



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02815371.5

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1311082C

[22] 申请日 2002.8.9 [21] 申请号 02815371.5  
 [30] 优先权  
 [32] 2001. 8. 10 [33] KR [31] 2001 - 48373  
 [86] 国际申请 PCT/KR2002/001522 2002. 8. 9  
 [87] 国际公布 WO2003/014360 英 2003. 2. 20  
 [85] 进入国家阶段日期 2004. 2. 5  
 [73] 专利权人 生物领先公司  
 地址 韩国大田市  
 共同专利权人 M. D. 实验室有限公司  
 [72] 发明人 成文喜 洪承杓 李宗洙 郑昌敏  
 金哲仲 左右田健次 芦内诚  
 [56] 参考文献  
 CN1185809A 1998. 6. 24

A poly - gamma - glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336 : gene cloning and biochemical analysis of poly - gamma - glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. Ashiuchi M, Soda K, Misono H, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 263 No. 1 1999

审查员 卢 阳

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司  
 代理人 高龙鑫 杨淑媛

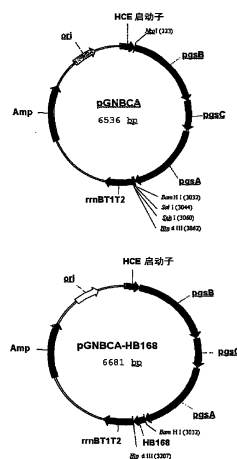
权利要求书 1 页 说明书 45 页 附图 23 页

## [54] 发明名称

具有编码多聚 -  $\gamma$  - 谷氨酸合成酶的基因 pgs-BCA 的表面表达载体以及利用该载体在微生物表面表达目的蛋白的方法

## [57] 摘要

本发明涉及具有编码多聚 -  $\gamma$  - 谷氨酸合成酶基因 pgsBCA 的表面表达载体, 以及利用该载体在微生物表面表达目的蛋白的方法。将外源性基因插入该载体, 转化微生物, 使外源性蛋白在微生物表面稳定表达。



1. 一种在微生物细胞表面制备目的蛋白的表达载体,其包含编码多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶复合物的 *pgsA* 基因以及编码目的蛋白的基因,其中所述 *pgsA* 基因来源于制备聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶的 *Bacillus sp.* 菌株,且该 *pgsA* 基因不含终止密码子。
2. 权利要求 1 所述的在微生物表面制备目的蛋白的表达载体,其中所述表达载体进一步包含 *pgsB* 基因和 *pgsC* 基因,或 *pgsC* 基因;其中 *pgsB* 基因和 *pgsC* 基因都来源于制备聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶的 *Bacillus sp.* 菌株,且 *gsB* 基因和 *pgsC* 基因都不含终止密码子。
3. 权利要求 1-2 中任意一个所述的在微生物表面制备目的蛋白的表达载体,其中所述的表达载体能用于革兰氏阴性细菌及革兰氏阳性细菌。
4. 革兰氏阴性细菌,其被权利要求 1-2 中任意一个所述的在微生物表面制备目的蛋白的表达载体所转化。
5. 革兰氏阳性细菌,其被权利要求 1-2 中任意一个所述的在微生物表面制备目的蛋白的表达载体所转化。
6. 一种在微生物细胞表面表达目的蛋白的方法,该方法包括:培养权利要求 4 所述的转化的革兰氏阴性细菌。
7. 一种在微生物细胞表面表达目的蛋白的方法,该方法包括:培养权利要求 5 所述的转化的革兰氏阳性细菌。

具有编码多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶的基因 pgsBCA 的表面表达载体以及利用该载体在微生物表面表达目的蛋白的方法

### 技术领域

本发明涉及可在微生物表面有效制备外源性蛋白的新的表达载体，该表达载体利用细胞外膜蛋白 (pgsBCA) 参与合成源于 *Bacillus* sp. 菌株的多聚- $\gamma$ -谷氨酸。此外，本发明还涉及在微生物表面表达外源性蛋白的方法，该方法是利用细胞外膜蛋白 (pgsBCA) 参与合成源于 *Bacillus* sp. 菌株的多聚- $\gamma$ -谷氨酸。

### 背景技术

近来，为了制备新的疫苗、筛选多种抗原和抗体、以及将有用的酶固定在细胞表面，已经在噬菌体、细菌、以及酵母中采用了表面表达用来在细胞表面制备有价值的外源性蛋白。

在细胞表面表达外源性蛋白的方法最初用于制备多肽的抗原区域，尤其用于疫苗的大规模稳定表达。目前，通过致病细菌随机突变来制备疫苗，并筛选得到具有一致、稳定滴度的细菌。然而，当人和动物口服后，酶不可避免地要失活。因此，许多研究都致力于克服这一问题。通常采用革兰氏阴性细菌的细胞表面蛋白，其基因与抗原蛋白基因连接，然后将连接后的基因插入适当的宿主细胞，从而在细胞表面可有效制备融合蛋白。通过上述步骤制备的重组蛋白由于在细胞表面突出，因此可作为有效的抗原。特别地，有报道说，由于细胞外膜的脂多糖(LPS) 增强了在细胞表面表达的蛋白的抗原性，因此革兰氏阴性细菌最适合用于该种制备。

为了在细胞表面表达外源性蛋白，在最初的序列中需要存在分泌信号，它能介导生物合成的细胞蛋白穿过细胞膜。此外，在革兰氏阴性细菌中，重组蛋白还必须穿过细胞内膜和细胞膜之间的空腔，插入并与细胞外膜相连，最后在细胞膜外侧稳定地突出。

实际上,有一些蛋白,例如细胞表面蛋白,特殊的酶,以及毒素蛋白,包含这样的分泌信号和目标信号,并可在细胞表面稳定突出。同样地,如果这些分泌和目标信号与适当的启动子相连,则可在细菌表面成功表达外源性蛋白。

用于外源性蛋白表面表达的细胞表面蛋白通常可被大致分成4部分,细胞外膜、脂蛋白、分泌蛋白、以及细胞表面器官蛋白。目前,革兰氏阴性细菌中的表面蛋白,例如 *LamB*, *PhoE*, 以及 *OmpA* 主要被用于制备有用的外源性蛋白。然而,这些蛋白具有对所插入蛋白大小的结构性限制,这些所插入的蛋白被插入到细胞表面的突出环(protruded loop)。由于所插入的外源性蛋白的 C-和 N-末端需要在立体结构上闭合,如果它们距离很远,可用连接肽连接以减小两末端之间的距离。

具体地,如果 *LamB* 和 *PhoE* 用于插入含有多于 50~60 氨基酸的外源性多肽,则结构性限制将阻止细胞膜稳定性蛋白的生成 (Charbit, et al., J. Immunol., 139: 1658-1664, 1987; Agterberg, et al., Vaccine, 8: 85-91, 1990)。尽管可使用 *OmpA* 将外源性蛋白插入突出环,但是由于结构限制,实际上只有含有最小目标信号的 *OmpA* 的部分片段可被插入。已经通过在 C-末端与 *OmpA* 目标信号连接而在细胞表面表达  $\beta$ -内酰胺酶。

近来,已经发现来源于 *Pseudomonas sp.* 的冰晶蛋白(ice-nucleation protein) 可以作为革兰氏阴性细菌的细胞外膜并用于表面表达(Jung et al., Nat. Biotechnol., 16: 576-560, 1998; Jung et al., Enzyme Microb. Technol., 22(5): 348-354, 1998; Lee et al., Nat. Biotechnol., 18: 645-648, 2000)。Jung 及其同事使用冰晶蛋白在细胞表面表达了果聚糖蔗糖酶(levansucrase), 其包括 N-末端、中间重复区域、以及 C-末端,在 C-末端与果聚糖蔗糖酶基因相连,而且还用冰晶蛋白表达了羧甲基纤维素,其包括 N-末端、缺失的中间重复区域、以及 C-末端,在 C-末端与该基因融合,从而检测各自酶的活性。此外, Lee 及其同事使用冰晶蛋白在 *Escherichia coli* 或者 *Salmonella typhi* *Ty21a* 菌株细胞表面进行表达,所用冰晶蛋白仅包含 N-末端或者 N-末端和 C-末端、在每一末端与 HBV 表面抗原和 HCV 核心抗原连接,研究证明了这些蛋白作为复杂的活疫苗是有效的。

脂蛋白同样被用作表面表达的表面蛋白。特别地, E. Coli 脂蛋白可通过 N-末端的分泌蛋白穿过细胞内膜, 该蛋白与细胞外膜或者内膜直接连接的末端含有 L-半胱氨酸。一种主要的脂蛋白, Lpp, 在 N-末端与细胞外膜相连, 在 C-末端与肽聚糖(PG) 相连。因此, 如果 Lpp 与细胞外膜蛋白的 *OmpA* 片段相连, 则外源性蛋白可被稳定地表达在细胞外膜的细胞表面上 (Francisco, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 489: 2713-2717, 1992)。该特性还可用于另一脂蛋白, TraT, 在细胞表面表达外源性蛋白, 诸如脊髓灰质炎病毒的 C3 抗原决定簇 (Felici, et al., J. Mol. Biol., 222: 301-310, 1991)。而且, 对肽聚糖连接性脂蛋白(peptidoglycan-associated lipoprotein, PAL) 来说, 尽管其确切功能还未得到阐明, 但其已被用于表面表达来制备重组抗原(Fuchs, et al., Bio/Technology, 9: 1369-1372, 1991)。在这种情况下, PAL 的 C-末端与细胞壁相连, N-末端与重组抗体相连, 从而在细胞表面表达融合蛋白。

同时, 尽管可穿过细胞外膜的分泌蛋白可被用作表面蛋白, 但这并未在革兰氏阴性细菌中得到应用, 并且只有在特定蛋白参与分泌机制时才有几种分泌蛋白可帮助穿过细胞外膜。例如, 当脂蛋白 *Klebsiella sp.* 普鲁兰酶(pullulanase)的 N-末端被脂类物质取代并连接至细胞外膜后, 可完全分泌至细胞培养介质中。Kornacker 及其同事使用普鲁兰酶(pullulanase)的 N-末端片段将  $\beta$ -内酰胺酶表达至细胞表面, 但是所得的普鲁兰酶- $\beta$ -内酰胺酶融合蛋白立刻连接到细胞表面, 然后却在细胞培养介质中分离了。此外, 还使用该步骤制备了碱性磷酸酶, 这是一种胞质间间隙蛋白(periplasmic space protein), 但由于其分泌过程至少需要 14 种蛋白, 因此不能稳定表达该重组蛋白(Kornacker, et al., Mol. Microbiol., 4: 1101-1109, 1990)。

此外, 来源于致病菌 *Neisseria sp.* 的 IgA 蛋白酶具有一特殊的分泌系统, 其 C-末端具有一片段信号, 可使 N-末端的蛋白酶稳定地连接到细胞外膜上。当该蛋白酶到达细胞外膜并在细胞表面突出后, 根据其水解能力分泌至细胞培养介质中。Klauser 及其同事采用 IgA 蛋白酶片段将分子量约为 12kDa 的霍乱毒素 B 亚基不连续地表达至细胞表面(Klauser, et al., EMBO J., 9: 1991-1999, 1990)。然而, 该融合蛋白的分泌被分泌过程中细胞膜空间产生的蛋白折叠所抑制。

另外，对革兰氏阴性细菌来说，存在于细胞表面且用于表面表达的细胞亚器官(suborgans)包括鞭毛、菌毛、菌伞毛等。更详细地，采用含有鞭毛、且与其抗体有强结合性的鞭毛蛋白作为亚单位已经连续制备了霍乱毒素 B 亚基和来源于乙型肝炎病毒多肽(Newton, et al., Science, 244: 70-72, 1989)。丝束蛋白(fimbrin)，一种在细胞表面由线状伞毛构成的亚基，已经被用于表达外源性多肽，然而只有小的多肽被成功地制备出来(Hedegaard, et al., Gene, 85: 115-124, 1989)。

除了已经将革兰氏阴性细菌的表面蛋白用于表面表达外，最近，革兰氏阳性细菌的表面蛋白也被用于表面表达(Samuels, et al., J. Bacteriol., 177: 1470-1476, 1995)。然而，在这种情况下，仍需要用来穿过细胞内膜的分泌信号以及用于表面表达和连接到细胞表面的载体。实际上，来源于 *Staphylococcus hyicus* 的脂肪酶的分泌信号和来源于 *Staphylococcus aureus* 的蛋白 A 的膜连接载体(membrane attachment carrier) 已经被用于制备疟疾血期(malaria blood stage)抗原，其包括 80 个氨基酸以及来源于 Streptococcus 蛋白 G 的白蛋白连接蛋白，并成功地将所得蛋白表达在细胞表面。

如上所述，由于很多研究已经集中在利用革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌进行表面表达，已经发展出很多表达系统用于制备有价值的蛋白，并且尤其在美国、欧洲、以及日本提交专利保护。更详细地，已经有 5 份专利申请公开了革兰氏阴性细菌的细胞外膜蛋白(WO 9504069, WO 9324636, WO 9310214, EP 603672, US 5356797), 1 份专利申请报道了使用鞭毛作为细胞表面器官(WO 9410330), 1 份使用细胞表面脂蛋白(WO 9504079)。

如上所述，为了使用细胞外膜蛋白将外源性蛋白表达至细胞表面，必须将适宜的细胞内膜和外源性蛋白在基因水平连接，诱导生物合成，当稳定穿过细胞内膜后持续存在于细胞外膜。为完成这一过程，应选择满足下述要求的细胞内膜，然后用于表面表达的载体中：首先，穿过细胞内膜的分泌信号的存在；其次，与细胞外膜稳定连接的目标信号的存在；第三，大量表达至细胞表面；第四，不考虑蛋白大小，蛋白能稳定表达。

然而，还没有发明出满足上述所有条件的用于表面表达的载体。目前，仅有下述缺点得到了补救。

基于上述背景，本发明人对来源于 *Bacillus sp.* 菌株的多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶基因(pgsBCA) 作为表面表达的新载体进行了研究。研究发现，采用含有 pgsBCA 基因的新的表达载体可有效地将外源性蛋白表达至微生物表面，同时发现了可大范围地将外源性蛋白成功表达至微生物表面的方法。

本发明公开

本发明的目的在于提供一种在微生物表面制备外源性蛋白的方法。

详细地，在本发明中，从参与合成源于 *Bacillus sp.* 菌株的多聚- $\gamma$ -谷氨酸的细胞外膜蛋白中选择出可大范围地将外源蛋白表达至革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌表面的新的表面表达载体。然后，利用该基因，构建可在微生物表面表达外源性蛋白或多肽的表面表达载体，并将该载体转化至多种宿主细胞，从而选择用于表面表达的细胞转化株。

为完成本发明的目的，提供了选自 pgsB、pgsC、以及 pgsA 的、包含一个或多个编码多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶复合物的基因的表面表达载体。

详细地，本发明提供了用于在微生物表面制备蛋白的表面表达载体，其中 pgsB、pgsC 以及 pgsA 基因包含分别与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 具有 80%同源性的核苷酸序列。此外，还提供了在微生物表面制备蛋白的表面表达载体，包括编码目的蛋白的基因以及 C-末端的终止密码子。

此外，还提供了用上述表达载体转化得到的细胞转化株。

最后，本发明提供了在革兰氏阴性或革兰氏阳性宿主细胞微生物表面表达目的蛋白的方法，其包括下述步骤：

- (a) 通过将编码目的蛋白的基因插入表面表达载体中构建重组表达载体；
- (b) 使用重组载体转化革兰氏阴性宿主细胞；以及
- (c) 培养转化的宿主细胞，在宿主细胞的表面表达目的蛋白。

附图详细描述

本发明的上述以及其他的目的、特性、以及优点将通过附图以及下述详细描述相结合得到更好的理解，其中：

图 1 描述了表面表达载体 pGNBCA 和重组表达载体 pGNBCA-HB168 的限制性图谱，在本发明中，它们利用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞；

图 2 描述了在用本发明的重组表达载体 pGNBCA-HB168 转化的革兰氏阴性细菌中 HBV 表面抗原蛋白的表面表达，其是通过 Western 印迹法和荧光活化细胞分类试验(fluorescence-activated cell sorting assays)检测的；

图 3 描述了本发明的表面表达载体 pGNCA 和重组表达载体 pGNCA-HB168 的限制性图谱；

图 4 描述了在用本发明的表面表达重组载体 pGNCA-HB168:A2、pGNCA-HB168:A3 和 pGNHB-A:A4 转化的革兰氏阴性细菌中 HBV 表面抗原蛋白的表面表达，其是通过 Western 印迹法和荧光活化细胞分类试验(fluorescence-activated cell sorting assays)检测的；

图 5 描述了本发明的表面表达载体 pGNA 和重组表达载体 pGNA-HB168 的限制性图谱；

图 6 描述了本发明的表面表达载体 pGNCA2 和重组表达载体 pGNHB-A 的限制性图谱；

图 7 描述了本发明的表面表达载体 pGNC 和重组表达载体 pGNC-PreS1 的限制性图谱；

图 8 描述了在用本发明的表面表达重组载体 pGNC-PreS1 转化的革兰氏阴性细菌中 HBV 表面抗原 PreS1 蛋白的表面表达方式，它是通过 Western 印迹法检测的；

图 9 描述了本发明的表面表达载体 pHCE1LB:BCA 和重组表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 的限制性图谱；

图 10 描述了在用本发明的表面表达重组载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的革兰氏阴性细菌中 HBV 表面抗原决定簇的表面表达方式，其是通过 Western 印迹法和荧光活化细胞分类试验(fluorescence-activated cell sorting assays)检测的；

图 11 描述了用本发明的重组表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的革兰氏阴性细菌的活疫苗的效力；

图 12 描述了在用本发明的表面表达重组载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的革兰氏阳性细菌中 HBV 表面抗原决定簇的表面表达，它是通过



Western 印迹法和荧光活化细胞分类试验(fluorescence-activated cell sorting assays)检测的;

图 13 描述了用本发明的重组表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的革兰氏阳性细菌的活疫苗的效力;

图 14 描述了本发明的表面表达载体 pHCE1LB:A 和重组表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1 以及 pHCE1LB:A-PEDN 的限制性图谱;

图 15 描述了用本发明的表面表达重组载体 pHCE1LB:A-TGEN1 转化的革兰氏阴性(*Escherichia coli*)和革兰氏阳性细菌制备的 TGE 病毒 N 蛋白的表面表达方式,它是通过 Western 印迹法检测的;

图 16 描述了用本发明的表达重组载体 pHCE1LB:A-PEDN 转化的革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌制备的 PED 病毒 N 蛋白的表面表达方式,它是通过 Western 印迹法检测的;

图 17 描述了用本发明的重组表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1 和 pHCE1LB:A-PEDN 转化的革兰氏阳性细菌的活疫苗的效力;

图 18 描述了本发明的表面表达载体 pHCE1LB:A 和重组表达载体 pHCE1LB:A-PreS1 以及 pHCE1LB:A-PreS2 的限制性图谱;

图 19 描述了本发明的表面表达载体 pHCE1LB:A 和重组表达载体 pHCE1LB:A-PreS1:PreS2 以及 pHCE1LB:A-L 的限制性图谱;

图 20 描述了分别用本发明的表达重组载体 pHCE1LB:A-PreS1 和 pHCE1LB:A-PreS1:PreS2 转化的革兰氏阴性细菌制备的乙型肝炎病毒 PreS1 和 PreS1:PreS2 的表面表达方式,以及用本发明的表达重组载体 pHCE1LB:A-L 转化的革兰氏阴性细菌制备的乙型肝炎病毒 L 蛋白的表面表达方式,它是通过 Western 印迹法检测的;

图 21 描述了本发明的表面表达载体 pHCE1LB:A-TNF- $\alpha$  的限制性图谱;

图 22 描述了本发明的重组表达载体 pGNA-脂肪酶的限制性图谱,以及采用重组表达载体 pGNA-脂肪酶转化的革兰氏阴性细菌细胞表面表达的脂肪酶活性;

图 23 描述了本发明的重组表达载体 pGNA-酰胺酶的限制性图谱，以及采用重组表达载体 pGNA-酰胺酶转化的革兰氏阴性细菌细胞表面表达的酰胺酶活性。

本发明的最佳实施方式

在下文中，将对本发明进行详细描述。

由 pgsBCA 基因编码的蛋白是一种存在于 *Bacillus* sp.菌株中的细胞外部蛋白，它是一种具有可食用性、可溶解性、带有阴离子、可生物降解的聚合体物质，其参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸的合成，并且是由 *Bacillus subtilis*(IFO3336; Natto. Biochem. Biophys. Research Comm., 263, 6-12, 199, *Bacillus licheniformis* (ATCC 9945; Biotech. Bioeng., 4), 430-437, 1998)以及 *Bacillus anthracis*(J. Bacteriol., 171, 722-730, 1989)等制备出的。

从 Natto 菌株(*Bacillus subtilis* IFO 3336)中分离出来的一种细胞膜蛋白(pgsBCA)总共包含 922 个氨基酸，精确地说，pgsB 的 393 个氨基酸，pgsC 的 149 个氨基酸，以及 pgsA 的 380 个氨基酸。Ashiuchi 等公开了来源于 *Bacillus natto* 菌株的多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶基因的克隆、将其转化至 *Escherichia coli* 中、以及其合成(Ashiuchi, et al., Biochem. Biophys. Research Comm, 263: 6-12, 1999)。

然而，包含多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶复合物的 pgsBCA 蛋白的功能还没有被详细阐述。至少，pgsB 作为氨基化合物连接系统参与了构成酶复合物蛋白，并且在 pgsB 的 N-末端通过特定的氨基酸与细胞膜或者细胞壁相互作用。pgsA 在 N-末端和 C-末端具有特定的亲水氨基酸序列，起到与 pgsB 相关联的分泌信号、目标信号以及结合信号的作用，进而穿过细胞内膜。

本发明人发现，参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白是一种有效的表面表达载体，该载体能根据外源性蛋白一级氨基酸序列的结构和特征将其表达至细胞表面。具体地，其有很多优点。首先，参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白可被大量表达，用于合成多聚- $\gamma$ -谷氨酸和细胞外分泌；其次，在细胞周期的静息期，表达至细胞表面的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白可被稳定保持；第三，该细胞外膜蛋白在细胞表面呈结构性突出，尤其在 pgsA 中；第四，参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白

