

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910167050.8

[51] Int. Cl.

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

C12R 1/685 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 1 月 20 日

[11] 公开号 CN 101629204A

[22] 申请日 2004.3.31

[21] 申请号 200910167050.8

分案原申请号 200480015112.9

[30] 优先权

[32] 2003.3.31 [33] US [31] 60/459,902

[71] 申请人 诺维信股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 玛丽亚·康奈利 霍华德·布罗迪

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 史悦

权利要求书 3 页 说明书 66 页 附图 14 页

[54] 发明名称

在缺乏酶的黑曲霉突变体中生产生物物质的方法

[57] 摘要

本发明涉及在缺乏酶的黑曲霉突变体中生产生物物质的方法，其包括：(a) 在适于生产异源生物物质的培养基中培养亲本黑曲霉菌株的突变株，其中(i) 该突变菌株包括编码异源生物物质的第一核苷酸序列和包括 glaA 和至少一个选自 asa、amyA、amyB、prtT 或 oah 的基因变体的一种或多种第二核苷酸序列，和(ii) 当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株缺乏葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、或中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、或草酸水解酶的酶的生产；以及(b) 从培养基回收异源的生物物质。

1. 一种生产异源多肽的方法，包括：

(a) 在适于生产异源多肽的培养基中培养亲本黑曲霉菌株的突变体，其中(i)该突变菌株包括编码异源多肽的第一核苷酸序列和包括 *glaA*、*asa*、*amyA*、*amyB* 和 *oah* 的变体的一种或多种第二核苷酸序列，以及(ii)当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株缺乏葡糖淀粉酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、中性 α -淀粉酶 B 和草酸水解酶的生产；以及

(b) 从培养基回收异源的多肽。

2. 权利要求 1 的方法，其中由第一核苷酸序列编码的异源多肽是抗体、抗原、抗菌肽、酶、生长因子、激素、免疫扩张剂、神经递质、受体、报告蛋白、结构蛋白、或转录因子。

3. 权利要求 2 的方法，其中酶是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、或连接酶。

4. 权利要求 1 的方法，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，突变菌株生产至少减少 25% 的葡糖淀粉酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、中性 α -淀粉酶 B、和草酸水解酶中的各酶。

5. 权利要求 1 的方法，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株完全缺乏葡糖淀粉酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、中性 α -淀粉酶 B、和草酸水解酶。

6. 权利要求 1 的方法，其中该突变菌株进一步包括编码具有蛋白质分解活性的酶的一种或多种基因的变体。

7. 权利要求 1 的方法，其中突变菌株进一步包括编码选自糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖苷酶、卤素过氧化物酶、半纤维素酶、转化酶、异构酶、漆酶、连接酶、脂肪酶、裂解酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、酚氧化酶、多酚氧化酶、核糖核酸酶、转移酶、 α -1,6-转葡萄糖苷酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶的酶的一种或多种基因的变体。

8. 一种亲本黑曲霉菌株的突变株，包括编码异源多肽的第一核苷酸序

列和包括 *glaA*、*asa*、*amyA*、*amyB* 和 *oah* 的变体的一种或多种第二核苷酸序列，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株缺乏葡糖淀粉酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、中性 α -淀粉酶 B 和草酸水解酶。

9. 权利要求 8 的突变菌株，其中由第一核苷酸序列编码的异源多肽是抗体、抗原、抗菌肽、酶、生长因子、激素、免疫扩张剂、神经递质、受体、报告蛋白、结构蛋白、或转录因子。

10. 权利要求 9 的突变菌株，其中酶是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、或连接酶。

11. 权利要求 8 的突变菌株，当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，其生产至少减少 25% 的葡糖淀粉酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、中性 α -淀粉酶 B、和草酸水解酶中的各酶。

12. 权利要求 8 的突变菌株，当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，其完全缺乏葡糖淀粉酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、中性 α -淀粉酶 B、和草酸水解酶。

13. 权利要求 8 的突变菌株，其进一步包括编码具有蛋白质分解活性的酶的一种或多种基因的变体。

14. 权利要求 8 的突变菌株，其进一步包括编码选自糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡糖苷酶、卤素过氧化物酶、半纤维素酶、转化酶、异构酶、漆酶、连接酶、脂肪酶、裂解酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、酚氧化酶、多酚氧化酶、核糖核酸酶、转移酶、 α -1,6-转葡糖苷酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶的酶的一种或多种基因的变体。

15. 一种用于获得亲本黑曲霉菌株的突变株的方法，包括：

(a) 将编码异源多肽的第一核苷酸序列和包括 *glaA*、*asa*、*amyA*、*amyB*、和 *oah* 的变体的一种或多种第二核苷酸序列导入亲本黑曲霉菌株；以及

(b) 鉴定来自步骤(a)的包括改变的核苷酸序列的突变菌株，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株缺乏葡糖淀粉酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、中性 α -淀粉酶 B、和草酸水解酶的生产。

16. 权利要求 15 的方法，其中由第一核苷酸序列编码的异源多肽是抗体、抗原、抗菌肽、酶、生长因子、激素、免疫扩张剂、神经递质、受体、报告蛋白、结构蛋白、或转录因子。

17. 权利要求 16 的方法，其中酶是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、或连接酶。

18. 权利要求 15 的方法，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株生产至少减少 25% 的葡糖淀粉酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、中性 α -淀粉酶 B、和草酸水解酶中的各酶。

19. 权利要求 15 的方法，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株完全缺乏葡糖淀粉酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、中性 α -淀粉酶 B、和草酸水解酶。

在缺乏酶的黑曲霉突变体中生产生物物质的方法

本发明申请是基于申请日为2004年3月31日,申请号为200480015112.9(国际申请号为PCT/US2004/010126),发明名称为“在缺乏酶的黑曲霉突变体中生产生物物质的方法”的专利申请的分案申请。

发明背景

发明领域

本发明涉及在缺乏酶的黑曲霉(*Aspergillus niger*)突变菌株中生产异源生物物质的方法、获得缺乏酶的黑曲霉突变菌株的方法、以及缺乏酶的黑曲霉突变菌株。

相关技术的说明

黑曲霉分泌大量的葡糖淀粉酶。然而,具有蛋白表达和分泌增加的需要性状的黑曲霉宿主未必具有用于成功发酵的最合乎需要的特性。由于需要在回收和纯化令人感兴趣的生物物质期间移出分泌的多重酶或可能伴随生物物质共同纯化该酶,因此发酵未必是最佳的。

Boel等,1984, *EMBO J.* 3: 1097-1102, 1581-1585,公开了对黑曲霉葡糖淀粉酶(*glaA*)基因的克隆。Fowler等,1990, *Curr. Genet.* 18: 537-545公开了黑曲霉葡糖淀粉酶(*glaA*)基因的缺失。

Korman等,1990, *Curr. Genet.* 17: 203-217公开了来自黑曲霉泡盛变种(*Aspergillus niger* var. *awamori*)的2个 α -淀粉酶基因(*amyA*和*amyB*)的克隆、表征鉴定和表达。美国专利号5,252,726公开了来自黑曲霉的2个全长中性 α -淀粉酶基因的克隆。

美国专利号5,252,726公开了来自黑曲霉的部分酸稳定的 α -淀粉酶基因(*asa*)的克隆。

Pedersen等,2000, *Metabolic Engineering* 2: 34-41,和WO 00/50576公开了在生产葡糖淀粉酶的黑曲霉菌株中编码草酰乙酸水解酶(EC 3.7.1.1)的草酰乙酸水解酶(*oah*)基因的断裂,其中所得到的菌株不能生产草酸。

WO 01/68864公开了 *prtT*-断裂的黑曲霉菌株缺乏蛋白酶,表明宿主菌

株中 *prtT* 表达的缺失可能导致对蛋白水解敏感的可回收蛋白的水平增加。

本发明的目的是提供改善的黑曲霉宿主，其兼备表达商品化的大量生物物质的能力而缺乏生产可能使令人感兴趣的生物物质的回收和下游加工过程复杂化的酶。

发明概述

本发明涉及生产异源生物物质的方法，包括：

- (a) 在适于生产异源生物物质的培养基中培养亲本黑曲霉菌株的突变株，其中(i)该突变菌株包括编码异源生物物质的第一核苷酸序列和包括 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT* 和 *oah* 的基因变体的一种或多种第二核苷酸序列，以及(ii)当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株缺乏葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、和中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、和草酸水解酶的酶的生产；以及
- (b) 从培养基回收异源的生物物质。

本发明也涉及缺乏酶的黑曲霉突变菌株和生产缺乏酶的黑曲霉突变菌株的方法。

具体地，本发明涉及如下方面：

1. 一种生产异源生物物质的方法，包括：

- (a) 在适于生产异源生物物质的培养基中培养亲本黑曲霉菌株的突变体，其中(i)该突变菌株包括编码异源生物物质的第一核苷酸序列和包括 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT* 或 *oah* 的基因变体的一种或多种第二核苷酸序列，以及(ii)当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株缺乏葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、或中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、或草酸水解酶的酶的生产； 以及
- (b) 从培养基回收异源的生物物质。

2. 项 1 的方法，其中至少一个基因是 *asa*。
3. 项 1 的方法，其中至少一个基因是 *amyA*。
4. 项 1 的方法，其中至少一个基因是 *amyB*。
5. 项 1 的方法，其中至少一个基因是 *prtT*。
6. 项 1 的方法，其中至少一个基因是 *oah*。
7. 项 1-6 中任何的方法，其中由第一核苷酸序列编码的生物物质是生

物聚合物。

8. 项 7 的方法, 其中生物聚合物选自核酸、聚酰胺、多胺、多元醇、多肽或多糖。

9. 项 8 的方法, 其中多肽选自抗原、酶、生长因子、激素、免疫扩张剂、神经递质、受体、报告蛋白、结构蛋白、或转录因子。

10. 项 9 的方法, 其中酶是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、或连接酶。

11. 项 8 的方法, 其中多糖是壳多糖、肝素、或透明质酸。

12. 项 1-6 中任何的方法, 其中由第一核苷酸序列编码的生物物质是代谢产物。

13. 项 1 的方法, 其中第一核苷酸序列包括生物合成或代谢途径。

14. 项 1-13 中任何的方法, 其中突变菌株包括至少 2 个拷贝的编码生物物质的第一核苷酸序列。

15. 项 1-14 中任何的方法, 其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比, 突变菌株生产至少减少 25% 的葡糖淀粉酶和选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、或中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、或草酸水解酶的一种或多种酶。

16. 项 1-14 中任何的方法, 其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比, 该突变菌株完全缺乏葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、或中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、或草酸水解酶的酶。

17. 项 1-16 中任何的方法, 其中该突变菌株进一步包括编码蛋白质分解活性的一种或多种基因的变体。

18. 项 17 的方法, 其中蛋白质分解活性选自氨肽酶、二肽基氨肽酶、三肽基氨肽酶、羧肽酶、曲霉胃蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、或液泡蛋白酶。

19. 项 1-17 中任何的方法, 其中突变菌株进一步包括编码选自糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖苷酶、卤素过氧化物酶、半纤维素酶、转化酶、异构酶、漆酶、连接酶、脂肪酶、裂解酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、酚氧化酶、多酚氧化酶、核糖核酸酶、转移酶、 α -1,6-转葡萄糖苷

酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶的酶的一种或多种基因的变体。

20. 一种亲本黑曲霉菌株的突变株，包括编码异源生物物质的第一核苷酸序列和包括 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT* 和 *oah* 的基因变体的一种或多种第二核苷酸序列，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株缺乏葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、或中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、或草酸水解酶的酶。

21. 项 20 的突变菌株，其中至少一个基因是 *asa*。

22. 项 20 的突变菌株，其中至少一个基因是 *amyA*。

23. 项 20 的突变菌株，其中至少一个基因是 *amyB*。

24. 项 20 的突变菌株，其中至少一个基因是 *prtT*。

25. 项 20 的突变菌株，其中至少一个基因是 *oah*。

26. 项 20-25 中任何的突变菌株，其中由第一核苷酸序列编码的生物物质是生物聚合物。

27. 项 26 的突变菌株，其中生物聚合物选自核酸、聚酰胺、多胺、多元醇、多肽或多糖。

28. 项 27 的突变菌株，其中多肽选自抗原、酶、生长因子、激素、免疫扩张剂、神经递质、受体、报告蛋白、结构蛋白、或转录因子。

29. 项 28 的突变菌株，其中酶是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、或连接酶。

30. 项 20-25 中任何的突变菌株，其中由第一核苷酸序列编码的生物物质是代谢产物。

31. 项 20 的突变菌株，其中第一核苷酸序列包括生物合成或代谢途径。

32. 项 20-31 中任何的突变菌株，其包括至少 2 个拷贝的编码生物物质的第一核苷酸序列。

33. 项 20-32 中任何的突变菌株，当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，其生产至少减少 25% 的葡糖淀粉酶和选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、或中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、或草酸水解酶的一种或多种酶。

34. 项 20-32 中任何的突变菌株，当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，其完全缺乏葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、或中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、或草酸水解酶的酶。

35. 项 20-34 中任何的突变菌株，其进一步包括编码蛋白质分解活性的

一种或多种基因的变体。

36. 项 35 的突变菌株，其中蛋白质分解活性选自氨肽酶、二肽基氨肽酶、三肽基氨肽酶、羧肽酶、曲霉胃蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、或液泡蛋白酶。

37. 项 20-36 中任何的突变菌株，其进一步包括编码选自糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡糖苷酶、卤素过氧化物酶、半纤维素酶、转化酶、异构酶、漆酶、连接酶、脂肪酶、裂解酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、酚氧化酶、多酚氧化酶、核糖核酸酶、转移酶、 α -1,6-转葡萄糖苷酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶的酶的一种或多种基因的变体。

38. 一种用于获得亲本黑曲霉菌株的突变株的方法，包括：

(a) 将编码异源生物物质的第一核苷酸序列和包括 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT* 或 *oah* 的基因变体的一种或多种第二核苷酸序列导入亲本黑曲霉菌株；以及

(b) 鉴定来自步骤(a)的包括改变的核苷酸序列的突变菌株，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株缺乏葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、或中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、或草酸水解酶的酶的生产。

39. 项 38 的方法，其中至少一个基因是 *asa*。

40. 项 38 的方法，其中至少一个基因是 *amyA*。

41. 项 38 的方法，其中至少一个基因是 *amyB*。

42. 项 38 的方法，其中至少一个基因是 *prtT*。

43. 项 38 的方法，其中至少一个基因是 *oah*。

44. 项 38-43 中任何的方法，其中由第一核苷酸序列编码的生物物质是生物聚合物。

45. 项 44 的方法，其中生物聚合物选自核酸、聚酰胺、多胺、多元醇、多肽或多糖。

46. 项 45 的方法，其中多肽选自抗原、酶、生长因子、激素、免疫扩张剂、神经递质、受体、报告蛋白、结构蛋白、和转录因子。

47. 项 46 的方法，其中酶是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、

异构酶、或连接酶。

48. 项 45 的方法，其中多糖是壳多糖、肝素、或透明质酸。

49. 项 38-43 中任何的方法，其中由第一核苷酸序列编码的生物物质是代谢产物。

50. 项 38 的方法，其中第一核苷酸序列包括生物合成或代谢途径。

51. 项 38-50 中任何的方法，其中突变菌株包括至少 2 个拷贝的编码生物物质的第一核苷酸序列。

52. 项 38-51 中任何的方法，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株生产至少减少 25% 的葡糖淀粉酶和选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、或中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、或草酸水解酶的一种或多种酶。

53. 项 38-51 中任何的方法，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，该突变菌株完全缺乏葡糖淀粉酶和选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、或中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、或草酸水解酶的一种或多种酶。

54. 项 38-53 中任何的方法，其中该突变菌株进一步包括编码蛋白质分解活性的一种或多种基因的变体。

55. 项 54 的方法，其中蛋白质分解活性选自氨肽酶、二肽基氨肽酶、三肽基氨肽酶、羧肽酶、曲霉胃蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、或液泡蛋白酶。

56. 项 38-55 中任何的方法，其中突变菌株进一步包括编码选自糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖苷酶、卤素过氧化物酶、半纤维素酶、转化酶、异构酶、漆酶、连接酶、脂肪酶、裂解酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、酚氧化酶、多酚氧化酶、核糖核酸酶、转移酶、 α -1,6-转葡萄糖苷酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶的酶的一种或多种基因的变体。

附图简述

图 1 显示 pJRoy10 的限制图谱。

图 2 显示 pMBin01+ 的限制图谱。

图 3 显示 pJRoy17 的限制图谱。

图 4.显示 pSMO127 的限制图谱。

图 5.显示 pMBin05 的限制图谱。

图 6.显示 pMBin04+的限制图谱。

图 7 显示 pMBin09 的限制图谱。

图 8 显示 pMBin10 的限制图谱。

图 9 显示 pMBin02 的限制图谱。

图 10 显示 pMBin03 的限制图谱。

图 11 显示 pMBin08 的限制图谱。

图 12 显示 *prtT* 缺失对蛋白酶活性的影响。

图 13 显示 *prtT* 缺失对南极假丝酵母(*Candida antarctica*)脂肪酶 B 活性的影响。

图 14 显示黑曲霉普通宿主菌株 MBin114、MBin118 和 MBin120 中嗜热柱顶孢(*Scytalidium thermophilum*)过氧化氢酶生产的比较。

发明详述

本发明涉及生产异源生物物质的方法, 包括: (a)在适于生产异源生物物质的培养基中培养亲本黑曲霉菌株的突变株, 其中(i)该突变菌株包括编码异源生物物质的第一核苷酸序列和包括 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT* 和 *oah* 的基因变体(modification)的一种或多种第二核苷酸序列, 和(ii)当在相同条件下培养时, 与亲本黑曲霉菌株相比, 该突变菌株缺乏葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、和中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、和草酸水解酶的酶的生产; 以及(b)从培养基回收异源的生物物质。

本发明的优点是消除或减少异源生物物质的黑曲霉发酵液体培养基简单化下游过程中的葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、和中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、和草酸水解酶的酶。

术语"淀粉葡萄糖苷酶"在此定义为糊精 6- α -D-葡聚糖水解酶活性, 其催化 1,4 -连接的 α -D-葡萄糖残基和末端 1,4 -连接的 α -D-葡萄糖残基链中分支点的 1,6- α -D-糖苷连接的內水解。就本发明而言, 根据 Fagershom 和 Kalkkinen, 1995, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 21: 223-231 描述的方法确定葡糖淀粉酶活性, 其中利用葡萄糖氧化酶测定试剂盒(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)在

pH 4, 25°C 测量由葡糖淀粉酶从 0.1 M 麦芽三糖产生的葡萄糖。1 个单位的葡糖淀粉酶活性定义为在 25°C, pH 4 每分钟产生 1.0 μ mol 的葡萄糖。

术语“ α -淀粉酶活性”在此定义为 1,4- α -D-葡聚糖葡聚糖水解酶活性, 其催化具有 3 个以上 α -1,4-连接的葡萄糖单元的多糖在存在水时内水解为麦芽低聚糖。

术语“酸稳定的 α -淀粉酶活性”在此定义为在酸性 pH 范围中具有最佳活性的 α -淀粉酶活性。为了本发明, 利用 4,6-亚乙基(G7)-p-硝基苯基(G1)- α -D-maltoheptaside 作为底物, 利用 Sigma Chemical Co. 试剂盒 577 在 pH 4.0 测定酸稳定的 α -淀粉酶活性。

术语“中性 α -淀粉酶活性”在此定义为在中性 pH 范围中具有最佳活性的 α -淀粉酶活性。为了本发明, 利用 4,6-亚乙基(G7)-p-硝基苯基(G1)- α -D-麦芽庚糖苷(maltoheptaside)作为底物, 利用 Sigma Chemical Co. 试剂盒 577, 在 pH 7.0 测定中性 α -淀粉酶活性。

术语“草酸水解酶”在此定义为在存在水时催化草酰乙酸转化为草酸和乙酸酯的酶活性。分类该酶为属于 EC 3.7.1.1。为了本发明, 根据在本文实施例小节中描述的方法测定草酰乙酸水解酶活性。1 个单位的草酰乙酸水解酶活性定义为在 30°C, pH 7.5 每分钟产生 1.0 μ mol 的草酸。

术语“变体”在此定义为在基因或为其转录或翻译所需要的调控元件中导入、取代、或除去一个或多个核苷酸, 以及基因断裂、基因转换、基因缺失、或 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT*、和 *oah* 的基因的随机或特异的诱变。*glaA* 基因和 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT*、和/或 *oah* 基因的缺失可以是部分或全部的。变体导致 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT*、和 *oah* 的基因的表达的降低或消除。

在优选的方面, 变体导致 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT*、和 *oah* 的基因的失活。在另一个优选的方面, 变体导致 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT*、和 *oah* 的基因的表达降低。在另一个优选的方面, 变体导致 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT*、或 *oah* 的基因的表达降低、消除、或其组合。

在优选的方面, 突变包括 *glaA* 和 *asa* 的改变。在另一个优选的方面, 突变包括 *glaA* 和 *amyA* 的改变。在另一个优选的方面, 突变包括 *glaA* 和 *amyB* 的改变。在另一个优选的方面, 突变包括 *glaA* 和 *prtT* 的改变。在另

一个优选的方面，突变包括 *glaA* 和 *oah* 的改变。

在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、和 *amyA* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、和 *amyB* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、和 *priT* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*amyA*、和 *amyB* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*amyA*、和 *priT* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*amyA*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*amyB*、和 *priT* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*amyB*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*priT*、和 *oah* 的改变。

在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*amyA*、和 *amyB* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*amyB*、和 *priT* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*priT*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*amyA*、和 *priT* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*amyA*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*amyA*、*amyB*、和 *priT* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*amyB*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*amyA*、*priT*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*amyA*、*amyB*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*amyB*、*priT*、和 *oah* 的改变。

在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*amyA*、*amyB*、和 *priT* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*amyB*、*priT*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*amyA*、*amyB*、*priT*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*amyA*、*amyB*、和 *oah* 的改变。在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*amyA*、*priT*、和 *oah* 的改变。

在另一个优选的方面，突变包括 *glaA*、*asa*、*amyA*、*amyB*、*priT*、和 *oah* 的改变。

术语“缺乏”(deficient)在此定义为当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，黑曲霉突变菌株没有产生可检测的葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、和中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、和草酸水解酶的酶，或备选的，当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉菌株相比，优选产生减少 25%，更优选减少至少 50%，更优选减少至少 75%，以及最优选减

少至少 95%的葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、和中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、和草酸水解酶的酶。可利用在此所描述的或本领域已知的方法测定由本发明黑曲霉突变菌株产生的酶的水平。

在本发明的方法中，亲本黑曲霉菌株可以是野生型黑曲霉菌株或其突变株。可以理解术语“黑曲霉”也包括黑曲霉的品种(参见，例如，Robert A. Samsom 和 John I. Pitt 编，*Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, Harwood Academic Publishers, 荷兰)。在优选的方面，亲本黑曲霉菌株是黑曲霉 DSM 12665。

可利用本领域公知的方法，例如插入、断裂、替代或缺失，通过减少或消除 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*priT* 和 *oah* 的基因的表达构建缺乏酶的黑曲霉突变菌株。待改变或失活的基因部分可以是例如编码区或为表达编码区所需要的调控元件。这种基因调节或调控序列的实例可以是启动子序列或其功能部分，即足够影响基因表达的部分。可能用于改变的其它调控序列包括但不限于，前导序列、前肽序列、信号序列、转录终止子、和转录活化子。

可通过基因缺失技术构建黑曲霉突变菌株来消除或减少 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、*amyB*、*priT* 和 *oah* 的基因的表达。基因缺失技术能够部分或完全除去基因，由此消除其表达。在这种方法中，基因的缺失可利用已经构建的、连续包含基因侧翼的 5'和 3'区的质粒而伴随有同源重组。

也可通过在基因或为其转录或翻译所需要的调控元件中导入、取代、和/或除去一个或多个核苷酸来构建黑曲霉突变菌株。例如，可插入或除去核苷酸以使得导入终止密码子，除掉起始密码子，或产生开放阅读框的阅读框移位。根据本领域已知的方法这种改变可伴随有定点诱变或 PCR 产生的诱变。参见例如，Botstein 和 Shortle, 1985, *Science* 229: 4719; Lo 等, 1985, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 2285; Higuchi 等, 1988, *Nucleic Acids Research* 16: 7351; Shimada, 1996, *Meth. Mol. Biol.* 57: 157; Ho 等, 1989, *Gene* 77: 61; Horton 等, 1989, *Gene* 77: 61; 以及 Sarkar 和 Sommer, 1990, *Bio Techniques* 8: 404。

也可通过基因断裂技术，通过将包含与基因同源的核酸片段的整合型质粒插入令人感兴趣的基因来构建黑曲霉突变菌株，其可能产生同源性区域的重复并且在复制区域之间结合载体 DNA。如果插入的载体分隔了基因

的启动子和编码区或打断编码序列以产生无功能的基因产物，这种基因断裂可消除基因表达。断裂构建体可以只是伴有与基因 5'和 3'区域同源的可选择的标记基因。可选择的标记物能够鉴定包含断裂基因的转化体。

也可通过基因转换的方法(参见例如，Iglesias 和 Trautner, 1983, *Molecular General Genetics* 189: 73-76)构建黑曲霉突变菌株。例如，在基因转换方法中，体外诱变处理相应于基因的核苷酸序列以产生有缺陷的核苷酸序列，然后将其转化入亲本黑曲霉菌株以产生有缺陷的基因。通过同源重组，有缺陷的核苷酸序列替代内源的基因。所需要的是有缺陷的基因或基因片段也包括可用于选择包含有缺陷基因的转化体的标记物。

