

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94109005.1

[51]Int.Cl⁶

C12N 15/10

[43]公开日 1996年1月3日

[22]申请日 94.6.22
[71]申请人 诺沃挪第克公司
地址 丹麦巴格斯瓦尔德
[72]发明人 S·T·约根森

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 黄革生

C12N 15/63 C12N 15/11
C12N 1/20 C12N 1/14
C12N 5/00 C12P 21/02

权利要求书 4 页 说明书 32 页 附图页数 10 页

[54]发明名称 DNA扩增

[57]摘要

本发明公开了一种在体内扩增亲本细胞基因组中DNA序列B的方法。

1. 一种在体内扩增亲本细胞基因组中DNA序列B的方法, 包括:

a) 将含有C-M-A-D结构的DNA构建体整合到所说细胞的基因组中, 其中, A表示与侧接或交叠待扩增DNA序列B的基因组DNA片段同源的DNA序列, 或者是与作为DNA序列B构成的所说序列B的末端之一的基因组DNA片段同源的DNA序列; C表示与侧接或交叠待扩增DNA序列B的基因组DNA片段同源的DNA序列, 或者是与作为DNA序列B构成的所说序列B的末端之一的基因组DNA片段同源的DNA序列, 与序列A相比, 序列C定位于序列B的相对的末端; D表示与序列B相比定位于序列C远端的基因组DNA片段同源的DNA序列; M表示编码选择标志的DNA序列,

b) 选择其中有DNA序列M与序列A一起整合至DNA序列B的上游或下游的基因组中的细胞, 该细胞含有任意方向的A-B-C-M-A-D结构,

c) 在增加对于由DNA序列M编码的选择标记的选择压力下增殖步骤b) 中选择的细胞, 得到与亲本细胞相比增加了DNA序列B和M的基因组整合拷贝数的细胞。

2. 根据权利要求1的方法, 其中的DNA构建体由适宜的载体携带。

3. 根据权利要求2的方法, 其中的载体是质粒或噬菌体。

4. 根据权利要求2或3的方法, 其中的载体对于复制具有温敏性。

5. 根据权利要求4的方法, 其中的载体进一步携带编码选择标志的DNA序列。

6. 根据在前权利要求中的任一方法, 其中的亲本细胞是微生物

细胞、植物细胞、昆虫细胞、脊椎动物细胞或哺乳动物细胞。

7. 根据权利要求6的方法, 其中的亲本细胞是细菌细胞或真菌细胞。

8. 根据权利要求7的方法, 其中的细菌细胞是如芽胞杆菌属或链霉菌属的 G^+ 细菌细胞, 或是如志贺氏菌属的 G^- 细菌细胞, 其中的真菌细胞是如糖酵母细胞的酵母细胞, 或是如曲霉菌属细胞的丝状真菌细胞。

9. 根据权利要求1—8中的任一方法, 其中的DNA序列B含有开放阅读码。

10. 根据权利要求9的方法, 其中的DNA序列B含有一个或多个调节信号。

11. 根据权利要求9或10的方法, 其中的DNA序列B是单个基因、一簇基因或操纵子。

12. 根据权利要求8—11中的任一方法, 其中的DNA序列B与亲本细胞异源, 并来自微生物、植物、昆虫、脊椎动物或哺乳动物。

13. 根据权利要求12的方法, 其中的DNA序列B来自细胞或真菌。

14. 根据权利要求8—13中的任一方法, 其中的DNA序列B编码酶、激素、抗原成分、免疫活性蛋白质或肽、生长因子、过敏原、肿瘤相关抗原, 血液蛋白质。

15. 根据权利要求8—14中的任一方法, 其中的DNA序列B含有一个或多个编码生物合成途径的基因、一个或多个编码细胞转录、翻译或蛋白分泌装置元件的基因、在细胞中或在金属抗性方面起作用的调节因了, 或者B互补宿主细胞的营养缺陷型突变。

16. 根据权利要求1的方法, 其中的DNA序列B是一个基因, DNA序

列A与DNA序列B编码部分上游的全部或部分启动子序列同源。

17. 根据权利要求中的任一方法, 其中的DNA序列M编码赋予亲本细胞抗生素抗性的产物、赋予营养缺陷性细胞原养性的产物或互补亲本细胞缺陷的产物。

18. 根据权利要求17的方法, 其中的抗生素抗性是抗卡那霉素、四环素、氨基青霉素、红霉素、氯霉素抗性。

19. 根据权利要求17的方法, 其中的DNA序列M编码赋予抗重金属如硒酸盐、锑或砷酸盐的抗性的产物。

20. 在基因组中含有M-B结构的多拷贝DNA序列的细胞, 其中, M表示编码选择标记的DNA序列, B表示编码所需多肽的DNA序列, 多拷贝的M-B结构位于两个直接重复的序列之间。

21. 根据权利要求20的细胞, 它具有微生物、植物、昆虫、脊椎动物或哺乳动物来源。

22. 根据权利要求1—19中任一方法生产的细胞。

23. 携带含有C-M-A-D结构的DNA构建体并将用于扩增基因组的DNA序列B的载体, 其中, A表示与侧接或交叠扩增DNA序列B的基因组DNA片段同源的DNA序列, 或者是与作为DNA序列B构成的所说序列B的末端之一的基因组DNA片段同源的DNA序列; C表示与侧接或交叠待扩增DNA序列B的基因组DNA片段同源的DNA序列, 或者是与作为DNA序列B构成的所说序列B的末端之一的基因组DNA片段同源的DNA序列, 与序列A相比, 序列C定位于序列B的相对的末端; D表示与序列B相比定位于序列C远端的基因组DNA片段同源的DNA序列; M表示编码选择标志的DNA序列。

24. 根据权利要求23的载体, 它是质粒或噬菌体。

25. 根据权利要求 24 的载体, 还含有复制的温敏性来源。

26. 含有意用于扩增基因组 DNA 序列 B 的 C-M-A-D 结构的 DNA 构建体, 其中, A 表示与侧接或交叠待扩增 DNA 序列 B 的基因组 DNA 片段同源的 DNA 序列, 或者是与作为 DNA 序列 B 构成的所说序列 B 的末端之一的基因组 DNA 片段同源的 DNA 序列; C 表示与侧接或交叠待扩增 DNA 序列 B 的基因组 DNA 片段同源的 DNA 序列, 或者是与作为 DNA 序列 B 构成的所说序列 B 的末端之一的基因组 DNA 片段同源的 DNA 序列, 与序列 A 相比, 序列 C 定位于序列 B 的相对的末端; D 表示与序列 B 相比定位于序列 C 元端的基因组 DNA 片段同源的 DNA 序列; M 表示编码选择标专的 DNA 序列。

27. 生产由 DNA 序列 B 编码的多肽的方法, 包括在有助于多肽生产的条件下培养根据权利要求 20—22 中任何一个具有整合的多拷贝 DNA 序列 B 的细胞, 从培养物中回收所产生的多肽。

DNA扩增

本发明涉及在体内扩增细胞基因组DNA序列的方法，含有多拷贝所说的被扩增的基因组DNA序列的细胞以及含有用于本发明方法中的DNA构建体的载体。此外，本发明还涉及通过培养上述细胞生产多肽的方法。

已发现大量天然存在的生物体可用于生产有用的产品，而大规模地生产这些有用产品为研究工作和商业目的所需。一旦这类产品被鉴定出来，就要尽力开发能够高效生产所说产品的方法。一种以重组DNA技术为基础被广泛应用的方法是克隆编码所需产品的基因，将其插入允许所需产品表达的适宜表达系统中，在有助于产品表达的条件下培养含有表达系统的适宜宿主细胞（表达系统或者整合到染色体中，或者独立于染色体外）。然而，利用上述方法的前提条件是鉴定并克隆出所需的基因，而且适宜的表达系统和宿主细胞是可以得到的。

另外一种可用于生产上述产品的方法是在适宜条件下培养天然就能产生所需产品的细胞或这类细胞的衍生物。然而，这种方法被公认的缺陷在于所说的细胞并非是合适的生产生物体，其原因之一是这类细胞的产量太低以致于不具有商业吸引力。

不论用哪种方法，通常希望它能提高所需蛋白质的生产水平。因此，所作的努力是例如通过将编码所需产品的基因插入到强表达

信号的调控之下或通过增加所用生产生物体中的基因拷贝数来提高产量。后一种方法的进行是通过将所需基因插入在所用宿主细胞中通常是趋于不稳定的多拷贝质粒中，或者是通过将多个拷贝的所需基因整合入生产生物体的染色体，一般认为一种方法颇具吸引力是因为构建体的稳定性有助于更好地使基因稳定地维持在生产生物体中。

EP0284126 和 EP166628 公开了将一个或多个拷贝的所需基因稳定地整合到其染色体中已含有至少一个拷贝的所述基因的原核细胞中的方法。根据 EP0284126 的描述，含所述基因的宿主细胞被另外含一个拷贝的所述基因的 DNA 构建体转化，因此，在经过适当的选择过程之后，所得到的细胞在其染色体中含有由内源染色体序列分隔开的两个拷贝的所需基因，这段内源序列是宿主细胞所必不可少的藉此保证了被整合基因的稳定维持。重复上述过程以制得在染色体中含有多拷贝所述基因的细胞。

