[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12P 1/00 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380108938.5

[45] 授权公告日 2009 年 4 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 100480391C

[22] 申请日 2003.11.18
[21] 申请号 200380108938.5
[30] 优先权
[32] 2002.11.18 [33] US [31] 60/427,314
[86] 国际申请 PCT/US2003/037139 2003.11.18
[87] 国际公布 WO2004/046373 英 2004.6.3
[85] 进入国家阶段日期 2005.7.18
[73] 专利权人 诺维信股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 戴比·亚弗 彼得·纳姆
[56] 参考文献
US6361973B 2002.5.26
CN1151762A 1997.6.11
CN1367838A 2002.9.4
审查员 朱洪杰

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 4 页 说明书 71 页 附图 8 页

[54] 发明名称

用于在真菌细胞中表达基因的启动子变体

[57] 摘要

本发明涉及一种生产生物物质的方法，其包括：(a)在有益于生物物质产生的条件下培养真菌宿主细胞，其中所述真菌宿主细胞包括与含有选自下述的启动子变体：SEQ ID NO：2，SEQ ID NO：3，SEQ ID NO：4，SEQ ID NO：5，SEQ ID NO：6，SEQ ID NO：7，SEQ ID NO：8，SEQ ID NO：9，SEQ ID NO：10，SEQ ID NO：11，或 SEQ ID NO：12 的第二核苷酸序列可操纵性连接的、编码生物物质的第一核酸序列；及其亚序列；和其杂合和串联启动子；以及(b)从培养基中分离生物物质。本发明还涉及分离的启动子变体，及其构建体、载体，以及真菌宿主细胞，其包括与编码生物物质的核酸序列可操纵连接的启动子变体。

1. 一种生产多肽的方法，其包括:

(a) 在有益于多肽产生的培养基中培养丝状真菌或酵母宿主细胞，其中所述丝状真菌或酵母宿主细胞包括与含有选自 SEQ ID NO: 5 及其亚序列，以及其杂合和串联启动子的启动子变体的第二核酸序列可操纵性连接的、编码多肽的第一核酸序列；和

(b) 从培养基中分离多肽。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的启动子变体包含 SEQ ID NO: 5 的核酸序列，或其亚序列；或其杂合或串联启动子。

3. 权利要求 2 所述的方法，其中所述的启动子变体包含核酸序列 SEQ ID NO: 5。

4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的启动子变体包括至少两个拷贝的 CGGCGTAATTTCGGCC 序列。

5. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的启动子变体增加了第一核酸序列的表达，所述的启动子变体为 SEQ ID NO: 5；及其亚序列。

6. 权利要求 1-5 中任一所述的方法，其中所述的杂合启动子包含两个或多个启动子的部分。

7. 权利要求 6 所述的方法，其中所述的杂合启动子包含选自下述的一个或多个部分：SEQ ID NO: 2，SEQ ID NO: 3，SEQ ID NO: 4，SEQ ID NO: 5，SEQ ID NO: 6，SEQ ID NO: 7，SEQ ID NO: 8，SEQ ID NO: 9，SEQ ID NO: 10，SEQ ID NO: 11，或 SEQ ID NO: 12。

8. 权利要求 7 所述的方法，其中所述的杂合启动子进一步包含另一启动子的一部分。

9. 权利要求 1-5 中任一所述的方法，其中所述的串联启动子包含两个或多个启动子。

10. 权利要求 9 所述的方法，其中所述的串联启动子包含选自下述的两个或多个启动子：SEQ ID NO: 2，SEQ ID NO: 3，SEQ ID NO: 4，SEQ ID NO: 5，SEQ ID NO: 6，SEQ ID NO: 7，SEQ ID NO: 8，SEQ ID NO: 9，SEQ ID NO: 10，SEQ ID NO: 11，或 SEQ ID NO: 12。

11. 权利要求 10 所述的方法，其中所述的串联启动子进一步包括另一

启动子。

12. 权利要求 9 所述的方法，其中所述串联启动子的两个或多个启动子同时启动核酸序列的转录。

13. 权利要求 9 所述的方法，其中串联启动子的两个或多个启动子的一个或多个在真菌宿主细胞的不同生长阶段启动第一核酸序列的转录。

14. 权利要求 1-5 中任一所述的方法，其中所述的丝状真菌或酵母宿主细胞含有一个或多个拷贝的第一核酸序列。

15. 权利要求 1-5 中任一所述的方法，其中所述的丝状真菌或酵母宿主细胞含有一个拷贝的第一核酸序列。

16. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的多肽选自：抗原、酶、生长因子、激素、免疫放大介质、神经递质、受体、报道蛋白、结构蛋白或转录因子。

17. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的多肽为胶原或明胶。

18. 权利要求 16 所述的方法，其中所述的酶为氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、或连接酶。

19. 权利要求 1-5 中任一所述的方法，其中所述的多肽为真菌宿主细胞天然或外源的物质。

20. 权利要求 1-5 中任一所述的方法，其中所述的第一核酸序列包含在真菌宿主细胞的染色体中。

21. 权利要求 1-5 中任一所述的方法，其中所述的第一核酸序列包含在染色体外元件中。

22. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的丝状真菌细胞为支顶孢属、曲霉属、镰孢属、腐质霉属、毛霉菌属（Mucor）、毁丝霉属、链孢霉属、青霉属、草根属(Thielavia)、Tolypocladium、或木霉属的细胞。

23. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的酵母细胞为假丝酵母属、汉逊氏酵母属、克鲁维氏酵母属、毕赤氏酵母属、糖酵母属、裂殖糖酵母属、或 Yarrowia 的细胞。

24. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的丝状真菌宿主细胞为曲霉属细胞。

25. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的丝状真菌宿主细胞为镰孢属细胞。

26. 一种包括选自下述的核酸序列的分离的启动子变体：SEQ ID NO: 5及其亚序列；及其杂合和串联启动子。

27. 权利要求 26 所述的启动子变体，其含有 SEQ ID NO: 5 的核酸序列，或其亚序列；或其杂合或串联启动子。

28. 权利要求 27 所述启动子变体，其含有 SEQ ID NO :5 的核酸序列。

29. 权利要求 26 所述的启动子变体，其中所述的启动子变体包含至少两个拷贝的 CGGCGTAATTTCGGCC 序列。

30. 权利要求 26 所述的启动子变体，其增加了第一核酸序列的表达，所述的启动子变体选自：SEQ ID NO: 2，SEQ ID NO: 3， SEQ ID NO: 4，和 SEQ ID NO: 5；及其亚序列。

31. 权利要求 26-30 中任一所述的启动子变体，其中所述的杂合启动子包含两个和多个启动子的部分。

32. 权利要求 31 所述的启动子变体，其中所述的杂合启动子包含选自下述的一个或多个部分：SEQ ID NO: 2，SEQ ID NO: 3，SEQ ID NO: 4，SEQ ID NO: 5，SEQ ID NO: 6，SEQ ID NO: 7，SEQ ID NO: 8，SEQ ID NO: 9，SEQ ID NO: 10，SEQ ID NO: 11，或 SEQ ID NO: 12。

33. 权利要求 32 所述的启动子变体，其中所述的杂合启动子进一步包含另一启动子的部分。

34. 权利要求 26-30 中任一所述的启动子变体，其中所述的串联启动子包含两个或多个启动子。

35. 权利要求 34 所述的启动子变体，其中所述的串联启动子包含选自下述的两个或多个启动子：SEQ ID NO: 2，SEQ ID NO: 3，SEQ ID NO: 4，SEQ ID NO: 5，SEQ ID NO: 6，SEQ ID NO: 7，SEQ ID NO: 8，SEQ ID NO: 9，SEQ ID NO: 10，SEQ ID NO: 11，和 SEQ ID NO: 12。

36. 权利要求 35 所述的启动子变体，其中所述的串联启动子进一步包括另一启动子。

37. 权利要求 34 所述的启动子变体，其中所述串联启动子的两个或多个启动子同时启动核酸序列的转录。

38. 权利要求 34 所述的启动子变体，其中串联启动子的两个或多个启动子的一个或多个在真菌宿主细胞的不同生长阶段启动第一核酸序列的转录。

39. 核酸构建体，其包含编码多肽的核酸序列，该核酸序列可操纵连接于权利要求 26-38 中任一所述的启动子变体；或其亚序列，或其杂合和串联启动子。

40. 包含权利要求 39 所述的核酸构建体的重组表达载体。

41. 包含权利要求 39 所述的核酸构建体的重组宿主细胞。

42. 一种生产多肽的方法，其包括

(a)在有利于多肽生产的条件下培养同源重组细胞，所述细胞中整合新的转录单元，该转录单元包含权利要求 26-38 中任一所述的启动子变体，外显子，和/或剪接供体位点，其与编码多肽的内源核酸序列的第二外显子可操纵性连接，以及

(b) 回收多肽。

用于在真菌细胞中表达基因的启动子变体

背景技术

技术领域

本发明涉及一种生产生物物质的方法。本发明还涉及分离的启动子变体，以及核酸构建体、载体和包含与编码生物物质的核酸序列可操纵性连接的启动子变体的宿主细胞。

相关领域说明

内源或异源生物物质在真菌宿主细胞，尤其是在丝状真菌细胞如曲霉属(Aspergillus)中的重组生产，为商业化相应规模量生产所述物质提供了一种更理想的载体。

通过构建表达盒可实现内源或异源生物物质的重组生产，其中在表达盒中编码所述蛋白的DNA被置于一种从调控基因中剪切、并适合宿主细胞的启动子的表达调控之下。所述的表达盒通常通过质粒介导的转化从而导入宿主细胞中。通过在表达盒中所含的启动子发挥合适功能所需的诱导条件下培养转化的宿主细胞即可实现所述物质的生产。

用于生物物质重组生产的新的真菌宿主细胞的开发通常需要能适当调控所述物质在宿主细胞中表达的高效启动子。Fusarium venenatum可作为一种用于这种表达的新的宿主细胞(WO 96/00787, WO 97/26330)。此外，现有技术中还记载了可用于在Fusarium venenatum宿主细胞中表达异源基因、来源于尖孢镰孢（Fusarium oxysporum）胰蛋白酶类蛋白酶基因的一种启动子(US 5,837, 847)。美国专利U. S. No. 6,361, 973公开了一种来源于Fusarium venenatum的葡糖淀粉酶启动子。不过，本领域还需要有能调控内源和异源基因表达的新的启动子。

本发明的目的是提供一种在真菌宿主细胞中生产生物物质的改进方法和用于这种生产的新的启动子变体。

发明简述

本发明涉及一种生产生物物质的方法，其包括：（a）在有益于生物物质产生的条件下培养真菌宿主细胞，其中所述真菌宿主细胞包括与具有选自下述核酸序列的启动子变体：SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11，或 SEQ ID NO: 12 的第二核酸序列可操纵性连接的、编码生物物质的第一核酸序列，及其亚序列(subsequence)；和杂合和串联启动子；以及（b）从培养基中分离的生物物质。所述的生物物质对于真菌宿主细胞来说可以是内源和异源的。

本发明还涉及包括具有选自下述核酸序列的分离的启动子变体：SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11，或 SEQ ID NO: 12；及其亚序列；以及杂合和串联启动子；本发明还涉及构建体、载体，以及真菌宿主细胞，其包括与编码生物物质的核酸序列可操纵连接的一个或多个启动子变体。

附图简要说明

图 1A 和 B 表示 Fusarium venenatum 内源葡糖淀粉酶基因启动亚序列的 DNA 序列。

图 2 表示 pDM237 的限制性图谱。

图 3 表示 pJRoy72 的限制性图谱。

图 4 表示 pNham1 的限制性图谱。

图 5 表示 pNham2 的限制性图谱。

图 6 表示 pDM156.2 的限制性图谱。

图 7 表示 pDM222A 的限制性图谱。

发明详述

本发明涉及生产生物物质的方法，其包括：（a）在有益于生物物质产生的条件下培养真菌宿主细胞，其中所述真菌宿主细胞包括与含有选自下述的启动子变体：SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11，或 SEQ ID NO: 12 的第二核酸序列可操纵性连接的、编码生

物物质的第一核酸序列，及其亚序列；和杂合和串联启动子；以及（b）从培养基中分离的生物物质。

在本发明的生产方法中，所述细胞采用本领域已知的方法在适合生物物质产生的营养培养基中培养。例如，所述细胞可采用合适的培养基，在允许生物物质表达和/或分离的条件下，在实验室或工业发酵罐中进行摇瓶震荡培养，小规模或大规模发酵（包括连续发酵、分批发酵、流加发酵、或固态发酵）。所述的培养在包含碳源、氮源和无机盐的适当的营养培养基中，按照本领域已知的步骤来进行。所述的适当的培养基可直接购于供应商处，或根据已公布的配方进行配制（例如，参见美国典型培养物保藏中心的目录）。如果所述的生物物质分泌进入营养培养基，则可直接从培养基中回收所述物质。如果所述生物物质是非分泌型的，则可从细胞裂解物中进行回收。

可采用特定于生物物质的本领域已知的方法来检测所述的生物物质。这些检测方法可包括应用特定抗体，高压液相色谱，毛细管层析法，酶产物形成(formation of an enzyme)，酶底物消失(disappearance of an enzyme substrate)，或 SDS- PAGE。例如，可通过酶检测法来确定酶的活性。本领域已知多种酶的酶活性检测方法（参见，例如，D. Schomburg & M.Salzmann (eds.), Enzyme Handbook, Springer-Verlag, New York, 1990）。

获得的生物物质可通过本领域已知的方法来分离。例如，可通过常规操作方法来分离感兴趣的多肽，所述方法包括但不仅限于，例如离心、过滤、抽提、喷雾干燥、蒸发或沉淀。分离的多肽然后可通过各种本领域已知的方法进一步进行纯化，所述方法包括但不仅限于，例如层析法（例如，离子交换层析、亲和层析、疏水层析、色谱聚焦、大小排阻）、电泳法（例如，制备性等电聚焦法（IEF））、溶解度差异法（例如，硫酸铵沉淀），或抽提法（参见，例如，蛋白质纯化 J. -C. Janson & Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989）。可通过，例如，抽提、沉淀、或溶解度差异、或本领域已知的任何方法来从培养基中分离感兴趣的代谢产物。可采用适合代谢产物的方法来进一步纯化分离的代谢产物。

启动子

本文中，术语“启动子”定义为一种结合 RNA 聚合酶并指导聚合酶到达编码生物物质的核酸序列的正确的下游转录起始位点从而开始转录的 DNA 序列。RNA 聚合酶能有效的催化与编码区适当 DNA 链互补的信息 RNA 的装配。术语“启动子”还可理解为包括用于转录 mRNA 后用于翻译的 5'非编码区（介于启动子和转录起始位点之间），cis-作用转录调控元件，如增强子和能与转录因子相互作用的其它核酸序列。

本文中，术语“启动子变体”定义为具有亲本启动子发生一个或多个核酸取代、缺失、和/或插入获得的核酸序列的启动子，其中所述的变体启动子与亲本启动子相比具有更强或更弱的启动子活性。术语“启动子变体”还包括天然变体和采用本领域已知的方法获得的体外产生的变体，所述方法可以是传统诱变、定点诱变、和 DNA 改组（DNA shuffling）技术。

本文中，术语“杂合启动子”定义为融合在一起从而产生两个或多个启动子的融合体的序列的两个或多个启动子的部分，其中当与编码序列可操纵性连接时，可介导编码序列转录成为 mRNA。

本文中，术语“串联启动子”定义为，两个或多个启动亚序列，其中每一序列分别可操纵性的与编码序列连接从而介导编码序列转录成为 mRNA。

本文中，术语“可操纵性连接”定义为一种结构，其中调控序列，如启动亚序列被置于相对编码序列来说适当的位置上，从而所述调控序列指导由编码序列编码的生物物质的产生。

本文中，术语“编码序列”被定义为能转录成为 mRNA 的核酸序列，其能被翻译成为生物物质，如多肽，其中所述序列被置于适当的调控序列的调控之下。所述编码序列的界限一般由位于开发阅读框刚好的上游的、其在 mRNA 的 5'末端的 ATG 起始密码子和位于开发阅读框正下游的、mRNA 的其在 3'末端的转录终止亚序列来确定。编码序列可包括，但不仅限于，基因组 DNA，cDNA，半合成、合成和重组核酸序列。

本发明的启动子变体可具有一个或多个突变。其中，每一突变都是一单独的核苷酸的取代、缺失、和/或插入。可采用本领域已知的任何方法，如标准诱变、定点诱变、或 DNA 改组（DNA shuffling）技术来实现向启动子中导入核苷酸的取代、缺失、和/或插入。利用超螺旋、插入了感兴趣基因的双链 DNA 载体和两含有目的突变的合成引物是一种特别有用的操作方法。分别互补于载体相对链的寡核苷酸引物可通过 Pfu DNA 聚合酶在热循

环中进行延伸。通过引物的掺入，可产生含有交错缺口（staggered nicks）的突变质粒。热循环后，采用特异性识别甲基化和半甲基化 DNA 的 DpnI 来处理产物，消化亲本 DNA 模板从而筛选含突变的合成 DNA。本领域已知的其它方法也可采用。

本发明的启动子变体的亲本启动亚序列为如图 1A 和 1B 所示的 SEQ ID NO: 1，或为存在于大肠杆菌 NRRL B-30067 中的质粒所携带的核酸序列。

SEQ ID NO: 1 中选择进行缺失、插入或取代的区域是基于对 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子核酸序列的观察来确定的。在 SEQ ID NO: 1 的 3792 至 3807，3678 至 3693，和 3814 至 3824 位置上（美国专利 No. 6,361,973）存在与其它淀粉诱导真菌启动子中的基元序列具有同源性的区域。该区域与现有技术中记载的曲霉属淀粉酶启动子的 IIIa和 IIIb 区域存在序列相似性（Minetoki 等, 1996, Current Genetics 30: 432-438）。在米曲霉（Aspergillus oryzae）的 α 葡糖苷酶，淀粉酶 B 和葡糖淀粉酶启动子以及黑曲霉（Aspergillus niger）的 α 葡糖苷酶中均发现了 IIIa 区域。仅在黑曲霉和米曲霉的 α 葡糖苷酶启动子中发现了 IIIb 区域。Fusarium venenatum 的葡糖淀粉酶启动子的 3792 至 3807 和 3678 至 3693 区域与 IIIa 区域共有序列具有一定的序列同源性，而 3814 至 3824 区域与 IIIb 序列具有同源性。Minetoki 等对曲霉属启动子的分析表明：IIIa 区域是在淀粉或麦芽糖存在的情况下高效表达所需，而 IIIb 区域是高效表达所需的，但在淀粉诱导中不起作用。Minetoki 等进一步指出通过向米曲霉的 α 葡糖苷酶启动子中导入多个拷贝的 IIIa 区域可观察到启动子活性显著增加。在本发明中，构建了 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子变体，其证明推测的 IIIa 和 IVb 区域对表达非常重要。此外，加入了 3792 至 3807 区域下游 35 bp 的 IIIa 区域可增强启动子。但是，曲霉属启动子中存在的 IIIa 共有序列（consencus）不如内源 Fusarium venenatum 启动亚序列有效（Minetoki 等, 1996, supra）。

