

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99815766. X

[51] Int. Cl.

C12P 21/00 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100529096C

[22] 申请日 1999.12.22 [21] 申请号 99815766. X
[30] 优先权

[32] 1998.12.23 [33] DK [31] PA199801726

[32] 1999.5.27 [33] DK [31] PA199900745

[86] 国际申请 PCT/DK1999/000726 1999.12.22

[87] 国际公布 WO2000/039322 英 2000.7.6

[85] 进入国家阶段日期 2001.7.20

[73] 专利权人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72] 发明人 比约恩·E·克里斯坦森

亨里克·莫尔加尔德

斯文德·卡斯加尔德 简·莱姆贝克

[56] 参考文献

WO9515391A2 1995.6.8

WO9515390A1 1995.6.8

杂色曲霉毒素研究进展. 赵宝玉, 曹光荣. 动物医学进展, 第 18 卷第 2 期. 1997

审查员 邢云龙

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 3 页 说明书 34 页 附图 2 页

[54] 发明名称

在曲霉属突变细胞中产生多肽的方法

[57] 摘要

本发明提供了产生目的多肽的方法, 其包括 (a) 培养亲代曲霉属细胞的突变株, 其中 (i) 所述突变株包含第一核酸序列和第二核酸序列, 其中第一核酸序列编码所述多肽, 第二核酸序列包含对负责至少一种毒素之生物合成或分泌的基因中至少一个基因的修饰, (ii) 所述突变株与亲代曲霉属细胞相比, 在相同培养条件下产生较少量的所述毒素; (b) 从所述培养物中分离所述多肽。本发明还提供了曲霉属细胞的突变株, 以及获得这些突变细胞的方法。

1. 一种产生目的多肽的方法，该方法包括：

(a) 培养亲代曲霉属细胞的突变株，其中(i)该突变株含有编码多肽的第一核酸序列，和(ii)在相同的培养条件下，突变株比亲代曲霉属细胞产生更少的至少一种相关毒素；和(b)从培养基中分离多肽。

2. 权利要求1的方法，其中突变株产生较少的毒素的原因是修饰了至少一种负责毒素生物合成或分泌的基因。

3. 权利要求2的方法，其中突变株在相同的培养条件下产生的所述毒素至少比亲代细胞少90%。

4. 权利要求1的方法，其中毒素选自环匹阿尼酸，曲酸，3-硝基丙酸，大黄素，畸形素，黄曲霉毒素，赭曲霉毒素和黑麦酮酸。

5. 权利要求4的方法，其中突变株在相同的培养条件下与亲代曲霉属细胞相比，产生较少的环匹阿尼酸和至少一种第二类毒素。

6. 权利要求5的方法，其中第二类毒素为曲酸或黄曲霉毒素。

7. 权利要求5的方法，其中突变株在相同的培养条件下比亲代曲霉属细胞相比，产生较少的3-硝基丙酸。

8. 权利要求1的方法，其中曲霉属细胞选自以下曲霉属亚组：Eurotium亚组，Chaetosartorya亚组，Sclerocleista亚组，Satoia亚组，Neosartorya亚组，Hemicarpenales亚组，Petromyces亚组，Emericella亚组和Fenellia亚组。

9. 权利要求1的方法，其中目的多肽源于曲霉属宿主细胞。

10. 权利要求9的方法，其中在相同的培养条件下与由亲代曲霉属宿主细胞中表达情况相比，目的多肽被曲霉属突变宿主细胞过表达。

11. 权利要求1的方法，其中目的多肽不源于曲霉属宿主细胞。

12. 权利要求1的方法，其中多肽选自激素或其前体形式、酶或其变体或前体形式、抗体或其功能性片段、受体或其功能性片段，以及报道体。

13. 一种用以生产目的异源多肽的毒素缺乏型曲霉属突变宿主细胞，该突变细胞经过遗传学改造使其在相同的培养条件下与亲代曲霉属细胞相比产生较少的毒素，其中所述毒素选自环匹阿尼酸、曲酸、3-硝基丙酸、大黄素、畸形素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素和黑麦酮酸中的至少一种。

14. 权利要求 13 的曲霉属突变细胞，其中所述毒素是在沉默毒素基因中编码的，所述沉默毒素基因源于米曲霉黄曲霉毒素簇。

15. 权利要求 14 的曲霉属突变细胞，其中所述毒素基因选自：omtA、aflR、pksA、Nor-1、fas-beta、fas-alpha、vber-1、avnA、ord-2 组成的组。

16. 权利要求 15 的突变细胞，其中黄曲霉毒素基因选自 omtA 和 aflR 组成的组。

17. 权利要求 13 的突变细胞，其中通过不可逆缺失或破坏全部或部分毒素基因的方法去除了毒素基因。

18. 权利要求 13 的突变细胞，其中曲霉属细胞选自下列曲霉属亚组中的一种：Eurotium 亚组，Chaetosartorya 亚组，Sclerocleista 亚组，Satoia 亚组，Neosartorya 亚组，Hemicarpenales 亚组，Petromyces 亚组，Emericella 亚组和 Fenellia 亚组。

19. 权利要求 13 的突变细胞，其中亲代曲霉属细胞是米曲霉细胞。

20. 权利要求 19 的突变细胞，其中所述亲代曲霉属细胞是 IFO 4177。

21. 权利要求 13 的突变细胞，其包含编码目的多肽的第一核酸序列和含有包含对负责毒素之生物合成或分泌的基因中至少一个基因的修饰的第二核酸序列。

22. 权利要求 21 的突变细胞，其中细胞含有至少两个拷贝的第一核酸序列。

23. 权利要求 21 的突变细胞，其中目的多肽源于突变细胞。

24. 权利要求 21 的突变细胞，其中目的多肽不源于突变细胞。

25. 权利要求 13 的突变细胞，其中毒素包括第一类毒素，即环匹阿尼酸和选自曲酸、3-硝基丙酸和黄曲霉毒素的第二类毒素。

26. 获得权利要求 13 到 25 中任一项所定义的毒素缺乏型曲霉属突变宿主细胞的方法，该细胞在至少一种目的毒素的产生过程中有缺陷，所述方法包括(a)诱变亲代细胞，该诱变是特异的，其目的是修饰参与目的毒素的产生或分泌或在目的毒素的产生或分泌中所必需的核苷酸序列，和(b)筛选减少或去除了目的毒素产生的突变细胞，其中所述目的毒素选自环匹阿尼酸、曲酸、3-硝基丙酸、大黄素、畸形素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素和黑麦酮酸中的至少一种。

27. 权利要求 26 的方法，该方法包含将含有修饰后的至少一种负责毒

素生物的合成或分泌的基因的核酸序列引入曲霉属宿主细胞，以便在介导与相应的宿主细胞的天然基因同源重组的条件下使所述基因失活，从而用无活性的改造基因替换天然基因。

在曲霉属突变细胞中产生多肽的方法

发明领域

本发明涉及在毒素缺乏型曲霉属突变细胞中产生目的多肽的方法。本发明也涉及曲霉属细胞的突变株和获得上述突变细胞的方法。

发明背景

近年来,使用重组宿主细胞表达异源多肽极大地简化了一些具有经济价值的多肽的大量生产,例如工业中使用的关键酶和二级代谢物,而使用其他方法会面临诸多困难,例如多肽的产量较低或者只能从其天然来源纯化获得。现在,已有多种表达系统可供选择,从中选择产生任何给定的多肽,这些表达系统包括真细菌和真核生物宿主。选择一种合适的表达系统经常不但取决于宿主细胞在产生足够量的具有预期组成和构造的多肽方面的能力,而且在很大程度上也取决于目的蛋白的预期用途。

使用某些宿主系统时遇到的一个问题是真菌毒素的产生。一些真菌可用作宿主细胞来产生目的多肽的一些真菌具有编码参与多种毒素生物合成的酶的基因。例如,环匹阿尼酸、曲酸、3-硝基丙酸和黄曲霉毒素都是已知的毒素,这些毒素可以在例如黄曲霉中生成。同样,多种真菌中可以产生单端孢菌毒素,例如镰孢霉属的一些种如 *Fusarium venenatum* 和木霉菌属。有关不同真菌中毒素生成的较详尽的综述可参见《有毒真菌代谢物手册》(Richard J Cole 和 Richard H. Cox 著, Academic Press, 1981)。

在目的多肽的发酵生产过程中产生此类毒素是很不合乎要求的,因为这些毒素会对操作人员、客户和环境带来健康方面的危害。

其结果是,人们投入了大量的努力以确保在相关生产所使用的条件下,产生的毒素的量不会达到被认为会影响健康的水平。这主要是通过使用庞大的分析程序对毒素直接进行分析,并且通过生物检测和/或投放饲养方面的研究进行。在许多种情况下,每一次批量生产均需进行这些庞大的分析,从而影响了产品造价和产品投放市场的时间。

环匹阿尼酸(此后也称为“CPA”)是一种弱酸(pK_a : 3.5)并且在酸性环境下沉淀。其形成的金属螯合物可以被稀酸解离。CPA 是一种剧毒物质,它可

以选择性抑制 Ca^{2+} -ATP 酶并且比其他毒素更易导致多种器官的退行性改变和坏死。CPA 有 α 和 β 两种存在形式，其中 β 型是 α 型的前体。CPA 产生于曲霉菌，但也可由其他真菌，例如青霉菌产生。

曲酸(此后也称为“KA”)产生于多种曲霉菌，但也可由其他真菌如青霉菌产生，甚至也产生于一些细菌中。它是一种弱碱(pK_a : 7.9; 酚基)，并与多种金属离子形成复合物。KA 具有抗微生物活性并对动物有微弱毒性。KA 是多种合成化合物例如杀虫剂、染料等的前体。

3-硝基丙酸(此后也称为“3-NPA”)是一种天然硝基化合物。它产生于多种真菌，特别是曲霉菌(黄曲霉、温特氏曲霉)和青霉菌(*P. Atroventum*)。有报道称在一些细菌中有 3-NPA 存在。还有报道称在一些植物中发现了 3-NPA 及其酯。3-NPA 本身是一种有相当毒性的物质，可以导致例如贫血症的发生。而且，在胃肠道内，3-NPA 可以部分地转化为另一有毒的亚硝酸盐化合物。3-硝基丙酸不可逆地抑制琥珀酸脱氢酶、异柠檬酸盐裂解酶、延胡索酸酶和天门冬氨酸酶，从而影响三羧酸循环。

黄曲霉毒素是一种生物活性非常高的二级代谢物，由真菌 *A.flavus* Link ex. Fries 和 *Aspergillus parasiticus* Speare 产生；参见 R.W. Detroy 等“黄曲霉毒素及相关化合物”，《微生物毒素》一书，第 6 卷(A.Ciegler, S.Kadis 和 S.J.Ajl 编辑)，Academic, New York, 1971, 3-178 页。主要的黄曲霉毒素包括 B_1 、 B_2 、 G_1 和 G_2 。这些代谢物，特别是黄曲霉毒素 B_1 ，不但对动物和人有毒性，而且也是所有已知的天然化合物中最具致癌性的物质。