EP166628 涉及扩增芽胞杆菌菌株染色体的特定基因以得到携带所谓“可扩增单位”的细胞的方法。所说的“可扩增单位”含有所说的基因、所述基因的表达元件及编码插入两个直接重复序列（称为“被复制序列”）之间的选择标记的基因。通过质粒整合载体将基因导入细胞中，所说的整合载体整合到芽胞杆菌的染色体中，并含有标记基因、待扩增基因和被复制的序列之一，以及存在于芽胞杆菌细胞染色体中的其它序列。

上述的两种方法都要求待扩增的完整基因可被插入用于扩增方法的载体中，因此，只有在待扩增基因被分离且可用于上述方法所用载体时所说方法才是可行的。

本发明涉及一种扩增细胞染色体上DNA序列的广泛新颖的方法，它与上述已知方法相比所具有的优点在于不需要得到完整的待扩增DNA序列。

更确切地说，本发明的第一方面涉及在体内扩增亲本细胞基因组中DNA序列B的方法，该方法包括：

a). 将含有C-M-A-D结构的DNA构建体整合到所说细胞的基因组中，其中，A表示与侧接或交叠待扩增的DNA序列B的基因组DNA片段同源的DNA序列，或者是与作为DNA序列B构成的所说序列B的末端之一的基因组DNA片段同源的DNA序列；C表示与侧接或交叠待扩增的DNA序列B的基因组DNA片段同源的DNA序列，或者是与作为DNA序列B构成的所说序列B的末端之一的基因组DNA片段同源的DNA序列，与序列A相比，序列C定位于序列B的相对末端；D表示与序列B相比定位于序列C远端的基因组DNA片段同源的DNA序列；M表示编码选择标志的DNA序列，

b). 选择其中有DNA序列M与序列A一起整合至DNA序列B的上游或下游的基因组中的细胞，该细胞含有任意方向的A-B-C-M-A-D结构，

c). 在增加对于由DNA序列M编码的选择标记的选择压力条件下增殖步骤b)中选择的细胞，得到与亲本细胞相比增加了DNA序列B和M的基因组整合拷贝数的细胞。

含有C-M-A-D结构的DNA构建体整合到亲本细胞的基因组中产生一个DNA序列B与适宜的可选择标记定位于两个直接重复的DNA序列A之间的基因组结构，所说的两个DNA序列A一个来自所说的基因组，一个来自DNA构建体。当含有这类构建体的菌株在增加了对于

选择标记的选择压力下增殖时，培养物便富集了含有成倍、三倍及更高扩增数的位于两个直接重复序列间基因的细胞。因此，据研究所感兴趣的DNA序列的拷贝数可以构成作为细胞过重负担的拷贝数上限值为20、50、100或更高。借助于本发明的方法，发现被扩增的DNA在缺乏对于标记M的选择压力时相当稳定。

应该理解，本发明的扩增方法特别优于现有技术方法之外在于所用的方法无需得到待扩增的完整DNA序列。所需要知道的只是部分DNA序列或其侧接区域。这个优点在于，尽管DNA分离及测序法在近十年中已基本得到改进，但分离并测序所感兴趣的DNA序列仍然不是件容易的事，实际上，这一系列工作并非总是可行的。

在本文中，术语“基因组”正常是意指亲本细胞的染色体。然而，该术语也将表示亲本细胞中的任何其它基因组，这样的例子可以是质粒，例如存在于细胞中的较大的稳定性质粒。

用于DNA序列A、C和D的术语“同源”意指任何上述序列与基因组对应部分之间一致的程度，它足以发生同源重组。优选的是，DNA序列显示出与基因组相应部分的至少8个连续的碱基对一致或基本一致。但是，DNA序列可以更长，例如含有达数千的核苷酸。

术语“侧接”意指DNA序列A或C与定位至但未延及DNA序列B中的基因组序列同源。术语“交叠”意指DNA序列A或C与由DNA序列B的末端之一和DNA序列B之外紧接的序列构成的基因组序列部分同源。

用于DNA序列D的术语“定位于C末端”将依其常规含义理解为DNA序列D与定位在同源于DNA序列C的基因组序列一侧的基因组序列同源，DNA序列C与待扩增的DNA序列B的位置相反。与DNA序列C和

D同源的基因组序列间的距离可以随着C和D与数千碱基对分隔序列的一致或部分交叠的情况而变化。然而，C和D之间的DNA序列在本发明方法实施时将最终从基因组中删除。

本发明的另一方面涉及在其基因组中含有M-B结构的多拷贝DNA序列的细胞，其中，M表示编码选择标记的DNA序列，B表示编码所需多肽的DNA序列，多拷贝的M-B结构位于两个直接重复序列之间。

本发明更进一步的方面涉及含有C-M-A-D结构并将用于扩增基因组DNA序列B的DNA构建体及携带所说DNA构建体的载体，其中，A、C、M和D具有上文所述的含义。

最后，本发明涉及生产DNA序列B编码的多肽的方法，包括在有助于多肽生产的条件下培养上述具有整合了多拷贝DNA序列B的细胞，并从培养物中回收所得的多肽。

本发明方法的整合步骤a)可以通过任何适当的方法来进行，其性质依赖于所涉及的生物体和DNA构建体。首先，DNA构建体必须导入细胞中。DNA构建体的导入可以利用现有技术中已知的直接导入DNA的技术，例如电穿孔、转化感受态细胞、原生质体转化或发射转化，但DNA构建体是携带在能够使得DNA构建体整合入细胞的基因组中的载体上。

载体最好是可以借助任何适合于所说载体和亲本细胞的技术被导入亲本细胞的质粒或噬菌体。所说的技术包括上述的转化，原生质体融合、转染、转导和接合。

在向亲本细胞的转导时，DNA构建体最好是连同载体衍生的DNA一起通过在同源序列间发生的同源重组而被整合入基因组。附图1说明根据本发明如何在细胞的基因组与DNA构建体之间产生双

重重组现象，使细胞的基因组含有A-B-C-M-A-D结构。

当载体被用于整合DNA构建体时，在本发明方法的选择步骤b)之前就可对具有接纳了载体的细胞进行选择以提高DNA构建体发生整合的效率。为此，可以应用在某种(允许)条件下能够复制而在其它(非允许)条件下不能复制的载体。例如，载体可以是对复制具有温敏性的。因此，载体可以是在升高温度时不能复制的，而此时仍允许亲本细胞生长。先在允许质粒复制的温度下培养细胞，继而在可能发生向细菌基因组中的整合后，再于不允许质粒复制的温度下培养细胞以使载体从细胞中丢失，除非载体已整合到基因组中。

载体进一步可以包括可选择标记。在这种情况下，非允许温度下的培养过程可以在选择性条件下进行，以保证只有那些含有包括DNA构建体和可选择标记在内的整合载体的细胞能够存活。

可选择标记可以是现有技术已知的任何标记，例如，编码一种能赋予细胞抗生素抗性的产物的基因、编码一种能赋予营养缺陷性菌株以原养性的产物的基因，或编码一种能补充宿主缺陷的产物的基因[例如导入 dal 菌株的 dal 基因；参考B. Didrichsen (1986)]。在这些条件下存活的细胞将是那些含有载体的细胞，或是那些含有本发明DNA构建体的载体已整合其中的细胞。可选择标记例如可从一已知来源切除，或者存在于用于构建本发明方法中所用DNA构建体的载体(如质粒)上。

在本发明方法的选择步骤b)中，选择含有以任意方向存在的A-B-C-M-A-D结构的细胞。这类细胞可能是单一重组过程的结果，在这种情况下载体仍然存在于基因组中，或者所说细胞最好可能是双重重组过程的结果，在此种情况下载体不在基因组中。双重重组过

程可以是相继的两个单一重组过程的结果，其中第一个重组过程包括含有C-M-A-D结构的载体整合到基因组中，第二个重组过程包括从基因组中切除载体。上述过程在图2中图示说明，从中可清楚地看到，通过片段C整合继而通过片段D切除（或者反之亦然）将产生含有本发明A-B-C-M-A-D结构的基因组。

选择过程的完成可以通过在对于由DNA序列M编码的选择标记的选择压力下生长细胞，然后分析被选择细胞是否存在A-B-C-M-A-D结构，分析过程例如可借助常规的DNA分析技术（包括限制性酶消化和凝胶分析+Southern印迹），或借助利用对应于A-B-C-M-A-D结构之特征性部分的适宜引物的PCR。

在本发明一个特定实施方案中，使用了温敏性载体，它除了C-M-A-D结构外，还携带另一个可选择标记Y。在允许温度下将载体导入亲本细胞中，选择M或Y或两者。然后在非允许温度下继续增殖过程，维持M或Y或两者的选择。在这些条件下均能生长的细胞将具有整合到基因组中的载体（通过片段C、A或D中的任何一个整合）。随后，在缺乏选择压力的情况下于允许温度生长细胞。这将使得质粒复制、整合的质粒从基因组中切除（同样通过片段C、A或D中的任何一个）以及最终质粒从细胞中丧失。至此开始选择仍然含有选择标记M的细胞，然后通过如影印平板法筛选存在选择标记Y的这类细胞。这类细胞只能借助通过片段C的整合继而通过片段D的切除（或反之亦可）产生，并且在其基因组中含有A-B-C-M-A-D结构。

存在于将由本发明方法进行整合的DNA构建体中的DNA序列M可编码上述与用于本发明方法中的载体可随意携带的标记相连的任何类型的任何可选择标记。因此，DNA序列M可以编码一种抗生素抗

