[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[6]
C12N 9/16
C12N 15/55 C12N 1/15
C12N 1/19 C12N 1/21
A23K 1/165

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97195166.7

[43]公开日 1999年6月23日

[11]公开号 CN 1220697A

[22]申请日 97.4.4 [21]申请号 97195166.7
[30]优先权
[32]96.4.5 [33]JP [31]84314/96
[86]国际申请 PCT/JP97/01175 97.4.4
[87]国际公布 WO97/38096 日 97.10.16
[85]进入国家阶段日期 98.12.1
[71]申请人 协和发酵工业株式会社
地址 日本东京都
共同申请人 新日本化学工业株式会社
[72]发明人 近藤英正 穴泽秀治 兼子俊一
长岛直 丹下达也
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 卢新华 齐曾度

权利要求书5页 说明书35页 附图页数6页

[54]发明名称 新型肌醇六磷酸酶及编码该新型肌醇六磷酸酶的基因

[57]摘要

一种对于植酸有低的米氏常数,价格低廉的肌醇六磷酸酶;编码此肌醇六磷酸 酶的DNA;包含有该DNA整合其中的重组DNA;携带该重组DNA的转 化子;利用该转化子制备肌醇六磷酸酶的方法,一种利用该肌醇六磷酸酶制备 的饲料。

ISSN 1008-4274

专利文献出版社出版

权　利　要　求　书

1、一种当用植酸作底物时，米氏常数为 10-30 μM 的肌醇六磷酸酶。

2、根据权利要求 1 的肌醇六磷酸酶，具有以下物理化学特征:

〈1〉分子量(通过 SDS-PAGE): 用内切糖苷酶 H 处理后为 60KDa;

〈2〉最适 pH 值: pH 5.0—6.5;

〈3〉最适温度: 45—65℃时，具最大活性;

〈4〉底物特异性: 可作用的底物有，植酸，对硝基苯基磷酸，D-葡萄糖-6-磷酸，果糖-6-磷酸，D-myo-肌醇-1,4,5-三磷酸,甘油磷酸和腺苷三磷酸; 及

〈5〉等电聚焦: pI 4.7—5.4。

3、根据权利要求 1 或 2 的肌醇六磷酸酶，其中的肌醇六磷酸酶是选自如下的蛋白质: 具有 SEQ ID NO:1,2 和 3 所示氨基酸序列的蛋白; 或具有 SEQ ID NO:1,2 和 3 所示氨基酸序列，其中一个或多个氨基酸被替换、删除或添加并且当将植酸用作底物时，其 Km 值为 10-30 μM 的具有肌醇六磷酸酶活性的蛋白。

4、根据权利要求 1 或 2 的肌醇六磷酸酶，其中的肌醇六磷酸酶源于黑曲霉属的微生物。

5、根据权利要求 1 或 2 的肌醇六磷酸酶，其中属于黑曲霉属的微生物选自黑曲霉 SK57(FERM BP-5473)或黑曲霉 SK92(FERM BP-5481)。

6、根据权利要求 1-3 中任何一项的肌醇六磷酸酶，其中的肌醇六磷酸酶具有糖链。

7、一种基因，当用植酸作底物时，其所编码的肌醇六磷酸酶的米氏常数为 10-30 μM.

8、根据权利要求 7 的基因，其中的肌醇六磷酸酶具有以下物理化学特征:

〈1〉分子量(通过 SDS-PAGE): 用内切糖苷酶 H 处理后为 60 KDa;

〈2〉最适 pH 值: pH 5.0—6.5;

〈3〉最适温度: 45—65℃时，具最大活性;

〈4〉底物特异性: 可作用的底物有植酸，对硝基苯基磷酸，D-葡萄糖-6-磷酸，果糖-6-磷酸，D-myo-肌醇-1,4,5-三磷酸,甘油磷酸和腺苷三磷酸; 及

〈5〉等电聚焦：pI 4.7—5.4。

9、根据权利要求7或8的基因，其中的基因编码的蛋白是选自如下的蛋白质：具有SEQ ID NO:1,2和3所示氨基酸序列的蛋白；具有SEQ ID NO: 1,2和3所示氨基酸序列，其中一个或多个氨基酸被替换、删除或添加并且当将植酸用作底物时，其Km值为10-30 μM的具有肌醇六磷酸酶活性的蛋白。

10、根据权利要求7或8的基因，其中的基因选自SEQ ID NO:4和5所示的DNA。

11、根据权利要求7或8的基因，其中的基因源于黑曲霉属的微生物。

12、根据权利要求11的基因，其中属于黑曲霉属的微生物选自黑曲霉SK57（FERM BP-5473）或黑曲霉SK92（FERM BP-5481）。

13、通过将一个DNA片段引入一个载体而得到重组DNA，其中的DNA片段编码一种当用植酸作底物时，米氏常数为10-30 μM的肌醇六磷酸酶的基因。

14、根据权利要求13的重组DNA，其中的肌醇六磷酸酶具有以下物理化学特征：

〈1〉分子量（通过SDS-PAGE）：用内切糖苷酶H处理后为60KDa；

〈2〉最适pH值：pH 5.0—6.5；

〈3〉最适温度：45—65℃时，具最大活性；

〈4〉底物特异性：可作用的底物有，植酸，对硝基苯基磷酸，D-葡萄糖-6-磷酸，果糖-6-磷酸，D-myo-肌醇-1,4,5-三磷酸，甘油磷酸和ATP；及

〈5〉等电聚焦：pI 4.7—5.4。

15、根据权利要求13或14的重组DNA，其中的基因编码的蛋白是选自如下的蛋白质：具有SEQ ID NO:1,2和3所示氨基酸序列的蛋白；或具有SEQ ID NO:1,2和3所示氨基酸序列，其中一个或多个氨基酸被替换、删除或添加并且当将植酸用作底物时，其Km值为10-30 μM的具有肌醇六磷酸酶活性的蛋白。

16、根据权利要求13或14的重组DNA，其中的基因选自SEQ ID NO:4和5所示的DNA。

17、根据权利要求13或14的重组DNA，其中的基因源于黑曲霉

属的微生物。

18、根据权利要求 17 的重组 DNA，其中属于黑曲霉属的微生物选自黑曲霉 SK57（FERM BP-5473）或黑曲霉 SK92（FERM BP-5481）。

19、根据权利要求 13 或 14 的重组 DNA，其中的重组 DNA 是 pANPHY1。

20、携带重组 DNA 的转化子，该重组 DNA 是通过将含有编码一种骨醇六磷酸酶的基因的 DNA 片段导入载体中而得到，当用植酸作底物时，该酶的米氏常数为 10－30μM。

21、根据权利要求 20 的转化子，其中的肌醇六磷酸酶具有以下物理化学特征:

〈1〉分子量（通过 SDS-PAGE）: 用内切糖苷酶 H 处理后为 60 KDa;

〈2〉最适 pH 值: pH 5.0—6.5;

〈3〉最适温度: 45—65℃时，具最大活性;

〈4〉底物特异性: 可作用的底物有，植酸，对硝基苯磷酸，D-葡萄糖-6-磷酸，果糖-6-磷酸，D-myo-肌醇-1,4,5-三磷酸，甘油磷酸和 ATP; 及

〈5〉等电聚焦: pI 4.7—5.4。

22、根据权利要求 20 或 21 的转化子，其中的基因编码的蛋白是选自如下的蛋白质: 具有 SEQ ID NO:1,2 和 3 所示氨基酸序列的蛋白; 或具有 SEQ ID NO:1,2 和 3 所示氨基酸序列，其中一个或多个氨基酸被替换、删除或添加并且当将植酸用作底物时，其 Km 值为 10-30 μM 的具有肌醇六磷酸酶活性的蛋白。

23、根据权利要求 20 或 21 的转化子，其中的基因选自 SEQ ID NO:4 和 5 所示的 DNA。

24、根据权利要求 20 或 21 的基因，其中的基因源于黑曲霉属的微生物。

25、根据权利要求 24 的基因，其中属于黑曲霉属的微生物选自黑曲霉 SK57（FERM BP-5473）或黑曲霉 SK92（FERM BP-5481）。

26、根据权利要求 20 或 21 的转化子，其中的重组 DNA 是 pANPHY1。

27、根据权利要求 20 或 21 的转化子，其中的转化子选自下述微生物: 大肠杆菌属，沙雷菌属，棒状杆菌属，短杆菌属，假单孢菌属，芽孢杆菌属，曲霉属，根霉菌属，木霉属，链孢霉属，毛霉菌属，青

霉属，克鲁维氏酵母属，糖酵母属，裂殖糖酵母属。

28、根据权利要求 20 或 21 的转化子，其中的转化子选自黑曲霉 MH-PA1（FERM BP-5372），构巢曲霉 M-PA1（FERM BP-5373）和米曲霉 MO- PG3。

29、一种制备肌醇六磷酸酶的方法，当用植酸作底物时，该酶的米氏常数为 10-30 μM，包括，在培养基中培养具有生产和积累肌醇六磷酸酶的微生物，生产和积累肌醇六磷酸酶，从培养物中回收肌醇六磷酸酶。

30、根据权利要求 29 的方法，其中的肌醇六磷酸酶具有以下物理化学特征:

〈1〉分子量（通过 SDS-PAGE）: 用内切糖苷酶 H 处理后为 60 KDa;

〈2〉最适 pH 值: pH 5.0—6.5;

〈3〉最适温度: 45—65℃时，具最大活性;

〈4〉底物特异性: 可作用的底物有，植酸，对硝基苯磷酸，D-葡萄糖-6-磷酸，果糖-6-磷酸，D-myo-肌醇-1,4,5-三磷酸，甘油磷酸和腺苷三磷酸; 及

〈5〉等电聚焦: pI 4.7—5.4。

31、根据权利要求 29 或 30 的方法，其中属于黑曲霉属的微生物选自黑曲霉 SK57（FERM BP-5473）或黑曲霉 SK92（FERM BP-5481）。

32、根据权利要求 29 或 30 的方法，其中的微生物是一个携带有重组 DNA 的转化子，其中的重组 DNA 是通过将包含有一个基因的 DNA 片段引入载体而得到的，其中的基因编码一种肌醇六磷酸酶，当用植酸作底物时，其米氏常数为 10-30 μM。

33、根据权利要求 32 的方法，其中的基因编码的蛋白是选自如下的蛋白: 具有 SEQ ID NO:1,2 和 3 所示氨基酸序列的蛋白; 或具有 SEQ ID NO:1,2 和 3 所示氨基酸序列，其中一个或多个氨基酸被替换、删除或添加并且当将植酸用作底物时，其 Km 值为 10-30 μM 的具有肌醇六磷酸酶活性的蛋白。

34、根据权利要求 32 的方法，其中的基因选自 SEQ ID NO:4 和 5 所示的 DNA。

35、根据权利要求 32 的方法，其中的基因源于黑曲霉属的微生物。

36、根据权利要求 32 的方法，其中属于黑曲霉属的微生物选自黑曲霉 SK57（FERM BP-5473）或黑曲霉 SK92（FERM BP-5481）。

37、根据权利要求 32 的方法，其中的重组 DNA 是 pANPHY1。

38、根据权利要求 32 的方法，其中的转化子选自下述微生物：大肠杆菌属，沙雷菌属，棒状杆菌属，短杆菌属，假单孢菌属，芽孢杆菌属，曲霉属，根霉菌属，木霉属，链孢霉属，毛霉菌属，青霉属，克鲁维氏酵母属，糖酵母属，裂殖糖酵母属。

39、根据权利要求 32 的方法，其中的转化子选自黑曲霉 MH-PA1（FERM BP-5372），构巢曲霉 M-PA1（FERM BP-5373）和米曲霉 MO-PG3。

40、一种动物饲料，包含有一种当用植酸作底物时，米氏常数为 10-30 μM 的肌醇六磷酸酶。

说　明　书

新型肌醇六磷酸酶及编码该新型肌醇六磷酸酶的基因

技术领域

本发明涉及一种价格低廉，对于植酸有低的米氏常数（下文缩写为 Km）的肌醇六磷酸酶，它可降解饲料中抗营养因子一植酸，由此提高饲料的营价值并可有效利用降解释放出的磷酸；本发明也涉及了编码此肌醇六磷酸酶的基因。

技术背景

对于所有生物来说，磷是一种基本元素。用于喂养家畜的、植物来源的饲料中含有 50-70%以植酸形式存在的磷。植酸是主要的贮存磷酸的物质，它大量存在于植物的种子之中。然而，在单胃动物如猪、鸡等，植酸不经过消化器官的消化和吸收就被排泄出来。也就是说，植酸是磷酸的贮存物质，然而其中的磷酸根本得不到利用。相应地，必需将磷酸加于单胃动物的饲料中以促进其生长。

饲料中添加的磷导致了排泄物中磷含量的增加。最近几年中，随着家畜饲养量的增加，动物的排泄物有很大的增加，由此导致了世界范围内的环境问题。特别是，排泄物中磷被认为是导致湖泊和沼泽中营养富集现象一个因素，因此排泄物中磷的量应受到调节，提出针对这一问题的措施迫在眉睫。

除了排泄物中磷这一问题，植酸能够螯合作为营养源的二价金属离子，如镁，钙，锌和铁，使得它难以被动物吸收而降低了饲料的营养价值。因此，植酸被认为是一种抗营养因子。

以前曾有人尝试通过用一种肌醇六磷酸酶处理饲料以降低排泄物中磷的含量，这种肌醇六磷酸酶能将一种植酸盐水解成肌醇和无机磷酸以利用植酸中释放出的磷酸而取代常规添加于饲料中的磷酸，也有人尝试通过降解抗营养因子植酸以提高饲料的营养价值[美国专利No. 3297548（1967）；营养杂志 101，1289-1294（1971）]。

已知的产生肌醇六磷酸酶的微生物包括细菌如枯草芽孢杆菌和假单孢菌属，酵母如啤酒糖酵母，丝状真菌如土曲霉（Aspergillus terreus），Aspergillus Ficcum 和泡盛曲霉（Aspergillus

awamori)。

对于来源于 Aspergillus Ficcum 的肌醇六磷酸酶，其纯化及生化特征在[制备生物化学；18，443-458（1988）]中有所描述，其基因和氨基酸序列发表于[基因，127，87-94（1993）]。对于源自泡盛曲霉的肌醇六磷酸酶，其核苷酸序列和氨基酸序列在基因，133，55-62（1993）中有所描述。

迄今所知的肌醇六磷酸酶中，源于麸皮的肌醇六磷酸酶的米氏常数为 0.57mM[农业生物化学 26，794-803（1962）]，源于稻皮的肌醇六磷酸酶的 Km 值为 0.17mM[农业生物化学 53，1475-1483（1988）]，对于源于玉米（Zea mays）的肌醇六磷酸酶，其 Km 值为 117mM，源于 Aspergillus Ficcum 的肌醇六磷酸酶 Km 值为 250 μM(W091/05053)，米曲霉来源的肌醇六磷酸酶 Km 值为 330 μM，枯草芽孢杆菌来源的肌醇六磷酸酶 Km 值为 150μM，源于纳豆芽孢杆菌（Bacillus natto）的肌醇六磷酸酶 Km 值为 500 μM，源于大肠杆菌的肌醇六磷酸酶 Km 值为 130 μM。

