



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1978650 B

(45) 授权公告日 2010. 11. 17

(21) 申请号 200510126156. 5

(22) 申请日 2005. 11. 30

(73) 专利权人 华北制药集团新药研究开发有限责任公司

地址 050000 河北省石家庄市和平东路 388 号

(72) 发明人 王富强 刘静 戴梦 任志红
韦春玲 张佳 赵颖 代明伟
贾茜 贺建功

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006

代理人 黄韧敏

(51) Int. Cl.

C12N 15/52 (2006. 01)

C12N 9/00 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

(56) 对比文件

王富强等. 产黄青霉转化载体 pPIPKA 的构建及青霉素工业生产菌株的转化研究. 菌物学报 23 1. 2004, 23(1), 第 66-72 页.

任志红等. 产黄青霉工业生产菌种基因报告

系统的构建及启动子效率的评价. 菌物学报 24 3. 2005, 24(3), 第 376-384 页.

Minambres B 等. Molecular Cloning and Expression in Different Microbes of the DNA Encoding Pseudomonas putida U Phenylacetyl-CoA Ligase. J Biol Chem 271 52. 1996, 271(52), 第 33531-33538 页.

审查员 朱宁

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

新的产黄青霉苯乙酰辅酶 A 连接酶基因及提高青霉素产量的方法

(57) 摘要

本发明涉及分离的来自产黄青霉的新的苯乙酰辅酶 A 连接酶基因 (pc1B)、其氨基酸序列和表达载体, 并证明了该基因的表达受苯乙酸的诱导, 进而构建了含有本发明新基因的表达载体和产黄青霉工程菌菌株, 该转基因菌株的青霉素产量明显提高, 本发明对于青霉素的生产具有重要意义。

1. 一种分离的多核苷酸, 其为 SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列或 SEQ IDNO :1 的第 59 位~ 1744 位核苷酸所示的序列。
2. 一种分离的多核苷酸, 其为与 SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列或 SEQID NO :1 的第 59 位~ 1744 位核苷酸所示的序列完全互补的核苷酸序列。
3. 由权利要求 1 所述的多核苷酸编码的多肽。
4. 权利要求 3 所述的多肽, 其具有 SEQ ID NO. 2 所示的序列, 编码的蛋白具有苯乙酰辅酶 A 连接酶活性。
5. 含有权利要求 1 所述的多核苷酸的表达载体。
6. 权利要求 5 所述的表达载体, 其中所述的表达载体为原核表达载体。
7. 含有权利要求 5 所述的表达载体的宿主细胞。
8. 一种产黄青霉工程菌菌株, 含有权利要求 1 所述的多核苷酸。
9. 一种提高产黄青霉青霉素产量的方法, 包括下述步骤:
 - 1) 将权利要求 1 所述的多核苷酸可操作地连接于表达载体;
 - 2) 以所述表达载体转化产黄青霉菌获得含有权利要求 1 所述多核苷酸的工程菌菌株;
 - 3) 发酵培养所述工程菌菌株, 分离纯化获得青霉素。

新的产黄青霉苯乙酰辅酶 A 连接酶基因及提高青霉素产量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及新的分离的核苷酸序列,具体地说涉及来自产黄青霉的新的苯乙酰辅酶 A 连接酶基因 (pclB)。

[0002] 本发明还涉及该基因编码的氨基酸序列。

[0003] 本发明还涉及含有该基因的表达载体。

[0004] 本发明还涉及一种提高产黄青霉的青霉素产量的方法。

背景技术

[0005] 以青霉素和头孢菌素为代表的 β -内酰胺类抗生素作为最重要的抗菌药物,占据了世界抗感染药物市场的 2/3,是目前已知的抗生素中毒性最低,品种最多,临床应用最广的一类抗生素。

[0006] 青霉素由丝状真菌产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 生产,由于广大的市场需求,人们对青霉素生产菌的改良投入了巨大的精力。基于传统的诱变筛选技术,现在的工业生产菌株的生产水平达到了相当高的水平。而分子生物学技术的发展为我们揭示 β -内酰胺类抗生素的生物合成机制提供了帮助。

[0007] 研究表明,青霉素的生物合成步骤由三个前体氨基酸, α -氨基己二酸、半胱氨酸、缬氨酸开始,经三肽合成酶 (ACVS) 催化缩合成 LLD-ACV 三肽,在异青霉素 N 合成酶作用下环化形成异青霉素 N,最终在乙酰辅酶 A:6-氨基青霉烷酸酰基转移酶 (AAT) 催化下侧链交换得到青霉素。其中前 2 步反应在细胞质中完成,最后一步侧链交换是在微体中完成的,催化该步反应的 AAT 具有保守的微体定位信号序列 ARL (Muller et al. EMBO J 10:489-495, 1991),为其功能所必需,生物合成相关的三个关键酶的编码基因都已克隆 (Ingolia & Queener, Med. Res. Rev. 9:245-264, 1989; Aharonowitz, et al., Ann. Rev. Microbiol. 46:461-495, 1992)。

[0008] 在青霉素的工业生产中,苯乙酸 (Phenylacetic acid, PA) 被用来作为青霉素 G 的侧链前体。在发酵过程中,苯乙酸首先被活化为辅酶 A 硫脂,再在 AAT 作用下经转酰基作用,替代异青霉素 N 的 L- α -氨基己二酰侧链,形成青霉素 G。由于 AAT 具有较宽的底物范围,因此在发酵过程中添加苯乙酸可以促进青霉素 G 的生物合成。作为青霉素 G 的侧链前体,其利用效率很大程度上取决于它的毒性以及青霉菌对其的氧化能力。苯乙酸在生产成本中占有相当的比重,提高苯乙酸的利用效率是青霉素菌种改良过程中非常重要的内容。

