



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107904254 B

(45) 授权公告日 2021.11.23

(21) 申请号 201711213274.9

C12N 15/90 (2006.01)

(22) 申请日 2017.11.28

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 105154462 A, 2015.12.16

申请公布号 CN 107904254 A

DE 3735380 A1, 1988.04.21

(43) 申请公布日 2018.04.13

(73) 专利权人 大连大学

地址 116622 辽宁省大连市开发区学府大街10号

郑宗宝. 一体化生物加工过程进行大肠杆菌的半纤维素琥珀酸生产.《中国博士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2013, (第5期), B018-1.

审查员 李婷

(72) 发明人 胡学军 丁宁 阮瑶 付鑫

吴凡凡 王莉娟

(74) 专利代理机构 大连八方知识产权代理有限公司

公司 21226

代理人 朱秀芬

(51) Int. Cl.

C12N 15/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

一种应用大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体是一种大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法。本发明方法主要步骤包括构建敲除大肠杆菌外膜脂蛋白Lpp基因的大肠杆菌菌株、引入外源N-糖基化机制到所构建的大肠杆菌中、构建质周腔中表达目的蛋白的载体及自动诱导方式表达目的蛋白,可实现利用大肠杆菌N-糖基化修饰目的蛋白并实现N-糖基化蛋白分泌到胞外。该方法降低了外源基因表达产物在质周腔过度积累所造成的代谢负荷,提高了N-糖基化目的蛋白总产量;无需破碎细菌而从培养基中直接分离纯化N-糖基化蛋白,简化了分离纯化步骤,易于大规模工业化生产。

1. 一种应用大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 大肠杆菌W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株构建:首先,合成特定的基因打靶片段;打靶片段的两端为70bp的基因组同源序列,中间是卡那霉素抗性标记序列,将所得的PCR产物切胶回收得到50ng/ μ L的高浓度打靶片段;然后利用5mmol/L的 L-阿拉伯糖诱导含有敲除辅助质粒pKD46的CLM37大肠杆菌2小时,再将所得的诱导后的菌液制备电感受态细胞;将所得高浓度的基因打靶片段用DpnI酶消化6小时以上,再次切胶回收,导入上述电转化感受态细胞之中后,在含5mmol/L的L-阿拉伯糖的SOC培养基恢复2小时后,使用抗性平板筛选发生同源重组的菌株,并使用鉴定引物lpp - F :5' - catctgcaacgtaccgaccgcgtgatgaa - 3' lpp-R :5' - atgccatacacaactgccagcaggctttacg-3',应用PCR法和测序法进行鉴定;确定基因区域发生替换突变后,再转化入pCP20质粒以去除卡那霉素抗性片段,即得到Lpp基因敲除的分泌型菌株W3110 Δ WecA Δ Lpp;

(2) 构建大肠杆菌质周腔中表达目的蛋白的载体,结合空肠弯曲杆菌N-糖基化机制,得到胞外生产N-糖基化重组蛋白的重组大肠杆菌:将表达载体pIG6-rFn3-Gly及来源于空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)的 N-糖基化基因簇载体的pACYCpg1质粒电击共转化大肠杆菌菌株W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株,获得可胞外生产N-糖基化重组蛋白的大肠杆菌菌株;

(3) 步骤(2)中获得的能胞外生产N-糖基化重组蛋白的重组大肠杆菌在自动诱导培养基中诱导胞外生产N-糖基化重组蛋白rFn3-Gly;

(4) 步骤(3)获得的重组蛋白纯化后即得N-糖基化重组蛋白。

2. 如权利要求1所述的一种应用大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法,其特征在于,步骤(1)是利用Red同源重组方法将大肠杆菌 K-12来源的W3110 Δ WecA中的外膜脂蛋白Lpp基因敲除,构建大肠杆菌W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株。

3. 如权利要求1所述的一种应用大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法,其特征在于,步骤(2)所述空肠弯曲杆菌N-糖基化机制是将来源于空肠弯曲菌中编码寡糖转移酶pg1B基因、寡糖合成基因簇以及含有编码寡糖转移酶pg1B识别序列的目的蛋白基因的质粒转入大肠杆菌W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株中。

