

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/55

C12N 1/14

C12N 15/63 C12P 21/02

A23L 1/305 A23K 1/16

/(C12N 15/55, C12R 1:645)

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95104559.8

[45]授权公告日 2000年11月15日

[11]授权公告号 CN 1058524C

[22]申请日 1995.4.24 [24]颁证日 2000.7.7

[21]申请号 95104559.8

[30]优先权

[32]1994.4.25 [33]EP [31]94810228.0

[73]专利权人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72]发明人 A·范·卢恩 D·米切尔

[56]参考文献

CN151058A 1991. 5. 1 C12N15/55

EP420358 1991. 4. 3 C12N15/55

审查员 曾繁辉

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 李 瑛

权利要求书 2 页 说明书 44 页 附图页数 14 页

[54]发明名称 热耐受性肌醇六磷酸酶

[57]摘要

本发明目的在于得到一种能编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA 序列, 其中 DNA 序列衍生自特异的真菌组, 由这类 DNA 序列编码多肽, 而载体含有这类 DNA 序列, 由这类 DNA 序列或载体来转化细菌或真菌或酵母寄主。即通过培养这类转化性寄主而制备多肽的一种方法, 以及制备含一种或多种这类多肽的复合饲料的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA 序列, 该 DNA 序列衍生于选自下列一组中的真菌: 土曲霉 (Aspergillus terreus)、烟曲霉 (Aspergillus, fumigatus)、构巢曲霉 (Aspergillus nidulans)、嗜热毁丝霉 (Myceliophthora thermophila)、嗜热踝节菌 (Talaromyces Thermophilus)。

2. 根据权利要求 1 的编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA 序列, 所说的 DNA 序列选自:

(a) 图 1 所示的 DNA 序列和其互补链;

(b) 编码与由这些 DNA 序列编码的多肽有确切相同氨基酸的多肽的 DNA 序列。

3. 根据权利要求 1 的编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA 序列, 该 DNA 序列选自:

(a) 图 2 所示的 DNA 序列和其互补链;

(b) 编码与由这些 DNA 序列编码的多肽有确切相同的多肽的 DNA 序列。

4. 根据权利要求 1 的编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA 序列, 该 DNA 序列选自:

(a) 包括图 4、5、6 或 10 的 DNA 序列之一的 DNA 序列或其互补链;

(b) 编码与由这些 DNA 序列编码的多肽有确切相同的多肽的 DNA 序列。

5. 根据权利要求 1 的编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA

序列，该 DNA 序列选自包括可从嗜热踝节菌中分离的图 4 DNA 序列、可从烟曲霉中分离的图 5 之 DNA 序列、可从构巢曲霉中分离的图 6 之 DNA 序列、可从土曲霉 (CBS 220.95) 中分离的图 10 之 DNA 序列的 DNA 序列。

6. 编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的嵌合构建体的 DNA 序列，其具有如图 7 所示特异性核苷酸序列。

7. 包括如权利要求 1 至 5 中任何一项中所限定的 DNA 序列的载体。

8. 如权利要求 10 中所限定 DNA 序列的载体，适于在细菌或真菌或酵母宿主中表达。

9. 被如权利要求 1 至 5 中任何一项中限定的 DNA 序列转化的细菌或真菌或酵母宿主。

说 明 书

热耐受性肌醇六磷酸酶

肌醇六磷酸酶(肌醇六磷酸酯磷酸水解酶; EC 3. 1. 3. 8)是一种将肌酸六磷酸酯水解成肌醇和无机磷酸的酶, 并且已知是有价值的饲料添加剂。

1907年首次描述了稻糠中的肌醇六磷酸酶 [Suzuki et al., Bull. Coll. Agr. Tokio Imp. Univ. 1, 495 (1907)], 并在1911年描述了从曲霉得到的肌醇六磷酸酶 [Dox and Golden, J. Biol. Chem. 10, 183—186 (1911)]。还在麦麸、植物种子、动物小肠和微生物中发现了肌醇六磷酸酶 [Mowsen and Davis, Enzyme Microb. Technol. 5, 377—382 (1983), Lambrechts et al., Biotech. Lett. 14, 61—66 (1992), Shine and Ware, Appl. Microbiol. 16, 1348—1351 (1968)]。

Van Hartingsveldt 等人在 Gene, 127, 87—94 (1993) 和欧洲专利申请 No. 420 358 中描述了得自黑曲霉的肌醇六磷酸酶的克隆和表达, 并且 Piddington 等人在 Gene, 133, 55—62 (1993) 中描述了得自黑曲霉变种 (var awamori) 之肌醇六磷酸酶的克隆和表达。

因为迄今用于农业中的肌醇六磷酸酶有某些缺点, 所以本发明

因为迄今用于农业中的肌醇六磷酸酶有某些缺点，所以本发明的目的是提供新的肌醇六磷酸酶，或者更一般地说是大量提供具有改良属性的包括肌醇六磷酸酶在内之抗肌醇磷酸酯（肌醇六磷酸酶活性）的肌醇六磷酸酶活性的多肽。因为已知迄今使用的肌醇六磷酸酶在饲料成粒加工期间受到热处理会失去活性，所以本发明的肌醇六磷酸酶应有改善热耐受性的性质。

除烟曲霉 (Aspergillus fumigatus) [Dox and Golden et al., J. Biol. Chem. 10, 183—186 (1911)] 和米根霉 (Rhizopus oryzae) [Howson and Davies, Enzyme Microb. Technol. 5, 377—382 (1993)] 外，迄今尚未报导过耐热真菌中的肌醇六磷酸酶。已报导了来源于土曲霉 (Aspergillus terreus) 菌株 9A—1 [最适温度 70°C; Yamada et al., Agr. Biol. Chem., 32, 1275—1282 (1968)] 和卡斯坦氏许日王氏酵母 (Schwanniomyces castellii) [最适温度 77°C; Segueilha et al., Bioeng. 74, 7—11 (1992)] 的耐热肌醇六磷酸酶。但这些用于农业时，必须大量得到之。因此，本发明的目的是提供编码热耐受性肌醇六磷酸酶的 DNA 序列。可用本领域已知的检测法，如用于饲料造粒的方法或例如由 Yamada 等人 (文献同上) 描述的检测酶促活性的热依赖性的方法，检测由这些 DNA 序列编码的改良的肌醇六磷酸酶的热耐受性。

本发明的再一个目的是筛选用于肌醇六磷酸酶生产时显示有某种程度热耐受性的真菌。可按实施例 1 中所述方法进行这种筛选。

以这种方法，已第一次鉴定了实施例1中所列的生产肌醇六磷酸酶的热耐受性真菌菌株。

可按本领域已知的方法，例如用热耐受性真菌（参见实施例1）菌株提供者，如 American Tissue Type Culture Collection (ATCC)、Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)、Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) 和 Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) 等所指定的方法，或者，如实施例2中指出的方法培养这样的菌株。

进一步的改良的性质是例如改善了对植物和种子中的磷的主要储存形式的肌醇六磷酸 [肌醇 (1, 2, 3, 4, 5, 6) 六磷酸] 底物特异性。为了从肌醇六磷酸中完全释放出六个磷酸基团，需要有足够活性的针对肌醇六磷酸和所有其它肌醇磷酸酯分子的酶。为了这种完全释放，需要使用例如黑曲霉肌醇六磷酸酶，加上 pH 2.5 酸性磷酸酶。只有一种具所需活性的酶显然是一个进步。例如，国际专利申请 No. 94/03072 中公开了以所需比例表达肌醇六磷酸酯降解酶之混合物的表达系统。然而，更期望在单一多肽中具有两种上述活性。因此本发明的目的还包括提供编码这种多肽的 DNA 序列。可用本领域已知的或实施例9中描述的方法检测肌醇六磷酸酶和磷酸酶。

另一个改良的性质是例如所谓改善的 pH 曲线。这就意味着例如两种肌醇六磷酸钙镁降解活性最大，例如一种是在大约 pH 2.5，其

可能是某些动物胃中的 pH；另一种在大约 pH5.5，其可能是某些动物之胃以下组织中的 pH。可用本领域已知的方法，例如实施例 9 中描述的方法确定这样的 pH 曲线。因此本发明还提供编码这些改良之多肽的 DNA 序列。

总的说来，本发明的目的是提供编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA 序列，且该 DNA 序列是衍生于选自拉维氏短梗孢 (Acrophialophora levis)、土曲霉 (Aspergillus terreus)、烟曲霉 (Aspergillus fumigatus)、构巢曲霉 (Aspergillus nidulans)、酱油曲霉 (Aspergillus sojace)、Calcarisporiella thermophila、Chaetomium rectopilium、Corynascus thermophilus、腐质霉菌种 (Humicola sp.)、Mycelia sterilia、Myrococcum thermophilum、嗜热毁丝霉 (Myceliophthora thermophila)、Rhizomucor Miehei、Sporotrichum cellulophilum、嗜热侧孢 (Sporotrichum thermophile)、Scytalidium indonesicum 和嗜热踝节菌 (Talaromyces thermophilus)，或提供编码这样的多肽的仍具有肌醇六磷酸酶活性之片段的 DNA 序列，或更具体地说是这样一个 DNA 序列，即其中所说的真菌选自拉维氏短梗孢、烟曲霉、构巢曲霉、土曲霉、Calcarisporiella thermophila、Chaetomium rectopilium、Corynascus thermophilus、Sporotrichum cellulophilum、嗜热侧孢、Mycelia sterilia、嗜热毁丝霉和嗜热踝节菌，或者更具体地说的这样的 DNA 序列，即其中所说的真菌选自于土曲霉、Myceliophthora thermophilus、烟曲霉、构巢曲霉和 Talaromyces thermophilus。编码本发明多肽之片段的 DNA 序列长度

例如可在 1350 至 900、较好在 900 至 450，更好在 450 至 150 个核苷酸之间，并可基于完整多肽的 DNA 序列用本领域技术人员熟知的重组方法或化学合成方法制备之。

本发明的再一个目的是提供编码有肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA 序列，且其 DNA 序列选自：

(a) 图 1 的 DNA 序列或其互补链；

(b) 在标准条件下与 (a) 所限定的序列，或较好与这些序列的编码区，或更好这些 DNA 序列之 491 至 1856 位间的区域，或最好与使用如实施例 12 中描述的上曲霉 9A1 的 DNA 进行随机探查所得到的基因组探针相杂交的 DNA 序列。

(c) 因为遗传密码的简并性而不与 (a) 或 (b) 的序列杂交，但编码与由这些 DNA 序列所编码的多肽有同样氨基酸序列之多肽的 DNA 序列；以及

(d) 作为 (a)、(b) 或 (c) 中所指定的 DNA 序列之片段的 DNA 序列。

杂交的“标准条件”在本文中是指本领域技术人员确定特异性杂交信号所通常使用的，并由 Sambrook 等人 (“Molecular Cloning”, 2th eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, N. Y.) 所描述的条件，或较好是本领域技术人员熟悉的并在 Sambrook 等人的上述文献中描述的所谓严格杂交和非严格洗涤条件，或更好是所谓的严格杂交和严格洗涤条件，或者更好是如实施例 12 中给出的严格杂交条

