



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94191638.3

[51]Int.Cl⁶

C12N 9/40

[43]公开日 1996 年 4 月 10 日

[22]申请日 94.3.30

[30]优先权

[32]93.3.31 [33]DK[31]0388/93

[86]国际申请 PCT/DK94/00138 94.3.30

[87]国际公布 WO94/23022 英 94.10.13

[85]进入国家阶段日期 95.9.29

[71]申请人 诺沃挪第克公司

地址 丹麦巴格斯瓦尔德

[72]发明人 I·H·克纳普 C·M·霍尔特

T·哈基尔

L·V·克夫德

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 黄革生

C12N 15/56

// (C12N9/40, C12R1:685)

权利要求书 3 页 说明书 47 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 α -半乳糖苷酶

[57]摘要

含有编码具有 α -半乳糖苷酶活性多肽的 DNA 序列的 DNA 构建体, 其中 DNA 序列 a) 编码含有附加的 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列的多肽, 或 b) 是 aDNA 序列的类似物, 它可

i) 在这里所限定的条件下, 与附加的 SEQ ID NO.1 或 2 所示的 DNA 序列, 或者与根据所说 DNA 序列或 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列制备的寡核苷酸探针杂交,

ii) 编码可与抗体反应的多肽, 此抗体可与含有附加的 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列多肽的至少一个抗原决定簇反应, 和/或

iii) 编码与具有附加的 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列的多肽至少有 50% 相同的多肽。

权 利 要 求 书

1. 含有编码具有 α -半乳糖苷酶活性多肽的 DNA 序列的 DNA 构建体, 其中 DNA 序列 a) 编码含有附加的 SEQ ID NO. 3 所示氨基酸序列的各肽, 或 b) 是 a) DNA 序列的类似物, 它可
 - i) 在这里所限定的条件下, 与附加的 SEQ ID NO. 1 或 2 所示的 DNA 序列, 或者与根据所说 DNA 序列或 SEQ ID NO. 3 所示的氨基酸序列制备的寡核苷酸探针杂交,
 - ii) 编码可与抗体反应的多肽, 此抗体可与含有附加的 SEQ ID NO. 3 所示氨基酸序列多肽的至少一个抗原决定簇反应, 和/或
 - iii) 编码与具有附加的 SEQ ID NO. 3 所示氨基酸序列的多肽至少有 50% 相同的多肽。
2. 如权利要求 1 的 DNA 构建体, 其中 DNA 序列衍生于微生物、植物或哺乳动物。
3. 如权利要求 1 或 2 的 DNA 构建体, 其中 DNA 序列衍生于细菌或真菌。
4. 如权利要求 1—3 中任一项的 DNA 构建体, 其中 DNA 序列衍生于曲霉属菌株, 特别是黑色曲霉菌株。
5. 如前述权利要求中任一项的 DNA 构建体, 其中编码 α -半乳糖苷酶的 DNA 序列如本文所述经等电聚焦测定其 PI 范围为 4.0—5.5, 在本文所述条件下测定其最适 PH 范围为 5.0—7.0, 最适温度约为 170, 000Da、和/或比活性约大于

250 GALU/mg 蛋白质。

6. 如权利要求 1—5 中任一项的 DNA 构建体，其中 DNA 序列如附加的 SEQ ID NO. 1 或 2 所示。
7. 如前述权利要求中任一项的 DNA 构建体，其中 DNA 序列是 cDNA 序列，基因组 DNA 序列或者合成的 DNA 序列或者混合的 cDNA、基因组的和/或合成的 DNA 序列。
8. 重组表达载体，它含有如权利要求 1—7 中任一项的 DNA 构建体。
9. 含有如权利要求 1—7 中任一项的 DNA 构建体的细胞或者如权利要求 8 的载体。
10. 如权利要求 9 的细胞，是微生物细胞。
11. 如权利要求 10 的细胞，是细菌细胞、酵母菌细胞或真菌细胞。
12. 如权利要求 11 的细胞，其中细菌细胞是革兰氏阳性细菌的细胞，如芽孢杆菌或链霉菌，或为革兰氏阴性细菌的细胞，如大肠杆菌，酵母菌细胞是糖酵母属的细胞，真菌细胞是曲霉属的细胞。
13. 由权利要求 1—7 中任一项的 DNA 构建体编码的 α —半乳糖苷酶制品。
14. 生产显示出 α —半乳糖苷酶活性的 α —半乳糖苷酶或其变异体的方法，包括在允许 α —半乳糖苷酶或其变异体表达的条件下，在适当的培养基中培养如权利要求 9—12 中任一项的细胞，并从培养基中回收所得酶或其变异体。
15. 如权利要求 13 所述的 α —半乳糖苷酶制品将 α —半乳糖苷

水解为半乳糖和蔗糖的用途。

16. 如权利要求 15 的用途，其中 α —半乳糖苷存在于由豆科植物、坚果、种子、谷类、谷类食物或蔬菜制备的组合物中。
17. 如权利要求 16 的用途，可用于在哺乳动物中对以 α —半乳糖苷相连接的糖进行体内转化。
18. 如权利要求 17 的用途，可用于预处理含有 α —半乳糖苷的食物或饲料。
19. 将如权利要求 13 的 α —半乳糖苷酶制品作为消化辅助药的用途。
20. 含有如权利要求 13 的 α —半乳糖苷酶制品的食物或饲料。
21. 生产经酶修饰的豆制品的方法，包括在如权利要求 13 的 α —半乳糖苷酶制品存在下，将含有豆制品的组合物经受酶解处理以修饰。
22. 转化豆制品的方法，包括：
 - a) 将任选地存在于适当表达载体中的如权利要求 1—7 任一项的 DNA 构建体插入适当的宿主生物体，
 - b) 在允许由 DNA 构建体编码的多肽表达的条件下，在适当的培养基中培养宿主生物体，并从培养基中回收所得多肽，和
 - c) 在由步骤 b) 回收的多肽存在下，将含有豆制品的组合物经受酶解处理以修饰。

说明书

α —半乳糖苷酶

本发明涉及编码 α —半乳糖苷酶及其具有 α —半乳糖苷酶活性的变异体的 DNA 构建体、重组表达载体以及含有所说 DNA 构建体的细胞、以及使用重组 DNA 技术制备 α —半乳糖苷酶制剂的方法。由本发明 DNA 构建体编码的 α —半乳糖苷酶可特别地用于降解不同的植物产品中存在的 α —半乳糖苷，或者也可以作为消化辅助药。

α —半乳糖苷酶是一众所周知的酶，它涉及水解例如用于营养目的的不同的植物或植物部分如豆科植物、蔬菜、谷类、谷类食物等中存在的 α —半乳糖苷。 α —半乳糖苷酶可由不同的微生物、植物和动物产生。然而，哺乳动物肠内的 α —半乳糖苷酶的产生量不足，因此不能自身分解摄入的 α —半乳糖苷，其肠中存在的微生物可代替它分解所摄入的 α —半乳糖苷。这种微生物的分解作用对于摄入含 α —半乳糖苷食物或饲料的哺乳动物通常会导致肠胃胀气进而引起消化不良。Rackis, J. J. 于 1975 年详细讨论了 α —半乳糖苷的生理作用。

为了克服与哺乳动物 α —半乳糖苷酶不足有关的问题，食物或饲料中所含的 α —半乳糖苷酶在摄入前已经过修饰，例如通过 α —半乳糖苷酶作用的酶解修饰。可任选地，WO90/14101 中建议 α —半乳糖苷酶可用作消化辅助药。

已报道了细菌例如嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) (US 3,846,239)、酵母菌例如啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (US4,431,737)、真菌例如链孢霉属 (*Neurospora*) 和根霉属 (*Rhizopus*) 的菌株 (Worthington and Beuchat, 1974)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) (Cruz and Park, 1982)、无花果曲霉 (*A. ficuum*) (形态与 *A. niger* 相似) (Zapater et al., 1990) 以及黑色曲霉 (*A. niger*) (Bahl and Agrawal (1969 and 1972)、Christakopoulos et al. (1990)、Chun and Lee (1988)、Jung and Lee (1986)、Lee and wacek (1970)、Adya and Elbein (1976)、Kaneko et al. (1991)) 中 α -半乳糖苷酶的产生。然而所有这些参考文献中只描述了通过常规发酵自然生成或经诱变的微生物菌株以产生 α -半乳糖苷酶。

Overbecke 等人于 1990 年描述了枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中 α -半乳糖苷酶的产生, 而 Aslandis 等人于 1989 年描述了大肠杆菌 (*E. Coli*) 中的 α -半乳糖苷酶。

由 Novo Nordisk A/S, Denmark 通过常规发酵制得的黑色曲霉 α -半乳糖苷酶制剂 (Alpha-Gal™) 是可用的。与发酵黑色曲霉产生 α -半乳糖苷酶有关的一个弊端是黑色曲霉在产生 α -半乳糖苷酶的同时也产生了大量不需要的副产品草酸。

必需能够在产生黑色曲霉 α -半乳糖苷酶制品的同时减少或除去草酸的产生, 进而可增加所产生的 α -半乳糖苷酶制品的产量和纯度。

本发明的目的是通过重组 DNA 技术来设计产生 α -半乳糖苷酶的手段和方法, 期望通过使用此技术比常规发酵技术可更节约、更大量地产生 α -半乳糖苷酶而同时避免或减少所形成的草酸的量。

相应地，本发明一方面涉及含有编码具 α —半乳糖苷酶活性多肽的 DNA 序列的 DNA 构建体，其中 DNA 序列 a) 编码含有附加的 SEQ ID No. 3 所示氨基酸序列的多肽，或 b) 是 a) DNA 序列的类似物，它可

i) 在下文限定的条件下，与附加的 SEQ ID No. 1 或 2 所示的 DNA 序列，或者与根据所说 DNA 序列或 SEQ ID No. 3 所示的氨基酸序列制备的寡核苷酸探针杂交，和/或

ii) 编码可与抗体反应的多肽，此抗体可与含有附加的 SEQ ID No. 3 所示氨基酸序列多肽的至少一个抗原决定簇反应，和/或

iii) 编码与具有附加的 SEQ ID No. 3 所示氨基酸序列的多肽至少有 50% 相同的多肽。

SEQ ID No. 1 所示的核苷酸序列表示从黑色曲霉菌株中分离鉴定的完整 α —半乳糖苷酶基因（包括内含子）SEQ ID No. 2 所示的核苷酸序列是相应的 cDNA 序列，核苷酸序列将在下文的实施例中进一步描述，SEQ ID No. 3 所示的氨基酸序列是由 SEQ ID No. 2 所示的 DNA 序列推导出的，它表示黑色曲霉包括其信号肽的 α —半乳糖苷酶的氨基酸序列。

本发明的另一方面涉及含有本发明 DNA 构建体的重组表达载体以及或者含有 DNA 构建体或者含有本发明表达载体的细胞。

本发明的又一方面是制备显示出 α —半乳糖苷酶活性的多肽的方法，此方法包括在允许多肽表达的条件下，在适当的培养基中培养上述含有本发明 DNA 构建体的细胞，并从培养液中回收所得多肽。

显示出 α —半乳糖苷酶活性的多肽可含有 SEQ ID No. 3 所示的

氨基酸序列或其变异体，此变异体可以是任何来源或生物体，尤其是从自然生成的微生物或突变体或其衍生物中得到的自然生成的变异体。另外此“变异体”也可以是经遗传设计的变异体，例如通过适当修饰本发明的 DNA 序列，导致由未经修饰的 DNA 序列编码的多肽 N—和 C—末端的任一端或两端增加了一个或多个氨基酸残基、在氨基酸序列的一个或多个不同的位点替换了一个或多个氨基酸残基、在多肽的任何一端或两端、或者在氨基酸序列的一个或多个位点缺失一个或多个氨基酸残基、或者在氨基酸序列的一个或多个位点插入一个或多个氨基酸残基。

通过使用本发明的方法，比常规发酵原本可产生 α —半乳糖苷酶的亲本微生物，如黑色曲霉可产生具有更高含量 α —半乳糖苷酶的酶制品。而且，所得 α —半乳糖苷酶制品基本上没有来自亲本微生物的任何其它成分，尤其是可引起不必要的酶解副活性的成分。相应地，通过使用本发明的方法可优化 α —半乳糖苷酶成分的产生，因此比使用本技术熟知方法可在较低花费下产生具有较高的特异性 α —半乳糖苷酶活性的酶制品，同时不必要的草酸的生成也可大量减少或避免。

在本发明的 DNA 构建体中，编码具 α —半乳糖苷酶活性的多肽的 DNA 序列类似物可以是例如所说 DNA 序列的亚序列、所说序列通过熟知方法例如定点诱变而制备的经遗传设计的修饰、和/或从另一生物体中分离出的，编码与具有 SEQ ID No. 3 所示氨基酸序列的 α —半乳糖苷酶实质上类似的 α —半乳糖苷酶的 DNA 序列。此类似物实际的序列并不关键，只要此类似物具有上文所列特性 i) —iii) 中至少一个特性，这些特性在下文中将进一步讨论。

特性 i) 即 NDA 序列与 SEQ ID No. 1 或 2 所示的 DNA 序列, 或者与根据所说 DNA 序列或 SEQ ID No. 3 所示多肽制备的适当寡核苷酸探针的杂交可在任何允许 DNA 序列杂交的适当条件下进行, 例如, 将有望含有类似 DNA 序列的 1 μ g 总 DNA 经受例如 EcoRI、BamHI 或 HindIII 的完全消化, 并使用 1% 的琼脂糖凝胶, 通过电泳分离 DNA 片段, 根据制造商的教导再将之转移至 Immobilon™—N 膜上 (Millipore Corporation), 根据制造商的教导此膜应预杂交, 再将经引物延伸标记有 ^{32}P (Sambrook et al., 1989) 的 SEQ ID No. 1 或 2 所示 DNA 序列或其代表性片段作为探针加入, 温度降至 45 $^{\circ}\text{C}$ 。杂交 18 小时后, 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下将膜置于 6 $\times$ SSC、0.1% SDS 中重复洗涤, 然后再将膜经受放射自显影并作出评价。