畸形素和赭曲霉毒素由黑曲霉产生。

通过去除或削弱宿主生物产生毒素的能力，不但可以大大简化受规章限制的批准程序，同时也可以节省消耗在生产阶段的时间和金钱，因为可以减少分析程序。

现在，亟需毒素缺乏型曲霉属突变细胞(也就是优选分类为 GRAS(一般认为安全)的安全生物)，这种曲霉属突变细胞适于高效、经济地产生目的多肽。本发明通过使用毒素缺乏型曲霉属突变宿主细胞产生目的多肽，并且提供了一种构建这类突变宿主细胞的方法满足了该需要。同样，现在亟需提供曲霉属突变细胞，其在亲代形式中含有一种或多种毒素基因，这些毒素基因不被表达，即沉默基因。

发明概述

依照本发明的一方面，本发明提供了一种使用曲霉属突变宿主细胞产生目的多肽的方法，该方法包括(a)培养亲代曲霉属细胞的突变株，其中(i)突变株包含第一核酸序列和第二核酸序列，其中第一核酸序列编码所述多肽，第二核酸序列包含对负责至少一种毒素之生物合成或分泌的基因中至少一个基因的修饰，和(ii)所述突变株与亲代曲霉属细胞相比，在相同培养条件下产生较少量的所述毒素；和(b)从所述培养物中分离所述多肽。

在本发明一个优选实施方案中，突变曲霉属细胞在相同的培养条件下产生的毒素比亲代细胞至少少 90%。更优选地，突变曲霉属细胞在相同的培养条件下比亲代曲霉属细胞细胞产生的以下毒素中的一种或几种少：环匹阿尼酸、曲酸、3-硝基丙酸和黄曲霉毒素。

在本发明另一实施方案中，提供了可供产生异源目的多肽的毒素缺乏型曲霉属突变宿主细胞，该宿主细胞经过遗传学修饰使其在相同的培养条件下产生的至少一种毒素少于曲霉属亲代细胞。

本发明中的曲霉属突变细胞选自：米曲霉、棘孢曲霉、构巢曲霉、无花果曲霉、黄曲霉、臭曲霉、酱油曲霉、米酒曲霉、黑曲霉、日本曲霉、寄生曲霉和海枣曲霉。

在本发明的另一实施方案中，提供了一种获得毒素缺乏型曲霉属突变宿主细胞的方法，该方法包括(a)将编码目的多肽的第一核酸序列和含有修饰后的至少一种负责至少一种毒素的生物合成或分泌的基因的第二核酸序列引入曲霉属亲代宿主细胞；和(b)从步骤(a)中鉴别出含有核酸序列的突变株。

本发明另一方面涉及曲霉属突变细胞，所述曲霉属突变细胞适于表达异源多肽，其中一个或多个沉默毒素基因已经被去除。

在下文的说明书中的详细描述中概述了这些和其它的一些实施方案。

附图简述

图 1 显示了米曲霉 DCAT-S 基因的基因组限制性酶切图谱，其中所用的限制性酶为 EcoRI、SalI、BbuI、XhoI 和 XbaI，使用了 1kb ³²P 标记的来自含有 DCAT-S 基因的 pJaL499 的 BglIII 片段作为探针。

图 2 显示了破坏质粒 p(DCAT-s-pyrG)的构建。

发明详述

定义

对于本申请目的，为了更好的理解本发明而对以下术语进行定义。

术语“载体”表示质粒、粘粒、噬菌体或允许插入、增殖和表达某基因或编码目的多肽的 DNA 序列包括其前体形式的其他任何介质。

术语“宿主”表示任何允许表达目的多肽包括其前体形式的任何细胞。

术语“转化”表示使得异源 DNA 序列由细胞表达的融入方式。

术语“突变”宿主(或菌株)表示经遗传学修饰的菌株，其中既包括转化体也包括野生型菌株的突变株。

术语“毒素”表示有植物毒性、动物毒性和抗生素活性的真菌代谢物。术语“真菌毒素”一般定义为在暴露水平下对人类和动物的健康造成潜在负面影响的二级真菌代谢物。在本文中，术语“毒素”和“真菌毒素”可以互换使用。

用以描述本发明的突变细胞的术语“毒素缺乏型”表示突变细胞与其亲代菌株比较有不完整的毒素产生情况，即突变细胞比其亲代细胞产生的至少一种，优选一种以上毒素的少。

本发明方法的步骤(a)中使用的术语“相同条件”将突变株的毒素产生情况和亲代细胞的毒素产生情况相关联，并且意在指出在突变株和亲代菌株的发酵生产过程中使用类似的条件，例如 pH 值、温度、氧气等。可以在有利于产生目的多肽的条件下或在有利于产生毒素的条件下，将亲代和突变细胞产生所研究毒素的情况进行比较。

宿主细胞

本发明提供了可用以表达目的多肽的曲霉属宿主细胞的变体，其中细胞经过遗传学修饰使其与亲代细胞相比，表达的一种或几种毒素的水平显著降低。宿主细胞可源于亲代细胞，该细胞可以为野生型细胞。

宿主菌株可以是传统上用以表达目的多肽的任何曲霉属宿主细胞。

在本发明一个优选的实施方案中，用以表达目的多肽的曲霉属宿主细胞选自下列曲霉属亚组：Eurotium 亚组(例如，以局限曲霉为代表)，Chaetosartorya(例如，以淡黄曲霉为代表)，Scleroleista(例如，以华丽曲霉为代表)，Satoia(例如，以黑曲霉为代表)，Neosartorya(例如，以烟曲霉、鹿色曲霉为代表)，Hemicarpenteles(例如，以棒曲霉为代表)，Petromyces(例如，以黄曲霉、白曲霉、稀疏曲霉为代表)，Emericella(例如，以构巢曲霉、杂色曲霉、赤褐曲霉为代表)和 Fenellia(例如，以土生曲霉为代表)。

在本发明一个特别优选的实施方案中，曲霉属宿主细胞选自：米曲霉、棘孢曲霉、无花果曲霉、黄曲霉、臭曲霉、酱油曲霉、米酒曲霉、黑曲霉、构巢曲霉和日本曲霉。其中又以米曲霉、黑曲霉、寄生曲霉和海枣曲霉最为优选。

本发明的宿主细胞的上述实例均依照现在公认的分类法命名。

毒素

毒素，即根据本发明其生产将被减弱或去除，可以是曲霉菌产生的任何毒素或者是那些由存在于曲霉菌中的基因编码但并不必表达的任何毒素。例如，已知黄曲霉毒素基因亦存在于米曲霉中，但在此种曲霉中并不表达。虽然并不表达，但去除黄曲霉毒素通路基因中的基因仍然是有利的。这将在下文中进行进一步描述，并在实施例6中详述。

特别地，将被减弱或去除的毒素选自以下物质：环匹阿尼酸(CPA)，例如其 α 或 β 形式，曲酸(KA)，3-硝基丙酸(NPA)，大黄素，畸形素(例如畸形素A或B)，黄曲霉毒素，赭曲霉毒素，浅黄霉素，和黑麦酮酸(例如，黑麦酮酸D)。有关这些毒素的进一步的描述请参阅发明背景中的相应部分，以及此部分所涉及的《有毒真菌代谢物手册》一书。

本发明中的二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶(DCAT-S)

本发明也涉及由丝状真菌分离获得的二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶，这种酶选自(a)氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 的二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶；(b)(a)中所述酶的等位基因变体；和(c) (a)或(b)的酶的片段，其中所述片段具有二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶活性。

优选地，本发明的二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶含有如 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列，或者是其等位基因变体。在一个更优选的实施方案中，本发明中的二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶含有与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。在另一个优选的实施方案中，本发明中的二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶含有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或者其片段，其中所述片段具有二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶活性。SEQ ID NO: 2 的片段是指在此氨基酸序列的氨基端和/或羧基端缺失了一个或更多氨基酸的多肽。在一个最优选的实施方案中，二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

优选地，SEQ ID NO：2 的片段至少有 320 个氨基酸残基，而最优选至少有 350 个氨基酸残基。

等位基因变体是指占据相同的染色体位点的任何两个或更多的可以相互替代的基因形式。通过突变可自然产生等位基因变体，并可导致种群中的表型多样性。基因突变可以是沉默性的(编码的多肽无变化)或者编码改变了氨基酸序列的多肽。术语“多肽的等位基因变体”是指某基因的等位基因变体编码的多肽。

SEQ ID NO：2 的氨基酸序列或其部分序列可以用来设计寡聚核苷酸探针，或编码本发明中的二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶的核酸序列，例如 SEQ ID NO：1 的核酸序列或其亚序列可依照本领域已熟知的方法从其它丝状真菌菌株中识别和克隆编码二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶的 DNA。特别是，依照标准的 Southern 印记操作法，这类探针可以用来与有关种属的基因组或 cDNA 杂交，从而识别并分离相关种属中的相应基因。这类探针可比全序列短许多，但至少应有 15 个核苷酸，优选至少 25 个，最优选至少 40 个核苷酸的长度。也可以使用更长的探针。DNA 和 RNA 探针均可使用。为检测相应基因，一般对探针进行标记(例如，使用 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 、生物素或亲和素标记)。

依照标准的 Southern 印记操作法，在从低到高的严紧度的条件下进行(例如，预杂交和杂交反应条件为 42°C ，5xSSPE，0.3%SDS， $200\ \mu\text{g/ml}$ 变性鲑鱼精 DNA，低、中、高严紧度分别在 25、35 或 50%的甲酰胺中进行)的杂交表明，核酸序列与相应于 SEQ ID NO：1 所示的核酸序列或 pJaL499 中所含的多肽编码部分的寡核苷酸探针杂交。

因此，可以从其他丝状真菌菌株制备的基因组、cDNA 或重组化学文库中筛选出与上述探针杂交的编码二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶的 DNA。来自其他丝状真菌菌株的基因组或其他 DNA 可由琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳，或其他分离技术制备。文库 DNA 或分离的 DNA 可以转移并固定在硝基纤维素或其他合适的载体物质上。为了识别克隆或与 SEQ ID NO：1 同源的 DNA，在 Southern 印记中应使用载体物质，其中所述载体物质最终在 2xSSC，0.2%SDS 中洗 3 次，每次 30 分钟，优选温度至少为 50°C ，更优选至少为 55°C ，更加优选至少为 60°C ，甚至更优选至少为 65°C ，甚至

更加优选至少为 70℃，和最优选至少为 75℃。在这些反应条件下，使用 X-射线胶片检测与寡聚核苷酸探针杂交的分子。

在一个优选的实施方案中，本发明中的二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶来源于曲霉属菌株，更优选地来源于米曲霉，例如具有 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列的多肽。