为了发挥某一种酶的作用，底物的浓度必须大于 Km 值，如果低 Km 值的与高 Km 值的酶具有相同的最大反应速率（Vmax），与高 Km 值的酶相比，当底物浓度较低时，低 Km 值的酶反应速度不会降低。

也就是说，与高 Km 值的酶相比，低 Km 值的酶具有优势，因为即使底物浓度较低，也能达到最大反应速率，由此降低了剩余底物的量。

相应地，需要一种对于植酸有低的 Km 值，价格低廉的肌醇六磷酸酶，它可用于降解饲料中抗营养因子—植酸，由此提高饲料的营价值并可有效利用降解释放出的磷酸。

发明描述

本文涉及一种肌醇六磷酸酶（下文称之为新型肌醇六磷酸酶），当用植酸作底物时，其米氏常数为 10-30 μM，本发明也涉及了编码此肌醇六磷酸酶的 DNA。包含有该 DNA 整合其中的重组 DNA，携带该重组 DNA 的转化子，利用该转化子制备肌醇六磷酸酶的方法，一种利用该肌醇六磷酸酶制备的饲料。

以下将对本发明进行详细描述。

本发明新型肌醇六磷酸酶的特点包括：一种具有下述下物理化学特性的肌醇六磷酸酶：

〈1〉Km 值：10-30 μM;

〈2〉分子量（通过 SDS-PAGE）：用内切糖苷酶 H 处理后为 60KDa;

〈3〉最适 pH 值：pH 5.0—6.5;

〈4〉最适温度：45—65℃时，具最大活性：

〈5〉底物特异性：可一作用的底物有，植酸，对硝基苯磷酸，D－葡萄糖-6-磷酸，果糖-6-磷酸，D-myo-肌醇-1,4,5-三磷酸，甘油磷酸和 ATP；及

〈6〉等电聚焦：pI 4.7—5.4。

具有 SEQ ID No.1 或 2 所示氨基酸序列的一种肌醇六磷酸酶。

更进一步地，本发明包括一种新型肌醇六磷酸酶（如 SEQ ID NO:3）所示，它的氨基酸序列在上述新型肌醇六磷酸酶上连接有分泌信号序列。

本发明进一步包括在 SEQ ID No. 1,2 或 3 基础上替换、删除或添加一个或多个氨基酸所形成的氨基酸序列的一种肌醇六磷酸酶；它与 SEQ ID NO: 1,2 或 3 的序列具有 40%或更大的氨基酸序列同源性；当用植酸作为底物时，其米氏常数为 10-30 μM. 优选地，该肌醇六磷酸酶具有 60%或更大的同源性，更优选地，其同源性可达 80%或更大。

氨基酸替换、删除或添加可根据下面杂志所述进行。核酸研究，10，6487（1982），美国国家科学院院报 79，6409（1982）美国国家科学院院报 81，5662（1984）科学，224，1431（1984），PCT WO85/00817（1985）；自然，316，601（1985），基因 34，315（1985），核酸研究，13，4431（1985）《现代分子生物学方法》，第八章，“克隆 DNA 的突变” John Wiley & Sons ,Inc (1989),等。

可以从任何产生此新型肌醇六磷酸酶的微生物中得到此酶。其中，优选的例子是属于曲霉属且具有产生该新型肌醇六磷酸酶能力的微生物，更优选的例子包括黑曲霉 SK57（FERN BP-5473）或其突变株或由其衍生出的株系。黑曲霉 SK92（FERN BP-5481）为源于黑曲霉 SK57 的突变株。

编码本发明的新型肌醇六磷酸酶的基因（后称之为新型肌醇六磷酸酶基因）可以是编码该新型肌醇六磷酸酶的任何基因：例如，编码肌醇六磷酸酶的基因可具有 SEQ ID NO: 1,2 或 3 的氨基酸序列的一个基因；或编码肌醇六磷酸酶的基因可具有 SEQ ID NO: 1,2 或 3 的

一个氨基酸序列，其中的一个或多个氨基酸替换、删除或添加，当用植酸作底物时，其米氏常数为 10-30 μM。此基因内可包含内含子。特别地，本发明的基因包含如 SEQ ID NO:4 所示的 DNA，或 SEQ ID NO:5 所示的序列中包含内含子的 DNA。

进一步地，本发明的新型肌醇六磷酸酶基因包括能够在严谨条件下与上述定义的 DNA 进行杂交，而且能够产生相应的肌醇六磷酸酶活性的 DNA。

在此描述的术语“能够在严谨条件下杂交的 DNA”指的是可用菌落杂交，噬斑杂交或 Southern 印迹杂交得到的 DNA，其中包含于 SEQ ID No.4 或 5 的任何 DNA 序列可作为探针。其中的一个具体例子是通过将 DNA 与源于菌落或噬斑并固定于滤膜上的 DNA 在 0.7-1.0M NaCl 中于 65℃杂交然后用 65℃的 0.1—2×SSC 溶液洗膜（1×SSC 溶液包含 150mM 氯化钠及 15mM 柠檬酸钠）。

杂交可受《分子克隆》实验手册中所描述的方法影响。《分子克隆》实验手册，第二版，Sambrook, Fritsch, Maniatis, Cold Spring Harbor laboratory Press(1989)(下文简写为“分子克隆，第二版”)。具体地，能够杂交的 DNA 包括与 SEQ ID NO: 4 或 5 的序列有 60%或更大，优选地，80%或更大，更优选地，95%或更大的同源性。

包含有新型肌醇六磷酸酶基因的 DNA 片段可以从具有产生此新型肌醇六磷酸酶能力的任何微生物中得到。尽管任何具有产生此新型肌醇六磷酸酶能力的微生物都可应用，优选的例子是属于曲霉属且具有产生该新型肌醇六磷酸酶能力的微生物，更优选的例子包括黑曲霉 SK57 或其突变株或由其衍生出的株系。黑曲霉 SK92 为源于黑曲霉 SK57 的突变株。

黑曲霉 SK57 和黑曲霉 SK92 分别在 1996 年 3 月 22 日和 1996 年 3 月 12 日以 FERM BP-5473 和 FERM BP-5481 保藏于国立生物科学和人类技术研究所，工业技术院，日本茨城县筑波市东 1 丁目 1 番 3 号，邮区 305。

进一步地，本发明包括一种含有此新型肌醇六磷酸酶的动物饲料。

下文将描述从具有产生此新型肌醇六磷酸酶能力的微生物中获取编码该肌醇六磷酸酶基因的方法。

利用一种常规的 DNA 分离方法从具有产生该新型肌醇六磷酸酶能力的微生物中制备染色体 DNA。例如，酚法[生物化学与生物物理学报 72，619（1963）]，以合适的限制性内切酶切割得到的染色体 DNA，将限制性内切酶切割得到的片段连入载体 DNA 从而构建来自这一微生物的基因组 DNA 文库。这个基因组 DNA 文库用以转化微生物宿主。用杂交的方法从上述转化子中筛选包含有新型肌醇六磷酸酶基因的转化子。从选择出的转化子中可得到包含目的基因的 DNA。

上述一系列程序可依本领域已知的体外重组技术进行。（分子克隆，第二版）

用以构建具有产生新型肌醇六磷酸酶能力的微生物基因组 DNA 文库的载体 DNA 可以是噬菌体载体，质粒载体等中的任何一种，它们可在大肠杆菌 K12 中自主复制。其中的例子包括，ZAP Express[策略 5,58(1992)； Stratagene];pBluescriptIISK(+)[核 酸 研 究 ， 17,9494(1989) ,Stratagene] ， λZapII(Stratagene) ， λgt10, λgt11[DNA克隆,实用方法 1, 49(1985)] LambdaBlueMid(Clonetech), λExCell(Pharmacia)， pT7T318U(Pharmacia)， pcD2[分子细胞生物学，3, 280(1983)]和 pUC18[基因，33,103(1985)]。

微生物宿主可以是埃希氏杆菌属的任一微生物，其中的例子包括大肠杆菌 XL1-Blue MRF' [策略 5,81(1992)；Stratagene]，大肠杆菌 C600[遗传学，39，440（1954）]，大肠杆菌 Y1088[科学，222，778（1985）]，大肠杆菌 Y1090[科学，222，778（1985）]，大肠杆菌 NM522[分子生物学杂志，166，1（1983）]，大肠杆菌 K802[分子生物学杂志，16，118(1996)]，大肠杆菌 JM105[基因，38，275(1985)]，大肠杆菌 JM109，大肠杆菌 XL1-Blue，大肠杆菌 XL2-Blue，大肠杆菌 DH1，大肠杆菌 MC1000，等。

可通过杂交筛选携带有此新型肌醇六磷酸酶基因的转化子。

用于杂交的探针包括依新型肌醇六磷酸酶的一段氨基酸序列合成的寡核苷酸。如果已从与具有产生新型肌醇六磷酸酶能力的微生物密切相关的一群微生物中得到了另外一个肌醇六磷酸酶基因，则此基因在某些情况下可用作筛选此新型肌醇六磷酸酶的探针。可以在这种情况下用作探针的基因包括来自 Aspergillus Ficcum 的肌醇六磷酸酶基因。

源于 Aspergillus Ficcum 的肌醇六磷酸酶可用下列方法得到，首先用上述方法制备它的染色体 DNA，然后用依据来自 Aspergillus Ficcum 的肌醇六磷酸酶基因 DNA 序列合成的 DNA 引物以 PCR 扩增它的肌醇六磷酸酶基因。

DNA 引物可用硫代亚磷酸方法在常规 DNA 合成仪上合成，如一种 DNA 合成仪（Shimadzu Seisakusho, Japan），也可用磷酰亚胺方法在 DNA 合成仪 Model 392（Perkin Elmer）或 380A 型 DNA 合成仪（Applied Systems）上合成。用这种方法合成的引物包括 SEQ ID NOS: 6 和 7 所示的 DNA。

用杂交方法筛选到的转化子中包含新型肌醇六磷酸酶基因的 DNA 可以 Sanger 等发明的双脱氧法进行分析[美国国家科学院院报，74，5463（1977）]，借此此基因的序列得以测定。如果用自动测序仪如 SQ-5500DNA 测序仪(Hitachi)或 373DNA 测序仪[Perkin Elmer]测序时，基因序列分析将会受到影响。

用这种方法测定的新型肌醇六磷酸酶基因的核苷酸序列包括例如 SEQ ID NO4 或 5 的核苷酸序列。

至于其在宿主细胞中的表达，这样得到的新型肌醇六磷酸酶基因可以分子克隆，第二版或现代分子生物学方法增补 1-34 中描述的方法进行。

首先，以合适限制性内切酶或 DNase 切割包含有新型肌醇六磷酸酶基因的 DNA 片段以形成包含此新型肌醇六磷酸酶基因、大小合适的 DNA 片段，然后此 DNA 片段被插入到表达载体启动子下游的一段区域，随后将插有此 DNA 片段表达载体转化到与之相容的宿主细胞中。

只要能表达目的基因的宿主都可应用。其中包括埃希氏杆菌属，沙雷菌属，棒状杆菌属，短杆菌属，假单孢菌属，芽孢杆菌属，小微杆菌属等的原核细胞，曲霉属，根霉菌属，木霉属，链孢霉属，毛霉菌属，青霉属等的丝状真菌，克鲁维酵母菌属，糖酵母属，裂殖糖酵母属，丝孢酵母属及许旺氏酵母属的酵母菌；动物细胞及昆虫细胞。

使用的表达载体能够在宿主细胞内自主复制或能整合到宿主染色体内并且在一个位点具有启动子以转录该新型肌醇六磷酸酶基因。

若使用细菌这样的原核细胞作宿主，此新型肌醇六磷酸酶的表达载体应该在微生物中自主复制并且包含一个启动子，核糖体结合序

列，此新型肌醇六磷酸酶基因及一个转录终止序列，此载体也可包括一个调节此启动子的基因。

表达载体包括 pKK233-2(Pharmacia)；pSE280(Invitrogen)；pGEMEX-1(Promega)；pQE-8(Qiagen)；pKY10(JP-A-110600/1983)；pKYP200[农业生物化学，48，669（1984）]，pLSA1[农业生物化学，53，277（1989）]，pGEL1[美国国家科学院院报，82，4306(1985)]，pBluescript (Stratagene)，pTrs30[从大肠杆菌 JM109/ pTrs30（FERM BP-5407）制备而来]，pTrs32[从大肠杆菌 JM109/pTrs32(FERM BP-5408)制备而来]，pGHA2[包含 pGHA2 的大肠杆菌以大肠杆菌 IGHA2 FERM BP-400 保藏于国家生物技术和人类技术研究所，工业科学和技术院，日本；见 JP-A-221091/1985]，pGKA2[包含 pGKA2 的大肠杆菌以大肠杆菌 IGKA2 FERM BP-6798 保藏于国家生物技术和人类技术研究所，工业科学和技术院，日本；见 JP-A-221091/1985]，pTerm2(JP-A-22979/1991)，USP 4686191，USP 4939094，USP 5160735，pGEX(Pharmacia)，pET 系统(Novagen)和 pSupex。

任何能够在象大肠杆菌这样宿主细胞中表达的启动子都可应用。其中的例子包括来自大肠杆菌，噬菌体等的启动子如 trp 启动子(Ptrp)，lac 启动子（Plac），P_L启动子和 P_R启动子。进一步地，人工修饰的启动子也可应用，这样的例子包括 Ptrpx2 启动子（具有两个紧密相连的 Ptrp 启动子），tac 启动子，T7 启动子，Plet 启动子等。

如果一个质粒中 SD 序列和起始密码子之间的距离恰到好处地受到调节（如距离 6-18 个碱基），则这个核糖体结合序列优先地被选用。

尽管任何编码新型肌醇六磷酸酶的基因可被用作新型肌醇六磷酸酶，其核苷酸可被优选地替换以使这个基因的 DNA 序列是微生物宿主表达的最适密码子。

尽管转录终止序列不是本发明的基因表达必须的，优选地，此转录终止序列应位于结构基因的下游紧接的一个密码子。

宿主包括埃希氏杆菌属，沙雷菌属，棒状杆菌属，短杆菌属，假单孢菌属，芽孢杆菌属等的微生物，例如大肠杆菌 XL1-Blue 大肠杆菌 XL2-Blue，大肠杆菌 DH1，大肠杆菌 MC1000，大肠杆菌 KY3276，大肠杆菌 W1485，大肠杆菌 JM109，大肠杆菌 HB101，大肠杆菌 N049，大肠杆菌 W3100，大肠杆菌 NY49，枯草芽孢杆菌，淀粉液化芽孢杆菌

(Bacillus amyloliquefacines),Brevibacterium immariophilum ATCC14068, 解糖短杆菌(Brevibacterium saccharolyticum), ATCC14066, 黄色短杆菌(Brevibacterium flavum) ATCC14067, 乳发酵短杆菌(Brevibacterium lactofermentum),ATCC13869,谷晏酯棒杆菌(Corynebacterium glutamicum) ATCC13032, 乙酰乙酸棒杆菌(Corynebacterium acetoacidophilum)ATCC 13870 和产氨棒杆菌(Microbacterium ammoniphilum) ATCC15354.