(pgsBCA)来源于革兰氏阳性细菌的细胞表面，其可被表达至革兰氏阳性或者革兰氏阴性细菌的细胞表面。

本发明提供了可用于将外源性蛋白表达至细胞表面的重组表达载体，其利用了参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白的性质。详细地说，将本发明的表面表达载体构建为含有分泌信号和目标信号的构建体，所述信号存在于参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白(pgsBCA)的一级序列中。

此外，本发明提供了使用表面表达载体将外源性蛋白表达至革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌表面的方法，其利用了参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白的特性。详细地说，由于利用了参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白，外源性蛋白表达至细胞表面，因此本发明的制备外源性蛋白的方法可以省略某些步骤，诸如细胞超声降解或者蛋白纯化等。

因此，本发明提供了通过表面表达方法制备的外源性蛋白的多种用途。详细地说，本发明提供的方法可有效制备抗原和抗体、筛选抗原的多肽库、结合蛋白或者吸附蛋白、以及生理活性物质等等。

除了细胞外膜蛋白参与来源于 *Bacillus* sp. 菌株的多聚- $\gamma$ -谷氨酸的合成外，所有含有多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成基因的表面表达载体也在本发明的保护范畴之内。

此外，本发明的使用多聚- $\gamma$ -谷氨酸合酶基因的表面表达载体可应用于所有表面表达的微生物菌株。优选地这些载体可被用于革兰氏阴性细菌，尤其是 *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholera*, *Mycobacterium bovis*, 以及 *Shigella*, 也可用于革兰氏阳性细菌，尤其是 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Lyseria*, *Monocytogenesis*, 以及 *Streptococcus*。所有使用这些菌株制备外源性蛋白的方法也在本发明的保护范畴之内。

根据需要，可将多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶基因在 N-末端或者 C-末端插入所有或某些限制性酶的多个识别位点。因此，包括这些限制性酶识别位点的表面表达载体也在本发明的保护范畴之内。

详细地，本发明涵盖了所有来源于 *Bacillus* sp. 菌株的多聚- $\gamma$ -谷氨酸合酶基因。其中，pgsA 基因用于在 C-末端插入限制性酶识别位点，它很容易克隆多种外源性蛋白基因，从而构建表面表达载体 pGNBCA。

本发明还提供了重组表面表达载体 pGNBCA-HB168，它能在革兰氏阴性细菌的细胞表面表达抗原决定簇，并以融合的形式形成抗 S 抗原的中和抗体。详细地，参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白复合物包括 pgsB、pgsC、以及 pgsA 蛋白，pgsA 蛋白基因的 C-末端与抗原决定簇的 N-末端相连接从而形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体。

本发明还提供了重组表面表达载体 pGNCA-HB168、pGNA-HB168 和 pGNHB-A，它们能在革兰氏阴性细菌的细胞表面表达抗原决定簇，并以融合的形式形成抗 S 抗原的中和抗体。详细地，参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白复合物包含 pgsC 和 pgsA 蛋白，或者仅有 pgsA 蛋白，然后，前一种情况的 pgsA 蛋白基因的 C-末端，或后一种情况的 N-末端或 C-末端与抗原决定簇的 N-末端相连接从而形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体。

本发明还提供了重组表面表达载体 pGNC-PreS1，它能在革兰氏阴性细菌的细胞表面表达抗原决定簇，并以融合的形式形成抗 S 抗原的中和抗体。详细地，参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白复合物包括 pgsC 蛋白，然后，pgsC 蛋白基因的 C-末端与乙型肝炎病毒表面抗原中的 Pres1 抗原的 N-末端相连接。

本发明还提供了重组表面表达载体 pHCE1LB:BCA 和 pHCE1LB:A，它们是对用在革兰氏阴性细菌的表面表达载体 pGNBCA 进行了修饰，并且这两种表达载体能用于革兰氏阴性和阳性菌。详细地，参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白复合物包含 pgsB、pgsC 和 pgsA 蛋白，或者仅含有 pgsA 蛋白，然后，pgsA 蛋白基因的 C-末端与外源蛋白基因连接。

本发明还提供了重组表面表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168，其能用于革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌，表达抗原决定簇，在细胞表面以融合形式形成抗 S 抗原的中和抗体。详细地，参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白复合物包括 pgsB, pgsC, 以及 pgsA 蛋白，pgsA 蛋白基因的 C-末端与抗原决定簇的 N-末端相联接，从而形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体。

本发明还提供了重组表面表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1，它能用于革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌，能以融合形式将核蛋白质 N 蛋白表达至细胞表面。详细地，参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白复合物包括 pgsA 蛋

白, pgsA 蛋白基因的 C-末端与猪的遗传性胃病(TGE)病毒的部分核蛋白基因的 N-末端相联接。

本发明还提供了重组表面表达载体 pHCE1LB:A-PEDN, 其能用于革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌, 能以融合形式将核蛋白 N 蛋白表达至细胞表面。详细地, 参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白复合物包括 pgsA 蛋白, pgsA 蛋白基因的 C-末端与猪腹泻疾病(PED)病毒的核蛋白基因的 N-末端相联接。

本发明还提供了重组表面表达载体 pHCE1LB:A-PreS1、pHCE1LB:A-PreS2、pHCE1LB:A-PreS1:PreS2, 以及 pHCE1LB:A-L, 它们能用于革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌, 以融合形式分别将下述蛋白表达至细胞表面: exPreS1、PreS2、PreS1-PreS2 或者 HBV 表面 L(PreS1-PreS2-S)蛋白中的全部 L 蛋白。详细地, 参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白复合物由 pgsA 蛋白组成, pgsA 蛋白基因的 C-末端分别与 PreS1、PreS2、PreS1-PreS2 或者全部 L 蛋白的 N-末端相联接。

本发明还提供了重组表面表达载体 pHCE1LB:A-TNF- $\alpha$ , 其能用于革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌, 以融合形式将 TNF- $\alpha$  蛋白表达至细胞表面。详细地, 参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白复合物由 pgsA 蛋白组成, pgsA 蛋白基因的 C-末端与一种细胞因子-肿瘤坏死因子  $\alpha$  的 N-末端相联接。

本发明还提供了重组表面表达载体 pGNA-脂肪酶和 pGNA-酰胺酶, 其能用于革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌, 并将工业用酶如脂肪酶和酰胺酶, 以融合形式至细胞表面。详细地, 参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白复合物由 pgsA 蛋白组成, pgsA 蛋白基因的 C-末端与工业应用酶中的脂肪酶或者酰胺酶的 N-末端相联接。

## 实施例

下述实施例为本发明的实用和优选的实施例。

然而, 在不偏离本发明实质精神的前提下, 本领域的技术人员结合本发明所公开的内容可对本发明进行修饰和改进。

### 实施例 1 表面表达载体 pGNBCA 的构建

利用细胞外膜蛋白基因 *pgsBCA* 参与合成源自 *Bacillus sp.*菌株的多聚- $\gamma$ -谷氨酸，并利用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来制备本发明的表面表达载体，对 *Bacillus subtilis var. chungkookjang*(目录号：KCTC 0697 BP) 的总染色体 DNA 进行了纯化。

基因 *pgsBCA* 由 DNA 片段 *pgaB*、*pgaC*、以及 *pgaA* 组成并具有上述的连续核苷酸序列，其中 DNA 片段 *pgaB* 含有核苷酸序列 SEQ ID NO:1，DNA 片段 *pgaC* 含有核苷酸序列 SEQ ID NO:2，DNA 片段 *pgaA* 含有核苷酸序列 SEQ ID NO:3。

为了获得参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸生物合成的细胞内膜的 N-末端和 C-末端的编码基因，采用总染色体作为模板，以 N-末端核苷酸序列为 SEQ ID NO:4(5-gaa cca tgg gct ggt tac tcc tta tag cct g-3)、C-末端核苷酸序列为 SEQ ID NO:5(5-ctc gga tcc ttt aga ttt tag ttt gtc act-3)的寡核苷酸作为引物。然后，利用上述模板和引物进行聚合酶链式反应(PCR)。

对应于 N-末端的寡核苷酸引物 SEQ ID NO:4 也可构建为含有在表达性载体 pHCE19T(II)中出现的限制性酶 *NcoI* 的识别位点，而 C-末端的寡核苷酸引物 SEQ ID NO:5 也可构建为含有在表达性载体 pHCE19T(II)中出现的限制性酶 *BamHI* 的识别位点。在这种情况下，测定从细胞外膜蛋白基因 *pgsB* 的 N-末端区域到 *pgsA* 的 C-末端区域的范围内的扩增基因片段的大小为 2.8kb。通过 PCR 扩增的基因片段用限制性酶 *NcoI* 和 *BamHI* 消化，并插入到用 *NcoI* 和 *BamHI* 消化的高表达载体 pHCE19T(II)中。结果，含有参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞内膜蛋白基因的新的表达载体并不包括翻译终止密码子，但它包括一个新的附加限制性酶识别位点，表达载体的大小约为 6.5kb，它具有核苷酸序列 SEQ ID NO:6，并且被命名为表达载体 pGNBCA(参考图 1)。

将表面表达载体转化至 *Escherichia coli*，所得细胞转化株于 2001 年 7 月 26 日存放在国际保藏机构以及位于 Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB) 的 Korean Collection for Type Cultures (KCTC: 52 Eoeun-dong, Yusong-gu, Daejeon) (目录号：KCTC 10025 BP)。

## 实施例 2 表面表达载体 pGNBCA-HB168 的构建

重组表达载体 pGNBCA-HB168 可表达抗原决定簇，该抗原决定簇用于产生抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体，该重组表达载体可利用细胞外膜蛋白基因 pgsBCA 参与合成源自 *Bacillus sp.* 菌株的多聚- $\gamma$ -谷氨酸，并利用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来构建。

为了将乙型肝炎病毒 S 抗原基因插入至利用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞的表面表达载体 pGNBCA 中，采用包含在常规克隆载体 pUC8 中的 1.4kb 大小的 HBV 基因作为模板，以核苷酸序列 SEQ ID NO:7 以及核苷酸序列 SEQ ID NO:8 的寡核苷酸作为引物。然后，利用上述模板和引物进行聚合酶链式反应(PCR)，从而扩增 S 抗原基因。结果得到 168bp 大小的扩增基因片段。

在这种情况下，构建的核苷酸序列 SEQ ID NO:7 以及核苷酸序列 SEQ ID NO:8 的引物也可包含限制性酶 BamHI 和 HindIII 识别位点。然后，将扩增后的乙型肝炎病毒 S 抗原基因用限制性酶 BamHI 和 HindIII 消化，并通过调节翻译密码子与已经制备好的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因的 C-末端区域相连接。所得的重组表达载体 pGNBCA-HB168 如图 1 所示。

实施例 3 利用重组表达载体 pGNBCA-HB168 表面表达抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇

使用重组表达载体 pGNBCA-HB168 对产生抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇进行表面表达。

将实施例 2 构件的表达载体转化至 *E. coli* 中，在含有 50ml 的 LB 培养液(酵母提取物 5g/L，胰化蛋白胨(trypton)10g/L，氯化钠 5g/L，pH7.0) 以及 100mg/L 抗菌素氨比西林的 500ml 的培养瓶中培养，使之进行表面表达。

抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇进行细菌表达，所述 S 抗原与参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的 C-末端基因进行融合，利用抗 S-抗原的抗体进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印迹法进行鉴定。将在相同细胞浓度下得到的蛋白变性，制备实验样品，通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对样品进行分析，将蛋白片段转移至 PVDF 膜上。将所得的 PVDF 膜在封闭缓冲液(10ml Tris HCl, 5%脱脂乳, pH8.0)中搅拌 1 小时进行封闭，然

后与用封闭液 1,000 倍稀释的抗 S 抗原的羊的多克隆一抗反应 12 小时。反应完成后, 将膜用同样的缓冲溶液清洗, 与用封闭缓冲液稀释 1,000 倍的与生物素偶联的二抗反应 4 小时。将反应后的膜再次用缓冲液清洗, 浸入抗生物素蛋白-生物素反应液中 1 小时, 然后清洗。在浸没的膜中加入底物  $H_2O_2$  和 DAB 试剂作为染料, 对膜进行染色, 可观察到与抗 S 抗原抗体和上述融合蛋白的特异性结合(参考图 2, A)。在图 2 中, 泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109, 泳道 2 是细胞转化株 pGNBCA-HB168/JM109。如所述, 约 48kDa 的融合蛋白条带由表达载体 pGNBCA-HB168 制备得到。

此外, 为直接证实用于产生抗乙型肝炎病毒的 S 抗原中和抗体的抗原决定簇在 E.coli 表面的表达, 将诱导表面表达的 E. coli 转化株超声降解, 通过外膜分馏法分成可溶性部分、细胞内膜部分、以及细胞外膜部分, 然后利用抗 S 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印迹试验进行鉴别。必要地, 收集如上所述的用于在细胞表面诱导融合蛋白表达的 E. coli 转化株以及未转化的 E. coli 菌株, 调节至相同浓度, 用缓冲溶液(10mM HEPES, pH 7.4)洗涤几次。然后, 将所得物质悬浮在缓冲液(10g/mL 溶菌酶, 1mM PMSF, 1mM EDTA)中, 在 4°C 反应 10 分钟, 加入 DNase(0.5mg/mL)和 RNase(0.5mg/mL), 将混合物用超声仪破裂, 在 4°C,  $10,000 \times g$  离心 20 分钟, 分离未反应的 E. coli 和细胞碎片。然后将分离到的 E. coli 的细胞碎片在 4°C,  $15,000 \times g$  离心 20 分钟, 收集含有外周胞质和细胞质蛋白的片段。将所得的细胞沉淀用含有 1% 月桂酰基肌氨酸钠(N-月桂醇肌氨酸酯, 钠盐)的 PBS 缓冲液(pH7.4)溶解, 在 4°C,  $15,000 \times g$  离心 2 小时并分离。

在这种情况下, 将上清液分为 E. coli 内膜和 E.coli 外膜蛋白沉淀, 利用抗 S-抗原的抗体采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印迹法进行鉴定。在上述的 E. coli 片段中, 在细胞外膜鉴定出可形成抗 S-抗原的中和抗体的抗原决定簇(参看图 2, A: Western blotting 后 E. coli 膜部分的结果)。如图 2 所示, 泳道 1 是未转化的 E. coli JM 109 菌株, 泳道 2 是 E. coli 转化株 pGNBCA-HB168/JM109 的全细胞, 泳道 3 是 E. coli 转化株 pGNBCA-HB168/JM109 的可溶性部分, 泳道 4 是 E. coli 转化株 pGNBCA-HB168/JM109 的细胞内膜部分, 泳道 5 是 E. coli 转化株 pGNBCA-HB168/JM109 的细胞外膜部分。



采用荧光活化细胞分类(FACS)流式细胞仪检测法,检测到 S 抗原中和抗体的抗原决定簇从多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶蛋白的 C-末端被表达至 E. coli 细胞的表面。在免疫荧光着色实验中,用于诱导表面表达的 E.coli 被以同样的细胞浓度收集,用 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗几次。然后将所得的细胞沉淀用 1ml 含有 1%牛血清白蛋白的缓冲液重悬,与 1,000 倍稀释的抗 S 抗原的羊的多克隆一抗在 4°C 反应 12 小时。反应完成后,将所得细胞再洗涤几次,用 1ml 含有 1%牛血清白蛋白的缓冲液重新悬浮,然后与 1,000 倍稀释的抗 S 抗原的与生物素偶联的二抗在 4°C 反应 3 小时。完全反应的细胞同样用缓冲溶液洗涤几次,用 0.1ml 含有 1%牛血清白蛋白的缓冲液重悬,然后与 1,000 倍稀释的对生物素特异的链亲和素-R-藻红蛋白(streptoavidin-R-phycoerythrin)染料试剂结合。

然后,将 E. coli 细胞重新洗涤几次,采用荧光活化细胞分类(FACS)流式计数检测法进行测定。结果证实了可形成抗 S 抗原中和抗体的抗原决定簇蛋白被表达至细胞表面,与未转化的 E. coli 区别明显(参照图 2, B)。如图 2 所示,白色条带描述了未转化的 E. coli JM109 菌株,而黑色条带是由 E. coli 转化株 pGNBCA-HB168/JM109 得到的。结果,可生成抗 S 抗原中和抗体的抗原决定簇蛋白在未转化的 E. coli 中未见表达,但在用本发明的表面表达载体转化的 E.coli 转化株可见到清楚表达。

实施例 4 重组表面表达载体 pGNCA-HB101 的构建以及可生成抗乙型肝炎病毒 S 抗原中和抗体的抗原决定簇的表面表达

(1) 采用源自 Bacillus sp.菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 pgsBCA,并利用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来构建一重组表达载体,该重组表达载体用来表达形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原中和抗体的抗原决定簇。

基因 pgsCA 具有包含 SEQ ID NO:2 的 pgsC DNA 和 SEQ ID NO:3 的 pgsA DNA 的连续的核苷酸序列。

为了利用参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因获得编码 pgsC 和 pgsA 蛋白的 N-末端和 C-末端的基因,利用其总染色体作为模板,以 N-末

端核苷酸序列为 SEQ ID NO:9、C-末端为 SEQ ID NO:5 的寡核苷酸作为引物，进行聚合酶链式反应。

还构建了对应于 N-末端的引物并包含 SEQ ID. NO: 9 的序列，它包括限制性酶 NdeI 的识别位点。在这种情况下，扩增的基因区域约为 1.6 kb，范围包括从参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 pgsC 的 N-末端区域到 pgsA 的 C-末端区域。

将通过聚合酶链式反应扩增的基因用限制性酶 NdeI 和 BamHI 消化，插入到已经用 BamHI 和 NdeI 消化的高表达载体 pHCE19T(II)，从而创建一种新的大小约 5.3kb 的表达载体，该表达载体具有新的限制性酶识别位点，且在细胞外膜蛋白基因的末端没有终止密码子，其被称作表达载体 pGNCA(参考图 3)。

(2) 采用与上述实施例 2 描述的相同的步骤构建重组表达载体 pGNCA-HB168，该表达载体能表达抗原决定簇，从而形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体。详细地，该重组表达载体是采用来源于参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的 pgsBCA 基因的细胞外膜蛋白基因 pgsC 和 pgsA，并用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来制备的。

如上构建的重组表达载体在图 3 中进行了描述。

(3) 利用表面表达载体 pGNCA-HB168 对形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇的表达采用下述方法检测：

将表面表达载体转化至 E. coli 宿主细胞，采用与上述实施例 3 所述的相同的步骤诱导表达。然后，使用抗 S 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹的方法对该抗原决定簇在 E.coli 转化株中的表达进行鉴别，该抗原决定簇可形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体，且与细胞外膜蛋白 pgsCA 融合（参照图 4）。

如图 4 所示，泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109，泳道 2 是细胞转化株 pGNCA-HB168/JM109。结果，鉴别到约 48kDa 的重组表达载体 pGNCA-HB168 表达的融合蛋白条带。

实施例 5 重组表面表达载体 pGNA-HB168 的构建和抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇的表面表达

(1) 采用细胞外膜蛋白基因 *pgsA* 并用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来构建重组表达载体, 该重组表达载体用来表达形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇, 所述细胞外膜蛋白基因来自参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的源于 *Bacillus sp* 菌株的 *pgsBCA* 基因。

基因 *pgsA* 包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 3。

为了利用参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因获得编码 *pgsA* 蛋白的 N-末端和 C-末端基因, 采用总染色体作为模板, 以寡核苷酸为引物进行聚合酶链式反应, 所述寡核苷酸含有在 N-末端的 SEQ ID NO: 10 和在 C-末端的 SEQ ID NO: 5 核苷酸序列。

构建与 N-末端相应并包括 SEQ ID NO: 10 序列的引物, 其包括限制性酶 *NdeI* 识别位点。在这一方面, 扩增的基因区域约为 1.1kb, 范围包括从参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 *pgsA* 的 N-末端区域到 *pgsA* 的 C-末端区域。

将通过聚合酶链式反应扩增得到的基因用限制性酶 *NdeI* 和 *BamHI* 消化后插入至预先用 *BamHI* 和 *NdeI* 消化过的高表达载体 pHCE19T(II), 从而制备新的被称作表达载体 pGNA 的表达载体, 其大小约为 4.8kb, 具有新的限制性酶识别位点, 并且在细胞外膜蛋白基因的末端没有终止密码子 (参考图 5)。

(2) 采用与上述实施例 2 描述的相同的步骤构建重组表达载体 pGNA-HB168, 该表达载体能表达抗原决定簇, 从而形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体。详细地, 该重组表达载体是采用细胞外膜蛋白基因 *pgsA*, 并用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来制备的, 所述的细胞外膜蛋白基因 *pgsA* 来源于参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的 *pgsBCA* 基因。

上述构建的重组表达载体 pGNA-HB168 在图 5 中有描述。

(3) 利用表面表达载体 pGNA-HB168 对形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇的表达采用下述方法检测:

将表面表达载体转化至 *E. coli* 宿主细胞, 采用与上述实施例 3 所述的相同的步骤诱导表达。然后, 使用抗 S 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹的方法对该抗原决定簇在 *E.coli* 转化株中的表达进行鉴

别，该抗原决定簇可形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体，且与细胞外膜蛋白 pgsCA 融合（参照图 5）。

如图 5 所示，泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109，泳道 2 是细胞转化株 pGNA-HB168/JM109。结果，鉴别到约 48kDa 的重组表达载体 pGNA-HB168 表达的融合蛋白条带。

此外，还通过荧光活化细胞分类（FACS）流式计数检测法检测了所述抗原决定簇从细胞外膜蛋白 pgsA 到 *E. coli* 细胞表面的表达，该抗原决定簇能形成抗 S 抗原的中和抗体。为了实现这一目的，采用与实施例 3 相同的步骤，在细胞表面检测可形成抗 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇，其与位转化的 *E. coli* 有着明显的区别（参照图 4）。如图 4 所示，白色条带是未转化的 *E. coli* JM109，而黑色条带来源于 *E. coli* 转化株 pGNA-HB168/JM109。由此可见，未转化的 *E. coli* 并未表达能形成抗 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇，而采用仅包括 pgsA 基因的表面表达载体转化的 *E. coli* 转化株显然在细胞表面表达了能形成抗 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇。

实施例 6 重组表面表达载体 pGNHB-A 的构建和可形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇的表面表达

(1) 采用 N-末端 pgsA 基因并用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来构建重组表达载体，该重组表达载体用来表达形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇，所述 N-末端 pgsA 基因来自源于 *Bacillus sp.* 菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的 pgsBCA 基因。

