸葡糖酸内酯酶 (“pgl”) 为戊糖 - 磷酸途径,具体在 6-PGL 到 6- 磷酸葡糖酸的水解中的重要酶 (Miclet, et al., J. Biol. Chem. 276 :34840-34846(2001))。编码此酶的基因已经在人 (Collard, et al., FEBS Letters 459 :223-226(1999))、铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)(Hager, et al., Journal ofBacteriology 182 :3934-3941(2000)) 和布氏锥虫 (Trypanosoma brucei) 以及镰状疟原虫中 (Plasmodium falciparum)(Miclet, et al.) 中得到鉴定。虽然已经长期地在大肠杆菌中观察到 pgl 活性 (Kupor and Fraenkel, Journalof Bacteriology 100 :1296-1301(1969) “Kupor I”and Kupor and Fraenkel, Journal of Biological Chemistry 247 :1904-1910(1972) “Kupor II”),但是没有鉴定出负责编码具有此活性的酶的基因序列 (Cordwell, S. J. Arch. Microbiol. 172 :269-279(1999))。已经表明,除了能够使代谢流通过磷酸戊糖支路外,细胞内的 pgl 活性防止 6-PGL 的积累以及随之发生的与胞内亲核试剂的破坏性反应 (Miclet, et al.)。已报道的对蛋白质在 N 末端的磷酸葡糖酰化的观察支持了在所述的途径中产生的 6-PGL 能够修饰蛋白质的假说,但没有报道调控 pgl 活性能够影响修饰的蛋白水平的证据。

[0006] 此外,大肠杆菌 BL21(DE3) 是常用的蛋白质表达宿主,其用于研究、诊断、治疗和工业目的 (Studier, F. W., and Moffatt, B. A., J. Mol. Biol. 1986May 5 ;189(1) :113-130)。此菌株在商业上是有吸引力的,因为它通过偶联 T7 RNA 聚合酶染色体拷贝的表达与目的重组蛋白上基于质粒的 T7 RNA 聚合酶启动子的使用,实现非常高的重组蛋白表达水平。因此,由于 T7 RNA 聚合酶是极具选择性和活性的 RNA 聚合酶,重组蛋白的转录积累到非常高的水平,甚至常常达到宿主细胞转录物被减少的程度。

[0007] 不利地,菌株 BL21(DE3) 释放非常少但可检出的感染性 lambda 噬菌体颗粒,所述 lambda 噬菌体颗粒的量级为 10-20 个噬斑形成单位 /ml(PFU), Stewart Shuman, Proc. Natl. Acad Sci. USA 1989 ;89 :3489-3493。明显地,通过用携有被插入 lambda int 基因之 T7 RNA 聚合酶基因的缺陷型 lambda 噬菌体 DE 3 进行转导,将 T7RNA 聚合酶基因导入 BL21 宿主细胞染色体 (Studier, F. W., and Moffat t, B. A., J. Mol. Biol. 1986 ;189(1) :113-130)。得到的缺陷型原噬菌体由于 int 基因中断而不能正常复制。DE3 原噬菌体的染色体切除,是包装及释放感染性的噬菌体颗粒之前原噬菌体复制所需的,并且依赖于由 int 基因产物指导的同源切除重组。如本文所述,非常低水平的释出的噬菌体颗粒是由于异常的、依赖于 int 的、随机的原噬菌体切除事件。尽管感染性噬菌体颗粒的低水平释放在一些研究实验室中是可以接受的,但在生物药剂的制造工厂设备中,任何感染性噬菌体的释放则是完全不能接受的,既因为为了患者安全考虑,还因为感染性试剂的释放能使其它基于

大肠杆菌的生产工艺处于危险状态中。

[0008] 在微生物诸如大肠杆菌中表达或过量表达多肽、同时使得发酵过程中的磷酸葡糖酰化发生率降低的方法是非常需要的。此外，构造完全无噬菌体的BL21(DE3)宿主细胞，对于在大肠杆菌形式中制备治疗性重组蛋白质是非常需要的。

发明内容

[0009] 本发明提供了通过使微生物在丰富培养基生长，从而防止由微生物表达的多肽发生葡糖酰化的方法。

[0010] 本发明也提供了防止由微生物所表达多肽的葡糖酰化的方法，其包括将编码显示pgl活性的多肽的DNA导入（例如，转化、感染或转染）到微生物中。此多肽可为磷酸葡糖酸内酯酶。在本发明的另一方面，该磷酸葡糖酸内酯酶与假单胞菌包括但不限于铜绿假单胞菌所产生的磷酸葡糖酸内酯酶具有至少90％序列同一性的氨基酸序列。

[0011] 本发明也提供了能够防止蛋白质的葡糖酰化的微生物。在一个实施方案中，微生物可含有编码显示pgl活性的多肽的DNA。

[0012] 本发明也提供了分离的多核苷酸，其与SEQ ID NO:7中的多核苷酸具有至少90％的同源性。

[0013] 本发明也提供了微生物，其没有可检出的感染性lambda噬菌体表达。

附图说明

[0014] 图1显示载体pECO-1-pgl-2-13的限制性酶图谱。

[0015] 图2显示载体pECO-1-pgl-2-13的多核苷酸序列(SEQID NO:9)。

[0016] 图3显示载体pET28ProIL18Casp5的限制性酶图谱。

[0017] 图4显示载体pET28ProIL18Casp5的多核苷酸序列(SEQ ID NO:13)。

[0018] 图5显示载体pET28proIL18casp5+pgl的限制性酶图谱。

[0019] 图6显示载体pET28proIL18casp5+pgl的多核苷酸序列(SEQ ID NO:14)。

[0020] 图7显示多核苷酸序列SEQ ID NO:7。

[0021] 图8显示多肽序列SEQ ID NO:8。

[0022] 术语表

[0023] “宿主细胞”是细胞，包括但不限于细菌细胞或微生物的细胞，其中已经导入（例如，转化、感染或转染）或者能够导入（例如，转化、感染或转染）分离的多核苷酸序列。

[0024] “转化的”如本领域已知，是通过外部DNA或RNA的导入对生物体的基因组或附加体(episome)的定向修饰，或者指外部DNA或RNA的任何其它稳定导入。

[0025] “转染的”如本领域已知，是将外部DNA或RNA包括但不限于重组的DNA或RNA导入微生物中。

[0026] “同一性”如本领域已知，是通过序列比较确定的两个或两个以上多肽序列或两个或两个以上多核苷酸序列之间的具体关系。在本领域中，“同一性”也指通过所述序列串之间的配对确定的多肽或多核苷酸序列之间的序列具体相关性程度。“同一性”能够通过已知的方法容易地计算，包括但不限于那些在(Computational Molecular Biology，Lesk，A.M.，ed.，Oxford UniversityPress，New York，1988；Biocomputing：Informaticsand

Genome Projects,Smith,D.W.,ed.,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of SequenceData,Part I,Griffin,A.M.,and Griffin,H.G.,eds.,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;and Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.and Devereux,J.,eds.,MStockton Press,New York,1991;and Carillo,H.,and Lipman,D.,SIAM J.Applied Math.,48:1073(1988))中描述的方法。确定同源性的方法被设计为在受试序列之间给出最大匹配度。而且,确定同源性的方法汇集在可以公开得到的计算机程序中。确定两个序列之间同一性的计算机程序方法包括,但不限于GCG程序包(Devereux,J.,et al.,Nucleic Acids Research12(1):387(1984))、BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul,S.F.et al.,J.Molec.Biol.215:403-410(1990)。公众可以从NCBI及其它来源(BLAST Manual,Altschul,S.,etal.,NCBI NLM NIH Bethesda,MD 20894;Altschul,S.,et al.,J.Mol.Biol.215:403-410(1990))获得BLAST X程序。著名的Smith Waterman算法也可被用于确定同一性。

[0027] 多肽序列比较的参数包括以下参数:

[0028] 算法:Needleman and Wunsch,J.Mol Biol.48:443-453(1970)比较矩阵:BLOSSUM62,来自Hentikoff and Hentikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.

[0029] USA.89:10915-10919(1992)

[0030] 缺口罚分:12

[0031] 缺口长度罚分:4

[0032] 利用这些参数的有用程序是可以公开获得的,如来自Genetics Computer Group,Madison WI的“缺口(gap)”程序。前面提及的参数(连同末端缺口无罚分一起)是肽比较的缺省参数。

[0033] 多核苷酸比较的参数包括以下参数:

[0034] 算法:Needleman and Wunsch,J.Mol Biol.48:443-453(1970)

[0035] 比较矩阵:配对=+10,错配=0

[0036] 缺口罚分:50

[0037] 缺口长度罚分:3

[0038] 可用的如:来自Genetics Computer Group,Madison WI的“缺口”程序。

[0039] 这些是核酸比较的缺省参数。

[0040] 多核苷酸和多肽的“同一性”的优选含意,根据具体情况,在下面的(1)和(2)中提供。

[0041] (1)多核苷酸实施方案进一步包括分离的多核苷酸,其包含与参比序列SEQ ID NO:7具有至少70、80、85、90、95、97或100%同源性的多核苷酸序列,其中所述的多核苷酸序列可与参比序列SEQ ID NO:7相同或者与参比序列相比可包含达某一整数个的核苷酸改变,其中所述的改变选自由至少一个核苷酸缺失、取代,包括转换或颠换,或插入所组成的组。而且其中所述的改变可发生在参比核酸序列的5'或3'末端位置或所述末端位置之间的任何地方,单个地分散在参比序列的核苷酸中,或者在参比序列内的一或多个相邻基团中,而且其中所述核苷酸改变的数目通过以下方法确定:用定义同一性百分比的整数除以100所得的结果乘以SEQ ID NO:7中核苷酸的总数,然后从所述的SEQ ID NO:7中核苷酸

的总数中减去上述乘积，或：

[0042] $n_n \leqslant x_n-(x_n \cdot y)$，

[0043] 其中 n_n 为核苷酸改变的数目，x_n 为 SEQ ID NO:7 中核苷酸的总数，y 对于 95％为 0.95，对于 97％为 0.97 或对于 100％为 1.00，而 • 为乘法算符的记号，而在从 x_n 中减去 x_n 与 y 的任何非整数乘积之前，将所述乘积向下舍入到最接近的整数。编码多肽的多核苷酸序列的改变会在该编码序列中产生无义、错义或移码突变，并从而改变由发生这些改变的多核苷酸编码的多肽。

[0044] (2) 多肽实施方案进一步包括分离的多肽，其包含与多肽参比序列具有至少 70、80、85、90、95、97 或 100％同一性的多肽，其中所述的多肽序列可与参比序列相同或者与参比序列相比可包含达某一整数个的氨基酸改变，其中所述的改变选自由至少一个氨基酸缺失、取代（包含保守的和非保守的取代），或插入所组成的组，而且其中所述的改变可发生在参比多肽序列的氨基末端或羧基末端位置或所述的末端位置之间的任何地方，单独地分散在参比序列的氨基酸中，或者在参比序列内的一或多个相邻基团中，而且其中所述的氨基酸改变的数目可通过以下方法确定：用定义同源性百分数的整数除以 100 的所得结果乘以氨基酸的总数，然后从所述的氨基酸的总数中减去上述方法所得乘积，或：

[0045] $n_a \leqslant x_a-(x_a \cdot y)$，

[0046] 其中 n_a 为氨基酸改变的数目，x_a 为序列中氨基酸的总数，y 对于 95％为 0.95，对于 97％为 0.97 或对于 100％为 1.00，而 • 为乘法算符的记号，而在从 x_a 中减去 x_a 和 y 的任何非整数的乘积之前，将所述乘积向下舍入到最接近的整数。

[0047] “分离的”意思是从其自然状态“通过人工”改变的，即，如果它存在于自然中，那么它已被改变或从其原始环境中去除，或两者都有。例如，天然存在于活生物体中的多核苷酸或多肽不是“分离的”，而从其天然状态的共存物质中分离的同样的多核苷酸或多肽是“分离的”，包括但不限于当所述的多核苷酸或多肽被导回进入细胞的情况。

[0048] “多核苷酸”通常指任何聚核糖核苷酸或聚脱氧核糖核苷酸，其可为未经修饰的 RNA 或 DNA 或者修饰的 RNA 或 DNA。“多核苷酸”非限制性地包括，单 - 和双 - 链 DNA，作为单 - 和双 - 链区域或单 -、双 - 和三 - 链区域的混合物的 DNA，单 - 和双 - 链 RNA，及作为单 - 和双 - 链区域混合物的 RNA，杂合分子，其含有作为单链或更通常地双链或三链区域、或作为单 - 和双 - 链区域的混合物的 DNA 与 RNA。此外，如本文应用的“多核苷酸”指含有 RNA 或 DNA 或 RNA 和 DNA 的三 - 链区域。此区域中的链可来自同一分子或来自不同分子。此区域可包括一个或多个分子的全部，但是更通常地只涉及这些分子中的区域。三 - 螺旋区域的分子之一常常为寡核苷酸。如在这里应用的，术语“多核苷酸”也包括如上所述含有一个或多个经修饰的碱基的 DNA 或 RNA。因此，具有为了稳定性或为了其它原因而被修饰的骨架的 DNA 和 RNA 为本文的“多核苷酸”。而且，含有不常见碱基如次黄嘌呤核苷，或经修饰的碱基如三苯甲基化的碱基的 DNA 或 RNA，仅举两例，为如在这里应用的多核苷酸。认识到已经对 DNA 和 RNA 进行多种修饰，所述修饰可用于本领域已知的多种有用目的。术语“多核苷酸”，如其在这里使用的，包含多核苷酸的所述化学性、酶性或代谢性修饰形式，以及病毒和细胞的特征性 DNA 和 RNA 的化学形式，包括，例如，简单和复杂细胞。“多核苷酸”也包括常常作为寡核苷酸提及的短多核苷酸。

[0049] “多肽”指包含两个或两个以上通过肽键或修饰的肽键互相连接的氨基酸的任何

多肽或蛋白。“多肽”既指通常称为肽、寡肽和寡聚物的短链，又指通常称为蛋白质的较长的链。多肽可包含除 20 基因编码的氨基酸之外的氨基酸。“多肽”包含那些通过天然方法诸如加工和其它翻译后修饰来修饰的多肽，也包括经化学修饰技术来修饰的多肽。这些修饰在基础文本和更详细的专论中，以及在大量的研究文献中充分地描述，并且它们为本领域的技术人员所熟知。应理解同样类型的修饰以同样的或变化的程度存在于给定的多肽中的数个位点。而且，给定的多肽可含有许多类型的修饰。修饰可发生在多肽中的任何地方，包括多肽骨架、氨基酸侧链以及氨基或羧基末端。修饰包括，例如，乙酰化、酰化、ADP 核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、形成二硫键、脱甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸盐、甲酰化、gamma- 羧化、形成 GPI 锚、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化 (myristoylation)、氧化、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊烯化 (prenylation)、外消旋化、糖基化、脂质连接、硫酸化、谷氨酸残基的 gamma- 羧化、羟基化和 ADP 核糖基化、硒化、硫酸化、转运 RNA 介导的向蛋白质添加氨基酸，如精氨酰化 (arginylation)，以及泛素化 (ubiquitination)。参见，例如，PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULARPROPERTIES，2nd Ed.，T.E.Creighton，W.H.Freeman and Company，New York(1993)and Wold，F.，Posttranslational Protein Modifications：Perspectives andProspects，pgs.1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATIONOF PROTEINS，B.C.Johnson，Ed.，Academic Press，New York(1983)；Seifter etal.，Meth.Enzymol.182：626-646(1990)and Rattan et al.，Protein Synthesis：Posttranslational Modifications and Aging，Ann.N.Y.Acad.Sci.663：48-62(1992)。多肽可为分枝的或带有或不带有分支的环。环状的、支化的和支化环状的多肽可由翻译后的天然过程产生，并且也可通过完全合成的方法制备。

[0050] “重组表达系统”指本发明的表达系统或其部分、或多核苷酸，其被导入或转化进入宿主细胞和宿主细胞裂解物，用于产生本发明的多核苷酸和多肽。

[0051] 本文术语“变体”，是分别与参比多核苷酸或多肽不同，但保持基本性质的多核苷酸或多肽。通常的多核苷酸变体的核苷酸序列不同于另一种，参比多核苷酸。在变体的核苷酸序列中的变化，可改变或不改变由参比多核苷酸编码的多肽的氨基酸序列。核苷酸变化可导致由参比序列编码的多肽中的氨基酸的取代、添加、缺失、融合蛋白和截短，如在下面讨论的。通常的多肽的变体在氨基酸序列上不同于另一个，参比多肽。一般地，差异是有限的，以致参比多肽和变体的序列大体上十分相似并在很多区域相同。变体和参比多肽通过一个或一个以上任意组合的取代、添加、缺失而在氨基酸序列上有所差异。取代的或插入的氨基酸残基是或不是由遗传密码所编码的。本发明也包括本发明的每种多肽的变体，即与参比物的差异在于保守的氨基酸取代的多肽，其中残基被具有相似特性的另一残基所取代。通常这样的取代在 Ala、Val、Leu 和 Ile 之间；在 Ser 和 Thr 之间；在酸性残基 Asp 和 Glu 之间；在 Asn 和 Gln 之间；也在碱性残基 Lys 和 Arg 之间；或芳香族残基 Phe 和 Tyr。具体优选的是其中数个，如 5-10、1-5、1-3、1-2 或 1 个氨基酸以任意组合的方式被取代、缺失或添加的变体。多核苷酸或多肽的变体可为天然存在的，诸如等位基因的变体，或者可为未知其为天然存在的变体。多核苷酸和多肽的非 - 天然存在的变体可通过诱变 (mutagenesis) 技术、通过直接合成和通过技术人员已知的其它重组方法来制备。