4. 如权利要求1所述的一种应用大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法,其特征在于,步骤(3)将转化子接种到含有氨苄青霉素和氯霉素的LB固体培养基,每升培养基中含胰蛋白胨10g、酵母提取物5g、氯化钠10g和15g琼脂粉平板上,过夜24小时培养;筛选出单克隆后将其接种到含有氨苄青霉素和氯霉素的LB 液体培养基,过夜16小时培养;次日,以1:100接种到10mL含有氨苄青霉素和氯霉素的LB液体培养基的三角瓶中,200rpm、37 $^{\circ}$ C培养,直至OD₆₀₀达到0.6;然后,以 1:100接种到100mL含有氨苄青霉素和氯霉素自动诱导培养基中,在 25 $^{\circ}$ C、200rpm条件诱导表达48小时;在此过程,含有pIG6-rFn3-Gly及pACYCpg1的大肠杆菌 W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株胞外生产N-糖基化重组蛋白rFn3-Gly;其中,每升自动诱导培养基中含有以下重量的各组分:胰蛋白胨10g,酵母提取物5g,甘油5g,葡萄糖0.5g,乳糖2g,磷酸氢二钠7.1g,磷酸二氢钾6.8g,硫酸铵3.3g,硫酸钠0.9g,七水硫酸镁 0.25g。

一种应用大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体是一种大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法。

背景技术

[0002] 近来应用大肠杆菌原核表达系统来生产糖蛋白日益受到重视。大肠杆菌具有基因组背景清楚、工程菌株构建简单快速、生长速度快、生产周期短、发酵成本低、产量高、适合大规模工业化生产等优点。目前,可以通过基因工程改造大肠杆菌菌株及将外源N-糖基化机制引入大肠杆菌,使其获得表达N-糖基化蛋白的能力。主要是将空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)糖基转移酶pglB及不同来源的糖基转移酶转到大肠杆菌体内,使其具有在大肠杆菌质周腔中N-糖基化修饰重组蛋白的能力,在此系统中只有在质周腔中才能实现N-糖基化修饰重组蛋白,所以重组蛋白须通过信号肽引导到质周腔中。而在质周腔中表达重组蛋白,表达量往往远远低于在大肠杆菌胞质内表达,所以导致N-糖基化的蛋白总量减少。

发明内容

[0003] 为解决上述问题,本发明提供了一种应用基因敲除大肠杆菌外膜脂蛋白Lpp进行胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法,可以显著提高重组N-糖基化蛋白的表达量,表达的N-糖基化重组蛋白直接分泌到培养基中,无需通过离心收集及再破碎大肠杆菌的方式获得N-糖基化重组蛋白,简化N-糖基化蛋白分离纯化步骤,显著降低生产成本。

[0004] 为实现上述发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0005] 一种应用大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

[0006] (1) 大肠杆菌W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株构建;

[0007] (2) 构建大肠杆菌质周腔中表达目的蛋白的载体,结合空肠弯曲杆菌N-糖基化机制,得到能胞外生产N-糖基化重组蛋白的重组大肠杆菌。

[0008] (3) 步骤(2)中获得的能胞外生产N-糖基化重组蛋白的重组大肠杆菌在自动诱导培养基中诱导胞外生产N-糖基化重组蛋白。

[0009] (4) 步骤(3)获得的重组蛋白纯化后即得N-糖基化重组蛋白。

[0010] 进一步地,步骤(1)是利用Red同源重组方法将大肠杆菌K-12来源的W3110 Δ WecA中的外膜脂蛋白Lpp基因敲除,构建大肠杆菌W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株。

[0011] 进一步地,步骤(2)所述空肠弯曲杆菌N-糖基化机制是将来源于空肠弯曲菌中编码寡糖转移酶pglB基因(Gene ID:905417)、寡糖合成基因簇以及含有编码寡糖转移酶pglB识别序列的目的蛋白基因的质粒转入大肠杆菌W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株中。

[0012] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:本发明应用一种大肠杆菌敲除菌株W3110 Δ WecA Δ Lpp使N-糖基化重组蛋白分泌到胞外的培养基中,可以提高重组糖蛋白表达水平和降低分离纯化成本,无需通过离心收集及再破碎大肠杆菌的方式获得N-糖基化重组蛋

白,简化N-糖基化蛋白分离纯化步骤,提高N-糖基化蛋白总产量,最终有利于N-糖基化药物蛋白或糖疫苗的大规模生产。

[0013] 本发明所述应用基因敲除大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法,可降低目标蛋白的胞内降解,提高重组蛋白表达量;同时减少重组蛋白的胞内过度积累,而降低包涵体形成;消除细胞破壁工艺,减少致热原污染,方便分离纯化,进而降低生产成本。

