

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/55

[12] 发 明 专 利 说 明 书

C12N 15/63 C12N 15/65

C12N 15/74 C12N 15/79

[21] ZL 专利号 95121451.9

/(C12N 15/55,C12R1 : 77,
1 : 19)



[43] 授权公告日 2003 年 2 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1100877C

[22] 申请日 1995.12.22 [21] 申请号 95121451.9

[30] 优先权

[32] 1994.12.23 [33] US [31] 363475

[71] 专利权人 布里斯托尔-迈尔斯斯奎布公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 S·J·蒋 小·W·V·本内特

S·M·通齐

[56] 参考文献

EP0302473A 1989.02.08

EP0453047A 1991.10.23

WO86/00929A 1986.02.13

审查员 曾繁辉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

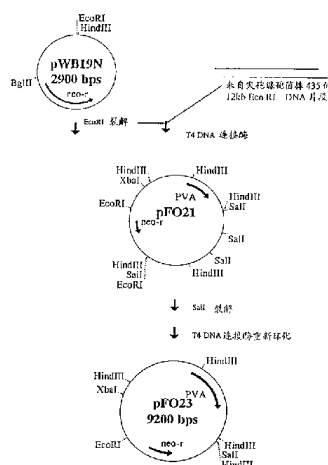
代理人 谭明胜

权利要求书 4 页 说明书 33 页 附图 20 页

[54] 发明名称 尖孢镰孢的青霉素 V 酰胺水解酶基因

[57] 摘要

编码尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)青霉素 V 酰胺水解酶(PVA)的核酸、表达载体、宿主细胞以及生产 PVA 的方法。



1. 分离的核酸分子，其序列编码 SEQ ID No: 19 或 22 的氨基酸序列。
2. 分离的核酸分子，其序列与编码 SEQ ID No: 19 或 22 的氨基酸序列的核酸序列互补。
3. 分离的核酸分子，其序列能与具有同编码 SEQ ID No: 19 或 22 的氨基酸序列的核酸序列互补的序列的核酸杂交。
4. 如权利要求 1 的核酸分子，其为 DNA 分子。
5. 如权利要求 2 的核酸分子，其为 DNA 分子。
6. 如权利要求 3 的核酸分子，其为 DNA 分子。
7. 分离的 DNA 分子，其序列编码 SEQ ID No: 19 的氨基酸序列。
8. 分离的 DNA 分子，其序列能与具有同编码 SEQ ID No: 19 的氨基酸序列的核酸序列互补的序列的核酸杂交。
9. 分离的 DNA 分子，其序列编码 SEQ ID No: 22 的氨基酸序列。
10. 分离的 DNA 分子，其序列能与具有同编码 SEQ ID No: 22 的氨基酸序列的核酸序列互补的序列的核酸杂交。
11. 分离的 DNA 分子，其核苷酸序列为 SEQ ID No: 18。
12. 分离的 DNA 分子，其核苷酸序列为 SEQ ID No: 21。
13. 分离的 DNA 分子，其核苷酸序列为 SEQ ID No: 11。
14. 分离的 DNA 分子，其核苷酸序列为 SEQ ID No: 23。
15. 分离的 DNA 分子，其核苷酸序列为 SEQ ID No: 14、15、16 或 17。
16. 分离的 DNA 分子，其核苷酸序列为 SEQ ID No: 9 或 10。
17. 分离的 DNA 分子，其核苷酸序列为 SEQ ID No: 26 或 30。

18. 分离的多肽, 其氨基酸序列为 SEQ ID No: 1、2、3、4、5、6、8 或 12。
19. 如权利要求 18 的多肽, 其氨基酸序列为 SEQ ID No: 1 或 12。
20. 表达载体, 它含有编码 SEQ ID No: 19 或 22 的部分氨基酸序列的核酸序列。
21. 如权利要求 20 的表达载体, 它含有编码 SEQ ID No: 19 的氨基酸序列的 DNA 序列。
22. 如权利要求 20 的表达载体, 它含有编码 SEQ ID No: 22 的氨基酸序列的 DNA 序列。
23. 如权利要求 20 的表达载体, 进一步包括复制起点、启动子和转录终止序列。
24. 如权利要求 23 的表达载体, 进一步包括选择性标记序列。
25. 如权利要求 24 的表达载体, 其中选择性标记是腐草霉素抗性。
26. 如权利要求 23 的表达载体, 它可整合到真菌染色体上。
27. 如权利要求 20 的表达载体, 其 DNA 序列为 SEQ ID No: 18 或 21。
28. 如权利要求 20 的表达载体, 其为质粒。
29. 表达载体, 它含有的启动子具有如 SEQ ID No: 23 的 DNA 序列。
30. 如权利要求 29 的表达载体, 进一步包括复制起点、编码结构蛋白质的 DNA 以及转录终止序列。
31. 如权利要求 30 的表达载体, 其中编码结构蛋白质的 DNA 编码 PVA。
32. 如权利要求 30 的表达载体, 进一步包括选择性标记序列。
33. 如权利要求 32 的表达载体, 其中选择性标记是腐草霉素抗性。

34. 如权利要求 30 的表达载体, 它可以整合到真菌染色体上。
35. 如图 10 所示的名称为 pBMFXPVA6 的表达载体。
36. 如图 11 所示的名称为 pBMFXPVA7 的表达载体。
37. 如图 14 所示的名称为 pBMPVA - P 的表达载体。
38. 如图 16 所示的名称为 pBMPVA - M 的表达载体。
39. 含有如权利要求 20 的表达载体的宿主细胞。
40. 含有如权利要求 23 的表达载体的宿主细胞。
41. 含有如权利要求 25 的表达载体的宿主细胞。
42. 含有如权利要求 26 的表达载体的宿主细胞。
43. 含有如权利要求 27 的表达载体的宿主细胞。
44. 含有如权利要求 28 的表达载体的宿主细胞。
45. 含有如权利要求 29 的表达载体的宿主细胞。
46. 含有如权利要求 30 的表达载体的宿主细胞。
47. 含有如权利要求 31 的表达载体的宿主细胞。
48. 含有如权利要求 32 的表达载体的宿主细胞。
49. 含有如权利要求 33 的表达载体的宿主细胞。
50. 含有如权利要求 34 的表达载体的宿主细胞。
51. 含有如权利要求 35 的表达载体的宿主细胞。
52. 含有如权利要求 36 的表达载体的宿主细胞。
53. 含有如权利要求 37 的表达载体的宿主细胞。
54. 含有如权利要求 38 的表达载体的宿主细胞。
55. 如权利要求 39 的宿主细胞, 它是真核生物。
56. 如权利要求 45 的宿主细胞, 它是真核生物。
57. 如权利要求 39 的宿主细胞, 它是镰孢属的种。
58. 如权利要求 45 的宿主细胞, 它是镰孢属的种。
59. 如权利要求 39 的宿主细胞, 它是尖孢镰孢。
60. 如权利要求 45 的宿主细胞, 它是尖孢镰孢。

61. 如权利要求 51 的宿主细胞, 它是尖孢镰孢。
62. 如权利要求 52 的宿主细胞, 它是尖孢镰孢。
63. 如权利要求 53 的宿主细胞, 它是尖孢镰孢。
64. 如权利要求 54 的宿主细胞, 它是尖孢镰孢。
65. 大肠杆菌 ATCC69720 的生物学纯培养物。
66. 大肠杆菌 ATCC69721 的生物学纯培养物。
67. 大肠杆菌 ATCC69722 的生物学纯培养物。
68. 生产含有 SEQ ID No: 19 或 22 的氨基酸序列的多肽的方法, 它包括在导致多肽表达的条件下培养如权利要求 39 的宿主细胞。
69. 如权利要求 68 的方法, 其中表达是通过在苯氧乙酸盐存在下培养而诱导的。
70. 生产多肽的方法, 它包括在导致多肽表达的条件下培养如权利要求 45 的宿主细胞。
71. 如权利要求 70 的方法, 其中表达是通过在苯氧乙酸盐存在下培养而诱导的。

尖孢镰孢的青霉素 V 酰胺水解酶基因

青霉素 V 酰胺水解酶可用于将青霉素 V(苯氧基 - 甲基青霉素)酶促水解成 6 - 氨基青霉烷酸(6-APA)。6 - APA 是生产半合成青霉素需使用的活性 β - 内酰胺核。已在真菌、链霉菌和细菌中发现了多种青霉素 V 酰胺水解酶(PVA)(Lowe et al., 1986, Biotechnol. Lett. 8:151-156)。Lowe 等人描述了来自尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)菌株的 PVA 酶活性; 但此酶尚未分离纯化。

本发明涉及已分离的核酸分子, 它编码全部或部分的尖孢镰孢菌株 435 的 PVA。该 PVA 基因已被克隆、测序和表达。

本发明另一方面涉及尖孢镰孢菌株 435 的新启动子、含有全部或部分 PVA 基因和/或新启动子的表达载体和含有表达载体的宿主细胞。本发明另一方面还涉及尤其当苯氧乙酸作为诱导物存在时 PVA 的生产。

图 1: 完整 PVA 酶六肽片段的氨基酸序列。N - 末端的氨基酸序列为 SEQ.ID.NO.: 1; 肽 A 氨基酸序列为 SEQ. ID. No.: 2; 肽 B1 的氨基酸序列为 SEQ.ID.NO.: 3; 肽 B2 氨基酸序列是 SEQ.ID. NO.: 4; 肽 C 的氨基酸序列为 SEQ.ID.NO.: 5; 肽 D 的氨基酸序列为 SEQ.ID. NO.: 6; 肽 E 的氨基酸序列为 SEQ, ID.NO.: 7。

图 2: 寡核苷酸探针。逆转录肽 C 的七个氨基酸(SEQ.ID.NO.: 5), 可得到一套四个寡核苷酸的探针。这七个氨基酸的序列为 SEQ, ID. NO.: 8; 由 SEQ.ID.: 8 逆转录的 DNA 序列为 SEQ.ID. NO.: 9; 与 SEQ.ID.NO.: 9 互补的 DNA 序列是 SEQ.ID.NO.: 10; 寡核苷酸探针是

SEQ.ID.NO.:11。

图 3：多种 DNA 和肽片段。PVA N - 末端氨基酸序列为 SEQ.ID.NO.:12；2585 翻译氨基酸序列为 SEQ.ID.NO.:13，2585 DNA 序列为 SEQ.ID.NO.:14；2585 - M DNA 序列为 SEQ.ID.NO.:15；2585 - FL 翻译氨基酸序列与 SEQ.ID.NO.:12 相同；编码链的 2585 - FL DNA 序列为 SEQ.ID.NO.:16；模板链(即与编码链互补)的 2585 - FL DNA 序列为 SEQ.ID.NO.:17。所有核苷酸序列(除 SEQ.ID.NO.:17 外)都以从左至右的 5'至 3'方向表示。

图 4：2585 - FL 的图示说明。

图 5：基因组 PVA 基因克隆的图示说明。

图 6：PVA cDNA (SEQ.ID.NO.:18)以及相应的氨基酸序列 (SEQ.ID.NO.:19)。划线的 DNA 序列(碱基对 1348 后 1368 的 SEQ.ID.NO.:20)与 20 mer 探针(SEQ.ID.NO.:11)互补。星号表示终止密码子。

图 7：PVA 基因组 DNA(SEQ.ID.NO.:21)以及相应的氨基酸序列(SEQ.ID.NO.:22)。启动子为碱基对编号 1 至 240(SEQ.ID.NO.:23)。第一个星号表示转录起始密码子。第二个星号表示终止密码子。

图 8：PWB 19N 构建的图示。

图 9：PSJC62 构建的图示。

图 10：PBMFXPVA6 构建的图示。

图 11：PBMFXPVA7 构建的图示。

图 12：PFO20 构建成的图示。

图 13：PFO20 - P 构建成的图示。

图 14：PBMPVA - P 构建的图示。

图 15：PFO20 - M 构建的图示。

图 16：PBMPVA - M 构建的图示。

图 17: PBMPVA - P/DAA04 构建的图示。

图 18: PBMPVA - M/DDA04 构建的图示。

本发明涉及分离的核酸分子。它包含编码全部或部分失孢镰孢 PVA 的核酸序列。优选地, 此核酸分子是 DNA 分子, 此核酸序列是 DNA 序列。本文中所有 DNA 序列都是由其从左至右的定向为常规的 5' 至 3' 方向的式子表示(唯一的例外是图 3 的 SEQ.ID.NO.: 17)。进一步优选的 DNA 序列具有基本上由图 6 和 7 的所有或部分核苷酸序列(特别是 SEQ.ID.NO.: 18 和 SEQ.ID.NO.: 21; 或者与这些 DNA 序列其中之一互补的 DNA 序列; 或者与这些 DNA 序列其中之一的互补 DNA 序列杂交的 DNA 序列。“严格条件”是指不亚于本文“优选实施方案的详细实施例”部分所述的严格条件。就编码部分 PVA 的核苷酸序列(例如 DNA 序列)而言, 优选此核苷酸序列的长度至少约为 20 个核苷酸。

优选的 DNA 片段是 SEQ.ID.NO.: 11 的探针和 SEQ.ID.NO.: 23 的启动子。

本发明的 PVA 分子不必具有催化活性, 例如, 无催化活性的 PVA 或其片段可用于产生此蛋白质的抗体。

我们也期望本发明包括经修饰的序列, 本申请中所用的术语“经修饰的”, 当指的是核苷酸或多肽序列时, 意思是与在自然界中发现的野生型序列不同的核苷酸或多肽序列。

使用本技术领域一般熟知的各种方法即可得到本发明的 DNA 序列, 至少可使用三种可选择的主要方法:

(1) 从含有此序列的基因组 DNA 或互补 DNA(cDNA) 中分离双链 DNA 序列;

(2) 化学合成此 DNA 序列; 和

(3)通过聚合酶链反应(PCR)合成此 DNA 序列。

在第一种方法中,需筛选出基因组或 cDNA 文库以鉴定编码全部或部分 PVA 的 DNA 的序列。例如,可筛选出尖孢镰孢的基因组 DNA 文库以鉴定编码全部或部分 PVA 的 DNA 的序列。可使用多种技术筛选基因组 DNA 或 cDNA 文库。

例如,在对已变性为单链形式的基因组 DNA 或 cDNA 的克隆拷贝进行的 DNA/DNA 杂交步骤中可使用经标记的单链 DNA 探针序列,此序列可复制出编码全部或部分 PVA 的靶基因组 DNA 或 cDNA 中所存在的序列。

使用免疫印迹技术也可筛选出编码全部或部分 PVA 的基因组 DNA 或 cDNA 的基因组 DNA 或 cDNA 文库。

在适于免疫印迹或杂交技术的一种典型筛选方法中,首先在琼脂平板上涂布通常包含于载体中的基因组 DNA 文库或 cDNA 文库,然后将克隆转移到如硝酸纤维膜的滤膜上,再与 DNA 探针杂交或将克隆与抗体结合以鉴定出含有编码全部或部分 PVA 的基因组 DNA 或 cDNA 的那些克隆。

在第二种方法中,本发明编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列可以化学合成,例如,编码 PVA 的 DNA 序列可被合成为一系列含 100 个碱基的寡核苷酸,它们可被顺序连接(通过适当的末端限制性位点或互补的末端序列)以形成正确的线形核苷酸序列。

在第三种方法中,可使用 PCR 合成本发明编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列。简单地说,可将与靶 DNA 序列的相反链杂交的长度至少为 15 个碱基的成对合成 DNA 寡核苷酸(PCR 引物)用于酸促扩增靶序列 DNA 的间插区域。将模板热变性,使引物退火并用 DNA 聚合酶使退火引物的 3'-末端延伸,重复上述循环可导致由 PRC 引物 5'-末端限定的片段的扩增,例见 White et al., Trends Genet. 5, 185-189(1989)。