[0052] “微生物”指(i)原核生物，包括但不限于，以下属的成员：链球菌属(Streptococcus)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、博德特菌属(Bordetella)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、分支杆菌属(Mycobacterium)、奈瑟氏菌属(Neisseria)、嗜血杆菌属(Haemophilus)、放线菌属(Actinomycetes)、链霉菌(Streptomycetes)、诺卡氏菌属(Nocardia)、肠杆菌属(Enterobacter)、耶尔森氏菌属(Yersinia)、Fancisella、Pasturella、摩拉克氏菌属(Moraxella)、不动杆菌属(Acinetobacter)、毒丝菌属(Erysipelothrix)、布兰汉氏球菌属(Branhamella)、放线杆菌属(Actinobacillus)、链杆菌属(Streptobacillus)、李斯特菌属(Listeria)、荚膜菌属(Calymma tobacterium)、布氏杆菌属(Brucella)、芽孢杆菌属(Bacillus)、梭菌属(Clostridium)、密螺旋体属(Treponema)、埃希氏杆菌属(Escherichia)、沙门氏菌属(Salmonella)、克氏杆菌属(Kleibsiella)、弧菌属(Vibrio)、变形杆菌属(Proteus)、文氏菌属(Erwinia)、包柔氏螺旋体属(Borrelia)、钩端螺旋体属(Leptospira)、螺旋菌属(Spirillum)、弯曲杆菌属(Campylobacter)、志贺氏菌属(Shigella)、军团杆菌属(Legionella)、假单胞菌属(Pseudomonas)、气单胞菌属(Aeromonas)、立克次氏体(Rickettsia)、衣原体属(Chlamydia)、包柔氏螺旋体属(Borrelia)和支原体(Mycoplasma)，并且进一步包括，但不限于，以下种或组的成员：A组链球菌(Group A Strep tococcus)、B组链球菌、C组链球菌、D组链球菌、G组链球菌、肺炎链球菌(Streptococcus pneumonia)、化脓性链球菌(Strep tococcus pyogenes)、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)、粪链球菌(Streptococcus faecalis)、尿链球菌(Streptococcus faecium)、坚忍链球菌(Streptococcus durans)、淋病奈瑟氏菌(Neisseria gonorrheae)、脑膜炎奈瑟氏菌(Neisseria meningitidis)、金黄色葡萄球(Staphylococcusaureus)、表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)、白喉棒杆菌(Corynebacterium diptheriae)、阴道加德菌(Gardnerella vaginalis)、结核分支杆菌(Mycobacteri-tuberculosis)、牛分支杆菌(Mycobacteriumbovis)、溃疡分支杆菌(Mycobacterium ulcerans)、麻风分支杆菌(Mycobacteriumleprae)、衣氏放线菌(Actinomyctes israelii)、单核细胞增多性李斯特菌(Listeriamonocytogenes)、百日咳博德特菌(Bordetell apertusis)、副百日咳博德特菌(Bordatella parapertusis)、支气管败血性博德特菌(Bordetella bronchiseptica)、大肠杆菌(Escherichia coli)、痢疾志贺氏菌(Shigella dysenteriae)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)、埃及嗜血杆菌(Haemophilus aegyptius)、副流感嗜血杆菌(Haemophilus parainfluenzae)、杜克雷嗜血杆菌(Haemophilus ducreyi)、博德特菌(Bordetella)、伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi)、弗罗因德(氏)枸橼酸杆菌(Citrobacter freundii)、奇异变形杆菌(Proteus mirabilis)、普通变形杆菌(Proteus vulgaris)、鼠疫耶尔森(氏)菌(Yersinia pestis)、肺炎克氏杆菌(Kleibsiellapneumoniae)、Serratia marcessens、Serratia liquefaciens、霍乱弧菌(Vibriocholera)、痢疾志贺氏菌(Shigella dysenterii)、弗氏志贺氏菌(Shigella, flexneri)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、Franscisella tularensis、Brucellaabortis、炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)、蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus)、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)、破伤风梭菌(Clostridium tetani)、肉毒梭菌(Clostridium botulinum)、苍白密螺旋体(Treponema pallidum)、立克次(氏)

立克次（氏）体(Rickettsia rickettsii)和Chlamydia trachomitis,(ii)古细菌(archaeon),包括但不限于Archaebacter,和(iii)单细胞的或丝状的真核生物,包括但不限于酿酒酵母(Saccharomyces cereviseae)、乳酸克鲁维酵母(Kluveromyces lactis)或白色念珠菌(Candida albicans)属的成员。

[0053] “细菌(I)”指(i)原核生物,包括但不限于以下属的成员:链球菌属、葡萄球菌属、博德特菌属、棒状杆菌属、分支杆菌属、奈瑟氏菌属、嗜血杆菌属、放线菌、链霉菌属、诺卡氏菌属、肠杆菌属、耶尔森氏菌属、Fancisella、Pasturella、摩拉克（氏）菌属、不动杆菌属、毒丝菌属、布兰汉球菌属、放线杆菌属、链杆菌属、李斯特菌属、荚膜菌属、布氏杆菌属、芽孢杆菌属、梭菌属、密螺旋体属、埃希氏杆菌属、沙门氏菌属、克氏杆菌属、弧菌属、变形杆菌属、文氏菌属、包柔氏螺旋体属、钩端螺旋体属、螺旋菌属、弯曲杆菌属、志贺氏菌属、军团杆菌属、假单胞菌属、气单胞菌属、立克次氏体属、衣原体属、包柔氏螺旋体属和支原体,并进一步包括,但不限于以下种或组的成员:A组链球菌、B组链球菌、C组链球菌、D组链球菌、G组链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、无乳链球菌、粪链球菌、链球菌素、坚忍链球菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、金黄色葡萄球、表皮葡萄球菌、白喉棒杆菌、阴道加德菌、结核分支杆菌、牛分支杆菌、溃疡分支杆菌、麻风分支杆菌、衣氏放线菌、单核细胞增多性李斯特菌、百日咳博德特菌、副百日咳博德特菌、支气管败血性博德特菌、大肠杆菌、痢疾志贺氏菌、流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、杜克雷嗜血杆菌、博德特菌、伤寒沙门氏菌、弗罗因德（氏）枸橼酸杆菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、鼠疫耶尔森（氏）菌、肺炎克氏杆菌、Serratia marcessens、Serratia liquefaciens、霍乱弧菌、痢疾志贺氏菌、弗氏志贺氏菌、铜绿假单胞菌、Franscisella tularensis、Brucellaabortis、炭疽芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、肉毒梭菌、苍白密螺旋体、立克次（氏）立克次（氏）体和Chlamydia trachomitis,(ii)古细菌,包括但不限于Archaebacter。

[0054] 如在这里应用的,“异源多肽”指不能通过经转化的目标宿主细胞或微生物天然地合成、并通过重组DNA导入该宿主细胞或微生物的多肽。例如,大肠杆菌可作为白细胞介素表达的宿主微生物,而白介素表达在非-转化的大肠杆菌中不会发生。异源多肽可包括已经过修饰以促进分离的多肽。

[0055] 如在这里应用的“亲和标记”指任何与分子相连的部分,其可给予所述的分子对于另一种物质或分子的选择性亲和力。例如,亲和标记可用于通过给分子提供对于纯化柱填充材料的选择性亲和力而促进分子的纯化。亲和标记的非-限制性的实例为his-标记。

[0056] 如在这里应用的,“His-标记”指组氨酸的重复,并可包含通过改造技术而被编码进多肽的其它氨基酸。通常地,一个His-标记包含至少六个（“hexa”）组氨酸重复,且其位于多肽的N-末端附近。His-标记能够用于促进异源多肽在Ni-柱上的纯化。

[0057] 如在这里应用的,“基本培养基”指含有化学限定成分的细胞生长培养基,包括但不限于,缓冲液,如磷酸盐缓冲液;盐,如硫酸镁、氯化钙、氯化钠、或硫酸锰;矿物质,如铁、锌、铜、钴或钼;碳源,如葡萄糖或甘油;和氮源,如硫酸铵或硝酸铵。一个实例为M9培养基(Kim,YS,JH Seo and HYCha,Enzyme and Microbial Technology 33(2003):460-465.)。

[0058] 如在这里应用的,“丰富培养基(rich culture medium)”指含有非限定成分的细胞生长培养基,包括但不限于,添加的成分,如缓冲液（例如磷酸盐缓冲液）、盐（例如硫酸镁、氯化钙、氯化钠或硫酸锰）、碳源,例如其可为葡萄糖或甘油。氮源可包含蛋白水解物,如

酵母提取物、肉类水解物或大豆水解物。氮源可以能够支持细胞生长的浓度提供，其中复合氮源（克每升）与最大细胞密度(OD单位）的比率为1：1或更高。丰富培养基的实例包括，但不限于，Superbroth(Atlas RM，Handbook of Microbiological Mesdia；Parks LC Ed.；CRCPress：Boca Raton FL，pp.281，523，529，859)、Teriffic Broth(Alpha Biosciences，Baltimore，MD USA)、Turbo Broth(Athena Enzyme Systems，Baltimore，MDUSA)或Hyper Broth(Athena Enzyme Systems，Baltimore，MD USA)。

[0059] 如在这里应用的，“葡糖酰化”指葡糖酸衍生物与蛋白的连接。葡糖酰化可包括，但不限于，6-磷酸葡糖酸内酯(6-PGL)加合物形成、乙酰化、甲酰化、去甲酰化、葡糖酸内酯化(gluconolactonation)或葡糖酸衍生化(derivatization)。

[0060] 如在这里应用的，“效价收率(titer yield)”指产物（例如，异源表达的多肽）在溶液（例如，培养液或细胞-裂解混合物或缓冲液）中的浓度，而其通常表示为mg/L或g/L。效价收率的增加可指在两个限定的条件组下产生的产物浓度的绝对的或相对的增加。

[0061] 如在这里应用的，“pgl活性”指任何6-磷酸葡糖酸内酯酶（“pgl”）的活性。此活性可包括将6-PGL水解为6-磷酸葡糖酸。显著的pgl活性可以定义为至少0.2IU/min/g的水解活性。

[0062] 如在这里应用的，术语“严谨条件”和“严谨杂交条件”指只有当序列之间的同一性为至少70％且优选至少80％，而具体优选至少95％时，杂交才会发生。严谨杂交条件的实例为，在含有50％甲酰胺、5×SSC(150mM NaCl，15mM枸橼酸三钠(trisodium citrate))、50mM磷酸盐(pH7.6)、5×Denhardt′s溶液、10％硫酸葡聚糖和20μg/ml变性的、经剪切的鲑精DNA的溶液中、于42℃过夜温育，然后是在0.1×SSC中、大约65℃洗涤滤纸。杂交和洗涤条件是已被熟知的，并在Sambrook，et al.，Molecular Cloning：A LaboratoryManual，Second Edition，Cold Spring Harbor，N.Y，(1989)，特别是其中第11章中举例说明，其公开在此全部并入以供参考。

[0063] 发明详述

[0064] 由于在基本培养基中的生长、高细胞密度和高水平的异源多肽的表达引起的细胞应激(Cellular stresses)，可有助于于异源多肽的葡糖酰化。减轻一种或一种以上这些应激物，可由此影响在微生物中表达的蛋白的葡糖酰化的水平，从而影响到所需多肽的纯度和效价收率。尽管造成此活性的基因还没有在大肠杆菌中鉴定出来，大肠杆菌的一些菌株可比其它菌株具有更高水平的pgl活性(Cordwell，S.J.1999.Arch.Microbiol.172：269-279)。此外，多肽的葡糖酰化可影响这些多肽的结晶和结构测定。

[0065] 本发明提供了防止在微生物中表达的多肽的葡糖酰化的方法，包括使所述的微生物在丰富培养基中生长。在本发明的又一方面，当微生物在基本培养基中生长时，不显示显著的6-磷酸葡糖酸内酯酶活性。该微生物可为大肠杆菌的菌株。在本发明的又一方面，大肠杆菌为B菌株。在本发明的又一方面，丰富培养基包含复合氮源。丰富培养基能够在复合氮源浓度与细胞密度的比率为1：1的条件下保持细胞生长。复合氮源可包含胰蛋白胨、蛋白胨或酵母提取物。在本发明的又一方面，培养基为Superbroth。Superbroth培养基可为双倍浓缩的。在本发明的又一方面，微生物以编码异源多肽的重组DNA分子转染。

[0066] 在本发明的另一实施方案中，提供防止在大肠杆菌中表达的多肽的葡糖酰化的方法，包括将大肠杆菌的K菌株变体发酵用于表达多肽。在本发明的又一方面，与在基本相同

的条件下生长的 B 菌株相比，K 菌株显示的磷酸葡糖酰化酶活性至少高大约 100 倍。在本发明的又一方面，K 菌株为 K-12。

[0067] 在本发明的另一实施方案中，提供防止在微生物中所表达多肽的葡糖酰化的方法，包括将 DNA 导入微生物，其中所述的 DNA 编码显示 6- 磷酸葡糖酸内酯酶活性的多肽。在本发明的又一方面，微生物是大肠杆菌。DNA 包括编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA。在本发明的又一方面，编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA 与来自假单胞菌的、编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA 具有至少 70％、80％、85％、90％、95％、97％或 100％的序列同一性，所述的假单胞菌可为铜绿假单胞菌。在本发明的又一方面，编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA 与 SEQ ID NO :7 具有至少 70％、80％、85％、90％、95％、97％或 100％的序列同一性。在本发明的又一方面，6- 磷酸葡糖酸内酯酶与 SEQ ID NO :8 具有至少 70％、80％、85％、90％、95％、97％或 100％的序列同一性的氨基酸序列。编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA 包括 SEQ ID NO :7 的序列。DNA 可为重组的 DNA，和 / 或其可被转化入微生物的基因组 DNA。

[0068] 在本发明的另一实施方案中，提供能够防止多肽的葡糖酰化的微生物。微生物包括编码显示 6- 磷酸葡糖酸内酯酶活性的多肽的 DNA。微生物包括编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA。在本发明的又一方面，编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA 与来自假单胞菌的、编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA 具有至少 70％、80％、85％、90％、95％、97％或 100％的序列同一性，并且其中所述的微生物不是假单胞菌。在本发明的又一方面，编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA 来自铜绿假单胞菌。在本发明的又一方面，微生物是大肠杆菌的菌株。在本发明的又一方面，微生物是大肠杆菌的菌株，并且其中编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA 被掺入微生物的基因组。

[0069] 在本发明的另一实施方案中，提供分离的多核苷酸，其包括与 SEQ IDNO :7 的多核苷酸具有至少 70％、80％、85％、90％、95％、97％或 100％的序列同一性的多核苷酸。在本发明的又一方面，分离的多核苷酸包括与编码下述多肽的多核苷酸具有至少 70％、80％、85％、90％、95％、97％或 100％的序列同一性的多核苷酸，所述的多肽包含与 SEQ ID NO :8 具有至少 70％、80％、85％、90％、95％、97％或 100％序列同一性的氨基酸序列。在本发明的又一方面，DNA 编码显示 6- 磷酸葡糖酸内酯酶活性的蛋白。在本发明的又一方面，DNA 序列在 SEQ ID NO :7 中列出。在本发明的又一方面，DNA 序列与来自铜绿假单胞菌的编码 6- 磷酸葡糖酸内酯酶的 DNA 同源。在本发明的又一方面，分离的多核苷酸进一步包括编码人白细胞介素 -18 的多核苷酸，或其变体。

[0070] 在本发明的另一实施方案中，提供改善多肽晶体形成的方法，包括通过本发明的方法表达所述的多肽以降低多肽的葡糖酰化。

[0071] 在本发明的另一实施方案中，提供提高生长效率及在微生物中表达多肽的方法。在一个方面，与葡糖酰化的多肽相比，多肽在发酵阶段显示出增加的效价收率。

[0072] 在本发明的另一实施方案中，提供产生人白细胞介素的方法，包括将所述的人白细胞介素在微生物中与具有 6- 磷酸葡糖酸内酯酶 (“pgl”) 活性的酶共表达。在一个方面，人白细胞介素是 IL-18 或其变体。在一个方面，微生物是大肠杆菌。在一个方面，pgl 是由被转化或转染入大肠杆菌中，包括但不限于被转化入基因组或附加体的多核苷酸编码的。

[0073] 在本发明的另一实施方案中，提供产生人白细胞介素的方法，包括在生长于丰富培养基中的微生物中表达所述的人白细胞介素。在一个方面，人白细胞介素是 IL-18 蛋

白或其变体。在一个方面，微生物是大肠杆菌。在一个方面，丰富培养基包括植物蛋白胨 (phytone peptone)。在一个方面，丰富培养基包括细菌用酵母提取物 (bacto yeast extract)。