在一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO: 2 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO: 3 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO: 4 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO: 5 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体包括至少两个拷贝，更优选至少三个拷贝，和最优选至少四个拷贝的 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子中的 CGGCGTAATTTCGGCC 序列。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO: 6 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO:7 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO: 8 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO: 9 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO: 10 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO:11 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在另一优选实施方案中，所述的启动子变体具有 SEQ ID NO: 12 所示的核酸序列，或其亚序列。所述亚序列优选的含有至少约 1200 个核苷酸，更优选至少约 1500 个核苷酸，和最优选至少约 1800 个核苷酸。

在本发明方法的一优选实施方案中，所述的能增强编码生物物质的核酸序列表达的启动子变体选自下述：SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO : 5；或其亚序列。

在本发明方法的另一优选实施方案中，所述的能降低编码生物物质的核酸序列表达的启动子变体选自下述：SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11，或 SEQ ID NO: 12；及其亚序列。

在本发明的方法中，所述的启动子变体还可以是杂合启动子，其可以包括：本发明的一个或多个启动子的一部分；本发明的启动子的一部分和其它启动子的一部分，例如，一启动子的前导序列和另一启动子的转录起始位点；或本发明的一个或多个启动子的一部分和一个或多个其它启动子的一部分。其它启动子可以是在选择的真菌宿主细胞中具有转录活性的任何启动亚序列，其包括突变、截短、和杂合启动子， 其可从与宿主细胞同源或异源的编码胞内或胞外多肽的基因中获得。其它的启动亚序列相对于编码生物物质的核酸序列来说可以是内源或异源的，相对于细胞来说可以是内源或异源的。

与本发明的启动子变体共同用于杂合启动子构建体的其它启动子的例子包括：来源于米曲霉 TAKA 淀粉酶、Rhizomucor miehei 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 α 淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 α 淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉（Aspergillus awamori）葡糖淀粉酶(glaA)，Rhizomucor miehei 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）的乙酰胺酶、Fusarium venenatum 淀粉葡糖苷酶、尖孢镰孢（Fusarium oxysporum）胰蛋白酶类蛋白酶(WO 96/00787)、瑞氏木霉（Trichoderma reesei）纤维二糖水解酶 I、瑞氏木霉纤维二糖水解酶 II、瑞氏木霉内切葡聚糖酶 I、瑞氏木霉内切葡聚糖酶 II、瑞氏木霉内切葡聚糖酶 III、瑞氏木霉内葡聚糖酶 IV、瑞氏木霉内葡聚糖酶 V、瑞氏木霉木聚糖酶 I、瑞氏木霉木聚糖酶 II、瑞氏木霉 β 木糖苷酶、以及 NA2-tpi 启动子（一种来源于黑曲霉中性 α 淀粉酶和米曲霉磷酸丙糖异构酶基因的杂合启动子）、Fusarium venenatum Daria 启动子、Fusarium venenatum Quinn 启动子、啤酒糖酵母(Saccharomyces cerevisiae)烯醇化酶（ENO-1）、啤酒糖酵母半乳糖激酶（GAL1）、啤酒糖酵母乙醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶（ADH2/GAP）、和啤酒糖酵母 3-磷酸甘

油酸激酶基因的启动子；及其突变、截短、和杂合启动子。其它有用的酵母细胞启动子记载于 Romanos 等，1992，Yeast 8: 423-488。

所述的启动子变体还可是串联启动子，其包括两个或多个(two more)本发明的启动子变体，或可选的一个或多个本发明的启动子变体和一个或多个如上文所述的其它启动子。串联启动子的两个或多个启动亚序列可以同时启动核酸序列的转录。可选的，串联启动子的一个或多个启动亚序列可以在细胞生长的不同时期来启动核酸序列的转录。

在本发明的方法中，即使野生型启动子是来源于该核酸序列的天然序列，本发明的杂合或串联启动子也可以理解为相对于编码生物物质的核酸序列来说的异源序列。例如，在由至少两个启动子组成的串联启动子中，启动子之一可以是编码生物物质的核酸序列的野生型启动子。

本发明的启动子变体具有至少 20%，优选的至少约 40%，更优选至少约 60%，更优选至少约 80%，更优选至少约 90%，更优选至少约 100%，进一步优选至少约 200%，最优选至少约 300%，和进一步最优选约 400%的如 SEQ ID NO: 1 所示的启动子的启动子活性。

生物物质的编码核酸序列

对于感兴趣的真菌宿主细胞来说，由第一核酸序列编码的生物物质可以是内源的或异源的。所述的生物物质可以是任何生物高分子或代谢产物。所述的生物物质可以由构成生物合成或新陈代谢途径的单个基因或一系列基因编码，或者可以直接是单个基因产物或一系列基因的产物。因此，术语“编码生物物质的第一核酸序列”可以理解为包含涉及生物物质生产的一个或多个基因。本文中，术语“异源生物物质”被定义为非宿主细胞内源的生物物质；或一种经修饰改变了内源生物物质结构的内源生物物质。

在本发明的方法中，生物聚合物(biopolymer)可以是任意的生物聚合物。本文中，术语“生物聚合物”被定义为具有一致的、类似的、或不同的亚基（单体）的链分子（或聚合物）。生物聚合物可以是，但不限于，核酸、多聚胺、多元醇、多肽（或聚酰胺）、或多糖。

在一优选实施方案中，所述的生物聚合物为多肽。所述多肽可以是具有感兴趣生物活性的任何多肽。本文中，术语“多肽”不是指被编码产物的特定长度，因此可以包括肽、寡肽、和蛋白。术语“多肽”还包括两个或多个肽结

合所形成的编码产物。多肽还包括杂交多肽，其包括来源于至少两个不同多肽的一部分或完全多肽序列组合，其中所述多肽中的一个或多个可以是真菌细胞异源的。多肽进一步包括上述多肽和杂交多肽的天然产生的等位变体和工程改造的变体。

在优选实施方案中，所述多肽为抗体、抗原、抗微生物肽、酶、生长因子、激素、免疫放大介质(immunodilator)、神经递质、受体、报道蛋白、结构蛋白和转录因子。

在一更优选实施方案中，所述多肽为氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶、或连接酶。在一更优选的实施方案中，所述多肽为α-葡糖苷酶、氨基肽酶、淀粉酶、碳水化物分解酶、羧基肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶(cutinase)、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、葡糖脑苷脂酶、α-葡糖苷酶、β-葡糖苷酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、mutanase、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、磷脂酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶(transglutaminase)、尿激酶、或木聚糖酶。

在其它优选实施方案中，所述的多肽为胶原或明胶。

在另一优选实施方案中，所述的生物聚合物为多糖。所述的多糖可以是任何多糖分子，其包括，但不仅限于粘多糖（例如肝素和透明质酸）以及含氮多糖（例如几丁质）。在一更优选的实施例中，所述多糖为透明质酸。

在本发明的方法中，所述代谢物可以是任何代谢物。所述的代谢物可以由一个或多个基因来编码，例如生物合成途径或代谢途径。术语“代谢物”包括初级代谢物和次级代谢产物。初级新陈代谢是细胞初级或一般代谢的产物，其涉及能量代谢、生长和结构。次级代谢产物为次级代谢的产物（参见，例如 R. B. Herbert, The Biosynthesis of Secondary Metabolites, Chapman and Hall, New York, 1981）。

初级代谢物可以是，但不仅限于，氨基酸、脂肪酸、核苷、核苷酸、糖、甘油三酯、或维生素。

次级代谢产物可以是，但不仅限于，生物碱、香豆素、类黄酮、聚酮化合物、奎宁、类固醇、肽或萜。在一优选实施方案中，次级代谢产物为一种抗生素、抗饲养剂(antifeedant)、诱引剂、杀菌剂、杀真菌剂、激素、杀虫剂、或杀啮齿类剂。

编码感兴趣生物物质的核酸序列可以是来源于任何原核的、真核的或其它来源的。为了实现本发明的目的，本文中与特定来源有关的术语“来源于”是指所述的生物物质是由其中源于该来源的基因被插入的细胞或来源所产生的。

用于分离或克隆编码感兴趣的生物物质的核酸序列的方法是本领域公知的，其包括：从基因组 DNA 中分离、从 cDNA 中制备、或其结合。可实施从该基因组 DNA 中克隆核酸序列，例如通过公知的聚合酶链反应（PCR）方法。可参见，例如 Innis 等, 1990, PCR Protocols : A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York。所述的克隆步骤包括：包含编码生物物质的核酸序列的目的核酸片段的剪切和分离，片段向载体分子的插入，和重组载体向突变真菌细胞的整合，从而核酸序列的多个拷贝或克隆将在该细胞中进行复制。核酸序列可以来源于基因组、cDNA、RNA、半合成、合成起始、或其任意的组合。

核酸构建体

本发明还涉及包括编码生物物质的核酸序列的核酸构建体，其中所述序列与至少一个本发明的启动子变体，和一个或多个调控序列可操纵性的连接，所述调控序列在适合调控序列的条件下、在适当的宿主细胞中指导编码序列的表达。表达可以理解为包括涉及生物物质生产的任何步骤，其包括，但不限于，转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

本文中，“核酸构建体”被定义为一种单链或双链的核酸分子，其可以从天然存在的基因中分离得到，或者可以被修饰从而含有以一种天然中不可能存在的组合或并排的方式存在的核酸片段。当核酸构建体含有编码序列和编码序列表达所需的全部调控序列时，术语核酸构建体与术语表达盒的含义相同。

为了实现生物物质的表达，可进一步通过各种方式来对分离的编码生物物质的核酸序列进行操作。根据采用的表达载体，理想的或必要的可在所述核酸序列插入载体之前，进行核酸操作。利用重组 DNA 方法修饰核酸序列的技术是本领域的公知技术。

在本发明的方法中，所述的核酸序列可包括一个或多个的天然调控序列，或者所述的一个或多个天然调控序列被一个或多个外源调控核酸序列所取代从而改善编码序列在宿主细胞中的表达。

本文中，术语"调控序列"被定义为包括对于本发明的生物物质表达有利的或所需的全部组分。每一调控序列对于编码生物物质的核酸序列来说既可以是天然的，也可以是外源的。这种调控序列包括，但不仅限于，前导序列，多聚腺苷酸序列，前肽序列，本发明的启动子变体，信号肽序列和转录终止子。至少，所述调控序列包括本发明的启动子变体，转录和翻译终止信号。为了实现导入特定的限制性位点从而有助于调控序列与编码生物物质的核酸序列的编码区相连接的目的，可制备带有接头的调控序列。

调控序列可以是合适的转录终止亚序列，其为能被宿主细胞识别的从而终止转录的序列。终止序列可操纵的与编码生物物质的核酸序列的3'末端连接。

丝状真菌宿主细胞的优选的终止子为来源于米曲霉TAKA淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合成酶、黑曲霉α-葡糖苷酶，和尖镰孢酶胰蛋白酶类蛋白酶的基因。

酵母宿主细胞优选的终止子来源于啤酒糖酵母烯醇化酶，啤酒糖酵母细胞色素C（CYC1），和啤酒糖酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因。酵母宿主细胞中其它有用的终止子记载于Romanos等, 1992, supra中。

所述调控序列还可以是适当的前导序列，对于宿主细胞翻译来说重要的mRNA的非翻译区。前导序列可以操纵的与编码生物物质的核酸序列的5'末端相连接。能在所选定的宿主细胞中起作用的任何前导序列都可以用于本发明。

丝状真菌宿主细胞的优选前导序列(leader)来源于米曲霉TAKA淀粉酶、黑曲霉磷酸丙糖异构酶、Fusarium venenatum胰蛋白酶、和Fusarium venenatum葡糖淀粉酶的基因。

酵母宿主细胞合适的前导序列来源于啤酒糖酵母烯醇化酶（ENO-1）、啤酒糖酵母 3-磷酸甘油激酶、啤酒糖酵母α因子、啤酒糖酵母乙醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶（ADH2/GAP）。

调控序列还可以是多聚腺苷酸序列，该序列可与核酸序列的3'末端可操纵的连接，当转录时，所述序列可被宿主细胞作为信号识别从而向转录的

mRNA 中添加多聚腺苷酸残基。在选定的真菌宿主细胞中具有功能的任何多聚腺苷酸序列均可用于本发明。

丝状真菌宿主细胞的优选的多聚腺苷酸序列来源于米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合成酶、尖镰孢酶胰蛋白酶类蛋白酶、和黑曲霉 α-葡糖苷酶的基因。

酵母宿主细胞有用的多聚腺苷酸序列记载于 Guo & Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15 : 5983-5990 中。

所述调控序列还可以是信号肽编码区，其编码与多肽氨基末端相连的氨基酸并且指导编码的多肽进入细胞分泌途径。核酸序列的编码序列的 5'末端可内在的含有信号肽编码区，其与编码分泌多肽的编码区片段以通读翻译阅读框的形式天然连接。可选的，编码序列的 5'末端可含有编码序列外源的信号肽编码区。当编码序列不天然的含有信号肽编码区时，则需要引入外源信号肽编码区。可选的，为了增强多肽的分泌，可以很简单的采用外源信号肽编码区来取代天然信号肽编码区。但是，任何能指导表达的多肽进入所选定的真菌宿主细胞的分泌途径的信号肽编码区都可用于本发明。

有效的丝状真菌宿主细胞的信号肽编码区为来源于米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、Rhizomucor miehei 天冬氨酸蛋白酶、Humicola insolens 纤维素酶、和 Humicola lanuginosa 脂肪酶的信号肽编码区。

酵母细胞有用的信号肽来源于啤酒糖酵母 α 因子、啤酒糖酵母转化酶。其它有用的信号肽编码区记载于 Romanos 等, 1992, supra 中。

调控序列还可以是前肽（propeptide）的编码区，其编码位于多肽氨基末端位置的氨基酸序列。获得的多肽被称作酶原（proenzyme）或前多肽（propolypeptide）（或在某些情况下被称作酶原 zymogen）。前多肽通常处于无活性状态，并且可通过从前多肽上切除前肽的催化或自动催化作用转化成为成熟有活性的多肽。前肽编码区可来源于啤酒糖酵母 α 因子、Rhizomucor miehei 天冬氨酸蛋白酶、和嗜热毁丝酶（Myceliophthora thermophila）漆酶的基因。

信号肽和前肽区域均位于多肽的氨基末端，前肽区域位于多肽的氨基末端附近，而信号肽区域位于前肽的氨基末端附近。

可期望的，可加入能调节与宿主细胞生长相关的生物物质的表达的调控序列。调控系统的例子为那些因化学或物理刺激，包括给予调控化合物从而导致基因表达开启或关闭的例子。在酵母中，可采用 ADH2 系统或 GAL1 系统。在丝状真菌中，TAKAα 淀粉酶启动子、黑曲霉葡糖淀粉酶启动子、米曲霉葡糖淀粉酶启动子、和 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子均可用作调控序列。其它调控序列的例子为那些允许基因扩增的序列。在真核系统中，其包括在存在氨甲蝶呤的情况下扩增的二氢叶酸还原酶基因，和在重金属存在的情况下扩增的金属硫蛋白基因。在该情况下，编码生物物质的核酸序列可以可操纵的与调控序列相连。

本发明还涉及能改变宿主细胞内源或外源的编码生物物质的基因的表达的核酸构建体。所述构建体可含有改变内源基因表达所需的最少数目的元件。在一实施例中，所述核酸构建体优选的含有(a)靶序列，(b)本发明的启动子变体，(c)外显子，和(d)剪接供体（splice-donor）位点。在核酸构建体导入细胞后，构建体通过同源重组从内源基因位点进入细胞基因组。靶序列指导元件(a)-(d)整合至内源基因中，其中元件(b)- (d)可操纵的与内源基因连接。在另一实施例中，核酸构建体含有(a)靶序列，(b)本发明的启动子变体，(c)外显子，(d)剪接供体位点，(e)内显子，和(f)结合受体位点，其中靶序列指导元件(a)- (f)的整合，其中元件(b)- (f)可操纵的与内源基因连接。不过，所述构建体还可含有其它的元件如选择标记。

在两个实施例中，这些元件的导入导致了新的转录单元产生，其中内源基因的表达被改变了。基本上，新的转录单元为导入的靶构建体和内源基因的序列融合产物。在一内源基因被改变的实施方案中，该基因被活化。在该实施例中，通过插入能使待表达基因以明显高的水平在相应的亲本细胞中表达的调控序列，同源重组用于取代、裂解、或失活那些与亲本细胞的内源基因相关的常规调控区。通过本领域公知的技术（参见美国专利 No. 5,641, 670），在构建体中包含扩增选择性标记基因可进一步扩增活化基因。在另一内源基因被改变的实施方案中，基因的表达水平被降低了。

靶序列可包含在内源基因中，毗邻该基因，位于该基因上游，或位于下游和与内源基因相距一段距离。可采用一个或多个靶序列。例如环状质粒或 DNA 片段优选的采用单个靶序列，而线性质粒或 DNA 片段优选的采用两个靶序列。

构建体进一步含有内源基因的一个或多个外显子。外显子被定义为一种复制成 RNA 并且在成熟 mRNA 分子中存在的 DNA 序列，其中外显亚序列与内源基因的编码区在同一阅读框内。外显子可以，可选的，含有编码一个或多个氨基酸和/或部分的编码氨基酸的 DNA。可选的，外显子含有相应于 5'非编码区的 DNA。当外源的外显子或外显子编码一个或多个氨基酸和/或氨基酸的一部分时，则设计得到了核酸构建体，使得在转录和拼接后，开放阅读框与内源基因编码区域处于同一开放阅读框中，从而来源于第二个外显子的 mRNA 的一部分的正确阅读框不会改变。

构建体的剪接供体位点指导一个外显子与另一个外显子的拼接。典型的，第一个外显子位于第二个外显子的 5'端，并且与第一个外显子的 3'侧重叠和侧面相接的剪接供体位点可识别位于第二个外显子 5'侧侧接的第二外显子的结合受体位点。受体剪接位点，与供体剪接位点类似，为一指导外显子与另一外显子拼接的序列。与剪接供体位点一起作用，剪接装置采用结合受体位点来影响内含子的去除。

