



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105420268 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201510920723. 8

(22) 申请日 2007. 12. 20

(30) 优先权数据

60/876, 895 2006. 12. 21 US

(62) 分案原申请数据

200780051262. 9 2007. 12. 20

(71) 申请人 诺维信股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 霍华德·布罗迪 唐娜·莫耶

阿曼达·费希尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 史悦

(51) Int. Cl.

C12N 15/80(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12P 1/02(2006. 01)

权利要求书2页 说明书37页

序列表29页 附图5页

(54) 发明名称

通过移行 RNA 干扰来降低或消除丝状真菌菌株中的基因表达的方法

(57) 摘要

本发明涉及通过移行 RNA 干扰来降低或消除丝状真菌菌株中的基因表达的方法,具体地涉及通过移行 RNA 干扰来降低或消除丝状真菌菌株中的靶基因表达的方法。

1. 用于降低或消除丝状真菌菌株中编码生物学物质的靶基因的表达的方法,其包括:

(a) 向丝状真菌菌株的基因组中插入双链可转录核酸构建体,该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子,所述第一多核苷酸包含与编码所述生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区,所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区,其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子;和

(b) 通过在如下条件下培养所述丝状真菌菌株来诱导包含要通过移行 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA(siRNA) 的生成,所述条件容许生成所述双链可转录核酸构建体的 RNA 转录物,其然后被转变成与靶基因的 RNA 转录物相互作用的 siRNA,以降低或消除编码所述生物学物质的靶基因的表达。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述与靶基因具有同源性的第一可转录区包含靶基因的至少 19 个核苷酸。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述与靶基因没有有效同源性的第二可转录区包含至少 19 个核苷酸。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述第一和第二多核苷酸由间隔序列分隔开。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述两个彼此反向互补的区段由连接序列分隔开。

6. 权利要求 1 的方法,其中靶基因的表达降低了至少 20%、优选至少 30%、更优选至少 40%、更优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、甚至更优选至少 80%、最优选至少 90%、和甚至最优选 100%。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述短干扰 RNA 与靶基因的一个或多个同系物的 RNA 转录物相互作用以降低或消除靶基因的一个或多个同系物的表达。

8. 权利要求 7 的方法,其中靶基因的一个或多个同系物的表达降低了至少 20%、优选至少 30%、更优选至少 40%、更优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、甚至更优选至少 80%、最优选至少 90%、和甚至最优选 100%。

9. 包含双链可转录核酸构建体的丝状真菌菌株,该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子,所述第一多核苷酸包含与编码生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区,所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区,其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且其中所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子,其中通过在如下条件下培养所述丝状真菌菌株来诱导包含要通过移行 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA(siRNA) 的生成,所述条件容许生成双链可转录核酸构建体的 RNA 转录物,其然后被转变成与靶基因的 RNA 转录物相互作用的 siRNA,以降低或消除编码生物学物质的靶基因的表达。

10. 用于生成生物学物质的方法,其包括:

(a) 在有益于生成感兴趣的生物学物质的条件下培养丝状真菌菌株,其中该丝状真菌菌株包含双链可转录核酸构建体,该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子,所述第一多核苷酸包含与编码不想要的生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区,所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区,其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且其中所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子,其中通过在如下条件下培养丝状真菌菌株来生成双链可转录的核酸构建

体的 RNA 转录物,所述条件容许生成所述 RNA 转录物,然后其被转变成包含要通过移行 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA (siRNA),其与靶基因的 RNA 转录物相互作用以降低或消除编码不想要的生物学物质的靶基因的表达;且其中所述丝状真菌菌株包含编码所述感兴趣的生物学物质的第三多核苷酸;和

(b) 自培养基回收所述感兴趣的生物学物质。

通过移行 RNA 干扰来降低或消除丝状真菌菌株中的基因表达的方法

[0001] 本发明申请是基于申请日为 2007 年 12 月 20 日、申请号为 200780051262.9 (国际申请号为 PCT/US2007/088447)、名称为“通过移行 RNA 干扰来降低或消除丝状真菌菌株中的基因表达的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 对序列表的提述

[0003] 本申请含有计算机可读形式的序列表。通过提述,将该计算机可读形式收入本文。

发明领域

[0004] 本发明涉及降低或消除丝状真菌菌株中的基因表达的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 丝状真菌菌株被广泛用于具有商业价值的生物学物质的生产。然而,具有生物学物质表达和分泌增加的期望性状的丝状真菌菌株可能未必具有成功发酵最期望的特性。生物学物质的生成可以伴有降解该生物学物质或与该生物学物质共纯化的其它物质(例如酶)的生成,这能使生物学物质的回收和纯化变得复杂。

[0007] 这些问题的一个解决方案是灭活非期望物质的生成中所牵涉的基因。灭活可通过使用本领域公知方法删除或破坏基因来实现。然而,在有些情况中,由于对基因组同源区的靶向差,基因的灭活可能是困难的。灭活也可通过随机诱变来实现,随机诱变并非总是对预定靶基因特异性的,而且常常将其它突变引入宿主生物体中。在其它情形中,基因及其产物可能是丝状真菌菌株的存活所要求的。在要通过删除或破坏来灭活多种基因的情况中,任务会是非常麻烦且费时的。在存在基因家族的高度同源成员的情况中,删除或破坏所有成员会是极端冗长且困难的。

[0008] 近年来,记载了多种形式的外成性(epigenetic)基因调节(Selker,1997,Trends Genet. 13 :296-301 ;Matzke 和 Matzke,1998, Cell. Mol. Life. Sci. 54 :94-103)。这些过程经由微 RNA (Morel 等,2000, Curr. Biol. 10 :1591-1594 ;Bailis 和 Forsburg,2002, Genome Biol. 3, 综述 1035 ;Grewal 和 Moazed,2003, Science 301 :798-802) 通过调控信使 RNA 水平来影响基因表达 (Hammond 和 Baulcombe,1996, Plant Mol. Biol. 32 :79-88 ;Xi-song Ke 等,2003, Current Opinion in Chemical Biology 7 :516-523)。

[0009] 基于果蝇 (*Drosophila*) 和秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的遗传研究, RNA 干扰 (RNAi), 也称作转录后基因沉默(在植物中), 理解为牵涉通过装配将同源 RNA 靶向降解的蛋白质-RNA 效应器核酸酶复合物来使基因表达沉默 (Hannon,2002, Nature 418 :244-251)。将双链 RNA (dsRNA) 加工成小干扰 RNA (siRNA) 通过称作 Dicer 的酶家族来实现 (Bernstein 等,2001, Nature 409 :363)。Dicer, 特异性切割 dsRNA 的内切核酸酶的 RNA 酶 III 家族的成员, 负责将 dsRNA 消化成范围为 20-25 个核苷酸的 siRNA (Elbashir 等, 2001, Nature 411 :494)。然后, 这些 siRNA 与 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC) 结合 (Elbashir 等,2001, Genes and Dev. 15 :188 ;Nykanen 等,2001, Cell 107 :303 ;Hammond 等,2001, Science 293 :1146)。虽然没有完全理解, RISC 靶向衍生反义片段的 mRNA, 接着是对 mRNA

的内切和外切核酸酶消化,高效地使该基因的表达沉默。已经在植物、线虫、昆虫、哺乳动物、和丝状真菌中证明了 RNAi (Matzke 和 Matzke, 1998, 见上文; Kennerdell 等, 2000, *Nat. Biotechnol.* 18 :896-8; Boshier 等, 1999, *Genetics* 153 :1245-56; Voorhoeve 和 Agami, 2003, *Trends Biotechnol.* 21 :2-4; McCaffrey 等, 2003, *Nat. Biotechnol.* 21 :639-44; WO 03/050288; WO 01/49844; WO 98/53083; 和 WO 05/056772)。

[0010] 移行 RNAi (transitive RNAi), 也称作铺展 (spreading), 指沉默信号在特定基因之外 (beyond) 移动。在植物中, 已经发现移行沉默存在于双链 RNA 的基因沉默所靶向的 mRNA 的上游和下游二者 (Fabian 等, 2002, *Plant Cell* 14 :857-867; Garcia-Perez 等, 2004, *The Plant Journal* 38 :594-602; Vaistij 等, 2002, *The Plant Cell* 14 :857-867; Van Houdt 等, 2003, *Plant Physiol.* 131 :245-253)。在秀丽线虫中, 已经将移行 RNAi 描述为靶 dsRNA 上游的转录物的沉默 (Alder 等, 2003, *RNA J.* 9 :25-32; Hannon, 2002, *Nature* 418 :244-251; Sijen 等, 2001, *Cell* 107 :465-476)。在秀丽线虫中, 移行 RNAi 的描述指示了在衍生自 dsRNA 靶的 siRNA 之外, 生成了与 5' 侧翼序列共享同源性的第二 siRNA, 推测是 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRP) 和 Dicer 活性的结果 (Bleys 等, 2006, *RNA J.* 12 :1633-1639; Petersen 等, 2005, *Plant Molecular Biology* 58 :575-583)。移行 RNAi 在昆虫和哺乳动物中不是普遍存在的 (Chi 等, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 :6343-6346; Hoa 等, 2003, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33 :949-957; Roignam 等, 2003, *RNA J.* 9 :299-308)。

[0011] 移行 RNAi 与常规 RNAi 在数个方面不同。虽然双链 RNA 充当 RNAi 和移行 RNAi 二者的诱导物, 但是移行 RNAi 表现出需要 RdRP, 而单独的 RNAi 则不然。因此, 在展现移行 RNAi 的生物体中, 基因沉默不受双链 RNA 的边界的限制, 而且基因沉默能延伸入侧翼序列。然而, 在缺乏移行 RNAi 的生物体中, 基因沉默局限在双链区域内。

[0012] 为了丝状真菌菌株的菌株开发和改善、功能基因组学、和途径工程, 本领域具有降低或消除一个或多个基因的表达的备选方法会是有利的。

[0013] 本发明涉及降低或消除丝状真菌菌株中的一个或多个基因的表达的方法。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及降低或消除丝状真菌菌株中编码生物学物质的靶基因的表达的方法, 其包括:

[0016] (a) 向丝状真菌菌株的基因组中插入双链可转录核酸构建体, 该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子, 所述第一多核苷酸包含与编码所述生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区, 所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区, 其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子; 和

[0017] (b) 通过在如下条件下培养所述丝状真菌菌株来诱导包含要通过移行 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA (siRNA) 的生成, 所述条件容许生成所述双链可转录核酸构建体的 RNA 转录物, 其然后被转变成与靶基因的 RNA 转录物相互作用的 siRNA, 以降低或消除编码所述生物学物质的靶基因的表达。

[0018] 本发明还涉及包含双链可转录核酸构建体的丝状真菌菌株, 该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子, 所述第一多核苷酸包含与编码生物学物

质的靶基因具有同源性的第一可转录区,所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区,其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且其中所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子,其中通过在如下条件下培养所述丝状真菌菌株来诱导包含要通过移行 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA (siRNA) 的生成,所述条件容许生成双链可转录核酸构建体的 RNA 转录物,其然后被转变成与靶基因的 RNA 转录物相互作用的 siRNA,以降低或消除编码生物学物质的靶基因的表达。

[0019] 本发明进一步涉及生成感兴趣的生物学物质的方法,其包括:

[0020] (a) 在有益于生成感兴趣的生物学物质的条件下培养丝状真菌菌株,其中该丝状真菌菌株包含双链可转录核酸构建体,该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子,所述第一多核苷酸包含与编码不想要的生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区,所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区,其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且其中所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子,其中通过培养丝状真菌菌株来生成双链可转录核酸构建体的 RNA 转录物,它然后被转变成包含要通过移行 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA (siRNA),其与靶基因的 RNA 转录物相互作用以降低或消除编码不想要的生物学物质的靶基因的表达;且其中所述丝状真菌菌株包含编码所述生物学物质的第三多核苷酸;和

[0021] (b) 自培养液回收所述生物学物质。

[0022] 具体地,本发明涉及如下各项:

[0023] 1. 用于降低或消除丝状真菌菌株中编码生物学物质的靶基因的表达的方法,其包括:

[0024] (a) 向丝状真菌菌株的基因组中插入双链可转录核酸构建体,该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子,所述第一多核苷酸包含与编码所述生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区,所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区,其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子;和

[0025] (b) 通过在如下条件下培养所述丝状真菌菌株来诱导包含要通过移行 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA (siRNA) 的生成,所述条件容许生成所述双链可转录核酸构建体的 RNA 转录物,其然后被转变成与靶基因的 RNA 转录物相互作用的 siRNA,以降低或消除编码所述生物学物质的靶基因的表达。

[0026] 2. 项 1 的方法,其中所述与靶基因具有同源性的第一可转录区包含靶基因的至少 19 个核苷酸。

[0027] 3. 项 1 的方法,其中所述与靶基因没有有效同源性的第二可转录区包含至少 19 个核苷酸。

[0028] 4. 项 1 的方法,其中所述第一和第二多核苷酸由间隔序列分隔开。

[0029] 5. 项 1 的方法,其中所述两个彼此反向互补的区段由连接序列分隔开。

[0030] 6. 项 1 的方法,其中靶基因的表达降低了至少 20%、优选至少 30%、更优选至少 40%、更优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、甚至更优选至少 80%、最优选至少 90%、和甚至最优选 100%。

[0031] 7. 项 1 的方法,其中所述短干扰 RNA 与靶基因的一个或多个同系物的 RNA 转录物

相互作用以降低或消除靶基因的一个或多个同系物的表达。

[0032] 8. 项 7 的方法, 其中靶基因的一个或多个同系物的表达降低了至少 20%、优选至少 30%、更优选至少 40%、更优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、甚至更优选至少 80%、最优选至少 90%、和甚至最优选 100%。

[0033] 9. 包含双链可转录核酸构建体的丝状真菌菌株, 该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子, 所述第一多核苷酸包含与编码生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区, 所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区, 其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且其中所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子, 其中通过在如下条件下培养所述丝状真菌菌株来诱导包含要通过移入 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA (siRNA) 的生成, 所述条件容许生成双链可转录核酸构建体的 RNA 转录物, 其然后被转变成与靶基因的 RNA 转录物相互作用的 siRNA, 以降低或消除编码生物学物质的靶基因的表达。

[0034] 10. 项 9 的丝状真菌菌株, 其中所述第一同源区包含靶基因的至少 19 个核苷酸。

[0035] 11. 项 9 的丝状真菌菌株, 其中所述与靶基因没有有效同源性的第二可转录区包含至少 19 个核苷酸。

[0036] 12. 项 9 的丝状真菌菌株, 其中所述第一和第二多核苷酸由间隔序列分隔开。

[0037] 13. 项 12 的丝状真菌菌株, 其中所述两个彼此反向互补的区段由连接序列分隔开。

[0038] 14. 项 12 的丝状真菌菌株, 其中靶基因的表达降低了至少 20%、优选至少 30%、更优选至少 40%、更优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、甚至更优选至少 80%、最优选至少 90%、和甚至最优选 100%。

[0039] 15. 项 12 的丝状真菌菌株, 其中所述短干扰 RNA 与靶基因的一个或多个同系物的 RNA 转录物相互作用以降低或消除靶基因的一个或多个同系物的表达。

[0040] 16. 项 15 的丝状真菌菌株, 其中靶基因的一个或多个同系物的表达降低了至少 20%、优选至少 30%、更优选至少 40%、更优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、甚至更优选至少 80%、最优选至少 90%、和甚至最优选 100%。

[0041] 17. 用于生成生物学物质的方法, 其包括:

[0042] (a) 在有益于生成感兴趣的生物学物质的条件下培养丝状真菌菌株, 其中该丝状真菌菌株包含双链可转录核酸构建体, 该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子, 所述第一多核苷酸包含与编码不想要的生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区, 所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区, 其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且其中所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子, 其中通过在如下条件下培养丝状真菌菌株来生成双链可转录的核酸构建体的 RNA 转录物, 所述条件容许生成所述 RNA 转录物, 然后其被转变成包含要通过移入 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA (siRNA), 其与靶基因的 RNA 转录物相互作用以降低或消除编码不想要的生物学物质的靶基因的表达; 且其中所述丝状真菌菌株包含编码所述感兴趣的生物学物质的第三多核苷酸; 和

[0043] (b) 自培养基回收所述感兴趣的生物学物质。

[0044] 18. 项 19 的方法, 其中所述与靶基因具有同源性的第一可转录区包含靶基因的至

少 19 个核苷酸。

[0045] 19. 项 19 的方法,其中所述与靶基因没有有效同源性的第二可转录区包含至少 19 个核苷酸。

[0046] 20. 项 19 的方法,其中所述第一和第二多核苷酸由间插序列分隔开。

[0047] 21. 项 19 的方法,其中所述两个彼此反向互补的区段由连接序列分隔开。

[0048] 22. 项 19 的方法,其中靶基因的表达降低了至少 20%、优选至少 30%、更优选至少 40%、更优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、甚至更优选至少 80%、最优选至少 90%、和甚至最优选 100%。

[0049] 23. 项 19 的方法,其中所述干扰 RNA 与靶基因的一个或多个同系物的 RNA 转录物相互作用以降低或消除靶基因的一个或多个同系物的表达。

[0050] 24. 项 23 的方法,其中靶基因的一个或多个同系物的表达降低了至少 20%、优选至少 30%、更优选至少 40%、更优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、甚至更优选至少 80%、最优选至少 90%、和甚至最优选 100%。

[0051] 附图简述

[0052] 图 1 显示了丝状真菌中移行 RNA 干扰的示意图。

[0053] 图 2 显示了 pCW098 的限制图 (restriction map)。

[0054] 图 3 显示了 pCW099 的限制图。

[0055] 图 4 显示了 pEFer14 的限制图。

[0056] 图 5 显示了 pDM261 的限制图。

[0057] 图 6 显示了 pDM266 的限制图。

[0058] 图 7 显示了 pAmFs031 的限制图。

[0059] 图 8 显示了 pAL01 的限制图。

[0060] 图 9 显示了 pAL02 的限制图。

[0061] 定义

[0062] 移行 RNA 干扰:术语“移行 RNA 干扰”或“移行 RNAi”在本文中定义为沉默信号在特定基因之外 (beyond a particular gene) 的移动。在移行 RNAi 中,双链 RNA (dsRNA) 能充当新 dsRNA 的合成的模板,由此与靶序列共享同源性的 siRNA 导致沿着 mRNA 的新序列的沉默的延伸或铺展。

[0063] 短干扰 RNA:术语“短干扰 RNA”或“siRNA”在本文中定义为长 20-25 个核苷酸的 RNA 片段,即 Dicer 介导的对双链 RNA 的消化的产物。

[0064] 没有有效同源性:术语“没有有效同源性”在本文中定义为有义链和反向互补链上的对应核苷酸包含优选少于 20 个、更优选少于 15 个、甚至更优选少于 10 个、和最优选少于 5 个与靶基因序列相同的连续核苷酸。

[0065] 两个彼此反向互补的区段:短语“两个彼此反向互补的区段”在本文中定义为数段或数条 DNA 之一,它与其它的 DNA 配合以构成整体且能够进行 Watson-Crick 碱基配对。

[0066] 移行沉默的靶序列:短语“移行沉默靶序列”在本文中定义为为基因沉默打上标记的 (earmarked) dsRNA 序列,其中该 dsRNA 序列是来自邻接序列 (adjoining sequence) 的 siRNA 延伸的结果。

[0067] 同一性:两种氨基酸序列之间或两种核苷酸序列之间的相关性以参数“同一性”来

描述。

[0068] 就本发明而言,两种氨基酸序列之间的同一性程度使用 Needleman-Wunsch 算法 (Needleman 和 Wunsch,1970, J.Mol.Biol.48 :443-453) 来测定,正如 EMBOSS 包 (EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice 等,2000,Trends in Genetics 16 :276-277) (优选 3.0.0 版或更晚的) 中的 Needle 程序中所执行的。所使用的任选参数是缺口打开罚分为 10,缺口延伸罚分为 0.5,及 EBLOSUM62 (EMBOSS 版的 BLOSUM62) 替代矩阵。使用 Needle 标记的“最长同一性”(使用 -nobrief 选项获得的) 的输出作为百分比同一性,而且是如下计算的:

[0069] (相同残基 x 100)/(比对长度 - 比对中的缺口总数)

[0070] 就本发明而言,两种脱氧核糖核苷酸序列之间的同一性程度使用 Needleman-Wunsch 算法 (Needleman 和 Wunsch,1970, 见上文) 来测定,正如 EMBOSS 包 (EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice 等,2000, 见上文) (优选 3.0.0 版或更晚的) 中的 Needle 程序中所执行的。所使用的任选参数是缺口打开罚分为 10,缺口延伸罚分为 0.5,及 EDNAFULL (EMBOSS 版的 NCBI NUC4.4) 替代矩阵。使用 Needle 标记的“最长同一性”(使用 -nobrief 选项获得的) 的输出作为百分比同一性,而且是如下计算的:

[0071] (相同脱氧核糖核苷酸 x 100)/(比对长度 - 比对中的缺口总数)

[0072] cDNA :术语“cDNA”在本文中定义为可通过逆转录自从真核细胞获得的成熟的、经过剪接的 mRNA 分子制备的 DNA 分子 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., 和 Maniatis, T,1989, Molecular Cloning:A Laboratory Manual。第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,NY)。cDNA 缺少在基因组 DNA 中存在的内含子序列。最初的初级 RNA 转录物是前体分子,其通过一系列加工步骤之后作为成熟的、经过剪接的 mRNA 出现。这些步骤包括通过称作剪接的过程消除内含子序列。因此,自 mRNA 衍生的 cDNA 缺少任何内含子序列。

[0073] 核酸构建体 :术语“核酸构建体”如本文中所使用的指从天然存在基因分离的,或经修饰而以在其它情况中不会在自然界中存在的方式含有核酸区段的,或人工合成的,单链或双链核酸分子。当核酸构建体含有编码序列的表达所需要的控制序列时,术语核酸构建体与术语“表达盒”同义。

[0074] 控制序列 :术语“控制序列”在本文中定义成包括编码本发明多肽的多核苷酸的表达所必需的所有构件。每一种控制序列对于编码多肽的核苷酸序列可以是天然的或外来的,或者对于彼此是天然的或外来的。此类控制序列包括,但不限于,前导序列、聚腺苷酸化序列、前肽序列 (propeptide sequence)、启动子、信号肽序列和转录终止子。最小限度,控制序列包括启动子及转录和翻译终止信号。控制序列可以与接头一起提供,接头用于引入特异性限制性位点以便于控制序列与编码多肽的核苷酸序列的编码区的连接。

[0075] 启动子 :术语“启动子”在本文中定义为结合 RNA 聚合酶并将聚合酶引导至编码生物学物质的核酸序列的正确的下游转录起始位点以启动转录的 DNA 序列。RNA 聚合酶高效催化与编码区的适宜 DNA 链互补的信使 RNA 的装配。术语“启动子”还会理解为包括 5' 非编码区 (介于启动子和翻译起点之间) (用于转录成 mRNA 之后的翻译)、顺式作用转录控制元件诸如增强子、和其它能够与转录因子相互作用的核苷酸序列。

[0076] 突变型启动子：术语“突变型启动子”在本文中定义为具有亲本启动子的包含一个或多个核苷酸的替代、删除和 / 或插入的核苷酸序列的启动子，其中突变型启动子具有比相应的亲本启动子或高或低的启动子活性。术语“突变型启动子”还涵盖天然突变体和使用本领域公知方法（诸如经典诱变、定点诱变、和 DNA 改组）获得的体外生成的突变体。

[0077] 杂合启动子：术语“杂合启动子”在本文中定义为两个或更多个启动子的部分融合在一起，以生成作为所述两个或更多个启动子的融合物的序列，当与编码序列可操作相连接时，它介导编码序列转录成 mRNA。

[0078] 串联启动子：术语“串联启动子”在本文中定义为与编码序列可操作相连接以介导编码序列转录成 mRNA 的，以串联排列的两个或更多个启动子序列。

[0079] 可操作相连接：术语“可操作相连接”在本文中指其中控制序列被置于相对于多核苷酸序列的编码序列的适宜位置使得控制序列指导多肽的编码序列表达的构造 (configuration)。

[0080] 编码序列：在本文中使用时，术语“编码序列”指直接规定其蛋白质产物的氨基酸序列的核苷酸序列。编码序列的边界一般由开读框来决定，开读框通常以 ATG 起始密码子或可选起始密码子诸如 GTG 和 TTG 开始，并以终止密码子诸如 TAA、TAG、和 TGA 结束。编码序列可以是基因组 DNA、cDNA、合成 DNA、或重组核苷酸序列。

[0081] 表达：术语“表达”包括多肽的生成中所牵涉的任何步骤，包括，但不限于，转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0082] 表达载体：术语“表达载体”在本文中定义为包含编码多肽的多核苷酸且与支持其表达的别的核苷酸可操作相连接的线性或环状 DNA 分子。

[0083] 宿主细胞：术语“宿主细胞”，如本文中所使用的，包括易于用包含本发明的多核苷酸的核酸构建体或表达载体转化、转染、转导等等的任何细胞类型。

[0084] 发明详述

[0085] 本发明涉及降低或消除丝状真菌菌株中编码生物学物质的靶基因的表达的方法，其包括：(a) 向丝状真菌菌株的基因组中插入双链可转录核酸构建体，该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子，所述第一多核苷酸包含与编码所述生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区，所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区，其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子；和 (b) 通过在如下条件下培养所述丝状真菌菌株来诱导包含要通过移行 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA (siRNA) 的生成，所述条件容许生成所述双链可转录核酸构建体的 RNA 转录物，其然后被转变成与靶基因的 RNA 转录物相互作用的 siRNA，以降低或消除编码所述生物学物质的靶基因的表达。

[0086] 图 1 显示了移行 RNA 干扰。转化子生成转录产物，该转录产物由 3' 侧翼为与靶基因没有同源性的反向重复序列 (IR) 的靶区段构成。通过 IR 的折叠和退火生成的双链 RNA (dsRNA) 被 Dicer 加工，生成与 IR 共享同源性的 siRNA。使用转录物作为模板，一部分 siRNA 被 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRP) 延伸超出 5' IR 边界，渗入 (infiltrating) 靶序列。继续延伸生成由靶物编码的 dsRNA，启动 RNAi。

[0087] 本发明的方法提供了用于丝状真菌菌株中的菌株开发和改善、功能基因组学、和途径工程的新机会。例如，依靠基因操作和途径工程，本方法可用作丝状真菌宿主菌株开发

的工具,或用作基因敲除(一种费时且成功率易变的办法)的替代方法。基因可能对通过本领域已知的标准方法灭活(诸如基因敲除)有抗性。本发明的方法提供了用于降低或消除这样的基因的表达的解决方案。基因敲除依赖于位点特异性基因置换。在真菌中,此方法的效率受到染色体基因座、置换构建体与基因组共享的DNA序列、和/或共享同源性的长度的影响。所描述的移行基因沉默的实现唯一地依赖于将靶序列的部分克隆到由反向重复构成的第二序列上游。对于降低或消除在特定丝状真菌菌株中高度表达的基因(这在例如开发作为生产宿主的生物体中可能是非常重要的),该方法也是特别有用和高效的。这种能力证明了本发明方法的力量。对于降低或消除彼此高度同源的多个基因的表达,尤其是相同家族的基因或生物合成途径或代谢途径中的同源基因,该方法也是有用的。可以操作这种方法来引起生物学物质表达的可变减少,因此该方法进一步有用。这种可变性在编码生物学物质的基因的完全敲除对于特定丝状真菌菌株会是致命的情况中,诸如在流入(feed into)感兴趣生物合成途径的第二途径中,尤其重要。

[0088] 在本发明的方法中,第一多核苷酸包含与靶基因具有同源性的第一可转录区。第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区,其中第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段。

[0089] 包含第一可转录区的第一多核苷酸(所述第一可转录区与编码生物学物质的靶基因具有同源性)和包含第二可转录区的第二多核苷酸(所述第二可转录区与靶基因没有有效同源性)可以是或不是由多核苷酸间插序列(intervening sequence)分隔开的,所述多核苷酸间插序列是双链可转录核酸构建体中与所述第一和第二多核苷酸有很少同源性或没有同源性的核苷酸序列。双链可转录核酸构建体的多核苷酸序列可以是基因组、cDNA、RNA、半合成、合成起源的,或其任意组合。

[0090] 在一个优选的方面,第一和第二多核苷酸由多核苷酸间插序列分隔开。间插序列优选由少于150个核苷酸、更优选少于100个核苷酸、更优选少于60个核苷酸、更优选少于40个核苷酸、甚至更优选少于20个核苷酸、和最优选少于10个核苷酸组成。

[0091] 在一个更优选的方面,第一和第二多核苷酸不是由多核苷酸间插序列分隔开的。

[0092] 间插序列可以是任何与第一或第二多核苷酸没有同源性的核苷酸序列,而且优选与丝状真菌菌株的基因组中的序列有很少的同源性或没有同源性,以最小化不想要的靶向/重组。

[0093] 启动子

[0094] 启动子序列对于第一同源可转录区可以是天然的或外来的(异源的),而且对于丝状真菌菌株可以是天然的或外来的。在本发明的方法中,启动子可以是天然启动子、异源启动子、突变型启动子、杂合启动子、或串联启动子。

[0095] 在本发明的方法中有用的启动子的例子包括从以下酶的基因获得的启动子:米曲霉(*Aspergillus oryzae*)TAKA淀粉酶、米赫根毛霉(*Rhizomucor miehei*)天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉(*Aspergillus niger*)中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)葡糖淀粉酶(*glaA*)、米赫根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉丙糖磷酸异构酶、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)乙酰胺酶、镶片镰孢(*Fusarium venenatum*)淀粉葡糖苷酶(WO 00/56900)、镶片镰孢 Daria(WO 00/56900)、镶片镰孢 Quinn(WO00/56900)、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)胰蛋白酶样蛋白酶(WO

96/00787)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶 I、里氏木霉纤维二糖水解酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 I、里氏木霉内切葡聚糖酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 III、里氏木霉内切葡聚糖酶 IV、里氏木霉内切葡聚糖酶 V、里氏木霉木聚糖酶 I、里氏木霉木聚糖酶 II、里氏木霉 β -木糖苷酶、以及 NA2-tpi 启动子 (来自黑曲霉中性 α -淀粉酶基因和米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的启动子的杂合体);和它们的突变的、截短的和杂合的启动子。

