

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12M 1/00

[12] 发明专利申请公开说明书

C12P 21/00 C12N 9/00

C12N 11/00 C12N 15/31

[21] 申请号 00135543.0

[43]公开日 2001 年 7 月 18 日

[11]公开号 CN 1303921A

[22]申请日 2000.10.11 [21]申请号 00135543.0

[30]优先权

[32]1999.10.11 [33]EP [31]99120289.6

[32]2000.9.8 [33]EP [31]00119676.5

[71]申请人 弗·哈夫曼－拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72]发明人 A·巴托克 T·穆赫

M·汝凯尔

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 周中琦

权利要求书 2 页 说明书 40 页 附图页数 84 页

[54]发明名称 连续发酵方法

[57]摘要

本发明涉及一种通过蛋白－产生微生物生产蛋白的连续方法,该方法中所述微生物任选地固定化在固体载体上和/或微生物生长和蛋白最佳化生产所需的营养和其它试剂分别以恒定的稀释速率进料到反应器中。而且,本发明还涉及使用发酵设备生产蛋白的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种发酵设备, 其包括:
一个适合于进行涉及活细胞的反应的容器;
至少两个与所述容器连接的、用于补加液体的贮料瓶和将所述液体从所述贮料瓶输送到所述容器的装置;
监测所述贮料瓶的内容物补加到所述容器的独立的装置;
与所述容器相连的收集瓶和将发酵液从所述容器输送到所述收集瓶的装置; 和
通过改变从所述贮料瓶向所述容器分别补加液体的速率来控制 and 维持所述容器内恒定稀释速率的装置。
2. 一种如权利要求 1 所述和图 1 所示的设备, 其包括:
配有来自于贮料瓶 2 并用于补加液体的进口管 2a 的发酵罐 1; 用于将液体从贮料瓶 2 输送到发酵罐 1 的泵 3; 用于检测液体补加到和排出发酵罐的量的秤 4; 气体的进口管 9 和出口管 10; 用于将发酵液通过出口管 5a 排到收集瓶 5 的泵 6; 用于监测和操纵全过程的主控制装置 7; 用于监测和操纵用于温度、PH、气压、发酵罐容量和消泡剂的独立控制系统 17 的控制装置 11; 包括用于供应气体和取样的泵 13 在内的回路 12; 气体进口和出口流量的控制装置 14 和 15; 和, 任选地, 灭菌滤器 16 和恒温装置 8。
3. 一种如权利要求 1 或 2 所述的设备, 其中所述贮料瓶包括用于为所述细胞生长和所需反应产物最佳化形成所需的碳、氮和矿物质源的溶液的独立的贮料瓶。
4. 一种如权利要求 1 至 3 中的任意一项权利要求所述的设备, 其中所述贮料瓶包括至少一个装有调控试剂的独立的贮料瓶。
5. 一种如权利要求 1 至 4 中的任意一项权利要求所述的设备, 其中所述贮料瓶包括一个装有水的独立的贮料瓶。
6. 一种如权利要求 1 至 5 中的任意一项权利要求所述的设备, 其中所述容器装有固定化活细胞的一个固定床和/或一个膨胀床和/或一个移动床。
7. 一种如权利要求 6 所述的设备, 其中所述活细胞固定化在多孔载体上。
8. 一种从活细胞培养物中生产蛋白的连续方法, 其中为所述细胞生长和所

需蛋白最佳化生产所需的营养物质和其它试剂以恒定的稀释速率分别进料到反应器中。

9. 一种如权利要求 8 所述的连续方法，其中所述蛋白选自过氧化氢酶、乳糖酶、酚氧化酶、氧化酶、氧化还原酶、葡聚糖酶、纤维素酶、木聚糖酶和其它多糖酶、过氧化物酶、脂酶、水解酶、酯酶、角质酶、蛋白酶和其它蛋白水解酶、氨肽酶、羧肽酶、肌醇六磷酸酶、裂解酶、果胶酶和其它的果胶分解酶、淀粉酶、葡糖苷酶、甘露糖苷酶、异构酶、转化酶、转移酶、核糖核酸酶、壳多糖酶和脱氧核糖核酸酶或选自一组治疗蛋白如抗体、疫苗、抗原、或抗菌的和/或利于健康的蛋白如 lactoternin、乳过氧化物酶或溶菌酶。

10. 一种如权利要求 8 所述的连续方法，其中所述蛋白选自一组具有治疗蛋白活性的蛋白如抗体、疫苗、抗原。

11. 一种如权利要求 8 至 10 中的任意一项权利要求所述的方法，其中所述细胞被固定化。

12. 一种如权利要求 8 至 11 中的任意一项权利要求所述的方法，其中所述细胞是肌醇六磷酸酶产生微生物。

13. 一种如权利要求 12 所述的方法，其中所述肌醇六磷酸酶产生微生物是多形汉逊氏酵母。

14. 一种如权利要求 13 所述的方法，其中所述肌醇六磷酸酶产生微生物是用编码真菌或共有序列来源的肌醇六磷酸酶的 DNA 转化的多形汉逊氏酵母。

15. 一种如权利要求 8 至 14 中的任意一项权利要求所述的方法，其中所述细胞或微生物载于固定床和/或膨胀床和/或移动床中的多孔载体上。

16. 一种如权利要求 8 至 15 中的任意一项权利要求所述的方法，其中所述碳源是甘油或一种糖如单糖、双糖或多糖。

17. 一种如权利要求 16 所述的方法，其中所述的碳源是葡萄糖。

18. 一种如权利要求 8 至 15 中的任意一项权利要求所述的方法，其中所述碳源是甲醇。

19. 一种如权利要求 8 至 15 中的任意一项权利要求所述的方法，其中所述碳源是葡萄糖和甲醇。

20. 一种如权利要求 19 所述的方法，其中甲醇和葡萄糖的总量分别为大约 10 至大约 500g/l。

连续发酵方法

本发明涉及一种生产蛋白的连续方法。

根据本发明，发现连续发酵过程中使用的培养基的分解能够用来研究对微生物的生长和代谢物-生产的影响并由此确定发酵过程的最适条件。连续输送的发酵培养基通常被分成如其所含成分一样多的部分。这些成分的例子是碳源、氮源、磷源和硫源，还有维生素和复杂的底物如玉米浆、酵母提取物和其它天然产物。而且，每一种所需的无机物、微量或痕量元素能以水溶性盐（如氯化物、硫酸盐或硝酸盐）的溶液形式分别提供。如果在分别进料的溶液或发酵培养基中所需用量的成分是（水）-溶解的并不发生相互干扰作用（例如，沉淀、反应），以这种方式可获得具有任何所需组成的发酵培养基。

一方面，本发明涉及一种通过蛋白-产生微生物生产蛋白的连续方法。

更特别地是，本发明涉及通过蛋白-生产微生物生产蛋白的连续方法，在该连续方法中微生物任选地被固定化在固体载体上和/或微生物生长和蛋白最佳化生产所需的营养成分和其它试剂以恒定的稀释速率被分别进料到反应器中。

优选的一个方面，本发明涉及使用一种发酵设备来生产蛋白的方法，该发酵设备包括：一个适合于进行涉及活细胞或灭活细胞的反应的容器；至少两个与所述容器相连的用于补加液体的贮料瓶和将所述液体从所述贮料瓶输送到所述容器的装置；监测所述贮料瓶中的内容物补加到所述容器中的独立的装置；与所述容器相连的收集瓶和将发酵液从所述容器输送到所述收集瓶的装置；和通过改变从所述贮料瓶向所述容器分别补加液体的速率来控制 and 维持所述容器内的恒定稀释速率的装置。

任何传统的发酵容器都可被用来实现本发明的目的。该容器可由如不锈钢、玻璃或陶瓷这样的材料制成并且可具有例如，从 100ml 至 2500m³ 的体积，尽管这些数值并不是本发明的关键。为了连续操作，容器的内部任选地配备有例如，吸收固定化细胞的子层托或筛板。并且，发酵容器连接着一系列装有营养液和用于保持和控制发酵液中的理想 PH 值以及其它参数（如泡沫形成、氧化还原电位等）的溶液的贮料瓶。根据发酵的特殊需要，可以设置分离的贮料瓶用于分别补加作

为活细胞所需的碳源或氮源或矿物质源的底物。

根据本发明，发现发酵容器中的恒定稀释速率对操作是有利的。如本文所用，术语“稀释速率”表示每小时 $[h^{-1}]$ 、每单位体积的发酵容器补加液体的总体积。

因此，在发酵过程中，当各种营养成分或其它添加剂的补加发生变化时，在发酵容器中以恒定的稀释速率进行发酵过程是本发明一个特有的特征。为了顺利完成这一任务，任选地提供装有惰性成分，例如水的贮料瓶，以便补足液体的补加量而保持液体的总补加量恒定。

优选地用来实施本发明方法的设备进一步包括从贮料瓶到发酵容器输送各种发酵培养基组分的装置，和监测补加到发酵容器的液体量的装置。每一套测量仪器（例如，通过重量分析的、测定风速的、磁力的、超声波的、文丘里的、J、交叉-关系、热量的、Coriolis 或辐射测量的体积或质量流速）和传输装置（例如，泵或压力差）都可用于此目的。另外，每一传输装置可被用作定量装置（例如，齿轮、蠕动、活塞、膜或偏心泵）。对于小规模的操作，可通过称量装有预定浓度的营养成分或添加剂溶液的贮料瓶的重量来适当地监测补料。

用于控制和维持发酵容器中恒定稀释速率的合适装置是一个包括监测贮料瓶流速的测量仪器和控制装置的系统，例如，计算实际的质量流速，与期望值比较并由此调节泵的设置的计算机-软件控制装置。一个合适的系统是，例如，通过系列-界面箱(Rocket Port, Control Europe Ltd, 大不列颠, 以 Technosoftware AG Rothackerstrasse 13, 5702 Niederlenz 为代表, 瑞士)被连到各种操作装置上(秤、泵)的程序自动化系统, National Instruments, Bridge View, 美国, for Windows NT4.0(以 National Instruments, Sonnenbergstrasses 53, 5408 Ennetbaden 为代表, 瑞士)。

本发明方法使用的设备如图 1 所示。

发酵容器 1 (发酵罐) 配备有来自贮料瓶 2 (适当地配有搅拌器) 的进口管 2a, 贮料瓶 2 用于补加盐溶液 (盐)、营养溶液 (营养成分)、补充例如不同碳源的特殊底物 (底物 1 和底物 2)、调控 PH 的试剂 (碱)、控制恒定稀释速率的水, 以及消泡剂。泵 3 将液体从贮料瓶 2 输送到发酵罐 1。秤 4 监控补加到发酵罐的和流出发酵罐的液体量。并且, 发酵罐有补加氧气的进口管 9 和由装置 14 和 15 调控的排放气体的出口管 10。泵 6 通过出口管 5a 将发酵液排到收集瓶 5。

一个主控制装置 7 监测和操纵全过程。控制装置 11 监测和操纵用于温度、PH、气压、发酵罐容量和补加消泡剂的独立的控制系统 17。包括泵 13 的回路 12 被用于从发酵液中取样并用于提供可控气流来移动发酵液。进口和出口的气流通过流动控制装置 14 和 15 来调控。可任选地提供灭菌滤器 16。任选地，发酵容器 1 配有恒温装置 8。

本发明的方法中，任何蛋白-产生微生物既可以是天然的，例如真菌或细菌，也可以是用蛋白编码 DNA 转化的微生物，其中这种转化的微生物可以是细菌或真菌或酵母菌，优选地是隔孢伏革菌属、曲霉属、汉逊氏酵母菌属或毕赤氏酵母属，特别是黑色曲霉、*Aspergillus awanari*、酱油曲霉、米曲霉或多形汉逊氏酵母或巴斯德毕赤氏酵母。

本文中，本技术领域的技术人员选择已知用于目的蛋白生产的那种蛋白-产生微生物。

在本发明的优选技术方案中，蛋白选自具有酶活性如过氧化氢酶、乳糖酶、酚氧化酶、氧化酶、氧化还原酶、葡聚糖酶、纤维素酶、木聚糖酶和其它多糖酶、过氧化物酶、脂酶、水解酶、酯酶、角质酶、蛋白酶和其它蛋白水解酶、氨肽酶、羧肽酶、肌醇六磷酸酶、裂解酶、果胶酶和其它的果胶分解酶、淀粉酶、葡糖苷酶、甘露糖苷酶、异构酶、转化酶、转移酶、核糖核酸酶、壳多糖酶和脱氧核糖核酸酶的一组蛋白。并且，在本发明的优选技术方案中，蛋白选自一组治疗蛋白如抗体、疫苗、抗原、或抗菌剂和/或利于健康的蛋白如 lactoternin、乳过氧化物酶或溶菌酶。

本技术领域的技术人员应该理解术语“活性”不但包括天然存在的酶的天然活性或治疗功能，还包括那些通过氨基酸的取代、缺失、添加、或其它增强或修饰所需活性或热稳定性、PH 耐受性和/或其它性能的修饰而改变的活性或功能。

在本发明最优选的技术方案中，所选蛋白是具有肌醇六磷酸酶活性的蛋白。

具有肌醇六磷酸酶活性的蛋白的例子在 EP684313、EP897010、EP897985 或本发明的实施例 6 至 16 和图 2 至 22 中被描述。

图 2: 共有肌醇六磷酸酶序列 (consensus phytase sequence) 的设计。字母代表以单字母密码表示的氨基酸残基。下列序列被用于排列: 土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 9A-1 的 phyA (Mitchell 等, 1997; 源于氨基酸(aa)27),

土曲霉 cbs116.46 的 phyA (van Loon 等, 1998; 源于 aa 27), 黑色曲霉泡盛变种的 phyA (Piddington 等, 1993; 源于 aa 27), 黑色曲霉 T213 的 phyA (Mitchell 等, 1997; 源于 aa 27), 黑色曲霉菌株 NRRL3135 的 phyA (van Hartingsveldt 等, 1993; 源于 aa 27), 烟曲霉 ATCC13073 的 phyA (Pasamontes 等, 1997; 源于 aa 25), 烟曲霉 ATCC32722 的 phyA (EP897985; 图 1; 源于 aa27), 烟曲霉 ATCC58128 的 phyA (EP897985; 图 1; 源于 aa 27), 烟曲霉 ATCC26906 的 phyA (EP897985; 图 1; 源于 aa 27), 烟曲霉 ATCC32239 的 phyA (EP897985; 图 1; 源于 aa 30), *Emericella nidulans* 的 phyA (Pasamontes 等, 1997a; 源于 aa 25), 嗜热踝节菌 (*Talaromyces thermophilus*) 的 phyA (Pasamontes 等, 1997a; 源于 aa 24), 嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) 的 phyA (Mitchell 等, 1997; 源于 aa 19)。采用程序 PILEUP 进行计算排列。通过手工精确定位缺口的位置。在给定位点的排列中用大写字母表示的氨基酸残基属于建立共有残基的氨基酸结合体。在计算的共有序列的下面, 以粗体表示最终构建的共有肌醇六磷酸酶 (Fcp) 的氨基酸序列。根据实施例 6 所述的原理, 通过手工填补计算的共有序列中的缺口。

图 3: 共有肌醇六磷酸酶-1 (consensus phytase-1) 基因 (fcp) 和用于基因构建的引物的 DNA 序列。采用程序 BACKTRANSLATE (Devereux 等., 1984) 和高度表达的酵母基因的密码子频率表 (GCG 程序包, 9.0) 将计算的氨基酸序列 (图 2) 转化为 DNA 序列。源自土曲霉 cbs. 116.46 的肌醇六磷酸酶的信号肽被融合到 N-末端。粗体碱基代表用于合成基因的寡核苷酸序列。每个寡核苷酸的名称在序列的上面或下面交替标注。划下标线的碱基代表基因的起始和终止密码子。斜体写的碱基表示两个引入的 EcoRI 位点。

图 4: 五种担子菌纲的肌醇六磷酸酶的排列和共有序列。字母代表单字母密码的氨基酸残基。开始于括号中提到的氨基酸残基并且源自于卷边桩菇 (*Paxillus involutus*)、phyA1 (aa21) 和 phyA2 (aa21, W098/28409)、绒毛栓菌 (aa24, W098/28409)、平田头菇 (aa19, W098/28409) 和 *Peniophora lycii* (aa21, W098/28409) 的肌醇六磷酸酶的氨基酸序列用于排列和计算称作 “Basidio” (实施例 7) 的相应共有序列。排列是通过程序 PILEUP 进行的。通过手工精确确定缺口的位置。通过程序 PRETTY 计算共有序列。将 0.5 的权重分配给两个 P. *Involutus* 的肌醇六磷酸酶, 所有其它基因以 1.0 的权重用于共有序列的计算。在不能由程序确定共有序列残基的位点, Basidio 序列含有一个

破折号。在给定位点的排列中用大写字母表示的氨基酸残基属于建立共有序列残基的氨基酸结合体。

图 5: 共有肌醇六磷酸酶-10 的氨基酸序列的设计。将 *Thermomyces lanuginosus* (Berka 等, 1998) 的肌醇六磷酸酶序列和五个担子菌纲的肌醇六磷酸酶的共有序列加入图 2 的排列之中, 通过程序 PRETTY 计算出改进的共有序列。另外, 黑色曲霉 T213 的氨基酸序列被删除; 因此, 0.5 的权重用于保留下来的黑色曲霉肌醇六磷酸酶序列。进一步的信息见实施例 8。

图 6: 共有肌醇六磷酸酶-10 的 DNA 和氨基酸序列。氨基酸序列采用单字母密码写在相应 DNA 序列的上面。用于组成基因的寡核苷酸的序列以粗体字母表示。与共有肌醇六磷酸酶-1 的氨基酸相比改变了的寡核苷酸和氨基酸的标记被划上下划线。fcp10 基因由下列寡核苷酸组成: CP-1, CP-2, CP-3. 10, CP-4. 10, CP-5. 10, CP-6, CP-7. 10, CP8. 10, CP-9. 10, CP-10. 10, CP-11. 10, CP-12. 10, CP-13. 10, CP-14. 10, CP-15. 10, CP-16. 10, CP-17. 10, CP-18. 10, CP-19. 10, CP-20. 10, CP-21. 10, CP-22. 10。新合成的寡核苷酸另外以数字 10 标记。肌醇六磷酸酶相对于共有肌醇六磷酸酶-1 具有下列 32 个置换: Y54F, E58A, D69K, D70G, A94K, N134Q, I158V, S187A, Q188N, D197N, S204A, T214L, D220E, L234V, A238P, D246H, T251N, Y259N, E267D, E277Q, A283D, R291I, A320V, R329H, S364T, I366V, A379K, S396A, G404A, Q415E, A437G, A463E。当作为共有肌醇六磷酸酶-1 中的单突变被检测时, 以粗体字母标注的突变显示出对共有肌醇六磷酸酶-1 的稳定作用。

图 7: 用于设计共有肌醇六磷酸酶-11 的排列。与共有肌醇六磷酸酶-10 的设计相反, 全部担子菌纲的肌醇六磷酸酶作为独立的序列用于共有肌醇六磷酸酶-11 的氨基酸序列的设计, 其中 0.2 的分配权重用于每一担子菌纲序列。另外, 黑色曲霉 T213 的肌醇六磷酸酶的氨基酸序列被再次用于排列。

图 8: 共有肌醇六磷酸酶-1-热[8]-Q50T-K91A(consensus phytase-1-thermo[8]-Q50T-K91A)的 DNA 和氨基酸序列。氨基酸序列以单字母密码的形式写在相应的 DNA 序列的上面。用下划线标注置换的氨基酸残基。所述基因的终止密码子用星号(*)标注。

图 9: 共有肌醇六磷酸酶-10-热[3]-Q50T-K91A(consensus phytase-1-thermo[3]-Q50T-K91A)的 DNA 和氨基酸序列。氨基酸序列以单字母密码的形式写

在相应的 DNA 序列上面。用下划线标注置换的氨基酸残基。所述基因的终止密码子用星号 (*) 标注。

图 10: 烟曲霉 ATCC13073 的 肌醇六磷酸酶 α -突变体的 DNA 和氨基酸序列。氨基酸序列以单字母密码的形式写在相应的 DNA 序列的上面。用下划线标注置换的氨基酸残基。所述基因的终止密码子用星号 (*) 标注。

图 11: 共有肌醇六磷酸酶-7 的 DNA 和氨基酸序列。氨基酸序列以单字母密码的形式写在相应的 DNA 序列的上面。用于组成基因的寡核苷酸序列以粗体字母表示。被置换的寡核苷酸和氨基酸用下划线标注并且其相应的三联体密码用小写字母标注。fcp7 基因由下列寡核苷酸组成: CP-1, CP-2, CP-3, CP-4. 7, CP-5. 7, CP-6, CP-7, CP-8. 7, CP-9, CP-10. 7, CP-11. 7, CP-12. 7, CP-13. 7, CP-14. 7, CP-15. 7, CP-16, CP-17. 7, CP-18. 7, CP-19. 7, CP-20, CP-21, CP-22。新合成的寡核苷酸另外以数字 7 标注。该肌醇六磷酸酶相对于原始共有肌醇六磷酸酶-1 具有以下 24 个置换: S89D, S92G, A94K, D164S, P201S, G203A, G205S, H212P, G224A, D226T, E255T, D256E, V258T, P265S, Q292H, G300K, Y305H, A314T, S364G, M365I, A397S, S398A, G404A 和 A405S。

图 12: 共有肌醇六磷酸酶-1 和共有肌醇六磷酸酶-10 的差示扫描量热法 (DSC)。蛋白样品被浓缩到约 50-60mg/ml 并用 10mM 的醋酸钠 (PH5.0) 进行充分的透析。以 10℃/分钟的恒定加热速率加热到 95℃。共有肌醇六磷酸酶-10 的 DSC (上图) 产生 85.4℃的解链温度, 比共有肌醇六磷酸酶-1 的解链温度高 7.3℃ (78.1℃, 下图)。

图 13: 共有肌醇六磷酸酶-10-热[3]-Q50T 和共有肌醇六磷酸酶-10-热[3]-Q50T-K91A 的差示扫描量热法 (DSC)。蛋白样品被浓缩到约 50-60mg/ml 并用 10mM 的醋酸钠 (PH5.0) 进行充分的透析。以 10℃/分钟的恒定加热速率加热到 95℃。共有肌醇六磷酸酶-10-热-[3]-Q50T 的 DSC (上图) 产生 88.6℃的解链温度, 而共有肌醇六磷酸酶-10-热-[3]-Q50T-K91A 的解链温度被发现是 89.3℃。

图 14: 共有肌醇六磷酸酶-1, 共有肌醇六磷酸酶-10 与共有肌醇六磷酸酶-10-热-[3]-Q50T 之间的温度最适值的比较。为了确定温度最适值, 在 37 至 86℃之间的一系列温度下进行肌醇六磷酸酶的标准分析。稀释的转化的酿酒酵母菌株的上清液被用于测定。上清液中的其它成分表明对温度最适值的测定没有影响: Δ , 共有肌醇六磷酸酶-1; $\diamond$, 共有肌醇六磷酸酶-10; $\blacksquare$, 共有肌醇六磷酸酶

-10-热-[3]-Q50T.

图 15: 共有肌醇六磷酸酶-10 及其变体热-[3]-Q50T 和热-[3]-Q50T-K91A 的 PH-依赖活性曲线图和底物特异性。图 a) 表示共有肌醇六磷酸酶-10 (□), 共有肌醇六磷酸酶-10-热-[3]-Q50T (△), 和共有肌醇六磷酸酶-10-热-[3]-Q50T-K91A (△) 的 PH-依赖活性曲线图, 通过在不同 PH 值的适当缓冲液中 (参见实施例 15) 采用标准分析方法测定肌醇六磷酸酶活性。图 b) 表示通过采用标准分析方法中由指定的化合物取代肌醇六磷酸后测得的相应底物特异性; 空心条, 共有肌醇六磷酸酶-10 (白色条, 共有肌醇六磷酸酶-10-热-Q50T; 黑色条, 共有肌醇六磷酸酶-10-热-Q50T-K91A)。数字对应于下列化合物: 1, 肌醇六磷酸; 2, 磷酸对硝基苯酯; 3, 磷酸苯酯; 4, 1, 6-二磷酸果糖; 5, 6-磷酸果糖; 6, 6-磷酸葡萄糖; 7, 5-磷酸核糖; 8, DL-3-磷酸甘油; 9, 2-磷酸甘油; 10, 3-磷酸甘油酸; 11, 磷酸烯醇丙酮酸; 12, AMP; 13, ADP; 14, ATP。

图 16: 共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]-Q50T 和共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]-Q50T-K91A 的 PH-依赖活性曲线图和底物特异性。图 a) 表示 Q50T (■) 和 Q50T-K91A-变体 (△) 的 PH-依赖活性曲线图。通过在不同 PH 值的适当缓冲液 (见实施例 15) 中采用标准分析方法测定肌醇六磷酸酶活性。图 b) 表示通过标准分析方法中指定的化合物取代肌醇六磷酸测得的相应底物特异性; (空心条, 共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]-Q50T; 实心条, 共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]-Q50T-K91A)。底物列在图 15 的图说明中。

图 17: 共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]-Q50T 和共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]-Q50T-K91A 的差示扫描量热法 (DSC)。蛋白样品被浓缩到约 50-60mg/ml 并用 10mM 的醋酸钠 (PH5.0) 进行充分的透析。以 10℃/分钟的恒定加热速率加热到 95℃。共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]-Q50T 的 DSC (上图) 显示 84.7℃的解链温度, 而共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]-Q50T-K91A 的解链温度被发现是 85.7℃。

图 18: 共有肌醇六磷酸酶-1, 共有肌醇六磷酸酶-1-热-[3]与共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]之间的温度最适值的比较。为了确定温度最适值, 在 37 至 86℃之间的一系列温度下进行肌醇六磷酸酶的标准分析。从转化的酿酒酵母菌株的上清液中提纯的蛋白被用于测定。○, 共有肌醇六磷酸酶-1; □共有肌醇六磷酸酶-1-热-[3]; △, 共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]。

图 19: 共有肌醇六磷酸酶-1, 共有肌醇六磷酸酶-7 和源自于黑色曲霉

NRRL3135. 的肌醇六磷酸酶之间的 PH-依赖活性曲线图和底物特异性的比较。图 a) 表示共有肌醇六磷酸酶-1 (■), 源自于黑色曲霉 NRRL3135. 的肌醇六磷酸酶 (○) 和共有肌醇六磷酸酶-7 (△) 的 PH-依赖活性曲线图。通过在不同 PH 值的适当缓冲液 (见实施例 15) 中采用标准分析方法测定肌醇六磷酸酶活性。图 b) 表示通过标准分析方法中指定的化合物取代肌醇六磷酸后测得的相应底物的特异性; (黑色条, 黑色曲霉 NRRL3135. 的肌醇六磷酸酶; 灰色条, 共有肌醇六磷酸酶-1; 阴影条, 共有肌醇六磷酸酶-7)。底物列在图 15 的图说明中。

图 20: 源自于烟曲霉 ATCC 13073 的肌醇六磷酸酶及其稳定的 α -突变体的差示扫描量热法 (DSC), 所述突变体含有下列氨基酸置换:F55Y, V100I, F114Y, A243L, S265P, N294D。

蛋白样品被浓缩到约 50-60mg/ml 并用 10mM 的醋酸钠 (PH5.0) 进行充分的透析。以 10℃/分钟的恒定加热速率加热到 95℃。烟曲霉 ATCC 13073 的共有肌醇六磷酸酶的 DSC (下图) 显示 62.5℃的解链温度, 而 α -突变体的解链温度被发现是 67.0℃。

图 21: 烟曲霉 13073 野生型肌醇六磷酸酶, 其 α -突变体和进一步稳定的 α -突变体 (E59A-S126N-R329H-S364T-G404A) 之间的温度最适值的比较。为了确定温度最适值, 在 37 至 75℃之间的一系列温度下进行肌醇六磷酸酶的标准分析。稀释的转化的酿酒酵母菌株上清液被用于测定。上清液中的其它成分对温度最适值的测定没有影响。○, 烟曲霉 ATCC 13073 肌醇六磷酸酶; △, 烟曲霉 ATCC 13073 α -突变体; □, 烟曲霉 ATCC 13073 α -突变体 (E59A-S126N-R329H-S364T-G404A)-Q27T; ■, 烟曲霉 ATCC 13073 α -突变体 (E59A-S126N-R329H-S364T-G404A)-Q27T-K68A。烟曲霉 α -突变体中的 Q51T 和 K92A 突变分别对应于共有肌醇六磷酸酶中的-IQ50T 和 K91A。

图 22: 含有一些从 “basidio” 共有序列转变为共有肌醇六磷酸酶-10-热-[3]-Q50T-K91A 的活性位点残基的共有肌醇六磷酸酶-12 (consphy12) 的氨基酸序列。

本发明的发酵过程中使用的培养基通常含有细胞或微生物的营养成分如可消化的氮源和无机物、维生素、微量-和痕量元素和其它促生长因子。另外, 培养基还含有碳源。根据本发明, 各种有机或无机物可用作发酵过程中的氮源, 如硝酸盐、铵盐、酵母提取物、肉膏、胨、酪蛋白、玉米浆、氨基酸和尿素。可用

于发酵过程中的典型无机物是钙、铁、锌、镍、锰、钴、铜、钼和碱金属盐如氯化物、硫酸盐和磷酸盐和硼酸。甘油或象单-、双-、寡聚-或多糖的糖类，例如葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、糖原、纤维素或含有这类物质的底物如糖蜜、葡萄糖浆和果糖糖浆可被用作碳源。总补料液流中的葡萄糖和/或甲醇每一组分的浓度变化范围是从大约 10 至大约 500g/L 并且优选地是从大约 200 至大约 300g/L。当发酵培养基主要是一种液体培养基时，这类培养基可含有诸如醇类这样的有机溶剂，例如甲醇、乙醇或异丙醇。并且，发酵培养基也可是一种分散液或悬浮液，这种情况适于进行搅拌发酵。

为了连续操作，细胞任选地固定化在多孔固体载体上。传统上用于发酵过程的具有任意孔、尺寸和几何形状并且对需要固定的特定细胞或微生物没有毒性作用的任何多孔固体载体都适用于本发明的目的。这种载体的例子是那些由无机物质制成并具有大约 0.5 至大约 100 μ m 的孔径，优选地大约 10 至大约 30 μ m 的孔径的载体。无机物质的例子是陶瓷和天然无机物如冻石、沸石、膨润土、硅酸盐（玻璃）、铝硅酸盐、铝氧化物、镁铝硅酸盐和镁铝氧化物。这种载体可以从市场上购买到，例如从德国的 Ceramtec, Marktreidwitz，德国的 Schott Engineering GmbH, Mainz 等公司购买。优选地，载体是平均直径为大约 0.2 至大约 20mm 的球形体。通过使载体颗粒与一种适当的细胞培养物接触的已知方式，将活细胞固定到载体上。如果需要，可进一步采用膜式包裹层，如 German Offenlegungsschrift DE3421049（德国专利 DE3421049）中所描述膜式包裹层处理固定了细胞的载体颗粒。合适地，载体以固定床的形式置于发酵容器内。并且，如果自动灭菌不可靠（例如，通过甲醇、乙醇、氨），应在使用前分别对培养基，它的组分和它们的容器适当地进行灭菌。优选地是蒸汽加热灭菌（例如，在 121 $^{\circ}$ C 和 1bar 压力下灭菌 20 分钟）和用于敏感成分的过滤（0.2 μ m）除菌。或采用其它的灭菌方法。当以连续的方式进行操作时，培养基成分不必灭菌。

根据使用的特定细胞或生物体，发酵可在 PH 为大约 2 至大约 11 的范围内进行。在本发明的优选方案中，使用微生物，即采用 EP897010、EP897985 或本申请实施例 11 中描述的用编码肌醇六磷酸酶的 DNA 序列转化的多形汉逊氏酵母进行生产肌醇六磷酸酶的发酵过程。根据本发明具体的方面，优选的碳源是葡萄糖和甲醇的混合物。并且，根据本发明的这一具体的方案，发酵可在 PH 范围为大约 4 至 5，优选地在 PH 大约为 4.6 下进行。用于进行这种发酵过程的优选温

度范围在大约 10 至 50℃, 更优选的发酵温度大约为 30℃。通气速率优选地调到单位体积的液体中大约 0.01 至大约 1.5 体积的气体, 其中液体中的溶氧浓度 (DO) 为 0.01 至大约 500%。100% 的 DO 表示在大气压 (1bar) 和反应器温度下的溶液的氧饱和度。发酵可在大约 0.1 至大约 100 bar 的压力下进行, 优选地在大气压下进行发酵, 即在大约 1 bar 下进行。稀释速率可从每小时大约 0.001 变化到大约 0.5。

本发明通过下面给出的实施例得到进一步的说明。

实施例 1

用于进料培养基的贮存液制备如下:

1.1 $\text{CaCl}_2/\text{H}_3\text{BO}_3$ 溶液

CaCl ₂ · 2H ₂ O	18.75	g/l
H ₃ BO ₃	0.0125	g/l

本溶液 121℃ 灭菌 20 分钟。

1.2 微量元素溶液

$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5	g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2	g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.75	g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0	g/l
Na-EDTA	2.5	g/l

本溶液 121℃ 灭菌 20 分钟。

1.3 痕量元素溶液

$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	g/l

KI

本溶液 121℃ 灭菌 20 分钟。

1.4 盐 + 维生素溶液

KH_2PO_4	50.0	g/l
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	100.0	g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	45.0	g/l

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50.0	g/l
KCl	23.0	g/l
NaCl	5.0	g/l
维生素溶液	5.0	ml/l
(在 50% 的异丙醇/水中 D-生物素, 600mg/l)		
盐酸硫胺素 200g/l)		

维生素溶液采用过滤 (0.2 μm) 除菌并加到经 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 分钟的盐溶液中。

1.5 葡萄糖溶液

为了得到 1L 含有 57% (重量) D-葡萄糖的溶液, 将 770g 的 D-葡萄糖 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶解到 480g 的水中并进行灭菌 (121 $^\circ\text{C}$, 20 分钟)。

1.6 甲醇

确定纯甲醇无菌后装入灭菌瓶中。

1.7 消泡剂

10% 消泡剂 (Struktol J673, Schill & Seilacher, Hamburg, 德国) 的灭菌 (121 $^\circ\text{C}$, 20 分钟) 溶液用于控制泡沫。

1.8 碱

大约 12.5% (重量) 的氨溶于无菌水中的溶液被装入灭菌瓶中。

实施例 2

固定床生物反应器 (1 升) 按图 1 所示的方式进行组装, 该反应器配有用于提供实施例 1 的溶液 1.1 到 1.8 的独立的贮料瓶。由多孔冻石球体 (直径 4mm, 孔径 10-30 μm , 每 ml 280 个孔, CeramTec, Marktredwitz, 德国) 组成的固定床被装载在顶部的筛板上。反应器进行灭菌 (121 $^\circ\text{C}$, 20 分钟) 后装入用例如 EP897010、EP897985 或实施例 11 中所述的肌醇六磷酸酶编码 DNA 转化的多形汉逊氏酵母的种子培养物。然后与贮料瓶连接。种子培养物在以甘油代替葡萄糖作为碳源的培养基上生长。反应器进行分批操作直到甘油被消耗完, 这由溶解氧浓度的升高来决定。然后打开进料液体并按照下面给出的操作条件进行发酵:

温度	30	$^\circ\text{C}$
PH	4.6	稀释的氧浓度
$P_{\text{总}}$	10^5	N/m $_2$
P_{O_2}	10^5	N/m $_2$

稀释速率	0.0067	h^{-1}
通气速率	100	ml/min
$V_{\text{液体}}$	1190	ml^{-1}
$V_{\text{固定床}}$	950	ml^{-1}

贮料瓶 1-8 提供的底物组成: (给定进料流体中的实际浓度):

D-葡萄糖	305	g/l
甲醇	264	g/l
$\text{CaCl}_2/\text{H}_3\text{BO}_3$ 溶液	12.2	g/l
微量元素溶液	20.9	g/l
痕量元素溶液	17.2	g/l
盐+维生素溶液	44.7	g/l

分析

用 Bio-Rad 蛋白分析试剂盒 I (Bio-Rad, Glattbrugg, 瑞士) 测定总蛋白浓度。由总蛋白浓度 (c_{tp}) 计算肌醇六磷酸酶浓度 (c_{phyt}) 的系数被确定为 $c_{\text{phyt}} = 0.76 \cdot c_{\text{tp}}$ 。

为了确定培养基中的生物量, 离心分离两份 1ml 的样品, 用 1ml 的水洗涤, 再次离心分离, 85°C 下干燥两天并称重。

结果:

上述操作条件下的生物量为 $59\text{g}/\text{l}$ 。给定 $0.0067/\text{小时}$ 的稀释速率, 产率是 0.078g 的肌醇六磷酸酶/ $\text{升} \cdot \text{小时}$ 。

进料-分批发酵的生物量是 $125\text{g}/\text{l}$; 然而计算的产率是 0.054g 的肌醇六磷酸酶/ $\text{升} \cdot \text{小时}$ 。

实施例 3

发酵的进行与实施例 2 类似, 但不采用冻石球体 (即, 不使用固定化微生物)。按下列组成的营养液、盐溶液和维生素溶液分别泵入反应器:

营养液:

$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	8.33	mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	8.33	mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.33	mg/l
KJ	8.33	mg/l

$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	833.33	mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	66.67	mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	333.33	mg/l
Na-EDTA	833.33	mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6250	mg/l
H_3BO_3	4.17	mg/l

盐+维生素溶液:

KH_2PO_4	50.0	g/l
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	100.0	g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	45.0	g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50.0	g/l
KCl	23.0	g/l
NaCl	5.0	g/l
维生素溶液	5.0	ml/l

(50%的异丙醇/水中 D-生物素, 600mg/l)

盐酸硫胺素 200g/l)

调节这两种溶液的补加量使得进料液体中的营养液浓度为 51g/l 和盐+维生素溶液浓度为 61g/l. 将稀释速率调节到 0.009h^{-1} . 通过补加 12.5 重量%的氢氧化铵将 PH 维持在 4.6.

