



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103827297 B

(45)授权公告日 2018.06.22

(21)申请号 201280039057.1

L • 卡卢

(22)申请日 2012.08.10

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103827297 A

代理人 龙淳 顾小曼

(43)申请公布日 2014.05.28

(51)Int.Cl.

C12N 9/00(2006.01)

(30)优先权数据

11177158.0 2011.08.10 EP

(56)对比文件

WO 2008036061 A2, 2008.03.27,
CN 101802180 A, 2010.08.11,
EP 0409300 A2, 1991.01.23,
Marek J. Pecyna et al. Molecular
characterization of aromatic peroxygenase
from Agrocybe aegerita.《Appl Microbiol
Biotechnol》.2009, 第84卷885-897.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.02.10

审查员 刘树柏

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/065768 2012.08.10

权利要求书2页 说明书36页

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/021061 EN 2013.02.14

序列表7页

(73)专利权人 诺维信公司

地址 丹麦, 鲍斯韦

(72)发明人 S • 兰德维克 L • H • 厄斯特高

(54)发明名称

具有过氧化酶活性的多肽及编码该多肽的
多核苷酸

(57)摘要

本发明涉及具有过氧化酶活性的分离的多
肽以及编码多肽的多核苷酸。本发明还涉及包含
多核苷酸的核酸构建体、载体和宿主细胞以及生
产和使用多肽的方法。

1. 一种具有过氧化酶活性的分离的多肽，其选自：
 - (a) 由SEQ ID NO:2组成的多肽；
 - (b) 在一个或多个位置包含替换的SEQ ID NO:2的成熟多肽的变体，其中替换选自Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ser/Asn、Ala/Val、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile和Leu/Val，所述变体来源于特异腐质霉(Humicola insolens)；
 - (c) SEQ ID NO:2的成熟多肽的变体，所述变体与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少99%序列同一性，且所述变体来源于特异腐质霉(Humicola insolens)；以及
 - (d) SEQ ID NO:2的成熟多肽的变体，所述变体由与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列或其cDNA序列具有至少99%序列同一性的多核苷酸所编码，且所述变体来源于特异腐质霉(Humicola insolens)。
2. 根据权利要求1所述的多肽，其包括SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的氨基酸序列。
3. 根据权利要求1或2所述的多肽，其中所述成熟多肽是SEQ ID NO:2的氨基酸1-261。
4. 根据权利要求1或2所述的多肽，其是在一个或多个位置包括替换的SEQ ID NO:2的成熟多肽的变体，其中替换选自Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ser/Asn、Ala/Val、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile和Leu/Val，所述变体来源于特异腐质霉(Humicola insolens)。
5. 一种组合物，其包括根据权利要求1-4中任一项所述的多肽。
6. 一种分离的多核苷酸，其编码根据权利要求1-4中任一项所述的多肽。
7. 一种核酸构建体或表达载体，其包括与一个或多个引导表达宿主中多肽产生的控制序列可操作地连接的根据权利要求6所述的多核苷酸。
8. 一种重组宿主细胞，其包括与一个或多个引导多肽产生的控制序列可操作地连接的根据权利要求6所述的多核苷酸，其中所述细胞是原核细胞或真菌细胞。
9. 一种产生根据权利要求1-4中任一项所述的多肽的方法，包括：
 - (a) 在有益于所述多肽产生的条件下培养细胞，所述细胞在其野生型形式下产生所述多肽；以及
 - (b) 回收所述多肽。
10. 一种产生具有过氧化酶活性的多肽的方法，包括：
 - (a) 在有益于所述多肽产生的条件下培养根据权利要求8所述的宿主细胞；以及
 - (b) 回收所述多肽。
11. 一种产生具有过氧化酶活性的多肽的方法，包括：
 - (a) 在有益于所述多肽产生的条件下培养被编码根据权利要求1-4中任一项所述的多肽的多核苷酸转化的转基因植物或植物细胞；以及
 - (b) 回收所述多肽。
12. 一种洗涤剂组合物，其包括表面活性剂和根据权利要求1-4中任一项所述的多肽。
13. 一种用于在取代或未取代的、直链或支链的脂族烃的任一端的2位或3位进行羟化的方法，所述脂族烃具有至少3个碳且具有连接到2位或3位碳的氢，所述方法包括使所述脂族烃与过氧化氢和根据权利要求1-4中任一项所述的多肽接触。
14. 一种用于在脂质酰基的末端的2位或3位进行羟化的方法，包括使所述脂质与过氧化氢和根据权利要求1-4中任一项所述的多肽接触。

15. 一种用于在取代或未取代的、直链或支链的脂族烃的至少两端的第二个或第三个碳处引入羟基或酮基的方法，所述脂族烃具有至少5个碳且具有至少一个连接到所述第二个或第三个碳的氢，所述方法包括使所述脂族烃与过氧化氢和根据权利要求1-4中任一项所述的多肽接触。

16. 根据权利要求13或15所述的方法，其中所述脂族烃是烷烃。

17. 根据权利要求16所述的方法，其中所述烷烃是戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、十一烷、十二烷、十三烷、十四烷、十五烷或十六烷、或其异构体。

18. 根据权利要求13或15所述的方法，其中所述脂族烃是未取代的。

19. 根据权利要求13或15所述的方法，其中所述脂族烃是直链的。

20. 根据权利要求13或15所述的方法，其中所述脂族烃通过两个羟基的引入被转化为二醇。

21. 根据权利要求13或15所述的方法，其中所述脂族烃是脂肪酸。

22. 一种产生聚氨酯的酶促方法，包括根据权利要求20所述的方法将脂族烃转化为二醇，以及使用所述二醇产生聚氨酯。

具有过氧化酶活性的多肽及编码该多肽的多核苷酸

[0001] 对序列表的引用

[0002] 本申请包含计算机可读形式的序列表，其并入本文以作参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及具有过氧化酶(peroxygenase)活性的多肽和编码该多肽的多核苷酸。本发明还涉及包含该多核苷酸的核酸构建体、载体和宿主细胞以及生产和使用多肽的方法。

背景技术

[0004] WO2008/119780公开了八种不同的来自茶树菇(Agrocybe aegerita)、灰盖鬼伞(Coprinopsis cinerea)、双色蜡蘑(Laccaria bicolor)和辐毛鬼伞(Coprinus radians)的过氧化酶。

[0005] Ullrich等人,Appl.Env.Microbiol.(2004)70(8):4575-4581公开了来自伞菌担子菌菌株茶树菇(菌株TM-A1)的过氧化酶,发现该酶氧化芳基醇类和醛类。

[0006] WO2006/034702公开了使用茶树菇TM A1的AaP过氧化酶对未活化的烃诸如萘、甲苯和环己烷进行酶促羟化的方法。这也描述于Ullrich and Hofrichter,FEBS Letters (2005) 579:6247-6250。

[0007] DE10332065A1公开了通过使用茶树菇TM A1的AaP过氧化酶经由醛类的中间形成从醇类酶法制备酸的方法。

[0008] 报道了迅速且选择性分光光度法直接检测经AaP过氧化酶的芳族羟化的方法(Kluge等人,Appl.Microbiol.Biotechnol.(2007)75:1473-1478)。

[0009] 众所周知,将氧官能团直接区域选择性引入有机分子(氧合)在化学合成中构成问题。产物可在各种不同的合成中用作重要的中间体。

[0010] WO2011/120938公开了使用各种过氧化酶在取代的或未取代的、直链的或支链的脂族烃的2位或3位进行酶促羟化的方法。

[0011] 本发明提供具有过氧化酶活性的多肽和编码该多肽的多核苷酸。

发明内容

[0012] 本发明涉及具有过氧化酶活性的分离的多肽,其选自:

[0013] (a)与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少60%序列同一性的多肽;

[0014] (b)由在中等严格条件下与(i)SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列;(ii)其cDNA序列;或(iii),(i)或(ii)的全长互补物杂交的多核苷酸所编码的多肽;

[0015] (c)由与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列或其cDNA序列具有至少60%序列同一性的多核苷酸所编码的多肽;

[0016] (d)在一个或多个(例如,若干个)位置包含替换、缺失和/或插入的SEQ ID NO:2的成熟多肽的变体;以及

[0017] (e), (a)、(b)、(c)或(d)多肽的具有过氧化酶活性的片段。

[0018] 本发明还涉及编码本发明多肽的分离的多核苷酸;包含该多核苷酸的核酸构建体、重组表达载体、重组宿主细胞;以及制备该多肽的方法。

[0019] 本发明还涉及使用本发明的多肽的方法。

[0020] 本发明还涉及编码包含SEQ ID NO:2的氨基酸-17至-1或由SEQ ID NO:2的氨基酸-17至-1组成的信号肽的多核苷酸,该多核苷酸与编码蛋白的基因可操作地连接;包含多核苷酸的核酸构建体、表达载体和重组宿主细胞;以及生产蛋白的方法。

具体实施方式

[0021] 定义:

[0022] 过氧化酶:术语“过氧化酶”根据EC1.11.2.1意指“非特异性过氧化酶”活性,其催化氧原子从H₂O₂插入广泛种类的底物,如4-硝基苯并二氧杂环戊烯(4-nitrobenzodioxole)。出于本发明的目的,根据实施例3中描述的步骤或M.Poraj-Kobielska,M.Kinne,R.Ullrich,K.Scheibner,M.Hofrichter,“A spectrophotometric assay for the detection of fungal peroxygenases”(用于真菌过氧化酶检测的分光光度测定),Analytical Biochemistry(2012),vol.421,issue1,pp.327-329中的步骤来确定过氧化酶活性。

[0023] 一方面,本发明的多肽(过氧化酶)具有SEQ ID NO:2的成熟多肽的过氧化酶活性的至少20%,如,至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、或至少100%。

[0024] 等位变体(allelic variant):术语“等位变体”是指占据相同染色体基因座的基因的两种或更多种可选形式中的任一种。等位变化天然地通过突变产生,并且可导致种群内的多态性。基因突变可以是沉默的(编码的多肽无变化),或者可以编码氨基酸序列改变的多肽。多肽的等位变体是由基因的等位变体所编码的多肽。

[0025] cDNA:术语“cDNA”是指可以通过逆转录由从真核或原核细胞得到的成熟的、已剪接的mRNA分子制备而来的DNA分子。cDNA缺少可存在于对应基因组DNA中的内含子序列。最初的初级RNA转录物是mRNA的前体,其在呈现为成熟的、已剪接的mRNA之前,通过一系列包括剪接在内的步骤进行加工。

[0026] 编码序列:术语“编码序列”是指直接指定多肽的氨基酸序列的多核苷酸。编码序列的边界通常由开放阅读框决定,开放阅读框以起始密码子如ATG、GTG或TTG开始并以终止密码子如TAA、TAG或TGA结束。编码序列可以是基因组DNA、cDNA、合成的DNA或其组合。

[0027] 控制序列:术语“控制序列”是指对于编码本发明成熟多肽的多核苷酸的表达为必需的核酸序列。各个控制序列对于编码多肽的多核苷酸可以是内生的(native)(即,来自相同基因)或外来的(foreign)(即,来自不同基因),或者对于彼此是内生或外来的。这些控制序列包括但不限于,前导序列、多腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列和转录终止子。最小程度地,控制序列包括启动子以及转录和翻译终止信号。出于引入特定的限制性酶切位点以促进控制序列与编码多肽的多核苷酸的编码区连接的目的,控制序列可设有接头(linker)。

[0028] 表达:术语“表达”包括多肽生产中所涉及的任何步骤,包括但不限于:转录、转录

后修饰、翻译、翻译后修饰以及分泌。

[0029] 表达载体:术语“表达载体”是指包括编码多肽的多核苷酸、并与用于其表达的控制序列可操作地连接的线性或环状DNA分子。

[0030] 片段:术语“片段”是指有一个或多个(例如,若干个)氨基酸从成熟多肽或结构域的氨基端和/或羧基端缺失的多肽或催化结构域;其中该片段具有过氧化酶活性。一方面,片段包含至少220个氨基酸残基(如,SEQ ID NO:2的氨基酸1至220)、至少230个氨基酸残基(如,SEQ ID NO:2的氨基酸1至230)、或至少240个氨基酸残基(如,SEQ ID NO:2的氨基酸1至240)。

[0031] 高等严格条件:术语“高等严格条件”是指对于长度为至少100个核苷酸的探针,在42°C下在5×SSPE、0.3%SDS、200μg/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交并杂交,遵循标准Southern印迹过程进行12~24个小时。载体材料最终使用2×SSC、0.2%SDS在65°C下清洗三次,每次15分钟。

[0032] 宿主细胞:术语“宿主细胞”是指对于用包含本发明多核苷酸的核酸构建体或表达载体进行的转化、转染、转导等是易感的(susceptible)任何细胞类型。术语“宿主细胞”包括由于在复制过程中发生突变而与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。

[0033] 分离的:术语“分离的”是指处于非天然出现的形式或环境中的物质。分离的物质的非限制性实例包括:(1)任何非天然出现的物质;(2)包括但不限于任何酶、变体、核酸、蛋白、肽或辅助因子的任何物质,其至少部分地从与其天然相关的一种或多种或所有天然出现的成分中移出;(3)相对于天然出现的物质有人工修饰的任何物质;或者(4)通过增加物质相对于与其天然相关的其他组分的含量(例如,多个拷贝的物质编码基因;使用比与编码物质的基因天然相关的启动子更强的启动子)而修饰的任意物质。分离的物质可以存在于发酵液样本中。

[0034] 低等严格条件:术语“低等严格条件”是指对于长度为至少100个核苷酸的探针,在42°C下在5×SSPE、0.3%SDS、200μg/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和25%甲酰胺中预杂交并杂交,遵循标准Southern印迹过程进行12~24个小时。载体材料最终使用2×SSC、0.2%SDS在50°C下清洗三次,每次15分钟。

[0035] 成熟多肽:术语“成熟多肽”是指在翻译和任何翻译后修饰(例如N端加工、C端截短、糖基化、磷酸化等)之后处于其最终形式的多肽。一方面,成熟多肽是SEQ ID NO:2的氨基酸1~261,基于SignalP3.0程序,预测SEQ ID NO:2的氨基酸-17至-1是信号肽。领域内公知,宿主细胞可以产生由相同多核苷酸表达的两种或更多种不同的成熟多肽(即,具有不同的C端和/或N端氨基酸)的混合物。

[0036] 成熟多肽编码序列:术语“成熟多肽编码序列”是指编码具有过氧化酶活性的成熟多肽的多核苷酸。一方面,成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:1的核苷酸52~88、170~410、483~757、827~982和1409~1482;或其cDNA序列,基于SignalP3.0程序,预测SEQ ID NO:1的核苷酸1至51编码信号肽。

[0037] 中等严格条件:术语“中等严格条件”是指对于长度为至少100个核苷酸的探针,在42°C下在5×SSPE、0.3%SDS、200μg/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交并杂交,遵循标准Southern印迹过程进行12~24个小时。载体材料最终使用2×SSC、0.2%SDS在55°C下清洗三次,每次15分钟。

[0038] 中-高等严格条件:术语“中-高等严格条件”是指对于长度为至少100个核苷酸的探针,在42℃下在5×SSPE、0.3%SDS、200μg/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交并杂交,遵循标准Southern印迹过程进行12~24个小时。载体材料最终使用2×SSC、0.2%SDS在60℃下清洗三次,每次15分钟。

[0039] 核酸构建体:术语“核酸构建体”是指从天然存在的基因中分离的、或以自然中不会另外出现的方式被修饰成包含核酸片段的、或合成的单链或双链的核酸分子,其包含一个或多个控制序列。