也可通过已建立的反义技术，利用与基因的核苷酸序列互补的核苷酸序列(Parish 和 Stoker, 1997, *FEMS Microbiology Letters* 154: 151-157)来构建黑曲霉突变菌株。更具体地说，可通过导入与该基因核苷酸序列互补的核苷酸序列来减少或消除经黑曲霉菌株的基因表达，其可在菌株中转录并能够与菌株中产生的 mRNA 杂交。在容许互补的反义核苷酸序列与 mRNA 杂交的条件下，因此减少或消除了翻译蛋白的数量。

可通过随机或特异的诱变，利用本领域公知的方法来进一步构建黑曲霉突变菌株，包括但不限于化学物诱变作用(参见例如，Hopwood, *The Isolation of Mutants in Methods in Microbiology* (J.R. Norris 和 D.W. Ribbons 编)第 363-433 页，Academic Press, 纽约, 1970)和转位(参见例如，Youngman 等, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2305-2309)。可通过使亲本菌株经受诱变并且筛选其中基因表达已经减少或消除的突变菌株来进行基因的改变。可进行特异或随机的诱变，例如使用合适的物理或化学诱变处理试剂，使用合适的寡核苷酸，或使 DNA 序列经受 PCR 产生的诱变。此外，可使用这些诱变处理方法的任何组合进行诱变。

适于本目的的物理或化学诱变处理试剂的实例包括紫外(UV)照射、羟胺、N-甲基-N'硝基-N-亚硝基胍(MNNG)、N-甲基-N'-亚硝基胍(NTG)O-甲基羟胺、亚硝酸、乙基甲烷磺酸盐(EMS)、亚硫酸氢钠、甲酸、和核苷酸类似物。当使用这种试剂时，一般通过在存在所选择的诱变处理试剂时在适宜条件下培养待诱变处理的亲本进行诱变，以及选择显示出基因表达减少或没有表达的突变株。

在优选的方面，*glaA* 包括与 SEQ ID NO: 5 具有至少 70%，优选至少 75%，

更优选至少 80%，更优选至少 85%，最优选至少 90%，以及最优选至少 95% 同一性的核苷酸序列。在最优选的方面，*glaA* 包括 SEQ ID NO: 5 的核苷酸序列。在另一个最优选的方面，*glaA* 由 SEQ ID NO: 5 的核苷酸序列组成。

在另一个优选的方面，*glaA* 包括在极低严谨条件，优选低严谨条件，更优选中等严谨条件，更优选中等-高严谨条件，更优选高严谨条件，以及最优选极高严谨条件下与 SEQ ID NO: 5 杂交的核苷酸序列。

在优选的方面，*amyA* 包括与 SEQ ID NO: 21 具有至少 70%，优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，最优选至少 90%，以及最优选至少 95% 同一性的核苷酸序列。在最优选的方面，*amyA* 包括 SEQ ID NO: 21 的核苷酸序列。在另一个最优选的方面，*amyA* 由 SEQ ID NO: 21 的核苷酸序列组成。

在另一个优选的方面，*amyA* 包括在极低严谨条件，优选低严谨条件，更优选中等严谨条件，更优选中等-高严谨条件，更优选高严谨条件，以及最优选极高严谨条件下与 SEQ ID NO: 21 杂交的核苷酸序列。

在优选的方面，*amyB* 包括与 SEQ ID NO: 17 具有至少 70%，优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，最优选至少 90%，以及最优选至少 95% 同一性的核苷酸序列。在最优选的方面，*amyB* 包括 SEQ ID NO: 17 的核苷酸序列。在另一个最优选的方面，*amyB* 由 SEQ ID NO: 17 的核苷酸序列组成。

在另一个优选的方面，*amyB* 包括在极低严谨条件，优选低严谨条件，更优选中等严谨条件，更优选中等-高严谨条件，更优选高严谨条件，以及最优选极高严谨条件下与 SEQ ID NO: 17 杂交的核苷酸序列。

在优选的方面，*oah* 包括与 SEQ ID NO: 23 具有至少 70%，优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，最优选至少 90%，以及最优选至少 95% 同一性的核苷酸序列。在最优选的方面，*oah* 包括 SEQ ID NO: 23 的核苷酸序列。在另一个最优选的方面，*oah* 由 SEQ ID NO: 23 的核苷酸序列组成。

在另一个优选的方面，*oah* 包括在极低严谨条件，优选低严谨条件，更优选中等严谨条件，更优选中等-高严谨条件，更优选高严谨条件，以及最优选极高严谨条件下与 SEQ ID NO: 23 杂交的核苷酸序列。

在优选的方面，*priT* 包括与 SEQ ID NO: 13 具有至少 70%，优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，最优选至少 90%，以及最优选至少 95% 同一性的核苷酸序列。在最优选的方面，*priT* 包括 SEQ ID NO: 13 的核苷酸序

列。在另一个最优选的方面, *priT* 由 SEQ ID NO: 13 的核苷酸序列组成。

在另一个优选的方面, *priT* 包括在极低严谨条件, 优选低严谨条件, 更优选中等严谨条件, 更优选中等-高严谨条件, 更优选高严谨条件, 以及最优选极高严谨条件下与 SEQ ID NO: 13 杂交的核苷酸序列。

为了本发明, 通过 Wilbur-Lipman 方法(Wilbur 和 Lipman, 1983, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 80: 726-730), 利用具有同一性表的 LASERGENE™ MEGALIGN™ 软件(DNASTAR, Inc., Madison, WI), 和下列多个序列对比参数: 缺口罚分 10 和缺口长度罚分 10 来确定 2 个核苷酸序列之间的同一性程度。成对序列对比参数是 K 元组(Ktuple) = 3, 缺口罚分 = 3, 和窗(windows) = 20。

在此公开的核苷酸序列或其亚序列, 以及其氨基酸序列或其片段可用于设计核酸探针以从不同属或种的菌株, 根据本领域公知的方法鉴定和克隆编码涉及透明质酸生物合成的酶的 DNA。特别地, 这种探针可用于与基因组或令人感兴趣的属或种的 cDNA, 按照标准的 Southern 印迹方法杂交, 以便鉴定和分离其中的相应基因。这种探针可以是比全部序列相当短的, 但应该是至少 15, 优选至少 25, 以及更优选是至少 35 个核苷酸长度。也可使用更长的探针。可使用 DNA 和 RNA 探针。一般标记探针用于检测相应的基因(例如, 用 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 、生物素或抗生物素蛋白)。

因此, 可筛选从这种其它的生物体制备的基因组 DNA 或 cDNA 文库的与如上所述的探针杂交, 并且编码透明质酸生物合成途径中的酶的 DNA。可通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳, 或其它分离技术分离来自这种其它生物体的基因组或其它的 DNA。可将来自文库的 DNA 或分离的 DNA 转移并固定到硝化纤维素或其它合适的载体材料上。为了鉴定与在此公开的核苷酸序列或其亚序列同源的克隆或 DNA, 在 Southern 印迹中使用载体材料。就本发明而言, 杂交表明核酸序列与相应于在此公开的核苷酸序列、其互补链、或其亚序列的标记核酸探针在极低至极高的严谨条件下杂交。可利用 X 光胶片检测在这些条件下与核酸探针杂交的分子。

对于长度为至少 100 个核苷酸的长探针, 定义极低至极高的严谨条件为在 42°C 在 5×SSPE, 3% SDS, 200μg/ml 剪切和变性的鲑鱼精 DNA, 以及对于极低和低严谨为 25%甲酰胺、对于中等和中等-高严谨为 35%甲酰胺、

或对于高和极高严谨为 50%甲酰胺中,按照标准的 Southern 印迹方法进行预杂交和杂交。

对于至少 100 个核苷酸长度的长探针,最后利用 2×SSC, 0.2% SDS 洗涤载体材料 3 次,每次 15 分钟,优选在 45℃(极低严谨)、更优选至少在 50℃(低严谨)、更优选至少在 55℃(中等严谨)、更优选至少在 60℃(中等-高严谨)、更优选至少在 65℃(高严谨)、以及最优选 70℃(极高严谨)进行洗涤。

对于大约 15 个核苷酸至大约 70 个核苷酸长度的短探针,严谨状态定义为在低于利用根据 Bolton 和 McCarthy (1962, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:1390)的算法计算的 T_m 大约 5℃至大约 10℃,在 0.9 M NaCl, 0.09 M Tris-HCl pH 7.6, 6 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1×Denhardt 氏溶液, 1 mM 焦磷酸钠, 1 mM 磷酸二氢钠, 0.1 mM ATP, 和每 ml 0.2 mg 的酵母 RNA 中,按照标准的 Southern 印迹方法进行预杂交、杂交和杂交后洗涤。

对于大约 15 个核苷酸至大约 70 个核苷酸长度的短探针,在 6×SSC 加 0.1% SDS 中洗涤载体材料 15 分钟一次,利用 6×SSC 在低于计算的 T_m 5℃至 10℃洗涤两次,每次 15 分钟。

可从产生酶以改变所选择的黑曲霉菌株中相应基因的其它微生物来源使用与在此所描述的、涉及生产令人感兴趣的酶的核苷酸序列同源或互补的核苷酸序列。

在优选的方面,未用可选择的标记物标记涉及在黑曲霉突变菌株中酶生产的基因变体。

除去可选择的标记基因可伴随有在反选择(counter-selection)的培养基上培养突变株。其中可选择的标记基因包含侧接其 5'和 3'末端的重复,该重复可当突变菌株经受反选择时便于通过同源重组使可选择的标记基因环化突出(looping out of)。也可通过将包括有缺陷基因的 5'和 3'区,但缺乏可选择标记基因的核酸片段导入突变菌株,然后在反选择培养基上选择经同源重组,而除去可选择的标记基因。通过同源重组,用缺乏可选择标记基因的核酸片段替换包含可选择标记基因的有缺陷基因。也可使用本领域已知的其它方法。

可以理解本发明的方法不限于为获得黑曲霉突变菌株的特定顺序。可将涉及酶生产的基因变体在构建用于生产生物物质的菌株的任何步骤导入亲本。优选在导入编码异源生物物质的基因前已经使得黑曲霉突变菌株成

为缺乏酶的。

在本发明进一步的方面，黑曲霉菌株的突变株可包含附加的改变，例如可编码对生产，回收或应用特定生物物质有害的物质的其它基因的缺失或断裂。

在优选的方面，黑曲霉菌株进一步包括变体，例如编码蛋白质分解活性的一个或多个基因的断裂或缺失。在更优选的方面，蛋白质分解活性选自氨肽酶、二肽基氨肽酶、三肽基氨肽酶、羧肽酶、曲霉胃蛋白酶(*aspergillopepsin*)、丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、和液泡蛋白酶。

在另一个优选的方面，黑曲霉菌株进一步包括变体，例如一个或多个基因的断裂或缺失，其中该基因编码选自下列的酶：糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡糖苷酶、卤素过氧化物酶(*haloperoxidase*)、半纤维素酶、转化酶、异构酶、漆酶、连接酶、脂肪酶、裂解酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶(*pectinolytic enzyme*)、过氧化物酶、肌醇六磷酸酶、酚氧化酶、多酚氧化酶、核糖核酸酶、转移酶、 α -1,6-转葡萄糖苷酶、 α -1,6-转葡萄糖苷酶、转谷氨酰胺酶、和木聚糖酶。

在本发明的方法中，当在相同的生产条件下培养时黑曲霉突变菌株优选生产与相应的亲本黑曲霉菌株至少相同数量的生物物质。在更优选的方面，当在相同的生产条件下培养时该突变菌株比相应的亲本黑曲霉菌株生产至少多出 25%，优选至少多出 50%，更优选至少多出 75%，以及最优选地至少多出 100%的生物物质。

在适于利用该领域已知的方法生产异源生物物质的营养培养基中培养黑曲霉突变菌株。例如，可通过摇瓶培养、在实验室或工业发酵罐中、在合适的培养基和在容许生物物质表达和/或分离的条件下进行小规模或大规模的发酵(包括连续、分批、分批饲养、或固态发酵)而培养菌株。在包括碳和氮源和无机盐的合适营养培养基中利用本领域已知的方法进行培养。可从商业供应商获得合适的培养基或可根据公开的组合物(例如，美国典型培养物保藏中心的目录)制备合适的培养基。可从培养基直接回收分泌的生物物质。如果生物物质不是分泌的，可从细胞裂解物获得该生物物质。

可利用本领域已知的特异于该生物物质的方法检测生物物质。这些检测方法可包括使用特异的抗体、高效液相色谱法、毛细管色谱法、酶产物的形成、

酶底物的消失或 SDS-PAGE。例如酶活性测定可用来测定该酶的活性。用于测定酶活性的方法是本领域已知用于许多酶的方法(参见例如, D. Schomburg 和 M. Salzmänn (编), *Enzyme Handbook*, Springer-Verlag, 纽约, 1990)。

可通过本领域已知的方法分离所得到的生物物质。例如, 可通过传统方法从培养基分离令人感兴趣的多肽, 包括但不限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。可通过本领域已知的多种方法进一步纯化本发明的分离多肽, 包括但不限于色谱法(例如离子交换、亲合的、疏水性的、色谱聚焦、和大小排阻)、电泳方法(例如预备性的等电聚焦(IEF)、差异溶解度(例如, 硫酸铵沉淀)、或提取(参见例如 *Protein Purification*, J.-C. Janson 和 Lars Ryden 编, VCH Publishers, 纽约, 1989)。可通过例如提取、沉淀、或差异溶解度、或本领域已知的任何方法从培养基分离令人感兴趣的代谢产物。然后可利用适于代谢产物的方法进一步纯化分离的代谢产物。

异源的生物物质可以是任何生物聚合物或代谢产物。可通过单个基因或组成生物合成或代谢途径的一系列基因编码该生物物质。因此, 术语“编码异源生物物质的第一核苷酸序列”可理解为包括涉及该生物物质生产的一个或多个基因。术语“异源生物物质”在此定义为对宿主菌株不是天然生物物质; 其中已经产生结构改变以改变该天然生物物质的天然生物物质, 例如天然多肽的蛋白质序列; 或由于通过例如强启动子的重组 DNA 技术, 核苷酸序列或宿主菌株的操作其表达定量改变的天然生物物质。

在本发明的方法中, 生物聚合物可以是任何生物聚合物。术语“生物聚合物”在此定义为相同、相似或不同亚基(单体)的链(或聚合物)。该生物聚合物可以是, 但不限于核酸、多胺、多元醇、多肽(或聚酰胺)、或多糖。

在优选的方面, 生物聚合物是多肽。多肽可以是具有令人感兴趣的生物活性的任何多肽。术语“多肽”在此不是意味着是指特定长度的编码产物, 因此包括肽、寡肽和蛋白质。术语“多肽”也包括两个或多个多肽组合形成编码的产物。多肽也包括杂合多肽, 其包括从至少 2 个不同多肽获得的部分或全部多肽序列的组合, 其中一个或多个多肽可能与黑曲霉菌株是异源的。多肽进一步包括上述多肽和杂合多肽的天然存在的等位的和工程化的变体。

优选地, 异源的多肽是抗体、抗原、抗菌肽、酶、生长因子、激素、免疫扩张剂(immunodilator)、神经递质、受体、报告蛋白、结构蛋白和转录因子。

在优选的方面, 异源的多肽是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、

异构酶、或连接酶。在更优选的方面，多肽是 α -葡萄糖苷酶、氨肽酶、 α -淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶， α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖脑苷脂酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、突变酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、磷脂酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、尿激酶、或木聚糖酶。

在另一个优选的方面，生物聚合物是胶原或白明胶(gelatin)。

在优选的方面，生物聚合物是多糖。多糖可以是任何多糖，包括但不限于粘多糖或包含氮的多糖。在更优选的方面，多糖是透明质酸。“透明质酸”在此定义为非硫酸化的氨基多糖，其由通过交替的 β -1,4和 β -1,3糖苷键连接在一起的N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)和葡萄糖醛酸(GlcUA)的重复二糖单位组成。透明质酸(hyaluronic acid)亦称透明质酸(hyaluronan)，透明质酸(hyaluronate)，或HA。在另一个更优选的方面，多糖是壳多糖。在另一个更优选的方面，多糖是肝素。

在本发明的方法中，代谢产物可以是任何代谢产物。代谢产物可经一个或多个基因编码。术语“代谢产物”包括初级和次级代谢产物。初级代谢产物是菌株的原始或总代谢产物，其是关于例如能量代谢、生长和结构。次级代谢产物是次级代谢的产物(参见例如，R.B. Herbert, *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, Chapman and Hall, 纽约, 1981)。

初级代谢产物可以是但不限于，氨基酸、脂肪酸、核苷、核苷酸、糖、甘油三酸酯、或维生素。

次级代谢产物可以是但不限于，生物碱、香豆素、类黄酮(flavonoid)、聚酮化合物(polyketide)、奎宁、类固醇、肽、或萜烯。在优选的方面，次级代谢产物是抗生素、拒食剂(antifeedant)、诱引剂(attractant)、杀菌剂、杀真菌剂、激素、杀虫剂、或灭鼠剂(rodenticide)。

在本发明的方法中，黑曲霉菌株的突变株是重组菌株，包括编码异源生物物质，例如多肽的核苷酸序列，其可有利地用于重组生产该生物物质。优选包括编码异源生物物质的核苷酸序列的载体转化菌株，然后将载体整合到染色体中。“转化”是指将包括核苷酸序列的载体导入宿主菌株以使得该载体保持为染色体的整合部分或作为染色体外自我复制的载体。一般认为整合是有利的，因为核苷酸序列更可能稳定地维持在该菌株中。可通过

同源重组, 非同源重组、或转位使载体整合到染色体中。

可从任何原核的、真核的、或其它来源, 例如原生细菌获得编码异源生物物质的核苷酸序列。就本发明而言, 术语如在此使用的与给定来源相关的"获得自"(obtained from)是指通过该来源或通过其中已经插入来自该来源基因的菌株而生产生物物质。

在本发明的方法中, 黑曲霉菌株的突变株也可用于黑曲霉菌株中天然生物物质的重组生产。可通过重组方式生产天然的生物物质, 例如将编码生物物质的基因置于不同启动子的控制下以增强该物质的表达, 使用例如信号序列促进其运输到菌株外部, 或增加编码由黑曲霉菌株正常生产的生物物质基因的拷贝数。因此, 本发明在术语"异源生物物质"的范围内也包括这种天然生物物质的重组生产, 其达到的程度是这种表达包括使用黑曲霉菌株的非天然遗传元件, 或使用已经操作的天然元件以不是通常存在于宿主菌株的方式发挥功能。

用于分离或克隆编码生物物质的核苷酸序列的技术是本领域已知的, 并且包括从基因组 DNA 分离、从 cDNA 制备、或其组合。例如可利用公知的聚合酶链式反应(PCR)影响从这种基因组 DNA 克隆核苷酸序列。参见例如, Innis 等, 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, 纽约。克隆方法可包括切下和分离包括编码生物物质的核苷酸序列的所需要核酸片段, 将该片段插入到载体分子中, 以及将重组载体整合到黑曲霉菌株中, 其中可复制该核苷酸序列的多个拷贝或克隆。核苷酸序列可以是基因组、cDNA、RNA、半合成的、合成的起源、或其任何组合。

在本发明的方法中, 生物物质也可以是融合的多肽, 其中另一个多肽融合在多肽或其片段的 N -末端或 C -末端。通过将编码多肽的核苷酸序列(或其部分)与编码另一个多肽的核苷酸序列(或其部分)融合而生产融合多肽。用于产生融合多肽的技术是本领域已知的, 并且包括连接编码多肽的编码序列以使得它们在读框内, 并且融合多肽的表达是在相同启动子和终止子的调控之下。

在此定义"核酸构建体"为单链或双链的核酸分子, 其分离自天然存在的基因或已经对其进行改变而包含以不会另外存在于自然界的方式组合和毗邻的核酸节段。当核酸构建体包含为表达编码序列所需的所有调控序列时, 术语核酸构建体与术语表达盒同义。术语"编码序列"在此定义为当置于下列

提及的调控序列的控制下转录成为 mRNA 并且转换为令人感兴趣的生物物质。一般通过开放阅读框确定编码序列的边界，其通常从 ATG 起始密码子或备选的起始密码子，例如 GTG 和 TTG 开始。编码序列可包括但不限于，DNA、cDNA 和重组的核苷酸序列。

可以多种方式操作编码生物物质的分离核苷酸序列以保证生物物质表达。在将核苷酸序列插入到载体中之前，根据表达载体或黑曲霉宿主菌株对核苷酸序列的操作可能是合乎需要的或必须的。利用克隆方法来改变核苷酸序列的技术是本领域公知的。

将包括编码生物物质的核苷酸序列的核酸构建体可操作地与能够指导编码序列在本发明的突变黑曲霉菌株中，在与调控序列相适合的条件表达的一个或多个调控序列连接。

术语“调控序列”在此定义为包括对核苷酸序列的编码序列的表达必须或有利的所有组分。各个调控序列可以是天然的或与编码生物物质的核苷酸序列是外源的。这种调控序列包括但不限于，前导序列、启动子、信号肽序列和转录终止子。至少调控序列包括启动子和转录及翻译终止信号。对调控序列可提供接头以便导入便于连接调控序列和编码生物物质的核苷酸序列编码区的特异限制酶切位点。

调控序列可以是适当的启动子序列，其由用于表达核苷酸序列的黑曲霉菌株识别。启动子序列包含介导生物物质表达的转录调控序列。启动子可以是在突变黑曲霉菌株中显示转录活性的任何核酸序列，并且可从编码胞外或胞内生物物质的、与黑曲霉菌株同源或异源的基因获得。

用于在本发明的方法中指导核酸构建体转录的合适启动子的实例是从下列基因获得的启动子：米曲霉(*Aspergillus oryzae*) TAKA 淀粉酶、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉稳定的 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)葡糖淀粉酶(*glaA*)、米黑根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)乙酰胺酶、镰片镰孢(*Fusarium venenatum*)淀粉葡萄糖苷酶(WO 00/56900)、镰片镰孢 Daria (WO 00/56900)、镰片镰孢 Quinn (WO 00/56900)、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)胰蛋白酶样蛋白酶(WO96/00787)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*) β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶 I、里氏木霉内切葡聚糖酶 I、里氏木霉葡聚糖内切酶 II、里氏木

霉菌葡聚糖内切酶 III、里氏木霉菌葡聚糖内切酶 IV、里氏木霉菌葡聚糖内切酶 V、里氏木霉菌木聚糖酶 I、里氏木霉菌木聚糖酶 II、里氏木霉 β -木糖苷酶, 以及 NA2-tpi 启动子(来自黑曲霉中性 α -淀粉酶和米曲霉磷酸丙糖异构酶基因的启动子的杂合体); 以及其突变的、截短的、和杂合的启动子。特别优选的启动子是葡糖淀粉酶、TAKA α -淀粉酶、和 NA2-tpi 启动子。

调控序列也可以是合适的转录终止子序列, 由黑曲霉菌株识别以终止转录的序列。将终止子序列可操作地与编码异源生物物质的核苷酸序列的 3'末端连接。在黑曲霉菌株中有功能的任何终止子都可用于本发明。

优选的终止子是从编码米曲霉 TAKA α -淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉氨基苯甲酸合酶、黑曲霉 α -葡糖苷酶和尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶的基因获得的。

调控序列也可以是合适的前导序列, mRNA 的非翻译区, 其对于经黑曲霉菌株的翻译是很重要的。将前导序列可操作地与编码异源生物物质的核苷酸序列的 5'末端连接。在黑曲霉菌株中有功能的任何前导序列都可用于本发明。

优选的前导序列是从编码米曲霉 TAKA α -淀粉酶和构巢曲霉磷酸丙糖异构酶的基因获得的。

调控序列也可以是多聚腺苷酸序列, 是可操作地与核苷酸序列的 3'末端连接的序列, 并且当其转录时, 受到黑曲霉菌株识别而作为向转录的 mRNA 加入多聚腺苷残基的信号。在黑曲霉菌株中有功能的任何多聚腺苷酸序列都可用于本发明。

优选的多聚腺苷酸序列是从编码米曲霉 TAKA α -淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉氨基苯甲酸合酶、和黑曲霉 α -葡糖苷酶的基因获得的。

调控序列也可以是编码与异源多肽氨基末端连接的氨基酸序列的信号肽编码区, 并且指导编码的多肽进入菌株的分泌途径。核苷酸序列的编码序列的 5'末端可固有地包含在翻译阅读框中天然连接编码分泌多肽的编码区节段的信号肽编码区。备选地, 编码序列的 5'末端可包含与编码序列外源的信号肽编码区。外源的信号肽编码区可能是当编码序列通常不包含信号肽编码区时所必需的。备选地, 外源的信号肽编码区可简单地替代天然的信号肽编码区以获得分泌增强的多肽。然而, 任何指导表达异源多肽进入黑曲霉菌株分泌途径的信号肽编码区可用于本发明。

用于黑曲霉宿主菌株的有效信号肽编码区是从米曲霉 TAKA α -淀粉酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉葡萄糖 α -淀粉酶、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶、特异腐质霉 (*Humicola insolens*) 纤维素酶、和疏棉状腐质霉 (*Humicola lanuginosa*) 脂肪酶基因获得的信号肽编码区。

调控序列也可以是编码位于多肽氨基末端的氨基酸序列的前肽编码区。所得到的多肽称为原酶或原多肽(或有时称为酶原)。前多肽一般是非活化的并且可通过前肽的催化或自催化切割而从前多肽转化为成熟的活性多肽。前肽编码区可从米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶基因、或嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) 漆酶基因 (WO 95/33836) 获得。

