

五、發明說明 (16)

- 圖 20：質體 pVRC900 的圖式。
- 圖 21：質體 pVRC1000 的圖式。
- 圖 22：質體 pVRC509 的圖式。
- 圖 23：質體 pVRC903 的圖式。
- 圖 24：質體 pVRC409 的圖式。
- 圖 25：質體 pVRC505 的圖式。
- 圖 26：質體 pVRC701 的圖式。
- 圖 27：質體 pVRC702 的圖式。
- 圖 28：質體 pVRC508 的圖式。
- 圖 29：質體 pVRC404 的圖式。
- 圖 30：質體 pVRC507 的圖式。
- 圖 31：質體 pVRC706 的圖式。
- 圖 32：總圖。

材料

Bio-Sil SEC 125和 250管柱 (Bio-rad)

MonoQ HR 5/5和 10/10管柱 (Pharmacia)

PD-10 管柱 (Pharmacia)

Superose 6 HR 10/30管柱 (Pharmacia)

Superdex 200 Hi-Load 16/60管柱 (Pharmacia)

Superose12 製備型管柱 (Pharmacia)

Vydac C4和 C18管柱 (The Separations Group)

Nucleosil 5-C18管柱 (Macherey-Nagel)

Phenyl Superose HR 10/10管柱 (Pharmacia)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

五、發明說明(18)

的 TE, 18 克的 CsCl 和 1.2 毫升濃度 10 毫克 / 毫升的 ETB 等。將該製備物於 20℃ 以 55,000 rpm 超離心過夜。

之後用巴斯德氏吸管收取 CsCl 梯度中帶狀形式的染色體 DNA。接著用飽和著 TE 緩衝液, 5M NaCl 的異丙醇溶液幾次而脫除掉 ETB。隨後添加 3 體積的 TE 和 4 體積的異丙醇以沉澱出 DNA。於用 70% 乙醇洗滌之後, 將 DNA 溶在適當體積的 TE 中。所得 DNA 的總量介於每克菌絲體得到 250 到 500 微克之間。

實施例 2: 大腸桿菌質體 DNA 之分離

本實施例闡述如何從大腸桿菌重組菌株製備大腸桿菌質體 DNA。

2.1. 大腸桿菌質體 DNA 的大量製備

本實施例闡述如何在大腸桿菌內製備大量的質體 DNA。

該製備是用含有 150 微克 / 毫升的氨苄黴素之 LB 培養基以 500 毫升培養液量進行者。其提取方案係源自 Birnboim 和 Doly (1979) 與 Ish-Horowicz 和 Burke (1981) 所述方法而載於 Maniatis et al. (1989) 中者。

於提取後, 用 CsCl 梯度依 Maniatis et al. (1981) 所述純化質體 DNA。然後添加 3 體積的 TE 和 4 體積的異丙醇沈澱出質體 DNA。離心之後, 將沈澱溶在 0.5 到 1 毫升的 TE 中。

2.2. 大腸桿菌質體 DNA 的少量製備

五、發明說明(19)

本實施例闡述如何在大腸桿菌內製備少量的質體DNA。

該製備係用含有150微克／毫升的氨苄青黴素之LB培養基以1.5毫升的培養液體積進行者。該程序為Birnboim和Doly(1979)所述者。

實施例3：在大腸桿菌內構成始旋鏈黴菌SP92的基因DNA庫及雜交膜之製備

本實施例闡述如何從大腸桿菌內製備始旋鏈黴菌SP92的基因體DNA庫。

3.1. 基因體DNA片段之製備

本實施例闡述如何製備高分子量的基因體DNA片段。

將實施例1所製備的SP92菌株之總DNA用Sau3A(New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA)在供應商所建議的緩衝液：0.100 mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 100微克／毫升BSA等之中予以部份消化。用以得到高分子量DNA片段的酵素用量係經由實驗決定者。使用約0.025酵素單位在37℃消化1微克的總DNA 20分鐘。然後將反應混合物置於65℃ 15分鐘以停止反應，之後添加等體積的酚／氯仿以去除酵素。於離心之後，將含有部份消化過的總DNA之上澄液經由添加0.3M最後濃度之乙酸鈉和2.5體積乙醇將其沉澱下來。

將約100微克的總DNA以這種方式消化，並用10-40%蔗糖梯度分離出大小在30到50kb之間的DNA片段。其尺寸再於0.4%瓊脂凝膠上以電泳法予以確定。

五、發明說明(20)

3.2. 粘 接 質 體 pHC79 之 製 備

本實施例闡述如何用大腸桿菌製備粘接質體 pHC79。

粘接質體 pHC79 (Hohn, B. and Collins, 1980) 包含一部份的 pBR322 (Bolivar, F. et al., 1977), λ 的 cro-clI 區和含有 Charon 4A 所含 cos 序列之區 (Blattner, F.R. et al., 1977) 等。

依實施例 2.1 所述從大腸桿菌 TG1 菌株進行粘接質體之提取 (K12, Δ (lac-pro) supE thi hsd DS F' traD36 proA⁺B⁺ lacIq LacZ Δ M15, Gibson, 1984)。

接著, 用 BamHI (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA) 在 20 微升含有 150 mM NaCl, 6mM Tris-HCl pH 7.9, 6mM MgCl₂, 6mM 2-巰基乙醇, 100 微克/毫升 BSA 等的緩衝液中消化 500 毫微克的粘接質體 pHC79。

3.3 DNA 片 段 與 粘 接 質 體 的 連 接

本實施例闡述如何將源自 Sau3A 消化所得始旋鏈黴菌 SP92 基因體片段與 BamHI-線性化載體 pHC79 連接起來。

將依上述線性化過的粘接質體約 150 毫微克與 350 毫微克依實施例 3.1 所述製備成的始旋鏈黴菌 SP92 之總 DNA 片段一起用乙醇予以沈澱。然後, 將沈澱丸溶解在 10 微升的連接緩衝液中: 50mM Tris-HCl pH7.8 10mM MgCl₂, 20mM DTT, 1mM ATP, 50 微克/毫升 BSA, 等並加入濃度為每毫升

五、發明說明(21)

400,000 單位的 T4 DNA 連接酶 (New England Biolabs, Beverly, MA. 01915-5510 USA)。接著在 15℃ 培育隔夜。

3.4 活體外包殼層

本實施例闡述 3.3 所構成的粘接質體如何在活體外 (in vitro) 包殼層。

連接後的雜交粘接質體之包殼層係用 Stratagene 所開發出來的 Gigapack II Gold kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA) 進行者。

將相當於 2 × 70 毫微克雜交粘接質體的 2 × 4 微升連接混合物依供應商所述程序在活體外 (in vitro) 進行外殼層。

3.5 大腸桿菌 DH1 和 HB101 菌株之轉移感染

本實施例闡述如何將粘接質體導到大腸桿菌內。

用兩種大腸桿菌菌株：DH1 (F⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 supE44L-, Low 1968) 和 HB101 (F⁻ supE44 hsdS20(rB⁻mB⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xy1-5 mtl-1, Boyer and Roulland-Dussoix 1969) 同時進行兩組轉移感染。

依下面程序製備細胞：在添補 0.2% 麥芽糖和 10mM MgSO₄ 的 LB 培養基中製備 100-毫升預培養物直到 OD₆₀₀ 達到 0.8 之值為止。然後離心該培養液並將離心丸溶在 40 毫升的 10mM MgSO₄ 中且於相同溶液內稀釋到 OD₆₀₀=0.5。取得 200 微升如此製得的細胞懸浮液與 100 微升包殼層混合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(22)

物混合。在 37℃ 接觸 20 分鐘後，加入 1 毫升的 LB 並將整體混合物置於 37℃ 培育 1 小時。之後，在含有 150 微克／毫升氨苄青黴素的固體 LB 培養基上選擇該轉移感染物。所得轉移感染物的數目約為每微克重組粘接質體約 10^4 。

3.6 始旋鏈黴菌 SP92 基因體 DNA 庫的保存

本實施例闡述如何將始旋鏈黴菌 SP92 的基因體 DNA 庫保存起來。

在確定過嵌入粘接質體 pHC79 中的片段之平均尺寸後，將 HB101 和 DH1 兩菌株經各組轉移感染所產生的約 1500 菌系在裝著 200 微升 Hogness 培養基（添補 8.8% 甘油，3mM 乙酸鈉，55mM K_2HPO_4 ，26mM KH_2PO_4 ，1mM $MgSO_4$ ，15mM $(NH_4)_2SO_4$ ，150 微克／毫升氨苄青黴素等的 LB 培養基）的 96-洞微滴板中傳代培育。將這些板置於 37℃ 培育隔夜，然後保存在 -80℃。

3.7 用始旋鏈黴菌 SP92 基因體庫製備雜交膜

本實施例闡述如何將構成始旋鏈黴菌 SP92 基因體庫的菌系之 DNA 轉移到雜交膜之上。

對 2 個庫分別依下述程序以二重複製備這些雜交膜：

將每個庫的 15 個微滴板用複製平板器複製在含有 150 微克／毫升氨苄青黴素的 LB 瓊脂培養基上。於 37℃ 生長隔夜後，依下面的程序進行菌系轉移到 Biohylon Z⁺ 膜 (Bioprobe System) 之上：將膜切成適當尺寸後與各菌落

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

五、發明說明(24)

溶液中潤洗30分鐘。然後將其浸於50℃含有500mM EDTA, 1% 月桂基 sarcosyl 和1毫克/毫升蛋白酶K的溶液中24小時, 隨時攪拌, 如此, 處理兩次。接著將該嵌入物置於含有1mM PMSF的TE中一小時進行洗滌叁次, 每次清洗後即更換溶液。將如此所得的嵌入物置於0.5M EDTA pH 8.0中, 保存在4℃不超過4個月。

4.2 始旋鏈黴菌 SP92菌株和 SP92衍生菌株的 DNA 嵌入物之消化及脈衝電場電泳分析

本實施例闡述如何將依實施例4.1所述製備成嵌入物形式的始旋鏈黴菌 SP92菌株和 SP92衍生菌株之染色體DNA用不同的限制酵素切割以進行脈衝電場電泳分析。

4.2.1 嵌入物形式的染色體DNA之消化：

先將該嵌入物在TE中洗六次, 然後在所選限制酵素的緩衝液中浸置一小時浸兩次。接著將每一嵌入物放置在裝有160微升限制酵素緩衝液和40單位酵素的Eppendorf試管蓋內。將整個用石蠟紙覆蓋住, 並將該Eppendorf試管閉合以固定住該石蠟紙使其能遏止緩衝液揮發掉。該試管即在所欲溫度保溫箱內培育隔夜。

4.2.2. 用脈衝電場電泳分析消化過的DNA：

本研究所用的脈衝-電場電泳技術為Chu et al., (1986)所開發的CHEF(夾式均勻電場)系統, 其可得到兩個彼此呈120°取向的均勻更迭電場及對該DNA分子的線型軌道。所用的設備為pharmacia-LKB所售之“Pulsafor

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(27)

以停止反應並以5000 g離心所得樣品5分鐘，然後用HPLC分析所形成的原始黴素IIA。將150微升的離心上澄液注射到15-公分Nucleosil 5-C8管柱並用34%乙腈和66% 0.1M磷酸鹽緩衝液pH2.9的混合物予以洗提。原始黴素IIA和IIB係利用其在206nm的UV吸收進行探測。

酵素活性單位定義為在所述條件下每小時合成1 μ mol原始黴素IIA所需的酵素量。

5.1.1.B. 始旋鏈黴菌SP92的原始黴素IIA合成酶之純化

本實施例闡述如何純化出始旋鏈黴菌SP92所含參與原始黴素IIA生物合成途徑的一種酵素。

使用上述實施例5.1.1.A中的分析，依下面所述進行原始黴素IIA合成酶之純化，其中要注意於必要時在兩連續步驟之間，將活性液份冷凍和保持在-30℃。

取始旋鏈黴菌SP92培養物在原始黴素生產期開始時收取之離心丸150克用含有10% v/v甘油的0.1M磷酸鹽緩衝液pH7.2洗之，然後用450毫升含有5mM DTT和0.2毫克/毫升溶菌酶的50mM bis-tris丙烷緩衝液pH6.8溶取之。如此所得懸浮液於27℃培育45分鐘以50,000g離心一小時。接著用硫酸銨沈澱法分級分離如此收集到的粗萃取物。於40到50%飽和度之間沈澱的蛋白質部份先在Sephadex G-25 Fine管柱上脫鹽，然後以在pH6.8 50mM bis-tris丙烷緩衝液/1mM DTT中之溶液注射(100毫克每次注射)到monoQ HR 10/10管柱上。用線型KCl梯度(0到0.5M洗提

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(29)

Phenyl Superose	8	2.8	12	14	86
Bio-Sil SEC	5	1.3	18	14	130
MonoQ 5/5	10	0.7	23	10	160

純化倍數是從純化過程所得各液份的比活性增加值來計算者。

5.1.2 用蛋白質序列製備寡核苷酸：

本實施例說明如何用實施例5.1.1.B所純化的原始黴素 IIA 合成酶所含兩個次單元的NH₂-端序列來合成寡核苷酸。原始黴素 IIA 合成酶的這兩個次單元稱為SnaA和SnaB，且如實施例5.1.1.B所述者，分別對應於分子量50,000和35,000的多肽。

將對應於原始黴素 IIA 合成酶所具次單元的蛋白質 SnaA和SnaB所含NH₂-端序列用微序列分析法推演出來。其後將用愛德曼氏降解技術(the Edman degradation technique)，使用耦合到HPLC設備的自動序列分析器(Applied Biosystems model 407A)以鑑定苯基硫代乙內醯胺衍生物。分別測定出約30個左右之殘基。

蛋白質SnaA：(參看SEQ ID no.2上的殘基2到29)

T A P(R)(R,W)R I T L A G I I D G P G G H V A A(W)R H P (A) T

蛋白質SnaB：(參看SEQ ID no.3上的殘基2到31)

五、發明說明(34)

現的顯著性質。該標的酵素為3-羥基吡啶羧酸：AMP連接酶，其係催化自由3-羥基吡啶羧酸與ATP在 $MgCl_2$ 存在下形成該酸的腺苷化反應者(圖9)。

將欲分析的酵素份(0.002到0.020單位)置於總體積為250微升含有pH6.8 50mM bis-tris 丙烷緩衝液，1mM DTT 10% v/v 甘油之溶液中，於3-羥基吡啶羧酸(1mM)，ATP (2mM)， $MgCl_2$ (5mM)和用磷原子放射性同位素 ^{32} 標示過的焦磷酸四鈉(200 μ m)等存在之下，於27℃培育15分鐘。

之後，添加1毫升濃度為10克/升，在75% 0.1M焦磷酸四鈉和25%的14%過氧酸之混合物中的活性炭懸浮液以停止該反應。於攪拌之後，收集該活性炭並用1毫升的該焦磷酸鹽/過氧酸混合物洗兩次。然後，各用1毫升的50%甲醇/50% N 氨溶液混合物將放射性有機分子洗提三次到裝有12毫升水的計數管瓶內。之後，用閃爍計數器(PACKARD Minaxi TriCarb 4000)利用Cerenkov效應測量放射性。

酵素活性的單位定義為在上述條件下於一小時過程中將1微莫耳焦磷酸根摻到ATP內所需的酵素量。

5.2.1.B. 始旋鏈黴菌SP92 3-基吡啶羧酸：AMP連接酶之純化

本實驗闡述如何純化出參與原始黴素IA生物合成途徑的始旋鏈黴菌SP92所含酵素。

使用上面實施例5.2.1.A中所述分析，依下文所述進行

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(35)

3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶之純化，其中要注意的是在必要時，於相連步驟之間將活性液份以 -70°C 冷凍並將其保存在 -30°C 。

將 234 克於原始黴素生產期開始即收取的始旋鏈黴菌 SP92 培養液之離心丸用含有 10% v/v 甘油的 0.1M 磷酸鹽緩衝液，pH 7.2 洗後，用 234 毫升含有 4mM DTE，1mM 苯甲脒，1mM PMSF，15% v/v 甘油和 0.6 毫克/毫升溶菌酶等的 pH 8.0 100 mM Tris-HCl 緩衝液溶取之。如此所得懸浮液於 27°C 培育 30 分鐘後，以 50,000g 離心一小時。將所得處於 pH 8.0 100 mM Tris-HCl 緩衝液/4mM DTE/1mM 苯甲脒/1mM PMSF/15% v/v 甘油之中的粗萃取物注射到 Q Sepharose Fast Flow 管柱上 (80 毫升)。用線性 KCl 梯度 (0 到 0.4M) 洗提蛋白質。將含有酵素活性 (用實施例 5.2.1.A 中所述試驗探測之) 的液份集中後，用一體積含有 2M 硫酸銨的 pH 8.0 100 mM Tris-HCl 緩衝液/1mM 苯甲脒/1mM PMSF/15% v/v 甘油予以稀釋。然後在 phenyl Sepharose 管柱上 (50 毫升) 用在 pH 8.0 100 mM Tris-HCl 緩衝液/1mM 苯甲脒/1mM PMSF/15% v/v 甘油中的遞減硫酸銨梯度 (1.0M 到 0M) 層析分離出蛋白質。於添加 4mM DTE 後，將活性部份集中，於 Centriprep 10 上濃縮到 5 毫升，再加到 Superose 12 製備型管柱 (100 毫升) 上。將含有所欲活性的液份集中，置於 pH 8.0 100 mM Tris-HCl 緩衝液/4mM DTE/1mM 苯甲脒/1mM PMSF/15% v/v 甘油中注射到 MonoQ HR 5/5 管柱上 (每次注射約 6 毫克)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(41)

明的 ATP-焦磷酸根交換酵素試驗進行測量。

該酵素用蘇胺酸或丙胺酸（在原始黴素 IC 中所含胺基丁酸同類似物）進行胺基醯化反應可使該肽合成酶有別於其他可能促成 ATP-焦磷酸根交換的酵素，特別是胺基醯基-tRNA 合成酶。因此，本實施例所採用者即為用氘-標示蘇胺酸對酵素進行胺基醯化之檢驗。

將欲分析的酵素分液（0.2到2單位）置於總體積為250微升的 pH6.8 50mM bis-tris丙烷緩衝液 / 1mM DTT/10% v/v 甘油中於 1 μ Ci 的 [3- ^{3} H]-L-蘇胺酸（15Ci/毫莫耳），ATP(2mM)和 MgCl₂(5mM)等存在之下，在 27℃ 培育 15分鐘。

之後，添加 150 微升的 25% 三氯乙酸溶液以停止該反應。在微濾器上收集沈澱出來的蛋白質，各用 400 微升的 7% 三氯乙酸溶液洗三次後，各用 400 微升 N 氫氧化鈉溶液洗提兩次到裝著 1 毫升 N HCl 和 12 毫升閃爍調配液 (Beckman Readygel) 的計數管瓶之內。再用閃爍計數器 (PACKARD Minaxi TriCarb 4000) 測量該管瓶所含放射性之量。其值代表以共價鍵結合到標的肽合成酶之上的蘇胺酸量。

酵素活性的單位定義為於 15 分鐘內將 1 pico 莫耳蘇胺酸在上述條件下共價鍵結合所需的酵素用量。

5.3.1.B. 原始黴素 I 合成酶 II 之純化

本實驗闡述如何純化出參與原始黴素 IA 生物合成途徑中的始旋鏈黴菌 SP92 所含酵素。

利用上文實施例 5.3.1.A 中所述分析，依下文所述純化

五、發明說明(42)

出負責將蘇胺酸和胺基丁酸殘基摻加到原始黴素IA肽鏈中的肽合成酶，其中要注意的是在4℃操作並將活性部份保存在-70℃。

將150克於原始黴素生產期開始即收取的始旋鏈黴菌SP92培養液離心丸用含有10% v/v甘油的0.1M磷酸鹽緩衝液，pH7.2洗滌後，用450毫升含有4mM DTE，1mM苯甲脒，1mM PMSF，1mM EDTA，1mM EGTA，15% v/v甘油等的pH8.0 100 mM Tris-HCl緩衝液予以溶取。如此所得懸浮液再用調整到5000 psi壓力的細胞破裂壓機(French Press)予以磨碎後，以50,000g離心1小時。如此收集到的粗萃取物於置於pH8.0 100 mM Tris-HCl緩衝液/4mM DTE/2mM苯甲脒/2毫克/升亮肽素/1毫克/升E-64/15% v/v甘油之中後注射到Q Sepharose Fast Flow管柱上(200毫升)。用線性KCl梯度(0到0.6M)洗提出蛋白質。在從管柱流出之際，每一液份都用十分之一其體積的1mM PMSF，/5mM EDTA/5mM EGTA溶液予以處理。將含有酵素活性的液份(用實施例5.3.1.A中所述檢驗予以探測)合併後，在Centriprep 30上超濾再濃縮到最後體積28毫升。接著，各以4毫升液份將該濃縮物注射到已用pH6.8 50mM bis-tris 丙烷緩衝液/1mM苯甲脒/4mM DTE/0.2mM Pefabloc/1mM EDTA/0.1M KCl/20% v/v甘油平衡過的Superdex 200 Hi-Load 16/60滲透管柱上。在分析之後，將活性液份合併，於Centriprep 30上再濃縮到15毫升，然後在處於pH8.0 100 mM Tris-HCl緩衝液/4mM DTE/2mM

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(43)

苯甲脒/2毫克/升亮肽素/1毫克/升 E-64/20% v/v 甘油之中的 PD-10 上脫鹽，再分成兩部份加到已平衡的 MonoQ HR 10/10 管柱上並用從 0/4M KCl/相同緩衝液開始的線型梯度洗提之。將含有所欲活性的液份合併，於 Centriprep 30 及隨後的 Centricon 30 之上再濃縮到 1 毫升之最後體積後，分成五部份注射到處於 pH 6.8 50mM bis-tris 丙烷緩衝液/1mM 苯甲脒/4mM DTE/0.2mM Pefabloc/1mM EDTA/0.1M KCl/20% v/v 甘油之中的 Superose 6 HR 10/30 管柱上。在此技術中探測到的活性尖峰係在以 450,000 為中心的分子量處。

在此步驟之後，所得酵素即為純者，且在 SDS-PAGE 電泳中，其分子量估計為約 240,000。該電泳帶也含有用氘化蘇胺酸經胺基醯化標示過的蛋白質所具全部放射性。

在此階段下，用濃度為 100 μ Ci/毫升蘇胺酸 (15 μ Ci/毫莫耳) 測得之最大酵素活性達到 3670 單位/毫克；該酵素也能夠與 L-胺基丁酸或 L-丙胺酸形成線甘鹽；另外，也用氘化丙胺酸探測到該酵素的胺基醯化反應，且於 200 μ Ci/毫升 [2,3- ^{3} H]-L-丙胺酸 (15 Ci/毫莫耳) 存在下的最大活性為 15 分鐘內 2290 pmol/毫克。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (47)

含活性的分析，該活性具有只在原始黴素產生期間才表現的顯著性質。標的活性為負責將脯胺酸和對 - 二甲胺基苯丙胺酸殘基於SAM, ATP和 $MgCl_2$ 存在之下摻加到原始黴素IA肽鏈中的肽合成酶之部份活性 (圖11)。

脯胺酸：AMP 連接酶和對 - 二甲胺基苯丙胺酸AMP 連接酶活性係以類似於5.2.1.A中對3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶之ATP-焦磷酸鹽交換酵素檢驗而測量者。

該酵素同脯胺酸和對 - 二甲胺基苯丙胺酸予以胺基醯化可用來區別該肽合成酶與可能進行ATP-焦磷酸鹽交換的其他酵素，特別是胺基醯基-tRNA合成酶。同樣情形可應用於在酵素上醯化的對 - 二甲胺基苯丙胺酸所含 α -胺基官能基之N-甲基化、後述具有N-甲基化特性的檢驗即為本實施例所採用者。

將欲分析的酵素部份 (0.2到2單位) 置於總體積為250微升的pH6.8 50mM bis-tris丙烷緩衝液 / 1mM DTT / 10% v/v 甘油之中於1 μ Ci的[甲基- ^3H]-SAM (15Ci/毫莫耳)，對二甲基-L-苯丙胺酸 (1mM)，ATP (2mM) 和 $MgCl_2$ (5mM) 等存在之下，在27 $^{\circ}C$ 培育15分鐘。

添加150微升的25%三氯乙酸溶液以停止反應。在微濾器上收集沈澱出來的蛋白質，各用400微升的7%三氯乙酸洗三次後，用400微升的N氫氧化鈉洗提兩次到裝著1毫升N HCl和12毫升閃爍調合液 (Bechman Readygel) 的計數管瓶中。用閃爍計數器 (PACKARD Minaxi TriCarb 4000) 測量該管瓶中所含放射性量。該量代表共價鍵結合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(48)

到所欲肽合成酶的N-甲基化對-二甲胺基苯丙胺酸之量。

酵素活性的單位定義為在15分鐘內於上述條件下將1微微莫耳(picomole)的N-甲基化對-二甲胺基苯丙胺酸共價鍵結合所需酵素的量。

5.4.1.B 原始黴素 I 合成酶 III 之純化

本實驗說明如何從始旋鏈黴菌 SP92 中純化出參與原始黴素 IA 生物合成途徑的一種酵素。

使用上面實施例 5.4.1.A 中所述分析法，依下文所述純化出負責將脯胺酸和對-二甲胺基苯丙胺酸殘基摻加到原始黴素 IA 肽鏈中的肽合成酶，其中要注意在 4℃ 進行且將活性部份保存在 -70℃。

將 250 克於原始黴素生產期開始收取到的始旋鏈黴菌 SP92 培養物之離心丸用 0.1M 磷酸緩衝液 pH 7.2 / 1mM PMSF / 5mM EDTA / 5mM EGTA, 0.5 M KCl / 10% v/v 甘油洗清後，用 750 毫升含有 4mM DTE, 5mM 苯甲脒, 0.2mM Pefabloc, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 2 毫克 / 升亮胺素, 2 毫克 / 升 STI, 2 毫克 / 升抑肽酶, 1 毫克 / 升 E-64, 20% v/v 甘油 等的 pH 8.0 100mM Tris-HCl 緩衝液予以溶取。然後將如此所得懸浮液用調整到 5,000 psi 壓力的細胞破裂器予以磨碎後，以 50,000g 離心一小時。將如此收集到的粗萃取物用硫酸銨沈澱法予以分級分離。然後將 0 到 35% 硫酸銨飽和度之間出來的蛋白質部份再溶解於破裂緩衝液中，於已平衡的 Sephadex G 25 Fine 管柱上脫鹽並用相同的緩衝液洗提。將依此製備所得蛋白質置於 pH 8.0 100 mM

五、發明說明(49)

Tris-HCl 緩衝液 / 4 mM DTE / 2 mM 苯甲脒 / 2 毫克 / 升亮胺素 / 1 毫克 / 升 E-64, 20% 甘油中注射到 Q Sepharose Fast Flow 管柱上 (200 毫升), 然後用線型 KCl 梯度 (0 到 0.6 M) 予以洗提。在從管柱流出時, 對每一液份用十分之一其體積的 2 mM Pefabloc / 5 mM EDTA / 5 mM EGTA / 5 mM 苯甲脒溶液處理之。將含有酵素活性的液份 (用實施例 5.4.1.A 中所述檢驗予以探測) 集中並以 80% 飽和度的硫酸銨沈澱之。沈澱所得蛋白質於再溶解在 pH 6.8 50 mM bis-tris 丙烷緩衝液 / 1 mM 苯甲脒 / 1 mM DTE / 0.2 mM Pefabloc / 1 mM EDTA / 1 mM EGTA / 2 毫克 / 升亮胺素 / 0.15 M NaCl / 20% v/v 甘油之中後, 以 5 個 4-毫升液份注射到已用該相同緩衝液平衡過的 Superdex 200 Hi-Load 16/60 滲透管柱並用該緩衝液洗提之。於分析之後, 將活性液份合併, 於 Centriprep 30 上再濃縮到 3 毫升, 用 pH 8.0 100 mM Tris-HCl 緩衝液 / 4 mM DTE / 1 mM 苯甲脒 / 1 mM PMSF / 20% v/v 甘油再稀釋到 20 毫升並分成兩部份加到已平衡的 MonoQ HR 10/10 管柱上, 以在該相同緩衝液內從 0.4 M KCl 開始的線型梯度洗提之。將含有所要活性的最佳液份集中, 用為酵素活性鑑定之物質並用於其微序列分析之中。

在此步驟之後, 該酵素即為純者, 且, 在 SDS-PAGE 電泳中, 其分子量估計為近乎 250,000。該電泳帶也含有用氘化 SAM 和對 - 二甲胺基苯丙胺酸經由胺基醯化予以標示過的蛋白質所具全部放射性。於 Superose 6 HR 10/30 的滲透分析中, 該酵素的天然分子量估計為 700,000。

五、發明說明(52)

將約500毫微克的寡核苷酸混合物以這種方式用 ^{32}P 予以標示後，與已用不同酵素消化過的pIBV3 DNA進行南方雜交。這些雜交結果證明粘接質體pIBV3載有一部份的原始黴素I合成酶III構造基因，並鑑定出含有該基因的區段。南方點染和雜交係依實施例5.1.4所述而進行者。

雜交結果證明粘接質體pIBV3具有一段含有與實施例5.4.2所合成的探頭相互同系性的序列之8.4-kb SphI片段。

5.5 粘接質體pIBV3上含有一部份原始黴素I合成酶IV (SnbE)構造基因之證明

本實施例闡述如何鑑定已分離出的粘接質體上(實施例5.1)含有原始黴素I生物合成基因。

5.5.1 負責將苯甘胺酸殘基摻加到原始黴素IA肽鏈內的肽合成酶(稱為原始黴素I合成酶IV)之鑑定

5.2.1.A 負責將苯甘胺酸殘基摻加到原始黴素IA肽鏈內的肽合成酶(原始黴素I合成酶IV)所載酵素活性之分析

本實施例闡述至今為止尚未被述及的原始黴素IA生物合成途徑所含一種酵素活性之分析；該活性具有只在野生型微生物生產原始黴素期間才表現之顯著性質。該標的活性為負責將L-苯甘胺酸殘基於ATP和 MgCl_2 存在下摻加到肽鏈中之肽合成酶(原始黴素I合成酶IV)所具活性(圖12)。

五、發明說明(53)

原始黴素 I 合成酶 IV 的苯甘胺酸：AMP 連接酶活性係以類似於 5.2.1.A 中對 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶活性所說明的 ATP-焦磷酸鹽交換酵素檢驗，於含有 L-苯甘胺酸 (1mM) 和 KCl (50mM) 的培育緩衝液存在下測量者。

5.5.1.B. 負責將苯甘胺酸殘基摻加到原始黴素 IA 肽鏈中的肽合成酶 (原始黴素 I 合成酶 IV) 之純化

本實施例闡述如何從始旋鏈黴菌 SP92 純化出參與原始黴素 IA 生物合成途徑中之酵素。使用上面實施例 5.5.1.A. 中所述分析，依下文所述純化原始黴素 IA 合成酶 IV。所有操作係在 4℃ 進行。含有活性的部份要立即冷凍並保存在 -70℃。

將依實施例 5.2.1.B. 所述收取的 70 克濕細胞再懸浮於 250 毫升的細胞溶緩衝液中 (100mM Tris-HCl pH 8.0，含有 25% 的甘油，4mM DTE，1mM EGTA，1mM EDTA，1mM PMSF，1 毫克/升 E-64，2 毫克/升 STI，2 毫克/升 α_2 -巨球蛋白，1 毫克/升亮肽素，2 毫克/升抑肽酶，5mM 苯甲脒，0.6 毫克/毫升溶菌酶)。如此所得溶液於 4℃ 保持攪拌一小時後，以 50,000 g 離心攪拌一小時。然後將處於該細胞溶緩衝液中的上澄液注射到 Sephadex G-25 管柱上，並將洗提出的分液 (每次層析分離注射約 250 毫克的蛋白質) 注射到已用 100 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0/ 4mM DTE/ 1mM EGTA/ 1mM EDTA/ 1 毫克/升 E-64/ 2 毫克/升 STI/ 20% 甘油平衡過的 MonoQ HR 10/10 管柱 (pharmacia)。用 0 到 0.6 M KCl 的線型梯度洗提出蛋白質

五、發明說明 (54)

，且在從管柱流出之際，用十分之一其體積的 2mM Pefabloc/ 5mM EGTA/ 5mM EDTA 溶液處理每一液份。將含有活性的諸液份合併，並對每 3 體積的液份混合入 1 體積的 100 mM Tris-HCl pH 8.0/ 15% 甘油 / 1mM PMSF/ 1mM 苯甲脒 / 4mM DTT/ 3.4M 硫酸銨。之後將所得溶液注射到 phenyl Superose HR 10/10 管柱上（每次層析分離操作注射五分之一的該溶液），並用 0.9 到 0 M 硫酸銨之遞減線性梯度洗提該蛋白質。將含有所欲活性的液份合併。所得溶液於 Centriprep 30 中濃縮到 3500 微升後，分成兩部份注射到已平衡的 Superdex 200 Hi-Load 10/60 管柱上並用含有 20% 甘油，0.15M NaCl, 4mM DTT, 1mM PMSF, 1mM 苯甲脒，1mM EDTA 等的 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 pH6.8 洗提之。所得活性液份用 9 體積含有 25% 甘油，4mM DTT, 1mM PMSF, 1mM 苯甲脒等的 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 pH6.8 予以稀釋後，注射到已平衡在相同緩衝液中的 MonoQ HR 5/5 管柱上。用 0 到 0.4 M KCl 的線型梯度洗提出所欲活性，並在 Centricon-30 中濃縮到 630 微升。將該樣品與 SDS/ 氫硫基乙醇混合物一起在 80℃ 加熱 10 分鐘後，在 6% 聚丙烯醯胺凝膠上電泳純化出所欲蛋白質。於電泳和用庫馬其藍 (Coomassie blue) 將凝膠染色後，切出含有該蛋白質的凝膠帶並在 Centrilutor 中從該凝膠電洗提出該蛋白質。

註：對應於原始黴素 I 合成酶 IV 的電泳帶係經由與氫化原始黴素 I 合成酶 IV 標準品（經由共價鍵結合到氫化苯

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(55)

甘胺酸；參看實施例 5.5.2 中之說明) 比對而後鑑定者。

於此步驟之後，該酵素即在電泳(SDS-PAGE)中為純者。其分子量估計約為 170,000。

5.5.2. 用放射性苯甘胺酸在酵素上進行硫酯化以標示原始黴素 I 合成酶 IV

在透過苯甘胺酸：AMP 連接酶活性以腺苷酸形式活化之後，將苯甘胺酸轉移到酵素所具活性部位的硫醇基上，再於鏈增長中摻加到肽鏈內（名稱為“硫模版機制”的肽抗生素生物合成一般程序）。一般而言，可據此經由用胺基酸的放射性形式製備其硫酯衍生物而進行促成胺基酸活化的蛋白質之放射性標示。

舉例而言，原始黴素 I 合成酶 IV 的放射性標示係經由將 50 微克的蛋白質（用 MonoQ HR 5/5 層析分離管柱洗提出來的活性液份；參看上面實施例 5.5.1.B）與 100 μ Ci 的 (RS)-2-苯基 [2- ^{3} H] 甘胺酸（18 Ci/毫莫耳；Amersham）在 70 微升含有 20% 甘油，25mM $MgCl_2$ ，5mM ATP，0.15 M NaCl，4mM DTT，1mM PMSF，1mM 苯甲脒，1mM EDTA 等的 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 pH 6.8 中，於 27°C 下培育 1 小時。接著在變性之後（只用 SDS，不用氫硫基乙醇），用電泳（SDS-PAGE，6% 凝膠）分離蛋白質並用庫馬其藍予以顯現。經由計數該蛋白質電泳帶及自動放射性攝影（Hyperfilm MP；在將凝膠浸漬 Amersham Amplify 後施以螢光照相）所作放射性分佈分析揭示一具有分子量為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(57)

，用另一份始旋鏈黴菌 SP92 培養物製得該蛋白質的第二份製備物，其中，在從 MonoQ HR 5/5 步驟出來的蛋白質，其純度相當於 5.5.1.B 中所述相同步驟得者之純度，但具有在 SDS-PAGE 中表現出的約 250,000 之分子量。該新製備物會競爭苯甘胺酸和活化和硫酯化，不過，卻另外具有在類似於 5.2.1.A 中對 3-羥基吡啶羧酸所述交換試驗中，所表現之與 L-六氫吡啶羧酸的 ATP-焦磷酸鹽交換活性。此外，可以證明者，該 170,000 蛋白質即使在仍然非常不純的蛋白質製備物中也不具有與 L-六氫吡啶羧酸的 ATP-焦磷酸鹽交換活性。必須提及者，始旋鏈黴菌 SP92 天然地產生少量以六氫吡啶羧酸殘基取代 4-氧六氫吡啶羧酸而構成之原始黴素 IA 類似物。因此，這一點證明負責摻加苯甘胺酸的肽合成酶（原始黴素 I 合成酶 IV）也催化其前面殘基（可能為六氫吡啶羧酸）之摻加。兩份製備物所得原始黴素 I 合成酶 IV 分子量之差異（170,000 和 250,000）可歸因於第一種情況中的部份蛋白水解型劈斷現象，導致 L-六氫吡啶羧酸活化活性之喪失。

5.5.4. 用蛋白質序列合成寡核苷酸

本實施例說明如何用原始黴素 I 合成酶 IV 的內部序列，以適當選出的寡核苷酸著手檢驗對應的基因。

原始黴素 I 合成酶 IV 一般具有 15 個胺基酸的內部序列係於將純化蛋白質以溴化氰切斷及在 Vydac C18 HPLC 管柱上純化所得片段之後鑑定出來者。

五、發明說明(61)

莫耳 NADH 所需的酵素量。

5.6.1.B 始旋鏈黴菌 SP92 FMN 還原酶之純化

本實驗闡述如何純化出始旋鏈黴菌 SP92 所含參與原始黴素 IIA 生物合成途徑中之酵素。

使用上面實施例 5.6.1.A 中所述分析，依下面所述進行 FMN 還原酶之純化，其中要注意於必要時在兩連續步驟之間將活性部份冷凍並保存在 -30°C 。

將 500 克於原始黴素生產期開始收取的始旋鏈黴菌 SP92 培養物所得離心丸用含有 10% v/v 甘油的 0.1M 磷酸鹽緩衝液 pH 7.2 予以洗清後，用 1500 毫升含有 5mM DTT, 10% v/v 甘油和 0.2 毫克/毫升溶菌酶的 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 pH 6.8 溶取之。將如此所得懸浮液置於 27°C 培育 45 分鐘，然後以 50,000g 離心 1 小時。所收集到的粗萃取物再用硫酸銨沈澱法予以分級分離。於 40 到 75% 飽和度之間沈澱的蛋白質部份於 Sephadex G-25 Fine 管柱上脫鹽份後，置於 pH 6.8 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 / 5mM DTT / 10% v/v 甘油中注射到 Q Sepharose Fast Flow 管柱上 (300 毫升)。活性蛋白質不保留在該管柱上，其在 Sephadex G-25 Fine 管柱上脫鹽份後，置於 pH 8.2 50mM Tris-HCl 緩衝液 / 5mM DTT / 10% v/v 甘油中再注射到 Q Sepharose Fast Flow 管柱上 (35 毫升) 並用線型 KCl 梯度 (0 到 0.5M) 洗提之。將含有酵素活性 (用實施例 5.6.1.A 中所述第一種檢驗探測到者) 的液份集中，於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(62)

Sephadex G-25 Fine 管柱上脫鹽後，再置於 pH 8.2 50mM Tris-HCl 緩衝液 / 5mM DTT / 10% v/v 甘油中注射到 MonoQ HR 10/10 管柱上。所保留住的蛋白質直接用已加入 0.2M KCl 的相同緩衝液予以洗提出。將其收集成 1 毫升體積，立即再注射到 Superdex 75 HR 10/30 管柱中，用 pH 6.8 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 / 1 mM DTT / 10% v/v 甘油予以洗提。將含有所欲活性的液份（從這個步驟開始，利用實施例 5.6.1.A 中所述分光光度計檢驗予以偵測）合併並將集中液的總體積調整到 7 毫升；將該 7 毫升注射到用 8 毫升 FMN-瓊脂糖填充好的管柱內；用 pH 6.8 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 / 1mM DTT / 10% v/v 甘油洗該管柱，然後用含有 10 μ M FMN 的相同緩衝液洗提之。將活性液份合併，於 PD-10 管柱上脫鹽份，於 pH 8.2 50mM Tris-HCl 緩衝液 / 5mM DTT / 10% v/v 甘油中注射到 MonoQ HR 5/5 管柱上並用線型 KCl 梯度（0 到 0.25M）洗提之。

在此步驟之後，該酵素即為純者。於 SDS-PAGE 電泳中，可以看到一個單一而相當寬的譜帶其分子量估計為 28,000，而在 Bio-Sil SEC 125 凝膠滲透層析分析法中，該蛋白質以約 30,000 分子量為中心形成一對稱的譜峰。

要用於序列分析時，先將該蛋白質在 25-公分 Vydac C4 管柱上用含有 0.07% 三氟乙酸的 30 到 70% 乙腈 / 水線型梯度予以洗提脫鹽份。

五、發明說明(68)

+ 水 (適量到1000毫升)

洗提劑 B = 1.2克庚烷磺酸鈉 + 2.5毫升冰醋酸
+ 300毫升乙腈 + 水 (適量到1000毫
升)

梯度 : t (分)	% B
0	30
16	30
17	100
20	100
21	30
25	30

- 固定相 : 150 x 4.6毫米 Nucleosil 5微米 C18管柱
(Macherey-Nagel)

於從管柱流出後，測定254nm之吸收而定量分析該酵素反應的受質和產物。該偵測另外耦合到一線內(in-line)放射化學探測，其係利用裝備著GT400-U4型固體閃爍管瓶的 Berthold LB 506探測器。這樣可以特定地監測放射性甲基摻加到反應產物內之結果。

對甲基化1 (對甲基化2) 的酵素活性單位定義為將1 nmol的甲基摻加到對-胺基苯丙胺酸之內 (摻加到對-甲胺基苯丙胺酸之內) 所需的酵素量。

5.7.1.B. 從始旋鏈黴菌純化出催化p-胺基苯丙胺酸經甲基化成為對-二甲胺基苯丙胺酸的SAM-相關性N-甲基轉移酶「對-胺基苯丙胺酸 (苯基-N)-甲

五、發明說明(69)

基轉移酶]

本實驗闡述如何純化始旋鏈黴菌 SP92 所含參與原始黴素 IA 生物合成途徑中的酵素。

使用上面實施例 5.7.1.A. 中所述分析，依下文所述進行 SAM-相關性 N-甲基轉移酶之純化，其中要注意於必要時在相連步驟之間將活性液份冷凍並保存在 -70°C 。

將 240 克於原始黴素生產期間開始即收取的始旋鏈黴菌 SP92 培養液之離心丸用 pH 7.2 100mM 磷酸鹽緩衝液 / 1mM PMSF / 5mM EDTA / 5mM EGTA / 0.5m KCl / 10% v/v 甘油洗過後，用 480 毫升保存在 $+4^{\circ}\text{C}$ ，含有 4mM DTE，5mM 苯甲脒，0.2 mM Petabloc，100 微克 / 升 E-64，2 毫克 / 升亮胺素，1mM EDTA，1mM EGTA，2 毫克 / 升 STI，2 毫克 / 升抑肽酶，20% v/v 甘油和 2 毫克 / 毫升溶菌酶等的 pH 8.0 0.1M Tris-HCl 緩衝液溶取之。將如此所得懸浮液於 4°C 激烈攪拌。在攪拌 30 分鐘之後，加入 0.2 毫克 / 毫升的脫氧核糖核酸酶 I 和 5mM MgCl_2 。於攪拌 90 分鐘後，將萃取液以 50,000g 離心一小時。將上澄液分成各約 180 毫升的 3 個液份。將各液份置於已用含有 4mM DTE，5mM 苯甲脒，0.2mM Pefabloc，100 微克 / 升 E-64，2 毫克 / 升亮胺素，1mM EDTA，1mM EGTA，2 毫克 / 升 STI，2 毫克 / 升抑肽酶，20% v/v 甘油等的 pH 6.8 20mM bis-tris 緩衝液以自然流速平衡過的 500 毫升 Sephadex G-25 Fine 管柱上經由凝膠滲透予以脫鹽份。然後將蛋白質洗提液置於 MonoQ HR 16/10 管柱上用在含有 4mM DTE，2mM 苯甲脒，100 微克

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (70)

／升 E-64，2 毫克／升亮肽素，20% v/v 甘油的 pH 6.8 20mM bis-tris 緩衝液中之遞增線型氯化鈉梯度 (0 到 0.3M) 以 6 毫升／分之流速進行層析分離 (每次循環分離 400 毫克蛋白質)。於從管柱中流出時，用 10% v/v 含有 4mM DTE，30mM 苯甲脒，2mM Pefabloc，100 微克／升 E-64，2 毫克／升亮肽素，5mM EDTA，5mM EGTA，10 毫克／升 STI，10 毫克／升抑肽酶，20% v/v 甘油等的 pH 6.8 20mM bis-tris 緩衝液補充該液份。在這些條件下，於排出液份與第一洗提液份中都測得相同的兩種甲基化活性 (1 和 2)。將這些液份合併，置於 Centriprep 10 上超濾濃縮。將該濃縮物調整到 0.85M 硫酸銨後，在 Phenyl Superose HR 10/10 管柱上用在含有 4mM DTE，2mM 苯甲脒，100 微克／升 E-64，2 毫克／升亮肽素，1mM EDTA，1mM EGTA，10% v/v 甘油等的 pH 6.8 50mM bis-tris 緩衝液中之遞減硫酸銨梯度 (0.85 到 0M) 以 1 毫升／分之流速進行層析分離 (每循環處理 20 到 80 毫克)。於從管柱流出時，用 10% v/v 含有 4mM DET，30mM 苯甲脒，2mM Pefabloc，100 微克／升 E-64，2 毫克／升亮肽素，1mM EDTA，1mM EGTA，10 毫克／升 STI，10 毫克／升抑肽酶，10% v/v 甘油等 pH 6.8 50mM bis-tris 緩衝液添補諸液份。在這些條件下，在對應於約 0.15M 硫酸銨的洗提液份中測得同等的兩種甲基化活性 (1 和 2)。將這些液份合併，在 Centricon 10 上超濾濃縮，在用含有 4 mM DTE，2mM 苯甲脒，100 微克／升 E-64，2 毫克／升亮肽素，20

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明(71)

% v/v 甘油等的 pH 8.2 (5℃ 下) 50mM Tris 緩衝液平衡過的 PD-10 管柱上脫鹽份後，於用相同緩衝液平衡過的 MonoQ HR 5/5 管柱上以 1 毫升 / 分之流速進行層析分離 (每循環約 10 毫克)。在這些條件下，該兩種活性都不保留在管柱上。於流出管柱時，用 10% v/v 含有 4mM DET, 30 mM 苯甲脒, 2mM Pefabloc, 100 微克 / 升 E-64, 2 毫克 / 升亮肽素, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 20% v/v 甘油等的 pH 8.2 50mM Tris 緩衝液補加到含有這兩種活性的排出液份。然後將這些液份置於 Centricon 10 上超濾濃縮並於其後在已用含有 4mM DTE, 0.2 mM Pefabloc, 1 mM DETA, 1mM EGTA, 10% v/v 甘油, 0.15M 氯化鈉等的 pH 7.0 50mM Hepes 緩衝液平衡過的 300 x 7.5 毫米 10 微米 TSK G2000 SW 管柱上以 0.5 毫升 / 分流速進行層析分離。在這種技術中，這兩種活性在對應於分子量接近 30,000 的持留時間處共洗提出來。於該步驟之後，在 SDS-PAGE 中可看出主要的蛋白質。其係出現在約 32,000 之處。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明(74)

此為甲基化1的酵素活性單位。對於每一步驟，甲基化2的酵素活性單位值等於甲基化1單位值的120%。

純化倍數是由純化過程中所得各部份的活性增加值計算而得者。

5.7.2 對-胺基苯丙胺酸(苯基-N)-甲基轉移酶構造基因之鑑定

實施例5.7.1.B中純化所得32,000蛋白質的NH₂-端序列係用實施例5.1.2中所述微序列分析予以測定者。以這種方式定出10個殘基：

TAAAPTLAQA

實施例5.7.1.C中純化所得32,000蛋白質的NH₂-端序列係依實施例5.1.2所述微序列分析法測定者，以這種方式測得10個殘基：

TAAAPTLAQA

兩種情況得到相同的殘基，且該序列正是對應於由papM基因序列所推導出的蛋白質序列之起頭（參看SEQ ID no. 10上的殘基2到11）。因此，純化所得對-胺基苯丙胺酸(苯基-N)-甲基轉移酶即為蛋白質PapM。

實施例6：選殖到實施例3中製得的粘接質體內且含有標的基因之DNA片段的分殖

本實施例闡述如何用依實施例3所述構成之含有原始微

五、發明說明(75)

素 II 或原始黴素 I 生物合成基因的粘接質體來分殖含有這些基因的 DNA 片段。

進行這些分殖的目的係為了於隨後推導出已鑑定的基因所具核酸序列，及為了進行下面實施例所提出的諸不同構成。

6.1 含有 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶構造基因的 5.5-kb EcoRI-BglII 片段之分離

本實施例說明如何用含有 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶構造基因的粘接質體 pIBV2 來分殖含有該基因但尺寸較小的 DNA 片段。

將約 10 微克的粘接質體 pIBV2 用限制酵素 BglII 和 EcoRI (New England Biolabs) 在供應商建議的條件下依序切斷。如此所得限制片段在 0.8% 瓊脂糖凝膠上電泳分離，並依 Maniatis et al. (1989) 中所述電洗提法分離出 5.5-kb 的 BglII-EcoRI 片段。

將用 BamHI 和 EcoRI 切過的 pUC19 (Viera 和 Messing 1982) 約 100 毫微克與 200 毫微克的該 5.5-kb BglII-EcoRI 片段在實施例 3.3 中所述條件下連接。

在將 TG1 菌株轉形且在含有 150 微克／毫升氨苄青黴素和 20 微克／毫升 X-gal 的固體 LB 培養基上依照 Maniatis et al., (1989) 中所述技術選擇轉形體，而分離出載有所欲片段的品系。該重組質體經編名為 pVRC402。其限制基因圖表於圖 15(A) 中。在實施例 5.2 中經由雜交證明該

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(76)

5.5-kb EcoRI-BglII 片段含有始旋鏈黴菌 SP92 的 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶之構造基因。因此，質體 pVRC402 亦含有始旋鏈黴菌 SP92 的 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶之構造基因。

6.2 從粘接質體 pIBV2 分離 4.6-kb BglII-BglII

本實施例說明如何用粘接質體 pIBV2 分殖具較小尺寸的 DNA 片段以在鄰接 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶構造基因之區段中鑑定出有參與原始黴素 I 生物合成的其他基因之存在。

諸不同選殖步驟係依上文所述而進行者。

將約 10 微克的粘接質體 pIBV2 用 BglII 切割，如此所得限制片段在 0.8% 瓊脂糖凝膠上分離後，以電洗提方式分離出 4.6-kb 的 BglII-BglII 片段。

將約 100 毫微克用 BamHI 切過的粘接質體 pUC19 與該 BglII-BglII 片段連接起來。

在依實施例 6.1 所述將 TG1 菌株轉形後分離出載著所欲片段的純系。該重組質體編號為 pVRC501。其限制基因圖表於圖 15(B) 之中。

6.3 含有原始黴素 IIA 合成酶所含兩個次單元構造基因的 6-kb BamHI-BamHI 片段之分離

本實施例說明如何用粘接質體 pIBV1 來分殖含有原始黴素 IIA 合成酶兩個次單元構造基因的較小尺寸 DNA 片段

五、發明說明(77)

諸不同選殖步驟係依上文所述進行。

將約10微克的粘接質體 pIBV1 用 BamHI 予以切割。如此所得限制片段在 0.8% 瓊脂糖凝膠上電泳分離後，經由電洗提而分離出 6-kb BamHI 片段。

將約100毫微克用 BamHI 切過的 pBKS⁻(Stivatagene Cloning Systems, La Jolla, California) 與200毫微克的該 6-kb BamHI 片段連接。

於將菌株 TG1 轉化後，分離出載有所欲片段之純系。該重組質體編號為 pXL2045。其限制基因圖表於圖16中。上文在實施例5.1中已證明過該 6-kb BamHI 片段含有編碼始旋鏈黴菌 SP92 所含原始黴素 IIA 合成酶兩個次單元的 snaA 和 snaB 基因。因此質體 pXL2045 含有編碼始旋鏈黴菌 SP92 所含原始黴素 IIA 合成酶兩個次單元的 snaA 和 snaB 基因。

6.4 含有原始黴素 I 合成酶一部份構造基因的 6.2-kb SphI 片段之分離

本實施例說明如何用粘接質體 pIBV3 來分殖含有原始黴素 I 合成酶 II 一部份構造基因的較小尺寸 DNA 片段。

諸不同選殖步驟係依上文所述而進行的。

將約10微克的粘接質體 pIBV3 用 SphI 切割。如此所得限制片段在 0.8% 瓊脂糖凝膠上分開後，利用 Bio101-Ozyme 公司所售的 "Geneclean" 配套試劑技術分離出 6.2-kb SphI 片段。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(78)

將約100毫微克用SphI切過的pUC19與200毫微克該6.2-kb SphI片段連接。

於將TG1菌株轉化後分離出載有所欲片段的純系。該重組質體編號為pVRC1105。其限制基因圖表於圖17中。

6.5 含有原始黴素I合成酶III一部份構造基因的
8.4-kb SphI片段之分離

本實施例說明如何用粘接質體pIBV3來分殖含有原始黴素I合成酶III一部份構造基因的較小尺寸DNA片段。

諸不同選殖步驟係依上文所述而進行者。

將約10微克的粘接質體pIBV3用SphI切割。如此所得限制片段在0.8%瓊脂糖凝膠上分開後，利用Bio101-Ozyme公司所售"Geneclean"配套試劑技術分離出8.4-kb SphI片段。

將約100毫微克用SphI切過的pUC19與200毫微克該8.4-kb SphI片段連接。

於將TG1菌株轉化後分離出載有所欲片段的純系。該重組質體編號為pVRC1106。其限制基因圖表於圖18中。

6.6 含有原始黴素I合成酶V一部份構造基因的6.6-kb
SphI片段之分離

本實施例說明如何用粘接質體pIBV3分殖含有原始黴素I合成酶IV一部份構造基因的較小尺寸DNA片段。

諸不同選殖步驟係依上文所述而進行者。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(79)

將約10微克的粘接質體 pIBV3 用 SphI 切割。如此所得限制片段在 0.8% 瓊脂糖凝膠上分開後，利用 Bio101-Ozyme 公司所售 "Geneclean" 配套試劑技術分離出 6.6-kb SphI 片段。

將約100毫微克用 SphI 切過的 pUC19 與200毫微克的該 6.6-kb SphI 片段連接。

於將 TG1 菌株轉形後，分離出載有所欲片段的純系。該重組質體編號為 pVRC1104。其限制基因圖表於圖19中。

6.7 含有粘接質體 pHC79且載有位於3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶(原始黴素 I 合成酶 I)上游的基因之 17-kb HindIII-HindIII 片段的分離

本實施例說明如何從含有 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶構造基因的粘接質體 pIBV2 經由刪除該粘接質體的大部份且只保留位於 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶上游的部份。

將約200毫微克的粘接質體 pIBV2 用限制酵素 HindIII 予以切割。該酵素依供應商所建議在 85℃ 變性 30 分鐘。以這種方式消化過的粘接質體 pIBV2 再依 Maniatis et al., (1989) 所述用乙醇沈澱並在 50 微升體積中與其本身再連接。

根據 Maniatis et al., (1989) 所述技術將 TG1 菌株轉形並在固體 LB+150 微克/毫升的氨苄青黴素上選擇轉形株後，分離出含有粘接質體 pHC79 及位於 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶上游的部份之純系(整個對應於約 17kb 之尺寸)

五、發明說明(80)

)。該重組質體編號為 pVRC900。其限制基因圖表於圖 20 中。

6.8 源自粘接質體 pIBV3 的 1.5-kb BamHI-SstI 片段之分離

本實施例說明如何從含有編碼 PIIA 合成酶所具大次單元的 *snaA* 基因之粘接質體 pIBV3 來分殖位於上游的 DNA 片段以研究和定其序列。

將約 10 微克的粘接質體 pIBV3 用限制酵素 *SstI* 和 *BamHI* 依序切割。將如此所得限制片段在 0.8% 瓊脂糖凝膠上分開後，用 Bio101-Ozyme 公司所售的 "GeneClean" 配套試劑技術分離出 1.5-kb *BamHI-SstI* 片段。

將約 100 毫微克用 *BamHI* 和 *SstI* 切過的 pDH5 (Hilleman et al. 1991) 片段。在實施例 3.3 中所述條件下與 200 毫微克的該 *BamHI-SstI* 片段連接。

於將 TG1 菌株轉形並在固體 LB+150 微克/毫升氨苄青黴素 + X-gal 根據 Maniatis et al. (1989) 所述技術選擇轉形株後，分離出載有所欲片段的純系。該重組質體編號為 pVRC1000。其限制基因圖表於圖 21 中。

6.9 含有 FMN 還原酶構造基因的 4-kb BamHI-BamHI 片段之分離

本實施例說明如何用含有 FMN 還原酶構造基因 (*snaC*) 的粘接質體 pIBV4 來分殖含有該基因的較小尺寸 DNA 片段。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(81)

諸不同選殖步驟皆係依上文所述而進行者。

將約10微克的粘接質體 pIBV4 用限制酵素 BamHI 予以切割。如此所得限制片段在 0.8% 瓊脂糖凝膠上分開後，用雷洗提方法分離出 4-kb BamHI-BamHI 片段。

將約100毫微克用 BamHI 切過的 pUC19 與 200 毫微克的該 4-kb BamHI-BamHI 片段連接。

於將大腸桿菌 DH5a 菌株 (supE 44 DlacU169 (f80lac ZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) 轉形並在固體 LB+150 微克/毫升氨苄青黴素 + X-gal 根據 Maniatis et al. (1989) 所述技術選擇轉形株後，分離出載有所欲片段之純系。該重組質體編號為 pVRC509。其限制基因圖表於圖 22 中。

實施例 7: 分離所得含有始旋鏈黴菌 SP92 所含原始黴素生物合成基因的 DNA 片段之順序

本實施例闡述一方面載有參與始旋鏈黴菌菌株的原始黴素 I 族所含原始黴素之生物合成基因，且另一方面載有參與原始黴素 II 族所含原始黴素的生物合成基因等的 DNA 片段之序列分析。

7.1. 5-kb BamHI-XhoI 片段之分離

本實施例闡述如何得到含有始旋鏈黴菌 SP92 所具 snaA 和 snaB 兩基因的片段之核苷酸順序。

BamHI-XhoI 片段為選殖在質體 pBK5 中以產生實施例 6 所

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(82)

述質體 pXL2045 的 6-kb BamHI-BamHI 片段之一部份。然後經由酵素消化及隨後以兩種取向分殖到噬菌體 M13mp18 或 M13mp19 之內 (Messing et al., 1981) 而得到該 5-kb BamHI-XhoI 嵌入物的次片段。所用的分殖部位為下所列者：EcoRI, PstI, PstI, NruI, EcoRI, NruI, NotI, SalI, SstI, XhoI, SalI 和 XhoI, 且都列於圖 16 之中者。

用通用引子 (universal primer) (Maniatis et al., 1989) 或被合成且對要進行序列分析的嵌入物所含具有 20 個核苷酸之序列為互補的寡核苷酸 (如實施例 5 中所述者) 等作為合成引子, 經由鏈末端反應法定出這些不同嵌入物的順序。

這些不同嵌入物之間的重疊促使含有 5392bp 的 BamHI-XhoI 片段所含兩股上的總核苷酸順序被確定出來 (SEQ ID no.1)。

7.2 5.5-kb EcoRI-BglII 片段所含 1870bp 區段之序列分析

本實施例闡述如何得到含有始旋鏈黴菌 SP92 所含 snbA 基因的片段之核苷酸順序。

要序列分析的 1870bp 區段為選殖到質體 pUC19 中以得到實施例 6 中所述質體 pVRC402 所用 5.5-kb EcoRI-BglII 片段的一部份 (圖 15(A))。經由酵素劈裂及隨後以兩種取向分殖到噬菌體 M13mp18 或 M13mp19 中而得到該 5.5-kb EcoRI-BglII 嵌入物的次片段。其分殖部位為 HindIII,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(83)

PstI和HindIII，且皆示於圖15(A)中。

這些片段之間的重疊即確立了含有1870bp的
Sau3A-Sau3A區段之全部順序(SEQ ID no.5)。

7.3 4.6-kb BglIII-BglIII片段所含1830bp區段之序列

本實施例闡述如何得到鄰接含有始旋鏈黴菌SP92 snbA基因的片段所具核苷酸順序。

將取自pVRC501(實施例6)的1-kb BamHI-PstI和
2.1-kb PstI-EcoRI片段(圖15(B))分殖到載體M13mp18和
M13mp19之中而推導出該序列。將與PstI部位重疊的
423-bp Sau3A-Sau3A片段分殖即越過該部位，隨後在進行
序列分析。所得1830bp的順序列於(SEQ ID no.6)之中。

7.4. 6.2-kb SphI片段所含227 bp和247 bp兩區段之序列分析

本實施例闡述如何得到含有始旋鏈黴菌所含原始黴素I
合成酶II構造基因(snbC)的一部份之片段所具核苷酸順序。

要序列分析的227和247 bp兩區段為被選殖到質體
pUC19以構成實施例6.4所述質體pVRC1105的6.2-kb
SphI片段之部份(圖17)。經由酵素劈斷和隨後以兩個取向分殖到噬菌體M13mp18或M13mp19中而得到6.2-kb SphI嵌入物的次片段。其分殖部位為XhoI, PstI和BglIII，且都示於圖17之中。該227-bp PstI-BglIII片段係經完全序列分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(84)

析者，而247-bp則係從900-bp XhoI 片段中定其順序者：這些序列都列於SEQ ID no. 11 和12之中。

7.5. 8.4-kb SphI片段所含192 bp和474 bp 兩區段之序列分析

本實施例闡述如何得到始旋鏈黴菌所含原始黴素I 合成酶III 構造基因(snbD)的部份之片段所具核苷酸順序。

要序列分析的192 和474 bp兩區段為選殖到質體pUC19 以構成實施例6.5 中所述質體pVRC1106所用8.4-kb SphI片段之部份(圖18)。經由酵素劈斷和隨後以兩個取向分殖到噬菌體M13mp18或M13mp19之中而得到該8.4-kb SphI嵌入物之次片段。其分殖部位為XhoI, PstI, SphI和BglII，且都示於圖18中。

該192-bp BglII-SphI 和474-bp PstI-XhoI 兩片段皆經完全的序列分析過：這些序列皆列於SEQ ID no. 13和14之中。

7.6. 6.6-kb SphI片段所含485 bp和291 bp 兩區段之序列分析

本實施例闡述如何得到含有始旋鏈黴菌所含原始黴素I 合成酶IV構造基因(snbE)的部份之片段所具核苷酸順序。

要序列分析的291 和485 bp兩區段都是選殖到質體pUC19 中構成實施例6.6 所述質體pVRC1104 所用6.6-kb SphI片段之部份(圖19)。經由酵素劈斷和隨後以兩個取

五、發明說明(85)

