

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/81



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/62 C12P 21/02

C12P 21/06 C07K 14/815

C07K 14/62 C12N 15/17

C12N 1/19

[21] 申请号 02806849.1

[43] 公开日 2004年9月1日

[11] 公开号 CN 1526021A

[22] 申请日 2002.2.8 [21] 申请号 02806849.1

[30] 优先权

[32] 2001.2.20 [33] DE [31] 10108211.8

[86] 国际申请 PCT/EP2002/001308 2002.2.8

[87] 国际公布 WO2002/070722 英 2002.9.12

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.19

[71] 申请人 安万特医药德国有限公司

地址 德国法兰克福

[72] 发明人 P·哈伯曼

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 2 页 说明书 10 页 序列表 4 页

[54] 发明名称 N 端部分为蛭素衍生物的融合蛋白
在生产酵母分泌的重组蛋白中的应用

[57] 摘要

本发明涉及一种 $P_x - S_x - B_n - (ZR) - Hir(As_m R) - 蛋白(Y) - T$ 形式的表达盒, 其中 P_x 为能够使所需蛋白质产量达到最佳的任何启动子 DNA 序列; S_x 为可使蛋白质产量达到最佳的编码信号序列或前导序列的任何 DNA; B_n 为 1-15 个氨基酸密码子或为化学键; Z 为选自赖氨酸和精氨酸的氨基酸的密码子; R 为精氨酸密码子或化学键; As_m 为化学键或 m 个氨基酸的密码子, 其中 $m = 1 - 10$; Hir 为编码蛭素或蛭素衍生物的 DNA 序列, 其中蛭素衍生物至少有 40% 与天然蛭素同源; 蛋白 Y 为编码可由酵母产生或分泌的任何蛋白的 DNA 序列; T 为有利于表达的非翻译 DNA 序列。

ISSN 1008-4274

1. 以下形式的 DNA 分子:

$P_x-S_x-B_n-(ZR)-Hir(As_mR)-蛋白(Y)-T$,

其中:

P_x 为任何可使所需蛋白质的产量达到最佳的启动子 DNA 序列;

S_x 为任何可使蛋白质产量达最佳的编码信号序列或前导序列的 DNA;

B_n 为 1-15 个氨基酸的密码子或为化学键;

Z 为选自赖氨酸和精氨酸的氨基酸的密码子;

R 为精氨酸密码子或为化学键;

As_m 为化学键或 m 个氨基酸的密码子, 其中 $m = 1-10$;

Hir 为编码蛭素或蛭素衍生物的 DNA 序列, 其中蛭素衍生物至少与天然蛭素有 40% 同源性;

蛋白 Y 为 DNA 序列, 其编码可由酵母产生并分泌的任何蛋白;

T 为有利于表达的非翻译 DNA 序列。

2. 如权利要求 1 所述的 DNA 分子, 其中蛋白 (Y) 为微胰岛素原或其衍生物。

3. 如权利要求 1 所述的 DNA 分子, 其中蛋白 (Y) 具有药用价值, 和/或是白介素、淋巴因子或干扰素。

4. 根据权利要求 1-3 中的任一项的 DNA 分子所编码的融合蛋白。

5. 包含权利要求 1-3 中任一项的 DNA 分子的多拷贝载体。

6. 包含权利要求 1-3 中任一项的 DNA 分子的质粒。

7. 包含权利要求 1-3 中任一项的 DNA 分子、权利要求 5 的多拷贝载体和/或权利要求 6 的质粒的宿主细胞, 其中所述分子、载体和质粒为宿主细胞染色体的一部分或微型染色体的一部分, 或位于染色体外。

8. 如权利要求 7 所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞为酵母。

9 如权利要求 8 所述的宿主细胞, 其选自酿酒酵母、乳克鲁维酵母、多形汉逊氏酵母、巴斯德毕赤酵母。

10. 发酵如权利要求 4 所述的融合蛋白的方法，其中

(a) 使权利要求 1-3 之任一项的 DNA 分子，权利要求 5 的多拷贝载体，权利要求 6 的质粒在权利要求 7-9 之任一项的宿主细胞中表达，以及

(b) 从细胞培养物的上清液中分离出表达的融合蛋白。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其中发酵完成后，将 pH 调节至 2.5-3.5，以使不需要的蛋白沉淀出来，然后将表达的融合蛋白从沉淀后的上清液中分离出来。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其中，将发酵上清液从宿主细胞中分离出来后，在新鲜培养基中反复培养宿主细胞，并从每次培养所获得的上清液中将释放的融合蛋白分离出来。

