

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480005592.0

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1328375C

[22] 申请日 2004.3.2

[21] 申请号 200480005592.0

[30] 优先权

[32] 2003.3.4 [33] JP [31] 057565/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/002566 2004.3.2

[87] 国际公布 WO2004/078967 日 2004.9.16

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.30

[73] 专利权人 独立行政法人制品评价技术基盘机构

地址 日本国东京都

共同专利权人 独立行政法人产业技术综合研究所
独立行政法人酒类综合研究所

[72] 发明人 北本胜彦 有冈学 山口庄太郎
町田雅之 阿部敬悦 五味胜也
浅井洁 佐野元昭 金大心

长崎英树 细山哲 秋田修

小笠原直毅 久原哲

[56] 参考文献

JP10-155493A 1998.6.16

JP9-208492A 1997.8.12

WO 02079476A1 2002.10.10

JP2002-101882A 2002.4.9

CN 1216061A 1999.5.5

审查员 张 建

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 徐 谦 刘继富

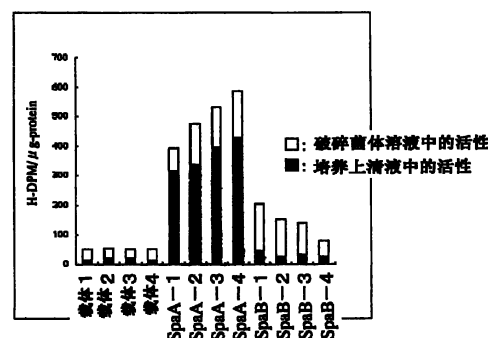
权利要求书 1 页 说明书 35 页 附图 5 页

[54] 发明名称

来自于曲霉菌的磷脂酶 A₂

[57] 摘要

提供来自于曲霉菌的磷脂酶 A₂ 及对其进行编码的 DNA。磷脂酶 A₂ 含有下述 (a) 或 (b) 蛋白质：
(a) 是具有序列号 1 或 2 表示的氨基酸序列的蛋白质；
(b) 是具有改变了序列号 1 或 2 表示的氨基酸序列的一部分的氨基酸序列、具有磷脂酶 A₂ 功能的蛋白质。



1. 磷脂酶 A₂, 其含有由下述(a)~(d)组成的组中选择的任意一种蛋白质:
 - (a)具有序列号 1 表示的氨基酸序列的蛋白质;
 - (b)具有序列号 1 表示的氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸发生缺失、置换、附加和/或插入的氨基酸序列、具有磷脂酶 A₂ 功能的蛋白质;
 - (c)具有序列号 2 表示的氨基酸序列的蛋白质;
 - (d)具有序列号 2 表示的氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸发生缺失、置换、附加和/或插入的氨基酸序列、具有磷脂酶 A₂ 功能的蛋白质。
2. 由下述(A)~(H)组成的组中选择的任意一种 DNA:
 - (A)对权利要求 1 中所述的蛋白质进行编码的 DNA;
 - (B)具有序列号 3 表示的碱基序列的 DNA;
 - (C)具有序列号 4 表示的碱基序列的 DNA;
 - (D)具有序列号 5 表示的碱基序列的 DNA;
 - (E)具有序列号 6 表示的碱基序列的 DNA;
 - (F)具有序列号 7 表示的碱基序列的 DNA;
 - (G)具有序列号 8 表示的碱基序列的 DNA。
3. 一种载体, 其携带有权利要求 2 中所述的 DNA。
4. 一种丝状菌, 其从外部导入了权利要求 2 中所述的 DNA。
5. 磷脂酶 A₂ 的生产方法, 其包括下述步骤(1)和步骤(2):
 - (1) 在能够产生权利要求 2 的 DNA 编码的蛋白质的条件下, 培养权利要求 4 所述的丝状菌的步骤;
 - (2)回收产生的蛋白质的步骤。

来自于曲霉菌的磷脂酶 A₂

技术领域

本发明涉及来自于曲霉菌的磷脂酶 A₂ 及对其进行编码的 DNA, 以及它们的应用。

背景技术

丝状菌中特别是含有米曲霉(キコウジ菌)等的曲霉菌, 在日本的酿造业如制造清酒、黄酱、酱油以及甜料酒等方面的利用由来已久, 是能够直接食用的菌类, 美国 FDA(食品药品监督管理局)在 GRAS(Generally Recognized as Safe)上将其列为安全的基因源。

因此, 在把来自于一般菌类的基因作为食品等利用时所进行的必要的慢性毒性检查等安全审查中, 来自于一般菌类的基因大约要花费 10 亿日元, 与此相比, 对于上述 GRAS 等级的基因的审查, 只需花费上述经费的约三分之一左右即可, 而且, 具有该审查所需要的时间更短的优点。

这样, 从安全性和经济性的角度来看, 可以说丝状菌特别是曲霉菌是利用价值非常高的基因宝库。

因此, 通过明确这些菌类的基因组 DNA 信息以及被编码的基因等的功能, 不但能够给如利用生物技术生产物质等的食品工业提供有效利用安全的基因资源的方法, 而且能够为农药及医药领域的各种基因的筛选提供有用的信息。

进一步, 能够成为解析亲缘菌如黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)等谷物的污染菌以及人体的感染菌的基因组信息的有用工具。

在上述背景下进行研究的结果, 本发明者们成功地解析了曲霉菌中的一种米曲霉的基因组, 确定了它的碱基序列(以及其编码的氨基酸序列)和各种功能等。基于所述的研究成果, 在先申请(特愿 2001-403261)中公开了

来自于米曲霉的各种 DNA，以及含有从这些 DNA 中制作的核苷酸序列、用于 GRAS 等级的丝状菌基因的扩增的引物组合以及用于检测出丝状菌基因的探针等。

本发明者们以得到的曲霉菌基因组信息为基础做了更进一步的研究。即关注于磷脂酶 A₂，从得到的碱基序列中确定对磷脂酶 A₂ 进行编码的序列，同时尝试确定被该序列编码的蛋白质的氨基酸序列。此外，磷脂酶 A₂ 是对甘油磷脂的 2 位的酯键进行加水分解、生成游离的脂肪酸和溶血磷脂的酶。人们从很早以前就知道来自动物的磷脂酶 A₂，这样的磷脂酶 A₂ 作为乳化剂已广泛用于溶血卵磷脂的制造（如参照特开平 10-042884 号公报）、油脂的脱胶工艺（如参照 Industrial Enzymology 2nd ed., p299-300(1996)）、制作面包（如参照特开昭 60-2135 号公报）、功能性磷脂（如参照オレオサイエンス第 2 卷第 1 号(2002)）等食品工业中。此外，也可在抗炎药、治疗败血症药、治疗风湿病药、治疗哮喘药、治疗缺血性疾病药、治疗缺血再灌注伤害药等药物开发方面使用。但是，来自动物的酶，由于其来自于动物，所以近年来消费者、食品制造公司都对它有敬而远之的倾向，人们期待着认为是更加安全的从微生物提取的酶。近年来对来自于微生物的磷脂酶 A₂ 进行了研究，发现了一种属于放线菌的紫红链霉菌(*Streptomyces violaceoruber*)的酶（参照特开平 6-327468 号公报）。接着最近又报道了来自于一种丝状菌 *Tuber borchii* 的酶（参照 Soragni et al., The EMBO Journal, 20 (18) 5079-5090 (2001)）、来自于 *Helicosporium* sp. 丝状菌的酶（参照 Wakatsuki et al., Biochim. Biophys. Acta 1522, 74, (2001)）。但是，没有把这些微生物作为食品使用的经验，因此期待着来自于安全性更高的菌种的酶。

因此，本发明的课题是提供来自于曲霉菌的磷脂酶 A₂ 和对其进行编码的 DNA，并提供来自于该曲霉菌的磷脂酶 A₂ 的生产方法等。

发明内容

本发明者们对上述课题进行了锐意研究，结果成功地在曲霉菌基因组内发现了与上述报道的来自于微生物的磷脂酶 A₂ 基因有高度同源性的 2 种序

列（以下分别称为“spaA 基因”和“spaB 基因”）。接着，以大肠菌和曲霉菌为宿主，表达该序列编码的 2 种蛋白质（以下分别称为“磷脂酶 A2-spaA”和“磷脂酶 A2-spaB”）时，确认任何一种蛋白质都具有磷脂酶 A2 的活性，根据此结果从实验上进一步确认该 2 种序列对磷脂酶 A2 进行了编码。另一方面，成功确定了该 2 种序列中的编码区域，发现该序列编码的 2 种蛋白质含有新发现的氨基酸序列。这样，本发明者们首次成功地确定了来自于曲霉菌的磷脂酶 A2 的基因及其氨基酸序列。

本发明是根据以上的研究成果完成的，提出了下述构成。

- (1) 含有下述(a)或(b)蛋白质的磷脂酶 A2:
 - (a)具有序列号 1 表示的氨基酸序列的蛋白质;
 - (b)具有改变了序列号 1 表示的氨基酸序列的一部分的氨基酸序列、具有磷脂酶 A2 功能的蛋白质。
- (2) 含有下述(c)或(d)蛋白质的磷脂酶 A2:
 - (c)具有序列号 2 表示的氨基酸序列的蛋白质;
 - (d)具有对序列号 2 表示的氨基酸序列的一部分实施改变的氨基酸序列、具有磷脂酶 A2 功能的蛋白质。
- (3) 下述(A)或(B) DNA:
 - (A)对(1)所述的磷脂酶 A2 进行编码的 DNA,
 - (B)在严格条件下与(A) DNA 杂交, 其编码的蛋白质具有磷脂酶 A2 功能的 DNA。
- (4) 下述(C)或(D)的 DNA:
 - (C)对(2)所述的磷脂酶 A2 进行编码的 DNA;
 - (D)在严格条件下与(C) DNA 杂交, 其编码的蛋白质具有磷脂酶 A2 功能的 DNA。
- (5) 具有下述(i)~(vi)中任一项序列的 DNA:
 - (i) 序列号 3 表示的碱基序列;
 - (ii) 序列号 4 表示的碱基序列;