并且, 为了维持进料液体中 275g/l 的葡萄糖浓度和 260g/l 的甲醇浓度, 将如实施例 1 所述的葡萄糖溶液和甲醇分别进料到反应器中.

这种发酵的产率是 0.088g 肌醇六磷酸酶/升·小时. 流出液体中的生物量是 58g/l.

实施例 4

发酵过程类似于实施例 3, 但将葡萄糖浓度调节到 290g/l, 甲醇浓度调节到 260g/l 并保持稀释速率恒定在 0.009h^{-1} , 产率是 0.092g 肌醇六磷酸酶/升·小时. 流出液中的生物量是 60.4g/l.

实施例 5

发酵过程类似于实施例 3, 但将葡萄糖浓度调节到 270g/l, 甲醇浓度调节到 280g/l 并保持稀释速率恒定在 0.009h^{-1} , 产率是 0.094g 肌醇六磷酸酶/升·小时。流出液中的生物量是 56.8g/l。

实施例 6

共有肌醇六磷酸酶-1 的氨基酸序列的设计

氨基酸序列的排列

采用具有标准参数(缺口产生级数 12(gap creation penalty 12), 缺口延伸级数 4(gap extension penalty 4))的 GCG 序列分析程序包 9.0 版(Release 9.0) (Devereux 等, 1984) 中的程序 PILEUP 来计算排列顺序。使用文本编辑器 (text editor) 精确推算缺口的定位。表 1 给出不含信号序列的、用于从表 1 提到的氨基酸 (aa) 开始排列的序列 (见图 2)。

表 1: 用于设计共有肌醇六磷酸酶(consensus phytase)-1 的肌醇六磷酸酶氨基酸序列的来源和权重 (vote weight)

- 土曲霉 9A-1 的 phyA, aa27, 权重 0.5 (Mitchell 等, 1997)
- 土曲霉 cbs116.46 的 phyA, aa27, 权重 0.5 (EP897985; 图 1)
- 黑色曲霉泡盛变种的 phyA, aa27, 权重 0.33 (Piddington 等, 1993)
- 黑色曲霉 T213 的 phyA, aa27, 权重 0.33
- 黑色曲霉菌株 NRRL3135 的 phyA, aa27, 权重 0.33 (van Hartingsveldt 等, 1993)
- 烟曲霉 ATCC13073 的 phyA, aa26, 权重 0.2 (Pasamontes 等, 1997)
- 烟曲霉 ATCC32722 的 phyA, aa26, 权重 0.2 (EP897985; 图 1)
- 烟曲霉 ATCC58128 的 phyA, aa26, 权重 0.2 (EP897985; 图 1)
- 烟曲霉 ATCC26906 的 phyA, aa26, 权重 0.2 (EP897985; 图 1)
- 烟曲霉 ATCC32239 的 phyA, aa30, 权重 0.2 (EP897985; 图 1)
- Emericella nidulans* 的 phyA, aa25, 权重 1.0 (Pasamontes 等, 1997a)
- 嗜热踝节菌 ATCC20186 的 phyA, aa24, 权重 1.0 (Pasamontes 等, 1997a)
- 嗜热毁丝菌的 phyA, aa19, 权重 1.0 (Mitchell 等, 1997)

共有肌醇六磷酸酶-1 的氨基酸序列的计算

输入精确的排列顺序, 通过 GCG 序列分析程序包 9.0 版(Release

9.0) (Devereux 等, 1984) 中的程序 PRETTY 计算共有序列。PRETTY 以排成列的形式打印序列并能显示用于排列的共有序列。与排成列的肌醇六磷酸酶的氨基酸序列间的相似性有关的权重被分布给所有序列。权重是如此设置的以使源自于一个序列亚组(相同的种,但来自于不同菌株)的所有肌醇六磷酸酶,例如来自于烟曲霉的所有肌醇六磷酸酶的氨基酸序列对选择的综合影响设置为 1,这意味着每一序列起的作用占菌株序列数目分之一(见表 1)。通过这一方法,可避免非常相似的氨基酸序列,例如源自于烟曲霉的不同菌株的肌醇六磷酸酶在计算的共有序列中起主导作用。

程序 PRETTY 起始于下列参数: 将限定其下没有共有序列的权数(number of votes)的复数(plurality)设为 2.0。确定评估矩阵值(scoring matrix value)的阈值设为 2,该矩阵值下的一个氨基酸残基不为残基结合体加权。PRETTY 使用了用于肽的 PrettyPep.Cmp 共有序列评估矩阵(consensus scoring matrix)。

排列序列中不能由程序确定共有序列残基的 10 个位点(位点 46, 66, 82, 138, 162, 236, 276, 279, 280, 308; 图 2)按照下述规则由手工填补: 如果一个残基出现的频率最高,就选择这个残基(138, 236, 280); 如果出现一个相似等同残基的优势组,频率最高或如果得不到的话,选择该组中的一个残基(46, 66, 82, 162, 276, 308)。如果既不存在一个优势残基也不存在一个优势组,根据对蛋白稳定性影响的一般假设选择一个出现的残基(279)。其它 8 个位点(132, 170, 204, 211, 275, 317, 384, 447; 图 2)不填补通过程序选择的氨基酸残基,但通常填补与使用程序选择的残基出现频率相同的氨基酸。大多数情况下,通过这一校正,完全消除了对三个黑色曲霉序列(权重之和: 0.99)的低估。

将共有肌醇六磷酸酶-1 的氨基酸序列转换成 DNA 序列

土曲霉 cbs116.46 的肌醇六磷酸酶的头 26 个氨基酸残基被用作信号肽并融合到所有共有肌醇六磷酸酶的 N-端。对于这一段序列,我们使用了一个特殊方法来计算相应的 DNA 序列。Purvis 等(1987)建议基因中掺入稀有密码子对蛋白的折叠效果有影响。信号序列的 DNA 序列是通过采用 Purvis 等(1987)的方法计算的并适于在酿酒酵母中表达。对于蛋白的其它部分,为了将计算的氨基酸序列翻译成 DNA 序列,我们采用了 GCG 程序包中的高度表达的酿酒酵母基因的密码

子频率表。

得到的 fcp 基因的序列如图 3 所示。

共有肌醇六磷酸酶-1 基因的构建和克隆

交替地使用有义和反义-链的序列，将计算的共有肌醇六磷酸酶-1 (fcp) 的 DNA 序列分成 85bp 的寡核苷酸。每一寡核苷酸与它前面和后面的反链寡核苷酸重叠 20bp。从 Microsynth, Balgach (瑞士) 购买的并且是 PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳)-纯的所有引物的定位如图 3 所示。

PCR-反应

在三个 PCR-反应中，将合成的寡核苷酸组合成全基因。Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim, 德国) 产的高保真试剂盒 (High Fidelity Kit) 和 AMS Biotechnology (欧洲) 有限公司 (Lugano, 瑞士) 产的热循环仪 Protokol (TM) 被用于 PCR 反应。

将寡核苷酸 CP-1 到 CP-10 (混合物 1, 图 3) 混合成每一种寡核苷酸的浓度为 $0.2\text{pmol}/\mu\text{l}$ 的混合物。采用 CP-9 到 CP-22 (每一种寡核苷酸的浓度为 $0.2\text{pmol}/\mu\text{l}$) 制备第二种寡核苷酸混合物 (混合物 2)。另外，四种短链引物被用于 PCR 反应:

CP-a: EcoRI
5'-TATATGAATTCATGGCGTGTTCGTC-3' (SEQ ID No. 1)

CP-b:
5'-TGAAAAGTTCATTGAAGGTTTC-3' (SEQ ID No. 2)

CP-c:
5'-TCTTCGAAAGCAGTACAAGTAC-3' (SEQ ID No. 3)

CP-e:
5'-TATATGAATTCTTAAGCGAAAC-3' (SEQ ID No. 4)

PCR 反应 a: 10 μl 混合物 1 (每一种寡核苷酸 2.0pmol)
 2 μl 核苷酸 (每一种核苷酸 10mM)
 2 μl 引物 CP-a ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$)
 2 μl 引物 CP-c ($10\text{pmol}/\mu\text{l}$)
 10.0 μl PCR 缓冲液
 0.75 μl 聚合酶混合物 (2.6U)

73. 25 μ LH₂O

PCR 反应 b: 10 μ l 混合物 2 (每一种寡核苷酸 2.0pmol)

2 μ l 核苷酸 (每一种核苷酸 10mM)

2 μ l 引物 CP-b (10pmol/ μ l)

2 μ l 引物 CP-e (10pmol/ μ l)

10. 0 μ lPCR 缓冲液

0. 75 μ l 聚合酶混合物 (2. 6U)

73. 25 μ LH₂O

PCR 反应 a 和 b 的反应条件:

步骤 1 2 分钟-45 $^{\circ}$ C

步骤 2 30 秒钟-72 $^{\circ}$ C

步骤 3 30 秒钟-94 $^{\circ}$ C

步骤 4 30 秒钟-52 $^{\circ}$ C

步骤 5 1 分钟-72 $^{\circ}$ C

步骤 3 至 5 重复 40 次。

采用琼脂糖凝胶电泳 (0. 9%的琼脂糖) 和下列凝胶提取 (QIAEXII凝胶提取试剂盒, Qiagen, Hilden, 德国) 纯化 PCR 产物 (670 和 905bp)。纯化的 DNA 片段被用于 PCR 反应 c。

PCR 反应 c: 6 μ l 反应 a 的 PCR 产物 ($\approx$ 50ng)

6 μ l 反应 b 的 PCR 产物 ($\approx$ 50ng)

2 μ l 引物 CP-a (10pmol/ μ l)

2 μ l 引物 CP-e (10pmol/ μ l)

10. 0 μ lPCR 缓冲液

0. 75 μ l 聚合酶混合物 (2. 6U)

73. 25 μ LH₂O

PCR 反应 c 的反应条件:

步骤 1 2 分钟-94 $^{\circ}$ C

步骤 2 30 秒钟-94 $^{\circ}$ C

步骤 3 30 秒钟-55 $^{\circ}$ C

步骤 4 1 分钟-72 $^{\circ}$ C

步骤2至4重复31次。

通过上述方法纯化产生的 PCR 产物 (1.4kb), 用 EcoRI 消化, 并将其与用 EcoRI-消化的并且去磷酸化的 pBsk(-)-载体 (Stratagene, La Jolla, CA, 美国) 连接。用 1 μ l 的连接混合物转化大肠杆菌 XL-1 感受态细胞 (Stratagene, La Jolla, CA, 美国)。按照 Sambrook 等 (1987) 的描述实施所有的标准方法。通过本技术领域已知的测序调控所构建的共有肌醇六磷酸酶基因 (fcp, 图 3) 的 DNA 序列。

实施例 7

改进的共有肌醇六磷酸酶 (共有肌醇六磷酸酶-10) 的氨基酸序列的设计使用带有标准参数 (缺口产生级数 12 (gap creation penalty 12), 缺口延伸级数 4 (gap extension penalty 4)) 的 GCG 序列分析程序包 9.0 版 (Release 9.0) (Devereux 等, 1984) 中的程序 PILEUP 计算用于设计共有肌醇六磷酸酶-10 的排列顺序。使用文本编辑器 (text editor) 精确推算缺口的定位。

下列序列被用于排列起始于表 2 所述氨基酸 (aa) 的担子菌纲肌醇六磷酸酶的顺序:

表 2: 用于计算相应氨基酸共有序列 (basidio) 的五种担子菌纲肌醇六磷酸酶的来源和权重 (vote weight)

-卷边桩菇 NN005693 的 phyA1 (肌醇六磷酸酶 A1), aa21, 权重 0.5 (W098/28409)

-卷边桩菇 NN005693 的 phyA2 (肌醇六磷酸酶 A2), aa21, 权重 0.5 (W098/28409)

-绒毛栓菌 NN9343 的 phyA, aa24, 权重 1.0 (W098/28409)

-平田头菇菌 NN009289 的 phyA, aa19, 权重 1.0 (W098/28409)

-Peniophora lycii NN006113 的 phyA, aa21, 权重 1.0 (W098/28409)

排列顺序如图 4 所示。

表 3 中列出了用于进行最终排列顺序的基因。用在排列顺序中的序列的第一个氨基酸 (aa) 在生物体名称的后面提到。

表 3: 用于设计共有肌醇六磷酸酶-10 的肌醇六磷酸酶序列的来源和权重 (vote weight)

-土曲霉 9A-1 的 phyA, aa27, 权重 0.5 (Mitchell 等, 1997)

- 土曲霉 cbs116.46 的 phyA, aa27, 权重 0.5 (EP897985; 图 1)
- 黑色曲霉泡盛变种的 phyA, aa27, 权重 0.5 (Piddington 等, 1993)
- 黑色曲霉菌株 NRRL3135 的 phyA, aa27, 权重 0.5 (van Hartingsveldt 等, 1993)
- 烟曲霉 ATCC13073 的 phyA, aa26, 权重 0.2 (Pasamontes 等, 1997)
- 烟曲霉 ATCC32722 的 phyA, aa26, 权重 0.2 (EP897985; 图 1)
- 烟曲霉 ATCC58128 的 phyA, aa26, 权重 0.2 (EP897985; 图 1)
- 烟曲霉 ATCC26906 的 phyA, aa26, 权重 0.2 (EP897985; 图 1)
- 烟曲霉 ATCC32239 的 phyA, aa30, 权重 0.2 (EP897985; 图 1)
- Emmericella nidulans* 的 phyA, aa25, 权重 1.0 (Pasamontes 等, 1997a)
- 嗜热踝节菌 ATCC20186 的 phyA, aa24, 权重 1.0 (Pasamontes 等, 1997a)
- 嗜热毁丝菌的 phyA, aa19, 权重 1.0 (Mitchell 等, 1997)
- Thermomyces lanuginosa* 的 phyA, aa36, 权重 1.0 (Berka 等, 1998)
- 五种担子菌纲的肌醇六磷酸酶的共有序列, 权重 1.0 (Basidio, 图 4)

图 5 显示了相应的排列顺序。

共有肌醇六磷酸酶-10 的氨基酸序列的计算

为了改进排列顺序, 我们将其中仍含有不确定序列位点 (见图 4) 的、源自于四种不同担子菌纲的称作 Basidio 的五种肌醇六磷酸酶的共有序列、几乎所有用于计算原始共有肌醇六磷酸酶的肌醇六磷酸酶序列和一种源自于 Ascomycete *Thermomyces lanuginosus* 的新的肌醇六磷酸酶序列组合成更长的排列顺序。

我们将复数设为 2.0 并将阈值设为 3。所用的权重列于表 3。排列顺序和相应的共有序列如图 5 所示。新的共有肌醇六磷酸酶-10 的序列含有 32 个不同于原始共有肌醇六磷酸酶的氨基酸。按照实施例 6 的规则来填补不能由程序 PRETTY 计算出共有氨基酸残基的位点。由程序推测出的残基没有一个被替换。

而且, 我们将所有担子菌纲的肌醇六磷酸酶作为一个氨基酸序列, 但在排列顺序中分配了 0.2 的权重。图 7 给出了相应的排列顺序。计算的共有氨基酸序列 (共有肌醇六磷酸酶-11) 与共有肌醇六磷酸酶-10 的序列具有下列区别:
D35X, X(K) 69K, X(E) 100E, A101R, Q134N, X(K) 153N, X(H) 190H, X(A) 204S, X(E) 220D, E222T, V227A, X(R) 271R, H287A, X(D) 288D, X(K) 379K, X(I) 389I, E390X, X(E) 415

E, X(A)416A, X(R)446L, E463A, 其中按照图 6 编号。

字母 X 表示程序不能计算共有氨基酸; 括号中的氨基酸对应最终包括在共有肌醇六磷酸酶-10 中的氨基酸。

我们也检测了由改进的共有肌醇六磷酸酶序列 10 和 11 所暗示的单个氨基酸置换对原始共有肌醇六磷酸酶-1 稳定性的影响。方法如实施例 8 所述。

将共有肌醇六磷酸酶-10 的氨基酸序列转换为 DNA 序列

土曲霉 cbs116.46 的肌醇六磷酸酶的头 26 个氨基酸残基被用作信号肽并融合到共有肌醇六磷酸酶-10 的 N-端。融合过程在实施例 6 中有进一步的描述。

产生的 fcp10 基因序列如图 6 所示。

共有肌醇六磷酸酶-10 基因 (fcp10) 的构建和克隆

交替地使用有义和反义链的序列, 将计算的 fcp10 的 DNA 序列分成 85bp 的寡核苷酸。每一寡核苷酸与它前面和后面反链的寡核苷酸重叠 20bp。从 Microsynth, Balgach (瑞士) 购买的并且是 PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳)-纯的所有引物的定位如图 6 所示。

PCR-反应

在三个 PCR-反应中, 合成的寡核苷酸被组合成全基因。Boehringer Mannheim(Boehringer Mannheim, 德国)产的高保真试剂盒和 AMS Biotechnology (欧洲)有限公司 (Lugano 瑞士) 产的热循环仪 Protokol™ 被用于 PCR 反应。下列寡核苷酸的使用浓度为 0.2pmol/ml。

混合物 1.10: CP-1, CP-2, CP-3.10, CP-4.10, CP-5.10, CP-6, CP-7.10, CP-8.10, CP-9.10, CP-10.10

混合物 2.10: CP-9.10, , CP-10.10, CP-11.10, CP-12.10, CP-13.10, CP-14.10, CP-15.10, CP-16.10, CP-17.10, CP-18.10, CP-19.10, CP-20.10, CP-21.10, CP-22.10

新合成的寡核苷酸以数字 10 来标记。如图 6 中用下划线所标明的, 肌醇六磷酸酶与原始共有肌醇六磷酸酶-1 相比, 具有下列 32 处置换: Y54F, E58A, D69K, D70G, A94K, N134Q, I158V, S187A, Q188N, D197N, S204A, T214L, D220E, L234V, A238P, D246H, T251N, Y259N, E267D, E277Q, A283D, R291I, A320V, R329H,

S364T, I366V, A379K, S396A, G404A, Q415E, A437G, A463E.

四种短链 PCR 引物被用于寡核苷酸的合成:

CP-a: EcoRI

5'-TATATGAATTCATGGGCGTGTTCGTC-3' (SEQ ID No. 1)

CP-b:

5'-TGAAAAGTTCATTGAAGGTTTC-3' (SEQ ID No. 2)

CP-c. 10:

5'-TCTTCGAAAGCAGTACACAAAC-3' (SEQ ID No. 5)

CP-e: EcoRI

5'-TATATGAATTCTTAAGCGAAAC-3' (SEQ ID No. 4)

PCR 反应 a: 10 μ l 混合物 1. 10 (每一种寡核苷酸 2. 0pmol)

2 μ l 核苷酸 (每一种核苷酸 10mM)

2 μ l 引物 CP-a (10pmol/ml)

2 μ l 引物 CP-c. 10 (10pmol/ml)

10. 0 μ l PCR 缓冲液

0. 75 μ l 聚合酶混合物 (2. 6U)

73. 25 μ l H₂O

PCR 反应 b: 10 μ l 混合物 2. 10 (每一种寡核苷酸: 2. 0pmol)

2 μ l 核苷酸 (每一种核苷酸: 10mM)

2 μ l 引物 CP-b (10pmol/ml)

2 μ l 引物 CP-e (10pmol/ml)

10. 0 μ l PCR 缓冲液

0. 75 μ l 聚合酶混合物 (2. 6U)

73. 25 μ l H₂O

PCR 反应 a 和 b 的反应条件:

步骤 1 2 分钟-45 $^{\circ}$ C

步骤 2 30 秒钟-72 $^{\circ}$ C

步骤 3 30 秒钟-94 $^{\circ}$ C

步骤 4 30 秒钟-52 $^{\circ}$ C

步骤 5 1 分钟-72 $^{\circ}$ C

PCR 反应 c:

- 6μl 反应 a 的 PCR 产物 (≈ 50ng)
- 6μl 反应 b 的 PCR 产物 (≈ 50ng)
- 2μl 引物 CP-a (10pmol/ml)
- 2μl 引物 CP-e (10pmol/ml)
- 10.0μl PCR 缓冲液
- 0.75μl 聚合酶混合物 (2.6U)
- 73.25μl H₂O

步骤1	2分钟-94℃
步骤2	30秒钟-94℃
步骤3	30秒钟-55℃
步骤4	1分钟-72℃

产生的 PCR 产物 (1.4kb) 以上述方法进行纯化, 用 EcoRI 消化, 并连接到用 EcoRI-消化的并且去磷酸化的 pBsk(-)-载体 (Stratagene, La Jolla, CA, 美国) 上。1 μ l 的连接混合物用来转化大肠杆菌 XL-1 感受态细胞 (Stratagene, La Jolla, CA, 美国)。按照 Sambrook 等 (1987) 的描述进行所有的标准方法。构建的基因 (fcp10) 的 DNA 序列通过本技术领域已知的测序方法进行测序。

通过引入共有肌醇六磷酸酶-10 和/或共有肌醇六磷酸酶-11 的氨基酸序列暗示的单突变来增强共有肌醇六磷酸酶-1 的热稳定性

22

为了构建在黑色曲霉, 酿酒酵母或多形汉逊氏酵母中表达的突变蛋白, 含有共有肌醇六磷酸酶基因的相应表达质粒被用作定点诱变的模板 (见实施例 11-13)。按照产品说明和采用相应的引物, 利用 Stratagene (La Jolla, CA, 美国) 生产的“快速置换™ 定点诱变试剂盒”引入突变。引入的所有突变和相应的引物由表 4 进行了概括。含有所需突变的质粒通过本技术领域已知的 DNA 序列分析进行鉴别。

表 4: 用于共有肌醇六磷酸酶定点诱变的引物

(置换的碱基用粗体标示。引入的限制位点在序列上面作了标记。写在括号里的限制位点是被引入的突变破坏了的位点。)

突变	引物对
	<i>Kpn</i> I
Q50T	5'-CACTTGTGGGGTACCTACTCTCCATACTTCTC-3' (SEQ ID No. 6) 5'-GAGAAGTATGGAGAGTAGGTACCCCAAGTG-3' (SEQ ID No. 7)
Y54F	5'-GGTCAATACTCTCCATTCTTCTCTTTGGAAG-3' (SEQ ID No. 8) 5'-CTTCCAAAGAGAAGAATGGAGAGTATTGACC-3' (SEQ ID No. 9)
E58A	5'-CATACTTCTCTTTGGCAGACGAATCTGC-3' (SEQ ID No. 10) 5'-GCAGATTCGTCTGCCAAAGAGAAGTATG-3' (SEQ ID No. 11)
	<i>Aat</i> II
D69K	5'-CTCCAGACGTCCCAAAGGACTGTAGAGTTAC-3' (SEQ ID No. 12) 5'-GTAACCTACAGTCCTTTGGGACGTCTGGAG-3' (SEQ ID No. 13)
	<i>Aat</i> II
D70G	5'-CTCCAGACGTCCCAGACGGCTGTAGAGTTAC-3' (SEQ ID No. 14) 5'-GTAACCTACAGCCGTCTGGGACGTCTGGAG-3' (SEQ ID No. 15)
K91A	5'-GATACCCAACTTCTTCTGCGTCTAAGGCTTACTCTG-3' (SEQ ID No. 16) 5'-CAGAGTAAGCCTTAGACGCAGAAGAAGTTGGGTATC-3' (SEQ ID No. 17)
	<i>Sca</i> I
A94K	5'-CTTCTAAGTCTAAGAAGTACTCTGCTTTG-3' (SEQ ID No. 18) 5'-CAAAGCAGAGTACTTCTTAGACTTAGAAG-3' (SEQ ID No. 19)
A101R	5'-GCTTACTCTGCTTTGATTGAACGGATTCAAAAGAACGCTAC-3' 5'-GTAGCGTTCTTTTGAATCCGTTCAATCAAAGCAGAGTAAGC-3'

- N134Q 5'-CCATTCGGTGAACAGCAAATGGTTAACTC-3' (SEQ ID No. 22)
5'-GAGTTAACCATTGTCTGTTACCGAATGG-3' (SEQ ID No. 23)
- Nru I*
- K153N 5'-GATACAAGGCTCTCGCGAGAAACATTGTTC-3' (SEQ ID No. 24).
5'-GGAACAATGTTTCTCGCGAGAGCCTTGTATC-3' (SEQ ID No. 25)
- Bss HI*
- I158V 5'-GATTGTTCCATTCGTGCGCGCTTCTGGTTC-3' (SEQ ID No. 26)
5'-GAACCAGAAGCGCGCACGAATGGAACAATC-3' (SEQ ID No. 27)
- Bcl I*
- D197N 5'-CTCCAGTTATTAACGTGATCATTCCAGAAGG-3' (SEQ ID No. 28)
5'-CCTTCTGGAATGATCACGTTAATAACTGGAG-3' (SEQ ID No. 29)
- Apa I*
- S187A 5'-GGCTGACCCAGGGGCCCAACCACACCAAGC-3' (SEQ ID No. 30)
5'-GCTTGGTGTGGTTGGGCCCTGGGTCAGCC-3' (SEQ ID No. 31)
- Nco I*
- T214L 5'-CACTTTGGACCATGGTCTTTGTAAGTCTTTTCG-3' (SEQ ID No. 32)
5'-CGAAAGCAGTACAAAGACCATGGTCCAAAGTG-3' (SEQ ID No. 33)
- Avr II*
- E222T 5'-GCTTTCGAAGACTCTACCCTAGGTGACGACGTTG-3' (SEQ ID No. 34)
5'-CAACGTCGTCACCTAGGGTAGAGTCTTCGAAAGC-3' (SEQ ID No. 35)
- V227A 5'-GGTGACGACGCTGAAGCTAACTTCAC-3' (SEQ ID No. 36)
5'-GTGAAGTTAGCTTCAGCGTCGTCACC-3' (SEQ ID No. 37)
- Sac II*
- L234V 5'-CTAACTTCACCGCGGTGTTGCTCCAG-3' (SEQ ID No. 38)
5'-CTGGAGCGAACACCGCGGTGAAGTTAG-3' (SEQ ID No. 39)
- A238P 5'-GCTTTGTTGCTCCACCTATTAGAGCTAGATTGG-3' (SEQ ID No. 40)
5'-CCAATCTAGCTCTAATAGGTGGAGCGAACAAAGC-3' (SEQ ID No. 41)
- Hpa I*
- T251N 5'-GCCAGGTGTTAACTTGAAGTACGAAG-3' (SEQ ID No. 42)
5'-TTCGTCAGTCAAGTTAACACCTGGC-3' (SEQ ID No. 43)
- Aat II*
- Y259N 5'-GACGAAGACGTCGTAACTTGATGGAC-3' (SEQ ID No. 44)
5'-GTCCATCAAGTTAACGACGTCTTCGTC-3' (SEQ ID No. 45)
- Asp I*
- E267D 5'-GTCCATTGACACTGTCGCTAGAACTT C-3' (SEQ ID No. 46)
5'-GAAGTTCTAGCGACAGTGTGGAATGGAC-3' (SEQ ID No. 47)

- E277Q 5'-CTGACGCTACTCAGCTGTCTCCATTC-3' (SEQ ID No. 48)
5'-GAATGGAGACAGCTGAGTAGCGTCAG-3' (SEQ ID No. 49)
- A283D 5'-GTCTCCATTCTGTGATTTGTTCACTCAC-3' (SEQ ID No. 50)
5'-GTGAGTGAACAAATCACAGAATGGAGAC-3' (SEQ ID No. 51)
- H287A *Ksp I*
5'-GCTTTGTTCAACGCGGACGAATGGAG-3' (SEQ ID No. 52)
5'-CTCCATTCGTCCGCGGTGAACAAAGC-3' (SEQ ID No. 53)
- R291I *Bam HI*
5'-CACGACGAATGGATCCAATACGACTAC-3' (SEQ ID No. 54)
5'-GTAGTCGTATTGGATCCATTCGTCGTG-3' (SEQ ID No. 55)
- Q292A *Bsi WI*
5'-GACGAATGGAGAGCGTACGACTACTTG-3' (SEQ ID No. 56)
5'-CAAGTAGTCGTACGCTCTCCATTCGTC-3' (SEQ ID No. 57)
- A320V *Hpa I*
5'-GGTGTTGGTTTCGTTAACGAATTGATTGC-3' (SEQ ID No. 58)
5'-GCAATCAATTCGTTAACGAAACCAACACC-3' (SEQ ID No. 59)
- R329H (Bgl II)
5'-GCTAGATTGACTCACTCTCCAGTTCAAG-3' (SEQ ID No. 60)
5'-CTTGAAGTGGAGAGTGAGTCAATCTAGC-3' (SEQ ID No. 61)
- S364T *Eco RV*
5'-CTCACGACAACACTATGATATCTATTTTCTTC-3' (SEQ ID No. 62)
5'-GAAGAAAATAGATATCATAGTGTTGTCGTGAG-3' (SEQ ID No. 63)
- I366V *Nco I*
5'-CGACAACTCCATGGTTTCTATTTTCTTCGC-3' (SEQ ID No. 64)
5'-GCGAAGAAAATAGAAACCATGGAGTTGTCG-3' (SEQ ID No. 65)
- A379K *Kpn I*
5'-GTACAACGGTACCAAGCCATTGTCTAC-3' (SEQ ID No. 66)
5'-GTAGACAATGGCTTGGTACCGTTGTAC-3' (SEQ ID No. 67)
- S396A 5'-CTGACGGTTACGCTGCTTCTTGGAC-3' (SEQ ID No. 68)
5'-GTCCAAGAAGCAGCGTAACCGTCAG-3' (SEQ ID No. 69)