[0009] 苯乙酸的活化由苯乙酰辅酶 A 连接酶完成。国际专利 W097/02349 公开了一个产黄青霉的苯乙酰连接酶及其编码序列 pclA。该酶由 578 个氨基酸组成,分子量约 63kDa。其最后 3 个氨基酸为 S-K-I,是保守的微体定位信号序列,为蛋白定位于微体所必需。这说明该连接酶要定位在微体起作用。这与青霉素生物合成的最后一步侧链交换是在微体中完成的研究结果一致。

[0010] 另外,Minambres 等从假单胞菌 (*Pseudomonas putida* U) 中克隆了一个苯乙

酰辅酶 A 连接酶基因 *pcl*, 将其与三肽合成酶基因 *pcbAB* 的启动子融合转化产黄青霉 Wis54-1255, 使青霉素产量提高了 1.8 ~ 2.2 倍。

发明内容

[0011] 本发明的一个目的在于提供新的产黄青霉苯乙酰辅酶 A 连接酶基因, 定名为 *pclB*。

[0012] 本发明的另一个目的在于提供上述基因编码的氨基酸序列。

[0013] 本发明的再一个目的在于提供含有上述基因序列的表达载体。

[0014] 本发明的又一个目的在于提供新的产黄青霉工程菌株和提高青霉素产量的方法。

[0015] 根据本发明的一方面, 新的产黄青霉苯乙酰辅酶 A 连接酶基因 *pclB* 是从产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 中鉴别、克隆的, 该基因的表达明显受到苯乙酸的诱导, 其编码的蛋白质由 562 个氨基酸组成, 推测的分子量为 62.6kDa, 最后 3 个氨基酸为微体定位信号序列 A-K-L, 表明该酶同样定位于微体中。Pc1B 与 Pc1A 氨基酸序列的一致性为 35%。在 187 ~ 198 位是保守的 AMP 结合域 -LVYSSGTTGvPK- (PROSITE database entry PS00455 [LIVMFY]-{E}-{VES}-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-x-[PASLIVM]-[KR]), 其开放阅读框架 (Open Reading Frame, ORF) 为自 5' 端的第 59 到第 1744 位碱基, 长度为 1686bp。具体地说本发明提供了含有 SEQ ID NO. 1 所示序列的分离的多核苷酸。

[0016] 上述涉及的多核苷酸还包括取代、缺失、和插入变体以及等位变体、剪接变体、片段、衍生物等, 其中可以通过取代、缺失、插入或衍生一个或多个核苷酸。优选的这些多核苷酸是那些编码具有生物学活性的苯乙酰辅酶 A 连接酶的多核苷酸。

[0017] 在本发明的优选实施方案中, 分离的多核苷酸包括苯乙酰辅酶 A 连接酶基因的全部编码序列。在特别优选的实施方案中, 多核苷酸包括如 SEQ ID NO: 1 的第 59 位 ~ 1744 位核苷酸所示的序列。这种分离的多核苷酸包含 1686 个核苷酸的苯乙酰辅酶 A 连接酶的开放阅读框架, 并且编码 562 个氨基酸的多肽, 如上所述。

[0018] 本领域技术人员可以理解的是, 上述的分离的多核苷酸也包括那些与 SEQ ID NO. 1 所示序列或 SEQ ID NO: 1 的第 59 位 ~ 1744 位核苷酸所示的序列具有较高同源性的序列, 例如同源性大于 90%、甚至 95%、甚至 98% 的序列; 还包括那些在严谨条件下可与 SEQ ID NO. 1 所示序列或 SEQ ID NO: 1 的第 59 位 ~ 1744 位核苷酸所示的序列杂交的序列。

[0019] 根据本发明的另一方面, 提供新的多肽序列, 其含有上述核苷酸序列所编码的氨基酸序列, 即含有 SEQ ID NO. 2 所示的序列, 表达的苯乙酰辅酶 A 连接酶的推测分子量为 62.6kDa, 最后 3 个氨基酸为微体定位信号序列 A-K-L, 表明该酶同样定位于微体中。Pc1B 与 Pc1A 氨基酸序列的一致性为 35%。在 187-198 位是保守的 AMP 结合域 -LVYSSGTTGvPK- (PROSITE database entry PS00455 [LIVMFY]-{E}-{VES}-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-x-[PASLIVM]-[KR])。

[0020] 同样地, 本领域技术人员可以理解的是, 上述的多肽序列也包括取代、缺失及插入变体, 以及其等位突变体、拼接变体、片段、衍生物或同系物。优选的多肽或多肽片段包括那些具有苯乙酰辅酶 A 连接酶生物活性的多肽及片段。取代、缺失及插入变体是指与 SEQ ID NO: 2 中所示的氨基酸序列相比, 所述氨基酸序列中包含一处或多处氨基酸序列的取代、缺失和 / 或添加。

[0021] 根据本发明的另一方面,本发明亦提供包括一种或多种上述多核苷酸的重组载体,以及包含上述多核苷酸的载体的基因工程宿主细胞。在优选的实施方案中,这种重组载体包括上述的多核苷酸,它编码含 SEQ ID NO:2 的多肽,其含 SEQ ID NO:1 的序列所示的多核苷酸,或含 SEQ ID NO:1 序列中 59 ~ 1744 的多核苷酸。在本发明的一个具体实施方案中,构建了含本发明多核苷酸的原核表达载体。

[0022] 本发明也涉及到包括任何一种上述重组载体的宿主细胞。在已经构建载体之后,可以插入全部或部分载体至适合的宿主细胞,以便扩增和 / 或多肽表达。宿主细胞可以是原核生物宿主细胞 (例如 E. coli) 或者真核生物宿主细胞 (例如丝状真菌细胞、酵母细胞,昆虫细胞,或脊椎动物细胞)。

[0023] 根据本发明的又一方面,提供了用基因工程手段构建的新的产黄青霉工程菌菌株,使用含有本发明多核苷酸的产黄青霉转化载体转化产黄青霉,筛选阳性菌株后获得本发明的产黄青霉工程菌菌株,与原始菌株相比,转基因菌株的青霉素产量明显提高,最高提高幅度超过了 23%。

