



(45) 授权公告日 2011.09.28

陈燕

代理人 巫肖南 封新琴

C12N 9/88 (2006.01)

序列表 10 页 附图 18 页

指导 B2:B1 除虫菌素比例的除虫链霉菌基因

(57) 摘要

本发明涉及含有编码 AveC 基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子,该多核苷酸分子可被用于改变除虫链霉菌发酵培养物中所产生的除虫菌素 2 类:1 类的比例或量。本发明进一步涉及除虫链霉菌的载体、宿主细胞和突变菌株,其中 AveC 基因已失活或突变以改变所产生的除虫菌素 2 类:1 类的比例或量。

1 TCAAGACACGGACACACACACACACGAAGATGAGACAGGATGACCTCTTCAGAGCGCTCCGCTCCGACACGATGTTATGTAACACCGACGCTCT
100
101 CTTGCTCCCTCCGCTACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
200
201 CAGTCTCCCTCCGCTACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
300
301 AAGACGACATACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
400
401 CCGTCTCCCTCCGCTACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
500
501 TGGCGCGCTCCGCTACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
600
601 NCGAGCTCCGCTACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
700
701 CTTGCTCCCTCCGCTACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
800
801 CTCTGCTCCCTCCGCTACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
900
901 GAGTCTCCCTCCGCTACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
1000
1001 TGGCGCGCTCCGCTACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
1100
1101 CCGTCTCCCTCCGCTACAGGATGAGTCTTCAGCGCTCGAGGCGCGACAGCTGCTGATGACAGAGAGCGAGCGAGGCTAGAGGCGAGCGAGGCT
1200
1201 CAGACACACCTCTCGCTGAGCATGATG

1. 一种多核苷酸分子或其简并变体,该多核苷酸分子在图1中的SEQID NO:1所示除虫链霉菌aveC ORF的核苷酸序列中包含突变,所述突变编码相应于SEQ ID NO:2氨基酸位置上的氨基酸残基的氨基酸取代的组合,使得具有如下特征的除虫链霉菌ATCC 53692株的细胞能产生具有如下特征的除虫菌素,该除虫链霉菌ATCC 53692株的特征为野生型aveC等位基因已失活并表达含所述突变型核苷酸序列的多核苷酸分子,所述除虫菌素的特征为其中2类:1类除虫菌素的比例相对于仅表达野生型aveC等位基因的除虫链霉菌ATCC 53692株的细胞而言降低,其中当所述2类:1类除虫菌素为环己基B2:环己基B1除虫菌素时,所述2类:1类除虫菌素的比例为0.2:1或更低,并且其中氨基酸取代的组合包含位于D48和G179的取代,其中所述氨基酸取代的组合选自:

(da)S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, F278L, P289L;

(db)S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, P289L;

(dc)D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V;

(dd)D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V;

(de)D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L;

(df)D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q;

(dg)D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;

(dh)D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L;

(di)Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;

(dj)D48E, A61T, L87V, A89T, W110L, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;

(dk)D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L;

(dl)D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D;

(ea)D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;

(eb)D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V;

(ec)Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;

(ed)D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;

(ee)V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;

(ef)D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V, A302T;

(eg)D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, P289L;

(eh)D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, A302T;

(ei)D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;

(ej)D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D;

(ek)V2M, D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;

(el)D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V;

(em)D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D;

(en)D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, I280V ;

(eo)D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L ;

(ep)D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L ;

(eq)D48E, R71L, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D ;

(er)D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D ;和

(es)D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D。

2. 权利要求 1 的多核苷酸分子或其简并变体,其中所述氨基酸取代的组合为 :

ea)D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V。

3. 一种重组载体,其包含权利要求 1 或 2 的多核苷酸分子或其简并变体。

4. 一种宿主细胞,其含有权利要求 3 的重组载体,该宿主细胞为链霉菌细胞。

5. 权利要求 4 的宿主细胞,其为除虫链霉菌细胞。

6. 一种产生除虫链霉菌菌株的方法,包括:(i) 使除虫链霉菌菌株的细胞中 SEQ ID NO :1 所示除虫链霉菌 aveC ORF 的核苷酸序列中包含突变,所述突变编码相应于 SEQ ID NO :2 氨基酸位置上的氨基酸残基的氨基酸取代组合,或(ii) 向除虫链霉菌菌株的细胞中引入多核苷酸分子或其简并变体,所述多核苷酸分子在 SEQ ID NO :1 所示除虫链霉菌 aveC ORF 的核苷酸序列中包含突变,该多核苷酸分子或其简并变体编码包含相应于 SEQ ID NO :2 氨基酸位置上的氨基酸残基的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物,其中包含突变的多核苷酸分子或其简并变体的细胞能够以 0.2 : 1 或更低的比例生产环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素,并且其中氨基酸取代的组合包含位于 D48 和 G179 的取代,其中 AveC 基因产物中的氨基酸取代的组合选自 :

(da)S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V 196A, E238D, F278L, P289L ;

(db)S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, P289L ;

(dc)D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V ;

(dd)D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V ;

(de)D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L ;

(df)D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q ;

(dg)D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L ;

(dh)D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L ;

(di)Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L ;

(dj)D48E, A61T, L87V, A89T, W110L, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L ;

(dk)D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L ;

(dl)D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D ;

(ea) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;
(eb) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V ;
(ec) Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;
(ed) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;
(ee) V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;
(ef) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V, A302T ;
(eg) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, P289L ;
(eh) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, A302T ;
(ei) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;
(ej) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D ;
(ek) V2M, D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;
(el) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;
(em) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D ;
(en) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, I280V ;
(eo) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L ;
(ep) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L ;
(eq) D48E, R71L, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D ;
(er) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D ;和
(es) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D。
7. 链霉菌细胞, 所述细胞包含多核苷酸分子或其简并变体, 该多核苷酸分子在图 1 中的 SEQ ID NO :1 所示除虫链霉菌 *aveC* ORF 的核苷酸序列中包含突变, 所述多核苷酸分子或其简并变体编码含有相应于 SEQ ID NO :2 氨基酸位置上的氨基酸残基的选自下组的氨基酸取代组合的 *AveC* 基因产物, 并且其中包含所述多核苷酸分子或其简并变体的细胞能够以 0.2 : 1 或更低的比例生产环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素 :
(da) S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, F278L, P289L ;
(db) S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, P289L ;
(dc) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V ;
(dd) D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V ;
(de) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L ;
(df) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q ;
(dg) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L ;
(dh) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L ;
(di) Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A,

E238D, P289L ;

(dj) D48E, A61T, L87V, A89T, W110L, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L ;

(dk) D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S, G179S, V196A, E238D, P289L ;

(dl) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D ;

(ea) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;

(eb) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V ;

(ec) Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;

(ed) D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;

(ee) V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;

(ef) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V, A302T ;

(eg) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, P289L ;

(eh) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, E238D, A302T ;

(ei) D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;

(ej) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D ;

(ek) V2M, D48E, R71L, A89T, L136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;

(el) D48E, A61T, R71L, A89T, L136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V ;

(em) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D ;

(en) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, I280V ;

(eo) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D,

V285G, P289L ;

(ep) D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G,

P289L ;

(eq) D48E, R71L, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D ;

(er) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D ;和

(es) D48E, R71L, A89T, V120A, L136P, T149S, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D。

8. 权利要求 7 的细胞, 其为除虫链霉菌细胞。

9. 生产除虫菌素的方法, 包含在允许或诱导除虫菌素从其中生产的条件下, 在培养基中培养权利要求 7 的除虫链霉菌细胞的菌株, 并从培养物回收所述除虫菌素。

指导 B2 : B1 除虫菌素比例的除虫链霉菌基因

[0001] 1. 发明领域

[0002] 本发明涉及主要应用于动物健康领域的除虫菌素 (avermectin), 例如 doramectin, 的组合物及有效产生除虫菌素的方法。更具体地, 本发明涉及含有编码 AveC 基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子, 其可用于调节除虫链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 培养物发酵所产生的除虫菌素 2 类 : 1 类的比例。本发明还涉及除虫链霉菌的载体, 转化的宿主细胞, 和新型突变株, 它们的 aveC 基因已突变从而调节所产生的除虫菌素 2 类 : 1 类的比例。

[0003] 2. 发明背景

[0004] 2.1. 除虫菌素

[0005] 链霉菌可产生各种各样的次级代谢产物, 其中包括除虫菌素, 其含有一系列八种相关的能产生有效的抗蠕虫和杀昆虫活性的大环内脂类化合物, 有 16 个成员。这八种截然不同但又密切相关的化合物主要指 : A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a 及 B2b。“a”系列化合物指的是天然除虫菌素, 其在 C25 位的取代基为 (S)- 仲丁基, “b”系列化合物指的是 C25 位的取代基为异丙基的那些化合物。代号“A”及“B”指的是 C5 位取代基分别为甲氧基和羟基的除虫菌素。数字“1”指的是在 C22 位及 C23 位为双键的除虫菌素 ; 而数字“2”为 C22 位有一个氢原子及在 C23 位有一个羟基的除虫菌素。在这些相关的除虫菌素中, B1 型的除虫菌素 (如 doramectin) 被公认为具有最有效的抗寄生虫活性和杀虫活性, 因而也是最具商业前景的除虫菌素。

[0006] 除虫菌素及其由除虫链霉菌菌株需氧发酵而生产的方法在美国专利 4,310,519 及 4,429,042 中都已描述。一般认为天然除虫菌素的生物合成可以通过异丁酸及 S-(+)-2- 甲基丁酸的辅酶 A 硫酯类似物来内源启动。

[0007] 经过随机诱变进行菌株改进并联合使用外源提供的脂肪酸可以有效生产除虫菌素类似物。支链 2- 氧酸脱氢酶缺陷的除虫链霉菌突变体 (bkd 缺陷突变体) 只有在发酵中补充有脂肪酸时才能产生除虫菌素。筛选和分离支链脱氢酶活性缺陷的突变体 (如除虫链霉菌, ATCC 53567) 在欧洲专利 (EP) 276103 中已有描述。在有外源提供脂肪酸的情况下发酵这些突变体, 导致仅产生四种对应于所用的脂肪酸的除虫菌素。因此, 用 S-(+)-2- 甲基丁酸补充除虫链霉菌 (ATCC 53567) 发酵, 结果产生天然除虫菌素 A1a, A2a, B1a 及 B2a ; 用异丁酸补充发酵, 结果产生天然除虫菌素 A1b, A2b, B1b 及 B2b ; 而用环戊烷羧酸补充发酵, 结果产生四种新型的环戊基除虫菌素 A1, A2, B1 及 B2。

[0008] 用其它脂肪酸补充发酵可以产生新的除虫菌素。通过筛选 800 多种潜在的前体, 已经鉴定出 60 多种其它新的除虫菌素 (例见 Dutton 等, 1991, J. Antibiot., 44 : 357-365 ; 和 Banks 等, 1994, Roy. Soc. Chem. 147 : 16-26)。此外, 5-O- 甲基转移酶活性缺陷的除虫链霉菌突变体基本上只产生 B 类除虫菌素, 因而, 同时缺少支链 2- 氧酸脱氢酶及 5-O- 甲基转移酶活性的除虫链霉菌突变体对应于补充发酵所用的脂肪酸仅生产出 B 类除虫菌素。因此, 用 S-(+)-2- 甲基丁酸补充这类双重突变体发酵, 结果仅产生天然除虫菌素 B1a 及 B2a, 而用异丁酸或环戊烷羧酸补充发酵则可以分别产生天然除虫菌素 B1b 及 B2b 或新型环戊

基 B1 及 B2 除虫菌素。用环己烷羧酸补充该双重突变体菌株是产生商业上重要的新型除虫菌素环己基除虫菌素 B1(doramectin) 的优选方法。这类双重突变体如除虫链霉菌 (ATCC 53692) 的分离及特性描述在 EP 276103 中。

[0009] 2.2. 参与除虫菌素生物合成的基因

[0010] 在很多情况下,涉及次级代谢产物生产的基因及编码一种具体抗菌素的基因在染色体上的位置常常是簇集在一起的。例如,链霉菌聚酮化合物合成酶基因簇 (PKS) (见 Hopwood 和 Sherman, 1990, Ann. Rev. Genet., 24 :37-66)。因此,对生物合成途径中的基因进行克隆的一个策略是,分离抗药性基因及然后检测染色体上相邻区域中其它与该具体抗生物素的生物合成相关的基因。另外一种克隆重要代谢产物生物合成之相关基因的策略是突变体互补。例如,将来自能产生具体代谢产物的生物体的 DNA 文库部分引入不产生该代谢产物的突变体,并筛选产生该代谢产物的转化株。另外,利用来自其它链霉菌的探针进行文库杂交的方法已被用于鉴别及克隆生物合成途径中的基因。

[0011] 涉及除虫菌素生物合成的基因 (ave 基因),象链霉菌其它次级代谢物 (例如,PKS) 的生物合成所必需的基因一样,是簇集于染色体上的。目前已使用载体成功克隆了许多 ave 基因来弥补除虫菌素生物合成受阻的除虫链霉菌突变体。这些基因的克隆在美国专利 5,252,474 中已有描述。此外,Ikeda 等,1995, J. Antibiot. 48 :532-534 描述了涉及 C22, C23 脱水步骤的染色体区域 (aveC) 定位在除虫链霉菌的 4.82Kb BamHI 片段上,并描述了产生单一组份 B2a 生产者的 aveC 基因突变。由于双氢除虫菌素 (ivermectin, 一种潜在的抗蠕虫化合物) 能由除虫菌素 B2a 化学合成,故认为该除虫菌素 B2a 的单一组分生产者对于双氢除虫菌素的商业生产特别有用。

[0012] 2001 年 6 月 19 日授予 Stutzman-Engwall 等的美国专利 6,248,579,描述了除虫链霉菌 aveC 基因的一些突变,它们导致环己基 B2 : 环己基 B1 的比例减少到约 0.75 : 1。

[0013] 2001 年 2 月 22 日公开的辉瑞产品公司 (Pfizer Products Inc.) 的 PCT 申请 WO 01/12821,描述了除虫链霉菌 aveC 基因的另一一些突变,它们导致环己基 B2 : 环己基 B1 的比例减少到约 0.40 : 1。

[0014] 鉴定出 aveC 基因中导致进一步减小除虫菌素生产的复杂度的突变或突变组合,例如,进一步降低除虫菌素 B2 : B1 比率的突变,可以简化商业上重要的除虫菌素的生产及纯化。

[0015] 3. 发明简述

[0016] 本发明提供了一种多核苷酸分子,其含有与除虫链霉菌 aveC 等位基因相同的核苷酸序列,与质粒 pSE186 (ATCC 209604) 上编码除虫链霉菌 AveC 基因产物的序列相同的核苷酸序列,或与图 1 (SEQ ID NO :1) 所示除虫链霉菌 aveC ORF 相同的核苷酸序列,或其简并变体,但所述核苷酸序列还包含编码氨基酸取代组合的突变,所述取代发生在对应于 SEQ ID NO :2 的氨基酸位置的氨基酸残基上,使除虫链霉菌 ATCC 53692 中失活了野生型 aveC 等位基因、且表达含有突变核苷酸序列的多核苷酸分子的那些细胞,相对于仅表达野生型 aveC 等位基因的除虫链霉菌 ATCC 53692 细胞而言,产生的除虫菌素 2 类 : 1 类的比例下降,其中当除虫菌素 2 类 : 1 类为环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时,除虫菌素 2 类 : 1 类的比例为 0.35 : 1 或更低。在一优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.30 : 1 或更低。在一更优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约

为 0.25 : 1 或更低。在一更优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.20 : 1 或更低。

[0017] 在一个具体实施方案中,氨基酸取代组合包含选自下组的组合 :

[0018] (a) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L ;

[0019] (b) G40S, D48E, L136P, G179S, E238D ;

[0020] (c) D48E, L136P, R163Q, G179S ;

[0021] (d) D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D ;

[0022] (e) D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D ;

[0023] (f) D48E, L136P, G179S, E238D ;

[0024] (g) D48E, A61T, L136P, G179S, E238D ;

[0025] (h) D48E, A61T, L136P, G179S ;

[0026] (i) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S ;

[0027] (j) D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L ;

[0028] (k) D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L ;

[0029] (l) D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L ;

[0030] (m) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L ;

[0031] (n) D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L ;

[0032] (o) Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D ;

[0033] (p) D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L ;

[0034] (q) D48E, L136P, G179S, R250W ;

[0035] (r) D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S ;

[0036] (s) D48E, L136P, G179S, A198G, P289L ;

[0037] (t) D48E, F78L, A89T, L136P, G179S ;

[0038] (u) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L ;

[0039] (v) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S ;

[0040] (w) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L ;

[0041] (x) D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S ;

[0042] (y) D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D ;

[0043] (z) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L ;

[0044] (aa) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S ;

[0045] (ab) D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L ;

[0046] (ac) D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D ;

[0047] (ad) D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D ;

[0048] (ae) G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L ;

[0049] (af) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D ;

[0050] (ag) D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D ;

[0051] (ah) S41G, D48E, A89T, L136P, G179S ;

[0052] (ai) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S ;

[0053] (aj) D48E, A89T, L136P, G179S, F234S ;

- [0054] (ak) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D ;
- [0055] (al) Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D ;
- [0056] (am) D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S ;
- [0057] (an) D48E, A89T, S138T, G179S ;
- [0058] (ao) D48E, A89T, L136P, G179S, E238D ;
- [0059] (ap) D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D ;
- [0060] (aq) D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L ;
- [0061] (ar) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D ;
- [0062] (as) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L ;
- [0063] (at) D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L ;
- [0064] (au) D48E, A89T, L136P, G179S ;
- [0065] (av) D48E, A89T, V120A, L136P, G179S ;
- [0066] (aw) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D ;
- [0067] (ax) D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D ;
- [0068] (ay) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L ;
- [0069] (az) D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D ;
- [0070] (ba) D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A ;
- [0071] (bb) D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L ;
- [0072] (bc) D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L ;
- [0073] (bd) D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L ;和
- [0074] (be) D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D。
- [0075] 本发明还提供了一种多核苷酸分子,其含有与除虫链霉菌 *aveC* 等位基因相同的核苷酸序列,与质粒 pSE186 (ATCC 209604) 上编码除虫链霉菌 *AveC* 基因产物的序列相同的核苷酸序列,或与图 1 (SEQ ID NO :1) 所示除虫链霉菌 *aveC* ORF 相同的核苷酸序列,或其简并变体,但所述核苷酸序列还包含编码氨基酸取代组合的突变,所述取代发生在对应于 SEQ ID NO :2 的氨基酸位置的氨基酸残基上,导致除虫链霉菌 ATCC 53692 中失活了野生型 *aveC* 等位基因、且表达含有突变核苷酸序列的多核苷酸分子的那些细胞,相对于仅表达野生型 *aveC* 等位基因的除虫链霉菌 ATCC 53692 细胞而言,产生的除虫菌素 2 类 : 1 类的比例下降,其中当除虫菌素 2 类 : 1 类为环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时,除虫菌素 2 类 : 1 类的比例约为 0.40 : 1 或更低,且其中氨基酸取代组合包含选自下组的组合 :
- [0076] (bf) D48E, S138T, A139T, G179S, E238D ;和
- [0077] (bg) Y28C, Q38R, D48E, L136P, G179S, E238D。
- [0078] 本发明还提供了含有本发明多核苷酸分子的重组载体。
- [0079] 本发明还提供了含有本发明的多核苷酸分子或重组载体的宿主细胞。在一优选实施方案中,所述宿主细胞是链霉菌细胞。在一个更优选的实施方案中,所述宿主细胞是除虫链霉菌细胞。
- [0080] 本发明还提供了一种制备除虫链霉菌新菌株的方法,包括 (i) 使除虫链霉菌菌株的细胞的 *aveC* 等位基因发生突变,该突变导致 *AveC* 基因产物中出现氨基酸取代组合,或 (ii) 向除虫链霉菌菌株的细胞中引入突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体,所述突变的

aveC 等位基因或其简并变体编码含有氨基酸取代组合的 AveC 基因产物,其中所述氨基酸取代组合选自上文中列出的 (a)-(be)。

[0081] 本发明还提供了一种制备除虫链霉菌新菌株的方法,包括 (i) 使除虫链霉菌菌株的细胞的 aveC 等位基因发生突变,该突变导致在 AveC 基因产物中的氨基酸取代组合,或 (ii) 向除虫链霉菌菌株的细胞中引入突变的 aveC 等位基因或其简并变体,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有氨基酸取代组合的 AveC 基因产物,其中含有突变的 aveC 等位基因或其简并变体的细胞能产生 0.35 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素。在一个非限制性实施方案中,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (a)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0082] 在一个优选实施方案中,所述环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.30 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (f)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0083] 在一个更优选实施方案中,所述环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.25 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (w)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0084] 在一个更优选实施方案中,所述环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.20 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (ao)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0085] 本发明还提供了一种制备除虫链霉菌新菌株的方法,包括 (i) 使除虫链霉菌菌株的细胞的 aveC 等位基因发生突变,该突变导致在 AveC 基因产物中的氨基酸取代组合,或 (ii) 向除虫链霉菌菌株的细胞中引入突变的 aveC 等位基因或其简并变体,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有氨基酸取代组合的 AveC 基因产物,其中所述氨基酸取代组合选自上文 (bf) 和 (bg) 所列的组。在一个优选实施方案中,含有这样的突变 aveC 等位基因或其简并变体的除虫链霉菌细胞能产生约 0.40 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素。

[0086] 本发明还提供了链霉菌的细胞,它包含突变的除虫链霉菌 aveC 等位基因或其简并变体,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (a)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。在一优选实施方案中,所述链霉菌是除虫链霉菌。

[0087] 本发明还提供了能产生 0.35 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的除虫链霉菌细胞。在一个非限制性实施方案中,所述细胞包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (a)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0088] 在一个优选实施方案中,所述环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.30 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述细胞包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (f)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0089] 在一个更优选实施方案中,所述环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.25 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述细胞包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (w)-(be) 所列的氨基

酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0090] 在一个更优选实施方案中,所述环己基 B2 : 环己基 B 1 除虫菌素的比例约为 0.20 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述细胞包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (ao)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0091] 本发明还提供了链霉菌的细胞,它包含突变的除虫链霉菌 aveC 等位基因或其简并变体,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (bf) 和 (bg) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。在一优选实施方案中,所述链霉菌是除虫链霉菌。在一个更优选实施方案中,所述细胞是能产生约 0.40 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的除虫链霉菌细胞。

[0092] 本发明还提供了产生除虫菌素的方法,包括在允许或诱导产生除虫菌素的条件下,在培养基中培养本发明除虫链霉菌菌株的细胞,并从培养中回收所述除虫菌素。

[0093] 本发明还提供了由除虫链霉菌细胞产生的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的组合物,包括已经培养了细胞的培养基中的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素,其中所述培养基中环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例为 0.35 : 1 或更低,优选约 0.30 : 1 或更低,更优选约 0.25 : 1 或更低,更优选约 0.20 : 1 或更低。在一个具体实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的组合物由表达突变的 aveC 等位基因或其简并变体的除虫链霉菌菌株的细胞产生,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码的基因产物导致由所述细胞产生的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的 2 类 : 1 类比例,相对于不表达突变的 aveC 等位基因、仅表达野生型 aveC 等位基因的除虫链霉菌相同菌株的细胞而言,比例减少。

[0094] 在一个优选实施方案中,当所述组合物为 0.35 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时,所述组合物由包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体的细胞产生,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (a)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0095] 在一个更优选实施方案中,当所述组合物为约 0.30 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时,所述组合物由包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体的细胞产生,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (f)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0096] 在一个更优选实施方案中,当所述组合物为约 0.25 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时,所述组合物由包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体的细胞产生,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (w)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0097] 在一个更优选实施方案中,当所述组合物为约 0.20 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时,所述组合物由包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体的细胞产生,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (ao)-(be) 所列的氨基酸取代组合的 AveC 基因产物。