本发明进一步涉及生产生物物质的方法，其包括（a）在有利于生物物质产生的条件下培养同源重组的细胞，其中所述细胞整合了新的转录单元，其包括本发明的启动子变体、外显子、和/或与编码生物物质的内源核酸序列的第二外显子可操纵性连接的剪接供体位点；和（b）回收生物物质。该方法基于基因活化技术的应用，例如，如美国专利 No. 5,641, 670 所述。

表达载体

本发明还涉及重组表达载体，其包括本发明的启动子变体、编码生物物质的核酸序列、和转录和翻译终止信号。上述各种核酸和调控序列可结合使用从而产生可包括一个或多个方便的限制性酶切位点并允许编码生物物质的启动子和/或核酸序列在该位点插入或取代的重组表达载体。可选的，可通过插入核酸序列或包含启动子变体和/或序列的核酸构建体进入适当的表达载体来表达核酸序列。在表达载体构建过程中，编码序列位于载体中从而编码序列与本发明的启动子变体和一个或多个适当的表达调控序列可操纵的连接。

所述的重组表达载体可以是任意载体（例如，质粒或病毒），其可以方便的用于重组 DNA 过程，并且可实现核酸序列的表达。典型的，根据载体

与该载体待导入的宿主细胞的相容性来选择载体。载体可以是线状或闭合环状的质粒。

载体可以是自主复制的载体，即所述载体以染色体外单元的结构存在，其复制过程独立于染色体的复制，例如，质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可含有保证自我复制的任何方式。可选的，所述载体可以是一种当导入宿主细胞时能整合至其所导入的细胞的基因组并与基因组一起复制的元件。此外，可采用单个载体或质粒，或者共同含有待导入宿主细胞基因组的全部 DNA 的两个或多个载体或质粒，或转座子。

本发明的载体优选的含有一个或多个可允许方便的筛选转化细胞的选择性标记。选择性标记为能提供抗生剂或病毒抗性，重金属抗性，相对营养缺陷型的原营养型，及其类似性质的基因产物。合适的酵母宿主细胞标记为 ADE2，HIS3，LEU2，LYS2，MET3，TRP1，和 URA3。可用于丝状真菌宿主细胞的合适的选择标记包括，但不仅限于：amdS (乙酰胺酶)，argB (鸟氨酸氨基甲酰基转移酶)，bar (膦丝菌素乙酰基转移酶)，hygB (潮霉素磷酸转移酶), niaD (硝酸还原酶)，pyrG (乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶)， sC(硫酸腺嘌呤转移酶), trpC (邻氨基苯甲酸合成酶)，及其等价物。曲霉属细胞中优选的采用的为黑曲霉或米曲霉的 amdS 和 pyrG 基因以及吸水链霉菌 (Streptomyces hygroscopeicus)的 bar 基因。镰孢属细胞中优选的采用的为 bar，amdS，pyrG，或 hygB 基因。

本发明的载体优选的含有允许载体稳定整合至宿主细胞基因组或所述载体独立于基因组在细胞中自主复制的元件。

载体可通过编码生物物质的核酸序列或用于使载体稳定整合至基因组的任何其它的载体元件的同源重组来实现对宿主细胞基因组的整合。可选的，所述载体可含有用于指导同源重组整合至宿主细胞基因组的其它的核酸序列。附加的核酸序列使载体整合至宿主细胞染色体的确切位点上。为了增加确切位点的整合可能性，所述的整合元件应当优选的含有足够数目的与相应靶序列高度同源的核酸，如 100 至 1500 碱基对，优选 400 至 1500 碱基对，和最优选 800 至 1500 碱基对，从而增强同源重组的可能性。整合元件可以是与宿主细胞基因组的靶序列同源的任何序列。此外，整合元件可以是编码序列或非编码序列。另一方面，所述载体可以通过非同源重组的方式整合至宿主基因组中。

为了自主复制，所述载体可进一步包括允许载体在感兴趣的宿主细胞中自主复制的复制起始点。酵母细胞中有用的质粒复制子的例子为复制的 2 micro 起始点，ARS1，ARS4，ARS1 和 CEN3 的组合，以及 ARS4 和 CEN6 的组合。丝状真菌细胞中有用的质粒复制子的例子为 AMA1 和 ANS1 (Gems 等, 1991, Gene 98: 61-67;Cullen 等, 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 00/24883)。可通过 WO 00/24883 中所记载的方法进行 AMA1 基因的分离和包括该基因的质粒或载体的构建。复制起始可以是一具有突变位点从而使其在宿主细胞中具有温度敏感性（参见，如 Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433）。

可向宿主细胞中插入超过一个拷贝的编码生物物质的核酸序列，从而增加基因产物的产量。通过向宿主细胞基因组上整合至少一个额外的序列拷贝或通过包含与核酸序列相连接的扩增选择标记可增加核酸序列的拷贝数目，其中细胞含有选择标记的扩增拷贝数，从而可通过在适当选择剂存在的条件下培养所述细胞来筛选得到附加拷贝数目的核酸序列。

用于将上述元件连接从而构建得到本发明的重组表达载体的方法是本领域技术人员公知的技术（参见，Sambrook 等, 1989, supra）。

宿主细胞

本发明还涉及包含与编码生物物质的核酸序列可操纵性连接的本发明的启动子变体的重组宿主细胞，其有助于生物物质重组生产的应用。包含与编码生物物质的核酸序列可操纵性连接的本发明的启动子变体的载体被导入宿主细胞，从而所述载体保持染色体整合或作为如前所述的自我复制的染色体外载体的状态。术语“宿主细胞”包括那些在复制过程中产生的突变获得的与亲本细胞不完全一致的亲本细胞的任何子代细胞。宿主细胞的选择很大程度上由所编码生物物质的基因和其来源来确定。

宿主细胞可以是本发明方法中可使用的任何真菌细胞。本文中的真菌包括 phyla Ascomycota，担子菌（Basidiomycota），Chytridiomycota，和结合菌门(Zygomycota)(如 Hawksworth 等，在 Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK 中所定义的那样)，以及卵菌门（Oomycota）(如 Hawksworth 等, 1995, supra, page 171 所引用的) 和全部 mitosporic 真菌(Hawksworth 等，1995, supra)。

在优选实施方案中，所述的真菌宿主细胞为酵母细胞。本文中酵母包括ascosporogenous 酵母(酵母目(Endomycetales))，basidiosporogenous 酵母，和属于半知菌（Fungi Imperfecti）(芽孢菌纲（Blastomycetes）)酵母。由于酵母的分类将来可能会改变，为了实现本发明的目的，酵母应当按 Biology and Activities of Yeast 中所述的来定义（Skinner, F. A., Passmore, S. M., 和 Davenport, R. R., eds, Soc.App. Bacteriol. Symposium Series NO: 9,1980）。

在一更优选实施方案中，酵母宿主细胞为假丝酵母属（Candida），汉逊酵母属（Hansenula），克鲁维酵母属（Kluyveromyces），毕氏酵母属（Pichia），糖酵母属（Saccharomyces），裂殖酵母属（Schizosaccharomyces），或耶氏酵母属（Yarrowia）细胞。

在进一步优选的实施例中，所述酵母宿主细胞为卡尔斯伯糖酵母（Saccharomyces carlsbergensis）、啤酒糖酵母（Saccharomyces cerevisiae）、糖化酵母（Saccharomyces diastaticus）、Saccharomyces douglasii、Saccharomyces kluyveri、Saccharomyces norbensis、或卵形糖酵母（Saccharomyces oviformis）细胞。在另一最优选实施方案中，所述酵母宿主细胞为乳酸克鲁维酵母细胞（Kluyveromyces lactis）。在另一最优选的实施例中，所述酵母宿主细胞为 Yarrowia lipolytica 细胞。

在另一优选实施方案中，所述的真菌宿主细胞为丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括Eumycota和Oomycota亚门的全部丝状形式(如Hawksworth等, 1995, supra 中所定义的)。丝状真菌的特征在于其菌丝壁由几丁质、纤维素、葡聚糖、脱乙酰壳多糖、甘露聚糖、和其它复合多糖组成。植物的生长是通过菌丝的延长，并且碳分解代谢是需氧的。相反的，酵母的营养生长如啤酒糖酵母是通过单细胞菌体的出芽方式，并且其碳代谢为可发酵。

在一更优选实施方案中，丝状真菌宿主细胞可以是，但不仅限于如下种类的细胞：支顶胞属(Acremonium)、曲霉属、镰孢属(Fusarium)、Humicola、Mucor、Myceliophthora、Neurospora、青霉属、Thielavia、Tolypocladium 或木霉属(Trichoderma)。

在一最优选实施方案种，丝状真菌宿主细胞为泡盛曲霉（Aspergillus awamori），臭曲霉（Aspergillus foetidus），日本曲霉（Aspergillus japonicus），构巢曲霉（Aspergillus nidulans），黑曲霉（Aspergillus niger），或米曲霉（Aspergillus oryzae）细胞中。在另一最优选实施方案中，所述丝状真菌宿

主细胞为：Fusarium bactridioides，Fusarium cerealis，Fusarium crookwellense，大刀镰孢（Fusarium culmorum），禾赤镰孢（Fusarium graminearum），Fusarium graminum，Fusarium heterosporum，Fusarium negundi，尖孢镰孢（Fusarium oxysporum），多枝镰孢（Fusarium reticulatum），玫瑰色镰孢（Fusarium roseum），接骨木镰孢（Fusarium sambucinum），Fusarium sarcochroum，拟分枝孢镰孢（Fusarium sporotrichioides），硫色镰孢（Fusarium sulphureum），Fusarium torulosum，Fusarium trichothecioides，或 Fusarium venenatum 细胞。在另一最优选的实施例中，丝状真菌宿主细胞为 Humicola insolens，Humicola lanuginosa，Mucor miehei，Myceliophthora thermophila，粗糙镰孢霉（Neurospora crassa），产紫青霉（Penicillium purpurogenum），Thielavia terrestris，Trichoderma harzianum，康宁氏木霉（Trichoderma koningii），Trichoderma longibrachiatum，Trichoderma reesei，或绿色木霉（Trichoderma viride）细胞。

在更进一步的最优选实施方案中，所述的 Fusarium venenatum 细胞为 Fusarium venenatum A3/5，其原来作为 Fusarium graminearum ATCC 20334 保藏，并且最近由 Yoder & Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23 : 62-80 和 O'Donnell 等, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67 被重新分类定义为 Fusarium venenatum；和不考虑其目前已知物种名称的 Fusarium venenatum 分类等价物。在另一优选实施方案中，所述的 Fusarium venenatum 细胞为如 WO 97/26330 中所述的 Fusarium venenatum A3/5 或 Fusarium venenatum ATCC 20334 形态突变体。

可通过目前已知的原生质体形成、原生质体转化、和细胞壁再生等方法来转化真菌细胞。EP 238 023 和 Yelton 等, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474 中记载了曲霉属的合适的转化方法。转化镰孢菌属的合适的方法记载于 Malardier 等，1989, Gene 78: 147-156 和 WO 96/00787 中。可采用 Becker & Guarente, In Abelson, J. N. & Simon, M. I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito 等, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163；和 Hinnen 等, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920 中记载的方法来转化酵母。

本发明通过如下非发明范围限定的实施例进行进一步的说明。

实施例

用于缓冲液和底物的化学物质为至少是试剂级的商品化产品。

菌种和材料

本发明所采用的真菌菌株为 Fusarium venenatum 野生型菌株 MLY3（参见美国专利 6,066, 493 和 6,180, 366），及 pyrG 突变株，Fusarium venenatum DLM15。用于产生质粒的菌株为大肠杆菌 Top 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA)，Epicurian E. coli XL1 Blue 感受态和超感受态细胞(Stratagene, La Jolla, Ca.)，和大肠杆菌 SEDM1 HKA702 (Stratagene, LaJolla, CA)。

1 升体积的 RA 培养基含有 50g 琥珀酸，4.9g 尿素，1g 葡萄糖，和 20ml 的 50×Vogels 盐。

1 升体积的 50×Vogel's 盐含有 150g 柠檬酸，250gKH_2PO_4，10g 的 $MgSO_4$-$7H_2O$，20ml 的 25%$CaCl_2$-$2H_2O$，5.0ml 的生物素(每 100ml 的 50%乙醇含有 5 mg)，和 5 ml 的 Vogels 微量元素（过滤除菌）。

1 升体积的 Vogel's 微量元素溶液含有 50g 柠檬酸，50g 的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$，10g 的 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$，2.5g 的 CuSO4·$5H_2O$，0.5g 的 $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.5g 的 H_3BO_3，和 0.5 g 的 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$。

转移和转化基本培养基平板（pH 6.5）由每升体积的 6 g 的 $NaNO_3$, 0.52 g 的 KCL, 1.52 g 的 KH_2PO_4, 1ml 的 Cove 微量元素,添加了 20ml 的 50% 葡萄糖的 20g 的 Noble 琼脂，2.5 ml 的 20%的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 20ml 的 0.02% 生物素高压灭菌而成。转化平板含有全部上述成分和加入的终浓度为 0.8 M 的蔗糖配制而成。

Cove 微量元素溶液由每升体积的 0.04 g 的 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0.4 g 的 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.2 g 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.7 g 的 $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.8 g 的 $Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$, 和 10 g 的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 配制而成。

Vogels $NH_4H_2PO_4$ 平板由每升体积的 20 ml 的 50×Vogels 盐, 15 g 的蔗糖, 25 g 的 Noble 琼脂加上 50ml 的 $NH_4H_2PO_4$ (1 M pH 6)灭菌而成。

M400 培养基(pH 6)由每升体积的 50 g 的麦芽糖糊精, 2 g 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 gKH_2PO_4, 4 g 的柠檬酸, 8 g 酵母提取物, 2 g 尿素, 0.5ml 的 AMG 微量元素, 和 0.5 g 的 $CaCl_2$ 配制而成。

AMG 微量元素溶液由每升体积的 14.3 g 的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5g 的 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.5 g 的 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 13.8 g 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 8.5 g 的 $MnSO_4 \cdot H_2O$, 和 3 g 的柠檬酸配制而成。

氯酸盐平板由每升体积的 20ml 的 Cove 盐溶液, 61.28 g 的氯化钾, 0.3 g 的尿素,和 25 g 的 Noble 琼脂配制而成。

Cove 盐溶液由每升体积的 26 g 的 KCl, 26g 的 $MnSO_4 \cdot H_2O$, 76 g 的 KH_2PO_4, 和 50 ml 的 Cove 微量元素溶液配制而成。

添加有氨苄青霉素的 LB 培养基由每升体积的 10 g 胰化蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 5 g 氯化钠, 和 100 mg 氨苄青霉素配制而成。

添加有氨苄青霉素的 LB 平板由每升体积的添加有氨苄青霉素的 LB 培养基加上 15 g 细菌琼脂配制而成。

YP-5%葡萄糖培养基由每升体积的 10g 酵母提取物，20g 的细菌蛋白胨和 5%葡萄糖配制而成。

添加有氨苄青霉素的 2×YT 培养基由每升体积的 16 g 的一蛋白胨, 10 g 酵母提取物, 5 g 氯化钠, 和 100 mg 的氨苄配制而成。

添加有氨苄青霉素的 2×YT 平板由每升体积的 2×YT + 氨苄青霉素加上 15g 的细菌培养用琼脂配制而成。

添加有 NYZ 培养基(pH 7.5)由每升体积的 5 g 的 NaCl, 2 g 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g 的酵母提取物, 10 g 的 NZ 胺(酪蛋白水解产物), 12.5ml 的 1 M 的 $MgCl_2$, 12.5 ml 的 1 M 的 $MgSO_4$, 和 20 ml 的 20%葡萄糖配制而成。

NZY top agarose 由每升体积的 5 g 的 NaCl, 2 g 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g 的酵母提取物, 10 g 的 NZ 胺(酪蛋白水解产物),和 7 g 的琼脂糖配制而成。

DNA 测序

采用 Perkin-Elmer Applied Biosystems Model 3700 自动 DNA 测序仪 (Perkin-Elmer Applied Biosystems,Inc., Foster City, CA)，根据染色终止化学原理（Giesecke etal., 1992, Journal of Virology Methods 38: 47-60）和正向和反向 lac 测序引物或序列特异性引物进行 DNA 测序。

实施例 1 pDM237 的构建

通过将 4.4 kb 的 EcoRI/HindIII 的 Fusarium venenatum 的 niaD 片段克隆至 pBluescript SK (-)中构建得到 pDM237 (图 2) (Stratagene, La Jolla, CA)。其中 niaD 插入片段由来源于克隆 F(基因组 niaD 克隆)的 1.8 kb 的 KpnI/EcoRI 片段和来源于 pDM201 (niaD 的基因组克隆)的 2.6 kbKpnI/HindIII 片段构成。

所述的 niaD 遗传克隆分离自如纤维所述的（美国专利 6,361, 973）λ ZipLox Fusarium venenatum 基因组文库。通过 1.1 kb 的尖孢镰孢的 niaD 片段 (Diolez et al., 1993, Gene 131: 61-67)作为探针筛选得到克隆 pDM201。采用如下引物从尖孢镰孢基因组 DNA 中扩增得到尖孢镰孢探针:

5'-ATCGAGGGTGCCAATGTG-3' (foxy. nia1) (SEQ ID NO: 13)

5'-GCCATTTACGACCTCAGC-3'. (foxy. nia2) (SEQ ID NO: 14)

100μl 的 PCR 反应物中含有 10μg 的基因组 DNA，每一引物 50 pmol，1×Taq 缓冲液(Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN), dATP, dCTP,dGTP, 和 dTTP 各 200μlM, 和 5 单位的 Pwo DNA 聚合酶(Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN)。PCR 反应条件为: 95℃3 分钟，随后为 30 个循环的 95℃30 秒, 50℃1 分钟, 和 72℃1 分钟; 最终延伸循环为 72℃5 分钟。采用 Invitrogen (Carlsbad, CA)公司的 TA 克隆试剂盒将 PCR 产物进行亚克隆。采用 EcoRI 限制性酶切消化来检验亚克隆，并通过 M13 通用正向和反向引物来进行核酸测序。将被证实含有 1.1 kb niaD 插入的克隆子命名为 pDM197。