件和非严格或严格洗涤条件。“DNA 序列的片段”在本文中是指编码仍具有如上所述肌醇六磷酸酶活性多肽的片段。

本发明的再一个目的是提供编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA 序列，且该 DNA 序列选自：

(a) 图 2 的 DNA 序列或其互补链；

(b) 在标准条件下与 (a) 中限定的序列，或较好是与扩展到大约至少占编码区 80%，包括这些 DNA 序列之非编码区 5' 端的约 100 到 150 位核苷酸的区域，或者更好是与这些 DNA 序列的 2068 至 3178 位核苷酸区域，或者最好与使用如实施例 12 中所述嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) 的 DNA 进行随机探查所得到的基因组探针相杂交的 DNA 序列。

(c) 因为遗传密码的简并性而不与 (a) 或 (b) 的序列杂交，但编码与由这些 DNA 序列编码的多肽有完全相同氨基酸序列之多肽的 DNA 序列；以及

(d) 作为 (a)、(b) 或 (c) 中指定是 DNA 序列的片段的 DNA 序列。

所述术语“片段”和“标准条件”具有如上给出的同样含义。

本发明的再一个目的是提供编码具有肌醇六磷酸酶活性的 DNA 序列，且所述 DNA 序列选自：

(a) 含有图 4、5、6 或 10 所示 DNA 序列的 DNA 序列或其互补链；

(b) 在标准条件下与 (a) 中限定的序列杂交, 或较好与含有可分离自嗜热蹠节菌 (*Talaromyces thermophilus*) 的图 4 之 DNA 序列, 或可分离自构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的图 6 的 DNA 序列、或可分离自土曲霉 (*Aspergillus terreus*) (CBS 220. 95) 的图 10 的 DNA 序列之一或两者的上述序列杂交, 或更好与至少跨越编码区的 80% 之这样的 DNA 序列的一个区域的序列杂交, 或最好与使用的嗜热蹠节菌或烟曲霉 (*A. fumigatus*) 或构巢曲霉 (*A. nidulans*) 或土曲霉 (*A. terreus*) (CBS 220. 95) 的 DNA, 以实施例 12 所述方法进行随机探查所得到的基因组探针杂交的 DNA 序列;

(c) 因为遗传密码的简并性, 不与 (a) 或 (b) 的序列杂交, 但编码与由这些 DNA 序列编码的多肽有完全相同之氨基酸序列的多肽的 DNA 序列; 以及

(d) 作为 (a)、(b) 或 (c) 中指定的 DNA 序列的片段的 DNA 序列。

本发明的再一个目的是提供编码具有肌醇六磷酸酶活性的多肽的 DNA 序列, 且所说 DNA 序列选自包含可分离自嗜热蹠节菌的图 4 之 DNA 序列、可分离自烟曲霉的图 5 之 DNA 序列、可分离自巢构曲霉的图 6 之 DNA 序列、或可分离自土曲霉 (CBS 220. 95) 的图 10 之 DNA 序列的 DNA 序列, 或具简并变异体或等同物。

术语“片段”和“标准条件”具有如上给出的同样含义。“简并变异体”在本文中是指因为遗传密码的简并性而与所指序列有不同

的核苷酸序列，但编码有同样氨基酸序列之多肽的 DNA 序列。“等同物”在本文中是指编码具有肌醇六磷酸酶活性且氨基酸序列因缺失、取代和/或加入 1 个或多个氨基酸，较好多至 50 个，更好多至 20 个，进一步多至 10 个或最好多至 5、4、3 或 2 个氨基酸而不同于其所指等同序列的 DNA 序列编码之多肽的氨基酸序列。一般不改变比活性的氨基酸取代是本领域中已知的，并且例如已由 H. Neurath 和 R. L. Hill 在 “The Proteins” (Academic Press, New York, 1976, 特别是参见第 14 页图 6) 描述过。最常见的互换是：Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly 以及相反的交流（用于代表氨基酸的三字母缩写是本领域已知的标准缩写字）。

可用本领域已知的和 Sambrook 等人（文献同上）描述的方法生产这些等同物。可用本领域已知的或实施例 9 中所述的方法检定由这些等同物序列编码的多肽是否仍具有肌醇六磷酸酶活性。

本发明的再一个目的是提供编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的上述 DNA 序列之一，所说 DNA 序列衍生于真菌，或具体地说衍生于选自上文提到的特定组中的真菌之一。

本发明的再一个目的是提供编码肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA 序列，且所说 DNA 序列在标准条件下与作为与分离自上述一组真菌之一的 DNA 和下列 PCR 引物对进行 PCR 反应产物的探针杂

交：

"ATGGA(C/T)ATGTG(C/T)TC(N)TT(C/T)GA"

作为有意义引物，和

"TT(A/G)CC(A/G)GC(A/G)CC(G/A)TG(N)CC(A/G)TA"

作为反义引物。

“标准条件”的含义同上所述。“PCR反应的产物”较好是指可通过参照实施例 11 的实施例 12 中所述反应可得到的，或更好是通过该反应所得到的产物。

本发明的再一个目的是提供编码具有肌醇六磷酸酶活性之多肽的 DNA 序列，所说 DNA 序列在标准条件下与作为与分离自土曲霉 (*Aspergillus terreus*) (CBS 220. 95) 的 DNA 和下列两个 PCR 引物对进行 PCR 反应所得产物的探针杂交)，

(a) "ATGGA(C/T)ATGTG(C/T)TC(N)TT(C/T)GA"

作为有意义引物和

"TT(A/G)CC(A/G)GC(A/G)CC(G/A)TG(N)CC(A/G)TA"

作为反义引物；

(b) "TA(C/T)GC(N)GA(C/T)TT(C/T)TC(N)CA(C/T)GA"

作为有意义引物和

"CG(G/A)TC(G/A)TT(N)AC(N)AG(N)AC(N)C"

作为反义引物。

“标准条件”的含义同上所述；术语“PCR反应的产物”较好是

指按实施例 11 中所述反应可得到的或更好是指按该反应得到的产物。

本发明的再一个目的是提供编码具有肌醇六磷酸酶活性之嵌合构建体的 DNA 序列。所述嵌合构建体包含如上文指定之 DNA 序列的片段，或较好这样的 DNA 序列中嵌合构建体在其 N 末端包含一个黑曲霉肌醇六磷酸酶的片段，并融合到其 C 末端的一个土曲霉肌醇六磷酸酶的片段上，或更好包括这样一个具有图 7 中所示特定核苷酸序列的 DNA 序列，和其简并变异体或等同物，其中“简并变异体”和“等同物”具有如上给出的意义。

本发明的再一个目的是提供如上文指定的 DNA 序列，其中所编码的多肽是肌醇六磷酸酶。

可按本领域已知的方法[如参见 Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1470—1474 (1984) 或 Sambrook et al., 文献同上)，或按实施例 2 中所述方法从真菌菌株制备基因组 DNA 或 cDNA。

然后例如使用已知的聚合酶链反应(PCR)方法从这样的基因组 DNA 中克隆到本发明的 DNA 序列。例如 White 等人(1989)描述了该方法的要点，而 Innis 等人[*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. (1990)] 则描述了改良的方法。PCR 是一种体外大量生产有一定长度的特定 DNA，和来自不同 DNA 序列之混合物的序列的方法。因此，PCR 是基于酶促扩增感兴趣的特定 DNA 片段，所说的片段侧翼接有两个对该片段特异的，且杂交到

靶序列之相反链上的寡核苷酸引物。引物是以它们的彼此指向的3'末端来定位的。对模板重复进行热变性循环，使引物退火到它们的互补序列上并用DNA聚合酶延伸退火的引物而导致在PCR引物间扩增该片段。因为每个引物的延伸产物均可用作另外者的模板，所以每次循环基本上使前次循环中产生的DNA片段扩增双倍量。利用从嗜热细菌水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*) 中分离的热稳定性 Taq DNA 聚合酶，已有可能避免在每个热变性步骤后必须加入的聚合酶发生变性。这一发展已导致可使用不同的单纯的温度循环装置自动进行PCR反应。另外，因为允许使用较高温度进行引物退火和链延伸，从而增加扩增反应的特异性。增加的特异性则通过减少非靶片段对酶和引物的竞争而改善了扩增产物的总得率。以这种办法有用的特异性序列得以高度扩增，并能很容易地借助已知方法，如在琼脂糖凝胶上分离将其与非特异性序列分离开，并使用例如 Holten 和 Graham [Nucleic Acid Res. 19, 1956 (1991)]、Kovalic 等人 [Nucleic Acid Res. 19, 4560 (1991)]、Marchuk 等人 [Nucleic Acid Res. 19, 1154 (1991)] 或 Mead 等人 [Bio/Technology 9, 657—663 (1991)] 所描述的载体，按本领域已知的方法克隆之。

可用本领域已知的和例如 Sambrook 等人 (1989, "Molecular cloning" 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor) 所描述的方法制备用于PCR程序的寡核苷酸引物。

已根据对黑曲霉 (*A. niger*) 肌醇六磷酸酶、黑曲霉酸性磷酸酶、

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 酸性磷酸酶和梨形裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 酸性磷酸酶之已知序列的比较 (有关序列信息参见 European Bioinformatics Institute, Hinxton Hall, Cambridge, GB), 设计了在本发明实践中用作简并引物的特异性引物。根据基于黑曲霉的已知序列制备的黑曲霉的密码子使用表选择某些密码子, 以降低引物的简并性。此外, 已发现用于限定特异性探针的氨基酸序列的 C 末端上的氨基酸, 应是在包括如上指定的肌醇六磷酸酶在内的所有酸性磷酸酶中所保留的氨基酸, 但其余氨基酸应是肌醇六磷酸酶比磷酸酶更为特异。

然后可按本领域已知的或具体地说用实施例 5—7 中描述的方法, 用如此扩增的 DNA 序列筛选例如真菌来源之 DNA 的 DNA 文库。

一旦得到了本发明的完整 DNA 序列, 即可用本领域已知的并按 Sambrook 等人的上述文献中描述的方法将它们整合到载体中, 以在适当的宿主系统中过表达所编码的多肽。但本领域技术人员都知道, 也可用 DNA 序列本身转化本发明的适当的宿主系统, 以过表达所编码的多肽。适当的宿主系统例如可以是真菌、如曲霉属的黑曲霉 [ATCC 9142] 或无花果曲霉 (*A. ficuum*) [NRRL 3135], 或例如木霉等的黑宿木霉 (*Trichoderma reesei*), 或酵母如酿酒酵母或毕赤酵母, 如巴斯德毕赤酵母—所有这些微生物均可从 ATCC 得到。可使用的细菌可以是大肠杆菌、芽胞杆菌如枯草芽胞杆菌或链霉菌, 如变青