[0040] 可操作地连接:术语“可操作地连接”是指如下的构造,其中控制序列相对于多核苷酸的编码序列安置在合适位置处,从而控制序列引导编码序列的表达。

[0041] 序列同一性:两个氨基酸序列之间或者两个核苷酸序列之间的相关性通过参数“序列同一性”来描述。

[0042] 出于本发明的目的,使用在EMBOSS软件包(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite(欧洲分子生物学开放软件包),Rice等人,2000,Trends Genet.16:276-277)(优选5.0.0版本或更新)的Needle程序中执行的Needleman-Wunsch算法(Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性。使用的可选参数:空位开放罚分为10,空位扩展罚分为0.5,以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)替代矩阵。标记为“最长同一性”(使用-nobrief选项获得)的Needle输出用作百分比同一性,计算如下:

[0043] (相同残基×100)/(比对长度-比对中的空位总数)

[0044] 出于本发明的目的,使用在EMBOSS软件包(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite(欧洲分子生物学开放软件包),Rice等人,2000,同上)(优选5.0.0版本或更新)的Needle 程序中执行的Needleman-Wunsch算法(Needleman and Wunsch,1970,同上)来确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列同一性。使用的可选参数:空位开放罚分为10,空位扩展罚分为0.5,以及EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)替代矩阵。标记为“最长同一性”(使用-nobrief选项获得)的Needle输出用作百分比同一性,计算如下:

[0045] (相同脱氧核苷酸×100)/(比对长度-比对中的空位总数)

[0046] 子序列:术语“子序列”是指从成熟多肽编码序列的5' 和/或3' 端缺失一个或多个(例如,若干个)核苷酸的多核苷酸;其中子序列编码具有过氧化酶活性的片段。一方面,子序列包含至少660个核苷酸、至少690个核苷酸、或至少720个核苷酸。

[0047] 变体:术语“变体”是指在一个或多个(例如,若干个)位置上包含改变(即替换、插入和/或缺失)的具有过氧化酶活性的多肽。替换是指用不同的氨基酸取代占据某位置的氨基酸;缺失是指去除占据某位置的氨基酸;而插入是指将氨基酸添加至并紧邻占据某位置的氨基酸。

[0048] 极高等严格条件:术语“极高等严格条件”是指对于长度为至少100个核苷酸的探针,在42℃下在5×SSPE、0.3%SDS、200μg/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交并杂交,遵循标准Southern印迹过程进行12~24个小时。载体材料最终使用2×SSC、0.2% SDS在70℃下清洗三次,每次15分钟。

[0049] 极低等严格条件:术语“极低等严格条件”是指对于长度为至少100个核苷酸的探

针,在42℃下在5×SSPE、0.3%SDS、200μg/ml剪切并变性的鲤鱼精子DNA和25%甲酰胺中预杂交并杂交,遵循标准Southern印迹过程进行12~24个小时。载体材料最终使用2×SSC、0.2% SDS在45℃下清洗三次,每次15分钟。

[0050] 具有过氧化酶活性的多肽

[0051] 在实施方式中,本发明涉及如下的具有过氧化酶活性的分离多肽,该分离多肽与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少60%的序列同一性,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。一方面,该多肽与SEQ ID NO:2的成熟多肽相差不超过10个氨基酸,如1、2、3、4、5、6、7、8或9个。

[0052] 本发明的多肽优选包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其等位变体,或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其等位变体组成;或者是它的具有过氧化酶活性的片段。另一方面,该多肽包括SEQ ID NO:2的成熟多肽,或者由SEQ ID NO:2的成熟多肽组成。另一方面,该多肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸1~261,或者由SEQ ID NO:2的氨基酸1~261组成。

[0053] 本发明的多肽可包括如下的氨基酸序列:

[0054] Glu-His-Asp-Gly-Ser-Leu-Ser-Arg (SEQ ID NO:3),或

[0055] Glu-His-Asp-Ala-Ser-Leu-Ser-Arg (SEQ ID NO:4)

[0056] -其与相邻于血红素基的Mn原子配位结合(coordinate)。

[0057] 在另一个实施方式中,本发明涉及由以下多核苷酸编码的具有过氧化酶活性的分离多肽,该多核苷酸在极低等严格条件、低等严格条件、中等严格条件、中-高等严格条件、高等严格条件、或极高等严格条件下与(i) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列;(ii)其cDNA序列;或(iii),(i)或(ii)的全长互补物杂交(Sambrook等人.,1989,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,2nd edition,Cold Spring Harbor,New York)。

[0058] 根据本领域已知的方法,SEQ ID NO:1的多核苷酸或其子序列以及SEQ ID NO:2的多肽或其片段可用来设计核酸探针,以便从不同属或种的株系鉴定和克隆编码具有过氧化酶活性的多肽的DNA。特别地,为了鉴定和分离其中相应的基因,可遵循标准Southern印迹程序,使用这种探针与目标细胞的基因组DNA或cDNA杂交。这种探针的长度可大大短于整个序列,但应为至少15个,如至少25、至少35、或至少70个核苷酸。优选地,核酸探针的长度为至少100个核苷酸,如至少200个核苷酸,至少300个核苷酸,至少400个核苷酸,至少500个核苷酸,至少600个核苷酸,至少700个核苷酸,至少800个核苷酸,或至少900个核苷酸。可使用DNA和RNA探针。通常对探针进行标记,用以检测相应的基因(例如,用³²P、³H、³⁵S、生物素或抗生物素蛋白标记)。本发明涵盖这些探针。

[0059] 可以对由这样的其它株系制备的基因组DNA或cDNA文库进行筛选,以筛选出与上述探针杂交且编码具有过氧化酶活性的多肽的DNA。可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳或者其它分离技术从这些其它株系中分离基因组或其它DNA。可以将来自文库的DNA或分离的DNA转移并固定化在硝化纤维或其它合适的载体材料上。为了鉴定与SEQ ID NO:1或其子序列杂交的克隆或DNA,在Southern印迹中使用载体材料。

[0060] 出于本发明的目的,杂交表示多核苷酸在极低等至极高等的严格条件下与如下的标记核酸探针杂交,其中标记核酸探针对应于(i) SEQ ID NO:1;(ii) SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列;(iii)其cDNA序列;(iv)其全长互补物;或(v)其子序列。可使用例如X光片或任

何其它本领域已知的检测方法来检测核酸探针在这些条件下所杂交的分子。

[0061] 一方面,核酸探针是SEQ ID NO:1的核苷酸391~410。另一方面,核酸探针是编码SEQ ID NO:2的多肽、其成熟多肽、或其片段的多核苷酸。另一方面,核酸探针是SEQ ID NO:1或其cDNA序列。

[0062] 在另一个实施方式中,本发明涉及由以下多核苷酸编码的具有过氧化酶活性的分离多肽,该多核苷酸与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列或其cDNA序列具有至少60%序列同一性,如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性。

[0063] 在另一个实施方式中,本发明涉及在一个或多个(例如,若干个)位置包含替换、缺失和/或插入的SEQ ID NO:2的成熟多肽的变体。在实施方式中,引入SEQ ID NO:2的成熟多肽中的氨基酸替换、缺失和/或插入的数量不超过10个,如1、2、3、4、5、6、7、8或9个。氨基酸变化可以是性质轻微的,即不显著影响蛋白折叠和/或活性的保守的氨基酸替换或插入;小的缺失,通常为1~30个氨基酸;小的氨基端或羧基端延伸,如氨基端的甲硫氨酸残基;多至20~25个残基的小接头肽;或通过改变净电荷或其它功能而促进纯化的小的延伸,如多组氨酸序列(poly-histidine tract)、抗原表位或结合结构域。

[0064] 保守替换的实例在碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)以及小的氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)的组内。通常不改变特异活性的氨基酸替换是领域内已知的,并在例如H.Neurath and R.L.Hill,1979,In,The Proteins,Academic Press,New York中记载。常见的替换为,Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Va1、Ala/Glu和Asp/Gly。

[0065] 或者,氨基酸变化的性质为多肽的物化性质被改变。例如,氨基酸变化可改进多肽的热稳定性、改变底物特异性、改变最适pH等。

[0066] 可根据领域内已知的步骤来鉴定多肽中的基本氨基酸,例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham and Wells,1989,Science244:1081-1085)。在后述的技术中,在分子的每个残基中引入单个丙氨酸突变,并对所得的突变分子测试过氧化酶活性,以鉴定对于分子活性为关键性的氨基酸残基。还参见,Hilton等人,1996,J.Biol.Chem.271:4699-4708。酶或其它生物学相互作用的活性部位也可以通过对结构的物理分析来确定,如通过以下这些技术:如核磁共振、结晶学、电子衍射或光亲和标记,结合对推定接触位点氨基酸的突变来加以测定。参见例如de Vos等人,1992,Science255:306-312;Smith等人,1992,J.Mol.Biol.224:899-904;Wlodaver等人,1992,FEBS Lett.309:59-64。还可从与相关的多肽进行比对来推断基本氨基酸的身份(identity)。

[0067] 可以使用已知的突变、重组和/或改组方法,接着进行相关的筛选步骤(例如Reidhaar-Olson and Sauer,1988,Science241:53-57;Bowie and Sauer,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:2152-2156;W095/17413;或W095/22625中所公开的)来做出并测试单个或多个氨基酸替换、缺失和/或插入。其它可用的方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如,Lowman等人,1991,Biochemistry30:10832-10837;美国专利第5,223,409号;W092/06204)以及定位诱变(Derbyshire等人,1986,Gene46:145;Ner等人,1988,DNA7:127)。

[0068] 突变/改组方法可与高通量的自动化筛选方法结合来检测由宿主细胞表达的克隆的突变多肽的活性(Ness等人,1999,Nature Biotechnology 17:893-896)。可使用领域内的标准方法从宿主细胞中回收编码活性多肽的突变DNA分子,并快速测序。这些方法使得可以快速确定多肽中单个氨基酸残基的重要性。

[0069] 多肽可以是杂合多肽,其中一个或多个区域融合在另一多肽的区域的N端或C端。

[0070] 多肽可以是融合多肽或可切割的融合多肽,其中另一个或多个区域融合在本发明多肽的N端或C端。通过将编码另一多肽的多核苷酸融合到本发明的多核苷酸来制备融合多肽。制备融合多肽的技术为本领域已知,且包括连接编码多肽的编码序列使得它们在阅读框内并且融合多肽的表达在同一启动子和终止子的控制下。融合多肽还可以使用内含肽技术来构建,其中融合多肽在翻译后产生(Cooper等人,1993,EMBO J.12:2575-2583;Dawson等人,1994,Science 266:776-779)。

[0071] 融合多肽还可以包括在两个多肽之间的切割位点。在融合蛋白分泌时,该位点被切割,释出两个多肽。切割位点的例子包括但不限于,在Martin等人,2003,J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3:568-576;Svetina等人,2000,J. Biotechnol. 76:245-251;Rasmussen-Wilson等人,1997,Appl. Environ. Microbiol. 63:3488-3493;Ward等人,1995,Biotechnology 13:498-503;以及Contreras等人,1991,Biotechnology 9:378-381;Eaton等人,1986,Biochemistry 25:505-512;Collins-Racie等人,1995,Biotechnology 13:982-987;Carter等人,1989,Proteins: Structure, Function, and Genetics 6:240-248;以及Stevens,2003,Drug Discovery World 4:35-48中公开的位点。

[0072] 具有过氧化酶活性的多肽的来源

[0073] 本发明的具有过氧化酶活性的多肽可从任何属的微生物获得。出于本发明的目的,本文中与给定来源关联使用的术语“获自”应指,由多核苷酸编码的多肽是由该来源或其中插入有该来源的多核苷酸的株系产生的。一方面,获自给定来源的多肽是分泌到细胞外的。

[0074] 多肽可以是真菌多肽。例如,多肽可以是腐质霉属多肽,如灰腐质霉(Humicola grisea)、特异腐质霉(Humicola insolens)或柔毛腐质霉(Humicola lanuginosa)的多肽。

[0075] 应当理解的是,就前文所述的物种而言,本发明涵盖了完全和不完全的状态,以及其它分类学上的等同物,例如无性型,不管它们已知的种名是什么。本领域技术人员可以很容易地识别出合适的等同物的身份。

[0076] 公众可以在若干保藏机构容易地获取这些物种的株系,这样的机构诸如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)、德意志微生物和细胞培养物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,DSMZ)、荷兰菌种保藏中心(Centraalbureau Voor Schimmelcultures,CBS)和农业研究机构专利培养物保藏中心北区研究中心(Agricultural Research Service Patent Culture Collection,Northern Regional Research Center,NRRL)。

[0077] 可以使用上述探针从其它来源,包括从自然界(例如,土壤、堆肥、水等)分离的微生物或者从天然材料(例如,土壤、堆肥、水等)直接获得的DNA样本鉴定和获得这些多肽。用于直接从天然生境(habitat)分离微生物和DNA的技术是本领域内公知的。随后可通过相似地筛选另一微生物的基因组DNA或cDNA文库或者混合的DNA样品来获得编码多肽的多核苷

酸。在用探针检测到编码多肽的多核苷酸后,就能够通过使用本领域普通技术人员熟知的技术分离或克隆多核苷酸(参见,例如,Sambrook等人,1989,同上)。

[0078] 核酸构建体

[0079] 本发明还涉及包括与一个或多个控制序列可操作地连接的本发明多核苷酸的核酸构建体,上述控制序列在与该控制序列相容的条件下引导编码序列在合适的宿主细胞中的表达。

[0080] 可以通过多种方式操纵多核苷酸,以提供多肽的表达。依赖于表达载体,在将多核苷酸插入到载体之前对其进行操纵可以是合意的或必需的。使用重组DNA方法修饰多核苷酸的技术是本领域公知的。

[0081] 控制序列可以是启动子,其是由宿主细胞识别用于编码本发明多肽的多核苷酸的表达的多核苷酸。启动子含有介导多肽表达的转录控制序列。启动子可以是任何在宿主细胞中表现出转录活性的多核苷酸,包括突变的、截短的和杂合的启动子,并且可以从与宿主细胞同源或异源的编码细胞外或细胞内多肽的基因获得。

[0082] 用于引导本发明的核酸构建体在细菌宿主细胞中转录的合适启动子的实例是:从解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) α -淀粉酶基因(*amyQ*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) α -淀粉酶基因(*amyL*)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因(*penP*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)麦芽糖淀粉酶基因(*amyM*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)果聚糖蔗糖酶基因(*sacB*)、枯草芽孢杆菌xy1A和xy1B基因、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)*cryIIIA*基因(Agaisse and Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13:97-107)、大肠杆菌lac操纵子、大肠杆菌trc启动子(Egon等人,1988, Gene 69:301-315)、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)琼脂糖酶基因(*dagA*)和原核 β -内酰胺酶基因(Villa-Kamaroff等人,1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731)以及tac启动子(DeBoer等人,1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25)中得到的启动子。其它启动子在Gilbert等人,1980, Scientific American 242:74-94的"Useful proteins from recombinant bacteria"(重组细菌的有用蛋白)中记载;并在Sambrook等人(1989,同上)中记载。串联启动子的实例在W099/43835中公开。

[0083] 用于引导本发明的核酸构建体在丝状真菌宿主细胞中转录的合适启动子的实例是从以下物质的基因获得的启动子:从构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)乙酰胺酶、黑曲霉(*Aspergillus niger*)中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)葡糖淀粉酶(*glaA*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)TAKA淀粉酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶、尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)胰酶样蛋白酶(W096/00787)、*Fusarium venenatum*淀粉葡萄糖苷酶(W000/56900)、*Fusarium venenatum* Daria(W000/56900)、*Fusarium venenatum* Quinn(W000/56900)、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)脂肪酶、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶、里氏木霉(*Trichoderma reesei*) β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶I、里氏木霉纤维二糖水解酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶I、里氏木霉内切葡聚糖酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶III、里氏木霉内切葡聚糖酶IV、里氏木霉内切葡聚糖酶V、里氏木霉木聚糖酶I、里氏木霉木聚糖酶II、里氏木霉 β -木糖苷酶,以及NA2-tpi启动子(曲霉中性 α -淀粉酶基因的修饰启动子,其中非翻译前导被曲霉磷酸丙糖异构酶基因的非翻译前导替代;非限制性实例包括来自黑曲霉中性 α -淀粉酶基因的修饰启动

