

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/60

C12N 9/88 C12N 15/76

C12N 1/21 C12P 17/18

C12P 19/62

//C12R1 : 465



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00811763.2

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1186447C

[22] 申请日 2000.7.19 [21] 申请号 00811763.2

[30] 优先权

[32] 1999. 8. 12 [33] US [31] 09/372,934

[86] 国际申请 PCT/IB2000/000996 2000.7.19

[87] 国际公布 WO2001/012822 英 2001.2.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.2.19

[71] 专利权人 辉瑞产品公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 金·J·施图茨曼 - 恩格沃尔

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 黄益芬

权利要求书 3 页 说明书 68 页 附图 7 页

[54] 发明名称 介导除虫菌素 B2:B1 比例的除虫链霉菌基因

[57] 摘要

本发明涉及含有编码 AveC 基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子，该多核苷酸分子可被用于改变除虫链霉菌发酵培养物中所产生的除虫菌素 2 类：1 类的比例或量。本发明进一步涉及除虫链霉菌的载体、宿主细胞和突变菌株，其中 aveC 基因已失活或突变以改变所产生的除虫菌素 2 类：1 类的比例或量。

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

1. 一种多核苷酸分子，其具有除虫链霉菌aveC等位基因或质粒pSE186 (ATCC 209604)上AveC基因产物编码序列的核苷酸序列，或具有图
5 1(SEQ ID NO:1)所示除虫链霉菌aveC ORF的核苷酸序列，或其简并变体，
但该核苷酸序列还具有至少第一和第二突变，所述突变使得除虫链霉菌
ATCC 53692株中野生型aveC等位基因已失活且表达具有所述突变型核苷酸
序列的多核苷酸分子的那些细胞所产生的除虫菌素中2类:1类的比例相对于
10 由除虫链霉菌ATCC 53692株中仅表达野生型aveC等位基因的那些细胞所产
生的比例降低，其中所述第一突变编码AveC基因产物中对应于SEQ ID
NO:2上第138位氨基酸的氨基酸残基从丝氨酸到苏氨酸的取代，所述第二
突变编码AveC基因产物中对应于SEQ ID NO:2上第139位氨基酸的氨基酸残
基从丙氨酸到苯丙氨酸的取代。

2. 权利要求1的多核苷酸分子，其中所述除虫菌素2类:1类为除虫菌素
15 环己基B2:环己基B1。

3. 权利要求2的多核苷酸分子，其中所述环己基B2:环己基B1的已降
低的比例为0.75:1或更低。

4. 一种重组载体，其含有权利要求1的多核苷酸分子。

5. 一种重组载体，其能通过导入至少第一突变和第二突变而使除虫链
20 霉菌的aveC等位基因发生突变，所述第一突变编码AveC基因产物中对应于
SEQ ID NO:2上第138位氨基酸的氨基酸残基从丝氨酸到苏氨酸的取代，所
述第二突变编码AveC基因产物中对应于SEQ ID NO:2上第139位氨基酸的氨
基酸残基从丙氨酸到苯丙氨酸的取代，所述重组载体包含携带了编码所述
突变的核苷酸序列的多核苷酸分子。

25 6. 权利要求5的重组载体，其含有权利要求1的多核苷酸分子。

7. 一种链霉菌属宿主细胞，其含有权利要求1的多核苷酸分子或权利
要求4或5的重组载体。

8. 一种制备除虫链霉菌新菌株的方法，所述菌株包含表达突变型aveC
等位基因并产生除虫菌素的细胞，该细胞产生的除虫菌素中2类:1类的比例
30 比除虫链霉菌相同菌株中仅表达野生型aveC等位基因的那些细胞所产生的
比例降低，所述方法包括：

(a) 将一种携带了突变型aveC等位基因或其简并变体的多核苷酸分子导入除虫链霉菌菌株的细胞，所述突变型aveC等位基因或其简并变体编码具有至少第一和第二氨基酸取代的AveC基因产物，所述第一取代为对应于SEQ ID NO:2上第138位氨基酸的氨基酸残基从丝氨酸到苏氨酸的取代，所述第二取代为对应于SEQ ID NO:2上第139位氨基酸的氨基酸残基从丙氨酸变为苯丙氨酸，其中所述基因产物的表达导致由除虫链霉菌菌株中表达突变型aveC等位基因或其简并变体的细胞产生的除虫菌素2类:1类的比例相对于相同菌株中仅表达野生型aveC等位基因的细胞所产生的比例降低，然后选择所产生的除虫菌素2类:1类的比例相对于相同菌株中仅表达野生型aveC等位基因的细胞所产生的比例降低的那些细胞；或

(b) 将一或多种多核苷酸分子导入除虫链霉菌菌株的细胞，所述多核苷酸分子能在aveC等位基因中导入一或多个突变，从而使得这类细胞编码的AveC基因产物具有至少第一和第二氨基酸取代，所述第一取代为对应于SEQ ID NO:2上第138位氨基酸的氨基酸残基从丝氨酸变为苏氨酸，所述第二取代为对应于SEQ ID NO:2上第139位氨基酸的氨基酸残基从丙氨酸变为苯丙氨酸，其中所述基因产物的表达导致由除虫链霉菌菌株中表达突变型aveC等位基因的细胞产生的除虫菌素2类:1类的比例相对于相同菌株中仅表达野生型aveC等位基因的细胞所产生的比例降低，然后选择所产生的除虫菌素2类:1类的比例相对于相同菌株中仅表达野生型aveC等位基因的细胞所产生的比例降低的那些细胞。

9. 权利要求8的方法，其中所述除虫菌素2类:1类为除虫菌素环己基B2:环己基B1。

10. 权利要求9的方法，其中所述降低的环己基B2:环己基B1的比例为0.75:1或更低。

11. 一种含有突变型aveC等位基因的除虫链霉菌细胞，所述突变型aveC等位基因包含第一和第二突变，所述第一突变编码对应于SEQ ID NO:2上第138位氨基酸的氨基酸残基从丝氨酸变成苏氨酸，所述第二突变编码对应于SEQ ID NO:2上第139位氨基酸的氨基酸残基从丙氨酸变成苯丙氨酸。

12. 权利要求11的细胞，其产生的除虫菌素2类:1类的比例相对于除虫链霉菌相同菌株中仅表达野生型aveC等位基因的细胞所产生的比例降低。

13. 权利要求12的细胞，其中所述除虫菌素2类:1类为除虫菌素环己基B2:环己基B1。

14. 权利要求13的细胞，其中所述降低的环己基B2:环己基B1的比例为0.75:1或更低。

- 5 15. 一种产生除虫菌素的方法，包括在允许或诱导除虫菌素产生的条件下于培养基中培养权利要求11的细胞，并从该培养基中回收所述除虫菌素。

介导除虫菌素B2：B1比例的除虫链霉菌基因

5

1. 发明领域

本发明涉及除虫菌素的组合物及除虫菌素的生产方法，主要应用于动物健康领域。更具体地，本发明涉及含有编码aveC基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子，该产物可用于调整除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)培养物发酵所产生的除虫菌素2类:1类的比例，本发明还涉及筛选这类多核苷酸分子的组合物及方法。本发明进一步涉及除虫链霉菌载体，转化的宿主细胞，和新型突变株(其中aveC基因已突变从而调整所产生的除虫菌素2类:1类的比例)。

15

2. 发明背景

2.1. 除虫菌素

链霉菌可产生各种各样的次级代谢产物，其中包括除虫菌素，其含有一系列八种相关的具有有效的抗蠕虫和杀昆虫活性的十六员的大环内脂类化合物，这八种截然不同但又密切相关的化合物指：Ala, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a 及 B2b。“a”系列化合物指的是天然除虫菌素，其在C25位的取代基为(S)-仲丁基，“b”系列化合物指的是C25位的取代基为异丙基的那些化合物。代号“A”及“B”指的是C5位取代基分别为甲氧基和羟基的除虫菌素。数字“1”指的是在C22位及C23位为双键的除虫菌素，而数字“2”为C22位有一个氢原子及在C23位有一个羟基的除虫菌素。在这些相关的除虫菌素中，B1型的除虫菌素被公认为具有最强的抗寄生虫和杀害虫活性，因而也是最具商业前景的除虫菌素。

除虫菌素及其通过除虫链霉菌菌株需氧发酵的生产方法在美国专利4,310,519 及4,429,042中都已描述。天然除虫菌素的生物合成被认为内源性起始于异丁酸及S-(+)-2-甲基丁酸的辅酶A硫代脂类似物。

经过随机诱变进行菌株改进并联合使用外源提供的脂肪酸可以有效生产除虫菌素类似物。支链2-氧代酸脱氢酶缺陷的除虫链霉菌的突变体(bkd缺陷突变体)只有在补充有脂肪酸进行发酵时才能产生除虫菌素。筛选和分离

支链脱氢酶活性缺陷的突变体(如除虫链霉菌, ATCC 53567)在欧洲专利(EP)276103中已有描述。在有外源提供的脂肪酸存在下发酵这些突变体的结果为对应于所使用的脂肪酸仅产生四种除虫菌素。因此, 用S-(+)-2-甲基丁酸补充除虫链霉菌(ATCC 53567)发酵, 结果产生天然除虫菌素Ala, A2a, B1a及 B2a; 用异丁酸补充发酵, 结果产生天然除虫菌素Alb, A2b, B1b及 B2b; 而用环戊烷羧酸补充发酵, 结果产生四种新型的环戊基除虫菌素Al, A2, B1及 B2。

如果用其它脂肪酸补充发酵可以产生新的除虫菌素。通过筛选800多种潜在的前体, 已经鉴定出60多种其它新的除虫菌素(例见Dutton等, 1991, 抗生素杂志, 44:357-365; 和 Banks 等, 1994, Roy. Soc. Chem. 147:16-26)。此外, 5-O-甲基转移酶活性缺陷的除虫链霉菌突变体实际上只能产生B类除虫菌素, 因而, 同时缺少支链2-氧代酸脱氢酶及5-O-甲基转移酶活性的除虫链霉菌的突变体对应于补充发酵所用的脂肪酸仅生产出B类除虫菌素。因此, 用S-(+)-2-甲基丁酸补充该双重突变体发酵, 结果仅产生天然除虫菌素B1a及B2a, 而用异丁酸或环戊烷羧酸补充发酵则可以分别产生天然除虫菌素B1b及B2b或新型环戊基B1及B2除虫菌素。而用环己烷羧酸补充该双重突变体菌是产生商业上重要的新型除虫菌素环己基除虫菌素B1(doramectin)的首选方法。该双重突变体如除虫链霉菌(ATCC 53692)的分离及特性描述在欧洲专利申请EP 276103中。

2.2. 参与除虫菌素生物合成的基因

在很多情况下, 涉及次生代谢产物生产的基因及编码一特定抗生素的基因在染色体上的位置常常是簇集在一起的, 例如, 链霉菌聚酮化合物合成酶基因簇(PKS)(见Hopwood和Sherman, 1990, 遗传学年评, 24:37-66)。这样, 通过生物合成途径进行基因克隆的一个策略是分离抗药性基因及然后检测染色体上相邻区域中其它与该特定抗生素生物合成相关的基因。另外一种克隆重要代谢产物生物合成之相关基因的策略是突变体互补。例如, 来自能产生特定代谢产物之生物的部分DNA文库被导入不产生该代谢产物的突变体和筛选产生该代谢产物的转化株。另外, 利用来自其它链霉菌的探针进行文库杂交已被用于鉴别及克隆生物合成途径中的基因。

涉及除虫菌素生物合成的基因(ave 基因), 就象其它链霉菌次生代谢产物(例如, PKS)生物合成所需基因一样, 同样簇集于染色体上。使用载体已

成功克隆了许多ave基因以补充除虫菌素生物合成受阻的除虫链霉菌突变体。这些基因的克隆在美国专利5,252,474中已有描述。此外, Ikeda 等, 1995, 抗生素杂志 48:532-534, 描述了涉及C22, C23脱水步骤的染色体区域(aveC)定位在除虫链霉菌4.82 Kb BamHI酶切片断上, 并描述了产生单一组份B2a 生产者的aveC基因的突变。既然双氢除虫菌素, 一潜在抗蠕虫化合物, 能由除虫菌素B2a化学合成, 该除虫菌素B2a 的单一组分生产者被认为在商业上生产双氢除虫菌素是特别有用的。

可以使除虫菌素生产的复杂度最小化的aveC基因突变, 例如, 降低除虫菌素B2:B1比率的突变的鉴定可以简化商业上重要的除虫菌素的生产及纯化。

3. 发明简述

本发明提供了分离的多核苷酸分子, 其含有除虫链霉菌完整的aveC ORF或其实质性部分, 该分离的多核苷酸分子缺少位于除虫链霉菌染色体上aveC ORF所处位置下游的下一个完整的ORF。本发明分离的多核苷酸分子优选包括与质粒pSE 186 (ATCC 209604)上除虫链霉菌AveC基因产物编码序列相同的核苷酸序列, 或与图1(SEQ ID NO:1)中aveC ORF或其实质性部分相同的核苷酸序列。本发明还提供一种分离的多核苷酸分子, 其含有SEQ ID NO: 1的核苷酸序列或其简并变体。

本发明进一步提供了一种分离的多核苷酸分子, 其具有与质粒pSE 186 (ATCC 209604)上除虫链霉菌AveC基因产物编码序列同源或与图1(SEQ ID NO:1)中aveC ORF的核苷酸序列或其实质性部分同源的核苷酸序列。

本发明进一步提供了一种分离的多核苷酸分子, 其含有的核苷酸序列编码的多肽的氨基酸序列与质粒pSE 186 (ATCC 209604)上AveC基因产物编码序列编码的氨基酸序列同源或与图1(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列或其实质性部分同源。

本发明进一步提供了分离的多核苷酸分子, 其含有一编码AveC同源基因产物的核苷酸序列。在优选的实施方案中, 分离的多核苷酸分子含有编码吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*)AveC 同源基因产物的核苷酸序列, 其中的同源基因产物含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其实质性部分。在优选的实施方案中, 编码吸水链霉菌AveC 同源基因产物的本发明分离的多核苷酸分

子含有SEQ ID NO:3 的核苷酸序列或其实质性部分。

本发明进一步提供了分离的多核苷酸分子，其含有与SEQ ID NO:3所示的吸水链霉菌核苷酸序列同源的核苷酸序列。本发明还提供了分离的多核苷酸分子，其含有的核苷酸序列编码的多肽与具有SEQ ID NO:4所示氨基酸
5 序列的吸水链霉菌AveC同源基因产物同源。

本发明还提供了寡核苷酸，其与具有图1(SEQ ID NO:1)或SEQ ID NO:3所示核苷酸序列的多核苷酸分子杂交，或与具有图1(SEQ ID NO:1)或SEQ ID NO:3所示核苷酸序列的互补核苷酸序列的多核苷酸分子杂交。

本发明进一步提供了重组克隆载体及表达载体，它们可用于克隆或表
10 达本发明的多核苷酸，包括含有除虫链霉菌的aveC ORF或aveC同系物的ORF的多核苷酸分子。在一非限制性的实施方案中，本发明所提供的质粒pSE186 (ATCC 209604)含有除虫链霉菌aveC 基因的完整ORF。本发明进一步提供了转化宿主细胞，其含有本发明的多核苷酸分子或重组载体及由此得到的新的菌株或细胞系。

本发明进一步提供了基本上纯化或分离的重组表达型AveC 基因产物
15 或AveC 同源基因产物或其实质性部分及其同系物。本发明进一步提供了产生重组AveC基因产物的方法，所述方法包括：在有利于生产重组AveC 基因产物或AveC 同源基因产物的条件下，培养用重组表达载体转化的宿主细胞，并从细胞培养物中回收AveC 基因产物或AveC 同源基因产物，其中所述重组表达载体所含有的多核苷酸分子的核苷酸序列可以编码AveC 基因产
20 物或AveC 同源基因产物，该多核苷酸分子与控制多核苷酸分子在宿主细胞中表达的一或多个调控元件可操作相连。

本发明进一步提供了多核苷酸分子，其包含相同于除虫链霉菌aveC等
25 位基因、或质粒pSE 186 (ATCC 209604)上AveC基因产物编码序列或其简并变体、或如图1 (SEQ ID NO:1)所示除虫链霉菌aveC ORF的核苷酸序列的一种核苷酸序列，但是其进一步包含一或多个突变以使其中野生型的aveC等位基因已经失活且其表达的多核苷酸分子含有突变的核苷酸序列的除虫链霉菌菌株(ATCC 53692)的细胞相对于仅表达野生型的aveC等位基因的除虫链霉菌菌株(ATCC 53692)的细胞而言，产生不同比例或量的除虫菌素。根据
30 本发明，可使用这种多核苷酸分子生产除虫链霉菌新菌株，其与仅表达野生型的aveC等位基因的相同菌株相比较，除虫菌素的产量有可测的改

变。在优选的实施方案中，这种多核苷酸分子可用于生产除虫链霉菌新菌株(其与仅表达野生型的aveC等位基因的相同菌株相比以减少的2类:1类比例生产除虫菌素)。在进一步优选的实施方案中，这种多核苷酸分子可用于生产除虫链霉菌新菌株(其与仅表达野生型的aveC等位基因的相同菌株相比可以生产增加水平的除虫菌素)。在进一步优选的实施方案中，这种多核苷酸分子可用于生产除虫链霉菌新菌株(其中aveC 基因已经失活)。

本发明提供了鉴别能改变所产生的除虫菌素的比例和/或量的除虫链霉菌aveC ORF突变的方法。在优选的实施方案中，本发明提供了鉴别能改变所产生的除虫菌素2类:1类比例的aveC ORF突变的方法，所述方法包括：(a)测定除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素2类:1类的比例，所述细胞中的野生型aveC等位基因已失活，含有编码突变的AveC基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子被导入该细胞并在其中被表达；(b)测定与步骤(a)中除虫链霉菌为相同菌株、但仅表达野生型aveC等位基因或图1(SEQ ID NO:1)所示ORF或其同源核苷酸序列的细胞产生的除虫菌素2类:1类之比；及(c)将步骤(a)中除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素2类:1类之比与步骤(b)中除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素2类:1类之比进行比较，如果二者不同，则鉴定出能改变除虫菌素2类:1类比例的aveC ORF突变。在优选的实施方案中，除虫菌素2类:1类的比例因突变而减少。

在另一个优选的实施方案中，本发明提供了一种鉴定aveC ORF突变或含aveC ORF之基因构建体的方法，所述突变或构建体能改变所产生的除虫菌素的量，所述方法包括：(a)测定除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素的量，所述细胞中野生型aveC等位基因已失活，且含有编码突变型AveC基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子，或含有编码AveC基因产物之核苷酸序列的基因构建体的多核苷酸分子已经导入该细胞并被表达；(b)测定与步骤(a)中除虫链霉菌为相同菌株、但仅表达具有图1(SEQ ID NO:1)所示ORF的核苷酸序列或与其同源的核苷酸序列的单个aveC等位基因的细胞产生的除虫菌素的量；及(c)比较步骤(a)中除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素的量与步骤(b)中除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素的量，如果二者不同，则鉴定出能改变除虫菌素量的aveC ORF突变或基因构建体。在优选的实施方案中，除虫菌素的量因突变而增加。

本发明进一步提供了重组载体，该载体可用于制备具有改变的除虫菌

素产量的除虫链霉菌新菌株。例如，本发明提供了这样一种载体，其可用于将任一个含有本发明的突变核苷酸序列的多核苷酸分子靶向除虫链霉菌染色体上的aveC基因位点，或插入，或以同源重组的方式取代aveC ORF或其部分。然而，根据本发明，当插入到除虫链霉菌染色体上除aveC基因以外的位点时或在除虫链霉菌细胞中以附加体的形式出现时，含有本发明的突变核苷酸序列的多核苷酸分子在调控除虫菌素生物合成方面也起到一定作用。因此，本发明也提供了这样一种载体，其含有的多核苷酸分子含有本发明的突变核苷酸序列，可使用该载体将多核苷酸分子插入到除虫链霉菌染色体上除aveC基因以外的位点处，或该载体可以附加体的形式出现。

5 在优选实施方案中，本发明所提供的基因取代载体可被用于将突变的aveC等位基因插入到除虫链霉菌染色体上以产生新型的细胞株，其可以较仅表达野生型aveC等位基因的相同菌株细胞以减少的2类:1类比例生产除虫菌素。

本发明进一步提供了一种制备除虫链霉菌新菌株的方法，所述菌株含有能表达突变的aveC等位基因的细胞，其与仅表达野生型aveC等位基因的除虫链霉菌相同菌株细胞相比，所产生的除虫菌素的比例和/或量发生改变。在优选的实施方案中，本发明提供了一种制备除虫链霉菌新菌株的方法，所述菌株含有能表达突变的aveC等位基因的细胞，其与仅表达野生型aveC等位基因的除虫链霉菌相同菌株细胞相比，所产生的除虫菌素的2类:1类比例发生改变，所述方法包括用携有突变的aveC等位基因的载体转化除虫链霉菌菌株细胞，该突变的aveC等位基因编码的基因产物使得表达突变的aveC等位基因的除虫链霉菌菌株细胞与仅表达野生型aveC等位基因的除虫链霉菌相同菌株细胞相比，所产生的除虫菌素的2类:1类比例发生改变，选择转化细胞，该转化细胞产生的除虫菌素2类:1类比例较仅表达野生型aveC等位基因的菌株细胞有所改变。在优选实施方案中，在新菌株细胞中，所产生的除虫菌素2类:1类的比例有所减少。

15 20 25

在进一步优选的实施方案中，本发明提供了制备除虫链霉菌新菌株的方法，所述菌株包括能产生改变量的除虫菌素的细胞，所述方法包括用携有突变aveC等位基因或含有该aveC等位基因的基因构建体的载体转化除虫链霉菌菌株细胞，其表达的结果使表达突变aveC等位基因或基因构建体的除虫链霉菌菌株细胞所生产的除虫菌素量较仅表达野生型aveC等位基因的

30

除虫链霉菌相同菌株细胞产生的除虫菌素的量有所改变，挑选已转化的细胞，该转化细胞产生的除虫菌素量较仅表达野生型aveC等位基因的菌株细胞产生的除虫菌素量有所改变。在优选实施方案中，在新菌株细胞中，所产生的除虫菌素的量有所增加。

- 5 在进一步优选的实施方案中，本发明提供了一种制备除虫链霉菌新菌株的方法，这些除虫链霉菌细胞中含有失活的aveC等位基因，所述方法包括用使得aveC等位基因失活的载体转化表达任何aveC等位基因的除虫链霉菌菌株细胞，并且挑选其中aveC等位基因已经失活的转化细胞。

10 本发明进一步提供了除虫链霉菌新菌株，其含有的细胞已被任一含有本发明的突变核苷酸序列的多核苷酸分子或载体转化。在优选的实施方案中，本发明提供了除虫链霉菌新菌株，其含有的细胞表达了突变的aveC等位基因而不是野生型的aveC等位基因，或同时表达突变的aveC等位基因和野生型的aveC等位基因，其中该新菌株细胞产生的除虫菌素的2类:1类比例相对于仅表达野生型aveC等位基因的相同菌株细胞而言有所改变。在更优
15 选的实施方案中，新菌株细胞产生的除虫菌素的2类:1类比例相对于仅表达野生型aveC等位基因的相同菌株细胞而言有所降低。这种新菌株可用于大规模生产有商业应用价值的除虫菌素例如doramectin。