[0098] 本发明还提供了由除虫链霉菌细胞产生的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的组合物,其包括已经培养了细胞的培养基中的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素,其中所述培养基中环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.40 : 1 或更低,本发明还提供了由包含突

变的 *aveC* 等位基因或其简并变体的细胞产生的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的组合物, 所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码含有选自上文 (bf) 和 (bg) 所列的氨基酸取代组合的 *AveC* 基因产物。

4. 附图说明

[0099] 图 1. 含有除虫链霉菌 *aveC* ORF 的 DNA 序列 (SEQ ID NO :1) 及其公认的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。

[0100] 图 2. 含有除虫链霉菌 *aveC* 基因完整的 ORF 的质粒载体 pSE186 (ATCC209604)。

[0101] 图 3. 含有插入除虫链霉菌 *aveC* ORF 中的红色糖多孢菌 (*Sacc. Erythraea*) *ermE* 基因的基因取代载体 pSE 180 (ATCC 209605)。

[0102] 图 4. 除虫链霉菌的除虫菌素聚酮化合物合成酶基因簇的 BamHI 限制性酶切图谱, 以及鉴定的五种重叠的粘粒克隆 (即 pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69)。还指示了 pSE118 与 pSE119 的关系。

[0103] 图 5. 除虫链霉菌菌株的发酵产物的 HPLC 分析。通过与环己基 B1 的标准量比较来进行峰定量。环己基 B2 的滞留时间是 7.4-7.7 分钟, 环己基 B1 的滞留时间是 11.9-12.3 分钟。图 5A. 携带失活的 *aveC* ORF 的除虫链霉菌 SE180-11 菌株。图 5B. 用 pSE186 (ATCC 209604) 转化的除虫链霉菌 SE180-11 菌株。图 5C. 用 pSE187 转化的除虫链霉菌 SE180-11 菌株。图 5D. 用 pSE188 转化的除虫链霉菌 SE180-11 菌株。

[0104] 图 6A-M. 汇编列表, 显示由第二轮“基因改组”鉴定的 *aveC* 等位基因突变所编码的氨基酸取代组合, 以及它们对环己基 B2 : 环己基 B1 生产比例的影响。对于每一种质粒而言, 在题为“突变”的栏中, 上面一格列出了氨基酸取代, 下面一格列出了导致这些氨基酸取代的核苷酸碱基改变。括号中的核苷酸碱基改变为沉默改变, 即它们不改变氨基酸序列。

[0105] 5. 发明详述

[0106] 本发明涉及鉴定及表征具有编码除虫链霉菌 *AveC* 基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子, 构建可用于筛选突变的 *AveC* 基因产物对除虫菌素生产的影响的除虫链霉菌新菌株, 并发现一些突变的 *AveC* 基因产物可以降低除虫链霉菌产生的除虫菌素 B2 : B1 的比例。例如, 本发明下文中描述了一种多核苷酸分子, 它具有与质粒 pSE186 (ATCC 209604) 的除虫链霉菌 *AveC* 基因产物编码序列相同的核苷酸序列, 或图 1 (SEQ ID NO :1) 的 ORF 的核苷酸序列, 下文中还描述了具有由上述序列衍生的突变核苷酸序列的多核苷酸分子及其简并变体。但本发明所述原理可以类似地应用于其它多核苷酸分子, 包括来自其它链霉菌例如吸水链霉菌 (*S. hygroscopicus*) 及灰产色链霉菌 (*S. griseochromogenes*) 等的 *aveC* 同源基因。

[0107] 5.1. 编码除虫链霉菌 *AveC* 基因产物的多核苷酸分子

[0108] 本发明提供了一种分离的多核苷酸分子, 其含有除虫链霉菌的完整 *aveC* ORF 或其实质性部分, 该分离的多核苷酸分子缺少处于除虫链霉菌染色体中 *aveC* ORF 所处位置下游的下一个完整 ORF。

[0109] 本发明所述分离的多核苷酸分子优选包括与质粒 pSE186 (ATCC209604) 的除虫链霉菌 *AveC* 基因产物编码序列相同, 或与图 1 (SEQ ID NO :1) 的 ORF 的核苷酸序列或其实质性部分相同的核苷酸序列。本文中, 含有编码除虫链霉菌 *AveC* 基因产物的核苷酸序列的分离

的多核苷酸分子的“实质性部分”指的是一种分离的多核苷酸分子,其至少包括图 1 (SEQ ID NO :1) 所示完整 aveC ORF 序列的约 70%,并且编码功能等效 AveC 基因产物。这里,“功能等效”的 AveC 基因产物被定义为一种基因产物,当其在失活了天然 aveC 等位基因的除虫链霉菌菌株 ATCC 53692 中表达时,导致与仅表达除虫链霉菌菌株 ATCC 53692 的天然野生型功能性 aveC 等位基因的除虫链霉菌菌株 ATCC 53692 相比,产生基本上相同的比例和量的除虫菌素。

[0110] 除了 aveC ORF 的核苷酸序列外,本发明所述分离的多核苷酸分子可以进一步包括天然侧翼于除虫链霉菌原位 aveC 基因的核苷酸序列,例如图 1 (SEQ ID NO :1) 所示的侧翼核苷酸序列。

[0111] 本发明还提供了一种分离的多核苷酸分子,其基于已知的遗传密码简并性包含 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列或其简并变体。

[0112] 本文中,术语“多核苷酸分子”,“多核苷酸序列”,“编码序列”,“开放阅读框”及“ORF”都是指 DNA 分子和 RNA 分子,其可以是单链或双链,当置于适当调控元件的控制之下时,在适当宿主细胞表达系统中可以被转录并翻译 (DNA) 或被翻译 (RNA) 成 AveC 基因产物,或者,被翻译成与 AveC 基因产物同源的多肽。编码序列包括但不限于原核序列,cDNA 序列,基因组 DNA 序列,及化学合成的 DNA 和 RNA 序列。

[0113] 图 1 (SEQ ID NO :1) 所示的核苷酸序列在 bp 位置 42,174,177 及 180 包含四个不同的 GTG 密码子。如美国专利 6,248,579 所示,可构建 aveCORF (图 1;SEQ ID NO :1) 5' 区域的多重缺失,以便帮助确定这些密码子中的哪些能在 aveC ORF 中用作蛋白质表达的起始位点。使 bp 42 位的第一个 GTG 位点缺失并不能消除 AveC 活性。进一步使 bp 位置 174,177 及 180 的所有 GTG 密码子都缺失消除了 AveC 活性,这表明该区域对于蛋白质表达是必须的。本发明因此包括具有不同长度的 aveC ORF。

[0114] 本发明还提供了一种多核苷酸分子,其包含与质粒 pSE186 (ATCC209604) 的除虫链霉菌 aveC 基因产物编码序列同源,或与图 1 (SEQ ID NO :1) 所示 aveC ORF 的核苷酸序列或其实质性部分同源的核苷酸序列。术语“同源”当用于指与除虫链霉菌 AveC 基因产物编码序列同源的多核苷酸分子时,指具有以下核苷酸序列的多核苷酸分子:(a) 与质粒 pSE186 (ATCC 209604) 上除虫链霉菌 AveC 基因产物编码序列编码相同的 AveC 基因产物,或与图 1 (SEQ ID NO :1) 所示 aveC ORF 的核苷酸序列编码相同的 AveC 基因产物,但在所述核苷酸序列中含有一或多个基于遗传密码简并性的沉默改变 (即简并变体);或 (b) 在中度严紧条件下与下述多核苷酸分子的互补序列杂交,并编码上述功能等效 AveC 基因产物,其中所述多核苷酸分子含有编码由质粒 pSE186 (ATCC 209604) 上 AveC 基因产物编码序列所编码的氨基酸序列,或编码图 1 (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列的核苷酸序列,其中所述中度严紧条件也即在 65°C,0.5M NaHPO₄,7% 十二烷基硫酸钠 (SDS),1mM EDTA 中与结合于滤膜上的 DNA 杂交,及在 42°C,在 0.2×SSC/0.1% SDS 中洗涤 (例见 Ausubel 等 (编),1989,Current Protocols inMolecular Biology,Vol.1,Green Publishing Associates, Inc.,和 John Wiley& Sons, Inc.,New York, p.2.10.3)。在优选的实施方案中,同源多核苷酸分子在高度严紧条件下与质粒 pSE186 (ATCC 209604) 中编码 AveC 基因产物的核苷酸序列的互补序列杂交,或与图 1 (SEQ ID NO :1) 所示的核苷酸序列或其实质性部分的互补序列杂交,并编码上述功能等效 AveC 基因产物,其中所述高度严紧条件是指,在 65°C,0.5M

NaHPO₄, 7% SDS, 1mMEDTA 中与结合于滤膜上的 DNA 杂交, 及在 68°C, 在 0.1×SSC/0.1% SDS 中洗涤 (Ausubel 等, 1989, 见上文)。

[0115] AveC 基因产物及其潜在的功能等效物的活性, 可以通过对发酵产物进行 HPLC 分析来测定, 见下文实施例。含有编码除虫链霉菌 aveC 基因产物之功能等效物的核苷酸序列的多核苷酸分子, 包括天然存在于除虫链霉菌其它菌株的 aveC 基因, 存在于链霉菌其它种的 aveC 同源基因, 及突变的 aveC 等位基因, 不管是天然的还是人工合成的。

[0116] 本发明还提供了一种多核苷酸分子, 其包含编码多肽的核苷酸序列, 所述多肽具有与质粒 pSE186 (ATCC 209604) 的 AveC 基因产物编码序列编码的氨基酸序列同源, 或与图 1 (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列或其实质性部分同源的氨基酸序列。本文中, 图 1 (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列的“实质性部分”是指一种多肽, 它包括图 1 (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列的至少约 70%, 并且组成了上述功能等效 AveC 基因产物。

[0117] 本文用来描述与除虫链霉菌 AveC 基因产物之氨基酸序列同源的氨基酸序列时, 术语“同源”指一种多肽, 它含有图 1 (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列、但其中一或多个氨基酸残基已被不同的氨基酸残基保守取代, 其中所述氨基酸序列与质粒 pSE186 (ATCC 209604) 上 AveC 基因产物编码序列编码的多肽、或与图 1 (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列相比, 具有按照任何标准氨基酸序列同一性算法如 BLASTP 算法 (GENBANK, NCBI) 所确定的至少约 70%, 更优选至少约 80%, 最优选至少约 90% 的氨基酸序列同一性, 其中所述保守氨基酸取代产生了功能等效的基因产物, 如上述定义。保守氨基酸取代是本领域众所周知的。进行这类取代的规则参见 Dayhof, M. D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D. C., Vol. 5, Sup. 3 等。更具体地, 保守氨基酸取代是通常在一族具有相关酸性或极性的氨基酸家族中发生的那些。基因编码的氨基酸一般分为四组: (1) 酸性=天冬氨酸, 谷氨酸; (2) 碱性=赖氨酸, 精氨酸, 组氨酸; (3) 非极性=丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 脯氨酸, 苯丙氨酸, 蛋氨酸, 色氨酸; 及 (4) 不带电的极性=甘氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 半胱氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸也可以归类为芳香氨基酸。在任何具体组中的一或多个取代通常对于该多肽的功能没有显著影响, 例如, 亮氨酸被异亮氨酸或缬氨酸取代, 或天冬氨酸被谷氨酸取代, 或苏氨酸被丝氨酸取代, 或任何其它氨基酸残基被结构相关的氨基酸残基 (例如, 具有相似的酸性或极性, 或具有相似性的一些结合的氨基酸残基) 取代。

[0118] 本文公开的多核苷酸分子的生产 and 操作是本领域技术范围内的, 可以按照下述重组技术进行操作, 例如, Maniatis 等, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel 等, 1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrook 等, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Innis 等 (编), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; Erlich (编), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, New York (列入本文作为参考)。编码 AveC 基因产物或 AveC 同源基因产物的多核苷酸克隆可以通过本领域已知的任何方法进行鉴别, 包括但不限于下文第 7 节所列举的方法。通过使用如 Benton 和 Davis, 1977, Science, 196:180 中所述的筛选噬菌体文库的方法和 Grunstein 及 Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

72:3961-3965 所述的筛选质粒文库的方法,可以从基因组 DNA 文库中筛选 aveC 及 aveC 同系物编码序列。具有已知包括 aveC ORF 核苷酸序列的多核苷酸分子,例如存在于质粒 pSE186 (ATCC209604),或质粒 pSE119 中的那些(见下文第 7 节),可以用作这些筛选实验的探针。或者,可以根据纯化的 AveC 同源基因产物的部分或全部氨基酸序列所推出的核苷酸序列,来合成对应的寡核苷酸探针。

[0119] 5.2. 重组系统

[0120] 5.2.1. 克隆与表达载体

[0121] 本发明还提供了重组克隆载体与表达载体,其可用于克隆或表达本发明含有,例如除虫链霉菌 aveC ORF 或任一 aveC 同系物 ORF 的多核苷酸分子。在一非限制性实施方案中,本发明提供了质粒 pSE186 (ATCC209604),其含有除虫链霉菌 aveC 基因的完整 ORF。

[0122] 所有下面有关除虫链霉菌 aveC ORF,或含有除虫链霉菌 aveC ORF 或其部分的多核苷酸分子,或除虫链霉菌 AveC 基因产物的描述,也是指如下所述的突变的 aveC 等位基因,除非明确指明或根据上下文可以看出。

[0123] 已研制出具体用于链霉菌的多种不同载体,包括噬菌体,高拷贝数质粒,低拷贝数质粒,及大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒等,其中任一个都可以用来实践本发明。另外还从链霉菌中克隆了大量药物抗性基因,其中一些基因被掺入载体作为选择性标记。在链霉菌中使用这些载体的例子可参见,如 Hutchinson,1980,Applied Biochem. Biotech.,16:169~190。

[0124] 本发明的重组载体,尤其是表达载体,优选被构建为,使得本发明多核苷酸分子的编码序列与转录或翻译编码序列所必需的一或多个调控元件可操作相连,以便产生多肽。本文所用术语“调控元件”包括但不限于这样的核苷酸序列,其编码诱导型和非诱导型启动子,增强子,操纵子,及本领域已知用于驱动和/或调控多核苷酸编码序列的表达的其它元件。此外,如本文所用,编码序列与一或多个调控元件“可操作相连”,其中这些调控元件有效调节并允许转录编码序列和/或翻译其 mRNA。

[0125] 典型的质粒载体经过改造可以包含本发明的多核苷酸分子,这些载体包括 pCR-Blunt, pCR2.1 (Invitrogen), pGEM3Zf (Promega), 和穿梭载体 pWHM3 (Vara 等,1989, J. Bact.,171:5872-5881) 等。

[0126] 构建含有具体编码序列并使其与适当调控元件可操作相连的重组载体的方法是本领域众所周知的,可使用这些方法实践本发明。这些方法包括体外重组技术,合成技术,和体内基因重组。例见 Maniatis 等,1989,文献同上;Ausubel 等,1989,文献同上;Sambrook 等,1989,文献同上;Innis 等,1995,文献同上;及 Erlich,1992,文献同上中描述的技术。

[0127] 这些载体的调控元件在强度和特异性方面可以不同。根据所用的宿主/载体系统,可使用多种适当的转录及翻译元件中的任一种。对于细菌来说,转录调控区或启动子的非限制性例子包括, β -gal 启动子,T7 启动子,TAC 启动子, λ 左及右启动子,trp 及 lac 启动子,trp-lac 融合启动子,具体对于链霉菌来说,启动子有 ermE, melC, 及 tipA 等。在一个具体实施方案中,制备了一种表达载体,其含有已被克隆在与强组成型启动子相邻的位置上的 aveC ORF 或其突变的 ORF,所述启动子如红色糖多孢菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 的 ermE。按照美国专利 6,248,579 所述,将含有 ermE 启动子的载体转化到除虫链霉菌中,随后对发酵产物进行的 HPLC 分析显示,所产生的除虫菌素的滴度相对于仪表

达野生型 *aveC* 等位基因的相同菌株的产量有所增加。

[0128] 融合蛋白表达载体可用于表达 AveC 基因产物-融合蛋白。纯化的融合蛋白可用于产生抗 AveC 基因产物的抗血清,研究 AveC 基因产物的生化特性,改造具有不同生化活性的 AveC 融合蛋白,或辅助鉴定或纯化所表达的 AveC 基因产物。可能的融合蛋白表达载体包括但不局限于这样的载体,其中掺入了编码 β -半乳糖苷酶的序列及 *trpE* 融合子,麦芽糖结合蛋白融合子,谷胱甘肽-S-转移酶融合子和多组氨酸融合子(运载区域)。在另一实施方案中,AveC 基因产物或其部分可与来源于链霉菌其它种或菌株(例如吸水链霉菌或灰产色链霉菌)的 AveC 同源基因产物或其部分融合。将这种杂合载体转化至除虫链霉菌细胞中,并检测其效应,例如对所产生的除虫菌素 2 类:1 类之比例的影响。

[0129] AveC 融合蛋白经过改造可以含有对纯化有用的区域。例如,AveC-麦芽糖结合蛋白融合可以用直链淀粉树脂纯化;AveC-谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白可以用谷胱甘肽-琼脂糖珠纯化;AveC-多组氨酸融合可以用二价镍树脂纯化。或者,可以用抗载体蛋白或肽的抗体进行融合蛋白的亲纯化。例如,可以将编码单克隆抗体靶表位的核苷酸序列插入表达载体的适当位置处,使其与调控元件可操作相连并使所表达的表位与 AveC 多肽融合。例如,可通过标准技术将编码 FLAG™ 表位标记(International Biotechnologies Inc.)(其为亲水性标记肽)的核苷酸序列插入表达载体中,使其插入位置对应于,例如,AveC 多肽羧基末端。所表达的 AveC 多肽-FLAG™ 表位融合产物然后可以利用商购的抗-FLAG™ 抗体来进行检测及亲和纯化。

[0130] 编码 AveC 融合蛋白的表达载体也可以经过改造而含有编码特异性蛋白酶裂解位点的多接头序列,以使表达的 AveC 多肽在用特异性蛋白酶处理后可以与运载区域或融合配对物脱离。例如,所述融合蛋白载体可以包括编码凝血酶或 Xa 因子酶切位点等的 DNA 序列。

[0131] 位于 *aveC* ORF 上游且与其在同一框内的信号序列,可以利用已知方法插入表达载体中,以便指导所表达的基因产物的运输和分泌。信号序列的非限制性例子包括得自 α 因子,免疫球蛋白,外膜蛋白,青霉素酶和 T 细胞受体等的信号序列。

[0132] 为了帮助选择经过本发明克隆载体或表达载体转化或转染的宿主细胞,可以对所述载体进行改造,以使其进一步包括编码报道基因产物或其它选择标记的序列。优选所述编码序列与上述调控元件编码序列可操作相连。对本发明有用的报道基因是本领域已知的,包括那些编码绿色荧光蛋白,萤光素酶, *xyIE* 以及酪氨酸酶等的报道基因。编码选择标记的核苷酸序列是本领域已知的,包括编码赋予抗生素抗性 or 抗代谢物抗性的基因产物的那些,或提供营养缺陷型需求的那些。这类序列的实例包括编码抗红霉素,硫链丝菌肽(thiostrepton)或卡那霉素等的抗性的那些。

[0133] 5.2.2 宿主细胞的转化

[0134] 本发明进一步提供含有本发明多核苷酸分子或重组载体的经转化的宿主细胞,或由其衍生的新菌株或细胞系。可用于本发明实践中的宿主细胞优选为链霉菌细胞,但也可以用其它原核细胞或真核细胞。这类经转化的宿主细胞一般包括但不局限于微生物,例如经重组噬菌体 DNA、质粒 DNA、或粘粒 DNA 载体转化的细菌,或经重组载体转化的酵母,等等。

[0135] 本发明的多核苷酸分子欲在链霉菌细胞中发挥作用,但也可以被转化至其它细菌或真核细胞中以便实现例如克隆或表达目的。一般使用大肠杆菌菌株,如 DH5 α 菌株,它

可得自美国典型培养物保藏中心 (ATCC), Rockville, MD, USA (保藏号 31343), 或可商购 (Stratagene)。优选的真核宿主细胞包括酵母细胞, 也可以有效利用哺乳动物细胞或昆虫细胞。

[0136] 本发明的重组表达载体优选被引入 (例如, 经转化或转染) 基本上均一培养的一个或多个宿主细胞中。表达载体通常利用已知技术引入宿主细胞, 所述技术如原生质体转化, 磷酸钙沉淀, 氯化钙处理, 显微注射, 电穿孔, 通过与重组病毒接触来进行转染, 脂质体介导转染, DEAE-葡聚糖转染, 转导, 接合, 或微粒轰击 (microprojectile bombardment)。转化子可以用标准方法来选择, 例如, 选择那些表达了与重组载体相关的选择标记 (如抗生素抗性) 的细胞, 如上述。

[0137] 一旦将表达载体引入宿主细胞, aveC 编码序列已整合并维持在宿主染色体上或为游离体形式的事实, 可以用标准技术如 Southern 杂交分析、限制酶分析、PCR (包括逆转录酶 PCR (rt-PCR)) 分析来证实, 或通过用免疫学试验检测预期基因产物来证实。含有和 / 或表达重组 aveC 编码序列的宿主细胞, 可以通过本领域公知的至少四种常规方法中的任一种来证实, 所述方法包括: (i) DNA-DNA, DNA-RNA, 或 RNA-反义 RNA 杂交; (ii) 检测标记基因功能的存在; (iii) 通过测定宿主细胞中 aveC 特异性 mRNA 转录物的表达来评估转录水平, 及 (iv) 通过免疫分析或 AveC 生物活性的存在 (例如, 具体比例和量的除虫菌素的产生表示在, 例如, 除虫链霉菌宿主细胞中存在 AveC 活性) 来测定成熟多肽产物的存在。

[0138] 5.2.3. 重组 AveC 基因产物的表达及鉴定

[0139] 一旦将天然的或突变的 aveC 编码序列稳定引入合适的宿主细胞, 可以使经过转化的宿主细胞无性繁殖, 所得的细胞可以在有助于天然的或突变的 AveC 基因产物最大量生产的条件下进行培养。所述条件通常包括培养细胞直至高密度。当表达载体含有诱导型启动子时, 可以根据诱导表达的需要采用合适的诱导条件, 例如, 温度变化, 使营养耗尽, 添加义务诱导物 (例如, 碳水化合物的类似物, 如异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)), 积累过量的代谢副产物等。

[0140] 当表达的 AveC 基因产物保留在宿主细胞内部时, 收集细胞并裂解, 在本领域已知使蛋白质降解最小化的提取条件下, 例如, 在 4°C 和 / 或有蛋白酶抑制剂存在的条件下, 从裂解物中分离并纯化产物。当表达的 AveC 基因产物从宿主细胞中分泌时, 只需收集耗尽的营养培养基并从中分离产物。

[0141] 表达的 AveC 基因产物, 可利用标准方法从相应的细胞裂解物或培养基中分离或基本上纯化, 所述方法包括但不限于下列方法的任何组合: 硫酸铵沉淀, 大小分级分离, 离子交换层析, HPLC, 密度离心及亲和层析。当表达的 AveC 基因产物表现出生物活性时, 可使用适当试验在纯化步骤的每一步监控所述制剂不断提高的纯度。不管表达的 AveC 基因产物是否表现出生物活性, 都可以依据其大小或与 AveC 特异性抗体的反应性来检测, 或在融合标记的存在下检测。如本文所用, AveC 基因产物当在具体制剂中占蛋白重量比的约 20% 以上时为“基本上纯化”。同样, 如本文所用, AveC 基因产物当在具体制剂中占蛋白重量比的至少约 80% 时是“分离的”。

[0142] 本发明因此提供分离的或基本上纯化的重组表达型除虫链霉菌 AveC 基因产物, 其含有可以被质粒 pSE186 (ATCC 209604) 的 AveC 基因产物编码序列所编码的氨基酸序列, 或图 1 (SEQ ID NO: 2) 所示的氨基酸序列或其实质性部分, 本发明还提供所述基因产物的突