性，如抗卡那霉素、四环素、氨基青霉素、红霉素、氯霉素抗性，或抗各种重金属如硒酸盐、锑或砷酸盐的抗性。

应该理解，在本发明方法的增殖步骤c)中所得到的DNA序列B和M经基因组整合的拷贝数增加是围绕DNA序列B和M的初始两个DNA序列A拷贝（直接重复）间相继重组过程的结果。有可能控制DNA序列B的扩增，并因此达到一个根据所用可选择标记的种类及增殖步骤c)中所用选择性压力的强弱所预定的拷贝数。在这一步骤中所获得的DNA序列B和M的拷贝数从理论上讲无上限，但在实践中拷贝数将受限于所施加于宿主细胞的负荷。

应该注意，一旦DNA构建体被整合到亲本细胞的基因组中，就可在缺乏选择压力的条件下培养细胞而不使DNA构建体或其部分从细胞中基本丧失。这被认为由于整合的DNA不能自主复制，而要与它所整合的宿主基因组一起复制。

应该理解，本发明的新方法普遍适用于扩增不论存在于哪种细胞或基因组类型的基因组DNA序列。对于细胞特性的唯一限制在于细胞可以被转化或另外允许外源DNA的转导。细胞可包含例如质粒或染色体形式的一个或多个基因组。

例如，亲本细胞可以是微生物细胞、昆虫细胞、植物细胞、脊椎动物细胞或哺乳动物细胞。当亲本细胞是微生物细胞时，它可以是原核细胞或真核细胞，如细菌细胞或真菌（包括酵母）细胞。

当亲本细胞为细菌细胞时，它可以是如芽胞杆菌属、链霉菌属和假单胞菌属的G⁺细菌细胞，例如枯草芽胞杆菌、地衣形芽胞杆菌、缓慢芽胞杆菌、短芽胞杆菌、嗜热脂肪芽胞杆菌、嗜碱芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌、凝结芽胞杆菌、环状芽胞杆菌、

Bacillus laulus、苏云金芽胞杆菌、变青链霉菌或鼠灰链霉菌细胞，或者可以是如埃希氏杆菌和假单胞菌的G⁻细菌细胞。细菌细胞的其它例子包括archaebacteria如Pyrococcus细胞。

当亲本细胞是真菌细胞时，它可以是酵母细胞，如糖酵母属或裂殖糖酵母属的细胞，或者可以是如曲霉菌属的丝状真菌细胞，例如黑色曲霉、构巢曲霉或米曲霉细胞。

待扩增的DNA序列B可以是亲本细胞中天然存在的，或者可选择地是并非为亲本细胞中天然存在的但在本发明DNA构建体被整合之前已从其它生物体（如上述类型）中克隆，或已被合成，继而借助任何常规方法（如交换）导入宿主染色体或被其它宿主携带的基因组中。DNA序列B可以被完整地导入，或者可以例如通过相继地导入序列B的组成序列而在所说的宿主基因组中进行装配。后一种方法在DNA序列B不能被完整地克隆时特别有用。

DNA序列B可以是具有或编码任何功能的一段序列。例如，DNA序列B可以含有一个开放读码（例如编码结构或调节蛋白或多肽），也可以是单个基因、一族基因或一个操纵子。DNA序列B进一步可以含有一个或多个涉及开放阅读码表达的调节信号，如转录或翻译终止或起始序列。

优选的是，DNA序列B含有一个具有所有必需的调节序列，如启动子、中止子、核糖体结合位点等的可表达基因。

正常情况下，待扩增的DNA序列B可编码一个所需产物，例如酶、激素、抗原成分、免疫活性蛋白质或肽、生长因子、过敏原、肿瘤相关抗原、血液蛋白质等，换句话说，它可以编码任何所需种类的工业实用产品。

所感兴趣的酶的例子包括淀粉酶、脂解酶、蛋白酶、转移酶、异构酶、过氧化酶、氧化酶等。特别优选的是DNA序列B编码蛋白酶、脂酶、淀粉酶、半乳糖苷酶、支链淀粉酶、纤维素酶、葡萄糖苷酶、蛋白质二硫化物异构酶、CGT酶(环糊精葡萄糖酸转移酶)、葡萄糖氧化酶、葡糖基转移酶或木聚糖酶。

其它有用产物的例子包括胰岛素样生长因子、胰岛素人或牛生长激素、人血液凝固因子、白介素、IPA等。

可以选择地是，DNA序列B含有一个或多个编码生物合成途径的基因、一个或多个编码细胞转录、翻译或蛋白质分泌装置(如原核细胞的因子或sec基因)元件的基因、在细胞中或在金属抗性方面起作用的调节因子，或者DNA序列B可互补亲本细胞的营养缺陷型突变。

从上面公开的内容可以理解，DNA序列A和C可以与任何交叠或侧接DNA序列B的基因组序列同源。当DNA序列B是一个基因时，DNA序列A或C最好可以是与DNA序列B编码部分上游的全部或部分启动子序列同源。这类构建体的例子如下文实施例1所示。

用于本发明方法中的DNA构建体可以通过现的技术中已知的一系列遗传操作应用方法和酶类来合成。典型的情况下，利用常规DNA分析法鉴定与DNA序列A、C和D具有同源性的每一段基因组序列。

例如，可以从所涉及的生物体中制备cDNA或基因组文库，并从中鉴别待扩增的DNA序列B。当已知至少一部分DNA序列B时，可以通过借助常规杂交过程[例如应用按标准技术(参考Sambrook等1989)根据部分DNA序列B合成的寡核苷酸探针]或者更好地是借助聚合酶链反应(PCR)应用在已知的部分DNA序列B的基础上制备的降解寡核

核苷酸探针筛选阳性克隆以鉴定DNA序列B。例如,可以利用US 4,683,202或由R. K. Saiki等人(1988)描述的技术进行PCR。

当DNA序列B的核苷酸序列未知而已知其表达产物时,可以筛选具有所说产物活性的cDNA或基因组克隆,并因此鉴定表达所说活性的克隆。随后,分离并测序所说克隆中所需的DNA部分,并鉴定DNA序列B或其部分的位置。

待扩增的DNA序列B也可以用突变的方法鉴别,鉴别通过插入损害细胞生产B的产物的能力的转座子,并且例如通过利用对应于转座子序列的引物的反相PCR确定DNA序列B部分。在这一方法中,可以确定含有B末端和侧接区的DNA序列,甚至是在B不能够被部分或完整地克隆时。

为了能够制备DNA序列A、C和D,应该知道的至少是B的5'和3'端(至少包括足以使得探针或PCR引物特异性结合的序列信息,如12个核苷酸)。一旦鉴定了这些末端序列,就可以利用例如杂交或PCR分析来鉴定侧接或交叠DNA序列B两端的DNA,然后测序。在这些序列的基础上制备DNA序列A、C和D。

DNA A、C、D和M可以经合成法制备,或者可以是利用上述方法分离自基因组或cDNA文库的cDNA或基因组来源。

可以选择地是,可以用已建立的标记方法合成制备本发明DNA构建体的DNA序列,所说的方法例如Beaucage和Caruthers(1981)所述的磷酸胺法,或者如Matthes等人(1984)所述的方法。根据磷酸胺法,例如用自动DNA合成仪合成寡核苷酸,然后纯化、退火、连接并克隆入适宜的载体。

最后,DNA构建体可以具有混合的基因组和合成来源,混合的合

成和cDNA来源或混合的基因组和cDNA来源,是按照标准技术通过连接合成的、基因组的或cDNA来源(作为适宜的)的片段制备成的,这些片段对应于完整的重组DNA分子的各个部分。

如上所述, DNA序列B最好编码一种感兴趣的多肽,因此本发明进一步涉及生产感兴趣多肽的方法,包括在有助于生产多肽的条件下培养本发明在基因组中含有多拷贝DNA序列的细胞,其中的多拷贝DNA序列含有M-B结构,而B编码感兴趣的多肽;并从培养物中回收所得的多肽。由本发明方法生产的多肽可以是上文所列举的任何一种产物,例如酶,其中又如蛋白酶、淀粉酶或脂酶。

本发明将由附图作进一步地说明。

图1说明发生于基因组和本发明构建体之间的双重重组过程,产生了在其基因组中含有A-B-C-M-A-D结构的细胞。

图2说明由两个相继的单一重组过程形成的双重重组过程,第一次重组包括将含有C-M-A-D结构的载体整合入基因组,第二次重组包括从基因组中切除载体,得到含有本发明A-B-C-M-A-D结构的基因组。图中分别说明了发生各种整合和切除的可能性。

图3是质粒pDN1981的限制性图。

图4是质粒pSJ1985的限制性图。

图5是质粒pSJ2024的限制性图。

图6是质粒pSJ980的限制性图。

图7是质粒pSJ1926的限制性图。

图8是质粒pSJ2059的限制性图。

图9是实施例1中所涉及的基因组图和整合过程,其中:

A说明地衣形芽胞杆菌染色体中的 $\underline{amy1}$ 基因,

- B说明通过启动子片段 (0000000) 进行的整合,
- C说明通过 amyI 片段 (编码序列的 5' 部分 *****) 进行的整合,
- D说明通过 amyI 片段下游 (编码序列的下游 ××××) 进行的整合,
- E说明通过编码序列的同源下游 (×××) 从整合型C中切除质粒,
- F说明扩增 P-amyI-KanB 区 (最初通过两个启动子区 000000)。