本文所定义的“分离的”二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶是基本上不含有其他多肽的多肽，例如经 SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)检测至少纯度达约 20%，优选至少纯度达约 40%，更优选纯度达约 60%，甚至更优选至少纯度达约 80%，最优选至少纯度达约 90%，甚至更加最优选至少纯度达约 95%。

本发明也涉及由丝状真菌分离获得的编码二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶的核酸序列，并且在一个优选的实施方案中，此核酸序列来源于曲霉属例如米曲霉，尤其是 SEQ ID NO: 1 所述的核酸序列。并且在另一个更为优选的实施方案中，核酸序列为质粒 pJaL499 中包含的序列。本发明也包括由于基因密码简并而引起的不同于 SEQ ID NO: 1 的核酸序列。本发明也涉及 SEQ ID NO: 1 的亚序列或 pJaL499 中的多肽编码部分，此序列编码的多肽片段有二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶活性。SEQ ID NO: 1 的亚序列或 pJaL499 中的多肽编码部分，是除了在 5' 末端和/或 3' 末端缺失了一个或多个核苷酸之外，SEQ ID NO: 1 所包括的核素序列或 pJaL499 中的多肽编码部分。优选地，SEQ ID NO: 1 的亚序列含有至少 870 个核苷酸，更优选地至少 960 个核苷酸，而最优选地至少含有 1050 个核苷酸。

核酸序列可由在分类学上与米曲霉相等同的微生物中获得。

这里描述了用于分离或克隆所述核酸序列的技术。这里使用的术语“分离的核酸序列”是指其基本上不含有其他核酸序列的核酸序列，例如经琼脂糖凝胶电泳检测至少纯度达约 20%，优选至少纯度达约 40%，更优选纯度达约 60%，甚至更加优选至少纯度达约 80%，最优选至少纯度达约 90%。核酸序列可以来自于基因组、cDNA、RNA、半合成、合成或以上来源的组合。

对编码本发明的二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶的核酸序列进行修饰对合成与多肽基本类似的酶来说可能是必要的。这里的与二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶“基本类似的”酶是指此酶的非天然

形式。这些二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶在乙酰改造方法方面可以不同于由其天然来源所分离出的酶。例如，使用诸如定点诱变的方法，合成此酶的变体可能是有意义的，其中所述变体在特异活性、热稳定性、最适 pH 值或类似性质方面不同。可以在诸如 SEQ ID NO: 1 多肽编码部分给出的核酸序列的基础上构建同源序列，这些序列包括：例如上述序列的亚序列，和/或引入了核苷酸取代的序列，所述取代不会造成核酸序列所编码的多肽的另一氨基酸序列，而是符合用于生产多肽的宿主生物的密码子用途，或那些引入了核苷酸取代的序列，该取代不会产生不同的氨基酸序列。关于核苷酸取代的一般性描述，请参见例如 Ford 等 1991 年《蛋白质表达和纯化》第 2 期：95-107 页。

对于熟悉本领域的专业人员来说，显然可以在对分子功能至关重要的区域外进行上述替换而仍然得到有生物活性的二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶。使用本领域已知的操作方法，例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(参见，例如 Cunningham 和 Wells, 1989 年《科学》第 224 期：1081-1085 页)可以识别出对二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶的活性至关重要的氨基酸残基(其中二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶是由本发明中分离的核酸序列编码的)，因此这些氨基酸残基优选不被取代。在后一种诱变技术中，在分子中的每一个带正电荷的残基上引入突变，对得到的突变分子进行二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶活性的测试，以识别出对分子活性至关重要的氨基酸残基。使用诸如核磁共振分析、结晶学或光亲和性标记技术对三维结构进行分析，还可以测定底物和酶之间相互作用的位点(参见，例如 de Vos 等，1992 年《科学》第 255 期：306-312 页；Smith 等，1992 年《分子生物学杂志》第 224 期：899-904 页；Wlodaver 等，1992 年《FEBS 通信》第 309 期：59-64 页)。

本发明的核酸序列，或其同源序列或其片段的优选用途，是去除或减少给定宿主细胞中特别是在米曲霉属细胞中二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶的活性，因而可以去除或降低上述细胞中 CPA 的产生。

本发明还涉及用以表达上述序列的含有 SEQ ID NO: 1 的核酸序列或 pJaL499 中多肽编码部分、其亚序列或同源序列的核酸构建体、重组表达载体和宿主细胞。构建体和载体可以按照本文的描述构建。宿主细胞可以是

适于表达核苷酸序列的任何细胞，可以是诸如从本文中所述的亲代或突变细胞中进行选择。

宿主细胞的基因修饰

为了表达显著降低了水平的一种或多种毒素，使用本领域技术人员所熟知的标准技术对本发明中的宿主细胞进行了基因修饰。将负责产生毒素活性的基因序列失活或者部分或完全地去除。因此，本发明的曲霉属突变宿主细胞表达一种或多种毒素的水平降低或检测不到。

在一个特定的实施方案中，对与所选的毒素的形成和分泌有关的各结构或调节区(例如基因)进行修饰，从而达到将其失活目的。已知有效的技术包括但并不局限于以下技术：特异性或随机诱变，PCR 引发的诱变，位点特异性 DNA 缺失、插入和/或取代，基因破坏或基因替换，反义技术，或以上技术的组合。

可以使用合适的物理或化学诱变因子达到诱变的效果。适宜于本目的的物理或化学诱变因子包括但并不局限于：紫外辐射，电离辐射(例如 γ 辐射)，羟胺、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)、O-甲基羟胺、亚硝酸、乙基甲烷磺酸(EMS)、亚硫酸氢钠和核苷酸类似物。但使用上述因子时，一般通过在所选的诱变因子存在下孵育待诱变的细胞，选择那些目标毒素的产生明显减少的细胞。

通过修饰与给定毒素的产生或分泌过程有关或必需的核苷酸序列，同样可以减少或去除该毒素在宿主细胞中的产生。例如，核苷酸序列可以编码的基因产物对于导致毒素产生的通路内具有必要的功能。例如，这样的核苷酸序列可以是如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列或 pJaL499 中的编码多肽部分。修饰可以通过在核苷酸序列中引入、取代或去除一个或多个核苷酸或通过序列转录、翻译中必需的调控元件而完成。例如，可以插入或删除核苷酸以引入终止密码子、去除起始密码子或改变核苷酸序列的开放读码框。可以通过本领域已知的定点或随机诱变或 PCR 引发诱变的方法实现对序列或其调控元件的修饰或失活。虽然从原则上来说，可以在体内条件下即直接在表达毒素基因的细胞中完成上述修饰，但目前优选的是如下文描述的那样在体外进行修饰。

使所选的丝状真菌细胞中目的毒素如 CPA 失活或减少的方便方法的实例是基于基因替换、基因缺失或基因破坏技术。例如，在基因破坏方法中，

相应于目的内源型基因或基因片段的核酸序列(例如本发明中的 DCAT-3 基因)在体外被诱变产生缺陷型核酸序列,并将此缺陷型核酸序列转化入亲代细胞中从而产生缺陷型基因。通过同源重组,缺陷型核酸序列取代了内源型基因或基因片段。一般来说希望缺陷型基因或基因片段同样编码一个标记物,该标记物可以用于对核酸序列已被修饰或被破坏的转化体进行筛选。

做为另一种选择,可以使用与基因的核酸序列互补的核苷酸序列通过已确立的反义技术进行基因的修饰或失活。更确切地,可以引入与基因的核酸序列互补的核苷酸序列减少或去除丝状真菌细胞中此基因的表达,互补核苷酸序列可以在细胞中转录并能够与细胞中产生的 mRNA 相杂交。在允许互补反义核苷酸序列与 mRNA 杂交的条件下,翻译产生的蛋白的量因此减少或消除。

在诱变或其他修饰毒素通路的基因后,筛选毒素产生减弱或去除的突变株。如何对毒素进行筛选的方法在以下实施例中给出。另一方面,合适的筛选分析方法在《有毒真菌代谢物手册》中有述,或者从经常检测诸如食品中真菌毒素含量的机构处获得。

因此,由于基因修饰,本发明曲霉属突变宿主细胞中毒素的表达水平显著降低。在一个优选实施方案中,突变宿主细胞中这些毒素的表达水平分别降低了大于约 50%,优选大于约 85%,更优选大于约 90%,最优选大于约 95%,或甚至更优选大于 99%。在另一个优选的实施方案中,本发明曲霉属突变宿主细胞中的这些毒素在任何组合下均有降低。在一个进一步的实施例中,宿主细胞所表达的产物基本上不含下列毒素的至少一种:环匹阿尼酸,曲酸,3-硝基丙酸,大黄素,畸形素,黄曲霉毒素,赭曲霉毒素和黑麦酮酸。在一个特别优选的实施方案中,宿主细胞所表达的产物基本上不含下列毒素的至少一种:环匹阿尼酸,更特别地至少不含环匹阿尼酸和曲酸或黄曲霉毒素,而最优选地至少不含环匹阿尼酸、曲酸和 3-硝基丙酸。

在一个优选的实施方案中,宿主细胞是减少或去除了 NPA、CPA、曲酸(KA)或麦芽米曲霉毒素中的至少一种毒素的产生的米曲霉菌株,优选地为这些毒素中的至少两种,例如 NPA 和 CPA; NPA 和 KA; CPA 和 KA; 或 NPA、CPA 和 KA。而且,除了减少或去除了至少一种所述毒素的产生之外,优选地,所选的黄曲霉毒素通路的基因也被失活,从而使得所得的突变菌株不能

产生黄曲霉毒素。黄曲霉中的黄曲霉毒素基因已经被充分认识，并可以用来识别米曲霉中的相应基因，此后可用本领域已知的方法将其失活。

在另一个优选的实施方案中，宿主细胞是减少或去除了一种或几种畸形素(例如，畸形素 A1 或 B)，一种赭曲霉毒素(例如，赭曲霉毒素 A)和浅黄霉素生产的黑曲霉或无花果曲霉，优选地为所述毒素的至少两种，例如畸形素和赭曲霉毒素；畸形素和浅黄霉素；赭曲霉毒素和浅黄霉素；以及畸形素、赭曲霉毒素和浅黄霉素的菌株。

在另一个优选的实施方案中，宿主细胞是减少或去除了一种或多种黑麦酮酸(例如，黑麦酮酸 D)或者大黄素(黑麦酮酸 D 的前体)的产生，优选地为所述类型毒素的两种的生产同时被减少或去除的棘孢曲霉菌株。

产生多肽的方法

根据本发明的方法，某些目标毒素的量显著减少，然而突变宿主细胞的特性，即在经遗传修饰的编码目的多肽的基因在细胞中的稳定保持性，细胞的生产能力和目的细胞的产量基本上被保持。更具体地说，根据本发明的方法，宿主细胞在产生或分泌一种或多种目的毒素所必需的结构和/或调节区内经过了遗传修饰，因此去除或减少了所述毒素的产生或分泌。