本发明的 DNA 序列可以根据本发明的多种方式被使用。此 DNA 序列最明显的用途是制备 PVA 以用于将青霉素 V 转变成 6 - APA。然而它们也可用作 DNA 探针以筛选出其它 cDNA 和基因组 DNA 文库, 从而通过杂交筛选出编码 PVA 相关蛋白质的其它 DNA 序列。另外, 本发明编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列也可用作 DNA 探针以筛选出其它 cDNA 和基因组 DNA 文库, 从而通过杂交筛选出编码除尖孢镰孢外的生物体 PVA 分子的 DNA 序列。

本发明编码全部和部分 PVA 的 DNA 序列也可经修饰(即突变)以制备多种突变。这种突变可以是简并的, 即突变改变了由突变密码子编码的氨基酸序列, 也可以是非简并的, 即突变不改变由突变密码子编码的氨基酸序列。例如, 可使用多种本技术领域的已知方法, 通过突变 PVA DNA 序列可导致所编码多肽中一个或多个氨基酸的缺失、取代、插入、倒位或添加, 从而制备经修饰的 DNA 序列。例如, 可使用 Morinaga、Taylor 和 kunkel 等(Morinaga et al., Bio / Technol. 2,636-639(1984), Taylor et al., Nucl. Acids Res. 13,8749-8764(1985) and kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,482-492(1985))所述的定点诱变法。另外, 可从供货商处购买定点诱变的试剂盒, 例如可从 Amersham Corp(Arlington Heights, IL)购买进行定点诱变的试剂盒, 另外也可使用 Sayers 等人(Nucl. Acids Res. 16, 791-802(1988))所述的断裂、缺失和截短法。简并和非简并突变都有助于产生或使用本发明多肽。例如这些突变可使产量更高、纯化较容易, 或者可提供额外的限制性内切酶识别位点。所有这种经修饰的 DNA 和多肽分子都包括在本发明的范围之内。

本发明尤其涉及图 7(SEQ ID NO.: 23)所示的 PVA 的新启动子。本发明的新启动子可与编码其它有用蛋白质或多肽的其它已知 DNA 序列一起使用。

本发明进一步涉及含有编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列和/或 PVA 启动子的表达载体。此表达载体优选含有具有基本上由图 6 或 7 核苷酸序列的 DNA 序列其中之一的全部或部分，进一步优选的此表达载体含有与编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列有效连接的一个或多个调节 DNA 序列。本文所用术语“有效连接”是指调节 DNA 序列可引导复制和/或表达编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列。

本发明使用的表达载体通常为“质粒”形式，它指的是环状双链 DNA 环，其载体形式不与染色体结合。然而，本发明还将包括具有等同功能并在以后的技术中会公知的其它形式的表达载体。

用于本发明的表达载体典型地含有复制起点，位于此 DNA 序列前方(即上游)的启动子(优选为 SEQ ID NO.: 23 的启动子)，其后为编码全部或部分结构蛋白质的 DNA 序列，如 PVA、D-氨基酸氧化酶、单克隆抗体、胰岛素、干扰素、表皮生长因子、生长激素等等。编码全部或部分结构蛋白质的 DNA 序列后紧随的是转录终止序列和其作的载体。此表达载体也可包括现有技术已知的其它 DNA 序列，例如提供表达产物稳定性的稳定性前导序列，提供表达产物分泌的分泌前导序列，允许调制结构基因表达的序列(例如通过培养基中营养物或其它诱导物的存在或缺乏)，能为经转化的宿主细胞提供表型选择的标记序列，为质粒提供有丝分裂稳定性的稳定性因子如着丝粒，为限制性内切酶裂解提供位点的序列。实际使用的表达载体的特征必需与所使用的宿主细胞相容。例如当在真菌细胞系统中克隆时，表达载体应含有分离自真菌细胞基因细胞基因组的启动子[例如构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的 *trpC* 启动子和尖孢镰孢的 PVA 的启动子]。某种表达载体可含有真菌自主复制序列[ARS;例尖孢镰孢和啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 ARS]，它可在真菌宿主体内启动自身复制质粒的产生。优选本发明的真菌表达载体不具有真菌 ARS 序列，

因此可通过质粒进入宿主细胞使之整合到宿主染色体上, 优选这种整合是由于它可加强遗传稳定性。本发明所期望的表达载体至少应能指导在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的复制以及在真菌细胞中的整合, 优选能表达本发明的 PVA DNA 序列。不同大肠杆菌宿主中的适当复制起点包括例如 Col E1 质粒复制起点, 适当的启动子包括例如构巢曲霉的 *trp C* 启动子, 尖孢镰孢的 PVA 启动子以及大肠杆菌的 *neo-r* 基因启动子, 适当的终止序列包括例如构巢曲霉的 *trp C* 终止子, 尖孢镰孢的 PVA 终止子以及大肠杆菌的 *neo-r* 基因终止子。还优选表达载体包括编码选择性标记的序列, 选择性标记优选为抗生素抗性, 可方便地使用腐草霉素抗性(对真菌细胞)、氨苄西林抗性和新霉素抗性(对细菌细胞)作为选择性标记, 所有这些物质都是现有技术中已知的, 并且可商购。

特别优选下文和图 10 所述的被称作 pBMFXPVA6 的表达载体, 它含有编码 PVA 的 DNA 序列, 或者优选与 pBMFXPVA6 特征一致的表达载体。也优选分别在下文和图 8, 9, 11, 14 和 16 中所述的被称作 PWB19N、PSJC62、PBMFXPVA7、PBMPVA-P 和 PBMPVA-M 的表达载体或者与 PWB19N、PSJC62、PBMFXPVA7 PBMPVA-P 和 PBMPVA-M 特征一致的表达载体。

根据布达佩斯条约, 已于 1994 年 12 月 14 日将含有 PBMFXPVA7、PBMPVA-P 和 PBMPVA-M 的宿主细胞大肠杆菌 DH 5 α 菌株保藏于美国典型的培养物保藏中心(Rockville, Maryland), 其入藏 ATCC 登记号分别为 69721、69722 和 69720。

可使用现有技术已知的一般重组 DNA 技术构建含有所需编码和控制序列的适当表达载体, 这些技术中有许多描述于 Sambrook et al., *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)。

本发明还涉及含有表达载体的宿主细胞, 此载体含有编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列和/或 SEQ ID NO.:23 的启动子。优选此宿主细胞所含有的表达载体包含具有基本上由图 6 或 7 所示核苷酸序列的 DNA 序列其中之一的全部或部分。进一步优选此宿主细胞含有的表达载体包含能指导复制和/或表达编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列, 并与之有效连接的一个或多个调节 DNA 序列。另外包括的宿主细胞含有的表达载体包含已经过修饰(例如断裂、缺失或截短)的 DNA 序列以编码无催化活性的 PVA 分子。适当的宿主细胞既包括真核宿主细胞, 也包括原核宿主细胞, 例如大肠杆菌细胞。适当的真核宿主细胞包括例如枝顶头孢(*Cephalosporium acremonium*), 尖孢镰孢和产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)细胞。

特别优选的宿主细胞是尖孢镰孢菌株。

可通过现有技术已知的多种方法将表达载体引入宿主细胞, 例如可通过聚乙二醇介导的原生质转化法来进行表达载体对宿主细胞的转染。然而也可使用例如电穿孔法、biolistic 注射或原生质体融合的其他方法将表达载体引入宿主细胞。

一旦表达载体已被引入适当的宿主细胞, 可在允许所需多肽大量表达的条件下培养此宿主细胞, 在优选的情况下多肽分子含有全部或部分 PVA。

可通过下述 6 种普通方法中的一种或多种鉴定出含有表达载体的宿主细胞, 此载体含有编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列: (a) DNA - DNA 杂交; (b) 标记物基因功能的存在或缺乏; (c) 通过测量宿主细胞中 PVA mRNA 转录物的产生来评价转录水平; (d) 用免疫法检测基因产物; (e) 比色检测和(f) 酶测定, 酶测定为鉴定的优选方法。

在第一种方法中, 使用与 DNA 序列互补的探针, 通过 DNA - DNA 或 RNA-RNA 的杂交可检测出编码全部或部分 PVA 的 DNA

序列的存在。

在第二种方法中，根据某种标记物基因功能(例如乙酰胺的利用、对抗生素的抗性、对杀真菌剂的抗性、尿嘧啶原养型等等)的存在或缺乏可鉴定和筛选出重组表达载体宿主系统。在与调节 PVA 编码序列所用启动子相同或不同启动子的调节之下，将标记基因置于与编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列相同的质粒之中。响应诱导或选择的标记物基因的表达表明存在有完整的重组表达载体，它携有编码全部或部分 PVA 和 DNA 序列。

在第三种方法中，可通过杂交测定法评价 PVA mRNA 转录物的产生。例如可使用与 RNA 序列互补的探针，通过 Northern 印迹法或核酸酶保护测定来分离和分析聚腺苷酸化的 RNA。另外，可抽提宿主细胞的总核酸和测定其与这种探针的杂交。

在第四种方法中，可通过例如 Western 印迹法以从免疫学上评价全部或部分 PVA 的表达。

在第五种方法中，可通过互补分析评价 PVA 蛋白质的表达。例如在已知缺乏这种酶的细胞中，通过在培养基平板上将无色底物苯氧乙酸 - P - 硝基酰苯胺酶促水解成黄色 P - 硝基苯胺可检测出 PVA 活性的表达。

在第六种方法中，使用已知方法通过测定 PVA 酶的活性可测出 PVA 的表达。例如可使用本文“优选实施方案的详细实施例”部分所述的测定法。

可通过现有技术已知的多种方法来测定本发明表达载体、质粒或 DNA 分子的 DNA 序列。例如可使用 Sanger 等人所述的双脱氧链终止法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74,5463-5467(1977)]或 Maxam-Gilbert 法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74,560-564(1977)]。

当然，应理解不是所有表达载体和 DNA 调节序列都能起同样好

地表达本发明 DNA 序列的作用。也不是所有宿主细胞对相同表达载体都能起到同样好的作用。然而, 本技术领域普通熟练人员利用本发明范围的情况下可在表达载体、DNA 调节序列和宿主细胞中作出选择。

本发明进一步涉及产生 PVA 的方法, 它包括培养含有表达 PVA 的表达载体的宿主细胞。优选地, 此表达载体为 pBMFXPVA6 或 PBMFXPVA7。我们惊奇地发现在苯氧乙酸盐作为诱导物存在时, 可极大地加强 PVA 的产生。

本发明进一步涉及含有全部或部分 PVA 的多肽分子, 所说多肽分子优选地具有基本上由图 6 或 7 所示的氨基酸序列其中之一的全部或部分。

至于含有部分 PVA 的多肽分子, 优选此多肽分子的长度至少约为 10 个氨基酸。

本文鉴定的所有氨基酸残基皆为天然 L - 构型。为保持标准多肽命名(J.Biol.Chem.243, 3557-3559(1969)), 下列对应表中表示的是氨基酸残基的缩写。

对应表

附号		氨基酸
1 - 字母	3 - 字母	
Y	Tyr	L - 酪氨酸
G	Gly	L - 甘氨酸
F	Phe	L - 苯丙氨酸
M	Met	L - 甲硫氨酸
A	Ala	L - 丙氨酸
S	Ser	L - 丝氨酸
I	Ile	L - 异亮氨酸
L	Leu	L - 亮氨酸
T	Thr	L - 苏氨酸
V	Val	L - 缬氨酸
P	Pro	L - 脯氨酸
K	Lys	L - 赖氨酸
H	His	L - 组氨酸
Q	Gln	L - 谷氨酰胺
E	Glu	L - 谷氨酸
W	Trp	L - 色氨酸
R	Arg	L - 精氨酸
D	Asp	L - 天冬氨酸
N	Asn	L - 天冬酰胺
C	Cys	L - 半胱氨酸

所有氨基酸序列都由其从左至右的方向为常规的氨基末端至羧基末端方向的式子来表示。

使用本领域一般熟练人员熟知的方法，通过合成的方式，即由其组成氨基酸化学合成多肽可得到本发明多肽。例如，可使用 Houghhton 等人[Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 5131-5135(1985)]所述的固相法。优选通过原核或真核或真核宿主细胞表达编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列产生并得到此多肽，或者优选体外翻译由编码全部或部分 PVA 的 DNA 序列所编码的 mRNA 得到此多肽。例如，可使用如上所述的 PCR 合成图 6 或 7 的 DNA 序列，并将之插入适当的表达载体，可以轮流使用此载体转化适当的宿主细胞。然后培养此重组宿主细胞以产生 PVA。通过这些方法产生多肽的技术是本领域已知的，在本文中也有所描述。

然后分离用此方法产生的多肽，并使用多种蛋白质纯化技术将之纯化至一定程度。例如可使用如离子交换层析、凝胶过滤层析和免疫亲和层析的层析法。

除了制备 6 - APP 外，本发明多肽也可以大量其它方式被使用。例如可以熟知的方法，将此多肽用于制备能与多肽结合的多克隆或单克隆抗体。使用如放射免疫测定或酶免疫测定的免疫测定技术，轮流使用这些抗体可检测出如细胞样品的样品中存在的本发明的多肽。此抗体也可用于亲和层析以纯化本发明多肽并将它们从各种来源中分离出来。

通过确定的 DNA 和推断出的氨基酸序列已经限定了本发明多肽。由于大多数氨基酸残基和终止信号都有一个以上的密码子而导致了遗传密码的简并性，因而也可使用编码与图 6 图和图 7 所述相同的氨基酸序列的其它 DNA 序列以产生本发明多肽。另外，应理解这些 DNA 和氨基酸序列天然存在等位变异，或者也可使用本领域熟知方法有目的地引入此变异。通过在整个序列中一个或多个氨基酸的差异，或者通过在所说序列中缺失、取代、插入、倒位或增加一个或多

个氨基酸可阐明这些变异。例如可根据所涉及残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性的相似性来进行这种氨基酸取代。例如，带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸；带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸；具有不带电的极性头基团或非极性头基团且亲水性数值相似的氨基酸包括：亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸。其它所期望的变异包括上述多肽的盐类和酯类以及上述多肽的前体，例如具有如甲硫氨酸，N - 甲酰甲硫氨酸的N - 末端取代基以及前导序列的前体，所有这种变异都包括在本发明的范围之内。

下述实施例将进一步阐明本发明，这些实施例并不想限制本发明的范围，只想提供对本发明的进一步理解。

优选实施方案的详细例子

在实施例中，微生物菌株、质粒、缓冲液、生长培养基和一般方法都如下所述。

微生物菌株和质粒

所用质粒、细菌和真菌菌株列于表1

表 1

菌株和质粒	相关特征	参注
大肠杆菌 DH5 α	F- ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁻</i>) <i>supE44 λ-thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	Life Technologies, Inc.
尖孢镰孢菌株 435	青霉素 V 酰胺酶产生者	新分离物
蕃茄尖孢镰孢	ATCC 菌株	ATCC 16322
pBM11/M5	Neo ^R , 5.6 kb	ATCC 67436
pES200	Amp ^R , HygB ^R , 6.2 kb	(1)
pUC19	Amp ^R , 2686 bp	(2)
pUT715	Amp ^R , 3337 bp	(3)
pUT715/ <i>trpC</i>	Amp ^R , <i>Phl</i> ^R , 4.6 kb	* 图 9
pWB19N	Neo ^R , 2.9 kb	* 图 8
pSJC62	Neo ^R , <i>Phl</i> ^R , 5.3 kb	* 图 9
pF020	Amp ^R , PVA ⁺ , 6.3 kb	* 图 12

pF020-P	Amp ^R , PVA ⁺ , 6.3 kb	*, Fig. 13
pF020-M	Amp ^R , PVA ⁺ , 6.3 kb	*, Fig. 15
pF021	Neo ^R , PVA ⁺ , 15 kb	*, Fig. 5
pF023	Neo ^R , PVA ⁺ , 9.2 kb	*, Fig. 5
pBMFXPVA6	Neo ^R , Phl ^R , PVA ⁺ , 10.3 kb	*, Fig. 10
pBMFXPVA7	Neo ^R , Phl ^R , PVA ⁺ , 14.6 kb	*, Fig. 11
pBMPVA-P	Amp ^R , PVA ⁺ , 6.3 kb	*, Fig. 14
pBMPVA-M	Amp ^R , PVA ⁺ , 6.3 kb	*, Fig. 16
pBMPVA-P/DAAO1	Amp ^R , DAAO ⁺ , 6.8 kb	*, Fig. 17
pBMPVA-P/DAAO2	Neo ^R , Phl ^R , DAAO ⁺ , 8.7 kb	*, Fig. 17
pBMPVA-M/DAAO3	Amp ^R , DAAO ⁺ , 6.9 kb	*, Fig. 18
pBMPVA-M/DAAO4	Neo ^R , Phl ^R , DAAO ⁺ , 8.8 kb	*, Fig. 18

(1) Staben et al., 1989, Fungal Genet. Lett. 36:79-81.