特性 ii), 即免疫交叉反应可以使用抗至少一个含有 SEQ ID No. 3 所示氨基酸序列的 α —半乳糖苷酶的抗原决定簇而产生的抗体或与之发生反应的抗体来检测。或者是单克隆或者是多克隆的抗体可通过本技术熟知的方法来制备, 例如 Hudson et al 于 1989 年所描述的。免疫交叉反应可使用本技术熟知的检测法来测定, 例如 Hucison et al. 于 1989 年描述的 Western 印迹法或散射状免疫扩散法。

特性 iii) 可通过使用熟知的规则系统, 例如 Lipman 和 Pearson (1985) 所描述的, 将由类似物编码的多肽的氨基酸序列与 SEQ ID No. 3 所示多肽序列相比较来测定。在本申请上下文中, “同一性”一词使用的是其常规的意思, 即趋于表明在所比较的两个 (或多个) 氨基酸序列中占据相似位置的相同氨基酸残基的数目。

据信与 SEQ ID No. 3 所示氨基酸序列有大于 50% 的同一性, 例如大于约 70%、75%、80%、90% 特别是大于约 95% 的同一性可以

表明它与 SEQ ID No. 1 和 2 所示 DNA 序列编码的 α —半乳糖苷酶具有同源性。通过联合研究 SEQ ID No. 3 所示的氨基酸序列和 Aslanclis 等人于 1989 年公开的编码大肠杆菌 α —半乳糖苷酶的氨基酸序列，发现它们之间有大约为 30% 的同一性。本发明人意识到这是至今唯一已知氨基酸序列的 α —半乳糖苷酶，它表现出与本发明 DNA 构建体编码的 α —半乳糖苷酶任何可比的同一性。

众所周知不同来源的多肽之间存在同源性，已发现植物以及哺乳动物中的 α —半乳糖苷酶与来自酵母菌的 α —半乳糖苷酶是同源的，与此类似，我们期望本发明的 DNA 构建体中的 DNA 序列可来自包括哺乳动物和昆虫的动物、植物或微生物。本申请上下文中特别感兴趣的来源是细菌和真菌，“真菌”一词趋于包括酵母菌和丝状真菌。

如上述及，编码 α —半乳糖苷酶的 SEQ ID No. 1 和 2 所示 DNA 序列可得自真菌，尤其是黑色曲霉。我们期望其它真菌的 α —半乳糖苷酶或在 DNA 水平上或在氨基酸水平上与本文公开的黑色曲霉 α —半乳糖苷酶有大部分的同源性，相应地，本发明 DNA 构建体的 DNA 序列可得自真菌，尤其是曲霉属 (*Aspergillus*) 菌株例如黑色曲霉的菌株。此类菌株的例子之一是保藏于美国典型培养物保藏中心的黑色曲霉菌株，保藏号为 ATCC 16882。

我们期望当 α —半乳糖苷酶分离自黑色曲霉时，可能由于大量的糖基化作用使此酶作为大量同功酶存在。由本发明 DNA 构建体编码的 α —半乳糖苷酶依据它所产生的环境，尤其依据所说产生此酶的宿主细胞，有望是不同同功酶的形式。

在下文实施例 1 中描述的是黑色曲霉 α —半乳糖苷酶（分离自

黑色曲霉) 的特有性质。我们惊奇地发现由本发明 DNA 构建体表达的 α —半乳糖苷酶的一些特性与分离自黑色曲霉的 α —半乳糖苷酶的相应特性有所不同。

因此, 分离的 α —半乳糖苷酶的最适 pH 范围为 3.8—6.0, 而由 SEQ ID No. 2 所示 DNA 序列在米曲霉宿主细胞中表达的 α —半乳糖苷酶经发现其最适 pH 范围为 5.0—7.0 (下文实施例 5 提供)。

根据经纯化的黑色曲霉 α —半乳糖苷酶的相应特性, 我们期望由本发明 DNA 构建体编码的 α —半乳糖苷酶的 PI 范围为 4.0—5.0 (根据所说同功酶而定), 例如本文所述由等电聚焦测定的约为 4.3, 温度最适范围为 50—70°C, 分子量为约 170KDa, 和/或比活性大于约 250 GALU/mg 蛋白质, 1GALU 是 α —半乳糖苷酶的强度单位, 在以下材料和方法部分将作进一步限定。

应理解本发明优选的 DNA 构建体是附加的 SEQ ID No. 1 或 2 所示的 DNA 序列位于其中的 DNA 构建体。

本发明 DNA 构建体的 DNA 序列可以通过熟知的方法分离, 因此, DNA 序列可以例如通过建立有望含有此序列的生物体。例如任何上述来源的细胞的 cDNA 或基因文库来分离, 并通过常规方法筛选阳性克隆。此类方法的例子是按照一般技术 (由 Sambrook et al., 1989 提供) 与根据含有 SEQ ID No. 3 所示氨基酸序列的黑色曲霉 α —半乳糖苷酶的全部或部分氨基酸序列合成的寡核苷酸探针杂交, 和/或选择可表达上文限定的适当生物活性的克隆, 和/或选择可产生能与抗黑色曲霉 α —半乳糖苷酶而生成的抗体反应的蛋白质的克隆。

从 cDNA 或基因文库中分离本发明 DNA 构建体的优选方法是

使用聚合酶链反应 (PCR), PCR 使用的是根据 SEQ ID No. 3 所示氨基酸序列而制备的变性寡核苷酸探针, 例如, PCR 可使用美国专利 No. 4, 683, 202 或 R. K. Saiki 等人 (1988) 描述的技术来进行。

可选择地, 本发明 DNA 构建体的 DNA 序列可通过确定的一般方法合成制备, 例如 Beaucage 和 Caruthers (1981) 描述的亚磷酰胺法, 或者由 Matthes 等人 (1984) 描述的方法。根据亚磷酰胺法, 寡核苷酸可在例如自动 DNA 合成仪中合成、并经纯化、退火、连接并克隆于适当的载体。

最终 DNA 构建体可以是基因组的和合成的相混合、合成的和 cDNA 相混合或者是基因组的和 cDNA 相混合, 这些来源是根据一般技术将合成的、基因组的或 cDNA 来源的片段 (适当地) 连接而制备的, 这些片段相应于完整的重组 DNA 分子的不同部分。

如上述及, 本发明 DNA 构建体也可含有经遗传修饰的 DNA 序列, 这类序列可根据本发明基因组或 cDNA 序列来制备, 例如按照熟知的方法, 使用编码同源重组所需氨基酸序列的合成寡核苷酸的定点诱变, 或者例如通过使用经放射性或化学处理的随机诱变, 对多肽需要引入氨基酸替换位点的相应位点进行适当的修饰。

DNA 序列适当修饰的例子是核苷酸的替换, 它不会产生多肽的另一个氨基酸序列, 但它可与引入重组 DNA 分子的宿主生物体密码子的用途相一致 (即修饰经表达后会产生例如含有附加的 SEQ ID No. 3 所示氨基酸序列的 α -半乳糖苷酶), 或者也可以是产生了不同的氨基酸序列的核苷酸替换, 因此可能是不同的多肽结构, 然而并没有损害到多肽的特性, 如它的酶解特性。可能的修饰的其它例子是在序列中插入一个或多个核苷酸, 在序列的任一端加上一个或

多个核苷酸以及在序列中或任一端缺失一个或多个核苷酸。

携有本发明 DNA 构建体的重组表达载体可以是便于经受重组 DNA 方法的任何载体,对载体的选择经常要依靠其被引入的宿主细胞。因此载体可以是自主复制的载体,即以染色体外实体而存在的载体,它的复制不依赖染色体的复制,例如质粒或细菌噬菌体。可选择地,此载体被引入宿主细胞时也可整合于宿主细胞基因组并随着被整合的染色体一起复制。

载体中的 DNA 序列应可操作地与适当的启动子序列相连接,启动子可以是任何在所选择的宿主细胞中显示出转录活性的 DNA 序列,并可得自编码与宿主细胞或者同源或者异源的蛋白质的基因。例如,在真菌宿主细胞中引导本发明 DNA 构建体转录的适当启动子的例子是米曲霉的 TAKA 启动子和丙糖磷酸异构酶启动子、黑色曲霉的淀粉糖苷酶启动子和甘油醛—3—磷酸脱氢酶启动子以及 *Trichoderma reesei* 的纤维二糖小解酶 I 启动子。

本发明的表达载体也可含有适当的终止子,它可操作地连接于本发明的 DNA 构建体。此终止子适于从与所选择的启动子相同来源处得到。

载体可进一步含有能使载体在所说宿主细胞中复制的 DNA 序列。这种序列的例子是质粒 PUC19、PACYC177、PUB110、PE194、PAMB1 和 PIJ702 的复制起点。

载体也可含有可选择的标记物,例如,一基因,其产物可补充宿主细胞的缺陷,如枯草芽孢杆菌或地方芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 的 dal 基因,或者是可提供抗生素抗性如氨苄西林、卡那霉素、氯霉素或四环素抗性的基因。

在某些方面细胞内表达是有利的，而例如当使用某种细菌作为宿主细胞时，通常优选表达为细胞外的。为了得到细胞外表达，表达载体通常应进一步含有编码前区的 DNA 序列，即信号肽，它允许所表达的 α -半乳糖苷酶或其变异体分泌到培养基中。

用于分别连接本发明 DNA 构建体、启动子、终止子和其它因子、并将它们插入含有复制必需信息的适当载体中的方法是本技术熟练人员熟知的（例如，Sambrook et al. (1989) 所提供的）。

含有以上限定的本发明的 DNA 构建体或者表达载体的本发明细胞在重组产生本发明多肽中用作宿主细胞是有利的，通过将 DNA 构建体整合到宿主染色体上，可方便地将本发明 DNA 构建体转化至细胞中。通常认为这种整合是有利的，因为 DNA 序列更可能在细胞中被稳定维持。根据常规方法，例如同源重组即可进行将 DNA 构建体整合进宿主染色体。可选择地，如下文所描述，关于不同类型的宿主细胞可用表达载体来转化此细胞。

本发明的细胞可以是高等生物体的细胞，例如哺乳动物或昆虫，但优选是微生物的细胞，例如细菌或真菌（包括酵母菌）细胞，它们经培养会产生大量多肽。

适当细菌的例子是革兰氏阳性细菌例如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、缓慢芽孢杆菌（*Bacillus lentus*）、短芽孢杆菌（*Bacillus brevis*）、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱性芽孢杆菌（*Bacillus alkalophilus*）、解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）、凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）、环状芽孢杆菌（*Bacillus circulans*）、*Bacillus lautus*、苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）或者变青链霉菌（*Streptomyces lividans*）、鼠灰链霉菌（*Streptomyces murinus*）。或者革兰氏阴性细胞例

如大肠杆菌。细菌的转化例如可以以本来已知的方法通过原生质体转化或通过使用感受态细胞来起作用。

酵母菌生物体利于选择糖酵母属 (*Saccharomyces*) 或裂殖糖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 的种, 例如啤酒糖酵母。丝状真菌利于属于曲霉属的种, 如米曲霉或黑色曲霉。真菌细胞可以以本来已知的方法通过包括原生质体形成、原生质体的转化, 然后细胞壁再生的方法来转化。例如 EP 238 023 中描述了使用曲霉属作为宿主生物体。

本发明另一方面涉及到产生本发明多肽的方法, 此方法包括在利于产生多肽的条件下培养上述宿主细胞并从细胞和/或培养基中回收多肽。

用于培养细胞的培养基可以是任何适于所说宿主细胞生长的常规培养基, 来自供货商的适当培养基是可用的, 或者也可根据已公开的配方来制备 (例如在美国典型培养物保藏中心的目录中)。

可用常规方法从培养基中回收多肽, 包括通过离心或过滤从培养基中分离细胞, 如有必要, 裂解细胞后用盐来沉淀上清液或滤液中的蛋白质成分, 例如用硫酸铵, 再经过不同的层析法纯化, 例如离子交换层析、亲和层析等等, 实际所用的回收法依据所说多肽的种类以及它所需要的最终纯度而定。

根据用本发明方法产生的多肽的纯化程度, 所得多肽制品会含有少量其它酶的成分, 这是用于生产的宿主细胞原本就会产生的。例如当真菌细胞如曲霉属中的一个用作宿主细胞以产生重组的真菌 α -半乳糖苷酶时, 根据本发明, 一般在由常规发酵亲本真菌菌株而产生的 α -半乳糖苷酶制品中才会发现的某些酶解副活性也会产生

并且与所产生的重组多肽一起被回收。在由常规技术制备的 α -半乳糖苷酶制品中一般会发现的酶的例子是转化酶。此酶原本可由大量曲霉属菌株产生，因而也可在根据本发明由曲霉属菌株产生的 α -半乳糖苷酶制品中发现，尽管相对于 α -半乳糖苷酶的量而言，要比常规发酵法中观察到的量要低得多。因此在本发明的上下文中，除了 α -半乳糖苷酶的总量有所增加，还可使得 α -半乳糖苷酶与其它酶解活性的比率有实质性地增加。

如果需要产生真正纯正的不带有某种不需要的酶解副活性的 α -半乳糖苷酶或者 α -半乳糖苷酶制品（对于 α -半乳糖苷酶的一些用途来说，转化酶即是一例），则可以或者通过纯化除去副活性，或者可以选择不会产生所说副活性的生产生物体。

