

[19]中华人民共和国专利局

[11]授权公告号



# [12] 发明专利说明书

CN 1021973C

[21] 专利号 ZL 86101830

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

C12N 15/18

[45]授权公告日 1993年9月1日

[24]颁证日 93.6.20

[21]申请号 86101830.3

[22]申请日 86.2.21

[30]优先权

[32]85.2.22 [33]US [31]704,362

[32]86.2.4 [33]US [31]824,202

[73]专利权人 孟山都公司

地 址 美国密苏里州

[72]发明人 格温·格拉博斯基·克里瓦

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华

C12N 15/64 C12N 15/70 A61K 37/36

说明书页数: 附图页数:

[54]发明名称 有生物活性的蛋白质与其生产的方法

[57]摘要

在细菌中生产具 N-端丙氨酸不具 N-端蛋氨酸的多肽的方法。所表达的 DNA 顺序有丙氨酸密码子, 直接紧靠的至少有一个蛋氨酸密码子, 并供具有基本上与这类天然存在的真核生物蛋白质的各种牛和猪生长激素品种的氨基酸顺序的表达。在另一个重要的实施例中, 本发明提供一类包含一定的含缬氨酸生长激素品种的成分, 它在泌乳的哺乳动物中增加牛奶产量数比用其他相同的亮氨酸生长激素品种成分要大。

## 权利要求书

1.一种在原核生物中生产具有 N-末端丙氨酸的牛生长激素的方法,包括:

为该具有 N-末端丙氨酸的牛生长激素制备一种 DNA 编码顺序,

将该编码顺序插入一种表达载体中,以获得一种基因顺序,该基因顺序包括一个在原核生物中可操作的启动子、一个核糖体结合位点、一个包括在该 DNA 编码顺序直接上游的蛋氨酸密码子的转译起始信号和该 DNA 编码顺序直接下游的转译停止信号,

其特征在于:

所述 DNA 编码顺序包含能有效增加相对于由从 mRNA 来的反转录作用产生的 DNA 的多肽表达水平的、在牛生长激素 N-末端编码部分中核苷酸顺序内的修饰,并包括下列步骤:

将携带该基因顺序的表达载体引入该具有用于产生 N-末端丙氨酸牛生长激素的加工容量的原核生物,

将该原核生物培养,获得该 DNA 的表达和产生该具有 N 末端丙氨酸的生长激素,以及

从该原核生物中回收所说的具有 N-末端的牛生长激素。

2.权利要求 1 的方法,其中原核生物是大肠杆菌。

3.权利要求 1 的方法,其中在所述原核生物中产生的生长激素选自 bGH (A, V) 和 bGH (A, L)。

4.权利要求 1 或 2 的方法,其中对该生长激素的 DNA 顺序编码是对选自 bGH (A, V) 和 bGH (A, L) 的多肽进行的编码。

5.权利要求 1 或 2 的方法,其中所述的生长激素是 bGH (A, V),含有所述引入的表达载体和培养产生所述生长激素的原核生物是 CCTCC: M90036。

6.权利要求 1 或 2 的方法,其中所述的多肽是 bGH (A, L),含有如此引入的表达载体和培养产生所述生长激素的原核生物是 CCTCC: M90034。

7.权利要求 3 的方法,其中所回收的生长激素含有一种基本上与天然存在的 bGH (A, V) 或

bGH (A, L) 相同的氨基酸顺序。

8.一种在原核生物中生产具有 N-末端丙氨酸的猪生长激素的方法,包括:

为该具有 N-末端丙氨酸的猪生长激素制备一种 DNA 编码顺序,

将该编码顺序插入一种表达载体中,以获得一种基因顺序,该基因顺序包括一个在原核生物中可操作的启动子、一个核糖体结合位点、一个包括在该 DNA 编码顺序直接上游的蛋氨酸密码子的转译起始信号和该 DNA 编码顺序直接下游的转译停止信号,

其特征在于:

所述 DNA 编码顺序为具有 N-末端丙氨酸的猪生长激素进行编码,并包含能有效增加相对于由从 mRNA 来的反转录作用产生的 DNA 的多肽表达水平的、在猪生长激素 N-末端编码部分中核苷酸顺序内的修饰,并包括下列步骤:

将携带该基因顺序的表达载体引入该具有用于产生 N-末端丙氨酸猪生长激素的加工容量的原核生物,

将该原核生物培养,获得该 DNA 的表达和产生该具有 N 末端丙氨酸的生长激素,以及

从该原核生物中回收所说的具有 N-末端的猪生长激素。

9.权利要求 8 的方法,其中原核生物是大肠杆菌。

10.权利要求 8 或 9 的方法,其中在所述原核生物中产生的生长激素选自 bGH (A, V)、bGH (A, L) 和 pGH (A)。

11.权利要求 8 或 9 的方法,其中对该生长激素的 DNA 顺序编码是对选自 bGH (A, V)、bGH (A, L) 和 pGH (A) 的多肽进行的编码。

12.权利要求 8 或 9 的方法,其中所述的多肽是 pGH (A),含有如此引入的表达载体和培养产生所述生长激素的原核生物是 CCTCC: M90035。

本发明一种在原核生物里表达异源 PNA 顺序(例如真核生物基因)的方法。在其中一个重要的实施例,本发明指出了在原核生物里生产具有一个 N 端为丙氨酸多肽以及用本方法能够生产各种

N 端为丙氨酸的多肽。也包括能增加牛奶产量大到出人意料程度的一类缬氨酸 bGH (牛生长激素) 品种。

由真核生物和原核生物表达基因, 在基因转录至信使 RNA (mRNA) 以及随之又把这种 mRNA 转译成蛋白质中都具有相同的基本步骤时, 则要应用细胞内的不同组合以控制这些步骤。

此外, 在真核生物里, 许多成熟的蛋白质首先被转译成为前一蛋白质; 即含有与引导顺序或信号顺序融合的成熟蛋白质顺序的多肽。真核生物的信使 RNA (mRNA) 编码整套前一蛋白质, 它们在转译后被加工除去引导顺序以后才成为这种成熟蛋白质的。真核生物细胞装备有把这样前一蛋白质转变为成熟蛋白质的特异加工机制, 原核生物的细胞一般不能识别存在于真核生物的蛋白质里的这种加工处理信号。因此, 如果真核生物信使 RNA (mRNA) 的完整互补 DNA (cDNA) 转录物被用作 DNA 顺序在原核生物里来表达, 那就只发现前一蛋白质而无成熟蛋白质。前一蛋白质在体外转变为成熟蛋白质是有可能的, 但不能没有重要的代价。

在编码成熟蛋白质的 DNA 顺序在原核生物里作成熟蛋白质表达的过程中, 这一顺序将是没有真核的转译作用和通常包含在作引导顺序 DNA 里的转译后加工信号。因此, 基于效能以及由于原核生物的宿主细胞也许不能识别真核生物的信号, 现已证实, 要在原核生物系统里表达所克隆的真核基因或其它异源 DNA 顺序, 最理想的是应用原核生物控制讯号。

“异源 DNA”一词在此定义为核 DNA 至少其有一部分序列不是正常地包含在宿主细胞的染色体组内。异源 DNA 的实例包括, 病毒及真核基因, 基因此段, 等位基因以及合成的 DNA 顺序但不局限这些。“异源蛋白质”或“异源多肽”一词在此定义为一种蛋白质或多肽, 其中至少有一部分氨基酸顺序不是正常地将其密码编在宿主细胞的染色体组里。

原核生物的控制讯号包括一启动子, 它引发转录起始和转译控制讯号包括核糖体结合位点, 转译启动以及转译停止。除了转译停止信号外, 所有这些讯号都必须位于真核基因或其它待表达 DNA 的前面。

技术界已采用一些方法在原核生物里去表达异源 DNA (即真核基因)。其中一个方法是, 把编码终产物蛋白的 DNA 片段与受细菌启动子操纵编码细菌的全部或部分蛋白的 DNA 相连接。这种内生的原核 DNA 也需要有核糖体结合位点及转译启动讯号。这样连接的 DNA 的表达结果产生一种所谓融合蛋白, 它由真核多肽与整个细菌蛋白或部分细菌蛋白组成, 这种真核生物的蛋白质的分离就可以用位点特异酶的或化学的方法在内源的——真核生物的蛋白质融合点上裂解而完成, 或用原核生物对多肽顺序的选择降解而实现。

在细菌中, 与生产真核生物蛋白融合的蛋白质, 有关的出版物包括全欧专利申请 47, 600 (1982, 3, 17 出版) 它涉及融合蛋白与非融合蛋白包括, 牛前——生长激素或牛生长激素, 在其羧基端 (C-) 上带有或在氨基端 (-N) 没有。原核生物蛋白质部分的。英联邦专利申请 GB2, 073, 245A (1981, 10, 14 出版) 论及 bGH 与大肠杆菌 *E. coli*  $\beta$ -乳糖酶 ( $\beta$ -Lactamase) 的融合蛋白质; E. Keshet 等人, 核酸研究, (Nucleic Acid Research) 9: 19-30 (1981) 论及牛生长激素 (bGH) 与大肠杆菌  $\beta$ -乳糖酶的融合蛋白质; 全欧专利申请 95, 361 (1983, 11, 30 出版) 论及融合蛋白质包括: 依次为, 在 N 基端的内源蛋白质, 转译启动信号氨基酸, 肠激酶切割优点以及羧基端 (C-) 上的外源蛋白质 (即生长激素)。然而, 这些融合蛋白质的方法都是繁琐的, 其间在纯化之后还需要进行体外加工处理, 而且达到商品化所需酶的成本过高。

不过, 由于融合的产物似乎能保护终产物异源蛋白质免受细胞内的降解, 因此已成为在原核生物细胞中表达某些真核基因或其它异源 DNA 的一种有吸引力的系统。细菌细胞似乎能识别出在其处产生的某些真核蛋白质是外来的, 因而, 在这些蛋白质合成时或刚合成后就尽快地使之降解。为保护目的而设计的融合蛋白质应用内源多肽顺序放在异源蛋白质的氨基端或羧基端。后者方法的例子见于欧洲专利申请 111, 814 (1984, 6, 27 出版) 其中论及融合蛋白质, 包括一种具有一合成的前一段 (氨基端) 以及在羧基端 (C-) 上有一大肠杆菌 (*E. coli*)  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -galactosidase) 形式的牛生长激素 bHG。它的优越性仍然由于象前

面讨论过那样需要最后从内生多肽切割异源蛋白而受贬。

在另一方法里，转译启动讯号，ATG，受细菌启动子操纵之下，被直接连于编码异源蛋白质（即真核的蛋白质）的DNA顺序之前，该所产生的异源蛋白质在其氨基端（N-）及羧基端（C-）都没有内源蛋白质。虽然由这样构建的基因所产生的蛋白质不需要最后切割来产生期望获得的蛋白质，它们典型的在N端上总会有蛋氨酸（某些情况下是甲酰蛋氨酸），因为ATG启动讯号本身也是蛋氨酸密码子。因此，除非所期望的成熟蛋白质以一蛋氨酸开始否则这种蛋白质将一在氨基端（N-）被包含有蛋氨酸残基在内的基团取代。

这样基团结构的例子包括Guarente等人，细胞（Cell）（1980）20：543-553其中具有N基端为缬氨酸的家兔 $\beta$ -球蛋白基因（ $\beta$ -globin gene）是应用刚叙述的基因结构在大肠杆菌（E.coli）里表达的。研究者发现，有鉴于“在家兔 $\beta$ -球蛋白里没有氨基端的蛋氨酸，且发现亮氨酸位于3, 14, 28, 31, 32……位上。而在标记的蛋白质里则发现亮氨酸在4, 15, 29, 32和33位上，还发现有一蛋氨酸在1位上。这一结果表明，该蛋白质是家兔 $\beta$ -球蛋白加上一个在大肠杆菌上未除去的氨基端的蛋氨酸。同上文献的546-547。

另一例子是与应用上述基因结构在细菌里生产生长激素有关。Schoncr等人Proc.Natl Acad. Scie U.S.A（1984）81：5403-5407叙述了在细菌里生产牛生长激素（bGH）一种高水平的表达系统。它导致产生出一种N-甲硫氨酰bGH；它是一种氨基酸顺序与天然存在的牛生长激素品种相似。在其N端加有蛋氨酸的化合物在细菌里生产在N端加蛋氨酸到各种生长激素品种里去又被再一次在全欧专利申请103, 395（1984, 3, 21出版）里讨论，而全欧专利申请75, 444（1983, 3, 30出版）论述了bGH和Seeburg et al.，在DNA（1983）2：37-45论述了bGH及猪的生长激素（“PGH”）。

把一个N端蛋氨酸加到天然蛋白的N端去由于多种原因也许是不太理想的。首先，在一种有机体里，它的内源蛋白质没有为N一端蛋氨酸的，这种蛋氨酸就有可能趋向于造成该蛋白质呈抗原性。其次，把蛋氨酸加到蛋白质的N端部分对它

的生物活性及它的物理学特性会有非所期望的影响。其三，蛋白质的这种改变形式会阻碍在测定天然蛋白质结构与功能相互关系上的科学尝试。再者，一种生物合成的蛋白质，使其结构尽可能地与天然的接近这对在请求政府批准医药的或兽医的申请时也许是有利的。

象细菌一样的原核生物，无论蛋白质正在产生或产生之后，从蛋白质上除去N端蛋氨酸的能力，一直是相当有趣的课题。例如，Waller, J. Mol.Biol.（1963）7：483-496考查了“可除的”N-端氨基酸成分，以及从无细胞的大肠杆菌E.coli抽提液得到的核糖体蛋白，以及全欧专利申请103, 395（1984, 3, 21出版）公开了从大肠杆菌E.coli产生的真核蛋白质去除N端蛋氨酸。特别的是，蛋氨酸从二个在细菌上生产的牛生长激素的一个上除去，该二个牛生长激素都会有丝氨酸残基紧接的是原先就存在的N端蛋氨酸。然而在这些研究里应用的基因结构包含有合成的编码5'-蛋氨酸-亮氨酸-亮氨酸-3'的启动顺序，它直接地插至紧接在牛生长激素编码顺序的5'端，在这bGH编码顺序里编码前面4个或9个天然存在的氨基酸的碱基已被删去。因此，在大肠杆菌里产生的终产物蛋白质是一种非天然存在的蛋白质。英联邦专利申请2,073,245A（1981,10,4出版）公开在成熟的bGH蛋白质里的丙氨酸被蛋氨酸、脯氨酸取代时，“蛋氨酸就能被细菌加工而成为用脯氨酸（Pro），苯丙氨酸（Phe），丙氨酸（Ala）脯氨酸（Pro）为一氨基酸顺序开始的修饰过的牛生长激素（bGH）。

因此，需要发展一种既经济而有预见性的在诸为细菌样的微生物里生产不带N基端蛋氨酸的异源（即真核生物的）蛋白质的方法。明确的说，人们特别希望发展一种方法，依靠它可以在细菌里生产这类蛋白质而不需要在体外进行发酵后加工处理，而且它不含有外加的非天然存在的N-端蛋氨酸。

生长激素（又称somatotropins）是由垂体细胞产生或分泌的多肽，大多数具有专一的活性。它的作用除了促进骨骼生长外，还可对包括激发泌乳增加从胰腺释放胰岛素和增加糖源分泌等代谢过程的变异型发生影响，而且它们还起脂类调动的的作用。例如，给牛施用外源生长激素（bGH）证明可增加产奶量，饲养率和/或生长率，可降低肥育

时间和增加瘦肉比率。然而，还没有完全弄清这种激素是怎样起到这么多效应的。

涉及人类生长激素 (hGH) 的工作已开始。例如人类垂体腺所分泌激素不是一个单一分子的实体而是多肽的混合物。不同类型的人类生长激素 hGH 的分级分离导致制成某些既不致糖尿病也不起脂解作用的人类生长激素 (hGH) 片断。

