[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07K 14/245
C12N 15/70 C12N 15/62
C12N 1/21
//(C12N1/21,C12R1:19)

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99810924.X

[45] 授权公告日 2004 年 4 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1144815C

[22] 申请日 1999.9.15 [21] 申请号 99810924.X
[30] 优先权
[32] 1998.9.15 [33] KR [31] 1998/38061
[86] 国际申请 PCT/KR1999/000547 1999.9.15
[87] 国际公布 WO00/15661 英 2000.3.23
[85] 进入国家阶段日期 2001.3.15
[71] 专利权人 韩美药品工业株式会社
地址 韩国京畿道
[72] 发明人 权世昌 郑圣烨 申 勋 崔宰道
崔基斗 李宽淳
审查员 赵 军

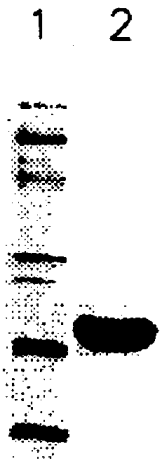
[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 李 悦

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 5 页

[54] 发明名称 修饰的大肠杆菌内毒素 II 信号肽以及表达该肽与异源蛋白质的融合蛋白的微生物

[57] 摘要

一种如下制备的异源蛋白质：(i)培养一种转化了表达载体的微生物以便产生异源蛋白质并分泌到周质中，其中的表达载体包含编码融合在一起的修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽和异源蛋白质的基因，所述修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽是通过将氨基酸序列如下(SEQ ID NO：1)的大肠杆菌内毒素 II 信号肽中第 2、第 4、第 5、第 12、第 20 和第 22 个氨基酸中的至少一个用其他氨基酸取代获得的，条件是修饰后的肽第 2 和第 4 个氨基酸至少一个是赖氨酸；(ii)从周质中纯化所述异源蛋白质。



ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

1．一种修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽，其特征在于具有氨基酸序列 Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala（SEQ ID NO：1）的大肠杆菌内毒素 II 信号肽中第 2、第 4、第 5、第 12、第 20 和第 22 个氨基酸中的至少一个是如下取代的：

第 2 个氨基酸 Lys 未被取代或被 Val 取代；

第 4 个氨基酸 Asn 被 Ser、Thr 或 Lys 取代；

第 5 个氨基酸 Ile 未被取代或者被 Thr 或 Ser 取代；

第 12 个氨基酸 Met 未被取代或被 Gly 或 Leu 取代；

第 20 个氨基酸 Asn 未被取代或者被 Val 取代；以及

第 22 个氨基酸 Tyr 未被取代或被 Gln 取代。

2．权利要求 1 所述修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽，其具有以下氨基酸取代情况：

(a)第 4 个 Thr 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(b)第 4 个 Thr 取代 Asn，第 20 个 Val 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(c)第 4 个 Lys 取代 Asn，第 5 个 Thr 取代 Ile，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(d)第 4 个 Ser 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(e) 第 4 个 Ser 取代 Asn，第 20 个 Val 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(f) 第 4 个 Thr 取代 Asn,第 12 个 Gly 取代 Met，第 20 个 Val 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(g) 第 4 个 Thr 取代 Asn,第 12 个 Leu 取代 Met，第 20 个 Val 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(h) 第 4 个 Lys 取代 Asn，第 5 个 Ser 取代 Ile，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(i)第 2 个 Val 取代 Lys,第 4 个 Lys 取代 Asn，第 5 个 Thr 取代 Ile，第 22 个 Gln 取代 Tyr；以及

(j) 第 4 个 Lys 取代 Asn，第 20 个 Val 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr。

3．编码权利要求 1 的修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽的基因。

4．包含融合在一起的权利要求 3 所述基因和编码人生长激素的基因的表达载体。

5. 权利要求 4 的表达载体，它还包含具有如下核苷酸序列（SEQ ID NO:2）的一个修饰过的大肠杆菌内毒素 II Shine-Dalgano 序列，该序列紧接在权利要求 3 所述基因的起始密码子前面：

5'-GAGGTGTTTT-3'

6. 权利要求 5 的表达载体，它是 pT14S1SH-4T22Q 或者 pT14S1SH-4T20V22Q。

7. 转化了权利要求 4 所述表达载体的大肠杆菌转化子。

8. 权利要求 7 的大肠杆菌转化子，它是大肠杆菌 HM10011（KCCM-10137）或大肠杆菌 HM10012（KCCM-10138）。

9. 一种在大肠杆菌中产生人生长激素的方法，包括培养权利要求 7 所述转化的大肠杆菌以便产生人生长激素并将其分泌至周质；以及从周质中回收该人生长激素。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述转化的大肠杆菌是大肠杆菌 HM10011（KCCM-10137）或大肠杆菌 HM10012（KCCM-10138）。

修饰的大肠杆菌内毒素 II 信号肽以及表达该肽与异源蛋白质的融合蛋白的微生物

发明领域

本发明涉及修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽，编码该肽的基因，包含融合在一起的该基因和编码异源蛋白质的基因的载体，转化了所述载体的微生物，以及利用该微生物制备所述异源蛋白质的方法。

发明背景

已有许多异源蛋白质是利用基因工程化的宿主微生物通过胞内方法或者分泌法制备的。

在胞内方法中，编码异源蛋白质的基因在微生物的细胞质内表达和积累。虽然公知该方法能得到较高的异源蛋白质产量，但表达出来的异源蛋白质不是天然活性形式而是氨基端甲硫氨酸化了的。此外，通过这种方法制备的没有生物活性的异源蛋白质经常形成不溶的包涵体，必须将其溶解并经过重折叠步骤转化为天然的活性形式。

对于分泌法来说，编码信号肽和异源蛋白质的融合蛋白的基因在微生物的细胞质内表达，然后融合蛋白质在跨过胞质膜时被微生物的信号肽酶加工去掉信号肽。加工过的蛋白质被分泌到微生物的细胞质（内）膜和外膜之间的周质空间。但是，已知该方法与胞内方法相比，异源蛋白质的产量低得多。因此，分泌法的产率需要提高。就此方法而言，已有报道说信号肽酶准确和有效地切割被表达融合蛋白的信号肽基元在提高分泌异源蛋白质的产量上非常重要（Akita, M.等，生物化学杂志 265：8164（1990））。

一般来说，信号肽分为两种，亲水信号肽和疏水信号肽。亲水信号肽通常由 12 到 70 个氨基酸组成。典型的疏水信号肽，例如大肠杆菌内毒素 II 信号肽含有 13 到 30 个氨基酸，它包含 3 个区域：含有 1 或 2 个碱性氨基酸的氨基端亲水区；含有大约 10 个碱性氨基酸的中央疏水区；

以及含有带小侧链的氨基酸的羧基端亲水区。

由于以和信号肽形成融合蛋白的形式表达的异源蛋白质经常被胞质蛋白酶迅速降解，当信号肽的分泌效率低时，分泌出来的异源蛋白质的产量下降。因此，通过修饰宿主微生物中表达的融合蛋白质的信号肽基元能增加分泌出来的异源蛋白质的产量。

人生长激素（hGH）包含 191 个氨基酸，分子量为 21500Da。自从 1956 年首次从人垂体中分离到纯化形式的 hGH（Li 和 Papkoff，科学 124：1293（1956））以来，对 hGH 已做了大量研究来阐述，例如 hGH 对人代谢的影响（Beck, J.C.等，科学 125：884（1957））以及 hGH 对垂体小躯干的抑制活性（Raben, M.S.，临床内分泌学杂志 18：901（1958））。最近，有报道说 hGH 对治疗唐氏综合症、骨质疏松症、创伤和烧伤也有效。

由于从人垂体获得的 hGH 量有限，有人试图通过胞内方法在基因工程化的大肠杆菌中产生大量 hGH（Goeddel, D.V.等，自然 281：544（1979））。但是，该方法也受到前面提到的产生不适合人用的甲硫氨酸化 hGH 问题的牵制。进一步尝试利用二肽氨肽酶除去甲硫氨酸化 hGH 的甲硫氨酸导致 hGH 产量低。

相应地，也试过分泌生产天然 hGH。例如，EP55942、20147 和 114695 公开了表达天然形式的 hGH 并通过分泌回收它的方法。然而，由这些方法产生的可回收量的 hGH 仍然很低。