由本发明 DNA 构建体编码的 α -半乳糖苷酶可以用作大量的目的，包括水解半乳糖和蔗糖的 α -半乳糖苷。

例如，由 DNA 构建体编码、并由本发明方法产生的 α -半乳糖苷酶可用来水解存在于例如打算用作哺乳动物食物或用于微生物发酵的植物或植物部分中的 α -半乳糖苷。如上述及，此类植物和植物部分包括豆科植物如豌豆和菜豆、坚果、种子、颖果、谷类、谷类食物和蔬菜包括土豆、甜菜和菊苣，以及它们经加工的产品包括面粉、麦片、麸糖、糖蜜等等。因此，根据本发明制备的 α -半乳糖苷酶可用于对含有 α -半乳糖苷的食物或饲料的预处理以及对用作微生物发酵底物的大豆或甜菜糖蜜的修饰。

根据本发明制备的 α -半乳糖苷酶制品的一个重要用途是对大豆或豆制品如豆糖蜜、酱油、豆奶和豆乳清的修饰。

相应地，本发明的另一方面涉及制备经酶修饰的豆制品的方法，

包括将含有需经修饰的豆制品的组合物在根据本发明产生的 α —半乳糖苷酶制品的存在下经受酶解处理。酶解处理可使用本技术熟知的方法进行。例如，豆粉可经修饰如下：将豆制品悬浮于水中以使所得悬浮液中干物质的含量为约 15—20%，调节 pH 至约 4.5—6，在 50℃ 下用含有约 500GALU/g 的 0.5% 本发明 α —半乳糖苷酶制品将所得悬浮液处理 2—8 小时，随后所得经修饰制品可被喷射干燥。而且也可如 Olsen 等人，1981 和 Eriksen、1983 所描述的生产豆制品，在生产过程中的适当时机加入 α —半乳糖苷酶制品。在豆奶的制备过程中， α —半乳糖苷酶制品可被加入到从大豆原料中分离出固体颗粒后所得抽提物中，或者在浓缩过程中加入，或者加入到最终经浓缩的豆奶制品中。

可选择地，豆制品可经下方法处理：

- a) 将任选地存在于适当表达载体的编码 α —半乳糖苷酶的本发明 DNA 构建体插入适当的宿主生物体，
- b) 在允许由 DNA 构建体编码的多肽表达的条件下，在适当培养基中培养宿主生物体，并从培养基中回收所得多肽，和
- c) 在从步骤 b) 回收到的多肽存在下，将含有需修饰的豆制品的组合物经受酶解处理。

步骤 a) 和 b) 可按本文公开的进行。

根据熟知的方法，可将根据本发明生产的 α —半乳糖苷酶制品进一步用于从甜菜中生产糖以通过将密三糖和水苏糖水解为半乳糖或蔗糖来提高糖的产量。

根据本发明制备的 α —半乳糖苷酶的另一个重要用途是在哺乳动物中体内转化被 α —半乳糖苷连接的糖，例如 WO 90/14101 中所

描述的。

α —半乳糖苷酶制品因而也可用作消化辅助药,为了此目的, α —半乳糖苷酶制品可与适当的载体或赋形剂联合以形成片剂、胶囊、粉末、液体或软胶囊的形式,存在于此类配方中的 α —半乳糖苷酶量的范围是 500—20000GALU/G。

本发明的另一方面涉及根据本发明制备的含有 α —半乳糖苷酶制品的食物或饲料。 α —半乳糖苷酶制品典型地含量为相应于每克食物或饲料约为 1—20GALU。上文已给出可包括有 α —半乳糖苷酶制品的食物或饲料的例子。

以下参见附加的图来描述本发明,其中

图 1 所示为实施例 4 所描述的 pCaHj 413 的构建,

图 2 所示为实施例 4 所描述的 pCaHj 414 的构建,

图 3 所示为实施例 4 所描述的 pCaHj 424 的构建,

图 4 所示为 α —半乳糖苷酶的最适 pH。

图 5 所示为 α —半乳糖苷酶降解蜜三糖的 HPLC 色谱图,和

图 6 所示为 α —半乳糖苷酶降解水苏糖的 HPLC 色谱图。

本发明将在以下实施例中进一步被阐明,它不会以任何方式限制本文公开的发明。

材料和方法

原料

以下实施例中所使用的 α —半乳糖苷酶制品是来自 Novo Nordisk A/S、Renmark 的商用黑色曲霉 α —半乳糖苷酶制品(Alpha—Gal™、Batch KAN 0001)。

α —半乳糖苷酶活性 (GALU) 的测定

1 GALU 被定义为在下述条件下, 1 分钟内水解 $1\mu\text{mole}$ P—硝基苯 α —D—吡喃半乳糖苷(至 P—硝基苯酚+半乳糖)所需 α —半乳糖苷酶的量。

底物: 0.80mM P—NPGal

pH: 5.5—醋酸盐缓冲液 0.0333M

温度: 37°C

反应时间: 15 分钟。

反应物

1. 缓冲液: 醋酸盐缓冲液 0.05M , pH5.5
2. 底物: 1.2mM P—硝基苯— α —D—吡喃半乳糖苷
3. 终止反应物: 硼砂—NaOH 缓冲液 0.0625M , pH9.7
4. 颜色标准: 4—硝基苯酚, $240\mu\text{m}$

方法

将 2ml 底物与 1ml 不同稀释度的颜色标准(用专矿物质水制备)相混合并加入 5ml 终止反应物以绘制标准曲线, 同时用去矿物质水替代颜色标准以制得颜色标准空白对照, 测量 OD405。

称量并稀释酶制品以使相应于浓度的活性为约 0.0015 GALU/ml 。

	样品	样品空白
样品	1 ml	1 ml
预热底物5分钟	37°C	
加底物(停止观察) 并混合	2 ml	
温育15分钟	37°C	室温
加终止试剂并混合	5 ml	5 ml
底物—室温		2 ml
在30分钟内测定 OD ₄₀₅		

活性的计算

绘制颜色标准曲线 (OD 相对于浓度)。

根据下列公式计算活性:

$$Act = \frac{(A_s - A_B) \cdot F_s \cdot 10^{-3}}{T \cdot M}$$

其中:

A_s = 对应于样品的 OD₄₀₅, 在标准曲线上 4—NP 的 μM 读数。

A_B = 对应于样品空白对照的 OD₄₀₅, 在标准曲线上 4—NP 的 μM 读数。

F_s = 样品的稀释度因子。

T = 以分钟计的反应时间 (=15)。

M = 样品称出的量。

10^{-3} = 转化因子 1/ml。

补料分批发酵

补料分批发酵在含有麦芽糖糊精作为碳源、尿素作为氮源以及

酵母浸出汁的培养基中进行。通过将所说米曲霉宿主细胞的摇瓶培养物接种于含有 3.5% 碳源和 0.5% 氮源的培养基中可进行补料分批发酵。在 34℃、pH7.0 下培养 24 小时时后，开始持续补加另外的碳氮源，将碳源作为限制因子保留，要保证氧气的过量存在，补料分批培养需持续 4 天，然后通过离心、超滤作用、清除过滤和微生物过滤即可回收酶。

本发明酶的鉴定

使用 0.1M pH2.5—10 的柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液中的 2mM PNP— α —半乳糖苷酶作为底物以测量最适 pH。在 10 μ l 酶溶液中 (100 $\times$ 稀释于 3mg/ml BSA 中) 加入 0.5ml 底物，将混合物在 30℃ 下温育 15 分钟，在 95℃ 下热灭活酶，准备三份样品和一个空白对照。移入 100 μ l 于微量滴定板的孔中，再加入 100 μ l 1M pH7.0 的 tris 缓冲液，在 405nm 下，在微量滴定读数器中测量光吸收值，以对硝基苯酚被用作标准物，计算出最适 pH 下的特异活性。

在最适 pH 下，于 PNP— α —半乳糖苷中进行温育之前，将酶溶液 (溶于 BSA 或 0.25% 蜜三糖中) 置于不同温度下放 1 和 2 小时以测量温度稳定性，测量可同上进行。

在最适 pH 下，于不同蜜三糖浓度中 (2—32mM) 进行温育可测量对蜜三糖的特异活性。通过减少的糖的量可测出释放的半乳糖。

通过将含有 0.15g 对羟基苯甲酸酐肼 (Sigma H—9882)、0.50g 钾—钠酒石酸盐 (Merck 8087) 和 2% NaOH 溶液，直至 10.0ml 的 pH-BAH 反应物置于微量滴定板中反应以测定糖的减少。去掉空白对照的结果。

为了检测存在和不存在半乳糖和蔗糖时，对蜜三糖和水苏糖的

活性,根据下表混合溶液,每个酶都处于最适 pH 下,缓冲液是 0.1M 醋酸盐缓冲液,加入 10 μ l 酶溶液(稀释 10 倍),在 30℃ 下进行温育 0、1、2、4 和 24 小时。在 Dionex HPLC 系统上分析 25 μ l 上清液(PAI 柱, 0.12M NaOH 洗脱液, 1ml/min 流速, Pulsed Amperometric Detection),它可分开所有的水苏糖。此实验也可表明是否有一些转化酶活性可被归于 α —半乳糖苷酶。

实验

	蜜三糖 1 %	水苏糖 4 % μ l	蔗糖 10% μ l	半乳糖 1% μ l	缓冲液 μ l
1.	200				800
2.		200			800
3.			200		800
4.	200			200	600
5.		200		200	600
6.			200	200	600
7.	200	200	200		400

实施例 1

从黑色曲霉中纯化鉴定 α —半乳糖苷酶

盐沉淀作用

将 α —半乳糖苷酶制品的试样置于 Amicon—UF—Cell (membrane GR 60 PP, Cut off 25. 000) 中,用 5 倍体积的离子水冲洗,使用饱和度为 60% (385g/l) 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 以得到盐沉淀,此饱和度水平下 α —半乳糖苷酶已显示沉淀,在室温搅拌下缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (超过 1 小时),加入碱以使 pH 值保持 pH5.5 不变。

将沉淀物重新溶于水中,并在 Amicon—UF—cell (membrane GR

60 PP) 中冲洗直至达到约为 0.9ms 的传导性。

离子交换

将经重新溶解和洗涤的沉淀物在 DEAE—Sephrose—GL—6B 柱上经受阴离子交换, 此柱已经用 pH5.5 的柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液 (0.002M 柠檬酸/0.006M Na_2HPO_4) 平衡过, 其传导率约为 0.9mS。用 0—0.5M NaCl 洗脱 α —半乳糖苷酶并收集含有 α —半乳糖苷酶活性的级分。

凝胶过滤

将收集到的 α —半乳糖苷酶级分浓缩 10 倍可得到约 16mg/ml 的蛋白质含量。在经用以上特定缓冲液平衡过的 Sephadex G100 (Mw4,000—150,000) 凝胶过滤柱上进行凝胶过滤。

随后使用以下将描述的等电聚焦快速电泳系统和 SDS—PAGE 快速电泳系统对存在于前沿级分并含有 5.6mg 蛋白质的 α —半乳糖苷酶进行纯度分析。

如上所述将前沿级分的比活性测定为 264 GALU/mg 蛋白质, 在 280nm 下用分光光度计测定蛋白质含量。

等电聚焦

将 α —半乳糖苷酶级分在 pH4—6.5 的等电聚焦—膦酰乙酸 (IEF—PAA) (Pharmacia Phast System File Nos. 100 and 200) 上跑电泳, 在 pH4.3 处可观察到浓带, 在 pH4.2 处可观察到弱影带。得出的结论是经纯化酶的等电点是 4.3。

SDS—PAGE

将 α —半乳糖苷酶级分在 SDS—梯度凝胶 PAA10—15 (Pharmacia Phast System 如上) 上跑电泳。在上样前, 通过煮沸和加入 DTT

(1, 4—二硫—DL—苏糖醇)使蛋白质经受变性和还原,在 Mw 90,000 处观察到浓带, Mw 100,000 处观察到弱影带。当不加入 DTT 进行煮沸, SDS—分析会使 Mw 170,000 处出现带,它表示的是完整蛋白质的分子量。完整蛋白质的 Mw 为 170,000 的事实依据是从凝胶过滤分析中得到的前沿级分含有 α —半乳糖苷酶,其中前沿级分所含蛋白质的 Mw 有望高于 150,000。

因此可得出结论:从本文描述的黑色曲霉得到的 α —半乳糖苷酶是两个蛋白质链的二聚体,每个的分子量约为 90,000。

实施例 2

α —半乳糖苷酶肽类的制备和鉴定

在 25℃ 下, 70% HCOOH 中, 用过量 CNBr 对经纯化的 α —半乳糖苷酶制品进行化学降解达 24 小时。使用胰凝乳蛋白酶的酶降解在 37℃ 下, 酶: 底物之比为 1:40 (W:W) 的 0.05M NH_4HCO_3 、2M 尿素中进行 5 小时。使用或用 C_4 或用 C_{18} 柱的微内经反相 HPLC, 并用溶于 0.1% TFA (三氟醋酸) 水溶液的 75% 异丙醇水溶液的线性梯度洗脱以纯化肽类。使用 Applied Biosystems 473A 蛋白质测序仪对经纯化的肽类测序。

以下两个肽得自 CNBr 的化学降解:

CNBr—肽 1:

Gly-Ala-His-Leu-Ser-Ala-Val-Pro-Asn-Ala-Gln-Thr-Gly-Arg-Thr-Val-Pro-Ile-Thr-Phe-Arg-Ala-His-Val- (SEQ ID No. 4)

CNBr—肽 2:

Asp-Asp-Gly-Trp-Phe-Gly-Asp-Lys-Tyr-Pro-Arg-Val-Ser-Asp-Asn-Ala-Gly-Leu-Gly-Asp-Asp- (SEQ ID No. 5)

以下肽类得自使用胰凝乳蛋白酶的酶降解：

胰凝乳蛋白酶—肽 1：

Thr-Thr-Arg-Phe-Pro-Asp-Val-Leu-Trp (SEQ ID No. 6)

胰凝乳蛋白酶—肽 2：

Thr-Ser-Asp-Asn-Thr-Asp-Ala-Ile-Asp-Arg-Ile-Thr-Ile-Gln-Phe
(SEQ ID No. 7)

胰凝乳蛋白酶—肽 3：

Arg-Leu-Arg-Leu-Pro-Gln-Asp-Ser-Gln-Trp-Pro-Ala-Ala-Leu-Phe
(SEQ ID No. 8)

胰凝乳蛋白酶—肽 4：

Gly-Leu-Glu-Leu-Asp-Pro-Ala-Thr-Val-Glu-Gly-Asp-Glu-Ile-Val-
Pro-Glu-Leu (SEQ ID No. 9)

胰凝乳蛋白酶—肽 5：

Val-Met-Asp-Asp-Gly-Trp-Phe-Gly-Asp-Lys-Tyr-Pro-Arg-Val-Ser-
Asp-Asn-Ala-Gly- (SEQ ID No. 10)

可看出胰凝乳蛋白酶—肽 5 的氨基酯残基 3—19 存在于 CN-
Br—肽 2 中（氨基酸残基 1—17）。

实施例 3

黑色曲霉 α —半乳糖苷酶的克隆

α —半乳糖苷酶探针的产生

如以上实施例 2 所述,胰凝乳蛋白酶—肽 5 和 CNBr—肽 2 是重叠的,它们一起表现出肽:

VMDDGWFGDKYPRVSDNAGLGDD (SEQ ID No. 11)

为了扩增编码肽序列的 DNA 序列,设计了聚合酶链反应 (PCR) 引物。

在 5' 末端 (有义链) 使用下列变性引物:

5' TTACTAGTNATGGAYGAYGGNTGGTT 3' (5' #1: 64 species) (SEQ ID No. 12).