同样地，牛生长激素 bGH 是有多种类型在牛中产生的。明确地说，产生了四种类型的 bGH，它们的差异是在蛋白质的两个位点上。由于在讯号肽 (引导) 顺序的除去上可能出现错误，所以 N 端氨基酸就会不同，因此成熟蛋白质就会用 NH<sub>2</sub>-Phe-pro 开头，或者用 NH<sub>2</sub>-aLa-phe-pro 开头。此外，在氨基酸 126 位处有一变异性或是亮氨酸或是缬氨酸，这是显然由于存在于牛种群里的一个等位基因的变异而引起的。Wallis (1969) FEBS Letters 3: 118-120; Fellows 和 Rogol (1969) J.Biol.Chem.244: 1567-1575; Fernandez 等人 (1971) FEBS Letters 18: 53-54, Fellows (1973) 在 Recent Progress in Hormone Research 29: 404 的个人评述; Santome (1973) Eur.J.Biochem.37: 164-170; Grat 和 Li (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 56: 168-176。垂体 bGH 的 4 种分子型式 (种) 命名并缩写如下:

Abbr.缩写	结 构
bGH(L)	NH <sub>2</sub> -phe(1)-pro(2)···Leu(126)··· COOH
bGH(A,L)	NH <sub>2</sub> -ala(-1)-phe(1)-pro(2)···Leu (126)···COOH
bGH(V)	NH <sub>2</sub> -phe(1)-pro(2)···Val(126)··· COOH
bGH(A,V)	NH <sub>2</sub> -ala(-1)-phe(1)-pro(2)···Val (126)···COOH

bGH(A, V) 和 bGH (V) 品种这里有时合称“缬氨酸等位的 bGH 品种”或“缬氨酸品种”。同样，bGH (A, L) 和 bGH (L) 品种这里有时合称“亮氨酸等位 bGH 品种”或“亮氨酸 bGH 品种”。在 bGH 蛋白中缩写如上的氨基酸旁边的号码，只是为了鉴定和参照的目的。

Mills 等人 (1970) J. Biol. Chem., 245: 3407-3415, 在各个 N 端显出不均一性的猪生长激素 pGH 同样地鉴定出两种溴化氰源能切的片段。

确切地说，其中一个片段含有-N 端苯丙氨酸而另一个有额外的 N 端丙氨酸。猪生长激素 (pGH) 的这些分子型式在此分别地缩写为 pGH (p) 和 pGH (A)。

全部 DNA 编码顺序以及与 bGH (L) 及 pGH (p) 的对应氨基酸顺序已由 Seebvirg 等人在 DNA (1983) 2: 37-45 上发表。在此它被编入参考文献。

已发现单个牛的垂体细胞通常都至少含有 bGH (A,L) 和 bGH (L) 的混合物或 bGH (A,V) 和 bGH (V) 的混合物。

在培养的脑垂体细胞中所产生 bGH 蛋白的 N 端分析说明近 50:50 分子混合物中含有 N-端苯丙氨酸 (Phe) 或 N-端丙氨酸 (ala) 从许多牛的垂体制成的在商业上有用的制剂通常包含有全部 4 种分子型的垂体牛生长激素。bGH 而且，已有报告从腺体中收集得到的 bGH 制品中大约 30% 在 126 位氨基酸的亮氨酸已由缬氨酸代替 (Fernandez 等) (1971) FEBS Letters 18: 53-54 用来分离已知 4 种 bGH 型的标准生化方法不容许按商业规模生产当中的每一品种或任一种类型。这些牛生长激素 bGH 的 4 种类型的不同生物活性将会被充分研究并用基本上没有其它三种型中一种或多种以及/或其他牛源蛋白方法制成这类型中一种有商业效益的类型在这里应用“基本上纯的”术语是指基本上没有在自然环境中或来源中与其结合的蛋白或其他物质。为了那些及其它目的，本发明的目标包括发明一种方法，借助它至少能够方便地生产那些牛生长激素单一型中的一些型。

据此，本发明的一个目的是在原核生物里生产真核的或其它异源的不具 N 端蛋氨酸残基的多肽。

本发明的另一目的是在原核生物里生产真核的或其它异源的多肽，它是不需要在体外进行加工来除去其 N 端的蛋氨酸。

本发明还有另一目的是提供一种方法以便在原核生物里生产真核的或其它异源的多肽它不需在体外进行加工就具有一 N 端丙氨酸。

本发明的一目的是在原核生物里生产真核的或其它异源的多肽，它具有的氨基酸顺序基本上与没有 N 端蛋氨酸的天然存在的蛋白质相同。

本发明更深远的目的是提供一种在原核生物里

生产多肽的方法，该多肽具有在成熟真核多肽里例如在 bGH (A.L) bGH (A.V) 及 pGH (A) 中发现的氨基酸顺序。

本发明还有另外一个更深远的目的是提供实际上各自地不含牛或猪来的蛋白质的 bGH (A, L) bGH (A.V) 或 PGH (A)。

本发明还有一个深远的目的是提供一类能在奶牛中增加牛奶产量到很有用的程序的 bGH 品种。用本发明的方法生产的 bGH 多肽提供了一潜在的象增加产奶量、生长率以及 / 或者饲养率那样的生长激素活性手段。

本发明的这些或其它的目的将会从本发明随后的一般的和详细的说明而更加明白。

在一个实施方案中，本发明的目的是通过用细菌生产一种具有 N 端为丙氨酸能在所选择的细菌里促使染色体组 DNA 表达的异源多肽的方法而达到的。所说的 DNA 含有邻接蛋氨酸的一个约到三个密码子包括转译启动讯号，紧接的是所说多肽的密码子，后面接着的是转译停止信号密码子，而且还回收在上述细菌内产生具有 N 端丙氨酸的终产物的异源多肽。

在另一实施例中，本发明提供了一种生产具有包含在所选择过的细菌里促使染色体组 DNA 表达的 N 端丙氨酸的异源多肽的方法，所说的 DNA 包含有转译起始讯号 / 蛋氨酸密码子，其后接有所说的多肽密码子，接着为转译停止信号密码子，而且回收在所说细菌内所产生的具有 N 端丙氨酸的终产物—异源多肽。

仍是在另一实施例中，本发明提供出一种在细菌里制备氨基酸顺序基本上与天然存在的真核多肽相同的异源多肽的方法。

在另一实施例中，本发明可提供包括象 bGH (A.L)，bGH (A.V)，PGH (A) 这样的生长激素以及 bGH (A, L) 和 bGH (A.V) 的混合物中各种组分，它们实际上各自没有牛源或猪源的或其它生长激素品种的多肽。

仍是在另一个实施例中发现含有缬氨酸一类 bGH 品种的生化物其在奶牛中增加牛奶产量的程度比其他相同的亮氨酸 bGH 品种或 bGH (A, L) 都大。在一个较好的实施例中能达到这样程度的增加牛奶产量的生化物基本上是由提供的纯缬氨酸 bGH 品种。其它的实施例包括各种基因，

DNA 运载体和在前述方法上有用的转化过的细菌，以及利用前述的组分以增加牛以及 / 或猪泌乳，成年前生长，以及 / 或饲养转化率的某些方法。

在下列图示里，镶线框代表细菌启动子的编码顺序，黑框表示异源 DNA 编码顺序，线条表示附加的如所标明的 DNA 编码顺序，而定向箭头表示从 5' 到 3' 的 DNA 编码顺序方位。有关的限制性核酸酶内切位点亦表示出。这样标出的 DNA 区段只为图解示意的目的而不是按比例尺绘制的。

图 1. M13mp8 / xba I 的构建图包含在 Sma I 切点上插入一个 xba I 酶切片段的 M13mp8 运载体。

图 2. M13mp8 / BGH ex-1 的构建图，包括带有 bGH (L) DNA 编码顺序的 M13mp8 / xba T

图 3. 以寡聚核苷酸导致一特异位点一诱发生成的 bGH (A.L) DNA 编码顺序的创造。

图 4. 以寡聚核苷酸导致特异位点诱发的 bGH (A.V) DNA 编码顺序的创造。

图 5. PMON3209 表达运载体的构建，其上在 bGH (L) DNA 编码顺序中带有 bGH (A.L) DNA 编码顺序的 PBGHex-1。

图 6. PMON3215 表达运载体的构建，其上的 bGH (L) DNA 编码顺序中带有 bGH (A.V) DNA 编码顺序的 PBGHex-1。

图 7. M13mp9 / PGHex-1 的构建，其上带有 --PGH (P) DNA 编码顺序的 M13mp9。

图 8. 由寡聚核苷酸导致特异位点一诱发的 --PGH (A) DNA 编码顺序的创造。

图 9. 含有 PBGHex-1 的 PBGHex-1\* 的构建图其中位于 Ptrp DNA 编码顺序 5' 端上游的 ECORI 限制性内切位点已被除去。

图 10. PMON3213 表达运载体的构建图，它含有有用 PPGH (A) DNA 编码顺序代替 bGH (L) DNA 顺序的 PBGHex-1\*。

本发明提供一种在原核生物里生产象真核生物 (即哺乳动物或鸟类) 蛋白质那样的具有 N 端丙氨酸的异源多肽的方法。因此产生的多肽 N 端不具蛋氨酸，因而可省去在生产该种 N 端具蛋氨酸的多肽时所需的体外加工。持续生产这样一种在基因编码顺序中缺 N 端蛋氨酸的多肽是一项崭新的以及完全设想到的成果。

本发明提供一种有价值的方法以生产基本上纯的具有 N 端丙氨酸的蛋白质。这样的蛋白质范围较广，包括特定牛生长激素品种和猪生长激素品种及其变异型，植物蛋白核酮糖-1, 5-磷酸二氢羧化酶小亚基，谷胱甘肽 S-转移酶，热休克蛋白 70，本发明对期望生产具有 N 末端丙氨酸而不是蛋氨酸其他多肽的生产亦是有用的。使 N 端丙氨酸比 N 端蛋氨酸更能合乎需要的是因为在多肽中，N-丙酰氨型的多肽也许致免疫性较少，或者可能有不同的物理性和修饰了的生物活性。

在本发明的例子里，其中基本上纯的 bGH 或 PGH 品种是由细菌细胞生产的除去 N 末端蛋氨酸的证据和技术，显然还缺乏。事实上，由细菌细胞表达 bGH 的所有报导其中有关 N 端的包括与天然存在的 bGHN 端氨基酸顺序相同的都报告 N 端蛋氨酸的存在。在 Seeburg 等人，DNA (1983) 2 : 37-45 中 44 页里报导 bGH 即 bGH (L) 的 N 端苯丙氨酸品种的基因顺序是审慎地被选择在大肠杆菌表达，部分原因是想避免予想中的第二个疏水氨基酸（蛋氨酸）加到其它 bGH 品种即 bGH (A) 的疏水的 N 端丙氨酸上去。因此有用的研究至今教导在细菌上生产 bGH 品种要保留这种 N 端蛋氨酸。不管这些报导如何，我根据上面讨论的理由认定，有必要生产两种 bGH 品种 bGH (A, L) 和 bGH (A, V) 中任一种以及 PGH 的 bGH (A) 品种，然而，企图在细菌里生产这些生长激素品种是带着产生的多肽将含有 N 端蛋氨酸的希望进行的。

正如在本发明例子里详细说明一样，我把在细菌里生产 bGH (A, L), bGH (A, V) 及 PGH (A) 的方法简述如下：前面所说蛋白质的 DNA 编码顺序，图 3, 4 及 8 所示它是由含 N 端苯丙氨酸的牛和猪生长激素品种编码顺序的 DNA 往用寡聚核苷酸——导致位点特导诱变而构建的。此后，这种 bGH (A, L), bGH (A, V) 及 pGH (A) 的编码顺序插入到表达运载体，这样所包含最后的基因顺序依次为启动子，核糖体结合位点，IATG 启动 / 蛋氨酸密码子它紧接在 bGH (A, L), bGH (A, V) 或 pGH (A) 的任一种密码顺序 DNA 上以及一个转译停止密码子。大肠杆菌随后被带有我们所期望得到的基因顺序的特定表达运载体感染，而且使它在可让这种所期望的异源

DNA 表达并能生产这种期望的蛋白质的条件下进行培养。这样生产的蛋白质随后进行顺序分析及检定它们适当的生物活性。

因此，人们在此发现当异源多肽含有的 N-丙酰氨密码子紧跟起始讯号 / 蛋氨酸密码子的 DNA 顺序表达时，从原核生物有机体回收的蛋白质，在其 N 端上实际上是丙氨酸而不是蛋氨酸。人们相信，当丙氨酸密码子被直接前移到约三个邻接蛋氨酸的密码子，其中包含编码所期望得到多肽产物的信使 RNA (mRNA) 转译的启动信号时就获得相似的结果。例如用含有那种转译启动信号和期望得到多肽产物的密码子的 DNA 就能够包含任何合适地为蛋氨酸丙氨酸 (met ala), 蛋氨酸蛋氨酸丙氨酸 (met met ala), 蛋氨酸蛋氨酸蛋氨酸丙氨酸 (met met met ala) 成其它任何动能相等物编码的顺序。

在这里把 N 丙氨酸多肽定义为其氨基端有-丙氨酸的一种多肽。然而申请人不希望受以下的机制原理所约束，人们相信转译之后，如果下一个氨基酸是丙氨酸或其它具有能使容易地除去 N-蛋氨酸的，相似特性的氨基酸（即极性或疏水性）多肽上 N-端的蛋氨酸就可被原核生物用酶除去。人们进一步相信，当上述 N-端的蛋氨酸是直接地连有一丙氨酸，则许多原核生物是能从异源的以及 / 或内生的多肽上除去 N-端的蛋氨酸。

这些原核生物（即熟知的以及通过公认的象 ATCC 或其它类似微生物保存机关获得对公众有益的各种细菌）包括大肠杆菌，但相信不限于大肠杆菌 E.coli 及其不同的品系。事实上期望的是：对能产生具有 N-端丙氨酸，DNA 编码顺序开始约为 1 个到 3 个蛋氨酸密码子，紧接的是丙氨酸密码子之多肽的任何原核生物，这里公开发明的实际可能是有用的。在商业上或其它方面有用的原核生物可以用插入一个基因到所说有机体的基因组中，而根据他们生产这样的 N-丙氨酸多肽的能力而被筛选到，插入的基因有序地包括一个在上述有机体起作用的启动子，编码核糖体结合位点的 DNA，从约 1 个到 3 个邻接的蛋氨酸密码子，其中包括一个转译起始信号紧接其后有异源的 N-丙氨酸多肽密码子及一转译停止讯号，此后，促使所说基因的表达从而测定所产生的异源多肽的 N-端的氨基酸的顺序。在体内能产生这类异源 N 丙酰氨多肽

的原核生物被发现时，按这里专利公开和权利要求的目的看，则此原核生物可被列入“选中”。

在本发明较佳的实施例中，大肠杆菌 K<sub>12</sub> 株的三种不同分离株，全都存放在美国马里兰州 (Maryland) 洛克维兰 (Rockville) 标准菌种保存库并已标有 ATcc 39936, 53010, 及 53009 的登记号。并注明上述 N 端的蛋氨酸后紧接丙氨酸时有除去 N 端蛋氨酸的能力。