子,其中非翻译前导被构巢曲霉或米曲霉的磷酸丙糖异构酶基因的非翻译前导替代);及其突变的、截短的和杂合的启动子。

[0084] 在酵母宿主中,可用的启动子获自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)烯醇化酶(ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶(GAL1)、酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶(ADH1,ADH2/GAP)、酿酒酵母磷酸丙糖异构酶(TPI)、酿酒酵母金属硫蛋白(CUP1)和酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶的基因。其它可用于酵母宿主细胞的启动子由Romanos等人,1992,Yeast8:423-488描述。

[0085] 控制序列也可以是转录终止子,其被宿主细胞识别以终止转录。终止子与编码多肽的多核苷酸的3'端可操作地连接。在宿主细胞中起作用的任何终止子均可用于本发明。

[0086] 用于细菌宿主细胞的优选终止子获自克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*)碱性蛋白酶(aprH)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶(amyL)和大肠杆菌核糖体RNA(rrnB)的基因。

[0087] 用于丝状真菌宿主细胞的优选终止子获自构巢曲霉邻氨基苯甲酸合成酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、黑曲霉 α -葡萄糖苷酶、米曲霉TAKA淀粉酶和尖孢镰孢胰酶样蛋白酶的基因。

[0088] 用于酵母宿主细胞的优选终止子获自酿酒酵母烯醇化酶、酿酒酵母细胞色素C(CYC1)和酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因。其他可用于酵母宿主细胞的终止子在Romanos等,1992(同上)中有过描述。

[0089] 控制序列也可以是在启动子下游和基因的编码序列上游的增加基因表达的mRNA稳定序列(mRNA stabilizer)区域。

[0090] 合适的mRNA稳定序列区域的实例获自苏云金芽孢杆菌cryIIIA基因(WO94/25612)和枯草芽孢杆菌SP82基因(Hue等人,1995,Journal of Bacteriology177:3465-3471)。

[0091] 控制序列也可以是前导序列,即对由宿主细胞翻译较为重要的mRNA非翻译区。前导序列可操作地连接到编码多肽的多核苷酸的5'端。任何在宿主细胞中起作用的前导序列均可以使用。

[0092] 用于丝状真菌宿主细胞的优选前导序列得自米曲霉TAKA淀粉酶和构巢曲霉磷酸丙糖异构酶的基因。

[0093] 用于酵母宿主细胞的合适前导序列得自酿酒酵母烯醇化酶(ENO-1)、酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母 α 因子和酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶(ADH2/GAP)的基因。

[0094] 控制序列也可以是多腺苷酸化序列,即可操作地连接至多核苷酸的3'端的序列,在转录时其被宿主细胞识别为向转录mRNA添加多腺苷酸残基的信号。在宿主细胞中起作用的任何多腺苷酸化序列均可以使用。

[0095] 用于丝状真菌宿主细胞的优选多腺苷酸化序列得自构巢曲霉邻氨基苯甲酸合成酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、黑曲霉 α -葡萄糖苷酶、米曲霉TAKA淀粉酶和尖孢镰孢胰酶样蛋白酶的基因。

[0096] 用于酵母宿主细胞的有用多腺苷酸化序列记载于Guo and Sherman,1995,Mol.Cellular Biol.15:5983-5990。

[0097] 控制序列也可以是编码与多肽N端连接的信号肽并引导多肽进入细胞分泌通路的信号肽编码区。多核苷酸的编码序列的5'端可以固有地包含在翻译阅读框中与编码多肽的编码序列片段自然连接的信号肽编码序列。或者,编码序列的5'端可以包含对于编码序列

为外来的信号肽编码序列。在编码序列不天然包含信号肽编码序列时,外来信号肽编码序列可能是需要的。或者,为增强多肽的分泌,外来信号肽编码序列可以简单地取代天然信号肽编码序列。然而,任何引导所表达的多肽进入宿主细胞的分泌通路的信号肽编码序列均可以使用。

[0098] 用于细菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是得自芽孢杆菌NCIB11837麦芽糖淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT,nprS,nprM)和枯草芽孢杆菌prsA的基因的信号肽编码序列。其他信号肽记载于Simonen and Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137。

[0099] 用于丝状真菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是得自黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米曲霉TAKA淀粉酶、特异腐质霉(Humicola insolens)纤维素酶、特异腐质霉内切葡聚糖酶V、柔毛腐质霉(Humicola lanuginosa)脂肪酶和米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶的基因的信号肽编码序列。

[0100] 用于酵母宿主细胞的可用信号肽得自酿酒酵母 α 因子和酿酒酵母转化酶的基因。其他可用的信号肽编码序列记载于Romanos等人, 1992, 同上。

[0101] 控制序列也可以是编码位于多肽N端的前肽的前肽编码序列。得到的多肽称为酶原或多肽原(或在一些情况下为酵素原)。多肽原一般是失活的且可以通过从多肽原到前肽的催化或自催化切割而转化为活性多肽。前肽编码序列可以得自枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶(aprE)、枯草芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT)、嗜热毁丝菌(Myceliophthora thermophila)漆酶(WO95/33836)、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶和酿酒酵母 α 因子的基因。

[0102] 在信号肽序列和前肽序列均存在时,前肽序列紧邻多肽的N端且信号肽序列紧邻前肽序列的N端。

[0103] 也可能需要添加调控多肽相对于宿主细胞生长的表达的调控序列。调控系统的实例是响应于化学或物理刺激引起基因表达的开启和关闭的那些,包括调控化合物的存在。原核系统中的调控系统包含lac、tac、和trp操纵子系统。在酵母中,可以使用ADH2系统或GAL1系统。在丝状真菌中,可以使用黑曲霉葡糖淀粉酶启动子、米曲霉TAKA α -淀粉酶启动子和米曲霉葡糖淀粉酶启动子。调控序列的其他实例是使得基因扩增的那些。在真核系统中,调控序列包括在甲氨蝶呤的存在下扩增的二氢叶酸还原酶基因、以及在重金属的存在下扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况下,编码多肽的多核苷酸将可操作地与调控序列连接。

[0104] 表达载体

[0105] 本发明还涉及包含本发明多核苷酸、启动子以及转录和翻译终止信号的重组表达载体。各种核苷酸和控制序列可以连接在一起,以产生可以包含一个或多个便利限制性位点的重组表达载体,该限制性位点使得可以在位点插入或替换编码多肽的多核苷酸。或者,可以通过插入多核苷酸或包含多核苷酸的核酸构建体到合适的表达载体中来表达多核苷酸。在构建表达载体的过程中,编码序列位于载体中,从而编码序列与合适的表达用控制序列可操作地连接。

[0106] 重组表达载体可以是任何可以方便地进行重组DNA程序并可引起多核苷酸表达的载体(例如,质粒或病毒)。载体的选择通常取决于载体与载体将要导入的宿主细胞的相容性。载体可以是线性或闭合的环状质粒。

[0107] 载体可以是自主复制型载体,即作为染色体外实体而存在且其复制独立于染色体复制的载体,例如,质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可以包含确保自我复制的任何元件(means)。或者,载体可以是,在导入宿主细胞时整合到基因组中并与其整合的染色体一起复制的载体。此外,可以使用单个载体或质粒,或使用共同包含将要导入宿主细胞基因组中的总DNA的两个或更多个载体或质粒,或使用转座子。

[0108] 载体优选包含一个或多个允许方便地选择转化细胞、转染细胞、转导细胞等细胞的选择性标记物。选择性标记物是如下的基因,其产物提供对生物灭杀剂的抗性或病毒抗性、重金属抗性、相对于营养缺陷型的原养型等。

[0109] 细菌选择性标记物的实例是地衣芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌dal基因、或赋予抗生素耐性(如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、新霉素、壮观霉素或四环素抗性)的标记物。用于酵母宿主细胞的合适标记物包括但不限于ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1和URA3。用于丝状真菌宿主细胞的选择性标记物包括但不限于amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、bar(膦丝菌素乙酰转移酶)、hph(潮霉素磷酸转移酶)、niaD(硝酸还原酶)、pyrG(乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶)、sC(硫酸腺苷酰转移酶)和trpC(邻氨基苯甲酸合成酶)以及其等同物。优选用在曲霉属细胞中的是构巢曲霉或米曲霉amdS和pyrG基因和吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)bar基因。

[0110] 优选载体包含有使得载体整合到宿主细胞的基因组中或使载体在细胞中独立于基因组而自主复制的元件。

[0111] 对于整合入宿主细胞基因组,载体可以依赖于编码多肽的多核苷酸序列或经同源重组或非同源重组整合入基因组的载体的任何其他元件。或者,载体可以含有用于引导经由同源重组在染色体的精确位置整合入宿主细胞基因组的其他多核苷酸。为增加在精确位置整合的可能性,整合元件应当包含足量的核酸,例如100~10,000个碱基对、400~10,000个碱基对、以及800~10,000个碱基对,其与相应的靶序列具有高度的序列同一性,以增强同源重组的可能性。整合元件可以是与宿主细胞基因组中的靶序列同源的任何序列。此外,整合元件可以是非编码的多核苷酸或编码的多核苷酸。另一方面,载体可以通过非同源重组而整合到宿主细胞的基因组中。

[0112] 对于自主复制,载体还可以包含使载体能在被考虑的宿主细胞中自主复制的复制起点。复制起点可以是在细胞中起作用的介导自主复制的任何质粒复制子。术语“复制起点”或“质粒复制子”是指使质粒或载体能在体内复制的多核苷酸。

[0113] 细菌复制起点的实例是使得在大肠杆菌中复制的质粒pBR322、pUC19、pACYC177和pACYC184的复制起点以及使得在芽孢杆菌中复制的质粒pUB110、pE194、pTA1060和pAM?1的复制起点。

[0114] 用在酵母宿主细胞中的复制起点的实例是2微米复制起点ARS1,ARS4,ARS1与CEN3的组合,以及ARS4与CEN6的组合。

[0115] 可用于丝状真菌细胞的复制起点的实例是AMA1和ANS1(Gems等人,1991,Gene98:61-67;Cullen等人,1987,Nucleic Acids Res.15:9163-9175;W000/24883)。AMA1基因的分离以及包含该基因的质粒或载体的构建可以根据W000/24883中公开的方法实现。

[0116] 多于一个拷贝的本发明多核苷酸可以插入到宿主细胞中,以增加多肽产生。多核苷酸拷贝数的增加可以通过将至少一个额外拷贝的序列整合入宿主细胞基因组中而得到;

或者通过包含可扩增选择标记物基因与多核苷酸而获得,这样,可以通过在合适选择剂的存在下培养细胞来选择含有扩增拷贝的选择标记物基因的细胞,由此选择含有额外拷贝的多核苷酸的细胞。

[0117] 用来连接上述元件以构建本发明的重组表达载体的步骤为本领域技术人员所熟知(参见,例如,Sambrook等人,1989,同上)。

[0118] 宿主细胞

[0119] 本发明还涉及重组宿主细胞,其包含与一个或多个引导本发明多肽生产的控制序列可操作地连接的本发明多核苷酸。将包含多核苷酸的构建体或载体导入到宿主细胞中,从而使构建体或载体保持为染色体整合子或作为前述的自我复制染色体外载体。术语“宿主细胞”包括因复制过程中发生的突变而与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。对于宿主细胞的选择将在很大程度上取决于编码多肽的基因及其来源。

[0120] 宿主细胞可以是任何可用于本发明多肽的重组生产的细胞,例如,原核细胞或真核细胞。

[0121] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包括但不限于芽孢杆菌属、梭菌属(*Clostridium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、地芽孢杆菌属(*Geobacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、海洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、和链霉菌属(*Streptomyces*)。革兰氏阴性细菌包括但不限于弯曲菌属(*Campylobacter*)、大肠杆菌、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、泥杆菌属(*Ilyobacter*)、奈瑟菌属(*Neisseria*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、和脲原体属(*Ureaplasma*)。

[0122] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌细胞,包括但不限于嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、灿烂芽孢杆菌(*Bacillus laetus*)、迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌细胞。

[0123] 细菌宿主细胞也可以是任何链球菌细胞,包括但不限于似马链球菌(*Streptococcus equisimilis*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)和似马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp.*Zooepidemicus*)细胞。

[0124] 细菌宿主细胞也可以是任何链霉菌(*Streptomyces*)细胞,包括但不限于不产色链霉菌(*Streptomyces achromogenes*)、阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)、灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)和变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)细胞。

[0125] 将DNA导入芽孢杆菌细胞可以通过原生质体转化(参见,例如,Chang and Cohen, 1979,*Mol.Gen.Genet.*168:111-115)、感受态细胞转化(参见,例如,Young and Spizizen, 1961,*J.Bacteriol.*81:823-829或Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971,*J.Mol.Biol.*56: 209-221)、电穿孔(参见,例如,Shigekawa and Dower, 1988,*Biotechniques*6:742-751)或

接合(参见,例如,Koehler and Thorne,1987,J.Bacteriol.169:5271-5278)来实现。将DNA导入大肠杆菌细胞可以通过原生质体转化(参见,例如,Hanahan,1983,J.Mol.Biol.166:557-580)或电穿孔(参见,例如,Dower等人,1988,Nucleic Acids Res.16:6127-6145)而实现。将DNA导入链霉菌细胞可以通过原生质体转化、电穿孔(参见,例如,Gong等人,2004,Folia Microbiol.(Praha)49:399-405)、接合(参见,例如,Mazodier等人,1989,J.Bacteriol.171:3583-3585)或转导(参见,例如,Burke等人,2001,Proc.Natl.Acad.Sci.USA98:6289-6294)来实现。将DNA导入假单胞菌细胞可以通过电穿孔(参见,例如,Choi等人,2006,J.Microbiol.Methods64:391-397)或接合(参见,例如,Pinedo and Smets,2005,Appl.Environ.Microbiol.71:51-57)而实现。将DNA导入链球菌细胞可以通过自然感受态(参见,例如,Perry and Kuramitsu,1981,Infect.Immun.32:1295-1297)、原生质体转化(参见,例如,Catt and Jollick,1991,Microbios68:189-207)、电穿孔(参见,例如,Buckley等人,1999,Appl.Environ.Microbiol.65:3800-3804)或接合(参见,例如,Clewell,1981,Microbiol.Rev.45:409-436)来实现。然而,可以使用任何领域内已知的将DNA导入到宿主细胞中的方法。

[0126] 宿主细胞也可以是真核细胞,如哺乳动物、昆虫、植物、或真菌细胞。

[0127] 宿主细胞可以是真菌细胞。本文所用的“真菌”包括子囊菌门、担子菌门、壶菌门和接合菌门以及卵菌门和所有有丝分裂真菌(如Hawksworth等人,In,Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi,8th edition,1995,CAB International,University Press,Cambridge,UK所定义)。

[0128] 真菌宿主细胞可以是酵母细胞。本文所用的“酵母”包括产子囊酵母(内孢霉目)、产担子酵母和属于半知菌的酵母(芽孢纲)。由于酵母的分类在未来可能会变化,出于本发明的目的,酵母应当如Biology and Activities of Yeast (Skinner,Passmore, and Davenport,editors,Soc.App.Bacteriol.Symposium Series No.9,1980)中记载般进行定义。

[0129] 酵母宿主细胞可以是假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、酵母属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)或耶氏酵母属(*Yarrowia*)细胞,例如乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、卡氏酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)、酿酒酵母、糖化酵母(*Saccharomyces diastaticus*)、*Saccharomyces douglasii*、克鲁弗酵母(*Saccharomyces kluyveri*)、*Saccharomyces norbensis*、*Saccharomyces oviformis*或解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)细胞。