20 在另一个优选的实施方案中，本发明提供了除虫链霉菌新菌株，其含有的细胞可以表达突变的aveC等位基因或含有aveC等位基因的基因构建体，而不是野生型的aveC等位基因，或同时表达这两者，其结果是相对于仅表达野生型的aveC等位基因的相同菌株细胞产生的除虫菌素的量而言，含有该突变的aveC等位基因的细胞产生的除虫菌素的量有所改变。在优选的实施方案中，新细胞产生的除虫菌素的量有所增加。

25 在另一个优选的实施方案中，本发明提供了除虫链霉菌新菌株，其含有的细胞中aveC基因已失活。这种菌株不仅可用于产生与野生型菌株所产生的不同谱的除虫菌素，而且可用于本文所述的互补筛选试验以便测定靶向或随机诱变的aveC基因是否影响除虫菌素产量。

30 本发明进一步提供了生产除虫菌素的方法，所述方法包括：在允许或诱导除虫菌素生产的条件下，在培养基中培养除虫链霉菌菌株细胞，并从培养物中回收除虫菌素，所述细胞表达突变的aveC等位基因，与不表达突变aveC等位基因而仅表达野生型的aveC等位基因的相同菌株细胞相比，该

突变等位基因编码的基因产物改变了表达突变的aveC等位基因的除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素的2类:1类的比例。在优选的实施方案中,表达突变的细胞产生的除虫菌素的2类:1类的比例有所减少。该方法提供了商业上有价值的除虫菌素例如doramectin的高效率的生产方法。

5 本发明进一步提供了生产除虫菌素的方法,所述方法包括:在允许或诱导除虫菌素生产的条件下,在培养基中培养除虫链霉菌菌株细胞,并从培养物中回收除虫菌素,所述细胞表达突变的aveC等位基因或含有aveC等位基因的基因构建体,与不表达突变aveC等位基因或基因构建体而仅表达野生型的aveC等位基因的相同菌株细胞相比,表达突变的aveC等位基因或
10 基因构建体的除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素的量有所改变。在优选的实施方案中,表达突变或基因构建体的细胞产生的除虫菌素的量增加。

本发明进一步提供了由表达本发明的突变的aveC等位基因的除虫链霉菌菌株产生的除虫菌素的新的组合物,其中与仅表达野生型的aveC等位基因而不表达突变的aveC等位基因的相同除虫链霉菌菌株细胞所产生的除虫
15 菌素的2类:1类的比例相比,其生产的除虫菌素中2类:1类比例减少。这种新型的除虫菌素组合物可以存在于发酵培养液中或从培养液中获得,并且可以部分或基本上纯化。

4. 附图说明

20 图1.含有除虫链霉菌aveC ORF的 DNA 序列 (SEQ ID NO:1)及其推定的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。

图2. 含有除虫链霉菌aveC基因完整的ORF的质粒载体pSE186 (ATCC 209604)。

25 图3. 含有插入除虫链霉菌aveC ORF中的红色糖多孢菌ermE基因的基因取代载体pSE180(ATCC 209605)。

图4. 除虫链霉菌的除虫菌素聚酮化合物合成酶基因簇的BamHI 限制性酶切图谱,并鉴定了五种重叠的粘粒克隆(即pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, PSE69)。还指示了pSE118 与 pSE119的关系。

30 图5. 除虫链霉菌菌株的发酵产物的 HPLC 分析。通过与环己基B1的标准量比较进行峰定量。环己基B2的保留时间是7.4-7.7分钟,环己基B1的保留时间是11.9-12.3分钟。FIG. 5A. 携带失活的aveC ORF的除虫链霉菌

SE180-11菌株；FIG. 5B. 用pSE186(ATCC 209604)转化的除虫链霉菌SE180-11菌株；FIG. 5C. 用pSE187转化的除虫链霉菌SE180-11菌株；FIG. 5D. 用pSE188转化的除虫链霉菌SE180-11菌株。

图6. 由除虫链霉菌aveC ORF 编码的推定氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)，来自产灰色链霉菌(*S. griseochromogenes*)的aveC同系物的部分ORF (SEQ ID NO:5)，及来自吸水链霉菌的aveC同系物ORF (SEQ ID NO:4)的比较。以粗体表示的缬氨酸残基是该蛋白质推定的起始位点。以大写字母表示的保守残基显示出全部三种序列中的同源性，以小写字母表示的保守残基显示出3种序列中的2种的同源性。这些氨基酸序列有近50%的序列同一性。

图7. 一种杂合质粒构建体，其含有吸水链霉菌aveC同源基因中564 bp的BsaAI/KpnI片段，该片段插入除虫链霉菌的aveC ORF上BsaAI/KpnI位点。

5. 发明详述

本发明涉及鉴定及表征具有编码除虫链霉菌AveC 基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子，构建可用于筛选突变的AveC 基因产物对生产除虫菌素的影响的除虫链霉菌新菌株，并且发现某些突变的AveC 基因产物可以降低除虫链霉菌产生的除虫菌素B2:B1的比例。作为例子，本发明将在下文中描述具有与质粒pSE186 (ATCC 209604)的除虫链霉菌AveC 基因产物编码序列相同的核苷酸序列，或具有图 1 (SEQ ID NO:1)的ORF 的核苷酸序列的多核苷酸分子，及具有由此得来的突变核苷酸序列的多核苷酸分子及其简并变体。然而，本发明阐明的原理可被类似地应用于其它的多核苷酸分子，包括来自其它链霉菌例如吸水链霉菌及产灰色链霉菌等的aveC同源基因。

5.1. 编码除虫链霉菌AveC基因产物的多核苷酸分子

本发明提供了一种分离的多核苷酸分子，其含有除虫链霉菌完整的aveC ORF或其实质性部分，该分离的多核苷酸分子缺少处于除虫链霉菌染色体中aveC ORF 所处位置下游的下一个完整的ORF。

本发明分离的多核苷酸分子优选包括的核苷酸序列与质粒pSE186 (ATCC 209604)的除虫链霉菌AveC 基因产物的编码序列相同，或与图 1 (SEQ ID NO:1)的ORF 的核苷酸序列或其实质性部分相同。本文所用的含有

编码除虫链霉菌AveC 基因产物的核苷酸序列的分离的多核苷酸分子的“实质性部分”指的是分离的多核苷酸分子，其至少包括图 1 (SEQ ID NO: 1) 所示的完整的aveC ORF序列的约70%，并且编码功能等同型AveC 基因产物。这里，“功能等同”的AveC基因产物被定义为基因产物，当其在其中天然aveC等位基因失活的除虫链霉菌菌株ATCC 53692中表达时，结果产生的除虫菌素与仅表达除虫链霉菌菌株ATCC 53692天然的野生型功能性aveC等位基因的除虫链霉菌菌株ATCC 53692产生的除虫菌素具有基本上相同的比例及量。

除了aveC ORF的核苷酸序列外，本发明分离的多核苷酸分子可以进一步包括天然侧翼于除虫链霉菌原位aveC基因的核苷酸序列，例如图 1 (SEQ ID NO:1)所示的侧翼核苷酸序列。

本发明还提供了一种分离的多核苷酸分子，其包含SEQ ID NO: 1的核苷酸序列或其简并变体。

本文所用的术语“多核苷酸分子”，“多核苷酸序列”，“编码序列”，“开放阅读框”及“ORF”都意指DNA分子和RNA分子，其可以是单链或双链，其可以被转录或翻译(DNA)，或被翻译(RNA)成AveC 基因产物，或者，如下所述，被翻译为AveC同源基因产物，或被翻译成多肽(当置于适当调控元件的控制之下时，在适当宿主细胞表达系统中其与AveC基因产物或AveC 同源基因产物同源)。编码序列包括但不限于原核序列，cDNA序列，基因组DNA序列，及化学合成的DNA和RNA序列。

如图 1 (SEQ ID NO:1)所示的核苷酸序列在bp位置42, 174, 177 及 180包含四个不同的GTG 密码子。如下面第9部分所示，可构建aveC ORF (图 1: SEQ ID NO:1)5'区域的多个缺失以帮助确定这些密码子中的哪些能在aveC ORF中用作蛋白质表达的起始位点。bp 42位置处第一个GTG位点的缺失并不能消除AveC的活性。此外，再缺失bp位置174, 177及180的所有GTG密码子才能消除AveC的活性，这表明该区域对于蛋白质表达是必须的。本发明因此包括具有不同长度的aveC ORF。

本发明进一步提供了多核苷酸分子，其包含的核苷酸序列同质粒pSE186 (ATCC 209604)的除虫链霉菌aveC 基因产物编码序列同源，或与图 1 (SEQ ID NO:1)所示的aveC ORF 核苷酸序列或其实质性部分同源。术语“同源”当用于指与除虫链霉菌aveC 基因产物编码序列同源的多核苷酸分

子时，指具有以下核苷酸序列的多核苷酸分子：(a)与质粒pSE186 (ATCC 209604)上除虫链霉菌AveC基因产物编码序列编码相同的AveC 基因产物，或与图1(SEQ ID NO:1)所示aveC ORF 核苷酸序列编码相同的AveC 基因产物，但其含有一或多个根据遗传密码子简并性而言的对核苷酸序列的沉默改变(即简并变体)；或(b)在中度严紧的条件下，与下述多核苷酸分子的互补序列杂交，该多核苷酸分子含有的核苷酸序列编码由质粒pSE186 (ATCC 209604)aveC 基因产物编码序列所编码的氨基酸序列，或编码图1 (SEQ ID NO:2)所示的氨基酸序列，并编码如上文所定义的功能等同型AveC 基因产物，所述中度严紧的条件也即在65℃下，0.5 M NaHPO₄，7%十二烷基硫酸钠(SDS)，1 mM EDTA中与结合于滤膜上的DNA杂交，及在42℃下，在0.2×SSC/0.1% SDS中洗涤(例见 Ausubel 等(编)，1989，分子生物学最新方法，Vol. 1，Green Publishing Associates公司，和John Wiley & Sons公司，纽约，p.2.10.3)。在优选的实施方案中，同源的多核苷酸分子在高度严紧的条件下与质粒pSE186 (ATCC 209604)中编码AveC基因产物的核苷酸序列的互补序列杂交，或与图1 (SEQ ID NO:1)所示的AveC ORF核苷酸序列或其实质性部分的互补序列杂交，并编码如上文所定义的功能等同型AveC 基因产物，高度严紧的条件指的是在65℃，0.5 M NaHPO₄，7%十二烷基硫酸钠(SDS)，1 mM EDTA中与结合于滤膜上的DNA杂交，及在68℃下，在0.1×SSC/0.1% SDS中洗涤(Ausubel 等，1989，见上文)。

如下文实施例所述，AveC 基因产物及其潜在的功能等同物的活性可以通过用HPLC分析发酵产物的方式来测定。不管是天然的还是人工合成的，多核苷酸分子(其含有的核苷酸序列编码除虫链霉菌aveC 基因产物的功能等同物)包括天然存在于除虫链霉菌其它菌株中的AveC 基因，存在于链霉菌其它种的aveC同源基因及突变的aveC等位基因。

本发明进一步提供了多核苷酸分子，其包含的核苷酸序列所编码的多肽含有的氨基酸序列与质粒pSE186 (ATCC 209604)的AveC 基因产物编码序列编码的氨基酸序列，或与图1 (SEQ ID NO:2)所示的氨基酸序列或其实质性部分有同源性。本文所用的图1 (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的“实质性部分”指的是该多肽至少包括约70%的如图1(SEQ ID NO:2)所示的氨基酸序列，并且组成了如上所定义的功能等同型AveC基因产物。

本文用来描述同源于除虫链霉菌AveC基因产物之氨基酸序列的氨基酸

序列时，术语“同源性”指含有图1(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列、但其中一或多个氨基酸残基已被不同的氨基酸残基保守取代的那些多肽，其中所述氨基酸序列与质粒pSE186 (ATCC 209604)上AveC 基因产物编码序列编码的多肽、或与图1 (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列有，按照任何标准氨基酸序列同一性算法如BLASTP算法(GENBANK, NCBI)所确定的至少约70%，更优选至少约80%，最优选至少约90%的氨基酸序列同一性。保守的氨基酸取代是本领域众所周知的。进行这样的取代的规则描述于Dayhof, M.D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D.C., Vol.5, Sup. 3等。更具体地，保守的氨基酸取代是通常发生在氨基酸的酸性或极性相关家族中的那些。基因编码的氨基酸一般分为四组：(1)酸性=天冬氨酸，谷氨酸；(2)碱性=赖氨酸，精氨酸，组氨酸；(3)非极性=丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，蛋氨酸，色氨酸；及(4)不带电的极性=甘氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，半胱氨酸，丝氨酸，苏氨酸，酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸也可以被通称为芳香的氨基酸。在任何特定组中的一或多个取代，例如，用异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸，或用谷氨酸取代天冬氨酸，或用丝氨酸取代苏氨酸，或用结构相关的氨基酸残基取代任一个其它氨基酸残基。例如，具有相似的酸性，极性或其某些结合的相似性的氨基酸残基进行取代对于整个多肽的功能没有显著的影响。

本发明进一步提供了分离的多核苷酸分子，其包括的核苷酸序列编码aveC同源基因产物。本文所用“AveC同源基因产物”定义为与下述除虫链霉菌AveC基因产物具有按照任何标准氨基酸序列同一性算法如BLASTP算法(GENBANK, NCBI)所确定的至少约50%氨基酸序列同一性的基因产物，所述除虫链霉菌AveC基因产物含有由质粒pSE186 (ATCC 209604)上AveC基因产物编码序列所编码的氨基酸序列、或图1 (SEQ ID NO:2)所示氨基酸序列。在一个非限制性的实施方案中，AveC同源基因产物来自吸水链霉菌(欧洲专利申请0298423已有描述；保藏号为FERM BP-1901)，其含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其实质性部分。SEQ ID NO:4的氨基酸序列的“实质性部分”指的是含有SEQ ID NO:4的至少约70%的氨基酸序列的多肽，其构成功能等同型AveC同源基因产物。“功能等同型”AveC同源基因产物被定义成基因产物，当在吸水链霉菌菌株 FERM BP-1901中表达时(其中天然的AveC同系物等位基因已经失活)，导致所产生的米尔倍霉素的的比例和量基本

上相同于仅表达吸水链霉菌菌株 FERM BP-1901天然的野生型功能性aveC同系物等位基因的吸水链霉菌菌株FERM BP-1901所产生的比例和量。在一个非限制性实施方案中，本发明分离的多核苷酸分子(其编码吸水链霉菌aveC同源基因产物)含有SEQ ID NO:3的核苷酸序列或其实质性部分。在这
5 点上，含有SEQ ID NO:3之核苷酸序列的分离的多核苷酸分子的“实质性部分”指的是该分离的多核苷酸分子至少包括约70%的如SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列，并且编码如上所定义的功能等同的AveC同源基因产物。

本发明进一步提供了含有同源于SEQ ID NO:3所示的吸水链霉菌核苷酸序列之核苷酸序列的多核苷酸分子。术语“同源”当用来指含有同源于SEQ
10 ID NO:3中吸水链霉菌aveC同源基因产物编码序列之核苷酸序列的多核苷酸分子时，指具有以下核苷酸序列的多核苷酸分子：(a) 编码与SEQ ID NO:3的核苷酸序列相同的基因产物，但在所述核苷酸序列中包括一或多个根据遗传密码简并性的沉默改变的核苷酸序列(即简并变体)；或(b)与含有编码SEQ ID NO:4的氨基酸序列之核苷酸序列的多核苷酸分子的互补序列在中度
15 严紧条件下杂交、并编码上述功能等同型AveC同源基因产物的核苷酸序列，所述中度严紧条件即65℃在0.5 M NaHPO₄，7% SDS，1 mM EDTA中与结合于滤膜上的DNA杂交，及42℃在0.2×SSC/0.1% SDS中洗涤(例见Ausubel等，文献同上)。在优选实施方案中，所述同源多核苷酸分子在高度严紧条件下与SEQ ID NO:3中编码AveC同源基因产物的核苷酸序列的互
20 补序列杂交，并编码上述功能等同型AveC同源基因产物，所述高度严紧条件指65℃，0.5 M NaHPO₄，7% SDS，1 mM EDTA中与结合于滤膜上的DNA杂交，及68℃，0.1×SSC/0.1% SDS中洗涤(Ausubel等，1989，见上文)。

本发明进一步提供了一种含有编码下述多肽的核苷酸序列的多核苷酸
25 分子，所述多肽同源于吸水链霉菌AveC同源基因产物。本文用于指同源于SEQ ID NO:4所示吸水链霉菌的AveC同源基因产物的多肽时，术语“同源性”指含有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列、但其中一或多个氨基酸残基已如上述被不同氨基酸残基保守取代，从而产生上述功能等同型AveC同源基因产物的多肽，其中所述氨基酸序列与SEQ ID NO:4的多肽具有，按照任何标
30 准氨基酸序列同一性算法如BLASTP算法(GENBANK，NCBI)所确定的至少约70%、更优选至少约80%、最优选至少约90%的氨基酸序列同一性。

本发明进一步提供了寡核苷酸分子，其与具有如图1 (SEQ ID NO:1)或 SEQ ID NO:3之核苷酸序列的多核苷酸分子杂交，或与具有如图1 (SEQ ID NO:1)或SEQ ID NO:3之核苷酸序列的互补序列的核苷酸序列的多核苷酸分子杂交。该寡核苷酸的长度至少约为10个核苷酸，且优选约为15-30个核苷酸，其在高度严紧的条件下与前述多核苷酸分子之一杂交，即在37℃左右，6×SSC /0.5% 焦磷酸钠中洗涤14个碱基左右的寡核苷酸，在48℃左右洗涤17个碱基左右的寡核苷酸，在55℃左右洗涤20个碱基左右的寡核苷酸，及在60℃左右洗涤23个碱基左右的寡核苷酸。在一个优选实施方案中，该寡核苷酸与前述多核苷酸分子之一的部分互补。这些寡核苷酸分子可用于不同目的，包括编码，或用作基因调控所用的反义核酸分子，或用作扩增编码aveC或aveC同系物的多核苷酸分子的引物。

此外，可以结合已知技术，使用本文公开的多核苷酸分子或寡核苷酸在链霉菌的其它种或菌株中鉴定其它aveC同源基因。例如，含有图1(SEQ ID NO:1)的除虫链霉菌核苷酸序列的一部分或SEQ ID NO:3的吸水链霉菌核苷酸序列的一部分的寡核苷酸分子可被可测地标记及用于筛选由来源于相关生物体的DNA所构建的基因组文库)。杂交条件严紧性的选择是基于所涉及生物体的相互关系，在这个例子中，指的是除虫链霉菌或吸水链霉菌与其它相关生物体的关系。对不同严紧条件的要求是本领域技术人员众所周知的，这样的条件将根据衍生得到文库及标记序列的特定生物体的不同而进行可预测的改变。优选所述寡核苷酸的长度至少为约15个核苷酸，其包括，如下述实施例描述的那些。可以利用这些和其它的寡核苷酸通过应用聚合酶链反应(PCR)等标准技术进行同源基因扩增，但也可使用本领域已知的其它扩增技术，如连接酶链反应。

可以检测被鉴定为含有aveC同系物核苷酸序列的克隆编码功能AveC同源基因产物的能力。为此，可对该克隆进行序列分析以鉴别适当的阅读框以及起始和终止信号。另一方面或另外，可将克隆的DNA序列插入合适的表达载体，即含有转录及翻译插入的蛋白质编码序列所必需的元件的载体。可按下述使用多种宿主/载体系统中的任一种，包括但不局限于如质粒，噬菌体，或粘粒表达载体等的细菌系统。可以如下面第7部分所述，通过使用如HPLC分析发酵产物来分析用含有潜在aveC同系物编码序列的载体转化的适当宿主细胞的AveC型活性。

本文所述的多核苷酸分子的生产 and 操作是本领域技术人员易于做到的，其可以依下述的重组技术进行操作，例如，Maniatis等，1989，分子克隆实验指南，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约；Ausubel等，1989，现代分子生物学教程，Greene Publishing Associates & Wiley Interscience，纽约；

5 Sambrook等，1989，分子克隆实验指南，(第二版)，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约；Innis 等(编)，1995，PCR 策略，Academic Press公司，San Diego；和Erlich (编)，1992，PCR 技术，牛津大学出版社，纽约，所有文献均引入本文作为参考。编码AveC 基因产物或AveC同源基因产物的多核苷酸克隆可以通过本领域已知的任何方法进行鉴别，包括但不限于下面

10 第7部分所列举的方法。通过使用如Benton和Davis，1977，科学 196:180中所述的筛选噬菌体文库的方法和Grunstein 及 Hogness，1975，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，72:3961-3965所述的筛选质粒文库的方法，可以从基因组DNA文库中筛选aveC及aveC同系物编码序列。存在于如质粒pSE186 (ATCC 209604)，或质粒pSE119中，且具有已知含有aveC ORF之核苷酸序列的多核苷酸分子(在下面第7部分进行描述)可以用作这些筛选实验的探针。或者，

15 可以合成对应由纯化的AveC同源基因产物的部分或全部氨基酸序列推出的核苷酸序列的寡核苷酸探针。

5.2. 重组系统

5.2.1. 克隆与表达载体

20 本发明进一步提供了重组克隆载体与表达载体，其可用于克隆或表达本发明的，包括有除虫链霉菌aveC ORF或任一aveC同系物ORF的多核苷酸分子。在一非限制性实施方案中，本发明提供了质粒pSE186 (ATCC 209604)，其含有除虫链霉菌aveC基因的完整ORF。

除非特别说明，所有下面有关除虫链霉菌aveC ORF或含有除虫链霉菌aveC ORF或其部分的多核苷酸分子，或除虫链霉菌AveC基因产物的描述，

25 同时也指的是AveC同系物和AveC同源基因产物。

已研制出多种不同的具体用于链霉菌的载体，包括噬菌体，高拷贝数质粒，低拷贝数质粒，及大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒等，其中任一个都可以用来实施本发明。也从链霉菌中克隆了大量药物抗性基因，其中某些基因

30 被掺入载体作为选择性标记。在其它文献如Hutchinson，1980，应用生物化学与生物技术，16:169~190中已经列举了在链霉菌中使用这些载体的例子。

优选构建出本发明的重组载体，尤其是表达载体使得本发明多核苷酸分子的编码序列与转录或翻译编码序列所必需的一或多个调控元件可操作相连以生产多肽。本文所用术语“调控元件”包括但不限于这样的核苷酸序列，其编码可诱导的及不可诱导的启动子，增强子，操作子，及本领域
5 已知的用于驱动和/或调控多核苷酸编码序列的表达的其它元件。同时，如本文所用，该编码序列与一或多个调控元件“可操作相连”，其中这些调控元件有效地调节并允许转录编码序列或翻译其mRNA，或既转录也翻译。

可被加工成含有本发明的多核苷酸分子的典型的质粒载体包括pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogen), pGEM3Zf (Promega), 及其穿梭载体 pWHM3
10 (Vara等, 1989, 细菌学杂志, 171:5872-5881)等。

构建含有特殊编码序列(其与合适的调控元件可操作相连)的重组载体的方法是本领域众所周知的，可使用这些方法实施本发明。这些方法包括体外重组技术，合成技术，体内基因重组。例见Maniatis等, 1989, 文献同上; Ausubel 等, 1989, 文献同上; Sambrook 等, 1989, 文献同上; Innis 等,
15 1995, 文献同上; 及 Erlich, 1992, 文献同上中描述的技术。