- (iii) 序列号 5 表示的碱基序列;
 - (iv) 序列号 6 表示的碱基序列;
 - (v) 序列号 7 表示的碱基序列;
 - (vi) 序列号 8 表示的碱基序列。
- (6) 一种载体, 其携带有权利要求 3~5 中任一项所述的 DNA。
- (7) 一种丝状菌, 其从外部导入权利要求 3~5 中任一项所述的 DNA。
- (8) 磷脂酶 A₂ 的生产方法, 其包括下述步骤①和步骤②:
- ①在能够产生上述 DNA 编码的蛋白质的条件下, 培养 (7) 所述的丝状菌的步骤; 以及
 - ②回收产生的蛋白质的步骤。

本发明中的“DNA”不仅限于双链 DNA, 而且还包括构成双链的单链 DNA (有义链和反义链)。另外, 本发明的 DNA 中还包括含有考虑到密码子简并的任意碱基序列的 DNA。进一步, 本发明中的“DNA”没有形态限制, 可以包括 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA。

本发明中的“对蛋白质进行编码的 DNA”指的是, 在基因表达时能得到该蛋白质的 DNA, 当然包括具有与该蛋白质的氨基酸序列相对应的碱基序列的 DNA, 也包括在这样的 DNA 中附加对氨基酸序列不编码的序列所形成的 DNA (如含有 1 个或多个内含子的 DNA)。

本发明中“来自于曲霉菌的磷脂酶 A₂”指的是, 以曲霉菌为起始原料生产的磷脂酶 A₂, 或在生产过程中利用曲霉菌持有的磷脂酶 A₂ 的信息 (氨基酸序列或 DNA 序列) 生产的磷脂酶 A₂。当然可以是利用物理方法或生物化学方法从曲霉菌中生产的磷脂酶 A₂, 还包括利用本发明所公开的磷脂酶 A₂ 的氨基酸序列或 DNA 序列采用基因工程学的方法生产的磷脂酶 A₂。

附图说明

图 1 是表达载体-pNGspaA 的构成的模式示意图。

图 2 是表达载体-pNGspaB 的构成的模式示意图。

图 3 是显示磷脂酶 A₂-spaA 的转化体以及磷脂酶 A₂-spaB 的转化体的

磷脂酶活性（培养上清液中和破碎菌体溶液中）的图示。

图 4 是显示由携带磷脂酶 A2-spaA 基因的转化体精制得到的磷脂酶 A2-spaA 蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的电泳图谱的图像。

图 5 是利用经 CM-纤维素柱精制的磷脂酶 A2-spaA 的转化体的培养上清液来测定磷脂酶 A2 的活性的结果总结表。

具体实施方式 (蛋白质)

本发明的第一方面涉及来自于曲霉菌的磷脂酶 A2。本发明提供的磷脂酶 A2 是例如含有具有序列号 1 或序列号 2 的氨基酸序列的蛋白质。如后述实施例所示，确认该蛋白质在使用丝状菌的表达系统中确实具有磷脂酶 A2 的活性。

这里，在对某蛋白质的氨基酸序列的一部分实施改变时，一般情况下改变后的蛋白质与改变前的蛋白质具有相同的功能。即氨基酸序列的改变不会对蛋白质的功能产生实质性的影响，蛋白质的功能在改变前后能够得以维持。考虑到此因素，即使是含有对具有上述磷脂酶 A2 活性的蛋白质的氨基酸序列（序列号 1 及 2）的一部分进行改变的氨基酸序列的蛋白质（以下称“改变的蛋白质”），只要有磷脂酶 A2 的功能就可以构成本发明的磷脂酶 A2（蛋白质）。换句话说，只要能够保持磷脂酶 A2 的功能，允许对一部分氨基酸实施改变。此外，优选改变前后磷脂酶 A2 的活性不发生降低，但也可以有稍微的变动（上升或降低）。

这里，“氨基酸序列的一部分被改变”指的是，氨基酸序列中有 1 个或多个氨基酸发生缺失、置换、附加和/或插入的意思。只要能够保持磷脂酶 A2 的活性，氨基酸序列的改变（变异）的位置没有特别的限定，并且可以在多个位置发生改变。改变的氨基酸的数量，例如可以是相当于全部氨基酸数量的 10%或更少，优选相当于全部氨基酸数量的 5%或更少，更优选相当于全部氨基酸数量的 1%或更少。上述改变的蛋白质，例如可以用下述方法制造，即制备核苷酸片断，该核苷酸片断含有对序列号 1 或 2 氨基酸序列进

行编码的碱基序列施加改变的序列,在适当的表达系中对此核苷酸片断进行表达等,利用基因工程学的方法制备上述改变的蛋白质。

对于本发明的蛋白质(包括改变的蛋白质)中的含有天然曲霉菌的蛋白质,可以通过对该曲霉菌提取、精制等操作制备。此外,也可以根据本说明书公开的磷脂酶 A2 的信息,采用基因工程学的方法生产本发明的蛋白质(包括改变的蛋白质)。例如,可以用本发明的对蛋白质编码的 DNA 使适当的宿主细胞发生转化,然后通过回收转化体内表达的蛋白质来生产。对于回收到的蛋白质根据相应的目的实施适宜的精制。制备重组蛋白质时能够进行各种修饰,例如,将对本发明的蛋白质进行编码的 DNA 和其他适当的 DNA 插入到同一载体内,如果利用该载体可以进行重组蛋白质的生产,就可以得到在本发明的蛋白质上连接别的肽甚至蛋白质的重组蛋白质。此外,也可以实施附加糖链和/或脂质、或者实施诸如在 N 末端或 C 末端发生加工(プロセッシング)之类的修饰。通过上述修饰,能够使重组蛋白质的提取、精制简便化,还能够附加生物学功能等。

(对磷脂酶 A2 进行编码的 DNA)

本发明的第 2 任务是提供对来自于曲霉菌的磷脂酶 A2 进行编码的 DNA。这样的 DNA 的具体例子,可以是含有序列号 3 或 4 表示的碱基序列的 DNA、或者含有序列号 7 表示的碱基序列的 DNA。序列号 3 或 4 的序列是来自对磷脂酶 A2 进行编码的基因组 DNA (磷脂酶 A2 基因) 序列,序列号 7 的序列是从序列号 4 所示序列中除去内含子后的序列。本发明的 DNA 的其它具体例子可以是具有序列号 5、6 或 8 表示的碱基序列的 DNA。序列号 5 的碱基序列是包括序列号 3 表示的磷脂酶 A2 基因及其推定的启动子和终止子区域的 DNA。同样,序列号 6 的碱基序列是包括序列号 4 表示的磷脂酶 A2 基因及其推定的启动子和终止子区域的 DNA。此外,序列号 8 的碱基序列是包括序列号 7 表示的 DNA (磷脂酶 A2 基因中除去内含子区后的 DNA) 及其推定的启动子和终止子区域的 DNA。在这些 DNA 中优选启动子及终止子与结构基因的组合,如

果利用该 DNA 生产磷脂酶 A2 就可能出现良好的基因表达效果。因此，能够构建高效率的磷脂酶 A2 的生产体系。

上述本发明的 DNA 可以采用下述方法制备。即利用合适的丝状菌基因组 DNA 基因文库或 cDNA 基因文库、或利用丝状菌的菌体内提取液，正确使用能够与编码本发明的磷脂酶 A2 基因（如具有序列号 3 或 4 表示的碱基序列的 DNA）发生特异性杂交的探针、引物等，就可制备本发明的 DNA。另外，关于制备本发明的 DNA 所使用的丝状菌基因组 DNA 基因文库或 cDNA 基因文库的制作方法，可参照例如 Molecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 进行。

具体来说，例如可以采用下述步骤制备本发明的 DNA。首先，将预想具有目的 DNA 的丝状菌培养一定时间后，通过过滤集菌，洗净后将菌体冷冻干燥；然后，使用研钵等粉碎菌体，加入适量的萃取用缓冲溶液（例如含有 SDS 的 Tris-HCl 缓冲液）作为萃取液；接着，通过苯酚萃取、乙醇沉淀等对基因组 DNA 进行萃取、精制。把这样得到的基因组 DNA 作为模板，采用 PCR 法就能够得到目的 DNA 的扩增产物，该 PCR 法使用了目的 DNA 序列的特异性引物。

在可能得到合适的丝状菌基因组 DNA 基因文库或 cDNA 基因文库的情况下，利用这些基因文库也可以制备本发明的 DNA。根据使用的基因文库的种类可以采用嗜菌斑杂交法或菌落杂交法（参照 Molecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 等）。例如使用质粒构成的基因文库时，可以采用菌落杂交法。在选择具有目的 DNA 的克隆时，可以使用具有本发明 DNA 的特异性序列的探针。如果选择了目的克隆，以具有该克隆的 DNA 为模板，采用 PCR 法等就能够得到本发明的 DNA 的扩增产物，该 PCR 法使用了目的 DNA 序列的特异性引物。

将得到的克隆 DNA 载入适当的载体中进行亚克隆化，可供以后的使用。据此，例如能够构建转化用的重组载体，或构建适合解读碱基序列的质粒。

这里，对编码某蛋白质的 DNA 的一部分实施改变时，一般情况下改变

后的 DNA 编码的蛋白质与改变前的 DNA 编码的蛋白质具有相同的功能。即 DNA 序列的改变不会对所编码的蛋白质的功能产生实质性的影响，所编码的蛋白质的功能在改变前后能够得以持续。考虑到此因素，即使是含有对上述本发明的 DNA 的一部分做了改变的碱基序列的 DNA（以下称“改变的 DNA”），只要其编码的蛋白质具有磷脂酶 A₂ 功能就可以构成本发明的 DNA。换句话说，只要含有编码的蛋白质、能够保持磷脂酶 A₂ 的功能，就允许对一部分序列实施改变。此外，优选在改变前后编码的蛋白质的磷脂酶 A₂ 的活性不发生降低，但也可以有稍微的变动（上升或降低）。

这里，“一部分的改变”指的是，典型情况是，改变前的碱基序列中有 1 个或多个碱基被置换、缺失、插入或附加。这种改变也可以在多个部位发生。这里所说的“多个”，因改变发生的位置以及改变的种类的不同而异，例如可以是 2~100 个，优选 2~50 个，更优选 2~10 个。上述的改变的 DNA，例如可以通过限制酶处理、核苷酸外切酶以及 DNA 连接酶等来处理，通过用指定位置突变导入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）、随机突变导入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）导入变异等来制备。此外，也能够用紫外线处理含有磷脂酶 A₂ 基因的丝状菌，然后分离出改变后的基因等公知的变异处理方法制备改变的 DNA。