(2) Yanisch-Perron et al., 1985, Gene 33:103-119.

(3) Jain et al., 1992, Mol. Gen. Genet. 234:489-493.

*下文将描述

Fig: 图

缓冲液和培养基

Luria 肉汤培养基: 1 % Difco Bacto 胰化蛋白胨, 0.5% Difco Bacto 酵母浸出汁, 0.5%氯化钠。

Luria 琼脂培养基: 在 Luria 肉汤中增加 1.5% Difco Bacto 琼脂。

SOC 培养基: 2 % Difco Bacto 胰化蛋白胨, 0.5% Difco Bacto 酵母浸出汁, 10 mM 氯化钠, 2.5 mM KCl, 高压灭菌后, 在培养基中加入百分之一体积的 1mM MgCl₂、1M MgSO₄ 和 20 % 的葡萄糖。

镰孢属营养生长培养基: 6 % 淀粉, 4 % 药物介质(Trader Protein,Memphis ,TN),0.3%(NH₄)₂SO₄, 0.75% KH₂PO₄,0.75% K₂HPO₄, 用 10N NaOH 将 PH 调至 6.8。

产生 PVA 的培养基: 在镰孢属营养生长培养基中增加 0.4% 苯氧乙酸盐。

Tris -DETA 缓冲液(TE):10 mM Tris -Hcl (PH7.4). 1 mM EDTA。

Tris - 乙酸电泳缓冲液(TAE):40 mM Tris- 乙酸(pH8.0),1 mM EDTA.

20 × SSC: 3 M NaCl, 0.3 M 柠檬酸钠, 用 10 N NaOH 调 pH 至 7.0。

20 × SSPE: 3M NaCl,0.2 M NaH₂PO₄,20 mM EDTA,用 10N NaOH 调节 PH 至 7.4。

50 × Deharclt 溶液: 1 % Ficoll, 1 % 聚乙烯吡咯烷酮, 1 % 牛血清白蛋白(BSA)。

30 × NET: 4.5 m NaCl, 0.45M Tris-HCl(pH7.5),30mM EDTA.

方法

如 Sambrook 等人(1989, “ Molecular Cloning :A Laboratory Manual”, 2nd edition ,Cold Spring Harbor Laboratory,CSH,New York.)所述, 使用一般的克隆技术进行 DNA 测序和从大肠杆菌中抽提质粒

DNA。所有限制性酶和 DNA 修饰酶都得自供货商，可根据制造者的教导使用它们。其它的常用方法可按下述进行。

1. 大肠杆菌的电-转化(电穿孔法)

将 4 ml 大肠杆菌 DH 5 α 细胞的新鲜过夜培养物接种于 400ml Luria 肉汤培养基中，在 37 °C 振荡培养直至 OD₆₀₀ 为 0.6。在冰上冷却 15 分钟，并在冷转头中以 7,000 $\times$ g 的转速离心 10 分钟以收获细胞。用 200ml 0 °C 的水将细胞沉淀洗涤两次并用 10ml 0 °C 的 10 % 甘油洗涤一次。在 0 °C 的 10 % 甘油中重新悬浮细胞沉淀至终体积为 1 ml(1 至 3 $\times$ 10¹⁰ 个细胞/ml)，每个 1.5 ml 聚丙烯试管中装入 40 ml 等分试样，在干冰上冷冻细胞悬浮液并贮存于 - 70 °C 之下。

在室温下使冷冻细胞解冻，然后立即置于冰上，在细胞中加入约 2 - 3 μ l 溶于 TE 或连接混合物中的 DNA，缓慢混合并再置冰上放 1 分，钟然后将混合物转移后预冷的 0.2cm 电穿孔样品池中(Bio-Rad catalog # 165 - 2086, Bio-Rad Laboratories, Inc.)。将 Bio-Rad 基因脉冲仪装置(Bio-Rad catalog # 165-2075)的电容设置为 25 μ F，电压设置为 2.50KV。将脉冲控制器(Bio-Rad catalog # 165-2098)的电阻设置为 200 vhm。在这些设置下使样品池被脉冲一次。电穿孔后，在样品池中加入 1 ml SOC 培养基，用 Pasteur 液管将细胞悬浮液转移到 17 $\times$ 100mm 聚丙烯试管中，在 37 °C 下温育 1 小时，将细胞涂平板于选择性培养基上(含有浓度分别为 40 μ g/ 或 100 μ g/ml 的新霉素或氨苄西林的 Luria 琼脂培养基)。

2. 镰孢属的原生质体转化

在 24 °C 下，于 20ml 土豆葡萄糖肉汤培养基(PDB ; Difco Laboratories)中培养尖孢镰孢菌株。通过一层 30 μ m 目的尼龙滤网(Spectra/Mesh Nylon N, Spectrum Medical Industries, Inc.)过滤小分生孢子。室温下以 1,500 $\times$ g 离心 8 分钟可沉淀小分生孢子，用无菌重蒸

水将小分生孢子洗涤两次,在 24 °C 下振荡 15 小时可使 100ml PDB 中萌发大约 1×10^{10} 个小分生孢子。在室温下以 $1,500 \times g$ 离心 8 分钟以将萌发的小分生孢子收集于无菌 50ml 圆锥形试管中。用 O 缓冲液 (1.4 M $MgSO_4$, 50mM 柠檬酸钠, pH5.8) 将沉淀物洗涤两次。在 24 °C 下用 20ml 含有 2 % Novozyme 234(Bios Pacific, Inc.) 的 O 缓冲液将萌发的小分生孢子处理 1 至 2 小时。当所形成的原生质体超过 90 % 时,在 40 °C $900 \times g$ 下,于两只 15ml 圆锥形试管中将此混合物离心 30 分钟,从悬浮液顶端缓慢吸取原生质体,于 4 °C 下用 T 缓冲液洗涤两次 (1.2 M 山梨醇, 50mM $CaCl_2$, 10 mM $Tris-HCl$, pH7.4), 在含有 6 % 聚乙二醇 4000 和 1 % 二甲基亚砷的 T 缓冲液中以每毫升 1×10^9 的浓度悬浮此原生质体,再以 1.5 毫升聚丙烯试管的小量等分试样于冰上冷冻此原生质体,并在 - 70 °C 下贮存。

通过在室温下将冷冻的悬浮液解冻,并加入核酸酶抑制剂金精三羧酸盐至终浓度为 2 mM 可转化此原生质体。在 200 μl 原生质体悬浮液中加入溶于 10 μl TE 中的 10 至 20 μg 质粒 DNA,并在冰上孵育 30 分钟,将 60% 的聚乙二醇 4000/50 mM $CaCl_2$ 溶液以两次 200 μl 、一次 800 μl 的体积加入,每次加入之间应缓慢混合,再置冰上孵 3 分钟,然后加入 10ml 1.2M 的山梨醇/0.5x PDB 并缓慢混合,在 4 °C, $900 \times g$ 下离心 8 分钟以沉淀原生质体,将沉淀悬浮于 0.5ml 的 1.2 M 山梨醇/0.5xPDB 中,在新鲜倾倒的 1.2M 山梨醇/0.1xPDB/1.5% 琼脂双层平板上涂布 0.1ml 原生质体悬浮液,下层培养基为 12.5ml,它含有浓度为 75 $\mu g/ml$ 的腐草霉素,可缓慢地扩散至 12.5ml 的上层培养基中。在 24 °C 下将平板温育 7 天,通过在含有浓度为 20 $\mu g/ml$ 的腐草霉素 1xPDA 培养基上的生长以及与质粒 DNA 探针的 DNA 斑点-印迹杂交可检测转化子。

3. 从镰孢菌株中抽提染色体 DNA

按“镰孢属原生质体转化”部分所述制备镰孢属原生质体，从悬浮液上层收集原生体，在 4℃ 下用 T 缓冲液洗涤两次，然后将原生质体再悬浮于 4 μ l 裂解缓冲液中[0.7M NaCl, 10mM Tris -HCl pH8.0, 10mM DETA 和 1 % 十二烷基硫酸钠(SDS)], 缓慢混合并在 37℃ 下温育 5 分钟，在原生质体裂解液中加入溶于 0.7M NaCl 中的十分之一体积的 10%十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)，缓慢混合并在 65℃ 下温育 15 分钟，通过加入等体积的氯仿:异戊醇混合物(24:1)可抽提出染色体 DNA，收集水溶液，加入十分之六体积的异丙醇以沉淀染色体 DNA，在室温下，以 1,500 × g 离心 5 分钟以收集 DNA，用 70 % 醇将 DNA 洗涤一次，真空干燥，将 DNA 再悬浮于每毫升含 200 μ g 核糖核酸酶 A(EC 3.1.27.5,得自 Singma Chemical Co.)的 1 ml TE 中，在 37℃ 下温育 20 分钟，加入蛋白酶 K 溶液制品(EC 3.4.21.14,得自 Boehringer Mannheim,GmbH)至终浓度为 400 μ g/ml，在 37℃ 下将 DNA 溶液温育 20 分钟，加入十分之一 体积的 3M NaCl，用等体积的苯:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合物将 DNA 溶液抽提两次，收集水溶液，加入两倍体积的乙醇以沉淀染色体 DNA，再在室温下，以 1,500 × g 离心 5 分钟以收集 DNA，用 70 % 乙醇将 DNA 洗涤一次，真空干燥并再悬浮于 1ml TE 中。

使用切口平移系统(Nick translation System)(Life Technologies,Inc)由质粒 DNA 或经琼脂糖纯化的 DNA 片段制备 DNA 探针，并用 α - 32 P-dCTP(Amersham Corp.)标记。使用 T4 多聚核苷酸激酶,用 γ - 32 P-ATP [Amersham Corp.]使寡核苷酸探针磷酸化，每次使用经标记的探针之前，应在 100℃ 下处理 5 分钟以使 DNA 探针热变性，并在冰上迅速冷却 2 分钟。

5.DNA 斑点 - 印迹杂交

将 DNA 样品置于含有 0.4 M NaOH 和 10mM EDTA 的溶液中，

至总体积为 0.4ml，在 100 °C 下处理 10 分钟以使 DNA 样品热变性，在真空下，于斑点 - 印迹装置中(Minifold, Schleicher & Schnell, Inc.)将变性后的 DNA 样品加样到 Bio-Rad Zeta-probe GT 膜(Bio-Rad Laboratories, Inc.)或硝酸纤维素膜上(Minifold, Schleicher & Schnell, Inc.)，在杂交烘箱(Laboratory Products Sales, Inc.)中进行杂交，将 Zeta -probe GT 膜置于瓶中，在 65 °C 下用 5ml 杂交缓冲液(0.5M Na_2HPO_4 , pH7.2, 7% SDS)在旋转下预杂交 2 小时，然后用 5ml 新鲜制备的杂交缓冲液取代此溶液，加入经标记的 DNA 探针，在 65 °C 下用含有 40mM Na_2HPO_4 (pH7.2)和 5 % SDS 的缓冲液将此膜洗涤两次，每次 30 分钟，随后在 45 °C 下含有 40mM NaHPO_4 (pH7.2)和 1 % SDS 的缓冲液将此膜洗涤两次。当所使用的是硝酸纤维素膜时，杂交在类似条件下进行，除了杂交缓冲液的组合物为 6 × SSC，5 × Denhardt 溶液，10mM 磷酸钾(pH7.2)，0.1% SDS 和每 ml 含 250 μg 变性的鲑精 DNA。在 65 °C 下用 2 × SSC - 0.1% SDS 将杂交膜洗涤两次，每次 30 分钟，然后在 65 °C 下，用 0.1 × SSC - 0.1% SDS 再洗涤两次，每次 30 分钟，如使用的是寡核苷酸探针，杂交和洗涤的温度可维持在 50 °C，洗涤后，将膜暴露于 Kodak XAR-5 X-射线胶片(Eastman Kodak Co.)中以放射自显影。

6. Southern DNA 杂交

用 n 种不同限制性酶中的每一种将镰孢属染色体 DNA 完全消化，在每 ml 含 0.25 μg 溴化乙锭的 TAE 缓冲液中，通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳，如 Sambrook 等人所述通过酸脱嘌呤作用、碱变性和中和以处理凝胶，使用 Bio-Rad Model 785 Vacuum Blotter (Bio-Rad catalog # 165-5000)将凝胶转移至 Bio-Rad Zeta-probe GT 膜或硝酸纤维素膜上，如上所述进行 DNA 杂交和放射自显影。

7. 青霉素 V 酰胺水解酶测定

用 5ml 无菌重蒸水洗涤 1 周龄马铃薯右旋糖琼脂(PDA,Difco Laboratories)平板的表面可分离到尖孢镰孢菌株的小分生孢子。将 0.5ml 小分生孢子溶液接种于 125ml 摇瓶中的 25ml 镰孢属营养生等培养基中, 在 24 °C 下, 将营养培养物置于旋转振荡器(250rpm)上培养 72 小时, 并将 0.2ml 营养培养物的等分试样接种于 125ml 摇瓶中的 25ml PVA 生产培养基中, 在 24 °C 下, 用旋转振荡器培养 144 小时。

首先将生产培养物稀释于 5mM 磷酸钾缓冲液(pH7.5)中, 向 1ml 于 25mM 磷酸钾缓冲液(pH7.5)中制得的 3 % 青霉素 V 溶液中加入 1ml 适当稀释的培养物, 在 35 °C 下将反应混合物振荡 15 分, 钟加入 1ml 6%(w/v)三氯醋酸(TCA)溶液以终止反应, 在 $1,500 \times g$ 下将混合物离心 8 分钟, 向 3ml 对 - 二甲氨基苯甲醛(P-DAB)工作溶液中加入 1ml 澄清的上清液, 此工作溶液是通过将 1 份于 100%甲醇中的 1%P-DAB 与 6 份冰醋酸:H₂O:1N NaOH 混合物(40:19:1 的比率)相混合而制得的。在室温下将此混合物温育 5 分钟, 测量波长为 415 nm 时的光密度, 含有 1ml 100 μ g/ml 6 - APA 和 3 ml P - DAB 工作溶液的对照试管在 415nm 处所读光密度为 0.27, 用 415nm 处读出的光密度乘以稀释系数再乘以 0.34 便可算出酶活性(IU/ml)。青霉素 V 酰胺水解酶活性以国际单位(IU)表示, 1 个单位相当于在上述测定条件下每分钟转化 1 μ mole 青霉素 V。