这些载体的调控元件的强度和特异性可以不同。根据所用的宿主/载体系统，可使用多种适当的转录及翻译元件中的任一种。对于细菌来说，转录调控区或启动子的非限制性例子包括有： β -gal 启动子，T7 启动子，TAC 启动子， λ 左及右启动子，trp 及 lac 启动子，trp-lac 融合启动子，
20 对于链霉菌来说更具体地是，启动子为ermE, melC, 及tipA等。在下面第11部分所述的具体的实施方案中，一个含有aveC ORF的表达载体得以产生，所述ORF被克隆在与红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)的强组成型ermE启动子相邻的位置。将该载体转化到除虫链霉菌中，随后用HPLC分析发酵产物显示所产生的除虫菌素的滴度相对于仅表达野生型aveC等位
25 基因的相同菌株的产量有所增加。

融合蛋白表达载体可被用于表达AveC基因产物-融合蛋白。纯化的融合蛋白可被用于提高抗AveC 基因产物的抗血清，用于研究AveC 基因产物的生化特性，用不同的生化活性加工AveC 融合蛋白，或有助于鉴定及纯化表达的AveC基因产物。可能的融合蛋白表达载体包括但不局限于这样的载体，其整合有编码 β -半乳糖苷酶及trpE 融合子，麦芽糖结合蛋白融合子，
30 谷胱甘肽-S-转移酶融合子及多组氨酸融合子(运载区域)的序列。在一个可供

选择的实施方案中，AveC 基因产物或其部分可与AveC同源基因产物或其部分融合，该AveC同源基因产物来源于链霉菌的其它种或菌株，例如吸水链霉菌或产灰色链霉菌。在下面第12部分及图-7所述的特定实施方案中，构建了嵌合质粒，其含有吸水链霉菌aveC同系物ORF的564 bp区域，其取代了除虫链霉菌aveC ORF的同源564 bp区域。将该杂合载体转化至除虫链霉菌细胞中，并且检测其对所产生的除虫菌素2类:1类之比例的影响。

AveC 融合蛋白可被设计成含有对纯化有用的区域。例如，可以使用直链淀粉树脂纯化AveC-麦芽糖结合蛋白融合子；可以使用谷胱甘肽琼脂糖珠纯化AveC-谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白；可以使用二价镍树脂纯化AveC-多组氨酸融合子。或者，抗载体蛋白或多肽的抗体可被用于融合蛋白的亲10和层析纯化。例如，可将与调控元件可操作相连的编码单克隆抗体靶表位的核苷酸序列加工入表达载体的适当位置处，以使表达的表位与AveC 多肽融合。例如，可通过标准技术将编码FLAGTM 表位标记(International Biotechnologies Inc.)(其为亲水性标记肽)的核苷酸序列插入表达载体中对应于如AveC多肽羧基末端的位点。可以利用商购的抗FLAGTM抗体检测及亲和15纯化表达的AveC多肽FLAGTM表位融合产物。

编码AveC 融合蛋白的表达载体同样也可以被设计成含有编码特殊的蛋白酶裂解位点的多接头序列，以使表达的AveC多肽经用特定的蛋白酶处理可以从载体区域或融合配对物中释放。例如，该融合蛋白载体可以包括20编码凝血酶或Xa因子酶切位点等的DNA序列。

利用已知的方法将aveC ORF上游和读框内的信号序列加工入表达载体中以介导表达的基因产物的运输和分泌。信号序列的非限制性例子包括得自 α 因子，免疫球蛋白，外膜蛋白，青霉素酶和T细胞受体等的信号序列。

为了帮助选择用本发明的克隆或表达载体转化或转染的宿主细胞，该载体也可被设计为进一步包括报道基因产物或其它可选择标记的编码序25列。优选所述编码序列与上述调控元件编码序列可操作相连。对本发明有用的报道基因是本领域众所周知的，其包括那些编码绿荧光蛋白，荧光素酶，xylE及酪氨酸酶等的报道基因。编码可选择标记的核苷酸序列是本领域众所周知的，其包括那些编码赋予抗生素抗性，抗代谢物抗性，或提供营30养缺陷型需求之基因产物的序列。这些序列包括例如编码红霉素，硫链丝菌肽或卡那霉素等抗性的核苷酸序列。

5.2.2 宿主细胞的转化

本发明进一步提供转化的宿主细胞，其含有本发明的多核苷酸分子或重组载体，或由该宿主细胞衍生的新菌株或细胞系。可用于本发明实施中的宿主细胞优选为链霉菌细胞，但其它的原核细胞或真核细胞同样也可被使用。该转化的宿主细胞一般包括但不局限于微生物，例如用重组噬菌体DNA，质粒DNA，或粘粒DNA 载体转化的细菌，或用重组载体等转化的酵母。

本发明的多核苷酸分子欲在链霉菌细胞中发挥作用，其也可以因克隆及表达目的转化至其它细菌或真核细胞中。例如一般使用大肠杆菌菌株，如DH5 α 菌株，可得自美国典型培养物保藏中心(ATCC)，Rockville, MD, USA (保藏号31343)，或可商购(Stratagene)。优选的真核宿主细胞包括酵母细胞，但哺乳动物细胞或昆虫细胞也可被有效使用。

本发明的重组表达载体最好被转化或转染至基本上均一培养的一或多个宿主细胞中。一般根据已知技术，例如，通过原生质体转化，磷酸钙沉淀，氯化钙处理，微量注射，电穿孔，通过与重组病毒接触进行转染，脂质体介导的转染，DEAE-葡聚糖转染，转导，接合，或微粒轰击将表达载体导入宿主细胞中。可以通过标准方法选择转化子，例如，选择表达与上述重组载体相关的选择性标记，如抗生素抗性的细胞。

一旦将表达载体导入宿主细胞，可以通过检测预期基因产物的标准技术证实aveC编码序列已整合并维持在宿主染色体上或以游离体的形式存在，所述技术如Southern 杂交分析，限制酶分析，PCR 分析，包括逆转录酶PCR (rt-PCR)或免疫测定法。含有和/或表达重组aveC编码序列的宿主细胞可以通过至少四种公知的一般方法中的任一种来证实，所述方法包括：(i)DNA-DNA，DNA-RNA，或RNA-反义RNA杂交；(ii)检测标记基因功能的存在；(iii)通过测定宿主细胞中aveC特异性mRNA转录物的表达来评估转录水平，及(iv)通过免疫测定法或AveC 生物活性的存在(例如，特定比例和量的除虫菌素的产生表示如除虫链霉菌宿主细胞中存在AveC活性)检测成熟多肽产物的存在。

5.2.3. 重组AveC基因产物的表达及鉴定

一旦aveC 编码序列被稳定导入合适的宿主细胞，该转化的宿主细胞被无性增殖，可以在有助于AveC 基因产物最大量生产的条件下培养所得细

胞。所述条件一般包括将细胞培养至高密度。当表达载体含有可诱导的启动子时，根据需要使用合适的诱导条件例如，温度变化，营养耗尽，添加义务诱导物(例如，碳水化合物的类似物，例如异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG))，过量的代谢副产物的积累等来诱导表达。

5 当表达的AveC 基因产物保留在宿主细胞内部时，收集细胞并裂解，在本领域已知的提取条件下，例如，在4℃或有蛋白酶抑制剂的存在，或二者共存的条件下，从裂解物中分离及纯化产物以使蛋白质的降解最小化。当表达的AveC基因产物从宿主细胞中分泌时，只需收集耗尽的营养培养基并从中分离产物。

10 利用标准方法，可从细胞裂解物或培养基(适当时)中分离或基本上纯化表达的AveC 基因产物，所述方法包括但不局限于下列方法的任何组合：硫酸铵沉淀，大小分级分离，离子交换层析，HPLC，密度离心及亲和层析。当表达的AveC 基因产物表现出生物活性时，可使用适当试验在纯化步骤的每一步监控制品纯度的提高。不管表达的AveC 基因产物是否表现出生物活
15 性，都可以依据其大小或与AveC特异性抗体的反应性来检测，或在融合标记的存在下检测。如本文所用，AveC基因产物当在具体制剂中占蛋白重量比的20%以上时为“基本上纯化”。同样，如本文所用，AveC基因产物当在具体制剂中占蛋白重量比的至少约80%时是“分离的”。

20 本发明因此提供分离的或基本上纯化的重组表达型除虫链霉菌AveC基因产物及其同系物，所述基因产物含有可以被质粒pSE186 (ATCC 209604)的AveC基因产物编码序列所编码的氨基酸序列，或图 1 (SEQ ID NO:2)所示的氨基酸序列或其实质性部分。

25 本发明进一步提供分离的或基本上纯化的重组表达型吸水链霉菌AveC同源基因产物及其同系物，所述基因产物含有如SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其实质性部分。

30 本发明进一步提供了生产AveC基因产物的方法，所述方法包括在有助于产生重组AveC基因产物的条件下，培养用重组表达载体转化的宿主细胞，并从细胞培养物中回收AveC基因产物，其中所述载体含有具有编码AveC基因产物之核苷酸序列的多核苷酸分子，所述多核苷酸分子与一或多个控制多核苷酸分子在宿主细胞中表达的调控元件可操作相连。

重组表达的除虫链霉菌AveC基因产物可用于不同的目的，其中包括筛

选改变AveC 基因产物功能的化合物，及因此调制除虫菌素的生物合成以及产生针对AveC基因产物的抗体。

一旦获得纯度足够高的AveC基因产物，通过下列标准方法就可以鉴定基因产物，所述方法如SDS-PAGE，大小排阻层析，氨基酸序列分析，在除虫菌素生物合成途径中产生合适产物的生物活性等等。例如，可以使用标准的肽测序技术测定AveC 基因产物的氨基酸序列。可以用亲水性分析(例见Hopp和Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824)，或类似的软件运算法则鉴定AveC 基因产物的亲水区及疏水区，藉此进一步鉴定AveC基因产物。可进行结构分析以鉴定AveC 基因产物中具有特殊二级结构的区域。可使用如X-射线结晶学的生物物理法(Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11: 7-13)，计算机模型制作法(Fletterick 及 Zoller (编), 1986, 分子生物学最新通讯, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约)和核磁共振(NMR)作图及研究AveC 基因产物及其底物之间相互作用的位点。通过这些研究所取得的信息可被用于选择aveC ORF的新突变位点，以帮助开发具有更合适的除虫菌素生产特性的除虫链霉菌新菌株。

5.3. aveC突变体的构建及应用

本发明提供一种多核苷酸分子，其含有与除虫链霉菌aveC等位基因或其简并变体相同的核苷酸序列，或含有质粒pSE186 (ATCC 209604)的AveC基因产物编码序列或其简并变体，或含有图1 (SEQ ID NO:1)所示除虫链霉菌aveC ORF的核苷酸序列或其简并变体，但其进一步含有一或多个突变，以致于除虫链霉菌菌株ATCC 53692 (其中已使野生型aveC等位基因失活并表达含有突变型核苷酸序列或其简并变体的多核苷酸分子)较仅表达野生型aveC等位基因的除虫链霉菌菌株ATCC 53692的细胞产生了不同比例及量的除虫菌素。

按照本发明，所述多核苷酸分子可被用于生产除虫链霉菌新菌株，所述新菌株与仅表达野生型aveC等位基因的除虫链霉菌相同菌株比较，除虫菌素的生产发生可测的改变。在优选的实施方案中，所述多核苷酸分子可用于生产除虫链霉菌新菌株(其与仅表达野生型aveC等位基因的相同菌株相比，以减少的2类:1类比例生产除虫菌素)。在另一个优选的实施方案中，所述多核苷酸分子可用于生产除虫链霉菌新菌株(其与仅表达单一的野生型aveC等位基因的相同菌株相比可以产生增加水平的除虫菌素)。在进一步优

选的实施案中，所述多核苷酸分子可用于生产除虫链霉菌新菌株(其中aveC 基因已经失活)。

AveC等位基因或编码序列的突变包括，在AveC基因产物中导入一或多个氨基酸缺失、添加或取代，或导致AveC基因产物截短，或它们的任何组合，且产生所需结果的任何突变。所述突变型aveC等位基因序列还包括它们的任何简并变体。例如，本发明提供以下多核苷酸分子，其包含aveC等位基因的核苷酸序列或其简并变体，或包含质粒pSE186 (ATCC 209604)上的aveC 基因产物编码序列或其简并变体，或图1 (SEQ ID NO:1)所示的除虫链霉菌aveC ORF 的核苷酸序列或其简并变体，但其进一步含有一或多个突变，所述突变编码用不同氨基酸残基在AveC基因产物的选定位点对氨基酸残基进行的取代。在下文例举的几个非限制性实施案中，这类取代发生在相应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289或298位，或它们的某些组合的aveC基因产物的任何氨基酸位置处。

aveC 编码序列的突变可通过多种已知方法的任一种进行，包括使用易错PCR，或通过盒式诱变。例如，可以使用寡核苷酸定向诱变以一种确定的方式改变aveC等位基因或ORF的序列，如在该aveC等位基因或ORF中特定区域导入一或多个限制性位点或终止密码子。也可使用如美国专利5,605,793、5,830,721、5,837,458所述的方法，包括随机片断化，重复诱变循环及核苷酸改组产生较大的具有编码aveC 突变的核苷酸序列的多核苷酸文库。

靶向突变是有用的，对于用于改变AveC 基因产物的一或多个保守的氨基酸残基尤其有用。例如，如图 6所示，通过将AveC 基因产物与来自除虫链霉菌 (SEQ ID NO:2)、产灰色链霉菌(SEQ ID NO:5)及吸水链霉菌(SEQ ID NO:4)的AveC同源基因产物推定的氨基酸残基序列相比较，显示了这些种之间显著保守的氨基酸残基位点。导致一或多个所述保守的氨基酸残基改变的靶向诱变对于产生显示所需的除虫菌素产量改变的新突变株是非常有效的。

随机诱变也是有用的，可以通过将除虫链霉菌细胞暴露于紫外线或X-射线照射，或暴露于如N-甲基-N'-亚硝基胍，甲烷磺酸乙酯，亚硝酸或氮芥子类的化学诱变剂进行诱变。有关诱变技术的综述可参见Ausubel，

1989, 文献同上。

一旦产生突变的多核苷酸分子, 可进行筛选以测定其是否可调制除虫链霉菌中的除虫菌素生物合成。在优选的实施方案中, 通过互补除虫链霉菌菌株(其中aveC基因已经失活从而给出aveC⁻背景)检测具有突变的核苷酸序列的多核苷酸分子。在非限制性方法中, 突变的多核苷酸分子被剪接成与一或多个调控元件可操作相连的表达质粒, 该质粒优选还包括一或多个药物抗性基因以选择转化细胞。使用已知技术将该载体转化至aveC⁻宿主细胞中, 选择转化细胞并在允许或诱导除虫菌素产生的条件下在合适的发酵培养基中进行培养。然后通过HPLC分析发酵产物以测定突变的多核苷酸分子互补宿主细胞的能力。在下面8.3部分要举例说明携有能降低除虫菌素B2:B1比例的突变的多核苷酸分子的几个载体, 其包括 pSE188, pSE199, pSE231, pSE239, 以及pSE290至pSE297。

本发明提供了鉴定除虫链霉菌aveC ORF突变(其可以改变所产生的除虫菌素的比例和/或产量)的方法。在优选的实施方案中, 本发明提供了鉴定除虫链霉菌aveC ORF突变(其可以改变所产生的除虫菌素的B2:B1比例)的方法, 所述方法包括: (a)测定除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素2类:1类的比例, 所述细胞中的野生型aveC等位基因已失活, 含有编码突变的AveC基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子被导入该细胞并在其中被表达; (b)测定与步骤(a)中除虫链霉菌为相同菌株、但仅表达野生型aveC等位基因或具有图1(SEQ ID NO:1)所示ORF的核苷酸序列的aveC等位基因或其同源核苷酸序列的细胞产生的除虫菌素2类:1类的比例; 及(c)比较步骤(a)中除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素2类:1类之比与步骤(b)中除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素2类:1类之比, 如果二者不同, 则鉴定出有能改变除虫菌素2类:1类比例的aveC ORF突变。在优选的实施方案中, 除虫菌素2类:1类的比例因突变而减少。

在另一个优选的实施方案中, 本发明提供了一种方法, 该方法用于鉴定aveC ORF或含有aveC ORF的基因构建体中能改变所产生的除虫菌素量的突变, 所述方法包括: (a)测定除虫链霉菌菌株的细胞所产除虫菌素的量, 所述细胞中野生型aveC等位基因已失活, 且含有编码突变型AveC基因产物之核苷酸序列的多核苷酸分子、或含有编码AveC基因产物之核苷酸序列的基因构建体的多核苷酸分子已导入该细胞并被表达; (b)测定与步骤(a)中除

虫链霉菌为相同菌株、但仅表达野生型aveC等位基因或其同源核苷酸序列的细胞所产生的除虫菌素的量；及(c)比较步骤(a)中除虫链霉菌菌株细胞所产生的除虫菌素的量与步骤(b)中除虫链霉菌菌株细胞所产生的除虫菌素的量，如果二者不同，则鉴定出能改变除虫菌素量的aveC ORF突变或基因构建体。在优选的实施方案中，除虫菌素的量因突变而增加。

上述的任一用于鉴定突变的方法可以通过使用发酵培养基进行，优选在该培养基中添加环己烷羧酸，但其它合适的脂肪酸前体，例如，如表1所列的脂肪酸前体中的任一种也可以被使用。

一旦鉴定出按所需方向调制除虫菌素生产的突变的多核苷酸分子，也可以确定核苷酸序列上发生突变的位置。例如，可以通过PCR分离含有编码突变的AveC基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子并使用已知方法对其进行DNA序列分析。通过比较突变的及野生型的aveC等位基因的DNA序列，可以确定负责改变除虫菌素生产的突变。在本发明的非限制性具体实施方案中，在第55 (S55F)，138 (S138T)，139 (A139T)或230 (G230D)位的任一处含有单个氨基酸取代或在第138 (S138T)及139 (A139T或A139F)位含有双重取代的除虫链霉菌AveC基因产物发生功能改变，使得所产生的除虫菌素2类:1类的比例改变(参见下文第8部分)，其中所述氨基酸位置对应于图1(SEQ ID NO:2)中所示。此外，以下7种突变组合分别显示能有效降低除虫菌素的2类:1类之比：(1)D48E/A89T；(2) S138T/A139T/G179S；(3) Q38P/L136P/E238D；(4)F99S/S138T/A139T/G179S；(5) A139T/M228T；(6) G111V/P289L；(7) A139T/K154E/Q298H。如本文所用，上述表达方式，如A139T，表示用单字母表示的原始氨基酸残基(本例中为丙氨酸A)，在指定位置(本例中为SEQ ID NO:2所示多肽的第139位)，随后为取代原始氨基酸残基的氨基酸残基(本例中为苏氨酸T)。因此，本发明包括含有能编码突变型除虫链霉菌aveC基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子，其含有在第38，48，55，89，99，111，136，138，139，154，179，228，230，238，266，275，289或298位氨基酸中的一或多处，或它们的任意组合位置处的氨基酸取代或缺失(参见图1)。

在优选的实施方案中，所述突变编码选自下组的一或多个氨基酸取代：

(a) 第38位的氨基酸残基Q被P取代或被相对于P为保守取代的一种氨基

酸取代；

(b) 第48位的氨基酸残基D被E取代或被相对于E为保守取代的一种氨基酸取代；

5 (c) 第89位的氨基酸残基A被T取代或被相对于T为保守取代的一种氨基酸取代；

(d) 第99位的氨基酸残基F被S取代或被相对于S为保守取代的一种氨基酸取代；

(e) 第111位的氨基酸残基G被V取代或被相对于V为保守取代的一种氨基酸取代；

10 (f) 第136位的氨基酸残基L被P取代或被相对于P为保守取代的一种氨基酸取代；

(g) 第138位的氨基酸残基S被T取代或被相对于T为保守取代的一种氨基酸取代；

15 (h) 第139位的氨基酸残基A被T或F取代或被相对于T或F为保守取代的一种氨基酸取代；

(i) 第154位的氨基酸残基K被E取代或被相对于E为保守取代的一种氨基酸取代；

(j) 第179位的氨基酸残基G被S取代或被相对于S为保守取代的一种氨基酸取代；

20 (k) 第228位的氨基酸残基M被T取代或被相对于T为保守取代的一种氨基酸取代；

(l) 第238位的氨基酸残基E被D取代或被相对于D为保守取代的一种氨基酸取代；

25 (m) 第289位的氨基酸残基P被L取代或被相对于L为保守取代的一种氨基酸取代；

(n) 第298位的氨基酸残基Q被H取代或被相对于H为保守取代的一种氨基酸取代；

其中保守氨基酸取代均按上文第5.1节的定义。

30 在另一优选实施方案中，所述突变编码氨基酸取代的组合，其中被取代的氨基酸残基的组合选自：

(a) 氨基酸残基S138和A139；

- (b) 氨基酸残基D48和A89；
 (c) 氨基酸残基S138， A139和G179；
 (d) 氨基酸残基Q38， L136和E238；
 (e) 氨基酸残基F99， S138， A139和G179；
 5 (f) 氨基酸残基A139和M228；
 (g) 氨基酸残基G111和P289； 和
 (h) 氨基酸残基A139， K154和Q298。

在另一优选实施方案中，在aveC等位基因中可有效降低本发明除虫菌素2类:1类之比例的特定突变组合选自下组的一或多种：

- 10 (a) S138T/A139T
 (b) S138T/A139F
 (c) D48E/A89T
 (d) S138T/A139T/G179S
 (e) Q38P/L136P/E238D
 15 (f) F99S/S138T/A139T/G179S
 (g) A139T/M228T
 (h) G111V/P289L； 和
 (i) A139T/K154E/Q298H。

本发明进一步提供了制备新的除虫链霉菌菌株的组合物，该菌株的细胞含有突变的aveC等位基因而导致除虫菌素生产的变化。例如，本发明提供了重组载体，可使用该载体将任何含有本发明的突变核苷酸序列的多核苷酸分子靶向除虫链霉菌染色体上的aveC基因位点，以通过同源重组插入或取代aveC ORF或其部分。然而，按照本发明，此处提供的含有本发明突变的核苷酸序列的多核苷酸分子也可以在插入到除虫链霉菌染色体上除aveC 基因外的位点，或在除虫链霉菌细胞中保持游离状态时，同样起到调制除虫菌素生物合成的作用。因此，本发明还提供了具有含有本发明突变的核苷酸序列的多核苷酸分子的载体，可使用这些载体将多核苷酸分子插入到除虫链霉菌染色体上除aveC 基因位点以外的位置，或保持游离状态。

在优选的实施方案中，本发明提供了基因取代载体，其可以用于将突变的aveC等位基因或其简并变体插入除虫链霉菌菌株细胞中，籍此产生新的除虫链霉菌菌株，所述菌株的细胞与仅表达野生型的aveC等位基因的相

同菌株细胞相比，产生的除虫菌素2类:1类比例有所改变。在优选的实施方案中，该细胞产生的除虫菌素2类:1类比例减少。可使用本文提供的表达载体如pSE188，pSE199，及pSE231(这些表达载体在下面第8.3部分将举例说明)中存在的突变的多核苷酸分子构建所述基因取代载体。