[0096] 在一个优选的方面,启动子是 NA2-tpi 启动子。在另一个优选的方面,启动子是 TAKA/NA2-tpi 前导杂合启动子。

[0097] 同源可转录区

[0098] 术语“与靶基因具有同源性的可转录区”在本文中定义为与靶基因的开读框或其部分同源,且在被置于适宜调节序列的控制下时被转录成 RNA (例如 ncRNA (非编码 RNA)、tRNA (转运 RNA)、rRNA (核糖体 RNA)、miRNA (微 RNA)、或 mRNA (信使 RNA)) (该 RNA 可以是或不是被翻译成生物学物质 (例如多肽)) 的核苷酸序列。可转录区的边界一般由 mRNA 5' 端恰位于开读框上游的转录起始位点和 mRNA 3' 端恰位于开读框下游的转录终止序列决定。同源可转录区可包括但不限于基因组 DNA、cDNA、半合成的、合成的、和重组的核酸序列。

[0099] 在本发明的方法中,与靶基因同源的可转录区与靶基因的对应区域可以是同样的,或者可以是它的同系物。

[0100] 实现靶基因表达的降低或灭活所需要的同系物与靶基因对应区域之间的同一性程度很可能会取决于靶基因。同系物的核苷酸序列相对于完整靶基因越小,序列间的同一性程度应当优选非常高或相同。同系物的核苷酸序列相对于完整靶基因越大,序列间的同一性程度很可能可以越低。

[0101] 在本发明的方法中,同系物的核苷酸序列与靶基因的对应区域的同一性程度为至少 65%、优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、甚至更优选至少 95%、且最优选至少 97%。就本发明而言,两种核酸序列之间的同一性程度是如本文中所定义的来确定的。

[0102] 或者,同系物与靶基因对应区域在各种严格条件下杂交的能力也能提供靶基因表达降低或灭活所需要的相关性程度的指标。然而,应当认识到,同系物与靶基因对于区域之间实现杂交所需要的严格条件越低 (例如低严格性),靶基因表达降低或灭活很可能会效率越低。

[0103] 在一个优选的方面,同系物与靶基因对应区域在低严格条件下杂交。在一个更优选的方面,同系物与靶基因对应区域在中等严格条件下杂交。在一个甚至更优选的方面,同系物与靶基因对应区域在中等-高严格条件下杂交。在一个最优选的方面,同系物与靶基因对应区域在高严格条件下杂交。在一个甚至最优选的方面,同系物与靶基因对应区域在很高严格条件下杂交。

[0104] 对于长度为至少 100 个核苷酸的探针,很低的至很高的严格条件定义为遵循标准的 Southern 印迹方法,在 42°C,在 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 μ g/ml 经剪切和变性的鲑精 DNA, 和 25% 甲酰胺 (用于很低的和低的严格性)、35% 甲酰胺 (用于中等和中等-高的严格性)、或 50% 甲酰胺 (用于高的和很高的严格性) 中进行预杂交和杂交,最佳为 12-24 小时。

[0105] 对于长度为至少 100 个核苷酸的探针,将载体材料最终优选在至少 45°C (很低的严格性)、更优选在至少 50°C (低的严格性)、更优选在至少 55°C (中等严格性)、更优选在至少 60°C (中等-高的严格性)、甚至更优选在至少 65°C (高的严格性)、和最优选在至少 70°C (很高的严格性)使用 2X SSC, 0.2% SDS 清洗三次各 15 分钟。

[0106] 对于长度为约 15 个核苷酸至约 70 个核苷酸的探针,严格条件定义为遵循标准的 Southern 印迹方法在比使用根据 Bolton 和 McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) 的算法得出的计算 T_m 低约 5°C 到约 10°C 的温度在 0.9M NaCl, 0.09M Tris-HCl pH 7.6, 6mM EDTA, 0.5% NP-40, 1X Denhardt 氏溶液, 1mM 焦磷酸钠, 1mM 磷酸二氢钠, 0.1mM ATP, 和 0.2mg/ml 酵母 RNA 中进行预杂交、杂交和杂交后清洗, 最佳为 12-24 小时。

[0107] 对于长度为约 15 个核苷酸至约 70 个核苷酸的探针,将载体材料在比计算 T_m 低 5°C 到 10°C 的温度在 6X SSC 加 0.1% SDS 中清洗一次 15 分钟和使用 6X SSC 清洗两次各 15 分钟。

[0108] 第一同源区优选由至少 19 个核苷酸、更优选至少 40 个核苷酸、更优选至少 60 个核苷酸、更优选至少 80 个核苷酸、甚至更优选至少 100 个核苷酸、且最优选至少 200 个核苷酸组成。第一同源区也可以由基因的整个开读框或其同系物组成。

[0109] 非同源可转录区

[0110] 双链可转录核酸构建体还包含与靶基因或宿主基因组没有有效同源性的第二可转录区,其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段。

[0111] 在一个优选的方面,第二可转录区是任何基因的任何可转录部分,诸如基因的 5' - 非翻译区、编码序列、或 3' - 非翻译区,其与靶基因或宿主基因组没有有效同源性。

[0112] 在一个更优选的方面,第二可转录区对应于与靶基因或宿主基因组没有有效同源性的基因的编码序列。

[0113] 在另一个更优选的方面,第二可转录区对应用于与靶基因或宿主基因组没有有效同源性的基因的 5' - 非翻译区。

[0114] 在另一个更优选的方面,第二可转录区对应于与靶基因或宿主基因组没有有效同源性的基因的 3' - 非翻译区。

[0115] 在一个最优选的方面,第二可转录区是与靶基因或宿主生物体没有同源性的非内源基因 (例如大肠杆菌的潮霉素抗性基因) 的一部分。

[0116] 第二可转录区优选由至少 19 个核苷酸、更优选至少 40 个核苷酸、更优选至少 60 个核苷酸、更优选至少 80 个核苷酸、更优选至少 100 个核苷酸、更优选至少 250 个核苷酸、甚至更优选至少 500 个核苷酸、最优选至少 750 个核苷酸、和甚至最优选至少 1000 个核苷酸组成。

[0117] 两个彼此反向互补的区段可以由多核苷酸接头分隔开。接头优选由至少 4 个核苷酸、更优选至少 20 个核苷酸、更优选至少 40 个核苷酸、更优选至少 60 个核苷酸、更优选至少 80 个核苷酸、甚至更优选至少 100 个核苷酸、最优选至少 250 个核苷酸、和甚至最优选至少 500 个核苷酸组成。

[0118] 靶基因

[0119] 靶基因可以是任何编码具有生物学活性的物质的基因或任何编码具有代谢物

(以下的“生物学物质”)生物合成所牵涉的生物学活性的多肽的基因。生物学物质可以是RNA(例如, ncRNA、rRNA、tRNA、miRNA 或 mRNA)。生物学物质也可以是具有生物学活性的多肽。生物学物质还可以是代谢物。具有生物学活性的物质对于丝状真菌菌株可以是天然的, 或者对于菌株可以是外来的或异源的。外来的或异源的物质指对于细胞不是天然物质; 或如下的天然物质, 即已经对该天然物质进行了结构修饰以改变该天然物质。

[0120] 在一个优选的方面, 生物学物质是具有生物学活性的多肽。多肽可以是任何具有生物学活性的多肽。术语“多肽”在本文中并非意图指特定长度的编码产物, 因此, 涵盖肽、寡肽、多肽和蛋白质。术语“多肽”还涵盖组合在一起以形成编码产物的两种或多种多肽。多肽还包括杂合多肽, 其包含自至少两种不同多肽(其中一个或多个多肽对于丝状真菌细胞可以是异源的)获得的部分或完整多肽序列的组合。多肽进一步包括上文所述多肽和杂合多肽的天然存在的等位变异和工程化改造的变异。

[0121] 在一个优选的方面, 多肽是抗体、抗原、抗微生物肽、酶、生长因子、激素、免疫扩张剂(immunodilator)、神经递质、受体、报道蛋白、结构蛋白、和转录因子。

[0122] 在一个更优选的方面, 多肽是氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶或连接酶。在一个最优选的方面, 多肽是乙酰木聚糖酯酶、氨肽酶、淀粉酶、碳水化合物酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、阿魏酸酯酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、葡糖脑苷酯酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、变位酶(mutanase)、氧化酶、果胶水解酶、过氧化物酶、磷脂酶、肌醇六磷酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、尿激酶或木聚糖酶。

[0123] 在另一个优选的方面, 多肽是白蛋白、胶原、原弹性蛋白、弹性蛋白、或明胶; 或其变体或杂合体。

[0124] 生物学物质也可以是选择标志的产物。选择标志指其产物提供杀生物剂抗性或病毒抗性、对重金属的抗性、对营养缺陷型的原养性(protothrophy to auxotrophs)等的基因。合适的标志包括, 但不限于, amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、bar(麟丝菌素(phosphinothricin)乙酰转移酶)、hygB(潮霉素磷酸转移酶)、niaD(硝酸还原酶)(nitrate reductase)、pyrG(乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶)(orotidine-5'-phosphate decarboxylase)、sC(硫酸腺苷酰转移酶)、trpC(邻氨基苯甲酸合酶(anthranilate synthase)), 以及它们的等同物。

[0125] 在本发明的实践中可能必须分离靶基因。用于分离或克隆基因的技术是本领域已知的, 包括自基因组DNA分离、自cDNA制备、或其组合。自此类基因组DNA克隆基因可通过例如使用公知的聚合酶链式反应(PCR)来实现。参见, 例如, Innis等, 1990, PCR Protocols: A Guide to Method and Application, Academic Press, New York。克隆方法可牵涉切出并分离包含编码生物学物质的基因的期望核酸片段, 将该片段插入载体分子中, 并将该重组载体掺入丝状真菌细胞, 其中会复制得到该核酸序列的多个拷贝或克隆。核酸序列可以是基因组、cDNA、RNA、半合成、合成起源的, 或其任意组合。

[0126] 在一个优选的方面, 靶基因的表达降低了至少20%、优选至少30%、更优选至少40%、更优选至少50%、更优选至少60%、更优选至少70%、甚至更优选至少80%、最优选至少90%、和甚至最优选100%。

[0127] 在期望使用 5' 非翻译区或 3' 非翻译区内的靶序列的情况下,用这些区域之任一内的反向重复序列构建的基因沉默载体可另外能够实现与沉默载体中存在的编码序列同源的基因的沉默。因此,在期望沉默生物体内的基因同系物的情况下,构建含有移行表达的靶序列(该靶序列在 5' 非翻译区、编码序列或 3' 非翻译区内具有同源性)的沉默载体可容许消除或降低一个或多个展现出对构建体内编码序列的序列同源性的基因的表达。术语“同源性”和“同源的”通常指那些有一些共同的祖传结构且展现出活性区的高度序列相似性的序列。

[0128] 在一个优选的方面,干扰 RNA 与靶基因的一个或多个同系物的 RNA 转录物相互作用,以降低或消除靶基因的一个或多个同系物的表达。

[0129] 在一个更优选的方面,靶基因的一个或多个同系物的表达降低了至少 20%、优选至少 30%、更优选至少 40%、更优选至少 50%、更优选至少 60%、更优选至少 70%、甚至更优选至少 80%、最优选至少 90%、和甚至最优选 100%。

[0130] 丝状真菌菌株

[0131] 本发明还涉及包含双链可转录核酸构建体的丝状真菌菌株,该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子,所述第一多核苷酸包含与编码生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区,所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区,其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子,其中通过在如下条件下培养所述丝状真菌菌株来诱导包含要通过移行 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA(siRNA) 的生成,所述条件容许生成双链可转录核酸构建体的 RNA 转录物,其然后被转变成与靶基因的 RNA 转录物相互作用的 siRNA,以降低或消除编码生物学物质的靶基因的表达。

[0132] 丝状真菌菌株可以是任何在本发明的方法中有用的丝状真菌菌株。“丝状真菌”包括真菌门 (Eumycota) 和卵菌门 (Oomycota) 的亚门(如 Hawksworth 等,于 Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi,第 8 版,1995,CAB International,University Press, Cambridge,UK 中所定义的)的所有丝状形式。丝状真菌的特征在于由壳多糖(chitin)、纤维素、葡聚糖、壳聚糖(chitosan)、甘露聚糖和其它复杂多糖构成的菌丝体壁。通过菌丝延伸进行营养性生长,而碳分解代谢是专性需氧的。相反,酵母如酿酒酵母的营养性生长通过单细胞菌体的出芽(budding)进行,而碳分解代谢可以是发酵的。

[0133] 在一个优选的方面,丝状真菌菌株是枝顶孢霉属(Acremonium)、曲霉属(Aspergillus)、短梗霉属(Aureobasidium)、烟管霉属(Bjerkandera)、拟蜡菌属(Ceriporiopsis)、金孢子菌属(Chrysosporium)、鬼伞属(Coprinus)、革盖菌属(Coriolus)、隐球菌属(Cryptococcus)、Filibasidium、镰孢属(Fusarium)、腐质霉属(Humicola)、梨孢菌属(Magnaporthe)、毛霉属(Mucor)、毁丝霉属(Myceliophthora)、新考玛脂霉属(Neocallimastix)、脉孢菌属(Neurospora)、拟青霉属(Paecilomyces)、青霉属(Penicillium)、平革菌属(Phanerochaete)、射脉菌属(Phlebia)、瘤胃壶菌属(Piromyces)、侧耳属(Pleurotus)、裂褶菌属(Schizophyllum)、踝节菌属(Talaromyces)、嗜热子囊菌属(Thermoascus)、梭孢壳属(Thielavia)、弯颈霉属(Tolypocladium)、栓菌属(Trametes)或木霉属(Trichoderma)菌株。

[0134] 在一个更优选的方面,丝状真菌菌株是泡盛曲霉(Aspergillus awamori)、

烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*)、日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、或米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 菌株。在另一个最优选的方面,丝状真菌菌株是杆孢状镰孢 (*Fusarium bactridioides*)、禾谷镰孢 (*Fusarium cerealis*)、库威镰孢 (*Fusarium crookwellense*)、大刀镰孢 (*Fusarium culmorum*)、禾本科镰孢 (*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢 (*Fusarium graminum*)、异孢镰孢 (*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢 (*Fusarium negundi*)、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢 (*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢 (*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢 (*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢 (*Fusarium sarcochromum*)、拟分枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*)、硫色镰孢 (*Fusarium sulphureum*)、圆镰孢 (*Fusarium torulosum*)、拟丝孢镰孢 (*Fusarium trichothecioides*)、或镶片镰孢 (*Fusarium venenatum*) 菌株。在另一个最优选的方面,丝状真菌菌株是黑刺烟管菌 (*Bjerkandera adusta*)、干拟蜡菌 (*Ceriporiopsis aneirina*)、干拟蜡菌 (*Ceriporiopsis aneirina*)、*Ceriporiopsis caregiea*、*Ceriporiopsis gilvescens*、*Ceriporiopsis pannocinta*、*Ceriporiopsis rivulosa*、*Ceriporiopsis subrufa*、虫拟蜡菌 (*Ceriporiopsis subvermisporea*)、嗜角质金孢子菌 (*Chrysosporium keratinophilum*)、*Chrysosporium lucknowense*、热带金孢子菌 (*Chrysosporium tropicum*)、*Chrysosporium merdarium*、*Chrysosporium inops*、毡金孢子菌 (*Chrysosporium pannicola*)、*Chrysosporium queenslandicum*、*Chrysosporium zonatum*、灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*)、毛革盖菌 (*Coriolus hirsutus*)、特异腐质霉 (*Humicola insolens*)、疏棉状腐质霉 (*Humicola lanuginosa*)、米赫毛霉 (*Mucor miehei*)、嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、产紫青霉 (*Penicillium purpurogenum*)、黄孢平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、辐射射脉菌 (*Phlebia radiata*)、刺芹侧耳 (*Pleurotus eryngii*)、土生梭孢霉 (*Thielavia terrestris*)、长绒毛栓菌 (*Trametes villosa*)、变色栓菌 (*Trametes versicolor*)、哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)、康宁木霉 (*Trichoderma koningii*)、长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、或绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 菌株。

[0135] 在一个最优选的方面,米曲霉菌株是保藏号为 IFO 4177 的米曲霉菌株。在另一个最优选的方面,镶片镰孢菌株是镶片镰孢 A3/5,其最初是作为禾本科镰孢 ATCC 20334 保藏的,最近由 Yoder 和 Christianson,1998, *Fungal Genetics and Biology* 23:62-80 及 O'Donnell 等,1998, *Fungal Genetics and Biology* 23:57-67 重新归为镶片镰孢;以及镶片镰孢的分类学等同物,不管它们当前知道的物种名称。在另一个最优选的方面,镶片镰孢菌株是镶片镰孢 A3/5 或镶片镰孢 ATCC 20334 的形态学突变体,如 WO 97/26330 中所披露的。在另一个最优选的方面,里氏木霉菌株是里氏木霉 ATCC 56765。在另一个最优选的方面,黑曲霉菌株是黑曲霉 Bo-1 (DSM 12665)。在另一个最优选的方面,黑曲霉菌株是黑曲霉 Bo-1 (DSM 12665) 的突变体,如 WO 2004/090155 中所披露的。

[0136] 可以通过牵涉原生质体形成、原生质体转化、和细胞壁重建的方法以本身已知的方式来转化丝状真菌菌株。用于转化曲霉属和木霉属菌株的合适方法记载于 EP 238 023 及 Yelton 等,1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences*

USA 81:1470-1474。用于转化镰孢属物种的合适方法记载于 Malardier 等, 1989, Gene 78:147-156 及 WO 96/00787。可以使用由如下文献记载的方法来转化酵母: Becker 和 Guarente, 于 Abelson, J. N. 和 Simon, M. I., 编, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 卷 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito 等, 1983, Journal of Bacteriology 153:163; 及 Hinnen 等, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920。

[0137] 编码不想要的生物学物质的靶基因的表达的消除或降低可使用本领域已知的、对所靶定的生物学物质特异性的方法来检测。这些检测方法可以包括特异性抗体的使用、高效液相层析、毛细管电泳、酶产物的形成、酶底物的消失、SDS-PAGE、或表型(例如孢子颜色)的消失或出现。例如, 可以使用酶测定法(enzyme assay)来测定所述酶的活性。用于测定酶活性的方法, 对于许多酶是本领域已知的(参见例如 D. Schomburg 和 M. Salzmann(编), Enzyme Handbook, Springer-Verlag, New York, 1990)。

[0138] 生产方法

[0139] 本发明还涉及感兴趣生物学物质的生产方法, 其包括:(a) 在有益于感兴趣生物学物质生成的条件下培养丝状真菌菌株, 其中所述丝状真菌菌株包含双链可转录核酸构建体, 该构建体包含与第一多核苷酸和第二多核苷酸可操作相连接的启动子, 所述第一多核苷酸包含与编码不想要的生物学物质的靶基因具有同源性的第一可转录区, 所述第二多核苷酸包含与靶基因没有有效同源性的第二可转录区, 其中所述第二可转录区包含两个彼此反向互补的区段且所述第一和第二可转录区被转录成单一 mRNA 分子, 其中通过在如下条件下培养丝状真菌菌株来生成双链可转录核酸构建体的 RNA 转录物, 所述条件容许生成所述 RNA 转录物, 它然后被转变成包含要通过移行 RNAi 的方法沉默的靶基因的序列的短干扰 RNA(siRNA), 其与靶基因的 RNA 转录物相互作用以降低或消除编码不想要的生物学物质的靶基因的表达; 且其中所述丝状真菌菌株包含编码感兴趣生物学物质的第三多核苷酸; 和 (b) 自培养液回收感兴趣生物学物质。

[0140] 感兴趣的生物学物质可以是任何如本文中所描述的生物学物质。在一个优选的方面, 感兴趣的生物学物质是具有生物学活性的多肽。它对于丝状真菌菌株可以是天然的或外来的。编码不想要的生物学物质的靶基因的表达的降低或消除可导致另一种感兴趣的生物学物质的表达增加。不想要的生物学物质能直接影响感兴趣的生物学物质的生成或表达。例如, 不想要的生物学物质可以是攻击感兴趣的生物学物质, 由此降低所生成的感兴趣的生物学物质的量的蛋白酶。通过降低或消除蛋白酶的表达, 会表达和生成更多的感兴趣的生物学物质。或者, 不想要的生物学物质可以与感兴趣的生物学物质共享一个或多个细胞过程, 例如, 转录因子或分泌途径, 由此降低所生成的感兴趣的生物学物质的量。通过降低或消除不想要的生物学物质的表达, 更多的一个或多个细胞过程会是感兴趣的生物学物质可利用的, 例如, 限制表达的转录元件, 由此提高所表达的和所生成的感兴趣的生物学物质的量。此外, 不想要的生物学物质可以是污染感兴趣的生物学物质, 阻止感兴趣的生物学物质在特定应用中(例如, 酶在食品加工中)使用的毒素。

[0141] 在本发明的生产方法中, 使用本领域已知方法在适合于感兴趣的生物学物质生成的营养培养基中培养丝状真菌菌株。例如, 可以通过在合适培养基中和在允许生物学物质表达和/或分离的条件下进行的摇瓶培养和实验室或工业发酵罐中的小规模或大规模发

酵（包括连续的、分批的、补料分批的或固态的发酵）来培养菌株。使用本领域已知的方法在合适的营养培养基中进行培养，所述营养培养基包含碳源和氮源和无机盐。合适的培养基能够从商业供应商获得或可以根据公开的组成制备（例如，在美国典型培养物保藏中心的目录中）。如果生物学物质被分泌入营养培养基中，那么可以自培养基直接回收它。如果生物学物质不被分泌，那么可以自细胞裂解物回收它。

[0142] 可以使用本领域已知的、对于生物学物质是特异性的方法来检测感兴趣的生物学物质。这些检测方法可以包括特异性抗体的使用、高效液相层析、毛细管层析、酶产物的形成、酶底物的消失或 SDS-PAGE。例如，可以使用酶测定法来测定酶的活性。用于测定酶活性的方法，对于许多酶是本领域已知的（参见例如 D. Schomburg 和 M. Salzmänn (编), *Enzyme Handbook*, Springer-Verlag, New York, 1990)。

[0143] 所得感兴趣的多肽可以使用本领域已知方法来分离。例如，可以通过常规方法自培养基回收感兴趣的多肽，所述常规方法包括但不限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。然后，分离得到的多肽可以通过本领域已知的多种方法来进一步纯化，所述方法包括但不限于层析（例如离子交换、亲和、疏水、层析聚焦、和大小排阻）、电泳方法（例如制备型等电聚焦 (IEF)）、差别溶解度（例如硫酸铵沉淀）、或提取（参见例如 *Protein Purification*, J. -C. Janson 和 Lars Ryden 编, VCH Publishers, New York, 1989)。可以通过例如提取、沉淀、或差别溶解度或本领域已知的任何方法自培养基分离感兴趣的代谢物。然后，分离得到的代谢物可使用适合于代谢物的方法进一步纯化。

[0144] 编码生物学物质的多核苷酸

[0145] 编码感兴趣的生物学物质的分离的多核苷酸序列可以自任何原核的、真核的或其它来源获得。就本发明而言，术语“自...获得”或“得自”，如本文中与所述来源一起使用的，应当意味着该生物学物质是由该来源或其中已经插入了来自该来源的基因的细胞生成的。

[0146] 用于分离或克隆编码感兴趣生物学物质的多核苷酸的技术是本领域已知的，包括自基因组 DNA 分离、自 cDNA 制备、或其组合。自此类基因组 DNA 克隆多核苷酸可以通过例如使用众所周知的聚合酶链式反应 (PCR) 来实现。参见例如 Innis 等, 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, New York。克隆步骤可以涉及切出和分离包含编码生物学物质的多核苷酸的期望核酸片段，将该片段插入载体分子，并将该重组载体掺入突变体丝状真菌细胞，其中将会复制多个拷贝或克隆的所述核酸序列。所述多核苷酸可以是基因组、cDNA、RNA、半合成、合成来源的，或其任意组合。

[0147] 核酸构建体

[0148] 编码感兴趣生物学物质的分离的多核苷酸可以包含在丝状真菌菌株中的核酸构建体中。核酸构建体包含编码感兴趣生物学物质的核苷酸序列，其与至少一种启动子和一个或多个控制序列可操作相连接，它们指导所述核苷酸序列在丝状真菌菌株中在与所述控制序列相容的条件下表达。表达应当理解为包括感兴趣的生物学物质的生成所涉及的任何步骤，包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0149] 可以以多种方式进一步操作编码感兴趣生物学物质的分离的多核苷酸，从而为生物学物质的表达作准备。取决于表达载体，在将核苷酸序列插入载体前对其进行操作可能是想要的或必要的。利用重组 DNA 方法修饰核苷酸序列的技术是本领域众所周知的。

[0150] 在本发明的方法中，多核苷酸可以包含一个或多个天然控制序列，或者可以将一

个或多个天然控制序列用对核苷酸序列而言是外来的一个或多个控制序列替换,从而改进编码序列在宿主细胞中的表达。此类控制序列包括但不限于前导序列、聚腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列、和转录终止子。最低限度,控制序列包括启动子、及转录和翻译终止信号。为了导入特定限制性位点以促进控制序列与编码感兴趣生物学物质的核苷酸序列的编码区的连接,控制序列可以与接头一起提供。

[0151] 控制序列可以是适当的启动子序列,即受到用于表达编码生物学物质的多核苷酸的宿主细胞识别的核苷酸序列。启动子序列包含介导生物学物质表达的转录控制序列。启动子可以是在所选择的宿主细胞中显示出转录活性的任何核苷酸序列,包括突变的、截短的和杂合的启动子,而且可以从编码对于宿主细胞而言是同源的或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。

[0152] 用于指导核酸构建体在丝状真菌宿主细胞中转录的合适启动子的实例是从下列酶的基因获得的启动子:米曲霉 TAKA 淀粉酶、米赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶 (glaA)、米赫根毛霉脂肪酶、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、镶片镰孢淀粉葡糖苷酶 (WO 00/56900)、镶片镰孢 Daria (WO 00/56900)、镶片镰孢 Quinn (WO 00/56900)、尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶 (WO 96/00787)、里氏木霉 β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解酶 I、里氏木霉纤维二糖水解酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 I、里氏木霉内切葡聚糖酶 II、里氏木霉内切葡聚糖酶 III、里氏木霉内切葡聚糖酶 IV、里氏木霉内切葡聚糖酶 V、里氏木霉木聚糖酶 I、里氏木霉木聚糖酶 II、里氏木霉 β -木糖苷酶、以及 NA2-tpi 启动子(来自黑曲霉中性 α -淀粉酶基因和米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的启动子的杂合体);和它们的突变的、截短的和杂合的启动子。

[0153] 控制序列可以是合适的转录终止子序列,即被宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列可操作连接至编码生物学物质的核酸序列的 3' 端。可以将所选择的丝状真菌菌株中有功能的任何终止子用于本发明。

[0154] 对于丝状真菌菌株优选的终止子从如下酶的基因获得:米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉 α -葡糖苷酶和尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶。

[0155] 控制序列还可以是合适的前导序列,即对于丝状真菌菌株进行的翻译而言是重要的 mRNA 非翻译区。前导序列可操作连接至编码生物学物质的核酸序列的 5' 端。可以将所选择的丝状真菌菌株中有功能的任何前导序列用于本发明。

[0156] 对于丝状真菌菌株优选的前导序列从如下酶的基因获得:米曲霉 TAKA 淀粉酶、构巢曲霉丙糖磷酸异构酶、镶片镰孢胰蛋白酶、和镶片镰孢葡糖淀粉酶。

[0157] 控制序列也可以是聚腺苷酸化序列,即可操作连接至核酸序列的 3' 端,在转录时被宿主细胞识别为向转录的 mRNA 添加聚腺苷残基的信号的序列。可以将所选择的丝状真菌菌株中有功能的任何聚腺苷酸化序列用于本发明。

[0158] 对于丝状真菌菌株优选的聚腺苷酸化序列从如下酶的基因获得:米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、尖镰孢胰蛋白酶样蛋白酶和黑曲霉 α -葡糖苷酶。

[0159] 控制序列还可以是信号肽编码区,其编码与多肽的氨基末端相连接并指导编码的

多肽进入细胞分泌途径的氨基酸序列。核酸序列编码序列的 5' 端可固在地包含信号肽编码区,其与编码分泌多肽的编码区片段一起天然地连接在翻译阅读框中。可供选择的是,编码序列 5' 端可含有对于所述编码序列外来的信号肽编码区。外来信号肽编码区在编码序列不天然地含有信号肽编码区时可为必需的。或者,外来信号肽编码区可以简单地取代天然信号肽编码区以增强多肽的分泌。然而,指导表达的多肽进入所选真菌宿主细胞的分泌途径的任何信号肽编码区可在本发明中使用。

[0160] 对于丝状真菌菌株有效的信号肽编码区是从如下酶的基因获得的信号肽编码区:米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶、特异腐质霉纤维素酶、和疏棉状腐质霉脂肪酶。

[0161] 控制序列还可以是前肽编码区,其编码位于多肽氨基末端的氨基酸序列。所得多肽称为酶原 (proenzyme) 或多肽原 (或在某些情况下为酶原 (zymogen))。多肽原一般是没有活性的,而且可以通过催化性地或自身催化性地自多肽原切割掉前肽而转变成成熟的、有活性的多肽。可以从如下酶的基因获得前肽编码区:酿酒酵母 α -因子、米赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶、和嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) 漆酶 (WO 95/33836)。

[0162] 若多肽的氨基末端存在有信号肽区和前肽区两者时,则前肽区连接至多肽的氨基末端,而信号肽区连接至前肽区的氨基末端。

[0163] 可能还期望添加调节序列,其允许相对于丝状真菌菌株的生长来调节生物学物质的表达。调节系统的例子是那些引起基因表达响应化学或物理刺激 (包括调节性化合物的存在) 而开启或关闭的系统。在丝状真菌中,可以使用 TAKA α -淀粉酶启动子、黑曲霉葡糖淀粉酶启动子、米曲霉葡糖淀粉酶启动子、和镶片镰孢葡糖淀粉酶启动子作为调节序列。调节序列的其它实例是那些允许基因扩增的序列。在真核系统中,这些序列包括在氨甲蝶呤 (methotrexate) 存在下扩增的二氢叶酸还原酶基因,和以重金属 (with heavy metal) 扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况中,编码感兴趣生物学物质的核苷酸序列会与调节序列可操作相连接。