其中信号肽和前肽区都存在于多肽的氨基末端，前肽区紧接位于多肽的氨基末端而信号肽区紧接位于前肽区域的氨基末端。

核酸构建体也可包括编码一个或多个有利于指导异源生物物质表达的因子的一个或多个核苷酸序列，例如转录活化子(例如,反式作用因子)、伴侣分子、和加工蛋白酶。在黑曲霉菌株中有功能的任何因子都可用于本发明。编码一种或多种这些因子的核酸不是必须与编码异源生物物质的核苷酸序列串联的。

也可能需要加入容许调节异源生物物质相对于黑曲霉菌株生长而表达的调控序列。调节系统的实例是应答化学或物理刺激，包括存在调控化合物时导致打开或关闭基因表达的调节系统。TAKA α -淀粉酶启动子、黑曲霉葡萄糖淀粉酶启动子、和米曲霉葡萄糖淀粉酶启动子可用作调控序列。调控序列的其它实例是容许基因增殖的序列，例如随重金属扩增的金属硫蛋白基因。这样的话，编码异源生物物质的核苷酸序列将可操作地与调控序列连接。

在本发明的方法中，包括核苷酸序列、启动子、及转录和翻译终止信号的重组表达载体可用于重组生产多肽或其它的生物物质。可将如上所述的多种核酸和调控序列连接在一起以产生重组表达载体，其可包括一个或多个便利的限制酶切位点以容许在这些位点插入或取代编码多肽或生物物质的核苷酸序列。备选地，可通过插入核苷酸序列或包括进入适当表达载体的序列的核酸构建体来表达本发明的核苷酸序列。在表达载体的产生中，编码序列位于载体中以便编码序列与用于表达的适当调控序列可操作地连接，并可能分泌。

重组表达载体可以是任何载体，其可便利地经受重组 DNA 方法而实现

核酸序列的表达。载体的选择一般取决于载体与其中将导入该载体的黑曲霉菌株的相容性。载体可以是线性的或封闭的环状质粒。载体可以是自我复制载体，即以染色体外的实体存在的载体，其复制不依赖于染色体的复制，例如质粒，染色体外的元件、微型染色体或人工染色体。载体可包含任何用于确保自我复制的方式。备选地，载体可以是当被导入黑曲霉菌株时，整合到基因组中并与其已经整合进入的染色体一起复制的载体。此外，载体系统可以是单个载体或质粒，或两个或多个载体或质粒，其同时包含将导入黑曲霉菌株基因组的总 DNA 或转位子。

当导入黑曲霉菌株时，可将载体整合到菌株基因组中。对于整合到本发明的突变黑曲霉菌株基因组中，载体可能依赖于编码异源生物物质的核苷酸序列，或通过同源或非同源重组将载体稳定整合到基因组中的任何其它元件。备选地，载体可包含用于通过同源重组到黑曲霉菌株基因组中而指导整合的附加核苷酸序列。附加的核苷酸序列能够使载体整合到宿主细胞基因组中染色体的准确位置。为了增加在准确位置整合的可能性，整合元件优选应包含足够数目的核酸，例如 100 至 1,500 个碱基对，优选 400 至 1,500 个碱基对，以及最优选 800 至 1,500 个碱基对，其与相应的靶序列是高度同源的以增强同源重组的可能性。整合元件可以是与黑曲霉基因组中的靶序列同源的任何序列。此外，整合元件可以是非编码或编码的核苷酸序列。另一方面，载体可通过非同源重组整合到菌株的基因组中。

对于自我复制，载体可进一步包括能够使载体在所述的黑曲霉中自主复制的复制原点。

可将如上所述的多种核酸和调控序列连接在一起以产生重组表达载体，其可包括一个或多个便利的限制酶切位点以容许在这些位点插入或取代编码异源生物物质的核苷酸序列。备选地，可通过插入序列或包括进入适当表达载体的序列的核酸构建体来表达编码异源生物物质的核苷酸序列。在表达载体的产生中，编码序列位于载体中以便编码序列与用于表达的适当调控序列可操作地连接，并可能分泌。

载体优选包含容许容易选择转化黑曲霉菌株的一个或多个可选择的标记物。可选择的标记物是提供抗微生物性或病毒抗性、重金属抗性、原养型到营养缺陷型等的基因产物。用于黑曲霉宿主菌株的选择性标记物可选自，包括但不限于，*amdS* (乙酰胺酶)、*argB* (鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、*bar* (膦丝

菌素转乙酰酶)、*hph* (潮霉素磷酸转移酶)、*niaD* (硝酸还原酶)、*pyrG* (乳清酸核苷-5'-磷酸酯脱羧酶)、*sC* (硫酸腺嘌呤转移酶)、和 *trpC* (氨基苯甲酸合酶), 以及来自其它种属的等价物。优选用于黑曲霉菌株的是构巢曲霉或米曲霉的 *amdS* 和 *pyrG* 基因和吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的 *bar* 基因。

载体优选包含容许载体稳定整合到基因组中或容许载体在菌株中不依赖于菌株基因组而自发复制的元件。

“导入”是指将包括核苷酸序列的载体导入黑曲霉菌株以使得该载体保持为染色体的整合部分或作为染色体外自我复制的载体。一般认为整合是有利的, 因为核苷酸序列更可能稳定地维持在该菌株中。通过同源重组, 非同源重组、或转位使载体整合到染色体中。

将表达载体导入黑曲霉宿主菌株可包括由以本身已知的方式形成原生质体、转化原生质体、再生菌株壁组成的方法。转化曲霉宿主菌株的合适方法在 EP 238 023 和 Yelton 等, 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474 中有描述。

用于连接在此所描述的元件以构建重组表达载体的方法是本领域技术人员已知的(参见, 例如 J.Sambrook, E.F. Fritsch 和 T. Maniatus, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor, 纽约)。

在本发明的另一个方面, 突变黑曲霉菌株可进一步包含一个或多个第三核苷酸序列的变体, 该第三核苷酸序列编码可能对生产、回收、和/或应用令人感兴趣的异源生物物质有害的物质。该变体减少或消除了一个或多个第三核苷酸序列的表达, 产生当在相同条件下培养时比没有改变第三核苷酸序列的突变菌株可生产更多异源生物物质的突变菌株。

第三核苷酸序列可以例如编码酶。例如, 该酶可以是氨肽酶、 α -淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、壳多糖酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、突变酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、磷脂酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶。第三核苷酸序列优选编码蛋白水解酶, 例如氨肽酶、羧肽酶、或蛋白酶。

本发明也涉及获得亲本黑曲霉菌株的突变株的方法, 包括: (a)在黑曲霉菌株中导入第一核苷酸序列, 其包括 *glaA* 和至少一个选自 *asa*、*amyA*、

amyB、*prtT* 和 *oah* 的基因的变体，其分别涉及葡糖淀粉酶、蛋白酶、草酸水解酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、和中性 α -淀粉酶 B 的生产；以及(b)鉴定来自步骤(a)的包括改变的核苷酸序列的突变菌株，其中当在相同条件下培养时，与亲本黑曲霉相比突变菌株缺乏葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、和中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、和草酸水解酶的酶的生产。

本发明进一步涉及亲本黑曲霉菌株的突变株，其包括编码异源生物物质的第一核苷酸序列和包括 *glaA* 和至少一个选自的 *asa*、*amyA*、*amyB*、*prtT* 和 *oah* 的基因变体的一个或多个第二核苷酸序列，其分别涉及葡糖淀粉酶、蛋白酶、草酸水解酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、和中性 α -淀粉酶 B 的生产，其中当在相同条件下培养时与亲本黑曲霉相比，该突变菌株缺乏葡糖淀粉酶和至少一个选自酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶 A、和中性 α -淀粉酶 B、蛋白酶、和草酸水解酶的酶的生产。

通过下列不应被认为是对本发明范围加以限制的实施例进一步描述本发明。

实施例

所有的引物和 oligos 由 MWG Biotech, Inc., High Point, NC 提供。

用 ABI 3700 测序仪(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)进行 DNA 测序。

菌株

所有的菌株来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*) Bo-1 (DSM 12665)。黑曲霉 Bo-1 包括 α -1,6 转葡糖苷酶基因的突变而导致没有 α -1,6 -转葡糖苷酶活性。

培养基和溶液

基本培养基的组成为每升 6 g NaNO_3 , 0.52 g KCl , 1.52 g KH_2PO_4 , 20 g Noble 琼脂, 10 g 葡萄糖, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 和 1 ml 的 Cove 微量元素。

Cove 平板的组成为每升 342.3 g 蔗糖, 20 ml Cove 盐(50 $\times$), 10 mM 乙酰胺, 15 mM CsCl , 和 25 g Noble 琼脂。

50 $\times$ Cove 盐溶液的组成为每升 26 g KCl , 26 g MgSO_4 , 76 g KH_2PO_4 , 和 50

ml 的 Cove 微量元素。

Cove 微量元素溶液的组成为每升 0.004 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.7 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.8 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 10 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

AMG 微量金属溶液的组成为每升 14.3 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g NiCl_2 , 13.8 g FeSO_4 , 8.5 g MnSO_4 和 3.0 g 柠檬酸。

YP 培养基的组成为每升 10 g 酵母提取物和 20 g 细菌用(Bacto)蛋白胨。

STC 由 0.8 M 山梨糖醇, 50 mM Tris, pH 8 和 50 mM CaCl_2 组成。

SPTC 由每升 40% PEG 4000, 0.8 M 山梨糖醇, 50 mM Tris, pH 8, 50 mM CaCl_2 组成。

SPC 由每升 40% PEG 4000, 0.8 M 山梨糖醇和 50 mM CaCl_2 pH 4.5 组成。

酪蛋白平板的组成为每升 7 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5g KCl , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g 酵母提取物, 10 g 葡萄糖, 0.5 g Triton X -100, 20 g Noble 琼脂和 10 g 酪蛋白。

淀粉苯胺蓝平板的组成为每升 0.1 g 葡萄糖, 1 g KH_2PO_4 , 0.5 g MgSO_4 , 0.5 g KCl , 3 g NaNO_3 , 0.1 g 酵母提取物, 1 ml Cove 微量元素, 5 g 淀粉苯胺蓝, 15 g Noble 琼脂, 和 100 mM 甘氨酸 pH 2.9。

实施例 1: 转化方法

用限制性内切酶消化下列实施例中所描述的 20 微克的每一个断裂盒, 利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒(QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)从 1%琼脂糖-50 mM Tris 碱-50 mM 硼酸盐-0.1 mM EDTA 二钠缓冲液(TBE)凝胶切下和纯化断裂所待用的片段。用无菌的蒸馏水使总体积达到 20 μl 并且分为 4 个转化物。

利用下列的方法制备原生质体。使含有补充有 5%葡萄糖的 20 ml YP 培养基的摇瓶接种密度为每 ml 大约 10^6 - 10^8 的黑曲霉分生孢子。在 34°C (200 rpm)孵育过夜(15-17 小时)后,通过用无菌的微孔布 Miracloth™ (Calbiochem, San Diego, CA)过滤收集菌丝体, 并转入在 10-20 ml 1.2 M 山梨糖醇中的每 ml 3-5 mg Novozym™ 234 的溶液(黑曲霉菌株 JRoy3、SMO110 和 MBin111 到 MBin114, 参见实施例 6-9)或 1 M MgSO_4 溶液(黑曲霉菌株 MBin115 到 MBin120, 参见实施例 9-12)中。Novozym™ 234 的消化一般在 37°C, 以 80-100

rpm 的温和摇动进行 30-45 分钟。使原生质体滤过无菌的 Miracloth™, 用 1.2 M 山梨糖醇(黑曲霉菌株 MBin111 到 MBin114)或 2 M 山梨糖醇(黑曲霉菌株 MBin115 到 MBin120)漂洗, 并且在 3000×g 离心 10 分钟。用 10 ml 1.2 M 山梨糖醇洗涤黑曲霉菌株 JRoy3、SMO110 和 MBin111 到 MBin114 两次, 并用 10 ml 1.2 M 山梨糖醇-50 mM CaCl₂ 洗涤一次, 然后以每 ml 1.2 M 山梨糖醇 3×10^7 - 1×10^8 个原生质体的浓度进行重悬。用 30 ml 1 M 山梨糖醇洗涤黑曲霉菌株 MBin115 到 MBin120 一次, 并用 30 ml STC 洗涤一次, 然后重悬在 STC:SPTC:DMSO (8:2:0.1 v/v)中以获得每 ml 3×10^7 - 1×10^8 个原生质体的浓度。直接使用该黑曲霉原生质体用于随后的转化或在-80℃冷冻。

在转化该原生质体前, 溶解选择的盖层(overlap)并置于 50℃。用于 *pyrG* 选择的盖层的组成为每升 20 ml Cove 盐, 273.8 g 蔗糖, 8 g Noble 琼脂, 6 g NaNO₃, 和 1 g NZAmine 酪蛋白氨基酸, pH 5.5。使用 *pyrG* 选择盖层来产生所有的基因断裂。用于 *amdS* 选择的盖层的组成为每升 20 ml Cove 盐(50×), 273.8 g 蔗糖, 8 g Noble 琼脂, 10 mM 乙酰胺, 和 15 mM CsCl。当转化任何表达质粒时, 使用 *amdS* 选择盖层。

将 DNA 加 5μl 肝素(5mg/ml STC)加入 100μl 的原生质体并置于冰上 30 分钟。在谱系中黑曲霉 MBin115 之前的黑曲霉菌株不接受肝素。在室温下孵育 30 分钟前, 加入 SPC(对于黑曲霉菌株 JRoy3、SMO110 和 MBin111 到 MBin114 为 250μl, 对于剩余的菌株为 1ml)并温和地混合。加入 10 ml 体积的盖层(50℃)并立即倾倒至选择性平板上。利用 *pyrG* 作为可选择标记物的对基因断裂的选择是补充有 1 M 蔗糖的基本培养基。在产生黑曲霉 MBin111 菌株中, 使用组成为每升 1 M 蔗糖, 1 g 5-氟-乳清酸(5-FOA), 和 10 mM 尿嘧啶核苷的基本培养基平板。Cove 平板用来选择包含表达质粒的转化体。平板在 34℃培养 3-7 天。

实施例 2: Southern 分析

从包含补充有 5%葡萄糖(以及当适用时为 10 mM 尿嘧啶核苷)的 5 ml YP 培养基的 15 mm 平板收获黑曲霉菌丝体, 用 10 mM Tris pH 7.4-0.1 mM EDTA pH 8 (TE), 利用有侧臂的培养瓶和陶瓷滤器过滤并漂洗, 最后置于微离心试管中, 在加速真空下干燥 1 小时。

利用 Qiagen DNeasy Plant Mini 试剂盒(Qiagen, Inc., Chatsworth, CA)分离

DNA。消化 5 微克的分离 DNA 2 小时(40 μ l 总体积, 4U 的特异限制性核酸内切酶/ μ l DNA)并且利用 TBE 缓冲液在 1%琼脂糖凝胶上电泳。通过用 0.25 M HCl 处理, 用 1.5 M NaCl-0.5 M NaOH 变性, 以及用 1.5 M NaCl-1 M Tris, pH 8 中和, 使凝胶中的 DNA 片段化, 然后在 20 $\times$ SSC 中转移至 MSI MagnaGraph 尼龙转移膜上(Micron Separations, Inc., Westborough, MA)。使 DNA 紫外交联到膜上并且在 20 ml 的 DIG Easy Hyb(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)中在 60 $^{\circ}$ C 预杂交 1 小时。

用 PCR DIG 探针合成试剂盒, 如制造商(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)所描述的制备探针, 电泳, 并从 1%低熔点琼脂糖凝胶切下。在使用前, 溶解凝胶并通过煮沸 10 分钟使探针变性。将总凝胶体积的百分之十加入杂交缓冲液。将变性探针直接加入 DIG Easy Hyb 缓冲液并在 60 $^{\circ}$ C 杂交过夜。进行杂交后洗涤(在 2 $\times$ SSC 中两次, 在 0.4 $\times$ SSC 中一次, 每次为 60 $^{\circ}$ C, 10 分钟), 利用 DIG 检测系统和 CPD-Star(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)进行化学发光检测。使用 DIG-标记的 DNA 分子量标示 III(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)作为标准。

实施例 3: 黑曲霉基因组 λ 文库的构建

根据 Wahleithner 等, 1996, *Current Genetics*. 29: 395-403 的方法通过在盐酸胍中裂解, 然后如制造商所描述的在 Qiagen Maxiprep 柱上(QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)纯化来分离黑曲霉 Bo-1 DNA。根据制造商的指导, 在 EMBL4(Clontech, Palo Alto, CA)中产生黑曲霉 Bo-1 的基因组文库。用 *Sau*3A 部分消化黑曲霉 Bo-1 基因组 DNA。消化后, DNA 在预备的低熔点琼脂糖凝胶上电泳, 从凝胶切下包含 8 至 23-kb DNA 的区域。用 β -琼脂水解酶(New England Biolabs, Waltham, MA)从凝胶提取 DNA。如供应商指导所描述的用 EMBL4 臂(Clontech, Palo Alto, CA)连接分离的 DNA。用 Gigapack Gold II 包装试剂盒(Stratagene, La Jolla, CA)体外包装该连接物。测定文库的滴度, 并用大肠杆菌 K802 细胞扩增该文库(美国典型培养物保藏中心, Rockville, MD)。估计未扩增的文库包含 26,500 个独立的重组体。

实施例 4: *pyrG* 盒的构建

将来自包含于 EMBL4 的黑曲霉 Bo-1 基因组文库的大约 26,500 个噬菌

斑复制接种到尼龙滤膜上,并用来自构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)*pyrG* 基因的 1.4 kb 片段探测。如制造商所描述的纯化并增殖若干阳性克隆。利用 QiagenλMini Prep 试剂盒(Qiagen, Inc.,Chatsworth, CA)分离来自阳性克隆的噬菌体 DNA。用几个限制性内切酶消化噬菌体 DNA,然后是 Southern 分析以鉴定包含 *pyrG* 基因的片段。标明为克隆 7b 的一个克隆包含黑曲霉 *pyrG* 基因(SEQ ID NOs: 1 [DNA 序列]和 2 [推导的氨基酸序列]),在 3.5 kb 的 *XbaI* 片段上包括启动子和终止子序列。

从克隆 7b 将 *pyrG* 基因片段以 3.5 kb 的 *XbaI* 片段亚克隆到 pUC118 中 (Roche Diagnostics Corporation,曼海姆,德国)产生 pJRoy10(图 1)。通过用 *KspI* 和 *SpeI* 消化从 pJRoy10 分离的包括启动子和终止子序列的 *pyrG* 基因。利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒,在 1%琼脂糖 TBE 凝胶上电泳后,分离在 5'末端包含 *KspI* 位点和在 3'末端包含 *SpeI* 位点的片段并且纯化。

从 pJRoy10 PCR 扩增 *pyrG* 终止子序列的 582 bp 片段,因此分别在该片段的 5'和 3'末端加入 *SpeI* 和 *KspI* 位点。使用引物 1 来产生 *SpeI* 位点而引物 2 加入 *KspI* 位点。

引物 1: 5'-GGGACTAGTGGATCGAAGTTCTGATGGTTA-3' (SEQ ID NO:3)

引物 2: 5'-ATACCGCGGGTTTCAAGGATGGAGATAGGA-3' (SEQ ID NO:4)

在 50μl 反应物中进行 PCR 扩增,其组成为 10 ng pJRoy10 质粒 DNA, 50 pmol 每种引物, 2.5 mM 各种 dATP、dCTP、dGTP、和 dTTP, 具有 2.5 mM MgCl₂ 的 1×PCR 缓冲液(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA), 以及 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)。在 RoboCycler 40 热循环仪(Stratagene, La Jolla, CA)中进行反应, 程序为 1 个循环的 95℃, 3 分钟; 30 个循环的 95℃, 1 分钟, 60℃, 1 分钟, 和 72℃, 1.5 分钟; 以及 1 个循环的 72℃, 5 分钟。

用 *SpeI* 和 *KspI* 消化 582 bp 的 PCR 产物并如下所述直接使用。

通过将黑曲霉 *pyrG* 基因片段和黑曲霉 *pyrG* 终止子片段连接到 pBluescript SK- (Stratagene, La Jolla, CA)的 *SpeI* 位点中,以使得 *pyrG* 在两侧都与 582 bp 的终止子序列侧邻来构建质粒 pMBin01+ (图 2)。从 pMBin01+ 分离 2696 bp 的 *SpeI* 片段,并在 1%琼脂糖-TBE 凝胶上电泳后利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒纯化。利用 Qiagen QiaPrep8 小提或大提试剂盒(Qiagen, Inc.,Chatsworth, CA)分离质粒 DNA。然后使用 2696 bp 的 *SpeI* 片段构建所有

的断裂盒。

实施例 5: 尿嘧啶核苷营养缺陷型的产生

下列实施例中描述的基因断裂使用黑曲霉 *pyrG* 基因作为选择性标记。*pyrG* 基因编码 orotidine-5'-磷酸酯脱羧酶, 其赋予在不加入尿嘧啶核苷而生长的尿嘧啶核苷营养缺陷型。通过向如实施例 4 所描述的标记物末端加入重复序列使重复使用 *pyrG* 成为可能。通过当对 5-FOA 进行选择时在直接重复之间的同源重组而发生 *pyrG* 的切割(d'Enfert, 1996, *Current Genetics* 30: 76-82)。

如实施例 4 所描述的, 断裂盒包含侧接 582 bp 的重复 *pyrG* 终止子序列的 *pyrG* 基因。基因断裂后, 使每种菌株在含有 10 mM 尿嘧啶核苷的基本培养基上传代一次以便除去对 *pyrG* 基因的选择。从包含 10 mM 尿嘧啶核苷的平板收集孢子并且转入包含 10 mM 尿嘧啶核苷和每升 1 g 5-FOA 的基本培养基平板。其中丢失 *pyrG* 基因的黑曲霉细胞在存在 5-FOA 时生长, 而保持该基因的细胞将 5-FOA 转化为有毒的中间产物 5-氟-UMP。从生长迟缓的非生成孢子集落的菌苔挑选出生长更快速的集落并生成孢子, 通过在含有 10 mM 尿嘧啶核苷和每升 1 g 5-FOA 的基本培养基平板上传代两次进行分离, 并且选择单个的、生成孢子的集落。如实施例 2 所描述的进行 Southern 分析以保证已经删除 *pyrG* 基因。在断裂位点留下 1 个拷贝的 *pyrG* 终止子。

实施例 6: 黑曲霉 SMO110 (Δgla) 的构建

从实施例 3 中所描述的基因组 λ 文库分离 8kb 片段的黑曲霉葡糖淀粉酶 (*gla*) 基因(SEQ ID NOs: 5 [DNA 序列]和 6[推导的氨基酸序列]), 并亚克隆到 pUC118 (Roche Diagnostics Corporation, 曼海姆, 德国)中以产生 pJRoy13。将来自 pJRoy13 的包含黑曲霉葡糖淀粉酶基因的 4kb *SpeI* 片段和 1.8 kb 的侧翼 DNA 插入 pBluescriptSK+中(Stratagene, La Jolla, CA)以产生 pJRoy17 (图 3)。

利用 QIAEX II Gel 提取试剂盒, 在 1%琼脂糖-TBE 凝胶上电泳后, 从 pJRoy10 分离包含 *pyrG* 基因的 2.3 kb 的 *SpeI/XhoI* 片段, 并在 1%琼脂糖-TBE 凝胶上电泳后利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒纯化。用 Klenow (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)补平限制性末端, 将该片段插入 pJRoy17 的葡糖淀粉酶基因编码区内的 *BglIII* 位点以产生质粒 pSMO127 (图

4)。pSMO127 的 2 个 *SpeI* 位点之间是分别侧接 2.2 kb 和 2.3 kb 的 5'和 3'葡糖淀粉酶基因序列的 2.3 kb 的 *pyrG* 基因。

用 *SpeI* 消化质粒 pSMO127, 分离由线性的断裂盒组成的 6 kb 片段并利用实施例 1 中所描述的转化方法用于转化缺失 *pyrG* 的菌株, 黑曲霉 JRoy3。利用实施例 5 中所描述的方法从黑曲霉 Bo-1 获得黑曲霉 JRoy3。获得大约 700 个转化体。

从黑曲霉葡糖淀粉酶基因座(起始密码子前直接的 1113 bp)PCR 扩增包含葡糖淀粉酶基因启动子的 1100 bp 片段并且用作 Southern 印迹分析中的探针。以引物 3 和 4 产生探针, 其中引物 3 与 5'末端的 *SpeI* 位点杂交, 而引物 4 在 3'末端加入 *SphI* 位点。

引物 3: 5'-ACTAGTGGCCCTGTACCCAGA-3' (SEQ ID NO: 7)

引物 4: 5'-GCATGCATTGCTGAGGTGTAATGATG-3' (SEQ ID NO: 8)

在 50 μ l 的反应物中进行葡糖淀粉酶基因启动子的 PCR 扩增, 其组成为 10ng 的 pJRoy17 质粒 DNA, 50 pmol 的每种引物, 2.5 mM 每种 dATP、dCTP、dGTP、和 dTTP, 具有 2.5 mM MgCl₂ 的 1 $\times$ PCR 缓冲液, 以及 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶。在 RoboCycler 40 热循环仪中进行反应, 程序为 1 个循环的 95 $^{\circ}$ C, 3 分钟; 30 个循环的 95 $^{\circ}$ C, 1 分钟; 55 $^{\circ}$ C, 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C, 2 分钟; 以及 1 个循环的 72 $^{\circ}$ C, 5 分钟。

