

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 17/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02803752.9

[45] 授权公告日 2006年7月19日

[11] 授权公告号 CN 1264860C

[22] 申请日 2002.1.15 [21] 申请号 02803752.9

[30] 优先权

[32] 2001.1.15 [33] KR [31] 2001/02156

[86] 国际申请 PCT/KR2002/000059 2002.1.15

[87] 国际公布 WO2002/055561 英 2002.7.18

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.15

[71] 专利权人 格诺福库斯株式会社

地址 韩国大田广域市

[72] 发明人 潘在龟 崔树根 郑兴采

审查员 葛永奇

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 丁业平 王维玉

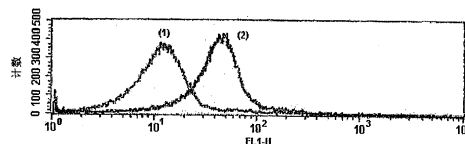
权利要求书 8 页 说明书 48 页 附图 8 页

[54] 发明名称

在遗传载体上表面展示蛋白的方法

[57] 摘要

本发明涉及在遗传载体上表面展示的目的蛋白的制备方法，目的蛋白的改进方法，目的物质的分离、生物转化以及生产抗体的方法。更具体而言，本发明涉及在遗传载体上表面展示的目的蛋白的制备方法，其包含下列步骤：(a)用含有编码目的蛋白基因的载体转化内有选自孢子和病毒的遗传载体的宿主细胞；(b)培养转化的宿主细胞和在宿主细胞中表达目的蛋白；和(c)让表达蛋白和遗传载体表面之间形成非共价键，从而目的蛋白展示在遗传载体表面上。



1. 一种制备在遗传载体上表面展示的目的蛋白的方法，其包括下列步骤：

- 5 (a) 用含有编码目的蛋白基因的载体转化内含选自孢子和病毒的遗传载体的宿主细胞；
- (b) 培养转化的宿主细胞并在宿主细胞中表达目的蛋白；和
- (c) 使表达蛋白和遗传载体表面之间形成非共价键，以便目的蛋白展示在遗传载体表面上。

10

2. 一种改进目的蛋白的方法，其包括下列步骤：

- (a) 通过突变编码目的蛋白的基因，构建目的蛋白的基因文库；
- (b) 制备含有构建的基因文库的载体文库；
- (c) 用载体文库转化内含选自孢子和病毒的遗传载体的宿主细胞；
- 15 (d) 培养转化的宿主细胞并在宿主细胞中表达目的蛋白的变体；
- (e) 通过在表达的蛋白变体和遗传载体表面之间形成非共价键以便使变体展示在遗传载体表面上，从而获取遗传载体文库；和
- (f) 筛选在其表面上展示具有所需特性的目的蛋白变体的遗传载体。
- 20

3. 一种从混合物中分离目的物质的方法，其包括下列步骤：

- (a) 通过突变编码作为目的蛋白的结合蛋白或结合区的基因，构建编码结合蛋白变体或其结合区的基因文库；
- 25 (b) 制备含有构建的基因文库的载体文库；
- (c) 用载体文库转化内含选自孢子和病毒的遗传载体的宿主细胞；
- (d) 培养转化的宿主细胞并在宿主细胞中表达结合蛋白或结合区的变体；
- 30 (e) 通过在表达的结合蛋白变体或结合区变体和遗传载体表面之

间形成非共价键以使变体展示在遗传载体表面上，从而获取遗传载体文库；

(f) 将遗传载体文库与预定的物质接触，并通过选择在其表面上展示结合预定物质的变体来筛选改进的结合蛋白或其结合区；和

5 (g) 将在其表面上展示改进的结合蛋白或其结合区的遗传载体与混合物接触以从混合物中分离目的物质。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中目的蛋白选自激素、激素类似物、酶、酶抑制剂、信号转导蛋白或其片段、抗体或其片段、
10 单链抗体、结合蛋白或其片段、肽、抗原、粘着蛋白、结构蛋白、调节蛋白、毒素蛋白、细胞因子、转录调节蛋白、血液凝固蛋白和植物防卫-诱导蛋白。

5. 根据权利要求 3 所述的方法，其中结合蛋白或其结合区为抗体
15 或其抗体结构域。

6. 根据权利要求 4 所述的方法，其中结合蛋白或其片段为抗体或其抗体结构域。

20 7. 根据权利要求 3 所述的方法，其中结合蛋白或结合区选自蛋白酶抑制剂、芥菜素、肠毒素、芋螺毒素、蜂毒明肽溶菌酶、核糖核酸酶、卡律蝎毒素、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、水蛭蛋白酶抑制剂、卵类粘蛋白、天青蛋白、肿瘤坏死因子和 CD4。

25 8. 根据权利要求 4 所述的方法，其中结合蛋白或结合区选自蛋白酶抑制剂、芥菜素、肠毒素、芋螺毒素、蜂毒明肽溶菌酶、核糖核酸酶、卡律蝎毒素、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、水蛭蛋白酶抑制剂、卵类粘蛋白、天青蛋白、肿瘤坏死因子和 CD4。

30 9. 根据权利要求 3 所述的方法，其中结合蛋白为单体或多聚体。

10. 根据权利要求 4 所述的方法，其中结合蛋白为单体或多聚体。

5 11. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中目的蛋白是一种修饰蛋白，其增强与遗传载体的非共价键。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中目的蛋白的修饰方法有：
10 (i)缺失一部分目的蛋白的氨基酸；(ii)将寡肽或多肽与(i)中的目的蛋白或其缺失形式融合，所述寡肽或多肽增强目的蛋白与遗传载体之间的非共价键；(iii)将目的蛋白进行定点诱变；或(iv)将目的蛋白进行随机诱变。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中缺失一部分目的蛋白的氨基酸的操作是使离子型氨基酸从目的蛋白的 N-端序列中缺失。

15

14. 根据权利要求 12 所述的方法，其中融合寡肽是阳离子型肽。

15. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中遗传载体具有修饰的表面蛋白，以增强与目的蛋白的非共价键。

20

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中遗传载体的修饰方法有：
(i)将寡肽或多肽与遗传载体表面蛋白融合，所述寡肽或多肽增强了目的蛋白与遗传载体之间的非共价键；(ii)使遗传载体表面蛋白进行定点诱变；或(iii)将遗传载体表面蛋白进行随机诱变。

25

17. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中内含孢子的宿主选自孢子形成革兰氏阴性菌、孢子形成革兰氏阳性菌、孢子形成放线菌(Actionmycete)、孢子形成酵母和孢子形成真菌。

30

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中孢子形成革兰氏阳性细

菌选自梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)、 类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)。

5 19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中芽孢杆菌选自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

20. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 其中病毒是噬菌体。

10 21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中噬菌体位于宿主细胞的周质, 以及目的蛋白结合于噬菌体的表面。

15 22. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 其中宿主细胞为一种突变细胞, 其消除了胞内蛋白酶或胞外蛋白酶的产生, 所述蛋白酶参与降解表面展示的目的蛋白。

20 23. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中筛选步骤的操作方式是将孢子文库用选自有机溶剂、热、酸、碱、氧化剂、干燥、表面活性剂和蛋白酶中的一种或多种进行处理, 然后对在其表面上展示目的蛋白变体、具有处理抗性的孢子加以选择。

25 24. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中遗传载体是孢子, 以及筛选步骤的操作方式是将孢子文库用选自有机溶剂、热、酸、碱、氧化剂、干燥和表面活性剂中的一种或多种首先进行处理, 接着用蛋白酶进行二次处理, 然后对在其表面上展示目的蛋白变体、具有蛋白酶抗性的孢子加以选择。

30 25. 根据权利要求 1 所述的方法, 其进一步包括对在其表面上展示目的蛋白的遗传载体进行筛选的步骤。

26. 根据权利要求 2、3 或 25 所述的方法，其中筛选步骤的操作依靠：(i)展示在遗传载体表面上的目的蛋白的活性；(ii)能够识别标记目的蛋白的物质的蛋白；(iii)能够结合目的蛋白的标记配体；或(iv)能够与目的蛋白特异性结合的抗体。

5

27. 根据权利要求 26 所述的方法，其中筛选采用能够结合于目的蛋白的标记配体或能够特异性结合于目的蛋白的抗体，由流式细胞仪来实施。

10

28. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其还包括使遗传载体表面和目的蛋白之间的键稳定的步骤，所述稳定步骤的操作途径是使用物理、化学或生化方法在遗传载体表面和目的蛋白之间形成共价键，接着通过非共价键在遗传载体表面上展示目的蛋白。

15

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中形成共价键的化学法是戊二醛处理，物理法是紫外线处理，以及生化法是酶处理，以确保共价键的形成。

20

30. 一种用于在遗传载体表面上展示目的蛋白的载体，其包括复制起点、抗生素抗性基因、限制性位点、编码目的蛋白的基因，其中当目的蛋白在宿主细胞中表达时，其能够与遗传载体表面形成非共价键。

25

31. 根据权利要求 30 所述的载体，其中编码目的蛋白的基因是一种突变基因，以增强遗传载体表面和目的蛋白之间的非共价键。

30

32. 根据权利要求 31 所述的载体，其中将编码目的蛋白的基因突变成(i)缺失一部分目的蛋白的氨基酸；(ii)将寡肽或多肽与(i)中的目的蛋白或其缺失形式融合，所述寡肽或多肽增强目的蛋白与遗传载体之间的非共价键；(iii)将目的蛋白进行定点诱变；或(iv)将目的蛋白进

行随机诱变。

5 33. 一种微生物转化子，其特征在于转化子的生产方法是用根据
权利要求 30-32 中任一项所述的载体转化内含孢子或病毒的宿主细
胞。

10 34. 根据权利要求 33 所述的转化子，其中宿主细胞是一种突变
细胞，以消除胞内蛋白酶或胞外蛋白酶的产生，所述蛋白酶参与降解
表面展示的目的蛋白。

15 35. 一种遗传载体和目的蛋白之间的复合体，其特征在于复合体
的制备方法是根据权利要求 1 所述的方法在遗传载体表面上展示激
素、激素类似物、酶、酶抑制剂、信号转导蛋白或其片段、抗体或其
片段、单链抗体、结合蛋白或其片段、肽、抗原、粘着蛋白、结构蛋
白、调节蛋白、毒素蛋白、细胞因子、转录调节蛋白、血液凝固蛋白
或植物防卫—诱导蛋白。

20 36. 根据权利要求 35 所述的复合体，其中目的蛋白是一种修饰
蛋白，修饰方法有：(i)缺失一部分目的蛋白的氨基酸；(ii)将寡肽或多
肽与(i)中的目的蛋白或其缺失形式融合，所述寡肽或多肽增强目的蛋
白与遗传载体之间的非共价键；(iii)将目的蛋白进行定点诱变；或(iv)
将目的蛋白进行随机诱变。

25 37. 根据权利要求 35 所述的复合体，其中复合体具有其他共价
键以使遗传载体表面和目的蛋白之间的键稳定，其中共价键的形成是
采用物理、化学或生化方法，接着通过非共价键在遗传载体表面上展
示目的蛋白。

30 38. 根据权利要求 35-37 中任一项所述的复合体，其中遗传载体
为孢子。

39. 根据权利要求 38 所述的复合体，其中孢子是非再生孢子，其是通过选自遗传方法、化学方法和物理方法中的一种或多种获得的。

5

40. 根据权利要求 39 所述的复合体，其中使孢子成为非再生性的遗传方法是通过缺失参与宿主细胞的孢子再生的基因来进行的。

10

41. 根据权利要求 38 所述的复合体，其中孢子衍生自突变体，以通过选自遗传方法、化学方法或物理方法中的一种或多种来增加其凝集特性。

42. 根据权利要求 35 所述的复合体，其中目的蛋白为单体或多聚体。

15

43. 根据权利要求 35-37 中任一项所述的复合体，其中遗传载体是噬菌体。

20

44. 一种在其表面上展示目的蛋白变体的遗传载体文库，其制备方法包含下列步骤：(a)通过突变编码目的蛋白的基因，构建目的蛋白的基因文库；(b)制备含有构建的基因文库的载体文库；(c)用载体文库转化内含选自孢子和病毒的遗传载体的宿主细胞；(d)培养转化的宿主细胞并在宿主细胞中表达目的蛋白的变体；(e)通过在表达的蛋白变体和遗传载体表面之间形成非共价键以使变体展示在遗传载体表面上，从而获取遗传载体文库；和(f)筛选在其表面上展示具有所需特性的目的蛋白变体的遗传载体。

25

45. 根据权利要求 44 所述的遗传载体文库，其中遗传载体为孢子。

30

46. 根据权利要求 44 所述的遗传载体文库，其中遗传载体为噬菌体，以及目的蛋白变体为结合蛋白或结合区的变体。

5 47. 一种利用具有转化反应活性的蛋白进行生物转化的方法，其特征在于该方法采用根据权利要求 35-37 中任一项所述的遗传载体和目的蛋白之间的复合体。

48. 根据权利要求 47 所述的方法，其中具有转化反应活性的蛋白为酶或抗体。

10

49. 一种生产针对脊椎动物抗原的抗体的方法，其特征在于该方法包括给脊椎动物施用一种组合物，所述组合物含有免疫有效量的根据权利要求 35-37 中任一项所述的遗传载体和目的蛋白之间的复合体，以及从所述脊椎动物中分离所述抗体。

15

50. 一种蛋白微阵列，其包括固相基底和固定到所述基底上的物质，其特征在于固定到基底上的物质选自根据权利要求 35-37 中任一项所述的遗传载体和目的蛋白之间的复合体以及根据权利要求 44-46 中任一项所述的遗传载体文库。

20

在遗传载体上表面展示蛋白的方法

5 技术领域

本发明涉及表面展示蛋白的方法，具体涉及在孢子等的表面上展示目的蛋白的、改进目的蛋白和分离目的物质的方法。

背景技术

10 生物体在其表面上展示所需的拟蛋白(proteinaceous)物质如肽和多肽的表面展示技术有更广的应用领域，这取决于所展示蛋白或宿主生物体的类型(Georgiou 等, 1993, 1997; Fischetti 等, 1993; 和 Schreuder 等, 1996)。这种常规表面展示技术已通过采用若干单细胞生物体如噬菌体、细菌、酵母和哺乳动物细胞开发出来。

15

把待展示蛋白的基因含在宿主生物体中，由此利用所展示蛋白的特征可选择性地筛选宿主，从而容易地从所选择的宿主中获得所需的基因。所以，这种表面展示技术对蛋白的分子进化可确保有强大的工具(参见 WO 9849286; 和美国专利号 5,837,500)。

20

高通量筛选

例如，将在其表面上展示具有所需结合亲和性的抗体的噬菌体与固定化抗原结合，然后洗脱，接着使洗脱的噬菌体增殖，由此获得编码噬菌体靶抗体的基因(美国专利号 5,837,500)。上述的生物摇摄方法
25 通过在大量的噬菌体表面上表面展示抗体文库，可提供筛选靶抗体的工具，以及包含如下的连续步骤：(1)构建文库；(2)表面展示文库；(3)与固定化抗原结合；(4)洗脱结合的噬菌体；最后(5)使选择的克隆增殖。

已发现噬菌体表面展示技术在从大量文库中获取所需的单克隆变
30 体方面是有用的(例如， 10^6 - 10^9 变体)，并因此应用到抗体的高通量筛

5 选的领域。抗体已用于各种领域如治疗、诊断、分析等，并且其需求已日益增长。就此而论，对新物质具有结合亲和性或催化生化反应的新型抗体一直存在着需要。生产单克隆抗体的杂交瘤技术已普遍使用以满足需求。然而，常规方法的实施需要高的成本和长的时间，但抗体的产量却很低。除此以外，为了筛选新型抗体，一般使用超过 10^{10} 个抗体文库，结果，杂交瘤技术已被认为在发现显示新的结合特性的抗体方面是不够的。