[0074] 在本发明的另一实施方案中，提供没有可检测的感染性 lambda 噬菌体表达的微生物。在一个方面，lambda 噬菌体的衣壳结构蛋白 gpE 在微生物内被缺失或被破坏。蛋白的缺失或破坏能通过数种非－限制性的方法实现。编码蛋白的基因可被或者部分地或者全部地从微生物中去除。编码蛋白的基因可通过如点突变或随机突变这样的非－限制性技术在基因上修饰。可用化学方法或酶法切断或修饰蛋白以破坏其结构或功能。可将调控基因表达的启动子破坏或缺失以消除或降低基因的表达。可以调控溶液条件或温度以影响蛋白结构或功能。在一个方面，微生物是大肠杆菌。在又一个方面，微生物包括 T7 RNA 聚合酶基因。

[0075] 下面的实施例说明了本发明的各个方面。这些实施例不限制由附加权利要求所限定的本发明的范围。

[0076] 实施例

[0077] 实施例 1

[0078] 创建大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株的改进菌株，其通过敲除主要的 lambda 噬菌体的衣壳结构蛋白 gpE，没有可检测的感染性 lambda 噬菌体表达。此菌株用于在这里显示的实施例中。

[0079] 对 gpE 编码区的 413 个碱基对内部片段进行 PCR 扩增，应用以下引物：

[0080] 5′ AGCTGGCCATTGCTCAGGTCGAAG 3′ (SEQ ID NO:1)

[0081] 5′ GTACTGTCCGGAATACACGACGATG 3′ (SEQ ID NO:2)

[0082] 并以 BL21(DE3) 染色体 DNA 作为模板。得到的片段为：

[0083] AGCTGGCCAT TGCTCAGGTC GAAGAGATGC AGGCAGTTTC TGCCGTGCTT

[0084] AAGGGCAAAT ACACCATGAC CGGTGAAGCC TTCGATCCGG TTGAGGTGGA

[0085] TATGGGCCGC AGTGAGGAGA ATAACATCAC GCAGTCCGGC GGCACGGAGT

[0086] GGAGCAAGCG TGACAAGTCC ACGTATGACC CGACCGAC**GA TATC**GAAGCC

[0087] TACGCGCTGA ACGCCAGCGG TGTGGTGAAT ATCATCGTGT TCGATCCGAA

[0088] AGGCTGGGCG CTGTTCCGTT CCTTCAAAGC CGTCAAGGAG AAGCTGGATA

[0089] CCCGTCGTGG CTCTAATTCC GAGCTGGAGA CAGCGGTGAA AGACCTGGGC

[0090] AAAGCGGTGT CCTATAAGGG GATGTATGGC GATGTGGCCA TCGTCGTGTA

[0091] TTCCGGACAG TAC

[0092] (SEQ ID NO:3)

[0093] 应用标准的方法对 PCR 扩增产物进行 TA 克隆，并验证其序列。然后，将氯霉素抗性基因的功能拷贝导入 EcoRV 位点，该位点位于克隆的 gpE 序列中间并以粗体显示。然后插入了氯霉素的 gpE 片段构建体被用作线性同源重组敲除载体，所述载体用于位于大肠杆菌宿主菌株 BL21(DE3) 中的 lambda(DE3)gpE 基因的基因敲除。除了应用本文所述的载体之外，如 Kirill A.Datsenko andBarry Wanner, Proc.Natl.Acad.Sci USA 2000;97:6640-6645 所述将此敲除载体导入宿主细胞，通过在存在 6μg/ml 的氯霉素的条件下生长的能力，初步鉴别出推定的 gpE 敲除体，并随后通过 PCR 分析进行确认。保存一个这种 BL21(DE3) 的

gpE 敲除体，并给出 GSK 定名 ECC-023。

[0094] 在非常敏感的噬菌斑测定中检测 ECC-023 中感染性噬菌体颗粒的存在。如表 1 中所示，在不诱导亲代 BL21(DE3) 表达噬菌体时，其表达勉强可检出量的噬菌体，大约 20pfu，但是通过对遗传损伤（紫外照射）的 SOS 应答来诱导时，所述表达大约高三个数量级。然而，即使被处理以诱导 SOS 应答时，gpE 敲除衍生物 ECC-023 也不产生感染性噬菌体的任何证据。数据显示，BL21(DE3) 衍生物 ECC-023 不产生任何可检测的感染性噬菌体颗粒，并因此它对于生物制药来说是适合的宿主细胞菌株。

[0095] 表 1 :从大肠杆菌产生感染性噬菌体颗粒。

[0096]

	PFU/ml	
	未经诱导的	SOS 诱导的
BL21 (DE3)	21	10，000
ECC-023	0	0

[0097] 实施例 2

[0098] 此实施例显示在丰富培养基中培养细胞与在基本培养基中相比，可以防止形成 His- 标记的蛋白的 6-PGL 加合物。

[0099] 由编码 Hexa-his-FabZ 基因的质粒 pET28FabZSa 转化的大肠杆菌 BL21(DE3)，在 MCJK（基本培养基）或 MCJKLB（丰富培养基）中、37℃生长直到 OD600 达到 1.0。MCJK 和 MCJKLB 的培养基组合物在表 2 中描述。

[0100] 表 2 :用于产生 Hexahis-FabZ 的培养基组合物

[0101]

成分	MCJK	MCJKLB
K_2HPO_4	56 mM	56 mM
$(NH_4)_2SO_4$	38 mM	38 mM
$MgSO_4$	5 mM	5 mM
$CaCl_2$	1 mM	1 mM
痕量金属*	1 mL/L	1 mL/L
葡萄糖	10 g/L	10 g/L
酵母提取物	无	5 g/L
细菌用蛋白胨(Bacto-tryptone)	无	10 g/L
*痕量金属溶液：161mM $FeCl_2$, 2.7mM Na_2MoO_4, 1.4mM $ZnSO_4$, 2.5mM $MnCl_2$, 3.2mM $CuSO_4$, 3.4mM $CoCl_2$ 和 3.2mM H_3BO_3		

[0102] 加入异丙基 -beta-D- 硫代半乳吡喃糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalacto-pyranoside)(“IPTG”) 至终浓度 1mM，细胞在 37℃维持 4 小时直至回收。细胞通过在 16,000×g 离心 10 分钟收集，并通过在 10mM Tris，pH8.0、1mMNa_2EDTA、10μg/mL 溶菌酶和 25U/mL

Benzonase(Sigma)中轻轻搅拌来裂解。细胞碎片通过在16,000×g离心10分钟去除,重组蛋白用Ni-NTA树脂根据生产者的推荐(Qiagen Inc.,Valencia,CA)以成批模式从可溶性提取物纯化。通过LC/MS分析来分析异源蛋白中葡糖酸内酯修饰的存在。

[0103] 当培养在基本培养基(MCJK)中进行时,如表3所示,$MGSSH_4$ His-标记异源多肽以总重组蛋白的34%的水平发生葡糖酰化。当培养基以酵母提取物或胰蛋白胨补充或变丰富时,葡糖酰化的蛋白是不可检测的,也在表3中显示。因此,更丰富的培养基的应用可以防止6-PGL加合物的形成。

[0104] 表3:基本培养基相对于丰富培养基对大肠杆菌中所表达His-标记的蛋白的葡糖酰化的影响

[0105]

载体	N-末端	插入	修饰%	宿主	培养基	说明
pET28FabZSa	$MGSSH_6$	FabZ	34%	BL21(DE3)	MCJK	基本培养基
pET28FabZSa	$MGSSH_6$	FabZ	不可检测	BL21(DE3)	MCJKLB	丰富培养基

[0106] 实施例3

[0107] 此实施例显示,在大肠杆菌中表达时,重组CXC趋化因子(也被称为Gro-beta-T)的内部赖氨酸残基可变为葡糖酰化的。人Gro-beta-T的cDNA和氨基酸序列在International Patent Application Publication No.WO 92/00327(Jan.9,1992)以及美国专利6,042,821和美国专利6,413,510中提供,在此它们全部并入以供参考。

[0108] CXC趋化因子(Gro-beta-T)产生过程中,应用定量的、高通量的反相测定法常规监测异源蛋白积累。此分离与高效电喷射飞行时间(″ESI-TOF″)质谱仪连接以提供常规监测产物相关变体的生成的方法。

[0109] 当在大肠杆菌BL21(DE3)宿主中表达时,观察到两种独特的产物修饰。质谱图的解卷积的特征在于,与分子量7,542Da的天然产物相比,变体显示出+178Da和+258Da的质量位移(shift)。

[0110] 使源自这些发酵的产物经过纯化过程。过程中的样品应用能够解析少量产物变体的高分辨率反相测定法鉴定。液相色谱质谱法(″LCMS″)分析证实,新的产物变体显示+258Da(ret.时间～14.8min)和+178Da(ret.时间～15.2Da)的质量位移。

[0111] 已公开的文献指出,先前已经在带有hexa His-标记的被表达蛋白中观察到所述+258Da和+178Da的质量位移,这是由于将6-PGL或葡糖酸内酯添加到N-末端残基而造成的。应用六His-标记时,CXC趋化因子(Gro-beta-T)不表达。此外,该分子中没有显示出任何的组氨酸富含区域。为了证实该物质是与产物相关的,分离每一种变体并进行N-末端测序。测序确认了适当的产物序列并确定没有六His-标记存在。

[0112] 对变体进行胰蛋白酶消化和肽作图。与应用产品标准产生的肽图谱的比较显

示，在胰蛋白酶图谱中有两个新的峰，第一个峰在 45.8min(m/z 1094) 洗脱，第二个峰在 46.5min(m/z 1174) 洗脱。分离新的肽并进行 N- 末端测序，其显示出所述两种肽都具有相同的序列 (NIQSVKVK(SEQ ID NO :4))。序列同一性和 80Da 质量差异的存在提示它们的区别仅仅在于磷酸化的存在。

[0113] 在峰 m/z 1174 进行 LCMS 质谱法分析，MS/MS 实验证实，该峰具有序列 NIQSVKVK(SEQ ID NO :4)。此外，从 y3 开始包括 y3、y4、y5 和 y6 的 y 系列片段离子 (fragment ion) 显示 258Da 的质量增加。然而，y2 离子不显示 258Da 的质量增加。此数据说明，修饰在赖氨酸 (序列中的 23 号) 上的情况，产生 258Da 的质量增加。

[0114] 为了证实观察到的修饰是由于产物葡糖酰化造成的，开发了应用活性的 L- 葡糖酸 -1,5- 内酯 (L-glucono-1,5-lactone) 或葡糖酸的体外实验，先前的工作已经显示，这些物质能够诱导在葡糖酸酰基物质中加入六 His- 标记 [Geohegan, et al.]。

[0115] 纯化的 CXC 趋化因子 (Gro-beta-T) 经缓冲交换到 TRIS 缓冲液、pH 8.0 中。加入 L- 葡糖酸 -1,5- 内酯或葡糖酸至浓度 450mM，并将样品在室温温育 20 分钟。两种内酯都诱导在大肠杆菌中表达过程中观察到的、与 CXC 趋化因子相同的 +178Da 修饰。

[0116] 实施例 4

[0117] 这个实施例举例说明重组人白细胞介素 (人 IL-18) 的内部赖氨酸残基的葡糖酰化，其中所述人 IL-18 在大肠杆菌中表达。

[0118] 联用 ESI-TOF 质谱法和高分辨率反相 HPLC 来筛选白细胞介素产品用于 6-PGL 加合物。对 B- 菌株表达的白细胞介素的分析得到产物相关物质，其显示 +178Da 的质量差异。由于表达的蛋白不带六 His- 标记，如应用 CXC 趋化因子时观察到的那样 (见实施例 3)，修饰很可能发生在内部赖氨酸残基。

[0119] 白细胞介素分子的高分辨率反相 HPLC 分析使得能够鉴定在 RT 21.0、22.0、23.0 分钟呈现 +178Da 质量位移的多种产物和呈现 +258Da 位移 (RT ～ 27.5 分钟) 的其它少量物质。

[0120] 在体外，白细胞介素的修饰也用 L- 葡糖酸 -1,5 内酯在 pH 8.0 进行评估，如在前面的实施例中所述。此反应又产生与白细胞介素在大肠杆菌 B- 菌株中表达时观察到的相同的 +178Da 修饰。

[0121] 实施例 5

[0122] 此实施例显示，在丰富培养基中培养细胞可防止重组蛋白的内部赖氨酸残基的葡糖酰化或 PGL 加合物形成。此研究中比较了三种补料 - 分批发酵法。发酵试验之间的差别是生产阶段中应用的批式培养基和补料组成。丰富培养基被用于工艺 I 发酵，而第二和第三批 (工艺 II 和 III) 用基本培养基进行。甘油用作工艺 I 和 II 的补料培养基，而葡萄糖则用于工艺 III。

[0123] 在大肠杆菌中产生重组白细胞介素的发酵工艺以补料 - 分批模式在 15- 升发酵罐中进行。发酵以批式工艺开始。通过无菌地将 0.5mL 甘油储用培养物转移到 2.8- 升摇瓶中的 1000ml PYE 培养基中制备接种物，如表 4 所示。

[0124] 表 4. 用于将接种物扩增进入发酵罐的种子培养基组合物。

[0125]

成分	批式培养基浓度
酵母提取物	5g/L
植物蛋白胨	10g/L
氯化钠	10g/L
葡萄糖	10g/L
硫酸卡那霉素	50mg/L

[0126] 培养物在27.5℃、旋转振荡器上过夜生长。然后将摇瓶培养物转移到含有5L批式培养基的发酵罐中。生产培养基含有盐、氨基酸和硫酸卡那霉素。此外，丰富培养基用高浓度的酵母提取物和植物蛋白胨补充，如在表5中所示。

[0127] 表5. 用于比较丰富培养基与基本培养基的生产阶段培养基组合物。

[0128]

	批式培养基浓度		
成分	**过程 I**	**过程 II**	**过程 III**
酵母提取物	48 g/L	5.8 g/L	5.8 g/L
植物蛋白胨	24 g/L	1.6 g/L	1.6 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	无	5 g/L	5 g/L
NaCl	无	1.3 g/L	1.3 g/L
葡萄糖	无	无	33.5 g/L
甘油	26 g/L	26 g/L	无
K_2HPO_4	15.3 g/L	6 g/L	6 g/L
KH_2PO_4	1.7 g/L	3 g/L	3 g/L
痕量金属*	1 mL/L	1 mL/L	1 mL/L
$MgSO_4$	5 mM	5 mM	5 mM
$CaCl_2$	1 mM	1 nM	1 nM
硫酸卡那霉素	30 mg/L	30 mg/L	30 mg/L
*痕量金属溶液: $FeCl_2 \cdot 6H_2O$， 37.8 g/L; $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$， 0.7 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$， 0.4 g/L; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$， 0.5 g/L; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$， 0.8 g/L; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$， 0.8 g/L; H_3BO_3， 0.2 g/L			

[0129] 每种培养基的pH应用氢氧化铵保持在大约7.3。将温度控制在大约27.5℃。分别对补料培养基，甘油或葡萄糖进行灭菌，并用硅橡胶管无菌地连接于发酵罐。

[0130] 当培养物中初始批式培养基的量被耗尽时，就开始供给补料培养基。极谱氧电极(polarographic oxygen electrode)监测发酵罐中的溶解氧压(dissolvedoxygen tension)。碳补料速率以级联模式控制以保持超过20％的恒定溶解氧压。将通气保持在10slpm并将压力保持在7.0psig超压(over pressure)。从发酵试验的开始到结束应用800rpm的搅拌速度。在大约40单位OD_{550}时，将100mL 1mM IPTG注入培养物以诱导重组基因表达。

[0131] 对添加IPTG 24小时后收集的样品进行的反相HPLC分析显示，产物中葡糖酸内酯水平降低。工艺I中6-PGL加合物的缺失以及工艺II和III中6-PGL加合物的存在说明，使用丰富培养基而不是甘油碳源是造成6-PGL加合物消除的原因。表6总结了分析的结果。

[0132] 表6. 在生产重组白细胞介素的三种发酵方法中，磷酸葡糖酸内酯加合物的分析。

[0133]

工艺编号	人白细胞介素(IL-18)上的磷酸葡糖酸内酯加合物
工艺I	缺失
工艺II	存在
工艺III	存在

[0134] 实施例6

[0135] 此实施例显示大肠杆菌的K-12菌株具有的pgl活性比B菌株的高100倍。

[0136] 在以下菌株的提取物中，测定6-磷酸葡糖酸内酯酶活性：以BL12(DE3)作为亲本的两种不同菌株ECC005和EC0680以及源自K-12基因型的另外两种菌株EC0706和ATG3995。

[0137] 为了培养这些菌株，含有1L的PYE培养基+1％葡萄糖和50μg/ml卡那霉素的2-L摇瓶用来自冻存小管的0.4mL细胞悬浮物接种。在30℃温育，以220rpm振荡6或7.5小时。在指定的时间点取出样品以在550nm测定光密度(optical density)，并收集沉淀以检测pgl活性。用于进行检测pgl活性的体外实验的详述在下面给出。

[0138] 用荧光计在340nm 25℃、在无细胞提取物中检测pgl活性。该无细胞提取物按照前面所述制备(Maitra and Lobo，Journal of Biological Chemistry 246：475-488(1971))；应用基本相同的悬浮缓冲液，即含有5mM-EDTA和5mM-β-巯基乙醇的50mM-HEPES pH 7.3，但是细胞通过超声法（每次20秒、5个循环）破碎。