如实施例 2 所描述的分离和标记葡糖淀粉酶基因启动子探针。

从如实施例 2 所描述的 700 个转化体中的 200 个制备基因组 DNA。用 *SpeI* 消化基因组 DNA, 然后用上述探针, 利用实施例 2 中所描述的方法进行 Southern 分析。断裂盒基因替代到葡糖淀粉酶基因座中导致野生型 4 kb 的葡糖淀粉酶基因条带增加至 6.3 kb, 这是由于增加了 2.3 kb 的 *pyrG* 基因。鉴定了一个这种转化体并指定为黑曲霉 SMO110。

实施例 7: 黑曲霉 Mbin111 (Δ *pyrG*, Δ *gla*)的构建

用与 3'末端的 *SpeI* 位点杂交的引物 5 和在 5'末端加入 *SphI* 位点的引物 6 从 pJRoy17 扩增 800 bp 片段的黑曲霉葡糖淀粉酶基因终止子。

引物 5: 5'-GAGGTCGACGGTATCGATAAG-3' (SEQ ID NO: 9)

引物 6: 5'-GCATGCAGATCTCGAGAATACACCGTTCCTCAG-3' (SEQ ID NO: 10)

在 50 μ l 的反应物中进行 *gla* 基因终止子的 PCR 扩增, 其组成为 10 ng pJRoy17 质粒 DNA, 50 pmol 每种引物, 2.5 mM 每种 dATP、dCTP、dGTP、和 dTTP, 具有 2.5 mM MgCl₂ 的 1 $\times$ PCR 缓冲液, 以及 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶。在 RoboCycler 40 热循环仪中进行反应, 程序为 1 个循环的 95 $^{\circ}$ C, 3 分钟; 30 个循环的 95 $^{\circ}$ C, 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C, 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C, 2 分钟; 以及 1 个循环的 72 $^{\circ}$ C, 5 分钟。

如下所述纯化包含葡糖淀粉酶基因终止子的 800 bp 片段并直接使用。

利用 TOPO-TA 克隆试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA), 根据制造商的指导将葡糖淀粉酶基因启动子(实施例 7)和终止子 PCR 产物亚克隆到 pCR2.1 载体中。利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒, 在 1%琼脂糖-TBE 凝胶上电泳后, 分离包含葡糖淀粉酶基因启动子的 1.1 kb 的 *SpeI/XhoI* 片段。以同样的方式分离葡糖淀粉酶基因终止子, 然而由于内部的 *SphI* 位点, 用 *SpeI/SphI* 消化产生 554 bp 的片段。将启动子和终止子连接到 pBluescript SK- (Stratagene, La Jolla, CA)的 *SpeI* 位点中产生 pMBin05(图 5)。

通过限制性内切酶消化从 pMBin05 移出 *SpeI* 片段并在 1%琼脂糖-TBE 凝胶上电泳后利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒纯化。将分离的片段转化入黑曲霉 SMO110 (实施例 6)以利用实施例 1 中所描述的转化方法删除 *pyrG* 断裂的葡糖淀粉酶位点。在将转化体接种到 5-FOA 上来选择减去 *pyrG* 的表型前(参见实施例 5), 进行生长以在选择前提供更多的时间用于重组。在补充有 5%葡萄糖, 0.9 M 蔗糖, 和 10 mM 尿嘧啶核苷的 5 ml YP 培养基中在 37 $^{\circ}$ C 和 100 rpm 生长 24 小时。

获得 9 个转化体, 当转入实施例 5 中所描述的选择培养基时一个保持 *pyrG* 表型。将保持 *pyrG*-表型的转化体指定为黑曲霉 MBin111。

对黑曲霉葡糖淀粉酶和 *pyrG* 基因产生探针。利用实施例 4 中所描述的不同方法, 使用上述的引物 3 和 5 来从 pJRoy17PCR 扩增 *gla* 基因(包括启动子和终止子), 使用引物 1 和 2 (参见实施例 4)来从 pJRoy10 扩增 *pyrG* 终止子序列。如实施例 2 所描述的分选和标记探针。

如实施例 2 所描述的, 从黑曲霉菌株 JRoy3、SMO110、和 MBin111 分离基因组 DNA, 用 *SpeI* 消化, 并根据实施例 2 所描述的用于 Southern 分析的方法用黑曲霉葡糖淀粉酶基因检测。在黑曲霉 JRoy3 中观察到表示未断裂的 *gla* 基因座的 4 kb 条带和 6.3 kb 的条带, 这是由于插入了从黑曲霉

SMO110 获得的断裂盒。用来自黑曲霉 MBin111 的基因组 DNA 没有检测到杂交,表示已经缺失了葡糖淀粉酶基因。此外,用 *pyrG* 终止子序列检测用 *SpeI* 消化的 DNA,再次没有在黑曲霉 MBin111 菌株中观察到杂交,但是黑曲霉 SMO110 保持有 6.3 kb 的条带。这些结果表示在黑曲霉 MBin111 中缺失了全部的葡糖淀粉酶基因座和 *pyrG* 基因。

实施例 8: 黑曲霉 MBin112 ($\Delta asa, \Delta pyrG, \Delta gla$) 的构建

分离部分的黑曲霉酸稳定的 α -淀粉酶基因(*asa*)并如美国专利号 5,252,726 所描述的克隆到 pUC19 (Roche Diagnostics Corporation, 曼海姆, 德国)中。通过用 *HpaI* 消化从包含部分酸稳定的 α -淀粉酶基因的 pUC19 切下部分酸稳定的 α -淀粉酶基因的起始密码子 346 bp 上游的 101 bp 片段,并通过平末端连接将来自 pMBin01 (实施例 4)的 *SpeI* 片段插入这个位点以产生 pMBin04+ (图 6)。用 *SmaI* 和 *SpeI* 进行 pMBin04+ 的二重消化,在 1% 琼脂糖-TBE 凝胶上电泳后利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒分离 4237 bp 的 *SmaI/SpeI* 片段。4237 bp 的 *SmaI/SpeI* 片段由酸稳定的 α -淀粉酶基因的 5' 末端、*pyrG* 终止子、全部的 *pyrG* 基因(包括终止子)、和酸稳定的 α -淀粉酶基因的 3' 末端组成。

利用实施例 1 中描述的转化方法,用来自 pMBin04+ 的 *SmaI/SpeI* 片段转化黑曲霉菌株 MBin111。在基本培养基上总共获得 160 个转化体。然后将转化体转入淀粉苯胺蓝平板以筛选缺乏酸稳定的 α -淀粉酶活性的转化体。16 个转化体几乎没有产生澄清带,在补充有 10 mM 尿嘧啶核苷的基本培养基上分离单个集落两次。

从酸稳定的 α -淀粉酶基因座 PCR 扩增 522 bp 的片段,用作 Southern 印迹分析中的探针。用引物 7 和 8 产生探针。

引物 7: 5'-CTCATTGGCCGAAACTCCGAT-3'(SEQ ID NO: 11)

引物 8: 5'-AGCAGACGATGTCCTGAGCTG-3'(SEQ ID NO: 12)

在 50 μ l 的反应物中进行 522 bp 片段的 PCR 扩增,其由 10 ng pUC19/HW360 质粒 DNA, 50 pmol 每种引物, 2.5 mM 每种 dATP、dCTP、dGTP、和 dTTP, 具有 2.5 mM $MgCl_2$ 的 1 $\times$ PCR 缓冲液,以及 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶组成。在 RoboCycler 40 热循环仪中进行反应,程序为 1 个循环的 95 $^{\circ}C$, 3 分钟; 30 个循环的 95 $^{\circ}C$, 1 分钟, 55 $^{\circ}C$, 1 分钟和 72 $^{\circ}C$, 1 分钟; 以

及 1 个循环的 72°C, 5 分钟。

如实施例 2 所描述的分离和标记 522 bp 的探针。

如实施例 2 所描述的从 16 个转化体和作为对照的未转化黑曲霉菌株 MBin111 分离基因组 DNA。然后用 *XhoI* 和 *SpeI* 消化基因组 DNA, 利用上述探针如实施例 2 中所描述的进行 Southern 杂交。完整的酸稳定的 α -淀粉酶基因座显示为 2.3 kb 的条带而断裂位点是 5.3 kb 大小。这个大小差异是由于插入了实施例 4 中所描述的 3 kb pMBin01+ *SpeI* 片段。获得包含酸稳定的 α -淀粉酶基因断裂的 5 个转化体, 将 1 个指定为黑曲霉 MBin112。黑曲霉菌株 MBin113 中产生的断裂盒的环突出留下了 *pyrG* 终止子并产生了 2.8 kb 的条带。如实施例 5 所描述的进行环突出并产生黑曲霉 MBin113。

实施例 9: 黑曲霉 MBin114 ($\Delta prtT, \Delta asa, \Delta pyrG, \Delta gla$) 的构建

利用 WO 00/20596 中描述的 2 个重叠的克隆, NcE 1.4 和 CIE 1.8 构建黑曲霉 *prtT* 基因 (SEQ ID NOs: 13 DNA 序列) 和 14 [推导的氨基酸序列] (pMBin09, 图 7)。用 *PstI* 消化 NcE 1.4, CIE 1.8, 和 pZeRO-2 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 分别在克隆的 5' 和 3' 末端产生 *PstI* 位点, 并且在多克隆位点使 pZeRO-2 线性化。利用 *prtT* 克隆的共享区中的 *SspI* 位点, 通过在 *PstI* 位点将 *PstI/SspI* 克隆片段连接到 pZeRO-2 中进行三线连接产生 pMBin09。

通过用 *Bst1107I/SspI* 消化 pMBin09 首先产生 233 bp 缺失的 *prtT* 编码序列, 将实施例 4 中描述的 pMBin01 *SpeI* 片段作为平端片段插入到消化的 pMBin09 中以产生 pMBin10 (图 8)。利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒在 1% 琼脂糖-TBE 凝胶上电泳后分离来自 pMBin10 的 *DraIII/NheI* 片段, 用其进行 *prtT* 断裂。

利用实施例 1 中描述的转化方法, 用来自 pMBin10 的 *DraIII/NheI* 片段转化黑曲霉 MBin113。在酪蛋白平板上筛选 102 个转化体。9 个转化体几乎没有或没有显示澄清带, 在补充有 10 mM 尿嘧啶核苷的基本培养基上分离单个集落两次。

从 pMBin10 中的 *prtT* 基因座 PCR 扩增 232 bp 片段的 *prtT* 编码序列并且用作 Southern 印迹中的探针。利用引物 9 和 10 产生该片段。

引物 9: 5'-TGTGATTGAGGTGATTGGCG-3' (SEQ ID NO: 15)

引物 10: 5'-TCAGCCACACCTGCAAAGGC-3' (SEQ ID NO: 16)

在 50 μ l 的反应物中进行 PCR 扩增, 其由 10 ng pMBin10 质粒 DNA, 50 pmol 每种引物, 2.5 mM 每种 dATP、dCTP、dGTP、和 dTTP, 具有 2.5 mM MgCl₂ 的 1 $\times$ PCR 缓冲液, 以及 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶组成。反应在 RoboCycler 40 热循环仪中进行, 程序为 1 个循环的 95 $^{\circ}$ C, 3 分钟; 30 个循环的 95 $^{\circ}$ C, 1 分钟, 60 $^{\circ}$ C, 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C, 1 分钟; 以及 1 个循环的 72 $^{\circ}$ C, 5 分钟。

如实施例 2 所描述的分离和标记探针, 其包含断裂的 232 bp 的 *prrT* 编码序列下游。

如实施例 2 所描述的从 9 个转化体, 以及作为对照的黑曲霉 Bo-1 和黑曲霉 MBin112 分离基因组 DNA, 并且如实施例 2 所描述的进行 Southern 分析。用 *Pst*I 消化基因组 DNA, 在对照菌株中观察到相应于未断裂的 *prrT* 基因的 2.5 kb 条带。当探针与包含 132 bp 的 *pyrG* 终止子和 1198 bp 的 *prrT* 基因的 *Pst*I 片段杂交时观察到相应于 *prrT* 基因断裂的 1.3 kb 条带。选择 1 个断裂体并指定为黑曲霉 MBin114。如实施例 5 所描述的外环化(looped out) *pyrG* 基因产生黑曲霉 MBin115。

实施例 10 :黑曲霉 MBin116 ($\Delta amyB, \Delta prrT, \Delta asa, \Delta pyrG, \Delta gla$)的构建

如美国专利号 5,252,726 中所公开的内容克隆黑曲霉中性 α -淀粉酶基因, *amyA* 和 *amyB* (NA1 = *amyA* 而 NA2 = *amyB*)。

通过 *Eco*RI/*Bgl*II 消化, 并利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒在 1%琼脂糖-TBE 凝胶上电泳后分离, 从 pTaka17 (美国专利号 5,536,661)分离 2.6 kb 片段的黑曲霉中性 α -淀粉酶基因(*amyB*) (SEQ ID NOs :17 [DNA 序列]和 18 [推导的氨基酸序列])。将 2.6 kb 片段插入 pZero2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA)的 *Eco*RI/*Bam*HI 位点以产生 pMBin02 (图 9)。通过 *Pme*I/*Sma*I 消化在 pMBin02 中产生从同源 *amyB* 基因的第 5 个外显子除去 186 bp 和从第 6 个外显子除去 52 bp 的 298 bp 缺失, 并通过平末端连接插入 pMBin01 2696 bp *Spe*I 片段 (实施例 4 中描述的)以产生 pMBin03 (图 10)。

利用实施例 1 中描述的方法用分离来自 pMBin03 的 *Eco*RI/*Avr*II 片段转化黑曲霉 MBin115。获得 192 个转化体, 如实施例 8 所描述的转入淀粉苯胺蓝平板, 其中有下列改变: 淀粉苯胺蓝平板缺乏甘氨酸并且 pH 是至少 5。8 个转化体显示减少的澄清带, 在补充有 10 mM 尿嘧啶核苷的基本培养基上分离单个集落两次。

利用引物 11 和 12 PCR 扩增产生具有相应于黑曲霉 *amyA* 或 *amyB* 编码序列的 295 bp, ATG 位点的 450 bp 下游(在该区域中 *amyA* 和 *amyB* 序列是相同的)的序列的探针。

引物 11: 5'-GGCAGCAGGATATGTAAGTCG-3' (SEQ ID NO: 19)

引物 12: 5'-CACTGTAATCGACTGAGCTAC-3' (SEQ ID NO: 20)

在 50 μ l 反应物中进行 PCR, 其由 10 ng pMBin03 质粒 DNA, 50 pmol 每种引物, 2.5 mM 每种 dATP、dCTP、dGTP、和 dTTP, 具有 2.5 mM MgCl₂ 的 1 $\times$ PCR 缓冲液, 以及 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶组成。在 RoboCycler 40 热循环仪中进行反应, 程序为 1 个循环的 95 $^{\circ}$ C, 3 分钟; 30 个循环的 95 $^{\circ}$ C, 1 分钟, 60 $^{\circ}$ C, 1 分钟, 和 72 $^{\circ}$ C, 1 分钟; 以及 1 个循环的 72 $^{\circ}$ C, 5 分钟。

如实施例 2 所描述的分离和标记探针。如实施例 2 所描述的从 8 个转化体和作为对照的未转化黑曲霉 MBin115 分离基因组 DNA 并用 *Eco*RI 和 *Bsp*LU11I 消化。利用实施例 2 中描述的方法对消化的基因组 DNA 进行 Southern 分析。起始密码子的 616 bp 上游存在 *Eco*RI 位点, 终止密码子的 99 bp 下游存在 *Bsp*LU11I 位点。野生型黑曲霉菌株 Bo-1 *amyB* 基因条带是 2659 bp。断裂的 *amyB* 基因导致 2659 bp 条带的消失, 并且由于插入 pMBin01 *Spe*I 片段, 在 5359 bp 显示条带。

1 个转化体包含清楚的断裂并被指定为黑曲霉 MBin116。如实施例 5 所描述的从黑曲霉 MBin116 切下 *pyrG* 基因, 并将该菌株指定为黑曲霉 MBin117。

实施例 11: 黑曲霉 MBin118 ($\Delta amyA, \Delta amyB, \Delta prtT, \Delta asa, \Delta pyrG, \Delta gla$) 的构建

因为黑曲霉 *amyA* 基因序列与 *amyB* 是基本上相同的, 除在 3' 末端 (Korman 等, 1990, *Current Genetics* 17: 203-212) 之外, 因此应用实施例 10 中所使用的断裂构建和方法。根据实施例 1 中描述的方法用来自 pMBin03 的 *Eco*RI/*Avr*II 片段转化黑曲霉 MBin117, 以便断裂 *amyA* 基因 (SEQ ID NOs: 21 DNA 序列]和 22 [推导的氨基酸序列])。

获得 356 个转化体并如实施例 10 所描述的转入淀粉苯胺蓝平板。在补充有 10 mM 尿嘧啶核苷的基本培养基上分离在淀粉苯胺蓝平板上没有产生澄清带的 4 个转化体的单个集落两次。

从 4 个转化体和作为对照的黑曲霉 MBin117 分离基因组 DNA 并利用实

实施例 2 中描述的方法进行 Southern 分析。用 *EcoRI* 和 *BspLU11I* 消化基因组 DNA 并如实施例 10 所描述的进行检测。在野生型黑曲霉 Bo-1 菌株中存在相应于 *amyB* 基因的 2.7 kb 条带和表示 *amyA* 基因的略大的条带。*amyA* 条带的确切大小不是已知的,因为 *BspLU11I* 在 *amyA* 基因下游的未知位点有切割。在 1 个分析的转化体中,相应于 *amyA* 基因的条带不再是用探针可检测到的,表明已经存在包括探针位置的 *amyA* 基因的缺失。将该转化体指定为黑曲霉 MBin118。如实施例 5 所描述的从黑曲霉 MBin118 切下 *pyrG* 基因,并将该菌株指定为黑曲霉 MBin119。

实施例 12: 黑曲霉 MBin120 ($\Delta oxa, \Delta amyA, \Delta amyB, \Delta prtT, \Delta asa, \Delta pyrG, \Delta gla$) 的构建

根据 WO 00/50576 中描述的方法克隆黑曲霉草酸水解酶(*oah*)基因(SEQ NOs: 23 [DNA 序列]和 24 [推导的氨基酸序列])。如 WO 00/50576 所描述的构建质粒 pHP1。

通过用 *BstEII* 消化 pHP1 除去 285 bp 的缺失,其包括 156 bp 的启动子和 129 bp 的草酸水解酶基因编码序列。将实施例 4 中描述的 pMBin01 *SpeI* 片段平末端连接到这个位点中以产生 pMBin08 (图 11)。用 *NotI* 消化质粒 pMBin08,在 1%琼脂糖-TBE 凝胶上电泳后利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒分离 7155 bp 的片段。来自 pMBin08 的 *NotI* 片段用来断裂黑曲霉 MBin119 中的草酸水解酶基因。

利用实施例 1 中描述的转化方法,用来自 pMBin08 的 *NotI* 片段转化黑曲霉 MBin119。获得 49 个转化体,利用 Sigma 草酸酯试剂盒(编号 591, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO)筛选草酸酯的产生。通过将密度为每 ml 大约 10^4 个转化体的分生孢子接种到包含补充有 5%葡萄糖的 20 ml YP 培养基的 125 ml 摇瓶中而在摇瓶中培养转化体。在 37°C 和 200 rpm 培养摇瓶 3 至 6 天。在第 3 天移出 5 μ l 的摇瓶培养物样品并离心以产生上清液用于酶活性测定。将第 3 天的上清液加入 96 孔平板的孔中,然后按照制造商的说明加入 1/10 体积的草酸酯试剂盒试剂。在 590 nm 分光光度测量草酸酯的产量。1 个转化体没有产生可检测的草酸酯,在补充有 10 mM 尿嘧啶核苷的基本培养基上分离单个集落两次。

利用引物 13 和 14 从草酸水解酶基因内(起始密码子下游的 404 bp)PCR 扩增包括 579 bp 序列的片段用作 Southern 印迹分析中的探针。

引物 13: 5'-CTACGACATGAAGACCAACGC-3' (SEQ ID NO: 25)

引物 14: 5'-GCACCGTTCTCCACCATGTTG-3' (SEQ ID NO: 26)

在 50 μ l 的反应物中进行 PCR 扩增, 其由 10 ng pMBin08 质粒 DNA, 50 pmol 每种引物, 2.5 mM 每种 dATP、dCTP、dGTP、和 dTTP, 具有 2.5 mM MgCl₂ 的 1 $\times$ PCR 缓冲液, 以及 2.5 单位的 Taq DNA 聚合酶组成。在 RoboCycler 40 热循环仪中进行反应, 程序为 1 个循环的 95 $^{\circ}$ C, 3 分钟; 30 个循环的 95 $^{\circ}$ C, 1 分钟, 60 $^{\circ}$ C, 1 分钟, 和 72 $^{\circ}$ C, 1 分钟; 以及 1 个循环的 72 $^{\circ}$ C, 5 分钟。

如实施例 2 所描述的分离和标记探针。如实施例 2 所描述的从转化体, 以及作为对照的黑曲霉 Bo-1 和黑曲霉 MBin118 分离基因组 DNA, 并且用 *Nde*I 和 *Ssp*I 消化。用上述探针对黑曲霉对照菌株 Bo-1 和 MBin118 的 Southern 分析显示相应于未断裂草酸水解酶基因的 2.5 kb 条带。该转化体具有与在草酸水解酶基因座插入断裂盒一致的 4.9 kb 条带。将该转化体指定为黑曲霉 MBin120。

实施例 13 :黑曲霉普通宿主菌株的表达分析

通过在摇瓶和/或发酵罐中培养菌株评估普通宿主黑曲霉菌株产生葡糖淀粉酶、酸稳定的 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶、和蛋白酶的能力。黑曲霉 Bo-1 作为对照。

将密度为每 ml 大约 10^4 的黑曲霉菌株分生孢子接种到包含补充有 5% 葡萄糖的 20 ml YP 培养基的 125 ml 摇瓶中。摇瓶在 37 $^{\circ}$ C 和 200 rpm 培养 3 至 6 天。在第 3-6 天移出摇瓶培养物样品, 离心产生用于酶活性测定的上清液。

也将黑曲霉菌株接种到包含 1.8 升培养基的 2 升发酵罐中, 培养基组成为每升 2 g MgSO₄·7H₂O, 2 g KH₂PO₄, 2 g 柠檬酸, 2 g K₂SO₄, 0.5 ml AMG 微量金属溶液, 300 g 高麦芽糖糖浆, 1.8 g CaCl₂·2H₂O 和 1.8 ml 普朗尼克酸 (pluronic acid)。培养的发酶培养基是组成为每升 50 g 尿素和 5 ml 普朗尼克酸的培养基。发酵条件是 34 $^{\circ}$ C, pH 4.5 $\pm$ 0.05, 1.0 vvm 曝气(aeration), 和 1000 rpm 进行 8 天。在第 1-8 天移出发酵样品, 离心产生用于酶活性测定的上清液。

在 25 $^{\circ}$ C, pH 4.3 的 0.1 M 醋酸钠中利用麦芽糖作为底物测量葡糖淀粉酶活性。根据制造商的指导, 利用 Sigma Trinder 显色试剂(Sigma reagent kit

315-100, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)在 490 nm 测量葡萄糖。AMG™ (Novozymes A/S, Bagsværd, 丹麦; 批次 7-195)用作以 AGU/ml 测量的具有葡萄糖淀粉酶活性的标准物。

确定黑曲霉 SMO110 没有产生可检测的葡萄糖淀粉酶活性(在第 4 天的摇瓶样品中小于 0.5 AGU/ml)。确定黑曲霉 MBin111 没有产生可检测的葡萄糖淀粉酶活性(在第 4 天的摇瓶或发酵样品中小于 0.5 AGU/ml)。

分别在 pH 4.5 和 pH 7.0, 利用 Sigma α -淀粉酶底物(Sigma Kit #577, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)在 30°C 测量酸稳定的和中性 α -淀粉酶活性。检测是在 405 nm。Fungamyl™ 用作标准物并且以 FAU/ml 报告活性。

与黑曲霉 Bo-1 (在第 5 天的发酵样品中为 51 FAU/ml)相比, 对于黑曲霉 MBin113、MBin116 和 MBin118 (在第 3 天的摇瓶或发酵样品中都 >0.1 FAU/ml)发现几乎不能检测到酸稳定的 α -淀粉酶活性。与发酵样品中的黑曲霉 Bo-1 相比, 对于黑曲霉 MBin114 (来自第 3 天的摇瓶样品为未检测到和在第 5 天的发酵样品中为 5.7 FAU/ml)中性 α -淀粉酶活性基本上减少了, 而对于黑曲霉 MBin118 (在第 5 天的发酵样品中为 0.5 FAU/ml)几乎不能检测到。

利用 FITC-酪蛋白作为底物(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)确定总的蛋白酶活性。通过混合 40 μ l 的 FITC-干酪素底物(储液: 1:1, 具有 0.1 M 磷酸钾, pH 6.0 或 0.1 M 柠檬酸钠, pH 5.0)和在 0.1 M 磷酸钾 pH 6.0 或 0.1 M 柠檬酸钠 pH 5.0 中适当稀释的 10 μ l 培养物样品, 然后在 37°C 孵育该溶液 1 小时而进行测定。孵育 1 小时后, 用 150 μ l 的 5%三氯乙酸淬灭反应并在冷藏室中孵育 1 小时。将淬灭的反应物转入 Eppendorf 试管并离心 10 分钟。将 10 μ l 等分的上清液转入包含 1ml 0.5 M 硼酸盐 pH 9.0 的试管并混合。将 200 μ l 等分的溶液转入黑色的“U”底 96 孔平板(ThermoLabsystems, Franklin, MA)。利用 Fluorolite 1000 仪器(ThermoLabsystems, Franklin, MA), 用参考通路 3 和设置为 1176 测量荧光。以蛋白酶荧光单位测量活性。