本发明由于它提供在原核生物里生产具有 N 端丙氨酸的异源多肽的方法而有价值。

在其中一个较佳的具体实施例中，本发明的方法是用来生产两种 bGH 品种，bGH (A, L) 及 bGH (A, V) 以及一种 PGH 品种 pGH (A) 它们分别不带有牛的或猪的蛋白质以及 / 或其他 bGH 或 pGH 品种。准确的说，本方法可为生产 bGH (A, L), bGH (A, V) 或 pGH (A), 作单一产种作准备。生产单一而氨基酸顺序与天然存在的生长激素相同的 bGH 品种或 pGH 品种的能力对测定每个 bGH 和 PGH 的已知品种的精确生物反应性是相当重要，bGH 和 PGH 的很多潜在作用，大体上如前所引。事实上，已发现服用两种 N-丙氨酰 bGH 品种中任一种都会产生例如象增加牛奶产量一样的这样 bGH 功能的可能性。此外，已发现的是给奶牛喂食按本发明生产的 bGH (A, V) 增加泌乳的剂量它的产奶量比用相似方法生产的 bGH (A, L) 在统计上有更大的增加 ( $P < 0.05$ )。至今，在泌乳的哺乳动物里，还无教知有增加牛奶产量比较有效的特异 bGH 类型 (品种)。而且在体内或体外还无先有成果可资说明在 bGH 品种间将能观察到在生物活性上的差异。因此，在牛奶产量上比亮氨酸等位 bGH 品种增加大的缬氨酸等位 bGH 品种的发现是既惊人又出乎意料。这个发现进一步说明 bGH 品种相对有效性的差异在增强其他生长激素特性如增高饲料效益和生长刺激也能同样地被确定。因此应用本发明的方法可以在细菌里生产至少二种垂体 bGH 分子型基本上是纯型，和 / 或用其它有用的技术，现在也能生产在达到特异生长激素诱导反应上最有效的 bGH 品种。这样有用的其它技术，包括，但不限于这些，化学合成整个 bGH 蛋白或它的片段，和 / 或用已知的重组 DNA 技术在其他微生物如酵母或在哺乳类细胞中进行生产。

此外，一旦测定了每种天然存在品种的生物活性，就得考虑能否生产每个这样品种的多肽变异型，它会进一步增加它们的生长激素的活性。因此，人们期望用核苷酸或用氨基酸删减取代以及 / 或加入来生产生长激素变异型将会提供在此公开 bGH 组成的各种有用的等值物。这类变异型包括一种 bGH 的交换型，其中交换过程包括把一个蛋氨酸加到氨基端去，用遗传上转化过的细菌所生产的这种变异型，亦已发现当按增加泌乳剂量服用时，奶牛产奶量增至惊人的程度。

而且按照服用这个 bGH (V) 变种在泌乳上所观察到的增加程度发现比依照服用其他在 126 位氨基酸上为亮氨酸的相同变种所观察到的泌乳可测得的增加程度更大。

但申请者不希望拘束于下列理论的机制，该理论机制表明在 126 位亮氨酸被缬氨酸代替，可大大增加这些生长激素蛋白的生物有效性或生物反应性。明确地说，生长激素蛋白用 X-线完成的晶体学表明，所说蛋白上大约 90 个氨基酸到 135 个氨基酸组成了相对的柔性区，其它蛋白的研究已说明柔性区常已含有生物活性位点 (即与生物受体相互作用的位点或 / 和同一蛋白的其他部位以达到生物活性型)。因此，可以预见的是，bGH (A, V) 的另外变株，它包括在上述柔性区内氨基酸代替、删减、增加和 / 或倒位的变株，和 / 或在这个区域之外，但在泌乳增加 (即牛奶生产) 测度上有相同结果而比其他同样的亮氨酸 bGH 品种或 bGH (A, L) 要大的变株，都能够被制作。例如改变 126 位或 126 位左右的氨基酸，包括用更亲水的和 / 或更小的氨基酸 (指与亮氨酸相比) 去代替以提供在牛奶产量上所说的增加到不能忍受程度前不减小。

进一步可以预见的是含 N 端 phe, 或 N 端 ala-1 的缬氨酸 bGH 品种，当给奶牛服用时能够达到上述增加牛奶产量。也可以预见的是，变化其氨基末端 (即 met-1)，它实质上与天然存在 bGH 的 N 端相同将不会干扰缬氨酸 bGH 品种增加牛奶产量比其他相同亮氨酸 bGH 品种或 bGH (A, L) 增加程度大到不能忍受程度的能力。还进一步可以预见到，其中缬氨酸 bGH 品种浓度，依据所有 bGH 在组成上的重量计实质上比在垂体 bGH 制品中所收集的缬氨酸 bGH 品种浓度大，因而将

会达到上述增产牛奶的结果。

在其广泛实施例中的一个实施例中，本发明细致地应用 DNA 重组体技术直接在原核生物里生产异源多肽。因此，发明的叙述是以所应用的重组 DNA 工艺学的技术基础知识为先需条件，它包括编码多肽的 DNA 顺序的分离与克隆 DNA 顺序的重排与交换，克隆了的或经修饰过的 DNA 顺序在转化过微生物中的表达。这样的技术已处于工艺技术范畴之内（见，例如，分子克隆化实验手册 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Maniatis, Fritsch & Sambrook eds, 1982）

#### 异源 DNA 的分离以及 / 或构建

在本发明的一个实施例里，已被选得或分离到为在原核生物里待生产想要得到的编码异源多肽的 DNA 顺序，或是说，编码它的 DNA 顺序已构建或已被化学合成。在许多重要的实施例中，这种多肽是一种真核生物蛋白质。如果这种多肽不大而且已知它的完整氨基酸顺序，一个合成的 DNA 分子或编码多肽的顺序就能够被构建。如果这种多肽的氨基酸顺序不知道，或是它或过大而实际上不能合成相应的 DNA 顺序，则可从表达这种多肽组织或细胞里获得的相应信使 RNA，用它的逆转录能制备一个互补 DNA (cDNA) 顺序。例如，在本发明的一个实施例里，bGH 的顺序能够用 Goodman 等人，在酶学方法 (*Methods in Enzymology*) 68 : 75-90 (1979) 所述的目前常用的步骤从牛的重体获得。另一方面，一个互补的 DNA (cDNA) 顺序能够用以一适当的探针从生产 GH 动物基因库中分离得到的染色体组 DNA 转化细胞再从中分离出信使 RNA (mRNA) 中制备。染色体组 DNA 亦可在不同的运载体系统进行修饰，使能在原核生物里表达。这些技术皆属工艺技术范畴。

一旦获得想要的多肽密码子的异源 DNA 顺序，有可能在该分子的核酸顺序上作一修饰。例如，如果这一分子已从 mRNA 模板逆转录产生，它往往含有至少一部分是编码前——蛋白质的引导顺序的 DNA。因此，必须除去想得到的蛋白质第一个密码子前面的所有带引导顺序的 DNA。在某些情况下，如果这一顺序还未具有-N-端的丙氨酸密码子就有必要在编码想要得的蛋白质顺序引起点加进或替代一个丙氨酸密码子。随后在上游引入一转译启动信号（它亦是一蛋氨酸密码子）而且直

接紧靠着丙氨酸密码子。虽然这个起始信号 / 蛋氨酸密码子通常会（而且较常地）是核苷酸顺序 ATG，但 GTG 顺序偶然也能用作启动信号 / 蛋氨酸密码子。此外在本发明的方法内，把出现多于一个蛋氨酸密码子，即 2, 3 或可能更多的邻接蛋氨酸密码子都理解为组建功能等值。

如果还未出现，也至少有一转译停止信号必须引到为羧基端氨基酸而编的密码子之后。转译停止信号的例子包括脱氧核苷酸三联体 TAA, TGA, 及 TAG。因此，从本质上看，重组体 DNA 技术是用来组建重组体 DNA 顺序的，这些顺序按序地包括一个转译启动信号 / 蛋氨酸密码子，具有紧靠起始信号 N-端丙氨酸密码子期望得到的多肽的密码子以及至少一个靠着为 C-端氨基酸密码子的转译停止信号。

已发现在 mRNA 内由氢键结合将两个互补的核苷酸系列形成二级结构能够阻碍信使 RNA 的有效表达。消除这些互补的顺序，特别是编码 N-端的分子的那段顺序，有利于将核糖体结合到 mRNA 上，从而增加表达级别。因此，有可能用氨基酸相同的密码子但包含不同的核苷酸三联体去取代那些参与形成二级结构的密码子。参阅全欧专利 75, 444 (1983, 3, 30 出版); Seeburg 等人, (1983) DNA2 : 37-45 和 shoner 等人 (1984). *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 81.5403-5407.

组建异源 DNA 顺序的其他方法对熟悉本行技术者们是很清楚的。例如，如果 DNA 分子合用的话，它编码的多肽是以  $\text{NH}_2\text{-met-X-y}$  的 N-端结构表达的，式中的 X 是除丙氨酸外的任一种氨基酸，一个丙氨酸密码子之间。另一方面，X 密码子可以删去，而用丙氨酸密码子代而插在其中。因此，在本发明的工艺过程里，将会产生 N-端分别具有  $\text{NH}_2\text{-ala-X-y}$  或  $\text{NH}_2\text{-ala-y}\dots\dots$  的蛋白质。

同样的，也许会对一个已知基因顺序的任一氨基酸密码子进行删减，加入以及 / 或取代，所以在本发明的工艺过程里就会表达出变异的多肽。一个“变异的”多肽在这里定义为与已知多肽天然存在的氨基酸顺序相比，有独个或多个氨基酸被删去，取代或加进。这样的变异实例包括在，但不局限在 met-bGH (L) 及 met-bGH (D) 型，这些变异品种的 bGH 的氨基酸顺序除了在 N-端出现一个

额外的蛋氨酸之外分别与 bGH (L) 和 bGH (V) 相同, 都是用牛的垂体体细胞生产的。被构建成的这些变异的多肽的氨基酸顺序具有与天然存在的多肽基本相似, 只要其生物活性不会减到不允许的程度。为达到增加积留, 提高蛋白质的稳定性, 便于纯化多肽以及 / 或使生物活性达到最适的程度, 创建与表达变异多肽是有希望的。

上述编码期望得到的多肽的 DNA 分子的修饰能够使用限制性酶类, 外切核酸酶, 内切核酸酶等等的已知技术来完成。寡聚核苷酸一导致位点特导诱变的一般技术亦能在 DNA 分子的结构或顺序上起到上述修饰的作用。而这些一般性技术是熟知本行技术的人所知道的。参阅例如, Zoller 及 Smith (1982) *Nuc. Acids Res.* 10: 6487-6500; Zoller 及 Smith, (1983) *Meth. Enzymol.* 100: 468: 500; Norris 等人, (1983) *Nuc. Acids Res.* 11: 5103-5112.

按照重组体 DNA 技术, 一旦获得想要得到的异源 DNA 顺序之后, 就要将该顺序插入到一个合适的能提供复制这一 DNA 顺序的克隆载体里。任何合适的克隆载体都可采用, 但最好是采用那些含有标记功能的克隆载体, 它包括 colEL, Hershfield 等人, *Proc Nat'l, Acad, Scio V.S.A* (1974) 71: 3455; pBR322, Bolivar 等人; *Gene* (1977) 2: 95, pBR325, Soberon 等人; *Gene* (1978) 4: 121; 以及 p<sub>kcT</sub>, Rao 等人, *Gene* (1979) 7: 79; 以及大肠杆菌噬菌体载体, 它包括 Charon  $\lambda$  L47.1 [Loenen 等人, *Gene* (1980) 10: 249]; 以及 M13mp8 和 M13mp9 [Messing 等人, *Gene* (1982) 19: 269]。把上述 DNA 顺序插到一克隆载体里去生成一个重组体的载体的一般技术是属于工艺技术范围。参阅, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Maniatis, Fritsch 和 Sambrook, eds, (1982)。

一旦获得期望得到的异源体 DNA 顺序的多重拷贝, 这些顺序就可按后面较详细的说明那样从重组的载体里移去这顺序, 并把它插入到为生产和分离期望得到的异源蛋白的表达系统里。在将这些 DNA 顺序插入到一个表达载体之前或之后可以用工艺熟练者所知的方法对异源体 DNA 顺序进行修饰。

在本发明的一些例子里, Mesring 等人在

*Gene* (1982) 19: 268 所说的, 修饰成含有一个 XbaI 位点的 M13mp8 如图 2 所示, 与 M13mp9 一道被选为克隆载体, 参考文献同上一。M13mp8 及 M13mp9 集合为: M13mp 载体”其双链 (ds) 或复制型 (RF) 及单链 (ss) DNA 型都可作分离用的重组体载体。RFDNA 重组体载体的分离, 如图 5, 6 及 10 所示便于随后把已复制了的希望得到的 DNA 顺序插到表达载体上。另一方面, 分离这些单链型重组体载体, 对在合适的 5'到 3'表达位置上含有的所期望得到 DNA 顺序的重组体载体的分离, 以及如图 3, 4 和 8 所示对用寡聚核苷酸导致特异位点诱变一类的技术所修饰的任何 DNA 顺序的创建都是方便的。此外, M13 载体能容纳长度是以克隆一个典型而又完整的真核基因顺序高达四千对碱基 (4Kb) 的 DNA 片段或基因。

用于 M13 载体里的功能标记, 正如 Messing 等人在 *Gene* (1982) 19: 269 所述, 它涉及与  $\beta$ -半乳糖苷酶有关的酶。确切地说, 期望得到的异源 DNA 顺序被插到至 M13 载体里的 Lac I 基因片段上。这样它就破坏了在 M13 载体上 IncE 基因片段与寄主 (即大肠杆菌 JM101) 细胞染色体上部分 IncE 基因片段间的正常互补作用, 所以, 所论的宿主不能再代谢在细菌培养基里存在的乳糖。用无任何外来基因顺序插入并承受有 lacZ 基因片段的 M13 载体去侵染的大肠杆菌 *E. coli*, 如果菌是在含有 0.8% (W/V) 胰蛋白胨, 0.5% (W/V) 酵母提取液, 0.5% (W/V) 氯化钠以及一种  $\beta$ -半乳糖苷酶指示剂配成的 1XYT 培养基里生长, 是能够代谢存在于细菌培养基里的乳糖并产生出特徵性的蓝色的噬菌斑。用在 M13lacZ 基因片段上已插入有异源 DNA 顺序的重组体载体感染的大肠杆菌 *E. coli*, 如果仍是在上述培养基生长时, 基噬菌斑的颜色就是透明的或无色的。据此, 异源体 DNA 顺序插到这些克隆载体的阳性反应可根据得重组体载体感染大肠杆菌寄主细胞后形成的无色噬菌斑进行鉴定。把编码 bGH (L) 及 pGH (P) 的 DNA 顺序插入到 M13 载体分别如图 2 和 9 所示。

在一个优选的实施例中, 象在 Seeburg 等人, *DNA* (1983) 2 (1) : 37-45 所作一样分别在细菌质粒 pBGHex-1 及 pPGHex-1 上的 bGH (L)

及 pGH (P) DNA 编码顺序是通过位点专一的限制性内切核酸酶切割方法从这些质粒分离得到的。应该注意的是, 用细菌质粒 pBGHex-1 或 pPGHex-1, 分别对细菌转化, 随后又分别在容许表达 bGH (L) 和 PGH (P) 密码顺序条件下进行培养可分别产生带有 N-端蛋氨酸 (即 met-bGH (L) 或 met-PGH (P)) 的促生长激素。然后分别地把各个顺序插入到如图 2 和 7 所学的经修饰了的 M13mp8 运载体 (M13mp8 / XbaI) 和 M13mp9 载体的复制型 DNA (RFDNA) 上。把期望得到的 bGH (L) 及 pGH (P) DNA 顺序插入到 M13mp8 / XbaI 及 M13mp9RFDNA 是通过位点专一的限制性内切核酸酶切割进行确定, 仍分别如图 2 和 7 所示。随后, 如 Messing 等人所述那样, 见酶学方法 (Methods in Enzymology 1983) 101: 20 用这些重组运载体中的一些运载体去感染大肠杆菌 Jml01 Messing 等人, 在 Gene (1982) 19: 269 上所说那样分离重组体运载体的单链 DNA (SSDNA) Messing 等人所引这些文献的有关部分在此并作参考文献。