向分殖到噬菌體 M13mp18 或 M13mp19 之中而得到該 6.6-kb SphI 嵌入物的次片段。其分殖部位為 XhoI, PstI, 和 SphI , 且都示於圖 19 之中。其中 485-bp XhoI-SphI 片段係經完全地序列分析, 而 291 bp 則是從 1500-bp PstI 片段定其順序者: 這些序列都表於 SEQ ID no. 15 和 16 中。

7.7. 從 pVRC900 分離出的 3.4-kb XhoI-XhoI 片段所含 645bp 區段之序列

本實施例闡述如何得到位於含有始旋鏈黴菌所含 SnbA 基因的區段上游處之片段所具核苷酸順序。

要推導出該序列時, 先將 3.4-kb XhoI-XhoI 片段分殖到衍生自實施例 6.7 所述載體 pVRC900 的載體 pUC18 之內。諸選殖步驟皆依 6.1 所述進行: 用限制酵素 XhoI 消化質體 pVRC900, 將如此所得片段在 0.8% 瓊脂糖凝膠上分離開。經由電洗提純化出 3.4-kb XhoI-XhoI 片段後與用限制酵素 SalI 切過的 pUC18 連接起來。在轉形到 TG1 之內後, 分離出載有 3.4-kb XhoI-XhoI 片段的純系。該重組質體編號為 pVRC903。其限制基因圖表於圖 23 中。

接著將得自上述 pVRC903 的 1.4-kb PvuII-EcoRI 和 0.9-kb PvuII-EcoRI 片段分殖到載體 M13mp18 和 M13mp19 中以推導出該序列。要進行這些選殖時, 先用限制酵素 BamHI 消化載體 M13mp18 和 M13mp19; 然後將釋放開來的粘性末端根據 Maniatis et al. (1989) 所述技術用大 DNA 聚合酶 I 片段 (Klenow: New England Biolabs) 填充以產

五、發明說明(86)

生鈍端而與 PvuII 消化所放出的末端相容；接著用限制酵素 EcoRI 消化該載體。經由分殖從 pVRC903 分出，與 PvuII 部位重疊的 2.2-kb PstI-PstI 片段而越過該 PvuII 部位。如此所得 645bp 序列示於 SEQ ID no. 9 中。

7.8. 從 pVRC900 分出的 4.1-kb PstI-PstI 片段所含 1050 bp 區段之序列

本實施例闡述如何得到位於含有始旋鏈黴菌所含 snbA 基因上游端的片段之核苷酸順序。

要推導出該序列時，先將 4.1-kb PstI-PstI 片段分殖到來自實施例 6.7 所述載體 pVRC900 的載體 pUC19 之中。諸不同選殖步驟係依 6.1 所述進行者：用限制酵素 PstI 消化質體 pVRC900，且將如此所得片段在 0.8% 瓊脂糖凝膠上分離。經由電洗提純化出 4.1-kb PstI-PstI 片段後與用限制酵素 PstI 切過的 pUC19 連接起來。於轉化到 TG1 之中後，分離出載有該 4.1-kb PstI-PstI 片段的純系。該重組質體編號為 pVRC409。其限制與圖表於圖 24 中。

然後將得上述 pVRC409 的 0.7-kb XhoI-XhoI 和 1-kb XhoI-SstI 兩片段（圖 24）分殖到載體 M13mp18 和 M13mp19 之中。序列內部的 XhoI 部位係經由質體 pVRC409 雙股序列分析而推導出者。如此所得 1050 bp 的序列示於 SEQ ID no. 10 中。

7.9. 1.5-kb BamHI-SstI 片段所含 640 bp 區段之序列

五、發明說明 (88)

本實施例闡述如何測定上面實施例6和7中分離及序列分析過的5-kb BamHI-XhoI內的開放密碼架構(reading frame)。

基於鏈黴菌屬DNA具有高百分比的G和C鹼及其使用構成編碼架構(coding frame)的密碼子之強烈傾向等事實而探討5-kb BamHI-XhoI片段中的開放密碼架構(Bibb等人, 1984)。可以採用Staden和McLachlan兩氏(1982)的方法根據已被序列分析過且在得自BISANCE數據處理服務處(Dessen et al. 1900)含有19673密碼子的檔案中對照過之鏈黴菌屬基因所含密碼子的使用而計算出編碼架構機率。

使用該方法在5-kb BamHI-XhoI片段中鑑定出四個高機率性開放密碼架構,示於下面的表中。根據其從BamHI部位開始的位置編號為架構1到4。對每一架構,於表中列出其鹼對長度,其在片段中的位置(BamHI部位係在位置1處,以及以kDa表出的對應蛋白質之分子量等。架構1, 3和4係由相同股所編碼而架構2則由互補股所編碼(圖16)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (89)

架構編號和 基因名稱	位置	核苷酸 數目	胺基酸 數目	所編碼的蛋 白質之MW， 單位kDa
1 (<u>snaA</u>)	48-1313	1266	422	46.5
2	2530-1328 (inv)	1203	401	-
3 (<u>snaB</u>)	2692-3522	831	277	29
4 (<u>samS</u>)	3558-4763	1206	402	43

- 架構 1 和 3 分別對應於依實施例 5 所述分離出的蛋白質 SnaA (SEQ ID no. 2) 和 SnaB (SEQ ID no. 3) 且其基因的選殖已在實施例 6 中詳述過。事實上，ORFs 1 和 3 產物的 NH₂-端序列分別相同於實施例 5.1.2 中所述蛋白質 SnaA 和 SnaB 的 NH₂-端序列，差別僅在於已切掉的胺基端甲硫胺酸。此外，由序列所計算到的分子質量也分別相當於實施例 5 所述用 SDS-PAGE 分別估測出的蛋白質 SnaA 和 SnaB 之表觀分子質量。

- 將開放密碼架構 no. 4 的產物與 NBRF 庫 (NBRF bank) 所含的蛋白質序列相比對後顯示出各種 S-腺苷基甲硫胺酸 (或 SAM) 合成酶之間的同系性，特別是在大腸桿菌 (Maricham *et al.*, 1984)，老鼠 (Horikawa *et al.*, 1989) 與啤酒酸母菌 (Thomas *et al.*, 1988) 等所屬之間者。使用 Kanehisa 氏 (1984) 的算法計算整個序列的百分同

五、發明說明 (90)

系性值為 51.8 到 55.4% 之間。

因此，這些序列比對可以證明開放密碼架構 no. 4 的產物為參與原始黴素 II 和 (和可能兼及原始黴素 I) 生物合成中的 SAM 合成酶。該基因編名為 SamS (SEQ ID no. 4)。

如實施例 9.2 中所述，經由構成在該基因中斷的 SP92 突變株即可肯定 SamS 基因有參與原始黴素之生物合成。

- 將開放密碼架構 no. 2 的產物序列與 Genpro 庫所含蛋白質序列相比對即可顯示出該蛋白質的內部部份與 Anabaena 的嵌入序列 (IS891) 之第一開放密碼架構 (Bancroft and Wolk, 1989) 所含內部部份有 36% 的同系性。這種結果可推斷編名為 ORF 401 的開放密碼架構 no. 2 係屬於一種嵌入序列，因此在 SnaA 和 SnaB 兩基因之間含有一嵌入序列。

8.2. 1870-bp Sau3A-Sau3A 片段 (pVRC402)

本實施例闡述如何測定出依上面實施例 6 和 7 所述分離出及序列分析過的 1870-bp Sau3A-Sau3A 片段內所含開放密碼架構。

依上文所述進行探索 Sau3A-Sau3A 片段內的開放密碼架構。以這種方式顯現出一單一完整的開放密碼架構。其特性如下所述：該架構係從 Sau3A-Sau3A 片段的位置 109 延伸到位置 1858，對應於編碼具分子量 61400 Da，具有 582 個胺基酸的蛋白質之含有 1749 鹼對的架構。該蛋白質對應於依上面實施例 5 所述純化出的蛋白質 SnbA 且其基因的選殖係在實施例中詳述過者。事實上，Sau3A-Sau3A 片段上

五、發明說明(91)

所含 ORF 產物的 NH₂-端序列相同於實施例 5.2 所得蛋白質 SnbA 之 NH₂-端序列。從其序列計算而得之 61400 Da 分子量相當於 SDS-PAGE 估計所得 67000 Da 的蛋白質 SnbA 之表觀分子量及如實施例 5.2.1.B 所述用凝膠滲透法測得之 60000 Da 分子量。

如上所述，該 SnbA 基因係編碼催化從一分子 3-羥基吡啶羧酸和一分子 ATP 形成醯基腺苷酸化 3-羥基吡啶甲醯基-AMP 的反應之酵素：3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶 (SEQ ID no. 5)。

8.3. 1830 bp 片段 (pVRC501)

本實施例闡述如何測定來自上面分離所得 3.1-kb BamHI-EcoRI 片段的 1830 bp 片段序列內所具開放密碼架構。

依上文所述探索該 1830 bp 片段的開放密碼架構。以這種方式可以展現出一單一完全的開放密碼架構。其特性如下所述：該架構的可能開端係以 BamHI-EcoRI 片段所具序列來算，位於 1830 bp 區段的 103 位置而在其位置 1686 處終止對應於分子量約 54000，具有 528 個胺基酸的蛋白質。

將該蛋白質的順序與 Genpro 庫中所含序列相比對之下顯示出其相對於對各種代謝物具有輸送機能，特別是，在多種微生物體內的四環素 (Khan and Novick, 1983; Hoshino et al., 1985)，在天藍色鏈黴菌 (S. coelicolor) 體內的放線紫紅素 (Fernandez-Moreno et

五、發明說明(92)

al., 1991) 和亞甲黴素(methylenomycin)(Neal and Chater, 1987b)等的蛋白質具有同系性。

這些數據顯示 3.1-kb BamHI-EcoRI 片段所含開放密碼架構的產物為可使原始黴素 I (及可能原始黴素 II) 從細胞輸送出來的輸送蛋白。該蛋白質命名為 SnbR, 其相對基因為 snbR (SEQ ID no. 6)。

用 Kyte 和 Doolittle 兩氏(1982)的方法分析該蛋白質 SnbR 的疏水性分佈確證其在膜上的局部分佈及因此而證知的輸送機能。

8.4. 1050-bp 片段(pVRC409)

本實施例闡述如何從上面實施例 7.8 所述 pVRC409 的序列分析測定 1050-bp 片段內所含之開放密碼架構。

依上文所述進行探求該 1050-bp 片段之開放密碼架構。以這種方式展現出一單一完全的開放密碼架構。其特性如下所述：該架構係從序列分析過的部份之位置 84 延伸到位置 962 處，對應於編碼具有分子量 32000 Da, 292 個胺基酸的蛋白質之 878 鹼對架構。該蛋白質稱為 PapM。其係依實施例 5 中所述從始旋鏈黴菌 SP92 菌株純化而得者。從順序所計算得到的分子量 32000 Da 相同於依實施例 5 中所述在 SDS-PAGE 上測得的表觀分子量 32000 Da。再者，如實施例 5 中所述者，該蛋白質的 NH₂-端序列頗對應於 1050 bp 序列 (SEQ ID no. 10) 所含開放密碼架構分析所鑑定出的蛋白質 papM 之 NH₂-端序列。

8.5. 227-bp 和 247-bp 片段(pVRC1105)

五、發明說明(93)

本實施例闡述如何從實施例6和7所述pVRC1105的序列分析中測定227-bp和247-bp片段內所含的開放密碼架構。

依上文所述進行探求這兩片段的開放密碼架構。這兩片段都可展現出在整個長度的片段上之完整密碼架構。

在從900-bp XhoI 片段分離出的247-bp片段上鑑定出之開放密碼架構所得的序列內含有依實施例5所述純化出的蛋白質SnbC之內部序列。

將pVRC1105分離出的227-bp和247-bp兩片段所鑑定出的開放密碼架構之產物與Genpro庫的序列相比對顯示其對於肽合成酶具同系性。從227-bp片段推導出者顯示出與Acremonium chrysogenum的(α -胺基己二醯基)半胱胺醯基纈胺酸合成酶有24.5%同系性(Gutierrez et al., 1991)。從247-bp片段推導出者顯示出與短桿菌素S合成酶II有34.9%的同系性(Hori et al. 1991)且與Acremonium chrysogenum(α -胺基己二醯基)半胱胺醯基纈胺酸合成酶有28%同系性(Gutierrez et al., 1991)。

這種結果肯定了實施例5.1所分離出的粘接質體pIBV3確實含有實施例5.3中所述原始黴素I合成酶II，編號為SnbC (SEQ ID nos. 11和12)者的構造基因之一部份。

8.6. 192-bp和474-bp片段(pVRC1106)

本實施例闡述如何從實施例6和7所述pVRC 1106的序列分析中測定192-bp和474-bp兩片段內所含的開放密碼架

五、發明說明(94)

構。

依上文所述探求這兩片段的開放密碼架構。在從 pVRC1106 分離出的 192-bp 片段上也可展現出一不完整的密碼架構。其特性如下所述：該架構係在依 BglII 方向序列分析所得部份的位置 29 處開始者。未鑑定出停止密碼子，表示該開放架構尚未終止。

從 192-bp BglII-SphI 片段上鑑定出的開放密碼架構所得序列中含有依實施例 5 所述純化出的蛋白質 SnbD 之內部列，其在事實上證明為該蛋白質的 NH₂-端序列。

在整個 474-bp XhoI-PstI 片段上也展現出一不完整的密碼架構。

將 pVRC1106 分離出的 474-bp 片段上鑑定出的開放密碼架構之產物與 Genpro 庫的序列比對之下揭示出該蛋白質片段與肽合成酶之間有 30 到 40% 的同系性，例如，與短桿菌素 S 合成酶 II (Hori et al., 1991) 有 39.4% 同系性而與 Acremonium chrysogenum (α -胺基己二醯基) 半胱胺醯基纈胺酸合成酶有 34% 同系性 (Gutierrez et al., 1991)。

這種結果肯定了實施例 5.1 分離出的粘接質體 pIBV3 確實含有實施例 5.4 中所述編名為 SnbD (SEQ ID nos. 13 和 14) 的原始黴素 I 合成酶 II 之構造基因的一部份。

8.7. 291-bp 和 485-bp 片段 (pVRC1104)

本實施例闡述如何從實施例 6 和 7 所述 pVRC1104 的序列分析中測定 291-bp 和 485-bp 兩片段所含之開放密碼架構。

五、發明說明 (95)

依上文所述進行探求這兩片段的開放架構。兩者的整個片段可展現出不完全的密碼架構。

從1450-bp PstI片段分離出的291 bp片段上鑑定出之開放架構所得到的序列中含有依實施例5中所述純化出的蛋白質SnbE之內部序列。

將pVRC1104分離出的485-bp XhoI-SphI片段上鑑定出的開放架構所得產物序列與Genpro庫內的序列比對之下顯示其對肽合成酶具有同系性。例如，與短桿菌素S合成酶II (Hori et al. 1991)有34.7%的同系性而與Acremonium chrysogenum(α -胺基己二醯基)半胱胺醯基纈胺酸合成酶 (Gutierrez et al., 1991)有36.2%同系性。

這種結果肯定了實施例5.1中分離出的粘接質體pIBV3確實含有實施例5.5所述編號為SnbE (SEQ ID nos. 15和16)的原始黴素I合成酶IV的構造基因之一部份。

8.8. 645-bp片段 (pVRC903)

本實施例闡述如何從實施例6.7所述質體pVRC903的序列分析中測定出645-bp片段內所含之開放密碼架構。

依上文所述進行探求該645-bp片段的開放密碼架構。以這種方式可以展現出一不完全的開放密碼架構。其特性如下所述：該架構提出兩個供轉譯起始的可能性，一為在該序列部份位置61的GTG，另一為在位置70的GTG(於位置124的ATG因下文所述序列同系性而不列入考慮)。Shine-Dalgarno區段存在機率的分析無法區別這兩密碼子中的那一個對應於轉譯起始。未鑑定出停止密碼子，代表

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (96)

該開放密碼架構尚未終止。以這種方式鑑定所得基因稱為 papA，其對應的蛋白質稱為蛋白質 PapA (SEQ ID no. 9)。

將在 pVRC900 分離出的 3.4-bp XhoI-XhoI 片段中所鑑定出的開放密碼架構之產物與 Genpro 庫所含序列相比對顯示出其係與分別參與各種微生物的對 - 胺基苯甲酸 (葉酸的前體) 合成及鄰 - 胺基苯甲酸 (色胺酸的前體) 合成的對 - 胺基苯甲酸合成酶和鄰 - 胺基苯甲酸合成酶兩蛋白質的 II 成份具同系性。特別者，其與 Azospirillum 的蛋白質 TrpG 有 48% 同系性 (Zimmer W., Aparicio C., and Elmerich c. Mol. Gen. Genet. (1991) 229:41-51) 且與肺炎桿菌 (Klebsiella pneumoniae) 的蛋白質 PabA 有 47% 同系性 (Kaplan J. B., Merkel W. K. and Nichols B. P. J. Mol. Biol. (1985) 183:327-340)。蛋白質 TrpG 和 PabA 載有參與分支酸轉胺基反應的穀胺醯胺酶活性。上述同系性可證明蛋白質 PapA 也可能參與分支酸轉胺基反應活性。分支酸被認為是對 - 二甲胺基苯丙胺酸 - PI 所含有的一成份 - 的前體；PI 為鏈黴菌屬以類似氯霉素的合成方式所產生之抗生素 (Sharka B., Westlake D. W. S. and Vining L. C. (1970) Chem. Zvesti 24, 66-72)。

蛋白質 PapA 的功能將在後文 (實施例 9.3) 中經由菌株 SP92 在 papA 基因中的突變株分析予以證實。

8.9. 1.5-kb BamHI-SstI 片段 (pVRC1000)

本實施例闡述如何測定在依前面實施例 6.8 和 7.9 所述

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (97)

分離及序列分析出來的 1.5-kb BamHI-SstI 片段內所含之開放密碼架構。

依實施例 8.1 所述進行探索 1.5-kb BamHI-SstI 片段所含 640 bp 區段之開放密碼架構。以這種方式可以展現出一單一完整的開放密碼架構。未展現轉譯起始和終止，這種結果顯示該 640 bp 區可能係在遠較為更大的密碼架構，命名為 snad (SEQ ID no. 8) 者之內部。

將該 640 bp 區所編碼的蛋白質序列與 Genpro 和 NBRF 兩庫所含蛋白質序列相比對之結果顯示該蛋白質與肽合成酶，例如，短桿菌 (B. brevis) 的短桿菌素合成酶 I (Hori et al. 1989)，短桿菌的短桿菌酪肽合成酶 I (Weckermann et al. 1988) 和 Acremonium chrysogenum ACV 合成酶 (Gutierrez et al. 1991) 等的內部部份有 20-25% 的同系性。

這些數據顯示為 640 bp 區段所部份編碼的蛋白質可能為參與原始黴素 II 肽部份的生物合成中之肽合成酶：事實上，參與原始黴素 I 生物合成的所有肽合成酶都已在始旋鏈黴菌染色體的其他區鑑定出來，如實施例 5.2，5.3，5.4 和 5.5 等之中所述者。

8.10. 694-bp 片段 (pVRC509)

本實施例闡述如何從實施例 6 和 7 所述 pVRC 509 的序列分析中測定 694-bp 片段內所含之開放密碼架構。

依上文所述進行探求 694-bp 片段的開放密碼架構。以這種方式可以展現出一不完全的開放密碼架構。其特性如下

五、發明說明 (98)

所列：該架構係從該序列部份的位置210開始者。未鑑定出停止密碼子，代表該開放架構尚未終止。因此，其對應蛋白質的分子量無法計算且不能與FMN還原酶依實施例5.6所述在SDS-PAGE上估測的表觀分子量28,000 Da相比較。但另一方面，以這種方式經由694-bp序列的開放密碼架構分析鑑定出來的蛋白質所含NH₂-端序列相同於實施例5純化所得蛋白質SnaC的NH₂-端序列。同樣地，5.6中所述FMN還原酶的兩個內部蛋白質序列也出現在該序列部份所推導出來的蛋白質之內。這種結果肯定了粘接質體pIBV4分離出來的基因確實對應於實施例5.6所述命名為SnaC (SEQ ID no. 7)的蛋白質FMN還原酶。

對於粘接質體pIBV1到pIBV4所載始旋鏈黴菌SP92菌株DNA片段的研究結果證明其中包含了幾種參與原始黴素II和原始黴素I生物合成的基因。snaA，snaB和samS等基因編號參與原始黴素II，原始黴素II A合成酶和可能SAM合成酶等之酵素，且係在選殖到質體pIBV1內的大DNA片段以物理方式組合在一起者。同樣地，snbA，snbR，papA和papM等基因係編碼參與原始黴素I生物合成的蛋白質，3-羥基吡啶羧酸：AMP連接酶(SnbA)，可能促成原始黴素I的輸送之蛋白質SnbR，參與從分支酸生物合成對-胺基苯丙胺酸中的蛋白質PapA，及對-胺基苯丙胺酸(苯基-N)-甲基轉移酶(PapM)等者-這些基因都在選殖到粘接質體pIBV2中的大DNA片段上聚集在一起，同樣地，編碼參與原始黴素II生物合成中的蛋白質，可能為肽合成酶的蛋白

五、發明說明(100)

成

本實施例說明如何經由 snaA 基因的斷裂來構成不再產生原始黴素 II A 且其相反地只產生原始黴素 II B 的始旋鏈黴菌 SP92 菌株。

構成該菌株的目的在於肯定蛋白質 SnaA 的機能及提供能夠供隨後改質的原始黴素 II 生產中間體。

其構成係利用只能在大腸桿菌內複製但載有可在鏈黴菌屬內表現的抗拒標誌 (resistance marker) 之自殺載體來進行的。該載體, pDH5, 係由 Hillemann et al. 所培育出者 (1991)。

9.1.1. 質體 pVRC505 之構成

本實施例闡述如何構成不在始旋鏈黴菌 SP92 內複製但可用來經由單一同系重組來斷裂 snaA 基因之質體。

用實施例 6.3 所述質體 pXL2045 構成質體 pVRC505 以產生其 snaA 基因斷裂之 SP92 染色體突變株。

將選殖到 pXL2045 內的 6-kb BamHI 片段 (圖 16) 用限制酵素 EcoRI 和 PstI 予以切割。在 1% 瓊脂糖凝膠上電泳分離如此所產生的片段後, 並用 Geneclean (Bio101, La Jolla, California) 分離和純化出含有 snaA 基因 5' 端的 0.7-kb 片段。

將 100 毫微克用 EcoRI/PstI 雙重消化予以線型化過的載體 pDH5 依實施例 3.3 所述與 100 毫微克的該 0.7-kb 片段連接在一起。於將 TG1 菌株轉化後分離出載有所欲片段的純系。該重組質體編號為 pVRC505。質體 pVRC505 係依實施

五、發明說明 (101)

例 2.1 所述進行製備。其限制與圖表於圖 25 中。

9.1.2. 經由同系重組斷裂 snaA 基因的 SP92 突變株之分離

本實施例闡述如何構成 snaA 基因斷裂的始旋鏈黴菌 SP92 之突變株。

該突變株係經由將 SP92 菌株用自殺質體 pVRC505 予以轉形而分離出者。

原生質體的製備和其他轉形皆依 D. Hopwood *et al.* (1985) 中所述而進行。

將菌株 SP92 置於 YEME 培養基 / 34% 蔗糖 / 5 mM MgCl₂ / 0.25% 甘油中，在 30℃ 培養 40 小時。將菌絲體於溶菌酶存在之下轉化成原生質體，並用 5 × 1 微克的 pVRC505 於該原生質體的轉化（經由使用 PEG 之方法）。將該原生質體於 R2YE 培養基上再生隔夜後（D. Hopwood *et al.* 1985），上覆 3 毫升含有 2.6 微克 / 毫升的硫鏈絲菌肽之 SNA 培養基以選擇重組體（D. Hopwood *et al.* 1985）。

於所進行的 5 組轉化中，分離出 3 組抗硫鏈絲菌肽的純系。得到每微克 DNA 低於 1 之重組效率。這些重組體係源自菌株 SP92 染色體所載 snaA 基因與自殺質體 pVRC505 所含 0.7-kb 片段之間的單一同系重組整合而得者。嵌入 pVRC505 內的片段所具小尺寸，0.7-kb，說明所得之低重組效率。

將該重組體在添補 400 微克 / 毫升硫鏈絲菌肽的 R2YE 培養上平板培養和生長以分離出其孢子，並在相同培養基上

五、發明說明 (103)

CaCO₃ 等。在加入碳酸鈣之前，要先用氫氧化碳將 pH 值調整到 6.9。然後將該三角瓶置於旋轉攪拌器上於 27℃ 以 325 rpm 轉速攪拌 44 小時。將培養 44 小時的上述培養液 2.5 毫升於無菌狀態下添加到 30 毫升裝在 300-毫升三角瓶內的生產培養基中。該生產培養基係由下列組成份所組成：25 克 / 升的大豆粉，7.5 克 / 升的澱粉，22.5 克 / 升的葡萄糖，3.5 克 / 升的飼料酵母，0.5 克 / 升的硫酸鋅和 6 克 / 升的碳酸鈣。在加入碳酸鈣之前，先用鹽酸將 pH 值調整到 6.0。然後，將三角瓶置於 27℃ 攪拌 24，28 和 32 小時。於每一時間，稱取 10 克的醱酵液加到一光滑的三角瓶內，於其中加入 20 毫升的移動相：62.5% 乙腈 / 37.5% 0.1M KH₂PO₄ 溶液（用 H₃PO₄ 調整到 pH 3.0）。置於室溫攪拌器上攪拌 20 分鐘（325 rpm）之後，整個用濾紙過濾並依實施例 5.1.1.A. 所述用 HPLC 分析原始黴素。

其結果顯示，在所實施的醱酵條件下，突變株 SP92::pVRC505 所產生的原始黴素 I 之量相當於 SP92 對照組所產生的量，對於所試驗的三種時間都是如此。相對地，對照組在醱酵 24，28 和 32 小時產生約 70% 的原始黴素 II A 和 30% 的原始黴素 II B，而突變株 SP92::pVRC505 在這三個相同時間都產生 100% 的原始黴素 II B，其量等於 SP92 菌株所產生的原始黴素 II A + 原始黴素 II B 之和。因此，該突變株確實在原始黴素 II 生物合成的一步驟中被阻斷，其對應於中間體原始黴素 II B 所含 D-脯胺酸的 2,3 鍵之氧化。因此，該突變株可蓄積原始黴素 II B。這一點也頗能證明

五、發明說明 (108)

SP92菌株 samS::WamR 產生比對照菌株較少約 35% 的原始黴素 IA 及 10- 倍多的原始黴素 IB。依此，突變種 SP92 samS::WamR 所產生的 IB 形式之原始黴素佔有其總體原始黴素 I 型產量的 20%，而對照組菌株只合成約 1% 的 PIB。原始黴素 IB 形式與其 IA 形式的差別在於原始黴素 IB 的第 5 個殘基為對 - 甲胺基苯丙胺酸而非原始黴素 IA 的對 - 二甲胺基苯丙胺酸。突變株 SP92 samS::WamR 產生較多的原始黴素 IB 和較少原始黴素 IA 之事實證明 samS 基因的斷裂引起原始黴素 I 所含第 5 個殘基的甲基化程度減低，因此，samS 基因可能參與甲基供體，SAM，的生物合成，亦即，其係編碼 SAM 合成酶者。

9.3 在 papA 基因中斷的始旋鏈黴菌 SP92 突變株之構成

本實施例闡述如何經由中斷 papA 基因而構成不再產生 PI 的始旋鏈黴菌 SP92 菌株。構成該突變株的目的在於確證 PapA 蛋白質的機能性。其係用實施例 9.1 所述自殺載體 pDH5 進行構成者。

9.3.1. 質體 pVRC508 之構成

本實施例闡述如何經由單一同系重組構成不在始旋鏈黴菌 SP92 內複製而可用以斷裂 papA 基因的質體。

用實施例 7.7 所述質體 pVRC903 構成質體 pVRC508 以產生 papA 基因中斷的 SP92 染色體突變株。

於實施例 7.7 中述及將來自質體 pVRC903 的 1.4-kb PvuII-EcoRI 片段選殖到 M13mp18 中以對 papA 基因進行序列分析（該片段係對應於載體 pVRC903 所含 1.4-kb

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (109)

PvuII-XhoI 片段者，(圖 23)。

將 M13mp18 內的構成物用限制酵素 HindIII 和 EcoRI 予以消化。在 0.8 % 瓊脂糖凝膠上將載體 M13mp18 和 1.4-kb 含有一部份 papA 基因的片段予以分離後，以 GeneClean (Bio101, 加州, La Jolla) 分離和純化後述片段。該片段在 papA 基因中的位置表於圖 23 中。

將 100 毫微克已用限制酵素 HindIII 和 EcoRI 雙重消化 / 線型化過的載體 pDH5 與 200 毫微克實施例 3.3 中所述的 1.4-kb 片段連接。在將菌株 TG1 轉化後，分離出載有所欲片段的株系。該重組質體編號為 pVRC508。質體 pVRC508 可依實施例 2.1 所述予以製備。其限制與圖表於圖 28 中。

9.3.2. 經由同系重組在 papA 基因中斷的 SP92 突變株之分離

本實施例闡述如何構成 papA 基因被中斷的始旋鏈黴菌 SP92 突變株。該突變株係用自殺質體 pVRC508 將 SP92 菌株轉化後分離得到者。原生質體的製備和其轉化皆依實施例 9.1 所述進行。於將 SP92 菌株的原生質體轉化之後，上覆 3 毫升含有 2.6 毫克 / 毫升硫鏈絲菌肽的 SNA 培養基以進行選擇。用 5 次 1 微克的質體 pVRC508 所進行的 5 次轉化中，分離出 10 個硫鏈絲菌肽抗拒性純系。如此所得重組效率約為 2 每微克 DNA。這些重組體來自菌株 SP92 染色體所載 papA 基因與自殺質體 pVRC508 所含 1.4-kb 片段之間的單一同系重組而整合得到者。

五、發明說明 (112)

本實施例闡述如何經由 snbA 基因的中斷構成不再生產原始黴素 I 的 始旋鏈黴菌 SP92 菌株。該突變株的構成目的為確定 snbA 蛋白質的機能性。其構成係用實施例 9.1 中所述自殺載體 pDH5 進行者。

9.4.1 質體 pVRC404 之構成

本實施例闡述如何構成不再 始旋鏈黴菌 SP92 中複製且可用來經由單一同系重組而中斷 snbA 基因之質體。

用實施例 6.2 所述質體 pVRC402 構成質體 pVRC404 以產生其 snbA 基因中斷的 SP92 染色體突變株。先用限制酵素 XhoI 和 HindIII 消化質體 pVRC402。將所得片段在 0.8 % 瓊脂糖凝膠上電泳分離後，用 GeneClean (Bio101, La Jolla, 加州) 分離和純化出含有 snbA 基因內部部份的 1170-kb 片段。該片段在 snbA 基因內的位置表於圖 15A 中。

將 100 毫微克用 SmaI 消化 / 線型化過的載體 pDH5 與 200 毫微克實施例 3.3 中所述 1170-kb 片段連接。於將 TG1 菌株轉化後，分離出載著所欲片段的純系。該重組質體編號為 pVRC404。質體 pVRC404 可依實施例 2.1 所述予以製備。其限制與圖表於圖 29 中。

9.4.2. 經由同系重組在 snbA 基因中斷的 SP92 突變株之分離。

本實施例闡述如何構成 snbA 基因中斷的 始旋鏈黴菌 SP92 突變株。

用自殺質體 pVRC404 將菌株 SP92 轉化後分離出該突變株

五、發明說明 (115)

該突變株的構成目的係為肯定 snaD 基因的機能性，及為得到只生產原始黴素 I，衍生自 SP92 之菌株。

其構成係用實施例 6.8 中所述衍生自自殺載體 pDH5，只能在大腸桿菌中複製且載有能在鏈黴菌屬中表現的拒抗標誌（參看實施例 9.1）之質體 pVRC1000 而進行者。

9.5.1 質體 pVRC1000 之構成

本實施例闡述如何構成不在始旋鏈黴菌 SP92 中複製且可用來經由單一同系重組而中斷 snaD 基因之質體。載有一部份 snaD 基因的質體 pVRC1000，其構成已述於實施例 6.8 之中。

9.5.2. 經由同系重組在 snaD 基因中斷的 SP92 突變株之分離

本實施例闡述如何構成其 snaD 基因被中斷的始旋鏈黴菌 SP92 之突變株。該突變株係經由用自殺質體 pVRC1000 將 SP92 菌株轉化後分離得到者。其原生質體之製備及其轉化皆依實施例 9.1 中所述進行之。在用 1 微克 pVRC1000 進行的 5 組轉化中，分離出約 1500 硫鏈絲菌肽抗拒性純系。如此所得重組效率為約 375 / 微克 DNA。這些重組株係經由 SP92 菌株染色體所載 snaD 基因與自殺質體 pVRC1000 所含 1.5-kb BamHI-SstI 片段之間的單一同系重組整合而得者。將約 20 種重組株在含有 400 微克 / 毫升硫鏈絲菌肽的 R2YE 培養基上傳代培養，並再在含有 400 微克 / 毫升硫鏈絲菌肽的 R2YE 培養基上平板培養和生長而分離出這些重組株的孢子。

五、發明說明 (118)

與100毫微克用 SstI 線型化過的載體 pUC1813 (Kay and McPherson, 1987) 連接。於將大腸桿菌菌株 DH5 α (supE44 Δ lacU169 (f80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1; Hanahan, 1983) 轉形後，在含有150微克／毫升氨苄青黴素和20微克／毫升 X-gal 的固體 LB 上選擇該轉形體而分離出載有該 7.6-kb 片段的純系。該質體編號為 pVRC506。該重組質體的製備係依實施例 2.1 所述進行者。

在載體 pIJ903 中的選殖係在 HindIII 部位進行。用 HindIII 切割質體 pVRC506 後，在 0.8 % 瓊脂糖凝膠上電泳及電洗提而分離出載有 snaA 和 snaB 兩基因的 7.6-kb 片段。將 500 毫微克的該片段與 500 毫微克用 HindIII 線型化過的載體 pIJ903 連接在一起。於將大腸桿菌菌株 DH5 α 轉形並在含有 150 微克／毫升氨苄青黴素的固體 LB 上選擇該轉形體後，分離出載有該 7.6-kb 片段的純系。該質體經命名為 pVRC507。該重組質體的製備係依實施例 2.1 中所述進行。其限制與圖表為圖 30 中。

10.2 snaA 和 snaB 兩基因在突變株 SP120 中的表現

本實施例闡述如何經由在始旋鏈黴菌 SP92 內導入載有對應的構造基因之質體而在該菌株內表現蛋白質 snaA 和 snaB。將突變株 SP120 用 500 毫微克的質體 pVRC507 轉化後進行 snaA 和 snaB 兩基因之表現。SP120 原生質體的轉形和用硫鏈絲菌肽進行的轉形體選擇都依實施例 9.1.2. 所述進行。

五、發明說明(128)

所用縮寫：

DNA: 脫氧核糖核酸

AMP: 腺苷 5'-一磷酸

ATP: 腺苷 5'-三磷酸

ETB: 溴化乙錠

bis-tris: (二-[2-羥乙基]亞胺基三-[羥甲基]-甲烷)

bis-tris丙烷: (1,3-二-[三-(羥甲基)-甲胺基]丙烷)

BSA: 牛血清白蛋白

HPLC: 高性能液相層析分析法

OD: 光密度

DTE: 二硫赤蘚糖醇

DTT: 二硫蘇糖醇

E-64: 反式-環氧丁二醯基-L-白胺醯胺基-(4-胍基)
丁烷

EDTA: 乙二胺四乙酸

FMN: 黃素單核苷酸

FMNH₂: 還原黃素單核苷酸

Hepes: (N-[2-羥乙基]六氫吡啶-N'-[2-乙烷磺酸])

IPTG: 異丙基β-D-吡喃半乳糖苷

kDa: 千道爾頓

kb: 千鹼

LB: Luria 肉湯(大腸桿菌的富生長培養基)

NAD: 菸鹼醯胺二核苷酸

NADH: 還原菸鹼醯胺二核苷酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (130)

參考資料

- Anzai H., Murakami T., Imai A., Satoh A., Nagaoka K. and Thompson C. J. (1987) *J. Bacteriol.*, 169 : 3482-3488.
- Bancroft I. and WolK C. P. (1989) *J. Bacteriol.*, 171 : 5949-5954.
- Bibb M. J., Findlay P. R. and Johnson M. W. (1984) *Gene*, 30 : 157-166.
- Birnboim H. C. and Doly J. (1979) *Nucleic Acids Res.*, 7 : 1513-1523.
- Blattner F. R., Williams B. G., Blechl A. E., Denniston-Thompson K., Faber H. E., Furlong L. A., Grunwald D. J., Kiefer D. O., Moore D. D., Schumm J. W., Sheldon E. L. and Smithies O. (1977) *Science*, 196 : 161-169.
- Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heynecker H. L., Boyer H. W., Crosa J. H. and Falkow S. (1977) *Gene*, 2 : 95-113.
- Boyer H. W. and Roulland-Dussoix D. (1969) *J. Mol. Biol.*, 41 : 459.
- Chater K. F. (1990) *Bio/Technology*, 8 : 115-121.
- Cocito C. G. (1979) *Microbiol. Rev.*, 43 : 145-198.
- Cocito C. G. (1983) *In Antibiotics*, 6 : (Ed. F. E. Hahn), 296-332.
- Dessen P. C., Fondrat C., Valencien C. and Mugnier C. (1990) *Comp. Appl. in Biosciences*, 6 : 355-356.
- Di Giambattista M., Chinali G. and Cocito C. G. (1989) *J. Antim. Chemother.*, 24 : 485-507.
- Fernandez-Moreno M. A., Caballero J. L., Hopwood D. A. and Malpartida F. (1991) *Cell*, 66 : 769-780.
- Gibson T. J. (1984) *Ph.D. thesis*, Cambridge University, England.
- Hallam S. E., Malpartida F. and Hopwood D. A. (1988) *Gene*, 74 : 305-320.
- Hames B. D. and Higgins S. J. (1985) *IRL Press Ltd., Oxford, U. K.*
- Hanahan D. (1983) *J. Mol. Biol.*, 166 : 557
- Hillemann D., Pülher A. and Wohlleben W. (1991) *Nucl. Acids Res.*, 19 : 727-731.
- Hohn B. et Collins J. F. (1980) *Gene*, 11 : 291-298.
- Hook J. D. and Vining L. C. (1973) *J.C.S. Chem. Comm.*, 185-186.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M. and Scrempf H. (1985) *A laboratory manual*, The John Innes Foundation, Norwich, England.
- Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Janssen G. R., Malpartida F. et Smith C. (1986b) *In Regulation of gene expression - 25 years on (ed. I; A. Booth C; F. Higgins)*, 251-276.
- Hopwood D. A., Malpartida F., Kieser H. M., Ikeda H., Duncan J., Fujii I., Rudd A. M., Floss H. G. and Omura S. (1985a) *Nature*, 314 : 642-644.
- Hopwood D. A., Malpartida F., Kieser H. M., Ikeda H. and Omura S. (1985b) *In Microbiology (ed S. Silver). American Society for Microbiology, Washington D. C.*, 409-413.

五、發明說明 (131)

- Hopwood D. A., Malpartida F. and Chater K. F. (1986a) *In Regulation of secondary metabolite formation.* (eds. H. Kleinkauf, H. von Hohren, H. Dornauer G. Neesemann), 22-33.
- Hoshino T., Ikeda T., Tomizuka N and Furukawa K. (1985) *Gene*, 37 : 131-138.
- Hutchinson C. R., Borell C. W., Otten S. L., Stutzman-Engwall K. J. and Wang Y. (1989) *J. Med. Chem.*, 32 : 929-937.
- Ish-Horowitz D. and Burk J. F. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9 : 2989-298.
- Kanehisa M. I. (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12 : 203-215.
- Kay R. and McPherson J. (1987) *Nucleic Acids Res.*, 15 (6) : 2778.
- Khan S. A. and Novick R. (1983) *Plasmid*, 10 : 251-259.
- Kingston D. G. I., Kolpak M. X., Lefevre W. and Borup-Grochtmann I. B. (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, 105 : 5106-5110.
- Kyte J. and Doolittle R. (1982) *J. Biol. Mol.*, 157 : 105-135.
- Low B. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 60 : 160.
- Lydiat D. J., Malpartida F. and Hopwood D. A. (1985) *Gene*, 35 : 223-235.
- Maniatis T., Fritsh E. F. and Sambrook J. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N. Y.,
- Meinkoth J. and Wahl G. (1984) *Anal. Biochem.*, 138 : 267-284.
- Messing J., Crea R. and Seeburg P. H. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9 : 309.
- Neal R. J. and Chater K. F. (1987) *Gene*, 58 : 229-241.
- Ohnuki T., Imanaka T. and Aiba S. (1985) *J. Bacteriol.*, 164 : 85-94.
- Rusnak F., Sakaitani M., Drueckhammer D., Reichert J. et Walsh C. T. (1991) *Biochemistry*, 30 : 2916-2927.
- Sawadogo M. and Van Dyke M. W. (1991) *Nucl. Acids Res.*, 19 : 674.
- Staad J. F., Elkins M. F. and Earhart C. F. (1989) *FEMS Microbial. Lett.*, 59 : 15-20.
- Staden R. and McLachlan A. D. (1982) *Nucleic Acids Res.*, 10 : 141-156.
- Videau D. (1982) *Path. Biol.*, 30 : 529-534.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (132)

序列表

(1) 一般資料：

(i) 申請人：

(A) 名稱：RHONE-POULENC RORER S.A.

(B) 街名：20, avenue Raymond ARON

(C) 市名：ANTONY

(E) 國名：法國

(F) 郵碼 (ZIP)：92165

(ii) 發明名稱：Polypeptides impliqués dans la
biosynthèse des streptogramines, séquences
nucléotidiques codant pour ces polypeptides
et leur utilisation

(iii) 序列數：16

(iv) 計算機可讀形式：

(A) 媒體類別：磁帶

(B) 計算機：IBM PC 相容

(C) 操作系統：PC-DOS/MS-DOS

(D) 軟體：PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(EPO)

(2) SEQ ID NO: 1 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：5392 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 (133)

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 1:

GGATCCTGGC GTCCGCCGTC AAGAACTGAA CCGAGGAGAC ACCCACCATG ACCGCACCCC	60
GCCGGCGCAT CACCCTCGCC GGCATCATCG ACGGCCCCGG CGGCCATGTG GCCGCCTGGC	120
GCCACCCGGC GACCAAGGCG GACGCCCAGC TCGACTTCGA ATTCCACCGC GACAACGCCC	180
GCACCCTCGA ACGCGGCCTG TTCGACGCCG TGTTTCATCGC GGACATCGTC GCCGTGTGGG	240
GCACCCGCCT GGAATCCCTG TGCCGCACCT CGCGCACC GAATTCGAA CCGCTCACCC	300
TGCTCGCCGC CTACGCCGCG GTCACCGAGC ACATCGGCCT GTGCGCCACC GCCACCACCA	360
CGTACAACGA ACCGGCGCAC ATCGCCGCC GCTTCGCCTC CCTCGACCAC CTCAGCGGCG	420
GCCGGGCCGG CTGGAACGTC GTCACCTCCG CCGCACCCTG GGAGTCCGCC AACTTCGGCT	480
TCCCCGAGCA CCTGGAGCAC GGCAAACGCT ACGAGCGGGC CGAGGAGTTC ATCGACGTCG	540
TCAAAAACT GTGGGACAGC GACGGCCGCC CCGTCGACCA CCGCGGCACC CACTTCGAGG	600
CCCCCGGCC GCTCGGGATC GCGCGCCCC CGCAGGGCCG CCGCGTCATC ATCCAGGCCG	660
GCTCCTCGCC GGTGGGACGC GAGTTCGCCG CCGGCACGC CGAGGTCATC TTCACCCGGC	720
ACAACCGGCT CTCCGACGCC CAGGACTTCT ACGGCGACCT CAAGGCACGC GTCGCCCCGGC	780
ACGGCCGCGA CCGCGAGAAG GTCCTCGTGT GGCCGACCCT CGCGCCGATC GTCGCGGCCA	840
CCGACACCGA GGCGAAGCAG CGCCTGCAGG AACTGCAGGA CCTCACCCAC GACCATGTCTG	900
CCCTGCGCAC CCTTCAGGAC CACCTCGGCG ACGTCGACCT GAGCGGTAC CCGATCGACG	960
GGCCCGTCCC CGACATCCCG TACACCAACC AGTCCCAGTC GACGACCGAG CGGCTGATCG	1020
GCCTGGCCAG GCGCGAGAAC CTCAGCATCC GCGAGCTGGC CCTGCGGGCTG ATGGGCGACA	1080
TCGTCGTCGG CACACCGGAG CAGCTCGCCG ACCACATGGA GAGCTGGTTC ACCGGCCGCG	1140
GCGCCGACGG CTTCACATC GACTTCCCGT ACCTGCCGGG CTCCGCCGAC GACTTCGTCTG	1200
ACCACGTGGT GCGCGAACTG CAGCGCCCGG GCCTGTACCG CTCGGGCTAC GAGGGCACCA	1260

五、發明說明(134)

CCCTGCGGGC CAACCTCGGC ATCGACGCCC CCCGGAAGGC AGGTGCAGCG GCTTGACTTC 1320

CGTCCTAAAG GCGGGGGATT CCAGCGGTCG CCCGCTGGGG TTCTTGCTTC ACCGACGACC 1380

GCCCCGTCCG GGAGGACTCC CGTTGAGGTC TTATACCGTC TCCACAGGCC GACGCCGCCA 1440

GCCCCGCGGC CAGGATGTTG CGTGCCGCAT TCACGTGCGG GTCATGCACA GCGCCGCAGT 1500

CGCACGTCCA CTCCCGGACG TTCAGCGGCA GCTTCCCGCG GACCGTGCCG CAGGTTCCGC 1560

ACAGCTTGA GCTGGGGAAC CAGCGGTCTG TCACGACGAG TTCGCGCCCA TACCAGGCGC 1620

ACTTGACTC CAGCATGGAG CGCAGTTCCG TCCAGGCCGC GTCGAGATG GCGCGCGCGA 1680

GCTTGCCGTT CTTGAGCAGG TTGCGGACGG TGAGGTCCTC GATCACGACC GTTTGGTTCT 1740

CACGACGAG TCGAGTCGAC AGCTTGTGGA GGAAGTCGCA GCGCCGGTCG GTGATCCGGG 1800

CGTGGACGCG GGCACCTTG CGGCGGGCTT TCTTCCGGTT CGCCGACCCC TTCGCCTTGC 1860

GCGACACGTC CCGCTGAGCC TTCGCGAGGC GGGCGCGGTC ACGGCGCTCG TGCTTGGGGT 1920

TGGTGATCTT CTCCCCGGTG GACAGGGTCA CCAGGGAGGT GATCCCGGCG TCGATGCCGA 1980

GCGCCGCCGT GGTGGCGGGC GCGGGGGTGA TGGTGTCTC GCACAGCAGG GACACGAACC 2040

AGCGGCCCCG ACGGTCGCGG GACACGGTCA CCGTCGTCGG CTCCGCCCCCT TCGGGAAGGG 2100

GACGGGACCA GCGGATGTCC AGGGGCTCCG CGGTCTTCGC CAGCGTGAGC TGTCCGTTAC 2160

GCCACGTGAA GGCCTGCGG GTGTACTCGG CCGACGCCCT GGAATTTTTC CGCGACTTGT 2220

ACCGCGGGTA CTTGACCGC TTGGCGAAGA AGTTGGCGAA CGCCGTCTGC AAGTGCCGCA 2280

GCGCCTGCTG GAGCGGGACG GAGGACACCT CCGAGAGGAA GCGAGTTCT TCGGTCTTCT 2340

TCCACTCCGT CAGCGCGGCG GACGACTGCA CGTAGGAGAC CCGGCGCTGC TCGCCGTACC 2400

AGGCTCGCGT GCGCCCCCTCA AGCGCCTTGT TGTACACGAG GCGGACACAG CCGAACGTGC 2460

GGGACAGCTC AGCCGCCTGC TCGTCCGTGG GATAAAAGCG GTACTTGAAA GCGCGCTTGA 2520

CCTGCTGCAT CACGCCTCAC ACGCTATCAG TTCCCGTGTG AGCGGCGGGT GTCTGCCGGT 2580

GGTTGCAGAC GCCGAACCGC CTTGGCGGCG ATTCGCCCCT CCCTGCCCTG CTCCGCAAGA 2640

GCTTCGTCTC CTCCCCGGTC TGAAGGCCGG GGTATCCACG AAGGAATTCT GATGACCGCG 2700

CCCATCCTCG TCGCCACCCT CGACACCCGC GGGCCCGCCG CCACCCCTCG CACGATCACC 2760

CGCGCCGTGC GGGCCGCGGA GGCCGCGGGA TTCGACGCCG TCCTGATCGA CGACCGGGCC 2820

GCGCCCGGCG TCCAGGGCCG GTTCGAGACG ACGACGCTGA CCGCCGCGCT GGCCGCGGTC 2880

ACCGAGCACA TCGGCCTGAT CACCGCCCCG CTCCCGGCCG ACCAGGCCCC CTACCACGTG 2940

TCCCGGATCA CCGCCTCGCT CGACCACCTC GCGCACGGCC GCACCGGCTG GCTCGCGAGC 3000

ACGGACACCA CCGACCCCGA GGGCCGCACC GCGGAATCA TCGACGTCTG CCGCGGCCTG 3060

五、發明說明 (135)

TGGGACAGCT TCGACGACGA CGCCTTCGTC CACGACCGCG CCGACGGCCT GTACTGGCGG 3120
 CTGCCC GCCG TCCACCAACT CGACCACCAG GGCAGGCACT TCGACGTGGC CGGCCCCCTC 3180
 AACGTCGCCC GCCCGCCGCA GGGCCACCCC GTCGTCGCCG TCACCGGCCC CGCCCTCGCC 3240
 GCGGCCGCCG ACCTCGTCCT GCTCGACGAG GCGGCCGACG CCGCCTCGGT GAAGCAGCAG 3300
 GCACCGCACG CCAAGATCCT CCTGCCGCTG CCCGGCCCCG CCGCCGAAT GCGGCCGAC 3360
 AGCCCCGCGG ACGGCTTCAC GGTGGCGCTC ACCGGCTCCG ACGACCCGGT CCTGGCCGCG 3420
 CTCGCCGCCG GGCCCGGCCG CCCGGACCGC ACCGCGGCCA CCACCCTGCG CGAACGCCTG 3480
 GGCCTGGCCC GCCCGGAGAG CCGCCACGCC CTCACCACCG CCTGACGACC CGTCCGCCCG 3540
 CTGCTTCCTG GAGAGTCATG TCCCGTCGCC TGTTACCTC GGAGTCCGTG ACCGAGGGCC 3600
 ACCCCGACAA GATCGCCGAC CAGATCAGTG ACACCGTCCT CGACGCCCTG CTGCGCGAGG 3660
 ACCCCGCCTC ACGCGTCGCG GTCGAGACCC TGATCACCAC CGGCCAGGTC CACATCGCCG 3720
 GCGAGGTCAC CACCAAGGCG TACGCGCCCA TCGCCCAACT GGTCCGCGAC ACGATCCTGG 3780
 CCATCGGCTA CGACTCGTCC GCCAAGGGCT TCGACGGCGC CTCCTGCGGC GTCTCCGTCT 3840
 CCATCGGCGC GCAGTCCCCG GACATCGCCC AGGGCGTCGA CAGCGCCTAC GAGACCCGCG 3900
 TCGAGGGCGA GGACGACGAG CTCGACCAGC AGGGCGCCG CGACCAGGGC CTGATGTTTCG 3960
 GCTACGCCAC CGACGAGACC CCCTCGCTGA TGCCGCTGCC CATCGAGCTC GCGGCCGCC 4020
 TCTCGCGCCG GCTCACCAGG GTCCGCAAGG ACGGCACCGT CCCCTACCTG CGCCCCGACG 4080
 GCAAGACCCA GGTCACCATC GAGTACCAGG GCAGCCGCCG GGTGCGCCTG GACACCGTCG 4140
 TCGTCTCCTC CCAGCACGCC GCCGACATCG ACCTCGGCTC CCTGCTCACC CCGACATCC 4200
 GCGAGCACGT CGTCGAGCAC GTCCTCGCCG CACTCGCCGA GGACGGCATC AAGCTCGAGA 4260
 CGGACAATA CCGCCTGCTG GTCAACCCGA CCGGCCGTTT CGAGATCGGC GGCCCGATGG 4320
 GCGACGCCGG CCTGACCGGC CGCAAGATCA TCATCGACAC GTACGGCGGC ATGGCCCGCC 4380
 ACGGCGGTGG CGCGTTCTCC GGCAAGGACC CGTCCAAGGT CGACCGTTCC GCCGCGTACG 4440
 CGATGCGCTG GGTCGCCAAG AACGTCGTCG CCGCGGGCCT CGCCTCCCGC TGCAGGTCC 4500
 AGGTGCGCTA CGCCATCGGC AAGGCCGAGC CGGTGCGCCT GTTCGTCGAG ACGTTCGGCA 4560
 CCGGCACCGT CGCCCAGGAG CGCATCGAGA AGGCCATCAC CGAGGTCTTC GACCTGCGCC 4620
 CCGCGGCCAT CATCCGCGAC CTCGACCTGC TCGGGCCAT CTACGCCGCC ACCGCCGCTT 4680
 ACGGCCACTT CGGCCCGGAA CTGCCCCGACT TCACCTGGGA GCGGACCGAC CGCGCCCACC 4740
 GGCTCAAGGC CGCGGCCGGT CTCTGAGCCG GCCGGACCTG TGAGGAGACC TGACGTGCGC 4800
 ATCGCTGTCA CCGGTTCCAT CGCCACCGAC CATCTGATGG TCTTCCCCGG CCGGTTGCGC 4860

五、發明說明 (136)

GATCAGCTGA TCCCCGACCA GCTCGCTCAT GTCTCGCTCT CCTTCCTGGT CGACGCACTC 4920
 GAGGTGCGCC GGGGCGGAGT GCGGACAAC GTCGCCTTCG GCCTCGGCGG CCTCGGCCTC 4980
 ACCCCCCAGC TGGTCGGCGC CGTGGGCAGC GACTTCGCCG AGTACGAGGT CTGGCTCAAG 5040
 GAACACGGCG TCGACACCGG CCCCCTCCTG GTCTCCACCG AGCGGCAGAC CGCCCGGTTC 5100
 ATGTGCATCA CCGACCAGGA CTCCAACCAG ATCGCCTCCT TCTACGCGGG CGCCATGCAA 5160
 GAGGC~~C~~CGCG ACATCGACCT GTGGCACCTG ACCACCGGCA GCGTCCGCCC CGACCTCGTC 5220
 CTGGTCTGCC CGAACGACCC GCGGCGCATG CTGCGCCACA CGGGGAGTGC CGCGAAACTG 5280
 GGCCTGCCGT TCGCCGCCGA CCCCTCCCAG CAGCTCGCCC GCCTGGAGGG AGGGAGGTAC 5340
 GCGAACTCGG TCGACGGGGC CCGTTGGTTT TTCACCAACG AAGTACGAGG CC 5392

(2) SEQ ID NO: 2 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：1269 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：1...1269

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 2:

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (137)

ATG ACC GCA CCC CGC CGG CGC ATC ACC CTC GCC GGC ATC ATC GAC GGC Met Thr Ala Pro Arg Arg Arg Ile Thr Leu Ala Gly Ile Ile Asp Gly 1 5 10 15	48
CCC GGC GGC CAT GTG GCC GCC TGG CGC CAC CCG GCG ACC AAG GCG GAC Pro Gly Gly His Val Ala Ala Trp Arg His Pro Ala Thr Lys Ala Asp 20 25 30	96
GCC CAG CTC GAC TTC GAA TTC CAC CGC GAC AAC GCC CGC ACC CTC GAA Ala Gln Leu Asp Phe Glu Phe His Arg Asp Asn Ala Arg Thr Leu Glu 35 40 45	144
CGC GGC CTG TTC GAC GCC GTG TTC ATC GCG GAC ATC GTC GCC GTG TGG Arg Gly Leu Phe Asp Ala Val Phe Ile Ala Asp Ile Val Ala Val Trp 50 55 60	192
GGC ACC CGC CTG GAC TCC CTG TGC CGC ACC TCG CGC ACC GAG CAC TTC Gly Thr Arg Leu Asp Ser Leu Cys Arg Thr Ser Arg Thr Glu His Phe 65 70 75 80	240
GAA CCG CTC ACC CTG CTC GCC GCC TAC GCC GCG GTC ACC GAG CAC ATC Glu Pro Leu Thr Leu Leu Ala Ala Tyr Ala Ala Val Thr Glu His Ile 85 90 95	288
GGC CTG TGC GCC ACC GCC ACC ACC ACG TAC AAC GAA CCG GCG CAC ATC Gly Leu Cys Ala Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Asn Glu Pro Ala His Ile 100 105 110	336
GCC GCC CGC TTC GCC TCC CTC GAC CAC CTC AGC GGC GGC CGG GCC GGC Ala Ala Arg Phe Ala Ser Leu Asp His Leu Ser Gly Gly Arg Ala Gly 115 120 125	384
TGG AAC GTC GTC ACC TCC GCC GCA CCG TGG GAG TCC GCC AAC TTC GGC Trp Asn Val Val Thr Ser Ala Ala Pro Trp Glu Ser Ala Asn Phe Gly 130 135 140	432
TTC CCC GAG CAC CTG GAG CAC GGC AAA CGC TAC GAG CGG GCC GAG GAG Phe Pro Glu His Leu Glu His Gly Lys Arg Tyr Glu Arg Ala Glu Glu 145 150 155 160	480
TTC ATC GAC GTC GTC AAA AAA CTG TGG GAC AGC GAC GGC CGC CCC GTC Phe Ile Asp Val Val Lys Lys Leu Trp Asp Ser Asp Gly Arg Pro Val 165 170 175	528
GAC CAC CGC GGC ACC CAC TTC GAG GCC CCC GGC CCG CTC GGG ATC GCC Asp His Arg Gly Thr His Phe Glu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Ile Ala 180 185 190	576
CGC CCC CCG CAG GGC CGC CCC GTC ATC ATC CAG GCC GGC TCC TCG CCG Arg Pro Pro Gln Gly Arg Pro Val Ile Ile Gln Ala Gly Ser Ser Pro 195 200 205	624
GTG GGA CGC GAG TTC GCC GCC CGG CAC GCC GAG GTC ATC TTC ACC CGG Val Gly Arg Glu Phe Ala Ala Arg His Ala Glu Val Ile Phe Thr Arg 210 215 220	672
CAC AAC CGG CTC TCC GAC GCC CAG GAC TTC TAC GGC GAC CTC AAG GCA His Asn Arg Leu Ser Asp Ala Gln Asp Phe Tyr Gly Asp Leu Lys Ala 225 230 235 240	720

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (138)

CGC	GTC	GCC	CGG	CAC	GGC	CGC	GAC	CCC	GAG	AAG	GTC	CTC	GTG	TGG	CCG	768
Arg	Val	Ala	Arg	His	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Lys	Val	Leu	Val	Trp	Pro	
				245					250					255		
ACC	CTC	GCG	CCG	ATC	GTC	GCC	GCC	ACC	GAC	ACC	GAG	GCG	AAG	CAG	CGC	816
Thr	Leu	Ala	Pro	Ile	Val	Ala	Ala	Thr	Asp	Thr	Glu	Ala	Lys	Gln	Arg	
			260					265					270			
CTG	CAG	GAA	CTG	CAG	GAC	CTC	ACC	CAC	GAC	CAT	GTC	GCC	CTG	CGC	ACC	864
Leu	Gln	Glu	Leu	Gln	Asp	Leu	Thr	His	Asp	His	Val	Ala	Leu	Arg	Thr	
		275					280					285				
CTT	CAG	GAC	CAC	CTC	GGC	GAC	GTC	GAC	CTG	AGC	GCG	TAC	CCG	ATC	GAC	912
Leu	Gln	Asp	His	Leu	Gly	Asp	Val	Asp	Leu	Ser	Ala	Tyr	Pro	Ile	Asp	
	290					295					300					
GGG	CCC	GTC	CCC	GAC	ATC	CCG	TAC	ACC	AAC	CAG	TCC	CAG	TCG	ACG	ACC	960
Gly	Pro	Val	Pro	Asp	Ile	Pro	Tyr	Thr	Asn	Gln	Ser	Gln	Ser	Thr	Thr	
305					310				315						320	
GAG	CGG	CTG	ATC	GGC	CTG	GCC	AGG	CGC	GAG	AAC	CTC	AGC	ATC	CGC	GAG	1008
Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Leu	Ala	Arg	Arg	Glu	Asn	Leu	Ser	Ile	Arg	Glu	
				325					330					335		
CTG	GCC	CTG	CGG	CTG	ATG	GGC	GAC	ATC	GTC	GTC	GGC	ACA	CCG	GAG	CAG	1056
Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Met	Gly	Asp	Ile	Val	Val	Gly	Thr	Pro	Glu	Gln	
			340					345					350			
CTC	GCC	GAC	CAC	ATG	GAG	AGC	TGG	TTC	ACC	GGC	CGC	GGC	GCC	GAC	GGC	1104
Leu	Ala	Asp	His	Met	Glu	Ser	Trp	Phe	Thr	Gly	Arg	Gly	Ala	Asp	Gly	
		355					360					365				
TTC	AAC	ATC	GAC	TTC	CCG	TAC	CTG	CCG	GGC	TCC	GCC	GAC	GAC	TTC	GTC	1152
Phe	Asn	Ile	Asp	Phe	Pro	Tyr	Leu	Pro	Gly	Ser	Ala	Asp	Asp	Phe	Val	
	370					375					380					
GAC	CAC	GTG	GTG	CCC	GAA	CTG	CAG	CGC	CGC	GGC	CTG	TAC	CGC	TCG	GGC	1200
Asp	His	Val	Val	Pro	Glu	Leu	Gln	Arg	Arg	Gly	Leu	Tyr	Arg	Ser	Gly	
385					390					395					400	
TAC	GAG	GGC	ACC	ACC	CTG	CGG	GCC	AAC	CTC	GGC	ATC	GAC	GCC	CCC	CGG	1248
Tyr	Glu	Gly	Thr	Thr	Leu	Arg	Ala	Asn	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Pro	Arg	
				405					410					415		
AAG	GCA	GGT	GCA	GCG	GCT	TG										1269
Lys	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala											
				420												

(2) SEQ ID NO: 3 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：834 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

五、發明說明 (139)

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：1..834

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 3:

ATG ACC GCG CCC ATC CTC GTC GCC ACC CTC GAC ACC CGC GGC CCC GCC	48
Met Thr Ala Pro Ile Leu Val Ala Thr Leu Asp Thr Arg Gly Pro Ala	
1 5 10 15	
GCC ACC CTC GGC ACG ATC ACC CGC GCC GTG CGG GCC GCG GAG GCC GCC	96
Ala Thr Leu Gly Thr Ile Thr Arg Ala Val Arg Ala Ala Glu Ala Ala	
20 25 30	
GGA TTC GAC GCC GTC CTG ATC GAC GAC CGG GCC GCC GCC GGC GTC CAG	144
Gly Phe Asp Ala Val Leu Ile Asp Asp Arg Ala Ala Ala Gly Val Gln	
35 40 45	
GGC CGG TTC GAG ACG ACG ACG CTG ACC GCC GCG CTG GCC GCC GTC ACC	192
Gly Arg Phe Glu Thr Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Ala Ala Val Thr	
50 55 60	
GAG CAC ATC GGC CTG ATC ACC GCC CCG CTC CCG GCC GAC CAG GCC CCC	240
Glu His Ile Gly Leu Ile Thr Ala Pro Leu Pro Ala Asp Gln Ala Pro	
65 70 75 80	
TAC CAC GTG TCC CGG ATC ACC GCC TCG CTC GAC CAC CTC GCC CAC GGC	288
Tyr His Val Ser Arg Ile Thr Ala Ser Leu Asp His Leu Ala His Gly	
85 90 95	
CGC ACC GGC TGG CTC GCG AGC ACG GAC ACC ACC GAC CCC GAG GGC CGC	336
Arg Thr Gly Trp Leu Ala Ser Thr Asp Thr Thr Asp Pro Glu Gly Arg	
100 105 110	
ACC GGC GAA CTC ATC GAC GTC GTC CGC GGC CTG TGG GAC AGC TTC GAC	384
Thr Gly Glu Leu Ile Asp Val Val Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Asp	
115 120 125	
GAC GAC GCC TTC GTC CAC GAC CGC GCC GAC GGC CTG TAC TGG CGG CTG	432