10 许多研究已集中在较容易和更有效的新方法上，如上述的生物摇摄方法，然后开发了以此方式进行的新技术，该方式是将文库展示在细菌或酵母的表面上，然后展示靶蛋白的细胞用流式细胞仪以高通量方式分类。根据此技术，将标记有荧光染料的抗原与表面一展示细胞结合，以及具有所需的结合亲和性的抗体用每小时能分析超过 10^8 细胞的流式细胞仪分离。通过揭示表面展示单克隆抗体可用流式细胞仪
15 以超过 10^5 的速率被浓缩，最终超过 79% 经证明是所需的细胞 (Daugherty 等, 1998), Francisco 等已证实微生物展示技术的有用性。

活疫苗

20 上述的表面展示技术可展示抗原或其片段，因此提供重组活疫苗的递送系统。迄今为止，减毒的病原体或病毒已被主要用作疫苗。特别地，已发现细菌在胞内或胞外或其细胞膜上表达抗原，由此给宿主细胞递送抗原。表面展示的活疫苗诱导潜在的免疫反应，并在宿主细胞的增殖过程中连续表达抗原；所以，它已成为突出的疫苗的新递送系统。具体而言，展示在非病原性大肠杆菌 (*E. coli*) 或沙门氏菌
25 (*Salmonella*) 的表面的病原体衍生的抗原性表位以活体形式口服，然后显示以更连续或强大的方式诱导免疫反应 (Georgiou 等, 1997; 和 Lee 等, 2000)。

全细胞生物转化

30 全细胞作为生物催化剂，在其表面上展示的酶能催化化学反应，

可避免酶的直接表达、分离和稳定的必要性。在细胞中表达酶用于生物转化的情况下，迫使细胞回收及化学(例如甲苯)处理以确保对底物的不通透性。此外，持续使用致使酶失活或者带来底物和产物转移上的问题，由此降低整个过程的生产率。

5

利用展示在细胞表面上的酶可克服上述的缺陷(Jung 等, 1998a: 1998b)。采用在其表面上展示磷酸二酯酶的全细胞，具有更高毒性的有机磷种类对硫磷和对氧磷可被降解，这是个典型的例子，表示展示酶的细胞对环境纯化过程的应用性(Richins 等, 1997)。

10

抗肽抗体

Martineau 等报道了利用大肠杆菌的表面展示技术生产抗肽抗体的高度简便的方法(Martineau 等, 1991)。正如所述，把所需的肽展示在 MalE 和外膜蛋白 LamB 的突出区域，然后，全细胞或片段化的细胞施用给动物以生成抗肽抗体。该方法使得生产抗体的同时避免肽的化学合成及其与载体蛋白的键合成为可能。

15

全细胞吸附剂

为了使抗体或多肽固定于合适的载体上，这在吸附层析中是有用的，必须进行随后的若干步骤，例如，发酵生长蛋白，纯化纯的蛋白以及固定于载体上。一般而言，难以制备生物吸附剂。

20

作为吸附剂，已开发出了展示吸附蛋白的全细胞。最有名的全细胞吸附剂是在其表面上自然展示蛋白 A 的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)，它与哺乳动物抗体的 Fc 区具有高的结合亲和性。当前，已提出了去除和回收重金属的新方法，其采用大量展示在微生物细胞表面上的金属硫蛋白或金属吸附蛋白(Sousa 等, 1996,1998; 和 Samuelson 等, 2000)。与利用吸附金属微生物的常规方法比较，该方法可更有效地从污染源中去除和回收重金属。

25

30

正是基于对上述事实的了解，为了在细胞表面上展示外源蛋白，合适的表面蛋白和外源蛋白必须在基因水平是相互连接的以表达融合蛋白，以及融合蛋白应稳定地越过细胞内膜以附着于细胞表面。优选地，具有下列特征的表面蛋白推荐为表面展示基元：1)有能通过细胞内膜的分泌信号，2)有能稳定附着于细胞表面上的靶信号，3)细胞表面上的高表达水平，和 4)不管蛋白大小都可稳定表达(Georgiou 等，1993)。

同时，根据上述现有的表面展示方法，为了把目的蛋白整合到表面蛋白的 N-端或 C-端或中心区，表面展示的基元需要进行遗传修饰。所有表面展示的蛋白以与表面展示基元融合的方式表达。所以，所得表面展示的蛋白是修饰蛋白而非野生型蛋白。

迄今为止，所开发的表面展示系统如下：噬菌体表面展示系统(Chiswell 和 McCarferty, 1992)、细菌表面展示系统(Georgiou 等, 1993; Little 等, 1993; 和 Georgiou 等, 1997)、革兰氏阴性细菌表面展示系统(Francisco 等, 1992; Fuchs 等, 1991; Klauser 等, 1990, 1992; 和 Hedegaard 等, 1989)、革兰氏阳性细菌表面展示系统(Samuelsen 等, 1995; Palva 等, 1994; 和 Sleytr 和 Sara, 1997)和酵母表面展示系统(Ferguson, 1988; 和 Schreuder 等, 1996)。此外，还已开发出了与芽孢外被蛋白融合的目的蛋白展示在孢子表面上。例如，美国专利号 5,766,914 公开了利用枯草芽孢杆菌的芽孢外被蛋白中的 cotC 或 cotD 与作为报道蛋白的 lacZ 的融合蛋白来生产和纯化酶的方法。美国专利号 5,837,500 和 5,800,821 也表明 cotC 和 cotD 作为优选的表面展示基元，但其实验演示未加以说明。

根据革兰氏阴性细菌的表面展示系统，外源多肽整合到表面结构不仅导致位的限制使得不可能具有稳定的膜蛋白(Charbit 等, *J. Immunol*, 139: 1644-1658 (1987); 和 Agterberg 等, *Gene*, 88: 37-45 (1990))而且导致细胞外膜的稳定性及其生存力的降低。大肠杆菌作为展示宿

主，其已被深入地进行了研究，通常利用细胞外膜蛋白作为表面展示基元。然而，与外源蛋白融合的细胞外膜蛋白的过表达可能带来细胞外膜结构的不稳定，结果使宿主细胞的生存力突然下降(Georgiou 等，1996)。

5

上述常规展示方法中存在的问题是由于目的蛋白和用于展示的表面展示基元之间的融合蛋白的制备。如果融合蛋白以少量表达，则全细胞生物转化的反应效率、蛋白阵列和抗体产量降低；但如果过表达，很可能导致上述的缺陷。另外，利用融合蛋白的表面展示方法依赖于表面展示基元整合到细胞、孢子或噬菌体表面中的程度，引起展示蛋白量的限制。

10

如上所述，常规表面展示技术根本上取决于目的蛋白和表面展示基元之间的融合蛋白的形成。因此，在常规表面展示系统中存在若干缺陷：(1)必须得知表面展示基元的基因序列；(2)必须克隆表面展示基元的基因；(3)表面展示基元很可能影响目的蛋白的三级结构；(4)当仅有多聚体形式的目的蛋白具有活性以及融合蛋白是独立表面展示时，致使目的蛋白失活；(5)由于利用融合蛋白的表面展示方法依赖于表面展示基元整合到宿主细胞表面中的程度，限制所展示蛋白的量；(6)当目的蛋白过量表面展示时，诱导宿主细胞的结构不稳定，从而降低了宿主细胞对环境的抗性和生存力。

15

20

因此，为了开发新表面展示系统，该系统能够克服常规方法中的缺陷，下列特征应得以实现：(1)能够构建系统而无需知道表面展示基元的基因序列；(2)能够构建系统而无需克隆表面展示基元的基因；(3)在目的蛋白形成其内在结构后，能够在宿主细胞表面上进行展示；(4)通过非选择性键合，能够增加表面展示的蛋白的量；和/或(6)即使在目的蛋白过量表面展示时，也不降低宿主细胞对环境的抗性和生存力。

25

30

在整个申请中，参考了各种各样的专利和出版物，文献引用在括号内。为了更充分说明本发明以及本发明涉及的技术领域状态，这些专利和出版物以其全文在此引作参考。

5 发明内容

在此情形下，本发明人进行了深入研究以克服常规表面展示方法的缺陷，结果我们开发了无需表面展示基元的新型展示系统。令人惊奇的是，开发的系统发现能够在表面上展示任何蛋白，而同时维持其内在结构，并且当过量展示时，遗传载体可保持其生存力以及对周围环境的抗性。

因此，本发明的一个目的是提供在遗传载体上表面展示的目的蛋白的制备方法。

15 本发明的另一目的是提供利用在遗传载体上表面展示的方法改进目的蛋白的方法。

本发明的另一目的是提供利用在遗传载体上表面展示的方法从混合物中分离目的物质的方法。

20 本发明的进一步目的是提供利用在遗传载体上表面展示的方法进行生物转化的方法。

25 本发明的进一步目的是提供利用在遗传载体上表面展示的方法生产针对脊椎动物抗原的抗体的方法。

本发明的另一目的是提供用于在遗传载体表面上展示目的蛋白的载体。

30 本发明的另一目的是提供用于在遗传载体表面上展示目的蛋白的

微生物转化子。

本发明的进一步目的是提供遗传载体和目的蛋白之间的复合体。

5 本发明的进一步目的是提供展示在表面目的蛋白变体上的遗传载体文库。

本发明的另一目的是提供利用在遗传载体上表面展示的方法所制备的蛋白微阵列。

10

附图简述

图 1 示意性说明本发明的原理；

图 2 表示展示在孢子表面上的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 脂肪酶活性；

15 图 3 表明在宿主细胞中表达的野生型脂肪酶在孢子表面上的展示；

图 4 显示流式细胞仪分析的结果，用于证实野生型羧甲基纤维素酶的孢子表面展示；

图 5 是用于孢子表面展示的载体 pCrylp-CMCase-hp 的遗传图；

20 图 6 显示流式细胞仪分析的结果，用于证实含有修饰的分泌信号的羧甲基纤维素酶的孢子表面展示；

图 7 是用于孢子表面展示的载体 pCrylp-CMCasehis 的遗传图；
和

25 图 8 示出流式细胞仪分析的结果，用于证实含有融合序列、阳离子区的羧甲基纤维素酶的孢子表面展示。

实施本发明的最佳方式

30 首先在此使用的术语“遗传载体”是指在其表面上展示目的蛋白并具有下列特征的生物体：(1)选自孢子和病毒；(2)具有与目的蛋白形成非共价键的能力，所述目的蛋白具有所需的解离常数，在内含遗传

载体的宿主细胞中表达；和(3)如果需要，其表面特性能够通过遗传工程方法进行修饰。

5 此处所用的术语“宿主细胞”意思不同于涉及蛋白表面展示的现有出版物所公开和显示的含义。在此所用的术语“宿主细胞”是指表达目的蛋白并具有下列特性的细胞：(1)能够被编码目的蛋白的基因转化；(2)能够内含遗传载体如孢子和病毒以及增殖遗传载体；和(3)如果需要，能够进行遗传操作。

10 如上所述，在本说明书中，术语“遗传载体”在其表面上展示目的蛋白，以及“宿主细胞”表达目的蛋白，它们具有严格不同的含义。

15 在本发明的一个方面，提供了在遗传载体上表面展示的目的蛋白的制备方法，所述方法包含下列步骤：(a)用含有编码目的蛋白的基因的载体转化内含选自孢子和病毒的遗传载体的宿主细胞；(b)培养转化的宿主细胞并在宿主细胞中表达目的蛋白；和(c)使表达蛋白和遗传载体表面之间形成非共价键，以便目的蛋白展示在遗传载体表面上。

20 在本发明的另一方面，提供了改进目的蛋白的方法，所述方法包括下列步骤：(a)通过突变编码目的蛋白的基因，构建目的蛋白的基因文库；(b)制备含有构建的基因文库的载体文库；(c)用载体文库转化内含选自孢子和病毒的遗传载体的宿主细胞；(d)培养转化的宿主细胞并在宿主细胞中表达目的蛋白的变体；(e)通过在表达的蛋白变体和遗传载体表面之间形成非共价键以便使变体展示在遗传载体表面上，从而
25 获取遗传载体文库；和(f)筛选在其表面上展示具有所需特性的目的蛋白变体的遗传载体。

30 在本发明的另一方面，提供了从混合物中分离目的物质的方法，所述方法包括下列步骤：(a)通过突变编码结合蛋白或作为目的蛋白的结合区的基因，构建编码结合蛋白或其结合区的基因文库；(b)制备含

有构建的基因文库的载体文库；(c)用载体文库转化内含选自孢子和病毒的遗传载体的宿主细胞；(d)培养转化的宿主细胞并在宿主细胞中表达结合蛋白或结合区的变体；(e)通过在表达的结合蛋白变体或结合区变体和遗传载体表面之间形成非共价键以便使变体展示在遗传载体表面上，从而获取遗传载体文库；和(f)将遗传载体文库与预定的物质接触，并通过选择在其表面上展示变体结合预定的物质来筛选改进的结合蛋白或其结合区；(g)将在其表面上展示改进的结合蛋白或其结合区的遗传载体与混合物接触以从混合物中分离物质。

10、 本发明方法已根据新的概念开发出来，其与常规表面展示方法大大不同。本发明方法利用了遗传载体表面上组分的特性，具体利用了遗传载体表面上的蛋白和目的蛋白之间的非共价键。本发明的原理路线利用孢子作为遗传载体，说明性示例在图1中。参照图1，宿主细胞被携带编码目的蛋白的序列的载体转化，目的蛋白在形成孢子过程中或之前胞内或胞外表达，并且凭借目的蛋白和宿主细胞中形成的孢子表面之间的非共价键最终实现目的蛋白的表面展示。

15 如上所述，本发明的显著特征在于无需表面展示的基元，所述基元在常规表面展示蛋白的方法中是必需的。由于本发明方法规避了表面展示基元的必要性，因此蛋白在宿主细胞中表达时，发现难以越过细胞膜，可在遗传载体表面上充分展示，当宿主细胞裂解露出遗传载体时，可回收在其表面上展示蛋白的遗传载体。这种回收的目的蛋白和遗传载体的复合体具有广泛的用途。

25 根据本发明方法，孢子或病毒可作为遗传载体使用。孢子是优选的遗传载体，这是由于它具有如下特性(Driks, 1999)：(1)较高的热稳定性；(2)对放射性显著的稳定性；(3)对毒素的稳定性；(4)对酸和碱较高的稳定性；(5)对溶菌酶显著的稳定性；(6)抗干燥性；(7)对有机溶剂较高的稳定性；(8)无代谢活性；和(9)较短的获取孢子的时间，例如几小时。

30

根据本发明方法，当病毒用作遗传载体时，优选使用噬菌体，以及在原核宿主细胞中表达的目的蛋白是通过非共价键结合到噬菌体的外被蛋白而得到表面展示的。如果噬菌体位于宿主细胞的周质中，可将信号肽与目的蛋白融合，以允许向周质中分泌，从而确保表面展示。如果目的蛋白不能与噬菌体的外被蛋白自然结合，则为了进行表面展示，可将其融合到能与噬菌体的外被蛋白结合的基元上。

根据一优选的实施方案，遗传载体具有修饰的表面蛋白以增强与目的蛋白的非共价键。遗传载体的修饰方法包括：(i)将寡肽或多肽与遗传载体表面蛋白融合，所述寡肽或多肽增强了目的蛋白与遗传载体之间的非共价键；(ii)使遗传载体表面蛋白进行定点诱变；和(iii)把遗传载体表面蛋白进行随机诱变，但不限于此。