在此引物的 5' 末端锚着有一个 SpeI 位点 (ACT AGT)。

在 3' 末端 (有义链) 使用下列变性引物:

5' TTGAGCTCRTCNCCTAANCCNGCRTT 3' (3' #1: 512 species)
(SEQ ID No. 13).

5' TTGAGCTCRTCNCNAGNCCNGCGTT 3' (3' #2: 512 species)
(SEQ ID No. 14)

5' TTGAGCTCRTCNCNAGNCCNGCATT 3' (3' #3: 512 species)
(SEQ ID No. 15)

5' #1 或者与 3' #1、3' #2、或者与 3' #3 一起使用。

如 Leach 等人于 1986 年所描述的那样从黑色曲霉 (ATCC 16882) 中制备基因组 DNA。

此 DNA 在 PCR 反应中被用作模板 (0.05 μ g 基因组 DNA、100pmol 每种变性引物、200 μ M dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、0.01% 明胶、10mM Tris—HCl pH8.3, 总体积为 100 μ l)、运行的是下列 PCR 方案:

94℃下 2 分钟, 1 个循环 (在此温育过程中加入 0.5μl amplitaq' taq 聚合酶 (Perkin Elmer—Cetus))。

94℃下 1 分钟, 50℃下 1 分钟、72℃下 2 分钟, 30 个循环。

72℃下 5 分钟, 1 个循环。

浓缩 PCR 扩增产物并在琼脂糖凝胶上跑电泳。在使用 3' #1 和 3' #3 的扩增中, 除了, 引物二聚体' 外没发现产物, 但在使用 3' #2 的扩增中, 可发现一大约为 80 bp 的清楚的片段, 分离此片段, 用限制性酶 SpeI 和 SacI 消化并连接到已用 xbaI 和 SacI 消化的载体 PUC 19 上 (Yanish—Perron 等人, 1985)。用常规方法将此连接混合物转化至被制成 r-m⁺ 的大肠杆菌 MC 1000 中 (Casadaban 等人, 1980)。

根据制造商的教导, 使用测序酶试剂盒 (United States Biochemicals) 测定分离自转化子的质粒 DNA 的序列。此序列表明所克隆的 PCR 片段实际上编码了上述肽片段。为了克隆 α—半乳糖苷酶基因将此质粒上的插入片段 (86 bp) 用作探针。

标记探针

用下述方法制备放射性标记的探针: 用 EcoRI 和 SalI 消化 5μg 质粒, 从琼脂糖凝胶中分离 86 bp 的片段并溶于 20μm 水中, 它在 PCR 反应中被用作模板, 此反应包括 2μl 片段、50pmol 引物 5' #1, 50pmol 引物 3' #2、10pmol α³²p d ATP (3000 Ci/mmol) (DuPont NEG—ORH)、10pmol dTTP、10pmol dCTP、10pmol dGTP、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、0.01% 明胶、10mM Tris—HCl pH8.3, 总体积为 100μl。

运行的是下列温度循环方案:

94℃下 2 分钟, 1 个循环 (在温育过程中加入 0.5μl amplitaq' taq 聚

合酶 (Perkin Elmer—Cetus))。

94℃下 1 分钟, 50℃下 1 分钟, 72℃下 2 分钟, 30 个循环。

72℃下 5 分钟, 1 个循环。

如 Maniatis 等人所述用 Sephadex G50 离心柱分离经标记的片段 (Maniatis et al., 1982)。在 100℃下加热探针 5 分钟使之变性, 再到杂交混合物 中。

α —半乳糖苷酶的基因组克隆

如上所述制备黑色曲霉的基因组 DNA, 用不同的限制性酶消化, 以所述 α —半乳糖苷酶作为探针的 Southern 印迹分析要用到此消化。

将 4.5kb 的 BamHI 片段与探针杂交, 此片段按下述方法克隆:

用 BamHI 消化黑色曲霉基因组 DNA, 以琼脂糖凝胶中分离 4—5kb 的片段, 将此片段连接到已被 Bam HI 消化的 pUC19 上, 并用牛小肠碱性磷酸酶去磷酸化。将连接混合物用来转化使用氨苄西林作为选择的大肠杆菌, 通过使用上述 α —半乳糖苷酶作为探针的菌落杂交, 并选择杂交菌落可筛选出含有 4.5kb α —半乳糖苷酶片段的 5000 个菌落。

使用引物 3710 和 3711, 对分离自其中一个菌落的质粒 DNA 进行序列分析确定了所克隆的片段含有 α —半乳糖苷酶的编码序列。此质粒被称为 pCaHj409, 从 M13 通用引物 (United States Biochemicals) 中推导的序列表明此基因的 3' 末端丢失了。

使用不同的引物从两条链测定覆盖了所克隆的部分 α —半乳糖苷酶基因的 2178 bp 插入部分的序列。

3710 5' GCGTTATCGGACACTCG 3' (SEQ ID No. 16)

3711 5' GTTTGGGGACAAGTACC 3' (SEQ ID No. 17)

通过 PCR 进行 cDNA 克隆

如 Sambrook 等人于 1989 年的描述,使用新解菌丝体,经硫氰酸胍抽提,再经于氯化铯溶液中的离心可制备 mRNA。

根据制造商的教导,使用 BRL Superscript cDNA 试剂盒从寡 dT 引物起合成 cDNA 第一链。

如 Frohman 于 1990 年的描述,使用快速扩增 cDNA 末端 (RACE) 法将 cDNA 基因克隆成 5' 片段和 3' 片段。

将引物 3710 用作序列特异性引物以扩增 5' 末端,将 3711 用作序列特异性引物以扩增 3' 末端,在这两种情况下,引物 2010 和 4433 都分别被用作杂交寡 dT 引物和衔接子引物。

2010 5' CTGCAGTCGACTCTAGAGGATCCGCGGCCGCTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTT 3' (SEQ ID No. 18)

4433 5' TTACTGCAGTCGACTCTAGAGGATCCGCG 3' (SEQ ID No. 19)

PCR 反应混合物的组成和循环图如 Frohman, op cit 所述。

用 BamHI 和 XhoI 消化所得 430 bp 的 5' 片段,并连接于已被 BamHI 和 SalI 消化的 PUC 19 中。将此连接混合物转化至使用氨苄西林选择的大肠杆菌中。使用不同引物从两条链起对含有插入片段的质粒测序,此序列证实了该片段是 α -半乳糖苷酶 cDNA 片段。

用 XhoI 和 XbaI 消化所得 1300 bp 的 3' 片段,并连接到已被 SalI 和 XbaI 消化的 PUC 19 上。将连接混合物转化至使用氨苄西林选择的大肠杆菌中。使用不同引物从两条链起对来自质粒的 1300bp 插入片段进行序列分析证实了它就是 α -半乳糖苷酶片段。

基因组序列和 cDNA 序列分别示于 SEQ ID No. 1 和 2。基因组

序列的核苷酸片段 302—371, 628—716, 978—1032 表示内含子序列。

α —半乳糖苷酶的蛋白质序列表现出与由 *rafA* 基因编码的大肠杆菌 α —半乳糖苷酶有约 30% 的同源性 (Aslandis et al. 1989)。

实施例 4

α —半乳糖苷酶的表达

α —半乳糖苷酶表达载体的构建

用 *Sal*I 和 *Psa*I 消化质粒 pCaHj 409, 分离 1.5kb 的片段并连接到已被 *Sal*I 和 *Pst*I 消化的 PUC 19 上。转化至大肠杆菌并分离质粒后, 将所得质粒用 *Sal*I 和 *Eco*RI 消化, 分离 4.2kb 片段。用 *Eco*RI 和 *Sal*I 消化 pCaHj 410, 分离 0.8kb 的片段并插入上述 4.2kb 的片段, 所得质粒被称为 pCaHj 412。用 *Apa*I 消化此质粒, 使用 Klenow 聚合酶填充 3' 凹端, 经用苯酚/氯仿抽提后, 再用 *Hind*III 消化此混合物, 分离所得 2.2kb 的片段。

用 *Bgl* II 消化曲霉属表达质粒 pTOC 68 (描述于 WO91/17243 中), 使用 Klenow 聚合酶填充 3' 凹端, 经用苯酚/氯仿抽提后, 再用 *Hind*III 消化此混合物, 分离 4.6kb 的片段并连接到上述 2.2kb 的片段中, 所得质粒称作 pCaHj 413, 它含有与黑色曲霉淀粉糖苷酶基因的终止子 (Tamg) 融合的 *aglN* 基因的一部分。图 1 为 pCaHj 413 构建的概要。

用 *Hind*III 和 *Xho*I 消化 pCaHj 413, 分离 4.1kb 的片段。用 *Hind*III 和 *Xho*I 消化 pCaHj409, 分离含有 *aglN* 基因 5' 末端的 4.0kb 片段并将它连接到 pCaHj 413 片段上, 所得表达质粒被称作 pCaHj414, 它含有 *aglN* 启动子, 紧接其后的是与 AMG 终止了融合的 *aglN* 基因。图

2 为 pCaHj 414 构建的概要。

用 BamHI—EcoRI 消化得自使用 pHD414 作为模板和引物：

5' GCTCCTCATGGTGGATCCCCAGTTGTGTATATAGAGGATTGAGGAAGGAAGAGAAGTG-
TGGATAGAGGTAAATTGAGTTGGAACTCCAAGCATGGCATCCCTTGC 3' 106 mer
(SEQ ID No. 20), and

5' TGTTCCTGGCTGTGGTGTACAGG 3' 22mer (SEQ ID No. 21).

的 PCR 反应的 PCR 片段, 用经消化的片段取代 pHD 414 的 617bp 的 BamHI—EcoRI 片段, 即可从 pHD414 中衍生得到 pMT 1560 (4169 bp) (描述于 WO 92/16634)。

用 NcoI 和 Hind III 消化 pMT 1560, 分离 3.9kb 的片段。用 NcoI 和 HindIII 消化 pCaHj 414, 分离含有 ag1N 基因的 5.2kb 片段并插入到 3.9kb 的 pMT 1560 片段中, 所得质粒被称作 pCaHj 419。用 HindIII 和 XhoI 消化此质粒, 分离含有米曲霉 TAKA 启动子的 5.2kb 片段和与 AMG 终止子融合的 ag1N 基因的 3' 末端。

pCaHj 414 与引物 3710 和 4982 (含有 HindIII 位点, 紧接其后的是 ag1N 基因的 ATG 起始码子) 一起被用作 PCR 模板:

3710 5' GCGTTATCGGACACTCG 3' (SEQ ID No. 16)

4982 5' GCAAGCTTTATCATCACCACCATGAT 3' (SEQ ID No. 22)

PCR 条件如以上实施例 3 中所述 (见“ α —半乳糖苷酶探针的产生”)。用 HindIII 和 XhoI 消化 PCR 片段并插入到 5.2kb 的 pCaHj 419 片段, 所得表达质粒被称作 pCaHj 424, 其 5' 端含有与 TAKA 启动子融合的 ag1N 基因, 3' 端含有与 AMG 终止子融合的 ag1N 基因。图 3 是 pCaHj424 构建的概要。

米曲霉的转化

如 WO 91/17243 中所述,通过与 pTOC 90 的共转化,使用乙酰胺作为选择,将质粒 pCaHj 414 转化至米曲霉 IFO 4177 中。

通过摇瓶培养或在浸没式发酵罐中培养共转化子可在肉汤培养其中积累活性。

使用相用方法将 pCaHj 424 转化至米曲霉 IFO 4177 中,其共转化子所表达的 α -半乳糖苷酶的量比 pCaHj 414 转化子要高很多。

α -半乳糖苷酶的纯化

发酵可表达重组酶的米曲霉所得培养液的上清经离心、并通过 0.2 μ m 滤网过滤以除去菌丝体。将 35—50ml 经过滤的上清液 (30—60mg α -半乳糖苷酶)置于 Filtron ultracette 或带有 10 KDa 膜的 Amicon 超滤装置中超滤以浓缩 10 倍。在同样装置中连续进行两轮超滤后将浓缩物用 25mM Tris pH8.0 稀释 100 倍。将此经超滤的样品以 1.5ml/min 装入经 25mM Tris pH8.0 平衡的 Pharmacia HR16/20 Fast Flow Q Sepharose 阴离子交换柱中。样品被施用后,用 2 倍柱体积的 25mM Tris pH8.0 冲洗柱,用溶于 25mM Tris pH8.0 中的 0 至 0.6M NaCl 的呈线性增加的 NaCl 梯度洗脱被束缚的蛋白质。