变体和简并变体。

[0143] 本发明还提供了生产 AveC 基因产物的方法,包括在有助于产生重组 AveC 基因产物的条件下,培养经重组表达载体转化的宿主细胞,并从细胞培养物中回收 AveC 基因产物,其中所述载体含有一种多核苷酸分子,该多核苷酸分子具有编码 AveC 基因产物的核苷酸序列并与一或多个控制该多核苷酸分子在宿主细胞中的表达的调控元件可操作相连。

[0144] 重组表达的除虫链霉菌 AveC 基因产物可用于多种目的,包括筛选可以改变 AveC 基因产物功能并因此调节除虫菌素生物合成的化合物,以及产生抗 AveC 基因产物的抗体。

[0145] 一旦获得纯度足够高的 AveC 基因产物,就可以用标准方法进行鉴定,所述方法如 SDS-PAGE,大小排阻层析,氨基酸序列分析,在除虫菌素生物合成途径中产生合适产物的生物活性等等。例如,可以使用标准的肽测序技术测定 AveC 基因产物的氨基酸序列。可以用亲水性分析(例见 Hopp 和 Woods,1981,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 :3824) 或类似的软件运算法来鉴定 AveC 基因产物的亲水区及疏水区,籍此进一步鉴定 AveC 基因产物。可进行结构分析以鉴定 AveC 基因产物中具有特殊二级结构的区域,例如可使用诸如 X- 射线结晶学等生物物理法 (Engstrom,1974, Biochem. Exp. Biol. 11 :7-13),计算机建模 (Fletterick 及 Zoller(编),1986, Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, ColdSpring Harbor, NY), 和核磁共振 (NMR) 来作图并研究 AveC 基因产物与其底物之间相互作用的位点。从这些研究所取得的信息可用于选择 aveC ORF 中的新突变位点,以帮助开发具有更合适的除虫菌素生产特性的除虫链霉菌新菌株。

[0146] 5. 3. aveC 突变体的构建及应用

[0147] 本发明的一个主要目的是鉴定除虫链霉菌 aveC 等位基因中导致 B2 : B1 除虫菌素的比例改变(最优选减少)的新突变。本发明因此提供了可用于产生除虫链霉菌新菌株的细胞的一种多核苷酸分子,所述细胞与仅表达野生型 aveC 等位基因的相同菌株的细胞相比,除虫菌素生产出现可以检测到的改变。在一个优选实施方案中,所述多核苷酸分子可以用于产生除虫链霉菌新菌株的细胞,这种细胞与仅表达野生型 aveC 等位基因的相同菌株的细胞相比,产生具有较低的 2 类 : 1 类比例的除虫菌素。所述菌株的细胞还可以包含其它突变,以便与仅表达单个野生型 aveC 等位基因的相同菌株的细胞相比,产生更多量的除虫菌素。

[0148] aveC 等位基因或编码序列的突变包括下述的任何突变,其在 AveC 基因产物中引入一或多个氨基酸取代、缺失和 / 或添加,或导致 AveC 基因产物截短,或它们的任何组合,且产生所需结果。所述突变的 aveC 等位基因序列还包括它们的任何简并变体。例如,本发明提供以下多核苷酸分子,其包含 aveC 等位基因的核苷酸序列或其简并变体,或包含质粒 pSE186(ATCC 209604) 上的 AveC 基因产物编码序列或其简并变体,或图 1 (SEQID NO :1) 所示除虫链霉菌 aveC ORF 的核苷酸序列或其简并变体,但其进一步含有突变,所述突变编码 AveC 基因产物选定位点的氨基酸取代的组合。在一个非限制性实施方案中,这类取代发生在 AveC 基因产物中对应于 SEQ ID NO :2 的氨基酸位置 25,28,35,36,38,40,41,48,55,61,78,84,89,90,99,107,108,111,120,123,136,138,139,141,154,159,163,179,192,196,198,200,202,220,228,229,230,231,234,238,239,250,252,266,275,278,289 或 298 的一或多个氨基酸位置上。优选将要取代的氨基酸位置的组合包含 D48, A61, A89, L136, S138, A139, R163, G179, V196, A198, E238 和 P289 中的一或多个。特别优选的氨基酸取代组合包

含在 D48 和 G179 的取代,更优选 D48E 和 G179S。导致环己基 B2 : 环己基 B1 比例下降的氨基酸取代组合的具体实例列在图 6A-J 中。

[0149] 本发明因此提供了一种多核苷酸分子,其含有与除虫链霉菌 *aveC* 等位基因相同的核苷酸序列,与质粒 pSE186 (ATCC 209604) 上编码除虫链霉菌 *AveC* 基因产物的序列相同的核苷酸序列,或与图 1 (SEQ ID NO :1) 所示除虫链霉菌 *aveC* ORF 相同的核苷酸序列,或其简并变体,但所述核苷酸序列还包含编码氨基酸取代组合的突变,所述取代发生在对应于 SEQ ID NO :2 的氨基酸位置的氨基酸残基上,使除虫链霉菌 ATCC 53692 中失活了野生型 *aveC* 等位基因、且表达含有上述突变核苷酸序列的多核苷酸分子的那些细胞,相对于仅表达野生型 *aveC* 等位基因的除虫链霉菌 ATCC 53692 细胞而言,产生的除虫菌素 2 类 : 1 类的比例下降,其中当除虫菌素 2 类 : 1 类为环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时,除虫菌素 2 类 : 1 类的比例为 0.35 : 1 或更低。在一优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比率为 0.30 : 1 或更低。在一更优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比率为 0.25 : 1 或更低。在一优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比率为 0.20 : 1 或更低。

[0150] 在一个具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (a) 组的组合 :D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE538 (见图 6)。

[0151] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (b) 组的组合 :G40S, D48E, L136P, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE559。

[0152] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (c) 组的组合 :D48E, L136P, R163Q, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE567。

[0153] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (d) 组的组合 :D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE572。

[0154] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (e) 组的组合 :D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE571。

[0155] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (f) 组的组合 :D48E, L136P, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE501 和 pSE546。

[0156] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (g) 组的组合 :D48E, A61T, L136P, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE510。

[0157] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (h) 组的组合 :D48E, A61T, L136P, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE512。

[0158] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (i) 组的组合 :D48E, A89T, S138T, A139T, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE519。

[0159] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (j) 组的组合 :D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE526。

[0160] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (k) 组的组合 :D48E, A61T, L136P, S 138T, A139F, G179S, E238D, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE528。

[0161] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(l)组的组合:D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE530。

[0162] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(m)组的组合:D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE531。

[0163] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(n)组的组合:D48E, L84P, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE534。

[0164] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(o)组的组合:Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE535。

[0165] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(p)组的组合:D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE542。

[0166] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(q)组的组合:D48E, L136P, G179S, R250W。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE545。

[0167] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(r)组的组合:D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE548。

[0168] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(s)组的组合:D48E, L136P, G179S, A198G, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE552。

[0169] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(t)组的组合:D48E, F78L, A89T, L136P, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE557。

[0170] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(u)组的组合:D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE564 和 pSE565。

[0171] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(v)组的组合:D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE568。

[0172] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(w)组的组合:D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE543。

[0173] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(x)组的组合:D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE504。

[0174] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(y)组的组合:D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE508。

[0175] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(z)组的组合:D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE511。

[0176] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(aa)组的组合:D48E, A89T, S138T, A139T, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE520。

[0177] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ab)组的组合:D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE523。

[0178] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ac)组的组合:D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE527。

[0179] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ad)组的组合:D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE539。

[0180] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ae)组的组合:G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE540。

[0181] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(af)组的组合:D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE547。

[0182] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ag)组的组合:D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE550。

[0183] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ah)组的组合:S41G, D48E, A89T, L136P, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE558。

[0184] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ai)组的组合:D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE563。

[0185] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(aj)组的组合:D48E, A89T, L136P, G179S, F234S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE566。

[0186] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ak)组的组合:D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE573 和 pSE578。

[0187] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(al)组的组合:Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE574。

[0188] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(am)组的组合:D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE575 和 pSE576。

[0189] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(an)组的组合:D48E, A89T, S138T, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE577。

[0190] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ao)组的组合:D48E, A89T, L136P, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE502 和 pSE524。

[0191] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ap)组的组合:D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE503。

[0192] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(aq)组的组合:D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE505。

[0193] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含(ar)组的组合:D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE506。

[0194] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (as) 组的组合 :D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE507。

[0195] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (at) 组的组合 :D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE509。

[0196] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (au) 组的组合 :D48E, A89T, L136P, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE514 和 pSE525。

[0197] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (av) 组的组合 :D48E, A89T, V120A, L136P, G179S。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE515。

[0198] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (aw) 组的组合 :D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE517。

[0199] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (ax) 组的组合 :D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE518。

[0200] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (ay) 组的组合 :D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE529 和 pSE554。

[0201] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (az) 组的组合 :D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE532。

[0202] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (ba) 组的组合 :D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE536。

[0203] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (bb) 组的组合 :D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE537。

[0204] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (bc) 组的组合 :D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE541。

[0205] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (bd) 组的组合 :D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE549 和 pSE553。

[0206] 在另一具体实施方案中,所述氨基酸取代组合包含 (be) 组的组合 :D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D。编码这些氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE551。

[0207] 本发明还提供了一种多核苷酸分子,其含有与除虫链霉菌 *aveC* 等位基因相同的核苷酸序列,与质粒 pSE186 (ATCC 209604) 上编码除虫链霉菌 *AveC* 基因产物的序列相同的核苷酸序列,或与图 1 (SEQ ID NO :1) 所示除虫链霉菌 *aveC* ORF 相同的核苷酸序列,或其简并变体,但所述核苷酸序列还包含编码氨基酸取代组合的突变,所述取代发生在对应于 SEQ

ID NO :2 的氨基酸位置的氨基酸残基上,导致除虫链霉菌 ATCC 53692 中失活了野生型 aveC 等位基因、且表达含有上述突变核苷酸序列的多核苷酸分子的那些细胞,相对于仅表达野生型 aveC 等位基因的除虫链霉菌 ATCC 53692 细胞而言,产生的除虫菌素 2 类 : 1 类的比例下降,其中当除虫菌素 2 类 : 1 类为环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时,除虫菌素 2 类 : 1 类的比例约为 0.40 : 1 或更低,且其中氨基酸取代组合包含选自下组的组合 :

[0208] (bf) D48E, S138T, A139T, G179S, E238D ;和

[0209] (bg) Y28C, Q38R, D48E, L136P, G179S, E238D。

[0210] 编码 (bf) 组氨基酸取代的质粒的非限制性实例是 pSE556 和 pSE569。编码 (bg) 组氨基酸取代的质粒的一个非限制性实例是 pSE561。

[0211] 本发明涉及,上述任一种氨基酸取代可以通过对 aveC 等位基因的核苷酸序列或其简并变体进行任何能导致所述取代的修饰来实现。例如,通过将天然密码子序列或其简并变体改换为编码相同氨基酸取代的数个可选密码子中任一种,有可能实现本文所述的大多数氨基酸取代。本领域技术人员基于本文所述以及已知的遗传密码子简并性,可以轻易而明显地确定编码上述氨基酸取代的各种可能序列。在上文所列的每一种具体组合的一个非限制性实施方案中,氨基酸取代通过图 6 所示非沉默核苷酸改变来实现。

[0212] 本文中,“氨基酸取代组合包含以下组合...”等等是指,本发明 AveC 基因产物中的氨基酸取代至少包括具体列出的那些取代,而且可以包括其它氨基酸取代,或氨基酸缺失,或氨基酸添加,或它们的一些组合,其中所得 AveC 基因产物在除虫链霉菌细胞中的表达导致 B2 : B 1 除虫菌素的比例按照预期的下降。

[0213] aveC 等位基因或其简并变体的突变可通过多种已知方法的任一种来实施,包括使用易错 PCR,或通过盒式诱变。例如,可以使用寡核苷酸定向诱变以一种限定的方式改变 aveC 等位基因或 ORF 的序列,如在 aveC 等位基因或 ORF 中的具体区域引入一或多个限制性位点或一个终止密码子。正如美国专利 5,605,793、5,830,721、5,837,458 所述,也可使用涉及随机片断化、诱变的反复循环、以及核苷酸改组的方法,来产生具有编码 aveC 突变的核苷酸序列的多核苷酸大文库。

[0214] 靶向突变是有效的,尤其当它们改变 AveC 基因产物中的一或多个保守氨基酸残基时更是如此。例如,将除虫链霉菌 AveC 基因产物的公认氨基酸序列 (SEQ ID NO :2) 与来自灰产色链霉菌 (SEQ ID NO :5) 及吸水链霉菌 (SEQ ID NO :4) 的 AveC 同源基因产物的公认氨基酸序列 (美国专利 6,248,579) 相比较,显示了这些物种之间显著保守的氨基酸残基位点。导致一或多个所述保守氨基酸残基改变的靶向诱变对于产生可以显示所需的除虫菌素产量改变的新突变株是非常有效的。

[0215] 随机诱变也是有效的,可以通过将除虫链霉菌细胞暴露于紫外线或 X- 射线照射,或暴露于化学诱变剂如 N- 甲基 -N' - 亚硝基胍,甲烷磺酸乙酯,亚硝酸或氮芥等,来进行诱变。有关诱变技术的综述可参见 Ausubel, 1989, 文献同上。

[0216] 一旦产生突变的多核苷酸分子,可通过筛选确定它们是否可调节除虫链霉菌中的除虫菌素生物合成。在优选的实施方案中,具有突变的核苷酸序列的多核苷酸分子,可以通过弥补 (complementing) 除虫链霉菌菌株来检测,所述菌株是 aveC 基因已失活从而给出 aveC 阴性 (aveC⁻) 背景的菌株。在一个非限制性方法中,突变的多核苷酸分子被剪接到表达质粒中,与一或多个调控元件可操作相连,该质粒优选还包括一或多个药物抗性基因,以

便允许对经转化的细胞进行选择。使用已知技术将该载体转化至 *aveC* 宿主细胞,选择经转化的细胞,并在允许或诱导除虫菌素产生的条件下在合适的发酵培养基中进行培养,所述条件例如,在培养基中包括合适的起始亚基,以及在本领域已知的最适合除虫菌素生产的条件下培养。然后通过 HPLC 分析发酵产物,以测定突变的多核苷酸分子弥补宿主细胞的能力。数种携有能降低除虫菌素 B2 : B1 比例的突变多核苷酸分子的载体,包括 pSE188, pSE199, pSE231, pSE239, 以及 pSE290 至 pSE297 都在下面 8.3 章节举例说明。这类质粒载体的其它实例见图 6。

[0217] 本发明上述任一种方法可以用发酵培养基进行,优选在培养基中添加环己烷羧酸,但也可以使用其它合适的脂肪酸前体,例如,表 1 所列的任一种脂肪酸前体,或甲硫乳酸 (methylthiolactic acid)。

[0218] 一旦鉴定出按所需方向调节除虫菌素生产的突变的多核苷酸分子,就可以确定核苷酸序列上发生突变的位置。例如,具有编码突变 *AveC* 基因产物的核苷酸序列的多核苷酸分子可以通过 PCR 分离,并用已知方法对其进行 DNA 序列分析。通过比较突变型和野生型 *aveC* 等位基因的 DNA 序列,可以确定负责改变除虫菌素生产的突变。例如,除虫链霉菌 *AveC* 基因产物在第 55 位 (S55F), 第 138 位 (S138T), 第 139 位 (A139T) 或第 230 位 (G230D) 中任一处含有单个氨基酸取代,或在第 138 位 (S138T) 和第 139 位 (A139T 或 A139F) 含有双重取代时,导致 *AveC* 基因产物的功能发生改变,使所产生的除虫菌素 2 类 : 1 类的比例改变 (参见下文第 8 章节),其中所述氨基酸位置对应于图 1 (SEQ ID NO :2) 中所示。此外,以下 7 种突变组合分别显示能有效降低除虫菌素的 2 类 : 1 类之比 : (1) D48E/A89T ; (2) S138T/A139T/G179S ; (3) Q38P/L136P/E238D ; (4) F99S/S138T/A139T/G179S ; (5) A139T/M228T ; (6) G111V/P289L ; (7) A139T/K154E/Q298H。本发明包括显示能降低除虫菌素环己基 B2 : 环己基 B1 之比例的另外 59 种突变组合,它们表示在图 6 中并引述在权利要求中。

[0219] 本文中,上述表达方式 (如 A139T) 是指,用单字母表示的起始氨基酸残基 (本例中为丙氨酸 A), 在指定位置 (本例中为 SEQ ID NO :2 所示多肽的第 139 位), 被替换起始氨基酸残基的氨基酸残基 (本例中为苏氨酸 T) 取代。

[0220] 本文中,当由除虫链霉菌染色体中,或者本发明载体或分离的多核苷酸分子中的 *aveC* 等位基因所编码的氨基酸残基被描述为“对应于”SEQ ID NO :2 的具体氨基酸残基,或者当氨基酸取代被描述为发生在“对应于”SEQ ID NO :2 中具体编号的氨基酸残基的具体位置上,这时是表示处在 *AveC* 基因产物相同位置上的氨基酸残基,本领域技术人员可以参看本文 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列很快确定该残基。

[0221] 本文中,当编码具体突变的 *aveC* 等位基因中的具体突变被描述为 *aveC* 等位基因中“对应于”SEQ ID NO :1 所示具体核苷酸位置的具体核苷酸位置上发生的碱基改变,或者当 *aveC* 等位基因中的核苷酸位置被描述为“对应于”SEQ ID NO :1 中的具体核苷酸位置,这时是指 *aveC* 核苷酸序列或其简并变体中同样相关位置上的核苷酸,本领域技术人员参照本文 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列能快速确定该核苷酸。

[0222] 本文中描述除虫菌素环己基 B2 : 环己基 B1 的比例时所用的术语“约”是指,具体指明的数值加或减该数值的 10%。

[0223] 本发明的多核苷酸分子可以是“分离的”,这意味着 : (i) 它已经经过纯化,因此基本上不含具有不同核苷酸序列的其它多核苷酸分子 ; 或 (ii) 它处在并非天然的环境中,例

如来自除虫链霉菌的 *aveC* 等位基因或其突变形式处在并非除虫链霉菌细胞的另一种细胞中;或 (iii) 它表现为并非天然的一种形式,例如更短的 DNA 片段,如消化细菌染色体所得的限制性片段,它们主要含有 *aveC* 编码区或其突变形式,可以含或不含其任何辅助调控序列,或者是随后被整合到异源 DNA 片段中,如(除了除虫链霉菌细胞以外的)细菌细胞的染色体中,或者诸如质粒或噬菌体等载体的 DNA 中,或者被整合到除虫链霉菌染色体上并非天然 *aveC* 等位基因所处的位置。

[0224] 本发明还提供了包含本发明多核苷酸分子的重组载体。所述重组载体可用于将任何含有本发明的突变核苷酸序列的多核苷酸分子靶向除虫链霉菌染色体上的 *aveC* 等位基因位点,以通过例如同源重组来插入或取代 *aveC* ORF 或其部分。然而,按照本发明,此处提供的含有本发明的突变核苷酸序列的多核苷酸分子也可以在插入到除虫链霉菌染色体上除 *aveC* 等位基因以外的其它位点时,或在作为除虫链霉菌细胞中的游离体形式维持时,发挥调节除虫菌素生物合成的功能。因此,本发明还提供了包含多核苷酸分子的载体,所述多核苷酸含有本发明所述突变的核苷酸序列,所述载体可用于将所述多核苷酸分子插入到除虫链霉菌染色体上除 *aveC* 基因位点以外的位置,或以游离体的形式维持。

[0225] 在非限制性实施方案中,所述载体是下述基因取代载体,其可以用于将本发明所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体插入除虫链霉菌菌株的细胞中,籍此产生新的除虫链霉菌菌株,所述菌株的细胞与仅表达野生型 *aveC* 等位基因的相同菌株的细胞相比,产生的除虫菌素 2 类: 1 类的比例下降。这类基因取代载体可以用本文提供的表达载体(例如以下第 8 章节中所列举的那些表达载体)中的突变多核苷酸分子来构建。

[0226] 本发明还提供了一种载体,其可用于将突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体插入除虫链霉菌菌株的细胞中,以便产生新菌株的细胞,所述新细胞与仅表达野生型 *aveC* 等位基因的相同菌株的细胞相比,除虫菌素的产量有所改变。在优选的实施方案中,所述新细胞产生的除虫菌素的量增加。在具体的非限制性实施方案中,该载体包含本领域已知的强启动子,例如,来自红色糖多孢菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 的强组成型 *ermE* 启动子,使其位于 *aveC* ORF 上游并与该 *aveC* ORF 可操作相连。所述载体可以使用质粒 pSE189 中的突变的 *aveC* 等位基因,按照美国专利 6,248,579 中所述的方法来构建。

[0227] 本发明提供了基因取代载体,其可用于灭活野生型除虫链霉菌菌株中的 *aveC* 基因。在非限制性实施方案中,所述基因取代载体可以用质粒 pSE180(ATCC 209605) 中存在的突变的多核苷酸分子来构建,该质粒在下文第 8.1 章节描述(图 3)。本发明还提供了含有多核苷酸分子的基因取代载体,所述多核苷酸分子包含天然侧翼于除虫链霉菌染色体上原位 *aveC* 基因的核苷酸序列或由该序列组成,包括,例如那些如图 1 (SEQ ID NO:1) 所示的侧翼核苷酸序列,所述载体可用于使除虫链霉菌 *aveC* ORF 缺失。

[0228] 本发明还提供了一种宿主细胞,其含有本发明的多核苷酸分子或重组载体。所述宿主细胞可以是任何能作为所述多核苷酸分子或重组载体的宿主的原核或真核细胞。在一个优选实施方案中,所述宿主细胞是细菌细胞。在一个更优选实施方案中,所述宿主细胞是链霉菌属的细胞。在一个更优选实施方案中,所述宿主细胞是除虫链霉菌的细胞。

[0229] 本发明还提供了产生除虫链霉菌新菌株的方法,包括 (i) 使除虫链霉菌菌株的细胞中的 *aveC* 等位基因突变,导致在 *AveC* 基因产物中出现氨基酸取代组合,或 (ii) 将突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体引入除虫链霉菌菌株的细胞中,所述基因或变体编码的

AveC 基因产物包含选自上文中 (a)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0230] 本发明还提供了产生除虫链霉菌新菌株的方法,包括 (i) 使除虫链霉菌菌株的细胞中的 aveC 等位基因突变,导致在 AveC 基因产物中出现氨基酸取代组合,或 (ii) 将突变的 aveC 等位基因或其简并变体引入除虫链霉菌菌株的细胞中,所述基因或变体编码的 AveC 基因产物包含氨基酸取代组合,所述含有突变的 aveC 等位基因或其简并变体的细胞能以 0.35 : 1 或更低的比例产生环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素。在一个非限制性实施方案中,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (a)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0231] 在一个优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.30 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (f)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0232] 在一个更优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.25 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (w)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0233] 在一个更优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.20 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (ao)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0234] 本发明还提供了产生除虫链霉菌新菌株的方法,包括 (i) 使除虫链霉菌菌株的细胞中的 aveC 等位基因突变,导致在 AveC 基因产物中出现氨基酸取代组合,或 (ii) 将突变的 aveC 等位基因或其简并变体引入除虫链霉菌菌株的细胞中,所述基因或变体编码的 AveC 基因产物包含选自 (bf) 和 (bg) 的氨基酸取代组合。在一优选实施方案中,含有所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体的细胞能以约 0.40 : 1 或更低的比例产生环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素。

[0235] 按照上述步骤使 aveC 等位基因突变,或引入突变的 aveC 等位基因或其简并变体之后,可以产生新的除虫链霉菌菌株。

[0236] 本发明还提供了包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体的链霉菌属细胞,所述基因或变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (a)–(be) 所列的氨基酸取代组合。在一个优选实施方案中,链霉菌属的物种是除虫链霉菌。