实施例 1

青霉素 V 酰胺酶的氨基酸序列

已分离、纯化和鉴定出 PVA 酶的分泌形式, 它是分子量为 65 千道尔顿的糖蛋白, 用溴化氰消化经纯化的酶, 在 Sephadex G-100 柱上, 对经溴化氰消化的 PVA 进行凝胶过滤层析, 可纯化得到 6 个主要片段: A、B1、B2、C、D 和 E。通过自动的 Edman 降解法(Hunkapiller and Hood,1983,Science 219:650-659)测定 6 个肽片段以及

完整PVA分子的N-末端氨基酸序列, 所得肽序列信息示于图1。

实施例2

青霉素V酰胺酶的cDNA克隆

1.提取尖孢镰孢菌株435的mRNA

在PVA生产培养基中培养尖孢镰孢菌株435细胞, 用重新悬浮的鸟嘌呤异硫氰酸盐缓冲液洗涤细胞, 并经用超声处理以使细胞破裂。通过CsCl垫层离心(Glisin et al., 1974, Biochem, 13:2633-2637)分离总RNA, 通过寡(dT)层析(Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd edition)以及随后的蔗糖梯度分级分离可制备mRNA, 通过体外翻译以及免疫沉淀法可测定出每个级分中的mRNA。

2.合成cDNA并制备cDNA文库

根据Gubler-Hoffman法(Gubler and Hoffman, 1983, Dene 25: 263-269)由mRNA制备互补的DNA(cDNA), 在50ml含有3 μ g mRNA, 50mM Tris-HCl (pH7.5), 65 mM KCl, 3 mM Mg mRNA, 0.5 μ g寡(dT), 2.5 μ g放线菌素D, 1mM 4种dNTP中的每一种以及2单位鼠白血病病毒(MLV)逆转录酶的反应混合物中合成第一条链, 在0℃下将反应物孵育3分钟, 然后在20℃下孵育5分钟并在37℃下孵育1小时。在反应结束时加入2 μ l 0.5M EDTA和5 μ l 3M NaCl, 用苯酚/氯仿抽提此混合物并用2倍体积的乙醇沉淀, 使用Rnase H、DNA聚合酶和DNA连接酶通过修复合成反应以制备第二条链, 将得自第一条链合成中的DNA溶解于100 μ l 修复缓冲液中, 此缓冲液含有20mM Tris-HCl(pH7.5), 5mM MgCl₂, 10mM 硫酸铵, 100mM KCl, 150mM β -DNA, 40 μ M 4种dNTP中的每一种, 5 μ g BSA, 1单位大肠杆菌RNase H, 20单位DNA聚合酶I以及1单位大肠杆菌DNA连接酶。将此混合物于12℃下孵育1小时然后于20℃下孵育1

小时, 反应结束时加入 $10\ \mu\text{l}$ 3M NaCl, 并用苯酚/氯仿抽提此混合物, 加入 2 倍体积的乙醇以沉 DNA。使用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)和 dCTP 使 cDNA 以 C 结尾。将 1 ng C-结尾的 cDNA 退火并与 25ng 以 G-结尾的质粒 puc19 相连接, 用连接后的 DNA 转化大肠杆菌并制备 cDNA 文库。

3. 制备寡核苷酸探针

由 PVA 酶羧基端附近之肽 C(图 1, SEQ.ID.NO.: 5)的七个氨基酸(SEQ.ID.NO.: 8)逆翻译可得到一套四个寡核苷酸的探针(图 2, SEQ.ID.NO.: 11)。

4. 鉴定 PVA cDNA 克隆并制备全长 cDNA

用简并的寡核苷酸探针(图 2, SEQ.ID.NO.: 11)筛选 cDNA 文库的菌落, 通过在 $50\ ^\circ\text{C}$ 下, 于杂交缓冲液($6 \times \text{NET}/10\times \text{Denhardtts}/1\%$ SDS)中与 ^{32}P 末端-标记探针的杂交可筛选出菌落印迹。

在室温下用 $2\times \text{NET} - 0.1\%$ SDS 将杂交膜洗涤两次, 每次 30 分钟, 接着在 $50\ ^\circ\text{C}$ 下用 $0.5 \times \text{NET} - 0.1\%$ SDS 再洗涤两次, 每次 30 分钟。筛选出强烈杂交的菌落(# 362)以供进一步研究, 它含有 - 500bp 的插入片段, 此片段可用作探针以重新筛选文库。第二个克隆(# 2585)含有 - 1.7Kb 的插入片段, 它可与探针强烈杂交。将 PVA 的 N-末端氨基酸序列与插入片段 5'末端的翻译相比较, 结果表明已克隆出成熟酶中除五个氨基酸以外的完整编码区域(图 3)。通过位点特异性诱变可在 5'末端生成一个 Pst I 限制性位点以产生 # 2585-M, 加入一合成接头以将 # 2585 - M 克隆转变为全长 cDNA 克隆 2585 - FL(图 3 和图 4)。

5. 2585 - FL cDNA 克隆的 DNA 序列分析

使用 Maxam-Gilbert 法(Maxam and Gilbert 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560-564)测定 cDNA 插入片段 2585 - FL 两条链的序列。

此插入片段含有 - 1521 个碱基对(bp)的开放读框, 它可编码 55,000 道尔顿的蛋白质(图 6), 在此序列中可发现完整 PVA 分子 N - 末端和经溴化氰消化的肽片段的所有氨基酸序列数据, 图 6 中划线部分是相应于 20 mer 寡核苷酸探针(SEQ.ID.NO.: 11)的区域(碱基对 1348 至 1368, SEQ.ID.NO.: 20)。

实施例 3

青霉系 V 酰胺酶基因组 DNA 克隆

1. 基因组 PVA 基因片段的鉴定

用 n 种限制性酶消化尖孢镰孢菌株 435 的高分子量染色体 DNA, 在 TAE 缓冲液中, 使用 0.6% 琼脂糖凝胶电泳并转移至硝酸纤维素膜上。将由 2585 插入片段 DNA 制备的探针与 Southern 印迹杂交以测定含有 PVA 基因的片段大小, 已发现此片段位于 ~ 12kb 的 EcoRI 片段上。

2. 质粒 pWB19N 的构建

pBM11/M5 (ATCC 67436) 衍生于 pBM11(ATCC 67366), 其中已通过位点特异性诱变除去了存在于新霉素 - 抗性基因中的 NcoI 位点。用 Hind III 和 Sma I 消化质粒 pBM11/M5 DNA, 使用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 klenow 片段将 Hind III 切割后的 5' 突出末端转变成钝端, 使 DNA 混合物进行 0.8% 制备性琼脂糖凝胶电泳, 从凝胶中切下含有新霉素 - 抗性基因的 1.3 kb 片段, 并在室温下, 以 100V 的电压进行电洗脱 1 小时, 收集所得洗脱液, 用等体积的经 TE 饱和过的苯酚抽提三次, 在 0.3M NaCl 存在下通过乙醇沉淀从水相中回收 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳分的所得 DNA 片段。

用 BspHI 裂解 pLIC19 质 DNA(Yanisch-Perronet al., 1985. Gene. 33: 103-119), 用 Klenow 片段使 5' 突出末端转变成钝端, 分离含有多接头位点和复制起点的 1.6 Kb 片段(碱基对 No. 2639 至 No. 2686 和 No. 1

至 No.1526), 在连接缓冲液(50 mM Tris -HCl, H7.6, 10mM Mg Cl₂, 1mM ATP, 1 mM DTT, 5% 聚乙二醇 - 8000)和 T4 DNA 连接酶存在下将此片段与 1.3 kb 新霉素 - 抗性基因片段相连接。

所得质粒被称为 pWB19N, 通过电穿孔将之导入大肠杆菌 DH 5 α 细胞, 筛选出存在 pWB19N 质粒的新霉素抗性菌落, 此质粒在用 Klenow 补平的 Hind III 和 BspHI 位点连接点处有一个恢复的 BspHI 位点, 还需在 X-gal 平板上筛选菌落的氨苄西林敏感性以及 β - 半乳糖苷酶活性的 α - 互补作用, pWB19N 的构建示于图 8。

3. 基因组 PVA 基因片段的克隆

用 EcoRI 裂解 100 μ g 自尖孢镰孢菌株 435 的高分子量染色体 DNA, 在 TAE 缓冲液中, 使用 0.6% 琼脂糖凝胶电泳泳此 DNA, 从凝胶上切下大小范围为 11.5 kb 至 12 kb DNA, 在室温下, 以 100V 的电压, 使之进行电洗脱 1 小时, 收集所得洗脱液, 用等体积的 TE 饱和的苯酚抽提 3 次, 在 0.3M NaCl 存在下通过乙醇沉淀从水相中回收 DNA, 然后将 ~ 12kb DNA 片段克隆进 pWB19N 载体以形成 pF021(图 5), 对 pF021 DNA 的限制性分析表明此克隆片段含有完整的 PVA 基因, 另外还带有 PVA 编码序列上游的 3.7kb 和下游的 6.8kb。

4. DNA 序列分析

通过 Maxam-gilbert 法(图 7)测定基因组克隆编码区域的序列, 除了 5' 末端所用密码子以外, cDNA 和基因组序列完全相同, 在 cDNA 克隆的 5' 末端插入了合成接头, 在基因组克隆的 5' 末端得到一额外的 315bp 序列信息, 这些数据表明 PVA mRNA 的翻译开始于图 7 的碱基 241 处, 并合成了含有 25 个氨基酸信号序列的"前 - PVA", 然后经裂解形成了 PVA 酶的分泌形式。

通过 S1 作图(Berk and Sharp, 1977 Cell 12:721-732; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd edition)可测出转

录起始点, 它位于碱基 162 处或其附近, 在此位点和位于碱基 241 处的 ATG 之间未发现其它潜在的 ATG 释译起始信号。

实施例 4

在异源宿主中表达 PVA 基因

1. 质粒 pSJC62 的构建

质粒 pES200(Staben et al., 1989, Fungal Genet. Lett. 36:79-81)具有来自构巢曲霉的 trp C 启动子序列以引导细菌潮霉素 B 抗性基因的转录。用 EcoRI 和 ClaI 酶裂解 pES200 DNA; 用 Klenow 片段使 5' 突出末端转变成钝端。通过琼脂糖凝胶电泳分离 1250bp 的 trp C 启动子片段, 并通过电洗脱回收此片段。质粒 pUT 715 (Jain et al., 1992, Mol. Ge. Genet. 235:489-493)是一启动子探针载体, 它携有来自印度斯坦链异壁菌(*Strptroalloteichus hindus-tanus*)的无启动子的腐草霉素抗性基因。用 EcoRV 消化 pUT 715 DNA, 并与 1250 bp trp C 启动子片段连接, 将连接混合物转化至大肠杆菌 DH 5 α 中, 所得质粒命名为 pUT 715/trp C。

用 Bam H 和 Bg III 酶消化 pUT 715/trp C DNA, 经琼脂糖凝胶电泳后分离含有 trp C 启动子和腐草霉素 - 抗性基因的 2.4 kb 片段。用 Bam H I 酶裂解 pWB 19N DNA, 并与 2.4 kb 片段连接, 所得质粒命名为 pSJC62(图 9)。

2. pFO23 的构建

质粒 pFO21 中插入了一来自尖孢镰孢菌株 435 基因组 DNA 的 ~12KB EcoRI 片段, 用 Sall 酶裂解 pFO21 DNA, 并用 T4 DNA 连接酶重新环化, 所得质粒 pFO23 缺失了 pFO21 中 5.8 kb 的镰孢属 DNA 非编码区(图 5)。

3. pBMFXDVA6 的构建

用 EcoRI 和 XbaI 酶裂解 pSJC62 DNA, 分离所得 2.4 kb 含有曲霉

属 *trp C* 启动子以及腐草霉素抗性基因的片段。用 *EcoRI* 和 *Xba I* 酶消化 pFO23 DNA, 在琼脂糖凝胶上分离 DNA 混合物, 分离含有 PVA 基因的 7.9 kb 片段, 并与含有曲霉属 *trp C* 启动子和腐草霉素 - 抗性基因的 2.4 kb 片段连接, 所得质粒命名为 pBMFXPVA 6(图 10)。

4. BMFXPVA 7 的构建

用 *Nco I* 和 *Xba I* 酶裂解 pBMFXPVA 6 DNA, 用 *klenow* 片段将粘性末端转变成钝端, 在琼脂糖凝胶上分离 DNA 混合物并分离含有 PVA 基因的 4.3 kb 片段, 用 *Xba I* 裂解 pBMFXPVA 6 DNA 并用 *klenow* 片段处理, 将线性化的 pBMFXPVA 6 DNA 与 4.3 kb 的 PVA 基因片段相连接可形成 pBMFXPVA 7(图 11)。

5. 在异源宿主中表达 PVA 基因

在 pFO23(图 5)中加入受构巢曲霉 *trp C* 启动子(图 10)调节的腐草霉素抗性基因可衍生得到重组质粒 pBMFXPVA 6, 在 pBMFXPVA 6 中加入第二拷贝的 PVA 的基因(图 11)可衍生得到重组质粒 pBMFXPVA 7。通过聚乙二醇介导的原生质体转化(Powell and Ristler, 1990, J. Bacteriol 172:3163-3171)将这些重组质粒引入 PVA 基因的异源宿主(即尖孢镰孢的不同亚种)ATCC 16233 菌株中(蕃茄尖孢镰孢)。对腐草霉素抗性转化分子的 DNA 分析证实了转化 DNA 已整合到宿主染色体上, 此时使用聚乙二醇介导的原生质体转化法不能转化尖孢镰孢菌株 435。

然后在摇瓶中发酵转化子并测定 PVA 活性, 尖孢镰孢菌株 435 产生的活性为 20 IU/ml, 未经转化的 ATCC 16233 菌株产生的活性为 1.0 IU/ml, 携有 pBMFXPVA 6 质粒(一个 PVA 基因)的转化子产生的活性为 10 IU/ml, 携有 pBMFXPVA 7 质粒(两个 PVA 基因)的转化子产生的活性为 130 IU/ml(表 2), 总之, 在异源宿主中表达的 PVA 活性与原始的尖孢镰孢株 435 相比增加了 5 倍。

表 2 青霉素 V 酰胺水解酶活性

菌株	摇瓶效价 (IU/ml)
尖孢镰孢菌株 435 rain 435	20
ATCC16322	1
ATCC16322(pBMFXPVA6)+ (一个 PVA 基因)	10
ATCC16322(pBMFXPVA7)+ (两个 PVA 基因)	130

另外, 在苯氧乙酸的存在下(表 3), 重组 PVA 的表达可被诱导至与尖孢镰孢菌株 435 相同的水平。

表 3 苯氧乙酸诱导青霉素 V 酰胺水解酶基因表达

菌株	- 苯氧 - 乙酸效价 (IU/ml)	+ 苯氧 - 乙酸效价 (IU/ml)	诱导水平
尖孢镰孢 菌株 435	0.49	21.13	43X
ATCC16322 (pBMFXPVA7)+	2.73	135.32	50X

实施例 5

真菌表达载体的构建

加入苯氧乙酸可诱导 PVA 基因的表达, 这表明可从 PVA 转录和翻译调节区即启动子区域开发表达载体以用来在尖孢镰孢中表达外源基因, 下述的构建用于产生质粒 pBMFXPVA -P 以表达细胞内蛋白质, 产生质粒 pBMFXPVA - M 以表达可分泌的蛋白质。

1. pFO20 的构建

用 Bam HI 和 XhoI 酶裂解 pFO23 DNA, 在琼脂糖凝胶上分离 DNA 混合物, 分离 PVA 基因 5' 末端上游含有转录和翻译调节序列的 2.1kb 片段, 用 Xho I 和 Hind III 酶裂解 pF023, 凝胶纯化含有 PVA 基因后一部分的 1.5 kb DNA 片段, 使两个片段在 pUC19 的 Hind III 和 Bam HI 位点处连接, 所得质粒命名为 pFO20, PFO20 的构建示于图 12。