为了制备 DIG 标记的尖孢镰孢 niaD 片段探针，采用 EcoRI 消化 pDM197 并利用 40 mM Tris 醋酸,1 mM 二钠 EDTA 缓冲液（TAE）在 0.8%琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳分离得到 1.1kb 的片段，并通过 QlAquick 凝胶提取试剂盒(Qiagen,Inc., Chatsworth, CA)从凝胶中提取 DNA。采用上述引物 foxy. Nial 和 foxy. nia2 通过 PCR 制备上述引物。100μl 的 PCR 反应物中含有 6ng 的 1.1 kb EcoRI niaD 片段，每一引物 50 pmol，1×Taq 缓冲液(Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN), 10μl 的 10×DIG 标记混合物（Boehringher Mannheim, Indianapolis, IN），和 5 单位的 Taq DNA 聚合酶(Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN)。PCR 反应条件为: 95℃3 分钟，随后为 30 个循环的 95℃30 秒，50℃1 分钟，和 72℃1 分钟; 最终延伸循环为 72℃5 分钟。

在中度严谨条件下（即，在 37℃下在 DIG Easy hyb (Boehringher Mannheim, Germany)中进行杂交; 杂交膜在室温下在含 0. 1% SDS 的 2×SSC

中漂洗两次，每次 5 分钟，随后在相同温度下在含 0.1% SDS 的 0.2×SSC 中漂洗两次，每次 15 分钟），采用 DIG 标记的探针通过杂交(Davis 等, 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science PublishingCo.,Inc., New York)共从 Fusarium venenatum 基因组 DNA 文库中筛选了约 90,000 平板。根据制造商的说明采用 CPD Star 作为底物，按照 Boehringher Mannheim 的标准实验手册进行 DIG 标记的探针的检测。在 E. coli Y1090ZL 细胞上纯化显示杂交信号的平板两次，并随后从作为 pZL1-衍生物（D'Alessio 等, 1992,Focus@ 14: 76）的 λZipLox 载体中切下单个克隆。DNA 序列分析表明这些克隆之一，含有缺失其开放阅读框 5'末端的约 400 bp 的序列的 niaD 基因质粒被命名为 pDM201。

为了获得含有完整 niaD 开发阅读框和启动子的基因组克隆，基因组克隆 pDM201 被用于产生针对开放阅读框 5'末端的 0.46 kb 的探针。采用如下引物通过 PCR 制备探针:

5'CCCCGATAAAGATGGCTGTA 3' (nia 探针.正向) (SEQ ID NO: 15)

5'TCGCTAGGCTCTTGGGTGAC 3' (nia 探针. 反向) (SEQ ID NO: 16)

50μl 的 PCR 反应物中含有 6ng 的 pDM201，每一引物 50 pmol，1×Taq 缓冲液(Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN), 5μl 的 10×DIG 标记的混合物（Boehringher Mannheim, Indianapolis,IN），和 5 单位的 Taq DNA 聚合酶 (Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN)。PCR 反应条件为：95℃3 分钟，随后为 30 个循环的 95℃30 秒，50℃1 分钟，和 72℃1.5 分钟；最终延伸循环为 72℃5 分钟。

在高度严谨条件下（即，在 65℃下在 DIG Easy hyb 中进行杂交；滤膜在室温下在含 0.1% SDS 的 2×SSC 中漂洗两次，每次 5 分钟，随后在 65℃下在含 0.1% SDS 的 0.1×SSC 中漂洗两次，每次 15 分钟），采用 DIG 标记的探针通过杂交(Davis 等, 1986, supra)共从 Fusarium venenatum 基因组 DNA 文库中筛选了约 80,000 平板。根据制造商的说明采用 CPD Star 作为底物，按照 Boehringher Mannheim 的标准实验手册进行 DIG 标记的探针的检测。在 E. coli Y1090ZL 细胞上纯化产生杂交信号的平板两次，并随后从作为 pZL1-衍生物的 λZipLox 载体中切下单个克隆。DNA 序列分析表明这些克隆之一，含有 niaD 基因和 1.6kb 启动子的质粒被命名为克隆 F。不过所述克隆缺失其开放阅读框 3'末端的 450 bp 的序列。

构建了含有完整 niaD 开放阅读框以及启动子和终止子的质粒 pDM237 (图 2)。通过按照如下所述的方法，将 4.4 kb 的 EcoRI/HindIII 的 Fusarium venenatum niaD 片段克隆至 pBluescript SK (-) (Stratagene, La Jolla, CA) 载体中，从而构建得到 pDM237。niaD 插入片段由来源于克隆 F 的 1.8 kbKpnI/EcoRI 片段和来源于 pDM201 的 2.6 kb 的 KpnI/HindIII 片段构成。采用 KpnI/HindIII 和 KpnI/EcoRI 限制性酶切消化 pDM201 和克隆 F；采用 TAE 缓冲液在琼脂糖凝胶上分别电泳酶切产物，采用 QIA quick 凝胶提取试剂盒分离目的片段。采用 EcoRI/HindIII 消化质粒 pBluescript SK (-)，随后按照上述方法电泳和分离。在 14℃下，将 2.9 kbp 的 Bluescript SK (-)质粒与 1.8 kb 的 KpnI/EcoRI 和 2.6 kb 的 KpnI/HindIII 片段连接 3 小时，随后采用购于 Stratagene (La Jolla, CA)的 SURE 感受态细胞进行转化，并在 2×YT 氨苄平板上进行筛选。从克隆中分离质粒 DNA，采用限制性酶切分析来验证克隆 pDM237 中含有目的插入。

实施例 2：pJRoy72 的构建

通过连接含有 Thermomyces lanuginosus 脂肪酶基因的 0.9 kb PCR 产物、一来源于 pRaMB62-int1 (美国专利 No. 6,361, 973)的 2.1kb 的 StuI/BspLU11I 片段、和 PmeI/PacI 消化的 pRamB60 (美国专利 6,361, 973)片段构建得到 pJRoy72 (图 3)。采用如下引物从 pDM194 (美国专利 6,361, 973)中扩增脂肪酶片段：

5'-GACTCATGAGGAGCTCCCTTGTGCTGTTC-3' (SEQ ID NO: 17)

5'-TGATTAATTAACCTAAAGACATGTCCCAATTAAC-3' (SEQ ID NO: 18)

100μl 的 PCR 反应物中含有 15ng 的 pDM194，每一引物 50 pmol，1×PCR 缓冲液(Perkin-Elmer Corp. , Branchburg, NJ), dATP, dCTP,dGTP, 和 dTTP 各 250μlM, 和 5 单位的 Pwo DNA 聚合酶(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)。PCR 反应条件为：1 循环的 94℃2 分钟，随后为 10 个循环的 94℃30 秒，55℃45 秒，和 72℃2 分钟；随后进行 17 个循环的 94℃30 秒，55℃45 秒，和每一循环分别再延长 20 秒的 72℃2 分钟；最终延伸循环为 72℃10 分钟。0.9 kb PCR 产物通过乙醇沉淀并采用 PacI 和 BspHI 来消化。

采用 TAE 缓冲液在 1%琼脂糖凝胶上电泳 PmeI/PacI 消化的 pRaMB60、StuI/BspLU11I 消化的 pRaMB62-int1 和 0.9 kb PCR 产物。采用 Qiaquick 试剂盒按照制造商的说明从切下的凝胶条带中纯化 DNA。

将 pRaMB60 的 5.8 kb 的 PmeI/PacI 片段与 0.9 kb 的 PacI/BspHI 脂肪酶片段和 2.1 kb 的 pRaMB62-int1 的 StuI/BspLU11I 片段相连接从而构建 pJRoy72。获得的载体 pJRoy72 (图 3)含有受到 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子(SEQ ID NO : 1)调控的 Thermomyces lanuginosus 脂肪酶基因。

实施例 3: pNham1 的构建

采用如下方法构建 pNham1（图 4）质粒：通过采用 BamHI/EcoRI 消化 pDM237 分离得到含 niaD 启动子的 1.6 kb 的片段，通过采用 BamHI/HindIII 消化实施例 5 的 pNham3 分离得到含 niaD 终止子区域的 760 bp 的片段。通过采用 BamHI 消化 pSM0122 (美国专利 5,958, 727)获得含米曲霉 pyrG 基因的约 1.6 kb 的片段。通过采用 EcoRI 和 HindIII 消化 pBluescript SK (-)获得 2.9 kb 的骨架载体片段，并且通过虾碱性磷酸酶(Boehringer-Mannheim, Germany) 处理以防止其自连接。酶切消化后，所有的片段均采用 TAE 缓冲液在 0.7%琼脂糖凝胶上电泳分离，并随后剪切下含目的片段的条带，并根据制造商的说明采用 Qiaquick 凝胶提取试剂盒从中分离 DNA。采用快速 DNA 连接试剂盒(BoehringerMannheim, Germany)及如下连接混合物将全部的凝胶纯化的片段连接到一起从而构建得到 pNham1：2μl 的 pNham3 的 BamHI/HindIII 片段,2μl 的 pDM237 的 BamHI/EcoRI 片段, 2 μl 的 pSMO122 的 BamHI 片段, 1μl 的 pBluescript SK (-), 10μl 的 2×T4 DNA 稀释缓冲液, 2μl 的 5×DNA 稀释缓冲液, 和 1μl 的 T4 连接酶。连接反应在室温下进行 30 分钟。将连接产物转化 Epicurian E. coli XL Blue 感受态细胞(Stratagene, La Jolla, Ca.)，并在 2×YT 氨苄青霉素平板上筛选转化子。从将每一克隆子接种于 2.5 ml 的添加有氨苄青霉素(100 g/ml)的 LB 培养基培养的数个转化子克隆中分离质粒 DNA。试管在 37℃下 250rpm 振荡培养过夜。采用 Qiagen BioRobot 根据制造商的说明分离质粒 DNA。通过限制性酶切分析来验证含有正确插入的质粒。

实施例 4: pNham2 的构建

构建的质粒 pNham2 (图 5)含有截短的 Fusarium venenatum niaD 基因和表达盒，其中 Thermomyces lanuginosus 脂肪酶基因介于 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子和 Fusaium oxysporum 胰蛋白酶终止子之间。通过采用 PacI/ClaI 和 PacI/NotI 分别消化 pJRoy72 分离得到含有尖孢镰孢胰蛋白酶基因终止子的 1.1 kb 片段和 3.0 kb 的含有 Thermomuyces lanuginosus 脂肪酶/葡糖淀粉酶启动子区域的片段。通过采用 XbaI/ClaI 消化 pDM237 得到一含有截短的 niaD 的 3.6 kb 的片段。通过采用 XbaI 和 NotI 消化 pCR2.1®-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA) 并通过虾碱性磷酸酶 (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN)处理以防止自连接可制备得到 3.9 kb 含有骨架载体的片段。消化了后，采用 TAE 在 0.7%琼脂糖凝胶上分离所有的片段，随后切下含有目的片段的凝胶条带，并按照制造商的说明采用 Qiaquick 凝胶提取试剂盒从凝胶中分离 DNA。

通过将 2μl 的 pJRoy72 的 PacI/ClaI 片段，2μl 的 pJRoy72 的 PacI/NotI 片段，2μl 的 pDM237 的 XbaI/ClaI 片段，1μl 的 pCR2.1®-TOPO®的 XbaI/NotI 片段，和 1μl 的 10×连接缓冲液和 1μl 的 T4 DNA 连接酶采用快速 DNA 连接试剂盒进行连接构建得到 pNham2。将连接产物转化 EpicurianE. coli XL blue 感受态细胞(Stratagene, La Jolla, CA) ，并在含有 50 mg 氨苄青霉素每升体积的 LB 平板上筛选转化子。从多个克隆中分离质粒 DNA，并通过限制性酶切分析和 pNham2 测序来验证葡糖淀粉酶的启动亚序列。

实施例 5 ： pNham3 的构建

通过 PCR，采用如下引物从 pDM237 中扩增得到一 760 bp 的 BamHI/HindIII nia 终止子片段:

5'-GGATCCTTGAATAAGCGTAAATAGGG-3' (SEQ ID NO: 19)

5'-AAGCTTGCTGAGCATTTGACTGCC-3' (SEQ ID NO: 20)

PCR 反应物含有 1μl 的 1: 10 稀释的 pDM237 (0.3μg/μl -0. 35μg/μl), 5μl 的 10×Taq 缓冲液(Perkin Elmer Corp. , Branchburg, NJ),1μl 的 25 mM dNTPs (Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN), 1μl 的 50 pmol 的引物 1, 1μl50 pmol 引物 2, 0.5μl 的 5 单位/μl 的 Taq 聚合酶(Perkin Elmer), 和 40.5μl 的蒸馏水。采用 EricompTwinBlock 热循环仪进行 PCR 反应，其反应条件和参数为: 1 循环的 95℃3 分钟，随后为 25 个循环的 95℃30 秒，55℃30 秒，和 72℃1

分钟; 最终 1 延伸循环的 72℃10 分钟。 取 1 等份的 PCR 反应物在 1%琼脂糖-TAE 凝胶上进行电泳来验证扩增得到了 760 bp 的片段。

采用 Topo TA 克隆试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA)根据制造商的克隆转化手册来将 Fusarium venenatum niaD 终止子的 760 bp PCR 产物克隆至 pCRII 中。从多个克隆子中分离质粒 DNA，并通过序列分析来验证所述克隆含有 760 bp 的插入片段。

实施例 6: 构建 Fusarium venenatum pyrG 突变体 DLM15

采用如下引物，在含有地高辛(DIG)标记的脱氧尿苷-三磷酸(dUTP)的 PCR 反应物中标记 Neurospora crassa pyr-4 基因的 0.78 kb 的片段。

引物 94-885 (有义链):

5'-GTCAGGAAACGCAGCCACAC-3' (SEQ ID NO : 21)

引物 94-959 (反义链) :

5'-AGGCAGCCCTTGGACGACAT-3' (SEQ ID NO : 22)

将一从质粒 pFB6（真菌遗传储藏中心）中纯化的 1.1 kb 的 HindIII 片段作为扩增模板。Taq 聚合酶的 PCR 反应条件为 95℃3 分钟，随后为 35 个循环的 95℃30 秒，55℃1 分钟，和 72℃1 分钟; 最终延伸为 72℃5 分钟。DIG 标记的探针用于筛选 Fusarium venenatum 菌株 ATCC 20334DNA 的基因组文库，其中采用如 Royer 等, 1995,Bio/Technology 13: 1479-1483 所述的方法将 λ 载体 EMBL4 克隆至细菌 DNA 中。将 λ 噬菌体与 E. coli K802 细胞 (Clonetech, Palo Alto, CA)一起铺于具有 NZY top agarose 的 LB 平板上。采用标准方法将平板转印至尼龙膜上(Hybond™ 膜, Amersham Pharmacia Biotech, UK)。通过 UV 交联使 DNA 结合于膜上。将膜于上述 0.78 kb 的 DIG-标记的探针杂交。采用 Boehringer Mannheim 的 Genius™ 系统使用手册中所述的方法来进行 pyrG 克隆的杂交和检测。杂交在 42℃下的 5×SSC, 35%甲酰胺, 0.1% L-月桂酰磺酸钠, 0.02% SDS, 1%核酸杂交封闭液(Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN)中进行。采用的 DIG 标记的探针浓度为每毫升杂交溶液 2.5 ng。采用与碱性磷酸酶结合的抗地高辛配基抗体来免疫检测杂交的 DNA，并采用化学发光底物 Lumiphos 530 显色(Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN)。采用 Qiagen Lambda Midi Kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)从可能的阳性 λ 克隆中制备 DNA。

从λ克隆子之一凝胶纯化得到 3.9 kb 的遗传 EcoRI 的 pyrG 片段，并将其克隆至 pUC118 的 EcoRI 位点，产生质粒 pDM156.2 (图 6)。pyrG 片段含有完整的编码区域和 1.3 kb 的启动子和 1.5 kb 的终止亚序列。

构建质粒 pDM222A (图 7)从而在 pyrG 位点产生 2.7 kb 的缺失。将从质粒 pJRoy47.1 中剪切的 3.2 kb 的携带米曲霉 pyrG 末端重复(Royer 等 ，1999, Fungal Genetics and Biology 28: 68-78) 的 PmeI/SwaI 构巢曲霉 amdS 片段克隆至 pDM156.2 中替换 pyrG 位点的 2.7 kb 的 StuI/EcoRV 片段，从而产生 pDM222A。该缺失包括了 0.78 kb 的启动子，完整的 pyrG 编码区，和 0.8 kb 的终止子区域。位于 amdS 插入片段两段的 pyrG 区域位于 5'末端 0.5 kb 处，和 3'末端 0.7 kb 处。从 pyrG 缺失的质粒 pDM222A 中凝胶纯化 4.4 kb 的 EcoRV 片段，并用于转化 Fusarium venenatum 菌株 MLY3。

将来源于新鲜 Fusarium venenatum MLY3 菌株(7-14 天)的 10 至 15 个琼脂块接种至 500ml 的 RA 培养基，在 26℃下 150 rpm、培养约 40 小时，以便产生孢子。通过无菌 Miracloth (Calbiochem, La Jolla, CA)过滤，并采用 Sorvall RC-5B 离心机以 7974×g 的速度离心 20 分钟来收获孢子。采用 40ml 蒸馏水重悬沉淀 2 次，并随后采用 Sorvall RT 6000D 在 1877×g 的速度下离心 20 分钟。采用细胞计数板(VWR Scientific, West Chester, PA)来确定孢子的数目。

按如下方法来生产用于转化的原生质体。取 1ml 新鲜孢子（2×10^8/mol ）接种于 500ml 的含 100ml 的 YP-5%葡萄糖培养基的隔板振荡烧瓶中，并在 23.5℃下 150rpm 下培养 16 小时。通过无菌 Miracloth 过滤培养物，并随后采用 50ml 蒸馏水漂洗两次，采用 50 ml 的 1 M 的 $MgSO_4\cdot7H_2O$ (0.2μm 过滤除菌)漂洗一次。采用无菌刮刀收集增殖物并与 100 mg 的 NOVOZYME 234™ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)一起重悬于 20 ml 的 1 M 的 $MgSO_4\cdot7H_2O$ 中。重悬后，将试管置于 29℃下，90 rpm 培养 1 小时。向试管中加入 30ml 的 1M 的山梨醇，并以 470×g 的速度离心 10 分钟。弃去上清液，将沉淀重悬于 1ml 的 1M 的山梨醇中，并加入 30ml 的 1M 的山梨醇。取 100μl 等份转移至一含有 900ul 的 STC(0.8 M 山梨醇, 25 mM, pH 8.0 Tris, 50 mM $CaCl_2$) 的 Eppendorf 管中用于确定原生质体的数目，并随后 470×g 离心 5 分钟。弃去上清并将沉淀重悬于 STC: SPTC (40% PEG, 0.8 M 山梨醇, 25 mM Tris pH 8.0, 50 mM $CaCl_2$) : DMSO (9: 1: 0.1)至终浓度为 5×10^7 原生质体/ml。在使用前将原生质体保存于-80℃。