[0130] 真菌宿主细胞可以是丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌门和卵菌门亚门的所有丝状形式(如Hawksworth等人,1995,同上所定义)。丝状真菌通常的特征在于,由几丁质、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖和其他复合多糖组成的菌丝体壁。营养生长是通过菌丝伸长,碳分解代谢是专性需氧的。相反,酵母例如酿酒酵母的营养生长是通过单细胞菌体的出芽,碳分解可以是发酵性的。

[0131] 丝状真菌宿主细胞可以是枝顶孢属(*Acremonium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、短梗霉属(*Aureobasidium*)、烟管菌属(*Bjerkandera*)、拟蜡菌属(*Ceriporiopsis*)、金孢子菌属(*Chrysosporium*)、鬼伞属(*Coprinus*)、革盖菌属(*Coriolus*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、

Filibasidium、镰孢霉属(*Fusarium*)、腐质霉属(*Humicola*)、稻瘟菌属(*Magnaporthe*)、毛霉属(*Mucor*)、毀丝霉属(*Myceliophthora*)、新美鞭菌属(*Neocallimastix*)、脉孢菌属(*Neurospora*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、青霉属(*Penicillium*)、平革菌属(*Phanerochaete*)、白腐菌属(*Phlebia*)、*Piromyces*、侧耳属(*Pleurotus*)、裂褶菌属(*Schizophyllum*)、篮状菌属(*Talaromyces*)、嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)、梭孢壳属(*Thielavia*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)、栓菌属(*Trametes*)或木霉属(*Trichoderma*)细胞。

[0132] 例如,丝状真菌宿主细胞可以是泡盛曲霉、臭曲霉(*Aspergillus foetidus*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉、米曲霉、烟管菌(*Bjerkandera adusta*)、干拟蜡菌(*Ceriporiopsis aneirina*)、*Ceriporiopsis caregiea*、浅黄拟蜡孔菌(*Ceriporiopsis gilvescens*)、*Ceriporiopsis pannocinta*、*Ceriporiopsis rivulosa*、*Ceriporiopsis subrufa*、虫拟蜡菌(*Ceriporiopsis subvermispora*)、*Chrysosporium inops*、嗜角质金孢子菌(*Chrysosporium keratinophilum*)、*Chrysosporium lucknowense*、*Chrysosporium merdarium*、*Chrysosporium pannicola*、*Chrysosporium queenslandicum*、热带金孢子菌(*Chrysosporium tropicum*)、*Chrysosporium zonatum*、灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)、毛云芝菌(*Coriolus hirsutus*)、*Fusarium bactridioides*、*Fusarium cerealis*、*Fusarium crookwellense*、黄色镰孢菌(*Fusarium culmorum*)、禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢(*Fusarium graminum*)、异孢镰孢(*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢(*Fusarium negundi*)、尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢(*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢(*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢(*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢(*Fusarium sarcochroum*)、拟枝孢镰孢菌(*Fusarium sporotrichioides*)、硫色镰孢(*Fusarium sulphureum*)、*Fusarium torulosum*、拟丝孢镰孢(*Fusarium trichothecioides*)、*Fusarium venenatum*、特异腐质霉(*Humicola insolens*)、柔毛腐质霉(*Humicola lanuginosa*)、米黑毛霉(*Mucor miehei*)、嗜热毀丝霉(*Myceliophthora thermophila*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、脉射侧菌(*Phlebia radiata*)、白腐菌(*Pleurotus eryngii*)、太瑞斯梭孢壳霉(*Thielavia terrestris*)、长绒毛栓菌(*Trametes villosa*)、变色栓菌(*Trametes versicolor*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、康宁木霉(*Trichoderma koningii*)、长梗木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)或绿色木霉(*Trichoderma viride*)细胞。

[0133] 真菌细胞可以通过涉及原生质体形成、原生质体转化和细胞壁再生的方法以本质上已知的方式进行转化。合适的用于曲霉属和木霉属宿主细胞的转化的方法记载在EP238023、Yelton等人,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA81:1470-1474以及Christensen等人,1988,Bio/Technology6:1419-1422中。用于转化镰孢菌属物种的适当方法记载于Malardier等人,1989,Genet.78:147-156和W096/00787。酵母可以使用由Becker and Guarante, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp182-187, Academic Press,

Inc., New York; Ito等人, 1983, J. Bacteriol. 153:163; 以及 Hinnen等人, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1920 记载的方法来转化。

[0134] 生产方法

[0135] 本发明还涉及生产本发明的多肽的方法,包括(a)在有益于生产多肽的条件下培养细胞,其中野生型的该细胞产生多肽;和(b)回收多肽。在优选的方面,该细胞为腐质霉属细胞。在更优选的方面,该细胞为特异腐质霉细胞。

[0136] 本发明还涉及生产本发明的多肽的方法,包括(a)在有益于生产多肽的条件下培养本发明的重组宿主细胞;和(b)回收多肽。

[0137] 使用本领域已知的方法在适合于生产多肽的营养介质中培养宿主细胞。例如,可通过在合适的介质中并在允许多肽表达和/或分离的条件下进行摇瓶培养、或在实验室或工业发酵罐中进行小规模或大规模发酵(包括连续发酵、分批发酵、分批补料发酵或固态发酵)来培养细胞。使用本领域已知的步骤在包含碳源和氮源以及无机盐的合适营养介质中进行培养。合适的介质可从商业供应商获得或可以根据公开的组成来制备(例如,在美国典型培养物保藏中心的目录中)。如果多肽被分泌到营养介质中,则可以直接从介质回收多肽。如果多肽未被分泌出去,则可以从细胞裂解物中进行回收。

[0138] 可以使用领域内已知的特定用于多肽的方法来检测多肽。这些检测方法包括但不限于特异性抗体的使用、酶产物的形成、或酶底物的消失。例如,酶的测定可用来判定多肽的活性。

[0139] 可使用本领域已知的方法来回收多肽。例如,可通过常规的步骤从营养介质回收多肽,该步骤包括但不限于收集、离心、过滤、萃取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。

[0140] 可通过本领域已知的多种方法提纯多肽来获得基本纯的多肽,该方法包括但不限于层析法(例如,离子交换、亲和性、疏水性、层析聚焦、和尺寸排阻)、电泳法(例如,制备式等电聚焦)、差别溶解法(例如,硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE、或萃取(参见例如, Protein Purification, Janson 和 Ryden, 编者, VCH Publishers, New York, 1989)。

[0141] 在可替代的方面,不回收多肽,而是使用表达多肽的本发明的宿主细胞作为多肽的来源。

[0142] 植物

[0143] 本发明还涉及分离的植物,例如,转基因植物、植物部分、或植物细胞,其包括本发明的多核苷酸以便表达和产生可回收量的多肽或结构域。可从植物或植物部分回收多肽或结构域。或者,可使用包含多肽或结构域的植物或植物部分来提高食物或饲料的质量,例如,提高营养价值、适口性、和流变特性,或破坏抗营养因子。

[0144] 转基因植物可为双子叶的(双子叶植物)或单子叶的(单子叶植物)。单子叶植物的实例为草,如草地早熟禾(meadow grass)(蓝草,早熟禾属),饲用牧草,如羊茅属、黑麦草属,温带草(temperate grass),如剪股颖属(Agrostis),和谷物,例如小麦、燕麦、黑麦、大麦、稻米、高粱、和玉米(maize)(玉米)。

[0145] 双子叶植物的实例为烟草、豆类,如羽扇豆、马铃薯、甜菜、豌豆、菜豆(bean)和黄豆,和十字花科植物(十字花科),如花椰菜、油菜籽,和密切相关的模式生物拟南芥。

[0146] 植物部分的实例为茎、愈伤组织、叶、根、果实、种子、和块茎以及包括以下部分的独立组织,例如,表皮、叶肉、薄壁组织、维管组织、分生组织。具体的植物细胞室,如叶绿体、

质外体(apoplast)、线粒体、液泡、过氧化物酶体和细胞质也被认为是植物部分。此外，任何植物细胞，无论组织的来源，都认为是植物部分。同样地，植物部分如分离以促进本发明的应用的具体组织和细胞也被认为是植物部分，例如，胚芽、胚乳、糊粉和种皮。

[0147] 同样包括在本发明范围内的是此类植物、植物部分和植物细胞的后代。

[0148] 表达多肽或结构域的转基因植物或植物细胞可按照本领域已知的方法构建。简单来说，通过将一个或多个编码多肽或结构域的表达构建体导入到植物宿主基因组或叶绿体基因组中并使所得的修饰的植物或植物细胞繁殖成转基因植物或植物细胞，从而构建植物或植物细胞。

[0149] 表达构建体便利地为核酸构建体，该核酸构建体包含与适合的调控序列可操作地连接的编码多肽或结构域的多核苷酸，该调控序列对于在所选的植物或植物部分中进行多核苷酸的表达是必需的。此外，表达构建体可包含可用来鉴定已整合有表达构建体的植物细胞的选择性标记物，以及对于将构建体导入所考虑植物中所必需的DNA序列(后者取决于所使用的DNA导入方法)。

[0150] 调控序列的选择，如启动子和终止子序列以及任选的信号或转运序列的选择，是基于例如期望何时、何处以及如何表达多肽或结构域而加以确定的。比如，编码多肽或结构域的基因的表达可以是组成型表达或诱导型表达，或者可以是发育性表达、阶段表达或组织特异性表达，且基因产物可靶向特定的组织或植物部分，如种子或叶。调控序列记载于例如Tague等人, 1988, Plant Physiology 86:506中。

[0151] 对于组成型表达，可使用35S-CaMV、玉蜀黍泛素1、或稻肌动蛋白1启动子(Franck等人, 1980, Cell 121:285-294; Christensen等人, 1992, Plant Mol. Biol. 18:675-689; Zhang等人, 1991, Plant Cell 13:1155-1165)。器官特异性启动子可以是，例如来自贮藏库组织如种子、马铃薯块茎和果实的启动子(Edwards and Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24:275-303)，或来自代谢库组织如分生组织的启动子(Ito等人, 1994, Plant Mol. Biol. 24:863-878)，种子特异性启动子如来自稻的谷蛋白、醇溶蛋白、球蛋白或白蛋白启动子(Wu等人, 1998, Plant Cell Physiol. 39:885-889)，来自豆球蛋白B4的蚕豆(Vicia faba)启动子和来自蚕豆的未知种子蛋白基因(Conrad等人, 1998, J. Plant Physiol. 152:708-711)、来自种子油体蛋白的启动子(Chen等人, 1998, Plant Cell Physiol. 39:935-941)、来自甘蓝型油菜(Brassica napus)的贮藏蛋白napA启动子，或本领域已知的任何其它种子特异性启动子，例如W091/14772中描述的。此外，启动子可以为叶特异性启动子，如来自稻或番茄的rbcs启动子(Kyozuka等人, 1993, Plant Physiol. 102:991-1000)，小球藻病毒腺嘌呤甲基转移酶基因启动子(Mitra and Higgins, 1994, Plant Mol. Biol. 26:85-93)，来自稻的aldP基因启动子(Kagaya等人, 1995, Mol. Gen. Genet. 248:668-674)，或伤口诱导型启动子如马铃薯pin2启动子(Xu等人, 1993, Plant Mol. Biol. 22:573-588)。同样地，启动子可经由非生物处理诱导，如温度、干旱、或盐度的改变，或经由外部施加的激活启动子的物质诱导，例如，乙醇、雌激素、植物激素(如乙烯、脱落酸、和赤霉酸)，以及重金属。

[0152] 也可使用启动子增强元件来实现植物中多肽或结构域的更高表达。比如，启动子增强元件可以是位于启动子与编码多肽或结构域的多核苷酸之间的内含子。比如，Xu等人(1993, 同上)公开了使用稻肌动蛋白1基因的第一内含子来加强表达。

[0153] 选择性标记物基因和表达构建体的任何其它部分可从本领域中可得的那些中选

择。

[0154] 核酸构建体按照本领域已知的常规技术导入到植物基因组中,这些技术包括农杆菌介导转化、病毒介导转化、显微注射、粒子轰击、基因枪转化(biolistic transformation)和电穿孔(Gasser等人,1990,Science244:1293;Potrykus,1990,Bio/Technology8:535;Shimamoto等人,1989,Nature338:274)。

[0155] 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导基因转移是用于产生转基因双子叶植物(对于综述,参见Hooykas and Schilperoort,1992,Plant Mol.Biol.19:15-38)和用来转化单子叶植物的方法,虽然对于这些植物也可使用其他转化方法。用于产生转基因单子叶植物的方法是对胚愈伤组织或发育中的胚进行粒子轰击(涂有转化DNA的微观的金或钨颗粒)(Christou,1992,Plant J.2:275-281;Shimamoto,1994,Curr.Opin.Biotechnol.5:158-162;Vasil等人,1992,Bio/Technology10:667-674)。可替代的用于单子叶植物的转化方法是基于Omirulleh等人,1993,Plant Mol.Biol.21:415-428描述的原生质体转化。额外的转化方法包括在美国专利第6,395,966号和第7,151,204号(二者均全部并入本文以供参考)中描述的那些。

[0156] 转化后,根据本领域已熟知的方法选择已导入表达构建体的转化株并再生成整个植物。通常,转化过程设计为通过以下方法在再生过程中或在后续世代中选择性地消除选择基因:通过使用例如两个单独的T-DNA构建体的共转化或通过特异性重组酶对选择基因的位点特异性切除。

[0157] 除使用本发明的构建体进行的特定植物基因型的直接转化之外,还可通过将具有该构建体的植物与缺乏该构建体的另一植物进行杂交(cross)获得转基因植物。例如,可通过杂交将编码多肽或结构域的构建体导入特定植物种类,而不需要直接转化给定类型的植物。因此,本发明不仅包含直接从按照本发明进行转化的细胞再生的植物,还包含此类植物的后代。如本文所使用的,后代可表示按照本发明制备的亲本植物的任一代的后裔。此类后代可包含按照本发明制备的DNA构建体。杂交使得转基因通过起始株系与供体植物系的异花授粉而导入植物系。此类步骤的非限制性实例在美国专利第7,151,204号中描述。

[0158] 植物可通过回交转换的过程产生。例如,植物包括被称为回交转换基因型、系、近交种的或杂交种的植物。

[0159] 遗传标记物可用于协助发明的一个或多个转基因从一个遗传背景到另一个遗传背景的渐渗作用(introgression)。标记物协助的选择相对于传统育种所提供的优势在于,它可用来避免表型变异导致的错误。另外,遗传标记物可提供关于特定杂交的个体后代中的优良种质相对程度的数据。例如,当具有期望性状的另外具有非农艺学所期望的遗传背景的植物与优良亲本杂交时,遗传标记物可用来选择不仅具有目标性状、还具有较大比例的期望种质的后代。这样,将一个或多个性状基因渗入到特定遗传背景所需的世代数目被最大程度地降低。

[0160] 本发明还涉及生产本发明的多肽或结构域的方法,其包括(a)在有益于生产多肽或结构域的条件下培养包括编码多肽或结构域的多核苷酸的转基因植物或植物细胞;(b)回收多肽或结构域。

[0161] 过氧化酶活性的去除或降低

[0162] 本发明还涉及生产亲本细胞的突变体的方法,其包括破坏编码本发明多肽的多核

昔酸或其部分或者使其缺失,得到与亲本细胞相比当在相同条件下培养时产生更少的多肽的突变细胞。

[0163] 可通过使用本领域熟知的方法(例如插入、破坏、取代或缺失)减少或消除多核昔酸的表达来构建突变细胞。在优选的方面,多核昔酸是失活的。所要修饰或失活的多核昔酸可以是,例如编码区或对于活性而言必需的部分,或者是编码区表达所需的调控元件。这样的调控序列或控制序列的实例可以是启动子序列或其功能性部分,即,足以影响多核昔酸的表达的部分。用于可能的修饰的其它控制序列包括但不限于,前导序列、多腺昔酸化序列、前肽序列、信号肽序列、转录终止子和转录激活因子。