因此，另一方面，本发明提供了一种在本发明所述的曲霉属突变宿主细胞中产生多肽或蛋白的方法，其中包括异源型多肽或蛋白，该方法包括将编码目的多肽的核酸序列引入上述突变宿主细胞中，在合适的生长培养基中培养突变宿主细胞，以及回收上述目的多肽。

因此，根据本发明的突变宿主细胞必须含有表达目的多肽所必需的结构和/或调节基因区。这类必需结构和/或调节基因区的本质在很大程度取决于目的产物和独特的曲霉属宿主菌株。为了对宿主细胞进行转化或转染，本领域技术人员可以使用标准的重组 DNA 技术完成本发明的宿主细胞的遗传设计(参见，例如 Sambrook 等的文章)。

优选地，应通过本领域已知的方法对宿主细胞进行修饰，以便引入合适的克隆媒介(即质粒或载体)，克隆媒介中含有编码所需目的多肽的 DNA 片段。克隆媒介既可以作为自主复制质粒被引入宿主细胞，也可以整合入染色体内。更优选地，克隆媒介含有与一个或多个合适的调节区域可操作相连的一个或多个结构区域。

结构区域是编码目的多肽的核苷酸序列。调节区域包括含有转录和翻译调控序列的启动子区域，含有终止信号的终止子区域，以及多聚腺苷酸区域。启动子即在所选宿主细胞中表现转录活性的核苷酸序列，可以来源于编码胞外或胞内蛋白的基因，优选是来源于编码酶的基因，所述酶例如淀粉酶、葡糖淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶、木聚糖酶、氧化还原酶、果胶酶、角质酶或糖酵解酶。在本发明的方法中，用于引导核酸构建体转录的合适的启动子的实例是得自编码下列酶的基因的启动子，所述酶是米曲霉 TAKA 淀粉酶、*Rhizomucor miehei* 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸性 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶(*glaA*)、曼赫根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、构巢曲霉乙酰胺酶、米曲霉乙酰胺酶(*amdS*)、尖孢镰孢菌胰岛素样蛋白酶 (美国专利第 4,288,627)，以及上述启动子的突变株、截断体和杂合启动子。特别优选的启动子是 NA2-tpi 启动子(是源于编码黑曲霉中性 α -淀粉酶基因的启动子和源于编码米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的启动子的杂合体)、葡糖淀粉酶启动子和 TAKA 淀粉酶启动子。

克隆媒介也可以含有选择性标记。选择性标记是一个基因，该基因的产物提供抗生素或病毒抗性，重金属抗性，微生物由原养型向营养缺陷型的转变以及类似的特性。用于丝状真菌宿主细胞的选择性标记可以选自但不限于：*amdS*(乙酰胺酶)、*argB*(鸟氨酸氨基甲酰转移酶)、*bar*(蒴丝菌素乙酰基转移酶)、*hygB*(潮霉素磷酸转移酶)、*niaD*(硝酸盐还原酶)、*pyrG* (乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶)、*sC*(硫酸盐腺嘌呤转移酶)和 *trpC*(氨基苯甲酸盐合成酶)，以及来源于其他物种的上述选择性标记的等价物。优选用于曲霉属细胞的是构巢曲霉或米曲霉中的 *amdS* 和 *pyrG* 基因，和吸水链霉菌中的 *bar* 基因。

而且，可以通过共转化实现选择目的，其中以两种载体的混合物转化宿主细胞而只对一种载体进行选择。

用于分别连接本发明中的 DNA 构建体、启动子、终止子和其他元件的操作法，以及将它们插入到合适的含有复制必需信息的克隆媒介的操作均为本领域技术人员所熟知(参见，例如 Sambrook 等，1989 年；同前)。

使用本领域已知的方法，将突变丝状真菌细胞在适合产生目的多肽的营养培养基中培养。例如，细胞可以在实验室或工业发酵罐中使用摇动烧瓶培养、小规模或大规模发酵培养(包括连续、批量、分批加料或固相发酵)的方

式培养在合适的培养基中，培养条件应使异源多肽可被表达和/或被分离。培养应在含有碳源、氮源和无机盐的合适的营养培养基中进行，使用的方法为本领域已知的操作方法。合适的培养基可从商业途径获得，也可以依照已经公开的配方制备而成(例如，美国典型培养物保藏中心的配方)。分泌的多肽可以直接从培养基中回收获得。

多肽可以使用本领域已知的多肽特异性的方法进行检测。这些检测方法可包括使用特异性抗体，酶产物的形成，酶底物的消失，或 SDS-PAGE。例如，可以使用酶学分析的方法检测多肽的活性。对于多种酶来说，确定酶活性的操作法是本领域已知的。

产生的多肽可以通过本领域已知的方法进行分离。例如，从营养培养基中分离多肽的传统操作包括，但并不局限于：离心、过滤、抽提、喷雾干燥、挥发或沉淀。分离得到的多肽可以再通过各种本领域已知的操作方法进一步纯化，这些方法包括，但并不局限于：层析(例如，离子交换层析、亲和层析、疏水层析、层析聚焦和大小排阻层析)，电泳操作(例如，制备型等电聚焦电泳)，差示溶解性(例如，硫酸铵沉淀法)或抽提法(参见，例如《蛋白质纯化》J.-C. Janson 和 Lars Ryden，编辑，VCH 出版商，纽约，1989)。

产物

所需的最终产物，即由曲霉属突变宿主细胞表达的目的多肽，可以是任何同源或异源性的蛋白或多肽。

多肽可以是变异丝状真菌细胞的任何异源性多肽。这里的术语“多肽”并不指某一特定长度的编码产物，而是包含多种多肽、寡肽和蛋白。异源性多肽也可以是某多肽经工程改造后的突变株。这里术语“异源性多肽”是指那些并不来源于丝状真菌细胞的多肽。突变丝状真菌细胞可以含有一个或多个拷贝的编码这种异源性多肽的核酸序列。

在本发明的方法中，突变丝状真菌细胞也可以用来重组产生与细胞天然存在的多肽。该天然存在的多肽可以通过以下重组的方式得到：例如，将编码多肽的基因置于不同启动子的控制之下，以增强多肽的表达，通过使用信号序列而促进目的天然多肽分泌到细胞外，以及增加编码通常由细胞所产生的多肽的基因的拷贝数而增加肽的产量。在术语“异源性多肽”涉及的范围，本发明也包括上述经重组方式产生的同源性多肽，所述范围应使得这类

表达包括使用细胞异源性遗传元件，或使用同源元件但该同源元件经过改造从而与其在宿主细胞内通常行使的功能有所不同。

在一个更具体的实施方案中，产物是有治疗活性的多肽或蛋白，例如激素，特别是胰岛素、生长激素、胰高血糖素或促生长素抑制素；白细胞介素，特别是干扰素；造血生长因子，特别是 PDGF(血小板源性生长因子)，EPO(促红细胞生成素)或 TPO(血栓生成素)；蛋白酶，特别是因子 VII、因子 VIII、尿激酶、凝乳酶或 TPA(组织纤溶酶原激活物)；或者血清白蛋白。

在另一个优选的实施方案中，产物是真菌或细菌源性的酶。优选地，此酶是一种糖苷酶，例如淀粉酶，特别是 α -淀粉酶、 β -淀粉酶或葡糖淀粉酶；葡聚糖 1,4- α -葡糖苷酶；氨基肽酶；糖酶；羧肽酶；过氧化氢酶；纤维素酶，特别是内-1,4- β -葡聚糖酶或内-1,3(4)- β -葡聚糖酶；纤维素-1,4- β -纤维二糖苷酶；壳多糖酶；角质酶；环糊精糖基转移酶；脱氧核糖核酸酶；半乳糖酶；半乳糖苷酶，特别是 α -半乳糖苷酶或 β -半乳糖苷酶；内葡聚糖酶，特别是内-1,3- β -葡聚糖酶、内-1,3- α -葡聚糖酶、内-1,2- β -葡聚糖酶或内-1,6- β -葡聚糖酶；葡糖苷酶，特别是 α -葡糖苷酶或 β -葡糖苷酶；转化酶；虫漆酶；分解脂肪酶，特别是脂肪酶、酯酶、磷脂酶或溶血磷脂酶；裂解酶或果胶酸酯分解酶；甘露聚糖酶；甘露糖苷酶；多聚半乳糖醛酸酶；(链球菌)齿斑葡聚糖酶；氧化酶或氧化还原酶，例如过氧化物酶或多酚氧化酶；加氧酶；胶质酶，肽链内切酶或肽链外切酶；肌醇六磷酸酶；多聚半乳糖醛酸酶；蛋白酶；核糖核酸酶；转谷氨酰胺酶；以及木聚糖酶，特别是内-1,4- β -木聚糖酶或木聚糖-内-1,3- β -木聚糖苷酶。

在另一个优选的实施方案中，产物是一种杂合多肽，例如凝乳酶原和原胰岛素样蛋白酶。在诸如缺乏显著的蛋白酶活性这样的合适条件下，由宿主细胞表达的异源性蛋白也可以是一种前体蛋白，例如酶原、杂合蛋白、作为原序列或前-原序列得到的蛋白，或者任何其他未成熟的形式。

参照以下实施例进一步描述本发明，但不应以任何方式将这些实施例解释为对所附权利要求书所限定的范围的限制。

去除了沉默毒素基因的曲霉属突变株

在产生黄曲霉毒素的两个种黄曲霉和寄生曲霉中，对黄曲霉毒素的生物合成途径已经进行了多年的研究。在这两个物种中识别出了许多基因，这些基因显示出其图谱在一个大的簇内(参见 Woloshuk, C.P.和 Prieto, R, 《FEMS

微生物学通信》(1998)160: 169-176 中的综述)。其中的一些基因已被克隆和测序,其中包括编码调控通路基因中其他基因表达的 aflR 基因,以及编码 O-甲基转移酶的 omtA 基因。

黄曲霉毒素基因存在于米曲霉的基因组中,但在这个物种中并不表达。虽然黄曲霉毒素并不被表达,但去除一个或更多这样的沉默黄曲霉毒素通路基因仍然是有利的。去除了黄曲霉毒素基因如 aflR 和/或 omtA 的曲霉属突变株例如米曲霉突变株是有利的,因为这样就不必检测新的突变株中所述黄曲霉毒素的产生情况。

因此,本发明的一方面涉及适宜表达异源性多肽并且去除了一个或更多沉默毒素基因的曲霉属突变细胞。

沉默毒素基因已经被“去除”是指正在讨论的基因已被改变或删除,例如通过本领域已熟知的基因替代或基因破坏技术(参见,例如 Miller 等,1985 年《分子和细胞生物学》第 1714-1721 页),所采用的方式应使得突变细胞中不含有上述沉默基因。