EP177343 公开了一种制备 hGH 的方法，包括在有表达诱导物异丙基硫代-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）的情况下，表达编码 hGH 和碱性磷酸酶或者内毒素信号肽的融合蛋白的基因，并将 hGH 分泌到周质中。但是，该方法 hGH 产量低，并且需要使用昂贵的表达诱导物 IPTG。

因此，需要建立一种高产 hGH 的有效方法。

发明概述

因此，本发明的一个目的是提供一种修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽，用它能有利地在分泌法产生异源蛋白质中增强分泌效率。

本发明的另一个目的是提供编码该肽的基因。

本发明的再一目的是提供包含融合在一起的该基因和编码异源蛋白

质的基因的载体，

本发明的再一目的是提供转化了所述载体的微生物，

本发明的再一目的是提供利用该微生物制备所述异源蛋白质的方法。

与本发明的一个方面相对应，此处提供了一种修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽（命名为 MST），其特征在于氨基酸序列如下（SEQ ID NO: 1）的大肠杆菌内毒素 II 信号肽中第 2、第 4、第 5、第 12、第 20 和第 22 个氨基酸中的至少一个被其他氨基酸取代，条件是 MST 第 2 和第 4 个氨基酸至少一个是赖氨酸：

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala

附图简述

从以下对优选实施方案的描述并结合附图可以容易地看出本发明以上所述目的和特点，其中：

图 1 显示构建载体 pT-hGH 的过程；

图 2 描述了构建载体 pUC19ST 和 pUC19SH 的过程；

图 3 表示构建载体 pT14SSH 的过程；

图 4 显示构建载体 pT14S1SH 的过程；

图 5 再现了纯 hGH 的 SDS-PAGE 分析结果。

发明详述

在本发明所述修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽（MST）中，优选的是那些，其中

第 2 个氨基酸 Lys 未被取代；

第 4 个氨基酸 Asn 被 Ser、Thr、Lys 或 Gln 取代；

第 5 个氨基酸 Ile 未被取代，或者被 Thr 或 Ser 取代；

第 12 个氨基酸 Met 未被取代，或者被 Ala、Gly、Val、Leu 或 Ile 取代；

第 20 个氨基酸 Asn 未被取代，或者被 Ile、Phe 、Ala 或 Val 取代；以及

第 22 个氨基酸 Tyr 未被取代，或者被 Gln、Asn、Ala 或 Lys 取代。

同样优选的是那些，其中

第 2 个氨基酸 Lys 被任何其他氨基酸取代；

第 4 个氨基酸 Asn 被 Lys 取代；

第 5 个氨基酸 Ile 被 Ser、 Thr、 Asn、Gln 或 Arg 取代；

第 12 个氨基酸 Met 未被取代，或者被 Ala、Gly、Val、Leu 或 Ile 取代；

第 20 个氨基酸 Asn 未被取代，或者被 Ile、Phe 、Ala 或 Val 取代；以及

第 22 个氨基酸 Tyr 未被取代，或者被 Gln、Asn、Ala 或 Lys 取代。

更优选的 MST 是那些有以下氨基酸取代情况的：

(a)第 4 个 Thr 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(b)第 4 个 Thr 取代 Asn，第 20 个 Val 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(c)第 4 个 Lys 取代 Asn，第 5 个 Thr 取代 Ile，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(d)第 4 个 Ser 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(e) 第 4 个 Ser 取代 Asn，第 20 个 Val 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(f) 第 4 个 Thr 取代 Asn,第 12 个 Gly 取代 Met，第 20 个 Val 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(g) 第 4 个 Thr 取代 Asn,第 12 个 Leu 取代 Met，第 20 个 Val 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(h) 第 4 个 Lys 取代 Asn，第 5 个 Ser 取代 Ile，第 22 个 Gln 取代 Tyr；

(i)第 2 个 Val 取代 Lys,第 4 个 Lys 取代 Asn，第 5 个 Ser 取代 Ile，第 22 个 Gln 取代 Tyr；以及

(j) 第 4 个 Lys 取代 Asn，第 20 个 Val 取代 Asn，第 22 个 Gln 取代 Tyr。

本发明的 MST 可以由含有从 MST 氨基酸序列根据遗传密码子推导的核苷酸序列的基因编码。由于密码子简并性，可能存在编码相同氨基酸的不同密码子，因此本发明的 MST 包括所有推导自 MST 氨基酸序列的核苷酸序列。优选，所述 MST 基因可以包括 1 或多个大肠杆菌的偏

爱密码子。

可以利用定点突变（Papworth, C.等，策略 9：3（1996））通过将天然大肠杆菌内毒素 II 信号肽基因(命名为 STII 基因)的 1 或多个核苷酸突变来制备 MST 基因。可以利用常规方法（Sambrook 等，分子克隆：实验指南，第 2 版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA(1989)）来获得大肠杆菌的 STII 基因。此外，也可以化学合成 MST 基因。

本发明的 MST 当与异源蛋白质融合时能带来该异源蛋白质通过微生物（例如大肠杆菌）细胞膜的高效分泌。这样，利用含有融合在一起的 MST 基因和编码异源蛋白质的基因的表达载体，就能够便利地在大肠杆菌的细胞质中表达 MST 和异源蛋白质的融合蛋白（称为 MST/异源蛋白），并且融合蛋白能被有效地加工除去 MST 基元从而将异源蛋白质迅速地释放到大肠杆菌的周质中。因此，利用本发明的 MST 将导致异源蛋白质产率大幅提高。

MST 基因和编码异源蛋白质的基因的融合可以依照常规连接方法操作（Sambrook 等，同前）。

代表性的异源蛋白质包括人生长激素（hGH）、集落刺激因子（G-CSF）、干扰素、白介素、尿激酶原、胰岛素、VIII 因子、水蛭素、超氧化物歧化酶和降钙素，但它们并不限制可以用于本发明的异源蛋白质。编码异源蛋白质的基因可以通过常规方法获得，例如 cDNA 文库筛选和 PCR。

本发明的表达载体可以进一步包含如下核苷酸序列（SEQ ID NO：2）之修饰过的大肠杆菌内毒素 II Shine-Dalgano 序列（修饰过的 STII SD 序列），该序列刚好插在 MST 基因的起始密码子之前：

5'-GAGGTGTTTT-3'

修饰过的 STII SD 序列含有一个 4 核苷酸长的 STII SD 序列(GAGG)和一个 6 核苷酸长的富 T 序列。修饰过的 STII SD 序列中的 STII SD 序列提供了一个非常强的核糖体结合位点，在没有表达诱导物（例如异丙基硫代-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)）时它能增强表达水平。修饰过的 STII SD 序列中的富 T 序列起到防止由此转录出来的 mRNA 形成二级结构的作用，从而增强表达效率。修饰过的 STII SD 序列可以通过常规方法制

备（Sambrook 等，同前），例如化学合成法。此外，可以对具有如下核苷酸序列（SEQ ID NO：3）的 SDII SD 基因进行定点突变来获得修饰过的 STII SD 序列：

5'-GCTCTAGAGGTTGAGGTGTTTTATGAAAAAGAATA-3'

可以将修饰过的 STII SD 序列插在 MST 基因的 ATG 起始密码子前面，或者可以将 MST 基因的 ATG 起始密码子前面的 STII SD 序列进行修饰。

本发明的表达载体的例子包括在实施例 1 到 10 中制备的 pT14S1SH-4T22Q 、 pT14S1SH-4T20V22Q 、 pT14S1SH-4K5T22Q 、 pT14S1SH-4S22Q、pT14S1SH-4S20V22Q、pT14S1SH-4T12G20V22Q、pT14S1SH-4T12L20V22Q、pT14SSH-4K5S22Q、pT14SSH-2V4K5T22Q 和 pT14SSH-4K20V22Q，优选的载体是 pT14S1SH-4T22Q 和 pT14S1SH-4T20V22Q。

可以按照常规转化方法（Sambrook 等，同前）将本发明的表达载体导入微生物，例如大肠杆菌中。在转化微生物中，优选转化子大肠杆菌 HM10011 和 HM10012，它们已根据用于专利程序的国际承认的微生物保藏布达佩斯条约的规定，于 1998 年 8 月 12 日保藏在韩国微生物培养物保藏中心（KCCM）（地址：食品工程系，工学院，Yonsei University, Sodaemungu, Seoul120-749, Republic of Korea），保藏号分别为 KCCM-10137 和 KCCM-10138。