附图说明

[0014] 图1是rFn3-Gly基因结构图;

[0015] 图2是pIG6/rFn3-Gly表达载体结构图;

[0016] 图3为Lpp基因敲除株W3110 Δ WecA Δ Lpp表达目标蛋白Western blot检测结果,蛋白为人纤维连接蛋白III型结构域(rFn3)蛋白;泳道1为W3110 Δ WecA Δ Lpp于自动诱导培养基中诱导表达48小时的胞内蛋白,泳道2为对应的胞外分泌蛋白。

[0017] 图4为Lpp基因敲除株W3110 Δ WecA Δ Lpp表达目标蛋白纯化及ESI-MS质谱检测结果,蛋白为人纤维连接蛋白III型结构域(rFn3);1道为W3110 Δ WecA Δ Lpp于自动诱导培养基中诱导表达48小时的非糖基化蛋白rFn3,对应质谱检测中12784.5平均分子量,与理论计算值相符;2道为W3110 Δ WecA Δ Lpp于自动诱导培养基中诱导表达48小时的rFn3-Gly,对应质谱检测中14191.0平均分子量,与理论计算值相符。

具体实施方式

[0018] 下面结合附图及具体实施方式对本发明作进一步的说明,但并不影响本发明的保护范围。

[0019] 一种应用大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法,包括以下步骤:

[0020] 步骤1:重组大肠杆菌W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株构建

[0021] 用于基因改造的原始菌株是大肠杆菌W3110 Δ WecA菌株。大肠杆菌基因敲除所用的质粒包括pKD13、pKD46和pCP20。大肠杆菌W3110 Δ WecA菌株来源于大肠杆菌K-12菌株,根据其基因组序列设计外膜脂蛋白Lpp基因(Gene ID:946175)两侧的两对引物,以pKD13为模板进行两次PCR反应,以得到两端为60-80bp与特定目标基因同源及中间为卡那霉素抗性的碱基序列(浓度为50ng/ μ L)。回收后经电转化进入靶细胞,经过诱导后W3110 Δ WecA菌株中pKD46质粒编码的重组酶发生作用,打靶片段可整合到大肠杆菌染色体中,再转化入pCP20质粒以去除卡那霉素抗性片段,得到胞外生产重组蛋白大肠杆菌菌株W3110 Δ WecA Δ Lpp。W3110 Δ WecA菌株中的WecA基因(Gene ID:948789)已经被敲出,也被命名为CLM37(F-lambda-IN(rrnD-rrnE)1rph-1, Δ WecA)。

[0022] 步骤2:N-糖基化重组蛋白基因表达载体构建

[0023] (1)以人纤维连接蛋白III型结构域(rFn3)为模式蛋白基因,在rFn3基因的3'端通过编码柔链GGGGS序列引入编码N-糖基化识别序列DQNAT的碱基序列。A代表丙氨酸残基,D代表天冬氨酸残基,G代表甘氨酸残基,N代表天冬酰胺残基,Q代表谷氨酰胺残基,S代表丝氨酸残基,T代表苏氨酸残基。

[0024] (2)根据大肠杆菌密码子偏好性在编码N-糖基化识别序列DQNAT碱基序列下游,通过编码柔链GGGGS序列引入编码6个组氨酸残基碱基序列,用于重组蛋白分离纯化。

[0025] (3) 将以上融合基因构建到大肠杆菌质周腔表达载体pIG6上ompA信号肽序列下游与携带来源于空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 的N-糖基化基因簇载体的pACYCpg1质粒共同转化大肠杆菌菌株W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株, 获得可胞外生产N-糖基化重组蛋白的大肠杆菌菌株。其中pACYCpg1质粒是由pACYC184载体携带编码空肠弯曲杆菌pg1基因簇构成, 合成的寡糖分子组成为GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-(Glc- β 1,3-)GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,3-Bac- β 1。

[0026] 步骤3: 将步骤2中鉴定过的阳性转化子进行自动诱导表达, 诱导表达24-72小时, 培养基中添加与表达载体所带抗性基因相应的抗生素。

[0027] 步骤4: 收集步骤3中上清及菌体, 用亲和层析柱分离纯化上清中重组蛋白, 该蛋白即为N-糖基化重组蛋白rFn3-Gly。

[0028] 实施例1

[0029] 一种应用大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法, 包括以下步骤:

[0030] 步骤1: 重组大肠杆菌W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株构建

[0031] 首先应用第一对基因敲除引物

[0032] F1: 5'-gctacatggagattaactcaatctagagggtattaataactgtcaaacatgagaattaa-3',

[0033] R1: 5'-cgcacaaatgtgcgccatttttcaacttcacaggtactagtgtaggctggagctgcttc-3', 以抗性标记基因质粒pKD13为模板, 进行PCR反应3个循环, 取产物1 μ L为模板, 应用第二对基因敲除引物

[0034] F2: 5'-ctcaacataaaaaactttgtgtaataacttgaacgctacatggagattaactcaatct-3',

[0035] R2: 5'-acgcagtagcggtaaaccggcagacaaaaaaatggcgcacaatgtgcgccatttttca-3' 合成特定的基因打靶片段。打靶片段的两端为70bp的基因组同源序列, 中间是卡那霉素抗性标记序列, 将所得的PCR产物切胶回收得到50ng/ μ L的高浓度打靶片段; 然后利用5mmol/L的L-阿拉伯糖诱导含有敲除辅助质粒pKD46的CLM37大肠杆菌2小时, 再将所得的诱导后的菌液制备电感受态细胞; 将所得高浓度的基因打靶片段用DpnI酶消化6小时以上, 再次切胶回收, 导入上述电转化感受态细胞之中后, 在含5mmol/L的L-阿拉伯糖的SOC培养基恢复2小时后, 使用抗性平板筛选发生同源重组的菌株, 并使用鉴定引物

[0036] lpp-F: 5'-catctgcgaacgtaccgaccgcgtgatgaa-3', lpp-R: 5'-atgccatacacactgccagcaggctttacg-3', 应用PCR法和测序法进行鉴定。确定基因区域发生替换突变后, 再转化入pCP20质粒以去除卡那霉素抗性片段, 即得到Lpp基因敲除的分泌型菌株W3110 Δ WecA Δ Lpp。

[0037] 步骤2: N-糖基化重组蛋白表达载体构建

[0038] 采用人纤维连接蛋白III型结构域(rFn3)蛋白为模式蛋白, 在基因的3'末端引入编码糖基化位点DQNAT的碱基序列及编码6个组氨酸残基的碱基序列, 融合基因结构见图1。将基因用NcoI和HindIII克隆构建到pIG6的ompA信号肽下游, 命名为pIG6-rFn3-Gly, 载体结构见图2。将表达载体pIG6-rFn3-Gly及来源于空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 的N-糖基化基因簇载体的pACYCpg1质粒电击共转化大肠杆菌菌株W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株, 获得可胞外生产N-糖基化重组蛋白的大肠杆菌菌株。

[0039] 步骤3: N-糖基化重组蛋白胞外生产

[0040] 将转化子接种到含有氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 和氯霉素 (37 μ g/mL) 的LB固体培养基

(每升培养基中含胰蛋白胨10g、酵母提取物5g、氯化钠10g和15g琼脂粉)平板上,过夜24小时培养。筛选出单克隆后将其接种到含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)和氯霉素(37 μ g/mL)的LB液体培养基,过夜16小时培养。次日,以1:100接种到10mL含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)和氯霉素(37 μ g/mL)的LB液体培养基的三角瓶中,200rpm、37 $^{\circ}$ C培养,直至OD₆₀₀达到0.6。然后,以1:100接种到100mL含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)和氯霉素(37 μ g/mL)自动诱导培养基中,在25 $^{\circ}$ C、200rpm条件诱导表达48小时。在此过程,含有pIG6-rFn3-Gly及pACYCpg1的大肠杆菌W3110 Δ WecA Δ Lpp菌株胞外生产N-糖基化重组蛋白rFn3-Gly。其中,自动诱导培养基的配方如下:每升培养基中含有以下重量的各组分:胰蛋白胨10g,酵母提取物5g,甘油5g,葡萄糖0.5g,乳糖2g,磷酸氢二钠7.1g,磷酸二氢钾6.8g,硫酸铵3.3g,硫酸钠0.9g,七水硫酸镁0.25g。

[0041] 实施例2 N-糖基化重组蛋白检测

[0042] 将实施例1获得的重组蛋白rFn3-Gly通过Western Blot方法测定糖基化效率。取1.00D菌液10000r/min,离心10min,收集其菌体用裂解液100 μ L裂解后与100 μ L上清分别加Loading buffer制样,进行SDS-PAGE电泳后湿转至PVDF膜上,经过封闭后,加入鼠源抗FLAG M1单克隆抗体(1:3000)进行室温孵育2小时。经PBS缓冲液洗膜5次后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG(1:4000)抗体孵育1小时后PBS缓冲液清洗5次,进行ECL发光检测,如图3所示。