基因 pgsA 包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 3。

为了利用参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因获得编码 pgsA 蛋白的 N-末端和 C-末端基因，采用总染色体作为模板，以寡核苷酸为引物进行聚合酶链式反应，所述寡核苷酸包括在 N-末端的 SEQ ID NO: 11 和在 C-末端的 SEQ ID NO: 12 核苷酸序列。

构建与 N-末端相应并包括 SEQ ID NO: 11 序列的引物，其包括限制性酶 BamHI 识别位点。在这一方面，扩增的基因区域约为 1.1kb，它包括从参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 pgsA 的 N-末端区域到 pgsA 的 C-末端区域。将通过聚合酶链式反应扩增得到的基因用限制性酶 BamHI 和

HindIII 消化后插入至预先用 BamHI 和 HindIII 消化过的高表达载体 pHCE19T(II)，从而制备新的被称作表达载体 pGNA2 的表达载体，其大小约为 4.8kb，在 pgsA 基因的前端具有新的限制性酶识别位点，并且在参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因的末端没有终止密码子（参考图 6）。

(2) 还构建了重组表达载体 pGNHB-A，该表达载体能表达抗原决定簇，该抗原决定簇能形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体。详细地，该重组表达载体是采用细胞外膜蛋白基因 pgsA 的 N-末端，并用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来制备的，所述的细胞外膜蛋白基因 pgsA 来源于参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的 pgsBCA 蛋白基因。

为了将乙型肝炎病毒 S 抗原基因插入表面表达载体 pGNA2，采用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞，将 1.4kb 的肝炎病毒基因克隆至普通的克隆载体 pUC18 中用作模板，用带有 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 核苷酸序列的寡核苷酸为引物，通过聚合酶链式反应来扩增 S 抗原基因。在这种情况下，扩增的基因区域的大小约为 1.6bp。

带有 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 核苷酸序列的引物还可构建为在表面表达载体 pGNA2 中含有限制性酶 NdeI 和 BamHI 的识别位点。扩增的乙型肝炎病毒 S 抗原的基因采用限制性酶 NdeI 和 BamHI 消化，并与 pgsA 基因的 N-末端区域连接，所述 pgsA 基因来自参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因，该基因存在于已经通过调节翻译密码子的方法制备的表面表达载体 pGNA2 中。上述构建的重组表达载体 pGNHB-A 在图 6 中有描述。

(3) 利用表面表达载体 pGNHB-A 对形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇的表达采用下述方法检测：

将表面表达载体转化至 E. coli 宿主细胞，采用与上述实施例 3 所述的相同的步骤诱导表达。然后，使用抗 S 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹的方法对该抗原决定簇在 E.coli 转化株中的表达进行鉴别，该抗原决定簇可形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体，且与细胞外膜蛋白 pgsCA 融合（参照图 5）。

如图 5 所示，泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109，泳道 2 是细胞转化株 pGNHB-A/JM109。结果，鉴别到约 48kDa 的由重组表达载体 pGNHB-A 表达的融合蛋白条带。

实施例 7 重组表面表达载体 pGNC-PreS1 的构建和形成抗乙型肝炎病毒 PreS1 抗原的中和抗体的抗原决定簇的表面表达

(1) 采用 C-末端 pgsC 基因并用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来构建重组表达载体，该重组表达载体用来表达可形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇，所述 C-末端 pgsC 基因来自参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的源于 *Bacillus sp.* 菌株的 pgsBCA 基因。

基因 pgsC 包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 2。

为了从参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因中获得编码 pgsA 蛋白的 N-末端和 C-末端基因，采用总染色体作为模板，以寡核苷酸为引物进行聚合酶链式反应，所述寡核苷酸包括在 N-末端的 SEQ ID NO: 15 和在 C-末端的 SEQ ID NO: 16 核苷酸序列。

构建包含 SEQ ID NO: 15 序列的 N-末端引物，该引物包括存在于表面表达载体 pHCE 19T(II)上的限制性酶 NdeI 识别位点，而所构建的包含 SEQ ID NO: 16 序列的引物包括存在于表面表达载体 pHCE 19T(II)上的限制性酶 BamHI 识别位点。在这一方面，扩增的基因区域约为 0.45kb，范围包括从参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 pgsC 的 N-末端区域到 pgsC 的 C-末端区域。将通过聚合酶链式反应扩增得到的基因用限制性酶 BamHI 和 NdeI 消化后插入至预先用 BamHI 和 NdeI 消化过的高表达载体 pHCE19T(II)，从而制备新的被称作表达载体 pGNC 的表达载体，其大小约为 4.1kb，具有新的限制性酶识别位点，并且在参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因的末端没有终止密码子（参考图 7）。

(2) 还构建了重组表达载体 pGNC-PreS1，该表达载体能表达抗原决定簇，该抗原决定簇能形成抗乙型肝炎病毒 PreS1 表面抗原的中和抗体。详细地，该重组表达载体是采用细胞外膜蛋白基因 pgsC 的 N-末端序列并用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来制备的，所述的细胞外膜蛋白基因 pgsC 来源于参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的 pgsBCA 蛋白基因。

为了将乙型肝炎病毒 PreS1 抗原基因插入表面表达载体 pGNC，采用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞，以克隆至普通的克隆载体 pUC18 的约 1.5kb 的肝炎病毒基因作为模板，以带有 SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 核苷酸序列的寡核苷酸为引物，通过聚合酶链式反应来扩增 S 抗原基因。在这种情况下，扩增的基因区域的大小约为 356bp。

带有 SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 核苷酸序列的引物还可构建为含有存在于表面表达载体 pGNC 中的限制性酶 HindIII 和 BamHI 的识别位点。扩增的乙型肝炎病毒 PreS1 抗原的基因采用限制性酶 HindIII 和 BamHI 消化，并与 pgsC 基因的 N-末端区域连接，所述 pgsC 基因来自参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因，该基因存在于已经通过调节翻译密码子的方法制备的表面表达载体 pGNC 中。上述构建的重组表达载体 pGNC-PreS1 在图 7 中有描述。

(3) 利用表面表达载体 pGNC-PreS1 对形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇的表达采用下述方法检测：

将表面表达载体转化至 *E. coli* 宿主细胞，采用与上述实施例 3 所述的相同的步骤诱导表达。然后，使用抗 PreS1 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹的方法对抗原决定簇在 *E. coli* 转化株中的表达进行鉴别，该抗原决定簇可形成抗乙型肝炎病毒 PreS1 抗原的中和抗体，且与细胞外膜蛋白 pgsC 融合（参照图 8）。

如图 8 所示，泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109，泳道 2 和 3 是细胞转化株 pGNC-PreS1/JM109。结果，鉴别到约 27kDa 的由重组表达载体 pGNC-PreS1 表达的融合蛋白条带。

实施例 8 重组表面表达载体 pHCE1LB:BCA 和 pHCE1LB:BCA-HB168 的构建和产生抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇的表面表达

(1) 采用 C-末端 pgsC 基因并用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来构建重组表达载体 pHCE1LB:BCA，该重组表达载体用来使形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇表达至细胞表面，所述 C-末端 pgsC 基因来自参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的源于 *Bacillus sp.* 菌株的 pgsBCA 基因。

由于质粒 pHCE1LB 在革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌内都能被接收并且能复制，因此采用该质粒作为克隆载体。表达载体 pHCE1LB 由构成性高表达 HCE 启动子、包括多个限制性酶识别位点的克隆位点、在革兰氏阴性细菌中的可复制起点、以及对氨比西林的抗生素抗性标记所组成。此外，表面表达载体 pHCE1LB 由来源于 *Lactobacillus* sp. 的革兰氏阳性细菌的可复制起点和对氯霉素(chloroamphenicol)的抗生素抗性标记所组成。

为了获得编码 pgsBCA 蛋白的 N-末端和 C-末端基因，采用总染色体作为模板，以寡聚核苷酸为引物进行聚合酶链式反应，所述 pgsBCA 蛋白为参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白中之一，所述寡聚核苷酸包括在 N-末端的 SEQ ID NO: 4 和在 C-末端的 SEQ ID NO: 5 核苷酸序列。由此得到的扩增的基因区域的大小约为 2.8kb，范围包括从参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 pgsB 的 N-末端区域到 pgsA 的 C-末端区域。将通过聚合酶链式反应扩增得到的基因用限制性酶 NcoI 和 BamHI 消化后插入至预先用 BamHI 和 NcoI 消化过的表达载体 pHCE1LB，从而制备新的被称作 pHCE1LB:BCA 的表达载体，其大小约为 8kb，具有新的限制性酶识别位点，在参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因的末端没有终止密码子，并且可利用革兰氏阴性或者革兰氏阳性细菌作为宿主细胞（参考图 9）。

(2) 还构建了重组表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168，该表达载体能表达抗原决定簇，该抗原决定簇能形成抗乙型肝炎病毒 S 表面抗原的中和抗体。详细地，采用与上述相同的步骤，即利用参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 pgsBCA，并且用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞来制备重组表达载体。

上述构建的重组表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 在图 9 中有描述。

(3) 利用表面表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 和 *Salmonella typhi* Ty21a 作为革兰氏阴性宿主细胞对形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇的表达采用下述方法检测：

将表面表达载体转化至 *Salmonella typhi* Ty21a 宿主细胞，采用与上述实施例 3 所述的相同的步骤诱导表达。然后，利用外膜分类法（outer membrane fractionation）分开可溶性部分、内膜部分和外膜部分，并对分离



的部分采用抗 S 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹的方法对抗原决定簇在 *Salmonella typhi* Ty21a 转化株的细胞表面的表达进行鉴别。结果显示, 产生了大小为 48kDa、可与 pgsA 融合的、可形成抗 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇条带, 且该抗原决定簇位于 *Salmonella typhi* Ty21a 的外膜部分(参照图 10)。如图 10 所示, 泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109, 泳道 2 是细胞转化株的全细胞, 泳道 3、4 和 5 分别是细胞转化株的可溶性部分、外膜部分和内膜部分。

此外, 还通过荧光活化细胞分类(FACS)流式计数检测法检测了能形成抗 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇的表面表达。为了实现这一目的, 采用与实施例 3 相同的步骤, 在细胞表面检测抗原决定簇蛋白, 其与未转化的 *Salmonella typhi* Ty21a 有着明显的区别(参照图 10)。如图 10 所示, 黑色没有箭头的是未转化的 *Salmonella typhi* Ty21a, 而黑色有箭头的是转化的 *Salmonella typhi* Ty21a。由此可见, 用表面表达载体转化的 *E.coli* 转化株很显然能将形成抗 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇表达至细胞表面。

实施例 9 用于将可形成抗 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇表达至细胞表面的微生物中疫苗效力的分析

构建用于实施例 8 中表面表达的重组载体 pHCE1LB:BCA-HB168, 将该载体转化至革兰氏阴性细菌 *Salmonella typhi* Ty21a 中, 利用与实施例 3 相同的步骤诱导在细胞表面的表达。然后, 检测能形成抗 S 抗原的中和抗体且与参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白融合的抗原决定簇的抗原性。

首先, 将用于表面表达的重组载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化至 *Salmonella typhi* Ty21a 中, 检测上述抗原的表达。然后, 将一部分 *Salmonella* 菌株通过鼻腔给药方式给予 BALB/C 小鼠, 几天以后: (1) 收集小鼠血清, 检测血清中存在的抗 S 抗原的 IgG 抗体, 以及(2) 收集小鼠各器官, 利用酶联免疫吸附检测方法(ELISA)检测用于洗涤器官的悬浮溶液中抗 S 抗原的 IgA 抗体的存在。

在该测定中, 用 PBS 缓冲液(pH7.4)洗涤收集的细胞, 并调节至相同的细胞浓度, 然后取表面有抗原表面表达的 *Salmonella typhi* Ty21a 细胞  $2 \times 10^9$  个, 用鼻腔给药的方式给予 4~6 周龄的 BALB/C 小鼠, 共给予两次, 两次

之间的间隔为 3 天。4 周以后，再注射给药 2 次，两次之间的间隔为 3 天。2 周以后收集血清和用于洗涤器官的溶液，利用 ELISA 的方法检测抗该抗原的抗体的滴度(参照图 11)。

如图 11 所示，框图 A 所示为血清中抗 S 抗原决定簇的 IgG 抗体的滴度：也就是未转化的 *Salmonella* 的滴度、用表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的 *Samonella* 的滴度、以及用表达载体 pHCE1LB:HB168 转化的 *Samonella* 的滴度。在图 11 中，框图 B 所示为组织中抗 S 抗原决定簇的 IgA 抗体的滴度：也就是未转化的 *Salmonella* 的滴度、用表达载体 pHCE1LB:HB168 转化的 *Samonella* 的滴度、以及用表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的 *Samonella* 的滴度。

如图 11 所示，用表面表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的 *Salmonella typhi* Ty21a 转化株的 BALB/c 小鼠的血清和用于洗涤器官的溶液中有更高滴度的 IgG 和 IgA，且与其他各组的结果有明显的差别。

因此，证实了本发明的微生物可用作有效的活疫苗，所述微生物可将形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原中和抗体的抗原决定簇表达至细胞表面。

实施例 10 形成抗乙型肝炎 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇在以表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的革兰氏阳性细菌表面的表达

研究了如实施例 8 所示的可形成抗乙型肝炎 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇在革兰氏阳性细菌 *Lactobacillus casei* 表面的表达，所述细菌采用为表面表达所构建的重组载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化。

将如上制备的用于表面表达的重组载体转化至 *Lactobacillus casei* 并在含有 200ml MRS 介质和 50mg/L 抗生素氯霉素的 500ml 培养瓶(flask)的稳定状态下培养，从而诱导表面表达。

为了对位于 *Lactobacillus casei* 细胞表面的抗原决定簇进行定位，利用细胞壁分馏法(cell wall fractionation method)将细胞转化株分离成片段，诸如细胞质和细胞壁等，然后利用抗 S 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹的方法对上述分离的部分进行分析。利用相同的细胞浓度收集将融合蛋白诱导表达至细胞表面的 *Lactobacillus* 转化株和未转化的 *Lactobacillus*，用 TES 缓冲液(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 25%蔗糖)

洗涤几次，用含有 5mg/ml 溶解酶、1mM PMSF、以及 1mM EDTA 的蒸馏水重悬，然后分别在 -60°C 和室温冷冻及溶解几次。所得的细胞加入 0.5mg/ml 的 DNase 和 0.5mg/ml 的 RNase，用超声仪裂解。然后，将超声裂解后的细胞溶液在 4°C，10,000 X g 离心 20 分钟分离出 *Lactobacillus* 全细胞沉淀（全细胞部分），即未被超声的部分以及细胞碎片（上清部分），然后再在 4°C，21,000 X g 离心 1 小时，收集包含 *Lactobacillus* 细胞质蛋白的上清液以及细胞沉淀。将所得的细胞沉淀用含有 1% SDS 的 TE 缓冲液(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 7.4)重悬，收集 *Lactobacillus* 的细胞壁蛋白(细胞壁片段)。

利用抗 S 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印迹方法对每一部分进行分析，确定细胞壁上可形成抗 S 抗原中和抗体的抗原决定簇的位点(参照图 12A)。如图 12 所示，泳道 1、3 和 5 是未转化 *Lactobacillus casei*，泳道 2 是用表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的 *Lactobacillus casei* 全细胞，泳道 4 和 6 分别是转化细胞的可溶性部分和细胞壁部分。

此外，采用荧光活化细胞分类(FACS)流氏计数检测法检测到形成 S 抗原中和抗体的抗原决定簇从多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶蛋白的 C-末端的表达。为了这一目的，采用与实施例 3 所述的相同的步骤，结果显示在细胞表面显示有抗原决定簇蛋白，这一点与未转化的 *Lactobacillus* 有明显区别(参照图 12B)。如图 12B 所示，白色带为未转化的 *Lactobacillus*，黑色条带来自于采用表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的 *Lactobacillus* 细胞。结果显示，用表面表达载体转化的 *Lactobacillus* 转化株能明显将形成抗 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇表达至细胞表面。

实施例 11 将形成抗乙型肝炎 S 抗原的中和抗体的抗原决定簇表达至细胞表面的微生物进行疫苗效力 2 的分析

构建用于实施例 8 中表面表达的重组载体 pHCE1LB:BCA-HB168，将该载体转化至革兰氏阳性细菌 *Lactobacillus casei* 中，利用与实施例 3 相同的步骤诱导在细胞表面的表达。然后，检测能形成抗乙型肝炎 S 抗原的中和

抗体且与参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白融合的抗原决定簇的抗原性。

首先，将构建的用于表面表达的重组载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化至 *Lactobacillus casei* 中，收集并使之达到相同的细胞浓度，用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤几次，然后，取表面表达了抗原的 *Lactobacillus* 细胞  $5 \times 10^{10}$  个，通过口腔给药的方式给予 4-6 周龄的 BALB/c 小鼠，共给予 3 次，每次之间的时间间隔为 1 天，4 周以后再给予 3 次，间隔为 1 天。此外，取表面表达了抗原的 *Lactobacillus* 细胞  $1 \times 10^{10}$  个，通过鼻腔给药的方式给予 BALB/c 小鼠，共给予 2 次，每次之间的时间间隔为 3 天，4 周以后再给予 2 次，间隔为 3 天。口腔和鼻腔给药 2 周后：(1) 收集小鼠血清，检测血清中存在的抗 S 抗原的 IgG 抗体滴度，以及(2) 收集小鼠各器官，利用酶联免疫吸附检测方法(ELISA)检测用于洗涤器官的悬浮溶液中抗 S 抗原的 IgA 抗体的存在（参照图 13）。

如图 13 所示，框图 A 所示为血清中抗 S 抗原决定簇的 IgG 抗体的滴度：也就是在鼻腔给药组中以表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的 *Lactobacillus* 中的滴度、在口腔给药组中以表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的 *Lactobacillus* 中的滴度、在口腔给药组中以表达载体 pHCE1LB:HB168（其中 pgsBCA 基因缺失，使用该载体细胞能表达 HB168）转化的 *Lactobacillus* 中的滴度、以及口腔给药组中未转化的 *Lactobacillus* 中的滴度。在图 13 中，框图 B 所示为器官中抗 S 抗原决定簇的 IgA 抗体的滴度：也就是未转化的 *Lactobacillus* 中的滴度、以表达载体 pHCE1LB:HB168 转化的 *Lactobacillus* 中的滴度、以及以表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的 *Lactobacillus* 中的滴度。利用不同的分组进行试验：鼻腔给药组和口腔给药组。

如图 11 所示，给予以表面表达载体 pHCE1LB:BCA-HB168 转化的 *Lactobacillus* 转化株的 BALB/c 小鼠的血清和用于洗涤器官的溶液中有更高滴度的 IgG 和 IgA，且与其他各组的结果有明显的差别。

因此，证实了本发明的微生物可用作有效的活疫苗，所述微生物可将形成抗乙型肝炎病毒 S 抗原中和抗体的抗原决定簇表达至细胞表面。

### 实施例 12 表面表达载体 pHCE1LB:A 的构建

仅利用细胞外膜蛋白基因 *pgsA* 来构建重组表达载体, 所述重组表达载体可表达形成抗乙型肝炎 S 抗原中和抗体的抗原决定簇, 所述 *pgsA* 基因来源于 *Bacillus sp.* 菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 *pgsBCA*: 即表面表达载体 pHCE1LB:A, 其能利用革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌作为宿主细胞。

为了获得参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸生物合成的细胞外膜蛋白中编码 *pgsA* 蛋白的 N-末端和 C-末端的编码基因, 采用总染色体作为模板, 以 N-末端核苷酸序列为 SEQ ID NO:10、C-末端核苷酸序列为 SEQ ID NO:5 的寡核苷酸作为引物, 进行聚合酶链式反应。

在这种情况下, 测定扩增基因区域的大小约为 1.1kb, 范围包括从参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸生物合成的外膜蛋白基因 *pgsA* 的 N-末端区域到 C-末端区域。通过聚合酶链式反应扩增的基因用限制性酶 *NdeI* 和 *BamHI* 消化, 并插入至预先以 *BamHI* 和 *NdeI* 消化的表达载体 pHCE1LB 中, 从而构建新的表达载体 pGNCA, 该表达载体大小约为 6.3kb, 具有新的限制性酶识别位点, 在细胞外膜蛋白基因的末端不包括翻译终止密码子, 其能利用革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌作为宿主细胞 (参考图 14)。

### 实施例 13 重组表面表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1 的构建以及 TGE N 抗原的表面表达

利用 *pgsA* 基因以及革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌作为宿主细胞构建重组表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1, 所述重组表达载体可将诱导猪遗传性胃病的遗传性胃肠炎病毒(TGE)的核蛋白(N)抗原表达至细胞表面, 所述 *pgsA* 基因来源于 *Bacillus sp.* 菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 *pgsBCA*。

为了将 TGE 病毒的 N 抗原基因的主要抗原决定簇区域引入表面表达载体 pHCE1LB:A 中, 如实施例 12 所述, 利用革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌作为宿主细胞, 约 1.1kb 的 TGE 病毒基因克隆至通用的克隆载体 pUC8 中用作模板, 以核苷酸序列为 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:20 的寡核苷酸作为引物, 进行聚合酶链式反应(PCR)扩增 S 抗原基因。结果得到大小为

415bp 的扩增基因片段。在这种情况下，还可构建核苷酸序列为 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:20 的寡核苷酸引物使其含有存在于表面表达载体 pHCE1LB:A 的限制性酶 BamHI 和 HindIII 的识别位点。

接下来，用限制性酶 BamHI 和 HindIII 消化扩增的 TGE 病毒的 N 抗原基因，并通过调整翻译密码子的方式将其连接至表面表达载体 pHCE1LB:A 中的细胞外膜蛋白基因 pgsA 的 C-末端区域。所得的重组表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1 如图 1 所示。

采用重组表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1 在 *E. coli* 和 *Lactobacillus* 中研究 TGE 病毒 N 抗原的表面表达。为实现这一目的，将重组表达载体转化至 *E. coli* 和 *Lactobacillus* 中，采用与上述相同的步骤诱导表达。分别利用抗 TGE N 抗原和 pgsA 蛋白的抗体，通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印迹的方法证实了与细胞外膜蛋白融合的 TGE N 抗原在细胞表面的表达（参考图 15）。