术语“沉默”毒素基因是指毒素基因不被表达。

可以使用不可逆转的缺失或破坏全部或部分毒素基因的方法去除毒素基因。

术语“不可逆转的缺失或破坏全部或部分毒素基因”是指所讨论的毒素基因或者已经被去除,或者已经一定的方式加以改变从而使得上述基因不能编码毒素且不能自然地回复突变,例如在产生编码毒素的基因期间。

所讨论的曲霉属细胞可以是上文已提及的任何一种,可以选自以下曲霉属亚组: Eurotium, Chaetosartorya, Sclerocleista, Satoia, Neosartorya, Hemicarpenales, Petromyces, Emericella 和 Fenellia。

所讨论的编码一个或更多毒素的毒素基因包括选自以下毒素的毒素: 环匹阿尼酸、曲酸、3-硝基丙酸、大黄素、畸形素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素和黑麦酮酸。

具体考虑的是编码黄曲霉毒素的毒素基因,特别是源于米曲霉黄曲霉毒素簇的毒素基因,特别是选自以下基因: omtA、aflR、pksA、Nor-1、fas-beta、fas-alpha、vber-1、avnA、ord-2。

亲代曲霉属细胞可以是米曲霉细胞,特别是米曲霉 A1560(IFO 0417)。

实验

材料和方法

1. 菌株

米曲霉 A1560 与 IFO 04177 一致(见下)。

米曲霉 A1560 IFO 4177: 来自 Institute for Fermentation, Osaka; 17-25 Juso Hammachi 2-Chome Yodogawaku, Osaka, Japan; 还参见 WO 98/12300。

JaL228: 米曲霉菌株, 其中用于中性金属蛋白酶—NpI 的基因被破坏; 在 WO 98/12300 中有关于该菌株构建的描述。

BECh 1: 在实施例 1 中有关于该 CPA 阴性的米曲霉菌株构建的描述。

BECh 2: 在实施例 1 中有关于该 CPA 阴性和 KA 阴性的米曲霉菌株构建的描述。

BECh 3: 在实施例 1 中有关于该 CPA 阴性和 KA 阴性的米曲霉菌株构建的描述。

BZ14: 在 WO 92/17573 中有关于与 ToC90 和 pH450 进行共转化的米曲霉 A1560 菌株的描述。

JaL 250: 在实施例 6 中有关于该米曲霉菌株构建的描述。

保藏:

含有 pJaL499 质粒的大肠杆菌菌株于 1999 年 1 月 13 日保藏在德国微生物保藏中心, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, 保藏号为 DSM 12622。

2. 基因

DMAT-S: 该基因编码二甲基烯丙基-L-色氨酸合成酶, 该酶参与麦角生物碱的生物合成。

DCAT-S: 该基因编码二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶, 该酶参与环匹阿尼酸(CPA)的生物合成。

pyrG: 该基因编码乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶, 该酶参与尿嘧啶核苷的生物合成。

3. 质粒

pAHL: 在 WO 97/07202 中有该质粒的描述。

PCaHj483: 在 WO 98/00529 中有该质粒的描述。

pCaHj493: 在实施例 2 中有该质粒的描述。

pJaL335: 在 WO 98/12300 中有该质粒的描述。

pJaL499：在实施例 4 中有该质粒的描述。

4. 培养基和溶液

用作缓冲液和底物的化学药品均为至少为试剂级的商品。

筛选培养基 1(每升)

甘露醇	30g
葡萄糖	10 g
琥珀酸	10 g
酪蛋白氨基酸	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.3 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.2 g
2,6-二氯-4-苯胺	2ppm
琼脂	20 g

以 14%NH₄OH 调节最终 pH 值到 5.6。

Cove N

Cove 盐溶液	50 ml
山梨糖醇	218g
右旋葡萄糖	10g
硝酸钾	2.02g
琼脂	35g
去离子水	1000 ml

COVE 盐溶液(每升)

KCl	26g
MgSO ₄	26 g
KH ₂ PO ₄	76 g
痕量金属溶液	50 ml
CHCl ₃	2ml

痕量金属溶液(每 1 升)

Na ₂ B ₄ O ₇ *10H ₂ O	40mg
CuSO ₄ *5H ₂ O	400 mg
FeSO ₄ *7H ₂ O	800 mg

MnSO ₄ *2H ₂ O	800 mg
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	800 mg
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8000 mg

G1-gly

酵母提取物	18g
87%甘油	24ml
Pluronic PE6100	1ml
以自来水补至	1000ml

1/5 MDU-2BP

麦芽糖	9g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.2g
K ₂ SO ₄	0.4g
KH ₂ PO ₄	2.4g
酵母提取物	1.4g
AMG 痕量金属	0.1ml
Pluronic PE6100	0.02ml
去离子水补至	1000ml

最终 pH 值为 5.0；

接种前加入 1.0 ml 50%尿素。

MDU-IB(每 1 升)

麦芽糖糊精 MD01	45.0g
MgSO ₄ *7H ₂ O	1.0g
NaCl	1.0g
K ₂ SO ₄	2.0g
KH ₂ PO ₄	12.0g
酵母提取物	7.0g
AMG 痕量金属	0.5ml
Pluronic PE6100	1ml

最终调节 pH 值到 5.0；

接种前加入 1.3ml 50%尿素/ 100ml 培养基。

AMG 痕量金属溶液(每 1 升)

FeSO ₄ *7H ₂ O	13.9g
MnSO ₄ *2H ₂ O	8.45g
ZnCl ₂	6.8g
CuSO ₄ *5H ₂ O	2.5g
NiCl ₂ *6 H ₂ O	2.5g
柠檬酸	>=3.0g
痕量金属溶液	1 ml

KM2 培养基(每 1 升)

酵母提取物	25 g
K ₂ HPO ₄	10 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
葡萄糖	100 g
柠檬酸	>=3.0g

最终调节 pH 值到 6.0；

若用于固体培养板，则用 20g/L 琼脂固化 KMZ 培养基。

加入 300 μ l/L Triton X-100 作为克隆生长限制制剂。

Nakamura 培养基(每 1 升)

蔗糖	50g
蛋白胨	20g
KH ₂ PO ₄	5g
CaHPO ₄	2.5g
MgSO ₄	2.5g

最终调节 pH 值到 6.4。

5.检测分析

A. 使用 HP 毛细管电泳法检测 CPA 的操作

为进行毛细管电泳(CE)分析，首先通过固相提取法在一个 Supelclean LC-18 SPE 管(预装 3ml 来自 Supelco 的柱，目录号为 5-7012，用 2ml 甲醇和 2ml Milli-Q 水进行调节)中制备 1ml 等分试样。使用抽吸多支管(suction

manifold)迫使液体通过柱子。使用 3ml Milli-Q 水冲洗后, 用 3ml 甲醇洗脱样品。洗脱物不需进一步处理可直接用于 CE 分析。偶尔会出现沉淀, 但通过离心法去除。

使用惠普光电二极管阵列 CE-仪器(3D-CE)进行 CE 分析。以 34 mbar 的静水压用 10 秒的时间将样品注入。使用 30℃下的 50mm 的毛细管(有效长度为 56cm), 该毛细管用 0.1M NaOH 处理 1 分钟, 接着用 100mM 硼酸盐/NaOH pH 9.1 处理 5 分钟。将电压设定为 17KV。始终收集紫外光谱以确定峰值, 但同样过程在 280nm 下进行。以商购的环匹阿尼酸作为标准物(Sigma Co.出产, St. Louis MO, USA, 目录号 C1530, 最低纯度 98%)。此方法的灵敏度下限约为 1ppm。

B. 使用薄层层析法(TLC)检测 CPA 的操作

1. 平板培养的分析

在 Filtenborg O., Frisvad J.C.和 Svendsen J.A.所著的“纯净培养基中对产生霉菌的细胞内真菌毒素的简易筛选方法”(参见《应用和环境微生物学》一书 1983 年 45: 581-585 页)中, 对琼脂平板的分析作了描述。

2. 液体培养物的分析

在 TLC 平板(Merck Silica Gel 60)两对边各上上清液样品 10 μ l。等分试样的环匹阿尼酸(Sigma, C1530)用体积比为 1:2 的甲醇:氯仿混合液稀释成 50ppm、25 ppm、5 ppm 和 2.5 ppm 的标准溶液。首先, 平板在 CAP 溶液(体积比为氯仿:丙酮:丙-2-醇=85:15:20)中展开 15 分钟, 干燥, 翻转, 另一半在 TEF(体积比为甲苯:乙酸乙酯:甲酸=5:4:1)中继续展开 15 分钟。

另一种方法是将平板在 EMA 溶液(体积比为乙酸乙酯:甲醇:25%氢氧化铵=16:8:2)中和 TEF 溶液中按上述方法各展开 15 分钟。

将平板在通风橱中彻底干燥(1 小时), 然后喷洒上 Ehrlich 试剂(将 2g 4-二甲氨基苯甲醛溶解在 85ml 96%乙醇中, 随后再加入 15ml 37%的盐酸)。

在 CAP 体系(一种中性体系)中, CPA 看上去是蓝紫色的蘑菇形小斑点, 有典型的低迁移率; 而酸性 TEF 体系在上样点和展开剂前沿之间产生典型的延长形污迹。在 EMA 体系中(碱/碱体系), 环匹阿尼酸聚集成为密集的小斑点。

对平板直接的视觉观察, 浓度大于等于 2.5ppm 的 CPA 看上去为紫色区域形涂污或斑点(依赖于展开体系的不同)。在台式平台扫描仪上对 TLC 平板

进行扫描,然后在合适的图像加工程序中增强电子图像(在这种情况下使用的是 Paint Shop Pro 4),可以使灵敏度增加 5 倍到 10 倍。

该分析的总灵敏度(不提取)约为 0.5-1ppm CPA;使用提取物增加灵敏度至少 10 倍。

C. 使用毛细管电泳法检测曲酸的操作

制备 1-3ml 等分试样用于在一个 Supelclean LC-18 SPE 管(预装 3ml Supelco 柱,目录号为 5-7012)通过固相提取法进行毛细管电泳(CE)分析,用甲醇、10mM 硼酸盐/NaOH、4M KCl pH9.1 进行调理。使用抽吸多支管迫使流体通过柱子。使用 3ml 10mM 硼酸盐/NaOH、4M KCl pH9.1 和 0.3ml 10mM 硼酸盐/NaOH pH9.1 冲洗后,用 7.5ml 10mM 硼酸盐/NaOH pH9.1 洗脱样品。洗脱物不需进一步处理可直接用于 CE 分析,根据上述对于环匹阿尼酸的操作进行。偶尔会出现沉淀,但可以通过离心法去除。此方法的灵敏度下限约为 6ppm。

D. 使用薄层层析法检测曲酸的操作

按上述对于 CPA 的方法,在 TLC 平板两对边上各上等分试样,并使用与 CPA 相同的溶液体系展开。干燥后的平板喷洒上 1%FeCl₃ 的 0.1M HCl 溶液。样品中的曲酸的存在通过红色斑点显示出来,且与作为对照而施用的纯曲酸产生的红色斑点的强度相比较。该检测的灵敏度下限约为 50 ppm。