13. 如权利要求 10-12 中任一项所述的方法，其中，用于沉淀后对上清液中的表达蛋白质进行浓缩的步骤选自微量过滤，疏水作用层析，离子交换层析。

14. 制备胰岛素的方法，其中

(a) 根据权利要求 10-13 表达和分离融合蛋白；

(b) 用胰蛋白酶和羧肽酶 B 处理融合蛋白；以及

(c) 从步骤 (b) 的反应混合物中分离出胰岛素。

N 端部份为蛭素衍生物的融合蛋白在生产酵母分泌的重组蛋白中的应用

研究在重组蛋白的基础上制备药物的最佳方法基于以下几种观点是必须进行的任务。首先，方法应尽可能的划算。第二，产品应该具有最高的纯度。就此来说，表达系统的选择决定了特定制备方法的过程。而且，通过对蛋白质化学中新技术及各种各样的生化可能性方法的研发，以及对已知技术进行新的组合总可能对现有方法作出改进，这对于本领域的技术人员来说是显而易见的。在此处广泛地应用的是在酵母中进行这种类型的相关蛋白的表达。

胰岛素、GM-CSM(Leukine[®])和蛭素(Refludan[®])等蛋白的制备是遗传工程方法的成功研发例子，这些方法以酵母中特定蛋白质或其前体的合成为基础。通常，酵母可以直接合成高产量的蛭素，用多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*) (Weydemann 等. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 44:377-385, 1995) 或巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (Rosenfeld 等. *Protein Expr. Purif.* 4, 476-482, 1996)时产量可以达到克数量级。

令人吃惊的是，我们目前发现 N 端含有蛭素或蛭素衍生物的融合蛋白可以由酵母以良好的产量向外分泌，此产量类似于酵母分泌单纯蛭素的量。产量以体积摩尔浓度为基础。这意味着，一个产生 100mg/l 天然蛭素的宿主/载体系统可以产生约 180mg/l 的由蛭素与例如微胰岛素原(mini proinsulin) (见 EP-A0347781 描述)组成的融合蛋白。令人惊奇的是，蛭素具有生物活性，而且微胰岛素原呈现出正确折叠的三维形状。如果这两种蛋白通过氨基酸接头融合在一起，而该氨基酸接头可以被能有效地在该处而非其它位置将此融合蛋白切割开的内切蛋白酶特异性识别，则所需蛋白可以直接以活性形式被切割出来。在胰岛素的生产中，蛭素和微胰岛素原

之间的氨基酸接头优选在羧基末端含有精氨酸。然后可以同时用胰蛋白酶进行转化将融合部分切除并将胰岛素原转化成单-精氨酸-胰岛素。因此，本发明涉及一种以下形式的 DNA 分子（也称作表达盒）：

$P_x-S_x-B_n-(ZR)-Hir(As_mR)-\text{蛋白}(Y)-T$

该表达盒编码通过序列 As_mR 与蛋白 Y 形成融合蛋白的蛭素或蛭素衍生物，其中，

P_x 为任何可使所需蛋白质产量达到最佳的启动子 DNA 序列；

S_x 为任何允许蛋白质产量达到最佳的编码信号序列或前导序列的 DNA；

B_n 为 1-15 个氨基酸的密码子或为化学键；

Z 为选自赖氨酸和精氨酸的氨基酸的密码子；

R 为精氨酸密码子；

As_m 为化学键或 m 个氨基酸的密码子，其中 $m = 1-10$ ；

Hir 为编码蛭素或蛭素衍生物的 DNA 序列，其中所述衍生物至少与天然蛭素有 40% 同源；

蛋白 Y 为编码能由酵母产生并分泌的任何蛋白的 DNA 序列；

T 为有利于表达的非翻译 DNA 序列。

蛋白 Y 优选为多肽，例如微胰岛素原衍生物、白介素或淋巴因子或干扰素。优选将该表达盒引入酵母中。所述表达盒可以有一个或多个拷贝稳定整合到特定酵母基因组中，或可以存在于染色体外的多拷贝载体或微型染色体元件上。