[0024] 因此,本发明也提供了提高产黄青霉青霉素产量的方法,即构建含有本发明多核苷酸的产黄青霉工程菌,将构建的工程菌株发酵培养获得青霉素。

[0025] 本发明从产黄青霉中成功地分离获得了编码新的产黄青霉苯乙酰辅酶 A 连接酶的基因,并证明了该基因的表达受苯乙酸的诱导,进而构建了含有本发明新基因的表达载体和产黄青霉工程菌菌株,该转基因菌株的青霉素产量明显提高,本发明对于青霉素的生产具有重要意义。

[0026] 附图的简要说明

[0027] 图 1 为 pc1A 基因与 pc1B 基因序列比较图;

[0028] 图 2 为苯乙酸诱导的 pc1A 基因和 pc1B 基因的表达对照图,

[0029] 其中 54-PAA 为不添加苯乙酸 Wis54-1255 菌株 RNA 样品,54+PAA 为添加苯乙酸 Wis54-1255 菌株 RNA 样品;

[0030] 图 3 为重组 pc1B 蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析图,

[0031] 其中:泳道 1 为蛋白分子量标准,2 为含空载体的对照菌,3-10 分别为诱导 0 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时的菌体。

[0032] 发明的具体实施方式

[0033] 下面结合附图,通过对本发明较佳实施例的描述,详细说明本发明。

[0034] 在下面使用的试剂材料如无特别说明,均为市售购买。

[0035] **【实施例 1】pc1B 基因克隆**

[0036] 将产黄青霉菌 Wis54-1255(ATCC28089) 在 YPD(1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖)培养基中培养 24h,过滤收菌丝,取 0.1g 湿菌丝液 N_2 研磨,加 1ml Trizol 试剂 (Invitrogen 公司,15596-026) 抽提产黄青霉总 RNA,将所得产黄青霉总 RNA 溶解于 DEPC 水中, -70°C 下保存备用。

[0037] 为去除可能的 DNA 污染,取产黄青霉总 RNA $5\mu\text{g}$,在 $100\mu\text{l}$ 反应体系内,加入 $5\mu\text{l}$ RQ1 RNase-Free DNase(Promega 公司, M6101), $10\mu\text{l}$ RQ1 RNase-Free DNase 反应缓冲液 ($10\times$), 37°C 保温 30 分,用酚:氯仿抽提,乙醇沉淀,溶于 $10\mu\text{l}$ DEPC 水。取 $5\mu\text{l}$ 去除 DNA 的 RNA 样品,用随机引物 (RandomHexamers, Promega 公司, C1181) 进行反转录,得到 cDNA,

所用反转录酶为 SuperScript™ II RNase H⁻ (Invitrogen 公司, 18064-022)。

[0038] 以 T220-1: 5'-TCCCTTTGAGCCTCTATTACATTC-3' 和 T220-2: 5'-TATCAATATCAACATGGACAGGTC-3' 为引物, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 条件为: 94℃, 5 分; 94℃ 1 分, 60℃ 1 分, 72℃ 2 分 -40 循环; 72℃ 7 分; 4℃ 保存。将 RT-PCR 产物按常规方法克隆测序, 测序结果表明 RT-PCR 产物具有序列中 SEQ ID NO. 1 的核苷酸序列, 长度为 1808bp。通过序列分析和 GenBank 数据库检索, 表明该序列的开放阅读框架 (OpenReading Frame, ORF) 为自 5' 端的第 59 到第 1744 位碱基, 长度为 1686bp。在 ORF 起始密码子 ATG 前 18bp 处, 同相位有终止密码子 TAG, 由此说明我们得到了该基因的全长序列, 定名为 pc1B。

[0039] 该基因 ORF 片段的读码框编码 562 个氨基酸, 推测分子量为 62.6kDa, 如序列表中 SEQ ID NO. 2 所示。最后 3 个氨基酸为微体定位信号序列 A-K-L, 表明该酶同样定位于微体中。Pc1B 与 Pc1A 氨基酸序列的一致性为 35%。在 187-198 位是保守的 AMP 结合域 -LVYSSGTTGvPK- (PROSITE database entry PS00455 [LIVMFY]-{E}-{VES}-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-x-[PASLIVM]-[KR])

[0040] 同时以提取的 Wis54-1255 菌株的基因组 DNA 为模版进行 PCR 扩增, 引物及反应条件同上, 得到 1954bp 的扩增产物, 将其与 RT-PCR 产物序列比较, 确认 pc1B 基因有 2 个内含子, 长度分别为 92bp、54bp。比较结果见图 1。

[0041] 【实施例 2】pc1B 基因的表达受苯乙酸的诱导

[0042] 将产黄青霉菌 Wis54-1255 (ATCC28089) 按 2×10^6 分生孢子 /ml 接种到种子培养基, 在 26℃ 下培养 24 小时, 种子培养基配方为 (g/l): 葡萄糖, 30; 乳糖, 10; 棉籽饼粉, 10; 酵母粉, 10; 玉米浆, 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2; KH_2PO_4 , 1; CaCO_3 , 5; pH5.8。然后将种子培养物以 5% 接种量接种到发酵培养基, 26℃ 下培养。发酵培养基为 (g/l): 乳糖, 120; 棉籽饼粉, 30; 玉米浆, 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5; KH_2PO_4 , 1; K_2SO_4 , 5; CaCO_3 , 10; pH6.5。