此外，在上述的碱基的置换、缺失、插入、附加或逆位等变异中，根据含有磷脂酶 A₂ 的微生物的个体差异、种属差异等情况，也包括自然发生的变异。

改变的 DNA 的制备方法，例如可举出，从带有改变的 DNA 的天然曲霉菌（米曲霉）中提取基因组（染色体）DNA，用适当的限制酶对此处理，然后以本发明的 DNA（如具有序列号 3 或 4 表示的序列的 DNA）或其一部分作为探针进行筛选，在严格条件下对杂交 DNA 进行选择、分离的方法。在含有具有改变的 DNA 的克隆的基因组（染色体）DNA 基因文库能够利用的情况下，以本发明的 DNA（如具有序列号 3 表示的序列的 DNA）或其一

部分作为探针，在严格条件下通过对该基因文库进行筛选也可以得到改变的DNA。

与上述本发明的DNA（如具有序列号3或4表示的序列的DNA或者在其上附加上述变化而得到的DNA）在严格条件下杂交，并且其编码的蛋白质具有磷脂酶A₂功能的DNA也可视为本发明的DNA。这里所说的“严格条件”，就是指能够形成特异性杂交化物、而不能形成非特异性杂交化物的条件。严格条件根据序列的长短、构成碱基的种类的不同而变动，例如使用杂交溶液（50%甲醛、10×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, PH 7.0)、5×Denhardt 溶液、1% SDS、10% 硫酸葡聚糖、10 μg/ml 的变性鲑精子DNA、50mM 磷酸缓冲液(PH 7.5))在42℃温育，然后使用0.1×SSC、0.1% SDS 在68℃洗净的条件。更优选的严格条件是，可以例示为使用的杂交液为50%甲醛、5×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, PH 7.0)、1×Denhardt 溶液、1% SDS、10% 硫酸葡聚糖、10 μg/ml 的变性鲑精子DNA、50mM 磷酸缓冲液(PH 7.5)。

（载体）

本发明的另外的方面是提供携带上述本发明DNA（包括改变的DNA）的载体。这样的载体是通过把本发明的DNA载入现有的载体或载入对现有的载体实施改变后的载体内而制作的。原则上只要能够携带本发明的DNA，任何载体都可作为起始材料，但可根据使用目的（克隆、聚肽的表达）的需要，以及考虑宿主细胞的种类来选择适当的载体。本发明的DNA向载体内载入的方法，可通过用限制酶及DNA连接酶的公知方法（Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）来进行制作。

此外，在构建携带有包括启动子区在内的DNA（如具有序列号5、6、8任一项所表示的序列的DNA）的载体时，可以容易地把该DNA的启动子区和其他区分开，再分别把它们载入载体内以构建重组载体。在这种情况下，以启动子能够确切地发挥其功能为条件，在载体内的两者（启动子区和其他

区)之间也可以介入其他序列。此外,也可以先构建携带启动子区的载体,然后再与其他区连结。

转化用的载体中,典型的是携带有磷脂酶 A2 基因(如具有序列号 3 表示的序列的 DNA)、启动子以及终止子。为确保启动子操纵的结构基因实现确切的转录,按照从上游到下游的顺序配置启动子、磷脂酶 A2 基因及终止子。载体内也可以含有具有选择标记或增强子功能的序列以及对信号肽进行编码的序列。

(转化体)

转化用的载体能够用于丝状菌的转化。即、使用上述转化用的载体,能够构建丝状菌的转化体的制备方法。根据所述的制备方法,可以得到从外部导入本发明的 DNA 的丝状菌。这样得到的丝状菌的转化体能够用于磷脂酶 A2 的生产。具体来说,在该 DNA 编码的蛋白质(磷脂酶 A2)能够表达的条件下,培养从外部导入本发明的 DNA 的丝状菌的转化体,能够产生磷脂酶 A2。根据使用的宿主的不同,选择适当的物质作培养基,例如可以使用市售的各种培养基或在其中添加了精氨酸、尿苷等转化体的生长发育、选择、促进蛋白质表达等所必须的成分的培养基。

可以从经过一定时间培养之后的培养液或菌体中回收目的蛋白质(磷脂酶 A2)。产生到菌体外时可以从培养液中回收,除此之外可以从菌体内回收。从培养液中回收的情况下,例如可以通过过滤培养上清液、离心分离除去不溶物,然后使用硫酸铵沉淀等盐析、透析、各种层析法等组合来进行分离、精制而得到目的蛋白质。另一方面,从菌体内回收的情况下,例如可以对菌体进行加压处理、超声波处理等使其破碎后,采取与上述同样的方法进行分离、精制而得到目的蛋白质。此外,也可以在经过过滤、离心分离等从预先制备的培养液中回收菌体后,实施上述一连串的工序(菌体的破碎、分离、精制)。此外,本发明的磷脂酶 A2 通常是产生到菌体外的,所以其分离、精制都比较容易。

用于转化的宿主丝状菌的种类没有特别的限制,可以使用曲霉属(米曲

霉、黑曲霉、构巢曲霉、酱油曲霉、泡盛曲霉、白曲霉、寄生曲霉、黄曲霉、*Aspergillus.nomius*、烟曲霉等)、青霉属、木霉属、根霉属、毛霉菌属、或镰孢(霉)属等分类出来的丝状菌。优选使用曲霉属丝状菌,其中因为米曲霉或黑曲霉的安全性高,所以优选。

可以利用公知的方法实施转化用的载体向宿主丝状菌内导入(转化)。例如可以根据使用原生质体化菌的 Turner 等的方法(Gene,36,321-331(1985))进行导入,此外也可以采用五味等的方法(Agric.Biol.Chem.,51, 323-328(1987))等导入。

[实施例]

下面通过实施例对本发明作更加详细的说明,但是本发明并不仅仅限于实施例的内容。并且实施例中对各种基因的操作根据上述 Current protocols in molecular biology(edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987)所记载的方法实施。

[实施例 1] 全基因组鸟枪法基因文库的制作方法

1. 插入方的制备

(1) 染色体 DNA 的制备

将丝状菌 *Aspergillus oryzae* RIB-40 株(ATCC 42149)的孢子接种在 YPD 培养基 (0.5% Yeast extract, 1% Peptone, 2% Glucose) 上, 30℃振荡培养过夜,然后根据饭村的方法(Agric. Biol. Chem. 323-328, 51 (1987)) 提取基因组 DNA。为了除去混在基因组 DNA 中的线粒体 DNA,参照 Watson 等的方法(Methods Enzymol. 57-75 118(1986)), 使用氯化铯超速离心,精制成只有染色体 DNA。

(2) 染色体 DNA 的片断化

把制备的纯净的染色体 DNA 放入随机化 DNA 片断装置 HydroShear(トミ-精工) 内,使染色体 DNA 变成 1-2kb 左右的片断。

(3) 片断化的 DNA 的末端处理

对片断化的染色体 DNA 进行 BAL31 核酸酶(TAKARA)处理, 然后实施 Klenow Fragment (TAKARA)处理使末端平滑。

(4) 向末端附加 Adaptor

在末端平滑的染色体 DNA 片断的两端, 使用 T4 DNA Ligase (TAKARA) 连接具有 (p)5'-CGAGAGCGGCCGCTAC-3' 和 (p)5'-GTAGCGGCCGCTC-3'的连接物。

2.转化

用限制酶 Sal I (TAKARA)把 pUC19 切断后, 通过 Taq DNA 聚合酶(ロシユ. ダイアグノステイクス)把 dT 插入到 Sal I 切断的部分。如此制作的质粒通过 Alkaline Phosphatase(TAKARA)处理, 脱磷酸化后作为载体使用。利用 T4 DNA Ligase 将载体和上述制备的染色体 DNA 片断进行连结, 利用电穿孔法在大肠菌 DH10B(Gibco)上进行转化。

3.碱基序列的确定

对于质粒 DNA, 将大肠菌转化体在培养基 2xYP 上培养, 37℃培养 10 小时, 集菌后在灭菌水中 99℃加热处理 10 分钟。把该上清液作为 DNA 模板水溶液使用, 通过实施 98℃20 秒、68℃2 分钟的 30 个循环的 PCR 反应, 测序用引物将包括复性部位在内的插入片断的全长扩增。将制得的 DNA 片断作为桑格法的模板, 使用 M13 通用引物或 M13 逆向引物和 Perkin Elmer 公司制造的 PRISM Dye-Terminator DNA 测序试剂盒, 参照试剂盒附加的说明书实施测序反应。对于测序反应的产物, 使用凝胶过滤法等除去未反应的 Dye-terminator 后, 使用 Perkin Elmer 公司制造的 3700 DNA sequencer 解读 DNA 片断的碱基序列。利用 Phred(phil Green)对 3700 DNA sequencer 输出波形数据进行再解析, 除去载体和连接物序列后, 使用 SPS Phrap(Southwest Parallel Software 公司)进行集成汇编, 构建曲霉菌基因组 DNA 碱基序列的重叠群。

[实施例 2] 基因的鉴定

采用下述方法从基因组 DNA 碱基序列中鉴定基因。基因的鉴定方法，对于基因组 DNA 碱基序列的重叠群，参考已经得到的 EST 序列的信息以及与已知蛋白质氨基酸序列数据库的同源性信息，采用以浅井洁等的算法(Pacific Symposium on Biocomputing 98,228-239)为基础的基因区域的预测系统 GeneDecoder 和后藤修的算法(Bioinformatics 2000 16:190-202.)为基础的基因区域的预测系统 ALN 的组合来鉴定基因。另外，采用 tRNA-scan 预测 tRNA 基因。

第1 “BLAST 同源性基因候补区域的提取”

从基因组 DNA 的碱基序列的重叠群中提取出与已知蛋白质的氨基酸序列具有高度同源性的区域。根据 Karlin and Altschul 的 BLAST 算法(Proc. Natl. Acad. Sei. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993) 可以确定氨基酸序列的同源性，而以该算法为基础开发出的被称为 BLASTX 的程序(Altschul et al. J. Mol. Biol.215:403-410, 1990)，在基因组 DNA 的碱基序列被翻译成氨基酸序列时能够直接检索出同源性高的区域。具体的解析方法是公知的(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。本方法中，以基因组 DNA 的碱基序列的重叠群为查询序列，以 SWISSPROT 版 39(Bairoch, A. &Apweiler,R.Nucleic Acids Res.28,45-48(2000).)以及 NRaa 为数据库，实施 BLASTX 检索，提取出 BLAST 算法中的同源性指标 E-value 为 10^{-30} 或更小(E-value 的数值越小表示同源性越高)的区域。在这些区域中，使同源性更高的部分优先，提取出相互不重叠的 BLAST 同源性基因的候补区域。

