

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 35/00

C12N 1/15

C12N 15/52 C12N 15/63

/(C12P35/00, C12

R1: 82, 1: 38, 1: 465)

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 92112278.0

[45] 授权公告日 2001 年 5 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1066488C

[22] 申请日 1992. 9. 10 [24] 颁证日 2001. 2. 3

[21] 申请号 92112278.0

[30] 优先权

[32] 1991. 9. 11 [33] US [31] 757, 879

[32] 1992. 8. 28 [33] US [31] 933, 469

[73] 专利权人 DSM 有限公司

地址 荷兰海尔伦

[72] 发明人 M · J · 康达 L · 克罗福

P · C · 麦阿达 J · A · 兰保塞克

[56] 参考文献

EP233715A 1987. 8. 26 C12N15/00

EP268343A 1988. 5. 25 C12P35/00

EP275901A 1988. 7. 27 C12N910

EP341892A 1989. 11. 15 C12N1500

US5108918 1992. 4. 28 C12N15/00

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪 洋

审查员 董 芳

权利要求书 1 页 说明书 54 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 制备 7 - ADCA 的新的生物方法

[57] 摘要

一种制备用于生产头孢菌素抗菌素的重要中间产物: 7 - 氨基去乙酰基头孢菌 烷酸(7 - ADCA) 的新的生物方法。该方法包括在己二酸原粒存在下培养 已转化的产黄青霉菌菌株从而生产己二酰 - 6 - APA(6 - 氨基青霉菌 烷 酸); 以及用转化产黄青霉菌的来自, 例如 Streptomyces Clavuligerus 的扩 展酶基因在原位进行表达, 将己二酰 - 6 - APA 进行环扩展使其转变为己二 酰 - 7 - ADCA。然后利用己二酰酰基转移酶裂解己二酰侧链而制备最终产 物, 7 - ADCA。因此, 整个合成过程是通过生物方法进行的, 既高效又经 济。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 制备 7-氨基去乙酰基头孢菌烷酸的新的生物方法，该方法包括下列步骤：

1) 在能供应其生长的培养基中培养一种能产生异青霉素 N 的产黄青霉菌，并向所说的培养基中加入一种含有己二酸，或其一种或多种该酸的盐或酯的己二酸原料，该原料能被所说的产黄青霉菌菌株同化和利用而产生己二酰-6-氨基青霉菌烷酸，从而产生所说的己二酰-6-氨基青霉菌烷酸；

其中所说的产黄青霉菌菌株已用编码能接受所说己二酰-6-氨基青霉菌烷酸作为底物的扩展酶的 DNA 进行转化，当表达后，所说的菌株产生的己二酰-6-氨基青霉菌烷酸随后在原位进行环扩展而形成己二酰-7-氨基去乙酰基头孢菌烷酸；

2) 将所说的己二酰-7-氨基去乙酰基头孢菌烷酸与己二酰酰基转移酶接触，从而移走己二酰侧链并且形成 7-氨基去乙酰基头孢菌烷酸产物；然后分离所说的产物。

2. 根据权利要求 1 的生物方法，其中己二酸原料是己二酸二钠。

3. 根据权利要求 1 的生物方法，其中编码扩展酶的 DNA 来源于 *Streptomyces Clavuligerus* ATCC27064。

4. 根据权利要求 1 所说的生物方法，其中的己二酰酰基转移酶来源于假单胞菌种。

5. 一种包括在适合于扩展酶基因表达的条件下培养重组产黄青霉菌宿主细胞的方法，其中所说的重组宿主细胞含有一个重组 DNA 表达载体，该载体含有来源于 *Streptomyces Clavuligerus* ATCC27064 的编码扩展酶的 DNA，和一个启动编码所说扩展酶的 DNA 表达的启动子，该启动子含有产黄青霉菌 IPNS 基因的启动子。

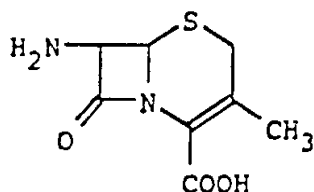
6. 根据权利要求 5 的方法，其中的重组宿主细胞是 CCTCC No. M92037。

说明书

制备 7 - A D C A 的新的生物方法

本发明属于制备商品头孢菌素抗菌素的合成方法领域，目前此类抗菌素已有很多，这些治疗剂是第四代产品。由于商品头孢霉素中存在大量的各种各样的侧链以及头孢菌素显著的经济上的重要性因而使得成功制备关键性中间产物的更经济，更有效的方法变得日益重要，这些中间产物便于头孢菌素的快速合成。

这些关键的中间产物之一是 7 - 氨基去乙酰基头孢菌烷酸 (7 - A D C A)，该物质用下面通式表示：



目前，7 - A D C A 是从青霉素 G 中产生的，并且需要 4 或 5 个化学步骤以将青霉素环系从 5 员环扩展到代表头孢菌素特征的六员环。由于该方法是典型的全部化学合成过程，因而存在严重的缺陷。这些缺陷是该方法需要多个步骤，是一个复杂的过程，需要昂贵的试剂，产生很多副产物导致污物处理问题，以及需在化学处理开始前对高度不纯的起始材料加以纯化。因此，人们在不断探索研究一种微生物或发酵方法，通过酶促反应使环扩展以及切割侧链，从而以比目前使用的

化学方法更经济地方法提供 7-ADCA。

因此，具体地说，本发明涉及制备关键的头孢菌素中间产物 7-ADCA，更具体地讲，本发明涉及制备 7-ADCA 的生物方法。

已证明，到目前为止，在探索制备 7-ADCA 的成功生物方法方面的研究都没有取得成效，肯定对一种工业生产规模而言确实如此。例如，利用直接的发酵法和/或通过酶促处理青霉素 G 时，可以制备 6-氨基青霉烷酸 (6-APA)，仅再需产生 7-ADCA 所必需的环扩展步骤；不幸的是，已发现在这些微生物的正常代谢途径中进行环扩展的头孢子菌属或链霉菌属酶并不以 6-APA 作为底物。在本领域内将这些酶统称为 DAOCS 或扩展酶，定义为催化青霉素型分子中存在的 Penam 环结构扩展为 Ceph-3-em 环 (如头孢菌素中存在的结构) 的酶。下文中，将这些酶称为“扩展酶”。

该扩展酶作用的底物是青霉素 N，使其环扩展获得脱乙酰基头孢菌素 C (DAOC)。这里，只需要切除 (D)- α -氨基己二酰侧链以得到 7-ADCA，但已证明该侧链对酶促切割具有顽强的抗性，仅能获得低得没什么价值的产量。

按照本发明，可以获得一种有效的生物方法，其中利用新的发酵方法以高效价生产青霉素化合物 (有一个己二酰侧链)，所说的青霉素化合物是一种可为扩展酶系接受的底物，该扩展酶系是由能产生青霉素化合物的同样的微生物原位产生的，该微生物已被转化并表达所说的扩展酶系。然后该扩展酶作用青霉素化合物进行环扩展产生高产量的头孢菌素化合物。并且重要的是在第二个关键步骤中，可通过另一酶系以惊人的高产量移去青霉素化合物 (即眼下的一种头孢菌素化合物) 的侧链。包含本发明的这种独特生物方法的意外结果是以惊人

的高产量生产 7 - A D C A。

在 Curr. Genet. (1 9 9 0) 1 7 : 2 1 3 - 2 2 1 上 Cantwell 等人建议了一种通过对青霉素 V 进行环扩展, 然后通过酶促水解得到的去乙酰基头孢菌素 V 而形成 7 - A D C A 而制备 7 - A D C A 的生物方法。该方案的根据是从 *S. clavuligerus* 可得到的一个克隆青霉素 N 扩展酶基因 (cefE) (Kovacevic 等人, J. Bacteriol. (1989) 1 7 1 : 7 5 4 - 7 6 0 和 U. S. 5, 0 7 0, 0 2 0)。但是, 由于该扩展酶作用于青霉素 N, 其天然底物, 而不作用于青霉素 V, 该方案需要通过遗传工程操作而产生能扩展青霉素 V 环的经过修饰的扩展酶基因。然而 Cantwell 等人没有获得所需的修饰, 他们仅成功地用 *Streptomyces Clavuligerus* 的 cefE 基因转化产黄青霉菌, 并得到低水平表达 D A O C S (扩展酶) 酶。

本领域内技术人员已对扩展酶, 其活性和遗传序列进行了充分的研究。例如, 在 Wolfe 的 U. S. 4, 5 1 0, 2 4 6 和 4,536,476 中已从产生 β -内酰胺的原核生物, 包括 *Streptomyces clavuligerus*, 的无细胞抽提物中分别分离出环化酶, 表异构酶和环扩展酶, 从而提供稳定的酶试剂。E P - A - 0 3 6 6 3 5 4 描述了一种来自 *S. clavuligerus* 的离体纯化的扩展酶, 并已对其进行过鉴定包括末端残基和氨基酸组成, 据说其分子量约为 3 4, 6 0 0 道尔顿。但是, 与其相反, 在 U. S. 4, 5 3 6, 4 7 6 中确定同样的酶其分子量为 2 9, 0 0 0。在 E P - A - 0 2 3 3 7 1 5 中公开了从 *S. Clavuligerus* 获得的扩展酶的分离和核酸内切酶限制性图谱特性, 转化和在宿主中表达所说的酶, 并证实用所说的酶进行青霉素 N 底物的环扩展。U. S. 5, 0 7 0, 0 2 0 公开了编码从 *S. Clavuligerus*

获得的扩展酶的DNA序列，并描述了用含有所说DNA序列的表达载体转化产黄青霉菌菌株的过程，从而获得扩展酶的表达。文献中暗示利用该酶可对除青霉素N以外的底物进行扩展，但事实上没有证明这种扩展法。

上面描述的研究工作其注意力集中于来源于原核的*S. Clavuligerus*的扩展酶。利用真核的支顶头孢霉菌株（也称为产黄支顶孢菌）也可以表达同样的酶，或至少明显具有相同环扩展活性的酶。但是，在这种菌株中扩展酶活性是由双功能基因（*cefEF*）表达的，该基因也能表达出DAOS（羟化酶）活性，该酶的天然功能是将扩展酶的去乙酰基头孢菌烷酸（DAOC）产物转变为脱乙酰基头孢菌素C（DAC）。该结果是单一的，但得到双功能扩展/羟化酶。在分离这两种基因产物的活性方面已作了许多工作，但至今没有成功。例如，EP-A-0281391公开了从支顶头孢菌STCC11550获得的DAOC/DACS基因连同相应的酶的氨基酸序列的分离和DNA序列的鉴定，转化青霉菌并表达该酶，但是，从没有实现将青霉素G和V转变为相应的头孢菌素的企图。再者，尽管建议利用遗传工程技术可以提供快速的从DAC中分离编码DAOC的遗传信息并分别表达这两种酶的方法，但没有提供已真正实现这种分离的证据。