如图 15 所示，在 A 中，泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109，泳道 2 和 3 是细胞转化株 pHCE1LB:A-TGEN1/JM109，在 B 中，泳道 1 是未转化的宿主细胞 *Lactobacillus casei*，泳道 3 和 4 是 *Lactobacillus casei* 的转化株 pHCE1LB-TGEN1。结果显示，鉴别到大小约 57kDa 的条带，该条带对应于从表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1 制备的融合蛋白。

实施例 14 重组表面表达载体 pHEC1LB:A-PEDN 的构建以及 PED N 抗原的表面表达

(1) 利用 pgsA 基因以及革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌作为宿主细胞构建重组表达载体 pHCE1LB:A-PEDN，所述重组表达载体可将诱导猪遗传性胃病的猪流行性痢疾病毒(PED)的核蛋白(N)抗原表达至细胞表面，所述 pgsA 基因来源于 *Bacillus sp.*菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 pgsBCA。

为了将 PED 病毒的 N 抗原基因的抗原决定簇区域引入表面表达载体 pHCE1LB:A 中，如实施例 12 所述，利用革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌作为宿主细胞，约 1.3kb 的 PED 病毒基因克隆至通用的克隆载体 pUC8 中用作模板，以核苷酸序列为 SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22 的寡核苷酸作为

引物，进行聚合酶链式反应(PCR)扩增 S 抗原基因。结果得到大小为 1326 bp 的扩增基因片段。在这种情况下，还可构建核苷酸序列为 SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22 的核苷酸引物使其含有存在于表面表达载体 pHCE1LB:A 的限制性酶 BamHI 和 HindIII 的识别位点。

接下来，用限制性酶 BamHI 和 HindIII 消化扩增的 PED 病毒的 N 抗原基因，并通过调整翻译密码子的方式将其连接至表面表达载体 pHCE1LB:A 中细胞外膜蛋白基因 pgsA 的 C-末端区域。所得的重组表达载体 pHCE1LB:A-PEDN 如图 14 所示。

(2) 采用重组表达载体 pHCE1LB:A-PEDN 在 *E. coli* 和 *Lactobacillus* 中研究 PED 病毒 N 抗原的表面表达。为实现这一目的，将重组表达载体转化至 *E. coli* 和 *Lactobacillus* 中，采用与上述相同的步骤诱导表达。分别利用抗 PED N 抗原和 pgsA 蛋白的抗体，通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印迹的方法证实了与细胞外膜蛋白融合的 PED N 抗原在细胞表面的表达（参考图 16）。

如图 16 所示，在 A 中，泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109，泳道 2 和 3 是细胞转化株 pHCE1LB:A-TGEN1/JM109，在 B 中，泳道 1 是未转化的宿主细胞 *Lactobacillus casei*，泳道 2 是 *Lactobacillus casei* 的转化株 pHCE1LB:A，泳道 3 是 *Lactobacillus casei* 的转化株 pHCE1LB:A-PEDN。

如上图所述，鉴别到大小约 90kDa 的条带，该条带对应于从表达载体 pHCE1LB:A-PEDN 制备的融合蛋白。

实施例 15 用于将 TGE 病毒和 PED 病毒的 N 抗原表达至细胞表面的 *Lactobacillus* 的疫苗效力 2 的分析

分别构建用于实施例 13 和 14 中表面表达的重组载体 pHCE1LB:A-TGEN1 和 pHCE1LB:A-PEDN，将该载体转化至革兰氏阳性细菌 *Lactobacillus casei* 中，利用与实施例 3 相同的步骤诱导在细胞表面的表达。然后，检测与参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白融合的 TGE 病毒 N 抗原和 PED 病毒 N 抗原的抗原性。

首先，将构建的用于表面表达的重组载体 pHCE1LB:A-TGEN1 和 pHCE1LB:A-PEDN 转化至 *Lactobacillus casei* 中，收集并使之达到相同的细

胞浓度，用 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤几次，然后，取表面表达了 N 抗原的 *Lactobacillus* 细胞  $5 \times 10^8$  个，各自通过口腔给药的方式给予 4-6 周龄的 BALB/c 小鼠，共给予 3 次，每次之间的时间间隔为 1 天，1 周以后再给予 3 次，间隔为 1 天。第一次给药 4 周以后：(1) 收集小鼠血清，利用 N 抗原通过 Western 印迹的方法检测抗 N 抗原的 IgG 抗体的存在（参照图 17）。

结果如图 17 所示，给予了用表面表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1 (A)或者 pHCE1LB:A-PEDN (B) 转化的 *Lactobacillus* 转化株的 BALB/c 小鼠的血清中含有抗 N 抗原的抗体。

实施例 16 重组表达载体 pHCE1LB:A-PreS1 的构建以及 PreS1 抗原的表面表达

(1) 仅利用来源于 *Bacillus* sp. 菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的 *pgsBCA* 基因的细胞外膜蛋白基因 *pgsA* 基因构建重组表达载体，该重组表达载体可将来源于乙型肝炎 S 抗原的 PreS1 抗原表达至细胞表面，即表面表达载体 pHCE1LB:A-PreS1，所述 *pgsA* 基因可利用革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌作为宿主细胞。

为了将来源于乙型肝炎病毒表面抗原的 PreS1 抗原决定簇引入表面表达载体 pHCE1LB:A 中，如实施例 12 所述，利用革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌作为宿主细胞，约 1.5kb 的乙型肝炎病毒基因克隆至通用的克隆载体 pUC8 中作为模板，以包含核苷酸序列 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18 的寡核苷酸作为引物，进行聚合酶链式反应。

接下来，用限制性酶 BamHI 和 HindIII 消化扩增的 HBV S 抗原基因，并通过调整翻译密码子的方式将其连接至表达载体 pHCE1LB:A 中细胞外膜蛋白基因 *pgsA* 的 C-末端区域，从而得到如图 18 所示的新的被称作 pHCE1LB:A-PreS1 的重组表达载体。

(2) 采用重组表达载体 pHCE1LB:A-PreS1 在 *E. coli* 中研究乙型肝炎病毒 PreS1 抗原的表面表达。为实现这一目的，将重组表达载体转化至 *E. coli* 中，采用与实施例 3 相同的步骤诱导表达。利用抗 PreS1 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印迹的方法证实了与细胞外膜蛋白 *pgsA* 融合的 PreS1 抗原在细胞表面的表达（参考图 20 中 A）。



如图 20 所示，在 A 中，泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109，泳道 2 是细胞转化株 pHCE1LB:A-PreS1/JM109。

如上图所述，鉴别到大小约 55kDa 的条带，该条带对应于从表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1 制备的融合蛋白。

#### 实施例 17 重组表面表达载体 pHCE1LB:A-PreS2 的构建

利用来源于 *Bacillus sp.* 菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白 pgsBCA 基因的 pgsA 基因，并利用革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌作为宿主细胞构建重组表达载体 pHCE1LB:A-PreS2，所述重组表达载体 pHCE1LB:A-PreS2 可将来源于乙型肝炎病毒表面抗原的 PreS2 抗原表达至细胞表面。

为了将乙型肝炎病毒的 PreS2 抗原基因的抗原决定簇区域引入表面表达载体 pHCE1LB:A 中，如实施例 12 所述，利用革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌作为宿主细胞，约 1.3kb 的乙型肝炎病毒基因克隆至通用克隆载体 pUC8 中用作模板，以包含核苷酸序列 SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24 的寡核苷酸作为引物，进行聚合酶链式反应从而扩增 PreS2 抗原基因。该扩增得到大小约 165bp 的扩增基因区域。构建的包含 SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24 的引物还进一步含有存在于表面表达载体 pHCE1LB:A 中的包括限制性酶 BamHI 和 HindIII 的识别位点。

用限制性酶 BamHI 和 HindIII 消化通过聚合酶链式反应扩增的 HBV PreS2 抗原基因，并通过调整翻译密码子的方式将其连接至表达载体 pHCE1LB:A 中细胞外膜蛋白基因 pgsA 的 C-末端区域，从而得到如图 18 所示的新的被称作 pHCE1LB:A-PreS2 的重组表达载体。

#### 实施例 18 重组表达载体 pHEC1LB:A-PreS1:PreS2 的构建以及 PreS1 抗原的表面表达

(1) 仅利用来源于 *Bacillus sp.* 菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的 pgsBCA 基因的细胞外膜蛋白基因 pgsA 构建重组表达载体，所述重组表达载体可将 PreS1 抗原和 PreS2 抗原的融合形式表达至细胞表面，所述 PreS1 抗原和 PreS2 抗原来源于乙型肝炎病毒表面抗原：所述重组表达载体即为

pHEC1LB:A-PreS1:PreS2，其可利用革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌作为宿主细胞。

为了将来源于乙型肝炎病毒表面抗原的 PreS1 和 PreS2 的抗原决定簇引入表面表达载体 pHCE1LB:A 中，如实施例 12 所述，利用革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌作为宿主细胞，约 1.5kb 的乙型肝炎病毒基因克隆至通用的克隆载体 pUC8 中用作模板，以包含核苷酸序列 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:24 的寡核苷酸作为引物，进行聚合酶链式反应。该反应得到大小约 522bp 的基因扩增区域。

接下来，用限制性酶 BamHI 和 HindIII 消化扩增的 HBV PreS1:PreS2 抗原基因，并通过调整翻译密码子的方式将其连接至表达载体 pHCE1LB:A 中细胞外膜蛋白基因 pgsA 的 C-末端区域，从而得到如图 19 所示的新的被称作 pHCE1LB:A-PreS1:PreS2 的重组表达载体。

(2) 采用重组表达载体 pHCE1LB:A-PreS1:PreS2 在 *E. coli* 中研究 HBV PreS1 和 PreS2 抗原的表面表达。为实现这一目的，将重组表达载体转化至 *E. coli* 中，采用与实施例 3 相同的步骤诱导表达。利用抗 PreS1 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印迹的方法证实了与细胞外膜蛋白 pgsA 融合的 PreS1:PreS2 抗原在细胞表面的表达（参考图 20 中 A）。如图 20 所示，在 A 中，泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109，泳道 3 是细胞转化株 pHCE1LB:A-PreS1:PreS2/JM109。

如上图所述，鉴别到大小约 60kDa 的条带，该条带对应于从表达载体 pHCE1LB:A-TGEN1 制备的融合蛋白。

实施例 19 重组表面表达载体 pHEC1LB:A-L 的构建以及 L 抗原的表面表达

(1) 利用来源于 *Bacillus sp.* 菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 pgsBCA 的 pgsA 基因，并利用革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌作为宿主细胞构建重组表达载体 pHCE1LB:A-L，所述重组表达载体 pHCE1LB:A-L 可将来源于乙型肝炎病毒表面抗原的 PreS1 和 PreS2 及 S 抗原的融合形式表达至细胞表面。构建的包含 SEQ ID NO:25 的引物还包括存在于表面表达载体 pHCE1LB:A 中的限制性酶 BamHI 和 HindIII 识别位点。

用限制性酶 BamHI 和 HindIII 消化扩增的乙型肝炎病毒的 L 基因，并通过调整翻译密码子的方式将其连接至来源于细胞外膜基因的 pgsA 基因的 C-末端区域。重组表达载体 pHCE1LB:A-L 如图 19 所示。

(3) 采用重组表达载体 pHCE1LB:A-L 在 *E. coli* 中研究 L 抗原，即包括 PreS1、PreS2 以及 S 抗原的融合抗原的表面表达。为实现这一目的，将表面表达载体转化至 *E. coli* 宿主细胞中，采用与实施例 3 相同的步骤诱导表达。利用抗 PreS1 抗原的抗体通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 免疫印迹的方法证实了与细胞外膜蛋白 pgsA 融合的 L 抗原的表达（参考图 20 中 B）。如图 20 所示，在 A 中，泳道 1 是未转化的宿主细胞 JM109，泳道 2 和 3 是细胞转化株 pHCE1LB:A/JM109。

如上图所述，鉴别到大小约 86kDa 的条带，该条带对应于由重组表达载体 pHCE1LB:A-L 表达的融合蛋白。

#### 实施例 20 重组表面表达载体 pHCE1LB:A-TNF- $\alpha$ 的构建

利用来源于 *Bacillus sp.* 菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 pgsBCA 的 pgsA 基因，并利用革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌作为宿主细胞构建重组表达载体 pHCE1LB:A-TNF- $\alpha$ ，所述重组表达载体 pHCE1LB:A-TNF- $\alpha$  可将肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )——一种制药或者临床应用的蛋白，的融合形式表达至细胞表面。

为了将 TNF- $\alpha$  基因引入表面表达载体 pHCE1LB:A 中，如实施例 12 所述，利用革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌作为宿主细胞，约 0.5kb 的 TNF- $\alpha$  基因克隆至通用的克隆载体 pUC8 中用作模板，以包含核苷酸序列 SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:27 的寡核苷酸作为引物，进行聚合酶链式反应。该扩增得到大小为 482bp 的基因扩增区域。构建的包含 SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:27 的引物还包含存在于表面表达载体 pHCE1LB:A 中的限制性酶 BamHI 和 HindIII 的识别位点。

用限制性酶 HindIII 和 BamHI 消化扩增的乙型肝炎病毒 L 基因，并通过调整翻译密码子的方式将其连接至参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜基因的 C-末端区域，从而得到如图 21 所示的重组表达载体 pHCE1LB:A-TNF- $\alpha$ 。

实施例 21 重组表面表达载体 pGNA-脂肪酶的构建以及脂肪酶的表面表达

利用 *pgsA* 基因以及革兰氏阴性细菌作为宿主细胞构建重组表达载体 pGNA-脂肪酶，所述重组表达载体可将脂肪酶表达至细胞表面，所述 *pgsA* 基因来源于 *Bacillus sp.*菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 *pgsBCA*。

为了将脂肪酶基因引入表面表达载体 pGNA 中，利用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞，约 0.5kb 的脂肪酶基因克隆至通用的克隆载体 pUC8 中用作模板，以包含核苷酸序列为 SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:29 的寡核苷酸作为引物，进行聚合酶链式反应。结果得到大小为 546 bp 的扩增基因片段。包含 SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:29 的引物还进一步构建为含有表面表达载体 pGNA 中的限制性酶 BamHI 和 HindIII 的识别位点。

用限制性酶 BamHI 和 HindIII 消化扩增的乙型肝炎病毒的 L 基因，并通过调整翻译密码子的方式将其连接至参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜基因的 C-末端区域。按上述方法构建得到的重组表达载体 pGNA-脂肪酶如图 22 所示。

(2) 采用重组表达载体 pGNA-脂肪酶在 *E. coli* 中研究脂肪酶基因的表面表达。为实现这一目的，将重组表达载体 pGNA-脂肪酶转化至 *E. coli* 中，采用与上述实施例 3 相同的步骤诱导表达。然后，在包含 1%的具有油降解活性的三辛酸甘油酯的琼脂介质（1%胰化蛋白胨(trypton)、0.5%酵母提取物、0.619%NaCl、0.5%阿拉伯胶、1mM CaCl<sub>2</sub>、1%三辛酸甘油酯）中检测表达至细胞表面的脂肪酶的活性。将 *E. coli* 转化株涂至含有 1%油性底物的琼脂介质表面，然后在 37°C 稳定状态下培养 9 小时。

结果，油性底物降解变为清楚的区域（参考图 22），从而证实了脂肪酶在细胞表面的表达。

实施例 22 重组表面表达载体 pGNA-酰胺酶的构建以及酰胺酶的表面表达

(1) 利用 *pgsA* 基因以及革兰氏阴性细菌作为宿主细胞构建重组表达载体 pGNA-酰胺酶, 所述重组表达载体可将酰胺酶表达至细胞表面, 所述 *pgsA* 基因来源于 *Bacillus sp.* 菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白基因 *pgsBCA*。

为了将酰胺酶基因引入表面表达载体 pGNA 中, 利用革兰氏阴性细菌作为宿主细胞, 约 0.8 kb 的酰胺酶基因克隆至 *E. coli* 表达载体 pGNA 中用作模板, 以包含核苷酸序列为 SEQ ID NO:30 和 SEQ ID NO:31 的寡核苷酸作为引物, 进行聚合酶链式反应。结果得到大小为 792 bp 的扩增基因片段。包含 SEQ ID NO:30 和 SEQ ID NO:31 的引物还进一步被构建为含有表面表达载体 pGNA 中限制性酶 BamHI 和 HindIII 的识别位点。

用限制性酶 HindIII 和 BamHI 消化扩增的乙型肝炎病毒的 L 基因, 并通过调整翻译密码子的方式将其与参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜基因 C-末端区域的表面表达载体 pGNA 相连接。按上述方法构建得到的重组表达载体 pGNA-酰胺酶如图 23 所示。

(2) 采用重组表达载体 pGNA-酰胺酶在 *E. coli* 中研究酰胺酶基因的表面表达。为实现这一目的, 将重组表达载体 pGNA-脂肪酶转化至 *E. coli* 中, 采用与上述实施例 3 相同的步骤诱导表达。然后, 在 *E. coli* 中加入 100mM 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.0, 其中含有 10mM 的 D-alanH 作为底物, 并含有 0.5mM 的 CoCl 作为辅助因子), 检测表达至细胞表面的酰胺酶的活性。详细地, 反应几小时后, 利用 HPLC(Hypersil ODS; 250X4.6mm 柱) 对表面表达了酰胺酶的 *E. coli* 进行检测, 在 600nm 的 OD 值为 1 的细胞生长作为一个单位体积。利用上述方法比较野生型 *E. coli* 和包含表面表达载体 pGNA 的细胞转化株中表达至细胞表面的酰胺酶的酶活性。

如图 23 所示, 与对照组相比, 可发现本发明的 *E. coli* 转化株的酰胺酶活性升高了 100 倍。因此, 证实了本发明的表面表达方法可有效地将酰胺酶表达至细胞表面。

### 工业实用性

如上所示及所证, 本发明的新的表达载体可在微生物表面有效制备外源性蛋白, 它是利用来源于 *Bacillus sp.* 菌株的参与多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞

外膜蛋白基因 *pgsBCA* 作为表面表达的载体从而在微生物表面产生外源蛋白，并且该载体在革兰氏阴性细菌及革兰氏阳性细菌都能稳定应用。采用表面表达载体转化的细胞转化株包括外源性目的蛋白的插入位点，从而制备所连接的编码外源性蛋白的外源性基因，通过培养使之进行细胞表面表达。

本发明的表面表达载体可有效用作多种外源性蛋白在细胞表面的稳定和易测的表达，该方法不用考虑细胞周期的情况。因此，这种微生物表面表达系统可用于制备多种抗原、重组抗体、重组酶、以及连接或吸附蛋白，可筛选多种抗原和抗体，并能制备用于生物转化的酶类。实际上，这些酶可被表达至细胞表面且其催化活性没有任何降低，从而可使本发明工业应用于生物转化的目的。

本领域的技术人员利用本发明公开的思想以及前述说明书中特定的实施例可以很容易地修改或者设计出其它的实施例，从而实现与本发明相同的目的。

本领域的技术人员同样在不偏离本发明所附权利要求书的实质精神的情况下可尝试等效的实施例。

## SEQUENCE LISTING

- <110> 生物领先公司  
M.D.实验室有限公司
- <120> 具有编码多聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶的基因 pgsBCA 的表面表达载体以及利用该载体在微生物表面表达目的蛋白的方法
- <130> PC031033C
- <150> KR2001-48373
- <151> 2001-08-10
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 1182
- <212> DNA
- <213> Bacillus subtilis
- <400> 1
- atgggctggt tactcattat agcctgtgct gtcatactgg tcatcggaat attagaaaaa 60
- cgacgacatc agaaaaacat tgatgccctc cctgttcggg tgaatattaa cggcatccgc 120
- gaaaaatcga ctgtgacaag gctgacaacc ggaatattaa tagaagccgg ttacaagact 180
- gttgaaaaaa caacaggaac agatgcaaga atgatttact gggacacacc ggaggaaaag 240
- ccgattaaac ggaaacctca ggggccgaat atcggagagc aaaaagaagt catgagagaa 300
- acagtagaaa gaggggctaa cgcgattgtc agtgaatgca tggctgttaa cccagattat 360
- caaatcatct ttcaggaaga acttctgcag gccaatatcg gcgtcattgt gaatgttta 420
- gaagaccata tggatgtcat ggggccgacg ctgatgaaa ttcagaagc gttaccgct 480
- acaattcctt ataatggcca tcttctcatt acagatagtg aatataccga gttctttaa 540
- caaaaagcaa aagaacgaaa cacaaaagtc atcattgctg ataactcaaa aattacagat 600
- gagtatttac gtaatttga atacatgga ttcctgata acgcttctct ggcgctgggt 660
- gtggctcaag cactcggcat tgacgaagaa acagcattta agggaatgct gaatgcgccg 720

ccagatccgg gagcaatgag aattctccg ctgatcagtc cgagcgagcc tgggcacttt 780  
 gttaatgggt ttgccgcaaa cgacgcttct tctactttga atatatggaa acgtgtaaaa 840  
 gaaatcggtt acccgaccga tgatccgac atcatcatga actgccgcgc agaccgtgtc 900  
 gatcggacac agcaattcgc aaatgacgta ttgccttata ttgaagcaag tgaactgatc 960  
 ttaatcgggt aaacaacaga accgatcgta aaagcctatg aagaaggcaa aattcctgca 1020  
 gacaaactgc atgacctaga gtataagtca acagatgaaa ttatggaatt gtaaagaaa 1080  
 agaatgcaca accgtgtcat atatggcgtc ggcaatattc atggtgccgc agagccttta 1140  
 attgaaaaaa tccacgaata caaggtaaag cagctcgtaa gc 1182

<210> 2

<211> 447

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 2

atgttcggat cagatttata catcgcacta atttaggtg tactactcag ttaattttt 60  
 gcggaaaaaa cagggatcgt gccggcagga ctgtttgtac cgggatattt aggactgtg 120  
 ttaatcagc cggctttat ttacttgtt ttgctagtga gcttgctcac ttatgttacc 180  
 gtgaaatcag gtttatccaa atttatgatt ttgtacggac gcagaaaatt cgctgccatg 240  
 ctgataacag ggatcgtcct aaaaatcgcg ttgattttc tataccgat tgtaccatt 300  
 gaaatcgcag aatttcgagg aatcggcatc atcgtgccag gttaattgc caataccatt 360  
 cagaaacaag gtttaacat tacgttcgga agcacgctgc tattgagcgg agcgaccttt 420  
 gctatcatgt ttgttacta ctaatt 447