[0164] 可以通过对亲本细胞进行诱变,并且选择其中多核昔酸的表达已降低或消除的突变细胞来进行多核昔酸的修饰或失活。诱变可以是特异性的或随机的,其可以通过例如使用合适的物理或化学诱变剂进行,通过使用合适的寡核昔酸进行,或通过对DNA序列施以PCR产生的诱变而进行。此外,可以通过使用这些诱变剂的任何组合来进行诱变。

[0165] 适合于本发明目的的物理或化学诱变剂的实例包括紫外线(UV)照射、羟胺、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)、邻甲基羟胺、亚硝酸、甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulphonate)(EMS)、亚硫酸氢钠、甲酸和核昔酸类似物。

[0166] 当使用这些试剂时,通常通过如下过程来进行诱变:在合适条件下,并在存在所选的诱变剂时,培育待诱变的亲本细胞,并筛选和/或选择表现出减少的基因表达或无基因表达的突变细胞。

[0167] 可以通过基因中一个或多个核昔酸或者其转录或翻译所需的调控元件的插入、替换或缺失来实现多核昔酸的修饰或失活。例如,可以插入或去除核昔酸从而导致终止密码子的引入,起始密码子的去除,或开放阅读框的改变。可以按照本领域已知的方法通过定位诱变或PCR产生的诱变来实现这种修饰或失活。尽管在理论上可以在体内进行修饰,即,直接在表达待修饰多核昔酸的细胞上进行,但优选如下面所示例的那样在体外进行修饰。

[0168] 消除或降低多核昔酸表达的便利方式的实例是基于基因取代、基因缺失或基因破坏的技术。例如,在基因破坏方法中,将对应于内源多核昔酸的核酸序列在体外进行诱变以产生有缺陷的核酸序列,随后将其转化入亲本细胞中以产生缺陷性基因。通过同源重组,缺陷性核酸序列取代内源多核昔酸。理想的是缺陷性多核昔酸还编码可用于选择其中多核昔酸已被修饰或破坏的转化子的标记物。在一个方面,使用选择性标记物(如本文所述的那些)来破坏多核昔酸。

[0169] 本发明还涉及抑制具有过氧化酶活性的多肽在细胞中表达的方法,其包括对细胞施用双链RNA(dsRNA)分子或者在细胞中表达双链RNA(dsRNA)分子,其中dsRNA包含本发明多核昔酸的子序列。在一个优选的方面,dsRNA长约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个或更多个双链体核昔酸。

[0170] dsRNA优选地是小干扰RNA(siRNA)或微小RNA(miRNA)。在优选的方面,dsRNA是用于抑制转录的小干扰RNA。在另一优选的方面,dsRNA是用于抑制翻译的微小RNA。

[0171] 本发明还涉及用于抑制细胞中多肽表达的包含SEQ ID NO:1成熟多肽编码序列的部分的这样的双链RNA(dsRNA)分子。本发明不受任何特定作用机制的限制,但是dsRNA能进入细胞并引起相似或等同序列的单链RNA(ssRNA)包括内源mRNA的降解。当细胞暴露于dsRNA时,来自同源基因的mRNA经由称为RNA干扰(RNAi)的过程被选择性地降解。

[0172] 本发明的dsRNA可以用于基因沉默。在一个方面，本发明提供使用本发明的dsRNAi选择性降解RNA的方法。该过程可以在体外、先体外后体内或在体内进行。在一个方面，dsRNA分子能够用于产生细胞、器官或动物中的功能丧失突变。制备和使用用于选择性降解RNA的dsRNA分子的方法在本领域中公知；参见，例如美国专利第6,489,127号；第6,506,559号；第6,511,824号；和第6,515,109号。

[0173] 本发明还涉及亲本细胞的突变细胞，其包含编码多肽的多核苷酸或其控制序列的破坏或缺失或者包含编码多肽的沉默基因，这样得到与亲本细胞相比产生更少的多肽或不产生多肽的突变细胞。

[0174] 多肽缺陷型突变细胞作为表达内生和异源多肽的宿主细胞特别有用。所以，本发明进一步涉及生产内生或异源多肽的方法，包括：(a)在有益于生产多肽的条件下培养突变细胞；和(b)回收多肽。术语“异源多肽”意为对宿主细胞不是内生的多肽，例如，内生蛋白的变体。宿主细胞可包含多于一个拷贝的编码内生或异源多肽的多核苷酸。

[0175] 用于培养和纯化目标产物的方法可通过本领域已知的方法进行。

[0176] 本发明的用于产生基本上无过氧化酶的产物的方法在真核多肽(特别是真菌蛋白比如酶)的生产中具有特别的意义。过氧化酶缺陷型细胞也可用于表达具有药用价值的异源蛋白，如激素、生长因子、受体等。术语“真核多肽”不仅包括内生的多肽，而且还包括例如酶的已经由氨基酸替换、缺失或增加或其它这样的修饰所修饰以增强活性、热稳定性和pH耐受性等的那些多肽。

[0177] 在另一个方面，本发明涉及通过本发明的方法产生的基本上无过氧化酶活性的蛋白产物。

[0178] 组合物

[0179] 在又一个方面，本发明涉及包含本发明的具有过氧化酶活性(过氧化酶)的多肽的组合物。

[0180] 该组合物可包含本发明的过氧化酶作为主要的多肽组分，例如，单组分组合物。或者，该组合物可包含多种酶活性，如氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、卤代过氧化物酶(haloperoxidase)、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、氧化酶、果胶分解酶、胱谷氨酰胺酶(peptidoglutaminase)、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶或木聚糖酶。

[0181] 可按照本领域已知的方法制备组合物，并且组合物可以是液体或干燥组合物的形式。例如，多肽组合物可以是颗粒或微粒的形式。可按照本领域内已知的方法将包含于组合物中的多肽稳定化。

[0182] 下面给出本发明多肽组合物的优选用途的实例。可以基于本领域内已知的方法来确定本发明的多肽组合物的剂量和使用该组合物的其它条件。

[0183] 可以加入本发明的过氧化酶多肽并由此使其成为洗涤剂组合物的组分。

[0184] 本发明的洗涤剂组合物可以配制成例如手洗或机洗洗涤剂组合物，其包括适合于预处理玷污织物的洗衣添加剂组合物和漂洗添加的织物柔软剂组合物；或者可以配制成用于一般家庭硬表面清洁操作的洗涤剂组合物；或者配制用于手洗或机洗洗碗操作。

[0185] 在具体的方面，本发明提供一种包含如本文所述的本发明多肽的洗涤剂添加剂。

[0186] 该洗涤剂组合物可包含一种或多种表面活性剂,该表面活性剂可以是阴离子的和/或阳离子的和/或非离子的和/或半极性的和/或两性离子的表面活性剂或其混合物。在具体的实施方式中,洗涤剂组合物包括一种或多种非离子表面活性剂与一种或多种阴离子表面活性剂的混合物。表面活性剂的典型存在水平是约0.1-60wt%,例如,约1%至约40%,或约3%至约20%,或约3%至约10%。表面活性剂的选择取决于所需的清洁应用,并且包括本领域已知的任何常规的表面活性剂。

[0187] 洗涤剂添加剂以及洗涤剂组合物可包含一种或多种其它酶,如蛋白酶、脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶,例如漆酶和/或过氧化物酶。

[0188] 本发明的多肽可以以与每升洗涤液0.001-100mg蛋白对应的量添加到洗涤剂组合物中,例如0.01-100mg的蛋白,优选0.005-50mg蛋白,更优选0.01-25mg的蛋白,甚至更优选0.05-10mg的蛋白,最优选0.05-5mg的蛋白,并且甚至最最优选0.01-1mg的蛋白。

[0189] 具有过氧化酶活性的多肽(过氧化酶)以及任选额外的过氧化氢源可以配制成液体(例如,水性的)、固体、凝胶、糊剂或干燥产品制剂。随后可将干燥产品制剂再水化以形成可用于本发明的方法中的活性液体或半液体制剂。

[0190] 当将过氧化酶与过氧化氢源配制成干燥制剂时,可将这些组分混合布置成不连续的层或单独进行包装。

[0191] 当使用非干燥形式的制剂时,并且即使在这种情况下,优选地使用过氧化酶与过氧化氢源分开的两部分制剂系统。

[0192] 本发明的组合物还可包含助剂,比如润湿剂、增稠剂、用于pH控制的缓冲剂、稳定剂、香料、着色剂、填充剂等。

[0193] 有用的润湿剂是表面活性剂,即非离子、阴离子、两性或两性离子表面活性剂。上文进一步描述过表面活性剂。

[0194] 方法和用途

[0195] 本发明的过氧化酶多肽可以用于脂族烃的2位或3位的位点特异性羟化,如在WO2011/120938中所描述的那样。脂族烃必须包括至少3个碳的链,并且脂族烃的任(一个或多个)端可以用作起始点以确定哪个碳在2位或3位。脂族烃必须具有至少一个连接至2位或3位的碳(被羟化的)的氢。在优选的实施方案中,由过氧化酶羟化的2位或3位的碳是未取代的(在进行羟化之前)。

[0196] 因此,在第一方面,本发明提供用于取代的或未取代的、直链或支链的脂族烃的任一端(一个或多个端)的2位或3位羟化的方法,该脂族烃具有至少3个碳并具有连接至2位或3位碳的氢,该方法包含使脂族烃与过氧化氢和本发明的具有过氧化酶活性的多肽相接触。

[0197] 本发明的方法可用于各种目的,例如批量化学合成(生物催化),增加脂族烃的水溶解度、生物除污(bioremediation)和改进食品特性。

[0198] 本发明的方法也可用于许多工业工艺中,其中所述羟化反应是有益的。这种应用的一个实例是在纸浆和纸制品的制造中,其中存在于木材(树脂)中的烷烃和其它相关的脂族烃可能导致纸浆和纸张制造过程中的沉积问题。这些疏水化合物是纸浆和纸张制造过程中所谓的树脂沉积物(pitch deposit)的前体。树脂沉积导致低品质的纸浆,并且可能引起纸浆厂运营的停工。与具有高提取物含量的纸浆相关的特定问题包括运转能力问题、纸上

的斑点和孔洞以及纸张断裂。用过氧化酶进行处理可以增加所述化合物的溶解度并因此缓解问题。

[0199] 本发明方法的另一个用途是，即用于石油或煤精炼，其中过氧化酶催化的羟化可用于改变烃的溶解度、粘度和/或燃烧特性。具体地，该处理会引起所处理的烃的烟点、着火点(*kindling point*)、燃点(*fire point*)和沸点发生变化。

[0200] 在散装化学品、农业化学品(包括杀虫剂)、专用化学品和药品的合成中，本发明的方法显然在将羟基选择性地引入底物从而影响所修饰的化合物的溶解度方面是相关联的。此外，选择性羟化对于通过有机化学合成和化学酶促合成领域的已知方法进行进一步修饰提供了位点。

[0201] 将天然气彻底加工以去除高级烷烃。此类高级烷烃的羟化可用于提高水溶解度，并且因此便于通过洗涤天然气流而去除高级烷烃。可以在井中或者在精炼过程中进行去除。

[0202] 油废物的羟化将显著地提高生物可降解性，并且可应用于涉及来自精炼厂的废水处理和被污染地面或水的生物除污的方面。

[0203] 在第二方面，本发明提供用于在脂质的酰基的末端的2位或3位进行羟化的方法，其包括使脂质与过氧化氢和本发明的具有过氧化酶活性的多肽相接触。

[0204] 脂质的酰基的羟化通常提高脂质的水溶解度。相应地，通过使衣物与过氧化酶和过氧化氢源、以及任选的表面活性剂相接触，本发明的方法可用于从衣物除去或减少包含油或脂质的污渍，如巧克力。

[0205] 在另一方面，通过将衣物与过氧化酶和过氧化氢源以及任选的表面活性剂相接触，本发明的方法可以用来减少衣物中难闻的气味。本发明的方法导致衣物中的丁酸(酪酸)量减少。丁酸在洗涤衣物期间某些动物脂肪和植物油例如通过洗涤剂脂肪酶被水解得到游离的脂肪酸(包括丁酸)时形成。丁酸具有极其难闻的气味。过氧化酶将丁酸羟化成2-羟基丁酸(α -羟基丁酸)或3-羟基丁酸(β -羟基丁酸)。

[0206] 本发明还提供使用本发明的过氧化酶多肽和过氧化氢在脂族烃的至少两端的第二或第三个碳处位点特异性引入羟基和/或氧代(酮)基的方法。

[0207] 脂族烃必须包括至少5个碳的链。通过从脂族烃的任一端对碳原子计数来确定第二个碳和第三个碳。

[0208] 脂族烃必须具有至少一个与经由羟基的连接而被羟化的碳相连接的氢；以及至少两个在引入氧代基时与碳连接的氢。在优选的实施方式中，第二或第三个碳在与过氧化酶接触之前是未取代的。

[0209] 根据本发明的方法，羟基和/或氧代基在脂族烃的(至少)两端处彼此独立地引入。因此，可以在一端引入羟基，同时在另一(其它)端引入氧代基，反之亦然。不能在脂族烃的相同端引入两个羟基、或两个氧代基、或一个羟基和一个氧代基。实施例1示出了一些组合的实例。

[0210] 在本发明的上下文中，“氧化”指的是羟基和/或氧代基的引入。

[0211] 相应地，在第一方面，本发明提供在取代或未取代的、直链或支链的脂族烃的(至少)两个端部的第二或第三个碳处引入羟基和/或氧代(酮)基的方法，脂族烃具有至少5个碳并且具有至少一个连接到所述第二或第三个碳上的氢，该方法包括将脂族烃与过氧化氢

和具有本发明的过氧化酶活性的多肽相接触。

[0212] 在实施方式中，脂族烃不是正己烷或正癸烷。

[0213] 在优选的实施方式中，脂族烃通过引入两个羟基被氧化成(转换成)二醇。更优选地，两个羟基位于直链脂族烃的每个端部处。

[0214] 本发明的方法可以用于各种目的，例如，批量化学合成(生物催化)，增加脂族烃的水溶解度、生物除污和改进食品特性。

[0215] 本发明的方法也可用于许多工业过程中，其中所述氧化反应是有益的。这种应用的一个实例是在纸浆和纸制品的制造中，其中存在于木材(树脂)中的烷烃和其它相关的脂族烃可能导致纸浆和纸张制造过程中的沉积问题。这些疏水化合物是纸浆和纸张制造过程中所谓的树脂沉积物的前体。树脂沉积导致低品质的纸浆，并且可能引起纸浆厂运营的停工。与具有高提取物含量的纸浆相关的特定问题包括运转能力问题、纸上的斑点和孔洞以及纸张断裂。用过氧化酶进行处理可以增加所述化合物的溶解度并因此缓解问题。

[0216] 本发明方法的另一个用途是，例如用于油或煤精炼，其中过氧化酶催化的氧化可用于改善烃的溶解度、粘度和/或燃烧特性。具体地，该处理会引起所处理的烃的烟点、着火点、燃点和沸点发生变化。

[0217] 在批量化学品、农业化学品(包括杀虫剂)、专用化学品和药品的合成中，本发明的方法显然在将羟基选择性地引入底物从而影响所修饰的化合物的溶解度方面是相关联的。此外，选择性氧化对于通过有机化学合成和化学酶促合成领域的已知方法进行进一步修饰提供了位点。

[0218] 将天然气彻底加工以去除高级烷烃。此类高级烷烃的氧化可用于提高水溶解度，并且因此便于通过洗涤天然气流而去除高级烷烃。可以在井中或者在精制过程中进行去除。