本领域内技术人员对支顶头孢菌的DAOC/DACS（扩展酶/羟化酶）酶也进行了充分的研究，包括其活性及其特征和遗传序列。例如，在Demain的U.S. 4,178,210；4,248,966；和4,307,192中，用能异构化和扩展环的支顶头孢菌无细胞抽提物处理各种青霉素型起始材料而得到头孢菌素抗菌素产物。Wu-Kuang Yeh在U.S. 4,753,881中描述了支顶头孢菌酶的

等电点，分子量，氨基残基，水解酶与扩展酶的活性比和肽片段各项指标。

上面讨论的现有技术仅解决了本发明的一个方面，即用表达扩展酶的基因转化产黄青霉菌菌株，并实现该酶的表达。但是该方法仅使用表达的酶对青霉素N而不是对青霉素G和V进行环扩展。甚至于在这种情况下，如本发明所述青霉素N有一个7位侧链，不能用酶切割该侧链而得到7-ADCA。本发明是基于下述惊人发现，即利用产黄青霉素菌株可有效地增加己二酰侧链，该菌株原位产生的扩展酶可利用化合物有效地作为底物进行环扩展得己二酰7-ADCA，并且也可以利用另一种酶有效地移去己二酰侧链得到7-ADCA。虽然现有技术中已发现本发明的各种离体的片段，但并没有暗示将它们结合起来会产生本发明方法所获得的意外结果。

例如，在本领域内生产6-己二酰青霉烷酸是已知的（见Ballio, A. 等人, Nature (1960) 185, 97-99）。在体外进行6-己二酰青霉烷酸的酶促扩展也是本领域内已知的（见Baldwin 等人, Tetrahedron (1987) 43, 3009-3014；和EP-A-0268343）。酶促方法切割己二酰侧链也是本领域内已知的（见 Matsuda 等人 J.Bact. (1987) 169, 5815-5820）。

己二酰侧链有下列结构： $\text{COOH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-$ ，而密切相关的结构侧链是戊二酰结构，具有下列通式：

$\text{COOH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-$ 。酶裂解戊二酰侧链是本领域内的已知技术。见，例如，Shibuya 等人；Agric. Biol. Chem. (1981) 45, 1561-1567；Matsuda 和 Komatsu, J. Bact. (1985)

1 6 3, 1 2 2 2 - 1 2 2 8; Matsuda 等人 J.Bact. (1 9 8 7)
1 6 9, 5 8 1 5 - 5 8 2 0; Jap. 5 3 - 0 8 6 0 8 4 (1 9 7 8
- Banyu Pharmaceutical Co. Ltd.); 和 Jap. 5 2 - 1 2 8 2 9 3
(1 9 7 7 - Banyu Pharmaceutical Co. Ltd.)。

E P A - A - 0 4 5 3 0 4 8 也描述了提高由假单胞菌 S Y - 77
- 1 产生的戊二酰酰基转移酶的己二酰裂解活性的方法。通过在 α 亚
基的特定位点上替代不同的氨基酸, 可观察切割己二酰 (从己二酰 -
丝氨酸上) 的速度提高 3 - 5 倍以上。需要注意的是, 虽然 E P - A
- 0 4 5 3 0 4 8 明显地证实了提高对己二酰侧链的作用活性的酰基
转移酶, 但没有首先描述产生己二酰头孢菌素的任何方法 (化学方法
或类似于本说明书描述的任何生物方法)。

如果存在 (D) - α - 氨基己二酰侧链, 本领域内技术人员都知道
首先用 (D) - 氨基酸氧化酶进行酶反应移走氨基并缩短侧链长度,
留下戊二酰 (G L - 7) 侧链, 然后用第二种酶 (戊二酰酰基转移酶)
移走戊二酰侧链。这样的二步裂解法公开于 Matsuda 的 U.S. 3,960,662;
E P - A - 0 2 7 5 9 0 1; Jap. 6 1 - 2 1 8 0 5 7 (1 9 8 8 -
Komatsu, Asahi Chemical Industry Co); Wo 9 0 / 1 2 1 1 0
(1 9 9 0 - Wong, Biopure Corp.); 和 Isogai 等人 Bio/Technology
(1 9 9 1) 9, 1 8 8 - 1 9 1。

参见未决的在审申请系列 N o .

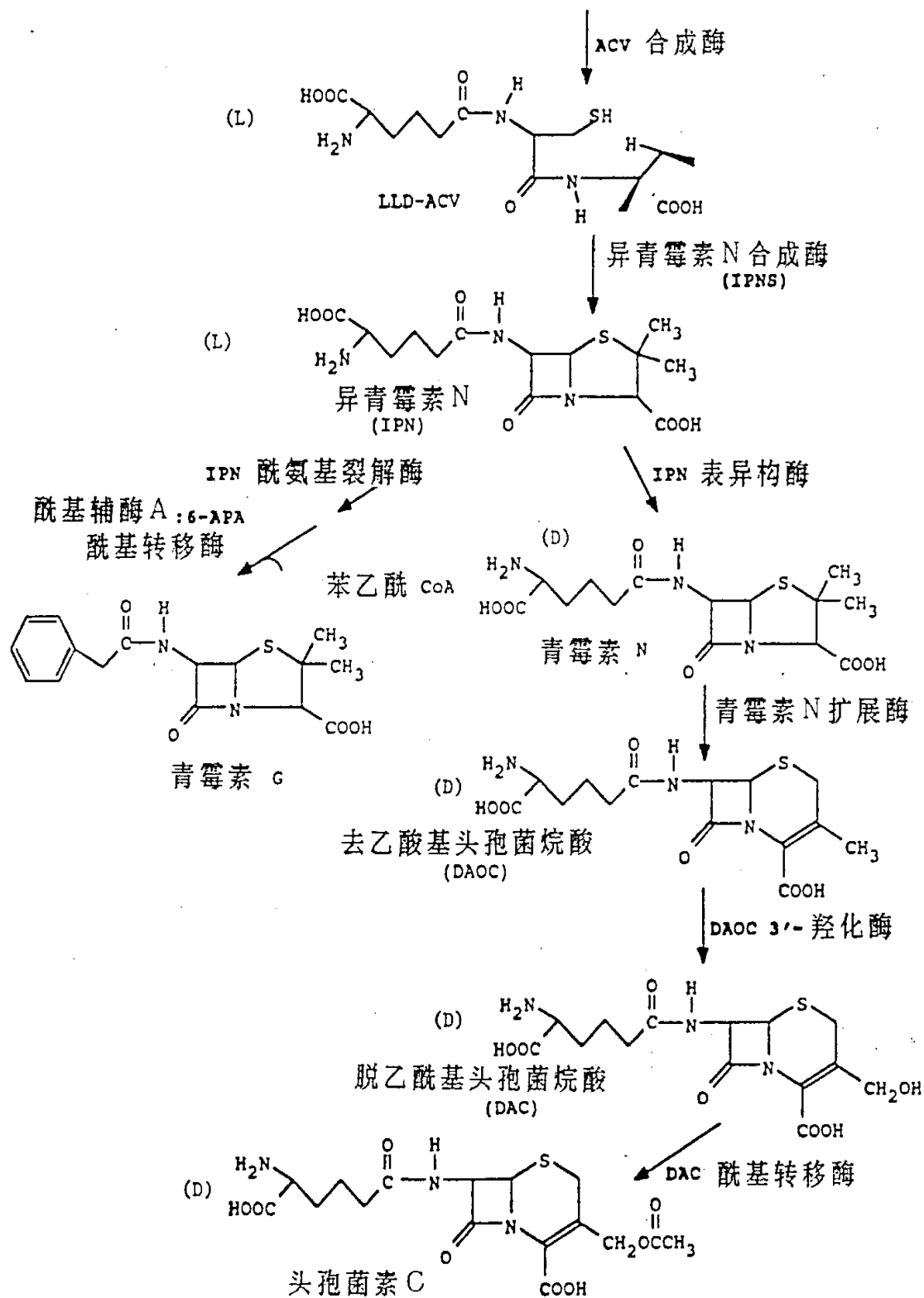
申请日

(Attorney Docket No. 1 8 5 7 2 1 A), 该申请公开了制备 7 -
A C A 的生物方法, 该方法是基于在产黄青霉菌转化体中表达扩展酶
活性, 与本文描述的制备 7 - A D C A 的生物方法相同。但是, 在制
备 7 - A C A 的生物方法中, 需要其他的转化体用于表达附加的酶促

活性，从而获得完全不同的重组代谢途径，生产独特的最终产物，这些产物在该发明中没有提出。

为了有助于对本发明方法以及上面讨论的现有参考技术内容进行更好的理解，产生青霉素 G 和头孢霉素 C，中间产物的代谢途径的各个阶段，以及执行转化使用的酶紧接着在下文中进行描述。

L- α -氨基己二酸 + L-胱氨酸 + L-缬氨酸



本发明涉及制备 7-氨基去乙酰基头孢菌烷酸 (7-ADCA) 的新的生物方法, 该方法包括:

1) 将产生异青霉素 N 的产黄青霉菌菌株维持于能供其生长的培养基中, 在所说的培养基中加入一种含有己二酸, 或它的一种或多种盐和酯的己二酸原料, 它能被所说的产黄青霉菌同化和利用并产生己二酰-6-氨基青霉菌烷酸 (己二酰-6-APA), 其中产生所说的己二酰-6-APA;

其中所说的产黄青霉菌菌株已用编码能以所说的己二酰-6-APA 作为底物的扩展酶活性物的 DNA 进行转化, 因此, 表达结果是, 此后由所说菌株产生的己二酰-6-APA 也在原位进行环扩展形成己二酰 7-ADCA; 和

2) 将所说的己二酰 7-ADCA 与己二酰酰基转移酶接触, 移去己二酰侧链, 并形成 7-ADCA 产物; 然后分离出所说的产物。

用于本发明中的下列术语具有下列所述的含义:

“己二酰-6-APA”是指 [2S-(2 α , 5 α , 6 β)]-3, 3-二甲基-7-氧-6-[(己烷-1, 6-二酰)氨]-4-硫代-1-氮杂双环-[3.2.0.]庚烷-2-羧酸;

“己二酰 7-ADCA”是指 7-[(己烷-1, 6-二酰)氨]-3-甲基-8-氧-5-硫代-1-氮杂双环-(4.2.0)-辛-2-烯-羧酸。

具体说来, 本发明涉及制备上文中描述的 7-氨基去乙酰基头孢菌烷酸 (7-ADCA) 的新的生物方法, 其中的己二酸盐原料是己二酸二钠, 其中的编码扩展酶活性物的 DNA 来源于 *Streptomyces*