通过培养转化微生物使它表达编码 MST/异源蛋白质融合蛋白的基因并将异源蛋白质分泌到周质，以及从周质中回收异源蛋白质可以制备到异源蛋白质。转化微生物的培养可以按照常规方法（Sambrook 等，同前）进行。可以将微生物培养物离心或过滤来收集分泌异源蛋白质的微生物。可以按照常规方法（Ausubel，F.M.等，现代分子生物学指南，1989）将所述转化微生物破碎来获得周质溶液。例如可以在低渗溶液（例如蒸馏水）中通过渗透压冲击来破碎微生物。周质液中的异源蛋白质的回收可以按照常规方法（Sambrook 等，同前）操作，例如离子交换层析、凝胶过滤柱层析或者免疫柱层析。例如，可以通过 DEAE-Separose 柱层析、Phenyl Separose 柱层析和 Sephadex G-100 柱层析等连续操作来纯化

hGH。

根据本发明制备的异源蛋白质是天然形态的，氨基端没有甲硫氨酸化，因此，可以直接用于各种用途。

以下实施例意在进一步阐述本发明，而非限制其范围。

预备实施例 1：筛选人生长激素 cDNA 基因

(步骤 1)构建人垂体 cDNA 文库

向 1g 人垂体加入 10ml 胍溶液（4M 异硫氰酸胍，50mM Tris-HCl, pH7.5,10mM EDTA, 和 5% 2-巯基乙醇）并匀浆。匀浆物于 6℃、10000rpm 离心 10 分钟。向上清液中加入 1/10 体积的 2%乙醚肌氨酰(Sigma, USA), 混合物于 65℃保持 2 分钟。所得溶液中加入氯化铯至终浓度 0.1g/ml，将混合物在 9ml 垫层溶液（5.7M CsCl 和 0.1mM EDTA）上于 25000rpm 离心 16 小时以便得到 RNA 沉淀。沉淀物溶于 3ml 悬浮液（5mM EDTA，0.5% 肌氨酰和 5%巯基乙醇）中，然后相继用酚/氯仿/异戊醇（25：24：1，v/v/v）体系和氯仿/异戊醇（24：1，v/v/）抽提。向合并在一起的抽提液中加入 1/10 体积的 3M 醋酸钠和 2.5 体积的乙醇，利用常规方法（Sambrook 等，同前）离心混合物以便获得 RNA 沉淀。将 RNA 沉淀溶于蒸馏水（D.W.）中，于 70℃保持 10 分钟。然后加入氯化锂至浓度为 0.5M，用寡 dT-纤维素层析（Type3, Collaboratory Research, USA）按照 Aviv 和 Leder 的方法(Aviv，H 和 Leder P，分子生物学杂志 134：743（1972）)分离 poly(A)$^+$ RNA。这样获得的 poly(A)$^+$ RNA 于 65℃处理 5 分钟，冷却至 0℃，立即加入 20μl 5mM dNTP、40μl 5X 缓冲液（0.25M Tris-HCl,pH8.3,0.5M KCl 和 50mM $MgCl_2$）、10μl 200mM DTT、20μl 0.5mg/ml oligo(T_{12-18})(Pharmacia Inc., Sweden)、80μl D.W.、10μl (10 单位)RNAsin(Promega,USA)和 20μl（20 单位）AMV 反转录酶（Life Science Inc., USA）。混合物于 42℃反应 90 分钟后，向反应体系中加入 5μl 0.5M EDTA(pH8.0)和 200μl Tris 缓冲的酚，混匀，并于室温、10000rpm 离心 10 分钟。用二乙醚将上清液提取两次，向合并在一起的提取液中混入 20μl 3M 醋酸钠和 1ml 95%乙醇来沉淀单链 cDNA（ss cDNA）。

为了由 ss cDNA 合成双链 cDNA（ds cDNA），将 ss cDNA 沉淀溶

于 284μl D.W.中，加入 40μl 5mM NTP、80μl 5X 第二链（SS）缓冲液（250mM Tris-HCl(pH7.2)、450mM KCl、15mM 二硫苏糖醇、15mM $MgCl_2$ 和 0.25mg/ml 牛血清清蛋白）、12μl 5mM β-NAD^+、2μl 3000Ci/mmol[α-^{32}P]dCTP、4μl(4 单位)大肠杆菌 DNA 连接酶以及 10μl（100 单位）大肠杆菌 DNA 聚合酶 I。混合物于 14℃反应 16 小时后，反应体系如上进行酚提取和乙醇沉淀来获得 ds cDNA 沉淀。

为了产生 ds cDNA 的平末端，将 ds cDNA 沉淀溶于 42μl D.W.中，随后加入 5μl NTP、16μl 5XSS 缓冲液、1μl 5mM β-NAD^+、4μl RNAase(2μg/ml, Biolabs, USA)、4μl（4 单位）RNAase H、2μl（20 单位）大肠杆菌 DNA 连接酶和 4μl（8 单位）T4 DNA 连接酶，随后使混合物于 37℃反应 45 分钟。反应完成后，反应体系如上进行酚提取和乙醇沉淀以便获得平末端的 ds cDNA 沉淀。

为了通过甲基化保护 ds cDNA 的 EcoRI 限制位点，将平末端 ds cDNA 沉淀溶于 25μl D.W.中，然后加入 27μl 2X 甲基化酶缓冲液（100mM NaCl、100mM Tris-HCl, pH8.0 和 1mM EDTA）、1μl 50X SAM 溶液（1mg S-腺苷甲硫氨酸）和 10μl（10 单位）EcoRI 甲基化酶（Biolabs,USA）。混合物于 37℃反应 2 小时，反应体系如上进行酚提取和乙醇沉淀。将沉淀的 cDNA 与 EcoRI 接头（Biolabs,USA）和 T4 DNA 连接酶混合，混合物于 4℃反应 16 小时以便获得 EcoRI 接头连接的 cDNA。

用 EcoRI 处理所述 EcoRI 接头连接的 cDNA，经过 Sepharose CL-4B 柱层析来除去残留的接头。将 EcoRI 接头连接的 cDNA 插入 λgt11(Amersham, USA)的 EcoRI 位点。利用 λ 体外包裹试剂盒（Amersham Co., USA）将这样得到的 λgt11 进行体外包裹，然后转染大肠杆菌 Y1088（ATCC37195）从而获得人垂体 cDNA 文库。

（步骤 2）筛选人生长激素 cDNA 基因

为了从步骤 1 制备的 cDNA 文库中筛选出人生长激素克隆，如下进行噬斑杂交。

根据报道的人生长激素的氨基端氨基酸序列（Liu W.K.,等，生物化学与生物物理学报 93：428（1964）；Li, C.H.等，美国化学学会杂志 88：

2050（1966）），设计并合成以下核苷酸序列代表的 30 核苷酸片段混合序列寡核苷酸探针：

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg(SEQ ID NO:4)

5'-TTCCCAACCATTCCCTTATCCAGG-3'(SEQ ID NO:5)

利用混合序列寡核苷酸探针，按照 Benton 等的方法（Benton, W.E. 等，科学 196：180（1977））进行初级噬斑杂交以便得到阳性克隆。对这些克隆进行次级和三级噬斑杂交从而获得含有人生长激素 cDNA 基因的克隆。

为了证实该克隆含有人生长激素基因，用 EcoRI 切割所克隆的噬菌体 DNA，然后利用混合序列寡核苷酸探针对 DNA 片段做 Southern 印迹（Southern, E.,分子生物学杂志 98：503（1975））。此外，将含有人生长激素基因的 0.65kb EcoRI 片段插入 M13mp18 载体（Pharmacia, USA）的 EcoRI 位点从而获得载体 M13-hGH。利用双脱氧介导的链终止法（Sanger, F.等，美国科学院学报 74：5463-5467（1977））确定载体 M13-hGH 中的人生长激素基因的核苷酸序列。

预备实施例 2：制备编码成熟人生长激素的基因

为了制备编码成熟人生长激素的 cDNA 基因，利用以下引物 S1 和 AS1 对在预备实施例 1 的步骤 2 中获得的载体 M13-hGH 做 PCR。设计有义引物 S1 来提供位于成熟人生长激素第 1 个氨基酸的密码子上游的 NdeI 限制位点（5'-CATATG-3'），反义引物 AS1 提供终止密码子下游的 BamHI 限制位点（5'-GGATCC-3'）。