[0043] 实验分为 2 组, 一组每天正常补加苯乙酸前体, 另一组为对照, 不加苯乙酸, 72 小时后收取菌体提取总 RNA, 提取及处理方法见实施例 1。

[0044] 用 SYBR Green 试剂作实时定量 PCR 检测 pc1B 基因的表达, 仪器为 ABI PRISM 7000 定量 PCR 仪。根据 pc1B 基因的 cDNA 序列, 利用 Primer Express 软件设计定量 PCR 引物, TS220: 5'-GATGCTATTGATGATGTTGCTGTC-3' TA220: 5'-TGCTTCAGAATCCGACGTAGG-3'。以产黄青霉 γ -actin 基因 (AF056975) 为内标, act1: 5'-CTCGCTGAGCGTGGTTACAC-3', act2: 5'-TTGATGTCACGGACGATTTCA-3'。同时做 pc1A 的定量 PCR 对照, AS013: CTGCCGATTTCTCAAACTCTAC, AA013: CTCCGTGCCTCTTCTCTTG。引物由上海生工合成。定量 PCR 试剂为 SYBR® Premix Ex Tag™ 试剂盒 (宝生物工程 (大连) 有限公司)。反应条件为: 95℃, 1 分钟; 95℃, 15 秒, 60℃, 1 分钟, 40 循环。对定量 PCR 的结果 C_T 值进行换算, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法 (Livak K. J. and T. D. Schmittgen Methods 25: 402-408, 2001)。结果, 苯乙酸能显著诱导 pc1B 基因的表达, 以不添加苯乙酸的表达量为 1, 则添加苯乙酸时 pc1B 的表达提高了 4 倍。而 pc1A 提高的幅度将近 8 倍。结果见图 2。

[0045] 【实施例 3】pc1B 基因的原核表达

[0046] 原核表达载体 pET-39b(+) 购自 Novagen 公司。

[0047] 以产黄青霉 Wis54-1255cDNA 为模版, 引物 T220a

[0048] 5'-CATATGCCCCGTATCCTCTA ACTACC-3' /T220b5'-CTCGAGCAGCTTGGCTTTTGGTGCC-3', 扩增出 pc1B 的编码序列, 两端引入限制性内切酶位点 Nde I, Xho I, 连接到用同样酶切的载体 pET-39b(+), 得到质粒 pET39/pc1B。

[0049] 将构建好的质粒 pET39/pc1B 转化表达宿主菌 BL21 (DE3)-RP (Stratgene 公司), 挑取阳性克隆至 LB 培养基 (酵母粉蛋白胨 NaCl) 37℃ 培养至 OD₆₀₀0.6, 加入 0.5mmol/L IPTG 诱导外源基因表达, 37℃ 200rpm 继续培养, 收集菌体, SDS-PAGE 分析。

[0050] 称取菌体 0.4g 用 16ml Buffer A (50mmol/L Tris-HCl pH7.5, 0.5mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, 5% 甘油) 重悬, 超声破碎, 10,000g 4℃ 10min 离心, 分别取上清和沉淀, SDS-PAGE 电泳分析, 结果见图 3。结果表明重组表达的 Pc1B 绝大多数为包涵体的形式存在。

[0051] 【实施例 4】通过增加产黄青霉中 pc1B 的基因表达提高青霉素的产量

[0052] 根据文献 (Carr et al., 1986, Gene 48:257 ~ 266), 设计两对合成引物 Pip1:5' TCGCGGATCCTGTCCCTAGTGCTGGGCTTGA AGTATG3' /Pip2:5' TGGAAGCATATGTGTCTAGAAAAAT AATGGTGAAAACT3', 和 Tip1:5' ATGGTACCAAGGGCCCATGGATGGGACCGGGGAT3' /Tip3:5' TAA GCTTGAGAGCTCGTGCCGAATCTGCTTGGC3'

[0053] 以产黄青霉 Wis54-1255 (ATCC28089) 菌株基因组 DNA 为模板, 分别克隆了异青霉素 N 合成酶基因 1.16kb 的启动子序列 Pipns (两端分别引入 BamHI 和 NdeI 酶切位点), 及 640bp 的终止子序列 Tipns (两端分别引入 Kpn I 和 Hind III 酶切位点)。

[0054] 以 T220-a:5'-CATATGCCCCGTATCCTCTA ACTACC-3' /T220-c:5'-GGTACCCAGCTTGGCTTTTGGTGCC-3' 重新扩增出 pc1B 的编码序列, 两端酶切位点为 Nde I /Kpn I。将此三段序列连接, 得到可在产黄青霉中表达的 pc1B 基因的表达盒 ibt。

[0055] 转化载体的制备采用申请号为 200410012139.4 的中国发明专利所描述的方法制备, 主要步骤如下: 将产黄青霉菌 ATCC10003 (X-1612) 培养在 YPD (1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖) 培养基中培养 24h, 菌丝过滤后, 加液 N₂ 磨碎, 用 Easy-DNA kit (Invitrogen 公司, K1800-01) 提取得到产黄青霉菌基因组 DNA。

[0056] 根据文献 (Carr et al., 1986, Gene 48:257 ~ 266), 以 pip1:5'-TCGCGGATCCTGTCCCTAGTGCTGGGCTTGAAGTATG-3' pip2:5'-TGGAAGCCATGGTGTCTAGAAAAATAATGGTGAAAACT-3' 为引物, 以产黄青霉 ATCC10003 (x-1612) 菌株基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 条件为: 94℃, 3 分; 94℃ 1 分, 60℃ 1 分, 72℃ 1.5 分 -40 循环; 72℃ 7 分; 4℃ 保存。将 PCR 产物采用常规方法克隆测序, 结果表明克隆产物长度为 1168bp, 和文献报道基本一致, 只在 589 位由 G 变为 A, 证明得到了 Pipns 序列。在克隆得到 1.16kb 的 Pipns 序列 5' 和 3' 端分别引入 BamH I 和 NcoI 酶切位点, 然后用 DNA 连接酶与 pGEM-T 载体在 16℃ 温度下连接 12 小时, 得到质粒 pGEM-T/Pipns。

[0057] 酵母表达载体 pPICZA 和原核生物基因克隆载体 pCR4Blunt-TOPO 均购自 Invitrogen 公司。

[0058] 利用引物:

[0059] pk15'-TGAAGCTTGTCAGCTACTGGGCTATCAGGAC-3'