五、發明說明(140)

Asp 130	Asp	Ala	Phe	Val	His	Asp 135	Arg	Ala	Asp	Gly	Leu 140	Tyr	Trp	Arg	Leu	
CCC 145	GCC	GTC	CAC	CAA	CTC	GAC	CAC	CAG	GGC	AGG	CAC	TTC	GAC	GTG	GCC	480
Pro	Ala	Val	His	Gln	Leu	Asp	His	Gln	Gly	Arg	His	Phe	Asp	Val	Ala	
					150					155					160	
GGC	CCC	CTC	AAC	GTC	GCC	CGC	CCG	CCG	CAG	GGC	CAC	CCC	GTC	GTC	GCC	528
Gly	Pro	Leu	Asn	Val	Ala	Arg	Pro	Pro	Gln	Gly	His	Pro	Val	Val	Ala	
				165					170					175		
GTC	ACC	GGC	CCC	GCC	CTC	GCC	GCG	GCC	GCC	GAC	CTC	GTC	CTG	CTC	GAC	576
Val	Thr	Gly	Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu	Val	Leu	Leu	Asp	
				180				185					190			
GAG	GCG	GCC	GAC	GCC	GCC	TCG	GTG	AAG	CAG	CAG	GCA	CCG	CAC	GCC	AAG	624
Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Val	Lys	Gln	Gln	Ala	Pro	His	Ala	Lys	
		195					200					205				
ATC	CTC	CTG	CCG	CTG	CCC	GGC	CCG	GCC	GCC	GAA	CTG	CCC	GCC	GAC	AGC	672
Ile	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Pro	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Ala	Asp	Ser	
	210					215					220					
CCC	GCG	GAC	GGC	TTC	ACG	GTG	GCG	CTC	ACC	GGC	TCC	GAC	GAC	CCG	GTC	720
Pro	Ala	Asp	Gly	Phe	Thr	Val	Ala	Leu	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Pro	Val	
	225				230					235					240	
CTG	GCC	GCG	CTC	GCC	GCC	CGG	CCC	GGC	CGC	CCG	GAC	CGC	ACC	GCG	GCC	768
Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Arg	Pro	Asp	Arg	Thr	Ala	Ala	
				245					250					255		
ACC	ACC	CTG	CGC	GAA	CGC	CTG	GGC	CTG	GCC	CGC	CCC	GAG	AGC	CGC	CAC	816
Thr	Thr	Leu	Arg	Glu	Arg	Leu	Gly	Leu	Ala	Arg	Pro	Glu	Ser	Arg	His	
			260				265						270			
GCC	CTC	ACC	ACC	GCC	TG											834
Ala	Leu	Thr	Thr	Ala												
				275												

(2) SEQ ID NO: 4 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：1209 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

五、發明說明 (141)

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：1..1209

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 4:

ATG TCC CGT CGC CTG TTC ACC TCG GAG TCC GTG ACC GAG GGC CAC CCC	48
Met Ser Arg Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Gly His Pro	
1 5 10 15	
GAC AAG ATC GCC GAC CAG ATC AGT GAC ACC GTC CTC GAC GCC CTG CTG	96
Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Thr Val Leu Asp Ala Leu Leu	
20 25 30	
CGC GAG GAC CCC GCC TCA CGC GTC GCG GTC GAG ACC CTG ATC ACC ACC	144
Arg Glu Asp Pro Ala Ser Arg Val Ala Val Glu Thr Leu Ile Thr Thr	
35 40 45	
GGC CAG GTC CAC ATC GCC GGC GAG GTC ACC ACC AAG GCG TAC GCG CCC	192
Gly Gln Val His Ile Ala Gly Glu Val Thr Thr Lys Ala Tyr Ala Pro	
50 55 60	
ATC GCC CAA CTG GTC CGC GAC ACG ATC CTG GCC ATC GGC TAC GAC TCG	240
Ile Ala Gln Leu Val Arg Asp Thr Ile Leu Ala Ile Gly Tyr Asp Ser	
65 70 75 80	
TCC GCC AAG GGC TTC GAC GGC GCC TCC TGC GGC GTC TCC GTC TCC ATC	288
Ser Ala Lys Gly Phe Asp Gly Ala Ser Cys Gly Val Ser Val Ser Ile	
85 90 95	
GGC GCG CAG TCC CCG GAC ATC GCC CAG GGC GTC GAC AGC GCC TAC GAG	336
Gly Ala Gln Ser Pro Asp Ile Ala Gln Gly Val Asp Ser Ala Tyr Glu	
100 105 110	
ACC CGC GTC GAG GGC GAG GAC GAC GAG CTC GAC CAG CAG GGC GCC GGC	384
Thr Arg Val Glu Gly Glu Asp Asp Glu Leu Asp Gln Gln Gly Ala Gly	
115 120 125	
GAC CAG GGC CTG ATG TTC GGC TAC GCC ACC GAC GAG ACC CCC TCG CTG	432
Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asp Glu Thr Pro Ser Leu	
130 135 140	
ATG CCG CTG CCC ATC GAG CTC GCC CAC CGC CTC TCG CGC CGG CTC ACC	480
Met Pro Leu Pro Ile Glu Leu Ala His Arg Leu Ser Arg Arg Leu Thr	
145 150 155 160	

五、發明說明 (142)

GAG GTC CGC AAG GAC GGC ACC GTC CCC TAC CTG CGC CCC GAC GGC AAG	528
Glu Val Arg Lys Asp Gly Thr Val Pro Tyr Leu Arg Pro Asp Gly Lys	
165 170 175	
ACC CAG GTC ACC ATC GAG TAC CAG GGC AGC CGC CCG GTG CGC CTG GAC	576
Thr Gln Val Thr Ile Glu Tyr Gln Gly Ser Arg Pro Val Arg Leu Asp	
180 185 190	
ACC GTC GTC GTC TCC TCC CAG CAC GCC GCC GAC ATC GAC CTC GGC TCC	624
Thr Val Val Val Ser Ser Gln His Ala Ala Asp Ile Asp Leu Gly Ser	
195 200 205	
CTG CTC ACC CCC GAC ATC CGC GAG CAC GTC GTC GAG CAC GTC CTC GCC	672
Leu Leu Thr Pro Asp Ile Arg Glu His Val Val Glu His Val Leu Ala	
210 215 220	
GCA CTC GCC GAG GAC GGC ATC AAG CTC GAG ACG GAC AAC TAC CGC CTG	720
Ala Leu Ala Glu Asp Gly Ile Lys Leu Glu Thr Asp Asn Tyr Arg Leu	
225 230 235 240	
CTG GTC AAC CCG ACC GGC CGT TTC GAG ATC GGC GGC CCG ATG GGC GAC	768
Leu Val Asn Pro Thr Gly Arg Phe Glu Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp	
245 250 255	
GCC GGC CTG ACC GGC CGC AAG ATC ATC ATC GAC ACG TAC GGC GGC ATG	816
Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Ile Asp Thr Tyr Gly Gly Met	
260 265 270	
GCC CGC CAC GGC GGT GGC GCG TTC TCC GGC AAG GAC CCG TCC AAG GTC	864
Ala Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val	
275 280 285	
GAC CGT TCC GCC GCG TAC GCG ATG CGC TGG GTC GCC AAG AAC GTC GTC	912
Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn Val Val	
290 295 300	
GCC GCG GGC CTC GCC TCC CGC TGC GAG GTC CAG GTC GCC TAC GCC ATC	960
Ala Ala Gly Leu Ala Ser Arg Cys Glu Val Gln Val Ala Tyr Ala Ile	
305 310 315 320	
GGC AAG GCC GAG CCG GTC GGC CTG TTC GTC GAG ACG TTC GGC ACC GGC	1008
Gly Lys Ala Glu Pro Val Gly Leu Phe Val Glu Thr Phe Gly Thr Gly	
325 330 335	
ACC GTC GCC CAG GAG CGC ATC GAG AAG GCC ATC ACC GAG GTC TTC GAC	1056
Thr Val Ala Gln Glu Arg Ile Glu Lys Ala Ile Thr Glu Val Phe Asp	
340 345 350	
CTG CGC CCC GCG GCC ATC ATC CGC GAC CTC GAC CTG CTG CCG CCC ATC	1104
Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Asp Leu Asp Leu Arg Pro Ile	
355 360 365	
TAC GCC GCC ACC GCC GCC TAC GGC CAC TTC GGC CGC GAA CTG CCC GAC	1152
Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu Leu Pro Asp	
370 375 380	
TTC ACC TGG GAG CGG ACC GAC CGC GCC CAC CGG CTC AAG GCC GCG GCC	1200
Phe Thr Trp Glu Arg Thr Asp Arg Ala His Arg Leu Lys Ala Ala Ala	
385 390 395 400	
GGT CTC TG	1209
Gly Leu	

五、發明說明(143)

(2) SEQ ID NO: 5 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：1879 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：110...1858

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 5:

GATCGGCTCC TGACGGAGCG GCGGCGCGCG GCGCGGCGC ATCAGCGGCG TGTCAACGGC	60
GCTGCCGACA CTGGGCGCGA CGCGAGGACG AAGCCGGAAA GGACCAACG ATG CTG	115
	Met Leu
	1
GAC GGA TGC GTT CCC TGG' CCC GAG GAT GTG GCC GCG AAG TAC CGG GCG	163
Asp Gly Cys Val Pro Trp Pro Glu Asp Val Ala Ala Lys Tyr Arg Ala	
5 10 15	
GCC GGC TAC TGG CGG GGC GAG CCG CTG GGC ATG CTG CTG GGC CGC TGG	211
Ala Gly Tyr Trp Arg Gly Glu Pro Leu Gly Met Leu Leu Gly Arg Trp	
20 25 30	
GCG GAG CAG TAC GGC GAG CGG GAG GCG CTG GTC GGC GCG GAC GGG TGC	259
Ala Glu Gln Tyr Gly Glu Arg Glu Ala Leu Val Gly Ala Asp Gly Cys	
35 40 45 50	
TCC CGT GTC ACC TAC CGT GCC CTG GAC CGC TGG TGC GAC CGG CTG GCG	307
Ser Arg Val Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Arg Trp Cys Asp Arg Leu Ala	
55 60 65	

A6

B6

五、發明說明 (144)

GCG GGG TTC GCG GCG CGC GGG ATC GGC GCC GGC GAG CGG GTG CTG GTG Ala Gly Phe Ala Ala Arg Gly Ile Gly Ala Gly Glu Arg Val Leu Val 70 75 80	355
CAG CTG CCG AAC ACG CCC GAG TTC GTC GCG GTG TGC TTC GCG CTG TTC Gln Leu Pro Asn Thr Pro Glu Phe Val Ala Val Cys Phe Ala Leu Phe 85 90 95	403
CGT CTG GGC GCG CTG CCG GTG TTC GCG CTG CCC GCG CAC CGT GCC GCC Arg Leu Gly Ala Leu Pro Val Phe Ala Leu Pro Ala His Arg Ala Ala 100 105 110	451
GAG GTG GGG CAC CTG CTC GAG CTG TCC GGC GCC GTC GCC CAC ATC CTG Glu Val Gly His Leu Leu Glu Leu Ser Gly Ala Val Ala His Ile Leu 115 120 125 130	499
CCG GGC ACC GGC ACC GGC TAC GAC CAT GTC GCG GCG GCC GTG GAG GCC Pro Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Asp His Val Ala Ala Ala Val Glu Ala 135 140 145	547
CGT GCC CGC CGT GCC CGC CCG GTG CAG GTG TTC GTG GCG GGC GAG GCG Arg Ala Arg Arg Ala Arg Pro Val Gln Val Phe Val Ala Gly Glu Ala 150 155 160	595
CCC GCG GTG CTG CCC GAG GGG TTC ACC GCG CTG GCC GAC GTG GAC GGC Pro Ala Val Leu Pro Glu Gly Phe Thr Ala Leu Ala Asp Val Asp Gly 165 170 175	643
GAC CCG GTG GCG CCG GCG GAC GTG GAC GCC TTC CGA CGT GGC GTC TTC Asp Pro Val Ala Pro Ala Asp Val Asp Ala Phe Arg Arg Gly Val Phe 180 185 190	691
CTG CTG TCC GGG GGG ACG ACC GCG CTG CCG AAG CTG ATC CCG CGC ACC Leu Leu Ser Gly Gly Thr Thr Ala Leu Pro Lys Leu Ile Pro Arg Thr 195 200 205 210	739
CAC GAC GAC TAC GCC TAC CAG TGC CGG GTC ACG GCC GGT ATC TGC GGC His Asp Asp Tyr Ala Tyr Gln Cys Arg Val Thr Ala Gly Ile Cys Gly 215 220 225	787
CTG GAC GCG GAC AGT GTC TAT CTG GCG GTG CTG CCG GCC GAG TTC AAC Leu Asp Ala Asp Ser Val Tyr Leu Ala Val Leu Pro Ala Glu Phe Asn 230 235 240	835
TTC CCC TTC GGC TGC CCG GGC ATC CTG GGC ACC CTG CAC GCC GGC GGG Phe Pro Phe Gly Cys Pro Gly Ile Leu Gly Thr Leu His Ala Gly Gly 245 250 255	883
CGG GTG GTG TTC GCG CTG TCA CCG CAG CCC GAG GAG TGC TTC GCG CTG Arg Val Val Phe Ala Leu Ser Pro Gln Pro Glu Glu Cys Phe Ala Leu 260 265 270	931
ATC GAA CGC GAA CAC GTC ACC TTC ACC TCC GTC ATC CCC ACG ATC GTG Ile Glu Arg Glu His Val Thr Phe Thr Ser Val Ile Pro Thr Ile Val 275 280 285 290	979
CAC CTG TGG CTG GCG GCC GCC GCA CAA GGC CAC GGC CGC GAC CTG GGC His Leu Trp Leu Ala Ala Ala Ala Gln Gly His Gly Arg Asp Leu Gly 295 300 305	1027
AGC CTT CAG CTG CTG CAG GTC GGC AGC GCC AAA CTC CAC GAG GAG CTC Ser Leu Gln Leu Leu Gln Val Gly Ser Ala Lys Leu His Glu Glu Leu	1075

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (145)

310	315	320	
GCC GCC CGG ATC GGC CCC GAA CTG GGG GTG CGG CTG CAG CAG GTG TTC Ala Ala Arg Ile Gly Pro Glu Leu Gly Val Arg Leu Gln Gln Val Phe 325 330 335			1123
GGC ATG GCC GAG GGA CTG CTG ACC TTC ACC CGC GAC GAC GAC CCG GCG Gly Met Ala Glu Gly Leu Leu Thr Phe Thr Arg Asp Asp Asp Pro Ala 340 345 350			1171
GAC GTG GTG CTG CGC ACC CAG GGC CGG CCG GTG TCC GAG GCC GAC GAG Asp Val Val Leu Arg Thr Gln Gly Arg Pro Val Ser Glu Ala Asp Glu 355 360 365 370			1219
ATA CGC GTC GCC GAC CCC GAC GGC CGG CCC GTG CCC CGC GGT GAG ACC Ile Arg Val Ala Asp Pro Asp Gly Arg Pro Val Pro Arg Gly Glu Thr 375 380 385			1267
GGT GAA CTG CTC ACC CGC GGC CCC TAC ACG CTG CGC GGC TAC TAC CCG Gly Glu Leu Leu Thr Arg Gly Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Arg 390 395 400			1315
GCC CCC GAG CAC AAC GCC CGC GCG TTC ACC GAG GAC GGC TTC TAC CGC Ala Pro Glu His Asn Ala Arg Ala Phe Thr Glu Asp Gly Phe Tyr Arg 405 410 415			1363
AGC GGC GAT CTG GTG CGG CTC ACC GCC GAC GGG CAG TTG GTG GTG GAG Ser Gly Asp Leu Val Arg Leu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Val Val Glu 420 425 430			1411
GGC AGG ATC AAG GAC GTC GTC ATC CGC GGC GGC GAC AAG GTC TCC GCG Gly Arg Ile Lys Asp Val Val Ile Arg Gly Gly Asp Lys Val Ser Ala 435 440 445 450			1459
ACC GAG GTC GAG GGC CAC CTG GGC GCC CAC CCC GAC GTC CAG CAG GCC Thr Glu Val Glu Gly His Leu Gly Ala His Pro Asp Val Gln Gln Ala 455 460 465			1507
GCC GTC GTC GCC ATG CCC GAC CCG GTG TGG GGC GAG AAG GTC TGC GCC Ala Val Val Ala Met Pro Asp Pro Val Trp Gly Glu Lys Val Cys Ala 470 475 480			1555
TAC ATC GTG CCC GCA CCC GGC CGT CCC GCA CCG CCG ATG GCG GCG CTG Tyr Ile Val Pro Ala Pro Gly Arg Pro Ala Pro Pro Met Ala Ala Leu 485 490 495			1603
CGC CGG CTG CTG CGC GCG CGG GGA CTG GCC GAC TAC AAG CTT CCC GAC Arg Arg Leu Leu Arg Ala Arg Gly Leu Ala Asp Tyr Lys Leu Pro Asp 500 505 510			1651
CGG GTG GAG GTC GTC GAC GCG TTC CCG CTG ACC GGC CTC AAC AAG GTC Arg Val Glu Val Val Asp Ala Phe Pro Leu Thr Gly Leu Asn Lys Val 515 520 525 530			1699
GAC AAG AAG GCC CTG GCG GCC GAC ATC GCC GCC AAG ACC GCC CCC ACC Asp Lys Lys Ala Leu Ala Ala Asp Ile Ala Ala Lys Thr Ala Pro Thr 535 540 545			1747
CGC CCC ACC ACC GCC GGC CAC GGC CCG ACC ACG GAC GGC GAT ACG GCC Arg Pro Thr Thr Ala Gly His Gly Pro Thr Thr Asp Gly Asp Thr Ala 550 555 560			1795

五、發明說明(146)

GGT GGG GGT GGG TCC GCG GGC GGG GTG ACG GCC GCC GGT GGC GGG CGG 1843
 Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Gly Gly Gly Arg
 565 570 575

GAG GAG GCG GCG TGAGCGGGCC CGGGCCCGAG GGCG 1879
 Glu Glu Ala Ala
 580

(2) SEQ ID NO: 6 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：1833 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：103..1689

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 6:

GGATCCCCTC GCCCAGGGCC CTGGCGGGCC CGCCGGGGCCG TGGGGGAGGT GCGGGGGCCG 60
 CGGGCCCCGG CACCGCACGA ACAGAACAAC CGCTCCGGGC CC ATG CGG ACT TCA 114
 Met Arg Thr Ser
 1
 CGG TCC CAC GAC CAG CGG GCC CCT ACC CCC TGG AGA CAT CCC TTG CAC 162
 Arg Ser His Asp Gln Arg Ala Pro Thr Pro Trp Arg His Pro Leu His
 5 10 15 20
 AGC ACC CGG CCC GCG CCC GCG GCC GAC CGT GAC CCC AGG CGC TGG GTC 210
 Ser Thr Arg Pro Ala Pro Ala Ala Asp Arg Asp Pro Arg Arg Trp Val
 25 30 35
 ATC CTC GGC GTG ATC TGC CTG GCC CAA CTC GTC GTC CTG CTC GAC AAC 258
 Ile Leu Gly Val Ile Cys Leu Ala Gln Leu Val Val Leu Leu Asp Asn
 40 45 50

-148-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (147)

ACC	GTC	CTC	AAC	GTC	GCC	ATC	CCG	GTG	CTC	ACC	ACC	GAC	CTG	GGC	GCC	306
Thr	Val	Leu	Asn	Val	Ala	Ile	Pro	Val	Leu	Thr	Thr	Asp	Leu	Gly	Ala	
		55					60					65				
AGC	ACC	GCC	GAC	ATC	CAG	TGG	ATG	ATC	AAC	GCC	TAC	GCG	CTC	GTG	CAG	354
Ser	Thr	Ala	Asp	Ile	Gln	Trp	Met	Ile	Asn	Ala	Tyr	Ala	Leu	Val	Gln	
	70					75					80					
TCC	GGG	CTG	CTG	CTC	ACC	GCG	GGC	AGC	CTC	GCG	GAC	CGC	TAC	GGC	CGC	402
Ser	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Ser	Leu	Ala	Asp	Arg	Tyr	Gly	Arg	
	85				90					95					100	
AAA	CGG	CTG	CTG	ATG	CTC	GGA	CTG	GTG	CTC	TTC	GGC	GCC	GGG	TCC	GCC	450
Lys	Arg	Leu	Leu	Met	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Phe	Gly	Ala	Gly	Ser	Ala	
				105					110					115		
TGG	GCG	GCC	TTC	GCC	CAG	GAC	TCC	GCC	CAA	CTC	ATC	GCC	GCC	CGG	GCC	498
Trp	Ala	Ala	Phe	Ala	Gln	Asp	Ser	Ala	Gln	Leu	Ile	Ala	Ala	Arg	Ala	
			120					125					130			
GGC	ATG	GGC	GTG	GGC	GGG	GCG	CTG	CTG	GCG	ACC	ACC	ACC	CTC	GCC	GTC	546
Gly	Met	Gly	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Thr	Thr	Leu	Ala	Val	
		135					140					145				
ATC	ATG	CAG	GTC	TTC	GAC	GAC	GAC	GAA	CGC	CCC	CGG	GCG	ATC	GGC	CTG	594
Ile	Met	Gln	Val	Phe	Asp	Asp	Asp	Glu	Arg	Pro	Arg	Ala	Ile	Gly	Leu	
	150					155					160					
TGG	GGA	GCG	GCC	AGC	TCA	CTG	GGC	TTC	GCG	GCC	GGC	CCG	CTG	CTC	GGC	642
Trp	Gly	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Gly	
	165				170					175					180	
GGC	GCC	CTC	CTC	GAC	CAC	TTC	TGG	TGG	GGC	TCC	ATC	TTC	CTG	ATC	AAC	690
Gly	Ala	Leu	Leu	Asp	His	Phe	Trp	Trp	Gly	Ser	Ile	Phe	Leu	Ile	Asn	
				185					190					195		
CTG	CCC	GTC	GCG	CTG	CTG	GGC	CTG	CTG	GCC	GTC	GCC	CGC	CTG	GTG	CCC	738
Leu	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Val	Pro	
			200				205						210			
GAG	ACG	AAG	AAC	CCC	GAA	GGC	CGG	CGC	CCC	GAC	CTG	CTC	GGC	GCC	GTG	786
Glu	Thr	Lys	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg	Arg	Pro	Asp	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	
		215					220					225				
CTC	TCC	ACC	CTC	GGC	ATG	GTC	GGC	GTC	GTC	TAC	GCC	ATC	ATC	TCC	GGC	834
Leu	Ser	Thr	Leu	Gly	Met	Val	Gly	Val	Val	Tyr	Ala	Ile	Ile	Ser	Gly	
	230				235						240					
CCC	GAA	CAC	GGC	TGG	ACG	GCC	CCG	CAG	GTC	CTC	CTG	CCG	GCC	GCC	GTC	882
Pro	Glu	His	Gly	Trp	Thr	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	
	245				250				255						260	
GCG	GCC	GCC	GCG	CTC	ACC	GCG	TTC	GTC	CGC	TGG	GAA	CTG	CAC	ACC	CCC	930
Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Arg	Trp	Glu	Leu	His	Thr	Pro	
			265					270					275			
CAC	CCC	ATG	CTC	GAC	ATG	GGC	TTC	TTC	ACC	GAC	CGG	CGC	TTC	AAC	GGG	978
His	Pro	Met	Leu	Asp	Met	Gly	Phe	Phe	Thr	Asp	Arg	Arg	Phe	Asn	Gly	
			280				285						290			
CCG	TCG	CCG	GCG	GAG	TGC	TCG	TCG	TTC	GGC	ATG	GCC	GGC	TCG	CTC	TTC	1026
Pro	Ser	Pro	Ala	Glu	Cys	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ala	Gly	Ser	Leu	Phe	
		295				300						305				

-149-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (148)

CTG CTC ACC CAG CAC CTC CAA CTC GTC CTC GGC TAC GAC GCC CTG CAG Leu Leu Thr Gln His Leu Gln Leu Val Leu Gly Tyr Asp Ala Leu Gln 310 315 320	1074
GCC GGC CTG CGC ACC GCG CCA CTG GCT TTG ACG ATC GTC GCC CTC AAC Ala Gly Leu Arg Thr Ala Pro Leu Ala Leu Thr Ile Val Ala Leu Asn 325 330 335 340	1122
CTG GCC GGC CTC GGC GCG AAA CTC CTC GCC GCG CTC GGC ACC GCC CGC Leu Ala Gly Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ala Ala Leu Gly Thr Ala Arg 345 350 355	1170
AGC ATC GCC CTG GGC ATG ACA CTG CTG GCC GCC GGC CTC AGC GCG GTG Ser Ile Ala Leu Gly Met Thr Leu Leu Ala Ala Gly Leu Ser Ala Val 360 365 370	1218
GCC GTC GGC GGA TCG GGC CCC GAC GCC GGC TAC GGC GGC ATG CTC GCC Ala Val Gly Gly Ser Gly Pro Asp Ala Gly Tyr Gly Gly Met Leu Ala 375 380 385	1266
GGC CTG CTC CTC ATG GGC GCG GGC ATC GCA CTG GCC ATG CCC GCC ATG Gly Leu Leu Leu Met Gly Ala Gly Ile Ala Leu Ala Met Pro Ala Met 390 395 400	1314
GCC ACC GCC GTG ATG TCC TCC ATC CCG CCC GCC AAG GCC GGG GCC GGA Ala Thr Ala Val Met Ser Ser Ile Pro Pro Ala Lys Ala Gly Ala Gly 405 410 415 420	1362
GCG GGC GTG CAG GGC ACC CTG ACC GAG TTC GGC GGC GGA CTG GGA GTG Ala Gly Val Gln Gly Thr Leu Thr Glu Phe Gly Gly Gly Leu Gly Val 425 430 435	1410
GCG ATC CTC GGC GCC GTC CTC GGC TCC CGC TTC GCC TCC CAA CTG CCC Ala Ile Leu Gly Ala Val Leu Gly Ser Arg Phe Ala Ser Gln Leu Pro 440 445 450	1458
GCC GCC ATC ACC GGC ACC GGC TCC CTC GAC GAG GCA CTG CGC GAC GCC Ala Ala Ile Thr Gly Thr Gly Ser Leu Asp Glu Ala Leu Arg Asp Ala 455 460 465	1506
ACA CCC CAA CAG GCC GGC CAG GTC CAC GAC GCG TTC GCC GAC GCG GTG Thr Pro Gln Gln Ala Gly Gln Val His Asp Ala Phe Ala Asp Ala Val 470 475 480	1554
AAC ACC AGC CAA CTC ATC GGC GCC GCC GCC GTG TTC ACC GGC GGC CTG Asn Thr Ser Gln Leu Ile Gly Ala Ala Val Phe Thr Gly Gly Leu 485 490 495 500	1602
CTC GCC GCG CTG CTG CTG CAC CGC GCC GAC CGC AAG GCC GCC CCC CAG Leu Ala Ala Leu Leu Leu His Arg Ala Asp Arg Lys Ala Ala Pro Gln 505 510 515	1650
CCC ACC GCC CCC ACC CCC GAA CCC ACC ACC ACC GCC TGACCCCCGG Pro Thr Ala Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Thr Ala 520 525	1696
CCCGCCGGGC ACCACACAAC CCACGGCCCC ACCCCTGCGG CTCCCCACCG GGACCCACAG	1756
GGGCGGGGCC GTGCCGCTGC CCTGCCACAC CACACAGCCC CCACACACAC AGCCCCGCA	1816
CGGCCGACAG CGCCGGG	1833

五、發明說明(149)

(2) SEQ ID NO: 7 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：695 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：212..695

(D) 其他資料：/ 產物 = "基因 SnaC"

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 7：

CTCGAGCCGC GCCCCAGGT GCTGGTGTCTG CTCGCCGTGG AGAAGGGCGC CGACGGCACC	60
GCGCCGCCGG ACCGGCTGCT GATCCACGAC GGCTTCCCCT GGGGCCGCGC CGCCCCGCGC	120
GAAGCGGAGC TGCCCACCGG GCACCGCGCC CTGCCGGCCC TGGCCGGCGC CGCCCGCTGA	180
GGCGCGGCAA CCACCAACAG AAGGAGCCCC C GTG ACA GGA GCC GAC GAC CCG	232
Val Thr Gly Ala Asp Asp Pro	
1 5	
GCA AGG CCC GCG GTC GGC CCG CAG AGT TTC CGA GAC GCG ATG GCG CAG	280
Ala Arg Pro Ala Val Gly Pro Gln Ser Phe Arg Asp Ala Met Ala Gln	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (150)

10	15	20	
CTG GCG TCG CCC GTC ACC GTC GTA ACC GTC CTC GAC GCG GCC GGA CGC			328
Leu Ala Ser Pro Val Thr Val Val Thr Val Leu Asp Ala Ala Gly Arg			
25	30	35	
CGC CAC GGC TTC ACG GCC GGC TCG GTG GTC TCT GTG TCG CTG GAC CCG			376
Arg His Gly Phe Thr Ala Gly Ser Val Val Ser Val Ser Leu Asp Pro			
40	45	50	55
CCG CTG GTG ATG GTC GGC ATC GCG CTC ACC TCC AGC TGC CAC ACG GCG			424
Pro Leu Val Met Val Gly Ile Ala Leu Thr Ser Ser Cys His Thr Ala			
60	65	70	
ATG GCC GCC GCC GCC GAG TTC TGC GTC AGC ATC CTC GGC GAG GAC CAG			472
Met Ala Ala Ala Ala Glu Phe Cys Val Ser Ile Leu Gly Glu Asp Gln			
75	80	85	
CGC GCC GTC GCG AAG CGG TGC GCG ACG CAC GGC GCC GAC CGG TTC GCG			520
Arg Ala Val Ala Lys Arg Cys Ala Thr His Gly Ala Asp Arg Phe Ala			
90	95	100	
GGC GGC GAG TTC GCC GCC TGG GAC GGT ACG GGG GTG CCC TAC CTG CCG			568
Gly Gly Glu Phe Ala Ala Trp Asp Gly Thr Gly Val Pro Tyr Leu Pro			
105	110	115	
GAC GCC AAG GTC GTC CTG CGC TGC CGC ACC ACG GAC GTG GTG CGC GCC			616
Asp Ala Lys Val Val Leu Arg Cys Arg Thr Thr Asp Val Val Arg Ala			
120	125	130	135
GGC GAC CAC GAC CTG GTG CTC GGC ACG CCC GTG GAG ATC CGC ACG GGC			664
Gly Asp His Asp Leu Val Leu Gly Thr Pro Val Glu Ile Arg Thr Gly			
140	145	150	
GAC CCG GCG AAG CCA CCC CTG CTG TGG TAC C			695
Asp Pro Ala Lys Pro Pro Leu Leu Trp Tyr			
155	160		

(2) SEQ ID NO: 8 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：640 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

五、發明說明 (151)

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：1..640

(D) 其他資料：/ 產物 = "基因 Snad"

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 8:

GCG ACC GCC CGG CTC ATC GGC CCG CTG CCG CGC CGG CTG GGC CTC CAG	48
Ala Thr Ala Arg Leu Ile Gly Pro Leu Pro Arg Arg Leu Gly Leu Gln	
1 5 10 15	
GTG CAC CAG GTG ATG ACG GGC GCG TTC GCG CAG GCC CTC GCC CGC TGG	96
Val His Gln Val Met Thr Gly Ala Phe Ala Gln Ala Leu Ala Arg Trp	
20 25 30	
CGG GGC AGC CGC GCC GTC ACC TTC GAC GTG GAG ACC CAC GGA CGG CAC	144
Arg Gly Ser Arg Ala Val Thr Phe Asp Val Glu Thr His Gly Arg His	
35 40 45	
GGC CGC GAC GAA CTG TTC CGT ACC GTC GGC TGG TTC ACC TCC ATC CAC	192
Gly Arg Asp Glu Leu Phe Arg Thr Val Gly Trp Phe Thr Ser Ile His	
50 55 60	
CCC GTC GTC CTG GGC GCG GAC CGC TCC GTG CAC CCC GAG CAG TAC CTC	240
Pro Val Val Leu Gly Ala Asp Arg Ser Val His Pro Glu Gln Tyr Leu	
65 70 75 80	
GCC CAG ATC GGC GCG GCG CTG ACC GCC GTA CCG GAC GGC GGC GTC GGC	288
Ala Gln Ile Gly Ala Ala Leu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Gly Val Gly	
85 90 95	
TTC GGC GCC TGC CGC GAG TTC TCC CCG GAC GCC GGG CTG CGC ACT CTG	336
Phe Gly Ala Cys Arg Glu Phe Ser Pro Asp Ala Gly Leu Arg Thr Leu	
100 105 110	
CTG CGT GAC CTG CCG CCC GCC CTG GTG TGC TTC AAC TAC TAC GGT CAG	384
Leu Arg Asp Leu Pro Pro Ala Leu Val Cys Phe Asn Tyr Tyr Gly Gln	
115 120 125	
GCC GAC CAG TTG AGC CCG AAC GGC GGT TTC CGT ATG TCG GGC CGT CCC	432
Ala Asp Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Phe Arg Met Ser Gly Arg Pro	
130 135 140	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (152)

ATC CCG CGC GAG CAC TCC GCC CGC TGC GAG CGC GTC TAC GGC ATC GAG Ile Pro Arg Glu His Ser Ala Arg Cys Glu Arg Val Tyr Gly Ile Glu 145 150 155 160	480
GTG TAC GGC ATC GTC CAC GGC GGC CGC CTG CGC ATG GGC CTG ACC TGG Val Tyr Gly Ile Val His Gly Gly Arg Leu Arg Met Gly Leu Thr Trp 165 170 175	528
GTG CCG AGC CCG GCG GAC GGT GTG GAC GAG GCC GGC GTC GAC GCG CTC Val Pro Ser Pro Ala Asp Gly Val Asp Glu Ala Gly Val Asp Ala Leu 180 185 190	576
GTG GAG CAG ATG AGC TGG GTG CTG GCC ACG CTC GCG GGC GCC GAC CCG Val Glu Gln Met Ser Trp Val Leu Ala Thr Leu Ala Gly Ala Asp Pro 195 200 205	624
CAC GCC GTG ACC CCG G His Ala Val Thr Pro 210	640

(2) SEQ ID NO: 9 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：645 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：61..645

(D) 其他資料：/ 產物 = "基因 papA"

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 9:

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(153)

GGCGTCAAGA ACCTGCCGCT GACCGTACGG CGCGGCTGAC ACAGACAAGG GGGCCACCTG																60
GTG	CGC	ACC	GTG	CGA	ACC	CTG	CTG	ATC	GAC	AAC	TAC	GAC	TCG	TTC	ACC	108
Val	Arg	Thr	Val	Arg	Thr	Leu	Leu	Ile	Asp	Asn	Tyr	Asp	Ser	Phe	Thr	
1				5					10					15		
TAC	AAC	CTC	TTC	CAG	ATG	CTG	GCC	GAG	GTG	AAC	GGC	GCC	GCT	CCG	CTC	156
Tyr	Asn	Leu	Phe	Gln	Met	Leu	Ala	Glu	Val	Asn	Gly	Ala	Ala	Pro	Leu	
			20					25					30			
GTC	GTC	CGC	AAC	GAC	GAC	ACC	CGC	ACC	TGG	CAG	GCC	CTG	GCG	CCG	GGC	204
Val	Val	Arg	Asn	Asp	Asp	Thr	Arg	Thr	Trp	Gln	Ala	Leu	Ala	Pro	Gly	
		35					40					45				
GAC	TTC	GAC	AAC	GTC	GTC	GTC	TCA	CCC	GGC	CCC	GGC	CAC	CCC	GCC	ACC	252
Asp	Phe	Asp	Asn	Val	Val	Val	Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	His	Pro	Ala	Thr	
	50					55					60					
GAC	ACC	GAC	CTG	GGC	CTC	AGC	CGC	CGG	GTG	ATC	ACC	GAA	TGG	GAC	CTG	300
Asp	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Ser	Arg	Arg	Val	Ile	Thr	Glu	Trp	Asp	Leu	
65					70					75					80	
CCG	CTG	CTC	GGG	GTG	TGC	CTG	GGC	CAC	CAG	GCC	CTG	TGC	CTG	CTC	GCC	348
Pro	Leu	Leu	Gly	Val	Cys	Leu	Gly	His	Gln	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Ala	
				85					90					95		
GGC	GCC	GCC	GTC	GTC	CAC	GCA	CCC	GAA	CCC	TTT	CAC	GGC	CGC	ACC	AGC	396
Gly	Ala	Ala	Val	Val	His	Ala	Pro	Glu	Pro	Phe	His	Gly	Arg	Thr	Ser	
			100					105					110			
GAC	ATC	CGC	CAC	GAC	GGG	CAG	GGC	CTG	TTC	GCG	AAC	ATC	CCC	TCC	CCG	444
Asp	Ile	Arg	His	Asp	Gly	Gln	Gly	Leu	Phe	Ala	Asn	Ile	Pro	Ser	Pro	
		115					120					125				
CTG	ACC	GTG	GTC	CGC	TAC	CAC	TCG	CTG	ACC	GTC	CGG	CAA	CTG	CCC	GCC	492
Leu	Thr	Val	Val	Arg	Tyr	His	Ser	Leu	Thr	Val	Arg	Gln	Leu	Pro	Ala	
	130					135					140					
GAC	CTG	CGC	GCC	ACC	GCC	CAC	ACC	GCC	GAC	GGG	CAG	CTG	ATG	GCC	GTC	540
Asp	Leu	Arg	Ala	Thr	Ala	His	Thr	Ala	Asp	Gly	Gln	Leu	Met	Ala	Val	
145					150					155					160	
GCC	CAC	CGC	CAC	CTG	CCC	CGC	TTC	GGC	GTG	CAG	TTC	CAC	CCC	GAA	TCG	588
Ala	His	Arg	His	Leu	Pro	Arg	Phe	Gly	Val	Gln	Phe	His	Pro	Glu	Ser	
				165					170					175		
ATC	AGC	AGC	GAA	CAC	GGC	CAC	CGG	ATG	CTC	GCC	AAC	TTC	CGC	GAC	CTG	636
Ile	Ser	Ser	Glu	His	Gly	His	Arg	Met	Leu	Ala	Asn	Phe	Arg	Asp	Leu	
			180					185					190			
TCC	CTG	CGC														645
Ser	Leu	Arg														
		195														

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(154)

(2) SEQ ID NO: 10 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：1052 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：84..962

(D) 其他資料：/ 產物 = "基因 PapM"

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 10：

CTCGAGGACG AGTGGATCGC CTCCGGCGGC GCCCCGTCC CCACGCCCCGT GCACGCGTCC	60
GCGTCCGCGC GGGGGGCCGT GTC GTG ACC GCC GCC GCA CCC ACC CTC GCC	110
Val Thr Ala Ala Pro Thr Leu Ala	
1 5	
CAG GCG CTG GAC GAG GCC ACC GGG CAG CTG ACC GGC GCC GGG ATC ACC	158
Gln Ala Leu Asp Glu Ala Thr Gly Gln Leu Thr Gly Ala Gly Ile Thr	
10 15 20 25	
GCC GAC GCC GCC CGG GCC GAC ACC CGG CTG CTG GCC GCC CAC GCC TGC	206
Ala Asp Ala Ala Arg Ala Asp Thr Arg Leu Leu Ala Ala His Ala Cys	
30 35 40	
CAG GTC GCC CCG GGG GAC CTC GAC ACC TGC CTG GCC GGC CCG GTG CCG	254
Gln Val Ala Pro Gly Asp Leu Asp Thr Cys Leu Ala Gly Pro Val Pro	
45 50 55	
CCC CGG TTC TGG CAC TAC GTC CGG CGC CGT CTG ACC CGC GAA CCC GCC	302
Pro Arg Phe Trp His Tyr Val Arg Arg Arg Leu Thr Arg Glu Pro Ala	
60 65 70	

五、發明說明 (155)

GAA CGC ATC GTC GGC CAC GCC TAC TTC ATG GGC CAC CGC TTC GAC CTG Glu Arg Ile Val Gly His Ala Tyr Phe Met Gly His Arg Phe Asp Leu 75 80 85	350
GCC CCC GGC GTC TTC GTC CCC AAA CCC GAG ACC GAG GAG ATC ACC CGG Ala Pro Gly Val Phe Val Pro Lys Pro Glu Thr Glu Glu Ile Thr Arg 90 95 100 105	398
GAC GCC ATC GCC CGC CTG GAG GCC CTC GTC CGC CGC GGC ACC ACC GCA Asp Ala Ile Ala Arg Leu Glu Ala Leu Val Arg Arg Gly Thr Thr Ala 110 115 120	446
CCC CTG GTC GTC GAC CTG TGC GCC GGA CCG GGC ACC ATG GCC GTC ACC Pro Leu Val Val Asp Leu Cys Ala Gly Pro Gly Thr Met Ala Val Thr 125 130 135	494
CTG GCC CGC CAC GTA CCG GCC GCC CGC GTC CTG GGC ATC GAA CTC TCC Leu Ala Arg His Val Pro Ala Ala Arg Val Leu Gly Ile Glu Leu Ser 140 145 150	542
CAG GCC GCC GCC CGC GCC GCC CGG CGC AAC GCC CGC GGC ACC GGC GCC Gln Ala Ala Ala Arg Ala Ala Arg Arg Asn Ala Arg Gly Thr Gly Ala 155 160 165	590
CGC ATC GTG CAG GGC GAC GCC CGC GAC GCC TTC CCC GAA CTG AGC GGC Arg Ile Val Gln Gly Asp Ala Arg Asp Ala Phe Pro Glu Leu Ser Gly 170 175 180 185	638
ACC GTC GAC CTC GTC GTC ACC AAC CCG CCC TAC ATC CCC ATC GGA CTG Thr Val Asp Leu Val Val Thr Asn Pro Pro Tyr Ile Pro Ile Gly Leu 190 195 200	686
CGC ACC TCC GCA CCC GAA GTG CTC GAG CAC GAC CCG CCG CTG GCC CTG Arg Thr Ser Ala Pro Glu Val Leu Glu His Asp Pro Pro Leu Ala Leu 205 210 215	734
TGG GCC GGG GAG GAG GGC CTC GGC ATG ATC CGC GCC ATG GAA CGC ACC Trp Ala Gly Glu Glu Gly Leu Gly Met Ile Arg Ala Met Glu Arg Thr 220 225 230	782
GCG GCC CGG CTG CTG GCC CCC GGC GGC GTC CTG CTC CTC GAA CAC GGC Ala Ala Arg Leu Leu Ala Pro Gly Gly Val Leu Leu Leu Glu His Gly 235 240 245	830
TCC TAC CAA CTC GCC TCC GTG CCC GCC CTG TTC CGC GCA ACC GGC CGC Ser Tyr Gln Leu Ala Ser Val Pro Ala Leu Phe Arg Ala Thr Gly Arg 250 255 260 265	878
TGG AGC CAC GCC TCG TCC CGT CCC ACC TGC AAC GAC GGC TGC CTG ACC Trp Ser His Ala Ser Ser Arg Pro Thr Cys Asn Asp Gly Cys Leu Thr 270 275 280	926
GCC GTA CGC AAC CAC ACC TGC GCA CCG CCC GCC TGACACGGCG TCACGGCAGC Ala Val Arg Asn His Thr Cys Ala Pro Pro Ala 285 290	979
GCCGGCCTGT CGGCAACGAC CCTACGCCAT TGACAAACCG ACCGTGCCGT TTTTAAATG	1039
TCGGGGTGGC GGA	1052

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (156)

(2) SEQ ID NO: 11 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：227 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：3..227

(D) 其他資料：/ 產物 = "基因 SnbC 的一部份"

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 11：

AG ATC TTC GAG CAC AAG ACC GTC GCC CAG CTC GCA CCC GTC GCC GAG	47
Ile Phe Glu His Lys Thr Val Ala Gln Leu Ala Pro Val Ala Glu	
1 5 10 15	
ACG CTC GCC GAC ACC ACC CGC GAG GAA CCC GCC GCC GTC GCC GCG ACC	95
Thr Leu Ala Asp Thr Thr Arg Glu Glu Pro Ala Ala Val Ala Ala Thr	
20 25 30	
GGC GAC GTA CCG CTC ACC CCG ATC ATG CAC TGG CTG CGC GAA CGC GGC	143
Gly Asp Val Pro Leu Thr Pro Ile Met His Trp Leu Arg Glu Arg Gly	
35 40 45	
GGC CCC GTC GAC GCG TTC AGC CAG ACG ATG GCC GTC ACC GTC CCC GCC	191
Gly Pro Val Asp Ala Phe Ser Gln Thr Met Ala Val Thr Val Pro Ala	
50 55 60	
GGC CTG GAC CGG GAA CGG CTC GTG GCC GCC CTG CAG	227
Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Val Ala Ala Leu Gln	
65 70 75	

五、發明說明 (157)

(2) SEQ ID NO: 12 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：247 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：1..247

(D) 其他資料：/ 產物 = "基因 SnbC 的一部份"

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 12：

CTC	GAG	TAC	GAC	ACC	GCC	CTG	TAC	GAG	CGG	GCC	ACC	GCC	GAA	GCC	CTC	48
Leu	Glu	Tyr	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Glu	Arg	Ala	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	
1				5				10					15			
ACC	GGC	CGG	CTG	CTG	CGG	CTC	CTC	GAC	GCC	GTC	GTC	ACC	GAC	CCG	CAG	96
Thr	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Asp	Ala	Val	Val	Thr	Asp	Pro	Gln	
			20					25					30			
GCG	CCG	GTC	GGC	TCC	CAC	GAC	CTC	CTC	GAA	GAG	GCC	GAA	CAC	GCC	CGC	144
Ala	Pro	Val	Gly	Ser	His	Asp	Leu	Leu	Glu	Glu	Ala	Glu	His	Ala	Arg	
			35				40					45				
CTG	GCA	GCC	TTC	AAC	GAC	ACC	GCC	CGG	CCC	GTG	CCG	CGA	GCC	GGC	CTC	192
Leu	Ala	Ala	Phe	Asn	Asp	Thr	Ala	Arg	Pro	Val	Pro	Arg	Ala	Gly	Leu	
			50				55				60					
GCC	GAA	CTC	TTC	ACC	GCC	CAG	GCC	CGC	CGC	ACC	GCC	GAT	GCG	GTC	GCC	240
Ala	Glu	Leu	Phe	Thr	Ala	Gln	Ala	Arg	Arg	Thr	Ala	Asp	Ala	Val	Ala	
			65			70				75					80	
GTC	GTC	G														247
Val	Val															

五、發明說明 (158)

(2) SEQ ID NO: 13 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：192 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：3..192

(D) 其他資料：/ 產物 = "基因 SnbD 的一部份"

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 13：

GC ATG CCC CCC GTC ACC CCC TAC CGC GCC TAC CTG GCC CAC CTC GCC	47
Met Pro Pro Val Thr Pro Tyr Arg Ala Tyr Leu Ala His Leu Ala	
1 5 10 15	
GGC CGT GAC GAC GAC GCC GCC CGC GCC GCG TGG CGG ACC GCC CTC GCG	95
Gly Arg Asp Asp Asp Ala Ala Arg Ala Ala Trp Arg Thr Ala Leu Ala	
20 25 30	
GAC CTG GAG GAG CCG AGC CTC GTC GCG GGC GCC GGA GCA GGC CGC GGC	143
Asp Leu Glu Glu Pro Ser Leu Val Ala Gly Ala Gly Ala Gly Arg Gly	
35 40 45	
GCC GCC GAC GGC TCC GCC CTG CCC GGC CAG ATC CCC GGT TAC CGA GCT C	192
Ala Ala Asp Gly Ser Ala Leu Pro Gly Gln Ile Pro Gly Tyr Arg Ala	
50 55 60	

五、發明說明 (159)

(2) SEQ ID NO: 14 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：474 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：1..474

(D) 其他資料：/ 產物 = "基因 SnbD 的一部份"

(xi) 序列說明：SEQ ID NO: 14：

CTG	CAG	GTC	GAG	GGC	CGG	CCC	GCG	CAC	CTG	GAA	CTG	CCC	TGC	GAC	CAC	48
Leu	Gln	Val	Glu	Gly	Arg	Pro	Ala	His	Leu	Glu	Leu	Pro	Cys	Asp	His	
1				5					10					15		
CCC	CGG	CCC	GCC	GTC	GCC	ACC	CAC	CGC	GGC	GCC	ACC	GTG	CCC	TTC	CAC	96
Pro	Arg	Pro	Ala	Val	Ala	Thr	His	Arg	Gly	Ala	Thr	Val	Pro	Phe	His	
			20					25					30			
ATC	GAC	GCC	GGC	CTC	CAC	GAG	AAG	CTG	ACC	GCG	CTC	TCC	AAG	GCC	TGC	144
Ile	Asp	Ala	Gly	Leu	His	Glu	Lys	Leu	Thr	Ala	Leu	Ser	Lys	Ala	Cys	
			35				40					45				
GAC	AGC	AGC	CTG	TTC	ATG	GTG	CTC	CAG	GCC	GCG	GTC	GCC	GCC	CTG	CTC	192
Asp	Ser	Ser	Leu	Phe	Met	Val	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	
			50				55				60					
ACC	CGG	CAC	GGC	GCC	GGC	ACC	GAC	ATC	CCC	GTC	GGC	AGC	CCC	GTC	GCC	240
Thr	Arg	His	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Ile	Pro	Val	Gly	Ser	Pro	Val	Ala	
			65			70				75					80	

五、發明說明 (160)

GGC CGC ACC GAC GAC GCC CTC GAC GAC CTG GTG GGC TTC TTC GTC AAC	288
Gly Arg Thr Asp Asp Ala Leu Asp Asp Leu Val Gly Phe Phe Val Asn	
85 90 95	
ACC CTC GTC CTG CGC ACC GAC ACC TCC GGC GAC CCC ACC TTC CGC GAA	336
Thr Leu Val Leu Arg Thr Asp Thr Ser Gly Asp Pro Thr Phe Arg Glu	
100 105 110	
CTC GTC GCA CGC GTG CGG CAG TTC GAC CTC GCC GCC TAC ACG CAC CAG	384
Leu Val Ala Arg Val Arg Gln Phe Asp Leu Ala Ala Tyr Thr His Gln	
115 120 125	
GAC ATG CCG TTC GAA AAG CTC GTC GAA GAG GTC AAC CCC GAG CGC TCC	432
Asp Met Pro Phe Glu Lys Leu Val Glu Glu Val Asn Pro Glu Arg Ser	
130 135 140	
CTG GCC CGC AAC CCG CTC TTC CAG GTC GTC CTG GCG CTG CAG	474
Leu Ala Arg Asn Pro Leu Phe Gln Val Val Leu Ala Leu Gln	
145 150 155	

(2) SEQ ID NO: 15 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：485 鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓模形態：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(iii) 假說：無

(iii) 反意：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：始旋鏈黴菌

(ix) 特點：

(A) 名稱 / 關鍵詞：CDS

(B) 位置：3..485

(D) 其他資料：/ 產物 = "基因 SnbE 的一部份"

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (161)

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO: 15 :

GC ATG CCG CGC TCC CTC GAC CTG TAC GTC GCA CTG CTC GCC GTC CTC	47
Met Pro Arg Ser Leu Asp Leu Tyr Val Ala Leu Leu Ala Val Leu	
1 5 10 15	
AAG ACC GGC GCC GCC TAC CTG CCC GTC GAC ATC TCC TAC CCG GCC GAA	95
Lys Thr Gly Ala Ala Tyr Leu Pro Val Asp Ile Ser Tyr Pro Ala Glu	
20 25 30	
CGC ATC GCG TTC ATG ATC GAG GAC GCC CGC CCG GTG ACC GTC CTC GAC	143
Arg Ile Ala Phe Met Ile Glu Asp Ala Arg Pro Val Thr Val Leu Asp	
35 40 45	
CGC CTG CCC GAC GAC CTG GGC GCC TAC CGG GAC ACC GAC CTC ACC GAC	191
Arg Leu Pro Asp Asp Leu Gly Ala Tyr Arg Asp Thr Asp Leu Thr Asp	
50 55 60	
GCC GAC CGC ACG GCG CCG CTA CGG CCC GAA CAC CCG GCG TAC GTC ATC	239
Ala Asp Arg Thr Ala Pro Leu Arg Pro Glu His Pro Ala Tyr Val Ile	
65 70 75	
CAC ACC TCC GGC TCC ACC GGC ACC CCC AAG GCC GTC GTC ATG CCC CAC	287
His Thr Ser Gly Ser Thr Gly Thr Pro Lys Ala Val Val Met Pro His	
80 85 90 95	
GCC GGC CTG GTC AAC CTG CTG ACC TGG CAC GCC CGC CGC TTC CCC GGC	335
Ala Gly Leu Val Asn Leu Leu Thr Trp His Ala Arg Arg Phe Pro Gly	
100 105 110	
GGC ACC GGG GTG CGC ACC GCC CAG TTC ACC GCC ATC GGC TTC GAC TTC	383
Gly Thr Gly Val Arg Thr Ala Gln Phe Thr Ala Ile Gly Phe Asp Phe	
115 120 125	
TCG GTG CAG GAG ATC CTC TCC CCG CTC GTC ATG GGC AAG ACC CTC GCC	431
Ser Val Gln Glu Ile Leu Ser Pro Leu Val Met Gly Lys Thr Leu Ala	
130 135 140	
GTG CCC TCG GAA GAG CTC CGC CAC AGC GCC GAA CTG CTG GCC GGC TGG	479
Val Pro Ser Glu Glu Val Arg His Ser Ala Glu Leu Leu Ala Gly Trp	
145 150 155	
CTC GAG	485
Leu Glu	
160	

(2) SEQ ID NO: 16 的資料 :

(i) 序列特性 :

(A) 長度 : 291 鹼對

五、發明說明(162)

(B)類別：核酸

(C)股型：雙股

(D)拓模形態：線型

(ii)分子類別：cDNA

(iii)假說：無

(iii)反意：無

(vi)原始來源：

(A)生物體：始旋鏈黴菌

(ix)特點：

(A)名稱 / 關鍵詞：CDS

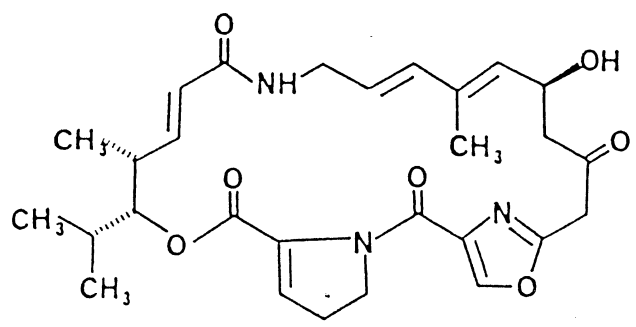
(B)位置：1..291

(D)其他資料：/ 產物 = "基因 SnbE 的一部份"

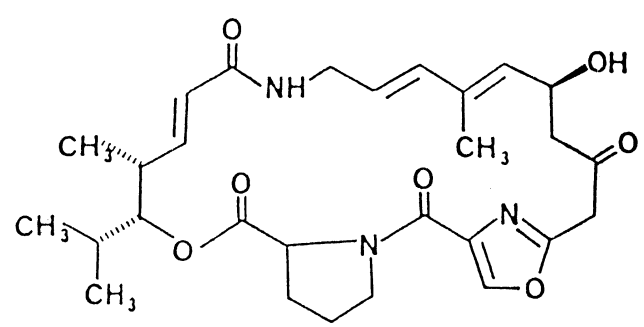
(xi)序列說明：SEQ ID NO: 16:

CTG CAG GCC GAG GGC GCC GAA GTG AGC CTG CTG GCC GTC CTC GAC GGC	48
Leu Gln Ala Glu Gly Ala Glu Val Ser Leu Leu Ala Val Leu Asp Gly	
1 5 10 15	
TAC CCC GAC GCC TAC GAC GGC ACC GAG CAC GAG GTC GGC GAG GAA CAG	96
Tyr Pro Asp Ala Tyr Asp Gly Thr Glu His Glu Val Gly Glu Glu Gln	
20 25 30	
GTC CTG GCG ATC CTC CTC AAC GCC GCC GGC GTC GAC CGG GCC CAG GCC	144
Val Leu Ala Ile Leu Leu Asn Ala Ala Gly Val Asp Arg Ala Gln Ala	
35 40 45	
TTC GGC GAC GCC CCC CTC CAA CGG GCC GCC GTG CTC GAG AAG CTG CGC	192
Phe Gly Asp Ala Pro Leu Gln Arg Ala Ala Val Leu Glu Lys Leu Arg	
50 55 60	
GAC AGC GGC AGC GCC CTG GGC AAC CTC GAC GAC GAC GCG GTC GGC CGC	240
Asp Ser Gly Ser Ala Leu Gly Asn Leu Asp Asp Asp Ala Val Gly Arg	
65 70 75 80	
ATG GTC ACC GTC TTC CTC AAC AAC ACG CGC CTC ATC CAG AAC TTC CGG	288
Met Val Thr Val Phe Leu Asn Asn Thr Arg Leu Ile Gln Asn Phe Arg	
85 90 95	
CCC	291
Pro	

34291



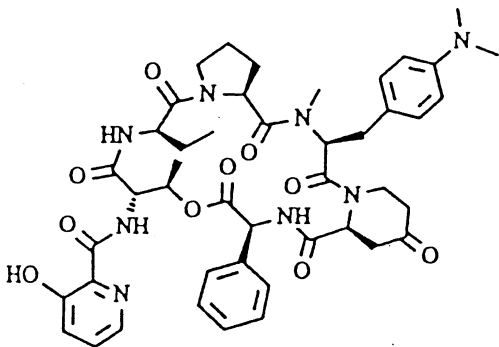
化學式 1



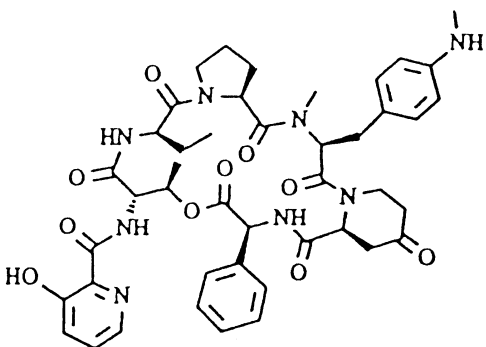
化學式 2

化學式 1	化學式 2
原始黴素 II A	原始黴素 II B
蜜柑黴素 A	
蠟灰菌素 A	蠟灰菌素 G
鏈陽性菌素 A	
協同菌素 A-I	
春黴素 A	
維吉尼黴素 M ₁	維吉尼黴素 M ₂

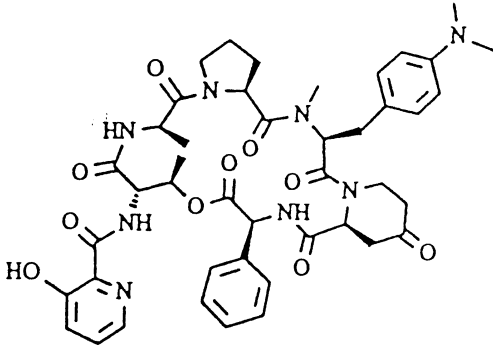
圖 1



化學式 1



化學式 2

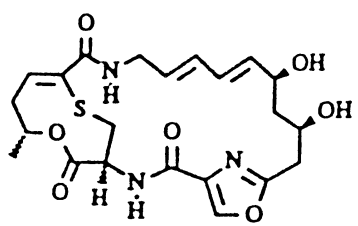


化學式 3

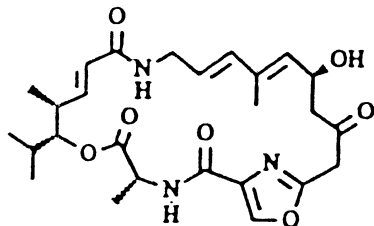
化學式 1	化學式 2	化學式 3
原始黴素 IA	原始黴素 IB	原始黴素 IC
鏈陽性菌素 B		
PA114B1		
春黴素 B α	春黴素 B β	春黴素 B γ
蠟灰菌素 B	蠟灰菌素 B2	蠟灰菌素 B1
蜜柑黴素 IA		