[0219] 根据本发明，油废物的氧化将显著地提高生物可降解性，并且可应用于涉及来自精炼厂的废水处理和被污染地面或水的生物除污的方面。

[0220] 可以用本发明的固定化过氧化酶多肽来实施本发明的方法。

[0221] 本发明的方法可在水性溶剂(反应介质)、多种醇、醚、其他极性或非极性溶剂、或其混合物中进行。通过研究用于本发明方法的脂族烃的特征，本领域技术人员可容易地认知溶剂的合适实例。通过提高或降低进行羟化/氧化的压力，溶剂(反应介质)和脂族烃可以在反应温度保持液相。

[0222] 根据本发明的方法可在0~90摄氏度，优选5~80摄氏度，更优选10~70摄氏度，甚至更优选15~60摄氏度，最优选20~50摄氏度，且特别是20~40摄氏度的温度进行。

[0223] 本发明的方法可采用10秒至(至少)24小时的处理时间，优选1分钟至(至少)12小时，更优选5分钟至(至少)6小时，最优选5分钟至(至少)3小时，且特别是5分钟至(至少)1小时的处理时间。

[0224] 通过本发明方法产生的二醇(二羟基脂族烃)可用于制备聚氨酯。聚氨酯是由通过氨基甲酸酯(carbamate, urethane)键连接的有机单元的链组成的聚合物。通过在催化剂的存在下使单体(具有至少两个异氰酸酯官能团)与另一单体(具有至少两个羟基)反应，经逐步生长聚合来形成聚氨酯聚合物。

[0225] 本发明还提供用于在取代的或未取代的、直链或支链的脂族烃的第二或第三个碳

处引入氧代(酮)基的方法,该脂族烃具有至少5个碳并具有至少两个与所述第二或第三个碳连接的氢,该方法包括将脂族烃与过氧化氢和具有本发明的过氧化酶活性的多肽相接触。

[0226] 在实施方式中,脂族烃不是正己烷或正癸烷。

[0227] 在另一方面,本发明还提供用于在直链或支链脂族烃的末端碳处引入羟基或氧代基的方法,该脂族烃具有至少五个用羧基取代的碳原子,该方法包括将脂族烃与过氧化氢和具有本发明的过氧化酶活性的多肽相接触。

[0228] 在实施方式中,被羧基取代的脂族烃是脂肪酸;优选丁酸(酪酸)、戊酸(缬草酸)、己酸(羊油酸)、庚酸(葡萄花酸)、辛酸(羊脂酸)、壬酸(天竺葵酸)、癸酸(羊蜡酸)、十二酸(月桂酸)、十四酸(肉豆蔻酸)、十六酸(棕榈酸)、十八酸(硬脂酸)、二十酸(花生酸)、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸或二十二碳六烯酸。

[0229] 在实施方式中,被羧基取代的脂族烃不是月桂酸或棕榈酸。

[0230] 在又一方面,本发明还提供用于将具有至少5个碳的直链或支链脂族烃的伯醇变成(氧化成)相应的酸的方法,该方法包含将脂族烃的醇与过氧化氢和具有本发明的过氧化酶活性的多肽相接触。

[0231] 例如,戊醇可以变化(氧化)为戊酸(缬草酸),己醇可以变化为己酸(羊油酸),庚醇可以变化为庚酸(葡萄花酸),辛醇可以变化为辛酸(羊脂酸),壬醇可以变化为壬酸(天竺葵酸),癸醇可以变化为癸酸(羊蜡酸),十二醇可以变化为十二酸(月桂酸),十四醇可以变化为十四酸(肉豆蔻酸),十六醇可以变化为十六酸(棕榈酸),十八醇可以变化为十八酸(硬脂酸),且二十醇可以变化为二十酸(花生酸)。

[0232] 具有本发明的过氧化酶活性的多肽(过氧化酶多肽或过氧化酶)以0.005-50ppm (mg/1)、或0.01-40、0.02-30、0.03-25、0.04-20、0.05-15、0.05-10、0.05-5、0.05-1、0.05-0.8、0.05-0.6或0.1-0.5ppm的量用于本发明的方法中。酶的量是指定义明确的酶制剂的毫克值。

[0233] 在本发明的方法中,过氧化酶可以单独应用或与额外的酶一起应用。术语“额外的酶”是指至少一种额外的酶,例如,一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或甚至更多额外的酶。

[0234] 术语“与…一起应用”(或“与…一起使用”)是指额外的酶可以应用于本发明方法的同一步骤或另一步骤中。与使用了过氧化酶的步骤相比,其它工序步骤可以是上游或下游的。

[0235] 在特定的实施方式中,额外的酶是具有蛋白酶、脂肪酶、木聚糖酶、角质酶、氧化还原酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、淀粉酶、甘露聚糖酶、甾酯酶(steryl esterase)和/或胆甾醇酯酶活性的酶。氧化还原酶的实例是具有漆酶和/或过氧化酶活性的酶。

[0236] 方法中的术语“步骤”是指至少一个步骤,并且其可以为一个、两个、三个、四个、五个或者更多个方法步骤。换句话说,本发明的过氧化酶可以应用于至少一个方法步骤中,且额外的酶也可应用于至少一个方法步骤,该步骤与使用过氧化酶的步骤相比可以是相同或不同的方法步骤。

[0237] 术语“酶制剂”是指含有至少一种过氧化酶的产品。酶制剂也可以包含具有其它酶活性的酶。除了酶活性,此类制剂优选地含有至少一种佐剂。佐剂的实例是缓冲剂、聚合物、

表面活性剂和稳定剂。

[0238] 过氧化氢

[0239] 过氧化酶所需的过氧化氢可提供为过氧化氢的水溶液,或提供为用于原位产生过氧化氢的过氧化氢前体。任何在溶解时释放可被过氧化酶利用的过氧化物的固体实体均可用于过氧化氢的来源。当溶解于水或合适的水性介质时产生过氧化氢的化合物包括但不限于,金属过氧化物、过碳酸盐、过硫酸盐、过磷酸盐、过氧酸、烷基过氧化物、酰基过氧化物、过氧酯(peroxyesters)、尿素过氧化物、过硼酸盐和过氧羧酸或它们的盐。

[0240] 过氧化氢的另一来源是生成过氧化氢的酶体系,诸如氧化酶和过氧化酶的底物。氧化酶和底物的组合的实例包括但不限于:氨基酸氧化酶(参见例如US6,248,575)和合适的氨基酸;葡萄糖氧化酶(参见例如W095/29996)和葡萄糖;乳酸氧化酶和乳酸盐;半乳糖氧化酶(参见例如W000/50606)和半乳糖;以及醛糖氧化酶(参见例如W099/31990)和合适的醛糖。

[0241] 通过研究EC1.1.3._、EC1.2.3._、EC1.4.3._和EC1.5.3._或类似的类型(根据国际生物化学联合会),本领域技术人员可容易地识别此类氧化酶和底物的组合的其他实例。

[0242] 可在本发明的方法开始时或过程中添加过氧化氢或过氧化氢源,例如作为过氧化氢的一次或多次单独添加;或连续地作为补料分批添加。过氧化氢的典型量相当于0.001 mM至25mM的水平,优选0.005mM至5mM的水平,且特别是0.01至1mM的水平的过氧化氢。过氧化氢还可以以相当于0.1mM至25mM的水平使用,优选0.5mM至15mM的水平,更优选1mM至10mM的水平,且最优选2mM至8mM的水平的过氧化氢量使用。

[0243] 脂族烃

[0244] 在本发明的方法中被羟化的烃是具有至少3个碳的链且具有与2位或3位碳相连接的氢的脂族烃。优选地,脂族烃是烷或烯;更优选地,脂族烃是烷,诸如丙烷、丁烷、戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷或癸烷或其异构体。

[0245] 脂族烃是直链或支链的,但非环化的,因为位点特异性羟化对环烃是不可行的。支链烃相当于直链烃的异构体。

[0246] 脂族烃是取代或未取代的。优选地,脂族烃是未取代的,诸如非活化的烃。

[0247] 当脂族烃是取代的时(连接有官能团),优选的取代基为卤素、羟基、羧基、氨基、硝基、氰基、硫醇基、磺酰基、甲酰基、乙酰基、甲氧基、乙氧基、苯基、苄基、二甲苯基、氨基甲酰基和氨磺酰基;更优选的取代基为氯、羟基、羧基和磺酰基;最优选的取代基为氯和羧基。

[0248] 脂族烃可被多至10个取代基,多至8个取代基,多至6个取代基,多至4个取代基,多至2个取代或多至一个取代基取代。

[0249] 在优选的实施方式中,脂族烃是脂肪酸(取代基是羧基)。脂肪酸的实例包括,但不限于,丁酸(酪酸)、戊酸(缬草酸)、己酸(羊油酸)、庚酸(葡萄花酸)、辛酸(羊脂酸)、壬酸(天竺葵酸)、癸酸(羊蜡酸)、十二酸(月桂酸)、十四酸(肉豆蔻酸)、十六酸(棕榈酸)、十八酸(硬脂酸)、二十酸(花生酸)、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸。

[0250] 在第二方面,脂族烃是脂质例如甘油一酯、甘油二酯、甘油三酯、磷脂或鞘脂的酰基;且羟化发生在酰基末端的2位或3位。酰基必须具有至少一个与末端的2位或3位碳连接的氢。酰基可以是饱和或不饱和的,并且可以连接有任选的官能团(取代基)。酰基的实例包括但不限于,丁酸(酪酸)、戊酸(缬草酸)、己酸(羊油酸)、庚酸(葡萄花酸)、辛酸(羊脂酸)、壬酸(天竺葵酸)、癸酸(羊蜡酸)、十二酸(月桂酸)、十四酸(肉豆蔻酸)、十六酸(棕榈酸)、十

八酸(硬脂酸)、二十酸(花生酸)、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的酰基形式。

[0251] 信号肽

[0252] 本发明还涉及分离的多核苷酸，其编码包括SEQ ID NO:2的氨基酸-17至-1或由其组成的信号肽。多核苷酸还可包括编码与信号肽可操作地连接的蛋白的基因。蛋白优选对于信号肽是外来的。在一个方面，编码信号肽的多核苷酸是SEQ ID NO:1的核苷酸1至51。

[0253] 本发明还涉及包括该多核苷酸的核酸构建体、表达载体和重组宿主细胞。

[0254] 本发明还涉及生产蛋白的方法，包括：(a)培养包含该多核苷酸的重组宿主细胞；和(b)回收蛋白。

[0255] 蛋白对于宿主细胞而言可以是内生的或异源的。术语“蛋白”在本文中并非意指特定长度的编码产物，因此其涵盖肽、寡肽和多肽。术语“蛋白”还包括组合形成编码产物的两个或更多个多肽。蛋白还包括杂合多肽和融合多肽。

[0256] 优选地，蛋白是激素、酶、受体或其部分、抗体或其部分、或报告子。例如，蛋白可以是水解酶、异构酶、连接酶、裂解酶、氧化还原酶或转移酶，例如氨肽酶、淀粉酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维二糖水解酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、内切葡聚糖酶、酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、变聚糖酶(mutanase)、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、木聚糖酶或 β -木糖苷酶。

[0257] 基因可以从任何原核生物、真核生物或其它来源获得。

[0258] 通过下面的实施例进一步描述本发明，这些实施例不应视为限制本发明的范围。

[0259] 实施例

[0260] 菌株

[0261] 米曲霉MT3568是米曲霉JaL355(WO2002/40694)的amdS(乙酰胺酶)基因破坏的衍生物，其中通过用pyrG基因破坏米曲霉乙酰胺酶(amds)基因来修复pyrG营养缺陷型。

[0262] 培养基和溶液

[0263] DAP-4C-1培养基

[0264] 11g MgSO₄, 7H₂O

[0265] 1g KH₂PO₄

[0266] 2g C₆H₈O₇, H₂O

[0267] 20g葡萄糖

[0268] 10g麦芽糖

[0269] 5.2g K₃PO₄, H₂O

[0270] 0.5g酵母提取物

[0271] 0.5ml KU6微量元素溶液(AMG)

[0272] 混合直至完全溶解

[0273] 添加1ml的Dowfax63N10(直链EO/PO嵌段共聚物、除泡剂/止泡剂)

[0274] 用Milli-Q水调节体积至1000ml

[0275] CaCO₃片剂0.5g(每200ml添加1片)

[0276] 接种前,150ml的各摇瓶添加3.5ml的50%磷酸氢二铵($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)和5.0ml的20%乳酸。

[0277] KU6微量金属溶液(AMG)

[0278] 6.8g ZnCl_2

[0279] 2.5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

[0280] 0.13g无水氯化镍

[0281] 13.9g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

[0282] 8.45g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

[0283] 3g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$

[0284] 离子交换水加至1000ml

[0285] 实施例1

[0286] 过氧化酶的表达和发酵

[0287] 米曲霉菌株MT3568用于SEQ ID NO:1多核苷酸所编码的成熟过氧化酶的异源表达。

[0288] SEQ ID NO:1是从在1964年保存且源自瑞士的特异腐质霉CBS147.64(从荷兰菌种保藏中心获得)分离的基因组核苷酸序列。

[0289] 包含SEQ ID NO:1多核苷酸的表达构建体被转化到米曲霉菌株MT3568中。于37℃孵育4-7天后,将四至八个转化子的孢子接种到96深孔板中的0.5ml DAP-4C-01培养基中。

[0290] 在30℃培养4天后,培养液通过SDS-PAGE分析以鉴定产生最大量的重组过氧化酶的转化子,并且还在用于证实过氧化酶活性的测定中对培养液进行分析。

[0291] 如上构建的米曲霉转化子在以150RPM旋转的振荡摇床孵育箱中在于30℃孵育的500ml凹槽摇瓶中的150ml DAP-4C-01培养基中发酵5天,并进一步用于下述的测定。

[0292] 实施例2

[0293] 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)的氧化

[0294] 过氧化物酶和过氧化酶在过氧化氢的存在下氧化2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(也称为ABTS),且产生的绿色用分光光度法在405nm处定量($\epsilon_{405}=36,800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

[0295] 反应混合物(0.2ml)包含1.0mM ABTS、缓冲液(50mM磷酸盐缓冲液pH7或50mM Britton-Robinson缓冲液pH4)、20 μl 过氧化酶发酵上清液(参见实施例1)和0.5mM过氧化氢。

[0296] 通过将过氧化酶上清液添加至测定中使用的其他组分而开始反应。应用Molecular Devices的SpectraMax酶标仪,在室温下监测96孔微孔板在405nm处的吸光度变化。包括不添加酶而制备的空白。

[0297] 记录5分钟的吸光度增加,且每分钟吸光度(milli Abs)的变化的结果在表1中示出。

[0298] 表1

[0299]

样本	pH4下的速率(mA/min)	pH7下的速率(mA/min)
空白	-0.08	-0.37

实施例1的过氧化酶	161.06	12.46
-----------	--------	-------

[0300] 实施例3

[0301] 4-硝基苯并二氧杂环戊烯的氧化

[0302] 过氧化酶在过氧化氢的存在下将4-硝基苯并二氧杂环戊烯(1,2-(亚甲基双氧)-4-硝基苯)氧化为4-硝基儿茶酚,且产生的黄色用分光光度法在425nm处进行定量($\epsilon_{425}=9,700\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

[0303] 在乙腈中制备4-硝基苯并二氧杂环戊烯(98%纯,161500Aldrich)的10mM储备溶液。最终的反应混合物(0.2ml)包含1.0mM4-硝基苯并二氧杂环戊烯、10%乙腈、缓冲液(50mM磷酸盐缓冲液pH7或50mM Britton-Robinson缓冲液pH4)、20μl过氧化酶发酵上清液(参见实施例1)和0.5mM过氧化氢。

[0304] 通过将过氧化酶上清液添加至测定中使用的其他组分而开始反应。应用Molecular Devices的SpectraMax酶标仪,在室温下监测96孔微孔板在425nm处的吸光度变化。包括不添加酶而制备的空白。