若用丝状真菌作为宿主，表达载体包括以下几种，p3SR2[基因，26，295-221（1983）]，p KBY2[美国国家科学院院报，82，834-838（1985）]，pSal23[农业生物化学，51，2549-2555（1987）]，pSTA4[Mol,Gen.Geneti. 218，99-104（1989）]，pDJB2[基因，36，321-331（1989）]和 pleu4[生物科学，生物技术，生物化学，56，1503-1504（1992）]。

只要在丝状真菌作为宿主时能够诱导表达的启动子都科应用。例如，可被淀粉或纤维素强烈诱导的启动子，如来自曲霉属的葡糖淀粉酶或α-淀粉酶的或来自木霉属的纤维素酶（纤维二糖水解酶）的启动子，糖酵解途径中的酶如磷酸甘油激酶（pgk）和 3-磷酸甘油醛脱氢酶（gpd）的启动子等。

尽管任何编码新型肌醇六磷酸酶的基因可被用作新型肌醇六磷酸酶基因，优选的例子是在该新型肌醇六磷酸酶末端连接了分泌信号序列肽的氨基酸序列编码的基因，这样的新型肌醇六磷酸酶可被分泌至微生物细胞外。具分泌信号序列肽包括来自曲霉属的葡糖淀粉酶或α-淀粉酶的分泌信号序列，或一段具有如 SEQ ID NO: 2 的 1-24 位氨基酸序列。

宿主包括黑曲霉 SK57，米曲霉 M-2-3[农业生物化学，51，2549-2555（1987）]，Aspergillus Ficcum NRRL3135，Aspergillus NRRL3112，构巢霉 IFO4340，Trichoderma reesei Rut-C-30[应用微生物学和生物技术，20，46-53（1984）]，雪白根霉(Rhizopus niveus) M-37[生物科学，生物技术，生物化学，56，1503-1504（1992）]等。

丝状真菌的转化可以 Gomi 等的方法[农业生物化学，51，2549（1987）]进行。

如果酵母被用作宿主，则可用表达载体如 YEp13（ATCC37115），

YEp24（ATCC37051）和 YCp50（ATCC37419）。

任何能够在象酵母这样宿主细胞中表达的启动子都可应用。其中的例子包括糖酵解途径中己糖激酶等基因的启动子，gal1 启动子，gal10 启动子，热休克蛋白启动子，MFα1 启动子和 CUP1 启动子。

可包括宿主啤酒糖酵母，粟酒裂殖糖酵母(Schizosaccharomyces pombe)，乳克鲁维氏酵母(Kluyveromyces lactis)，茁芽丝孢酵母(Trichosporon Pullulans)，河岸许旺氏酵母(Schwanniomyces alluvius)等。

重组载体的导入可以将 DNA 导入酵母的任何方法进行，如电穿孔法[酶学方法 194，182（1990）]，原生质球法[美国国家科学院院报，84，1929（1978）]，乙酸锂法[细菌学杂志 153，163（1983）]等。

如果动物细胞用作宿主，可用作表达载体的有 pAGE107[JP-A-22979/1991，细胞技术学，3，133(1990)]，pAS3-3(JP-A-227075/1990)，pCDM8 [自然，329，840(1987)]，pcDNAI/Amp(Invitrogen)，pREP4(Invitrogen)，pAGE103[生物化学杂志，101，1307（1987）]和 pAGE210。

任何能够在动物细胞中表达的启动子都可应用。其中的例子包括巨细胞病毒启动子（HCMV）的 IE（立即早期）基因的启动子，SV40 早期启动子，金属硫蛋白的启动子。另外，源于人类巨细胞病毒立即早期启动子的增强子可与此启动子一起使用。

宿主细胞包括人类 Namalwa 细胞，猴 COS 细胞，中国仓鼠卵巢 CHO 细胞，HBT5673（JP-A-299/1988）等。

任何将 DNA 导入动物细胞的方法都可应用，如电穿孔法[细胞技术学，3，133(1990)]，磷酸钙法（JP-A-227075/1990），脂质体法[美国国家科学院院报，84，7413（1987）]等。

转化子的制备和培养可依 JP-A-227075/1990 或 JP-A-257891/1990 中描述的方法进行。

如果昆虫细胞用作宿主，目的蛋白的基因可以如《杆状病毒表达载体实验室手册》，《现代分子生物学方法增补 1-34》和生物/技术 6，47（1988）中描述的方法进行表达。

即，将含有重组基因的载体与杆状病毒同时转入昆虫细胞；这样就可在培养上清中得到重组病毒，然后用重组病毒感染昆虫细胞，由

此蛋白可得以表达。

在这种方法中使用的导入基因的载体包括如 pLV1392，pVL1393 和 pBlueBacIII（它们都是 Invitrogen 公司的产品）。

可用感染某些蛾的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒作为杆状病毒。

可用秋粘虫的卵巢细胞 sf9 和 sf21《杆状病毒表达载体实验室手册，W.H.Freeman and Company，New York(1992)》，粉纹夜蛾的卵巢细胞 High5(Invitrogen)等作为昆虫细胞。

为了将含有重组基因的载体与杆状病毒同时转入昆虫细胞而制备重组病毒，可用磷酸钙法（JP-A-227075/1990）或脂质体法[美国国家科学院院报，84，7413（1987）]。

基因表达除了用直接表达的方法外，还可以根据《分子克隆，第二版》的描述，将基因以分泌方式或融合蛋白的方式进行表达。

用丝状真菌、酵母、动物细胞或昆虫细胞表达这个基因时，可以得到具有糖或碳氢链的多肽。

除上述转化子以外，具有产生新型肌醇六磷酸酶能力的微生物或具有更强的产生新型肌醇六磷酸酶能力的微生物的突变体皆可用于生产该新型肌醇六磷酸酶。

用常规的突变方法可获得具有更强的产生新型肌醇六磷酸酶能力的突变体。

为了制备该新型肌醇六磷酸酶，可以常规方法培养具有产生该新型肌醇六磷酸酶能力的微生物及其突变体以及携带有整合了新型肌醇六磷酸酶基因重组 DNA 的转化子以生产和积累该新型肌醇六磷酸酶，然后从培养基中收获该酶。这些微生物突变体及用于生产该新型肌醇六磷酸酶的转化子在下文称之为产生肌醇六磷酸酶的微生物。

如果产生新型肌醇六磷酸酶的微生物为原核生物如大肠杆菌或如丝状噬菌体或酵母，培养这些微生物的培养基为天然培养基或包含有可被微生物吸收的碳源、氮源、无机盐等的合成培养基，在这些培养基中，转化子可被有效地培养。

只要能够被微生物吸收，任何碳源都可被使用，例如葡萄糖、果糖、蔗糖、糖浆一类的碳氢化合物；淀粉和淀粉水解物，乙酸和丙酸一类的有机酸，以及甲醇、乙醇、丙醇一类的醇类物质。

用作氮源的有：氨、无机或有机氨盐如氯化氨、硫酸氨、乙酸铵

和磷酸铵、以及其它的氮化合物；胨、肉汁（肉汤）；酵母提取物；谷物浸出液；珞蛋白水解液；豆饼及其水解液；多种发酵微生物及其消化产物。

培养基中所用的无机物质包括磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸镁、硫酸镁、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、硫酸锰、硫酸铜、碳酸钙等。

培养丝状真菌的培养基以麸皮，稻皮做碳源，以适当形式的盐补充氮源和无机物。

在通气状况下用摇动培养或通气状况下浸没摇动培养。培养温度以 15-40℃为佳，培养时间通常为 16-96 小时。培养过程中，pH 值保持在 3.0-9.0，培养真菌时，pH 值保持在 3.0-6.5 为佳，用无机或有机酸、碱性溶液、尿素、碳酸钙、氨等调节 pH 值。

培养过程中，可任选地向培养基中加入氨苄青霉素或四环素一类的抗生素。

如果转化了一种微生物的表达载体具有可诱导的启动子，微生物在培养过程中，可任选地向培养基中加入诱导物。例如，转化了具有 lac 启动子的表达载体的微生物，其培养基中应加入 IPTG 等，转化了具有 trp 启动子的表达载体的微生物，其培养基中应加入 IAA 等。

如果丝状真菌在含有麸皮一类的固体成分的培养基中培养时，先接种真菌，然后将真菌与固体成分混合均匀，随后将混合物以一薄层铺于铝盘或不锈钢盘上，将之置于培养箱中在可控温度、湿度和通气状况下在培养室中 25-35℃静置培养 3-10 天。

如果产生新型肌醇六磷酸酶的为动物细胞，培养基通常为 RPMI1640，Eagle's MEM 培养基或在该培养基中补充胎牛血清。

5%CO_2存在的情况下进行培养。培养温度以 35-37℃为佳，培养时间通常为 3-7 天。

培养过程中，可任选地向培养基中加入卡那霉素或青霉素一类的抗生素。

培养以昆虫细胞为宿主的转化子使用的培养基为正常培养基如 TNM-FH 培养基 (Pharmigen)sf-900II SFM 培养基 (Gibco BRL)Excell400Excell405 培养基[皆来自 JRH Biosciences]。

培养温度以 25-35℃为佳，培养时间通常为 1-4 天。

培养过程中，可任选地向培养基中加入庆大霉素一类的抗生素。

可以用常规的分离/纯化酶的方法从产生新型肌醇六磷酸酶的微生物的培养基中分离和纯化新型肌醇六磷酸酶。

例如，如果新型肌醇六磷酸酶以可溶形式在产生该酶的微生物细胞中积累，则通过离心从培养物中收集细胞，然后以缓冲液洗涤细胞，用弗氏压碎器、manntongaurin 匀浆器、dynomill 等超声破碎细胞，由此产生无细胞抽提液。将无细胞抽提液离心留取上清，按常规的分离/纯化酶的方法进行操作：溶剂萃取、硫酸铵盐析、有机溶剂沉淀脱盐，以如 DEAE-Sepharose 琼脂糖凝胶或 DIAION HPA-75(Mitsubishi 公司)树脂为基质进行离子交换层析，以 S-SepharoseFF(pharmacia)树脂为基质进行离子交换层析，在丁基琼脂糖凝胶或苯基琼脂糖凝胶上进行疏水层析，用分子筛进行凝胶过滤，亲合层析，层析聚焦及等电聚焦一类的电泳，上述方法可以单独使用也可联合使用，由此可得到纯品。

如果此新型肌醇六磷酸酶在细胞中以不溶形式表达，则用相似的方法收集、粉碎，离心以得到含有该酶的沉淀部分，用多肽去污剂溶解不溶于水的新型肌醇六磷酸酶。然后稀释或透析得到的液体直至除掉去污剂或其量不致于使多肽变性，由此新型肌醇六磷酸酶恢复到天然构象。通过上述的分离/纯化方法可得到纯品。如果该新型肌醇六磷酸酶被分泌到细胞外，则离心培养物并保留上清可溶部分。若培养基中有麸皮一类的固体成分，则先用温水等提取新型肌醇六磷酸酶，然后离心并保留上清可溶部分。用上述从无细胞提取液中分离和纯化方法，可得到该新型肌醇六磷酸酶纯品。

用下述标准分析方法可确定该新型肌醇六磷酸酶的活性。

将 0.5ml 含 2.5 mM 植酸钠(Sigma)的 pH5.5（乙酸钠）的 0.2M 乙酸缓冲液在 37℃放置 5 分钟，然后将 0.5ml 的酶液加入其中以起始反应。37℃放置 10 分钟，将 2ml 酶反应终止液（如 10 mM: 5N 硫酸：丙酮为 1:1:2 的混合物）加入其中以终止反应，然后再加入 0.1ml 1M 的柠檬酸钠并混匀。在分光光度计（Hitachi U-2000）上 380 nm 读取该溶液的吸值。肌醇六磷酸酶活性单位定义为 pH5.5，37℃时 1 分钟内释放 1μM 的无机磷酸所需要的酶量。

该新型肌醇六磷酸酶的 Km 值可通过 Lineweaver-Burk 图来确定，Lineweaver-Burk 图是通过标准分析方法测得的新型肌醇六磷酸

酶的活性对不同的底物浓度绘制的。

本发明的肌醇六磷酸酶可用于需要将植酸盐转化为肌醇集合无机磷酸的多种过程。

例如，本酶可用于动物饲料，大豆加工，猪和家禽的液体饲料及从植酸盐制备肌醇或肌醇（单）磷酸。

下面是这类动物饲料的一例。

本发明的新型肌醇六磷酸酶与麦壳一类的携带物混合后在喷洒塔或流化床上干燥。干燥后，将渗透压稳定剂如山梨醇和防腐剂如苯甲酸加入其中形成一种动物饲料。在此动物饲料中新型肌醇六磷酸酶的量为 10-5000 单位。每 Kg 动物饲料中含 100-1000 单位该酶为佳。

附图简述

图 1 展示了源自黑曲霉 SK52 的肌醇六磷酸酶基因的限制性酶切图谱，其中箭头指示肌醇六磷酸酶编码区域。

图 2 展示了质粒 pANPHY1 的限制性酶切图谱，其中“肌醇六磷酸酶”代表一个新型肌醇六磷酸酶基因，“Amp”指代来自 pUC118 的氨苄青霉素抗性基因，箭头指示了该基因的转录和翻译方向。

图 3 展示了用 SDS-PAGE 测定新型肌醇六磷酸酶的分子量。

图 4 展示了通过测定新型肌醇六磷酸酶的分子量得到的标准曲线。

图 5 展示了新型肌醇六磷酸酶的最适 pH 值，每一个值处的活性为相对活性（%），将最大酶活性处的值定为 100%。

图 6 展示了新型肌醇六磷酸酶的酸碱稳定性。

图 7 展示了新型肌醇六磷酸酶的最适温度。每一个温度处的活性为相对活性（%），将最大酶活性处的温度定为 100%。

图 8 展示了新型肌醇六磷酸酶的热稳定性。每一个温度处的活性为相对活性（%），4℃时活性定为 100%。

图 9 展示了新型肌醇六磷酸酶在等电聚焦时的等电点。

在 pH 7.0 或更大时，此酶无活性。

执行本发明的最佳模式

实施例 1 制备编码新型肌醇六磷酸酶的染色体 DNA

1、制备黑曲霉 SK57

将 100ml 麦芽汁培养基（2%麦芽汁提取液，2%葡萄糖，0.1%蛋白

胨）放入具有阻板的 500ml 三角瓶中，用硅海绵瓶塞封口，120℃灭菌 20 分钟。

将 SK57 接种于此培养基中，28℃摇动培养 7 天。

用灭菌的玻璃滤器过滤培养物得到 0.5g SK57.