[0139] 应用包括一些改变的先前公开的方法(Sinha and Maitra Journal ofGeneral Microbiology，1992；138：1865-1873)来检测pgl。检测方法包括，将含有50μM-葡萄糖-6-磷酸(glucose-6-phosphate)、0.5mM-NADP+和1单位葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的1mL-混合物在含有25mM-KCl和10mM-$MgCl_2$的100mM-MES pH 6.5的缓冲液中进行预-温育。一旦反应达到稳定状态(plateau)，加入2单位的6-磷酸葡糖酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase)造成吸光度的缓慢增加，这是由于在预-温育步过程中形成的6-PGL的自发的水解。在加入无细胞提取物时，荧光的任何显著增加是由于磷

酸葡糖酸内酯酶活性造成的。加入无细胞提取物后，在吸光度增加的线性范围内估计所有的 pgl 活性。

[0140] 酶活性通过减去 6-PGL 自发水解的速率进行估计。酶活性以 mmolNADPH/ 每分钟及每 mg 总蛋白表示。总蛋白通过 Bicinchoninic acid(BCA) 蛋白测定方法 (Pierce, Illinois, USA) 检测。

[0141] 在基于亲本 K-12 基因型的菌株中，我们已经检测到比 B 菌株中高 100- 倍以上的活性。

[0142] 表 7 总结了在两种菌株背景下的酶测定结果。

[0143] 表 7 :在大肠杆菌 K-12 和 B 菌株中测定的磷酸葡糖酸内酯酶活性

[0144]

“K” 菌株	培养	活性	自发水解
菌株	时间(小时)	(mmol NADH/min/mg 蛋白)	(mmol/min/mg 蛋白)
ATCC 10798	5.5	1.061	0.0011
	6.5	2.899	0.0012
	7.5	2.584	0.0012
表达人白细胞介素 (IL-18)的 K-12	7.5	3.539	0.0011
“B” 菌株	培养	活性	自发水解
菌株	时间(小时)	(mmol NADH/min/mg 蛋白)	(mmol/min/mg 蛋白)
ATCC 10798	5.5	0.028	0.0012
表达人白细胞介素 (IL-18)的 BL21(DE3)	5.5	0.032	0.0012
	6.5	0.019	0.0011
	7.5	0.032	0.0012

[0145] 实施例 7

[0146] 此实施例显示异源多肽 CXC 趋化因子 (还被称为 Gro-beta-T) 在大肠杆菌 BL21 菌株中的表达产生 6-PGL 加合物，然而在 K-12 菌株中表达同样的多肽防止内部赖氨酸的葡糖酰化。

[0147] 应用为重组表达 CXC 趋化因子而构建的四种不同大肠杆菌菌株，进行十次发酵试验。此实例通过应用两种分别带有每种宿主细胞背景的表达系统，显示了相对于启动子系统，宿主背景对于重组蛋白 6-PGL 加合物形成的存在的影响。表 8 描述了用到的菌株。

[0148] 表 8 :用于在大肠杆菌中表达 CXC 趋化因子的宿主背景和启动子系统。

[0149]

菌株号	宿主背景	启动子系统
1	BL21(DE3)	T7 聚合酶
2	K-12(DE3)	T7 聚合酶
3	BL21(DE3)	Lambda pL
4	K-12	Lambda pL

[0150] 用于在大肠杆菌中产生 CXC 趋化因子 (Gro-beta-T) 的发酵以补料分批模式在 15- 升发酵罐中进行。发酵以批式工艺开始。通过无菌地将 0.75mL 的甘油储用培养物转移到 500mL 带有挡板摇瓶中的 100mL PYE 培养基中，制备接种物。培养物在 32.0℃、在旋转振荡器上生长 7 小时。然后将摇瓶培养物与 1.0L 的 PYE 培养基混合，并转移到含有 8.0L 批式培养基的发酵罐中。生产培养基含有盐以及羧苄青霉素或者硫酸卡那霉素（根据启动子而不同）。用于种子扩增的培养基配方在表 9 中提供，而用于在大肠杆菌中产生 CXC 趋化因子的培养基配方在表 10 中提供。

[0151] 表 9 ：用于种子扩增的培养基配方

[0152]

成分	浓度
酵母提取物	5g/L
植物蛋白胨	10g/L
氯化钠	10g/L
葡萄糖	10g/L
硫酸卡那霉素	50mg/L

[0153] 表 10 ：在大肠杆菌中生产 CXC 趋化因子的培养基配方

[0154]

成分	浓度
硫酸铵	5 g/L
磷酸氢二钾	6 g/L
磷酸二氢钾	3 g/L
氯化钠	1.3 g/L
葡萄糖	18 g/L
硫酸镁	4.8 g/L
生物素	1 mg/L
痕量金属*	10 mL/L
硫酸卡那霉素	50 mg/L
	-或-
羧苄青霉素	25 mg/L
*痕量金属溶液：$FeCl_2 \cdot 6H_2O$, 3.78 g/L; $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$, 0.7 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.4 g/L; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.5 g/L; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.8 g/L; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.8 g/L; H_3BO_3, 0.2 g/L	

[0155] 每种培养基的pH用氢氧化铵保持在大约7.0。温度控制在大约32.0℃并在诱导时升高到大约37.5℃。分别对补料培养基和葡萄糖灭菌，并应用硅橡胶管无菌地连接于发酵罐。

[0156] 当培养物中初始批式培养基的量被耗尽时，就开始供给补料培养基。极谱氧电极监测发酵罐中的溶解氧压。碳补料速率以级联模式控制以保持超过大约25％的恒定溶解氧压。将通气保持在10slpm并将压力保持在大约7.0psig超压。在开始时应用大约400rpm的搅拌速度，并根据需要提高以保持大约25％的溶解氧压。在大约14单位OD_{550}时，将100mL 1.0mM IPTG注入培养物，或将温度提高至37.5℃以诱导重组基因表达。

[0157] 所有应用K-12宿主背景的发酵试验中，都没有检测到6-PGL加合物在重组表达的多肽上的形成，然而应用与T7启动子协同的B菌株的试验中，都可检测到6-PGL加合物在重组表达的多肽上形成的存在。应用B菌株和pL启动子的三次试验则没有可检出的加合物形成。这些数据显示出，在具有pgl活性的宿主菌株例如K-12中，表达重组蛋白可防止6-PGL加合物在对此修饰敏感的重组蛋白中形成，参见实施例3。对于每次发酵，在大肠杆菌B和K-12菌株中，所表达的CXC趋化因子中6-PGL加合物形成的存在见表11。

[0158] 表11：在大肠杆菌B和K-12菌株中由T7或pL启动子表达的CXC趋化因子上6-PGL加合物的存在

[0159]

菌株基因型	启动子	试验次数	诱导 5 小时后葡糖酸内酯加合物 [产物峰的%]
B	T7	1	21.7
		2	5.8
		3	4.2
		平均	10.6
K-12	T7	1	0
		2	0
		平均	0
B	pL	1	0
		2	0
		3	0
		平均	0
K12	pL	1	0
		2	0
		平均	0

[0160] 实施例 8

[0161] 此实施例显示异源多肽人白细胞介素 (人 IL-18),在大肠杆菌 BL21 菌株中的表达导致 6-PGL 加合物形成,然而在 K-12 菌株中表达该多肽可防止内部赖氨酸的 6- 磷酸葡糖酰化。

[0162] 构建大肠杆菌 BL21(DE3) 和 K-12 菌株以表达白细胞介素 (人 IL-18)。培养物在如实施例中所述的基本培养基中生长。6-PGL 对产物的修饰的监测应用实施例中所述的方法、在培养整个过程中的不同时间点进行。

[0163] 结果表示为未修饰的产物与经修饰的产物之峰面积比。越大的数字表示越小的葡糖酰化产物比例。明显地,BL21(DE3) 菌株中葡糖酰化的程度明显高于 K-12 菌株中的所述程度。在大肠杆菌的 B 和 K-12 菌株中表达的人白细胞介素 (人 IL-18) 的磷酸葡糖酰化总结于表 12 中。

[0164] 表 12 :在大肠杆菌 B 和 K-12 菌株中表达的人白细胞介素的磷酸葡糖酰化

[0165]

大肠杆菌菌株	诱导后时间 (小时)	未修饰的产物与经修饰的产物的面积比率
K-12	16	58.4
	18	44.5
	20	N/d
	22	29.3
	24	30.0
BL21 (DE3)	22	8.3
	24	7.7
N/d = 经修饰的产物检测不到		

[0166] 实施例 9

[0167] 此实施例举例说明异源 pgl 在大肠杆菌宿主细胞中的过量表达导致 6-PGL 到其产物 6- 磷酸葡糖酸的代谢转化增加,由此减少了可用于加合物形成的 6-PGL 池 (pool)。克隆铜绿假单胞菌 (P.aeruginosa)pgl 基因,并构造入基于质粒的可诱导型表达载体系统中,该载体系统与基于 colE1 复制起始的质粒相容,使得两种不同的质粒可在同样的宿主细胞中保持。铜绿假单胞菌 pgl 的诱导型表达水平能够以不依赖于内源大肠杆菌代谢途径且不依赖于目标重组蛋白的诱导型表达的方式随意调控。因此,能够调控重组 pgl 表达以使 6-PGL 池减少到低于用于加合物形成所需的水平,但不达到实质上影响宿主细胞来源的程度。因此,能够独立地调控所需重组蛋白的水平以提供非常高的表达水平。

[0168] 铜绿假单胞菌 pgl 的克隆

[0169] 如下克隆铜绿假单胞菌 pgl。铜绿假单胞菌从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection)(American Type Culture Collection,12301Parklawn Drive, Rockville MD 20852-1776) 获得 :铜绿假单胞菌 (Pseudomonasaeruginosa),菌株 ATCC 27853。设计并合成 5′ 和 3′ PCR 扩增引物以指导整个 pgl 基因的 PCR 扩增,所述 pgl 基因中包括紧邻起始密码子 ATG 上游的区域,有义和反义扩增引物的序列分别为 :

[0170] 5′ GGCCTCGAGCTCGGTGGCCCTGGTGGCCC 3′ (SEQ ID NO :4) 和

[0171] 5′ GCCCTCGAGTCCGCCACTCAGGGGTACCAAT 3′ (SEQ ID NO :5) 粗体的序列显示导入该基因以实现后续克隆步骤的 XhoI 位点。

[0172] 此外发现铜绿假单胞菌基因是非常富含 GC 的,并且在普通的扩增条件下不能通过 PCR 扩增。发现 PCR 扩增需要应用经优化以用于富含 GC 的模板的 PCR 扩增条件,所述富含 GC 的模板具体为 Advantage-GC cDNA PolymeraseMix(cat.8419-1 ;BD Biosciences Clontech :Palo Alto,CA ;USA)。在 94℃ 30 秒 25 个循环、然后 68℃ 1.5 分钟之后,编码多肽

SEQ ID NO:8 的相应 pgl DNA 序列 (SEQ ID NO:7) 自完整的铜绿假单胞菌细胞中通过 PCR 扩增出来。然后在 68℃单独地温育 3 分钟以完成扩增。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳和柱色层析通过 QIAquick Gel Extraction 试剂盒 (cat.28704,Qiagen:Valencia,CA;USA) 分离。经扩增、凝胶纯化的 pgl DNA 在水中洗脱,并立即应用 TOPO TA Cloning® 试剂盒 (cat.K4550-40,Invitrogen:Carlsbad,CA;USA) 克隆到克隆载体 pCR2.1 中,再转化入 One Shot® TOP10 化学感受态大肠杆菌 (ChemicallyCompetent E.coli)(cat.C4040-06, Invitrogen:Carlsbad, CA;USA) 中。通过 E.coRI 消化及产物的电泳筛选所得 amp^r 菌落中的插入体 (insert)。其序列经验证的插入体通过 XhoI 消化从克隆载体中释放并应用 QIAquick 凝胶提取试剂盒纯化。pECO-1 表达载体 DNA(BioCat73552,GlaxoSmithKline:King ofPrussia, PA;USA) 用 SaII 切割并以小牛肠碱性磷酸酶 (Calf Intestinal AlkalinePhosphatase) (CIP)(cat M0290S,New England Biolabs:Beverly,MA;USA) 处理,然后应用 QIAquick 凝胶提取试剂盒纯化。经 XhoI 消化的插入体和经 SalI 处理的 pECO-1 用 T4 DNA 连接酶基本上根据生产者所述来连接 (cat.M0202S;New England Biolabs:Beverly,MA;USA)。将 2 微升 (2μl) 的连接反应物根据生产者的描述转化入 One Shot® TOP10 化学感受态大肠杆菌细胞 (cat.C4040-06,Invitrogen:Carlsbad,CA;USA)。通过 PCR 筛选菌落中方向正确的 pgl 插入体的存在。为了如下又所述进一步研究,选出克隆 pECO-1 pglcl2-13。

[0173] 得到的构建体基于 pACYC184 质粒骨架,并包含下列的基因功能元件:(1)p15A ori,其允许与带有 colE1- 型 ori 元件的异源质粒同样的宿主细胞中的质粒附加体保持;(2) 氯霉素抗性 ($chloramphenical^r$) 选择性标记;(3) 多克隆位点上游的四环素诱导型启动子 (tetracycline inducible promoter);(4) 全长铜绿假单胞菌 pgl 基因。

[0174] 如上所述,将最终的构建体 pECO-1pglcl2-13 转化入 BL21(DE3) 细胞用于进一步研究,所述细胞表达人白细胞介素。pECO-1pglcl2-13 序列的 DNA 序列如 SEQ ID NO:9 所示,且 pECO-1pgicl2-13 的限制性图谱在图 1 中给出。

[0175] 培养如实施例 3 所述进行。6-PGL 加合物的分析如实施例 4 中的描述进行。磷酸葡糖酸内酯酶活性如实施例 6 中的描述测定。表达本研究中所检测的人白细胞介素 (IL-18) 的其它菌株包括无 pECO-1pglcl2-13 的 BL21(DE3) 和 K-12。含 pgl 质粒的菌株在添加和不添加 20ng/mL 无水四环素 (anhydrotetracycline) 的情况下检测。在表达 pgl 的细胞中没有六 -PGL 加合物形成的情形总结于表 13 中,如下所示。

[0176] 表 13:pgl 表达对于人白细胞介素的磷酸葡糖酰化的影响

[0177]

菌株	最大 pgl 活性 IU/min/g DCW	人白细胞介素 (IL-18)上 6-PGL 加合物 的形成
BL21 (DE3)	0.002	存在
BL21 (DE3) pECO-1 pglcl2-13， 无 tet	0.56 ± 0.13	缺失
BL21 (DE3) pECO-1 pglcl2-13， tet 诱导的	0.64 ± 0.11	缺失
K-12	0.96 ± 0.14	缺失
DCW = 干细胞重		

[0178] 此实施例已经说明，假单胞菌磷酸葡糖酸内酯酶与人白细胞介素 (IL-18) 的共表达成功地防止大肠杆菌 B 菌株中 6-PGL 加合物的形成。

[0179] 实施例 10

[0180] 人白细胞介素 (IL-18) 是免疫调节性细胞因子，其正在被开发成为抗癌试剂用于肾细胞癌和恶性黑素瘤的治疗。人和鼠 IL-18 的描述在下述美国专利中给出：美国专利 6,582,689、美国专利 5,914,253、美国专利 5,879,942、美国专利 5,912,324、美国专利 5,914,253、美国专利 6,060,283、美国专利 6,087,116 和美国专利 6,214,584，其在此全部并入以供参考。IL-18 被认为刺激免疫系统，促进 Fas- 诱导的肿瘤细胞死亡和细胞介导的免疫。IL-18 的多肽序列 (SEQ ID NO:10) 可在大肠杆菌 BL21(DE3) 中产生。它可自 pro-IL18 的多核苷酸序列 (SEQ ID NO:11) 表达，并通过在同一细胞中共表达的加工酶 (processing enzyme)Caspase 5 进一步加工为成熟的 IL-18。

[0181] 将来自革兰氏阴性细菌铜绿假单胞菌的 6- 磷酸葡糖酸内酯酶克隆到 BL21(DE3) 菌株中。在该菌株中 IL-18 的生产产生出检测不到加合物形成的 IL-18，这导致所需产物的产率直接增加。此外，pgl 缺陷的较正也导致比产率＞ 10％的增加。因此，通过应用经修饰的生产菌株，产品质量和比生产率改进的组合效果已经转化为在发酵阶段效价收率 (titer yield) ＞ 25％的提高。可以预期，加合物形成的消除对于纯化过程具有直接的、积极的影响，并进一步增加总工艺收率 (overall process yield)。

[0182] 实施例 11

[0183] IL-18 的葡糖酰化通过对共表达或不共表达 pgl 的 BL21(DE3) 细胞中产生的 IL-18 进行 HPLC 分析来监测。在洗脱经纯化的 IL-18 大约两分钟之后，加合物形成作为肩峰 (shoulder peak) 被检测到。当 IL-18 在大肠杆菌菌株 BL21DE3(pgl-(minus)) 中表达并从中纯化时，IL-18 的主峰面积 (main peak area)（即，没有可检测到的葡糖酸酰基加合物形成的 IL-18 峰面积）大约为 56％。而在 BL21 DE3(pgl 阳性 (plus)) 细胞中，基于高分辨率 HPLC 测定，IL-18 的表达和纯化产生大约 88％的主峰面积，并显示没有加合物形成。