[0237] 本发明还提供了能以 0.35 : 1 或更低比例产生环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的除虫链霉菌细胞。在一个非限制性实施方案中,所述细胞包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体,所述 aveC 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (a)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0238] 在一个优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.30 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述细胞包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (f)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0239] 在一个更优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.25 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述细胞包含突变的 aveC 等位基因或其简并变体,所述突变的 aveC 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (w)–(be)

所列的氨基酸取代组合。

[0240] 在一个更优选实施方案中,环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约为 0.20 : 1 或更低。在一个非限制性实施方案中,所述细胞包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体,所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (ao)-(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0241] 本发明还提供了链霉菌属物种的细胞,其包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体,所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文所列 (bf) 和 (bg) 的氨基酸取代组合。在一优选实施方案中,所述链霉菌属物种是除虫链霉菌。在一个更优选实施方案中,所述细胞是能以约 0.40 : 1 或更低的比例产生环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的除虫链霉菌细胞。

[0242] 上述任一种突变都可以出现在本发明细胞中的染色体外元件(如质粒)上,但优选所述突变出现在整合到除虫链霉菌染色体中的 *aveC* 编码序列中,优选,但并非必需,位于天然 *aveC* 等位基因的位置。

[0243] 所述新菌株的细胞可以用于大量产生具有商业价值的除虫菌素如 doramectin。

[0244] 本发明还提供了产生除虫菌素的方法,包括在培养基中,用允许或诱导本发明的除虫链霉菌细胞产生除虫菌素的条件下,培养所述细胞,并从培养物中回收所述除虫菌素。在一个优选实施方案中,该方法中所用的细胞以 0.35 : 1 或更低的比例产生环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素,更优选所述比例为约 0.30 : 1 或更低,更优选所述比例为约 0.25 : 1 或更低,更优选所述比例为约 0.20 : 1 或更低。

[0245] 在一个优选实施方案中,以 0.35 : 1 或更低比例产生环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的细胞,包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体,所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (a)-(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0246] 在另一个优选实施方案中,以约 0.30 : 1 或更低比例产生环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的细胞,包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体,所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (f)-(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0247] 在另一个优选实施方案中,以约 0.25 : 1 或更低比例产生环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的细胞,包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体,所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (w)-(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0248] 在另一个优选实施方案中,以约 0.20 : 1 或更低比例产生环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的细胞,包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体,所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (ao)-(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0249] 在另一个优选实施方案中,所述细胞以约 0.40 : 1 或更低比例产生环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素,且包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体,所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 AveC 基因产物包含选自上文中 (bf) 和 (bg) 所列的氨基酸取代组合。

[0250] 本发明的方法使具有商业价值的除虫菌素如 doramectin 的生产效力提高。

[0251] 本发明还提供了由除虫链霉菌细胞产生的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的组合物,其在培养所述细胞的培养基中包含环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素,该培养基中环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例为 0.35 : 1 或更低,优选约 0.30 : 1 或更低,更优选约

0.25 : 1 或更低, 优选约 0.20 : 1 或更低。在一个具体实施方案中, 所述的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素组合物由表达突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体的除虫链霉菌菌株的细胞产生, 所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的基因产物, 导致所述细胞与不表达突变的 *aveC* 等位基因而是仅表达野生型 *aveC* 等位基因的除虫链霉菌相同菌株的细胞相比, 产生的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例下降。

[0252] 在一个优选实施方案中, 当所述组合物是 0.35 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时, 所述组合物由包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体的细胞产生, 所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 *AveC* 基因产物包含选自上文中 (a)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0253] 在另一个优选实施方案中, 当所述组合物是约 0.30 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时, 所述组合物由包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体的细胞产生, 所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 *AveC* 基因产物包含选自上文中 (f)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0254] 在另一个优选实施方案中, 当所述组合物是约 0.25 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时, 所述组合物由包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体的细胞产生, 所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 *AveC* 基因产物包含选自上文中 (w)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0255] 在另一个优选实施方案中, 当所述组合物是约 0.20 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素时, 所述组合物由包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体的细胞产生, 所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 *AveC* 基因产物包含选自上文中 (ao)–(be) 所列的氨基酸取代组合。

[0256] 本发明还提供了由除虫链霉菌细胞产生的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的组合物, 其在培养所述细胞的培养基中包含环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素, 该培养基中环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素的比例约 0.40 : 1 或更低, 且是由包含突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体的细胞产生, 所述突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体编码的 *AveC* 基因产物包含选自上文中 (bf) 和 (bg) 所列的氨基酸取代组合。

[0257] 优选所述除虫菌素新组合物出现在培养过细胞的培养基中, 例如, 在部分或完全耗尽的发酵培养液中, 另外也可以用已知的生物化学纯化技术, 如硫酸铵沉淀, 透析, 大小分级分离, 离子交换层析, HPLC 等, 将除虫菌素组合物从培养液中部分纯化或实质上纯化出来。

[0258] 除了如上所述产生除虫链霉菌新菌株, 使其包含能产生比例降低的环己基 B2 : 环己基 B1 的细胞, 本发明还涉及将其它突变引入除虫链霉菌细胞中, 以便进一步改进除虫菌素生产的特性。在一个非限制性实施方案中, 本发明的细胞还包含一些修饰, 以便提高除虫菌素的生产水平。在一个实施方案中, 所述细胞可以如下制备: (i) 使除虫链霉菌细胞中的 *aveC* 等位基因突变, 或 (ii) 将突变的 *aveC* 等位基因或其简并变体引入除虫链霉菌菌株的细胞中, 其中所述突变的等位基因的表达导致, 表达该突变的 *aveC* 等位基因的除虫链霉菌菌株的细胞, 与仅表达单个野生型 *aveC* 等位基因的相同菌株的细胞相比, 除虫菌素的产量增加, 然后选出经转化的细胞, 其与仅表达单个野生型 *aveC* 等位基因的菌株的细胞相比, 除虫菌素的产量增加。例如, 可以对 *aveC* 等位基因进行修饰, 使其包含强启动子, 如

红色糖多孢菌的强组成型 *ermE* 启动子,使其位于 *ave* ORF 上游并与该 *aveC* ORF 可操作相连。在另一实施方案中,可以将一或多个突变引入除虫链霉菌的 *aveR1* 和 / 或 *aveR2* 基因中,从而增加除虫菌素的生产水平,如 2001 年 3 月 6 日授予 Stutzman-Engwall 的美国专利 6,197,5591 所述。

[0259] 5.4. 除虫菌素的用途

[0260] 除虫菌素是可具体作为治蠕虫剂、杀体外寄生虫剂、杀虫剂及杀螨剂来使用的高效抗寄生虫药剂。按本发明方法产生的除虫菌素化合物均可用于这些用途。例如,按本发明方法产生的除虫菌素化合物可用于治疗人类的各种疾病或症状,尤其是本领域已知由寄生虫感染造成的那些疾病。参见 Ikeda and Omura, 1997, Chem. Rev. 97 (7) :2591-2609。更具体地,按本发明方法产生的除虫菌素化合物可有效治疗由内寄生虫所致的各种疾病,所述内寄生虫如能感染人,家养动物,猪,绵羊,家禽,马或牛的寄生性线虫。

[0261] 更具体地,按本发明方法产生的除虫菌素化合物可有效抵抗感染人体的线虫以及感染各种动物的线虫。这类线虫包括胃肠道寄生虫如钩虫 (*Ancylostoma*), 线虫 (*Necator*), 蛔虫 (*Ascaris*), 类圆线虫 (*Strongyloides*), 旋毛虫 (*Trichinella*), 毛细线虫 (*Capillaria*), 鞭虫 (*Trichuris*), 蛲虫 (*Enterobius*), 恶丝虫 (*Dirofilaria*), 及在血管或其它组织或器官中发现的寄生虫如丝虫性蠕虫以及类圆线虫和旋毛虫的肠道提取物。

[0262] 按本发明方法产生的除虫菌素化合物也可用于治疗体外寄生虫感染,包括节肢动物对哺乳动物或鸟类的感染,如能感染马和牛的蜱 (tick)、螨、虱、蚤、绿头苍蝇、咬虫 (biting insect)、或移栖双翅目幼虫等引起的感染。

[0263] 按本发明方法产生的除虫菌素化合物也可作为杀虫剂用于对抗室内害虫 (household pest) 如蟑螂、衣蛾、地毯甲虫、及家蝇等,以及侵害储存的谷物和农作物的有害昆虫,包括红蜘蛛 (spider mite)、蚜虫、毛虫、和直翅目幼虫如蝗虫 (locust) 等。

[0264] 用按本发明方法产生的除虫菌素化合物能治疗的动物包括绵羊、牛、马、鹿、山羊、猪、鸟类包括家禽、狗和猫。

[0265] 按本发明方法产生的除虫菌素化合物可根据具体用途、接受治疗的宿主动物的具体种类、所涉及的寄生虫或昆虫等情况以相应剂型给药。当作为杀寄生虫剂使用时,按本发明方法产生的除虫菌素化合物可以以胶囊、丸剂、片剂、或灌服液的剂型口服,或以倾注 (pour-on)、注射或植入的形式给药。这类制剂可以按标准兽医学实践以传统方式制备。因此,可将活性成分与精确分配的适当稀释剂或载体混合来制备胶囊、丸剂或片剂,所述稀释剂或载体另外含有崩解剂和 / 或粘合剂如淀粉、乳糖、滑石粉、硬脂酸镁等。灌服剂是将活性成分与分散剂或润湿剂等一起分散在水溶液中来制备。注射剂可配制成无菌溶液,其中可含其它物质如足够的盐和 / 或葡萄糖以便使该溶液相对于血液为等渗状态。

[0266] 这些配制剂中活性化合物的重量可根据患者、或所治疗的宿主动物种类、感染的严重性及类型、宿主的体重等而变化。通常,口服给药的一剂为约 0.001-10mg 活性化合物 / kg 患者或动物的体重,单次给药或在 1-5 天内分次给药。但有时可由医生或兽医根据临床症状确定较高或较低的剂量。

[0267] 或者,按本发明方法产生的除虫菌素化合物也可以与动物饲料一起给药,为此,可制备浓缩的食物添加剂或预混剂以便与常规动物饲料混合。

[0268] 当作为杀虫剂使用,及用于处理农业害虫时,按本发明方法产生的除虫菌素化合

物也可以按标准农业实践以喷雾剂,粉剂,乳剂和类似形式来使用。

[0269] 6. 实施例:除虫链霉菌的发酵及除虫菌素 B2 : B1 的分析

[0270] 如果发酵培养基中不补充脂肪酸,则既缺失支链 2- 氧酸脱氢酶又缺失 5-0- 甲基转移酶活性的菌株将不产生除虫菌素。该实施例证实这类突变株在有不同脂肪酸的条件下启动生物合成时,可获得很宽范围的除虫菌素 B2 : B 1 比例。

[0271] 6. 1. 材料及方法

[0272] 除虫链霉菌 ATCC 53692 储存在 -70℃ 的全肉汤接种培养基中,培养基的组成为:淀粉 (Nadex,Laing National)-20g;Pharmamedia(Trader's Protein,Memphis,TN)-15g;Ardamine pH(Yeast Products Inc.)-5g;碳酸钙 -1g。终体积用自来水调整为 1 升,pH 调整至 7.2,培养基在 121℃ 高压灭菌 25 分钟。

[0273] 取 2ml 上述制剂的解冻后悬浮液接种到一个含有 50ml 同样培养基的烧瓶中。以 180rpm 在旋转振荡器上 28℃ 培养 48 小时后,取 2ml 肉汤接种到一个含有 50ml 生产培养基的烧瓶中,该培养基含有:淀粉 -80g;碳酸钙 -7g;Pharmamedia-5g;磷酸氢二钾 -1g;硫酸镁 -1g;谷氨酸 -0.6g;七水合硫酸亚铁 -0.01g;硫酸锌 -0.001g;硫酸亚镁 -0.001g。终体积用自来水调整为 1 升,pH 调整至 7.2,培养基在 121℃ 高压灭菌 25 分钟。

[0274] 将不同的羧酸底物(见表 1)溶于甲醇中并在接种 24 小时后添加到发酵液中使终浓度为 0.2g/l。将该发酵液于 28℃ 培养 14 天,然后离心(2,500rpm,2 分钟),去除上清。菌丝沉淀用丙酮(15ml),然后用二氯甲烷(30ml)提取,分离有机相,过滤,然后蒸发使之干燥。残余物用 1ml 甲醇吸收,并用配有扫描二极管阵列检测器的 Hewlett-Packard 1090A 液相色谱在 240nm 进行 HPLC 分析,所用柱子是保持在 40℃ 的 Beckman Ultrasphere C-18,5 μ m,4.6mm × 25cm 柱。将 25 μ l 上述甲醇溶液注入该柱子中。以 0.85/ml min 的流速,用甲醇-水从 80 : 20 到 95 : 5 的线性梯度洗脱 40 分钟。用环己基 B1 的两种标准浓度校准检测器的反应,测量除虫菌素 B2 及 B1 的曲线以下面积。

[0275] 6. 2. 结果

[0276] 除虫菌素 B2 和 B1 的 HPLC 滞留时间,及 2 : 1 比例如表 1 所示。

[0277] 表 1

[0278]

	HPLC滞留时间 (分钟)		比例
底物	B2	B1	B2:B1
4-四氢吡喃羧酸	8.1	14.5	0.25
异丁酸	10.8	18.9	0.5
3-糠酸	7.6	14.6	0.62
S-(+)-2-甲基丁酸	12.8	21.6	1.0
环己烷羧酸	16.9	26.0	1.6
3-噻吩羧酸	8.8	16.0	1.8
环戊烷羧酸	14.2	23.0	2.0
3-三氟甲基丁酸	10.9	18.8	3.9
2-甲基戊酸	14.5	24.9	4.2
环庚烷羧酸	18.6	29.0	15.0

[0279] 表 1 所列数据证实 B2 : B1 除虫菌素的产生比有相当宽的范围,其表明根据所提供的脂肪酸侧链起始物单元的性质,2 类化合物相对于 1 类化合物的脱水转化结果有很大的差异。这指示由 AveC 蛋白的改变所致 B2 : B1 比例的改变只特异性针对具体底物。因此,对用具体底物获得的 B2 : B1 比例发生变化的突变体进行筛选时需要该底物的存在。下面这些例子描述了使用环己烷羧酸作为筛选底物。然而,该底物仅用于举例说明本发明潜在的实用性,而不是有意要限制本发明。

[0280] 7. 实施例 :分离 aveC 基因

[0281] 本实施例描述了除虫链霉菌染色体中编码 AveC 基因产物的区域的分离及鉴定,如下文所证实,aveC 基因经鉴定能改变所产生的环己基 B2 对环己基 B1 除虫菌素的比例 (B2 : B1)。

[0282] 7. 1. 材料与方法

[0283] 7. 1. 1. 使链霉菌生长以便分离 DNA

[0284] 下面的方法用于培养链霉菌。除虫链霉菌 ATCC 31272 株单菌落 (单菌落分离物 #2) 在 1/2 强度的 YPD-6 中分离,YPD-6 含有 :Difco 酵母提取物 -5g ;Difco 细菌用胨 -5g ;葡萄糖 -2.5g ;MOPS-5g ;Difco 细菌用琼脂 -15g,终体积用 dH₂O 调整至 1 升,pH 调整至 7.0,培养基在 121℃ 高压灭菌 25 分钟。

[0285] 将上述培养基中生长的菌丝体接种到 25mm ×150mm 试管中的 10mlTSB 培养基 (Difco Tryptic Soy Broth-30g,在 1 升 dH₂O 中,在 121℃ 高压灭菌 25 分钟) 中,在 28℃ 以 300rpm 振荡培养 48-72 小时。

[0286] 7. 1. 2. 从链霉菌中分离染色体 DNA

[0287] 将如上所述生长的菌丝体取等份试样 (0.25ml 或 0.5ml) 置于一个 1.5ml 的微量离心试管中,将细胞在 12,000×g 离心 60 秒而浓缩。去除上清液,使细胞重新悬浮于 0.25ml TSE 缓冲液 (20ml 1.5M 蔗糖,2.5ml 1M Tris-HCl,pH 8.0,2.5ml 1M EDTA,pH 8.0,和 75ml dH₂O) 中,该缓冲液含有 2mg/ml 溶菌酶。样品在 37℃ 振荡培养 20 分钟,上样至 AutoGen 540™ 自动核酸分离仪 (Integrated Separation Systems, Natick, MA),用 Cycle 159 (仪

器软件)按照操作手册分离基因组 DNA。

[0288] 或者,将 5ml 菌丝体置于一个 17mm ×100mm 的试管中,3,000rpm 离心 5 分钟使细胞浓缩,去除上清液。将细胞重新悬浮在 1ml TSE 缓冲液中,3,000rpm 离心 5 分钟使细胞浓缩,去除上清液。将细胞重新悬浮在含有 2mg/ml 溶菌酶的 1ml TSE 缓冲液中,37℃振荡培养 30-60 分钟。培养后,加入 0.5ml10%十二烷基硫酸钠 (SDS),将细胞在 37℃保温,直到裂解完成。裂解产物在 60℃保温 10 分钟,冷却至室温,分到两个 1.5mlEppendorf 试管中,并用 0.5ml 苯酚/氯仿 (50%苯酚,预先用 0.5M Tris 平衡,pH 8.0 ;50%氯仿) 萃取 1 次。去除水相,用氯仿:异戊醇 (24 : 1) 萃取 2 到 5 次。通过加入 1/10 体积 3M 醋酸钠, pH 4.8 沉降 DNA,在冰中保温混合物 10 分钟,在 15,000rpm,5℃将混合物离心 10 分钟,将上清液移至干净试管中,并在其中加入 1 倍体积的异丙醇。然后将上清液与异丙醇一起在冰中保温 20 分钟,在 15,000rpm 5℃将混合物离心 20 分钟,将上清液移除,用 70%乙醇洗涤 DNA 粒状沉淀物 1 次。在粒状沉淀物干燥后,将 DNA 再悬浮于 TE 缓冲液 (10mM Tris,1mM EDTA, pH 8.0) 中。

[0289] 7.1.3. 从链霉菌中分离质粒 DNA

[0290] 将一份菌丝体 (1.0ml) 置于一个 1.5ml 的微量离心试管中,12,000xg 离心 60 秒浓缩细胞。去除上清液,细胞再悬浮于 1.0ml 10.3%蔗糖中,12,000x g 离心浓缩 60 秒,去除上清液。然后将细胞重新悬浮于含有 2mg/ml 溶菌酶的 0.25ml TSE 缓冲液中,37℃振荡保温 20 分钟,然后上样至 AutoGen 540™ 自动核酸分离仪中。按照操作手册,使用 Cycle 106 (仪器软件) 分离质粒 DNA。

[0291] 或者,将 1.5ml 的菌丝体置于 1.5ml 微型离心试管中,12,000x g 离心 60 秒浓缩细胞。去除上清液,细胞再悬浮于 1.0ml 10.3%蔗糖中,12,000xg 离心浓缩 60 秒,去除上清液。细胞重新悬浮于含有 2mg/ml 溶菌酶的 0.5ml TSE 缓冲液中,37℃保温 15-30 分钟。保温后,加入 0.25ml 碱性 SDS (0.3N NaOH,2% SDS),55℃保温 15-30 分钟或直到溶液变清。将醋酸钠 (0.1ml,3M, pH 4.8) 加入到 DNA 溶液中,将其在冰中保温 10 分钟。DNA 样品在 5℃ 14,000rpm 离心 10 分钟。将上清液移至干净试管中,并在其中加入 0.2ml 的苯酚/氯仿 (50%苯酚:50%氯仿) 并轻轻混和。DNA 溶液在 5℃以 14,000rpm 离心 10 分钟,上清液移至干净的 Eppendorf 试管中。加入异丙醇 0.75ml,将溶液轻轻混和,然后在室温下保温 20 分钟。将该 DNA 溶液在 5℃以 14,000rpm 离心 15 分钟,移除上清液,用 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀颗粒,干燥,再在 TE 缓冲液中重新悬浮。

[0292] 7.1.4. 从大肠杆菌中分离质粒 DNA

[0293] 将单个大肠杆菌转化菌落在 5ml Luria-Bertani (LB) 培养基 (细菌用胨 -10g,细菌用酵母提取物 -5g,和 NaCl-10g 在 1 升 dH₂O 中, pH7.0,121℃高压灭菌 25 分钟,并添加 100 μg/ml 氨苄青霉素) 中保温。将培养物过夜培养,将 1 μm 等分试样置于 1.5ml 微型离心试管中,将培养样品载至 AutoGen 540™ 自动核酸分离器中,按照操作手册,使用 Cycle 3 (仪器软件) 分离质粒 DNA。

[0294] 7.1.5. 除虫链霉菌原生质体的制备及转化

[0295] 将除虫链霉菌单菌落在 1/2 强度的 YPD-6 中分离。将菌丝体接种到 25mm ×150mm 试管中的 10ml TSB 培养基中,在 28℃以 300rpm 振荡培养 48 小时。将 1ml 菌丝体接种至 50ml YEME 培养基。每升 YEME 培养基含有 :Difco 酵母提取物 -3g ;Difco 细菌用胨 -5g ;

Difco Malt Extract-3g;蔗糖-300g。121℃高压灭菌 25 分钟后,加入下列物质:2.5M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (单独在 121℃高压灭菌 25 分钟)-2ml;及甘氨酸(20%)(过滤除菌)-25ml。

[0296] 将菌丝体 30℃培养 48-72 小时,然后在 50ml 离心管(Falcon)中在 3,000rpm 下离心 20 分钟收获。去除上清液,菌丝体在 P 缓冲液中重新悬浮,P 缓冲液含有:蔗糖-205g; K_2SO_4 -0.25g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -2.02g; H_2O -600ml; K_2PO_4 (0.5%)-10ml;痕量元素溶液-20ml; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.68%)-100ml;及 MES 缓冲液(1.0M, pH 6.5)-10ml(*痕量元素溶液每升含有: ZnCl_2 -40mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -200mg; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -10mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -10mg; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ -10mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -10mg)。pH 调至 6.5,终体积调至 1 升,培养基用 0.45 微米滤膜热过滤。

[0297] 菌丝体以 3,000rpm 离心 20 分钟得到粒状沉淀,去除上清液,将菌丝体在含有 2mg/ml 溶菌酶的 20ml P 缓冲液中重新悬浮。菌丝体在 35℃振荡保温 15 分钟,经显微镜镜检确定原生质体的形成程度。当原生质体的形成结束时,将其在 8,000rpm 离心 10 分钟。去除上清液,将原生质体在 10ml P 缓冲液中重新悬浮。将原生质体在 8,000rpm 离心 10 分钟,去除上清液,将其在 2ml P 缓冲液中重新悬浮,将约 1×10^9 个原生质体分配至 2.0ml 低温小瓶(Nalgene)中。

[0298] 含 1×10^9 个原生质体的小瓶在 8,000rpm 离心 10 分钟,去除上清液,原生质体在 0.1ml P 缓冲液中重新悬浮。将 2~5 μg 转化的 DNA 加入到原生质体中,接着加入 0.5ml T 工作液。T 缓冲基质含有:PEG-1000(Sigma)-25g;蔗糖-2.5g; H_2O -83ml。用 1N NaOH(已滤膜除菌)将 pH 调节至 8.8,将 T 缓冲基质经滤膜过滤除菌,于 4℃保存。T 工作液(于使用当天制备)是 T 缓冲基质-8.3ml; K_2PO_4 (4mM)-1.0ml; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5M)-0.2ml;及 TES(1M, pH8)-0.5ml。T 工作液的每一组分均分别过滤除菌。