G404A	5'-CTGTTCCATTTCGCTGCTAGAGCTTAC-3' (SEQ ID No. 70) 5'-GTAAGCTCTAGCAGCGAATGGAACAG-3' (SEQ ID No. 71)
Q415E	5'-GATGCAATGTGAAGCTGAAAAGGAACC-3' (SEQ ID No. 72) 5'-GGTTCCTTTTCAGCTTCACATTGCATC-3' (SEQ ID No. 73)
A437G	<i>Sal</i> I 5'-CACGGTTGTGGTGTGACAAAGTTGGG-3' (SEQ ID No. 74) 5'-CCCAACTTGTGACACCACAACCGTG-3' (SEQ ID No. 75)
A463E	<i>Mun</i> I 5'-GATCTGGTGGCAATTGGGAGGAATGTTTCG-3' (SEQ ID No. 76) 5'-CGAAACATTCTCCCAATTGCCACCAGATC-3' (SEQ ID No. 77)

并用于其它突变。

按照实施例 14 所述的方法测定由酿酒酵母表达的纯化的肌醇六磷酸酶（实施例 14）的温度最适值。表 5 显示了引入的每一突变对共有肌醇六磷酸酶-1 稳定性的影响。

表 5: 共有肌醇六磷酸酶-1 的单个氨基酸置换对稳定性的影响

(+或-分别代表升高到 1℃对蛋白稳定性的正, 负的影响, ++或- -分别代表在 1-3℃之间对蛋白稳定性的正, 负的影响; 数字 10 或 11 相当于暗示氨基酸置换的共有肌醇六磷酸酶的序列。)

稳定的		中性的		不稳定的	
突变	影响	突变	影响	突变	影响
E58A (10)	+	D69A	±	Y54F (10)	-
D69K (11)	+	D70G (10)	±	V73I	-
D197N (10)	+	N134Q (10)	±	A94K (10)	-
T214L (10)	++	G186H	±	A101R (11)	-
E222T (11)	++	S187A (10)	±	K153N (11)	-
E267D (10)	+	T214V	±	I158V (10)	--
R291I*	+	T251N (10)	±	G203A	--
R329H (10)	+	Y259N (10)	±	G205S	-
S364T (10)	++	A283D (10)	±	A217V	-
A379K (11)	+	A320V (10)	±	V227A (11)	--
G404A (10)	++	K445T	±	L234V (10)	-
		A463E (10)	±	A238P (10)	--
				E277Q (10)	-
				H287A (11)	-
				Q292A (10)	-
				I366V (10)	-
				S396A (10)	--
				Q415E (11)	-
				A437G (10)	--
				E451R	--

*: 在另一轮突变中发现了这一氨基酸的置换。

使用本实施例以上所述的引物和技术，我们将八个正突变（E58A, D197N, E267D, R291I, R329H, S364T, A379K, G404A）组合到共有肌醇六磷酸酶-1 中。并且，引入了主要影响肌醇六磷酸酶的催化特性的突变 Q50T 和 K91A（见 EP897985 和实施例 14）。所产生的肌醇六磷酸酶基因（共有肌醇六磷酸酶-1-热-[8]-Q50T-K91A）的 DNA 和氨基酸序列如图 8 所示。通过此方法，共有肌醇六磷酸酶的温度最适值和解链温度被提高了 7℃（图 16, 17, 18）。

使用表 5 的结果，我们通过下列回复突变 K94A, V158I 和 A396S（其对共有肌醇六磷酸酶-1 的稳定性呈很强负影响），进一步提高了共有肌醇六磷酸酶 10 的热稳定性。产生的蛋白是共有肌醇六磷酸酶-10-热-[3]。而且，我们引入了主要影响共有肌醇六磷酸酶催化特性的突变 Q50T 和 K91A（见 EP897985 和实施例 14 和图 15 和图 16）。所产生的 DNA 和氨基酸序列如图 9 所示。最佳化的肌醇六磷酸酶的温度最适值和解链温度比共有肌醇六磷酸酶-10 提高了 4℃（图 13 和 14）。而且在以肌醇六磷酸作底物以及 PH5.5 的条件下，该肌醇六磷酸酶的比活性急剧地提高到 250U/mg（图 15）。

实施例 9

通过以共有肌醇六磷酸酶-1 和共有肌醇六磷酸酶-10 的相应残基置换氨基酸残基来稳定烟曲霉 ATCC 13073 的肌醇六磷酸酶

在六个典型位点，非-共有氨基酸残基被共有氨基酸残基所替代，在所述位点，烟曲霉 13073 的肌醇六磷酸酶是图 2 排列顺序中唯一或近乎唯一的不含相应共有肌醇六磷酸酶氨基酸残基的肌醇六磷酸酶。在第一个轮中，含有 Q51T 置换和土曲霉 cbs. 116.46 肌醇六磷酸酶的信号序列的烟曲霉 13073 肌醇六磷酸酶中的下列氨基酸被置换（见图 10）：

F55(28)Y, V100(73)I, F114(87)Y, A243(220)L, S265(242)P, N294(282)D.

括号中的数字参考图 2 的编号。

在第二个轮中，在共有肌醇六磷酸酶-10 的序列中发现并被测定为共有肌醇六磷酸酶-1（表 5）中的单突变的七个稳定氨基酸置换中的四个置换（E59A, R329H, S364T, G404A）被另外引入烟曲霉 α -突变体中。而且，引入了能够降低肌醇六磷酸酶的蛋白酶敏感性的氨基酸置换 S154N。

按照实施例 8（见表 6）引入突变并按照实施例 11 至 13 进行表达。产生的烟曲霉 13073 肌醇六磷酸酶变体被称作 α -突变体（ α -mutant）和 α -突变体-

E59A-S154N-R329H-S364T-G404A.

烟曲霉 13073 肌醇六磷酸酶 α -突变体的温度最适值 (60℃, 图 21) 和解链温度 (67.0℃, 图 20) 与野生型的值 (温度最适值: 55℃, T_m : 60℃) 相比提高了 5-7℃。另外五个氨基酸置换进一步将温度最适值提高了 3℃ (图 21)。

表 6: 用于稳定烟曲霉 ATCC 13073 肌醇六磷酸酶的诱变引物

突变	引物
F55Y	5'-CACGTACTCGCCATACTTTTCGCTCGAG-3' (SEQ ID No. 78) 5'-CTCGAGCGAAAAGTATGGCGAGTACGTG-3' (SEQ ID No. 79)
	(<i>Xho</i> I)
E58A	5'-CCATACTTTTCGCTCGCGGACGAGCTGTCCGTG-3' (SEQ ID NO. 80) 5'-CACGGACAGCTCGTCCGCGAGCGAAAAGTAGG-3' (SEQ ID NO. 81)
V100I	5'-GTATAAGAAGCTTATTACGGCGATCCAGGCC-3' (SEQ ID No. 82) 5'-GGCCTGGATCGCCGTAATAAGCTTCTTATAC-3' (SEQ ID No. 83)
F114Y	5'-CTTCAAGGGCAAGTACGCCTTTTGAAGACG-3' (SEQ ID No. 84) 5'-CGTCTTCAAAAAGGCGTACTTGCCCTTGAAG-3' (SEQ ID No. 85)
A243L	5'-CATCCGAGCTCGCCTCGAGAAGCATCTTC-3' (SEQ ID No. 86) 5'-GAAGATGCTTCTCGAGGCGAGCTCGGATG-3' (SEQ ID No. 87)
S265P	5'-CTAATGGA TGTGTCCGTTTGATACGGTAG-3' (SEQ ID No. 88) 5'-CTACCGTATCAAACGGACACATGTCCATTAG-3' (SEQ ID No. 89)
N294D	5'-GTGGAAGAAGTACGACTACCTTCAGTC-3' (SEQ ID No. 90) 5'-GACTGAAGGTAGTCGTACTTCTTCCAC-3' (SEQ ID No. 91)
	(<i>Mlu</i> I)
R329H	5'-GCCCCGTTGACGCATTCGCCAGTGCAGG-3' (SEQ ID No. 92) 5'-CCTGCACTGGCGAATGCGTCAACCGGGC-3' (SEQ ID No. 93)

Nco I

S364T 5'-CACACGACAACACCATGGTTTCCATCTTC-3' (SEQ ID No. 94)
5'-GAAGATGGAAACCATGGTGTGTCGTGTG-3' (SEQ ID No. 95)

(Bss HI)

G404A 5'-GTGGTGCCTTTTCGCCGCGGAGCCTACTTC-3' (SEQ ID No. 96)
5'-GAAGTAGGCTCGCGCGGCGAAAGGCACCAC-3' (SEQ ID No. 97)

实施例 10

将黑色曲霉 NRRL 3135 肌醇六磷酸酶的活性位点氨基酸残基引入共有肌醇六磷酸酶-1 中

我们使用黑色曲霉 NRRL 3135 肌醇六磷酸酶的晶体结构定义所有活性位点氨基酸残基（见参考实施例和 EP897010）。采用图 2 的排列顺序，用黑色曲霉的肌醇六磷酸酶的残基置换了共有肌醇六磷酸酶-1 中的下列活性位点残基和它的不同的相邻残基：

S89D, S92G, A94K, D164S, P201S, G203A, G205S, H212P, G224A, D226T, E255T, D256E, V258T, P265S, Q292H, G300K, Y305H, A314T, S364G, M365I, A397S, S398A, G404A, 和 A405S.

按照实施例 6 所述将新的共有肌醇六磷酸酶-7 的蛋白序列反译成 DNA 序列（图 11）。采用下列寡核苷酸混合物，按照实施例 6 所述方法合成相应的基因（fcp7）：

混合物 1.7: CP-1, CP-2, CP-3, CP-4.7, CP-5.7, CP-6, CP-7, CP-8.7, CP-9, CP-10.7

混合物 2.7: CP-9, CP-10.7, CP-11.7, CP-12.7, CP-13.7, CP-14.7, CP-15.7, CP-16, CP-17.7, CP-18.7, CP-19.7, CP-20, CP-21, CP-22.

寡核苷酸的 DNA 序列如图 11 所示。另外用数字 7 标记新合成的寡核苷酸。采用与实施例 6 所述的相同 PCR 引物合成寡核苷酸后，将基因克隆到实施例 11-13 中所述的表达载体上。

由多形汉逊氏酵母表达并提纯的共有肌醇六磷酸酶-7 的 PH-曲线与黑色曲霉 NRRL 3135 肌醇六磷酸酶的非常相似（见图 19）。

实施例 11

共有肌醇六磷酸酶基因在多形汉逊氏酵母中的表达

通过将 pBsk⁻fcf 或其变体的 EcoRI 片段插入多形汉逊氏酵母表达载体 pFPMT121 的多克隆位点上来构建用于转化多形汉逊氏酵母 RB11(Gellissen 等, 1994)的肌醇六磷酸酶表达载体, 其中该表达载体基于源自于酿酒酵母的 *ura3* 选择标记, 源自于多形汉逊氏酵母的甲酸脱氢酶 (FMD) 启动子元件和甲醇氧化酶 (MO) 终止子元件。fcf 基因的 5'端融合到 FMD 启动子上, 3'端融合到 MOX 终止子上 (Gellissen 等, 1996; EP0299108B) 中。产生的表达载体被命名为 pFPMTfcf, pFPMTfcf10, pFPMT fcf7。

将构建的质粒在大肠杆菌中进行繁殖。使用标准技术方法纯化质粒 DNA。采用 Gellissen 等 (1996) 所描述的制备感受态细胞和转化酵母的方法, 将表达质粒转化到乳清苷-5'-磷酸脱羧酶 (*ura3*) 缺陷的多形汉逊氏酵母菌株 RP11 中。将每一转化混合物平板接种到含有 2%葡萄糖和 1.8%琼脂的 YNB 平板 (0.14%w/v Difco YNB 和 0.5%的硫酸铵) 上并在 37℃ 下培养。4 至 5 天后, 挑出单个的转化菌落并在上述液体培养基中于 37℃ 下培养 2 天。接着将该培养物的一份等分试样用来接种到装有含 2%葡萄糖的 YNB-培养基的新鲜小瓶中。进一步在选择培养基中进行七次传代后, 表达载体以多聚体的形式被整合到酵母的基因组中。随后, 通过在 3ml 非-选择液体培养基 (YPD, 2%葡萄糖, 10g 酵母提取物和 20 g 蛋白胨) 中的两个附加培养步骤, 获得了有丝分裂稳定的转化子。为了获得基因同源重组菌株, 将最终稳定培养物的一份等分试样平板接种到选择平板上。分离单个菌落用于分析在以 2%甘油代替葡萄糖来抑制 *fmd* 启动子的 YNB 中肌醇六磷酸酶的表达。共有肌醇六磷酸酶的纯化按照实施例 12 所述的方法进行。

实施例 12

共有肌醇六磷酸酶基因在酿酒酵母中的表达和由培养上清液中肌醇六磷酸酶的纯化

从相应的 Bluescript-质粒 (pBsk⁻fcf, pBSK⁻fcf10, pBSK⁻fcf7) 中分离共有肌醇六磷酸酶基因并连入酿酒酵母表达载体 pYES2 (Invitrogen, San Diego, CA, 美国) 的表达盒的 EcoRI 位点或亚克隆到 Janes 等所描述 (1990) 的截短的 GAPFL (甘油醛-3-磷酸脱氢酶) 启动子和 *pho5* 终止子之间。采用 PCR 检测基因的正确取向。按照 Hinnen 等所述的方法 (1978) 转化酿酒酵母菌株, 例如 INVSc1 (Invitrogen, San Diego, CA, 美国)。挑选出含有由 GAPFL 启动子调控的肌醇六磷酸酶基因的单个菌落, 并在 5ml 选择培养基 (SD-尿嘧啶, Sherman 等,

1986) 中、于 30℃ 下剧烈振荡 (250rpm) 培养一天。然后将预培养物加到 500 ml YPD 培养基 (Sherman 等, 1986) 并在相同的条件下培养。按照产品说明书的方法诱导 Gal1 启动子。培养四天后的细胞培养液通过离心 (7000 rpm, GS3 转子, 15 分钟, 5℃) 去除细胞并通过采用 Amicon 8400 cells (PM30 膜) 和 ultrafree-15 离心过滤装置 (Biomax-30K, Millipore, Bedford, MA, 美国) 进行超滤来浓缩上清液。以 PH5.0 的 10mM 醋酸钠作为洗脱缓冲液将浓缩物 (10ml) 在一根 40 ml 的 Sephadex G25 Superfine 柱 (Pharmacia Biotech, Freiburg, 德国) 上脱盐。将脱盐样品加到 2M 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中并直接上样到 1ml 的 Butyl Sepharose4 快速流动疏水相互作用层析柱 (Pharmacia Biotech, Freiburg, 德国), 然后用溶于 PH5.0 的 10mM 醋酸钠的 2M 到 0M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的线性梯度进行洗脱。将肌醇六磷酸酶洗脱到临界点, 浓缩并上样到 120ml 的 Sephacryl S-300 凝胶渗透层析柱 (Pharmacia Biotech, Freiburg, 德国)。洗脱的共有肌醇六磷酸酶-1 和共有肌醇六磷酸酶-7 呈均匀的对称峰, 经 SDS-PAGE 分析纯度大约是 95%。

实施例 13

共有肌醇六磷酸酶基因在黑色曲霉中的表达

将 Bluescript-质粒 pBsk⁻fcf, pBSK⁻fcf10, 和 pBsk⁻fcf7 作为模板, 用于引入基因起始密码子上游的 BspHI-位点和终止密码子下游的 EcoRV-位点。使用具有下列引物的 Expand™ 高保真 PCR 试剂盒 (Boehringer Mannheim, Mannheim, 德国):

引物 Asp-1:

BspHI

5'-TATATCATGAGCGTGTTCGTCGTGCTACTGTTC-3' (SEQ ID No. 98)

用于克隆 fcf 和 fcf7 的引物 Asp-2:

EcoRV

3'-ACCCGACTTACAAAGCGAATTCTATAGATATAT-5' (SEQ ID No. 99)

用于克隆 fcf10 的引物 Asp-3:

EcoRV

3'-ACCCTTCTTACAAAGCGAATTCTATAGATATAT-5' (SEQ ID No. 100)

按照生产商提供的说明进行反应。PCR-扩增的 fcf 基因在起始密码子处具有通过引物 Asp-1 引入的新的 BspHI 位点, 结果导致第二个氨基酸残基甘氨酸

酸被丝氨酸置换。接着, 用 BspHI 和 EcoRV 消化 DNA-片段并接入黑色曲霉的葡萄糖淀粉酶启动子 (glaA) 下游的 NcoI 位点和构巢曲霉的色氨酸 C 终止子 (trpC) (Mullaney 等, 1985) 上游的 EcoRV 位点。完成这一克隆步骤后, 基因通过测序来检测由 PCR 引入的可能的衰退。产生的基本对应于 EP684313 中的实施例 9 所描述的 pGLAC 载体的表达质粒含有作为选择标记的粗糙链孢霉的乳清苷-5'-磷酸脱羧酶基因 (pyr4)。按照 EP684313 的方法转化黑色曲霉并进行共有肌醇六磷酸酶基因的表达。

实施例 14

肌醇六磷酸酶活性和温度最适值的测定

肌醇六磷酸酶活性基本上是按照 Mitchell 等 (1997) 所描述的方法测定的。在含有溶于 200mM 醋酸钠, PH5.0 的 0.5%肌醇六磷酸 ($\approx 5\text{mM}$) 的测定混合物中测定活性。在 37°C 培养 15 分钟后, 通过加入等体积的 15%三氯乙酸终止反应。通过将 100 μl 的测定混合物与 900 μl H_2O 和 1ml 的 0.6M H_2SO_4 , 2%的抗坏血酸和 0.5%的钼酸铵进行混合来定量测定释放出的磷酸。用标准磷酸钾溶液作对照。37 $^\circ\text{C}$ 下每分钟释放 1 μmol 的磷酸的酶量被定义为一个酶活性单位。通过采用由 Pace 等 (1995) 计算出的 280nm 下的酶消光系数测定下列蛋白质的浓度: 共有肌醇六磷酸酶-1, 1.101; 共有肌醇六磷酸酶-7, 1.068; 共有肌醇六磷酸酶-110, 1.039。

在 PH-最适值曲线图中, 用 PH5.0 的 10 mM 醋酸钠稀释纯化的酶。通过将稀释蛋白的等份样品与等体积的 1%肌醇六磷酸 ($\approx 10\text{mM}$) 混合在一系列不同的缓冲液: 0.4M 甘氨酸/HCl, PH2.5; 0.4M 乙酸/NaOH, PH3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5; 0.4M 咪唑/HCl, PH6.0, 6.5; 0.4M Tris/HCl, PH7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 中开始培养。对照实验表明 PH 只受混合步骤的轻微影响。如上所述培养在 37°C 下进行 15 分钟。

为了确定肌醇六磷酸酶的底物特异性, 测定混合物中的肌醇六磷酸分别被 5mM 浓度的各个磷酸化合物所替代。活性的测定如上所述。

为了确定温度最适值, 酶 (100 μl) 和底物溶液 (100 μl) 在给定的温度下预培养 5 分钟。通过将底物溶液加入到酶中开始反应。培养 15 分钟后, 加入三氯乙酸终止反应并测定释放的磷酸的量。

原始共有肌醇六磷酸酶的 PH-最适值大约为 PH6.0-6.5 (80U/mg)。引入 Q50T

突变后, PH-最适值变为 PH6.0 (130U/mg)。引入 K91A 突变后, PH-最适值变化一个 PH 单位成为酸性 PH-范围: PH2.5 至 PH6.0 之间, 这个范围内呈现较高的比活性。对于稳定的突变体和共有肌醇六磷酸酶-10 情况也是这样(图 15 和 16)。

将黑色曲霉 NRRL3135 肌醇六磷酸酶的催化特性转移给共有肌醇六磷酸酶-1 所构建的共有肌醇六磷酸酶-7 具有非常类似于黑色曲霉 NRRL3135 肌醇六磷酸酶的 PH-曲线图(见图 19)。共有肌醇六磷酸酶-7 的底物特异性也比类似于共有肌醇六磷酸酶-1 更类似于黑色曲霉 NRRL3135 肌醇六磷酸酶。

共有肌醇六磷酸酶-1 的温度最适值(71℃)比用于计算共有序列的野生型肌醇六磷酸酶的温度最适值(45-55℃, 表 7)高 16-26℃。改进的共有肌醇六磷酸酶-10 的温度最适值进一步增高到 80℃(图 12)。通过采用超量生产的酿酒酵母菌株的上清液, 发现共有肌醇六磷酸酶-1-热 [8]肌醇六磷酸酶的温度最适值在同一范围(78℃)内。共有肌醇六磷酸酶-10-热 [3]-Q50T-K91A 的最高温度最适值达到 82℃。

表 7: 共有肌醇六磷酸酶和源自于烟曲霉、黑色曲霉、*E.nidulans* 和嗜热毁丝菌的肌醇六磷酸酶温度最适值和 T_m -值。温度最适值的测定如实施例 14 所述进行。按照实施例 15 所述的差示扫描量热法测定 T_m -值。

肌醇六磷酸酶	温度最适值[℃]	T _m [℃]
共有肌醇六磷酸酶-10-热[3]-Q50T-K91A	82	89.3
共有肌醇六磷酸酶-10-热[3]-Q50T	82	88.6
共有肌醇六磷酸酶-10	80	85.4
共有肌醇六磷酸酶-1-热[8]-Q50T	78	84.7
共有肌醇六磷酸酶-1-热[8]-Q50T-K91A	78	85.7
共有肌醇六磷酸酶-1	71	78.1
黑色曲霉 NRRL3135	55	63.3
烟曲霉 13073	55	62.5
烟曲霉 13073	60	67.0
α -突变体		
烟曲霉 13073	63	-
α -突变体 (最优化的)		
土曲霉 9A-1	49	57.5
土曲霉 cbs. 116.46	45	58.5
E. nidulans	45	55.7
嗜热毁丝菌	55	n. d.
嗜热踝节菌	45	n. d.

实施例 15

采用差示扫描量热法 (DSC) 测定解链温度

采用以前由 Lehmann 等 (2000) 发表的差示扫描量热法来测定肌醇六磷酸酶的伸展温度。50–60mg/ml 的均质肌醇六磷酸酶溶液用于测定。以恒定的加热速率 10℃/分钟加热到 90–95℃。

测定的解链温度反应了获得的温度最适值的结果 (表 7)。所设计的最稳定的共有肌醇六磷酸酶是在选择条件下具有 89.3℃ 的解链温度的共有肌醇六磷酸酶-10-热 [3]-Q50T-K91A。这比使用的野生型肌醇六磷酸酶的解链温度高 26 至 33.6℃。

实施例 16

将担子菌纲肌醇六磷酸酶的活性位点转入共有肌醇六磷酸酶-10-热 [3]-Q50T-K91A 中

如前所述(实施例 8), 将源自于担子菌纲肌醇六磷酸酶活性位点的突变引入共有肌醇六磷酸酶-10 中。五个构建体 a) 至 e) 的制备如下:

a) 此构建体称作共有肌醇六磷酸酶-12, 其含有选定数目的 basidio 共有序列的活性位点残基。它的氨基酸序列(consphy12)如图 22 所示(头 26 个氨基酸形成信号肽, 修正的位置用下划线标出);

b) 将一组突变(Cluster II)转入共有肌醇六磷酸酶-10 序列中, 即:S80Q, Y86F, S90G, K91A, S92A, K93T, A94R, Y95I;

c) 类似地, 转入另一组突变(Cluster III), 即:T129V, E133A, Q143N, M136S, V137S, N138Q, S139A;

d) 类似地, 进一步转入一组突变(Cluster IV), 即:A168D, E171T, K172N, F173W;

e) 最后, 又进一步转入一组突变(Cluster IV), 即: Q297G, S298D, G300D, Y305T.

这些构建体按照实施例 11-13 所述进行表达。

参考文献

- Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N. & Oshima, T. (1998). 实验评价来自 *Bacillus subtilis* 的 3-异丙基苹果酸脱氢酶的热稳定性的系列增加, 蛋白质科学(Prot. Sci.)7, 698-705.
- Arase, A., Yomo, T., Urabe, I., Hata, Y., Katsube, Y. & Okada, H. (1993). 通过随机诱变稳定木聚糖酶. FEBS Lett. 316, 123-127.
- Berka, R.M., Rey, M.W., Brown, K.M., Byun, T. & Klotz, A.V. (1998). 来自嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* 的植酸酶基因的分子表征和表达. 应用环境微生物学(Appl. Environ. Microbiol.)64, 4423-4427.
- Blaber, M., Lindstrom, J.D., Gassner, N., Xu, J., Heinz, D.W. & Matthews, B.W. (1993). 在 T_4 溶菌酶中 Ala 'Ser 和 Val' Thr 取代所致的蛋白的核中埋入羟基的能量消耗和结构后果. 生物化学(Biochemistry)32, 11363-11373.
- Cosgrove, D.J. (1980) 肌醇磷酸 - 其化学, 生物化学和生理学: 无机化学研究, chapter 4. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York.
- Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) 全套 VAX 序列分析程序. 核酸研究(Nucleic Acids Res.)12, 387-395.
- Gellissen, G., Hollenberg, C.P., Janowicz, Z.A. (1994) 甲基营养酵母中的基因表达. In: Smith, A. (ed.) 重组微生物中的基因表达. Dekker, New York, 395-439.
- Gellissen, G., Piontek, M., Dahlems, U., Jenzelewski, V., Gavagan, J.E., DiCosimo, R., Anton, D.I. & Janowicz, Z.A. (1996) 重组多形汉逊氏酵母作为生物催化剂: 共表达菠菜乙醇酸氧化酶(GO)和酿酒酵母过氧化氢酶 T(CT1) 基因. 应用微生物生物技术(Appl. Microbiol. Biotechnol.)46, 46-54.
- Gerber, P. and Müller, K. (1995) Moloc 分子模拟软件. 计算机辅助分子设计杂志(J. Comput. Aided Mol. Des.)9, 251-268.
- Hinnen, A., Hicks, J.B. & Fink, G. R. (1978) 酵母转化. 美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)75, 1929-1933.
- Imanaka, T., Shibasaki, M. & Takagi, M. (1986). 增强蛋白酶热稳定性的一种新方法. 自然(Nature)324, 695-697.

- Janes, M., Meyhack, B., Zimmermann, W. & Hinnen, A. (1990) GAP 启动子变体对酿酒酵母中蛭素生产, 平均质粒拷贝数和细胞生长的影响. 当代遗传学(Curr. Genet.) 18, 97-103.
- Karpusas, M., Baase, W. A., Matsumura, M. & Matthews, B. W. (1989). 腔-填充突变体探测的 T4 溶菌酶中的疏水性堆积. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86, 8237-8241.
- Lehmann, L., Kostrewa, D., Wyss, M., Brugger, R., D' Arcy, A., Pasamontes, L., van Loon, A. (2000), 从 DNA 到改进的官能度: 用蛋白质序列比较来快速设计热稳定性共有植酸酶, 蛋白质工程(Protein Engineering) 13, 49-57.
- Margarit, I., Campagnoli, S., Frigerio, F., Grandi, G., Fillipis, V. D. & Fontana, A. (1992). 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶中甘氨酸-丙氨酸的置换的累积的稳定作用. Prot. Eng. 5, 543-550.
- Matthews, B. W. (1987a). 蛋白质稳定问题的遗传学和结构分析. Biochemistry 26, 6885-6888.
- Matthews, B. W. (1993). 蛋白质稳定性的结构和遗传分析. 生物化学年鉴(Annu. Rev. Biochem.) 62, 139-160.
- Matthews, B. W., Nicholson, H. & Becktel, W. (1987). 源自降低伸张熵的定点突变的增强的蛋白质热稳定性. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84, 6663-6667.
- Mitchell, D. B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L. & van Loon, A. P. G. M. (1997) 组氨酸酸性磷酸酶的植酸酶亚族: 从真菌 *Aspergillus terreus* 和 *Myceliophthora thermophila* 分离的两种新的植酸酶 微生物学(Microbiology)143, 245-252.
- Mullaney, E. J., Hamer, J. E., Roberti, K. A., Yelton, M. M. & Timberlake, W. E. (1985) *Aspergillus nidulans* 的 *trpc* 基因的一级结构. 分子遗传学(Mol. Gen. Genet.) 199, 37-46.
- Munoz, V. & Serrano, L. (1995). 螺旋设计, 预测和稳定性. 当代生物技术观点(Curr. Opin. Biotechnol). 6, 382-386.
- Pace, N. C., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995).

如何测量和预测蛋白质的摩尔吸收系数. *Prot. Sci.* 4, 2411-2423.

Pantoliano, M. W., Landner, R. C., Brian, P. N., Rollence, M. L., Wood, J. F. & Poulos, T. L. (1987). 枯草蛋白酶 BPN' 的蛋白质工程: 通过引入两个半胱氨酸形成二硫键而增强的稳定性. *Biochemistry* 26, 2077-2082.

Pasamontes, L., Haiker, M., Henriquez-Huecas, M., Mitchell, D. B. & van Loon, A. P. G. M. (1997a). 从 *Emericella nidulans* 和嗜热真菌 *Talaromyces thermophilus* 克隆植酸酶. *Biochim. Biophys. Acta* 1353, 217-223.

Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M. & van Loon, A. P. G. M. (1997) 真菌烟曲霉的热稳定的植酸酶克隆, 纯化和鉴定, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1696-1700.

Piddington, C. S., Houston, C. S., Paloheimo, M., Cantrell, M., Miettinen-Oinonen, A. Nevalainen, H., & Rambosek, J. (1993) 黑曲霉泡盛变种的植酸酶(phy)和 pH2.5-最适的酸性磷酸酶(aph)编码基因的克隆和测序. *基因(Gene)* 133, 55-62.

Purvis, I. J., Bettany, A. J. E., Santiago, T. C., Coggins, J. R., Duncan, K., Eason, R. & Brown, A. J. P. (1987). 通过控制体内翻译速率而增加一些蛋白质的折叠效率. *分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)* 193, 413-417.

Risse, B., Stempfer, G., Rudolph, R., Schumacher, G. & Jaenicke, R. (1992). *Lactobacillus plantarum* 的丙酮酸氧化酶的点突变的稳定作用的鉴定: 通过调节辅酶结合和亚基相交作用保护天然状态. *Prot. Sci.* 1, 1710-1718.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) 分子克隆: 实验手册, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sauer, R., Hehir, K., Stearman, R., Weiss, M., Jeitler-Nilsson, A., Suchanek, E. & Pabo, C. (1986). 改造的亚基间二硫键增强 1-阻抑蛋白的 N-末端区的稳定性和 DNA 结合. *Biochemistry* 25, 5992-5999.

- Serrano, L., Day, A. G. & Fersht, A. R. (1993). Step-wise mutation of barnase to binase. 一种改造增加蛋白质稳定性的方法和一种评价蛋白质稳定性的实验分析. *J. Mol. Biol.* 233, 305-312.
- Sheman, J. P., Finck, G. R. & Hicks, J. B. (1986) 酵母遗传学方法的实验手册. Cold Spring Harbor University.
- Steipe, B., Schiller, B., Plueckthun, A. & Steinbach, S. (1994). 序列统计可靠地预测蛋白质区域的稳定性突变. *J. Mol. Biol.* 240, 188-192.
- van den Burg, B., Vriend, G., Veltman, O. R., Venema & G., Eijsink, V.G.H. (1998). 工程改造酶以耐煮沸. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95, 2056-2060.
- Van Etten, R.L. (1982) 人前列腺酸式磷酸酶: 一种组氨酸磷酸酶. *Ann. NY Acad. Sci.* 390, 27-50.
- van Hartingsveldt, W., van Zeijl, C. M. F., Harteveld, G. M., Gouka, R. J., Suykerbuyk, M.E.G., Luiten, R. G. M., van Paridon, P. A., Selten, G. C. M., Veenstra, A. E., van Gorcom, R. F. M., & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1993) 黑曲霉的植酸酶-编码基因(phyA)的克隆, 定性和过表达. *Gene* 127, 87-94.