本发明在下面的实施例中得以进一步地说明, 实施例将以任何方式限制本发明的范围。

材料与amp;方法

菌株:

地衣形芽胞杆菌 SJ1904 是产 α 一定粉酶的菌株, 它来源于如 W093/10249 的实施例 6 所述整合/切除质料 pSJ1755 的 SJ1707 菌株, 所引专利文献的内容并入本文作为参考。

枯草芽胞杆菌 DN1885 为 amyE、amyR2、SPO⁺、Pro⁺, 是枯草芽胞杆菌 168 (Diderichsen 等 1990) 的衍生物。培养基:

TY:	胰蛋白酶	20g/l
	酵母浸膏	5g/l
	FeCl ₂ · 4H ₂ O	6mg/l
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1mg/l
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15mg/l
	pH	7.3
BPX:	土豆淀粉	100g/l

大麦粉	50g/l
BAN 5000 SKB	0.1g/l
酪蛋白酸钠	10g/l
大豆餐	20g/l
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	9g/l
环氧乙烷—环氧丙烷的 嵌段共聚物	0.1g/l
LB琼脂: 细菌胰胨	10g/l
细菌酵母浸膏	5g/l
NaCl	10g/l
细菌琼脂	15g/l
用NaOH调pH至7.5	

一般方法

用于构建质粒的实验技术是重组DNA技术领域中的标准技术, 参见Sanbrook等(1989)。

限制性核酸内切酶购自New England Biolabs和Boehringer Mannheim, 并按生产商的说明使用。T4 DNA连接酶购自New England Biolabs, 按生产商的说明使用。

利用Kieser(1984)描述的方法从所有菌株中制备质粒DNA。

转化枯草芽胞杆菌

根据Yasbin等人(1975)所述制备和转化感受态细胞。

转化地衣形芽胞杆菌

根据Alamatzu(1984)所述的聚乙二醇介导的原生质体转化法将质粒导入地衣形芽胞杆菌。

利用 Phadebas[®]淀粉酶检测试剂盒 (Pharmacia Diagnostics), 按供应商所述测定淀粉酶活性。

实施例 1

扩增淀粉酶编码基因

本实施例说明扩增地衣形芽胞杆菌 SJ1904 染色体中的淀粉酶编码基因。按照本实施例构建的菌株在其染色体上依次含有下列序列: 1) 淀粉酶启动子; 2) 淀粉酶结构基因; 3) 卡那霉素抗性基因; 4) 另外一个拷贝的淀粉酶启动子。在这一情况下, 两个拷贝的淀粉酶启动子起着直接重复的 DNA 序列 A 的作用。

在增加卡那霉素含量情况下对生长状况进行选择已被证实产生了淀粉酶编码基因 (包括启动子) 和卡那霉素抗性基因的扩增。

构建质粒

所有的质粒在枯草芽胞杆菌 DN1885 中构建, 选择卡那霉素抗性 ($10 \mu\text{g/ml}$)。

pDN1981 (图 3) 含有地衣形芽胞杆菌 α -淀粉酶 (amyl) 基因, 并由 Jergensen 等人 (1990) 描述过。

pSJ1985 (图 4) 含有 amyl 启动子 (Pamyl), 其后接有原本紧邻于 amyl 中止子序列下游的 210bp 片段。该片段用引物 LWN3226 + LWN3223 (表 1) 由 pDN1981 经 PCR 扩增, 再用 Nde I 和 Hind III 消化, 然后与来自 pDN1981 的 4Kb Nde I—Hind III 片段连接, 产生 pSJ1985。

pSJ2024 (图 5) 含有温敏质粒 pE194 (Horinouchi and Weisblum, 1982b) 上的启动子和下游片段的结合物。该质粒的构建是通过将来自 pSJ1985 的 1.7Kb Bgl II—Hind III 片段与 pSJ980 (图 6) 的 4.9Kb Bgl II—Hind III 片段相连。WO 93/10249 描述了质粒

pSJ980。

pSJ1926 (图7) 含有包括中止子序列的 amy1 基因, 但已缺失了中止子下游的序列 (pSJ1985 所含有的下游 210bp 片段因此而不存在于 pSJ1926 中)。pDN1981 的 0.5Kb 片段用引物 LWN3224+LWN3227 (表 I) 经 PCR 扩增, 用 Sal I 和 Hind III 消化, 并与 pDN1981 的 5.2Kb Sal I—Hind III 片段连接产生质粒 pSJ1926。经 PCR 扩增所得的 pSJ1926 的 Sal I—Hind III 片段已被 DNA 测序, 不含 PCR 诱导的突变。

pSJ2059 (图8) 含有正好包括中止子序列卡那霉素抗性基因、amy1 启动子最后为 amy1 中止子下游片段的 1Kb amy1 基因片段, 所有这些成分都具有温敏性来源。pSJ1926 经 EcoRI 和 KpnI 消化, 所得的 1Kb 片段插入到 pSJ2024 的 EcoRI 和 KpnI 之间, 产生质粒 pSJ2059。

表 I 引物表

<EcoRI>

LWN3223: 5'-GAA TTC TCA TGT TTG ACA GC -3' (SEQ ID #1)

pDN1981V2 序列中的 1—20 位

<-XbaI-><-NdeI->

LWN3226: 5'-GAC TTC TAG ACA TAT GGA AAT TTC GTT GAT TAC ATT -3' (SEQ ID #2)

amy1v2 序列中的 2221—2240 位

<HindIII>

LWN3227: 5'-GAC TGT CCA GAA GCT TAA AAT AAA AAA ACG GAT TTC -3' (SEQ ID #3)

amy1v2 序列中的 2210—2190 位

LWN3224: 5'-ATG ATA CAC AGC CCG GGC AA -3' (SEQ ID #4)

amy1v2 序列中的 1690—1710 位

LWN3554: 5'-GTT GAC CAG ACA TTA CG -3' (SEQ ID #5)

KanB 序列中的 1217—1201 位

<-NheI->

LWN3208: 5'-TGA GTC AGC TAG CAA CTG TCA TGA AAC AAC AAA AAC GGC TTT ACG CC
-3' (SEQ ID #6)

amy1v2 序列中的 622—650 位

转化地衣形芽胞杆菌

pSJ2059 经原生质体转化导入地衣形芽胞杆菌 SJ1904 中, 选择红霉素抗性 ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$), 因此得到一个转化菌株 SJ2127。

整合

将 SJ2127 在含有 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素的 LB 平板上划线, 并于 50°C 培养。因为 pSJ2059 对于复制具温敏性, 所以只有那些含有经染色体整合了质粒拷贝的细胞才将形成集落。

pSJ2059 含有三个与 SJ1904 中染色体的 *amy1* 区同源的不同区域, 并且有可能通过在这三个区域的任何区发生的重组而进行整合。这将产生其中的染色体观之如图 9B、C 或 D 所示的菌株。

如图 9B 所示整合的质粒将不能被切除, 因此产生所需菌株。

如图 9C 所示整合的质粒如果通过发生于下游片段的重组而被切除的话, 将能产生所需的菌株。

如图 9D 所示整合的质粒如果通过发生于 *amy1* 结构基因片段的重组而被切除的话, 将能产生所需的菌株。

借助利用引物 LWN3208+LWN3554 (表 I) 的 PCR 扩增来核实 50°C 平板上的 8 个菌落。反应直接在通过重悬和煮沸 TY 培养基中的细胞所得的物质上进行。引物的位置如图 9B、D 和 E 所示。

B 型整合得不到 PCR 扩增片, 而 C 型整合产生 2.7Kb 片段, D 型整合产生 7.5Kb 片段。

从 8 个菌落中有 5 个观察到了 2.7Kb 片段, 表明在这种情况下通过 *amy1* 结构基因片段发生了整合, 产生了 C 型整合体。然后在 TY 培养基中于 30°C 增殖这些菌落, 以使质粒切除和丧失。在三个菌落转移至 TY 培养基中后, 经影印平板法发现了 $\text{Kana}^{\text{R}}\text{Erm}^{\text{s}}$ 菌落。红霉素

敏感性表明质粒的丧失。正如所期望的那样, 如果通过发生于下游片段的重组而切除质粒, 产生如图 9E 所示的结果, 经 PCR 扩增从上述菌落中仍能产生 2.7Kb 片段。从 5 个 50℃ 的单一菌落中的每个菌落得到一个菌株分别记作 SJ2147—2151。

扩增

利用下列过程扩增菌株 SU2148 和 SJ2150 中的 α -淀粉酶 (amy1) + 卡那霉素抗性基因:

将菌株接种于含 10 μ g/ml 卡那霉素的 10ml TY 培养基中, 于 37℃ 摇育过夜。用 100 μ l 10 μ g/ml 培养物接种分别含有 20、50、100 和 200 μ g/ml 卡那霉素的新的 10ml 培养基中, 于 37℃ 摇育过夜。用 100 μ l 含 200 μ g/ml 的培养物接种含有 500、1000、1500、2000 和 2500 μ g/ml 卡那霉素的 10ml 培养基中。

2000 μ g/ml 和 2500 μ g/ml 培养物孵育 4 天, 其它的培养物在生长过夜后就被收获。所有培养物的等分试样都在 15% 甘油中冷冻, 收集细胞制备染色体 DNA。

亲本菌株	分离的菌株	
	SJ2148	SJ2150
卡那霉素浓度 (μ g/ml)		
10	SJ2172	SJ2182
20	SJ2173	SJ2183
50	SJ2174	SJ2184
100	SJ2175	SJ2185
200	SJ2176	SJ2186