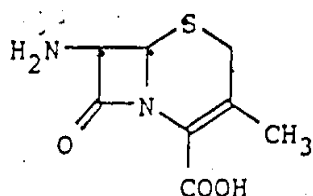
Clavuligerus ATCC 27064，而其中的己二酰酰基转移酶来源于假单孢菌种。

本发明进一步涉及重组 DNA 表达载体，该载体含有编码源自 Streptomyces Clavuligerus ATCC 27064 的扩展酶活性物的 DNA，和一个启动所说的含有质粒 pPenFTS0 编码扩展酶活性物的 DNA 的表达的启动子（如下文中描述）。

本发明进一步涉及用重组 DNA 表达载体转化的产黄青霉菌宿主细胞，该重组表达载体含有编码源自 Streptomyces Clavuligerus ATCC 27064 的扩展酶活性物的 DNA，和一个启动含有产黄青霉菌 IPNS 基因启动子的，编码所说扩展酶活性物的 DNA 进行表达的启动子。具体说来本发明涉及用含有 pPenFTS0 质粒的重组 DNA 表达载体转化的产黄青霉菌宿主细胞（如下面描述的）。

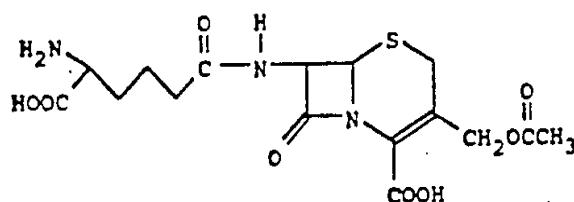
本发明再进一步涉及包括在适用于基因表达的条件下培养重组产黄青霉菌宿主细胞的步骤在内的方法，所说的重组宿主细胞包含一个重组 DNA 表达载体，该载体含有编码源于 Streptomyces Clavuligerus ATCC 27064 的扩展酶活性物的 DNA，和一个启动含有产黄青霉菌 IPNS 基因启动子的编码所说扩展酶活性物的 DNA 的表达的启动子。具体说来，本发明涉及在适用于基因表达的条件下，培养重组产黄青霉菌宿主细胞的方法，其中所说的重组宿主细胞含有重组 DNA 表达载体，该载体含有 pPen FTSO 质粒，（如下文描述的）。

本发明的第一个方面是一种制备 7-氨基去乙酸头孢菌烷酸（7-ADCA）的新的生物方法，该物质是制备合成的商品头孢菌素的一个关键性中间产物，可用下列结构式表示：



除头孢菌素核外，7-ADCA的显著特征是7-氨基基团和3-甲基基团。7-氨基基团可以被转化为许多侧链衍生物，从而形成合成各种商品头孢菌素的基本结构。正如头孢氨苄一样，通常（但不总是）必须将3-氨基基团转化为某种其他侧链用于合成商品头孢菌素。

本发明的方法制备的7-ADCA产品与头孢菌素C形成对比，头孢菌素C是另一个关键的头孢菌素中间产物，可用下列通式表示：



对于该中间产物，3-乙酰氧甲基侧链适用于商品头孢菌素。但是，7-(D)- α -氨基己二酰侧链不适用于进一步合成衍生物，必须进行裂解得到满足要求的7-氨基基团。不幸的是，已证明无论是用化学或生物化学方法要移走7-(D)- α -氨基己二酰侧链总是十

分困难。

使用于本说明书中，尤其是在描述优选的实施方案中，下列术语具有的含意为：

7 - A D C A	7 - 氨基去乙酰基头孢菌烷酸
6 - A P A	6 - 氨基青霉菌烷酸
D A O C	去乙酰基头孢菌烷酸
D A O C S	D A O C 合成酶
D A C	去乙酰基头孢菌素 C
D A C S	D A C 合成酶
I P N S	异青霉素 N 合成酶
Tris	Tris [羟甲基]氨基甲烷
E D T A	乙二胺四乙酸
D E P C	二乙基焦碳酸酯
T E	T r i s / E D T A 缓冲液
S S C	盐 (氯化钠)，柠檬酸钠缓冲液
S D S	十二烷基磺酸钠
P E G	聚乙二醇

产黄青霉菌培养物

本发明方法的第一个步骤包括将能产生异青霉素 N 的产黄青霉菌菌株保持于能供养其生长的培养基中，将一种包含己二酸，或其盐和酯的己二酸盐原料加入所说培养基中。可在接种产黄青霉菌后向培养基中加入该己二酸盐原料，但优选的是在接种的时候己二酸盐原料已

存在于培养基中。己二酸，或它的盐和酯能被所说的产黄青霉菌菌株同化和利用而产生己二酰-6-AP A；其中所说的产黄青霉菌菌株已用编码扩展酶活性物的DNA转化，表达后，所说的己二酰-6-AP A在原位进行环扩展而形成己二酰-7-ADCA。

除产黄青霉菌种外青霉菌属内其他种也产生异青霉素N。但是，生产史上异青霉素N的最高产量菌株是利用已知的菌株改良方法从产黄青霉菌种加以改良的。作为一种实际方法，虽然也明显适用于其他菌种，但本发明仅局限于产黄青霉菌菌株，任何已寄存的产黄青霉菌菌株或其他的公众可获得的这样的菌株源都适用于作为实施本发明方法的起始材料。

能够维持产生异青霉素N的产黄青霉菌菌株生长的培养基是本领域内普通技术人员都熟知的种类。例如，培养可以使用浸没通气发酵法完成，使用的培养基可从许多合适的能得到的培养基中选择。典型的培养基利用如蔗糖，葡萄糖和淀粉作为碳源，利用黄豆饼粉和粗燕麦粉，棉子油，花生粉，和各种氨基酸，其混合物，以及豚作为氮源。生产要求强调产量和容易分离，因而适于这种情况的优选培养基是以糖蜜作为碳源，以黄豆饼粉和氨基酸作为氮源。

在培养基中通常加入无机盐营养物，含有能够提供下列离子成份的盐：钠，钾，铵，钙，磷酸根，硫酸根，氯化物，溴化物，硝酸根，碳酸根，铁，亚铁，镁，锰等。通常微量元素也是产黄青霉菌生长，分化和代谢必不可少的，并且除非基本上已补充了其它培养基成份作为沾染物，否则可以直接加入到培养基中。

如果仅需要生产小量的7-ADCA，可以在小体积的设备如1升震荡瓶中培养产黄青霉菌菌株。如果需要更大量的己二酰-7-A

D C A，则可以在浸没通气发酵条件下使用大容量的发酵罐。

在制备大批量的己二酰-7-ADCA制剂中，将产黄青霉菌孢子维持于琼脂斜面上。从斜面上获取孢子接种于小体积的营养培养基中。培养该培养基产生大量的，新鲜的，旺盛生长的微生物培养物。然后将该营养生长物作为大规模发酵培养基的种菌。在特定条件下，还需要一种营养生长培养基作为发酵培养基的种菌。当发酵培养基的体积显著大于第一阶段营养培养基体积时，通常使用这样的第二阶段营养培养基。按照这种方式，首先在小体积的营养培养基中培养微生物孢子而得到大体积营养培养基的种菌。更大体积的营养培养基提供足够浓度的微生物在大规模发酵罐中引发快速发酵。营养培养基可以含有与发酵培养基中相同的成份，或者含有其他刺激微生物在小规模上生长和分化的成份。

本发明的方法中使用的产黄青霉菌菌株最适宜的培养温度是在20~30℃之间，如果使用约22℃~28℃之间，优选约25℃温度时能够获得最高产量。

在大容量发酵罐中培养产黄青霉菌菌株约10~30天，优选15~25天时可以产生最大量的己二酰-7-ADCA。但是，如果在小容量的设备，如250ml 震荡烧瓶中培养时，微生物的生长速度更快，可在较短时间，如4~15天，常常是5~7天即可产生己二酰-7-ADCA。

如果大容量发酵罐中最终PH达到8.0或更高，己二酰-7-ADCA产量受到不利影响。在这种情况下，需要监测整个发酵过程中培养基的PH。如果监测结果显示在最大量产生己二酰-7-ADCA时期之前PH将达到那样的水平，通常可通过将合适的酸或缓冲

剂加到发酵培养基中而调低P H值。

己二酰-7-ADCA产生后利用色谱法测试发酵液样本。

与大多数浸没通气发酵相同，无菌空气通过培养基使产黄青霉菌菌株最有效地生长，增加己二酰-7-ADCA的产量。

强制通过培养基的空气体积通常为每分钟内单位体积培养基至少约0.2体积的空气。但是，增高空气通过的速度对产生己二酰-7-ADCA常有有利影响。

通常情况下，除产生己二酰-7-ADCA外，产黄青霉菌菌株也将产生许多副产物和代谢物。由于这些付产物某些对酸不稳定，因而在从发酵培养基中回收己二酰-7-ADCA时，用酸性P H短时间处理整个发酵液，以便破坏某些共产生的杂质。从过滤后的按上法处理过的发酵液中回收己二酰-7-ADCA发酵产物，并用离子交换树脂层析而将它与发酵培养基中其他成分分开，如果需要，在随后的酶促切割己二酰侧链前，通过色谱进一步纯化。在侧链切除后，也可以进行这样的离子交换色谱分离。在分离中引起困难的主要副产物之一是己二酰-6-APA，可以通过化学或酶降解该副产物以便分离更容易进行。首先，将经过过滤的发酵液进行初步的纯化步骤，包括用水不混溶性有机溶剂如正-丁醇或乙酸戊酯萃取，去除杂质。然后按预试的方法将萃取过的肉汤用活性炭层析而进一步纯化。

加入己二酸原料

优选按照上面描述的制备产黄青霉菌的发酵培养物的同时，即接种之前，将己二酸原料加入到发酵培养基的其他成分中。或者任意地在接种后的某个时刻，例如：接种后的1，2和/或3天时加入己二

酸原料。己二酸原料是指能为培养的产黄青霉菌菌株同化并利用而产生己二酰-6-APA的己二酸或己二酸的任何一种或多种盐或酯。己二酸，盐和酯可单独使用或联合使用。优选二钠盐，但钾盐和其与钠的混合盐也适用。也可以利用甲基酯，而乙基酯是水不溶性。己二酸盐或酯必须是能为产黄青霉菌菌株同化并利用，从而制备己二酰-6-APA。例如，己二酸本身是合适的，即使它不溶于水，如果在合适的PH条件下，可以形成一种可同化的盐。