[0043] 实施例3大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白rFn3-Gly的纯化

[0044] 按照实施例1中的方法,试剂按比例扩大,收集自动诱导培养的上清,纯化可溶蛋白,具体步骤如下:①收取诱导48小时的菌液500mL于10000r/min,10min离心,弃沉淀。上清中按体积比1:1加入40mM的咪唑(终浓度为20mM)。②0.22 μ M滤膜抽滤除杂质,并分别加入氯化钠(终浓度为300mM)及1%的Tween-20,冰浴保存。③装好His-Trap镍柱后,500mM咪唑洗脱5个柱体积,洗去残留蛋白。④用Binding buffer(20mM咪唑+1%的Tween-20)过柱,流速1mL/min,约15个柱体积。⑤将上清液进行过柱,流速1mL/min。⑥上清液全部过柱后,再用20mM的咪唑以2mL/min去除杂蛋白,约15个柱体积。⑦将镍柱取下,装在干净的注射器上,按40mM,60mM,80mM,120mM,160mM,240mM,500mM的咪唑浓度进行蛋白洗脱,收集洗脱液,可得到大量均质、纯度较高的N-糖基化重组蛋白rFn3-Gly,如图4所示。

[0045] 实施例4 N-糖基化重组蛋白rFn3-Gly的质谱分析

[0046] 采用液质联用测定重组蛋白rFn3-Gly及N-糖基化重组蛋白rFn3-Gly的分子量,进而进行糖基化分析。

[0047] 质谱分析所用设备:HPLC:1100毛细液相,Agilent Technologies;ESI-MS:LTQ-Orbitrap XL,Thermo Fisher Scientific。

[0048] 色谱条件如下:色谱柱:MicroTrap,1 \times 8mm C₁₈预柱(5.0 μ L,MICHRUM Bioresources),柱温:50 $^{\circ}$ C,进样量:1 μ L,洗脱条件为:流动相A:0.1%甲酸,2%乙腈溶液;流动相B:0.1%甲酸,98%乙腈溶液;流速:20 μ L/min;洗脱梯度:0-5min,5%B;5-8min,5-95%B;8-18min,95%B。

[0049] 质谱条件如下:Orbitrap分辨率:60000,喷雾电压:+4.5kV,离子传输毛细管温度:275 $^{\circ}$ C,雾化气流速:15unit,MS扫描范围:400-2000。实施例3中所得重组蛋白rFn3-Gly及N-糖基化重组蛋白rFn3-Gly的分子量分别为12784.5和14191.0,与预期分子量完全相符,如

图4所示。

[0050] 从具体实施例来看,该方法可以大量、快速、高效获得N-糖基化重组蛋白,为进一步生产相关N-糖基化药物蛋白及N-糖基化疫苗奠定基础。

[0051] 本发明实施方式不限于此,仅为本发明较佳的具体实施方式,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和通用方法,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,本发明还可以有其它的实施方式。任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,本发明还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更,如可以用其它的大肠杆菌质周腔表达载体等类似方法,用大肠杆菌胞外生产N-糖基化修饰的重组蛋白,均落在本发明权利保护范围之内。