将转化的DNA与2 ml原生质体(5×10^7/ml)在50ml 的Falcon试管中混合，并随后加入50μl 的肝素(5mg/ml 溶于 STC 中)和 100μg 的 DNA 从而进行转化。将上述组分通过振荡轻轻混合，将试管置于冰上静置 30 分钟。向试管中缓慢加入 200μl 体积的 SPTC，并在室温下培养 10 分钟。向反应物中再添加 20ml 体积的 SPTC 并轻轻混合，随后在室温下培养 10 分钟。取 2ml 转化反应物加入含添加了 10 mM 尿苷的 25 ml 的 COVE top agarose 的 Falcon 试管中，通过轻轻倒转试管来混合内容物。将混合物铺平板于含有 COVE 培养基的 underlay 上。

将转化子转移至±10 mM 尿苷的 Vogel's 乙酰胺琼脂上。在无尿苷培养基上生长较差的转化子被转移至含 10 mM 尿苷的液体基本培养基中。从在含有尿苷的培养基上生长良好但在不含尿苷的培养基上生长不好的菌株中收集菌丝。通过将 3 个含有感兴趣的真菌菌株的来源于添加有尿苷的基本培养基的琼脂块接种于含有 25 ml 的 M400 培养基 125ml 的烧瓶中来制备基因组 DNA。将烧瓶在 26℃下，150rpm 振荡培养 3 天。通过 Miracloth 过滤和采用 TE（每升含有 1 M Tris-HCI pH8, 0.5 M EDTA pH 8）漂洗两次来收获真菌菌丝体。将菌丝体置于 15 ml Falcon 试管中并在液氮下冷冻。采用研钵和研棒将冷冻的菌丝体研磨成细小的粉末。迅速将细小粉末转移至 15ml Falcon 试管，并且按照制造商的说明采用 Qiagen DNeasy Plant kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)提取基因组 DNA。采用 EcoRI 消化基因组 DNA。进行 Southern 杂交并采用 3.2 kb 的荧光素标记的 pyrG 片段作为探针。pyrG 片段含有完整的编码区和 1.3 kb 的启动子和 1.5 kb 的终止子。按照制造商的杂交和洗涤印迹的说明，选用了 Amersham Life Science 公司的 Vistra f 荧光试剂盒 RPN 5751。但是采用 CDP-star (Roche Molecular Biochemicals)进行信号检测，并将印迹转移至 X-射线底片上而不是采用 STORM Fluorlmager。

产生预计的 4.4 kb 杂交带的清晰双交联现象的转化子接种于添加 10 mM 尿素的液体基本培养基中，在 28℃，200 rpm 下培养 63 小时。通过在添加有 10 mM 尿苷的 Vogel's 乙酰胺培养基上进行显微操作来分离孢子。将分离的孢子在添加有尿苷的 RA 孢子形成培养基上，30℃，150 rpm 培养 30 小时。通过无菌 Miracloth 过滤从菌丝体中分离孢子。

100μl 等分的孢子（9.5×10^5 孢子）分别接种于添加有 10 mM 尿苷的氟乙酰胺琼脂平板上。将在氟乙酰胺平板上生长的克隆子转移至氟乙酰胺和

COVE 琼脂上。在氟乙酰胺上生长良好但在 COVE 上生长不好或根本不生长的的克隆进行进一步的分析。将从 3 种这类菌株种分离的孢子进行 Southern blot 分析。按照上述方法分离基因组 DNA，采用 EcoRI 消化，并采用上述 pyrG 探针进行探针杂交。一些分离的孢子产生一的 1.4 kb 的杂交带，其表明为 amdS 的"loop-out"。挑选一分离的孢子，并将其命名为 Fusarium venenatum 菌株 DLM15。

实施例 7：用于 Southern 分析的 DIG-标记的 niaD, pyrG, 尖孢镰孢胰蛋白酶基因，和 Thermomyces lanuginosus 脂肪酶基因的构建

按照制造商的说明，采用 PCR DIG 探针合成试剂盒(Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN)来构建 DIG 标记的 niaD, pyrG, 尖孢镰孢胰蛋白酶基因，和 Thermomyces lanuginosus 脂肪酶基因探针。下面列出的引物用于产生用于 Southern 分析的 DlG-标记的探针。

Primer 3:5-ACAATGTTATCAATCCTCTTA-3' (SEQID NO: 23)

Primer 4: 5'-TGTCCCATGTTCTCGGTGCTA-3' (SEQ ID NO: 24)

Primer 5:5'-GCCGACGTGACAACCACCAAAGA-3' (SEQ ID NO: 25)

Primer 6: 5'-CCACGGGATCAGGAGCAGCATAAA-3' (SEQ ID NO: 26)

Primer 7: 5'-GAAGCGTCGAGATGTTCCTTG-3' (SEQ ID NO: 27)

Primer 8: 5'-GGCAGACCGATGACTTTGG-3' (SEQ ID NO: 28)

Primer 9: 5'-GTTCTTTGTCTCTGCGTGGAC-3' (SEQ ID NO: 29)

Primer 10: 5'-GGATATCCGGAATGTTAGGC-3' (SEQ ID NO: 30)

引物 3 和 4 用于扩增来源于 pDM237 的 niaD 基因的 3.5 kb niaD 片段。引物 5 和 6 被用于扩增来源于 pNham1 的 719 bp 的 pyrG 片段。引物 7 和 8 被用于扩增来源于 pNham2 的 756 bp 的尖孢镰孢的胰蛋白酶基因片段。引物 9 和 10 被用于扩增来源于 pNham2 的 811 bp 的 Thermomyces lanuginosus 脂肪酶片段。

将如下成分加入 PCR 反应物中从而产生用于 Southern 分析的 DIG 标记的探针：5μl 的 PCR 10×缓冲液，5μl DIG 合成混合物(瓶 2)，1μl 的上游引物(50pmol/μl)，1μl 的下游引物(50 pmol/μl)，0.75μl 的 Expand™ High Fidelity 酶混合物(瓶 1)，1μl 的 pDM237 或 pNham1 或 pNham2 (50-100ng/μl)，和 35.25μl 的蒸馏水。

PCR 反应在 Eppendorf Master Cycler 循环仪中进行，考虑到 DIG 探针采用如下循环参数和条件：

对于 niaD 探针，首先进行 1 个循环的 95℃3 分钟，随后为 30 个循环的 95℃1 分钟，52.9℃1 分钟，和 72℃3.5 分钟；最后进行 1 循环的 72℃10 分钟。

对于 pryG 探针，首先进行 1 个循环的 95℃3 分钟，随后为 30 个循环的 95℃1 分钟，60.1℃1 分钟，和 72℃1 分钟；最后进行 1 循环的 72℃10 分钟。

对于尖孢镰孢胰蛋白酶基因探针，首先进行 1 个循环的 95℃3 分钟，随后为 30 个循环的 95℃1 分钟，54.9℃1 分钟，和 72℃1 分钟；最后进行 1 循环的 72℃10 分钟。

对于 Thermomyces lanuginosus 脂肪酶基因探针，首先进行 1 个循环的 95℃3 分钟，随后为 30 个循环的 95℃1 分钟，56.8℃1 分钟，和 72℃1 分钟；最后进行 1 循环的 72℃10 分钟。

采用 1×TAE 缓冲液， 0.75%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物。从凝胶上切下扩增的 DNA 片段并根据制造商的说明采用 Qiaquick 凝胶提取试剂盒来纯化片段。

实施例 8：Fusarium venenatum niaD 变体的构建

质粒 pNham1 (实施例 3)用于构建 Fusarium venenatum niaD 变体。采用 XhoI 和 EcoRI 使 pNham1 线性化，并将其转化至 Fusarium venenatum pyrG 突变株 DLM15 (实施例 6)中。为了进行转化，如实施例 7 所述取 50μg 的线性化 pNham1 用于每个转化反应。在 Vogels $NH_4H_2PO_4$ 平板上生长有 114 个转化子，其中的 50 个转化子在氯酸盐平板上验证了生长。验证在氯酸盐中生长的 50 个转化子中的 40 个表现出预期 niaD 突变的氯酸盐抗性。在基本培养基上，进一步验证该 40 个氯酸盐抗性转化子的利用亚硝酸盐而不是硝酸盐作为唯一氮源的能力。其表型特征为 niaD 突变的所有氯酸盐抗性转化子均能在以亚硝酸盐作为唯一氮源培养基上生长。

选择 6 个可能的 niaD 突变株采用 Southern 分析来进行验证和分析。按照如下方法从所有的 6 个菌株中分离基因组 DNA。从含有感兴趣的真菌菌株的基本培养基平板上分离 3 个琼脂块，并将其置于含有 25ml 的 M400 培养基的 125ml 的烧瓶中。26℃，150rpm 振荡烧瓶培养 3 天。通过 Miracloth

过滤从培养物中收获真菌菌丝体，并采用 TE 漂洗两次（每升体积含有 1 M Tris-HCl pH8, 0.5 M EDTA pH 8）。将菌丝体置于 15ml 的 Falcon 试管中，并在液氮中冷冻。采用研钵和研棒将冷冻的菌丝体研磨成细小的粉末。迅速将细小粉末转移至 15ml Falcon 试管，并且按照制造商的说明采用 Qiagen DNeasy Plant kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)提取基因组 DNA。

为了进行 Southern 分析，采用 PstI， NsiI, 和 EcoRV 分别消化来源于 6 个可能的 niaD 裂解菌株的基因组 DNA，并采用来源于 pDM237 的 3.6 Kb 的 niaD 片段(实施例 8)或来源于 pNham1 的 780 bp 的 pyrG 片段(实施例 8)来进行探针筛选。采用 Nsi I 和 PstI，EcoRV，和 BamHI 在 37℃下消化 niaD 变体和未转化的 DLM15 菌株的基因组 DNA 过夜（11μl 的蒸馏水，5μl 的基因组 DNA（3μg），2μl 的 10×缓冲液，和 2μl 的限制性内切酶）。消化后，每一反应物均采用 TAE 缓冲液在含 2μl 溴化乙锭的 1%的琼脂糖凝胶上进行电泳。将凝胶在室温下浸入 250 mM HCl 10 分钟并轻轻摇动。用水漂洗凝胶 5 分钟并随后置于变性缓冲液(0.5 MNaOH, 1.5 M NaCl)中并在室温下轻轻摇动 15 分钟，随后浸入水中 5 分钟。随后将凝胶浸入中性缓冲液(1 M Tris pH 8, 1.5 M NaCl)中并在室温下轻轻摇动 2 次，每次 15 分钟。采用 10×SSC (1.5 M NaCl 和 1.5 M 柠檬酸钠)，采用 Schleicher & Schuell Turblotter (Schleicher & Schuell Inc. Keene, N. H.)将 DNA 转移至 Hybond™ 上过夜。

第二天，将膜轻轻采用 2×SSC 漂洗 5 分钟，并随后在 UV Stratalinker ™(Stratagene, La Jolla,Ca.)以 120,000 焦耳/cm^2 的强度进行交联反应。随后将干燥的印迹在含有 30ml DIG Easy Hyb 的玻璃管中，置于 42℃下预杂交至少 2 小时。预杂交后，弃去预杂交液并加入 7.5 ml 新鲜的含 40μl 经凝胶纯化的 PCR 扩增的 DIG 标记探针的 DIG Easy Hyb，其在沸水浴中变性 10 分钟。将杂交试管在 42℃下置于 Hybaid (National Labnet Company Woodbridge, NJ)中培养过夜。

杂交后，在同一杂交管中，每一印迹在 300ml 的 2×SCC, 0.1 % SDS 溶液中室温下轻轻摇动漂洗两次，每次 5 分钟；并置于 300ml 的 2×SCC, 0.1 % SDS 溶液中在 65℃下再漂洗两次，每次 15 分钟。随后将每一印迹在 150ml 的 1×漂洗缓冲液（15ml 10×漂洗缓冲液[Roche Mannheim, Germany]和 135ml 蒸馏水）中室温下轻轻摇动平衡一分钟。弃去漂洗液并向每一印迹中加入 100ml 的 1×封闭液（10ml 的 10×封闭液[Roche Mannheim, Germany], 10 ml

的 10×马来酸 [Roche Mannheim, Germany]，和 80 ml 蒸馏水），并随后在室温下轻轻摇动至少 60 分钟。弃去封闭液，并将每一印迹置于 30ml 抗地高辛配基-AP 缓冲液（在 1×封闭液中 1: 20,000 稀释）中轻轻摇动 15 分钟。每一印迹在 130ml 的 1×漂洗液中室温下轻轻摇动的漂洗两次，每次 20 分钟。随后将印迹置于 40ml 的 1×检测缓冲液(4 ml 的 10×检测液(Roche) 和 36 ml 蒸馏水)中，在室温下轻轻摇动平衡 5 分钟。将印迹置于醋酸薄膜上并加上 1ml 的化学发光底物（在 1×检测液中 1: 100 稀释的 CDP-Star™）。将印迹采用第二张醋酸薄膜覆盖并在室温下孵育 5 分钟。将印迹在金属盒中 X-射线底片曝光 10-15 分钟或直至获得理想的曝光效果。

Southern分析表明6个转化子中的3个在niaD位点具有预期的基因替换。三个转化子含有 pyrG 基因，其通过双交联整合从而破坏了 niaD 基因。来源于 niaD 转化子的 PstI 消化的基因组 DNA 产生了 869 bp 和 1.6 kb 的条带以及第三条> 8.5 kb 的条带。当采用 niaD 片段作为探针杂交时，未转化的 Fusarium venenatum 菌株 DLM15 产生 3.3 kb 条带和> 8.5 kb 的条带。NsiI 消化的基因组 DNA 产生 687 bp 和 1.7 kb 的带以及第三条> 8.5 kb 的条带。当采用同一 niaD 片段作为探针杂交时，未转化的 Fusarium venenatum 菌株 DLM15 产生 680 bp 和> 8.5kb 的条带。此外，三个 niaD 转化子采用 EcoRV 来消化，当采用 niaD 片段或 pyrG 片段探针杂交时其产生 4.5 kb 和 1.9 kb 的条带。EcoRV 消化的未转化的 Fusarium venenatum 菌株 DLM15 的 DNA 时，产生三条分别为 1.2 kb, 1.5 kb, 和 4.2 kb 的条带，并且当采用 pyrG 片段作为探针时，没有条带产生。

为了获得纯化的真菌菌株，采用如下的孢子纯化操作进行两次。从含有目的真菌菌株的基本培养基中取出 3 个琼脂块并置于含有 25ml RA 培养基的烧瓶中。将烧瓶置于 26℃下 150rpm 振荡培养 40 小时。

通过 Miracloth 过滤和采用 Sorvall RT 6000D 离心机以 1877×g 转速离心 10 分钟来收获真菌孢子。将沉淀置于 40ml 蒸馏水中漂洗两次，随后以 1877×g 转速离心 20 分钟。将适当稀释的孢子铺平板于基本培养基上以便获得单个克隆。将单个克隆转移至基本培养基上并生长 5-7 天，并随后重复孢子纯化操作。

根据从全部三个转化子中获得的原生质体和脂肪酶的产量选择了 Fusarium venenatum niaD 突变体＃3: 当与 niaD 突变体＃2 相比较时，niaD

突变体＃3 可观察到稍高的脂肪酶产量；并且当与 niaD 突变体＃4 相比时，niaD 突变体＃3 显示出产生更多的原生质体数目。因此，选择 niaD 突变体＃3 作为分析 pNham2 和 pNham2 变体的宿主。

实施例 10： pNham2 启动子变体的构建

按照制造商的说明，利用 Stratagene QuikChange™定点突变试剂盒（Stratagene Cloning System, La Jolla, CA），通过下列引物，通过缺失、取代和插入核酸序列产生了 13 个 pNham2 的启动子变体：

引物 15:5'-CACGAACGCCTGCTCTATAGCGCCAATGAGG-3'(SEQ ID NO: 31)

引物 16: 5'-CCTCATTGGCGCTATAGAGCAGGCGTTCGTG-3'(SEQ ID NO : 32)

引物 17:5'-CGACCAGACTAAACCATGCGGGGGATTGGGG-3' (SEQ ID NO: 33)

引物 18:5'-CCCCAATCCCCCGCATGGTTTAGTCTGGTCG-3' (SEQ ID NO: 34)

引物 19:
5'-GGCGTAATTTATACCATAGCGGGAAACTCCTGTTTTGTCAAG-3' (SEQ ID NO: 35)

引物 20:
5-CTTGACAAAACAGGAGTTTCCCGCTATGGTATAAATTACGCC-3' (SEQ ID NO: 36)

引物 21: 5'-CGAACGCCTGCTCTCGTAATTTATACC-3'(SEQ ID NO : 37)

引物 22:5'-GGTATAAATTACGAGAGCAGGCGTTCG-3' (SEQ ID NO: 38)

引物 23:5'-CTCGGCGTAATTTCGGCCATAGCGCCAATG-3'(SEQ ID NO : 39)

引物 24:5'-CATTGGCGCTATGGCCGAAATTACGCCGAG-3' (SEQ ID NO: 40)

引物 25:5'-CGCCTGCTCTCGGAAATTTAAATACCATAGCGCC-3' (SEQ ID NO: 41)

引物 26:5'-GGCGCTATGGTATTTAAATTTCCGAGAGCAGGCG-3'(SEQ ID NO: 42)

引物 27

:5'-CGCCTGCTCTCGGAAATTTAACGGCCATAGCGCCAATG-3'(SEQ ID NO: 43)

引物 28:

5'-CATTGGCGCTATGGCCGTTAAATTTCCGAGAGCAGGCG-3' (SEQ ID NO: 44)

引物 29:

5'-GCCTGCTCTCGGAAATTTAAAAATTTAACGGCCATAGCGCCAATG-3' (SEQ ID NO : 45)

引物 30:

5'-ATTGGCGCTATGGCCGTTAAATTTTTAAATTTCCGAGAGCAGGCG-3' (SEQ ID NO: 46)

引物 31:

5'-CGAACGCCTGCTCTTATATGCCGGGCGCAAATAGCGCCAATGAG-3' (SEQ ID NO: 47)

引物 32:

5'-CTCATTGGCGCTATTTGCGCCCGGCATATAAGAGCAGGCGTTCG-3' (SEQ ID NO: 48)

引物 33:

5'-CGAACGCCTGCTCTATTCGTAATTTATACC-3' (SEQ NO: 49)

引物 34:

5'-GGTATAAATTACGAATAGAGCAGGCGTTCG-3' (SEQ ID NO: 50)

引物 35:

5'-CGTAATTTATACCATAGCGAAGGGTCTTTAGGAAACTCCTGTTTTGTC-3' (SEQ ID NO: 51)

引物 36:

5'-GACAAAACAGGAGTTTCCTAAAGACCCTTCGCTATGGTATAAATTACG-3' (SEQ ID NO: 52)

引物 37:

5'-CTCCTGTTTTGTCGGCGTAATTTCGGCCGTTGGGTCATG-3' (SEQ ID NO: 53)

引物 38:

5'-CATGACCCAACGGCCGAAATTACGCCGACAAAACAGGAG-3' (SEQ ID NO: 54)

引物 15 和 16 用于产生 pNham2-Del.1，其含有缺失，在 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶上游-158 至-143 位即相应于 SEQ ID NO:1 的 1952 至 1967 位核苷酸处 CGGCGTAATTTATACC 核酸序列(SEQ ID NO: 68)。

引物 17 和 18 用于产生 pNham2-Del.2，其含有缺失，在 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子上游-272 至-257 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1838 至 1853 位核苷酸处 CGGGAGAGTGTCAAAT 核酸序列(SEQ ID NO: 2)。

引物 19 和 20 用于产生 pNham2-Del.3，其含有缺失，在 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子上游-134 至-124 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1974 至 1984 位核苷酸处 CCAATGAGGGC 核酸序列(SEQ ID NO: 6)。

引物 21 和 22 用于产生 pNham2-Del.4，其含有缺失，在 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子上游-158 至-156 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1952 至 1954 位核苷酸处产生 CGGCGTAATTTATACC 核酸序列的 CGG 核苷酸(SEQ ID NO: 7)。

引物 23 和 24 用于产生 pNham2-Sub.1，其含有位于 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子上游-147 至-145 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1963 至 1965 位处的采用 CGG 三联密码替换 ATA 获得的取代。该取代产生包括序列 CGGCGTAATTTCGGCC 的启动子变体(SEQ ID NO :3)。

引物 25 和 26 用于产生 pNham2-Sub.2，其在序列 CGGCGTAATTTATACC 内部含有一致的 AAATTTAA 共有序列。该取代产生了在 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子上游-155 至-148 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1955 至 1962 位核苷酸处含有 CGGAAATTTAAATACC 序列(SEQ ID NO : 8)。

引物 27 和 28 用于产生 pNham2-Sub.3，其含有位于从起始密码子开始的 -155 至-145 位的 CGGAAATTTAACGGCC 取代序列。该取代相应于 SEQ ID NO: 1 的 1955 至 1965 位核苷酸(SEQ ID NO: 9)。

引物 29 和 30 用于产生 pNham2- Ins.1，其在 pNham2-Sub.3 变体内部的 -148 至-147 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1962 至 1963 位，插入 AAATTTAA 共有序列(SEQ ID NO : 10)。该插入产生包含 CGGAAATTTAAAAATTTAA CGG 序列的变体。

引物 31 和 32 用于产生 pNham2- Sub.4，其含有位于 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子-158 至-143 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1952 至 1967 位核酸处的取代序列 TATATGCCGGGCGCAA(SEQ ID NO: 69)。

引物 33 和 34 用于产生 pNham2- Sub.5，其含有位于 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子-158 至-156 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1952 至 1954 位核酸处的序列 ATT 替换 CGG 的取代(SEQ ID NO: 11)。该取代产生一包括序列 ATTCGTAATTTATACC 的变体。

引物 35 和 36 用于产生 pNham2- Sub.6，其含有位于 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子-134 至-124 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1974 至 1984 位核酸处的取代序列 AAGGGTCTTTA(SEQ ID NO: 12)。

采用 pNham2-Del.2 和引物 23 和 24 来产生 pNham2-Sub. 7，其在位于 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子-147 至-145 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1974 至 1984 位核酸处的 ATA 被 CGG 三联体所取代(SEQ ID NO : 4)。

引物 37 和 38 用于产生 pNham2-Sub.8（来源于 pNham2-Sub.1），其含有位于位于 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子-108 至-93 位，即相应于 SEQ ID NO: 1 的 1974 至 1984 位核酸处的另外一个拷贝的 CGGCGTAATTTCGGCC 取代序列(SEQ ID NO: 5)。

通过定点突变产生的所有的 pNham2 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子变体均通过序列测定来验证。对 pNham2 变体中的 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子，Thermomyces lanuginosus 脂肪酶基因，和尖孢镰孢胰蛋白酶终止子部分进行序列分析。如下引物用于验证变体的序列：

引物 39. 5'-CGAACAGACGCCTCCGAAGAG-3' (SEQ ID NO: 55)

引物 40. 5'-GTGACATCGCCCACTCCAGAG-3' (SEQ ID NO: 56)

引物 41. 5'-GATGTTACGACGTGGGCCTGA-3' (SEQ ID NO: 57)

引物 42. 5'-ACGCCGCAGCCGAGAC-3' (SEQ ID NO: 58)

引物 43. 5'-CTGGTTATTGCCGCCG-3' (SEQ ID NO: 59)

引物 44. 5'-TACCGCATTACCCACACCAAT-3' (SEQ ID NO: 60)

引物 45. 5'-TGTTCGGCAGACAGATAACTG-3' (SEQ ID NO: 61)

引物 46. 5'-GCCCAAGACGACAGAGACGAC-3' (SEQ ID NO: 62)

引物 47. 5'-ATGACCTCAACATCTACCCGG-3' (SEQ ID NO: 63)

实施例 11：Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子变体的序列分析

如实施例 10 所述，采用野生型 pNham2 转化 Fusarium venenatum niaD 突变体，并且其变体用于评价当单个拷贝的构建体整合至 niaD 位点时得到的脂肪酶产量的差异。采用实施例 7 所述的转化方法，并且取每一变体 DNA 各 100μl 用于预反应，随后在含有亚硝酸盐的基本培养基上进行筛选。在含有亚硝酸盐作为唯一氮源的基本培养基平板上进行转化子筛选。只有那些含有功能 niaD 基因的转化子才能生长，这是引物表达质粒的整合引起的。

对多个 pNham2 或葡糖淀粉酶启动子变体的转化子进行 Southern 分析，从而确定整合至如实施例 8 所述的 niaD 位点的拷贝数目。按照实施例 8 所述的方法分离每一变体的多个转化子的基因组 DNA，并采用 NheI 和 MunI 进行消化。当采用如实施例 7 所述的胰蛋白酶基因片段作为探针杂交时，含有单个拷贝的在 niaD 位点整合的 pNham2 的功能性 niaD 转化子产生 4.5 kb 和 9.5 kb 的条带。具有多个拷贝质粒的转化子产生 4.5 kb 和 9.5 kb 的条带以及相应于 pNham2 大小的第三条 11.5 kb 的带。当采用尖孢镰孢胰蛋白酶基因片段探针杂交时，未转化的 niaD 突变株不含任何条带。此外，采用脂肪酶片段（实施例 7）作为探针进行 Southern 印迹。

当采用脂肪酶片段作为探针时，pNham2 的单个整合体应当只含有 9.5 kb 的带。多个整合体应当含有 9.5 kb 的带和第二条 11.5 kb 的带。当采用脂肪酶片段作为探针时，未转化的 niaD 菌株不产生任何条带。

含有 pNham2 或变体的单个拷贝的功能性 niaD 转化子在进行脂肪酶产量测定前进行纯化孢子两次（如实施例 9 所述）。选择最少量的，即每一具有单拷贝质粒整合的变体的 5 个转化子被选择用于比较脂肪酶活性。将每一转化子接种至 3 个独立的震荡烧瓶并一式三份的测定其脂肪酶活性。将来源于培养了 5-7 天的平板的 2 或 4 个琼脂块接种于含 25ml 体积的 M400 培

养基的 125ml 的烧瓶中。所有的烧瓶在 28℃、200 rpm 的条件下震荡培养 7 天。在第 4 天和第 7 天，分别从每一烧瓶中取出 1.5ml 的样品并采用 Sorvall MC 12V 微量离心机 13,720×g 离心 30 分钟。将上清液转移至离心管中并在 -20℃下保存直至进行脂肪酶测定。

采用如下方法测量脂肪酶活性。分析中采用的底物为 p-硝基苯丁酸盐（990μl 的 DMSO, 0.1 M MOPS, 和 10μl p-硝基苯丁酸盐共 4ml）。取 100μl 底物加入置于 96 孔板中的 100μl 的酶（在 0.1 M MOPS pH 7.5, 4μM $CaCl_2$ 中稀释）中。通过采用由 LIPOLASE™(Thermomyces lanuginosus lipase, Novozymes, A/S, Bagsvaerd, Denmark)在 0.1，0.2，0.4，0.6，0.8，0.9，和 1 LU/ml 产生的标准曲线来确定脂肪酶的活性。采用微孔板计数器测量 25℃时，405 nm 处 5 分钟的脂肪酶活性。

野生型和其启动子变体的相对脂肪酶活性如表 1 所示。表 1 显示了每一变体的脂肪酶活性的相对平均值和 t-test 产生的 p 值，该值用于确定一特定变体的脂肪酶产量与野生型 pNham2 的产量相同的可能性。p 值越低则总数不同的可能性越高。

表 1. Fusarium venenatum 功能性 niaD 转化子的脂肪酶活性

菌株	# 转化子筛选的	脂肪酶相对平均值活性（LU/ml）	Prob > [t]
pNham2	5	1.0	——
pNham2-Del.1	7	0.87	0.127
pNham2-Del.2	9	1.41	0.0005
pNham2-Del.3	7	0.34	0.0002
pNham2-Del.4	7	0.64	0.0059
pNham2- Sub.1	6	3.01	1.2E-05
pNham2- Sub.2	7	0.62	0.0022
pNham2- Sub.3	6	0.75	0.0140
pNham2-Ins.1	7	0.51	0.0004
pNham2- Sub.4	7	1.01	0.9210
pNham2- Sub.5	6	0.40	0.0002
pNham2- Sub.6	5	0.25	7.5E-05

pNham2- Sub.7	8	2.72	9.9E-06
pNham2- Sub.8	5	6.04	1.8E-10

质粒 pNham2-Del.1 含有缺失的可能区域 IIIa，与野生型质粒 pNham2 相比，该区域的缺失不会显著改变其脂肪酶活性。pNham2-Del.2 的脂肪酶活性稍有增加。与野生型相比，pNham2-Del.3 和 pNham2-Del.4 脂肪酶活性显著降低。

当位于 Fusarium venenatum 葡糖淀粉酶启动子上游-147 至-145 位发生 CGG 三联体取代时，pNham2-Sub.1 的脂肪酶活性显著增加了 3 倍。

pNham2-Sub.(2-3)和 pNham2-lns.4 的脂肪酶活性显著降低。

进行 pNham2 Sub.4-6 变体的取代分析，从而来确定 pNham2-Del.1, 3,和 4 获得的脂肪酶产量是否由位置效应或重要启动子元件的缺失所引起的。当将 pNham2-Sub.4 与 pNham2-Del.1 和野生型 pNham2 相比较时，其脂肪酶活性没有显著差异。因此，pNham2-Sub.4 证实 pNham2-Del.1 变异的结果不是由于位置效应造成的。pNham2-Sub.5 和 6 的发现证实了 pNham2-Del.3 和 4 的效果。因此，其表明缺失的核苷酸序列为启动子元件，其与葡糖淀粉酶启动子高水平表达有关。

构建了 pNham2-Sub.7 变体来检验表达水平中的其它的效果。通过结合 pNham2- Del.2 和 pNham2-Sub.1 中的突变构建了 pNham2-Sub.7 变体。pNham2-Sub.7 在脂肪酶活性方面没有表现出其它的效果，实际上，pNham2-Sub. 7 和 pNham2-Sub.1 在表达方面没有显著的改变。

当与 pNHam2 相比时，在葡糖淀粉酶启动子的-108 至-93 位含有附加的 CGGCGTAATTTCGG 序列的 pNham2-Sub.8 中可观察到其脂肪酶产量增加了 6 倍。该发现表明，可通过向启动子上游导入多个拷贝的 CGG-TAATTT-CGG 可实现葡糖淀粉酶启动子活性的提高。

实施例 12：用于 Northern 分析的 DIG 标记的组蛋白/脂肪酶杂交探针的构建

采用如下引物对来生产组蛋白/脂肪酶杂交探针：

引物 11:5'-TCTGGAGTGGGCGATGTCA-3' (SEQ ID NO: 64)

引物 12:
5'-ACCAGTGGACTTGCGGGCGTACCCATTTCCACGCAGGTC-3' (SEQ ID NO: 65)

引物
13:5'-GACCTGCGTGGAAATGGGTACGCCCGCAAGTCCACTGGT-3' (SEQ ID NO: 66)

引物 14: 5'-GGATGGCGCAGAGGTTGGTG-3' (SEQ ID NO: 67)

引物 11 和 12 用于从 cDNA H3 组蛋白片段(WO 2000/56762)中扩增得到 320bp 的组蛋白片段。引物 13 和 14 用于从 pNham2 中扩增得到 320 bp 的脂肪酶片段。引物 11 和 14 用于从组蛋白和脂肪酶 PCR 反应产物中扩增得到 620 bp 的组氨酸脂肪酶片段。

用于扩增组氨酸和脂肪酶片段的 PCR 组分如下：组氨酸或脂肪酶片段：100μl 的 DNA（组蛋白 cDNA 或 pNham2）约 50ng，5μl 的 10×Taq 缓冲液(Roche), 1μl 的 25 mM dNTPs (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 1μl 的 50 pmol 引物 11 或 12，1μl 的 50 pmol 引物 13 或 14，1μl 的 5 单位/μl Taq 聚合酶(Roche)，和 40μl 的蒸馏水。PCR 的循环参数和条件如下：组蛋白或脂肪酶片段：1 个循环的 95℃ 3 分钟，随后为 25 个循环的 95℃ 30 秒，60℃ 30 秒，和 72℃ 1 分钟，随后为 1 个循环的 72℃ 10 分钟。

采用 PCR Dig 探针合成试剂盒与下列组分一起来生产组蛋白/脂肪酶杂交探针：5μl 的 PCR 10×缓冲液，5μl 的 Dig 合成混合物，1μl 的引物 11 (50 pmol/μl)，1μl 的引物 14(50pmol/μl)，1μl 的 Expand™ High Fidelity 酶混合物，1μl 的组蛋白 PCR 产物，1μl 的脂肪酶 PCR 产物，和 35μl 的蒸馏水。

采用如下循环参数和条件，在 Eppendorf Master Cycler 循环仪中进行 PCR 反应：1 个循环的 95℃ 3 分钟，随后为 30 个循环的 95℃ 1 分钟，60℃ 1 分钟，和 72℃ 1 分钟，随后为 1 个循环的 72℃ 10 分钟。

采用 TAE 电泳缓冲液，在 0.75%琼脂糖凝胶上对 640 bp 的 PCR 产物进行电泳，从凝胶上切下凝胶带，并按照制造商的说明采用 Qiaquick 凝胶提取试剂盒进行纯化。

实施例 13：含有单个拷贝 pNham2 变体的构建体的 Northern 分析

对一定数量的 pNham2 启动子变体进行 Northern 分析，以确定转化子间观察到的脂肪酶产量的差异是否是由于细胞中脂肪酶 mRNA 转录量的差异造成的。对于 6 个 pNham2 变体中的每一个均选择两个转化子。

从含有感兴趣的真菌菌株的基本培养基中取下 3 个琼脂块置于含有 25mlM400 培养基的 125ml 的烧瓶中。将烧瓶置于 28℃、200 rpm 的条件下震荡培养 3 天。随后从培养物中收集真菌菌丝体用于 RNA 提取。按照制造商的说明，采用 Bio 101 FastRNA Kit RED (Qbiogene,Inc., Carlsbad, CA)从菌丝体中提取 RNA。

取自每一转化子的 10 微克总 RNA 被等分至微量离心管中，并通过介质加热的加速真空干燥器使其内容物干燥至体积接近约 5μl。向每一样品中加入 15μl 体积的 NorthernMAX™凝胶加样缓冲液(AMBION, Austin, TX)并震荡重悬。样品在沸水中加热 2 分钟，随后在微量离心机中快速离心并置于冰上冷却。

将样品加样至浸于 MOPS 缓冲液(Amersco Solon, OH)的 1.5%甲醛琼脂糖凝胶上，在 100V 电压下电泳凝胶，直至溴酚蓝染料迁移至凝胶底部的约四分之三处。通过将 1.5g 琼脂糖、10ml 的 10×MOPS 缓冲液和 85 ml 的 H_2O 在烧杯中混合来制备甲醛凝胶。

通过加热溶解琼脂糖，并随后冷却至 50℃并添加 5μl 的 EtBr 和 5.4ml 的 37%的甲醛。采用 DEPC 处理的水来漂洗凝胶以便除去甲醛，随后采用 Schleicher & Schuell Turboblotter (Schleicher & Schuell, Keene, NH)和 10×SSC 缓冲液，在 4℃下将其转移至 HyBond N+膜上。

转移后，将膜置于 80℃的真空炉中干燥 10 分钟。采用 STORM 860 Phosphoimager (Molecular Dynamics Piscataway, NJ) 在 1000 PMT 伏特的蓝荧光模式下扫描膜，从而使膜上的 RNA 成像用于随后的定量分析。随后，将膜采用 2×SSC 缓冲液轻轻震荡漂洗两次，每次 5 分钟，并在 UV Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA)中进行交联反应。

按照前文所述的 Southern 分析（实施例 8）进行 Northern 分析的预杂交和杂交步骤。但是在检测前将印迹置于缓冲液 A(0.3 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5)中进行平衡。检测后，将膜暴露于 ECF 底物(Amersham Pharmacia Biotech. , Buckinghamshire, England)中过夜。采用 STORM 860

Phosphoimager 和 Image Quant (version 5.0)程序来定量确定组蛋白和脂肪酶 mRNA 水平。获得的结果列与表 2 中。

表 2 pNham2 变体的 Northern 分析

菌株	脂肪酶比组蛋白 mRNA 水平的平均比率	相对脂肪酶活性平均值（LU/ml）
pNham2	0.22	1.0
pNham2-Del.1	0.23	0.87
pNham2-Del.2	0.33	1.41
pNham2-Del.3	0.14	0.34
pNham2-Del.4	0.19	0.64
pNham2- Sub.1	0.63	3.01
pNham2- Sub.2	0.18	0.62
pNham2- Sub.5	0.12	0.40
pNham2- Sub.8	1.19	6.04