说明书附图

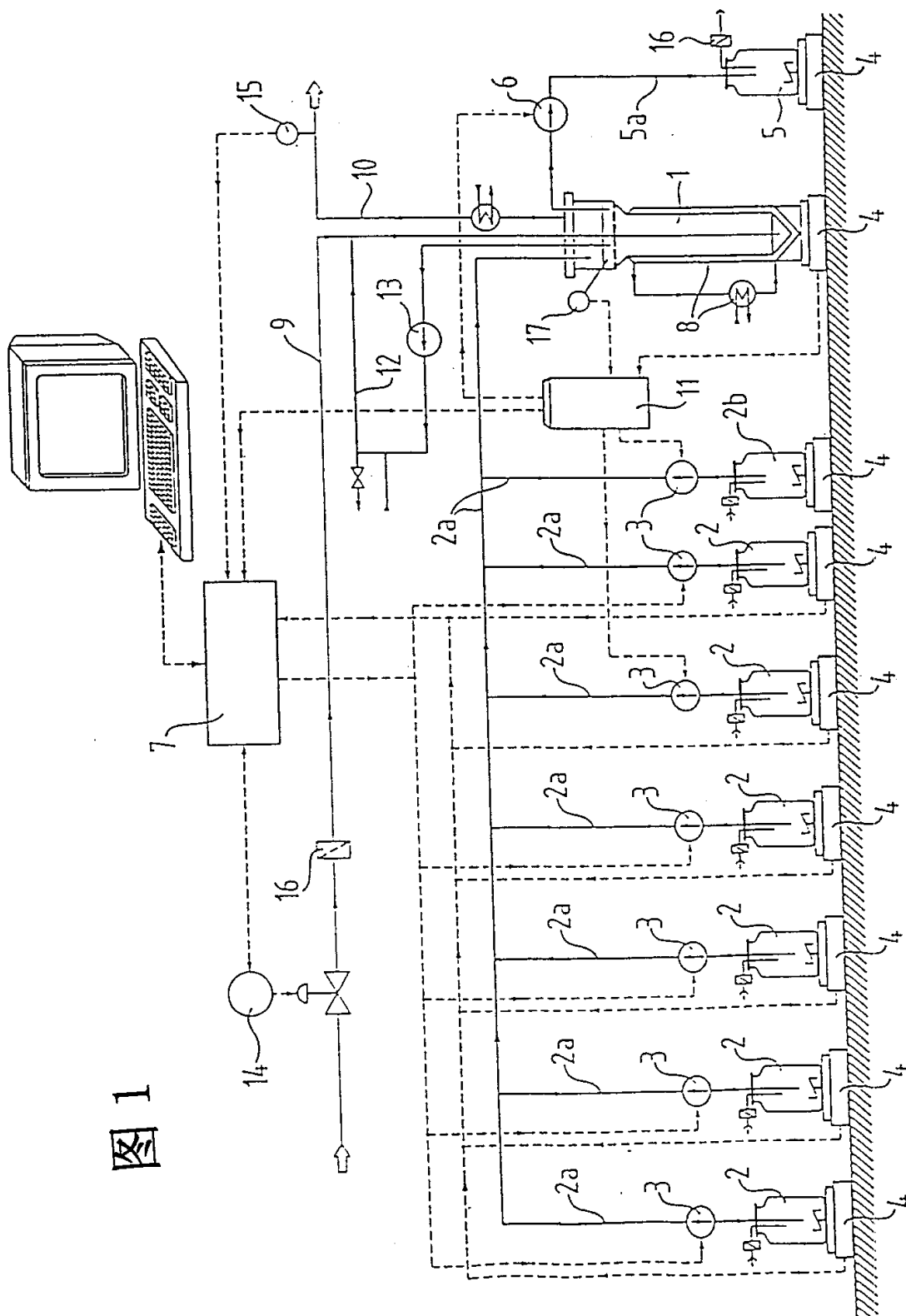


图 1

图 2

1		
50		
土曲霉	9A-1	KhsDCNSVDh GYQCFPELSH KWGLYAPYFS
LEDESPPFLD	VPEDChITFV	
土曲霉	cbs	NhsDCTSVDr GYQCFPELSH KWGLYAPYFS
LEDESPPFLD	VPDDChITFV	
黑色曲霉泡盛变种		NqsTCDTVdQ GYQCFSETSH LWGQYAPFFS
LANESAISPD	VPAGCrVTFA	
黑色曲霉 T213		NqsSCDTVdQ GYQCFSETSH LWGQYAPFFS
LANESVISPD	VPAGCrVTFA	
黑色曲霉 NRRL3135		NqsSCDTVdQ GYQCFSETSH LWGQYAPFFS
LANESVISPE	VPAGCrVTFA	
烟曲霉 13073		GskSCDTVd1 GYQCsPATSH LWGQYSPFFS
LEDELsvSSK	LPKDCrITLV	
烟曲霉 32722		GskSCDTVd1 GYQCsPATSH LWGQYSPFFS
LEDELsvSSK	LPKDCrITLV	
烟曲霉 58128		GskSCDTVd1 GYQCsPATSH LWGQYSPFFS
LEDELsvSSK	LPKDCrITLV	
烟曲霉 26906		GskSCDTVd1 GYQCsPATSH LWGQYSPFFS
LEDELsvSSK	LPKDCrITLV	
烟曲霉 32239		GskACDTvE1 GYQCsPGTSH LWGQYSPFFS
LEDELsvSSD	LPKDCrVTFV	
<i>E. nidulans</i>		QNHSCNTADG GYQCFPM/SH VWGQYSPYFS
IEQESAISed	VPHGCEvTFV	
<i>T. thermophilus</i>		DSHSCNTVEG GYQCrPEISH sWGQYSPFFS
LADQSEISPD	VPQNCkITFV	
<i>M. thermophila</i>		ESRPCDTpD1 GFQCgTAISH FWGQYSPYFS
VpSElDaS..	IPDDCeVTFA	
共有序列		NSHSCDTVdG GYQCFPEISH LWGQYSPYFS
LEDESAISPD	VPDDC-VTFV	
共有肌醇六磷酸酯		NSHSCDTVdG GYQCFPEISH LWGQYSPYFS
LEDESAISPD	VPDDCrVTFV	
51		
100		
土曲霉	9A-1	QVLARHGArS PThSKtKAYA AtIAAIQKSA
TaFpGKYAFL	QSYNYSLDSE	
土曲霉	cbs	QVLARHGArS PTDSKtKAYA AtIAAIQKNA
TaLpGKYAFL	KSYNYSMGSE	
黑色曲霉泡盛变种		QVLSRHGARY PTESKtKAYS ALIEEIQQNV
TtFDGKYAFL	KTYNYSLGAD	
黑色曲霉 T213		QVLSRHGARY PTESKtKAYS ALIEEIQQNV
TtFDGKYAFL	KTYNYSLGAD	
黑色曲霉 NRRL3135		QVLSRHGARY PTDSKtKAYS ALIEEIQQNA
TtFDGKYAFL	KTYNYSLGAD	
烟曲霉 13073		QVLSRHGARY PTSSKsKXYK KLVTAlQaNa
TdFKGKFAFL	KTYNYTLGAD	
烟曲霉 32722		QVLSRHGARY PTSSKsKXYK KLVTAlQaNa
TdFKGKFAFL	KTYNYTLGAD	
烟曲霉 58128		QVLSRHGARY PTSSKsKXYK KLVTAlQaNa
TdFKGKFAFL	KTYNYTLGAD	
烟曲霉 26906		QVLSRHGARY PTSSKsKXYK KLVTAlQaNa
TdFKGKFAFL	KTYNYTLGAD	
烟曲霉 32239		QVLSRHGARY PTASKsKXYK KLVTAlQKNA
TeFKGKFAFL	ETNYNYTLGAD	

E. nidulans QVLSRHGARY PTESKsKAYS GLIEAIQKNA
 TsFwGQYAFI ESYNITLGAD
T. thermophilus QLLSRHGARY PTSSKtElys QLISrIQKTA
 TaYKGyYAFI KDYrYqLGAN
M. thermophila QVLSRHGARA PtlKRaaSYv DLIDrIHhGA
 IsYgPgYEFL RTYDYTLGAD

 共有序列 QVLSRHGARY PTSSK-KAYS ALIEAIQKNA T-
 FKGGYAFI KTYNITLGAD
 共有肌醇六磷酸酯 QVLSRHGARY PTSSKSKAYS ALIEAIQKNA
 TAFKGGYAFI KTYNITLGAD

101

150
 土曲霉 9A-1 ELTPFGrNQL rDlGaQFYeR YNALTRhInP
 FVRATDASRV hESAeKFVEG
 土曲霉 cbs NLTPFGrNQL qDlGaQFYRR YDTLTrhInP
 FVRAADSSRV hESAeKFVEG
 黑色曲霉泡盛变种 DLTPFGEQEL VNSGIKFYQR YESLTrNIIP
 FIRSSGSSRV IASGEKFIEG
 黑色曲霉 T213 DLTPFGEQEL VNSGIKFYQR YESLTrNIIP
 FIRSSGSSRV IASGEKFIEG
 黑色曲霉 NRRL3135 DLTPFGEQEL VNSGIKFYQR YESLTrNIIP
 FIRSSGSSRV IASGKKFIEG
 烟曲霉 13073 DLTPFGEQQL VNSGIKFYQR YKALARSVVP
 FIRASGSDRV IASGEKFIEG
 烟曲霉 32722 DLTPFGEQQL VNSGIKFYQR YKALARSVVP
 FIRASGSDRV IASGEKFIEG
 烟曲霉 58128 DLTPFGEQQL VNSGIKFYQR YKALARSVVP
 FIRASGSDRV IASGEKFIEG
 烟曲霉 26906 DLTAfGEQQL VNSGIKFYQR YKALARSVVP
 FIRASGSDRV IASGEKFIEG
 烟曲霉 32239 DLTPFGEQQM VNSGIKFYQK YKALAgSVVP
 FIRSSGSDRV IASGEKFIEG
E. nidulans DLTI FGEnQM VDSGaKFYRR YKNLARKnTP
 FIRASGSDRV VASAeKFING
T. thermophilus DLTPFGEnQM IQlGIKFYnH YKSLARNAVP
 FVRCSGSDRV IASGrIFIEG
M. thermophila ELTRtGQQQM VNSGIKFYRR YRALARKsIP
 FVRTAGqDRV VhSAENFTQG

 共有序列 DLTPFGEnQM VNSGIKFYRR YKALARK-VP
 FVRASGSDRV IASAeKFIEG
 共有肌醇六磷酸酯 DLTPFGEnQM VNSGIKFYRR YKALARKIVP
 FIRASGSDRV IASAeKFIEG

151

200
 土曲霉 9A-1 FQTARqDDHh ANpHQSPPrV DVaIPEGSAY
 NNTLEHSICT AFES...STV
 土曲霉 cbs FQNARqGDPh ANpHQSPPrV DVVIPEGTAY
 NNTLEHSICT AFEA...STV
 黑色曲霉泡盛变种 FQSTKLkDPr AqpgQSSPKI DVVISEASSs
 NNTLDPGTCT VFED...SEL
 黑色曲霉 T213 FQSTKLkDPr AqpgQSSPKI DVVISEASSs
 NNTLDPGTCT VFED...SEL
 黑色曲霉 NRRL3135 FQSTKLkDPr AqpgQSSPKI DVVISEASSs
 NNTLDPGTCT VFED...SEL
 烟曲霉 13073 FQqAKLADPG A.TNRAAPAI SVIIPESETF
 NNTLDHGVCT KFEA...SQL
 烟曲霉 32722 FQqAKLADPG A.TNRAAPAI SVIIPESETF
 NNTLDHGVCT KFEA...SQL
 烟曲霉 58128 FQqAKLADPG A.TNRAAPAI SVIIPESETF
 NNTLDHGVCT KFEA...SQL
 烟曲霉 26906 FQqAKLADPG A.TNRAAPAI SVIIPESETF
 NNTLDHGVCT KFEA...SQL
 烟曲霉 32239 FQqANVADPG A.TNRAAPVI SVIIPESETY
 NNTLDHVSCT NFEA...SEL
 E. nidulans FRKAQLhDHG S..gQATPVV NVIIPeIDGF
 NNTLDHSTCV SFEN...DEr
 T. thermophilus FQSAKVLDPH SDkHDAPPTI NVIIeEGPSY
 NNTLDtGSCP VFED...SSg
 M. thermophila FHSALADRG STvRPTlPyd mVVIPEtAGa
 NNTLHNDICT AFEEgpySTI
 共有序列 FQSAKLADPG S-PHQASpVI NVIIPeGSGY
 NNTLDHGTCT AFED---SEL
 共有肌醇六磷酸酶 FQSAKLADPG SQPHQASpVI DVIIPeGSGY
 NNTLDHGTCT AFED...SEL

201

250
 土曲霉 9A-1 GDDAVANFTA VFAPAIAQRL EADLPGVqLS
 TDDVVnLMAM CPFETVSLTD
 土曲霉 cbs GDAAADNFTA VFAPAIAkRL EADLPGVqLS
 ADDVVnLMAM CPFETVSLTD
 黑色曲霉泡盛变种 ADTVEANFTA TFAPSIRQRL ENDLSGVTLT
 DTEVTyLMDM CSFDTISStST
 黑色曲霉 T213 ADTVEANFTA TFAPSIRQRL ENDLSGVTLT
 DTEVTyLMDM CSFDTISStST
 黑色曲霉 NRRL3135 ADTVEANFTA TFVPSIRQRL ENDLSGVTLT
 DTEVTyLMDM CSFDTISStST
 烟曲霉 13073 GDEVAANFTA 1FAPDIRARA EKHLPGVTLT
 DEDVVSLMDM CSFDTVARTS
 烟曲霉 32722 GDEVAANFTA 1FAPDIRARA EKHLPGVTLT
 DEDVVSLMDM CSFDTVARTS
 烟曲霉 58128 GDEVAANFTA 1FAPDIRARA EKHLPGVTLT
 DEDVVSLMDM CSFDTVARTS
 烟曲霉 26906 GDEVAANFTA 1FAPDIRARA EKHLPGVTLT
 DEDVVSLMDM CSFDTVARTS
 烟曲霉 32239 GDEVEANFTA 1FAPAIRARI EKHLPGVqLT
 DDDVVSLMDM CSFDTVARTS
 E. nidulans ADEIEANFTA IMGPPIRKRL ENDLPGIKLT
 NENViYLMMD CSFDTMARTA
 T. thermophilus GHDAQEKFAK qFAPAIIEKI KDHLPGVDLA
 vSDVpyLMDL CPFETLARNh
 M. thermophila GDDAQDTYIS TFAGPITARV NANLPGANLT
 DADTVaLMDL CPFETVASSS

共有序列

LMDM CPFETVARTS

共有肌醇六磷酸酶

DEDVVYLMDM CPFETVARTS

GDDAEANFTA TFAPAIRARL EADLPGVTLT DEDVV-

GDDVEANFTA LFAPAIRARL EADLPGVTLT

251

300
 土曲霉 : 9A-1DAhTLSPFC DLFTAcEWtq
 YNYLISLDKY YGYGGGNPLGDAhTLSPFC DLFTAcEWtq
 土曲霉 : cbsDAhTLSPFC DLFTAcEWtq
 YNYLISLDKY YGYGGGNPLGVDTKLSPFC DLFTHdEWih
 黑色曲霉泡盛变种 : yamoriVDTKLSPFC DLFTHdEWih
 YDYLQSLKKY YGHGAGNPLGVDTKLSPFC DLFTHdEWih
 黑色曲霉 : T213VDTKLSPFC DLFTHdEWih
 YDYLRLSLKKY YGHGAGNPLGVDTKLSPFC DLFTHdEWih
 黑色曲霉 : NRRL3135DASQLSPFC QLFTHnEWkk
 YDYLQSLKKY YGHGAGNPLGDASQLSPFC QLFTHnEWkk
 烟曲霉 : 13073DASQLSPFC QLFTHnEWkk
 YNYLQSLGKY YGYGAGNPLGDASQLSPFC QLFTHnEWkk
 烟曲霉 : 32722DASQLSPFC QLFTHnEWkk
 YNYLQSLGKY YGYGAGNPLGDASQLSPFC QLFTHnEWkk
 烟曲霉 : 58128DASQLSPFC QLFTHnEWkk
 YNYLQSLGKY YGYGAGNPLGDASQLSPFC QLFTHnEWkk
 烟曲霉 : 26906DASELSPFC AIFTHnEWkk
 YNYLQSLGKY YGYGAGNPLGDASELSPFC AIFTHnEWkk
 烟曲霉 : 32239HGTLSLSPFC AIFTEKEWlq
 YDYLQSLGKY YGYGAGNPLGHGTLSLSPFC AIFTEKEWlq
 E. nidulansTDT.LSPFC ALSTQeEWqa
 T. thermophilussdpatadagg gNGrPLSPFC rLFSEsEWra
 YDYYQSLGKY YGnGGGNPLGDATELSLSPFC ALFTE-EW--
 M. thermophilaDATELSLSPFC ALFTHDEWRQ
 YDYLQSVGKW YGYGPGNPLG
 共有序列
 YDYLQSLGKY YGYGAGNPLG
 共有肌醇六磷酸酶
 YDYLQSLGKY YGYGAGNPLG

350
 土曲霉 9A-1 PVQGVGWaNE LMARLTRA PV HDHTCVNN TL
 DASPATFPLN ATLYADFSHD
 土曲霉 cbs PVQGVGWaNE LIARLTRSPV HDHTCVNN TL
 DANPATFPLN ATLYADFSHD
 黑色曲霉泡盛变种 PTQGVGYaNE LIARLTHSPV HDDTSSNHTL
 DSNPATFPLN STLYADFSHD
 黑色曲霉 T213 PTQGVGYaNE LIARLTHSPV HDDTSSNHTL
 DSNPATFPLN STLYADFSHD
 黑色曲霉 NRRL3135 PTQGVGYaNE LIARLTHSPV HDDTSSNHTL
 DSSPATFPLN STLYADFSHD
 烟曲霉 13073 PAQGIGFcNE LIARLTRSPV QDHTSTNStL
 VSNPATFPLN ATMYVDFS HD
 烟曲霉 32722 PAQGIGFcNE LIARLTRSPV QDHTSTNStL
 VSNPATFPLN ATMYVDFS HD
 烟曲霉 58128 PAQGIGFcNE LIARLTRSPV QDHTSTNStL
 VSNPATFPLN ATMYVDFS HD
 烟曲霉 26906 PAQGIGFcNE LIARLTRSPV QDHTSTNStL
 VSNPATFPLN ATMYVDFS HD
 烟曲霉 32239 PAQGIGFcNE LIARLTNSPV QDHTSTNStL
 DSDPATFPLN ATLYVDFS HD
 E. nidulans PAQGIGFcNE LIARLTQSPV QDNTSTNHTL
 DSNPATFPLD rKLYADFS HD
 T. thermophilus PAQGVGFvNE LIARLTHSPV QDYTTVNHTL
 DSNPATFPLN ATLYADFS HD
 M. thermophila PTQGVGFvNE LLARLAGvPV RDgTSTNRTL
 DGDPrTFPLG rPLYADFS HD
 共有序列 PAQGVGF-NE LIARLTHSPV QDHTSTNHTL
 DSNPATFPLN ATLYADFS HD
 共有肌醇六磷酸酶 PAQGVGFANE LIARLTRSPV QDHTSTNHTL
 DSNPATFPLN ATLYADFS HD

400
 土曲霉 9A-1 SNLVSIFWAL GLYNGTAPLS qTSVESVSQT
 DGYAAAWTVP FAARAYVEMM
 土曲霉 cbs SNLVSIFWAL GLYNGTkPLS qTTVEDITrT
 DGYAAAWTVP FAARAYIEMM
 黑色曲霉泡盛变种 NGIISILFAL GLYNGTkPLS TTTVENITQT
 DGFSSAWTVP FASRLYVEMM
 黑色曲霉 T213 NGIISILFAL GLYNGTkPLS TTTVENITQT
 DGFSSAWTVP FASRLYVEMM
 黑色曲霉 NRRL3135 NGIISILFAL GLYNGTkPLS TTTVENITQT
 DGFSSAWTVP FASRLYVEMM
 烟曲霉 13073 NSMVSIFFAL GLYNGTEPLS rTSVESaKE1
 DGYSASWVVP FGARAYFetM
 烟曲霉 32722 NSMVSIFFAL GLYNGTGPLS rTSVESaKE1
 DGYSASWVVP FGARAYFetM
 烟曲霉 58128 NSMVSIFFAL GLYNGTEPLS rTSVESaKE1
 DGYSASWVVP FGARAYFetM
 烟曲霉 26906 NSMVSIFFAL GLYNGTEPLS rTSVESaKE1
 DGYSASWVVP FGARAYFetM
 烟曲霉 32239 NGMIPIFFAM GLYNGTEPLS qTSeESTKES
 NGYSASWAVP FGARAYFetM
 E. nidulans NSMISIFFAM GLYNGTQPLS mDSVESIQEm
 DGYAASWTVP FGARAYFetM
 T. thermophilus NTMTSIFaAL GLYNGTAKLS TTEIKSIEET
 DGYSAAWTVP FGGRAYIEMM
 M. thermophila NDMMGVLgAL GaYDGVPPLD KTArrDpEE1
 GGYAASWAVP FAARIYVEKM

共有序列
DGYAASWTVP FGARAYVEMM NSMISIFFAL GLYNGTAPLS TTSVESIEET
共有肌醇六磷酸酶
DGYSASWTVP FGARAYVEMM NSMISIFFAL GLYNGTAPLS TTSVESIEET

450
土曲霉 9A-1 QC.....RAEKE PLVRVLVNR
VMPLHGCTD KLGRCKrDAF
土曲霉 cbs QC.....RAEKQ PLVRVLVNR
VMPLHGCAVD NLGRCKrDDF
黑色曲霉泡盛变种 QC.....QAEQE PLVRVLVNR
VVPLHGCPID aLGRCTrDSF
黑色曲霉 T213 QC.....QAEQE PLVRVLVNR
VVPLHGCPID aLGRCTrDSF
黑色曲霉 NRRL3135 QC.....QAEQE PLVRVLVNR
VVPLHGCPVD aLGRCTrDSF
烟曲霉 13073 QC.....KSEKE PLVRALINDR
VVPLHGCDVD KLGRCKLNDF
烟曲霉 32722 QC.....KSEKE PLVRALINDR
VVPLHGCDVD KLGRCKLNDF
烟曲霉 58128 QC.....KSEKE SLVRALINDR
VVPLHGCDVD KLGRCKLNDF
烟曲霉 26906 QC.....KSEKE PLVRALINDR
VVPLHGCDVD KLGRCKLNDF
烟曲霉 32239 QC.....KSEKE PLVRALINDR
VVPLHGCAVD KLGRCKLKDF
E. nidulans QC.....E.KKE PLVRVLVNR
VVPLHGCAVD KFGRCTLDDW
T. thermophilus QC.....DDSDE PVVRVLVNR
VVPLHGCEVD SLGRCKrDDF
M. thermophila RCsggggggg ggegrQEKE eMVRVLVNR
VMTLkGCGAD ErGMCTLerF

共有序列 QC-----QAEKE PLVRVLVNR
VVPLHGCAVD KLGRCKLDDF
共有肌醇六磷酸酶 QC.....QAEKE PLVRVLVNR
VVPLHGCAVD KLGRCKRDDF

471
土曲霉 9A-1 VAGLSFAQAG GNWADCF~~~
土曲霉 cbs VEGLSFARAG
GNWAECF~~~
黑色曲霉泡盛变种 VrGLSFARSG GDWAECsa~~~
黑色曲霉 T213 VrGLSFARSG GDWAECFA~~~
黑色曲霉 NRRL3135 VrGLSFARSG
GDWAECFA~~~
烟曲霉 13073 VKGLSWARSG GNWGECFS~~~
烟曲霉 32722 VKGLSWARSG GNWGECFS~~~
烟曲霉 58128 VKGLSWARSG GNWGECFS~~~
烟曲霉 26906 VKGLSWARSG GNWGECFS~~~
烟曲霉 *igatus* 32239 VKGLSWARSG
GNSEQSFS~~~
E. nidulans VEGLNfARSG GNWkTCFTl~
T. thermophilus VrGLSFARqG GNWEGCYAas e
M. thermophila IESMAFARGN GKWDlCFA~~~

共有序列 VEGLSFARSG GNWAECFA--
共有肌醇六磷酸酶 VEGLSFARSG GNWAECFA..

图 3

CP-1

Eco RI M G V F V V L L S I A T L F G S T
TATATGAATTCATGGGCGTGTTCGTCTGCTACTGTCCATTGCCACCTTGTTCGGTTCCA

1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

ATATACTTAAGTACCCGCACAAGCAGCAGCATGACAGGTAACGGTGAACAAGCCAAGGT

S G T A L G P R G N S H S C D T V D G G
CATCCGGTACCGCCTTGGGTCTCGTGGTAATTCTCACTCTTGTGACACTGTTGACGGTG

61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120

GTAGGCCATGGCGGAACCCAGGAGCACCATTAAAGAGTGACAACACTGTGACAACCTGCCAC

CP-2

CP-3

Y Q C F P E I S H L W G Q Y S P Y F S L
GTTACCAATGTTCCCGAAATTTCTCACTTGTGGGGTCAATACTCTCCATACTTCTCTT

121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180

CAATGGTTACAAAGGGTCTTTAAAGAGTGAACACCCCAGTTATGAGAGGTATGAAGAGAA

E D E S A I S P D V P D D C R V T F V Q
TGGAAGACGAATCTGCTATTTCTCCAGACGTTCCAGACGACTGTAGAGTTACTTTCGTTT

181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240

ACCTTCTGCTTAGACGATAAAGAGGTCTGCAAGGTCTGCTGACATCTCAATGAAAGCAAG

CP-4

CP-5

V L S R H G A R Y P T S S K S K A Y S A
AAGTTTGTCTAGACACGGTGTAGATACCCAACTTCTTCTAAGTCTAAGGCTTACTCTG

241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300

TTCAAAACAGATCTGTGCCACGATCTATGGGTGAAGAAGATTCAGATTCCGAATGAGAC

L I E A I Q K N A T A F K G K Y A F L K

CTTTGATTGAAGCTATTCAAAAGAACGCTACTGCTTTCAAGGGTAAGTACGCTTCTTGA

301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360

GAAACTAACTTCGATAAGTTTTCTTGCGATGACGAAAGTTCCCATTCATGCGAAAGAACT

CP-6

CP-7

T Y N Y T L G A D D L T P F G E N Q M V

AGACTTACAACACTACACTTTGGGTGCTGACGACTTGACTCCATTCGGTGAAAACCAATGG

361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420

TCTGAATGTTGATGTGAAACCCACGACTGCTGAACTGAGGTAAGCCACTTTTGGTTTACC

N S G I K F Y R R Y K A L A R K I V P F

TTAACTCTGGTATTAAGTTCTACAGAAGATACAAGGCTTTGGCTAGAAAGATTGTTCCAT

421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480

AATTGAGACCATAATTCAAGATGTCTTCTATGTTCCGAAACCGATCTTTCTAACAAGGTA

CP-8

CP-9

I R A S G S D R V I A S A E K F I E G F

TCATTAGAGCTTCTGGTTCTGACAGAGTTATTGCTTCTGCTGAAAAGTTCATTGAAGGTT

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540

AGTAATCTCGAAGACCAAGACTGTCTCAATAACGAAGACGACTTTCAAGTAACTTCCAA

Q S A K L A D P G S Q P H Q A S P V I D
TCCAATCTGCTAAGTTGGCTGACCCAGGTTCTCAACCACACCAAGCTTCTCCAGTTATTG

541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600

AGGTTAGACGATTCAACCGACTGGGTCCAAGAGTTGGTGTGGTTCGAAGAGGTCAATAAC

CP-10

CP-11

V I I P E G S G Y N N T L D H G T C T A
ACGTTATTATTCCAGAAGGATCCGGTTACAACAACACTTTGGACCACGGTACTTGTACTG

601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660

TGCAATAATAAGGTCTTCCTAGGCCAATGTTGTTGTGAAACCTGGTGCCATGAACATGAC

F E D S E L G D D V E A N F T A L F A P
CTTTCGAAGACTCTGAATTGGGTGACGACGTTGAAGCTAACTTCACTGCTTTGTTGCTC

661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720

GAAAGCTTCTGAGACTTAACCCACTGCTGCAACTTCGATTGAAGTGACGAAACAAGCGAG

CP-12

A I R A R L E A D L P G V T L T D E D V
CAGCTATTAGAGCTAGATTGGAAGCTGACTTGCCAGGTGTTACTTTGACTGACGAAGACG

721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780

GTCGATAATCTCGATCTAACCTTCGACTGAACGGTCCACAATGAAACTGACTGCTTCTGC

CP-13

V Y L M D M C P F E T V A R T S D A T E
TTGTTTACTTGATGGACATGTGTCCATTGAAACTGTTGCTAGAACTTCTGACGCTACTG

781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840

AACAAATGAACTACCTGTACACAGGTAAGCTTTGACAACGATCTTGAAGACTGCGATGAC

L S P F C A L F T H D E W R Q Y D Y L Q

AATTGTCTCCATTCTGTGCTTTGTTCACTCAGACGAATGGAGACAATACGACTACTTGC

841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900

TTAACAGAGGTAAGACACGAAACAAGTGAGTGCTGCTTACCTCTGTTATGCTGATGAACG

CP-14

CP-15

S L G K Y Y G Y G A G N P L G P A Q G V

AATCTTTGGGTAAGTACTACGGTTACGGTGCTGGTAACCCATTGGGTCCAGCTCAAGGTG

901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960

TTAGAAACCCATTCATGATGCCAATGCCACGACCATTGGGTAACCCAGGTGCGAGTTCCAC

G F A N E L I A R L T R S P V Q D H T S

TTGGTTTCGCTAACGAATTGATTGCTAGATTGACTAGATCTCCAGTTCAAGACCACACTT

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020

AACCAAAGCGATTGCTTAACTAACGATCTAACTGATCTAGAGGTCAAGTTCTGGTGTGAA

CP-16

CP-17

T N H T L D S N P A T F P L N A T L Y A

CTACTAACCCACACTTTGGACTCTAACCCAGCTACTTTCCCATTGAACGCTACTTTGTACG

1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

GATGATTGGTGTGAAACCTGAGATTGGGTGCGATGAAAGGGTAACCTGCGATGAAACATGC

00-10-00

D F S H D N S M I S I F F A L G L Y N G
CTGACTTCTCTCAGGACAACTCTATGATTTCTATTTTCTTCGCTTGGGTTTGTACAACG

1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1140
GACTGAAGAGAGTGCTGTTGAGATACTAAAGATAAAAAGAAGCGAAACCCAAACATGTTGC

CP-18

CP-19

T A P L S T T S V E S I E E T D G Y S A
GTACTGCTCCATTGTCTACTACTTCTGTTGAATCTATTGAAGAACTGACGGTTACTCTG

1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1200
CATGACGAGGTAACAGATGATGAAGACAACCTTAGATAACTTCTTTGACTGCCAATGAGAC

S W T V P F G A R A Y V E M M Q C Q A E
CTTCTTGGACTGTTCCATTGGTGCTAGAGCTTACGTTGAAATGATGCAATGTCAAGCTG

1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1260
GAAGAACCTGACAAGGTAAGCCACGATCTCGAATGCAACTTTACTACGTTACAGTTCGAC

CP-20

CP-21

K E P L V R V L V N D R V V P L H G C A
AAAAGGAACCATTTGGTTAGAGTTTGGTTAACGACAGAGTTGTTCCATTGCACGGTTGTG

1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1320
TTTTCCTTGGTAACCAATCTCAAAACCAATTGCTGTCTCAACAAGGTAACGTGCCAACAC

Basidio S-P-R-TAAQ LPIP-Q-Q-- WSPYSPYFPV A-Y-APPAGC QI-
QVNIIQR

51

100

卷边桩菇 (phyA1) HGARFPTSGA TTRIKAGLTK LQGvqnftDA KFNFIKsÉKY
dLGnsDLVPP

卷边桩菇 (phyA2) HGARFPTSGA ATRIKAGLSK LQSVqnftDP KFDfIKsÉTY
dLGtsDLVPP

绒毛栓菌 HGARFPTSGA AKRIQTAVAK LKAAsnyTDP lLAFVtNyTY
sLGqDsLVeL

平田头菇 HGARFPTSGA GTRIQAavKk LQSAktyTDP RLDFLtnTY
tLGhDDLVPF

P. lycii HGARWPTSGA rSRqVAavAK IQmArpftDP KYEFLnDéVY
kFGvADLLPF

Basidio HGARFPTSGA ATRIQAavAK LQSA---TDP KLDFL-N-TY -LG-
DDLVPF

101

150

卷边桩菇 (phyA1) GAaQsfDAGQ EAFARYSkLV SKnDLPFIRA dGSDRVVDSA
TNWTAGFAsA

卷边桩菇 (phyA2) GAaQsfDAGl EvFARYSkLV SsDNLPFIRS dGSDRVVDTA
TNWTAGFAsA

绒毛栓菌 GaTQSSEAGQ EAFTRYSSLV SaDELPPFVRA SGSDRVVATA
nNWTAGFAIA

平田头菇		GAlQSSQAGE ETFqRYSfLV SKENLPFVRA SSSNRVVDSA
TNWTEGFSaA		
<i>P. lycii</i>		GAnQShQTGt DmYTRYStLf egGDVPFVRA AGdQRVVDSS
TNWTAGFGdA		
Basidio		GA-QSSQAGQ EAFTRYs-LV S-DNLPPFVRA SGSDRVVDSA
TNWTAGFA-A		
	151	
200		
卷边桩菇	(phyA1)	ShNTvqPkLn LILPQtGNDT LEDNMCPaAG DSDPQvNaWL
AVafPSITAR		
卷边桩菇	(phyA2)	SrNAiqPkLd LILPQtGNDT LEDNMCPaAG ESDPQvDaWL
AsafPSVTAQ		
绒毛栓菌		SsNSitPvLs VIISEaGNDT LDDNMCPaAG DSDPQvNqWL
AqFAPPMTAR		
平田头菇		ShHvlnPiLf VILSEsINDT LDDaMCPaAG sSDPQtGiWt
SIYGTPIAnR		
<i>P. lycii</i>		SgETvlPtLq VVLqEeGNcT LcNNMCPnEv DGDest.tWL
GVFAPnITAR		
Basidio		S-NT--P-L- VILSE-GNDT LDDNMCP-AG DSDPQ-N-WL
AVFAPPITAR		
	201	
250		
卷边桩菇	(phyA1)	LNAAAPSVNL TDtDAfNLvs LCAFlTVSKE kKSdFCtLFE
giPGsFeAFa		