[0164] 表达载体

[0165] 编码感兴趣生物学物质的多核苷酸可以包含在重组表达载体中,该重组表达载体包含启动子、编码生物学物质的核苷酸序列、及转录和翻译终止信号。本文所述各种核酸和控制序列可以结合在一起以产生重组表达载体,其可以包含一个或多个 (数个) 方便的限制性位点以允许在这些位点插入或取代编码多肽的核苷酸序列。或者,可以通过在用于表达的适当载体中插入核苷酸序列或包含所述序列的核酸构建体来表达多核苷酸序列。在创建表达载体时,将编码序列置于载体中,使得编码序列与用于表达的适当的控制序列可操作相连接。

[0166] 重组表达载体可以是任何载体 (例如质粒或病毒),其能方便地进行重组 DNA 步骤,而且能产生核苷酸序列的表达。载体的选择将通常取决于载体与其中待引入该载体的宿主细胞的相容性。载体可以是线状的或闭合环状的质粒。

[0167] 载体可为自主复制载体,即作为染色体外实体 (entity) 存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如质粒、染色体外元件、微型染色体 (minichromosome)、或人工染色体。载体可包含任何用于确保自复制的手段 (means)。或者,载体可为一种当被导入宿主细胞时,整合到基因组中并且与整合了该载体的染色体一起复制的载体。此外,可使用单一的载体

或质粒或者两个或更多个载体或质粒,其一起含有待导入宿主细胞基因组的总 DNA (total DNA),或者可使用转座子。

[0168] 载体优选包含一个或多个(数个)选择标志,其允许简单选择经转化、转染、转导等等的细胞。选择标志是其产物提供杀生物剂抗性或病毒抗性、对重金属的抗性、对营养缺陷型的原养性(protothrophy to auxotrophs)等的基因。用于丝状真菌宿主细胞的选择标志包括但不限于 amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、bar(麟丝菌素(phosphinothricin)乙酰转移酶)、hph(潮霉素磷酸转移酶)、niaD(硝酸还原酶)(nitrate reductase)、pyrG(乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶)(orotidine-5'-phosphate decarboxylase)、sC(硫酸腺苷酰转移酶)、和 trpC(邻氨基苯甲酸合酶(anthranilate synthase)),以及它们的等效物。优选用在曲霉属细胞中的是构巢曲霉或米曲霉的 amdS 和 pyrG 基因和吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的 bar 基因。

[0169] 载体优选包含允许载体整合入宿主细胞基因组或允许载体在细胞中独立于基因组自主复制的元件。

[0170] 为了整合入宿主细胞基因组,载体可以依赖编码多肽的多核苷酸序列或用于通过同源或非同源重组整合入基因组的任何其它载体元件。或者,载体可以包含额外的核苷酸序列,用于指导通过同源重组在染色体中的精确位置整合入宿主细胞基因组中。为了增加在精确位置处整合的可能性,整合元件应优选包含足够数目的核酸,如 100-10,000 碱基对、优选 400-10,000 碱基对和最优选 800-10,000 碱基对,其与相应的靶序列具有高的同一性程度以增强同源重组的概率。整合元件可以是与宿主细胞基因组中的靶序列同源的任何序列。此外,整合元件可以是非编码的或编码的核苷酸序列。另一方面,可以将载体通过非同源重组整合到宿主细胞的基因组中。

[0171] 为了自主复制,载体可以进一步包含复制起点,其使载体能够在所讨论的宿主细胞中自主复制。复制起点可以是在细胞中发挥功能的、介导自主复制的任何质粒复制子(replicator)。术语“复制起点”或“质粒复制子”在本申请中定义为使质粒或载体能够在体内复制的核苷酸序列。

[0172] 在丝状真菌细胞中有用的复制起点的实例是 AMA1 和 ANS1(Gems 等,1991, Gene 98:61-67;Cullen 等,1987, Nucleic Acids Research 15:9163-9175;WO 00/24883)。分离 AMA1 基因和构建包含该基因的质粒或载体可以依照 WO 00/24883 中披露的方法来进行。

[0173] 可以将多于一个拷贝的多核苷酸插入宿主细胞以增加基因产物的产生。多核苷酸拷贝数的增加可通过如下方法获得:将至少一个额外拷贝的序列整合入宿主细胞基因组,或将可扩增的选择标志基因包括在多核苷酸内,其中可通过在适当选择剂(selectable agent)存在下培养细胞来选择含有选择标志基因的扩增拷贝并由此含有多核苷酸的额外拷贝的细胞。

[0174] 用于连接上文所述元件以构建重组表达载体的方法是本领域技术人员熟知的(参见例如 Sambrook 等,1989, 见上文)。

[0175] 通过下文实施例来进一步描述本发明,所述实施例不应解释为限制本发明的范围。

实施例

- [0176] 培养基和溶液
- [0177] amdS 覆盖琼脂每升由 20ml COVE 盐溶液, 273.8g 蔗糖, 8g Noble 琼脂, 10mM 乙酰胺, 和 15mM CsCl, pH 5.0 构成。
- [0178] AMG 痕量金属溶液每升由 14.3g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.5g $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 13.8g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 8.5g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 和 3.0g 柠檬酸构成。
- [0179] 纤维素酶诱导培养基每升由 20g Arboce1-天然纤维素纤维 (J. Rettenmaier USALP), 10g 玉米浆固体 (corn steep solids, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 1.45g $(NH_4)_2SO_4$, 2.08g KH_2PO_4 , 0.28g $CaCl_2$, 0.42g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.42ml 里氏木霉痕量金属溶液, 和 2 滴 Pluronic 酸构成。在高压灭菌前将 pH 用 10N NaOH 调节至 6.0。
- [0180] COVE 选择板每升由 342.3g 蔗糖, 20ml COVE 盐溶液, 10mM 乙酰胺, 15mM CsCl₂, 和 25g 或 30g Noble 琼脂构成。
- [0181] COVE2 板每升由 30g 蔗糖, 20ml COVE 盐溶液, 10mM 乙酰胺, 和 25g 或 30g Noble 琼脂构成。
- [0182] COVE 盐溶液每升由 26g KCl, 26g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 76g KH_2PO_4 , 和 50ml COVE 痕量金属溶液构成。
- [0183] COVE 痕量金属溶液每升由 0.04g $NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0.4g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.2g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.7g 或 1g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.8g $Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$, 和 10g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 构成。
- [0184] COVE A 盐溶液每升由 26g KCl, 26g $MgSO_4$, 76g KH_2PO_4 , 和 50ml COVE A 痕量元素溶液。
- [0185] COVE A 痕量元素溶液每升由 0.04g $NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0.4g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.8g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.8g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.8g $Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$, 10g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 和 10g 柠檬酸构成。
- [0186] COVE A 减尿素加乙酰胺选择板每升由 20ml COVE A 盐溶液, 220g 山梨醇, 10g 葡萄糖, 10mM 乙酰胺, 和 30g 细菌用琼脂 (Bacto agar), pH 5.2 构成。
- [0187] M410 每升由 50g 麦芽糖, 50g 葡萄糖, 2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2g KH_2PO_4 , 4g 柠檬酸, 8g 酵母提取物, 2g 尿素, 0.5ml AMG 痕量金属溶液, 和 0.5g $CaCl_2$, pH 6.0 构成。
- [0188] 基本培养基每升由 6g $NaNO_3$, 0.52g KCl, 1.52g KH_2PO_4 , 1ml COVE 痕量元素溶液, 10g 葡萄糖, 0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 和 0.004g D-生物素构成。
- [0189] 基本培养基琼脂每升由 6g $NaNO_3$, 0.52g KCl, 1.52g KH_2PO_4 , 1ml COVE 痕量元素溶液, 20g Noble 琼脂, 10g 葡萄糖, 0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 和 0.004g D-生物素构成。
- [0190] PDA 板每升由 39g DIFCO™ 马铃薯右旋糖糖 (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) 构成。
- [0191] PEG 由 60% PEG 4000 (Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA), 10mM $CaCl_2$, 和 10mM Tris-HCl, pH 6.5 构成, 过滤除菌。
- [0192] SPC 由 40% PEG 4000, 50mM $CaCl_2$, 和 0.8M 山梨醇, pH 4.5-5.5 构成, 过滤除菌。
- [0193] 20X SSC 每升由 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠 pH 7.0 构成。
- [0194] 0.5X SSC 每升由 4.38g NaCl 和 2.2g 柠檬酸钠 pH 7.0 构成。
- [0195] STC 由 1M 山梨醇, 10mM $CaCl_2$, 和 10mM Tris-HCl, pH 6.5 构成, 过滤除菌。
- [0196] 里氏木霉痕量金属溶液每升由 216g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 58g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 27g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2.4g H_3BO_3 , 和 336g 柠檬酸构成。

[0197] YPG 每升由 10g 酵母提取物 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), 20g BACTO™蛋白胨 (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA), 和 20g 葡萄糖构成。

[0198] 实施例 1:质粒 pCW098 的构建

[0199] 质粒 pCW098 构建成含有 TAKA/NA2-tpi 前导杂合启动子 (美国专利 No. 6, 461, 837)、自大肠杆菌潮霉素抗性基因 (Kaster 等, 1983, Nucleic Acids Res. 11: 6895-6911) 的部分制备的反向重复序列 (hyg IR)、黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶 (AMG) 终止子 (Hata 等, 1991, Agric. Biol. Chem. 55:941-949)、和作为选择标志的构巢曲霉 pyrG 基因 (Ballance 和 Turner, 1985, Gene 36:321-331)。

[0200] 为了表达自大肠杆菌 aph(4) (hygB) 基因 (Kaster 等, 1983, 见上文) 衍生的双链 RNA (dsRNA), 使用下文所示拥有 Not I 限制性位点的有义链引物和拥有 5' Sma I 或 Xma I 限制性位点的反义引物自 aph(4) 基因开读框内 PCR 扩增反向重复序列的一半, 即 199 个碱基对。

[0201] 引物 cwhygnot. 1 (有义):

[0202] 5' -gcggccgcGCGATGTTTCGGGGATTCCCAATACGAGGTC-3' (SEQ ID NO:1)

[0203] 引物 cwhygsma. 1A (反义):

[0204] 5' -cccgggGCATCATCGAAATTGCCGTCAACCAAGCTC-3' (SEQ ID NO:2)

[0205] hygB 编码序列的部分以大写字母显示。

[0206] 扩增反应 (50 μ l) 由 1X THERMOPOL™反应缓冲液 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), 0.4mM dNTP, 100ng pSMail155(WO 05/074647), 50pmole 有义引物, 50pmole 反义引物, 和 5 个单位 Taq DNA 聚合酶 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) 构成。将反应在 EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) 中温育, 编程为 30 个循环, 每个循环 94°C 30 秒、55°C 30 秒、和 72°C 1 分钟 (最后延伸 7 分钟)。

[0207] 214bp 的 PCR 产物通过 TAE 缓冲液 (每升 4.84g Tris 碱, 1.14ml 冰醋酸, 和 2ml 0.5M EDTApH 8.0) 中的 1% 琼脂糖凝胶电泳来纯化, 并使用 QIAQUICK®凝胶提取试剂盒 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) 进一步纯化。使用 TOPO® TA 克隆试剂盒连接 214bp PCR 产物与 pCR2.1-TOPO®, 并依照制造商的指示 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) 转化入 ONE SHOT® TOP10 化学感受态大肠杆菌细胞。使用 BIOROBOT® 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) 纯化来自数个转化子的质粒 DNA, 并通过 DNA 测序来分析以鉴定含有期望的 hygB 插入物的那些。将具有预期 DNA 序列的一个质粒命名为 MP#3。

[0208] 使用下文所示拥有 5' Pac I 限制性位点的有义链引物和拥有 5' Sma I 或 Xma I 限制性位点的反义引物扩增反向重复序列的另一半 (包括 100 个碱基对的间隔物 (spacer)); hygB 序列以大写字母显示。

[0209] 引物 cwhygpac. 2 (有义):

[0210] 5' -ttaattaaGCGATGTTTCGGGGATTCCCAATACGAGGTC-3' (SEQ ID NO:3)

[0211] 引物 cwhygsma. 2a (反义):

[0212] 5' -cccgggATCGGTCCAGACGGCCGCGCTTCTGCGGGC-3' (SEQ ID NO:4)

[0213] 扩增反应 (50 μ l) 由 1X THERMOPOL™ 反应缓冲液, 0.4mM dNTP, 100ng pSMai155, 50pmole 有义引物, 50pmole 反义引物, 和 5 个单位 Taq DNA 聚合酶构成。将反应在 EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 中温育, 编程为 30 个循环, 每个循环 94°C 30 秒、55°C 30 秒、和 72°C 1 分钟 (最后延伸 7 分钟)。

[0214] 314bp 的 PCR 产物通过 TAE 缓冲液中的 1% 琼脂糖凝胶电泳来纯化, 并使用 QIAQUICK® 凝胶提取试剂盒进一步纯化。使用 TOPO® TA 克隆试剂盒连接 314bp PCR 产物与 pCR2.1-TOPO®, 并依照制造商的指示转化入 ONE SHOT® TOP10 化学感受态大肠杆菌细胞。使用 BIOROBOT® 9600 纯化来自数个转化子的质粒 DNA, 并通过 DNA 测序来分析以鉴定含有期望的 hygB 插入物的那些。将具有预期 DNA 序列的一个质粒命名为 MP#9。

[0215] 用 Not I 和 Xma I 消化 MP#3。用 Pac I 和 Xma I 消化 MP#9。通过 TAE 缓冲液中的 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化这两种 hygB DNA 片段, 并使用 QIAQUICK® 凝胶提取试剂盒提取。将片段连接至经 Not I/Pac I 消化的载体 pA1Lo2 (W005/056772, 实施例 21) 以创建 pCW098 (图 2)。

[0216] 实施例 2: 质粒 pCW099 的构建

[0217] 质粒 pCW099 构建成含有 TAKA/NA2-tpi 前导杂合启动子、来自米曲霉 wA 基因 (全长基因组 DNA 序列为 SEQ ID NO:5, 推导氨基酸序列为 SEQ ID NO:6) 的片段、大肠杆菌 hygB 反向重复序列 (hyg IR)、黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶 (AMG) 终止子、和作为选择标志的构巢曲霉 pyrG 基因。

[0218] 使用下文所示引物 cwwanco.1corr (有义) 和 cwwanot.1A (反义) 自从米曲霉菌株 P2-5.1 (W0 05/056772, 实施例 27 和 28) 挽救的质粒加 wA 侧翼序列 PCR 扩增米曲霉 wA 基因 (DNA 序列为 SEQ ID NO:7, 其推导氨基酸序列为 SEQ ID NO:8) 的 176bp 片段。有义引物工程化改造成在 5' 末端具有 Nco I 位点, 而反义引物工程化改造成在 5' 末端具有 Not I 位点。

[0219] 引物 cwwanco.1corr (有义):

[0220] 5' -ccatggAGCACTTCGATTGCATTAG-3' (SEQ ID NO:9)

[0221] 引物 cwwanot.1A (反义):

[0222] 5' -gcggccgcAGAACGAACGCAGGTTTTATAC-3' (SEQ ID NO:10)

[0223] wA 序列以大写字母显示。

[0224] 扩增反应 (50 μ l) 由 1X THERMOPOL™ 反应缓冲液, 0.4mM dNTP, 100ng 米曲霉 P2-5.1 DNA (W0 05/056772), 50pmole 引物 cwwanco.1corr, 50pmole 引物 cwwanot.1a, 和 5 个单位 Taq DNA 聚合酶构成。将反应在 EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 中温育, 编程为 30 个循环, 每个循环 94°C 30 秒、55°C 30 秒、和 72°C 1 分钟 (最后延伸 7 分钟)。

[0225] 188bp 的 PCR 产物通过 TAE 缓冲液中的 1% 琼脂糖凝胶电泳来纯化, 并使用 QIAQUICK® 凝胶提取试剂盒进一步纯化。使用 TOPO® TA 克隆试剂盒连接 188bp PCR 产物与 pCR2.1-TOPO®, 并依照制造商的指示转化入 ONE SHOT® TOP10 化学感受态大

肠杆菌细胞。使用**BIOROBOT®** 9600 纯化来自数个转化子的质粒 DNA, 并通过 DNA 测序来分析以鉴定含有期望的 wA 插入物的那些。将具有预期 DNA 序列的一个质粒命名为 MP#10。

[0226] 将 MP#10 DNA 用 Nco I 和 Not I 消化, 并通过 TAE 缓冲液中的 1% 琼脂糖凝胶电泳来纯化。使用**QIAQUICK®** 凝胶提取试剂盒提取 wA 片段。将纯化的片段连接至经 Nco I/Not I 消化的 pCW098 以创建 pCW099 (图 3)。

[0227] 实施例 3: 质粒 pEFer14 的构建

[0228] 质粒 pEFer14 构建成含有 TAKA/NA2-tpi 前导杂合启动子、米曲霉 wA 基因的 176bp 片段、大肠杆菌 hygB 反向重复序列 (hyg IR)、黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶 (AMG) 终止子、和作为选择标志的全长构巢曲霉 amdS 基因。

[0229] 通过 TAE 缓冲液中的 1% 琼脂糖凝胶电泳来纯化经 Nco I 和 Pac I 消化的质粒 pCW099。使用**ULTRAFREE®-DA** 柱 (Millipore, Billerica, MA, USA) 依照制造商的指示提取含有 176bp wA 片段和 hygB 反向重复序列的 698bp 片段。将纯化的片段连接至经 Nco I/Pac I 消化的 pAllo1 (WO 05/056772, 实施例 1) 以创建 pEFer14 (图 4)。

[0230] 实施例 4: 质粒 pDM261 的构建

[0231] 质粒 pDM261 构建成含有 TAKA/NA2-tpi 前导杂合启动子、大肠杆菌 hygB 反向重复序列 (hyg IR)、黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶 (AMG) 终止子、和作为选择标志的全长构巢曲霉 amdS 基因。

[0232] 通过 TAE 缓冲液中的 1% 琼脂糖凝胶电泳来纯化经 Nco I 和 Pac I 消化的质粒 pCW098。使用**ULTRAFREE®-DA** 柱提取含有 hygB 反向重复序列的 527bp 片段。将纯化的片段连接至经 Nco I/Pac I 消化的 pAllo1 以创建 pDM261 (图 5)。

[0233] 实施例 5: 质粒 pDM266 的构建

[0234] 质粒 pDM266 构建成含有 TAKA/NA2-tpi 前导杂合启动子、米曲霉 wA 基因的 499bp 片段、大肠杆菌 hygB 反向重复序列 (hyg IR)、黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶 (AMG) 终止子、和作为选择标志的全长构巢曲霉 amdS 基因。

[0235] 使用下文所示引物 wA500FWD (有义) 和 wA500REV (反义) 自米曲霉菌株 A1560 (IFO 4177) 基因组 DNA 扩增 wA 基因的 499bp 片段。有义引物工程化改造成在 5' 末端具有 Nco I 位点, 而反义引物工程化改造成在 5' 末端具有 Not I 位点。使用**DNEASY®** 植物 Maxi 试剂盒 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) 依照制造商的指示制备米曲霉菌株 A1560 (IFO 4177) 基因组 DNA。

[0236] 引物 wA500FWD (有义):

[0237] 5' -ccatggGCGCTCAAAAACAACATCAAC-3' (SEQ ID NO:11)

[0238] 引物 wAREV (反义):

[0239] 5' -gcggccgcAGAACGAACGCAGGTTTTAT-3' (SEQ ID NO:12)

[0240] wA 序列以大写字母显示。

[0241] 扩增反应 (50 μ l) 由 1X THERMOPOL™ 反应缓冲液, 0.2mM dNTP, 100ng 米曲霉菌株 A1560 基因组 DNA, 50pmole 引物 wA500FWD, 50pmole 引物 wA500REV, 和 2.5 个单位 Taq DNA 聚合酶构成。将反应在**EPPENDORF® MASTERCYCLER®** 5333 中温育, 编程为 30 个循环, 每个循环 94°C 30 秒、55°C 30 秒、和 72°C 30 秒 (最后延伸 10 分钟)。

[0242] 513bp 的 PCR 产物通过 TAE 缓冲液中的 1% 琼脂糖凝胶电泳来纯化, 并使用 ULTRAFREE®-DA 柱进一步纯化。使用 TOPO® TA 克隆试剂盒连接 wA 片段与 pCR2.1-TOPO®, 并依照制造商的指示转化入 ONE SHOT® TOP10 化学感受态大肠杆菌细胞。使用 BIOROBOT® 9600 纯化来自数个转化子的质粒 DNA, 并通过 DNA 测序来分析以鉴定含有期望的 wA 插入物的那些。将具有预期 DNA 序列的一个质粒命名为 MP#8。

[0243] 将 MP#8DNA 用 Nco I 和 Not I 消化, 并通过 TAE 缓冲液中的 1% 琼脂糖凝胶电泳来纯化。使用 QIAQUICK® 凝胶提取试剂盒提取 wA 片段。将纯化的片段连接至经 Nco I/Not I 消化的 pDM261 以创建 pDM266 (图 6)。

[0244] pDM266 中的 499bp wA 片段 (wA 基因的碱基对 2607-3106) 与 pCW099 和 pEFer14 中的 176bp wA 片段具有相同的 3' 末端。

[0245] 实施例 6: 米曲霉的转化和转化子的分析

[0246] 将米曲霉菌株 JaL250 (WO 98/11203) 在补充有 20mM 尿苷 (uridine) 的 PDA 板上于 34°C 培养 7 天。通过如下收集孢子: 添加 5ml 0.01% TWEEN® 80 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), 使用无菌接种环刮板的表面, 并用 5ml 移液器收集孢子悬浮液。将大约 $2-5 \times 10^7$ 个孢子添加至 500ml 烧瓶中的 100ml YPG 培养基, 并于 30-34°C 和 140rpm 温育 16-18 小时。使用无菌 0.2 μ m 500ml EXPRESS® 过滤单元 (Millipore, Billerica, MA, USA) 收集菌丝体。自生长培养基中过滤出菌丝体, 然后用 100ml 0.7M KCl 清洗两次。将菌丝体重悬于 20ml 原生质体化溶液 (protoplasting solution) [0.7M KCl 中 5mg/ml GLUCANEX® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) 加 0.5mg/ml 几丁质酶 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)]。将菌丝体转移至 125ml 摇瓶, 并于 34°C, 80rpm 温育 30-90 分钟。将原生质体经衬有 MIRACLOTH™ (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 的无菌漏斗倾倒入无菌 50ml 聚丙烯管。将原生质体在 Sorvall RT6000D 离心机中以 1,303x g 于室温离心 20 分钟。丢弃上清液, 并将原生质体重悬于 20ml STC。将原生质体如上所述离心并重悬于 20ml STC。取出 20 μ l 等分试样并用 STC 稀释。使用血球计对原生质体计数。将原生质体如上所述离心并重悬于适当体积的 STC 以产生 2×10^7 个原生质体 /ml。

[0247] 将 5 μ g pEFer14、pDM261、或 pDM266DNA 添加至 100 μ l 米曲霉 JaL250 原生质体。于室温温育 30 分钟后, 将原生质体 /DNA 混合物用 STC 调节至 9ml, 分成 3 份等份, 并涂布到 3 块补充有 20mM 尿苷和 1% 麦芽糖的 150mm COVE 板上。然后将板于 34°C 温育。在乙酰胺上生长要求每一种表达质粒上所存在的 amdS 基因的表达。

[0248] 温育 4 天后, 在成熟孢子着色变得明显前, 将 25 或 30 个使用质粒 pEFer14、pDM261、和 pDM266 获得的初级转化子在补充有 20mM 尿苷和 1% 麦芽糖的 COVE2 板上划线。所有自 pDM261 转化子衍生的菌落一律为深绿色。相反, 自 pEFer14 或 pDM266 转化子获得的菌落孢子颜色变化范围为浅黄色至深绿色。如下纯化转化子, 即将孢子在补充有 20mM 尿苷和 1% 麦芽糖的 COVE2 板上划线, 然后挑取分离的菌落至相同培养基的板。将所有板于 34°C 温育。

[0249] 结果显示于表 1。30 个孢子纯化的 pDM266 (499bp wA) 转化子中有 40% 显示出比野生型浅的孢子着色。30 个孢子纯化的 pEFer14 (176bp wA) 转化子中有 30% 显示出比野

生型浅的孢子着色。25 个孢子纯化的 pDM261 (无 wA) 转化子中 100% 显示出野生型孢子着色。

[0250] 表 1

[0251]

质粒	可转录区	%着色浅	%野生型	# 筛选
pEFer14	176bp wA, hyg IR	30	70	30
pDM266	499bp wA, hyg IR	40	60	30
pDM261	hyg IR	0	100	25

[0252] 显示 pDM266 和 pEFer14 转化子孢子着色浅的结果指明了与移行 RNAi 对 wA 基因的抑制一致的表型。

[0253] 实施例 7 :wA 基因沉默的米曲霉转化子的 Southern 印迹分析

[0254] 实施了 Southern 印迹分析来验证 6 个来自实施例 6 的选定转化子 (如下文表 2 中所列举的) 的不同孢子着色不是基因破坏的结果。突变型米曲霉 P2-5.1 (WO 2005/056772) 含有 wA 基因的破坏。

[0255] 表 2

[0256]

菌株名称	孢子颜色
Jal.250 (未转化)	野生型
DLM1610-45-pDM261#2	野生型
P2-5.1	白色
DLM1641-74-pEFer14#3	浅色
DLM1641-74-pDM266#17	白色
DLM1641-74-pDM266#24	浅色
DLM1641-74-pDM266#29	白色

[0257] 使用 DNEASY® 植物 Maxi 试剂盒依照制造商的指示自上文每一种米曲霉菌株制备基因组 DNA。将 2 μg 每种基因组 DNA 用 Sap I 和 Cla I 于 37°C 消化过夜。将经过消化的基因组 DNA 通过 TAE 缓冲液中的 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分级 17 小时, 并使用 TURBOBLOTTER (Schleicher&Schuell BioScience, Keene, NH, USA) 遵循制造商的推荐印迹到 NYTRAN® SuPerCharged 膜 (Schleicher&Schuell BioScience, Keene, NH, USA) 上 14-16 小时。

[0258] 将膜首先与 463bp 异羟基洋地黄毒苷配基 (digoxigenin) 标记的米曲霉 wA 探针

杂交,该探针是通过使用下文所示引物 wA5primeFWD(有义)和引物 wA5primeREV(反义)的 PCR 掺入异羟基洋地黄毒苷配基-11-dUTP 来合成的:

[0259] 引物 wA5primeFWD(有义):

[0260] 5'-TACTACGGAGACCTTGAAA-3'(SEQ ID NO:13)

[0261] 引物 wA5primeREV(反义):

[0262] 5'-GCTCTTAGACAGCCTAGAAT-3'(SEQ ID NO:14)

[0263] 扩增反应(50 μ l)由 1X THERMOPOL™反应缓冲液,5 μ l PCR DIG 标记混合物(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)、10ng 米曲霉 JaL250 基因组 DNA(使用 DNEASY®植物 Maxi 试剂盒制备)、10pmol 引物 wA5primeFWD、10pmol 引物 wA5primeREV、和 2.5 个单位 Taq DNA 聚合酶构成。将反应在 EPPENDORF® MASTERCYCLER® 中温育,编程为 30 个循环,每个循环 95°C 30 秒、52°C 30 秒、和 72°C 1 分钟(最后延伸 7 分钟)。将 PCR 反应通过 TAE 缓冲液中的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳来纯化,其中异羟基洋地黄毒苷配基的掺入通过分子量的增加来指示。自凝胶切出 463bp 产物条带,并使用 MINELUTE®凝胶提取试剂盒(QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)依照制造商的指示来纯化。

[0264] 在 DIG Easy Hyb 缓冲液(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)中于 42°C 实施杂交 15-17 小时。然后将膜在高严格条件下在 2X SSC 加 0.1% SDS 中于室温清洗两次 5 分钟,接着在 0.5X SSC 加 0.1% SDS 中于 65°C 清洗 2 次 15 分钟。通过化学发光测定法(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)遵循制造商的指示检测探针-靶物杂合物。

[0265] 对转化子实施的 Southern 印迹分析揭示了,所有转化子的杂交条带与含有全长 wA 基因的米曲霉宿主菌株 JaL250 的杂交条带大小相同,比较而言,P2-5.1 的杂交条带显著较小。结果证明了非野生型孢子颜色不是基因破坏的结果。

[0266] 实施例 8:自米曲霉转化子提取 RNA

[0267] 将 6 个展现出不同孢子颜色的米曲霉转化子(实施例 6)涂布在补充有 20mM 尿苷和 1% 麦芽糖的 COVE2 板上,并于 34°C 培养 7 天。将未转化的米曲霉 JaL250 的孢子涂布在补充有 20mM 尿苷的 PDA 板上,并于 34°C 培养 7 天。

[0268] 在添加 5ml 0.01% TWEEN® 80 后,通过使用无菌的一次性使用的涂布器(Arben Bioscience, Rochester, NY, USA)刮板的表面来收集每种菌株的孢子。将每份孢子悬浮液吸入无菌 5ml 血清学移液管,添加至 500ml 摇瓶中 75ml 补充有 10mM 尿苷和 1% 麦芽糖的基本培养基(pH 6.5),并于 34°C 和 65rpm 培养 22-24 小时。将 47mm 硝酸纤维素滤器(Whatman Inc., Florham Park, NJ, USA)置于无菌 0.2 μ m 250ml MF75 过滤单元(Nalgene, Rochester, NY, USA)中滤膜的上部。将 25-75ml 每种全培养液置于分开的硝酸纤维素滤器上,并进行真空过滤,用以在滤器上生成菌丝体薄层。将硝酸纤维素滤器加菌丝体转移至装有补充有 10mM 尿苷和 1% 麦芽糖的基本培养基琼脂(pH 6.5)的 60mm 皮氏皿。将琼脂板置于塑料袋中,密封,并于 37°C 温育。

[0269] 当米曲霉 JaL250 对照中开始出现有色的分生孢子梗时(42-48 小时),使用刮勺(spatula)自每个滤器刮取 120mg 菌丝体,并每个转移至装有 1ml RNAPRO™溶液(Q-Biogene, Irvine, CA, USA)的裂解基质 C 管(Q-Biogene, Irvine, CA, USA)。给裂解基质