在本发明方法中，目的蛋白包括任何蛋白和肽，如激素、激素类似物、酶、酶抑制剂、信号转导蛋白或其片段、抗体或其片段、单链抗体、结合蛋白或其片段、肽、抗原、粘着蛋白、结构蛋白、调节蛋白、毒素蛋白、细胞因子、转录调节蛋白、血液凝固蛋白和植物防卫一诱导蛋白，但不限于此。

本发明所用的结合蛋白或其结合区包括任何能够结合预定的物质的蛋白或其结构域，例如当分离某种抗原物质时，所述结合蛋白或其结合区是抗体或其抗体结构域。结合蛋白或结合区包括但不限于蛋白酶抑制剂、芥菜素(crambin)、肠毒素、芋螺毒素、蜂毒明肽(apamin)、溶菌酶、核糖核酸酶、卡律蝎毒素、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、水蛭蛋白酶抑制剂、卵类粘蛋白、天青蛋白、肿瘤坏死因子和 CD4。

根据本发明方法，单体或多聚体(包括同型多聚体和异型多聚体)可被表面展示。多聚体蛋白一般只有其所有单体结合时才具有完整的活性。在常规方法中，已发现多聚体蛋白是以失活形式进行表面展示

的，因为其单体是彼此独立表面展示的。根据本发明方法，多聚体蛋白可以展示在遗传载体表面上而同时维持其整体结构。

5 根据优选的实施方案，待表面展示的目的蛋白可以被修饰，以便增强与遗传载体的非共价键。修饰方法包括：(i)缺失一部分目的蛋白的氨基酸；(ii)将寡肽或多肽与(i)中的目的蛋白或其缺失形式融合，所述寡肽或多肽增强目的蛋白与遗传载体之间的非共价键；(iii)将目的蛋白进行定点诱变；和(iv)将目的蛋白进行随机诱变，但不限于此。

10 使一部分目的蛋白氨基酸缺失的方法可以各种各样的方式进行，例如通过从目的蛋白的 N-端序列（例如信号肽）缺失离子型氨基酸。由此修饰的目的蛋白增强了与遗传载体的疏水性相互作用，因此可以较低的解离常数被表面展示。有报道孢子表面携带阴离子电荷。所以优选阳离子肽与用于表面展示的目的蛋白进行融合。

15 在本发明方法中，作为编码待转化目的蛋白的基因，两个或更多个重复序列也是有用的。在两个或更多个重复序列中，重复序列可以彼此相同或不同。其他组合也可用于融合序列中。此外，转化中所用的基因可以质粒独立存在于宿主细胞中，或整合到宿主细胞的染色体中。

20 目的蛋白的表达可以依靠其自身的启动子或其他可在宿主细胞中诱导的适当的启动子进行诱导。

25 根据本发明方法，非共价键，尤其是疏水键、离子键、氢键和范德瓦耳斯键中的一种或多种，使得目的蛋白与遗传载体之间相互作用。

30 根据一优选的实施方案，内含孢子的宿主细胞包括但不限于孢子形成革兰氏阴性菌如粘球菌(Myxococcus)；孢子形成革兰氏阳性菌如

梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)、类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)和芽孢杆菌(*Bacillus*); 孢子形成放线菌(*Actionmycete*); 孢子形成酵母如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、假丝酵母(*Candida*)和汉逊酵母(*Hansenulla*)和孢子形成真菌。更优选地, 宿主细胞是孢子形成革兰氏阳性菌, 以及最优选地, 芽孢杆菌包括枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。具体而言, 枯草芽孢杆菌在某种意义上是有利的, 因为对其孢子形成的遗传知识和实验方法以及培养方法是众所周知的。

5

10

根据一优选的实施方案, 宿主细胞是一种突变细胞, 其删除了胞内和胞外蛋白酶的生成, 所述蛋白酶参与表面展示的目的蛋白的降解。

15

虽然本发明方法主要针对通过遗传载体和目的蛋白之间非共价键的表面展示, 但如果需要更稳定的连接, 其它共价键也可使用。使遗传载体表面和目的蛋白之间的键稳定的操作方法是使用物理、化学或生化方法在遗传载体表面和目的蛋白之间形成共价键, 接着通过非共价键在遗传载体表面上展示目的蛋白。在形成共价键的方法中, 化学法戊二醛处理(DeSantis G.和 Jones J. B. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 324-330 (1999))是优选的, 物理法紫外线处理(Graham L.,和 Gallop P. M. *Anal. Biochem.* 217: 298-305 (1994))是优选的, 以及生化法酶处理确保了共价键的形成(Gao Y.,和 Mehta K., *J. Biochem.* 129: 179-183 (2001))。

20

25

在遗传载体上表面展示的目的蛋白的制备方法中, 优选方法进一步包含筛选在其表面上展示目的蛋白的遗传载体的步骤。

30

在改进目的蛋白的方法中, 通过突变野生型目的蛋白基因来构建基因文库的步骤是利用: DNA 改组方法(Stemmer, *Nature*, 370: 389-391 (1994))、StEP 方法(Zhao, H.等, *Nat. Biotechnol.*, 16: 258-261 (1998))、

RPR 方法(Shao, Z.等, *Nucleic acids Res.*, 26: 681-683 (1998))、分子繁殖方法(Ness, J. E.等, *Nat. Biotechnol.*, 17: 893-896 (1999))、ITCHY 方法(Lutz S.和 Benkovic S., *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 319-324 (2000))、易错 PCR(Cadwell, R. C.和 Joyce, G. F., *PCR Methods Appl.*, 2: 28-33 (1992))和点诱变(Sambrook 等, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989)。

根据改进目的蛋白方法的一优选实施方案, 遗传载体是孢子, 以及筛选步骤的方式是将孢子文库用选自有机溶剂、热、酸、碱、氧化剂、干燥、表面活性剂和蛋白酶中的一种或多种进行处理, 然后对在其表面上展示目的蛋白变体、具有处理抗性的孢子加以选择。

根据改进目的蛋白方法的另一优选实施方案, 遗传载体是孢子, 以及筛选步骤的方式是将孢子文库先用选自有机溶剂、热、酸、碱、氧化剂、干燥、表面活性剂中的一种或多种进行处理, 接着用蛋白酶进行二次处理, 然后对在其表面上展示目的蛋白变体、具有蛋白酶抗性的孢子加以选择。

在本发明方法中, 筛选步骤的操作依靠: (i)展示在遗传载体表面上的目的蛋白的活性; (ii)能够识别标记目的蛋白的物质的蛋白; (iii)能够结合目的蛋白的标记配体; 或(iv)能够与目的蛋白特异性结合的抗体, 但不限于此。优选地, 通过能够与目的蛋白结合的标记配体或能够与目的蛋白特异性结合的抗体, 将流式细胞仪用于筛选中。例如, 一级抗体结合于展示在孢子表面上的目的蛋白, 然后与标记有荧光化学物质的二级抗体反应以染色孢子, 接着用荧光显微镜观察或用流式细胞仪分析。如果二级抗体是金标记的, 则能用电子显微镜观察。通过测量由此蛋白催化的比色反应, 利用目的蛋白的活性进行筛选。

在本发明制备表面展示的目的蛋白以及改进目的蛋白的方法中, 优选的是在所筛选的遗传载体增殖后, 具有所需特性的蛋白变体或编

码它们的基因得到回收。

5 根据利用孢子作为遗传载体的一优选实施方案，孢子回收的操作方式是通过控制培养时间，使目的蛋白在孢子表面上的展示最大化，其后培养终止，然后回收孢子。适当的培养时间是变化的，这取决于所用的细胞类型，例如在使用枯草芽孢杆菌作为宿主的情形下，优选的培养时间为 16-25 小时。根据本领域一名技术人员已知的常规方法，更优选 renografin 梯度方法(C.R. Harwood 等, "Molecular Biological Methods for Bacillus." John Wiley & Sons, New York, 第 416 页
10 (1990)), 可进行孢子回收。

改进蛋白的方法以高通量方式从野生型中提供(1)催化非生物反应的酶(例如第尔斯-阿尔德缩合); (2)具有非自然立体选择性或区域选择性的酶; (3)在有机溶剂或有机溶剂-水溶液两相体系中具有活性的酶; 和(4)在极端条件如高温或高压下具有活性的酶。此外, 为了选择具有增强的结合亲和性的抗体变体, 通常是使 pH 突然发生变化或调整碱的浓度, 从而洗脱变体。在利用噬菌体或细菌作为载体的方法中, 这种洗脱条件有可能降低噬菌体或细菌在培养基中的生存力。然而, 利用孢子表面展示系统改进蛋白的方法克服了这种障碍。
15

20

在本发明的进一步方面, 提供了在遗传载体表面上展示目的蛋白的载体, 所述载体包含复制起点、抗生素抗性基因、限制性位点、编码目的蛋白的基因, 其中当目的蛋白在宿主细胞中表达时, 其能够与遗传载体的表面形成非共价键。

25

根据一优选实施方案, 编码目的蛋白的基因是一种突变基因, 其增强遗传载体表面和目的蛋白之间的非共价键。将编码目的蛋白的基因突变成(i)缺失一部分目的蛋白的氨基酸; (ii)将寡肽或多肽与(i)中的目的蛋白或其缺失形式融合, 所述寡肽或多肽增强目的蛋白与遗传载体之间的非共价键; (iii)将目的蛋白进行定点诱变; 或(iv)将目的蛋白
30

进行随机诱变。

在本发明的进一步方面，提供了微生物转化子，其特征在于转化子的制备方法是使用本发明载体转化内含孢子或病毒的宿主细胞。根据一优选实施方案，宿主细胞是一种突变细胞，其消除了胞内蛋白酶或胞外蛋白酶的产生，所述蛋白酶参与降解表面展示的目的蛋白。

在本发明的另一方面，提供了遗传载体和目的蛋白之间的复合体，其特征在于复合体的制备是根据权利要求 1 所述的方法在遗传载体表面上展示激素、激素类似物、酶、酶抑制剂、信号转导蛋白或其片段、抗体或其片段、单链抗体、结合蛋白或其片段、肽、抗原、粘着蛋白、结构蛋白、调节蛋白、毒素蛋白、细胞因子、转录调节蛋白、血液凝固蛋白和植物防卫—诱导蛋白。

根据一优选实施方案，目的蛋白是一种修饰蛋白，其修饰方法是 (i) 缺失一部分目的蛋白的氨基酸；(ii) 将寡肽或多肽与 (i) 中的目的蛋白或其缺失形式融合，所述寡肽或多肽增强目的蛋白与遗传载体之间的非共价键；(iii) 将目的蛋白进行定点诱变；或 (iv) 将目的蛋白进行随机诱变。

此外，本发明复合体可具有其它共价键以使遗传载体表面和目的蛋白之间的键稳定，其中使用物理、化学或生化方法形成共价键，接着通过非共价键在遗传载体表面上展示目的蛋白。

在本发明复合体中，孢子是优选的遗传载体。如果孢子用作遗传载体，孢子优选的是非繁殖孢子，其获得途径是选自遗传方法(Popham D. L.等, J. Bacteriol., 181: 6205-6209 (1999))、化学方法(Setlow T. R.等, J. Appl. Microbiol., 89: 330-338 (2000))和物理方法(Munakata N等, Photochem. Photobiol., 54: 761-768 (1991))中的一种或多种。本发明复合体仅利用孢子作为目的蛋白的展示手段可排除繁殖孢子的必要性。

可考虑的是经遗传工程改造的生物体有可能受到法律和规章的控制；因此非繁殖孢子是优选的。造成孢子非繁殖的遗传方法可通过缺失参与宿主细胞的孢子再生的基因来实施。例如，缺乏 *cw1D* 基因的枯草芽孢杆菌优选用于本发明中。另外，孢子优选衍生自突变的变体，所述变体通过选自物理方法(Wienc K. M.等, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2600-2605 (1990))、化学方法和遗传方法中的一种或多种增加了其凝集特性。具有增加的凝集特性的孢子可在以工业规模进行的生物转化中从所得产物方便地分离出来。

10 在优选的实施方案中，遗传载体是噬菌体。

在本发明另一方面，提供了在其表面上展示目的蛋白变体的遗传载体文库，该文库的制备方法包含下列步骤：(a)通过突变编码目的蛋白的基因，构建目的蛋白的基因文库；(b)制备含有构建的基因文库的载体文库；(c)用载体文库转化内含选自孢子和病毒的遗传载体的宿主细胞；(d)培养转化的宿主细胞并在宿主细胞中表达目的蛋白变体；(e)通过在表达的蛋白变体和遗传载体表面之间形成非共价键以使变体展示在遗传载体表面上，获取遗传载体文库；和(f)筛选在其表面上展示具有所需特性的目的蛋白变体的遗传载体。

20 根据一优选实施方案，遗传载体是孢子或噬菌体。

在本发明的进一步方面，提供了利用具有转化反应活性的蛋白来进行生物转化的方法，其特征在于所述方法采用遗传载体和目的蛋白之间的本发明复合体。能够催化(生物)化学反应的任何蛋白包括酶和酶活性抗体，可用于此生物转化中。

同时，利用表面展示的酶的生物转化方法要求表面展示的遗传载体在极端条件下的生理化学的稳定性，这是因为所述方法通常在高温和/或有机溶剂下进行。特别地，在当今工业中有价值的化学合成主要

在有机溶剂中进行，以及手性化合物的合成或外消旋混合物的分辨也是在高度苛刻的生理化学条件下进行的。所以，表面展示的酶以及展示酶的生物体被迫在如此极端条件下具有稳定性。就此而论，本发明利用表面展示的孢子或病毒的生物转化方法显示是大为有利的。

5

利用表面展示酶的化学方法已有人提出(Georgiou 等, 1993)。然而，这种方法一般要求细胞表面用交联剂固定化，因为展示酶的宿主在此过程中很不稳定(Freeman 等, 1996)。本发明生物转化方法不含有上述的缺陷。由于表面展示的酶以及展示酶的遗传载体大都稳定，因此本发明方法避免了固定化。本发明生物转化方法也可应用于任意类型的酶，如脂肪酶、蛋白酶、纤维素酶、糖基转移酶、氧化还原酶和醛缩酶。此外，本发明方法在单步或多步反应以及水溶液或非水溶液中是有用的。本发明生物转化方法采用遗传载体作为游离或固定的形式，可采用其他微生物或酶来实施。

10

在本发明的进一步方面，提供针对脊椎动物抗原的抗体的生产方法，其特征在于所述方法包含给脊椎动物施用一种组合物，所述组合物含有免疫学上有效量的在遗传载体和目的蛋白之间的本发明复合体。根据本发明生产抗体的方法，组合物含有免疫学上有效量的复合体，优选另包含佐剂，如不完全和完全弗氏佐剂。在本发明方法中，给药可通过口服和静脉内、腹膜内、皮下和肌内注射进行。第一次给药后，在适当的期间内加强给药是优选的，以生成足够量的抗体。

15

与 DNA 微阵列相似，蛋白质微阵列提供用于分析某些细胞中靶蛋白的表达或表达水平的手段。为了制造蛋白质阵列，必须获得适当的待阵列的蛋白，然后固定于固相表面。在利用蛋白质阵列的分析过程中，清洗步骤必须进行以除去非结合的蛋白，以及各种处理如高温、高盐浓度和 pH 调节得以实施；所以，关键是保证拟蛋白物质在这种有害环境中具有较高的稳定性。此外，制备蛋白质阵列的常规方法需要乏味和重复的工作，如克隆数千到数万种蛋白的基因并且固定所表