本发明的另一个实施方案为上述任一 DNA 分子编码的融合蛋白。

本发明的另一个实施方案为包含上述 DNA 分子的多拷贝载体和质粒。

本发明的另一个实施方案为宿主细胞，该细胞包含上述 DNA 分子或上述多拷贝载体或上述质粒，它们可以是宿主细胞染色体或微型染色体的一部分或在染色体外存在，其中所述宿主细胞优选为酵母，尤其是选自酿酒酵母(S. Cerevisiae)、乳克鲁维酵母(K. Lactis)、多形汉逊氏酵母(H.

Polymorpha)和巴斯德毕赤酵母(P. Pastoris)。

本发明的另一个实施方案为发酵上述融合蛋白的方法，其中

(a) 在上述宿主细胞中表达上述 DNA 分子、上述多拷贝载体或上述质粒，以及

(b) 将表达的融合蛋白从细胞培养物的上清液中分离出来，其中，特别是在发酵完成后，将 pH 值调节至 2.5-3.5，从而使不需要的蛋白沉淀，并将表达的融合蛋白从沉淀后的上清液中分离出来。

本发明的另一个实施方案为上述方法，其中从发酵上清液中分离出宿主细胞后，在新鲜培养基中反复培养所述宿主细胞，并从每次培养所获得的上清液中分离出释放的融合蛋白。

本发明的另一个实施方案为上述方法，其中用于在沉淀后使上清中的表达蛋白浓缩的步骤选自微量过滤，疏水作用层析，离子交换层析。

本发明的另一个实施方案为制备胰岛素的方法，其中

(a) 根据上述方法表达和分离上述融合蛋白；

(b) 用胰蛋白酶和羧肽酶 B 处理所述融合蛋白；和

(c) 从步骤 (b) 的反应混合液中分离出胰岛素。

下文所描述的表达系统为本发明的例子。为了将所述表达盒引入所述经选择的系统中，必须根据所选择的宿主系统类型适当地构建重组 DNA，这对于本领域的技术人员来说是显而易见的。因此，根据所选择的宿主/载体系统，可以对工业发酵过程进行优化。

例如，蛭类 (Hirudo) 中的水蛭已经逐渐形成凝血酶抑制剂 - 蛭素的多种同工型。通过人工改变例如，改变 N 末端氨基酸(例如, EP-A0324712)，已经对蛭素进行优化以使其符合制药要求。本发明包括蛭素和蛭素变体的应用。本发明的特定实施方案使用一种天然蛭素同工型 (所有天然同工型通称为“蛭素”)。例如，蛭素的天然同工型有缬氨酸-缬氨酸-蛭素或异亮氨酸-苏氨酸-蛭素。本发明的其它实施方案中使用天然蛭素同工型的变体。所述变体是从天然蛭素同工型衍生得到的，但是与天然同工型相比，含有氨基酸添加和/或氨基酸缺失和/或氨基酸替代。蛭素变体可以含有天然蛭素

同工型的交替肽片段以及新的氨基酸。蛭素变体是已知的,例如 DE3430556 中所描述的。蛭素变体可以以蛋白的形式购买得到 (Calbiochem Biochemicals, Cat. No. 377-853, -950-960)。

含有蛭素的融合蛋白常常在酸性培养基中显示出良好的溶解性,在对该蛋白进行化学后处理时这具有显著的优势。首先,上清液中的许多成分可在上述条件下沉淀。第二,大多数的肽酶或蛋白酶是无活性的。因此,在操作结束后,使发酵培养液酸化可以直接将不需要的上清液蛋白和宿主细胞一起与融合蛋白分离开来,并使得可以在进一步步骤中浓缩所述融合蛋白。这同样是本发明的一个方面。