圖 2

A

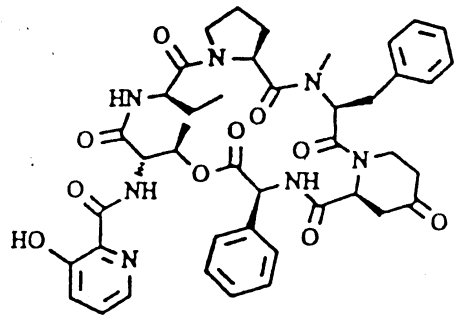


蟪灰菌素

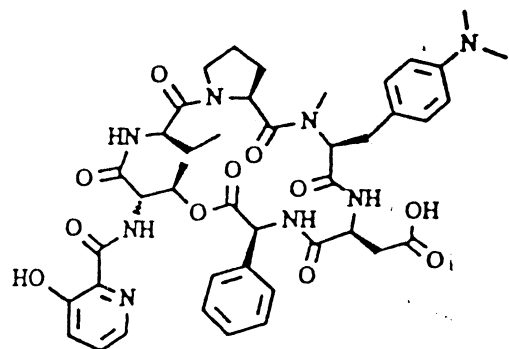


馬度徽素

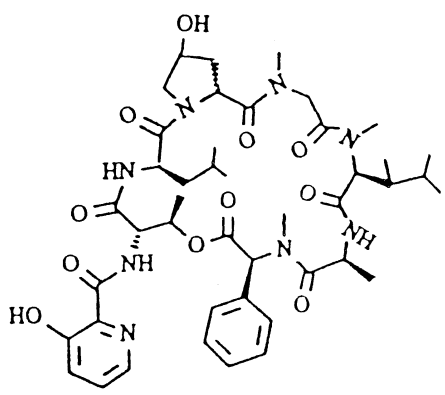
B



維吉尼徽素 S₁



春徽素 C



宜他徽素

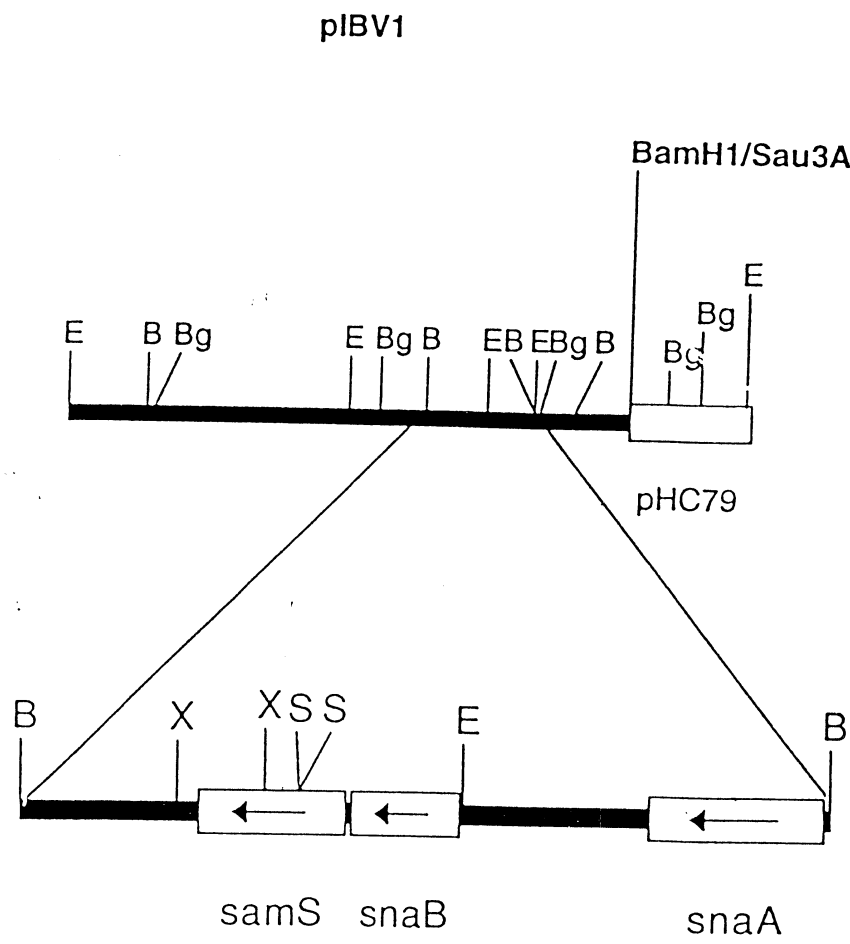


圖 4

pIBV2

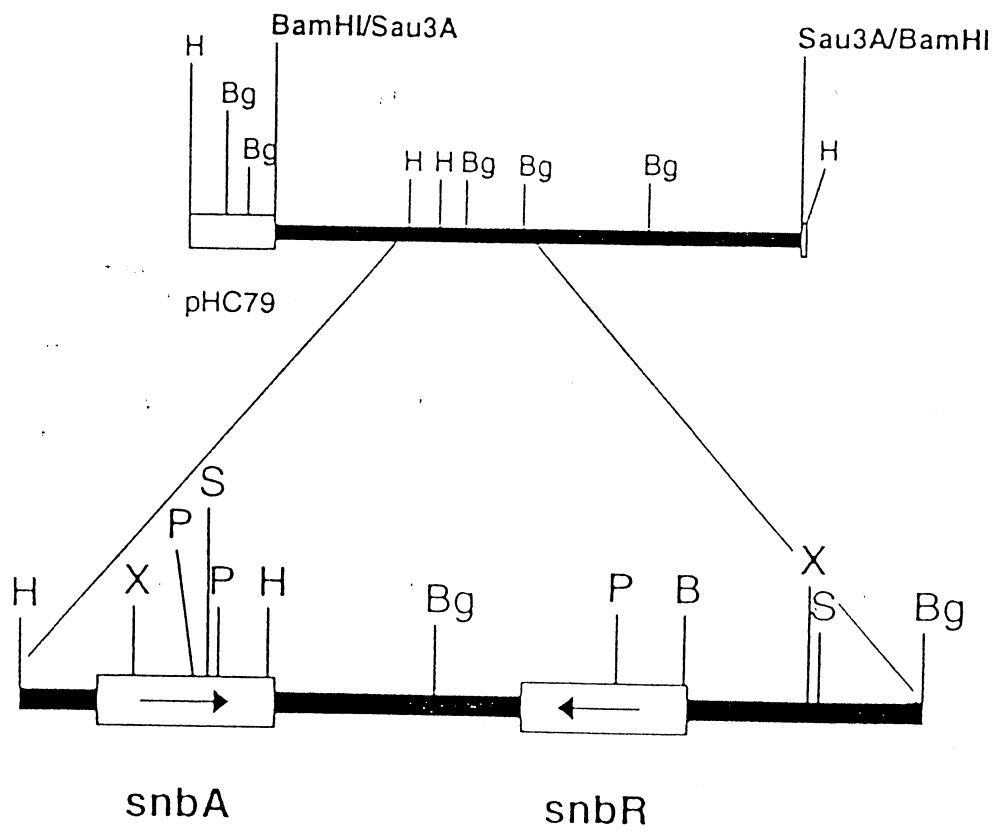
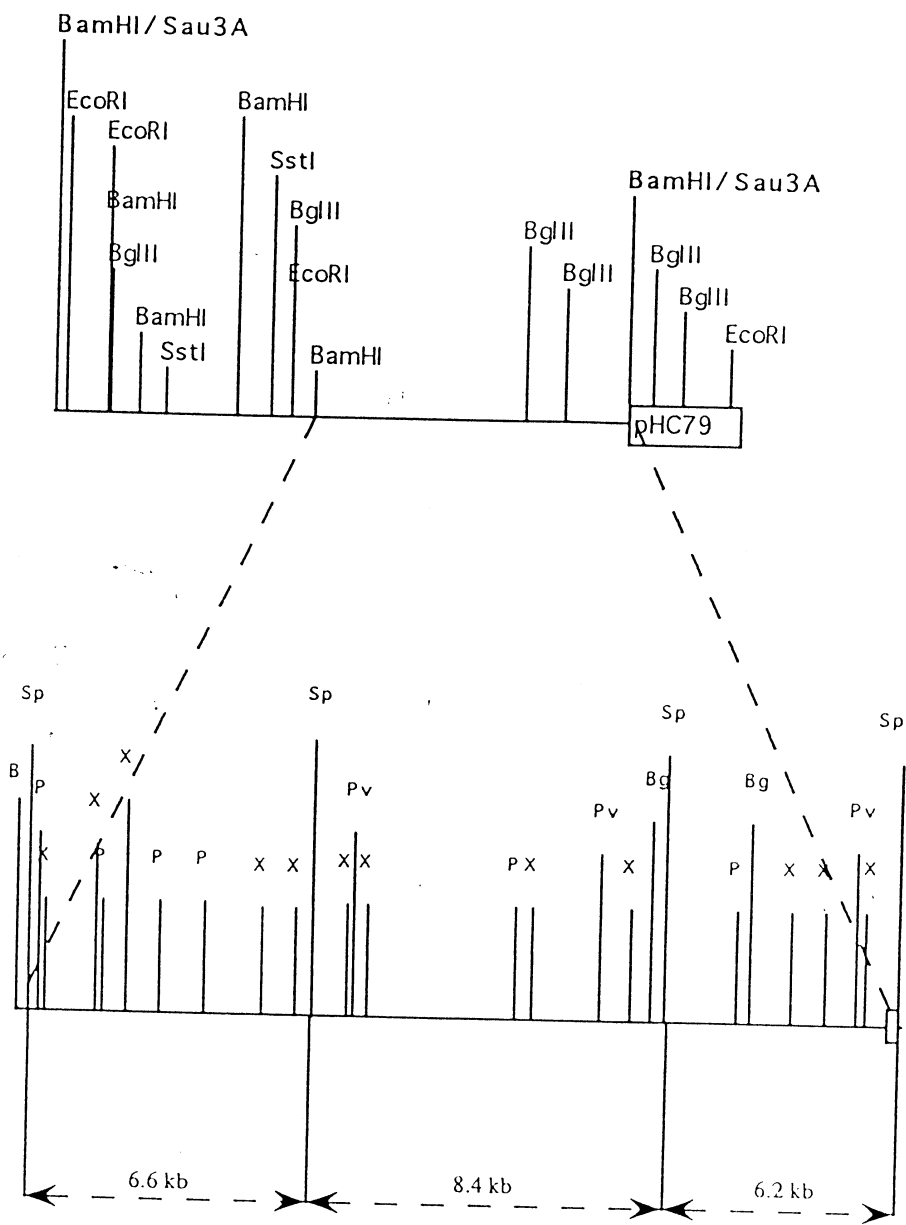


圖 5

plBV3



B: BamHI
Sp: SphI
P: PstI
X: XhoI
Pv: PvuII

圖 6

[illegible]

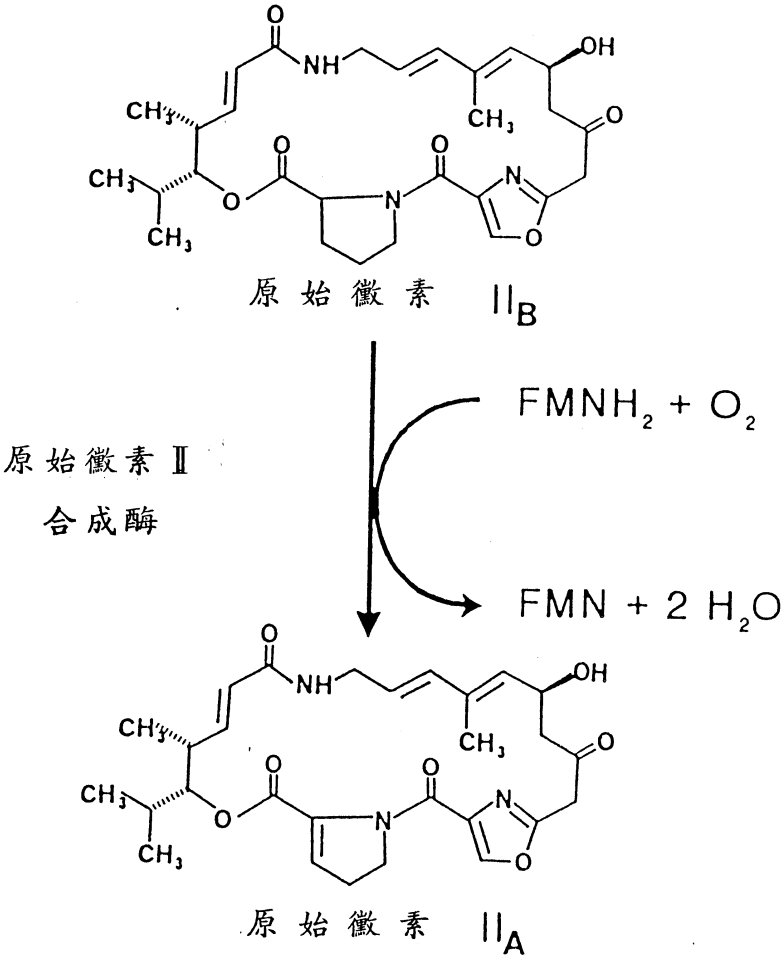
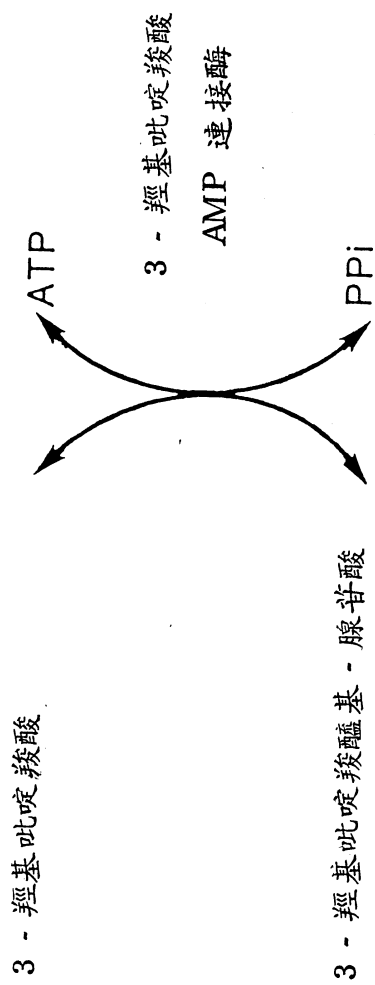


圖 8



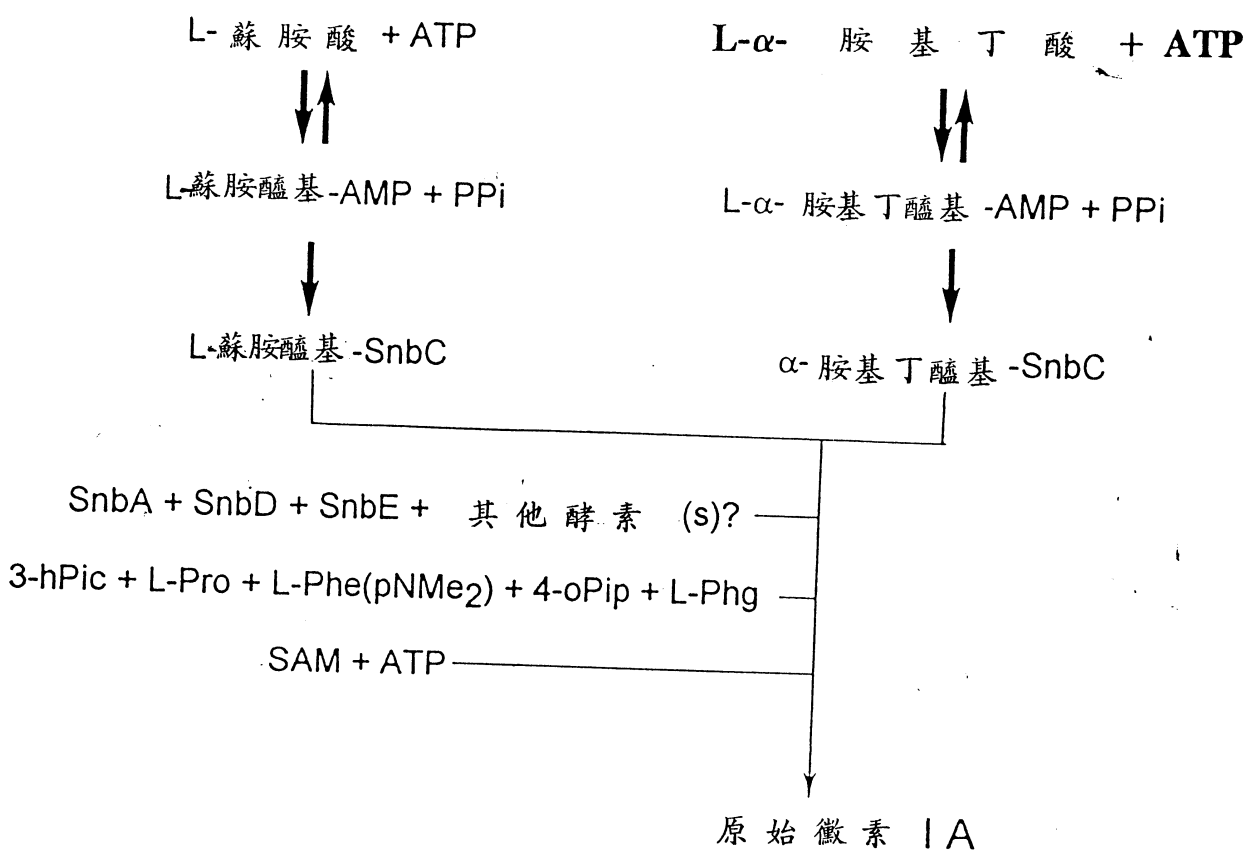


圖 10

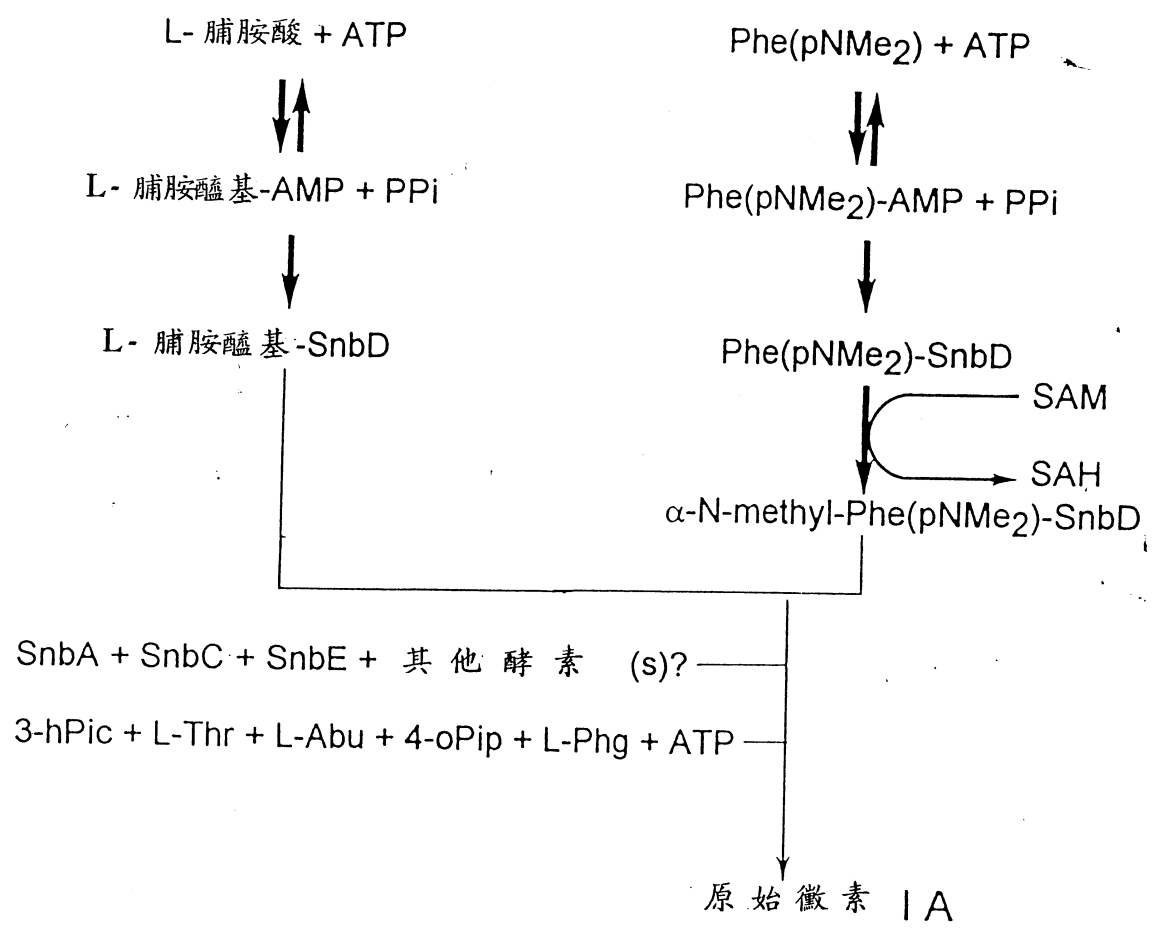


圖 11

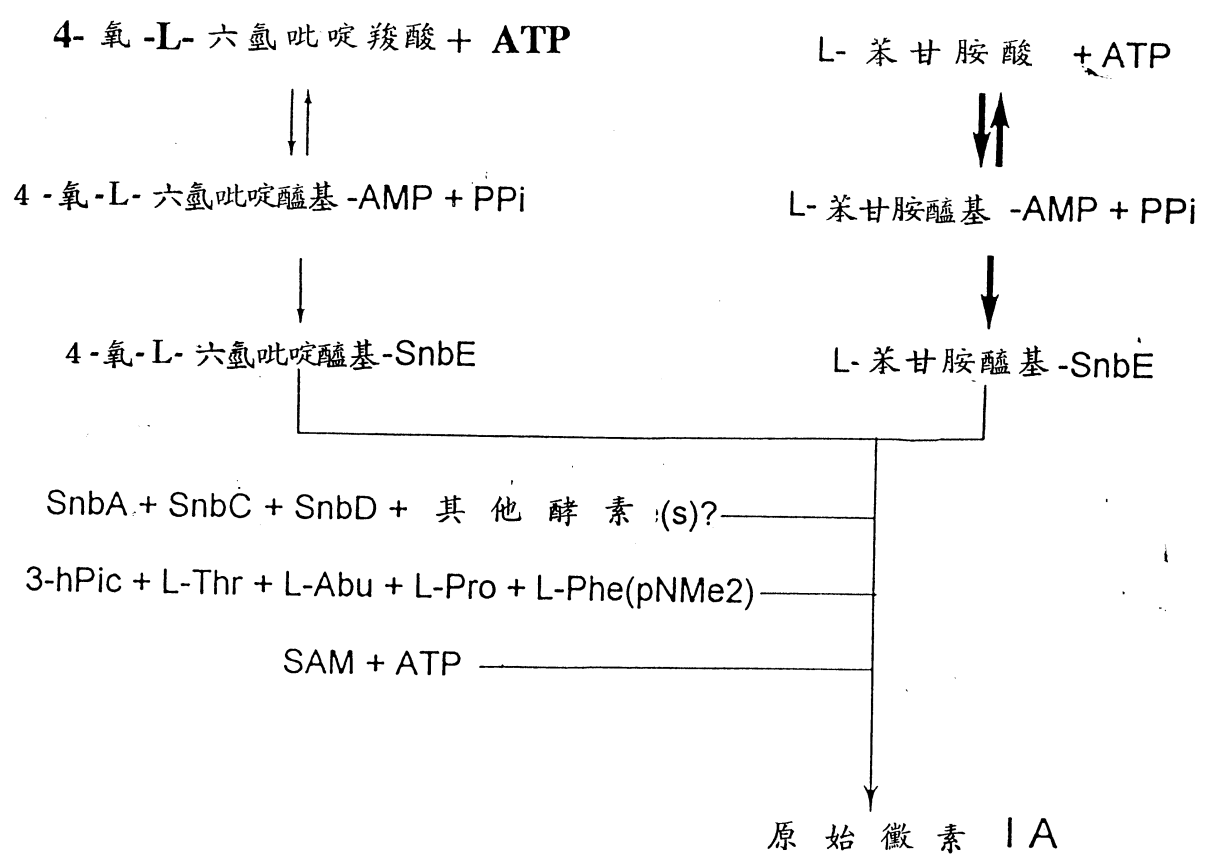


圖 12

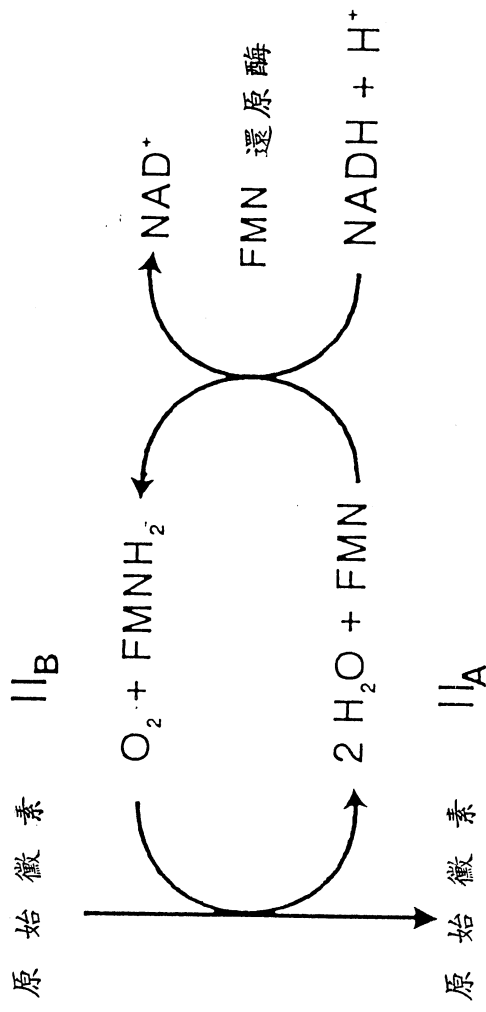
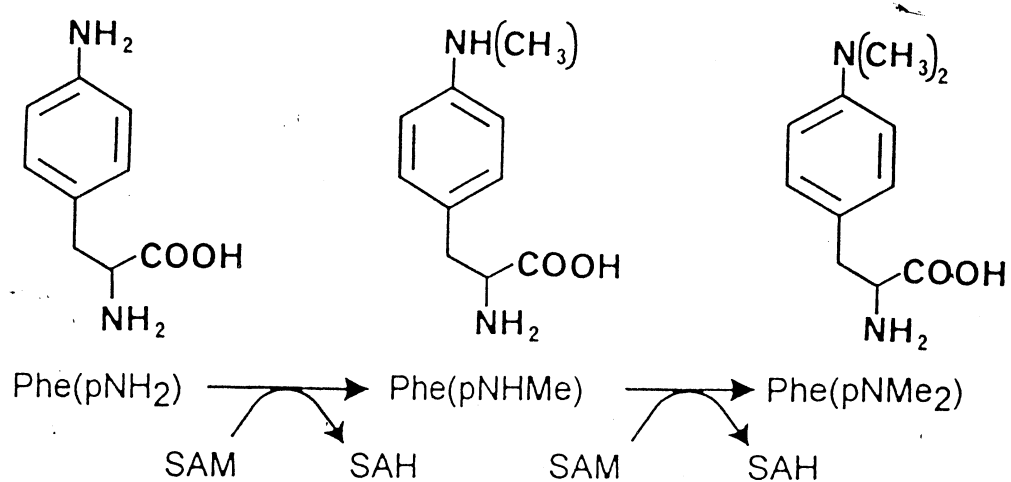


圖 13



Phe(pNH₂) : 對氨基苯丙氨酸
Phe(pNMe) : 對甲胺基苯丙氨酸
Phe(pNMe₂) : 對二甲胺基苯丙氨酸

圖 14

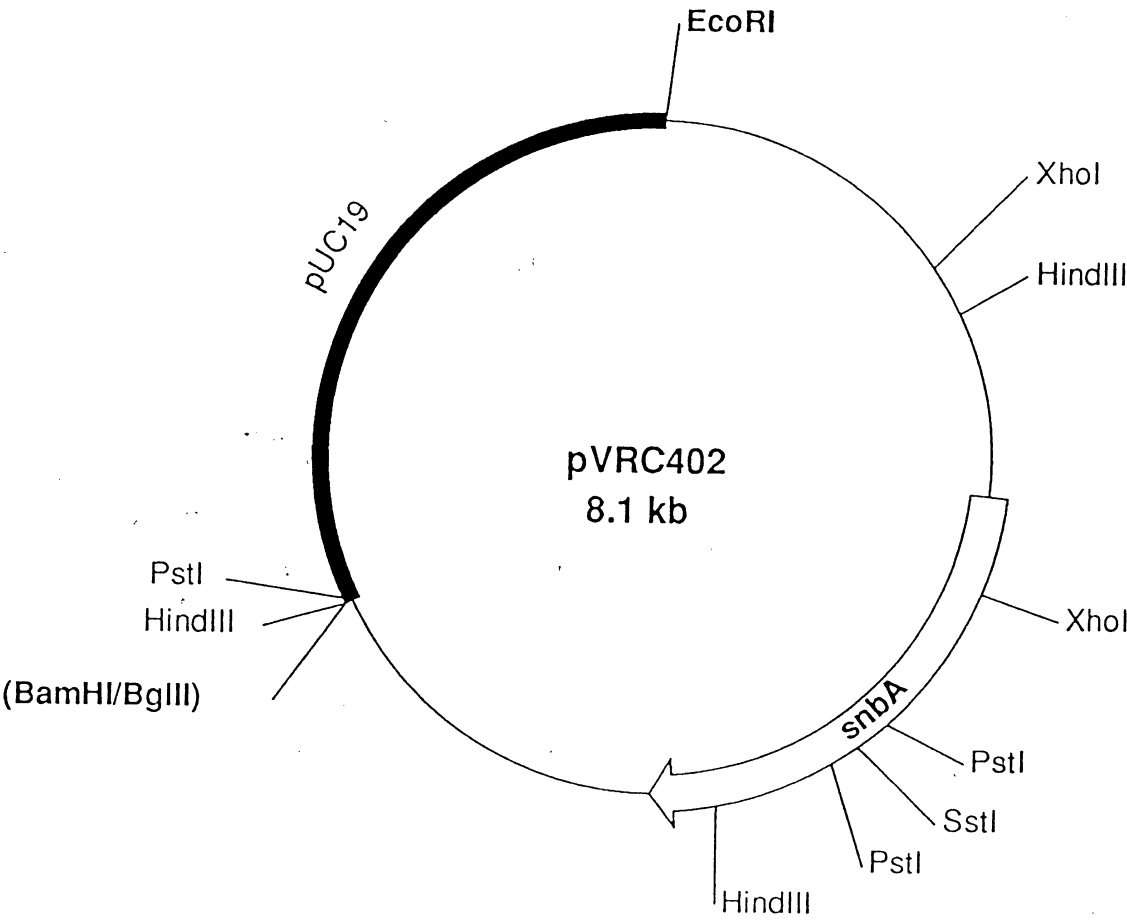
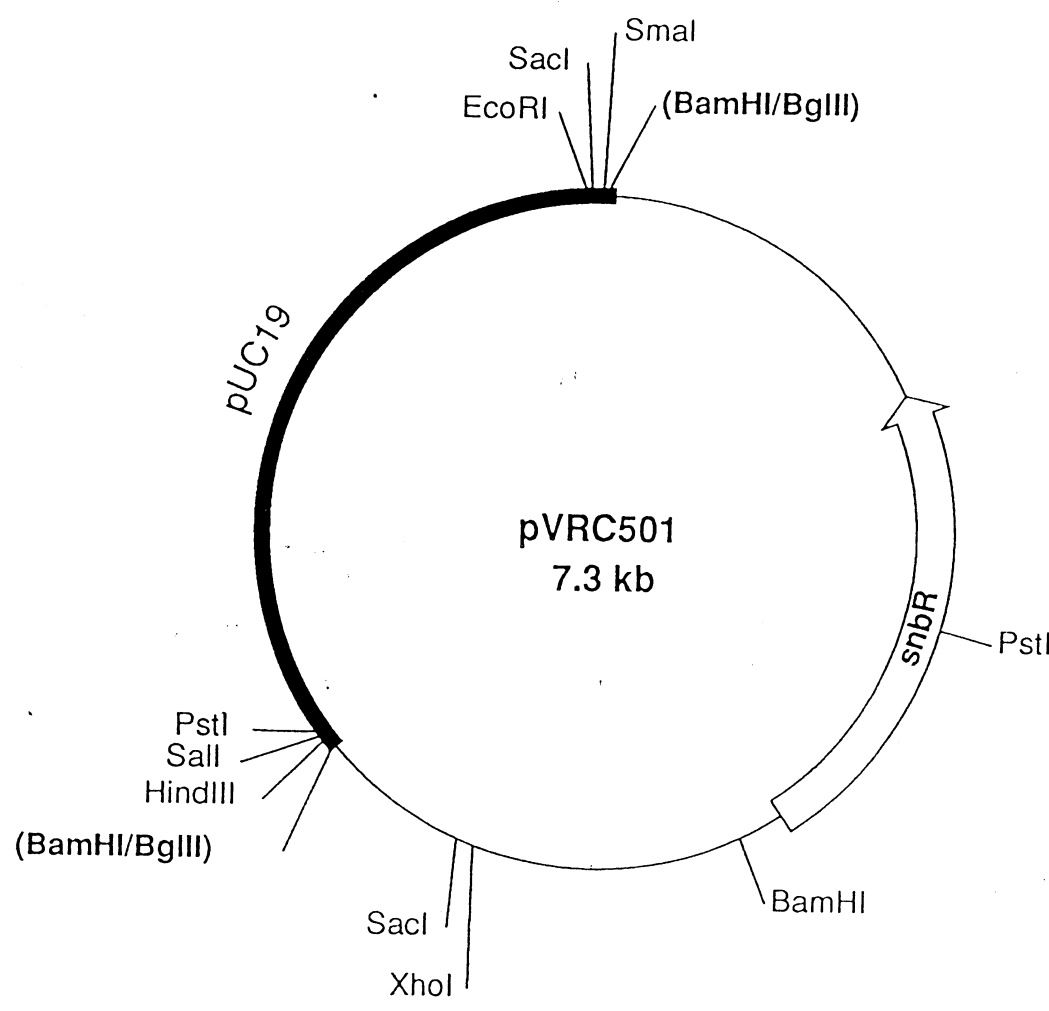


圖 15(A)



15(B)

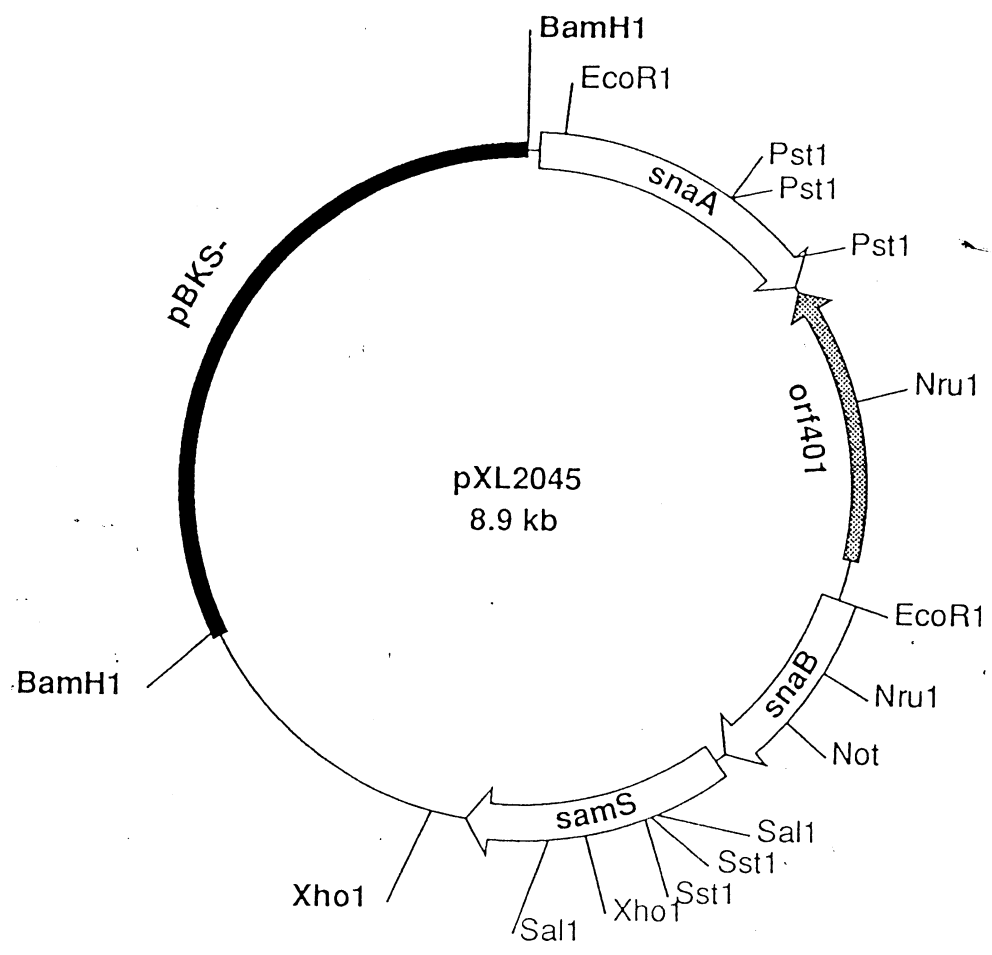


圖 16

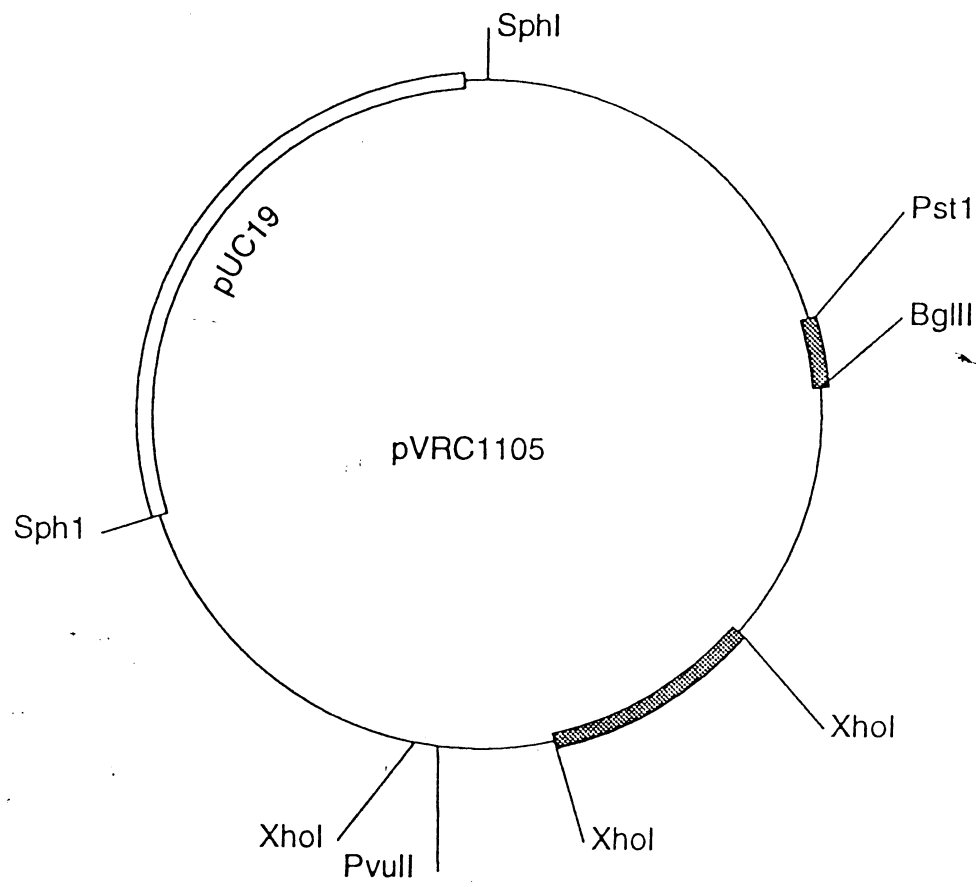


圖 17

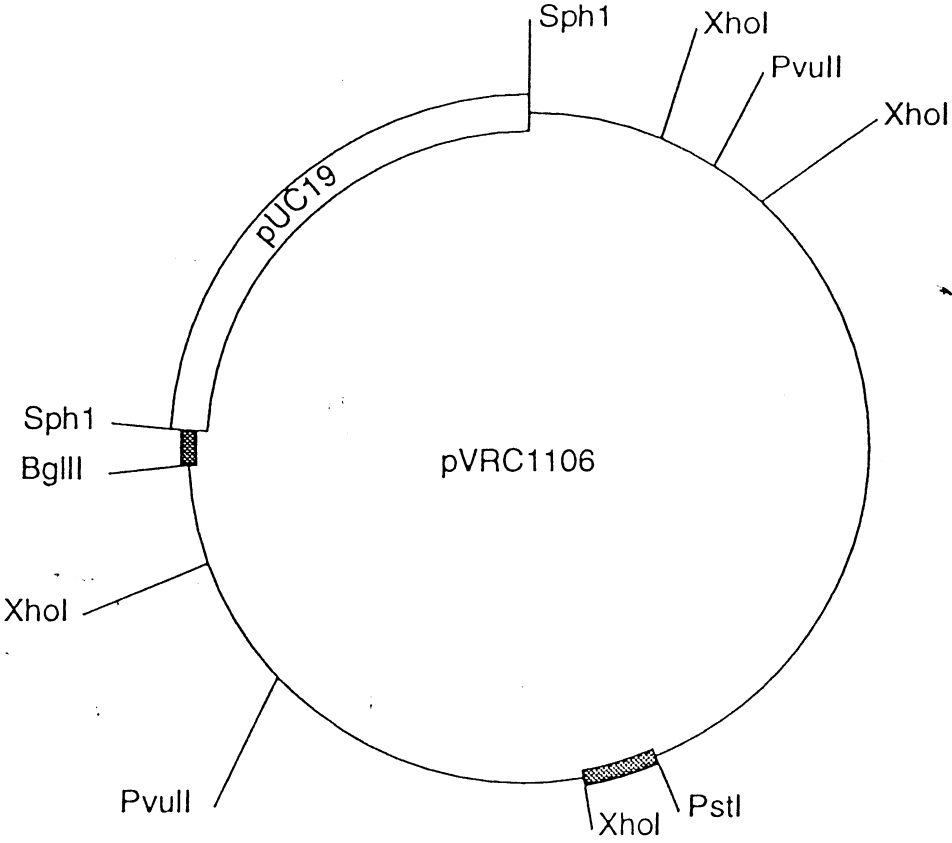


圖 18

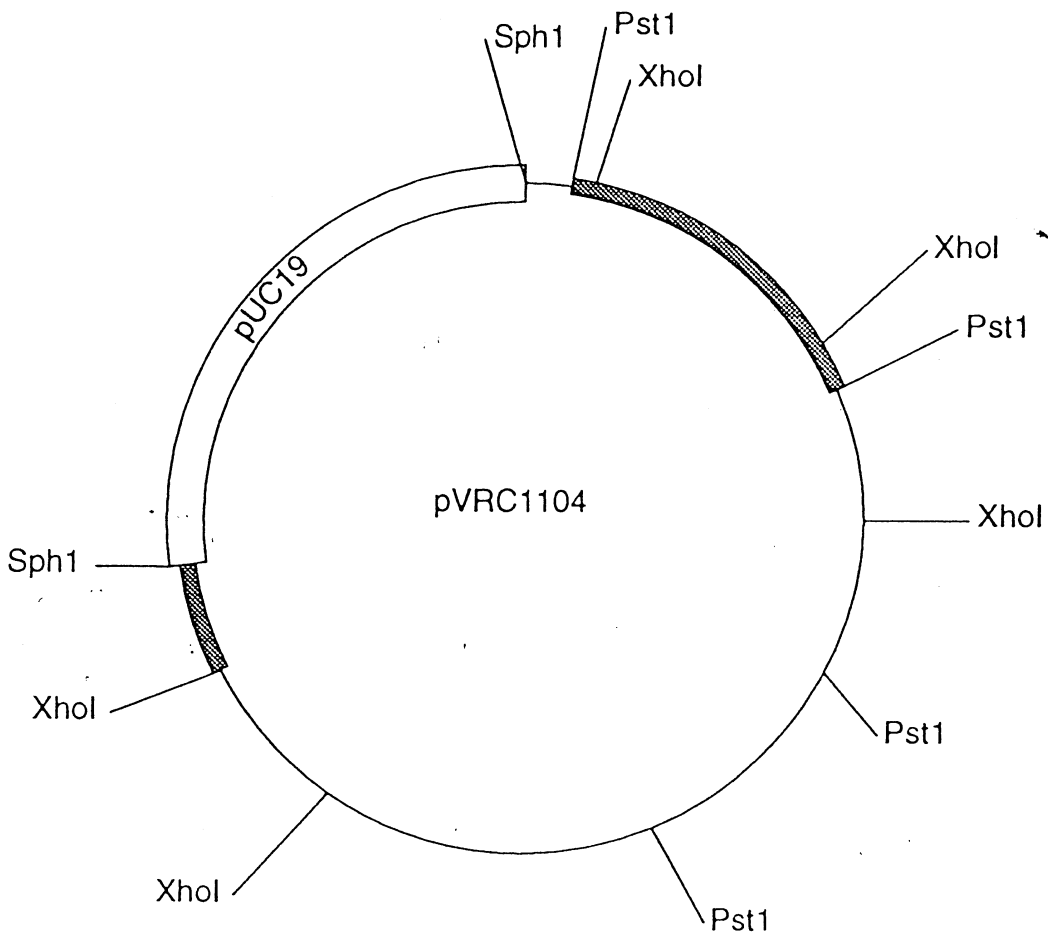
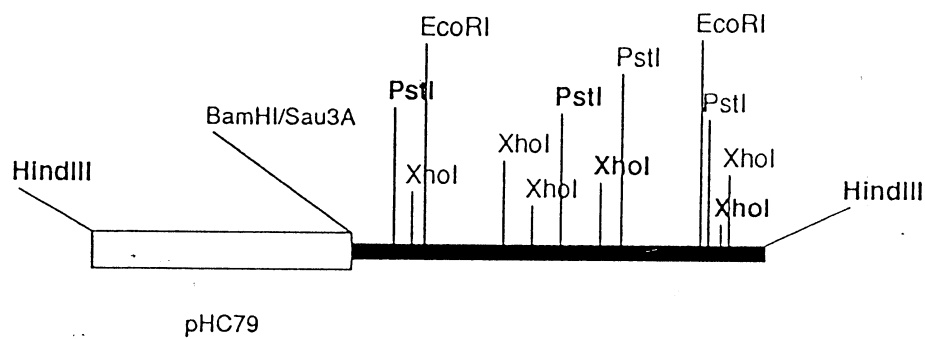


圖 19

pVRC900



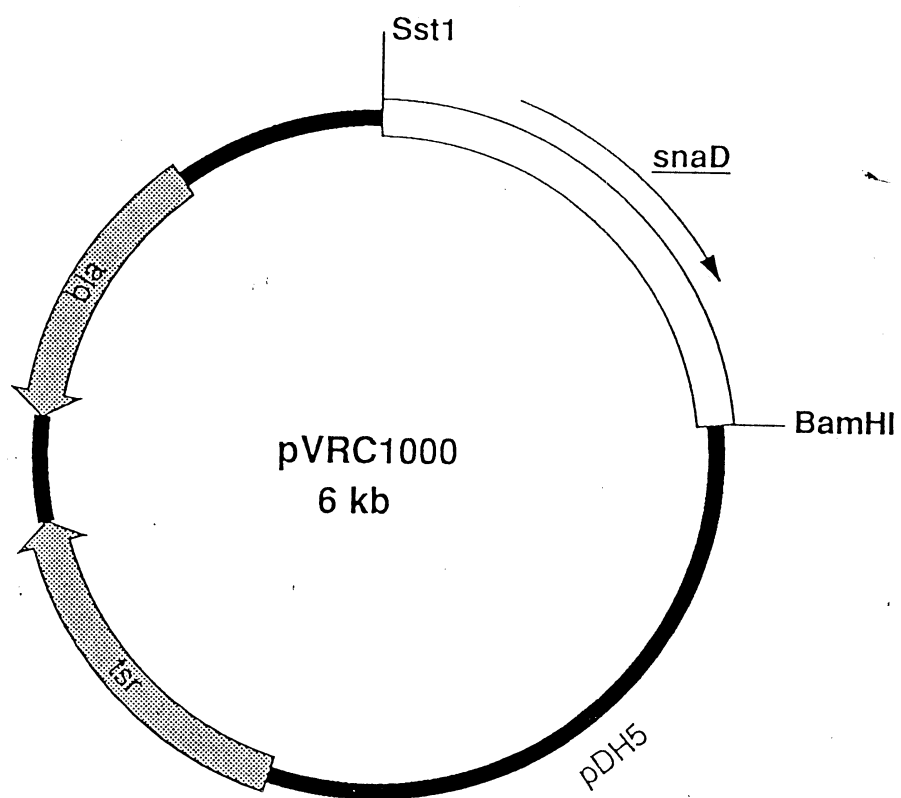
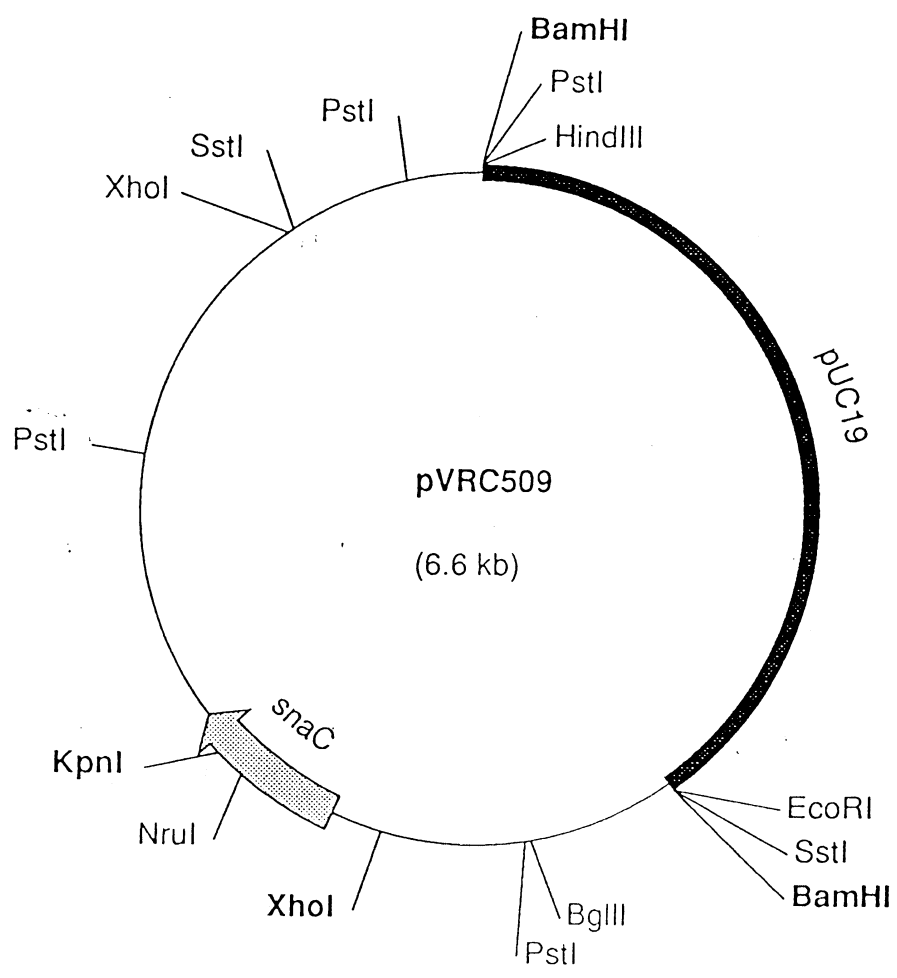


圖 21



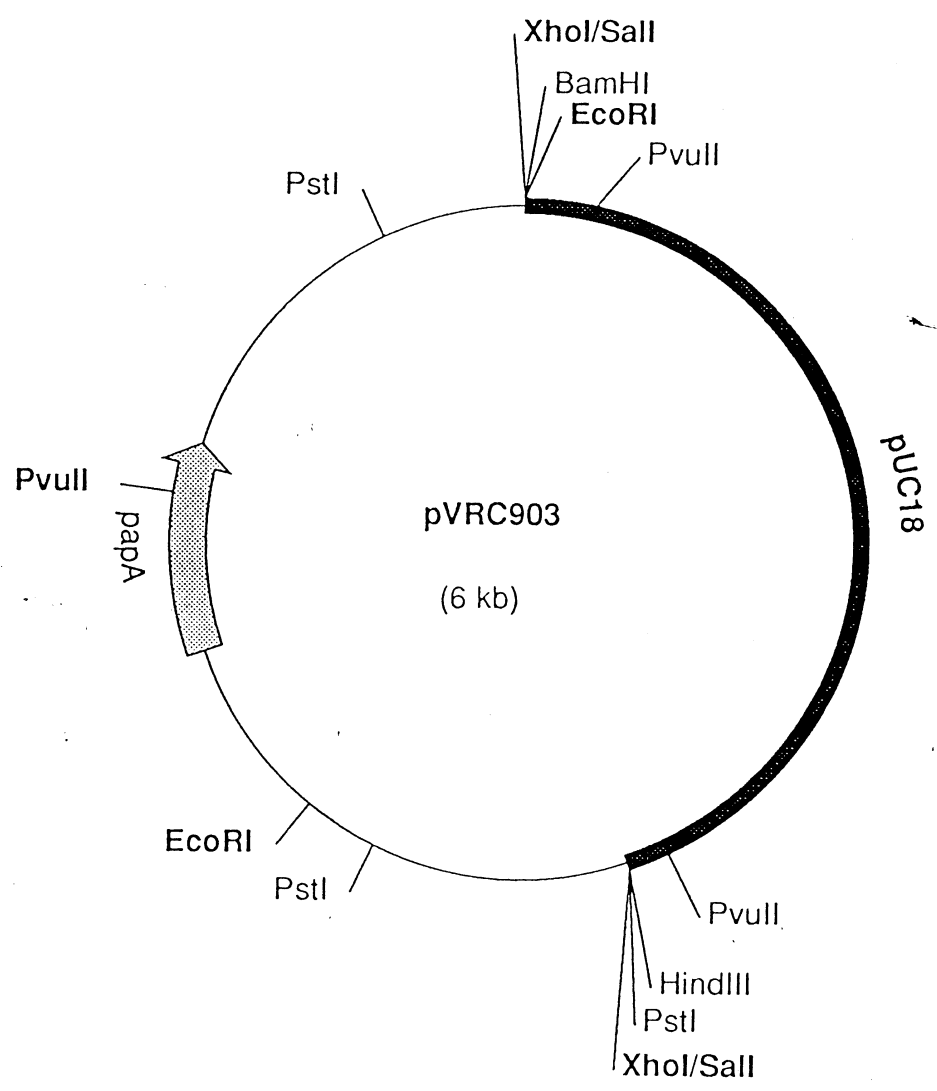


圖 23

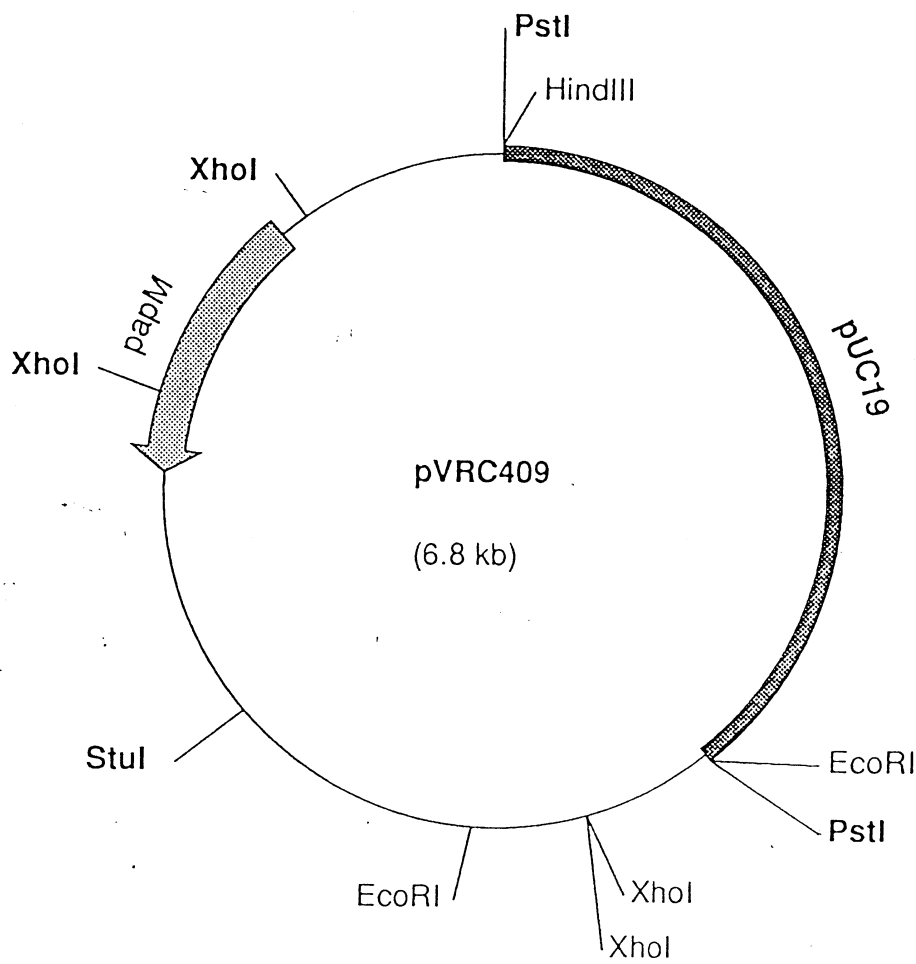


圖 24

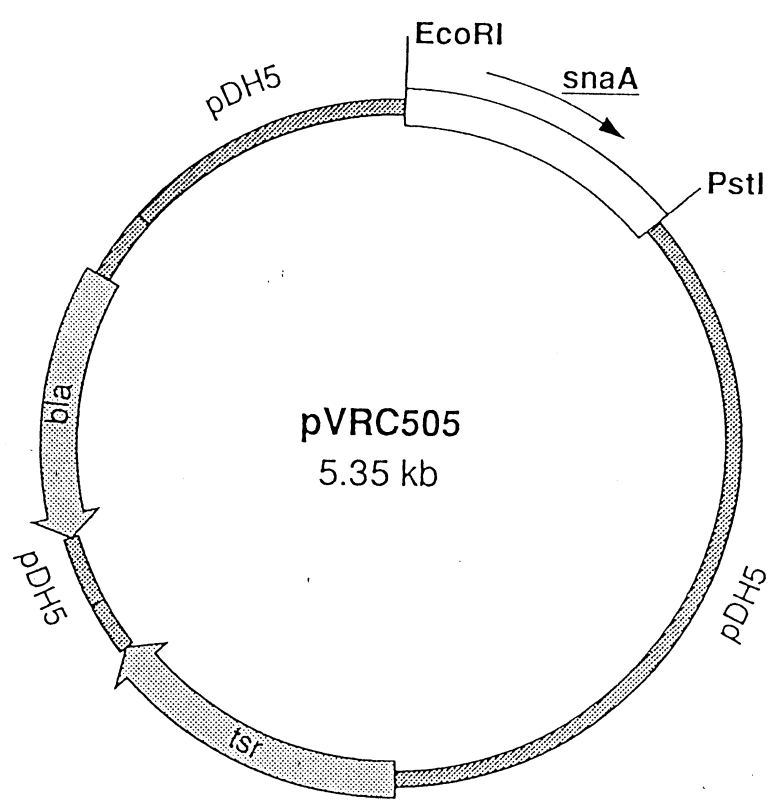
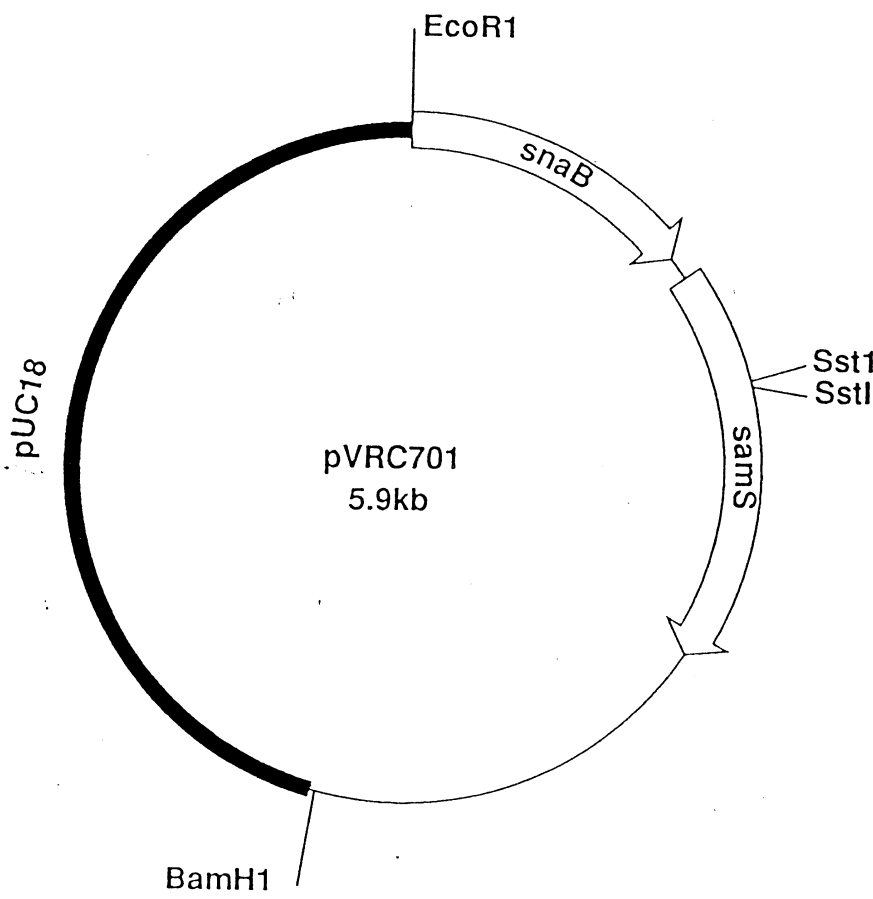