链霉菌 (*Streptomyces lividans*) [参见 Anne and Mallaert, *FEMS Microbiol. Letters* 114, 121 (1993)]。可使用的大肠杆菌是大肠杆菌 K12 菌株如 M15 [如 Villarejo 等人在 *J. Bacteriol.* 120, 466—474 (1974) 中描述为 DZ 291 的菌株]、HB 101 [ATCC No. 33694] 或大肠杆菌 SG 13009 [Gottesman et al., *J. Bacteriol.* 148, 265—273 (1981)]。

可用于在真菌中表达的载体是本领域已知的并且是在 EP 420 358 中, 或 Cullen 等人 [*Bio/Technology* 5, 369—376 (1987)]、或 Word [Molecular Industrial Mycology, Systems and Applications for Filamentous Fungi, Marcel Dekker, New York (1991)]、Upshall 等人 [*Bio/Technology* 5, 1301—1304 (1987)]、Gwynne 等人 [*Bio/Technology* 5, 71—79 (1987)]、Punt 等人 [*J. Biotechnology* 17, 19—34 (1991)] 描述过的, 用于在酵母中表达的载体则是由 Sreekrishna 等人 [*J. Basic Microbiol.* 28, 265—278 (1988); *Biochem.* 28, 4117—4125 (1989)]、Hitzemann 等人 [*Nature* 293, 717—722 (1981)] 或在 EP 183 070、EP183 071、EP 248 227、EP 263 311 中描述过的。用于在大肠杆菌中表达的适当载体是例如 Sambrook 等人 (文献同上) 或 Fiers 等人 [*Procd. 8th Int. Biotechnology Symposium; Soc. Franc. de Microbiol. Paris* (Durand et al., eds.) pp. 680—697 (1999)] 或 Bujord 等人 [*Methods in Enzymology*, eds. Wu and Grossmann, Academic Press, Inc. Vol. 155, 416—433 (1987)] 和 Stuber 等人 [*Immuno. Methods*, eds. Lefkovits and Pernis, Academic Press, Inc., Vol. IV, 121—152 (1990)] 所提

到的。可用在芽胞杆菌中表达的载体是已知的并且是已在 EP405 370 中，或 Yansura [Proc. Natl. Acad. Sci USA 81, 439 (1984)] 和 Memer [Meth. Enzym. 185, 199—228 (1990)] 或 EP 207 459 中描述过的。

这些载体已经携带调节元件如启动子，或可工程化改造本发明的 DNA 序列使之含有这些元件。可使用的适当启动子元件是本领域中已知的，并且适用于里赛木霉 (*Trichoderma reesei*) 的启动子元件是 *cbhl* [Haarki et al., *Biotechnology* 7, 596—600 (1989)] 或 *pkil* 启动子 [Schindler et al., *Gene* 130, 271—275 (1993)]，用于米曲霉的是 *amy* 启动子 [Christensen et al., Abstr. 19th Luntenen Lectures on Molecular Genetics F23 (1987), Christensen et al., *Biotechnology* 6, 1419—1422 (1988)、Tada et al., *Mol. Gen. Genet.* 229, 301 (1991)]、用于黑曲霉的是 *glaA*- [Cullen et al.,

Bio/Technology 5, 369-376 (1987), Gwynne et al., *Bio/Technology* 5, 713-719 (1987), Ward in *Molecular Industrial Mycology, Systems and Applications for Filamentous Fungi*, Marcel Dekker, New York, 83-106 (1991)], *alcA*- [Gwynne et al., *Bio/Technology* 5, 71-719 (1987)], *suc1*- [Boddy et al. *Current Genetics* 24, 60-66 (1993)], *aphA*- [MacRae et al., *Gene* 71, 339-348 (1988), MacRae et al., *Gene* 132, 193-198 (1993)], *tpiA*- [McKnight et al., *Cell* 46, 143-147 (1986), Upshall et al., *Bio/Technology* 5, 1301-1304 (1987)], *gpdA*- [Punt et al., *Gene*

69, 49-57 (1988), Punt et al., *J. of Biotechnology* 17, 19-37 (1991)] 和 pkiA-启动子 [de Graaff et al., *Curr. Genet.* 22, 21-27 (1992)].

可用于在酵母中表达的适当启动子元件是本领域已知的并且可以是 pho5 启动子 [Vogel et al., *Molecular and Cellular Biology*, 2050—2057 (1989); Rudolf and Hinnen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 1340—1344 (1987)], 或用于在酿酒酵母中表达的 gap 启动子, 及用于在巴斯德华赤酵母中表达的例如 aox 启动子 [Koutz et al., *Yeast* 5, 167—177 (1989); Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.* 28, 265—278 (1988)].

因此, 包含本发明的 DNA 序列, 较好是适于在细菌或真菌或酵母宿主中表达所述 DNA 序列的载体, 以及这些被转化的细菌或真菌或酵母宿主也是本发明的主题。

一旦在存在于适当培养基中的适当宿主细胞中表达了这些 DNA 序列, 即可用已知的蛋白质纯化方法或例如 EP420 358 中描述的方法从培养基中 (在肌醇六磷酸酶产物被分泌到培养基中的情况下) 或从宿主生物体中 (在肌醇六磷酸酶存在于细胞内的情况下) 分离其所编码的肌醇六磷酸酶。因此, 制备本发明之多肽的方法的特征在于在适当培养条件下培养上述被转化的细菌或宿主细胞, 并从中回收多肽; 用这样的方法产生的多肽或由本发明的 DNA 序列编码的多肽也是本发明的主题。

一旦得到本发明的多肽, 即可用本领域已知的或如 Engelen 等人

[J. AOAC Intern. 77, 760—764 (1994)] 或实施例 9 中所述的方法鉴定其活性。就检测用于农业的本发明多肽的性质来说, 可使用本领域已知的和 Simons 等人 [British J. of Nutrition 64, 525—540 (1990)]、Schöner 等人 [J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr, 6, 248—255 (1991)]、Vogt [Arch, Geflügelk, 56, 93—98 (1992)]、Jongbloed 等人 [J. Anim, Sci., 70, 1159—1168 (1992)]、Rerney 等人 [Poultry Science 72, 2106—2114 (1993)]、Farrell 等人 [J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr. 69, 278—283 (1993)]、Broz 等人 [British Poultry Science 35, 273—280 (1994)]、Düngelhoef 等人 [Animal Feed Science and Technology 49, 1—10 (1994)] 所述的检测法。就它们的热耐受性而言可使用本领域已知的和例如 Yamada 等人 (文献同上) 所描述的检测法检测, 并可用本领域已知的和实施例 9 中描述的或 Yamada 等人 (文献同上) 描述的任何检测法检测它们的 pH 和底物特异性曲线。

一般说来, 可不限于特定的应用领域, 将本发明的多肽用于使肌醇六磷酸转化成肌醇和无机磷酸。

另外, 本发明的多肽可用于制备复合食品或饲料的方法中, 其中这种组合物的成分是与一种或多种本发明的多肽相混合的。因此, 包括一种或多种本发明之多肽的化合物食品或饲料也是本发明的主题。本领域技术人员熟知它们的制备方法。这类复合食品或饲料还可含有添加剂或用于这种目的的成分, 并且是本领域已知的。

本发明的再一个目的是提供一种降低动物粪肥中肌醇六磷酸水

平的方法，其特征在于给动物饲喂有效量的这种饲料组合物，以将饲料中所含的肌醇六磷酸转化成肌醇和无机磷酸。

实施例

所用的特定培养基和溶液

完全培养基 (Clutterbuck)

葡萄糖	10g/l
—CN 溶液	10ml/l
硝酸钠	6g/l
细菌蛋白胨 (Difco Lab., Detroit, MI, USA)	2g/l
酵母浸膏	1g/l
酪蛋白氨基酸 (Difco)	1.5g/l
改良的微量元素溶液	1ml/l
维生素溶液	1ml/l

M3 培养基

葡萄糖	10g/l
—CN 溶液	10ml/l
改良的微量元素溶液	1ml/l
硝酸铵	2g/l

M3 培养基—磷酸盐

M3 培养基，其中用—CNP 代替—CN

M3 培养基—磷酸盐+肌醇六磷酸

M3 培养基—磷酸盐加上 5g/l Na₂肌醇六磷酸 (Sigma #P—3168; Sigma, St. Louis, MO, USA)

改良的微量元素溶液

CuSO ₄	0.04%
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.08%
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.08%
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.8%
B ₁ Na ₂ O ₇ · 10H ₂ O	0.004%
MnSO ₄ · H ₂ O	0.08%

维生素溶液

核黄素	0.1%
尼克酰胺	0.1%
对位氨基苯甲酸	0.01%
吡哆醇/HCl	0.05%
维生素 B ₁ /HCl	0.05%

生物素 0.001%

—CN 溶液

KH_2PO_4	140g/l
$\text{K}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	90g/l
KCl	10g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10g/l

—CNP 溶液

HEPES	47.6g/200ml
KCl	2g/200ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2g/200ml

实施例 1

筛选产生肌醇六磷酸酶活性的真菌

使用下列三种培养基在三个平板系统上筛选真菌：“M3”（一种含有磷酸盐的限定的培养基），“M3—P”（缺少磷酸盐的 M3 培养基）和“M3—P+肌醇六磷酸”（缺少磷酸盐但含有肌醇六磷酸作为单一磷源的 M3 培养基）。
用琼脂糖制备平板以降低磷酸盐的本底水平。

使真菌在培养基上和提供者推荐的温度下生长。将孢子和菌丝体转移到试验平板上并在推荐的温度下保温直到观察到生长。

发现下列耐热菌株表面有这种生长：

嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) [ATCC 48 102]

嗜热裸节菌 (*Talaromyces thermophilus*) [ATCC 20 186]

烟曲霉 [ATCC 34 625]

实施例 2

真菌的生长和基因组 DNA 的制备

使嗜热毁丝霉、嗜热裸节菌、烟曲霉、构巢曲霉、土曲霉 9A—1 和土曲霉 CBS 220.95 生长在马铃薯右旋糖培养液 (Difco Lab., Detroit, MI, USA) 或完全培养基 (Clutterbuck) 中。土曲霉 9A—1 和构巢曲霉已按用于专利目的的布达佩斯条约规定分别于 1994 年 3 月 7 日和 1995 年 2 月 17 日保藏在 DSM (Braunschweig, BRD), 登记号为 DSM 9097 和 DSM 9743。

按下述方法制备基因组 DNA：

用孢子和生长的 O/N 在振荡下以高密度接种培养基。如此产生一小的真菌团的厚层培养物。过滤回收菌丝体，吸干并称重。每份制品达 2.0g。在液氮中将菌丝体研成丝粉末，直接加到 10ml 提取缓冲液 (200mM Tris/HCl、250mM NaCl、25mM EDTA、0.5% SDS、pH 8.5) 并混匀。向浆液中加入苯酶 (7ml)，混合后再加入氯仿