C管盖紧盖以防止均质化期间的渗漏。将样品管在**FASTPREP®** FP120 仪器 (Q-Biogene, Irvine, CA, USA) 中以速度 6 处理 40 秒,然后在冰上放置 2 分钟。再次将样品管以速度 6 处理 40 秒,然后在冰上放置 2 分钟。将样品在**EPPENDORF®** 5415D 微量离心机中以 13,400x g 于 4°C 离心 5 分钟。将所得上清液转移至 1.7ml 微量离心管,然后于室温温育 5 分钟。将 300 μ l 氯仿添加至样品管,并旋涡震动 10 秒钟。于室温温育 5 分钟后,将样品在**EPPENDORF®** 5415D 微量离心机中以 13,400x g 于 4°C 离心 5 分钟。将每份样品的上层相 (upper phase) 转移至新的 1.7ml 微量离心管,然后于室温温育 5 分钟。再次,将 300 μ l 氯仿添加至样品,并旋涡震动 10 秒钟。将样品于室温温育 5 分钟,接着在**EPPENDORF®** 5415D 微量离心机中以 13,400x g 于 4°C 离心 5 分钟。将上层相转移至新的 1.7ml 微量离心管。将 500 μ l 冰冷的乙醇添加至样品管,并于 -20°C 温育 30 分钟。将样品在**EPPENDORF®** 5415D 微量离心机中以 13,400x g 于 4°C 离心 20 分钟。除去所得上清液,并用 75% 乙醇清洗沉淀物。除去乙醇,并让沉淀物于室温风干 5 分钟。将沉淀物重悬于 100 μ l 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的水,接着添加 50 μ l 8M 氯化锂 (VWR, West Chester, PA, USA)。将样品于 -20°C 温育 1 小时。温育后,将样品在**EPPENDORF®** 5415D 微量离心机中以 13,400x g 于 4°C 离心 25 分钟。自样品管除去上清液,并用 70% 乙醇冲洗 RNA 沉淀物。除去乙醇,并将 RNA 沉淀物重悬于 25-40 μ l 无 DNA 酶、RNA 酶的水 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)。使用**NANODROP®** 1000 分光光度计 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) 对 RNA 浓度定量。

[0270] 实施例 9 :用 DNA 酶处理米曲霉 RNA

[0271] 使用 TURBO 无 DNATM试剂盒 (Ambion, Austin, TX, USA) 自米曲霉 RNA 样品 (实施例 8) 除去污染性基因组 DNA。将 3 μ g 提取的 RNA 与 1X TURBO DNA 酶缓冲液 (Ambion, Austin, TX, USA) 组合,并用无 DNA 酶、RNA 酶的水调节至 10 μ l 体积。将 1 个单位的 TURBO DNA 酶 (Ambion, Austin, TX, USA) 添加至样品,并于 37°C 温育 30 分钟。再添加 1 个单位的 TURBO DNA 酶,并将样品于 37°C 温育 1 小时。添加 2 μ l DNA 酶灭活试剂 (Ambion, Austin, TX, USA)。将样品管的内容物于室温在 2 分钟温育期期间混合 3 次,以再分散 DNA 酶灭活试剂。通过在**EPPENDORF®** 5415D 微量离心机中以 9,300x g 离心 2 分钟来沉淀 DNA 酶灭活试剂。将 9 μ l 每份上清液转移至 0.65ml 微量离心管。使用**NANODROP®** 1000 分光光度计测量 1 μ l 经 DNA 酶处理的 RNA,以确定 RNA 浓度。

[0272] 实施例 10 :自米曲霉总 RNA 样品合成 cDNA 第一链

[0273] 使用 Transcriptor cDNA 第一链合成试剂盒 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 自每份提取的米曲霉 RNA 样品 (实施例 9) 合成 cDNA 第一链。将 1 μ g 经 DNA 酶处理的 RNA 与 1.2nmol 随机六聚物引物 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 组合,并用 DEPC 处理的水调节至 13 μ l 体积。将样品于 65°C 温育 10 分钟,然后放置在冰上。将 13 μ l 样品与 1X Transcriptor RT 反应缓冲液 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)、20 个单位 Protector RNA 酶抑制剂 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)、10mM 脱氧核苷酸混合物、和 10 个单位 Transcriptor 逆转录酶 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 在 20 μ l 终体积中组合。将反应混合物于 25°C 温育 10 分钟、于 50°C 温育 60 分钟、和于 85°C 温育 5 分钟。合成后,将样品

放置在冰上。

[0274] 为了验证清除了污染性基因组 DNA 和检查 cDNA 的完整性,用下文所示跨越内含子的 wA 和肌动蛋白引物组 PCR 扩增样品。

[0275] 引物 2wAFWD(有义):

[0276] 5'-ATGCCTCGCAGCTTATAGGA-3'(SEQ ID NO:15)

[0277] 引物 2wAREV(反义):

[0278] 5'-CGCACTGATATACGGTTTGG-3'(SEQ ID NO:16)

[0279] 引物 2actinFWD(有义):

[0280] 5'-GGATCTCTACGGTAACATCGTCA-3'(SEQ ID NO:17)

[0281] 引物 2actinREV(反义):

[0282] 5'-GATCGGAGATGCCAGGGTA-3'(SEQ ID NO:18)

[0283] 扩增反应(50 μ l)由 1X THERMOPOL™反应缓冲液、0.4mM dNTP、2 μ l 模板 cDNA 样品、50pmol 引物 2wAFWD、50pmol 引物 2wAREV、和 2.5 个单位 Taq DNA 聚合酶构成。对照扩增反应(50 μ l)由 1X THERMOPOL™反应缓冲液、0.4mM dNTP、10ng 米曲霉 JaL250 基因组 DNA(使用 DNEASY®植物 Maxi 试剂盒制备)、50pmol 引物 2wAFWD、50pmol 引物 2wAREV、和 2.5 个单位 Taq DNA 聚合酶构成。将反应在 EPPENDORF® MASTERCYCLER™中温育,编程为 30 个循环,每个循环 95°C 30 秒、50°C 30 秒、和 72°C 1 分钟(最后延伸 7 分钟)。通过 TAE 缓冲液中的 0.8%琼脂糖凝胶电泳来纯化 PCR 产物。结果显示了使用 cDNA 模板的 PCR 反应生成了比使用基因组 DNA 作为模板的对照 PCR 反应要小的扩增子。自基因组 DNA 生成的 PCR 扩增子会比自 cDNA 生成的对应扩增子要大。因此,cDNA 制备物不含有可检测量的基因组 DNA。

[0284] 实施例 11:通过实时 PCR(RT-PCR)检测稳态 wA mRNA 米曲霉

[0285] 使用 RT-PCR 实现了转化子中米曲霉 wA 表达水平的测定。使用如实施例 10 中所述自每个转化子合成的互补 DNA(cDNA)作为 RT-PCR 反应的模板。wA 基因充当靶 DNA 序列,而米曲霉肌动蛋白基因(DNA 序列为 SEQ ID NO:19,而推导氨基酸序列为 SEQ ID NO:20)充当内源对照,以及参比 DNA 序列。依照通用探针文库测定法设计软件指南(Universal ProbeLibrary Assay Design Software Guide, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)选择和设计引物及其相应的单色水解探针。首先基于外显子-外显子剪接连接点附近的期望转录物 DNA 序列来选择探针。然后设计引物组来扩增跨越该外显子-外显子剪接连接点或内含子的靶物。选择了如下探针:

[0286] 通用探针文库探针 #131(肌动蛋白 - 参比)

[0287] 5'-CTGGTGGT-3'

[0288] 通用探针文库探针 #134(wA - 靶物)

[0289] 5'-CCTCCTTC-3'

[0290] 使用了以下引物:

[0291] 引物 2wAFWD(有义):

[0292] 5'-ATGCCTCGCAGCTTATAGGA-3'(SEQ ID NO:21)

[0293] 引物 2wAREV(反义):

[0294] 5'-CGCACTGATATACGGTTTGG-3'(SEQ ID NO:22)

[0295] 引物 2actinFWD(有义)：

[0296] 5'-GGATCTCTACGGTAACATCGTCA-3'(SEQ ID NO:23)

[0297] 引物 2actinREV(反义)：

[0298] 5'-GATCGGAGATGCCAGGGTA-3'(SEQ ID NO:24)

[0299] 使用 **LIGHTCYCLER®** 480 系统 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 实施了相对定量实时 PCR 测定法。每份 RT-PCR 反应 (20 μ l) 由 1X **LIGHTCYCLER®** 480 探针 Master 混合物 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)、200nM 有义引物、200nM 反义引物、100nM 探针、和不同稀释度 (即, 未稀释的、1:10、1:100、1:1000) 的 cDNA 模板构成。在 **LIGHTCYCLER®** 480 系统中实施 RT-PCR 反应, 编程为 45 个循环, 每个循环 95°C 变性 10 秒及对于扩增产物的定量和延伸均为 60°C 30 秒。使用 384 孔板 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 一式三份地制备每份样品。在测试的每块 384 孔板上运行阴性对照 (其中用 PCR 级的水替换模板 cDNA) 以揭示假定的假阳性结果。

[0300] 使用 **LIGHTCYCLER®** 480 相对定量软件 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 分析自 **LIGHTCYCLER®** 480 系统获得的数据。在相对定量方法中, 通过计算靶基因浓度相对于不受调节的参比基因, 对每份样品校准由初始样品浓度的差异、样品加载中的变异、移液误差、或 cDNA 合成效率的差异引起的质量和数量差异。不仅测定了靶基因 / 参比基因比, 而且通过校准靶物和参比基因的 PCR 效率的任何差异的校准物 (calibrator) 进行了标准化。相对定量分析结果表述为标准化的比, 其中将样品中靶 DNA 序列对参比 DNA 序列的比除以标准样品或校准物中这两种序列的比。

[0301] 首先使用未转化的米曲霉 JaL250 作为标准样品为靶物和参比物生成了标准曲线。标准曲线分别为靶物和参比物生成了 0.996 和 0.995 的 R^2 值。由 Roche **LIGHTCYCLER®** 480 相对定量软件为靶物和参比物计算得出的 PCR 效率值分别为 1.757 (误差 0.0449) 和 1.907 (误差 0.0287)。为了比较实施例 7 中所列出的所有菌株间的 mRNA 的相对表达水平, 如上所述实施了实时 PCR 反应。使用 **LIGHTCYCLER®** 480 相对定量软件收集和分析数据, 并与先前依照 Roche **LIGHTCYCLER®** 480 相对定量软件手册 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 生成的标准曲线进行比较。使用相对定量分析, 米曲霉 DLM1610-45-pDM261#2 (即具有野生型孢子颜色的转化子) 中的 wA mRNA 表达水平与未转化的米曲霉 JaL250 菌株相当。米曲霉 DLM1641-74-pEFer14#3 和米曲霉 DLM1641-74-pDM266#24 (即具有浅色孢子的转化子) 中的 wA mRNA 相对表达水平分别显示出与具有野生型孢子颜色的菌株中的 wA mRNA 水平相比的 67% 和 62% 降低。米曲霉 DLM1641-74-pDM266#17 和米曲霉 DLM1641-74-pDM266#29 (即具有白色孢子的菌株) 显示出与具有野生型孢子颜色的菌株中的 wA mRNA 相比的 73% 和 81% 降低。

[0302] 实施例 12: 质粒 pAmFs031 的构建

[0303] 为了抑制黑曲霉 ATCC 1015 聚酮化合物合酶基因 (cDNA 序列为 SEQ ID NO:25, 推导氨基酸序列为 SEQ ID NO:26) 的表达, 构建了移行 RNAi 表达载体。

[0304] 质粒 pAmFs031 构建成含有 TAKA/NA2-tpi 前导杂合启动子、黑曲霉聚酮化合物合酶基因的开放读框的片段、大肠杆菌 hygB 反向重复序列 (hyg^{IR})、黑曲霉淀粉葡萄糖苷

酶终止子、和作为选择标志的全长构巢曲霉 *amdS* 基因 (Kelly 和 Hynes, 1985, EMBO J. 4: 475-479)。选择黑曲霉聚酮化合物合酶基因作为沉默靶物,因为它与丝状真菌中分生孢子色素生物合成所牵涉的其它聚酮化合物合酶具有序列同一性。

[0305] 使用下文所示拥有 5' Nco I 限制性位点的有义链引物和拥有 5' Not I 限制性位点的反义引物自分离自黑曲霉菌株 MBin120 (WO 2004/090155) 的基因组 DNA 扩增黑曲霉聚酮化合物合酶开读框 (DNA 序列为 SEQ ID NO:27, 推导氨基酸序列为 SEQ ID NO:28) 内的 502bp 片段。

[0306] 引物 56896F (有义) :

[0307] 5' -ggggccatggTCAGCGCGTAAGCTCTAAT-3' (SEQ ID NO:29)

[0308] 引物 56896R (反义) :

[0309] 5' -gggggcggccgcGTAAGGTTCCGCATTTCTGG-3' (SEQ ID NO:30)

[0310] 聚酮化合物合酶编码序列以大写字母显示。

[0311] 扩增反应 (50 μ l) 由 1X **HERCULASE®** 反应缓冲液 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)、0.2mM dNTP、128ng 黑曲霉 MBin120 基因组 DNA (使用 **DNEASY®** 植物 Maxi 试剂盒制备)、20pmole 有义引物、20pmole 反义引物、和 2.5 个单位 **HERCULASE Hotstart DNA 聚合酶** (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 构成。将反应在 **EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333** 中温育,编程为 30 个循环,每个循环 94°C 30 秒、55°C 30 秒、和 72°C 1 分钟 (最后延伸 7 分钟)。

[0312] 将所得 502bp PCR 产物和 pDM261 用 Nco I 和 Not I 消化,通过 TAE 缓冲液中的 0.75% 琼脂糖凝胶电泳来纯化,并使用 **MINELUTE®** 试剂盒进一步纯化 PCR 产物或使用 **QIAQUICK®** 凝胶提取试剂盒进一步纯化质粒。使用 **FAST-LINK™** DNA 连接试剂盒 (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) 连接 PCR 产物与 pDM261 质粒片段,并依照制造商的指示 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 转化入 **SURE™ II** 化学感受态大肠杆菌细胞。使用 **BIOROBOT® 9600** 纯化来自数个转化子的质粒 DNA,并通过 DNA 测序来分析以鉴定含有期望的聚酮化合物合酶插入物的那些。将具有预期 DNA 序列的一个质粒命名为 pAmFs031 (图 7)。

[0313] 实施例 13:黑曲霉的转化和转化子的分析

[0314] 将黑曲霉菌株 MBin120 在 PDA 板上于 34°C 培养 14 天。如下收集孢子,即添加 7ml 0.01% **TWEEN® 20** (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA),使用无菌接种环刮板的表面,并用 5ml 移液器收集孢子悬浮液。给装有 25ml 补充有 1M 蔗糖的 YPG 培养基的 500ml 玻璃摇瓶接种 2.6×10^8 个孢子,并于 28°C 和 150rpm 温育 15 小时。使用无菌 0.2 μ m 500ml **EXPRESS®** 过滤单元 (Millipore, Billerica, MA, USA) 收集菌丝体。自生长培养基中过滤出菌丝体,然后用 150ml 1M 山梨醇清洗两次。将菌丝体重悬于 30ml 含有 20mg **GLUCANEX®** 和 0.4mg 几丁质酶每 ml 1M 山梨醇的原生质体化溶液。将菌丝体转移至 125ml 玻璃摇瓶,并于 34°C,100rpm 温育 45 分钟。将原生质体经衬有 **MIRACLOTH™** 的无菌漏斗倾倒入无菌 50ml 聚丙烯管。然后给管注满冰冷的 1M 山梨醇。将原生质体在 Sorvall RT6000D 离心机中以 1,303x g 于室温离心 5 分钟。丢弃上清液,并将原生质体重

悬于 50ml 1M 山梨醇。将原生质体在 Sorvall RT6000D 离心机中离心,并重悬于 10ml STC。取出 20 μ l 等分试样并用 STC 稀释。使用血球计对原生质体计数。将原生质体在 Sorvall RT6000D 离心机中离心,并重悬于适当体积的 PEG 4000 (Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) 以产生 2×10^7 个原生质体 /ml。

[0315] 将 5 μ g pAmFs031 或 pDM261DNA 添加至 100 μ l 黑曲霉 MBin120 原生质体。于冰上温育 30 分钟后,将 1ml SPC 添加至原生质体 /DNA 溶液,并温和混匀。将溶液于室温温育 30 分钟。然后,将 10ml 冷却至 50°C 的溶解的 amdS 覆盖琼脂添加至转化混合物,并散布到 150mm COVE 板上。然后将板于 34°C 温育。在乙酰胺上生长要求每一种表达质粒中所存在的 amdS 基因的表达。

[0316] 温育 4 天后,为 pAmFs031 和 pDM261 每一种获得 10 个初级转化子。将转化子在补充有 1% 麦芽糖的 COVE A 减尿素加乙酰胺板上划线。所有自 pDM261 衍生的菌落一律为深黑色。相反,自 pAmFs031 转化子获得的菌落孢子颜色变化范围为白色至深褐色。如下纯化转化子,即将孢子在补充有 1% 麦芽糖的 COVE A 减尿素加乙酰胺板上划线,然后挑取分离的菌落至相同培养基的板。菌株纯化总共重复四次。将所有板于 34°C 温育。

[0317] 10 个孢子纯化的 pAmFs031 转化子中有 3 个展现出比野生型浅的孢子着色。10 个孢子纯化的 pDM261 “空载体”转化子都显示出野生型孢子着色。显示 pAmFs031 转化子孢子着色浅的这些结果指明了与对聚酮化合物合酶基因的移行 RNAi 相关抑制一致的表型。

[0318] 实施例 14 :聚酮化合物合酶沉默的和对照黑曲霉菌株的生长和 RNA 提取

[0319] 将以下黑曲霉菌株在补充有 1% 麦芽糖的 COVE A 减尿素加乙酰胺板上于 34°C 培养 7 天 :2 个具有白色孢子的黑曲霉 pAmFs031 菌株 (称作 pAmFs031-W1 和 pAmFs031-W2), 1 个具有黑色孢子的黑曲霉 pAmFs031 菌株 (称作 pAmFs031-B1), 和 1 个用 pDM261 转化的黑曲霉菌株。在 PDA 板上培养未转化的对照菌株黑曲霉 MBin120。如下为每一个菌株收集孢子,即添加 5ml 0.01% TWEEN® 20,用无菌接种环刮板的表面,并用 10ml 移液器收集孢子悬浮液。将 40 μ l 孢子悬浮液与 10ml M410 培养基混合,并将 1ml 此混合物添加至 24 孔聚苯乙烯微量滴定板 (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) 的每个孔。在分开的微量滴定板中培养每一个菌株以避免交叉污染。将板在湿度控制室中于 34°C 温育 4 天,此时,对于所有菌株,真菌在孔间形成菌丝体生长的连续垫,而且存在有色的分生孢子梗。

[0320] 使用 RNAPRO™ Pro Red 试剂盒 (Q-Biogene, Irvine, CA, USA) 在菌丝体垫提取总 RNA。自孔中取出垫,并置于纸巾上以吸收任何多余的培养基。将总共 200mg 每种菌丝体垫组织转移至装有 1ml RNAPRO™ 溶液 (Q-Biogene, Irvine, CA, USA) 的 FASTRNA® ProRed 管。使用 FASTPREP® FP120 仪器将菌丝体以速度 6 均质化 40 秒。将每份样品在 Sorvall MC12V 微量离心机中以 13,400x g 于 4°C 离心 5 分钟。将水相转移至 1.7ml 微量离心管。将样品于室温温育 5 分钟。添加 300 μ l 氯仿,并将样品旋涡震动 10 秒钟,然后于室温温育 5 分钟。将样品在 Sorvall MC12V 微量离心机中以 13,400x g 于 4°C 离心 5 分钟。将上层相转移至新的 1.7ml 微量离心管。再次如上所述用氯仿提取样品。添加 500 μ l 冰冷的乙醇,并将样品于 -20°C 保存 1 小时。将样品在 Sorvall MC12V 微量离心机中以 13,400x g 于 4°C 离心 20 分钟。除去乙醇,并用 75% 乙醇清洗沉淀物。除去乙醇,并让沉淀物风干 5 分钟。将 RNA 样品重悬于 100 μ l DEPC 处理的水。添加 50 μ l 8M LiCl,并将样品于 -20°C 保存 1 小时。将样品在 Sorvall MC12V 微量离心机中以 13,400x g 于 4°C 离心 25 分钟。除去

LiCl,并将 500 μ l 75%乙醇添加至沉淀物,然后除去。让沉淀的样品风干 5 分钟。将 RNA 样品重悬于 30 μ l DEPC 处理的水。使用 NANODROP® 1000 分光光度计测量 RNA 浓度。将样品保存于 -80°C 。

[0321] 实施例 15 :合成 cDNA 第一链

[0322] 使用 TURBO DNA 酶试剂盒 (Ambion, Inc., Austin, TX, USA) 的试剂,用 DNA 酶处理来自实施例 14 中所描述的每一种黑曲霉菌株的 RNA 样品以清除基因组 DNA。将 3 μ g RNA 与 1 μ l TURBO DNA 酶缓冲液 (Ambion, Inc., Austin, TX, USA) 组合,并用 DEPC 处理的水调节至 10 μ l 体积。添加 TURBO DNA 酶 (Ambion, Inc., Austin, TX, USA) 的 0.5 μ l 等分试样,并将样品于 37°C 温育 30 分钟。添加 TURBO DNA 酶的第二个 0.5 μ l 等分试样,并再次将样品于 37°C 温育 30 分钟。添加 2 μ l 灭活试剂 (Ambion, Inc., Austin, TX, USA),并将样品于室温在 2 分钟温育期期间混合 3 次。将样品在 EPPENDORF® 5415D 微量离心机中以 9,300x g 离心 2 分钟。将 9 μ l 上清液转移至 0.6ml 微量离心管。使用 NANODROP® 1000 分光光度计测量 RNA 浓度。将样品保存于 -80°C 。

[0323] 使用 Transcriptor 逆转录酶 cDNA 第一链合成试剂盒 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 合成 cDNA 第一链。为实施例 14 中所描述的 5 种黑曲霉菌株中的每一个制备 4 个文库,其中使用不同量的经 DNA 酶处理的 RNA :将 1-2 μ l 体积中的 300ng、600ng、900ng、和 1.2 μ g 经 DNA 酶处理的 RNA 与 2 μ l 随机六聚物引物 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 组合,并用 DEPC 处理的水调节至 13 μ l 体积。将样品于 65°C 温育 10 分钟,然后放置在冰上。将 Transcriptor 逆转录酶 Master 混合物的 6.5 μ l 等分试样 (4 μ l Transcriptor 逆转录酶缓冲液,0.5 μ l Protector RNA 酶抑制剂,和 2 μ l dNTP 混合物) 添加至管,接着添加 Transcriptor 逆转录酶的 0.5 μ l 等分试样。自冰中取出样品,并转移至 EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333,编程为 25°C 10 分钟、 55°C 60 分钟、和 85°C 5 分钟。将样品保存于 -80°C 。

[0324] 实施例 16 :通过实时 PCR 检测黑曲霉聚酮化合物合酶 mRNA

[0325] 通过 RT-PCR 对实施例 14 中所描述的黑曲霉菌株中黑曲霉聚酮化合物合酶 mRNA 的相对表达水平进行定量。如实施例 15 中所描述的,自每一种菌株提取总 RNA,充当 cDNA 第一链合成的模板。cDNA 第一链充当 RT-PCR 的模板。使用黑曲霉肌动蛋白基因作为参比标准 (即,内部对照)。使用 Roche 通用探针文库设计中心软件 (Universal ProbeLibrary Design Center Software, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 设计探针和引物。使用了如下引物和探针对:

[0326] 黑曲霉聚酮化合物合酶正向引物 (62488) :

[0327] 5' -tcgtgaatcaggtcctagcc-3' (SEQ ID NO:31)

[0328] 黑曲霉聚酮化合物合酶反向引物 (62489) :

[0329] 5' -aaacaaccaattggtagatgc-3' (SEQ ID NO:32)

[0330] Roche 通用探针文库探针 #80 (04689038001) :

[0331] 5' -cctggaga-3'

[0332] 黑曲霉肌动蛋白正向引物 (62520) :

[0333] 5' -atctgtacggcaacattgtca-3' (SEQ ID NO:33)

[0334] 黑曲霉肌动蛋白反向引物 (62521) :

[0335] 5'-ttctgcatacggtcggagat-3' (SEQ ID NO:34)

[0336] Roche 通用探针文库探针 #131 (04694155001) :

[0337] 5'-ctggtggt-3'

[0338] 使用 **LIGHTCYCLER®** 480 系统和上文 Roche 通用探针文库探针实施了 RT-PCR 试验,所述探针预先在 5' 末端标记荧光素,在 3' 末端附近标记深色淬灭剂 (quencher) 染料。每个反应混合物含有 10 μ l **LIGHTCYCLER®** 480 探针 Master 混合物、0.1 μ M Roche 通用探针文库探针、0.2 μ M 正向引物、0.2 μ M 反向引物、和 2 μ l cDNA 第一链 (如实施例 15 中所描述的,自不同量的总 RNA 生成),总体积 20 μ l。所有 RT-PCR 反应都在 384 孔板 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 中进行。RT-PCR 反应在 **LIGHTCYCLER®** 480 系统中实施,编程为 1 个循环的 95°C 预温育 10 分钟 (4.8°C /s); 45 个循环使用定量分析模式的扩增,95°C 10 秒 (4.8°C /s),55°C 15 秒 (2.5°C /s),72°C 1 秒 (4.8°C /s) (以获取模式 Single);和 1 个循环的 40°C 冷却 10 秒 (2°C /s)。为了对靶物 (聚酮化合物合酶基因) 和参比物 (肌动蛋白基因) 生成标准曲线和 PCR 效率值,自 2 个 cDNA 文库创建 4 个连续稀释。在分开的反应中用靶物和参比物的探针 / 引物组一式四份地测定这些连续稀释的每一个。标准曲线分别对靶物和参比物生成了 0.996 和 0.998 的 R² 值。由 **LIGHTCYCLER®** 480 相对定量软件为靶物和参比物计算得出的 PCR 效率值分别为 1.950 (误差 0.0266) 和 1.854 (误差 0.0181)。为了比较所有 5 种黑曲霉菌株间的聚酮化合物合酶 mRNA 的相对水平,对每一种 cDNA 文库一式三份地测定 3 个稀释度。在对于每个稀释度和每次重复的单独反应中使用靶物和参比物的探针 / 引物组实施了 RT-PCR 反应。使用 **LIGHTCYCLER®** 480 相对定量软件依照制造商将这些数据与标准曲线进行比较。使用这种分析方法,相对于未处理的对照样品计算经处理样品的表达量。由标准曲线除以未处理对照样品的量来确定经处理样品的量。如此,将未处理样品称作 1X 样品,而将所有其它的量表述为相对于未处理样品的 n 倍差异。然后,将经处理样品的量相对于内源对照肌动蛋白进行标准化,以解决 (account for) 添加至每个反应的总 RNA 量的差异。

[0339] 使用相对定量分析,测定出,菌株 pAmFs031-W1 和 pAmFs031-W2 中的黑曲霉聚酮化合物合酶 mRNA 的相对表达水平显著低于菌株黑曲霉 MBin120pAmFs031-B1、黑曲霉 MBin120pDM261、或未转化的黑曲霉 MBin120,这与孢子着色中观察到的变化相关联。黑曲霉 MBin120pAmFs031-W1 和黑曲霉 MBin120pAmFs031-W2 菌株显示出与“空载体”对照菌株相比聚酮化合物合酶 mRNA 的 68% 和 82% 降低。如实施例 17 中所述,对相同菌株实施了 Southern 印迹以证实完整聚酮化合物合酶基因的存在,并消除转录物的降低是由于聚酮化合物合酶基因自身破坏的可能性。

[0340] 实施例 17:通过 Southern 印迹检测黑曲霉聚酮化合物合酶基因

[0341] 使用 **DNEASY®** 植物 Maxi 试剂盒自以下黑曲霉菌株 (实施例 16 中所描述的) 提取基因组 DNA:未转化的黑曲霉 MBin120,黑曲霉 MBin120pAmFs031-W1,黑曲霉 MBin120pAmFs031-W2,黑曲霉 MBin120pAmFs031-B1,和黑曲霉 MBin120pDM261。将每种菌株的总共 2 μ g 基因组 DNA 用 Hind III 于 37°C 消化 17 小时。将经过消化的基因组 DNA 和 DIG 标记的 DNA 分子量标志物 II (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 加载

到 TAE 缓冲液中的 0.7% 琼脂糖凝胶上,并施加 22V 电流 17 小时。使用 20X SSC 转移缓冲液将 DNA 自凝胶转移到 **NYTRAN**[®] SuPerCharged 膜上 18 小时。使用紫外线照射将 DNA 交联至膜,然后在 DIG Easy Hyb 溶液 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 中于 42°C 平衡 30 分钟。将膜用 20 μ l 重悬于 DIG Easy Hyb 溶液 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 的 DIG 标记的 434bp PCR 产物于 42°C 探查 (probe) 18 小时。434bp DIG 标记的 DNA 探针是使用 PCR DIG 探针合成试剂盒 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 和下文所示引物合成的。

[0342] 黑曲霉聚酮化合物合酶 Southern 正向引物 (062849) :

[0343] 5' -ttaattaatcggtaatcgccgttgatcaga-3' (SEQ ID NO:35)

[0344] 黑曲霉聚酮化合物合酶 Southern 反向引物 (062850) :

[0345] 5' -aatttccaaacagggtactccac-3' (SEQ ID NO:36)

[0346] 扩增反应 (50 μ l) 由 1X PCR 缓冲液、5 μ l PCR DIG 探针合成混合物、50 μ M 有义引物、50 μ M 反义引物、2.6 个单位 Expand 高保真聚合酶、和 50ng 黑曲霉 MBin120 基因组 DNA (如上所述纯化) 构成。将反应在 **EPENDORF**[®] MASTERCYCLER[™]5333 中温育,编程为 30 个循环,每个循环 94°C 30 秒、55°C 30 秒、和 72°C 30 秒 (最后延伸 7 分钟)。探针序列与黑曲霉聚酮化合物合酶基因 (其序列包含在 8.8kb Hind III 基因组 DNA 片段内) 的启动子 (5' 非翻译区) 互补。

[0347] 探查膜后,将膜用 2X SSC 加 0.1% SDS 低严格性缓冲液于室温清洗 5 分钟,接着用 0.5X SSC 加 0.1% SDS 于 65°C 进行两次高严格性清洗,每次 15 分钟。然后使用 DIG 发光检测试剂盒 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 遵循制造商的说明书显现发生了杂交的 DIG 标记的探针和分子量标志物。将印迹对 Biomax XAR 胶片 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 曝光,并使用 Konica SRX-101A 胶片处理器 (Konica Minolta Medical Imaging USA Inc., Wayne, NJ, USA) 显影以显现被标记的 DNA。结果证明了所有菌株展现出预期的 8.8kb 条带,证明了整个基因在所有测试的菌株中保持完整。