20

25

30

达的蛋白。所以，有需要对该工作的简便和快速进行改进。

5 根据本发明蛋白质阵列的制备方法，上述工作可确保以更迅速的方式进行。在本发明方法中，将前述的本发明复合体或遗传载体文库固定于固相基底上。本发明蛋白质阵列的制备方法是使其表面上展示目的蛋白的遗传载体固定于固相基底上。在制备蛋白质阵列的方法中，可使用常规的方法(参见 WO 0061806、WO 0054046、US 5807754、EP 0818467、WO 9742507、US 5114674 和 WO 9635953)。由本发明制造的蛋白质微阵列具有各种各样的可应用领域，包括诊断、基因表达的分析、蛋白质之间相互作用的分析、蛋白和配体之间的相互作用的分析、代谢的研究、筛选新型或改进的酶、组合的生化合成和生物传感器。

15 本发明方法中适当的固相基底包括但不限于玻璃(例如，功能化的玻璃)、Si、Ge、GaAs、GaP、SiO₂、SiN₄、改性的硅氧烷硝化纤维素、聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride)、聚苯乙烯(polystyrene)、聚四氟乙烯、聚碳酸酯、尼龙、纤维及其组合。遗传载体通过接头分子可任选连接到阵列基底。阵列表面未被点击的区域优选加以封闭。施用到各个点(或地址)的遗传载体的量依赖于阵列的种类。连接到固相基底的遗传载体上展示的蛋白和所施加的样品之间的相互作用可根据它们固有的特征(例如免疫原性)加以检测或通过标记有独立可检测的标志(例如荧光、化学发光或放射分子和表位)给予检测。利用已知的电脑化的系统如“读数仪”和“扫描仪”对用本发明的蛋白质阵列所产生的数据进行分析。

25 正如从本申请的所有说明中所了解的，本发明表面展示方法利用适合于所有本发明方法的遗传载体，具有若干优点：(1)避免需要表面展示的基元；(2)确保目的蛋白具有其完整的活性，其作用方式是目的蛋白在表达后形成其固有的结构，并且展示在表面上；(3)增加目的蛋白表面展示的量，这是因为蛋白通过非共价键即以非选择的方式加

30

以展示；和(4)尽管表面展示的蛋白量得到增加，但是对遗传载体的存活力和周围环境的抗性没有或很少有影响。

5 下列特定的实施例旨在说明本发明，不应理解成如所附权利要求所限定的那样限制本发明的范围。

实施例

实施例 1：对孢子表面展示纯的分离的脂肪酶的确证

10 胞质蛋白能否如以前报道的外被蛋白或结构蛋白(形态发生素)那样结合和展示在孢子表面仍有待证实。根据孢子表面的疏水特性(Wienczek, K. M.等, Appl. Environ. Microbiol., 56: 2600-2605 (1990)), 本发明人假设含有疏水区的蛋白如脂肪酶(Brockhoff H., Chem. Phys. Lipids, 10: 215 (1973))可通过疏水键连接并展示在孢子表面上。该假设的证实是在脂肪酶附着到从枯草芽孢杆菌中分离的纯孢子上后测定其酶活性，该酶纯化自荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。

15

首先，将枯草芽孢杆菌 DB104 菌株(Kawamura F.和 Doi R. H., J. Bacteriol., 160: 442-444 (1984))在 GYS 培养基($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l、酵母提取物 2 g/l、 K_2HPO_4 0.5 g/l、葡萄糖 1 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.41 g/l、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.08 g/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.07 g/l)中摇床(37°C, 250 rpm)培养 24 小时，以及利用 renografin 梯度方法仅分离纯化的孢子(C. R. Harwood 等, "Molecular Biological Methods for Bacillus." John Wiley & Sons, New York, 第 416 页 (1990))。在显微镜下验证纯的分离的孢子(1000 x, ALPHAPHOT-2, Nikon)。

20

25

将 2 mg 纯的分离的芽孢杆菌孢子和 94 μg 部分纯化的假单胞菌脂肪酶(Ahn, J. H.等, J. Bacteriol., 181: 1847-1852 (1999))混合到 200 l 的 50 mM Tris 缓冲液(pH 8.0)中，4°C 下无搅动反应 12 小时，然后离心使孢子从缓冲液中分离出来。接着，分离的孢子用 0.5 ml 的 50 mM Tris 缓冲液(pH 8.0)漂洗三次，最后将脂肪酶附着的孢子进行纯化。为

30

了测定附着在孢子上的脂肪酶活性，将脂肪酶附着的孢子悬浮在添加有 10% 橄榄油的 PBS 缓冲液中反应 48 小时，上清液用 0.2 ml 铜酸 (cupric acid) 处理，以及在 715 nm 处测定最终的 OD。上清液的结果显示脂肪酶活性通过橄榄油从脂肪酶附着的孢子中释放出来(图 2)。在图 2 中，线(1)代表脂肪酶附着的孢子，线(2)代表无脂肪酶附着的对照，以及水平线是指脂肪酶活性的反应时间。

这些结果显示由于疏水作用，脂肪酶仅能通过吸附结合到孢子表面。

这些结果举例说明具有疏水性的任何蛋白都可展示在孢子上，本领域的那些技术人员应理解，当蛋白在细胞中表达或分泌到胞外时，具有疏水性的蛋白可展示在孢子表面上。

实施例 2：野生型脂肪酶在孢子表面上的展示

对宿主细胞中表达的野生型脂肪酶的孢子展示进行如下检查：质粒 pBS:lipA (Bell P. J. L.等, Biotechnol. Lett., 21: 1003-1006 (1999)) 由澳大利亚的 Bergquist 博士赠送。利用 lip1 (SEQ ID NO:1) 和 lip2 (SEQ ID NO:2) 为引物及 pBS:lipA 质粒为模板进行 PCR。Taq 聚合酶购自 Boehringer Mannheim, PCR 共 35 次循环，条件为 94°C 变性 30 秒、55 °C 退火 30 秒以及 72°C 延伸 1 分钟。

然后，将各个扩增的 PCR 产物用 BamHI 和 KpnI 限制性酶切，并克隆到切去预先克隆的羧甲基纤维素酶基因后的质粒 pCryIP-CMCase 同样的限制性位点中，并通过自然转化方法(C. R. Harwood 等, "枯草芽孢杆菌的分子生物学方法(Molecular Biological methods for Bacillus)" John Wiley & Sons, New York, 第 416 页 (1990)) 将该克隆的质粒转化到枯草芽孢杆菌 DB104 中。在以实施例 1 相同的方式从转化的芽孢杆菌菌株分离孢子后，测定纯的分离的孢子中的脂肪酶活性(图 3)。在图 3 中，线(1)代表展示有野生型脂肪酶的孢子，线(2)为对照孢

子的结果，以及水平线是指脂肪酶活性的反应时间。这些结果显示，利用本发明的孢子展示系统，具有疏水性的蛋白可展示在孢子表面。

5 该实施例中表达的脂肪酶的 N-端含有分泌信号肽，导致胞外分泌。分泌的酶可附着到在孢子形成后暴露于培养基的孢子表面。此外，尽管存在分泌性信号肽，非分泌酶在孢子形成过程中由于疏水特性 (Bron S., J. Biotechnol., 64: 313 (1998))也可附着到孢子表面上。

10 结果一目了然，具有疏水性的蛋白可展示到孢子表面，不管蛋白是胞内表达还是胞外分泌。

实施例 3：野生型羧甲基纤维素酶在孢子表面上的展示

15 为了在孢子表面上展示羧甲基纤维素酶，将分离自枯草芽孢杆菌 BSE616 菌株的羧甲基纤维素酶基因(Park S. H.等, Agric. Biol. Chem., 55: 441-448 (1991))克隆在苏云金芽孢杆菌菌株的 cryIAa 毒素基因的启动子的控制之下。

20 首先，利用 1AP1 (SEQ ID NO:3)和 1AP2 (SEQ ID NO:4)为引物，通过 Kalman S.等方法(Appl. Environ. Microbiol., 59: 1131-1137 (1993))从购自 BGSC (Bacillus Genetic Stock Center, Ohio, USA)的苏云金芽孢杆菌库斯塔基亚种(*Bacillus thurigiensis kurstaki*) HD1 菌株中分离的 DNA 为模板，以实施例 2 相同的条件，由 PCR 扩增 cryIAa 启动子。将 PCR 产物克隆到购自 Promega 公司(USA)的载体 pGemT-easy 中，随后用 SphI 和 SalI 消化，并克隆到质粒 pUC19 (GenBank X02514)同

25 样的限制性位点中。质粒 pUC19 再次用 HindIII 和 BamHI 限制性酶切割，并把所得的片段插入到 pCPaC3 (KCTC 0831BP)同样的限制性位点中，由此构建 pCryIP-CMCase。pCryIP-CMCase 是一种穿梭载体，其在大肠杆菌和芽孢杆菌菌株中均可复制。

30 将最终构建的质粒 pCryIP-CMCase 通过自然转化方法转化到枯草

芽孢杆菌 DB104 菌株中。其他方法如接合或转导也可用于使重组载体导入到芽孢杆菌菌株中。其后，由 pCryIP-CMCCase 转化的芽孢杆菌菌株在 GYS 培养基中摇床(37°C, 250 rpm)培养 24 小时，并利用 renografin 梯度方法仅分离纯的孢子。

5

对分离的孢子中的羧甲基纤维素酶活性进行如下测定：首先，将 100 μ l 密度为 OD (600nm) =1.4 的孢子悬浮液的 0.1M 磷酸钾缓冲液(pH 6.0)与 200 μ l 的 1% 羧甲基纤维素的 0.1 M 磷酸钾缓冲液(pH 6.0)混合，然后 50°C 反应 40 分钟。反应后，向反应溶液中加入 900 μ l 的 DNS 溶液(20%酒石酸钾钠、1%NaOH、0.05% NaHSO₃、0.2%苯酚、1% 3,5-二硝基水杨酸)，加热 5 分钟，然后在冷水中冷却。离心后上清液的光密度在波长 575nm 处进行测定。与对照 0 mU 比较，展示在孢子表面上的羧甲基纤维素酶的活性为 1.96 mU。

15

在另一确认方法中，当通过 Kim 等(*Appl. Environ, Microbiol.*, 66: 788-793 (2000))的方法利用羧甲基纤维素酶特异抗体(Kim 等, *Appl. Environ, Microbiol.*, 66: 788-793 (2000))来操作流式细胞仪(FACSort, Becton Dickinson, USA) 时，流式细胞仪也显示在转化有 pCryIP-CMCCase 的芽孢杆菌菌株的孢子表面上展示羧甲基纤维素酶(图 4)。在图 4 中，线 1 代表对照孢子，线 2 是指由 pCryIP-CMCCase 转化的芽孢杆菌菌株的孢子，垂直线表示孢子数，以及水平线为荧光强度。如图 4 所示，与对照比较，在展示羧甲基纤维素酶的孢子中峰移向右边，这说明有更多的特异于羧甲基纤维素酶的抗体结合在转化有质粒 pCryIP-CMCCase 的孢子表面上。结果，羧甲基纤维素酶附着在转化有 pCryIP-CMCCase 的孢子表面上。

25

该实施例中表达的羧甲基纤维素酶的 N-端含有分泌信号肽，导致胞外分泌。虽然分泌的酶有可能附着到在孢子形成后暴露于培养基的孢子表面，但是非分泌酶尽管存在分泌性信号肽(Bron S., *J. Biotechnol.*, 64: 313 (1998))，由于信号肽的疏水特性也可附着到孢子

30

上。因此可以理解，任何具有分泌信号的蛋白通过本发明的孢子表面展示系统能在孢子表面上得以展示。

实施例 4：具有修饰的分泌信号的羧甲基纤维素酶的孢子展示

5 N-端分泌信号肽一般包含 N-端 2-3 个阳离子型氨基酸残基，接着是疏水区，阳离子型氨基酸通过与细胞膜的阴离子磷脂结合使得蛋白分泌(Tjalsma H., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 515-547 (2000))。另外，用中性氨基酸取代阳离子型氨基酸已知会导致分泌降低(Chen M.和 Nagarajan V., *J. Bacteriol.*, 176: 5796-5801 (1994))。基于上述事实，本
10 发明人假设蛋白分泌的降低会增加胞内蛋白，并且由于蛋白的 N-端疏水区，导致蛋白在孢子表面上更高的展示。为了试图证明此假设，进行了如下实验。

为了用仅含有疏水区而不含阳离子型氨基酸残基的分泌信号克隆
15 羧甲基纤维素酶，将法国巴斯德研究所(Pasteur Institute in France)的 F. Kunst 博士赠送的枯草芽孢杆菌 168 菌株的 DNA(*Nature*, 390: 249-256 (1997))通过 Kalman 等方法分离。其后，利用引物 cmc-hp (SEQ NO:5)和另一引物(SEQ NO:6)以及与实施例 2 同样条件分离的 DNA 为模板进行 PCR。

20 随后，用 BamHI 和 SacI 消化 PCR 产物，并克隆到已切去 CMCase 基因的 pCrylP-CMCase 中。通过自然转化方法，将 pCrylP-CMCase-hp (图 5)转化到枯草芽孢杆菌 DB104 中。所得转化子命名为“枯草芽孢杆菌 BSK209”，于 2000 年 12 月 2 日保藏在国际保藏机构韩国典型
25 培养物保藏中心(KCTC)，保藏号为 KCTC 0902BP。SEQ ID NO:7 是指在其信号肽中缺乏阳离子型氨基酸的 CMCase 的 DNA 序列，而 SEQ ID NO:8 是指其 CMCase 的氨基酸序列。

30 然后，将转化的芽孢杆菌菌株 BSK209 培养在摇床(37°C, 250 rpm)中，并通过 renografin 梯度方法分离纯的孢子。

与对照 0 mU 比较，以实施例 3 所述的同样方法，分离孢子的羧甲基纤维素酶活性为 4.74 mU。该结果比野生型高出 2.4 倍，并显示比野生型有更多的酶得到展示。此外，以实施例 3 的同样方式，流式细胞仪利用羧甲基纤维素酶，显示有更多的酶展示在转化有 pCryIP-CMCase-hp 的芽孢杆菌菌株的孢子表面上(图 6)。

在图 6 中，线 1 是指对照孢子，而线 2 是用质粒 pCryIP-CMCase-hp 转化的芽孢杆菌菌株的孢子。如图 6 所示，与图 4 所示的野生型羧甲基纤维素酶比较，峰移向右边，这显示有更多的羧甲基纤维素酶结合到孢子表面。结果，其分泌信号仅含疏水区而不含阳离子残基的羧甲基纤维素酶是孢子展示的中意形式。

从这些结果中可以理解，N-端阳离子信号氨基酸的缺失或中和在孢子展示中可利用来得到更多的便利。此外，信号肽的疏水区或其他不含信号肽的目的蛋白的疏水区显然可用于孢子展示。再者，通过选择性或随机诱变编码遗传载体表面蛋白的基因，或通过融合其他增强载体蛋白和目的蛋白之间的非共价键合的寡肽或多肽，疏水性增加，显然也会在孢子表面上增强目的蛋白的展示。

20

实施例 5：利用离子结构域进行孢子表面展示羧甲基纤维素酶

如实施例 1 所示，尽管芽孢杆菌的孢子表面是疏水的，但是也有阴离子型氨基酸残基(Nishihara T.等, Microbiol. Immunol., 25 : 763771 (1981))。本发明人假设目的阳离子蛋白可由离子键展示，而阳离子基元融合到无阳离子特性的目的蛋白将能在孢子表面上展示目的蛋白。为了试图证实这种假设，实施了如下实例。

25

为了使阳离子结构域融合到羧甲基纤维素酶上，利用下列引物将 6 个组氨酸残基融合到酶的成熟形式的 N-端。首先，利用引物 cmc-his (SEQ ID NO:9)和引物 cmc-ter (SEQ ID NO:10)以及枯草芽孢杆菌 168