(3ml) 并再次混匀。离心混合物 (20,000g) 并回收液相。加入 RNase A 到终浓度 250 μ g/ml 并于 37 $^{\circ}$ C 保温 15 分钟。然后用 1 体积氯仿提取混合物并离心 (10,000g, 10 分钟)。回收液相并用 0.54 体积 RT 异丙醇在室温下沉淀 DNA 1 小时。将 DNA 浇在玻棒上回收之并重新悬浮在水中。

按下述方法进一步纯化所得 DNA:

在 37 $^{\circ}$ C 用蛋白质 K 将一部分 DNA 消化 2 小时, 然后重复 (2 至 3 次) 用等体积苯酚/氯仿提取, 用乙醇沉淀, 再重新悬浮在水中达到浓度约 1 μ g/ μ l。

实施例 3

简并 PCR

基本上按照 Perkin Elmer Cetus [(PEC); Norwalk, CT, USA] 的方法进行 PCR。使用下列两个引物 (括号中指出的碱基是两者/或之一):

Phyt18: 5' ATG GA (CT) ATG TG (CT) TCN TT (CT) GA3' 简并
度 = 32

温度高 = 60 $^{\circ}$ C / 温度低 52 $^{\circ}$ C

Phyt9: 5' TT (AG) CC (AG) GC (AG) CC (GA) TGNCC (GA)
TA3'

温度高 = 70 $^{\circ}$ C / 温度低 58 $^{\circ}$ C

典型反应按下述方法进行：

H ₂ O	24.5μl
10XPEC GeneAmp 缓冲液	5μl
GeneAmp dNTP' s (10mM)	8μl
引物 1 (Phyt8, 100μM)	5μl
引物 2 (Phyt9, 100μM)	5μl
DNA (~1μg/ml)	1μl
Taq 聚合酶 (PEC)	$\frac{0.5\mu l}{50\mu l}$

除 Taq 聚合酶外，所有成分均在 95℃ 保温 10 分钟，再在 50℃ 保温 (10) 分钟，然后放在冰上反应。之后加入 Taq 聚合酶 (Amplitaq, Hoffmann—La Roche, Basel, CH) 并按下述循环程序在 Triothermoblock (Biometra, Gottingen, DE) 中进行 35 次 PCR 循环：

95℃/60''

50℃/90''

72℃/120''

在 1.5% 琼脂糖凝胶上分析一等分的反应混合物。

实施例 4

PCR 片段的亚克隆和序列测定

从低熔点琼脂糖中切下预期大小的 PCR 产物 (得自黑曲霉的

DNA 序列推测约 146bp) 并基本上按照制造者推荐的方法从 NACS—PREPAC 柱 (BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA) 上纯化之。于 37°C 在 50 μ l 100mM 卡可酸钠 pH6.6、12.5mM Tris/HCl pH 7.0、0.1mM 二硫苏糖醇、125 μ g/ml 牛血清白蛋白、1mM CoCl₂、20 μ M dATP、10 单位末端脱氧转移酶 (Boehringer Mannheim, Mannheim, DE) 使片段聚腺苷酸化 5 分钟, 并克隆到 p123T 载体 [Mitchell et al., PCR Meth. App. 2, 81—82 (1982)]

另外, 可纯化 PCR 片段并使用 “Sure Clone” 连接药盒 (Pharmacia) 按制造商提供的说明书克隆之。

按照制造商提供的方法, 使用二脱氧方法和 Pharmacia T7 药盒 (Pharmacia, LKB Biotechnology AB, Uppsala, SE) 对在 Quiagen 柱 (Diagen GmbH, Hilden, DE) 上纯化的 ds DNA 进行序列测定。

实施例 6

λ Fix II 文库的构建和筛选

使用得自土曲霉菌株 9A—1 和嗜热毁丝酶的片段进行 BamHI 和 BglII Southern 探查, 以确定用于在 λ Fix II 载体 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 中构建基因组文库的适当限制性酶。 λ Fix II 可能只接受来自 9—23 kb 的插入段。按下述方法进行 Southern 分析。以 200 μ l 的最终体积消化基因组 DNA (10 μ g)。准备进行无酶参加的反应并在冰上保温 2 小时。加入酶 (50 单位) 并在适当温度下将反应混合物

保温 3 小时。然后用等体积苯酚/氯仿提取并用乙醇沉淀。将在装填缓冲液中重新悬浮的 DNA 加热到 65°C 并保持 15 分钟，然后在 0.7% 琼脂糖凝胶 (O/N 30V) 上分离之。在转移前将凝胶在 0.2M HCl 中室温下洗两次，然后在 1M NaCl/0.4M NaOH 中室温下洗两次 (15')。将转移到 0.4M NaOH 中的 DNA 在毛细管中经 4 小时转移到 Nytran 13N 尼龙膜 (Schleicher and Schuell AG, Feldbach, Zurich, CH) 上。转移后使膜暴露于紫外线下 [Auto cross-link, UV Stratinker 2400, Stratagene (La Jolla, CA, USA)]。

在杂交缓冲液 [50% 甲酰胺、1% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、10% 硫酸葡聚糖、4XSSPE (180mM NaCl、10mM NaH₂PO₄、1mM EDTA, pH 7.4)], 将膜于 42°C 预杂交 4 小时，再加入变性的探针后于 42°C 下 O/N。洗涤印迹：

1XSSPE/0.5%SDS/室温/30 分钟

0.5XSSPE/0.1% SDS/室温/30 分钟

0.1XSSPE/0.1% SDS/65°C/30 分钟

结果表明，用 Bam HI 消化的土曲霉菌株 9A—1 基因组 DNA 和用 Bgl II 消化的嗜热毁丝霉基因组 DNA 产生适于克隆到 λFixII 载体中的片段。

按照制造商提供的方法 (Stratagene 在 λFixII 中构建土曲霉菌株 9A—1 和嗜热毁丝霉的基因组文库。

将 λ 文库铺敷在每文库 10 个 137mm 平板上。将噬斑挖出移至

Nytran 13N 圆形滤膜上并在 0.5M NaOH/1.5M NaCl 中处理1分钟,然后在 0.5M Tris-HCl pH8.0/1.5M NaCl 中处理 5 分钟。再将滤膜在 2XSSC 中处理 5 分钟进行空气干燥。然后用紫外线将其固定(1分钟, UV Stratalinker 2400, Stratagene)。滤膜按上述方法杂交并洗涤。记录推测的阳性噬斑并在 SM 缓冲液 (180mM NaCl、8mM MgSO₄·7H₂O、20mM Tris/HCl pH7.5, 0.01%明胶) 浸出噬菌体。稀释该材料并铺敷在 137mm 平板上。移出复制滤膜并按上述方法处理。从各平板中排出清楚的单个阳性噬斑并在 SM 缓冲液中稀释之。排出三个阳性噬斑。两个来自土曲霉菌株 9A-1 (9A117 和 9A122), 一个来自嗜热毁丝霉 (MTX27)。

实施例 6

λ DNA 的制备和克隆的验证

从阳性噬斑制备 λDNA。使用“Magic Lambda Prep”系统(Promega Corp., Madison, WI, USA) 并按照制造商推荐的说 明书进行制备。为证实克隆确实性,用 Pst I 和 SalI 消化 λDNA 并用 PCR 产物探查所得印迹。在所有情况下,该被证实的克隆均被含有互补于探针之序列的克隆。

实施例 7

肌醇六磷酸酶基因的亚克隆和序列分析

用 PstI 消化得自 9A1λ17 的 DNA，将所得的片段混合物连接到用 PstI 切割的 pBluescript IISK⁺ (Stratagene) 上，并用河虾碱性磷酸酶 (United State Biochemical Corp., Cleveland, OH, USA) 处理。在 15°C 对连接混合物进行 O/N。将连接混合物转化到 XL-1 Blue Supercompetent 细胞 (Stratagene) 中，并铺敷在含 0.5mM 异丙醇-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG)、40μg/ml 5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-半乳糖苷 (Xgal)、50μg/ml 氯霉素素的 LB 平板上。

用 Bgl II 和 Xba I 消化得自 9Aλ 17 的 DNA 并将所得混合物连接到用 Bam HI/Xba I 消化的 pBluescript II Sk⁺ 中。按上述方法连接、转化和筛选。

用 Sal I 消化得自 MTλ27 的 DNA，将所得片段的混合物连接到用 Sal I 切割的 pBluescript II SK⁺ 中，并用河虾碱性磷酸酶处理。连接混合物在 16°C 下 O/N。将连接混合物转化到 XL-1 Blue Supercompetent 细胞中并铺敷在含有 Xgal/IPTG 和氯霉素素的 LB 平板上。

挑出上述转化所得的集落并“栅格定位”约 75 个集落到单一平板。37°C O/N 保温后，将集落挖出移到尼龙滤膜 (“Hybond-N”, Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA) 上，并用 0.5M NaCl 处理 1 分钟，用 1M Tris /HCl pH7.5 处理两次各 1 分钟，然后用 0.5 Tris/HCl pH7.5/1.5M NaCl 处理 5 分钟。空气干燥滤膜后用紫外线固定之 (2 分钟, UV Stratalinker 2400, Stratagene)，将滤膜与实施例 5 的 PCR 产物杂交。选择阳性集落并制备 DNA。按实施例 4 中所述

方法测定亚克隆序列。测得的土曲霉菌株 9A1 的肌醇六磷酸酶及其编码 DNA 的序列示于图 1 中, 图 2 则显示来自嗜热毁丝霉的肌醇六磷酸酶的序列及其编码 DNA 序列。图 3A 显示土曲霉 DNA 的限制图 (其中箭头为编码区, 条纹为编码区之外所测定序列的区域, 且图 3B 显示来自嗜热毁丝菌的 DNA 的限制图; 图 4 显示来自嗜热裸节菌之肌醇六磷酸酶的一部分及其编码 DNA 序列; 图 5 显示来自烟曲霉之肌醇六磷酸酶的一部分及其编码 DNA 序列; 图 6 显示来自构巢曲霉之肌醇六磷酸酶的一部分及其编码 DNA 序列。按照实施例 2-7 中所述涉及土曲霉菌株 9A1 和嗜热毁丝霉肌醇六磷酸酶的同样方法, 制得来自嗜热裸节菌、烟曲霉和构巢曲霉之肌醇六磷酸酶的序列及它们的编码 DNA 序列。用惯用的一字母代码缩写字以小写字母给出两条链的碱基。在相应 DNA 序列下方用惯用的一字母代码以大写字母给出衍生的肌醇六磷酸酶的氨基酸序列。

实施例 8

黑曲霉和土曲霉肌醇六磷酸酶 DNA 序列间嵌合构建体的构建

使用 Sambrook 等人 (1989) (Molecular cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) 所述的标准分子生物学方法进行所有的构建。