[0348] 实施例 18 :里氏木霉移行 RNAi 表达载体 pAL02 的构建

[0349] 为了抑制里氏木霉 β -木糖苷酶基因 (DNA 序列为 SEQ ID NO:37, 推导氨基酸序列为 SEQ ID NO:38) 的表达,构建了移行 RNAi 表达载体。

[0350] 用 Pac I 和 Mlu I 消化移行 RNAi 质粒 pEvFz-14, 以分离潮霉素反向重复序列。通过 TAE 缓冲液中的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳解析 527bp 片段,然后从凝胶中切下。使用 **QIAQUICK**[®] 凝胶提取试剂盒依照制造商的指示纯化片段。然后使用快速连接试剂盒 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 将经过纯化的片段连接至经 Pac I 和 Mlu I 消化的 pMJ09 (WO 2005/056772)。依照制造商的指示 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 使用 2 μ l 连接混合物来转化 SURE[™] 化学感受态大肠杆菌细胞。使用 **BIOROBOT**[®] 9600 纯化来自数个转化子的质粒 DNA, 并通过用 Pac I 和 Mlu I 消化来分析。通过 TAE 缓冲液中的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳来解析限制性消化的产物。通过 DNA 序列分析证实了一个转化子拥有 527bp 潮霉素反向重复序列, 并命名为 pAL01 (图 8)。

[0351] 采用 PCR 来扩增包含里氏木霉 β -木糖苷酶编码区 (DNA 序列为 SEQ ID NO:39, 推导氨基酸序列为 SEQ ID NO:40) 的部分的 500bp 片段, 利用来自里氏木霉 RutC30 (WO

2005/056772) 的基因组 DNA 充当模板。来自里氏木霉 RutC30 的基因组 DNA 是使用 DNEASY® 植物 Maxi 试剂盒依照制造商的指示分离的。如下所示, 有义引物设计成在 5' 末端掺入 Nco I 位点, 而反向引物设计成在 5' 位点掺入 Mlu I 位点。

[0352] 有义引物:

[0353] 5' -CCATGGTACGAGTTTGGCAGTGGTCT-3' (SEQ ID NO:41)

[0354] 反义引物:

[0355] 5' -ACGCGTTTATGCGTCAGGTGTAGCAT-3' (SEQ ID NO:42)

[0356] 扩增反应 (50 μ l) 由 10X HERCULASE™ 反应缓冲液 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)、0.8mM dNTP、200ng 如实施例 7 中所述制备的里氏木霉 RutC30 基因组 DNA、1ng 引物、和 2.5 个单位 HERCULASE HOTSTART™ 聚合酶 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 构成。将反应在 EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 中温育, 编程为 1 个循环的 92°C 2 分钟; 30 个循环, 每个循环 92°C 30 秒, 58°C 30 秒, 和 68°C 1 分钟; 和 10 分钟最终延伸。通过 TAE 缓冲液中的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳来分离反应产物, 其中自凝胶中切出 500bp 条带并使用 QIAQUICK® 凝胶提取试剂盒依照制造商的指示纯化。用 Nco I 和 Mlu I 消化经过纯化的 PCR 片段, 并使用快速连接试剂盒接入经 Nco I 和 Mlu I 消化的 pAL01 中。依照制造商的指示使用连接混合物来转化 SURE™ 化学感受态大肠杆菌细胞。然后通过菌落 PCR 来筛选转化子, 以鉴定含有期望的 β -木糖苷酶插入物的那些。反应 (20 μ l) 由 2 μ l 10X THERMOPOL™ 反应缓冲液、0.4 μ l 10mM dNTP、1 μ l 悬浮于 50 μ l 去离子水的大肠杆菌转化子菌落、和 1pmol β -木糖苷酶扩增引物构成。将反应在 EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 中温育, 编程为 1 个循环的 94°C 2 分钟; 17 个循环, 每个循环 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 和 72°C 30 秒; 和 5 分钟的最后延伸。通过 TAE 缓冲液中的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳来分离扩增产物。使用 BIOROBOT® 9600 纯化来自数个含有 500bp β -木糖苷酶扩增产物的的转化子的质粒 DNA, 并通过 DNA 测序来分析。一个含有 500bp β -木糖苷酶扩增产物的的质粒的 DNA 序列分析证实了预期的插入物, 并命名为 pAL02 (图 9)。

[0357] 实施例 19: 里氏木霉中里氏木霉 β -木糖苷酶基因的移行 RNAi 的转化和测定

[0358] 使用 5 μ g pAL02 来转化里氏木霉 SaMe13, 一种 cbh1 被删除的菌株 (WO2005/030926)。如下收获里氏木霉 SaMe13 孢子, 即将 20ml 0.01% TWEEN® 80 倾倒入成熟里氏木霉 SaMe13 的 COVE2 板上并用皮氏皿涂布器刮下孢子。将孢子混合液吸入 20ml 移液器。将大约 $2-5 \times 10^7$ 个孢子接种入 100ml 补充有 2% 葡萄糖和 10mM 尿苷的 YP 培养基中, 并于 27°C 和 90rpm 温育 16 小时。使用 500ml STERICUP™ 过滤单元 (Millipore, Burlington, MA, USA) 收集菌丝体, 并用 100ml 去离子水清洗两次。然后将菌丝体用 250ml 1.2M 山梨醇清洗两次。将清洗后的菌丝体重悬于 20ml 1.2M 山梨醇、5mg/ml GLUCANEX® 和 0.5mg/ml 几丁质酶。将混合物于 34°C 和 90rpm 温育 15-25 分钟。将烧瓶在冰上放置 5 分钟, 接着通过 MIRACLOTH™ 过滤。将含有原生质体的滤器置于 50ml FALCON™ 管 (VWR International, West Chester, PA, USA) 中。将管在 Sorvall RT6000D 离心机中以 370x g 离心 10 分钟。丢弃上清液, 将原生质体沉淀物重悬于 25ml 1.2M 山梨醇并在 Sorvall RT6000D 离心机中以 370x g 离心 10 分钟。丢弃上清液, 并将沉淀物重悬于 25ml 1.2M 山梨醇。取出 10 μ l, 并如上所述将管离心, 同时在血球计中对原生质体计数。丢

弃上清液,并将沉淀物以 1×10^8 个原生质体 /ml STC 的浓度重悬。

[0359] 将由 $100 \mu\text{l}$ 原生质体悬浮液、 $1-10 \mu\text{g}$ $10 \mu\text{l}$ STC 中的质粒 DNA、和 $250 \mu\text{l}$ 聚乙二醇组成的转化混合物温和混匀。将混合物于室温温育 30 分钟。添加 3ml STC,混匀,并倾倒入 150mm COVE 板上。将板于 28°C 温育 10-14 天。

[0360] 选择了 20 个转化子 (即 AL02-1 到 AL02-20) 和 4 个含有 pAL01 的对照转化子,将来自单菌落的孢子在 COVE 板上划线,并于 28°C 温育 5 天。将来自这些板的孢子接种入装有 25ml 纤维素酶诱导培养基的 125ml 带挡板的摇瓶中,并于 28°C 和 200rpm 培养 5 天。接种后 5 天,取出 1ml 培养液样品,在 EPPENDORF® 离心机 5415D 中以 $6,000 \times g$ 离心 10 分钟,并将上清液转移至新的 EPPENDORF® 管。使用培养液样品的复制品测定 β -木糖苷酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性。

[0361] 使用 Coulter Biomek 3000, Biomek NX, 和 ORCA 机械臂 (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA), 对上文上清液测定 β -木糖苷酶活性。将培养物上清液在 0.1M 琥珀酸盐、 0.01% Triton X-100 pH 5.0 (样品缓冲液) 中适当稀释,接着连续稀释,从稀释样品的 0 倍到 $1/3$ 倍到 $1/9$ 倍。将每个稀释度总共 $20 \mu\text{l}$ 转移至 96 孔平底板。将 $200 \mu\text{l}$ 底物溶液 (每 ml 0.1M 琥珀酸盐 pH 5.0 含有 1mg 对硝基苯基- β -D-吡喃木糖苷) 添加至每个孔,然后于环境温度温育 45 分钟。温育期完成时,将 $50 \mu\text{l}$ 1M TRIS 缓冲液 pH 9 添加至每个孔,以终止反应。在 405nm 光密度对 96 孔板测量终点。

[0362] 使用 Coulter Biomek 3000, Biomek NX, 和 ORCA 机械臂, 对上文上清液测定 β -葡萄糖苷酶活性。将培养物上清液在 0.1M 琥珀酸盐、 0.01% Triton X-100 pH 5.0 (样品缓冲液) 中适当稀释,接着连续稀释,从稀释样品的 0 倍到 $1/3$ 倍到 $1/9$ 倍。将每个稀释度总共 $20 \mu\text{l}$ 转移至 96 孔平底板。将 $200 \mu\text{l}$ 底物溶液 (每 ml 0.1M 琥珀酸盐 pH 5.0 含有 1mg 对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷) 添加至每个孔,然后于环境温度温育 45 分钟。温育期完成时,将 $50 \mu\text{l}$ 1M TRIS 缓冲液 pH 9 添加至每个孔,以终止反应。在 405nm 光密度对 96 孔板测量终点。使用以下方程来测定样品活性:

[0363] $[(\{\text{OD}_{405} / \text{消光系数}\} \times 1 \times 10^6) / \text{温育时间}] / \text{样品体积}$

[0364] 其中消光系数 = 17,749, 温育时间 = 45, 而样品体积 = 0.02。

[0365] 计算自 β -木糖苷酶活性测定法获得的 OD 与自 β -葡萄糖苷酶测定法确定的活性之间的比值,并报告为 BX/BG。由于 β -葡萄糖苷酶是天然存在的,因此使用它的活性作为对各转化子间生长差异进行标准化的手段。结果显示于表 3。

[0366] 表 3

[0367]

样品	β -木糖苷酶 ¹	β -葡萄糖苷酶 ²	蛋白质 ³	BX/BG 比 ⁴
AL021	5.53 ± 1.10	965.63 ± 107.02	3.51 ± 0.48	0.006 ± 0.001
AL022	10.13 ± 2.38	857.73 ± 40.30	4.23 ± 0.51	0.012 ± 0.004
AL023	9.89 ± 1.60	1139.06 ± 37.99	2.54 ± 0.31	0.009 ± 0.002

AL024	2.94±0.25	174.90±45.20	1.38±0.25	0.017±0.007
-------	-----------	--------------	-----------	-------------

[0368]

AL025	15.67±2.55	919.14±39.01	3.56±0.03	0.017±0.004
AL026	15.04±7.12	725.61±225.20	4.58±1.96	0.021±0.004
AL027	4.78±0.44	494.99±69.17	3.29±0.17	0.010±0.003
AL028	3.87±0.22	507.37±262.44	3.25±0.09	0.008±0.005
AL029	9.70±3.52	771.72±35.46	4.25±0.43	0.013±0.005
AL0210	3.25±1.61	576.40±202.08	2.45±1.04	0.006±0.001
AL0211	3.47±2.19	667.39±159.68	2.21±0.76	0.005±0.003
AL0213	7.27±2.44	521.00±66.65	3.40±0.74	0.014±0.004
AL0214	5.75±2.54	834.19±414.42	4.54±1.58	0.007±0.000
AL0215	10.58±0.64	625.86±427.59	5.51±2.95	0.017±0.015
AL0216	1.80±0.60	309.91±39.37	4.51±1.76	0.006±0.002
AL0217	7.31±6.48	477.29±370.17	6.75±2.44	0.015±0.003
AL0218	6.04±3.83	556.43±143.08	4.69±1.81	0.011±0.005
AL0219	1.64±0.42	226.67±24.94	2.49±0.12	0.007±0.001
AL0220	3.55±1.78	410.71±261.33	3.91±1.97	0.009±0.001
AL03ev	3.59±0.78	320.76±92.52	3.60±1.36	0.011±0.003

[0369] ¹β-木糖苷酶活性是使用对硝基苯基-β-D-吡喃木糖苷作为底物测量的。数值表述为吸光度单位 ± 标准偏差 (n = 2, 除了 n = 4 的样品 AL03ev)。

[0370] ²β-葡萄糖苷酶活性是使用对硝基苯基-β-吡喃葡萄糖苷作为底物测量的。数值表述为 μmol 被水解的底物每分钟每 ml 培养液 ± 标准偏差 (n = 2, 除了 n = 4 的样品 AL03ev)。

[0371] ³蛋白质浓度是使用 BCA 测定试剂测定的。数值表述为 mg/ml 培养液 ± 标准偏差 (n = 2, 除了 n = 4 的样品 AL03ev)。

[0372] ⁴β-木糖苷酶和 β-葡萄糖苷酶活性比 ± 标准偏差 (n = 2, 除了 n = 4 的样品 AL03ev)。

[0373] 大约 5/20 的转化子表现出以对照的 36% 至 55% 的值表达 BX/BG。这些结果证明

了移行 RNAi 能用于成功敲低里氏木霉中的基因表达。

[0374] 本申请描述和要求保护的本发明并不受限于本申请所公开的具体方面的范围,因为这些方面意欲作为本发明几个方面的说明。任何等价的方面意欲在本发明的范围之内。实际上,从前面的说明中,除本申请所显示和描述的之外,本发明的多种修改对于本领域的技术人员来说是显而易见的。这些修改也意欲落入所附的权利要求的范围内。在冲突的情况下,将以包括定义的本公开为准

[0375] 本申请引用了多篇参考文献,其公开的内容通过提述以其整体并入。

[0001]

序列表

<110> 诺维信股份有限公司(Novozymes, Inc.)
 <120> 通过移行 RNA 干扰来降低或消除丝状真菌菌株中的基因表达的方法
 <130> 10918-CN-PCD
 <150> 60/876,895
 <151> 2006-12-21
 <160> 42
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
 <400> 1
 gcggccgcgc gatgttcggg gattcccaat acgaggtc 38
 <210> 2
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
 <400> 2
 cccggggcat catcgaattt gcggtcaacc aagctc 36
 <210> 3
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
 <400> 3
 ttaattaagc gatgttcggg gattcccaat acgaggtc 38
 <210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
 <400> 4
 cccgggatcg gtccagacgg ccgcgtttct ggggct 36
 <210> 5
 <211> 6651
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(Aspergillus oryzae)
 <400> 5
 atggaggggc cacgcggcgt ctatctcttc ggagaccaga caagtgatit cgacgccggc 60
 ttacgtcgcc tctacaagt aaagaataac acaattgttg catcgttctt ccagagatgc 120
 tticacgctt tgcgccaaga gatcgcgagg ctttcacccat ctgaacggaa gatcttcccc 180
 cggtttacga gcatagtggg tctaetggcg cgtcaccggg agtcagaccg taatccgget 240
 clggagatg cgttgacctg taclatcaaa ttgggatgct ttataaagla cglgtaactg 300
 cagatctcga cccgittgaa cgagcctaac ctgagatagc tactaeggag accttgaaa 360
 cgtgtacca tctgcttcag actgccaat agttggcctg tgcgcgggtc ttcttagttc 420
 tgcagctgta agctgctcga acaatgittg agaattgctc cccgctcggg ttgaagcggc 480

[0002]

ggtggtagct ctccgacttg gtctatgcgt cctfaaagtt cgagagctgg igagctctga	540
ccaagcgtcg tcaacaagct ggicagctctt gatttcaggg attagcgaga aagatgcctc	600
gcagcttiata ggagaattca ctgctgaacg ggtaagicaa ttgatctgaa atagtttgca	660
ggacagaatg ttctaaccac tggataaagg caattctctc ttcattccaaa ccgiatatca	720
gtgcegtggg atataacagt ataaccatca ggcacccgc taaggctcct gatgatttaa	780
ttgattctag gctgtctaag agccataagc cggtagggc gcaaatccat ggctcctacc	840
atgcagcaca tctgtactat ggcgagatg tcgacaggat categaaagc igccataatg	900
aggctgttcc aaactacaca ccccgatcc ccgtactatc aagtactacg ggacagccga	960
tagaggccaa acacatgaaa gatctactta aggccgccc tgaagagatt ctactacgic	1020
aaactatgctg ggagaaagtg accgatgctt gctattccat attaaaaact gctcgtcctc	1080
aaacafgcaa gttgttccca atttcaagca ctgcgacaca aagcttgttt acagctctta	1140
cgaagccggg gataaccgac atcgaagtgg aaaatgggct cggagatgtt cccacgaacc	1200
cgaaggacaa ccttaacatc agcggcaggc cggactgctc caagatagct atcattggca	1260
tgctcggacg attcaccaga gctgatggca cagagagttt ctgggacctt ctgtataatg	1320
gccctgatgt acaccggaag gtccctgcag agcgttggga tgttgatgcc cacgttgatc	1380
ctaccggaac aaaacggaac accagcaagg ttccatacgg atgctggata aacgaaccgg	1440
ggttatttga ccccccttc ttaaatatgt cgcacccgga agccctccag gcagatcccg	1500
ctcaagact tgcattgctc accgctatg aagctcttga aatggccggc tttatccccg	1560
acagcacccc ttctacacag agggatcgag tcggctctct ctatggaaig actagcgatg	1620
actatcggga gataaatagt ggtcaagata ttgatactta ctttatccct ggtgggaatc	1680
gtgtcttcc acctgccgg ataaactact attcaagtt cagtgggcc agcgcagcg	1740
ttgatacage ttgttcttca agtcttggc ctattcatal ggcttgcaat tcgatctgga	1800
gaaatgatg cgatgctgct attgctggag ggttcaatat attgacaaac cctgataacc	1860
atgccggtct tgaccgtggc ctttctctgt ccagaaccgg gaattgcaac acatttgacg	1920
atggtcttga ttgctactgt agagcagatg gagtgggtac aateattctc aagcggctgg	1980
aagacgctca ggcggacaac gatccaatcc tcggtgtgat caatggagcc tataccaatc	2040
attcggcaga agcagctcgt attaccggcc ctcattgttg cgcacaagcg tttatcttta	2100
ataagctatt gaacgatgcc aafatcgacc ctaaggagct cagctacgtt gaaatgcatg	2160
gaactggtag tcaagctggg gatcgctgg aaatgcaatc ggtcttggat acgtttgctc	2220
ccgactaccg ccgtggacca ggacagtctc tccatcttgg ttccgccaaa gcaaatgttg	2280
ggcatggaga gtcagcatct ggtgtaactg cacttctgaa agtgcctgct atgatgaaga	2340
agaataccat acccccctat tttggtataa agactaagat caaccacaac ttcgccacgg	2400
atctcgcga acgaaatgct cacattgctt ttcaacctac cccttggaa acgaccggctt	2460
ccgaaaagcg gcagtgcttc attaacaact tttcggcggc tgggtgaaat accgctcttt	2520
tgatggaaga cgttccaatc gctgaggfta aggggcagga cactcgacct gttcacgttg	2580
tgctcgtatc ggcacgatcc cagagtggc tcaaaaaaaa catcaactct ctctgfaaaat	2640
acatcgacga acaaaggaag tcattcaatg tgaacgagcc agactttatc ccaagcttgg	2700

[0003]

catacaccac cacagcaegg cgtatccate acccattccg tgtcacagct atcgggtcta	2760
gtttgcagga gctgcgtgac tcaactaaca acagctctcg tetggaaagc tttaccctg	2820
lcccigcgac ggccccctggc gtagggttcg tgttcgctgg ccaaggagct cagcaacccg	2880
gaatgggaag gcaactatac gaaaaatgct ctcaattccg ggcaacaatg cagcacttcc	2940
attgcattag tcaaaaccaa gggtttcctt cgatccttcc cttggttgac ggaagcgtgc	3000
ccgtggagga gctgggccct atcgtgacac agctcggcac cacatgtctt cagatggctt	3060
tggtaacta ttggggttca ctaggataaa aacctgcgtt cgttcttggg catagtctcg	3120
ggngatttgc tgettgaat accgcaggag tattatcgac ttccgatacc atctaccctt	3180
gtggccgtcg ggctaccctc ctacagaat actgccaggt tgggacacac gccatgctgg	3240
cigtcaagc ttctaccctc caggtcaagc agttaetgaa agaaggtgtg gatgaagtgc	3300
cctgtgtcaa ctcaaccagt gagacagtcg tcaagtggct caccgctgat attgatgact	3360
tggctcaaa ggttccact gaaggttggc agtccactaa actaagggta ccgttccctt	3420
tccattctgc ccaagttact ccaattcttg aacggttcca agaagaggcc cagggtgta	3480
cgttccgtaa gccgtcgtta ccgtttgttt cctcactcct tggggaagtc atcaccgaat	3540
ctaaftaaga tglcttggga gctcaalata tggfgaagca glcccgaag tccgtgaact	3600
tccttggctc tcttgaggcc accagatatg cgaattgat gactgataag actgtctgge	3660
tggaagtgg tgcceatacc atttgcctcg giatgatcaa agcaacatc ggtccccagg	3720
ttaccactgt ggcatctctt cggccagagg agaatgatg gaaggctctc tccaatagtc	3780
tatcgccctc tcatitggct ggcattgata ttaattgnaa agaatatcat caagacttca	3840
gctccagcca ccagggtgct ccaactctt cttaacaagt ggatecgaag aactactgga	3900
taeccctaac taacaatttc tgccttaca aggggtctcc ccaactgca attcaagctg	3960
caccacaaac tacattctcg accactgctg cgcaaaaggt tgttgagagt cgcgacgacg	4020
gtacaacagc gactgtctgt gtgcaaatg acatcctga tcttgattg aaccgtgtta	4080
tccaaggtea caaggtea gtagccgca tttgcccate ggtaagtatt geatgcattg	4140
ccagactatc ttgtgttata attcgctac ttacgtattg cctagtcaet ctacgcagat	4200
attgcccaga cacttggaga glatcttalt gagaataca aaccagatt caaagatctt	4260
ggctctgat tgtgtgacat ggtcgtaccg aagccactca tccggaaggg aggagagcag	4320
ctctttagag tctctgctat tgcctaattg gctgagaaga aggcctcagt tcaagtatac	4380
gccgttaatg ctgacggcaa aaagaccgtg gatcatcgtt attgtacggt gaagtctt	4440
gataccaatg ctcccgact cgagtggaag agaatctctt acctggtcaa gagaagcate	4500
gacagtcttc accagaatgc ggagacaggg gaggtcacc gtatccagc agaatggtc	4560
tataaacttt tcagcgcgtt ggctgattat gatgaaaatt tcaagtcgat tccgaggtt	4620
atcctggaca gcgacaataa tgaggccacc gctcgtgta aattccaage accgcccaga	4680
aatttccacc gaaaccatt ctggattgac agtttcggtc acttgtccgg attcattatg	4740
aatgcgagcg acgcgaccga ctctaagaac caagtatttg ttaaccatgg atggattc	4800
atgcgttgc tgaagaagt ctccctgat gtcacttate gcacttaigt gaggatcag	4860

[0004]

ccattggcaaa acaacatttg ggcftggagat gtttatatct ttgaggcgca cgatattatf 4920
 gctgtcttcg gaggtgtaa ggtgggtacc tcaactactga ttttggttcc tgcctactga 4980
 catgataatt agttecaagc actggcacgc aagatacttg acaactgtct tccccctggt 5040
 ggcggttcaa aggcaccaat tatagcgaaa tcaccacctc cagctcgeac ttagaaggcc 5100
 aacaccggcg ccaagaccgg tcttaaagca cctgttcctt ceaagfegt caccaaatct 5160
 tctgggcgca gtgtgtcgt acgcgcactc agcattctgg cctcagaagt tggectggea 5220
 gagtctgaaa tctcagacga catggtgttt gggactacg gtgtagacie actcctctcc 5280
 cttacagtta ctggcaggta tctgaagag ttgaacctcg atttgactc ctctgtgttt 5340
 accgateatc caactgtaaa cgacttcaag cgcctcatcg cccaagttag tcttcagag 5400
 agccatgatg gttcctccag tgaacaagag tgaatttct ctttcaacgg tggcagatcc 5460
 tcaagcgcaa gcacacctga cataacgtca ccgccgaatg agaaggtagc tcaagtcgag 5520
 caaacggca ccatgaagga aatccgtaac atcatggcgg aggagatcgg tgfaccgca 5580
 gaagagatcg acctgacga gaacttggga gagatggta tggactcgt tctctccctt 5640
 actgttcttg gaagaatag ggagacttg gacatggacc tgccaggaga gttctctc 5700
 gaaaaccaga ccctcaatga tatagaggtg gctttggacc taaaacceaa gactacctct 5760
 gctccaatc ctatgccaga gccagtgaaa ttccctgaag ctatecaca cetccagcca 5820
 aagcttgcct aacatcccaa gccacatcc atctgttac aaggaaacce caggacagca 5880
 acaaagactg tattcttgtt tctgacggc tctgctcag ctacactta cgttaeccatc 5940
 cccggactct ctctgactg ctgcgttac gggttgaatt gccatataa gaagacacct 6000
 gagaagctca aatgcagctt agatgaactc actgcacct atgtagcaga gattcgtct 6060
 cggcaaccca aggttctta cagcttctgt ggcgtgtag caggaggat ctgtgcatat 6120
 gatgcggca cccatctaat gttgaggaa ggtgaacaag tgaacctt gettctctt 6180
 gataccccct tccccatcg cctcagaaag ctgccgcaga gattgtaegg ctcttcaac 6240
 tctatcggtc tcttcagta agttaaagc gcaccacct cctgctcct accccactc 6300
 ctagccctta tgaactctc cgacgcatac aaggccgcgc ccttccatt caaagacgag 6360
 aaatgggcca agaaactgc caagacttat ataatctgg ccaaggagg tgtttgggt 6420
 aagccgggag atccccgcc tgaatcccc acagacggtt ccaaggatcc caaggagatg 6480
 gctgacttc ttaatgaccg gaccgatctg ggacctaca agtgggafac atgtgttga 6540
 cctgagaata ttgttgaat cacagtaag gaagatgcta atcattttac gatgacgaag 6600
 ggcgaaaaag cgaagaggtt gctacattt atggctaacg ccatgctta a 6651

<210> 6
 <211> 2141
 <212> FRT
 <213> 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)

<400> 6

Met. Glu. Gly. Pro. Arg. Gly. Val. Tyr. Leu. Phe. Gly. Asp. Gln. Thr. Ser. Asp
 1 5 10 15

Phe. Asp. Ala. Gly. Leu. Arg. Arg. Leu. Leu. Gln. Val. Lys. Asn. Asn. Thr. Ile
 20 25 30

[0005]

Val Ala Ser Phe Phe Gln Arg Cys Phe His Ala Leu Arg Gln Glu Ile
 35 40 45
 Ala Arg Leu Ser Pro Ser Glu Arg Lys Ile Phe Pro Arg Phe Thr Ser
 50 55 60
 Ile Val Asp Leu Leu Ala Arg His Arg Glu Ser Asp Pro Asn Pro Ala
 65 70 75 80
 Leu Glu Ser Ala Leu Thr Cys Ile Tyr Gln Leu Gly Cys Phe Ile Asn
 85 90 95
 Tyr Tyr Gly Asp Leu Gly Asn Val Tyr Pro Ser Ala Ser Asp Cys His
 100 105 110
 Ile Val Gly Leu Cys Ala Gly Leu Leu Ser Ser Ala Ala Val Ser Cys
 115 120 125
 Ser Asn Asn Val Gly Glu Leu Leu Pro Ala Ala Val Glu Ala Val Val
 130 135 140
 Val Ala Leu Arg Leu Gly Leu Cys Val Leu Lys Val Arg Glu Leu Val
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Gln Ala Ser Ser Thr Ser Trp Ser Val Leu Ile Ser Gly
 165 170 175
 Ile Ser Glu Lys Asp Ala Ser Gln Leu Ile Gly Glu Phe Thr Ala Glu
 180 185 190
 Arg Ala Ile Pro Pro Ser Ser Lys Pro Tyr Ile Ser Ala Val Gly Tyr
 195 200 205
 Asn Ser Ile Thr Ile Ser Ala Pro Pro Lys Val Leu Asp Asp Leu Ile
 210 215 220
 Asp Ser Arg Leu Ser Lys Ser His Lys Pro Val Arg Ala Gln Ile His
 225 230 235 240
 Gly Pro Tyr His Ala Ala His Leu Tyr Tyr Gly Arg Asp Val Asp Arg
 245 250 255
 Ile Ile Glu Ser Cys His Asn Glu Val Val Ser Asn Tyr Thr Pro Arg
 260 265 270
 Ile Pro Val Leu Ser Ser Thr Thr Gly Gln Pro Ile Glu Ala Lys His
 275 280 285
 Met Lys Asp Leu Leu Lys Ala Ala Leu Glu Glu Ile Leu Leu Arg Gln
 290 295 300
 Leu Cys Trp Glu Lys Val Thr Asp Ala Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Thr
 305 310 315 320
 Ala Arg His Gln Pro Cys Lys Leu Phe Pro Ile Ser Ser Thr Ala Thr
 325 330 335
 Gln Ser Leu Phe Thr Ala Leu Thr Lys Ala Gly Ile Thr Asp Ile Glu
 340 345 350
 Val Glu Asn Gly Leu Gly Asp Val Pro Thr Asn Pro Lys Asp Asn Leu
 355 360 365
 Asn Ile Ser Gly Arg Ala Asp Cys Ser Lys Ile Ala Ile Ile Gly Met
 370 375 380
 Ser Gly Arg Phe Pro Glu Ala Asp Gly Thr Glu Ser Phe Trp Asp Leu
 385 390 395 400
 Leu Tyr Asn Gly Leu Asp Val His Arg Lys Val Pro Ala Glu Arg Trp
 405 410 415

[0006]