一旦分离到这种重组体运载体的单链 DNA (SSDNA) 可通过寡聚核苷酸导致专一位点诱发进行修饰而创建 bGH (A, V), bGH (A, L), bGH (V) 及 PGH (A) 的 DNA 编码顺序。确切地说, bGH (L) 是用加一个丙氨酸密码子进行修饰, 例如, 在 bGH (L) 编码顺序的 5'-末端上加 GCC (如图 3 所示)。可以预见的是编码丙氨酸 4 个密码子中的任何一个都可以加入为得促生长激素最好产量而最好的编码丙氨酸密码子在这里表达系统中应用的是 GCC。加入一个丙氨酸密码子而创建的 bGH (A, L) 编码顺序可借用 Sang-er 等人 1) Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A. (1977) 74: 5463 的方法对整个 bGH (A, L) 的 DNA 顺序或其 5'-末端的 DNA 顺序分析而进行确定。

bGH (A, V) 编码顺序是通过 bGH (A, L) 密码顺序的寡聚核苷酸导致特异位点诱发而生成的如图 4 所示。或是用 127 位氨基酸 [在 bGH (A, L) 是如此] 即亮氨酸, 密码子变为缬氨酸密码子, 例如转变成 GTG。再一次可以肯定的是, 任何缬氨酸密码子都可用于这类转变。这类 bGH

(A, V) 密码顺序的创建仍然是通过对终产物 bGH (A, V) 编码顺序的 DNA 序列分析进行确认。

能使感染有包括 bGH (V) 编码序列的表达运载体的细菌中产生 met-bGH (V) 蛋白的编码顺序也同样可用寡聚核苷酸导致特异位点突变而创建, 使 bGH (L) 编码序列在 126 位 (在 bGHL 上) 氨基酸改变成缬氨酸密码子 GTG。

这种通过 PGHCP 编码顺序的寡聚核苷酸导致特异位点诱发而创造 PGH (A) 编码顺序同样地象图 8 所示过程那样以及象后面将要较详细说明那样进行完成的, 而且仍是通过 DNA 顺序分析进行确认的。

如果现在已分离和组建的这种期望得到的异源 DNA 顺序象所列举的 bGH (A, L) bGH (A, V) 及 bGH (A) 则, 这些顺序可以靠熟悉本行技艺者们用已知的方法和参照上述文献扩增各个重组体运载体以复制和产生很多的拷贝数。现在这些异源 DNA 顺序就可以被插入到任何适合表达运载体上使在原核生物里生产这类期望得到的异源多肽。

#### N-端丙氨酸多肽的生产

象前面讨论的那样在选定的宿主细胞里, 一个适合表达的运载体应该含有为生产异源蛋白必需的转录与转译信号和与之一起用以识别那些已插入有异源 DNA 顺序的表达运载体上的功能标记。用原核生物的表达载体, 能够通过转导作用, 转化作用, 或者转染作用 (在此通称“作转染作用”) 把重组体 DNA 顺序引入与其基因互补的生物体中, 然后所说的原核生物能够在一定的条件里培养 (一般都由启动子和所用宿主控制) 从而导至生产出期望得到的异源蛋白质。因此, 在本发明里所用的“染色体组”DNA 包含有染色体的和附加体的 DNA。

为了表达异源基因及在源核生物的宿主细胞里生产异源蛋白质。许多表达运载体已被描述, 而且都为熟悉本行技艺者们掌握。

在本发明一个较佳的实施例里, 应用了表达运载体 pBGHex-1 参阅 Seeburg 等人“DNA (1983) 2 (1) : 37-45. 以及 pBGHex-1”, 还包括已修饰过的 pBGHex-1 运载体。

表达运载体 bGHHex-1 是一种带有 bGH (L) 基因的细菌质粒 pBR322。这个基因依次包括一色

氨酸启动子 (ptrp)。— Shine-Delgarro 顺序, 一种除接在 N-端苯丙氨酸编码顺序上的 ATG 转译启动 / 蛋氨酸密码子, bGH (L) 多肽的第一个氨基酸, bGH (L) 编码顺序以及一个转译停止密码子。有关 pBGHex-1 表达载体的功能标记是抗菌素抗性。确切地说, pBGHex-1 带有两种抗菌素抗性基因, 一种是抗氨苄青霉素抗性 (amp<sup>r</sup>) 而第二种是抗四环素抗性 (tetr), 这两种抗性由于表达运载体授与其它敏感性宿主细胞以对抗菌素的特异抗性而稳定地被转化。因此稳定的转化体通入在含有四环素, 氨苄青霉素或二者都有的培养基上生长可以被选出来。

在本发明的一些例子里, 表达运载体 PMON3209 以及包括有分别带 bGH (A, L) 及 bGH (A, V) 编码顺序以代替 bGH (L) 编码顺序的 pBGHex-1 质粒在内的 pMON3215 都分别如图 5 和 6 所示那样过程产生的。象大肠杆菌样的细菌随后被这些表达运载体的一种所稳定地转化, 而且转化体通过在含有适当抗菌素的培养基上生长而被选出。在转化的细菌里含有的这些表达运载体随后用限制性酶切割方法查对在正确的 5' 至 3' 位置上筛选 bGH (A, L) 及 bGH (A, V) 编码顺序的存在。

在本发明的一个例子里 pBGHex-1\* 包括位于 ptrp 编码顺序 5' 端上游经除去 EcoRI 酶切位点方法修饰过的 pBGHex-1 也被应用以创造带有 bGH (A) 编码顺序代替 bGH (L) 编码顺序的表达运载体 PMOM3213 终产物 pBGHex-1 运载体只含有单一的 EcoRI 位点如图 9 所示在 pBGHex-1 里用 PGH (A) 编码顺序代替 bGH (L) 编码顺序以创造表达运载体 pMON3213 图 10 所示。然后用所说混合物转化大肠杆菌, 同时通过在含有抗菌素的培养基上生长选取转化体。在经过转化的细菌里含有的表达质粒随后用限制切割筛选 bGH (A) 编码顺序的存在。

在大肠杆菌里生产 bGH (A, L), bGH (A, V) 或 bGH (A) 是用表达运载体 pMON3209, pMON3215 或 pMON3213 中任一种按照后面较详细说明的方法通过转化大肠杆菌株多 ECodi W3110LE392 或 294 而实现的, 这些株多的 ATCC 登记号分别为 39936, 53010, 及 53009。转化了的大肠杆菌 (E.COLi) W3110 随

后在容许表达生长激素基因和生产这种期望得到的异源多肽的条件下进行培养。

所产生异源肽的纯化将随蛋白质及所选的宿主细胞二者而定。例如, 曾观察到在象大肠杆菌那样的细菌里生产的异源蛋白质常常以“折射体”的形式在细胞里沉积, 采用“折射体”一词是因为这些物体实际上用相差显微镜能够看见的。一种回收异源蛋白质及回收在生物学上有活性物质有用的方法已在全欧专利申请 114, 506 (1984.8.1 出版) 里叙述, 在此并作参考文献。这个纯化的方法简言之包括浓缩宿主细胞, 将它们裂解以产生细胞提取液或匀浆液, 继而用差速离心分离这些折射体, 其中所有步骤对熟知本行技艺者都是知道的。分离得的折射体溶于一种象盐酸胍一类的强变性剂里, 这种溶解了的蛋白质随后在适当的溶剂里 (例如尿素) 交换, 用层析法纯化。最后使之在生物学上活化。即容许它呈假定的活性构型然后进行氧化之。因而使这样的构型就象在全欧专利申请 114, 506 所述那样, 通过它适合的半胱氨酸残基间的二硫键而保持它的构型。

这种异源蛋白质更详细的纯化过程在两个同时申请的美国专利里叙述, 其一是由 Storrd s.B 题名生长激素可溶解化的方法 “Method of somatotropin Solobibilitation”, 而另一由 Bentle, L.A storrs.S.B 及 Mitchell J.W. 题名生长激素自然化的方法: “Method of Sometotropin Naturation”, 在此均并作文献。”这两个同时申请的美国专利以及本申请一起全都同意转让给 mon Santo 公司。从这种异源多肽上去除污染的细菌性蛋白质的进一步纯化, 可通过象凝胶过滤处理或离子交换层析的常规层析方法能够达到。经这样处理纯化过的组成物, 典型地将含有 N-丙氨酸、多肽大约为其全重的 90% 至 99.5% 而由细菌产生的蛋白质或在其它原核生物宿主上产生的多肽, 大约为 0.5% 到 10%。

已发现用本发明的方法所表达的异源肽, 通常至少有大约 80% 具有  $-NH_2-ala\cdots$  的 N 端结构其余的多肽有代表性的是呈蛋氨酸形式, 它具有  $-NH_2-met-ala\cdots$  的 N 端结构。然而, 以不同的培养条件以及 / 或者诱导基因表达的时间, 就有可能提高 N 端具有丙氨酸的多肽的比值至少到 95% 或甚至更高一些。

在本发明的一个特别好的实施例中，根据前面叙述那样生产和分离的多种生长激素多肽按照 Tsushina 及 Frieses 在 *J. clin. Endocrinol. Metab.* (1973) 37: 334-337 所说那样的家兔肝受体上分析完成的方法进行测定以及对小白鼠增重的生物分析都表明有类生长激素的生物活性。在后者的分析里，大肠杆菌产生的生长激素的生物活性是通过切除重体小白鼠分别注入不同剂量待测生长激素与注入一些已知的生长激素（例如猪或牛的重体生长激素）后所得小白鼠的相对增重进行评定。确切地说，给去除垂体的小白鼠（体重 95-135 克）注射滴定剂量未知的或标准的（0 至 60 微克之间）生长激素，按日为基础进行 7 天或更长的试验时间。使用多重回归分析，接受已知或未知激素组的动物的体重增量与剂量的对数变换值呈回归，测试斜率以确定非平行现象及截距普遍性。生物活性是以斜率的比值乘标准的活性。

使用本发明的带有 N-丙氨酸的 bGH 产品增加了奶牛的产奶量，而且认为该奶牛获得特定出奶量所需饲料量下降。对奶牛按增强泌乳量施用，在成熟蛋白质大约 126 位或相近处有一缬氨酸的 bGH 品种是特别适于促进这些奶牛产奶的。本发明的这类产品可以用注射，灌输或移植在多聚物或其它众所周知在循环系统里达到输送必要剂量的基质给奶牛施用，也许可以用象溶剂、乳剂或凝胶那样的药物上可接受的基本配制方法，也可用胶囊或不用胶囊，这些配方可单独含有 bGH 品种或其变型，或前面说过的一些天然存在的复合型以及 / 或者变异多肽[例如，一种 bGH (A, V) 和 bGH (A, L) 的混合物以及 / 或者 bGH (A, V) 和蛋氨酸-bGH (A) 的混合物]。每畜每天的剂量从少至大约 0.005mg 直至大约 200mg，而每畜每天最佳剂量从大约 5mg 至大约 40mg。增加产奶量和 / 或增加饲料牛奶效应最有效的剂量可以通过常规的试验来测定。bGH 实际的最佳剂量是由特定动物的大小，一般健康以及营养状况的差异而决定的。在奶牛上，产奶虽然能用来分析 bGH 的作用，但牛的其他生产性能，象总生长率及产肉情况亦能用来分析。如果希望的话，bGH 能和其它有益的制剂，象其它生物活性蛋白质，抗原或类似物及由此而获得增效的制剂一起施用。

正如前面讨论过一样，本发明亦期望 bGH 变

异型的产品其上有-N-端丙氨酸，但此沿着多肽链可进行删减、加进倒转和 / 或取代。这种具有期望得到的泌乳和 / 或生长增效功能的修饰作用能够通过通过在牛里进行的常规试验鉴定。

下列例子阐述了较佳的实施例本发明，但无论如何不想限制本发明的界限。虽然本发明已在与发明有关的较好的实施例中作了阐述熟知本行技术者从阅读这个申请里，提出各种各样的修正那将是显然的。

#### 微生物及质料

下列微生物可从美国标准菌种库 (ATCC) 12301 parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, U.S.A. 获得，它们也已在武汉的中国典型培养物保藏中心进行了保藏，保藏号为 CCTCC: M90031-M90036。

ATCC 39936- CCTCC: M90033- E. Coli W3110

ATCC 53010- CCTCC: M90032- E. Coli LE392

ATCC 53009- CCTCC: M90032- E. Coli Strain294

ATCC 53024- CCTCC: M90034- E. Coli W3110 (pMON3209)

ATCC 53022- CCTCC: M90036- E. Coli W3110 (pMON3215)

ATCC 53023- CCTCC: M90035- E. Coli W3110 (pMON3213)

这些存放菌种可通过本申请的受让人 (Monsanto 公司) 取得美国专利 (局) 同意而为公众使用。这些存放菌种将会由于这个申请具有申请日期开始获利的任何这样的美国 (U.S) 专利的有效期内而可取得使用。然而，必须明了这些存放菌种的可用性并不构成允许去实施本主题的发明以贬低政府同意颁发的专利权。况且本发明不限于存放微生物的范畴，因为这个存放菌种的实施例只是企图作为本发明的具体阐述而已。

#### 例一

所有的寡聚核苷酸的合成都是依据制造厂应用生物系统公司 (Applied Biosystem, Inc. Foster, City, California) 提出的步骤用一个应用生物系统 DNA 合成仪在 Monsanto 公司生物科学部 (Department of BiologiCal

Science, Monsanto) 进行的、限制性内切酶和 DNA 修饰酶是由新英伦生物实验室 (New England Biolabs Beverly, Massachusetts) 新英伦核子公司 (New England Nuclear, Boston, Massachusetts) 及 Bethesda 研究实验室 (Bethesda Research Laboratories, (BRL)(Gaithersburg, Maryland) 供应。限制性核酶内切酶 XbaI 接头 (XbaI linker) 是从合作研究公司 (Collaborative Research, Inc. (Lexington, Massachusetts) 获得。T<sub>4</sub>DNA 连接酶是由 BRL 供应。T<sub>4</sub>DNA 激酶是从新英伦生物实验室购买。32P-林记核苷酸是由 Amercham (Arlington Heights, Illinois) 供应。E.Coli DNA 多聚酶 I · Klenow 片段, 是由新英伦核子公司供应, E. Coli JM101 是从 Dr. JoMessing, University of Minnesota (St. Paul, Minnesota) 处获得。

限制性酶的酶解过程, T<sub>4</sub>DNA 连接酶的连接及大肠杆菌 E · Coli DNA 多聚酶 I, Klenow 片段的反应都可以按制造商提出的步骤进行。对下列限制性酶的较佳缓冲液如下: 用于 XbaI: 100 毫摩尔 NaCl, 50 毫摩尔 Tris (三羟甲基氨基甲烷) pH7.5, 10 毫摩尔 mgSO<sub>4</sub>; 用于 EcoRI, Hind III 及 SmaI: 50 毫摩尔 NaCl, 10 毫摩尔 Tris pH7.5, 10 毫摩尔 mgSO<sub>4</sub> · T<sub>4</sub>DNA 连接酶反应是在含在 25 毫摩尔 Tris, pH8.0 10 毫克 MgCl<sub>2</sub>, 10 毫摩尔 dithiothritol (DTT) [二巯基赤藓糖醇] 2 毫摩尔亚精胺以及 0.2 毫摩尔 ATP 的缓冲液内进行, 大肠杆菌 E · Coli DNA 多聚酶 I, klenow 片段酶, 是在含有 20 毫摩尔 Tris pH7.2, 10 毫摩尔 MgCl<sub>2</sub>, 10 毫摩尔 (DTT), 1 毫摩尔 ATP, 及 1 毫摩尔下列各物之一: dATP, dGTP, dCTP, dTTP 的缓冲液中使用。如果标记新合成的 DNA 链, 则可加入 Alpha-32P-dATP (400 居里/毫摩尔) 至 Klenow 反应液里。

标记寡聚核苷酸是用伽马 (γ) -32P-ATP (比活性大于 5000 居里/毫摩尔) 及 T<sub>4</sub>DNA 激酶于 100 毫摩尔 Tris, pH8.0 10 毫摩尔 MgCl<sub>2</sub>, 5 毫摩尔 DTT。