500	SJ2177	SJ2187
1000	SJ2178	SJ2188
1500	SJ2179	SJ2189
2000	SJ2180	SJ2190
2500	SJ2181	SJ2191

用 Bgl II 消化得自上述菌株的染色体 DNA 将产生来自被扩增 DNA 的 4.1Kb 片段 (参见图 9F)。甚至连在 10 μ g/ml 卡那霉素浓度下选择的菌株中该片段也能见于溴化乙锭染色的凝胶上, 在 20 和 50 μ g/ml 卡那霉素浓度下选择的菌株所说片段更为明显, 在其余的菌株中, 4.1Kb 片段维持在高水平。

扩增的产率结果

在含有 BPX 培养基的振荡烧瓶中直接接种用甘油冻存的培养物, 于 37 $^{\circ}$ C 以 300rpm 摇动。

将用被扩增菌株获得的 α -淀粉酶产率与用菌株 SJ1904 得到的 α -淀粉酶产率相比较。

菌株	实验A		实验B	
	摇瓶中卡那 霉素的浓度 μg/ml	7 天 相对产率	4 天 相对产率	6 天 相对产率
SJ2172	10 0	2.76 2.6		
SJ2173	20 0	3.44 3.04	1.92	2.72
SJ2174	50 0	2.68 2.72		
SJ2175	100 0	3.24 2.84	1.84	2.88
SJ2176	200 0	3.2 3.24	1.84	2.84
SJ2177	500 0	0.72 3.24	1.76	2.76
SJ2182	10 0	0.48 2.0		
SJ2183	20 0	3.68 3.68	2.04	2.6
SJ2184	50 0	2.96 2.8		
SJ2185	100 0	2.8 3.2	1.44	2.32
SJ2186	200 0	2.96 2.92		
SJ2187	500 0	0.6 3.56	1.68	2.6
SJ1904	0	1.00	0.6	1.00

很明显,被扩增菌株都比亲本菌产生更多的 α -淀粉酶。

实施例2

扩增CGT酶编码基因

本实施例说明编码环糊精葡糖基转移酶的基因扩增。该基因最初从*Thermoanaerobacter*中克隆,并以一个拷贝插入地衣形芽胞杆菌菌株的染色体中,以代替该菌株中的内源性 α -淀粉酶基因(*amy1*)。CGT酶基因与用于该方法中的质粒上的 α -淀粉酶启动子和 α -淀粉酶信号肽的有效突变体结合,并且,用重组的构建体转化地衣形芽胞杆菌仅当自发的重组过程使*amy1-cgtA*基因转移至野生型*amy1*启动子控制下的染色体上时才能成功。然后将后一重组过程用于导入染色体的*amy1-cgtA*基因前的突变启动子。这部分工作已在W093/10249和W093/10248中描述,并将由此产生用于本实施例的菌株SJ1707。

因为本发明人不能得到用含有由突变启动子表达的*amy1-cgtA*基因的质粒转化地衣形芽胞杆菌的转化体,而用需要在一步中导入完整表达盒的方法又不可能扩增染色体中的所说表达盒,但利用本发明所述方法却可能做到。

根据本实施例构建的菌株在其染色体中依次含有下列序列:1)突变的*amy1*启动子;2)*amy1-cgtA*基因;3)卡那霉素抗性基因;4)另外一个拷贝的突变*amy1*启动子。在这一情况下两个拷贝的*amy1*启动子作为直接重复的DNA序列A起作用。

在增加了卡那霉素含量情况下对生长状况进行选择,已证实产生了包括突变的启动子在内的*amy1-cgtA*基因和卡那霉素抗性基因的扩增。

SJ1707的染色体含有 amyI—cglA 构建体远侧的 amyI 基因片段 (参见 W093/10249)。因此质粒 pSJ2059 可用作以同于用在实施例 1 中扩增地衣形芽胞杆菌淀粉酶基因的方式构建菌株 SJ1707 的可扩增衍生物的工具。

转化:

pSJ2059 经原生质体转化法导入地衣形芽胞杆菌 SJ1707, 于 30°C 选择红霉素抗生素 (5 μ g/ml)。

所得的一个转化体被记作 SJ2285。

整合:

SJ2285 在含 10 μ g/ml 卡那霉素的 LB 平板上划线, 并于 50°C 孵育过夜。

在 50°C 形成的 10 个菌落被置于 TY 培养基中于 30°C 增殖, 以使整合的质粒被切除和丧失。

在被转移至 TY 培养基中后, 通过影印培养来自 10 个整合体菌落中的 7 个的培养物发现了 Kana^Rerm^S 菌落。

用这些菌株中的 4 株进行扩增 (如实施例 1), 从这 4 株中的 3 株分离得到最后在 2000 μ g/ml 卡那霉素中存活的菌株。

被扩增的列系记录如下:

卡那霉素浓度 μ g/ml	菌株
10	SJ2322
20	SJ2323
50	SJ2324
100	SJ2325

200	SJ2326
500	SJ2327
1000	SJ2328
1500	SJ2329
2000	SJ2330

由 SJ2322 接种得到 SJ2323—SJ2326 (100 μ l 于 10ml 中), 由 SJ2326 接种得到 SJ2327—SJ2330。

所有培养物的等分试样用 15% 甘油冻存, 收集细胞制备染色体 DNA。

对用 EcoRI 消化的菌株 SJ2324 和 SJ2328 的染色体 DNA 进行 Southern 分析显示了如扩增 amy1—cgtA/+ 卡那霉素抗性基因所期望的 5.5Kb 片段。来自菌株 SJ2328 的 5.5Kb 片段已在溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶上非常明显。

扩增的产率结果:

含 BPX 培养基的烧瓶直接由甘油冻存的培养物接种, 并于 37 $^{\circ}$ C 以 300rpm 摇育。将用被扩增的菌株得到的 CGT 酶产率与用菌标 SJ1707 所得的产率相比较。

菌株	卡那 霉素 $\mu\text{g/ml}$	实验 A	实验 B	实验 C
		7 天	7 天	8 天
		相对产率	相对产率	相对产率
SJ1707	0		1.0	1.1
SJ2322	0	2.1	1.4	
	10	2.2	1.7	
SJ2323	0	1.9		
	20	2.0		
SJ2324	0	2.2	1.5	1.5
	50	2.4	1.7	1.8
SJ2325	0	1.8		
	100	1.6		
SJ2326	0	1.6		
	200	1.8		
SJ2327	0	1.9		
	500	1.3		
SJ2328	0	1.9	1.6	1.4
	1000	2.4	2.0	2.1

很明显，被扩增的菌株比亲本菌株产生更多的CGT酶。

来自不含卡那霉素的摇瓶的一些菌株的稳定性通过在含淀粉的LB平板上接种和对晕圈形成作记号来核实。遗传不稳定性的最终结果将会丧失最后拷贝的CGT酶基因，产生不能在淀粉平板上形成晕圈的CGT酶阴性分离子。

SJ2322:	100/100 阳性 (实验A)
	300/300 阳性 (实验B)
SJ2324:	100/100 阳性 (实验A)
	300/300 阳性 (实验B)
	120/120 阳性 (实验C)
SJ2328:	200/200 阳性 (实验A)
	500/500 阳性 (实验B)
	120/120 阳性 (实验C)

所研究的菌株在测试条件下无一丧失了最后拷贝的CGT酶基因。

参考文献

- Jørgensen 等 (1990). In vivo genetic engineering: homologous recombination as a tool for plasmid construction. *Gene* 96, 37-41.
- Horinouchi, S. and Weisblum, B. (1982b). Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.*, 150, 804-814.
- B. Diderichsen, (1986), Bacillus: Molecular Genetics and Biotechnology Applications, A.T. Ganesan and J.A. Hoch, Eds., Academic Press, pp. 35-46.
- Sambrook 等 (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd edition
- Beaucage 等 , Tetrahedron Letters 22, 1981, pp. 1859-1869,
- Matthes 等 , EMBO Journal 3, 1984, pp. 801-805
- Saiki 等 (1988), Science 239, 1988, pp. 487-491.
- Diderichsen 等 . (1990). Cloning of aldB, which encodes α -acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.*, 172, 4315-4321.
- Kieser, T. (1984), Factors affecting the isolation of CCC DNA from Streptomyces lividans and Escherichia coli. *Plasmid* 12, 19-36.
- Akamatzu 等 . (1984), An improved method of protoplast regeneration for Bacillus species and its application to protoplast fusion and transformation. *Agric. Biol. Chem.* 48, 651-655.
- Yasbin 等 . (1975), *J. Bacteriol.* 121, 296-304.