Asp Val Asp Ala His Val Asp Pro Thr Gly Thr Lys Arg Asn Thr Ser
 420 425 430
 Lys Val Pro Tyr Gly Cys Trp Ile Asn Glu Pro Gly Leu Phe Asp Pro
 435 440 445
 Arg Phe Phe Asn Met Ser Pro Arg Glu Ala Leu Gln Ala Asp Pro Ala
 450 455 460
 Gln Arg Leu Ala Leu Leu Thr Ala Tyr Glu Ala Leu Glu Met Ala Gly
 465 470 475 480
 Phe Ile Pro Asp Ser Thr Pro Ser Thr Gln Arg Asp Arg Val Gly Leu
 485 490 495
 Phe Tyr Gly Met Thr Ser Asp Asp Tyr Arg Glu Ile Asn Ser Gly Gln
 500 505 510
 Asp Ile Asp Thr Tyr Phe Ile Pro Gly Gly Asn Arg Ala Phe Thr Pro
 515 520 525
 Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Phe Lys Phe Ser Gly Pro Ser Val Ser Val
 530 535 540
 Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Ala Ala Ile His Met Ala Cys Asn
 545 550 555 560
 Ser Ile Trp Arg Asn Asp Cys Asp Ala Ala Ile Ala Gly Gly Val Asn
 565 570 575
 Ile Leu Thr Asn Pro Asp Asn His Ala Gly Leu Asp Arg Gly His Phe
 580 585 590
 Leu Ser Arg Thr Gly Asn Cys Asn Thr Phe Asp Asp Gly Ala Asp Gly
 595 600 605
 Tyr Cys Arg Ala Asp Gly Val Gly Thr Ile Ile Leu Lys Arg Leu Glu
 610 615 620
 Asp Ala Gln Ala Asp Asn Asp Pro Ile Leu Gly Val Ile Asn Gly Ala
 625 630 635 640
 Tyr Thr Asn His Ser Ala Glu Ala Val Ser Ile Thr Arg Pro His Val
 645 650 655
 Gly Ala Gln Ala Phe Ile Phe Asn Lys Leu Leu Asn Asp Ala Asn Ile
 660 665 670
 Asp Pro Lys Asp Val Ser Tyr Val Glu Met His Gly Thr Gly Thr Gln
 675 680 685
 Ala Gly Asp Ala Val Glu Met Gln Ser Val Leu Asp Thr Phe Ala Pro
 690 695 700
 Asp Tyr Arg Arg Gly Pro Gly Gln Ser Leu His Leu Gly Ser Ala Lys
 705 710 715 720
 Ala Asn Val Gly His Gly Glu Ser Ala Ser Gly Val Thr Ala Leu Val
 725 730 735
 Lys Val Leu Leu Met Met Lys Lys Asn Thr Ile Pro Pro His Cys Gly
 740 745 750
 Ile Lys Thr Lys Ile Asn His Asn Phe Pro Thr Asp Leu Ala Gln Arg
 755 760 765
 Asn Val His Ile Ala Phe Gln Pro Thr Pro Trp Asn Arg Pro Ala Ser
 770 775 780
 Gly Lys Arg Gln Cys Phe Ile Asn Asn Phe Ser Ala Ala Gly Gly Asn
 785 790 795 800
 Thr Ala Leu Leu Met Glu Asp Ala Pro Ile Ala Glu Val Lys Gly Gln

[0007]

805				810				815							
Asp	Thr	Arg	Pro	Val	His	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ala	Arg	Ser	Gln	Ser
			820						825					830	
Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Ile	Asn	Ser	Leu	Val	Lys	Tyr	Ile	Asp	Glu	Gln
		835					840							845	
Gly	Arg	Ser	Phe	Asn	Val	Asn	Glu	Ala	Asp	Phe	Ile	Pro	Ser	Leu	Ala
		850					855							860	
Tyr	Thr	Thr	Thr	Ala	Arg	Arg	Ile	His	His	Pro	Phe	Arg	Val	Thr	Ala
					870						875				880
Ile	Gly	Ser	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Arg	Asp	Ser	Leu	Asn	Asn	Ser	Ser
					885					890				895	
Arg	Leu	Glu	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Pro	Ala	Thr	Ala	Pro	Gly	Val	Gly
			900						905					910	
Phe	Val	Phe	Ala	Gly	Gln	Gly	Ala	Gln	His	Thr	Gly	Met	Gly	Arg	Gln
			915				920							925	
Leu	Tyr	Glu	Lys	Cys	Ser	Gln	Phe	Arg	Ala	Thr	Met	Gln	His	Phe	Asp
		930					935							940	
Cys	Ile	Ser	Gln	Asn	Gln	Gly	Phe	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Leu	Val	Asp
					950					955				960	
Gly	Ser	Val	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Gly	Pro	Ile	Val	Thr	Gln	Leu	Gly
					965				970					975	
Thr	Thr	Cys	Leu	Gln	Met	Ala	Leu	Val	Asn	Tyr	Trp	Gly	Ser	Leu	Gly
			980						985					990	
Ile	Lys	Pro	Ala	Phe	Val	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Glu	Phe	Ala	Ala
			995				1000							1005	
Leu	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Leu	Ser	Thr	Ser	Asp	Thr	Ile	Tyr	Leu	
			1010			1015								1020	
Cys	Gly	Arg	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Thr	Glu	Tyr	Cys	Gln	Val	Gly	
			1025			1030								1035	
Thr	His	Ala	Met	Leu	Ala	Val	Lys	Ala	Ser	Tyr	Pro	Gln	Val	Lys	
			1040			1045								1050	
Gln	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Val	Asp	Glu	Val	Ala	Cys	Val	Asn	Ser	
			1055			1060								1065	
Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Val	Ser	Gly	Leu	Thr	Ala	Asp	Ile	Asp	Asp	
			1070			1075								1080	
Leu	Ala	Gln	Arg	Cys	Ser	Thr	Glu	Gly	Trp	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	
			1085			1090								1095	
Arg	Val	Pro	Phe	Ala	Phe	His	Ser	Ala	Gln	Val	Thr	Pro	Ile	Leu	
			1100			1105								1110	
Glu	Arg	Phe	Gln	Glu	Glu	Ala	Gln	Gly	Val	Thr	Phe	Arg	Lys	Pro	
			1115			1120								1125	
Ser	Leu	Pro	Phe	Val	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Glu	Val	Ile	Thr	Glu	
			1130			1135								1140	
Ser	Asn	Tyr	Asp	Val	Leu	Gly	Ala	Gln	Tyr	Met	Val	Lys	Gln	Cys	
			1145			1150								1155	
Arg	Lys	Ser	Val	Asn	Phe	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Ala	Thr	Arg	Tyr	
			1160			1165								1170	
Ala	Lys	Leu	Met	Thr	Asp	Lys	Thr	Val	Trp	Leu	Glu	Val	Gly	Ala	
			1175			1180								1185	

[0008]

His	Thr	Ile	Cys	Ser	Gly	Met	Ile	Lys	Ala	Thr	Phe	Gly	Pro	Gln
	1190					1195						1200		
Val	Thr	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Arg	Arg	Glu	Glu	Asn	Ala	Trp	Lys
	1205					1210						1215		
Val	Leu	Ser	Asn	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	His	Leu	Ala	Gly	Ile	Asp
	1220					1225						1230		
Ile	Asn	Trp	Lys	Glu	Tyr	His	Gln	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser	His	Gln
	1235					1240						1245		
Val	Leu	Pro	Leu	Pro	Ser	Tyr	Lys	Trp	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Trp
	1250					1255						1260		
Ile	Pro	Tyr	Thr	Asn	Asn	Phe	Cys	Leu	Thr	Lys	Gly	Ala	Pro	Gln
	1265					1270						1275		
Thr	Ala	Ile	Gln	Ala	Ala	Pro	Gln	Thr	Thr	Phe	Leu	Thr	Thr	Ala
	1280					1285						1290		
Ala	Gln	Lys	Val	Val	Glu	Ser	Arg	Asp	Asp	Gly	Thr	Thr	Ala	Thr
	1295					1300						1305		
Val	Val	Val	Gln	Asn	Asp	Ile	Ala	Asp	Pro	Glu	Leu	Asn	Arg	Val
	1310					1315						1320		
Ile	Gln	Gly	His	Lys	Val	Asn	Gly	Ala	Ala	Leu	Cys	Pro	Ser	Ser
	1325					1330						1335		
Leu	Tyr	Ala	Asp	Ile	Ala	Gln	Thr	Leu	Gly	Glu	Tyr	Leu	Ile	Glu
	1340					1345						1350		
Lys	Tyr	Lys	Pro	Glu	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Leu	Asp	Val	Cys	Asp
	1355					1360						1365		
Met	Val	Val	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	Ala	Lys	Gly	Gly	Glu	Gln	Leu
	1370					1375						1380		
Phe	Arg	Val	Ser	Ala	Ile	Ala	Asn	Trp	Ala	Glu	Lys	Lys	Ala	Ser
	1385					1390						1395		
Val	Gln	Val	Tyr	Ala	Val	Asn	Ala	Asp	Gly	Lys	Lys	Thr	Val	Asp
	1400					1405						1410		
His	Ala	Tyr	Cys	Thr	Val	Lys	Phe	Phe	Asp	Thr	Asn	Ala	Ser	Glu
	1415					1420						1425		
Leu	Glu	Trp	Lys	Arg	Ile	Ser	Tyr	Leu	Val	Lys	Arg	Ser	Ile	Asp
	1430					1435						1440		
Ser	Leu	His	Gln	Asn	Ala	Glu	Thr	Gly	Glu	Ala	His	Arg	Ile	Gln
	1445					1450						1455		
Arg	Gly	Met	Val	Tyr	Lys	Leu	Phe	Ser	Ala	Leu	Val	Asp	Tyr	Asp
	1460					1465						1470		
Glu	Asn	Phe	Lys	Ser	Ile	Arg	Glu	Val	Ile	Leu	Asp	Ser	Asp	Asn
	1475					1480						1485		
Asn	Glu	Ala	Thr	Ala	Arg	Val	Lys	Phe	Gln	Ala	Pro	Pro	Gly	Asn
	1490					1495						1500		
Phe	His	Arg	Asn	Pro	Phe	Trp	Ile	Asp	Ser	Phe	Gly	His	Leu	Ser
	1505					1510						1515		
Gly	Phe	Ile	Met	Asn	Ala	Ser	Asp	Ala	Thr	Asp	Ser	Lys	Asn	Gln
	1520					1525						1530		
Val	Phe	Val	Asn	His	Gly	Trp	Asp	Ser	Met	Arg	Cys	Leu	Lys	Lys
	1535					1540						1545		

[0009]

Phe Ser Pro Asp Val Thr Tyr Arg Thr Tyr Val Arg Met Gln Pro
 1550 1555 1560
 Trp Gln Asn Asn Ile Trp Ala Gly Asp Val Tyr Ile Phe Glu Gly
 1565 1570 1575
 Asp Asp Ile Ile Ala Val Phe Gly Gly Val Lys Phe Gln Ala Leu
 1580 1585 1590
 Ala Arg Lys Ile Leu Asp Thr Val Leu Pro Pro Val Gly Gly Ser
 1595 1600 1605
 Lys Ala Pro Ile Thr Ala Lys Ser Pro Pro Pro Ala Arg Thr Gln
 1610 1615 1620
 Lys Ala Asn Thr Gly Ala Lys Thr Arg Pro Lys Ala Pro Val Pro
 1625 1630 1635
 Ser Lys Ser Phe Thr Lys Ser Ser Gly Pro Ser Val Val Val Arg
 1640 1645 1650
 Ala Leu Ser Ile Leu Ala Ser Glu Val Gly Leu Ala Glu Ser Glu
 1655 1660 1665
 Ile Ser Asp Asp Met Val Phe Ala Asp Tyr Gly Val Asp Ser Leu
 1670 1675 1680
 Leu Ser Leu Thr Val Thr Gly Arg Tyr Arg Glu Glu Leu Asn Leu
 1685 1690 1695
 Asp Leu Asp Ser Ser Val Phe Thr Asp His Pro Thr Val Asn Asp
 1700 1705 1710
 Phe Lys Arg Leu Ile Ala Gln Val Ser Pro Ser Glu Ser His Asp
 1715 1720 1725
 Gly Ser Ser Ser Glu Gln Glu Ser Asn Phe Ser Phe Asn Gly Gly
 1730 1735 1740
 Glu Ser Ser Ser Ala Ser Thr Pro Asp Ile Thr Ser Pro Pro Asn
 1745 1750 1755
 Glu Lys Val Ala Gln Val Glu Gln Asn Gly Thr Met Lys Glu Ile
 1760 1765 1770
 Arg Asn Ile Met Ala Glu Glu Ile Gly Val Pro Ala Glu Glu Ile
 1775 1780 1785
 Asp Pro Asp Glu Asn Leu Gly Glu Met Gly Met Asp Ser Leu Leu
 1790 1795 1800
 Ser Leu Thr Val Leu Gly Arg Ile Arg Glu Thr Leu Asp Met Asp
 1805 1810 1815
 Leu Pro Gly Glu Phe Phe Ile Glu Asn Gln Thr Leu Asn Asp Ile
 1820 1825 1830
 Glu Val Ala Leu Asp Leu Lys Pro Lys Thr Thr Ser Ala Pro Ile
 1835 1840 1845
 Pro Met Pro Glu Pro Val Lys Phe Pro Glu Ala Ile His Asp Leu
 1850 1855 1860
 Gln Pro Lys Leu Ala Gln His Pro Lys Ala Thr Ser Ile Leu Leu
 1865 1870 1875
 Gln Gly Asn Pro Arg Thr Ala Thr Lys Thr Leu Phe Leu Phe Pro
 1880 1885 1890
 Asp Gly Ser Gly Ser Ala Thr Ser Tyr Ala Thr Ile Pro Gly Leu
 1895 1900 1905
 Ser Pro Asp Val Cys Val Tyr Gly Leu Asn Cys Pro Tyr Met Lys

[0010]

1910	1915	1920
Thr Pro Glu Lys Leu Lys Cys Ser Leu Asp Glu Leu Thr Ala Pro		
1925	1930	1935
Tyr Val Ala Glu Ile Arg Arg Arg Gln Pro Lys Gly Pro Tyr Ser		
1940	1945	1950
Phe Gly Gly Trp Ser Ala Gly Gly Ile Cys Ala Tyr Asp Ala Ala		
1955	1960	1965
Arg His Leu Met Phe Glu Glu Gly Glu Gln Val Asp Arg Leu Leu		
1970	1975	1980
Leu Leu Asp Thr Pro Phe Pro Ile Gly Leu Glu Lys Leu Pro Gln		
1985	1990	1995
Arg Leu Tyr Gly Phe Phe Asn Ser Ile Gly Leu Phe Gly Glu Gly		
2000	2005	2010
Lys Thr Ala Pro Pro Ser Trp Leu Leu Pro His Phe Leu Ala Phe		
2015	2020	2025
Ile Asp Ala Leu Asp Ala Tyr Lys Ala Ala Pro Leu Pro Phe Lys		
2030	2035	2040
Asp Glu Lys Trp Ala Lys Lys Leu Pro Lys Thr Tyr Ile Ile Trp		
2045	2050	2055
Ala Lys Asp Gly Val Cys Gly Lys Pro Gly Asp Pro Arg Pro Asp		
2060	2065	2070
Pro Pro Thr Asp Gly Ser Lys Asp Pro Lys Glu Met Val Trp Leu		
2075	2080	2085
Leu Asn Asp Arg Thr Asp Leu Gly Pro Asn Lys Trp Asp Thr Leu		
2090	2095	2100
Val Gly Pro Glu Asn Ile Gly Gly Ile Thr Val Met Glu Asp Ala		
2105	2110	2115
Asn His Phe Thr Met Thr Lys Gly Glu Lys Ala Lys Glu Leu Ser		
2120	2125	2130
Thr Phe Met Ala Asn Ala Met Ala		
2135	2140	

<210> 7
 <211> 176
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(Aspergillus oryzae)

<400> 7	
cagcacttgc atfgcattag tcaaaaccaa gggtttccit egatccttcc cttggttgac	60
ggaagcgigc ccgtggagga gcigggccct atcgtgacac agctcggcac cacatgtctt	120
cagatggctt tggteaacta ttggggttca ctaggataa aacctgcgtt cgttct	176

<210> 8
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 米曲霉(Aspergillus oryzae)

<400> 8	
Gln His Phe Asp Cys Ile Ser Gln Asn Gln Gly Phe Pro Ser Ile Leu	
1	15
Pro Leu Val Asp Gly Ser Val Pro Val Glu Glu Leu Gly Pro Ile Val	
20	30

[0011]

Thr Gln Leu Gly Thr Thr Cys Leu Gln Met Ala Leu Val Asn Tyr Trp
 35 40 45
 Gly Ser Leu Gly Ile Lys Pro Ala Phe Val Leu
 50 55

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(Aspergillus oryzae)
 <400> 9
 ccattggagca cttcgattgc atfag 25

<210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(Aspergillus oryzae)
 <400> 10
 gcggccgcag aacgaacgca ggtttatnc 30

<210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(Aspergillus oryzae)
 <400> 11
 ccattggcgc tcaaaaacaa catcaac 27

<210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(Aspergillus oryzae)
 <400> 12
 gcggccgcag aacgaacgca ggtttat 28

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(Aspergillus oryzae)
 <400> 13
 tactacggag accttgaaa 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(Aspergillus oryzae)
 <400> 14
 gctccttagac agcctagaat 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(Aspergillus oryzae)
 <400> 15
 atgcctcgcgca gcttatagga 20

<210> 16
 <211> 20

[0012]

<212> DNA
 <213> 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)

<400> 16
 cgcactgata tacggtttgg 20

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)

<400> 17
 ggatctctac ggtaacatcg tca 23

<210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)

<400> 18
 gatcggagat gccaggta 19

<210> 19
 <211> 1128
 <212> DNA
 <213> 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)

<400> 19
 atggaagagg aagtgtgtgc tctcgtcatt gacaatggtt cgggtatgtg caaggccggt 60
 ttcccgctgc aegatgctcc ccgtgcctgc ttccccctca ttgtcggctg tcccctcac 120
 catggtatca tgattggtat gggtcagaag gactcctacg tcggtgatga ggcacagctc 180
 aagcgtggta tctcaccctc cagatacccc attgagcagc gtgtcgtcac gaactgggat 240
 gacatggaga agatctggca ccacaccttc tacaatgaac tccgtgtcgc tccigaggag 300
 caccccctcc tcttgaccga agcccccttc aacccccagt ccaaccgtga gaagatgacc 360
 cagatcgtct tcgagacctt caacgcccc gccttctacg tctccatca ggcctcctg 420
 tccctgtaag cctccgctgc taccaccggt atcgttctgg actctggtga cgggtcacc 480
 cactgtgtcc ceatctacga ggttttgcgc ctccccacgc ccatctcccg tctcagatg 540
 gctggtcgtg acctgacgga ttacctcatg aagatcctgg ccgagcgtgg ttacaatttc 600
 tccactaccg ctgagcgtga aattgtccgt gacatcaagg agaagctctg ctacgtcgt 660
 ctgcacttcc agcaggagat ccagaccctt tcccagagct ccagcctega gaagtccctac 720
 gacttcccc acggtcaggt catcaccatc ggcacagacc gtttccgtgc tccigaggct 780
 ctgttcctcc ctacgctcct ggtctggag agcgtggta tccacgagac cacttcaac 840
 tccatcatga agtctgatgt tgatgtccgt aaggatctgt accgcaacat tctcatgtct 900
 ggtggtacta ccatgtaccc cggtatctcc gaccgtatgc agaaggagat cactgctctt 960
 gctccctctt ccctgaaggt caagatcatt gctccctccg agcgcgaagta ctccgctcgg 1020
 atcggctggt ccatctctgc ctccctctcc accttccagc agatgtggat ctccaagcag 1080
 gagtaccgac agagcggctc ctccatctgc caccgcaagt gcttctaa 1128

<210> 20
 <211> 375
 <212> PRT

[0013]

<213> 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)

<400> 20

Met Glu Glu Glu Val Ala Ala Leu Val Ile Asp Asn Gly Ser Gly Met
1 5 10 15

Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val Phe Pro
20 25 30

Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His His Gly Ile Met Ile Gly Met Gly
35 40 45

Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg Gly Ile
50 55 60

Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Ile Glu His Gly Val Val Thr Asn Trp Asp
65 70 75 80

Asp Met Glu Lys Ile Trp His His Thr Phe Tyr Asn Glu Leu Arg Val
85 90 95

Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu Leu Thr Glu Ala Pro Ile Asn Pro
100 105 110

Lys Ser Asn Arg Glu Lys Met Thr Gln Ile Val Phe Glu Thr Phe Asn
115 120 125

Ala Pro Ala Phe Tyr Val Ser Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr Ala
130 135 140

Ser Gly Arg Thr Thr Gly Ile Val Leu Asp Ser Gly Asp Gly Val Thr
145 150 155 160

His Val Val Pro Ile Tyr Glu Gly Phe Ala Leu Pro His Ala Ile Ser
165 170 175

Arg Val Asp Met Ala Gly Arg Asp Leu Thr Asp Tyr Leu Met Lys Ile
180 185 190

Leu Ala Glu Arg Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile
195 200 205

Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu
210 215 220

Gln Glu Ile Gln Thr Ala Ser Gln Ser Ser Ser Leu Glu Lys Ser Tyr
225 230 235 240

Glu Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe Arg
245 250 255

Ala Pro Glu Ala Leu Phe Ala Pro Ser Val Leu Gly Leu Glu Ser Gly
260 265 270

Gly Ile His Glu Thr Thr Phe Asn Ser Ile Met Lys Cys Asp Val Asp
275 280 285

Val Arg Lys Asp Leu Tyr Gly Asn Ile Val Met Ser Gly Gly Thr Thr
290 295 300

Met Tyr Pro Gly Ile Ser Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu
305 310 315 320

Ala Pro Ser Ser Met Lys Val Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg Lys
325 330 335

Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe
340 345 350

Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser
355 360 365

[0014]

Ile Val His Arg Lys Cys Phe	
370	375
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 米曲霉(<i>Aspergillus oryzae</i>)	
<400> 21	
atgcctcgca gcttatagga	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 米曲霉(<i>Aspergillus oryzae</i>)	
<400> 22	
cgcaactgata tacggittgg	20
<210> 23	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 米曲霉(<i>Aspergillus oryzae</i>)	
<400> 23	
ggatctctac ggtaacatcg tea	23
<210> 24	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 米曲霉(<i>Aspergillus oryzae</i>)	
<400> 24	
gacggagat gccaggta	19
<210> 25	
<211> 6387	
<212> DNA	
<213> 黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	
<400> 25	
atggagggtc catctcgtgt gtaccttttt ggagaccaga ccagcgacat cgaagctggc	60
ctgcgcgctc tgcctcaagc gaagaatagt accaattgtcc agtctctttt ccagcaatgc	120
ttccatgcaa ttcgteaaga gatcgcgaag ctcccgcctg ctcatcggaa gctcttccca	180
cgcttcaaga gcafcgttga tctcttttcc aggagtcgtg aatecaggtcc tagccctgtc	240
ctggagagtg caatgacaig cafetaccaa ttgggttgtt teatfcactt ttacggggat	300
cttggacaig acfaccctac accctccaac agccatcttg ttggcctgtg cactgggttt	360
ctgagctgca cgctgttaag ttgcgccaga aatgttggag agcttatfcc agctgcagtg	420
gaatcggftg taattgcact gcgactggga atctgcgttt ttcgagttcg agaactggtg	480
gactccgcgc attccgagtc nacatgettg tcagcgttgg tttctggaat cagtgaagca	540
gaggetagcc acctgatcga cgagtacagt agtaagaagg ctactcggcc ttcttcgaaa	600
ccgtataatc gcgcggtaag ctetaatggc gttactgtca gcgcaccacc taeggtactt	660
gatgaattcg tegagacctg catttccaag aattacaagc cagtgaagcc cctattcat	720
ggcccgtacc atgcgccaca tctgtatgat gataaggata tegaccgcat cctgcagcag	780
tcctctgctc tagaaggact gaccggetgt tcaccctgta ttccatcat ctccagtaac	840

[0015]

actggaaage cgatcaagge caagtecate aaagatctct tcaaggtcge actggaggag	900
atactcctac gacgactatg ctgggacaag gtcacggagt cctgcacatc agtctgcaag	960
accggcacia accactcttg caaatfgitt ccgatctcga gtagegccac tcaaaagtig	1020
ttcacagtcc tcaagaagge cgggtgtgagc atcagcttgg agactggggt aggagagatc	1080
gcgacgaacc cagaaatgcg gaaccttact ggcaaggcag aaaattcaaa gattgctate	1140
attggtatgt ctggaagatt tctgtactcg gatggtacgg agagcttctg gaacctctg	1200
tacaaaggac tcgacgtaca tcgcaagtc cccgeagacc gttgggacgt tgatgccac	1260
gtcgacatga cgggfciaa gagaaacaca agcaaagtgg ctacggttg ctgcatcaac	1320
gaaccgggcc tgtttgacc ccgattctc aacatgtcgc ctgggaage actccaagca	1380
gactctgcac aacgtcttgc gttgcttaca gcgtacgagg ctctcgagat ggcctgcttc	1440
atcccggata gctctccatc gacgcagagg gaccgtgigg gtattttcta cggaaigacc	1500
agtgcgact accgtgagat caacagcgc caggacattg atacctattt catcccigcc	1560
ggtaaccgag catttaccgc gggtcgata aactactact tcaaatitag cggccccagt	1620
gtgagcgttg acacagegtg ctctctagat ctgtctgcta tccacatgge ttgcaattcg	1680
atctggagaa atgactgcga tcccgccatc actggaggtg tgaacattct gaccaaccct	1740
gacaaccacg ccggtctgga tcggggccat tictgtcca ccaactggca ctgtaacace	1800
tttgatgacg gcgccgacgg ctactgtaga gcggacggag ttggaagcat cgttttgaag	1860
cggtctgaag atgccgagcc cgacaacgac ccgactctgg ccgtcatcaa eggctctac	1920
accaaccact cggcggagcc cgtgtcaatc actcgtccc atgittggege gcaagcattc	1980
atcttcaaca agctgctcaa tgatgcgaat atcgacctc aggacgtgag ctacgtggaa	2040
atgcatggca ctggaactca agcaggtgat gcagtcgaaa tgcagtcctt tcttgacgtc	2100
ttcgcaccag actaccgccg gggtcccggt caatcgcttc atatcggttc tgccaaggca	2160
aacattggac acggtgaatc cgcateagga gtgactgctc ttgtcaaggt cctcctaagt	2220
atgagagaga acatgattec tctctatigt ggtatcaaga ccaagatcaa tccaatttc	2280
ccgacagact tggcgaagcc caatgttcat atcgcttcc aaccactcc ctggaatcgg	2340
ccagcttcag gaaagcggcg aactttcctc aacaactttt ctgctgcigg tgtaacaet	2400
gctcttctac tggaaatgc tccataccg gaacgccaa ggcaggacce caggctcttc	2460
catttggctc ccgltcagc aagatcccag tctgcatlga agaacaacgt cgaagctctg	2520
gtgaagtaca ttgactctca ggcaagtc ttgtgtgta aagagactga attccttcca	2580
aacctggcgt acacgaccac cgcacgccgt atccaccatc ccttccgtgt cactgcggtt	2640
ggagcgaacc tacaatcact gcgtgactcg ctgcatggtg ctgtgcaccg tgagacatat	2700
accccagttc cctcaacgce tctgtgtatt gtttctgtct teaccggcca aggagcccaa	2760
tactccgaa tgggcaaggc actctaccgc agttgttcc aattecgaac caccattgag	2820
caatttgact gcatcgcaag aogccaggcc ctctcttcta tcttctctct tctcgatgga	2880
agcgtggctg tcgaagaact tagccctgtc gttgtacaag tgggaactac ctgtgtacaa	2940
atggtcttag taaatfacg gactgctctg ggtgtgaagc cggccttatt catcggacac	3000

[0016]

agtcttggag actatgcage ccttaacacg gccgggtgtc tatccaccag egatacaatc	3060
tatctttgtg gccggcgtgc tcagttgctg acgaaggaat gcaagattgg gacacattcg	3120
atgetggcca tcaaggegtc cctggcagag gicaaacatt tectcagaga cgagctccac	3180
gaagctctct gtgtaacgc acctgcggag accgtcgtca gccggccttg cgtgatac	3240
gaccagttgg ctcagaaatg ctccacagag gttttgaagt caaccaaget caaggttctc	3300
taccggttcc attcctctca ggttgatcct aicttggagg ccttcgaaga tattgcccac	3360
ggtgtcaact tccacaagcc gacaacacct ttctctcag cctgttccgg ggaagtgatc	3420
accgatgcta actgggagtg tctcggcccc aagtaactgc gcaicattig caganagacg	3480
gtcaacticc ttggcggcgt ggaggctacg aggcattgca agctgaccaa tgacaagact	3540
ctgtgggttg agatcggctc acataccatt tctctggaa tgatcaaagc aactcttggc	3600
ccgcaagtta caacggttgc atctctacgc cgcgaagaag atacctgga ggctcttfcg	3660
aacagctctg cgagccttca tctggcgggt attgatatca actggaagca atatcaccag	3720
gactttagct cctctctcca ggctctccgc ctccacgctt acaagtggga tctcaagaac	3780
tactggattc cctataccaa caacttctgc ctgagcaagg gcctctcagt tgcgacagta	3840
gcggcagggc caeagcatga gtactgaca accgcggctc agaaggtcat tgagactcga	3900
agtgatggag caacagctac agtcgtgata gagaacgaca ttgctgatec cgagctcaac	3960
cgctcattc aaggccataa ggicaacggt actgctttgt gicctctatc actatatgcc	4020
gacatctctc aaacgcttgc agagtatctc atcaaaaagt acaagcctga gtacgacgga	4080
cttggacttg atgtgtgtga ggtcacagtg ccacgaccac tgattcgcaa aggcggacag	4140
cagctcttta gagtatctgc gacagcggat tggcgggaga agaagacaac ccttcagata	4200
taifcagta ctgcccgggg gaagaagacg gctgaccacg caacttgcac tctccgattc	4260
ttgacttgcg ctgctcggga ggcggaatgg aaacgagttt cctaccttgt caagaggagc	4320
attgaccgac tgcattgat atccgaaaat ggtgacgctc accgtcttgg tagaggcatg	4380
gtttacaaac tcttctctgc ctgtgtgat tatgacgaca acttcaagtc cattcgcgag	4440
gtttattctg acagtgaaca gcacgaagcg actgcacgag tcaagttcca agcaccacaa	4500
ggcaatttcc accgaanacc gttctggatt gacagtttg gacaactgtc tgggttctac	4560
atgaacgcaa gcgatgcaac cgactccaag aaccaggctt ttgtcaatca cggatgggac	4620
tccaatcggt gttgaagaa gttctcctt gatgtaacct acaggacta ttttagaatg	4680
cagccttggc aagactccat ctggcctggt gatgtctac ttttcgatgg ggaigatac	4740
gttgcggtgt atggtgcagt caagttccaa gccctatcac gcaagattct cgatacggtc	4800
ctacctccaa gtcgtctag cgcctccgcc ccggcgaagc ctgctgctaa gccacgccc	4860
ccaagcttgg tcaaacgggc acttaccatc ctccagagg aagtgggtct gctgaafcc	4920
gagattacgg atgatctggt ctccgcagac tacgggtgtg actcccttct ttcttgacg	4980
gtcaccggca ggtatctgta agagetggat ategatctcg aatctccat ctctatgac	5040
cagccgaccc tgaagactt caagcagttc ttggcccaa tgagccaggg agaagccagc	5100
gafgggtcca ccagtaccc agagtctagt agctcttcca atgggtgctc tccaacagac	5160
gagtcagtg ctgggtcccc tctcagctca ccacaaaatg agaagttac gcaggctcag	5220