E. 使用毛细管电泳法检测 3-硝基丙酸(3-NPA)的操作

用于毛细管电泳(CE)分析的样品是否需要经过纯化取决于样品的传导性。如果传导性低于 10mS,样品通过在 Varian SAX 阴离子交换器(Varian Instruments, Palo Alto CA)进行离子交换并使用 0.1M KCl 作为洗脱缓冲液纯化。如果传导性高于 100mS,样品需使用 2-丁醇提取液提取,其中用酸化/高盐处理样品使其沉淀,并再溶于 pH 7.0 10mM Tris/HCl 中,用 6 毫升丁醇提取 2ml 样品。

使用 HP-CE 仪器的二极管阵列检测,于 30℃使用未包被二氧化硅的 50 微米毛细柱(有效长度为 56cm),调节缓冲液为 25mM 硼酸盐/磷酸盐 pH 7.6。以静态水压用 20 秒的时间将样品注入。设定电压为 30KV。该方法的灵敏度下限为 6 ppm。

F. 使用薄层层析法检测 3-硝基丙酸(3-NPA)的操作

在 TLC 平板上用发酵液点样,并使用用于 CPA 相同的方法展开。按照

W.Majak 和 R.J.Bose 在“分离米瑟毒苷和检测脂肪族硝基化合物的层析方法”(《植物化学》1974年13:1005-1010页)中所述的方法,在其上喷洒上重氮化的对-硝基苯胺。斑点相对于对照物的强度和位置是3-NPA浓度的量度。TLC平板上的检测水平为25-50 ppm。

另一种方法是,在100 μ l样品中加入50 μ l 1M NaOH和70 μ l重氮化的对-硝基苯胺,通过分光光度法对3-NPA进行分析。检测水平为5-10 ppm。

实施例 1

A. 米曲霉 Bz 14 的 CPA 阴性菌株的构建

冻干的米曲霉 Bz 14 菌株芽孢经过最适剂量的 γ -射线的照射,剂量范围在1000Gy到1250Gy,然后将这些芽孢以25-50个菌落/9cm平板的密度铺板在筛选培养基1的平板上。产生环匹阿尼酸的菌落由于有红色不溶性 CPA-Fe 复合物存在而在筛选培养基1上形成红色反面(菌落的底面)。

从照射后的芽孢中筛选出了大约50,000个菌落并且分离出了154个CPA缺陷型菌落,这些菌落的特点是有奶油色/白色的外观。在再次分离后,64个菌株在筛选培养基1的平板上仍然保持非红色外观。使用TLC-plug(平板)分析法,在52个菌株中未检测到CPA。然后将这些菌株在MDU-1B培养基中在毒素诱导(34 $^{\circ}$ C, 250转/分,培养5天)的摇瓶发酵培养条件下进行培养。使用TLC进行检测,36个菌株的上清液中不存在可检测水平的CPA。

B. 来自米曲霉 JaL228 的 CPA 阴性菌株-BECh 1 的构建

冻干的JaL228芽孢经过 γ -射线照射,并且以上述方法筛选。待确定的无CPA的分离株在毒素诱导条件下(34 $^{\circ}$ C, 250转/分,培养5天)在摇瓶中的MDU-1B培养基上生长,使用TLC方法检测上清液中的CPA。检测可以在上清液中直接进行或在上清液提取物中进行。

若使用提取方法,用10ml 0.1M的HCl酸化50ml总样品。然后将该混合物与70ml甲醇/氯仿(1:2)混合后剧烈振摇3-5分钟。分相后(约3小时),将底层相(大约25ml)转移到一个300ml的烧杯中使氯仿挥发。剩余物再溶于5ml氯仿中并转移到一个25ml的烧杯中使氯仿挥发。残余物溶于100 μ l氯仿中。

在TLC平板(20cm $\times$ 20cm)两对边上各上10 μ l样品上清液或氯仿提取物,并按前一章所述的分析方法进行处理。

包括BECh在内的3个分离株不产生CPA。

C. CPA 阴性和 KA 阴性菌株, BECh2 和 BECh3 的构建

将 BECh1 生长在 Cove N 的斜面培养基中。在 0.01% 的 Tween 中悬起芽孢至密度为 $3-5 \times 10^6$ ，并进行短波紫外辐射(254nm，杀菌灯)。在下面的筛选中使用紫外剂量辐射的芽孢，该剂量使得 1-5% 存活。

辐射后的芽孢在 KM2 培养基中稀释到约 0.7 个芽孢/100 μ l，取 100 μ l 接种到 96 孔微量滴定板的每一个孔中。在 34 $^{\circ}$ C 的湿箱中静止培养培养物 5-7 天。向每孔中加入 40 μ l 溶于 0.1M HCl 中的 1%FeCl₃ 作为生长指示剂。

出现强烈的红色代表产生了曲酸(KA)；没有颜色代表菌落不能产生曲酸。

作为可供选择的另一方法，芽孢铺板于固化的 KM2 培养基上(在有 Triton x-100 下限制性生长)并在成熟菌落出现时将平板用 0.1M HCl 中的 1%FeCl₃ 浸没。在菌落周围没有红色区域代表推定的不产生曲酸。

从约 7000 个微量滴定培养板培养物中分离了 132 个推定不含 KA 的菌落，即与 FeCl₃ 不发生颜色反应的菌落。然而当在初级 KM2 筛选琼脂板上测试时，没有一个菌落被确定为 KA 阴性。

随后，对固态培养基上和静止液态 KM2 培养基(30 $^{\circ}$ C)中的阴性菌落再在 KA 诱导条件下在液体培养基中进行检测，KA 阴性突变株的数目降到 11 个。当在摇瓶中检测这些菌株的时候，其中的 8 个菌株产生 KA。剩余的 3 个菌株在其上清液上直接进行的分析中不产生颜色反应且用 TLC 检测时也没有盐酸反应。正如所料想的一样，当生长在同时平行培养基中时，对照菌株 BECh1 会产生 KA。分离株中的一个表现出异常的形态。剩余的两个分离株在 MDU-1B 中延长培养后对 CPA 和 KA 产生情况进行再测试。结果是 CPA 和 KA 均未检测得到。这两个菌株命名为 BECh2 和 BECh3。

D. 已为 CPA 阴性和 KA 阴性的 3-NPA 阴性米曲霉菌株的构建

BECh2 和 BECh3 菌株各自按上述方法进行紫外诱变。辐射后的芽孢在 96 孔微量滴定板中稀释到约 0.7 个活芽孢/100 μ l Nakamura 培养基。在 30 $^{\circ}$ C 的湿箱中培养 5-7 天。

孔中生长的发酵肉汤样品或者转移到新的微孔板中并使用分光光度法分析，或者应用于 TLC 平板中。3-NPA 阴性的菌株在摇瓶中用 Nakamura 培养基再培养并对 3-NPA 产生情况进行分析。仍为 3-NPA 阴性的菌株依照实施例 2 中的方法用 pCaHj 493 进行转化，如实施例 3 所述对转化体进行处理。

实施例 2

米曲霉菌株 JAL228 和 BECh1 中脂肪酶的表达

A. 质粒 pCaHj493 的构建

用 BamHI 和 SalI 消化脂肪酶质粒 pAHL(WO 97/07202), 分离获得 916bp 的编码脂肪酶的片段。

按 WO 98/00529 中所述, pCaHj 483 用 BamHI 和 XhoI 进行消化, 将 6757bp 的载体片段与脂肪酶片段相连。连接混合物用于转化大肠杆菌 DH 5 α 细胞, 分离得到含有所需质粒的转化体。此质粒命名为 pCaHj 493。

B. 将 pCaHj 493 转化入 JaL228 和 BECh-1 菌株中

按 EP-A-0531372 中所述, 用在乙酰胺进行筛选的方法将 pCaHj 493 转化入米曲霉菌株 JaL228 和 BECh1。转化体经过两次芽孢再分离。在摇瓶和微量滴定板培养物中检测每个转化体第二次再分离的芽孢的脂肪酶产生情况。

实施例 3

A. CPA 阴性和 CPA 阳性米曲霉菌株中脂肪酶的产生

检测摇瓶培养物中按实施例 2 所述方法制备的 18 个 JaL228 转化体和 30 个 BECh 1 转化体的脂肪酶的产生情况。

用 10ml 0.1% 的 Tween 溶液收获转化体的 Cove N 斜面培养物, 芽孢悬液用作 100ml Gl-Gly 培养基中的接种物并置于 500ml 的双挡板摇瓶中。将培养基在旋转摇动器上在 250 转/分, 34℃ 下培养 24 小时。然后将 10ml Gl-Gly 培养物转移到 500ml 摇瓶中的 100ml 1/5MDU-2BP 中并在 34℃, 250 转/分下继续培养。

50 小时后取出样品, 通过 Miracloth 过滤并在 4000 $\times$ g 下离心。用简单放射免疫扩散的方法(见 Scand.J. Immuno. Vol. 17,suppl. 10, 41-56 页,(1983) “免疫沉淀凝胶技术技术手册”, N.H.Axelsen 编辑, Blackwell Scientific Publications,1983)检测上清液中脂肪酶的浓度(以 LU/ml 表示)。

30 个 CPA 阴性 BECh 1 转化体的脂肪酶产量等于或高于 18 个 JaL228 CPA 阳性转化体的产量。下表 2 给出了分布的概况图。

B. CPA 阴性和 CPA 阳性米曲霉菌株中木聚糖酶的产生

使用不可检测到 CPA 产生的 10 个菌株(实施例 1A 中制备)和 3 个可检测到 CPA 的菌株进行有关木聚糖酶产生的评价。结果总结在下表 1 中。第 2 列表示以真菌木聚糖酶单位(FXU)的形式表示的摇瓶培养物中木聚糖酶含

量, 检测方法是简单放射免疫扩散的方法(见 Scand.J. Immuno. Vol. 17, suppl. 10, 41-56 页,(1983) “免疫沉淀凝胶技术手册”, N.H.Axelsen 编辑, Blackwell Scientific Publications)。

结果显示 CPA 阴性的菌株可以产生与 CPA 阳性菌株可比的木聚糖酶量。

表 1

菌株	FXU	CPA/ppm
2-5	360	<2
3-34	440	<2
4-2	550	<2
5-1	250	<2
5-2	475	<2
7-1	530	<2
7-2	475	<2
9-5	370	<2
10-4	300	<2
12-2	365	<2
1-1	600	2-3
1-3	650	20
3-1	635	7

<2=低于检测限

C. CPA 阴性和 KA 阴性菌株中脂肪酶的产生

按照实施例 2 所述的方法用质粒 pCaHj 493 对两个无 CPA 和 KA 的米曲霉菌株 BECh 2 和 BECh 3 进行转化。分离转化体的芽孢两次。按照实施例 2 所述, 检测来自每个菌株的第二次再分离得到的芽孢的脂肪酶产生情况。