序列表

(1) 一般情况:

(i) 申请人:

(A) 姓名: NOVO NORDISK A/S

(B) 街道: NOVO Alle

(C) 城市: Bagsvaerd

(E) 国家: 丹麦

(F) 邮编 (ZIP): DK-2880

(G) 电话: +45 44448888

(H) 传真: +45 4449 3256

(I) 电传: 37304

(ii) 发明名称: DNA 扩增

(iii) 序列数: 6

(iv) 计算机可读形式:

(A) 介质类型:

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: Patent In Release #1.0, Version #1.25

(EPO)

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(iii) 假设的: 否

(iii) 反义: 否

(V) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

GAATTTCAT GTTTGACAGC

20

(2) SEQ ID NO: 2的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 36 bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(iii) 假设的: 否

(iii) 反义: 否

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

GACTTCATAGA CATATGTAAG TTTCGTTGAT TACATT

36

(2) SEQ ID NO: 3的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 36 bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(iii) 假设的: 否

(iii) 反义: 否

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

GACTGATCCAG AAGCTTAAAA TAAAAAACG GATTTC

36

(2) SEQ ID NO: 4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(iii) 假设的: 否

(iii) 反义: 否

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

ATGATACACA GCCGGGCAA

20

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(iii) 假设的: 否

(iii) 反义: 否

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

GTTGACCAGA CATTACG

17

(2) SEQ ID NO: 6 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 47bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链数: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(iii) 假设的: 否

(iii) 反义: 否

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

TGAGTCAGCT AGCAACTGTC ATGAAACAAC AAAAACGGCT TTACGCC

1/10

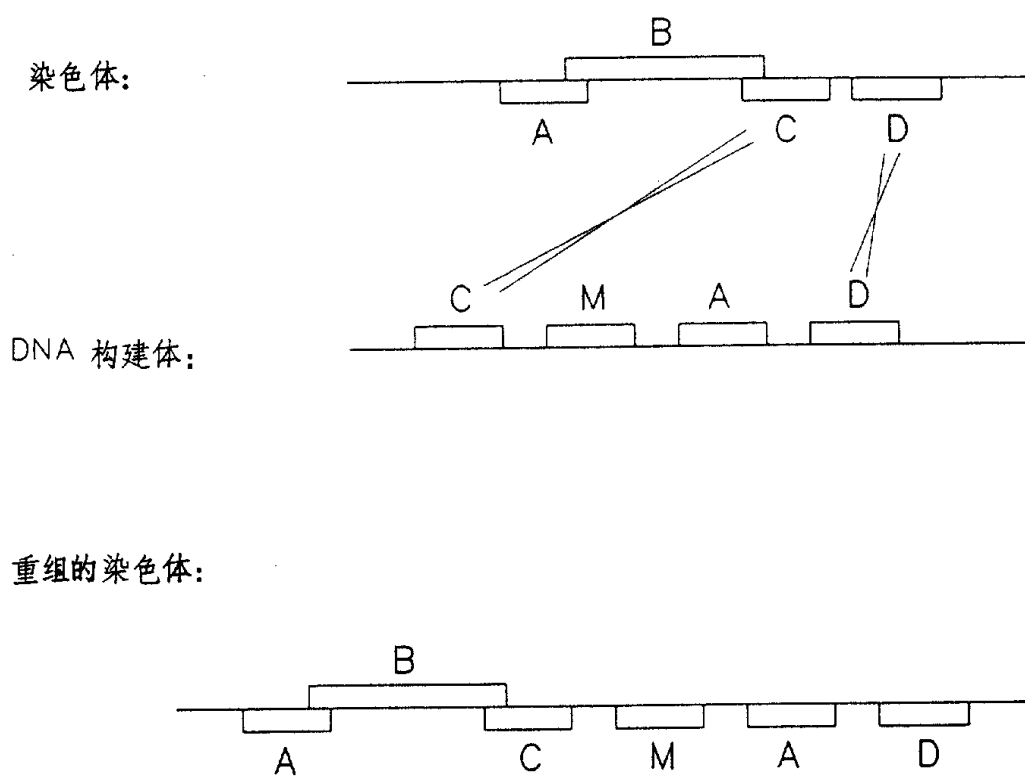
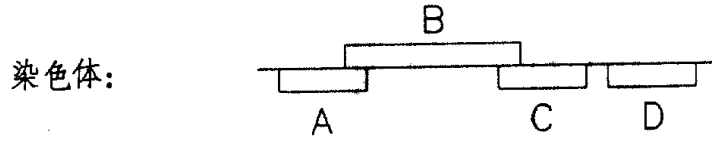
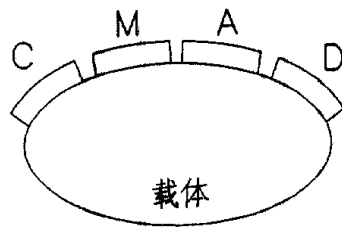


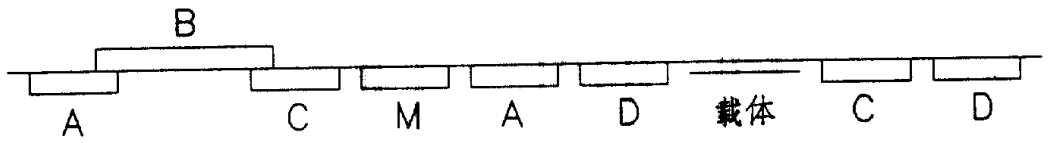
图 1



载体 + DNA 构建体:



通过C整合:



通过D切除:

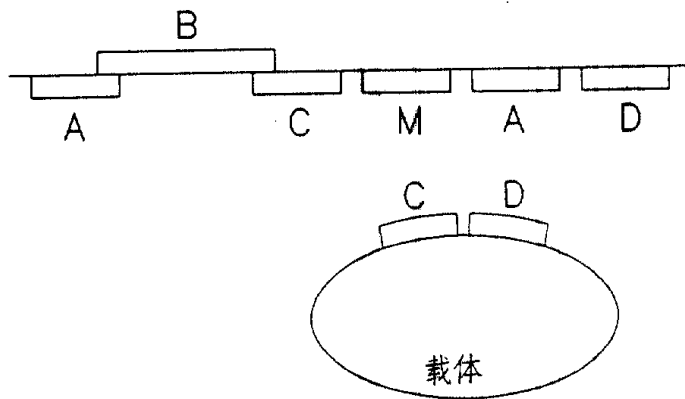
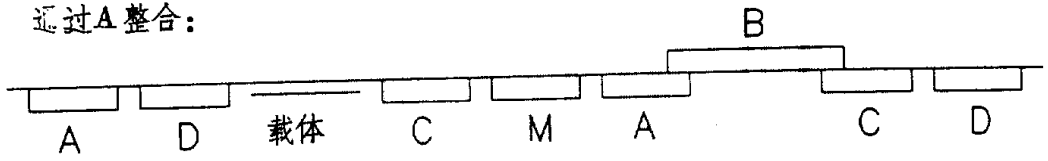
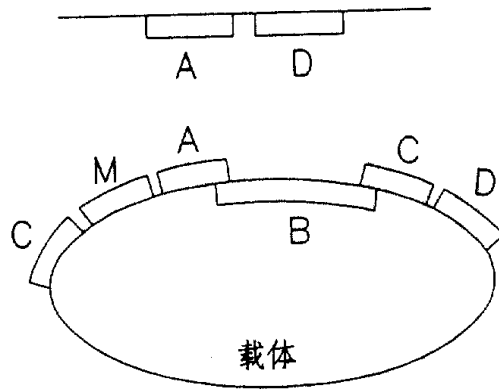


图 2

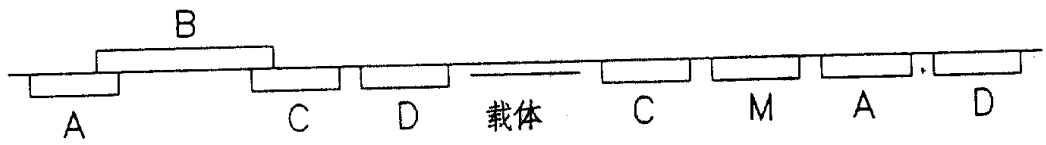
通过A整合:



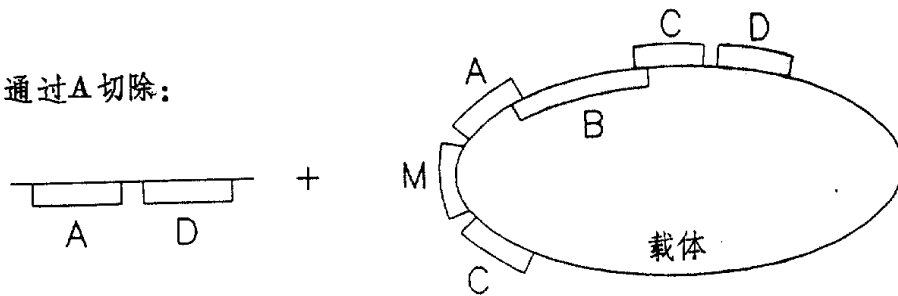
通过D切除:



通过D整合:



通过A切除:



通过C切除:

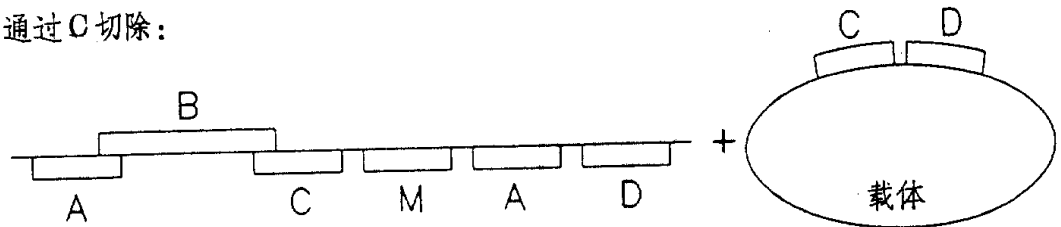


图2 (续上页)