供 bGH (L) 及 pGH (P) 用的带有 DNA 密码顺序的质粒 (分别是 pBGHex-1 及 pBGHex-1) 是从遗传工程有限责任公司 (Genentech Inc. 获得, So. San Francisco,

California. 这些质粒也能按在全欧专利申请 75, 444 (1983, 3, 30 出版); Seeburg · 等人, DNA (1983) 2 (1): 37-45; Goed-del 等人, Nature (1979) 281: 544-548; DeBoer 等人, 在启动子 Promoters: 结构与功能 (Structure and Function) (1982); M. J. Chamberlin and R. Rodriguer ed. Charptor293; Miozzari and yanofsky, J. Bacteriol. (1978) 133: 1457-1466; 以及 Rosenberg and Court, Annual Review of Genetics B: 319-353 所述制备。如在全欧专利申请 75, 444 (DeBoer 等人) 所示, 在 bGH (L) DNA 前面 21 个转译密码是 ATG, TTC CCA GCT ATG TCT CTA TCT GGT CTA TTC GCT AAC GCT GTT CTT CGT GCT CAG CAT CTT 或是它们的功能等值物编码氨基酸不同的不同密码子) (那些密码子的功能等值物当然可以交换使用时。) 这些出版刊物的有关部份在此皆并作文献。

M<sub>13</sub>mp8 及 M<sub>13</sub>mp9 是从明尼苏达大学(圣保罗, 密苏里) McsSing Jo 博士处获得。

所有细菌培养基成份及抗菌素是 Sigma (St. Louis Mo) 或是从 Difco 实验室 (Detroit, Michigan) 获得的。

## 例二

下面的例子说明三种 DNA 密码顺序的组建, 这些顺序在细菌里表达时, 就提供直接在细菌里生产具一 N 端丙氨酸的多肽。确切地说, DNA 密码顺序就是建成这样以致在转译起始/蛋氨酸密码子 (ATG) 之后紧接有一丙氨酸密码子 (即 GCC)。这三种 DNA 编码顺序, 它们包括 bGH (A · L), bGH (A · V) 及 bGH (A), 是从以前分离的生长激素 DNA 顺序通过寡聚核苷酸一导致特异位点一诱变而建成的。此例也说明在细菌中表达使产生 metbGH (V) 的编码 bGH (V) 密码顺序的 DNA 的构建。

a · bGH (A, L) DNA 密码顺序的组建。

生长激素 bGH (L) 的 DNA 密码顺序是由 pGHex-1 质粒上切出-XbaI 片段并克隆至一个修饰了的 M13mp8 运载体 (M13mp8 / XbaI) 的 XbaI 位点上。在原来 SmaI 位点处含有一个 XbaI 接头 (或称连接子) · 的 M13mp8 / XbaI 运载体其组建过程在图 1 示出。如图 2 所示, XbaI 能在

bGH (L) 密码顺序的任一端酶切, 因此切出完整的 bGH (L) 密码顺序。在存在有 T<sub>4</sub>DNA 连接酶时, XbaI 限制酶切过的 pBGHex-1 质粒与用 XbaI 限制性酶裂开后并用小牛肠碱性磷酸酶去末端磷处理呈线形化复制型的 (RF) M13mp8 / XbaI DNA 相混合。随后这种混合物在 14℃ 里温育过液, 用小牛肠碱性磷酸处理防止了 M13mp8 / XbaI 运载体重新环化将 bGH (L) DNA 密码顺序插到 M13mp8 / XbaI 运载体里制造成重组运载体 M13mp8 / BGHex-1, 开始时是在含有 10 微升 100 毫摩尔 IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷) 和 50 微升 2% (W/V) X-GAL (5-溴-4-氯-3-吡啶氧基-β-D-半乳糖吡喃糖苷) (加入到 3ml 上层琼脂中并用前面所述的重组运载体去转染分子克隆化 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis, Fritsch 和 Sambrook, eds (1982) pp. 64, 所说的运用软琼脂复盖步骤 (双层法), 在 IxyT 培养基上生长的大肠杆菌 E·ColiJM 101 菌层上形成无色的噬菌斑进行确定, bGH (L) 密码顺序插入可用酶解分离出的复制型 (RF) DNA 而确证, 把重组运载体用 XbaI 酶切, 产生含有插入序列 590 碱基对片段。参阅分子克隆化 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis, Fritsch and Sanbrook, eds. (1982) 第三章。这 590 对碱基片段是在百分之一 (W/V) 琼脂糖里按在 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis, Fritsch Sanbrook, eds (1982) 所述用琼脂糖凝胶电泳鉴定出的。所有后面的限制性酶酶切片段都用这种参比的方法鉴定。插入的 bGH (L) 密码顺序的方法是通过用 SamI 和 HindIII 酶解 RF 重组运载体进行确定的。当这种密码顺序是在正确的 5, 至 3, 方位, 用这些限制性酶酶解时应该产生-207 对碱基的片段单链噬菌体 DNA 的分离是按 Messing et al, 在 Gene (1982) 19: 269 里的方法进行的。M13mp8 / BGHex-1 运载体以后在寡聚核苷酸导致特异位点诱变中被用作模板, 基本上按 Eoller 和 Smith 在 Nuc·Acids Res· (1982) 10: 64876500, Eoller and Smith 在 Methods in EnZymol (1983) 100: 468—500 所述进行, Norris 等人, Nuc·Acids Research (1983) 11: 5103—5112, 其中有关部分在此并作

文献。

图 3 绘出从 bGH (L) 密码顺序构建成为一个 bGH (A·L) 编码的 DNA 顺序的诱变步骤。简言之含有希望突变顺序寡聚核苷酸引物 (见后表 1) 被用作合成单链 DNA M13mp8 / BGHex-1 运载体的闭环 DNA 拷贝引物的模板。因此而产生的闭环双链 DNA 分子按 Zoller 和 Smith Methods in Enzymol (1983) 100: 468—500 里所述那样方法, 用碱性蔗糖梯度离心从不完整环和单链 DNA 环中分离开。这种闭环的双链 DNA 分子随后用来转化大肠杆菌 (E·Coli) JM101 方法像 Messing 等人, Gene (1982) 19: 269—276 所述那样, 而且挑取出无色的噬菌斑, 把它们放在从 pall Ultrafine Filtration Corp· (Glen Cove, Newyork 获得的 pall 过滤器上与用以产生特异位点诱变并用 <sup>32</sup>P 标记的寡核苷酸引物作分子杂交进行筛选。上述噬菌体的挑取是按 pall 过滤器制造厂所述方法进行。分子杂交筛选是用生物达因尼龙沪器实现的, 该方法按 pall 超细沪器公司在其“DNA 转移到 pall 生物达因尼龙沪器上的指导方案”中所述。用升高温度洗涤沪器, 直到用 M13mp8 / bGH<sub>mut-1</sub> 制备的对照沪器洗尽放射性为止。一个标准的滤器清洗方案包括用 6×SSC (0.9MNaCl 和 0.09M 柠檬酸钠) 在室温清洗 10 分钟, 接着在 50℃ 用 6×SSC 洗 5 分钟, 最后升高 5℃ 洗涤之。与放射性标记寡聚核苷酸引物分子杂交的噬菌斑, 温度比对照噬菌体高时, 被假设为带有新构建成的 bGH (A·L) 密码顺序, 而且各之为潜在阳性。另一方面, 从转化的 E·Coli JM101 上挑取各个无色噬菌斑, 并放在 5ml2XyT 培养基 (1.6% (W/V) 胰蛋白胨 Tryptone, 1.0% (W/V) 酵母抽提液, 0.5% (W/V) NaCl) 置 37℃ 下好气培养过液。依据 Messing 等人, 在 Gene (1982) 19: 269 方法制备噬菌体 DNA 随后在硝酸纤维上与放射性标记引物一起分子杂交, 并像上述一样升温洗涤之。显示出杂交温度比 M13mp8 / BGHex-1 对照噬菌斑高的噬菌体 DNA 同样地被各之为潜在阳性。从两种筛选过程中取得具潜在阳性的噬菌斑按上述一样培养, 并用来制备单链 (SS) 噬菌体 DNA, 随后又按 Sanger 等人, 在 proC·Nat'l. ACad-Sai U.S.A (1977) 74: 5463-的方法进行序列分析以

确证它们带有 bGH (A.L) 密码顺序。因为丙氨酸密码子可造成一个附加的 *Hal*II 限制性位点, 所以 M13mp8 / BGH (aLa) 复制型也可以用 *Hae*III 限制性内切配介分析筛选以证实加入的一个丙氨酸密码子跟在起始讯号 / 蛋氨酸密码子 ATG 之后。在这种 bGH (L) DNA 密码顺序上加进丙氨酸密码子的频率大约是 2%。

#### b.bGH (A.V) DNA 密码顺序的组建

bGH (A.V) DNA 密码顺序的组建, 筛选及顺序确认除了模板如图 4 所示是 M13mp8 / BGHex-1 (ala) 以及寡聚核苷酸引物是如后表 1 所示外都是使用前面同样的步骤完成的。亮氨酸密码子转化为缬氨酸密码子的频率大约是 10%。

#### c.bGh (V) DNA 密码顺序的组建

bGH (V) DNA 密码顺序的组建, 筛选, 和顺序确定是用与上述相同的方法实现的。明确的说, 模板, M13mp8 / BGHex-1 和寡核苷酸引物也与创建 DGH (AV) 所应用的相同, 亮氨酸密码子到缬氨酸密码子的转变频率为约 10%。

#### d.pGH (A<sub>1</sub>) DNA 密码顺序的组建

寡聚核苷酸——特异位点——诱变, 像 Seeburg 等人, 在 DNA (1983) 2 (1): 37—45 里所说的那样同样可以用来把丙氨酸密码子加到 pGH (p) DNA 密码顺序里。这一诱变方法如图 8 所示进行如后。

在 pPGHex-1 质粒上所带的 590 对碱基 pGH (p) DNA 密码顺序在 pGH (P) 密码顺序 5'端和 3'端分别用 *Eco*RI 和 *Hind*III 限制性酶切割质粒从质粒上把它移去, 如图 7 所示。这个限制性酶切过的 PGex-1 质粒随后与 MBmp9 复制型 DNA 混合, 该复制型 DNA 在混合之前同样同 *E. Copi* 及 *Hind*III 酶切开, 并另外再用小牛肠碱性磷酸酶予处理以防该 M13mp9 的限制性片段重新连接。T<sub>4</sub>DNA 连接酶随后加入上述混合物里。由于畸型的端部位于用两种不同的限制性酶酶切生成 RF 噬菌体 DNA 和 pGH (p) DNA 密码顺序, 所以 pGH (p) DNA 将能选择地被插至 RF 噬菌体 DNA 里, 并且将会插到正确的 5'至 3'方位上, 如图 7 所示。如前面所述 M13mp8 / BGHex-1 一样, 随后大肠杆菌 *E.colim101* 用带有 pGH (p) DNA 密码序的重组

体 M13Mp / pGHex-1 运载体转化。然后把这种转化了的大肠杆菌 *E. Coli*JM101 放在有指示剂的 1XTY 培养基里生长, 而且也像前面所说那样选择无色噬菌斑。这种 pGH (p) DNA 密码顺序的插入是用下法确认的。挑取无色的噬菌斑, 按前面所说方法分离 M13mp9 / pGHex-1 的复制型 DNA 然后用 *ECo*R1 及 *Hind*III 切开, 并在琼脂糖凝胶上电泳产生含有所插入 pGH (p) DNA 的一个 590 对碱基的切段。然后把 M13mp9 / pGHex-1 噬菌体在大肠杆菌 *E. Coli* JM101 里增殖并按前所说的方法分离单链噬菌体 DNA。

随后将 M13mp9 / pGHex-1 DNA 用作步骤核苷酸——特异位点——诱发的模板, 如图 8 所示, 按前面所说的步骤构造一个应用专性引物的 bGH (AL) 密码顺序 (见后表 1)。在这种 pGH (p) 密码顺序上加进一个在此是 GCC 的丙氨酸密码子的频率几乎是 12%。终产物 pGH (A) 密码顺序再用 DNA 顺序分析法进行确认。

#### 例三

这个例子说明供直接在细菌里生产含有 N 端丙氨酸的多肽的三个重组的表达运载体的组建及表达。这样生产出的三种多肽是 bGH (A · L), bGH (A.V) 及 PGH (A) 型的生长激素。这个例子也说明 bGH (V) 表达运载体和 bGH (L) 表达运载体的组建。这样产生的多肽分别是 mcf-bGH (V) 和 mcf-bGH (L)。

a.bGH (A.L)、bGH (A.V) 和 bGH (L) 的表达。

分别用重组的运载体 M13mp8 / BGHex-1 (ala), M13mp8 / BGHex-1 (ala, Val) 及 M13mp8 / BGHex-1 (Val) 上带有的 bGH (A.L) 及 bGH (A.V) DNA 密码顺序去代替在 pBGHex-1 表达质粒上带有的 bGH (L) DNA 密码顺序 (参阅图 5 和图 6)。这是用 *Xba*I 酶解相应的 M13RFDNA 上片段而完成的。表达质粒 pBGHex-1 亦用 *Xba*I 酶解, 并接着用小牛肠碱性磷酸酶处理以防止这些限制性酶切片重新连接。每种已酶解了的 RFDNA 的片段随后分别与已酶解了和处理过的 pBGHex-1 DNA 混合, 并如前面所说那样在 14℃ 下连接过夜。这样形成的重组的表达运载体把带有 bGH (A.L) bGH (A.V) 和 bGH (V) DNA 密码顺序分别标记为

pMoN3209、pMoN3215 和 pMoN3214。随后大肠杆菌 E.ColiM3110 用含有 pMoN3209 或含有 pMoN3215 或含有 pMoN3214 或含有 pBGHex-1 的连接混合物转化，并在 LauriH 肉汤上生长出 Lauua 肉汤含有 1% (W/V) 胰蛋白胨，0.5% (W/V) 酵母抽提液和 0.5% NaCl (W/V) 以及含有 12.5 微克/毫升四环素和 200 微克/毫升氨基青霉素。含 pMoN3209 的大肠杆菌 E.ColiW3110 其 ATCC 登记号为 53024。含 pMoN3215 的 E.ColiW3110 其 ATCC 登记号为 53022。转化作用简要地进行如下。把近 50ml E.Coli W3110 在 LB 培养液里生长到光密度 (OD) 600 = 0.60。随后将其细胞收集成小丸并悬浮在含有 25 毫摩尔 Tris, pH7.6 和 10 毫摩尔 NaCl 的 10 毫升缓冲液 A 里。然后，又把这些细胞收集成小丸并再悬浮在 1 毫升缓冲液 A 内于其中加入 14 毫升缓冲液 B 使成悬浮液并在水中保持 30 分钟，缓冲液 B 含有 25 毫摩尔 Tris, pH7.6, 10 毫摩尔 NaCl, 50 毫摩尔 CaCl<sub>2</sub>。然后又把这些细胞再收集成小丸并再悬浮在 3 毫升缓冲液 B 内。取再悬浮的细胞的一份等分试样 0.2 毫升随后与 0.1 毫升缓冲液 B 及 0.1—0.5 μg 理想的重组的表达载体 (pMoN3209 或 pMoN3215 或 pMoN3214 或 BGHex-1 混合，并在水上孵育 60 分钟。这些孵育的混合液随后在 37℃ 上加热 1 分钟在此之后加入 3 毫升 LB 培养基，然后把终产混合物在 37℃ 温育 60 分钟。随后收集这些细胞成小丸并再将其悬浮在 300 毫升 LB 培养液内，并使它在如前面所述的含抗菌素的 LB 平板上生长。就这样选出了抗性菌落以及按 Molecular Cloning Alabor atory manual, maniat's, Fritsch and Sambrook, eds (1982) 所说的步骤分离出 pMoN3209、pMoN3215、pMGHex-1 和 pMoN3214 表达载体 DNA 的片段。这些 pMoN3209、pMoN3215、pBGHex-1 和 pMoN3214 的 DNA 片段可用它存在有 590 碱基对的 XbaI 片段与 200 碱基对 HindIII / SmaI DNA 片段进行筛选因为它说明在正确的方位上存在有 bGH (A.L) bGH (V) 和 bGH (A.V) DNA 编码顺序。pMoN3209 和 pMoN3215 表达质粒可以用 HaeIII 酶酶解分析进一步筛选，并从而确证由于加进 GCC (丙氨酸) 密码子导致产生一个 Hae