第2 “提取 ALN 基因的候补区域”

在 BLAST 同源性基因的候补区域中，以相对于同源性对象的蛋白质的氨基酸序列的全长的 90%的区域具有同源性的序列为核心，运用基因区域预测系统 ALN, 对重叠群序列提取出 ALN 基因的候补区域。ALN 通过对同源性对象的蛋白质的氨基酸序列的全长与重叠群序列进行整列和确定剪接部位，来预测基因区域。

第3 “GD 同源性基因候补区域的提取”

在 BLAST 同源性基因的候补区域中，以相对于同源性对象的蛋白质的氨基酸序列的残余长度的 20%或更高、不足 90%的区域中具有同源性的序列为核心，运用基因区域预测系统 GeneDecoder，对重叠群序列提取出 GD 同源性基因的候补区域。GeneDecoder 統合了 BLASTX 的 E-value 和蛋白质编码区的指向性指标的 2 组密码子统计量，进一步参考根据以剪接部位的位置为依据的一阶马尔科夫模型（マルコフモデル）的得分，预测基因区域。

第4 “EST-GD 基因候补区域的提取”

对于与重叠群序列相对应的 EST 确定的基因表达区域，在该区域附近的重叠群序列中通过运用 GeneDecoder，不仅能预测 EST 序列确定的基因区域，而且能够预测基因的全部区域，把此区域作为 EST-GD 基因的候补区域。

第5 “一般的 GD 基因的候补区域的提取”

对于没有被第 1 到第 4 的基因候补区域所包括的重叠群序列，通过运用 GeneDecoder 预测基因区域。

第6 “tRNA 基因的候补区域的提取”

在全部的重叠群序列中使用 tRNA-scan，提取 tRNA 基因的候补区域。

第7 “基因候补区域的统合”

根据下述步骤，统合第 2 到第 6 的基因候补区域。首先，从第 2 到第 6 的基因的候补区域中除去预测与 EST 确定的剪接部位相矛盾的基因区域，把残留的基因候补区域通过除去互相重合的部分后进行统合。此时，优先按照 tRNA、ALN 同源性基因候补区域、GD 同源性基因候补区域、GD-EST 基因候补区域、一般的 GD 基因候补区域的顺序统合。把这种被统合的基因候补区域作为预测基因的组合。

根据上述操作步骤，从同源性的观点看，按照与已知蛋白质的全部长度

具有同源性的基因、与已知蛋白质部分地具有同源性的基因、与已知蛋白质不具有同源性的基因这样的顺序的可信性，来保证能够准确鉴定这些基因。此外，从表达的确定性来看，按照根据 EST 确定的表达基因、根据 EST 序列没有确定的表达基因的顺序的可信性，来保证能够准确鉴定这些基因，同时要保证所有的候补基因与用 EST 确定的剪接部位不相矛盾。

使用的方法是采用了蛋白质的编码区全部不能包括起始密码子和终止密码子的算法，这样把伪基因预测为正常基因的可能性小。

关于功能确定，对于预测到的基因区域通过以 Nraa 作为数据库的 BLAST 进行同源性检索，以鉴定功能用的充分同源性(E-value 10^{-30})作为域值来确定功能。

实施例 3 对磷脂酶 A2 进行编码序列的检索

以来自于 *Helicosporium* sp.的磷脂酶 A2 基因的 DNA 序列为基础，以曲霉菌基因组 DNA 中的全部 DNA 序列为对象，实施 NCBI 提供的 BLAST 检索(Standard protein-protein BLAST:blastp)。其结果是成功发现了 2 个与来自于 *Helicosporium* sp.磷脂酶 A2 有高度同源性的区域。其中的 1 个区域，在鉴定上述基因时预测其中多少具有一些功能的序列，但还没有推定出它的功能。并且，该基因的编码区(推定是磷脂酶 A2-spaA 编码区)用序列号 3 表示。此外，该区域编码的氨基酸序列用序列号 1 表示。

另一方面，另一个区域(序列)，当初预测其具有翻译(translation)功能，存在于没有得到功能推定的序列内部。并且，当初预测该序列是由与本次推定的氨基酸序列完全不同的 624 个氨基酸残基组成的蛋白质的编码序列，但通过本次研究发现了与来自于其他丝状菌的磷脂酶 A2 的氨基酸序列同源性更高的 160 个氨基酸序列(序列号 2)的编码序列。对该氨基酸序列编码的碱基序列用序列号 7(推定是磷脂酶 A2-spaB 的编码区域)表示(包含内含子的序列在序列号 4 中表示)。另外，至于出现这样的区别，是由于在当初的预测中没有正确地进行内含子的推定。此外，考虑到链孢菌属(*ノイロスボラ*

クラッサ)中存在有2种磷脂酶A2基因(GenBank 数据库:ACCESSION NO. NCU06650, NCU09423), 所以预测本基因组序列中也存在除上述序列(序列号3)之外的别的磷脂酶A2基因, 在该预测的基础上进行的反复研究是成功发现该氨基酸序列(序列号2)的原因之一。

为了解析上述鉴定的2个区域(序列)的功能, 实施了下述实验。

实施例4 染色体DNA的制备

将米曲霉(*Aspergillus oryzae*)RIB-40株放入装有200ml的DPY培养基(2%糊精、1%聚脲、0.5%酵母提取液、0.5%KH₂PO₄、0.05%MgSO₄·7H₂O、PH 5.5)的三角烧瓶中, 30℃培养2天; 使用布氏漏斗和空吸滤瓶过滤培养液, 得到菌体; 用研钵、研棒将被液态氮冷冻的菌体破碎, 然后加入20ml Sol I (50mM EDTA、0.5%SDS、0.1mg/ml Proteinase K、PH 8.0), 50℃温育4小时。接着用苯酚处理2次、苯酚·氯仿处理1次、氯仿处理1次(离心分离的条件为3500rpm、15分钟、4℃), 在上清液中加入其量的1/10的3M醋酸钠(PH 5.2)和等量的异丙醇, 冷却一个晚上; 在3500rpm、4℃时离心分离20分钟, 用70%的乙醇溶液清洗沉淀后, 再把其溶解于TE(10 mM Tris-HCl(PH8.0)、1mM EDTA)溶液中; 接着, 使RNase A成为10 μg/ml, 37℃温育30分钟; 加入等量的苯酚·氯仿混合后, 在3500rpm、4℃时离心分离20分钟, 回收上层液; 在上层液中加入其量的1/10的3M醋酸钠(PH 5.2)和2.5倍量的乙醇, 在3500rpm、4℃时离心分离20分钟得到沉淀, 将其作为染色体DNA溶液。

实施例5 磷脂酶A2基因的制备

在实施例3得到的曲霉菌基因组DNA重叠群序列信息的基础上, 以实施例4得到的曲霉菌基因组DNA为模板, 克隆磷脂酶A2-spaA及磷脂酶A2-spaB基因。将预测为各个目的基因(推定磷脂酶A2-spaA及磷脂酶A2-spaB基因)的起始密码子到终止密码子的DNA片断进行扩增的引物对设计如下。

磷脂酶 A2-spaA 基因用引物:

Ao1724s 5'-cagcgaattcATGAAGAACATCTTCGTTGC-3'(序列号 9)

Ao1724as 5'-cagcgaattcCTACAGGTTTTCAATATCGT-3'(序列号 10)

对于磷脂酶 A2-spaB 基因,在来自于链孢菌属(ノイロスポラクラッサ)的 2 种磷脂酶 A2 基因 (GenBank 数据库 :ACCESSION NO.NCU06650,NCU09423)内分别发现了内含子,假定在本基因内的相当于同样的位置也存在内含子,那么比来自于其他微生物的磷脂酶 A2 的氨基酸序列的同源性更高。考虑到这些因素,磷脂酶 A2-spaB 基因扩增用的引物设计如下。

磷脂酶 A2-spaB 基因用的引物:

Ao0940s 5'-cagcgaattcATGAAGGCTAACAGCTTTCT-3'(序列号 11)

Ao0940as 5'-gcgcgaattccaaggtctcatatatgtatc-3'(序列号 12)

此外,上述 4 个引物中下划线部分表示限制酶 EcoRI 识别部位,大写字母分别表示蛋白质编码区域。

使用上述引物对实施 PCR 反应,并且,反应液的组成如下所示。

灭菌水: 29.75 μ l

rTaq DNA Polymerase 用 10x 缓冲液: 5 μ l

2mM dNTP 溶液: 5 μ l

10 pmol/ μ l Ao1724s 或 Ao0940s: 2.5 μ l

10 pmol/ μ l Ao1724as 或 Ao0940as: 2.5 μ l

60ng/ μ l RIB40 基因组 DNA: 5 μ l

5U/ μ l rTaq DNA Polymerase (宝酒造公司): 0.25 μ l/50 μ l

采用 MJ research 公司制造的 PTC-100 型 PCR 装置,将上述反应液在上述条件下实施 PCR 反应。

(1) 94℃ 1 分钟 (2) 94℃30 秒、50℃30 秒、72℃2 分钟的循环进行 30 次循环 (3) 4℃放置

PCR 反应的结果,有约 670 bp 及约 700bp 的 DNA 片断分别得到特异

性扩增,琼脂糖凝胶电泳后使用 GeneClonIII(BIO 101 公司)提取扩增的 DNA 片断。把提取的 DNA 片断在 PT7-Blue(Novagen 公司)里进行连接反应,利用常规方法确定碱基序列。