表 2 表明，野生型和 pNham2-Del.1 间的脂肪酶比组蛋白 mRNA 比率不存在差异，二者可观察到基本相同的脂肪酶产量。相反的，当与野生型 pNham2 相比，其它 pNham2 变体中存在显著差异。当与 pNham2 相比时，pNham2-Del.2 和 pNham2-Sub.1 增加的脂肪酶 mRNA 转录水平与观察到的增加的脂肪酶产量相关性很高。该相关性表明葡糖淀粉酶启动子的转录效率是脂肪酶产量增加的原因所在。在 pNham2-Del.3-Del. 4 和 pNham2-Sub.2 中观察到的脂肪酶 mRNA 水平的降低与脂肪酶产量的降低相关性很高。该发现表明，由于 CGG 和 CCAATGAGGGC 的缺失造成的转录调控是脂肪酶产量降低的原因，并且添加 AAATTTAA 共有序列不会导致表达的增加。

生物材料保藏

如下生物材料已按照布达佩斯条约的规定保藏于农业研究机构保藏中心（Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional

Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604), 并获得如下保藏号:

保藏物	保藏编号	保藏日期
E.coli TOP10 (pECO3)	NRRL B-30067	1998-10-27

在本专利申请受理期间至被专利商标局根据 37 C. F. R. §1.14 和 35 U. S. C. §122 条款作出决定期间，该菌株被置于能确保获得其培养物的条件下保藏。保藏物实质上表示保藏的菌株的纯培养物。保藏也是本申请同一主题，或其系列申请的副本提交的所在国的外国专利法所要求的。但是应当理解，保藏物的获得并不构成破坏政府行政授予的专利权的实施发明主题的许可。

本文中对发明所公开的特定实施例的记载和权利要求不用于限制本发明的范围，因此这些实施方案仅用于举例说明本发明的几个方面。任意相同意义的实施例都认为是包含在本发明的范围之中。实质上，在阅读了上述说明书的内容后，除了本文中记载和说明的那些以外的对于本发明所作的各种任何改进，对于本领域技术人员来说都是显而易见的。这些改进也被认为落入了所附权利要求的范围之内。在存在矛盾的情况下，包括定义的本说明将用于解决矛盾。

本文中所引用的各类参考资料，其说明书全文在此整体作为参考。

申请人或代理人档案号 **10351.204-WO**	国际申请号: 尚未给出

关 于 微 生 物 保 藏 的 说 明

（细则 13 之二）

A. 对说明书第 45 页，第 11 行所述的微生物的说明。

B.保藏事项 其它保藏在补充页中 □

保藏单位名称 **农业研究机构保藏中心**
Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL)

保藏单位地址
(包括邮政编码和国名)

Northern Regional Research Center
1815 University Street
Peoria, 伊利诺伊州 61604, 美国

保藏日期 **27. 10 月 1998**	保藏编号 **B-30067**

C. 补充说明（必要时） 本栏内容有补充页 □

针对那些指定国家，在其中欧洲专利和/或澳大利亚专利被请求的，在专利申请期间，被保藏的微生物样品只能提供给一位独立的专家，而该专家是由申请得到该样品的人所指定的(EPC 条约 28(4)/澳大利亚法定规则 1991No.71 之细则 3.25)。

D. 本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）

E. 补充说明（必要时）

下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如："保藏的编号"）

由受理局填写	由国际局填写
□本页已经和国际申请一起收到	□国际局收到本页日期:
授权官员	授权官员

PCT/RO/134 表（1992 年 7 月）

序列表

<110> 诺维信生物技术公司（NOVOZYMES BIOTECH, INC.）

<120> 用于在真菌细胞中表达基因的启动子变体

<130> 10351.204-WO

<150> 60/437,314
<151> 2002-11-18

<160> 69

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 2112
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 1
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tcggcgtaat ttataccata gcgccaatga 1980

gggcggaaac tcctgttttg tcaagtcgtc attgttggtt gggtcatgat atatagccag 2040

taggtatccg tcttggtgat tgaccagaca tatcgctcat cacagatcaa catcactgct 2100

atcaccaaca tg 2112

<210> 2
<211> 2096
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 2
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaaccatg cgggggattg gggaacttac 1860

cccagaaaag agaaggagga taaattccat gtctggggtt gacgtctcta ttggttagac 1920

acgaacgcct gctctcggcg taatttatac catagcgcca atgagggcgg aaactcctgt 1980

tttgtcaagt cgtcattgtt ggttgggtca tgatatatag ccagtaggta tccgtcttgg 2040

tgattgacca gacatatcgc tcatcacaga tcaacatcac tgctatcacc aacatg 2096

<210> 3
<211> 2112
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 3
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tcggcgtaat ttcggccata gcgccaatga 1980

gggcggaaac tcctgttttg tcaagtcgtc attgttggtt gggtcatgat atatagccag 2040

taggtatccg tcttggtgat tgaccagaca tatcgctcat cacagatcaa catcactgct 2100

atcaccaaca tg 2112

<210> 4
<211> 2096
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 4
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaaccatg cgggggattg gggaacttac 1860

cccagaaaag agaaggagga taaattccat gtctggggtt gacgtctcta ttggttagac 1920

acgaacgcct gctctcggcg taatttcggc catagcgcca atgagggcgg aaactcctgt 1980

tttgtcaagt cgtcattgtt ggttgggtca tgatatatag ccagtaggta tccgtcttgg 2040

tgattgacca gacatatcgc tcatcacaga tcaacatcac tgctatcacc aacatg 2096

<210> 5
<211> 2112
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 5
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tcggcgtaat ttcggccata gcgccaatga 1980

gggcggaaac tcctgttttg tcggcgtaat ttcggccgtt gggtcatgat atatagccag 2040

taggtatccg tcttggtgat tgaccagaca tatcgctcat cacagatcaa catcactgct 2100

atcaccaaca tg 2112

<210> 6
<211> 2101
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 6
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tcggcgtaat ttataccata gcgggaaact 1980

cctgttttgt caagtcgtca ttgttggttg ggtcatgata tatagccagt aggtatccgt 2040

cttggtgatt gaccagacat atcgctcatc acagatcaac atcactgcta tcaccaacat 2100

g 2101

<210> 7
<211> 2109
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 7
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tcgtaattta taccatagcg ccaatgaggg 1980

cggaaactcc tgttttgtca agtcgtcatt gttggttggg tcatgatata tagccagtag 2040

gtatccgtct tggtgattga ccagacatat cgctcatcac agatcaacat cactgctatc 2100

accaacatg 2109

<210> 8
<211> 2112
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 8
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tcggaaattt aaataccata gcgccaatga 1980

gggcggaaac tcctgttttg tcaagtcgtc attgttggtt gggtcatgat atatagccag 2040

taggtatccg tcttggtgat tgaccagaca tatcgctcat cacagatcaa catcactgct 2100

atcaccaaca tg 2112

<210> 9
<211> 2112
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 9
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tcggaaattt aacggccata gcgccaatga 1980

gggcggaaac tcctgttttg tcaagtcgtc attgttggtt gggtcatgat atatagccag 2040

taggtatccg tcttggtgat tgaccagaca tatcgctcat cacagatcaa catcactgct 2100

atcaccaaca tg 2112

<210> 10
<211> 2120
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 10
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tcggaaattt aaaaatttaa cggccatagc 1980

gccaatgagg gcggaaactc ctgttttgtc aagtcgtcat tgttggttgg gtcatgatat 2040

atagccagta ggtatccgtc ttggtgattg accagacata tcgctcatca cagatcaaca 2100

tcactgctat caccaacatg 2120

<210> 11
<211> 2112
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 11
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tattcgtaat ttataccata gcgccaatga 1980

gggcggaaac tcctgttttg tcaagtcgtc attgttggtt gggtcatgat atatagccag 2040

taggtatccg tcttggtgat tgaccagaca tatcgctcat cacagatcaa catcactgct 2100

atcaccaaca tg 2112

<210> 12
<211> 2112
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 12
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tcggcgtaat ttataccata gcgaagggtc 1980

tttaggaaac tcctgttttg tcaagtcgtc attgttggtt gggtcatgat atatagccag 2040

taggtatccg tcttggtgat tgaccagaca tatcgctcat cacagatcaa catcactgct 2100

atcaccaaca tg 2112

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢(Fusarium oxysporum)

<400> 13
atcgagggtg ccaatgtg 18

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢(Fusarium oxysporum)

<400> 14
gccatttacg acctcagc 18

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢(Fusarium oxysporum)

<400> 15
ccccgataaa gatggctgta 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢(Fusarium oxysporum)

<400> 16
tcgctaggct cttgggtgac 20

<210> 17
<211> 29
<212> DNA
<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 17
gactcatgag gagctccctt gtgctgttc 29

<210> 18
<211> 34
<212> DNA
<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 18
tgattaatta acctaaagac atgtcccaat taac 34

<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢（Fusarium oxysporum）

<400> 19
ggatccttga ataagcgtaa ataggg 26

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢（Fusarium oxysporum）

<400> 20
aagcttgctg agcatttgac tgcc 24

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 粗糙链孢霉（Neurospora crassa）

<400> 21
gtcaggaaac gcagccacac 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 粗糙链孢霉（Neurospora crassa）

<400> 22
aggcagccct tggacgacat 20

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢（Fusarium oxysporum）

<400> 23
acaatgttat caatcctctt a 21

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢（Fusarium oxysporum）

<400> 24
tgtcccatgt tctcggtgct a 21

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> 粗糙链孢霉（Neurospora crassa）

<400> 25

gccgacgtga caaccaccaa aga 23

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> 粗糙链孢霉 (Neurospora crassa)

<400> 26
ccacgggatc aggagcagca taaa 24

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢 (Fusarium oxysporum)

<400> 27
gaagcgtcga gatgttcctt g 21

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢 (Fusarium oxysporum)

<400> 28
ggcagaccga tgactttgg 19

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 29
gttctttgtc tctgcgtgga c 21

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 30
ggatatccgg aatgttaggc 20

<210> 31
<211> 31
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 31
cacgaacgcc tgctctatag cgccaatgag g 31

<210> 32
<211> 31
<212> DNA

<213> Fusarium venenatum

<400> 32
cctcattggc gctatagagc aggcgttcgt g 31

<210> 33
<211> 31
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 33
cgaccagact aaaccatgcg ggggattggg g 31

<210> 34
<211> 31
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 34
ccccaatccc ccgcatggtt tagtctggtc g 31

<210> 35
<211> 42
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 35
ggcgtaattt ataccatagc gggaaactcc tgttttgtca ag 42

<210> 36
<211> 42
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 36
cttgacaaaa caggagtttc ccgctatggt ataaattacg cc 42

<210> 37
<211> 27
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 37
cgaacgcctg ctctcgtaat ttatacc 27

<210> 38
<211> 27
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 38
ggtataaatt acgagagcag gcgttcg 27

<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 39
ctcggcgtaa tttcggccat agcgccaatg 30

<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 40
cattggcgct atggccgaaa ttacgccgag 30

<210> 41
<211> 34
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 41
cgcctgctct cggaaattta ataccatag cgcc 34

<210> 42
<211> 34
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 42
ggcgctatgg tatttaaatt tccgagagca ggcg 34

<210> 43
<211> 38
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 43
cgcctgctct cggaaattta acggccatag cgccaatg 38

<210> 44
<211> 38
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 44

cattggcgct atggccgtta aatttccgag agcaggcg 38

<210> 45
<211> 45
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 45
gcctgctctc ggaaatttaa aaatttaacg gccatagcgc caatg 45

<210> 46
<211> 45
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 46
attggcgcta tggccgttaa atttttaaat ttccgagagc aggcg 45

<210> 47
<211> 44
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 47
cgaacgcctg ctcttatatg ccgggcgcaa atagcgccaa tgag 44

<210> 48
<211> 44
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 48
ctcattggcg ctatttgcgc ccggcatata agagcaggcg ttcg 44

<210> 49
<211> 30
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 49
cgaacgcctg ctctattcgt aatttatacc 30

<210> 50
<211> 30
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 50
ggtataaatt acgaatagag caggcgttcg 30

<210> 51
<211> 48
<212> DNA

<213> Fusarium venenatum

<400> 51
cgtaatttat accatagcga agggtcttta ggaaactcct gttttgtc 48

<210> 52

<211> 48
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 52
gacaaaacag gagtttccta aagacccttc gctatggtat aaattacg 48

<210> 53
<211> 39
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 53
ctcctgtttt gtcggcgtaa tttcggccgt tgggtcatg 39

<210> 54
<211> 39
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 54
catgacccaa cggccgaaat tacgccgaca aaacaggag 39

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 55
cgaacagacg cctccgaaga g 21

<210> 56
<211> 21
<212> DNA
<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 56
gtgacatcgc ccactccaga g 21

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 57
gatgttacga cgtgggcctg a 21

<210> 58
<211> 16
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 58
acgccgcagc cgagac 16

<210> 59
<211> 16
<212> DNA
<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 59
ctggttattg ccgccg 16

<210> 60
<211> 21
<212> DNA
<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 60
taccgcatta cccacaccaa t 21

<210> 61
<211> 21
<212> DNA
<213> 尖孢镰孢(Fusarium oxysporum)

<400> 61
tgttcggcag acagataact g 21

<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 62
gcccaagacg acagagacga c 21

<210> 63
<211> 21
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 63
atgacctcaa catctacccg g 21

<210> 64
<211> 19
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 64
tctggagtgg gcgatgtca 19

<210> 65
<211> 39
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 65
accagtggac ttgcgggcgt acccatttcc acgcaggtc 39

<210> 66
<211> 39
<212> DNA
<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 66
gacctgcgtg gaaatgggta cgcccgcaag tccactggt 39

<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 67
ggatggcgca gaggttggtg 20

<210> 68
<211> 2096
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 68
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tatagcgcca atgagggcgg aaactcctgt 1980

tttgtcaagt cgtcattgtt ggttgggtca tgatatatag ccagtaggta tccgtcttgg 2040

tgattgacca gacatatcgc tcatcacaga tcaacatcac tgctatcacc aacatg 2096

<210> 69
<211> 2112
<212> DNA
<213> Fusarium venenatum

<400> 69
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta cttctttgaa ccagctcgcc 60

atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca 120

tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg 180

aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa 240

aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat 300

gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc 360

taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac 420

gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt 480

taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt 540

gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt atttttcgcc gtctttatgt 600

gtactaacac ttccattgat accccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat 660

caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct 720

ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg 780

ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag 840

gttttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg 900

caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat 960

tcggggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020

gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080

cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140

tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200

acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260

gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320

ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380

acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440

ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500

atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560

gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620

caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680

accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca 1740

actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact 1800

gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg 1860

ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg 1920

tctctattgg ttagacacga acgcctgctc ttatatgccg ggcgcaaata gcgccaatga 1980

gggcggaaac tcctgttttg tcaagtcgtc attgttggtt gggtcatgat atatagccag 2040

taggtatccg tcttggtgat tgaccagaca tatcgctcat cacagatcaa catcactgct 2100

atcaccaaca tg 2112

```
cctcacccat ctcaacacct gtcgtgtgct cacttgacta ctttctttgaa ccagctcgcc   60
atcggactag tcgaacaagc ttgtcgcccc catacagatg aatgtatgtt taaagctaca  120
tgatcagcct gaaccgagca taactcgagt gccgagactc ctctgatgta tatcgagatg  180
aatgacaaac ctacgggtcc gttcttgaga agtggcctga gatttctcac ttggtgagaa  240
aaaggacggg cgagcgggag cctgagtcag aagaaatacc tgtctccttg gatctcacat  300
gacggtgttg tggaagagtg catctattgt cattgctgga gtgacggcag agtaggggtc  360
taaagaaacc catactgagt agagatggag aagacaacaa aagcccaaga cgacagagac  420
gacagaagat taaagctatc agagcgagac tatatcacta ttcgaaacct gcgagtaatt  480
taacaagaag tacacatcat cattgttatc aattcgacga agacatggtc gaaaattctt  540
gcggtgtata tgtctgttgt atatgggcct gggcattgtt attttcgcc gtctttatgt  600
gtactaacac ttccattgat acccagaac aaaagatgaa cgcttaaaca gcaccaaaat  660
caggagaaga atggcgctgc tctaggtatg cttctgggat aaaaagcgat gttgatacct  720
ctcagaaaag aagtgatttg aagttgaatc aaacaaatag ccgatggagc gatctgaagg  780
ggtggcagac ctgctacgcg catttaggca aggcatcaac tcggcagatg attaagaaag  840
gtttgtagg ttcacgtgtt gtgttgtgtt ccattataag tttataacct tgctaagatg  900
caacgactct gacctcaggg tgttagaaaa attgaccact aggagcataa gtgacgaaat  960
tcgggatca agacaataga tagtttcatt ttcatgtgct cctacgtctt ttcacgtaat 1020
gtttcttata aaaaaaaaga tagcattgtc tctttggtga aaagagaaaa aaagatgtta 1080
cgacgtgggc ctgattcgaa cagacgcctc cgaagagaat agatttctag tctatcgcgt 1140
tagaccactc cgccaccacg ccttacgtaa tctgtgattg ttgaaagtta ctctcgtgtt 1200
acggtctata cgtgaagaat ctacacttga cgagtctcga ggtctggggt cagttagacg 1260
gaaatgggag aacaaagaga cttggtgaca ttgcaggcaa ccgggtagat gttgaggtca 1320
ttgatcggac aagattgttg cttcaaaagt aacaggtatt ctttttttta atcaacagaa 1380
acgttccatg ttcatttgtt aatccaatct atttgtgata gcgtttgatg acaaacaata 1440
ataatgatgg tctggcggct agtgatcgtt tgtaatgacg tcgtcatata tcctatcact 1500
atacagttgc tttgcacacg cactcacgtc cttcattcgt tgtcttcact atttgatggt 1560
gatttggttc aacaacctac agaaataatg acctgtggtg ttctccgaat atggctagac 1620
caacacaagc ttgtaccgcg gcattcaaat caccatgtga tgcccatcat cagatcatcc 1680
```

图 1A

```
accaacccaa aaacagacca actactcaca aaaaggcatc tcatcaagaa aaaacggcca  1740
actaacgtcc aaaaggcccg aaaaacgtcc atcacgccgc agccgagact tcaatagact  1800
gcacaagaag gaccgatgag atcgaccaga ctaaacccgg gagagtgtca aatatgcggg  1860
ggattgggga acttacccca gaaaagagaa ggaggataaa ttccatgtct ggggttgacg  1920
tctctattgg ttagacacga acgcctgctc tcggcgtaat ttataccata gcgccaatga  1980
gggcggaaac tcctgttttg tcaagtcgtc attgttggtt gggtcatgat atatagccag  2040
taggtatccg tcttggtgat tgaccagaca tatcgctcat cacagatcaa catcactgct  2100
atcaccaaca tg                                                      2112
```