将 EP 420 350 中所述的黑曲霉肌醇六磷酸酶的前 146 个氨基酸融合到土曲霉 9A1 基因的 320 末端氨基酸上。在用 PCR 克隆了黑

曲霉肌醇六磷酸酶基因时；在ATG起始密码子处引入NcoI位点。使用下列引物（其中竖短线指示向其左侧的序列与第一个外显子的3'端杂交，向其右侧的序列与第二个外显子的5'端杂交），以位点针对性诱变法（Bio-Rad药盒，Cat Nr170-3581；Bio-Rad, Richmond, CA, USA）除去见于黑曲霉肌醇六磷酸酶中的内含子。

为了构建黑曲霉和土曲霉之肌醇六磷酸酶的嵌合构建体，在黑曲霉编码序列中导入Eco47II位点以帮助克隆之。使用以诱变引物（5'CGA TTC GTA GCG CTG GTA G3'）含用T3引物进行的PCR产生用Bam HI和Eco RI裂解的DNA片段。将Bam HI/Eco47III片段插入经p9AI_{Pst}切割的Bam HI/Eco47III中实施例7。图7显示该融合构建体的氨基酸序列和其编码DNA序列。

实施例9

肌醇六磷酸酶的表达

表达载体的构建

为了在黑曲霉中表达融合构建体，选择其中融合基因处于可诱导的黑曲霉葡糖淀粉酶（glaA）启动子控制下的表达暗盒。

对于完整土曲霉9AI基因，制得带有结构性构巢曲霉甘油醛—3-磷酸脱氢酶（gpd A）启动子的表达暗盒。

用于在黑曲霉中表达的所有基因均携带自己的分泌信号序列。

载体 pFPAN1 的构建

从质粒 pDH33 [Smith et al. (1990), Gene 88: 259—262] 中分离出作为 1960bpXhoI/Cla I 片段的黑曲霉葡糖淀粉酶 (gla A) 启动子, 并克隆到含有构巢曲霉 trp C 终止子之 710 bp BamHI/Xba I 片段的 pBluescript SK⁺ 载体 (pBS) [Stratagene, La Jolla, CA, USA] 中。带有此暗盒的质粒被定名为 pGLAC。通过将切成平头的 NcoI/EcoRI 片段连接到质粒 pGLAC 的切成平头的 ClaI 位点和 EcoRV 位点上, 使实施例 8 中所述的融合基因处于黑曲霉 gla A 启动子的控制下。经限制性酶消化验证正确方向。将整个暗盒作为 KpnI/XbaI 片段转移到 pUC19 (New England Biolabs, GmbH, Schwalbach, BRD) 中, 其携带粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*) pyr4 基 (pUC19—phr4) 一种在尿苷营养缺陷型曲霉中的选择标志, 得到载体 pFPAN1 (参见附有所指出的限制性位点和编码区的图 8; 横线划出的位点指示平端连接的位点)。

载体 pPAT1 的构建

从质粒 pAN52-1 [Punt et al. (1987), Gene 56: 117—124] 中分离作为 ~2.3kb EcoRI/NcoI 片段的构巢曲霉甘油醛—3—磷酸脱氢酶 (gpdA) 启动子, 克隆到 pUC19--NcoI (具有被 NcoI 位点取代之 SmaI 位点的 pUC19) 中, 再作为 EcoPI/BamHI 片段分离之并克隆到带有上述 trpC 终止子的 pBS 中。所得到的暗盒称为 pGPDN。分离作为 NcoI/EcoRI 片段的土曲霉基因, 其中填入 EcoRI 位点以产生平

头。用 BamHI 和 NcoI 切割质粒 pGPDN。填入 Bam HI 位点以产生平头。将土曲霉基因的 NcoI/EcoRI (平头) 片段克隆到 gpdA 启动子和 trpC 终止子之间。分离作为 KpnI/XbaI 片段的表达暗盒并克隆到 pUC19--pyr4 中, 得到质粒 pPAT1 (参见图 9; 对缩写字的解释见图 8)。

在黑曲霉中表达融合蛋白质

A) 转化

使用 Ballance 等人 [(1983), Biochem, Biophys. Res. Commun. 112, 284—289] 的作如下改动的转化方法用质粒 pFPAN1 转化黑曲霉:

- 用每毫升 10^6 个孢子接种 YPD 培养基 (1% 酵母浸膏, 2% 蛋白胨、2% 右旋糖), 并在 30°C 和 250rpm 条件下培养 24 小时;
- 使用 Wero—Lene N 组织 (No. 8011. 0600 Wernli AG Verbandstoffabrik, 4852 Rothrist, CH) 收获细胞, 并用缓冲液 (0. 8M KCl、0. 05M CaCl_2 , 在 0. 01M 琥珀酸盐缓冲液中, pH5. 5);
- 只使用溶解酶 (SIGMA L—2265, St. Louis, MO, USA) 进行原生质体制备;
- 在 30°C 和 100rpm 条件下将细胞保温 90 分钟, 并经过滤 (Wero—Lene N 组织) 分离原生质体;
- 用 STC (1M 山梨醇、0. 05M CaCl_2 、0. 01M Tris/HCl, pH7. 5) 将原生质体洗一次并重新悬浮在同样缓冲液中;

- 将 150 μ l 原生质体 ($\sim 10^8$ 个/ml) 与 10-15 μ g 质粒 DNA 轻轻混合并于室温下 (RT) 保温 25 分钟;
- 分三步加入聚乙二醇 (60% PEG 4000, 50mM CaCl₂, 10mM Tris/HCl, pH7.5), 每次各 150 μ l, 200 μ l 和 900 μ l, 并在室温再将样品保温 25 分钟;
- 加入 5ml STC, 离心并将原生质体重新悬浮在 2.5ml YGS (0.5% 酵母浸膏、2% 葡萄糖、1.2M 山梨醇);
- 将样品于 30 $^{\circ}$ C (100rpm) 保温 2 小时, 离心并将原生质体重新悬浮在 1ml 1.2M 山梨醇中;
- 将转化的原生质体与 20ml 基本再生培养基 (0.7% 无氨基酸酵母氮碱、2% 葡萄糖、1M 山梨醇、1.5% 琼脂、20mM Tris/HCl (pH7.5), 其中每升溶加 0.2g 精氨酸和 10mg 尼龙酰胺);
- 将平板于 30 $^{\circ}$ C 保温 3-5 天。

B) 表达

分离单个转化体、纯化并试验其融合蛋白质的过量产生。100ml M25 培养基 (每升含 70g 麦芽糖糊精 (Glucidex 17D, Sugro Basel, CH), 12.5g 酵母浸膏、25% 酪蛋白水解物、2g KH₂PO₄、2g K₂SO₄、0.5g MgSO₄ · 7H₂O、0.03g ZnCl₂、0.02g CaCl₂、0.05g MnSO₄ · 4H₂O、0.05g FeSO₄, pH5.6) 分别接种得自转化体 FPAN1#11、#13、#16、#E25、#E30 和 E31 的 10⁶ 个孢子/ml, 并于 30 $^{\circ}$ C 和 270rpm 条件下保温 5 天。收集上清并检测活性。该融合蛋白质用肌醇六磷酸作为底物于

pH2.5 条件下显示有最高活性，而用 4-硝基苯基磷酸酯作为底物则在 pH2.5 和 5.0 显示两个最佳活性（表 1）。

c) 活性检测法

a) 肌醇六磷酸

1ml 酶反应混合物含有 0.5ml 透析的上清液（如必要须稀释）和 5.4mM 肌醇六磷酸（SIGMAP--3168）。分别在 0.2M 乙酸钠缓冲液（pH5.0）、0.2M 甘氨酸缓冲液（pH2.5）中进行反应。样品于 37℃ 保温 15 分钟。加入 1ml 15% TCA（三氯乙酸）终止反应。

为进行颜色反应，用 0.9ml 蒸馏水稀释 0.1ml 终止反应的样品，并与 1ml 试剂溶液（3 体积 1M H_2SO_4 、1 体积 2.5% $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 、1 体积 10% 抗坏血酸）。样品于 50℃ 保温 20 分钟并于 820nm 处以分光光度法检测所呈现的兰色。因为该检测法是基于磷酸的释放，故使用磷酸准曲线来（每毫升 11-14nmol）确定样品的活性。

b) 4-硝基苯基磷酸酯

1ml 酶反应混合物含有 100 μ l 透析的上清液（如必要时须稀释）和 1.7mM 4-硝基苯基磷酸酯（Merck, 6850, Darmstadt, BRD）。分别在 0.2M 乙酸钠缓冲液 pH5.0 和 0.2M 甘氨酸缓冲液 pH2.5 中进行酶反应。样品于 37℃ 保温 15 分钟。加入 1ml 15% TCA 终止反应。

使用如上所述的方法检测酶活性。

表 1

转化体	底 物					
	* 肌醇六磷酸			# 4-硝基苯磷酸酯		
	pH 5.0	pH 2.5	pH 5.0	pH 5.0	pH 2.5	pH 2.5
A. niger i)	0.2	1	1	1	2	
FPANI # 11	6	49	173		399	
FPANI # 13	2	21	60		228	
FPANI # 16	1	16	46		153	
FPANI # E25	3	26	74		228	
FPANI # E30	3	43	157		347	
FPANI # E31	3	39	154		271	

* 每毫升单位数: 1 单位 = 3 1°C 下每分钾释放 1 μ mol 磷酸

1 未转化

在黑曲霉中表达土曲霉 9A1 基因

用上述质粒 pPAT1 转化黑曲霉 NW 205。分离单个转化体，纯化并根据土曲霉蛋白质的过产生量筛选之。用分别得自转化体 PAT1 # 3、# 10、# 11、# 13 和 # 16 的 10^6 个孢子/ml 接种 50ml YPD 培养基并于 30°C 和 270rpm 条件下保温 3 天。收集上清液并大致按上述方法检测活性，只是酶反应的 pH 不同。用肌醇六磷酸作底物，酶在 pH 5.5 时显示有其最大活性，而用磷酸硝基苯酯作底物则在 pH 3.5 时表现有最大活性（表 2）。

表 2

转化体	底物					
	* 肌醇六磷酸		* 4-硝基苯磷酸酯			
	pH 5.5	pH 3.5	pH 5.5	pH 3.5	pH 5.5	pH 3.5
A. niger ¹⁾	0	0	0	0	0.1	0.1
PAT1 # 3	10	0	0.2	0.7		
PAT1 # 10	9	0	0.2	0.8		
PAT1 # 11	5	0	0.1	0.5		
PAT1 # 13	9	0	0.2	0.7		
PAT1 # 16	5	0	0.1	0.5		