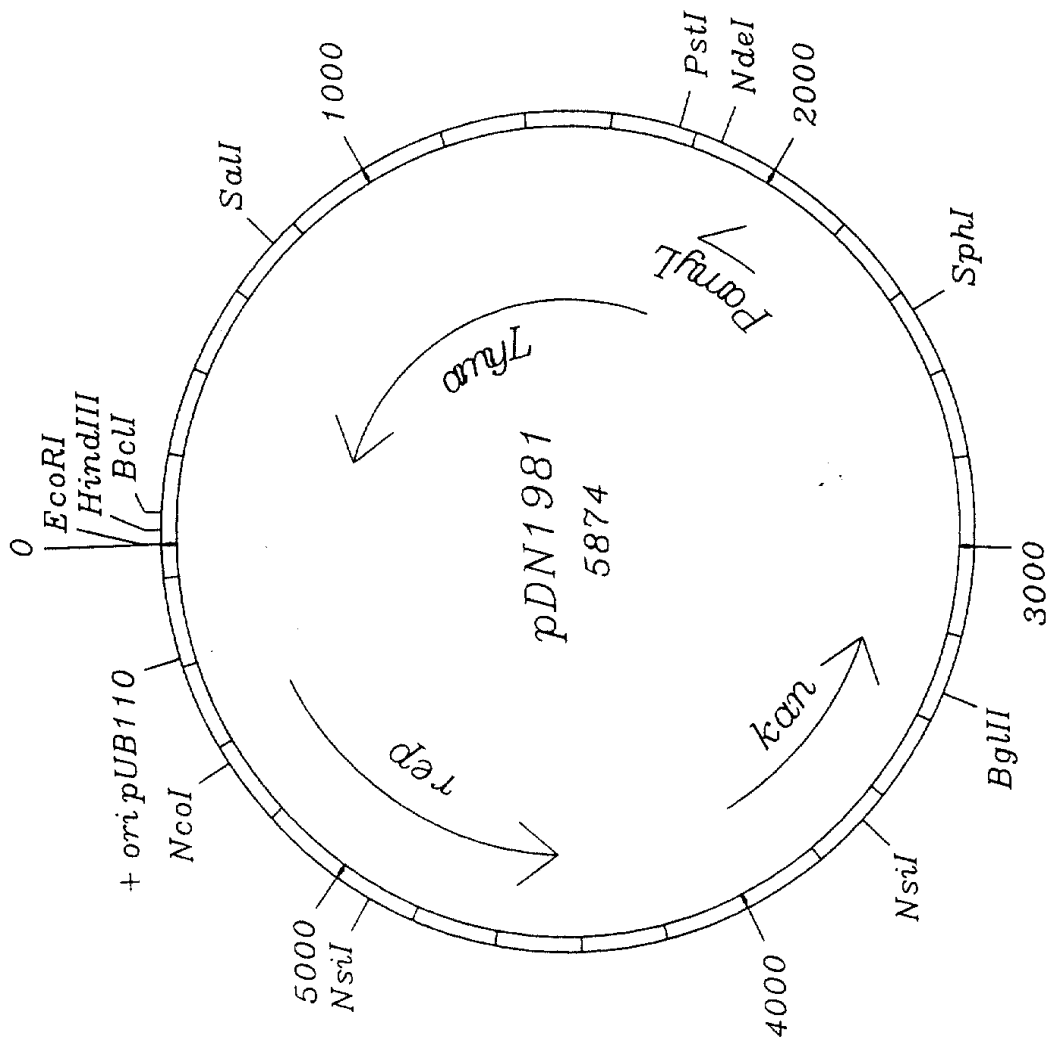


图 3

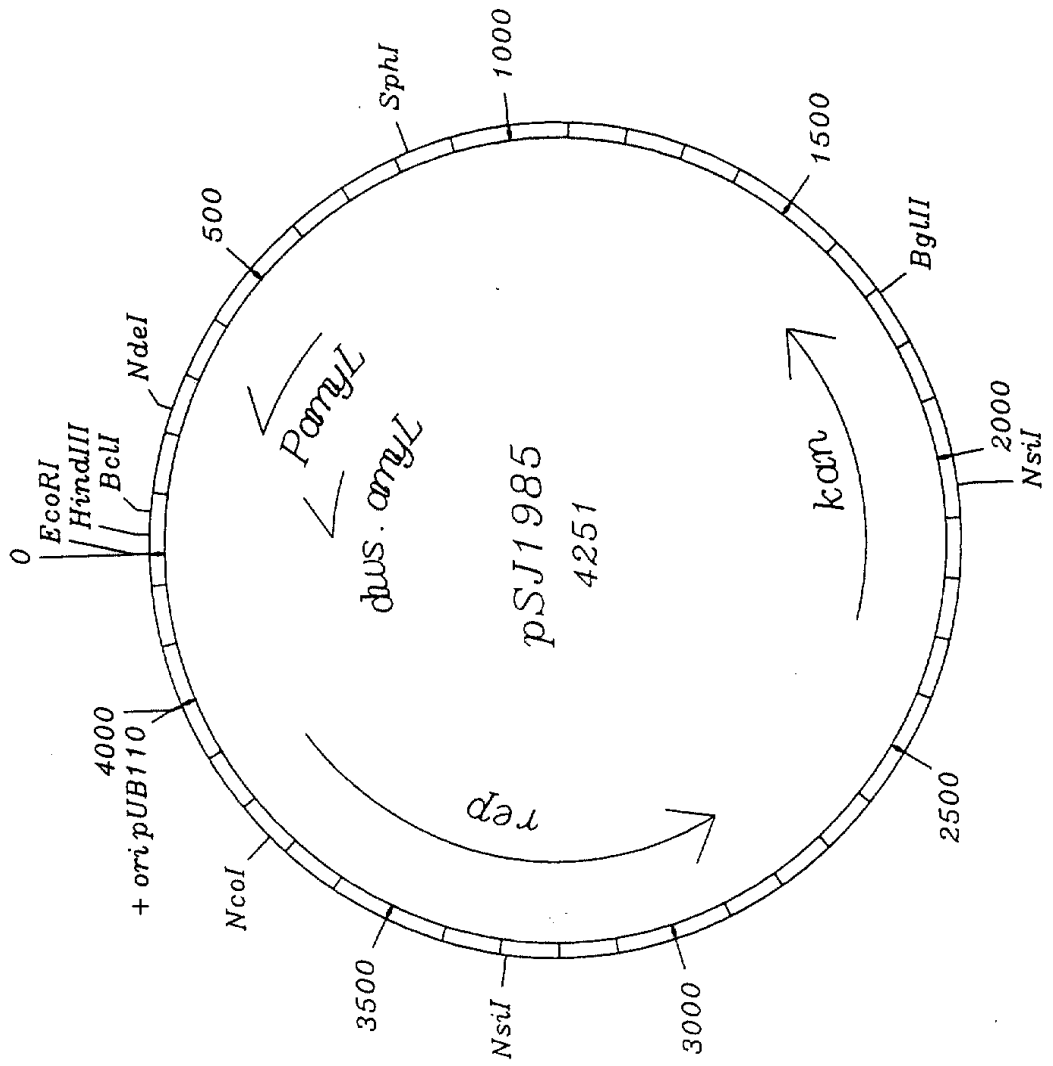


图 4

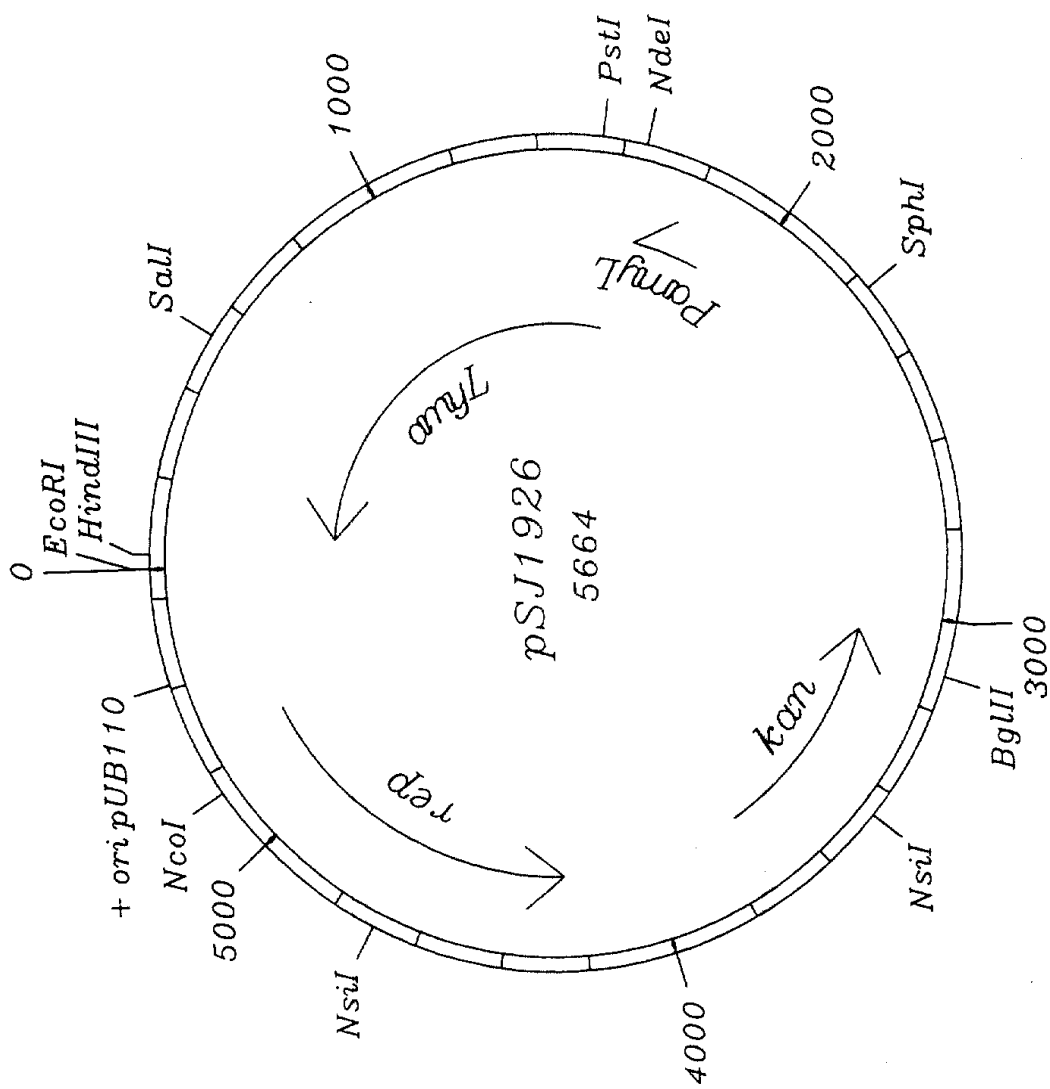


图7

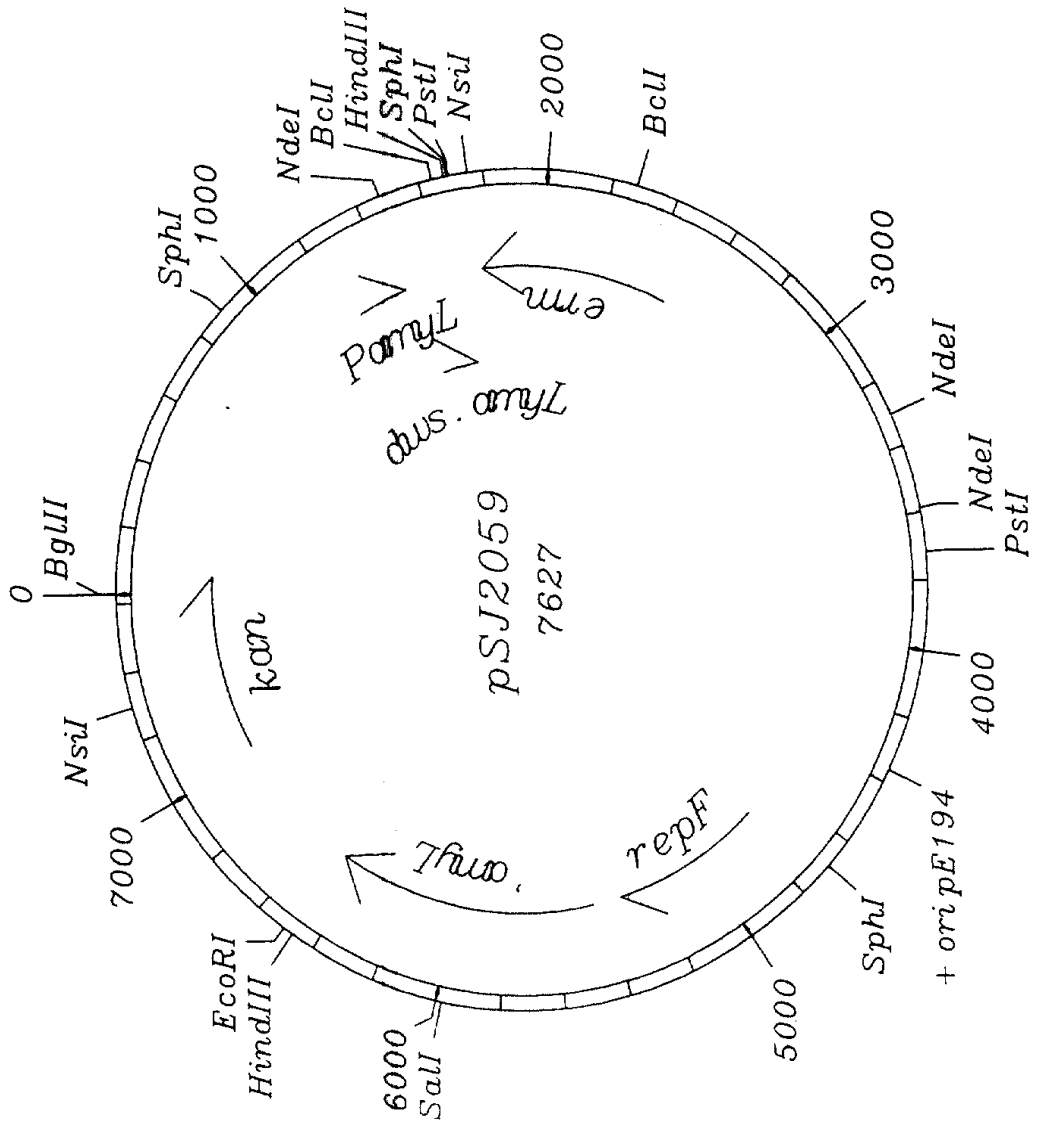
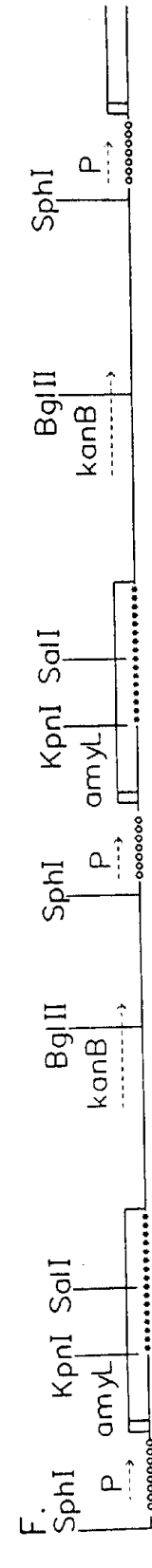
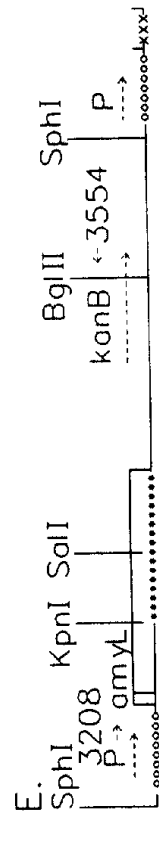