[0060] pk25'-ACA GATCTAAAGTGCCACCTGTATGCGGTGTG-3', 以 pCR4Blunt-TOPO 质粒为模板, PCR 扩增得到卡那霉素的抗性基因 (kan^r), 并在其 5' 端和 3' 端分别引入 Hind III、Bgl II 酶切位点。

[0061] pPICZA 质粒用 Hind III/BglIII 双酶切后回收 2.46kb 片段,与经过同样酶切的 kan^r 片段在 16℃温度下连接 12 小时,然后采用 CaCl₂ 转化法转化大肠杆菌 DH5 α,在 LB 培养基中筛选同时具有卡那霉素和腐草霉素抗性的阳性克隆,从中提取得到 pPICZA/kan 质粒。

[0062] pPICZA/kan 质粒经 BamH I/Nco I 部分消化,回收 3.1kb 片段。pGEM-T/Pipns 同样用 BamH I/Nco I 酶切,回收 1.16kb 小片段。将两片段在 16℃温度下连接 12 小时,得到产黄青霉的转化载体,定名为 pPIPKA。

[0063] 将产黄青霉转化载体 pPIPKA 用 Hind III 和 BamH I 酶切后,回收大片段,与 ibt 表达盒连接得到载体 pPCLB。按上述方法将 pPCLB 转化菌株 Wis54-1255,筛选阳性克隆用于青霉素产量检测。检测按照标准方法 (Brownlee et al, J GenMicrobiol,1949) 进行。对筛选到的高单位菌株利用摇瓶发酵进行复试,方法参照 Lein (Overproduction of microbial metabolites, Z. Vanek and Z Hostalekeds, pp105-139)。通过 89 株菌的试验结果,与出发菌株相比,转基因菌株的青霉素产量明显提高,最高提高幅度超过了 23%。

[0064] 以上对本发明的详细描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明做出各种改变和变形,只要未脱离本发明的精神,均应属于本发明权利要求所定义的范围。

[0065] SEQUENCE LISTING

[0066] <110> 华北制药集团新药研究开发有限责任公司

[0067] <120> 新的产黄青霉苯乙酰辅酶 A 连接酶基因及提高青霉素产量的方法

[0068] <130>05P101404

[0069] <160>2

[0070] <170>PatentIn version 3.1

[0071] <210>1

[0072] <211>1808

[0073] <212>DNA

[0074] <213> 产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)

[0075] <220>

[0076] <221>CDS

[0077] <222>(59).. (1744)

[0078] <223> 开放阅读框架

[0079] <400>1

[0080] tccctttgag cctctattca catttcgatt accggtcca tagctttgtt tcgccgca 58

[0081] atg ccc gta tcc tct aac tac ccc ctg gtc gac atc cca gaa gtg gat 106

[0082] Met Pro Val Ser Ser Asn Tyr Pro Leu Val Asp Ile Pro Glu Val Asp

[0083] 1 5 10 15

[0084] ctt tgg acc ttt cta ttt gag cgc aag gac aga gct tac cca gat gac 154

[0085] Leu Trp Thr Phe Leu Phe Glu Arg Lys Asp Arg Ala Tyr Pro Asp Asp

[0086] 20 25 30

[0087] aag att atc tac caa gat gcc gat acc caa cgt cat tac aca tac aaa 202

[0088] Lys Ile Ile Tyr Gln Asp Ala Asp Thr Gln Arg His Tyr Thr Tyr Lys

[0089]	35	40	45	
[0090]	tcg cta cgt gat gcc tcg cta gat ttc ggc aag ggc ctc aaa gcc ctg			250
[0091]	Ser Leu Arg Asp Ala Ser Leu Asp Phe Gly Lys Gly Leu Lys Ala Leu			
[0092]	50	55	60	
[0093]	tat gag tgg cgc aag ggc gat gta ctg gcc ctc ttc acg cca aac agc			298
[0094]	Tyr Glu Trp Arg Lys Gly Asp Val Leu Ala Leu Phe Thr Pro Asn Ser			
[0095]	65	70	75	80
[0096]	atc gat aca ccc gtg gtg atg tgg ggc aca ctt tgg gcc ggc gga acc			346
[0097]	Ile Asp Thr Pro Val Val Met Trp Gly Thr Leu Trp Ala Gly Gly Thr			
[0098]	85	90	95	
[0099]	atc tcg cct gca aac ccg ggt tac acg gtt gac gag ctg gcc ttc cag			394
[0100]	Ile Ser Pro Ala Asn Pro Gly Tyr Thr Val Asp Glu Leu Ala Phe Gln			
[0101]	100	105	110	
[0102]	ctc aag aac tcc cat gcc aag ggc ctt gta acg caa gcc tcg gtg ctg			442
[0103]	Leu Lys Asn Ser His Ala Lys Gly Leu Val Thr Gln Ala Ser Val Leu			
[0104]	115	120	125	
[0105]	ccc gtt gcg cgg gaa gcg gcg aag aaa gtt ggc atg cct gaa gac cgc			490
[0106]	Pro Val Ala Arg Glu Ala Ala Lys Lys Val Gly Met Pro Glu Asp Arg			
[0107]	130	135	140	
[0108]	att atc ctg att ggg gac cag cgt gat ccc gat gcg cgc gtc aag cat			538
[0109]	Ile Ile Leu Ile Gly Asp Gln Arg Asp Pro Asp Ala Arg Val Lys His			
[0110]	145	150	155	160
[0111]	ttc acc tct gtg cgc aat atc tct ggt gct acc cgc tac cgc aag cag			586
[0112]	Phe Thr Ser Val Arg Asn Ile Ser Gly Ala Thr Arg Tyr Arg Lys Gln			
[0113]	165	170	175	
[0114]	aag atc act cct gcg aag gat gtg gct ttt ttg gtt tat tct tct ggg			634
[0115]	Lys Ile Thr Pro Ala Lys Asp Val Ala Phe Leu Val Tyr Ser Ser Gly			
[0116]	180	185	190	
[0117]	acc acg ggt gtg cct aag ggt gtc atg ata tcg cat cgg aac atc gtt			682
[0118]	Thr Thr Gly Val Pro Lys Gly Val Met Ile Ser His Arg Asn Ile Val			
[0119]	195	200	205	
[0120]	gcc aat atc agg cag cag ttc att gct gag ggt gaa atg tta agc tgg			730
[0121]	Ala Asn Ile Arg Gln Gln Phe Ile Ala Glu Gly Glu Met Leu Ser Trp			
[0122]	210	215	220	
[0123]	aat ggt ggt cct gat gga aag ggt gat cgg gtc ctg gca ttt ttg ccg			778
[0124]	Asn Gly Gly Pro Asp Gly Lys Gly Asp Arg Val Leu Ala Phe Leu Pro			
[0125]	225	230	235	240
[0126]	ttc tat cat atc tat gga ttg act tgc tta att acc cag gct tta tac			826
[0127]	Phe Tyr His Ile Tyr Gly Leu Thr Cys Leu Ile Thr Gln Ala Leu Tyr			