5 在进一步优选的实施方案中，本发明提供了载体，可使用该载体将突变的aveC等位基因或其简并变体插入除虫链霉菌菌株细胞中以产生新细胞株，所述新细胞与仅表达野生型的AveC等位基因的相同菌株细胞相比，产生的除虫菌素的量有所改变。在优选的实施方案中，所述新细胞产生的除虫菌素的量增加。在具体的、非限制性实施方案中，该载体进一步包含本
10 领域已知的强启动子，例如，来自*Saccharopolyspora erythraea* 的强组成型ermE 启动子，其位于ave等位基因上游并与该aveC等位基因可操作相连。所述载体可以是如下面实施例11所述的质粒pSE189，或可通过使用质粒pSE189的突变的aveC等位基因进行构建。

在进一步优选的实施方案中，本发明提供了基因取代载体，该载体可
15 用于灭活野生型除虫链霉菌菌株中的aveC基因。在非限制性的实施方案中，可以通过使用质粒pSE180(ATCC 209605)中存在的突变的多核苷酸分子构建所述基因取代载体，其在下面第8.1部分中举例说明(图3)。本发明进一步提供了含有多核苷酸分子的基因取代载体，所述多核苷酸分子包含天然侧翼于除虫链霉菌染色体上原位aveC基因的核苷酸序列或由该序列组成，
20 例如，包括那些如图1(SEQ ID NO:1)所示的侧翼核苷酸序列，可使用所述载体缺失除虫链霉菌aveC ORF。

本发明进一步提供了制备除虫链霉菌新菌株的方法，所述新菌株含有表达突变的aveC等位基因的细胞，其与仅表达野生型aveC等位基因的除虫链霉菌相同菌株的细胞比较，所产生的除虫菌素的比例和/或量发生改变。
25 在优选的实施方案中，本发明进一步提供了制备除虫链霉菌新菌株的方法，所述新菌株含有能表达突变型aveC等位基因的细胞，其与仅表达野生型aveC等位基因的除虫链霉菌相同菌株的细胞比较，所产生的除虫菌素2类:1类之比例发生改变，所述方法包括用携有突变型aveC等位基因的载体转化除虫链霉菌菌株的细胞，该突变型aveC等位基因编码的基因产物使得：
30 与仅表达野生型aveC等位基因的除虫链霉菌相同菌株的细胞比较，表达其突变型aveC等位基因的除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素的2类:1类比例

有所改变；选择所产生的除虫菌素2类:1类的比例较仅表达野生型aveC等位基因的菌株细胞有所改变的转化细胞。在一个更优选的实施方案中，本发明提供了制备除虫链霉菌新菌株的方法，包括用能向除虫链霉菌细胞的aveC等位基因中导入突变的载体转化所述细胞，其中所述aveC等位基因的突变导致在所编码的AveC基因产物中，在对应于SEQ ID NO:2中第38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289或298位的一或多个氨基酸位置上发生不同氨基酸残基的取代，使得除虫链霉菌菌株中携有如此突变之aveC等位基因的细胞产生的除虫菌素2类:1类的比例不同于除虫链霉菌相同菌株中仅表达野生型aveC等位基因的细胞所产生的比例。在优选实施方案中，除虫菌素2类:1类的比例有所降低。

如本文所用，当除虫链霉菌染色体中、或本发明的载体或分离的多核苷酸分子中由aveC等位基因编码的氨基酸残基被描述为“对应于”SEQ ID NO:2中的特定氨基酸残基时，或当在“对应于”SEQ ID NO:2中特定编号的氨基酸残基的具体位置处发生氨基酸取代时，它是指在AveC基因产物中由本领域技术人员参照本文SEQ ID NO:2所示氨基酸序列能快速确定的相同位置处的氨基酸残基。

本发明还提供了制备新菌株的方法，所述新菌株中aveC等位基因上的特定突变均以aveC等位基因中“对应于”SEQ ID NO:1所示具体核苷酸位置的特定核苷酸位置处的碱基改变。与上文中关于相应氨基酸位置的描述一样，当将aveC等位基因中的某一个核苷酸位置描述为“对应于”SEQ ID NO:1上具体核苷酸位置时，表示在aveC核苷酸序列中由本领域技术人员参照本文SEQ ID NO:1所示核苷酸序列能快速确定的相应位置的核苷酸。

在进一步优选的实施方案中，本发明提供了制备除虫链霉菌新菌株的方法，所述菌株含有生产改变量的除虫菌素的细胞，所述方法包括用携有突变aveC等位基因或含有该aveC等位基因的基因构建体的载体转化除虫链霉菌菌株细胞，所述突变的aveC等位基因的表达使得表达突变aveC等位基因或基因构建体的除虫链霉菌菌株细胞所产生的除虫菌素的量较仅表达单一的野生型aveC等位基因的除虫链霉菌相同菌株细胞产生的除虫菌素的量有所改变；选择所产生的除虫菌素的量较仅表达单个野生型aveC等位基因的菌株细胞所产生的量有所改变的转化细胞。在优选实施方案中，转化细

胞中所产生的除虫菌素的量有所增加。

在进一步优选的实施方案中，本发明提供了制备除虫链霉菌新菌株的方法，所述菌株的细胞含有失活的aveC等位基因，所述方法包括用使aveC等位基因失活的载体转化除虫链霉菌菌株中表达任一种aveC等位基因的细胞；选择其中aveC等位基因已失活的转化细胞。在非限制性优选实施方案中，除虫链霉菌菌株细胞被基因取代载体转化，该载体所携带的aveC等位基因已经因突变或用异源基因序列取代AveC等位基因的一部分而失活，选择其中天然aveC等位基因已被失活的aveC等位基因所取代的转化细胞。如下所述，AveC等位基因的失活可以通过用HPLC分析发酵产物来测定。在下面第8.1部分所述的具体的、非限制性的实施方案中，通过在aveC ORF中插入来自红色糖多孢菌的ermE基因而使aveC等位基因失活。

本发明进一步提供了除虫链霉菌的新菌株，其含有用本发明的任何多核苷酸分子或载体转化的细胞。在优选的实施方案中，本发明提供了除虫链霉菌新菌株，其含有能表达突变型aveC等位基因或其简并变体而不表达，或另外还表达野生型aveC等位基因的细胞，其中新菌株的细胞生产的除虫菌素的2类:1类的比例相对于相同菌株中仅表达野生型aveC等位基因的细胞而言有所改变。在优选的实施方案中，新细胞产生的除虫菌素的2类:1类比例降低。这些新菌株可用于大规模生产具有商业价值的除虫菌素如doramectin。在一个更优选的实施方案中，本发明提供除虫链霉菌的细胞，它们在aveC等位基因上对应于上述位置的核苷酸处含有上述任一种突变或突变组合，或者它们编码AveC基因产物中的上述任一种氨基酸取代。尽管这些突变可出现在上述细胞中一种染色体外元件如质粒上，但优选这些突变出现在除虫链霉菌染色体上的aveC等位基因中。在一个优选实施方案中，本发明提供了一种除虫链霉菌菌株，其含有在编码AveC基因产物的aveC等位基因中携带突变的细胞，其中这种细胞产生的除虫菌素2类:1类之比不同于相同除虫链霉菌菌株中仅表达野生型aveC等位基因的那些细胞所产生的比例，其中所述AveC基因产物在对应于SEQ ID NO:2中第38, 48, 55, 89, 99, 111, 136, 138, 139, 154, 179, 228, 230, 238, 266, 275, 289或298位氨基酸的一或多个氨基酸位置上发生取代。

本文所述筛选试验的根本目的是鉴定突变的aveC等位基因，其在除虫链霉菌细胞中的表达已发生改变，特别是降低了所产生的除虫菌素2类:1类

的比例。在优选的实施方案中，由本发明能表达突变型aveC等位基因或其简并变体的除虫链霉菌新菌株的细胞所产生的除虫菌素B2：B1之比约为1.6:1或更小。在一个更优选的实施方案中，所述比例约为1:1或更小。在一个更优选的实施方案中，所述比例约为0.84:1或更小。在一个更优选的实施方案中，所述比例约为0.80:1或更小。在一个更优选的实施方案中，所述比例约为0.75:1或更小。在一个更优选的实施方案中，所述比例约为0.73:1或更小。在一个更优选的实施方案中，所述比例约为0.68:1或更小。在一个还更优选的实施方案中，所述比例约为0.67:1或更小。在一个更优选的实施方案中，所述比例约为0.57:1或更小。在一个还更优选的实施方案中，所述比例约为0.53:1或更小。在一个还更优选的实施方案中，所述比例约为0.42:1或更小。在一个还更优选的实施方案中，所述比例约为0.40:1或更小。

在下述一个具体实施方案中，本发明的新细胞以小于1.6:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一不同的具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.94:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一不同的具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.88:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一不同的具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.84:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.75:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一不同的具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.73:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一不同的具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.68:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一不同的具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.67:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一不同的具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.57:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一不同的具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.53:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一不同的具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.42:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。在下述另一不同的具体实施方案中，本发明的新细胞以约0.40:1的比例产生环己基B2:环己基B1除虫菌素。

在更优选的实施方案中，本发明提供了除虫链霉菌新菌株，其含有能表达突变型aveC等位基因或其简并变体，或含有aveC等位基因或其简并变

体之基因构建体，而不表达或另外还表达野生型aveC等位基因的细胞，其中新菌株的细胞以相对于仅表达野生型aveC等位基因的同菌株细胞而言有所改变的量生产除虫菌素。在优选的实施方案中，新菌株产生的除虫菌素的量增加。在非限制性的实施方案中，基因构建体进一步包括强启动子，例如，来自红色糖多孢菌的强组成型ermE启动子，其位于aveC ORF上游并与aveC ORF可操作相连。

在进一步优选的实施方案中，本发明提供了除虫链霉菌新菌株，其含有其中aveC基因已经失活的细胞。所述菌株可用于产生与野生型菌株相比有不同谱的除虫菌素，在本文所述的互补筛选试验中还可测定aveC基因靶向或随机诱变是否影响除虫菌素的生产。在下文所述的具体实施方案中，除虫链霉菌宿主细胞经基因改造后含有失活的aveC基因。例如，下面实施例中所述的菌株SE180-11就是使用基因取代质粒pSE180(ATCC209605)(图3)产生的，通过在aveC编码区插入ermE抗性基因而使除虫链霉菌aveC基因失活。

本发明进一步提供了重组表达的、突变的除虫链霉菌AveC基因产物及其制备方法，所述基因产物由本发明上述多核苷酸分子的任一种编码。

本发明进一步提供了生产除虫菌素的方法，所述方法包括：在允许或诱导除虫菌素生产的条件下，在培养基中培养除虫链霉菌菌株细胞，并从培养物中回收所述除虫菌素，所述细胞表达编码基因产物的突变的aveC等位基因，与仅表达野生型的aveC等位基因的同菌株细胞相比，所述突变的等位基因改变了表达突变的aveC等位基因的除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素的2类:1类的比例。在优选的实施方案中，表达突变的aveC等位基因的细胞在培养物中所产生的除虫菌素的2类:1类的比例有所减少。该方法提供了商业上有价值的除虫菌素例如doramectin的高效率的生产方法。

本发明进一步提供了生产除虫菌素的方法，所述方法包括：在允许或诱导除虫菌素生产的条件下，在培养基中培养除虫链霉菌菌株细胞，并从培养物中回收所述除虫菌素，所述细胞表达突变的aveC等位基因或含有aveC等位基因的基因构建体，与不表达突变aveC等位基因或基因构建体而仅表达野生型的aveC等位基因的同菌株细胞相比，表达突变的aveC等位基因或基因构建体的除虫链霉菌菌株细胞产生的除虫菌素的量有所改变。在优选的实施方案中，在培养物中表达突变aveC等位基因或基因构建体的

细胞产生的除虫菌素的量有所增加。

本发明进一步提供了由表达突变型aveC等位基因或其简并变体的除虫链霉菌菌株产生的除虫菌素新组合物，其中所述突变型aveC等位基因或其简并变体所编码的基因产物使表达该突变型aveC等位基因或其简并变体的除虫链霉菌菌株细胞所产生的除虫菌素2类:1类的比例与除虫链霉菌相同菌株中仅表达野生型aveC等位基因的细胞相比有所降低，其中，与除虫链霉菌相同菌株中仅表达野生型aveC等位基因的细胞产生的除虫菌素2类:1类比例相比，新组合物中除虫菌素2类:1类的比例降低。这种新型除虫菌素组合物可以产生于营养耗竭的发酵培养液中或从中回收，可通过已知的生化纯化技术如硫酸铵沉淀，透析，大小分级分离，离子交换层析，HPLC等从培养液中部分纯化或基本上纯化。

5.4.除虫菌素的用途

除虫菌素是可具体作为治蠕虫剂、杀体外寄生虫剂、杀虫剂及杀螨剂来使用的一种高效抗寄生虫药剂。按本发明方法产生的除虫菌素化合物均可用于这些用途。例如，按本发明方法产生的除虫菌素化合物可用于治疗人类的各种疾病或症状，尤其是本领域已知的由寄生虫感染造成的那些疾病。参见 Ikeda and Omura, 1997, Chem. Rev. 97(7):2591-2609。更具体地，按本发明方法产生的除虫菌素化合物可有效治疗由内寄生虫所致各种疾病，所述内寄生虫如能感染人，家畜，猪，绵羊，家禽，马或牛的寄生性线虫。

更具体地，按本发明方法制备的除虫菌素化合物可有效抵抗感染人体的线虫以及感染各种动物的线虫。这类线虫包括胃肠道寄生虫如钩虫(*Ancylostoma*)，线虫(*Necator*)，蛔虫(*Ascaris*)，类圆线虫(*Strongyloides*)，旋毛虫(*Trichinella*)，毛细线虫(*Capillaria*)，鞭虫(*Trichuris*)，蛲虫(*Enterobius*)，恶丝虫(*Dirofilaria*)，及血管或其它组织或器官中发现的寄生虫如丝虫性蠕虫以及类圆线虫和旋毛虫的肠道提取物。

按本发明方法产生的除虫菌素化合物也可用于治疗体外寄生虫感染，包括节肢动物对哺乳动物或鸟类的感染，如能感染马和牛的蜱(tick)、螨、虱、蚤、绿头苍蝇、咬虫(biting insect)、或移栖双翅目幼虫等引起的感染。

按本发明方法产生的除虫菌素化合物也可作为杀虫剂用于针对室内害虫(household pest)如蟑螂、衣蛾、地毯甲虫、及家蝇等，以及侵害储存的谷

物和农作物的有害昆虫，包括红蜘蛛(spider mite)、蚜虫、毛虫、和直翅目幼虫如蝗虫(locust)等。

用按本发明方法产生的除虫菌素化合物能治疗的动物包括绵羊、牛、马、鹿、山羊、猪、鸟类包括家禽、狗和猫。

5 按本发明方法产生的除虫菌素化合物可根据特定用途、接受治疗的宿主动物的具体种类、所涉及的寄生虫或昆虫等情况以相应剂型给药。当作为杀寄生虫剂使用时，按本发明方法产生的除虫菌素化合物可以以胶囊、丸剂、片剂、或灌服液的剂型口服，或以倾注(pour-on)、注射或植入的形式给药。这类制剂可以按标准兽医学实践以传统方式制备。因此，可将活性成分与合适的细分稀释剂或载体混合来制备胶囊、丸剂或片剂，所述稀释剂或载体另外含有崩解剂和/或粘合剂如淀粉、乳糖、滑石粉、硬脂酸镁等。灌服剂是将活性成分与分散剂或润湿剂等一起分散在水溶液中来制备。注射剂可配制成无菌溶液，其中可含其它物质如足够的盐和/或葡萄糖以便使该溶液与血液成等渗状态。

15 这些制剂中活性化合物的重量可根据患者、或将要治疗的宿主动物种类、感染的严重性及类型、宿主的体重等而变化。通常，口服给药的一剂为约0.001-10mg活性化合物/kg患者或动物的体重，以单剂或分几剂给药，期间为1-5天。但有时可由医生或兽医根据临床症状确定较高或较低的剂量。

20 或者，按本发明方法产生的除虫菌素化合物也可以与动物饲料一起给药，为此，可制备浓缩的食物添加剂或预混剂以便与常规动物饲料混合。

当作为杀虫剂使用，及用于处理农业害虫时，按本发明方法产生的除虫菌素化合物也可以按标准农业实践以喷雾剂，粉剂，乳剂和类似形式来施用。

25 6. 实施例：除虫链霉菌的发酵 及除虫菌素B2:B1的分析

如果发酵培养基中不补充脂肪酸，则既缺失支链2-氧代酸脱氢酶又缺失5-O-甲基转移酶活性的菌株将不产生除虫菌素。该实施例证实这类突变株在有不同脂肪酸存在的条件下启动生物合成时，可获得很宽范围的除虫菌素B2:B1比例。

30 6.1. 材料及方法

除虫链霉菌 ATCC 53692 储存在 -70°C 的全肉汤种子培养基中，培养基的组成为：淀粉(Nadex, Laing National)-20g；Pharmamedia (Trader's Protein, Memphis, TN)-15 g；Ardamine pH (Yeast Products Inc.)-5 g；碳酸钙-1g。终体积用自来水调整为1升，pH调整至7.2，培养基在 121°C 高压灭菌5 25分钟。

取2ml上述制剂的解冻后悬浮液接种到一个含有50ml同样培养基的烧瓶中。以180 rpm在旋转振荡器上 28°C 培养48小时后，取2ml肉汤接种到一个含有50ml生产培养基的烧瓶中，该培养基含有：淀粉-80g；碳酸钙-7g；Pharmamedia-5g；磷酸氢二钾-1g；硫酸镁-1g；谷氨酸-0.6g；七水合硫酸亚铁-0.01g；硫酸锌-0.001g；硫酸亚镁-0.001g。终体积用自来水调整为1升，pH调整至7.2，培养基在 121°C 高压灭菌25分钟。

将不同的羧酸底物(见表1)溶于甲醇中并在接种24小时后添加到发酵肉汤中使终浓度为 0.2g/l 。将该发酵肉汤于 28°C 培养14天，然后离心(2,500 rpm, 2分钟)，去除上清。菌丝沉淀用丙酮(15ml)，然后用二氯甲烷(30ml)提取，分离有机相，过滤，然后蒸发使之干燥。残余物用1 ml 甲醇吸收，并用配有设置在240nm的扫描二极管阵列检测器的Hewlett-Packard 1090A液相色谱进行HPLC分析，所用柱子是保持在 40°C 的Beckman Ultrasphere C-18, $5\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm} \times 25\text{ cm}$ 柱。将 $25\mu\text{l}$ 上述甲醇溶液注入该柱子中。以 0.85 ml/min 的流速，用甲醇-水从80:20到95:5的线性梯度洗脱40分钟。用两种标准浓度的环己基B1校准检测器的反应，测量除虫菌素B2及B1的曲线下的面积。

6.2. 结果

除虫菌素B2和B1的HPLC保留时间，及 2:1 比例如表1所示。

表 1

底物	HPLC保留时间 (分钟)		比例 B2:B1
	B2	B1	
4-四氢吡喃羧酸	8.1	14.5	0.25
异丁酸	10.8	18.9	0.5
3-糠酸	7.6	14.6	0.62
S-(+)-2-甲基丁酸	12.8	21.6	1.0
环己烷羧酸	16.9	26.0	1.6
3-噻吩羧酸	8.8	16.0	1.8

环戊烷羧酸	14.2	23.0	2.0
3-三氟甲基丁酸	10.9	18.8	3.9
2-甲基戊酸	14.5	24.9	4.2
环庚烷羧酸	18.6	29.0	15.0

表1所列数据证实B2:B1除虫菌素的产量比有相当宽的范围，其表明根据所提供的脂肪酸侧链启动子单元的性质，2类化合物相对于1类化合物的脱水转化结果有很大的差异。这指示由AveC蛋白的改变所致B2:B1比例的改变只特异性针对特定底物。因此，对用特定底物获得的B2：B1比例发生变化的突变体进行筛选时需要在该底物的存在下进行。下面这些例子描述了使用环己烷羧酸作为筛选底物。然而，该底物仅用于举例说明本发明潜在的实用性，而不是有意要限制本发明。

7. 实施例：aveC基因的分离

本实施例描述了除虫链霉菌染色体中编码AveC基因产物的区域的分离及鉴定，如下文所证实，aveC基因经鉴定能改变所产生的环己基B2对环己基B1除虫菌素的比例(B2:B1)。

7.1. 材料与amp;方法

7.1.1. 用于 DNA 分离的链霉菌的生长

下面的方法用于培养链霉菌。除虫链霉菌 ATCC 31272株单菌落 (单菌落分离物#2)在1/2强度的YPD-6中分离，YPD-6含有：Difco酵母提取物-5g；Difco细菌用脲-5g；葡萄糖-2.5g；MOPS-5g；Difco细菌用琼脂-15g，终体积用dH₂O调整至1升，pH调整至7.0，培养基在121℃高压灭菌25分钟。

将上述培养基中生长的菌丝体接种到25mm x 150mm试管中的10 ml TSB 培养基(Difco Tryptic Soy Broth-30g，在1升dH₂O中，在121℃高压灭菌25分钟)中，在28℃以300 rpm振荡培养48-72小时。

7.1.2. 从链霉菌中分离染色体DNA

将如上所述生长的菌丝体取等份试样(0.25ml或0.5ml)置于一个1.5 ml的微量离心试管中，将细胞在12,000 × g离心60秒而浓缩。去除上清液，使细胞重新悬浮于0.25ml TSE缓冲液(20 ml 1.5 M 蔗糖，2.5 ml 1 M Tris-HCl，pH 8.0，2.5 ml 1 M EDTA，pH 8.0，和75 ml dH₂O)中，该缓冲液含有2 mg/ml溶菌酶。样品在37℃振荡培养20分钟，上样至AutoGen 540TM自动核酸分离仪(Integrated Separation Systems, Natick, MA)，用Cycle 159(仪器软

件)按照操作手册分离基因组DNA。

或者，将5ml菌丝体置于一个17 mm x 100 mm 的试管中，3,000 rpm离心5分钟使细胞浓缩，去除上清液。将细胞重新悬浮在1 ml TSE 缓冲液中，3,000 rpm离心5分钟使细胞浓缩，去除上清液。将细胞重新悬浮在含有2 mg/ml溶菌酶的1 ml TSE 缓冲液中，37℃振荡培养30-60分钟。培养后，加入0.5 ml 10%十二烷基硫酸钠(SDS)，将细胞在37℃下保温，直到裂解完成。裂解产物在65℃下保温10分钟，冷却至室温，分到两个1.5 ml Eppendorf 试管中，并用0.5 ml苯酚/氯仿(50%苯酚，预先用0.5 M Tris平衡，pH 8.0; 50%氯仿)萃取1次。去除水相，用氯仿:异戊醇 (24:1)萃取2到5次。通过加入1/10体积3M醋酸钠，pH 4.8沉降DNA，在冰中保温混合物10分钟，在 15,000 rpm, 5℃将混合物离心10分钟，将上清液移至干净试管中，并在其中加入1倍体积的异丙醇。然后将上清液与异丙醇混合物一起在冰中保温20分钟，在15,000 rpm 5℃将混合物离心20分钟，将上清液移除，用70%乙醇洗涤DNA粒状沉淀物1次。在粒状沉淀物干燥后，将DNA再悬浮于TE缓冲液(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)中。