卷边桩菇 giPGsFeAFa	(phyA2) LNAAAPGANL TDaDAfNLvs LCPFmTVSkE qkSdFcLFE
绒毛栓菌 elQAE.dAFa	LNAGAPGANL TDtDTyNLlt LCPFETVAcE rrSeFCDIYE
平田头菇 .tPEEFaqFe	LNqqAPGANI TAaDvsNLip LCAFETIvKE tpSpFCNLf.
<i>P. lycii</i> .tAEEYvSYe	LNAAAPSANL SDsDAItLmd MCPFDTLSSG naSpFCDLf.
Basidio AF-	LNAAAPGANL TD-DA-NL-- LCPFETVS-E --S-FCDLFE --PEEF-

251

300

卷边桩菇 NTQTNRTLDA	(phyA1) YgGDLDKfYG TGYGQeLGPV QGVGYVNELI ARLTnsAVRD
卷边桩菇 NTQTNRTLDA	(phyA2) YaGDLDKfYG TGYGQALGPV QGVGYINELL ARLTnsAVnD
绒毛栓菌 HTQTNsTLDS	YnADLDKfYG TGYGQPLGPV QGVGYINELI ARLTaQnVsD
平田头菇 NTQTNRTLDS	YfGDLDKfYG TGYGQPLGPV QGVGYINELL ARLTemPVRD
<i>P. lycii</i> ETQTNRTLDS	YyyDLdkYYG TGpGNALGPV QGVGYVNELL ARLtgQAVRD
Basidio NTQTNRTLDS	Y-GDLDKfYG TGYGQPLGPV QGVGYINELL ARLT-QAVRD

301

350

卷边桩菇 (phyA1) SPvTFPLNKT FYADFSHDN1 MVAVFSAMGL FrQPAPLsTS
vPNPwRTWrT

卷边桩菇 (phyA2) APdTFPLNKT MYADFSHDN1 MVAVFSAMGL FrQSAPLsTS
tPDPNRTWLT

绒毛栓菌 SPeTFPLNRT LYADFSHDNQ MVAIFSAMGL FNQSAPLDPT
tPDPaRTFLv

平田头菇 SP1TFPLDRS IYADLSHDNQ MIAIFSAMGL FNQSSPLDPS
fPNPKRTWVT

P. lycii dPaTFPLNRT FYADFSHDNt MVPIFAALGL FNAtA.LDP1
kPDeNRLWVd

Basidio SP-TFPLNRT FYADFSHDNQ MVAIFSAMGL FNQSAPLDPS -
PDPNRTWVT

351

400

卷边桩菇 (phyA1) SsLVPFSGRM VVERLsC...f GT.....tkV
RVLVQDqVQP

卷边桩菇 (phyA2) SsVVPFsARM aVERLsC...a GT.....tkV
RVLVQDqVQP

绒毛栓菌 kKIVPFsARM VVERLdC...g GA.....GsV
RLLVNDaVQP

平田头菇 SRLtPFsARM VtERLlCqrd GTgsgggsri mrngnvqtFV
RILVNDALQP

P. lycii SKLVPFSGHM tVEKLaC... ..sg'keav
RVLVNDaVQP

```

Basidio          SKLVPFsARM VVERL-C--- GT-----V
RVLVNDAVQP

401                                     441

卷边桩菇      (phyA1) LEFCGGDrNG lCTLakFVES QtFARsDGaG DFEKCFATSa ~
卷边桩菇      (phyA2) LEFCGGDqDG lCALDkFVES QaYARsGGaG DFEKCLATTv ~
绒毛栓菌      LAFCGADtsG vCTLDAFVES QaYARNDGEG DFEKCFAT~~~
平田头菇      LKFCGGDmDS lCTLEAFVES QkYAREDGQG DFEKCFD~~~
P. lycii      LEFCGG.vDG vCeLsAFVES QtYARENGQG DfAKCgfvPs e

Basidio          LEFCGGD-DG -CTLDAFVES Q-YAREDGQG DFEKCFATP-

```

图 5 :

		1	
50			
土曲霉	9a1	KhSDCNSVDh	GYQCfPELSH KWGLYAPYFS LqDESPFPID
VPeDCHITFV			
土曲霉	cbs	NhsdCtSVDr	GYQCfPELSH KWGLYAPYFS LqDESPFPID
VPdDCHITFV			
黑色曲霉泡盛变种		NqSTCDTVDq	GYQCfSEtSH LWGQYAPFFS LANESAISPD
VPaGCRVTFa			
黑色曲霉	NRRL3135	NqsSCDTVDq	GYQCfSEtSH LWGQYAPFFS LANESVISPE
VPaGCRVTFa			
烟曲霉	13073	GskSCDTVD1	GYQCSPAtSH LWGQYSPFFS LEDELVSSSK
LPkDCRITLV			
烟曲霉	32722	GskSCDTVD1	GYQCSPAtSH LWGQYSPFFS LEDELVSSSK
LPkDCRITLV			
烟曲霉	58128	GskSCDTVD1	GYQCSPAtSH LWGQYSPFFS LEDELVSSSK
LPkDCRITLV			
烟曲霉	26906	GskSCDTVD1	GYQCSPAtSH LWGQYSPFFS LEDELVSSSK
LPkDCRITLV			
烟曲霉	32239	GskACDTVE1	GYQCSPGtSH LWGQYSPFFS LEDELVSSSD
LPkDCRVTFV			
E. nidulans		QNHSCNTaDG	GYQCfPNVSH VWGQYSPYFS IEQESAISED
VPhGCeVTFV			
T. thermophilus		DSHSCNTVEG	GYQCrPEISH SWGQYSPFFS LADQSEISPD
VPqNCKITFV			
T. lanuginosa		-----rvDIAR	hWGQYSPFFS LAEvSEISPA
VPkGCRVeFV			

M. thermophila ESRPCDTpDl GFQCgTAISH FWGQYSPYFS VPSElDaS..
 IPdDCeVTFa

Basidio xSxPxrxxtAA qLPipxQxqx xWSPYSPYFP VAXyxA....
 pPaGCQIxqV

共有序列 NSHSCDTVDG GYQC-PEISH LWGQYSPFFS LADESAISPD VP-
 GCRVTFV

Fcp10 NSHSCDTVDG GYQCFPEISH LWGQYSPFFS LADESAISPD
 VPKGCRVTFV

51

100

土曲霉 9a1 QVLARHGARS PThSKTKaYA AtIaAIQKSA TaFpGKYAFL
 QSYNYSLDSE

土曲霉 cbs QVLARHGARS PTdSKTKaYA AtIaAIQKNA TaLpGKYAFL
 KSYNYSMGSE

黑色曲霉泡盛变种 QVLSRHGARY PTeSKGKKYS ALIeEIQQNv TtFDGKYAFL
 KTYNYSLGAD

黑色曲霉 NRRL3135 QVLSRHGARY PTdSKGKKYS ALIeEIQQNA TtFDGKYAFL
 KTYNYSLGAD

烟曲霉 13073 QVLSRHGARY PTSSKSKKYk kLVtAIQaNA TdFKGKFAFL
 KTYNYTLGAD

烟曲霉 32722 QVLSRHGARY PTSSKSKKYk kLVtAIQaNA TdFKGKFAFL
 KTYNYTLGAD

烟曲霉 58128 QVLSRHGARY PTSSKSKKYk kLVtAIQaNA TdFKGKFAFL
 KTYNYTLGAD

烟曲霉 26906 QVLSRHGARY PTSSKSKKYk kLVtAIQaNA TdFKGKFAFL
 KTYNYTLGAD

烟曲霉	32239	QVLSRHGARY PTASKSKKYk KLVtAIQKNA TeFKGKFAFL
ETYNNTLGAD		
<i>E. nidulans</i>		QVLSRHGARY PTeSKSKaYS GLIeAIQKNA TsFwGQYAFL
ESYNYTLGAD		
<i>T. thermophilus</i>		QLLSRHGARY PTSSKTelyS qLIsrIQKtA TaYKGyYAFL
KdYrYqLGAN		
<i>T. lanuginosa</i>		QVLSRHGARY PTAhkSEvYA ELLqrIQDtA TeFKGDFAFL
RdYaYhLGAD		
<i>M. thermophila</i>		QVLSRHGARA PtlkRAasYv DLIdrIHhGA isYgPgYEFL
RTYDYTLGAD		
Basidio		NIIqrHGARF PTSGaAtRiq AaVakLQsax xxtDPKLDFL
xnxtYxLGxD		
共有序列		QVLSRHGARY PTSSKSKKYS ALI-AIQKNA T-FKGKYAFL
KTYNNTLGAD		
Fcp10		QVLSRHGARY PTSSKSKKYS ALIEAIQKNA TAFKGKYAFL
KTYNNTLGAD		

101

150

土曲霉	9a1	ELTPFGrNQL rDlGaQFYeR YNAL.TRhIn PFVRATDAsR
VhESAeKFVE		
土曲霉	cbs	NLTPFGrNQL qDlGaQFYRR YDTL.TRhIn PFVRAADSSR
VhESAeKFVE		

黑色曲霉泡盛变种		DLTPFGEQEL VNSGIKFYQR YESL.TRnII PFIRSSGSsR
VIASGEKFIE		
黑色曲霉	NRRL3135	DLTPFGEQEL VNSGIKFYQR YESL.TRnIV PFIRSSGSsR
VIASGKKFIE		
烟曲霉	13073	DLTPFGEQQL VNSGIKFYQR YKAL.ARsVV PFIRASGSDR
VIASGEKFIE		
烟曲霉	32722	DLTPFGEQQL VNSGIKFYQR YKAL.ARsVV PFIRASGSDR
VIASGEKFIE		
烟曲霉	58128	DLTPFGEQQL VNSGIKFYQR YKAL.ARsVV PFIRASGSDR
VIASGEKFIE		
烟曲霉	26906	DLTAFGEQQL VNSGIKFYQR YKAL.ARsVV PFIRASGSDR
VIASGEKFIE		
烟曲霉	32239	DLTPFGEQQM VNSGIKFYQR YKAL.AgsVV PFIRSSGSDR
VIASGEKFIE		
<i>E. nidulans</i>		DLTiFGENQM VDSGaKFYRR YKnL.ARknt PFIRASGSDR
VVASAEKFIN		
<i>T. thermophilus</i>		DLTPFGENQM IQlGIKFYnH YKSL.ARnaV PFVRCGSDR
VIASGrIFIE		
<i>T. lanuginosa</i>		NLTRFGEEQM MESGrQFYHR YREq.AReIV PFVRAAGSAR
VIASAEfFnr		
<i>M. thermophila</i>		ELTRtGQQQM VNSGIKFYRR YPAL.ARksI PFVRTAGqDR
VVhSAENftQ		
Basidio		DLvPFGAxQs sQAGqEaFtR YsxLvSxdnL PFVRASGSDR
VVDSAtNWtA		
共有序列		DLTPFGEQQM VNSGIKFYRR YKAL-AR-IV PFVRASGSDR
VIASAEKFIE		
Fcp10		DLTPFGEQQM VNSGIKFYRR YKAL.ARKIV PFVRASGSDR
VIASAEKFIE		

151

200

土曲霉	9a1	GFQTARqDDh hAnphQPSPz VDVaIPEGsA YNNTLEHSLC
TAFES...St		
土曲霉	cbs	GFQNARqGDP hAnphQPSPz VDVVIPEGtA YNNTLEHSIC
TAFEa...St		
黑色曲霉泡盛变种		GFQSTKLkDP rAqpgQSSPk IDVWISEAsS sNNTLDpGtC
TvFEd...SE		
黑色曲霉	NRRL3135	GFQSTKLkDP rAqpgQSSPk IDVWISEAsS sNNTLDpGtC
TvFEd...SE		
烟曲霉	13073	GFQqAKLADP gAt.nRAAPa ISVIIPESet FNNTLDHGVC
TkFEa...SQ		
烟曲霉	32722	GFQqAKLADP gAt.nRAAPa ISVIIPESet FNNTLDHGVC
TkFEa...SQ		
烟曲霉	58128	GFQqAKLADP gAt.nRAAPa ISVIIPESet FNNTLDHGVC
TkFEa...SQ		
烟曲霉	26906	GFQqAKLADP gAt.nRAAPa ISVIIPESet FNNTLDHGVC
TkFEa...SQ		
烟曲霉	32239	GFQqANVADP gAt.nRAAPV ISVIIPESet YNNTLDHSVC
TnFEa...SE		
<i>E. nidulans</i>		GFRkaQLhDh g.s.gQATPV VNVIIPeIdG FNNTLDHStC
vSFEn...dE		
<i>T. thermophilus</i>		GFQSAKVlDP hSdKhDAPPt INVIIeEGpS YNNTLDtGSc
PvFEd...Ss		
<i>T. lanuginosa</i>		GFQdAKdrDP rSnkdQAePV INVIISEEtG sNNTLDgltC
PAaEe...Ap		
<i>M. thermophila</i>		GFHSALLADR gStvrPTlPy dmVVIPEtAG aNNTLHNDLC
TAFEegPySt		

Basidio GFaxA..... ..sxntxxPx LxVILSExg. .NDTLDDNMC
PxAG

共有序列 GFQSAKLADP -A---QASPV INVIIPEG-G YNNTLDHGLC
 TAFE--P-SE

Fcp10 GFQSAKLADP GANPHQASPV INVIIPEGAG YNNTLDHGLC
 TAFEE...SE

201

250

土曲霉 9a1 VGDDavANFT AVFAPAIaqR LEAdLPGVQL StDDVVNLMA
 MCPFETVSlt

土曲霉 cbs VGDAaADNFT AVFAPAIakR LEAdLPGVQL SADDVVNLMA
 MCPFETVSlt

黑色曲霉泡盛变种 LADtVEANFT AtFAPSIRqR LEndLSGVtL TDtEVtyLMD
 MCSFDTIStS

黑色曲霉 NRRL3135 LADtVEANFT AtFvPSIRqR LEndLSGVtL TDtEVtyLMD
 MCSFDTIStS

烟曲霉 13073 LGDEVAANFT ALFAPdIRAR aEkhlPGVtL TDdVVSLMD
 MCSFDTVArT

烟曲霉 32722 LGDEVAANFT ALFAPdIRAR aEkhlPGVtL TDdVVSLMD
 MCSFDTVArT

烟曲霉 58128 LGDEVAANFT ALFAPdIRAR aEkhlPGVtL TDdVVSLMD
 MCSFDTVArT

烟曲霉 26906 LGDEVAANFT ALFAPdIRAR aKkhLPGVtL TDdVVSLMD
 MCSFDTVArT

烟曲霉 32239 LGDEVEANFT ALFAPAIRAR IEkhLPGVQL TDDdVVSLMD
 MCSFDTVArT

<i>E. nidulans</i>		rADEIEANFT AIMGPPIRkR LEndLPGIKL TNENVIyLMD
MCSFDTMArT		
<i>T. thermophilus</i>		gGHDaQEKFk qkFAPAIkK IKDhLPGVDL AvsDVpyLMD
LCPFETLA:n		
<i>T. lanuginosa</i>		.DptqpAEFl qVFGPRVlkK ItkhMPCGVNL TLEDVplFMD
LCPFDTVGsd		
<i>M. thermophila</i>		IGDDaQDtYl StFAGPItAR VNAnLPGaNL TDADtVaLMD
LCPFETVAsS		
Basidio		dSDpqxnXWl AVFAPPItAR LNAAApgANL TDxDaxNLxx
LCPFETVS..		
	共有序列	LGDDVEANFT AVFAPPiRAR LEA-LPGVNL TDEDVVNLMD
MCPFDtVA-T		
	Fcp10	LGDDVEANFT AVFAPPiRAR LEAHLPGVNL TDEDVVNLMD
MCPFDtVART		
		251
300		
土曲霉	9a1	dD..Aht... ..LSPF CDLFta...tE WtQYNYLlSL
dKYYGYGGGN		
土曲霉	cbs	dD..Aht... ..LSPF CDLFta...aE WtQYNYLlSL
dKYYGYGGGN		
黑色曲霉泡盛变种		Tv..DTK... ..LSPF CDLFTH...dE WtHYDYlQSL
kKYYGHGAGN		
黑色曲霉 · NRRL3135		Tv..DTK... ..LSPF CDLFTH...dE WtNYDYlQSL
kKYYGHGAGN		
烟曲霉	13073	SD..ASQ... ..LSPF CQLFTH...nE WkXNYlQSL
gKYYGYGAGN		

烟曲霉	32722	SD..ASQ... ..LSPF CQLFTH..nE WkKYNYLQSL
gKYYGYGAGN		
烟曲霉	58128	SD..ASQ... ..LSPF CQLFTH..nE WkKYNYLQSL
gKYYGYGAGN		
烟曲霉	26906	SD..ASQ... ..LSPF CQLFTH..nE WkKYNYLQSL
gKYYGYGAGN		
烟曲霉	32239	AD..ASE... ..LSPF CAIFTH..nE WkKYDYLQSL
gKYYGYGAGN		
<i>E. nidulans</i>		AH..GTE... ..LSPF CAIFTE..kE WlQYDYLQSL
sKYYGYGAGS		
<i>T. thermophilus</i>		ht..DT.... ..LSPF CALStQ..eE WqaYDYQSL
gKYYGnGGGN		
<i>T. lanuginosa</i>		PvlfPrQ... ..LSPF CHLFTa..dD WmaYDYyTL
dKYYSHGGGS		
<i>M. thermophila</i>		SsdpATadag ggngRpLSPF CrLFSE..sE WraYDYLQSV
gKWYGYGPGN		
Basidio		xexxSxF CDLFexxpeE FxaFyXgdL
dKFYGTGyGQ		
共有序列		SD--ATQ--- ----LSPF CDLFTH---E W-QYDYLQSL -
KYYGYGAGN		
Fcp10		SD..ATQ... ..LSPF CDLFTH..DE WlQYDYLQSL
GKYYGYGAGN		
	301	
	350	
土曲霉	9a1	PLGPvQGVGW aNELMARLTR A.PVHDHTCV NNTLDASPAT
FPLNATLYAD		

土曲霉	cbs	PLGPvQGvGW aNELIARLTR S.PVHDHTCV NNTLDANPAT
FPLNATLYAD		
黑色曲霉泡盛变种		PLGPTQGVGY aNELIARLTH S.PVHDDTSS NHTLDSNPAT
FPLNSTLYAD		
黑色曲霉	NRRL3135	PLGPTQGVGY aNELIARLTH S.PVHDDTSS NHTLDSSPAT
FPLNSTLYAD		
烟曲霉	13073	PLGPAQGIGF tNELIARLTR S.PVQDHTST NsTLvSNPAT
FPLNATMYvD		
烟曲霉	32722	PLGPAQGIGF tNELIARLTR S.PVQDHTST NsTLvSNPAT
FPLNATMYvD		
烟曲霉	58128	PLGPAQGIGF tNELIARLTR S.PVQDHTST NsTLvSNPAT
FPLNATMYvD		
烟曲霉	26906	PLGPAQGIGF tNELIARLTR S.PVQDHTST NsTLvSNPAT
FPLNATMYvD		
烟曲霉	32239	PLGPAQGIGF tNELIARLTN S.PVQDHTST NsTLvSDPAT
FPLNATIYvD		
<i>E. nidulans</i>		PLGPAQGIGF tNELIARLTQ S.PVQDNTST NHTLDSNPAT
FPLDrkLYAD		
<i>T. thermophilus</i>		PLGPAQGVGF vNELIARMTg S.PVQDYTTV NHTLDSNPAT
FPLNATLYAD		
<i>T. lanuginosa</i>		AFGpSRGVGF vNELIARMTg NLPVKDHTTV NHTLDGnPET
FPLDAvLYAD		
<i>M. thermophila</i>		PLGPTQGVGF vNELLARLA. GvPVRDgTST NRTLGDPrT
FPLGrPLYAD		
Basidio		PLGPvQGvGY iNELLARLTx qa.VRDNTqT NRTLDSsPxT
FPLNcTFYAD		
共有序列		PLGPAQGVGF -NELIARLTH S-PVQDHTST NHTLDSNPAT
FPLNATLYAD		

Fcp10 PLGPAQGVGF VNELIARLTH S.PVQDHTST NHTLDSNPAT

FPLNATLYAD

351

400

土曲霉	9a1	FSHDSnLVSI FWALGLYNGT aPLSQtSVE. .SvsQTDGYA
AAWTVPFAAR		
土曲霉	cbs	FSHDSnLVSI FWALGLYNGT kPLSQtTVE. .ditrTDGYA
AAWTVPFAAR		
黑色曲霉泡盛变种		FSHDNGIISI LFALGLYNGT kPLSTTTVE. .NitQTDGFS
SAWTVPFASR		
黑色曲霉	NRRL3135	FSHDNGIISI LFALGLYNGT kPLSTTTVE. .NitQTDGFS
SAWTVPFASR		
烟曲霉	13073	FSHDNSMVSI FFALGLYNGT ePLSrTSVE. .SaKElDGYS
ASWvVPFGAR		
烟曲霉	32722	FSHDNSMVSI FFALGLYNGT gPLSrTSVE. .SaKElDGYS
ASWvVPFGAR		
烟曲霉	58128	FSHDNSMVSI FFALGLYNGT ePLSrTSVE. .SaKElDGYS
ASWvVPFGAR		
烟曲霉	26906	FSHDNSMVSI FFALGLYNGT ePLSrTSVE. .SaKElDGYS
ASWvVPFGAR		
烟曲霉	32239	FSHDNGMIPI FFAMGLYNGT ePLSQtSeE. .S:KESNGYS
ASWAVPFGAR		
<i>E. nidulans</i>		FSHDNSMISI FFAMGLYNGT qPLSmdSVE. .SiQEmDGYA
ASWTVPFGAR		
<i>T. thermophilus</i>		FSHDNTMtSI FaALGLYNGT akLSTTeIK. .SiEETDGYS
AAWTVPFGGR		
<i>T. lanuginosa</i>		FSHDNTMtGI FsAMGLYNGT kPLSTSKIQP pTgAAADGYA
ASWTVPFAAR		

M. thermophila FSHDNdMMGV LgALGaYDGv pPLdkTA..R rdpEElGGYA
ASWAVPFAAR

Basidio FSHDNqMVAI FsAMGLFNqS aPLdPSxpDP nrt.....Wv
TSklVPFSAR

共有序列 FSHDNTMVS I FFALGLYNGT -PLSTTSVEP -S-EETDGYA
ASWTVPFAAR

Fcp10 FSHDNTMVS I FFALGLYNGT KPLSTTSVE. .SIEETDGYA
ASWTVPFAAR

401

450

土曲霉 9a1 AYVEMMQC.. ra.....EKEPL VRVLVNDVRM
PLHGCPtDKL

土曲霉 cbs AYIEMMQC.. ra.....EKQPL VRVLVNDVRM
PLHGCAVDNL

黑色曲霉泡盛变种 1YVEMMQC.. Qa.....EQEPL VRVLVNDRVV
PLHGCPIDaL

黑色曲霉 NRRL3135 1YVEMMQC.. Qa.....EQEPL VRVLVNDRVV
PLHGCPVDaL

烟曲霉 13073 AYfEtMQC.. Ks.....EKEPL VRaLINDRVV
PLHGCDVDKL

烟曲霉 32722 AYfEtMQC.. Ks.....EKEPL VRaLINDRVV
PLHGCDVDKL

烟曲霉 58128 AYfEtMQC.. Ks.....EKESL VRaLINDRVV
PLHGCDVDKL

烟曲霉 26906 AYfEtMQC.. Ks.....EKEPL VRaLINDRVV
PLHGCDVDKL

烟曲霉	32239	AYfEtMQC.. Ks.....EKEPL VRaLINDRVV
PLHGCAVDKL		
<i>E. nidulans</i>		AYfELMQC.. E.....KKEPL VRVLVNDRVV
PLHGCAVDKF		
<i>T. thermophilus</i>		AYIEMMQC.. Dd.....sDEPV VRVLVNDRVV
PLHGCEVDsL		
<i>T. lanuginosa</i>		AYVELLRC.. Etetsseeee EG...EDEPF VRVLVNDRVV
PLHGCrVDRW		
<i>M. thermophila</i>		iYVEkMRC.. sggggggggg EGrqeKDEeM VRVLVNDRVM
TLkGCGaDEr		
Basidio		mvVERLxCxx xgtxxxxxxxx xxxxxxxxxxx VRVLVNDaVq
PLEfCGgDxd		
共有序列		AYVEMMQC-- E-----EG---EKEPL VRVLVNDRVV
PLHGCGVDKL		
Fcp10		AYVEMMQC.. EA.....EKEPL VRVLVNDRVV
PLHGCGVDKL		
	451	482
土曲霉	9a1	GRCKrDAFVA GLSFAQAG.. GNWADCF--- --
土曲霉	cbs	GRCKrDDFVE GLSFARAG.. GNWAECF--- --
黑色曲霉泡盛变种		GRCTrDsFVr GLSFARSG.. GDWAECsA-- --
黑色曲霉	NRRL3135	GRCTrDsFVr GLSFARSG.. GDWAECFA-- --
烟曲霉	13073	GRCKlNDFVK GLSWARSG.. GNWGECS-- --
烟曲霉	32722	GRCKlNDFVK GLSWARSG.. GNWGECS-- --
烟曲霉	58128	GRCKlNDFVK GLSWARSG.. GNWGECS-- --
烟曲霉	26906	GRCKlNDFVK GLSWARSG.. GNWGECS-- --
烟曲霉	igatus 32239	GRCKlKDFVK GLSWARSG.. GNSEQSFS-- --

E. nidulans GRClDDWVE GLNFARSG.. GNWktCFTl- --
T. thermophilus GRCKrDDFVr GLSFARqG.. GNWEGCYAas e-
T. lanuginosa GRCRrDEWIK GLTFARqG.. GHWDrCF--- --
M. thermophila GmCtlerFIE SMAFARGN.. GKWDlCFA-- --
Basidio GxCtlDAFVE SqxYAReDgq GDFEKCFatp xx

共有序列 GRCK-DDFVE GLSFARSG-- GNWEECFa-- --

Fcp10 GRCKRDDFVE GLSFARSG.. GNWEECFa.. ..

图 6

CP-1

Eco RI M G V F V V L L S I A T L F G S T 17
TATATGAATTCATGGGCGTGTTCGTCGTGCTACTGTCCATTGCCACCTTGTTGGGTCCA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ATATACTTAAGTACCCGCACAAGCAGCAGCATGACAGGTAACGGTGGAACAAGCCAAGGT

S G T A L G P R G N S H S C D T V D G G 37
CATCCGGTACCGCCTTGGGTCCTCGTGGTAATTCTCACTCTTGACACTGTTGACGGTG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GTAGGCCATGGCGGAACCCAGGAGCACCATTAAAGAGTGAGAACACTGTGACAACCTGCCAC

CP-2

CP-3.10

Y Q C F P E I S H L W G Q Y S P F S L 57
GTTACCAATGTTTCCAGAAATTTCTCACTTGTGGGGTCAATACTCTCCATTCTTCTCTT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180

CAATGGTTACAAAGGGTCTTTAAAGAGTGAACACCCCAGTTATGAGAGGTAAGAAGAGAA

A D E S A I S P D V P K G C R V T F V Q 77

TGGCTGACGAATCTGCTATTTCTCCAGACGTTCCAAAGGGTTGTAGAGTTACTTTTCGTTC

181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240

ACCGACTGCTTAGACGATAAAGAGGTCTGCAAGGTTTCCCGACATCTCAATGAAAGCAAG

CP-4.10

CP-5.10

V L S R H G A R Y P T S S K S K K Y S A 97

AAGTTTTGTCTAGACACGGTGCTAGATACCCAACCTTCTTCTAAGTCTAAGAAGTACTCTG

241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300

TTCAAAACAGATCTGTGCCACGATCTATGGGTTGAAGAAGATTCAGATTCTTCATGAGAC

L I E A I Q K N A T A F K G K Y A F L K 117

CTTTGATTGAAGCTATTCAAAAGAACGCTACTGCTTTCAAGGGTAAGTACGCTTTCTTGA

301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360

GAACTAACTTCGATAAGTTTTCTTGCATGACGAAAGTTCCCATTCATGCGAAAGAAGT

CP-6

CP-7.10

T Y N Y T L G A D D L T P F G E Q Q M V 137

AGACTTACAACCTACACTTTGGGTGCTGACGACTTGACTCCATTCGGTGAACAACAAATGG

361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420

TCTGAATGTTGATGTGAAACCCACGACTGCTGAACTGAGGTAAGCCACTTGTGTTTACC

N S G I K F Y R R Y K A L A R K I V P F 157

TTAACTCTGGTATTAAGTTCTACAGAAGATACAAGGCTTTGGCTAGAAAGATTGTTCCAT

421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480

AATTGAGACCATAATTCAAGATGTCTTCTATGTTCCGAAACCGATCTTTCTAACAAGGTA

CP-8.10

CP-9.10

V R A S G S D R V I A S A E K F I E G F 177
TCGTTAGAGCTTCTGGTTCTGACAGAGTTATTGCTTCTGCTGAAAAGTTCATTGAAGGTT

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540

AGCAATCTCGAAGACCAAGACTGTCTCAATAACGAAGACGACTTTTCAAGTAACTTCCAA

Q S A K L A D P G A N P H Q A S P V I N 197
TCCAATCTGCTAAGTTGGCTGACCCAGGTGCTAACCCACACCAAGCTTCTCCAGTTATTA

541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600

AGGTTAGACGATTCAACCGACTGGGTCCACGATTGGGTGTGGTTCGAAGAGGTCAATAAT

CP-10.10

CP-11.10

V I I P E G A G Y N N T L D H G L C T A 217
ACGTTATTATTCCAGAAGGTGCTGGTTACAACAACACTTTGGACCACGGTTTGTGTACTG

601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660

TGCAATAATAAGGTCTTCCACGACCAATGTTGTTGTGAAACCTGGTGCCAAACACATGAC

F E E S E L G D D V E A N F T A V F A P 237
CTTTCGAAGAATCTGAATTGGGTGACGACGTTGAAGCTAACTTCACTGCTGTTTTCGCTC

661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720

GAAAGCTTCTTAGACTTAACCCACTGCTGCACTTCGATTGAAGTGACGACAAAAGCGAG

CP-12.10

P I R A R L E A H L P G V N L T D E D V 257
 CACCTATTAGAGCTAGATTGGAAGCTCACTTGCCAGGTGTTAACTTGACTGACGAAGACG
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 GTGGATAATCTCGATCTAACCTTCGAGTGAACGGTCCACAATTGAACTGACTGCTTCTGC

CP-13.10

V N L M D M C P F D T V A R T S D A T Q 277
 TTGTTAACTTGATGGACATGTGTCCATTGACACTGTTGCTAGAACTTCTGACGCTACTC
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 AACAAATTGAACTACCTGTACACAGGTAAGCTGTGACAACGATCTTGAAGACTGCGATGAG

L S P F C D L F T H D E W I Q Y D Y L Q 297
 AATTGTCTCCATTCTGTGACTTGTTCACTCAGACGAATGGATTCAATACGACTACTTGC
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 TTAACAGAGGTAAGACACTGAACAAGTGAGTGCTGCTTACCTAAGTTATGCTGATGAACG

CP-14.10CP-15.10

S L G K Y Y G Y G A G N P L G P A Q G V 317
 AATCTTTGGGTAAGTACTACGGTTACGGTGCTGGTAACCCATTGGGTCCAGCTCAAGGTG
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 TTAGAAACCCATTTCATGATGCCAATGCCACGACCATTGGGTAACCCAGGTCGAGTTCCAC

G F V N E L I A R L T H S P V Q D H T S 337
 TTGGTTTCGTTAACGAATTGATTGCTAGATTGACTCACTCTCCAGTTCAAGACCACACTT

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1020
AACCAAAGCAATTGCTTAACTAACGATCTAACTGAGTGAGAGGTCAAGTTCTGGTGTGAA
CP-16.10
CP-17.10
T N H T L D S N P A T F P L N A T L Y A 357
CTACTAACCACACTTTGGACTCTAACCCAGCTACTTTCCCATTGAACGCTACTTTGTACG
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1080
GATGATTGGTGTGAAACCTGAGATTGGGTCGATGAAAGGGTAACTTGCGATGAAACATGC
D F S H D N T M V S I F F A L G L Y N G 377
CTGACTTCTCTCACGACAACACTATGGTTTCTATTTTCTTCGCTTTGGGTTTGTACAACG
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1140
GACTGAAGAGAGTGCTGTTGTGATACCAAAGATAAAAGAAGCGAAACCCAAACATGTTGC
CP-18.10
CP-19.10
T K P L S T T S V E S I E E T D G Y A A 397
GTACTAAGCCATTGTCTACTACTTCTGTTGAATCTATTGAAGAACTGACGGTTACGCTG
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1200
CATGATTGCGTAACAGATGATGAAGACAACTTAGATAACTTCTTTGACTGCCAATGCGAC
S W T V P F A A R A Y V E M M Q C E A E 417

CTTCTTGGACTGTTCCATTGCTGCTAGAGCTTACGTTGAAATGATGCAATGTGAAGCTG
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1260
 GAAGAACCTGACAAGGTAAGCCACGATCTCGAATGCAACTTTACTACGTTACACTTCGAC