[0128]	245	250	255	
[0129]	aag ggt tat cac ttg att gtc atg tcc aaa ttc gac att gaa aag tgg			874
[0130]	Lys Gly Tyr His Leu Ile Val Met Ser Lys Phe Asp Ile Glu Lys Trp			
[0131]	260	265	270	
[0132]	tgc gcc cac gtg cag aac tat cgc tgc tcg ttt agt tat atc gtc cct			922
[0133]	Cys Ala His Val Gln Asn Tyr Arg Cys Ser Phe Ser Tyr Ile Val Pro			
[0134]	275	280	285	
[0135]	ccc gtg gtg cta ttg tta ggc aag cac ccg gtg gtc gac aaa tat gac			970
[0136]	Pro Val Val Leu Leu Leu Gly Lys His Pro Val Val Asp Lys Tyr Asp			
[0137]	290	295	300	
[0138]	ctt tca agt ctg cgc atg atg aac tca ggc gct gca cca ctc act caa			1018
[0139]	Leu Ser Ser Leu Arg Met Met Asn Ser Gly Ala Ala Pro Leu Thr Gln			
[0140]	305	310	315	320
[0141]	gag ctg gta gaa gca gtc tac tcc cgc atc aag gtt ggc att aag cag			1066
[0142]	Glu Leu Val Glu Ala Val Tyr Ser Arg Ile Lys Val Gly Ile Lys Gln			
[0143]	325	330	335	
[0144]	ggc tac gga ctc agc gag acc agc ccg act aca cac tcc caa cgg tgg			1114
[0145]	Gly Tyr Gly Leu Ser Glu Thr Ser Pro Thr Thr His Ser Gln Arg Trp			
[0146]	340	345	350	
[0147]	gag gac tgg cgc gaa gcc atg ggt tcc gtc ggc cgc ttg atg cct aat			1162
[0148]	Glu Asp Trp Arg Glu Ala Met Gly Ser Val Gly Arg Leu Met Pro Asn			
[0149]	355	360	365	
[0150]	atg caa gcc aag tac atg act atg cct gag gat ggg tcc gag cct aag			1210
[0151]	Met Gln Ala Lys Tyr Met Thr Met Pro Glu Asp Gly Ser Glu Pro Lys			
[0152]	370	375	380	
[0153]	gag gtt ggc gag ggc gag gtt ggc gaa ttg tac ctg aaa gga cct aac			1258
[0154]	Glu Val Gly Glu Gly Glu Val Gly Glu Leu Tyr Leu Lys Gly Pro Asn			
[0155]	385	390	395	400
[0156]	gtt ttc ctg ggc tat cac gag aac cca gag gct acc aag ggc tgc ctg			1306
[0157]	Val Phe Leu Gly Tyr His Glu Asn Pro Glu Ala Thr Lys Gly Cys Leu			
[0158]	405	410	415	
[0159]	tct gag gat ggg tgg ttc cag act ggt gac gtt gga tac cag gac gcc			1354
[0160]	Ser Glu Asp Gly Trp Phe Gln Thr Gly Asp Val Gly Tyr Gln Asp Ala			
[0161]	420	425	430	
[0162]	aag ggt aat ttc tac att acc gat cgt gtc aag gaa ctt atc aag tat			1402
[0163]	Lys Gly Asn Phe Tyr Ile Thr Asp Arg Val Lys Glu Leu Ile Lys Tyr			
[0164]	435	440	445	
[0165]	aag ggc ttc cag gtg cct cct gct gag ttg gaa ggg tat ctg gtt gac			1450
[0166]	Lys Gly Phe Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Gly Tyr Leu Val Asp			