30

的 DNA 为模板在与实施例 2 相同的条件下进行 PCR。

5 随后, PCR 产物用 BamHI 和 SacI 限制性酶切, 并克隆到实施例 3 所述的 pCryIP-CMCase 而非 CMCase 基因中。把构建的质粒 pCryIP-CMCase-his (图 7)通过自然转化方法转化到枯草芽孢杆菌 DB104 中。SEQ ID NO:11 是指在其 N-端区域融合有 6 个组氨酸残基的 CMCase 的基因序列, 而 SEQ No. 12 是指其氨基酸序列。

10 然后, 将转化有 pCryIP-CMCase-his 的芽孢杆菌菌株培养在摇床 (37°C, 250 rpm)中, 并通过 renografin 梯度方法分离纯的孢子。

15 以实施例 3 所述的相同方法, 与对照 0 mU 比较, 分离孢子的羧甲基纤维素酶活性为 1.90 mU, 以及利用羧甲基纤维素酶特异的抗体以实施例 3 相同的方式操作流式细胞仪, 显示酶展示在用 pCryIP-CMCase-his 转化的芽孢杆菌菌株的孢子表面上(图 8)。

20 在图 8 中, 线 1 是指对照孢子, 线 2 代表用质粒 pCryIP-CMCase-his 转化的芽孢杆菌菌株的孢子。如图 8 所示, 与对照比较, 峰移至右边, 这表明有更多的特异于羧甲基纤维素酶的抗体结合于孢子表面。这些结果显示其 N-端含有其他阳离子结构域的羧甲基纤维素酶结合于转化有 pCryIP-CMCase-his 的芽孢杆菌的孢子表面。

25 所以, 通过选择性或随机诱变基因或通过与任何蛋白中的阳离子结构域融合, 阳离子特性增加显然会增强孢子展示。此外, 融合其他寡肽或多肽, 增强遗传载体表面蛋白和目的蛋白之间的非共价键, 或通过选择性或随机诱变编码遗传载体表面蛋白的基因, 增加阴离子特性, 会提高孢子表面展示阳离子目的蛋白。

30 根据实施例的结果, 显示通过融合其他序列增加表面展示, 可以想象的是把结合配偶体如抗体-抗原或配体-受体融合到目的蛋白和

遗传载体表面蛋白有助于表面展示。

另应理解，通过戊二醛、紫外线或酶处理，催化共价键的形成，由此在遗传载体表面蛋白和目的蛋白之间形成其他共价键，所展示的目的蛋白会更加得以稳定。

实施例 6：在噬菌体表面上展示目的蛋白

根据上述实施例所证实的事实和发现，能够与噬菌体的外被蛋白结合的目的蛋白可展示在噬菌体表面上是一目了然的。这种可能性证实如下：而且，不能结合于噬菌体表面的目的蛋白通过融合能结合于外被蛋白的基元可在噬菌体表面上加以展示，这也是很有可能的。

首先，把疏水结构域融合到噬菌体的外被蛋白和目的蛋白上。此外，还融合向胞质分泌的信号肽。当它们在宿主细胞中表达时，所分泌的目的蛋白通过与位于胞质中的噬菌体的外被蛋白疏水作用，在噬菌体表面上得以展示。

根据此实施例中的发现，通过其他键合而非疏水作用能够展示的修饰对本领域那些技术人员来说是一目了然的。

20

实施例 7：利用在遗传载体上的展示方法定向进化目的蛋白

利用本发明中设计的展示系统，有可能实施目的蛋白的定点进化，其中表面展示由目的蛋白和遗传载体表面之间的相互作用来实现。首先，以羧甲基纤维素酶基因为模板进行易错 PCR (Cadwell, R. C. 和 Joyce, G. F., PCR Methods Appl., 2: 28-33 (1992))。采用特异于羧甲基纤维素酶基因的引物和以实施例 3 中所述的质粒 pCPaC3 为模板，进行 PCR。

PCR 混合物的制备方法是混合 0.3 μ M 各种引物、5 ng DNA 模板、PCR 溶液(10mM Tris (pH 8.3)、50 mM KCl、7 mM MgCl₂、0.01% (w/v)

30

明胶)、0.2 mM dGTP、0.2 mM dATP、1 mM dTTP、1 mM dCTP、0.15 mM MnCl₂、5 U Bioneer (Korea)的 Taq 聚合酶和蒸馏水补至 100 μl。在下列条件下共进行 13 个循环的 PCR: 94℃变性 30 秒、50℃退火 30 秒以及 72℃延伸 1 分钟。

5

随后, 将上述 PCR 扩增的插入片段克隆到可复制载体中, 并通过自然转化方法用克隆的载体转化枯草芽孢杆菌 DB104, 以及通过在摇床中培养转化的芽孢杆菌菌株 24 小时, 将羧甲基纤维素酶在孢子表面上得以展示, 并通过 renografin 梯度方法分离纯的孢子。其后, 如实施例 3 所述, 利用羧甲基纤维素酶活性的变化或采用特异于羧甲基纤维素酶的抗体的流式细胞仪的变化, 对具有改性羧甲基纤维素酶的孢子加以选择。

10

实施例 8: 利用遗传载体表面展示目的蛋白进行生物转化

15

利用有机溶剂中的脂肪酶进行生物转化已有报道(Zaks, A.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3192 (1985); 和 Klibanow, A. M., CHEMTECH, 16: 354 (1986))。没有酶的失活对实施反应是必不可少的。为了达到此目的, 按惯例一直采用脂肪酶的固定(Mustranta, A. Forssell 等, Enz. Microb. Technol., 15 : 133 (1993); 和 Reetz, M. T.等, J. Biotechnol. Biogen., 49: 527 (1996))。根据这些报道, 固定的脂肪酶在有机溶剂中保持高的稳定性, 并与游离的脂肪酶比较, 合成增加。

20

首先, 根据本发明将脂肪酶展示孢子的表面上, 以及如所述进行生物转化(Zaks, A.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3192 (1985); Klibanow, A. M., CHEMTECH, 16; 354 (1986))。

25

本发明的生物转化也可通过在抗有机溶剂的病毒表面上展示目的蛋白来进行。

30

实施例 9: 利用遗传载体上表面展示的目的蛋白的蛋白质阵列

采用自动化阵列装置，将 10^6 - 10^9 个展示抗特异表面抗原的单克隆抗体的孢子附着到玻璃基底上用于在其表面上含有醛官能团的蛋白质阵列(BMS, Germany)。附着以共价键的形式进行，所述共价键是孢子表面上蛋白的氨基和载玻片表面上的醛基之间的席夫碱。虽然在固相表面上附着的展示蛋白有可能是失活的，但它们可具有方向性。

根据本发明制造的蛋白质阵列试剂盒具有各种各样的应用领域，包括诊断、基因表达的分析、蛋白质之间相互作用的分析、蛋白和配体之间的相互作用的分析、代谢的研究、筛选新型或改进的酶、组合的生化合成和生物传感器。

实施例 10：利用遗传载体上表面展示的目的蛋白生产抗体

通过展示能够体内诱导免疫应答的抗原，抗体可被诱导。

首先，通过自然转化方法，将实施例 3 中所用的含有羧甲基纤维素酶的 pCryIP-CMCase 作为抗原转化到枯草芽孢杆菌 DB104 中。然后，通过在补充有 GYS 培养基的摇床中培养转化的芽孢杆菌菌株 24 小时，将羧甲基纤维素酶展示在孢子表面上。随后，通过 renografin 梯度方法分离纯的孢子。将抗原—展示的孢子重悬浮于 PBS 中，并加入相同体积的佐剂。其后，通过旋涡混合上述溶液，并静脉内注射到出生后 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠中。4 周后，进行第二次注射。通过 2-3 次加强诱导抗体。

实施例 11：利用遗传载体上表面展示的目的蛋白分离特异物质

利用遗传载体展示结合区从混合物中分离特异物质是可能的。首先，采用编码结合区的基因作为模板进行易错 PCR (Cadwell, R. C.和 Joyce, G. F., PCR Methods Appl., 2: 28-33 (1992))。利用特异于目的基因的引物以及含有目的基因或染色体的质粒模板，进行 PCR。PCR 混合物的制备方法是混合 $0.3 \mu\text{M}$ 各种引物、5 ng DNA 模板、PCR 溶液 (10mM Tris (pH 8.3)、50 mM KCl、7 mM MgCl_2 、0.01% (w/v) 明胶)、

0.2 mM dGTP、0.2 mM dATP、1 mM dTTP、1 mM dCTP、0.15 mM MnCl₂、5 U Bioneer (Korea)的 Taq 聚合酶和蒸馏水补至 100 μl。在下列条件下共进行 13 个循环的 PCR：94℃变性 30 秒、50℃退火 30 秒以及 72℃延伸 1 分钟。

5

随后，将上述 PCR 扩增的插入片段克隆到可复制的载体中以在宿主细胞中构建文库。用克隆载体文库转化宿主细胞，使结合区在宿主细胞中表达并在遗传载体表面上展示，并对具有目标特性的载体展示修饰的结合区进行筛选。通过与混合物混合，将筛选的遗传载体分

10 离、繁殖、表达并用于分离特异物质。

如上所述，本发明方法用于制备在遗传载体上表面展示的目的蛋白，用来在缺乏展示基元的情况下在遗传载体表面上展示各种各样的蛋白，目的蛋白在形成其固有结构后，由于展示可获取完全的活性，并且目的蛋白表达和展示的量的增加从来不降低对环境的抗性和遗传载体的生存力。

15

参考文献

1. Agterberg, M., Adriaanse, H.和 Tommassen, J. 利用外膜蛋白 PhoE 作为载体用于把外源抗原决定簇转运到大肠杆菌(*Escherichia coli*)K-12 的细胞表面上。Gene 59: 145-150 (1987)

20

2. Agterberg, M., Adriaanse, H., van Bruggen, A., Karperien, M.和 Tommassen, J. 大肠杆菌 K-12 的外膜 PhoE 蛋白作为暴露载体：可能性和限制。Gene 88: 3745 (1990)

3. Arnold, F. H.和 Volkov, A. A. 生物催化的定向进化。Curr. Opin. Chem. Biol. 3: 54-59 (1999).

25

4. Charbit, A., Molla, A., Saurin, W.和 Hofnung, M. 用于在革兰氏阴性细菌的表面上表达外源多肽的载体的多样性。Gene 70: 181-189 (1988)

5. Charbit, A., Sobczak, E., Michel, M.-L., Molla, A., Tiollais, P.

30

- 和 Hofnung, M. 将乙型病毒的 preS2 区的两个表位在活的重组细菌上呈递。J. Immunol 139: 1644-1658 (1987)
6. Chiswell, D. J.和 McCafferty, J. 噬菌体抗体: 新“多克隆抗体”会取代单克隆抗体吗? TIBTECH 10: 80-84 (1992)
- 5 7. Daugherty, P. S., Chen G., Olsen, M. J., Iverson, b. L., Georgiou, G. 利用细菌表面展示的抗体亲和性成熟。Protein Eng. 11: 825-832 (1998)
8. d'Enfert, C., Ryter, A.和 Pugsley, A. P. 在大肠杆菌中克隆和表达肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)基因用于载脂蛋白普鲁兰酶的生产、细胞表面定位和分泌。EMBO J. 6: 3531-3538 (1987)
- 10 9. Driks, A. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)芽孢外被。Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63 (1) : 1-20 (1999)
10. Ferguson, M. A. J.和 Williams, A. F. 通过糖基磷脂酰肌醇结构对蛋白进行细胞表面锚定。Ann. Rev. Biochem. 57: 285-320 (1988)
- 15 11. Fischetti, V. A., Medaglini, D., Oggioni, M.和 Pozzi, G. 外源蛋白在革兰氏阳性共生细菌上的表达用于粘膜疫苗递送。Curr. Opin. Biotechnol. 4: 603-610 (1993)
12. Francisco, J. A., Earhart, C. F.和 Georgiou, G. 把 b-内酰胺酶转运和锚定到大肠杆菌的外部表面上。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2713-2717 (1992)
- 20 13. Freeman, A., Abramov, S.,和 Georgiou G. 展示表面锚定的 β -内酰胺酶的大肠杆菌细胞的位点保护的固定和固定化。Biotechnol. Bioeng. 62 (2) : 155-159 (1999).
14. Fuchs, P., Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T.和 Little, M. 将重组抗体靶击到大肠杆菌的表面: 与肽聚糖相关的载脂蛋白的融合。
- 25 Bio/Technology 9: 1369-1372 (1991)
15. Georgiou, G. 利用流式细胞仪分析大的蛋白突变体的文库。Adv. Protein Chem. 55: 293-315 (2000).
16. Georgiou, G., Poetschke, H. L., Stathopoulos, C.和 Francisco, J. A. 改造革兰氏阴性细菌 1 细胞表面的实际应用。TIBTECH 11: 6-10
- 30

(1993)

17. Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P. S., Nayak, A. R., Iverson, B. L.和 Curtiss III, R. 异源蛋白在微生物表面上的展示: 从组合文库的筛选到活的重组疫苗。Nature Biotechnology 15: 29-34 (1997)

5 18. Georgiou, G., Stephens D., Stathopoulos, C., Poetschke H. L., Mendenhall J.和 Earhart C. F. 在大肠杆菌表面上展示 b-内酰胺酶: 由 Lpp'-OmpA'-b-内酰胺酶融合赋予外膜表型。Protein Eng. 9: 239-247 (1996)

10 19. Hedegaard, L.和 Klemm, P. 大肠杆菌的 1 型伞作为异源抗原序列的载体。Gene 85: 115-124 (1989)

20. Jung, H. C., Lebeault, J. M.和 Pan, J. G. 通过利用丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringe*)的冰核蛋白来表面展示运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)左聚糖蔗糖酶(levansucrase)。Nature Biotechnol. 16: 576-580 (1998a).

15 21. Jung, H. C., Park, J. H., Park, S. H., Lebeault, J. M.和 Pan, J. G. 利用丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringe*)冰核蛋白在大肠杆菌表面上表达羧甲基纤维素酶。Enzyme Microb. Technol. 16: 576-580 (1998b).

22. Kim, E. J.和 Yoo, S. K. 利用冰核蛋白在大肠杆菌上细胞表面展示 CD8 外结构域。Biotechnol. Tech. 12: 197-201 (1998).

20 23. Kim, E. J.和 Yoo, S. K. 利用丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringe*)冰核蛋白在大肠杆菌上细胞表面展示乙型病毒表面抗原。Lett. Appl. Microbiol. 29: 292-297 (1999).

25 24. Kim, Y. S., Jung, H. C.和 Pan, J. G. 细菌细胞表面展示酶文库用于选择性筛选改进的纤维素酶变体。Appl. Environ. Microbiol. 66: 788-793 (2000).

25. Kwak, Y. D., Kim, E. J.和 Yoo, S. K. 通过利用冰核蛋白在大肠杆菌上细胞表面展示人免疫缺陷病毒 I 型 gp120。Clinic. Diag. Lab. Immun. 6: 499-503 (1999).