7.1.3. 从链霉菌中分离质粒DNA

将一份菌丝体(1.0 ml)置于一个1.5 ml 的微量离心试管中，在12,000 x g下离心60秒浓缩细胞。去除上清液，细胞再悬浮于1.0 ml 10.3%蔗糖中，12,000 x g下离心浓缩60秒，去除上清液。然后将细胞重新悬浮于含有2 mg/ml 溶菌酶的0.25 ml TSE 缓冲液中，37℃下振荡保温20分钟，然后上样至AutoGen 540™自动核酸分离仪中。按照操作手册，使用Cycle 106(仪器软件)分离质粒DNA。

或者，将1.5 ml 的菌丝体置于1.5 ml微型离心试管中，12,000 x g离心60秒浓缩细胞。去除上清液，细胞再悬浮于1.0 ml 10.3%蔗糖中，12,000 x g离心浓缩60秒，去除上清液。细胞重新悬浮于含有2 mg/ml 溶菌酶的0.5 ml TSE 缓冲液中，37℃保温15-30分钟。保温后，加入0.25 ml碱性SDS (0.3N NaOH, 2% SDS)，细胞在55℃保温15-30分钟或直到溶液变清。将醋酸钠(0.1 ml, 3M, pH 4.8)加入到DNA溶液中，将其在冰中保温10分钟。DNA样品在5℃ 14,000 rpm离心10分钟。将上清液移至干净试管中，并在其中加入0.2ml的苯酚/氯仿(50%苯酚:50%氯仿)并轻轻混和。DNA 溶液在5℃下以14,000 rpm离心10分钟，上层移至干净的Eppendorf 试管中。加入异丙

醇0.75 ml, 将溶液轻轻混和, 然后在室温下保温20分钟。将该DNA溶液在5℃下以14,000 rpm离心15分钟, 移除上清液, 用70%乙醇洗涤DNA沉淀颗粒, 干燥, 再在TE缓冲液中重新悬浮。

7.1.4. 从大肠杆菌中分离质粒DNA

5 将单个大肠杆菌转化菌落接种在5 ml Luria-Bertani(LB)培养基(细菌用胰蛋白胨-10 g, 细菌用酵母提取物-5g, 和NaCl-10g在1升dH₂O中, pH7.0, 121℃高压灭菌25分钟, 并添加100µg/ml氨基青霉素)中。将培养物过夜培养, 将1毫升等分试样置于1.5 ml 微型离心试管中, 将培养样品载至AutoGen 540™自动核酸分离器中, 按照操作手册, 使用Cycle 3(仪器软件)

10 分离质粒DNA。

7.1.5. 除虫链霉菌原生质体的制备及转化

将除虫链霉菌单菌落在1/2强度的YPD-6中分离。将菌丝体接种到25 mm x 150 mm 试管中的10 ml TSB 培养基中, 在28℃以300 rpm振荡培养48小时。将1ml菌丝体接种至50 ml YEME培养基。每升YEME 培养基含有:

15 Difco酵母提取物-3g; Difco细菌用胨-5g; Difco Malt Extract-3g; 蔗糖-300 g。121℃高压灭菌25分钟后, 加入下列物质: 2.5 M MgCl₂·6H₂O (单独在121℃高压灭菌 25分钟)-2 ml; 及甘氨酸(20%)(过滤除菌)-25 ml。

将菌丝体在30℃下培养48-72小时, 然后在50 ml离心管(Falcon)中在3,000 rpm下离心20分钟收获。去除上清液, 菌丝体在P缓冲液中重新悬浮,

20 P缓冲液含有: 蔗糖-205 g; K₂SO₄-0.25 g; MgCl₂·6H₂O-2.02 g; H₂O-600 ml; K₂PO₄ (0.5%)-10 ml; 痕量元素溶液-20 ml; CaCl₂·2H₂O(3.68%)-100 ml; 及MES缓冲液(1.0 M, pH 6.5)-10 ml(*痕量元素溶液每升含有: ZnCl₂-40 mg; FeCl₃·6H₂O-200 mg; CuCl₂·2H₂O-10 mg; MnCl₂·4H₂O-10 mg; Na₂B₄O₇·10H₂O-10 mg; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O-10 mg)。pH 调至6.5, 终体积调至1升, 培养基

25 用0.45 微米滤膜热过滤。

菌丝体以3,000 rpm离心20分钟得到粒状沉淀, 去除上清液, 将菌丝体在含有2 mg/ml 溶菌酶的20 ml P缓冲液中重新悬浮。菌丝体在35℃振荡保温15分钟, 经显微镜检查确定原生质体的形成程度。当原生质体的形成完全时, 将其在8,000 rpm下离心10分钟。去除上清液, 将原生质体在10 ml P

30 缓冲液中重新悬浮。将原生质体在8,000 rpm离心10分钟, 去除上清液, 将其在2 ml P缓冲液中重新悬浮, 将约1x 10⁹ 个原生质体分配至2.0 ml 低温小

瓶(Nalgene)中。

含 1×10^9 个原生质体的小瓶在8,000 rpm离心10分钟, 去除上清液, 原生质体在0.1 ml P缓冲液中重新悬浮。将2~5 μ g 转化的DNA 加入到原生质体中, 接着加入0.5ml T工作缓冲液。T缓冲基质含有: PEG-1000 (Sigma)-25g; 蔗糖-2.5g; H₂O-83ml。用1N NaOH(已滤膜除菌)将pH调节至8.8, 将T缓冲基质经滤膜过滤除菌, 于4℃保存。T工作缓冲液(于使用当天制备)是T缓冲基质-8.3 ml; K₂PO₄ (4 mM)-1.0 ml; CaCl₂·2H₂O(5 M)-0.2 ml; 及 TES (1 M, pH 8)-0.5 ml。T工作缓冲液的每一组分均分别过滤除菌。

在20秒钟内将T缓冲液加入到原生质体中, 还加入1.0 ml P缓冲液, 然后将原生质体在8,000 rpm 离心10分钟。去除上清液后将原生质体在0.1 ml P缓冲液中重新悬浮。然后将原生质体铺板至RM14培养基上, 该培养基含有: 蔗糖-205g; K₂SO₄-0.25g; MgCl₂·6H₂O-10.12g; 葡萄糖-10g; Difco酪蛋白氨基酸-0.1g; Difco酵母提取物-5g; Difco燕麦琼脂-3g; Difco细菌用琼脂-22g; dH₂O-800ml。溶液在121℃高压灭菌25分钟。然后加入下列的无菌原液: K₂PO₄(0.5%) -10ml; CaCl₂·2H₂O(5M)-5ml; L-脯氨酸 (20%) -15 ml; MES缓冲液(1.0 M, pH 6.5)-10 ml; 痕量元素溶液(同上)-2 ml; 环己酰亚胺原液(25 mg/ml)-40 ml; 及1 N NaOH-2 ml。将25ml RM14 培养基等分在每个平板上, 这些平板在使用前都要干燥24小时。

原生质体在湿度95%、温度30℃下保温20-24小时。为了选择硫链丝菌肽抗性转化子, 将含有125 μ g/ml 硫链丝菌肽的1 ml上层缓冲液均匀覆盖在RM14再生平板上。每100 ml上层缓冲液含有: 蔗糖-10.3g; 痕量元素溶液(与上相同)-0.2ml; 及MES(1 M, pH 6.5)-1ml。原生质体在湿度95%、温度30℃下保温7-14 天直到能观察到硫链丝菌肽抗性(Thio^r)菌落。

7.1.6. 变青链霉菌原生质体的转化

在某些情况下, 用变青链霉菌(*S. lividans*) TK64(由John Innes研究所, Norwich, U.K提供)进行转化。用于变青链霉菌生长、原生质化及转化的方法和组合物在Hopwood等, 1985, Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, U.K.中作了描述。如上述7.1.3中所述从变青链霉菌转化株中分离质粒DNA。

7.1.7. 除虫链霉菌菌株的发酵分析

除虫链霉菌的菌丝体在1/2强度的YPD-6上培养4-7天后, 接种到含有8

ml 预制培养基及两个5 mm 玻璃珠的1 x 6英寸试管中, 预制培养基含有:
可溶性淀粉(为稀的煮沸的淀粉或KOSO, Japan Corn Starch Co., Nagoya)-20
g/L; Pharmamedia-15g/L; Ardamine pH-5 g/L (Champlain Ind., Clifton,
NJ); CaCO₃-2 g/L; 2x bcfa ("bcfa" 指支链脂肪酸), 其在培养基中含有终浓
5 度为50 ppm的2-(+/-)-甲基丁酸, 60 ppm的异丁酸, 及20 ppm的异戊酸。将
pH调至7.2, 培养基在121℃高压灭菌25分钟。

试管以17°角在29℃下以215 rpm振荡培养3天。将种子培养物的2ml等
分试样接种到含有25 ml 生长培养基的300 ml Erlenmeyer烧瓶中, 该培养基
含有: 淀粉(为稀的煮沸的淀粉或KOSO)-160g/L; Nutrisoy(Archer Daniels
10 Midland, Decatur, IL) - 10g/L; Ardamine pH-10g/L; K₂HPO₄-2g/L;
MgSO₄·4H₂O-2g/L; FeSO₄·7H₂O-0.02g/L; MnCl₂-0.002g/L; ZnSO₄·7H₂O-
0.002 g/L; CaCO₃-14 g/L, 2x bcfa(同上); 及环己烷羧酸(CHC)(在pH 7.0下
制成20%的溶液)-800 ppm。pH调至6.9, 培养基在121℃高压灭菌25分钟。

接种后, 将烧瓶在29℃以200 rpm振荡培养12天。培养后, 从烧瓶中取
15 2ml样品, 用8 ml甲醇稀释, 混合, 混合物在1,250 x g离心10分钟以沉淀碎
片。用Beckman Ultrasphere ODS 柱(25 cm x 4.6 mm ID)以0.75ml/min的流速
进行HPLC来分析上清液, 检测240 nm的吸光度。流动相为86/8.9/5.1 甲醇/
水/乙腈。

7.1.8. 除虫链霉菌PKS基因的分离

20 制备除虫链霉菌(ATCC 31272, SC-2)染色体DNA的粘粒文库并使其与
由红色糖多孢菌聚酮化合物合成酶(PKS)基因的片段制成的酮合成酶(KS)探
针杂交。粘粒文库的制备详见Sambrook等, 1989, 同上。链霉菌染色体
DNA文库的制备详见Hopwood等, 1985, 同上。带有酮合成酶-杂交区域的
粘粒菌落可通过与pEX26(由Dr. P. Leadlay, Cambridge, UK提供)的2.7 Kb
25 NdeI/Eco47III片段杂交来识别。将约5 ng pEX26用NdeI及Eco47III消化。将
反应混合物上样至0.8% SeaPlaque GTG琼脂糖凝胶(FMC BioProducts,
Rockland, ME)。电泳后从凝胶中切出2.7 Kb的NdeI/Eco47III片段, 用Fast
Protocol的GELase™(Epicentre Technologies)从凝胶中回收DNA。2.7 Kb的
NdeI/Eco47III片段使用BRL Nick翻译系统(BRL Life Technologies,
30 Gaithersburg, MD)按说明书进行[α-³²P]dCTP(脱氧胞苷5'-三磷酸盐, 四(三
乙胺)盐, [α-³²P]-)(NEN-Dupont, Boston, MA)标记。一个典型反应在0.05

ml体积中进行。加入 5 μ l 终止缓冲液后, 用G-25 Sephadex Quick Spin™ Column (Boehringer Mannheim)按说明书将标记的DNA分子与未发生掺入的核酸分子分离。

约1,800个粘粒菌落通过菌落杂交进行筛选。鉴定出10个与红色糖多孢菌KS探针强力杂交的克隆。将含有粘粒DNA的大肠杆菌菌落在LB液体培养基中培养, 用Cycle 3(仪器软件)在AutoGen 540™ 自动核酸分离器中按照操作说明分离每一培养物中的粘粒DNA。限制性核酸内切酶作图及 Southern 印迹杂交分析揭示五个克隆中含有重叠的染色体区域。五种粘粒(也即 pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69)的除虫链霉菌基因组BamHI 酶切图谱通过对重叠粘粒的分析及杂交法进行构建(图4)。

7.1.9. 能调控除虫菌素B2:B1比例的DNA鉴定 及aveC ORF的鉴定

以下方法用于测试来自pSE66粘粒克隆的亚克隆片段调控AveC突变株中除虫菌素B2:B1比例的能力。用SacI及BamHI消化pSE66(5 μ g)。将反应混合物上样至0.8% Seaplaque™ GTG 琼脂糖凝胶(FMC BioProducts), 电泳后从凝胶中切出2.9 Kb的SacI/BamHI片段, 使用Fast Protocol 的GELase™ (Epicentre Technologies)从凝胶中回收DNA。约5 μ g穿梭载体pWHM3(Vara等, 1989, J. Bacteriol. 171:5872-5881)用SacI及BamHI消化。将约0.5 μ g所述2.9Kb插入子与0.5 μ g已消化的pWHM3混合, 并按照厂商说明与1个单位的连接酶(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)在15℃、总体积20 μ l中保温过夜。保温后, 将5 μ 连接混合物在70℃保温10分钟, 冷却至室温, 按照操作手册用于转化感受态的大肠杆菌DH5 α 细胞(BRL)。从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒DNA, 通过限制性分析可以证实2.9Kb SacI/BamHI 插入子的存在。该质粒被命名为pSE119。

如上7.1.5部分所述, 制备除虫链霉菌1100-SC38菌株(Pfizer内部(in-house)菌株)的原生质体并用pSE119转化。1100-SC38株是一种突变体, 当补充环己烷羧酸时, 相对于除虫菌素环己基-B1形式, 其产生明显多的除虫菌素环己基-B2形式(B2:B1的比例大约是 30:1)。用于转化除虫链霉菌原生质体的pSE119从大肠杆菌GM2163株(得自Dr. B. J. Bachmann, Curator, 大肠杆菌Genetic Stock Center, Yale University)、大肠杆菌DM1株 (BRL)、或变青链霉菌TK64株中分离。分离1100-SC38菌株的硫链丝菌肽抗性转化子并

通过对发酵产物的HPLC分析来进行分析。除虫链霉菌1100-SC38菌株的含有pSE119的转化子产生了比例已改变的除虫菌素环己基B2:环己基-B1, 该比例大约是3.7:1(表2)。

5 确定了pSE119能调控AveC突变体中的除虫菌素 B2:B1的比例后, 测出插入的DNA序列。按照操作手册, 使用质粒DNA分离试剂盒(Qiagen, Valencia, CA), 大约有10 μ g 的pSE119被分离, 然后用ABI 373A 自动DNA测序仪(Perkin Elmer, Foster City, CA)进行测序。用遗传学计算机组程序(GCG, Madison, WI)组合和编辑测序数据。DNA序列及aveC ORF示于图1 (SEQ ID NO:1)中。

10 如下构建一种新的质粒, 命名为pSE118。用SphI及BamHI消化大约5 μ g的pSE66。将反应混合物上样至0.8% SeaPlaque GTG 琼脂糖凝胶(FMC BioProducts)上, 电泳后从凝胶中切出2.8Kb的SphI/BamHI片段, 使用 Fast Protocol的GELase™ (Epicentre Technologies)从凝胶中回收DNA。约5 μ g穿梭载体pWHM3用SphI及BamHI消化。将0.5 μ g 2.8 Kb 插入子与0.5 μ g已消化的pWHM3混合, 在15 $^{\circ}$ C、总体积20 μ l中按照厂商说明与1个单位的连接酶(New England Biolabs)一起保温过夜。保温后, 将5 μ l连接混合物在70 $^{\circ}$ C保温10分钟, 冷却至室温, 按照操作手册用于转化感受态的大肠杆菌DH5 α 细胞。从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒DNA, 通过限制性分析可以证实2.8Kb SphI/BamHI插入子的存在。该质粒被命名为pSE118。在pSE118及
15 pSE119中的DNA插入子中约有838个核苷酸重叠(图4)。

除虫链霉菌1100-SC38菌株的原生质体用pSE118如上进行转化。分离1100-SC38菌株的硫链丝菌肽抗性转化子并通过对发酵产物的HPLC分析来进行分析。除虫链霉菌1100-SC38菌株的含pSE118的转化株相对于1100-SC38株在除虫菌素环己基B2:环己基-B1的比例上并未改变(表 2)。

25 7.1.10. 对除虫链霉菌染色体DNA上aveC基因的PCR扩增

通过PCR扩增法从除虫链霉菌染色体 DNA中分离含aveC ORF的~1.2 Kb片段, 所用引物根据从上所获的aveC核苷酸序列进行设计。PCR引物由Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas)提供。右向引物是:5'-TCACGAAACCGGACACAC-3'(SEQ ID NO:6); 左向引物是:5'-CATGATCGCTGAACCGAG-3'(SEQ ID NO:7)。在由生产商所提供的缓冲液中, 在有300 μ M dNTP, 10%甘油, 每种引物各200 pmol, 0.1 μ g 模板及2.5 单位酶, 终体积100 μ l的条
30

件下，用Deep Vent™聚合酶(New England Biolabs)在Perkin-Elmer Cetus热循环仪中进行PCR反应。第一循环的加热分布(thermal profile)为 95℃5分钟(变性步骤)，60℃2分钟(退火步骤)，72℃2分钟(延伸步骤)。随后24循环的加热分布与此相似，但变性步骤的时间缩短至45秒种且退火时间缩短至1分钟。

PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳后，检测到约1.2Kb的单一DNA带。从凝胶中纯化该DNA，并以1:10 摩尔的载体:插入子比例与25ng线性化钝端PCR-Blunt载体(Invitrogen)按照操作手册进行连接。按照操作手册用该连接混合物转化感受态One Shot™大肠杆菌细胞(Invitrogen)。从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒DNA，该~1.2 Kb插入子的存在可以通过限制性分析证实。该质粒被命名为pSE179。

将pSE179中的DNA插入子通过用BamHI/XbaI消化而分离，电泳分辨，从凝胶中纯化，并与已被BamHI/XbaI消化的穿梭载体pWHM3连接，该反应中DNA总浓度为1μg，载体与插入子的摩尔比为1:5。按照操作手册用该连接混合物转化感受态大肠杆菌DH5α细胞。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒DNA，所述~1.2 Kb插入子的存在可以通过限制性分析证实。该质粒(被命名为pSE186(图 2, ATCC 209604))被转化至大肠杆菌DM1中，并从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒DNA。

7.2. 结果

鉴定出来自pSE119的2.9 Kb SacI/BamHI 酶切片段，当其转化至除虫链霉菌1100-SC38菌株中时，显著地改变了B2:B1除虫菌素的产量比。一般情况下，除虫链霉菌1100-SC38菌株的B2:B1比约为30:1，但当用含有2.9 Kb SacI/BamHI酶切片段的载体转化时，除虫菌素B2:B1的比例减少至大约3.7:1。对转化体培养物进行发酵后分析证实了转化DNA的存在。

对2.9 Kb pSE119 片段进行测序，鉴定了约0.9 Kb的ORF (图1)(SEQ ID NO:1)，其包含一个已于他处发生突变而仅产生B2产物的PstI/SphI片段(Ikeda等，1995，同上)。该ORF或其相应的推导多肽，与已知数据库(GenEMBL, SWISS-PROT)相比，并不表明其与已知DNA或蛋白序列有任何强烈的同源性。

表2表示用不同质粒转化的除虫链霉菌1100-SC38株的发酵分析

表2

除虫链霉菌菌株(转化质粒)	所测转化体的编号	平均B2: B1比例
1100-SC38 (无)	9	30.66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31.3
1100-SC38(pSE119)	12	3.7
1100-SC38(pSE118)	12	30.4
1100-SC38(pSE185)	14	27.9

8. 实施例: 除虫链霉菌aveC突变株的构建

本实施例描述用上述组合物及方法对几种不同除虫链霉菌aveC突变株的构建。在链霉菌基因中引入突变的技术见Kieser 及Hopwood, 1991, Meth. Enzym. 204:430-458。详见Anzai等, 1988, J. Antibiot. XLI(2):226-233和Stutzman-Engwall等, 1992, J. Bacteriol. 174 (1):144-154。这些参考资料在此都被全文引用。

8.1. 除虫链霉菌AveC 基因的失活

含有失活的AveC基因的AveC 突变株可通过下述的几种方法构建。

10 在第一种方法中, 将pSE119(上文第7.1.9所述质粒)上aveC基因内部的640 bp SphI/PstI片段用红色糖多孢菌的ermE基因(赋予红霉素抗性)取代。ermE基因通过用BglIII和EcoRI进行限制酶切消化而从pIJ4026(来自John Innes Institute, Norwich, U.K.; 还参见Bibb等, 1985, Gene 41:357-368)中分离, 然后电泳, 从凝胶中纯化。将此约1.7 Kb的片段连接到已用BamHI和
15 EcoRI消化的pGEM7Zf (Promega)中, 将该连接混合物依照操作手册转化到大肠杆菌DH5 α 的感受态细胞中。从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒DNA, 所述约1.7 Kb插入子的存在可以通过限制性分析证实。将该质粒命名为pSE27。

pSE118(如上第7.1.9部分描述)用SphI及BamHI消化, 将消化物电泳, 从
20 凝胶中纯化约2.8Kb的SphI/BamHI插入子。pSE119用PstI和EcoRI消化, 将消化物电泳, 从凝胶中纯化约1.5Kb的PstI/EcoRI插入子。将穿梭载体pWHM3用BamHI及 EcoRI消化。pSE27用PstI和SphI消化, 将消化物电泳, 从凝胶中纯化约1.7Kb的PstI/SphI插入子。将全部四种片段(即: 约2.8Kb, 约1.5Kb, 约7.2Kb, 约1.7Kb)通过一个4步骤(4-way)连接反应连接在一起。将
25 该连接混合物依照操作手册转化到大肠杆菌DH5 α 的感受态细胞中。从氨苄

青霉素抗性转化子中分离质粒DNA，通过限制性分析证实正确插入子的存在。该质粒被命名为pSE180(图 3; ATCC209605)。

将pSE180转化入变青链霉菌TK64细胞，用针对硫链丝菌肽和红霉素的抗性鉴定转化的菌落。从变青链霉菌中分离pSE180，用其转化除虫链霉菌的原生质体。鉴定出四种硫链丝菌肽抗性除虫链霉菌转化体，制备原生质体并在非选择性条件下将其铺板至RM14培养基中。使原生质体再生，然后筛选有红霉素抗性而无硫链丝菌肽抗性的单菌落，其表明失活型aveC基因的染色体整合但游离复制子已丢失。鉴定出一个Erm^r Thio^s转化体，将其命名为SE180-11菌株。从SE180-11株中分离总染色体DNA，用限制性酶 BamHI, Hind III, PstI或SphI消化，在0.8%琼脂糖凝胶中电泳分辨，然后转移至尼龙膜上，与ermE 探针进行杂交。这些分析显示，通过一个双交换事件使得ermE 抗性基因进行染色体整合并同时使640 bp PstI/SphI片段缺失。对SE180-11株发酵产物的HPLC分析显示不再产生正常的除虫菌素(图5A)。