[0299] 在 20 秒钟内将 T 缓冲液加入到原生质体中,还加入 1.0ml P 缓冲液,然后将原生质体在 8,000rpm 离心 10 分钟。去除上清液后将原生质体在 0.1ml P 缓冲液中重新悬浮。然后将原生质体铺板至 RM14 培养基上,该培养基含有:蔗糖-205g; K_2SO_4 -0.25g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -10.12g;葡萄糖-10g;Difco 酪蛋白氨基酸-0.1g;Difco 酵母提取物-5g;Difco 燕麦琼脂-3g;Difco 细菌用琼脂-22g; dH_2O -800ml。溶液在 121℃高压灭菌 25 分钟。然后加入下列的无菌原液: K_2PO_4 (0.5%)-10ml; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5M)-5ml;L-脯氨酸(20%)-15ml;MES 缓冲液(1.0M, pH 6.5)-10ml;痕量元素(同上)-2ml;环己酰亚胺原液(25mg/ml)-40ml;及 1N NaOH-2ml。将 25ml RM14 培养基等分在每个平板上,这些平板在使用前都要干燥 24 小时。

[0300] 原生质体在湿度 95%、温度 30℃保温 20-24 小时。为了选择硫链丝菌肽抗性转化子,将含有 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫链丝菌肽的 1ml 上层缓冲基质均匀覆盖在 RM14 再生平板上。每 100ml 上层缓冲基质含有:蔗糖-10.3g;痕量元素溶液(与上相同)-0.2ml;及 MES(1M, pH 6.5)-1ml。原生质体在湿度 95%、温度 30℃保温 7-14 天直到能观察到硫链丝菌肽抗性(Thior)菌落。

[0301] 7.1.6. 变青链霉菌原生质体的转化

[0302] 有些例子中用变青链霉菌(*Streptomyces lividans*)TK64(由 John Innes 研究所, Norwich, U.K 提供)进行转化。用于变青链霉菌生长、原生质化及转化的方法和组合物如 Hopwood 等,1985, Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, U.K. 所述并遵照执行。如上文 7.1.3 中所述从变青链霉菌转

化株中分离质粒 DNA。

[0303] 7.1.7. 除虫链霉菌菌株的发酵分析

[0304] 除虫链霉菌的菌丝体在 1/2 强度的 YPD-6 上培养 4-7 天后,接种到含有 8ml 预制培养基及两个 5mm 玻璃珠的 1×6 英寸试管中,预制培养基含有:可溶性淀粉(为可溶性淀粉或 KOSO, Japan Com Starch Co., Nagoya)-20g/L; Pharmamedia-15g/L; Ardamine pH-5g/L (Champlain Ind., Clifton, NJ); CaCO_3 -2g/L; 2x bcfa("bcfa'"指支链脂肪酸),其在培养基中含有终浓度为 50ppm 的 2-(+/-)-甲基丁酸, 60ppm 的异丁酸, 及 20ppm 的异戊酸。将 pH 调至 7.2, 培养基在 121℃ 高压灭菌 25 分钟。

[0305] 试管以 17° 角在 29℃ 以 215rpm 振荡培养 3 天。将种子培养物的 2ml 等分试样接种到含有 25ml 生长培养基的 300ml Erlenmeyer 烧瓶中, 该培养基含有:淀粉(为可溶性淀粉或 KOSO)-160g/L; Nutrisoy (Archer Daniels Midland, Decatur, IL) 10g/L; Ardamine pH-10g/L; K_2HPO_4 -2g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -2g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.02g/L; MnCl_2 -0.002g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.002g/L; CaCO_3 -14g/L 2x bcfa(同上); 及环己烷羧酸 (CHC) (在 pH 7.0 制成 20% 的溶液)-800ppm。pH 调至 6.9, 培养基在 121℃ 高压灭菌 25 分钟。

[0306] 接种后, 将烧瓶在 29℃ 以 200rpm 振荡培养 12 天。培养后, 从烧瓶中取 2ml 样品, 用 8ml 甲醇稀释, 混合, 混合物在 1, 250xg 离心 10 分钟以沉淀碎片。用 Beckman Ultrasphere ODS 柱 (25cm×4.6mm ID) 以 0.75ml/min 的流速进行 HPLC 来分析上清液, 检测 240nm 的吸光度。流动相为 86/8.9/5.1 甲醇/水/乙腈。

[0307] 7.1.8. 除虫链霉菌 PKS 基因的分离

[0308] 制备除虫链霉菌 (ATCC 31272, SC-2) 染色体 DNA 的粘粒文库并使其与由红色糖多孢菌聚酮化合物合成酶 (PKS) 基因的片段制成的酮合成酶 (KS) 探针杂交。粘粒文库的制备详见 Sambrook 等, 1989, 同上。链霉菌染色体 DNA 文库的制备详见 Hopwood 等, 1985, 同上。带有酮合成酶-杂交区域的粘粒菌落可通过与 pEX26 (由 Dr. P. Leadlay, Cambridge, UK 提供) 的 2.7Kb NdeI/Eco47III 片段杂交来识别。将约 5ng pEX26 用 NdeI 及 Eco47III 消化。将反应混合物上样至 0.8% SeaPlaque GTG 琼脂糖凝胶 (FMC BioProducts, Rockland, ME)。电泳后从凝胶中切出 2.7Kb 的 NdeI/Eco47III 片段, 用 FastProtocol 的 GELase™ (Epicentre Technologies) 从凝胶中回收 DNA。2.7Kb 的 NdeI/Eco47III 片段使用 BRL Nick 翻译系统 (BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) 按说明书进行 [α - ^{32}P] dCTP (脱氧胞苷 5' - 三磷酸盐, 四 (三乙胺) 盐, [α - ^{32}P]-) (NEN-Dupont, Boston, MA) 标记。一个典型反应在 0.05ml 体积中进行。加入 5 μ l 终止缓冲液后, 用 G-25 Sephadex Quick Spin™ Column (Boehringer Mannheim) 按说明书将标记的 DNA 分子与未发生掺入的核酸分子分离。

[0309] 约 1,800 个粘粒菌落通过菌落杂交进行筛选。鉴定出 10 个与红色糖多孢菌 KS 探针强力杂交的菌落。将含有粘粒 DNA 的大肠杆菌菌落在 LB 液体培养基中培养, 用 Cycle 3 (仪器软件) 在 AutoGen 540™ 自动核酸分离器中按照操作说明分离每一培养物中的粘粒 DNA。限制性核酸内切酶作图及 Southern 印迹杂交分析揭示五个菌落中含有重叠的染色体区域。五种粘粒 (也即 pSE65, pSE66, pSE67, pSE68, pSE69) 的除虫链霉菌基因组 BamHI 酶切图谱通过对重叠粘粒的分析及杂交进行构建 (图 4)。

[0310] 7.1.9. 鉴定能调控除虫菌素 B2 : B1 比例的 DNA 及鉴定 aveC ORF

[0311] 从凝胶中切出 2.9Kb 的 *SacI*/*Bam*HI 片段, 使用 Fast Protocol 的 *GELase*TM(Epicentre Technologies) 从凝胶中回收 DNA。约 5 μ g 穿梭载体 pWHM3 (Vara 等, 1989, J. Bacteriol. 171:5872-5881) 用 *SacI* 及 *Bam*HI 消化。将约 0.5 μ g 所述 2.9Kb 插入子与 0.5 μ g 已消化的 pWHM3 混合, 并按照厂商说明与 1 个单位的连接酶 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 在 15°C、总体积 20 μ l 中保温过夜。保温后, 将 5 μ l 连接混合物在 70°C 保温 10 分钟, 冷却至室温, 按照操作手册用于转化感受态的大肠杆菌 DH5 α 细胞 (BRL)。从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒 DNA, 通过限制性分析可以证实 2.9Kb *SacI*/*Bam*HI 插入子的存在。该质粒被命名为 pSE119。

[0312] 如上 7.1.5 部分所述, 制备除虫链霉菌 1100-SC38 菌株 (Pfizer 内部 (in-house) 菌株) 的原生质体并用 pSE119 转化。1100-SC38 株是一种突变体, 当补充环己烷羧酸时, 相对于除虫菌素环己基 -B1 形式, 其产生明显多的除虫菌素环己基 -B2 形式 (B2 : B1 的比例大约是 30 : 1)。用于转化除虫链霉菌原生质体的 pSE119 从大肠杆菌 GM2163 株 (得自 Dr. B. J. Bachmann, Curator, E. coli Genetic Stock Center, Yale University)、大肠杆菌 DM1 株 (BRL)、或变青链霉菌 TK64 株中分离。分离 1100-SC38 菌株的硫链丝菌肽抗性转化子并通过对发酵产物的 HPLC 分析来进行分析。除虫链霉菌 1100-SC38 菌株的含有 pSE119 的转化子产生了比例已改变的除虫菌素环己基 B2 : 环己基 -B1, 该比例大约是 3.7 : 1 (表 2)。

[0313] 确定了 pSE119 能调控 *AveC* 突变体中的除虫菌素 B2 : B1 的比例后, 测出插入的 DNA 序列。按照操作手册, 使用质粒 DNA 分离试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA), 大约有 10 μ g 的 pSE119 被分离, 然后用 ABI 373A 自动 DNA 测序仪 (Perkin Elmer, Foster City, CA) 进行测序。用遗传学计算机组程序 (GCG, Madison, WI) 组合和编辑测序数据。DNA 序列及 *aveC* ORF 在图 1 (SEQ ID NO :1) 中已经列出。

[0314] 如下构建一种新的质粒, 命名为 pSE118。用 *SphI* 及 *Bam*HI 消化大约 5 μ g 的 pSE66。将反应混合物上样至 0.8% SeaPlaque GTG 琼脂糖凝胶 (FMCBioProducts) 上, 电泳后从凝胶中切出 2.8Kb 的 *SphI*/*Bam*HI 片段, 使用 FastProtocol 的 *GELase*TM(Epicentre Technologies) 从凝胶中回收 DNA。约 5 μ g 穿梭载体 pWHM3 用 *SphI* 及 *Bam*HI 消化。将 0.5 μ g 2.8Kb 插入子与 0.5 μ g 已消化的 pWHM3 混合, 在 15°C、总体积 20 μ l 中按照厂商说明与 1 个单位的连接酶 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 一起保温过夜。保温后, 将 5 μ l 连接混合物在 70°C 保温 10 分钟, 冷却至室温, 按照操作手册用于转化感受态的大肠杆菌 DH5 α 细胞。从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒 DNA, 通过限制性分析可以证实 2.8Kb *SphI*/*Bam*HI 插入子的存在。该质粒被命名为 pSE118。pSE118 及 pSE119 中的 DNA 插入子约有 838 个核苷酸重叠 (图 4)。

[0315] 除虫链霉菌 1100-SC38 菌株的原生质体用 pSE118 如上进行转化。分离 1100-SC38 菌株的硫链丝菌肽抗性转化子并通过对发酵产物的 HPLC 分析来进行分析。除虫链霉菌 1100-SC38 菌株的含 pSE118 的转化株相对于 1100-SC38 株而言, 除虫菌素环己基 B2 : 环己基 -B1 的比例并未改变 (表 2)。

[0316] 7.1.10. 对除虫链霉菌染色体 DNA 上 *aveC* 基因的 PCR 扩增

[0317] 通过 PCR 扩增法从除虫链霉菌染色体 DNA 中分离含 *aveC* ORF 的 ~ 1.2Kb 片段, 所用引物根据从上所获的 *aveC* 核苷酸序列进行设计。PCR 引物由 Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas) 提供。右向引物是 :5' -TCACGAAACCGACACAC-3 (SEQ ID NO :6); 左向引物

是:5' -CATGATCGCTGAACCGAG-3' (SEQ ID NO:7)。在由生产商所提供的缓冲液中,在有 300 μ M dNTP,10%甘油,每种引物各 200pmol,0.1 μ g 模板及 2.5 单位酶,终体积 100 μ l 的条件下,用 DeepVent™ 聚合酶 (New England-Biolabs) 在 Perkin-Elmer Cetus 热循环仪中进行 PCR 反应。第一循环为 95°C 5 分钟 (变性步骤),60°C 2 分钟 (退火步骤),72°C 2 分钟 (延伸步骤)。随后 24 循环的温度变化与此相似,但变性步骤的时间缩短至 45 秒且退火时间缩短至 1 分钟。

[0318] PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳后,检测到约 1.2Kb 的单一 DNA 带。从凝胶中纯化该 DNA,并以 1 : 10 摩尔的载体:插入子比例与 25ng 线性化钝端 PCR-Blunt 载体 (Invitrogen) 按照操作手册进行连接。按照操作手册用该连接混合物转化 One Shot™ 大肠杆菌感受态细胞 (Invitrogen)。从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒 DNA,该~1.2Kb 插入子的存在可以通过限制性分析证实。该质粒被命名为 pSE179。

[0319] 将 pSE179 中的 DNA 插入子通过 BamHI/XbaI 消化而分离,电泳分离,从凝胶中纯化,并与已被 BamHI/XbaI 消化的穿梭载体 pWHM3 连接,该反应中 DNA 总浓度为 1 μ g,载体与插入子的摩尔比为 1 : 5。按照操作手册用该连接混合物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA,所述~1.2Kb 插入子的存在可以通过限制性分析证实。该质粒 (被命名为 pSE186 (图 2, ATCC 209604)) 被转化至大肠杆菌 DM1 中,并从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒 DNA。

[0320] 7.2. 结果

[0321] 鉴定出来自 pSE119 的 2.9Kb SacI/BamHI 酶切片段,当其转化至除虫链霉菌 1100-SC38 菌株中时,显著地改变了 B2 : B1 除虫菌素的产量比。一般情况下,除虫链霉菌 1100-SC38 菌株的 B2 : B1 比约为 30 : 1,但当用含有 2.9Kb SacI/BamHI 酶切片段的载体转化时,除虫菌素 B2 : B1 的比例减少至大约 3.7 : 1。对转化体培养物进行发酵后分析证实了转化 DNA 的存在。

[0322] 对 2.9Kb pSE119 片段进行测序,鉴定了约 0.9Kb 的 ORF (图 1) (SEQ IDNO:1),其包含一个已于他处发生突变而仅产生 B2 产物的 PstI/SphI 片段 (Ikeda 等,1995,同上)。该 ORF 或其相应的推导多肽,与已知数据库 (GenEMBL, SWISS-PROT) 相比,并不表明其与已知 DNA 或蛋白序列有任何的同源性。

[0323] 表 2 表示用不同质粒转化的除虫链霉菌 1100-SC38 株的发酵分析

[0324] 表 2

[0325]

除虫链霉菌菌株 (转化质粒)	所测转化体的编号	平均 B2 : B 1 比例
1100-SC38 (无)	9	30.66
1100-SC38 (pWHM3)	21	31.3
1100-SC38 (pSE119)	12	3.7
1100-SC38 (pSE118)	12	30.4
1100-SC38 (pSE185)	14	27.9

[0326] 8. 实施例 :除虫链霉菌 *aveC* 突变株的构建

[0327] 本实施例描述用上述组合物及方法对几种不同除虫链霉菌 *aveC* 突变株的构建。在链霉菌基因中引入突变的技术见 Kieser 及 Hopwood, 1991, Meth. Enzym. 204 :430-458。详见 Anzai 等, 1988, J. Antibiot XLI(2) :226-233 和 Stutzman-Engwall 等, 1992, J. Bacteriol. 174(1) :144-154。这些参考资料在此都被全文引用。

[0328] 8.1. 除虫链霉菌 *AveC* 基因的失活

[0329] 含有失活的 *AveC* 基因的 *AveC* 突变株可通过下述的几种方法构建。在第一种方法中, 将 pSE119(上文第 7.1.9 所述质粒) 上 *aveC* 基因内部的 640bp SphI/PstI 片段用红色糖多孢菌的 *ermE* 基因(赋予红霉素抗性) 取代。*ermE* 基因通过用 BglIII 和 EcoRI 消化而从 pIJ4026(来自 John Innes Institute, Norwich, U.K. ; 还参见 Bibb 等, 1985, Gene 41 : 357-368) 中分离, 然后电泳, 从凝胶中纯化。将此约 1.7Kb 的片段连接到用 BamHI 和 EcoRI 消化的 pGEM7zf (Promega) 中, 将该连接混合物依照操作手册转化到大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞中。从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒 DNA, 所述约 1.7Kb 插入子的存在可以通过限制性分析证实。将该质粒命名为 pSE27。

[0330] pSE118(如上第 7.1.9 部分描述) 用 SphI 及 BamHI 消化, 将消化物电泳, 从凝胶中纯化约 2.8Kb 的 SphI/BamHI 插入子。pSE119 用 PstI 和 EcoRI 消化, 然后电泳, 从凝胶中纯化约 1.5Kb 的 PstI/EcoRI 插入子。将穿梭载体 pWHM3 用 BamHI 及 EcoRI 消化。pSE27 用 PstI 和 SphI 消化。然后电泳, 从凝胶中纯化约 1.7Kb 的 PstI/SphI 插入子。将全部四种片段(即 : 约 2.8Kb, 约 1.5Kb, 约 7.2Kb, 约 1.7Kb) 通过一个 4 步骤(4-way) 连接反应连接在一起。将该连接混合物依照操作手册转化到大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞中。从氨苄青霉素抗性转化子中分离质粒 DNA, 通过限制性分析证实正确插入子的存在。该质粒被命名为 pSE180(图 3 ; ATCC209605)。

[0331] 将 pSE180 转化入变青链霉菌 TK64 细胞, 用针对硫链丝菌肽和红霉素的抗性鉴定转化的菌落。从变青链霉菌中分离 pSE180, 用其转化除虫链霉菌的原生质体。鉴定出四种硫链丝菌肽抗性除虫链霉菌转化体, 制备原生质体并在非选择性条件下将其铺板至 RM14 培养基中。使原生质体再生, 然后筛选有红霉素抗性而无硫链丝菌肽抗性的单菌落, 其表明失活型 *aveC* 基因已整合在染色体上但游离复制子已丢失。鉴定出一个 *Erm^rThio^s* 转化体, 将其命名为 SE180-11 菌株。从 SE180-11 株中分离总染色体 DNA, 用限制性酶 BamHI, Hind III, PstI 或 SphI 消化, 在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 然后转移至尼龙膜上, 与 *ermE* 探针进行杂交。这些分析显示, 通过一个双交换事件使得 *ermE* 抗性基因整合至染色体上并同时使 640bpPstI/SphI 片段缺失。对 SE180-11 株发酵产物的 HPLC 分析显示不再产生正常的除虫菌素(图 5A)。

[0332] 在使 *aveC* 基因失活的第二种方法中, 从除虫链霉菌 SE180-11 株的染色体上取出 1.7Kb 的 *ermE* 基因, 使得 *aveC* 基因中出现 640bp PstI/SphI 的缺失。如下构建基因取代质粒 : pSE180 用 XbaI 进行部分消化, 从凝胶中纯化约 11.4Kb 的片段。该约 11.4Kb 的带缺少所述 1.7Kb *ermE* 抗性基因。将此 DNA 连接并转化进大肠杆菌 DH5 α 细胞。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA, 正确插入子的存在可以通过限制性分析证实。将该质粒(被命名为 pSE184) 转化进大肠杆菌 DM1 中, 从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA。用该质粒转化除虫链霉菌 SE180-11 株的原生质体。从 SE180-11 株的硫链丝菌肽抗性转化体制备原

生质体,并在 RM14 上铺板为单菌落。使原生质体再生,然后筛选出无红霉素抗性和硫链丝菌肽抗性的单菌落,其表明失活型 *aveC* 基因已整合在染色体上但含有 *ermE* 基因的游离复制子已缺失。鉴定出一个 *Erm^sThio^s* 转化子并命名为 SE184-1-13。对 SE184-1-13 的发酵分析显示正常除虫菌素不再产生,且 SE184-1-13 具有与 SE180-11 相同的发酵特征。

[0333] 在第三种使 *aveC* 基因失活的方法中,用 PCR 在第 471 位核苷酸 C 之后添加两个 G,导致在染色体 *aveC* 基因中引入移码突变,从而创建一个 BspE1 位点。工程化 EspE1 位点的存在可用于检测基因取代事件。PCR 引物被设计为能在 *aveC* 基因中引进移码突变,所述引物由 Genosys Biotechnologies 公司提供。右向引物为:5' -GGTTCGGATGCCGTCTCG-3' (SEQ ID NO:8),左向引物为:5' -AACTCCGGTCGACTCCCCTTC-3' (SEQ ID NO:9)。PCR 条件如上第 7.1.10 节所述。666bp 的 PCR 产物用 SphI 消化,分别得到 278bp 及 388bp 的两种片段。从凝胶中纯化所述 388bp 的片段。

[0334] 基因取代质粒如下构建:穿梭载体 pWHM3 用 EcoRI 及 BamHI 消化。pSE119 用 BamHI 及 SphI 消化,然后电泳,从凝胶中分离出约 840bp 的片段。pSE119 用 EcoRI 及 XmmI 消化,电泳分离,从凝胶中纯化约 1.7Kb 的片段。四种片段(也即:~7.2Kb,~840bp,~1.7Kb 及 388bp)通过一个 4 步骤连接反应连接在一起。将该连接混合物转化进大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA,通过限制性分析及 DNA 序列分析证实正确插入子的存在。将该质粒(命名为 pSE185)转化至大肠杆菌 DM1 细胞,从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA。用该质粒转化除虫链霉菌 1100-SC38 菌株的原生质体。分离 1100-SC38 菌株的硫链丝菌肽抗性转化体,并通过对发酵产物的 HPLC 分析来分析。当 pSE185 转化入除虫链霉菌 1100-SC38 菌株中时,并未明显改变除虫菌素 B2 : B1 的比例(表 2)。

[0335] 用 pSE185 转化除虫链霉菌原生质体以在染色体 *aveC* 基因中产生一个移码突变。从硫链丝菌肽抗性转化株制备原生质体,并在 RM14 培养基上铺板为单菌落。使原生质体再生,然后筛选无硫链丝菌肽抗性的单菌落。分离硫链丝菌肽敏感菌落的染色体 DNA 并通过 PCR 筛选整合至染色体中的移码突变的存在。PCR 引物根据 *aveC* 核苷酸序列设计,由 GenosysBiotechnologies(Texas) 公司提供。右向 PCR 引物为:5' -GCAAGGATACGGGGACTAC-3' (SEQ ID NO:10),左向 PCR 引物为:5' -GAACCGACCGCCTGATAC-3' (SEQ ID NO:11),PCR 条件如上第 7.1.10 节所述。所获 PCR 产物为 543bp,当用 BspE1 消化时,可检测到三种片段 368bp,96bp,及 79bp,其表明失活型 *aveC* 基因的染色体整合及游离复制子的缺失。

[0336] 对 *aveC* 基因上含有移码突变的除虫链霉菌突变株的发酵分析显示,正常除虫菌素不再产生,且这些突变株具有与 SE180-11 株及 SE184-1-13 株相同的发酵产物 HPLC 特征。鉴定出一个 *Thio^s* 转化株并命名为 SE185-5a。

[0337] 此外,在 *aveC* 基因上产生一个突变,其使第 520 位核苷酸由 G 变为 A,从而导致第 116 位上编码色氨酸(W)的密码子变为终止密码子。携带此突变的除虫链霉菌菌株不产生正常除虫菌素且具有与 SE180-11、SE184-1-13、及 SE185-5a 菌株相同的发酵特征。

[0338] 此外,在 *aveC* 基因中产生突变,其导致:(i) 第 970 位核苷酸由 G 变为 A,使第 256 位氨基酸从甘氨酸(G)变为天冬氨酸(D),(ii) 第 996 位核苷酸由 T 变为 C,使第 275 位氨

基酸从酪氨酸 (Y) 变为组氨酸 (H)。具有这些突变 (G256D/Y275H) 的除虫链霉菌菌株并不产生正常除虫菌素但具有与 SE180-11、SE184-1-13、及 SE185-5a 菌株相同的发酵特征。

[0339] 除虫链霉菌 *aveC* 失活突变株 SE180-11、SE184-1-13、SE185-5a, 及此处所提的其它菌株, 为评估 *aveC* 基因中其它突变的影响提供了筛选工具。将含有野生型 *aveC* 基因的 pSE186 转化入大肠杆菌 DM1 细胞中, 从氨苄青霉素抗性转化株中分离质粒 DNA。用该 pSE186DNA 转化除虫链霉菌 SE180-11 株。分离 SE180-11 株的硫链丝菌肽抗性转化体, 测定红霉素抗性的存在, 通过 HPLC 分析发酵产物来分析 Thio^rErm^r 转化体。功能性 *aveC* 基因的反位 (in trans) 存在能将除虫菌素的正常产量恢复到 SE180-11 株的水平 (图 5B)。