表 2 显示了来自这两个菌株的脂肪酶产量的概率分布情况。与米曲霉菌株 BECh 1 和 JaL228 的产量相比, 结果表明并没有潜在的表达退化现象发生。

从与用于脂肪酶生产培养物相同的芽孢悬液中, 对用于 CPA 生产的

MDU1B 摇瓶进行接种，并按上述方法培养 5 天。依照 5B2 部分进行 DPA 分析。BECh 1 菌株无一产生 CPA 而 18 株 JaL228 菌株中的 17 株产生高于 25ppm 的 CPA，大多数菌株的 CPA 产量在 100ppm 以上。

表 2

菌株	N	中值 LU/ml	平均值 LU/ml	最小值 LU/ml	最大值 LU/ml	标准偏差 LU/ml
BECh2	50	3101	3203	350	6329	1490
BECh3	47	2619	2662	203	5455	1057
JaL228	18	1890	2330	635	4664	1361
BECh1	30	3025	2733	876	4097	879

实施例 4

米曲霉 DCAT-S 基因的识别和基因组克隆

A. 米曲霉二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶(DCAT-S)基因的识别

cDNA 克隆(pJaL499)含有 SEQ ID NO: 1 中所示的 DNA 序列，由于该序列与麦角菌的二甲基烯丙基色氨酸合成酶(DMAT-S)同源而被认为参与了 CPA 的生物合成。米曲霉 cDNA 克隆的测序显示其长度为 1393 个碱基对(SEQ ID NO: 1)并编码含 473 个氨基酸的多肽(SEQ ID NO: 2)，该多肽与麦角菌的 DMAT-S 有 42.1%相同。

米曲霉 DCAT-S 多肽参与了由环乙酰乙酰基-L-色氨酸和二甲基烯丙基焦磷酸盐合成 β -CPA 的过程(见 Nethling D.C.和 R.M.McGrath, 《Can. J. Microbiol.》(1977)23: 856-872 页)。

制备了 JaL228 和 BECh 1 菌株的染色体 DNA。该 DNA 经过 BglII、NcoI、XhoI 和 SpeI 的消化并通过 Southern 印记法进行分析，使用 1kb 的 ^{32}P 标记的来源于 pJaL499 并含有 DCAT-S 基因的 BglII DNA 片段作为探针。Southern 印记分析表明产生 CPA 的 JaL228 菌株有 1 个 DCAT-S 基因，而在 BECh 1 中 DCAT-S 基因已经从染色体中缺失。

B. DCAT-S 基因的基因组克隆

使用以下限制酶作出米曲霉 DCAT-S 基因的基因组限制酶图谱：EcoRI、SalI、BbuI、XhoI 和 XbaI，使用 1kb 的 ^{32}P 标记的来源于 pJaL499

并含有 DCAT-S 基因的 BglII DNA 片段作为探针(图 1)。此图表明其只有一个拷贝的 DCAT-S 基因。

JaL228 的基因组 DNA 或者用 Tsp509I 进行部分消化, 或者在 0.7% 的琼脂糖凝胶上进行。纯化大小在 7 到 10kb 之间的片段。

按照生产商(Stratagene®)提供的操作手册将纯化的 DNA 克隆入 Lambda ZAP II 中。体内切下并再环化 Lambda 载体中所含的任何克隆插入体, 并按照生产商提供的指南构建含有插入克隆的用作 DNA 文库的噬菌粒。采用菌落杂交的方法, 使用 1kb 的 ^{32}P 标记的来源于 pJaL499 并含有 DCAT-S 基因的 BglII DNA 片段作为探针来筛选编码 DCAT-S 基因的克隆, 此方法在标准的方法教科书中有概述(例如, J. Sambrook, E. F. Fritsch 和 T. Maniatis 编辑(1989)“分子克隆: 实验室手册”, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)。

实施例 5

通过基因破坏方法破坏米曲霉二甲基烯丙基-环乙酰乙酰基-L-色氨酸合成酶(DCAT-S)产生米曲霉 CPA 阴性菌株

使用米曲霉 pyrG 基因作为筛选标记, 在米曲霉 pyrG⁻菌株中用一步基因替换方法破坏 DCAT-S 基因(B.L.Miller 等, 《分子和细胞生物学》(1985)5: 1714-1721 页, 和 G.May, 《丝状真菌应用分子遗传学》, 1-25 页; J.R.Kinghorn 和 G.Turner 编辑; Blakie Academic and Professional, 1992)。

A. DCAT-S 基因破坏质粒的构建

质粒 pJaL499 经过 SacII 消化并用 Klenow 多聚酶进行处理形成钝端, 按生产商(Boehringer Mannheim)提供的指南用细菌碱性磷酸酶去除 5' 磷酸酯基, 然后用苯酚提取并沉淀。

按 WO 98/12300 所述, 质粒 pJaL335 经过 HindIII 消化以获得含有米曲霉 pyrG 基因的 3.5kb 片段, 用 Klenow 多聚酶片段处理以形成钝端, 通过凝胶电泳进行分离并纯化。在转化入大肠杆菌后, 用 mini-plasmid preparation 的限制酶消化, 鉴定含有合适质粒的菌落。图 2 总结了 DCAT-S 破坏质粒(pDCAT-S-pyrG)的构建过程。

B. PyrG⁻米曲霉菌株 JaL250 的分离

筛选对 5-氟-乳清酸有抗性的米曲霉菌株 JaL228 以识别自然产生的 pyrG 突变株。一个命名为 JaL250 的菌株被鉴定为 PyrG⁻。该突变株为尿嘧啶核苷

依赖性的，因此其可以用野生型的 *pyrG* 基因进行转化并通过在缺乏尿嘧啶核苷下生长的能力来筛选转化体。

C. 米曲霉 DCAT-S 菌株的构建

按照 Christensen 等在《生物技术》(1988)6: 1419-1422 所述方法，将质粒 pDCAT-S-*pyrG* 的 4.9kb 的 *NotI*-*EcoRI* 片段经过凝胶纯化，并用于转化米曲霉菌株 JaL250。然后通过其在缺乏尿嘧啶核苷下的生长能力来筛选转化体。再分离两次后，按照实施例 1 所述的方法依其产生 CPA 的能力筛选转化体。

为了确定 DCAT-S 基因已经被破坏，从不产生 CPA 的转化体制备染色体 DNA。制得的 DNA 经过 *EcoRI* 的消化并用于 Southern 印记分析，使用 1kb 的 ³²P 标记的来源于 pJaL499 并含有 DCAT-S 基因的 *BglIII* DNA 片段作为探针。通过基于 6.3kb 的野生型 *EcoRI* 带迁移到基于 9.8kb 的 *EcoRI* 带，识别出带有 DCAT-S 基因破坏的转化体。

实施例 6

BECh1 和 BECh2 缺少黄曲霉毒素生物合成通路簇中的两个基因的确定找到了米曲霉 IFO4177 和其许多衍生物中的黄曲霉毒素生物合成通路簇中存在的 *aflR* 和 *omtA* 黄曲霉毒素基因。通过 PCR 的方法从基因组 DNA 中分离得到米曲霉 IFO4177 中 *aflR* 的同源序列，引物为 5956 (5' - GGATCCAGGGCTCCCTGGAG-3') (SEQ ID NO : 3) 和 5955 (5' - CCTGACCAGCCAGATCTCCT-3') (SEQ ID NO : 4)。获得了一种 0.9kb 的 PCR 片段并克隆入 Invitrogen 公司的 pCR2 载体中。使用 M13 正向(-40)和反向引物对所得质粒 pToC280 进行测序，从而确定克隆的该片段的同一性。*omtA* 的同源序列也通过 PCR 的方法从基因组 IFO4177 DNA 中分离得到，引物为 6120(5' -AGTGAGAGAACTCCCTCCTC-3')(SEQ ID NO : 5)和 6121(5' -CCATATCTTCTCAGTCTCCA-3')(SEQ ID NO : 6)。获得了一种 1.2kb 的片段并克隆入 Invitrogen 公司的 pCR2 载体中，对所得的质粒 pToC276 进行测序，使用 M13 正向(-40)和反向引物以确认所克隆的片段的同一性。

aflR 和 *omtA* 的克隆片段作为 ³²P 标记的探针用于杂交试验中。IFO4177、pJaL228、BECh1 和 BECh2 的基因组 DNA 均经过限制酶 *EcoRI* 消化，产生的片段在 0.7%的琼脂糖凝胶中分离。将 DNA 印记到膜上并在严紧的条件下与两个 ³²P 标记的探针分别杂交(方法见 J.Sambrook, E.F. Fritsch,

和 T. Maniatis 编辑(1989)“分子克隆:实验室手册”,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)。印记表明对来自 IFO4177 和 JaL228 的两种探针均为阳性杂交信号,而含有 BECh1 和 BECh2 DNA 的泳道没有可见的条带。使用 omtA 探针可见 IFO4177 和 JaL228 泳道上有约 3.8kb 的片段,使用 aflR 探针可见约为 0.5 和 4.3kb 的两个带。

结果为,米曲霉 IFO4177 中含有至少两个来自黄曲霉毒素生物合成通路的基因,即 aflR 和 omtA 基因。在黄曲霉和寄生曲霉中分离得到的基因约为 32kb(Woloshuk, C.P.和 Prieto,R,《FEMS 微生物学通信》(1998)160: 169-176 页)。在 IFO4177 的衍生物 BECh1 和 BECh2 中均不存在这些基因。

这里所述并要求保护的本发明并不局限于这里公开的特定实施方案的范围,因为这些实施方案是用来对本发明的几个方面进行说明。任何相当的实施方案也应包括在本专利所涉及的范围内。事实上,通过前述描述,对于本领域的普通技术人员来说,在本文所示出并描述之外的本发明的各种修饰是显而易见的。这些修饰也落在所附权利要求书的范围内。