* 每毫升单位数: 1 单位 = 37°C 下每分钟释放 1 μ mol 磷酸

¹⁾ 未转化

实施例 10

黑曲霉 NW 205 转化体的发酵

A) 转化体 FPAN1 #11

用加在振荡瓶中的 10^6 个孢子/ml 接种预培养基 [每升含 30g 麦芽糖糊精 (GlucideX170)、5g 酵母浸膏、10g 酪蛋白水解物、 $1\text{gKH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.5\text{g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3g Tween 80; pH5.5], 并在 34°C 和 250rpm 条件下保温 24 小时。

用预培养物接种 10 升发酵罐以将预培养物最终稀释到 1:100。在 30°C 进行分批发酵, 自动控制的溶解氧浓度最小为 25% ($p\text{O}_2 \geq 25\%$)。用 5M NaOH 自动滴定以使 pH 保持 3.0。

用于发酵的培养基是: 每升含 35g 麦芽糖糊精、9.4g 酵母浸膏、18.7g 酪蛋白水解物、 $2\text{g KH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.5\text{g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $2\text{gK}_2\text{SO}_4$ 、 0.03g ZnCl_2 、 0.02g CaCl_2 、 $0.05\text{g MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 0.05g FeSO_4 ; pH5.6。

在这些条件下发酵 3 天后, 如用肌醇六磷酸作底物, pH2.5 时达到的酶活性为 35 单位/ml, pH5.0 时为 16 单位/ml; 如用 4-磷酸硝基苯酯作底物, pH2.5 时为 295 单位/ml, pH5.0 时为 90 单位/ml。

B) 转化体 PAT1 #11

预培养, 发酵罐的接种和发酵培养基均同上所述, 不同的是经用 5M NaOH 自动滴定使 pH 保持在 4.5。

在这些条件下 4 天后所达到的酶活性分别是, 用肌醇六磷酸作底物且在 pH5.5 时为 17.5 单位/ml, 用 4-硝基苯基磷酸酯作底物

且在 pH3.5 时为 2 单位/ml。

实施例 11

土曲霉 (CBS 220.95) 肌醇六磷酸酶基因 PCR 片段分离

使用土曲霉 (CBS 220.95) 的 DNA, 用两个不同的引物进行片段的 PCR 扩增。所用引物如下表所示。

扩增的 片段	引物	寡核苷酸序列 (5' to 3')
8 加 9 大约 150 bp	8	ATGGA(C/T)ATGTG(C/T)TC(N)TT(C/T)GA 氨基酸 254-259: MDMCSF
	9	TT(A/G)CC(A/G)GC(A/G)CC(G/A)TG(N)CC(A/G)TA 氨基酸 296-301: YGHGAG
	10	TA(C/T)GC(N)GA(C/T)TT(C/T)TC(N)CA(C/T)GA 氨基酸 349-354: YADFSH
	11	CG(G/A)TC(G/A)TT(N)AC(N)AG(N)AC(N)C 氨基酸 416-422: RVLVNDNR

黑体字 DNA 序列显示有意义引物，斜体字则显示反义引物。引物相当于黑曲霉基因之编码序列的所指出部分。使用的组合是引物 8 加 9 和 10 加 11。按照制造商推荐的方法使用由 Clontech (Palo Alto, CA, USA) 提供的 Tag-Start 抗体药盒。引物 8 加 9 的浓度为 0.2mM，引物 10 加 11 的浓度为 1mM。使用 Touch-down PCR 进行扩增 [Don, R. H. et al. (1991), Nucleic Acids Res. 19, 4008]。首先于 95°C 使 DNA 变性 3 分钟。然后是两次循环，每次使用下列退火温度：60°C、59°C、58°C、57°C、56°C、55°C、54°C、53°C、52°C 和 51°C，退火时间各 1 分钟。退火之前，加热至 95°C 保温 1 分钟；退火后于 72°C 进行延伸反应 30 秒。如下程序进行 21 至 35 次循环：95°C 变性 1 分钟，50°C 退火 1 分钟，72°C 链延伸 30 秒钟。

得到两个不同的 PCR 片段。所得到的 DNA 序列和它们与土曲霉 9A1 之肌醇六磷酸酶基因相关部分的比较如图 10 中所示 [土曲霉 9A1 肌醇六磷酸酶基因的相关部分：“9A1” (上引) (1)；土曲霉 CBS 220.95 的 PCR 片段：“aferr 21” (下引)。其中 A 图：用引物对 8 加 9 得到的片段 (aterr 21)，B 图：用引物对 10 加 11 得到的片段 (aterr 58)。土曲霉 CBS 220.95 的 DNA 序列 (上引) 与土曲霉 9A1 的 DNA 序列 (1) (下引)] 相比较。A 图：aterr 21 片段中的黑体字 gc 序列 (碱基 16 加 17) 可能是 cg (DNA 序列测定的不确定性)。B 图：aterr 58 PCR 片段 26 位的 X 可能代表四种核苷酸的任何一种]。

实施例 12

在非严格和严格洗涤条件下交叉杂交

将表 3 中所列各菌株的各 5 μ g 基因组 DNA 分别与每 μ g DNA 4 单位的 Hind III 或 Pst I 于 37 $^{\circ}$ C 保温 4 小时。消化后, 用苯酚提取该混合物并用乙醇沉淀 DNA。然后在 0.8% 琼脂糖凝胶上分析样品。使用含有 1M NaCl 的 0.4M NaOH 作为转移溶液将 DNA 转移到 Nytran 膜 (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA) 上。于 42 $^{\circ}$ C 杂交 18 小时。杂交溶液每毫升含有 50% 甲酰胺、1% SDS、10% 硫酸葡聚糖、4XSSPE (1XSSPE = 0.18M NaCl, 1mM EDTA, 10mM NaH₂PO₄, pH7.4)、0.5% blotto (干牛奶粉加在水中) 和 0.5mg 鲑鱼精子 DNA。在使用最后的和最严格洗涤条件的非严格条件下, 在含有 0.1% SDS 的 0.1XSSPE 中室温保温 30 分钟洗膜。所使用的探针 (以大约 10⁶ dpm/ μ g DNA) 的比活性标记的是使用嗜热毁丝霉 (Myceli. thermo.) 构巢曲霉 (Asperg. nidul.) 烟曲霉 (Asperg. fumig.)、土曲霉 9A1 (Asperg. terreus 9A1)、嗜热裸节菌 (Talarom. thermo.) 的基因组 DNA 用引物 8 加 9 产生的 PCR 片段 (参见实施例 11)。经随机引导 (按照 Pharmacia, Uppsala, Sweden 给出的方法) 得到 MT2 基因组探针, 并跨越 1410 bp, 即从嗜热毁丝霉肌醇六磷酸酶基因之 N 末端的 BspEI 位点上游到 C 末端中的 PvuII 位点 (位置 2068 至 3478)。经随机引导得到 AT2 基因组探针并跨越 1365bp, 即从土曲霉 9A1 肌醇六磷酸酶基因的 ApaI 位点到 NdeI 位点 (位置 491 至 1856)。经随机

引导得到 AN2 DNA 探针并跨越黑曲霉基因 (EP 420 358) 的完整编码序列 (1404 bp)。结果在表 3 中给出。[“*” 除外相当于非特异性 20kb 片段的弱信号；在很弱交叉杂交信号的情况下，使用来自嗜热裸节菌的 PCR 片段在 20kb 处见有来自黑曲霉的 DNA，因为它明显不同于含有肌醇六磷酸酶基因的预期的 10kb Hind III 片段，所以该片段是非特异性的；“**” 只因 DNA 的部分消化所产生的信号]。

为了用严格洗涤条件进行交叉杂交，进一步于 65°C 在含有 0.1% SDS 的 0.1XSSFE 中洗涤 30 分钟。结果示于表 4 中 [① 只是仍测到 10.5kb HindIII 片段，而未出现 6.5kb Hind III 片段(参见表 3)]。

表 3

用于交叉杂交的 DNA 来源	PCR 探针					基因组探针		DNA 探针
	用烟曲霉 (<i>A. fumig</i>) 的探针 测得的 带 (kb)	用构巢 曲霉 (<i>A. nidu</i>) 的探针 测得的 带 (kb)	用土曲霉 (<i>terreus</i>) 的探针 测得的 带 (Kb)	用嗜热毁 丝霉 (<i>Mycelio.</i> <i>tuermo.</i>) 的探针 测得的 带 (kb)	用嗜热深 节菌 (<i>Talarom,</i> <i>thermo.</i>) 的探针测 得的带 (kb)	用嗜热毁 丝霉基因 组探针 AT2 测得的 带 (kb)	用土曲霉 (<i>Asperg.</i> <i>terreus</i>) 9A1 的探 针测得的 带 (kb)	用黑曲霉 (<i>Asperg.</i> <i>niger</i>) 的 DNA 探 针 AN2 测得的 带 (Kb) (对照)
拉维氏菌梗孢 ATCC 48380	无	无	无	无	无	8-kb	无	无
黑曲霉 ATCC 9142 (对照)	无	无	无	无	无*	无	无	10 kb <i>HindIII</i>
土曲霉 CBS 220 .95	无	无	11-kb <i>HindIII</i>	无	无	无	11-kb <i>HindIII</i>	无
酱油曲霉 CBS 221 .95	无	无	无	无	无*	无	3.7-kb <i>HindIII</i>	无
<i>Calcarisporiella</i> <i>thermophila</i> [ATCC 22718]	无	无	10.5-kb <i>HindIII</i>	无	无	10.5-kb <i>HindIII</i>	10.5-kb <i>HindIII</i>	无
<i>Chaetomium</i> <i>opilium</i> [ATCC 22431]	无	无	无	无	无	>20-kb** <i>HindIII</i>	>20-kb** <i>HindIII</i>	无
<i>Coryascus</i> <i>thermophilus</i> [ATCC 22066]	无	无	无	无	无	10.5-kb <i>HindIII</i>	无	无
腐质霉菌种 [ATCC60819]	无	无	无	无	无	9.5-kb <i>HindIII</i>	无	无