[0184] 实施例 12

[0185] 创建两个载体，包含编码 pro-IL-18(SEQ ID NO:11)、Caspase 5(SEQ IDNO:12) 的多核苷酸。两者均为 pET 载体，其中多肽产生应用 T7 启动子诱导。一个载体还包含编码来

自铜绿假单胞菌的 pgl 的多核苷酸 (SEQ ID NO :7)，其由与 pro-IL-18 一样的启动子诱导。包含 pro-IL-18 和 Caspase 5 的 pET 载体的全部序列在 SEQ ID NO :13 中给出。此载体的限制性图谱在图 2 中给出。包含 pro-IL-18、Caspase 5 和 pgl 的 pET 载体的全部序列在 SEQ ID NO :14 中给出。此载体的限制性图谱在图 3 中给出。当应用这些载体在大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞中表达 IL-18 时，如果该多肽与 pgl 共表达，可回收的 IL-18 的量与无 pgl 的情况下 IL-18 的表达相比前者极大地提高。从大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞中的每个表达载体得到的回收的 IL-18 的量在表 14 中给出。

[0186] 表 14 :在共表达或不共表达 pgl 的大肠杆菌“B”菌株中产生的 IL-18 最大效价

[0187]

菌株*	pgl 基因	最大效价 (g/L)
RBB057	无	4.32 (+/- 0.4)
RBB059	有	6.78 (+/- 0.1)
*两种菌株都为大肠杆菌 B 菌株		

[0188] 本说明书中引用的所有的出版物和参考文献，包括但不限于专利和专利申请，在此全文并入以供参考，如同具体而个别地指出每个单独的出版物和参考文献如前述在此并入以供参考。本申请要求其优先权的任何专利申请也以前面对于出版物和参考文献所述的方式在此全部并入以供参考。

序列表

<110> 史密丝克莱恩比彻姆公司

<120> 防止蛋白质葡糖酰化的方法

<130>PU60116

<140>To Be Assigned
<141>2004-03-04

<150>60/451,686
<151>2003-03-04

<160>14

<170>FastSEQ for windows Version 4.0

<210>1
<211>24
<212>DNA
<213> 大肠杆菌 (ESCHERIACHIA COLI)
<400>2
agctggccat tgctcaggtc gaag 24

<210>2
<211>25
<212>DNA
<213> 大肠杆菌 (ESCHERIACHIA COLI)

<400>2
gtactgtccg gaatacacga cgatg 25

<210>3
<211>413
<212>DNA
<213> 大肠杆菌 (ESCHERIACHIA COLI)

<400>3

agctggccat tgctcaggtc gaagagatgc aggcagtttc tgccgtgctt aagggcaaat 60
acaccatgac cggtgaagcc ttcgatccgg ttgaggtgga tatgggccgc agtgaggaga 120
ataacatcac gcagtccggc ggcacggagt ggagcaagcg tgacaagtcc acgtatgacc 180
cgaccgacga tatcgaagcc tacgcgctga acgccagcg ～ tgtggtgaat atcatcgtgt 240
tcgatccgaa aggctgggcg ctgttccgtt ccttcaaagc cgtcaaggag aagctggata 300
cccgtcgtgg ctctaattcc gagctggaga cagcggtgaa agacctgggc aaagcggtgt 360
cctataaggg gatgtatggc gatgtggcca tcgtcgtgta ttccggacag tac 413

<210>4
<211>8
<212>PRT
<213> 人 (HOMO SAPIENS)

<400>4

Asn lie Gin Ser Val Lys Val Lys
15

<210>5
<211>29
<212>DNA

<213> 铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)

<400>5
ggcctcgagc tcggtggccc tggtggccc 29

<210>6
<211>3i
<212>DNA
<213> 铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)

<400>6
gccctcgagt ccgccactca ggggtaccaa t 31

<210>7
<211>732
<212>DNA
<22.3> 铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)

<400>7

atgggaggag ttggtatggc gatttctgag ttgaagctgc cggccggcgt cggcctgcag 60
gtctggggca gcgccgccga gcaggcccgc ggcctggccg ccgaggtcgc cggccggttg 120
cgctcggcgc.tggccgagca gggccaggcg ctgctggtgg tgtccggtgg gcgcagtccg 180
gtggccttcc tcgaagcctt gagcgaggag ccgctggact ggtcgcggat caccgtcagc 240
ctggccgacg agcgctgggt gccggagtcg catgccgata gcaacgccgg cctggttcgc 300
cgccacctgc tccgtggcga ggcggcgaag gcgcgcttca tcggcctcta ccagccggcg 360
gcgagcctgg aggaagcggc cgagctggcc gaccatcacc tgcacgagct gccattgccg 420
atcgacgtgc tggtcctcgg catgggcgac gacggccata ccgcctcgct gttcccgaac 480
agcccctggcC tggacctggc gatggatccc caggggacgc gccgttgcct gccgatgtgg 540
gcgccgagcg tgccgcacca gcgcctgacc ctgccgcgcg ccgtgctggc ggcggcgaag 600
gtgcagctgc tggcgatcca gggccagtcc aagctggcca ccctgaacgc cgcgctggcg 660
gtcgaggacg aacggcggat gccggttcgc gccttcctcc gcgcgccgct gacgatccat 720
tggtacccct ga 732

<210>8
<211>243
<212>PRT
<213> 铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)

<400>8

Met Gly Gly Val Gly Met Ala lie Ser Glu Leu Lys Leu Pro Ala Gly
1 5 10
Val Gly Leu Gin Val Trp Gly Ser Ala Ala Glu Gin Ala Arg Gly Leu
15 20 25
Ala Ala Glu Val Ala Gly Arg Leu Arg Ser Ala Leu Ala Glu Gin Gly
30 35 40
Gin Ala Leu Leu Val Val Ser Gly Gly Arg Ser Pro Val Ala Phe Leu
45 50 55
Glu Ala Leu Ser Giu Glu Pro Leu Asp Trp Ser Arg lie Thr Val Ser
60 65 70 75
Leu Ala Asp Glu Arg Trp Val Pro Giu Ser His Ala Asp Ser Asn Ala
80 85 90
Gly Leu Val Arg Arg His Leu Leu Arg Gly Glu Ala Ala Lys Ala Arg
95 100 105
Phe Ile Gly Leu Tyr Gin Pro Ala Ala Ser Leu Glu Giu Ala Ala Glu
110 115 120

Leu Ala Asp His His Leu His Glu Leu Pro Leu Pro Ile Asp Val Leu
125 130 135
Val Leu Gly Net Gly Asp Asp Gly His Thr Ala Ser Leu Phe Pro Asn
140 145 150 155
Ser Pro Gly Leu Asp Leu Ala Met Asp Pro Gln Gly Thr Arg Arg Cys
160 165 170
Leu Pro Met Trp Ala Pro Ser Val Pro His Gin Arg Leu Thr Leu Pro
175 180 185
Arg Ala Val Leu Ala Ala Ala Lys Val Gin Leu Leu Ala lie Gin Gly
190 195 200
Gin Ser Lys Leu Ala Thr Leu Asn Ala Ala Leu Ala Val Glu Asp Glu
205 210 215
Arg Arg Met Pro Val Arg Ala Phe Leu Arg Ala Pro Leu Thr Lie His
220 225 230 235
Trp Tyr Pro
240

<210>9
<211>3416
<212>DNA
<213> 人工序列
<223> 包含 PECO-1 表达 & 铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)

<400>9
gaattccgga tgagcattca tcaggcgggC aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt 60
gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata tccagctgaa cggtctggtt 120
ataggtacat tgagcaactg actgaaatgC ctcaaaatgt tctttacgat gccattggga 180
tatatcaacg gtggtatatc cagtgatttt tttctccatt ttagcttcct tagctcctga 240
aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt 300
ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgccaa aagttggccc agggcttccc 360
ggtatcaaCa gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttccg tcacaggtat 420
ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt 480
gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg 5~0
acggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca gcgctagcgg agtgtatact 600
ggcttactat gttggcactg atgagggtgt cagtgaagtg cttcatgtgg caggagaaaa 660
aaggctgcac cggtgcgtCa gcaga.atatg tgataca.gga tatattccgC ttcctcgctc 720
actgactcgc tacgctcggt cgttcgactg cggcgagcgg aaatggctta cgaacggggc 780
ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg aagtgagagg gccgcggcaa 840
agccgttttt ccataggctc cgccccccctg acaagcatca cgaaatctga cgctcaaatc 900

agtggtggCg aaacccgaCa ggactataaa gataccaggc gtttcccccc t. ggcggctccc 960
tcgtgcgctc tcctgttcCt gcctttcggt ttaccggtgt cattccgctg ttatggccgc 1020
gtttgtctca ttccacgcCt gacactcagt tccgggtagg cagttcgctc caagctggac 1080
tgtatgcacg aacccccccgt tcagtccgaC cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 1140
gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca. ccactggcag cagccactgg taattgattt 1200
agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg 1260
tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaagag ttggtagctc agagaacctt 1320
cgaaaaaccg ccctgcaagg cggtttttc gttttcagag caagagatta cgcgcagacc 1380
aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa tatttctaga tttcagtgca 1440
atttatctct tcaaatgtag cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgtaattctc 1500
atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt aatgcggtag tttatcacag t±aaattgct 1560
aacgcaqtca ggcaccgt～t catatggatc ccgggtaccg tcgagctcga gctcggtggc 1620
cctggtggcc cgcgatggga ggagttggta tggcgatttc tgagttgaag ctgccggccg 1680
gcgtcggcct gcaggtctgg ggcagcgccg ccgagcaggc ccgcggcctg gccgccgagg 1710
tcgccggccg gttgcgctcg gcgctggccg agcagggcca ggcgctgctg gtggtgtccg 1800
gtgggcgcag tccggtggcc ttcctcgaag ccttgagcga ggagccgctg gactggtcgc 1860
ggatcaccgt cagcctggcc gacgagcgct gggtgccgga gtcgcatgcc gatagcaacg 1920
ccggcctggt tcgccgccac ctgctccgtg gcgaggcggc gaaggcgcgc ttcatcggcc 1980
tctaccagcc ggcggcgagc ctggaggaag cggccgagct ggccgaccat cacctgcacg 2040
agctgccatt gccgatcgac gtgctggtcc tcggcatggg cgacgacggc cataccgcct 2100
cgctgttccC gaacagccct ggcctggacc tggcgatgga tccccagggg acgcgccgtt 2160
gcctgccgat gtgggcgccg agcgtgccgc accagcgcct gaccctgccg cgcgccgtgc 2220
tggcggcggc gaaggtgcag ctgctggcga tccagggcca gtccaagctg gccaccctga 2280
acgccgcgct ggcggtcgag gacgaacggc ggatgccggt tcgegccttc ctccgcgcgc 2340
cgctgacgat ccattggtac ccctgagtgg cggactcgac tagtcaacgc catgagcggc 2400
ctcatttctt attctgagtt acaacagtcc gcaccgctgt ccggtagctc cttccggtgg 2460
gcgcggggca tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta 2520
ggacaggtgc cggcagcgcc caacagtccc ccggccacgg ggcctgccac catacccacg 2580
ccgaaacaag cgccctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta 2640
ccctgtggaa cacctacatc tgtattaacg aagcgctaac cgtttttatc aggctctggg 2700
aggcagaata aatgatcata tcgtcaatta ttacctccac ggggagagcc tgagcaaact 2760
ggcctcaggc atttgagaag cacacggtca cactgcttcc ggtagtcaat aaaccggtaa 2820
accagcaata gacataagcg gctatttaac gaccctgccc tgaaccgacg accgggtcga 2880
atttgctttc gaatttctgc cattcatccg cttattatca cttattcagg cgtagcacca 2940
ggcgtttaag ggcaccaata actgccttaa aaaaattacg ccccgccctg ccactcatcg 3000
cagtactgtt gtaattcatt aagcattctg ccgacatgga agccatcaca gacggcatga 3060
tgaacctgaa tcgccagcgg catcagcacc ttgtcgcctt gcgtataata tttgcccatg 3120
gtgaaaacgg gggcgaagaa gttgtccata ttggccacgt ttaaatcaaa actggtgaaa 3180
ctcacccagg gattggctga gacgaaaaac atattctcaa taaacccttt agggaaatag 3240

gccaggtttt caccgtaaca cgccacatct tgcgaatata tgtgtagaaa ctgccggaaa 3300
tcgtcgtggt attcactcca gagCgatgaa aacgtttcag tttgctcatg gaaaacggtg 3360
taacaagggt gaacactatC ccatatcacc agc～caccgt ctttcattqc catacg 3416

<210>10
<211>157
<212>PRT
<213> 人 (HOMO SAPIENS)

<400>10
Tyr Phe Gly Lys Leu Giu Ser Lys Leu Ser Val lie Arg Asn Leu Asn
1 5 10
Asp Gin Val Leu Phe lie Asp Gin Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
15 20 25
Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr lie Phe Ile
30 35 40
lie Ser Net Tyr Lys Asp Ser Gin Pro Arg Gly Net Ala Val Thr Ile
45 50 55
Ser Val Lys Cys Glu Lys lie Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
60 65 70 75
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn lie Lys Asp Thr Lys
80 85 90
Ser Asp lie lie Phe Phe Gin Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
95 100 105
Met Gin Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
110 115 120
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu lie Leu Lys Lys Giu Asp Glu Leu
125 130 135
Gly Asp Arg Ser lie Met Phe Thr Val Gin Asn Giu Asp
140 145 150 155

<210>11
<211>582
<212>DNA
<213> 人 (HOMO SAPIENS)

<400>11
atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatga-a atttattgac 60

aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggcaag 120
cttgagagca aactatcggt cattcgtaat ttaaatgacc aggtcctatt tatcgaccaa 180
gggaatcgtC cactattcga ggacatgaca gacagtgact gccgagacaa tgcgccgCga 240
accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc gcggaatggc cgtaactatt 300
tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tcgtgtgaga acaagattat tagtttcaaa 360
gagatgaatC cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt tttccagcgc 420
agcgtgcCgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga agggtacttt 480
cttgcatgcg agaaggaacg cgatctcttt aaacttattt taaagaaaga ggacgagcta 540
ggcgatcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact ag 582

<210>12
<211>849
<212>DNA
<213> 人 (HOMO SAPIENS)
<400>12
atgggccatc atcatcatca tcatggcata ctcaaacttt gtcctcgtga agaattcctg 60
agactgtgta aaaaaaatca tgatgagatc tatccaataa aaaagagaga ggaccgcaga 120
cgcctggctc tcatcatatg caatacaaag tttgatcacc tgcctgcaag gaatggggct 180
cactatgaca tcgtg～ggat gaaaaggctg cttcaaggcc tgggctacac tgtggttgac 240
gaaaagaatC tcacagccag ggatatggag tcagtgctga gggcatttgc tgccagacca 300
gagcacaagt cctctgacag cacgttcttg gtactcatgt ctcatggcat cctagaggga 360
atctgcggaa ctgcgcataa aaagaaaaaa ccggatgtgc t.gctttatga caccatcttc 420
cagatattCa acaaccgCaa ctgcctcagt ctaaaggaca aacccaaggt catcattgtc 480
caggcctgca gaggtgaaaa acatggggaa ctctgggtca gagactctcc agcatccttg 540
gcagtcatct cttcacagtc atctgagaaC ctggaggcag attctgtttg caagatccac 600
gaggagaagg acttcattgc tttctgttct tcaacaccac ataacgtgtc ctggagagac 660
cgcacaaggg gctccatctt cattacggaa ctcatcacat gcttccagaa atattcttgc 720
tgctgccacC taatggaaat atttcggaag gtacagaaat catttgaagt tccacaggct 780
aaagcccaga tgcccaccat agaacgagCa accttgacaa gagatttcta cctctttcct 840
ggcaattga 849

<210>13
<211>6687
<212>DNA
<213> 人工序列
<223> 包含 pET 载体和人

<400>13
tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60

cagcgtgacC gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccctttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag 1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtaC ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
cccttgtatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttte cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta.tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gccttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280
tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatggtgc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400

ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtCc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgat.aaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggt aaacaactgg cggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaca taatggtgca gggcgctgaC ttccgcgttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattC tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcacCC gtggggccgc 3180
catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgacgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat gacccagagC gctgccggCa cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgaCg atagtcatgc cccgcgccca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatC ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgCg gggagaggCg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagC ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaaCca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcC agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccaCgcC cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagaC atcaagaaat aacgCCggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtC atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgC gcgagaagat 4260
tgtgcaCCgC cgctttacag gcttcgaCgC cgcttcgttc taccatcgac accaccacgC 4320
tggcacccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctCCg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
c ～ tactctgC gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttcCgggcg ctatcatgCC ataccgCgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740

ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccaC cataccCacg ccgaaaca.ag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat cttccccatC ggtgatgtCg gcgatatagg cgccagcaaC cgcacctgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcact.ata.ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaccaca 5040
ccttaaggag gatataacat atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg 5100
tggcaatgaa.atttattgac aatacgcbtt actttatagC tgaagatgat gaaaacctgg 5160
aatcagatta ctttggcaag cttgagagca aactatcggt cattcgtaat ttaaatgacc 5220
aggtcctatt tatcgaccaa gggaatcgtc cactattcga ggacatgaca gacagtgact 5280
gccgagacaa tgcgccgcga accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc 5340
gcggaatggc cgtaactatt tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tcgtgtgaga 5400
acaagattat tagtttcaaa gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg 5460
atatcatatt tttccagcgc agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat 5520
ccagctatga agggtacttt cttgcatgcg agaaggaacg cgatctcttt aaacttattt 5580
taaagaaaga ggacgagcta ggcgatcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact 5640
agtggaggat ataataccag gaataaataa aatccat9gg ccatcatcat catcatcatg 5700
gcatactCaa actttgtcct cgtgaagaat tcctgagact gtgtaaaaaa aatcatgatg 5760
agatctatcC aataaaaaag agagagga～cc gcagacgcct ggctctcatc atatgcaata 5820
caaagtttga tcacctgcct gcaaggaatg gggctcacta tgacatcgtg gggatgaaaa 5880
ggctgcttca aggcctgggc tacactgtgg ttgacgaaaa gaatctcaca gccagggata 5940
tggagtcagt gctgagggca tttgctgcca gaccagagca caagtcctct gacagcacgt 6000
tcttggtact catgtctcat ggcatcctag agggaatctg cggaactgcg cataaaaaga 6060
aaaaaccgga tgtgctgctt tatgacacca tcttccagat attcaacaac cgcaactgcc 6120
tcagtctaaa ggacaaaccC aaggtcatca ttgtccaggC ctgcagaggt gaaaaacatg 6180
gggaactctg ggtcagagaC tctccagcat ccttggca-gt catctcttca cagtcatctg 6240
agaacctgga ggcagattct gtttgcaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct 6300
gttcttcaac accacataac gtgtcctgga gagaccgcac aaggggctcc atcttcatta 6360
cggaactcat cacatgcttC cagaaatatt cttgctgctg ccacctaatg gaaatatttc 6420
ggaaggtaca gaaatcattt gaagttccac aggctaaagc ccagatgccc accatagaac 6480
gagcaacctt gacaagagat ttctacctct ttcctggcaa ttgactcgag caccaccacc 6540
accaccactg agatccggct gctaacaaag cccgaaagga agctgagttg gctgctgcca 6600
ccgctgagca ataactagca taacccccttg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt 6660
tgctgaaagg aggaactata tccggbt 6687

<210>14
<211>7454
<212>DNA
<213> 人工序列
<214> 包含 pET 载体 & 人,铜绿假单胞菌

<400>14

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggCgC attaagCgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccCt agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccCCg tcaagctcta aatcgggggc tccctbtagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct-cggtctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa～660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagCga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac′ 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca.tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag 1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
cccttgtatt actgtttatg taagcagaca gttt～attgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttte cgaaggtaac tggcttcagc 1600
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcC tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccaggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gccttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220

agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg 2280
tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacacg ca tatatggtgc actctcagta 2340
caatctgCtC tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gctcccggCa tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580
gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaa.t gtctggcttC tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg gggg～aatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcaCga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggt aaacaactgg cggtatggat gcggcgggaC cagagaaaaa tcactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcC agcagcatcc 2940
tgcgatgcag atccggaaCa taatggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgcagca 3060
gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgacgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggtcct cgccgaaaat gacccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgccca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcatc ggtcgagatC ccggtgccta 3480
atgagtgagC taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa .3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600
tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcC ctgagagagt tgcagcaagC ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa .3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactaC cgagatatcC gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgccCagCgC catctgatcg ttggcaacca.gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 3900
gcatttg～at ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020
agacagaact taatgggCCc gctaacagCg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaCCgC cgctttacag gcttcgaCgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcacccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctCCg ccatcgccgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaaC gtggctggcC tggttcacca cgcgggaaaC ggtctgataa gagacaccgg 4560

catactCtgc gacatcgtat a.acgttaCtg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttcCgggCg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgccgccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800
ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcCCgat cttccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgccggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980
aattaatacg actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaccaca 5040
ccttaaggag gatataacat atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg 5100
tggcaatgaa atttattgac a.atacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg 5160
eatcagatta ctttggcaag cttgagagca a.actatcggt cattcgtaat ttaaatgacc 5220
aggtcctatt tatcgaccaa gggaatcgtc cactattcga ggacatgaca gacagtgact 5280
gccgagacaa tgcgccgcga accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc 5340
gcggaatggc cgtaactatt tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tcgtgtgaga 5400
acaagattat tagtttcaaa gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg 5460
atatcatatt tttccagcgc agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat 5520
ccagctatga agggtacttt cttgcatgcg agaaggaacg cgatctcttt aaacttattt 5580
taaagaaaga ggacgagcta ggcgatcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact 5640
agtggaggat ataataccag gaataaataa aatccatggg ccatcatcat catcatcatg 5700
gcatactcaa actttgtcct cgtgaagaat tcctgagact gtgtaaaa.aa aatcatgatg 5760
agatctatcc aataaaaaag agagaggacc gcagacgcct ggctctcatc atatgcaata 5820
caaagtttga tcacctgcct gcaaggaatg gggctcacta tgacatcgtg gggatgaaaa 5880
ggctgcttca aggcctgggc tacactgtgg ttgacgaaaa gaatctcaca gccagggata 5940
tggagtcagt gctgagggca tttgctgcca gaccagagca caagtcctct gacagcacgt 6000
tcttggtact catgtctcat ggcatcctagagggaatctg cggaactgcg cataaaaaga 6060
aaaaaccgga tgtgctgctt tatgacacca tcttccagat attcaacaac cgcaactgcc 6120
tcagtctaaa ggacaaaccc aaggtcatca ttgtccaggc ctgcagaggt gaaaaacatg 6180
gggaactctg ggtcagagac tctccagcat ccttggcagt catctcttca cagtcatctg. 6240
agaacctgga ggcagattct gtttgcaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct 6300
gttcttcaac accacataac gtgtcctgga gagaccgcac aaggggctcc atcttcatta 6360
cggaactcat cacatgcttc cagaaatatt cttgctgctg ccacctaatg gaaatatttc 6420
ggaaggtaca gaaatcattt gaagttccac aggctaaaag cccagatgccc accatagaac 6480
gagcaacctt gaca.agagat ttctacctct ttcctggcaa ttgactcgag ctcggtggcc 6540
ctggtggccc gcgatgggag gagttggtat ggcgatttct gagttgaagc tgccggccgg 6600
cgtcggcctg caggtctggg gcagcgccgc cgagcaggcc cgcggcctgg ccgccgaggt 6660
cgccggccgg ttgcgctcgg cgctggccga gcagggccag gcgctgctgg tggtgtccgg 6720
tgggcgcagt ccggtggcct tcctcgaagc cttgagcgag gagccgctgg actggtcgcg 6780
gatcacagtc agcctggccg acgagcgctg ggtgccggag tcgcatgccg atagcaacgc 6840
cggcctggtt cgccgccacc tgctccgtgg cgaggcggcg aaggcgcgct tcatcggcct 6900

ctaccagccg gcggcgagcc tggaggaagc ggccgagctg gccgaccatc acctgcacga 6960
gctgccattg ccgatcgacg tgctggtcct cggcatgggc gacgacggcc ata.ccgcctc 7020
gctgttcccg aacagccctg gcctggacct ggcgatggat ccccagggga cgcgccgttg 7080
cctgccgatg tgggcgccga gcgtgccgca ccagcgcctg accctgccgc gcgccgtgct 7140
ggcggcggcg aaggtgcagc tgctggcgat ccagggccag tccaagctgg ccaccctgaa 7200
cgccgcgctg gcggtcgagg acgaacggcg gatgccggtt cgcgccttcc tccgcgcgcc 7260
gctgacgatc cattggtacc cctgagtggc ggactcgagc accaccacca ccaccactga 7320
gatccggctg ctaaca.aagc ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa 7380
taactagcat aacccccttgg ggcctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gctgaaagga 7440
ggaactatat ccgg 7454

pECO-1-pgl-2-13

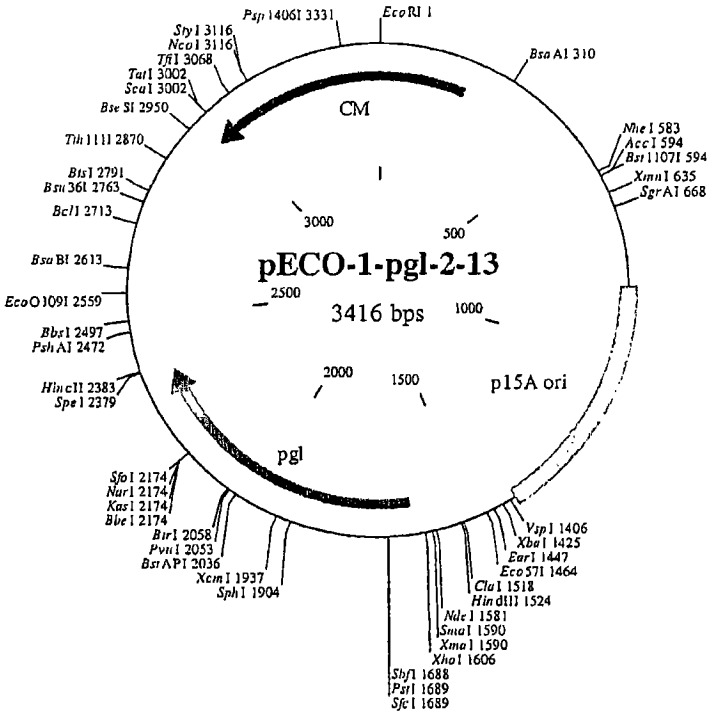


图 1

SEQ ID NO:9
DNA
pECO-1pglcl2-13

```
   1  GAATTCCGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAATGTGA ATAAAGGCCG GATAAAACTT
  61  GTGCTTATTT TTCTTTACGG TCTTTAAAAA GGCCGTAATA TCCAGCTGAA CGGTCTGGTT
 121  ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAATGC CTCAAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA
 181  TATATCAACG GTGGTATATC CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCT TAGCTCCTGA
 241  AAATCTCGAT AACTCAAAAA ATACGCCCGG TAGTGATCTT ATTTCATTAT GGTGAAAGTT
 301  GGAACCTCTT ACGTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC AGGGCTTCCC
 361  GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG TGATCTTCCG TCACAGGTAT
 421  TTATTCGGCG CAAAGTGCGT CGGGTGATGC TGCCAACTTA CTGATTTAGT GTATGATGGT
 481  GTTTTTGAGG TGCTCCAGTG GCTTCTGTTT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG
 541  ACGGGGTGGT GCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGGACATCA GCGCTAGCGG AGTGTATACT
 601  GGCTTACTAT GTTGGCACTG ATGAGGGTGT CAGTGAAGTG CTTCATGTGG CAGGAGAAAA
 661  AAGGCTGCAC CGGTGCGTCA GCAGAATATG TGATACAGGA TATATTCCGC TTCCTCGCTC
 721  ACTGACTCGC TACGCTCGGT CGTTCGACTG CGGCGAGCGG AAATGGCTTA CGAACGGGGC
 781  GGAGATTTCC TGGAAGATGC CAGGAAGATA CTTAACAGGG AAGTGAGAGG GCCGCGGCAA
 841  AGCCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCCTG ACAAGCATCA CGAAATCTGA CGCTCAAATC
 901  AGTGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGCGGCTCCC
 961  TCGTGCGCTC TCCTGTTCCT GCCTTTCGGT TTACCGGTGT CATTCCGCTG TTATGGCCGC
1021  GTTTGTCTCA TTCCACGCCT GACACTCAGT TCCGGGTAGG CAGTTCGCTC CAAGCTGGAC
1081  TGTATGCACG AACCCCCCGT TCAGTCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT
1141  GAGTCCAACC CGGAAAGACA TGCAAAAGCA CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAATTGATTT
1201  AGAGGAGTTA GTCTTGAAGT CATGCGCCGG TTAAGGCTAA ACTGAAAGGA CAAGTTTTGG
1261  TGACTGCGCT CCTCCAAGCC AGTTACCTCG GTTCAAAGAG TTGGTAGCTC AGAGAACCTT
1321  CGAAAAACCG CCCTGCAAGG CGGTTTTTTC GTTTTCAGAG CAAGAGATTA CGCGCAGACC
1381  AAAACGATCT CAAGAAGATC ATCTTATTAA TCAGATAAAA TATTTCTAGA TTTCAGTGCA
1441  ATTTATCTCT TCAAATGTAG CACCTGAAGT CAGCCCCATA CGATATAAGT TGTAATTCTC
1501  ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG TTTATCACAG TTAAATTGCT
1561  AACGCAGTCA GGCACCGTGT CATATGGATC CCGGGTACCG TCGAGCTCGA GCTCGGTGGC
1621  CCTGGTGGCC CGCGATGGGA GGAGTTGGTA TGGCGATTTC TGAGTTGAAG CTGCCGGCCG
1681  GCGTCGGCCT GCAGGTCTGG GGCAGCGCCG CCGAGCAGGC CCGCGGCCTG GCCGCCGAGG
1741  TCGCCGGCCG GTTGCGCTCG GCGCTGGCCG AGCAGGGCCA GGCGCTGCTG GTGGTGTCCG
1801  GTGGGCGCAG TCCGGTGGCC TTCCTCGAAG CCTTGAGCGA GGAGCCGCTG GACTGGTCGC
1861  GGATCACCGT CAGCCTGGCC GACGAGCGCT GGGTGCCGGA GTCGCATGCC GATAGCAACG
1921  CCGGCCTGGT TCGCCGCCAC CTGCTCCGTG GCGAGGCGGC GAAGGCGCGC TTCATCGGCC
1981  TCTACCAGCC GGCGGCGAGC CTGGAGGAAG CGGCCGAGCT GGCCGACCAT CACCTGCACG
2041  AGCTGCCATT GCCGATCGAC GTGCTGGTCC TCGGCATGGG CGACGACGGC CATACCGCCT
2101  CGCTGTTCCC GAACAGCCCT GGCCTGGACC TGGCGATGGA TCCCCAGGGG ACGCGCCGTT
2161  GCCTGCCGAT GTGGGCGCCG AGCGTGCCGC ACCAGCGCCT GACCCTGCCG CGCGCCGTGC
2221  TGGCGGCGGC GAAGGTGCAG CTGCTGGCGA TCCAGGGCCA GTCCAAGCTG GCCACCCTGA
2281  ACGCCGCGCT GGCGGTCGAG GACGAACGGC GGATGCCGGT TCGCGCCTTC CTCCGCGCGC
```

```
2341  CGCTGACGAT CCATTGGTAC CCCTGAGTGG CGGACTCGAC TAGTCAACGC CATGAGCGGC
2401  CTCATTTCTT ATTCTGAGTT ACAACAGTCC GCACCGCTGT CCGGTAGCTC CTTCCGGTGG
2461  GCGCGGGGCA TGACTATCGT CGCCGCACTT ATGACTGTCT TCTTTATCAT GCAACTCGTA
2521  GGACAGGTGC CGGCAGCGCC CAACAGTCCC CCGGCCACGG GGCCTGCCAC CATACCCACG
2581  CCGAAACAAG CGCCCTGCAC CATTATGTTC CGGATCTGCA TCGCAGGATG CTGCTGGCTA
2641  CCCTGTGGAA CACCTACATC TGTATTAACG AAGCGCTAAC CGTTTTTATC AGGCTCTGGG
2701  AGGCAGAATA AATGATCATA TCGTCAATTA TTACCTCCAC GGGGAGAGCC TGAGCAAACT
2761  GGCCTCAGGC ATTTGAGAAG CACACGGTCA CACTGCTTCC GGTAGTCAAT AAACCGGTAA
2821  ACCAGCAATA GACATAAGCG GCTATTTAAC GACCCTGCCC TGAACCGACG ACCGGGTCGA
2881  ATTTGCTTTC GAATTTCTGC CATTCATCCG CTTATTATCA CTTATTCAGG CGTAGCACCA
2941  GGCGTTTAAG GGCACCAATA ACTGCCTTAA AAAAATTACG CCCCGCCCTG CCACTCATCG
3001  CAGTACTGTT GTAATTCATT AAGCATTCTG CCGACATGGA AGCCATCACA GACGGCATGA
3061  TGAACCTGAA TCGCCAGCGG CATCAGCACC TTGTCGCCTT GCGTATAATA TTTGCCCATG
3121  GTGAAAACGG GGGCGAAGAA GTTGTCCATA TTGGCCACGT TTAAATCAAA ACTGGTGAAA
3181  CTCACCCAGG GATTGGCTGA GACGAAAAAC ATATTCTCAA TAAACCCTTT AGGGAAATAG
3241  GCCAGGTTTT CACCGTAACA CGCCACATCT TGCGAATATA TGTGTAGAAA CTGCCGGAAA
3301  TCGTCGTGGT ATTCACTCCA GAGCGATGAA AACGTTTCAG TTTGCTCATG GAAAACGGTG
3361  TAACAAGGGT GAACACTATC CCATATCACC AGCTCACCGT CTTTCATTGC CATACG
```