30 26. Klauser, T., Kramer, J., Otzelberger, K., Pohlner, J.和 Meyer, T. F. 奈瑟球菌 Iga-核心的表征: 用于外膜靶击和胞外蛋白分泌的必要单

- 元。 *J. Mol. Biol.* 234: 579-593 (1993)
27. Klauser, T., Pohlner, J.和 Meyer, T. F. 利用奈瑟球菌 IgA 蛋白酶-结构域胞外转运霍乱毒素 B 亚基: 构型依赖的外膜易位。 *EMBO J.* 9: 1991-1999 (1990)
- 5 28. Kornacker, M. G.和 Pugsley, A. P. 当普通周质的酶-内酰胺酶与细胞表面酶普鲁兰酶融合时可使其特异和有效地通过大肠杆菌外膜进行移位。 *Mol. Microbiol.* 4 (7): 1101-1109 (1990)
29. Lee, J. S., Shin, K. S., Pan, J. G.和 Kim, C. J. *Nature Biotechnol.* 18: 645-648 (2000)
- 10 30. Lewis P. J.和 Errington J. 利用绿色荧光蛋白对在枯草芽孢杆菌的孢子形成过程中细胞特异的基因表达和亚细胞蛋白定位进行检测。 *Microbiology* 142: 733-740 (1996)
31. Little, M., Fuchs, P., Breitling, F.和 Dubel, S. 细菌表面呈递蛋白和肽: 一种噬菌体展示技术的替代。 *TIBTECH* 11: 3-5 (1993)
- 15 32. Martineau, P., Charbit, A., Leclerc, C., Werts, C., O'Callaghan, D.和 Hofnung, M. 引出和监控抗肽抗体的无需肽合成的遗传系统。 *Bio/Technology* 9: 170-172 (1991)
33. Newton, S. M., Jacob, C. O.和 Stocker, B. A. D. 对插入到沙门氏菌鞭毛蛋白中的霍乱毒素表位的免疫应答。 *Science* 244: 70-72 (1989)
- 20 34. Ochs, M., Angerer, A., Enz, S.和 Braun, V. 表面信号在大肠杆菌的柠檬酸铁转运系统中的转录调节: 突变分析或选的 σ 因子 FecI 支持其在 fec 转运基因转录中的必要作用。 *Mol. Gen. Genet.* 250: 455-465 (1996)
35. Palva, A. M.和 Palva, I. A. 利用表面蛋白基因序列的乳杆菌表达系统, W094/00581 (1994).
- 25 36. Richins, R. D., Kaneva, I., Mulchandani, A., 和 Chen, W. 通过表面展示的水解酶生物降解有机磷杀虫剂。 *Nature Biotechnol.* 15: 984-987 (1997).
37. Samuelson, P., Hansson, M., Ahlborg, N., Androoni, C., Gotz, F., Bachi, T., Nguyen, T. N., Binz, H., Ulhen, M.和 Stahl, S. 在肉葡萄球菌
- 30

(*Staphylococcus carnosus*)上细胞表面展示重组蛋白。*J. Bacteriol.* 177 (6): 1470-1476 (1995).

38. Samuelson, P., Wernerus, H., Svedberg, M. 和 Stahl S. 葡萄球菌表面展示金属结合的聚组氨酸。 *Appl. Envir. Microbiol.* 66: 1243-1248 (2000).

39. Schreuder, M. P., Mooren, A. T. A., Toschka, H. Y., Theo Verrips, C.和 Klis, F. M. 酵母细胞表面上的固定化。 *TIBTECH* 14: 115-120 (1996).

40. Schulz, G. E. 细菌孔蛋白：结构和功能。 *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 701-707 (1993)

41. Sleytr, U. B.和 Sara, M. 细菌 I 和 archaeal S-层蛋白：结构—功能关系及其生物技术的应用。 *TIBTECH* 15: 1-9 (1997)

42. Stathopoulos, C., Georgiou G.,和 Earhart C. F. 表达位于外膜中的 Lpp'OmpA (46-159)-PhoA 融合蛋白的大肠杆菌的鉴别。 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 (12): 112-119 (1996).

43. Sousa, C., Cebolla, A.,和 de Lorenzo, V. 增强的展示聚组氨酸的细菌细胞的金属吸附。 *Nature Biotechnol.* 14: 1017-1020 (1996).

44. Sousa, C., Kotrba, P., Ruml, T. Cebolla, A.,和 de Lorenzo, V. 通过大肠杆菌展示酵母的金属吸附和锚定于外膜蛋白 LamB 的哺乳动物金属硫蛋白。 *Bacteriol.* 180: 2280-2284 (1998).

45. Taylor, I. M., Harrison, J. L., Timmis, K. N.和 O'Connor, C. D. TraT 载脂蛋白作为媒介物用于把外源抗原决定簇转运到大肠杆菌 K12 的细胞表面：TraT 蛋白的结构—功能关系。 *Mol. Microbiol.* 4 (8): 1259-1268 (1990)

46. Webb, C. D., Decatur A., Telemann A.和 Losick R. 利用绿色荧光蛋白目测细胞特异基因表达以及在枯草芽孢杆菌的孢子形成过程中亚细胞蛋白的定位。 *J. Bacteriol.* 177: 5906-5911 (1995)

47. Zheng L 和 Losick R., 级联调节孢子外被基因在枯草芽孢杆菌中的表达。 *J. Mol. Biol.* 212: 645-660 (1990)

根据布达佩斯条约用于专利程序的微生物保藏国际识别

国际表格

5

原始保藏收据

根据第 7.1 条颁布

授予人：潘在龟

大韩民国大田广域市 305-340 儒城区道龙洞 380-43

10

I. 微生物的识别	
保藏者给出的识别号： 枯草芽孢杆菌 BSK209	国际保藏单位给出的登记号： KCTC 0902BP
II. 科学描述和/或建议的分类名称	
有关 I 识别的微生物： (x) 科学描述 () 建议的分类名称 (x 表示适用)	
III. 接收	
国际保藏单位已接收 I 识别的微生物，收到日：2000 年 12 月 2 日	
IV. 国际保藏单位	
名称：韩国典型培养物保藏中心 地址：大韩民国大田广域市 305-333 韩国生物科学和生物技术研究所以 (KRIBB)	国际保藏单位授权官签名： DAE Kyung Sook, Director 日期：2000.12.7.

 序列表

- <110> 格诺福库斯株式会社 (GENOFOCUS Co., Ltd.)
- <120> 在遗传载体上表面展示蛋白的方法
(Method for Surface Display of Proteins on Genetic Carriers)
- <130> SCT031940-47
- <150> KR2001-2156
- <151> 2001-01-15
- <160> 12
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 28
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 对脂肪酶基因进行 PCR 的有义引物
- <400> 1
- ggggatccgt tggaaggaga gggagaac 28
- <210> 2
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 对脂肪酶基因进行 PCR 的反义引物
- <400> 2
- gcggtacctt tttgtccggtt ctctga 27
- <210> 3
- <211> 29

- <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 对 cry1Aa 启动子进行 PCR 的有义引物
- <400> 3
 tccccgctggg actcttccta tatttactt 29
- <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 对 cry1Aa 启动子进行 PCR 的反义引物
- <400> 4
 atttgtacag gaaatgcgtc 20
- <210> 5
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 对突变 CMCas 基因进行 PCR 的有义引物
- <400> 5
 ggatccgggg aggagaatca tgatctctat ttttattacg tg 42
- <210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 对突变 CMCas 基因进行 PCR 的反义引物

<400> 6
 gagctccagt atttcatcca caacgc 26

<210> 7
 <211> 1491
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含有突变的信号序列以增强其疏水性的 CMCase 基因

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1488)

<400> 7
 atg atc tct att ttt att acg tgt tta ttg att acg tta ttg aca atg 48
 Met Ile Ser Ile Phe Ile Thr Cys Leu Leu Ile Thr Leu Leu Thr Met
 1 5 10 15
 ggc ggc atg ctg gct tcg ccg gca tca gca gca ggg aca aaa acg cca 96
 Gly Gly Met Leu Ala Ser Pro Ala Ser Ala Ala Gly Thr Lys Thr Pro
 20 25 30
 gta gcc aag aat ggc cag ctt agc ata aaa ggt aca cag ctc gtt aac 144
 Val Ala Lys Asn Gly Gln Leu Ser Ile Lys Gly Thr Gln Leu Val Asn
 35 40 45
 cga gac ggt aaa gcg gta cag ctg aag ggg atc agt tca cac gga ttg 192
 Arg Asp Gly Lys Ala Val Gln Leu Lys Gly Ile Ser Ser His Gly Leu
 50 55 60
 caa tgg tat gga gaa tat gtc aat aaa gac agc tta aaa tgg ctg agg 240
 Gln Trp Tyr Gly Glu Tyr Val Asn Lys Asp Ser Leu Lys Trp Leu Arg
 65 70 75 80
 gac gat tgg ggt atc acc gtt ttc cgt gca gcg atg tat acg gca gat 288
 Asp Asp Trp Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala Met Tyr Thr Ala Asp
 85 90 95

ggc ggt ata att gac aac ccg tcc gtg aaa aat aaa atg aaa gaa gcg Gly Gly Ile Ile Asp Asn Pro Ser Val Lys Asn Lys Met Lys Glu Ala 100 105 110	336
gtt gaa gcg gca aaa gag ctt ggg ata tat gtc atc att gac tgg cat Val Glu Ala Ala Lys Glu Leu Gly Ile Tyr Val Ile Ile Asp Trp His 115 120 125	384
atc tta aat gac ggt aat cca aac caa aat aaa gag aag gca aaa gaa Ile Leu Asn Asp Gly Asn Pro Asn Gln Asn Lys Glu Lys Ala Lys Glu 130 135 140	432
ttc ttc aag gaa atg tca agc ctt tac gga aac acg cca aac gtc att Phe Phe Lys Glu Met Ser Ser Leu Tyr Gly Asn Thr Pro Asn Val Ile 145 150 155 160	480
tat gaa att gca aac gaa cca aac ggt gat gtg aac tgg aag cgt gat Tyr Glu Ile Ala Asn Glu Pro Asn Gly Asp Val Asn Trp Lys Arg Asp 165 170 175	528
att aaa ccg tat gcg gaa gaa gtg att tcc gtt atc cgc aaa aat gat Ile Lys Pro Tyr Ala Glu Glu Val Ile Ser Val Ile Arg Lys Asn Asp 180 185 190	576
cca gac aac att atc att gtc gga acc ggt aca tgg agc cag gat gtg Pro Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Thr Gly Thr Trp Ser Gln Asp Val 195 200 205	624
aat gat gct gcc gat gac cag cta aaa gat gca aac gtt atg gac gca Asn Asp Ala Ala Asp Asp Gln Leu Lys Asp Ala Asn Val Met Asp Ala 210 215 220	672
ctt cat ttt tat gcc ggc aca cac ggc caa ttt tta cgg gat aaa gca Leu His Phe Tyr Ala Gly Thr His Gly Gln Phe Leu Arg Asp Lys Ala 225 230 235 240	720
aac tat gca ctc agc aaa gga gca cct att ttt gtg aca gag tgg gga Asn Tyr Ala Leu Ser Lys Gly Ala Pro Ile Phe Val Thr Glu Trp Gly 245 250 255	768
aca agc gac gcg tct ggc aat ggc ggt gta ttc ctt gat caa tcg agg Thr Ser Asp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Val Phe Leu Asp Gln Ser Arg 260 265 270	816

gaa tgg ctg aaa tat ctc gac agc aag acc atc agc tgg gtg aac tgg	864
Glu Trp Leu Lys Tyr Leu Asp Ser Lys Thr Ile Ser Trp Val Asn Trp	
275 280 285	
aat ctt tct gat aag cag gaa tca tcc tca gct tta aag ccg ggg gca	912
Asn Leu Ser Asp Lys Gln Glu Ser Ser Ser Ala Leu Lys Pro Gly Ala	
290 295 300	
tct aaa aca ggc ggc tgg cgg ttg tca gat tta tct gct tca gga aca	960
Ser Lys Thr Gly Gly Trp Arg Leu Ser Asp Leu Ser Ala Ser Gly Thr	
305 310 315 320	
ttc gtt aga gaa aac att ctc ggc acc aaa gat tcg acg aag gac att	1008
Phe Val Arg Glu Asn Ile Leu Gly Thr Lys Asp Ser Thr Lys Asp Ile	
325 330 335	
cct gaa acg cca gca aaa gat aaa ccc aca cag gaa aac ggt att tct	1056
Pro Glu Thr Pro Ala Lys Asp Lys Pro Thr Gln Glu Asn Gly Ile Ser	
340 345 350	
gta caa tac aga gca ggg gat ggg agt atg aac agc aac caa atc cgt	1104
Val Gln Tyr Arg Ala Gly Asp Gly Ser Met Asn Ser Asn Gln Ile Arg	
355 360 365	
ccg cag ctt caa ata aaa aat aac ggc aat acc acg gtt gat tta aaa	1152
Pro Gln Leu Gln Ile Lys Asn Asn Gly Asn Thr Thr Val Asp Leu Lys	
370 375 380	
gat gtc act gcc cgt tac tgg tat aac gcg aaa aac aaa ggc caa aac	1200
Asp Val Thr Ala Arg Tyr Trp Tyr Asn Ala Lys Asn Lys Gly Gln Asn	
385 390 395 400	
gtt gac tgt gac tac gcg cag ctt gga tgc ggc aat gtg aca tac aag	1248
Val Asp Cys Asp Tyr Ala Gln Leu Gly Cys Gly Asn Val Thr Tyr Lys	
405 410 415	
ttt gtg acg ttg cat aaa cca aag caa ggt gca gat acc tat ctg gaa	1296
Phe Val Thr Leu His Lys Pro Lys Gln Gly Ala Asp Thr Tyr Leu Glu	
420 425 430	
ctt gga ttt aaa aac gga acg ctg gca ccg gga gca agc aca ggg aat	1344
Leu Gly Phe Lys Asn Gly Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ser Thr Gly Asn	
435 440 445	

att cag ctt cgt ctt cac aat gat gac tgg agc aat tat gca caa agc 1392
 Ile Gln Leu Arg Leu His Asn Asp Asp Trp Ser Asn Tyr Ala Gln Ser
 450 455 460

ggc gat tat tcc ttt ttc aaa tca aat acg ttt aaa aca acg aaa aaa 1440
 Gly Asp Tyr Ser Phe Phe Lys Ser Asn Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys
 465 470 475 480

atc aca tta tat gat caa gga aaa ctg att tgg gga aca gaa cca aat 1488
 Ile Thr Leu Tyr Asp Gln Gly Lys Leu Ile Trp Gly Thr Glu Pro Asn
 485 490 495

ta g 1491

<210> 8
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 8
 Met Ile Ser Ile Phe Ile Thr Cys Leu Leu Ile Thr Leu Leu Thr Met
 1 5 10 15
 Gly Gly Met Leu Ala Ser Pro Ala Ser Ala Ala Gly Thr Lys Thr Pro
 20 25 30
 Val Ala Lys Asn Gly Gln Leu Ser Ile Lys Gly Thr Gln Leu Val Asn
 35 40 45
 Arg Asp Gly Lys Ala Val Gln Leu Lys Gly Ile Ser Ser His Gly Leu
 50 55 60
 Gln Trp Tyr Gly Glu Tyr Val Asn Lys Asp Ser Leu Lys Trp Leu Arg
 65 70 75 80
 Asp Asp Trp Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala Met Tyr Thr Ala Asp
 85 90 95
 Gly Gly Ile Ile Asp Asn Pro Ser Val Lys Asn Lys Met Lys Glu Ala
 100 105 110
 Val Glu Ala Ala Lys Glu Leu Gly Ile Tyr Val Ile Ile Asp Trp His
 115 120 125

Ile Leu Asn Asp Gly Asn Pro Asn Gln Asn Lys Glu Lys Ala Lys Glu
 130 135 140

Phe Phe Lys Glu Met Ser Ser Leu Tyr Gly Asn Thr Pro Asn Val Ile
 145 150 155 160

Tyr Glu Ile Ala Asn Glu Pro Asn Gly Asp Val Asn Trp Lys Arg Asp
 165 170 175

Ile Lys Pro Tyr Ala Glu Glu Val Ile Ser Val Ile Arg Lys Asn Asp
 180 185 190

Pro Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Thr Gly Thr Trp Ser Gln Asp Val
 195 200 205