圖 25



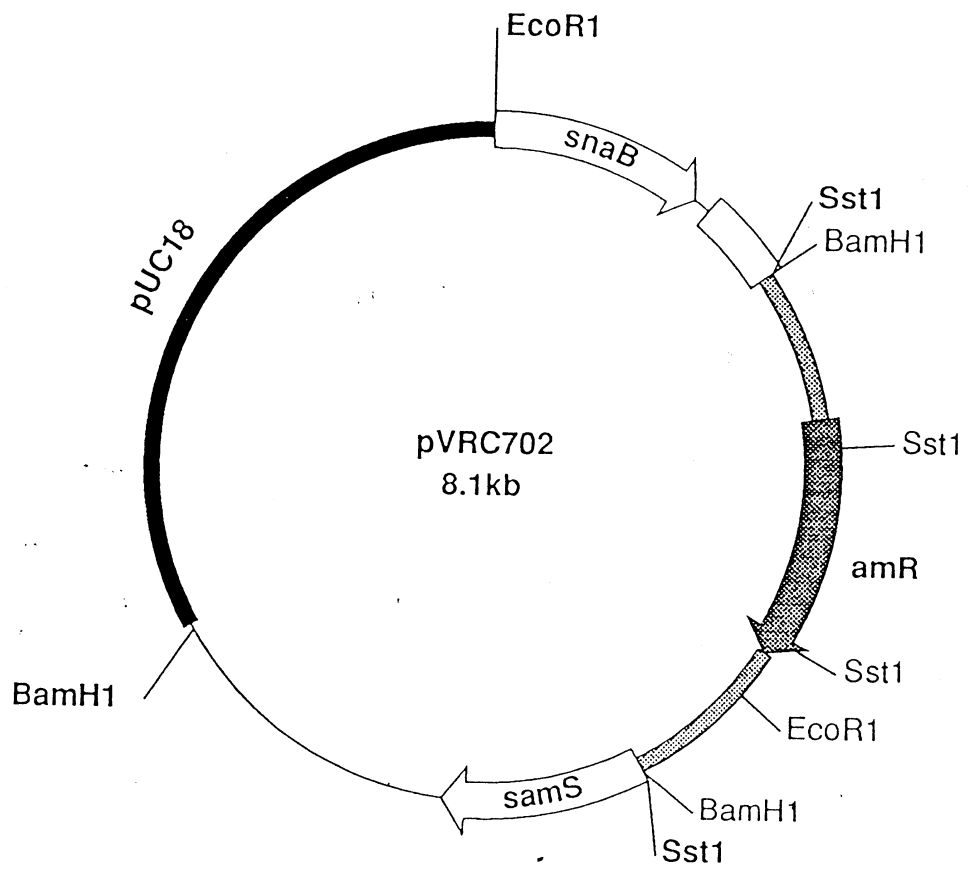


圖 27

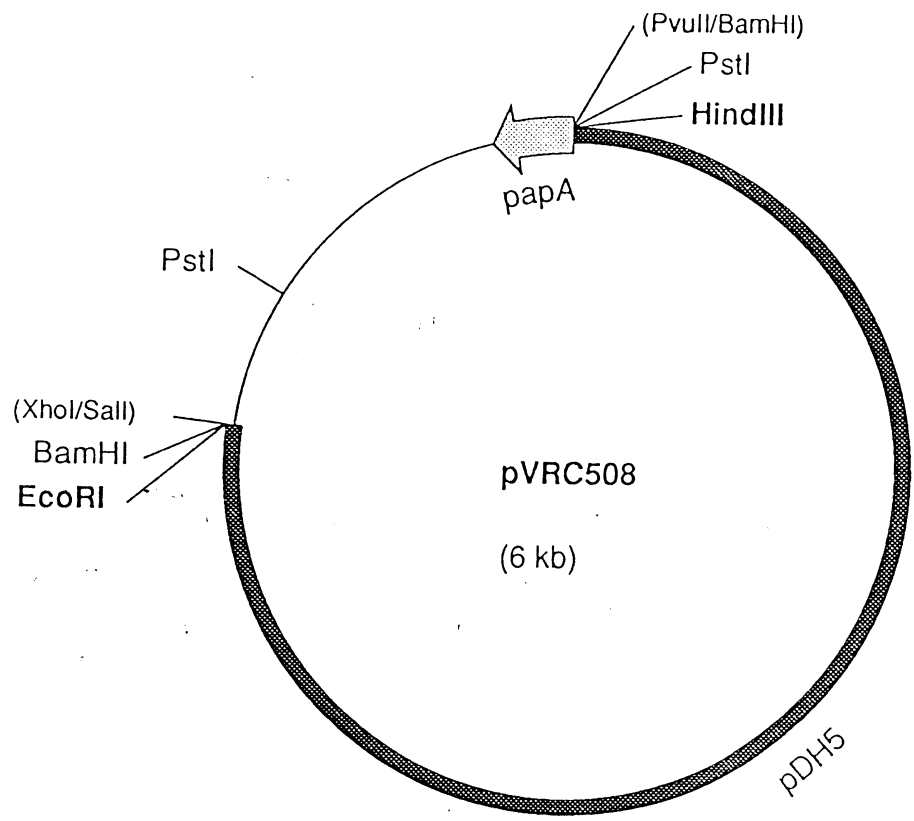


圖 28

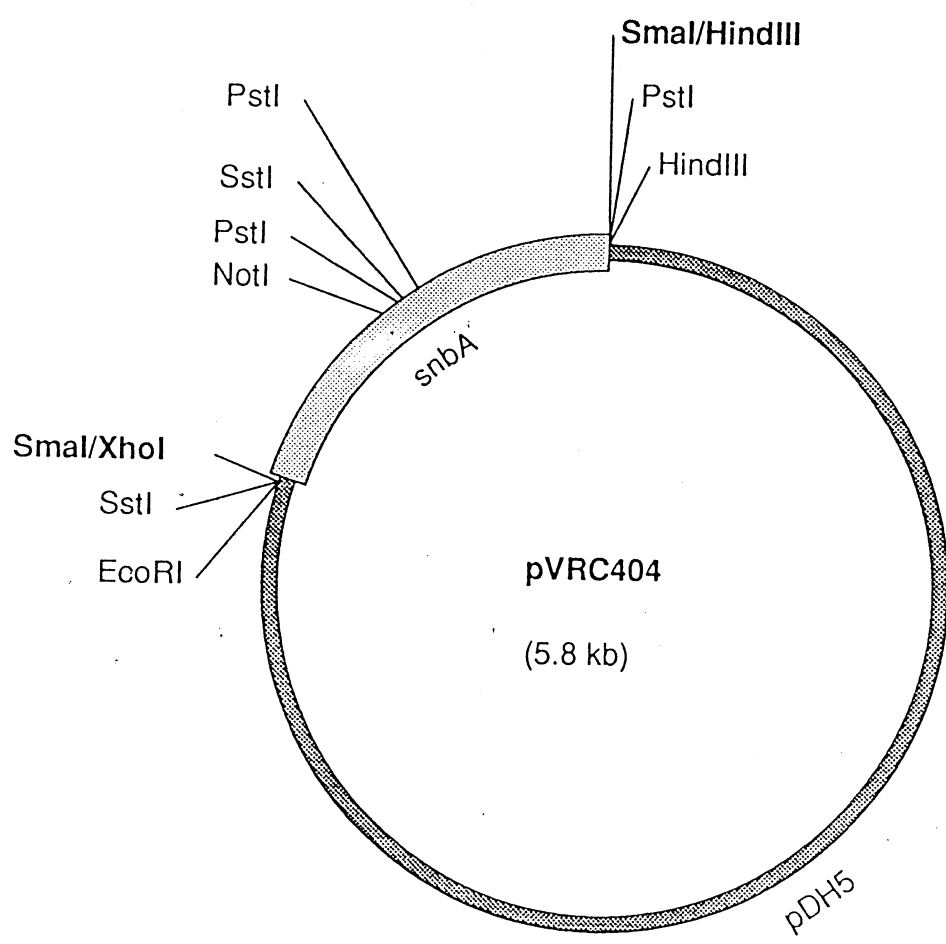


圖 29

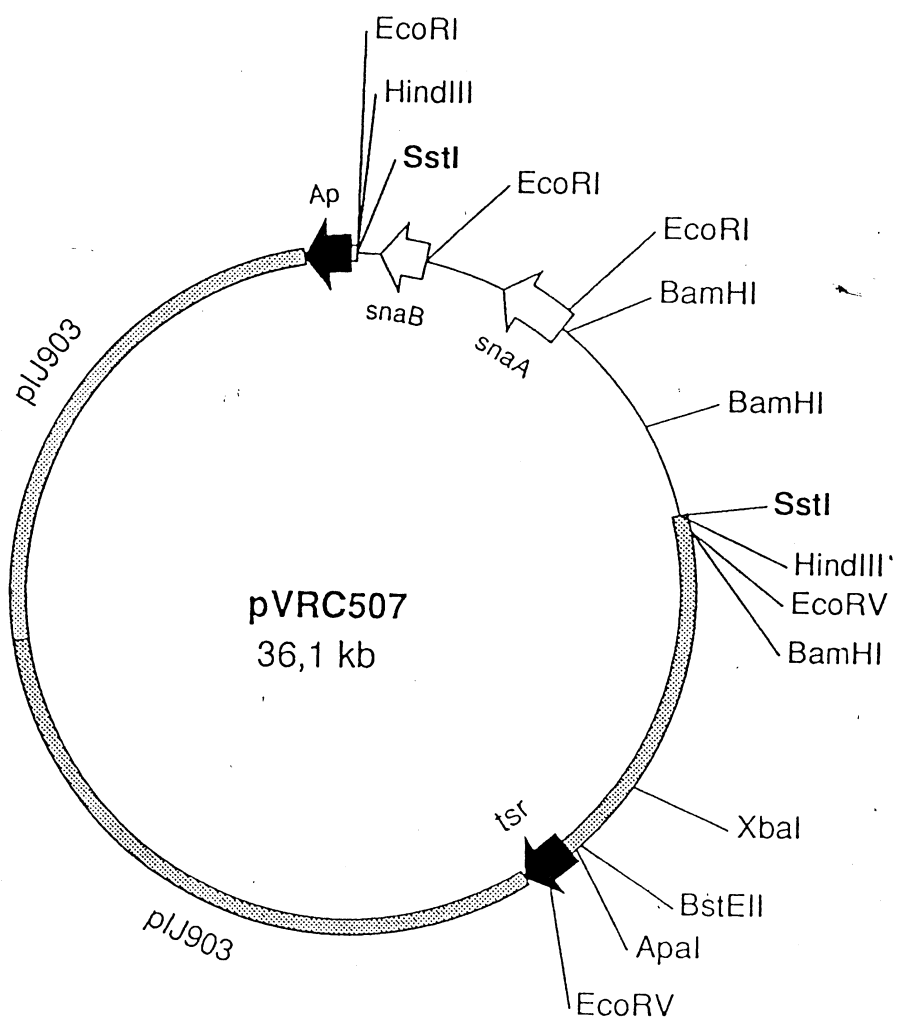


圖 30

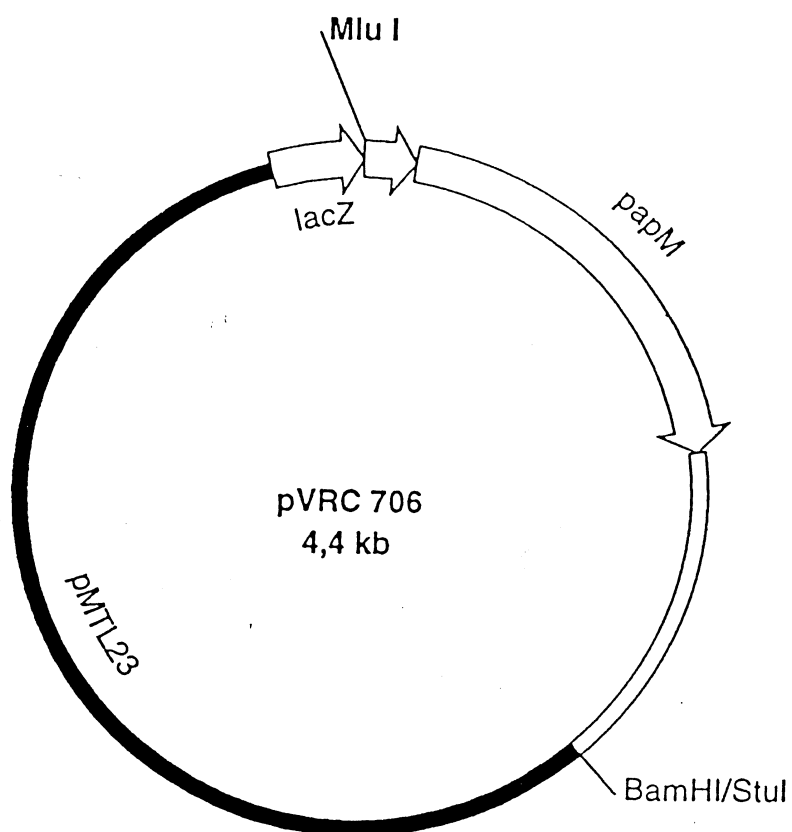


圖 31

83年12月2日 修正 補充

公告本

申請日期	82. 09. 25
案 號	82107903
類 別	

A4
C4
(83年12月修正頁)

570978

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	有關鏈革蘭素生合成之多肽，編碼此等多肽之核苷酸序列及其用途
	英 文	"POLYPEPTIDES INVOLVED IN THE BIOSYNTHESIS OF STREPTOGRAMINS, NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR THESE POLYPEPTIDES AND THEIR USE"
二、發明人 創作	姓 名	1. 凡洛尼魁·布蘭克 2. 法蘭希斯·布蘭曲 3. 裘爾·克洛茲特 4. 那札里·傑魁斯 5. 派崔希亞·拉克洛 6. 丹尼斯·席包特 7. 莫尼魁·札格瑞克
	國 籍	1-7 均法國
三、申請人	住、居所	1. 法國巴黎市道米尼爾路247號 2. 法國巴黎市索里塔瑞路41號 3. 法國巴黎市紐尼爾路48-52號 4. 法國巴黎市普魯米特路16號 5. 法國拜瑞蘇瑪恩市瑞尼路54號 6. 法國巴黎市珍哥里路28號 7. 法國巴黎市麥爾路19號
	姓 名 (名稱)	法商隆寶蘭洛爾公司
	國 籍	法國
	住、居所 (事務所)	法國安東尼市雷蒙阿諾大道20號
	代 表 人 姓 名	賈奎斯·皮拉德

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝

訂

線

五、發明說明 (

86. 2. 27 修正
年 月 日 補充

本發明係有關參與鏈革蘭素生物合成的的新穎多肽，且亦包括鏈革蘭素 A 和 B 成份生物合成的基因之分離和鑑定，這些基因在增進生產水平目標上的表現及其對於能夠導致新穎抗生素合成或鏈革蘭素衍生形式的阻斷突變體之構成的用途。

鏈革蘭素形成一同源抗生素組，由化學上相異的兩類型分子之組合所組成；其中一組為多不飽和巨內酯 (macrolactones) (A-組成份，其構造的兩個例子表於圖 1 中)，而另一組為縮環肽類 (depsipeptides) (B-組成份，其構造的兩個例子表於圖 2 中)。該組包含許多根據其來源而有不同名稱的抗生素 (參看表 9 和圖 3)，包括原始黴素 (pristinamycins)，蜜柑黴素 (mikamycins) 和維吉尼黴素 (virginiamycins) (有關之評述，參看 Cocito 1979, 1983)。

成份 A 和成份 B 具有協合抗菌活性，其可能達到個別成份活性的 100 倍，且與各成份不同者，其為殺菌性者 (Cocito 1979)。該活性對於革蘭陽性細菌，例如葡萄球菌 (staphylococci) 和鏈球菌 (streptococci) 等更特別有效 (Cocito 1979, Videau 1982)。成份 A 和 B 可經由結合到核糖體的 50S 次單元而抑制蛋白質合成 (Cocito 1979；有關之詳述，可參看 Giambattista *et al.*, 1989)。

鏈革蘭素主要是由放線菌屬 (actinomycetes) 所產生，包括許多鏈黴菌 (streptomycetes) 在內，表列於表 9 中。

五、發明說明 (2)

修正
83. 12. 02 補充

此外，有些真核生物也會合成鏈革蘭素，例如合成 vernamycins 的細單孢子菌屬 (*Micromonospora*)。從其所產生大量二次代謝產物，包括許多種抗生素 (β -內醯胺，四環素，大環內酯，胺基糖甘，多乙酸酯等)，殺草劑，抗癌劑，抗真菌劑，免疫調劑劑和酵素抑制劑等之事實來看，放線菌屬確構成非常重要的微生物組。到目前為止已研究過的有關各種類別的抗生素以及其他二次代謝物，如色素等之許多生物合成途徑都是用放線菌進行者，這一組細菌的一項重要部份為參與相同生物合成途徑的基因，構造基因以及抗拒性基因和調節基因等都是在染色體上以物理方式組合在一起，構成可能達到超過 100kb 以上的基因群 (Hopwood et al. 1986a, Hopwood et al. 1986b, Hallam et al. 1988, Anzai et al. 1987, Onuki et al. 1985b)。至今尚未有實例與此事實有矛盾者。這種構造組織對於選殖生物合成基因所用策略的開發有大益處。事實上，可以從在先前用各種技術選殖好的單一基因，生物合成，抗拒性或調節等基因開始沿著染色體結伴而分離出生物合成群的基因組。

現有對於鏈革蘭素所具每一成份的生物合成途徑之了解仍不完全，不過，每一分子所含不同部份的來源已用放射性標示鑑定過 (Kingston et al. 1983)。例如，A-型成份係由源自乙酸和幾種胺基酸，例如絲胺酸和甘胺酸等縮合所成的兩個區所構成者。而在 B-型成份上，研究證明其肽鏈所含胺基酸皆源自自然胺基酸 (Hook and Vining

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

修正 補充
年 月 日
83.12.02

1973)。不過，至目前為止，參與此途徑的多肽尚未被純化出足供分子鑑定所用的量，且未曾述及其生物合成基因者。於B-型成份的生物合成程序中，可區分成兩部份：

(1) 巨環前體或類似物之合成，包括：3-羥基吡啶羧酸，L-2-胺基丁酸，對-二甲胺基-L-苯丙胺酸，4-氧基-L-六氫吡啶羧酸，L-苯基甘胺酸。

(2) 從上述前體，L-蘇胺酸和L-脯胺酸，經可能的這些前體之改質或肽N-甲基化之衍生物等形成巨環。

到目前為止，B-型成份巨環前體中，只有可能的代謝來源曾用標示同位素予以測定過。(Reed *et al.* 1986, Molinero *et al.* 1989, Reed *et al.* 1989)。

本發明導源自參與鏈革蘭素生物合成中的多肽之純化，以及源自其產物參與鏈革蘭素生物合成的基因之選殖。要了解者，“鏈革蘭素生物合成”一詞包括調節基因以及賦予生產型微生物抗拒性的基因。因此，本發明可促使利用重組DNA技術增加這些代謝物的產量。本發明的另一好處在於經由在該生物合成不同步驟予以阻斷的突變體之構成而產生兩種成份個別合成中間體之可行性。這些中間體可作用基質以供後續以化學，生化學，酵素或微生物等手段之改質所用。同樣情形，將生物合成基因分離出來可促使經由生產株之間的基因轉移而製造出具有藥學優勢性質的雜交抗生素成為可能(Hopwood *et al.* 1985a, Hopwood *et al.* 1985b, Hutchinson *et al.* 1989)。本發明的另一好處在於可提供有關分類在鏈革蘭素內的代謝物之生物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 86.2.27 修正
年 月 日 補充

合成途徑更佳的了解。事實上，本發明可使細菌或真菌菌株構成得使一種或多種參與鏈革蘭素生物合成中的蛋白質在適當表現訊號的控制下被表現出來。之後，可以利用這些種菌株來進行生物轉換。這些生物轉換可以用全細胞，或用該細胞的無細胞型萃取物等來進行。這些生物轉換可以促使鏈革蘭素用其生物合成途徑中的一種酵素轉化成衍生成形式。例如，原始黴素 IIB 可以經由這種方式轉化成原始黴素 IIA。相同的原理可以應用於任何生物合成中間體。

綜上所述，本發明的第一項目標係有關編碼參與鏈革蘭素生物合成的多肽之核苷酸序列。

更特定言之，從始旋鏈黴菌 (*Streptomyces pristinaespiralis*) 分離出其產物參與鏈革蘭素生物合成之幾種基因，由於該菌株所產生的鏈革蘭素較普遍地被稱為原始黴素 (參看表 9)，因此，在後文中，於某些例子內，係指用於原始黴素生物合成之基因。不過，確定的是，其所得結果都可用於所有的鏈革蘭素。原始黴素 I 和 II 分別對應於鏈革蘭素的 B 成份和 A 成份。因此，在後文中，原始黴素 II 族分子和原始黴素 I 族分子分別稱為鏈革蘭素 A 成份和 B 成份。

本發明所特別述及者為 snaA, snaB, snaC, snaD, papA, papM, samS, snbA, snbC, snbD, snbE, 和 snbR 等基因的分離和鑑定。這些基因是從始旋鏈黴菌的基因體 DNA 庫中分離出來。該庫係經由用限制酵素 *Sau3A* 將始旋

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (5)

B7
修正
年 月 日
83.12.02 補充

鏈黴菌的基因體 DNA 予以部份消化而得者。將大型 DNA 片段，從平均 40 到 50kb 者，選殖到粘接質體 (cosmid) pHC79 中 (Hohn, B., and Collins, J.F., 1980)。在經由活體外 (*in vitro*) (encapsidation) 後，將大腸桿菌 (*E. coli*) 菌株 HB101 (Boyer et Roulland-Dussoix, 1969) 和 DH1 (Low, 1968) 予以轉移感染。如此，始旋鏈黴菌的基因庫即出現在兩個不同的大腸桿菌株。

snaA, snaB 和 samS (原稱為 SnaC) 等基因係在粘接質體 pIBV1 上 (圖 4)。分別對應於多肽 SnaA 和多肽 SnaB 的 snaA 和 snaB 兩基因之產物係參與原始黴素成份 II 生物合成的最後步驟 (將原始黴素 IIB 轉化成原始黴素 IIA)，係對應於 D-脯胺酸 2,3-鍵的氧化。這兩種多肽構成原始黴素 IIA 合成酶的兩個次單元，其純化詳載於本發明中。SamS 基因的產物被認為係參與從 ATP 和甲硫胺酸合成 SAM (甲基供體) 之步驟中。事實上，大部份鏈革蘭素的 A 成份是在 C-4 甲基化者 (圖 1)，且該甲基曾被述及 (Kingston et al. 1983) 係衍生自甲硫胺酸的甲基，非常可能是經由用 SAM 進行的甲基化反應來完成。因此，samS 基因被認為是編碼對原始黴素生物合成途徑具專一性的 SAM 合成酶 (SamS; EC.2.5.1.6) 者。

SnbA, SnbR, papA 和 papM 等基因都在粘接質體 pIBV2 之上 (圖 5)。基於實施例 5 所提出的生化研究結果可知 SnbA 基因對應於原始黴素 I 合成的第一步驟。該步驟包括鏈中第一個酸，3-羥基吡啶羧酸經由線甘酸化之活化作用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (6)

年	月	日	修正
83.	12.	00	補充

。 snbR 基因可能參與原始黴素 I 族 (或可能原始黴素 II 族) 分子在合成後輸送到細胞外之過程, 因而賦予生產菌株對該成份的抗拒性。 papA 基因以序列分析 (實施例 8.8) 和對在該基因中斷的突變體所作研究 (實施例 9.3) 等的結果來判斷係對應於從分支酸生物合成對胺基苯丙胺酸之基因。對 - 胺基苯丙胺酸於隨後被 papM 基因的產物, 其為本發明所述的 N-甲基轉移酶, 所二甲基化而形成對 - 二甲胺基苯丙胺酸, 之後, 再組合到原始黴素 IA 中。因此, papA 和 papM 兩基因係參與原始黴素 IA 諸前體之一的合成。

snaA, snaD, snaC, snbD 和 snbE 等基因都是在粘接質體 pIBV3 上 (圖 6), 因此其係鄰接已含有 snaA 基因的粘接質體 pIBV1 者。基於其序列分析 (實施例 8.9) 和對在此基因中斷的突變體所作研究 (實施例 9.5) 等之結果來判斷, snaD 基因係編碼參與原始黴素 II 生物合成中的一肽合成酶。其產物在本發明內述及的 snaC 基因係參與蘇胺酸和胺基丁酸殘基在原始黴素 IA 肽鏈中的嵌入。其產物也在本發明內提及的 snbD 基因係參與脯胺酸和對 - 二甲胺基苯丙胺酸殘基在原始黴素 IA 肽鏈中的嵌入。其亦控制這兩殘基之間的肽鏈之 N-甲基化。最後, 其產物也在本發明內述及的 snbE 基因係參與原始黴素 IA 所含最後兩個殘基, 亦即苯甘胺酸和 4-氧六氫吡啶羧酸之嵌入。

snaC 基因係在粘接質體 pIBV4 上 (圖 7)。其係編碼 FMN:NADH 氧化還原酶, 也稱為 FMN 還原酶, 在本發明中述及者, 其係從 FMN 和 NADH 產生 FMNH₂ 而供給原始黴素 IIA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(7)

修正
83.12.02 補充

合成酶所用。因此，snaC基因係參與原始黴素 IIA 生物合成之最後步驟。

將這些不同基因從其來源粘接質體分殖後，測定其核苷序列。將 snaA，snaB 和 samS 等基因分殖在一段 6-kb 的 BamHI-Bam-HI 片段，將其一部份予以序列分析 (SEQ ID no.1)。snbA 基因係分殖在 5.5-kb EcoRI-BglII 片段上，將其中一部份序列分析 (SEQ ID no.5)。snbR 基因係分殖在 4.6-kb BglII-BglII 片段上，其中一部份亦經序列分析過 (SEQ ID no.6)。papA 基因的一部份係分殖在 3.4-kb XhoIXhoI 片段上，其中一部份經序列分析過 (SEQ ID no.9)。papM 基因係選殖在 4.1-kb PstI-PstI 片段上，其中一部份經序列分析過 (SEQ ID no.10)。一部份的 SnaD 基因係分殖在 1.4-kb BamHI-SstI 片段上，其中一部份經序列分析過 (SEQ ID no.8)。一部份的 snbC 基因係分殖在一 6.2-kb SphI-SphI 片段上，其中 2 區經序列分析過 (SEQ ID no.11 和 12)。一部份的 snbD 基因係分殖在 8.4-kb SphI-SphI 片段上，其中 2 區係經序列分析過者 (SEQ ID no.13 和 14)。一部份的 snbE 基因係分殖在 6.6-kb SphI-SphI 片段上，其中兩區經序列分析過 (SEQ ID no.15 和 16)。snaC 基因係分殖在 4-kb BamHI-BamHI 片段上，其一部份經序列分析過 (SEQ ID no.7)。

snaA，snaB，snaD，samS，snbC，snbD，和 snbE 等基因的接近性加上 snbA，snbR，papA 和 papM 等基因肯定了鏈革蘭素成份 A 和 B 生物合成基因的群聚局部化。此外，本

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (8)

修正
年 月 日
83.12.32 補充

發明所述 4 種粘接質體也都一起集中在染色體的一區內，該區的大小用脈衝電場電泳予以估計為 200kb，相當於 *Streptomyces pristinaespiralis* 所具總基因體 (7500 kb) 的 3% (實施例 13)。因此，顯然地包圍本發明所鑑定出的基因 (snaA, snaB, snaD, samS, snbC, snbD, 和 snbE; snbA, snbR, papA, 和 papM; snaC) 之區域含有原始黴素生物合成基因群的其他基因，且這些基因可以用來定位出參與鏈革蘭素生物合成的其他基因。

較佳者，本發明主體為選自下列的核苷酸序列：

- (a) snaA (SEQ ID no.2), snaB (SEQ ID no.3), snaC (SEQ ID no.7), snaD (SEQ ID no.8), papA (SEQ ID no.9), papM (SEQ ID no.10), samS (SEQ ID no.4), snbA (SEQ ID no.5), snbC (SEQ ID nos.11和 12), snbD (SEQ ID nos. 13和 14), snbE (SEQ ID nos. 15和 16) 和 snbR (SEQ ID no.6) 等基因的全部或部份。
- (b) 與構成鏈革蘭素生物合成基因群簇及編碼參與鏈革蘭素生物合成中的多肽等的 (a) 中所述基因相鄰接之序段，
- (c) 與上述 (a) 或 (b) 基因的全部或部份雜交且編碼參與鏈革蘭素生物合成的多肽之序列，及
- (d) 從上述 (a)，(b) 和 (c) 等序列因為遺傳密碼簡併衍生之序列。

更佳者，本發明主體為 snaA (SEQ ID no.2), snaB

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (9)

年 月 日	修正
83.12.02	補充

(SEQ ID no.3), snaC (SEQ ID no.7), snaD (SEQ ID no.8), papA (SEQ ID no.9), papM (SEQ ID no.10), samS (SEQ ID no.4), snbA (SEQ ID no.5), snbC (SEQ ID nos. 11和12), snbD (SEQ ID nos. 13和14), snbE (SEQ ID nos. 15 和16), 和 snbR (SEQ ID no.6) 等基因。

本發明的只一主體係有關包含鏈革蘭素生物合成基因的任何重組 DNA。更佳者，其為包括圖 4 到 7 中所示粘接質體 pIBV1, pIBV2, pIBV3 或 pIBV4 等的全部或部份，或與粘接質體 pIBV1到 pIBV4 雜交或與這些粘接質體的片段雜交的序列之全部或部份等之重組 DNA。

於本發明一較佳實施例中，上面所定義的核苷酸序列形成一表現載體 (expression vector) 的一部分，其為可自身複製或整合者。

如上面提及者，雖然本發明係用原始黴素生物合成基因予以更特別地闡述，不過，無疑地，其所得結果可應用於所有的鏈革蘭素。

更特別者，本發明所開發出的用以純化蛋白質或選殖從始旋鏈黴菌生物合成鏈革蘭素所用基因等之技術可以應用於其他生產鏈革蘭素之微生物 (參看表 1)。

亦即，從始旋鏈黴菌純化酵素活性所用技術可用來從另一種產生鏈革蘭素的菌株純化出相同的活性。因此，本發明可經由純化出參與生物合成的蛋白質及隨後利用其 NH₂-端序列合成出可讓對應的基因被選殖之寡聚核苷酸探針等而應用於選殖從任何產生型微生物生物合成鏈革蘭素所用之基因。然後，以染色體行走 (chromosome walking) 鑑定出全部的生物合成基因群。

五、發明說明(10)

年 月 日 修正
83.12.02 補充

此外，從本專利申請案中所述已鑑別出的基因可以經由雜交直接從另一種生產型微生物的DNA選殖出鏈革蘭素生物合成基因。事實上，原始黴素生物合成基因與其他鏈革蘭素生物合成基因可堅強地雜合。因此可以用 sna、snb 或 pap 等基因及其片段，或鄰接於含有如本發明所示者，其他 sna 和 snb 基因的彼等之片段等作為探針(probe)，經由雜交而選殖鏈革蘭素生物合成基因。這是因為下列事實而促成者：1)不同微生物所產生的鏈革蘭素具有相同或類似的構造(參看圖3)，2)鏈革蘭素生物合成的基因都組織成群簇，及3)負責此生物合成的酵素系統對其受質不具絕對的專一性(specificity)。

此外，參與鏈革蘭素生物合成的基因，其選殖也可以用上面所提 sna 或 snb 基因的序列，或這些基因的片段，或鄰接這些基因的片段等所製備成的簡併寡核苷酸來進行。如此，可以挑選基因來進行不同菌株所產生的鏈革蘭素所含成份A和成份B之生物合成。這些菌株可屬於鏈黴菌屬(streptomyces)，也可以屬於其他菌屬(參看表1)。再者，若所用起始菌株的基因體DNA具有不同於鏈黴菌屬中所觀察到的G+C組成時，則所採用的探針可以為使用對於要分離DNA所用菌屬或菌種具偏差專一性的密碼所合成者。

本發明的另一主體係有關上文定義的核苷酸序列經表現所得之多肽。更特定言之，本發明係有關包括 SnaA (SEQ ID no.2)，SnaB (SEQ ID no.3)，SnaC (SEQ ID no.7)，SnaD (SEQ ID no.8)，PapA (SEQ ID no.9)，PapM (SEQ

五、發明說明 (//)

年 月 日 修正
83.12.02 補充

ID no.10), SamS (SEQ ID no.4), SnbA (SEQ ID no.5), SnbC (SEQ ID nos. 11和12), SnbD (SEQ ID nos. 13和14), SnbE (SEQ ID nos. 15和16) 與 SnbR (SEQ ID no.6)等多肽或其衍生物等的全部或部份之多肽。於本發明所用意義中,“衍生物”一詞代表將肽序列的基因和/或化學本質予以改變所得之任何分子。基因和/或化學本質的改變要了解者係指一種或多種殘基的突變,置換,刪除,添加和/或改質。這種衍生物可針對不同目的而產生,例如,特別者,增加該肽對其受質的親和性,改進其生產水平,增加其對蛋白酶的抗拒性,增強和/或改變其活性,或賦與其新穎生物活性等。經由添加所產生的衍生物中,可提及者有,例如,在其一端接著附加的異系部份之嵌合型多肽。衍生物一詞也包括對本發明所述多肽具同系性且源自其他細胞源,特別是源自產生鏈革蘭素的菌株之多肽。

本發明主體也為含有上文所定義的核苷酸序列或載體之任何重組細胞。本發明重組細胞可為真核生物細胞或原核生物細胞。適用的真核生物細胞包括,例如,動物細胞,酵母或真菌等。特別者,以酵母而言,可為釀母菌屬 (Saccharomyces),克魯維酵母菌屬 (Kluyveromyces),畢赤酵母菌屬 (Pichia),許旺酵母菌屬 (Schwanniomyces)或漢遜酵母菌屬 (Hansenula)等菌屬的酵母。至於動物細胞,可為COS, CHO, C127等細胞,鼠蚤 (Xenopus) 卵等。對於真菌,特別要提及者為細單孢子菌屬 (Micromonospora)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

年 月 日 修正
83. 12. 02 補充

， 麴 菌 屬 (*Aspergillus*) 或 木 黴 屬 (*Trichoderma* ssp.) 等。
有 關 原 核 生 物 細 胞， 較 佳 者 為 採 用 下 列 細 菌：放 線 菌 屬，
大 腸 桿 菌， 桿 菌 屬 (*Baxillus*) 及， 特 別 者， 鏈 黴 菌 屬 等。
較 佳 者， 本 發 明 重 組 細 胞 係 選 自 產 生 鏈 革 蘭 素 的 細 胞 (表
1)。 本 發 明 重 組 細 胞 可 以 經 由 能 將 外 來 核 甘 酸 序 列 導 到 一
細 胞 內 的 任 何 方 法 來 取 得。 其 可 為， 特 別 者， 轉 形
(transformation)， 電 轉 化 (electroporation)， 接 合
(conjugation)， 原 生 質 融 合 或 為 諳 於 此 技 者 所 已 知 之 任
何 其 他 技 術。

本 發 明 的 另 一 主 體 為 製 備 參 與 鏈 革 蘭 素 生 物 合 成 的 多 肽
之 方 法， 包 括 將 上 述 重 組 細 胞 予 以 培 養 並 回 收 所 產 生 的 多
肽。

本 發 明 主 體 還 包 括 上 述 重 組 細 胞 在 一 生 物 轉 化 反 應 中 表
現 至 少 一 種 參 與 鏈 革 蘭 素 生 物 合 成 的 多 肽 之 用 途。 特 別 者
， 這 些 細 胞 可 將 鏈 革 蘭 素 轉 化 成 衍 生 形 式。 例 如， 原 始 黴
素 IIB 可 以 用 這 種 方 式 轉 化 成 原 始 黴 素 IIA。 相 同 的 理 則
可 以 應 用 於 任 何 生 物 合 成 中 間 體。 這 些 細 菌 也 可 以 用 來 製
造 具 有 優 勢 藥 學 性 質 的 雜 交 抗 生 素 (Hopwood et al.,
1985a, Hopwood et al., 1985b, Hutchinson et al.,
1989)。 這 些 生 物 轉 換 可 以 用 全 細 胞， 或 該 細 胞 的 無 細 胞 萃
取 物 來 進 行。

本 發 明 的 另 一 主 體 係 有 關 上 述 核 甘 酸 序 列 對 於 擴 大 鏈 革
蘭 素 生 產 的 用 途。 本 發 明 也 有 關 生 產 鏈 革 蘭 素 的 方 法， 包
括 將 一 種 或 多 種 本 發 明 核 甘 酸 序 列 導 入 可 產 生 鏈 革 蘭 素 或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

B7
修正
年 月 日
83.12.02 補充

其潛在前體的細胞內和／或在該細胞內擴大，然後在鏈革蘭素生產條件下培養該細胞，並收取所產生的鏈革蘭素。

參與生物合成的某些基因之過度表現可使生產菌株的鏈革蘭素 A 和／或 B 之產量增加。這種過度生產可以在幾種菌株內進行：可為只產生鏈革蘭素 A 族分子的菌株，或只產生鏈革蘭素 B 族分子的菌株，或可同時產生 A 和 B 兩種成份的菌株。這種過度表現可能導自 A 和／或 B 成份在燒瓶內，或在發酵器內，或在大型工業發酵器內等中的合成水平，因而其產率之增加。此外，參與 A 或 B 成份生物合成中的基因之過度表現也可以藉而改變菌株所產生的 A 和 B 兩成份之%，藉而得到這些分子之間的較佳協合性。再者，從生產鏈革蘭素的微生物分離出來的生物合成基因也可以用來在另一種生產型微生物體內擴大生產。

本發明另一主體為在鏈革蘭素生物合成途徑中的含一步驟被阻斷的細胞之製備方法，包括生產鏈革蘭素的細胞上進行至少一種生物合成途徑基因的突變形成 (mutagenesis)。

較佳者，該突變形成係在活體外 (in vitro) 或就地 (in situ) 進行，包括將標的基因所含一個或多個鹼予以抑制，置換，刪除和／或添加，或經由基因斷裂等。

本發明的另一部份事實上係有關鏈革蘭素生物合成的某一步驟被阻斷的突變體之構成。其有用性在一方面為突突蛋白質機能性之研究，而另一方面為可生產生物合成中間體的菌株之產生。這些中間體可在分離後於適當處予以改

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(14)

年 月 日 修正
83.12.02 補充

質，包括經由在生產培養基中添加特殊成份，或經由在如此突變過的菌株內導入能夠以其受質形式改變該中間體的其他基因等。因此，這些中間體可用化學，生化學，酵素和／或微生物學等手段予以改質。於本發明中，構成始旋鏈黴菌 SP92 菌株的突變株 SP92::pVRC505：在用載體 pDH5 和 snaA 基因內部片段所構成的自殺質體 pVRC505 之 snaA 基因內，將始旋鏈黴菌菌株 SP92 同系整合進去而後分離出來。另外構成下列突變株：SP92 SamS::WamR；SP92::pVRC508；SP92::pVRC 404 和 SP92::pVRC1000（實施例 9）。

因此，本發明也有關鏈革蘭素生物合成中間體的製備方法，包括：

- 依上文所述製備出鏈革蘭素生物合成途徑所含一步驟被阻斷的細胞，
- 培養該細胞，及
- 收取蓄積的中間體。

本發明另有關一種鏈革蘭素衍生分子的製備方法，包括：

- 依上文所述製備出鏈革蘭素生物合成途徑所含一步驟被阻斷的細胞，
- 培養該細胞，及
- 將該細胞所蓄積的中間體於分離培養基之後，於恰當處予以改質。

本發明要用下面的實施例續予闡明，這些實施例係為闡

五、發明說明 (15)

年 月 日 修正
83.12.02 補充

述用而非用以限制本發明者：

附圖表列

- 圖 1：鏈革蘭素 A 成份的構造例。
- 圖 2：鏈革蘭素 B 成份的構造例。
- 圖 3：鏈革蘭素的其他構造例。
- 圖 4：粘接質體 pIBV1 圖式。
- 圖 5：粘接質體 pIBV2 圖式。
- 圖 6：粘接質體 pIBV3 圖式。
- 圖 7：粘接質體 pIBV4 圖式。
- 圖 8：原始黴素 IIA 合成酶所催化的反應。
- 圖 9：3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶所催化的反應。
- 圖 10：SnbC 所催化的反應。
- 圖 11：SnbD 所催化的反應。
- 圖 12：SnbE 所催化的反應。
- 圖 13：SnaC 所催化的反應。
- 圖 14：PapM 所催化的反應。
- 圖 15：質體 pVRC402(A) 和 pVRC501(B) 之圖式。
- 圖 16：質體 pXL2045 的圖式。
- 圖 17：質體 pVRC1105 的圖式。
- 圖 18：質體 pVRC1106 的圖式。
- 圖 19：質體 pVRC1104 的圖式。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(16)

年	月	日	修正
83.	12.	02	補充

TSK G2000 SW管柱(Tosoh, 日本)。

Phenyl Sepharose (Pharmacia)

FMN-瓊脂(Sigma)

Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia)

Sephadex G-25 Fine (Pharmacia)

Centricon 10或30 (Amicon)

Centriprep 10 或 30 (Amicon)

Centrilutor (Amicon)

實施例 1: 始旋鏈黴菌(*Streptomyces*

pristinaespiralis) 菌株 SP92 總 DNA 之分離

本實施例闡述如何純化始旋鏈黴菌 SP92 的 DNA。

始旋鏈黴菌 SP92 菌株係衍生自始旋鏈黴菌 DS5647 菌株(ATCC25486)。

在 50 毫升的 YEME 培養基內 (34% 蔗糖, 5mM $MgCl_2$, 0.25% 甘胺酸 (D. Hopwood et al. 1985)) 中接種 10^8 始旋鏈黴菌 SP92 的孢子, 並將該培養液置於 30℃ 以 280rpm 攪拌培養 40 小時。

收取其菌絲體並用 15 毫升的 10.3% 蔗糖洗滌。用 5 毫升加添 34% 蔗糖的 TE 溶取約 1 克的該菌絲體丸, 並於其中加入 1 毫升濃度為 50 毫克/毫升 10mM Tris-HCl 溶液 pH8.0 的溶菌酶和 1 毫升的 0.25M EDTA pH8.0。於 30℃ 培育 30 到 60 分鐘期間後, 添加 0.8 毫升的 10% Sarkosyl 以澄清該混合物。然後加入 2 毫升的 0.25M EDTA pH8.0, 10 毫升

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(23)

年	月	日	修正
83	12	02	補充

接觸一分鐘。然後進行變性，先將該膜浸漬在0.5M NaOH, 1.5M NaCl 溶液中5分鐘，接著浸漬在3M乙酸鈉溶液中5分鐘以中和之。最後用UV燈照射該膜5分鐘將DNA固定在膜上。

實施例4

4.1 將始旋鏈黴菌 SP92菌株和 SP92衍生菌株的染色體DNA

製備成供脈衝電場電泳所用之嵌入物形式

本實施例係闡述如何將始旋鏈黴菌 SP92菌株和以下述方式由 SP92 衍生的菌株之 DNA 製備成用於脈衝電場電泳的嵌入物形式。

該製備係用於下述方式得到的菌絲體培養物製成者：在含有0.25%甘油的30毫升 YEME 培養基中接種 10^8 個研究菌株的孢子，並將培養物置於250-毫升三角燒瓶中於30℃以280 rpm 攪拌48小時。然後以3800 rpm 離心10分鐘且用10%蔗糖溶液洗兩次而收集該菌絲體。接著將該菌絲體再懸浮於5毫升的溶液I中(250mM EDTA pH8.0, 20.6%蔗糖)。於200微升如此所得菌絲體液中加入保持在42℃的400微升濃度為50毫克/毫升溶液I的溶菌酶溶液及800微升的1% LMP 瓊脂糖/25mM EDTA pH 8/10.3% 蔗糖溶液。然後將保持在42℃的混合物倒在特殊蟻築菌巢(comb)的洞中，用膠帶密封後，保持在4℃ 30分鐘。該混合物會固化，再小心地從模子內取出如此所得且裝在洞中的30到40個嵌入物。

先將該嵌入物置於4℃，含有25mM EDTA和10.3%蔗糖的

五、發明說明(2)

年 月 日 修正
83.12.02 補充

System”。

電泳移動參數，例如脈衝時間和移動期間等都加以變動以得到尺寸在10到2500kb之間的DNA片段之最佳分離。使用三種移動條件，如下所述：要分離尺寸在200到1700kb的大片段時，所選移動期間為40小時，脈衝時間為90秒，要分離尺寸在50到400 kb之間的片段時，所選移動期間為20小時，脈衝時間為10秒，接著20小時，脈衝時間為30秒；最後，要分離尺寸在10kb到200 kb之間的較小片段時，所選移動期間為24小時，脈衝時間為10秒。對於這三種移動條件，其電壓係設定在固定的150伏，溫度保持在13℃且所用電泳凝膠含有1.3%的瓊脂糖。

將含有始旋鏈黴菌SP92菌株和SP92衍生菌株所具染色體DNA的嵌入物依上文所述用限制酵素予以消化後，用兩片手術刀片放置在電泳凝膠的洞中。所用分子量標示物為New England Biolabs公司所售的“酵母染色體PFG標示物”和“Lambda Ladder PFG標示物”。在上述條件之一下進行移動後，將凝膠置於濃度為4微克／毫升的ETB(溴化乙錠)浴中染色20分鐘，再於水中褪色20分鐘。將凝膠照相後，即將該DNA片段轉移到尼龍膜上，依實施例9.1所述與 $[\alpha - ^{32}P]$ dCTP- 標示探針雜交。

實施例5：載有對參與鏈革菌素生物合成的純化蛋白質編碼的基因之粘接質體的分離

本實施例說明如何用參與原始黴素生物合成且其NH₂-端序

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (>6)

年 月 日	修正
86.5.13	補充

列或內部序列已確定的純化蛋白質從上面所製基因體庫分離出載有該相同蛋白質的構造基因之粘接質體，或者從該粘接質體所載諸基因中鑑別出對應的構造基因且係已經序列分析過者。

5.1 載有原始黴素 IIA 合成酶兩個次單元的一個或兩個構造基因的粘接質體 pIBV1 和 pIBV3 之分離

5.1.1. 參與原始黴素 II 合成最後步驟的蛋白質之一：原始黴素 IIA 合成酶之鑑定和分離

如緒論中所述及者，原始黴素 IIA 合成的最後步驟係對應於 D-脯氨酸的 2,3 鍵氧化成為脫氫脯氨酸。負責此活動的蛋白質已純勻到具均一性，如本發明所闡述者。

5.1.1.A 原始黴素 IIA 合成酶活性分析

本實施例闡述原始黴素 IIA 生物合成途徑中一種尚未述及的活性之分析，該活性具有只在原始黴素產生期間才表現出的值得注意之性質。該標的酵素為原始黴素 IIA 合成酶，其係經由將原始黴素 IIB 所含 D-脯氨酸殘基在分子氧和 FMNH₂ 存在下氧化成 2,3-脫氫脯氨酸殘基而將原始黴素 IIB 轉化成原始黴素 IIA (圖 8)。將欲分析的酵素份液 (0.002 到 0.005 單位) 在總體積為 500 微升含有 NADH (550 μ M), FMN (5 μ M), 原始黴素 IIB (20 μ M) 和 0.02 單位的 FMN 還原酶 (Boehringer Mannheim) 等的 50mM bis-tris 丙烷緩衝液，pH 6.8 中，於 27℃ 下培育 1 小時。

於培育後，添加 500 微升的 0.1N 鹽酸和 500 微升的乙腈

五、發明說明(28)

年 月 日 修正
83.12.02 補充

蛋白質。將含有酵素活性(依實施例 5.1.1.A 中所述分析法探測者)的液份集中後,在 Centriprep 10 上濃縮到 20 毫升。於用一體積含有 2M 硫酸銨的 pH6.8 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 / 1mM DTT 稀釋之後,將蛋白質安排在 Phenyl Superose HR 10/10 管柱上用遞減硫酸銨梯度(1.0M 到 0M)進行層析分離(每次注射 22.5 毫克)。將含有所欲活性的最佳液份集中,在 Centriprep 10 上再濃縮到 1 毫升,然後,加在 Bio-Sil SEC 250 管柱上(每次注射 200 微升)。在此技術中探測到的活性尖峰出現在以 77,000 為中心的分子量處。將含有活性的液份注射到處於 pH6.8 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 / 1mM DTT 中的 MonoQ HR 5/5 管柱上,用線型 KCl 梯度(0 到 0.5M)洗提。

在此步驟之後,該酵素即為純者,且在 SDS-PAGE 電泳中,探測到出現於分子量估測為 35,000 和 50,000 處之兩個次單元。其可在 25-公分 Vydac C4 管柱上,用含有 0.07% 三氟乙酸的 30 到 50% 乙腈 / 水線型梯度洗提而分離開。

表 1: 原始黴素 IIA 合成酶之純化

純化步驟	體積 (毫升)	蛋白質 (毫克)	比活性 $\mu\text{mol/h/mg}$	產率 (%)	純化倍數
粗萃取物	490	1690	0.14	100	1
40-55% 硫酸銨	60	1050	0.19	85	1.4
MonoQ 10/10	95	45	3.0	58	21

五、發明說明 (30)

修正
年 月 日
83.12.02 補充

T A P I L V A T L D T R G P A A T L G T I T(R) A V(R) A A E A

此外，將 SnaA 和 SnaB 用胰蛋白酶消化並將所得片段在 Vydac C18 HPLC 管柱上純化後，測定在這個多肽內部的序列。得到下列內部序列：

蛋白質 SnaA：（參看 SEQ ID no.2 上的殘基 365 到 384）

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

蛋白質 SnaB：（參看 SEQ ID no.3 上的殘基 122 到 136）

G L(-) D S E D D D A F V H D R

從 SnaA 和 SnaB 兩蛋白質內部片段序列下面劃線區，及根據對鏈黴菌屬具專一性的遺傳密碼之簡併性（參看實施例 8），用 Biosearch 8600 自動合成器合成下面劃線區，及根據對鏈黴菌屬具專一性的遺傳密碼之簡併性（參看實施例 8），然後用已及過的技術予以純化（Sawadogo M. 和 Von Dyke M.W., 1991）。SnaA 和 SnaB 兩基因分別代表 SnaA 和 SnaB 兩蛋白質的構造基因。

對應於 SnaA 內部序列底下劃線部份的混合物：

ATC GAC TTC CCC TAC CTC CCC GG

T T G T G G

A

T

對應於 SnaB 內部序列底下劃線部份的混合物：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(71) 83.12.02 補充

TTC GAC GAT GAT GCA TTC GTC CAT GAC

C C T G C

C

G

5.1.3 合成寡核苷酸混合物的標示及與 SP92 菌株基因體 DNA 庫的雜交

本實施例說明對原始微素生物合成基因具專一性的寡核苷酸如何給予放射性標示後與其上面已轉移上始旋鏈微菌 SP92 基因體庫 DNA 的膜雜交。

用 T4 聚核苷酸激酶 5'-末端位置轉移 ATP 的 [γ - ^{32} P]-磷酸根而將該寡核苷酸標示住。該標示操作係依 Maniatis et al. (1989) 所述進行者。於標示之後，該寡核苷酸即不再純化而逕付使用。

將約 2 x 500 毫微克的每一份寡核苷酸混合物以這種方式用 ^{32} P 標示後，即用來分別雜交兩個庫。

每一庫的薄膜之雜交操作係根據 Meinkoth, J. 和 Wahl, G. (1984) 及 Hames, B.D. 和 Higgins S.J. (1985) 所開發的方案衍生出的程序而進行：將 15 片薄膜在 50℃ 下於 40 毫升含有下列成份的溶液中進行預雜交 3 小時：Denhardt (x5) [Denhardt] (x100)：2% (w/v) Ficoll, 2% (w/v) 聚乙基吡咯烷酮，2% (w/v) BSA, SSC (x5) [SSC (x20)：3M NaCl, 0.3M 檸檬酸鈉]，50mM NaPO₄ pH6.5, 0.1% SDS, 250 微克／毫升的鮭魚精子 DNA 等。

然後於 50℃ 在 20 毫升另含 500 毫微克標示寡核苷酸的相

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

修正
年 月 日
83.12.02 補充

同溶液中進行雜交隔夜。

之後，將該濾器置於 SSC(x6) 和 0.5% SDS 溶液中，於室溫下洗 30 分鐘洗兩次，接著實驗地在逐漸增高的溫度（50 到 65℃）下洗清之。後述洗清的溫度在相繼的自動放射線攝影曝光後要逐漸增加以測定與寡核苷酸混合物雜交的菌系之專一性。

5.1.4 粘接質體 pIBV1 和 pIBV3 之分離及含有 *snaA* 和 *snaB* 基因的區段之測定

本實施例闡述如何分離出依實施例 3 所構成含有原始微生物合成基因的粘接質體。

分別從菌株 HB101 所產生的庫和從菌株 DH1 所產生的庫所得兩系分離出粘接質體 pIBV1 和 pIBV3，其中，對於 pIBV1，係同時與兩份寡核苷酸混合物雜交，而對於 pIBV3，則係與源自蛋白質 *SnaA* 內部序列的寡核苷酸混合物雜交。

將這些粘接質體依實施例 2 所述予以純化。粘接質體 pIBV1 和 pIBV3 分別含有其大小經估測為 30kb 和 34kb 的始旋鏈細菌 SP92 所含基因體 DNA 嵌入物。然後，用不同的限制酵素根據供應商 (New England Biolabs, Beverly, MA./ 01915-5510, USA) 的程序進行消化而建立其基因圖 (圖 4 和 6)。

利用不同酵素消化過的 pIBV1 和 pIBV3 DNA 與寡核苷酸混合物進行南方雜交可用來鑑定該粘接質體含有 *SnaA* 和 /

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (33)

83.12.02 ^{B7}	修正 補充
------------------------	----------

或 SnaB 基因的區段。

南方雜交係根據 Maniatis et al. (1989) 所述進行者。在 0.8% 瓊脂糖凝膠上電泳分離出限制片段之後，將 DNA 移置於 Biohyllon Z⁺ 膜上 (Bioprope System)。依此轉置於膜上的 DNA 再依實施例 5.1.3 所述與寡核苷酸混合物進行雜交。

這些南方雜交結果證明粘接質體 pIBV1 具有一 6-kb BamHI 片段，其中含有與實施例 5.1.2 所合成的探針同系之序列，且另具有一在 BamHI 片段內部的 2.5-kb EcoRI 片段，其中含有與完全源自蛋白質 SnaA 的探針相同系之序列。此外，用粘接質體 pIBV3 得到的雜交訊號顯示其只具有該含有與完全源自蛋白質 SnaA 的探針相互同系的序列之 2.5-kb EcoRI 片段。

5.2. 含有 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶 (snbA) 構造基因的粘接質體 pIBV2 之分離

本實施例闡述如何得到如實施例 3 所構成的含有至少一個原始黴素 I 生物合成基因之粘接質體。

5.2.1 參與 3-羥基吡啶羧酸活化的蛋白質之鑑定與純化

本實施例闡述如何從始旋鏈黴菌 SP92 將促成 3-羥基吡啶羧酸活化的蛋白質純化到呈均一性。

5.2.1.A. 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶之分析

本實施例闡述原始黴素 IA 生物合成途徑中一種尚未被述及過的活性之分析，該活性具有只在原始黴素產生期間才表

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(36)

修正
年 月 日
83.12.02 補充

，再用線型 KCl 梯度（0 到 0.4M）洗提之。合併活性液份，在 Centricon 10 上濃縮到 1 毫升，用 3 體積的 pH6.8 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 / 4mM DTE / 1mM 苯甲脒 / 1mM PMSF / 15% v/v 甘油稀釋後，注射到處於後述緩衝液中的 Mono Q HR 5/5 管柱上（每次注射 2 毫克），再用線型 KCl 梯度（0 到 0.3M）洗提之。將含有所欲連接酶的最佳液份集中後，置於 pH6.8 20mM 磷酸鈉緩衝液 / 50mM 硫酸鈉中加到 Bio-Sil SEC 250 管柱上。在此技術中偵測到的活性尖峰係在以 60,000 為中心的分子量處。

具有 3-羥基吡啶羧酸活化活性的蛋白質於後文稱之為 SnbA。

在此步驟之後，該酵素即為純者，且在 SDS-PAGE 電泳中，其分子量經估測約為 67,000。

表 2：3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶之純化

純化步驟	體積 (毫升)	蛋白質 (毫克)	比活性 $\mu\text{mol/h/mg}^{\text{A}}$	產率 (%)	純化倍數
粗萃取物	246	2050	(0.06)		
Q Sepharose	40	188	0.47	100	1
Phenyl Sepharose	70	35	2.21	88	4.7
Superose 12	16	17	2.03	39	4.3
MonoQ pH 8.0	4.5	9.0	2.09	21	4.5
MonoQ pH 6.8	1.0	2.0	2.9	6.6	6.2
Bio-Sil 250	2.5	0.23	12.4	3.2	26

五、發明說明(

修正
83.12.02 補充

。粗萃取物中的活性由於對 3-羥基吡啶羧酸不具專一性的焦磷酸根與 ATP 之間的交換作用而無法 3 帆地測量。

純化倍數係從純化過程中諸液份所具比活性的增加值計算得者。

5.2.2 用蛋白質序列製備寡核苷酸：

本實施例說明如何用 3-羥基 38 吡啶羧酸：AMP 連接酶蛋白質的 NH₂-端和內部兩序列來合成寡核苷酸。

蛋白質 SnbA 的 NH₂-端序列係依實施例 5.1.2 中所述經由微序列分析推演出來。以這種方式鑑定出約 20 個殘基。

在用胰蛋白酶水解和將所得片段在 Vydac C18 HPLC 管柱上純化後，也鑑定出在蛋白質 SnbA 內部的一段約 20 個胺基酸之序列。

蛋白質： 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶之 NH₂-端序列：

(參看 SEQ ID no.5 上的殘基 1 到 21)

M L D G S V P W P E D V A A K Y R A A G Y

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (38)

修正 年 月 日 83.12.02 補充

蛋白質：3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶的內部序列：
(參看 SEQ ID no. 5 上的殘基 448 到 467)

V S A (-) E V E G H L G A H P D V Q Q A A

從每一序列中底下列線的區段，並根據對鏈黴菌屬具專一性的遺傳密碼簡併性（參看實施例 8），而合成下列寡核苷酸混合物：

對應於蛋白質 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶 NH₂-端序列中
底下劃線部份之混合物：

5' 3'

GTC CCC TGG CCC GAG GAC GTC GCC GCC AAG TAC

G G G G G G

對應於蛋白質 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶內部序列中底
下劃線部份的混合物：

5' 3'

GAG GTC GAG GGC CAC CTC GGC GCC CAC CCC GAC GTC CAG CAG GC

G G G G G G G

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(29)

修正
83.12.02 補充

5.2.3 合成寡核苷酸混合物的標示及始旋鏈黴菌 SP92 基因體 DNA 庫的雜交

本實施例說明如何將對於原始黴素 生合成基因具專一性的寡核苷酸予以放射性標示且隨後與已轉置始旋鏈黴菌基因庫 DNA 於其上的膜雜交。

該寡核苷酸的標示係經由用 T4 多核苷酸激酶，係實施例 5.1.3 所述在 5' - 端位置轉移 ATP 的 [γ ' - ^{32} P] 磷酸根而進行的。

約 2×500 毫微克的各寡核苷酸混合物係以這種方式用 ^{32} P 標示並用以分別雜交該兩基因體庫。

對各庫的膜之雜交係依實施例 5.1.3 所述實施。

5.2.4 粘接質體 pIBV2 的分離及含有 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶構造基因的區段之測定

本實施例闡述如何得到如實施例 3 所構成且至少含有 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶構造基因之粘接質體。

從同時和兩種寡核苷酸混合物雜交的大腸桿菌 DH1 菌株所產生的基因庫系分離出粘接質體 pIBV2。

依實施例 2 中所述純化該粘接質體。其含有始旋鏈黴菌 SP92 的基因體 DNA 嵌入物，其大小估計為 47kb。依實施例 5.1.4 所述用不同的限制酵素予以消化而建立其基因圖（圖 5）。

pIBV2 DNA 用不同酵素消化過後與寡核苷酸混合物進行南方雜交可鑑定出含有 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶構造

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(40)

年	月	日	修正
83	12	02	補充

基因之區段。南方點染分析與雜交皆係依實施例 5.1.4 所述而實施者。

雜交結果證明粘接質體 pIBV2 具有一含有與實施例 5.2.2 合成的探針相同系的序列之 5.5-kb EcoRI-BglII 片段。

5.3. 粘接質體 pIBV3 上含有一部份的原始黴素 I 合成酶 II (SnbC) 構造基因之證明

本實施例闡述如何在已分離出的粘接質體 (實施例 5.1) 上鑑定原始黴素 I 生物合成基因之存在。

5.3.1 參與將蘇胺酸和胺基丁酸殘基摻合到原始黴素 IA 肽鏈中的步驟之原始黴素 I 合成酶 II 之鑑定

本實施例闡述如何從始旋鏈黴菌 SP92 將負責將蘇胺酸和胺基丁酸殘基摻到原始黴素 IA 肽鏈中的蛋白質純化到具均一性。

5.3.1.A 原始黴素 I 合成酶 II 部份活性之分析

本實施例闡述尚未被提及的原始黴素 IA 生物合成途徑所含活性的分析，該活性具有只在原始黴素產生期間才表現之顯著性質。該標的活性為負責將蘇胺酸和胺基丁酸兩殘基於 ATP 和 $MgCl_2$ 存在下摻合到原始黴素 IA 肽鏈中的肽合成酶之部份活性 (圖 10)。

蘇胺酸：AMP 連接酶和胺基丁酸：AMP 連接酶兩活性是用類似於 5.2.1.A 中對 3-羥基吡啶羧酸：AMP 連接酶所說

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(44)

修正
83.12.01 補充

表 3：原始黴素 I 合成酶 II 之純化

純化步驟	體積 (毫升)	蛋白質 (毫克)	比活性 ^a (單位/毫克)	產率 (%)	純化倍數
粗萃取物	445	4700	(1)	-	-
Q Sepharose	308	834	7	100	1
Superdex 200	120	105	22	40	3.1
HonoQ HR	15	11.5	96	19	14
Superose 6	7.5	2.8	122	6	17

^a 粗萃取物的活性法正確測得。

純化倍數是用純化過程中各部份的比活性增加值計算而得者。

5.3.2 用蛋白質序列製備寡核苷酸

本實例說明如何用原始黴素 I 合成酶 II 的内部序列合成寡核苷酸。

負責將蘇胺酸和胺基丁酸殘基摻加到原始黴素 IA 肽鏈中的肽合成酶所含内部序列在經胰蛋白酶水解和所得片段在 Vydac C18 管柱上純化之後，依實施例 5.1.2 所述經由微序列分析而推衍出來。

蛋白質：原始黴素 I 合成酶 II 内部序列

(參看 SEQ ID no.12 上的殘基 49 到 61)

五、發明說明 (45)

修正 83.12.02 補充

1	5	10		
L	A	A	F	N
D	T	A	R	P
V	P	R		

1	5	10	15	20
V	P	A	A	F
V	P	L	D	A
L	P	L	T	G
N	G	V	L	D

從這些序列底下劃線部份及根據對鏈黴素具專一性的遺傳密碼之簡併性 (參看實施例 8)，而合成下列寡核苷酸混合物：

對應於蛋白質原始黴素 I 合成酶 II 內部序列 1 底下劃線部份的混合物：

5'								3'
	GCC	GCC	TTC	AAC	GAC	ACC	GCC	CGC
	G	G				G	G	G

對應於蛋白質原始黴素 I 合成酶 II 內部序列 2 底下劃線部份的混合物：

5'								3'
	TTC	GTC	CCC	CTC	GAC	GCC	CTC	CCC
	G	G	G		G	G	G	

5.3.3. 合成寡核苷酸混合物之標示和粘接質體 pIBV3

DNA 之南方雜交

本實施例說明如何將對原始黴素 I 生物合成基因具專一性的寡核苷酸予以放射性標示及隨後與已轉置粘接質體 pIBV3 DNA 的膜進行雜交。

五、發明說明 (46) 修正
83.12.02 補充

寡核苷酸的標示係依 5.1.3 中所述用 T4 多核苷酸激酶在 5' - 端位置的 ATP [γ - ^{32} P] 磷酸根進行轉移而成者。

將約 500 毫微克的寡核苷酸混合物以這種方式用 ^{32} P 標示後，與用不同酵素消化過的 pIBV3 DNA 進行南方雜交。這些雜交結果證明粘接質體 pIBV3 載有原始黴素 I 合成酶 II 構造基因的一部份，並鑑定出含有該基因的區段。南方點染和雜交皆依實施例 5.1.4 所述實施之。

雜交結果證明粘接質體 pIBV3 具有一 6.2-kb 含有與實施例 5.3.2 合成的探針相同系的序列之 SphI 片段。

5.4 粘接質體 pIBV3 上含有原始黴素 I 合成酶 III (SnbD) 一部份構造基因之證明

本實施例闡述如何鑑定已分離的粘接質體上含有原始黴素 I 的生物合成基因 (實施例 5.1)。

5.4.1 參與將脯胺酸和對 - 二甲胺基苯丙胺酸殘基添加到原始黴素 IA 肽鏈中的原始黴素 I 合成酶 III 之鑑定

本實施例闡述如何從始旋鏈黴菌 SP92 將負責將脯胺酸和對 - 二甲胺基苯丙胺酸殘基添加到原始黴素 IA 肽鏈中的蛋白質純化到具均一性。

5.4.1.A. 原始黴素 I 合成配 III 部份活性之分析

本實施例闡述尚未被述及的原始黴素 IA 生物合成途徑中所

五、發明說明(17)

年 月 日 修正
83.12.02 補充

在此階段，該酵素也能夠與脯胺酸形成腺苷酸；探測該酵素與氘化脯胺酸的胺基酯化反應，在 $200 \mu\text{Ci}/\text{毫升}$ $[5-^3\text{H}]\text{-L-脯胺酸}$ ($34 \text{ Ci}/\text{毫莫耳}$) 存在下，其最大活性為 $2490 \text{ pmol}/\text{mg}/15\text{分}$ 。

表 4：原始黴素 I 合成酶 III 之純化

純化步驟	體積 (毫升)	蛋白質 (毫克)	比活性 ^a (單位/毫克)	產率 (%)	純化倍數
粗萃取物	800	8100	(4)	-	-
35% 硫酸銨	200	4000	(6)	-	-
Q Sepharose	132	498	46	100	1
Superdex 200	45	39.5	417	71	9
MonoQ HR	9	5.3	1070	25	23