2.pFO20-P 的构建

使用来自 Marinaga 等人(1984,Bio/Technol, 2:636-639)的位点特异性诱变法可在 PVA 基因的翻译起始位点处产生一个 Mlu I 位点 (SEQ.ID.NO.:21 的碱基对 no.241)。

STGCGCGTC (SEQ.ID.NO.: 24)

↓ 位置特异性诱变

ATACGCGTC (SEQ.ID.NO.: 25)

Mlu I

Mlu I 位点的产生使得通过 Mlu I 和 BamHI 裂解可除去 PVA 基因的编码区, 取而代之的是可在 PVA 启动子控制之下表达的基因编码序列。已合成了一个 15mer 诱变寡核苷酸(GGCATATACGCGTC SEQ.ID.NO.: 26)。

pFO20 -P 的构建示于图 13。用 Xma I 消化 2 - μ g pFO20，再用细菌碱性磷酸酶(BAP)处理以防止所得片段 I 的自身连接，用 EcoRI 和 SphI 裂解 2 μ g pFO20 以除去突变靶区域(例如 PVA 基因的上游区域)，凝胶纯化所得 5 kb 片段(片段 II)。将等克分子量的片段 I 和 II 与 200 倍克分子过量的 15mer 诱变寡核苷酸相混合，在 100 °C 下使混合物温育 3 分钟以使混合物中的 DNA 片段完全变性，变性后，以分步的方式逐渐冷却此混合物以使变性的 DNA 片段重新退火，在重新退火的过程中除去了原有的片段 I 和 II 外，还形成了两种新 DNA，即 DNA - a 和 DNA - b。如图 13 所示，15mer 诱变寡核苷酸仅与两种环状 DNA 中的一种杂交形成异源双链，这是因为寡核苷酸仅与靶区域两条链中的一条互补。将 DNA 与 klenow 片段、T4 DNA 连接酶和四种 dNTP 一起温育，此处理可使开环 DNA 转变为闭合状 DNA。反应过后，用此混合物转化大肠杆菌 DH 5 α ，通过 Mlu I 裂解分析筛选出转化子的质粒 DNA，鉴定质粒 pFO20-P 中 Mlu I 位点的产生。

3. pBMPVA-P 具有两个妨碍此表达载体之应用的 Bam HI 位点，因此需从 puc19 载体区域除去 BamHI 位点。用限量的 Bam HI 酶处理 pFO20-P 以形成部分裂解状态，再用 EcoRI 裂解，用 Klenow 片段补平 5' 突出末端，凝胶纯化 6.3 kb 的片段，用 T4 DNA 连接酶连接并转化到 DH5 α 中，所得质粒 pBMPVA-P(图 14)可用作表达载体以在 PVA 启动子控制之下将所需基因的编码序列插入 Mlu I / BamHI 位点。

4. pFO20 - M 的构建

在 PVA 分泌信号序列和成熟 PVA 蛋白质(氨基酸 No.24-25, SEQ.ID.NO.: 22)的连接处产生一个 Sma I 位点。

AACAAAA/GGCAAC (SEQ.ID.NO.: 27)

N K G N (SEQ.ID.NO.: 28)

↓ 位置特异性诱变

AACCCC/GGGAAC(SEQ.ID.NO.: 29)

SmaI 位点

Sma I 位点的产生可允许在 PVA 分泌信号序列之后插入编码序列, 因而使得表达后的蛋白质可以分泌, 已合成了 28mer 诱变寡核苷酸(GCAGCTCCCAACCCCCGGGAACGATGATT, SEQ.ID.NO.: 30)。

pFO20-M 的构建示于图 15, 其过程类似于 pFO20-P 的构建。用 XmaI 裂解质粒 pFO20, 接着用 BAP 处理以产生片段 I, 再用 SphI 和 Hind III 消化 pFO20 以除去靶区域, 并产生了 6kb 的片段 II, 异源双链形成以及 DNA 延伸的条件类似于 pFO20-p 的构建, 筛选转化子质粒 DNA 中额外产生的 Sma I 位点。

5. pBMPVA-M 的构建

质粒 pFO20-M 具有妨碍此载体使用的两个 Bam HI 和两个 Sma I 位点, 来自 PUC 19 区的多余 Bam HI 和 Sma I 位点需被除去。用 Bam HI 部分裂解 pFO20-M, 然后用 EcoRI 裂解, 用 Klenow 片段补平粘性末端, 凝胶纯化 6.3 kb 的片段, 连接并转化大肠杆菌 DH 5 α , 所得质粒 pBMPVA-M(图 16)可用作分泌表达载体以在 PVA 启动子的控制之下将所需基因的编码序列插入 Sma I/Bam HI 位点。

实施例 6

通过 PVA 表达载体表达 D-氨基酸氧化酶基因

从变异三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)中克隆的 D - 氨基酸氧化酶基因可用作通过镰孢属 PVA 表达载体表达外源基因的例子。

1.通过 pBMPVA-p 表达 D - 氨基酸氧化酶基因

Bristol-Myers Squibb 科学克隆出变异三角酵母的 D-氨基酸氧化酶(DAAO)基因, DNA 序列分析表明在编码序列的 5'末端附近存在有 38bp 的内含子。使用寡核苷酸定向的位点特异性诱变法可除去内

含子并在 DAAO 基因的翻译起始位点处产生一个 NcoI 位点, 因此 DAAO 编码序列再加上 700bp 的 3'-非转录区域可被纯化为 2.1 kb 的 NcoI / Bam HI 片段。

用 Mlu I 裂解处理质粒 pBMPVA-P DNA, 用 klenow 片段补平粘性末端, 然后用 BamHI 裂解此 DNA, 凝胶纯化含有 PVA 启动子区域的 4.7kb 片段, 将 DAAO 基因片段与 DAAO 基因 2.1 kb 的 NcoI/Klenow/BamHI 片段相连接可产生质粒 pBMPVA-P/DAA01。通过用 NdeI 裂解、Klenow 补平质粒 pBMPVA-P/DAA01 并经过凝胶纯化可制备 3.4 kb 的 PVA 启动子/DAAO 基因融合片段。将此片段插入 pSJC62 DNA 以及经 klenow 补平的 Xba I 位点, 所得质粒命名为 pBMPVA-P/DAAO2。完整的构建图示于图 17。

使用聚乙二醇介导的原生质体转化法可将 pBMPVA-p/DAAO2 DNA 引入 ATCC 16322 菌株, 通过对腐草霉素的抗性筛选转化子, 在 PVA 生产培养基中培养 n 个转化子并测定 D - 氨基酸氧化酶活性, 结果表明 D - 氨基酸氧化酶基因在 ATCC/16322 转化子中的表达水平为 0.2-0.8 IU/ml。

2.通过 pBMPVA-M 表达 D - 氨基酸氧化酶基因

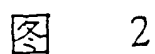
用 Sma I 和 Bam HI 酶裂解质粒 pBMPVA-M DNA, 凝胶纯化含有 PVA 启动子区域以及 PVA 分泌信号序列的 4.8kb 片段。通过 Nco I 裂解加上绿豆核酸酶处理以除去 5'粘性末端并维持 DAAO 基因适当的阅读框, 然后用 Bam HI 消化以产生 2.1 kb 的片段即可制备得到 DAAO 基因片段。将 4.8kb 的 PVA 启动子/信号序列片段与 2.1 kb 的 DAAO 基因片相连接即可产生质粒 pBMPVA-M/DDAO3, 用 Nde I 裂解 pBMPVA-M/DDAO3 DNA, 用 klenow 片段补平 5'粘性末端, 纯化 3.5kb 的 PVA 启动子 - 信号序列、DAAO 基因融合片段, 并在经 klenow 补平的 Xba I 位点处插入 pSJC62 DNA 中, 所得质粒命名为

pBMPVA-M/DDAO4 (图 18)。

将 pBMPVA-M/DDAO4 DNA 转化进 ATCC 16322 菌株, 测定 n 个腐草霉素抗性转化子的 D- 氨基酸氧化酶活性, 不幸的是这些转化子都未显示出 D - 氨基酸氧化酶活性。通过 pBMPVA-M 载体表达 D - 氨基酸氧化酶基因的失败可能是由于 D - 氨基酸氧化酶的细胞内特性。人们普遍认为编码细胞内蛋白质的基因不能通过分泌表达系统表达并转移到细胞外(Model and Russel,1990,Cell 61:739-741)。即使此基因能在细胞内表达, PVA 信号序列的结合也会使 D-氨基酸氧化酶活性丧失, 因此, pBMPVA-M 载体仍然可用于表达其它分泌蛋白质基因。

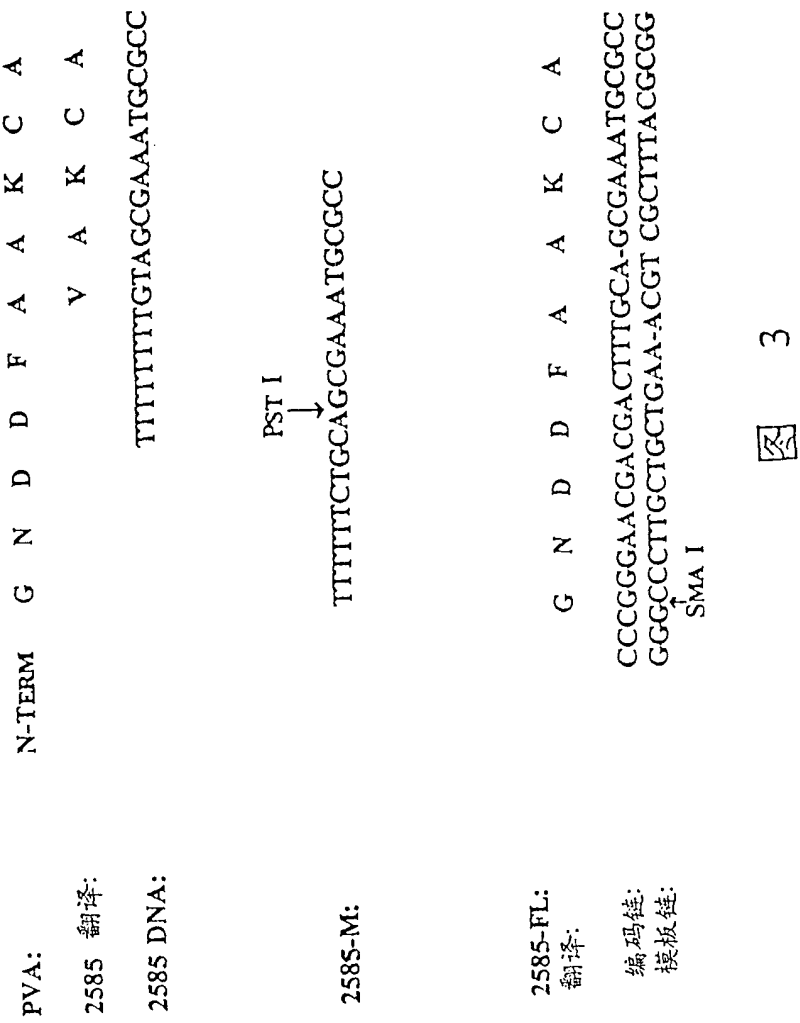
 1

N-末端:	Gly-Asn-Asp-Asp-Phe-Ala-[Ala/Lys]-Lys-[]- Ala-Ser-Leu-Lys-Lys-Ser-Leu-Lys-Leu-Pro-Gly- Thr-[Thr/Val]-Val-Tyr-Phe-Thr-Gln-His-Val
肽 A:	Gly-Leu-Asn-[Ser/Pro]-Ser-Gln-[Ala/Leu]- [Asp/Glu]-Gln-Phe-Tyr-[Tyr/Arg]
肽 B1:	Leu-Val-Lys-Thr-Gly-Pro-Ala-[Ser/Lys]-[]- Val-Ser-Ile
肽 B2:	Gly-Asn-Asp-Asp-Phe-Ala-Ala-[Ser/Lys]-[]- Ala
肽 C:	Gly-[]-[Asn/Lys]-Thr-Ala-Asp-Thr-Asn-Val- Leu-Leu-Ala-[Ile/Arg]-Val-Lys-Trp-Val-Glu- Glu-Gly
肽 D:	Ile-His-Trp-Ser-Gly-Leu-Glu-Asp-Gly-Leu-Ile- Ser-Ala-Glu-Asn-[Asn/Ser]-Asp-Tyr-Tyr-Asn- [Asn/His]-Val-[Val/Ser]-Ser-[Thr/Arg]
肽 E:	Pro-Tyr-Asn-Asp

 图 2

氨基酸:	Val-Lys-Trp-Val-Glu-Glu-Gly
逆转录:	GTN-AAR-TGG-GTN-GAR-GAR-GG
互补:	CC-YTC-YTC-NAC-CCA-YTT-NAC
探针:	CC-YTC-YTC-CTC-GGA-YTT-NAC
	A
	G
	T

(N 为 A, G, T, 或 C; R 为 A 或 G; Y 为 C 或 T)