<210> 3

<211> 1140

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 3

atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag 60



aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcggtt ttgccttat gttcgcttc	120
atgtggcggg gaaaagcggg aacgccgaag gtcaaacgt attetgacga cgtacttca	180
gcctcatttg taggcgatat tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa	240
ggggcagaca gtatittca atatgttgaa ccgatcttta gagcctcgga ttatgtagca	300
ggaaactttg aaaaccggg aacctatcaa aagaattata aacaagcaga taaagagatt	360
catctgcaga cgaataagga atcagtgaag gcttgaagg atatgaattt cacggttctc	420
aacagcgcca acaaccacgc aatggattac ggcgttcagg gcatgaaaga tacgcttga	480
gaatttgcga agcaaacct tgatatcgtt ggagcgggat acagcttaag tgatgcgaaa	540
aagaaaattt cgtaccagaa agtcaacggg gtaacgattg caacgcttg cttaccgat	600
gtgtccggga aaggtttcgc ggctaaaaag aatacaccgg gcgtgctgcc cgcagatcct	660
gaaatctta tcctatgat ttcagaagcg aaaaaacatg ctgacattgt tgttgcag	720
tcacactggg gccaaagta tgacaatgat ccaaacgacc gccagcgcca gcttgaaga	780
gccatgtctg atgcgggagc tgacatcgc gtcggccatc atccgcacgt cttagaaccg	840
attgaagtat ataacggaac cgtcatttc tacagcctcg gcaacttgt cttgaccaa	900
ggctggacga gaacaagaga cagtgcactg gttcagtatc acctgaagaa aaatggaaca	960
ggccgctttg aagtgcacc gatcgatc catgaagcga cacctgcacc tgtgaaaaaa	1020
gacagcctta aacagaaaac cattatcgc gaactgacga aagactctaa ttcgcttg	1080
aaagtagaag acggaaaact gacgtttgat atgatcata gtgacaaact aaaatctaaa	1140
	1140
<210> 4	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer 1	
<400> 4	
gaaccatggg ctggttactc cttatagcct g	31

---

<210> 5  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> PCR primer 2  
 <400> 5  
 ctcggatcct ttagatttta gttgtcact 30  
 <210> 6  
 <211> 6536  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> pGNBCA vector  
 <400> 6  
 gatctctcct tcacagattc ccaatctctt gttaaataac gaaaaagcat caatcaaaac 60  
 ggccggcatgt cttctatata tccagcaatg ttttataggg gacatattga tgaagatggg 120  
 tatcacctta gtaaaaaaag aattgctata agctgctctt tttgttcgt gatatactga 180  
 taataaattg aatttcaca ctctggaaa aaggagatat accatgggct ggttactcat 240  
 tatagcctgt gctgtcatac tggatcgcg aatattagaa aaacgacgac atcagaaaaa 300  
 cattgatgcc ctccctgttc gggatgaat taacggcatc cgcggaaaat cgactgtgac 360  
 aaggctgaca accggaatat taatagaagc cggttacaag actgttgaa aaacaacagg 420  
 aacagatgca agaatgattt actgggacac accggaggaa aagccgatta aacggaaacc 480  
 tcaggggccg aatatcggag agcaaaaaga agtcatgaga gaaacagtag aaagaggggc 540  
 taacgcgatt gtcagtgaat gcatggctgt taaccagat tatcaaatca tcttcagga 600  
 agaactctg caggccaata tcggcgtcat tgtgaatgtt tagaagacc atatggatgt 660  
 catggggccc acgcttgatg aaatgcaga agcgtttacc gctacaattc cttataatgg 720

---

ccatctgtc attacagata gtgaatatac cgagttcttt aaacaaaaag caaaagaacg	780
aaacacaaaa gtcacattg ctgataactc aaaaattaca gatgagtatt tacgtaattt	840
tgaatacatg gtattccctg ataacgcttc tctggcgctg ggtgtggctc aagcactcgg	900
cattgacgaa gaaacagcat ttaagggaat gctgaatcgc cgcagagatc cgggagcaat	960
gagaattctt ccgctgatca gtccgagcga gcctgggcac tttgtaatg ggtttgccgc	1020
aaacgacgct tcttctactt tgaatatatg gaaacgtgta aaagaatcgc gttaccgcgac	1080
cgatgatccg atcatcatca tgaactgccg cgcagaccgt gtcgatcggc cacagcaatt	1140
cgcaaatgac gtattgcctt atattgaagc aagtgaactg atcttaatcg gtgaaacaac	1200
agaaccgacg gtaaaagcct atgaagaagg caaaattcct gcagacaaac tgcatgacct	1260
agagtataag tcaacagatg aaattatgga attgttaaag aaaagaatgc acaaccgtgt	1320
catatatggc gtcggcaata ttcattgtgc cgcagagcct ttaattgaaa aaatccacga	1380
atacaaggta aagcagctcg taagctaggg ggaaatgcaa acatgttcgg atcagattta	1440
tacatgcgac taatttagg tgtactactc agtttaattt ttgcggaaaa aacagggatc	1500
gtgccggcag gactgtgtgt accgggatat ttaggacttg tgttaatca gccggtcttt	1560
atfttacttg tttgctagt gagcttgcct acttatgta tcgtgaaata cggtttatcc	1620
aaattatga tttgtacgg acgcagaaaa ttcgctgcca tgctgataac agggatcgtc	1680
ctaaaaatcg cgtttgattt tctataccg attgtacat tfgaaatcgc agaattcga	1740
ggaatcggca tcatcgtgcc aggtttaatt gccaatacca ttcagaaaca aggtttaacc	1800
attacgttcg gaagcacgct gctattgagc ggagcgacct ttgctatcat gttgtttac	1860
tacttaattt aatgtaagg gtgtcaaacg atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag	1920
ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt	1980
ccgatcgttt ttgtccttat gttcgcttc atgtggcgcg gaaaagcggc aaccccgaag	2040
gtcaaaacgt attctgacga cgtactctca gcctcatttg taggcgatat tatgatggga	2100
cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa ggggcagaca gtattttca atatgtgaa	2160
ccgatcttta gagcctcgga ttatgtagca ggaaactttg aaaaccgggt aacctatcaa	2220
aagaattafa aacaagcaga taagagatt catctgcaga cgaataagga atcagtgaaa	2280
gtcttgaagg atatgaattt cacggttctc aacagcgcca acaaccacgc aatggattac	2340

---

ggcgttcagg gcatgaaaga tacgcttga gaatttcga agcaaacct tgatcgtt	2400
ggagcgggat acagcttaag tgatgcgaaa aagaaaattt cgtaccagaa agtcaacggg	2460
gtaacgattg caacgcttgg ctttaccgat gtgtccggga aaggtttcgc ggctaaaaag	2520
aatacgcggg gcgtgctgcc cgcagatcct gaaatctca tcctatgat ttcagaagcg	2580
aaaaacatg ctgacattgt tgttgtgcag tcacactggg gccaaagta tgacaatgat	2640
ccaaacgacc gccagcgcca gcttgcaaga gccatgtctg atgcgggagc tgacatcac	2700
gtcggccatc atccgcacgt cttagaacgg attgaagtat ataacggaac cgtcatttc	2760
tacagcctcg gcaactttgt cttgaccaa ggctggacga gaacaagaga cagtgcactg	2820
gttcagtatc acctgaagaa aatggaaca ggccgcttg aagtgcacc gatcgatc	2880
catgaagcga cacctgcacc tgtgaaaaa gacagcctta aacagaaaac cattattcg	2940
gaactgacga aagactctaa tttcgttgg aaagtagaag acggaaaact gacgtttgat	3000
attgatcata gtgacaaact aaaatctaaa ggatcctcta gagtcgacct gcaggcatgc	3060
aagcttgctt gtttggcgg atgagagaag atttcagcc tgatacagat taatcagaa	3120
cgcagaagcg gtctgataa acagaattg cctggcggca gtagcgggt ggtcccacct	3180
gaccccatgc cgaactcaga agtgaacgc cgtagcggc atggtagtgt ggggtctccc	3240
catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaacga aaggctcagt cgaaagactg	3300
ggccttctgt tttatctgtt gtttctcgtt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc	3360
gggagcggat ttgaacttg cgaagcaacg gcccggaggg tggcgggcag gacgcccgcc	3420
ataaactgcc aggcacaaa ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc ttttgcgtt	3480
tctacaaact cttttgttt attttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga	3540
caataacctt gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat	3600
ttcgtgtcg cccattatcc ctttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcacca	3660
gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacac	3720
gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagtttc gccccgaaga acgtttcca	3780
atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg	3840
caagagcaac tcggtcggc catacactat tctcagaatg acttggttga gtaattcact	3900
ggcgtctgtt ttacaacgic gtgactggga aaacctggc gttaccaac ttaatgcct	3960

---

tcagcacat cccctttcg ccagctggcg taatagcga gaggccgca ccgatcgccc	4020
ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctcctac	4080
gcatctgtgc ggtattcac accgcatatg gtgcacttc agtacaatct gctctgatgc	4140
cgcatagta agccagcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgcct gaogggcttg	4200
tctgctccc gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca	4260
gaggtttca ccgcatcac cgaaacgcgc gagacgaag ggcctcgtga tacgcctatt	4320
ttatagggt aatgcatga taataatgtt ttcttagacg tcaggtgga ctttcgggg	4380
aaatgtgctc ggaacccta tttgttatt ttctaaata cattcaaata tgtatccgct	4440
catgagacaa taaccctgat aaatgctca ataattga aaaaggaaga gtatgagtat	4500
tcaacattc cgtgtcgccc ttatccctt tttgcgga tttgcctc ctgttttgc	4560
tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagtgggtg cacgagtggg	4620
ttacatcga cttgatctca acagcggtaa gatccttgag agtttcgcc ccgaagaacg	4680
tttccaatg atgagcactt taaagtctt gctatgtgac gcggtattat cccgtattga	4740
cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta	4800
ctcaccagtc acagaaaagc atctfacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc	4860
tgccataacc atgagtata aactgcggc caactfactt ctgacaacga tcggaggacc	4920
gaaggagcta accgctttt tgcacaacat gggggatcat gtaactgcc ttgatcgttg	4980
ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccagc tcctgtagc	5040
aatggcaaca acgttgcga aactattaac tggcgaacta ctactctag ctcccggca	5100
acaattaata gactggatgg agcgggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggcct	5160
tccgctggc tggttattg ctgataaac tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat	5220
cattgcagca ctggggccag atggttaacc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg	5280
gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgt gagatagggt cctcactgat	5340
taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg atttaaaact	5400
tcattttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatcctttt gataatcga tgacaaaat	5460
ccctaacgt gagtttctg tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc	5520
ttcttgatg ccttttttc tgcgcgtaat ctgctgctg caaacaaaa aaccaccgct	5580

accagcggtg gttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg 5640  
 cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca 5700  
 cttcaagaac tctgtagcac cgctacata cctcgctctg ctaatctgt taccagtggc 5760  
 tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agtaccgga 5820  
 taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 5880  
 gagctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgctcccga 5940  
 agggagaaag gcggacaggt atccggaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 6000  
 ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatgtcct gtcgggttc gccacctctg 6060  
 acttgacgct cgatthttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag 6120  
 caacgcggcc ttttacggt tctggcctt ttgctgcct tttgctcaca tgttcttcc 6180  
 tgcgtatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc ttgagtgag ctgataccgc 6240  
 tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcggcc 6300  
 aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgtg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag 6360  
 gttcccgcac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca 6420  
 ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag 6480  
 cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgacatgat tacgccaagc tagctt 6536