图 2

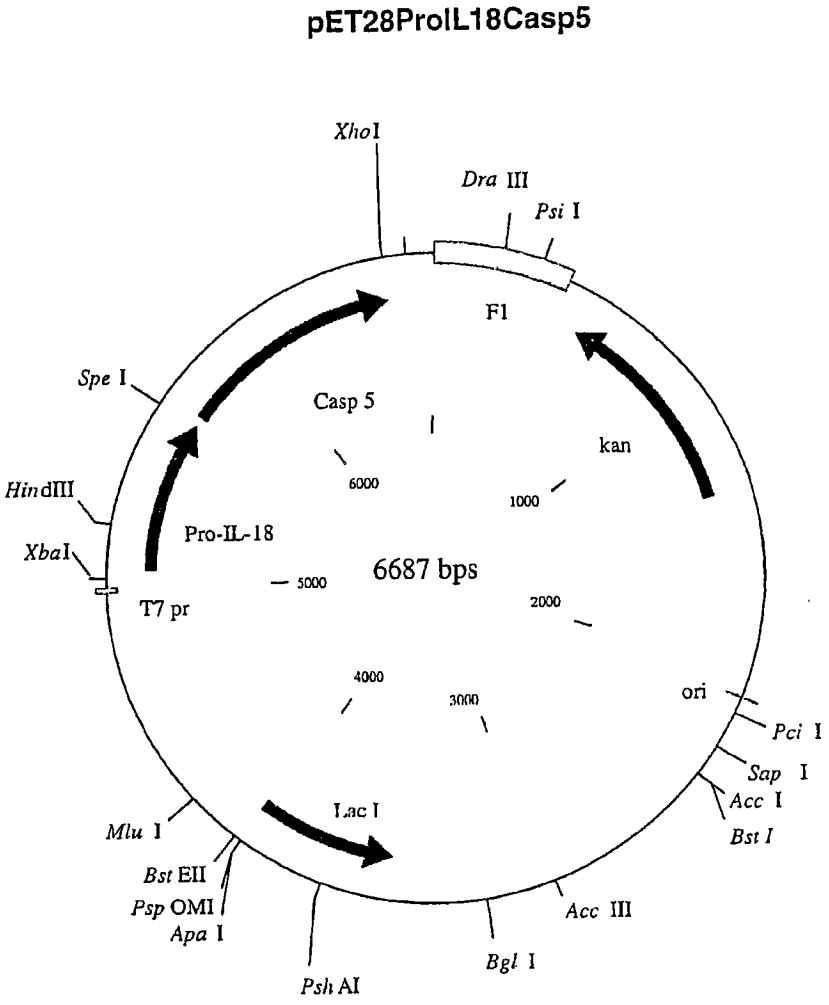

pET28ProIL18Casp5
XhoI
Dra III
Psi I
F1
Spe I
Casp 5
kan
6000
1000
HindIII
Pro-IL-18
XbaI
6687 bps
5000
2000
T7 pr
4000
3000
ori
Pci I
Sap I
Acc I
Bst I
Lac I
Mlu I
Bst EII
Psp OMI
Apa I
Acc III
Bgl I
Psh AI

图 3

SEQ ID NO:13

DNA

pET28ProIL18Casp5

```
   1  TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG
  61  CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC
 121  CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG
 181  GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC
 241  ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
 301  CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC AACCCTATCT CGGTCTATTC
 361  TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTC GGCCTATTGG TTAAAAAATG AGCTGATTTA
 421  ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTCAG GTGGCACTTT
 481  TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA
 541  TCCGCTCATG AATTAATTCT TAGAAAAACT CATCGAGCAT CAAATGAAAC TGCAATTTAT
 601  TCATATCAGG ATTATCAATA CCATATTTTT GAAAAAGCCG TTTCTGTAAT GAAGGAGAAA
 661  ACTCACCGAG GCAGTTCCAT AGGATGGCAA GATCCTGGTA TCGGTCTGCG ATTCCGACTC
 721  GTCCAACATC AATACAACCT ATTAATTTCC CCTCGTCAAA AATAAGGTTA TCAAGTGAGA
 781  AATCACCATG AGTGACGACT GAATCCGGTG AGAATGGCAA AAGTTTATGC ATTTCTTTCC
 841  AGACTTGTTC AACAGGCCAG CCATTACGCT CGTCATCAAA ATCACTCGCA TCAACCAAAC
 901  CGTTATTCAT TCGTGATTGC GCCTGAGCGA GACGAAATAC GCGATCGCTG TTAAAAGGAC
 961  AATTACAAAC AGGAATCGAA TGCAACCGGC GCAGGAACAC TGCCAGCGCA TCAACAATAT
1021  TTTCACCTGA ATCAGGATAT TCTTCTAATA CCTGGAATGC TGTTTTCCCG GGGATCGCAG
1081  TGGTGAGTAA CCATGCATCA TCAGGAGTAC GGATAAAATG CTTGATGGTC GGAAGAGGCA
1141  TAAATTCCGT CAGCCAGTTT AGTCTGACCA TCTCATCTGT AACATCATTG GCAACGCTAC
1201  CTTTGCCATG TTTCAGAAAC AACTCTGGCG CATCGGGCTT CCCATACAAT CGATAGATTG
1261  TCGCACCTGA TTGCCCGACA TTATCGCGAG CCCATTTATA CCCATATAAA TCAGCATCCA
1321  TGTTGGAATT TAATCGCGGC CTAGAGCAAG ACGTTTCCCG TTGAATATGG CTCATAACAC
1381  CCCTTGTATT ACTGTTTATG TAAGCAGACA GTTTTATTGT TCATGACCAA AATCCCTTAA
1441  CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA
1501  GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG
1561  GTGGTTTGTT TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC
1621  AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTCCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
1681  AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC
1741  AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG
1801  CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC
1861  ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA
1921  AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT
1981  CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTCGGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG
2041  CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG
2101  GCCTTTTTAC GGTTCCTGGC CTTTTGCTGG CCTTTTGCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA
2161  TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC
2221  AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCTGATGCGG
2281  TATTTTCTCC TTACGCATCT GTGCGGTATT TCACACCGCA TATATGGTGC ACTCTCAGTA
```

```
2341  CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGTATACACT CCGCTATCGC TACGTGACTG
2401  GGTCATGGCT GCGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT
2461  GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG
2521  GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGAG GCAGCTGCGG TAAAGCTCAT CAGCGTGGTC
2581  GTGAAGCGAT TCACAGATGT CTGCCTGTTC ATCCGCGTCC AGCTCGTTGA GTTTCTCCAG
2641  AAGCGTTAAT GTCTGGCTTC TGATAAAGCG GGCCATGTTA AGGGCGGTTT TTTCCTGTTT
2701  GGTCACTGAT GCCTCCGTGT AAGGGGGATT TCTGTTCATG GGGGTAATGA TACCGATGAA
2761  ACGAGAGAGG ATGCTCACGA TACGGGTTAC TGATGATGAA CATGCCCGGT TACTGGAACG
2821  TTGTGAGGGT AAACAACTGG CGGTATGGAT GCGGCGGGAC CAGAGAAAAA TCACTCAGGG
2881  TCAATGCCAG CGCTTCGTTA ATACAGATGT AGGTGTTCCA CAGGGTAGCC AGCAGCATCC
2941  TGCGATGCAG ATCCGGAACA TAATGGTGCA GGGCGCTGAC TTCCGCGTTT CCAGACTTTA
3001  CGAAACACGG AAACCGAAGA CCATTCATGT TGTTGCTCAG GTCGCAGACG TTTTGCAGCA
3061  GCAGTCGCTT CACGTTCGCT CGCGTATCGG TGATTCATTC TGCTAACCAG TAAGGCAACC
3121  CCGCCAGCCT AGCCGGGTCC TCAACGACAG GAGCACGATC ATGCGCACCC GTGGGGCCGC
3181  CATGCCGGCG ATAATGGCCT GCTTCTCGCC GAAACGTTTG GTGGCGGGAC CAGTGACGAA
3241  GGCTTGAGCG AGGGCGTGCA AGATTCCGAA TACCGCAAGC GACAGGCCGA TCATCGTCGC
3301  GCTCCAGCGA AAGCGGTCCT CGCCGAAAAT GACCCAGAGC GCTGCCGGCA CCTGTCCTAC
3361  GAGTTGCATG ATAAAGAAGA CAGTCATAAG TGCGGCGACG ATAGTCATGC CCCGCGCCCA
3421  CCGGAAGGAG CTGACTGGGT TGAAGGCTCT CAAGGGCATC GGTCGAGATC CCGGTGCCTA
3481  ATGAGTGAGC TAACTTACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC AGTCGGGAAA
3541  CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT
3601  TGGGCGCCAG GGTGGTTTTT CTTTTCACCA GTGAGACGGG CAACAGCTGA TTGCCCTTCA
3661  CCGCCTGGCC CTGAGAGAGT TGCAGCAAGC GGTCCACGCT GGTTTGCCCC AGCAGGCGAA
3721  AATCCTGTTT GATGGTGGTT AACGGCGGGA TATAACATGA GCTGTCTTCG GTATCGTCGT
3781  ATCCCACTAC CGAGATATCC GCACCAACGC GCAGCCCGGA CTCGGTAATG GCGCGCATTG
3841  CGCCCAGCGC CATCTGATCG TTGGCAACCA GCATCGCAGT GGGAACGATG CCCTCATTCA
3901  GCATTTGCAT GGTTTGTTGA AAACCGGACA TGGCACTCCA GTCGCCTTCC CGTTCCGCTA
3961  TCGGCTGAAT TTGATTGCGA GTGAGATATT TATGCCAGCC AGCCAGACGC AGACGCGCCG
4021  AGACAGAACT TAATGGGCCC GCTAACAGCG CGATTTGCTG GTGACCCAAT GCGACCAGAT
4081  GCTCCACGCC CAGTCGCGTA CCGTCTTCAT GGGAGAAAAT AATACTGTTG ATGGGTGTCT
4141  GGTCAGAGAC ATCAAGAAAT AACGCCGGAA CATTAGTGCA GGCAGCTTCC ACAGCAATGG
4201  CATCCTGGTC ATCCAGCGGA TAGTTAATGA TCAGCCCACT GACGCGTTGC GCGAGAAGAT
4261  TGTGCACCGC CGCTTTACAG GCTTCGACGC CGCTTCGTTC TACCATCGAC ACCACCACGC
4321  TGGCACCCAG TTGATCGGCG CGAGATTTAA TCGCCGCGAC AATTTGCGAC GGCGCGTGCA
4381  GGGCCAGACT GGAGGTGGCA ACGCCAATCA GCAACGACTG TTTGCCCGCC AGTTGTTGTG
4441  CCACGCGGTT GGGAATGTAA TTCAGCTCCG CCATCGCCGC TTCCACTTTT TCCCGCGTTT
4501  TCGCAGAAAC GTGGCTGGCC TGGTTCACCA CGCGGGAAAC GGTCTGATAA GAGACACCGG
4561  CATACTCTGC GACATCGTAT AACGTTACTG GTTTCACATT CACCACCCTG AATTGACTCT
4621  CTTCCGGGCG CTATCATGCC ATACCGCGAA AGGTTTTGCG CCATTCGATG GTGTCCGGGA
4681  TCTCGACGCT CTCCCTTATG CGACTCCTGC ATTAGGAAGC AGCCCAGTAG TAGGTTGAGG
4741  CCGTTGAGCA CCGCCGCCGC AAGGAATGGT GCATGCAAGG AGATGGCGCC CAACAGTCCC
4801  CCGGCCACGG GGCCTGCCAC CATACCCACG CCGAAACAAG CGCTCATGAG CCCGAAGTGG
```

```
4861  CGAGCCCGAT CTTCCCCATC GGTGATGTCG GCGATATAGG CGCCAGCAAC CGCACCTGTG
4921  GCGCCGGTGA TGCCGGCCAC GATGCGTCCG GCGTAGAGGA TCGAGATCTC GATCCCGCGA
4981  AATTAATACG ACTCACTATA GGGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCCCCT CTAGACCACA
5041  CCTTAAGGAG GATATAACAT ATGGCTGCTG AACCAGTAGA AGACAATTGC ATCAACTTTG
5101  TGGCAATGAA ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG
5161  AATCAGATTA CTTTGGCAAG CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATTCGTAAT TTAAATGACC
5221  AGGTCCTATT TATCGACCAA GGGAATCGTC CACTATTCGA GGACATGACA GACAGTGACT
5281  GCCGAGACAA TGCGCCGCGA ACCATTTTCA TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC
5341  GCGGAATGGC CGTAACTATT TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA
5401  ACAAGATTAT TAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCTG
5461  ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA TTTGAATCAT
5521  CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTGCATGCG AGAAGGAACG CGATCTCTTT AAACTTATTT
5581  TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GGCGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
5641  AGTGGAGGAT ATAATACCAG GAATAAATAA AATCCATGGG CCATCATCAT CATCATCATG
5701  GCATACTCAA ACTTTGTCCT CGTGAAGAAT TCCTGAGACT GTGTAAAAAA AATCATGATG
5761  AGATCTATCC AATAAAAAAG AGAGAGGACC GCAGACGCCT GGCTCTCATC ATATGCAATA
5821  CAAAGTTTGA TCACCTGCCT GCAAGGAATG GGGCTCACTA TGACATCGTG GGGATGAAAA
5881  GGCTGCTTCA AGGCCTGGGC TACACTGTGG TTGACGAAAA GAATCTCACA GCCAGGGATA
5941  TGGAGTCAGT GCTGAGGGCA TTTGCTGCCA GACCAGAGCA CAAGTCCTCT GACAGCACGT
6001  TCTTGGTACT CATGTCTCAT GGCATCCTAG AGGGAATCTG CGGAACTGCG CATAAAAAGA
6061  AAAAACCGGA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTTCCAGAT ATTCAACAAC CGCAACTGCC
6121  TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTCATCA TTGTCCAGGC CTGCAGAGGT GAAAAACATG
6181  GGGAACTCTG GGTCAGAGAC TCTCCAGCAT CCTTGGCAGT CATCTCTTCA CAGTCATCTG
6241  AGAACCTGGA GGCAGATTCT GTTTGCAAGA TCCACGAGGA GAAGGACTTC ATTGCTTTCT
6301  GTTCTTCAAC ACCACATAAC GTGTCCTGGA GAGACCGCAC AAGGGGCTCC ATCTTCATTA
6361  CGGAACTCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTTGCTGCTG CCACCTAATG GAAATATTTC
6421  GGAAGGTACA GAAATCATTT GAAGTTCCAC AGGCTAAAGC CCAGATGCCC ACCATAGAAC
6481  GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT TTCCTGGCAA TTGACTCGAG CACCACCACC
6541  ACCACCACTG AGATCCGGCT GCTAACAAAG CCCGAAAGGA AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA
6601  CCGCTGAGCA ATAACTAGCA TAACCCCTTG GGGCCTCTAA ACGGGTCTTG AGGGGTTTTT
6661  TGCTGAAAGG AGGAACTATA TCCGGBT
```

图 4

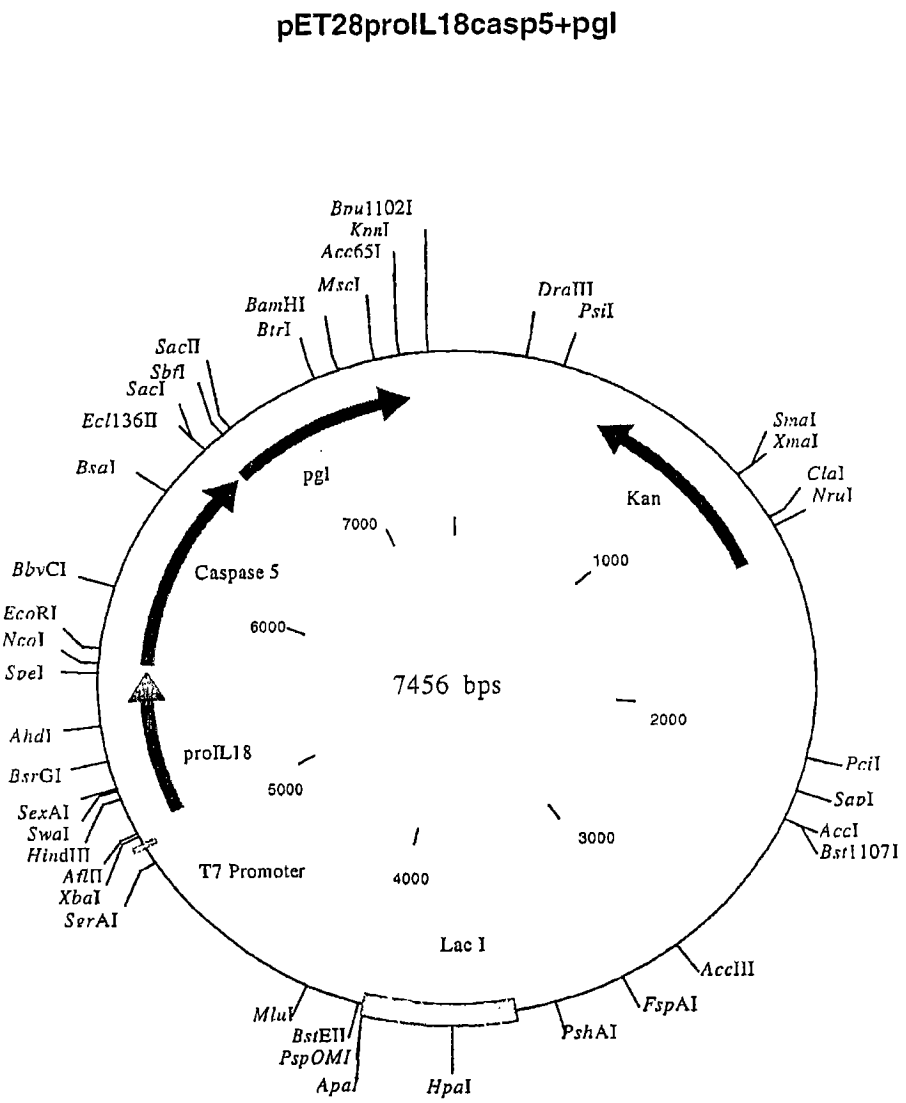

pET28prolL18casp5+pgl
Bnu1102I
KpnI
Acc65I
MscI
BamHI
BtrI
SacII
SbfI
SacI
Ecl136II
BsaI
BbvCI
EcoRI
NcoI
SpeI
AhdI
BsrGI
SexAI
SwaI
HindIII
AflII
XbaI
SerAI
MluI
BstEII
PspOMI
ApaI
HpaI
PshAI
FspAI
AccIII
Bst1107I
AccI
SapI
PciI
NruI
ClaI
XmaI
SmaI
DraIII
PsiI
pgl
Caspase 5
proIL18
T7 Promoter
Lac I
Kan
7456 bps
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