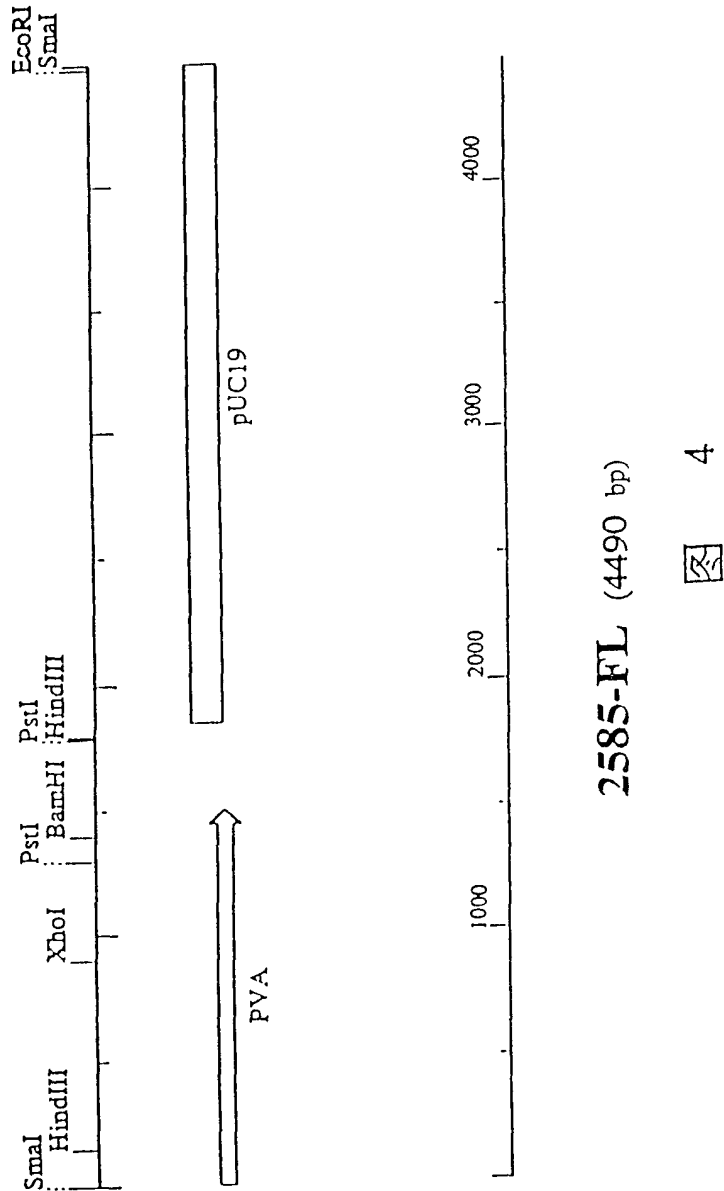


图 5

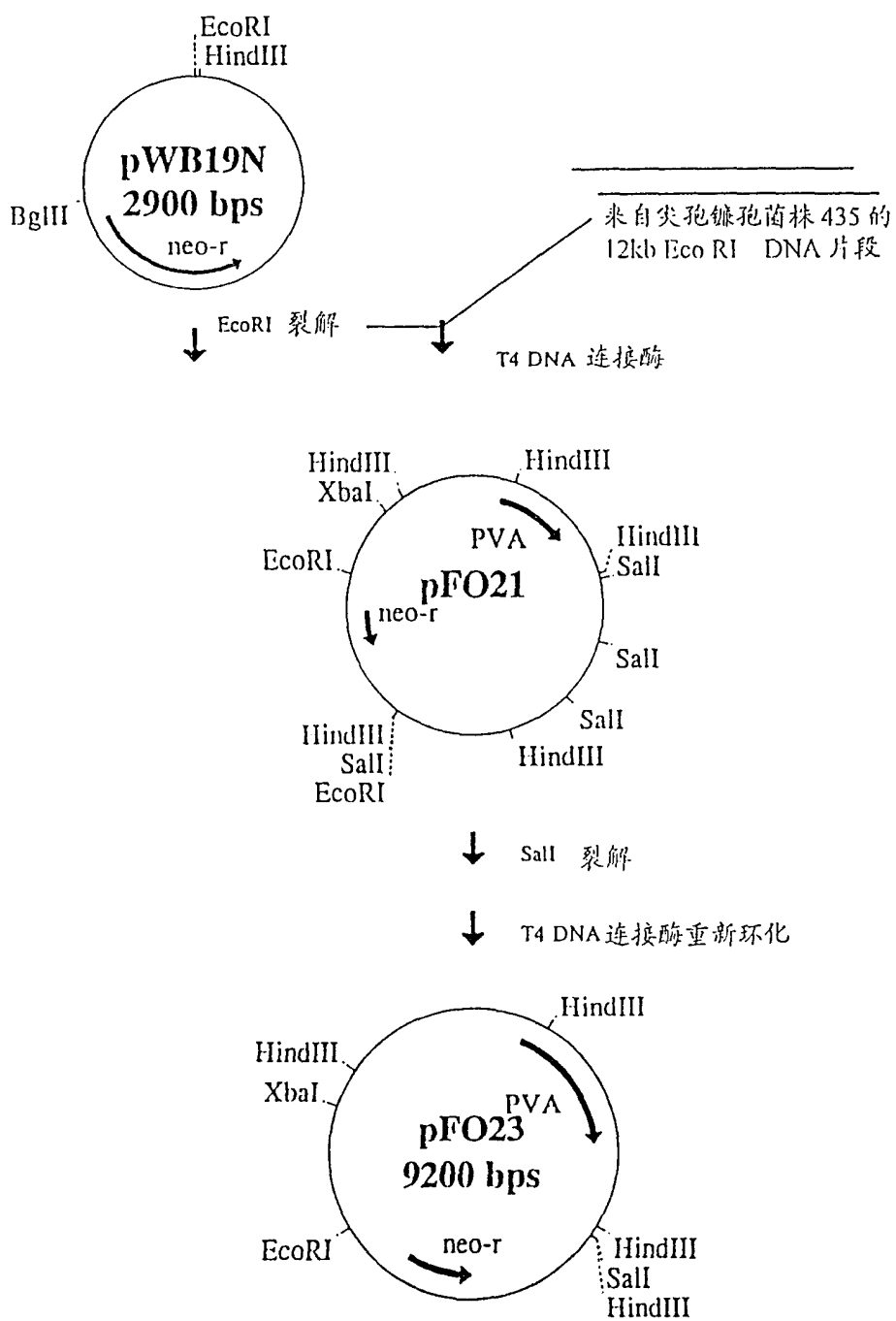


图 6

尖孢镰孢的青霉素 V 酰胺水解酶基因(cDNA)

```

GGCAACGATGATTTTGGCCGCGAAATGCGCCAGCCTCAAGAAGTCGCTCAAACCTCCCCGGC 60
G N D D F A A K C A S L K K S L K L P G

ACCACCGTATACTTCACCCAGCATGTCTCGGCTGGTACCAACATCACTTTCCCCGATAAT 120
T T V Y F T Q H V S A G T H I T F P D N

CACCCGACCTGCGGTCCTAACTATCAGGTTACGGACGTTGAGGTCTGCCGCGTGGCCATG 180
H P T C G P N Y Q V T D V E V C R V A M

TTAGTCAAGACGGGACCCGCTCAAACGTTAGCATCGAAGCTTGGCTTCCCTTGAACCTGG 240
L V K T G P A S N V S I E A W L P L N W

ACAGGTCGGTTCTTAGGAACTGGCAATGGTGGATTAGCTGGCTGTATGCCCTACAACGAT 300
T G R F L G T G N G G L A G C M P Y N D

ATGGCGTACGGCAACAGTTTCGGCTTCGCCAGCGTTGGCACGAACAACGGACATAACCGGA 360
M A Y G N S F G F A S V G T N N G H N G

ACCTCAGGCCTACCCATGTACCGCAACCCAGGCCTGGTTGAGGACTTTGCCCTATCGTGCG 420
T S G L P M Y R N P G V V E D F A Y R A

GTGCACGCTGGTGCTGTTATCGGAAAGAAGATCACCCAGGGCTTTTACGGCAAGAAGTTC 480
V H A G A V I G K K I T Q G F Y G K K F

AAGTCCTACTTTCTCGGCTGCTCGACAGGAGGACGTCAAGCAATGAAGTTGGCACAGAGC 540
K S Y F L G C S T G G R Q A M K L A Q S

TTCCCCGAGGATTACGATGGCTATGTGGCAGGTGCTCCGGCTATGCGCTGGAACGGTCTT 600
F P E D Y D G Y V A G A P A M R W N G L

CAGGCACGCTCTGGAAGTTTCTGGGGCATCACCGGCCCCCTGGAGCTCCTGGCCATGTG 660
Q A R S G S F W G I T G P P G A P G H V

ACTCCAGACGAGTGGGAAATGGTGCACAAGAGCGTCCTGACTCAGTGCACGAGGCCATT 720
T P D E W E M V H K S V L T Q C D E P I

GATGGCGTCGATGACGGCGTGCTTGAGGACCCACCCCTCTGTAGTACCGCCCTGAGGCT 780
D G V D D G V L E D P T L C Q Y R P E A

CTCATCTGCGGTAAGGGCCAGACCGAGAATTGCCTGACCAAGGCCAAGATTGAGACGGTC 840
L I C G K G Q T E N C L T K A K I E T V

CGCAAAGTCTTTTCTCCCTATACACCACGAATGAGACATACGTCTACCCTCGAGCGGTT 900
R K V F S P L Y T T N E T Y V Y P R A V

CCTGGTGCTAACGCTCTCTTTAACTTTGTTGTGCGCGAGACACCATTCGTTTACTCCACA 960
P G A N A L F N F V V A E T P F V Y S T

GAATGGTACCAGTATGTCATCTGGGAAGACCTGAGTGGGAATCCTGACACTATTGGGCCC 1020
E W Y Q Y V I W E D P E W N P D T I G P

```

图 6 (续)

AAGGACTATGATAGAGGTGCCGAGATGAACCCCTATGACATTGAGACTTGGGAGGGAGAC 1080
 K D Y D R G A E M N P Y D I E T W E G D
 CTGTCTAAGTTCCGCAAGCGTGGCAACAAGATGATTCACCTGGCACGGCCTTCAGGACGGA 1140
 L S K F R K R G N K M I H W H G L Q D G
 CTCATCAGCGCCGAGAACTCAGACGATTATTATAATCACGTGTCTCGAACAATGGGCCTC 1200
 L I S A E N S D D Y Y N H V S R T M G L
 AATAGTAGCCAGCTGGACCAGTTTATAGGTTCTCCGCGTCAGTGGGTGTGGCCATTGC 1260
 N S S Q L D Q F Y R F F R V S G C G H C
 AGCGCCGGAGACGGGGCTTCTCGCATTGGAACAACGCCGGAACATGGGCGGCAAGACG 1320
 S A G D G A S R I G N H A G N M G G K T
 GCAGATACTAATGTGCTTCTGGCTATTGTGAATGGGTCGAGGAAGGCGTTGCGCCAGAA 1380
 A D T N V L L A I V K W V E E G V A P E
 [与 20 mer 探针互补]
 ACGATTGGGGGCTACAAGAACGTCGGCGGAACTGCAGATGGCGCTTTTGAATATGAGCGT 1440
 T I G G Y K N V G G T A D G A F D Y E R
 AGGCATTGCCGATACCCACACCGCAATGTCTGGGACGGGAAGGGGAATGTGAAGGATCCC 1500
 R H C R Y P H R N V W D G K G N V K D P
 GATAGCTGGAACGTGAAGATCTGAGGTGTGGCCCTAGGCTTTTGTGGCTGTCTTAGGTG 1560
 D S W N C K I *
 GCATACGTATATAAGAGGATCACTGTGAACATGCTTTATGTTGTGCAAGAATTGATTGAG 1620
 AATCAGATTGAGCTTGCAGAGCCAAGGCAATAGACCCAACCTGTTGACGAGATCTTGGCC 1680
 GAAGGTAGAGGCAACGGGGAGAGAGACCATGGAAGACAAGGCGTAGAAAATGGCCTGGGA 1740
 AGACGGAAAAAAAAAACCCCCCCCCC 1767

图 7

尖孢镰孢的青霉素 V 酰胺水解酶基因(基因组)

```

AGGTGTCATACGCGTGTAACGAGGTATCACCTCCTTTCTTGGAATATTGGTTGGTTGTTT 60
TATGAAGGACCATCCGTTCAACCCGCAGGAACAGGGACATCTATGGCAAGAGTTTATCC 120
CGAGGCATGTATATAATAAAGCTCTTGCCTCTCCTTCTCCTGACACTTCTCAGCCAGGCT 180
* 转录起始
CAGGAGGCTGGCAGTGAGTTGAATATCTATCTGTCTGATAGTTGTTTCGTCATCAGGCACT 240
ATGCGCGTCAACTTCTCGACCCTGCTGCTTCCCAGCCTCCTCCAAGGGCTAGGTGCATGC 300
M R V N F S T L L L P S L L Q G L G A C
GCAGCTCCCAACAAAGGCAACGATGATTTTGCCGCGAAATGCGCCAGCCTCAAGAAGTCG 360
A A P N K G N D D F A A K C A S L K K S
CTCAAACCTCCCGGCACCAACCGTATACTTCAACCCAGCATGTCTCGGCTGGTACCAACATC 420
L K L P G T T V Y F T Q H V S A G T N I
ACTTCCCCGATAATCACCCGACCTGCGGTCCTAACTATCAGGTTACGGACGTTGAGGTC 480
T F P D N H P T C G P N Y Q V T D V E V
TGCCCGGTGGCCATGTAGTCAAGACGGGACCCGCCTCAAACGTTAGCATCGAAGCTTGG 540
C R V A M L V K T G P A S H V S I E A W
CTTCCCTTGAACTGGACAGGTCGGTTCTTAGGAACTGGCAATGGTGGATTAGCTGGCTGT 600
L P L N W T G R F L G T G N G G L A G C
ATGCCCTACAACGATATGGCGTACGGCAACAGTTTCGGCTTCGCCAGCGTTGGCACGAAC 660
M P Y N D M A Y G N S F G F A S V G T N
AACGGACATAACGGAACCTCAGGCCTACCCATGTACCGCAACCCAGGCGTGGTTGAGGAC 720
N G H N G T S G L P M Y R N P G V V E D
TTTGCCTATCGTGCGGTGCACGCTGGTGCTTATCGGAAAGAAGATCACCCAGGGCTTT 780
F A Y R A V H A G A V I G K K I T Q G F
TACGGCAAGAAGTTCAAGTCCTACTTTCTCGGCTGCTCGACAGGAGGACGTCAAGCAATG 840
Y G K K F K S Y F L G C S T G G R Q A M
AAGTTGGCACAGAGCTTCCCCGAGGATTACGATGGCTATGTGGCAGGTGCTCCGGCTATG 900
K L A Q S F P E D Y D G Y V A G A P A M
CGCTGGAACGGTCTTCAGGCACGCTCTGGAAGTTTCTGGGGCATCACCGGCCCCCTGGA 960
R W N G L Q A R S G S F W G I T G P P G
GCTCCTGGCCATGTGACTCCAGACGAGTGGGAAATGGTGCACAAGAGCGTCTGACTCAG 1020
A P G H V T P D E W E M V H K S V L T Q
TGCGACGAGCCCATTGATGGCGTCGATGACGGCGTGCTTGAGGACCCACCTCTGTCTCAG 1080
C D E P I D G V D D G V L E D P T L C Q

```

图 7 (续)

```

TACCGCCCTGAGGCTCTCATCTGCGGTAAGGGCCAGACCGAGAATTGCCTGACCAAGGCC 1140
Y R P E A L I C G K G Q T E N C L T K A

AAGATTGAGACGGTCCGCAAAGTCTTTCTCCCCTATACACCAGGAATGAGACATACGTC 1200
K I E T V R K V F S P L Y T T N E T Y V

TACCCTCGAGCGGTTCTCTGGTCTAACGCTCTCTTTAACTTTGTGTGCGCCGAGACCA 1260
Y P R A V P G A N A L F N F V V A E T P

TTCGTTTACTCCACAGAATGGTACCAGTATGTCATCTGGGAAGACCCTGAGTGGAATCCT 1320
F V Y S T E W Y Q Y V I W E D P E W N P

GACACTATTGGGCCCAAGGACTATGATAGAGGTGCCGAGATGAACCCCTATGACATTGAG 1380
D T I G P K D Y D R G A E M N P Y D I E

ACTTGGGAGGGAGACCTGTCTAAGTTCGCAAGCGTGGCAACAAGATGATTCACTGGCAC 1440
T W E G D L S K F R K R G N K M I H W H

GGCCTTCAGGACGGACTCATCAGCGCCGAGAACTCAGACGATTATTATAATCACGTGTCT 1500
G L Q D G L I S A E N S D D Y Y N H V S

CGAACAATGGGCTCAATAGTAGCCAGCTGGACCAGTTTATAGGTTCTTCCGCGTCAGT 1560
R T M G L N S S Q L D Q F Y R F F R V S

GGGTGTGGCCATTGCAGCGCCGAGACGGGGCTTCTCGCATTGGAACAACGCCGGAAC 1620
G C G H C S A G D G A S R I G N N A G N

ATGGGCGGCAAGACGGCAGATACTAATGTGCTTCTGGCTATTGTAAGTGGGTCGAGGAA 1680
M G G K T A D T N V L L A I V K W V E E
[与 20 mer 探针互补]
ggCGTTGCGCCAGAAACGATTGGGGGCTACAAGAACGTCGGCGGAACTGCAGATGGCGCT 1740
G V A P E T I G G Y K N V G G T A D G A

TTTGACTATGAGCGTAGGCATTGCCGATACCCACACCGCAATGTCTGGGACGGGAAGGG 1800
F D Y E R R H C R Y P H R N V W D G K G

AATGTGAAGGATCCCGATAGCTGGAAGTGTAAAGATCTGAGGTGTGGCCCTAGGCTTTTGT 1860
N V K D P D S W N C K I *

GGCTGTCCGTAGGTGGCATACTATATAAGAGGATCACTGTGAACATGCTTTATGTTGTG 1920
CAAGAATGATTGAGAATCAGATTGAGCTTGCGAGGCCAAGGCAAATAGACCCAACTGTT 1980
GACGAGATCTTGGCCGAAGGTAGAGGCAACGGGGAGAGAGACCATGGAAGACAAGGCGTA 2040
GAAAATGGCCGGGAAGACGGGCTGTGCGCGATGGAGTAGCAACAGCTGTCACTGGTGGT 2100
CAATGACTACACTTCTGAGCGGCGAGAGATTATAGGGACCGCACACAGGCCATCATTTCC 2160
CGATAACTAATGGAGACGCAATGGAGCGATGTTTAAATGCGACAAGACTGCCATCATCTA 2220
GGTACTTCATGCGTCGCTAAACGCACCAATGCTGCGCTGCTCATGATTGTAACTTAGTT 2280
TATA 2284