[0340] 8.2 对改变 B2 : B1 比例的 *AveC* 基因中突变分析

[0341] 如上所述, 含有失活的 *aveC* 基因的除虫链霉菌 SE180-11 菌株通过用含有功能性 *aveC* 基因的质粒 (pSE186) 转化而补充。SE180-11 株也可用作宿主菌株来鉴定 *aveC* 基因的其它突变, 如下所述。

[0342] 从 1100-SC38 菌株中分离染色体 DNA, 并用作 *aveC* 基因进行 PCR 扩增的模板。通过 PCR 扩增分离 1.2Kb ORF, 扩增所用引物根据 *aveC* 核苷酸序列来设计。右向引物为 SEQ ID NO :6, 左向引物为 SEQ ID NO :7 (见第 7.1.10 节所述)。PCR 及亚克隆条件如第 7.1.10 节所述。1.2Kb ORF 的 DNA 序列分析显示了第 337 位核苷酸由 C 变为 T 的 *aveC* 基因突变, 第 55 位的氨基酸由丝氨酸 (S) 变为苯丙氨酸 (F)。将含有 S55F 突变的 *aveC* 基因亚克隆入 pWHM3 以产生一个质粒, 其被命名为 pSE187, 并用于转化除虫链霉菌 SE180-11 菌株的原生质体。分离 SE180-11 株的硫链丝菌肽抗性转化体, 以确定红霉素抗性的存在, 通过 HPLC 分析发酵产物来分析 Thio^rErm^r 转化体。编码第 55 位氨基酸之改变 (S55F) 的 *aveC* 基因的存在, 能将正常的除虫菌素产量恢复到 SE180-11 株的水平 (图 5C); 但环己基 B2 : 环己基 B1 的比例约为 26 : 1, 而用 pSE186 转化的 SE180-11 株的 B2 : B1 比约为 1.6 : 1 (表 3), 表明该单突变 (S55F) 调节了环己基 B2 相对于环己基 B1 的量。

[0343] 鉴定出在 *aveC* 基因中的另一个突变, 其使第 862 位核苷酸由 G 变为 A, 从而第 230 位的氨基酸由甘氨酸 (G) 变为天冬氨酸 (D)。含有该突变 (G230D) 的除虫链霉菌菌株产生的除虫菌素 B2 : B1 比例约为 30 : 1。

[0344] 8.3. 使 B2 : B1 比例下降的突变

[0345] 可以如下构建减少环己基 -B2 相对于环己基 -B1 的量的几种突变。

[0346] 鉴定出 *aveC* 基因中一个突变, 其使第 588 位核苷酸由 G 变为 A, 从而第 139 位的氨基酸由丙氨酸 (A) 变为苏氨酸 (T)。将含有 A139T 突变的 *aveC* 基因亚克隆入 pWHM3 中, 产生一个质粒 (命名为 pSE188), 用该质粒转化除虫链霉菌 SE180-11 株的原生质体。分离 SE180-11 株的硫链丝菌肽抗性转化体, 测定红霉素抗性株的存在, 通过 HPLC 分析发酵产物来分析 Thio^rErm^r 转化体。编码氨基酸残基 139 改变 (A139T) 的突变型 *aveC* 基因的存在能将除虫菌素产量恢复至 SE180-11 株的水平 (图 5D); 但 B2 : B1 的比例约是 0.94 : 1, 这表明该突变减少了环己基 B2 相对于环己基 B1 的量。该结果很意外, 因为已公布的结果以及上述突变结果仅证明了 *aveC* 基因的失活或除虫菌素 B2 型相对于 B1 型的产量增加 (见表 3)。

[0347] 由于 A139T 突变以更利于 B1 的方式改变了 B2 : B1 的比例, 因此构建一个突变, 其使第 138 位的氨基酸由丝氨酸变为苏氨酸。为此, pSE186 用 EcoRI 消化并克隆入已用 EcoRI

消化的 pGEM3Zf (Promega) 中。该被命名为 pSE186a 的质粒用 ApaI 及 KpnI 消化,在琼脂糖凝胶中分离 DNA 片段,从凝胶中纯化两种片段~ 3.8Kb 及~ 0.4Kb。用 pSE186 的~ 1.2Kb DNA 插入片段作 PCR 模板,诱导第 585 位核苷酸的单碱基改变。将 PCR 引物设计成在核苷酸 585 位能引进一个突变,该引物由 Genosys Biotechnologies 公司 (Texas) 提供。右向 PCR 引物为:5' -GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCTGGCGACG-3' (SEQ ID NO:12);左向 PCR 引物为:5' -GGAACCGACCGCCTGATACA-3' (SEQ ID NO:13)。使用 Advantage GC 基因组 PCR 试剂盒 (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA),在由厂商提供的缓冲液中,在有 200 μ M dNTPs,每种引物各 200pmol,50ng 模板 DNA,1.0MGC-Melt 及 1 个单位的 KlenTaq 聚合酶混合物的条件下,在终体积 50 μ l 中进行 PCR 反应。第一循环为 94 $^{\circ}$ C 1 分钟;接下来以 94 $^{\circ}$ C 30 秒钟及 68 $^{\circ}$ C 2 分钟进行 25 个循环;然后以 68 $^{\circ}$ C 3 分钟进行一个循环。将 295bp 的 PCR 产物用 ApaI 及 KpnI 消化以释放一个 254bp 的片段,其通过电泳进行分辨并从凝胶中纯化。所有三种片段 (~ 3.8Kb, ~ 0.4Kb 及 254bp) 用一个 3 步骤连接反应连接在一起。将该连接混合物转化入完整的大肠杆菌 DH5 α 细胞中。从氨苄青霉素抗性转化株中分离质粒 DNA,正确插入子的存在可以通过限制性分析确认。该质粒被命名为 pSE198。

[0348] pSE198 用 EcoRI 进行消化,克隆进已用 EcoRI 消化的 pWHM3 中,并将其转化至大肠杆菌 DH5 α 细胞中。从氨苄青霉素抗性转化株中分离质粒 DNA,通过限制性分析及 DNA 序列分析确认正确插入子的存在。将该质粒 DNA 转化至大肠杆菌 DM1,从氨苄青霉素抗性转化株中分离质粒 DNA,通过限制性分析确认正确插入子的存在。将这一命名为 pSE199 的质粒用于转化除虫链霉菌 SE180-11 菌株原生质体。分离 SE180-11 菌株的硫链丝菌肽抗性转化株,确定红霉素抗性的存在,通过用 HPLC 法分析发酵产物而分析 Thio^rErm^r 转化株。编码 138 位上氨基酸改变 (S138T) 的突变 aveC 基因的存在能将正常除虫菌素产量恢复至 SE180-11 株的水平;然而,B2 : B1 的比例为 0.88 : 1,表明了该突变减少了环己基 -B2 相对于环己基 -B1 的量 (见表 -3)。该 B2 : B1 的比例甚至低于 0.94 : 1 (这是用 pSE188 转化 SE180-11 菌株而产生的 A139T 突变所观察到的比例,如上所述)。

[0349] 构建另一个突变以同时在氨基酸位置 138 及 139 处引进一个苏氨酸。用 pSE186 的约 1.2Kb DNA 插入片段做 PCR 的模板。将 PCR 引物设计成能在核苷酸位置 585 及 588 处诱发突变,该引物由 Genosys Biotechnologies 公司 (Texas) 提供。右向 PCR 引物为:5'-GGGGGCGGGCCCCGGGTGCGGAGGCGGAAATGCCCTGGCGACGACG-3' (SEQ ID NO:14);左向 PCR 引物为:5' -GGAACATCACGGCATTACAC-3' (SEQ ID NO:15)。使用本节上述条件进行 PCR 反应。449bp 的 PCR 产物用 ApaI 及 KpnI 消化以释放 254bp 的片段,其通过电泳进行分辨并从凝胶中纯化。将 pSE186a 用 ApaI 及 KpnI 消化,琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段,从凝胶中纯化 3.8Kb 与 0.4Kb 的两种片段。所有这三种片段 (~ 3.8Kb, ~ 0.4Kb 及 254bp) 以 3 步骤连接反应进行连接,将该连接混合物转化至大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA,通过限制性分析确认正确插入子的存在。该质粒被命名为 pSE230。

[0350] pSE230 用 EcoRI 消化,克隆至已被 EcoRI 消化的 pWHM3 质粒中,转化至大肠杆菌 DH5 α 细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA,通过限制性分析及 DNA 序列分析确认正确插入子的存在。将该质粒 DNA 转化至大肠杆菌 DM1 中,从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA,通过限制性分析确认正确插入子的存在。用这一命名为 pSE231 的质粒转

化除虫链霉菌 SE180-11 菌株的原生质体。分离 SE180-11 的硫链丝菌肽抗性转化体,确定红霉素抗性的存在,然后通过发酵分析 Thio^rErm^r 转化体。双突变 aveC 基因(编码 S138T/A139T)的存在能使正常的除虫菌素生产恢复到 SE180-11 株的水平;但 B2 : B1 的比例为 0.84 : 1,显示该突变相对于 pSE188 或 pSE199 所转化的 SE180-11 株所提供的降低作用而言,进一步降低了环己基 -B2 相对于环己基 B1 的产量(见表 3)。

[0351] 构建另一突变,以便进一步降低环己基 B2 相对于环己基 B1 的产量。由于 S138T/A139T 突变能使 B2 : B1 之比向更利于 B1 的方向改变,因此构建一种突变,使得能在第 138 位氨基酸处引入一个苏氨酸并在第 139 位氨基酸处引入一个苯丙氨酸。用来自 pSE186 的约 1.2kb DNA 插入片段作为 PCR 的模板。将 PCR 引物设计为能在第 585 位核苷酸处引入突变(使 T 变为 A),第 588 位核苷酸处引入突变(使 G 变为 T),第 589 位核苷酸处引入突变(使 C 变为 T),这些引物可由 Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas) 提供。正向 PCR 引物为:5'-GGGGGCGGGCCCGGTGCGGAGGCGAAATGCCGCTGGCGACGTTC-3'(SEQ ID NO:16);反向 PCR 引物为:5'-GGAACATCACGGCATTACAC-3'(SEQ ID NO:15)。PCR 反应用 Advantage GC 基因组 PCR 试剂盒(Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)在厂家提供的缓冲液中进行,所述缓冲液中有 200 μM dNTPs,每种引物各 200pmol,50ng 模板 DNA,101mM 乙酸镁,1.0M GC-Melt 和 1 个单位的 Tth DNA 聚合酶,终体积 50 μl。热循环过程为,94℃ 1 分钟进行第一个循环;然后 94℃ 30 秒和 68℃ 2 分钟共 25 个循环;68℃ 3 分钟进行一个循环。449bp 的 PCR 产物用 ApaI 和 KpnI 消化,释放出一个 254bp 的片段,将其通过电泳分离并在凝胶上纯化。将所有三种片段(约 3.8Kb,约 0.4Kb 和 254bp)通过一个三步骤连接反应连接在一起。将该连接混合无转化至感受态的大肠杆菌 DH5 α 细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA,通过限制性分析证实正确插入子的存在。将该质粒命名为 pSE238。

[0352] pSE238 用 EcoRI 消化,克隆至已被 EcoRI 消化的 pWHM3 质粒中,转化至大肠杆菌 DH5 α 细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA,通过限制性分析及 DNA 序列分析确认正确插入子的存在。将该质粒 DNA 转化至大肠杆菌 DM1 中,从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA,通过限制性分析确认正确插入子的存在。用这一命名为 pSE239 的质粒转化除虫链霉菌 SE180-11 菌株的原生质体。分离 SE180-11 菌株的硫链丝菌肽抗性转化体,确定红霉素抗性的存在,然后通过对发酵产物进行 HPLC 分析来分析 Thio^rErm^r 转化体。双突变 aveC 基因(编码 S138T/A139F)的存在能使正常的除虫菌素生产恢复到 SE180-11 株的水平;但 B2 : B1 的比例为 0.75 : 1,表明该突变相对于如上述用 pSE188, pSE199 或 pSE231 转化的 SE180-11 株所提供的降低作用而言,进一步降低了环己基 -B2 相对于环己基 B1 的产量(见表 3)。

[0353] 表 3

[0354]

除虫链霉菌菌株 (转化质粒)	转化体 测试号	B2 相对 浓度	B1 相对 浓度	平均 B2 : B1 比例
SE180-11(无)	30	0	0	0
SE180-11(pWHM3)	30	0	0	0
SE180-11(pSE186)	26	222	140	1.59
SE180-11(pSE187)	12	283	11	26.3
SE180-11(pSE188)	24	193	206	0.94
SE180-11(pSE199)	18	155	171	0.88
SE180-11(pSE231)	6	259	309	0.84
SE180-11(pSE239)	20	184	242	0.75

[0355]

[0356] 可利用 DNA 改组 (shuffling) 技术构建另外的突变,以进一步降低环己基 B2 相对于环己基 B1 的产量,所述技术如 Stemmer,1994, Nature 370 :389-391 ;Stemmer,1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :10747-10751 所述 ;还可详见美国专利 5605793,5811238, 5830721 和 5837458。

[0357] 将含有突变型 aveC 基因的 DNA 改组质粒转化至感受态的 dam⁻ dcm⁻ 大肠杆菌细胞中。从氨苄青霉素抗性转化体中分离质粒 DNA,用于转化除虫链霉菌 SE180-11 菌株的原生质体。分离 SE180-11 菌株的硫链丝菌肽抗性转化体,从中筛选能产生除虫菌素但其环己基 B2 : 环己基 B1 之比为 1 : 1 或更低的那些转化体。测定能产生除虫菌素但其 B2 : B1 之比为 1 : 1 或更低的那些转化体中质粒 DNA 的 DNA 序列。

[0358] 鉴定出 8 株转化体,其产生的环己基 B2 相对于环己基 B1 的量减少。这些转化体中最低 B2 : B1 之比为 0.40 : 1(表 4)。分离这 8 种转化体每一种的质粒 DNA,测定其 DNA 序列以便鉴定 aveC 基因中的突变。所述突变如下。

[0359] pSE290 包含 4 个核苷酸突变,即第 317 位的核苷酸从 T 变为 A,第 353 位的核苷酸从 C 变为 A,第 438 位的核苷酸从 G 变为 A,第 1155 位的核苷酸从 T 变为 A。第 317 位核苷酸的改变使得第 48 位的氨基酸由 D 变为 E,第 438 位核苷酸的改变使得第 89 位的氨基酸由 A 变为 T。携有该质粒的细胞所产生的 B2 : B1 之比为 0.42 : 1(表 4)。

[0360] pSE291 包含 4 个核苷酸突变,即第 272 位的核苷酸从 G 变为 A,第 585 位的核苷酸从 T 变为 A,第 588 位的核苷酸从 G 变为 A,第 708 位的核苷酸从 G 变为 A。第 585 位核苷酸的改变使得第 138 位的氨基酸由 S 变为 T,第 588 位核苷酸的改变使得第 139 位的氨基酸由 A 变为 T,第 708 位核苷酸的改变使得第 179 位的氨基酸由 G 变为 S。携有该质粒的细胞所产生的 B2 : B1 之比为 0.57 : 1(表 4)。

[0361] pSE292 包含与 pSE290 相同的 4 个核苷酸突变。携有该质粒的细胞所产生的

B2 : B1 之比为 0.40 : 1 (表 4)。

[0362] pSE293 包含 6 个核苷酸突变,即第 24 位的核苷酸从 A 变为 G,第 286 位的核苷酸从 A 变为 C,第 497 位的核苷酸从 T 变为 C,第 554 位的核苷酸从 C 变为 T,第 580 位的核苷酸从 T 变为 C,第 886 位的核苷酸从 A 变为 T。第 286 位核苷酸的改变使得第 38 位的氨基酸由 Q 变为 P,第 580 位核苷酸的改变使得第 136 位的氨基酸由 L 变为 P,第 886 位核苷酸的改变使得第 238 位的氨基酸由 E 变为 D。携有该质粒的细胞所产生的 B2 : B1 之比为 0.68 : 1 (表 4)。

[0363] pSE294 包含 6 个核苷酸突变,即第 469 位的核苷酸从 T 变为 C,第 585 位的核苷酸从 T 变为 A,第 588 位的核苷酸从 G 变为 A,第 708 位的核苷酸从 G 变为 A,第 833 位的核苷酸从 C 变为 T,第 1184 位的核苷酸从 G 变为 A。此外,第 173、174 和 175 位的核苷酸已缺失。第 469 位核苷酸的改变使得第 99 位的氨基酸由 F 变为 S,第 585 位核苷酸的改变使得第 138 位的氨基酸由 S 变为 T,第 588 位核苷酸的改变使得第 139 位的氨基酸由 A 变为 T,第 708 位核苷酸的改变使得第 179 位的氨基酸由 G 变为 S。携有该质粒的细胞所产生的 B2 : B1 之比为 0.53 : 1 (表 4)。

[0364] pSE295 包含 2 个核苷酸突变,即第 588 位的核苷酸从 G 变为 A,第 856 位的核苷酸从 T 变为 C。第 588 位核苷酸的改变使得第 139 位的氨基酸由 A 变为 T,第 856 位核苷酸的改变使得第 228 位的氨基酸由 M 变为 T。携有该质粒的细胞所产生的 B2 : B1 之比为 0.80 : 1 (表 4)。

[0365] pSE296 包含 5 个核苷酸突变,即第 155 位的核苷酸从 T 变为 C,第 505 位的核苷酸从 G 变为 T,第 1039 位的核苷酸从 C 变为 T,第 1202 位的核苷酸从 C 变为 T,第 1210 位的核苷酸从 T 变为 C。第 505 位核苷酸的改变使得第 111 位的氨基酸由 G 变为 V,第 1039 位核苷酸的改变使得第 289 位的氨基酸由 P 变为 L。携有该质粒的细胞所产生的 B2 : B1 之比为 0.73 : 1 (表 4)。

[0366] pSE297 包含 4 个核苷酸突变,即第 377 位的核苷酸从 G 变为 T,第 588 位的核苷酸从 G 变为 A,第 633 位的核苷酸从 A 变为 G,第 1067 位的核苷酸从 A 变为 T。第 588 位核苷酸的改变使得第 139 位的氨基酸由 A 变为 T,第 633 位核苷酸的改变使得第 154 位的氨基酸由 K 变为 E,第 1067 位核苷酸的改变使得第 298 位的氨基酸由 Q 变为 H。携有该质粒的细胞所产生的 B2 : B1 之比为 0.67 : 1 (表 4)。

[0367] 表 4

[0368]

除虫链霉菌菌株 (转化质粒)	所测转化 体的编号	相对 B2 浓度	相对 B1 浓度	平均 B2 : B1 比例
SE180-11 (无)	4	0	0	0
SE180-11 (pWHM3)	4	0	0	0
SE180-11 (pSE290)	4	87	208	0.42
SE180-11 (pSE291)	4	106	185	0.57
SE180-11 (pSE292)	4	91	231	0.40
SE180-11 (pSE293)	4	123	180	0.68
SE180-11 (pSE294)	4	68	129	0.53
SE180-11 (pSE295)	4	217	271	0.80
SE180-11 (pSE296)	1	135	186	0.73
SE180-11 (pSE297)	1	148	221	0.67

[0369] 如下进行另一轮 DNA 改组,以便使环己基 -B2 除虫菌素的产量相对于环己基 -B1 除虫菌素减少。

[0370] 半合成改组

[0371] 用 Maxygen Inc. 的 W097/20078 中所述的方法对最佳克隆进行改组。在改组反应中添加多个单独的寡核苷酸,它们编码与降低的 B2 : B1 比例最佳对应的有益取代,它们的添加量是相对于 aveC 模板链为 5 摩尔过量。使所述寡核苷酸的每一核苷酸错配的侧翼为 20 个具有完美同一性 (perfect identity) 的核苷酸,以便确保在改组反应期间的正确插入。寡核苷酸购自 Operon Technologies (Alameda, CA)。

[0372] 除虫链霉菌的 HTP 生长

[0373] 从转化平板上挑取独立的菌落,将其接种到 96 孔深孔接种板的 200 μ l R5 培养基 (Kieser, T 等, "Practical Streptomyces Genetics", 2000, Norwich, U.K., John Innes Foundation) 中, 30℃ 振荡培养。在每一孔中分配玻璃珠,以便分散菌丝体并给培养物通气。在此期间,使培养物实现平稳的密集生长。4-5 天后,取 20 μ l 接种培养物分散到生产平板中,剩余的体积在加入甘油至终浓度为 20% 以后,作为主平板冻在 -80℃。将生产平板在 30℃ 潮湿环境中保温 12-14 天。保温 5-8 天后,这些菌株开始形成孢子。生产平板基本如辉瑞产品公司 (Pfizer Inc.) 的 W0 99/41389 所述来制备,不同仅在于添加 1% 琼脂糖以确保固体表面。

[0374] 提取以及 ESI-MS/MS 筛选

[0375] 将总量为 1ml 的乙酸乙酯加入每一孔中,室温振荡保温 20 分钟。回收约 750 μ l 乙酸乙酯相,转移到 96 孔板中,蒸发过夜。将沉淀重悬于 100 μ l 甲醇 1mM NaCl 中,用 96 孔

板模式的自动取样器取 5 μ l 溶液注入质谱仪中,不进行液相层析或其它分离就直接分析流动注射相。通过电喷雾离子化作用 (electrospray ionization) 使化合物离子化,监控两个不同通道的两轮 MS/MS 跃迁 (transition)。B1 钠化离子 (sodiated ion) 的 MS/MS 跃迁是从 m/z 921 到 m/z 777, B2 钠化离子的 MS/MS 跃迁是从 m/z 939 到 m/z 795。用 Finnigan TSQ-7000, Micromass Quattro-LC 质谱仪和 Leap Technology Twin-Pal 自动取样器进行该高通量筛选。将每一孔位置上 B1 和 B2 各自的图谱整合可以鉴定出热点 (hit)。

[0376] 最后鉴定出 57 种新的氨基酸取代组合,它们可以产生 0.35 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素 (图 6)。其中一些新突变可以产生约 0.30 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素;一些可以产生约 0.25 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素,还有一些可以产生约 0.20 : 1 或更低比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素。鉴定出 2 种新突变可以产生 0.37 或 0.38 的比例的环己基 B2 : 环己基 B1 除虫菌素。

[0377] 生物材料的保藏

[0378] 1998 年 1 月 29 日,下列生物材料保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, 保藏号为:

[0379]	<u>质粒</u>	<u>保藏号</u>
--------	-----------	------------

[0380]	质粒 pSE180	209605
--------	-----------	--------

[0381]	质粒 pSE186	209604
--------	-----------	--------

[0382] 以上所引用的全部的专利,专利申请,及公开文献在此全面引作参考。

[0383] 本发明并不局限于本文所述具体实施方案的范围,这些仅为本发明各个方面的个别举例,功能上相当的方法及组合物都属于本发明的范围。实际上,除了上述说明及示例外,从上述说明和附图,本发明的各种变化对于本领域技术人员来说都是很明显的。这些变化都将落入所附权利要求书的保护范围之内。

[0001]

序列表

<110> 辉瑞产品公司 (PFIZER PRODUCTS INC.)