在使aveC基因失活的第二种方法中，从除虫链霉菌SE180-11株的染色体上取出1.7 Kb的ermE基因，使得aveC基因中缺失640 bp PstI/SphI。如下构建基因取代质粒：pSE180用XbaI进行部分消化，从凝胶中纯化约11.4 Kb的片段。该约11.4 Kb的带缺少所述1.7 Kb ermE抗性基因。将此DNA连接并转化进大肠杆菌DH5 α 细胞。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒DNA，正确插入子的存在可以通过限制性分析证实。将该质粒(被命名为pSE184)转化进大肠杆菌DM1中，从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒DNA。用该质粒转化除虫链霉菌SE180-11株的原生质体。从SE180-11株的硫链丝菌肽抗性转化体制备原生质体，并在RM14上铺板为单菌落。使原生质体再生，然后筛选出无红霉素抗性和硫链丝菌肽抗性的单菌落，其表明失活型aveC基因的染色体整合但缺失含有ermE基因的游离复制子。鉴定出一个Erm^sThio^s转化子并命名为SE184-1-13。对SE184-1-13的发酵分析显示正常除虫菌素不再产生，且SE184-1-13具有与SE180-11相同的发酵特征。

在第三种使aveC基因失活的方法中，通过用PCR在第471位核苷酸C之后添加两个G而在染色体aveC基因中引入移码突变，从而创建一个BspEI位点。工程化的BspEI位点的存在可用于检测基因取代事件。PCR引物被设计为能在aveC基因中引进移码突变，所述引物由Genosys Biotechnologies公司提供。右向引物为：5'-GGTTCGGATGCCGTTCTCG-3' (SEQ ID NO:8)，左

向引物为: 5'-AACTCCGGTCGACTCCCCTTC-3' (SEQ ID NO:9)。PCR条件如上第7.1.10节所述。666 bp的PCR产物用SphI消化, 分别得到278 bp及388 bp的两种片段。从凝胶中纯化所述388 bp的片段。

如下构建基因取代质粒: 穿梭载体pWHM3用EcoRI及BamHI消化。
5 pSE119用BamHI及SphI消化, 将消化物电泳, 从凝胶中分离出约840 bp的片段。pSE119用EcoRI及XmnI消化, 通过电泳分辨消化物, 从凝胶中纯化约1.7 Kb的片段。所有四种片段(也即: ~7.2 Kb, ~840 bp, ~1.7 Kb及388 bp)通过一个4步骤连接反应连接在一起。将该连接混合物转化进大肠杆菌DH5 α 的感受态细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒DNA, 通过限制
10 性分析及DNA序列分析证实正确插入子的存在。将该质粒(命名为pSE185)转化至大肠杆菌DM1细胞, 从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒DNA。用该质粒转化除虫链霉菌1100-SC38菌株的原生质体。分离1100-SC38菌株的硫链丝菌肽抗性转化体, 并通过对发酵产物的HPLC分析来分析。当pSE185
15 转化入除虫链霉菌1100-SC38菌株中时, 并未明显改变除虫菌素B2:B1的比例(表2)。

用pSE185转化除虫链霉菌原生质体以在染色体aveC基因中产生一个移码突变。从硫链丝菌肽抗性转化株制备原生质体, 并在RM14培养基上铺板为单菌落。使原生质体再生, 然后筛选无硫链丝菌肽抗性的单菌落。分离
20 硫链丝菌肽敏感菌落的染色体DNA并通过PCR筛选整合至染色体中的移码突变的存在。PCR引物根据aveC核苷酸序列设计, 由Genosys Biotechnologies公司(Texas)提供。右向PCR引物为: 5'-GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID NO:10), 左向PCR引物为: 5'-GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEQ ID NO:11), PCR条件如上第7.1.10节所述。所获PCR产物为543 bp, 当用BspEI消化时, 可检测到三种片段368 bp, 96 bp, 及79 bp,
25 其表明失活型aveC基因的染色体整合及游离复制子的缺失。

对aveC基因上含有移码突变的除虫链霉菌突变株的发酵分析显示, 不再产生正常除虫菌素, 且这些突变株具有与SE180-11株及SE184-1-13株相同的发酵产物HPLC特征。鉴定出一个Thio^S转化株并命名为SE185-5a。

此外, 在aveC基因上产生一个突变, 其使第520位核苷酸由G变为A,
30 从而导致第116位上编码色氨酸(W)的密码子变为终止密码子。携带此突变的除虫链霉菌菌株不产生正常除虫菌素且具有与SE180-11、SE184-1-13、及

SE185-5a菌株相同的发酵特征。

此外，在aveC基因中产生突变，其导致：(i)第970位核苷酸由G变为A，使第266位氨基酸从甘氨酸(G)变为天冬氨酸(D)，(ii)第996位核苷酸由T变为C，使第275位氨基酸从酪氨酸(Y)变为组氨酸(H)。具有这些突变
5 (G256D/Y275H)的除虫链霉菌菌株并不产生正常除虫菌素但具有与SE180-11、SE184-1-13、及SE185-5a菌株相同的发酵特征。

除虫链霉菌aveC失活突变株SE180-11、SE184-1-13、SE185-5a，及此处所提的其它菌株，为评估aveC基因中其它突变的影响提供了筛选工具。将含有野生型aveC基因的pSE186转化入大肠杆菌DM1细胞中，从氨基青霉素抗性转化株中分离质粒DNA。用该pSE186 DNA转化除虫链霉菌
10 SE180-11株。分离SE180-11株的硫链丝菌肽抗性转化体，测定红霉素抗性的存在，通过HPLC分析发酵产物来分析Thio^r Erm^r转化体。功能性aveC基因的反位(*in trans*)存在能将除虫菌素的正常产量恢复到SE180-11株的水平(图5B)。

15 8.2 对AveC基因中改变B2:B1比例的突变的分析

如上所述，含有失活的aveC基因的除虫链霉菌SE180-11菌株通过用含有功能性aveC基因的质粒(pSE186)转化而补充。SE180-11株也可用作宿主菌株来鉴定aveC基因的其它突变，如下所述。

从1100-SC38菌株中分离染色体DNA，并用作aveC基因进行PCR扩增的模板。通过PCR扩增分离1.2 Kb ORF，扩增所用引物根据aveC核苷酸序列来设计。右向引物为SEQ ID NO:6，左向引物为SEQ ID NO:7(见第7.1.10节所述)。PCR及亚克隆条件如第7.1.10节所述。1.2 Kb ORF的DNA序列分析显示了第337位核苷酸由C变为T的aveC基因突变，第55位的氨基酸由丝氨酸(S)变为苯丙氨酸(F)。将含有S55F突变的aveC基因亚克隆入pWHM3中以产生
20 一个质粒，其被命名为pSE187，并用于转化除虫链霉菌SE180-11菌株的原生质体。分离SE180-11株的硫链丝菌肽抗性转化体，以确定红霉素抗性的存在，通过HPLC分析发酵产物来分析Thio^r Erm^r转化体。编码第55位氨基酸残基之改变(S55F)的aveC基因的存在，能将正常的除虫菌素产量恢复到SE180-11株的水平(图5C)；但环己基B2:环己基B1的比例约为26:1，而用
25 pSE186转化的SE180-11株的B2:B1比约为1.6:1(表3)，表明该单突变(S55F)调节了环己基B2相对于环己基B1的产量。

鉴定出在aveC基因中的另一个突变，其使第862位核苷酸由G变为A，从而第230位的氨基酸由甘氨酸(G)变为天冬氨酸(D)。含有该突变(G230D)的除虫链霉菌菌株产生的除虫菌素B2:B1比例约为30:1。

8.3. 能减少B2:B1比例的突变

5 可以如下构建减少环己基-B2相对于环己基-B1的产量的几种突变。

鉴定出aveC基因中的一个突变，其使第588位核苷酸由G变为A，从而第139位的氨基酸由丙氨酸(A)变为苏氨酸(T)。将含有A139T突变的aveC基因亚克隆入pWHM3中，产生一个质粒(命名为pSE188)，用该质粒转化除虫链霉菌SE180-11株的原生质体。分离SE180-11株的硫链丝菌肽抗性转化体，
10 测定红霉素抗性株的存在，通过HPLC分析发酵产物来分析Thio^r Erm^r转化体。编码氨基酸残基139改变(A139T)的突变型aveC基因的存在能将除虫菌素产量恢复至SE180-11株的水平(图5D)；但B2:B1的比例约是0.94:1，这表明该突变减少了环己基B2相对于环己基B1的量。该结果很意外，因为已公布的结果以及上述突变结果仅证明了aveC基因的失活或除虫菌素B2型相对于
15 B1型的产量增加(见表3)。

由于A139T突变以更利于B1的方向改变了B2:B1的比例，因此构建一个突变，其编码第138位氨基酸处的丝氨酸而不是苏氨酸。为此，pSE186用EcoRI消化并克隆入已用EcoRI消化的pGEM3Zf(Promega)中。该被命名为psE186a的质粒用ApaI及KpnI消化，在琼脂糖凝胶中分离DNA片段，从凝胶
20 中纯化两种片段~3.8 Kb及~0.4 Kb。用pSE186的~1.2 Kb DNA插入片段作PCR模板，诱导第585位核苷酸的单碱基改变。将PCR引物设计成在核苷酸585位能引进一个突变，该引物由Genosys Biotechnologies公司(Texas)提供。右向PCR引物为：5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGG
AAATGCCCTGGCGACG-3' (SEQ ID NO: 12)；左向PCR引物为：5'-GGAA
25 CCGACCGCCTGATACA-3' (SEQ ID NO:13)。使用Advantage GC基因组PCR试剂盒(Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)，在由厂商提供的缓冲液中，在有200μM dNTPs，每种引物各200 pmol，50 ng模板DNA，1.0 M GC-Melt及1个单位的KlenTaq聚合酶混合物的条件下，在终体积50μl中进行PCR
30 反应。第一循环的加热分布为94℃1分钟；接下来以94℃30秒钟及68℃2分钟进行25个循环；然后以68℃3分钟进行一个循环。将295 bp的PCR产物用ApaI及KpnI消化以释放一个254 bp的片段，其通过电泳进行分辨并从凝胶中

纯化。所有三种片段(~3.8Kb, ~0.4 Kb及254 bp)用一个3步骤连接反应(3-way ligation)连接在一起。将该连接混合物转化入感受态的大肠杆菌DH5 α 细胞中。从氨苄青霉素抗性转化株中分离质粒DNA, 正确插入子的存在可以通过限制性分析确认。该质粒被命名为pSE198。

- 5 pSE198用EcoRI进行消化, 克隆进已用EcoRI消化的pWHM3中, 并将其转化至大肠杆菌DH5 α 细胞中。从氨苄青霉素抗性转化株中分离质粒DNA, 通过限制性分析及DNA序列分析确认正确插入子的存在。将该质粒DNA转化至大肠杆菌DM1, 从氨苄青霉素抗性转化株中分离质粒DNA, 通过限制性分析确认正确插入子的存在。将这一命名为pSE199的质粒用于转化除虫链霉菌SE180-11菌株的原生质体。分离SE180-11菌株的硫链丝菌肽抗性转化株, 确定红霉素抗性的存在, 通过用HPLC法分析发酵产物而分析Thio^r Erm^r转化株。编码138位上氨基酸残基改变(S138T)的突变aveC基因的存在能将正常除虫菌素产量恢复至SE180-11株的水平; 然而, B2:B1的比例为0.88:1, 表明了该突变减少了环己基-B2相对于环己基-B1的量(见表-3)。
- 10 该B2:B1的比例甚至低于0.94:1(这是用pSE188转化SE180-11菌株而产生的A139T突变所观察到的比例, 如上所述)。

- 构建另一个突变以同时在氨基酸位置138及139处引进一个苏氨酸。用pSE186的约1.2Kb DNA插入片段作PCR的模板。将PCR引物设计成能在核苷酸位置585及588处诱发突变, 该引物由 Genosys Biotechnologies 公司(Texas)
- 20 提供。右向PCR引物为: 5'-GGGGGCGGGCCCGGGTGC GGAGGC GGAAATGCCGCTGGCGACGACC-3' (SEQ ID NO:14); 左向PCR引物为: 5'-GGAACATCACGGCATTACACC-3' (SEQ ID NO:15)。使用本节上述条件进行PCR反应。449 bp的PCR产物用ApaI及KpnI消化以释放254 bp的片段, 其通过电泳进行分辨并从凝胶中纯化。将pSE186a用ApaI及KpnI消化, 在琼脂糖凝胶上分辨DNA片段, 从凝胶中纯化3.8 Kb与0.4 Kb的两种片段。所有这三种片段(~3.8 Kb, ~0.4 Kb 及254 bp)以3步骤连接反应进行连接, 将该连接混合物转化至大肠杆菌DH5 α 的感受态细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒DNA, 通过限制性分析确认正确插入子的存在。该质粒被命名为pSE230。
- 25

- 30 pSE230用EcoRI消化, 克隆至已被EcoRI消化的pWHM3中, 转化至大肠杆菌DH5 α 细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒DNA, 通过限制

性分析及DNA序列分析确认正确插入子的存在。将该质粒DNA转化至大肠杆菌DM1中，从氨基青霉素抗性转化体中分离质粒DNA，通过限制性分析确认正确插入子的存在。用这一命名为pSE231的质粒转化除虫链霉菌SE180-11菌株的原生质体。分离SE180-11的硫链丝菌肽抗性转化体，确定红霉素抗性的存在，然后通过发酵分析Thio^r Erm^r转化体。双突变aveC基因(编码S138T/A139T)的存在能使正常的除虫菌素生产恢复到SE180-11株的水平；但B2:B1的比例为0.84:1，显示该突变相对于pSE188或pSE199所转化的SE180-11株所提供的降低作用而言，进一步降低了环己基-B2相对于环己基B1的产量(见表3)。

10 构建另一突变，以便进一步降低环己基B2相对于环己基B1的产量。由于S138T/A139T突变能使B2:B1之比向更利于B1的方向改变，因此构建一种突变，使得能在第138位氨基酸处导入一个苏氨酸并在第139位氨基酸处导入一个苯丙氨酸。用来自pSE186的约1.2 kb DNA插入片段作为PCR的模板。将PCR引物设计为能在第585位核苷酸处导入突变(使T变为A)，第588位
15 核苷酸处导入突变(使G变为T)，第589位核苷酸处导入突变(使C变为T)，这些引物可由Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas)提供。右向PCR引物为：5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCGCTGGCGAC GTTC-3' (SEQ ID NO:25)；左向PCR引物为：5'-GGAACATCACGGCATTCC ACC-3'(SEQ ID NO:15)。PCR反应用Advantage GC基因组PCR试剂盒(Clontech
20 Laboratories, Palo Alto, CA)在厂家提供的缓冲液中进行，所述缓冲液中有200 μM dNTPs，每种引物各200 pmol，50 ng模板DNA，1.1 mM乙酸镁，1.0 M GC-Melt和1个单位的Tth DNA聚合酶，终体积50 μl。第一个循环的加热分布为：94℃1分钟；然后94℃30秒和68℃2分钟共25个循环；68℃3分钟进行一个循环。449 bp的PCR产物用ApaI和KpnI消化，释放出一个254 bp的
25 片段，将其通过电泳分辨并在凝胶上纯化。将所有三种片段(约3.8 Kb，约0.4 Kb和254 bp)通过一个三步骤连接反应连接在一起。将该连接混合物转化至感受态的大肠杆菌DH5α细胞中。从氨基青霉素抗性转化体中分离质粒DNA，通过限制性分析证实正确插入子的存在。将该质粒命名为pSE238。

pSE238用EcoRI消化，克隆至已被EcoRI消化的pWHM3质粒中，转化
30 至大肠杆菌DH5α细胞中。从氨基青霉素抗性转化体中分离质粒DNA，通过限制性分析及DNA序列分析确认正确插入子的存在。将该质粒DNA转化至

大肠杆菌DM1中，从氨基青霉素抗性转化体中分离质粒DNA，通过限制性分析确认正确插入子的存在。用这一命名为pSE239的质粒转化除虫链霉菌SE180-11菌株的原生质体。分离SE180-11菌株的硫链丝菌肽抗性转化体，确定红霉素抗性的存在，然后通过对发酵产物进行HPLC分析来分析Thio^r Erm^r 5 转化体。双突变aveC基因(编码S138T/A139F)的存在能使正常的除虫菌素生产恢复到SE180-11株的水平；但B2:B1的比例为0.75:1，表明该突变相对于如上述用pSE188，pSE199或pSE231转化的SE180-11株所提供的降低作用而言，进一步降低了环己基-B2相对于环己基B1的产量(见表3)。

表3

除虫链霉菌菌株 (转化质粒)	转化体 测试号	B2相对 浓度	B1相对 浓度	平均B2： B1比例
SE180-11 (无)	30	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	30	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	26	222	140	1.59
SE180-11 (pSE187)	12	283	11	26.3
SE180-11 (pSE188)	24	193	206	0.94
SE180-11 (pSE199)	18	155	171	0.88
SE180-11 (pSE231)	6	259	309	0.84
SE180-11 (pSE239)	20	184	242	0.75

10 可利用DNA改组(shuffling)技术构建另外的突变，以进一步降低环己基B2相对于环己基B1的产量，所述技术如Stemmer, 1994, 自然370:389-391；Stemmer, 1994, 美国国家科学院学报91:10747-10751所述；还可详见美国专利5605793, 5811238, 5830721和5837458。

15 将含有突变型aveC基因的DNA改组质粒转化至感受态的dam dcm大肠杆菌细胞中。从氨基青霉素抗性转化体中分离质粒DNA，用于转化除虫链霉菌SE180-11菌株的原生质体。分离SE180-11菌株的硫链丝菌肽抗性转化体，从中筛选以环己基B2:环己基B1之比为1:1或更低产生除虫菌素的那些转化体。测定以B2:B1之比为1:1或更低产生除虫菌素的那些转化体中质粒DNA的DNA序列。

20 鉴定出8株能产生相对于环己基B1减少量的环己基B2的转化体。这些转化体中最低B2:B1之比为0.40:1(表4)。分离这8种转化体每一种的质粒DNA，测定其DNA序列以便鉴定aveC基因中的突变。所述突变如下。

pSE290包含4个核苷酸突变，即第317位的核苷酸从T变为A，第353位的核苷酸从C变为A，第438位的核苷酸从G变为A，第1155位的核苷酸从T变为A。第317位核苷酸的改变使得第48位的氨基酸由D变为E，第438位核苷酸的改变使得第89位的氨基酸由A变为T。携有该质粒的细胞所产生的B2:B1之比为0.42:1 (表4)。

pSE291包含4个核苷酸突变，即第272位的核苷酸从G变为A，第585位的核苷酸从T变为A，第588位的核苷酸从G变为A，第708位的核苷酸从G变为A。第585位核苷酸的改变使得第138位的氨基酸由S变为T，第588位核苷酸的改变使得第139位的氨基酸由A变为T，第708位核苷酸的改变使得第179位的氨基酸由G变为S。携有该质粒的细胞所产生的B2:B1之比为0.57:1 (表4)。

pSE292包含与pSE290相同的4个核苷酸突变。携有该质粒的细胞所产生的B2:B1之比为0.40:1 (表4)。

pSE293包含6个核苷酸突变，即第24位的核苷酸从A变为G，第286位的核苷酸从A变为C，第497位的核苷酸从T变为C，第554位的核苷酸从C变为T，第580位的核苷酸从T变为C，第886位的核苷酸从A变为T。第286位核苷酸的改变使得第38位的氨基酸由Q变为P，第580位核苷酸的改变使得第136位的氨基酸由L变为P，第886位核苷酸的改变使得第238位的氨基酸由E变为D。携有该质粒的细胞所产生的B2:B1之比为0.68:1 (表4)。

pSE294包含6个核苷酸突变，即第469位的核苷酸从T变为C，第585位的核苷酸从T变为A，第588位的核苷酸从G变为A，第708位的核苷酸从G变为A，第833位的核苷酸从C变为T，第1184位的核苷酸从G变为A。此外，第173、174和175位的核苷酸已缺失。第469位核苷酸的改变使得第99位的氨基酸由F变为S，第585位核苷酸的改变使得第138位的氨基酸由S变为T，第588位核苷酸的改变使得第139位的氨基酸由A变为T，第708位核苷酸的改变使得第179位的氨基酸由G变为S。携有该质粒的细胞所产生的B2:B1之比为0.53:1 (表4)。

pSE295包含2个核苷酸突变，即第588位的核苷酸从G变为A，第856位的核苷酸从T变为C。第588位核苷酸的改变使得第139位的氨基酸由A变为T，第856位核苷酸的改变使得第228位的氨基酸由M变为T。携有该质粒的细胞所产生的B2:B1之比为0.80:1 (表4)。

pSE296包含5个核苷酸突变，即第155位的核苷酸从T变为C，第505位的核苷酸从G变为T，第1039位的核苷酸从C变为T，第1202位的核苷酸从C变为T，第1210位的核苷酸从T变为C。第505位核苷酸的改变使得第111位的氨基酸由G变为V，第1039位核苷酸的改变使得第289位的氨基酸由P变为L。携有该质粒的细胞所产生的B2:B1之比为0.73:1 (表4)。

pSE297包含4个核苷酸突变，即第377位的核苷酸从G变为T，第588位的核苷酸从G变为A，第633位的核苷酸从A变为G，第1067位的核苷酸从A变为T。第588位核苷酸的改变使得第139位的氨基酸由A变为T，第633位核苷酸的改变使得第154位的氨基酸由K变为E，第1067位核苷酸的改变使得第298位的氨基酸由Q变为H。携有该质粒的细胞所产生的B2:B1之比为0.67:1 (表4)。

表4

除虫链霉菌菌株 (转化质粒)	所测转化 体的编号	B2相对 浓度	B1相对 浓度	平均B2:B1 比例
SE180-11 (无)	4	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	4	0	0	0
SE180-11 (pSE290)	4	87	208	0.42
SE180-11 (pSE291)	4	106	185	0.57
SE180-11 (pSE292)	4	91	231	0.40
SE180-11 (pSE293)	4	123	180	0.68
SE180-11 (pSE294)	4	68	129	0.53
SE180-11 (pSE295)	4	217	271	0.80
SE180-11 (pSE296)	1	135	186	0.73
SE180-11 (pSE297)	1	148	221	0.67

9. 实施例：5'端缺失突变体的构建

如上面第5.1节所述，图1 (SEQ ID NO:1)所示的除虫链霉菌核苷酸序列在第42、174、177及180位(它们都是潜在的起始位点)含有四种不同的GTG密码子。本节将要描述aveC ORF(图 1; SEQ ID NO:1)5'区多重缺失的构建，以帮助确定这些密码子中哪个在aveC ORF中用作蛋白表达的起始位点。

带有5'端不同缺失的aveC基因片段可通过PCR扩增从除虫链霉菌染色体DNA中分离。PCR引物根据aveC DNA序列设计，由Genosys

Biotechnologies 公司提供。右向引物为:5'-AACCCATCCGAGCCGCTC-3' (SEQ ID NO:16)(D1F1); 5'-TCGGCCTGCCAACGAAC-3' (SEQ ID NO:17) (D1F2); 5'-CCAACGAACGTGTAGTAG-3' (SEQ ID NO:18)(D1F3);及 5'-TGC AGGCGTACGTGTTTCAGC-3' (SEQ ID NO:19)(D2F2)。左向引物为:5'-CATG
 5 ATCGCTGAACCGA-3' (SEQ ID NO:20); 5'-CATGATCGCTGAACCGAGGA-
 3' (SEQ ID NO:21);及 5'-AGGAGTGTGGTGCCTCTGGA-3' (SEQ ID NO:
 22)。PCR 反应如上文第8.3节所述。

PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳分辨, 所测单一DNA带为约1.0 Kb或
 1.1 Kb。从凝胶中纯化PCR产物, 并依照操作手册用25 ng 线性化pCR2.1载
 10 体(Invitrogen)以载体-插入片段为1:10摩尔的比例进行连接。依照操作手册
 用连接混合物转化One Shot™感受态大肠杆菌细胞(Invitrogen)。从氨苄青霉
 素抗性转化体中分离出质粒DNA, 该插入片段的存在通过限制性分析及
 DNA序列分析确认。这些质粒被命名为pSE190(用引物 D1F1获得)、pSE191
 (用引物D1F2获得)、pSE192(用引物D1F3获得)及pSE193(用引物D2F2获
 15 得)。

将每种DNA插入子用BamHI/XbaI消化, 电泳分辨, 从凝胶中纯化, 分
 别与已用BamHI/XbaI消化的穿梭载体pWHM3在总DNA 浓度为1μg的1:5摩
 尔比载体-插入片段比例中连接。用连接混合物转化大肠杆菌DH5α感受态细
 胞。从氨苄青霉素抗性转化体中分离出质粒DNA, 插入片段的存在可通过
 20 限制性分析确认。将这些质粒命名为pSE194(D1F1)、pSE195 (D1F2)、
 pSE196 (D1F3)及pSE197 (D2F2), 分别转化至大肠杆菌DM1株中, 从氨苄青
 霉素抗性转化体中分离质粒DNA, 通过限制性分析确认正确插入片段的存在。
 用该DNA转化除虫链霉菌SE180-11菌株的原生质体。分离SE180-11菌
 株的硫链丝菌肽抗性转化体, 确定红霉素抗性转化体的存在, 通过HPLC分
 25 析发酵产物来分析Thio^r Erm^r 转化体以确定哪一个GTG位点为aveC表达所必
 需。结果表明可以消除42位的GTG密码子而不影响aveC的表达, 因为当
 pSE194、pSE195及pSE196(都缺乏42位的GTG位点, 但都在174、177及180
 位含有三个GTG位点)转化进SE180-11时, 分别都能恢复正常除虫菌素的产
 量。只有当SE180-11株用缺少所有这四种GTG位点的pSE197进行转化时,
 30 其才不能恢复正常除虫菌素的产量(表 5)。

表5

除虫链霉菌菌株 (转化质粒)	所测转化 体的编号	相对浓度 [B2]	相对浓度 [B1]	平均B2:B1
SE180-11 (无)	6	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	6	0	0	0
SE180-11 (pSE186)	6	241	152	1.58
SE180-11 (pSE194)	6	35	15	2.43
SE180-11 (pSE195)	6	74	38	1.97
SE180-11 (pSE196)	6	328	208	1.58
SE180-11 (pSE197)	12	0	0	0

10. 实施例:对来自吸水链霉菌和 产灰色链霉菌的aveC同系物的克隆

本发明还允许对来自链霉菌属产除虫菌素或蜜比霉素的其它菌种的
5 aveC同源基因进行鉴定和克隆。例如,使吸水链霉菌(FERM BP-1901)基因
组 DNA的粘粒文库与上述除虫链霉菌的1.2Kb aveC 探针杂交。鉴定出强杂
交的几个粘粒克隆。从这些粘粒中分离染色体DNA,并鉴定出与aveC探针
杂交的4.9 Kb KpnI片段。测定该DNA的序列,鉴定出与除虫链霉菌的aveC
10 ORF 有很明显同源性的ORF(SEQ ID NO:3)。从吸水链霉菌aveC同系物ORF
推导出来的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)如图6所示。

此外,将产灰色链霉菌基因组DNA的粘粒文库与来自上述除虫链霉菌
的1.2 Kb aveC探针杂交。鉴定出强杂交的几寡个粘粒克隆。从这些粘粒中
分离染色体DNA,鉴定出与aveC探针杂交的5.4 Kb PstI片段。对该DNA进行
15 测序,并鉴定出与除虫链霉菌的aveC ORF 有很明显同源性的aveC同系物的
部分ORF。推导的部分氨基酸序列(SEQ ID NO:5)如图6所示。

对吸水链霉菌和产灰色链霉菌中aveC同系物的DNA和氨基酸序列分析
显示这些区域彼此有明显同源性(在氨基酸水平上约有50%的序列同一性)或
与除虫链霉菌aveC ORF及AveC基因产物也有明显同源性(图 6)。

11. 实施例:构建一种质粒,

20 其中aveC基因位于ermE启动子之后

将pSE186的1.2 Kb aveC ORF亚克隆至pSE34中,该pSE34是将300 bp
ermE启动子作为一个KpnI/BamHI 片段插入pWHM3的KpnI/BamHI位点的穿
梭载体pWHM3(见Ward等,1986, Mol. Gen. Genet 203:468478)。用BamHI

及HindIII消化pSE186，通过电泳分辨消化物，从琼脂糖凝胶中分离1.2 Kb片段，与已用BamHI及HindIII消化的pSE34连接。依照操作说明，将该连接混合物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离出质粒DNA，通过限制性分析确认1.2 Kb插入片段的存

5 在。将该质粒(命名为pSE189)转化至大肠杆菌DM1中，从氨苄青霉素抗性转化体中分离出质粒DNA。用pSE189转化除虫链霉菌1100-SC38菌株的原生质体。分离1100-SC38菌株的硫链丝菌肽抗性转化体，并通过HPLC分析发酵产物来进行分析。

含有pSE189的除虫链霉菌1100-SC38菌株转化体所产除虫菌素环己基-B2与环己基-B1比例(约3:1)相对于菌株1100-SC38所产生的上述物质的比例(约34:1)已经改变，但与用pSE119进行转化的1100-SC38菌株相比，总的除虫菌素产量增加了约2.4倍(表6)。

也可将pSE189转化至野生型除虫链霉菌菌株的原生质体中。分离硫链丝菌肽抗性转化株，并通过HPLC分析发酵产物来进行分析。用pSE189转化的除虫链霉菌野生型的除虫菌素总产量与用pSE119转化的野生型除虫链霉菌菌株相比增加了2.2倍(表6)。

表6

除虫链霉菌菌株 (转化质粒)	所测转化体的 编号	相对 [B2]	相对 [B1]	相对的除虫 菌素总量	平均B2:B1 比例
1100-SC38	6	155	4.8	176	33.9
1100-SC38 (pSE119)	9	239	50.3	357	4.7
1100-SC38 (pSE189)	16	546	166	849	3.3
野生型	6	59	42	113	1.41
野生型(pSE119)	6	248	151	481	1.64
野生型(pSE189)	5	545	345	1071	1.58

12. 实施例:含有除虫链霉菌aveC ORF及

20

吸水链霉菌aveC同系物序列的嵌合质粒

如下所述，构建命名为pSE350的杂合质粒，其用吸水链霉菌aveC同系物中的564bp部分取代了除虫链霉菌aveC ORF中的564bp的同系物部分(见图7)。使用BsaAI限制性位点和KpnI限制性位点构建pSE350，其中BsaAI限制性位点在所述两序列中保守(aveC 225位)，KpnI限制性位点存在于除虫链霉

菌aveC基因中(aveC 810位)。用上述第7.1.10节所述PCR条件,通过PCR将KpnI位点引入吸水链霉菌DNA中,其所用的右向引物为5'-CTTCA GGTGTACGTGTTTCG-3' (SEQ ID NO:23),左向引物为5'-GAACTGGTACC AGTGCCC-3'(SEQ ID NO:24)(由Genosys Biotechnologies 公司提供)。将

5 PCR产物用BsaAI及KpnI消化,在1%琼脂糖凝胶中电泳来分离这些片段,从凝胶中分离564bp的BsaAI/KpnI片段。将pSE179(如第7.1.10节所述)用KpnI及HindIII消化,在1%琼脂糖凝胶中电泳,从凝胶中分离约4.5 Kb的片段。pSE179用HindIII及BsaAI消化,在1%琼脂糖凝胶中电泳,从凝胶中分离约0.2 Kb的BsaAI/HindIII片段。将所述4.5 Kb的HindIII/kpnI片段、0.2 Kb

10 BsaAI/HindIII片段及来自吸水链霉菌的564 bp的BsaAI/KpnI片段以3步骤连接反应连接在一起,将该连接混合物转化进感受态的大肠杆菌DH5 α 细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒DNA,用KpnI及AvaI限制性分析确认该正确插入片段的

15 存在。该质粒用HindIII及XbaI消化以释放1.2 Kb插入片段,然后与pWHM3(其已经用HindIII及XbaI消化)进行连接。将该连接混合物转化进感受态的大肠杆菌DH5 α 细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离出

20 质粒DNA,并用HindIII及AvaI限制性分析确认正确插入片段的

存在。该质粒DNA转化至大肠杆菌DM1中,从氨苄青霉素抗性转化体中分离出

质粒DNA,通过限制性分析及DNA序列分析确认正确插入片段的

存在。该质粒被命名为pSE350,并用于转化除虫链霉菌SE180-11菌株的原生质体。分

25 离SE180-11菌株的硫链丝菌肽抗性转化体,确定有红霉素抗性存在,并通过HPLC分析发酵产物对Thio^r Erm^r转化体进行分析。结果显示出含有除虫链霉菌/吸水链霉菌杂合质粒的转化体的平均B2:B1比例约为109:1(参见表7)。

表7

除虫链霉菌菌株 (转化质粒)	所测转化体 的编号	相对[B2]	相对[B1]	平均B2:B1 比例
SE180-11 (无)	8	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	8	0	0	0
SE180-11 (pSE350)	16	233	2	109

25

生物材料的保藏

1998年1月29日,下列生物材料保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC),

12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, 保藏号为：

<u>质粒</u>	<u>保藏号</u>
质粒pSE180	209605
质粒pSE186	209604

5

以上所引用的全部的专利，专利申请，及公开文献在此全面引作参考。

10 本发明并不局限于本文所述具体实施方案的范围，这些仅为本发明各个方面的个别举例，功能上相当的方法及组分都属于本发明的范围。实际上，除了上述说明及示例外，从上述说明和附图，本发明的各种变化对于本领域技术人员来说都是很明显的。这些变化都将落入所附权利要求书的保护范围之内。

序列表

<110> 辉瑞产品公司 (PFIZER PRODUCTS INC.)

<120> 介导除虫菌素B2: B1比例的除虫链霉菌基因

<130> PC10649A

<140> PC10649

<141> 1999-08-12

<150> 60/074, 636

<151> 1998-02-13

<150> PCT/IB99/00130

<151> 1999-01-25

<160> 25

<170> PatentIn 2.1版

<210> 1

<211> 1229

<212> DNA

<213> 除虫链霉菌 (Streptomyces avermitilis)

<220>

<221> CDS

<222> (174).. (1085)

<400> 1

tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaacca tccgagccgc 60

tcggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg ctctacccg 120

aggccggcct gaacaggcca ggagcgctgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg 176

Val

1

gtg gtg tgg gcc ggg gtc ggc ctg ctg ttt ctg gcc ctg cag gcg tac 224

Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala Tyr

5

10

15

gtg ttc agc cgc tgg gcg gcc gac ggt ggc tac cgg ctg atc gag acg 272

Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu Thr

20

25

30

gcg ggc cag ggt cag ggc ggc agc aag gat acg ggg act acc gat gtg 320
 Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp Val
 35 40 45

gtc tat ccc gtg att tcc gtc gtc tgc atc acc gcc gcg gcg gcg tgg 368
 Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala Trp
 50 55 60 65

ctc ttc cgg agg tgc cgt gtc gaa cga cgg ctg ctg ttc gac gcc ctt 416
 Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala Leu
 70 75 80

ctc ttc ctc ggg ctg ctg ttc gcg agc tgg cag agc ccg ctc atg aac 464
 Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met Asn
 85 90 95

tgg ttc cat tcc gtt ctc gtc tcc aac gcg agt gtg tgg ggc gcg gtg 512
 Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala Val
 100 105 110

ggt tcc tgg ggt ccg tat gtg ccc ggc tgg cag ggg gcg gcc ccg ggt 560
 Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln Gly Ala Gly Pro Gly
 115 120 125

gcg gag gcg gaa atg ccg ctg gcg tgc gcc tcc gtc tgc atg tgc gct 608
 Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser Ala
 130 135 140 145

ctg atc gtc acc gtg ctg tgc agc aag gca ctg ggg tgg atc aag gcc 656
 Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys Ala
 150 155 160

cgc cgg ccg gca tgg cgg acc tgg cgg ctg gtc ctg gcc gtg ttc ttc 704
 Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe Phe
 165 170 175

atc ggc atc gtg ctc ggt ctg tcc gag ccg ctg ccg tcc gcc tcc ggg 752
 Ile Gly Ile Val Leu Gly Leu Ser Glu Pro Leu Pro Ser Ala Ser Gly
 180 185 190

atc agc gta tgg gcc aga gcg ctg ccc gag gtg acc ttg tgg agt gcc 800
 Ile Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Thr Leu Trp Ser Gly
 195 200 205

gag tgg tac cag ttc ccc gtg tat cag gcg gtc ggt tcc gcc ctg gtc 848

Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu Val
 210 215 220 225

 tgc tgc atg ctg ggc tgc ctg cgc ttc ttc cgc gac gaa cgc gat gag 896
 Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp Glu
 230 235 240

 tcg tgg gtg gaa cgg gga gcc tgg cgg ttg ccg caa cgg gca gcg aac 944
 Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala Asn
 245 250 255

 tgg gcg cgt ttc ctc gcc gtg gtc ggt ggg gtg aat gcc gtg atg ttc 992
 Trp Ala Arg Phe Leu Ala Val Val Gly Gly Val Asn Ala Val Met Phe
 260 265 270

 ctc tac acc tgt ttc cat atc ctc ctg tcc ctc gtc ggt gga cag ccg 1040
 Leu Tyr Thr Cys Phe His Ile Leu Leu Ser Leu Val Gly Gly Gln Pro
 275 280 285

 ccc gac caa ctg ccg gac tcc ttc caa gcg ccg gcc gct tac tga 1085
 Pro Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Gln Ala Pro Ala Ala Tyr
 290 295 300

 gttcaggcca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagtccg gtcacctccc 1145

 ctttgtgcat gggtagcagg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc 1205

 acactcctcg gttcagcgat catg 1229

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

<213> 除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)

<400> 2

Val Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala
 1 5 10 15
 Tyr Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu
 20 25 30
 Thr Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp
 35 40 45
 Val Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala
 50 55 60
 Trp Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala
 65 70 75 80

ctg gga ctt cag gtg tac gtg ttc gcc gcc tgg ctc gcc gac agc ggc	153
Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly	
20 25 30	
tac cgc atc gag aag gcg tcc ccg gcc agg ggc ggt ggg gac tcg gag	201
Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Asp Ser Glu	
35 40 45	
cgg atc gcc gat gtg ctg atc ccg ctg ctg tcc gtg gtg gga gcg gtg	249
Arg Ile Ala Asp Val Leu Ile Pro Leu Leu Ser Val Val Gly Ala Val	
50 55 60	
gtc ctc gca gtg tgt ctg tac cgg agg tgt cgg gcc agg agg cgg ctg	297
Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Arg Leu	
65 70 75 80	
acg ttc gac gcg tcg ctc ttc atc ggg ctg ctg tcg gcc agt tgg cag	345
Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln	
85 90 95	
agt ccc ttg atg aac tgg atc aat ccg gtg ctc gcg tca aac gtc aat	393
Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn	
100 105 110	
gtg ttc gga gcg gtg gcc tcg tgg ggg ccg tat gtg ccc ggt tgg cag	441
Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln	
115 120 125	
ggg gcg ggg gcg cac cag gag gcc gag ctg ccg ctg gcg acc ctg agc	489
Gly Ala Gly Ala His Gln Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Thr Leu Ser	
130 135 140	
atc tgt atg acg gcc atg atg gcc gcc gtg gcc tgc ggc aag ggc atg	537
Ile Cys Met Thr Ala Met Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met	
145 150 155 160	
ggt ctt gcc gcc gcc cgg tgg ccg cgg ctg ggg ccg ctc cgg ctg atc	585
Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile	
165 170 175	
gcg ctc ggc ttt ctg ctc gtc gtg ctc ctc gac atc gcc gag ccg ctg	633
Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu	
180 185 190	
gtg tcc ttc gcg ggc gtc tcc gtg tgg acg ccg gca gtg ccc gag ctg	681
Val Ser Phe Ala Gly Val Ser Val Trp Thr Arg Ala Val Pro Glu Leu	

195	200	205	
acc atc tgg agt ggg cac tgg tat cag ttc ccg ctg tat cag atg gtg			729
Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val			
210	215	220	
gct tcg gcg ctc ttc ggc gcc tct ttg ggg gcc gcg cgc cac ttt cgc			777
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg			
225	230	235	240
aac cgg cgc ggc gaa acg tgt ctg gag tcc ggg gcg gcc ctc cta ccg			825
Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro			
245	250	255	
gag ggc ccg agg cca tgg gtc cgg ctg ctg gcg gtg gtg ggc ggg gcc			873
Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala			
260	265	270	
aac atc agc atc gcc ctc tac acc ggc gca cac ggc gca cac atc ctg			921
Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu			
275	280	285	
ttc tcg ctg atg gac ggc gct ccc ccg gac cgg ctc ccc gaa ttc ttc			969
Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe			
290	295	300	
cgt ccg gcg gcc ggc tac tga gaccgccgc accaccacg taccgatgt			1020
Arg Pro Ala Ala Gly Tyr			
305	310		
gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cggggtgtca tcggctcacc tgtggcgcct			1080
catgcgggtga gcgetccgcc tcgtccttgt tccgctcct gggetccacg accatacgga			1140
gcggccgggg			1150

<210> 4

<211> 310

<212> PRT

<213> 吸水链霉菌 (Streptomyces hygroscopicus)

<400> 4

Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val

1

5

10

15

Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly

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

<210> 5

<211> 215

<212> PRT

<213> 产灰色链霉菌(*Streptomyces griseochromogenes*)

<400> 5

Val Ile Gly Trp Ala Ala Leu Gly Ala Val Phe Leu Val Leu Gln Val

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

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)

<400> 6 tcacgaaacc ggacacac	18
<210> 7 <211> 18 <212> DNA <213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 7 catgatcgct gaaccgag	18
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 8 ggttccggat gccgttctcg	20
<210> 9 <211> 21 <212> DNA <213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 9 aactccggtc gactcccctt c	21
<210> 10 <211> 19 <212> DNA <213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 10 gcaaggatac ggggactac	19
<210> 11 <211> 18 <212> DNA <213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	

<400> 11 gaaccgaccg cctgatac	18
<210> 12 <211> 43 <212> DNA <213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 12 gggggcgggc ccgggtgctg aggcggaaat gccctggcg acg	43
<210> 13 <211> 20 <212> DNA <213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 13 ggaaccgacc gcctgataca	20
<210> 14 <211> 46 <212> DNA <213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 14 gggggcgggc ccgggtgctg aggcggaaat gccgctggcg acgacc	46
<210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 15 ggaacatcac ggcattcacc	20
<210> 16 <211> 18 <212> DNA <213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 16	

aacctatccg agccgctc	18
<210> 17	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 17	
tcggcctgcc aacgaac	17
<210> 18	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 18	
ccaacgaacg tgtagtag	18
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 19	
tgcaggcgta cgtgttcagc	20
<210> 20	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 20	
catgatcgct gaaccga	17
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 21	
catgatcgct gaaccgagga	20

<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 22	
aggagtgtgg tgcgtctgga	20
<210> 23	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 23	
cttcaggtgt acgtgttcg	19
<210> 24	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 24	
gaactgttac cagtgcc	18
<210> 25	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 25	
gggggcggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc	46

```

1      TCAGAACCGGACACACCACACAGGAGGTGAGACAGCTGMAACCATCCGAGCGCTCGGCTGCCAACGAACTGTAGTAGACACCCGACCCGTC
101    CGATGCCACGCTCTCACCCGAGGCCGGCTGMAACAGGTACAGAGCGCTGCCCGTGAACCTGCTGCTGCTGCCGGTGGTGGTGGGCCGGGCTCGGCCTG
201    CTGTTTCGGCCCTGCAGGCGTACGCTGTTACGGCCCTGGCCGCGCCAGCGGTGATCGAGACGGGCGGCCAGGTCAGGGCGGCAGCAAGG
301    LFLALQAYVFSSRNAAAADGGYRLIE T A G Q Q G G S K D
    ATACGGGACTACCGATGTYATCCCGTATCCGTCGTCAACCCGCGCGCGCTCTTCCGGAGGTCCCTGTCGAAACGACGGCT
401    TGT T D V V Y P V I S V V C I T A A A A W L F R R C R V E R R L
    GCTGTTCCAGCCCTCTCTCCCTGGCTGCTGTTCCGAGCTGGCAGGCCCTCATGAAC TGGTTCATTCGGTTCCTGCTCCAAACGGGAGTGTG
501    LFDALLPLGLLFLFASWQSP L M N M F H S V L V S N A S V
    TGGGGCGGTGGTTCTGGGTCGTATGTGCCCGGCTGGCAGGGGGCGGCGCGGTGGAGCGGAAATGCCGCTGGCTGGCTCCGCTCGCTGCA
601    WGA V G S W G P Y V P G W Q G A G P G A E A E M P L A S A S V C H
    TGTGGCTGATCGTACACCGTGTGTCAGCAAGGCATGGGGTGA TCAAGGCCCGCGCGCTGGCATGGCGGACTGGCGGTGCTTGGCCGCTGT
701    S A L I V T V L C S K A L G M I K A R R P A W R T H R L V L A V F
    CTTTCGGCATCGTCTGGTCTGTCCGAGCCCGTCCGCTCCGGATCAGCCATGGCCACAGCGCTGCCCGAGGTGACCTTGTGGAGTGGC
801    F I G I V L G L S E P L P S A S G I S V W A R A L P E V T L W S G
    GAGTGTACAGTCCCGTGTATCAGCGGTGGTTCGGCTCGGCTGCTGTCATCTGCGCTCGCTCGGCTTCTCCCGCACGAAACGGATGATCGT
901    E W Y Q F P V Y Q A V G S G L V C C M L G S L R F F R D E R D E S H
    CGGTGMAACGGGAGCTGGCGGTTGCCCAACGGGCAAGCACTGGCGGTTCTCCCGTGGTGGTGGTGAATGCCGATGTTCTCTACAC
1001  V E R G A W R L P Q R A A N W A R F L A V V G G V N A V M F L Y T
    CTGTTCCATCTCCCTCGTGGTGGACAGCCGCCCAACTGCCGGACTCTTCCAAGCGCCGGCTTACTGATTCAGGGCAGGTG
1101  C F H I L L S L V G G Q P P D Q L P D S F Q A P A A Y *
    GAGGACGGGAGGGGAGCCCGGAGTCCCGTACCTCCCTTGTGATGGTGGACGGGATCACGCTCCCATGGCGGGGCTCTCTCCAGAC
1201  GCACACACTCCTCGTTACGGATCATG
-----+----- 1229