[0305] 记录5分钟的吸光度增加,且每分钟吸光度(milli Abs)变化的结果在表2中示出。

[0306] 表2

[0307]

样本	pH4下的速率(mA/min)	pH7下的速率(mA/min)
空白	-6.15	-10.10
实施例1的过氧化酶	-12.26	153.48

[0308] 实施例4

[0309] 萍的氧化

[0310] 萍氧化活性的鉴定根据Kluge等人(2007,Appl Microbiol Biotechnol 75:1473-1478)描述的分光光度法步骤进行。

[0311] 在乙腈中制备萍的10mM储备溶液。最终反应混合物(1ml)包含2mM萍、20%乙腈、50mM缓冲液(醋酸盐缓冲液pH4或磷酸盐缓冲液pH7)、20μl过氧化酶发酵上清液(参见实施例1)和1mM过氧化氢。

[0312] 通过添加过氧化氢而开始反应,并在产生1-萍酚($\epsilon_{303}=2,010\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)后测量303nm处的吸光度增加。

[0313] 记录2分钟的吸光度增加,结果在表3中示出。

[0314] 表3

[0315]

时间(秒)	pH4	pH7
1.4	0.702	0.919
14	0.715	1.002
26	0.765	1.059
38	0.804	1.099
50	0.834	1.129
62	0.858	1.155
74	0.877	1.174

86	0.894	1.188
[0316]		
98	0.907	1.200
110	0.919	1.208
119	0.928	1.214

[0317] 实施例5

[0318] 黎芦醇的氧化

[0319] 在1mL的总反应体积中,使用0.01mg/mL纯化的过氧化酶(由SEQID NO:1编码的成熟过氧化酶),与20%乙腈和5mM醋酸盐(pH4.5)、磷酸盐(pH6.5)或硼酸盐缓冲液(pH8.5)在特定pH值下实施1mM H₂O₂对1mM黎芦醇的氧化。反应在室温下进行25分钟,且样本随后用50μL50%(w/v)三氯乙酸失活。

[0320] 样本在装备有二极管阵列检测器的Agilent 1200HPLC系统(Agilent, Santa Clara CA, USA)上分析,并在40℃恒温的Phenomenex(Torrance CA, USA)的Gemini C6-苯基(110Å, 2×150mm, 3μm)柱上分离。使用两个流动相:(A) 0.1%甲酸和(B) 乙腈中的0.1%甲酸。

[0321] 分离使用分级式梯度运行,以20%B开始,保持1分钟,然后在4分钟内增加到55%并在55%保持1分钟,恒定流速0.4mL/min。

[0322] 黎芦醇及其氧化产物黎芦醛和黎芦酸通过外部校准使用可靠的标准物,基于它们的保留时间、UV吸收光谱(分别为230nm、280nm和260nm)进行鉴别和定量。

[0323] 表4.在各个pH计算的黎芦醛(V-CHO)和黎芦酸(V-COOH)收率的比较

[0324]

pH	V-CHO (%)	V-COOH (%)
4.5	0.8%	0%
6.5	4.0%	0.4%
8.5	0.7%	0%

[0325] 实施例6

[0326] 二苯并噻吩的氧化

[0327] 在1mL的总反应体积中,使用0.01mg/mL纯化的过氧化酶(由SEQ ID NO:1编码的成熟过氧化酶)与30%乙腈和5mM醋酸盐(pH3~5)、磷酸盐(pH6~7)或硼酸盐缓冲液(pH8~8.5)在特定pH值下进行1mM H₂O₂对1mM二苯并噻吩的氧化。反应在室温下进行25分钟,且样本随后用50μL50%(w/v)三氯乙酸失活。

[0328] 样本在装备有二极管阵列检测器的Agilent 1200HPLC系统(Agilent, Santa Clara CA, USA)上分析,并在40℃恒温的Phenomenex(Torrance CA, USA)的Gemini C6-苯基(110Å, 2×150mm, 3μm)柱上分离。使用两个流动相:(A) 0.1%甲酸和(B) 乙腈中的0.1%甲酸。

[0329] 分离使用分级式梯度运行,以30%B开始,保持0.5分钟,然后在14.5分钟内增加到80%并在80%保持3分钟,恒定流速0.4mL/min。

[0330] 二苯并噻吩及其氧化产物二苯并噻吩砜通过外部校准使用可靠的标准物,基于它们的保留时间、UV吸收光谱(230nm和260nm)进行鉴别和定量。二苯并噻吩氧化物(dibenzothiophene oxide)标准物不是市售可得,该化合物的定量使用二苯并噻吩砜校准曲线进行。

[0331] 过氧化酶氧化二苯并噻吩,产生两种产物二苯并噻吩氧化物和二苯并噻吩砜。

[0332] 表5.在各个pH下计算的二苯并噻吩氧化物(DBT-SO)和二苯并噻吩砜(DBT-SO2)收率的比较(30%ACN;反应时间1分钟)

pH	DBT-SO (%)	DBT-SO2 (%)
3.0	65.9	0.0
4.0	66.2	0.0
5.0	81.3	0.4
6.0	87.9	0.8
6.5	87.1	0.7
7.0	83.4	0.8
8.0	85.6	0.5
8.5	80.5	0.0

[0334] 表6.在各个乙腈(ACN)浓度下计算的二苯并噻吩氧化物(DBT-SO)和二苯并噻吩砜(DBT-SO2)收率的比较(pH5.0;反应时间25分钟)

ACN (%)	DBT-SO (%)	DBT-SO2 (%)
30	72.0	12.5
40	86.0	7.2
50	89.6	1.4
60	64.1	0.8
70	14.8	0.0
80	2.1	0.0

[0336] 实施例7

[0337] 芳甲醇的氧化

[0338] 在1mL的总反应体积中,使用0.01mg/mL纯化的过氧化酶(由SEQ ID NO:1编码的成熟过氧化酶),与30%乙腈和10mM乙酸盐(pH3~5)、磷酸盐(pH7)或硼酸盐缓冲液(pH8)在特定pH值下进行2mM H₂O₂对1mM苯甲醇的氧化。反应在室温下进行25分钟,且通过加入1μL过氧化氢酶(Terminox Ultra50L,Novozymes)而停止。

[0339] 样本在装备有二极管阵列检测器的Agilent 1200HPLC系统(Agilent,Santa Clara CA,USA)上分析,并在40℃恒温的Phenomenex(Torrance CA,USA)的Zorbax Stable Bond C18 (2) (80Å,2.1x50mm,1.8μm)柱上分离。使用两个流动相:(A)0.1%甲酸和(B)乙腈中的0.1%甲酸。

[0340] 分离使用分级式梯度运行,以5%B开始,保持4分钟,然后在6分钟内增加到100%B,恒定流速0.5ml/min。

[0341] 苯甲醇及其氧化产物苯甲醛和苯甲酸通过外部校准使用可靠的标准物,基于它们

的保留时间、UV吸收光谱(分别为210nm、250nm和230nm)进行鉴别和定量。

[0342] 过氧化酶氧化苯甲醇,产生两种产物苯甲醛和苯甲酸。

[0343] 表7.在各个pH下计算的总产物、苯甲醛(B-CHO)和苯甲酸(B-COOH)收率的比较

[0344]

pH	B-CHO (%)	B-COOH (%)	总产物 (%)
3	14.1	0.6	14.6

[0345]

5	50.9	17.9	68.7
7	56.5	19.2	75.8
8	7.7	0.0	7.7

[0346] 实施例8

[0347] 4-羟基苯甲酸的氧化

[0348] 在1mL的总反应体积中,使用0.01mg/mL纯化的过氧化酶(由SEQ ID NO:1编码的成熟过氧化酶),在20%乙腈和特定pH值的20mM醋酸盐(pH3~5)、磷酸盐(pH6~7)或硼酸盐(pH8)缓冲液(具有2mM抗坏血酸)中,进行1mM H₂O₂对0.8mM4-羟基苯甲酸的氧化。反应在室温下进行30分钟,并通过加入1μL过氧化氢酶(Terminox Ultra50L,Novozymes)而停止。

[0349] 样本在装备有二极管阵列检测器的Agilent 1200HPLC系统(Agilent,Santa Clara CA,USA)上分析,并在40℃恒温的Phenomenex (Torrance CA,USA)的Zorbax Stable Bond C18 (2) (80Å, 2.1x50mm, 1.8μm)柱上分离。使用两个流动相:(A) 0.1%甲酸和(B) 乙腈中的0.1%甲酸。

[0350] 分离使用分级式梯度运行,以5%B开始,保持4分钟,然后在6分钟内增加到100%B,恒定流速0.5ml/min。

[0351] 4-羟基苯甲酸及其氧化产物3,4-二羟基苯甲酸通过外部校准使用可靠的标准物,基于它们的保留时间、UV吸收光谱(210nm)进行鉴别和定量。

[0352] 过氧化酶氧化4-羟基苯甲酸,产生单一产物3,4-二羟基苯甲酸。

[0353] 表8.各个pH下3,4-二羟基苯甲酸(3,4DHBAc)收率的比较

[0354]

pH	3,4-DHBAc (%)
3	5.0
5	12.4
7	2.3
9	0.2

[0355] 实施例9

[0356] caren的氧化

[0357] 在1mL的总反应体积中,使用0.01mg/mL纯化的过氧化酶(由SEQ ID NO:1编码的成熟过氧化酶),与20%乙腈和特定pH值的5mM醋酸盐(pH3)、磷酸盐(pH5)或硼酸盐缓冲液(pH8)进行2mM H₂O₂对1mM caren的氧化。反应在室温下进行25分钟,并通过加入1μL过氧化

氢酶(Terminox Ultra50L,Novozymes)而停止。

[0358] 样本在装备有二极管阵列检测器的Agilent1200HPLC系统(Agilent,Santa Clara CA,USA)上分析,并在40℃恒温的Phenomenex(Torrance CA,USA)的Zorbax Stable Bond C18 (2) (80Å,2.1x50mm,1.8μm)柱上分离。使用两个流动相:(A) 0.1%甲酸和(B)乙腈中的0.1%甲酸。

[0359] 分离使用分级式梯度运行,以30%B开始,保持0.5分钟,然后在2分钟之内增加到60%,然后在2.5min内再增加到95%,并在95%保持1分钟,恒定流速0.5ml/min。

[0360] caren及其氧化产物carenon通过外部校准使用可靠的标准物,基于它们的保留时间、UV吸收光谱(分别为210nm、250nm和230nm)进行鉴定和定量。

[0361] 过氧化酶氧化caren,产生单一产物carenon。

[0362] 表9.在各个pH下的carenon收率的比较

[0363]

pH	Carenon (%)
3	0.0
5	15.4
8	22.1

[0364] 实施例10

[0365] 正庚烷的氧化

[0366] 在1mL的总反应体积中,使用0.01mg/mL纯化的过氧化酶(由SEQ ID NO:1编码的成熟过氧化酶)与20%丙酮和10mM磷酸盐缓冲液在pH6下进行1mM H₂O₂对2mM正庚烷的氧化。反应在室温下进行10分钟,且样本随后通过添加萃取溶剂乙酸乙酯而失活。

[0367] 样本在装备有Agilent5975C系列MSD系统(Agilent,Santa Clara CA,USA)的Agilent7890A气相色谱仪和Phenomenex(Torrance CA,USA)的ZB-5HT(15×0.25mm,0.1μm)柱上分析。氦气被用作载气,恒定流速为2mL/min。

[0368] 为进行分析,在250℃在分流模式(50:1)下将2μL乙酸乙酯提取物注入GC系统。分离使用如下的温度程序运行,以45℃开始,保持1分钟,接着以5℃/min的速率增加到50℃并保持1分钟,然后以30℃/min的速率增加到200℃并保持0.5分钟。

[0369] 正庚烷氧化产物通过外部校准使用可靠的标准物,基于它们的保留时间和在70eV的电子轰击MS而加以鉴别和定量。

[0370] 过氧化酶氧化正庚烷,产生多种产物2-庚醇、3-庚醇、2-庚酮和3-庚酮。

[0371] 表10.正庚烷氧化产物收率

[0372]

产物	收率(%)
2-庚醇	5.0
3-庚醇	4.5
2-庚酮	2.0
3-庚酮	0.5
总产物	12.0

[0373] 实施例11

[0374] 环己烷的氧化

[0375] 在1mL的总反应体积中,使用0.01mg/mL纯化的过氧化酶(由SEQ ID NO:1编码的成熟过氧化酶)与20%丙酮和5mM醋酸盐(pH3~5)、磷酸盐(pH6~7)或硼酸盐(pH9)缓冲液在特定pH值下进行1mM H₂O₂对2mM环己烷的氧化。反应在室温下进行10分钟,且样本随后通过添加萃取溶剂乙酸乙酯而失活。

[0376] 样本在装备有Agilent 5975C系列MSD系统(Agilent, Santa Clara CA, USA)的Agilent 7890A气相色谱仪和Phenomenex (Torrance CA, USA)的ZB-5HT (15×0.25mm, 0.1μm)柱上分析。氦气被用作载气,恒定流速为1.2mL/min。

[0377] 为进行分析,在250 °C在分流模式(50:1)下将2μL乙酸乙酯提取物注入GC系统。分离使用如下的温度程序运行,以45 °C开始,保持1分钟,接着以20 °C/min的速率增加到90 °C,然后以35 °C/min的速率增加到160 °C并保持0.5分钟。

[0378] 环己烷氧化产物通过外部校准使用可靠的标准物,基于它们的保留时间和在70eV的电子轰击MS而加以鉴别和定量。

[0379] 过氧化酶氧化环己烷,产生单一产物环己酮。

[0380] 表11.在不同pH下的环己酮收率比较

pH	环己酮 (%)
[0381]	3 0.0
	5 1.3
	6 2.4
	7 1.6
	9 0.8

[0382] 实施例12

[0383] 萍的氧化

[0384] 在1mL的总反应体积中,使用0.01mg/mL纯化的过氧化酶(由SEQ ID NO:1编码的成熟过氧化酶),与20%乙腈和20mM醋酸盐(pH3~5)、磷酸盐(pH6~7)或硼酸盐缓冲液(pH8)在特定pH值下进行1mM H₂O₂对1mM萘的氧化。反应在室温下进行25分钟,且样本随后通过1μL过氧化氢酶(Terminox Ultra50L, Novozymes)而失活。

[0385] 样本在装备有二极管阵列检测器的Agilent 1200HPLC系统(Agilent, Santa Clara CA, USA)上分析,并在40 °C恒温的Phenomenex (Torrance CA, USA)的Gemini C6-苯基(110Å, 2×150mm, 3μm)柱上分离。使用两个流动相:(A) 0.1%甲酸和(B)乙腈中的0.1%甲酸。

[0386] 分离使用分级式梯度运行,以30%B开始,保持0.5分钟,然后在3.5分钟内增加到50%B并接着在5分钟内增加到60%,恒定流速0.4mL/min。

[0387] 萍及其氧化产物1-萍酚、2-萍酚、1,4-萍醌和萍-1,4-二醇使用可靠的标准物,基于它们的保留时间和UV吸收光谱(210nm或204nm)加以鉴定。基于可靠标准物的外部校准进行定量,使用萍-1,4-二醇作为标准物进行定量的1,4-萍醌除外。

[0388] 过氧化酶氧化萍,产生多种产物1-萍酚、2-萍酚、1,4-萍醌、萍-1,4-二醇和一些不

确定产物。

[0389] 表12. 在各个pH下的萘氧化产物收率

[0390]

pH	收率 (%)					
	NPD	NPQ	2-NOL	1-NOL	未知	总产物
3	15.4	2.5	1.1	6.7	0.0	25.7
5	8.4	1.3	1.0	21.0	14.4	46.1
6	8.8	1.4	0.5	20.7	14.4	45.7
7	10.0	1.5	0.0	20.2	15.3	47.0
8	8.2	1.5	0.0	16.7	18.1	44.4