对于黑曲霉 MBin114 中 *priT* 基因的缺失, 总的蛋白酶活性降低到黑曲霉 Bo-1 的大约 20%。第 6 天的 MBin114 发酵样品具有 692 的蛋白酶活性, 而 Bo-1 是至少 3953 荧光单位/ml。

实施例 14: 南极假丝酵母脂肪酶 B 在黑曲霉 MBin114、MBin118 和 MBin120 中的表达

如美国专利号 6,020,180 所描述的克隆假丝酵母南极洲脂肪酶 B 基因 (SEQ ID NOs: 27 [DNA 序列]和 28 [推导的氨基酸序列])。如 Hoegh 等在 *Can. J. Bot.* 73 (Suppl.1): S869-S875 (1995)中所描述的构建包含脂肪酶 B 基因的质粒 pMT1335。如 WO 91/17243 所描述的构建包含构巢曲霉 *amdS* 基因的质粒 pTOC90。根据实施例 1 中描述的方法将质粒 pMT1335 和 pTOC90 共转化入黑曲霉 MBin114, 并且在乙酰胺上选择转化体。

通过划线至乙酰胺平板分离 30 个转化体。从转化体收集分生孢子, 用于如实施例 13 所描述的接种于摇瓶。在第 3-6 天移出摇瓶培养物样品, 离心产生用于酶活性测定的上清液。

为了评估 *pvtT* 基因的断裂对蛋白酶活性的总水平的影响, 和南极假丝酵母脂肪酶 B (CLB)的产率, 确定蛋白酶和脂肪酶 B 的活性。通过发酵评估产生脂肪酶 B 的几个转化体和最高的生产体。

如实施例 13 所描述的, 在 2 升的发酵罐中培养黑曲霉 MBin114 和作为对照的黑曲霉 Bo-1。

如实施例 9 所描述的测量总的蛋白酶活性。

在 pH 7, 用 p-硝基苯基丁酸(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)作为底物进行脂肪酶 B 测定。在 0.1 M MOPS-4 mM CaCl₂ pH 7.0 中适当稀释培养物上清液。将 100μl 等分的培养物上清液加入在 96 孔微平板孔中的 100μl 的 p-硝基苯基丁酸底物溶液。p-硝基苯基丁酸底物溶液由 10μl 的 p-硝基苯基丁酸, 990μl 的 DMSO, 和 4ml 的 0.1 M MOPS -4 mM CaCl₂ pH7.0 组成。用南极假丝酵母脂肪酶 B 标准物(Novozymes Japan Ltd., Chiba-shi, 日本)来计算 LU/ml, 在 405 nm 分光光度测量脂肪酶活性。

图 14 显示了这些测定的结果。总的蛋白酶活性降低到野生型的大约 20% (参见实施例 13, 图 12), 脂肪酶 B 活性在发酵的自始至终稳定地上升(图 13)。

实施例 15: 嗜热柱顶孢过氧化氢酶在黑曲霉 MBin114、MBin118 和 MBin120 中的表达

如美国专利号 5,646,025 所描述的克隆嗜热柱顶孢过氧化氢酶基因(SEQ ID NOs: 29 [DNA 序列]和 30 [推导的氨基酸序列])。如美国专利号 5,646,025 所描述的构建包含过氧化氢酶基因的质粒 pDM153。根据实施例 1 描述的方法将质粒 pDM153 转化入黑曲霉菌株 MBin114、MBin118 和 MBin120。

选择 40 个转化体，在包含 1.5 ml 1:4 稀释度的 M400 培养基的 24 孔平板中培养。在 34°C 和 125 rpm 培养平板 90 小时。在第 90 个小时移出样品用于测定。在发酵罐中评估产生最高水平的过氧化氢酶活性的 3 个转化体。

在 25°C，包含 18.2 μ l 过氧化氢储液的 10 mM 磷酸盐 pH 7 缓冲液中测量过氧化氢酶活性。过氧化氢储液由每 10 ml 10 mM 磷酸钾 pH 7 的 30% 过氧化氢组成。将 25 μ l 等分的培养物上清液加入在 96 孔微平板孔中的 25 μ l 的过氧化氢储液。孵育 5 分钟后，加入 200 μ l 的钛试剂，在 405 nm 读取吸光率。钛试剂由 1.0 g 二氧化钛和 10 g K₂SO₄ 组成，其用 150 ml 浓缩的 H₂SO₄ 在 180-220°C 消化 2-3 小时，冷却，然后用 1.5 升去离子水稀释。利用 Catazyme (Novozymes A/S, Bagsværd, 丹麦, 批次 31-2197) 作为标准物，并以 KCIU/ml 报告在 405 nm 分光光度测量过氧化氢酶活性。

如实施例 13 所描述的，在 2 升发酵罐中培养黑曲霉菌株 MBin114、MBin118 和 MBin120。

图 14 显示了黑曲霉普通宿主菌株 MBin114、MBin118 和 MBin120 中嗜热柱顶孢过氧化氢酶生产的比较。在任何测试的菌株中没有观察到酶生产量的明显变化。

在此所描述和要求的本发明不限于在此所公开的由特定方面所限制的范围，因为这些方面旨在例证说明本发明的几个方面。任何等效方面限定为是在本发明的范围内的。实际上，除在此所显示和描述的实施方案外，从上述说明书看来，本发明的各种改变对于本领域的技术人员来说是显而易见的。这种改变也是属于所附的权利要求的范围内的。就分歧来说，包括定义的本公开的内容将进行控制。

在此引用多种参考文献，其公开的内容全部引入作为参考。

序列表

<110> 诺维信股份有限公司 (NOVOZYMES, INC.)

<120> 在缺乏酶的黑曲霉突变体中生产生物物质的方法

<130> 10345.204-WO

<160> 30

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1517

<212> DNA

<213> 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)

<400> 1

```

gcagggaaaa atacgagctc caatgaacct ggggtgtggca acttcaatgg aaaggaactg      60
cctttgcagg tgtggctgaa cccacggtt ccggtcggag gcggcgaaat caccgatgt      120
ggctggtgcg tggagggtcg cgatgattta ctgagctcct cttttgctcg acattgaatg      180
tgcattgttc acctcatata agggccagtc gctgctaaat tattcggtag tatttgcgca      240
tctctggatc taccaattag ggcctatcag tcgaaactcc aagctactca tattgcacaa      300
gcctctttca tccccgcatt aacccctcca ccgacaccat gtcctccaag tcgcaattga      360
cctacactgc ccgtgccagc aagcacccca atgctctggc caagcggctg ttcgaaattg      420
ctgaggccaa gaagaccaat gtgaccgtct ctgccgacgt taccaccact aaggagctac      480
tagatcttgc tgaccgtagg ccgaccgcc attctgcctg tttatgctgc atacaaactt      540
attaacggtg ataccggact gaggtctcgg tccctacatc gccgtgatca aaaccacat      600
cgatatcctc tctgacttca gcgacgagac cattgagggc ctcaaggctc ttgcgcagaa      660
gcacaacttc ctcatcttcg aggaccgcaa attcatcgac attggcaaca ctgtccagaa      720
gcaataccac cgtggtaccc tccgcatctc agaatgggcc catatcatca actgcagcat      780
cctgccttgc gaggtatcgc tcgaggctct cgctcagacg gcgtctgcac cggacttctc      840
ctacggcccc gaacgtggtc tgttgatctt ggcggaaatg acctctaagg gttccttggc      900
caccggccag tacactactt cttcggttga ttatgcccg aaatacaaga acttcgtcat      960
gggattttgtg tcgaccgct cgttgggtga ggtgcagtcg gaagtcagct ctccttcgga      1020
tgaggaggac tttgtggtct tcacactgg tgtgaacatt tcgtccaagg gagataagct      1080
cggtcagcag taccagactc ccgcatcggc tatcggtcgg ggtgctgact tcattatcgc      1140
gggtcgcggt atctacgcc gcgccgaccc ggtgcaggct gcgcaacagt accagaagga      1200
aggttgggag gcgtacctgg cccgtgtcgg cggaaactaa tactataaaa tgaggaaaaa      1260
agttttgatg gttatgaatg atatagaaat gcaacttgcc gctacgatac gcatacaaac      1320
taatgtcgag cacgggtagt cagactgcgg catcggatgt caaaacggta ttgatcctgc      1380
aggctattat agggltggcac gggattaatg cggtagcagc atttgatgca gataagcagg      1440
ctgcgaagta cttagtctcg taactcttgc gtagagcaaa tggcgacggg tggttgataa      1500
gggacggtga taagctt                                     1517

```

<210> 2
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 2

```

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

```

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 3	
gggactagtg gatcgaagtt ctgatgtta	30
<210> 4	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)	
<400> 4	
ataccgcggg tttcaaggat ggagatagga	30
<210> 5	
<211> 2103	
<212> DNA	
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)	
<400> 5	
tcccttttag gcgcaactga gagcctgagc ttcattccca gcatcattac acctcagcaa	60
tgtcgttccg atctctactc gccctgagcg gccctcgtctg cacagggttg gcaaatgtga	120
tttccaagcg cgcgaccttg gattcatggt tgagcaacga agcgacctg gctcgtactg	180
ccatcctgaa taacatcggg gcggacggtg cttgggigtg gggcgcggac tctggcattg	240
tcgttcttag tcccagcacg gataacccgg actacttcta cacctggact cgcgactctg	300
gtctcgtcct caagaccctc gtcatctct tccgaaatgg agataccagt ctctctcca	360
ccattgagaa ctacatctcc gcccaggcaa ttgtccaggg tatcagtaac ccctctggtg	420
atctgtccag cggcgtggt ctcggtgaac ccaagttaa tgcgatgag actgcctaca	480
ctggttcttg gggacggccg cagcgagatg gtccggctct gagagcaact gctatgatcg	540
gcttcgggca gtggctgctt gacaatggct acaccagcac cgcaacggac attgtttggc	600
ccctcgttag gaacacctg tcgtatgtgg ctcaatactg gaaccagaca ggatgatc	660
tctgggaaga agtcaatggc tcgtcttctt ttacgattgc tigtcaacac cgcgcccttg	720
tcgaaggtag tgccttcgag acggccgtcg gctcgtcctg ctctgtgtg gattctcagg	780
caccgaaat tctctgtac ctgcagtcct tctggaccgg cagcttcatt ctggccaact	840
tcgatagcag ccgttcggcg aaggacgcaa acaccctcct gggaagcatc cacaccttg	900
atcctgagcg cgcatgcgac gactccacct tccagccctg ctccccgcgc gcgctcgcca	960
accacaagga ggttgtagac tctttcgtc caatctatac cctcaacgat ggtctcagt	1020
acagcgagcg tgttgcggtg ggtcgggtacc ctgaggacac gtactacaac ggcaaccgt	1080
ggttcctgtg caccttggtt gccgcagagc agttgtacga tgctctatac cagtgggaca	1140
agcaggggtc gttggaggtc acagatgtgt cgttgactt cttcaaggca ctgtacagcg	1200
atgctgctac tggcacctac tcttcgtcca gttcgactta tagtagcatt gtagatgccg	1260
tgaagacttt cgccgatggc ttcgtctcta ttgtggaaac tcacgccgca agcaacggct	1320
ccatgtccga gcaatacgac aagtctgatg gcgagcagct ttccgctcgc gacctgacct	1380
ggtcttatgc tgctctgtg accgccaaca accgtcgtaa ctccgtcgtg cctgcttctt	1440
ggggcgagac ctctgccagc agcgtgcccg gcacctgtgc ggccacatct gccattggta	1500

```

cctacagcag tgtgactgtc acctcgtggc cgagtatcgt ggctactggc ggcaccacta 1560
cgacggctac cccactgga tccggcagcg tgacctcgac cagcaagacc accgcgactg 1620
ctagcaagac cagcaccagt acgtcatcaa cctcctgtac cactcccacc gccgtggctg 1680
tgactttcga tctgacagct accaccacct acggcgagaa catctacctg gtcggatcga 1740
tctctcagct ggggtgactgg gaaaccagcg acggcatagc tctgagtgtg gacaagtaca 1800
cttccagcga cccgctctgg tatgtcactg tgactctgcc ggctgggtgag tcgtttgagt 1860
acaagtttat ccgcattgag agcgatgact ccgtggagtg ggagagtgat cccaaccgag 1920
aatacaccgt tcctcaggcg tgcggaacgt cgaccgagc ggtgactgac acctggcggt 1980
gacaatcaat ccatttcgct atagttaaag gatggggatg agggcaattg gttatatgat 2040
catgtatgta gtgggtgtgc ataatagtag tgaaatggaa gccaagtcac gtgattgtaa 2100
tcg 2103

```

<210> 6
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉(*Aspergillus niger*)

<400> 6

```

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

```

Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg
 210 215 220
 Ala Leu Val Glu Phe Thr Gly Ser Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser
 225 230 235 240
 Ser Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu
 245 250 255
 Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser
 260 265 270
 Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe
 275 280 285
 Asp Phe Thr Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ser Thr Phe Gln Pro Cys
 290 295 300
 Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Glu Val Val Asp Ser Phe Arg
 305 310 315 320
 Ser Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser Asp Ser Glu Ala Val Ala
 325 330 335
 Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro Phe Thr
 340 345 350
 Trp Phe Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Leu
 355 360 365
 Tyr Gln Trp Asp Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr Asp Val Ser Leu
 370 375 380
 Asp Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr Gly Thr Tyr Ser
 385 390 395 400
 Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Phe Thr Ala Val Lys
 405 410 415
 Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala Ala Ser
 420 425 430
 Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu Gln Leu
 435 440 445
 Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr Ala Asn
 450 455 460
 Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Phe Thr Ala Ser Trp Gly Glu Thr
 465 470 475 480
 Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly
 485 490 495
 Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr
 500 505 510
 Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr
 515 520 525
 Ser Thr Ser Lys Thr Phe Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr
 530 535 540
 Ser Thr Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr
 545 550 555 560
 Phe Asp Leu Thr Ala Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val
 565 570 575

Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr Ser Asp Gly Ile Ala
580 585 590

Leu Ser Phe Thr Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr
595 600 605

Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile
610 615 620

Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg
625 630 635 640

Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Phe
645 650 655

Thr Thr Asp Thr Trp Arg
660

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 7
actagtggcc ctgtaccag a 21

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 8
gcatgcattg ctgaggtgta atgatg 26

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 9
gaggtcgacg gtatcgataa g 21

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 10
gcatgcagat ctcgagaata caccgttcct cag 33

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 11
ctcattggcc gaaactccga t 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 12	
agcagacgat gtcctgagct g	21
<210> 13	
<211> 4098	
<212> DNA	
<213> 黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	
<400> 13	
ttggtgctgg aaagccatt taaggatct tataaggtaa ttgccaatgt tcagtcgcct	60
atggtctttg tcgagagaaa ctctttctcg ttaagatcta catgatcgct tttgattttc	120
tctgggttca cgcggtactt tctccccgtc aatccccaac cgctgtttgtg cctgaccatc	180
aatgtggaac ggataagggg acaagagaaa ttgaaggagc gatcataaaa agctaatttt	240
ggtttattat tttttttct tataaaactc aaaaaagaaa acgaaaacga aaaaggaaaa	300
aagaaaaggt aaaaaggaaa aagaaaggcg gtcatacatt ccaataacca tcagccaaag	360
atacagacga gttactgacc ttcttatcct ggacttccgc ccgatccata tcttcatgat	420
aagcagggaa ccgaacaaat caacccaac ttcagcggca gttcctcact aatttccac	480
tccccaccgg cgtcattttg gtcccaaccc cctccctgga agcagcggga tttagttagc	540
atccggttta catcggagac tcggaataa ccatagcgca tgccaatcaa aacccctccc	600
agggtgactg gccagtatca cgaccattg tttctatctt tctagaagac ctgcagggac	660
atggattggc tggccgccgt gctgccgtcc attagcgtct accccaggtc aagaacggac	720
tggacggacc cataaccaat ctaaccaaag ccaatttcgt caattcccag ctggcgagca	780
caatccatt cccagggttg gccgccaact gttaaaaggc actatgtgtc tctccacctg	840
cccgccccc tcgatggcct gcgcgtaata actattctac tgctttttgc ctcttacttg	900
cctcattatt agtattttac tctactctcc agattgcctg ccagcaattg gtccaaagt	960
gactttgttt gatgacatga ctcgaaaccgt ggacgagatc aaatacgaac cgccttcttc	1020
atgggagcac aagagcttgg acgttgccga ggatggcagg cgactagctc cccattccga	1080
cactgctcgt ccgaaaggcc gcatacgacg atcgatgact gcctgtcaca catgtcggaa	1140
gcttaaaact agatgtgatc tagatccgcg cggtcacgct tgccgtcgct gtctatctct	1200
aaggtcagag gcactaccta cctgccagtt gaagctttgt ccttctgaac gcgacatgat	1260
actagtcgtg gaatataact gtcccaactt tgctgacagt ccacaatatc tttagaatcg	1320
attgtaagct gcctgaaacg accgaccgct tccaagacag tgctgcgatg tggccagacg	1380
ccacctcggc aattccctcc atcgaggagc gcctcacctc cctagaaaga tgcatgaggg	1440
agatgacggg catgatgcga cagatgctag atcactcccc aggtttcgca aatgcctcgg	1500
ttccgcattt gacaaaaagc atcatcacgg atgaaaccgc ctcgatggag ggaagcccgt	1560
cgtcccccct cctgcetaag ccggttcgcc tcattcagga cctccagtcg gacttcttcg	1620
gagaagcaga gacttcccc gttgactccc ctctctccag cgatggtaac gccaaaggcg	1680
ctatcgactc taagctatcc ctcaaattgt tgcaaacgta tgggtatacc tgattgacaa	1740
ttaccaaaaa gtgctaatc cttggcgcaa atcaggtttg tcgatcattt tggcgcttgc	1800

gtttccattt acaatctctc cgacatccac aacgacatga aagccccga ctctttactg 1860
 tataatactg catgccttct agcttcacgc tatgtaccgg ggataccgac atctaccgtg 1920
 catgctatat accttcaagt gcgacatgca gtagtcaata ttttgtggga aaaaccaccc 1980
 ctgaagtatg agaccctcca agcacttgca cttctctgtc tctggccagc aaccgcccag 2040
 aaagagccac ccatggacag ctggctgctg agtggatatc caattaacca tgcaattatc 2100
 gcgctcgatt tcctaaacta tgcgcctcgc gaagtcattg tggacaatga aacggctgcg 2160
 cagctgcggc tatggaatac atattgcttg acacagctac agtgggtttc atctaagatc 2220
 tcccgctccag aagatagcta acaagcttta gttttgcggt cgggaatgcg cgtcctttcc 2280
 atatccagca aagatacctt gaccactgcc cacggatact ggagcaccca gcagcaactc 2340
 tggaggacgc aagggttgta gcagaaatac agttgtatct gatgacattg cggctccaga 2400
 gcaatagcag tcgaatgcgg ttggcggacc ttgactatga ggaaatagag cgatggaaga 2460
 gggagtgggc tcaccttttc tgtaagaagc ctgttcttgt tccccggga ctaccactga 2520
 cgagagcaac agctggggaa agttccacat tggagctgag cctttgggtc tgccagacac 2580
 tccttcaccg cacagcaatg aggttcacgc ccagatccga caggtcgcga tctgaggttc 2640
 tgcaaacctc acgtctgata atatcgcggt tcctccagat ccggtactct accgcattaa 2700
 gccttgtcga ccaagtctat ttcattgtcg gctacgctgc actgaatctg tgcgatttca 2760
 atcttatgga cccgcttacc gagcaagtgc agatgttctt gctgcatctc tccccgaacg 2820
 aagaccacat cgcctaccgg ttttcgtgca tggtcgccga gttcaagcgg cgatgtggca 2880
 gtgcggaatg caatgaccca tcattccactg tcaaggggtc tccgttatca tcctacggcg 2940
 acagtctgaa gatgagcatg gggcaagcac cgttcatgcc accgctcatg gatggcatga 3000
 tcgaggggta cggcttcgag caactgatgc cagaagtcac gccgagttcc tttccggatg 3060
 ggatactcaa cggaatgcct gtgactgggc tagcagcgta tcggtcagcg acgctgtaag 3120
 taatcgagat cgggttggaaggacatgag tgggggtggt ggtggtagta gcagtaacac 3180
 cagggatgat aacctgcagc ggtggtttag ttcttgccta tgggctgaac taaaaccccg 3240
 aacctagcat gatgacgtgc aacgaaagga tcataaccaa ggccaagtaa atactaaaat 3300
 aaaataatat aattccacac gatccactac caccaccacc accgcatcca tcaggttgcc 3360
 ttcttcgaca ggcctattta gttagagggc ccgtgccacg aaacatcacg taattgagcg 3420
 cttttgcttc ctgcaactt aaacaacccc atagacactc tcacattcac atgccaaact 3480
 actaactcct actgaccacc agctgcagga agccagccag ccaccatttc ctaatcggat 3540
 atatctccga aacgtacgct ttctctcttt gttcggaccg ttccgtgcct ccgcggagag 3600
 ttgaacgagt cagaacacat tcttttcgtt tctatcgttt cttttccaag gcagcagaga 3660
 gacgaacaag tcagtcttg ctaactaact taccctcag cattttagta aactactatt 3720
 taggaagag taatcattca tcgaagacaa gatgtttatt tctccgatec accaaacaaa 3780
 aacgttcagg tagactaagt agtagtagta gtatgtcttt gacccttta ctccactatc 3840

```

cgttgactgc acatagtagt aagtaactat ctaaccagtt gccgaggaga ggaaagtgag 3900
tgggtgggag cgggaggatg ccgccgagaa ttattaagtc gatcattgct agttagtatt 3960
cttttcatga tgaggagagg aaggagaggg gggacgggat tagagaaata aacttttctc 4020
tccaattaat tatctggatt aattaaaact tggagaggag ggtaggggag ttgggtattg 4080
gtatgttgct gtgaatgt 4098

```

<210> 14
 <211> 666
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉 (Aspergillus niger)

<400> 14

```

Met Thr Arg Thr Val Asp Glu Ile Lys Tyr Glu Thr Pro Ser Ser Trp
1           5           10          15

```

```

Glu His Lys Ser Leu Asp Val Ala Glu Asp Gly Arg Arg Leu Ala Pro
          20           25           30

```

```

His Ser Asp Thr Ala Arg Pro Lys Gly Arg Ile Arg Arg Ser Met Thr
          35           40           45

```

```

Ala Cys His Thr Cys Arg Lys Leu Lys Thr Arg Cys Asp Leu Asp Pro
          50           55           60

```

```

Arg Gly His Ala Cys Arg Arg Cys Leu Ser Leu Arg Ile Asp Cys Lys
65           70           75           80

```

```

Leu Pro Glu Thr Thr Asp Arg Phe Gln Asp Ser Ala Ala Met Trp Pro
          85           90           95

```

```

Asp Ala Thr Ser Ala Ile Pro Ser Ile Glu Glu Arg Leu Thr Ser Leu
          100          105          110

```

```

Glu Arg Cys Met Arg Glu Met Thr Gly Met Met Arg Gln Met Leu Asp
          115          120          125

```

```

His Ser Pro Gly Phe Ala Asn Ala Ser Val Pro His Leu Thr Lys Ser
          130          135          140

```

```

Ile Ile Thr Asp Glu Thr Ala Ser Met Glu Gly Ser Pro Ser Ser Pro
          145          150          155          160

```

```

Phe Leu Pro Lys Pro Val Arg Leu Ile Gln Asp Leu Gln Ser Asp Phe
          165          170          175

```

```

Phe Gly Glu Ala Glu Thr Ser Pro Val Asp Ser Pro Leu Ser Ser Asp
          180          185          190

```

```

Gly Asn Ala Lys Gly Ala Ile Asp Ser Lys Leu Ser Leu Lys Leu Leu
          195          200          205

```

```

Gln Thr Phe Val Asp His Phe Gly Ala Cys Val Ser Ile Tyr Asn Leu
          210          215          220

```

```

Ser Asp Ile His Asn Asp Met Lys Ala Pro Asp Ser Leu Leu Tyr Asn
          225          230          235          240