有义引物 S1（SEQ ID NO：6）

5'-CCGCATATGTTCCCAACCATTCCC-3'

反义 AS1(SEQ ID NO:7)

5'-GCTGGATCCTAGAAGCCACAGCTGC-3'

用 NdeI 和 BamHI 切割扩增好的人生长激素基因从而获得编码成熟人生长激素的基因（命名为 hGH 基因）。将 hGH 基因插入载体 pET14b(Movagen,USA)来获得载体 pT- hGH。

图 1 显示了以上构建载体 pT- hGH 的过程。

预备实施例 3：构建含有编码大肠杆菌内毒素 II 信号肽/ hGH 融合蛋白的基因的载体

（步骤 1）克隆大肠杆菌内毒素 II 信号肽基因

为了制备大肠杆菌内毒素 II 信号肽基因，在大肠杆菌内毒素 II 信号肽的核苷酸序列的基础上设计下面一对互补寡核苷酸，并用 DNA 合成仪（380B 型，Applied Biosystem, USA）合成。

有义链寡核苷酸 STII S1（SEQ ID NO：8）

5'-TCATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTGCATCTATGTTCGTTT TTTCTATTGCTACAAATGCCTACGCGT-3'

反义链寡核苷酸 STII AS1（SEQ ID NO：9）

5'-ACGCGTAGGCATTTGTAGCAATAGAAAAAACGAACATAGA TGCAAGAAGAAATGCGATATTCTTTTTCATGA-3'

将寡核苷酸设计成大肠杆菌内毒素 II 的起始密码子上游有 NcoI 和 BspHI 限制位点，另一端通过一个沉默突变引入 MluI 限制位点。

将两个寡核苷酸于 95℃退火得到含有编码大肠杆菌内毒素 II 信号肽的核苷酸序列（STII 基因）的平末端 ds DNA 片段。

将所述 STII 基因插入载体 pUC19（Biolabs, USA）中的 SmaI 位点以获得载体 pUC19ST。

（步骤 2）制备编码 STII/hGH 融合蛋白的基因

为了制备编码 STII/hGH 融合蛋白的基因，利用在预备实施例 2 中使用过的引物 S2 和 AS1，将预备实施例 2 中得到的载体 pT- hGH 做 PCR。将有义引物 S2 设计成成熟人生长激素第 1 个氨基酸（苯丙氨酸）的密码子上游有 MluI 限制位点(5'-CATATG-3')。

有义引物 S2（SEQ ID NO：10）

5'-GCGACGCGTTCCCAACCATTCCCTTATCC-3'

用 MluI 和 BamHI 切割扩增好的 DNA 片段，然后插入步骤 2 中获得的 pUC19ST 的 MluI/BamHI 部分。这样获得的载体 pUC19SH 含有编

码 STII/hGH 融合蛋白的基因（命名为 STII/hGH 基因）。

图 2 描述了以上构建载体 pUC19ST 和 pUC19SH 的过程。

（步骤 3）向 STII/hGH 基因添加大肠杆菌内毒素 II Shine-Dalgarno 序列

用 BspHI 和 BamHI 切割步骤 2 中获得的载体 pUC19SH 从而得到一个 640bp 的 STII- hGH 片段，将它插入载体 pET14b(Novagen, USA)的 NcoI/BamHI 部分得到载体 pT14SH。

利用引物 S3 和 AS3 将载体 pT14SH 做 PCR。将有义引物 S3 设计成提供大肠杆菌内毒素 II Shine-Dalgarno 序列（称为 STII SD 序列）和 XbaI 限制位点，反义引物 AS3 提供位于成熟 hGH 终止密码子下游的 BamHI 从而得到含有 STII SD 和 STII-hGH 融合基因的 DNA 片段（STII SD-STII-hGH）。

有义引物 S3（SEQ ID NO：11）

5'-GCTCTAGAGGTTGAGGTGATTTTATGAAAAAGAATA-3'

反义引物 AS3（SEQ ID NO：12）

5'-GGATGCCACGCTGGATCCTAGAAAGCCACAGCTGC-3'

用 XbaI 和 BamHI 切割所述 STII SD- STII-hGH 片段，然后插入载体 pET14b（Movagen, USA）的 Xbal/BamHI 部分得到载体 pET14SSH。用载体 pET14SSH 转化大肠杆菌 BL21（DE3）（Stratagene,USA）得到转化子命名为大肠杆菌 HM10010。

图 3 表示以上构建载体 pT14SSH 的过程。

预备实施例 4：用 STII-hGH 基因生产 hGH

为了检验大肠杆菌内毒素 II SD 序列对产生 hGH 的影响，分别在有和没有表达诱导物（IPTG）的情况下，将转化了载体 pET14SSH 的大肠杆菌 BL21（DE3）和同样得自预备实施例 3 步骤 3 的大肠杆菌 HM10010 在 LB 培养基（1%bacto-蛋白胨，0.5%bacto-酵母提取物和 1%NaCl）中于 37℃培养 24 小时。每份培养物在 10000rpm 离心 10 分钟以便沉淀细菌细胞，将沉淀悬浮在 1/10 体积等渗溶液（20%蔗糖，含有 1mM EDTA

的 10mM Tris-Cl 缓冲液，pH7.0）中。悬浮液在室温下保持 30 分钟，然后在 10000rpm 离心 15 分钟以收集细菌细胞。将细胞于 4℃重悬在 D.W. 中，在 12000rpm 离心 20 分钟从而得到上清液，作为周质液。利用抗 hGH 的抗体（Boehringer Mannheim）按照 ELISA 方法（Kato,K.等，免疫学杂志 116：1554（1976））检测周质液中的 hGH 水平,计算每升培养物产生的 hGH 量。结果如表 1 所示。

表 1

	pT14SH		pT14SSH	
IPTG	-	+	-	+
hGH 水平(mg/l)	120	100	330	250

从表 1 可以看出，含有 STII SD 序列的载体 pT14SSH 即使在没有表达诱导物 IPTG 时也高产 hGH。

实施例 1 到 10

实施例 1 到 10 描述了根据本发明构建含有编码 MST/ hGH 融合蛋白的基因的载体，其中 MST 代表修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽。按照定点突变（Papworth C.等，策略 9：3（1996））将得自预备实施例 3 之步骤 3 的质粒 pT14SSH 中的 STII 基因或 STII SD 序列进行修饰，这是通过利用一个带有修饰过的核苷酸序列的有义引物和带有与有义引物互补的核苷酸序列的反义引物做 PCR 进行的。

在实施例 1 到 10 中获得的修饰过的大肠杆菌内毒素 II 信号肽 MST（MST1 到 MST10）和 STII 的特征见表 2，以下描述实施例 1 到 10 的制备过程。

表 II

实施例	MST	2nd	4th	5th	12th	20th	22th
	STII（SEQ ID NO：1）	Lys	Asn	Ile	Met	Asn	Tyr
1	MST1（SEQ ID NO：13）	Lys	Thr	Ile	Met	Asn	Gln
2	MST2（SEQ ID NO：14）	Lys	Thr	Ile	Met	Val	Gln
3	MST3（SEQ ID NO：15）	Lys	Lys	Thr	Met	Asn	Gln
4	MST4（SEQ ID NO：16）	Lys	Ser	Ile	Met	Asn	Gln
5	MST5（SEQ ID NO：17）	Lys	Ser	Ile	Met	Val	Gln
6	MST6（SEQ ID NO：18）	Lys	Thr	Ile	Gly	Val	Gln
7	MST7（SEQ ID NO：19）	Lys	Thr	Ile	Leu	Val	Gln
8	MST8（SEQ ID NO：20）	Lys	Lys	Ser	Met	Asn	Gln
9	MST9（SEQ ID NO：21）	Val	Lys	Thr	Met	Asn	Gln
10	MST10（SEQ ID NO：22）	Lys	Lys	Ile	Met	Val	Gln

实施例 1：构建含有编码 MST1/hGH 融合蛋白的基因的载体

(步骤 1)

利用以下互补引物 S4 和 AS4 将得自预备实施例 3 的载体 pT14SSH 做 PCR，上述引物设计来以 Thr 密码子（ACA）取代 STII 的第 4 个密码子（ATT）。

有义引物 S4（SEQ ID NO：23）

5'-GGTGTTTTATGAAAAAGACAATCGCATTTCTTC-3'