合适的扩展酶

按上面所述，并供给己二酸原料以产生己二酰-6-APA的产黄青霉菌菌株，用已编码扩展酶活性物的DNA进行转化过，表达后，在原位将所说的己二酰-6-APA进行环扩展而形成己二酰-7-ADCA。

用己二酸盐原料培养的产黄青霉菌产生细胞内己二酰-6-APA。在该细胞内环境中，即在原位，转化的产黄青霉菌也表达编码扩展酶活性物的DNA，当该酶作用于底物己二酰-6-APA时，进行环扩展形成己二酰-7-ADCA。

本发明的新生物方法其范围包括用编码扩展酶活性物的DNA转化上面描述的类型的产黄青霉菌菌株，表达后在原位将己二酰-6-APA进行环扩展而形成己二酰-7-ADCA。因而，用于转化产黄青霉菌的DNA必须表达一种酶，该酶不仅具有扩展酶活性，（如本领域已知的），即能够将异青霉素N环扩展为DAO C，而且能够将己二酰-6-APA进行环扩展得到己二酰-7-ADCA。但是，

考虑到基于侧链的相似性，任何扩展酶都可在本发明的新生物方法中起作用。

在描述现有技术的章节中已经着重指出，对源于 *Streptomyces Clavuligerus* A T C C 2 7 0 6 4 的扩展酶已全部进行测序并且表征其限制性核酸内切酶图谱特征。但是，已有报道，与上述酶显示相同作用的源于 *S. Clavuligerus* N R R L 3 5 8 5 的同样的酶具有不同的分子量，但还未对该酶进行测序。

在现有技术中已经鉴别的这些扩展酶可用于本发明的新生物方法。也已证明源于 *S. Clavuligerus* 的不同菌株或甚至源于不同属的微生物的还未鉴定的其他扩展酶也适用于实施本发明的新生物方法。鉴别这样的新菌株和有用的微生物属以及分离推定的扩展酶并建立使之适用于本发明方法的方案是明确的并且是本领域内技术人员熟知的。对候选的新菌株和有用的微生物属的无细胞提取物的筛选可用可靠的能重复进行的方法进行，即在存在已知的 D A O C S 辅助因子时将所说的提取物加到己二酰 - 6 - A P A 底物中，该辅助因子包含亚铁 (Fe^{2+}) 离子，抗坏血酸盐， α -酮戊二酸盐和三磷酸腺苷 (A T P)。以类似于下文中详细描述的方法给未转化的产黄青霉菌喂养己二酸原料可以制备足够量的己二酰 - 6 - A P A 底物。如果形成己二酰 - 7 - A D C A，就存在所需的扩展酶，通过色谱法可以检测其存在。

利用熟知的重组技术，根据 *S. Clavuligerus* 和支顶头孢菌的扩展酶序列也可以生产 D N A 探针，例如，从待选的微生物中筛选其 D N A 物质，很可能生产出适用于本发明方法的扩展酶。

扩展酶的潜在来源

如已经指出的,扩展酶是一种催化 Penam 环结构(存在于青霉素类分子中)扩展为 Ceph - 3 - em 环(如存在于头孢菌素中)的酶。因此任何含有 cephem 环的微生物产生的代谢产物都是编码扩展酶的 DNA 的潜在来源。这样的微生物列举于下面,但该表仅是举例而不能认为已详尽无遗。

真菌:

支顶头孢菌
头孢菌属种
Emericellopsis
类青霉菌属
帚霉属
Diheterospora
Spiroidium
Anoxiopsis

放线菌: Streptomyces Clavuligerus
利波曼氏链霉菌
S.Wadayamensis
S.todorominensis
S.filipinensis Cephameini
S.heteromorphus
S.panayensis

灰色链霉菌

S. cattleya

Nocardia lactamdurans

其他细菌

黄杆菌属种

脱氮产碱菌

节枝动杆菌

Providencia rettgeri

Lysobacter Lactamgenus

上表中列出的有机体的扩展酶仅作待选物用于进一步研究，可能并不是所有这些生物体的酶都适用于本发明的新方法。例如，使用既具有扩展酶又具有羟化酶活性的那些酶，如来源于支顶头孢菌的那些酶可以合成羟化的己二酰-7-ADCA，即带有一个己二酰侧链的DAC。

编码扩展酶活性物的DNA片段的分离

一旦按照上面描述的方法检测到所需要的扩展酶存在，分离该编码扩展酶活性物的DNA的方法也是明确的，并且是本领域内熟知的。根据编码扩展酶基因的已知序列和部分序列构建DNA探针，将其与所需的待分离的编码酶的DNA进行杂交。该探针的构建是基于对扩展酶的氨基酸和其核苷酸碱基序列，以及有关特定的微生物优选密码子的现有知识。下文中进一步详细描述应用于 *Streptomyces*

Clavuligerus ATCC 27064 的基因组 DNA 的该类型方法的典型步骤。

利用重组 DNA 技术中已知的限制性裂解和连接步骤完成对编码扩展酶活性物的 DNA 的分离。必需有该微生物基因组的限制性核酸内切酶图谱，以便产生和分离恰当的限制性片段。S.Clavuligerus 和支顶头孢菌的、限制性图谱已能得到；因此，对于前者，可以利用限制性内切酶 Bam HI 和 Sal I 以及电泳而获得需要的 1.8 - 2.2 kb 大小的片段。

产黄青霉菌菌株的转化

一旦获得编码扩展酶活性物的 DNA 片段，可将它们与含有下列成分的 DNA 片段一起插入（连接）到一个质粒或其它表达载体，这些成分是：启动子，转译活化序列，抗性标记，调节序列，粘性质粒构件部分，以及任何其他的允许或启动转化，启动基因产物表达，便于转化体分离的 DNA 序列。由此构建的表达载体用于完成产黄青霉菌菌株的转化以及细胞内扩展酶活性物的表达。用于进行转化和表达的技术是本领域内熟知的，在下文中对这类典型步骤进行详细描述。

正如上文中已经描述的，已转化的产黄青霉菌菌株表达胞内扩展酶活性物，然后该酶在原位作用于己二酰 - 6 - A P A 底物进行环扩展而形成己二酰 - 7 - A D C A。

新的转化体

在本发明的优选实施方案中给出的特定的表达扩展酶活性物基因的产黄青霉菌转化体相对于现有技术如 Cantwell 等人, (1 9 9 0) Current Genetic, 1 7, 2 1 3 - 2 2 1 描述的那些构建体而言是新的。在这二种构建体中, 利用体外诱变技术将启动子与扩展酶基因相连。在 Cantwell 的构建体中, 经过加工处理后在扩展酶基因的 A T G 上导入 Nde I 位点, 该基因通过一个 Xba I/Nde I 接头连接到 I P N S 启动子的 3' 端的 Xba I 位点上。在本发明的构建体中, 在扩展酶基因的 A T G 处制备一个 Nco I 位点, 并且连接到 I P N S 接头的 3' 末端的 Nco I 位点。这样, 在这些构建体中启动子-基因周围具有下列序列:

		XbaI		NcoI	
IPNS 启动子	5'	TCTAGACACCATGG	3'		SEQ ID NO:1
链霉菌扩展酶	5'	GTGAGAGTTGATGGAC	3'		SEQ ID NO:2
Cantwell	5'	TCTAGACACTATGGAC	3'		SEQ ID NO:3
本发明	5'	TCTAGACACCATGGAC	3'		SEQ ID NO:4

在 Cantwell 构建体中用 T 代替 C, 而在本发明的构建体中保留了 C; 因此, I P N S 启动子序列与 A T G 起始密码子紧密相连, 发现其与天然存在的 I P N S 基因精确匹配。尽管只有一个单核苷酸碱基不同, 现有技术中的启动子可以产生较低的转译效率, 结果是以较低水平表达扩展酶基因。

其他的不同点是在这些构建体中包括的启动子或基因区域。Cantwell

构建体含有 I P N S 启动子的 5' Bam HI 至 Xba I 3' 区域, 而本发明的载体含有该启动子的 5' Nco I 至 Nco I 3' 区 [Diez 等, (1990), J. Biol. Chem. 265, 16358 - 16365]。结果导致在 Cantwell 构建体的 I P N S 启动子的 5' 末端产生附加的约 250 碱基对。但是, 该区域是位于 I P N S 基因上游的 A C V 合成酶基因的开放式读码内。

该 Cantwell 构建体还含有链霉菌基因的 A T G 至 Bam HI 位点 3' 端部分, 而本发明载体含有该基因的 A T G 至 Sal I 位点 3' 端部分 [Kovacevic 等人, 1989), J. Bacteriol., 171, 754 - 760]。从而导致在 Cantwell 构建体内有一个约 1000 碱基对的附加的 3' 末端序列。本发明的构建体还含有扩展酶基因至 A T G 的 Bam HI 位点 5' 端的上游区 ; 但是由 I P N S 启动子将它与扩展酶基因的读码相隔开。

本发明的构建体与现有技术中描述的构建体的另一个不同点是指所用的可选择性标记。使用青霉菌的 I P N S 启动子时: 本发明构建体中的腐草霉素基因融合趋向于选择整合多个拷贝或在能产生高水平表达的位点处整合的方式, 从而可能得到能以高水平表达扩展酶基因的较高的转化体百分率。

上文中描述的新转化体类型, 记作 P C 1 0 0, 已寄存于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, 保藏号为 A T C C (寄存日期:)。

己二酰侧链的裂解

本发明新生物方法中的下一个步骤是从己二酰-7-ADCA上裂解己二酰侧链，该步骤需要用己二酰酰基转移酶系处理前一步骤中的产品。正如上面已经解释的，本发明的明显进步之一是能在单一发酵培养物中完成所有的逐渐导致己二酰-7-ADCA形成的步骤。这种改善可以不必从该方法的每一步骤中分离和部分纯化中间产物产品从而额外地提高了效率。但在最后一个步骤，没有己二酰酰基转移酶系存在，即在原始的发酵培养物中在原位不能产生己二酰酰基转移酶系。

如果以不连续培养方式完成本发明的新生物方法，必需将第一步的产品进行分离和部分纯化，完成这一过程的初步方案已在上文中描述。

而且，本发明的方法可以任何能有效地将己二酰酰基转移酶与己二酰-7-ADCA接触的任何方式完成从而将该化合物酶促转变为7-ADCA。这是在上下文中最宽的对术语“接触”的定义。可以利用粗制己二酰-7-ADCA无细胞肉汤作为养料流并且以非连续培养方式用粗制己二酰乙酰基转移酶肉汤处理之。由于该方法不需要对初始反应物进行任何实质上的纯化因而该方法具有一定效益。当然，也可以进行修饰。例如在将它们相互接触之前，将反应物纯化到所需的某种程度。也可以以连续方式而不是非连续方式实施该方法。可用各种方法对反应物本身接触方式进行修改使生产技术保持先进。这样，可利用一种固定化酶，例如，制成含己二酰酰基转移酶的柱将己二酰-7-ADCA通过柱子。也可以将固定化酶加到己二酰-7-