```

```

Thr Ala Cys Leu Leu Ala Ser Arg Tyr Val Pro Gly Ile Pro Thr Ser

```

	245		250		255
Thr Val His Ala Ile Tyr Leu Gln Val Arg His Ala Val Val Asn Ile					
	260		265		270
Leu Trp Glu Lys Pro Pro Leu Lys Tyr Glu Thr Leu Gln Ala Leu Ala					
	275		280		285
Leu Leu Cys Leu Trp Pro Ala Thr Ala Gln Lys Glu Pro Pro Met Asp					
	290		295		300
Ser Trp Leu Leu Ser Gly Ile Ser Ile Asn His Ala Ile Ile Ala Leu					
305		310		315	320
Asp Phe Leu Asn Tyr Ala Pro Ser Glu Val Met Val Asp Asn Glu Thr					
	325		330		335
Ala Ala Gln Leu Arg Leu Trp Asn Thr Tyr Cys Leu Thr Gln Leu His					
	340		345		350
Phe Ala Val Gly Asn Ala Arg Pro Phe His Ile Gln Gln Arg Tyr Leu					
	355		360		365
Asp His Cys Pro Arg Ile Leu Glu His Pro Ala Ala Thr Leu Glu Asp					
	370		375		380
Ala Arg Val Val Ala Glu Ile Gln Leu Tyr Leu Met Thr Leu Arg Leu					
385		390		395	400
Gln Ser Asn Ser Ser Arg Met Arg Leu Ala Asp Leu Asp Tyr Glu Glu					
	405		410		415
Ile Glu Arg Trp Lys Arg Glu Trp Ala His Leu Phe Cys Lys Lys Pro					
	420		425		430
Val Leu Val Ser Arg Gly Leu Pro Leu Thr Arg Ala Thr Ala Gly Glu					
	435		440		445
Ser Ser Thr Leu Glu Leu Ser Leu Trp Phe Cys Gln Thr Leu Leu His					
	450		455		460
Arg Thr Ala Met Arg Leu Gln Pro Arg Ser Asp Arg Leu Ala Ser Glu					
465		470		475	480
Val Leu Gln Thr Ser Arg Leu Ile Ile Ser Arg Phe Leu Gln Ile Arg					
	485		490		495
Tyr Ser Thr Ala Leu Ser Leu Val Asp Gln Val Tyr Phe Ile Val Gly					
	500		505		510
Tyr Ala Ala Leu Asn Leu Cys Asp Phe Asn Leu Met Asp Pro Leu Ile					
	515		520		525
Glu Gln Val Gln Met Phe Leu Leu His Leu Ser Pro Asn Glu Asp His					
	530		535		540
Ile Ala Tyr Arg Phe Ser Cys Met Val Ala Glu Phe Lys Arg Arg Cys					
545		550		555	560
Gly Ser Ala Glu Cys Asn Asp Pro Ser Ser Thr Val Lys Gly Ser Pro					
	565		570		575
Leu Ser Ser Tyr Gly Asp Ser Arg Lys Met Ser Met Gly Gln Ala Pro					

580	585	590
Phe Met Pro Pro Leu Met Asp Gly Met Ile Glu Gly Tyr Gly Phe Glu		
595	600	605
Gln Leu Met Pro Glu Val Met Pro Ser Ser Phe Pro Asp Gly Ile Leu		
610	615	620
Asn Gly Met Pro Val Thr Gly Leu Ala Ala Tyr Arg Ser Ala Thr Leu		
625	630	635
Ser Ser Asn Thr Arg Asp Asp Asn Leu Gln Arg Trp Phe Ser Ser Cys		
645	650	655
Pro Trp Ala Glu Leu Lys Pro Arg Thr Pro		
660	665	
<210> 15		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)		
<400> 15		
tgtgattgag gtgattggcg	20	
<210> 16		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)		
<400> 16		
tcagccacac ctgcaaaggc	20	
<210> 17		
<211> 2443		
<212> DNA		
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (10)..(10)		
<223> n=a, c, g 或 t		
<400> 17		
ctgcagaatn aatttaaact cttctgcgaa tcgcttgat tccccgccc tggccgtaga	60	
gcttaaagta tgtcccttgt cgaatcgatg taccacaaca tataaatact agcaagggat	120	
gccatgcttg gaggatagca accgacaaca tcacatcaag ctctcccttc tctgaacaat	180	
aaacccacac gaaggcattt atgatggtcg cgtgggtggtc tctatttctg tacggccttc	240	
aggctgcggc acctgctttg gctgcaacgc ctgcggactg gcgatcgcaa tccatttatt	300	
tccttctcac ggatcgattt gcaaggacgg atgggtcgac gactgcgact tgtaatactg	360	
cggatcaggt gtgttggttac ctactagctt tcagaaagag gaatgtaaac tgacttgata	420	
tagaaatact gtggtggaac atggcagggc atcatcgaca aggtaaattg cccctttatc	480	
aaaaaaaaag aaggaaaagc agaagaaaaa taaaataaaa agaactctag tcctaaccat	540	
cacatagttg gactatatcc agggaatggg cttcacagcc atctggatca cccccgttac	600	

```

agcccagctg cccagacca ccgcatatgg agatgcctac catggctact ggcagcagga 660
tatgtaagtc gatttcttta aatatctacc tgcacatctt tacatcaata tgaactaact 720
tgatggtttt agatactctc tgaacgaaaa ctacggcact gcagatgact tgaaggcgct 780
ctcttcggcc ctcatgaga gggggatgta tcttatggtc gatgtggttg ctaaccatat 840
ggttcgtggt cctttgcaac tgacttcgcg gatatggttc atttcagtac tgacaatgag 900
taatatcagg gctatgatgg agcgggtagc tcagtcgatt acagtgtgtt taaaccgttc 960
agttcccaag actacttcca cccgttctgt ttcatcaca actatgaaga tcagactcag 1020
gttgaggatt gctggctagg agataacact gtctccttgc ctgatctcga taccaccaag 1080
gatgtggtca agaataatg gtacgactgg gtgggatcat tggatcga ctactccagt 1140
aagatatttc tccctatc tacaacttgg ctgatcgatg atacttacga aatcagttga 1200
cggcctccgt atcgacacag taaaacacgt ccagaaggac ttctggcccg ggtacaaca 1260
agccgcagcg gtgtactgta tcggcgaggt gctcgacggt gatccggcct acacttgcc 1320
ctaccagaac gtcatggacg gcgtactgaa ctatcccatg tatggttcct ccaaccatga 1380
gccttcttgc aagtctcatc tcctaacgaa acggctaaaa ccagttacta tccactcctc 1440
aacgccttca agtcaacctc cggcagcatg gacgacctct acaacatgat caacaccgtc 1500
aaatccgact gtccagactc aacactcctg ggcacattcg tcgagaacca cgacaacca 1560
cggttcgctt cgtaagtctt cccctttatt ttccgttccc aatttcaca cagaacccca 1620
cctaacaaga gcaaagttac accaacgaca tagccctcgc caagaacgtc gcagattca 1680
tcactctcaa cgacggaatc cccatcatct acgccggcca agaacagcac tacgccggcg 1740
gaaacgaccc cgcaaccgc gaagcaacct ggctctcggg ctacccgacc gacagcgagc 1800
tgtacaagtt aattgcctcc cgggaacgaa tccggaacta tgccattagc aaagatacag 1860
gattcgtgac ctacaaggta agcacaacct ctaagcatac cctaattgcc tatcttcaga 1920
gtatctgaca caagagacta atcactggca atacagaact ggcccatcta caaagacgac 1980
acaacgatcc cgatgcgcaa gggcacagat gggtcgcaga tcgtgactat ctgtccaac 2040
aagggtgctt cgggtgattc gtataccctc tccttgagtg gtgcgggta cacagccggc 2100
cagcaattga cggaggtcat tggctgcacg accgtgacgg ttggttcgga tggaaatgtg 2160
cctgttccta tggcaggtgg gctacctagg gtattgtatc cgactgagaa gttggcaggt 2220
agcaagatct gtagtagctc gtgaagggtg gagagtatat gatgtactg ctattcaatc 2280
tggcattgga cagcgagatt gaatgtggtg gacgtaacct acgttgtgtc tgtagaatat 2340
atacatgtaa gatacatgag ctccggtgat ataatacaga agtaccatac agtaccgcgt 2400
tatggaatcg aactaclaca gggcctttcc tataatagac tag 2443

```

<210> 18
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉(*Aspergillus niger*)
 <400> 18

Met Met Val Ala Trp Trp Ser Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Gln Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Leu Ala Ala Thr Pro Ala Asp Trp Arg Ser Gln Ser Ile
 20 25 30
 Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Ala Arg Thr Asp Gly Ser Thr Thr
 35 40 45
 Ala Thr Cys Asn Thr Ala Asp Gln Lys Tyr Cys Gly Gly Thr Trp Gln
 50 55 60
 Gly Ile Ile Asp Lys Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala
 65 70 75 80
 Ile Trp Ile Thr Pro Val Thr Ala Gln Leu Pro Gln Thr Thr Ala Tyr
 85 90 95
 Gly Asp Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Asp Ile Tyr Ser Leu Asn
 100 105 110
 Glu Asn Tyr Gly Thr Ala Asp Asp Leu Lys Ala Leu Ser Ser Ala Leu
 115 120 125
 His Glu Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Ala Asn His Met
 130 135 140
 Gly Tyr Asp Gly Ala Gly Ser Ser Val Asp Tyr Ser Val Phe Lys Pro
 145 150 155 160
 Phe Ser Ser Gln Asp Tyr Phe His Pro Phe Cys Phe Ile Gln Asn Tyr
 165 170 175
 Glu Asp Gln Thr Gln Val Glu Asp Cys Trp Leu Gly Asp Asn Thr Val
 180 185 190
 Ser Leu Pro Asp Leu Asp Thr Thr Lys Asp Val Val Lys Asn Glu Trp
 195 200 205
 Tyr Asp Trp Val Gly Ser Leu Val Ser Asn Tyr Ser Ile Asp Gly Leu
 210 215 220
 Arg Ile Asp Thr Val Lys His Val Gln Lys Asp Phe Trp Pro Gly Tyr
 225 230 235 240
 Asn Lys Ala Ala Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Leu Asp Gly Asp
 245 250 255
 Pro Ala Tyr Thr Cys Pro Tyr Gln Asn Val Met Asp Gly Val Leu Asn
 260 265 270
 Tyr Pro Ile Tyr Tyr Pro Leu Leu Asn Ala Phe Lys Ser Thr Ser Gly
 275 280 285
 Ser Met Asp Asp Leu Tyr Asn Met Ile Asn Thr Val Lys Ser Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asp Ser Thr Leu Leu Gly Thr Phe Val Glu Asn His Asp Asn Pro
 305 310 315 320
 Arg Phe Ala Ser Tyr Thr Asn Asp Ile Ala Leu Ala Lys Asn Val Ala
 325 330 335
 Ala Phe Ile Ile Leu Asn Asp Gly Ile Pro Ile Ile Tyr Ala Gly Gln
 340 345 350
 Glu Gln His Tyr Ala Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Ala Thr
 355 360 365

Trp Leu Ser Gly Tyr Pro Thr Asp Ser Glu Leu Tyr Lys Leu Ile Ala
370 375 380

Ser Arg Asn Ala Ile Arg Asn Tyr Ala Ile Ser Lys Asp Thr Gly Phe
385 390 395 400

Val Thr Tyr Lys Asn Trp Pro Ile Tyr Lys Asp Asp Thr Thr Ile Pro
405 410 415

Met Arg Lys Gly Thr Asp Gly Ser Gln Ile Val Thr Ile Leu Ser Asn
420 425 430

Lys Gly Ala Ser Gly Asp Ser Tyr Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ala Gly
435 440 445

Tyr Thr Ala Gly Gln Gln Leu Thr Glu Val Ile Gly Cys Thr Thr Val
450 455 460

Thr Val Gly Ser Asp Gly Asn Val Pro Val Pro Met Ala Gly Gly Leu
465 470 475 480

Pro Arg Val Leu Tyr Pro Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys
485 490 495

Ser Ser Ser

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 19
ggcagcagga tatgtaagtc g 21

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 20
cactgtaatc gactgagcta c 21

<210> 21
<211> 2520
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<220>
<221> misc_feature
<223> n=a, c, g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (10).. (10)
<223> n=a, c, g 或 t

<400> 21
ctgcagaatn aatttaaact cttctgcgaa tcgcttggat tccccgcccc tggccgtaga 60
gcttaaagta tgtcccttgt cgatgcgatg tatcacaaca tataaatact agcaagggat 120
gccatgcttg gaggatagca accgacaaca tcacatcaag ctctcccttc tctgaacaat 180
aaacccca gaaggcattt atgatggctg cgtggtggtc tctatttctg tacggccttc 240

```

aggtcgcggc acctgctttg gctgcaacgc ctgcggaactg gcgatcgcaa tccatttatt 300
tccttctcac ggatcgattt gcaaggacgg atgggtcgac gactgcgact tgtaatactg 360
cggatcaggt gtgttggtac ctactagctt tcagaaagag gaatgtaaac tgacttgata 420
tagaaatact gtggtggaac atggcagggc atcatcgaca aggtaaattg cccctttatc 480
aaaaaaaaag aaggaaaagc agaagaaaaa taaaataaaa agaactctag tcctaaccat 540
cacatagttg gactatatcc agggaaatggg cttcacagcc atctggatca cccccgttac 600
agcccagctg ccccgagcca ccgcatatgg agatgcctac catggctact ggcagcagga 660
tatgtaagtc gatttcttta aatatctacc tgtcatcttt tacatcaata tgaactaact 720
tgatggtttt agatactctc tgaacgaaaa ctacggcact gcgatgact tgaaggcgct 780
ctcttcggcc cttcatgaga ggggatgta tcttatggtc gatgtggtg ctaaccatat 840
ggttcgtggt cctttgcaac tgacttcgcg gataiggttc atttcagtac tgacaatgag 900
taatatcagg gctatgatgg agcgggtagc tcagtcgatt acagtgtgtt taaaccgttc 960
agttcccaag actacttcca cccgttctgt ttcatcaca actatgaaga tcagactcag 1020
gttgaggatt gctggctagg agataacact gtctccttgc ctgatctcga taccaccaag 1080
gatgtggtca agaataatg gtacgactgg gtgggatcat tggatcgaa ctactccagt 1140
aagatatitc tccctcattc tacaacttgg ctgatcgatg ataactacga aatcagttga 1200
cggcctccgt atcgacacag taaaacacgt ccagaaggac ttctggcccg ggtacaacaa 1260
agccgcaggc gtgtactgta tcggcgaggt gctcgacggt gatccggcct acacttgtcc 1320
ctaccagaac gtcatggacg gcgtactgaa ctatcccatg tatggttcct ccaaccatga 1380
gccttcttgc aagtctcadc tcctaacgaa acggctaaaa ccagttacta tccactcctc 1440
aacgccttca agtcaacctc cggcagcatg gacgacctct acaacatgat caacaccgtc 1500
aaatccgact gtccagactc aacactcctg ggcacattcg tcgagaacca cgacaacca 1560
cggttcgctt cgtaagtctt ccccttttatt ttccgttccc aatttccaca cagaacccca 1620
cctaacaaga gcaaagttac accaacgaca tagccctcgc caagaacgtc gcagatttca 1680
tcatcctcaa cgacggaatc cccatcatct acgccggcca agaacagcac tacgccggcg 1740
gaaacgaccc cgcaaccgc gaagcaacct ggctctcggg ctacccgacc gacagcgagc 1800
tgtacaagtt aattgcctcc cggaacgcaa tccggaacta tgccattagc aaagatacag 1860
gattcgtgac ctacaaggta agcacaacct ctaagcatac cctaattggc tatcttcaga 1920
gtatctgaca caagagacta atcactggca atacagaact ggcccatcta caaagacgac 1980
acaacgatcc cgatgcgcaa gggcacagat gggtcgcaga tcgtgactat cttgtccaac 2040
aagggtgctt cgggtgattc gtataccctc tcttgagtg gtgcgggtta cacagccggc 2100
cagcaattga cggagggtcat tggctgcacg accgtgacgg ttggttcgga tggaaatgtg 2160
cctgttccta tggcagggtg gctacctagg gtattgtatc cgactgagaa gttggcaggt 2220
agcaagatct gttacggctg agcagtcaag ctcaagtccc aactgtattg actctgttga 2280

```

ctatttcctgg gttctccttag atgatgcagt tggaggaata tgccaattgg cacttgtcgc 2340
 gtgttgcccg tgagatttat agagaccata ttaaaaaagc acgtgatgtg gcgttggaag 2400
 atggattaga ccttcaacag gtttcgaagg aagaccaga cttcttcgtc aagcaagggg 2460
 tgataattgg tgtcgcacgc cggttcgta gcgacattag agattgggcc aaccaataca 2520

<210> 22
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉(*Aspergillus niger*)

<400> 22

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

275	280	285
Ser Met Asp Asp Leu Tyr Asn Met Ile Asn Thr Val Lys Ser Asp Cys		
290	295	300
Pro Asp Ser Thr Leu Leu Gly Thr Phe Val Glu Asn His Asp Asn Pro		
305	310	315
Arg Phe Ala Ser Tyr Thr Asn Asp Ile Ala Leu Ala Lys Asn Val Ala		
	325	330
Ala Phe Ile Ile Leu Asn Asp Gly Ile Pro Ile Ile Tyr Ala Gly Gln		
	340	345
Glu Gln His Tyr Ala Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Ala Thr		
	355	360
Trp Leu Ser Gly Tyr Pro Thr Asp Ser Glu Leu Tyr Lys Leu Ile Ala		
	375	380
Ser Arg Asn Ala Ile Arg Asn Tyr Ala Ile Ser Lys Asp Thr Gly Phe		
385	390	395
Val Thr Tyr Lys Asn Trp Pro Ile Tyr Lys Asp Asp Thr Thr Ile Pro		
	405	410
Met Arg Lys Gly Thr Asp Gly Ser Gln Ile Val Thr Ile Leu Ser Asn		
	420	425
Lys Gly Ala Ser Gly Asp Ser Tyr Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ala Gly		
	435	440
Tyr Thr Ala Gly Gln Gln Leu Thr Glu Val Ile Gly Cys Thr Thr Val		
	450	455
Thr Val Gly Ser Asp Gly Asn Val Pro Val Pro Met Ala Gly Gly Leu		
465	470	475
Pro Arg Val Leu Tyr Pro Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys		
	485	490

Tyr Gly

<210> 23
 <211> 3494
 <212> DNA
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3370)..(3370)
 <223> n=a, c, g 或 t

<400> 23
 tgctccctcg gccaaagcgc aataacgtcc gattcatccc attcctcgtc cagctggcga 60
 actccggagg ttgattgctc gctcgtcttc agttggccac caaacttact cgccccctc 120
 cttcacccctc cctcctctgc caatgctaca gactacttgg ctaggctact atcttctcag 180
 ctgggtgaag aacaacgggc cccgtgcgtg atgagcaaaa gcgtctgaca tgcagcaact 240
 gcagtatact ggagcccgcg gctaccgagg aactcgtgct cgtgtgccac cacatcgaag 300
 tgagttgatg cgtcttgctc atgcagtgtc ggcgtggcct aaagtacggg ccaaacctgt 360
 ctgacttcat cccacactat taccacctcc ctcattctcc cctgattcgg cccaataagg 420

```

aatcactta gicaatcaat cctgccatta cggcgcgta atctgaaact acgcgcggac 480
tgtctcttac tccccctcgc gtggcgggcc cagccagccc catccttact agatttagcg 540
aattactggt cattagccct gtacggggga gggcgggaa aacaaaaatg cgaataatag 600
aataaattta ataaagaaaa aagagggggg gggagcttat ctaggccctt gctgcattgc 660
attcggacat ttttcgactt gtcacaggca caaatcatag tccgccgatg gcgtcgattg 720
accattttct tttcttttct cggcgctggg atgttgcca agaaaattga atggcaatgg 780
ttcgttcacc ggagtagggt gtacgtgcat tgtgtggatt gacgatgatt ctcgccaag 840
ggcttgcgtt gcaatccac caggaggga atgttcaga cagacagaaa gcaaaagaag 900
tattggaggg aaaaaacaa ttcttgaaa atgatcttct caggtaatga atattggtg 960
ctggcgggct gatcttctcc cgacacgtct atataaactg gtcaccttct ggcccttct 1020
ttctatctct tccttctcat catcagctct aaacaagcct ctttctctcc taccttact 1080
ctccacttct tccttctgaa agggataaaa ctctctctct cattctcacc tatatatacc 1140
ttgtgctttt ctgcgaatga aagttgatac ccccgattct gcttcacca tcagcatgac 1200
caacactatc accatcaccg tagagcagga cggatatctat gagatcaacg gtgcccgta 1260
agagcccggt gtcaacctga acatggtcac cggtcgagc aaactgcgca agcagcttcg 1320
cgagaccaat gagttgctcg tgtgtctgg tgtgtacgac ggtctgtccg cccgtattgc 1380
catcaacctg ggcttcaagg gcatgtacat ggtatgttgg attccttaga ctaccttcc 1440
ccacagtcaa cacttctccg ctcccgcat ggagaaaaa gatcatacta acgaaaggt 1500
cagaccggcg ccggtactac cgcgtctaga ctgggcattg ccgatctggg tctagccac 1560
atctacgaca tgaagaccaa cgcagagatg atcgcaacc tggacccta cgttctccc 1620
ctgatcgag acatggacac tggctacgga ggtgagaatc ccccatctcc actgtctgcc 1680
aagacataat gatctaccg cgcaaaaaa caaacggca atatagacc agttccccac 1740
taacacaaaa aaaacaaaa taggccccct gatggtcgcc cgttccgtt aacaatacat 1800
ccaagccgga gtcgcggtt tccacatcga agatcagatc caaacaagc gatcgggaca 1860
cctggcaggc aagcgcgtcg tcaccatgga cgaatacttg actcgcatcc gcgccgcaa 1920
gctcaccaag gaccgcctcc gcagcgacat cgtgctgatt gcccgaccg acgcctcca 1980
gcagcacggc tacgacgagt gcattcgccg ccttaaggcc gcccgcatc ttggcgccga 2040
tgttggtctc ctgagggct tcaccagtaa ggagatggcg aggcggtgtg tccaggacct 2100
tgcgccttgg ccgcttctgc tcaacatggt ggagaacggt gctggcgccg ttatttccgt 2160
cgatgaggct agggaaatgg gcttccgcat tatgatcttc tcgttcgctt gcattactcc 2220
tgcctatatg gggattaccg ctgctctgga gaggtcaag aaggatggtg tggttgggtt 2280
gcccaggagg atggggccga agaagctgtt tgaggtgtgc ggattgatgg actcggtgag 2340
ggttgatacc gaggtggtg gagatgggtt tgctaagtgt gttaattct tttcttttt 2400
tgattcttaa ttccctggtt gtttgttgt gaaagtttct tattttctg gtttgttta 2460

```

```

tttcccttc tggtaactaa ttttgttga gaaagagttg ttgagttggg ttgaactgca 2520
ttggatggga ttgatttatt ttcgggatca aagtgaagg aaggaagg ggctgtgtta 2580
ttggttttcg agtggggacc gatatatcc tactatacat atcgaagctt gcgtggtaca 2640
tatactagta tctactacat taccaagaat ggaaatgaaa actgggtgtt agatttcagt 2700
tgacaggtct tatgttcgtt taccgataga gtaattcctg cttctcactc catgtgagcc 2760
caatcacaat ggaattgtaa tctggttgcc ttataagtac ttagtactct gtactctgta 2820
ctacttctcg catcacatca aatcttaata cttagtacgt agtttgtttc acccagcaaa 2880
accttattgc ctaacaate atattctcag taagcacgag acacagaaac gagagaagta 2940
ttctagacc tgacagaacw ccctgatcga cagtcactta cccaacaaag taagtgtct 3000
ctaccctctg attacagtta aggcaggcag tagtaagcaa gaagaagaaa gaaagaataa 3060
ttaactacta agtttctcac tactgcatgc acgaccacgg agtcgccgtg caaaaaaatt 3120
ggtgctgtct cagctagctg cactctgcac actgccaccc tcgccctaca aaagaaacca 3180
tgctgtttct ccactatact gttcccgca tgaactagg gccaataacc atgcagttac 3240
tattggtccc actgggggtg gttgggtagc cttatggtat taaaaggagt aggggtcttt 3300
gtcgatcgtt ttctgttttc ttttgkatt tttatttytg ttggwctctg tttgtgttgt 3360
gttgggccgn tttgttttc tttgggtaac gagggatggg aatataattca tatggaaatg 3420
gaaatggatt atgctattga ttgatgaatg gtgatgatct gcgtggaaat taatgtcaga 3480
gtcttgmtga ttca 3494

```

<210> 24
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉(*Aspergillus niger*)

<400> 24

Met Lys Val Asp Thr Pro Asp Ser Ala Ser Thr Ile Ser Met Thr Asn
1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Thr Val Glu Gln Asp Gly Ile Tyr Glu Ile Asn Gly
20 25 30

Ala Arg Gln Glu Pro Val Val Asn Leu Asn Met Val Thr Gly Ala Ser
35 40 45

Lys Leu Arg Lys Gln Leu Arg Glu Thr Asn Glu Leu Leu Val Cys Pro
50 55 60

Gly Val Tyr Asp Gly Leu Ser Ala Arg Ile Ala Ile Asn Leu Gly Phe
65 70 75 80

Lys Gly Met Tyr Met Thr Gly Ala Gly Thr Thr Ala Ser Arg Leu Gly
85 90 95

Met Ala Asp Leu Gly Leu Ala His Ile Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala
100 105 110

Glu Met Ile Ala Asn Leu Asp Pro Tyr Gly Pro Pro Leu Ile Ala Asp
115 120 125

Met Asp Thr Gly Tyr Gly Gly Pro Leu Met Val Ala Arg Ser Val Gln

130 135 140
Gln Tyr Ile Gln Ala Gly Val Ala Gly Phe His Ile Glu Asp Gln Ile
145 150 155 160
Gln Asn Lys Arg Cys Gly His Leu Ala Gly Lys Arg Val Val Thr Met
165 170 175
Asp Glu Tyr Leu Thr Arg Ile Arg Ala Ala Lys Leu Thr Lys Asp Arg
180 185 190
Leu Arg Ser Asp Ile Val Leu Ile Ala Arg Thr Asp Ala Leu Gln Gln
195 200 205
His Gly Tyr Asp Glu Cys Ile Arg Arg Leu Lys Ala Ala Arg Asp Leu
210 215 220
Gly Ala Asp Val Gly Leu Leu Glu Gly Phe Thr Ser Lys Glu Met Ala
225 230 235 240
Arg Arg Cys Val Gln Asp Leu Ala Pro Trp Pro Leu Leu Leu Asn Met
245 250 255
Val Glu Asn Gly Ala Gly Pro Val Ile Ser Val Asp Glu Ala Arg Glu
260 265 270
Met Gly Phe Arg Ile Met Ile Phe Ser Phe Ala Cys Ile Thr Pro Ala
275 280 285
Tyr Met Gly Ile Thr Ala Ala Leu Glu Arg Leu Lys Lys Asp Gly Val
290 295 300
Val Gly Leu Pro Glu Gly Met Gly Pro Lys Lys Leu Phe Glu Val Cys
305 310 315 320
Gly Leu Met Asp Ser Val Arg Val Asp Thr Glu Ala Gly Gly Asp Gly
325 330 335
Phe Ala Asn Gly Val
340