2、从微生物中分离和纯化总 DNA

将从实施例 1-1 中得到的 SK57 置于纸间并压挤之以除去水分，然后将微生物置于冷却至-80℃的研钵中，向其中加入液氮使之冷冻，用冷却至-80℃的研杵将之磨细。

将上述磨细的微生物置入一离心管中并入 0.2ml TE 缓冲液[10mM Tris-HCl(pH8.0)，1mM EDTA]并悬浮之。往上述悬浮液中加入 0.2ml 裂解缓冲液[2%SDS，0.1M NaCl,10mM EDTA，50mM Tris-HCl(pH7.0)]以裂解微生物。裂解液在 4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 10 分钟后，将上清移入一个新的离心管中。

将 0.4 ml 酚溶液（即，酚:氯仿:异戊醇 25:24:1 的混合液）加入上述上清中，轻轻摇动试管并在 4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 10 分钟后，将上清移入一个新的离心管中。将此过程重复 3 次，上清移入一个新的离心管中。

向上述上清中加入 1ml 冷的乙醇，-80℃放置 10 分钟，4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 10 分钟，由此可得到沉淀物（DNA）。

真空干燥沉淀并将之溶于 0.5ml TE 缓冲液中。

向上述溶液中加入 5μl RNase（10 mg/ml），37℃放置 30 分钟。

向上述处理溶液中加入 0.5ml 酚溶液，缓慢摇动混合物，15000 rpm（18500×g）离心 10 分钟，将上清移入一个新的离心管中，将此过程重复 2 次，上清移入一个新的离心管中。

将 0.5ml 氯仿溶液（即，氯仿:异戊醇 24:1 的混合液）加入上述上清中，4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 10 分钟后，将上清移入一个新的离心管中以回收沉淀物（DNA）。

向上述上清中加入 5oμl NaCl 及 1ml 冷的乙醇，-80℃放置 10 分钟，4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 10 分钟，由此可得到沉淀物（DNA）。用 0.5 ml 70%的乙醇进一步洗涤沉淀并在 4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 10 分钟以收集沉淀物（DNA）。真空干燥沉淀后会得到大约 5ug 纯基因组 DNA。

3、探针制备

可用来自 Aspergillus ficcum NRRL3135[来自北部地区研究中心，农业 Peoria 联邦部，Illinois 美国 NRRL]的基因作为探针检测来自黑曲霉 SK57 的肌醇六磷酸酶克隆。

以实施例 1-1 和 1-2 描述的方法制备 NRRL3135 的总 DNA.

为了从 NRRL3135 中扩增肌醇六磷酸酶的结构基因，正义和反义引物分别为 SEQ ID NO:6 和 NO:7，它们是在 380ADNA 合成仪（Applied Biosystems）上合成的。用 100 μl 包含正义引物、反义引物及反义引物基因 DNA 的混合物以 PCR 方法扩增肌醇六磷酸酶的结构基因。按下列反应步骤进行 PCR，每循环中，92℃1 分钟，45℃2 分钟，72℃3 分钟，总共 25 个循环。

先用限制性内切酶 EcoRI 切割 pUC118，将一段 EcoRI 处理过的用 PCR扩增到的肌醇六磷酸酶的结构基因通过连接试剂盒（Taraka Shuzo, Japan）连入 pUC118 EcoRI 位点。

有肌醇六磷酸酶的结构基因片段插入的质粒转化大肠杆菌 JM109（Taraka Shuzo）。

将大肠杆菌转化子在含有 50 mg/ml 氨苄青霉素钠的 LB 培养基中（1%蛋白胨，0.5%酵母提取物，1% NaCl）37℃培养一天。

从培养物中提取质粒，然后用 EcoRI 消化质粒以回收 1.7Kb 的 DNA 片段。

此 1.7Kb 的 DNA 片段用作探针。

4、Southern 杂交

将 12U 的限制性内切酶 XbaI(Takara Shuzo)加入到 20 ug SK57 基因组 DNA 中，37℃作用 12 小时以切割 DNA。琼脂糖凝胶电泳分离此 DNA。按照 ECL 试剂盒（Amersham）说明书以实施例 1-3 得到的探针进行 Southern 杂交。

琼脂糖凝胶电泳后，DNA 在 0.4N 的氢氧化钠溶液中通过毛细作用转印到 Hybond-N^+膜上（Amersham），空气干燥此膜。将膜于 42℃在 10 杂交缓冲液中[0.5M NaCl 和 5%封闭剂]浸泡 1 小时，此杂交缓冲也包含在直接 ECL 核酸标记和检测系统中（Amersham），然后向浸泡有转印了 DNA 的膜的杂交液中加入 30μl 探针溶液[制备方法，将 7 μl 无菌水加入到 3 μl 实施 1-3 中得到的探针中，95℃作用 5 分钟，然后

冰上放置 5 分钟，再向上述溶液中加入 10 μl 标记溶液和 10 μl 戊二醛溶液，将混合物在 37℃放置 10 分钟]，42℃摇动过夜。

用 100ml 初级洗液[6M 尿素，0.4%S DS，0.5×SSC（1×SSC，150 mM 氯化钠及 15 mM 柠檬酸钠）]在 42℃洗膜 20 分钟。然后，用 100ml 次级洗液[0.4% SDS，0.5×SSC]在 55℃洗膜 2 此，每次 10 分钟，随后，用 100ml 2×SSC 在室温下洗膜 2 次，每此 5 分钟。

洗涤后的膜空气干燥 1 分钟，然后将之浸入 7ml 的显色剂中 1 分钟，迅速将之包于 Saran 纸中。然后将膜置于一个 X-光片夹中 X-光片(Fuju，Japan)室温下曝光 5 分钟。

与探针杂交信号强的 DNA 片段约 4.6Kb。

5、黑曲霉 SK57 染色体 DNA 制备

将 12U 的限制性内切酶 XbaI 加入到 10 ug 黑曲霉 SK57 基因组 DNA 中，37℃作用 12 小时以切割 DNA，随后将之进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳。电泳后，从胶上切下约的 DNA 片段，用 Geneclean(BIO101)可得到约 100ng 的 DNA 片段。

在另一反应中，将 12 U XbaI 加入到约 200ng 大肠杆菌载体 pUC118 中(Takara Shuzo)并在 37℃作用 1 小时以切割 pUC118。

将 1U 碱性磷酸酶加入到上述处理过的溶液中，37℃作用 30 分钟，加入 20 μl 酚处理液至反应混合物中，轻轻摇动，4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 10 分钟后，将上清移入一个新的离心管中。重复此过程两遍，将上清移入一个新的离心管中。

向上清中加入 2 μl 3M 乙酸钠及 50 μl 冷乙醇，-80℃放置 10 分钟，4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 10 分钟以回收沉淀物。

真空干燥沉淀并将之溶于 10 1 TE 缓冲液中以获得切割后的片段。

上述方法制备的约 4.6 Kb 的 DNA 片断通过 T4 DNA 连接酶(Takara Shuzo）连入到切割后片段的切点处，由此产生了具有黑曲霉 SK57 染色体 DNA 片段的质粒。

用常规方法将此质粒转化大肠杆菌 JM109（Taraka Shuzo）。

转化大肠杆菌在含有 50 mg/ml 氨苄青霉素钠的 LB 培养基中在 37℃培养一天。为了制备一个复制物，转化子进一步在含有 50 ug/ml 氨苄青霉素钠的 LB 培养基（通过在 LB 培养基中加入 2%的琼脂制备）

中在 37℃培养一天。在培养基上生长的克隆用作 SK57 染色体 DNA 文库。

6、从染色体 DNA 文库中分离含目的 DNA 的克隆:

为了从实施例 1-5 制备的文库中筛选具有新型肌醇六磷酸酶基因的克隆，文库中的克隆被转移至滤膜上并且利用 ECL 试剂盒（Amersham），以实施例 1-3 制备的探针通过克隆杂交方法进行筛选。几千个克隆用于杂交以分离阳性克隆。

7、限制性酶切图谱的制备及测序

用常规方法提取实施例 1-6 中得到的阳性克隆的质粒。此质粒被命名为 pANPHY1。用多种限制性酶切割质 pANPHY1 并进行琼脂糖凝胶电泳，依据片段大小，得到了一个由 XbaI 处理来自 SK57 染色体 DNA 插入片段的限制性酶切图谱（图 1），此插入片段大小为 4.6Kb。

用多种限制性酶切割质粒 pANPHY1，然后进行琼脂糖凝胶电泳，将其转移至尼龙膜上。用 ECL 试剂盒以实施例 1-3 中得到的探针进行 Southern 杂交。插入片段的中间部位与探针杂交。pANPHY1 的限制性酶切图谱及新型肌醇六磷酸酶的编码区示于图 2。

插入到 pANPHY1 的新型肌醇六磷酸酶基因全核苷酸序列通过双脱氧链终止法测定。此核苷酸序列示于 SEQ ID NO:4。

实施例 2 编码新型肌醇六磷酸酶 DNA 的内含子分析

从实施例中获得的编码新型肌醇六磷酸酶的染色体 DNA 内的内含子的分析是通过下述方法从黑曲霉 SK57 中获得肌醇六磷酸酶 cDNA 中来进行的。

1、黑曲霉 SK57 的培养

此培养基以察氏培养基为基础，在 50mM MES 缓冲液含有 0.05%硫酸镁，0.01%硫酸亚铁，0.05%氯化钾，0.2%硝酸钠，1%葡萄糖及谷物浸出液（Sanei Toka, Japan）。将此培养基以 100ml/瓶等分到具有阻板的 500ml 三角瓶中，高压蒸汽灭菌（120℃，20 分钟）。灭菌后，将斜面上的一铂环 SK-5 接种于培养基中，28℃，200rpm 振荡培养 5 天。用吸力使培养物通过玻璃滤器以收获微生物并快速将之冻存于液氮中以抑制 RNase 的活性。在使用前此生物一直保存于-80℃。

2、RNA 的提取

边快速研磨 1g 实施例 1-1 中得到的冰冻微生物边向其中加入液

氮。将获得的粉末加入到 50℃的 10ml ISOGEN 提取液(Nippon Gene)中并激烈振荡 30 秒。

上述溶液在 50℃放置 10 分钟并以 1ml/管分到 Eppendorf 管中。

向每一份液体中加入 200 μl 氯仿，然后摇动之，并在 4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 10 分钟后，收集上层水相。

将 500 μl 4M 氯化锂加入水相，混匀，-80℃放置 1 小时。并在 4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 15 分钟，获得的沉淀物溶于 0.4 ml 无 RNase 的灭菌水中（此后简称为无 RNase 水）。

向上述溶液加入 0.4 ml 异丙醇，4℃放置 30℃，4℃以 15000 rpm（18500×g）离心 15 分钟，回收沉淀物。

以 75%乙醇洗涤沉淀，然后在真空离心机中干燥之，并将其溶于 0.4 ml RNase 水中。

将 1ml 乙醇加入上述乙醇，然后离心并再次回收沉淀物。

将 75%乙醇洗涤沉淀并将之溶于无 RNase 水中，总体积为 0.4ml，此溶液可用作 RNA 样品。

3、用 RT-PCR 括增肌醇六磷酸酶 cDNA

用 RT-PCR 试剂盒（Toyobo）扩增肌醇六磷酸酶 cDNA。

〈1〉反转录反应

将 1ug 实施例 2-2 中得到的 RNA 样品置于一个 Eppendorf 管中，以无 RNAse 水将溶液补至 10μl。

将 RT-PCR 试剂盒（Toyobo）中的 4 μl 5×RTase 缓冲液， 1μl 随机引物，1μl RNase 抑制剂及 2 μl RTase 加到上述溶液中，然后在 PJ2000 热循环仪上（Perkin Elmer）30℃反应 10 分钟，42℃反应 20 分钟，99℃反应 5 分钟，4℃反应 5 分钟。

〈2〉PCR

将 RT-PCR 试剂盒（Toyobo）中的 10 μl Plus 缓冲液，68 μl 灭菌水，0.5 μl 正义引物、0.5μl 反义引物及 1 μl rTaq DNA 多聚酶加入到实施例 2-1 的 20 μl 反应液中，最后的总体积为 100 μl。肌醇六磷酸酶 cDNA 的扩增在下列条件下进行；每个循环中，94℃30 秒，60℃30 秒，72℃90 秒，总共 35 个循环。

反应结束后，将 10 μl 氯仿：异戊醇（24：1）混合物加入反应体系，振荡，然后 15000RPM 离心 5 分钟以回收上清作为 cDNA 样品。

此 cDNA 样品用于 cDNA 分析，结果，在 SEQ ID NO: 4 的碱基序列(44-155 位置)发现一个内含子。此序列编码 SEQ ID NO 2 的氨基酸序列。从下面描述的纯化的新型肌醇六磷酸酶的氨基酸（SEQ ID NO 1）中可以发现，从 N 末端至第 24 位的氨基酸相当于分泌信号肽。

实施例 3 表达新型肌醇六磷酸酶 DNA 的转化子的制备

表达新型肌醇六磷酸酶的转化子以黑曲霉 SK57，构巢曲霉 MD-4 和米曲霉 M-23 作为宿主的。

宿主(黑曲霉 SK57，构巢曲霉 MD-4 和米曲霉 M-23)在 DPY 培养基中（2%糊精，1%蛋白胨，5%酵母提取物，0.5% KH_2PO_4，0.05% $MgSO_4.7H_2O$ pH5.5）30℃振荡培养 2-3 天。用 3G1 玻璃滤器收集生长的微生物并用灭菌水洗涤之。

将洗涤后的微生物加入到 10 ml 原生质体制备液中[5 mg/ml Novozyme234，5 mg/ml 纤维素酶 R-10，0.8 M NaCl，10 mM 磷酸缓冲液(pH6.0)]并在 30℃轻轻震荡 3 小时。未被裂解的菌丝通过 3G3 玻璃滤器除掉，获得的滤液则以 700×g（2000 rpm）离心以获得原生质体。

0.8M NaCl 洗涤两次原生质体，以溶液 I [0.8M NaCl，10mM $CaCl_2$，50mM Tris-HCl(pH7.5)]洗涤一次，然后将其溶于 4/5 体积的溶液 I 中，最终浓度为 2.5×10^8 /ml。向悬浮液中加入 1/5 体积的溶液 II[40%(w/v)PEG4000，50mM Tris-HCl(pH7.5)]，由此制备了用于转化的原生质体悬液。

在使用黑曲霉 SK57 和构巢曲霉 MD-4 的原生质体悬液时，向 0.2ml 原生质体悬液中加入 20μl 质粒 pANPHY1，或质粒 pANPHY1 和 p3SR2 各 10μl，混合液在冰上放置 30 分钟，随后加入 1ml 溶液 II 并在室温下放置 20 分钟。然后，加入 10ml 溶液 I 并在 700×g 离心 5 分钟以得到沉淀部分。将沉淀部分悬浮于 0.2ml 溶液 I。将悬液涂到含 0.8 M NaCl 的 CD 板培养基上（1%蔗糖，10 mM 乙酰胺，0.1% KH_2PO_4，0.05% $MgSO_4.7H_2O$，0.05% KCl，），随后将含 0.5%琼脂的培养基覆于其上，30℃培养 5-10 天。