III 新位点的存在。最后，从 pMoN3209、pMoN3214 和 pMoN3215 三运载体来的 590 碱基对的 XbaI 片段，可按前面所述进行部分顺序测定以确定在这些表达运载体上存在有 bGH (A.L) bGH (V) 与 bGH (A.V) DNA 编码顺序。

带有 pMoN3209 pMoN3214、BGHex-1' 或 pMN3215 的 E.Coli W3110 的单菌落分别接种在含有 12.5Mg/ml 四环素的 5 毫升培养基 LB 里，而且在 37℃ 下通气培养过夜。然后取 0.5 毫升过夜培养物分别接种装在 250ml 锥形瓶里的 25 毫升的 M9 培养液。M9 培养液组分为 (按升计) 100 毫升 10 倍浓缩盐液 (按千毫升总体积计含有 70 克 (g) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5gNaCl, 10gNH<sub>4</sub>Cl, 1.2 毫升 1MMgSO<sub>4</sub>, 0.25 毫升 0.1%B<sub>1</sub>, 12.5 毫升 20% (W/V) 葡萄糖, 0.025 毫升 1M CaCl<sub>2</sub>, 并再补充 0.5% (W/V) 酪蛋白氨基酸液和 6.25 μg/ml 四环素。随后把这些接种物各自在 37℃ 通气培养至达到 OD600 (光密度在 600 毫微米) = 1.0。每份 0.2ml 等份试液再从每个上述的锥形瓶里取出并逐个裂解后放在十二烷基硫酸钠 (SDS) 一聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 缓冲液里，并按 Laemmli, 在 Nature (1970) 227: 680—685 所说方法用 SDS-PAGE 分析。从这两种基因结构得出的 22,000 道尔顿的蛋白质在大肠杆菌 E.Coli W3110 里处于高水平。而且，与在 Western 浸渍分析中，两种 22,000 道尔顿蛋白质由抗牛垂体生长激素所产生，单克隆抗体，F11—A1—B6 结合 (参图 Kriviand Rowold, Hybridoma (1984)，因此，证实这种多肽是与垂体生长激素有关。带有亲本的 pBR322 质粒的 E.Coli W3110 细胞不产生与抗生长激素抗体结合 22,000 道尔顿蛋白质。

带有表达质粒 pMoN320pMoN3214、pBGHex-1 及 pMoN3215 的细菌贮存方法如下，用这些质粒 (pMoN3209 或 pMoN3215) 或 pMoN3214，或 pBGHex-1 转化了的 E.Coli W3110 的单菌落，放入 5ml 加有 12.5 μg/ml 四环素的 LB 在 37℃ 下通气生长过夜。从每一过夜培养物里取出 1ml (等分成液分别地加到各个含有 25ml LB 和 12.5 μg/ml 四环素的三角瓶里生长至 OD600 = 1.0，然后把每个瓶里的细胞用 6000Xg 在 4℃ 下离心 5 分钟收集。离心集成小丸逐个地再悬

浮在 12 毫升加有 7.5% (V/V) DMSO 的 LB 里并且用 1 毫升等分试液立即在干水上冻结。这些细胞随后就贮存在一个液氮瓶内。另外, 大约 10 毫克纯化了的质粒 DNA 可贮存在  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

#### b.pGH (A) DNA 顺序的表达

如图 10 所示, 重组的运载体 M13mp9/gGHex-1 (a/a) 上的 pGH (A) 密码顺序可代替在修饰过的 pBGHex-1 表达运载体上所带的 bGH (L) DNA 密码顺序。一个修饰过的表达运载体 pBGHex-1 包括一个 pBGHex-1 表达载体, 其上位于色氨酸启动子 (ptrp) 上游的 ECoRI 限制性位点已经被除去 (见图 9)。已修饰的 pBGHex-1\* 表达运载体是先用 pBGHex-1\* 的 ECoRI 部分酶介之后用 SI 核酸酶处理除去其粘性末端创建成。这种经限制性酶切的 pBGHex-1 运载体随后用  $J_4$  DNA 连接酶环化并用它转化 E. Coli JM101, 以上皆按前面所说方法进行。第二步就是从单菌落的质粒 DNA 中筛选带有 pGH (A) 密码顺序的 590 对碱基的 EOOR1/HindIII 片段以及带有色氨酸启动区 (ptrp) 顺序的 1050 对碱基的 ECoRI/pat1 片段 (见图 9)。这种 ECoRI 酶切位点的除去, 使得在正确方位上把 pGH (A) 密码顺序插到 pBGHex-1\* 表达运载体上去的专性位点插入过程变得简便, 如图 10 所示, 由此形成的这种重组的表达运载体在下文皆称作 PMoN3213。含有 pMoN3213 的混合物随后用来转化 E. Coli W3110, 而且如上所述一样对生长出的转化体进行筛选。含有 pMoN3213 的 E. Coli W3110 有 -ATCC 的登记号 53023。在 pBGHex-1\* 表达运载体里用 pBGH (A) 密码顺序取代 pBGH (L) 密码顺序的证实是用分离 pMoN3213 DNA, 并随后用 E (OR) 及 HindIII 酶切上述表达运载体产生出 590 对碱基片段, 以及用 HaeIII 酶切割表明 pGH (A) DNA 密码顺序里含丙氨酸密码子导致额外的一种 HaeIII 限制性酶片的存在等方法进行。在 pMoN3212 表达运载体里有 pGH (A) DNA 顺序存在的最后确认是把 EcoRI/HincIII 的 590 对碱基的片段按前面所说方法作部分序列测定。

pGH (A) DNA 密码顺序的表达以及 pGH (A) 在 E. Coli W3110 内的生产是按前所说生产 bGH (A.L) 及 bGH (A.V) 所提出的作法实现

的。证明 22, 000 道尔顿蛋白质的高水平同样地是像前面所说那样用 SDS/PAGE 来完成的。

带有 pMoN3212 表达运载体的 E. Coli W3110 可按前面所说的那样保存的, 而且供大规模 (10—100 升发酵) 生产 pGH (A) 用的亦像前面所说那样进行。这种 100 升批量发酵的 pGH (A) 蛋白质含量按 ROSner 等人, J. Immunol. Methods (1982) 52: 175—181 用放射免疫法测定产量接近 1 克/升肉汁培养基。

#### 例四

完成这个实例是为了测定在细菌里生产的 bGH (A, L)、bGH (A, V) met-bGH (V) met-bGH (L) 及 pGH (A) 等导源蛋白质的 N 端氨基酸顺序而作为本发明方法的实例。

这种在大肠杆菌所产生的促生长激素多肽是从含有 bGH (A.L), bGH (A, V) met-bGH (V) met-bGH (L) 或 pGH (A) 的粗而可溶的折射体中用按 Krivi& Rowold, Hybridoma (1984) 3: 151—161 所说的免疫吸附层析法被纯化的。用免疫吸附层析法纯化的所有三种促生长素品种似乎都比按 Laemmli, Nature (1970) 227: 680—685) 的方法用 SDS—PAGE 分析在 7.5—15% (W/V) 梯度凝胶里处理所得  $1\mu\text{g}$  纯化蛋白质所得 95% 纯度要高。纯化后的 bGH 品种的蛋白溶度按常规的高压液相层析法分析。

由免疫吸附层析纯化供 N 一端序列分析使用的蛋白质要对水充份透析, 然后亲水化。在作 N 一端序列分析之前, 把纯化蛋白质再悬浮在含有 50 毫摩尔重碳酸胺加 0.1% (W/V) SDS 的重碳酸胺缓冲液里, 而且对相同的缓冲液透析以除去残留的 tris (羟甲基) 氨基甲醇 (tris) 及甘氨酸。然后用“应用生物系统”的蛋白质顺序分析仪 470A 型 (Applied, Biosystems, Inc. Foster (ity CA) 按 Hunkapiller 等人, (1983), Methods in Enzymol. 91: 399—413 and Hunkapiller 等人 (1983), Method—SinEngmol. 91: 486—493, 所说的方法把所有的都进行 N 一端的序列分析。

后面的表 2 列出了几种 bGH (A.L), bGH (A.V), met-bGH (V), met-bGH (L) 及 pGH (A) 多肽制品序列分析的结果。是 N 一端蛋氨酸的蛋白质含量是作为样品内生长激素总量的百分比而列于表内的。两种方法都在蛋氨酸定量中使用。

使用直接法,  $\text{NH}_2\text{-met-ala-phe}$  的量……在主要为  $\text{NH}_2\text{-ala-phe}$ …组群里根据迟滞讯号的差导进行计算。由于这一方法取决于对“正常”顺序延迟滞的估计。这种延迟各环不同, 所以只能是对  $\text{NH}_2\text{-ala-phe}$  顺序的粗略估计。直接法包括 ECdan 的降解反应, 它能在用高压液相层析从化学干扰里 (Hple) 分开 pTH-met, 之后对 PTH-met 和 pTH-ala 的讯号强度进行比较。“pTH”指的是苯基-硫化乙内酰尿。确切地说, 这个 Edman 降解顺序反应是由与 N 端氨基酸作用的试剂组成, 它促使氨基酸断裂并随之释放出那个氨基酸的 pTH-衍生物, 这后一过程只要游离氨基酸污染是低就会给 met-ala-phe 的百分比作出好的估计。根据后表 2 所列的 N-端序列分析的结果表明, 当 N-端蛋氨酸之后是苯丙氨酸就见不到蛋氨酸加工的证据, 然而有 80% 或更多的从 MBs (A·L) 及 MBs(A.V) 基因结构所产生的分子在其 N-端具有丙氨酸而不是蛋氨酸。从不同发酵生产和里得到的细胞其 N-端蛋氨酸的加工过程是各不相同, 但至少要有 80% 生长激素分子经常发生的。此外, 在转化微生物里生产生长激素的生产水平接近细菌蛋白质总量 10-15%。

1、具 N-端蛋氨酸蛋白质的含量是按样品中生长激素总量的 % 列出。

2、两个数字代表从 2 个单独的发酵中纯化而得蛋白质的数据。

#### 例五

完成这个实施例是为要确定在细菌中产生的 bGH 品种在奶牛中刺激牛奶增产的能力。如后面表 3 所示, bGH (A, V) 和 met-bGH (V) 都有不可预计的刺激牛奶增产, 其增加的程度比与其相当含亮氨酸的类似物, bGH (A, L) 和 metbGH (L) 都大。此外受试的缬氨酸 bGH 品种对亮氨酸 bGH 品种进行集体比较时, 也在统计上表现出牛奶产量增加大 ( $P=0.02$ )。

所进行的试验简述如下: 用荷兰母牛在其第二, 第三的三个月试乳期间每天单给 5 毫升重碳酸钠溶液,  $\text{pH}9.8 \pm .5$  (这里当作对照样本) 或给以含约 25 毫克 bGH (A, V), bGH (A, L), met-bGH (V) 或 met-bGH (L) (这里, 集合当作受试生长激素者)。所有受试生长激素者和对照样本都用每天肌肉注射到半腱肌肉中的肠胃外给药

方式持续 21 天。每天上午和下午记录每头奶牛产奶数, 在第一天注射之前开始的 6 天直到第 21 天都要记录, 牛奶脂肪, 蛋白以及体细胞每周都要用 DHIA 实验室的测试方法在 Missowi, springfield, 65803, DHIA 测试中心进行分析。结果列在表 3 中, 下面可说明的是从母牛给以 bGH (A, V) 所增加牛奶产量比给以 bGH (A, L) 的大 50%, 而给以 met-bGH (V) 比给以 met-bGH (L) 高约 17%。通过这个发明的缬氨酸 bGH 品种所提供的这样出于意料的生产能力优点, 很明显, 对牛奶牧场主是有着很大的游在经济效益。

表 2

met-bGH(L),bGH(A、L),bGH(A.V)及 pGH(A)蛋白质  
N-端顺序分析

样 品	%N-端蛋氨酸	
	间 接 法	直 接 法
met-bGH(L)	92.0	100.0
bGH(A、L)	20.3 <sup>2</sup>	18.42 <sup>2</sup>
bGH(A、V)	10.8	<6.0
	7.5 <sup>2</sup>	<3.0 <sup>2</sup>
pGH(A)	16.7	9.0
	16.7	17.0
met-bGH(V)	没有做	100.0

1. 具 N-端蛋氨酸蛋白质的含量是按样品中生长激素总量的%列出
2. 两个数字代表从 2 个单独的发酵中纯化而得蛋白质的数据。

表 3 在奶牛中与用可溶解的 bGH 品种注射相关的产奶量反应

处 理	N <sup>b</sup>	试验的周数 <sup>a</sup>			1-3	与对照 相比的 变动值	与对照相比 的变动值 %	机率的 意 义
		1	2	3				
对 照	10	25.5	24.6	26.0	25.3	—	—	
bGH(A,V)	9	32.2	33.1	36.7	34.0	8.6	33.9	
bGH(A,L)	9	29.9	30.2	33.5	31.2	5.8	22.8	
met-bGH(V)	8	31.6	33.8	35.8	33.7	8.3	32.7	
met-bGH(L)	9	31.0	32.1	34.2	32.5	7.1	28.0	
bGH(A,V)与 bGH(A,L)比较							P=0.02	
met-bGH(V)与 met-bGH(L)比较							P=0.33	
val 与 Leu 比较							P=0.02	

注: a. 数值是根据奶牛每头每天千克数最小乘方平均数并作奶脂3.5%校正的牛奶预处理调整后所得的。

b. "N"是指每个处理中所应用的奶牛头数。

表 1

N 端为丙氨酸的生长激素密码顺序的创建过程

蛋白质名称	引物顺序	模板	质粒名称
bGH (A,L)	5'GACATAGCTGGGAAGGCCATAGAAATTCTAG	M13mp8/BGH <sub>ex-1</sub>	pMON3209
bGH (A,V)	5'GGTGCCATCTTCCACCCTCCCGCATCAG	M13mp8/BGH <sub>ex-1</sub> (ala)	pMON3215
pGH (A)	5'CCAGTGAAATTCTATGGCCTTCCAGCTATG	M13mp9/PGH <sub>ex-1</sub>	pMON3213