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 3

<400> 7

ctgggatccc aaggtatggt gcccgttg

29

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

---

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 4

<400> 8

tgaagcttat taggacgatg ggatgggaat

30

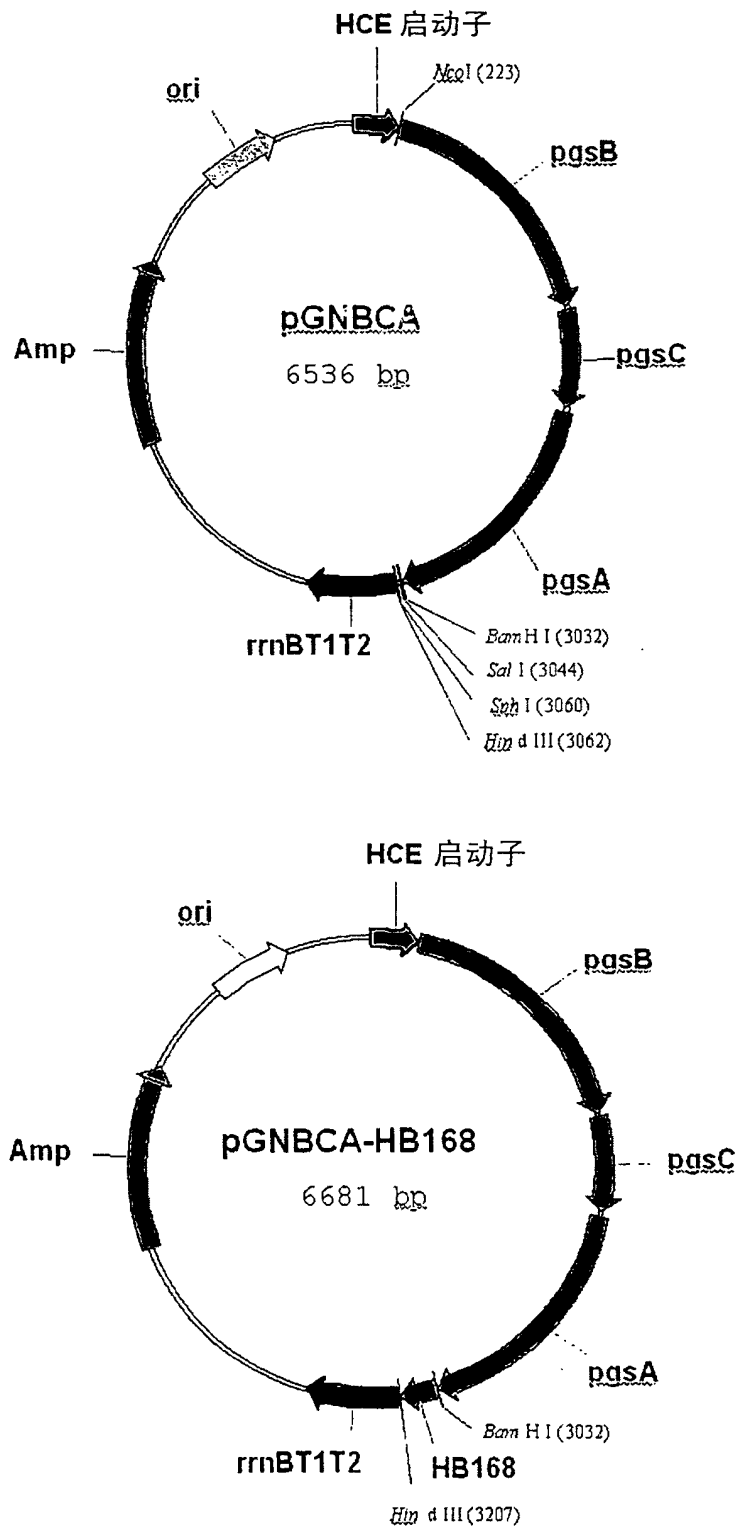


图 1



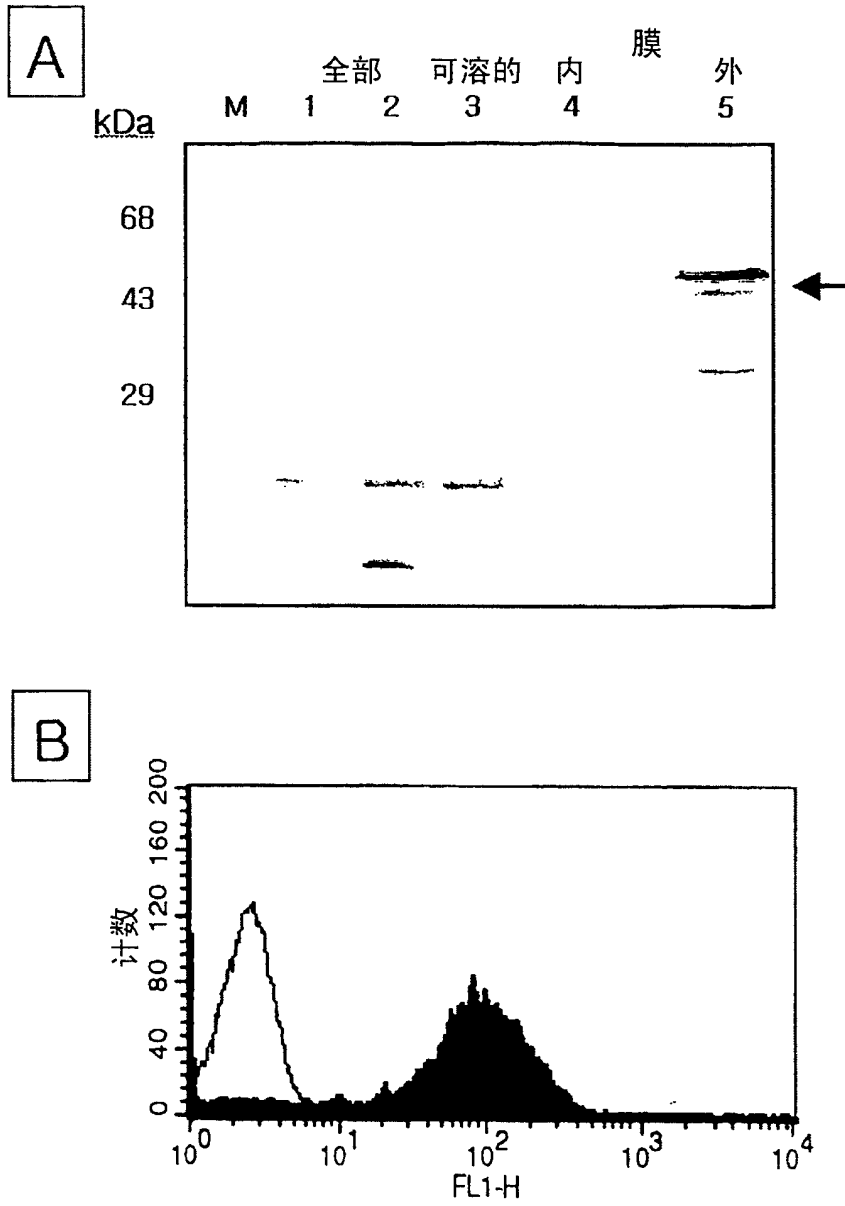


图 2

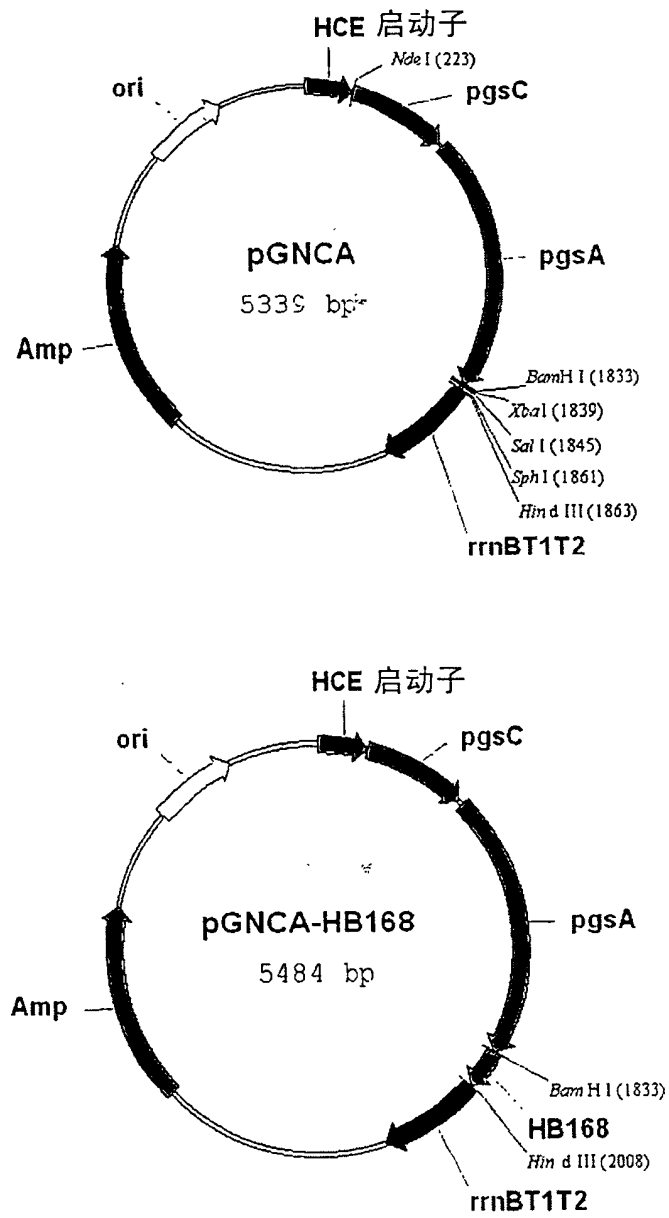


图 3

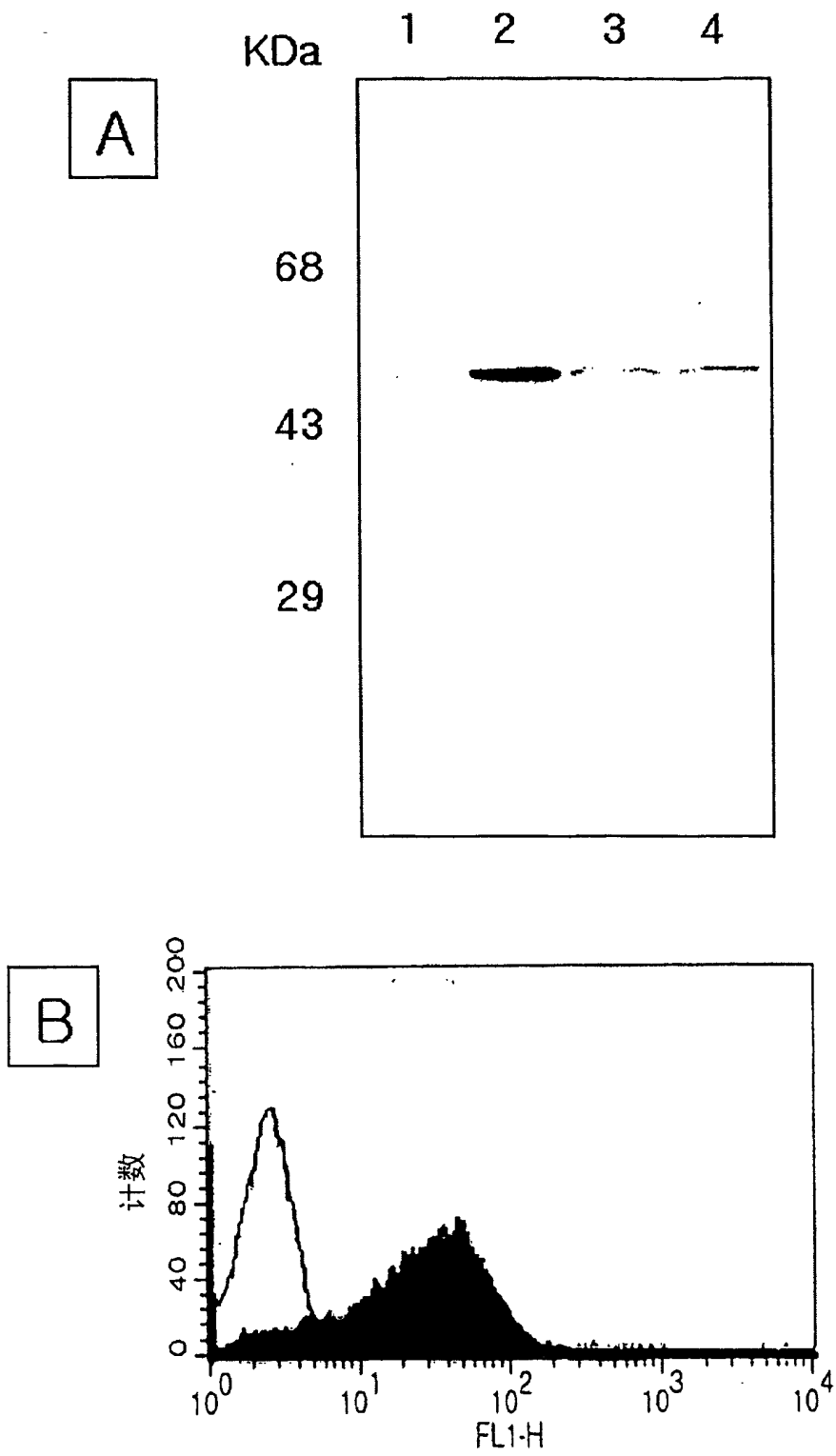


图 4

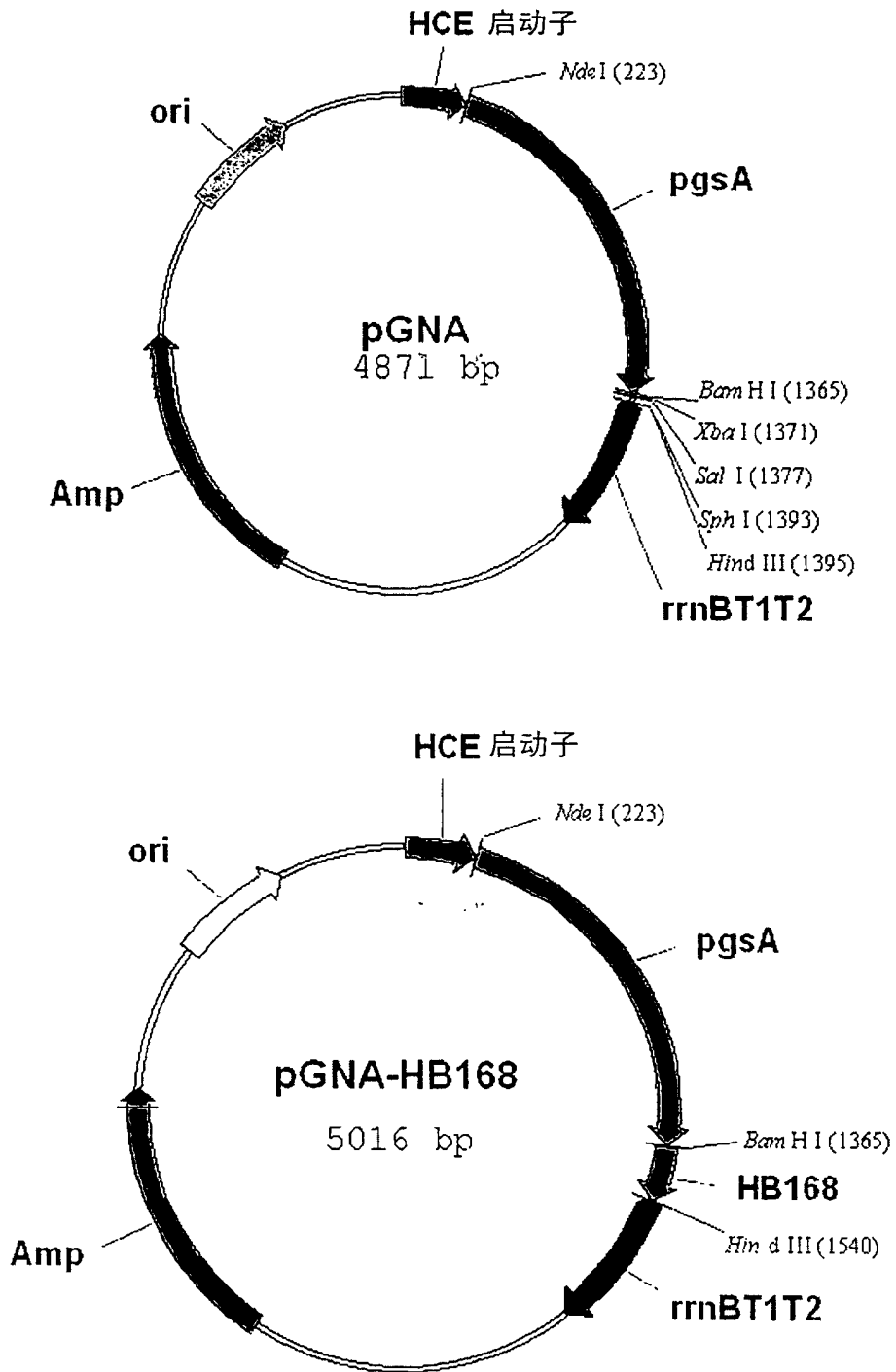


图 5

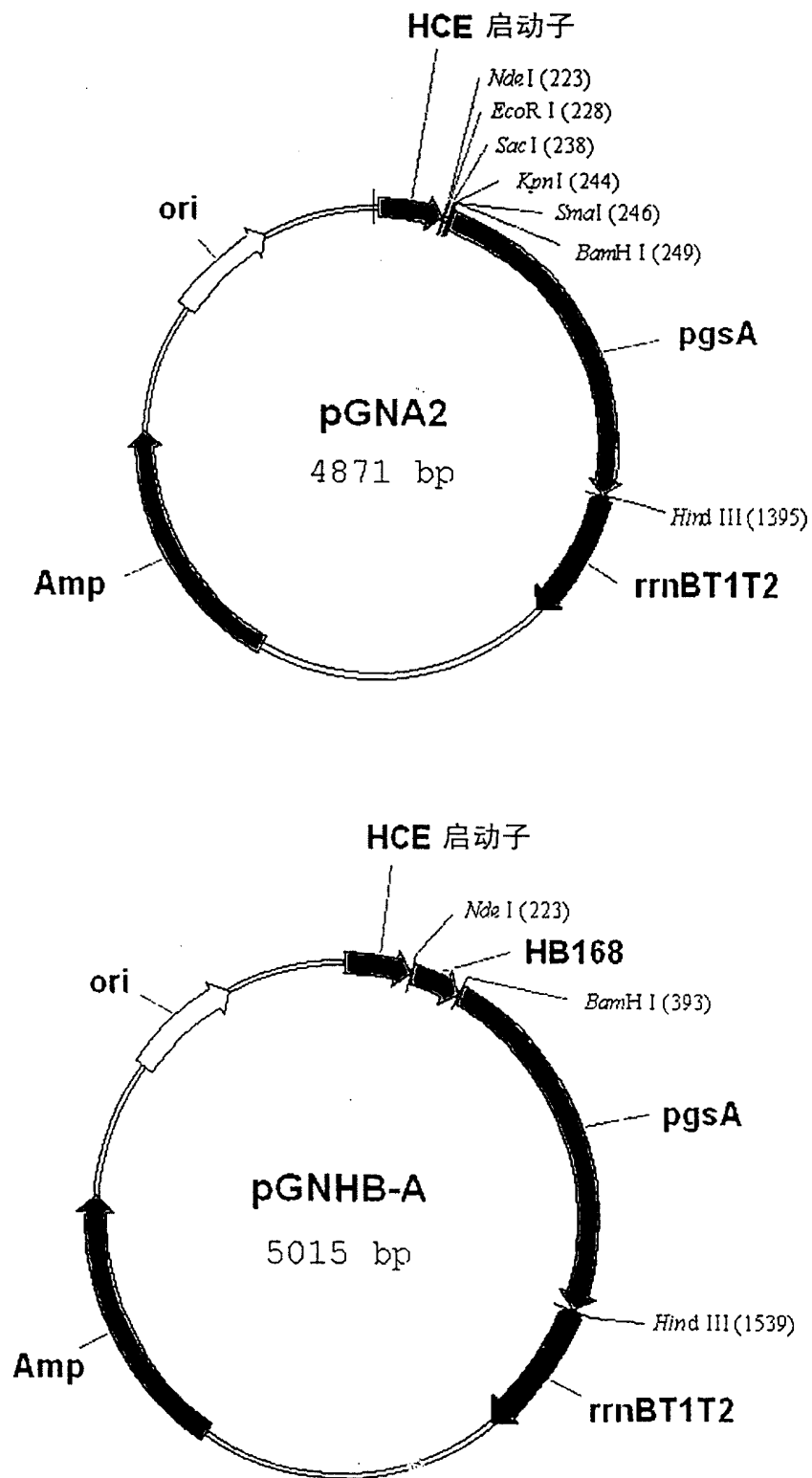


图 6

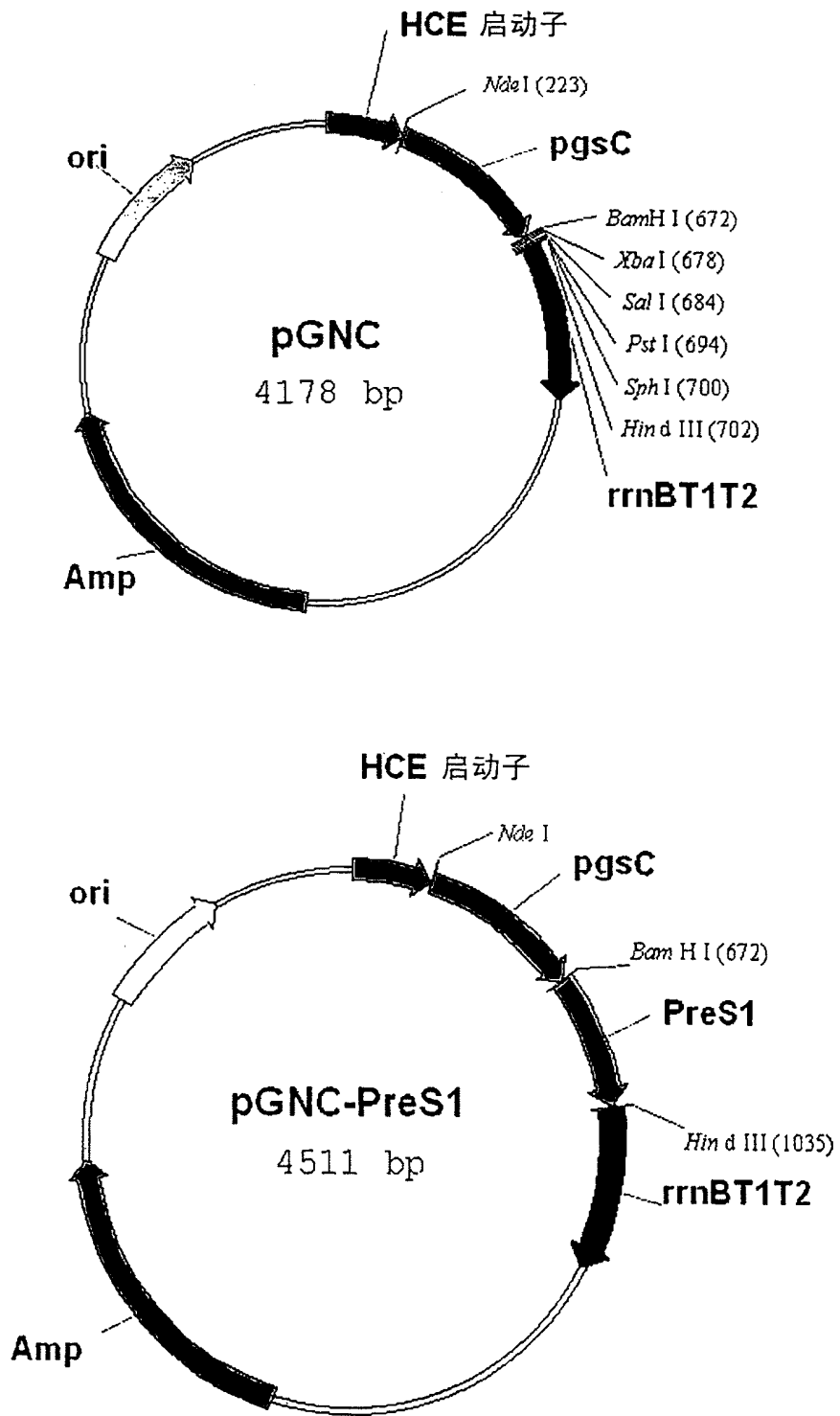


图 7

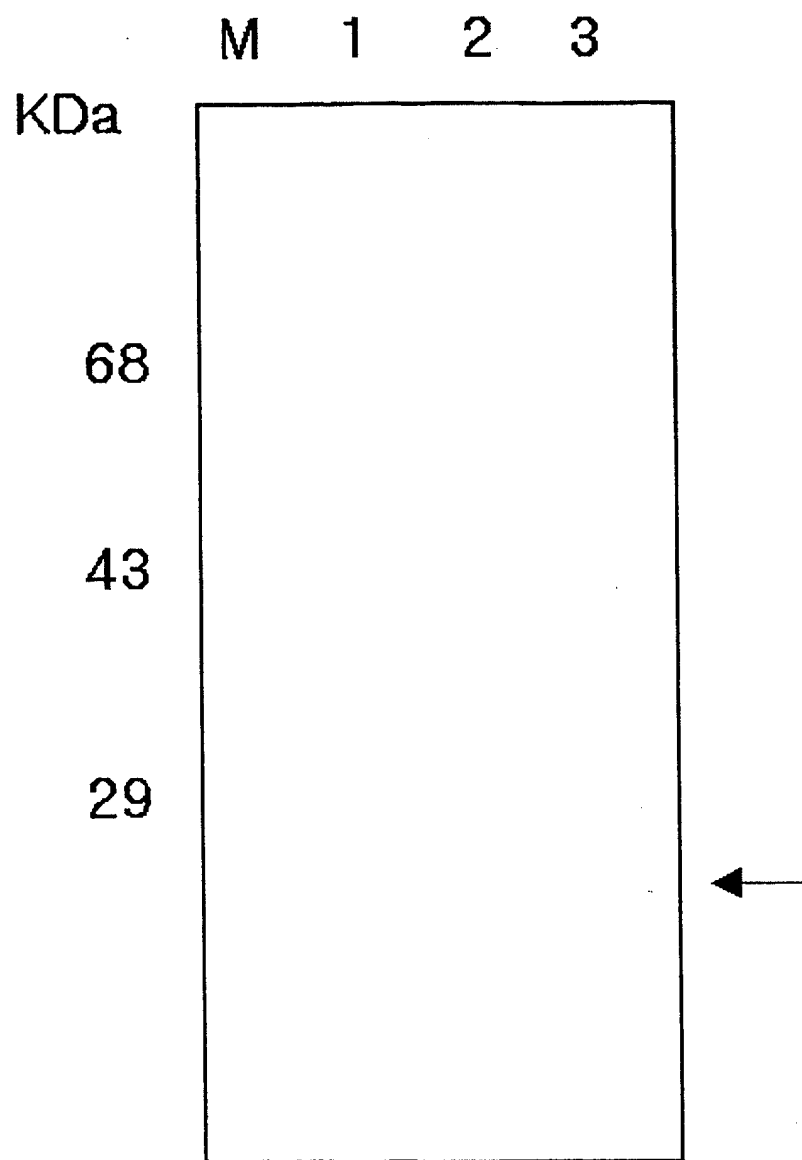


图 8

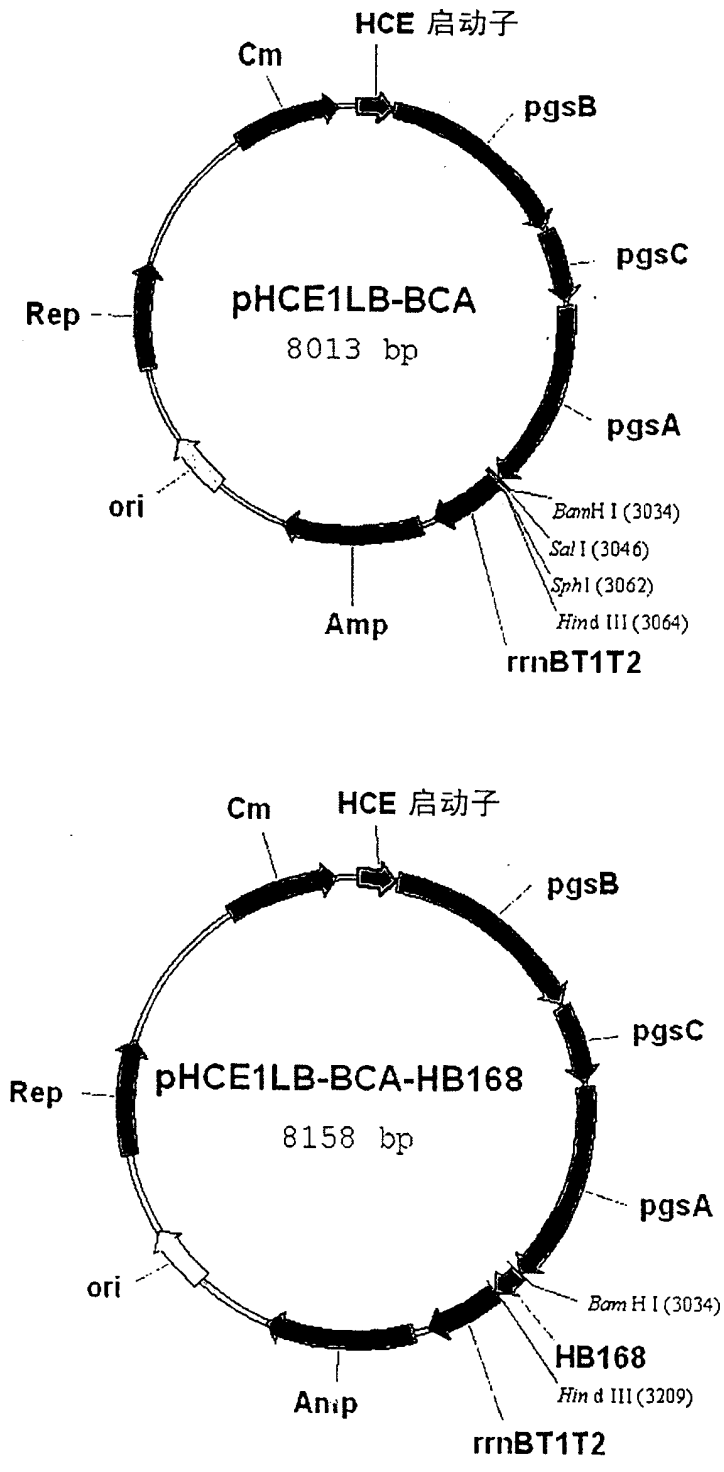


图 9



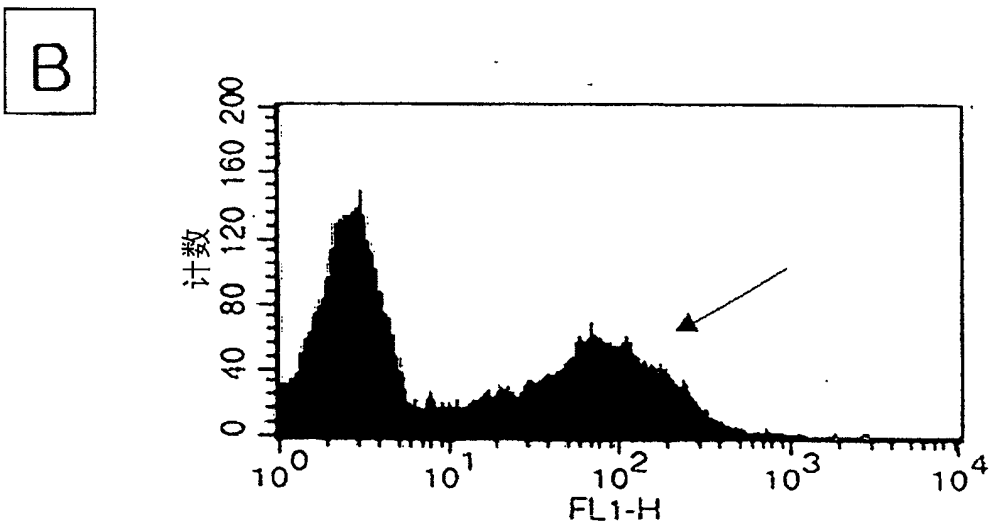
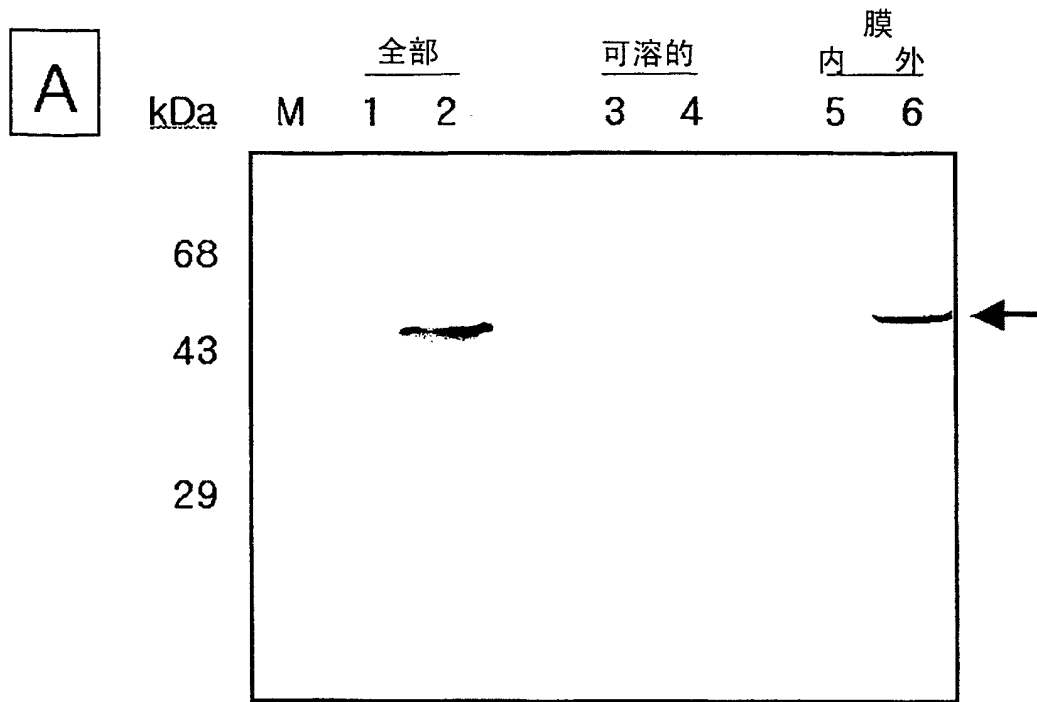