A D C A 溶液中形成悬浮液。这种固定化酶系具有容易回收酶和多次重复使用的优点。该处理技术的另一例子是膜反应器。将反应物接触的优选方法是利用固定化酶柱。

在裂解步骤中使用己二酰基转移酶

已知有许多酶对己二酰侧链有特异性。用从购自 R A E V 公司的己二酰基转移酶获得的结果在下文中的研究实例中进一步详细描述。在文献中已报道了 7 个其他的酶可以在头孢菌素型分子上移去己二酰侧链。该七种酶中有六种来源于假单胞菌，第七种来源于芽孢杆菌。在来源于假单胞菌的酶之间存在某些相似性，但是所有七种酶在其物理/生物特性方面有某种程度的差异。下面概括出它们的某些特性：

酶	参考	近似分子量(亚单位)
(假单胞菌和芽孢杆菌菌株)		
P. SY-77-1 (Toyo JoZo)	Shibuya 等人 (1981)	表观与 GK 16 以下相同
P. GK 16 (Asahi)	Matsuda, Komatsu (1985)	16,000 54,000
P. SE83(acyI) (Asahi)	Matsuda 等人 (1987)	38,200 19,900

P. SE83 (acyII)	Matsuda 等人	25,400
Asahi	(1987)	58,200
P. diminuta	Aramori 等人	58,000
N176	(1991a)*	26,000
(Fujisawa)		
p. Diminuta	Aramori 等人	?
V 22	(1991)*	?
(Fujisawa)		
侧孢芽孢杆菌J1	Aramori 等人	70,000
	(1991 b)* *	(单体的)
假单孢菌属SP		16,000
(RAEV 公司)		54,000

* Aramori 等人, J. Ferment. Bioeng. (1991) 72 :
232 - 243。

* * Aramori 等人, J. Bacteriol. (1991) 173 :
7848 - 7855。

上述所有己二酰酰基转移酶可用于本发明的新生物方法中。用于
本发明方法的其他己二酰酰基转移酶可通过检测待选的针对己二酰 -

7 - A D C A (它必需作用的真正底物) 的酶而很容易发现。阳性结果表示一种可靠的, 可重复的本发明方法中真正可用的候选酶的测定方法, 选用 Szewczuk 和 Wellman - Bednawska 在 Clin.Chim.Acta (1 9 7 8) 8 4 : 1 9 - 2 6 中报道的经过修改的方法, 直接从己二酸酐与 7 - A D C A 的反应中制备底物。可按照 Albertson 和 Lundmark 在 J. Macromol. Sci. Chem. (1 9 9 0) A 2 7 , 3 9 7 - 4 1 2 上描述的方法制备己二酸酐。7 - A D C A 可从几种商业途经包括 E . R . Squibb & Sons, Ltd., NJ, 和 Interchem.Corp., NJ. 购买。

如果需要利用一种快速的比色法完成对候选酶的初步筛选, 则一种比色底物如己二酰 - P A B A (对 - 氨基苯甲酸) 或己二酰 - P N A (对 - 硝基苯胺) 可以替代己二酰 - 7 - A D C A 底物。侧链裂解后得到一种显色物质, 可用比色计方便地测定其存在和浓度。关于这些和其他合适的比色方法的更详细资料见 Marelli, L.P. (1 9 6 8) J.Pharm. Sci. 5 7 : 2 1 7 2 - 2 1 7 3 ; Szasz, G. (1 9 6 9) Clin. Chem. 1 5 : 1 2 4 - 1 3 6 ; Szewczuk, A. 等人 (1 9 8 0) Anal.Biochem. 1 0 3 : 1 6 6 - 1 6 9 ; 和 Reyes, F. 等人 (1 9 8 9) J . Pharma. Pharmacol. 4 1 : 1 3 6 - 1 3 7 。

将 R A E V 酶的 N - 末端氨基酸序列和下表中列出的 acy II 大亚基和 G K 1 6 酶进行比较。比较结果显示于下文 (其中圆括号表示小于真实描述) :

R A E V - S E Q I D N O : 5

S N (S) (G) A V A P G K T A N G N A L (L) L Q N (P)

GK16-SEQ ID NO: 6

SN SWAVAPGKTANGNALLQNP

acyI SEQ ID NO: 7

SN SWAVAPGRTATGRPILAGDP

从显示的序列可明显地看到这些肽中所有三种都是相关的。但是，具有类似于上面所表示的N-末端序列的蛋白质不一定具有己二酰基转移酶活性，正如对于由节杆菌菌株产生的青霉素G酰基转移酶的情况。而另一方面，用于本发明方法的己二酰基转移酶有并不显示与上述N-末端序列具有显著的同源性者。例如，在上面表中列出的Asahi 酶acyI和Fujisawa B. Laterosporus J1 酰基转移酶显示具有己二酰-7-ACA酰基转移酶活性，但并不与上文中列出的其他酶具有序列同源性。因此，根据待选的酶是否能够从己二酰-7-ADCA上裂解己二酰侧链而决定可用于本发明新生物方法的第二步中的己二酰基转移酶的范围，如上文中详细描述的是一个可简便和可靠地作出决定的事情。

也可以通过其他方法发现合适的己二酰基转移酶。例如，EP-A-0453048中描述了提高由假单胞菌SY-77-1产生的戊二酰基转移酶的裂解己二酰活性的方法。通过在 α -亚基的特定位点上进行不同氨基酸替代，可以观察到切割己二酰（从己二酰-丝氨酸）的速度提高3-5倍以上。这种改进的酶也适合用于本发明的方法。应该注意到虽然EP-A-0453048明确地证实了一种具有对己二酰侧链改善活性的酰基转移酶，但是没有首先描述任何方法（化学方法或通过类似于本说明书描述的生物方法）产生己二酰-头孢菌素。

下面对本发明的优选的实施方案进行详细的描述，但这仅是为了说明而不是以任何方式对本发明进行限制。

实施例 1

产黄青霉菌的培养条件

在这些步骤中使用的产黄青霉菌菌株培养于含有 L C S B 培养基的平皿中，该培养基含有乳糖，单水合物，1.5% (W/V)；玉米浸提液，0.5% (V/V)；蛋白胨，0.5% (W/V)；NaCl，0.4% (W/V)；MgSO₄ - 7H₂O，0.05% (W/V)；KH₂PO₄，0.06% (W/V)；FeCl₃ - 6H₂O，0.0005% (W/V)；CuSO₄ - 5H₂O，0.0002% (W/V)；琼脂，3.0% (W/V)；溶于1升蒸馏水，PH 4.8。在12天后，在25℃和65%相对湿度，移去单个菌落并加到含有玻璃珠的螺旋顶的试管中的2ml 无菌水中。通过涡旋离析生长的培养物后将悬浮液用于接种“稻米烧瓶”。该“稻米烧瓶”在每250ml烧瓶中含有25克 Uncle Ben's 转换稻米，天然长谷物，已用3-4倍体积的蒸馏水洗涤7分钟，并每30秒混合一次，直至约25%的水被稻吸收后排掉水。在25℃和65%湿度培养12天后，用50ml 无菌水从稻米上洗掉孢子。用孢子悬浮液接种液体培养基，将该培养物冻干并贮存于4℃。将该孢子加到等体积的5%脱脂牛奶中并于无菌安瓿管中冻干。

利用在振荡烧瓶中的菌株二步发酵法生产青霉素或生产作为 R N A 或 D N A 来源的菌丝体。将 1×10^8 孢子加到含有 50 ml 下列成分培养基的 500 ml 烧瓶中开始种子阶段的发酵，该培养基含有葡萄糖 3.0% (W/V)；药物介质 (Pharmamedia) 1.0% (W/V)；玉米浸提液 3.0% (V/V)；硫酸铵 0.2% (W/V)， CaCO_3 0.5% (W/V)；无水磷酸单钾盐 0.05% (W/V)，乳糖 1.0% (W/V)；原始干酵母 1.0% (W/V) 溶于 1 升蒸馏水中。在 70 mm 直径大的旋转振荡器中以 220 rpm 在 25℃ 和 65% 相对湿度条件下培养。在培养 48 小时后，将 2 ml 的营养生长期种子转移至 35 ml 下列组分的培养基的 500 ml 烧瓶中，开始生产阶段发酵，该培养基组成： KH_2PO_4 ，0.05% (W/V)； K_2SO_4 0.5% (W/V)； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0% (W/V)；乳糖 12.0% (W/V)，药物介质 (Pharmameclia) 2.75% (W/V)； CaCO_3 (沉淀的)，1.0% (W/V)，猪油 1.0 (V/V) 溶于 1 升蒸馏水；PH 6.6。接着进行高压灭菌，但在接种前，加入无菌的 25% 己二酸钠 (PH 6.6)，其最终己二酸钠浓度为 2.5%。接种后，在与种子阶段同样的条件下，连续培养 5—7 天。

如果需要将菌丝体产生转化用的原生质体或作为 D N A 来源，在含有 50 ml 完全培养基 (cm) 的 250 ml 烧瓶中使菌株生长，该完全培养基含有：50 ml 的 $20 \times \text{Clutterbuck's}$ 盐 (120 克 Na_2NO_3 ，10.4 克 KCl ，10.4 克 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，30.4 克 KH_2PO_4)，2.0 ml Vogel's 微量元素 (0.3 M 柠檬酸，0.2 M ZnSO_4 ，25 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，

10 mM CuSO_4 , 3 mM MnSO_4 , 8 mM 硼酸, 2 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) , 5 克胰蛋白胨, 5 克酵母抽提物, 10 克葡萄糖, 溶于 1 l 蒸馏水中, 在旋转振荡器中以 220 rpm 在 25 °C 培养。