[0017]

cagcatgcta cgataaagga gattcgcgcc attttggccg atgagattgg tgttacggag 5280
 gaggagctga aggacgatga gaacttggga gagatgggga tggactctct gctttcgtt 5340
 acggtgcttg gtaggatecg tgagacattg gatctggatc taccggcgca gttcttcac 5400
 gagnaanaa ctctgaatga cgtggaggat gcattgggcc taaaaccnaa ggcagctctt 5460
 gcgctcgcgc ctgcgcctgc tccctaccgc gcaccctgtt ccgcgcccat attgaaggag 5520
 cctgtcccca acgcaaaact taccatcatg gcccggggga gcccgaccgc tcgatcaacc 5580
 tccattctgt tgcaaggaaa cccgaaaacc gegaccaaga cctgttctct gttccctgat 5640
 gggctggtet ccgcaacatc gtagcaacc attcccgagag tgtccccgga cgtgtgtgtc 5700
 tacggattga actgccccta caigaagact ccagagaagc tcaagtatcc ccttgcctgag 5760
 atgacattcc cctatctgga cgagatccgc cgcagacagc ccaagggccg gtacaacttc 5820
 ggtggatggt ctgcaggtgg tatttgcgcc tatgatgccg ctgctacct aatcctttaa 5880
 gagggcgaac aggttgaccg attgcttctt cttgactcgc ccttccccat tggcttagag 5940
 aagttgccca ctcggetgta cggcttcatc aactcaatgg gtctctttgg tgaaggcaac 6000
 aaggetcccc cggcctgggt gtcccctcat ttcttggcct tcattgatte cctcgatacc 6060
 tacaaggcgc tcccctccc ctttgacgat ccgaagtggg ccaagaagat gcccaagaca 6120
 ttcatggtct gggccaagga cggtatctgc agcaagccgg atgaccctgt gcccgagccg 6180
 gaccgggacg gcaagccgga cagagagag atggtctggc tctcaagaa ccggaccgac 6240
 atgggaccca acaagtggga caaactcgtc gggccccaaa acgtcgttgg aataactgtg 6300
 atagagggtg cgaatcattt caccatgact ttgggaccca agcctaaaga attgggctcg 6360
 ttcattgca acgccaatgc caaitaa 6387

<210> 26
 <211> 2128
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 26

Met	Glu	Gly	Pro	Ser	Arg	Val	Tyr	Leu	Phe	Gly	Asp	Gln	Thr	Ser	Asp
1				5					10					15	
Ile	Glu	Ala	Gly	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Asn	Ser	Thr	Ile
			20					25					30		
Val	Gln	Ser	Phe	Phe	Gln	Gln	Cys	Phe	His	Ala	Ile	Arg	Gln	Glu	Ile
		35					40					45			
Ala	Lys	Leu	Pro	Pro	Ser	His	Arg	Lys	Leu	Phe	Pro	Arg	Phe	Thr	Ser
		50				55					60				
Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Ser	Arg	Ser	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ser	Pro	Val
65					70					75				80	
Leu	Glu	Ser	Ala	Leu	Thr	Cys	Ile	Tyr	Gln	Leu	Gly	Cys	Phe	Ile	His
				85					90					95	
Phe	Tyr	Gly	Asp	Leu	Gly	His	Asp	Tyr	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Ser	His
			100					105					110		
Leu	Val	Gly	Leu	Cys	Thr	Gly	Val	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Val	Ser	Cys
		115					120						125		

[0018]

Ala Arg Asn Val Gly Glu Leu Ile Pro Ala Ala Val Glu Ser Val Val
 130 135 140
 Ile Ala Leu Arg Leu Gly Ile Cys Val Phe Arg Val Arg Glu Leu Val
 145 150 155 160
 Asp Ser Ala Asp Ser Glu Ser Thr Cys Trp Ser Ala Leu Val Ser Gly
 165 170 175
 Ile Ser Glu Ala Glu Ala Ser His Leu Ile Asp Glu Tyr Ser Ser Lys
 180 185 190
 Lys Ala Thr Pro Pro Ser Ser Lys Pro Tyr Ile Ser Ala Val Ser Ser
 195 200 205
 Asn Gly Val Thr Val Ser Ala Pro Pro Thr Val Leu Asp Glu Phe Val
 210 215 220
 Glu Thr Cys Ile Ser Lys Asn Tyr Lys Pro Val Lys Ala Pro Ile His
 225 230 235 240
 Gly Pro Tyr His Ala Pro His Leu Tyr Asp Asp Lys Asp Ile Asp Arg
 245 250 255
 Ile Leu Gln Gln Ser Ser Ala Leu Glu Gly Leu Thr Gly Cys Ser Pro
 260 265 270
 Val Ile Pro Ile Ile Ser Ser Asn Thr Gly Lys Pro Ile Lys Ala Lys
 275 280 285
 Ser Ile Lys Asp Leu Phe Lys Val Ala Leu Glu Glu Ile Leu Leu Arg
 290 295 300
 Arg Leu Cys Trp Asp Lys Val Thr Glu Ser Cys Thr Ser Val Cys Lys
 305 310 315 320
 Thr Gly Thr Asn His Ser Cys Lys Leu Phe Pro Ile Ser Ser Ser Ala
 325 330 335
 Thr Gln Ser Leu Phe Thr Val Leu Lys Lys Ala Gly Val Ser Ile Ser
 340 345 350
 Leu Glu Thr Gly Val Gly Glu Ile Ala Thr Asn Pro Glu Met Arg Asn
 355 360 365
 Leu Thr Gly Lys Ala Glu Asn Ser Lys Ile Ala Ile Ile Gly Met Ser
 370 375 380
 Gly Arg Phe Pro Asp Ser Asp Gly Thr Glu Ser Phe Trp Asn Leu Leu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Gly Leu Asp Val His Arg Lys Val Pro Ala Asp Arg Trp Asp
 405 410 415
 Val Asp Ala His Val Asp Met Thr Gly Ser Lys Arg Asn Thr Ser Lys
 420 425 430
 Val Ala Tyr Gly Cys Trp Ile Asn Glu Pro Gly Leu Phe Asp Pro Arg
 435 440 445
 Phe Phe Asn Met Ser Pro Arg Glu Ala Leu Gln Ala Asp Pro Ala Gln
 450 455 460
 Arg Leu Ala Leu Leu Thr Ala Tyr Glu Ala Leu Glu Met Ala Gly Phe
 465 470 475 480
 Ile Pro Asp Ser Ser Pro Ser Thr Gln Arg Asp Arg Val Gly Ile Phe
 485 490 495
 Tyr Gly Met Thr Ser Asp Asp Tyr Arg Glu Ile Asn Ser Gly Gln Asp
 500 505 510
 Ile Asp Thr Tyr Phe Ile Pro Gly Gly Asn Arg Ala Phe Thr Pro Gly

[0019]

Arg	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Lys	Phe	Ser	Gly	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Asp
530						535					540				
Thr	Ala	Cys	Ser	Ser	Ser	Leu	Ala	Ala	Ile	His	Met	Ala	Cys	Asn	Ser
545					550				555						560
Ile	Trp	Arg	Asn	Asp	Cys	Asp	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Gly	Val	Asn	Ile
			565						570					575	
Leu	Thr	Asn	Pro	Asp	Asn	His	Ala	Gly	Leu	Asp	Arg	Gly	His	Phe	Leu
			580					585					590		
Ser	Thr	Thr	Gly	Asn	Cys	Asn	Thr	Phe	Asp	Asp	Gly	Ala	Asp	Gly	Tyr
		595					600					605			
Cys	Arg	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Ile	Val	Leu	Lys	Arg	Leu	Glu	Asp
610						615					620				
Ala	Glu	Ala	Asp	Asn	Asp	Pro	Ile	Leu	Ala	Val	Ile	Asn	Gly	Ala	Tyr
625					630					635					640
Thr	Asn	His	Ser	Ala	Glu	Ala	Val	Ser	Ile	Thr	Arg	Pro	His	Val	Gly
			645						650						655
Ala	Gln	Ala	Phe	Ile	Phe	Asn	Lys	Leu	Leu	Asn	Asp	Ala	Asn	Ile	Asp
			660					665						670	
Pro	Lys	Asp	Val	Ser	Tyr	Val	Glu	Met	His	Gly	Thr	Gly	Thr	Gln	Ala
		675					680					685			
Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Met	Gln	Ser	Val	Leu	Asp	Val	Phe	Ala	Pro	Asp
690						695					700				
Tyr	Arg	Arg	Gly	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	His	Ile	Gly	Ser	Ala	Lys	Ala
705					710					715					720
Asn	Ile	Gly	His	Gly	Glu	Ser	Ala	Ser	Gly	Val	Thr	Ala	Leu	Val	Lys
			725						730					735	
Val	Leu	Leu	Met	Met	Arg	Glu	Asn	Met	Ile	Pro	Pro	His	Cys	Gly	Ile
			740					745					750		
Lys	Thr	Lys	Ile	Asn	Ser	Asn	Phe	Pro	Thr	Asp	Leu	Ala	Lys	Arg	Asn
		755					760					765			
Val	His	Ile	Ala	Phe	Gln	Pro	Thr	Pro	Trp	Asn	Arg	Pro	Ala	Ser	Gly
		770				775					780				
Lys	Arg	Arg	Thr	Phe	Val	Asn	Asn	Phe	Ser	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Thr
785					790					795					800
Ala	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Ala	Pro	Ile	Pro	Glu	Arg	Gln	Gly	Gln	Asp
				805					810					815	
Pro	Arg	Ser	Phe	His	Leu	Val	Ser	Val	Ser	Ala	Arg	Ser	Gln	Ser	Ala
			820					825					830		
Leu	Lys	Asn	Asn	Val	Glu	Ala	Leu	Val	Lys	Tyr	Ile	Asp	Ser	Gln	Gly
		835					840					845			
Lys	Ser	Phe	Gly	Val	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Leu	Pro	Asn	Leu	Ala	Tyr
850						855					860				
Thr	Thr	Thr	Ala	Arg	Arg	Ile	His	His	Pro	Phe	Arg	Val	Thr	Ala	Val
865					870					875					880
Gly	Ala	Asn	Leu	Gln	Ser	Leu	Arg	Asp	Ser	Leu	His	Gly	Ala	Leu	His
			885					890						895	
Arg	Glu	Thr	Tyr	Thr	Pro	Val	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Gly	Ile	Gly	Phe
			900					905					910		

[0020]

Val Phe Thr Gly Gln Gly Ala Gln Tyr Ser Gly Met Gly Lys Glu Leu
 915 920 925
 Tyr Arg Ser Cys Phe Gln Phe Arg Thr Thr Ile Glu His Phe Asp Cys
 930 935 940
 Ile Ala Arg Ser Gln Gly Leu Pro Ser Ile Leu Pro Leu Val Asp Gly
 945 950 955 960
 Ser Val Ala Val Glu Glu Leu Ser Pro Val Val Val Gln Val Gly Thr
 965 970 975
 Thr Cys Val Gln Met Ala Leu Val Asn Tyr Trp Thr Ala Leu Gly Val
 980 985 990
 Lys Pro Ala Phe Ile Ile Gly His Ser Leu Gly Asp Tyr Ala Ala Leu
 995 1000 1005
 Asn Thr Ala Gly Val Leu Ser Thr Ser Asp Thr Ile Tyr Leu Cys
 1010 1015 1020
 Gly Arg Arg Ala Gln Leu Leu Thr Lys Glu Cys Lys Ile Gly Thr
 1025 1030 1035
 His Ser Met Leu Ala Ile Lys Ala Ser Leu Ala Glu Val Lys His
 1040 1045 1050
 Phe Leu Arg Asp Glu Leu His Glu Val Ser Cys Val Asn Ala Pro
 1055 1060 1065
 Ala Glu Thr Val Val Ser Gly Leu Val Ala Asp Ile Asp Glu Leu
 1070 1075 1080
 Ala Gln Lys Cys Ser Thr Glu Gly Leu Lys Ser Thr Lys Leu Lys
 1085 1090 1095
 Val Pro Tyr Ala Phe His Ser Ser Gln Val Asp Pro Ile Leu Glu
 1100 1105 1110
 Ala Phe Glu Asp Ile Ala Gln Gly Val Thr Phe His Lys Pro Thr
 1115 1120 1125
 Thr Pro Phe Val Ser Ala Leu Phe Gly Glu Val Ile Thr Asp Ala
 1130 1135 1140
 Asn Trp Glu Cys Leu Gly Pro Lys Tyr Leu Arg Asp His Cys Arg
 1145 1150 1155
 Lys Thr Val Asn Phe Leu Gly Gly Val Glu Ala Thr Arg His Ala
 1160 1165 1170
 Lys Leu Thr Asn Asp Lys Thr Leu Trp Val Glu Ile Gly Ser His
 1175 1180 1185
 Thr Ile Cys Ser Gly Met Ile Lys Ala Thr Leu Gly Pro Gln Val
 1190 1195 1200
 Thr Thr Val Ala Ser Leu Arg Arg Glu Glu Asp Thr Trp Lys Val
 1205 1210 1215
 Leu Ser Asn Ser Leu Ala Ser Leu His Leu Ala Gly Ile Asp Ile
 1220 1225 1230
 Asn Trp Lys Gln Tyr His Gln Asp Phe Ser Ser Ser Leu Gln Val
 1235 1240 1245
 Leu Arg Leu Pro Ala Tyr Lys Trp Asp Leu Lys Asn Tyr Trp Ile
 1250 1255 1260
 Pro Tyr Thr Asn Asn Phe Cys Leu Ser Lys Gly Ala Pro Val Ala
 1265 1270 1275

[0021]

Thr Val Ala Ala Gly Pro Gln His Glu Tyr Leu Thr Thr Ala Ala
 1280 1285 1290
 Gln Lys Val Ile Glu Thr Arg Ser Asp Gly Ala Thr Ala Thr Val
 1295 1300 1305
 Val Ile Glu Asn Asp Ile Ala Asp Pro Glu Leu Asn Arg Val Ile
 1310 1315 1320
 Gln Gly His Lys Val Asn Gly Thr Ala Leu Cys Pro Ser Ser Leu
 1325 1330 1335
 Tyr Ala Asp Ile Ser Gln Thr Leu Ala Glu Tyr Leu Ile Lys Lys
 1340 1345 1350
 Tyr Lys Pro Glu Tyr Asp Gly Leu Gly Leu Asp Val Cys Glu Val
 1355 1360 1365
 Thr Val Pro Arg Pro Leu Ile Ala Lys Gly Gly Gln Gln Leu Phe
 1370 1375 1380
 Arg Val Ser Ala Thr Ala Asp Trp Ala Glu Lys Lys Thr Thr Leu
 1385 1390 1395
 Gln Ile Tyr Ser Val Thr Ala Glu Gly Lys Lys Thr Ala Asp His
 1400 1405 1410
 Ala Thr Cys Thr Val Arg Phe Phe Asp Cys Ala Ala Ala Glu Ala
 1415 1420 1425
 Glu Trp Lys Arg Val Ser Tyr Leu Val Lys Arg Ser Ile Asp Arg
 1430 1435 1440
 Leu His Asp Ile Ala Glu Asn Gly Asp Ala His Arg Leu Gly Arg
 1445 1450 1455
 Gly Met Val Tyr Lys Leu Phe Ala Ala Leu Val Asp Tyr Asp Asp
 1460 1465 1470
 Asn Phe Lys Ser Ile Arg Glu Val Ile Leu Asp Ser Glu Gln His
 1475 1480 1485
 Glu Ala Thr Ala Arg Val Lys Phe Gln Ala Pro Gln Gly Asn Phe
 1490 1495 1500
 His Arg Asn Pro Phe Trp Ile Asp Ser Phe Gly His Leu Ser Gly
 1505 1510 1515
 Phe Ile Met Asn Ala Ser Asp Ala Thr Asp Ser Lys Asn Gln Val
 1520 1525 1530
 Phe Val Asn His Gly Trp Asp Ser Met Arg Cys Leu Lys Lys Phe
 1535 1540 1545
 Ser Pro Asp Val Thr Tyr Arg Thr Tyr Val Arg Met Gln Pro Trp
 1550 1555 1560
 Lys Asp Ser Ile Trp Ala Gly Asp Val Tyr Val Phe Asp Gly Asp
 1565 1570 1575
 Asp Ile Val Ala Val Tyr Gly Ala Val Lys Phe Gln Ala Leu Ser
 1580 1585 1590
 Arg Lys Ile Leu Asp Thr Val Leu Pro Pro Ser Arg Ala Ser Ala
 1595 1600 1605
 Pro Ala Pro Ala Lys Pro Ala Ala Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu
 1610 1615 1620
 Val Lys Arg Ala Leu Thr Ile Leu Ala Glu Glu Val Gly Leu Ser
 1625 1630 1635
 Glu Ser Glu Ile Thr Asp Asp Leu Val Phe Ala Asp Tyr Gly Val

[0022]

1640	1645	1650
Asp Ser Leu Leu Ser Leu	Thr Val Thr Gly Arg Tyr	Arg Glu Glu
1655	1660	1665
Leu Asp Ile Asp Leu Glu	Ser Ser Ile Phe Ile	Asp Gln Pro Thr
1670	1675	1680
Val Lys Asp Phe Lys Gln	Phe Leu Ala Pro Met	Ser Gln Gly Glu
1685	1690	1695
Ala Ser Asp Gly Ser Thr	Ser Asp Pro Glu Ser	Ser Ser Ser Phe
1700	1705	1710
Asn Gly Gly Ser Ser Thr	Asp Glu Ser Ser Ala	Gly Ser Pro Val
1715	1720	1725
Ser Ser Pro Pro Asn Glu	Lys Val Thr Gln Val	Glu Gln His Ala
1730	1735	1740
Thr Ile Lys Glu Ile Arg	Ala Ile Leu Ala Asp	Glu Ile Gly Val
1745	1750	1755
Thr Glu Glu Glu Leu Lys	Asp Asp Glu Asn Leu	Gly Glu Met Gly
1760	1765	1770
Met Asp Ser Leu Leu Ser	Leu Thr Val Leu Gly	Arg Ile Arg Glu
1775	1780	1785
Thr Leu Asp Leu Asp Leu	Pro Gly Glu Phe Phe	Ile Glu Asn Gln
1790	1795	1800
Thr Leu Asn Asp Val Glu	Asp Ala Leu Gly Leu	Lys Pro Lys Ala
1805	1810	1815
Ala Pro Ala Pro Ala Pro	Ala Pro Ala Pro Val	Pro Ala Pro Val
1820	1825	1830
Ser Ala Pro Ile Leu Lys	Glu Pro Val Pro Asn	Ala Asn Ser Thr
1835	1840	1845
Ile Met Ala Arg Ala Ser	Pro His Pro Arg Ser	Thr Ser Ile Leu
1850	1855	1860
Leu Gln Gly Asn Pro Lys	Thr Ala Thr Lys Thr	Leu Phe Leu Phe
1865	1870	1875
Pro Asp Gly Ser Gly Ser	Ala Thr Ser Tyr Ala	Thr Ile Pro Gly
1880	1885	1890
Val Ser Pro Asp Val Cys	Val Tyr Gly Leu Asn	Cys Pro Tyr Met
1895	1900	1905
Lys Thr Pro Glu Lys Leu	Lys Tyr Pro Leu Ala	Glu Met Thr Phe
1910	1915	1920
Pro Tyr Leu Ala Glu Ile	Arg Arg Arg Gln Pro	Lys Gly Pro Tyr
1925	1930	1935
Asn Phe Gly Gly Trp Ser	Ala Gly Gly Ile Cys	Ala Tyr Asp Ala
1940	1945	1950
Ala Arg Tyr Leu Ile Leu	Glu Glu Gly Glu Gln	Val Asp Arg Leu
1955	1960	1965
Leu Leu Leu Asp Ser Pro	Phe Pro Ile Gly Leu	Glu Lys Leu Pro
1970	1975	1980
Thr Arg Leu Tyr Gly Phe	Ile Asn Ser Met Gly	Leu Phe Gly Glu
1985	1990	1995
Gly Asn Lys Ala Pro Pro	Ala Trp Leu Leu Pro	His Phe Leu Ala
2000	2005	2010

[0023]

Phe Ile Asp Ser Leu Asp Thr Tyr Lys Ala Val Pro Leu Pro Phe
 2015 2020 2025
 Asp Asp Pro Lys Trp Ala Lys Lys Met Pro Lys Thr Phe Met Val
 2030 2035 2040
 Trp Ala Lys Asp Gly Ile Cys Ser Lys Pro Asp Asp Pro Trp Pro
 2045 2050 2055
 Glu Pro Asp Pro Asp Gly Lys Pro Asp Thr Arg Glu Met Val Trp
 2060 2065 2070
 Leu Leu Lys Asn Arg Thr Asp Met Gly Pro Asn Lys Trp Asp Thr
 2075 2080 2085
 Leu Val Gly Pro Gln Asn Val Gly Gly Ile Thr Val Ile Glu Gly
 2090 2095 2100
 Ala Asn His Phe Thr Met Thr Leu Gly Pro Lys Ala Lys Glu Leu
 2105 2110 2115
 Gly Ser Phe Ile Gly Asn Ala Met Ala Asn
 2120 2125

<210> 27
 <211> 502
 <212> DNA
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 27
 tcagcgcggt aagctctaata ggcgttactg tcagegcacc acctacggta ettgatgaat 60
 tcgtcgagac etgcatttcc aagaattaca agccagtgaa ggccectatt caiggeccgt 120
 accatgcgcc acatcigtat gatgataagg atategaccg catcctgcag cagtcctctg 180
 ctctagaagg actgaccggc tgttcaccgg ttatteccat catctccagt aacactggaa 240
 agccgatcaa ggccaagtcc atcaaagatc tcttcaaggt cgcactggag gagatactcc 300
 tacgacgact atgctgggac aaggtcacgg agtcctgcac atcagctctgc aagaccggca 360
 caaaccactc ttgcaaattg ttccgatct cgagtagcgc cactcaaagt ttgttcacag 420
 tectcaagaa ggccggtgtg agcatcagct tggagactgg gstagtagag atcgcgacga 480
 acccagaaat gcggaacctt ac 502

<210> 28
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 28
 Ser Ala Val Ser Ser Asn Gly Val Thr Val Ser Ala Pro Pro Thr Val
 1 5 10 15
 Leu Asp Glu Phe Val Glu Thr Cys Ile Ser Lys Asn Tyr Lys Pro Val
 20 25 30
 Lys Ala Pro Ile His Gly Pro Tyr His Ala Pro His Leu Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Lys Asp Ile Asp Arg Ile Leu Gln Gln Ser Ser Ala Leu Glu Gly Leu
 50 55 60
 Thr Gly Cys Ser Pro Val Ile Pro Ile Ile Ser Ser Asn Thr Gly Lys
 65 70 75 80

[0024]

Pro Ile Lys Ala Lys Ser Ile Lys Asp Leu Phe Lys Val Ala Leu Glu
 85 90 95
 Glu Ile Leu Leu Arg Arg Leu Cys Trp Asp Lys Val Thr Glu Ser Cys
 100 105 110
 Thr Ser Val Cys Lys Thr Gly Thr Asn His Ser Cys Lys Leu Phe Pro
 115 120 125
 Ile Ser Ser Ser Ala Thr Gln Ser Leu Phe Thr Val Leu Lys Lys Ala
 130 135 140
 Gly Val Ser Ile Ser Leu Glu Thr Gly Val Gly Glu Ile Ala Thr Asn
 145 150 155 160
 Pro Glu Met Arg Asn Leu
 165

<210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 29
 ggggccatgg tcagcgcggt aagctctaat 30

<210> 30
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 30
 gggggcggcc gcgtaagggt ccgcatttct gg 32

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 31
 tcgtgaatca gtcctagcc 20

<210> 32
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 32
 aaacaacca attgtagat gc 22

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 33
 atctgtacgg caacattgtc a 21

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 黑曲霉(Aspergillus niger)

<400> 34
 ttctgcatac ggtcggagat 20

[0025]

<210> 35	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	
<400> 35	
ttaattaatc ggtaaatcgc cgttgtcaga	30
<210> 36	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	
<400> 36	
aatttccaaa cagggtaact ccac	24
<210> 37	
<211> 2564	
<212> DNA	
<213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 37	
ggacagccgg acgcaatggt gaataacgca getcttctcg ccgcaactgc ggctctcctg	60
cccacggccc tggcgcagaa caatcaaaac tacgccaact acctctgctea gggccagcct	120
gatctctace ccgagacaci tgccacgctc acactctegt tcccgcactg cgaacatggc	180
ccctcaaga acaatctcgt ctgtgactca tggcgggct atgtagagcg agcccaggcc	240
ctcatctcgc tcttcaccct cgaggagctc attctcaaca cgcataaact gggccccggc	300
gtgcctcgcc tgggtcttcc gaactaccaa gtcggaatg aggcctcgca cggcctggac	360
cgcgccaacl tggccaccaa gggcggccag ttcgaaatgg cgaactcgct ccccatgccc	420
atccfcaacta cggcggccct caaccgcaca ttgatccacc agattgccga cactatctcg	480
acccaagctc gagcattcag caacagcgcg cgttacggtc tcgacgctca tgcgccaaac	540
gtcaatggct tccgaagccc cctctggggc cgtggccagg agacgcccg cgaagacgcc	600
ttttctctca gctccgctca tacctacgag facatcacgg gcatccaggg tggcgtcgac	660
cctgagcace tcaaggttgc cggcacggtg aagcacttfg ccggatacga cctcgagaac	720
tggaaacaace agtcccgtct cggttctgac gccatcataa ctgacgagga cctctccgaa	780
tactacacte cccagttcct cgtcgggccc cgttatgcaa agtcacgcag cttagatgtc	840
gcatacaact ccgtcaacgg cgtgcccgag tgtgccaaac gcttcttctc gcagacgctt	900
ttgcgcgaga gctggggctt ccccgaatgg ggatacgtct cgtccgattg cgatgccgtc	960
tacaacgctt tcaacctca tgaactagcc agcaaccagt cgtcagccc cgcagctca	1020
ctgcgagccg gcaccgatat cgaactcggg cagaattacc cgtggcaact caacgagtc	1080
tttctggccc gcaagctc ccgcggcgag atcgagcggf ccgtcaccgg tctgtacgcc	1140
aacctcgtcc gtctcgata ctccgacaag aagaaccagt accgctcctt cggttggaag	1200
gatgtctca agactgatgc ctggaacatc tcgtacgagg ctgctgttga gggcatcgtc	1260
ctgctcaaga acgatggcac tctctctctg tccaagaagg tggcagcat tgetctgac	1320
ggaccatggg ccaatgccac aacccaatg caagcaact actatggccc tgcaccatac	1380
ctcatcagcc cctctggaag tgcataagag gccgctatc acgtcaactt tgaactcggc	1440
acagagatcg ccgcaacag caccactggc ttgccaagg ccattctctc cgcacaagaag	1500

[0026]

```

tcggatgcca teatclacct cggiggaatl gacaacacca ttgaacagga gggcgcigac 1560
cgcacggaca ttgcttgccc cgtaatcag ctgzatctca tcaagcagct cagcgaggte 1620
ggcaaacccc ttgtcgtcct gcaaatgggc ggtggtcagg tagactcatt ctgcctcaag 1680
agcaacaaga aggtcaacte cctcgtctgg ggcggatatt ccgcccagtc gggaggcggt 1740
gacctcttcg acattctctc tgcaagcgt gctccctgcc gcgactggt caccactcag 1800
taccggctg agtatgttea ccaattccce cagaatgaca tgaacctccg acccgatgga 1860
aagteaance ctggacagac ttacatctgg tacaccgca naccctctca cgagtttggc 1920
agtgctctct tctacaccac ctcaaggag actctcgcga gccaccccaa gagctcaag 1980
tcaaacctt cctcgtctct ctctgctctt caccctggat acacttacag cgagcagatt 2040
cccgctctca ccttcgagge caacatcaag aactcgggca agacggagtc ccaatatac 2100
gcatgctgt ttgttcgac aagcaacgt ggcccagccc cgtaccgaa caagtggctc 2160
gtcggattcg aecgacttgc cgacatcaag cctggctact ctccaagct cagcctcccc 2220
atccctgta gtctctctc ccgtgtgat tctcaggaa accgattgt ataccctgct 2280
aagtatgagc tagccttgaa caccgaagc tctgtgaagc ttgagttga gttggfggga 2340
gaagaggtaa cgattgagaa ctggcgttg gaggagcaac agatcaagga tgctacacct 2400
gagcataag ggttttaag atgttgttat gacanaagg tagagtagtt aatgatgaa 2460
taggaagagg ccatagtctt ctgtttgcaa accatttttg ccattgcgaa aaaaaaaaaa 2520
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2564

```

- <210> 38
- <211> 797
- <212> PRT
- <213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)
- <400> 38

```

Met Val Asn Asn Ala Ala Leu Leu Ala Ala Leu Ser Ala Leu Leu Pro
1          5          10         15
Thr Ala Leu Ala Gln Asn Asn Gln Thr Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Gln
20         25         30
Gly Gln Pro Asp Leu Tyr Pro Glu Thr Leu Ala Thr Leu Thr Leu Ser
35         40         45
Phe Pro Asp Cys Glu His Gly Pro Leu Lys Asn Asn Leu Val Cys Asp
50         55         60
Ser Ser Ala Gly Tyr Val Glu Arg Ala Gln Ala Leu Ile Ser Leu Phe
65         70         75         80
Thr Leu Glu Glu Leu Ile Leu Asn Thr Gln Asn Ser Gly Pro Gly Val
85         90         95
Pro Arg Leu Gly Leu Pro Asn Tyr Gln Val Trp Asn Glu Ala Leu His
100        105        110
Gly Leu Asp Arg Ala Asn Phe Ala Thr Lys Gly Gly Gln Phe Glu Trp
115        120        125
Ala Thr Ser Phe Pro Met Pro Ile Leu Thr Thr Ala Ala Leu Asn Arg
130        135        140
Thr Leu Ile His Gln Ile Ala Asp Ile Ile Ser Thr Gln Ala Arg Ala