反义引物 AS4（SEQ ID NO：24）

5'-GAAGAAATGCGATTGTCTTTTTCATAAAACACC-3'

用 XbaI 和 MluI 切割这样得到的载体从而获得一个 0.1kb 的 XbaI/MluI 片段，将其插入载体 pT14SSH 的 XbaI/MluI 部分获得载体 pT14SSH-4T。载体 pT14SSH-4T 含有编码修饰过的 STII/hGH 融合蛋白的基因，所述蛋白 STII 的第 4 个氨基酸被 Thr 代替。

（步骤 2）

利用以下互补引物 S5 和 AS5 将载体 pT14SSH-4T 做 PCR，上述引物设计来以 Gln 密码子（CAA）取代 STII 的第 22 个密码子（AAT）从而获得载体 pT14SSH-4T22Q。

有义引物 S5（SEQ ID NO：25）

5'-CAAATGCCCAAGCGTTCCCA-3'

反义引物 AS5（SEQ ID NO：26）

5'-TGGGAACGCTTGGGCATTTG-3'

载体 pT14SSH-4T22Q 含有编码 MST1/hGH 融合蛋白的基因，该蛋白中 STII 的第 4 和 22 个氨基酸分别被 Thr 和 Gln 取代。

(步骤 3)

利用以下互补引物 S6 和 AS6 将载体 pT14SSH-4T22Q 做 PCR，所述引物在 STII SD 序列 5'-GAGG-3'和 STII 起始密码子之间有如下所示的 6 核苷酸序列以便防止其 mRNA 转录物形成二级结构。

有义引物 S6（SEQ ID NO：27）

5'-TCTAGAGGTTGAGGTGTTTTATGA-3'

反义引物 AS6（SEQ ID NO：28）

5'-TCATAAAACACCTCAACCTCTAGA-3'

这样得到的载体 pT14S1SH-4T22Q 含有一个修饰过的 STII SD 序列和编码 MST1/hGH 融合蛋白的基因，该蛋白的 STII 的第 4 和第 22 个氨基酸分别被 Thr 和 Gln 取代。

图 4 显示了以上构建载体 pT14S1SH 的过程。

用载体 pT14S1SH-4T22Q 转化大肠杆菌 BL21（DE3）得到一个转化子，命名为大肠杆菌 HM10011，已于 1998 年 8 月 12 日保藏在韩国微生物培养物保藏中心（KCCM），保藏号 KCCM-10137。

实施例 2：构建含有编码 MST2/hGH 融合蛋白的基因的载体

重复实施例 1 中步骤 2 的过程，只是使用以下互补引物 S7 和 AS7，所述引物设计来以 Val 和 Gln 密码子（GTT 和 CAA）分别取代 STII 的第 20 和 22 个密码子（AAT 和 TAT）从而得到载体 pT14SSH-4T20V22Q。

有义引物 S7（SEQ ID NO：29）

5'-GTTTTTTCTATTGCTACAGTTGCCCAAGCGTTCCCAACCATTCCC-3'

反义引物 AS7（SEQ ID NO：30）

5'-GGGAATGGTTGGGAACGCTTGGGCAACTGTAGCAATAGAAAAAAC-3'

然后，重复实施例中步骤 3 的过程，只是利用载体 pT14SSH-4T20V22Q 得到载体 pT14S1SH-4T20V22Q。载体 pT14S1SH-4T20V22Q 含有修饰过的 STII SD 序列和一个编码 MST1/hGH 融合蛋白的基因，该蛋白的 STII 的第 4、第 20 和第 22 个氨基酸分别被 Thr、Val 和 Gln 取代。

用载体 pT14S1SH-4T20V22Q 转化大肠杆菌 BL21（DE3）得到一个转化子，命名为大肠杆菌 HM10012，已于 1998 年 8 月 12 日保藏在韩国微生物培养物保藏中心（KCCM），保藏号 KCCM-10138。

实施例 3：构建含有编码 MST3/hGH 融合蛋白的基因的载体

重复实施例 1 中步骤 1 的过程，只是使用以下互补引物 S8 和 AS8，所述引物设计来以 Lys 和 Thr 密码子（AAG 和 ACA）分别取代 STII 的第 4 和 5 个密码子（AAT 和 ATC）从而得到载体 pT14SSH-4K5T。

有义引物 S8（SEQ ID NO：31）

5'-GAGGTGTTTTATGAAAAAGAAGACAGCATTTCTTC-3'

反义引物 AS8（SEQ ID NO：32）

5'-GAAGAAATGCTGTCTTCTTTTTCATAAAACACCTC-3'

使用载体 pT14SSH-4K5T，重复实施例 1 中步骤 2 的过程以便得到载体 pT14SSH-4K5T22Q。

然后，用载体 pT14SSH-4K5T22Q 重复实施例 1 中步骤 3 的过程以便得到载体 pT14S1SH-4K5T22Q。载体 pT14S1SH-4K5T22Q 含有修饰过的 STII SD 序列和一个编码 MST3/hGH 融合蛋白的基因，其中 STII 的第 4、5 和 22 个氨基酸分别被 Lys、Thr 和 Gln 取代。

用载体 pT14S1SH-4K5T22Q 转化大肠杆菌 BL21（DE3）从而获得转化子，命名为大肠杆菌 HM10013。

实施例 4：构建含有编码 MST4/hGH 融合蛋白的基因的载体

重复实施例 1 中步骤 1 的过程，只是使用以下互补引物 S9 和 AS9，所述引物设计来以 Ser 密码子（TCT）取代 STII 的第 4 个密码子（AAT）从而得到载体 pT14SSH-4S。

有义引物 S9（SEQ ID NO：33）

5'-GAGGTGTTTTATGAAAAAGTCTATCGCATTTCTTC-3'

反义引物 AS9（SEQ ID NO：34）

5'-GAAGAAATGCGATAGACTTTTTCATAAAACACCTC-3'

使用载体 pT14SSH-4S，重复实施例 1 中步骤 2 的过程以便得到载体 pT14SSH-4S22Q。

然后，用载体 pT14SSH-4S22Q 重复实施例 1 中步骤 3 的过程以便得到载体 pT14S1SH-4S22Q。载体 pT14S1SH-4S22Q 含有修饰过的 STII SD 序列和一个编码 MST4/hGH 融合蛋白的基因，其中 STII 的第 4 和 22 个氨基酸分别被 Ser 和 Gln 取代。

用载体 pT14S1SH-4S22Q 转化大肠杆菌 BL21（DE3）从而获得转化子，命名为大肠杆菌 HM10014。

实施例 5：构建含有编码 MST5/hGH 融合蛋白的基因的载体

重复实施例 1 中步骤 2 的过程，只是使用实施例 4 中得到的载体 pT14SSH-4S 和实施例 2 中使用的引物 S7 和 AS7，从而得到载体 pT14SSH-4S20V22Q。

然后使用载体 pT14SSH-4S20V22Q，重复实施例 1 中步骤 3 的过程以便得到载体 pT14S1SH-4S20V22Q。载体 pT14S1SH-4S20V22Q 含有修饰过的 STII SD 序列和一个编码 MST5/hGH 融合蛋白的基因，其中 STII 的第 4、20 和 22 个氨基酸分别被 Ser、Val 和 Gln 取代。

用载体 pT14S1SH-4S20V22Q 转化大肠杆菌 BL21（DE3）从而获得转化子，命名为大肠杆菌 HM10015。

实施例 6：构建含有编码 MST6/hGH 融合蛋白的基因的载体

用以下互补引物 S10 和 AS10 将实施例 2 中获得的载体 pT14SSH-4T20V22Q 做 PCR，所述引物设计来以 Gly 密码子（GGT）取代 STII 的第 12 个密码子（ATG）从而获得载体 pT14SSH-4T12G20V22Q。

有义引物 S10（SEQ ID NO：35）

5'-GCATTTCTTCTTGCATCTGGTTTCGTTTTTTCTATTGC-3'

反义引物 AS10（SEQ ID NO：36）

5'-GCAATAGAAAAAACGAAACCAGATGCAAGAAGAAATGC-3'

然后使用载体 pT14SSH-4T12G20V22Q 重复实施例 1 中步骤 3 的过程以便得到载体 pT14S1SH-4T12G20V22Q。载体 pT14S1SH-4T12G20V22Q 含有修饰过的 STII SD 序列和一个编码 MST6/hGH 融合蛋白的基因，其中 STII 的第 4、12、20 和 22 个氨基酸分别被 Thr、Gly、Val 和 Gln 取代。