实施例 2

青霉菌基因组 DNA 和总 RNA 的分离

通过用干酪包布过滤, 从按照上述方法制备的经过 48 小时培养的培养物中收集营养菌丝体生长物, 在液氮中冷冻并冻干过夜。在白中用沙子和杵研磨干菌丝体, 并再悬浮于 25 ml 的 100 mM LiCl , 50 mM EDTA , 10 mM Tris PH 8.0 , 4 % SDS 中。在 60 °C 的水浴中将悬浮液加热至 50 - 55 °C , 首先用 1 M Tris (PH 8) 饱和酚, 接着用 Tris -饱和酚: 氯仿 (1 : 1 , V : V) , 然后用氯仿萃取该混合物。通过加入等体积的冷 6 M LiCl 然后在 -20 °C 将该混合物保持 2-3 小时而从水相中沉淀出 RNA。在 12000 X g 于 4 °C 离心 20 分钟, 用 66 % (V / V) 乙醇处理上清液, 并冷却至 -20 °C 15 分钟, 沉淀出 DNA。在按上面描述离心后, 用 70 % 乙醇洗涤 DNA 沉淀, 干燥并再悬浮于 TE 缓冲液 (10 mM Tris - HCl , PH 7.5 , 1 mM EDTA) 。当用溴化 3.8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶鎓染色琼脂糖凝胶电泳时, 通过与已知的 DNA 标准物比较而估测 DNA 的浓度。

将在实施例 1 中描述的产黄青霉菌培养物在一个旋转振荡器中在 25 °C 以 220 rpm 在 35 ml 发酵培养基 (发酵条件如前所述) 中生长 96 小时。在真空条件下用 Whatman # 1 滤纸过滤而收集菌丝体并

用约 50 ml 水洗涤。立即从滤纸上刮下菌丝体，重新悬浮于 5 ml 的“破裂缓冲液”（50 mM Tris - HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 5% SDS），在液氮中冷冻，并冻干。在过夜冻干后，加入 5 ml 含有 0.1% DEPC 的水和 5 ml 1M Tris (pH 8) 饱和苯酚：氯仿：异戊醇（50：50：1），通过振荡将混合物在 37℃ 解冻 20 分钟。在 4℃ 以 $12000 \times g$ 将混合物离心处理 10 分钟，并移走水层，先用 1M Tris (pH 8) 饱和苯酚：氯仿：异戊醇（50：50：1），再用 1M Tris (pH 8) 饱和苯酚，最后用氯仿再次提取。将等体积的 6 M LiCl 与最后的水层混合，将该溶液置于 -20℃ 至少 4 小时。在 4℃ 以 $12000 \times g$ 离心 20 分钟将全部 RNA 团成球，将该沉淀溶于加了 0.03 ml 3 M 乙酸钠的 0.3 ml TE 缓冲液中，并将 2.5 倍体积的乙醇加入沉淀的 RNA 中。将最后得到的沉淀球溶于 0.1 ml 的 TE 缓冲液中，并通过分光光度法检测在 260 nm 处的吸收值而确定 RNA 浓度。

实施例 3

Streptomyces Clavuligerus 的培养条件

在这些步骤中使用的 *Streptomyces Clavuligerus* 菌株保藏号为 ATCC 27064。将该菌株培养于含有酵母抽提物 4 克，麦芽提取物 10 克；葡萄糖 4 克，琼脂 20 克，溶于 1 升蒸馏水中 pH 7.2 的平板培养基上。在 30℃ 生长 5 天后，将 2 ml 无菌水加到平板上并从琼脂表面上刮下生长的培养物。将得到的悬浮液转移至含有玻璃珠

的无菌螺旋顶试管中。旋转离析生长培养物后，将悬浮液用于接种液体培养液，在该悬浮液中加入甘油至15%终体积贮存于-70℃用作持久性培养物。

如果需要用菌丝体生产用于转化的原生质体或作为DNA来源的原生质体，将菌株拌在200ml YEME培养基/1升烧瓶中培养，该培养基含有酵母提取液3克；蛋白胨5克；麦芽浸提液3克；葡萄糖10克；蔗糖340克； $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.02克；甘氨酸5克；琼脂18克；溶于1升蒸馏水中。在旋转振荡器中28℃以220rpm培养。

实施例4

链霉菌基因组DNA的分离

通过在22100Xg离心10分钟而从上面所述制备的48小时培养物中收集营养生长物。将细胞重悬于10ml TE缓冲液中并加入10mg溶菌酶，将该混合物在30℃培养15分钟。然后加入1ml 20% SDS，接着立即加入10ml TE (pH 8) 饱和苯酚和1.5ml的5M NaCl并缓慢地将混合物倒置20分钟。在12000Xg离心10分钟而分成不同的相，然后移走水层并转移至新鲜试管中。加入等体积的氯仿并将混合物缓慢地倒置10分钟。通过在12000Xg离心10分钟而再次分成不同的相，移去水层，再次将其转移至新鲜管。仔细地加入2倍体积的异丙醇，将DNA沉淀裹卷并重新溶于最小体积的TE缓冲液中。加入RNA酶A到最终浓度为20mg/ml，将该溶液在50℃培养1小时。然后将蛋白酶K加入连同100

mM NaCl 和 0.4% SDS 至终浓度为 100 mg/ml, 将混合物在 37℃ 培养 1 小时。用等体积的 TE (pH 8) 饱和苯酚再次抽提该溶液, 随后进行另一次氯仿抽提。加入 2 倍体积的异丙醇后从最后提取物中将 DNA 裹卷。并通过分光光度法测定在 260 nm 处的吸收值而确定其浓度。

实施例 5

构建基因文库并分离含有 *Streptomyces Clavuligerus*

扩展酶基因的 DNA 片段

从前面描述的方法中获得的 *Streptomyces Clavuligerus* 基因组 DNA 用限制性酶 BamHI 和 SalI 进行消化。在 0.8% 琼脂糖凝胶上将经过消化的 DNA 进行电泳, 洗脱出 1.8 - 2.2 kb 大小的片段并连接至予先用 BamHI 和 SalI 消化的 pUC18 DNA 上。利用电击穿法 (Gene Pulser, Bio-Rad, Richmond, CA) 将该连接混合物稀释液用于转化感受态 JM109 细胞。根据制造商的介绍制备感受态细胞及确定电击穿条件。将转化混合物置于含有 100 mg/ml 氨苄青霉素, 7.5 ml 2% X-Gal 的 LB 平板上培养。在 37℃ 培养过夜后, 根据其由于质粒载体 β -半乳糖苷酶基因活性的丧失而不显示颜色的特性鉴别出重组菌落。挑取无色菌落置于含有 100 mg/ml 氨苄青霉素的新鲜 LB 平板上。在 37℃ 生长过夜后, 将菌落转移至硝酸纤维素膜上并用由聚合酶链反应产生的探针进行杂交, 该探针相应于已公开的 *Streptomyces Clavuligerus* 扩展酶基因序列的碱

基 5 2 - 9 1 8 位 [Kovacevic 等人 , (1 9 8 9) J. Bacteriol. 1 7 1 : 7 5 4 - 7 6 0 ; 和 U . S . 5 , 0 7 0 , 0 2 0] 。按照制造商的说明 (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) 用 (^{32}P) d C T P 和寡聚标记盒通过随机引物扩展反应而完成对聚合酶链反应产物的标记。在 10^6 C P M 的放射性探针, 3 0 % 甲酰胺, $5 \times$ S S C (0.15 M NaCl , 0.015 M 柠檬酸钠 pH 7), 0.1% S D S, $5 \times$ Denhardt's (5 克 ficoll, 5 克聚乙烯吡咯烷酮, 和 5 克 B S A 配制 5 0 0 ml 的 $50 \times$ 原液) 和 100 mg/ml 小牛胸腺 D N A 存在下, 在 37°C 进行杂交反应过夜。有几个转化体与探针进行强烈杂交。通过限制性酶分析已证实有一个菌落含有携带扩展酶基因的载体, 将该质粒记作 p F T S O - 1 。

实施例 6

质粒 D N A 的分离

在一个旋转振荡器中以 220 rpm 将含有该质粒的大肠杆菌培养物于 37°C 在添加了四环素 15 mg/ml 的 500 ml L B 肉汤 (20 克 / 升的 L B Broth Base, Gibco, Paisley, Scotland) 中培养 1 2 - 1 6 小时。通过在 4°C , $4000 \times g$ 离心 1 0 分钟而沉淀细胞。将该细胞沉淀物重新悬浮于 18 ml 葡萄糖缓冲液 (50 mM 葡萄糖, 25 mM Tris pH 8.0, 10 mM E D T A) , 并加入溶于葡萄糖缓冲液中的 40 mg/ml 融解酶 (Sigma, St. Louis, Mo) 2 ml , 混合, 将该混合物在室温下培养 1 5 分钟。加入 40 ml 新制备的 0.2 N N a O H , 1% S D S 溶液, 并缓慢地旋转该混合物将其置于冰上 10

分钟。然后加入 30 ml 5 M 乙酸钾 pH 4.8, 充分混合, 并将得到的混合物再置于冰上 10 分钟。在 4000 X g, 4℃ 离心 10 分钟而沉淀细胞碎片, 用干酪包布过滤所得到的上清液。向澄清的上清液中加入异丙醇 (0.6 体积) 而沉淀质粒 DNA, 并在室温下保温 20 分钟而形成沉淀。在 4℃ 以 4000 X g 离心 20 分钟而沉淀质粒 DNA, 然后用 70% 乙醇洗涤并短暂地干燥。将沉淀重悬浮于 9 ml TE 缓冲液, 然后加入 10 克氯化铯和 0.387 ml 的 10 mg/ml 溴化乙吡啶溶液。将该溶液在 313, 100 X g 离心 24 小时。用紫外光观察氯化铯梯度中的质粒带, 分离, 然后用水饱和丁醇进行萃取而去除溴化乙吡啶。通过在 TE 缓冲液中渗析而移走质粒制剂中的氯化铯, 最后用 PEG (MW 8000) 浓缩 DNA。利用分光光度计测定在 260 nm 处的吸收值而确定 DNA 浓度。

实施例 7

构建青霉菌转化载体 pPenFTSO

用腐草霉素抗性基因作为主要的选择性标记而构建青霉菌转化载体。这一过程可用下列方法完成, 首先分离一个 660 bp 片段, 其含有腐草霉素抗性基因 (来自 *Streptoalloteichus hindustanus* 的腐草霉素结合蛋白基因), 并也结合到酵母细胞色素 C1 终止子上, 该终止子是通过在琼脂糖凝胶上电泳和洗脱而获得的 pUT713 质粒 (CAYLA, Toulouse Cedex, France) 的 Bam HI/Bgl II 消化片段。将分离到的片段连接到 pSELECT[®] 1 (Promega Corporation) 载体的 BamHI 位点, 并通过限制性酶分析确定基因取

向。接着，插入含有入C O S位点的5 5 0bp Pst I 片段，它能使载体用于形成粘性质粒（当含有合适大小插入片段时）。然后，从含有I P N S基因的基因组克隆的Nco I/Bam HI 消化产物中分离（通过在琼脂糖凝胶上电泳并洗脱）含有产黄青霉菌异青霉素N合成酶（I P N S）基因的启动子区域的1.5 kb的Nco I/Bam HI 片段。将分离到的I P N S启动子片段连接到Bam HI/Nco I 消化的载体上。Nco I 位点位于腐草霉素抗性基因的A T G起始密码子。该载体记作p U T Z - 2。