```

图 8

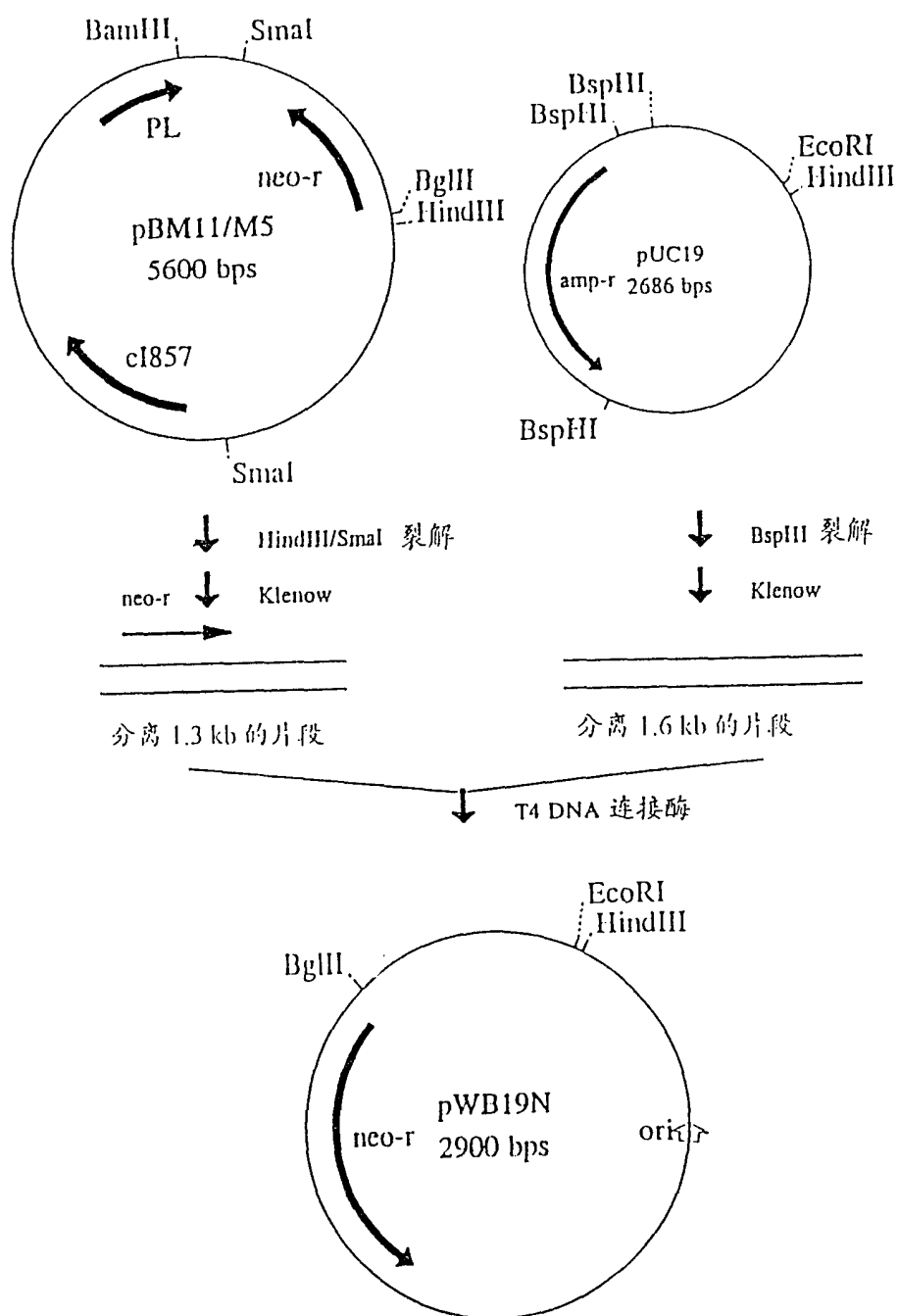


图 9

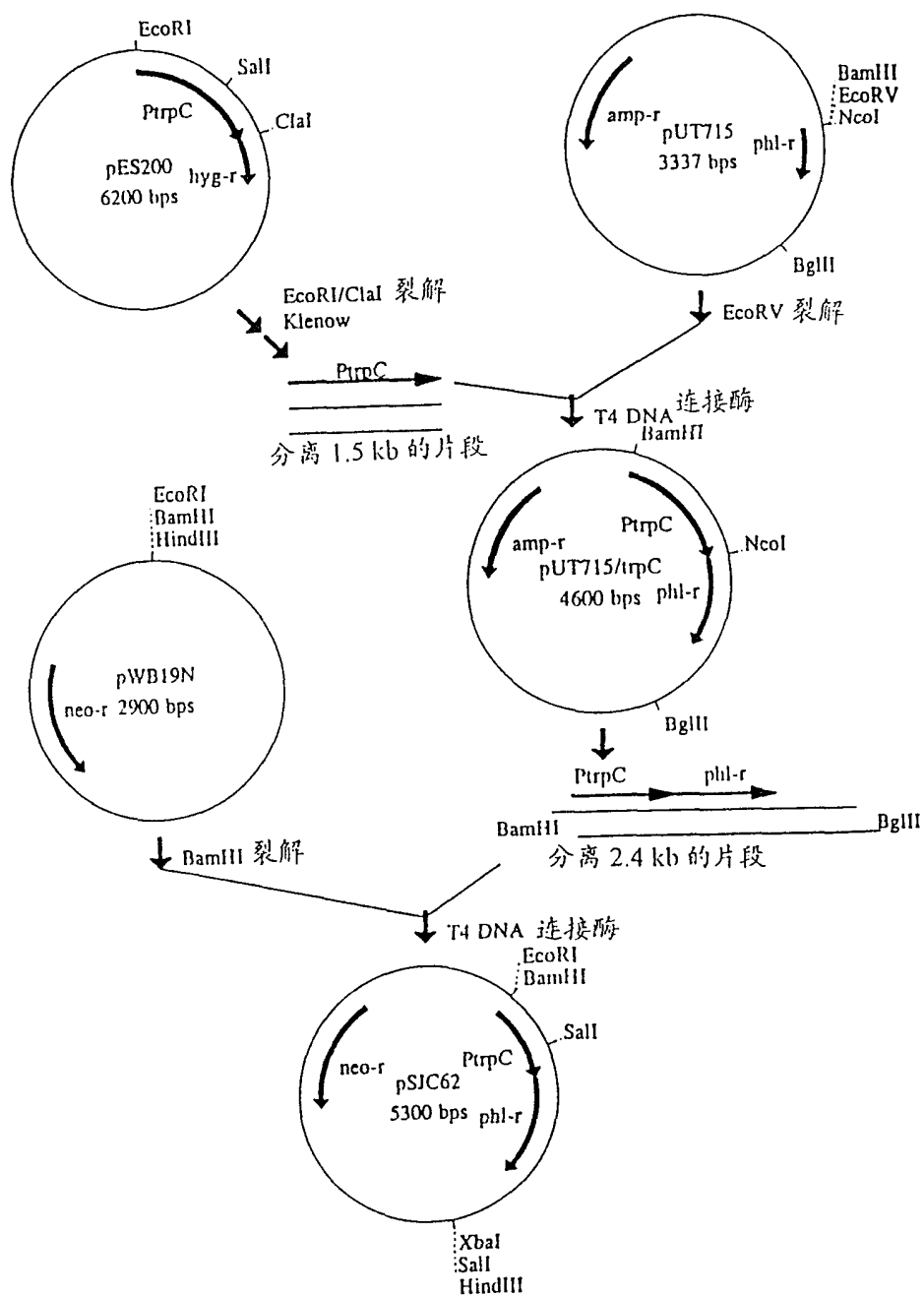


图 10

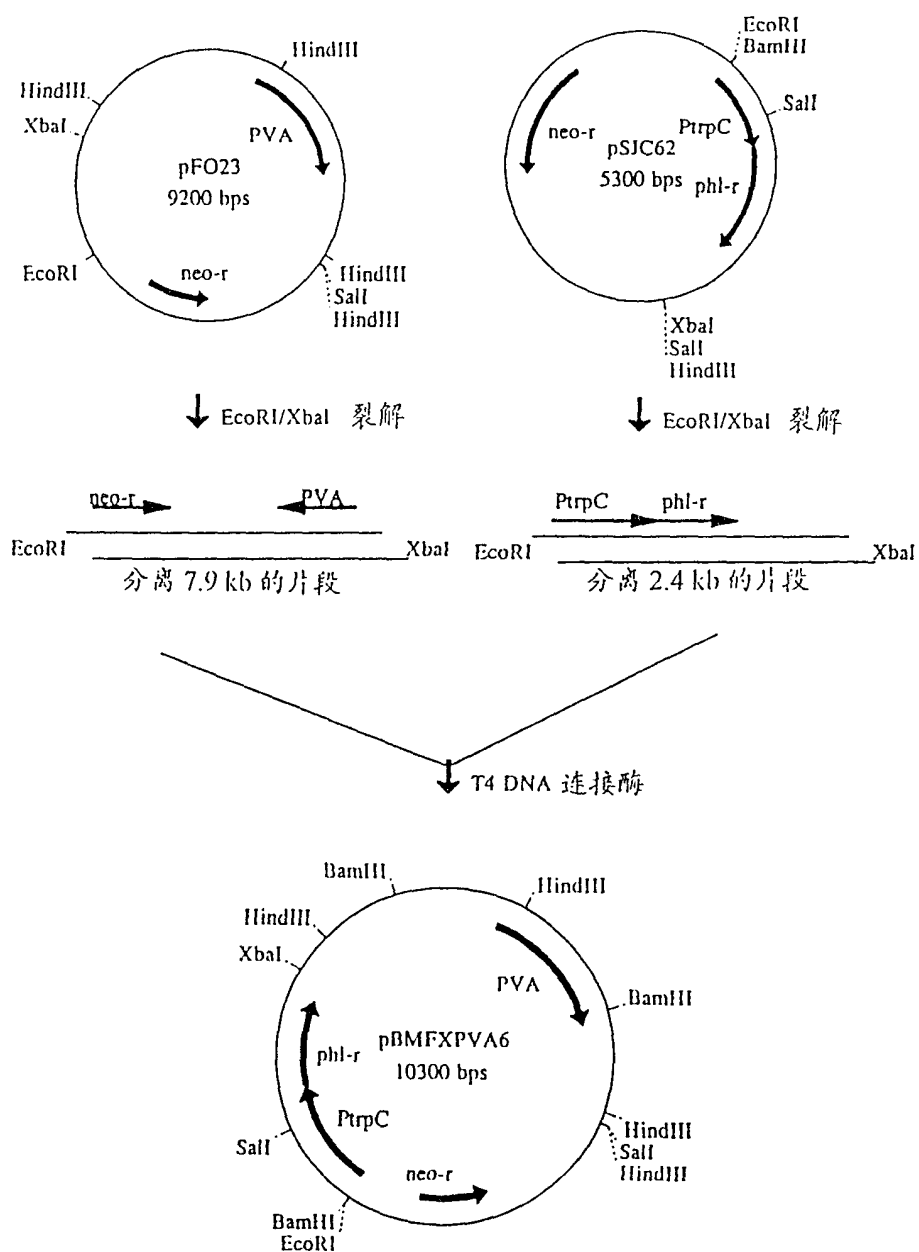


图 11

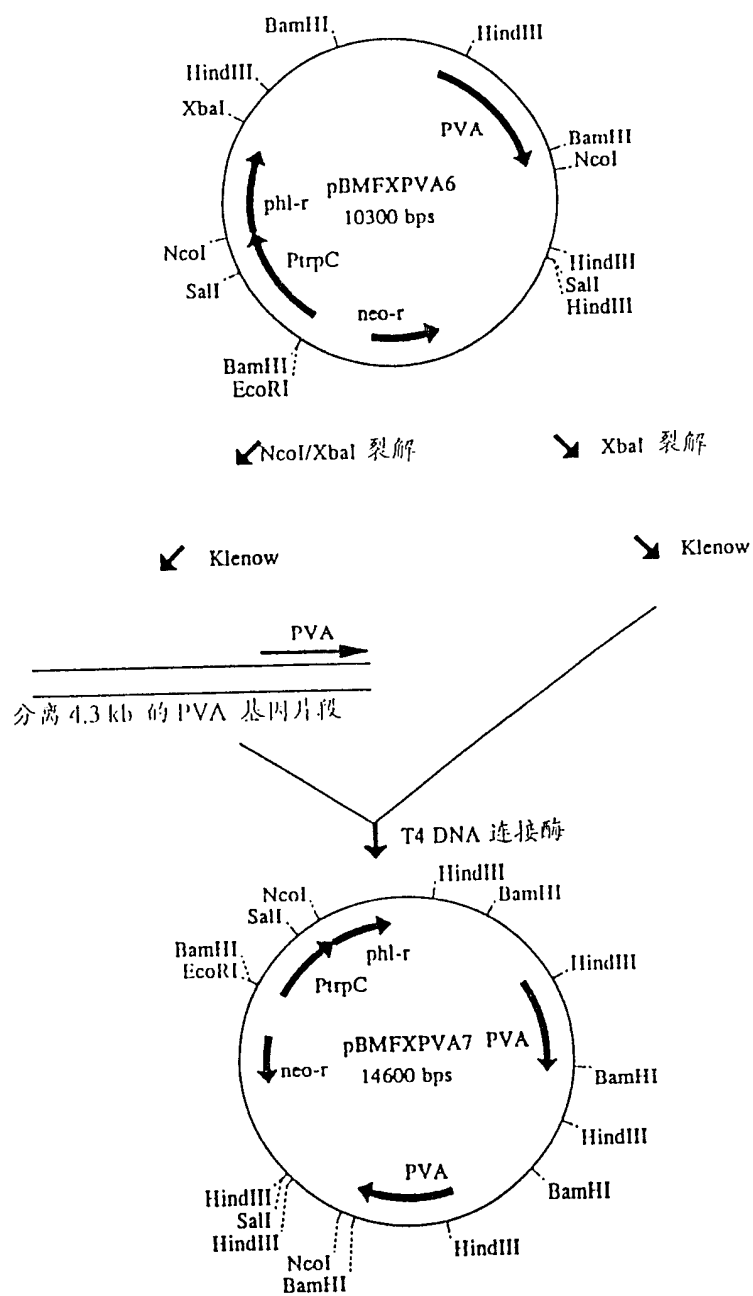


图 12