CP-20.10
CP-21.10
 K E P L V R V L V N D R V V P L H G C G 437
 AAAAGGAACCATTGGTTAGAGTTTGGTTAACGACAGAGTTGTTCCATTGCACGGTTGTG
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1320
 TTTTCCTTGGTAACCAATCTCAAAACCAATTGCTGTCTCAACAAGGTAACGTGCCAACAC

 V D K L G R C K R D D F V E G L S F A R 457
 GTGTTGACAAGTTGGGTAGATGTAAGAGAGACGACTTCGTTGAAGGTTTGTCTTTCGCTA
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1380
 CACAACCTGTTCAACCCATCTACATTCTCTGCTGAAGCAACTTCCAACAGAAAGCGAT

CP-22.10
 S G G N W E E C F A * Eco RI 467
 GATCTGGTGGTAACTGGGAAGAATGTTTCGCTTAAGAATTCATATA
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1426
 CTAGACCACCATTGACCCTTCTTACAAAGCGAATTCTTAAGTATAT

1

50

卷边桩菇	(phyA1)	-----	-FPipeseqR nWSPYSPYFP LAEyKA....
pPaGCQInqV			
卷边桩菇	(phyA2)	-----	-FsipeseqR nWSPYSPYFP LAEyKA....
pPaGCeInqV			
绒毛栓菌		-----	-LDvtRDVqQ sWSmYSPYFP aAtyvA....
pPaSCQInqV			
平田头菇		-----	-pffpPQIqD sWAaYTPYYP VqAyTP....
pPKDCKITqV			
<i>P. lycii</i>		-----	-LPipAQnTs nWGPYdPFFP VEpyAA....
pPEGCtVTqV			
土曲霉	9a1		KhscCNSVDh GYQCfPELSH kWGLYAPYFS LqDESPPPlD
VPEDCHITFV			
土曲霉	cbs		NhscCtSVDr GYQCfPELSH kWGLYAPYFS LqDESPPPlD
VPDDCHITFV			
黑色曲霉泡盛变种			NqsTCDTVdQ GYQCfSEtSH LWGQYAPFFS LANESAISPD
VPaGCRVTFa			
黑色曲霉	T213		NqsSCDTVdQ GYQCfSEtSH LWGQYAPFFS LANESVISPD
VPaGCRVTFa			
黑色曲霉	NRRL3135		NqsSCDTVdQ GYQCfSEtSH LWGQYAPFFS LANESVISPE
VPaGCRVTFa			
烟曲霉	ATCC13073		GskSCDTVd1 GYQCSPAtSH LWGQYSPFFS LEDELsvSSK
LPKDCRITLV			
烟曲霉	ATCC32722		GskSCDTVd1 GYQCSPAtSH LWGQYSPFFS LEDELsvSSK
LPKDCRITLV			
烟曲霉	ATCC58128		GskSCDTVd1 GYQCSPAtSH LWGQYSPFFS LEDELsvSSK
LPKDCRITLV			

烟曲霉	ATCC26906	GSKSCDTVD1	GYQCSPAtSH	LWGQYSPFFS	LEDElSVSSK
LPKDCRITLV					
烟曲霉	ATCC32239	GSKACDTVE1	GYQCSPGtSH	LWGQYSPFFS	LEDElSVSSD
LPKDCRVTFV					
<i>E. nidulans</i>		QNHSCNTaDg	GYQCfPNVSH	VWGQYSPYFS	IEQESAISeD
VPhGCeVTFV					
<i>T. thermophilus</i>		DSHSCNTVEg	GYQCrPEISH	SWGQYSPFFS	LADQSEISPD
VPQNCKITFV					
<i>T. lanuginosa</i>		-----nvDIAR	hWGQYSPFFS	LAEvSEISPA	
VPKGCRVeFV					
<i>M. thermophila</i>		ESRPCDTpD1	GFQCgTAISH	FWGQYSPYFS	VPsElDaS..
IPDDCeVTFa					
共有序列	11	NSHSCDTVD-	GYQC-PEISH	LWGQYSPFFS	LADESAISPD
VPKGCRVTFV					
					51
					100
卷边桩菇	(phyA1)	NIIqRHGARF	PTSGaTtRik	AgLtKLQgvq	nftDAKFnFI
KSFKYdLGns					
卷边桩菇	(phyA2)	NIIqRHGARF	PTSGaAtRik	AgLsKLQsvq	nftDPKFDFI
KSftYdLGts					
绒毛栓菌		HIIqRHGARF	PTSGaAKRiq	TaVAKLKaaS	nytDPlLAFV
tnYtYSLGqD					
平田头菇		NIIqRHGARF	PTSGaGtRiq	AaVKKLQsak	TytDPRLDfL
tnYtYTLGhD					
<i>P. lycii</i>		NLIqRHGARW	PTSGarsRqv	AaVAKIQmar	PftDPKYEFL
NdFvYkFGvA					

土曲霉 · 9a1	QVLARHGARs PThSKTKaYA AtIAaIQKSA TaFpGKYAFL
QSYNYSLDSE	
土曲霉 · cbs	QVLARHGARs PTdSKTKaYA AtIAaIQKNA TaLpGKYAFL
KSYNYSMGSE	
黑色曲霉泡盛变种	QVLSRHGARY PTeSKGKKYS ALIEeIQQNv TtFDGKYAFL
KTYNYSLGAD	
黑色曲霉 · T213	QVLSRHGARY PTeSKGKKYS ALIEeIQQNv TtFDGKYAFL
KTYNYSLGAD	
黑色曲霉 NRRL3135	QVLSRHGARY PTdSKGKKYS ALIEeIQQNA TtFDGKYAFL
KTYNYSLGAD	
烟曲霉 ATCC13073	QVLSRHGARY PTSSKSKKYk kLVtaIQaNA TdFKGKFAFL
KTYNYTLGAD	
烟曲霉 ATCC32722	QVLSRHGARY PTSSKSKKYk kLVtaIQaNA TdFKGKFAFL
KTYNYTLGAD	
烟曲霉 ATCC58128	QVLSRHGARY PTSSKSKKYk kLVtaIQaNA TdFKGKFAFL
KTYNYTLGAD	
烟曲霉 ATCC26906	QVLSRHGARY PTSSKSKKYk kLVtaIQaNA TdFKGKFAFL
KTYNYTLGAD	
烟曲霉 ATCC32239	QVLSRHGARY PTASKSKKYk kLVtaIQKNA TeFKGKFAFL
ETNYNYTLGAD	
<i>E. nidulans</i>	QVLSRHGARY PTeSKSKaYS GLIEaIQKNA TsFwGQYAFL
ESYNYTLGAD	
<i>T. thermophilus</i>	QLLSRHGARY PTSSKTELYS qLIIsRIQKtA TaYKGyYAFL
KdYrYqLGAN	
<i>T. lanuginosa</i>	QVLSRHGARY PTAhKSEvYA ELLQRIQDcA TeFKGDFAFL
RdYaYhLGAD	
<i>M. thermophila</i>	QVLSRHGARA PtlkRAasYv DLIDRIHhGA isYgPgYEFL
RTYDYTLGAD	

共有序列 11 QVLSRHGARY PTSSKSKKYS ALIERIQKNA T-FKGYAFL
KTNYNTLGAD

101

150

卷边桩菇 (phyA1) DLvPFGAaQs fDAGqEaFaR YskLvSKNnL PFIRAdGSDR
VVDSAtNWtA

卷边桩菇 (phyA2) DLvPFGAaQs fDAGLEvFaR YskLvSsDnL PFIRSdGSDR
VVDTAtNWtA

绒毛栓菌 sLveLGAtQs sEAGqEaFtR YsSLvSaDeL PFVRASGSDR
VVATANNWtA

平田头菇 DLvPFGAlQs sQAGeEtFQR YsfLvSKEnL PFVRASSSNR
VVDSAtNWtE

P. lycii DLlPFGANQs hQTGTDMYtR YsTLfEgGdV PFVRAAGdQR
VVDSStNWtA

土曲霉 9a1 ELTPFGrNQL rDlGaQFYeR YNAL.TRHIn PFVRATDAsR
VhESAeKFVE

土曲霉 cbs NLTPFGrNQL qDlGaQFYRR YDTL.TRHIn PFVRAADSSr
VhESAeKFVE

黑色曲霉泡盛变种 DLTPFGEQEL VNSGIKFYQR YESL.TRNII PFIRSSGSsR
VIASGEKFIE

黑色曲霉 T213 DLTPFGEQEL VNSGIKFYQR YESL.TRNII PFIRSSGSsR
VIASGEKFIE

黑色曲霉 NRRL3135 DLTPFGEQEL VNSGIKFYQR YESL.TRNIV PFIRSSGSsR
VIASGKKFIE

烟曲霉 ATCC13073 DLTPFGEQQL VNSGIKFYQR YKAL.ARSVv PFIRASGSDR
VIASGEKFIE

烟曲霉 ATCC32722 DLTPFGEQQL VNSGIKFYQR YKAL.ARSVv PFIRASGSDR
VIASGEKFIE

烟曲霉 ATCC58128 DLTPFGEQQL VNSGIKIFYQR YKAL.ARSVV PFIRASGSDR
VIASGEKFIE

烟曲霉 ATCC26906 DLTAFFGEQQL VNSGIKIFYQR YKAL.ARSVV PFIRASGSDR
VIASGEKFIE

烟曲霉 ATCC32239 DLTPFGEQQM VNSGIKIFYQK YKAL.AgSVV PFIRSSGSDR
VIASGEKFIE

E. nidulans DLTiFGENQM VDSGaKfYRR YKnl.ARKnt PFIRASGSDR
VVASAEKFIN

T. thermophilus DLTPFGENQM IQlGIKfYnH YKSL.ARNv PFVRCSGSDR
VIASGrIFIE

T. lanuginosa NLTRFGEEQM MESGrQfYHR YREq.AREIV PFVRAAGSAR
VIASAEfFnr

M. thermophila ELTRtGQQQM VNSGIKfYRR YRAL.ARKsI PFVRTAGqDR
VWhSAENFtQ

共有序列 11 DLTPFGENQM VNSGIKfYRR YKAL-ARNIV PFVRASGSDR
VIASAEKFIN

151

200

卷边桩菇 (phyA1) GFaSA.....shNtvqPk LNLILPQ..T gNDTLEDNMC
PAaGD.....

卷边桩菇 (phyA2) GFaSA.....srNaiqPk LDLILPQ..T gNDTLEDNMC
PAaGE.....

绒毛栓菌 GFaLA.....ssNsITPV LSVIISE..A gNDTLDDNMC
PAaGD.....

平田头菇 GFsAA.....shHvlnPI LfVILSE..S LNDTLDDAMC
PnaGs.....

P. lycii GFgdA..... ..sgEtvlPt LQVVLQE..E gNcTLcNNMC
PnevD.....

土曲霉 9a1 GFQTARqDDh hAnpHQPSPr VDVaIPEGSA YNNTLEHSLC
TAFES...ST

土曲霉 cbs GFQNARqGDP hAnpHQPSPr VDVVIPEGTA YNNTLEHSIC
TAFEA...ST

黑色曲霉泡盛变种 TvFED...Se GFQSTKLkDP rAqpgQSSPk IDVVISeASS sNNTLDpGtC

黑色曲霉 T213 TvFED...Se GFQSTKLkDP rAqpgQSSPk IDVVISeASS sNNTLDpGtC

黑色曲霉 NRRL3135 TvFED...Se GFQSTKLkDP rAqpgQSSPk IDVVISeASS sNNTLDpGtC

烟曲霉 ATCC13073 TkFEA...Sq GFQqAKLADP gAt.NRAAPa ISVIIPeSeT FNNTLDHGVC

烟曲霉 ATCC32722 TkFEA...Sq GFQqAKLADP gAt.NRAAPa ISVIIPeSeT FNNTLDHGVC

烟曲霉 ATCC58128 TkFEA...Sq GFQqAKLADP gAt.NRAAPa ISVIIPeSeT FNNTLDHGVC

烟曲霉 ATCC26906 TkFEA...Sq GFQqAKLADP gAt.NRAAPa ISVIIPeSeT FNNTLDHGVC

烟曲霉 ATCC32239 TnFEA...Se GFQqANVADP gAt.NRAAPV ISVIIPeSeT YNNTLDHSVC

E. nidulans vSFEN...de GFRkaQLhDh g.s.gQATPV VNVIIPeIdG FNNTLDHStC

T. thermophilus PvFED...SS GFQSAKVlDP hSdKHDApPt INVIIeEGPS YNNTLDtGsC

T. lanuginosa PAaEE...AP GFQdAKdrDP rSnkDQaEPV INVIISeETG sNNTLDgltC

M. thermophila GFHSA1LADR gStvRPTlPy dmVVIPETAG aNNTLHNDLC
 TAFEegpyST

共有序列 11 GFQSAKLADP -A--HQASPV INVIIPEGSG YNNTLDHGLC
 TAFED---ST

201

250

卷边桩菇 (phyA1) .SDpqvnaWl AVafPSItAR LNAaaPSVNL TDtDafNLVs
 LCAFlTVSK.

卷边桩菇 (phyA2) .SDpqvDaWl AsafPSVtAQ LNAaaPGaNL TDADafNLVs
 LCPFmTVSK.

绒毛栓菌 .SDpqvnQWl AqFAPPMtAR LNAgaPGaNL TDtDtyNLLt
 LCPFETVAt.

平田头菇 .SDpqtGiWT SIYGTPIanR LNqqaPGaNI TAADVsNLIp
 LCAFETivK.

P. lycii .GDESt.tWl GVfAPhItAR LNAaaPSaNL SDsDaLtLMD
 MCPFDTLSS.

土曲霉 9a1 VGDDAVANFT AVFAPAIaqR LEAdLPGVQL StDDVVNLMA
 MCPFETVSlt

土曲霉 cbs VGDAARDNFT AVFAPAIakR LEAdLPGVQL SADDVVNLMA
 MCPFETVSlt

黑色曲霉泡盛变种 LADtveANFT AtFAPSIRqR LEndLSGVtL TDtEVtyLMD
 MCSFDTIStS

黑色曲霉 T213 LADtveANFT AtFAPSIRqR LEndLSGVtL TDtEVtyLMD
 MCSFDTIStS

黑色曲霉 NRRL3135 LADtveANFT AtFvPSIRqR LEndLSGVtL TDtEVtyLMD
 MCSFDTIStS

烟曲霉	ATCC13073	LGDEVAANFT ALFAPdIRAR aEkhlPGVtL TDEDVVSLMD
MCSFDTVART		
烟曲霉	ATCC32722	LGDEVAANFT ALFAPdIRAR aEkhlPGVtL TDEDVVSLMD
MCSFDTVART		
烟曲霉	ATCC58128	LGDEVAANFT ALFAPdIRAR aEkhlPGVtL TDEDVVSLMD
MCSFDTVART		
烟曲霉	ATCC26906	LGDEVAANFT ALFAPdIRAR aKkhLPGVtL TDEDVVSLMD
MCSFDTVART		
烟曲霉	ATCC32239	LGDEVEANFT ALFAPAIRAR IEkhLPGVQL TDDDVVSLMD
MCSFDTVART		
<i>E. nidulans</i>		rADEiEANFT AIMGPPiRKR LEndLPGIKL TNENVIyLMD
MCSFDTMART		
<i>T. thermophilus</i>		gGHDAQEKFA kqFAPAIiEK IKDhLPGVDL AvsDVpyLMD
LCPFETLARN		
<i>T. lanuginosa</i>		.DptqpAEFl qVFGPRVlKK ItkhMPGVNL TLEDVplFMD
LCPFDTVGsd		
<i>M. thermophila</i>		IGDDAQDtYl StFAGPiRAR VNAnLPGaNL TDAdtVaLMD
LCPFETVAsS		
共有序列	11	LGDDAEANFT AVFAPPiRAR LEA-LPGVNL TDEDVVNLMD
MCFFDTVART		
		251
		300
卷边桩菇	(phyA1)	ekkSdF CtLFegiPGs FeaFAYggdL
dKFYGTGyGQ		
卷边桩菇	(phyA2)	eqkSdF CtLFegiPGs FeaFAYagdL
dKFYGTGyGQ		

绒毛栓菌		errSeF CDIYeelqAE .daFAYnadL
dKFYGTgYgQ		
平田头菇		etpSPF CNLF..TPEE FaQFEYFgdL
dKFYGTgYgQ		
<i>P. lycii</i>		gnaSPF CDLF..TAEE YvsYEYYydL
dKYYGTGPGN		
土曲霉	9a1	dD..Aht... ..LSPF CDLF..TatE WtQYNYLlSL
dKYYGYGGGN		
土曲霉	cbs	dD..Aht... ..LSPF CDLF..TAAE WtQYNYLlSL
dKYYGYGGGN		
黑色曲霉泡盛变种		Tv..DTK... ..LSPF CDLF..ThDE WiHYDYlQSL
kKYYGHGAGN		
黑色曲霉	T213	Tv..DTK... ..LSPF CDLF..ThDE WiHYDYlRSL
kKYYGHGAGN		
黑色曲霉	NRRL3135	Tv..DTK... ..LSPF CDLF..ThDE WiNYDYlQSL
kKYYGHGAGN		
烟曲霉	ATCC13073	SD..ASQ... ..LSPF CQLF..ThNE WkKYNlQSL
gKYYGYGAGN		
烟曲霉	ATCC32722	SD..ASQ... ..LSPF CQLF..ThNE WkKYNlQSL
gKYYGYGAGN		
烟曲霉	ATCC58128	SD..ASQ... ..LSPF CQLF..ThNE WkKYNlQSL
gKYYGYGAGN		
烟曲霉	ATCC26906	SD..ASQ... ..LSPF CQLF..ThNE WkKYNlQSL
gKYYGYGAGN		
烟曲霉	ATCC32239	AD..ASE... ..LSPF CAIF..ThNE WkKYDYlQSL
gKYYGYGAGN		
<i>E. nidulans</i>		AH..GTE... ..LSPF CAIF..TEKE WlQYDYlQSL
sKYYGYGAGS		

<i>T. thermophilus</i>		ht..DT.....LSPF CALs..TqEE WqaYDYYQSL
gKYYGnGGGN		
<i>T. lanuginosa</i>		PvlfPrQ... ..LSPF CHLF..TADD WmaYDYyTL
dKYYSHGGGS		
<i>M. thermophila</i>		SsdpATadag ggngrrpLSPF CrLF..SsE WraYDYLQSV
gKWYGYGPGN		
共有序列	11	SD--ATQ--- -----LSPF CDLF--TADE W-QYDYLQSL -
KYYGYGAGN		
		301
		350
卷边桩菇	(phyA1)	eLGPvQGVGY vNELIARLTN S.AVRDNTqT NRTLDA SPvT
FPLNkTFYAD		
卷边桩菇	(phyA2)	ALGPvQGVGY iNELLARLTN S.AVNDNTqT NRTLDAaPDT
FPLNkTMYAD		
绒毛栓菌		PLGPvQGVGY iNELIARLTa q.nVsDHTqT NsTLDSSPET
FPLNrTLYAD		
平田头菇		PLGPvQGVGY iNELLARLTE m.PVRDNTqT NRTLDS SP1T
FPLDrSIYAD		
<i>P. lycii</i>		ALGPvQGVGY vNELLARLTg q.AVRDETqT NRTLDS DPAT
FPLNrTFYAD		
土曲霉	9a1	PLGPvQGVGW aNELMARLTR A.PVHDHTCv NNTLDAS PAT
FPLNATLYAD		
土曲霉	cbs	PLGPvQGVGW aNELIARLTR S.PVHDHTCv NNTLDAN PAT
FPLNATLYAD		
黑色曲霉泡盛变种		PLGPTQGVGY aNELIARLTH S.PVHDDTSS NHTLDSN PAT
FPLNSTLYAD		

黑色曲霉 T213 PLGPTQGVGY aNELIARLTH S.PVHDDTSS NHTLDSNPAT
FPLNSTLYAD

黑色曲霉 NRRL3135 PLGPTQGVGY aNELIARLTH S.PVHDDTSS NHTLDSSPAT
FPLNSTLYAD

烟曲霉 ATCC13073 PLGPAQGIGF tNELIARLTR S.PVQDHTST NstLvSNPAT
FPLNATMYvD

烟曲霉 ATCC32722 PLGPAQGIGF tNELIARLTR S.PVQDHTST NstLvSNPAT
FPLNATMYvD

烟曲霉 ATCC58128 PLGPAQGIGF tNELIARLTR S.PVQDHTST NstLvSNPAT
FPLNATMYvD

烟曲霉 ATCC26906 PLGPAQGIGF tNELIARLTR S.PVQDHTST NstLvSNPAT
FPLNATMYvD

烟曲霉 ATCC32239 PLGPAQGIGF tNELIARLTN S.PVQDHTST NstLDSDPAT
FPLNATIYvD

E. nidulans PLGPAQGIGF tNELIARLTQ S.PVQDNTST NHTLDSNPAT
FPLDrkLYAD

T. thermophilus PLGPAQGVGF vNELIARMTH S.PVQDYTTv NHTLDSNPAT
FPLNATLYAD

T. lanuginosa AFGPSRGVGF vNELIARMTg NlPVKDHTTv NHTLDdNPET
FPLDAVLYAD

M. thermophila PLGPTQGVGF vNELLARLA. GvPVRDgTST NRTLOGDPrT
FPLGrPLYAD

共有序列 11 PLGPAQGVGF -NELIARLTH S-PVQDHTST NHTLDSNPAT
FPLNATLYAD

卷边桩菇	(phyA1)	FSHDNlMVAV FsAMGLFrqP aPLSTsvpNP wrt.....Wr
TSSlVPFSGR		
卷边桩菇	(phyA2)	FSHDNlMVAV FsAMGLFrqS aPLSTSTpDP nrt.....Wl
TSSvVPFSAR		
绒毛栓菌		FSHDNqMVAI FsAMGLFNqS aPLdPTTpDP art.....Fl
vkkiVPFSAR		
平田头菇		LSHDNqMIAI FsAMGLFNqS sPLdPSfpNP krt.....Wv
TSRltPFASR		
<i>P. lycii</i>		FSHDNTMVPI FaALGLFNAT a.LdPlkpDe nrl.....Wv
DSklVPFSGH		
土曲霉	9a1	FSHDSnLVSI FWALGLYNGT aPLSqTSVES Vs..QTDGYA
AAWTVPFAAR		
土曲霉	cbs	FSHDSnLVSI FWALGLYNGT KPLSqTTVEd It..rTDGYA
AAWTVPFAAR		
黑色曲霉泡盛变种		FSHDNGIISI LFALGLYNGT KPLSTTTVEN It..QTDGFS
SAWTVPFASR		
黑色曲霉	T213	FSHDNGIISI LFALGLYNGT KPLSTTTVEN It..QTDGFS
SAWTVPFASR		
黑色曲霉	NRRL3135	FSHDNGIISI LFALGLYNGT KPLSTTTVEN It..QTDGFS
SAWTVPFASR		
烟曲霉	ATCC13073	FSHDNSMVSI FFALGLYNGT EPLSrTSVES ak..EldGYS
ASWvVPFGAR		
烟曲霉	ATCC32722	FSHDNSMVSI FFALGLYNGT gPLSrTSVES ak..EldGYS
ASWvVPFGAR		
烟曲霉	ATCC58128	FSHDNSMVSI FFALGLYNGT EPLSrTSVES ak..EldGYS
ASWvVPFGAR		
烟曲霉	ATCC26906	FSHDNSMVSI FFALGLYNGT EPLSrTSVES ak..EldGYS
ASWvVPFGAR		

烟曲霉	ATCC32239	FSHDNGMIPI FFAMGLYNGT EPLSqtSeES tk..ESNGYS
ASWAVPFGAR		
<i>E. nidulans</i>		FSHDNSMISI FFAMGLYNGT QPLSmdSVES Iq..EmDGYA
ASWTVPFGAR		
<i>T. thermophilus</i>		FSHDNTMtSI FaALGLYNGT akLSTTeIKS Ie..ETDGYS
AAWTVPFGGR		
<i>T. lanuginosa</i>		FSHDNTMtGI FsAMGLYNGT KPLSTSKIQP ptgaAADGYA
ASWTVPFAAR		
<i>M. thermophila</i>		FSHDNdMMGV LgALGaYDgv pPLdkTArrd ..peElGGYA
ASWAVPFAAR		
共有序列	11	FSHDNTMVSI FFALGLYNGT KPLSTTSVES I---ETDGYA
ASWTVPFAAR		
401		
450		
卷边桩菇	(phyA1)	mvVERLsC.. fGt.....Tk VRVLVQDQVq
PLEfCGgDRn		
卷边桩菇	(phyA2)	maVERLsC.. AGt.....Tk VRVLVQDQVq
PLEfCGgDQd		
绒毛栓菌		mvVERLDC.. GGa.....Qs VRLLVNDaVq
PLafCGaDts		
平田头菇		mvteRlLCQr DGtGsGGpsr imrNgnvQTF VRILVNDaLq
PLkfCGgDmd		
<i>P. lycii</i>		mtVEkLaC..sgKea VRVLVNDaVq
PLEfCGg.vd		
土曲霉	9a1	AYVENMQCrAEK...EPL VRVLVNDRVm
PLHGCPtDKL		

土曲霉	cbs	AYIEMMQCrA	..EK...QPL VRVLVNDVRM
PLHGCAVDNL			
黑色曲霉泡盛变种		1YVEMMQCQA	..EQ...EPL VRVLVNDRVV
PLHGCPIDaL			
黑色曲霉 T213		1YVEMMQCQA	..EQ...EPL VRVLVNDRVV
PLHGCPIDaL			
黑色曲霉 NRRL3135		1YVEMMQCQA	..EQ...EPL VRVLVNDRVV
PLHGCPVDaL			
烟曲霉	ATCC13073	AYfEtMQCKS	..EK...EPL VRaLINDRVV
PLHGCDVDKL			
烟曲霉	ATCC32722	AYfEtMQCKS	..EK...EPL VRaLINDRVV
PLHGCDVDKL			
烟曲霉	ATCC58128	AYfEtMQCKS	..EK...ESL VRaLINDRVV
PLHGCDVDKL			
烟曲霉	ATCC26906	AYfEtMQCKS	..EK...EPL VRaLINDRVV
PLHGCDVDKL			
烟曲霉	ATCC32239	AYfEtMQCKS	..EK...EPL VRaLINDRVV
PLHGCAVDKL			
<i>E. nidulans</i>		AYfELMQCE.	..KK...EPL VRVLVNDRVV
PLHGCAVDKF			
<i>T. thermophilus</i>		AYIEMMQCDD	..sD...EPV VRVLVNDRVV
PLHGCEVDsL			
<i>T. lanuginosa</i>		AYVELLRcET ETsSeEEeEG ..	..ED...EPF VRVLVNDRVV
PLHGCrVDRW			
<i>M. thermophila</i>		iYVEkMRCsG GGgGgGGgEG ..	..rQekdEeM VRVLVNDVRM
TLkGCGaDEr			
共有序列	11	AYVEMMQCEA GG-G-GG-EG --EK---	EPL VRVLVNDRVV
PLHGCGVDKL			

		451	482
卷边桩菇	(phyA1)	GlCtLAKFVE SqTFARSDga GDFEKCFAts a-	
卷边桩菇	(phyA2)	GlCaLDKFVE SqAYARSGga GDFEKCLAtt v-	
绒毛栓菌		GvCtLDAFVE SqAYARNDge GDFEKCFat~ --	
平田头菇		SlCtLEAFVE SqkYAReDgq GDFEKCFD-- --	
<i>P. lycii</i>		GvCELSAFVE SqTYAReNgq GDFAKCgfv se	
土曲霉	9a1	GRCKrDAFVA GLSFAQAG.. GNWADCF--- --	
土曲霉	cbs	GRCKrDDFVE GLSFARAG.. GNWAECF--- --	
黑色曲霉泡盛变种		GRCtrDsFVr GLSFARSG.. GDWAECsA-- --	
黑色曲霉	T213	GRCtrDsFVr GLSFARSG.. GDWAECFA-- --	
黑色曲霉	NRRL3135	GRCtrDsFVr GLSFARSG.. GDWAECFA-- --	
烟曲霉	ATCC13073	GRCKLNDFVK GLSWARSG.. GNWGECSF-- --	
烟曲霉	ATCC32722	GRCKLNDFVK GLSWARSG.. GNWGECSF-- --	
烟曲霉	ATCC58128	GRCKLNDFVK GLSWARSG.. GNWGECSF-- --	
烟曲霉	ATCC26906	GRCKLNDFVK GLSWARSG.. GNWGECSF-- --	
烟曲霉	ATCC32239	GRCKLKDFVK GLSWARSG.. GNSEQSFS-- --	
<i>E. nidulans</i>		GRCLDDWVE GLNFARSG.. GNWktCFT1~ --	
<i>T. thermophilus</i>		GRCKrDDFVr GLSFARqG.. GNWEGCYAas e-	
<i>T. lanuginosa</i>		GRCRrDEWIK GLTFARqG.. GHWDrcF--- --	
<i>M. thermophila</i>		GmCtLErFIE SMAFARGN.. GKWDlCFA-- --	
共有序列	11	GRCKLDDFVE GLSFARSG-- GNWAECFA-- --	

图 8

M G V F V V L L S I A T L F G S T S G T
 20
 ATGGGCGTGTTCGTCTGCTACTGTCCATTGCCACCTTGTTCGGTTCACATCCGGTACC
 1 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----
 60
 TACCCGCACAAGCAGCAGCATGACAGGTAACGGTGGAACAAGCCAAGGTGTAGGCCATGG
 A L G P R G N S H S C D T V D G G Y Q C
 40
 GCCTTGGGTCTCTGTTAATTCTCACTCTTGTGACACTGTTGACGGTGGTTACCAATGT
 61 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----
 120
 CGGAACCCAGGAGCACCATTAAAGAGTGAGAACACTGTGACAACTGCCACCAATGGTTACA
 F P E I S H L W G T Y S P Y F S L E D E
 60
 TTCCCAGAAATTTCTCACTTGTGGGTACCTACTCTCCATACTTCTCTTTGGCAGACGAA
 121 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----
 180
 AAGGGTCTTTAAAGAGTGAACACCCCATGGATGAGAGGTATGAAGAGAAACCGTCTGCTT
 S A I S P D V P D D C R V T F V Q V L S
 80
 TCTGCTATTTCTCCAGACGTTCCAGACGACTGTAGAGTTACTTTCGTTCAAGTTTGTCT
 187 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----
 240