^a 粗萃取物中及硫酸銨沈澱之後的活性無法正確地測得。

純化倍數是從純化過程中各部份的比活性增加值計算而得者。

5.4.2 用蛋白質序列製備寡核苷酸

本實施例說明如何用原始黴素 I 合成酶 III 的內部序列合成寡核苷酸。

負責將脯胺酸和對二甲胺基苯丙胺酸殘基摻加到原始黴素 IA 肽鏈中的肽合成酶所含內部序列是在溴化氫處理及在

五、發明說明(56)年 月 日 修正

83.12.0 補充

170,000 的單一放射性電泳帶。

表 5：原始黴素 I 合成酶 IV 之純化

純化步驟	蛋白質 (毫克)	比活性 (cpm/mg) ^a	蛋白質 (毫克)	純化倍數
粗萃取物	2200	3.6	-	-
MonoQ 16/10	136	58	100	16
Phenyl Superose	32.6	175	72	49
Superdex 200	3.1	870	34	240
MonoQ 5/5	2.0	1000	25	280
雷洗提 SDS-PAGE	0.1	-	-	-

- 粗萃取物因其中高含量的非-苯甘胺酸-相關性 ATP-焦磷酸鹽交換，所以無法正確地測量其比活性。比活性值是用第一層析分離步驟出來時所表現的單位值相對於粗萃取物所含蛋白質的量計算得利者。

5.5.3. 原始黴素 I 合成酶 IV 所帶其他活性

實施例 5.5.2. 中所述負責摻加苯甘胺基的肽合成酶之純化導致分子量 170,000 的純蛋白質。該蛋白質不會活化受試的其他胺基酸，尤其是六氫吡啶羧酸或 4-氧六氫吡啶羧酸。在 5.5.1.B 所述條件但省卻 phenyl Superose 步驟下

五、發明說明 (50)

年 月 日 修正
83. 12. 02 補充

蛋白質原始黴素 I 合成酶 IV 的内部序列

(參看 SEQ ID no.16上的殘基82到98)

1 5 10 15

V T V F L N N T R L I O N F R P R - F - GD

用該序列中的底下劃線區段及根據對鏈黴菌屬特具的遺傳密碼簡併性（參看實施例8），合成下列寡核苷酸混合物：

對應於蛋白質原始黴素 I 合成酶 IV 內部序列中底下劃線部份的混合物：

```

5'                                     3'
ACG CGC CTC ATC CAG AAC TTC CGC CC
      C       G       G                               G
              T                                       T

```

5.5.5. 合成寡核苷酸混合物之標示及粘接質體 pIBV3

DNA 之南方雜交

本實施例說明如何將對原始黴素 I 生物合成基因具專一性的寡核苷酸予以放射性標示，然後與已轉置粘接質體 pIBV3 DNA 於其上的薄膜雜交。

該寡核苷酸的標示係依 5.1.3. 中所述用 T4 多核苷酸激酶

五、發明說明(59)修正
 年 月 日
 83.12.02 補充

轉移在 5'-端位置的 ATP [γ - ^{32}P] 磷酸根而進行者。

約 500 毫微克的寡核苷酸混合物以這種方式用 ^{32}P 標示後，用於已用不同酵素消化過的 pIBV3 DNA 之南方雜交。這些雜交結果證明粘接質體 pIBV3 載有一部份的原始黴素 I 合成酶 II 的構造基因，並因此鑑定出含有該基因的區段。南方點染和雜交皆係依實施例 5.1.4. 中所述進行者。

雜交結果證明粘接質體 pIBV3 具有一段 6.6-kb，含有對實施例 5.5.2. 所合成的探針具同系性之 SphI 片段。

5.6. 含有 FMN 還原酶 (snaC) 構造基因的粘接質體 pIBV4 之分離

本實施例闡述如何得到如實施例 3 所構成含有至少一個 PII 生物合成基因之粘接質體。

5.6.1. 與原始黴素 IIA 合成酶相關聯的 FMN 還原酶之鑑定

本實施例闡述如何從始旋鏈黴菌 SP92 將原始黴素 IIA 合成酶催化的反應所需促成 FMN 被 NADH 還原而形成 FMNH₂ 之蛋白質純化到具均一性。

5.6.1.A FMN 還原酶活性之分析

本實施例闡述一種尚未被述及的原始黴素 IIA 生物合成途徑所含活性之分析；該活性具有只在原始黴素生產期間才表現出之顯著性質。該標的酵素為 FMN 還原酶，也稱為 NADH:FMN 氧化還原酶，其係在 NADH 存在下催化 FMN 變成

五、發明說明 (50) 年 月 日 修正
83.12.02 補充

FMNH₂ 的還原反應者 (圖 13)。他處亦有述及可催化對 NADH 或 NADPH 具專一性或其他方面且與其他生物合成途徑相關聯的相同反應之 FMN 還原酶 (Duane et al., 1975; Jablonski et al., 1977; Watanabe et al., 1982)。

使用兩種分析來探測該活性：

第一種係基於與實施例 5.1.1 中所述原始黴素 IIA 合成酶之耦合，且用於最先的純化步驟中。將欲分析的酵素部份 (0.002 到 0.005 單元) 於總體積為 500 微升含有 NADH (500 μ M)，FMN (2 μ M)，原始黴素 IIB (20 μ M) 和 0.01 單元的實施例 5.1.1 所述原始黴素 IIA 合成酶等之 50mM bis-tris 丙烷緩衝液 pH 6.8 中，於 27°C 下培育 1 小時。所形成的原始黴素 IIA 則依實施例 5.1.1.A 中所述以 HPLC 分析之。

酵素活性單位定義為在上述條件下每分鐘合成 1 微莫耳原始黴素 IIA 所需的酵素量。

第二種分析為分光光度計分析，只能用於至少部份純化過的部份。將欲分析的酵素部份 (0.006 到 0.030 單位) 置於總體積為 3 毫升含有 NADH (500 μ M) 和 FMN (2 μ M) 的 50M bis-tris 丙烷緩衝液 pH 6.8 中，於 27°C 下培育 13 分鐘。於 7 分鐘培育時間後，每一分鐘間隔對沒有裝酵素的參考小瓶讀取 6 個在 340nm 測取的光密度讀值。單位為微莫耳 / 分的活性係將每分鐘光密度減少值的斜率除於 6.2 因數 (一莫耳 NADH 在 340nm 的光密度) 而計算得者。

酵素活性單位的定義為在上述條件下每分鐘消耗掉 1 微

五、發明說明 (〇修正
年 月 日
83.12.02 補充)

表 6：FMN 還原酶之純化

純化步驟	體積 (毫升)	蛋白質 (毫克)	比活性 ^{a,b} (單位/毫克)	產率 (%)	純化倍數
粗萃取物	1620	5100	0.004 ^a	100	1
40-75% 硫酸銨	155	2930	0.005 ^a	68	1.2
Q Seph. pH 6.8	357	180	0.058 ^a	49	14
Q Seph. pH 8.2	153	15	0.36 ^a	25	85
MonoQ HR 10/10	1.0	8	0.50 ^a 4.4 ^b	19	120
Superdex 75	1.5	3.1	7.4 ^b	12	200
FMN-瓊脂糖	7.5	0.28	96 ^b	14	2600
MonoQ HR 5/5	3.0	0.29	68 ^b	11	1900
Bio-Sil 125	7.5	0.18	106 ^b	10	2900

^a 耦合到原始黴素 IIA 合成酶之分析

^b 分光光度分析法

純化倍數是從純化中各部份的比活性增加值計算得到者

5.6.2 用蛋白質序列製備寡核苷酸

本實施例說明如何用蛋白質 FMN 還原酶的 NH₂-端序列和內部序列來合成寡核苷酸。

五、發明說明 (54)

修正 補充
83.12.02

FMN 還原酶的 NH₂-端序列係用實施例 5.1.2 中所述經由微序列分析法推衍出來的。以這種方式鑑定出約 30 個殘基。

(從第 4 和第 11 兩殘基開始的兩 NH₂-端序列也在被序列分析的樣品中出現)。

在 FMN 還原酶內部分別具有 13 和 21 個胺基酸的兩段序列也在胰蛋白酶水解和在 Vydac C18 管柱上純化所得片段後鑑定出來。

蛋白質 FMN 還原酶的 NH₂-端序列

(參看 SEQ ID no.7 上的殘基 2 到 25)

1	5	10	15	20	25
T G A D D P A R P A V G P Q S <u>F R D A M A Q L A S P V</u>					

蛋白質 FMN 還原酶的內部序列

(參看 SEQ ID no.7 上的殘基 102 到 122)

1	5	10	15	20
<u>F A G G E F A A W D G T G V P Y L P D A K</u>				

(參看 SEQ ID no.7 上的殘基 149 到 161)

1	5	10
<u>T G D P A K P P L L W Y R</u>		

從每一序列的底下劃線區段及根據鏈黴菌屬特具的遺傳密碼簡併性 (參看實施例 8)，合成下列寡核苷酸混合物：

五、發明說明() 修正

年 月 日
83.12.02 補充

對應於蛋白質FMN 還原酶的NH₂-端序列

5' 3'
TTC CGC GAC GCC ATG GCC CAG CTC GC
G G G G

對應於蛋白質FMN 還原酶的內部序列：

5' 3'
TTC GCC GGC GGC GAG TTC GCC GCC TGG GAC GGC ACC GG
G G G G G G

5' 3'
GAC CCC GCC AAG CCC CCC CTG CTG TGG TAC CG
G G G G C C

5.6.3. 合成寡核苷酸混合物之標示及始旋鏈黴菌SP92基因體DNA庫之雜交

本實施例說明如何將對原始黴素生物合成基因具專一性的寡核苷酸予以放射性標示，然後與已轉置始旋鏈黴菌基因體庫DNA於其上的薄膜雜交。

寡核苷酸的標示係依實施例5.1.3中所述，用T4多核苷酸激酶在5'-端位置轉移ATP[γ -³²P]磷酸根而進行者。

以這種方式將約2×500毫微克的每一寡核苷酸混合物用³²P標示，並用以雜交兩個基因體庫：

五、發明說明(66)

修正
83.12.02 補充

各基因體庫的膜係依實施例 5.1.3 中所述進行雜交者。

5.6.4 粘接質體 pIBV4 的分離和含有 FMN 還原酶構造基因 (snaC) 的區段之測定

粘接質體 pIBV4 係從大腸桿菌 HB101 菌株所產生的基因庫系分離出來者；該 HB101 菌株係與所有三種寡核苷酸混合物同時雜交者。

該粘接質體係依實施例 2 中所述純化出。其中含有始旋鏈黴菌 SP92 的基因體 DNA 嵌入物，其大小估計為 48kb。根據實施例 5.1.4 中所述，從不同限制酵素的消化物建立其基因圖（圖 7）。

pIBV4 DNA 用不同酵素消化後與寡核苷酸混合物進行南方雜交可鑑定出含有 FMN 還原酶構造基因，snaC，的區段。南方點染和雜交都是依實施例 5.1.4 中所述進行者。

雜交結果證明粘接質體 pIBV4 具有一段 4-kb 含有與實施例 5.6.3 合成的探針相同系的序列之 BamHI-BamHI 片段。

5.7 粘接質體 pIBV2 上含有對 - 胺基苯丙胺酸 (苯基 -N) - 甲基轉移酶構造基因之證明

本實施例闡述如何用純化蛋白質從已依實施例 6.7 和 7.8 中所述分析及序列分析過且依實施例 11 中所述在大腸桿菌中表現過之諸基因中鑑定出對應的構造基因。

5.7.1 參與將對 - 胺基苯丙胺酸甲基化成為對 - 二甲胺基苯丙胺酸的步驟之蛋白質的鑑定和純化

五、發明說明 (67)

修正
83.12.02 補充

本實施例說明如何從始旋鏈黴菌 SP92 菌株將促成對 - 胺基苯丙胺酸甲基化成為對 - 二甲胺基苯丙胺酸的蛋白質 [對 - 胺基某苯丙胺酸 (苯基 - N) - 甲基轉移酶] 純化到具均一性，及如何也從重組大腸桿菌菌株得到該純蛋白質。

5.7.1.A. 對 - 胺基苯丙胺酸甲基化成為對 - 甲胺基苯丙胺酸的活性分析及對 - 甲胺基苯丙胺酸甲基化成為對 - 二甲胺基苯丙胺酸的活性分析

本實施例闡述原始黴素 IA 所含一種成份，對 - 二甲胺基苯丙胺酸生物合成中所含兩種末端活性之分析。這些活性係尚未被提及過者，且具有只在原始黴素生產期間才表現之顯著性質。其一係對 - 胺基苯丙胺酸經甲基化成為對 - 甲胺基苯丙胺酸 (甲基化 1) 而其二為對 - 甲胺基苯丙胺酸經甲基化成為對 - 二甲胺基苯丙胺酸 (甲基化 2)，這兩種活性都使用 SAM 作為甲基供體 (圖 14)。

將欲分析的酵素部份 (1 到 20 單元) 置於總體積為 200 微升含有其甲基已有碳原子同位素 14 予以放射性標示過 (2 Ci/莫耳) 的 SAM ($200 \mu \text{M}$) 之 pH 6.8 50mM bis-tris 丙烷緩衝液中，在對 - 胺基-L-苯丙胺酸 (1 mM) 存在下，於 27°C 培育 30 分鐘以進行甲基化 1 的分析，或者，在對 - 甲胺基-L-苯丙胺酸 (2.5 mM) 存在下進行甲基化 2 之分析。

之後，添加 16 微升的 37% 鹽酸，然後 $20 \mu \text{l}$ 濃度為 240 克/升的庚烷磺酸鈉以停止該反應。於離心後，將 150 微升的上澄液注射到處於下列梯度方式的 HPLC 系統中：

- 移動相：洗提劑 A = 1.2 克庚烷磺酸鈉 + 2.5 毫升冰醋酸

五、發明說明 (72)

修正
83.12.02 補充

表 7: 將對 - 胺基苯丙胺酸甲基化成為對 - 二甲胺基苯丙胺酸的酵素之純化

純化步驟	體積 (毫升)	蛋白質 (毫克)	比活性 (單位*/毫克)	產率 (%)	純化倍數
粗萃取物	510	1800	29	-	-
G-25 Fine	560	1560	34	102	1.17
MonoQ HR 16/10	670	82	430	67	14.8
Phenyl Superose	10	3.48	6300	42	217
MonoQ HR 5/5	7	0.88	17200	29	593
TSK G2000	0.8	0.113	40300	8.7	1390

- a. 指甲基化 1 的酵素活性單位。於每一步驟，甲基化 2 的酵素活性單位值等於甲基化 1 的單位值之 120 %。

純化倍數是用純化中諸液份的比活性增加值計算而得者。

5.7.1.C. 從大腸桿菌 pVRC706 純化出始旋鏈黴菌 SP92 所含顯示出可催化對 - 胺基苯丙胺酸變成對 - 二甲胺基苯丙胺酸的甲基化之 SAM-相關性 N-甲基轉移酶的重組蛋白質。

本實驗闡述如何純化出始旋鏈黴菌 SP92 所含參與原始黴素 IA 生物合成途徑且可經由 papM 基因選殖而在大腸桿菌

五、發明說明(73)

修正
83.12.02 補充

內表現之酵素。

使用上面實施例 5.7.1.A 中所述分析可以證明重組大腸桿菌 pVRC706 菌株的粗萃取物顯示出對甲基化 1 和甲基化 2 有強烈活性，而在對照組大腸桿菌菌株(pMTL23)中則皆未探測到這兩種活性。因此進行催化對 - 胺基苯丙胺酸甲基化成為對 - 二甲胺基苯丙胺酸的反應之 SAM-相關性對 - 胺基苯丙胺酸 (苯基-H)-甲基轉移酶。

在實施例 5.7.1.B 中所述相同條件，但省略一層析分離步驟(在 MonoQ HR 5/5 管柱上的純化步驟)之下，可將該蛋白質純化到具均一性，其在 TSK G2000 管柱上的層析分離中及在 SDS-PAGE 中所顯示的分子量相同於實施例 5.7.1.B 所純化出的蛋白質之分子量。

表 8：從大腸桿菌 pVRC706 菌株純化出將對 - 胺基苯丙胺酸甲基化成為對 - 二甲胺基苯丙胺酸的酵素

純化步驟	體積 (毫升)	蛋白質 (毫克)	比活性 (單位*/毫克)	產率 (%)	純化倍數
粗萃取物	15	190	235	-	-
G-25 Fine	22	175	231	91	1
MonoQ HR 16/10	24	13.4	2100	63	8.9
Phenyl Superose	3.0	0.39	35500	31	145
TSK G2000	0.8	0.092	45200	9.3	192

五、發明說明(87)

83.12.02

修正
補充

本實施例闡述如何得到鄰接於含有始旋鏈黴菌所含編碼 PIIA 合成酶兩個次單元的 *snaA* 和 *snaB* 基因之區段的片段所具核苷酸順序。

該序列係經由將得自 pVRC1000 的 1.5-kb *Bam*HI-*Sst*I 片段(圖 21)(實施例 6.8)分殖到載體 M13mp18 和 M13mp19 之中而推導出者(參看實施例 7.1)。所得 640 bp 的序列示於 SEQ ID no. 8 之中。

7.10. 4-kb *Bam*HI-*Bam*HI 片段所含 694 bp *Xho*I-*Xpn*I 區段之序列分析

本實施例闡述如何取得含有始旋鏈黴菌所含 *snaC* 基因的片段所具核苷酸順序。

要被序列分析的 694 bp 區段為選殖到質體中以構成實施例 6.9 中所述質體 pVRC509 所用的 4-kb *Bam*HI-*Bam*HI 片段之部份。將經由將質體 pVRC509 用限制酵素 *Xho*I-*Xpn*I 施以雙重消化且與 5.6 中所述 3 種寡核苷酸探針雜交所得 694-bp *Xho*I-*Xpn*I 片段選殖到噬菌體 M13mp18 和 M13mp19 中。其 *Xho*I-*Kpn*I 分殖部位示於圖 22 中。

如此所得 694-bp 片段的序列表於 SEQ ID no. 7 之中。

實施例 8：經由測定開放密碼以分析核苷酸序列

本實施例闡述如何測定實施例 7 所定諸核苷酸序列的開放密碼(open reading frame)，並鑑定參與始旋鏈黴菌 SP92 內的原始黴素 I 和原始黴素 II 生物合成之基因以及這些基因所編碼的多肽。

8.1. 5-kb *Bam*HI-*Xho*I 片段(pXL2045)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (pp)

修正
年 月 日
83.12.02 補充

質 SnaD 等之 snaA 和 snaD 兩基因於一組，而編碼參與從其 6 個個別胺基酸形成原始黴素 I 肽鏈的 3 個肽合成酶 Snbc，Snbd 和 Snbe 等之 snbc，snbd 和 snbe 等基因於另一組也都在選殖到粘接質體 pIBV3 內的一大 DNA 片段上組合在一起。這些結果肯定了原始黴素 II 生物合成基因，及原始黴素 I 生物合成基因組合在一起的假說，且提供了將供於所研究區段的上游和下游處，參與這些生物合成中的其他基因經由染色體行走予以選殖之可能性。

再者，也可以經由將不同鏈革蘭素產生型菌株（參看表 1）的總 DNA 與 snaA，snaB，snaC，snaD，samS，snbA，snbR，snbC，snbd，snbe，papA 和 papM 等基因，或與經由染色體行走鑑定出的基因，或與這些基因的片段等進行雜交而從其他鏈革蘭素產生型微生物體內分離出對應於相同機能的基因。如此一來就可以經由對原始黴素所擬定的相同做法分離出參與諸不同鏈革蘭素生物合成中的所有基因。

實施例 9：經由基因斷裂進行 DNA 片段的遺傳研究

本實施例闡述如何經由構成從產生型菌株所衍生且在鏈革蘭素生物合成基因處斷裂產生突變所得之菌株，加上分析這些突變株的表現型而證明這些基因在鏈革蘭素生物合成中的參與。此外，本實施例也顯示如何得到只生產鏈革蘭素 A 和 B 兩成份中的一種或另一種，或產生與菌株 SP92 所得不同的 A 和 B 成份比例等之菌株。

9.1. 在 snaA 基因處斷裂的始旋鏈黴菌 SP92 突變株之構

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (102)

年	月	日	修正
83	12	02	補充

再平板培養而得到分離出的株系。

為了確認出質體 pVRC505 的整合位置，用經由適當限制酵素消化過的幾個重組系所含總 DNA 製備出多種南方點染物 (Southern blots) 並與載體 pDH5 和 0.7-kb 片段雜交，後述兩者係在用 $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ -dCTP 經由隨機引導予以標示 (隨機引導 DNA 標示配套試劑，Boehringer Mannheim，法國) 後，依次作為探針，如 Maniatis et al. (1989) 所述進行者。雜交結果顯示在重組古系的基因體內出現加入的 EcoRI-PstI 帶，其尺寸為載體 pDH5 之尺寸且與後者雜交，以充另一 6 個與兩個探針皆雜交的附加 EcoRI-EcoRI 帶。這些突變體中之一命名為 SP92::pVRC505 該突變株頗對應於質體 pVRC505 在 snaA 基因中經由單一同系重組之整合。

9.1.3. 突變株 SP92::pVRC505 的原始黴素產生

本實施例闡述如何測定經由質體 pVRC505 整合在 snaA 基因斷裂的始旋鏈黴菌 SP92 突變株不再生產原始黴素 II A 而會繼續生產原始黴素 II B。

將突變株 SP92::pVR5505，及以菌株 SP92 作為對照株，分別在液體生產培養基內培養。醱酵的進行如下所述：將 0.5 毫升上文所述菌株的孢子懸浮液於無菌狀態下添加到裝在 300-毫升三角瓶內的 40 毫升菌種培養基內。該菌種培養基係由下列成份所組成：10 克 / 升玉米糖漿，15 克 / 升的蔗糖，10 克 / 升的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，1 克 / 升的 K_2HPO_4 ，3 克 / 升的 NaCl ，0.2 克 / 升的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 1.25 克 / 升的

五、發明說明(100)

年	月	日	修正
83	12	3	補充

SnaA在原始黴素 II B 轉化成原始黴素 II A 中的機能性參與。

本實施例證明可以用選殖的生物合成基因來構成在原始黴素生物合成所含步驟發生突變之菌株。這點是用原始黴素 II 予以證明，不過該相同的結果也可以得自原始黴素 I 且，經由延伸，可得自不同的鏈革蘭素成份。如此即可得到能產生諸不同中間體的菌株，這些菌株可以用來經由將該中間體予以化學，生化學，酵素等方式的改質而產生新穎分子。在一種或他種鏈革蘭素成份的生物合成途徑早期步驟中予以阻斷也可以導致只產生一種或另一種成份之突變株。

9.2. samS基因斷裂的始旋鏈黴菌 SP92 突變株之構成

本實施例闡述如何經由 samS 基因的斷裂而構成可產生相對於野生型 SP92 菌株較少 35% 的 PIA 但產生 10 倍之多的 PIB (其化學構造示於圖 2 中) 之始旋鏈黴菌 SP92 突變菌株。構成該突變株的目的是為了確定 samS 基因所編碼的蛋白質預先假設之 SAM 合成酶機能，以及為了得到可合成比野生型 SP92 菌株更多 PIB 的菌株。

9.2.1. 質體 pVRC702 之構成

將質體 pXL2045 (實施例 6.3 所述者) 用酵素劈開並於 1% 瓊脂糖凝膠上電泳後以 Geneclean 配套試劑方法純化分離出 3.2-kb BamHI-EcoRI 片段 (參看實施例 6.8)。該片段載有 snaB 基因及 samS 基因 (圖 16)。然後將該片段以下述方式選殖到質體 pUC18 中：將 50 毫微克的 pUC18 用酵素

五、發明說明 (105)

年	月	日	修正
86	5	13	補充

EcoRI 和 BamHI 予以雙重消化使其線型化後，於 T4 DNA 連接酶 (Biolabs) 存在下與 300 毫微克的該 3.2-kb BamHI-EcoRI 片段連接在一起。於用該連接混合物將適合的大腸桿菌 TG1 菌株細胞轉化後，可以分離出具有含 3.2-kb 嵌入物的質體 pUC18 之重組系，命名為 pVRC701 (圖 26)。

質體 pVRC702 係經由在質體 pVRC701 所含 samS 基因中央的兩個 SstI 部位之間 (圖 27) 導入一個載有編碼對阿莫拉黴素 (amramycin) 和京尼帝辛 (genitacin) 抗拒性的 amR 基因之卡段 (cassette) 而衍生成者。其中，先用上述相同技術將質體 pHP45Ω amR (J. L. Pernodet, Laboratoire de Genetique d'Orsay 所贈) 予以 BamHI 消化而分離出載有 Ω amR 卡段的 2.2-kb BamHI-BamHI 片段。然後將 200 毫微克的該片段與已用酵素 BamHI 線型化的 50 毫微克質體 pUC1318 (Key and McPherson, 1987) 連接，再將該連接混合物導到適當的大腸桿菌 TG1 細胞內。從具有含 Ω amR 卡帶的質體 pUC1318 之重組區以酵素 SstI 部份劈開，可以再分離出含有 Ω amR 卡帶的 50 毫微克 2.2-kb SstI-SstI 片段，並將該片段與已用 SstI 切過的 30 毫微克質體 pVRC701 連接 (圖 26)，於轉入適當的大腸桿菌 TG1 細胞後可得到質體 pVRC702，其結構詳示於圖 27 中。

如此所得質體 pVRC702 可根據實施例 2.1 所述方法予以大量製備。

9.2.2. 具有染色體基因 SamS::Ω amR 的菌株之構成

五、發明說明 (106)

年 月 日 修正
83.12.02 補充

該菌株係用 1 微克能夠在鏈黴菌屬細胞內複製的自殺質體 pVRC702 將始旋鏈黴菌原生質體予以轉化而得者。原生質體的製備和該轉化所用方案皆為上面所述者 (實施例 9.1)。雖一的修改為針對實施例 10.1 有關選擇抗生素而做的。在本例子中，將在 R2YE 培養基上於 30℃ 再生 18 小時後所得重組原生質體在 50 微克 / 毫升最後濃度的京尼帝辛 (Sigma Chemical Co.) 存在下進行選擇。其中係將 3 毫升含有 383 微克 / 毫升京尼帝辛的 SNA 覆蓋層加在每一 R2YE 培養皿上。

以這種方式，可以分離出 500 個抗京尼帝辛重組系，其可能來自質體 pVRC702 整合到染色體內，接著在染色體 samS 基因與質體 samS 基因之間單一同系組合 (於單一互換之情況中) 而得者，或在染色體 samS 基因與質體 samS::WamR 質體基因之間交換，接著雙重同系重組事件 (於雙重互換之情形中) 而得者。在這兩種情況中，WamR 卡段會被轉移到該菌株的染色體上，而賦與該菌株數代之中仍穩定持有的 amR 抗拒性。

將該重組株置於含有 50 微克 / 毫升最後濃度的京尼帝辛之 R2YE 培養基上平板培養和生長，然後用菌落雜交技術予以分析。將該等株系與依實施例 9.1 中所述從源自 pVRC702 且對應於 pUC18 的 2.7-kb BamHI-EcoRI 片段所得第一探針進行雜交，或與對應於載有 WamR 卡段的 2.1-kb BamHI 片段之第二探針進行雜交，可以將單一互換情況 (與兩種探針雜交) 與雙重互換情況 (只與第二種探針雜交)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (

修正
83.12.02 補充

) 區別開來。依此選擇得自雙重互換的三個株系再經由在含有 50 毫克 / 毫升最後濃度的京尼帝辛之 R2YE 培養基上平板培養和生長，得到孢子儲料。

為了確證該三雙重重組株的基因體構造，先產生用酵素 EcoRI 和 BamHI 消化這些株系的染色體 DNA 所得之南方點染物並與下述三種探針雜交：對應於得自 pVRC702 所含 2.2-kb BamHI 片段的 WamR 卡段之探針，對應於得自 pVRC701 所含 2.7-kb BamHI-EcoRI 片段的 pUC18 之探針，及最後一種，得自載有 snaB 基因和 samS 開頭的 pVRC701 所含 1.3-kb EcoRI-SstI 片段之探針。這些雜交結果可以證明所試驗的三株系確實來自雙重同系重組事件，其中係將原有的染色體 samS 基因用被 WamR 卡帶中斷的突變 samS 基因予以取代。

這三種突變株中的一種命名為 SP92 samS::WamR。

9.2.3. 突變株 samS::WamR 的原始黴素生產

本實施例闡述如何測定具有中斷 samS 基因的突變 SP92 samS::WamR 菌株可產生比野生型 SP92 菌株較少 35% 的原始黴素 IA 和 10- 倍多的原始黴素 IB。

將突變株 samS::WamR 及對照組 SP92 菌株分別在液體生產培養基中培養，並依實施例 9.1 中所述分析其原始黴素 II 和原始黴素 I 之生產。

其結果顯示在所實施的醱酵條件下，於三個試驗時間中，突變株 SP92 samS::WamR 產生的原始黴素 II，其量相當於 SP92 對照株的產量。相對地，於三個時間內，突變

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

83.12.02

修正
補充

經由在含有 400 微克／毫升的硫鏈絲菌肽之 R2YE 培養基上平板培養和生長分離出重組株的孢子，並再度於相同的培養基上平板培養以得到純系。

為了確證出質體 pVRC508 的整合位置，用依上文所述純化出的幾種重組系所含總 DNA 製備出多種南方染點物，並用載體 pDH5 和 1.4-kb 片段依實施例 9.1 所述以 [α - ^{32} P] dCTP 隨機引導標示後依序用為探針與其進行雜交。該雜交結果顯示用限制酵素 EcoRI 消化過的重組株系基因體（側接 1.4-kb 片段的部位）所含 6.8-kb EcoRI 帶消失不見，而有兩個相對於對照 SP92 菌株的增加帶出現，其一為 2.4 kb 與該 1.4-kb 片段雜交者，而另一為與 pDH5 和 1.4-kb 片段兩者都雜交的 10.5 kb 者。用限制酵素 PstI 消化該重組系後顯示相對於對照 SP92 菌株出現兩個增加出來的帶，其一為與 1.4-kb 片段雜交的 1.0 kb 者，而另一為與 pDH5 和該 1.4-kb 片段皆雜交的 5.1 kb 者。這些突變株中之一命名為 SP92::pVRC508。

9.3.3. 突變株 SP92::pVRC508 的原始黴素生產

本實施例闡述如何測定其 papA 基因經由質體 pVRC508 整合而中斷的始旋鏈黴菌 SP92 突變株不再產生原始黴素 I。

將突變株 SP92::pVRC508，及作為對照菌株的 SP92 菌株，置於液體生產培養基中培養。其醇酯及原始黴素 I 和 II 的分析皆依實施例 9.1 中所述進行。

其結果顯示在所實施的醱酵條件下，對照組 SP92 菌株產生標準量的原始黴素 I，而在突變株 SP92::pVRC508 的醱

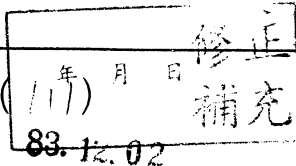
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明



醇液中未測得該 I 類原始黴素。此外，突變株 SP92::pVRC508 的原始黴素 II 產量等於 SP92 對照菌株之產量。因此，突變株 SP92::pVRC508 變成只能生產原始黴素 II。這些結果清楚地顯示 papA 基因係編碼參與原始黴素 I 生物合成中的蛋白質者。

此外為確定該基因中斷只影響到標的基因 papA，將突變株 SP92::pVRC508 在對 - 二甲胺基 - 苯丙胺酸存在下進行醱酵。突變株 SP92::pVRC508 依上文所述醱酵後，在醱酵 17 小時處，添加 100 毫克 / 升的對 - 二甲胺基苯丙胺酸。於這些補充條件下，突變株 SP92::pVRC508 的原始黴素 I 產量等於菌株 SP92 所產之量。而兩個株的原始黴素 II 產量則相當。這種結果可以用來判定突變株 SP92::pVRC508 以其確實在參與對 - 二甲胺基苯丙胺酸生物合成的基因 (papA 基因) 處中斷而無法產生原始黴素 I。用對 - 二甲胺基苯丙胺酸補充該菌株可回復其產生原始黴素 I 之能力，只要突變不會對其他原始黴素 I 前體的合成或對這些前體的縮合等有極性影響即可。

本實施例證明可以用選殖的生物合成基因來構成其原始黴素生物合成步驟中，特別是原始黴素 I 者，發生突變之菌株。本實施例也證明可以用這種方法構成能特定地生產原始黴素 II 的始旋鏈黴菌菌株，及，經由延伸，構成能特定地產生原始黴素 I 之菌株。這種相同方式也可以用於產生鏈革蘭素的其他放線菌屬菌株。

9.4 snbA 基因中斷的始旋鏈黴菌 SP92 突變株之構成

五、發明說明 (113)

修正
年 月 日
83.12.02 補充

。其原生質體的製備和其轉化皆依實施例 9.1 所述進行。於將菌株 SP92 的原生質體轉化後，上覆 3 毫升含有 2.6 毫克／毫升硫鏈絲菌肽的 SNA 培養基以選擇其重組體。在用 5 次 1 微克質體 pVRC404 所進行的五次轉化中，分離出約 30 個硫鏈絲菌肽抗拒性純系。如此所得重組效率為約 5 每微克 DNA。這些重組體來自菌株 SP92 染色體所載 snbA 基因與自殺質體 pVRC404 所含 1170-bp 片段之間的單一同系重組整合而得者。經由在 R2YE 培養基 + 400 微克／毫升硫鏈絲菌肽上平板培養和生長分離出該重組體的孢子後，再於相同培養基上平板培養得到分離純系。為了確定質體 pVRC404 的整合位置，用上面純化到的幾種重組純系的總 DNA 製備多種南方點染物並已用 [α - ^{32} P]dCTP 依 Maniatis et al. (1989) 所述進行隨機引導標示後的載體 pDH5 和 1170-kb 片段依次用為探針進行雜交。該雜交結果顯示在用限制酵素 XhoI 和 HindIII 消化過的重組系之基因體中出現相對於對照組 SP92 菌株 (載體 pDH5 + 1.17 kb) 而言，多出之 4.7-kb XhoI-HindIII 帶，可與 pDH5 和 1170-bp 片段兩者都雜交者。用限制酵素 PflMI 消化該重組系 (側接 1170-bp XhoI-HindIII 片段之部位) 顯示出 3.1-kb PflMI-PflMI 帶消失掉而出現可與兩種探針雜交的 8.8 kb 帶。這些結果顯示所分析的純系之基因體構造確實是 pVRC404 與染色體 snbA 基因之間發生同系重組事件後所預期者。這些突變株之一命名為 SP92::pVRC404。

9.4.3. 突變株 SP92::pVRC404 的原始黴素產生

五、發明說明 (114)

年	月	日	修正
83	12	02	補充

本實施例闡述如何測定經由質體 pVRC404 整合在 snbA 基因內中斷的始旋鏈黴菌 SP92 突變株不再生產 PI。

將突變株 SP92::pVRC404，及作為對照組菌株的菌株 SP92 置於液體生產培養基中培養。其醱酵及原始黴素 I 和 II 之分析皆依實施例 9.1 中所述進行。其結果顯示在所實施的醱酵條件，雖則對照組 SP92 菌株產生標準量的原始黴素 I，但在突變株 SP92::pVRC404 的醱酵液中卻未測得原始黴素 I。此外，突變株 SP92::pVRC404 的原始黴素 II 生產相當於 SP92 對照株的產量。因此，突變株 SP92::pVRC404 只能生產原始黴素 II。這種結果清楚地顯示該 snbA 基因編碼參與原始黴素 I 生物合成中的蛋白質 snbA，如已在實施例 5.2 的純化中證明過者。

如前面實施例一段，本實施例證明可以用選殖過的生物合成基因構成在原始黴素，特別是原始黴素 I 的生物合成步驟中發生突變過之菌株。本實施例也證明可以經由這種方式產生能特定地生產原始黴素 II 的始旋鏈黴菌菌株且，經由延伸，產生能特定地生產原始黴素 I 之菌株，如下面實施例 9.5 中所說明者。這種相同手法也可以用於產生鏈革蘭素的其他放線菌屬菌株。

9.5 在可能編碼參與原始黴素 II 生物合成中的肽合成酶之 snad 基因中斷的始旋鏈黴菌 SP92 突變株之構成

本實施例闡述如何經由將可能編碼參與原始黴素 II 生物合物中的肽合成酶之 snad 基因予以中斷而構成不再產生原始黴素 II 的始旋鏈黴菌 SP92 菌株。

五、發明說明(1)

(6) 年 月 日 修正
83.12.02 補充

為了確定質體 pVRC1000 的整合位置，用上面純化出的七重組株所含總 DNA 製備多種南方染點物，並與已用 [α - ^{32} P]dCTP 依實施例 9.1 所述標示過的載體 pDH5 和 pVRC1000 所含 1.5-kb BamHI-SstI 片段依序作為探針進行雜交。其雜交結果顯示在該七重組株的基因體內出現一 13.8-kb EcoRI 帶和一約 17-kb BglII 帶等可與兩種探針都雜交者，以及一可與該 1.5-kb BamHI-SstI 探針雜交的 3.7-kb EcoRI 帶。這些突變株中之一經命名為 SP92::pVRC1000 且頗對應於質體 pVRC1000 經由單一同系重組在 snaD 基因內的整合。

9.5.3. 突變株 SP92::pVRC1000 的原始黴素生產

本實施例闡述如何測定經由質體 pVRC1000 整合而在其 snaD 基因中斷的始旋鏈黴菌 SP92 突變株不再產生原始黴素 II，而只產生原始黴素 I。將突變株 SP92::pVRC1000 及對照組 SP92 菌株置於液體生產培養基中培養，並依實施例 9.1 中所述分析其原始黴素 II 和 I 之生產。

其結果顯示，在所實施的醱酵條件下及對於全部三種試驗時間，突變株 SP92::pVRC1000 產生 0 毫克／升的原始黴素 II 且其原始黴素 I 產量等於 SP92 對照株之產量。因此，該突變株確實在原始黴素 II 生物合成的一步驟中被阻斷，因而證明 snaD 基因係編碼一參與原始黴素 II 生物合成的酵素，且非常可能是一種肽合成酶。

本實施例如同前面實施例一般證明可以用已選殖的生物合成基因來構成其原始黴素生物合成步驟，且特別是原始

五、發明說明 (117)

年 月 日 修正
83.12.02 補充

黴素 I 的生物合成步驟中發生突變之菌株。本實施例也證明可以經由這種方式來構成能特定地產生原始黴素 I 之始旋鏈黴菌菌株，且，經由延伸，構成能特定地產生原始黴素 II 之菌株。這種相同手法也可以用於產生鏈革蘭素的其他放線菌屬菌株。

實施例 10：非生產型 SP92 突變株之補充

本實施例證明如何表現原始黴素生物合成基因。該表現係較特別針對粘接質體 pIBV1 所載 snaA 和 snaB 兩基因而在衍生自 SP92::SP120 的突變株中實施者。該突變株不會產生原始黴素 IIA。它會蓄積原始黴素 II 生物合成途徑中的最後一中間體：原始黴素 IIB。

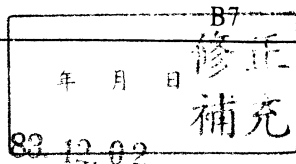
10.1 將 snaA 和 snaB 兩基因選殖到往返載體 pIJ903 中

本實施例闡述如何將含有 snaA 和 snaB 兩基因的粘接質體 pIBV1 次片段選殖到在大腸桿菌和鏈黴菌中都能複製的載體內。

載體 pIJ903 (Lydiat D. J. et al., 1985) 是一種低複製數 (1 到 3 每細胞) 往返載體，其能夠因其 pBR322 複製源而在大腸桿菌內複製，且同時因其 SCP2⁺ 複製源而在鏈黴菌屬內複製。氯苯青黴素抗拒性基因促成在大腸桿菌內的選擇，而硫鏈絲菌肽抗拒性基因促成在鏈黴菌內的選擇。

將粘接質體 pIBV1 用限制酵素 SstI 予以消化。經由在 0.8 % 瓊脂糖凝膠上電泳和電洗提而分離出載有 snaA 和 snaB 兩基因的大 7.6-kb DNA 片段。將 500 毫微克的該片段

五、發明說明(118)



以這種方式得到許多轉形體，選出其中三株在液體培養基中進行生產試驗。其中，選擇載有質體 pIJ903 的 SP120 菌株作為對照組。醱酵條件及生物合成的萃取皆依實施例 9.1.3. 中所述進行。

其結果證明在所用醱酵條件下，對照組（載有質體 pIJ903 的 SP120）在醱酵 24，28 和 32 小時皆產生 100 % 的原始黴素 IIB 和 0 % 的原始黴素 IIA，而 3 株用質體 pVRC507 轉形過的 SP120 菌株在這三種時間產生約 85 到 80 % 的原始黴素 IIB 和 15 到 20 % 的原始黴素 IIA，其和等於對照菌株（載有質體 pIJ903 的 SP120）的原始黴素 IIB 產量。載著 pVRC507 的菌株確實補充了對應於中間體原始黴素 IIB 所含 D-脯胺酸 2,3 鍵氧化之原始黴素 II 生物合成步驟。這一點也可以依實施例 5.1.1.A 中所述，對載有 pVRC507 的 SP120 菌株和載有 pIJ903 的 SP120 菌株進行原始黴素 IIA 合成酶活性的酵素分析予以肯定。載著 pIJ903 的對照組菌株 SP120 未顯示出原始黴素 IIA 合成酶活性，而載有 pVRC507 的菌株 SP120 則顯示出 PIIA 合成酶活性。

本實施例證明可以讓鏈革蘭素的生物合成基因表現。該表現係特別針對編碼原始黴素 IIA 合成酶的基因而研究，不過原始黴素 II 和原始黴素 I 兩者的其他生物合成基因，以及參與不同鏈革蘭素成份生物合成中的基因也都可以用這種方式表現。這種表現可以在突變菌株內進行，如實施例 10 中的情況一般，也可以在生產型菌株內進行以增高鏈革蘭素的生產水平。此外，可以經由將基因選殖到具有不

年 月 日 修正
83.12.02 補充

五、發明說明 (170)

同複本數(低或高者)的載體內或到整合性載體內;經由將這些基因向下調節,或經由在同系或異系啟動基因(強或經特定地調節過之啟動基因)下選殖這些基因等方式來修改這些表現。不同鏈革蘭素生物合成基因的表現也可以用適當的表現載體在異系菌株內進行以產生雜交抗生素。

實施例 11: 始旋鏈黴菌所含 papM 基因在大腸桿菌內的表現

本實施例闡述如何在大腸桿菌內表現始旋鏈黴菌基因以鑑定,純化和研究該基因所編碼的蛋白質。

11.1. 質體 pVRC706 之構成

將 papM 基因置於大腸桿菌啟動基因和核糖體結合部位的下游以在大腸桿菌內表現該基因。從實施例 7.8 所述質體 pVRC409 分離出 1.7-kb MluI-StuI 片段,然後選殖到質體 pMTL23 (Chambers et al. 1988) 內於隨後用 Klenow 酵素填充的 BamHI 部位 (Maniatis et al. 1989) 及其 MluI 部位,構成圖 31 所示的質體 pVRC706。在 MluI 部位的選殖可得到質體 pMT123 所含 lacZ 基因所編碼的 β -半乳糖苷酶之前面 32 個胺基酸與緊接 papM 上游的基因之最後十一個胺基酸之間的架構內融合,如此可以保留住存在於 papM 基因與該上游基因之間從實施例 7.8 所給核苷酸序列看來的轉譯耦合。因此, lacZ 與 papM 上游基因之間的雜交基因及 papM 基因等的表現都在 lacZ 基因的表現訊號控制之下:

11.2 papM 基因產物在大腸桿菌 DH5a 菌株內的表現

將質體 pVRC706 和 pMTL23 經由轉化而導到大腸桿菌菌株

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

修正
年 月 日
83. 12. 02 補充

DH5a(ref****)內，並在已述及的 *lacZ* 基因之啟動基因被誘導出的條件下進行研究。將載有質體 pVRC706 或對照質體 pMTL23 等的大腸桿菌菌株置於 500 毫升含有 100 微克／毫升氨苄青黴素和 1 mM IPTG 的富 LB 培養基中培養，以誘導 *lacZ* 基因的啟動基因。在培養到 600 nm 的光密度為 1 左右時採取該培養物，並依下面所述製備蛋白質萃取物。

11.3 在大腸桿菌中表現出的 *papM* 基因產物之活性分析

papM 基因編碼的蛋白質所對應的活性係在從載有質體 pVRC706 或質體 pMTL23 的兩種大腸桿菌培養物所製備的兩種萃取物予以分析者 (實施例 5.7)。結果顯示用大腸桿菌 pVRC706 製備所得萃取物係催化對 - 胺基苯丙胺酸變成對 - 二甲胺基苯丙胺酸之甲基化反應，其活性為 235 單位／毫克，而在對照組大腸桿菌 pMTL23 菌株的萃取物中則不含這種活性 (實施例 5.7.1.C)。這些結果證明可以將 *P. spiralis* 所含 *papM* 基因在大腸桿菌內表現且其對應的蛋白質確實為催化對 - 胺基苯丙胺酸變成對 - 二甲胺基苯丙胺酸的甲基化反應之酵素。本實施例證明可以用經調適成可以產生抗生素前體或甚至於天然或雜交抗生素等的表現載體在異源菌株 (例如大腸桿菌，不過也可以在其他微生物體內) 表現鏈革蘭素生物合成基因。

實施例 12：不同鏈黴菌所含鏈革蘭素生物合成基因之間的同系性之證明

本實施例闡述如何經由總 DNA 雜交證明不同產生鏈革蘭

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (1~3)

年 月 日

83. 12.

修正
補充

素的鏈黴菌菌株所含不同鏈革蘭素生物合成基因之間存在著同系性。

12.1 不同鏈革蘭素產生型鏈黴菌所含總 DNA 之萃取

本實施例闡述如何純化不同鏈革蘭素產生型菌株所含 DNA。這些鏈黴菌屬菌株係從表 1 中選出者：

勞意德鏈黴菌 (*Streptomyces loidensis*)

橄欖色鏈黴菌 (*Streptomyces olivaceus*)

蠟灰色鏈黴菌 (*Streptomyces ostreogriseus*)

維吉尼鏈黴菌 (*Streptomyces virginiae*)

另外選出一種不產生鏈革蘭素的菌株：吸水鏈黴菌 (*Streptomyces hygroscopicus*)，作為陰性對照組：

不同總 DNA 的萃取是用在 YEME 培養基內的培養物進行者，如實施例 1 所述。

12.2 鏈革蘭素產生型菌株所含總 DNA 與含有鏈革蘭素生物合成基因的 DNA 片段及從始旋鏈黴菌 SP92 菌株分離出來的 DNA 片段等之雜交

本實施例闡述如何用參與原始黴素生物合成的基因和依前面諸實施例所述從 SP92 菌株分離出的基因等經由鏈革蘭素產生型菌株的總 DNA 之雜交展現同系性基因。

用為探針的 DNA 片段為：

依前面實施例 6.5 中所述從 pVRC1106 分離出的 3.9-kb *Xho*I-*Xho*I-片段，其限制與圖表於圖 18 中。該片段含有編碼原始黴素 I 合成酶 II 的基因之一部份。

從實施例 6.3 所述質體 pXL2045 分離出來的 6-kb

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(123)

年 月 日

修正
補充

BamHI-BamHI 片段，其限制與圖表於圖 16 中者。該片段含有 PIIA 合成酶兩個次單元的構造基因。

將四種產生鏈革蘭素的總 DNA，吸水鏈黴菌菌株的總 DNA 和菌株 SP92 的總 DNA 等用限制酵素 BamHI 和 XhoI 予以消化。如此所得 DNA 片段在 0.7 % 瓊脂糖凝膠上分離後，依 Maniatis et al. (1989) 所述將該 DNA 轉置於尼龍膜上。3.6-kb XhoI-XhoI 和 6-kb BamHI-BamHI 諸片段的標示係依實施例 9.1.2. 中所述經由隨機引導標示而進行。膜的雜交係依 Maniatis et al. (1989) 所述在 42℃，甲醯胺存在下實施之。雜交後用含有稀釋十倍的 SSC (Maniatis et al. (1989)) 和 0.1 % SDS 等之溶液在 50℃ 和 60℃ 洗該膜。

這些雜交顯示出下列結果：

吸水鏈黴菌菌株未顯示出與所用兩種探針有任何雜交現象。

壩灰色鏈黴菌，橄欖色鏈黴菌，勞意德鏈黴菌和維吉尼鏈黴菌等菌株的總 DNA (用 XhoI 和 BamHI 消化過者) 都顯示出與所用兩種探針有所有的雜交訊號，其強度相當於菌株 SP92 的總 DNA 所觀察到者。

本實施例顯示不同的鏈革蘭素產生型鏈黴菌菌株含有與如前面諸實施例所提出的從始旋鏈黴菌 SP92 分現出且參與鏈革蘭素生物合成的基因相親交之基因。這種雜交現象因而證明在菌株 SP92 所含鏈革蘭素生物合成基因與其也鏈革蘭素產生型菌株所含鏈革蘭素生物合成基因之間存在著同

五、發明說明 (174)

年	月	日	修正
83	12	02	補充

系性。

因此，本實施例證明可以用從 SP92 分離出的鏈革蘭素生物合成基因經由雜交和選殖分離出存在於其他鏈革蘭素產生型菌株內的同系基因。

實施例 13：始旋鏈黴菌所含不同原始黴素 I 和原始黴素 II 生物合成基因的物理結合研究

本實施例闡述如何研究始旋鏈黴菌所含原始黴素 PI 和 PII 生物合成基因的物理結合。本研究的目的係為證明所有這些基因係在染色體上組合在一起成為群簇，因而可以經由染色體行走從已鑑定出的基因來分離參與原始黴素 PI 和 PII 生物合成的其他基因。這種作法可以針對參與其他鏈革蘭素生物合成的基因而設計。

13.1 脈衝電場電泳所用的限制酵素

始旋鏈黴菌 SP92 基因體中有 70% 到 75% 含有 G 和 C 兩種鹼的核苷酸。為了將其基因體切成少數目的大片段，採用可辨識富含 AT 的序列之酵素，例如，AseI (AT/TAAT)，和 SspI (AAT/ATT)，以及 HindIII (A/AGCTT)，EcoRI (G/AATTC)，NdeI (CA/TATG) 和 ClaI (AT/CGAT) 等。

13.2 脈衝電場電泳所用的始旋鏈黴菌菌株

本發明使用幾種菌株的染色體 DNA 經由脈衝電場電泳來研究原始黴素 I 和原始黴素 II 生物合成基因的物理結合。依實施例 4.2 所述製備始旋鏈黴菌 SP92 菌株所含染色體 DNA，以及依實施例 9.1 和 9.3 所述構成的 SP92 衍生菌株所含染色體 DNA 等之嵌入物。這些衍生菌株包括：其

五、發明說明(175)

年 月 日 修正
83.12.02 補充

snaA基因經由質體 pVRC505 整合所中斷的菌株 SP92::pVRC505 和其 snaB基因經由質體 pVRC404 整合所中斷的菌株 SP92::pVRC404。後述這兩菌株是因其可經由採用質體 pVRC505 和 pVRC404 所含，很少切割染色體 DNA 的部位：AseI，SspI，HindIII，EcoRI，HdeI和 ClaI等將 snaA和 snaB兩基因正確地定位在染色體圖上，所以包含在本研究中。

13.3 脈衝電場電泳分離出的片段進行雜交所用之 DNA 探針

本發明使用不同的 DNA 片段依實施例 9.1 所述來得到放射性標示的探針，並用以與上述三菌株的染色體 DNA 嵌入物經酵素劈開後由脈衝電場電泳分離出的片段進行雜交。所用探針為如下所述者：從載有 snaB和 snaS兩基因的質體 pVRC701 分離出的 3.2-kb EcoRI-BamHI片段（參看實施例 9.2），從載有一部份 snaD基因的質體 pVRC1000 分離出的 1.5-kb-BamHI-SstI 片段（參看實施例 6.8），從載有 snaA基因的質體 pVRC402 分離出的 1.1-kb XhoI-HindIII 片段（參看實施例 6.1），從載有 papA基因的質體 pVRC900 分離出來的 2.4-kb PstI-PstI 片段（參看實施例 6.7 和 6.8）及從載有 snaC基因的質體 pVRC509 分離出來的 1.5-kb XhoI-PstI片段（參看實施例 6.9）。

13.4 不同原始黴素 I 和 II 生物合成基因在染色體上的定位及其物理結合之研究

始旋鏈黴菌菌株 SP92，SP92::pVRC404 和

五、發明說明 (176)

修正
83.12.02 補充

SP92::pVRC505 等的染色體 DNA 經由用上述六種酵素以單一消化和雙重消化切割後，與上述不同探針進行雜交產生圖 32 所示的全盤圖；其中示出重要部位的位置以及原始黴素 PI 和 PII 生物合成基因的位置和轉錄方向。如此可以計算含有鑑定過的基因之三染色體區，亦即，snbA，snbR，papA 和 papM 等基因的區（粘接質體 pIBV2，實施例 5.2），snaA，snaB，sanS，snaD，snbC，snbD 和 snbE 等基因的區（粘接質體 pIBV1 和 3，實施例 5.1），及最後的 snaC 基因的區（粘接質體 pIBV4，實施例 5.6）等之間的分隔距離。例如，snaA 與 snbA 兩基因之間的距離曾被估計為約 160-170 kb。此即顯示已鑑定過的基因都包含在始旋鏈黴菌菌株染色體上涵覆只 200 kb 的區域內，相當於少於基因體總長度 3 % 之區段；其長度業經用脈衝電場電泳技術估計為 7500 kb。

這些結果顯示原始黴素 I 和 II 生物合成基因係在染色體上聚集在一起成為群簇者，因此，可以利用染色體行走從這些已鑑定過的基因分離出參與原始黴素 I 和原始黴素 II 生物合成中的其他基因。更廣泛地說，可以經由從參與鏈革蘭素生物合成中的任一基因開始染色體行走而鑑定出參與該生物合成的其他基因。

五、發明說明(127)

修正
年 月 日
83.12.02 補充

表 9

微 生 物	抗 生 素
真菌	
細單孢子菌屬 (<i>Micromonospora</i> sp.)	春黴素 (Vernamycins)
鏈黴菌屬白直鏈黴菌 (<i>STREPTOMYCES</i>)	
<i>S. albiorectus</i>	維吉尼黴素 (<i>Virginiamycins</i>)
澱粉酶鏈黴菌 (<i>S. conganesis</i> (ATCC13528)	
(<i>S. diastaticus</i>)	F1370 A, B Plauracins, 鏈革蘭素 (<i>Plauracins</i> , <i>Streptogramins</i>)
禾生鏈黴菌 (<i>S. graminofasciens</i>)	鏈革蘭素 (<i>Streptogramins</i>)
灰色鏈黴菌 (<i>S. griseus</i> (NRRL2426)	綠灰菌素(宜他黴素) (<i>Viridogrisein</i> (<i>Etamycin</i>))
灰綠鏈黴菌 (<i>S. griseoviridus</i>)	灰綠黴素 (<i>Griseoviridin</i>)
灰綠鏈黴菌(FERMP3562) (<i>S. griseoviridus</i> FERMP3562)	新綠灰菌素 (<i>Neoviridogriseins</i>)
淡紫灰鏈黴菌 (<i>S. lavendulae</i>)	宜他黴素 (<i>Etamycins</i>)
勞意德鏈黴菌(ATCC11415) (<i>S. loidensis</i> (ATCC11415)	春黴素 (<i>Vernamycins</i>)
三鷹鏈黴菌(ATCC15297) (<i>S. mitakaensis</i> (ATCC15297)	蜜柑黴素 (<i>Mikamycins</i>)
橄欖色鏈黴菌(ATCC12019) (<i>S. olivaceus</i> (ATCC12019))	協同菌素(PA114 A, B) (<i>Synergistins</i> (PA114 A, B))
蠟灰色鏈黴菌(ATCC27455) (<i>S. ostreogriseus</i> (ATCC27455)	蠟灰菌素 (<i>Ostreogrycins</i>)
始旋鏈黴菌(ATCC25486) (<i>S. pristinaespiralis</i> (ATCC25486)	原始黴素 (<i>Pristinamycins</i>)
維吉尼鏈黴菌(ATCC13161) (<i>S. virginiae</i> (ATCC13161)	維吉尼黴素(制葡萄黴素) (<i>Virginiamycins</i> (<i>Staphylomycins</i>))
放線菌屬	
<i>A. auranticolor</i> (ATCC31011)	Plauracins
<i>A. azureus</i> (ATCC31157)	Plauracins
<i>A. daghestanicus</i>	宜他黴素(<i>Etamycin</i>)
菲律賓放線菌 <i>A. philippinensis</i>	
游動放線菌(ATCC33002) <i>Actinoplanes</i> sp. (ATCC33002)	A-2315 A, B, C
游動放線菌 <i>Actinoplanes</i> sp.	A15104
<i>Actinomadura flava</i>	A17002 A, B, C, F 馬度黴素(<i>Madumycins</i>)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (129)

修正
B7
年 月 日
86.5.13 補充

PAGE: 聚丙烯醯胺凝膠電泳

bp: 鹼對

PMSF: 苯甲基磺醯氟

PPI: 焦磷酸鹽

rpm: 每分鐘之轉數

A.S.: 硫酸銨

SAM: S-腺甘基甲硫胺酸

SDS: 十二烷基硫酸鈉

STI: 大豆胰蛋白酶抑制劑

TE: 含有 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 的緩衝劑

Tris: 2-胺基-2-羥甲基-1,3-丙二醇

UV: 紫外線

X-gal: 5-溴-4-氯-3-吡啶基 β -D-半乳糖苷

YEME: 酵母萃取物 - 麥芽萃取物培養基 (鏈黴菌的富生長培養基)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱： 有關鏈革蘭素生合成之多肽，編碼此等多肽之核苷酸) 序列及其用途

修正
年 月 日
83.12.92 補充

本發明係有關編碼參與鏈革蘭素生物合成的多肽之核苷酸序列，有關含有這種序列的重組細胞及其用途。

英文發明摘要(發明之名稱： "POLYPEPTIDES INVOLVED IN THE BIOSYNTHESIS OF STREPTOGRAMINS, NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR THESE POLYPEPTIDES AND THEIR USE")

The present invention relates to nucleotide sequences coding for a polypeptide involved in the biosynthesis of streptogramins, to recombinant cells containing such sequences and to their uses.