1、在引物顺序密码上为期望获得加入的或突变所强调的碱基。

2、名称系指最后在大肠杆菌里直接生产含有多肽的 N-端丙氨酸所用的质粒。

图 1

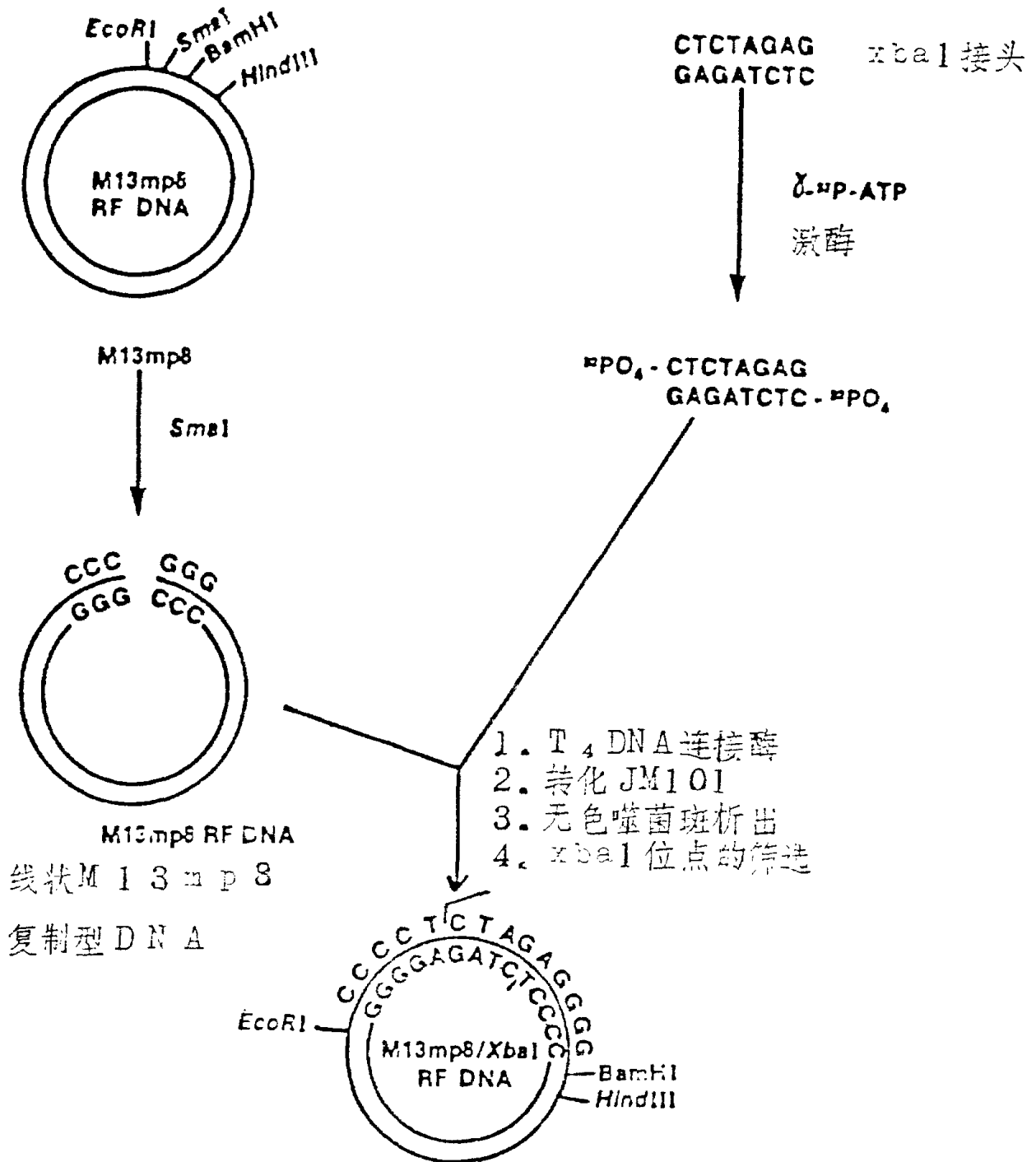


图 2

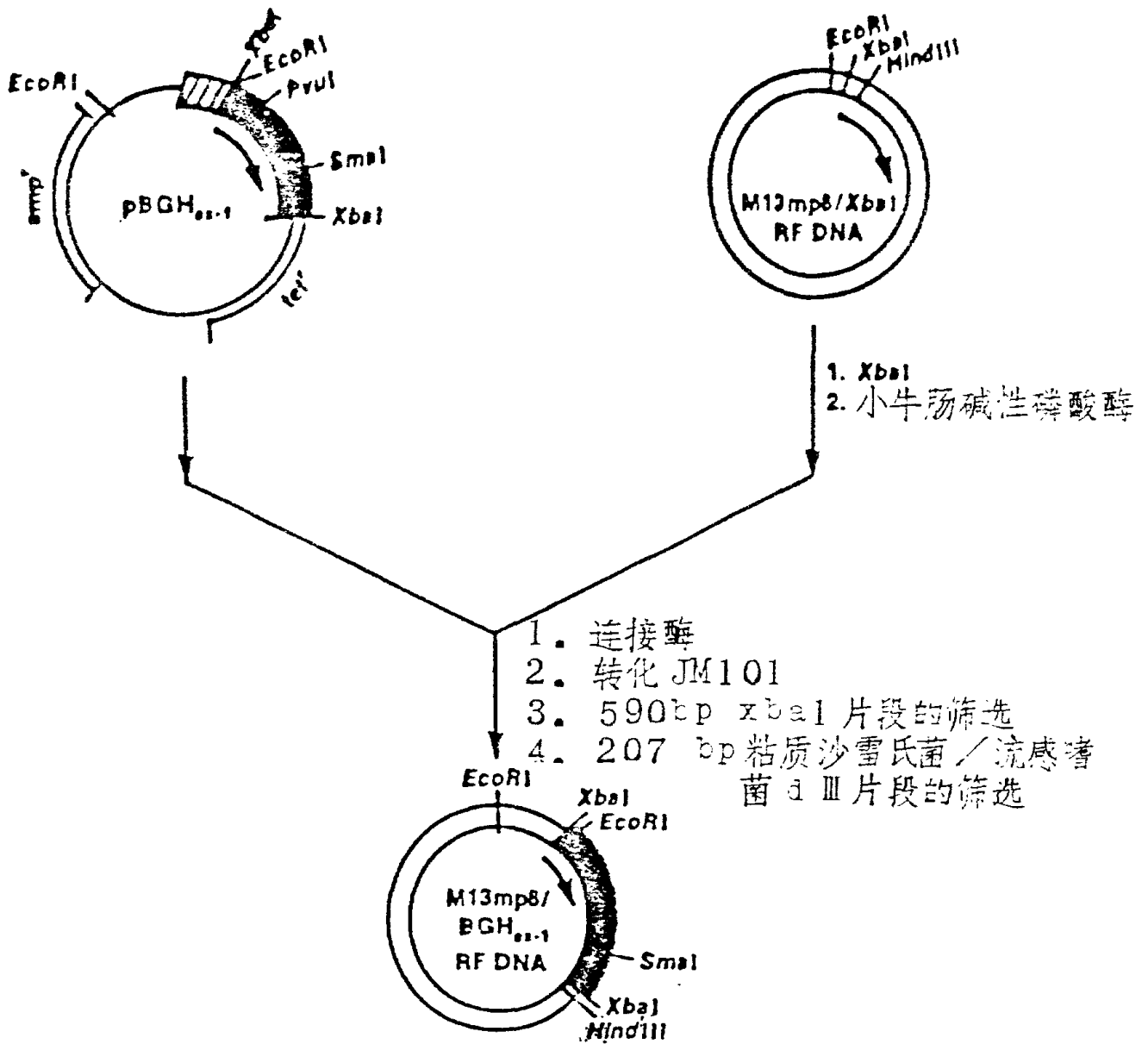


图 3

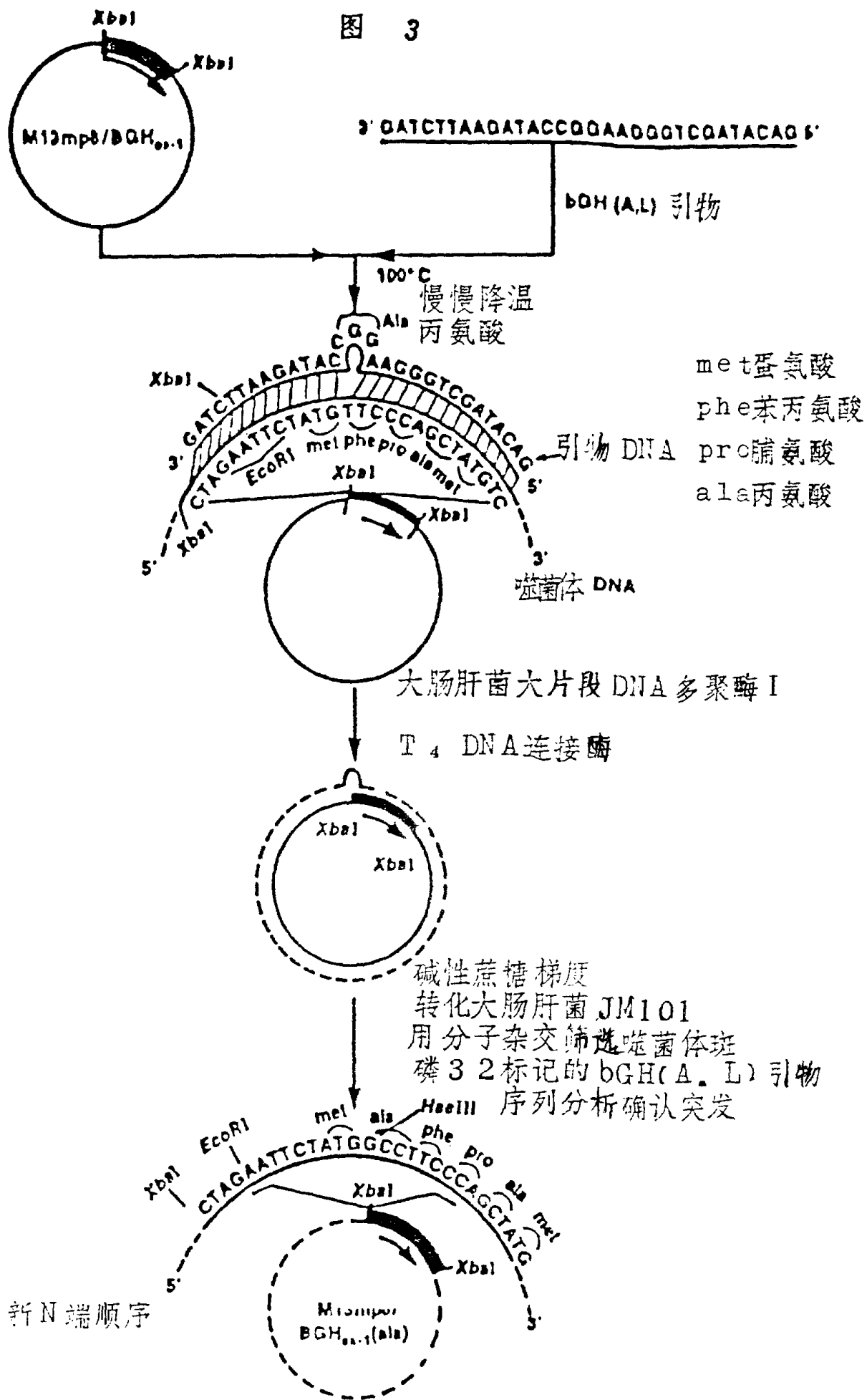


图 4

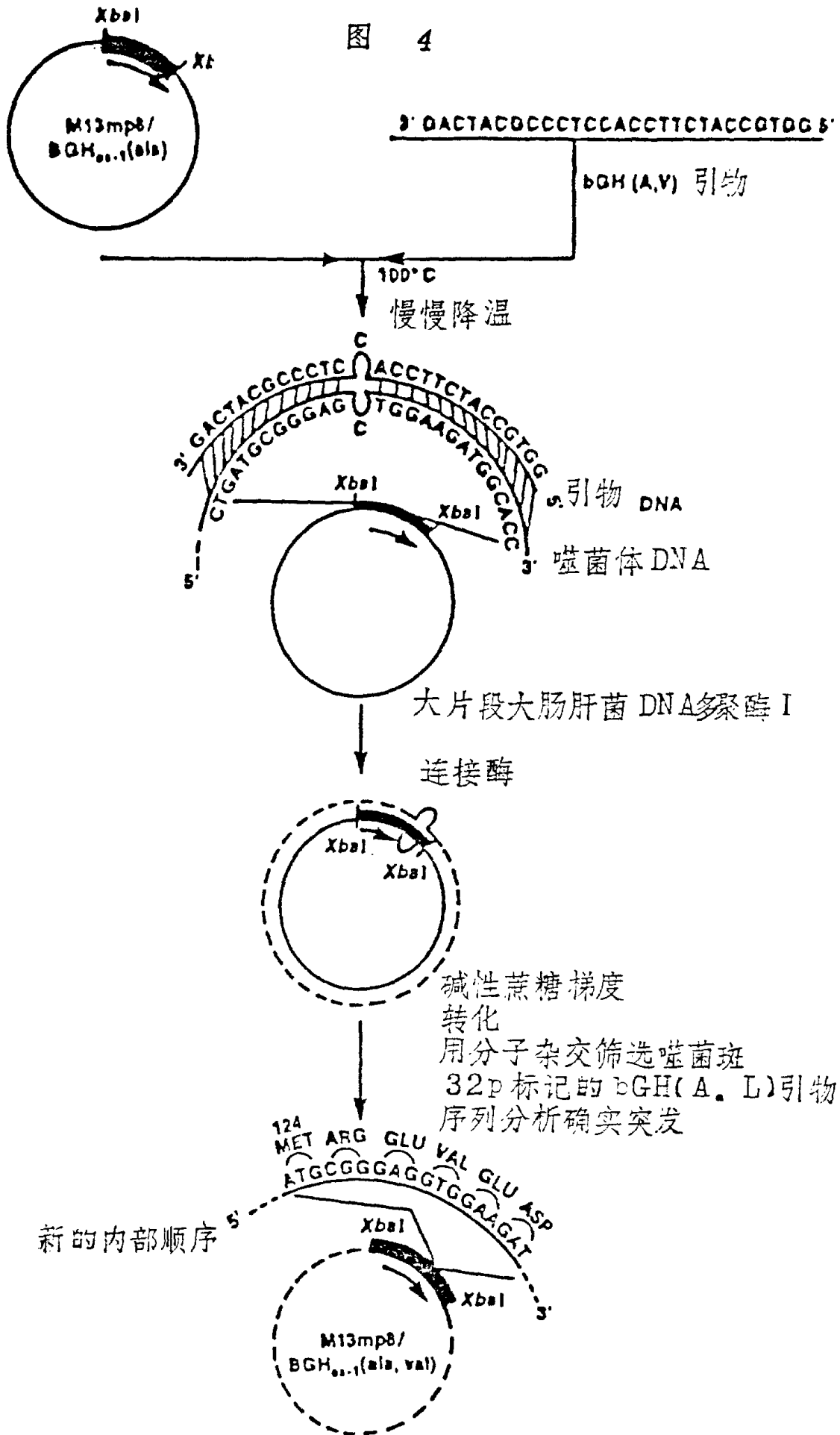


图 5

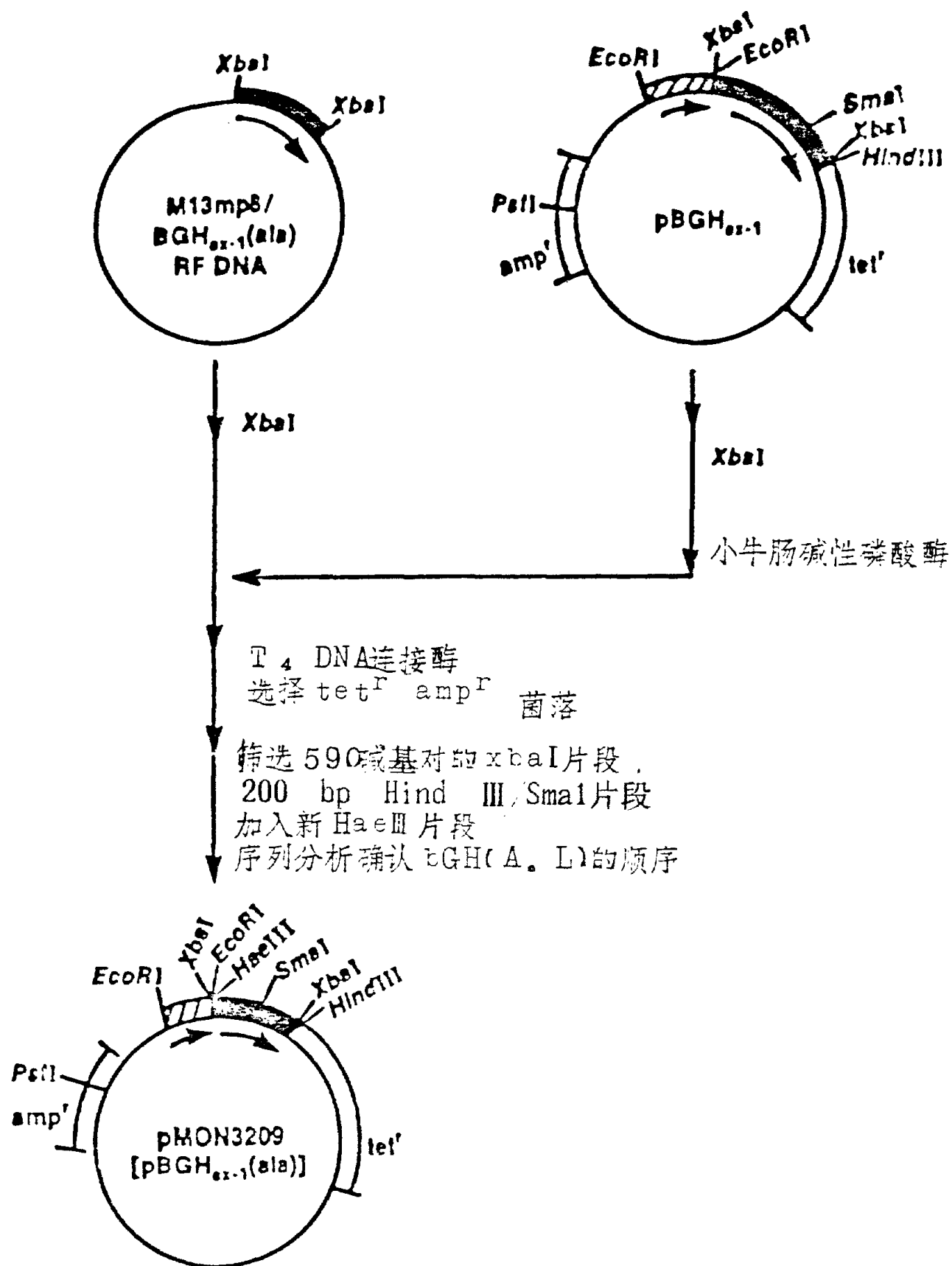


图 6