```

[0027]

145	150	155	160
Phe Ser Asn Ser Gly Arg Tyr Gly Leu Asp Val Tyr Ala Pro Asn Val			
	165	170	175
Asn Gly Phe Arg Ser Pro Leu Trp Gly Arg Gly Gln Glu Thr Pro Gly			
	180	185	190
Glu Asp Ala Phe Phe Leu Ser Ser Ala Tyr Thr Tyr Glu Tyr Ile Thr			
	195	200	205
Gly Ile Gln Gly Gly Val Asp Pro Glu His Leu Lys Val Ala Ala Thr			
	210	215	220
Val Lys His Phe Ala Gly Tyr Asp Leu Glu Asn Trp Asn Asn Gln Ser			
	225	230	235
Arg Leu Gly Phe Asp Ala Ile Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ser Glu Tyr			
	245	250	255
Tyr Thr Pro Gln Phe Leu Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Lys Ser Arg Ser			
	260	265	270
Leu Met Cys Ala Tyr Asn Ser Val Asn Gly Val Pro Ser Cys Ala Asn			
	275	280	285
Ser Phe Phe Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Ser Trp Gly Phe Pro Glu			
	290	295	300
Trp Gly Tyr Val Ser Ser Asp Cys Asp Ala Val Tyr Asn Val Phe Asn			
	305	310	315
Pro His Asp Tyr Ala Ser Asn Gln Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Leu			
	325	330	335
Arg Ala Gly Thr Asp Ile Asp Cys Gly Gln Thr Tyr Pro Trp His Leu			
	340	345	350
Asn Glu Ser Phe Val Ala Gly Glu Val Ser Arg Gly Glu Ile Glu Arg			
	355	360	365
Ser Val Thr Arg Leu Tyr Ala Asn Leu Val Arg Leu Gly Tyr Phe Asp			
	370	375	380
Lys Lys Asn Gln Tyr Arg Ser Leu Gly Trp Lys Asp Val Val Lys Thr			
	385	390	395
Asp Ala Trp Asn Ile Ser Tyr Glu Ala Ala Val Glu Gly Ile Val Leu			
	405	410	415
Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Pro Leu Ser Lys Lys Val Arg Ser Ile			
	420	425	430
Ala Leu Ile Gly Pro Trp Ala Asn Ala Thr Thr Gln Met Gln Gly Asn			
	435	440	445
Tyr Tyr Gly Pro Ala Pro Tyr Leu Ile Ser Pro Leu Glu Ala Ala Lys			
	450	455	460
Lys Ala Gly Tyr His Val Asn Phe Glu Leu Gly Thr Glu Ile Ala Gly			
	465	470	475
Asn Ser Thr Thr Gly Phe Ala Lys Ala Ile Ala Ala Ala Lys Lys Ser			
	485	490	495
Asp Ala Ile Ile Tyr Leu Gly Gly Ile Asp Asn Thr Ile Glu Gln Glu			
	500	505	510
Gly Ala Asp Arg Thr Asp Ile Ala Trp Pro Gly Asn Gln Leu Asp Leu			
	515	520	525
Ile Lys Gln Leu Ser Glu Val Gly Lys Pro Leu Val Val Leu Gln Met			
	530	535	540

[0028]

Gly Gly Gly Gln Val Asp Ser Ser Ser Leu Lys Ser Asn Lys Lys Val
545 550 555 560

Asn Ser Leu Val Trp Gly Gly Tyr Pro Gly Gln Ser Gly Gly Val Ala
565 570 575

Leu Phe Asp Ile Leu Ser Gly Lys Arg Ala Pro Ala Gly Arg Leu Val
580 585 590

Thr Thr Gln Tyr Pro Ala Glu Tyr Val His Gln Phe Pro Gln Asn Asp
595 600 605

Met Asn Leu Arg Pro Asp Gly Lys Ser Asn Pro Gly Gln Thr Tyr Ile
610 615 620

Trp Tyr Thr Gly Lys Pro Val Tyr Glu Phe Gly Ser Gly Leu Phe Tyr
625 630 635 640

Thr Thr Phe Lys Glu Thr Leu Ala Ser His Pro Lys Ser Leu Lys Phe
645 650 655

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Ser Ala Pro His Pro Gly Tyr Thr Tyr Ser
660 665 670

Glu Gln Ile Pro Val Phe Thr Phe Glu Ala Asn Ile Lys Asn Ser Gly
675 680 685

Lys Thr Glu Ser Pro Tyr Thr Ala Met Leu Phe Val Arg Thr Ser Asn
690 695 700

Ala Gly Pro Ala Pro Tyr Pro Asn Lys Trp Leu Val Gly Phe Asp Arg
705 710 715 720

Leu Ala Asp Ile Lys Pro Gly His Ser Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ile
725 730 735

Pro Val Ser Ala Leu Ala Arg Val Asp Ser His Gly Asn Arg Ile Val
740 745 750

Tyr Pro Gly Lys Tyr Glu Leu Ala Leu Asn Thr Asp Glu Ser Val Lys
755 760 765

Leu Glu Phe Glu Leu Val Gly Glu Glu Val Thr Ile Glu Asn Trp Pro
770 775 780

Leu Glu Glu Gln Gln Ile Lys Asp Ala Thr Pro Asp Ala
785 790 795

<210> 39
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<400> 39
 acgagtttgg cagtggtctc ttctacacca cttcaagga gactctcgcc agccacccca 60
 agagcctcaa gttcaacacc tcategatcc tctctgctcc tcaccccgga tacactiaca 120
 gcgagcagal tcccgtcttc acelttcgagg ccaacatcaa gaactcgggc aagacggagt 180
 ccccatatac ggccatgctg ttgttgcga caagcaacgc tgcccagcc cegtaccgga 240
 acaagtggct cgtcggatcc gaccgactg cggacatcaa gcttggtcac tcttcaagc 300
 tcageatccc catcccgtgc agtgcctcgc cccgtgttga ttctcaagga aaccggattg 360
 tataccccgg caagtatgag ctagccttga acaccgacga gtctgtgaag ctfgagtttg 420
 agttggtggg agaagaggta acgattgaga actggccgtt ggaggagcaa cagatcaagg 480
 atgtacacc tgaccgataa 500

[0029]

<210> 40
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)
 <400> 40
 Tyr Glu Phe Gly Ser Gly Leu Phe Tyr Thr Thr Phe Lys Glu Thr Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser His Pro Lys Ser Leu Lys Phe Asn Thr Ser Ser Ile Leu Ser
 20 25 30
 Ala Pro His Pro Gly Tyr Thr Tyr Ser Glu Gln Ile Pro Val Phe Thr
 35 40 45
 Phe Glu Ala Asn Ile Lys Asn Ser Gly Lys Thr Glu Ser Pro Tyr Thr
 50 55 60
 Ala Met Leu Phe Val Arg Thr Ser Asn Ala Gly Pro Ala Pro Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asn Lys Trp Leu Val Gly Phe Asp Arg Leu Ala Asp Ile Lys Pro Gly
 85 90 95
 His Ser Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ile Pro Val Ser Ala Leu Ala Arg
 100 105 110
 Val Asp Ser His Gly Asn Arg Ile Val Tyr Pro Gly Lys Tyr Glu Leu
 115 120 125
 Ala Leu Asn Thr Asp Glu Ser Val Lys Leu Glu Phe Glu Leu Val Gly
 130 135 140
 Glu Glu Val Thr Ile Glu Asn Trp Pro Leu Glu Glu Gln Gln Ile Lys
 145 150 155 160
 Asp Ala Thr Pro Asp Ala
 165

<210> 41
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)
 <400> 41
 ccatggtacg agtttggcag tggctc 26

<210> 42
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)
 <400> 42
 accggttat gctcaggtg tagcat 26

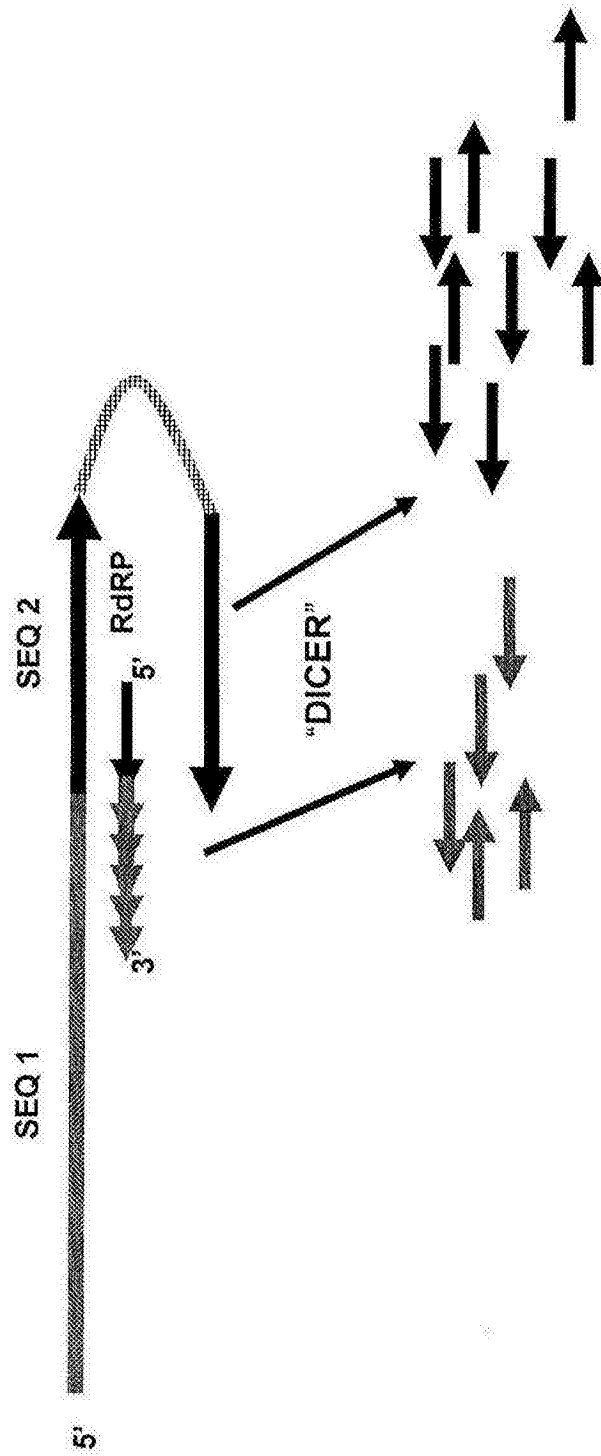


图 1

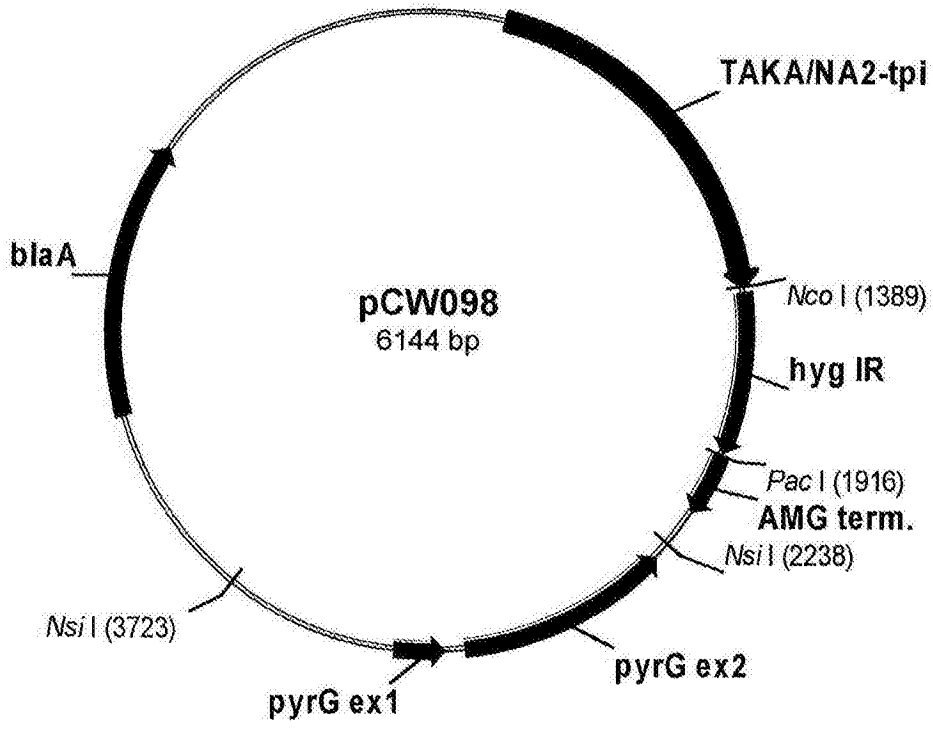


图 2

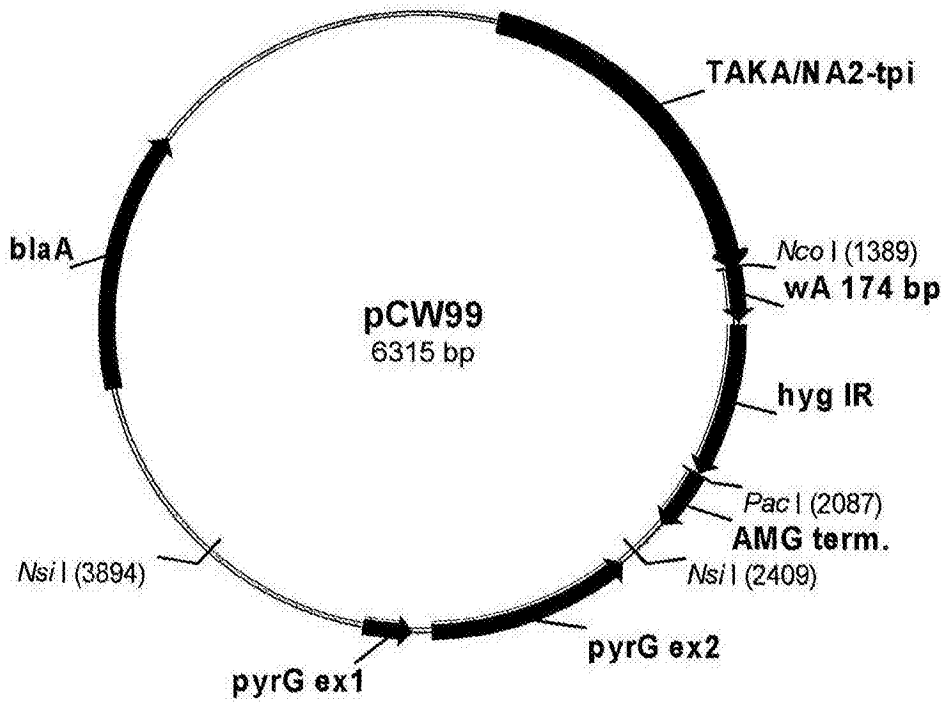


图 3

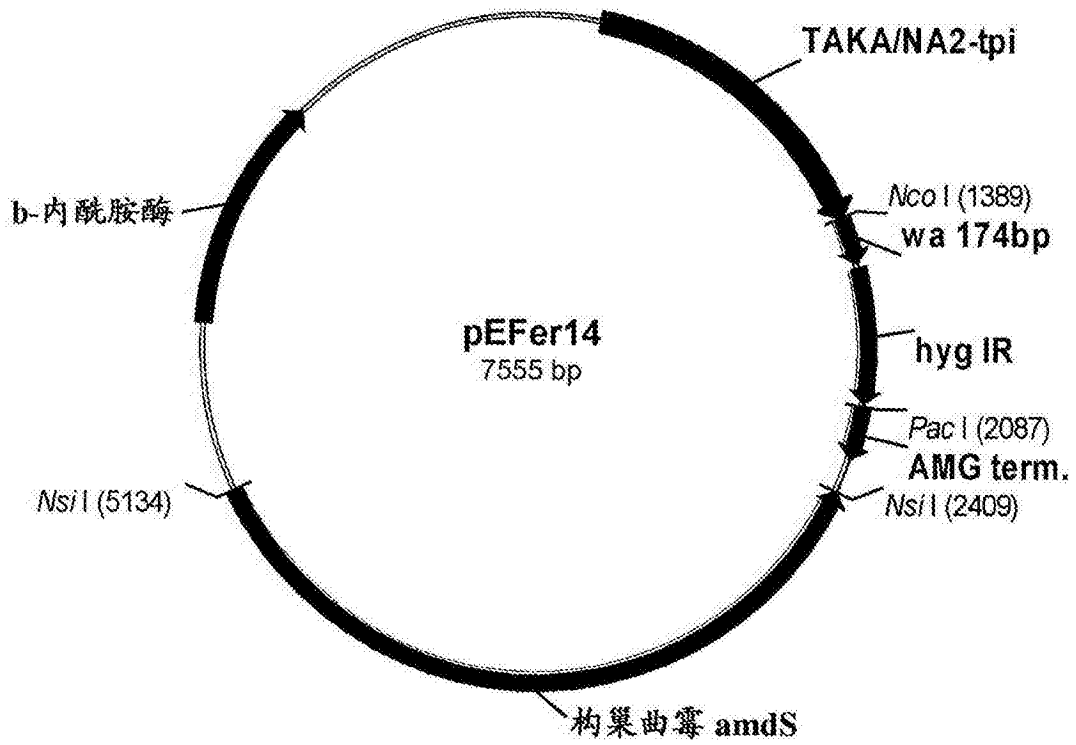


图 4

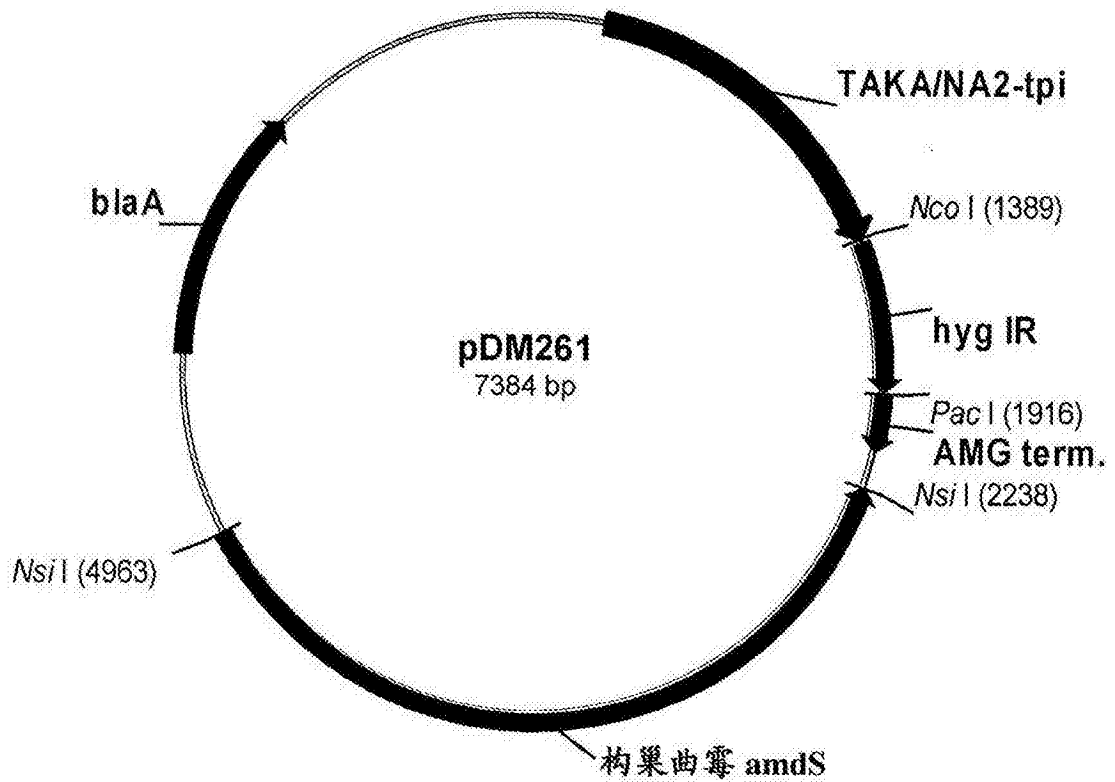


图 5

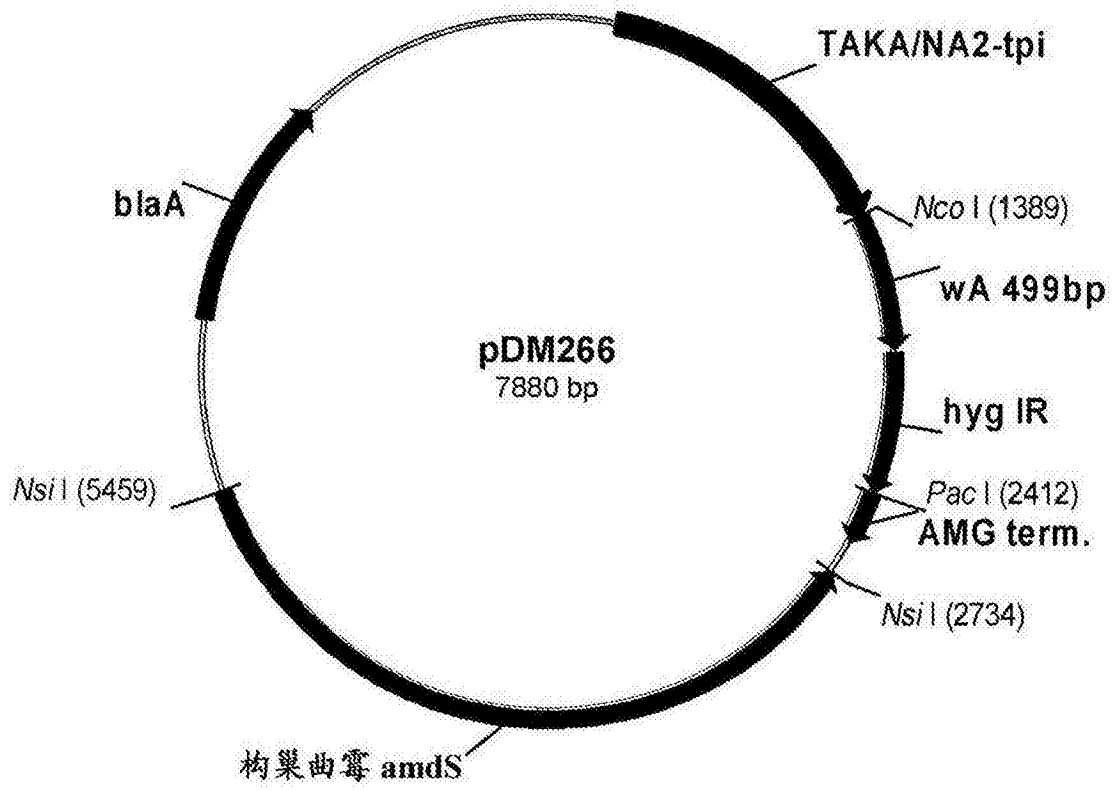


图 6

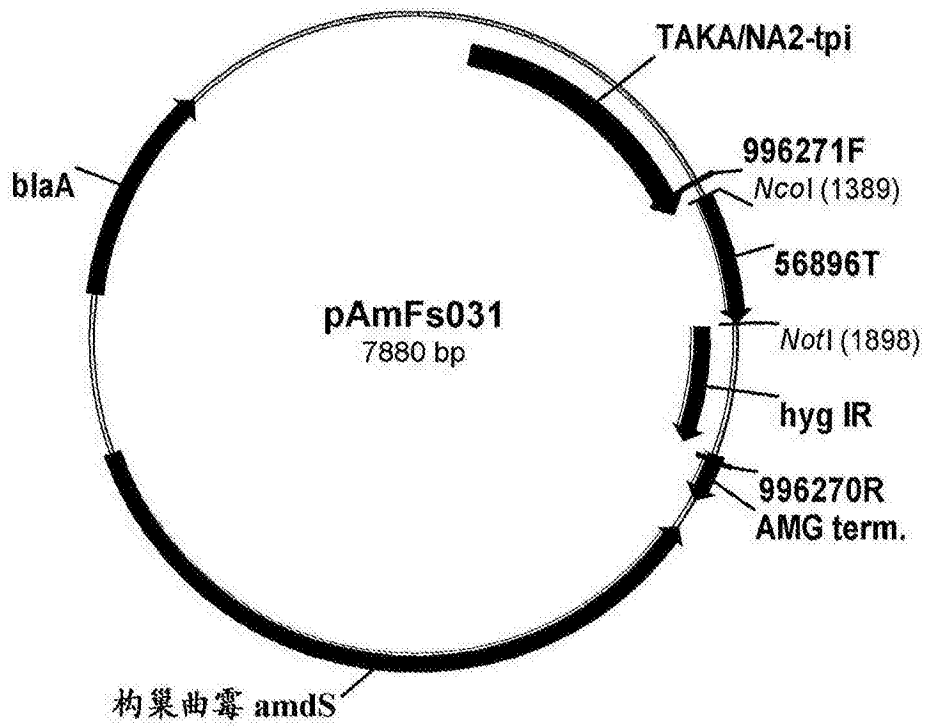


图 7

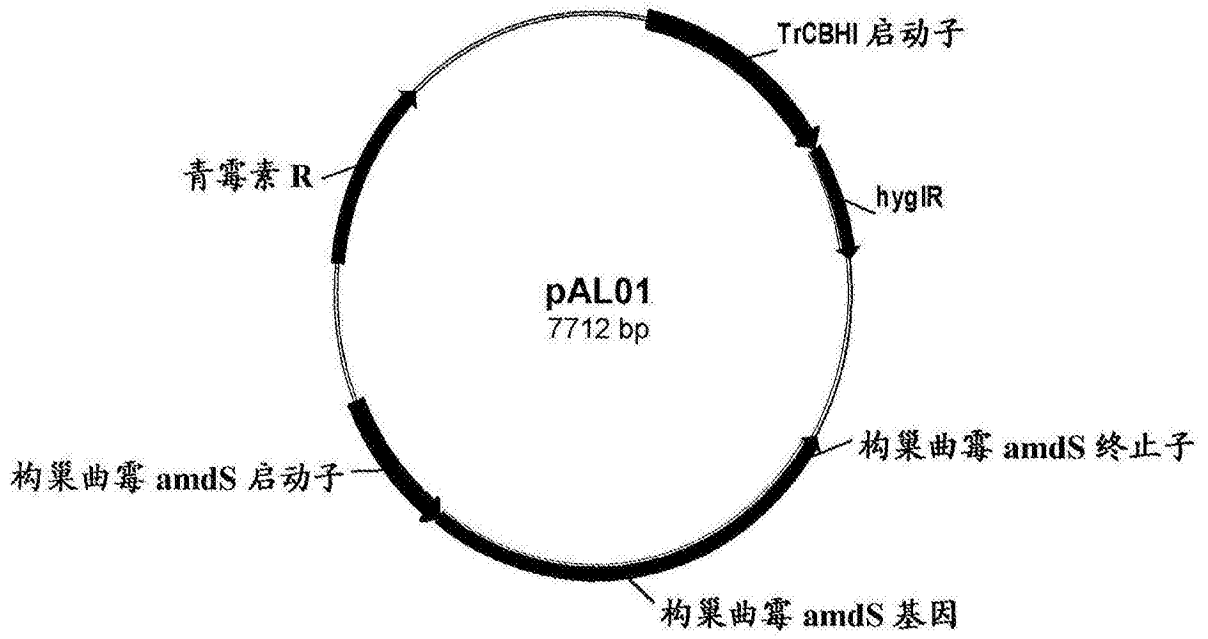


图 8

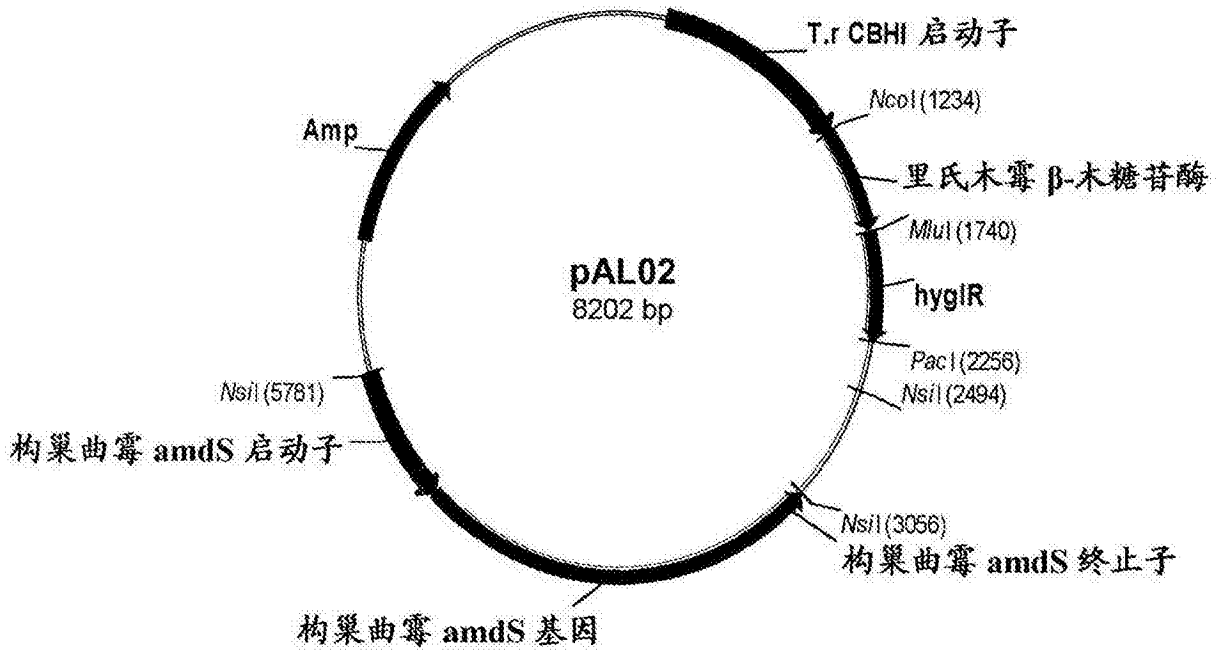


图 9