在大约 0.25—0.3M NaCl 处洗脱出 α -半乳糖苷酶,但是此级分中的酶不完全纯 (大约 80% 的纯度)。因此将含有 α -半乳糖苷酶的级分通过在带有 10 KDa 膜的 Amicon 超滤装置中超滤浓缩至体积为 4.5ml,并施用于处于 0.25M 醋酸铵 pH5.5 中、固定流速为 1ml/min 的 HR 26/60 Sephacryl S200 凝胶过滤柱上, α -半乳糖苷酶作为一个纯度约为 90% 的清楚的峰被洗脱出来。为了得到纯化的物质以使电泳均一性,收集含有 α -半乳糖苷酶的级分,并超滤进 10mM 磷酸钠 pH6.8 中。将样品施用于 8ml BioRad HTP 羟基磷灰石柱中 (内

径为 10mm), 固定流速为 1ml/min。以超过 40 分钟的时间, 通过从 10mM 至 0.2M 增加磷酸钠的浓度以洗脱被束缚的酶。在大约 0.1M 磷酸钠处洗脱出 α -半乳糖苷酶, 此级分的纯度超过 95%。

实施例 5

α -半乳糖苷酶的鉴定

表达并纯化自米曲霉的 α -半乳糖苷酶的下列特性可通过以上材料和方法部分所述的方法来测定。

所得结果概括于下表:

Mw	95KDa
最适 pH	6.0
水中的稳定性	很稳定
置 BSA 中 1 小时的温度稳定性	<60°C
在蜜三糖存在下的温度稳定性	<70°C
比活性相对于 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ 酶/min)	
a) PNP— α -半乳糖苷酶	90
b) 蜜三糖	145 (100)
c) 水苏糖	(350)
d) 瓜耳胶	(0)
由半乳糖的抑制作用	无
转化酶活性	无

括号中的结果从 HPLC 结果中计算出的

最适 pH

图 4 所示的最适 pH 表明此酶在 pH6 时活性最高, 但是在 pH4—

8 的整个范围内都保留有一些活性。奇怪的是分离自黑色曲霉的酶的最适 pH 是 4—6 的范围。

对水苏糖和蜜三糖的降解以及 HPLC 分析

从图 5 和 6 的 HPLC 色谱图中可看出蜜三糖的降解(峰 4)在 24 小时之内完成,反应产物是蔗糖(峰 39)、半乳糖(峰 1)和少量果糖(峰 2)。水苏糖的降解会导致蜜三糖(峰 4)、蔗糖(峰 39)和半乳糖(峰 1)的形成。24 小时后所有的水苏糖和糖三蜜都被转化为蔗糖、半乳糖和少量果糖。

可奇怪地发现此酶不被半乳糖抑制。

说明书中引用的参考文献如下:

Leach et. al., 1986, Fungal gent. newsl., 33, 32-33.

Yanish-Perron et al., Gene 33, 103-119 (1985)

Casadaban et al., J. Mol. Biol., 138, 179-207 (1980)

Maniatis et al., Molecular cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory 1982

Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis. (1989), Molecular cloning, a laboratory manual. 2. edition. Cold Spring Harbor Laboratory press)

M. A. Frohman (1990). RACE, rapid amplification of cDNA ends. in: M. A. Innis et. al. PCR protocols, A guide to methods and applications. Academic press).

Aslandis et al., 1989, Nucleotide sequences and operon structure of plasmid borne genes mediating uptake and utilization of raffinose in *Escherichia coli*. J. Bact. 171, 6753-6763

WO 90/14101 (AEK DEVELOPMENT CORPORATION, US)

US 3,846,239 of 5 Nov. 1974 (MONSANTO COMPANY)

Worthington et al., " α -Galactosidase Activity of Fungi on Intestinal Gas-Forming Peanut Oligosaccharides", J.Agr.Food Chem., Vol. 22, No. 6 (1974)

US 4,431,737 of 14 Feb. 1984 (ANIC, S.p.A., IT)

Cruz and Park, (1982), "Production of Fungal α -Galactosidase and Its Application to the Hydrolysis of Galactooligosaccharides in Soybean Milk", J. of Food Science - 1973, Vol. 47

Zapater et al. (1990), Preparative Biochemistry, 20 (3&4), pp. 263-296

Bahl and Agrawal (1969), "Glycosidases of *Aspergillus niger*", J. of Biol. Chem., Vol. 244 (11), pp. 2970-2978

Christakopoulos et al. (1990), Process Biochemistry International, pp. 210-212

Chun and Lee (1988), Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 20 (1), pp. 79-84

Jung and Lee (1986), Korean J. Food Schi Technol., Vol. 18 (6), pp. 450-457

Lee and Wacek (1970), "Galactosidases from *Aspergillus niger*", Archives of Biochem. and Biophysics 138, pp. 264-271

Adya and Elbein (1976), J. of Bact., Vol. 129 (2), pp. 850-856

Kaneko et al. (1991), Agric. Biol. Chem. 55 (1), pp. 109-115

Rackis, J. J. (1975), ACS Symposium Series 15, "Physiological Effects of Food Carbohydrates", pp. 207-222

Bahl et al., " α -Galactosidase, β -Galactosidase, and β -N-Acetylglucosaminidase from *Aspergillus niger*" (1972), Methods in Enzymology, Vol 28, pp. 728-734

Overbeeke et al., 1990, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 56, No. 5., pp. 1429-1434.

Lipman and Pearson, 1985, Science 227, p. 1435

Hudson et al, 1989, Practical Immunology, Third edition, Blackwell Scientific Publications.

Beaucage and Caruthers, 1984, Tetrahedron Letters 22, 1981,
pp. 1859-1869

Matthes et al., 1984, The EMBO J. 3, 1984, pp. 801-805

R.K. Saiki et al., 1988, Science 239, pp. 487-491

Olsen and Adler-Nissen, Sonderdruck aus ZFL - Zeitschrift für
Lebensmittel-Technologie und Verfahrenstechnik 31. Jahrgang
1980 - Heft 8 - (Teil I); 32. Jahrgang 1981 - Heft 2 - (Teil
II)

Eriksen S., J. Food Sci. 48(2): 445-557, 1983.

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人:

- (A) 姓名: NOVO NORDISK A/S
(B) 街道: Novo Alle
(C) 城市: Bagsvaerd
(E) 国家: DENMARK
(F) 邮编(ZIP): DK-2880
(G) 电话: +45 44448888
(H) 传真: +45 4449 3256
(I) 电传: 37304

(ii) 发明名称: 黑色曲霉 α -半乳糖苷酶

(iii) 序列数目: 22

(iv) 计算机的可读形式:

- () 介质类型: Floppy disk
(B) 计算机: IBM PC 兼容机
(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
(EPO)

(2) SEQ ID NO:1 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 2476bp
(B) 类型: 单链
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

(iii) 假拟结构: 无

(iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

(vi) 来源:

(A) 生物体: 黑色曲霉

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

```
GTAGTCCCAG CCAAGTTGGG GAATGAGAAG TGGGGGTGOC AAGCCGGAGT GGGGGATGAT      60
GCCAGCAAG AAACCTGGATA CCTCCGATG TTTCCTCCGGA TGCAGTCGAG ACCGTCCGGG      120
```

	GATAAAAGGC	CGGTGAGAGG	AAGAACTGCT	GCTTCACTCA	OCTGOCACAT	GIGTTAGGAT	180
	TGAOGGOCAG	CAATATCATC	ACCAOCATGA	TGGTCTTTC	CATGCTGTGG	TGCTGGGOC	240
	TTTTTACGTT	ATACGGTCAT	TCTGCAGACA	OGCOOGCAAC	TGGGGTTTCA	AACCCACAGA	300
	GTATGGACTG	COGGGGGGGA	GGATGCTACT	GCAAAGCTTG	ATCTTCAATC	GGAGTAAGCT	360
5	GACCAAACAG	OGATCGTTAC	GAATGGCACT	AGTTTCCGAT	TGAACGGCGA	CAATGTCTCA	420
	TATOGATTCC	ATGTCAACAG	TACCAOCCGC	GACTTGATTT	CTGATCATTT	TGGTGGTGTG	480
	GTCTOCCGCA	CAATCOCTTC	GOCAGTGGAA	OCTGCTGTCA	ACGGCTGGGT	CGGCATGOCT	540
	GGTOGAATOC	GOOGGGAGTT	COOOGACCAA	GGOOGTGGGG	ATTTTCCGAT	COOCCOOGTT	600
	OGTATTOGGG	AATOGGCAGG	TTTACTGTGT	AGOGATCTOC	ATATGTGTGG	CACGAGGTGA	660
10	TOGAAGGTAA	AAATGCTTTG	COOOGGOCCTG	OCTGOCACAT	TTGGOGATGC	GCAGGCTGTG	720
	ACAACTTTGG	TAGTOCATCT	GTATGACAAC	TATAGCTCCG	TOGOGGCOGA	CTTGTCAATC	780
	TOCATATTTT	CGAAATATGA	TGOGATCGTG	AGGAGTGTCA	ATGTGATCAA	CCAGGGCOCA	840
	GGTAATATCA	CTATOGAGGC	OCTTGCAAGC	ATAAGTATCG	ATTTCCOCTA	TGAAGACCTC	900
	GACATGGTCA	GOCTOOGAGG	OGACTGGGOC	AGAGAGGCAA	ATGTTTCAAG	AAGCAAAGTG	960
15	CAGTATGGCG	TOCAGGGGTA	AGTCAGCATA	GCATAAAACC	GACATGGTGA	OCTTGCTGAC	1020
	GGGAGAGTAG	ATTCCGAAGC	AGTACTGGAT	ATTCTCTCTA	OCTTCACAAT	COCTTCTTTG	1080
	CCATAGTAGA	TOCAGCTACT	ACCGAATCCG	AAGGOCAGGC	ATGGGGTTTC	AACCTTGTAT	1140
	ATACCGGCTC	TTTTCTGGOC	CAAGTAGAGA	AAGGATCCGA	AGGTTTCACC	CGGGCGCTGC	1200
	TOGGCTTCAA	COOGGAACAA	TTATCGTGGG	ACCTTGGGCC	TGGOGAGACT	TTAACTTCC	1260
20	CCGAGTGTGT	TGCAGTCTAC	TOGGACAAAG	GOCTTGGCTC	AGTGTCTCCG	AAATTOCAAC	1320
	GGCTATATCG	CAAACAACCTC	ATGAAGAGCA	AGTTGOCAC	GTOOGAOCGG	COGGTCTGTC	1380
	TGAATAGCTG	GGAAGGTGTT	TATTTGACT	ACAATCAAAG	CAGCATOGAA	ACTCTTGOOG	1440
	AAGAGTCCGC	TGOOCTGGGT	GTOCAOCTCT	TTGTCAATGA	OGACGGCTGG	TTTGGGGACA	1500
	AGTACCOCTG	AGTGTCCGAT	AACGOCCGAC	TGGGOGACTG	GATGCOCAAT	CCAGCGCGCT	1560
25	TGOCCGAOCG	GTTGAACCCG	GTOGTGCAAG	ACATCACAAA	TCTCAOCCGC	AATGGCACAG	1620
	AGTOCACAAA	ACTTCCGCTTT	GGTATTTGGG	TGGAGCOOGA	GATGGTCAAC	CCCAATTCCA	1680
	CTCTCTACCA	CGAACACCCG	GAGTGGGGGC	TTCAATGCOG	GOCTTACCC	CGTACCGAGC	1740
	GTOGGAACCA	GCTCGTCTC	AAOCTGGGCG	TTCCGGCTGT	GCAGGACTTC	ATCATAGACT	1800
	TCATGACGAA	OCTGTTACAA	GATAOCCGCA	TTTCCCTACG	CAAATGGGAC	AACAACCCGG	1860
30	GAATACACGA	GACGCOCTCT	COGTGACTG	ACCATCAGTA	CATGCTTGGC	CTCTACCCGG	1920
	TGTTGACAC	ACTGACCAAC	CGCTTCCCGG	ATGTCTGTG	GGAAGGATGT	GOCTCCGGTG	1980
	GAGGCOGCTT	TGATGCTGGC	ATGCTGCACT	ATGTCCOCCA	GATCTGGACT	TOCGATAACA	2040
	COGACGOCAT	CGACCGAATC	ACCATCCAAT	TTGGGAOCTC	GCTTGOCTAC	COGOCATCAG	2100
	CAATGGGTGC	CCACCTCTCC	GCGGTTCCTA	ACGCACAGAC	CGGTCCCACT	GTGCOCAATTA	2160
35	CTTTCCCGGC	ACACGTTGCT	ATGATGGGTG	GTTCTTTCCG	CTTGGAGCTG	GATCCGGCGA	2220
	CGGTGGAAGG	GGACGAAATA	GTTCCCGAGC	TTCTTGGCGT	GGCGGAAAAA	GTGAACCCCTA	2280
	TCATTTTGAA	CGGAGATCTG	TATCCGCTAC	GOCTACCTCA	AGACTCCACG	TGGCTGTCAG	2340
	CACTCTTTGT	GACTCAGGAT	GGCGCACAGG	CTGTTCTGTT	CTACTTCAGG	TOCAGCCGAA	2400

TGTCAACCAT GCGGCGTGGG TCAGGCTGCT GGGGTGGAC CTAAGGCGAC TATACGTGA	2460
TGGAGATAAG CATGG	2476

(2) SEQ ID NO:2 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 2028bp

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假拟结构: 无

(iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

(vi) 来源:

(A) 生物体: 黑色曲霉

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

ATGATCGGTC TTCCATGCT GTGGTGCTG GGCTTTTTTA CGTTATAAGG TCATTCTGCA	60
GACACGCGCG CAACTGGGGT TTCAAACCCA CAGACGATCG TTACGAATGG CACTAGTTTC	120
CGATTGAACG GCGACAATGT CTCATATCGA TTCCATGTCA ACAGTAACAC CGGCGACTTG	180
20 ATTTCTGATC ATTTTGGTGG TGTCGTCTCC GGCACAATCC CTTGCGCAGT GGAAOCTGCT	240
GTCAAACGCT GGGTGGGCAT GCTGGTCCA ATCCGCGGG AGTTCCCGCA CCAAGGCGGT	300
GGGGATTTC GCATCCCGC CGTTGTTATT CGGGAATCGG CAGGTTATAC TGCTGTACA	360
ACTTTGGTAG TCCATCTGTA TGACAACIAT AGCTCCGTGG CGGCGACTT GTCATACTCC	420
ATATTTCCGA AATATGATGC GATCGTGAG AGTGTCATG TGATCAACCA GGGCCAGGT	480
25 AATATCACTA TCGAGGCGCT TGCAAGCATA AGTATCGATT TCCCTATGA AGAOCCTGAC	540
ATGGTCAGCC TCCGAGGCGA CTGGGCGAGA GAGGCAAATG TTCAGAGAAG CAAAGTGCAG	600
TATGGCGTCC AGGGATTCCG AAGCAGTACT GGATATTCC CTCAOCTTCA CAATCCCTTC	660
CTTGCCATAG TAGATCCAGC TACTACCGAA TCGCAAGGCG AGGCATGGGG TTTCAAOCTT	720
GTATATAACG GCTCTTTCTC GGCCCAAGTA GAGAAAGGAT CGCAAGGTTT CACCCGGGCG	780
30 CTGCTCGGCT TCAACCCGGA CCAATTATCG TGGAAOCTTG GOCCTGGCGA GACTTTAACT	840
TCCCCCGAGT GTGTTGCAGT CTACTCGGAC AAAGGCGCTG GCTCAGTGTG TCGCAAATTC	900
CACCGGCTAT ATCGCAACCA CCTCATGAAG AGCAAGTTGG CCAOCTCCGA CCGGCGGTT	960
CTGCTGAATA GCTGGGAAGG TGTTTATTTT GACTACAATC AAAGCAGCAT CGAAACTCTT	1020
GCCGAAGAGT CCGCTGCGCT GGGTGTCCAC CTCCTTGTCA TGGACGAGG CTGGTTTGGG	1080
35 GACAAGTACC CTGAGTGTG CGATAACGCC GCACTGGGCG ACTGGATGCC CAATCCAGCG	1140
CGCTTGCGCG ACGGGTTGAC CCGGCTGTG CAAGACATCA CAAATCTCAC GTCAATGGC	1200
ACAGAGTCCA CAAAACCTCG CTTTGGTATT TGGGTGGAGC CCGAGATGGT CAACCCCAAT	1260
TCCACTCTCT ACCACGAACA CCGGAGTGG GCGCTTCATG CCGGGCTTA CCCCCGTACC	1320

	GAGGCTGGGA ACCAGCTGGT OCTCAACCTG GGGCTTGGG CTGTGCAGGA CTTTCATCATA	1380
	GACTTCATGA CGAAOCTGTT ACAAGATACC GGCATTTGCT AOGTCAAATG GGACAACAAC	1440
	CGGGGAATAC ACGAGACGCC CTCTOOGTGG ACTGAACATC AGTACATGCT TGGCCTCTAC	1500
	CGGGTGTTCG ACACACTGAC CACOOGCCTC COGGATGTGC TGTGGGAAGG ATGTGCOCTG	1560
5	GGTGGAGGOC GCTTTGATGC TGGCATGCTG CAGTATGTGC COCAGATCTG GACTTTOGAT	1620
	AACACOGACG CCATOGACCG AATCAOCCATC CAATTTGGGA OCTOGCTTGC CTACCOGACA	1680
	TCAGCAATGG GTGCOCAOCT CTCOGGGTTC OCTAAOCCAC AGACCOGGTG CACTGTGOOC	1740
	ATTACTTTTC GGGCACAAGT TGCTATGATG GGTGGTTCCT TGGGCTTGA GCTGGATOOG	1800
	GOGACGGTGG AAGGGGAAGA AATAGTTTOC GAGCTTCTTG CGCTGGCGGA AAAAGTGAAC	1860
10	OCTATCATTT TGAACGGAGA TCTGTATOGG CTACGCTTAC CTCAAGACTC CCAGTGGCCT	1920
	GCAGCACTCT TTGTGACTCA GGATGGOGCA CAGGCTGTTC TGTTCCTACTT CAGGTCCAGC	1980
	CGAATGTCAA CCATGCGGCG TGGGTACGGC TGCTGGGGTT GGAOCTAA	2028

(2) SEQ ID NO:3 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 676 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假拟结构: 无

(iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

(vi) 来源

(A) 生物体: 黑色曲霉

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3

30	Met Ile Gly Leu Pro Met Leu Trp Cys Leu Gly Leu Phe Thr Leu Tyr	1 5 10 15
	Gly His Ser Ala Asp Thr Pro Ala Thr Gly Val Ser Asn Pro Gln Thr	20 25 30
35	Ile Val Thr Asn Gly Thr Ser Phe Arg Leu Asn Gly Asp Asn Val Ser	35 40 45
	Tyr Arg Phe His Val Asn Ser Thr Thr Gly Asp Leu Ile Ser Asp His	50 55 60
40	Phe Gly Gly Val Val Ser Gly Thr Ile Pro Ser Pro Val Glu Pro Ala	65 70 75 80

	Val Asn Gly Trp	Val Gly Met Pro	Gly Arg Ile Arg Arg	Glu Phe Pro
	85		90	95
5	Asp Gln Gly Arg Gly Asp Phe Arg	Ile Pro Ala Val Arg	Ile Arg Glu	
	100	105	110	
	Ser Ala Gly Tyr Thr Ala Val Thr Thr	Leu Val Val His Leu Tyr Asp		
	115	120	125	
10	Asn Tyr Ser Ser Val Ala Ala Asp Leu Ser Tyr Ser	Ile Phe Pro Lys		
	130	135	140	
	Tyr Asp Ala Ile Val Arg Ser Val Asn Val	Ile Asn Gln Gly Pro Gly		
	145	150	155	160
15	Asn Ile Thr Ile Glu Ala Leu Ala Ser Ile Ser Ile Asp Phe Pro Tyr			
	165	170	175	
	Glu Asp Leu Asp Met Val Ser Leu Arg Gly Asp Trp Ala Arg Glu Ala			
20	180	185	190	
	Asn Val Gln Arg Ser Lys Val Gln Tyr Gly Val Gln Gly Phe Gly Ser			
	195	200	205	
25	Ser Thr Gly Tyr Ser Ser His Leu His Asn Pro Phe Leu Ala Ile Val			
	210	215	220	
	Asp Pro Ala Thr Thr Glu Ser Gln Gly Glu Ala Trp Gly Phe Asn Leu			
	225	230	235	240
30	Val Tyr Thr Gly Ser Phe Ser Ala Gln Val Glu Lys Gly Ser Gln Gly			
	245	250	255	
	Phe Thr Arg Ala Leu Leu Gly Phe Asn Pro Asp Gln Leu Ser Trp Asn			
35	260	265	270	
	Leu Gly Pro Gly Glu Thr Leu Thr Ser Pro Glu Cys Val Ala Val Tyr			
	275	280	285	
40	Ser Asp Lys Gly Leu Gly Ser Val Ser Arg Lys Phe His Arg Leu Tyr			
	290	295	300	
	Arg Asn His Leu Met Lys Ser Lys Phe Ala Thr Ser Asp Arg Pro Val			
	305	310	315	320
45	Leu Leu Asn Ser Trp Glu Gly Val Tyr Phe Asp Tyr Asn Gln Ser Ser			
	325	330	335	
	Ile Glu Thr Leu Ala Glu Glu Ser Ala Ala Leu Gly Val His Leu Phe			
50	340	345	350	
	Val Met Asp Asp Gly Trp Phe Gly Asp Lys Tyr Pro Arg Val Ser Asp			
	355	360	365	
55	Asn Ala Gly Leu Gly Asp Trp Met Pro Asn Pro Ala Arg Leu Pro Asp			
	370	375	380	

	Gly Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Ile Thr Asn Leu Thr Val Asn Gly	385	390	395	400
5	Thr Glu Ser Thr Lys Leu Arg Phe Gly Ile Trp Val Glu Pro Glu Met	405	410	415	
	Val Asn Pro Asn Ser Thr Leu Tyr His Glu His Pro Glu Trp Ala Leu	420	425	430	
10	His Ala Gly Pro Tyr Pro Arg Thr Glu Arg Arg Asn Gln Leu Val Leu	435	440	445	
	Asn Leu Ala Leu Pro Ala Val Gln Asp Phe Ile Ile Asp Phe Met Thr	450	455	460	
15	Asn Leu Leu Gln Asp Thr Gly Ile Ser Tyr Val Lys Trp Asp Asn Asn	465	470	475	480
20	Arg Gly Ile His Glu Thr Pro Ser Pro Ser Thr Asp His Gln Tyr Met	485	490	495	
	Leu Gly Leu Tyr Arg Val Phe Asp Thr Leu Thr Thr Arg Phe Pro Asp	500	505	510	
25	Val Leu Trp Glu Gly Cys Ala Ser Gly Gly Gly Arg Phe Asp Ala Gly	515	520	525	
	Met Leu Gln Tyr Val Pro Gln Ile Trp Thr Ser Asp Asn Thr Asp Ala	530	535	540	
30	Ile Asp Arg Ile Thr Ile Gln Phe Gly Thr Ser Leu Ala Tyr Pro Pro	545	550	555	560
	Ser Ala Met Gly Ala His Leu Ser Ala Val Pro Asn Ala Gln Thr Gly	565	570	575	
35	Arg Thr Val Pro Ile Thr Phe Arg Ala His Val Ala Met Met Gly Gly	580	585	590	
40	Ser Phe Gly Leu Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Glu Gly Asp Glu Ile	595	600	605	
	Val Pro Glu Leu Leu Ala Leu Ala Glu Lys Val Asn Pro Ile Ile Leu	610	615	620	
45	Asn Gly Asp Leu Tyr Arg Leu Arg Leu Pro Gln Asp Ser Gln Trp Pro	625	630	635	640
	Ala Ala Leu Phe Val Thr Gln Asp Gly Ala Gln Ala Val Leu Phe Tyr	645	650	655	
50	Phe Arg Ser Ser Arg Met Ser Thr Met Arg Arg Gly Ser Gly Cys Trp	660	665	670	
55	Gly Trp Thr Glx	675			

(2) SEQ ID NO:4 的资料

(i) 序列特征:

- (A)长度:24个氨基酸
(B)类型:氨基酸
(C)链型:单链
(D)拓扑结构:线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟结构: 无

(iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4

Gly Ala His Leu Ser Ala Val Pro Asn Ala Gln Thr Gly Arg Thr Val
1 5 10 15

Pro Ile Thr Phe Arg Ala His Val
20

(2) SEQ ID NO:6: 的资料:

(i) 序列特征:

- (A)长度:21个氨基酸
(B)类型:氨基酸
(C)链型:单链
(D)拓扑结构:线形

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟结构: 无

(iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5

Asp Asp Gly Trp Phe Gly Asp Lys Tyr Pro Arg Val Ser Asp Asn Ala
1 5 10 15

Gly Leu Gly Asp Asp
20

(2) SEQ ID NO:6 的资料:

(i) 序列特征:

- (A)长度:9个氨基酸
(B)类型:氨基酸
(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线形

(ii)分子类:肽

(iii)假拟结构:无

(iii) (iv)反义:无

(v) 片段类型:内部的

(xi)序列描述:SEQ ID NO:6:

Thr	Thr	Arg	Phe	Pro	Asp	Val	Leu	Trp
1				5				

(2) SEQ ID NO:7:的资料:

(i)序列特征:

(A)长度:15 个氨基酸

(B)类型:氨基酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线形

(ii)分子类:肽

(iii)假拟结构:无

(iv)反义:无

(v) 片段类型:内部的

(xi)序列描述:SEQ ID NO:7

Thr	Ser	Asp	Asn	Thr	Asp	Ala	Ile	Asp	Arg	Ile	Thr	Ile	Gln	Phe
1				5				10					15	

(2) SEQ ID NO:8:的资料:

(i)序列特征:

(A)长度:15 个氨基酸

(B)类型:氨基酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线形

(ii)分子类:肽

(iii)假拟结构:无

(iv)反义:无

(v) 片段类型:内部的

(xi) (xi)序列描述:SEQ ID NO:8

Arg	Leu	Arg	Leu	Pro	Gln	Asp	Ser	Gln	Trp	Pro	Ala	Ala	Leu	Phe
1				5				10					15	

(2) SEQ ID NO:9: 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 18 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类: 肽

(iii) 假拟结构: 无

(iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9

Gly Leu Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Glu Gly Asp Glu Ile Val Pro
1 5 10 15
Glu Leu

(2) SEQ ID NO:10: 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 19 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类: 肽

(iii) 假拟结构: 无

(iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10

Val Met Asp Asp Gly Trp Phe Gly Asp Lys Tyr Pro Arg Val Ser Asp
1 5 10 15
Asn Ala Gly

(2) SEQ ID NO:11: 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 19 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链