[0001]		序列表	
[0002]	<110>	大连大学	
[0003]	<120>	一种应用大肠杆菌胞外生产N-糖基化重组蛋白的方法	
[0004]	<160>	3	
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
[0006]	<210>	1	
[0007]	<211>	315	
[0008]	<212>	DNA	
[0009]	<213>	rFn3-Gly	
[0010]	<400>	1	
[0011]		gatatccgtg acctggaagt ggtcgtgcc acaccgacga gtctgctgat ttcttgggat	60
[0012]		gcaccagctg taacctgcg ctactaccgc attacttacg gggagacggg cggcaattcc	120
[0013]		ccggtgcaag aatttactgt tccgggcagc aaaagtacag caactattag cggcctgaaa	180
[0014]		ccggcgcttg attataccat tactgtttac gcagtaactg ggcgtggcga ttcaccggcg	240
[0015]		tcctctaaac ctatttcgat caactatcgt actgaaatcg gtggtggtgg ttctgaccaa	300
[0016]		aacgcgacca agctt	315
[0017]	<210>	2	
[0018]	<211>	3813	
[0019]	<212>	DNA	
[0020]	<213>	Escherichia coli	
[0021]	<400>	2	
[0022]		accgacacc atcgaatggc gcaaacctt tcgcggtatg gcatgatagc gcccggaaga	60
[0023]		gagtcaattc aggggtggtga atgtgaaacc agtaacgta tacgatgtcg cagagtatgc	120
[0024]		cggtgtctct tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag gccagccacg tttctgcgaa	180
[0025]		aacgcgggaa aaagtggaag cggcgtatgc ggagctgaat tacattccca accgcgtggc	240
[0026]		acaacaactg gcgggcaaac agtcgttctt gattggcgtt gccacctcca gtctggccct	300
[0027]		gcacgcgccg tcgcaaattg tcgcgcgcat taaatctcgc gccgatcaac tgggtgccag	360
[0028]		cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc tgtaaagcgg cgggtgcaaa	420
[0029]		tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat cattaactat ccgctggatg accaggatgc	480
[0030]		cattgctgtg gaagctgctt gcactaatgt tccggcgta tttcttgatg tctctgacca	540
[0031]		gacaccatc aacagtatta tttctccca tgaagacggt acgcgactgg gcgtggagca	600
[0032]		tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgttagcg ggcccattaa gttctgtctc	660
[0033]		ggcgcgtctg cgtctggctg gctggcataa atatctcact cgcaatcaaa ttcagccgat	720
[0034]		agcggaacgg gaagcgact ggagtccat gtccggtttt caacaaacca tgcaaatgct	780
[0035]		gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac gatcagatgg cgctgggcgc	840
[0036]		aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctcgc cgttggtgcg gacatctcgg tagtgggata	900
[0037]		cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgccgta accaccatca aacaggattt	960
[0038]		tcgctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa ctctctcagg gccaggcggg	1020
[0039]		gaagggcaat cagctgttgc ccgtctcact ggtgaaaaga aaaaccacce tggcgcccaa	1080
[0040]		tacgcaaacc gcctctccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt	1140
[0041]		ttcccactg gaaagcggc agtgagcga acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt	1200

[0042]	aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg	1260
[0043]	gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgaatttcta gataacgagg	1320
[0044]	gcaaaaaatg aaaaagacag ctatcgcgat tgcagtggca ctggctgggt tcgctaccgt	1380
[0045]	agcgcaggcc gactacaaag atatcgaaca gaaactgatc tctgaagaag acctgaacca	1440
[0046]	ccaccaccac caccactgat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg	1500
[0047]	acattttttt tgtctgccgt ttaccgctac tgcgtcacgg atccccacgc gccctgtagc	1560
[0048]	ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtgggt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc	1620
[0049]	gccctagcgc ccgctccttt cgttttcttc ctttccttc tcgccacgtt cgccggcttt	1680
[0050]	ccccgtcaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac	1740
[0051]	ctcgacccca aaaaacttga ttaggggatg ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag	1800
[0052]	acggtttttc gcccttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa	1860
[0053]	actggaaca cactcaacc tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgccg	1920
[0054]	atctcggcct attggttaa aatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac	1980
[0055]	aaaatattaa cgcttacaat ttcagtgggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccctt	2040
[0056]	atgtgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga	2100
[0057]	taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgc	2160
[0058]	cttattccct tttttgcggc attttgctt cctgtttttg ctcaccaga aacgctggtg	2220
[0059]	aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc	2280
[0060]	aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact	2340
[0061]	tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca agagcaactc	2400
[0062]	ggtcgcgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag	2460
[0063]	catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat	2520
[0064]	aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt	2580
[0065]	ttgacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa	2640
[0066]	gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgcgc	2700
[0067]	aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccgc aacaattaat agactggatg	2760
[0068]	gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt	2820
[0069]	gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcgta tcattgcagc actggggcca	2880
[0070]	gatggtaaag cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcagc aactatggat	2940
[0071]	gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca	3000
[0072]	gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaac ttcatTTTTA atttaaaagg	3060
[0073]	atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaa tcccttaacg tgagttttcg	3120
[0074]	ttcactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt	3180
[0075]	ctgcgcgtaa tctgtctgtt gcaacaaaa aaaccaccgc taccagcgtt ggtttgtttg	3240
[0076]	ccgatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata	3300
[0077]	caaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca	3360
[0078]	ccgctacat acctcgtct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag	3420
[0079]	tcgtgtctta ccgggttga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcga gcggtcgggc	3480
[0080]	tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcga cgacctacac cgaactgaga	3540
[0081]	tacctacagc gtgagctatg agaaagccc acgcttccc aaggagaaa ggcggacagg	3600
[0082]	tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttc aggggaaac	3660
[0083]	gcttggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg	3720