AGACGATAAAGAGGTCTGCAAGGTCTGCTGACATCTCAATGAAAGCAAGTTCAAAACAGA

R H G A R Y P T S S A S K A Y S A L I E

100

AGACACGGTGCTAGATACCCAACTTCTTCTGCGTCTAAGGCTTACTCTGCTTTGATTGAA

241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

300

TCTGTGCCACGATCTATGGGTGAAGAAGACGCAGATTCCGAATGAGACGAACTAACTT

A I Q K N A T A F K G K Y A F L K T Y N

120

GCTATTCAAAGAACGCTACTGCTTTCAAGGTAAGTACGCTTTCTTGAAGACTTACAAC

301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

360

CGATAAGTTTTCTTGCATGACGAAAGTCCCATTCATGCGAAAGAACTTCTGAATGTTG

Y T L G A D D L T P F G E N Q M V N S G

140

TACACTTTGGGTGCTGACGACTTGACTCCATTCGGTGAAAACCAAATGGTTAACTCTGGT

361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

420

ATGTGAAACCCACGACTGCTGAACTGAGGTAAGCCACTTTTGGTTTACCAATTGAGACCA

I K F Y R R Y K A L A R K I V P F I R A

160

ATTAAGTTCTACAGAAGATACAAGGCTTTGGCTAGAAAGATTGTTCCATTCATTAGAGCT

421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

480

TAATTCAAGATGTCTTCTATGTTCCGAAACCGATCTTTCTAACAAGGTAAGTAATCTCGA

S G S D R V I A S A E K F I E G F Q S A

180

TCTGGTTCTGACAGAGTTATTGCTTCTGCTGAAAAGTTCATTGAAGGTTCCAATCTGCT

481 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

540

AGACCAAGACTGTCTCAATAACGAAGACGACTTTTCAAGTAACTTCCAAAGGTTAGACGA

K L A D P G S Q P H Q A S P V I N V I I

200

AAGTTGGCTGACCCAGGTTCTCAACCACACCAAGCTTCTCCAGTTATTAACGTGATCATT

541 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

600

TTCAACCGACTGGGTCCAAGAGTTGGTGTGGTTCGAAGAGGTCAATAATTGCACTAGTAA

P E G S G Y N N T L D H G T C T A F E D

220

CCAGAAGGATCCGGTTACAACAACACTTTGGACCACGGTACTTGTACTGCTTTCGAAGAC

601 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

660

GGTCTTCCTAGGCCAATGTTGTTGTGAAACCTGGTGCCATGAACATGACGAAAGCTTCTG

S E L G D D V E A N F T A L F A P A I R

240

TCTGAATTAGGTGACGACGTTGAAGCTAACTTCACTGCTTTGTTGCTCCAGCTATTAGA

661 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

720

AGACTTAATCCACTGCTGCAACTTCGATTGAAGTGACGAAACAAGCGAGGTCGATAATCT

A R L E A D L P G V T L T D E D V V Y L

260

GCTAGATTGGAAGCTGACTTGCCAGGTGTTACTTTGACTGACGAAGACGTTGTTTACTTG

721 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----

780

CGATCTAACCTTCGACTGAACGGTCCACAATGAACTGACTGCTTCTGCAACPAATGAAC

M D M C P F D T V A R T S D A T E L S P

280

ATGGACATGTGTCCATTGACACTGTGCTAGAACTTCTGACGCTACTGAATTGTCTCCA

781 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----

840

TACCTGTACACAGGTAAGCTGTGACAGCGATCTTGAAGACTGCGATGACTTAACAGAGGT

F C A L F T H D E W I Q Y D Y L Q S L G

300

TTCTGTGCTTTGTTCACTCACGACGAATGGATCCAATACGACTACTTGCAAAGCTTGGGT

841 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----

900

AAGACACGAAACAGTGAGTGCTTGCTTACCTAGGTTATGCTGATGAACGTTTCGAACCCA

K Y Y G Y G A G N P L G P A Q G V G F A

320

AAGTACTACGGTTACGGTGCTGGTAACCCATTGGGTCCAGCTCAAGGTGTTGGTTTCGCT

901 ---+-----+-----+-----+-----+-----+-----

960

TTCATGATGCCAATGCCACGACCATTGGGTAACCCAGGTCGAGTTCCACAACCAAAGCGA

N E L I A R L T H S P V Q D H T S T N H

340

AACGAATTGATTGCTAGATTGACTCACTCTCCAGTTCAAGACCACACTTCTACTAACCAC

961 -----+

1020

TTGCTTAACTAACGATCTAACTGAGTGAGAGGTCAAGTTCTGGTGTGAAGATGATTGGTG

T L D S N P A T F P L N A T L Y A D F S

360

ACTTTGGACTCTAACCCAGCTACTTTCCCATTTGAACGCTACTTTGTACGCTGACTTCTCT

1021 -----+

1080

TGAAACCTGAGATTGGGTCGATGAAAGGGTAACTTGCGATGAAACATGCGACTGAAGAGA

H D N T M I S I F F A L G L Y N G T K P

380

CACGACAACACTATGATATCTATTTTCTTCGCTTTGGGTTTGTACAACGGTACCAAGCCA

1081 -----+

1140

GTGCTGTTGTGATACTATAGATAAAAGAAGCGAAACCCAAACATGTTGCCATGGTTGCGT

L S T T S V E S I E E T D G Y S A S W T

400

TTGTCTACTACTTCTGTTGAATCTATTGAAGAACTGACGGTTACTCTGCTTCTTGGACT

1141 -----+

1200

AACAGATGATGAAGACAACTTAGATAACTTCTTTGACTGCCAATGAGACGAAGAACCTGA

V P F A A R A Y V E M M Q C Q A E K E P

420

GTTCCATTGCTGCTAGAGCTTACGTTGAAATGATGCAATGTCTAGCTGAAAAGGAACCA

1201 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

1260

CAAGGTAAGCGACGATCTCGAATGCAACTTTACTACGTTACAGTTCGACTTTTCCTTGGT

L V R V L V N D R V V P L H G C A V D K

440

TTGGTTAGAGTTTGGTTAACGACAGAGTTGTTCCATTGCACGGTTGTGCTGTGACAAG

1261 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

1320

AACCAATCTCAAAACCAATTGCTGTCTCAACAAGGTAACGTGCCAACACGACAACTGTTC

L G R C K R D D F V E G L S F A R S G G

460

TTGGGTAGATGTAAGAGAGACGACTTCGTTGAAGGTTTGTCTTTCGCTAGATCTGGTGGT

1321 ----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----

1380

AACCCATCTACATTCTCTCTGCTGAAGCAACTTCCAAACAGAAAGCGATCTAGACCACCA

N W A E C F A * 467

AACTGGGCTGAATGTTTCGCTTAA

1381 ----+-----+-----+ 1410

TTGACCCGACTTACAAAGCGAATT

图 9

M G V F V V L L S I A T L F G S T S G T
 20
 ATGGGCGTGTTTCGTGCTACTGTCCATTGCCACCTTGTTCGGTTCCACATCCGGTACC
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 60
 TACCCGCACAAGCAGCACGATGACAGGTAACGGTGAACAAGCCAAGGTGTAGGCCATGG
 A L G P R G N S H S C D T V D G G Y Q C
 40
 GCCTTGGGTCCTCGTGGTAACTCTCACTCTTGTGACACTGTTGACGGTGGTTACCAATGT
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 120
 CGGAACCCAGGAGCACCATTGAGAGTGAGAACACTGTGACAACTGCCACCAATGGTTACA
 A F P E I S H L W G T Y S P F F S L A D E
 60
 TTCCAGAAATTCTCACTTGTGGGGTACATACTCTCCATTCTTCTCTTGGCTGACGAA
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 180
 AAGGGTCTTTAAGAGTGAACACCCCATGTATGAGAGGTAAGAAGAGAAACCGACTGCTT
 S A I S P D V P K G C R V T F V Q V L S
 80
 TCTGCTATTTCTCCAGACGTTCCAAAGGGTTGTAGAGTTACTTTCGTTCAAGTTTGTCT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 240

AGACGATAAAGAGGTCTGCAAGGTTTCCCAACATCTCAATGAAAGCAAGTTCAAAACAGA

R H G A P Y P T S S A S K A Y S A L I E

100

AGACACGGTGCTAGATACCCAACCTTCTTCTGCGTCTAAGGCGTACTCTGCTTTGATTGAA

241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

300

TCTGTGCCACGATCTATGGGTTGAAGAAGACGCAGATTCCGCATGAGACGAACTAACTT

A I Q K N A T A F K G K Y A F L K T Y N

120

GCTATTCAAAAGAACGCTACTGCTTTCAAGGGTAAGTACGCTTTCTTGAAGACTTACAAC

301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

360

CGATAAGTTTTCTTGCGATGACGAAAGTTCCCATTCATGCGAAAGAACTTCTGAATGTTG

A Y T L G A D D L T P F G E Q Q M V N S G

140

TACACTTTGGGTGCTGACGACTTGACTCCATTGCGTGAACAACAAATGGTTAACTCTGGT

361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

420

ATGTGAAACCCACGACTGCTGAACTGAGGTAAGCCACTTGTGTGTTACCAATTGAGACCA

I K F Y R R Y K A L A R K I V P F I R A

160

ATTAAGTTCTACAGAAGATACAAGGCTTTGGCTAGAAAGATTGTTCCATTCAATTAGAGCT

421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

480

TAATTCAAGATGTCTTCTATGTTCCGAAACCGATCTTTCTAACAAGGTAAGTAATCTCGA

180 S G S D R V I A S A E K F I E G F Q S A

TCTGGTTCTGACAGAGTTATTGCTTCTGCTGAAAAGTTCATTGAAGGTTTCCAATCTGCT

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

540 AGACCAAGACTGTCTCAATAACGAAGACGACTTTTCAAGTAACCTCCAAAGGTTAGACGA

200 K L A D P G A N P H Q A S P V I N V I I

AAGTTGGCTGACCCAGGTGCTAACCACACCAAGCTTCTCCAGTTATTAACGTTATTATT

541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

600 TTCAACCGACTGGGTCCACGATTGGGTGTGGTTCGAAGAGGTCAATAATTGCAATAATAA

220 P E G A G Y N N T L D H G L C T A F E E

CCAGAAGGTGCTGGTTACAACAACACTTTGGACCACGGTTTGTGTACTGCTTTCGAAGAA

601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

660 GGTCTTCCACGACCAATGTTGTTGTGAAACCTGGTGCCAAACACATGACGAAAGCTTCTT

240 S E L G D D V E A N F T A V F A P P I R

TCTGAATTGGGTGACGACGTTGAAGCTAACTTCACTGCTGTTTTCGCTCCACCAATTAGA

661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

720

AGACTTAACCCACTGCTGCAACTTCGATTGAAGTGACGACAAAAGCGAGGTGGTTAATCT

A R L E A H L P G V N L T D E D V V N L

260

GCTAGATTGGAAGCTCACTTGCCAGGTGTTAACTTGACTGACGAAGACGTTGTTAACTTG

721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

780

CGATCTAACCTTCGAGTGAACGGTCCACAATTGAACTGACTGCTTCTGCAACAATTGAAC

M D M C P F D T V A R T S D A T Q L S P

280

ATGGACATGTGTCCATTGACACTGTTGCTAGAACTTCTGACGCTACTCAATTGTCTCCA

781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

840

TACCTGTACACAGGTAAGCTGTGACAACGATCTTGAAGACTGCGATGAGTTAACAGAGGT

F C D L F T H D E W I Q Y D Y L Q S L G

300

TTCTGTGACTTGTTCACTCACGACGAATGGATTCAATACGACTACTTGCAATCTTTGGGT

841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

900

AAGAACTGAACAAGTGAGTGCTGCTTACCTAAGTTATGCTGATGAACGTTAGAAACCCA

K Y Y G Y G A G N P L G P A Q G V G F V

320

AAGTACTACGGTTACGGTGCTGGTAACCCATTGGGTCCAGCTCAAGGTGTTGGTTTCGTT

901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

960

TTCATGATGCCAATGCCACGACCATTGGGTAACCCAGGTCGAGTTCACAAACCAAAGCAA

N E L I A R L T H S P V Q D H T S T N H

340

AACGAATTGATTGCTAGATTGACTCACTCTCCAGTTCAAGACCACACTTCTACTAACCAC

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
1020

TTGCTTAACTAACGATCTAACTGAGTGAGAGGTCAAGTTCTGGTGTGAAGATGATTGGTG

T L D S N P A T F P L N A T L Y A D F S

360

ACTTTGGACTCTAACCCAGCTACTTTCCCATTTGAACGCTACTTTGTACGCTGACTTCTCT

1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
1080

TGAAACCTGAGATTGGGTCGATGAAAGGGTAACTTGCATGAACATGCGACTGAAGAGA

H D N T M V S I F F A L G L Y N G T K P

380

CACGACAACACTATGGTTTCTATTTCTTCGCTTTGGGTTTGTACAACGGTACTAAGCCA

1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
1140

GTGCTGTTGTGATACCAAAGATAAAAGAAGCGAAACCAACATGTTGCCATGATTCCGGT

L S T T S V E S I E E T D G Y S A S W T

400

TTGTCTACTACTTCTGTTGAATCTATTGAAGAACTGACGGTTACTCTGCTTCTTGGACT

1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
1200

AACAGATGATGAAGACAACTTAGATAACTTCTTTGACTGCCAATGAGACGAAGAACCTGA

V P F A A R A Y V E M M Q C E A E K E P

420

GTTCCATTGCTGCTAGAGCTTACGTTGAAATGATGCAATGTGAAGCTGAAAAGGAACCA

1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

1260

CAAGGTAAGCGACGATCTCGAATGCAACTTTACTACGTTACACTTCGACTTTTCCTTGGT

L V R V L V N D R V V P L H G C G V D K

440

TTGGTTAGAGTTTGGTTAACGACAGAGTTGTTCCATTGCACGGTTGTGGTGTGACAAG

1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

1320

AACCAATCTCATAACCAATTGCTGTCTCAACAAGGTAACGTGCCAACACCACAACCTGTTT

L G R C K R D D F V E G L S F A R S G G

460

TTGGGTAGATGTAAGAGAGACGACTTCGTTGAAGGTTTGTCTTTCGCTAGATCTGGTGGT

1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+

1380

AACCCATCTACATTCTCTCTGCTGAAGCAACTTCCAAACAGAAAGCGATCTAGACCACCA

N W E E C F A * 467

AACTGGGAAGARTGTTTCGCTTAA

1381 -----+----- 1404

TTGACCCTTCTTACAAAGCGAAT

图 10

M G V F V V L L S I A T L F G S T S G' T 20
 ATGGGGGTTTTCGTCGTTCTATTATCTATCGCGACTCTGTTTCGGCAGCACATCGGGCACT
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 TACCCCCAAAAGCAGCAAGATAATAGATAGCGCTGAGACAAGCCGTCGTGTAGCCCGTGA
 A L G P R G N H S K S C D T V D L G Y Q 40
 GCGCTGGGCCCCCGTGAAATCACTCCAAGTCCTGCGATACGGTAGACCTAGGGTACCAG
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 CGCGACCCGGGGGACCTTTAGTGAGGTTTCAGGACGCTATGCCATCTGGATCCCATGGTC
 C S P A T S H L W G T Y S P Y F S L E D 60
 TGCTCCCCTGCGACTTCTCATCTATGGGGCACGTACTCGCCATaCTTTTCGCTCGAGGAC
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 ACGAGGGGACGCTGpAGAGTAGATACCCCGtgCATGAGCGGTAtGAAAAGCGAGCTCCTG
 E L S V S S K L P K D C R I T L V Q V L 80
 GAGCTGTCCGTGTCGAGTAAGCTTCCCAAGGATTGCCGGATCACCTTGGTACAGGTGCTA
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 CTCGACAGGCACAGCTCATTCTGAAGGGTTCCTAACGGCCTAGTGGAACCATGTCCACGAT
 S R H G A R Y P T S S K S K K Y K K L I 100
 TCGCGCCATGGAGCGCGGTACCCAACCAGCTCCAAGAGCAAAAAGTATAAGAGCTTaTt
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300

ACGCGGGTACCTCGCGCCATGGGTGGTTCGAGGTTCTCGTTTTTCATATTCTTCGAAtAa

T A I Q A N A T D F K G K Y A F L K T Y 120

ACGGCGATCCAGGCCAATGCCACCGACTTCAAGGGCAAGTAcGCCTTTTTGAAGACGTAC

301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360

TGCCGCTAGGTCCGGTTACGGTGGCTGAAGTTCCCGTTCatgCGGAAAACTTCTGCATG

N Y T L G A D D L T P F G E Q Q L V N S 140

AACTATACTCTGGGTGCGGATGACCTCACTCCCTTTGGGGAGCAGCAGCTGGTGAACCTCG

361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420

TTGATATGAGACCCACGCCTACTGGAGTGAGGGAAACCCCTCGTCGTCGACCACTTGAGC

G I K F Y Q R Y K A L A R S V V P F I R 160

GGCATCAAGTTCTACCAGAGGTACAAGGCTCTGGCGCGCAGTGTTGGTGCCGTTTATTTCGC

421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480

CCGTAGTTCAAGATGGTCTCCATGTTCCGAGACCGCGGTCACACCACGGCAAATAAGCG

A S G S D R V I A S G E K F I E G F Q Q 180

GCCTCAGGCTCGGACCGGGTTATTGCTTCGGGAGAGAAGTTCATCGAGGGGTTCCAGCAG

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540

CGGAGTCCGAGCCTGGCCCAATAACGAAGCCCTCTCTTCAAGTAGCTCCCCAAGGTCGTC

A K L A D P G A T N R A A P A I S V I I 200

GCGAAGCTGGCTGATCCTGGCGCGACGAACCGCGCCGCTCCGGCGATTAGTGTGATTATT

541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600

CGCTTCGACCGACTAGGACCGCGCTGCTTGGCGCGGCGAGGCCGCTAATCACACTAATAA

P E S E T F N N T L D H G V C T K F E A 220

CCGGAGAGCGAGACGTTCAACAATACGCTGGACCACGGTGTGTGCACGAAGTTTGAGGCG

601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660

GGCCTCTCGCTCTGCAAGTTGTTATGCGACCTGGTGCCACACACGTGCTTCAAACCTCCGC

S Q L G D E V A A N F T A L F A P D I R 240

AGTCAGCTGGGAGATGAGGTTGCGGCCAATTTCACTGCGCTCTTTGCACCCGACATCCGA

661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720

TCAGTCGACCCTCTACTCCAACGCCGGTTAAAGTGACGCGAGAAACGTGGGCTGTAGGCT

A R L E K H L P G V T L T D E D V V S L 260

GCTCGCctCGAGAAGCATCTTCCTGGCGTGACGCTGACAGACGAGGACGTTGTCACTCTA

721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780

CGAGCGgaGCTCTTCGTAGAAAGGACCGCACTGCGACTGTCTGCTCCTGCAACAGTCAGAT

M D M C P F D T V A R T S D A S Q L S P 280

ATGGACATGTGTcCGTTTGATACGGTAGCGCGCACCAGCGACGCAAGTCAGCTGTACCCG

781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840

TACCTGTACACAgGCAA[^]ACTATGCCATCGCGCGTGGTCGCTGCGTTCAGTCGACAGTGGC

F C Q L F T H N E W K K Y D Y L Q S L G 300

TTCTGTCAACTCTTCACTCACAATGAGTGGAAGAAGTACgACTACCTTCAGTCCTTGGGC

841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900

AAGACAGTTGAGAAGTGAGTGTTACTCACCTTCTTCATGCTGATGGAAGTCAGGAACCCG

K Y Y G Y G A G N P L G P A Q G I G F T 320

AAGTACTACGGCTACGGCGCAGGCAACCCTCTGGGACCGGCTCAGGGGATAGGGTTCACC

901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960

TTCATGATGCCGATGCCGCGTCCGTTGGGAGACCCTGGCCGAGTCCCCTATCCCAAGTGG

N E L I A R L T R S P V Q D H T S T N S

340

AACGAGCTGATTGCCCGGTTGACGCGTTCGCCAGTGCAGGACCACACCAGCACTAACTCG

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020

TTGCTCGACTAACGGGCCAACTGCGCAAGCGGTCACGTCCTGGTGTGGTTCGTGATTGAGC

T L V S N P A T F P L N A T M Y V D F S

360

ACTCTAGTCTCCAACCCGGCCACCTTCCCGTTGAACGCTACCATGTACGTCGACTTTTCA

1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

TGAGATCAGAGGTTGGGCCCGGTGGAAGGGCAACTTGCGATGGTACATGCAGCTGAAPAGT

H D N S M V S I F F A L G L Y N G T E P

380

CACGACAACAGCATGGTTTCCATCTTCTTTGCATTGGGCCTGTACAACGGCACTGAACCC

1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140

GTGCTGTTGTCGTACCAAAGGTAGAAGAAACGTAACCCGGACATGTTGCCGTGACTTGGG

L S R T S V E S A K E L D G Y S A S W V
 400
 TTGTCCCGGACCTCGGTGGAAGCGCCAAGGAATTGGATGGGTATTCTGCATCCTGGGTG
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1200
 AACAGGGCCTGGAGCCACCTTTCGCGGTTTCCTTAACCTACCCATAAGACGTAGGACCCAC
 V P F G A R A Y F E T M Q C K S E K E P
 420
 GTGCCTTTCGGCGCGCGAGCCTACTTCGAGACGATGCAATGCAGTCGGAAAAGGAGCCT
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1260
 CACGGAAAGCCGCGCTCGGATGAAGCTCTGCTACGTTACGTTACGCTTTTCCTCGGA
 L V R A L I N D R V V P L H G C D V D K
 440
 CTTGTTGCGCCTTTGATTAATGACCGGGTTGTGCCACTGCATGGCTGCGATGTGGACAAG
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1320
 GAACAAGCGCGAATACTAATTACTGGCCCAACACGGTGACGTACCGACGCTACACCTGTTC
 L G R C K L N D F V K G L S W A R S G G
 460
 CTGGGGCGATGCAAGCTGAATGACTTTGTCAAGGGATTGAGTTGGGCCAGATCTGGGGGC
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1380
 GACCCCGCTACGTTGCACTTACTGAAACAGTTCCTAACTCAACCCGGTCTAGACCCCGG

AAGTTTTGTCTAGACACGGTGCTAGATACCCAACtgacTCTAAGggtAAGaagTACTCTG
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 TTCAAAACAGATCTGTGCCACGATCTATGGGTTGactgAGATTCCcaTTcTtcATGAGAC
 L I E A I Q K N A T A F K G K Y A F L K
 CTTTGATTGAAGCTATTCAAAAGAACGCTACTGCTTTCAAGGGTAAGTACGCTTTCTTGA
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 GAAACTAACTTCGATAAGTTTCTTGGCGATGACGAAAGTCCCATTTCATGCGAAAGAAGT

CP-6

CP-7

T Y N Y T L G A D D L T P F G E N Q M V
 AGACTTACAAC TACACTTTGGGTGCTGACGACTTGACTCCATTTCGGTGAAAACCAAATGG
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 TCTGAATGTTGATGTGAAACCCACGACTGCTGAACTGAGGTAAGCCACTTTTGGTTTACC
 N S G I K F Y R R Y K A L A R K I V P F
 TTAAC TCTGGTATTAAAGTTCTACAGAAGATACAAGGCTTTGGCTAGAAAGATTGTTCCAT
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 AATTGAGACCATAATTCAAGATGTCTTCTATGTTCCGAAACCGATCTTTCTAACAAGGTA

CP-8.7

CP-9

I R A S G S S R V I A S A E K F I E G F
 TCATTAGAGCTTCTGGTTCTTctAGAGTTATTGCTTCTGCTGAAAAGTTCATTGAAGGTT
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 AGTAATCTCGAAGACCAAGAgaTCTCAATAACGAAGACGACTTTTCAAGTAACTTCCAA

Q S A K L A D P G S Q P H Q A S P V I D
 TCCAATCTGCTAAGTTGGCTGACCCAGGTTCTCAACCACACCAAGCTTCTCCAGTTATTG
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 AGGTTAGACGATTCAACCGACTGGGTCCAAGAGTTGGTGTGGTTTCGAAGAGGTCAATAAC

CP-10.7CP-11.7

V I I S E A S S Y N N T L D P G T C T A

ACGTTATTATTtctGAcgctTCTtctTACAACAACACTTTGGACccaGGTACTTGTACTG
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 TGCAATAATAAagaCTgcgaAGGagaATGTTGTTGTGAAACCTGggtCCATGAACATGAC
 F E D S E L A D T V E A N F T A L F A P
 CTTTCGAAGACTCTGAATTGgctGACactGTTGAAGCTAACTTCACTGCTTTGTTGCTC
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 GAAAGCTTCTGAGACTTAACcgaCTGtgaCAACTTCGATTGAAGTGACGAAACAAGCGAG

CP-12.7

A I R A R L E A D L P G V T L T D T E V
 CAGCTATTAGAGCTAGATTGGAAGCTGACTTGCCAGGTGTTACTTTGACTGACactgaag
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 GTCGATAATCTCGATCTAACCTTCGACTGAACGGTCCACAATGAAACTGACTGtgacttc

CP-13.7

T Y L M D M C S F E T V A R T S D A T E
 TTactTACTTGATGGACATGTGTtctTTTCGAAACTGTTGCTAGAACTTCTGACGCTACTG
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 AatgaATGAACTACCTGTACACAagaAAGCTTTGACACGATCTTGAAGACTGCGATGAC
 L S P F C A L F T H D E W R H Y D Y L Q
 AATTGTCTCCATTCTGTGCTTTGTTCACTCACGACGAATGGAGacactACGACTACTTGC
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 TTAACAGAGGTAAGACACGAAACAAGTGAGTGCTGCTTACCTCTgtgatGCTGATGAACG

CP-14.7CP-15.7

S L K K Y Y G H G A G N P L G P T Q G V
 AATCTTTGaagAAGTACTACGGTcacGGTGCTGGTAACCCATTGGGTCCAactCAAGGTG
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 TTAGAAACttctTCATGATGCCAgtgCCACGACCAATTGGGTAAACCAGGTtgaGTTCCAC
 G F A N E L I A R L T R S P V Q D H T S
 TTGGTTTCGCTAACGAATTGATTGCTAGATTGACTAGATCTCCAGTTCAAGACCACACTT
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1020 AACCAAAGCGATTGCTTAACTAACGATCTAACTGATCTAGAGGTCAAGTTCTGGTGTGAA

CP-16CP-17.7

T N H T L D S N P A T F P L N A T L Y A
CTACTAACCACACTTTGGACTCTAACCCAGCTACTTTCCCATTGAACGCTACTTTGTACG
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1080

GATGATTGGTGTGAAACCTGAGATTGGGTCGATGAAAGGGTAACTTGCGATGAAACATGC

D F S H D N G I I S I F F A L G L Y N G
CTGACTTCTCTCACGACAACggtattATTTCTATTTTCTTCGCTTTGGGTTTGTACAACG
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1140

GACTGAAGAGAGTGCTGTTGccataaTAAAGATAAAAGAAGCGAAACCCAAACATGTTGC

CP-18.7
CP-19.7

T A P L S T T S V E S I E E T D G Y S S
GTACTGCTCCATTGTCTACTACTTCTGTTGAATCTATTGAAGAACTGACGGTTACTCTt
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1200

CATGACGAGGTAACAGATGATGAAGACAACCTTAGATAACTTCTTTGACTGCCAATGAGAA

A W T V P F A S R A Y V E M M Q C Q A E
ctgctTGGACTGTTCCATTTCgcttctAGAGCTTACGTTGAAATGATGCAATGTCAAGCTG
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1260

gacgaACCTGACAAGGTAAGcgaagaTCTCGAATGCAACTTTACTACGTTACAGTTTCGAC

CP-20
CP-21

K E P L V R V L V N D R V V P L H G C A
AAAAGGAACCATTGGTTAGAGTTTTGGTTAACGACAGAGTTGTTCCATTGCACGGTTGTG
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1320