Asn Asp Ala Ala Asp Asp Gln Leu Lys Asp Ala Asn Val Met Asp Ala
 210 215 220

Leu His Phe Tyr Ala Gly Thr His Gly Gln Phe Leu Arg Asp Lys Ala
 225 230 235 240

Asn Tyr Ala Leu Ser Lys Gly Ala Pro Ile Phe Val Thr Glu Trp Gly
 245 250 255

Thr Ser Asp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Val Phe Leu Asp Gln Ser Arg
 260 265 270

Glu Trp Leu Lys Tyr Leu Asp Ser Lys Thr Ile Ser Trp Val Asn Trp
 275 280 285

Asn Leu Ser Asp Lys Gln Glu Ser Ser Ser Ala Leu Lys Pro Gly Ala
 290 295 300

Ser Lys Thr Gly Gly Trp Arg Leu Ser Asp Leu Ser Ala Ser Gly Thr
 305 310 315 320

Phe Val Arg Glu Asn Ile Leu Gly Thr Lys Asp Ser Thr Lys Asp Ile
 325 330 335

Pro Glu Thr Pro Ala Lys Asp Lys Pro Thr Gln Glu Asn Gly Ile Ser
 340 345 350

Val Gln Tyr Arg Ala Gly Asp Gly Ser Met Asn Ser Asn Gln Ile Arg

355	360	365
Pro Gln Leu Gln Ile Lys Asn Asn Gly Asn Thr Thr Val Asp Leu Lys		
370	375	380
Asp Val Thr Ala Arg Tyr Trp Tyr Asn Ala Lys Asn Lys Gly Gln Asn		
385	390	395
Val Asp Cys Asp Tyr Ala Gln Leu Gly Cys Gly Asn Val Thr Tyr Lys		
	405	410
		415
Phe Val Thr Leu His Lys Pro Lys Gln Gly Ala Asp Thr Tyr Leu Glu		
	420	425
		430
Leu Gly Phe Lys Asn Gly Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ser Thr Gly Asn		
	435	440
		445
Ile Gln Leu Arg Leu His Asn Asp Asp Trp Ser Asn Tyr Ala Gln Ser		
450	455	460
Gly Asp Tyr Ser Phe Phe Lys Ser Asn Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys		
465	470	475
		480
Ile Thr Leu Tyr Asp Gln Gly Lys Leu Ile Trp Gly Thr Glu Pro Asn		
	485	490
		495

<210> 9
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 对突变的 CMCase 基因进行 PCR 的有义引物

<400> 9
 ggatccgggg aggagaatca tgcacatca ccaccaccac gcagggacaa aaacgcca

58

<210> 10
 <211> 26

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	对突变的 CMCase 基因进行 PCR 的反义引物	
<400>	10	
	gagctccagt atttcatcca caacgc	26
<210>	11	
<211>	1434	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	含有额外的组氨酸编码序列的 CMCase 基因	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1)..(1431)	
<400>	11	
	atg cac cat cac cac cac cac gca ggg aca aaa acg cca gta gcc aag	48
	Met His His His His His His Ala Gly Thr Lys Thr Pro Val Ala Lys	
	1 5 10 15	
	aat ggc cag ctt agc ata aaa ggt aca cag ctc gtt aac cga gac ggt	96
	Asn Gly Gln Leu Ser Ile Lys Gly Thr Gln Leu Val Asn Arg Asp Gly	
	20 25 30	
	aaa gcg gta cag ctg aag ggg atc agt tca cac gga ttg caa tgg tat	144
	Lys Ala Val Gln Leu Lys Gly Ile Ser Ser His Gly Leu Gln Trp Tyr	
	35 40 45	
	gga gaa tat gtc aat aaa gac agc tta aaa tgg ctg agg gac gat tgg	192
	Gly Glu Tyr Val Asn Lys Asp Ser Leu Lys Trp Leu Arg Asp Asp Trp	
	50 55 60	
	ggt atc acc gtt ttc cgt gca gcg atg tat acg gca gat ggc ggt ata	240
	Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala Met Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Ile	
	65 70 75 80	

att gac aac ccg tcc gtg aaa aat aaa atg aaa gaa gcg gtt gaa gcg Ile Asp Asn Pro Ser Val Lys Asn Lys Met Lys Glu Ala Val Glu Ala	288
85 90 95	
gca aaa gag ctt ggg ata tat gtc atc att gac tgg cat atc tta aat Ala Lys Glu Leu Gly Ile Tyr Val Ile Ile Asp Trp His Ile Leu Asn	336
100 105 110	
gac ggt aat cca aac caa aat aaa gag aag gca aaa gaa ttc ttc aag Asp Gly Asn Pro Asn Gln Asn Lys Glu Lys Ala Lys Glu Phe Phe Lys	384
115 120 125	
gaa atg tca agc ctt tac gga aac acg cca aac gtc att tat gaa att Glu Met Ser Ser Leu Tyr Gly Asn Thr Pro Asn Val Ile Tyr Glu Ile	432
130 135 140	
gca aac gaa cca aac ggt gat gtg aac tgg aag cgt gat att aaa ccg Ala Asn Glu Pro Asn Gly Asp Val Asn Trp Lys Arg Asp Ile Lys Pro	480
145 150 155 160	
tat gcg gaa gaa gtg att tcc gtt atc cgc aaa aat gat cca gac aac Tyr Ala Glu Glu Val Ile Ser Val Ile Arg Lys Asn Asp Pro Asp Asn	528
165 170 175	
att atc att gtc gga acc ggt aca tgg agc cag gat gtg aat gat gct Ile Ile Ile Val Gly Thr Gly Thr Trp Ser Gln Asp Val Asn Asp Ala	576
180 185 190	
gcc gat gac cag cta aaa gat gca aac gtt atg gac gca ctt cat ttt Ala Asp Asp Gln Leu Lys Asp Ala Asn Val Met Asp Ala Leu His Phe	624
195 200 205	
tat gcc ggc aca cac ggc caa ttt tta cgg gat aaa gca aac tat gca Tyr Ala Gly Thr His Gly Gln Phe Leu Arg Asp Lys Ala Asn Tyr Ala	672
210 215 220	
ctc agc aaa gga gca cct att ttt gtg aca gag tgg gga aca agc gac Leu Ser Lys Gly Ala Pro Ile Phe Val Thr Glu Trp Gly Thr Ser Asp	720
225 230 235 240	
gcg tct ggc aat ggc ggt gta ttc ctt gat caa tcg agg gaa tgg ctg Ala Ser Gly Asn Gly Gly Val Phe Leu Asp Gln Ser Arg Glu Trp Leu	768
245 250 255	

aaa tat ctc gac agc aag acc atc agc tgg gtg aac tgg aat ctt tct Lys Tyr Leu Asp Ser Lys Thr Ile Ser Trp Val Asn Trp Asn Leu Ser 260 265 270	816
gat aag cag gaa tca tcc tca gct tta aag ccg ggg gca tct aaa aca Asp Lys Gln Glu Ser Ser Ser Ala Leu Lys Pro Gly Ala Ser Lys Thr 275 280 285	864
ggc ggc tgg cgg ttg tca gat tta tct gct tca gga aca ttc gtt aga Gly Gly Trp Arg Leu Ser Asp Leu Ser Ala Ser Gly Thr Phe Val Arg 290 295 300	912
gaa aac att ctc ggc acc aaa gat tgc acg aag gac att cct gaa acg Glu Asn Ile Leu Gly Thr Lys Asp Ser Thr Lys Asp Ile Pro Glu Thr 305 310 315 320	960
cca gca aaa gat aaa ccc aca cag gaa aac ggt att tct gta caa tac Pro Ala Lys Asp Lys Pro Thr Gln Glu Asn Gly Ile Ser Val Gln Tyr 325 330 335	1008
aga gca ggg gat ggg agt atg aac agc aac caa atc cgt ccg cag ctt Arg Ala Gly Asp Gly Ser Met Asn Ser Asn Gln Ile Arg Pro Gln Leu 340 345 350	1056
caa ata aaa aat aac ggc aat acc acg gtt gat tta aaa gat gtc act Gln Ile Lys Asn Asn Gly Asn Thr Thr Val Asp Leu Lys Asp Val Thr 355 360 365	1104
gcc cgt tac tgg tat aac gcg aaa aac aaa ggc caa aac gtt gac tgt Ala Arg Tyr Trp Tyr Asn Ala Lys Asn Lys Gly Gln Asn Val Asp Cys 370 375 380	1152
gac tac gcg cag ctt gga tgc ggc aat gtg aca tac aag ttt gtg acg Asp Tyr Ala Gln Leu Gly Cys Gly Asn Val Thr Tyr Lys Phe Val Thr 385 390 395 400	1200
ttg cat aaa cca aag caa ggt gca gat acc tat ctg gaa ctt gga ttt Leu His Lys Pro Lys Gln Gly Ala Asp Thr Tyr Leu Glu Leu Gly Phe 405 410 415	1248
aaa aac gga acg ctg gca ccg gga gca agc aca ggg aat att cag ctt Lys Asn Gly Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ser Thr Gly Asn Ile Gln Leu 420 425 430	1296

cgt ctt cac aat gat gac tgg agc aat tat gca caa agc ggc gat tat 1344
 Arg Leu His Asn Asp Asp Trp Ser Asn Tyr Ala Gln Ser Gly Asp Tyr
 435 440 445

tcc ttt ttc aaa tca aat acg ttt aaa aca acg aaa aaa atc aca tta 1392
 Ser Phe Phe Lys Ser Asn Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Ile Thr Leu
 450 455 460

tat gat caa gga aaa ctg att tgg gga aca gaa cca aat tag 1434
 Tyr Asp Gln Gly Lys Leu Ile Trp Gly Thr Glu Pro Asn
 465 470 475

<210> 12

<211> 477

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 12

Met His His His His His His Ala Gly Thr Lys Thr Pro Val Ala Lys
 1 5 10 15

Asn Gly Gln Leu Ser Ile Lys Gly Thr Gln Leu Val Asn Arg Asp Gly
 20 25 30

Lys Ala Val Gln Leu Lys Gly Ile Ser Ser His Gly Leu Gln Trp Tyr
 35 40 45

Gly Glu Tyr Val Asn Lys Asp Ser Leu Lys Trp Leu Arg Asp Asp Trp
 50 55 60

Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala Met Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Ile
 65 70 75 80

Ile Asp Asn Pro Ser Val Lys Asn Lys Met Lys Glu Ala Val Glu Ala
 85 90 95

Ala Lys Glu Leu Gly Ile Tyr Val Ile Ile Asp Trp His Ile Leu Asn
 100 105 110

Asp Gly Asn Pro Asn Gln Asn Lys Glu Lys Ala Lys Glu Phe Phe Lys
 115 120 125

Glu Met Ser Ser Leu Tyr Gly Asn Thr Pro Asn Val Ile Tyr Glu Ile
 130 135 140

Ala Asn Glu Pro Asn Gly Asp Val Asn Trp Lys Arg Asp Ile Lys Pro
 145 150 155 160

Tyr Ala Glu Glu Val Ile Ser Val Ile Arg Lys Asn Asp Pro Asp Asn
 165 170 175

Ile Ile Ile Val Gly Thr Gly Thr Trp Ser Gln Asp Val Asn Asp Ala
 180 185 190

Ala Asp Asp Gln Leu Lys Asp Ala Asn Val Met Asp Ala Leu His Phe
 195 200 205

Tyr Ala Gly Thr His Gly Gln Phe Leu Arg Asp Lys Ala Asn Tyr Ala
 210 215 220

Leu Ser Lys Gly Ala Pro Ile Phe Val Thr Glu Trp Gly Thr Ser Asp
 225 230 235 240

Ala Ser Gly Asn Gly Gly Val Phe Leu Asp Gln Ser Arg Glu Trp Leu
 245 250 255

Lys Tyr Leu Asp Ser Lys Thr Ile Ser Trp Val Asn Trp Asn Leu Ser
 260 265 270

Asp Lys Gln Glu Ser Ser Ser Ala Leu Lys Pro Gly Ala Ser Lys Thr
 275 280 285

Gly Gly Trp Arg Leu Ser Asp Leu Ser Ala Ser Gly Thr Phe Val Arg
 290 295 300

Glu Asn Ile Leu Gly Thr Lys Asp Ser Thr Lys Asp Ile Pro Glu Thr
 305 310 315 320

Pro Ala Lys Asp Lys Pro Thr Gln Glu Asn Gly Ile Ser Val Gln Tyr
 325 330 335

Arg Ala Gly Asp Gly Ser Met Asn Ser Asn Gln Ile Arg Pro Gln Leu
 340 345 350

Gln Ile Lys Asn Asn Gly Asn Thr Thr Val Asp Leu Lys Asp Val Thr
 355 360 365

Ala Arg Tyr Trp Tyr Asn Ala Lys Asn Lys Gly Gln Asn Val Asp Cys
 370 375 380

Asp Tyr Ala Gln Leu Gly Cys Gly Asn Val Thr Tyr Lys Phe Val Thr
 385 390 395 400

Leu His Lys Pro Lys Gln Gly Ala Asp Thr Tyr Leu Glu Leu Gly Phe
 405 410 415

Lys Asn Gly Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ser Thr Gly Asn Ile Gln Leu
 420 425 430

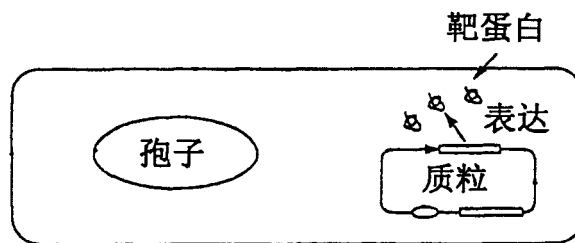
Arg Leu His Asn Asp Asp Trp Ser Asn Tyr Ala Gln Ser Gly Asp Tyr
 435 440 445

Ser Phe Phe Lys Ser Asn Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Ile Thr Leu
 450 455 460

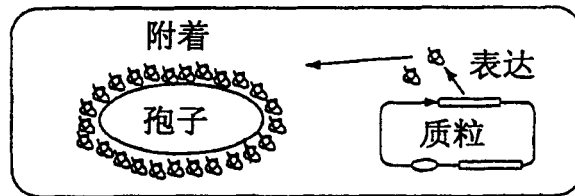
Tyr Asp Gln Gly Lys Leu Ile Trp Gly Thr Glu Pro Asn
 465 470 475