<i>Mucella sterilis</i> [ATCC 20350]	无	无	无	6-kb <i>Hind</i> III	无	6-kb <i>Hind</i> III	6-kb <i>Hind</i> III	无
<i>Myrocoecum thermophilum</i> [ATCC 22112]	无	无	无	无	4.8-kb <i>Hind</i> III	无	无	无
<i>Rhizomucor miehei</i> [ATCC 22064]	无	3.8-kb <i>Hind</i> III	无	无	无	无	无	无
<i>Sporotrichum cellulophilum</i> [ATCC 20494]	无	无	无	6-kb <i>Hind</i> III 2.1/3.7- kb <i>Pst</i> I	无	6-kb and 10.5-kb <i>Hind</i> III	6-kb and 10.5-kb <i>Hind</i> III	无
嗜热侧孢 [ATCC 22482]	无	无	无	6-kb <i>Hind</i> III 2.1/3.7- kb <i>Pst</i> I	6-kb <i>Hind</i> III	6-kb <i>Hind</i> III	6-kb <i>Hind</i> III	无
<i>Scytalidium indonesicum</i> [ATCC 46858]	无	无	无	无	无	9-kb <i>Hind</i> III	无	无
烟曲霉 [ATCC 34625]	2.3-kb <i>Hind</i> III	无	无	无	无	无	无	无
构巢曲霉 [DSM 9713]	无	9.5-kb <i>Hind</i> III	无	无	无	无	9.5-kb <i>Hind</i> III	无
土曲霉 9AT [DSM 9076]	无	无	10.5-kb <i>Hind</i> III	无	6.5-kb <i>Hind</i> III	10.5-kb <i>Hind</i> III	10.5-kb <i>Hind</i> III	无
嗜热假丝霉 [ATCC 48102]	无	无	无	6.5-kb <i>Hind</i> III	无	6.5-kb <i>Hind</i> III	6.5-kb <i>Hind</i> III	无
嗜热蹼节菌 [ATCC 20186]	无	无	无	无	9.5-kb <i>Hind</i> III	无	无	无

表 4

用于交叉杂交之 DNA 的来源	烟曲霉 (A. fumig) 的探针	构巢曲霉 (A. nidul.) 的探针	土曲霉 (A. terreus) 9A1 的探针	嗜热毁丝霉 (Mycelium thermo.) 的探针	嗜热踝节菌 (Talarom. thermo.) 的探针	嗜热毁丝菌 MT2 (Mycdelio. thermo) 的基因组探针	AT2 土曲霉 (A. terreus) 9A1 的基因组探针	AN2 黑曲霉 (A. niger) 的 DNA 探针 (对照)
拉维氏端梗孢						是		
黑曲霉 (对照)								是
土曲霉 (CBS 220.95)			是				是	
<i>Calcarisporiella thermophila</i>			是				是	
<i>Chaetomium rectopilium</i>						是		
<i>Corynascus thermophilus</i>						是		
<i>Sporotrichum cellulophilum</i>				是		是	是 (1)	
嗜热侧孢				是		是		
烟曲霉	是							
构巢曲霉		是						
<i>Aspergillus terreus</i> 9A1			是				是	
<i>Mycelia sterilia</i>						是		
嗜热毁丝霉				是		是		
嗜热踝节菌					是			

说 明 书 附 图

图 11

```

tctagaacaataacaggtactccctaggtaccogaaggacctgtggaaaatgtatggag 60
gtggacacggcaccacaccaccaccggatggcgcacgtggtgacctaaccccttgcctcc 120
ctcaggatggaatccatgtcgactcttaccctcaccatcgectggatgaaacctccccg 180
ctaagctcacgaogatcgctatttccgaccgatttgaccgcatggaggaggctgattc 240
ggtcgatgctcctgccttcatttccggagtcggagacatgaaaggcttatatgaggacgt 300
cccaggtcggggacgaaatccgcccctgggctgtgctccttcgtaggaaacatctgctgtc 360
cgtgatggctaccatgggcttcttggcatttggctctcctcgccttgcctttagaag 420
M G F L A I V L S V A L L F R S 16

glatgcaccctctacgtccaattctctgggcactgacaacggcgcagcacatcgggcac 480
T S G T 20

cccgtgggacccccggggcaaacatagcgactgcaactcagtcgatcaccggctatcaatg 540
P L G P R G K H S D C N S V D H G Y Q C 40

ctttcctgaactctctcaataatggggactctacggccctacttctccctccaggacga 600
F P E L S H K W G L Y A P Y F S L Q D E 60

gtctccggttctctggacgtcccagaggactgtcacatcaccttngtgcaggctgctggc 660
S P F P L D V P E D C H I T F V Q V L A 80

ccccacgncggcgggagcccaaccatagcaagaccagggcgtacggcggaccattgc 720
R H G A R S P T H S K T K A Y A A T I A 100

ggcaatccagaagagtgccactgogtttccgggcaaatccggcttctcgcagtcatalaa 780
A I Q K S A T A F P G K Y A F L Q S Y N 120

ctactccttggactctgaggactgactcccttccggcggaaaccagctgcgagatctggg 840
Y S L D S E E L T P E G R N Q L R D L G 140

cgncagttctcagagcgtacaacgccctcacccgacacatcaacccttngtccggcc 900
A Q F Y E R Y N A L T R H I N P F V R A 160

ccccgatgcacccggctccacgaatccggcggagaagttcgtcaggggcttccaaaccgc 960
T D A S R V H E S A E K F V E G F Q T A 180

tcgacaggacgatcatcagcccaatccccaccagcttccctcggcgtggacgtggccat 1020
K Q D D H H A N P H Q P S P R V D V A I 200

ccccgaagccagccctacaacaacacgctggagcacagcctctgcaccgccttcgaatc 1080
P E G S A Y N N T L E H S L C T A F E S 220

cagcaacgtcggcgaagcggcggctcggcaactcaccgncgtgttcggcggcggcgtatgc 1140
S T V G D D A V A N F T A V F A F A I A 240

ccagccctcagaggcagctctccggcgtcagctgtccaccgacagcgtggtcaacct 1200
Q P L E A D L P G V Q L S T D D V V N L 260

gatggccatgtgtccctcagagcggctcagcctgacccgacagcggcaccacgctgtcggc 1260
M A M C P F E T V S L T D D A H T L S P 280

gttctcagacctcttcaaggccactgagtggacgcagtcacaactacctgctctcgttgg 1320
F C D L F T A T E W T Q Y N Y L L S L D 300

caagtaactacggctacggcgggggcaatccgctgggtccgggtgcagggggtcggctggc 1380
K Y Y G Y G G G N P L G P V Q G V G W A 320

gaacgaqctgatggcggcgtcaacggcggcccccgtgcacgaccacacctggctcaaca 1440
N E L M A R L T R A P V H D H T C V N N 340

caccctcagcggcagtcggccaccttcccgctgaacggcaacctctacggcagctctc 1500
T L D A S P A T F P L N A T L Y A D F S 360

```

图 1/2

ccacgacagcaacctggtgtcgtatctctctgggcctcggccctgtacaacggcaccgcgcc 1560
 H D S N L V S I F W A L G L Y N G T A P 380

 gctgtcgcagacctccgtcgagagcgtctccagagggacgggtacgcgcgcgcctggac 1620
 L S Q T S V E S V S Q T D G Y A A A W T 400

 ggtgcgcttcgcgcctcgcgcctacgtcgagatgatgcagtgtcgcgcgcgagaaggagcc 1680
 V P F A A R A Y V E M M Q C R A E K E P 420

 gctggtgcgcgctcgtcgtcaacgacccggctcatgcgcctcctggctgcctacggacaa 1740
 L V R V L V N D R V M P L H G C P T D K 440

 gctcggcggcgtgcaagcgggacgctttcgtcgcggggctgagctttgcgcagggcggcgg 1800
 L G R C K R D A F V A G L S F A Q A G G 460

 gaactggcgggatttgtttctgntcttgagaagaaaggtagatagataggtagtagatitg 1860
 N W A D C F 466

 gattgctcggctctgggtcgttgcccacaatgcctattacgcccgtcaactgccttgccg 1920
 catccacctctcaccctggacgcaaccgagcggctcaccctgcacacggcttccaccgcg 1980
 acgcgcacggataaggcgttttgttacggggttggggtgggggcagccggagccggag 2040
 agagagaccagcgtgaaaaacgacagaacatagatatcaattcgacgccaattcatgcag 2100
 agtagtatacagacgaaactgaacaaaacacatcacttcctcgtcctctcctgtagaag 2160
 acgctcccaccagcgcctctctggcccttattcccgtacgctaggtagaccagtcagccag 2220
 acgcatgcctcacaagaacggggggggggacacactcggctcgtacagcaccacagcag 2280
 tgtacaggaaaaaccggcagcgcacacaatcgtcagagaccatctgcag 2327

gtcgacgaggcaaccacgcccgctcctcggcgggtccgagagggccgggctcgggttcga 60
caaggagacgggctcccttcgggcccggctcggggtgtgggtgtgctgtggacgggtga 120
ggagggggacgggctggcggtgatgacggtagcaatgcgaacggacacaggccgctgag 180
cgtgggtgtgcggttctaactcttcttctgtgtgggtgtgtacgtgtgggtgtgatgtgt 240
ttggggggggaatgttcttggtaattatcttctacccttcttcttcttcttattct 300
gttcagcaggtatccccgtgtaagtgtacaggattatgggacgggtgggtggatggact 360
acttctagaaggacggataaagaaaaaggggaaacaagaatagccgccctgggtggcgc 420
gtcgagctggatgcttgacgccggcttgcaaacatttcttcttcttagcaccacaacct 480
gtacttgatagagtggttcggggcccaggcgggttgcgctgtgttttaccaatcaccac 540
tagtgctactactattattgcccgtgttgatgcagccgtgtaccaaaaatgccgcccac 600
ctccattgatacttgtagtgttgatagatcaatatttgggaggttgcgctgggctgctct 660
gaaacccctctcttctgtgtacgtaacgtatgtgcacagtatgtcaccgacaaagacga 720
ttgcatgcgcatcggtttttgtgtgttccaggcctcgctcgtgtctagggtataaacac 780
attgaagactacatagcgcgaagcgttgacattaacggggtcctgcagccgcccaggt 840
gcatgtcgtgattaataaccacgcgctcgcgtaaatagctagccgccccctgtttcact 900
cggtagagacggacaggtgagacgggtcctcggtaagcaagcaaatggaaatgcaaggt 960
tgaaggtgtaactctgcatagcgtggaatgagagggctctgtgggcagccaggaaggtga 1020
gacgaaatgaggaagaggcaccagaagcgtgtgttctgaaagtcccgtggtcatagctc 1080
caggattaagtacggatgtcccatgccaaagctgctggcttcgaaagcagtagcggagtag 1140
tgtccattgttcacaggggatccccaatgtgttagacatgctgaatcaattttgtccta 1200
tttttggattccaactgtttctctcgcactgtgctcggtagcgactatgccgcaaggtaca 1260
ctacatgtgtacaataatcctacacgacctccgtaggagtgctgaaataaccgacct 1320
ctctctctagcaggtgcctaatggcttctgtgtaactcgatcgaaacggatcagcaagt 1380
ccatttgcgtgtgggtgagatgtacgatttacaacacgctggagaggtgagccacagcga 1440
taggcttctggaaggattctggcgtctcggaaagagggccactcgcacctaacggcg 1500
ccgatcttgacatggggctcgcagggggtttaaagtgcacactacggagtagcggattacac 1560
agttagtgtatgggtggggcgagtttgggtggccttgtgtggggctcaccggctgctgt 1620
tctcggggagtcctggcgggcccagattggaccacctaaccacgggtagtcttggcccggc 1680
caactcacaccgccctcatgttccggagccagttagggagggcagggcactactcagtcagg 1740
tacacacgctcgggctcctcagatgctgggtgacatcgagggcagatcgtcattccaactacg 1800
gttggcataggaggtatcctattctagagctgttctacgccggaacgtaaccgggataa 1860
cccgggatacgcctccctcagcagcagcgcgctgctgaggatcatacaaccaacaaccga 1920
cgacggtgcaagaaggttgggggaaggaagaaatcaaggaaaaaaaaatagggggggtgg 1980
ggaccaagagagaaagaaaggagaaaaaggggtggggggagggaaagagaaaaaaaacgga 2040
ggaaataggcgtcgtctctcgcactggttccggaagggggcatctgggtacacatagcac 2100
ctctccgcacggcagggatataaacgggagtgacgtcccaccgatcatgtgagtcgg 2160
cccgtctccagactcaccggtcgcagaggactagacgcgcggtgaagatgactggcctcg 2220
M T G L G 5