实施例 6 氨基酸序列的解析

对实施例 5 得到的碱基序列进行解析,解析结果证明,该碱基序列是对蛋白质进行编码的 DNA (序列号 3 和 4),该蛋白质与以前报告的来自于微生物的磷脂酶 A2 的氨基酸序列有约 35%~约 55%的同源性,把各 DNA 作为 spaA 和 spaB 基因。由前者编码的推定磷脂酶 A2-spaA 全长含有 222 个氨基酸,除去由 SMART(Schultz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857-5864(1998); Letunic et al., Nucleic Acids Res. 30,242-244(2002);<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测的信号序列区域(19 个氨基酸)后的分子量是 23.4kDa,含有 6 个半胱氨酸。另一方面,由 spaB 基因编码的推定磷脂酶 A2-spaB 全长含有 160 个氨基酸,除去上述由 SMART 预测的信号区域(17 个氨基酸)后的分子量是 16.4kDa,含有 4 个半胱氨酸。此外发现任一种酶都含有与分泌型磷脂酶 A2 共同的活性中心的 His-Asp 配对序列。

实施例 7 曲霉菌表达载体-pNGspaA 的构建

接着,为了在曲霉菌中表达磷脂酶 A2-spaA 构建了质粒 pNGspaA。首先,对于实施例 5 得到的、在 pT7-Blue 中克隆的磷脂酶 A2-spaA 基因,用限制酶 Hind III Xba I (宝酒造公司)把它消化成约 670 bp 的 DNA 片断后切出,作为插入 DNA。另一方面,用限制酶 HindIII Xba I (宝酒造公司)消化曲霉菌表达载体-pNGA142(Minetoki et al., Appl. Microbiol. Biotechnol.,50,459-467(1988)),该曲霉菌表达载体含有作为选择标记物的来自于曲霉菌的 niaD 基因、作为启动子的来自于曲霉菌的改良型葡萄糖淀粉酶基因的改良型启动子、作为终止子的来自于曲霉菌的 α -糖苷酶基因的终止子,然后使用 Alkaline Phosphatase(宝酒造公司)进行脱磷酸化,作为载体 DNA;利用 Ligation Kit ver.2(宝酒造公司)使上述得到的插入

DNA 和载体 DNA 进行连接反应, 利用此连接反应产物使大肠菌 DH5 α 株的感受态细胞 (TOYOBO 公司) 发生转化, 得到耐氨苄西林的转化体。把具有得到的克隆的质粒命名为 pNGspaA, 把其作为表达载体使用 (图 1)。

实施例 8 曲霉菌表达载体-pNGspaB 的构建

接着, 为了在曲霉菌中表达磷脂酶 A2-spaB 构建了质粒 pNGspaB。首先, 将实施例 5 得到的并且在 pT7-Blue 中克隆的磷脂酶 A2-spaB 基因, 用限制酶 HindIII Xba I (宝酒造公司) 把它消化成 700 bp 的 DNA 片断后切出, 作为插入 DNA; 另一方面, 用限制酶 Hind III Xba I (宝酒造公司) 消化曲霉菌表达载体 pNGA142 (Minetoki et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 459-467 (1988)), 该曲霉菌表达载体含有作为选择标记物的来自于曲霉菌的 niaD 基因、作为启动子的来自于曲霉菌的改良型葡萄糖淀粉酶基因的改良型启动子、作为终止子的来自于曲霉菌的 α -糖苷酶基因的终止子, 然后使用 Alkaline Phosphatase (宝酒造公司) 脱磷酸化, 作为载体 DNA; 利用 Ligation Kit ver.2 (宝酒造公司) 使上述调制的插入 DNA 和载体 DNA 进行连接反应, 利用此连接反应产物使大肠菌 DH5 α 株的感受态细胞 (TOYOBO 公司) 发生转化, 得到耐氨苄西林的转化体。把具有得到的克隆的质粒命名为 pNGspaB, 把其作为表达载体使用 (图 2)。

实施例 9 曲霉菌的转化

将硝酸还原酶缺损株米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) niaD 300 株 (*Aspergillus oryzae* RIB-40 株 (ATCC 42149) 的硝酸还原酶缺损变异株、Minetoki et al., Curr. Genet., 30, 432-438 (1996)) 放入糊精·胨培养基 (2% 糊精、1% 聚胨、0.5% KH_2PO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、PH 5.5) 中, 30°C 振荡培养 3 天; 然后用灭菌水把得到的菌体洗净; 把该菌体加入细胞壁溶解液 (10Mm 磷酸缓冲液、PH 6.0、0.8M NaCl、20mg/ml ヤタラーゼ (宝酒造公司)) 中使之发生悬浊, 30°C 缓慢振荡培养 2~3 小时, 发生原生质体化; 将得到的

原生质体通过玻璃过滤器过滤除去残存的菌体。

接着，通过五味等的方法(Agric.Biol.Chem.,51,323-328(1987))，利用该原生质体制备大肠杆菌感受态细胞以及利用 pNGA142(对照)、pNGspaA 或 pNGspaB 进行转化，以含有硝酸作为单一氮源的培养基，例如恰佩克培养基 (0.2%NaNO₃、0.1%KH₂PO₄、0.2%KCl、0.05%MgSO₄·7H₂O、0.002%FeSO₄·7H₂O、2%葡萄糖、PH 5.5)，对于每种质粒，分别取 4 株能够在这种培养基上生长发育的转化体，共取得 12 株。把来自于质粒 pNGA142、pNGspaA 或 pNGspaB 的转化体分别命名为载体 1~载体 4、SpaA-1~ SpaA- 4、SpaB-1~ SpaB -4。

实施例 10 用磷脂酶 A2-spaA 转化体表达磷脂酶 A2

将得到的磷脂酶 A2-spaA 的转化体在下述所示的 DPY 培养基上 30℃振荡培养 3 天，然后将培养液在室温、10,000×g 的条件下离心分离 10 分钟，得到培养上清液和菌体。用粉碎机(マルチビーズショッカー)(安井器械公司)破碎菌体，得到的悬浊液作为菌体破碎液。

〈DPY 培养基〉

2%糊精

1%聚脲

0.5%酵母提取液

0.5%KH₂PO₄

0.05%MgSO₄·7H₂O

PH 5.5

采用下述方法测定上述制备的培养上清液和菌体中磷脂酶 A2 的活性，结果确认，尤其是培养上清液中明显存在比对照株(即载体 1~载体 4 株)的活性更高的磷脂酶 A2 活性(图 3)。该结果可以明确证实取得的推定磷脂酶 A2-spaA 基因对磷脂酶 A2 进行编码。

(磷脂酶 A2 酶的活性测定方法)

磷脂酶 A2 的活性测定，采用对定量测定标识油酸的方法

(Elsbach,P.,and Weiss,J.(1991)Methods Enzymol.197,24-31)进行若干变更后的方法,该定量测定标识油酸的方法是定量测定从 in vivo 标识的大肠菌的膜上分离出的油酸。即、将由 2.5×10^8 的 $[^3\text{H}]$ 油酸标识后的高压蒸汽灭菌的大肠菌(500,000dpm)、25mM Tris-HCl 缓冲溶液(PH 7.5)和 10mM CaCl_2 及酶液组成的反应液(最终液量为 $100 \mu\text{l}$)、 30°C 温育 30 分钟,添加用冰冷却的 1%的牛血清白蛋白(W/V)后立刻离心分离($10,000 \times g$),用液体闪烁扫描计数器测量得到的上清液中的放射活性。根据本条件下测出的计数(H-DPM)求出酶的活性(H-DPM/ μg -protein)。采用下述方法制备 $[^3\text{H}]$ 油酸标识的大肠菌,将在营养培养基中 37°C 培养了 1 夜的 *Eshcericia coli* DH5 α 株的培养液 $100 \mu\text{l}$ 接种于含有 10ml 的 $5 \mu\text{Ci/ml}$ 的 $[^3\text{H}]$ 油酸的营养培养基内, 37°C 培养 3 小时。将该培养液在室温、 $3,000 \times g$ 的条件下离心分离 12 分钟,把收集到的菌体加入到 10ml 新鲜的上述培养基中使之悬浊, 37°C 培养 30 分钟。在室温、 $3,000 \times g$ 的条件下离心分离、收集菌体,用 5ml 的 1%的牛血清白蛋白(W/V)洗净,最后加入适量的蒸馏水使之成为 5×10^8 细胞/ml 悬浊液,作为 $[^3\text{H}]$ 油酸标识的大肠菌液。

实施例 11 用磷脂酶 A2-spaB 转化体表达磷脂酶 A2

利用磷脂酶 A2-spaB 转化体,通过实施与实施例 10 同样的培养及培养后的处理,得到 A2-spaB 转化体的培养上清液和菌体破碎液。此外,与磷脂酶 A2-spaA 转化体的情况相比, A2-spaB 转化体的生长发育大大受到抑制。认为可能是因为磷脂酶 A2-spaB 的大量表达对菌体产生的一些抑制效果所致。

对于取得的培养上清液和菌体破碎液,与磷脂酶 A2-spaA 的情况一样,测定磷脂酶 A2 的活性。其结果确认,尤其是菌体破碎液中明显存在比对照株(载体 1~载体 4 株)活性更高的磷脂酶 A2 活性(图 3)。该结果可以明确证实取得的推定磷脂酶 A2-spaB 基因对磷脂酶 A2 进行编码。

实施例 12 用磷脂酶 A2-spaA 的转化体表达的磷脂酶 A2 的精制

取 20ml 实施例 10 得到的磷脂酶 A2-spaA 的转化体的培养上清液，用 25mM Tris-HCl 缓冲液(PH7.4)将其稀释 10 倍，然后向用 25mM Tris-HCl 缓冲液(PH7.4)平衡过的 CM-纤维柱内进样，使用含有 0.1M、0.25M、0.5M、1.0M NaCl 的同样的缓冲液进行梯度洗脱，分别取 10 μ l 的各洗脱液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，再用考马斯亮蓝染色。结果在 NaCl 浓度为 0.5 M ~1.0 M 的溶出区域中检出了分子量约为 16kDa 的单一谱带(图 4)。测定得到的未吸附、0.25M NaCl、0.5M NaCl、1.0M NaCl 的各区域中的磷脂酶 A2 的活性。结果如图 5 所示，在 0.5M NaCl、1.0M NaCl 的各区域中检出了磷脂酶 A2 的活性，而在未吸附、0.25M NaCl 的区域中几乎没有检出磷脂酶 A2 的活性。因此可以证明，在 0.5M NaCl、1.0M NaCl 的区域中溶出的分子量约为 16kDa 的蛋白质就是磷脂酶 A2。