TTTTCCTTGGTAACCAATCTCAAAACCAATTGCTGTCTCAACAAGGTAACGTGCCAACAC

00-10-00

V D K L G R C K R D D F V E G L S F A R
CTGTTGACAAGTTGGGTAGATGTAAGAGAGACGACTTCGTTGAAGGTTTGTCTTTCGCTA

1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1380

GACAACTGTTCAACCCATCTACATTCTCTCTGCTGAAGCAACTTCCAAACAGAAAGCGAT

S G G N W A E C F A * Eco RI CP-22

GATCTGGTGGTAACTGGGCTGAATGTTTCGCTTAAGAAATTCATATA

1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1426

CTAGACCACCATTGACCCGACTTACAAAGCGAATTCTTAAGTATAT

图 12

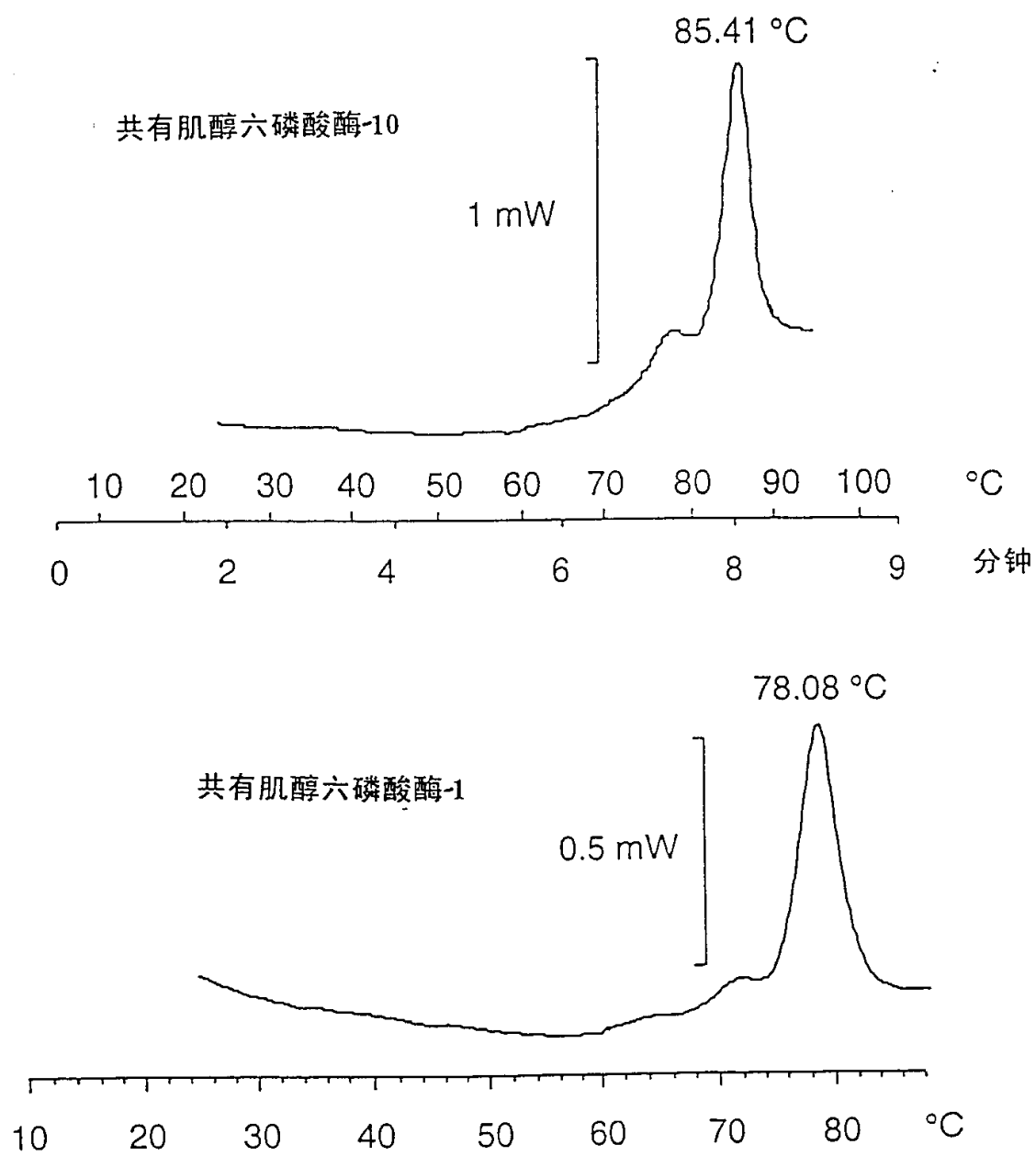


图 13

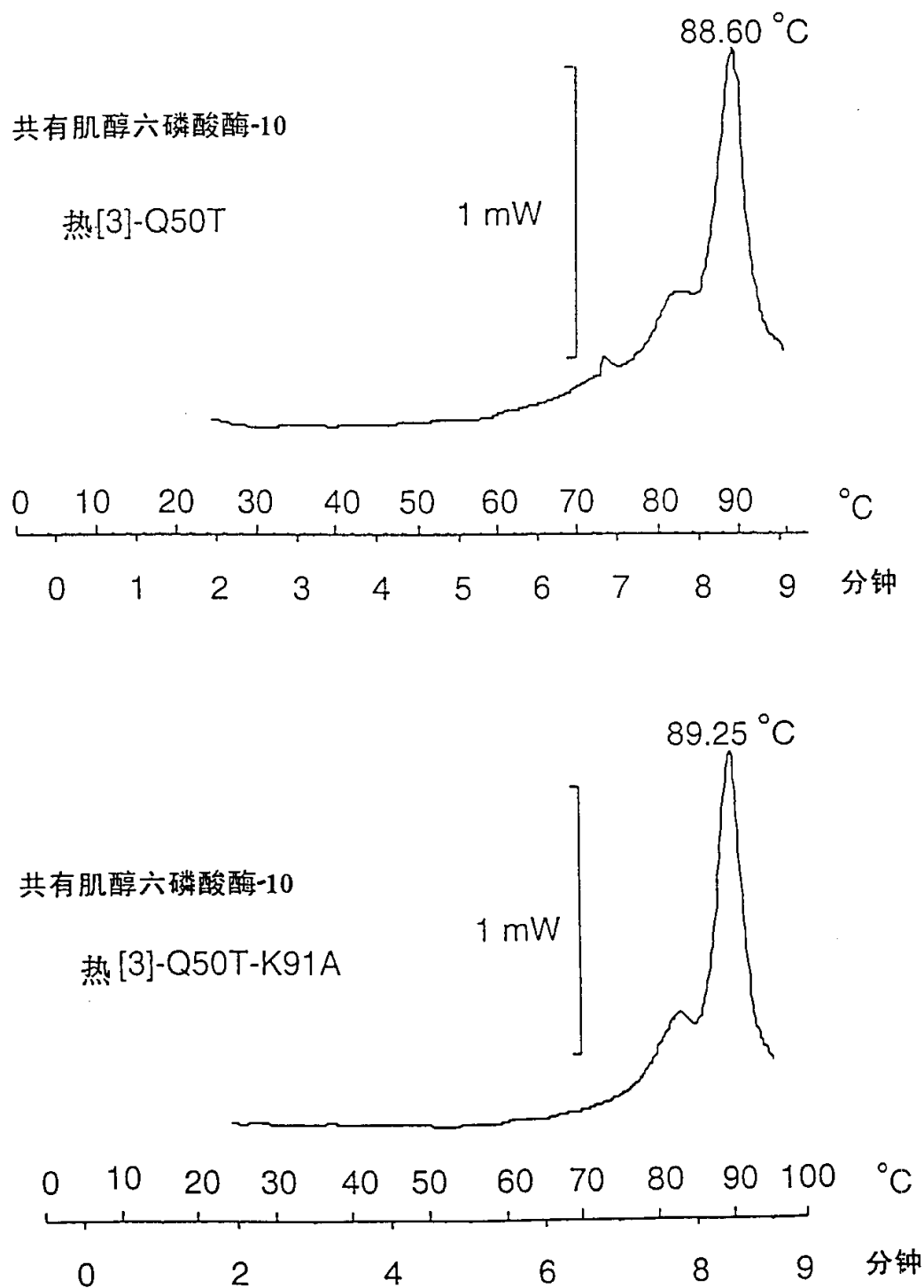


图 14

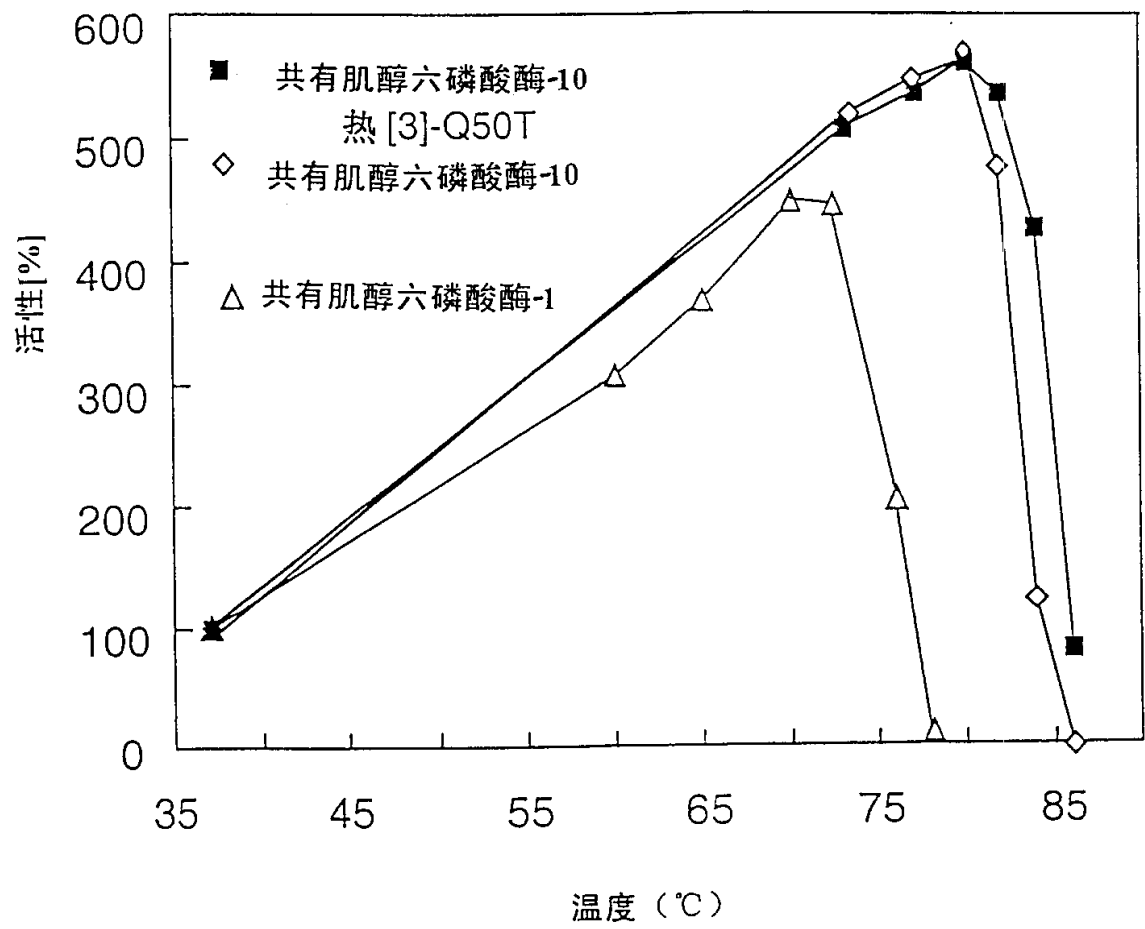


图 15

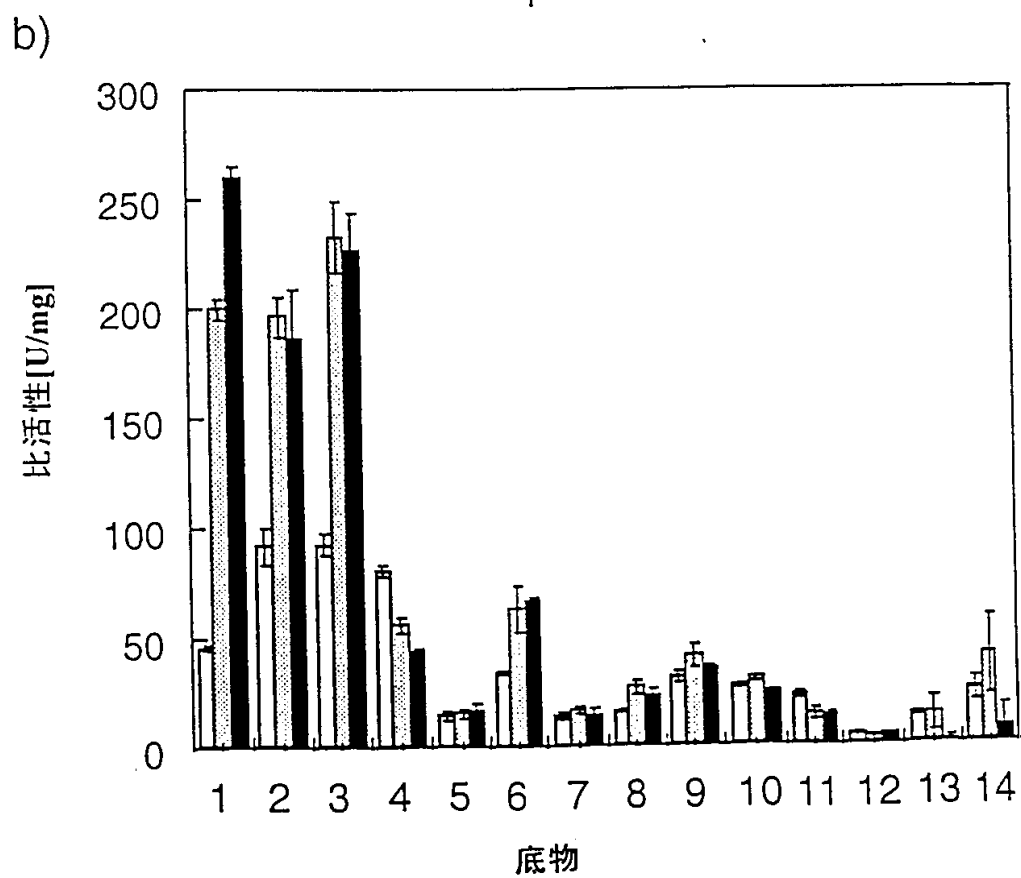
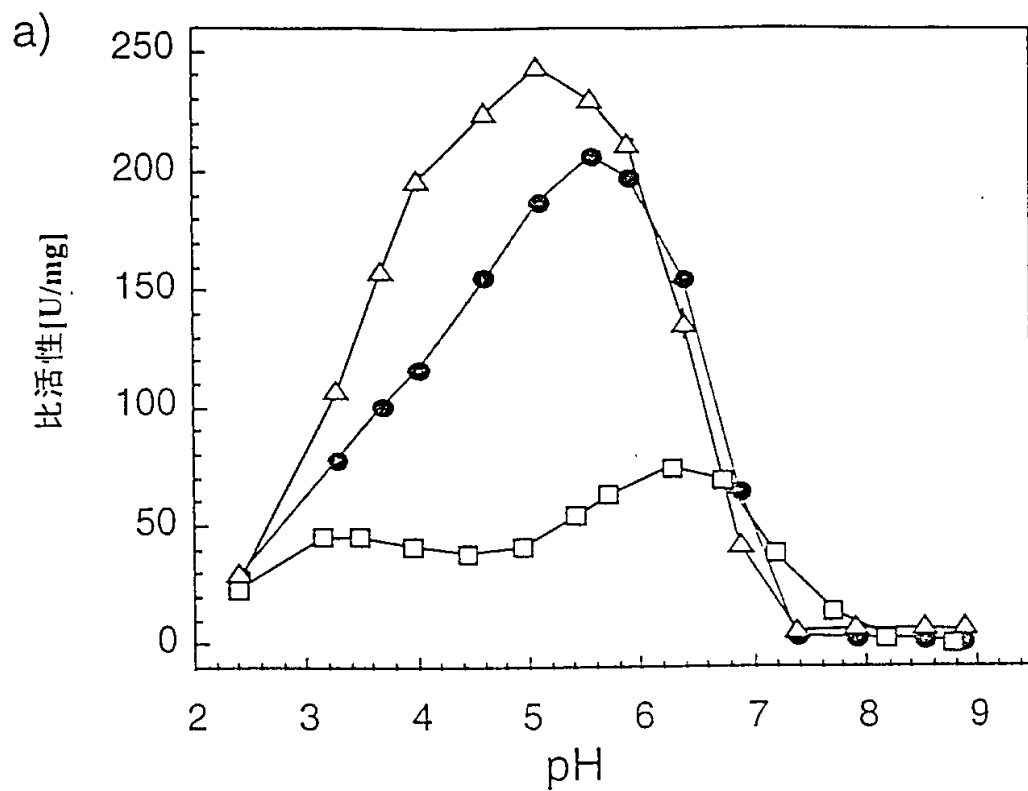


图 16

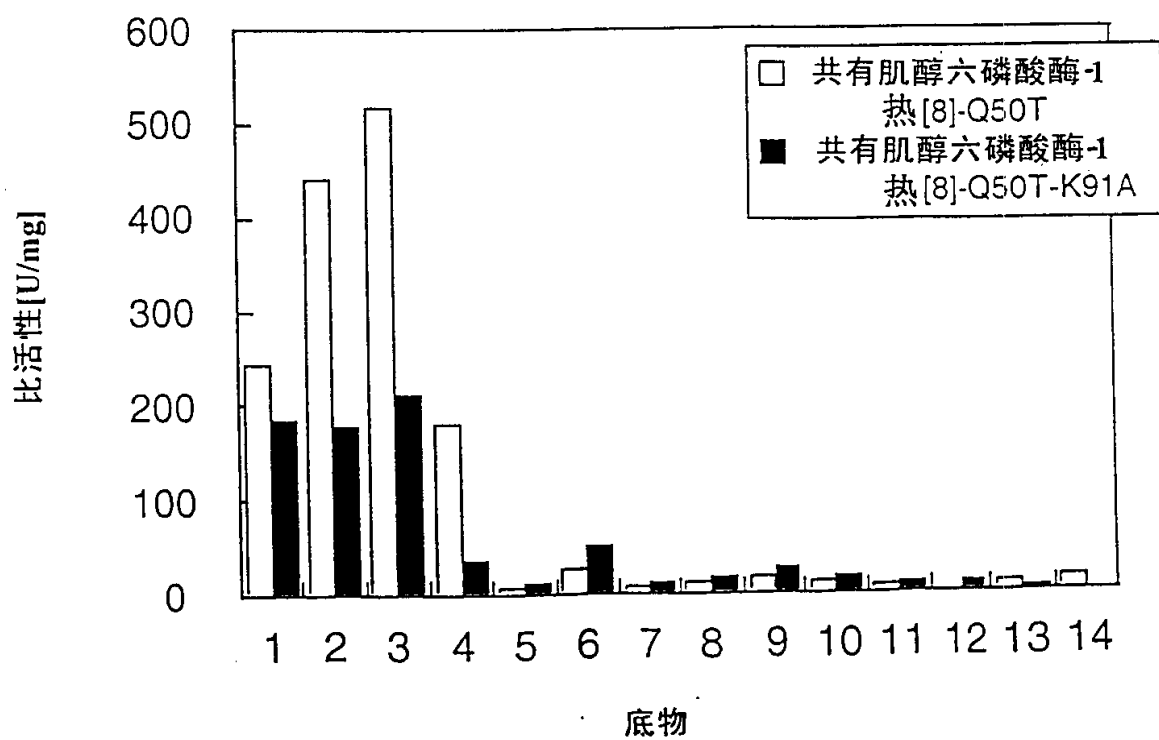
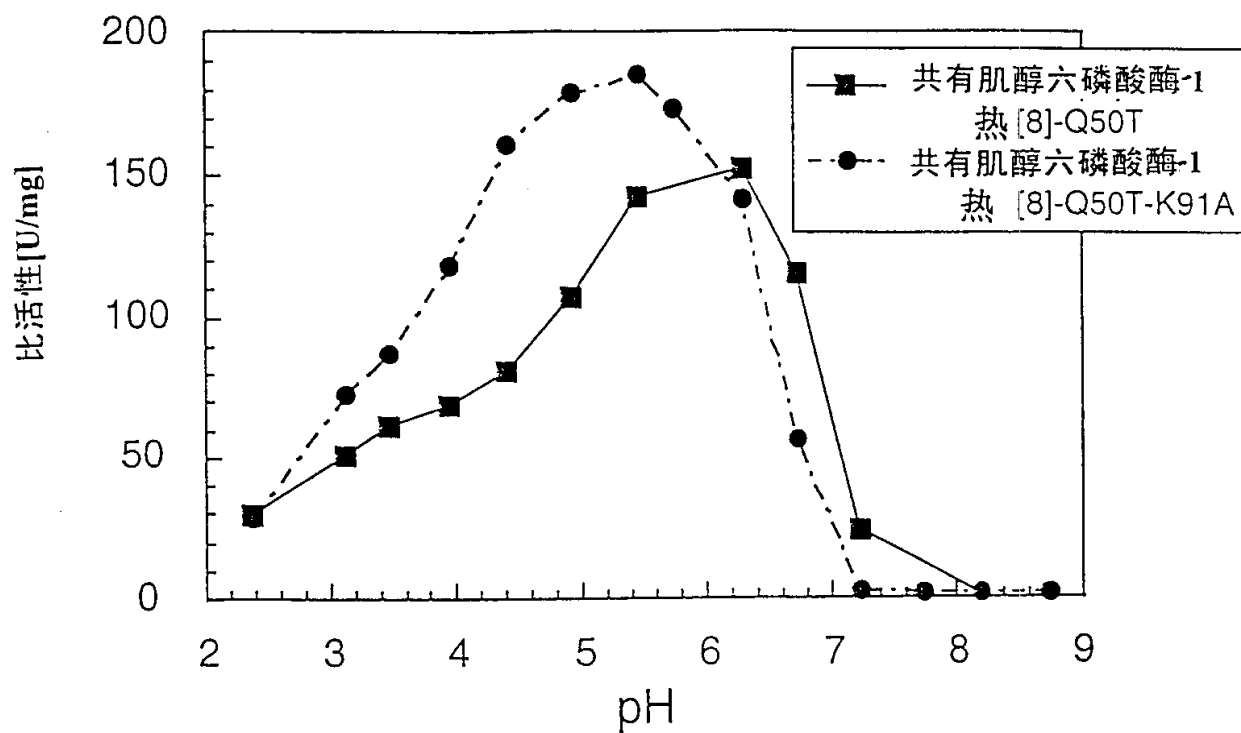


图 17

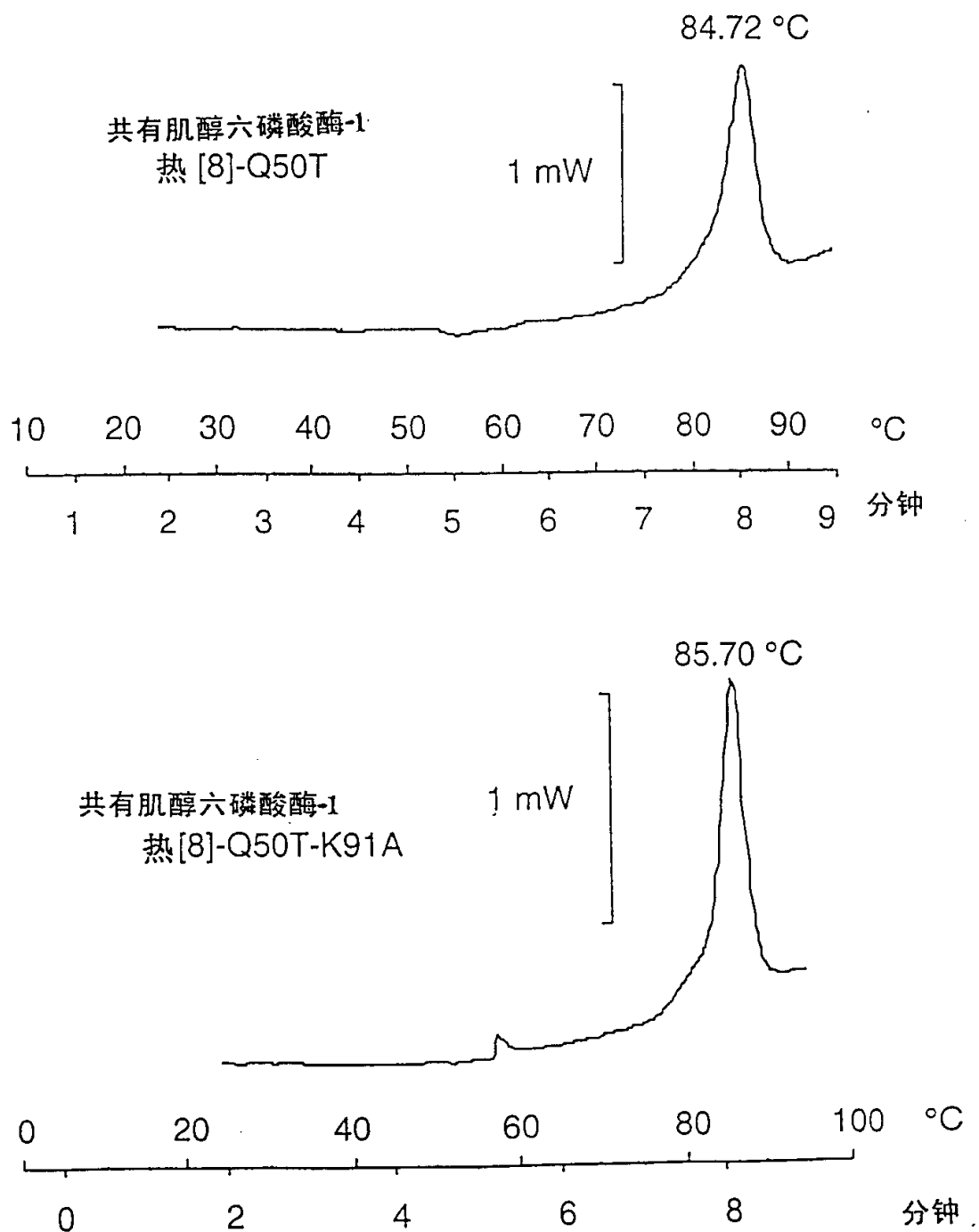


图 18

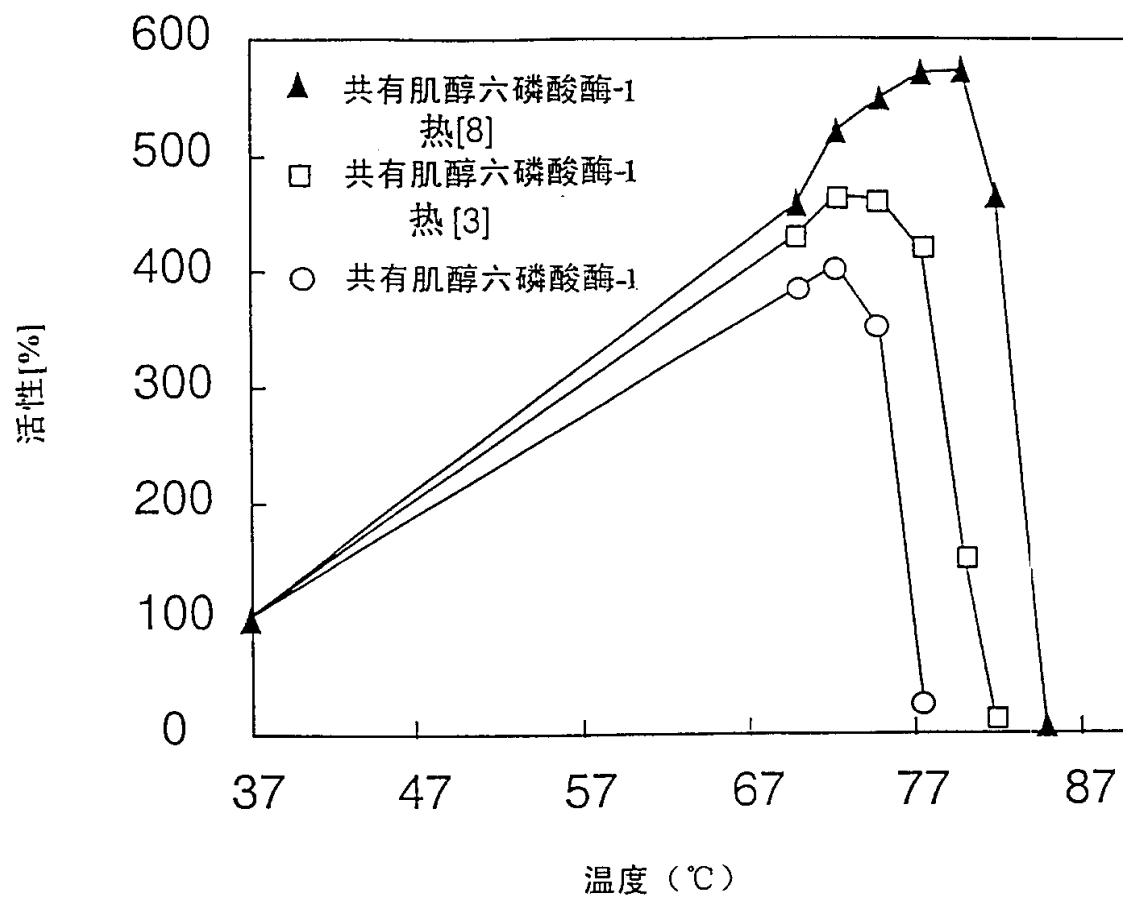


图 19

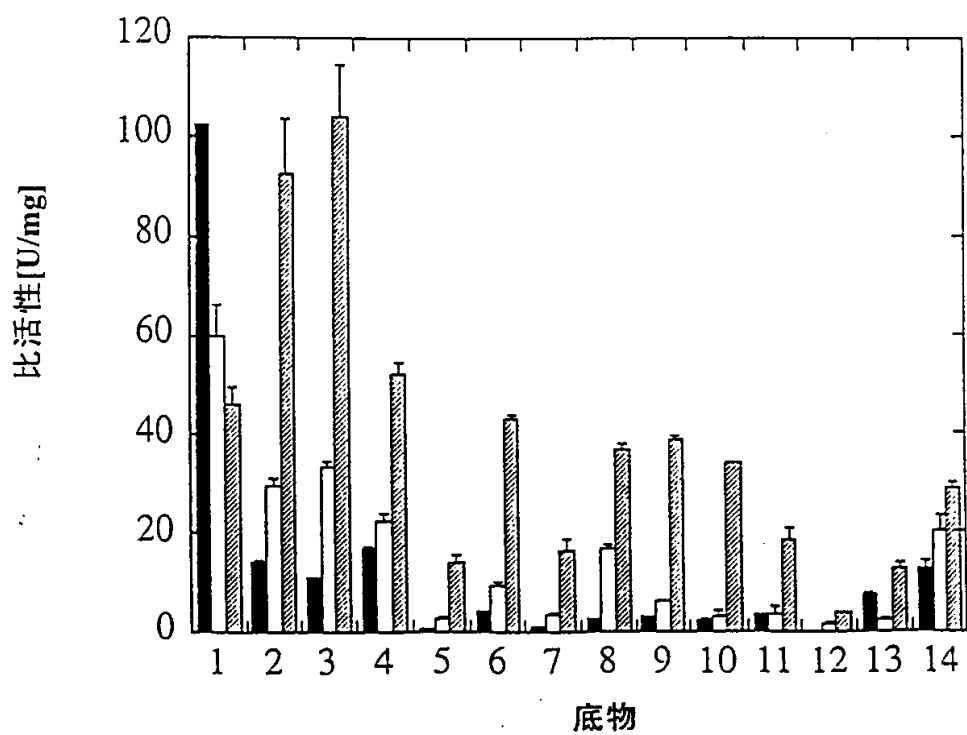
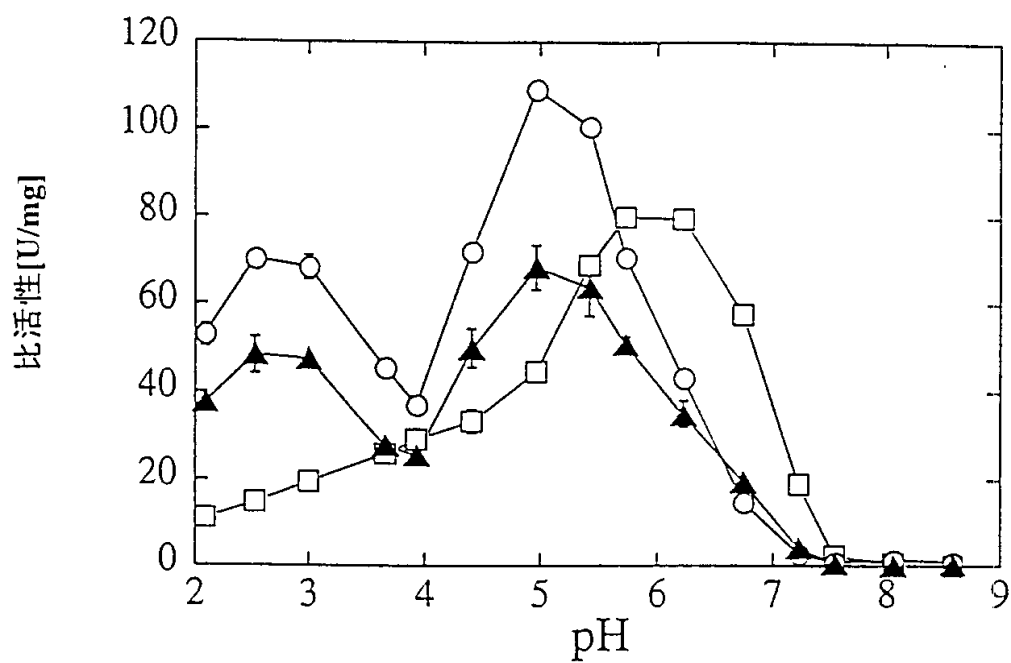


图 20

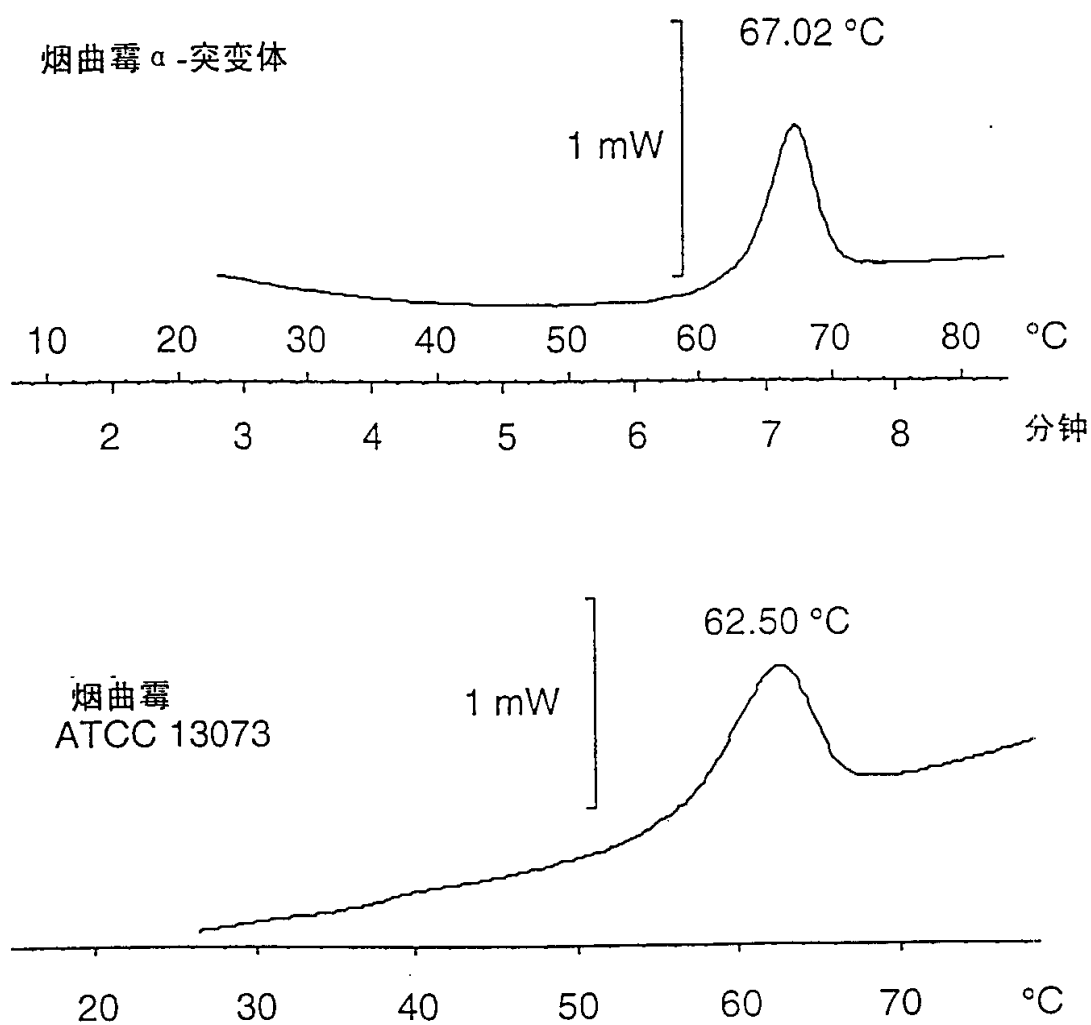


图 21

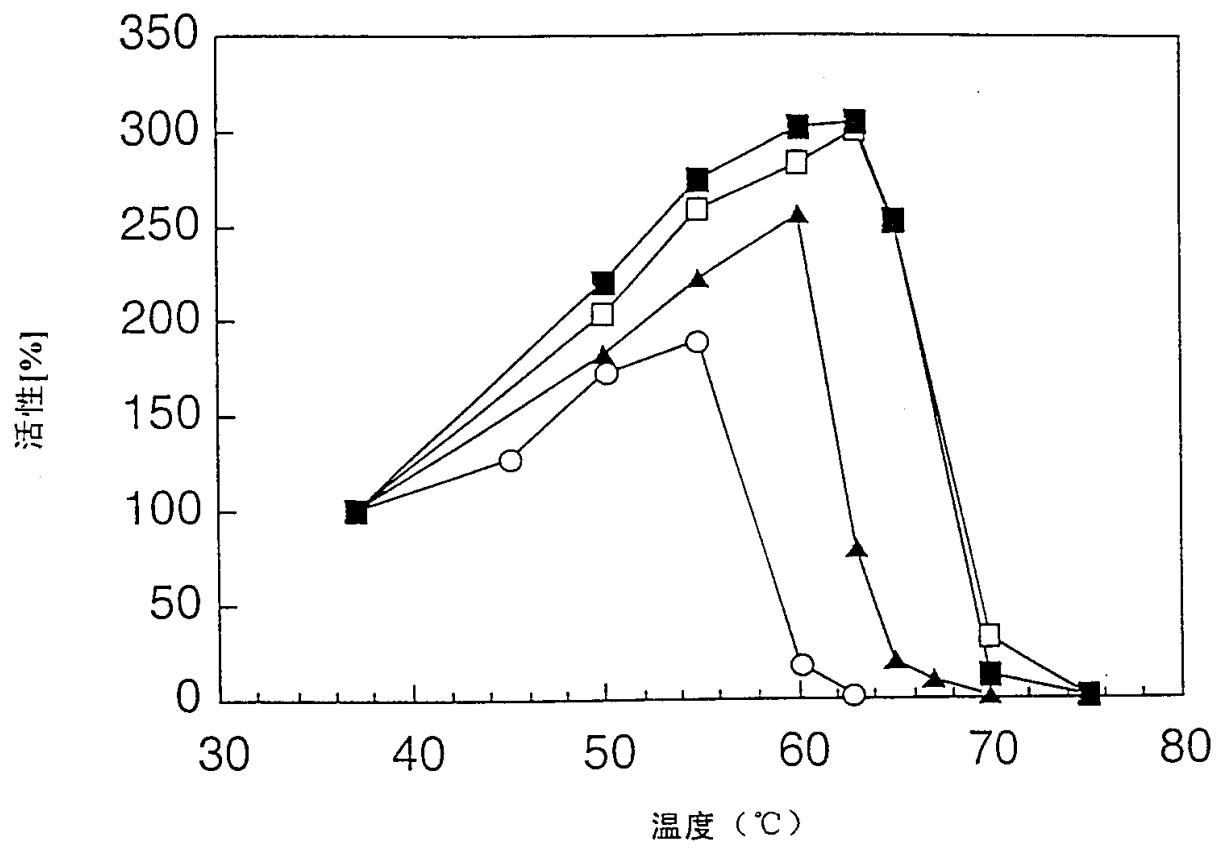


图 22

1 MGVFVLLSI ATLEGSTSGT ALGPRGNSHS CDTVGGGYQC FPEISSNWSP
 51 YSPYFSLADE SAISPDVPKG CRVTFVQVLQ RHGAREPTSG AATRISALIE
 101 AIQKNATAFK GKYAFLKTYN YTLGADDLYP FGANQSSQAG IKFYRRYKAL
 151 ARKIVPFIRA SGSDRVIDSA TNWIEGFQSA KLADPGANPH QASPVINVII
 201 PEGAGYNNTL DHGLCTAFEE SELGDDVEAN FTAVFAPPPIR ARLEAHLPGV
 251 NLTDEDVVNL MDMCPFDIVA RTSDATELSP FCDLFTHDEW IQYDYLGDLD
 301 KYYGTGAGNP LGPAQGVGVFV NELIARLTHS PVQDHTSTNH TLDSNPATFP
 351 LNATLYADES HDNTMVAIFF ALGLYNGTKP LSTTSVESIE ETDGYSASWL
 401 VPFARMYVE MMQCEAEKEP LVRVLVNDRV VPLHGCGVDK LGRCKRDDFV
 451 EGLSFARSGG NWEECF