在使用米曲霉 M-23 的原生质体悬液时，向 0.2ml 原生质体悬液中加入质粒 pANPHY1 和 pSal23 各 10μl，混合液在冰上放置 30 分钟，随后加入 1ml 溶液 II 并在室温下放置 20 分钟。然后，加入 10ml 溶液 I

并在 700×g 离心 5 分钟以得到沉淀部分。将沉淀部分悬浮于 0.2ml 溶液 I。将悬液涂到基本培养基上板上（1%蔗糖，0.3% $NaNO_3$，0.1% KH_2PO_4，0.05% $MgSO_4$.7H20，0.05% KCl，pH5.5），随后将含 0.5%琼脂的培养基覆于其上，30℃培养 5-10 天。

培养过程中，将生长良好的株系选作转化子，测定每一转化子的肌醇六磷酸酶的活性，得到了具有高活性的黑曲霉 MH-PA1，构巢曲霉 M-PA1 及米曲霉 MO-PG3。黑曲霉 MH-PA1，构巢曲霉 M-PA1 分别在 1996 年 1 月 25 日以 FERM BP-5372 和 FERM BP-5373 贮存于国家生物科学和人类技术研究所，工业科学和技术院，日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番 3 号，邮区 305。

实施例 4 由转化子生产肌醇六磷酸酶

〈1〉由黑曲霉 MH-PA1 生产肌醇六磷酸酶

将 10g 麸皮加入到一个 500 ml 的三角瓶中并用棉塞封瓶口，在 120℃灭菌 20 分钟，然后向其中加入 8ml 灭菌水。在此培养基中接种 MH-PA1 菌株，摇动三角瓶使 MH-PA1 菌株与麸皮完全混合，30℃静置培养 4-5 天。

向上述三角瓶中加入 100 ml 37℃的灭菌水，并将之在 37℃放置 1-2 小时，然后，用 2 号滤纸将液相与固相分开，由此可得到 560U 的新型肌醇六磷酸酶。由 MH-PA1 产生的新型肌醇六磷酸酶比实施例 6-1 中 SK57 产生的新型肌醇六磷酸酶高 2.4 倍。

〈2〉由构巢曲霉 M-PA1 生产肌醇六磷酸酶

将 10ml 肌醇六磷酸酶生产培养基(1%蔗糖，0.2% $NaNO_3$，0.05% $MgSO_4$.7H_2O，0.05% KCl，0.001% $FeSO_4$.7H_2O，0.1% C.S.L pH 5.5)加入到 100 ml 的三角瓶中，用硅塞封瓶口在 120℃灭菌 30 分钟，将 M-PA1 接种到此培养基中，30℃摇动培养 4-5 天。

转化子 M-PA1 产生 90mU 肌醇六磷酸酶，它是在同样条件下构巢曲霉 MD-4 产生的肌醇六磷酸酶的 18 倍，后者为 5mU。

〈3〉由米曲霉 MO-PG3 生产肌醇六磷酸酶

将 500ml 肌醇六磷酸酶产生培养基置于一个 2L 的三角瓶中，用硅塞封瓶口在 120℃灭菌 20 分钟。将 MO-PG3 接种到此培养基中，30℃摇动培养 4-5 天。

转化子 MO-PG3 产生 370 mU/ml 肌醇六磷酸酶，它是在同样条件下

米曲霉M-23产生的肌醇六磷酸酶的29倍，后者为13 MU/ML。

实施例5 由黑曲霉SK57制备高产新型肌醇六磷酸酶的黑曲霉SK92

在基础培养基[2%蔗糖，0.3%亚硝酸钠，0.05%氯化钾，0.05%硫酸镁，2%琼脂，pH5.5]上培养黑曲霉SK57使其产生孢子。将这些孢子悬浮在灭菌水中。悬浮液的终浓度为10^7孢子/ml灭菌水，10ml这样的悬浮液用于突变。以99%致死量的UV-射线或γ-射线照射孢子悬液。用这种突变方法得到了一肌醇六磷酸酶高表达株。此菌株又通过了7次突变，得到了高表达新型肌醇六磷酸酶的黑曲霉SK92。

实施例6 由黑曲霉SK57和黑曲霉SK92生产新型肌醇六磷酸酶

〈1〉 由SK57和SK92生产新型肌醇六磷酸酶

将10 g麸皮加入到一个500 ml的三角瓶中，用棉塞封瓶口并在120℃ 高压20分钟，然后向瓶中加入8 ml灭菌水。 将SK57或SK92接种于此培养基中，摇动三角瓶以使菌丝与麸皮完全混匀。

将100ml 37℃ 的水置于上述三角瓶中，并将之在37 ℃放置1-2小时，随后，用2号滤纸将液相与固相分开。

通过此过程，SK57生产230U新型肌醇六磷酸酶而SK92产生1000U新型肌醇六磷酸酶。

SK92产生新型肌醇酶的量比SK57高4.5倍。

〈2〉 由SK57和SK92生产新型肌醇六磷酸酶

原来在纯培养基上生长的SK57被接种到120℃高压30分钟的750g麸皮中，在混合器中将菌丝与麸皮混匀。

将混合物到在铝盘上(600×1000mm)，每盘为5Kg，将SK57在100%湿度，30℃培养5天。

培养物转移至抽提液中并喷洒18吨温水。将肌醇六磷酸酶抽提液回收至一个25吨的罐。将抽提液转移至真空浓缩罐（Nippon Shinku K.K.）在真空作用下将抽提液浓缩2-3倍，并向其中加入3.5吨95%冷乙醇。用压力滤器将由此产生的不纯固体成分除掉。

用无菌滤器(0.45 μM, Nippon Rosuiki K.K.)过滤上述得到的滤液，并将3.5吨95%冷乙醇加入到滤液中以分离新型肌醇六磷酸酶。沉淀分离肌醇六磷酸酶，得到3吨包含新型肌醇六磷酸酶的沉淀。

在沉淀中加入8吨95%的冷乙醇，脱水后，分离到的肌醇六磷酸酶被沉淀，由此得到3吨包含新型肌醇六磷酸酶的沉淀。将脱水和沉

淀过程重复 2-3 次，沉淀经真空干燥后，得到 1.5×10^{8} 肌醇六磷酸酶粗制品。

实施例 7 新型肌醇六磷酸酶的纯化

〈1〉纯化由黑曲霉 SK57 产生的新型肌醇六磷酸酶

将实施例 6-2 中得到的 10g 肌醇六磷酸酶粗制品溶于 50ml 乙酸缓冲液 A[50mM 乙酸/50mM 乙酸钠(pH5.5)]并用一种超滤膜脱盐（除掉分子量 10000 以下的物质 Sartrius）。得到的酶液上样于用乙酸缓冲液 A 平衡过的 DIAIONPA-75[Mitsubishi]柱上（5.6×30cm），用乙酸缓冲液 A 洗柱后，以含 0.3MNaCl 乙酸缓冲液 B[50mM 乙酸/50mM 乙酸钠(pH4.8)]洗脱新型肌醇六磷酸酶。用超滤膜脱盐（除掉分子量 10000 以下的物质 Advantec）将洗脱部分浓缩 20 倍，然后上样于用乙酸缓冲液 C[50mM 乙酸/50mM 乙酸钠(pH4.9)]平衡过的 S-Sepharose FF（2.5×30cm Pharmacia）柱上。用乙酸缓冲液 C 洗涤后，以乙酸缓冲液 D[50mM 乙酸/50mM 乙酸钠(pH5.2)]洗脱蛋白以得到新型肌醇六磷酸酶。用超滤膜（除掉分子量 10000 以下的物质 Advantec）将洗脱部分浓缩 20 倍，然后上样于用乙酸缓冲液 E[50mM 乙酸/50mM 乙酸钠(pH4.5)]平衡过的 Toyopearl HW-55F（Toso）柱上。新型肌醇六磷酸酶以乙酸缓冲液 E 洗脱。将洗脱部分上样于用 25mM 组氨酸-盐酸缓冲液 pH5.8(Pharmacia)平衡过的 mono-PHR5/20 柱(Pharmacia)，然后以 10% Polybuffer74-HCl,pH 4.2(Pharmacia)洗脱新型肌醇六磷酸酶。

经过上述步骤，新型肌醇六磷酸酶被纯化到特异性为 158 U/mg。

〈2〉纯化由黑曲霉 MH-PA1 及构巢曲霉 M-PA1 产生的新型肌醇六磷酸酶

根据实施例 6-1 描述的方法培养 MH-PA1 和 M-PA1，分别用 2 号滤纸从其培养物中分离液体部分（新型肌醇六磷酸酶粗提液）。

向每一新型肌醇六磷酸酶粗提液加入 50 ml 乙酸缓冲液 A(pH 5.5)并用一种超滤膜脱盐（除掉分子量 10000 以下的物质 Advantec）。

将脱盐酶液上样于用乙酸缓冲液 A 平衡过的 DIAIONPA-75 柱上（5.6×30cm），用乙酸缓冲液 A 洗柱后，以含 0.3 M NaCl 乙酸缓冲液 B[50mM 乙酸/50mM 乙酸钠(pH4.8)]洗脱新型肌醇六磷酸酶。

洗脱部分超滤膜脱盐（除掉分子量 10000 以下的物质 Advantec）

浓缩然后透析。得到的酶液上样于用 50 mM 乙酸缓冲液 E[50mM 乙酸/50mM 乙酸钠(pH4.5)]平衡过的 Toyopearl HW-55F（Toso）柱上。新型肌醇六磷酸酶以乙酸缓冲液 E 洗脱。

经过上述步骤，由黑曲霉 MH-PA1 及构巢曲霉 M-PA1 产生新型肌醇六磷酸酶得以纯化。

〈3〉纯化由米曲霉 MO-PG3 产生的新型肌醇六磷酸酶

通过离心除掉实施例 4-3 培养物中的微生物，得到的上清用作酶粗提液。

向酶粗提液加入 50 mM 乙酸缓冲液 A(pH 5.5)并用一种超滤膜脱盐（除掉分子量 10000 以下的物质 Advantec）。

将脱盐酶液上样于用乙酸缓冲液 A 平衡过的 DIAIONPA-75 柱上（5.6×30cm），用乙酸缓冲液 A 洗柱后，以含 0.3MNaCl 乙酸缓冲液 B[50mM 乙酸/50mM 乙酸钠(pH4.8)]洗脱新型肌醇六磷酸酶。

洗脱部分超滤膜脱盐（除掉分子量 10000 以下的物质 Advantec）浓缩然后透析。得到的酶液上样于用 50 mM 乙酸缓冲液 E[50mM 乙酸/50mM 乙酸钠(pH4.5)]平衡过的 Toyopearl HW-55F（Toso）柱上。然后以乙酸缓冲液 E 洗脱新型肌醇六磷酸酶。

经过上述步骤，由米曲霉 MO-PG3 产生的新型肌醇六磷酸酶得以纯化。

实施例 8 新型肌醇六磷酸酶的物理化学特性

在实施例 7-1—7-3 中得到的新型肌醇六磷酸酶的物理化学特性如下。

〈1〉Km 值：活性测定按标准分析方法进行，其中底物浓度变化范围为 0.00625-1.25 mM。结果做成 Lineweave-Burk 图以确定 Km 值。

来自黑曲霉 SK57，黑曲霉 MH-PA1，构巢曲霉 M-PA1 和米曲霉 MO-PG3 新型肌醇六磷酸酶的 Km 值分别为 13，30，20 和 28 μM。

在同样条件确定来自 Aspergillus ficcum NRRL3135 的肌醇六磷酸酶 Km 值为 197 μM，因此本发明的新型肌醇六磷酸酶的 Km 值比已知肌醇六磷酸酶的 Km 值低一个数量级。

〈2〉分子量（通过 SDS-PAGE）：向实施例 7-1—7-3 中得到的每一新型肌醇六磷酸酶 40ml 样品中加入 10 ml 加样缓冲液（4% 2-巯基乙醇，80%甘油，4% SDS，40 mM Tris-HCl 缓冲液，pH6.8），将混合物煮沸

分钟，在 12.5%聚丙烯酰胺凝胶上用 AE-6200(Atoh)型电泳仪进行电泳。以考马斯亮兰 G250 染蛋白。进一步，用内切糖苷酶 H 处理每一样品而去掉碳氢链后，也以同样的方式进行电泳。

图 3 展示了来自黑曲霉 SK57 的新型肌醇六磷酸酶的 SDS-PAGE 电泳结果。根据 SDS-PAGE，来自黑曲霉 SK57 或 MH-PA1 的新型肌醇六磷酸酶的分子量为 60 KDa。用内切糖苷酶 H 处理每一样品而去掉碳氢链后，这些新型肌醇六磷酸酶的分子量几乎没有改变。由 SEQ ID No.1 或 2 所示的氨基酸序列推断的分子量为 50 KDa，与 SDS-PAGE 测定的分子量是一致的。

由 SDS-PAGE 测定的来自构巢曲霉 M-PA1 和米曲霉 MO- PG3 新型肌醇六磷酸酶的分子量展示于图 4。经测定，来自两菌株的新型肌醇六磷酸酶的分子量为 90-100 KDa。因为这些新型肌醇六磷酸酶经内切糖苷酶 H 处理后，其分子量（60 KDa）与来自黑曲霉 SK57 或 MH-PA1 的新型肌醇六磷酸酶的分子量相同，所以认为自构巢曲霉 M-PA1 和米曲霉 MO- PG3 新型肌醇六磷酸酶具有碳氢链。