本发明并不限于上述发明的实施方式及实施例的说明内容，同领域的技术人员在不脱离本发明权利要求书所记载的范围内，容易想到的各种变形方式都包括在本发明的范围内。

产业利用的可能性

本发明能够提供来自于曲霉菌的磷脂酶 A2 及对其进行编码的 DNA。利用本发明的 DNA，能够构建使用安全性高的用丝状菌来生产磷脂酶 A2 的生产系统。

序列表

<110> 独立行政法人制品评价技术基盘机构
 独立行政法人产业技术综合研究所
 独立行政法人酒类综合研究所
 北本胜彦
 有冈学
 山口庄太郎
 町田雅之
 阿部敬悦
 五味胜也
 浅井洁
 佐野元昭
 金大心
 长崎英树
 细山哲
 秋田修
 小笠原直毅
 久原哲

<120> 来自于曲霉菌的磷脂酶 A2

<130> P0302001

<150> JP P2003-57565

<151> 2003-03-04

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 222

<212> PRT

<213> 米曲霉菌

<400> 1

Met Lys Asn Ile Phe Val Ala Thr Leu Gly Leu Phe Ala Ala Val Ser

1

5

10

15

Ser Ala Leu Pro Tyr Thr Thr Pro Val Asn Asp Asn Pro Ile Ser Ala

	20	25	30	
Leu Gln Ala Arg Ala Thr Thr Cys Ser Ala Lys Ala Thr Asp Asn Leu				
	35	40	45	
Ile Phe Lys Val Ser Met Lys Thr Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ala Lys				
	50	55	60	
Asn Pro Ser Lys Cys Asn Trp Ser Ser Asp Asn Cys Ser Lys Ser Pro				
65	70	75	80	
Asp Lys Pro Asp Gly Tyr Asn Phe Ile Pro Ser Cys Gln Arg His Asp				
	85	90	95	
Phe Gly Tyr Arg Asn Thr Lys Lys Gln Lys Arg Phe Thr Lys Ala Met				
	100	105	110	
Lys Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr Lys Tyr Cys				
	115	120	125	
Ser Gln Phe Ser Gly Trp Ser Ser Trp Lys Gly Val Glu Cys Arg Arg				
	130	135	140	
Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Thr Ala Val Arg His Phe Gly Lys Arg Asp				
145	150	155	160	
Glu Ala Leu Glu Phe Asp Pro Glu Val Glu Phe Glu Lys Arg Asp Glu				
	165	170	175	
Val Ala Asp Val Gln Pro Asp Glu Phe Asp Asn Phe Asp Gly Ser Glu				
	180	185	190	
Val Asp Pro Asp Ile Glu Gly Gln Val Ile Pro Glu Val Leu Glu Asp				

195	200	205
Asp Gly Val Asp Val Glu Asn Leu Asp Asp Ile Glu Asn Leu		
210	215	220
<210> 2		
<211> 160		
<212> PRT		
<213> 米曲霉菌		
<400> 2		
Met Lys Ala Asn Ser Phe Leu Ile Ala Leu Leu Pro Thr Ala Leu Ala		
1	5	10 15
Ile Pro Leu Pro Thr Pro Asn Glu Gly Ala Thr Ser Leu Ser Glu Ser		
20	25	30
Gln Arg Leu Gln Ser Ile Thr Asp Glu Leu Met Phe Gly Leu Glu Leu		
35	40	45
Pro Asp Phe Thr Ala Arg Arg Glu Ala Asn Asp Pro Pro Gln Leu Asp		
50	55	60
Trp Tyr Ser Asp Gly Cys Thr Arg Ala Pro Ser Asn Pro Leu Gly Phe		
65	70	75 80
Pro Phe Gln Arg Ala Cys Glu Arg His Asp Phe Gly Tyr Gln Asn Tyr		
85	90	95
Arg Ile Gln Gly Arg Phe Thr Lys Ala Ala Lys Ala Gln Ile Asp Leu		
100	105	110
Arg Phe Lys Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Cys Glu Leu Gly Arg Ala Val		
115	120	125

Gly Ile Cys Lys Lys Leu Ala Arg Leu Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly Arg
 130 135 140

His Gly Gly Lys Asp Ala Ala Lys Arg Arg Glu Leu Asp Glu Leu Leu
 145 150 155 160

<210> 3

<211> 669

<212> DNA

<213> 米曲霉菌

<400> 3

atgaagaaca tcttcgttgc cactttgggc ctgttcgccg cagtttcgtc tgccttgccc 60
 tacacaaccc ctgtcaatga caatcccatc tctgctttac aagcacgcgc gacaacatgc 120
 tcggccaagg ccacggataa cctcatcttc aaggtctcca tgaagacctt ccagaaggcg 180
 cgcaaggcca agaacccttc caagtgaac tggatcatcg acaactgctc caagtcaccc 240
 gataagcccg atggatacaa cttcatcccc agctgccaaa gacacgattt cggctaccgg 300
 aacacgaaga agcagaagcg cttcacaag gccatgaaga agcgcattga cgacaacttc 360
 aagaaggatc tctacaagta ctgcagccaa ttctcgggct ggagctcatg gaagggagtg 420
 gagtgccgtc gccttgccga tgtctactat actgctgtcc gccactttgg caagcgtgat 480
 gaagcgcttg agtttgacct tgaggttgag ttcgagaagc gtgatgaggt ggccgatgtc 540
 cagcctgacg aatttgataa ctttgacggt tctgaagtg accctgatat cgagggccag 600
 gtcattcccg aagttcttga agatgatgga gtggatgtgg agaacctga cgatattgaa 660
 aacctgtag
 669

<210> 4

<211> 593

<212> DNA

<213> 米曲霉菌

<400> 4

```

atgaaggcta acagctttct cattgccctc ctcccaaccg cctagccat cccctcccc    60
acaccaaata aaggcgctac aagcctctca gaaagccagc gcctccagtc tatcaccgac    120
gagcttatgt tcggcctcga gctgcccgcac ttacagctc gcagagaggc aaacgaccct    180
cctcagttag actggtactc tgatggctgc acaagggtc cgagtaacct tctcggttc    240
cccttcaaa gggcgtgtga acgcatgac ttcggttacc agaactaccg aatacaaggg    300
cgcttcacca aggccgcaaa agcgcagata gatcttagat tcaaagaaga gtatgatttc    360
ccttcgttc ctctcttc ccttgaatc tgcttctgt gattcttat gcagtggat    420
attgagagtc tggaggactg acgtttgatt cactgttag tcttactat caatgtgaat    480
taggacgcgc tgctggaatt tgcaagaagt tggctcggtt gtactaccgt gcttcggggc    540
ggcatggtgg taaagatgca gcgaagagaa gggagttgga tgaacttct tag          593

```

<210> 5

<211> 1969

<212> DNA

<213> 米曲霉菌

<220>

<221> 外显子

<222> (1001)..(1666)

<223>

<400> 5

```

tgacctcata tagaagtgc gccgggcca tgccaaaatt gaagcttta cgaagactaa    60
cctcggattt ttcttgga gagcttgacc tcgtattgcg tcaattgca caattatgc    120
ttcttgga aatatgcat attgaagaag tggcatgtat tgctgttagt gagttggat    180
acgtatcaaa atactcctaa taaccagcaa caaaagaaa atgtgagcac tgggtgaacc    240

```

```

gaattgtgtt atggcaggat agaattgaga atgggtttct tcagcggggg atcctccgat    300

gataaccttc tgagagctat tttagaatc aagggtcttc cagcttgacg atcatcttgg    360

catacacaag cactacagct gcacgacgat ggggctttac gagtcacgaa ggtaacccaa    420

gattcttcac tgagtcttgg catgcgagcc atgctcgtac ctggatccct tttgtctgga    480

atttactatt attggatacg ataatgcctt gatccagggt ccttttagaa ccaataggcc    540

actaaagctt acccgaggcc aatttatcct tcgaagtgaa tatgctcggg gcatttcagg    600

ttctgcagat cctgaagccc ttaccgtat cctgaatggg cttctcttct tctccaataa    660

tacgtcgagg gctttaatta tgttcgtgtt gagaactcgt aaagaaagac aaataggttc    720

ttggcgagag gggatagaat gcacacgctc cacaatgcgg cacagggaat gtgccagacg    780

atacagcaga atggggggcgg agcgagacgt agtttaccga gtacgaaata gcctcgttca    840

aggagacagt ccatggcaac cataagagtc attcgcgagt ataaagggca ggtaactcc    900

tgtcatgtag ctctctacag aatcatcaac aatctctctc cgcaagcadc acatctactt    960

cttattgcct attctgtccg agtgctagcc acttatcatc atg aag aac atc ttc    1015
                                     Met Lys Asn Ile Phe
                                     1             5

ggt gcc act ttg ggc ctg ttc gcc gca gtt tcg tct gcc ttg ccc tac    1063
Val Ala Thr Leu Gly Leu Phe Ala Ala Val Ser Ser Ala Leu Pro Tyr
          10             15             20

aca acc cct gtc aat gac aat ccc atc tct get tta caa gca cgc gcg    1111
Thr Thr Pro Val Asn Asp Asn Pro Ile Ser Ala Leu Gln Ala Arg Ala
          25             30             35

aca aca tgc tcg gcc aag gcc acg gat aac ctc atc ttc aag gtc tcc    1159
Thr Thr Cys Ser Ala Lys Ala Thr Asp Asn Leu Ile Phe Lys Val Ser
          40             45             50

atg aag acc ttc cag aag gcg cgc aag gcc aag aac ccc tcc aag tgc    1207
Met Lys Thr Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ala Lys Asn Pro Ser Lys Cys
          55             60             65