通过在0.8%琼脂糖凝胶上电泳并洗脱而从p F T S O - 1（前面描述的载体）的Bam HI和Sal I消化物中纯化含有Streptomyces Clavuligerus 扩展酶基因的1.645 kb片段。将分离到的片段连接到也用Bam HI和Sal I 消化的p S E L E C T载体（Promega Corporation）。将该载体记作p F T S O - 8。利用变化位点（Altered Sites）的体外诱变系例（Promega Corporation）对p F T S O - 8进行位点特异性诱变法在扩展酶基因的A T G起始密码子处产生一个新的Nco I 位点。根据制造商的说明进行诱变。构建一个寡聚核苷酸，与来自于已公开的链霉菌扩展酶基因序列的A T G起始密码子处的D N A区域的编码序列互补（Kovacevic 等人，（1990）Journal of Bacteriology, 171, P.3952-3958）。利用氰乙基氨基磷酸酯（Phosphoramidite）化学方法合成寡聚核苷酸（Pharmacia Gene Assembler instrumentation），该寡聚序列如下所示：

SEQ ID NO: 8

3' CGAGAGGATCAGTGAGAGTCCATGGACACGACGG 5'

通过限制性酶分析可确证诱变的发生。接着,通过在琼脂糖凝胶上电泳并从其上洗脱而从含有 I P N S 基因的基因组克隆的 Nco I 消化产物中分离含有产黄青霉菌异青霉素 N 合成酶基因的启动子区域的 1.2 k b 的 Nco I 片段。将 I P N S - 启动子区域连接到 p F T S O - 8 载体的新 Nco I 位点处,该位点是通过诱变在扩展酶基因的 A T G 起始密码子处产生的。通过限制性酶分析确定启动子对扩展酶基因的取向。然后以 Bam HI/Sal I 片段的形式移走 I P N S - 启动子:扩展酶基因盒至如上所述的切割青霉菌转化载体 p U T Z - 2 的 Bam HI/Sal I 上。最后得到的构建体称为 pPen FIS0。

实施例 8

青霉菌 β -微管蛋白 (β -Tubulin) 启动子的克隆

利用黑曲霉 β -微管蛋白基因作为杂交探针从青霉菌 λ 基因组文库中克隆青霉菌 β -微管蛋白基因。对该克隆进行序列分析与黑曲霉的 β -微管蛋白基因的已知氨基酸序列进行比较而鉴定一个从 A T G 起始密码子开始的有 91%同源性的区域。在起始密码子和 Bam HI 位点 1.4 k b 上游之间分离包含功能性启动子的序列。

携带青霉菌 β -微管蛋白启动子的转化载体的构建

将含有青霉菌 β -微管蛋白启动子的 2.0 k b XbaI/HindIII 片段连接到已用 XbaI/HindIII 消化的 p SELECT 载体 (Promega Corporation)

上。利用变化位点体外诱导系统 (Promega Corporation) 进行位点特异性诱变在 A T G 起始密码子处产生新的 Nco I 位点。诱变按照制造商的说明进行。构建与 A T G 起始位点区域互补的寡聚核苷酸, 但其中掺入了几个变化从而产生 Nco I 位点, 并用于诱变。通过氰乙基氨基磷酸酯 (Phosphoramidite) 化学方法 (Pharmacia Gene Assembler instrumentation) 合成寡聚核苷酸, 该寡聚序列如下所示:

SEQ ID NO: 8

3'CGAGAGGATCAGTGAGAGTCCATGGACACGACGG5'

通过限制性酶分析可证实诱变的发生。接着, 将含有青霉菌 β -微管蛋白启动子的 1.4 kb Bam H I / Nco I 片段连接到 Bam H I / Nco I 消化的 p F T S O - 8 载体 (前面实施例 7 中描述的载体) 中的链霉菌扩展酶基因的 A T G 处的 Nco I 工程位点上。将该载体命名为 b t F T S O - 8。再将含有 β -微管蛋白启动子的 1.4 kb Bam H I / Nco I 片段连接到用 Bam H I / Nco I 消化的 p U T Z - 2 载体 (前面实施例 7 中描述的载体) 上。该连接反应发生于紧靠腐草霉素抗性基因前面的 β -微管蛋白启动子处。该载体命名为 p C I - 6。接着, 将来自含有 β -微管蛋白启动子扩展酶基因盒的 b t F T S O - 8 载体的 2.4 kb Bam H I / Hind III 片段连接到 Bam H I / Hind III 消化的 p C I - 6 载体上从而产生最后的青霉菌转化载体, 在该载体中从 β -微管蛋白启动子表达链霉菌扩展酶基因和腐草霉素抗性标记。该载体记作 p T S - 2。

实施例 9

克隆青霉菌 (GAP) 启动子

利用来自黑曲霉的 GAP 基因作为杂交探针从青霉菌 λ 基因组文库中克隆青霉菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAP) 基因。用从头孢菌 GAP 基因的 5' 区域的引物产生的 PCR 产物进一步探测四个潜在的阳性克隆 (Kimura, H. 等人, (1991), J. Ferm. and Bioeng., 71, 145-150)。利用氰乙基氨基磷酸酯化学方法 (Pharmacia Gene Assembler instrumentation) 合成为聚合酶链反应 (PCR) 的引物使用的寡聚核苷酸, 该寡聚序列如下:

Seq.ID NO:10

5' CGCGGATCCGGCATCAACGGATTCCGGTCGTAT 3'

Seq.ID NO:11

5' CGCGGATCCGGGCACGCCATGGACATGCCAGTG 3'

四个假设的阳性克隆之一与 PCR 产物发生交叉杂交。将来自该基因组克隆的 4 kb BamH I 片段连接到 BamH I 消化的 p S E L E C T 载体 (Promega Corporation) 以便进行序列分析。将该载体记作 p T S - 0。通过与已知的头孢菌素 GAP 基因序列进行比较而对该片段进行序列分析鉴定 A T G 起始密码子。

构建携带青霉菌 G A P 启动子的转化载体

为了建造具有链霉菌扩展酶基因的青霉菌 G A P 启动子，利用 p T S - 0 载体通过体外特异性诱变在青霉菌 G A P 基因的 A T G 处产生一个新的 Nco I 位点。诱变过程按照制造商的说明进行。构建一个与 G A P 基因的 A T G 起始密码子处的 D N A 区域的编码系列互补的寡聚核苷酸，但掺入碱基变化创造一个 Nco I 位点。利用氰乙基氨基磷酸酯 (Phosphoramidite) 化学方法合成寡聚核苷酸 (Pharmacia Gene Assembler instrumentation)，该寡聚序列如下：

seq. ID NO: 12

5' CAGTAAACGCAACCATGGTTGTCCAG 3'

利用限制性酶分析方法可证实诱变的发生。接着，将来自 p T S - 0 的含有 G A P 启动子的 1.9 kb Nco I/Bam HI 片段连接到用 Nco I/Bam HI 消化的 p G T S O - 8 载体（前面实施例 7 中描述的载体），以便安置带有链霉菌扩展酶基因的 G A P 启动子。将该载体记作 p T S - O - 1。接着，将来自载体 p T S - O - 1 的含有 G A P 启动子：扩展酶盒的 3.0 kb BamHI/HindIII 片段连接到用 BamHI/HindIII 消化的 p C I - 6 载体（前面实施例 8 中描述的载体），从而产生最后的青霉菌转化载体 p S D - 1，在该载体中 G A P 启动子启动表达链霉菌扩展酶基因。

实施例 10

产黄青霉菌的转化

在一个旋转振荡器中，25℃，以220rpm，用 1×10^7 孢子接种50ml的CM肉汤67小时而产生上面描述的来自产黄青霉菌菌株的原生质体。用干酪包布过滤而收集菌丝体，将其转移至500ml烧瓶中并重悬于含有100mg Novozyme 234 (Novo BioLabs, Bagsvaerd, Denmark)的25mlKMP (0.7M KCl, 0.8M 甘露醇, 0.02M KPO_4 , pH6.3)中，并将其在30℃100rpm培养。用干酪包布/玻璃棉滤器过滤而分离球型原生质并在350Xg离心10分钟进行沉淀。然后用10mlKMP缓冲液洗涤原生质球三次，然后重悬于KMPC (加有50mM $CaCl_2$ 的KMP)至终浓度为 5×10^7 个细胞/ml并置于室温下20分钟。为了转化青霉菌，将200ml的原生质球悬浮液与50ml的PPC (40%PEG MW 3500, 20mM KPO_4 , pH 6.3, 在使用之际加入5% $CaCl_2$)一起加入到DNA (于含有5mg/ml肝素的6.2ml的KMPC中的5mg载体DNA)中，并将转化混合物置于冰上培养30分钟。加入1ml新制备的PPC，将该混合物转移至50ml经融化回热琼脂 (CM加1.3M甘露醇和3%琼脂)上。然后将转化混合物均分于5个培养皿中。在25℃再生24小时，平板上再铺以50mlOL含有100mg腐草霉素的OL (1%蛋白胨于1%琼脂)，涂敷的量相当于回热琼脂的量。将平板在25℃培养7-14天并观察转化菌落的生长情况。

实施例 11

己二酰-6-APA和己二酰-7-ADCA发酵产物

的HPLC分析

利用高效液相色谱(HPLC)法分析所使用的未转化产黄青霉菌菌株中己二酰-6-APA的产生以及所使用的转化的产黄青霉菌菌株中己二酰-7-ADCA的产生。分析是用包括625溶剂传输系统,置于220nm和254nm处的490E可变波长检测器,825Maxima 数据体系和一个作为固定相的NOVO-C18柱的Waters 系统中进行。流动相(以1ml/分钟的流速)由5分钟isocratic 2%甲醇/98%0.010M gKH_2PO_4 , pH 7.0, 15分钟2至40%的甲醇/0.010M KH_2PO_4 线性梯度pH7.0组成。用在220nm处检测标准青霉素N得到的标准曲线对己二酰-6-APA进行定量,并利用254nm处检测标准的脱乙酸头孢菌素C得到的标准曲线而对己二酰-7-ADCA进行定量。

通过向滤液中加入1单位/ml的青霉素酶I或青霉素酶III并在室温下培养10-30分钟而分析己二酰-6-APA和己二酰-7-ADCA对青霉素酶处理的敏感性。在前面描述的相同的HPLC条件下使样品流过色谱柱。