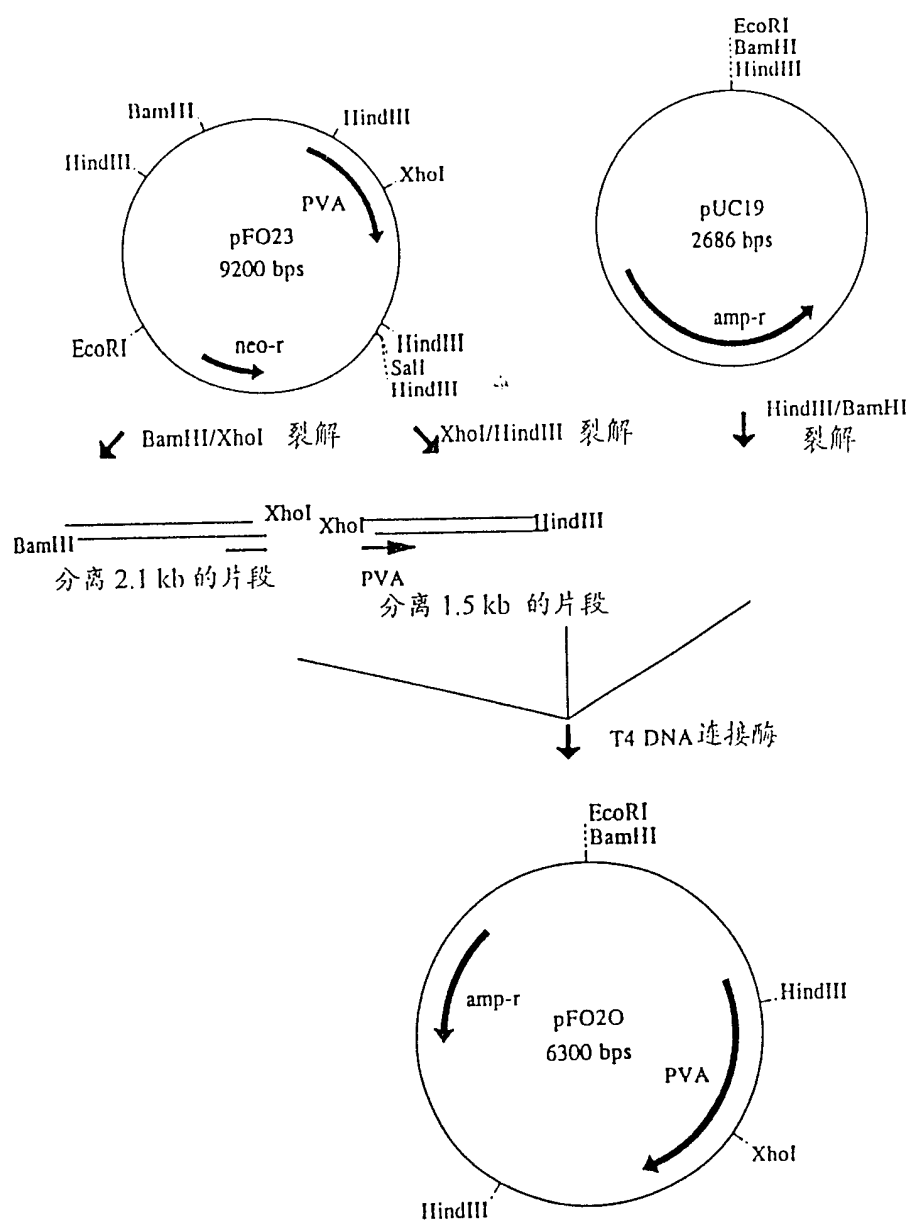


图 14

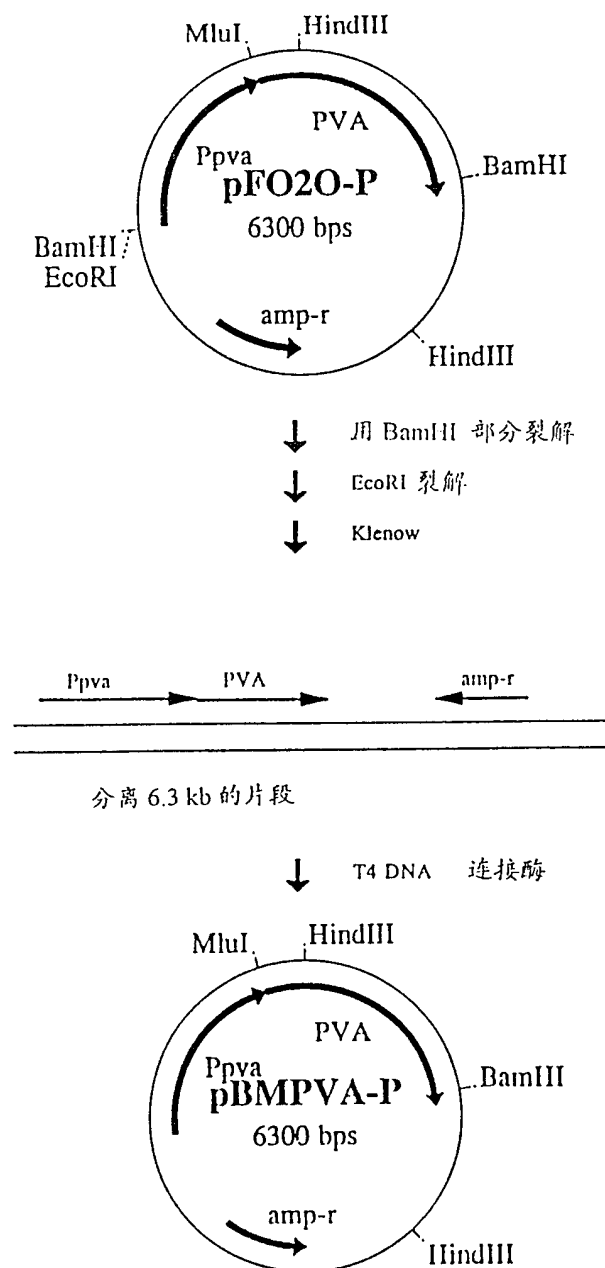


图 15

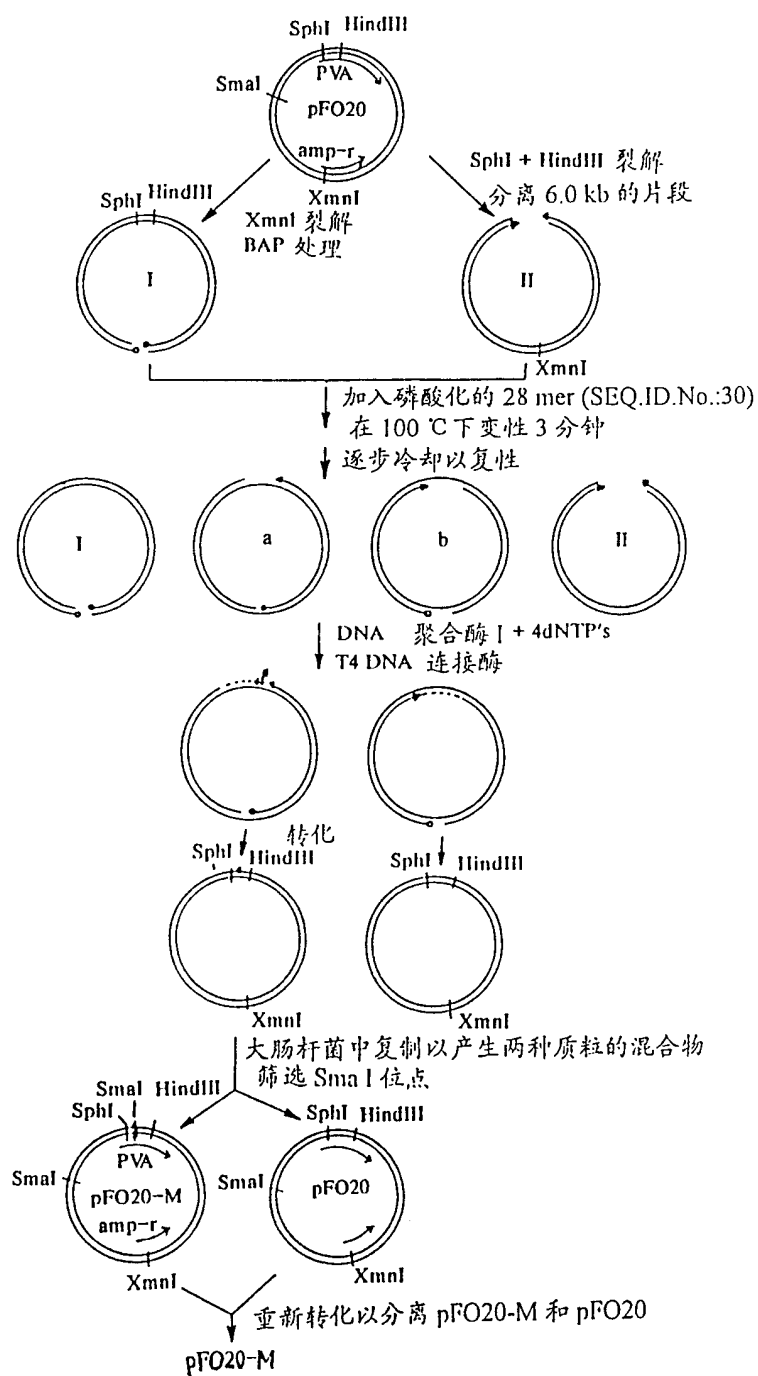


图 16

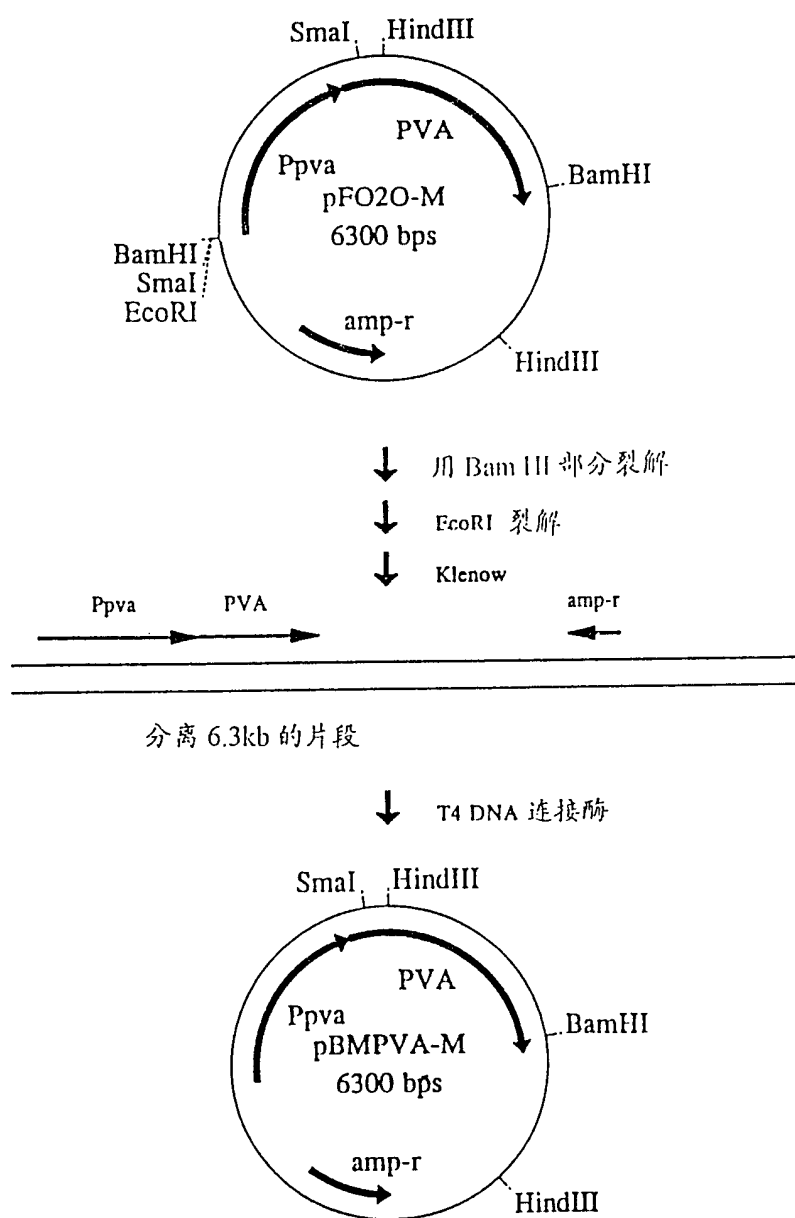


图 17

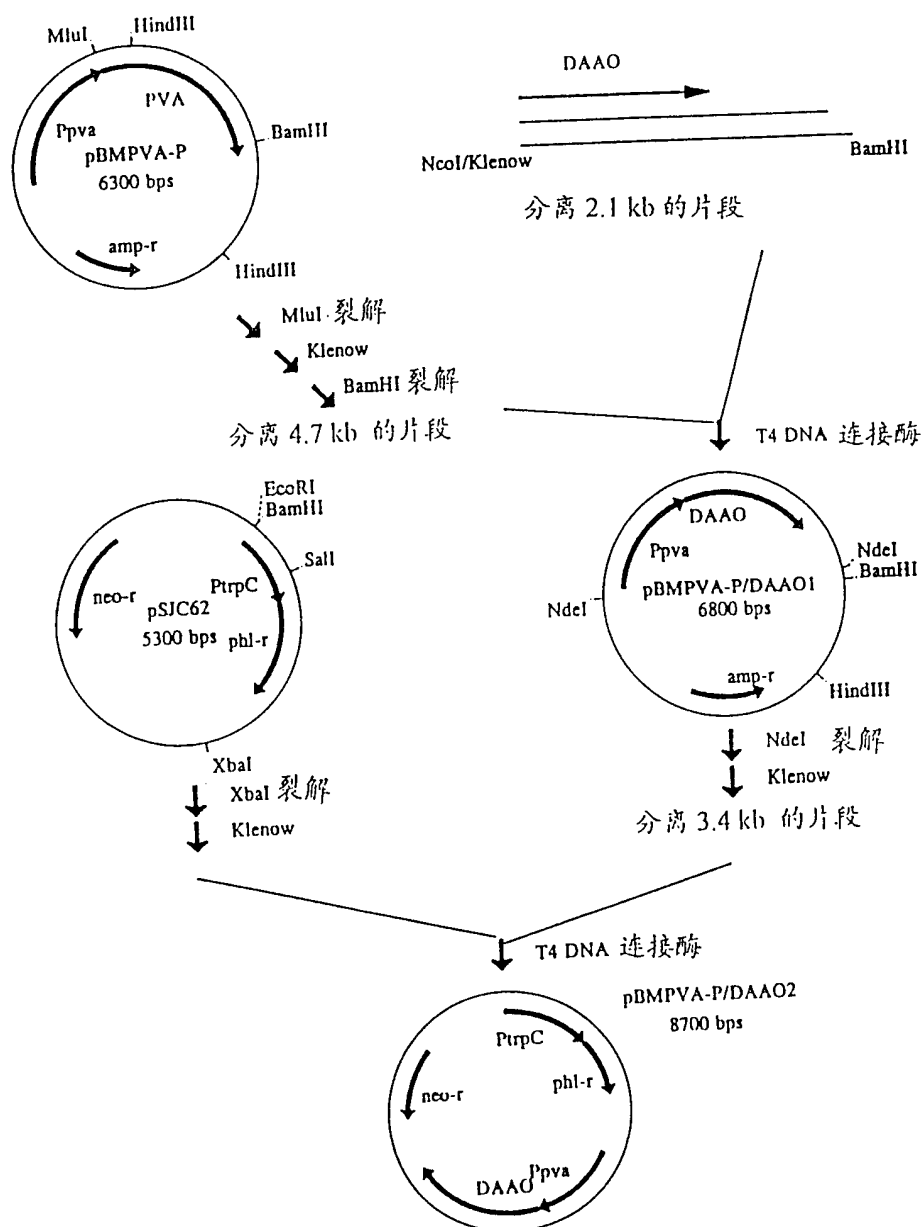


图 18