[0084]	tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg	3780
[0085]	ttcttggcct tttgctggcc ttttgcac atg	3813
[0086]	<210> 3	
[0087]	<211> 4125	
[0088]	<212> DNA	
[0089]	<213> pIG6-rFn3-Gly	
[0090]	<400> 3	
[0091]	accgcacacc atcgaatggc gcaaaacctt tcgcggtatg gcatgatagc gcccggaaga	60
[0092]	gagtcaattc aggggtggtga atgtgaaacc agtaacgta tacgatgtcg cagagtatgc	120
[0093]	cggtgtctct tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag gccagccacg tttctgcgaa	180
[0094]	aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat tacattccca accgcgtggc	240
[0095]	acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgc gattggcgtt gccacctcca gtctggccct	300
[0096]	gcacgcgccg tcgcaaatg tcgcggcgat taaatctgc gccgatcaac tgggtgccag	360
[0097]	cgtgggtggt tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc tgtaaagcgg cggtgcacaa	420
[0098]	tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat cattaactat ccgctggatg accaggatgc	480
[0099]	cattgctgtg gaagetgct gactaatgt tccggcgtta tttcttgatg tctctgacca	540
[0100]	gacaccatc aacagtatta ttttctcca tgaagacggt acgcgactgg gcgtggagca	600
[0101]	tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatgc gctgttagcg ggcccattaa gttctgtctc	660
[0102]	ggcgcgtctg cgtctggctg gctggcataa atatctcact cgcaatcaaa ttcagccgat	720
[0103]	agcggaacgg gaagcgact ggagtgcct gtcggtttt caacaaacca tgcaaatgct	780
[0104]	gaatgagggc atcgttcca ctgcgatgct ggttgccaac gatcagatgg cgctgggcgc	840
[0105]	aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgcg cgttggtgcg gacatctcgg tagtgggata	900
[0106]	cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgccgtta accacatca aacaggattt	960
[0107]	tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa ctctctcagg gccaggcgggt	1020
[0108]	gaagggcaat cagctgttgc ccgtctcact ggtgaaaaga aaaaccacc tggcgcccga	1080
[0109]	tacgcaaac gcctctccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cagcagaggt	1140
[0110]	ttcccactg gaaagcggc agtgagcga acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt	1200
[0111]	aggcaccca ggctttacac tttatgctt cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg	1260
[0112]	gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgaattteta gataacgagg	1320
[0113]	gcaaaaaatg aaaaagacag ctatcgcgat tgcagtggca ctggctggtt tcgctaccgt	1380
[0114]	agcgcaggcc gactacaaag atatccgtga cctggaagt gtcgctgcca caccgacgag	1440
[0115]	tctgctgatt tcttgggatg caccagctgt aaccgtgcgc tactaccgca ttacttacgg	1500
[0116]	ggagacgggc ggcaattccc cggtgcaaga atttactgtt ccgggcagca aaagtacagc	1560
[0117]	aactattagc ggctgaaac cgggcgttga ttataccatt actgtttacg cagtaactgg	1620
[0118]	gcgtggcgat tcaccggcgt cctctaaacc tatttcgatc aactatcgta ctgaaatcgg	1680
[0119]	tggtggtggt tctgacaaa acgcgaccaa gcttggtggt ggtggttcac tcgagacca	1740
[0120]	ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa gatagcttga cctgtgaagt gaaaaatggc	1800
[0121]	gcacattgtg cgacatttt tttgtctgcc gtttaccgct actgcgtcac ggatccccac	1860
[0122]	gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggc ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgct	1920
[0123]	acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcct tctcgccacg	1980
[0124]	ttcgccgct ttccccgta agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt ccgatttagt	2040
[0125]	gctttacggc acctcgacce caaaaaactt gattagggtg atggttcacg tagtgggcca	2100