用载体 pT14S1SH-4T12G20V22Q 转化大肠杆菌 BL21（DE3）从而获得转化子，命名为大肠杆菌 HM10016。

实施例 7：构建含有编码 MST7/hGH 融合蛋白的基因的载体

用以下互补引物 S11 和 AS11 将实施例 6 中获得的载体 pT14SSH-4T12G20V22Q 做 PCR，所述引物设计以 Leu 密码子（CTT）取代 STII 的第 12 个密码子（GGT）从而获得载体 pT14SSH-4T12L20V22Q。

有义引物 S11（SEQ ID NO：37）

5'-GCATTTCTTCTTGCATCTCTTTTCGTTTTTTCTATTGC-3'

反义引物 AS11（SEQ ID NO：38）

5'-GCAATAGAAAAAACGAAAAGAGATGCAAGAAGAAATGC-3'

然后使用载体 pT14SSH-4T12L20V22Q 重复实施例 1 中步骤 3 的过程以便得到载体 pT14S1SH-4T12L20V22Q。载体 pT14S1SH-4T12L20V22Q 含有修饰过的 STII SD 序列和一个编码 MST7/hGH 融合蛋白的基因，其中 STII 的第 4、12、20 和 22 个氨基酸分别被 Thr、Leu、Val 和 Gln 取代。

用载体 pT14S1SH-4T12L20V22Q 转化大肠杆菌 BL21（DE3）从而获得转化子，命名为大肠杆菌 HM10017。

实施例 8：构建含有编码 MST8/hGH 融合蛋白的基因的载体

重复实施例 1 中步骤 1 的过程，但使用以下互补引物 S12 和 AS12，所述引物设计以 Lys 和 Ser 密码子（AAG 和 TCT）取代 STII 的第 4 和第 5 个密码子（AAT 和 ATC）从而获得载体 pT14SSH-4K5S。

有义引物 S12（SEQ ID NO：39）

5'-GAGGTGTTTTATGAAAAAGAAGTCTGCATTTCTTC-3'

反义引物 AS12（SEQ ID NO：40）

5'-GAAGAAATGCAGACTTCTTTTTCATAAAACACCTC-3'

使用载体 pT14SSH-4K5S 重复实施例 1 中步骤 2 的过程以便得到载体 pT14SSH-4K5S22Q。载体 pT14SSH-4K5S22Q 含有编码 MST8/hGH 融合蛋白的基因，其中 STII 的第 4、5 和 22 个氨基酸分别被 Lys、Ser 和 Gln 取代。

用载体 pT14SSH-4K5S22Q 转化大肠杆菌 BL21（DE3）从而获得转化子，命名为大肠杆菌 HM10018。

实施例 9：构建含有编码 MST9/hGH 融合蛋白的基因的载体

重复实施例 1 中步骤 1 的过程，但使用以下互补引物 S13 和 AS13，所述引物设计以 Val、Lys 和 Thr 密码子（GTT、AAG 和 ACA）取代 STII 的第 2、4 和 5 个密码子（AAA、AAT 和 ATC）从而获得载体 pT14SSH-2V4K5T。

有义引物 S13（SEQ ID NO：41）

5'-GAGGTGTTTTATGGTTAAGAAGACAGCATTTCTTC-3'

反义引物 AS13（SEQ ID NO：42）

5'-GAAGAAATGCTGTCTTCTTAACCATAAAACACCTC-3'

使用载体 pT14SSH-2V4K5T 重复实施例 1 中步骤 2 的过程以便得到载体 pT14SSH-2V4K5T22Q。载体 pT14SSH-2V4K5T22Q 含有编码 MST9/hGH 融合蛋白的基因，其中 STII 的第 2、4、5 和 22 个氨基酸分

别被 Val、Lys、Thr 和 Gln 取代。

用载体 pT14SSH-2V4K5T22Q 转化大肠杆菌 BL21（DE3）从而获得转化子，命名为大肠杆菌 HM10019。

实施例 10：构建含有编码 MST10/hGH 融合蛋白的基因的载体

重复实施例 1 中步骤 1 的过程，但使用以下互补引物 S14 和 AS14，所述引物设计以 Lys 密码子（AAG）取代 STII 的第 4 个密码子（AAT）从而获得载体 pT14SSH-4K。

有义引物 S14（SEQ ID NO：43）

5'-GAGGTGTTTTATGAAAAAGAAGATCGCATTTCTTC-3'

反义引物 AS14（SEQ ID NO：44）

5'-GAAGAAATGCGATCTTCTTTTTCATAAAACACCTC-3'

使用载体 pT14SSH-4K 重复实施例 1 中步骤 2 的过程以便得到载体 pT14SSH-4K22Q。用实施例 2 中使用的引物 S7 和 AS7 将载体 pT14SSH-4K22Q 做 PCR 从而获得载体 pT14SSH-4K20V22Q。载体 pT14SSH-4K20V22Q 含有编码 MST10/hGH 融合蛋白的基因，其中 STII 的第 4、20 和 22 个氨基酸分别被 Lys、Val 和 Gln 取代。

用载体 pT14SSH-4K20V22Q 转化大肠杆菌 BL21（DE3）从而获得转化子，命名为大肠杆菌 HM10020。

实施例 11：利用 MST/ hGH 基因制备 hGH

为了检验 MST 对 hGH 产量的影响，利用实施例 1 到 10 制备的转化子（大肠杆菌 HM10011 到 HM10020），在不加 IPTG 的情况下重复预备实施例 4 的过程。在预备实施例 3 之步骤 3 中制备的转化子 HM10010 作为对照。hGH 水平计算为每升培养基中 hGH 的产量。结果如表 III 所示。

表 III

转化子	表达载体	hGH 水平（mg/l）
大肠杆菌 HM10010	p14SSH	330
大肠杆菌 HM10012	pT14S1SH-4T20V22Q	1300
大肠杆菌 HM10013	pT14S1SH-4K5T22Q	1270
大肠杆菌 HM10014	pT14S1SH-4S22Q	1320
大肠杆菌 HM10015	pT14S1SH-4S20V22Q	1230
大肠杆菌 HM10016	pT14S1SH-4T12G20V22Q	1173
大肠杆菌 HM10017	pT14S1SH-4T12L20V22Q	1282
大肠杆菌 HM10018	pT14SSH-4K5S22Q	1150
大肠杆菌 HM10019	pT14SSH-2V4K5T22Q	1140
大肠杆菌 HM10020	pT14SSH-4K20V22Q	1230

从表 III 可以看出，本发明的每个含有 MST 基因的载体 hGH 产量高于含有天然 STII 的对照载体 p14SSH。另外，在本发明的载体中，含有修饰过的 STII SD 序列的载体与含有天然 STII SD 序列的那些相比，hGH 产量高。

实施例 12：hGH 的纯化

将实施例 1 中制备的转化子大肠杆菌 HM10011 培养在 LB 培养基中，用 IPTG 诱导 MST/ hGH 的表达，培养物于 6000rmp 离心 20 分钟来收获细胞。通过重复预备实施例 4 的过程由这些细胞制备周质液。

将周质液调节至 pH5.3 到 6.0，吸附到预平衡至 pH5.8 的 DEAE-Separose(Pharmacia Inc., Sweden)柱子上，然后用 10mM NaCl 溶液洗柱子。利用分别含有 20mM、40mM 和 80mM 的 NaCl 缓冲液洗脱 hGH，收集含有 hGH 的流分并合并。

合并的流分经 Phenyl Separose(Pharmacia Inc., Sweden)柱层析获得纯

度 99%的 hGH，经 Sephadex G-100(Pharmacia Inc., Sweden)柱层析进一步纯化。

纯化的 hGH 流分经十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）来确定纯度和 hGH 的大致浓度，然后经 ELISA 确定流分中的确切浓度。

图 5 再现了 SDS-PAGE 的结果，其中 1 道显示蛋白大小标记蛋白质；2 道显示纯化的 hGH。从图 5 可以看出，通过培养本发明的转化子可以获得高纯度的 hGH。