附註：本案已向

國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

法

1992.9.25

92 11441

六、申請專利範圍

年	月	日	修正
92	10	14	補充

1. 一種純化之核苷酸序列，其係編碼一種多肽，該多肽之特徵在於選自下列：

(a) 基因 snaA(SEQ ID no. 2), snaB(SEQ ID no. 3), snaC(SEQ ID no. 7), snaD (SEQ ID no. 8), papa(SEQ ID no. 9), papM(SEQ ID no. 10), samS(SEQ ID no. 4), snbA(SEQ ID no. 5), snbC(SEQ ID nos. 11 和 12), snbD(SEQ ID nos. 13 和 14), snbE(SEQ ID nos. 15 和 16) 和 snbR(SEQ ID no. 6)；其中該等序列如下：

SEQ ID NO: 2:

ATG ACC GCA CCC CGC CGG CGC ATC ACC CTC GCC GGC ATC ATC GAC GGC	48
Met Thr Ala Pro Arg Arg Arg Ile Thr Leu Ala Gly Ile Ile Asp Gly	
1 5 10 15	
CCC GGC GGC CAT GTG GCC GCC TGG CGC CAC CCG GCG ACC AAG GCG GAC	96
Pro Gly Gly His Val Ala Ala Trp Arg His Pro Ala Thr Lys Ala Asp	
20 25 30	
GCC CAG CTC GAC TTC GAA TTC CAC CGC GAC AAC GCC CGC ACC CTC GAA	144
Ala Gln Leu Asp Phe Glu Phe His Arg Asp Asn Ala Arg Thr Leu Glu	
35 40 45	

六、申請專利範圍

CGC GGC CTG TTC GAC GCC GTG TTC ATC GCG GAC ATC GTC GCC GTG TGG Arg Gly Leu Phe Asp Ala Val Phe Ile Ala Asp Ile Val Ala Val Trp 50 55 60	192
GGC ACC CGC CTG GAC TCC CTG TGC CGC ACC TCG CGC ACC GAG CAC TTC Gly Thr Arg Leu Asp Ser Leu Cys Arg Thr Ser Arg Thr Glu His Phe 65 70 75 80	240
GAA CCG CTC ACC CTG CTC GCC GCC TAC GCC GCG GTC ACC GAG CAC ATC Glu Pro Leu Thr Leu Leu Ala Ala Tyr Ala Ala Val Thr Glu His Ile 85 90 95	288
GGC CTG TGC GCC ACC GCC ACC ACC ACG TAC AAC GAA CCG GCG CAC ATC Gly Leu Cys Ala Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Asn Glu Pro Ala His Ile 100 105 110	336
GCC GCC CGC TTC GCC TCC CTC GAC CAC CTC AGC GGC GGC CGG GCC GGC Ala Ala Arg Phe Ala Ser Leu Asp His Leu Ser Gly Gly Arg Ala Gly 115 120 125	384
TGG AAC GTC GTC ACC TCC GCC GCA CCG TGG GAG TCC GCC AAC TTC GGC Trp Asn Val Val Thr Ser Ala Ala Pro Trp Glu Ser Ala Asn Phe Gly 130 135 140	432
TTC CCC GAG CAC CTG GAG CAC GGC AAA CGC TAC GAG CGG GCC GAG GAG Phe Pro Glu His Leu Glu His Gly Lys Arg Tyr Glu Arg Ala Glu Glu 145 150 155 160	480
TTC ATC GAC GTC GTC AAA AAA CTG TGG GAC AGC GAC GGC CGC CCC GTC Phe Ile Asp Val Val Lys Lys Leu Trp Asp Ser Asp Gly Arg Pro Val 165 170 175	528
GAC CAC CGC GGC ACC CAC TTC GAG GCC CCC GGC CCG CTC GGG ATC GCC Asp His Arg Gly Thr His Phe Glu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Ile Ala 180 185 190	576
CGC CCC CCG CAG GGC CGC CCC GTC ATC ATC CAG GCC GGC TCC TCG CCG Arg Pro Pro Gln Gly Arg Pro Val Ile Ile Gln Ala Gly Ser Ser Pro 195 200 205	624
GTG GGA CGC GAG TTC GCC GCC CGG CAC GCC GAG GTC ATC TTC ACC CGG Val Gly Arg Glu Phe Ala Ala Arg His Ala Glu Val Ile Phe Thr Arg 210 215 220	672
CAC AAC CGG CTC TCC GAC GCC CAG GAC TTC TAC GGC GAC CTC AAG GCA His Asn Arg Leu Ser Asp Ala Gln Asp Phe Tyr Gly Asp Leu Lys Ala 225 230 235 240	720
CGC GTC GCC CGG CAC GGC CGC GAC CCC GAG AAG GTC CTC GTG TGG CCG Arg Val Ala Arg His Gly Arg Asp Pro Glu Lys Val Leu Val Trp Pro 245 250 255	768
ACC CTC GCG CCG ATC GTC GCC GCC ACC GAC ACC GAG GCG AAG CAG CGC Thr Leu Ala Pro Ile Val Ala Ala Thr Asp Thr Glu Ala Lys Gln Arg 260 265 270	816
CTG CAG GAA CTG CAG GAC CTC ACC CAC GAC CAT GTC GCC CTG CGC ACC Leu Gln Glu Leu Gln Asp Leu Thr His Asp His Val Ala Leu Arg Thr 275 280 285	864
CTT CAG GAC CAC CTC GGC GAC GTC GAC CTG AGC GCG TAC CCG ATC GAC Leu Gln Asp His Leu Gly Asp Val Asp Leu Ser Ala Tyr Pro Ile Asp 290 295 300	912

六、申請專利範圍

GGG Gly 305	CCC Pro	GTC Val	CCC Pro	GAC Asp	ATC Ile 310	CCG Pro	TAC Tyr	ACC Thr	AAC Asn 315	CAG Gln	TCC Ser	CAG Gln	TCG Ser	ACG Thr	ACC Thr 320	960
GAG Glu	CGG Arg	CTG Leu	ATC Ile	GGC Gly 325	CTG Leu	GCC Ala	AGG Arg	CGC Arg	GAG Glu 330	AAC Asn	CTC Leu	AGC Ser	ATC Ile	CGC Arg 335	GAG Glu	1008
CTG Leu	GCC Ala	CTG Leu	CGG Arg 340	CTG Leu	ATG Met	GGC Gly	GAC Asp	ATC Ile 345	GTC Val	GTC Val	GGC Gly	ACA Thr	CCG Pro 350	GAG Glu	CAG Gln	1056
CTC Leu	GCC Ala	GAC Asp 355	CAC His	ATG Met	GAG Glu	AGC Ser	TGG Trp 360	TTC Phe	ACC Thr	GGC Gly	CGC Arg	GGC Gly 365	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	1104
TTC Phe 370	AAC Asn	ATC Ile	GAC Asp	TTC Phe	CCG Pro	TAC Tyr 375	CTG Leu	CCG Pro	GGC Gly	TCC Ser	GCC Ala 380	GAC Asp	GAC Asp	TTC Phe	GTC Val	1152
GAC Asp 385	CAC His	GTG Val	GTG Val	CCC Pro	GAA Glu 390	CTG Leu	CAG Gln	CGC Arg	CGC Arg	GGC Gly 395	CTG Leu	TAC Tyr	CGC Arg	TCG Ser	GGC Gly 400	1200
TAC Tyr	GAG Glu	GGC Gly	ACC Thr	ACC Thr	CTG Leu 405	CGG Arg	GCC Ala	AAC Asn	CTC Leu 410	GGC Gly	ATC Ile	GAC Asp	GCC Ala	CCC Pro 415	CGG Arg	1248
AAG Lys	GCA Ala	GGT Gly	GCA Ala	GCG Ala	GCT Ala	TG										1269

SEQ ID NO: 3:

ATG Met 1	ACC Thr	GCG Ala	CCC Pro	ATC Ile 5	CTC Leu	GTC Val	GCC Ala	ACC Thr	CTC Leu 10	GAC Asp	ACC Thr	CGC Arg	GGC Gly	CCC Pro 15	GCC Ala	48
GCC Ala	ACC Thr	CTC Leu	GGC Gly 20	ACG Thr	ATC Ile	ACC Thr	CGC Arg	GCC Ala 25	GTG Val	CGG Arg	GCC Ala	GCG Ala	GAG Glu 30	GCC Ala	GCC Ala	96
GGA Gly	TTC Phe	GAC Asp 35	GCC Ala	GTC Val	CTG Leu	ATC Ile	GAC Asp 40	GAC Asp	CGG Arg	GCC Ala	GCC Ala	GCC Ala	GGC Gly 45	GTC Val	CAG Gln	144
GGC Gly 50	CGG Arg	TTC Phe	GAG Glu	ACG Thr	ACG Thr	ACG Thr	CTG Leu 55	ACC Thr	GCC Ala	GCG Ala	CTG Leu 60	GCC Ala	GCC Ala	GTC Val	ACC Thr	192
GAG Glu 65	CAC His	ATC Ile	GGC Gly	CTG Leu	ATC Ile 70	ACC Thr	GCC Ala	CCG Pro	CTC Leu 75	CCG Pro	GCC Ala	GAC Asp	CAG Gln	GCC Ala	CCC Pro 80	240
TAC Tyr	CAC His	GTG Val	TCC Ser	CGG Arg 85	ATC Ile	ACC Thr	GCC Ala	TCG Ser	CTC Leu 90	GAC Asp	CAC His	CTC Leu	GCC Ala	CAC His 95	GGC Gly	288
CGC Arg	ACC Thr	GGC Gly	TGG Trp 100	CTC Leu	GCG Ala	AGC Ser	ACG Thr	GAC Asp 105	ACC Thr	ACC Thr	GAC Asp	CCC Pro	GAG Glu 110	GGC Gly	CGC Arg	336

六、申請專利範圍

ACC GGC GAA CTC ATC GAC GTC GTC CGC GGC CTG TGG GAC AGC TTC GAC Thr Gly Glu Leu Ile Asp Val Val Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Asp 115 120 125	384
GAC GAC GCC TTC GTC CAC GAC CGC GCC GAC GGC CTG TAC TGG CGG CTG Asp Asp Ala Phe Val His Asp Arg Ala Asp Gly Leu Tyr Trp Arg Leu 130 135 140	432
CCC GCC GTC CAC CAA CTC GAC CAC CAG GGC AGG CAC TTC GAC GTG GCC Pro Ala Val His Gln Leu Asp His Gln Gly Arg His Phe Asp Val Ala 145 150 155 160	480
GGC CCC CTC AAC GTC GCC CGC CCG CCG CAG GGC CAC CCC GTC GTC GCC Gly Pro Leu Asn Val Ala Arg Pro Pro Gln Gly His Pro Val Val Ala 165 170 175	528
GTC ACC GGC CCC GCC CTC GCC GCG GCC GCC GAC CTC GTC CTG CTC GAC Val Thr Gly Pro Ala Leu Ala Ala Ala Asp Leu Val Leu Leu Asp 180 185 190	576
GAG GCG GCC GAC GCC GCC TCG GTG AAG CAG CAG GCA CCG CAC GCC AAG Glu Ala Ala Asp Ala Ala Ser Val Lys Gln Gln Ala Pro His Ala Lys 195 200 205	624
ATC CTC CTG CCG CTG CCC GGC CCG GCC GCC GAA CTG CCC GCC GAC AGC Ile Leu Leu Pro Leu Pro Gly Pro Ala Ala Glu Leu Pro Ala Asp Ser 210 215 220	672
CCC GCG GAC GGC TTC ACG GTG GCG CTC ACC GGC TCC GAC GAC CCG GTC Pro Ala Asp Gly Phe Thr Val Ala Leu Thr Gly Ser Asp Asp Pro Val 225 230 235 240	720
CTG GCC GCG CTC GCC GCC CGG CCC GGC CCG CCG GAC CGC ACC GCG GCC Leu Ala Ala Leu Ala Ala Arg Pro Gly Arg Pro Asp Arg Thr Ala Ala 245 250 255	768
ACC ACC CTG CGC GAA CGC CTG GGC CTG GCC CGC CCC GAG AGC CGC CAC Thr Thr Leu Arg Glu Arg Leu Gly Leu Ala Arg Pro Glu Ser Arg His 260 265 270	816
GCC CTC ACC ACC GCC TG Ala Leu Thr Thr Ala 275	834

SEQ ID NO: 7:

CTCGAGCCGC GCCCCAGGT GCTGGTGTCTG CTCGCCGTGG AGAAGGGCGC CGACGGCACC	60
GCGCCGCCGG ACCGGCTGCT GATCCACGAC GGCTTCCCCT GGGGCCGCGC CGCCCCGCGC	120
GAAGCGGAGC TGCCCACCGG GCACCGCGCC CTGCCGGCCC TGGCCGGCGC CGCCCGCTGA	180
GGCGCGGCAA CCACCAACAG AAGGAGCCCC C GTG ACA GGA GCC GAC GAC CCG Val Thr Gly Ala Asp Asp Pro 1 5	232
GCA AGG CCC GCG GTC GGC CCG CAG AGT TTC CGA GAC GCG ATG GCG CAG Ala Arg Pro Ala Val Gly Pro Gln Ser Phe Arg Asp Ala Met Ala Gln	280

六、申請專利範圍

10	15	20	
CTG GCG TCG CCC GTC ACC GTC GTA ACC GTC CTC GAC GCG GCC GGA CGC Leu Ala Ser Pro Val Thr Val Val Thr Val Leu Asp Ala Ala Gly Arg 25 30 35			328
CGC CAC GGC TTC ACG GCC GGC TCG GTG GTC TCT GTG TCG CTG GAC CCG Arg His Gly Phe Thr Ala Gly Ser Val Val Ser Val Ser Leu Asp Pro 40 45 50 55			376
CCG CTG GTG ATG GTC GGC ATC GCG CTC ACC TCC AGC TGC CAC ACG GCG Pro Leu Val Met Val Gly Ile Ala Leu Thr Ser Ser Cys His Thr Ala 60 65 70			424
ATG GCC GCC GGC GGC GAG TTC TGC GTC AGC ATC CTC GGC GAG GAC CAG Met Ala Ala Ala Glu Phe Cys Val Ser Ile Leu Gly Glu Asp Gln 75 80 85			472
CGC GCC GTC GCG AAG CCG TGC GCG ACG CAC GGC GCC GAC CGG TTC GCG Arg Ala Val Ala Lys Arg Cys Ala Thr His Gly Ala Asp Arg Phe Ala 90 95 100			520
GGC GGC GAG TTC GCC GCC TGG GAC GGT ACG GGG GTG CCC TAC CTG CCG Gly Gly Glu Phe Ala Ala Trp Asp Gly Thr Gly Val Pro Tyr Leu Pro 105 110 115			568
GAC GCC AAG GTC GTC CTG CCG TGC CCG ACC ACG GAC GTG GTG CGC GCC Asp Ala Lys Val Val Leu Arg Cys Arg Thr Thr Asp Val Val Arg Ala 120 125 130 135			616
GGC GAC CAC GAC CTG GTG CTC GGC ACG CCC GTG GAG ATC CGC ACG GGC Gly Asp His Asp Leu Val Leu Gly Thr Pro Val Glu Ile Arg Thr Gly 140 145 150			664
GAC CCG GCG AAG CCA CCC CTG CTG TGG TAC C Asp Pro Ala Lys Pro Pro Leu Leu Trp Tyr 155 160			695
SEQ ID NO: 8:			
GCG ACC GCC CGG CTC ATC GGC CCG CTG CCG CGC CGG CTG GGC CTC CAG Ala Thr Ala Arg Leu Ile Gly Pro Leu Pro Arg Arg Leu Gly Leu Gln 1 5 10 15			48
GTG CAC CAG GTG ATG ACG GGC GCG TTC GCG CAG GCC CTC GCC CGC TGG Val His Gln Val Met Thr Gly Ala Phe Ala Gln Ala Leu Ala Arg Trp 20 25 30			96
CGG GGC AGC CGC GCC GTC ACC TTC GAC GTG GAG ACC CAC GGA CGG CAC Arg Gly Ser Arg Ala Val Thr Phe Asp Val Glu Thr His Gly Arg His 35 40 45			144
GGC CGC GAC GAA CTG TTC CGT ACC GTC GGC TGG TTC ACC TCC ATC CAC Gly Arg Asp Glu Leu Phe Arg Thr Val Gly Trp Phe Thr Ser Ile His 50 55 60			192
CCC GTC GTC CTG GGC GCG GAC CGC TCC GTG CAC CCC GAG CAG TAC CTC Pro Val Val Leu Gly Ala Asp Arg Ser Val His Pro Glu Gln Tyr Leu 65 70 75 80			240

六、申請專利範圍

GCC CAG ATC GGC GCG GCG CTG ACC GCC GTA CCG GAC GGC GGC GTC GGC Ala Gln Ile Gly Ala Ala Leu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Gly Val Gly 85 90 95	288
TTC GGC GCC TGC CGC GAG TTC TCC CCG GAC GCC GGG CTG CGC ACT CTG Phe Gly Ala Cys Arg Glu Phe Ser Pro Asp Ala Gly Leu Arg Thr Leu 100 105 110	336
CTG CGT GAC CTG CCG CCC GCC CTG GTG TGC TTC AAC TAC TAC GGT CAG Leu Arg Asp Leu Pro Pro Ala Leu Val Cys Phe Asn Tyr Tyr Gly Gln 115 120 125	384
GCC GAC CAG TTG AGC CCG AAC GGC GGT TTC CGT ATG TCG GGC CGT CCC Ala Asp Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Phe Arg Met Ser Gly Arg Pro 130 135 140	432
ATC CCG CGC GAG CAC TCC GCC CGC TGC GAG CGC GTC TAC GGC ATC GAG Ile Pro Arg Glu His Ser Ala Arg Cys Glu Arg Val Tyr Gly Ile Glu 145 150 155 160	480
GTG TAC GGC ATC GTC CAC GGC GGC CGC CTG CGC ATG GGC CTG ACC TGG Val Tyr Gly Ile Val His Gly Gly Arg Leu Arg Met Gly Leu Thr Trp 165 170 175	528
GTG CCG AGC CCG GCG GAC GGT GTG GAC GAG GCC GGC GTC GAC GCG CTC Val Pro Ser Pro Ala Asp Gly Val Asp Glu Ala Gly Val Asp Ala Leu 180 185 190	576
GTG GAG CAG ATG AGC TGG GTG CTG GCC ACG CTC GCG GGC GCC GAC CCG Val Glu Gln Met Ser Trp Val Leu Ala Thr Leu Ala Gly Ala Asp Pro 195 200 205	624
CAC GCC GTG ACC CCG G His Ala Val Thr Pro 210	640

SEQ ID NO: 9:

GGCGTCAAGA ACCTGCCGCT GACCGTACGG CGCGGCTGAC ACAGACAAGG GGGCCACCTG	60
GTG CGC ACC GTG CGA ACC CTG CTG ATC GAC AAC TAC GAC TCG TTC ACC Val Arg Thr Val Arg Thr Leu Leu Ile Asp Asn Tyr Asp Ser Phe Thr 1 5 10 15	108
TAC AAC CTC TTC CAG ATG CTG GCC GAG GTG AAC GGC GCC GCT CCG CTC Tyr Asn Leu Phe Gln Met Leu Ala Glu Val Asn Gly Ala Ala Pro Leu 20 25 30	156
GTC GTC CGC AAC GAC GAC ACC CGC ACC TGG CAG GCC CTG GCG CCG GGC Val Val Arg Asn Asp Asp Thr Arg Thr Trp Gln Ala Leu Ala Pro Gly 35 40 45	204
GAC TTC GAC AAC GTC GTC GTC TCA CCC GGC CCC GGC CAC CCC GCC ACC Asp Phe Asp Asn Val Val Ser Pro Gly Pro Gly His Pro Ala Thr 50 55 60	252
GAC ACC GAC CTG GGC CTC AGC CGC CGG GTG ATC ACC GAA TGG GAC CTG Asp Thr Asp Leu Gly Leu Ser Arg Arg Val Ile Thr Glu Trp Asp Leu 65 70 75 80	300

六、申請專利範圍

CCG CTG CTC GGG GTG TGC CTG GGC CAC CAG GCC CTG TGC CTG CTC GCC Pro Leu Leu Gly Val Cys Leu Gly His Gln Ala Leu Cys Leu Leu Ala	348
85 90 95	
GGC GCC GCC GTC GTC CAC GCA CCC GAA CCC TTT CAC GGC CGC ACC AGC Gly Ala Ala Val Val His Ala Pro Glu Pro Phe His Gly Arg Thr Ser	396
100 105 110	
GAC ATC CGC CAC GAC GGG CAG GGC CTG TTC GCG AAC ATC CCC TCC CCG Asp Ile Arg His Asp Gly Gln Gly Leu Phe Ala Asn Ile Pro Ser Pro	444
115 120 125	
CTG ACC GTG GTC CGC TAC CAC TCG CTG ACC GTC CGG CAA CTG CCC GCC Leu Thr Val Val Arg Tyr His Ser Leu Thr Val Arg Gln Leu Pro Ala	492
130 135 140	
GAC CTG CGC GCC ACC GCC CAC ACC GCC GAC GGG CAG CTG ATG GCC GTC Asp Leu Arg Ala Thr Ala His Thr Ala Asp Gly Gln Leu Met Ala Val	540
145 150 155 160	
GCC CAC CGC CAC CTG CCC CGC TTC GGC GTG CAG TTC CAC CCC GAA TCG Ala His Arg His Leu Pro Arg Phe Gly Val Gln Phe His Pro Glu Ser	588
165 170 175	
ATC AGC AGC GAA CAC GGC CAC CGG ATG CTC GCC AAC TTC CGC GAC CTG Ile Ser Ser Glu His Gly His Arg Met Leu Ala Asn Phe Arg Asp Leu	636
180 185 190	
TCC CTG CGC Ser Leu Arg	645
195	
SEQ ID NO: 10:	
CTCGAGGACG AGTGGATCGC CTCCGGCGGC GCCCCGTCC CCACGCCCGT GCACGCGTCC	60
GCGTCCGCGC GGGGGGCCGT GTC GTG ACC GCC GCC GCA CCC ACC CTC GCC	110
Val Thr Ala Ala Ala Pro Thr Leu Ala	
1 5	
CAG GCG CTG GAC GAG GCC ACC GGG CAG CTG ACC GGC GCC GGG ATC ACC Gln Ala Leu Asp Glu Ala Thr Gly Gln Leu Thr Gly Ala Gly Ile Thr	158
10 15 20 25	
GCC GAC GCC GCC CGG GCC GAC ACC CGG CTG CTG GCC GCC CAC GCC TGC Ala Asp Ala Ala Arg Ala Asp Thr Arg Leu Leu Ala Ala His Ala Cys	206
30 35 40	
CAG GTC GCC CCG GGG GAC CTC GAC ACC TGC CTG GCC GGC CCG GTG CCG Gln Val Ala Pro Gly Asp Leu Asp Thr Cys Leu Ala Gly Pro Val Pro	254
45 50 55	
CCC CGG TTC TGG CAC TAC GTC CGG CGC CGT CTG ACC CGC GAA CCC GCC Pro Arg Phe Trp His Tyr Val Arg Arg Arg Leu Thr Arg Glu Pro Ala	302
60 65 70	
GAA CGC ATC GTC GGC CAC GCC TAC TTC ATG GGC CAC CGC TTC GAC CTG Glu Arg Ile Val Gly His Ala Tyr Phe Met Gly His Arg Phe Asp Leu	350
75 80 85	

六、申請專利範圍

GCC Ala 90	CCC Pro	GGC Gly	GTC Val	TTC Phe	GTC Val 95	CCC Pro	AAA Lys	CCC Pro	GAG Glu	ACC Thr 100	GAG Glu	GAG Glu	ATC Ile	ACC Thr	CGG Arg 105	398
GAC Asp	GCC Ala	ATC Ile	GCC Ala	CGC Arg 110	CTG Leu	GAG Glu	GCC Ala	CTC Leu	GTC Val 115	CGC Arg	CGC Arg	GGC Gly	ACC Thr	ACC Thr 120	GCA Ala	446
CCC Pro	CTG Leu	GTC Val 125	GTC Val	GAC Asp	CTG Leu	TGC Cys	GCC Ala	GGA Gly 130	CCG Pro	GGC Gly	ACC Thr	ATG Met	GCC Ala 135	GTC Val	ACC Thr	494
CTG Leu	GCC Ala	CGC Arg 140	CAC His	GTA Val	CCG Pro	GCC Ala	GCC Ala 145	CGC Arg	GTC Val	CTG Leu	GGC Gly	ATC Ile 150	GAA Glu	CTC Leu	TCC Ser	542
CAG Gln 155	GCC Ala	GCC Ala	GCC Ala	CGC Arg	GCC Ala	GCC Ala 160	CGG Arg	CGC Arg	AAC Asn	GCC Ala	CGC Arg 165	GGC Gly	ACC Thr	GGC Gly	GCC Ala	590
CGC Arg 170	ATC Ile	GTG Val	CAG Gln	GGC Gly	GAC Asp 175	GCC Ala	CGC Arg	GAC Asp	GCC Ala	TTC Phe 180	CCC Pro	GAA Glu	CTG Leu	AGC Ser	GGC Gly 185	638
ACC Thr	GTC Val	GAC Asp	CTC Leu	GTC Val 190	GTC Val	ACC Thr	AAC Asn	CCG Pro	CCC Pro 195	TAC Tyr	ATC Ile	CCC Pro	ATC Ile	GGA Gly 200	CTG Leu	686
CGC Arg	ACC Thr	TCC Ser	GCA Ala 205	CCC Pro	GAA Glu	GTG Val	CTC Leu	GAG Glu 210	CAC His	GAC Asp	CCG Pro	CCG Pro	CTG Leu 215	GCC Ala	CTG Leu	734
TGG Trp	GCC Ala	GGG Gly 220	GAG Glu	GAG Glu	GGC Gly	CTC Leu	GGC Gly 225	ATG Met	ATC Ile	CGC Arg	GCC Ala	ATG Met 230	GAA Glu	CGC Arg	ACC Thr	782
GCG Ala 235	GCC Ala	CGG Arg	CTG Leu	CTG Leu	GCC Ala	CCC Pro 240	GGC Gly	GGC Gly	GTC Val	CTG Leu	CTC Leu 245	CTC Leu	GAA Glu	CAC His	GGC Gly	830
TCC Ser 250	TAC Tyr	CAA Gln	CTC Leu	GCC Ala	TCC Ser 255	GTG Val	CCC Pro	GCC Ala	CTG Leu	TTC Phe 260	CGC Arg	GCA Ala	ACC Thr	GGC Gly	CGC Arg 265	878
TGG Trp	AGC Ser	CAC His	GCC Ala	TCG Ser 270	TCC Ser	CGT Arg	CCC Pro	ACC Thr	TGC Cys 275	AAC Asn	GAC Asp	GGC Gly	TGC Cys	CTG Leu 280	ACC Thr	926
GCC Ala	GTA Val	CGC Arg	AAC Asn 285	CAC His	ACC Thr	TGC Cys	GCA Ala	CCG Pro 290	CCC Pro	GCC Ala	TGACACGGCG	TCACGGCACG				979
GCCGGCCTGT CGGCAACGAC CCTACGCCAT TGACAAACCG ACCGTGCCGT TTTTTTAATG																1039
TCGGGGTGGC GGA																1052

六、申請專利範圍

ATG TCC CGT CGC CTG TTC ACC TCG GAG TCC GTG ACC GAG GGC CAC CCC Met Ser Arg Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Gly His Pro	48
1 5 10 15	
GAC AAG ATC GCC GAC CAG ATC AGT GAC ACC GTG CTC GAC GCC CTG CTG Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Thr Val Leu Asp Ala Leu Leu	96
20 25 30	
CGC GAG GAC CCC GCC TCA CGC GTC GCG GTC GAG ACC CTG ATC ACC ACC Arg Glu Asp Pro Ala Ser Arg Val Ala Val Glu Thr Leu Ile Thr Thr	144
35 40 45	
GGC CAG GTC CAC ATC GCC GGC GAG GTC ACC ACC AAG GCG TAC GCG CCC Gly Gln Val His Ile Ala Gly Glu Val Thr Thr Lys Ala Tyr Ala Pro	192
50 55 60	
ATC GCC CAA CTG GTC CGC GAC ACG ATC CTG GCC ATC GGC TAC GAC TCG Ile Ala Gln Leu Val Arg Asp Thr Ile Leu Ala Ile Gly Tyr Asp Ser	240
65 70 75 80	
TCC GCC AAG GGC TTC GAC GGC GCC TCC TGC GGC GTC TCC GTC TCC ATC Ser Ala Lys Gly Phe Asp Gly Ala Ser Cys Gly Val Ser Val Ser Ile	288
85 90 95	
GGC GCG CAG TCC CCG GAC ATC GCC CAG GGC GTC GAC AGC GCC TAC GAG Gly Ala Gln Ser Pro Asp Ile Ala Gln Gly Val Asp Ser Ala Tyr Glu	336
100 105 110	
ACC CGC GTC GAG GGC GAG GAC GAC GAG CTC GAC CAG CAG GGC GCC GGC Thr Arg Val Glu Gly Glu Asp Asp Glu Leu Asp Gln Gln Gly Ala Gly	384
115 120 125	
GAC CAG GGC CTG ATG TTC GGC TAC GCC ACC GAC GAG ACC CCC TCG CTG Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asp Glu Thr Pro Ser Leu	432
130 135 140	
ATG CCG CTG CCC ATC GAG CTC GCC CAC CGC CTC TCG CGC CGG CTC ACC Met Pro Leu Pro Ile Glu Leu Ala His Arg Leu Ser Arg Arg Leu Thr	480
145 150 155 160	
GAG GTC CGC AAG GAC GGC ACC GTC CCC TAC CTG CGC CCC GAC GGC AAG Glu Val Arg Lys Asp Gly Thr Val Pro Tyr Leu Arg Pro Asp Gly Lys	528
165 170 175	
ACC CAG GTC ACC ATC GAG TAC CAG GGC AGC CGC CCG GTG CGC CTG GAC Thr Gln Val Thr Ile Glu Tyr Gln Gly Ser Arg Pro Val Arg Leu Asp	576
180 185 190	
ACC GTC GTC GTC TCC TCC CAG CAC GCC GCC GAC ATC GAC CTC GGC TCC Thr Val Val Val Ser Ser Gln His Ala Ala Asp Ile Asp Leu Gly Ser	624
195 200 205	
CTG CTC ACC CCC GAC ATC CGC GAG CAC GTC GTC GAG CAC GTC CTC GCC Leu Leu Thr Pro Asp Ile Arg Glu His Val Val Glu His Val Leu Ala	672
210 215 220	
GCA CTC GCC GAG GAC GGC ATC AAG CTC GAG ACG GAC AAC TAC CGC CTG Ala Leu Ala Glu Asp Gly Ile Lys Leu Glu Thr Asp Asn Tyr Arg Leu	720
225 230 235 240	
CTG GTC AAC CCG ACC GGC CGT TTC GAG ATC GGC GGC CCG ATG GGC GAC Leu Val Asn Pro Thr Gly Arg Phe Glu Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp	768
245 250 255	

六、申請專利範圍

GCC GGC CTG ACC GGC CGC AAG ATC ATC ATC GAC ACG TAC GGC GGC ATG Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Ile Asp Thr Tyr Gly Gly Met	816
260 265 270	
GCC CGC CAC GGC GGT GGC GCG TTC TCC GGC AAG GAC CCG TCC AAG GTC Ala Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val	864
275 280 285	
GAC CGT TCC GCC GCG TAC GCG ATG CGC TGG GTC GCC AAG AAC GTC GTC Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn Val Val	912
290 295 300	
GCC GCG GGC CTC GCC TCC CGC TGC GAG GTC CAG GTC GCC TAC GCC ATC Ala Ala Gly Leu Ala Ser Arg Cys Glu Val Gln Val Ala Tyr Ala Ile	960
305 310 315 320	
GGC AAG GCC GAG CCG GTC GGC CTG TTC GTC GAG ACG TTC GGC ACC GGC Gly Lys Ala Glu Pro Val Gly Leu Phe Val Glu Thr Phe Gly Thr Gly	1008
325 330 335	
ACC GTC GCC CAG GAG CGC ATC GAG AAG GCC ATC ACC GAG GTC TTC GAC Thr Val Ala Gln Glu Arg Ile Glu Lys Ala Ile Thr Glu Val Phe Asp	1056
340 345 350	
CTG CGC CCC GCG GCC ATC ATC CGC GAC CTC GAC CTG CTG CGG CCC ATC Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Asp Leu Asp Leu Leu Arg Pro Ile	1104
355 360 365	
TAC GCC GCC ACC GCC GCC TAC GGC CAC TTC GGC CGC GAA CTG CCC GAC Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu Leu Pro Asp	1152
370 375 380	
TTC ACC TGG GAG CGG ACC GAC CGC GCC CAC CGG CTC AAG GCC GCG GCC Phe Thr Trp Glu Arg Thr Asp Arg Ala His Arg Leu Lys Ala Ala Ala	1200
385 390 395 400	
GGT CTC TG Gly Leu	1209

SEQ ID NO: 5:

GATCGGCTCC TGACGGAGCG GCGGCGCGCG GCGCGGGCGC ATCAGCGGCG TGTCACGGC	60
GCTGCCGACA CTGGGCGCGA CGCGAGGACG AAGCCGGAAG GGACCAACG ATG CTG Met Leu	115
1	
GAC GGA TGC GTT CCC TGG CCC GAG GAT GTG GCC GCG AAG TAC CGG GCG Asp Gly Cys Val Pro Trp Pro Glu Asp Val Ala Ala Lys Tyr Arg Ala	163
5 10 15	
GCC GGC TAC TGG CGG GGC GAG CCG CTG GGC ATG CTG CTG GGC CGC TGG Ala Gly Tyr Trp Arg Gly Glu Pro Leu Gly Met Leu Leu Gly Arg Trp	211
20 25 30	
GCG GAG CAG TAC GGC GAG CGG GAG GCG CTG GTC GGC GCG GAC GGG TGC	259

六、申請專利範圍

Ala	Glu	Gln	Tyr	Gly	Glu	Arg	Glu	Ala	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Cys	
35					40					45					50	
TCC	CGT	GTC	ACC	TAC	CGT	GCC	CTG	GAC	CGC	TGG	TGC	GAC	CGG	CTG	GCG	307
Ser	Arg	Val	Thr	Tyr	Arg	Ala	Leu	Asp	Arg	Trp	Cys	Asp	Arg	Leu	Ala	
				55					60					65		
GCG	GGG	TTC	GCG	GCG	CGC	GGG	ATC	GGC	GCC	GGC	GAG	CGG	GTG	CTG	GTG	355
Ala	Gly	Phe	Ala	Ala	Arg	Gly	Ile	Gly	Ala	Gly	Glu	Arg	Val	Leu	Val	
			70				75						80			
CAG	CTG	CCG	AAC	ACG	CCC	GAG	TTC	GTC	GCG	GTG	TGC	TTC	GCG	CTG	TTC	403
Gln	Leu	Pro	Asn	Thr	Pro	Glu	Phe	Val	Ala	Val	Cys	Phe	Ala	Leu	Phe	
		85					90					95				
CGT	CTG	GGC	GCG	CTG	CCG	GTG	TTC	GCG	CTG	CCC	GCG	CAC	CGT	GCC	GCC	451
Arg	Leu	Gly	Ala	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Leu	Pro	Ala	His	Arg	Ala	Ala	
	100					105					110					
GAG	GTG	GGG	CAC	CTG	CTC	GAG	CTG	TCC	GGC	GCC	GTC	GCC	CAC	ATC	CTG	499
Glu	Val	Gly	His	Leu	Leu	Glu	Leu	Ser	Gly	Ala	Val	Ala	His	Ile	Leu	
115					120					125					130	
CCG	GGC	ACC	GGC	ACC	GGC	TAC	GAC	CAT	GTC	GCG	GCG	GCC	GTG	GAG	GCC	547
Pro	Gly	Thr	Gly	Thr	Gly	Tyr	Asp	His	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	
				135					140					145		
CGT	GCC	CGC	CGT	GCC	CGC	CCG	GTG	CAG	GTG	TTC	GTG	GCG	GGC	GAG	GCG	595
Arg	Ala	Arg	Arg	Ala	Arg	Pro	Val	Gln	Val	Phe	Val	Ala		Gly	Ala	
				150				155					160			
CCC	GCG	GTG	CTG	CCC	GAG	GGG	TTC	ACC	GCG	CTG	GCC	GAC	GTG	GAC	GGC	643
Pro	Ala	Val	Leu	Pro	Glu	Gly	Phe	Thr	Ala	Leu	Ala	Asp	Val	Asp	Gly	
		165					170					175				
GAC	CCG	GTG	GCG	CCG	GCG	GAC	GTG	GAC	GCC	TTC	CGA	CGT	GGC	GTC	TTC	691
Asp	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Asp	Val	Asp	Ala	Phe	Arg	Arg	Gly	Val	Phe	
	180					185					190					
CTG	CTG	TCC	GGG	GGG	ACG	ACC	GCG	CTG	CCG	AAG	CTG	ATC	CCG	CGC	ACC	739
Leu	Leu	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	Ala	Leu	Pro	Lys	Leu	Ile	Pro	Arg	Thr	
195					200					205					210	
CAC	GAC	GAC	TAC	GCC	TAC	CAG	TGC	CGG	GTC	ACG	GCC	GGT	ATC	TGC	GGC	787
His	Asp	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Cys	Arg	Val	Thr	Ala	Gly	Ile	Cys	Gly	
				215					220					225		
CTG	GAC	GCG	GAC	AGT	GTC	TAT	CTG	GCG	GTG	CTG	CCG	GCC	GAG	TTC	AAC	835
Leu	Asp	Ala	Asp	Ser	Val	Tyr	Leu	Ala	Val	Leu	Pro	Ala	Glu	Phe	Asn	
				230				235					240			
TTC	CCC	TTC	GGC	TGC	CCG	GGC	ATC	CTG	GGC	ACC	CTG	CAC	GCC	GGC	GGG	883
Phe	Pro	Phe	Gly	Cys	Pro	Gly	Ile	Leu	Gly	Thr	Leu	His	Ala	Gly	Gly	
		245					250					255				
CGG	GTG	GTG	TTC	GCG	CTG	TCA	CCG	CAG	CCC	GAG	GAG	TGC	TTC	GCG	CTG	931
Arg	Val	Val	Phe	Ala	Leu	Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	Glu	Cys	Phe	Ala	Leu	
	260					265						270				
ATC	GAA	CGC	GAA	CAC	GTC	ACC	TTC	ACC	TCC	GTC	ATC	CCC	ACG	ATC	GTG	979
Ile	Glu	Arg	Glu	His	Val	Thr	Phe	Thr	Ser	Val	Ile	Pro	Thr	Ile	Val	
275					280					285					290	
CAC	CTG	TGG	CTG	GCG	GCC	GCC	GCA	CAA	GGC	CAC	GGC	CGC	GAC	CTG	GGC	1027
His	Leu	Trp	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	His	Gly	Arg	Asp	Leu	Gly	
				295				300						305		
AGC	CTT	CAG	CTG	CTG	CAG	GTC	GGC	AGC	GCC	AAA	CTC	CAC	GAG	GAG	CTC	1075
Ser	Leu	Gln	Leu	Leu	Gln	Val	Gly	Ser	Ala	Lys	Leu	His	Glu	Glu	Leu	

六、申請專利範圍

310	315	320	
GCC GCC CGG ATC GGC CCC GAA CTG GGG GTG CGG CTG CAG CAG GTG TTC Ala Ala Arg Ile Gly Pro Glu Leu Gly Val Arg Leu Gln Gln Val Phe 325 330 335			1123
GGC ATG GCC GAG GGA CTG CTG ACC TTC ACC CGC GAC GAC GAC CCG GCG Gly Met Ala Glu Gly Leu Thr Phe Thr Arg Asp Asp Asp Pro Ala 340 345 350			1171
GAC GTG GTG CTG CGC ACC CAG GGC CGG CCG GTG TCC GAG GCC GAC GAG Asp Val Val Leu Arg Thr Gln Gly Arg Pro Val Ser Glu Ala Asp Glu 355 360 365 370			1219
ATA CGC GTC GCC GAC CCC GAC GGC CGG CCC GTG CCC CGC GGT GAG ACC Ile Arg Val Ala Asp Pro Asp Gly Arg Pro Val Pro Arg Gly Glu Thr 375 380 385			1267
GGT GAA CTG CTC ACC CGC GGC CCC TAC ACG CTG CGC GGC TAC TAC CGG Gly Glu Leu Leu Thr Arg Gly Pro Tyr Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Arg 390 395 400			1315
GCC CCC GAG CAC AAC GCC CGC GCG TTC ACC GAG GAC GGC TTC TAC CGC Ala Pro Glu His Asn Ala Arg Ala Phe Thr Glu Asp Gly Phe Tyr Arg 405 410 415			1363
AGC GGC GAT CTG GTG CGG CTC ACC GCC GAC GGG CAG TTG GTG GTG GAG Ser Gly Asp Leu Val Arg Leu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Val Val Glu 420 425 430			1411
GGC AGG ATC AAG GAC GTC GTC ATC CGC GGC GGC GAC AAG GTC TCC GCG Gly Arg Ile Lys Asp Val Val Ile Arg Gly Gly Asp Lys Val Ser Ala 435 440 445 450			1459
ACC GAG GTC GAG GGC CAC CTG GGC GCC CAC CCC GAC GTC CAG CAG GCC Thr Glu Val Glu Gly His Leu Gly Ala His Pro Asp Val Gln Gln Ala 455 460 465			1507
GCC GTC GTC GCC ATG CCC GAC CCG GTG TGG GGC GAG AAG GTC TGC GCC Ala Val Val Ala Met Pro Asp Pro Val Trp Gly Glu Lys Val Cys Ala 470 475 480			1555
TAC ATC GTG CCC GCA CCC GGC CGT CCC GCA CCG CCG ATG GCG GCG CTG Tyr Ile Val Pro Ala Pro Gly Arg Pro Ala Pro Pro Met Ala Ala Leu 485 490 495			1603
CGC CGG CTG CTG CGC GCG CGG GGA CTG GCC GAC TAC AAG CTT CCC GAC Arg Arg Leu Leu Arg Ala Arg Gly Leu Ala Asp Tyr Lys Leu Pro Asp 500 505 510			1651
CGG GTG GAG GTC GTC GAC GCG TTC CCG CTG ACC GGC CTC AAC AAG GTC Arg Val Glu Val Val Asp Ala Phe Pro Leu Thr Gly Leu Asn Lys Val 515 520 525 530			1699
GAC AAG AAG GCC CTG GCG GCC GAC ATC GCC GCC AAG ACC GCC CCC ACC Asp Lys Lys Ala Leu Ala Ala Asp Ile Ala Ala Lys Thr Ala Pro Thr 535 540 545			1747
CGC CCC ACC ACC GCC GGC CAC GGC CCG ACC ACG GAC GGC GAT ACG GCC Arg Pro Thr Thr Ala Gly His Gly Pro Thr Thr Asp Gly Asp Thr Ala 550 555 560			1795
GGT GGG GGT GGG TCC GCG GGC GGG GTG ACG GCC GCC GGT GGC GGG CGG Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Gly Gly Gly Arg 565 570 575			1843
GAG GAG GCG GCG TGAGCGGGCC CGGGCCCGAG GGCG Glu Glu Ala Ala 580			1879

六、申請專利範圍

SEQ ID NO: 11:

AG ATC TTC GAG CAC AAG ACC GTC GCC CAG CTC GCA CCC GTC GCC GAG	47
Ile Phe Glu His Lys Thr Val Ala Gln Leu Ala Pro Val Ala Glu	
1 5 10 15	
ACG CTC GCC GAC ACC ACC CGC GAG GAA CCC GCC GCC GTC GCC GCG ACC	95
Thr Leu Ala Asp Thr Thr Arg Glu Glu Pro Ala Ala Val Ala Ala Thr	
20 25 30	
GGC GAC GTA CCG CTC ACC CCG ATC ATG CAC TGG CTG CGC GAA CGC GGC	143
Gly Asp Val Pro Leu Thr Pro Ile Met His Trp Leu Arg Glu Arg Gly	
35 40 45	
GGC CCC GTC GAC GCG TTC AGC CAG ACG ATG GCC GTC ACC GTC CCC GCC	191
Gly Pro Val Asp Ala Phe Ser Gln Thr Met Ala Val Thr Val Pro Ala	
50 55 60	
GGC CTG GAC CGG GAA CGG CTC GTG GCC GCC CTG CAG	227
Gly Leu Asp Arg Glu Arg Leu Val Ala Ala Leu Gln	
65 70 75	

SEQ ID NO: 12:

CTC GAG TAC GAC ACC GCC CTG TAC GAG CGG GCC ACC GCC GAA GCC CTC	48
Leu Glu Tyr Asp Thr Ala Leu Tyr Glu Arg Ala Thr Ala Glu Ala Leu	
1 5 10 15	
ACC GGC CGG CTG CTG CGG CTC CTC GAC GCC GTC GTC ACC GAC CCG CAG	96
Thr Gly Arg Leu Leu Arg Leu Leu Asp Ala Val Val Thr Asp Pro Gln	
20 25 30	
GCG CCG GTC GGC TCC CAC GAC CTC CTC GAA GAG GCC GAA CAC GCC CGC	144
Ala Pro Val Gly Ser His Asp Leu Leu Glu Glu Ala Glu His Ala Arg	
35 40 45	
CTG GCA GCC TTC AAC GAC ACC GCC CGG CCC GTG CCG CGA GCC GGC CTC	192
Leu Ala Ala Phe Asn Asp Thr Ala Arg Pro Val Pro Arg Ala Gly Leu	
50 55 60	
GCC GAA CTC TTC ACC GCC CAG GCC CGC CGC ACC GCC GAT GCG GTC GCC	240
Ala Glu Leu Phe Thr Ala Gln Ala Arg Arg Thr Ala Asp Ala Val Ala	
65 70 75 80	
GTC GTC G	247
Val Val	

六、申請專利範圍

SEQ ID NO: 13:

GC ATG CCC CCC GTC ACC CCC TAC CGC GCC TAC CTG GCC CAC CTC GCC	47
Met Pro Pro Val Thr Pro Tyr Arg Ala Tyr Leu Ala His Leu Ala	
1 5 10 15	
GGC CGT GAC GAC GAC GCC GCC CGC GCC GCG TGG CGG ACC GCC CTC GCG	95
Gly Arg Asp Asp Asp Ala Ala Arg Ala Ala Trp Arg Thr Ala Leu Ala	
20 25 30	
GAC CTG GAG GAG CCG AGC CTC GTC GCG GGC GCC GGA GCA GGC CGC GGC	143
Asp Leu Glu Glu Pro Ser Leu Val Ala Gly Ala Gly Ala Gly Arg Gly	
35 40 45	
GCC GCC GAC GGC TCC GCC CTG CCC GGC CAG ATC CCC GGT TAC CGA GCT C	192
Ala Ala Asp Gly Ser Ala Leu Pro Gly Gln Ile Pro Gly Tyr Arg Ala	
50 55 60	

SEQ ID NO: 14:

CTG CAG GTC GAG GGC CGG CCC GCG CAC CTG GAA CTG CCC TGC GAC CAC	48
Leu Gln Val Glu Gly Arg Pro Ala His Leu Glu Leu Pro Cys Asp His	
1 5 10 15	
CCC CGG CCC GCC GTC GCC ACC CAC CGC GGC GCC ACC GTG CCC TTC CAC	96
Pro Arg Pro Ala Val Ala Thr His Arg Gly Ala Thr Val Pro Phe His	
20 25 30	
ATC GAC GCC GGC CTC CAC GAG AAG CTG ACC GCG CTC TCC AAG GCC TGC	144
Ile Asp Ala Gly Leu His Glu Lys Leu Thr Ala Leu Ser Lys Ala Cys	
35 40 45	
GAC AGC AGC CTG TTC ATG GTG CTC CAG GCC GCG GTC GCC GCC CTG CTC	192
Asp Ser Ser Leu Phe Met Val Leu Gln Ala Ala Val Ala Ala Leu Leu	
50 55 60	
ACC CGG CAC GGC GCC GGC ACC GAC ATC CCC GTC GGC AGC CCC GTC GCC	240
Thr Arg His Gly Ala Gly Thr Asp Ile Pro Val Gly Ser Pro Val Ala	
65 70 75 80	
GGC CGC ACC GAC GAC GCC CTC GAC GAC CTG GTG GGC TTC TTC GTC AAC	288
Gly Arg Thr Asp Asp Ala Leu Asp Asp Leu Val Gly Phe Phe Val Asn	
85 90 95	
ACC CTC GTC CTG CGC ACC GAC ACC TCC GGC GAC CCC ACC TTC CGC GAA	336
Thr Leu Val Leu Arg Thr Asp Thr Ser Gly Asp Pro Thr Phe Arg Glu	
100 105 110	
CTC GTC GCA CGC GTG CGG CAG TTC GAC CTC GCC GCC TAC ACG CAC CAG	384
Leu Val Ala Arg Val Arg Gln Phe Asp Leu Ala Ala Tyr Thr His Gln	
115 120 125	
GAC ATG CCG TTC GAA AAG CTC GTC GAA GAG GTC AAC CCC GAG CGC TCC	432
Asp Met Pro Phe Glu Lys Leu Val Glu Glu Val Asn Pro Glu Arg Ser	
130 135 140	
CTG GCC CGC AAC CCG CTC TTC CAG GTC GTC CTG GCG CTG CAG	474
Leu Ala Arg Asn Pro Leu Phe Gln Val Val Leu Ala Leu Gln	
145 150 155	

六、申請專利範圍

SEQ ID NO: 15:

GC ATG CCG CGC TCC CTC GAC CTG TAC GTC GCA CTG CTC GCC GTC CTC	47
Met Pro Arg Ser Leu Asp Leu Tyr Val Ala Leu Leu Ala Val Leu	
1 5 10 15	
AAG ACC GGC GCC GCC TAC CTG CCC GTC GAC ATC TCC TAC CCG GCC GAA	95
Lys Thr Gly Ala Ala Tyr Leu Pro Val Asp Ile Ser Tyr Pro Ala Glu	
20 25 30	
CGC ATC GCG TTC ATG ATC GAG GAC GCC CGC CCG GTG ACC GTC CTC GAC	143
Arg Ile Ala Phe Met Ile Glu Asp Ala Arg Pro Val Thr Val Leu Asp	
35 40 45	
CGC CTG CCC GAC GAC CTG GGC GCC TAC CGG GAC ACC GAC CTC ACC GAC	191
Arg Leu Pro Asp Asp Leu Gly Ala Tyr Arg Asp Thr Asp Leu Thr Asp	
50 55 60	
GCC GAC CGC ACG GCG CCG CTA CGG CCC GAA CAC CCG GCG TAC GTC ATC	239
Ala Asp Arg Thr Ala Pro Leu Arg Pro Glu His Pro Ala Tyr Val Ile	
65 70 75	
CAC ACC TCC GGC TCC ACC GGC ACC CCC AAG GCC GTC GTC ATG CCC CAC	287
His Thr Ser Gly Ser Thr Gly Thr Pro Lys Ala Val Val Met Pro His	
80 85 90 95	
GCC GGC CTG GTC AAC CTG CTG ACC TGG CAC GCC CGC CGC TTC CCC GGC	335
Ala Gly Leu Val Asn Leu Leu Thr Trp His Ala Arg Arg Phe Pro Gly	
100 105 110	
GGC ACC GGG GTG CGC ACC GCC CAG TTC ACC GCC ATC GGC TTC GAC TTC	383
Gly Thr Gly Val Arg Thr Ala Gln Phe Thr Ala Ile Gly Phe Asp Phe	
115 120 125	
TCG GTG CAG GAG ATC CTC TCC CCG CTC GTC ATG GGC AAG ACC CTC GCC	431
Ser Val Gln Glu Ile Leu Ser Pro Leu Val Met Gly Lys Thr Leu Ala	
130 135 140	
GTG CCC TCG GAA GAG GTC CGC CAC AGC GCC GAA CTG CTG GCC GGC TGG	479
Val Pro Ser Glu Glu Val Arg His Ser Ala Glu Leu Leu Ala Gly Trp	
145 150 155	
CTC GAG	485
Leu Glu	
160	

SEQ ID NO: 16:

CTG CAG GCC GAG GGC GCC GAA GTG AGC CTG CTG GCC GTC CTC GAC GGC	48
Leu Gln Ala Glu Gly Ala Glu Val Ser Leu Leu Ala Val Leu Asp Gly	
1 5 10 15	
TAC CCC GAC GCC TAC GAC GGC ACC GAG CAC GAG GTC GGC GAG GAA CAG	96
Tyr Pro Asp Ala Tyr Asp Gly Thr Glu His Glu Val Gly Glu Glu Gln	
20 25 30	

六、申請專利範圍

GTC	CTG	GCG	ATC	CTC	CTC	AAC	GCC	GCC	GGC	GTC	GAC	CGG	GCC	CAG	GCC	144
Val	Leu	Ala	Ile	Leu	Leu	Asn	Ala	Ala	Gly	Val	Asp	Arg	Ala	Gln	Ala	
		35					40					45				
TTC	GGC	GAC	GCC	CCC	CTC	CAA	CGG	GCC	GCC	GTG	CTC	GAG	AAG	CTG	CGC	192
Phe	Gly	Asp	Ala	Pro	Leu	Gln	Arg	Ala	Ala	Val	Leu	Glu	Lys	Leu	Arg	
	50					55				60						
GAC	AGC	GGC	AGC	GCC	CTG	GGC	AAC	CTC	GAC	GAC	GAC	GCG	GTC	GGC	CGC	240
Asp	Ser	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Asn	Leu	Asp	Asp	Asp	Ala	Val	Gly	Arg	
65					70				75						80	
ATG	GTC	ACC	GTC	TTC	CTC	AAC	AAC	ACG	CGC	CTC	ATC	CAG	AAC	TTC	CGG	288
Met	Val	Thr	Val	Phe	Leu	Asn	Asn	Thr	Arg	Leu	Ile	Gln	Asn	Phe	Arg	
				85					90					95		
CCC																291
Pro																

SEQ ID NO: 6:

GGATCCCCTC	GCCCAGGGCC	CTGGCGGGCC	CGCCGGGCCG	TGGGGGAGGT	GCGGGGGCCG	60
CGGGCCCCGG	CACCGCACGA	ACAGAACAAC	CGCTCCGGGC	CC	ATG CGG ACT TCA	114
					Met Arg Thr Ser	
					1	
CGG TCC CAC GAC CAG CGG GCC CCT ACC CCC TGG AGA CAT CCC TTG CAC	162					
Arg Ser His Asp Gln Arg Ala Pro Thr Pro Trp Arg His Pro Leu His						
5 10 15 20						
AGC ACC CGG CCC GCG CCC GCG GCC GAC CGT GAC CCC AGG CGC TGG GTC	210					
Ser Thr Arg Pro Ala Pro Ala Ala Asp Arg Asp Pro Arg Arg Trp Val						
25 30 35						
ATC CTC GGC GTG ATC TGC CTG GCC CAA CTC GTC GTC CTG CTC GAC AAC	258					
Ile Leu Gly Val Ile Cys Leu Ala Gln Leu Val Val Leu Leu Asp Asn						
40 45 50						
ACC GTC CTC AAC GTC GCC ATC CCG GTG CTC ACC ACC GAC CTG GGC GCC	306					
Thr Val Leu Asn Val Ala Ile Pro Val Leu Thr Thr Asp Leu Gly Ala						
55 60 65						
AGC ACC GCC GAC ATC CAG TGG ATG ATC AAC GCC TAC GCG CTC GTG CAG	354					
Ser Thr Ala Asp Ile Gln Trp Met Ile Asn Ala Tyr Ala Leu Val Gln						
70 75 80						
TCC GGG CTG CTG CTC ACC GCG GGC AGC CTC GCG GAC CGC TAC GGC CGC	402					
Ser Gly Leu Leu Leu Thr Ala Gly Ser Leu Ala Asp Arg Tyr Gly Arg						
85 90 95 100						
AAA CGG CTG CTG ATG CTC GGA CTG GTG CTC TTC GGC GCC GGG TCC GCC	450					
Lys Arg Leu Leu Met Leu Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ala						
105 110 115						
TGG GCG GCC TTC GCC CAG GAC TCC GCC CAA CTC ATC GCC GCC CGG GCC	498					
Trp Ala Ala Phe Ala Gln Asp Ser Ala Gln Leu Ile Ala Ala Arg Ala						
120 125 130						
GGC ATG GGC GTG GGC GGG GCG CTG CTG GCG ACC ACC ACC CTC GCC GTC	546					
Gly Met Gly Val Gly Gly Ala Leu Leu Ala Thr Thr Thr Leu Ala Val						
135 140 145						
ATC ATG CAG GTC TTC GAC GAC GAC GAA CGC CCC CGG GCG ATC GGC CTG	594					
Ile Met Gln Val Phe Asp Asp Asp Glu Arg Pro Arg Ala Ile Gly Leu						

六、申請專利範圍

150	155	160	
TGG GGA GCG GCC AGC TCA CTG GGC TTC GCG GCC GGC CCG CTG CTC GGC Trp Gly Ala Ala Ser Ser Leu Gly Phe Ala Ala Gly Pro Leu Leu Gly 165 170 175 180			642
GGC GCC CTC CTC GAC CAC TTC TGG TGG GGC TCC ATC TTC CTG ATC AAC Gly Ala Leu Leu Asp His Phe Trp Trp Gly Ser Ile Phe Leu Ile Asn 185 190 195			690
CTG CCC GTC GCG CTG CTG GGC CTG CTG GCC GTC GCC CGC CTG GTG CCC Leu Pro Val Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ala Val Ala Arg Leu Val Pro 200 205 210			738
GAG ACG AAG AAC CCC GAA GGC CGG CGC CCC GAC CTG CTC GGC GCC GTG Glu Thr Lys Asn Pro Glu Gly Arg Arg Pro Asp Leu Leu Gly Ala Val 215 220 225			786
CTC TCC ACC CTC GGC ATG GTC GGC GTC GTC TAC GCC ATC ATC TCC GGC Leu Ser Thr Leu Gly Met Val Gly Val Val Tyr Ala Ile Ile Ser Gly 230 235 240			834
CCC GAA CAC GGC TGG ACG GCC CCG CAG GTC CTC CTG CCG GCC GCC GTC Pro Glu His Gly Trp Thr Ala Pro Gln Val Leu Leu Pro Ala Ala Val 245 250 255 260			882
GCG GCC GCC GCG CTC ACC GCG TTC GTC CGC TGG GAA CTG CAC ACC CCC Ala Ala Ala Ala Leu Thr Ala Phe Val Arg Trp Glu Leu His Thr Pro 265 270 275			930
CAC CCC ATG CTC GAC ATG GGC TTC TTC ACC GAC CGG CGC TTC AAC GGG His Pro Met Leu Asp Met Gly Phe Phe Thr Asp Arg Arg Phe Asn Gly 280 285 290			978
CCG TCG CCG GCG GAG TGC TCG TCG TTC GGC ATG GCC GGC TCG CTC TTC Pro Ser Pro Ala Glu Cys Ser Ser Phe Gly Met Ala Gly Ser Leu Phe 295 300 305			1026
CTG CTC ACC CAG CAC CTC CAA CTC GTC CTC GGC TAC GAC GCC CTG CAG Leu Leu Thr Gln His Leu Gln Leu Val Leu Gly Tyr Asp Ala Leu Gln 310 315 320			1074
GCC GGC CTG CGC ACC GCG CCA CTG GCT TTG ACG ATC GTC GCC CTC AAC Ala Gly Leu Arg Thr Ala Pro Leu Ala Leu Thr Ile Val Ala Leu Asn 325 330 335 340			1122
CTG GCC GGC CTC GGC GCG AAA CTC CTC GCC GCG CTC GGC ACC GCC CGC Leu Ala Gly Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ala Ala Leu Gly Thr Ala Arg 345 350 355			1170
AGC ATC GCC CTG GGC ATG ACA CTG CTG GCC GCC GGC CTC AGC GCG GTG Ser Ile Ala Leu Gly Met Thr Leu Leu Ala Ala Gly Leu Ser Ala Val 360 365 370			1218
GCC GTC GGC GGA TCG GGC CCC GAC GCC GGC TAC GGC GGC ATG CTC GCC Ala Val Gly Gly Ser Gly Pro Asp Ala Gly Tyr Gly Gly Met Leu Ala 375 380 385			1266
GGC CTG CTC CTC ATG GGC GCG GGC ATC GCA CTG GCC ATG CCC GCC ATG Gly Leu Leu Leu Met Gly Ala Gly Ile Ala Leu Ala Met Pro Ala Met 390 395 400			1314
GCC ACC GCC GTG ATG TCC TCC ATC CCG CCC GCC AAG GCC GGG GCC GGA Ala Thr Ala Val Met Ser Ser Ile Pro Pro Ala Lys Ala Gly Ala Gly 405 410 415 420			1362
GCG GGC GTG CAG GGC ACC CTG ACC GAG TTC GGC GGC GGA CTG GGA GTG Ala Gly Val Gln Gly Thr Leu Thr Glu Phe Gly Gly Gly Leu Gly Val 425 430 435			1410

六、申請專利範圍

GCG ATC CTC GGC GCC GTC CTC GGC TCC CGC TTC GCC TCC CAA CTG CCC	1458
Ala Ile Leu Gly Ala Val Leu Gly Ser Arg Phe Ala Ser Gln Leu Pro	
440 445 450	
GCC GCC ATC ACC GGC ACC GGC TCC CTC GAC GAG GCA CTG CGC GAC GCC	1506
Ala Ala Ile Thr Gly Thr Gly Ser Leu Asp Glu Ala Leu Arg Asp Ala	
455 460 465	
ACA CCC CAA CAG GCC GGG CAG GTC CAC GAC GCG TTC GCC GAC GCG GTG	1554
Thr Pro Gln Gln Ala Gly Gln Val His Asp Ala Phe Ala Asp Ala Val	
470 475 480	
AAC ACC AGC CAA CTC ATC GGC GCC GCC GCC GTG TTC ACC GGC GGC CTG	1602
Asn Thr Ser Gln Leu Ile Gly Ala Ala Ala Val Phe Thr Gly Gly Leu	
485 490 495 500	
CTC GCC GCG CTG CTG CTG CAC CGC GCC GAC CGC AAG GCC GCC CCC CAG	1650
Leu Ala Ala Leu Leu Leu His Arg Ala Asp Arg Lys Ala Ala Pro Gln	
505 510 515	
CCC ACC GCC CCC ACC CCC GAA CCC ACC ACC ACC GCC TGACCCCGG	1696
Pro Thr Ala Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Thr Ala	
520 525	
CCCGCCGGGC ACCACACAAC CCACGGCCCC ACCCCTGCGG CTCCCCACCG GGACCCACAG	1756
GGGCGGGGCC GTGCCGCTGC CCTGCCCACA CACACAGCCC CCACACACAC AGCCCCCGCA	1816
CGGCCGACAG CGCCGGG	1833

(b)於 42℃、甲醯胺存在下，並以 50℃及 60℃洗出，可與基因(a)雜交之序列，且其編碼一種多肽，該多肽係選自由下列組成之多肽之群：snaA，snaB，snaC，snaD，papA，papM，samS，snbA，snbC，snbD，snbE及 snbR；及

(c)因為遺傳密碼簡併性而衍生自(a)及(b)中所列序列之序列。

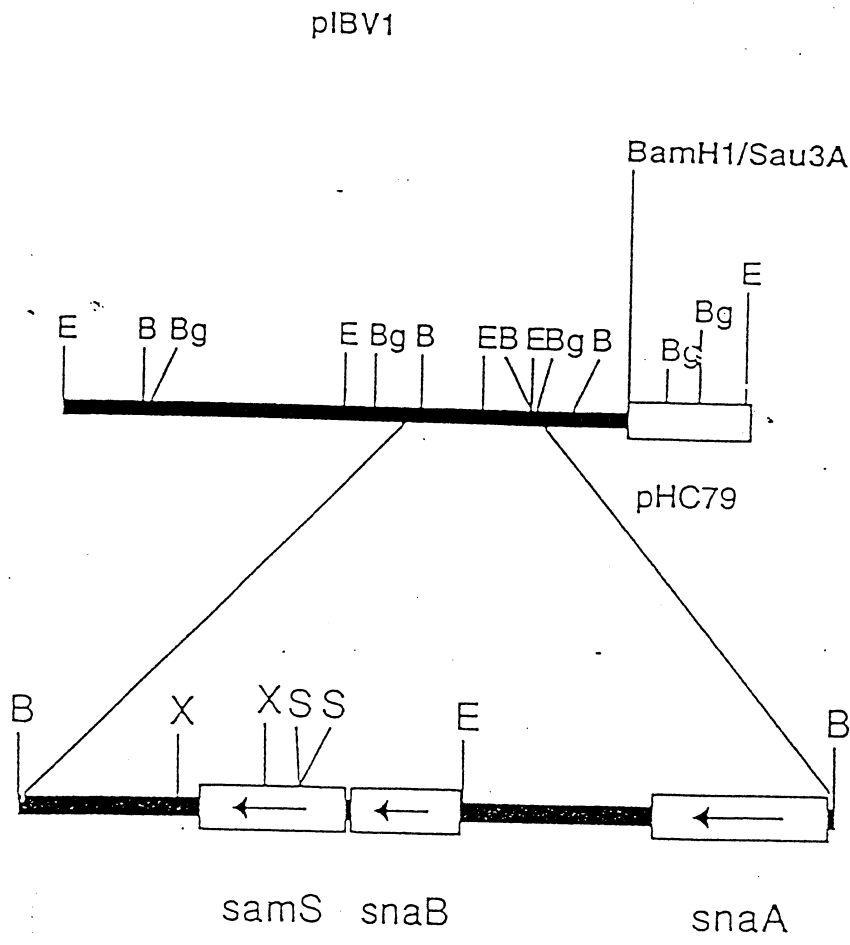
2. 根據申請專利範圍第 1 項之核苷酸序列，其特徵在於其

六、申請專利範圍

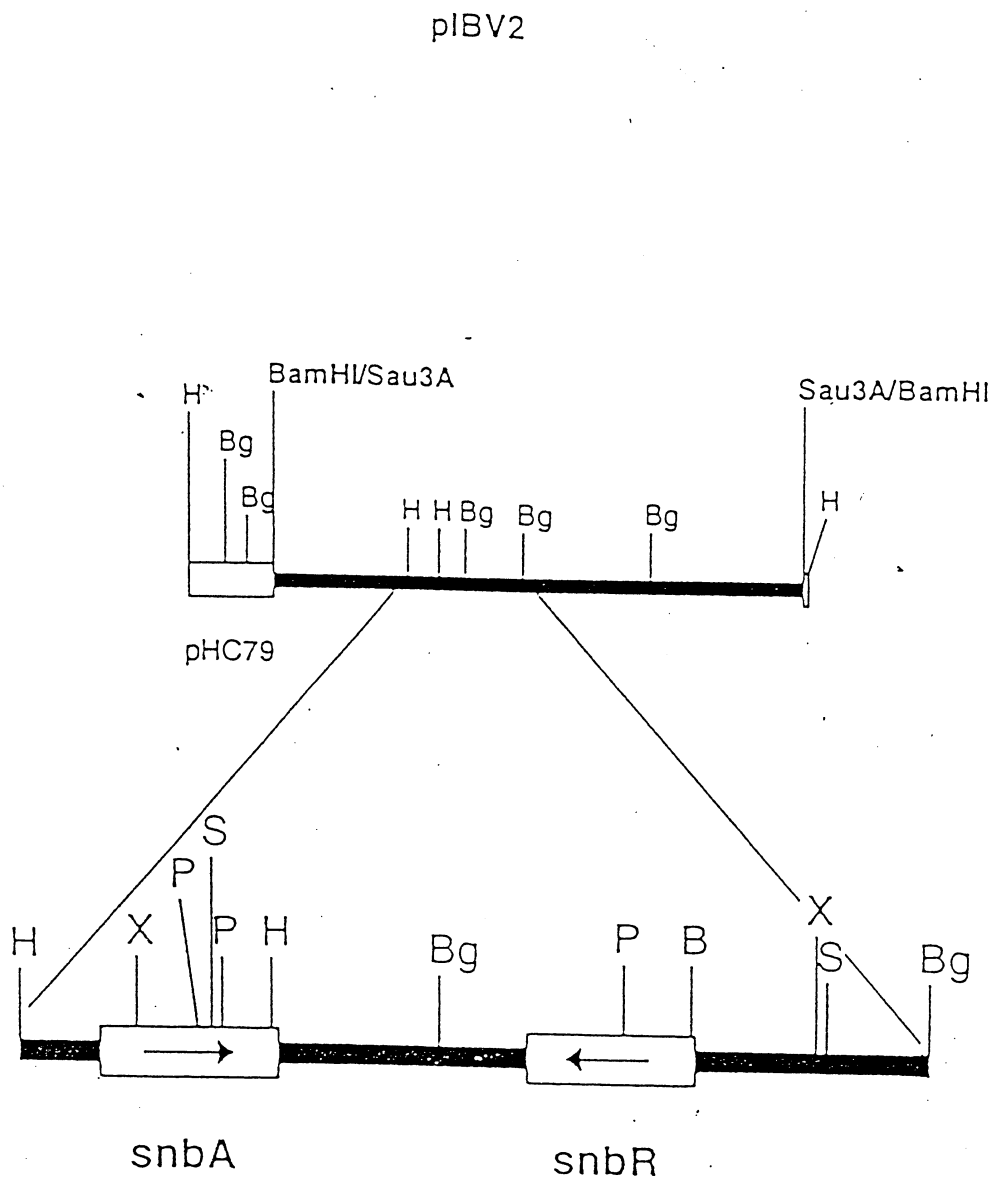
係選自 snaA , snaB , snaC , snaD , papA , papM , samS , snbA , snbC , snbD , snbE 和 snbR 基因之中者。