(D)拓扑结构:线形

(ii)分子类:肽

(iii)假拟结构:无

(iv)反义:无

(v) (v)片段类型:内部的

(xi)序列描述:SEQ ID NO:11

Val Met Asp Asp Gly Trp Phe Gly Asp Lys Tyr Pro Arg Val Ser Asp
1 5 10 15

Asn Ala Gly Leu Gly Asp Asp
20

(2) SEQ ID NO:12:的资料:

(i)序列特征:

(A)长度:26bp

(B)类型:核苷酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线形

(ii)分子类:DNA(基因组)

(iii)假拟结构:无

(iv)反义:无

(v)片段类型:内部的

(vi)来源:

(A)生物体:合成的DNA引物

(xi)序列描述:SEQ ID NO:12

TTACTAGTGA TGGAYGAYGG NIGGTT

(2) SEQ ID NO:13:的资料:

(i)序列特征:

(A)长度:26bp

(B)类型:核苷酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线形

(ii)分子类:DNA(基因组)

(iii)假拟结构:无

(iv)反义:无

(v)片段类型:内部的

(vi)来源:

(A)生物体:合成的DNA引物

(xi)序列描述:SEQ ID NO:13

TTGAGCTCRT CNCCYAANCC NGCRRIT

(2) SEQ ID NO:14:的资料:

(i)序列特征:

(A)长度:26bp

(B)类型:核苷酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线形

(ii)分子类:DNA(基因组)

(iii)假拟结构:无

(iv)反义:无

(v)片段类型:内部的

(vi)来源:

(A)生物体:合成的DNA引物

(xi)序列描述:SEQ ID NO:14

TTGAGCTCRT CNCCNAGNCC NGCGIT

(2) SEQ ID NO:15:的资料:

(i)序列特征:

(A)长度:26bp

(B)类型:核苷酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线形

(ii)分子类:DNA(基因组)

(iii)假拟结构:无

(iv)反义:无

(v)片段类型:内部的

(vi)来源:

(A)生物体:合成的引物

(xi)序列描述:SEQ ID NO:15

TTGAGCTCRT CNCCNAGNCC NGCATT

(2) SEQ ID NO:16:的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度:17bp

(B) 类型:核苷酸

(C) 链型:单链

(D) 拓扑结构:线形

(ii) 分子类:DNA(基因组)

(iii) 假拟结构:无

(iv) 反义:无

(v) 片段类型:内部的

(vi) 来源:

(A) 生物体:合成的引物

(xi) 序列描述:SEQ ID NO:16

GCGTTATCGG ACACTCG

(2) SEQ ID NO:17:的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度:17bp

(B) 类型:核苷酸

(C) 链型:单链

(D) 拓扑结构:线形

(ii) 分子类:DNA(基因组)

(iii) 假拟结构:无

(iv) 反义:无

(v) 片段类型:内部的

(vi) 来源:

(A) 生物体:合成的引物

(xi) 序列描述:SEQ ID NO:17

GTITGGGGAC AAGTACC

(2) SEQ ID NO:18:的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度:55bp

(B) 类型:核苷酸

(C) 链型:单链

(D) 拓扑结构:线形

- (ii)分子类:DNA(基因组)
- (iii)假拟结构:无
- (iv)反义:无
- (v)片段类型:内部的
- (vi)来源:
 - (A)生物体:合成的引物

(xi)序列描述:SEQ ID NO:18
CTGCAGTCGA CTCTAGAGGA TCCGCGGCGG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTT 55

(2) SEQ ID NO:19:的资料:

- (i)序列特征:
 - (A)长度:29bp
 - (B)类型:核苷酸
 - (C)链型:单链
 - (D)拓扑结构:线形
- (ii)分子类:DNA(基因组)
- (iii)假拟结构:无
- (iv)反义:无
- (v)片段类型:内部的
- (vi)来源:
 - (A)生物体:合成的引物

(xi)序列描述:SEQ ID NO:19
TTACTGCAGT CGACTCTAGA GGATCCGCG 29

(2) SEQ ID NO:20:的资料:

- (i)序列特征:
 - (A)长度:106bp
 - (B)类型:核苷酸
 - (C)链型:单链
 - (D)拓扑结构:线形
- (ii)分子类:DNA(基因组)
- (iii)假拟结构:无
- (iv)反义:无
- (v)片段类型:内部的
- (vi)来源:
 - (A)生物体:合成的引物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 20

GCTOCTCATG GTGGATCCCC AGTTGTGTAT ATAGAGGATT GAGGAAGGAA GAGAAGTGTG 60
GATAGAGGTA AATTGAGTTG GAAACTCCAA GCATGGCATC CCTTGC 106

(2) SEQ ID NO: 21: 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 22bp

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类: DNA(基因组)

(iii) 假拟结构: 无

(iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

(vi) 来源:

(A) 生物体: 合成的引物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 21

TGTTCTGGCT GTGGTGTACA GG 22

(2) SEQ ID NO: 22: 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 26bp

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类: DNA(基因组)

(iii) 假拟结构: 无

(iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

(vi) 来源:

(A) 生物体: 合成的引物

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 22

GCAAGCTTTA TCATCAACCAC CATGAT 26

说明书附图

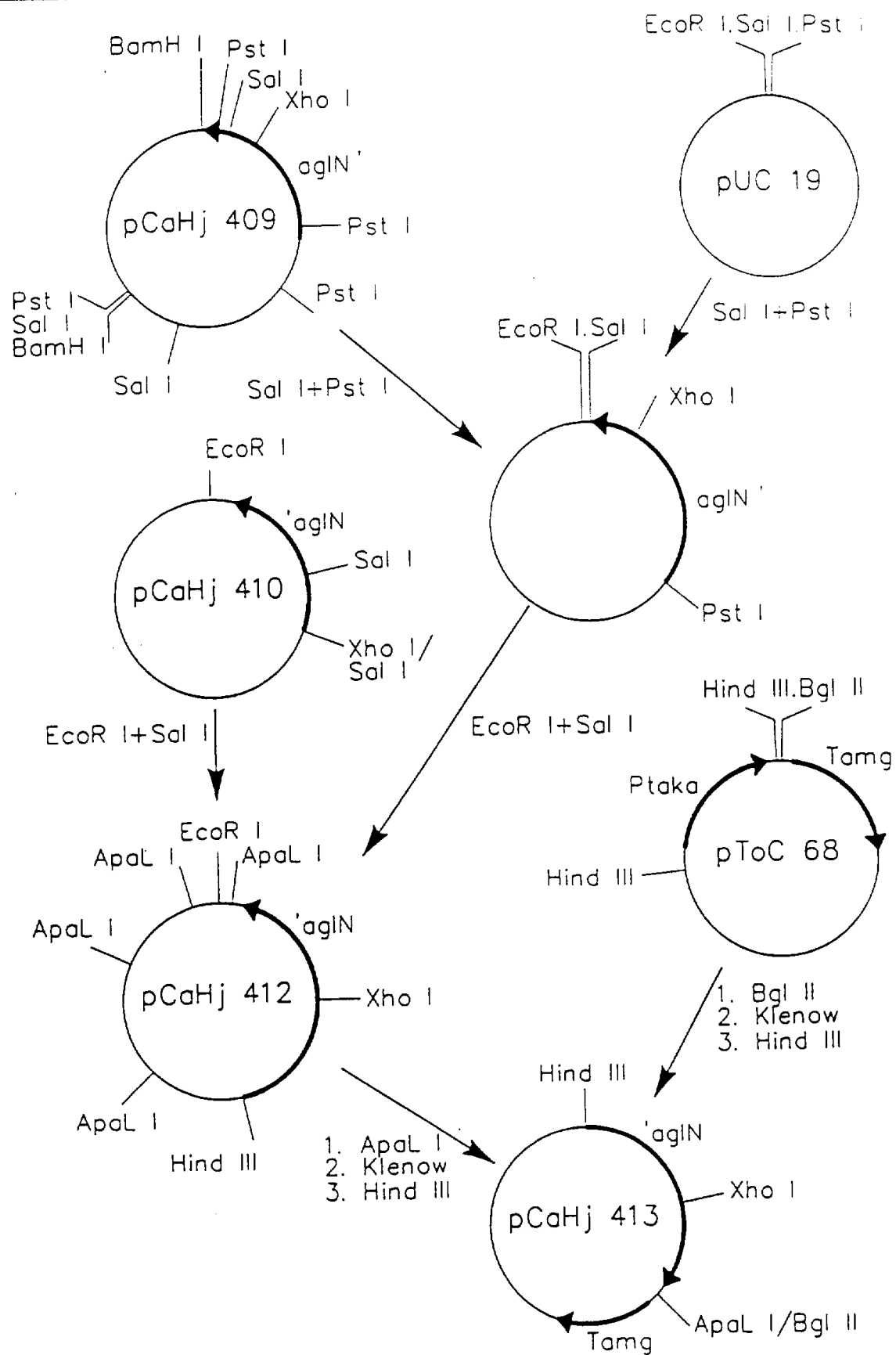


图 1

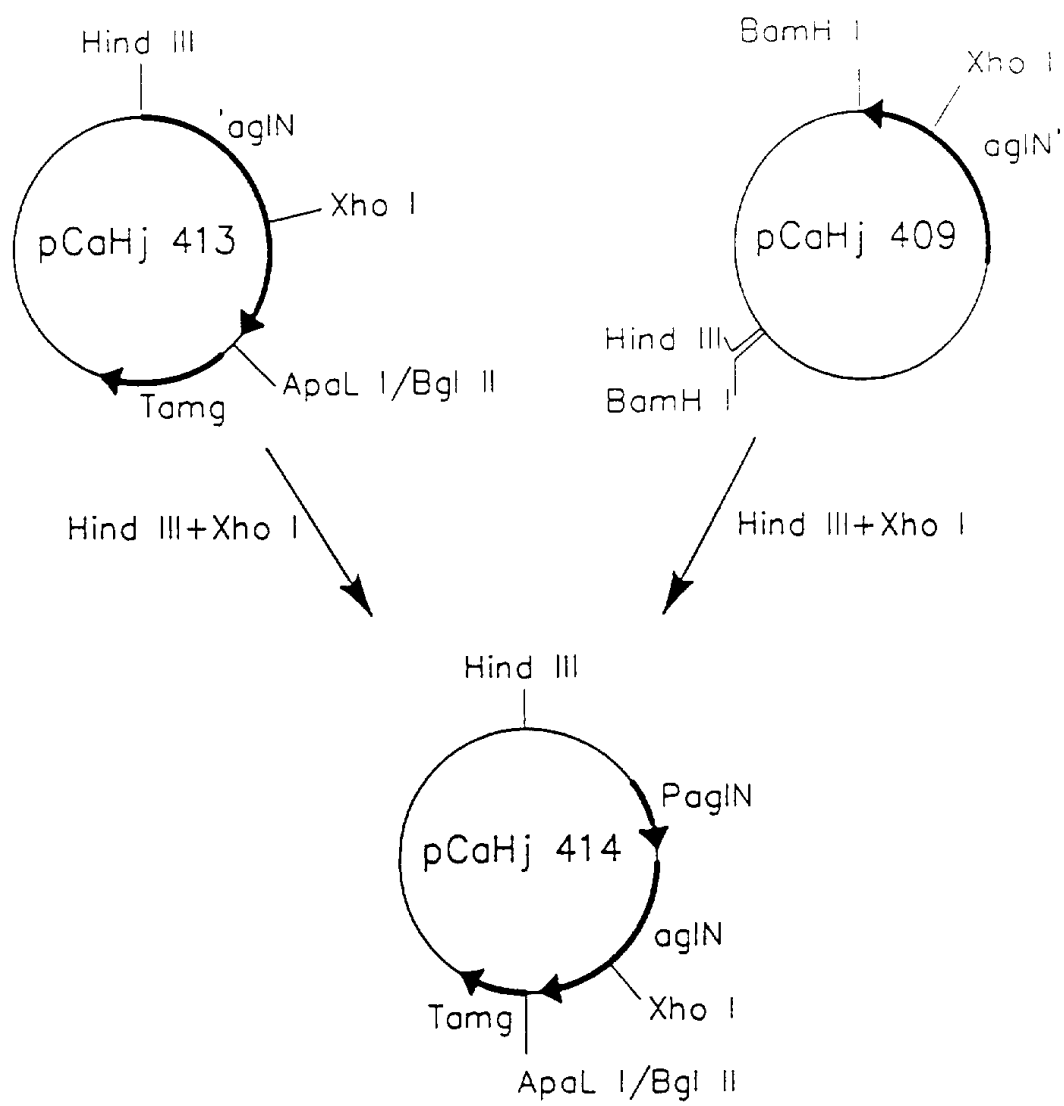


图 2

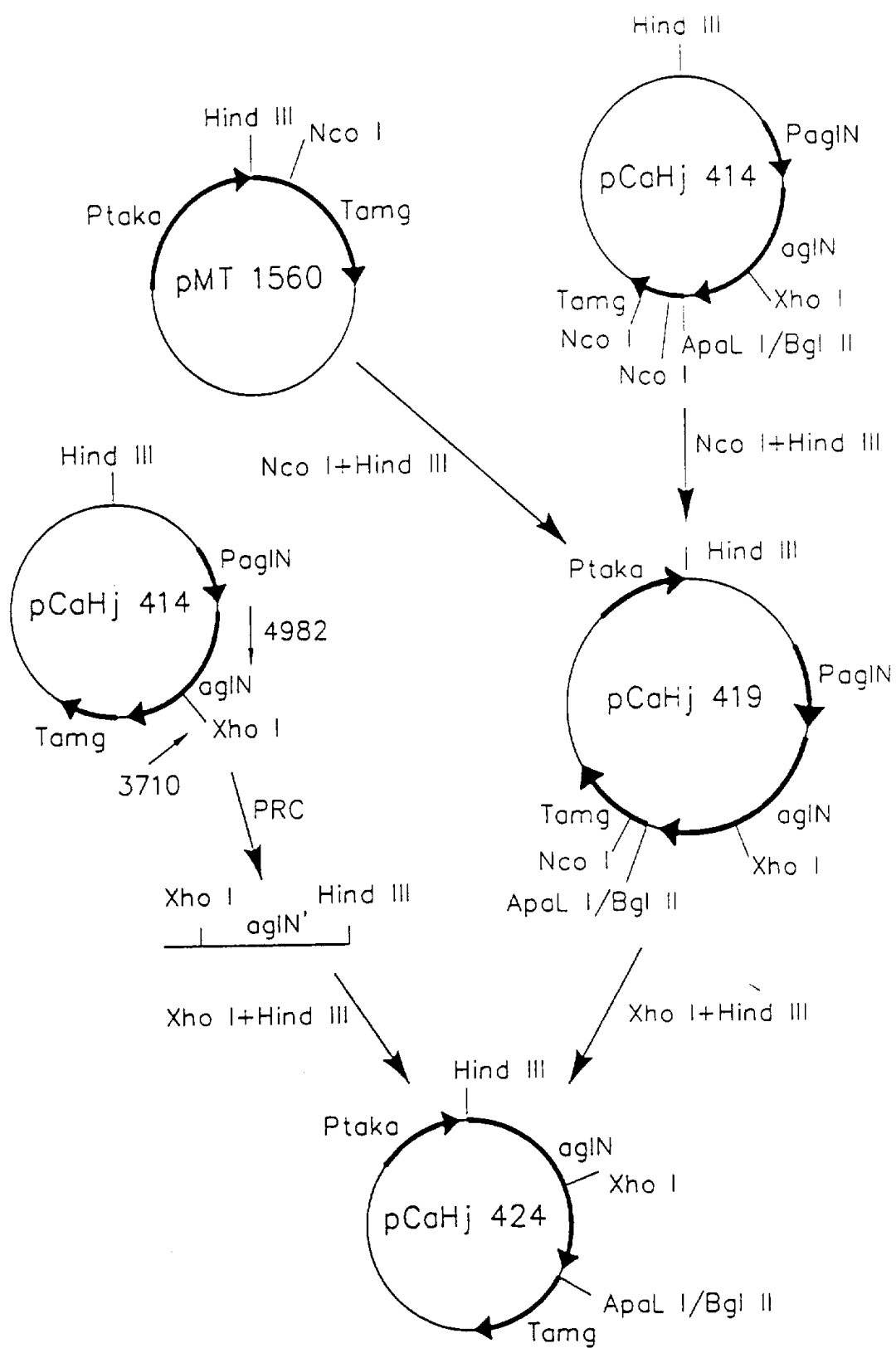


图 3

相对活性 9

最适 pH

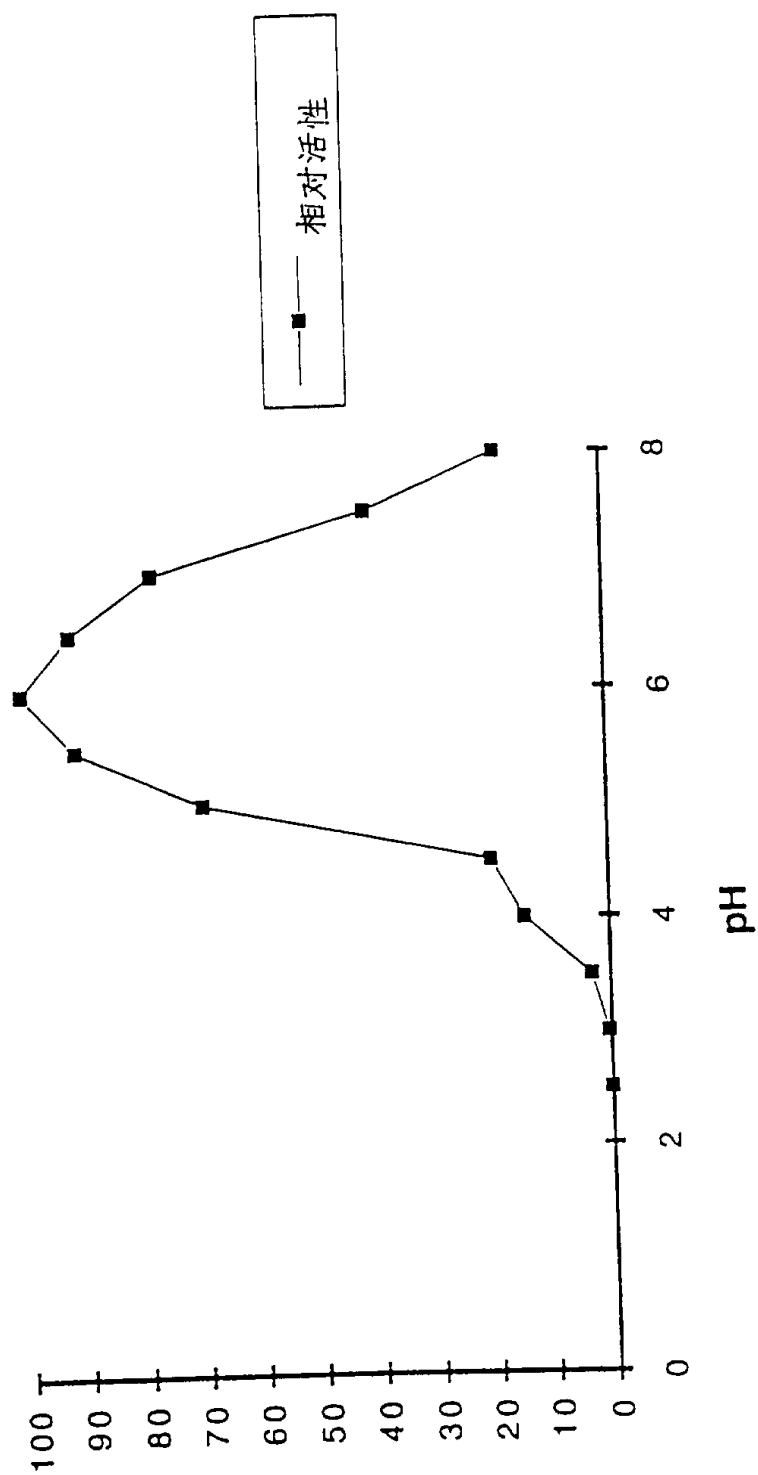


图4

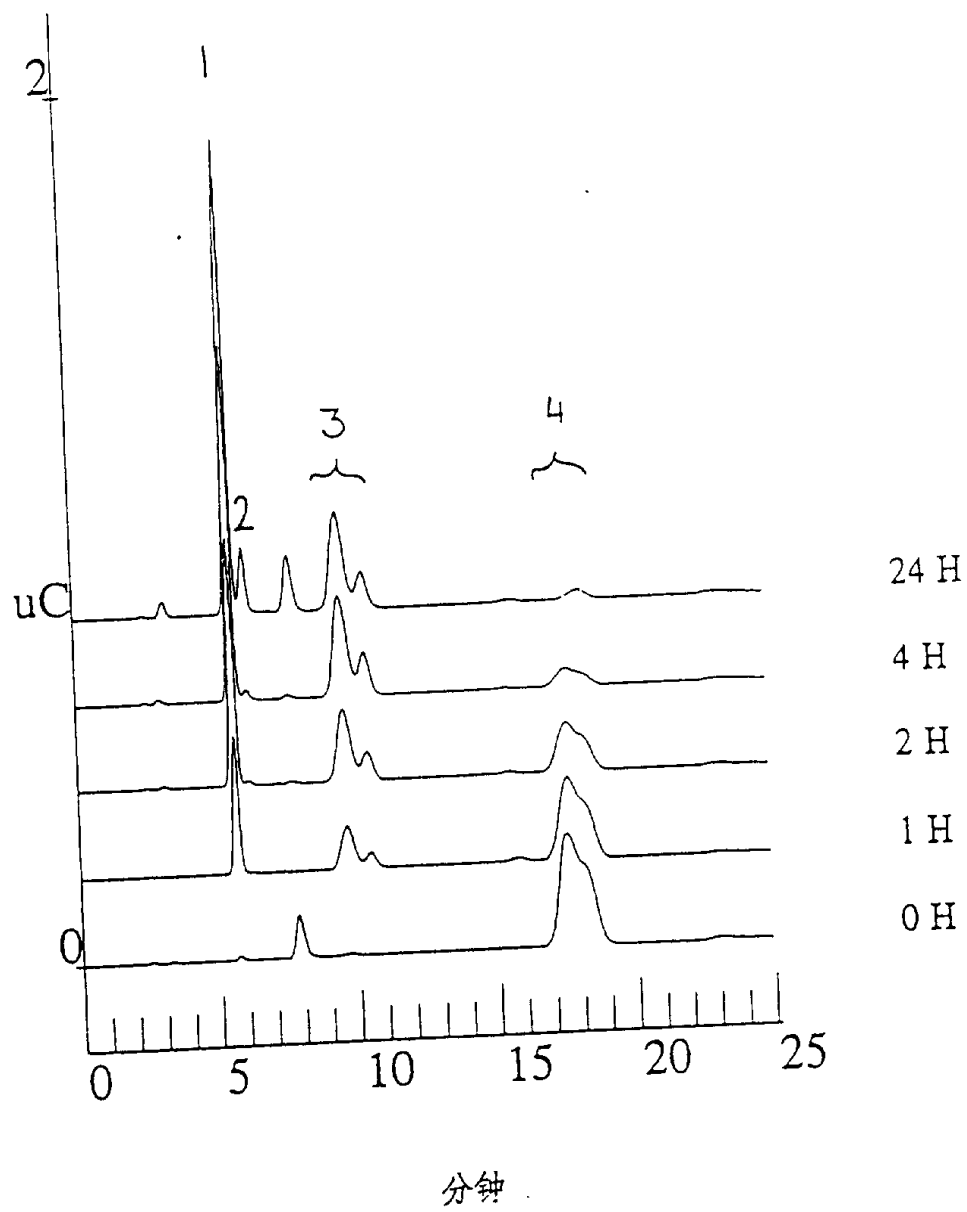


图 5

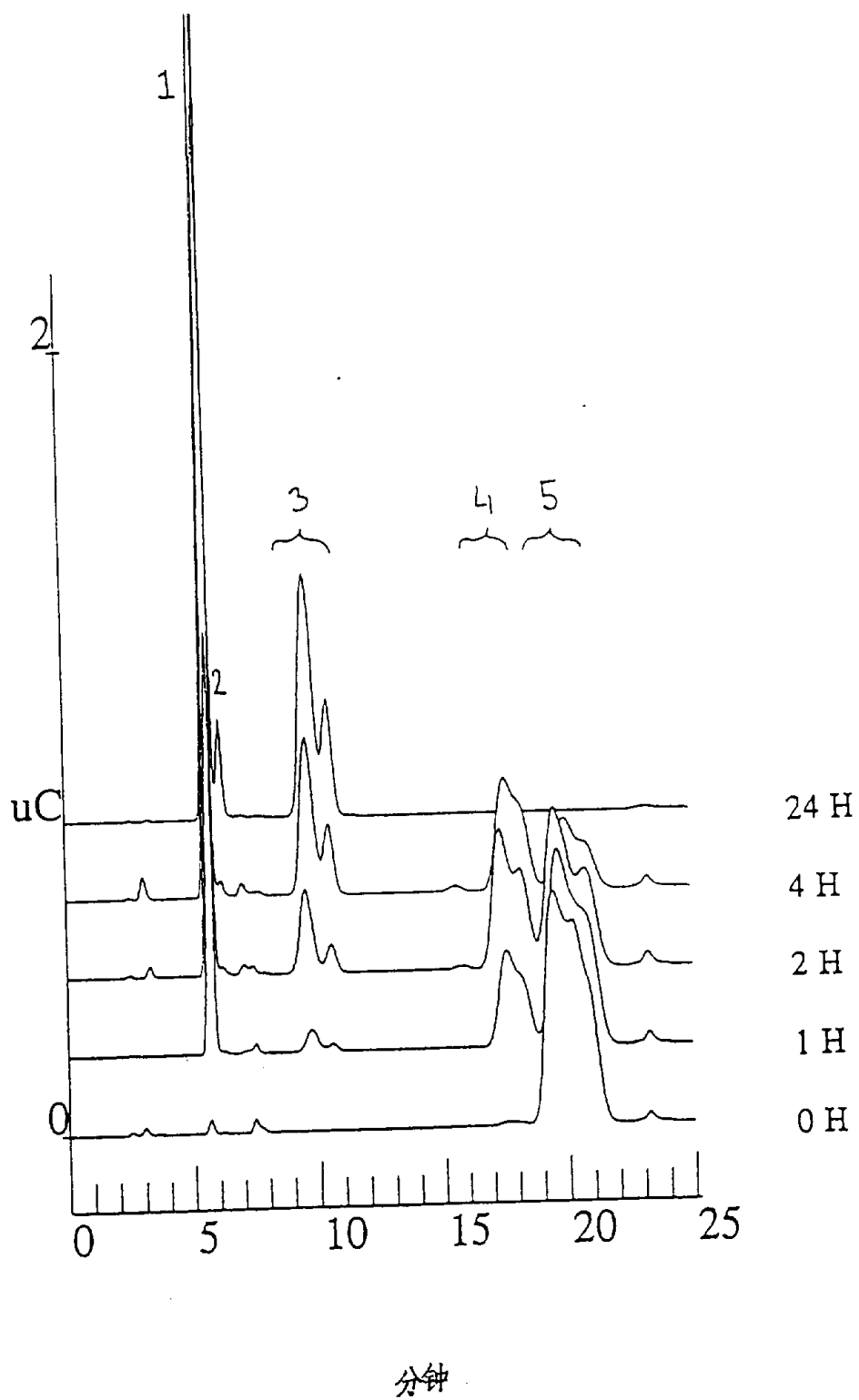


图 6