此外，确定了 hGH 的氨基端氨基酸序列，结果显示按照本发明制备的 hGH 氨基端未被甲硫氨酸化。

参考以上具体实施方案对本发明进行了描述，但应当认识到本领域技术人员可以做出各种改进和变化，它们也落在所附权利要求限定的本发明的范围内。

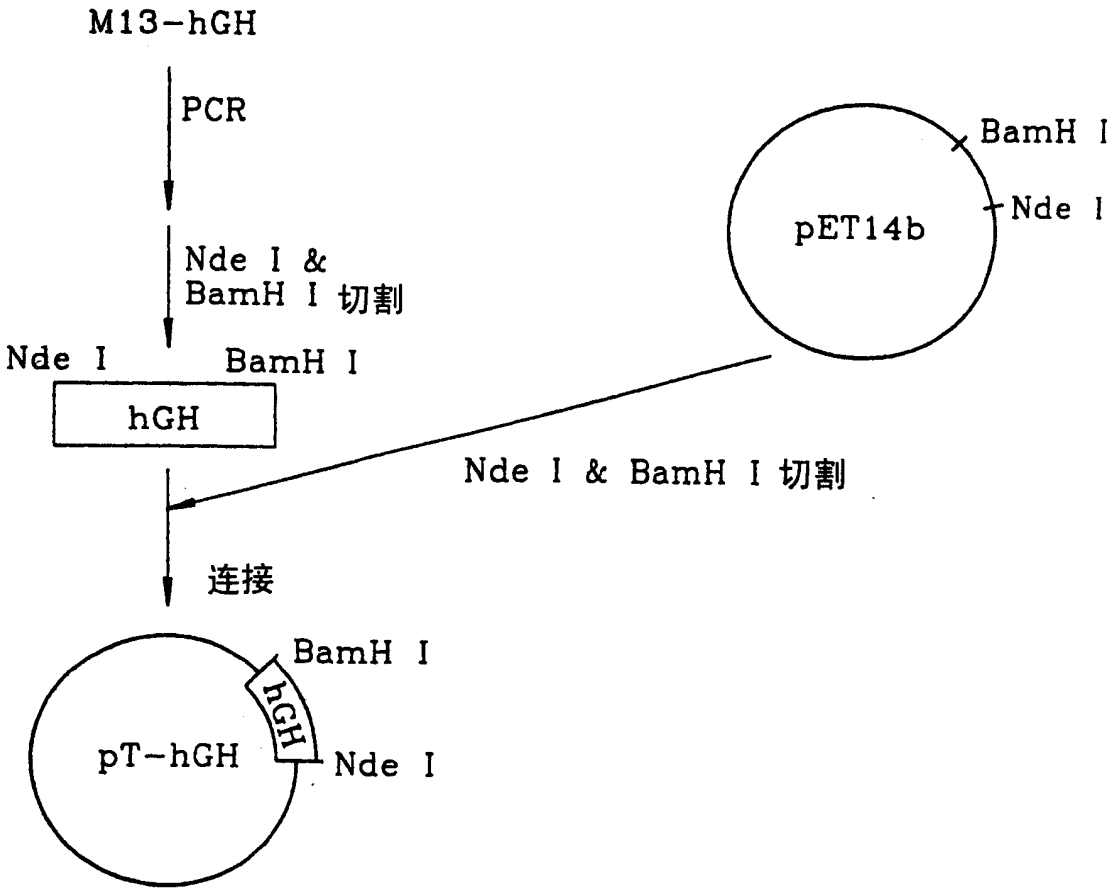

M13-hGH
PCR
Nde I &
BamH I 切割
Nde I
BamH I
hGH
pET14b
BamH I
Nde I
Nde I & BamH I 切割
连接
BamH I
hGH
pT-hGH
Nde I

图 1

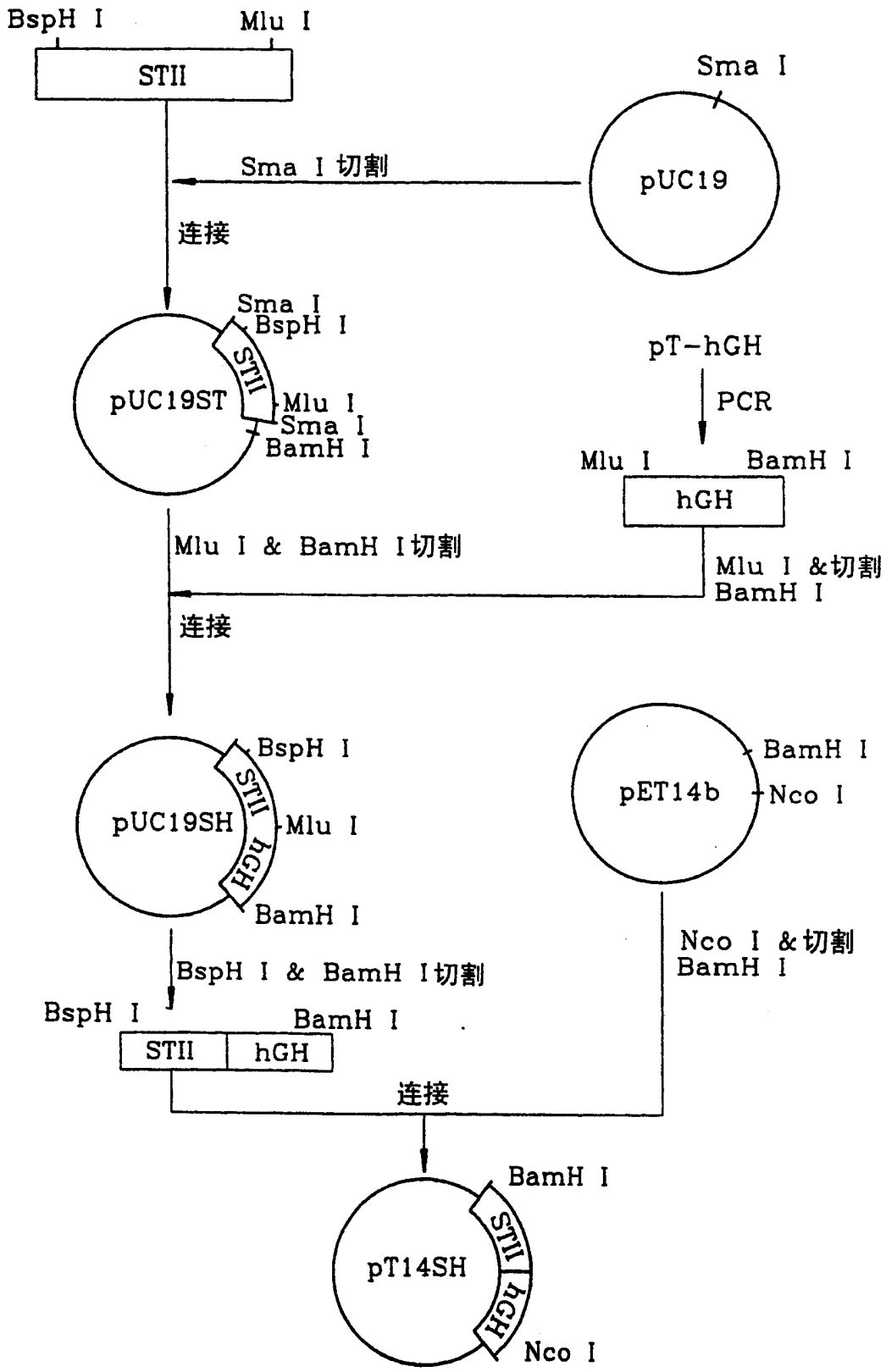

BspH I
Mlu I
STII
Sma I
pUC19
Sma I 切割
连接
Sma I
BspH I
pUC19ST
STII
Mlu I
Sma I
BamH I
pT-hGH
PCR
Mlu I
BamH I
hGH
Mlu I & BamH I切割
Mlu I &切割
BamH I
连接
BspH I
pUC19SH
STII
hGH
Mlu I
BamH I
pET14b
BamH I
Nco I
BspH I & BamH I切割
Nco I &切割
BamH I
BspH I
BamH I
STII
hGH
连接
BamH I
pT14SH
STII
hGH
Nco I