```

aac tgg tca tcg gac aac tgc tcc aag tca ccc gat aag ccc gat gga 1255
 Asn Trp Ser Ser Asp Asn Cys Ser Lys Ser Pro Asp Lys Pro Asp Gly
 70 75 80 85

tac aac ttc atc ccc agc tgc caa aga cac gat ttc ggc tac cgg aac 1303
 Tyr Asn Phe Ile Pro Ser Cys Gln Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn
 90 95 100

acg aag aag cag aag cgc ttc aca aag gcc atg aag aag cgc att gac 1351
 Thr Lys Lys Gln Lys Arg Phe Thr Lys Ala Met Lys Lys Arg Ile Asp
 105 110 115

gac aac ttc aag aag gat ctc tac aag tac tgc agc caa ttc tcg ggc 1399
 Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr Lys Tyr Cys Ser Gln Phe Ser Gly
 120 125 130

tgg agc tca tgg aag gga gtg gag tgc cgt cgc ctt gcg gat gtc tac 1447
 Trp Ser Ser Trp Lys Gly Val Glu Cys Arg Arg Leu Ala Asp Val Tyr
 135 140 145

tat act gct gtc cgc cac ttt ggc aag cgt gat gaa gcg ctt gag ttt 1495
 Tyr Thr Ala Val Arg His Phe Gly Lys Arg Asp Glu Ala Leu Glu Phe
 150 155 160 165

gac cct gag gtt gag ttc gag aag cgt gat gag gtg gcc gat gtc cag 1543
 Asp Pro Glu Val Glu Phe Glu Lys Arg Asp Glu Val Ala Asp Val Gln
 170 175 180

cct gac gaa ttt gat aac ttt gac ggt tct gaa gtt gac cct gat atc 1591
 Pro Asp Glu Phe Asp Asn Phe Asp Gly Ser Glu Val Asp Pro Asp Ile
 185 190 195

gag ggc cag gtc att ccc gaa gtt ctt gaa gat gat gga gtg gat gtg 1639
 Glu Gly Gln Val Ile Pro Glu Val Leu Glu Asp Asp Gly Val Asp Val
 200 205 210

gag aac ctc gac gat att gaa aac ctg taggttttcg gcattggctc 1686
 Glu Asn Leu Asp Asp Ile Glu Asn Leu
 215 220

tacactttgc aaatgggtcg tcataatcca ttggaagccg gaggaggagg gaaatcaagg 1746

catcttttgg ttgtcagtaa ctttgagtgc ctagtgttg aattgtttt tgaggttcta 1806

ttgaattct gctttgttc aatcttatag cttctacgt tgtgtcatt taaaaatgga 1866
 caggagtatc tgtgagattt ttgacttgaa atcagtagca gtcaaccaat aaaagaatag 1926
 caaatgcttc taccaatctt tggatctagt acataagtag aca 1969

 <210> 6
 <211> 1893
 <212> DNA
 <213> 米曲霉菌

 <220>
 <221> 外显子
 <222> (1001)..(1350)
 <223>

 <220>
 <221> 外显子
 <222> (1461)..(1590)
 <223>

 <400> 6
 atttatgcgc gatttatatg ctgtatcagg cgcccggatg gctttggcag tagccgacgg 60
 cagacgacgg tgaatggaat gcaaggaaga gggggattta gcactcactc ttcacaaagt 120
 tcaccacgac gctcaagagc cggcgcaaat gatcgcaggt gcggcttggg atgagcgaat 180
 gctgaaacac tcctcagaca cggggtcgaa cgagaggggg gattgaggag atggtatcca 240
 ggatggagtg gtggaggaag aagaggtgaa agtcggaagt aattataaa ggctgcgatt 300
 ccgcgcgatt ccattactc cagccaagc ctgattgcc tcttcggaa tggctccta 360
 tcgacctta agcaaaaacg gtaagaaatg gcagaatctc tgctgcccc cgagctgttt 420
 ctccggttcc gatctatgtt ctacatctat acatcaagca gacctacca atatcctcaa 480
 agggaagcag tgcctattat gctctattct ctaatgatta tctggcatta gccttgttga 540
 ttggaatgct ccgccaatgg accagactaa agagtatgac tcaggctaaa agtcttcgct 600
 acaatccaag gcttgctgga atcagtcgcg ttgtgggtca agctggtaat ccaatggact 660

ggagcatgta atatttgggt cagcgggggtg tgggggatta agcgggctac actagggcat 720
 gtcactactg cgatgcgttg acgtctacgc caggcaagaa agactgagat catttcaca 780
 taggtagcat ctgaccacaa atagaaagag cattaggtc tctctctc tctctctc 840
 tctctctc tctctctatg ttccagttcc acaagctctt atcagtatat cgtatacggc 900
 tctcatacgt ctatatatca ttcttgggt gctacaagct tctatcttct atttgtgctt 960
 gacaagccaa cccccaactc ttataaccc ctataacgca atg aag gct aac agc 1015
 Met Lys Ala Asn Ser
 1 5
 ttt ctc att gcc ctc ctc cca acc gcc cta gcc atc ccc ctc ccc aca 1063
 Phe Leu Ile Ala Leu Leu Pro Thr Ala Leu Ala Ile Pro Leu Pro Thr
 10 15 20
 cca aat gaa ggc gct aca agc ctc tca gaa agc cag cgc ctc cag tct 1111
 Pro Asn Glu Gly Ala Thr Ser Leu Ser Glu Ser Gln Arg Leu Gln Ser
 25 30 35
 atc acc gac gag ctt atg ttc ggc ctc gag ctg ccc gac ttc aca gct 1159
 Ile Thr Asp Glu Leu Met Phe Gly Leu Glu Leu Pro Asp Phe Thr Ala
 40 45 50
 cgc aga gag gca aac gac cct cct cag tta gac tgg tac tct gat ggc 1207
 Arg Arg Glu Ala Asn Asp Pro Pro Gln Leu Asp Trp Tyr Ser Asp Gly
 55 60 65
 tgc aca agg gct ccg agt aac cct ctc gga ttc ccc ttt caa agg gcg 1255
 Cys Thr Arg Ala Pro Ser Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Gln Arg Ala
 70 75 80 85
 tgt gaa cgc cat gac ttc ggt tac cag aac tac cga ata caa ggg cgc 1303
 Cys Glu Arg His Asp Phe Gly Tyr Gln Asn Tyr Arg Ile Gln Gly Arg
 90 95 100
 ttc acc aag gcc gca aaa gcg cag ata gat ctt aga ttc aaa gaa ga 1350
 Phe Thr Lys Ala Ala Lys Ala Gln Ile Asp Leu Arg Phe Lys Glu Asp
 105 110 115
 gtatgatttc ccttcgttc cttcctctc ccctggaatc tgcttctgtt gattcttatg 1410

gcagttggat attgagagtc tggaggactg acgtttgatt cactgttttag t ctt tac 1467
Leu Tyr

tat caa tgt gaa tta gga cgc gct gtc gga att tgc aag aag ttg gct 1515
Tyr Gln Cys Glu Leu Gly Arg Ala Val Gly Ile Cys Lys Lys Leu Ala
120 125 130 135

cgg ttg tac tac cgt gct tcg ggg cgg cat ggt ggt aaa gat gca gcg 1563
Arg Leu Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly Arg His Gly Gly Lys Asp Ala Ala
140 145 150

aag aga agg gag ttg gat gaa ctt ctt taggtatagg tgcaaaagac 1610
Lys Arg Arg Glu Leu Asp Glu Leu Leu
155 160

gcccagtaaa ggggagtcac cacctttgtt aataacatga tacatatatg agaccttgag 1670

tggaacgga ccacgaagtc tgacctgcat tataagacac aatcttacc tgaacaacaa 1730

cagatagatt cagagatttt gcataacatg ttgacggatt aaatgtacta ctgtccaggg 1790

ttgtatctat cacaagctag cataaccatc tgaatattgt tgtccagatc acccagatga 1850

ggtacttatt ctccacgta acacttcttg cgtatggatt tca 1893

<210> 7

<211> 482

<212> DNA

<213> 米曲霉菌

<400> 7

atgaaggcta acagctttct cattgccctc ctcccaaccg ccctagccat cccctcccc 60

acaccaaagtg aaggcgctac aagcctctca gaaagccagc gcctccagtc tatcaccgac 120

gagcttatgt toggcctcga gctgcccagc ttcacagctc gcagagaggc aaacgaccct 180

cctcagttag actgggtactc tgatggctgc acaagggtc cgagtaaccc tctcggattc 240

ccctttcaaa gggcgtgtga acgcatgac ttcggttacc agaactaccg aatacaaggg 300

cgcttcacca aggccgcaaa agcgagata gatcttagat tcaaagaaga ctttactatc 360

aatgtgaatt aggacgcgct gtcggaattt gcaagaagtt ggctcgggtg tactaccgtg 420

cttcggggcg gcatggtggt aaagatgcag cgaagagaag ggagttggat gaactcttt 480

ag
482

<210> 8

<211> 1782

<212> DNA

<213> 米曲霉菌

<400> 8

atttatgcgc gatttatatg ctgtatcagg cgcccggatg gctttggcag tagccgacgg 60

cagacgacgg tgaatggaat gcaaggaaga gggggattta gcactcactc ttcacaaagt 120

tcaccacgac gctcaagagc cggcgcaaat gatcgcaggt gcggcttggg atgagcgaat 180

gctgaaacac tcctcagaca cggggtcgaa cgagaggggg gattgaggag atggtatcca 240

ggatggagtg gtggaggaag aagaggtgaa agtcggaagt aatttataaa ggctgcgatt 300

ccgcgcgatt ccattactc cacgccaagc ctagattgcc tcttcggaa tggctccta 360

tcgacctcta agcaaaaacg gtaagaaatg gcagaatctc tgcctgcccc cgagctgttt 420

ctccggttcc gatctatgtt ctacatctat acatcaagca gacctacca atatcctcaa 480

agggaagcag tgcctattat gctctattct ctaatgatta tctggcatta gccttgttga 540

ttggaatgct ccgccaatgg accagactaa agagtatgac tcaggctaaa agtcttgcgt 600

acaatccaag gcttgcctga atcagtcgcg ttgttggtca agctggtaat ccaatggact 660

ggagcatgta atattgggt cagcgggggtg tgggggatta agcgggctac actagggcat 720

gtcatcactg cgatgcgttg acgtctacgc caggcaagaa agactgagat catttcaca 780

taggtagcat ctgaccacaa atagaaagag cattaggctc tctctctctc tctctctctc 840

tctctctctc tctctctatg ttccagttcc acaagctctt atcagtatat cgtatacggc 900
 tctcatacgt ctatatatca ttctgggggt gctacaagct tctatcttct atttgtgctt 960
 gacaagccaa cccccaacte tctataaccc ctataacgca atgaaggcta acagctttct 1020
 cattgccctc ctccaacccg ccctagccat cccctcccc acaccaaagtg aaggcgctac 1080
 aagcctctca gaaagccagc gcctccagtc taccacgac gagcttatgt tcggcctcga 1140
 gctgcccagc ttacagctc gcagagaggc aaacgaccct cctcagttag actggtactc 1200
 tgatggctgc acaagggctc cgagtaaccc tctcggttc cctttcaaa gggcgtgtga 1260
 acgccatgac ttcggttacc agaactaccg aatacaaggg cgcttcacca aggccgcaaa 1320
 agcgcagata gatcttagat tcaaagaaga cttactatc aatgtgaatt aggacgcgt 1380
 gtcggaattt gcaagaagtt ggctcggttg tactaccgtg cttcggggcg gcatggtggt 1440
 aaagatgcag cgaagagaag ggagttggat gaactcttt aggtataggt gcaaaagacg 1500
 cccagtaaag gggagtcacc acctttgta ataacatgat acatatatga gacctgagt 1560
 ggcaacggac cacgaagtct gacctgcatt ataagacaca atcttaccct gaacaacaac 1620
 agatagattc agagattttg cataacatgt tgacggatta aatgtactac tgtccagggt 1680
 tgatatctac acaagctagc ataaccatct gaatttgtt gtccagatca cccagatgag 1740
 gtacttattc ttccacgtaa cacttcttgc gtatggattt ca 1782