<120> 指导 B2:B1 除虫菌素比例的除虫链霉菌基因

<130> PC23034A

<140> PC23034A

<141> 2002-02-12

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1229

<212> DNA

<213> 除虫链霉菌 (Streptomyces avermitilis)

<220>

<221> CDS

<222> (174).. (1085)

<400> 1

tcacgaaacc ggacacacca cacacacgaa ggtgagacag cgtgaacca tccgagccgc 60

tcggcctgcc caacgaacgt gtagtagaca cccgaccgtc cgatgccacg ctctcaccgc 120

aggccggcct gaacaggtca ggagcgtgc cccgtgaact gctgtcgttg ccg gtg 176
Val
1gtg gtg tgg gcc ggg gtc ggc ctg ctg ttt ctg gcc ctg cag gcg tac 224
Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala Tyr
5 10 15gtg ttc agc cgc tgg gcg gcc gac ggt ggc tac cgg ctg atc gag acg 272
Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu Thr
20 25 30gcg ggc cag ggt cag ggc ggc agc aag gat acg ggg act acc gat gtg 320
Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp Val
35 40 45

[0002]

[0003]

230	235	240	
tcg tgg gtg gaa cgg gga gcc tgg cgg ttg ccg caa cgg gca gcg aac			944
Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala Asn			
245	250	255	
tgg gcg cgt ttc ctc gcc gtg gtc ggt ggg gtg aat gcc gtg atg ttc			992
Trp Ala Arg Phe Leu Ala Val Val Gly Gly Val Asn Ala Val Met Phe			
260	265	270	
ctc tac acc tgt ttc cat atc ctc ctg tcc ctc gtc ggt gga cag ccg			1040
Leu Tyr Thr Cys Phe His Ile Leu Leu Ser Leu Val Gly Gly Gln Pro			
275	280	285	
ccc gac caa ctg ccg gac tcc ttc caa gcg ccg gcc gct tac tga			1085
Pro Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Gln Ala Pro Ala Ala Tyr			
290	295	300	
gttcagggca ggtcggagga gacggagaag gggaggcgac cggagttccg gtcacctccc			1145
ctttgtgcat ggggtggacgg ggatcacgct cccatggcgg cgggctcctc cagacgcacc			1205
acactcctcg gttcagcgat catg			1229
<210> 2			
<211> 303			
<212> PRT			
<213> 除虫链霉菌 (Streptomyces avermitilis)			
<400> 2			
Val Val Val Trp Ala Gly Val Gly Leu Leu Phe Leu Ala Leu Gln Ala			
1 5 10 15			
Tyr Val Phe Ser Arg Trp Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Arg Leu Ile Glu			
20 25 30			
Thr Ala Gly Gln Gly Gln Gly Gly Ser Lys Asp Thr Gly Thr Thr Asp			
35 40 45			
Val Val Tyr Pro Val Ile Ser Val Val Cys Ile Thr Ala Ala Ala Ala			
50 55 60			
Trp Leu Phe Arg Arg Cys Arg Val Glu Arg Arg Leu Leu Phe Asp Ala			
65 70 75 80			
Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Phe Ala Ser Trp Gln Ser Pro Leu Met			
85 90 95			
Asn Trp Phe His Ser Val Leu Val Ser Asn Ala Ser Val Trp Gly Ala			
100 105 110			
Val Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln Gly Ala Gly Pro			

[0004]

115	120	125
Gly Ala Glu Ala Glu Met Pro Leu Ala Ser Ala Ser Val Cys Met Ser		
130	135	140
Ala Leu Ile Val Thr Val Leu Cys Ser Lys Ala Leu Gly Trp Ile Lys		
145	150	155
Ala Arg Arg Pro Ala Trp Arg Thr Trp Arg Leu Val Leu Ala Val Phe		
165	170	175
Phe Ile Gly Ile Val Leu Gly Leu Ser Glu Pro Leu Pro Ser Ala Ser		
180	185	190
Gly Ile Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Thr Leu Trp Ser		
195	200	205
Gly Glu Trp Tyr Gln Phe Pro Val Tyr Gln Ala Val Gly Ser Gly Leu		
210	215	220
Val Cys Cys Met Leu Gly Ser Leu Arg Phe Phe Arg Asp Glu Arg Asp		
225	230	235
Glu Ser Trp Val Glu Arg Gly Ala Trp Arg Leu Pro Gln Arg Ala Ala		
245	250	255
Asn Trp Ala Arg Phe Leu Ala Val Val Gly Gly Val Asn Ala Val Met		
260	265	270
Phe Leu Tyr Thr Cys Phe His Ile Leu Leu Ser Leu Val Gly Gly Gln		
275	280	285
Pro Pro Asp Gln Leu Pro Asp Ser Phe Gln Ala Pro Ala Ala Tyr		
290	295	300

<210> 3

<211> 1150

<212> DNA

<213> 吸水链霉菌 (Streptomyces hygroscopicus)

<220>

<221> CDS

<222> (58).. (990)

<400> 3

gtcgacgaag accggccgga ggccgtcggc cgggccgata ccgtacgcgg cctgcgg 57

gtg ttc acc ctt ccc gta aca ctg tgg gcg tgt gtc ggc gcg ctg gtg 105

Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val

1

5

10

15

ctg gga ctt cag gtg tac gtg ttc gcc gcc tgg ctc gcc gac agc ggc 153

Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly

20

25

30

[0005]

tac cgc atc gag aag gcg tcc ccg gcc agg ggc ggt ggg gac tcg gag	201
Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu	
35 40 45	
cgg atc gcc gat gtg ctg atc ccg ctg ctg tcc gtg gtg gga gcg gtg	249
Arg Ile Ala Asp Val Leu Ile Pro Leu Leu Ser Val Val Gly Ala Val	
50 55 60	
gtc ctc gca gtg tgt ctg tac cgg agg tgt cgg gcc agg agg cgg ctg	297
Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Arg Leu	
65 70 75 80	
acg ttc gac gcg tcg ctc ttc atc ggg ctg ctg tcg gcc agt tgg cag	345
Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln	
85 90 95	
agt ccc ttg atg aac tgg atc aat ccg gtg ctc gcg tca aac gtc aat	393
Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn	
100 105 110	
gtg ttc gga gcg gtg gcc tcg tgg ggg ccg tat gtg ccc ggt tgg cag	441
Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln	
115 120 125	
ggg gcg ggg gcg cac cag gag gcc gag ctg ccg ctg gcg acc ctg agc	489
Gly Ala Gly Ala His Gln Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Thr Leu Ser	
130 135 140	
atc tgt atg acg gcc atg atg gcc gcc gtg gcc tgc ggc aag ggc atg	537
Ile Cys Met Thr Ala Met Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met	
145 150 155 160	
ggt ctt gcc gcc gcc cgg tgg ccg cgg ctg ggg ccg ctc cgg ctg atc	585
Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile	
165 170 175	
gcg ctc ggc ttt ctg ctc gtc gtg ctc ctc gac atc gcc gag ccg ctg	633
Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu	
180 185 190	
gtg tcc ttc gcg ggc gtc tcc gtg tgg acg cgg gca gtg ccc gag ctg	681
Val Ser Phe Ala Gly Val Ser Val Trp Thr Arg Ala Val Pro Glu Leu	
195 200 205	
acc atc tgg agt ggg cac tgg tat cag ttc ccg ctg tat cag atg gtg	729
Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val	

[0006]

210	215	220	
gct tcg gcg ctc ttc ggc gcc tct ttg ggg gcc gcg cgc cac ttt cgc			777
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg			
225	230	235	240
aac cgg cgc ggc gaa acg tgt ctg gag tcc ggg gcg gcc ctc cta ccg			825
Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro			
	245	250	255
gag ggc cgc agg cca tgg gtc cgg ctg ctg gcg gtg gtg ggc ggg gcc			873
Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala			
	260	265	270
aac atc agc atc gcc ctc tac acc ggc gca cac ggc gca cac atc ctg			921
Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu			
	275	280	285
ttc tcg ctg atg gac ggc gct ccc ccg gac cgg ctc ccc gaa ttc ttc			969
Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe			
	290	295	300
cgt ccg gcg gcc ggc tac tga gaccgccggc accacccacg taccgatgt			1020
Arg Pro Ala Ala Gly Tyr			
305	310		
gcgcgatgtg cctgatgcgc ctgatgtacc cgggggtgtca tcggctcacc tgtggcgctt			1080
catgcgggtga gcgctccgcc tcgtccttgt tccggctcct gggctccacg accatacgga			1140
gcggccgggg			1150
<210> 4			
<211> 310			
<212> PRT			
<213> 吸水链霉菌 (Streptomyces hygroscopicus)			
<400> 4			
Val Phe Thr Leu Pro Val Thr Leu Trp Ala Cys Val Gly Ala Leu Val			
1	5	10	15
Leu Gly Leu Gln Val Tyr Val Phe Ala Ala Trp Leu Ala Asp Ser Gly			
	20	25	30
Tyr Arg Ile Glu Lys Ala Ser Pro Ala Arg Gly Gly Gly Asp Ser Glu			
	35	40	45
Arg Ile Ala Asp Val Leu Ile Pro Leu Leu Ser Val Val Gly Ala Val			

[0007]

```

      50              55              60
Val Leu Ala Val Cys Leu Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Arg Arg Leu
65              70              75              80
Thr Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ile Gly Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln
      85              90              95
Ser Pro Leu Met Asn Trp Ile Asn Pro Val Leu Ala Ser Asn Val Asn
      100             105             110
Val Phe Gly Ala Val Ala Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Gln
      115             120             125
Gly Ala Gly Ala His Gln Glu Ala Glu Leu Pro Leu Ala Thr Leu Ser
      130             135             140
Ile Cys Met Thr Ala Met Met Ala Ala Val Ala Cys Gly Lys Gly Met
145             150             155             160
Gly Leu Ala Ala Ala Arg Trp Pro Arg Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ile
      165             170             175
Ala Leu Gly Phe Leu Leu Val Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Pro Leu
      180             185             190
Val Ser Phe Ala Gly Val Ser Val Trp Thr Arg Ala Val Pro Glu Leu
      195             200             205
Thr Ile Trp Ser Gly His Trp Tyr Gln Phe Pro Leu Tyr Gln Met Val
      210             215             220
Ala Ser Ala Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Ala Ala Arg His Phe Arg
225             230             235             240
Asn Arg Arg Gly Glu Thr Cys Leu Glu Ser Gly Ala Ala Leu Leu Pro
      245             250             255
Glu Gly Pro Arg Pro Trp Val Arg Leu Leu Ala Val Val Gly Gly Ala
      260             265             270
Asn Ile Ser Ile Ala Leu Tyr Thr Gly Ala His Gly Ala His Ile Leu
      275             280             285
Phe Ser Leu Met Asp Gly Ala Pro Pro Asp Arg Leu Pro Glu Phe Phe
      290             295             300
Arg Pro Ala Ala Gly Tyr
305             310

```

<210> 5

<211> 215

<212> PRT

<213> 灰产色链霉菌(*Streptomyces griseochromogenes*)

<400> 5

```

Val Ile Gly Trp Ala Ala Leu Gly Ala Val Phe Leu Val Leu Gln Val
1              5              10              15

```

```

Tyr Val Phe Ala Arg Trp Thr Ala Asp Gly Gly Tyr His Leu Ala Asp

```

[0008]

20	25	30
Val Ser Gly Pro Asp Gly Arg Glu Pro Gly His Arg Arg Ile Ile Asp		
35	40	45
Val Leu Leu Pro Ala Leu Ser Met Ala Gly Val Val Gly Leu Ala Phe		
50	55	60
Trp Leu Val Arg Arg Trp Arg Ala Glu Arg Arg Leu Ser Phe Asp Ala		
65	70	75 80
Leu Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe Ala Gly Trp Leu Ser Pro Leu Met		
85	90	95
Asn Trp Phe His Pro Val Leu Met Ala Asn Thr His Val Trp Gly Ala		
100	105	110
Val Gly Ser Trp Gly Pro Tyr Val Pro Gly Trp Arg Gly Leu Pro Pro		
115	120	125
Gly Lys Glu Ala Glu Leu Pro Leu Val Thr Phe Ser Leu Gly Ser Thr		
130	135	140
Val Leu Leu Gly Val Leu Gly Cys Cys Gln Val Met Ser Arg Val Arg		
145	150	155 160
Glu Arg Trp Pro Gly Val Arg Pro Trp Gln Leu Val Gly Leu Ala Phe		
165	170	175
Leu Thr Ala Val Ala Phe Asp Leu Ser Glu Pro Phe Ile Ser Phe Ala		
180	185	190
Gly Val Ser Val Trp Ala Arg Ala Leu Pro Thr Val Thr Leu Trp Arg		
195	200	205
Gly Ala Trp Tyr Arg Ala Arg		
210	215	

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 除虫链霉菌(Streptomyces avermitilis)

<400> 6

tcacgaaacc ggacacac

18

[0009]

<210> 7	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (Streptomyces avermitilis)	
<400> 7	
catgatcgct gaaccgag	18
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (Streptomyces avermitilis)	
<400> 8	
ggttccggat gccgttctcg	20
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (Streptomyces avermitilis)	
<400> 9	
aactccggtc gactcccctt c	21
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (Streptomyces avermitilis)	
<400> 10	
gcaaggatac ggggactac	19
<210> 11	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (Streptomyces avermitilis)	
<400> 11	
gaaccgaccg cctgatac	18

[0010]