3. 一種製備自體複製型及/或整合型表現載體之方法，其包含將根據申請專利範圍第 1 或 2 項之核苷酸序列併入一表現載體中。
4. 根據申請專利範圍第 3 項之方法，其特徵在於所獲得之表現載體具有選自下列之結構：粘接質體 pIBV4，粘接質體 pIBV2，粘接質體 pIBV3，粘接質體 pIBV4，質體 pVRC402，質體 pVRC501，質體 Px12045 質體 pVRC1105，pVRC1106，pVRC1104，pVRC900，pVRC1000，pVRC509，pVRC903，pVRC409，pVRC505，pVRC701，pVRC702，pVRC508，pVRC404，pVRC507 和 pVRC706，其中該等質體之限制酶圖譜如下：

六、申請專利範圍

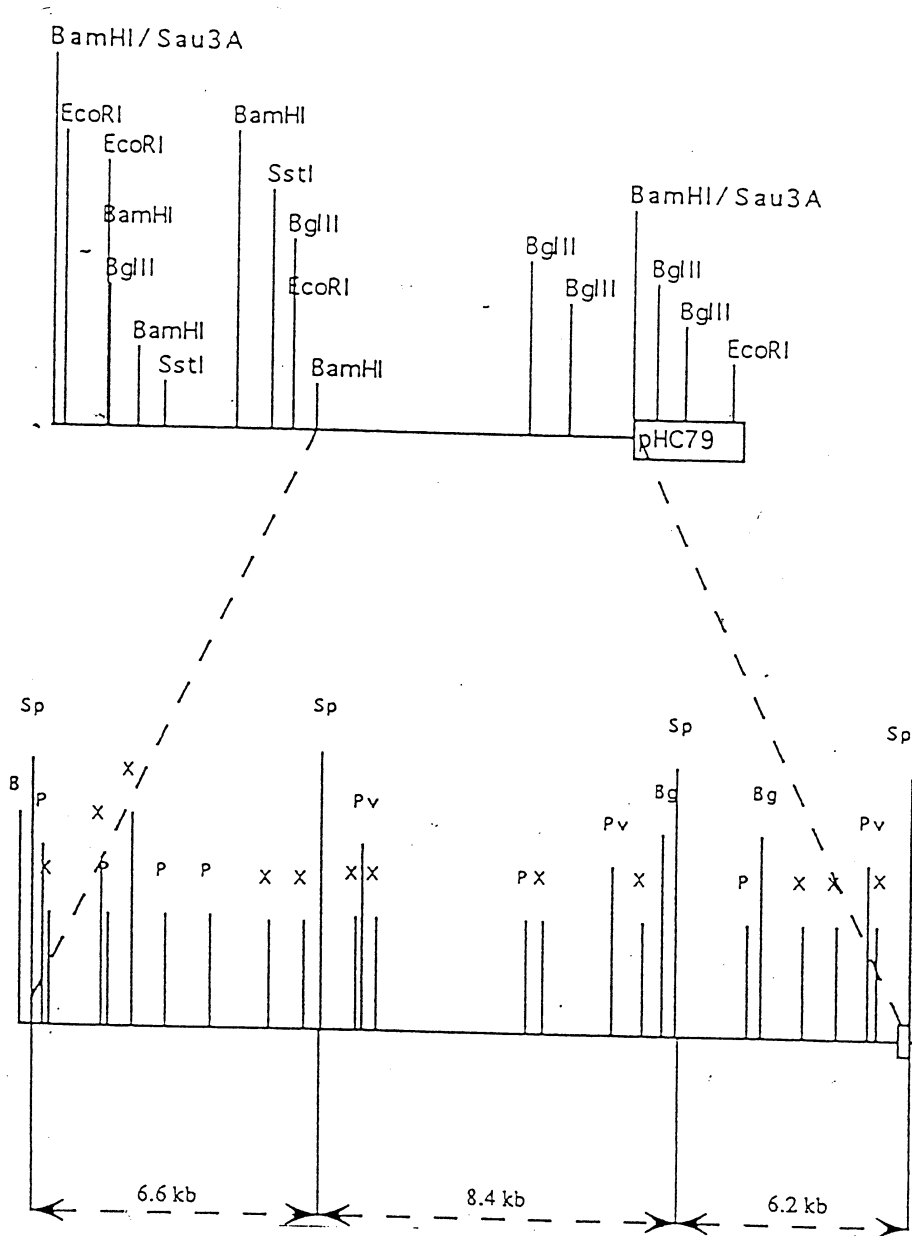


六、申請專利範圍



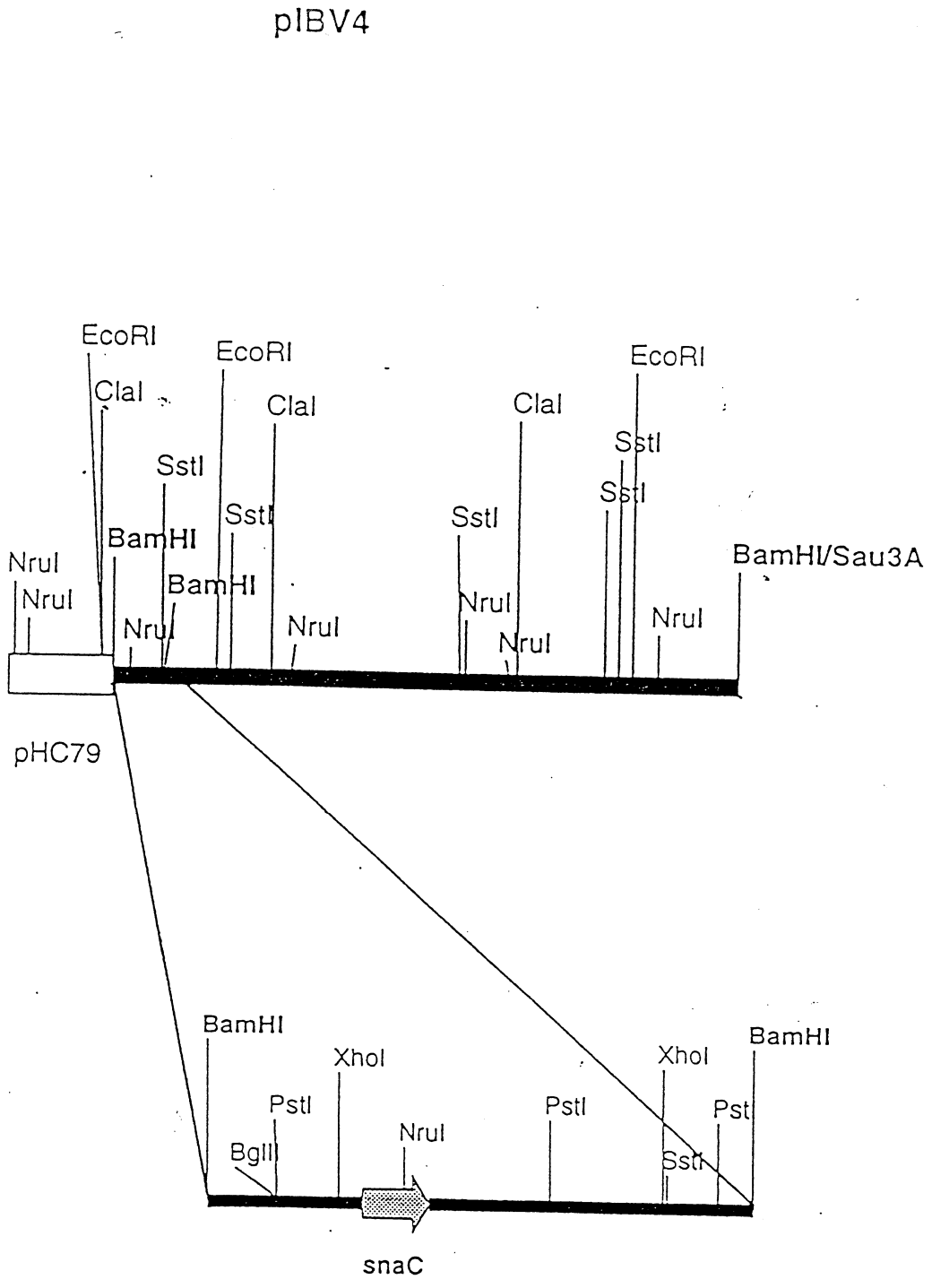
六、申請專利範圍

pIBV3

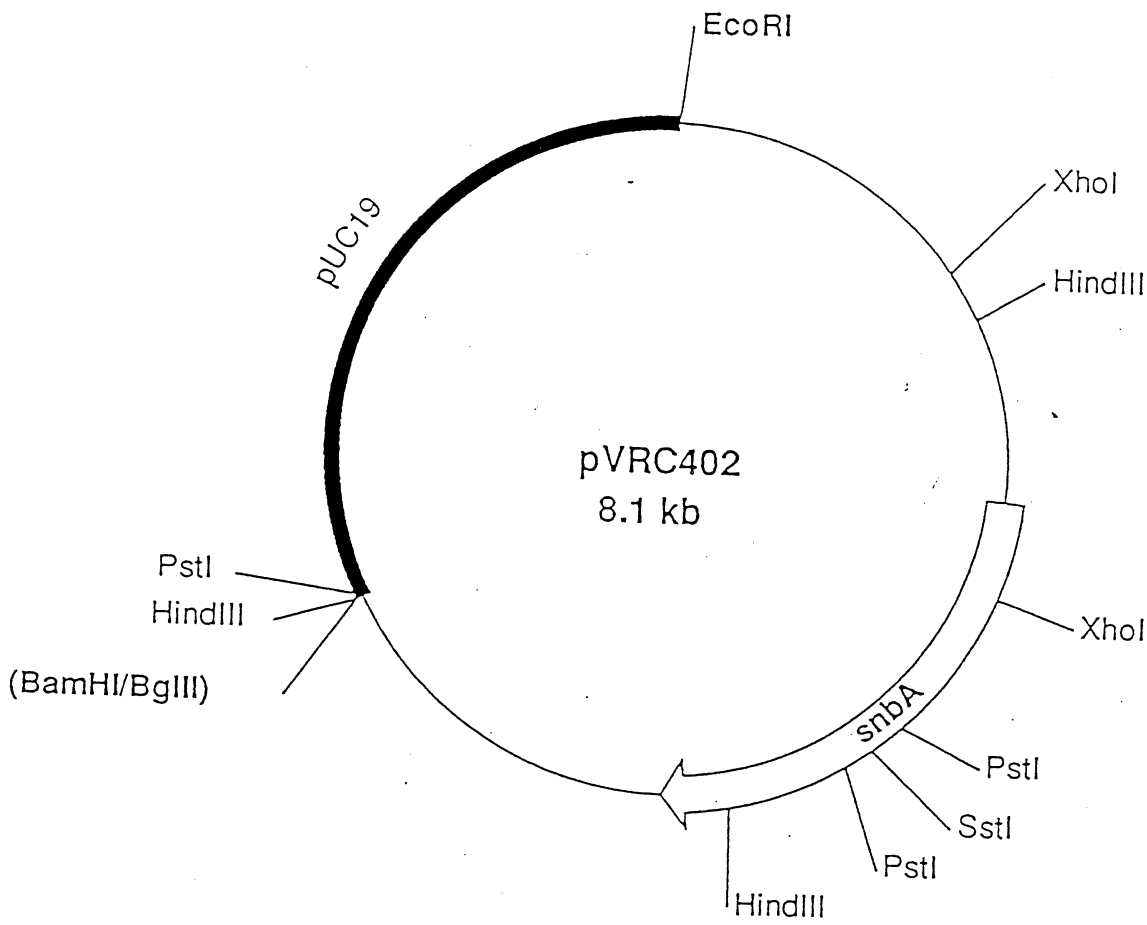


B: BamHI
Sp: SphI
P: PstI
X: XhoI
Pv: PvuII

六、申請專利範圍

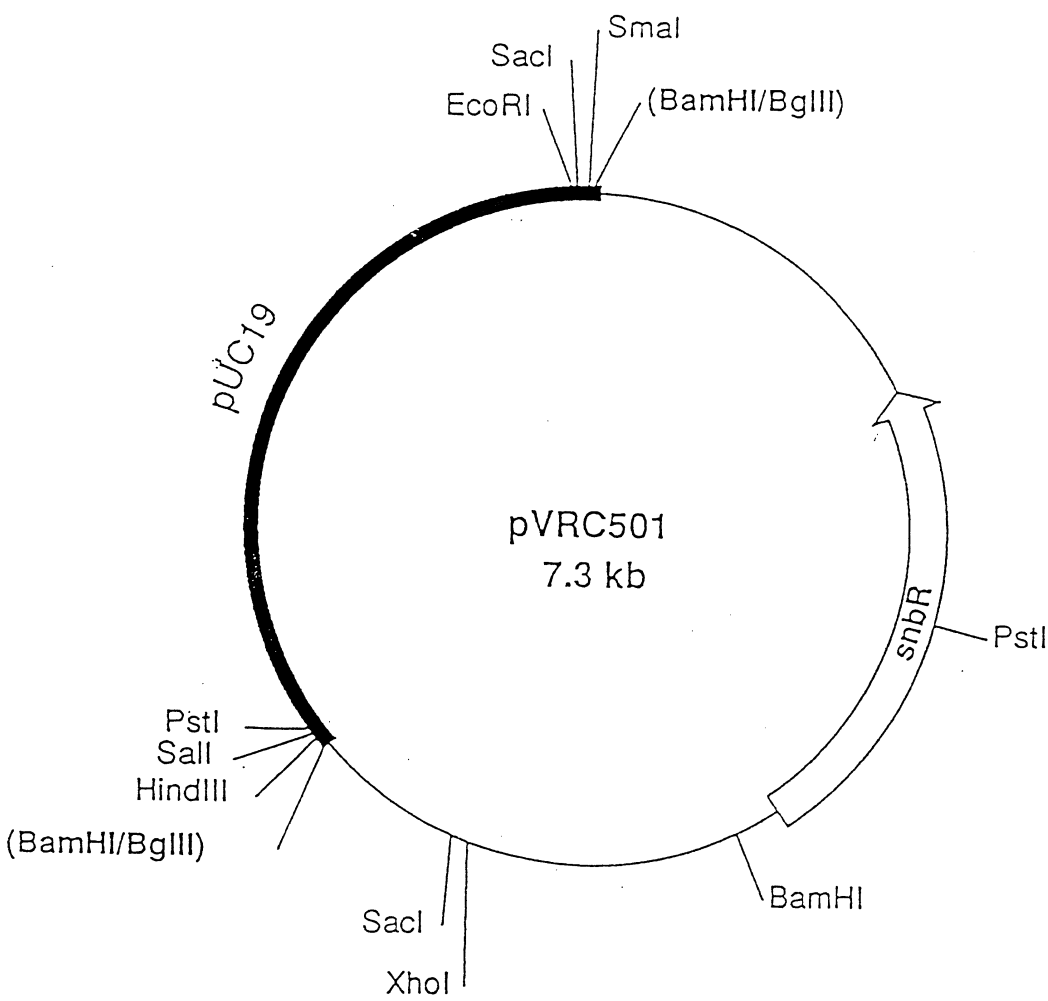


六、申請專利範圍



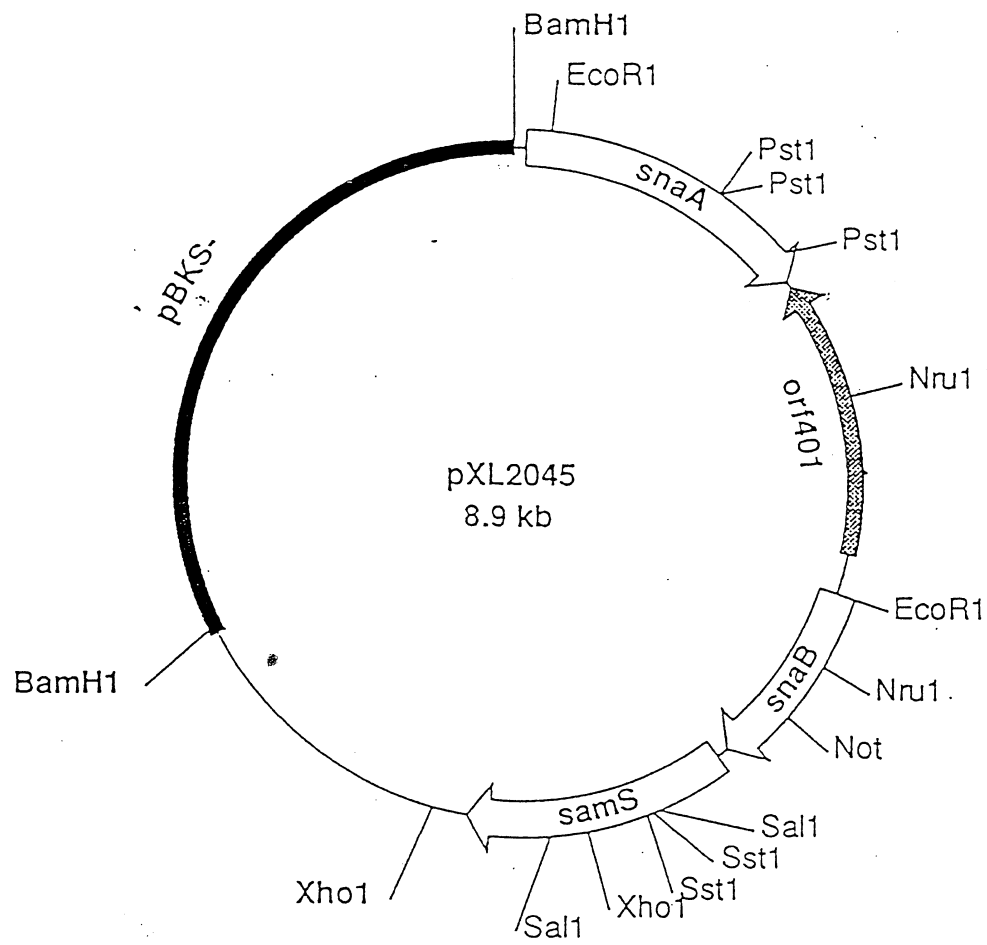
裝
訂

六、申請專利範圍



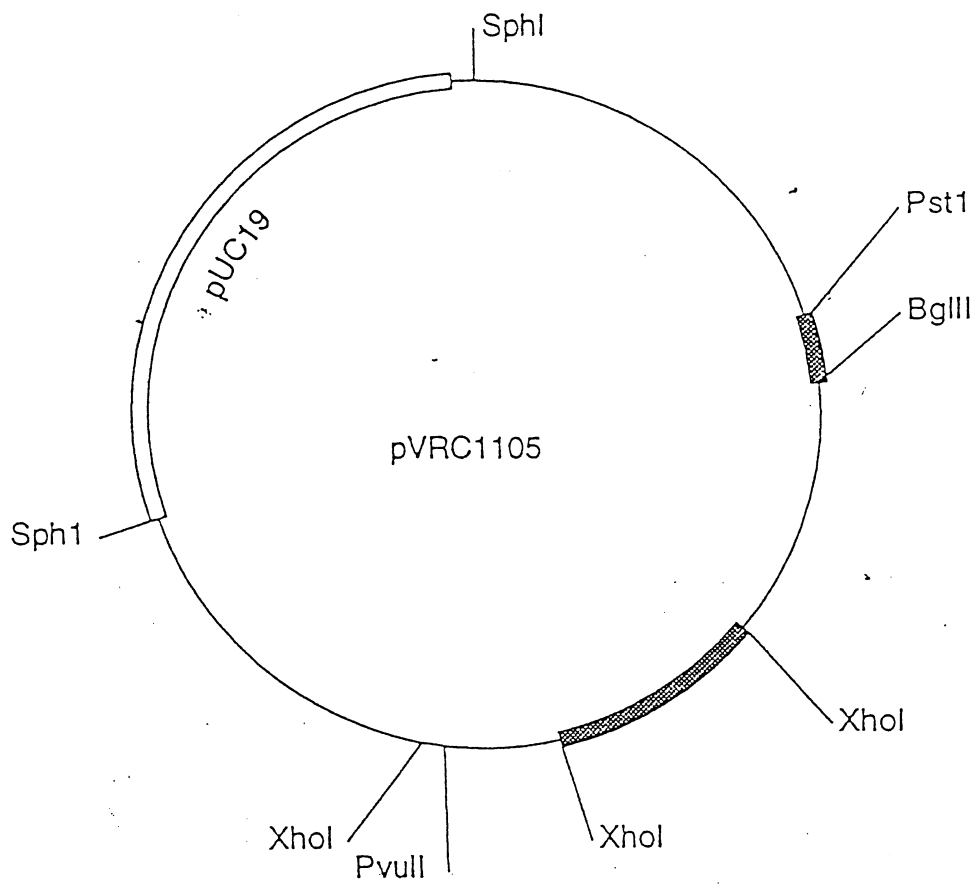
裝訂

六、申請專利範圍



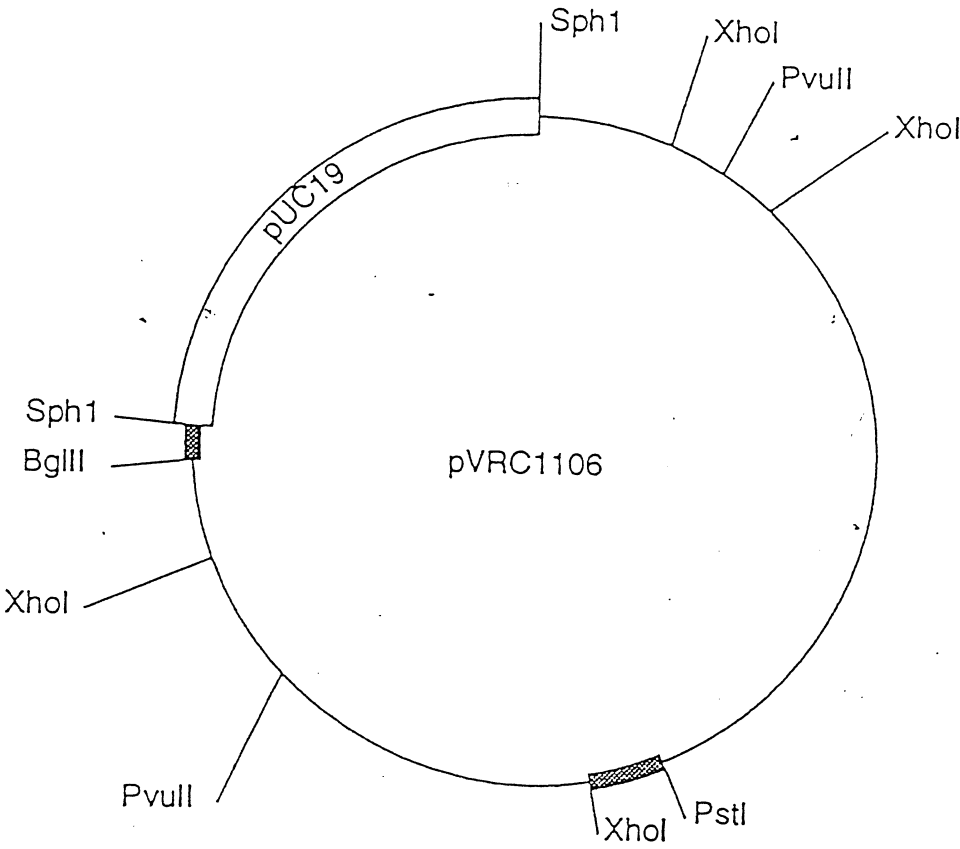
裝
訂

六、申請專利範圍



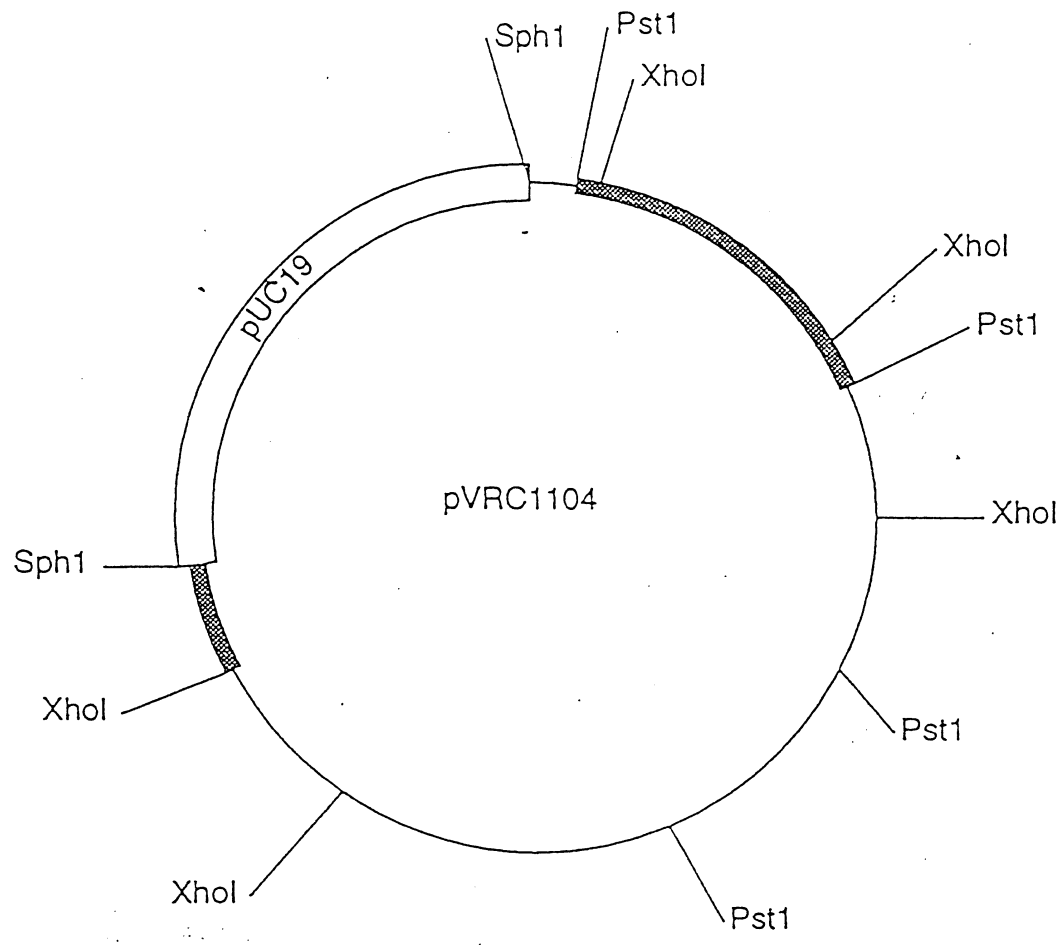
裝
訂

六、申請專利範圍



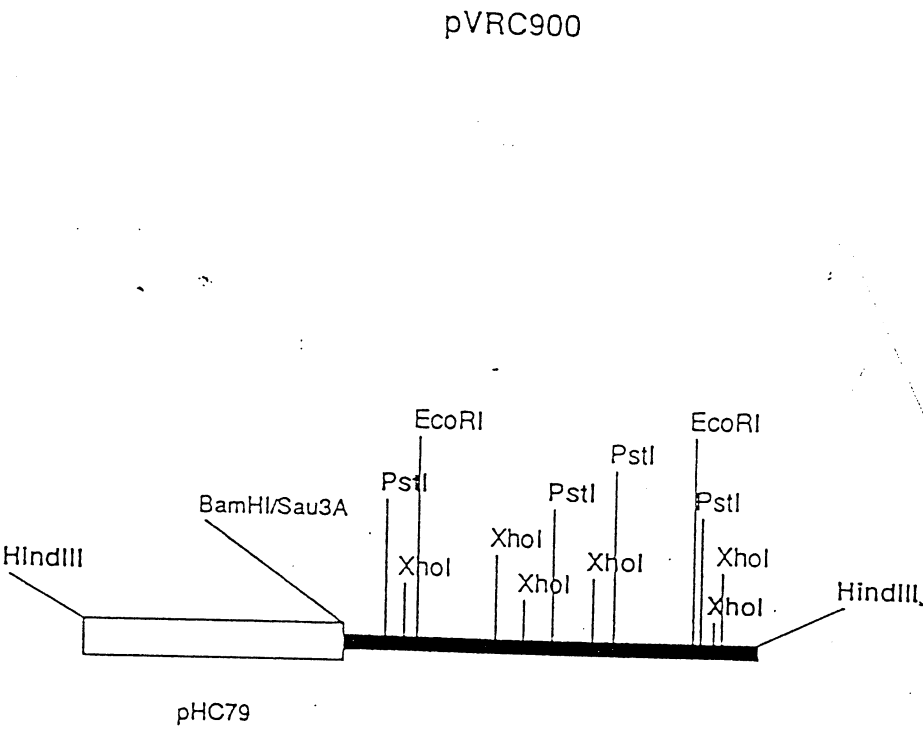
裝
訂

六、申請專利範圍



裝
訂

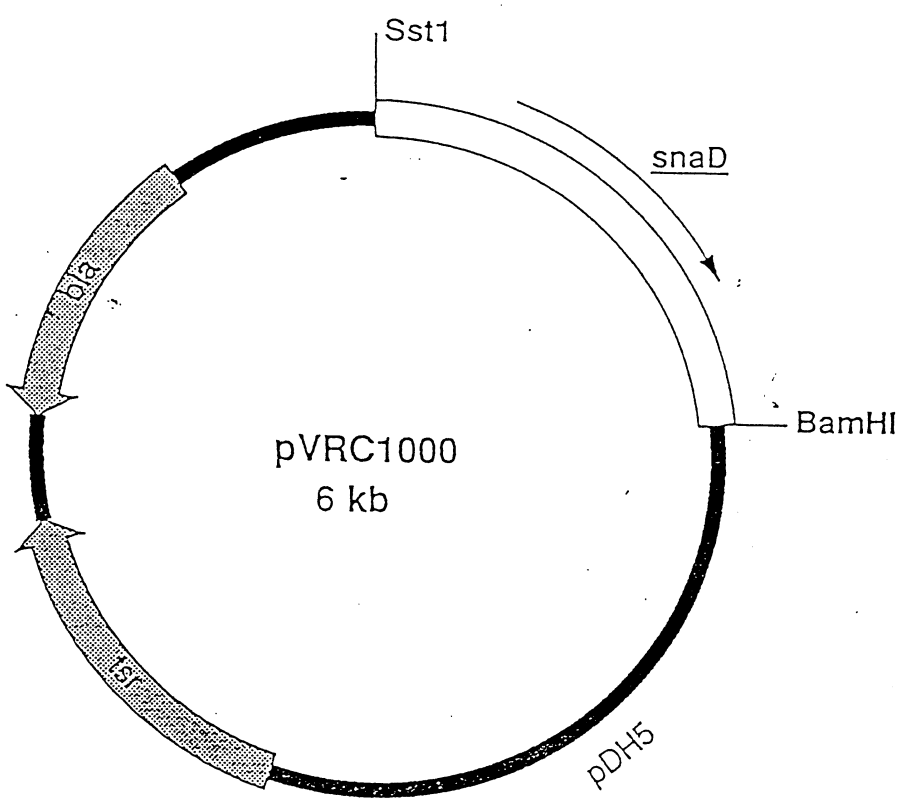
六、申請專利範圍



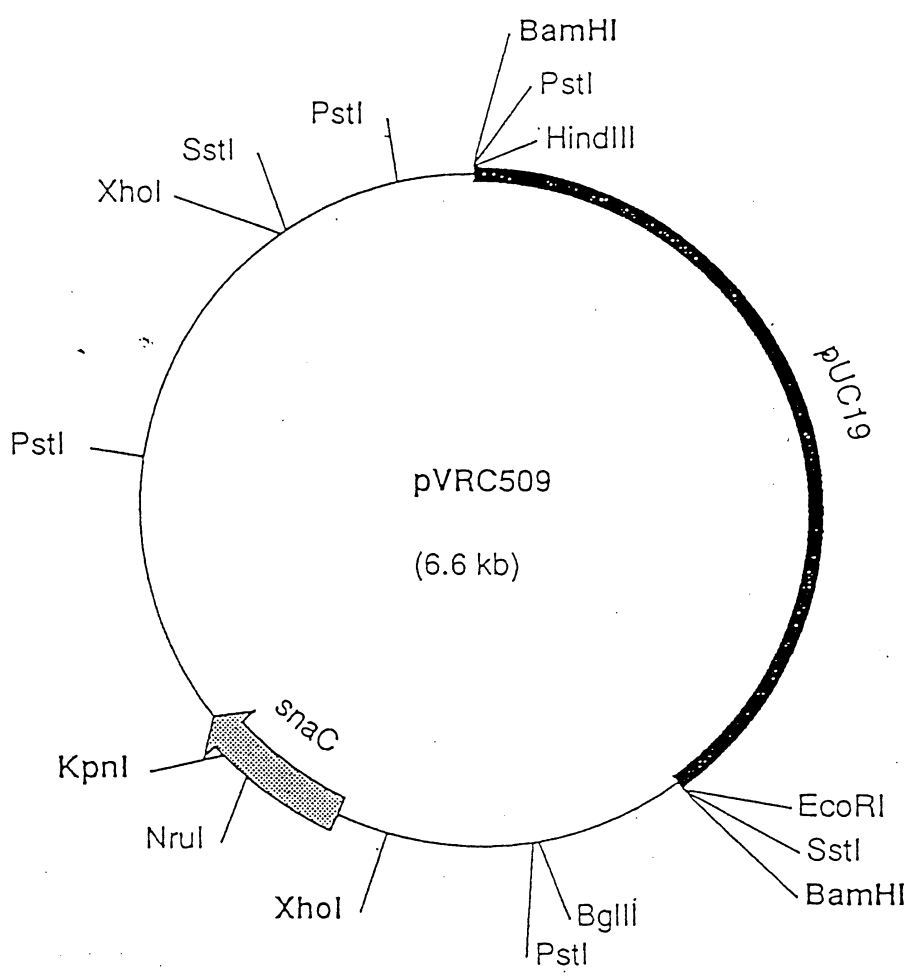
裝
訂

裝
訂

六、申請專利範圍

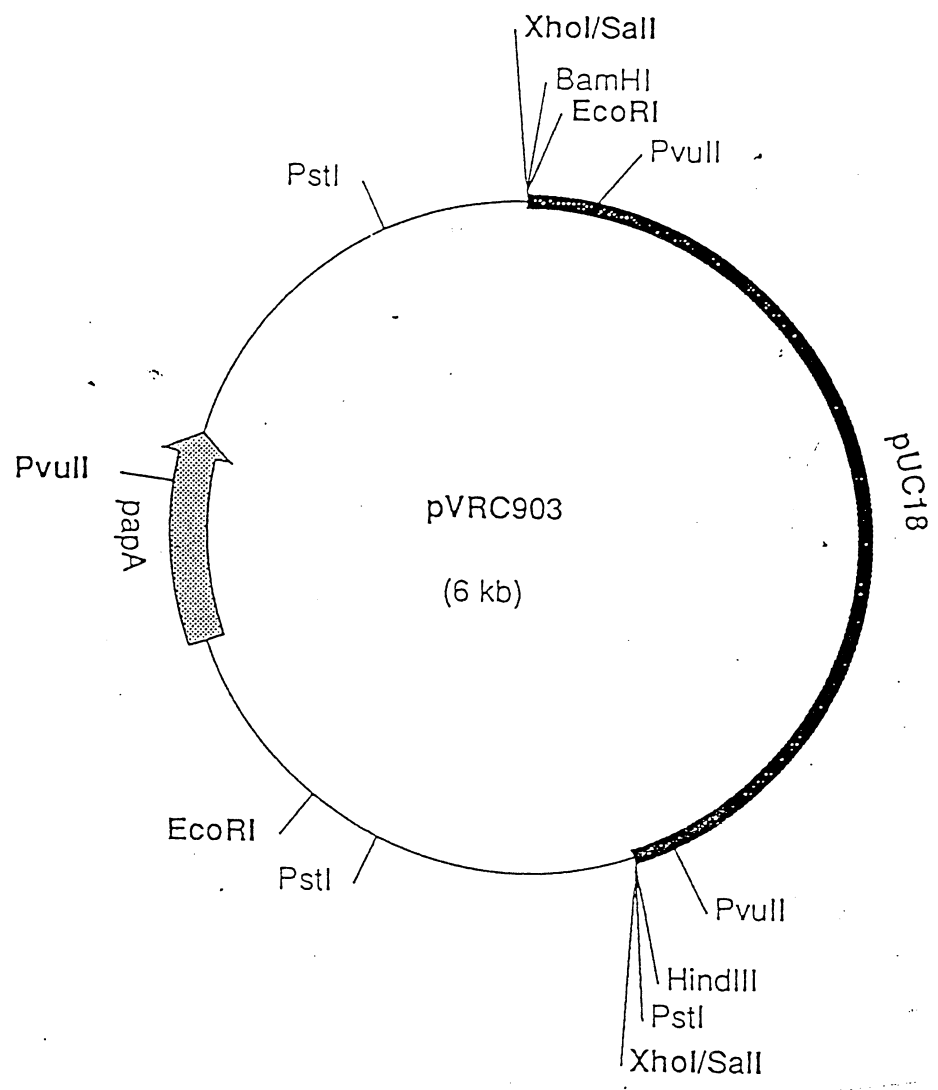


六、申請專利範圍



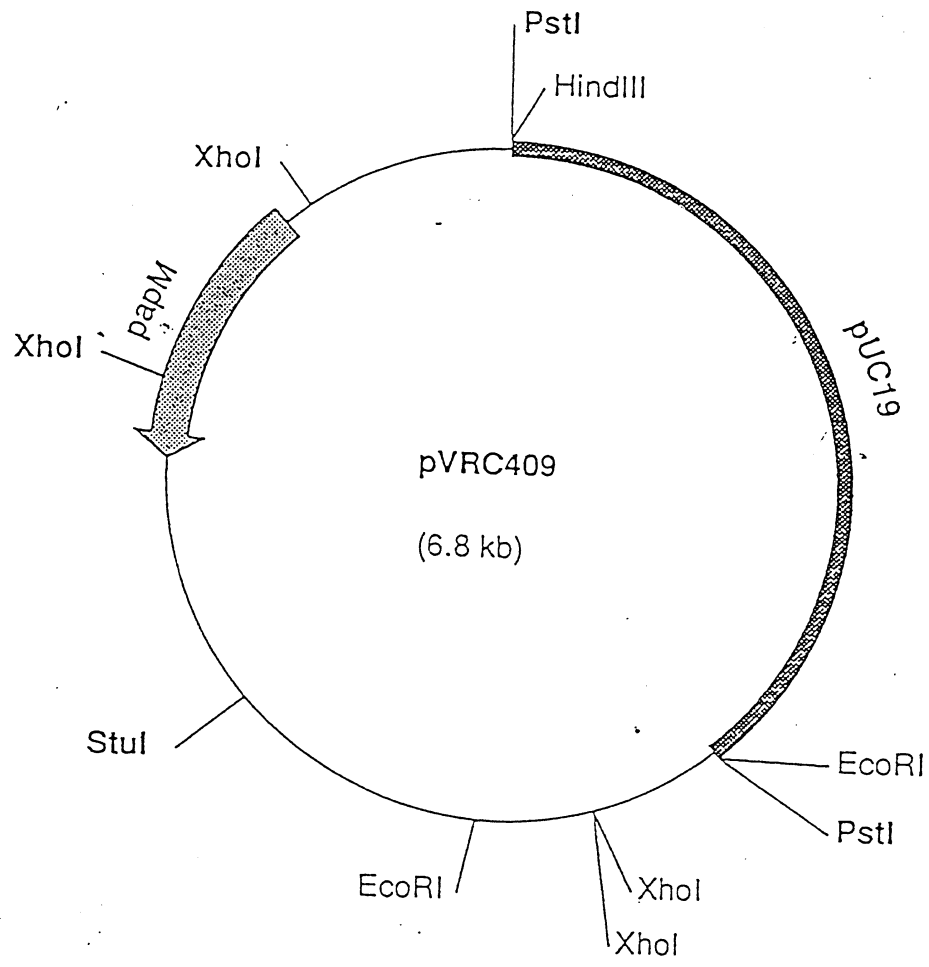
裝
訂

六、申請專利範圍



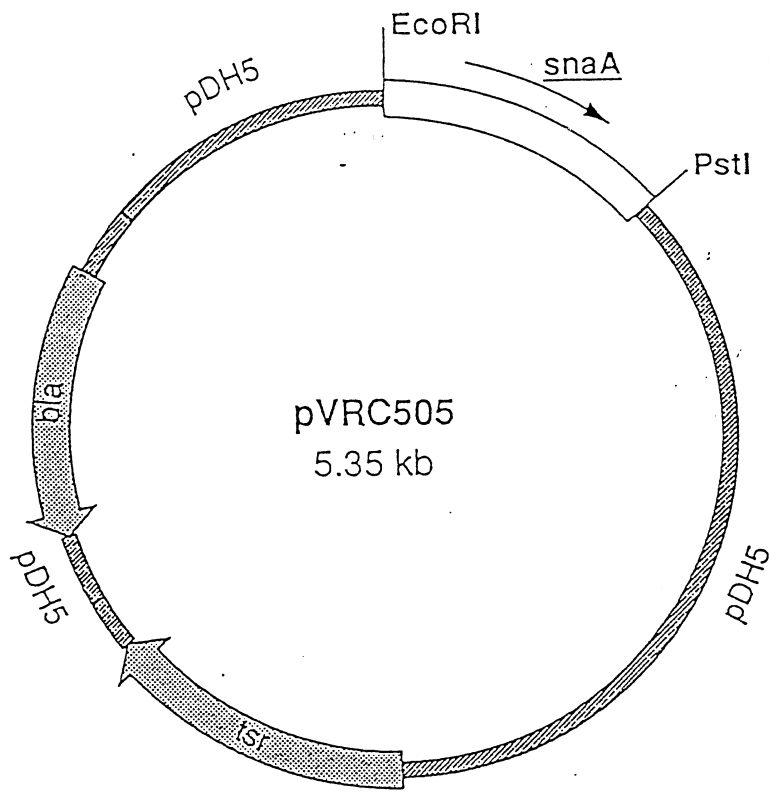
裝
訂

六、申請專利範圍



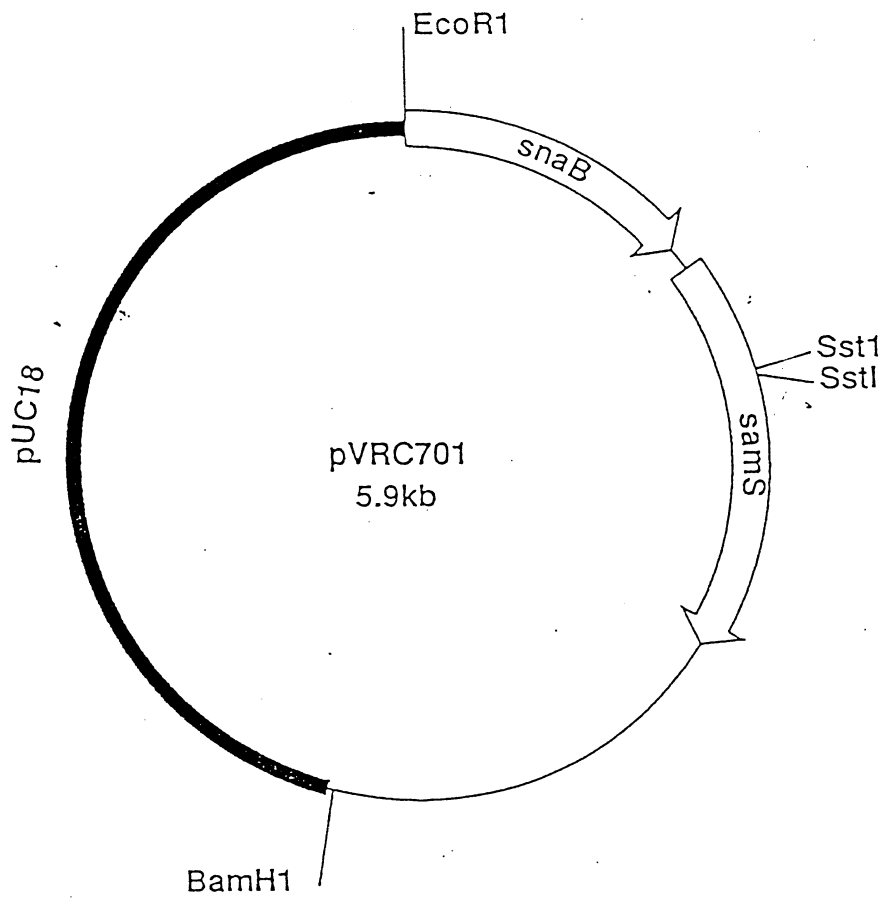
裝訂

六、申請專利範圍



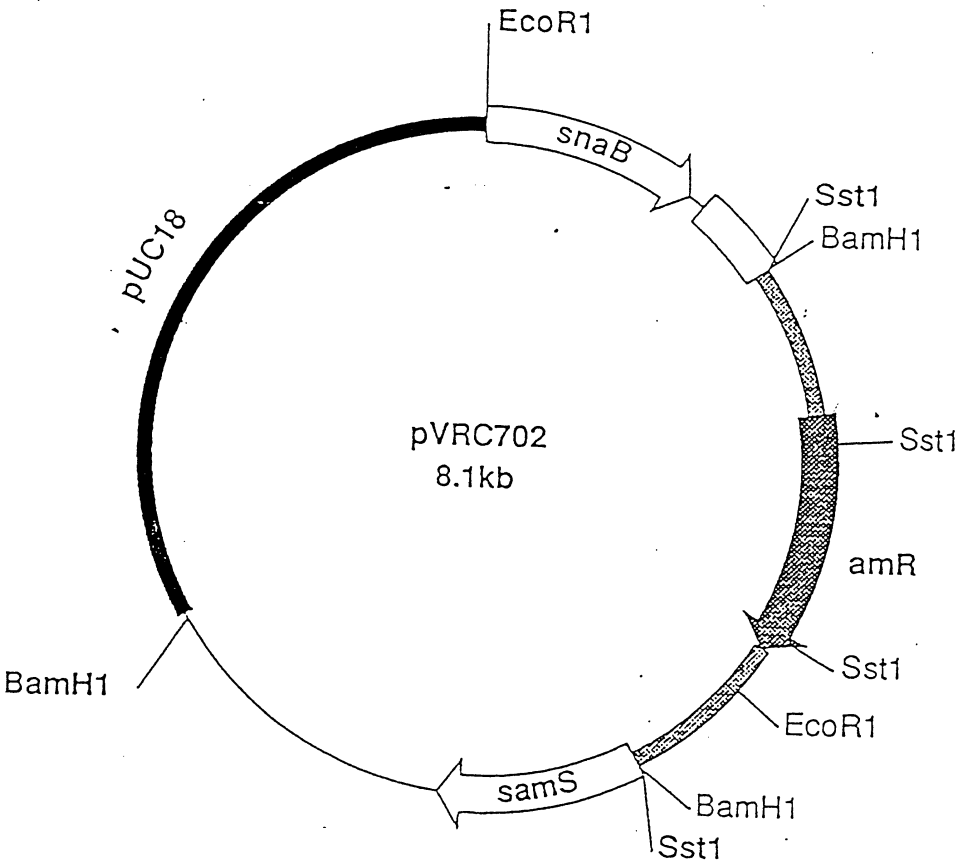
裝
訂

六、申請專利範圍

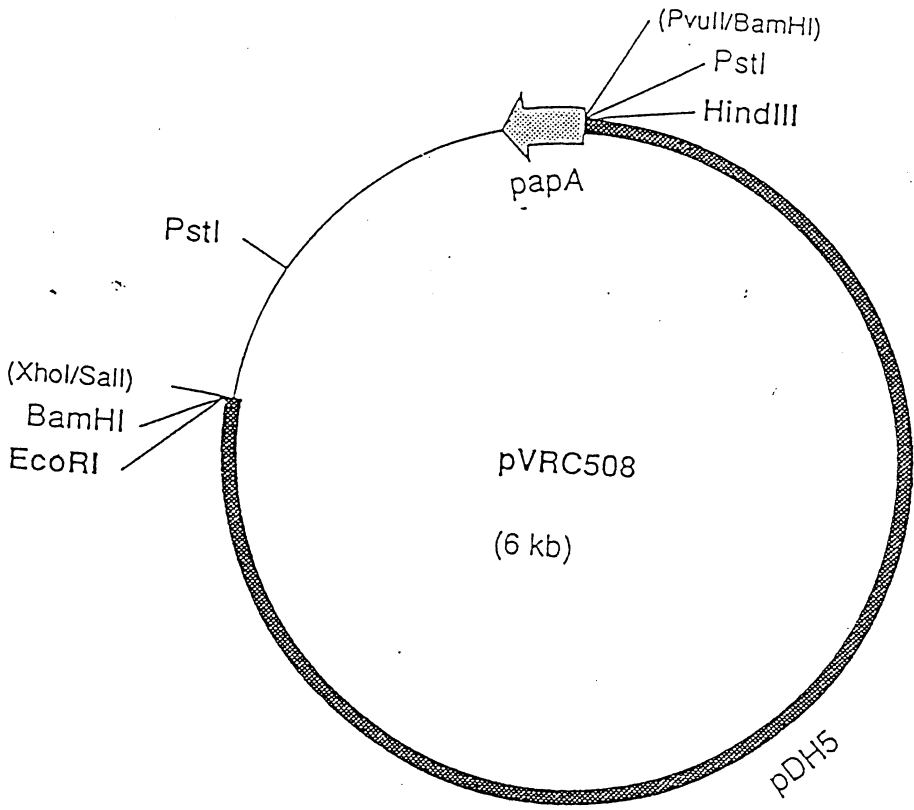


裝
訂

六、申請專利範圍

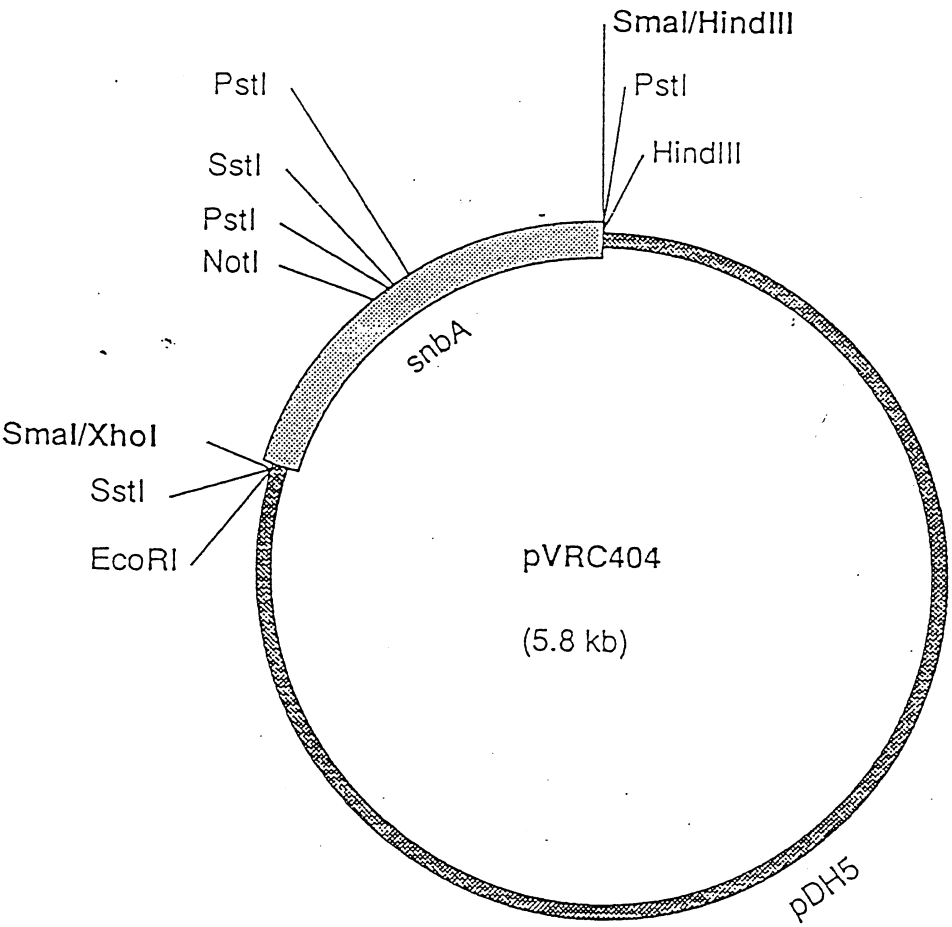


六、申請專利範圍



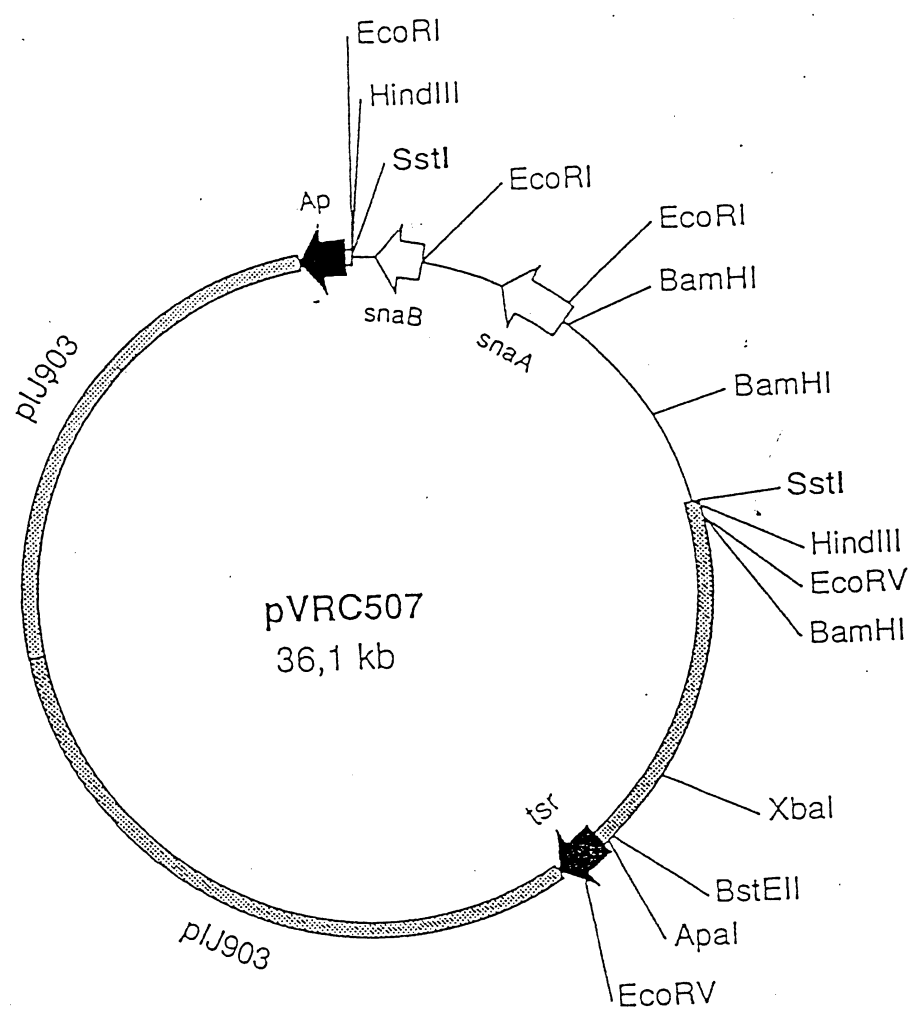
裝
訂
線

六、申請專利範圍



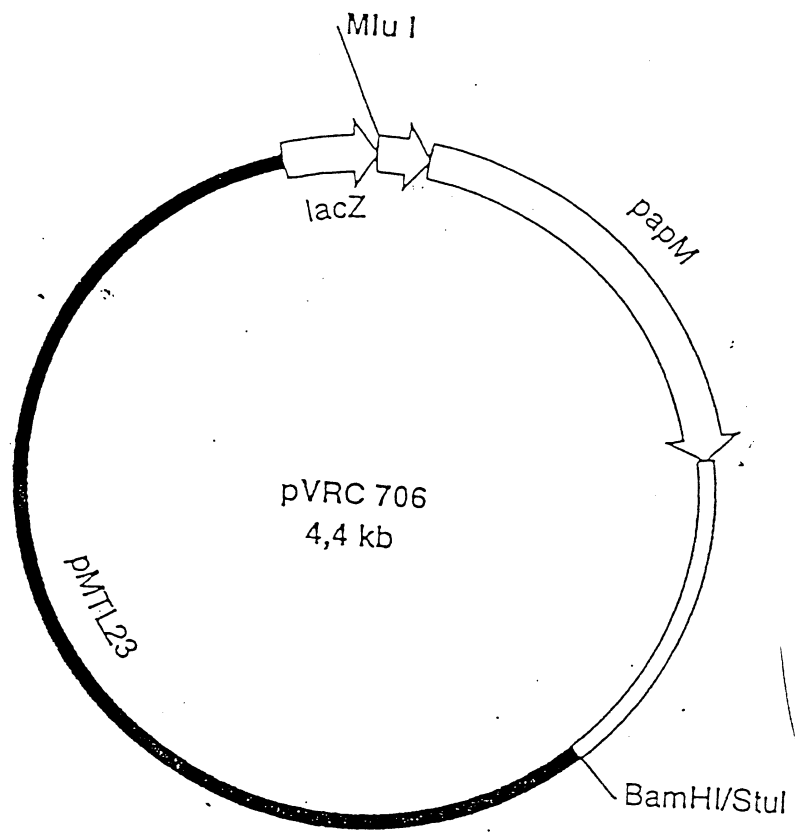
裝
訂

六、申請專利範圍



裝
訂

六、申請專利範圍



裝
訂

六、申請專利範圍

5. 一種製備一種多肽之方法，該多肽係選自由下列組成之多肽之群：snaA，snaB，snaC，snaD，papA，papM，samS，snbA，snbC，snbD，snbE及snbR，該方法之特徵在於在已知條件下培養含有根據申請專利範圍第1或2項之核苷酸序列之重組細胞，其係以選自轉形作用、電穿透反應、結合作用及原質體融合之一已知方法引入及以色層分析法回收所產生的多肽。
6. 一種製備一種多肽之方法，該多肽係選自由下列組成之多肽之群：snaA，snaB，snaC，snaD，papA，papM，samS，snbA，snbC，snbD，snbE及snbR，該方法之特徵在於在已知條件下培養含有根據申請專利範圍第3項之方法所製得之表現載體之重組細胞及回收所產生的多肽。
7. 一種純化之多肽，其係由申請專利範圍第1項定義之核苷酸序列編碼。
8. 根據申請專利範圍第7項之純化之多肽，其包含如申請專利範圍第1項所定義之序列snaA(係依SEQ ID no. 2編碼)，snaB(係依SEQ ID no. 3編碼)，snaC(係依SEQ ID no. 7編碼)，snaD(係依SEQ ID no. 8編碼)，papa(係依SEQ ID no. 9編碼)，papM(係依SEQ ID no. 10編碼)，samS(係依SEQ ID no. 4編碼)，snbA(係依SEQ ID no. 5編碼)，snbC(係依SEQ ID nos. 11和12編碼)，snbD(係依SEQ ID nos. 13和14編碼)，snbE(係依SEQ ID nos. 15和16編碼)和snbR(係依SEQ ID no. 6編碼)。

年 月 日 修正
86. 5. 13 補充

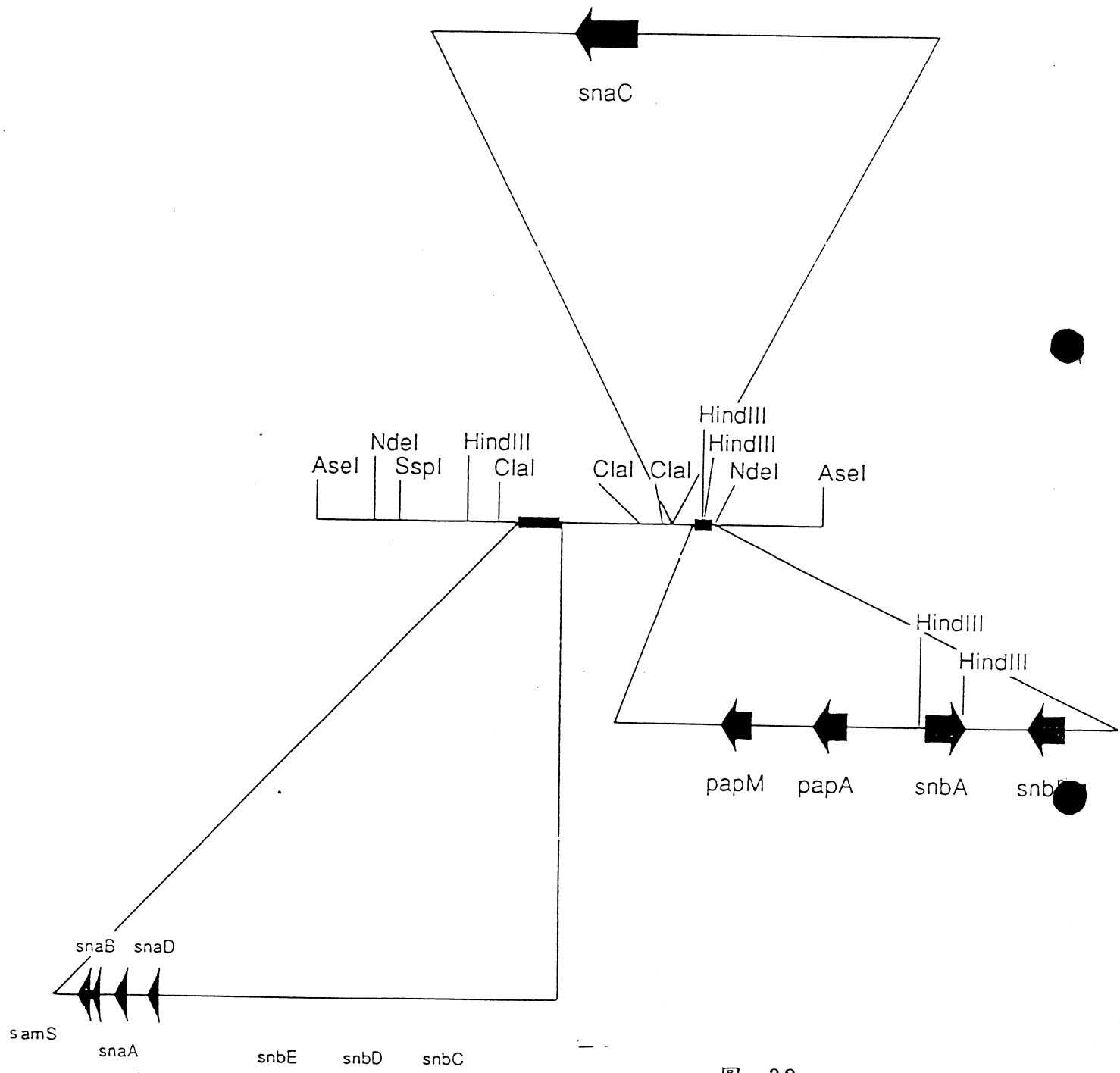


圖 32