发酵结束后,折叠过程可能仍然没有 100%地完成。加入硫醇,或例如盐酸半胱氨酸可以完成该过程。这同样是本发明的一个方面。

以下实施例将对本发明进行更详细描述。这些实施例是非限制性的。

实施例 1: 构建编码由 Leu - 蛭素 (Refludan[®]) - Arg - 微胰岛素原构成的融合蛋白的表达盒。

构建原料为质粒 pK152(PCT/EP00/08537), pSW3(EP-A0347781), 以及编码牛白介素 2 的重组酵母质粒衍生物 (Price 等 Gene 55, 1987)。所述酵母质粒的一个区别特点是其携带受酵母 ADH2 启动子控制的 α 因子前导序列, 该序列后面为通过 KpnI 限制性酶识别位点相连接的牛白介素 2 的 cDNA 序列。经过处理后, 该 cDNA 序列在非翻译 3' 端具有 NcoI 限制性酶识别位点, 该位点在载体中是独特的。因此, 该 cDNA 序列很容易通过 KpnI/NcoI 酶切从质粒上除去。由于已经有报道表明具有高水平表达, 因此可以推断, 剩余的 3' - 白介素 2 序列 (如 T) 对 mRNA 具有稳定作用, 从而不需要用特定的酵母终止序列替代。质粒 pK152 携带有编码亮氨酸 - 蛭素 (Refludan[®]) Kodiart 的 DNA 序列且质粒 pSW3 携带有微胰岛素原的 DNA 序列。编码蛭素 - 赖氨酸 - 精氨酸 - 微胰岛素原的基因序列首先通过 PCR 技术制备出来。为此, 在 Expedite[™] DNA 合成系统中制备 4 个引物:

i. hir_insf1(SEQ ID NO:1, 编码的蛋白片段: SEQ ID NO: 2)

I P E E Y L Q Arg F V N Q H L C

5'- ATCCCTGAGGAATACCTTCAG CGA TTTGTTAACCAACACTTGTGTGG-3'

59 60 61 62 63 64 65 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7

ii. hir_insrev1(SEQ ID NO:3)

5'- CCTCACAAGTG TTGGTTAACA AA TCG CT GAAGGTATTC CTCAGGGAT-3'

iii. hirf1(SEQ ID NO:4, 编码的蛋白片段: SEQ ID NO: 5)

L T Y T D C

5'- TTTTTTTGGATCCTTTGGATAAAAGACTTACGTATACTGACTGCAC

iv. insnco1rev(SEQ ID NO:6)

5'- TTTTTTCCAT GGGTCGACTATCAG

引物 **hir_insf1** 描述了蛭素末端氨基酸 (59-65) 密码子和胰岛素序列 B1-B7 之间通过精氨酸接头 (密码子用黑体表示) 的连接。引物 **hir_insrev1** 是与引物 **hir_insf1** 100% 互补的链。引物 **hirf1** 编码 EP-A0324712 中所述的蛭素基因的开始处, 其延伸至 KpnI 切割位点。引物 **insnco1rev** 标明了据 EP-A0347781A 的合成微胰岛素原的 3' 端。

以质粒 pK152 的 DNA 为模板并使用引物对 **hirf1/hir_insrev1**, 以及以质粒 pSW3 的 DNA 为模板并使用引物对 **hir_insf1/insnco1rev** 进行两个标准聚合酶链式反应。上述反应在 100 μ l PCR 缓冲液中进行, 在每个反应中, 引物为 200 nmol, 聚合酶为 1 μ l, 载体为 100 ng。步骤 1 为在 95°C 下孵育 2 分钟。然后以 95°C 下 30 秒, 55°C 下 30 秒, 72°C 下 30 秒为周期运

行 25 个循环。最后的循环后，在 72°C 下孵育 3 分钟，然后终止反应。由于引物 *hir_insrevkr* 和 *hir_insfkr* 是 100% 互补的，那么根据所述序列，上述两对引物的 DNA 产物相互有重叠，因此在第三个反应中，将前两个反应的产物作为模板，加入引物 *hirf1* 和 *insncolrev*，形成一个 DNA 片段，该片段编码由精氨酸分隔开的蛭素和微胰岛素原。该 PCR 片段用 *KpnI* 酶和 *NcoI* 酶进行消化，然后，通过 T4 连接酶，插入由 *KpnI* /*NcoI* 切开的 *pαADH2* 载体中。类似于 EP-A0347781 中的实施例 7，用上述连接混合物对感受态大肠杆菌 MM294 细胞进行转化。将质粒 DNA 从两个克隆中分离出来以通过 DNA 序列分析进行鉴定。确定所插入的 DNA 序列后，根据所述实施例，用质粒 DNA 制品转化面包酵母细胞株 Y79。然而，使用 *pαADH2* 载体时，与所述实施例不同，引入载体后进行 *trp1-1* 突变互补的选择。对于另一个对照，将质粒 DNA 从酵母转化体中再次分离出来，通过限制性分析方法对其进行分析。将所构造的表达载体定为 *pADH2Hir_Ins*。根据实施例 4 进行表达。在上清液中发现融合蛋白。