利用包括510溶剂传输系统,990光电二极管组检测器,990数据系统,和Novo-C18柱作为固定相的Waters系统对己二酰-6-APA和己二酰-7-ADCA产品进行UV光谱分析。所使用的流动相相同于上面描述的条件。

利用包括 510 溶剂传输系统, 990 光电二极管组检测器, 990 数据系统和 μ BondapakC18 制备柱作为固定相的 Waters 系统从整个发酵液中大批量分离己二酰-7-ADCA 产物。流动相 (以 5 ml/分钟流速) 由 35 分钟的 isocratic 0.010M KH_2PO_4 pH 7.0 组成。使用馏分收集器收集相应于己二酰-7-ADCA 产品滞留时间的吸收峰部份。

实施例 12

生物活性分析

利用琼脂扩散生物测定法检测通过 HPLC 分离到的己二酰-6-APA 和己二酰-7-ADCA 发酵产品的抗菌素活性。将 20 μ l 分离产物加到 LB 琼脂平板 (20 g / 1 L B Broth Base 加 3% 琼脂, Gibco, Paisley, Scotland, 上的 5 mm 圆纸片上, 该平板已接种了枯草芽孢杆菌 ATCC 33677, 或大肠杆菌超敏感菌株 (由 Arnold L. 教授提供, Demain, MIT)。将枯草芽孢杆菌作为指示菌用于检测己二酰-6-APA 产品, 以大肠杆菌超敏感菌株作为指示菌株用于检测己二酰-7-ADCA 产品。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 15 小时后, 在圆纸片周围, 由于指示菌生长受到抑制而出现的抑菌圈表明该产品显示有生物活性。该实验的对照实验包括去乙酰基头孢菌素 C, 头孢菌素 C, 青霉素 V, 和含有青霉素酶或不含青霉素酶的琼脂以作为确证 β -内酰胺结构的对照。

实施例 13

RAEV 酶分析

从整个发酵液得到的纯化己二酰-7-ADCA 产品作为底物用于检测 RAEV 酶 (购自 RAEV 公司) 的比活性。将含有 10 mM 底物, 1 mg RAEV 酶, 5% 甘油, 溶于 0.16 M KH_2PO_4 , 总体积为 50 ml 的反应混合物在 37 °C 保温。分别在时间点 0, 1, 3, 5, 10, 20 和 30 分钟时各取 5 ml 样品, 用 35 ml 0.010 M KH_2PO_4 pH 3.5 进行稀释, 在 HPLC 分析前于 -70 °C 冷冻, HPLC 的条件按前面所述。

用溶于 0.065 M KH_2PO_4 pH 7.0 中的 5 mM 底物, 总体积为 50 ml, 在 37 °C 检测 RAEV 酶作用于比色的己二酰一对一氨基苯甲酸底物的活性, 作用时间为 30 分钟。该反应在 96 井的点滴板上进行。加入在 0.25 M 乙酸中进行 1/100 稀释的 1 M NaNO_2 稀释液 50 ml 以终止反应, 将该反应置于室温下 3 分钟。加入 100 ml 的在 0.5 M NaHCO_3 中进行 1/100 稀释的 10 mg/ml 4-氨基-5-羟基-2,7-萘-二磺酸和溶于水中的单钠盐水合物的稀释液, 利用 EL 312 Bio-Kinetics Plate Reader (Bio Tek Instruments) 立即在 515 nm 处监测显色反应。

实施例 1 4

用 H P L C 分析 R A E V 酶反应产物

用由 H P L C 监测的己二酰 - 7 - A D C A 底物进行的所有的 R A E V 酶 (购自 R A E V 公司) 分析是用 Waters 系统进行的, 该 Waters 系统包括 6 2 5 溶剂传输系统, 置于 2 0 3 n m 和 2 5 4 n m 处的 4 9 0 E 可变波长检测器, 8 2 5 Maxima 数据系统, 和一个 Novo - C 1 8 标作为固定相。流动相 (以 1 ml / 分钟流速) 由 5 分钟 isocratic 2 % 甲醇 / 9 8 % 0 . 0 1 0 M K H ₂ P O ₄ pH 3 . 5, 以及 5 分钟 2 - 4 0 % 甲醇 / 0 . 0 1 0 M K H ₂ P O ₄ pH 3 . 5 线性梯度组成。利用标准的 7 - A D C A 监测反应产物的滞留时间。根据在 2 5 4 n m 监测标准 7 - A D C A 得到的标准曲线计算反应产物的量。

实施例 1 5

用 1 3 C - N M R 分析己二酰 - 7 - A D C A 发酵产物

用 Fourier Transform 型中的 1 B M - A F - 3 5 0 分光计在 7 5 . 4 M H z (7 . 1 T) 处获得 1 3 C - N M R (去偶合质子宽谱带) 光谱。该样品由 3 5 0 ° K 的 5 m m 试管中含有溶于 0 . 5 ml D ₂ O (9 9 . 8 % D, Aldrich) 或 0 . 5 ml D M S O - d ₆ (9 9 . 0 % D, Aldrich) 中的 5 0 mg 来自发酵液的己二酰 - 7 - A D C A 产物组成。由 N M R 数据证实产物是己二酰 - 7 - A D C A。

实施例 16

其它己二酰基转移酶的估测

除了用 R A E V 酶进行研究外，已证实用从各种微生物源生产的酶可从己二酰 - 7 - A D C A (和其他的己二酰化合物) 上移去己二酰侧链。在初始研究中将假单胞菌属菌株 S E - 8 3 和 S E - 4 9 5 (在发酵研究院寄存，寄存号分别为 F E R M B P - 8 1 7 和 F E R M B P - 8 1 8) 以假单胞菌菌株 S Y - 7 7 - 1 (在 Northern Regional Research Laboratory 寄存，寄存号为 N N R L B - 8 0 7 0) 在含有 HyCase S F, 2.0% (W / V) ; 谷氨酸单钠 0.5% (W / V) ; 酵母抽提物 0.5% (W / V) ; 玉米浸提粉 0.2% (W / V) ; 棉籽油 0.5% (W / V) 和谷氨酸 0.1% (W / V) 的培养基中培养 72 小时。通过离心收集细胞，并用 5 mM 磷酸缓冲液 pH 8.0 进行洗涤；然后将其再悬浮于缓冲液中并加入小体积的氯仿而使外膜具渗透性。然后用己二酰 - 对 - 硝基苯胺 (a d - P N A) 与等量细胞悬液样品进行混合，并在 30℃ 保温 2 - 18 小时的时间。在保温后，加入 10% (V / V) 乙酸而酸化该混合物。随着其转变为重氮化合物，(利用由 Sigma 化学公司提供的用于检测 γ - 谷氨酰转移酶 (Sigma 产品号 545 - A) 的药盒型试剂) 然后由比色法检测出释放的对 - 硝基苯胺。三个菌株 S E - 4 9 5, S E - 8 3 和 S Y - 77 - 1 的相对活性分别是 100%, 85.5% 和 48%。利用类似于上面所描述的用于 R A E V 酶的方法，也可以证实 S E - 8 3 和 S E - 4 9 5 酶作用于己二酰 - 7 - A D C A 的活性。由 S Y - 77 - 1 产生 β - 内酰胺酶这一事实来证实该菌株具己二酰 - 7 - A

D C A 的脱酰基化活性。

利用同样的方法也可以证实在两种真菌菌株中能产生己二酰-酰基转移酶(这两菌株是交链孢霉菌种MA-133, ATCC NO. 20492 和曲霉菌种MA-13, ATCC NO. 20491; 可参考属于Meiji Seika Kaisha Ltd. 的US 4, 141, 790) 在Merck & Co. Inc. 的 U. S. 3, 239, 394 中描述了三种其他的细菌菌株(Brevibacterium ATCC No. 14, 699, 和节杆菌ATCC No. 14, 648 和黄杆菌ATCC No. 14, 650) 也可作为头孢菌素C酰基转移酶的制造者。

序列目录

(1) 一般资料

(i) 申请人: Conder, Michael J.

McAda, Phyllis 和

Rambosek, John

(ii) 发明名称: 制备7-ADCA 的新生物方法

(iii) 序列号: 12

(iv) 对应的地址:

(A) 地址: Merck & Co., Inc.

(B) 街道: 126E. Lincoln Avenue

(C) 城市: Rahway

(D) 州: New Jersey

(E) 国家: USA

(F) ZIP: 07065

(V) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: Floppy disk

(B) 计算机: IBM PC 相容

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: Patent In Release ~~≠~~1.0, Version~~≠~~1.25

(Vi) 现在的申请数据:

(A) 申请号: US07/757,879

(B) 申请日: 1991年9月11日

(C) 分类:

(Viii) 代理人/代理机构资料

(A) 姓名: Speer, Raymond M.

(B) 登记号: 26,810

(C) 参考文献/摘要号: [07/757,879]18532

(ix) 通讯资料:

(A) 电话: (908)594-4481

(B) 传真: (908)594-4720

(2) SEQ ID NO.1 资料:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 14碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 双链

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1

TCTAGACACC ATGG

(2) SEQ ID NO.2 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 16 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 双链

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

GTGAGAGTTG ATGGAC

(2) SEQ ID NO.3 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 16 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 双链

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3

TCTAGACACT ATGGAC

(2) SEQ ID NO.4 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 16 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 双链

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4

TCTAGACACC ATGGAC

(2) SEQ ID NO.5 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 22 碱基对

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股数: 单股

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5

Ser Asn Ser Gly Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala

1 5 10

Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro

15 20

(2) SEQ ID NO.6 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 22个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股数: 单股

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6

Ser Asn Ser Trp Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala

1 5 10

Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro

15 20

(2) SEQ ID NO.7 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 22个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 股数: 单股

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7

Ser Asn Asn Trp Ala Val Ala Pro Gly Arg Thr Ala

1 5 10

Thr Gly Arg Pro Ile Leu Ala Gly Asp Pro

15

20

(2) SEQ-ID.NO.8 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 34个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8

CGAGAGGATC AGTGAGAGTC CATGGACACG ACGG

(2) SEQ ID NO.9 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 47个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9

ATCTCTTTTC TAATACCTTC ACCATGGGTTG AGATTGTACG
TGATCCC

(2) SEQ ID NO.10 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 33个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10

CGCGGATCCC GGCATCAACG GCTTCGGTCG TAT

(2) SEQ ID NO.11 资料:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 34个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11

CGCGGATCCG GGCACGCGCA TGGACATGCC AGTG

(2) SEQ ID NO.12 资料:

(i) 序列特性:

(A) 长度: 26个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 股数: 单股

(D) 形态: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组的)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:

CAGTAAACGC AACCATGGTT GTCCAG