[0167]	450	455	460	
[0168]	aac gat gct att gat gat gtt gct gtc att ggt att gag agt gag aca			1498
[0169]	Ash Asp Ala Ile Asp Asp Val Ala Val Ile Gly Ile Glu Ser Glu Thr			
[0170]	465	470	475	480
[0171]	cac ggt tcc gag gtt cct atg gct tgt gtg gtt cgc agc gcg aag agc			1546
[0172]	His Gly Ser Glu Val Pro Met Ala Cys Val Val Arg Ser Ala Lys Ser			
[0173]		485	490	495
[0174]	aag tct tcc gga aca agc gag aag gat gaa gca gca agg att atc aaa			1594
[0175]	Lys Ser Ser Gly Thr Ser Glu Lys Asp Glu Ala Ala Arg Ile Ile Lys			
[0176]		500	505	510
[0177]	tgg ctg gat agc aag gtc gca agc cac aag cgt ctg cgc ggt ggc gtc			1642
[0178]	Trp Leu Asp Ser Lys Val Ala Ser His Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val			
[0179]		515	520	525
[0180]	cac ttt gtg gat gag atc ccc aag aat ccc agt ggg aag atc cta cgt			1690
[0181]	His Phe Val Asp Glu Ile Pro Lys Asn Pro Ser Gly Lys Ile Leu Arg			
[0182]		530	535	540
[0183]	cgg att ctg aag cag aag ttc aag ggg gcg gcc gag gca cca aaa gcc			1738
[0184]	Arg Ile Leu Lys Gln Lys Phe Lys Gly Ala Ala Glu Ala Pro Lys Ala			
[0185]	545	550	555	560
[0186]	aag ctg taaatgagaa cttttagata tgcacgctat atacacttaa gacctgtcca			1794
[0187]	Lys Leu			
[0188]	tggtgatatt gata			1808
[0189]	<210>2			
[0190]	<211>562			
[0191]	<212>PRT			
[0192]	<213>产黄青霉 (Penicillium chrysogenum)			
[0193]	<400>2			
[0194]	Met Pro Val Ser Ser Asn Tyr Pro Leu Val Asp Ile Pro Glu Val Asp			
[0195]	1	5	10	15
[0196]	Leu Trp Thr Phe Leu Phe Glu Arg Lys Asp Arg Ala Tyr Pro Asp Asp			
[0197]		20	25	30
[0198]	Lys Ile Ile Tyr Gln Asp Ala Asp Thr Gln Arg His Tyr Thr Tyr Lys			
[0199]		35	40	45
[0200]	Ser Leu Arg Asp Ala Ser Leu Asp Phe Gly Lys Gly Leu Lys Ala Leu			
[0201]		50	55	60
[0202]	Tyr Glu Trp Arg Lys Gly Asp Val Leu Ala Leu Phe Thr Pro Asn Ser			
[0203]	65	70	75	80
[0204]	Ile Asp Thr Pro Val Val Met Trp Gly Thr Leu Trp Ala Gly Gly Thr			
[0205]		85	90	95

[0206]	Ile Ser Pro Ala Asn Pro Gly Tyr Thr Val Asp Glu Leu Ala Phe Gln
[0207]	100 105 110
[0208]	Leu Lys Asn Ser His Ala Lys Gly Leu Val Thr Gln Ala Ser Val Leu
[0209]	115 120 125
[0210]	Pro Val Ala Arg Glu Ala Ala Lys Lys Val Gly Met Pro Glu Asp Arg
[0211]	130 135 140
[0212]	Ile Ile Leu Ile Gly Asp Gln Arg Asp Pro Asp Ala Arg Val Lys His
[0213]	145 150 155 160
[0214]	Phe Thr Ser Val Arg Asn Ile Ser Gly Ala Thr Arg Tyr Arg Lys Gln
[0215]	165 170 175
[0216]	Lys Ile Thr Pro Ala Lys Asp Val Ala Phe Leu Val Tyr Ser Ser Gly
[0217]	180 185 190
[0218]	Thr Thr Gly Val Pro Lys Gly Val Met Ile Ser His Arg Asn Ile Val
[0219]	195 200 205
[0220]	Ala Asn Ile Arg Gln Gln Phe Ile Ala Glu Gly Glu Met Leu Ser Trp
[0221]	210 215 220
[0222]	Asn Gly Gly Pro Asp Gly Lys Gly Asp Arg Val Leu Ala Phe Leu Pro
[0223]	225 230 235 240
[0224]	Phe Tyr His Ile Tyr Gly Leu Thr Cys Leu Ile Thr Gln Ala Leu Tyr
[0225]	245 250 255
[0226]	Lys Gly Tyr His Leu Ile Val Met Ser Lys Phe Asp Ile Glu Lys Trp
[0227]	260 265 270
[0228]	Cys Ala His Val Gln Asn Tyr Arg Cys Ser Phe Ser Tyr Ile Val Pro
[0229]	275 280 285
[0230]	Pro Val Val Leu Leu Leu Gly Lys His Pro Val Val Asp Lys Tyr Asp
[0231]	290 295 300
[0232]	Leu Ser Ser Leu Arg Met Met Asn Ser Gly Ala Ala Pro Leu Thr Gln
[0233]	305 310 315 320
[0234]	Glu Leu Val Glu Ala Val Tyr Ser Arg Ile Lys Val Gly Ile Lys Gln
[0235]	325 330 335
[0236]	Gly Tyr Gly Leu Ser Glu Thr Ser Pro Thr Thr His Ser Gln Arg Trp
[0237]	340 345 350
[0238]	Glu Asp Trp Arg Glu Ala Met Gly Ser Val Gly Arg Leu Met Pro Asn
[0239]	355 360 365
[0240]	Met Gln Ala Lys Tyr Met Thr Met Pro Glu Asp Gly Ser Glu Pro Lys
[0241]	370 375 380
[0242]	Glu Val Gly Glu Gly Glu Val Gly Glu Leu Tyr Leu Lys Gly Pro Asn
[0243]	385 390 395 400
[0244]	Val Phe Leu Gly Tyr His Glu Asn Pro Glu Ala Thr Lys Gly Cys Leu