实施例 2: 构建编码由 Leu - 蛭素 (Refludan) - Gly Asn Ser Ala Arg - 微胰岛素原组成的融合蛋白的表达盒

该实施例中显示了对位于蛭素衍生物和微胰岛素原之间的胰蛋白酶识别位点进行修饰的一种方法。其构建参照实施例 1 进行。

合成两个新的寡核苷酸:

Hir_insf(SEQ ID NO: 7, 编码的蛋白片段: SEQ ID NO: 8)

G N S A R F V N Q H L C

5' ATCCCTGAGGAATACCTTCAGGGAAATTCGGCACGATTTGTTAACCAACACTTGTGTGG

3'

Hir₆₅

B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7

Hir_insrev (SEQ ID NO: 9)

5'CCACACAAGTGTTGGTTAACAAATCGTGCCGAATTTCCCTGAAGGTATTCCTCAGGGAT

B2 B1

Hir₆₅

以质粒 pK152 的 DNA 为模板并利用引物 hirf1/hir_insrev1, 以及以质粒 pSW3 的 DNA 为模板并利用引物 hir_insf1/insncolrev 进行两个聚合酶链反应。在第三个反应中, 将前两个反应的产物作为模板, 以 hirf1 和 Insncolrev 作为引物, 形成一 DNA 片段, 该片段编码由氨基酸接头 Gly Asn Ser Ala Arg 分隔的蛭素和微胰岛素原。然后, 用 KpnI 和 NcoI 切割 PCR3 的产物, 将其引入适当打开的 p α ADH2 载体中, 根据实施例 1 对其进行鉴定。所得到的质粒定为 pADHH_GNSA_Ins。细胞用上述质粒 DNA 进行转化。根据实施例 3 进行表达。在上清液中发现融合蛋白。

实施例 3: 面包酵母系统中重组产物的表达

表达分为两阶段。首先, 在基本酵母培养基中进行预培养。每升该培养基具有以下组成:

6.7g—酵母氮源 (Yeast Nitrogen base) (不含氨基酸)

5.0g—酪蛋白氨基酸 (不含维生素)

0.008%—腺嘌呤

0.008%—尿嘧啶

2%—葡萄糖

在主要培养基或表达培养基中接种等份预培养物。

每升主要培养基含有:

10g—酵母提取物

20g—蛋白胨

0.008%—腺嘌呤

0.008%—尿嘧啶

4%—葡萄糖

使用所述培养基, 按照以下方式在振动的烧瓶中进行表达: 用 80 ml

标准 PCR 反应，产生含有被 XhoI 和 SacII 整合位点延长的蛭素 - Arg - 微胰岛素原序列的 DNA 产物。如果该 DNA 产物被适当切割，并分离出片段，则通过 T4 DNA 连接酶，所述片段可以插入到打开的载体 DNA 中。与上述生产商所提供的技术方案的不同在于，用连接混合物转化实施例 1 中所述的大肠杆菌 MM294，在 zeocine 选择板上筛选成功转化的重组菌落。再次从克隆中分离出质粒 DNA，通过限制性酶切和 DNA 序列分析对其进行鉴定。应用按照上述方法构建的质粒，根据生产商所提供的技术方案制备用于生产上述融合蛋白的 *P. Pastoris* 表达克隆。

实施例 5: 凝血酶抑制试验

根据 Griebach 等的方法确定蛭素的浓度 (Thrombosis Research 37, pp.347-350, 1985)。为了该目的，在测量过程中包括特定量的 Refludan 标准，以制作标准曲线，从此曲线可以直接确定表达量 (mg/l)。该生物活性也是对融合蛋白中胰岛素原组分的正确折叠的直接测量。备选的，可以先用金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*) 蛋白酶解消化，之后在 RP-HPLC 系统中进行分析确定正确的 S-S 桥的形成。