这里引用了各类参考文献,将其公开内容的全文引入作为参考。

```

<110> Novo Nordisk A/S
<120>
<130>
<160> 6
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1393
<212> DNA
<213> 米曲霉
<220>
<221> CDS
<222> (15)..(1328)
<400> 1
ccgaaagctg agca atg gag atc tcc aag aaa gca gca aca ctg ctg cca 50
           Met Glu Ile Ser Lys Lys Ala Ala Thr Leu Leu Pro
             1             5             10
aag ccc ttc tac gtg ctg agt caa gcc ctg aac ctc tcg aac aag gac 98
Lys Pro Phe Tyr Val Leu Ser Gln Ala Leu Asn Leu Ser Asn Lys Asp
      15             20             25
cac aca aaa tgg tgg tat agc aca gct ccg atg ttt gcc acc atg atg 146
His Thr Lys Trp Trp Tyr Ser Thr Ala Pro Met Phe Ala Thr Met Met
      30             35             40
gcg ggg gcc ggc tat gat gtt cac gca cag tac aag ttc ctc tgt atc 194
Ala Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Ala Gln Tyr Lys Phe Leu Cys Ile
      45             50             55             60
cac cgt gag gtc atc atc ccg gcg ttg ggt cca tac cca gaa aag ggt 242
His Arg Glu Val Ile Ile Pro Ala Leu Gly Pro Tyr Pro Glu Lys Gly
             65             70             75
cag ccc atg cac tgg aag agt cat ctc aca cgc ttc gga ctt cct ttc 290
Gln Pro Met His Trp Lys Ser His Leu Thr Arg Phe Gly Leu Pro Phe
             80             85             90
gag ctg agc ttc aat tac tcc aaa tca cta cta cgg ttt gca ttc gag 338
Glu Leu Ser Phe Asn Tyr Ser Lys Ser Leu Leu Arg Phe Ala Phe Glu
             95             100             105
ccc ctc ggt tcc ctg acg gga acg aag gat gat cca ttc aac acc cag 386
Pro Leu Gly Ser Leu Thr Gly Thr Lys Asp Asp Pro Phe Asn Thr Gln
             110             115             120
gca atc agg cct gtt ctc cag gac ctc aag gcc atg gtt cca ggg ctt 434
Ala Ile Arg Pro Val Leu Gln Asp Leu Lys Ala Met Val Pro Gly Leu
             125             130             135             140
gac ctg gaa tgg ttc gat cat ttc act aaa gca ttg gtc gtt tcg gag 482
Asp Leu Glu Trp Phe Asp His Phe Thr Lys Ala Leu Val Val Ser Glu
             145             150             155

```

gaa gag gct cgg act ctg cta gat cga gat att gag atc ccc gtc ttc	530
Glu Glu Ala Arg Thr Leu Leu Asp Arg Asp Ile Glu Ile Pro Val Phe	
160 165 170	
aag aca cag aac aaa ctg gca gcc gat ctg gag cca tct ggc gat att	578
Lys Thr Gln Asn Lys Leu Ala Ala Asp Leu Glu Pro Ser Gly Asp Ile	
175 180 185	
gtc ttg aag acc tac atc tac ccg cgg atc aag tcg atc gcg acc ggg	626
Val Leu Lys Thr Tyr Ile Tyr Pro Arg Ile Lys Ser Ile Ala Thr Gly	
190 195 200	
acc cca aaa gag aga ctc atg ttt gac gca atc aag gct gcc gac aag	674
Thr Pro Lys Glu Arg Leu Met Phe Asp Ala Ile Lys Ala Ala Asp Lys	
205 210 215 220	
ttt ggc aaa gtt gcc act cca ctg gca atc ctc gag gag ttt ata gct	722
Phe Gly Lys Val Ala Thr Pro Leu Ala Ile Leu Glu Glu Phe Ile Ala	
225 230 235	
gag cga gca ccc acc ctc ctc ggc cac ttt ctc tca tgc gat ttg gtc	770
Glu Arg Ala Pro Thr Leu Leu Gly His Phe Leu Ser Cys Asp Leu Val	
240 245 250	
aag ccg tcc gag tcc cga atc aag gtc tac tgt atg gaa cgc cag ctc	818
Lys Pro Ser Glu Ser Arg Ile Lys Val Tyr Cys Met Glu Arg Gln Leu	
255 260 265	
gac ctg gcc tcc atc gaa ggt att tgg act ctc aac ggg cga cgg aac	866
Asp Leu Ala Ser Ile Glu Gly Ile Trp Thr Leu Asn Gly Arg Arg Asn	
270 275 280	
gat cca gag aca ctg gat ggt ctg gat gcg ctg agg gag ctg tgg cag	914
Asp Pro Glu Thr Leu Asp Gly Leu Asp Ala Leu Arg Glu Leu Trp Gln	
285 290 295 300	
cta ttg ccc gtc acg gag ggt ctg tgt cca ctg ccg aac tgc ttt tac	962
Leu Leu Pro Val Thr Glu Gly Leu Cys Pro Leu Pro Asn Cys Phe Tyr	
305 310 315	
gag ccg ggt acc tca ccg cag gag cag ctc ccc ttc att ata aat ttt	1010
Glu Pro Gly Thr Ser Pro Gln Glu Gln Leu Pro Phe Ile Ile Asn Phe	
320 325 330	
acc ttg tct cct aaa agc gca ctt ccc gaa cca cag atc tat ttc cct	1058
Thr Leu Ser Pro Lys Ser Ala Leu Pro Glu Pro Gln Ile Tyr Phe Pro	
335 340 345	
gct ttt ggg cag aac gac aaa acc atc gcg gaa gga ttg gcc acc ttc	1106
Ala Phe Gly Gln Asn Asp Lys Thr Ile Ala Glu Gly Leu Ala Thr Phe	
350 355 360	
ttt gag agc aga ggt tgg ggt ggc ttg gct aag agc tat cca gcg gat	1154
Phe Glu Ser Arg Gly Trp Gly Gly Leu Ala Lys Ser Tyr Pro Ala Asp	
365 370 375 380	
ttg gca tcc tac tat ccc gat gtg gac ctg cag acc gca aat cac ctg	1202
Leu Ala Ser Tyr Tyr Pro Asp Val Asp Leu Gln Thr Ala Asn His Leu	

```

          385          390          395
cag gcg tgg atc tcc ttc tct tac aag ggg aaa aaa ccg tac atg agt 1250
Gln Ala Trp Ile Ser Phe Ser Tyr Lys Gly Lys Lys Pro Tyr Met Ser
          400          405          410

gtg tac ctc cat acc ttc gaa gcg ttc agt gct gct gcc cag gag gtg 1298
Val Tyr Leu His Thr Phe Glu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Gln Glu Val
          415          420          425

gct atg tgt cac gat ggc cac aat cct tag gactagttta tcccttcatt 1348
Ala Met Cys His Asp Gly His Asn Pro
          430          435

ctatgcatcc gttgaatgtg ttggtcgaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1393

<210> 2
<211> 437
<212> PRT
<213> 米曲霉

<400> 2
Met Glu Ile Ser Lys Lys Ala Ala Thr Leu Leu Pro Lys Pro Phe Tyr
  1              5              10              15

Val Leu Ser Gln Ala Leu Asn Leu Ser Asn Lys Asp His Thr Lys Trp
          20              25              30

Trp Tyr Ser Thr Ala Pro Met Phe Ala Thr Met Met Ala Gly Ala Gly
          35              40              45

Tyr Asp Val His Ala Gln Tyr Lys Phe Leu Cys Ile His Arg Glu Val
          50              55              60

Ile Ile Pro Ala Leu Gly Pro Tyr Pro Glu Lys Gly Gln Pro Met His
          65              70              75              80

Trp Lys Ser His Leu Thr Arg Phe Gly Leu Pro Phe Glu Leu Ser Phe
          85              90              95

Asn Tyr Ser Lys Ser Leu Leu Arg Phe Ala Phe Glu Pro Leu Gly Ser
          100             105             110

Leu Thr Gly Thr Lys Asp Asp Pro Phe Asn Thr Gln Ala Ile Arg Pro
          115             120             125

Val Leu Gln Asp Leu Lys Ala Met Val Pro Gly Leu Asp Leu Glu Trp
          130             135             140

Phe Asp His Phe Thr Lys Ala Leu Val Val Ser Glu Glu Glu Ala Arg
          145             150             155             160

Thr Leu Leu Asp Arg Asp Ile Glu Ile Pro Val Phe Lys Thr Gln Asn
          165             170             175

Lys Leu Ala Ala Asp Leu Glu Pro Ser Gly Asp Ile Val Leu Lys Thr
          180             185             190

```

```

Tyr Ile Tyr Pro Arg Ile Lys Ser Ile Ala Thr Gly Thr Pro Lys Glu
    195                      200                      205
Arg Leu Met Phe Asp Ala Ile Lys Ala Ala Asp Lys Phe Gly Lys Val
    210                      215                      220
Ala Thr Pro Leu Ala Ile Leu Glu Glu Phe Ile Ala Glu Arg Ala Pro
    225                      230                      235                      240
Thr Leu Leu Gly His Phe Leu Ser Cys Asp Leu Val Lys Pro Ser Glu
    245                      250                      255
Ser Arg Ile Lys Val Tyr Cys Met Glu Arg Gln Leu Asp Leu Ala Ser
    260                      265                      270
Ile Glu Gly Ile Trp Thr Leu Asn Gly Arg Arg Asn Asp Pro Glu Thr
    275                      280                      285
Leu Asp Gly Leu Asp Ala Leu Arg Glu Leu Trp Gln Leu Leu Pro Val
    290                      295                      300
Thr Glu Gly Leu Cys Pro Leu Pro Asn Cys Phe Tyr Glu Pro Gly Thr
    305                      310                      315                      320
Ser Pro Gln Glu Gln Leu Pro Phe Ile Ile Asn Phe Thr Leu Ser Pro
    325                      330                      335
Lys Ser Ala Leu Pro Glu Pro Gln Ile Tyr Phe Pro Ala Phe Gly Gln
    340                      345                      350
Asn Asp Lys Thr Ile Ala Glu Gly Leu Ala Thr Phe Phe Glu Ser Arg
    355                      360                      365
Gly Trp Gly Gly Leu Ala Lys Ser Tyr Pro Ala Asp Leu Ala Ser Tyr
    370                      375                      380
Tyr Pro Asp Val Asp Leu Gln Thr Ala Asn His Leu Gln Ala Trp Ile
    385                      390                      395                      400
Ser Phe Ser Tyr Lys Gly Lys Lys Pro Tyr Met Ser Val Tyr Leu His
    405                      410                      415
Thr Phe Glu Ala Phe Ser Ala Ala Ala Gln Glu Val Ala Met Cys His
    420                      425                      430
Asp Gly His Asn Pro
    435

```

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：引物 5956

<400> 3

ggatccaggg ctccctggag

20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：引物 5955

<400> 4
cctgaccagc cagatctcct 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：引物 6120

<400> 5
agtgagagaa ctccctcctc 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：引物 6121

<400> 6
ccatatcttc tcagtcctcca 20

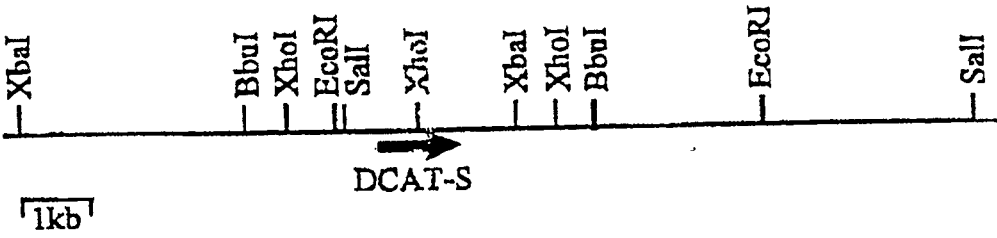


图 1



图 2