[0126]	tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt taatagtgga	2160
[0127]	ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt tgatttataa	2220
[0128]	gggattttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac	2280
[0129]	gcgaatttta acaaaaatatt aacgcttaca atttcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg	2340
[0130]	cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga	2400
[0131]	caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat	2460
[0132]	ttccgtgtcg cccttatcc cttttttgcg gcattttgcc ttccgttttt tgctcaccca	2520
[0133]	gaaacgctgg tgaaagtaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc	2580
[0134]	gaactggatc tcaacacggg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca	2640
[0135]	atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg	2700
[0136]	caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca	2760
[0137]	gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata	2820
[0138]	accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag	2880
[0139]	ctaaccgctt ttttgacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg	2940
[0140]	gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca	3000
[0141]	acaacgttgc gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta	3060
[0142]	atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ctttccggct	3120
[0143]	ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca	3180
[0144]	gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag	3240
[0145]	gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat	3300
[0146]	tggtaaactgt cagaccaagt ttactcatat ataactttaga ttgattttaa acttcatttt	3360
[0147]	taatttmetaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa	3420
[0148]	cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga	3480
[0149]	gatccttttt ttctgcgctg aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg	3540
[0150]	gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc	3600
[0151]	agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag	3660
[0152]	aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaacc tgttaccagt ggctgctgcc	3720
[0153]	agtgcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg	3780
[0154]	cagcgtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac	3840
[0155]	accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttc cgaagggaga	3900
[0156]	aaggcgaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt	3960
[0157]	ccaggggaa acgcttggtg tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag	4020
[0158]	cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg	4080
[0159]	gcctttttac gtttccctggc cttttgctgg cttttgctc acatg	4125

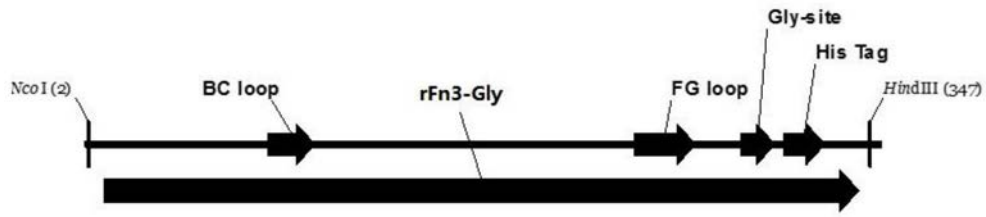


图1

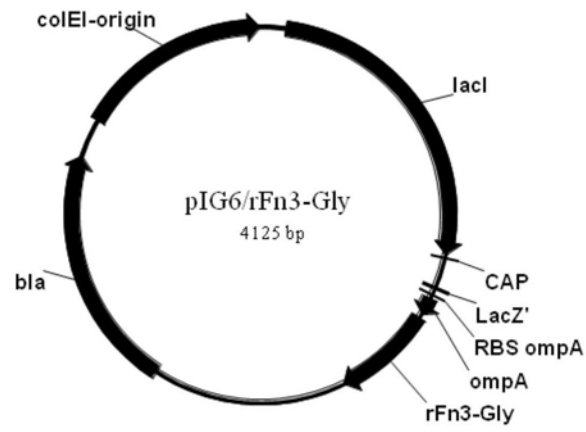


图2



图3

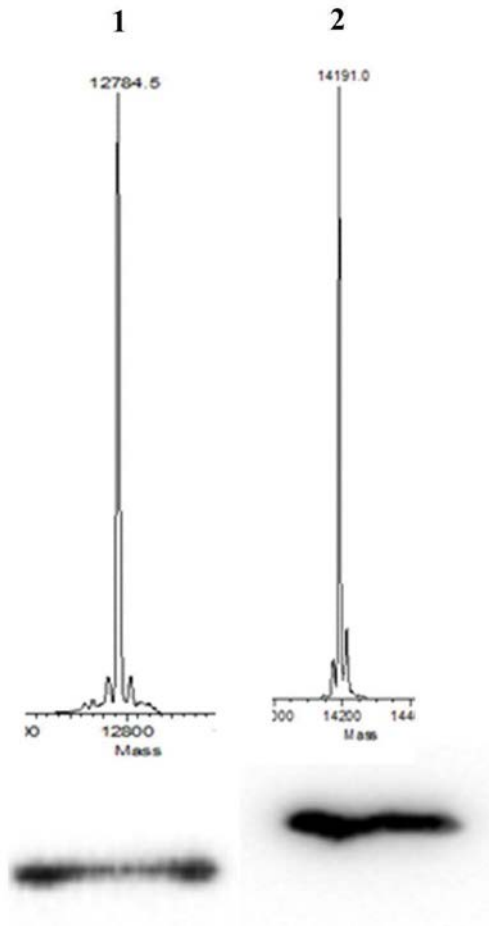


图4