<210> 12	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 12	
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gcccctggcg acg	43
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 13	
ggaaccgacc gcctgataca	20
<210> 14	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 14	
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgacc	46
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 15	
ggaacatcac ggcatcacc	20
<210> 16	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 除虫链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)	
<400> 16	
gggggcgggc ccgggtgcgg aggcggaaat gccgctggcg acgttc	46

```

1      TCAGAAACCGGACACACACACAGAGGTGAGACAGCTGAACCCATCCGAGCCGCTCGGCCCTGACCAACGACGAGTGTAGACACACCCGACCGTCTC
100    CGATGCCACGGTCTCACCAGGCGCGGCTGAAACAGGTACAGAGCGCTGCCCGTGAACTGCTGTGCTGCGGTGGTGGTGGGCGGGGTCGGGCTTG
200    -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
101    1-V V V W A G V G L
      CTGTTTCTGGCCCTGCAGGCGGTACGTGTTACGCCGCTGGGCGCGCCGACGGTGGCTACCGGCTGATCGAGACGGCGGGCCAGGGTCAAGGCGGGCAGCAGG
201    L F L A L Q A Y V F S R W A A D G G Y R L I E T A G Q G Q G G S K D
      ATACGGGACTACCGATGTGGTCTATCCCGTGATTTCCGTCGTCTGCATCACCGCCGCGGCGCGTGGCTCTTTCCGAGGGTGCCTGTCTGGAACGACGGCT
301    T G T T D V V Y P V I S V V C I T A A A A W L F R R C R V E R R L
      GCTGTCGACGCCCTTCTCTTCCCTCGGCGTGTCTCGGAGCTGGCAGAGCCCGCTCATGAACGTGTTCCATTCGTTCTCTCCACGCGAGTGTG
401    L F D A L L F L G L L F A S W Q S P L M N W F H S V L V S N A S V
      TGGGCGCGGTTCCCTGGGGTCCGATGTGCCCCGCTGGCAGGGGCGCGCCCGGGTGCAGAGCGGGAATGCGCGTGGCGCTCGGCTCTCGCTCTGCA
501    W G A V G S W G P Y V P G W Q G A G P G A E A E M P L A S A S V C M
      TGTCCGCTCTGATCGTACCGTGTGACGACAGGCACTGGGGTGGATCAAGCCCCGCGCGGCACTGCGCGGACCTTGGCGGCTGGTCTCGGCGGTGT
601    S A L I V T V L C S K A L G W I K A R R P A W R T W R L V L A V F
      CTTTATCGGCATCGTGTCTGTCGAGCCGCTGCCGTCGCGCTCCGGGATCAGCGTATGGGCCACAGCGCTGCCGAGGTGACCTTGTGGAGTGGC
701    F I G I V L G L S E P L P S A S G I S V W A R A L P E V T L W S G
      GATGGTACCAGTCCCGCTGTATCAGGCGGTCCGCTTCCGCGCTGGTCTGCTGATGCTGGGCTGCTGCCGCTTCTTCCGCGACGACCGGATGAGTCTGT
801    E W Y Q F P V Y Q A V G S G L V C C M L G S L R F F R D E R D E S W
      GGGTGGACCGGGAGCCTGGCGGTGCCCAACGGGCACGAACTGGGCGCGTTCCTTCCCGTGGTTCGGTGGGTGAATGCCGTGATTTCTCTCTACAC
901    V E R G A W R L P Q R A A N W A R F L A V G G V N A V M F L Y T
      CTGTTTCCATATCCTCTCCTCGTCTCGGTGGACAGCGCCCGACCACTGCCGACCTCTTCAAGCGCGCGCGCTTACTAGTTTACGGGAGGTCG
1001    C F H I L L S L V G G Q P P D Q L P D S F Q A P A A Y *
      GAGGAGACGAGAGGGGAGCGGACCTCCGCTACCTCCCTTTGTGATGGGTGGACCGGGATCAGCTCCCATCGCGCGCGGCTCTCTCCAGAC
1101    GCACCACACTCCTCGGTTTACGGATCATG
1201    -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```

图 1

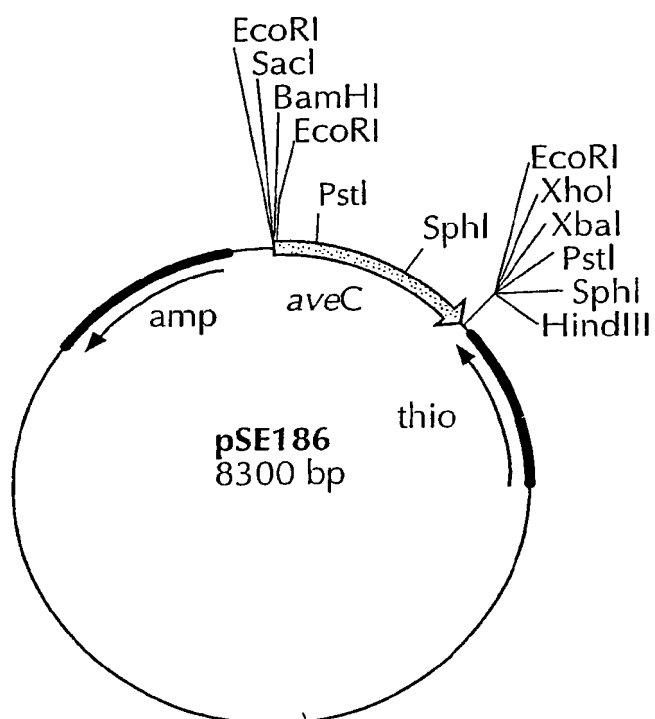


图 2

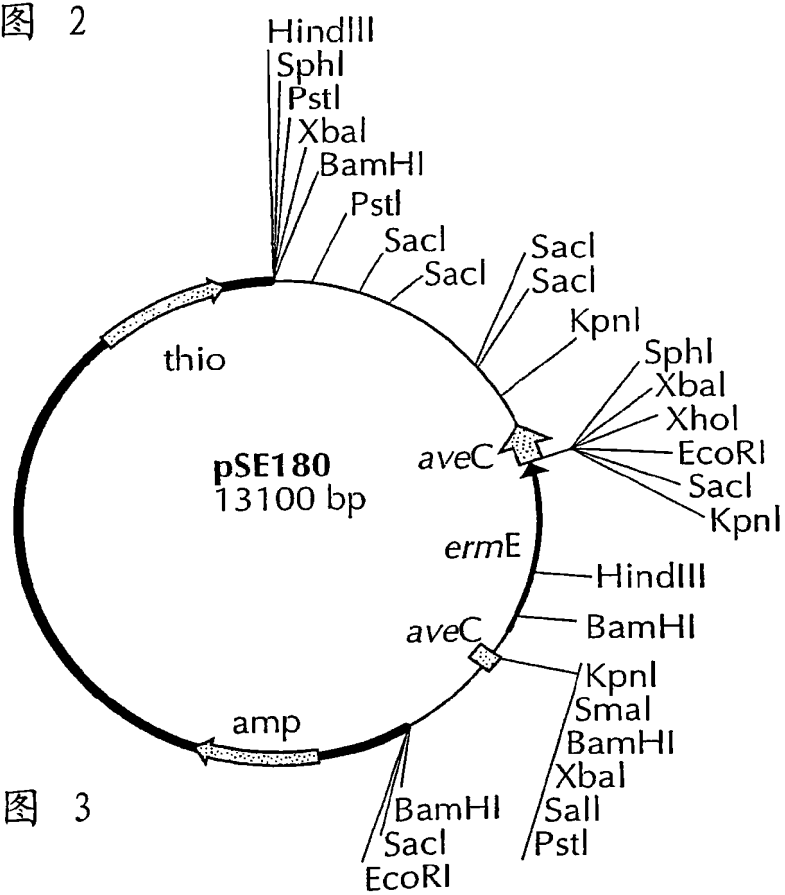


图 3

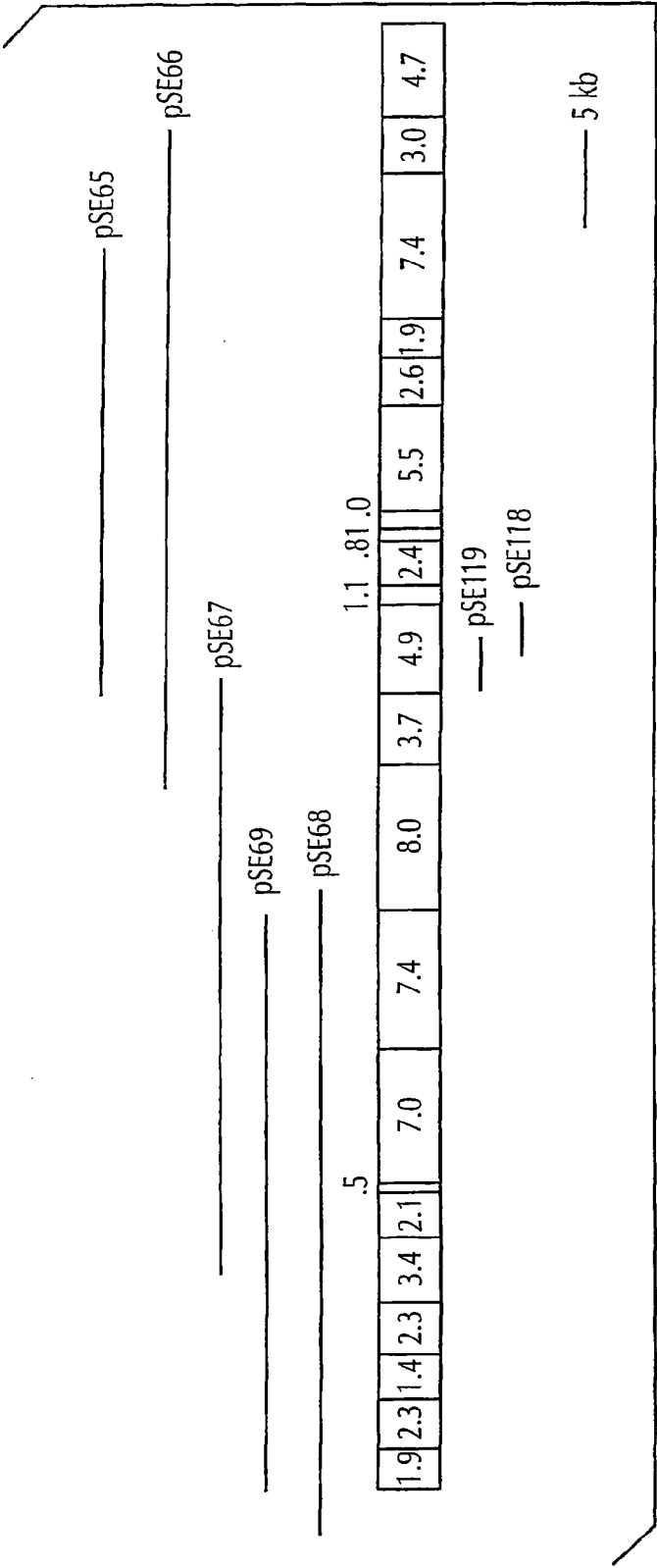


图 4

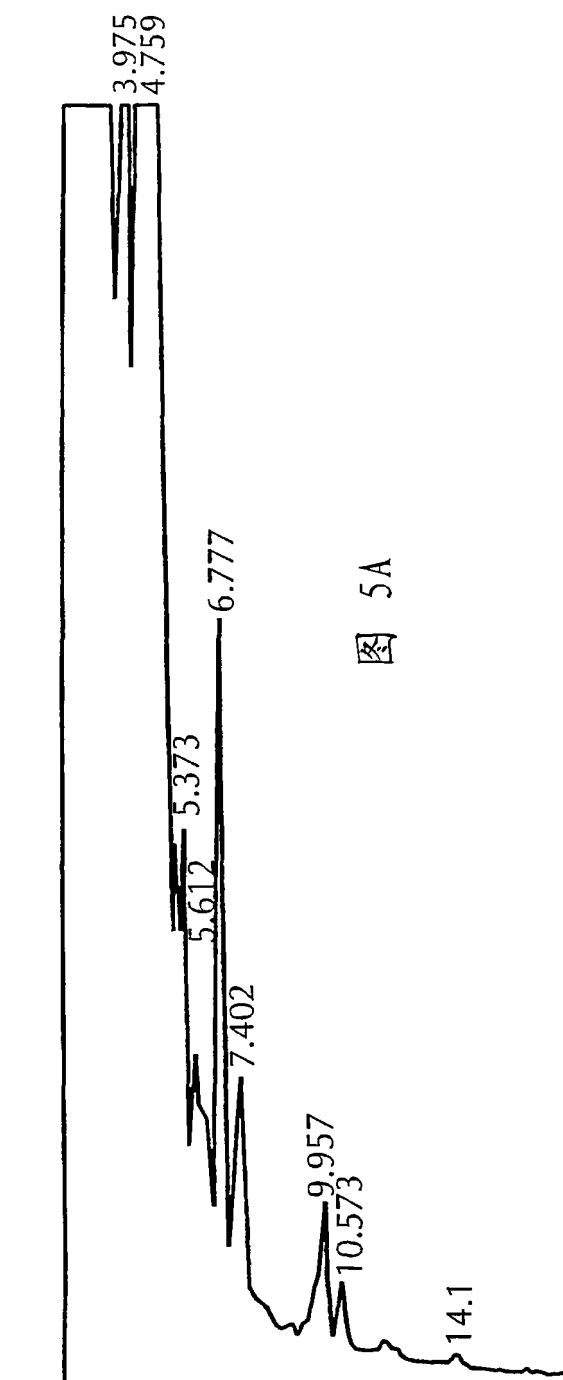


图 5A

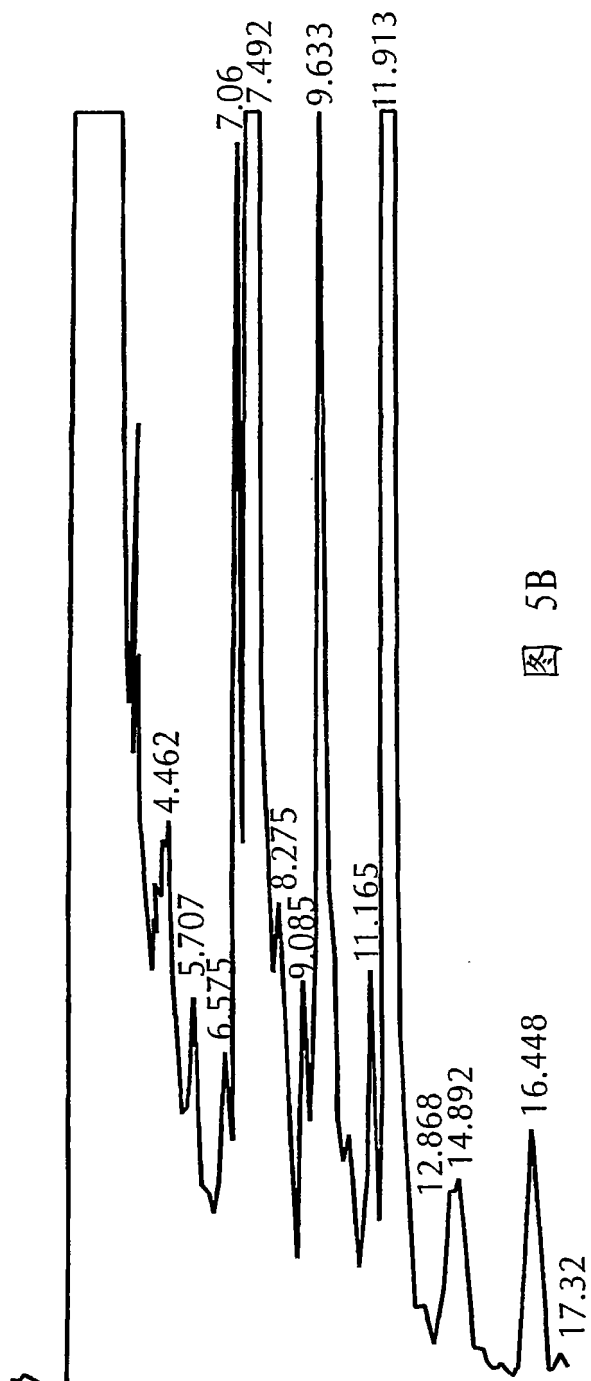


图 5B

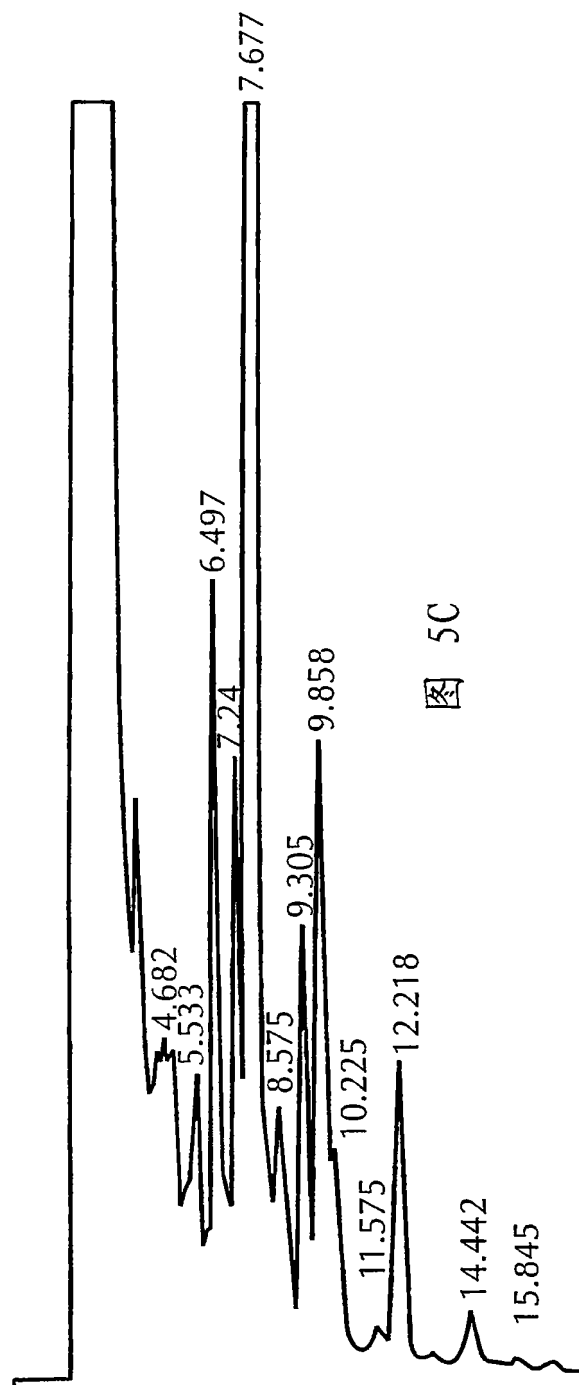


图 5C

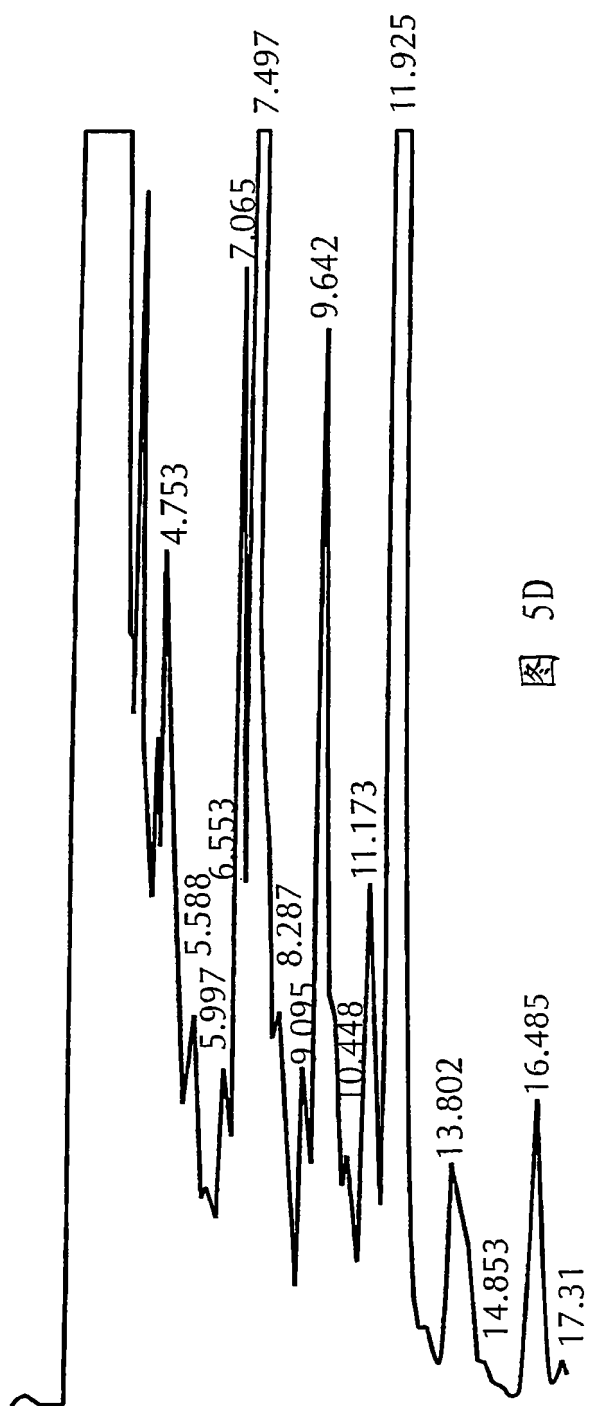


图 5D

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE501	D48E, L136P, G179S, E238D	52	184	0.28
	(A132G), T317A, T580C, G708A, A887T, (A1124G)			
PSE502	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	42	204	0.2
	T317A, G438A, T580C, G708A, A887T			
pSE503	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, E238D	32	172	0.19
	T317A, G438A, (T497C), T580C, T633C, G708A, (C775T), A887T			
PSE504	D25G, D48E, A89T, L136P, S138T, A139T, V141A, I159T, R163Q, G179S	44	205	0.21
	A247G, T317A, G438A, (T497C), T580C, T585A, G588A, T595C, T649C, G661A, G708A, (C884T)			
pSE505	D48E, A89T, S138T, A139T, K154R, G179S, V196A, P289L	35	178	0.2
	T317A, G438A, T585A, G588A, A634G, G708A, T760C, A761C, C1039T			
pSE506	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	26	135	0.19
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588T, G589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE507	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, V196A, A198G, P289L	18	88	0.2
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, G708A, T760C, A761C, C766G, C1039T			

图 6A

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1]
pSE508	D48E, A89T, S90G, L136P, R163Q, G179S, E238D	22	91	0.24
	T317A, G438A, A441 G, T580C, G661A, G708A, A887T, (A938G)			
pSE509	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, G196A, E238D, P289L	22	114	0.19
	(G136A), T317A, G354A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			
pSE510	D48E, A61T, L136P, G179S, E238D	64	211	0.30
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A, A887C			
pSE511	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, E238D, P289L	20	91	0.21
	T317A, G354A, (T416C), G438A, G505T, T585A, G588A, G708A, (G775T), A887C, C1039T			
pSE512	D48E, A61T, L136P, G179S	55	88	0.29
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A			
pSE514	D48E, A89T, L136P, G179S	36	175	0.20
	(T33A), T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A			
pSE515	D48E, A89T, V120A, L136P, G179S	36	189	0.19
	T317A, G438A, T532C, T580C, G708A, (T1031C)			

图 6B

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE517	D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, A198G, E238D	20	99	0.20
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, C766G, A887C			
PSE518	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	11	57	0.18
	T317A, G354A, G438A, G505T, T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE519	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S	40	153	0.26
	T317A, G438A, T585A, G588A, G708A			
pSE520	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S	45	177	0.25
	T317A, G438A, (T497C), T585C, G588A, G708A			
pSE523	D48E, L136P, R163Q, G179S, S231L	37	168	0.22
	T317A, T580C, G661A, G708A, (T797C), C865T			
pSE524	D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	25	137	0.18
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A, A887T			
PSE525	D48E, A89T, L136P, G179S	22	129	0.17
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G708A			

图 6C

质粒	突变	[B2]	[B1]	[B2/B1]
pSE526	D48E, A61T, L136P, G179S, A198G, P202S, E238D, P289L,	35	135	0.26
	T317A, G354A, (T497C), T580C, G708A, C766G, C777T, A887C, C1039T			
pSE527	D48E, L136P, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	31	119	0.25
	T317A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE528	D48E, A61T, L136P, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L	50	160	0.30
	T317A, G354A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, A887C, C1039T			
pSE529	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L	26	150	0.17
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			
pSE530	D48E, L136P, G179S, A198G, E238D, P289L	37	136	0.27
	(C97T), T317A, T580C, G708A, C766G, A887C, C1039T			
pSE531	D48E, A61T, S138T, A139F, G179S, A198G, P289L	27	101	0.27
	T317A, G354A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, C1039T			

图 6D

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE532	D48E, A61T, A89T, L136P, S138T, A139F, G179S, A198G, E238D	19	91	0.20
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, A887C			
pSE534	D48E, L84P, G111V, S138T A139T, G179S, A198G, P289L	37	139	0.26
	T317A, T424C, G505T, T585A, G588A, G708A, C766G, C1039T			
pSE535	Y28C, D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D	34	132	0.26
	A256G, T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, A887C			
pSE536	D48E, A89T, S138T, A139F, G179S, A198G, V220A	19	106	0.17
	(G137T), T317A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, C766G, T832C			
pSE537	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, R239H, P289L	34	171	0.19
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, G889A, C1039T			
pSE538	D48E, A61T, A89T, S138T A139T, G179S, A198G, P289L	13	39	0.33
	T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, C766G, C1039T			
pSE539	D48E, A61T, A89T, F99S, S138T, A139T, G179S, E238D	43	179	0.24
	T317A, G354A, G438A, G469C, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887C, (C1094T)			

图 6E

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE540	G35S, D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, P289L	42	180	0.23
	G276A, T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, C1039T			
pSE541	D48E, A61T, A89T, L136P, G179S, P289L	36	174	0.20
	(C266T), T317A, G354A, G438A, (T497C), T580C, G708A, C1039T			
pSE542	D48E, A61T, A107T, S108G, L136P, G179S, S192A, E238D, P289L	50	175	0.29
	T317A, G354A, G492A, A495G, (T497C), T580C, G708A, T747G, A887C, C1039T			
pSE543	D48E, A61T, A89T, G111V, S138T, A139F, G179S, E238D, P289L	17	67	0.25
	T317A, G354A, G438A, G505T, T585A, G588T, C589T, G708A, A887C, C1039T			
pSE545	D48E, L136P, G179S, R250W	37	134	0.27
	G317A, T580C, G708A, C921T			
pSE546	D48E, L136P, G179S, E238D	48	178	0.27
	G317A, T580C, G708A, A887T			
pSE547	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D	32	142	0.23
	T317A, G354A, G438A, T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C			

图 6F

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE548	D48E, A89T, S138T, A139T, R163Q, G179S	41	157	0.26
	(T114C), (T130C), T317A G438A, T585A, G588A, G661A, G708A			
pSE549	D48E, A89T, S138T, A139T G179S, V196A, E238D, P289L	24	141	0.17
	G317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			
pSE550	D48E, A89T, G111V, S138T, A139T, G179S, A198G, E238D	19	76	0.25
	T317A, G438A, G505T, T585A, G588A, G708A, C766G, A887C			
pSE551	D48E, A61T, A89T, S138T, A139F, G179S, V196A, E238D	24	141	0.17
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588T, C589T, G708A, T760C, A761C, A887C			
pSE552	D48E, L136P, G179S, A198G, P289L	40	154	0.26
	T317A, (T497C), T580C, G708A, C766G, C1039T			
pSE553	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L	23	123	0.18
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			
pSE554	D48E, A61T, A89T, S138T, A139T, G179S, V196A, E238D, P289L	30	162	0.18
	T317A, G354A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, T760C, A761C, A887C, C1039T			

图 6G

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE556	D48E, S138T, A139T, G179S, E238D	66	177	0.37
	(T169C), T317A, T585A, G588A, G708A, A887T			
pSE557	D48E, F78L, A89T, L136P, G179S	57	219	0.26
	A317A, T405C, G438A, T580C, G708A			
pSE558	S41G, D48E, A89T, L136P, G179S	51	215	0.24
	(G87A), A294G, T317A, G438A, T580C, G708A			
pSE559	G40S, D48E, L136P, G179S, E238D	81	247	0.33
	G291A, T317A, T580C, G708A, A887T			
pSE561	Y28C, Q38R, D48E, L136P, G179S, E238D	31	83	0.37
	A256G, A286G, T317A, (T497C), T580C, G708A, A887T			
pSE563	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, P252S	43	177	0.24
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A, C927T			
pSE564	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L	61	216	0.28
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T, T1005C			
pSE565	D48E, A89T, S138T, A139T, G179S, E238D, F278L	59	210	0.28
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T, T1005C			

图 6H

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE566	D48E, A89T, L136P, G179S, F234S	37	154	0.24
	T317A, (C341T), G438A, (T497C), T580C, (C695T), G708A, T874C			
pSE567	D48E, L136P, R163Q, G179S, T317A, T580C, G661A, G708A	60	192	0.31
pSE568	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	48	173	0.28
	(T85C), T317A, G438A, (T497C), T580C, G661A, G708A, (C800T)			
pSE569	D48E, S138T, A139T, G179S, E238D	59	153	0.38
	(T104C), T317A, (T497C), T585A, G588A, G708A, A887T			
pSE570	D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D	73	221	0.33
	T317A, T580C, G661A, G708A, A887T			
pSE571	D48E, L136P, R163Q, G179S, A200G, E238D	75	236	0.32
	(T67C), T317A, T580C, G661A, G708A, C772G, A887T			
pSE572	D48E, L136P, R163Q, G179S, E238D	74	229	0.32
	T317A, (T497C), T580C, G661A, G708A, A887T			
pSE573	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D	39	173	0.23
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A, A887T			

图 61

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE574	Q36R, D48E, A89T, L136P, G179S, E238D	53	231	0.23
	A280G, T317A, (G359A), G438A, T580C, G708A, (T836C), A887T			
pSE575	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	49	217	0.23
	T317A, G438A, T580C, G661A, (C704T), G708A, (G965A)			
pSE576	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S	44	197	0.22
	T317A, G438A, T580C, G661A, G708A			
pSE577	D48E, A89T, S138T, G179S	36	140	0.25
	T317A, G438A, (T497C), T585A, G708A			
pSE578	D48E, A89T, L136P, R163Q, G179S, E238D	45	193	0.23
	T317A, G438A, (T497C), T580C, G661A, G708A, A887T			

图 6J

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE582 ca	V3L, L136M	186	178	1.04
pSE583 cb	G26A, D48Y, R75W, S93N	94	88	1.07
pSE584 cc	R71L	314	293	1.07
pSE585 cd	T471, W110L, A139T	168	189	0.89
pSE586 ce	V1041, S138T, V2201, F2341	150	138	1.10
pSE587 cf	G45R, A64V, R69K	182	192	0.95
pSE588 cg	S90N	251	243	1.03
pSE589 ch	G26D, W1110L, R233H	97	107	0.91
pSE590 ci	Q36R, V1041, P128S, C152W, T276A	194	171	1.13
pSE591 ci	S90N	164	147	1.12
pSE592 ck	C142Y, A302T	152	133	1.14
pSE593 cl	V2M, V56D	117	121	0.97
pSE594 cm	S41G, L87V, A139T, L206M,	122	212	0.58
pSE595 cn	A62V, A139D	150	122	1.23
pSE596 co	F176C	203	204	1.0
pSE597 cp	T149S	120	135	0.89
pSE598 cq	A64T, C142Y	105	90	1.17
pSE599 cr	A130V, C142Y, L224M, E238V, L293M	79	71	1.11
pSE600 cs	A16T, K154M, L206F	103	97	1.06

图 6K

质粒	突变	[B2]	[B1]	[B2/B1]
pSE601 da	S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, F278L, P289L	17	137	0.12
pSE602 db	S41G, D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. F176C, G179S, V196A, E238D, P289L	17	87	0.19
pSE603 dc	D48E, R71L, A89T, L136P, T149S. F176C, G179S, E238D, I280V	19	146	0.13
pSE604 dd	D48E, A61T, R71L, W110L, T149S, G179S, V196A, L206M, E238D, V271A, I280V	26	180	0.14
pSE605 de	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, H279Q, P289L	22	158	0.14
pSE606 df	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, G287E, P289Q	16	94	0.17
pSE607 dg	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	21	243	0.13
pSE608 dh	D48E, A61T, R71L, A89T, A139T, T149S. F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	18	146	0.12
pSE609 di	Q38R, D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	20	150	0.13
pSE610 dj	D48E, A61T, L87V, A89T, W110L,, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	14	110	0.13
pSE611 dk	D48E, A61T, R71L, A89T, L136M, S138T, A139T, T149S. G179S, V196A, E238D, P289L	25	184	0.14
pSE612 di	D48E, A89T, L136P, K154E, G179S, S231L, E238D	16	132	0.12

图 6L

质粒	突变	[B2]	[B1]	B2/B1
pSE617 ea	D48E, A61T, R711, A89T, I136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	4	86	0.05
pSE620 eb	D48E, R711, A89T, I136P, T149S, F176C, G179S, E238D, I280V	17	179	0.08
pSE621 ec	Q36P, D48E, A61T, R71L, A89T, I136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	12	204	0.06
pSE622 ed	D48E, A61T, R711, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	16	226	0.07
pSE639 ee	V2M, D48E, A61T, R71L, A89T, I136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	15	225	0.07
pSE643 ef	D48E, A61T, R71L, A89T, I136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V, A302T	19	247	0.08
pSE646 eg	D48E, R71L, A89T, I136P, T149S, F176C, G179S, E238D, P289L	7	100	0.06
pSE655 eh	D48E, R71L, A89T, I136P, T149S, F176C, G179S, E238D, A302T	10	139	0.07
pSE657 ei	D48E, R71L, A89T, I136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	9	157	0.06
pSE659 ej	D48E, A61T, R71L, A89T, I136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D	7	105	0.06
pSE670 ek	V2M, D48E, R71L, A89T, I136P, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	7	104	0.07
pSE682 el	D48E, A61T, R71L, A89T, I136P, T149S, R162H, F176C, G179S, V196A, E238D, I280V	4	83	0.05
pSE683 em	D48E, R71L, A89T, V120A, I136P, T149S, K154E, G179S, S231L, E238D	8	154	0.05
pSE684 en	D48E, R71L, A89T, V120A, I136P, T149S, F176C, G179S, S231L, E238D, I280V	11	155	0.07
pSE685 eo	D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, S90N, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	11	134	0.08
pSE686 ep	D48E, A61T, R71L, L87V, A89T, A139T, T149S, F176C, G179S, V196A, E238D, V285G, P289L	8	100	0.08
pSE579 eq	D48E, R71L, A89T, I136P, K154E, G179S, S231L, E238D	16	178	0.09
pSE580 er	D48E, R71L, A89T, V120A, I136P, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D	14	149	0.09
pSE581 es	D48E, R71L, A89T, V120A, I136P, T149S, K154E, F176C, G179S, S231L, E238D	8	146	0.06

图 6M