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 25
ctacgacatg aagaccaacg c 21

<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 26
gcaccgttct ccaccatgtt g 21

<210> 27
<211> 1389
<212> DNA
<213> 南极假丝酵母(Candida antarctica)

<400> 27
atgcgagtgt ccttgcgtc catcacgtcg ctgcttgccg cggcaacggc ggctgtgctc 60
gcggctccgg cggccgagac gctggaccga cgggcggcgc tgcccaaccc ctacgacgat 120

```

cccttctaca cgacgccatc caacatcggc acgtttgcc aaggccaggt gatccaatct 180
cgcaaggtgc ccacggacat cggcaacgcc aacaacgtg cgtcgttcca gctgcagtac 240
cgcaaccacca atacgcagaa cgaggcggtg gccgacgtgg ccaccgtgtg gatcccggcc 300
aagcccgcct cgccgcccaa gatcttttcg taccaggtct acgaggatgc cacggcgtc 360
gactgtgtc cgagctacag ctacctact ggattggacc agccgaacaa ggtgacggcg 420
gtgctcgaca cgccatcat catcggtcgg gcgctgcagc agggctacta cgtcgtctcg 480
tccgaccacg aaggcttcaa agccgccttc atcgctggct acgaagaggg catggctatc 540
ctcgacggca tccgcgcgt caagaactac cagaacctgc catccgacag caaggtcgct 600
cttgagggct acagtggcgg agctcacgcc accgtgtggg cgacttcgct tgetgaatcg 660
tacgcgcccg agctcaacat tgtcgggtgt tcgcacggcg gcacgcccg gagcgccaag 720
gacaccttta cattctcaa cggcggaccc ttcgccggct ttgccctggc ggggttttcg 780
ggctctctgc tcgctcatcc tgatatggag agcttcattg aggcccgatt gaacgccaag 840
ggtcagcgga cgtcaagca gatccgcggc cgtggcttct gcctgccgca ggtggtgttg 900
acctaccct tcctcaacgt cttctcgtg gtcaacgaca cgaacctgct gaatgaggcg 960
ccgatcgcta gcatcctcaa gcaggagact gtggtccagg ccgaagcgag ctacacggta 1020
tcggtgcccc agtccccgcg cttcatctgg catgcgatcc ccgacgagat cgtgccgtac 1080
cagcctcggg ctacctagct caaggagcaa tgtccaagg gcgccaacat caatttttcg 1140
ccctaccga tcgccgagca cctcacgcc gagatctttg gtctggtgcc tagcctgttg 1200
tttatcaagc aagccttcga cggcaccaca cccaaggtga tctgcggcac tcccatcct 1260
gctatcgtg gcatcaccac gccctcggcg gaccaagtgc tgggttcgga cctggccaac 1320
cagctcgca gcctcgacgg caagcagagt gcgttcggca agccctttgg ccccatcaca 1380
ccaccttag 1389

```

<210> 28
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> 南极洲假丝酵母(Candida antarctica)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1389)..(1389)
 <223> X=Xaa

<400> 28

Met Arg Val Ser Leu Arg Ser Ile Thr Ser Leu Leu Ala Ala Ala Thr
1 5 10 15

Ala Ala Val Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Thr Leu Asp Arg Arg Ala
20 25 30

Ala Leu Pro Asn Pro Tyr Asp Asp Pro Phe Tyr Thr Thr Pro Ser Asn
35 40 45

Ile Gly Thr Phe Ala Lys Gly Gln Val Ile Gln Ser Arg Lys Val Pro
50 55 60

Thr Asp Ile Gly Asn Ala Asn Asn Ala Ala Ser Phe Gln Leu Gln Tyr
 65 70 75 80
 Arg Thr Thr Asn Thr Gln Asn Glu Ala Val Ala Asp Val Ala Thr Val
 85 90 95
 Trp Ile Pro Ala Lys Pro Ala Ser Pro Pro Lys Ile Phe Ser Tyr Gln
 100 105 110
 Val Tyr Glu Asp Ala Thr Ala Leu Asp Cys Ala Pro Ser Tyr Ser Tyr
 115 120 125
 Leu Thr Gly Leu Asp Gln Pro Asn Lys Val Thr Ala Val Leu Asp Thr
 130 135 140
 Pro Ile Ile Ile Gly Trp Ala Leu Gln Gln Gly Tyr Tyr Val Val Ser
 145 150 155 160
 Ser Asp His Glu Gly Phe Lys Ala Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Glu Glu
 165 170 175
 Gly Met Ala Ile Leu Asp Gly Ile Arg Ala Leu Lys Asn Tyr Gln Asn
 180 185 190
 Leu Pro Ser Asp Ser Lys Val Ala Leu Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Ala
 195 200 205
 His Ala Thr Val Trp Ala Thr Ser Leu Ala Glu Ser Tyr Ala Pro Glu
 210 215 220
 Leu Asn Ile Val Gly Ala Ser His Gly Gly Thr Pro Val Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Phe Thr Phe Leu Asn Gly Gly Pro Phe Ala Gly Phe Ala Leu
 245 250 255
 Ala Gly Val Ser Gly Leu Ser Leu Ala His Pro Asp Met Glu Ser Phe
 260 265 270
 Ile Glu Ala Arg Leu Asn Ala Lys Gly Gln Arg Thr Leu Lys Gln Ile
 275 280 285
 Arg Gly Arg Gly Phe Cys Leu Pro Gln Val Val Leu Thr Tyr Pro Phe
 290 295 300
 Leu Asn Val Phe Ser Leu Val Asn Asp Thr Asn Leu Leu Asn Glu Ala
 305 310 315 320
 Pro Ile Ala Ser Ile Leu Lys Gln Glu Thr Val Val Gln Ala Glu Ala
 325 330 335
 Ser Tyr Thr Val Ser Val Pro Lys Phe Pro Arg Phe Ile Trp His Ala
 340 345 350
 Ile Pro Asp Glu Ile Val Pro Tyr Gln Pro Ala Ala Thr Tyr Val Lys
 355 360 365
 Glu Gln Cys Ala Lys Gly Ala Asn Ile Asn Phe Ser Pro Tyr Pro Ile
 370 375 380
 Ala Glu His Leu Thr Ala Glu Ile Phe Gly Leu Val Pro Ser Leu Trp
 385 390 395 400
 Phe Ile Lys Gln Ala Phe Asp Gly Thr Thr Pro Lys Val Ile Cys Gly
 405 410 415
 Thr Pro Ile Pro Ala Ile Ala Gly Ile Thr Thr Pro Ser Ala Asp Gln
 420 425 430

Val Leu Gly Ser Asp Leu Ala Asn Gln Leu Arg Ser Leu Asp Gly Lys
435 440 445

Gln Ser Ala Phe Gly Lys Pro Phe Gly Pro Ile Thr Pro Pro
450 455 460

<210> 29

<211> 2794

<212> DNA

<213> 嗜热柱顶孢(*Scytalidium thermophilum*)

<400> 29

```

atgaacagag tcacgaatct cctcgcttg gccggcgcca tagggctcgc ccaagcaaca    60
tgtccctttg cggaccctgc cgctctgtat agtcgtcaag atactaccag cggccagtcg   120
ccacttgca cctacgaggt ggatgacagc accggatacc tgacctcca tgttggcggg    180
cccatcagg accagaccag cctcaaggca ggcatccggg gtccgaccct tctttaggac    240
tttatgttcc gccagaagat ccagcacttc gaccatgaac gggtaaggac ataagtctca   300
cacgagcggc tgcgtgcccc cctatttccg agacattggg ctggctggct ggctgtgact   360
gcttgagttt ggggacatac ggagtacctt actgacgcgc tgaaccactc caggttcccg   420
aaagggcggg ccatgctcga ggcgctggag cacacgggac cttcacgagt tacgccgact   480
ggagtaacat caccgcggcg tcctttctga acgccactgg aaagcagacg ccggtgtttg   540
tccggttctc gaccgttgct gggctctcga ggagcgca cagggcgaga gacgttcag    600
gtttcgcgac gcggtttgta agttttgttg tgtttcattc gtcccggtct gtagaggagg   660
gttaggatat gagctaactg gtgtgtgtgt gtgaagtaca ctgatgaagg caactttgta   720
cgtcccacgc atggtcctca attctcttat ctggcagcca tgtggtcatt gtcgacgttg   780
ctaacttgcg taggatatcg tcggaacaa catcccggta ttcttcattc aagatgcaat   840
ccagttccct gaccttatcc actcgggtcaa gccgcgtccc gacaacgaga ttccccaagc   900
ggcgacggct catgattcag cttgggactt cttcagccag cagccaagca ccatggtaag   960
caatggacca aggagccgca cctgggggtga catgccaggg agtacacaag gcgttccgat  1020
gaccctcgtg tgaccaaggc agtacaacac tccacggagg actcgaagag attcggcaat  1080
atggaacaca gaactgacag gatggtagca cacgttggtt tgggcatgt ccggccacgg  1140
aatccctcgc agctaccgcc atatggtacg ttgcctggc tgagatgacc gtgaatccat  1200
ttctaaccct aagcccagga tggttcggc gtccacacgt tccggtttgt caaagatgac  1260
ggctcgtcca agttgatcaa gtggcatttc aagtcacgcc agggaaaggc gagtctagtc  1320
tgggaagagg cgcaggttct ttctggcaag aatgccgact tccaccgtca ggacctctgg  1380
gatgctattg agtccgggaa cggaccagaa tgggatgtct gcgtccagat tgtcgatgag  1440
tcccaggcgc aagccttttg ctctgacttg ctggaccga caaagatcat ccccaggagg  1500
tacgccccct tgacgaagct gggcctcttg aagctggatc gcaatccgac caactacttc  1560
gccgagacgg agcaggtcat gtccaaccc ggtcatatcg tccgcggcat cgacttcacg  1620
gaggatcccc tgctacaggg acgcctcttt tcgtaccttg acacgcagct gaaccggaat  1680

```

```

ggcggggccca actttgagca gctgcccatac aacatgccgc ggggtccgat tcacaacaat 1740
aatcgcgacg gcgceggcca gatgticacac cacaggaaca agtatcctgt aagtgcctct 1800
tttgctcga tcgttgtgtt gccggcttgc tgacagacgc agtacactcc caacaccctg 1860
aacagtgggt atccgcggca agccaaccaa aatgccggac gcggattctt cacagcgcct 1920
ggccgtaccg ccagcgggtc cctcgtccgt gaggtgtcgc caacattcaa cgaccactgg 1980
tcgcagcccc gtctcttctt caactccctc actcccgtcg aacaacagtt cctcgtcaac 2040
gccatgcgct tcgaaatcag ctttgtgaag tcggaagaag tcaagaagaa cgtgctcacc 2100
cagctcaacc gcgtcagcca tgacgtggcc gtgcgcgtgg ccgccgtat cgccctcggc 2160
gcgcccgacg cggacgacac atactaccac aacaacaaga cggctggcgt ctcaatcgtt 2220
ggaagcgggc cttgcctac catcaagact ctccgcgtcg gcatcctggc taccacgagc 2280
gagtcgacg cgctggatca ggccggcccag ctccgcaccc gtctggaaaa ggacgggctt 2340
gtggtcacgg ttgtggctga aacgtgcgc gagggggtag accagacgta ctgcacggcg 2400
gatgccacgg gtttcgacgg cgttgttgtt gtggacgggg cggcggcgct gtttgccagc 2460
accgcgtcgt cgcggttgtt cccgacgggc aggccgttgc agatctttgt ggacgcgtat 2520
cgggtggggaa agccggtcgg tgtgtgtgtt gggaagtcga gcgagggttt ggatgcggcg 2580
gatgttccgg aagacgggga cggggtgtat tcggaggagt cggtgacat gtttgtggag 2640
gagtttgaga aggggttggc tactttcagg gtgagtcttg atgcctttgt ttgttgtgat 2700
gttatgtttt tgtttgtct cggactttgt gaaagaatga cggactgacg tctttgttat 2760
ctagtttacc gatcggtttg ctctcgactc ttag 2794

```

<210> 30
 <211> 717
 <212> PRT
 <213> 嗜热柱顶孢(*Scytalidium thermophilum*)

<400> 30

```

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

```

115	120	125
Thr Gly Lys Gln Thr Pro Val Phe Val Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly 130 135 140		
Ser Arg Gly Ser Ala Asp Thr Ala Arg Asp Val His Gly Phe Ala Thr 145 150 155 160		
Arg Phe Tyr Thr Asp Glu Gly Asn Phe Asp Ile Val Gly Asn Asn Ile 165 170 175		
Pro Val Phe Phe Ile Gln Asp Ala Ile Gln Phe Pro Asp Leu Ile His 180 185 190		
Ser Val Lys Pro Arg Pro Asp Asn Glu Ile Pro Gln Ala Ala Thr Ala 195 200 205		
His Asp Ser Ala Trp Asp Phe Phe Ser Gln Gln Pro Ser Thr Met His 210 215 220		
Thr Leu Phe Trp Ala Met Ser Gly His Gly Ile Pro Arg Ser Tyr Arg 225 230 235 240		
His Met Asp Gly Phe Gly Val His Thr Phe Arg Phe Val Lys Asp Asp 245 250 255		
Gly Ser Ser Lys Leu Ile Lys Trp His Phe Lys Ser Arg Gln Gly Lys 260 265 270		
Ala Ser Leu Val Trp Glu Glu Ala Gln Val Leu Ser Gly Lys Asn Ala 275 280 285		
Asp Phe His Arg Gln Asp Leu Trp Asp Ala Ile Glu Ser Gly Asn Gly 290 295 300		
Pro Glu Trp Asp Val Cys Val Gln Ile Val Asp Glu Ser Gln Ala Gln 305 310 315 320		
Ala Phe Gly Phe Asp Leu Leu Asp Pro Thr Lys Ile Ile Pro Glu Glu 325 330 335		
Tyr Ala Pro Leu Thr Lys Leu Gly Leu Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro 340 345 350		
Thr Asn Tyr Phe Ala Glu Thr Glu Gln Val Met Phe Gln Pro Gly His 355 360 365		
Ile Val Arg Gly Ile Asp Phe Thr Glu Asp Pro Leu Leu Gln Gly Arg 370 375 380		
Leu Phe Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Leu Asn Arg Asn Gly Gly Pro Asn 385 390 395 400		
Phe Glu Gln Leu Pro Ile Asn Met Pro Arg Val Pro Ile His Asn Asn 405 410 415		
Asn Arg Asp Gly Ala Gly Gln Met Phe Ile His Arg Asn Lys Tyr Pro 420 425 430		
Tyr Thr Pro Asn Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Pro Arg Gln Ala Asn Gln 435 440 445		
Asn Ala Gly Arg Gly Phe Phe Thr Ala Pro Gly Arg Thr Ala Ser Gly 450 455 460		
Ala Leu Val Arg Glu Val Ser Pro Thr Phe Asn Asp His Trp Ser Gln 465 470 475 480		
Pro Arg Leu Phe Phe Asn Ser Leu Thr Pro Val Glu Gln Gln Phe Leu		

485	490	495
Val Asn Ala Met Arg Phe Glu Ile Ser Leu Val Lys Ser Glu Glu Val		
500	505	510
Lys Lys Asn Val Leu Thr Gln Leu Asn Arg Val Ser His Asp Val Ala		
515	520	525
Val Arg Val Ala Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Pro Asp Ala Asp Asp		
530	535	540
Thr Tyr Tyr His Asn Asn Lys Thr Ala Gly Val Ser Ile Val Gly Ser		
545	550	555
Gly Pro Leu Pro Thr Ile Lys Thr Leu Arg Val Gly Ile Leu Ala Thr		
565	570	575
Thr Ser Glu Ser Ser Ala Leu Asp Gln Ala Ala Gln Leu Arg Thr Arg		
580	585	590
Leu Glu Lys Asp Gly Leu Val Val Thr Val Val Ala Glu Thr Leu Arg		
595	600	605
Glu Gly Val Asp Gln Thr Tyr Ser Thr Ala Asp Ala Thr Gly Phe Asp		
610	615	620
Gly Val Val Val Val Asp Gly Ala Ala Ala Leu Phe Ala Ser Thr Ala		
625	630	635
Ser Ser Pro Leu Phe Pro Thr Gly Arg Pro Leu Gln Ile Phe Val Asp		
645	650	655
Ala Tyr Arg Trp Gly Lys Pro Val Gly Val Cys Gly Gly Lys Ser Ser		
660	665	670
Glu Val Leu Asp Ala Ala Asp Val Pro Glu Asp Gly Asp Gly Val Tyr		
675	680	685
Ser Glu Glu Ser Val Asp Met Phe Val Glu Glu Phe Glu Lys Gly Leu		
690	695	700
Ala Thr Phe Arg Phe Thr Asp Arg Phe Ala Leu Asp Ser		
705	710	715