图1

(A) 孢子形成和表达



(B) 靶蛋白的表达和附着



(c) 细胞裂解

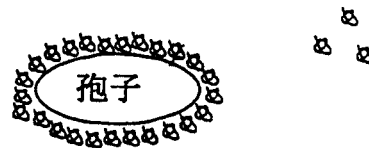
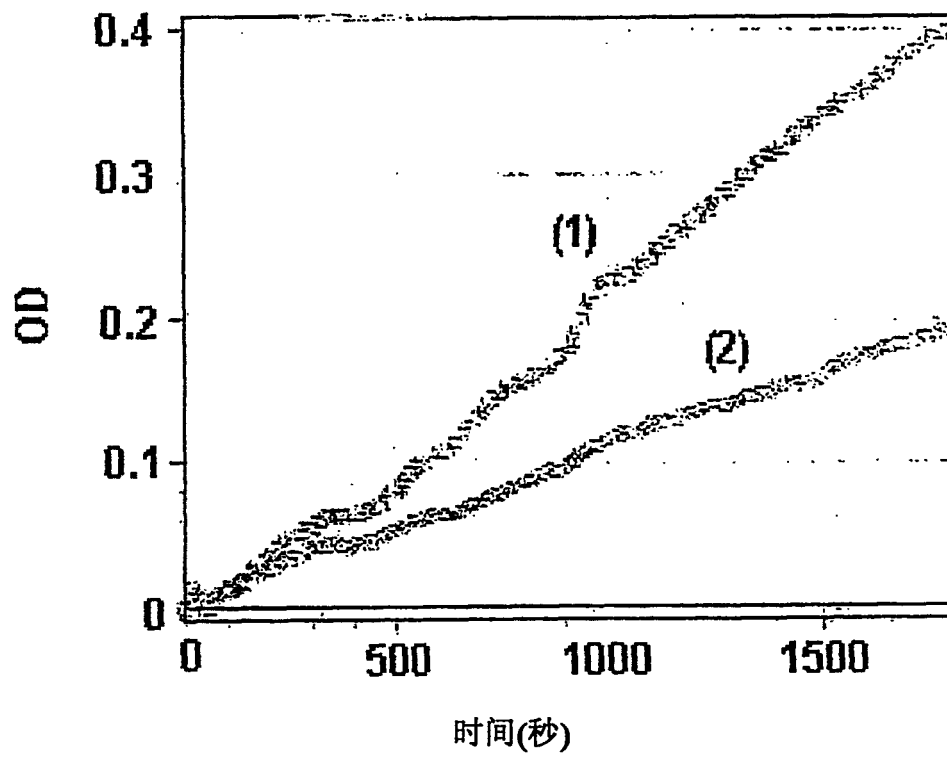
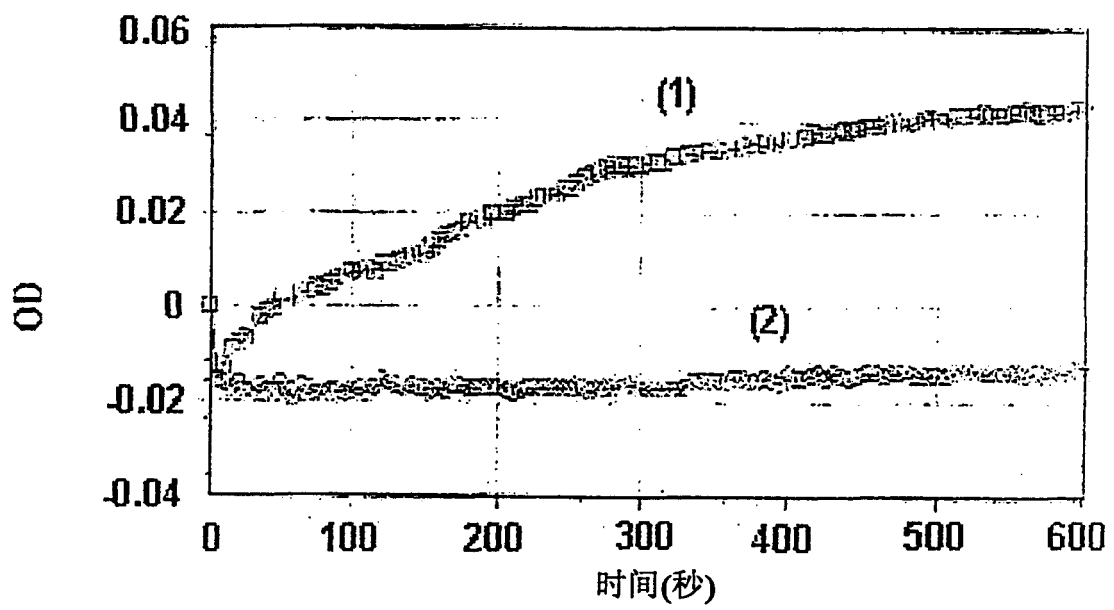


图2



Vmax 点 =181
孔 o A2 □ B2
Vmax 6.489 14.569
R² 0.996 0.995

图3



Vmax 点 =121
 孔 o A1 □ B1
 Vmax 0.373 5.163
 R² 0.252 0.919

图4

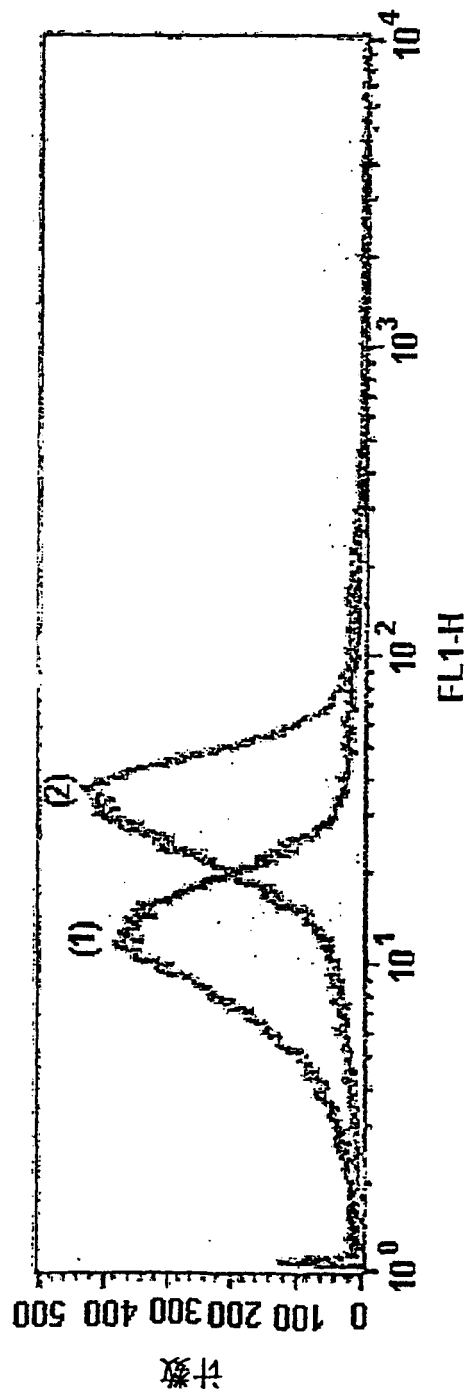


图5

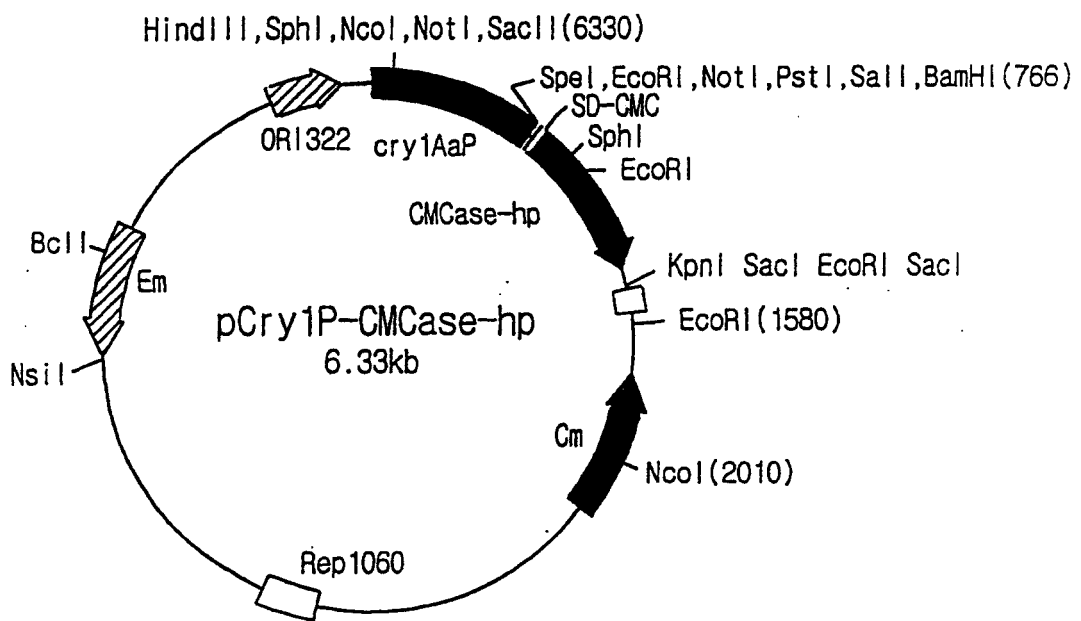


图6

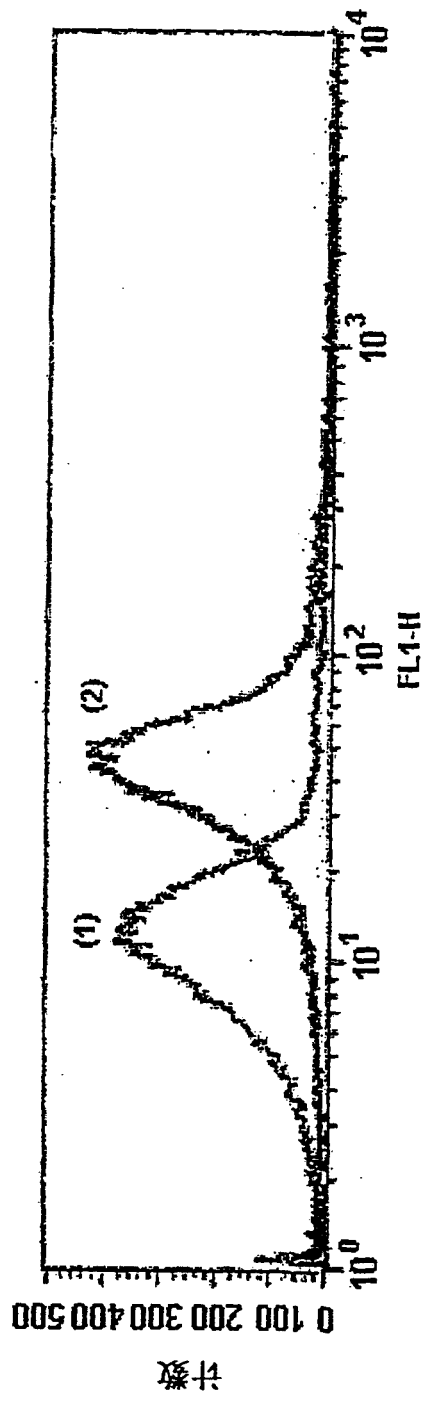


图7

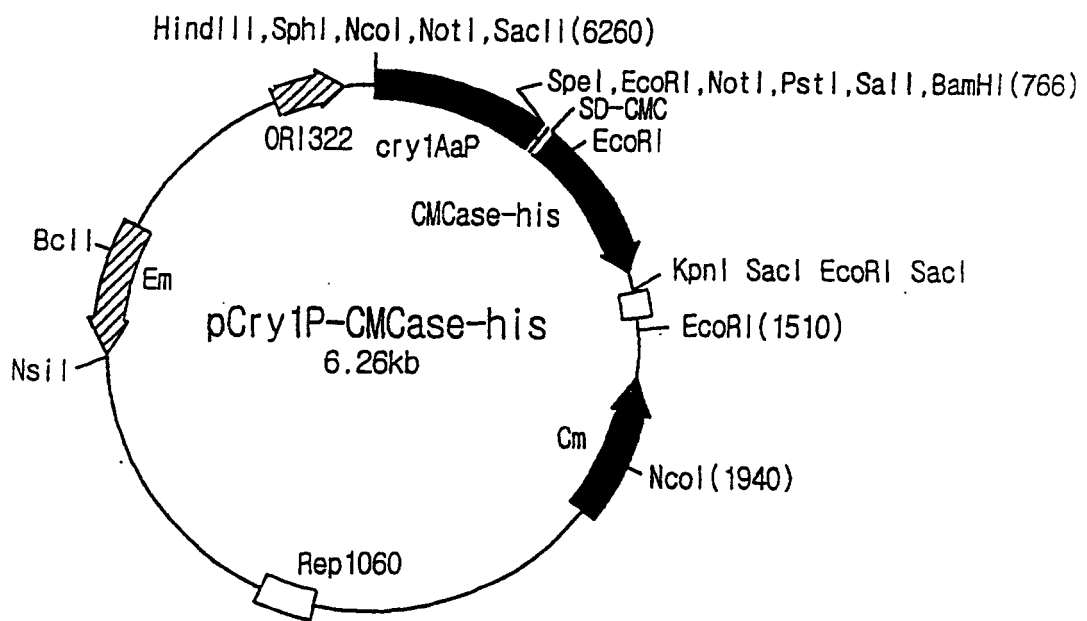
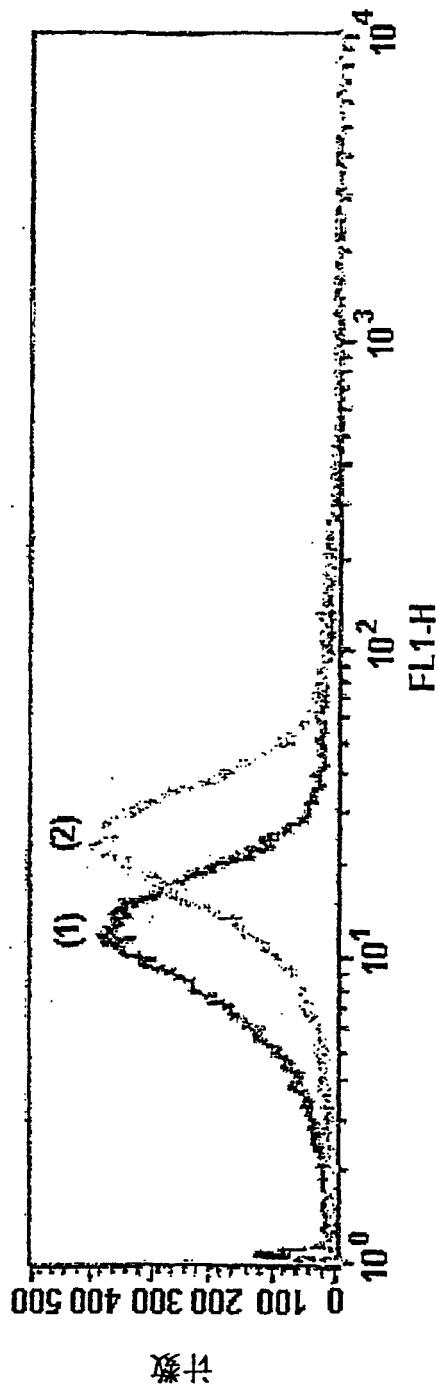


图8



专利名称(译)	在遗传载体上表面展示蛋白的方法		
公开(公告)号	CN1264860C	公开(公告)日	2006-07-19
申请号	CN02803752.9	申请日	2002-01-15
[标]发明人	潘在龟 崔树根 郑兴采		
发明人	潘在龟 崔树根 郑兴采		
IPC分类号	C07K17/02 G01N33/50 C07K1/04 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N9/20 C12N9/24 C12N11/16 C12N15/09 C12N15/10 C12P21/02 C12R1/145 C12R1/92 C40B40/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N37/00		
CPC分类号	C40B40/02 C07K1/047 C12N15/1037		
代理人(译)	丁业平 王维玉		
优先权	1020010002156 2001-01-15 KR		
其他公开文献	CN1486328A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及在遗传载体上表面展示的目的蛋白的制备方法，目的蛋白的改进方法，目的物质的分离、生物转化以及生产抗体的方法。更具体而言，本发明涉及在遗传载体上表面展示的目的蛋白的制备方法，其包含下列步骤：(a)用含有编码目的蛋白基因的载体转化内有选自孢子和病毒的遗传载体的宿主细胞；(b)培养转化的宿主细胞和在宿主细胞中表达目的蛋白；和(c)让表达蛋白和遗传载体表面之间形成非共价键，从而目的蛋白展示在遗传载体表面上。