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400> 9

cacggaattc atgaagaaca tcttcgttgc

30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 10
cagcgaattc ctacagggtt tcaatatcgt

30

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 11
cacggaattc atgaaggcta acagctttct

30

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 12
cagcgaattc tcaacagaag cagattccag

30

图1

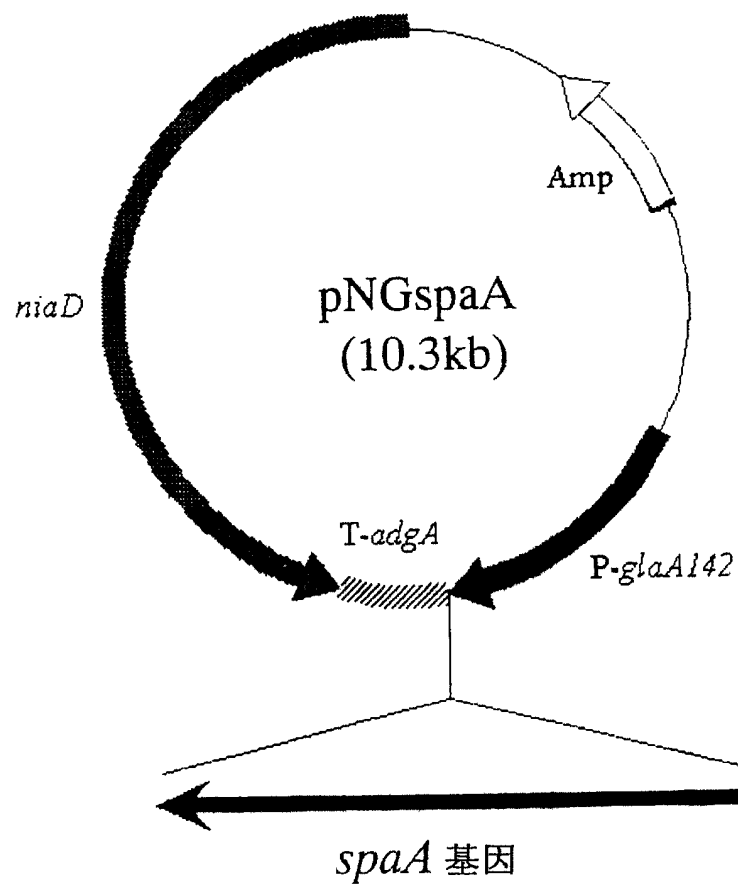


图2

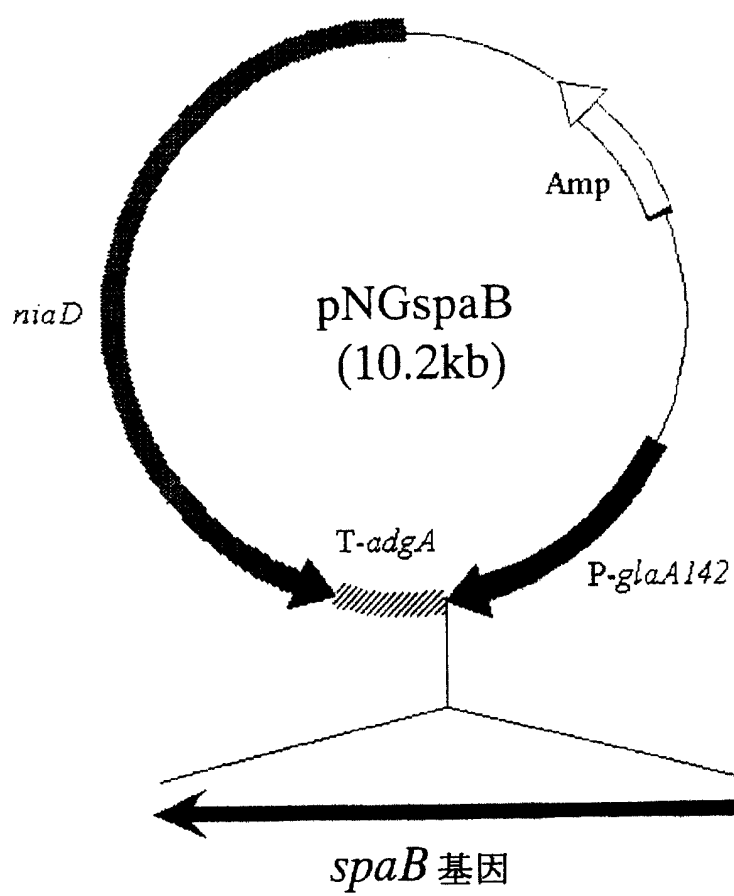


图3

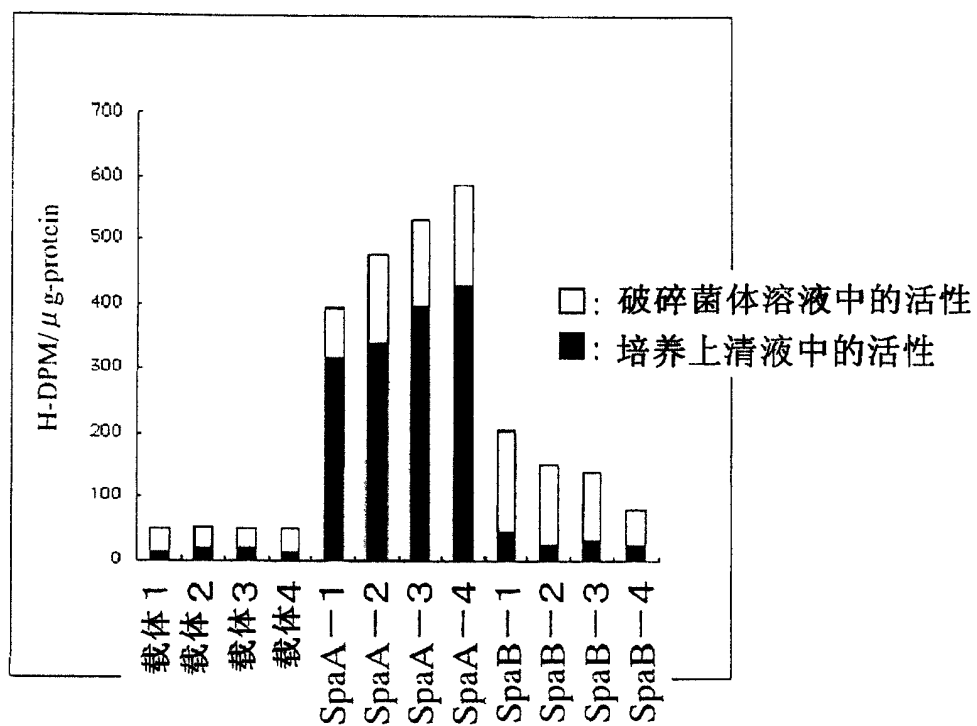


图4

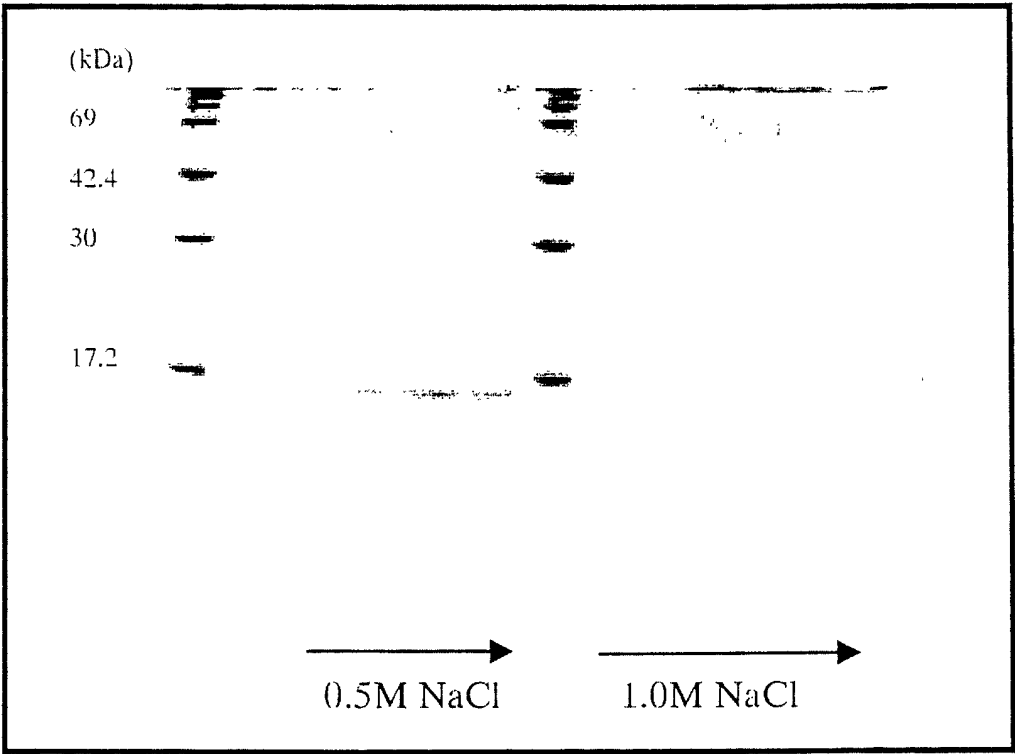


图5