图 10

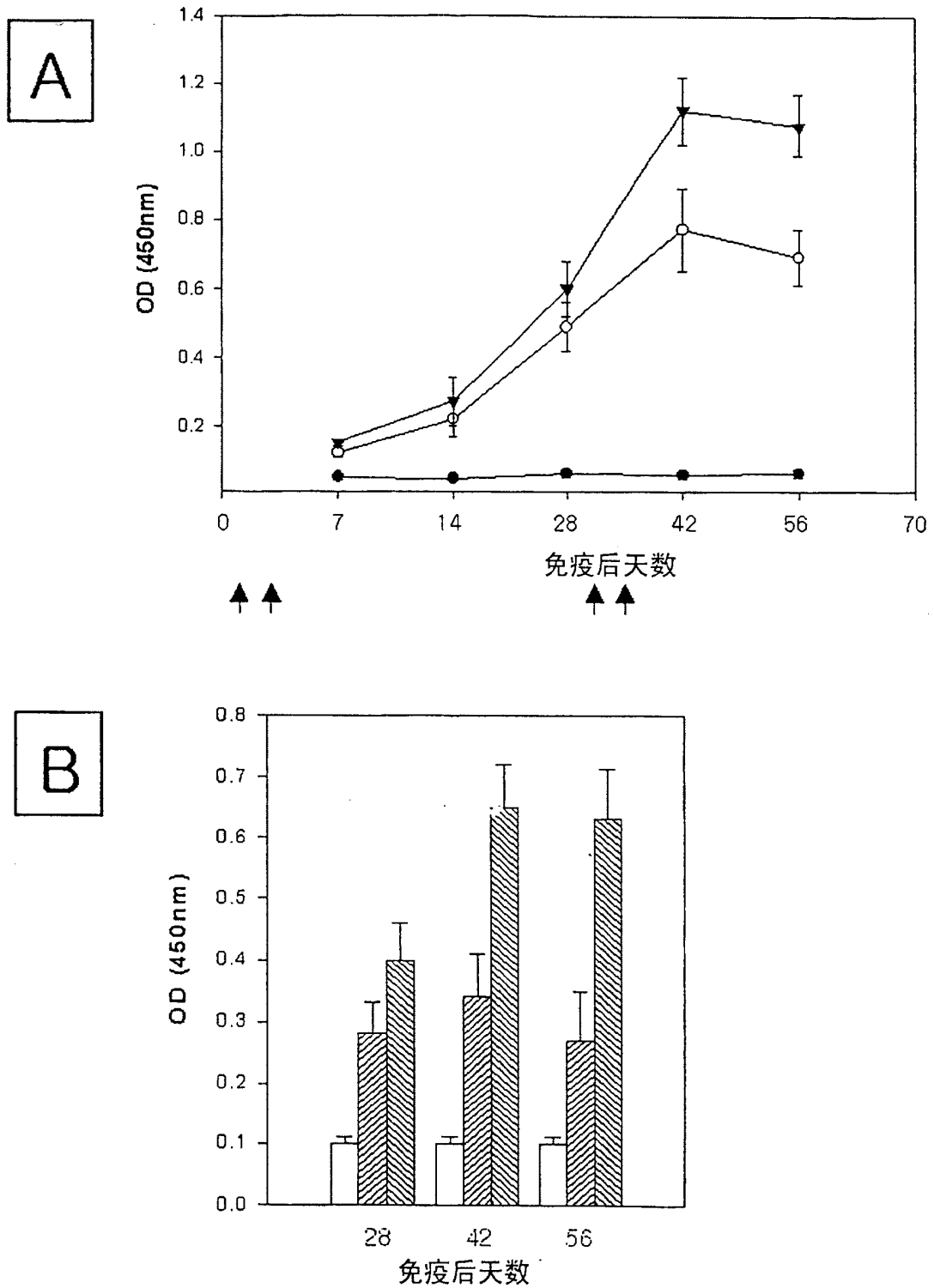
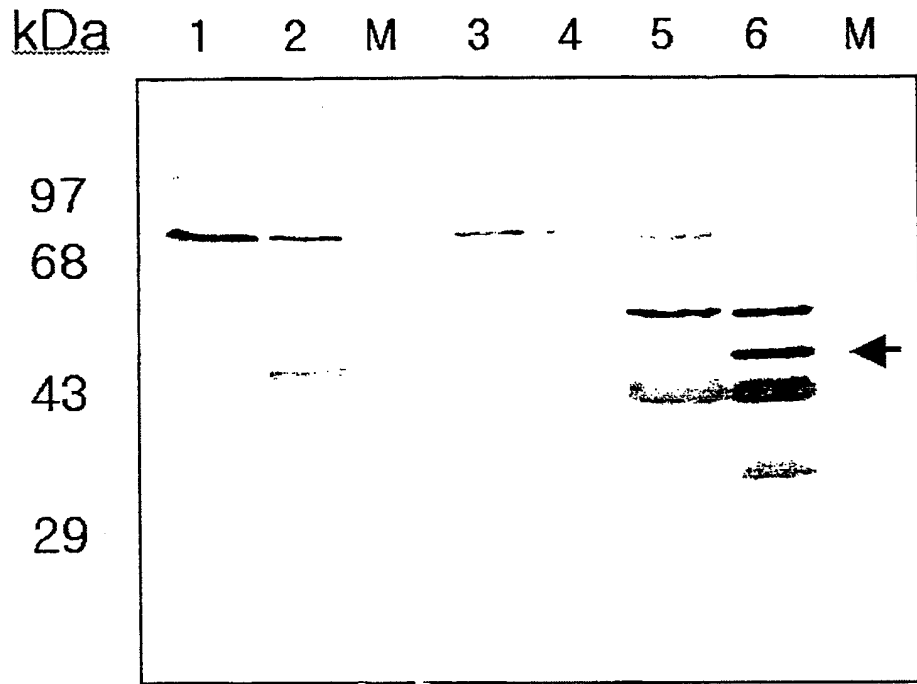


图 11

A



B

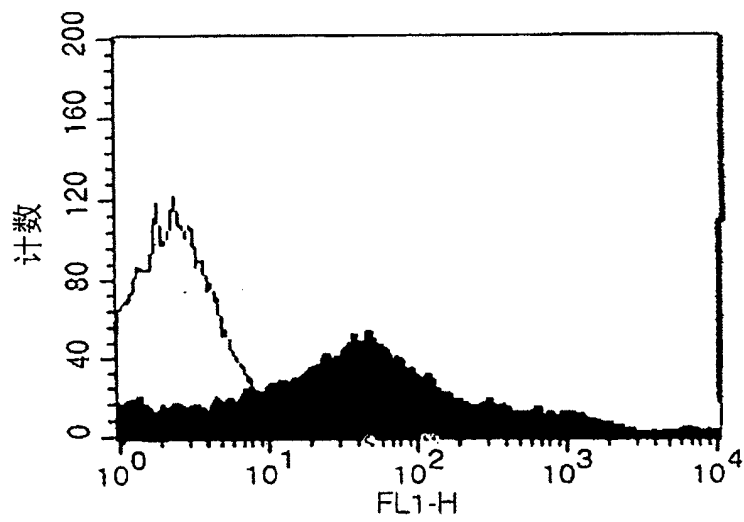


图 12

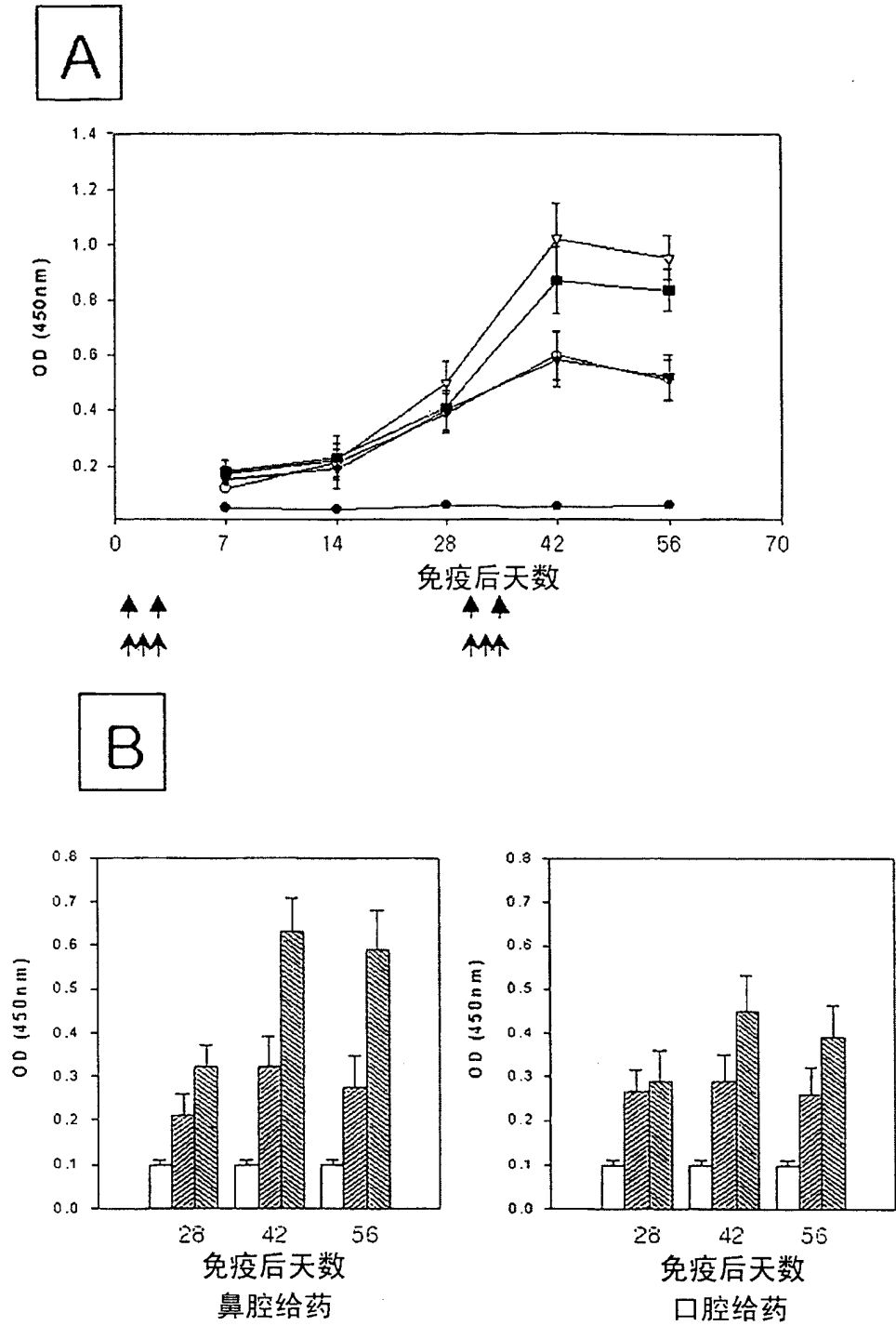


图 13

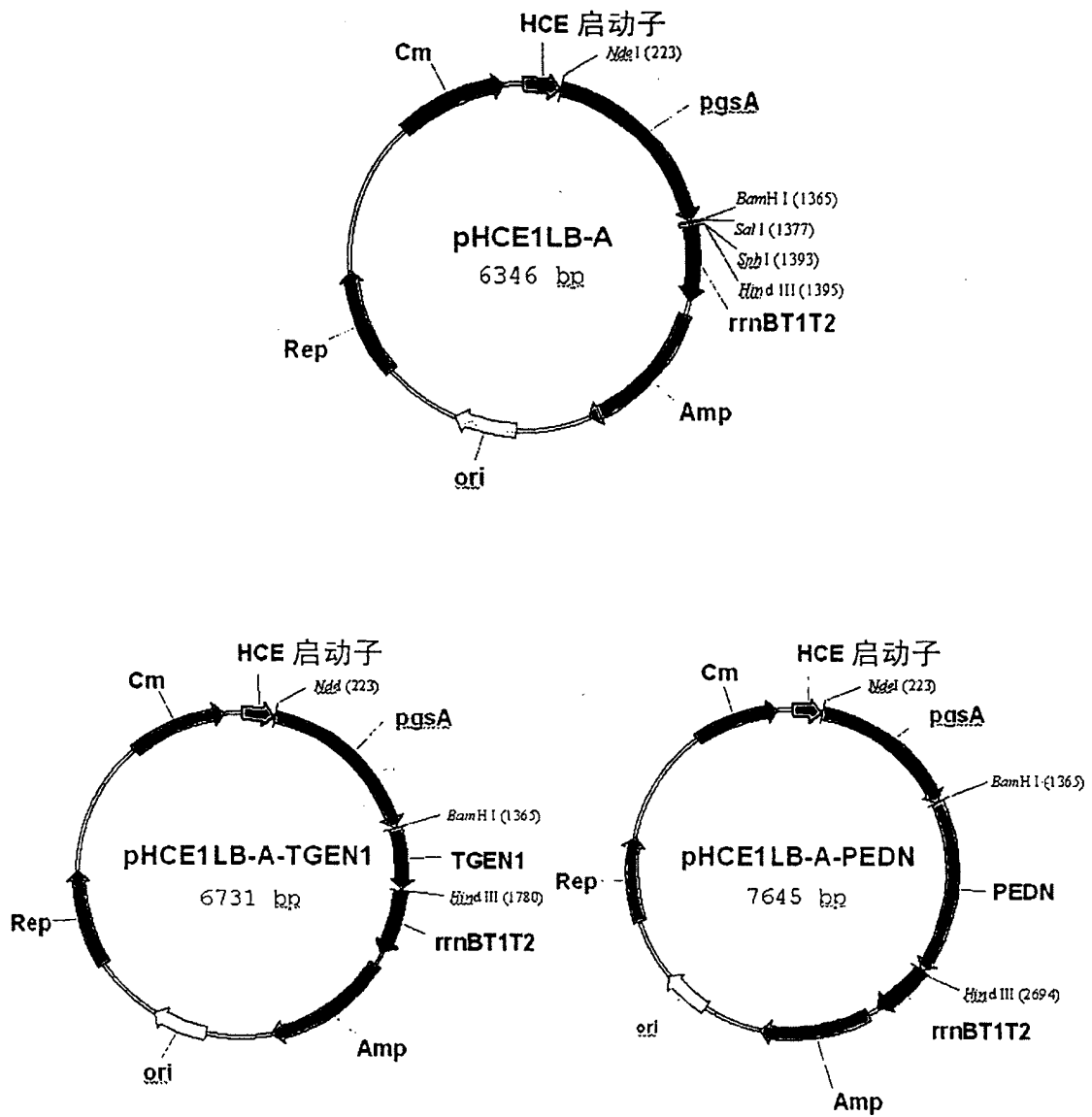


图 14

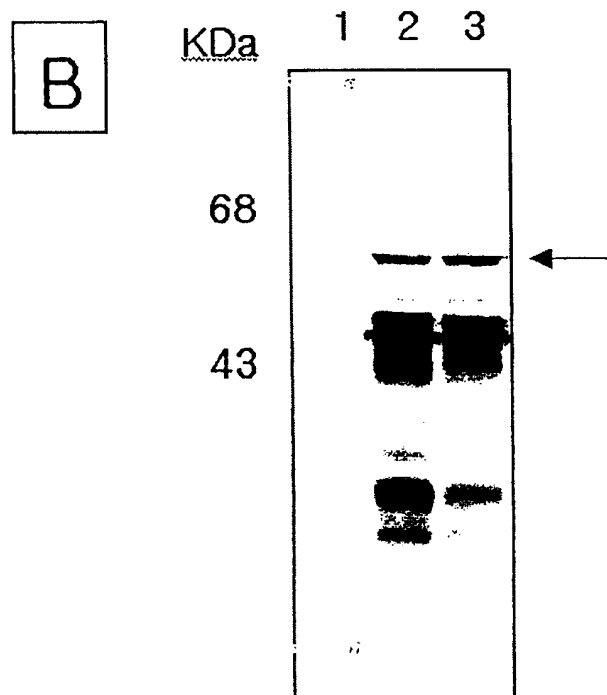
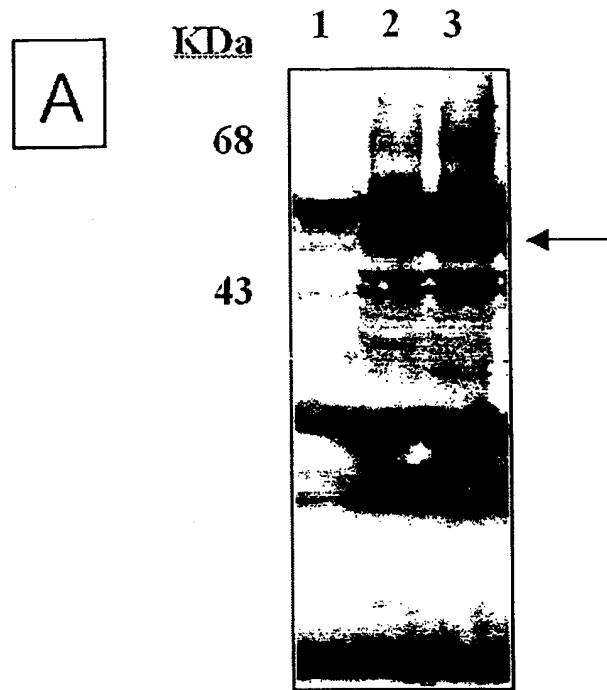


图 15

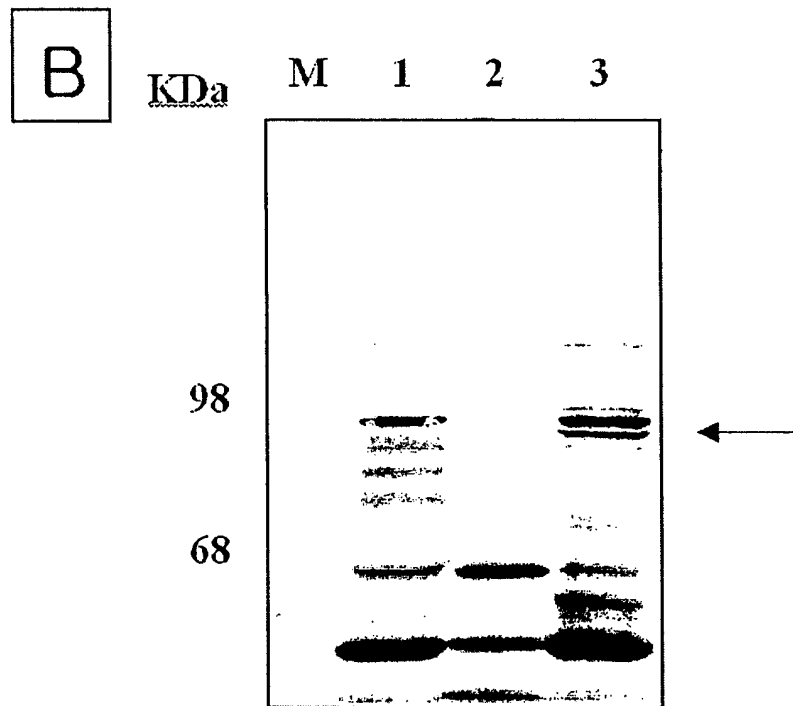
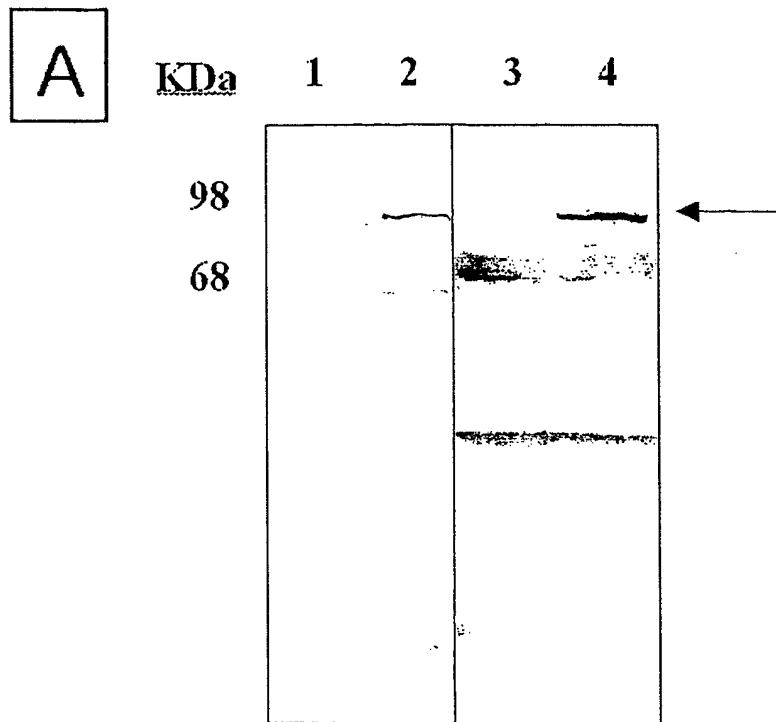