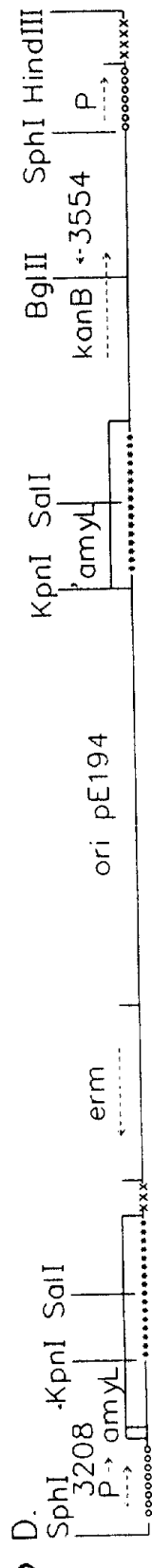
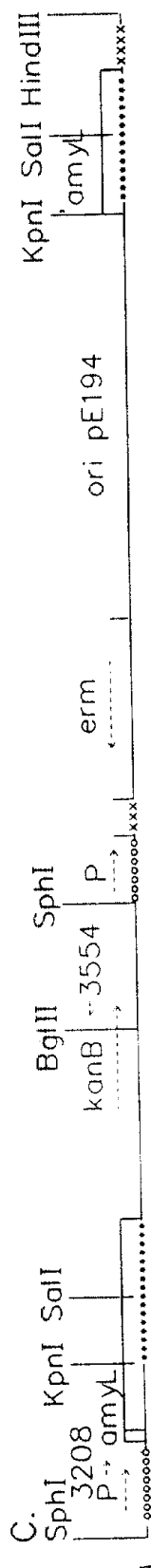
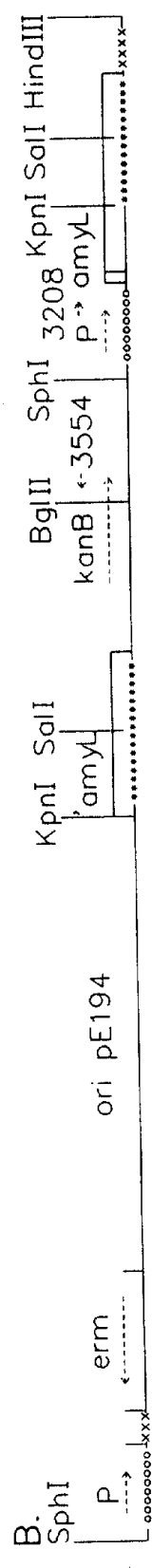
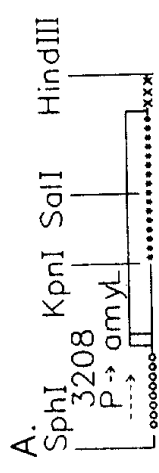


图 8

10 kb

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9



10/10