```

图 1

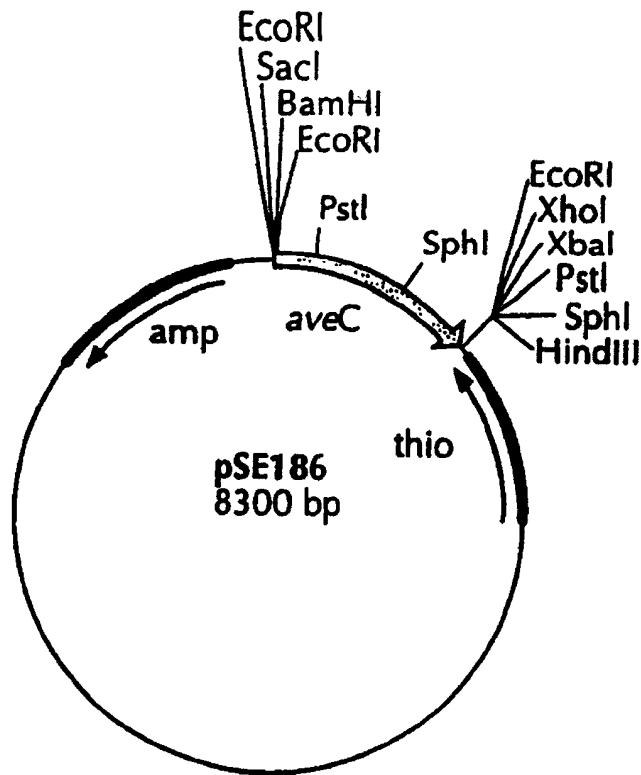


图 2

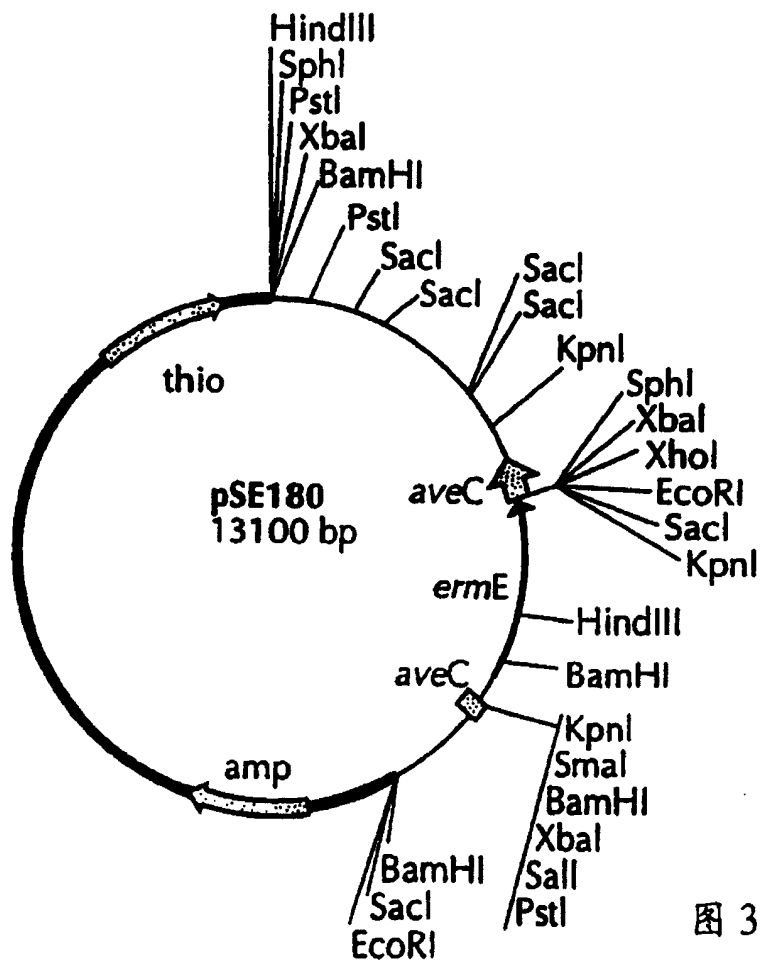


图 3

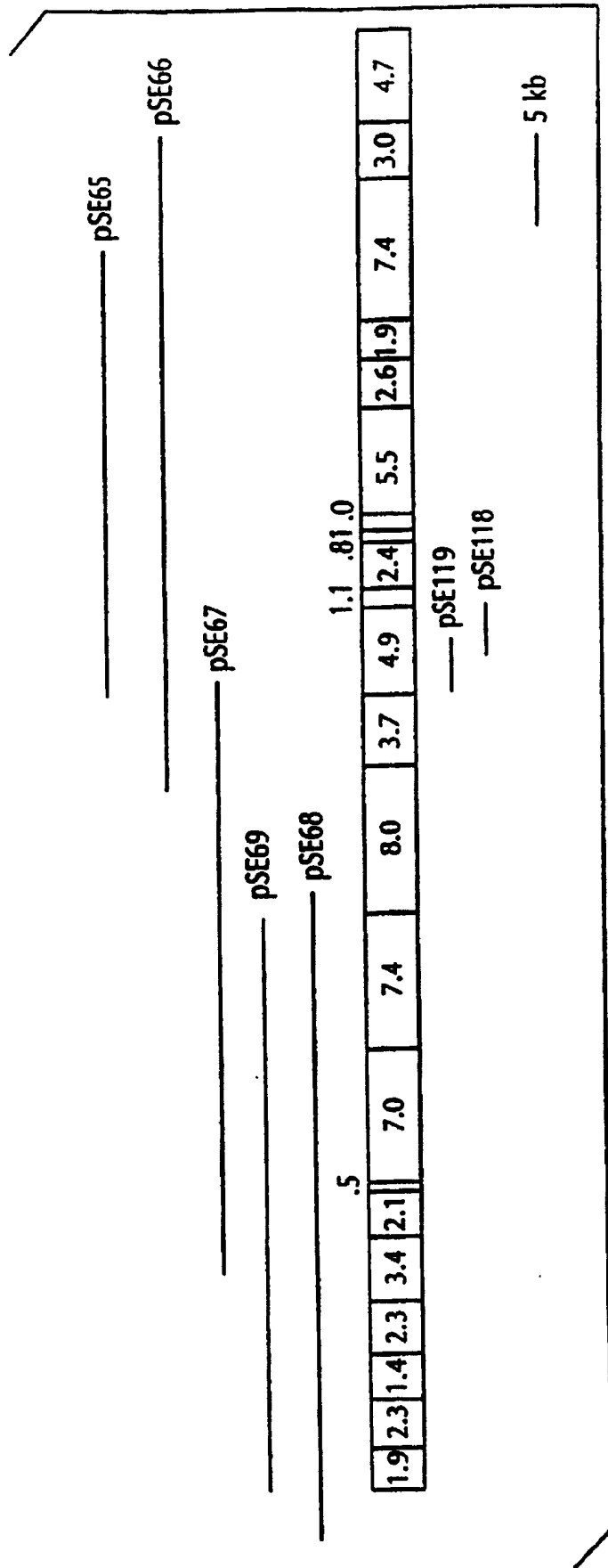


图 4

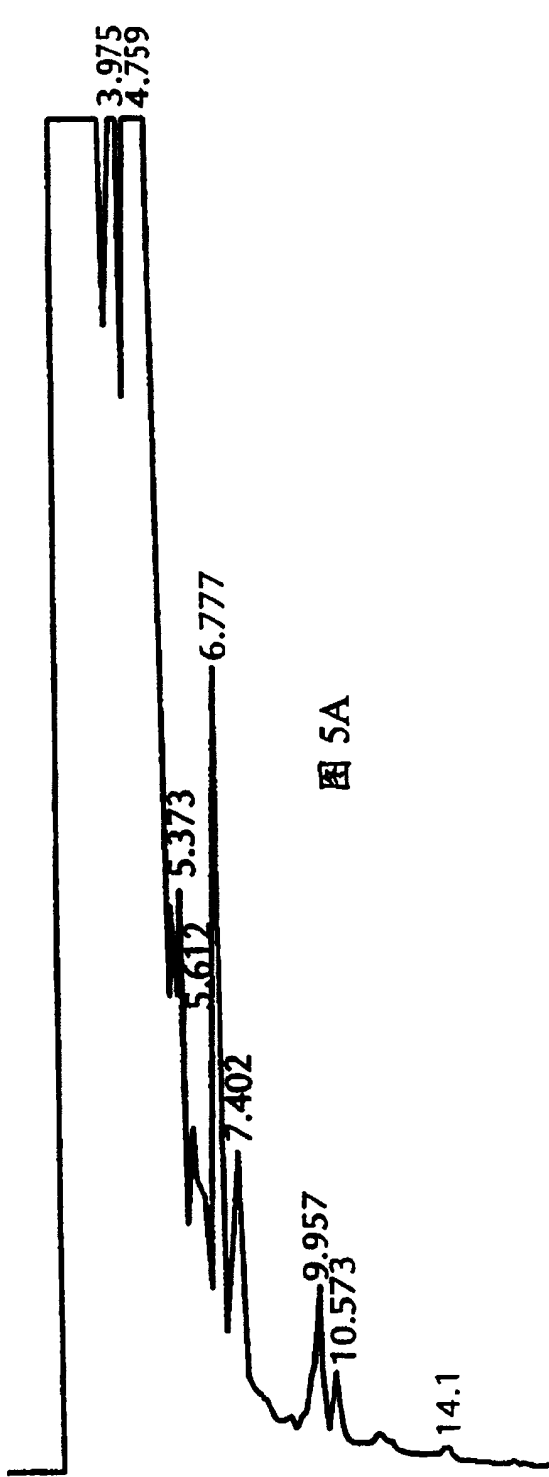


图 5A

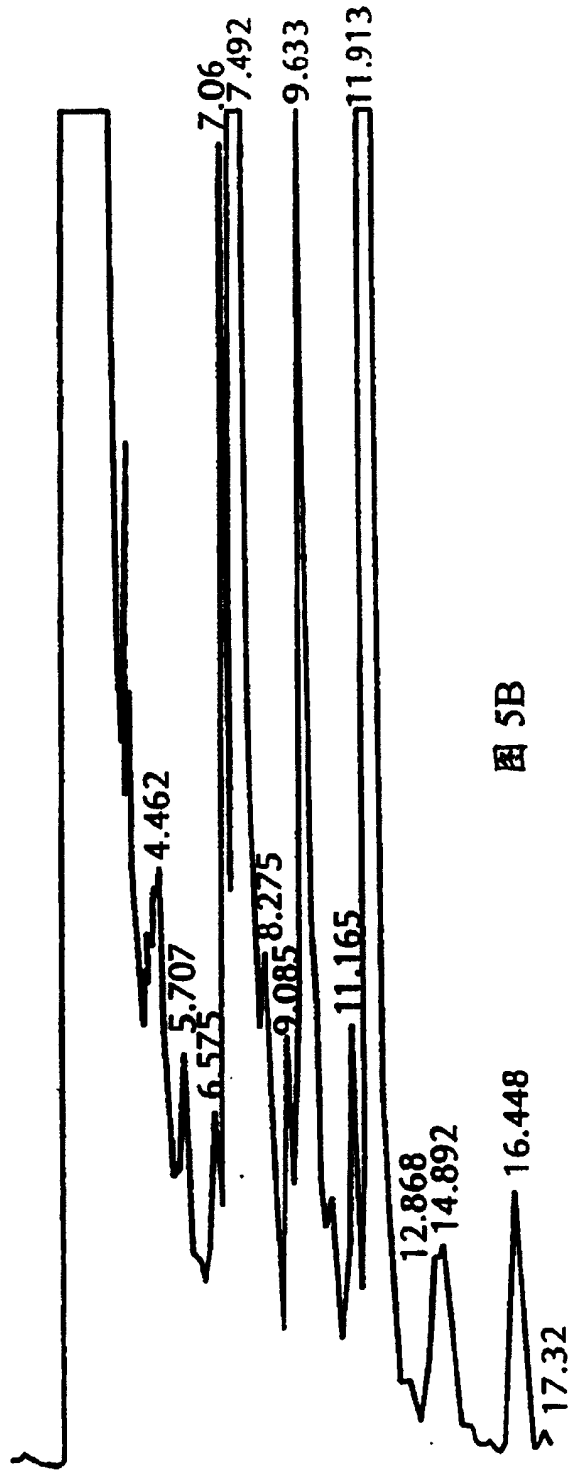


图 5B

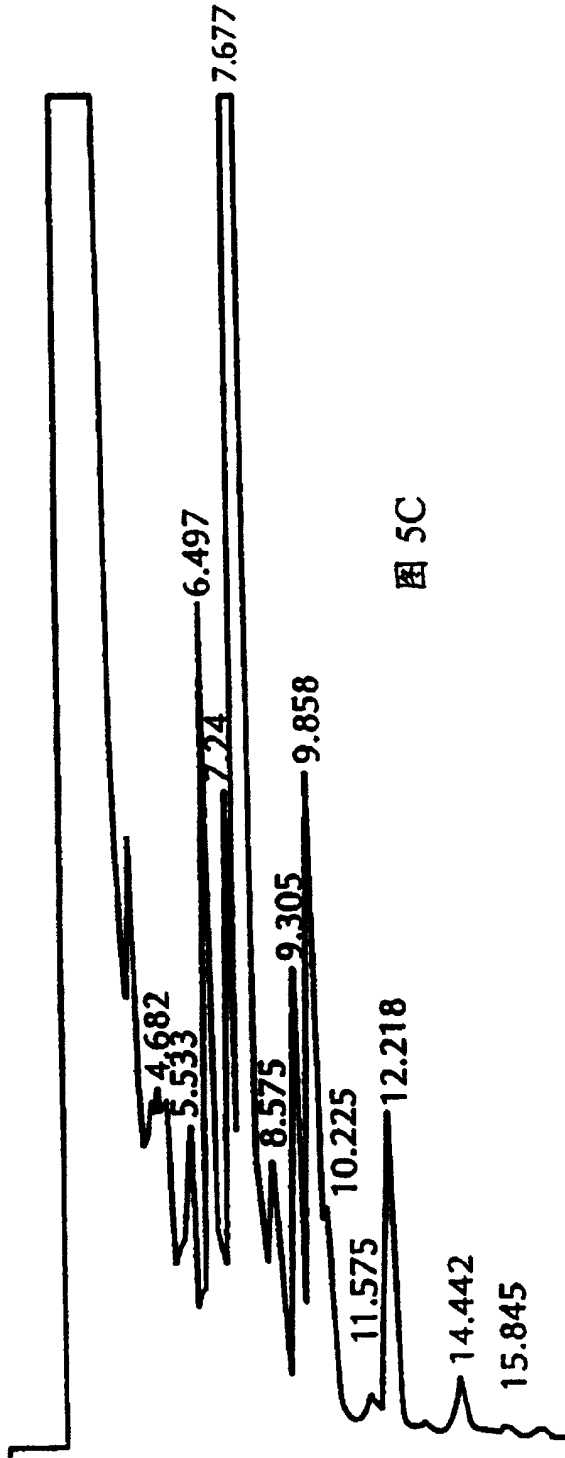


图 5C

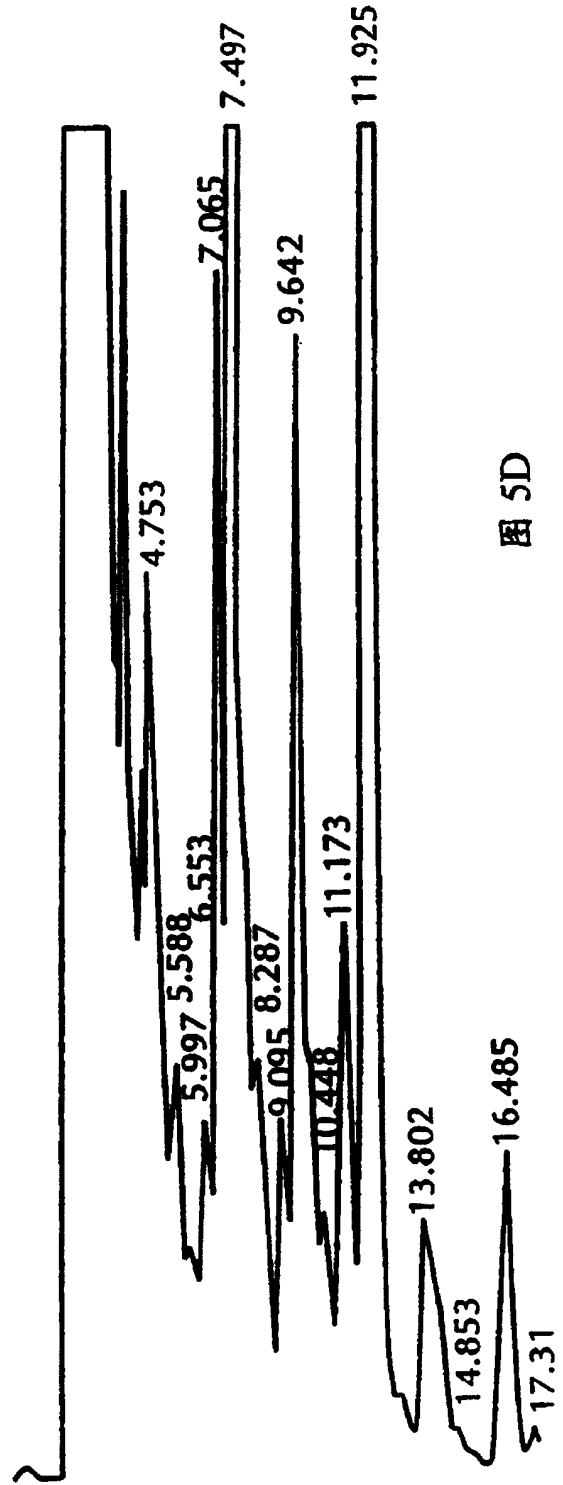


图 5D

除虫链霉菌				
产灰色链霉菌				
吸水链霉菌					VFTLP
保守残基(Cons)					-----
	1				50
除虫链霉菌	VVVWAGVGLL	FLALQAYVFS	RWAADGGYRL	IETAGQGQGG	SKDTGTDDVV
产灰色链霉菌	VIGWAALGAV	FLVLQVYVFA	RWTADGGYHL	ADVSGPDGRE	PGHRRIIDVL
吸水链霉菌	VTLWACVGAL	VLGLQVYVFA	AWLADSGYR.	IEKASPARGG	GDSERIADVL
保守残基	V--WA-vGal	fL-LQvYVfa	rW-ADgGYrl	ie-agp--gg	----r--DVL
	51				100
除虫链霉菌	YPVISVVCIT	AAAAWLFRRC	RVERLLFDA	LLFLGLLFAS	WQSPLMNWFH
产灰色链霉菌	LPALSMAGVV	GLAFWLVRRW	RAERLSFDA	LLFTGVLFAG	WLSPLMNWFH
吸水链霉菌	IPLLSVVGAV	VLAVCLYRRC	RARRLTFDA	SLFIGLLSAS	WQSPLMNWIN
保守残基	-P-lSvvg-v	-lA-wL-RRC	RaERL-FDA	lLF-GlLfAs	WqSPLMNWfh
	101				150
除虫链霉菌	SVLVSNASVW	GAVGSWGPYV	PGWQGAGPGA	EAEMPLASAS	VCMSALIVTV
产灰色链霉菌	PVLMANTHW	GAVGSWGPYV	PGWRGLPPGK	EAEPLVTFS	LGSTVLLGVL
吸水链霉菌	PVLASNVMVF	GAVASWGPYV	PGWQGAGAHQ	EAEPLATLS	ICMTAMMAAV
保守残基	pVL-sN--Vw	GAVgSWGPYV	PGWqGagpg-	EAElPLat-S	-cmtal---v
	151				200
除虫链霉菌	LCSKALGWIK	ARRPAWRTWR	LVLAVFFIGI	VLGLSEPLPS	ASGISVWARA
产灰色链霉菌	GCCQVMSRVR	ERNPGRVPWQ	LVGLAFLTAV	AFDLSEPFIS	FAGVSVWARA
吸水链霉菌	ACGKGMGLAA	ARWPRLGPLR	LIALGFLLVV	LLDIAEPLVS	FAGVSVWTRA
保守残基	-C-k-mg---	aRwP--rpwr	Lv-l-F1--v	-ldlsePl-S	faGvSVwARA
	201				250
除虫链霉菌	LPEVTLWSGE	WYQFPVYQAV	GSGLVCCMLG	SLRFFRDERD	ESWVERGAWR
产灰色链霉菌	LPTVTLWRGA	WYRAR-----	-----	-----	-----
吸水链霉菌	VPELTIWSGH	WYQFPYQMV	ASALFGASLG	AARHFRNRRG	ETCLES GAAL
保守残基	lPevTlWsG-	WYqfp-yq-v	-s-l----lg	--r-fr--r-	e----e-ga--
	251				300
除虫链霉菌	LPQRAANWAR	FLAVVGGVNA	VMFLYT...C	FHILLSLVGG	QPPDQLPDSF
产灰色链霉菌	-----	-----	-----	-----	-----
吸水链霉菌	LPEGPRPWVR	LLAVVGGANI	SIALYTGAGH	AHILFSLMDG	APPDRLPEFF
保守残基	lp-----w-r	-lavvvgg-n-	---lyt----	-hil-sl--g	-ppd-lp--f
	301				
除虫链霉菌	QAPAAY*				
产灰色链霉菌	-----				
吸水链霉菌	RPAAGY*				
保守残基	---a-y				

图 6

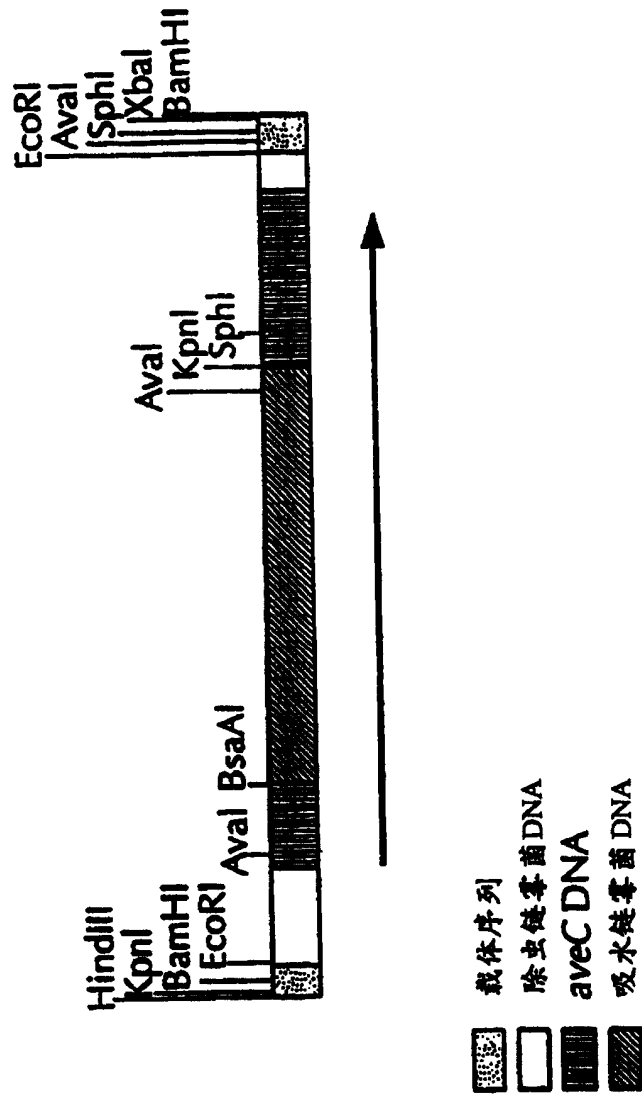


图 7