图 1B

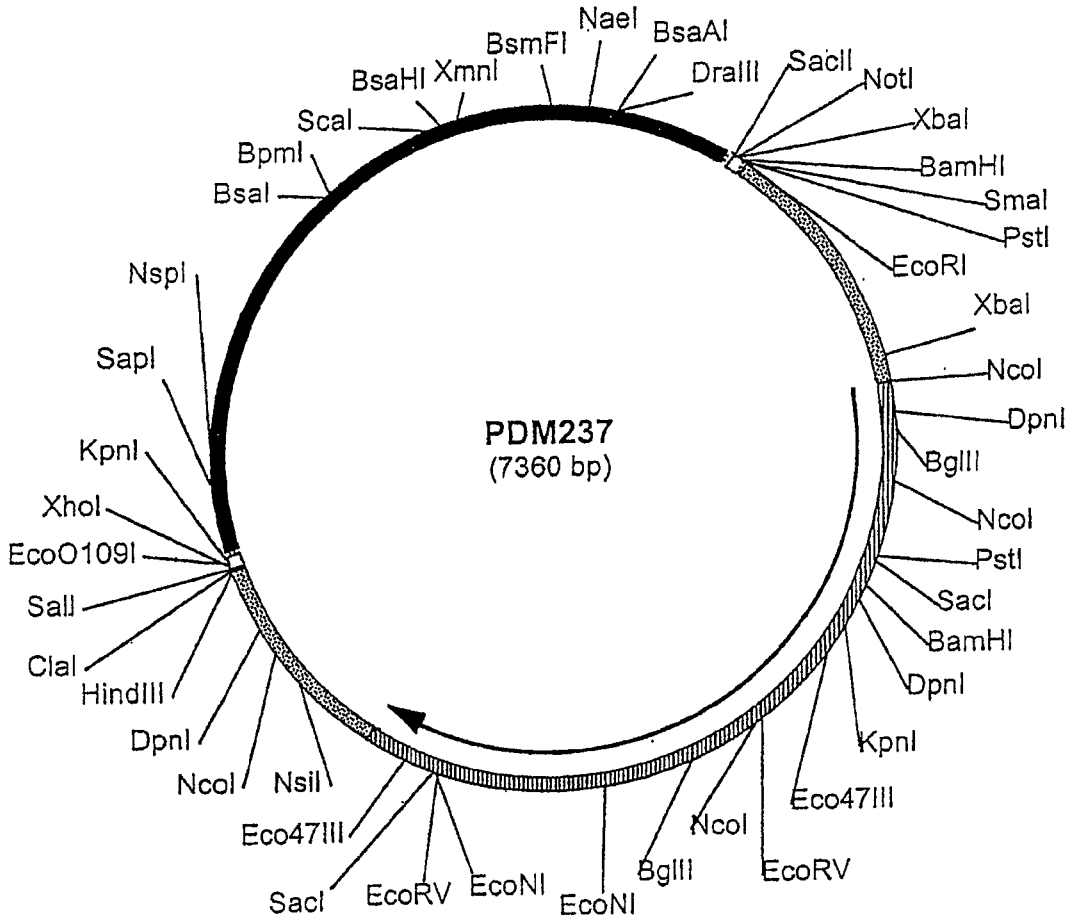

PDM237
(7360 bp)
NaeI
BsaAI
BsmFI
DraIII
SacII
NotI
XmnI
BsaHI
ScaI
XbaI
BpmI
BamHI
BsaI
SmaI
PstI
EcoRI
NspI
XbaI
SapI
NcoI
DpnI
KpnI
BglII
XhoI
NcoI
EcoO109I
PstI
SalI
SacI
ClaI
BamHI
HindIII
DpnI
DpnI
KpnI
NcoI
NsiI
Eco47III
NcoI
Eco47III
BglII
EcoRV
SacI
EcoRV
EcoNI
EcoNI

图 2

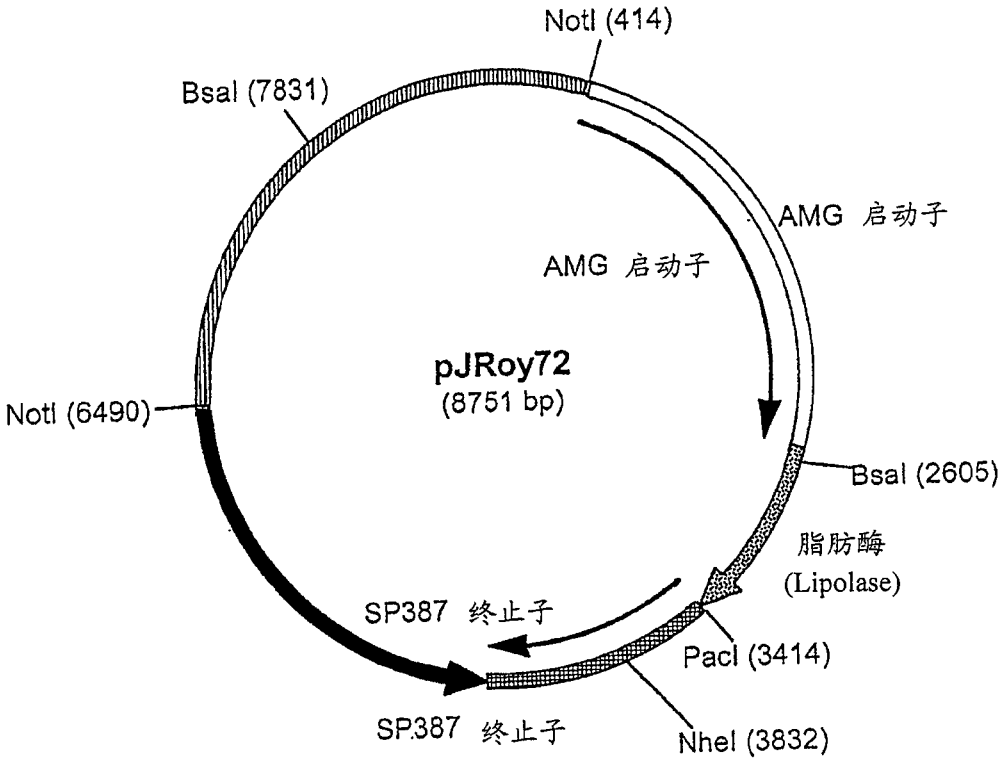

NotI (414)
BsaI (7831)
AMG 启动子
AMG 启动子
pJRoy72
(8751 bp)
NotI (6490)
BsaI (2605)
脂肪酶
(Lipolase)
SP387 终止子
PacI (3414)
SP387 终止子
NheI (3832)

图 3

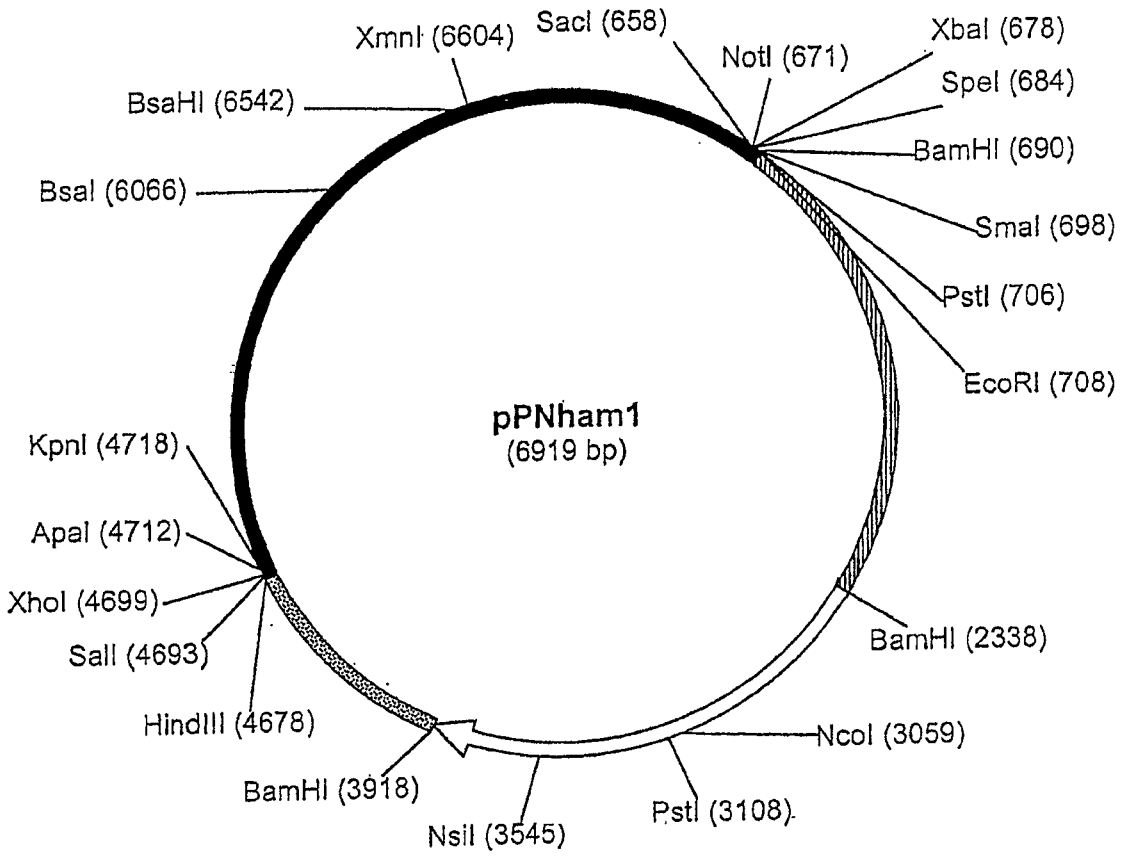

XmnI (6604)
SacI (658)
NotI (671)
XbaI (678)
SpeI (684)
BamHI (690)
SmaI (698)
PstI (706)
EcoRI (708)
BsaHI (6542)
BsaI (6066)
pPNham1
(6919 bp)
KpnI (4718)
ApaI (4712)
XhoI (4699)
SalI (4693)
HindIII (4678)
BamHI (3918)
NsiI (3545)
PstI (3108)
NcoI (3059)
BamHI (2338)

图 4

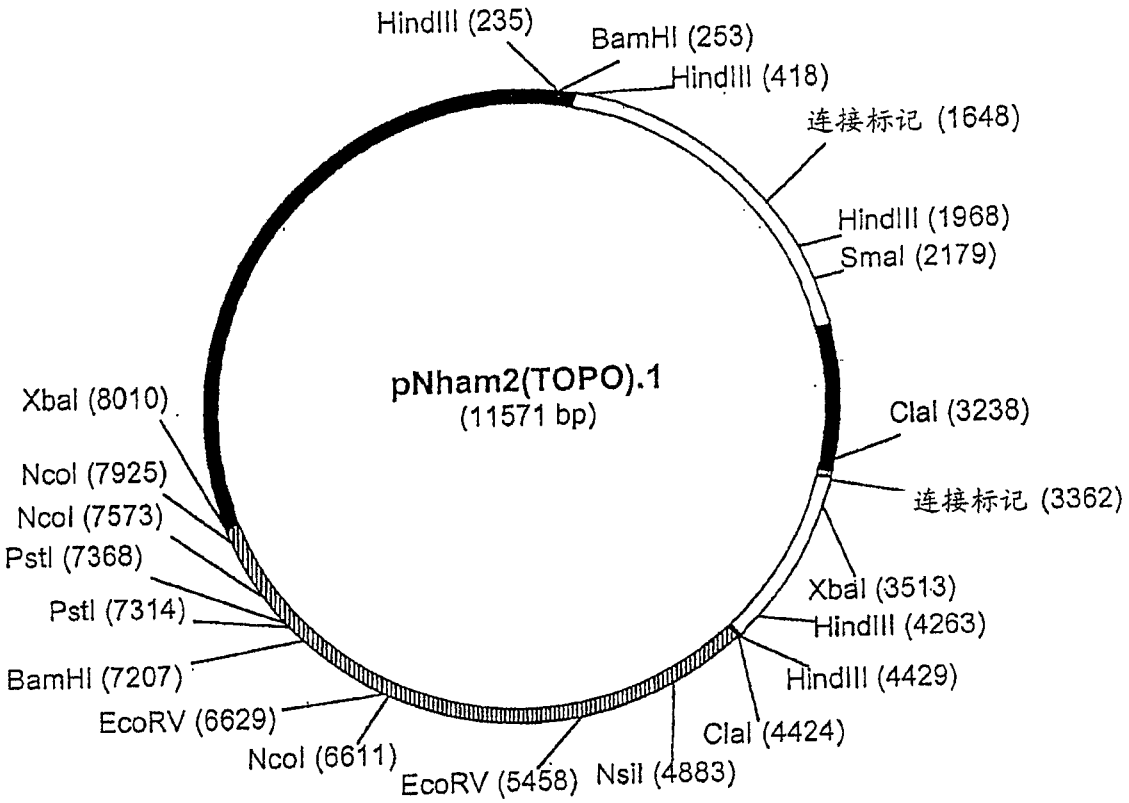

HindIII (235)
BamHI (253)
HindIII (418)
连接标记 (1648)
HindIII (1968)
SmaI (2179)
pNham2(TOPO).1
(11571 bp)
ClaI (3238)
连接标记 (3362)
XbaI (3513)
HindIII (4263)
HindIII (4429)
ClaI (4424)
NsiI (4883)
EcoRV (5458)
NcoI (6611)
EcoRV (6629)
BamHI (7207)
PstI (7314)
PstI (7368)
NcoI (7573)
NcoI (7925)
XbaI (8010)

图 5

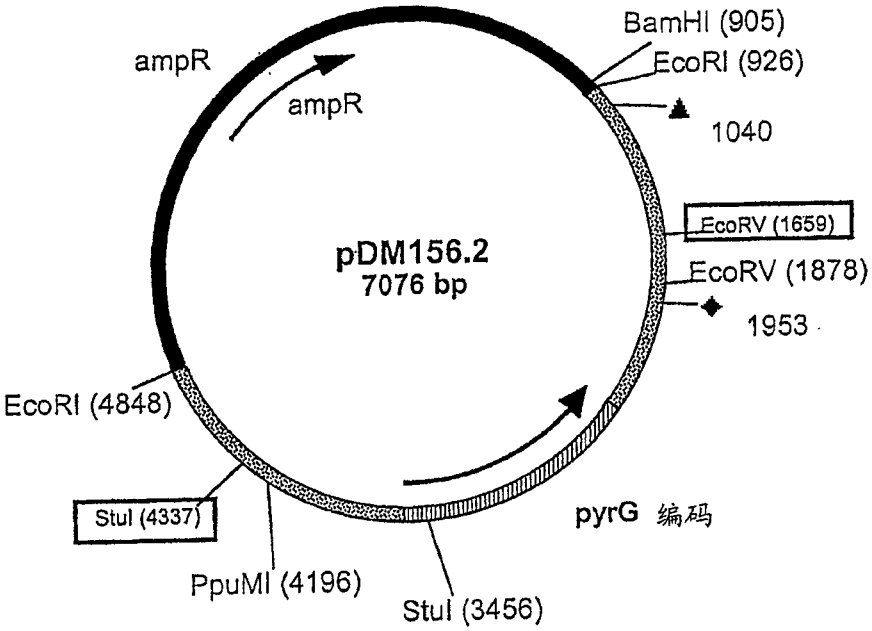

ampR
ampR
BamHI (905)
EcoRI (926)
1040
EcoRV (1659)
EcoRV (1878)
1953
pDM156.2
7076 bp
EcoRI (4848)
StuI (4337)
PpuMI (4196)
StuI (3456)
pyrG 编码

图 6

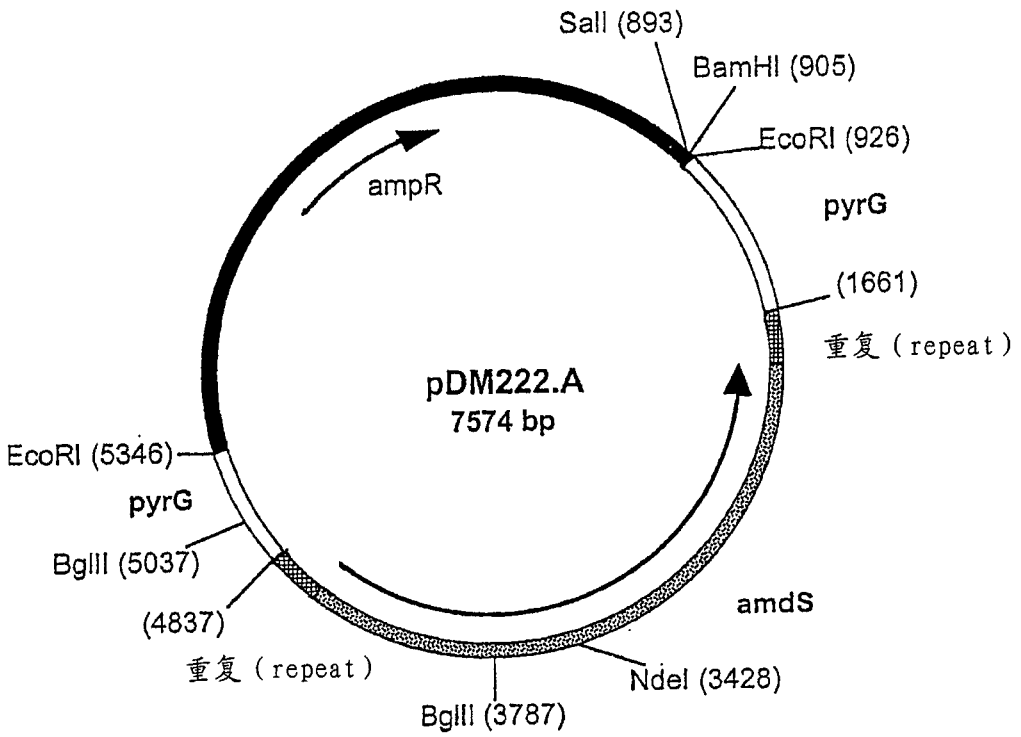

SalI (893)
BamHI (905)
EcoRI (926)
pyrG
(1661)
重复（repeat）
ampR
pDM222.A
7574 bp
EcoRI (5346)
pyrG
BglII (5037)
(4837)
重复（repeat）
amdS
NdeI (3428)
BglII (3787)

图 7