〈3〉最适 pH 值：按标准分析方法测定活性，其中用下列 0.2M 缓冲液改变 pH 值。

pH 2—4：甘氨酸/盐酸缓冲液

pH 4—5.5：乙氨酸/乙酸钠缓冲液

pH 5.5—7：MES 缓冲液（Good 缓冲液）

pH 7—8：MOPS 缓冲液（Good 缓冲液）

pH 8—9 ：Tris-HCl 缓冲液

结果展示于图 5。本发明的新型肌醇六磷酸酶在 pH5.0—6.5 表现出最大活性。在 pH 7.0 或更大时，此酶无活性。

〈4〉pH 稳定性：将 2.1 mg/ ml 新型肌醇六磷酸酶在下列 100M 缓冲液于 37℃放置 60 分钟，按标准分析方法测定其活性。

pH 2—4：甘氨酸/盐酸缓冲液

pH 4—5.5：乙氨酸/乙酸钠缓冲液

pH 5.5—7：MES 缓冲液（Good 缓冲液）

pH 7—8：MOPS 缓冲液（Good 缓冲液）

pH 8—9 ：Tris-HCl 缓冲液

结果展示于图 6。

来自黑曲霉SK57和MH-PA1的新型肌醇六磷酸酶在pH 4.5—7.5中具有60%或更高的活性。

来自构巢曲霉 M-PA1和米曲霉MO- PG3新型肌醇六磷酸酶在pH 8或低于pH 8，具有70%或更高活性。

〈5〉最适温度：其活性通过标准分析方法在0—70℃的反应温度范围内测定。结果展示于图7。本发明的新型肌醇六磷酸酶在45—65℃具有最大其活性。

〈6〉温度稳定性：酶液以2.1 mg/ ml的蛋白浓度在100M乙氨酸/乙酸钠缓冲液（pH 5.5）中于0—60℃放置60分钟，按标准分析方法测定其活性。

结果展示于图8。

来自黑曲霉SK57和MH-PA1的新型肌醇六磷酸酶在30℃或30℃以下中具有70%或更高的相对活性。

来自构巢曲霉 M-PA1和米曲霉MO- PG3新型肌醇六磷酸酶在高至50℃时仍稳定，在高于 50℃时，其渐渐失活。因为来自构巢曲霉 M-PA1和米曲霉MO- PG3新型肌醇六磷酸酶具有如实施例8-1所示的碳氢链人们认为它们比来自黑曲霉SK57和MH-PA1的新型肌醇六磷酸酶具有更高的热稳定性。

〈7〉底物特异性：其活性通过标准分析方法进行，其中底物浓度为1mM和10mM。

来自黑曲霉SK57的新型肌醇六磷酸酶的测定结果列于表1。此新型肌醇六磷酸酶对于表1的底物具有低的特异性，它对植酸以外的底物活性也较低。来自其他株系的新型肌醇六磷酸酶具有相同的结果。

表 1

底物	浓度(mM)	相对活性(%)
植酸	1	100
对硝基苯磷酸	1	1.9
	10	10
葡萄糖－6－磷酸	1	0.45
	10	4.2
果糖－6－磷酸	1	0.15
	10	0.93
肌醇 1，4，5－三磷酸	1	0.71
	10	5.8
甘油磷酸	1	0.11
	10	0.96
ATP	1	1.6
	10	1.2

〈8〉等电聚焦：等电聚焦以 AE—3230 型电泳仪（Atoh）在 3%聚丙烯酰胺凝胶（Ampholine pH3.5—10.0）上进行。

来自黑曲霉 SK57 的新型肌醇六磷酸酶的结果示于图 9。新型肌醇六磷酸酶的等电点（PI）在 pH 4.7—5.4。

工业应用

根据本发明，它可提供一种对于植酸有低的，价格低廉的肌醇六磷酸酶，编码此肌醇六磷酸酶的 DNA，具有该 DNA 的重组 DNA，携带

该重组 DNA 的转化子，利用该转化子制备肌醇六磷酸酶的方法。该肌醇六磷酸酶可用于饲料以降解饲料中抗营养因子—植酸，由此提高饲料的营价值并可有效利用降解释放出的磷酸。

序列表

序列号: 1

长度: 443

类型: 氨基酸

拓扑结构: 线性

分子类型: 蛋白质

假拟的: 是

序列描述: 序列号: 1

```
Ser Arg Asn Gln Ser Thr Cys Asp Thr Val Asp Gln Gly Tyr Gln Cys
 1               5                  10                  15
Phe Ser Glu Thr Ser His Leu Trp Gly Gln Tyr Ala Pro Phe Phe Ser
            20                  25                  30
Leu Ala Asn Lys Ser Ala Ile Ser Pro Asp Val Pro Ala Gly Cys His
        35                  40                  45
Val Thr Phe Ala Gln Val Leu Ser Arg His Gly Ala Arg Tyr Pro Thr
    50                  55                  60
Asp Ser Lys Gly Lys Lys Tyr Ser Ala Leu Ile Glu Glu Ile Gln Gln
65                  70                  75                  80
Asn Ala Thr Thr Phe Glu Gly Lys Tyr Ala Phe Leu Lys Thr Tyr Asn
                85                  90                  95
Tyr Ser Leu Gly Ala Asp Asp Leu Thr Pro Phe Gly Glu Gln Glu Leu
            100                 105                 110
Val Asn Ser Gly Val Lys Phe Tyr Gln Arg Tyr Glu Ser Leu Thr Arg
        115                 120                 125
Asn Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Ser Gly Ser Ser Arg Val Ile Ala
    130                 135                 140
Ser Gly Asn Lys Phe Ile Glu Gly Phe Gln Ser Thr Lys Leu Lys Asp
145                 150                 155                 160
Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile
                165                 170                 175
Ser Glu Ala Ser Thr Ser Asn Asn Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr
            180                 185                 190
Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala Asp Asp Ile Glu Ala Asn Phe Thr
        195                 200                 205
Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser
    210                 215                 220
Gly Val Ser Leu Thr Asp Thr Glu Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys
225                 230                 235                 240
Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro
                245                 250                 255
Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Glu Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu
            260                 265                 270
Gln Ser Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly
        275                 280                 285
Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr
    290                 295                 300
His Ser Pro Val His Asp Asp Thr Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser
305                 310                 315                 320
Asn Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser
                325                 330                 335
His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn
```

340 345 350
Gly Thr Lys Pro Leu Ser Ser Thr Thr Ala Glu Asn Ile Thr Gln Thr
355 360 365
Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr Val Pro Phe Ala Ser Arg Met Tyr
370 375 380
Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ser Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val
385 390 395 400
Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala
405 410 415
Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser Phe Val Lys Gly Leu Ser Phe Ala
420 425 430
Arg Ser Gly Gly Asp Trp Gly Glu Cys Phe Ala
435 440

序列号: 2

长度: 443

类型: 氨基酸

拓扑结构: 线性

分子类型: 蛋白质

假拟的: 是

序列描述: 序列号: 2

Ser Xaa Xaa Gln Ser Thr Cys Asp Thr Val Asp Gln Gly Tyr Gln Cys
1 5 10 15
Phe Ser Glu Thr Ser His Leu Trp Gly Gln Tyr Ala Pro Phe Phe Ser
20 25 30
Leu Ala Asn Lys Ser Ala Ile Ser Pro Asp Val Pro Ala Gly Cys His
35 40 45
Val Thr Phe Ala Gln Val Leu Ser Arg His Gly Ala Arg Tyr Pro Thr
50 55 60
Asp Ser Lys Gly Lys Lys Tyr Ser Ala Leu Ile Glu Glu Ile Gln Gln
65 70 75 80
Asn Ala Thr Thr Phe Glu Gly Lys Tyr Ala Phe Leu Lys Thr Tyr Asn
85 90 95
Tyr Ser Leu Gly Ala Asp Asp Leu Thr Pro Phe Gly Glu Gln Glu Leu
100 105 110
Val Asn Ser Gly Val Lys Phe Tyr Gln Arg Tyr Glu Ser Leu Thr Arg
115 120 125
Asn Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Ser Gly Ser Ser Arg Val Ile Ala
130 135 140
Ser Gly Asn Lys Phe Ile Glu Gly Phe Gln Ser Thr Lys Leu Lys Asp
145 150 155 160
Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile
165 170 175
Ser Glu Ala Ser Thr Ser Asn Asn Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr
180 185 190
Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala Asp Asp Ile Glu Ala Asn Phe Thr
195 200 205
Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser
210 215 220
Gly Val Ser Leu Thr Asp Thr Glu Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys
225 230 235 240
Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro
245 250 255
Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Glu Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu
260 265 270

Gln Ser Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly
275 280 285
Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr
290 295 300
His Ser Pro Val His Asp Asp Thr Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser
305 310 315 320
Asn Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser
325 330 335
His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn
340 345 350
Gly Thr Lys Pro Leu Ser Ser Thr Thr Ala Glu Asn Ile Thr Gln Thr
355 360 365
Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr Val Pro Phe Ala Ser Arg Met Tyr
370 375 380
Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ser Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val
385 390 395 400
Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala
405 410 415
Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser Phe Val Lys Gly Leu Ser Phe Ala
420 425 430
Arg Ser Gly Gly Asp Trp Gly Glu Cys Phe Ala
435 440

序列号: 3

长度: 467

类型: 氨基酸

拓扑结构: 线性

分子类型: 蛋白质

假拟的: 是

序列描述: 序列号: 3

Met Gly Val Ser Ala Val Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Ser Gly Val
1 5 10 15
Thr Ser Gly Leu Ala Val Pro Ala Ser Arg Asn Gln Ser Thr Cys Asp
20 25 30
Thr Val Asp Gln Gly Tyr Gln Cys Phe Ser Glu Thr Ser His Leu Trp
35 40 45
Gly Gln Tyr Ala Pro Phe Phe Ser Leu Ala Asn Lys Ser Ala Ile Ser
50 55 60
Pro Asp Val Pro Ala Gly Cys His Val Thr Phe Ala Gln Val Leu Ser
65 70 75 80
Arg His Gly Ala Arg Tyr Pro Thr Asp Ser Lys Gly Lys Lys Tyr Ser
85 90 95
Ala Leu Ile Glu Glu Ile Gln Gln Asn Ala Thr Thr Phe Glu Gly Lys
100 105 110
Tyr Ala Phe Leu Lys Thr Tyr Asn Tyr Ser Leu Gly Ala Asp Asp Leu
115 120 125
Thr Pro Phe Gly Glu Gln Glu Leu Val Asn Ser Gly Val Lys Phe Tyr
130 135 140
Gln Arg Tyr Glu Ser Leu Thr Arg Asn Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser
145 150 155 160
Ser Gly Ser Ser Arg Val Ile Ala Ser Gly Asn Lys Phe Ile Glu Gly
165 170 175
Phe Gln Ser Thr Lys Leu Lys Asp Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser
180 185 190
Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile Ser Glu Ala Ser Thr Ser Asn Asn

195 200 205
Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala
210 215 220
Asp Asp Ile Glu Ala Asn Phe Thr Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg
225 230 235 240
Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser Gly Val Ser Leu Thr Asp Thr Glu
245 250 255
Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser
260 265 270
Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Glu
275 280 285
Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu Gln Ser Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly
290 295 300
His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala
305 310 315 320
Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr His Ser Pro Val His Asp Asp Thr
325 330 335
Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser Asn Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn
340 345 350
Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile
355 360 365
Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn Gly Thr Lys Pro Leu Ser Ser Thr
370 375 380
Thr Ala Glu Asn Ile Thr Gln Thr Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr
385 390 395 400
Val Pro Phe Ala Ser Arg Met Tyr Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ser
405 410 415
Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro
420 425 430
Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser
435 440 445
Phe Val Lys Gly Leu Ser Phe Ala Arg Ser Gly Gly Asp Trp Gly Glu
450 455 460
Cys Phe Ala
465

序列号: 4

长度: 1332

类型: 核苷酸

链型: 单链

拓扑结构: 线型

分子类型: 基因组 DNA

序列描述: 序列号: 4

TCG AGA AAT CAA TCC ACT TGC GAT ACG GTC GAT CAG GGG TAT CAA TGC 48
Ser Arg Asn Gln Ser Thr Cys Asp Thr Val Asp Gln Gly Tyr Gln Cys
1 5 10 15
TTC TCG GAG ACT TCG CAT CTT TGG GGC CAA TAC GCG CCG TTC TTT TCT 96
Phe Ser Glu Thr Ser His Leu Trp Gly Gln Tyr Ala Pro Phe Phe Ser
20 25 30
CTG GCA AAC AAA TCG GCC ATC TCC CCT GAT GTT CCT GCC GGA TGC CAT 144
Leu Ala Asn Lys Ser Ala Ile Ser Pro Asp Val Pro Ala Gly Cys His
35 40 45
GTC ACT TTC GCC CAG GTT CTC TCC CGC CAT GGA GCA CGG TAT CCG ACC 192
Val Thr Phe Ala Gln Val Leu Ser Arg His Gly Ala Arg Tyr Pro Thr
50 55 60

GAC TCC AAG GGC AAG AAA TAC TCC GCT CTC ATC GAG GAG ATC CAG CAG 240
Asp Ser Lys Gly Lys Lys Tyr Ser Ala Leu Ile Glu Glu Ile Gln Gln
65 70 75 80
AAC GCG ACA ACC TTC GAG GGG AAA TAT GCC TTC CTG AAG ACA TAC AAC 288
Asn Ala Thr Thr Phe Glu Gly Lys Tyr Ala Phe Leu Lys Thr Tyr Asn
85 90 95
TAC AGC CTG GGC GCG GAT GAT CTG ACT CCC TTC GGA GAG CAG GAG CTG 336
Tyr Ser Leu Gly Ala Asp Asp Leu Thr Pro Phe Gly Glu Gln Glu Leu
100 105 110
GTC AAC TCC GGC GTC AAG TTC TAC CAG CGA TAC GAA TCG CTC ACA AGA 384
Val Asn Ser Gly Val Lys Phe Tyr Gln Arg Tyr Glu Ser Leu Thr Arg
115 120 125
AAC ATT GTC CCG TTC ATC CGA TCC TCA GGC TCC AGC CGC GTG ATT GCC 432
Asn Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Ser Gly Ser Ser Arg Val Ile Ala
130 135 140
TCT GGC AAT AAA TTC ATC GAG GGC TTC CAG AGC ACT AAG CTG AAG GAT 480
Ser Gly Asn Lys Phe Ile Glu Gly Phe Gln Ser Thr Lys Leu Lys Asp
145 150 155 160
CCT CGT GCC CAG CCC GGC CAA TCG TCG CCC AAG ATC GAC GTG GTC ATT 528
Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile
165 170 175
TCA GAG GCC AGC ACA TCC AAC AAC ACT CTC GAT CCG GGC ACC TGC ACC 576
Ser Glu Ala Ser Thr Ser Asn Asn Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr
180 185 190
GTT TTC GAA GAT AGC GAA TTG GCC GAT GAC ATC GAA GCC AAT TTC ACC 624
Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala Asp Asp Ile Glu Ala Asn Phe Thr
195 200 205
GCC ACG TTC GTC CCC TCC ATT CGT CAA CGT CTG GAG AAC GAC TTG TCT 672
Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser
210 215 220
GGC GTG TCT CTC ACG GAC ACA GAA GTG ACC TAC CTC ATG GAC ATG TGC 720
Gly Val Ser Leu Thr Asp Thr Glu Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys
225 230 235 240
TCC TTC GAC ACC ATC TCC ACC AGC ACC GTC GAC ACC AAG CTG TCC CCC 768
Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro
245 250 255
TTC TGT GAC CTG TTC ACC CAT GAA GAA TGG ATC AAC TAC GAC TAC CTC 816
Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Glu Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu
260 265 270
CAG TCC CTG AAC AAA TAC TAC GGC CAT GGC GCA GGT AAC CCG CTC GGC 864
Gln Ser Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly
275 280 285
CCG ACC CAG GGC GTC GGC TAC GCT AAC GAG CTC ATC GCC CGT CTC ACC 912
Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr
290 295 300
CAC TCG CCT GTC CAC GAT GAC ACC AGC TCC AAC CAC ACA TTG GAC TCC 960
His Ser Pro Val His Asp Asp Thr Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser
305 310 315 320
AAC CCG GCT ACT TTC CCG CTC AAC TCC ACT CTC TAT GCG GAC TTT TCG 1008
Asn Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser
325 330 335
CAT GAT AAC GGC ATC ATC TCT ATC CTC TTT GCT TTG GGT CTG TAC AAC 1056
His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn
340 345 350
GGC ACC AAG CCG CTG TCT TCC ACG ACC GCG GAG AAT ATC ACC CAG ACC 1104
Gly Thr Lys Pro Leu Ser Ser Thr Thr Ala Glu Asn Ile Thr Gln Thr
355 360 365
GAT GGG TTC TCA TCT GCC TGG ACG GTT CCT TTC GCG TCG CGC ATG TAC 1152
Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr Val Pro Phe Ala Ser Arg Met Tyr
370 375 380
GTC GAG ATG ATG CAA TGC CAG TCC GAG CAG GAG CCT TTG GTC CGT GTC 1200
Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ser Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val
385 390 395 400
TTG GTT AAT GAT CGT GTT GTT CCG CTG CAT GGC TGT CCG GTT GAT GCT 1248
Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala

```
                405                     410                     415
TTG GGA AGA TGT ACG CGG GAT AGC TTC GTG AAG GGG TTG AGC TTT GCC  1296
Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser Phe Val Lys Gly Leu Ser Phe Ala
            420                     425                     430
AGA TCT GGC GGT GAT TGG GGG GAG TGT TTC GCT TAG                  1332
Arg Ser Gly Gly Asp Trp Gly Glu Cys Phe Ala Ala
        435                     440
```