图 5

SEQ ID NO:14

DNA

pET28proIL18casp5+pgl

```
   1  TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG
  61  CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC
 121  CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG
 181  GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC
 241  ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
 301  CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC AACCCTATCT CGGTCTATTC
 361  TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTC GGCCTATTGG TTAAAAAATG AGCTGATTTA
 421  ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTCAG GTGGCACTTT
 481  TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA
 541  TCCGCTCATG AATTAATTCT TAGAAAAACT CATCGAGCAT CAAATGAAAC TGCAATTTAT
 601  TCATATCAGG ATTATCAATA CCATATTTTT GAAAAAGCCG TTTCTGTAAT GAAGGAGAAA
 661  ACTCACCGAG GCAGTTCCAT AGGATGGCAA GATCCTGGTA TCGGTCTGCG ATTCCGACTC
 721  GTCCAACATC AATACAACCT ATTAATTTCC CCTCGTCAAA AATAAGGTTA TCAAGTGAGA
 781  AATCACCATG AGTGACGACT GAATCCGGTG AGAATGGCAA AAGTTTATGC ATTTCTTTCC
 841  AGACTTGTTC AACAGGCCAG CCATTACGCT CGTCATCAAA ATCACTCGCA TCAACCAAAC
 901  CGTTATTCAT TCGTGATTGC GCCTGAGCGA GACGAAATAC GCGATCGCTG TTAAAAGGAC
 961  AATTACAAAC AGGAATCGAA TGCAACCGGC GCAGGAACAC TGCCAGCGCA TCAACAATAT
1021  TTTCACCTGA ATCAGGATAT TCTTCTAATA CCTGGAATCC TGTTTTCCCG GGGATCGCAG
1081  TGGTGAGTAA CCATGCATCA TCAGGAGTAC GGATAAAATG CTTGATGGTC GGAAGAGGCA
1141  TAAATTCCGT CAGCCAGTTT AGTCTGACCA TCTCATCTGT AACATCATTG GCAACGCTAC
1201  CTTTGCCATG TTTCAGAAAC AACTCTGGCG CATCGGGCTT CCCATACAAT CGATAGATTG
1261  TCGCACCTGA TTGCCCGACA TTATCGCGAG CCCATTTATA CCCATATAAA TCAGCATCCA
1321  TGTTGGAATT TAATCGCGGC CTAGAGCAAG ACGTTTCCCG TTGAATATGG CTCATAACAC
1381  CCCTTGTATT ACTGTTTATG TAAGCAGACA GTTTTATTGT TCATGACCAA AATCCCTTAA
1441  CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA
1501  GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG
1561  GTGGTTTGTT TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC
1621  AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTCCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
1681  AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC
1741  AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG
1801  CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC
1861  ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA
1921  AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT
1981  CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTCGGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG
2041  CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG
2101  GCCTTTTTAC GGTTCCTGGC CTTTTGCTGG CCTTTTGCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA
2161  TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC
2221  AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCTGATGCGG
2281  TATTTTCTCC TTACGCATCT GTGCGGTATT TCACACCGCA TATATGGTGC ACTCTCAGTA
```

2341 CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGTATACACT CCGCTATCGC TACGTGACTG
2401 GGTCATGGCT GCGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT
2461 GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG
2521 GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGAG GCAGCTGCGG TAAAGCTCAT CAGCGTGGTC
2581 GTGAAGCGAT TCACAGATGT CTGCCTGTTC ATCCGCGTCC AGCTCGTTGA GTTTCTCCAG
2641 AAGCGTTAAT GTCTGGCTTC TGATAAAGCG GGCCATGTTA AGGGCGGTTT TTTCCTGTTT
2701 GGTCACTGAT GCCTCCGTGT AAGGGGGATT TCTGTTCATG GGGGTAATGA TACCGATGAA
2761 ACGAGAGAGG ATGCTCACGA TACGGGTTAC TGATGATGAA CATGCCCGGT TACTGGAACG
2821 TTGTGAGGGT AAACAACTGG CGGTATGGAT GCGGCGGGAC CAGAGAAAAA TCACTCAGGG
2881 TCAATGCCAG CGCTTCGTTA ATACAGATGT AGGTGTTCCA CAGGGTAGCC AGCAGCATCC
2941 TGCGATGCAG ATCCGGAACA TAATGGTGCA GGGCGCTGAC TTCCGCGTTT CCAGACTTTA
3001 CGAAACACGG AAACCGAAGA CCATTCATGT TGTTGCTCAG GTCGCAGACG TTTTGCAGCA
3061 GCAGTCGCTT CACGTTCGCT CGCGTATCGG TGATTCATTC TGCTAACCAG TAAGGCAACC
3121 CCGCCAGCCT AGCCGGGTCC TCAACGACAG GAGCACGATC ATGCGCACCC GTGGGGCCGC
3181 CATGCCGGCG ATAATGGCCT GCTTCTCGCC GAAACGTTTG GTGGCGGGAC CAGTGACGAA
3241 GGCTTGAGCG AGGGCGTGCA AGATTCCGAA TACCGCAAGC GACAGGCCGA TCATCGTCGC
3301 GCTCCAGCGA AAGCGGTCCT CGCCGAAAAT GACCCAGAGC GCTGCCGGCA CCTGTCCTAC
3361 GAGTTGCATG ATAAAGAAGA CAGTCATAAG TGCGGCGACG ATAGTCATGC CCCGCGCCCA
3421 CCGGAAGGAG CTGACTGGGT TGAAGGCTCT CAAGGGCATC GGTCGAGATC CCGGTGCCTA
3481 ATGAGTGAGC TAACTTACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC AGTCGGGAAA
3541 CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT
3601 TGGGCGCCAG GGTGGTTTTT CTTTTCACCA GTGAGACGGG CAACAGCTGA TTGCCCTTCA
3661 CCGCCTGGCC CTGAGAGAGT TGCAGCAAGC GGTCCACGCT GGTTTGCCCC AGCAGGCGAA
3721 AATCCTGTTT GATGGTGGTT AACGGCGGGA TATAACATGA GCTGTCTTCG GTATCGTCGT
3781 ATCCCACTAC CGAGATATCC GCACCAACGC GCAGCCCGGA CTCGGTAATG GCGCGCATTG
3841 CGCCCAGCGC CATCTGATCG TTGGCAACCA GCATCGCAGT GGGAACGATG CCCTCATTCA
3901 GCATTTGCAT GGTTTGTTGA AAACCGGACA TGGCACTCCA GTCGCCTTCC CGTTCCGCTA
3961 TCGGCTGAAT TTGATTGCGA GTGAGATATT TATGCCAGCC AGCCAGACGC AGACGCGCCG
4021 AGACAGAACT TAATGGGCCC GCTAACAGCG CGATTTGCTG GTGACCCAAT GCGACCAGAT
4081 GCTCCACGCC CAGTCGCGTA CCGTCTTCAT GGGAGAAAAT AATACTGTTG ATGGGTGTCT
4141 GGTCAGAGAC ATCAAGAAAT AACGCCGGAA CATTAGTGCA GGCAGCTTCC ACAGCAATGG
4201 CATCCTGGTC ATCCAGCGGA TAGTTAATGA TCAGCCCACT GACGCGTTGC GCGAGAAGAT
4261 TGTGCACCGC CGCTTTACAG GCTTCGACGC CGCTTCGTTC TACCATCGAC ACCACCACGC
4321 TGGCACCCAG TTGATCGGCG CGAGATTTAA TCGCCGCGAC AATTTGCGAC GGCGCGTGCA
4381 GGGCCAGACT GGAGGTGGCA ACGCCAATCA GCAACGACTG TTTGCCCGCC AGTTGTTGTG
4441 CCACGCGGTT GGGAATGTAA TTCAGCTCCG CCATCGCCGC TTCCACTTTT TCCCGCGTTT
4501 TCGCAGAAAC GTGGCTGGCC TGGTTCACCA CGCGGGAAAC GGTCTGATAA GAGACACCGG
4561 CATACTCTGC GACATCGTAT AACGTTACTG GTTTCACATT CACCACCCTG AATTGACTCT
4621 CTTCCGGGCG CTATCATGCC ATACCGCGAA AGGTTTTGCG CCATTCGATG GTGTCCGGGA
4681 TCTCGACGCT CTCCCTTATG CGACTCCTGC ATTAGGAAGC AGCCCAGTAG TAGGTTGAGG
4741 CCGTTGAGCA CCGCCGCCGC AAGGAATGGT GCATGCAAGG AGATGGCGCC CAACAGTCCC
4801 CCGGCCACGG GGCCTGCCAC CATACCCACG CCGAAACAAG CGCTCATGAG CCCGAAGTGG

```
4861  CGAGCCCGAT CTTCCCCATC GGTGATGTCG GCGATATAGG CGCCAGCAAC CGCACCTGTG
4921  GCGCCGGTGA TGCCGGCCAC GATGCGTCCG GCGTAGAGGA TCGAGATCTC GATCCCGCGA
4981  AATTAATACG ACTCACTATA GGGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCCCCT CTAGACCACA
5041  CCTTAAGGAG GATATAACAT ATGGCTGCTG AACCAGTAGA AGACAATTGC ATCAACTTTG
5101  TGGCAATGAA ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG
5161  AATCAGATTA CTTTGGCAAG CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATTCGTAAT TTAAATGACC
5221  AGGTCCTATT TATCGACCAA GGGAATCGTC CACTATTCGA GGACATGACA GACAGTGACT
5281  GCCGAGACAA TGCGCCGCGA ACCATTTTCA TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC
5341  GCGGAATGGC CGTAACTATT TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA
5401  ACAAGATTAT TAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCTG
5461  ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA TTTGAATCAT
5521  CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTGCATGCG AGAAGGAACG CGATCTCTTT AAACTTATTT
5581  TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GGCGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
5641  AGTGGAGGAT ATAATACCAG GAATAAATAA AATCCATGGG CCATCATCAT CATCATCATG
5701  GCATACTCAA ACTTTGTCCT CGTGAAGAAT TCCTGAGACT GTGTAAAAAA AATCATGATG
5761  AGATCTATCC AATAAAAAAG AGAGAGGACC GCAGACGCCT GGCTCTCATC ATATGCAATA
5821  CAAAGTTTGA TCACCTGCCT GCAAGGAATG GGGCTCACTA TGACATCGTG GGGATGAAAA
5881  GGCTGCTTCA AGGCCTGGGC TACACTGTGG TTGACGAAAA GAATCTCACA GCCAGGGATA
5941  TGGAGTCAGT GCTGAGGGCA TTTGCTGCCA GACCAGAGCA CAAGTCCTCT GACAGCACGT
6001  TCTTGGTACT CATGTCTCAT GGCATCCTAG AGGGAATCTG CGGAACTGCG CATAAAAAGA
6061  AAAAACCGGA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTTCCAGAT ATTCAACAAC CGCAACTGCC
6121  TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTCATCA TTGTCCAGGC CTGCAGAGGT GAAAAACATG
6181  GGGAACTCTG GGTCAGAGAC TCTCCAGCAT CCTTGGCAGT CATCTCTTCA CAGTCATCTG
6241  AGAACCTGGA GGCAGATTCT GTTTGCAAGA TCCACGAGGA GAAGGACTTC ATTGCTTTCT
6301  GTTCTTCAAC ACCACATAAC GTGTCCTGGA GAGACCGCAC AAGGGGCTCC ATCTTCATTA
6361  CGGAACTCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTTGCTGCTG CCACCTAATG GAAATATTTC
6421  GGAAGGTACA GAAATCATTT GAAGTTCCAC AGGCTAAAGC CCAGATGCCC ACCATAGAAC
6481  GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT TTCCTGGCAA TTGACTCGAG CTCGGTGGCC
6541  CTGGTGGCCC GCGATGGGAG GAGTTGGTAT GGCGATTTCT GAGTTGAAGC TGCCGGCCGG
6601  CGTCGGCCTG CAGGTCTGGG GCAGCGCCGC CGAGCAGGCC CGCGGCCTGG CCGCCGAGGT
6661  CGCCGGCCGG TTGCGCTCGG CGCTGGCCGA GCAGGGCCAG GCGCTGCTGG TGGTGTCCGG
6721  TGGGCGCAGT CCGGTGGCCT TCCTCGAAGC CTTGAGCGAG GAGCCGCTGG ACTGGTCGCG
6781  GATCACAGTC AGCCTGGCCG ACGAGCGCTG GGTGCCGGAG TCGCATGCCG ATAGCAACGC
6841  CGGCCTGGTT CGCCGCCACC TGCTCCGTGG CGAGGCGGCG AAGGCGCGCT TCATCGGCCT
6901  CTACCAGCCG GCGGCGAGCC TGGAGGAAGC GGCCGAGCTG GCCGACCATC ACCTGCACGA
6961  GCTGCCATTG CCGATCGACG TGCTGGTCCT CGGCATGGGC GACGACGGCC ATACCGCCTC
7021  GCTGTTCCCG AACAGCCCTG GCCTGGACCT GGCGATGGAT CCCCAGGGGA CGCGCCGTTG
7081  CCTGCCGATG TGGGCGCCGA GCGTGCCGCA CCAGCGCCTG ACCCTGCCGC GCGCCGTGCT
7141  GGCGGCGGCG AAGGTGCAGC TGCTGGCGAT CCAGGGCCAG TCCAAGCTGG CCACCCTGAA
7201  CGCCGCGCTG GCGGTCGAGG ACGAACGGCG GATGCCGGTT CGCGCCTTCC TCCGCGCGCC
7261  GCTGACGATC CATTGGTACC CCTGAGTGGC GGACTCGAGC ACCACCACCA CCACCACTGA
7321  GATCCGGCTG CTAACAAAGC CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA
```

```
7381  TAACTAGCAT AACCCCTTGG GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA
7441  GGAACTATAT CCGG
```

图 6

SEQ ID NO:7
DNA
铜绿假单胞菌 PGL

```
ATG GGA GGA GTT GGT ATG GCG ATT TCT GAG TTG AAG CTG CCG GCC GGC
GTC GGC CTG CAG GTC TGG GGC AGC GCC GCC GAG CAG GCC CGC GGC CTG
GCC GCC GAG GTC GCC GGC CGG TTG CGC TCG GCG CTG GCC GAG CAG GGC
CAG GCG CTG CTG GTG GTG TCC GGT GGG CGC AGT CCG GTG GCC TTC CTC
GAA GCC TTG AGC GAG GAG CCG CTG GAC TGG TCG CGG ATC ACC GTC AGC
CTG GCC GAC GAG CGC TGG GTG CCG GAG TCG CAT GCC GAT AGC AAC GCC
GGC CTG GTT CGC CGC CAC CTG CTC CGT GGC GAG GCG GCG AAG GCG CGC
TTC ATC GGC CTC TAC CAG CCG GCG GCG AGC CTG GAG GAA GCG GCC GAG
CTG GCC GAC CAT CAC CTG CAC GAG CTG CCA TTG CCG ATC GAC GTG CTG
GTC CTC GGC ATG GGC GAC GAC GGC CAT ACC GCC TCG CTG TTC CCG AAC
AGC CCT GGC CTG GAC CTG GCG ATG GAT CCC CAG GGG ACG CGC CGT TGC
CTG CCG ATG TGG GCG CCG AGC GTG CCG CAC CAG CGC CTG ACC CTG CCG
CGC GCC GTG CTG GCG GCG GCG AAG GTG CAG CTG CTG GCG ATC CAG GGC
CAG TCC AAG CTG GCC ACC CTG AAC GCC GCG CTG GCG GTC GAG GAC GAA
CGG CGG ATG CCG GTT CGC GCC TTC CTC CGC GCG CCG CTG ACG ATC CAT
TGG TAC CCC TGA
```

图 7

SEQ ID NO:8
氨基酸
铜绿假单胞菌 PGL

```
MGGVGMAISELKLPAGVGLQVWGSAAEQARGLAAEVAGRLRSALAEQGQALLVVSGGRSPVAFLEA
LSEEPLDWSRITVSLADERWVPESHADSNAGLVRRHLLRGEAAKARFIGLYQPAASLEEAAELADH
HLHELPLPIDVLVLGMGDDGHTASLFPNSPGLDLAMDPQGTRRCLPMWAPSVPHQRLTLPRAVLAA
AKVQLLAIQGQSKLATLNAALAVEDERRMPVRAFLRAPLTIHWYP
```

图 8