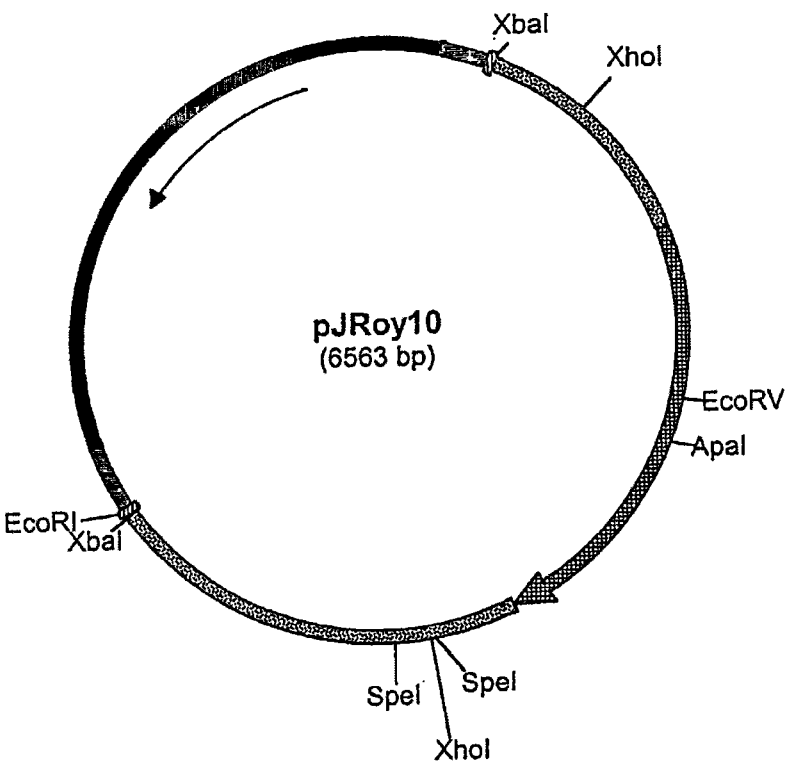


图 1

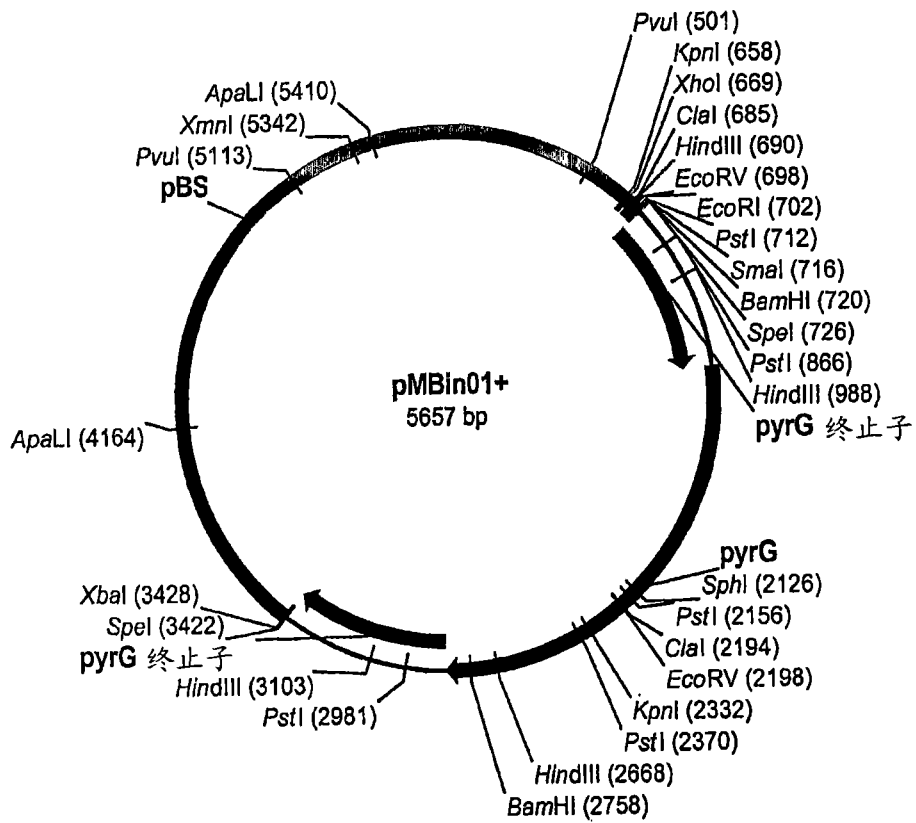


图 2

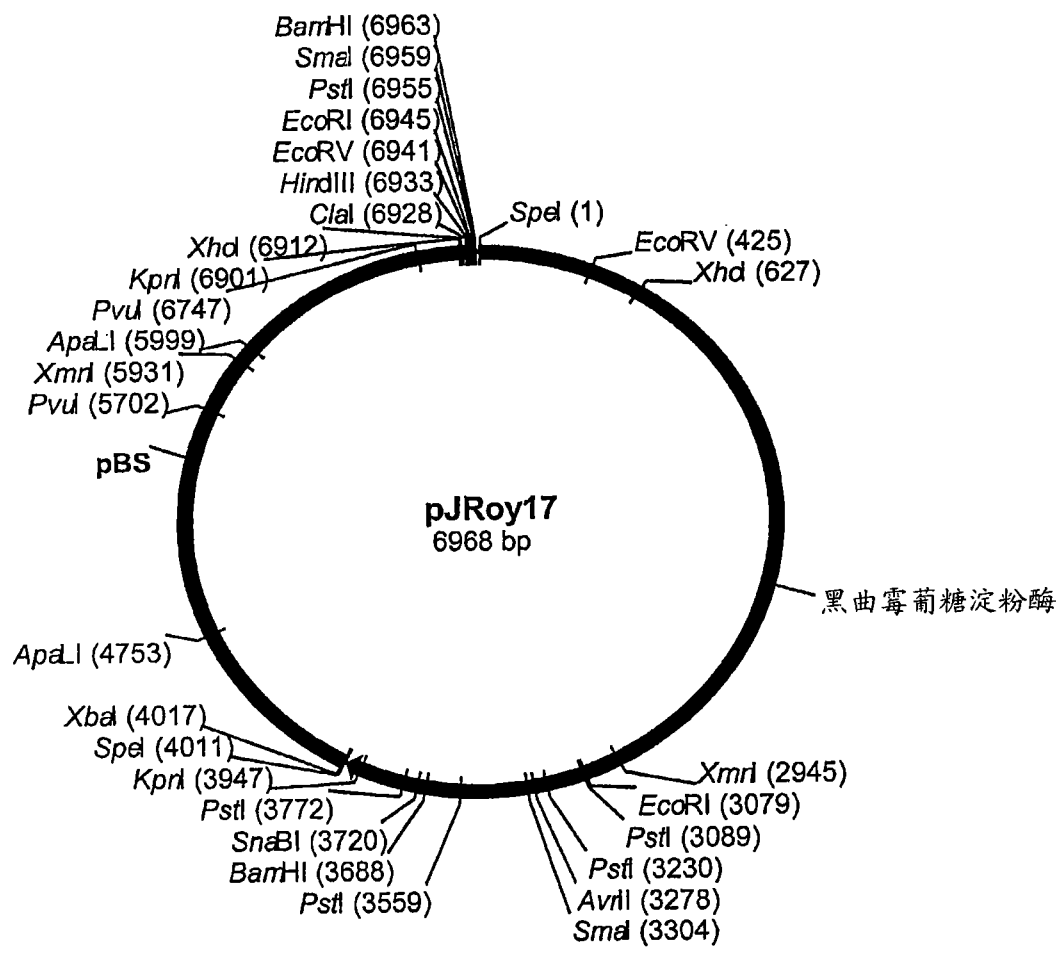


图 3

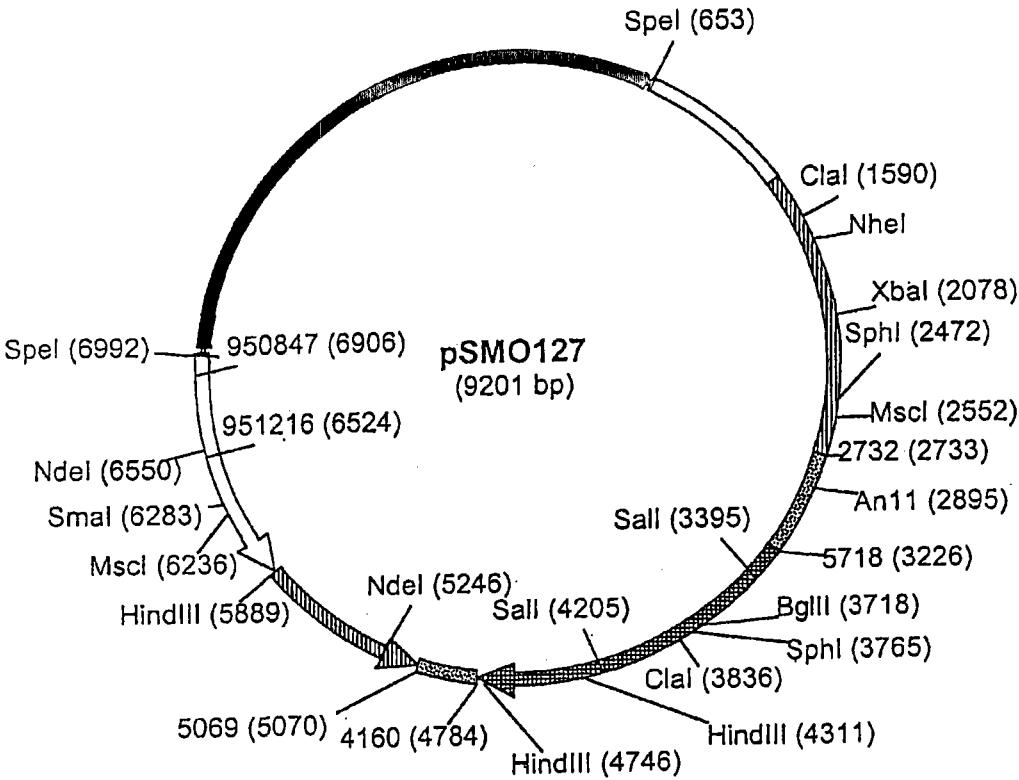


图 4

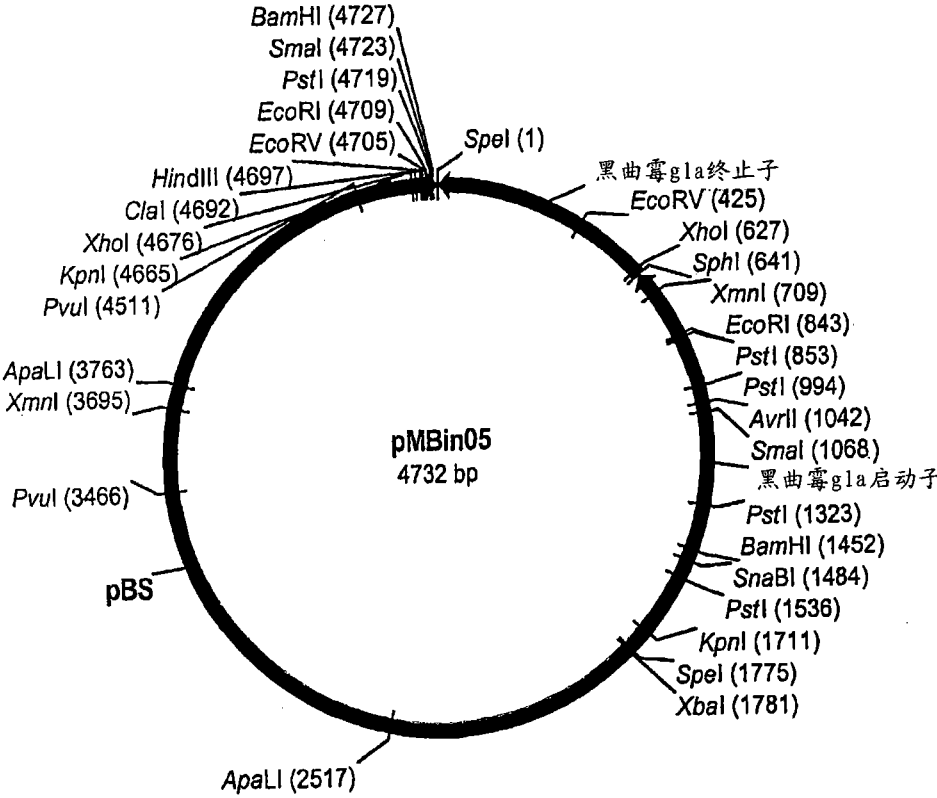


图 5

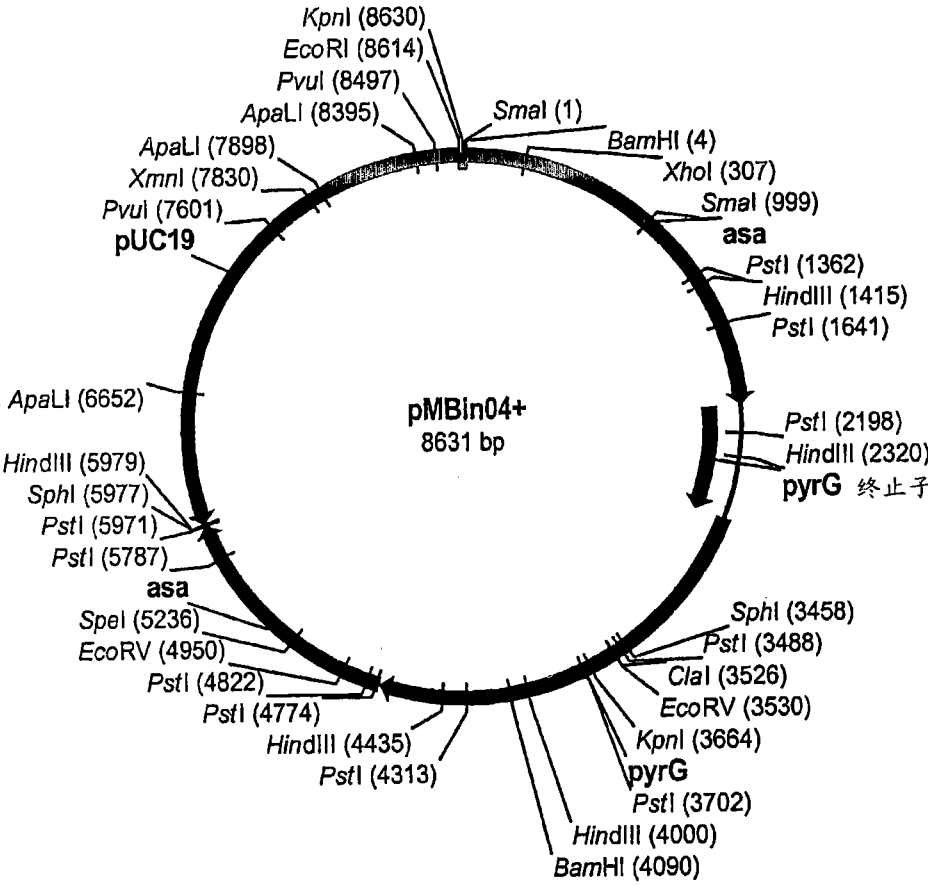


图 6

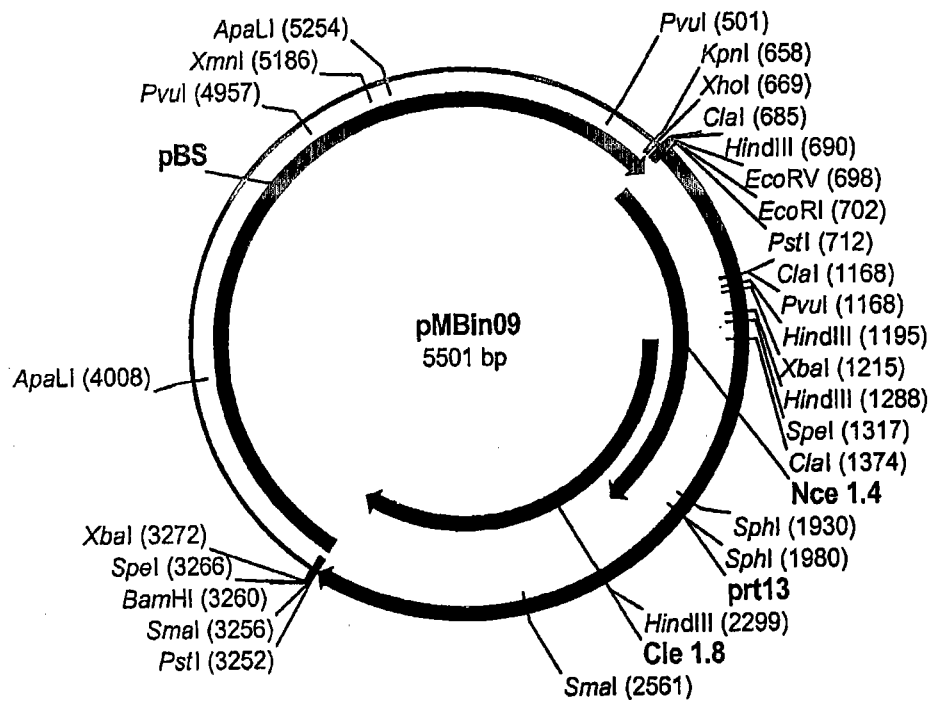


图 7

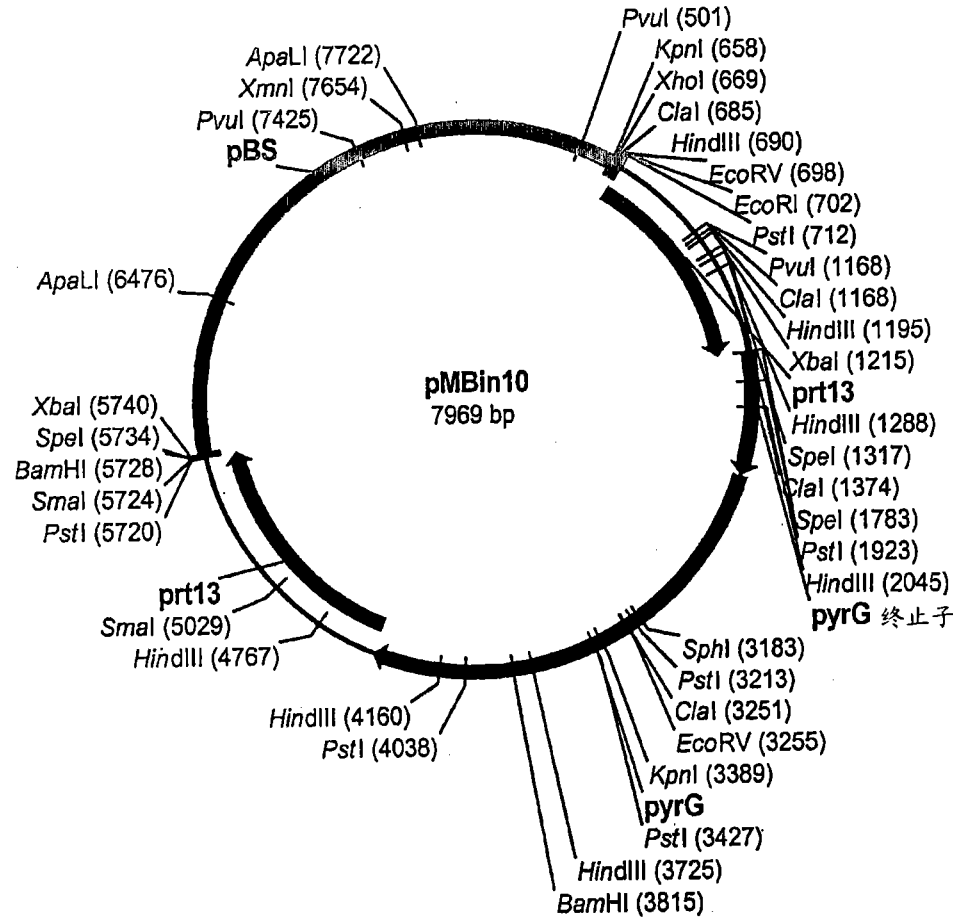


图 8

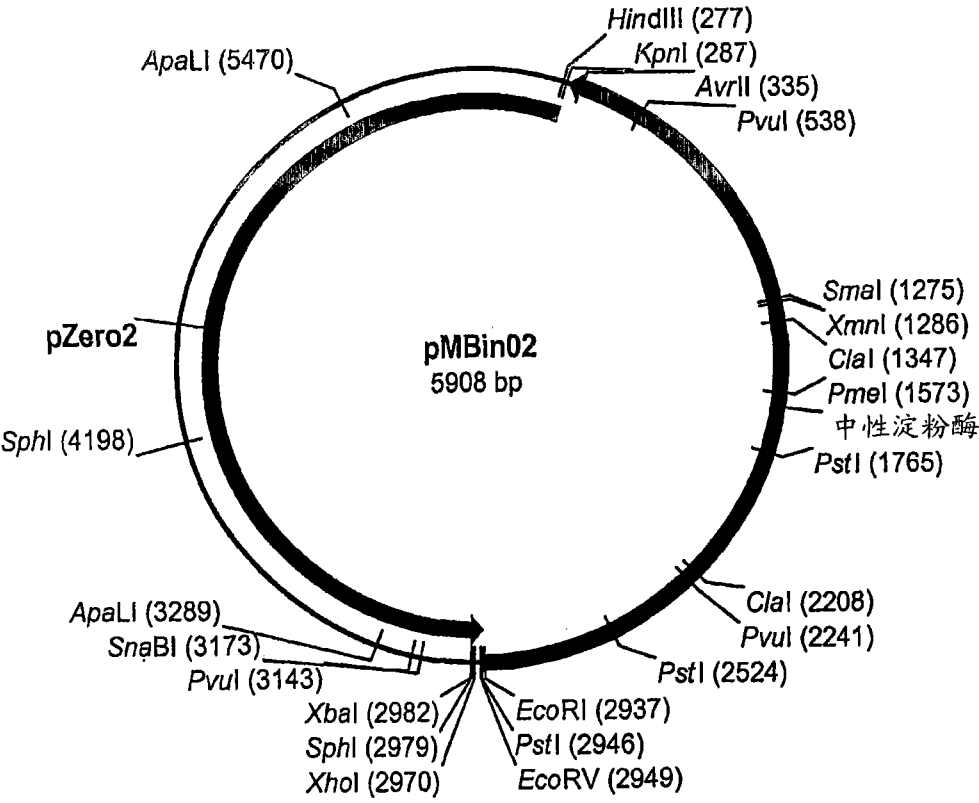


图 9

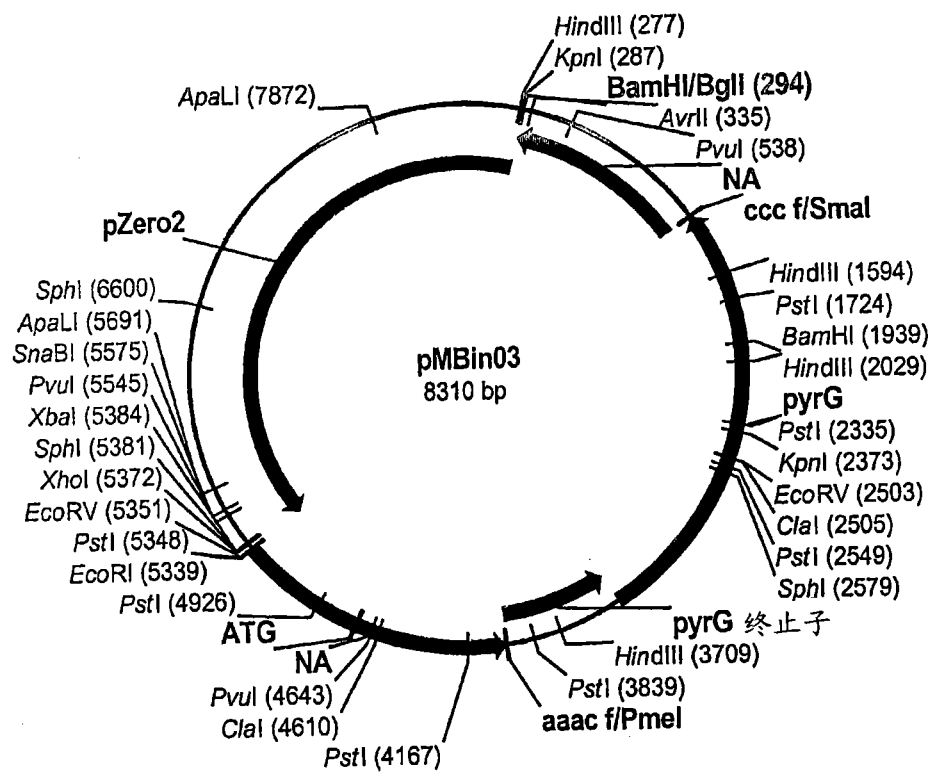


图 10

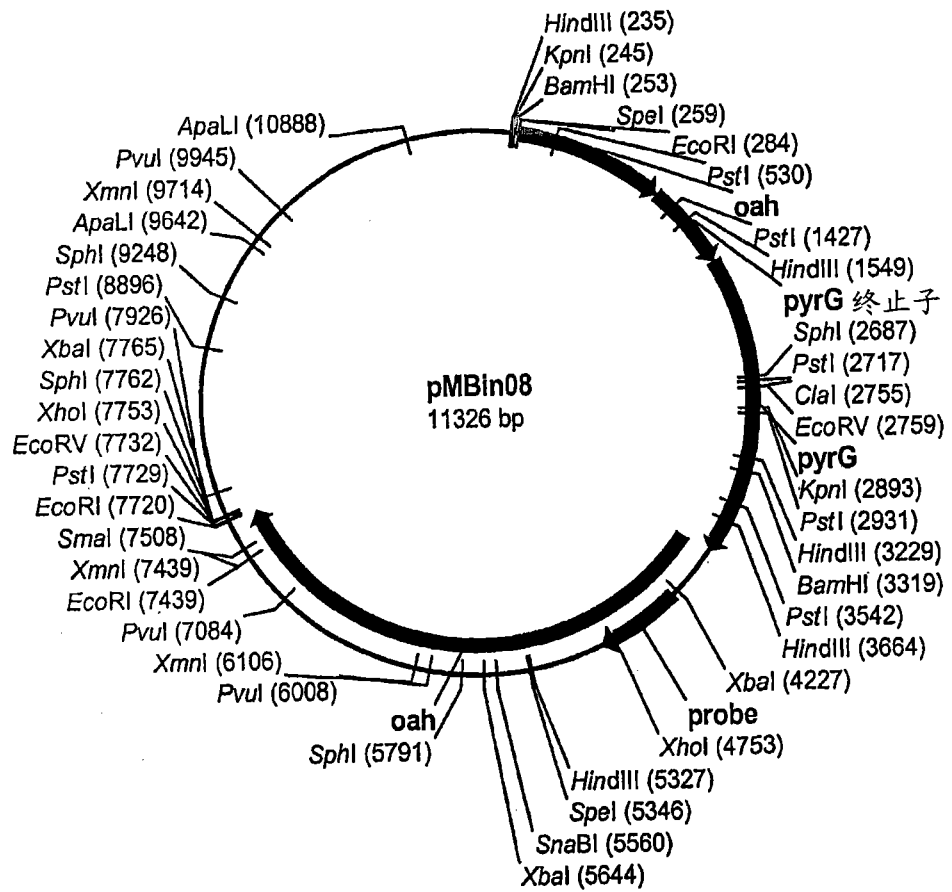


图 11

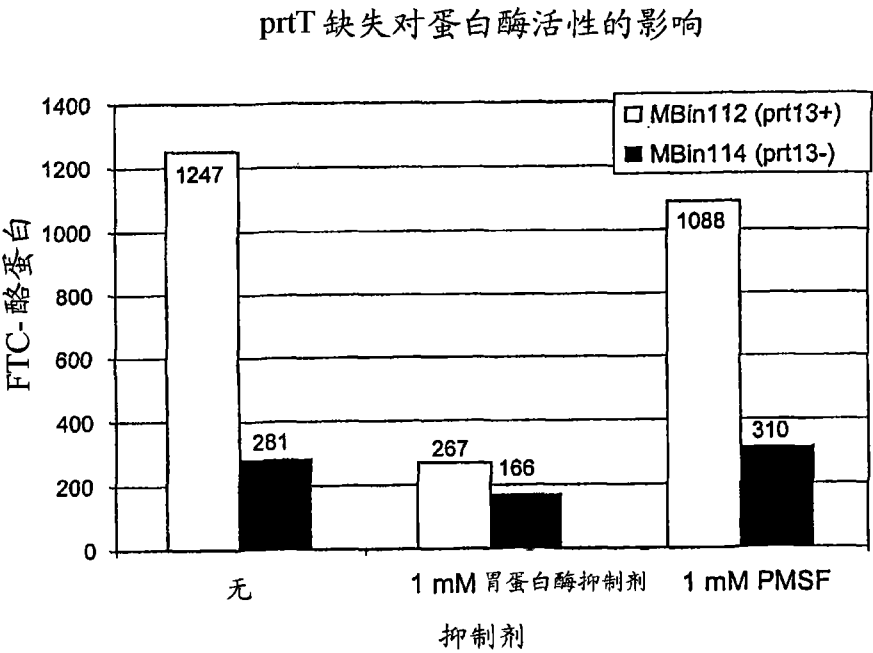


图 12

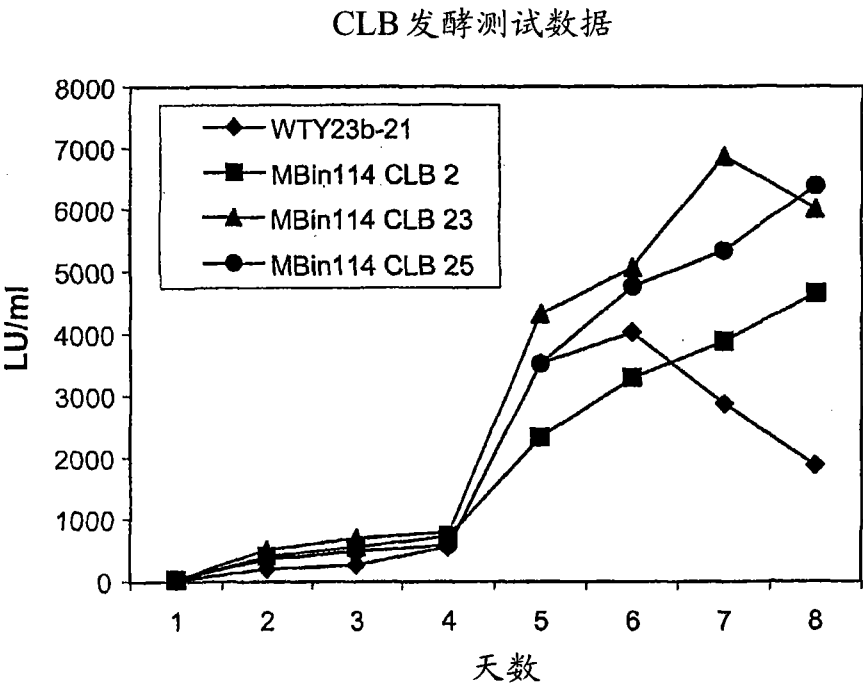


图 13

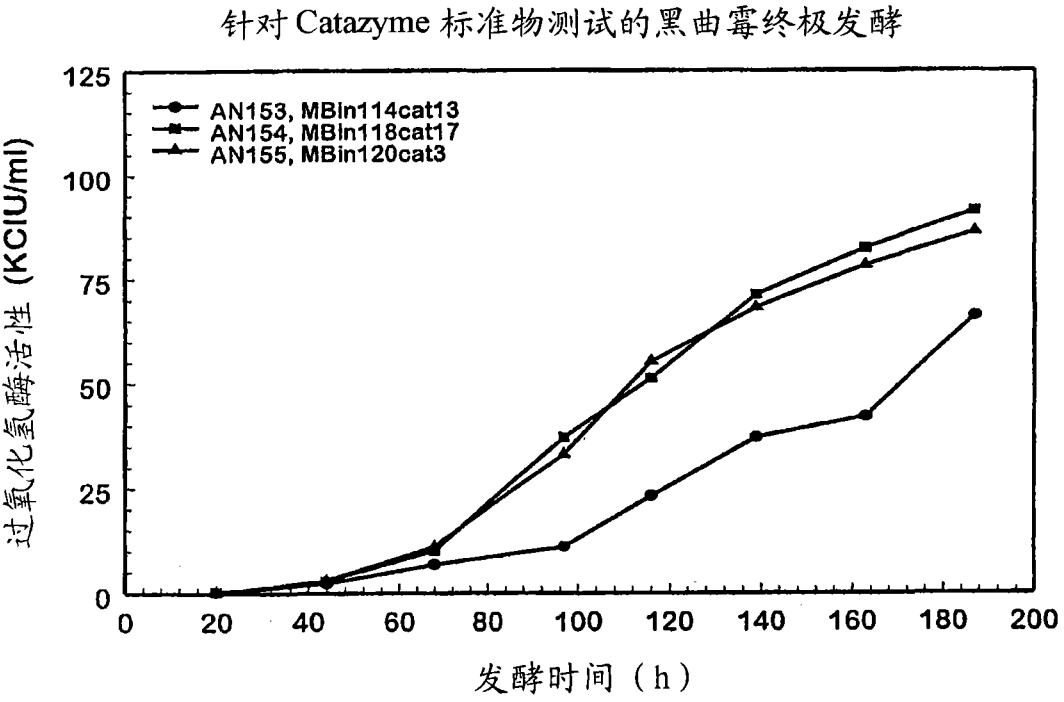


图 14