图 2

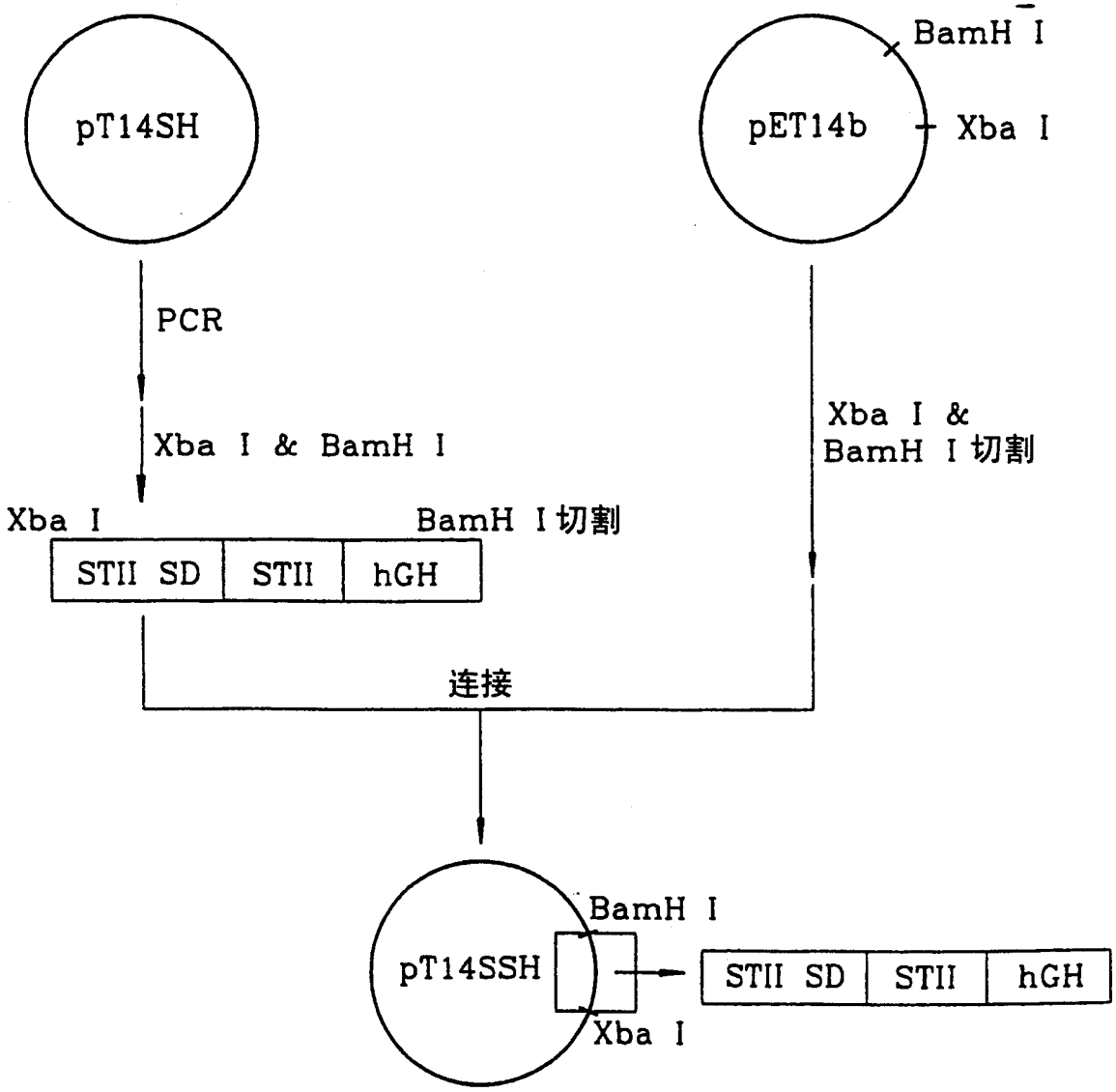

pT14SH
pET14b
BamH I
Xba I
PCR
Xba I & BamH I
Xba I & BamH I 切割
Xba I
BamH I 切割
STII SD
STII
hGH
连接
pT14SSH
BamH I
Xba I
STII SD
STII
hGH

图 3

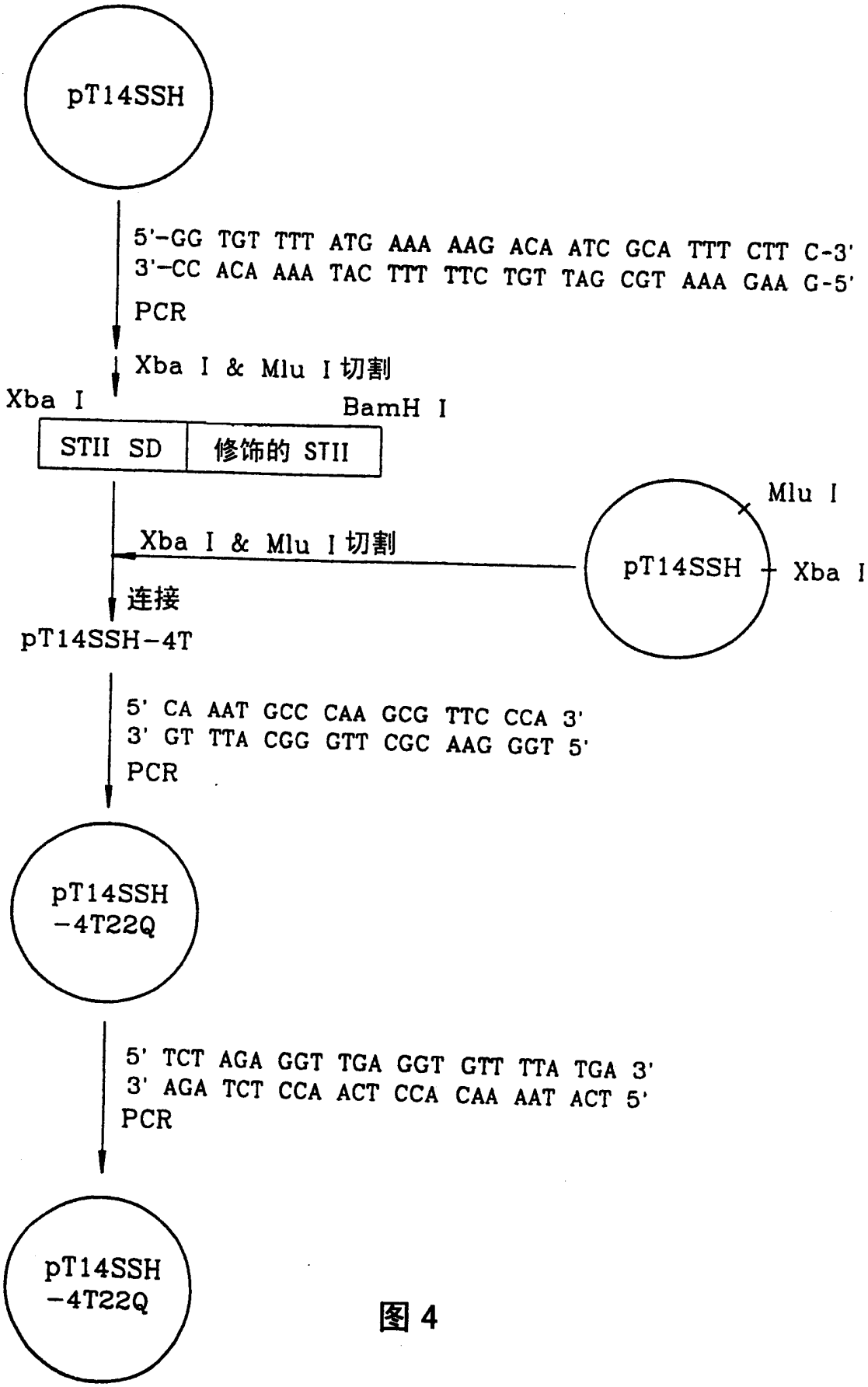

pT14SSH
5'-GG TGT TTT ATG AAA AAG ACA ATC GCA TTT CTT C-3'
3'-CC ACA AAA TAC TTT TTC TGT TAG CGT AAA GAA G-5'
PCR
Xba I & Mlu I 切割
Xba I
BamH I
STII SD
修饰的 STII
Mlu I
Xba I & Mlu I 切割
pT14SSH
Xba I
连接
pT14SSH-4T
5' CA AAT GCC CAA GCG TTC CCA 3'
3' GT TTA CGG GTT CGC AAG GGT 5'
PCR
pT14SSH
-4T22Q
5' TCT AGA GGT TGA GGT GTT TTA TGA 3'
3' AGA TCT CCA ACT CCA CAA AAT ACT 5'
PCR
pT14SSH
-4T22Q

图 4



图 5