[0391] 实施例13

[0392] 异丁基苯的氧化

[0393] 在1mL的总反应体积中, 使用0.01mg/mL纯化的过氧化酶(由SEQ ID NO:1编码的成熟过氧化酶), 与有机溶剂(见下表)和5mM醋酸盐(pH3~5)、磷酸盐(pH6~7)或硼酸盐缓冲液(pH8~9)在特定pH值下进行1mM H₂O₂对1mM异丁基苯的氧化。反应在室温下进行, 并通过添加1μL过氧化氢酶而停止(Termino Ultra50L, Novozymes)。

[0394] 样本在装备有二极管阵列检测器的Agilent 1200HPLC系统(Agilent, Santa Clara CA, USA)上分析, 并在40℃恒温的Phenomenex (Torrance CA, USA)的Gemini C6-苯基(110?, 2×150mm, 3μm)柱上分离。使用两个流动相: (A) 0.1%甲酸和(B)乙腈中的0.1%甲酸。

[0395] 分离使用分级式梯度运行, 以40%B开始, 保持1分钟, 然后在4.5分钟内增加到90%并在90%保持2分钟, 恒定流速0.4mL/min。

[0396] 异丁基苯及其氧化产物2-甲基-1-苯基-1-丙醇、异丁酰苯、2-甲基-1-苯基-2-丙醇通过外部校准使用可靠的标准物, 基于它们的保留时间、UV吸收光谱(210nm)来鉴别和定量。

[0397] 过氧化酶氧化异丁基苯(IBB), 产生三种产物2-甲基-1-苯基-1-丙醇(MP1)、异丁酰苯(IBP)和2-甲基-1-苯基-2-丙醇(MP2)。

[0398] 表13. 在各个pH下的异丁基苯氧化产物收率(1mM IBB, 1mM H₂O₂, 20%ACN, 10分钟)

[0399]

pH	收率 (%)			
	MP2	MP1	IBP	总产物
3	3.4	51.2	6.8	61.4
4	4.0	60.8	11.0	75.8
5	4.2	60.1	12.7	76.9
6	4.0	57.8	11.6	73.5
7	4.1	57.2	13.2	74.5
8	4.0	60.7	12.8	77.5
9	4.0	59.3	13.1	76.4

[0400] 表14. 在各个乙腈浓度下的异丁基苯氧化产物收率(1mM IBB, 1mM H₂O₂, pH6.5, 10分钟)

[0401]

ACN (%)	收率 (%)			
	MP2	MP1	IBP	总产物
20	3.1	46.8	11.4	61.4
30	2.8	46.8	10.6	60.1
40	2.3	38.5	8.1	48.9
50	0.7	13.7	1.2	15.6
60	0.0	4.6	0.0	4.6
70	0.0	1.6	0.0	1.6

[0402] 表15. 在各个丙酮浓度下的异丁基苯氧化产物收率(1mM IBB, 2mM H₂O₂, pH6.5, 25分钟)

[0403]

丙酮 (%)	收率 (%)			
	MP2	MP1	IBP	总产物
10	4.1	7.0	45.0	56.1
20	2.9	19.3	28.7	50.9
30	2.9	36.9	7.8	47.6
40	0.0	10.0	0.0	10.0
50	0.0	4.3	0.0	4.3
60	0.0	3.8	0.0	3.8

[0404] 表16. 在各个二甲亚砜浓度下的异丁基苯氧化产物收率(1mM IBB, 2mM H₂O₂, pH6.5, 25分钟)

[0405]

DMSO (%)	收率 (%)			
	MP2	MP1	IBP	总产物
10	3.7	25.0	0.0	28.7

[0406]

20	0.0	14.0	0.0	14.0
30	0.0	8.1	0.0	8.1
40	0.0	3.5	0.0	3.5

[0407] 表17. 在20%丙酮下的异丁基苯氧化动力学 (1mM IBB, 1mM H₂O₂, 20%丙酮, pH6.5)

[0408]

时间 (分钟)	收率 (%)			
	MP2	MP1	IBP	总产物
0.3	3.1	48.7	19.1	70.8
0.7	3.3	48.5	22.8	74.7
1.0	3.4	47.7	25.4	76.5
2.0	3.5	46.5	30.2	80.2
3.0	3.5	43.8	33.7	81.0
5.0	3.6	42.0	36.7	82.2
7.0	3.6	41.0	37.6	82.2
10.0	3.6	40.4	38.7	82.7

[0409] 表18. 在20%乙腈下的异丁基苯氧化动力学 (1mM IBB, 1mM H₂O₂, 20%ACN, pH6.5)

[0410]

时间 (分钟)	收率 (%)			
	MP2	MP1	IBP	总产物
0.3	2.1	36.9	10.7	49.7
0.7	2.7	44.3	10.0	57.0
1.0	3.0	45.2	14.8	63.0
2.0	3.1	40.2	24.2	67.5
3.0	3.2	38.2	25.6	67.0
5.0	3.2	37.1	26.5	66.7
7.0	3.2	37.3	26.7	67.1
10.0	3.2	37.5	26.5	67.2

[0411] 表19. 在30%乙腈下的异丁基苯氧化动力学 (1mM IBB, 1mM H₂O₂, 30%ACN, pH6.5)

[0412]

时间 (分钟)	收率 (%)			
	MP2	MP1	IBP	总产物
0.3	1.5	29.3	4.5	35.3
1.0	2.7	51.6	4.2	58.5
2.0	3.2	60.9	6.2	70.3

[0413]

3.0	3.4	64.1	8.0	75.5
5.0	3.6	65.7	7.9	77.2
10.0	3.7	66.6	8.0	78.2

[0414] 表20. 在各个过氧化氢浓度下的异丁基苯氧化产物收率(1mM IBB, 20%ACN, pH6.5, 10分钟)

[0415]

H_2O_2 (mM)	收率 (%)			
	MP2	MP1	IBP	总产物
0.1	0.0	12.2	0.0	12.2
0.3	0.0	21.1	0.0	21.1
0.5	2.9	38.3	2.8	43.9
1.0	4.3	54.5	16.4	75.2
1.5	4.7	24.7	53.5	82.9
2.0	4.7	7.8	70.6	83.1
3.0	4.8	16.3	64.7	85.8
4.0	5.2	35.5	48.4	89.2

[0416] 在此描述并主张权利的本发明在范围上并不受在此公开的具体方面的限制,因为这些方面是要作为本发明若干方面的说明。任何等同的方面意在落入本发明的范围之内。事实上,除在此示出并描述的那些之外的本发明的各种修改根据前述说明对本领域技术人员来说将会是显而易见的。这些修改也意在落入所附权利要求的范围之内。在冲突的情况下,将以包括定义在内的本发明的公开内容为准。

序列表

〈110〉 诺维信公司

〈120〉 具有过氧化酶活性的多肽及编码该多肽的多核苷酸

〈130〉 12245-WO-PCT

〈160〉 4

〈170〉 PatentIn version 3.5

〈210〉 I

〈211〉 1485

〈212〉 DNA

〈213〉 特异腐质霉(Humicola insolens)

〈220〉

〈221〉 CDS

〈222〉 (1)..(88)

[0001]

〈220〉

〈221〉 sig_peptide

〈222〉 (1)..(51)

〈220〉

〈221〉 mat_peptide

〈222〉 (52)..(1482)

〈220〉

〈221〉 内含子

〈222〉 (89)..(169)

〈220〉

〈221〉 CDS

〈222〉 (170)..(410)

〈220〉

〈221〉 内含子

〈222〉 (411)..(482)

〈220〉

〈221〉 CDS

<222> (483)..(757)

<220>

<221> 内含子

<222> (758)..(826)

<220>

<221> CDS

<222> (827)..(982)

<220>

<221> 内含子

<222> (983)..(1408)

<220>

<221> CDS

<222> (1409)..(1482)

<400> 1

atg aag tcc atc tta atc ctt ctc tct cct ctc atc acc cca gct tat
Met Lys Ser Ile Leu Ile Leu Leu Ser Pro Leu Ile Thr Pro Ala Tyr

[0002] -15 -10 -5

48

gct ggg ttc cat gat tgg gag cct ccg ggg ccg aat gat g gtacgtcctt
Ala Gly Phe His Asp Trp Glu Pro Pro Gly Pro Asn Asp
-1 1 5 10

98

ccatgtgget cactcatgaa ccatacgatctt ccaagaaccg gggacatggc tgacacggga

158

ctctctaaca g tg cgc geg ccg tgc ecg atg ctt aac act ctc gca aac
Val Arg Ala Pro Cys Pro Met Leu Asn Thr Leu Ala Asn
15 20 25

207

cac ggg ttt ctc cca cat cac ggc agg gac ttg aca cgc aag cag gta
His Gly Phe Leu Pro His Gly Arg Asp Leu Thr Arg Lys Gln Val
30 35 40

255

gtt gac ggc ctc tac aat ggc ctc aac atc aac aag acg gct gcc agc
Val Asp Gly Leu Tyr Asn Gly Leu Asn Ile Asn Lys Thr Ala Ala Ser
45 50 55

303

act ctt ttc gac ttt gcc ctc atg act agc ccc aag cca aac gcc acc
Thr Leu Phe Asp Phe Ala Leu Met Thr Ser Pro Lys Pro Asn Ala Thr
60 65 70

351

	act ttc tcg ctg gac gat ctc ggc aga cac aac ate ctt gaa cat gac Thr Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gly Arg His Asn Ile Leu Glu His Asp	75	80	85	399
	gcc agt ctc ag gttggttct actcaactcc agcattecca ttgaagccac Ala Ser Leu Ser	90			450
	gattgagctg acaattcccg gaaacacctcac ag c cgc acc gat gct tac ttt gga Arg Thr Asp Ala Tyr Phe Gly	95		100	504
	gac gtc ttg gct ttc aac aag acc att ttc gag gag acg aag cgg cac Asp Val Leu Ala Phe Asn Lys Thr Ile Phe Glu Glu Thr Lys Arg His	105	110	115	552
	tgg ggt aag agc ccg atc ctc gac gtc act gcc gca gca cgg gca cgg Trp Gly Lys Ser Pro Ile Leu Asp Val Thr Ala Ala Ala Arg Ala Arg	120	125	130	600
[0003]	ctc ggt cgc att caa acc tcc aag gct acc aac ccg gag tac ttc atg Leu Gly Arg Ile Gln Thr Ser Lys Ala Thr Asn Pro Glu Tyr Phe Met	135	140	145	648
	tcg gaa ctg gga aat att ttc acc tac ggc gag tcc gtc gca tac atc Ser Glu Leu Gly Asn Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Ser Val Ala Tyr Ile	150	155	160	696
	atg ctg atc ggc gac gcc aag acg ggc agg gcg aat agg aga tgg gtg Met Leu Ile Gly Asp Ala Lys Thr Gly Arg Ala Asn Arg Arg Trp Val	165	170	175	744
	180				
	gag tac tgg ttt g gtgagttctc gccattctgt tccttgtcg ctgtttcttg Glu Tyr Trp Phe				797
	agtgatgctg actgtcggtg aaactgcag ag aac gag agg ctg ccc act cat Glu Asn Glu Arg Leu Pro Thr His	185		190	849
	190				
	ctc ggc tgg cgt cgg ccg agc aag gag ctc acc agc gac gtt ctg gac Leu Gly Trp Arg Arg Pro Ser Lys Glu Leu Thr Ser Asp Val Leu Asp	195	200	205	897

act tac att tcc ctg atc caa aat atc acg ttg act ctt cct ggc gga	945
Thr Tyr Ile Ser Leu Ile Gln Asn Ile Thr Leu Thr Leu Pro Gly Gly	
210 215 220	
acg gac ccc gtc aag cgc cgcc gct gcg tcc cac ttc g gttgggtatg	992
Thr Asp Pro Val Lys Arg Arg Ala Ala Ser His Phe	
225 230 235	
tgctcatgat ggcttgaga ctccagacgg acaatcttgc cgagtggagc tccgcatgct	1052
gccagcaatc tgaggacttt gtgcattcagg atatccaaa aatgtccact ttgcgttgaa	1112
gaagtaggtg gtgggttgt ccaggaaaga agctgtgtat agtccctcca accattttct	1172
catgtccaga gaaaggctga gagttagacg agtttacttg agccacaaca tagtgctccg	1232
tgatttcatec ctcgcgactc gatttagctt cggccatccc tcagttacgt gtggcagtt	1292
catcacataa tcttttcgtt cccgcattgt gcccagcage gcttgcctca acacgcctgt	1352
[0004] tgatggttgg agacctgaaa tggcaccgt tattatggag tggatcat gtccag tg	1410
Val	
ttt ccg ttc ggt caa ggc ctt gga ggc ccg gcc ggt gta gcc ctc atg	1458
Phe Pro Phe Gly Gln Gly Leu Gly Gly Pro Ala Gly Val Ala Leu Met	
240 245 250	
ttt atc tct gtg gtc gcc tat gga tga	1485
Leu Ile Ser Val Val Ala Tyr Gly	
255 260	
<210> 2	
<211> 278	
<212> PRT	
<213> 特异腐质霉	
<400> 2	
Met Lys Ser Ile Leu Ile Leu Leu Ser Pro Leu Ile Thr Pro Ala Tyr	
-15 -10 -5	

Ala Gly Phe His Asp Trp Glu Pro Pro Gly Pro Asn Asp Val Arg Ala
 -1 1 5 10 15

Pro Cys Pro Met Leu Asn Thr Leu Ala Asn His Gly Phe Leu Pro His
 20 25 30

His Gly Arg Asp Leu Thr Arg Lys Gln Val Val Asp Gly Leu Tyr Asn
 35 40 45

Gly Leu Asn Ile Asn Lys Thr Ala Ala Ser Thr Leu Phe Asp Phe Ala
 50 55 60

Leu Met Thr Ser Pro Lys Pro Asn Ala Thr Thr Phe Ser Leu Asp Asp
 65 70 75

[0005] Leu Gly Arg His Asn Ile Leu Glu His Asp Ala Ser Leu Ser Arg Thr
 80 85 90 95

Asp Ala Tyr Phe Gly Asp Val Leu Ala Phe Asn Lys Thr Ile Phe Glu
 100 105 110

Glu Thr Lys Arg His Trp Gly Lys Ser Pro Ile Leu Asp Val Thr Ala
 115 120 125

Ala Ala Arg Ala Arg Leu Gly Arg Ile Gln Thr Ser Lys Ala Thr Asn
 130 135 140

Pro Glu Tyr Phe Met Ser Glu Leu Gly Asn Ile Phe Thr Tyr Gly Glu
 145 150 155

Ser Val Ala Tyr Ile Met Leu Ile Gly Asp Ala Lys Thr Gly Arg Ala
 160 165 170 175

Asn Arg Arg Trp Val Glu Tyr Trp Phe Glu Asn Glu Arg Leu Pro Thr
 180 185 190

His Leu Gly Trp Arg Arg Pro Ser Lys Glu Leu Thr Ser Asp Val Leu
 195 200 205

Asp Thr Tyr Ile Ser Leu Ile Gln Asn Ile Thr Leu Thr Leu Pro Gly
 210 215 220

Gly Thr Asp Pro Val Lys Arg Arg Ala Ala Ser His Phe Val Phe Pro
 225 230 235

Phe Gly Gln Gly Leu Gly Gly Pro Ala Gly Val Ala Leu Met Leu Ile
 240 245 250 255

[0006] Ser Val Val Ala Tyr Gly
 260

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 共有序列

<400> 3

Glu His Asp Gly Ser Leu Ser Arg

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

〈220〉

〈223〉 共有序列

[0007] 〈400〉 4

Glu His Asp Ala Ser Leu Ser Arg

1 5