图 16

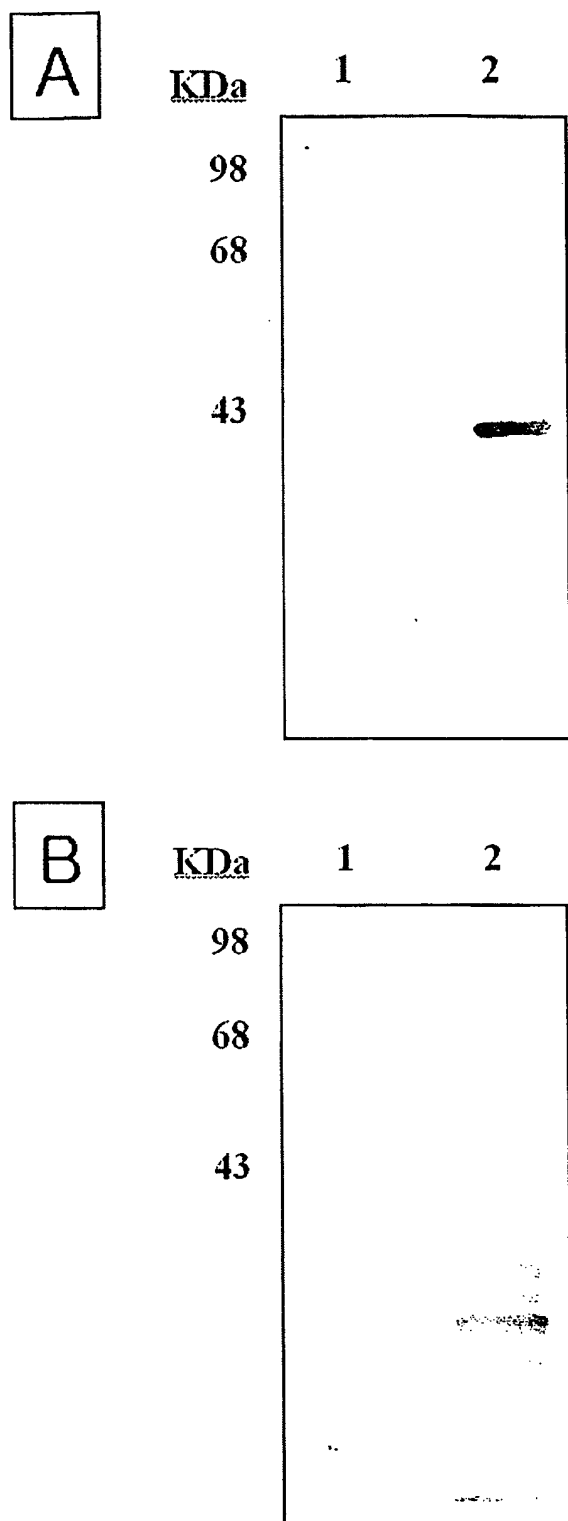


图 17



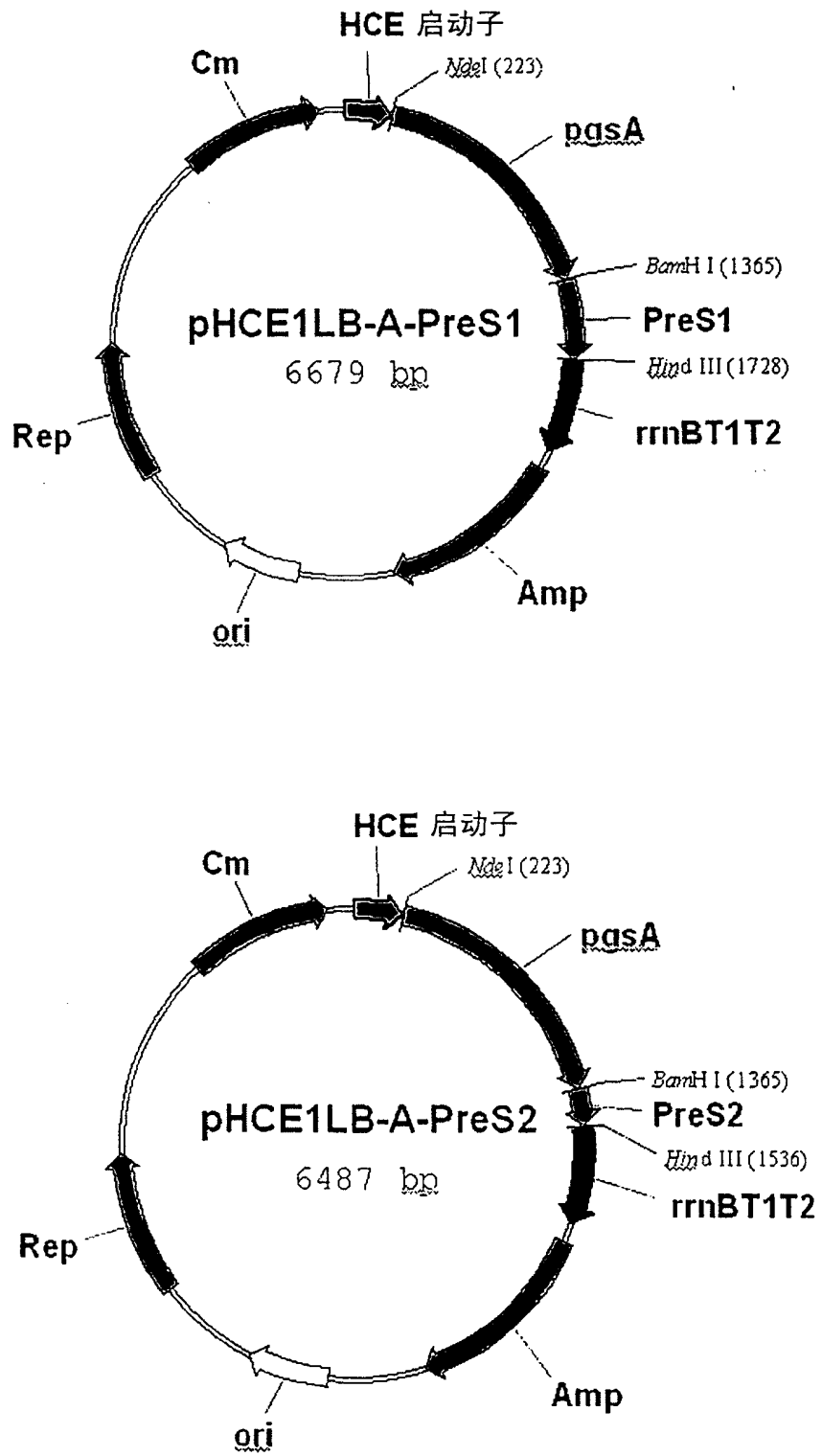


图 18

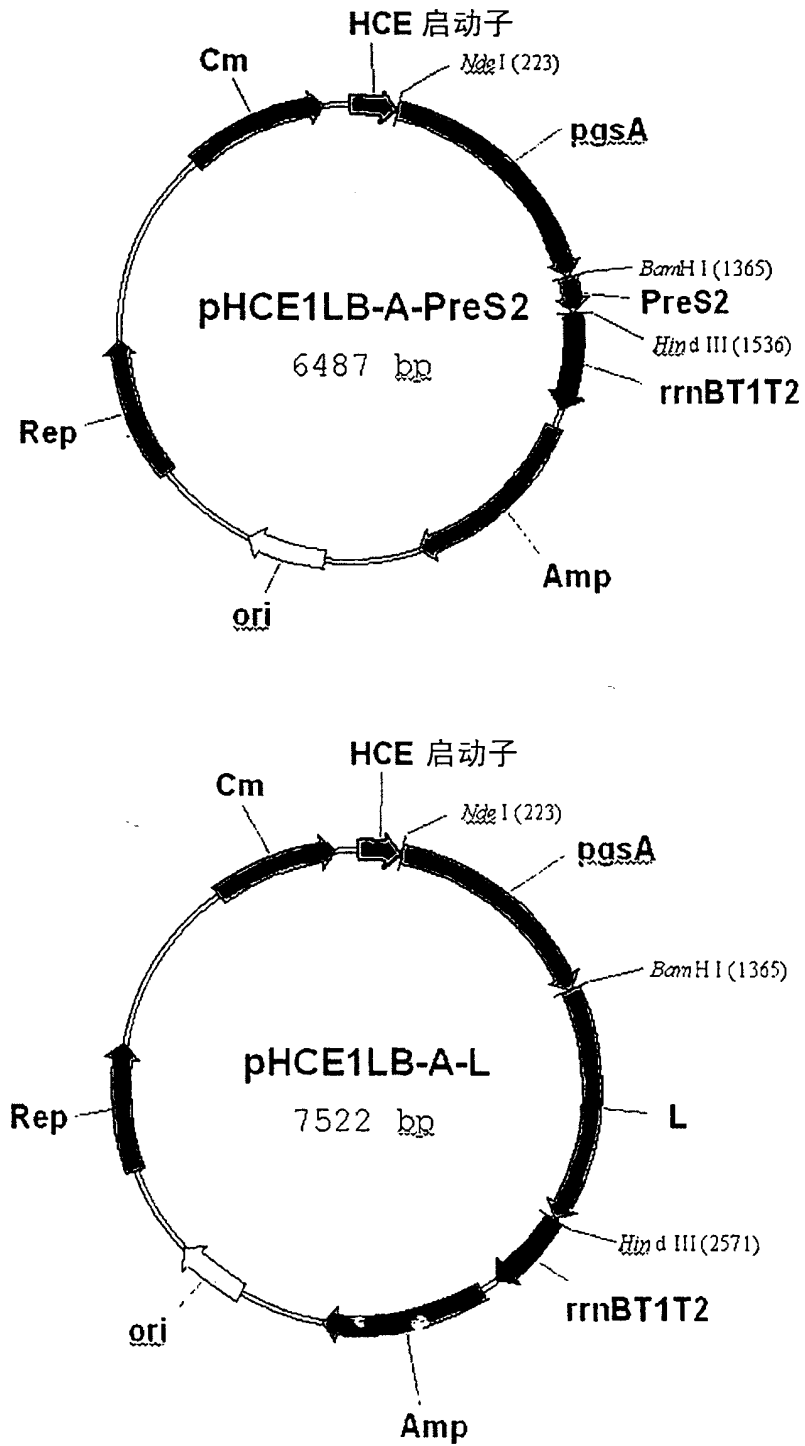


图 19

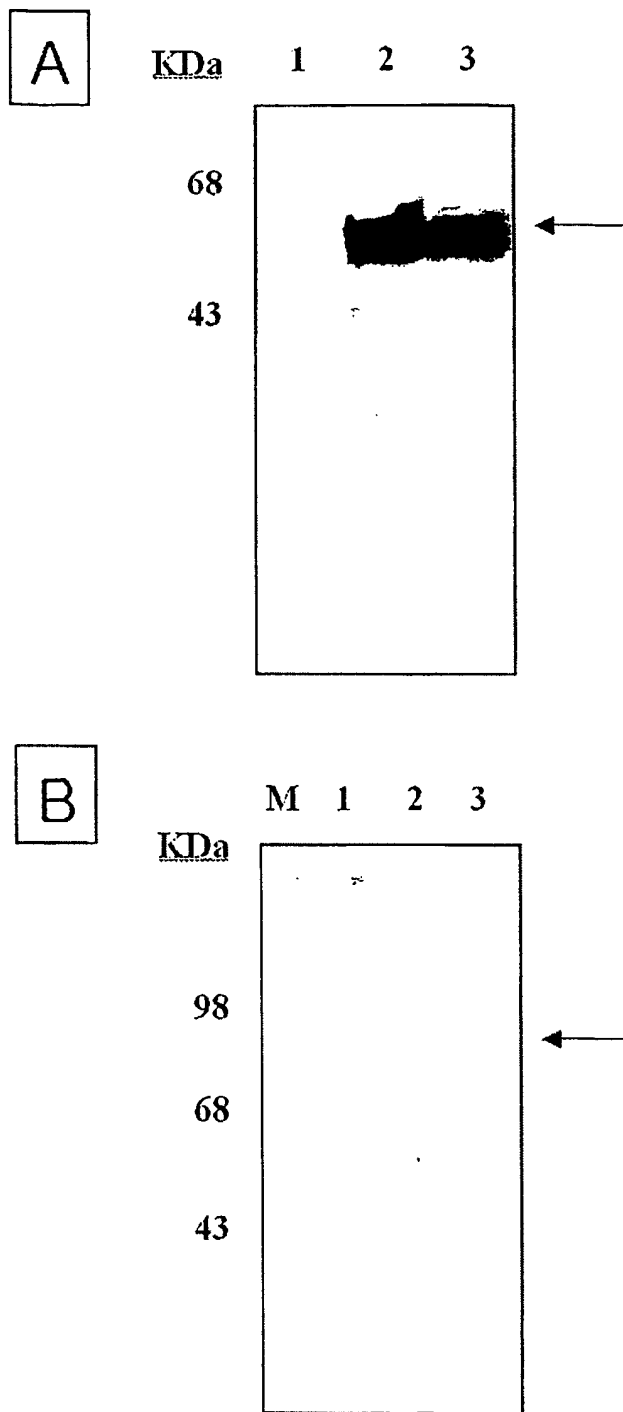


图 20

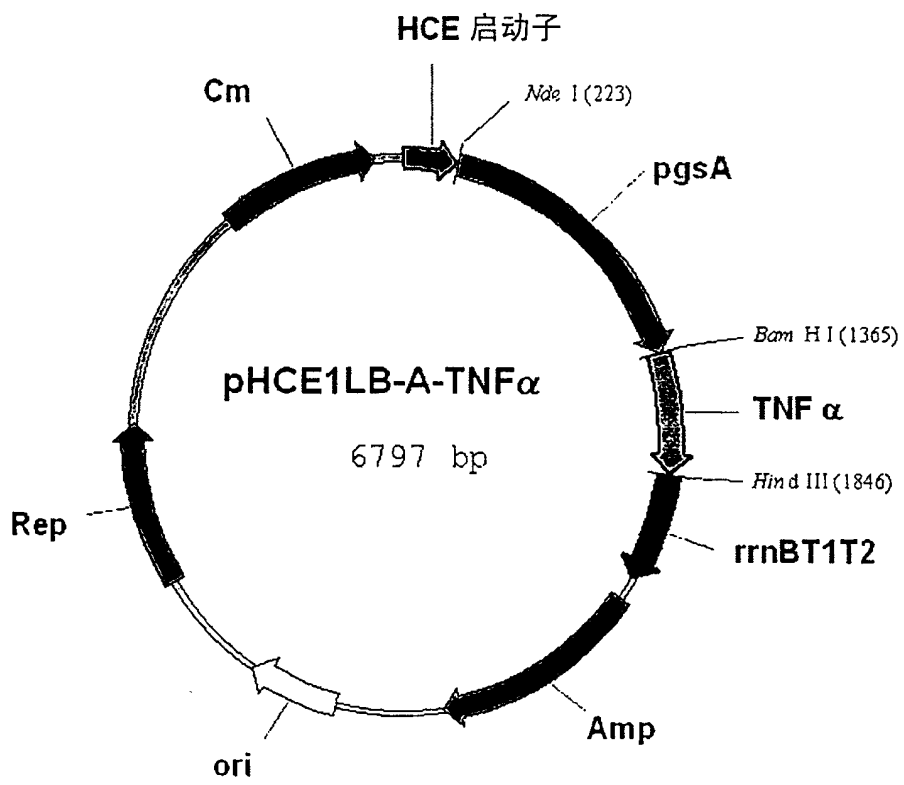


图 21

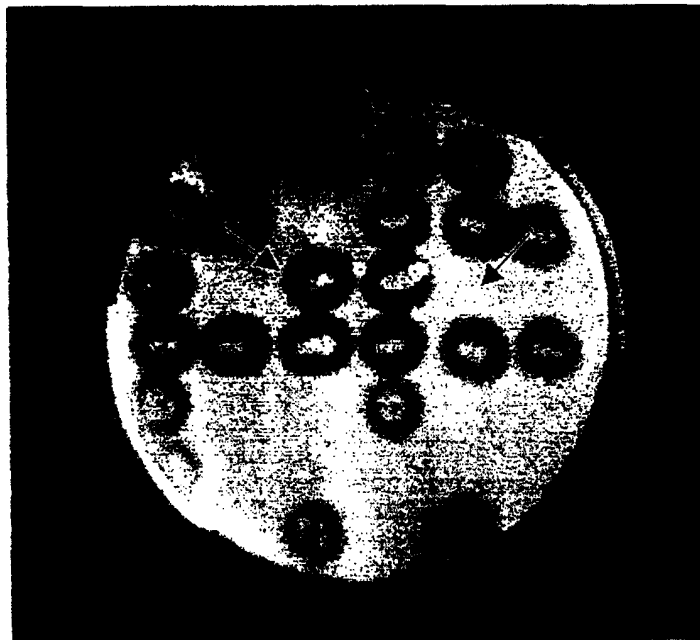
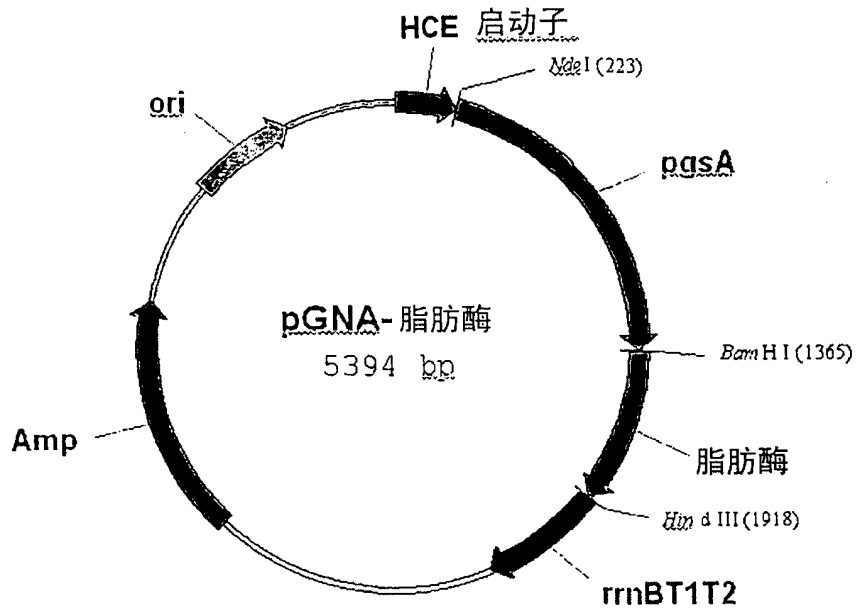


图 22

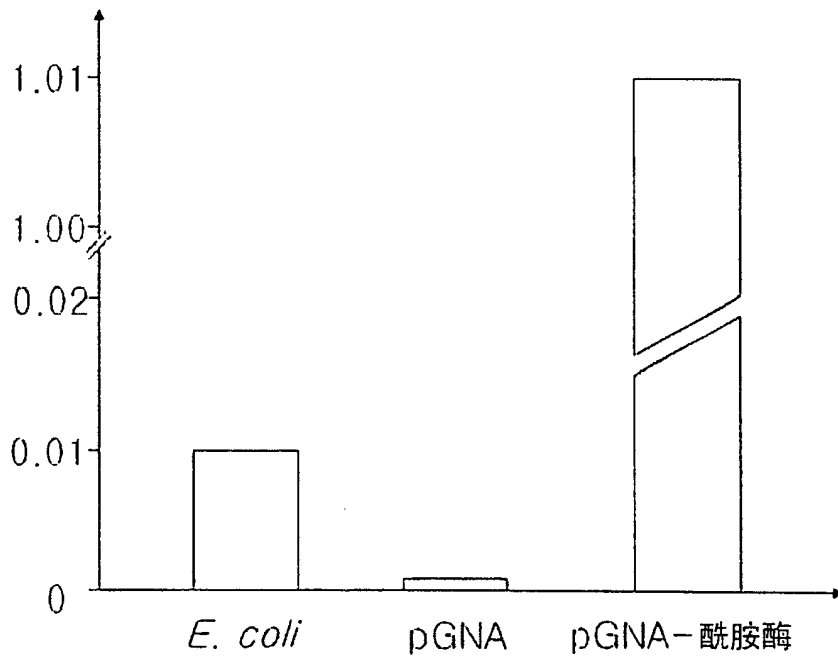
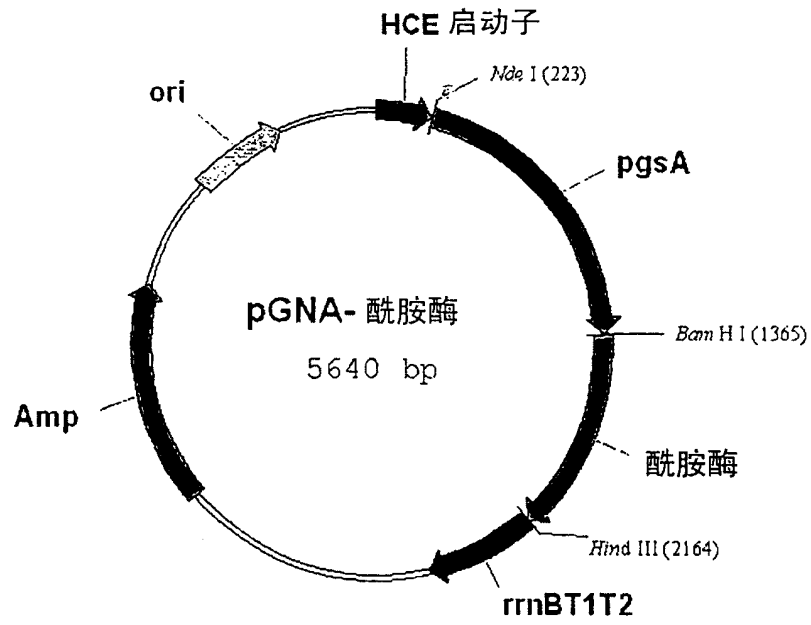


图 23