[0245]		405		410		415
[0246]	Ser Glu Asp Gly Trp Phe Gln Thr Gly Asp Val Gly Tyr Gln Asp Ala					
[0247]		420		425		430
[0248]	Lys Gly Asn Phe Tyr Ile Thr Asp Arg Val Lys Glu Leu Ile Lys Tyr					
[0249]		435		440		445
[0250]	Lys Gly Phe Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Gly Tyr Leu Val Asp					
[0251]		450		455		460
[0252]	Asn Asp Ala Ile Asp Asp Val Ala Val Ile Gly Ile Glu Ser Glu Thr					
[0253]	465		470		475	480
[0254]	His Gly Ser Glu Val Pro Met Ala Cys Val Val Arg Ser Ala Lys Ser					
[0255]		485		490		495
[0256]	Lys Ser Ser Gly Thr Ser Glu Lys Asp Glu Ala Ala Arg Ile Ile Lys					
[0257]		500		505		510
[0258]	Trp Leu Asp Ser Lys Val Ala Ser His Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val					
[0259]		515		520		525
[0260]	His Phe Val Asp Glu Ile Pro Lys Asn Pro Ser Gly Lys Ile Leu Arg					
[0261]		530		535		540
[0262]	Arg Ile Leu Lys Gln Lys Phe Lys Gly Ala Ala Glu Ala Pro Lys Ala					
[0263]	545		550		555	560
[0264]	Lys Leu					

```

PclA  MVFLPPKESGQDPIDNIPISEMLNHYGVHRASSRDPETCGITGKSYSSDEVANRVDLSARLSKEFGAPNEGSE 80
PclB  ---MPVSSNYPVDIPE-VDLWTILF-EKQDA-YPDDKIIHQDADTQRHYTYSLRDASLDFGKGLKALYET---R-KG 70

PclA  WDKTLVVALNTTSLPLFVAVHRLGVLTPLASTSAAEITHILDKAAALVTCVPLSISLAAAGALEKNAIYLL 160
PclB  -D-VLALTPSILTPVVMGTLWAGHTISAPPGTVDLAFQKNHANGLVQASVLPVAREAKVEMBEDK---- 145

PclA  DVPEQLLGVKPAGYKSYSELQAGKSLPPVDELWSAGEGERRTAPVCTSSGTSLEKGVNISHRVIANI-LQIKAF 239
PclB  -I---IIDQRDADA--RQKHF-SVRNIGATRYEKQKITPAKDVALLVSSGTTVEHGVNISHRVIANIROQFIE 218

PclA  EQNYRDGEGTKPASTEVALGLIQSNIAVVGIGHAGATREDQITVLKPELKSYLENAIQNKISALFLVPPITIMLST 319
PclB  GEMLSWNEPDP-GKGDRLAFLEFYHNGTCLITQALYKGYHLTUMSKFDIEKWCAHVQNTKCSFSYIVFVVL-LLEG 296

PclA  QDVCSKPLSSVTSLSFTDAPVGMITAADFLKLYPNILIRQVGTFTCTVVSSTHPHDIN---LSSSALLGVENRIV 396
PclB  HPSVDVYDLSLRLMNSDRAETQLVEAVYSRI-KVGKKGZELSET-SPTTHSQRWEDREAMEGVRRIMNMQAKYM 374

PclA  I-----PENKEITTYDSPGVVRSLSVGLNHEKATAETV-DGMRIGDEAVIRSPRGIEHVFVDDIKELIVV 470
PclB  IMPEDGSLPVGGE-GEVETYLKGENFLGHEHPEATKGCLSEDEGFQED--VGYQDAK--NFYITDEVKELIYV 449

PclA  SLNADAEYAHILAHDPVSCTVIA-PDDRAGGVKIPVKS-----SAGDESVSQALVYVEDHKRHWKKEIR 545
PclB  QFDPDAHLGYLVDNDAIDVAGGESETHGSEVMCVVRSKSKSGTSEKDEAARIILWLDKVAISHRRRQVH 529

PclA  PVALDSSSGHILIRLQDEERRKAGSI 578
PclB  PVEEDNNSDAILKQKFGAEAPKAIL 562

```

图 1

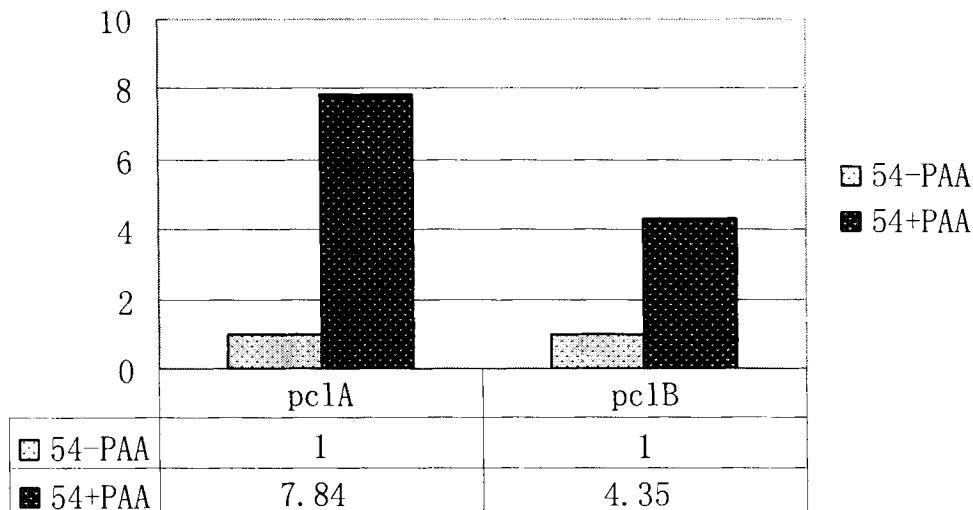


图 2

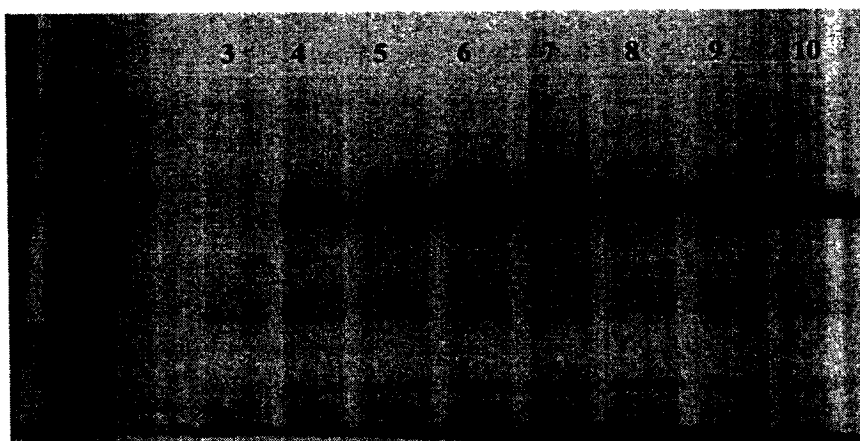


图 3