序列号: 5

长度: 1515

类型: 核苷酸

链型: 单链

拓扑结构: 线性

分子类型: 基因组 DNA

假拟的: 是

反义: 是

在基因组的位置

单位: 基因组%

序列描述: 序列号: 5

```
ATG GGT GTC TCT GCC GTT CTA CTT CCT TTG TAC CTC CTG TCC GG        44
Met Gly Val Ser Ala Val Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Leu Ser Gly
                -20                     -15                     -10
GTATGCTAAT CATCCCTATC GGAGCCTGAT ATGGACCCTC CCCTTCCGAA GGCCCCCTGA 104
AGCTTGGACT GTGTGGGACT ATTGATCTGA TCGCTGACAA TCTGTGCACA GA GTC     159
                                                            Val
ACC TCC GGA CTG GCA GTC CCC GCC TCG AGA AAT CAA TCC ACT TGC GAT   207
Thr Ser Gly Leu Ala Val Pro Ala Ser Arg Asn Gln Ser Thr Cys Asp
            -5                      1                       5
ACG GTC GAT CAG GGG TAT CAA TGC TTC TCG GAG ACT TCG CAT CTT TGG   255
Thr Val Asp Gln Gly Tyr Gln Cys Phe Ser Glu Thr Ser His Leu Trp
    10                      15                      20
GGC CAA TAC GCG CCG TTC TTT TCT CTG GCA AAC AAA TCG GCC ATC TCC   303
Gly Gln Tyr Ala Pro Phe Phe Ser Leu Ala Asn Lys Ser Ala Ile Ser
25                      30                      35                      40
CCT GAT GTT CCT GCC GGA TGC CAT GTC ACT TTC GCC CAG GTT CTC TCC   351
Pro Asp Val Pro Ala Gly Cys His Val Thr Phe Ala Gln Val Leu Ser
                45                      50                      55
CGC CAT GGA GCA CGG TAT CCG ACC GAC TCC AAG GGC AAG AAA TAC TCC   399
Arg His Gly Ala Arg Tyr Pro Thr Asp Ser Lys Gly Lys Lys Tyr Ser
            60                      65                      70
GCT CTC ATC GAG GAG ATC CAG CAG AAC GCG ACA ACC TTC GAG GGG AAA   447
Ala Leu Ile Glu Glu Ile Gln Gln Asn Ala Thr Thr Phe Glu Gly Lys
        75                      80                      85
TAT GCC TTC CTG AAG ACA TAC AAC TAC AGC CTG GGC GCG GAT GAT CTG   495
Tyr Ala Phe Leu Lys Thr Tyr Asn Tyr Ser Leu Gly Ala Asp Asp Leu
    90                      95                      100
ACT CCC TTC GGA GAG CAG GAG CTG GTC AAC TCC GGC GTC AAG TTC TAC   543
Thr Pro Phe Gly Glu Gln Glu Leu Val Asn Ser Gly Val Lys Phe Tyr
105                     110                     115                     120
CAG CGA TAC GAA TCG CTC ACA AGA AAC ATT GTC CCG TTC ATC CGA TCC   591
Gln Arg Tyr Glu Ser Leu Thr Arg Asn Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser
```

```
                125                 130                 135
TCA GGC TCC AGC CGC GTG ATT GCC TCT GGC AAT AAA TTC ATC GAG GGC   639
Ser Gly Ser Ser Arg Val Ile Ala Ser Gly Asn Lys Phe Ile Glu Gly
            140                 145                 150
TTC CAG AGC ACT AAG CTG AAG GAT CCT CGT GCC CAG CCC GGC CAA TCG   687
Phe Gln Ser Thr Lys Leu Lys Asp Pro Arg Ala Gln Pro Gly Gln Ser
        155                 160                 165
TCG CCC AAG ATC GAC GTG GTC ATT TCA GAG GCC AGC ACA TCC AAC AAC   735
Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ile Ser Glu Ala Ser Thr Ser Asn Asn
    170                 175                 180
ACT CTC GAT CCG GGC ACC TGC ACC GTT TTC GAA GAT AGC GAA TTG GCC   783
Thr Leu Asp Pro Gly Thr Cys Thr Val Phe Glu Asp Ser Glu Leu Ala
185                 190                 195                 200
GAT GAC ATC GAA GCC AAT TTC ACC GCC ACG TTC GTC CCC TCC ATT CGT   831
Asp Asp Ile Glu Ala Asn Phe Thr Ala Thr Phe Val Pro Ser Ile Arg
                205                 210                 215
CAA CGT CTG GAG AAC GAC TTG TCT GGC GTG TCT CTC ACG GAC ACA GAA   879
Gln Arg Leu Glu Asn Asp Leu Ser Gly Val Ser Leu Thr Asp Thr Glu
            220                 225                 230
GTG ACC TAC CTC ATG GAC ATG TGC TCC TTC GAC ACC ATC TCC ACC AGC   927
Val Thr Tyr Leu Met Asp Met Cys Ser Phe Asp Thr Ile Ser Thr Ser
        235                 240                 245
ACC GTC GAC ACC AAG CTG TCC CCC TTC TGT GAC CTG TTC ACC CAT GAA   975
Thr Val Asp Thr Lys Leu Ser Pro Phe Cys Asp Leu Phe Thr His Glu
    250                 255                 260
GAA TGG ATC AAC TAC GAC TAC CTC CAG TCC CTG AAC AAA TAC TAC GGC  1023
Glu Trp Ile Asn Tyr Asp Tyr Leu Gln Ser Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly
265                 270                 275                 280
CAT GGC GCA GGT AAC CCG CTC GGC CCG ACC CAG GGC GTC GGC TAC GCT  1071
His Gly Ala Gly Asn Pro Leu Gly Pro Thr Gln Gly Val Gly Tyr Ala
                285                 290                 295
AAC GAG CTC ATC GCC CGT CTC ACC CAC TCG CCT GTC CAC GAT GAC ACC  1119
Asn Glu Leu Ile Ala Arg Leu Thr His Ser Pro Val His Asp Asp Thr
            300                 305                 310
AGC TCC AAC CAC ACA TTG GAC TCC AAC CCG GCT ACT TTC CCG CTC AAC  1167
Ser Ser Asn His Thr Leu Asp Ser Asn Pro Ala Thr Phe Pro Leu Asn
        315                 320                 325
TCC ACT CTC TAT GCG GAC TTT TCG CAT GAT AAC GGC ATC ATC TCT ATC  1215
Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn Gly Ile Ile Ser Ile
    330                 335                 340
CTC TTT GCT TTG GGT CTG TAC AAC GGC ACC AAG CCG CTG TCT TCC ACG  1263
Leu Phe Ala Leu Gly Leu Tyr Asn Gly Thr Lys Pro Leu Ser Ser Thr
345                 350                 355                 360
ACC GCG GAG AAT ATC ACC CAG ACC GAT GGG TTC TCA TCT GCC TGG ACG  1311
Thr Ala Glu Asn Ile Thr Gln Thr Asp Gly Phe Ser Ser Ala Trp Thr
                365                 370                 375
GTT CCT TTC GCG TCG CGC ATG TAC GTC GAG ATG ATG CAA TGC CAG TCC  1359
Val Pro Phe Ala Ser Arg Met Tyr Val Glu Met Met Gln Cys Gln Ser
            380                 385                 390
GAG CAG GAG CCT TTG GTC CGT GTC TTG GTT AAT GAT CGT GTT GTT CCG  1407
Glu Gln Glu Pro Leu Val Arg Val Leu Val Asn Asp Arg Val Val Pro
        395                 400                 405
CTG CAT GGC TGT CCG GTT GAT GCT TTG GGA AGA TGT ACG CGG GAT AGC  1455
Leu His Gly Cys Pro Val Asp Ala Leu Gly Arg Cys Thr Arg Asp Ser
    410                 415                 420
TTC GTG AAG GGG TTG AGC TTT GCC AGA TCT GGC GGT GAT TGG GGG GAG  1503
Phe Val Lys Gly Leu Ser Phe Ala Arg Ser Gly Gly Asp Trp Gly Glu
425                 430                 435                 440
TGT TTC GCT TAG                                                  1515
Cys Phe Ala
        443
```

序列号: 6

长度: 32
类型: 核苷酸
链型: 单链
拓扑结构: 线性
分子类型: 其他核苷酸, 合成 DNA
序列描述: 序列号: 6

GGGAATTCAT GGGCGTCTCT GCTGTTCTAC TT 32

序列号: 7
长度: 32
类型: 核苷酸
链型: 单链
拓扑结构: 线性
分子类型: 其他核苷酸, 合成 DNA
序列描述: 序列号: 7

GGGAATTCCT AAGCAAAACA CTCCGCCCAA TC 32

说 明 书 附 图

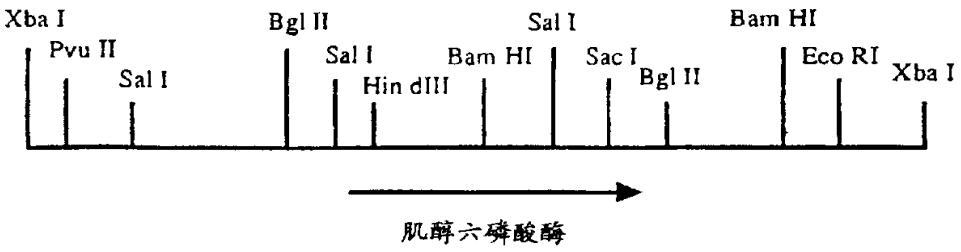
Xba I
Pvu II
Sal I
Bgl II
Sal I
Hin dIII
Bam HI
Sal I
Sac I
Bgl II
Bam HI
Eco RI
Xba I
肌醇六磷酸酶

图 1

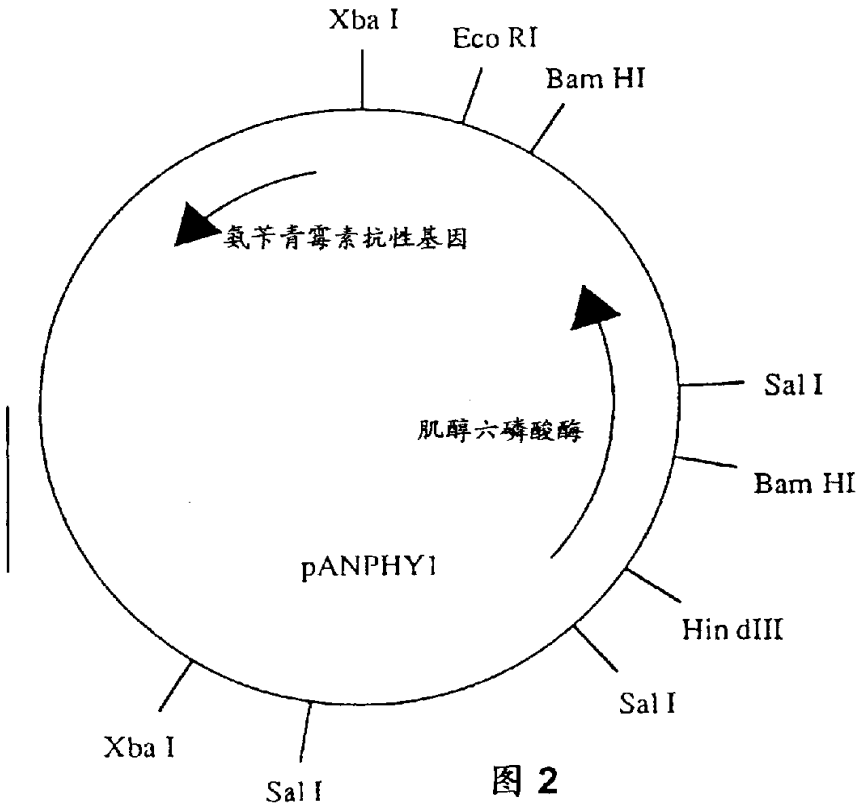
Xba I
Eco RI
Bam HI
氨苄青霉素抗性基因
Sal I
肌醇六磷酸酶
Bam HI
pANPHY1
Hin dIII
Sal I
Xba I
Sal I