实施例 6: 融合蛋白的纯化

发酵过程完成后，将 pH 调整至 2.5-3。与上清液中由于宿主细胞的自发裂解或分泌所产生的大多数其它多肽相反，在 pH 2.5-3 时，融合蛋白并不沉淀。因此，可以将培养液适当酸化，沉淀之后，通过离心或微量过滤除去沉淀物和细胞，然后进行浓缩。然后，将培养液的 pH 值调整至 6.8，通过 HPLC 测量平行确定融合蛋白的含量。确定后在上清液中加入胰蛋白酶，其中每 1-1.5 mg 融合蛋白约 1 μ g 胰蛋白酶。在室温下孵育约 4 小时后，在 pH 3.5 以及 2-丙醇存在的条件下，通过阳离子交换层析进行纯化。用浓度梯度为 0.15-0.45 M 的缓冲液进行洗脱。单精氨酸胰岛素在约 0.3 M 时洗脱。经 1: 1 稀释后，加入 10% ZnCl₂ 溶液，在 pH 约 6.8，单 - Arg - 胰岛素从含有胰岛素的级分中沉淀出来。过滤出胰岛素，在 0.05 M tris

-HCl (PH 8.5) 中溶解, 从而产生 2 mg/ml 的溶液。每 100ml 溶液加入约 1 单位羧肽酶 B, 轻微振荡进行反应。然后, 用柠檬酸将 pH 调节至 5.5, 在 $ZnCl_2$ 存在时, 胰岛素形成结晶。移出晶体, 并溶解, 用 RP-HPLC 进行纯化, 然后再通过结晶的方法纯化胰岛素。

实施例 7: 在培养基中直接对融合蛋白进行处理

表达结束后, 将培养基的 pH 调节至 6.8, 加入胰蛋白酶并搅拌, 使终浓度达到 4-8 mg/l。孵化约 4 小时后, 将上述处理的发酵培养液的 pH 调整至 2.5-3。经 1-6 小时的沉淀后, 将 pH 升至 3.5。在 30% 的 2-丙醇存在下, 用阳离子交换层析对单-Arg-胰岛素进行纯化。用 NaCl (梯度为 0.05-0.5 M) 进行洗脱。对含有产物的级分用水进行 1: 1 的稀释, 然后加入 $ZnCl_2$, 形成 0.1% 的 $ZnCl_2$ 溶液。在约 pH 6.8 下沉淀出单-Arg-胰岛素, 然后例如根据实施例 6 中的方法将其转化成胰岛素。

<110> 安万特医药德国有限公司 (Aventis Pharma Deutschland GmbH)

<120> N 端部份为蛭素衍生物的融合蛋白在生产酵母分泌的重组蛋白中的应用

<130> DEAV2001/0008

<140> 10108211.8

<141> 2001-02-20

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:hir_insf1

<400> 1

atccctgagg aataccttca gcgatttggt aaccaacact tgtgtgg 47

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:蛋白质 hir_insf1

<400> 2

Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys

1

5

10

15

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: hir_insrev1

<400> 3

cctcacaagt gttggttaac aaatcgctga aggtattcct cagggat

47

<210> 4

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: hirf1

<400> 4

tttttttggga tcctttggat aaaagactta cgtatactga ctgcac

46

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:蛋白质 hirf1

<400> 5

Leu Thr Tyr Thr Asp Cys

1

5

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: insncolrev

<400> 6

ttttttccat gggtcgacta tcag

24

<210> 7

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: Hir_insf

<400> 7

atccctgagg aataccttca gggaaattcg gcacgatttg ttaaccaaca cttgtgtgg 59

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 蛋白质 Hir_insf

<400> 8

Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys

1

5

10

<210> 9

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: Hir_insrev

<400> 9

ccacacaagt gttggttaac aaatcgtgcc gaatttcctt gaaggtattc ctcaggat 59

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: pichia_H_lf1

<400> 10

ttttttctc gagaaaagac ttacgtatac tgac

34

<210> 11

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: pichia_H_Irev2

<400> 11

ttttttggcg ccgaattcac tattagttac agtagtttc c

41