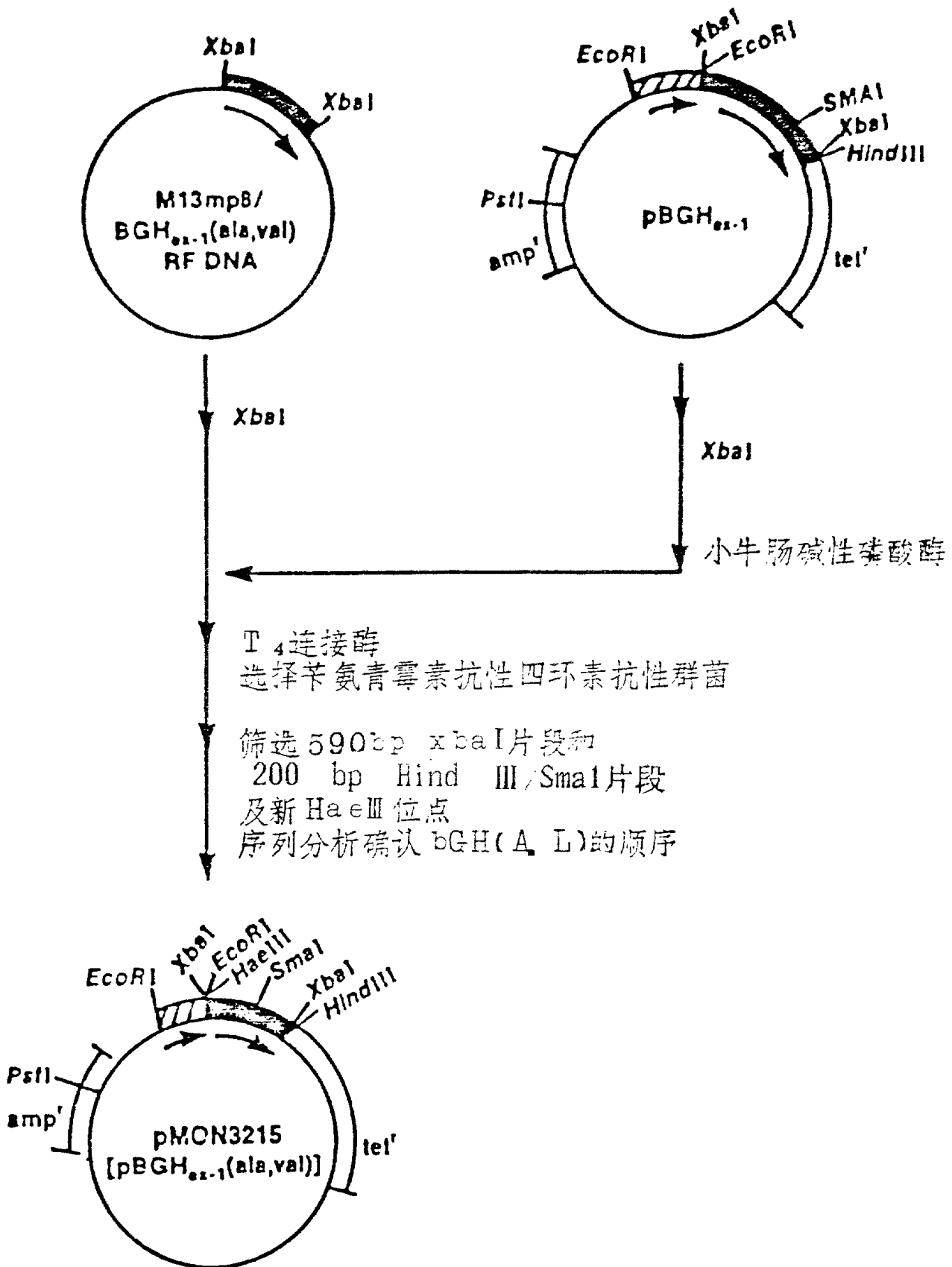


图 7

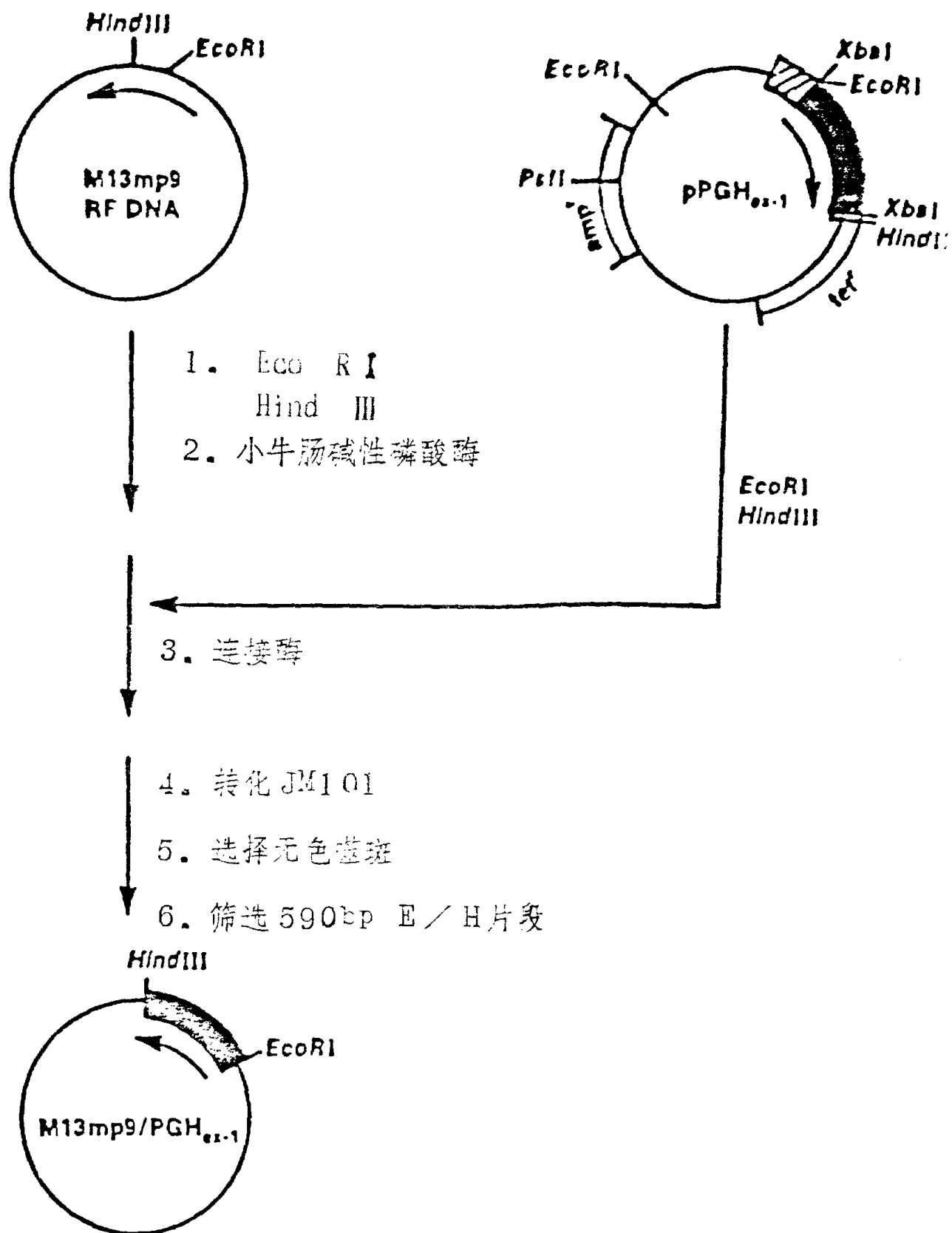


图 8

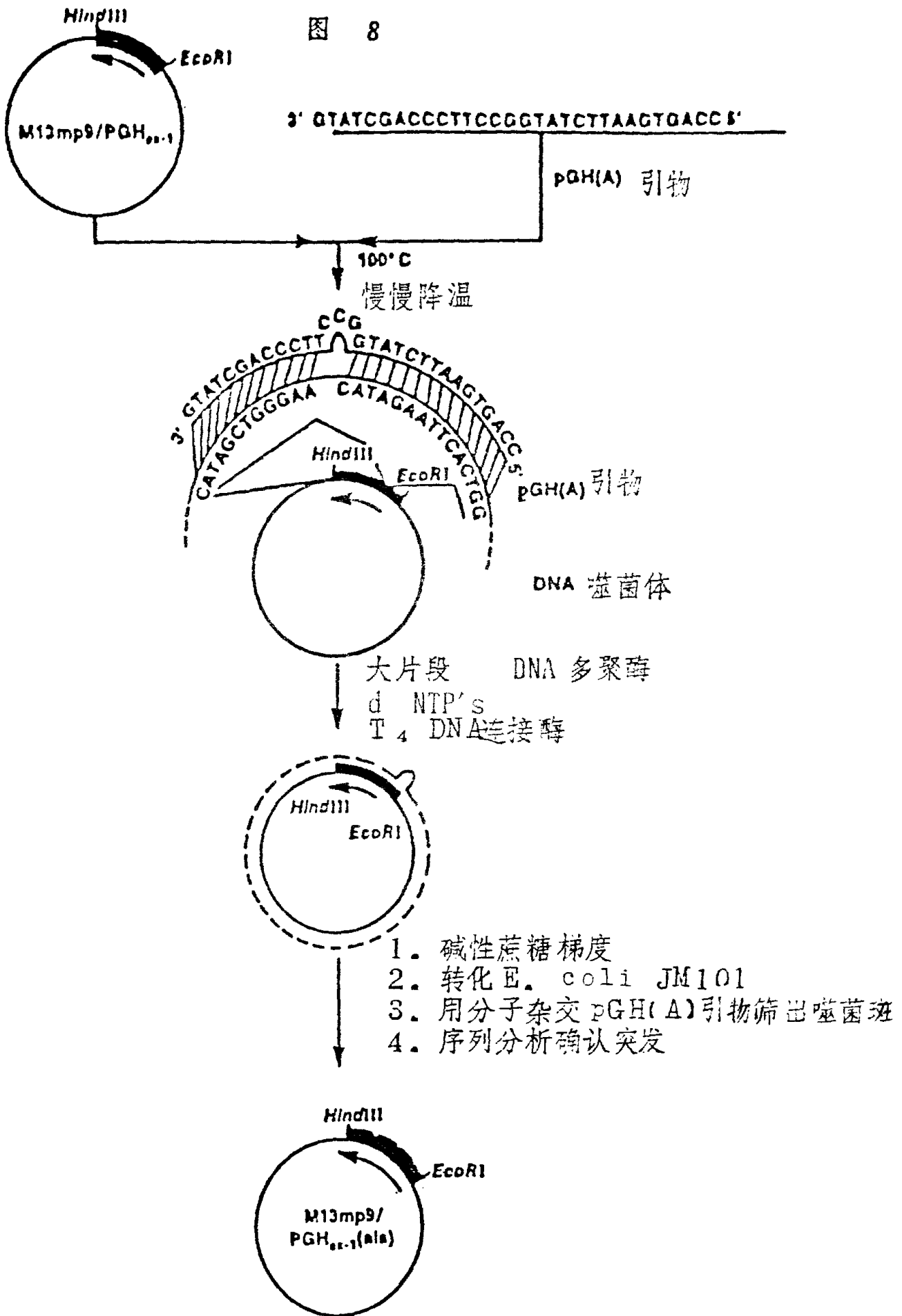
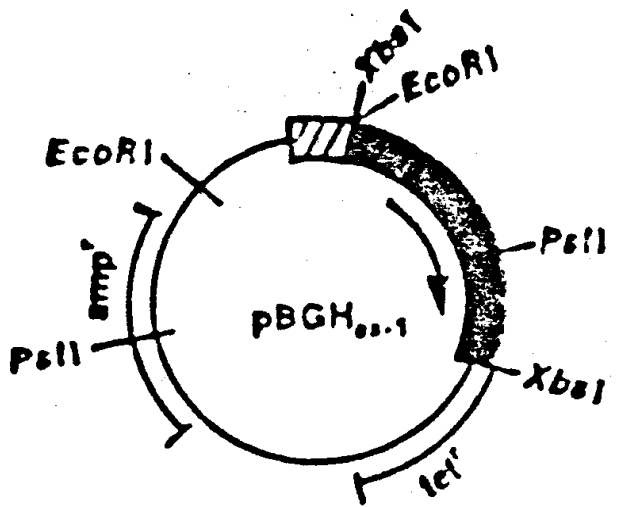


图 9



1. EcoRI部分酶介
2. S1核酸酶除去粘性末端
3. 连接酶
4. 转化 E. coli, 选择氨苄青霉素四环素抗性菌落
5. 筛选 590碱基对 EcoRI/HindIII 片段及 1050碱基对 EcoRI/PstI 片段

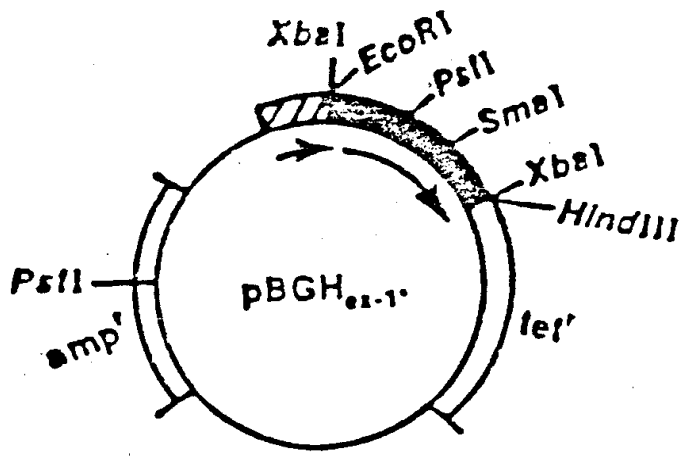


图 10