图 2

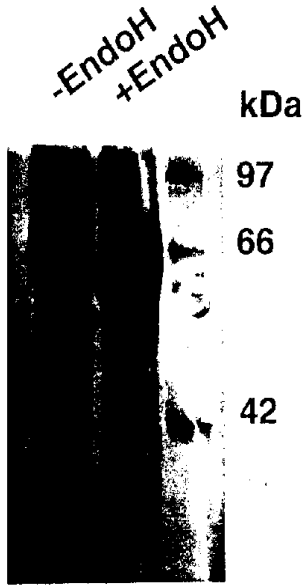

图 3

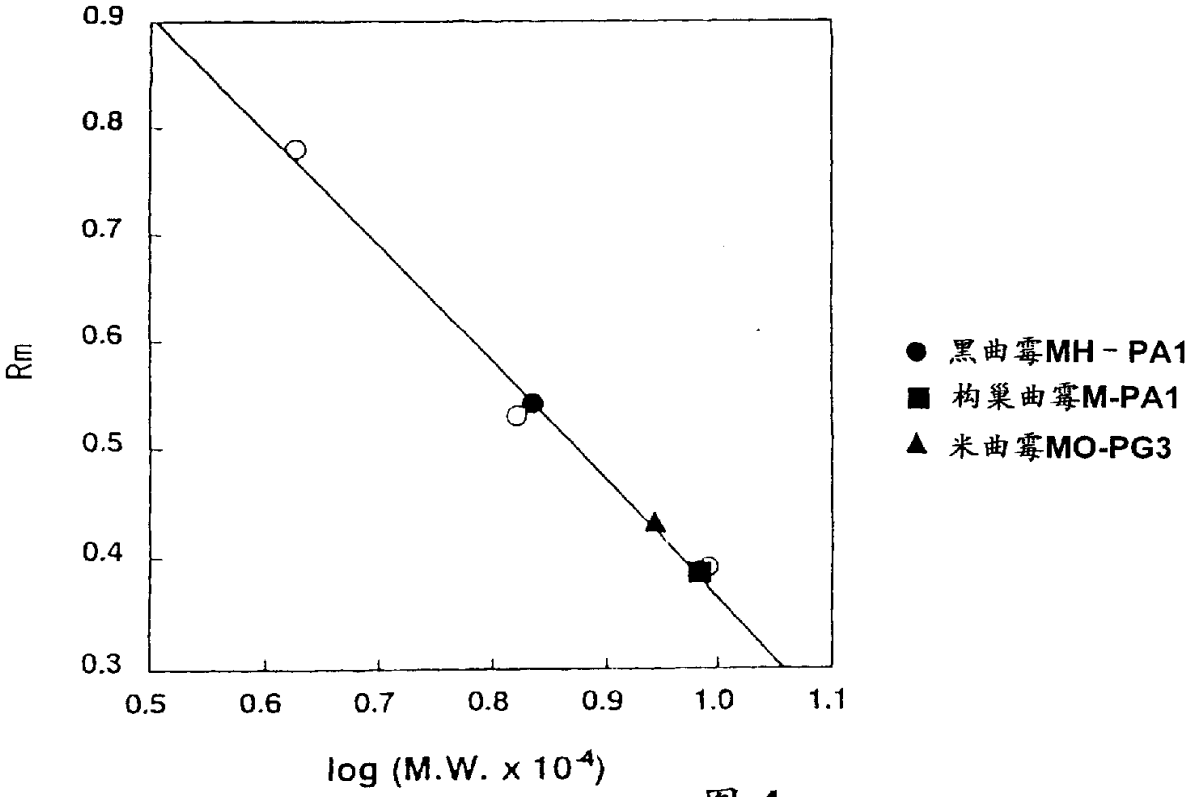
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
Rm
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
1.1
log (M.W. x 10-4)
● 黑曲霉MH－PA1
■ 构巢曲霉M-PA1
▲ 米曲霉MO-PG3

图 4

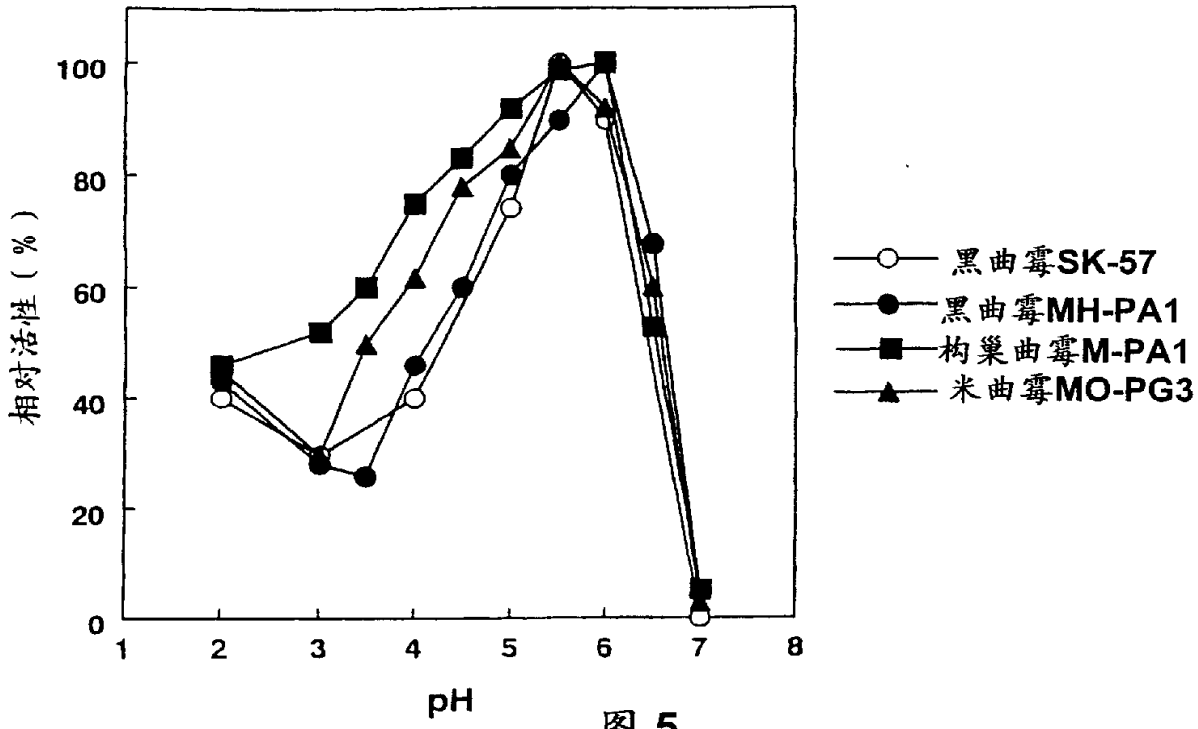
100
80
60
40
20
0
相对活性（%）
1
2
3
4
5
6
7
8
pH
黑曲霉SK-57
黑曲霉MH-PA1
构巢曲霉M-PA1
米曲霉MO-PG3

图 5

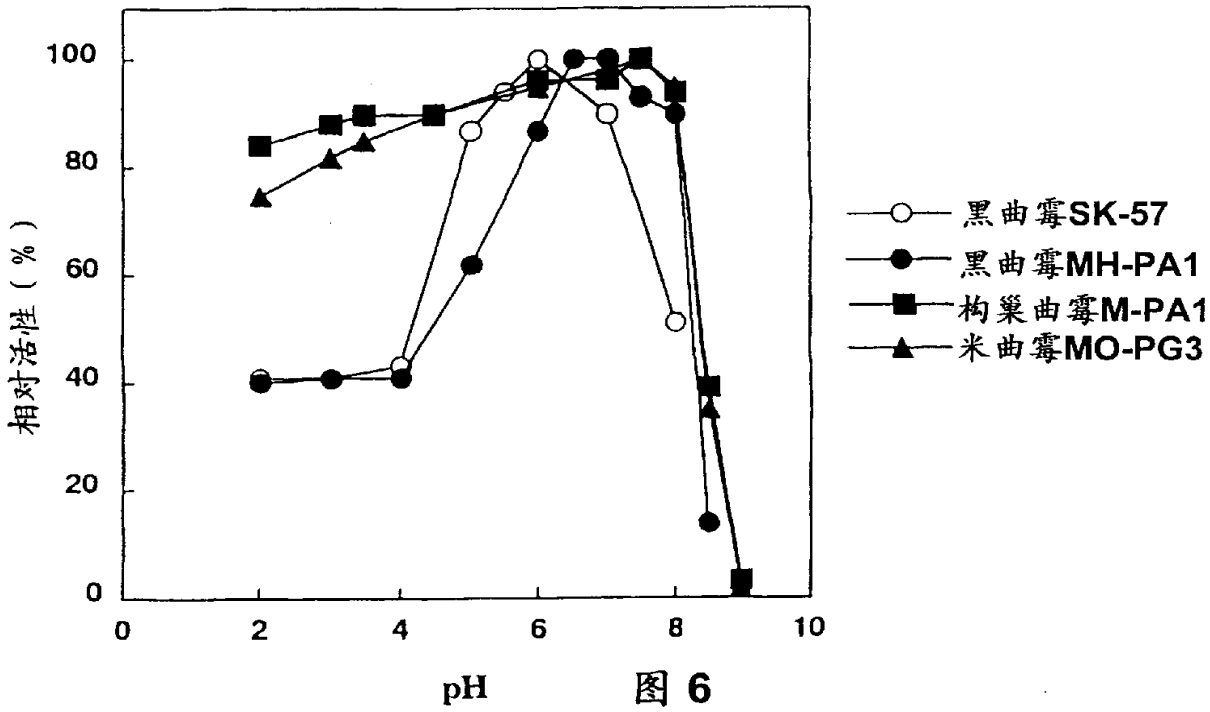
100
80
60
40
20
0
相对活性（%）
0
2
4
6
8
10
pH
黑曲霉SK-57
黑曲霉MH-PA1
构巢曲霉M-PA1
米曲霉MO-PG3

图 6

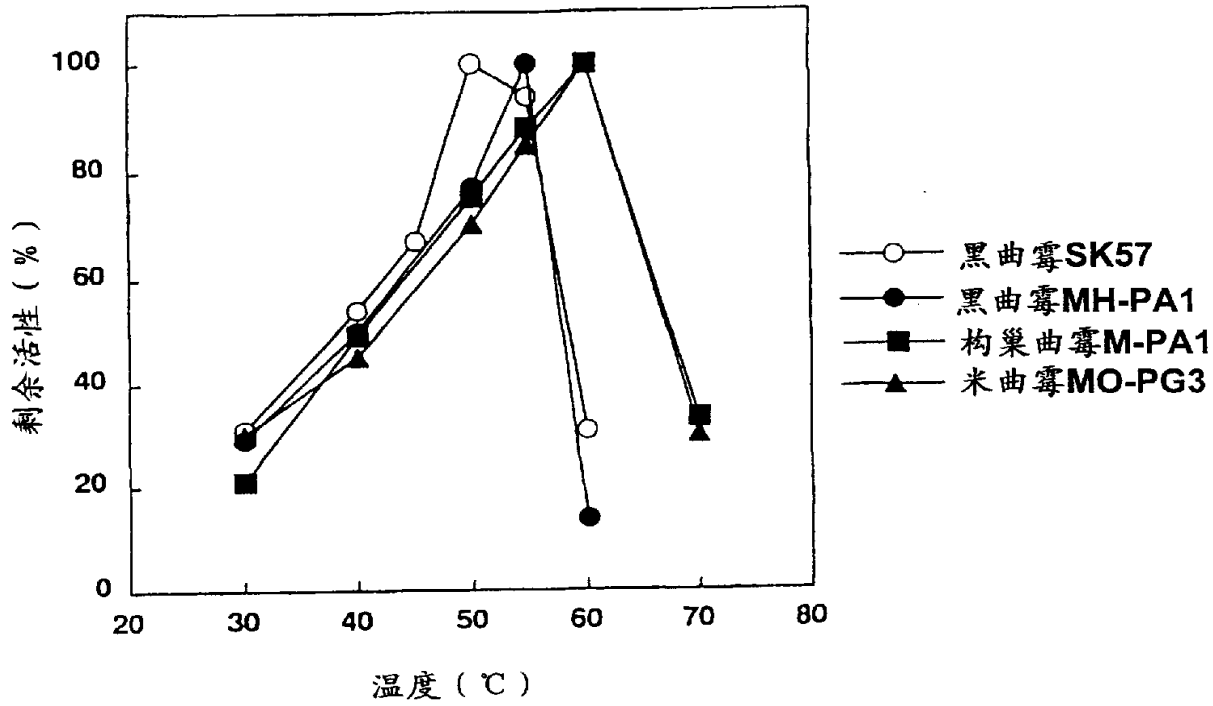
100
80
60
40
20
0
剩余活性（%）
20
30
40
50
60
70
80
温度（℃）
黑曲霉SK57
黑曲霉MH-PA1
构巢曲霉M-PA1
米曲霉MO-PG3

图 7

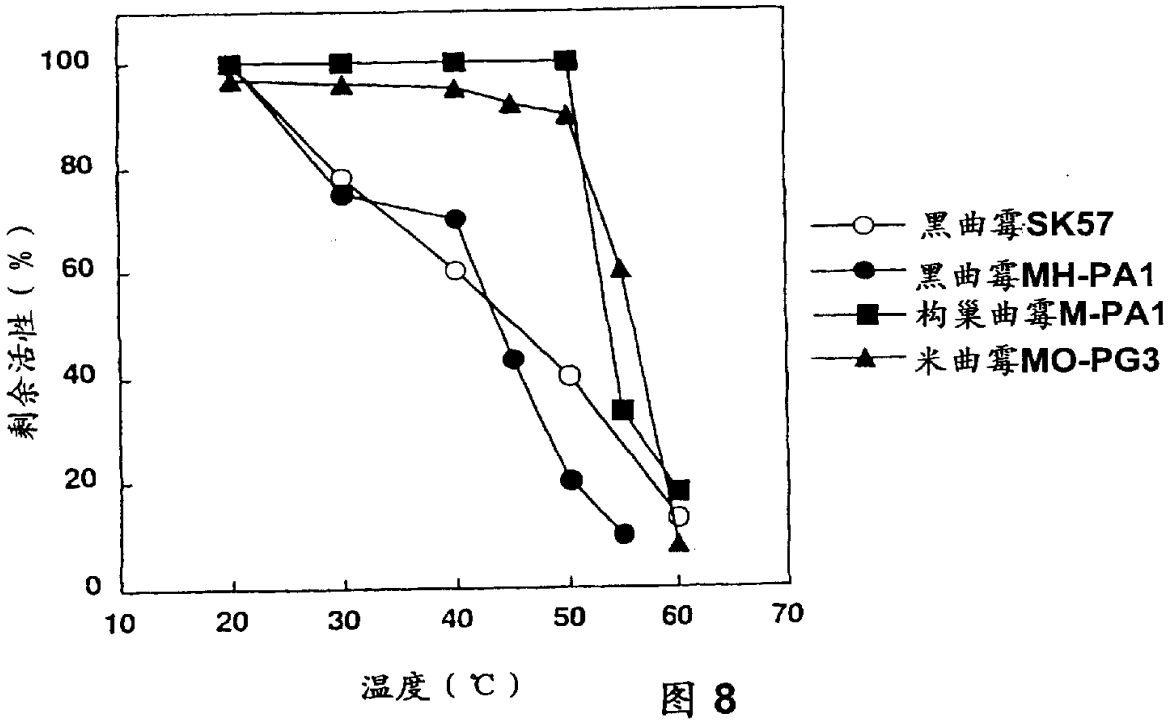
100
80
60
40
20
0
剩余活性（%）
10
20
30
40
50
60
70
温度（℃）
黑曲霉SK57
黑曲霉MH-PA1
构巢曲霉M-PA1
米曲霉MO-PG3

图 8

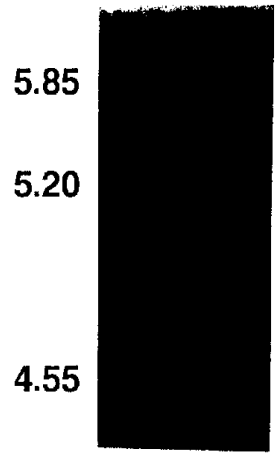

图 9