gagtgatgggtgatggtcggcttccctggcgatcgcctctctgtgaagcagcattccag 2280
V M V V M V G F L A I A S L 19

gggtccggtgtgcttlaaaagaaaaagctaacgccaccagacaatccgagtcgccggccat 2340
Q S E S R P C 26

gcgacaccccagacttgggcttccagtggtgtaaggccatttcccacttctggggccag 2400
D T P D L G F Q C G T A I S H F W G Q Y 46

actcgcctacttctccgtgccctcggagctggatgcttcgatccccgacgactcgcagg 2460
S P Y F S V P S E L D A S I P D D C E V 66

tgacglttgcccaagtcctctcccgccagggcgcgagggcgcgacgctcaaacgggccc 2520
T F A Q V L S R H G A R A P T L K R A A 86

cgagctacgtcgatctcatcgacaggatccaccatggcggcatctcctacgggcccgggt 2580
S Y V D L I D R I H H G A I S Y G P G Y 106

accagttcctcaggacgtatgactacacctggggcccagagctcaccggacggggc 2640
E F L R T Y D Y T L G A D E L T R T G Q 126

agcagcagatggtcaactcgggcatcaagttttaccgcgctaccgcgctctcggcccga 2700
Q Q M V N S G I K F Y R R Y R A L A R K 146

agtcqatcccttcgtccgcaccgcccgaaggaccgctcgtccactcggccgagaact 2760
 S I P F V R T A G Q D R V V H S A E N F 166
 tcacccagggttccactctgacctctcgcgcaccgcccgggtccaccgtccggcccacc 2820
 T Q G F H S A L L A D R G S T V R P T L 186
 tccccatgacatggtcgtcaccggaaccgcccggcgcacaacacgctccacaacg 2880
 P Y D M V V I P E T A G A N N T L H N D 206
 acctctgcaccgcttcgaggaagcccctactcgaccatcggcgacgacgcccagaaca 2940
 L C T A F E E G F Y S T I G D D A Q D T 226
 cctacctctccaccttcgcccgaaccatcaccgcccgggtcaacgccaacctcggccggc 3000
 Y L S T F A G P I T A R V N A N L P G A 246
 ccaacctgaccgacgcccgaacggtcgcacctgatggacctctgccccttcgaacggtcg 3060
 N L T D A D T V A L M D L C P F E T V A 266
 cctcctcctcctccgaccggaaccggaagcggggggggggggaaccggggggcggctgt 3120
 S S S S D P A T A D A G G G H G R F L S 286
 cggcctctcccgctgttcagcgaatccgagtgccgcccgtacgaactacctgcagtcgg 3180
 P F C R L F S E S E W R A T D Y L Q S V 306
 tggccaagtggtagggatcggggcccgggaaccgctggggccgacgcaaggggtcgggt 3240
 G K W Y G Y G P G N P L G P T Q G V G F 326
 tcgtcaacgagctgctggcgcggctcggccgggtcccctgcccgcacggcaccagcaca 3300
 V N E L L A R L A G V P V R D G T S T N 346
 accgcacctcgaacggcaccgcccaccttcccgtcggcccggccctctacgcccact 3360
 R T L D G D P R T F P L G R P L Y A D F 366
 tcagccacgacaacgacatgatggcgtcctcgggcacctcggcgcctacgacggcgtcc 3420
 S H D N D M M G V L G A L G A Y D G V P 386
 cggcctcgaacaagaccgcccggcggcaccgggaagactcggcgggtacgcccagct 3480
 P L D K T A R R D P E E L G G Y A A S W 406
 gggccgtcccgttcgcccaccagatctacutcgagaagatgggtgcagcggcggcggc 3540
 A V P F A A R I Y V E K M R C S G G G G 426
 gggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 3600
 G G G G G E G R Q E K D E E M V R V L V 446
 tgaacgaccgggtgatgacgctgaaggggtgcccggcggcggcggcggcggcggcggc 3660
 N D P V M T L K G C G A D E R G M C T L 466
 tagaacgggttcacgaaagcatggccttgcgggggggaacggcaagtgggatctctgct 3720
 E R F I E S M A F A R G N G K W D L C F 486
 ttgcttgatatgcccacgcccagattgaacagaacttgtgatgggggtagagtgtgga 3780
 A 487
 ttcgagatgatagttcacagttttcgggaatcnaaaatcgggttagactggcgaattcaa 3840
 gtctggggcctgcccgtctgcattctccgttccctggttggttaccttcttaatggtttt 3900
 tttatTTTTtattttcttaattttcacacaaacctttattgtttttttcttctt 3960
 tttcttcttgcacatggatgggaattgtcgac 3995

图 3A



图 3B

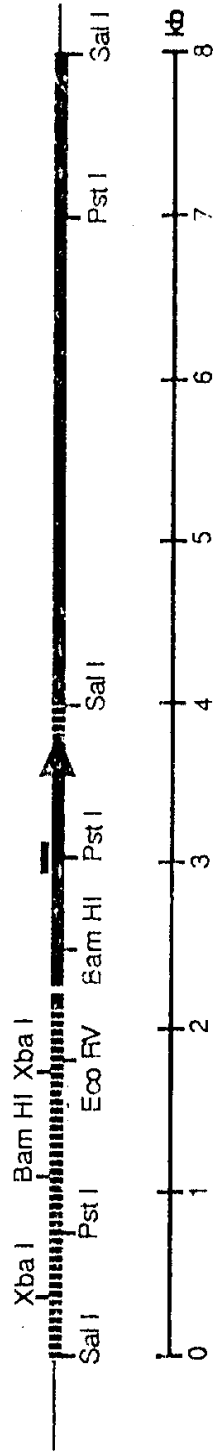


图 4

```
1  gaccttggtcgcaaccacacagacagctgtctccgttctggtcttccacgcaaga 60
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
  ctggaaccgagcgttggtgtgtctgtcgacagaggcaagacgagagaagggtgcttct
  T L A R N H T D T L S P F C A L S T Q E
  ggagtggcaagcatabtgactactaccaaagtctgtgggaatac
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
  cctcacccgttcgtactgatgattggttcagaccctttatg 103
  E W Q A Y D Y Y Q S L G K Y
```

图 5

```
1  tacggtagcgcaccagcgacgcaagtcaagtcagctgtcaccggttctgtcaactcttcaactca 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   atgccatcgcgcgtggctcgctgcgttcagtcgacagtgcaagacagttgagaagtggagt
   T V A R T S D A S Q L S P F C Q L F T H
61  caatgagtggaagaagtacaactaccttcagtccttgggcaagtac
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   gttactcaccttctcatgttgatggaagtcaggaacccttcatg 106
   N E W K K Y N Y L Q S L G K Y
```

1
7
1

图 6

```
1 caccatggcgccaccgcccacccggaaaccgtagtctgtctcccatcttggccatcttcac + 60
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
gtggtaaccgcgctggcggtagccctggccatcagacagagggtaaaacacggtagaagtg
T M A R T A T R N R S L S P F C A I F T
61 Tgaaaaggagtggctgcagtaactacctctctatcaaatgac ----- 109
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
acttttcctcaaccgacgctcatgctgatggaagttagagatagtttcatg
E K E W L Q Y D Y L Q S L S K Y
```

1
∞

```

atgggcgtctctgcbgttctacttccctttgtatctcctagctggagtcacctccggactg
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
taccgcgacagacgacaagatgaaggaacatagaggatcgaacctcagtgaggcctgac
N G V S A V L L P L Y L L A G V T S G L

gcagtcaccgctcaganaatcaatcaacttgcgataccgtcgatcaagggtatcaatgc
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
cgtcagggcgggaacctctttagtttaggtgaacgctatgccagctagtcccatagttacg
A V F A S R N Q S T C D T V D Q G Y Q C

tctccggaacttcgcactcttggggtaantacggcgggttctctctctcggcaaacgaa
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
aagacacctctgaagcgtagaaacaccagttatggcgggcaagaagagagaccggttgctt
F S E T S H L W G Q Y A P F F S L A N E

tcggtcactctccctgatgtgcccggcgttgcagagtcactttcgcctcaggtctctcc
151 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
agccagtagaggggactacacgggcggcacaacgctctcagtgaaagcaggtccaggagagg
S V I S P D V P A G C R V T F A Q V L S

cgtcattggagcgggtatccgacccgagtcgaaggcaagaataactccgctctctttgag
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
gcagtcacctcggcgcataaggtggctcaggttccctctctttatgagggcagagtaactc
R H G A R Y P T E S K G K K Y S A L I E

gagatccagcagaacgtgaccacctttgatggaaaatatgccttccctgaagacatacaac
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ctctaggtcgtcttgcactggtggaacctaccttttatacggaaaggacttctgtatgttg
E I Q Q N V T T F D G K Y A F L K T Y N

tacagcttgggtgcagatgacctgactcccttcgagagcaggagctagtcaactccggc
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
atgtcgaaccacgctctactggactgagcgaagcctctcgtcctcgatcagttgaggccg
Y S L G A D D L T P F G E Q E L V N S G

atcaagttctaccagcgtacaacgcctcaccgcacatcaacccttcgtecgcgcc
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
tacttcaagatggctcgcgatgttcgnggagtgggctgtgtagttggggaagcaggcggg
I K F Y Q R Y N A L T R H I N P F V R A

accgatgcctcccgctccacgaatccgcccagaaagttcgtcagagggttccaaaccgct
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
tggctacgtatggcgcaggtgcttagggcgtcttcaagcagctccogaaggtttggcga
T D A S R V H E S A E K F V E G F Q T A

cgaaggacgatcattacgcdaatcccaaccagccttcgctcgcgtggacgtggccatc
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
gctgtcctgctagttagtcgggttaggggtggtcgaagcggagcgcacctgcaccggtag
R Q D D H H A N P H Q F S P R V D V A I

```

```

ccggaaggcagcggcctacaacaacacgctggagcagagcctctgcaccgcttcgaatcc
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
gggcttcggtcgggqatgftgttqtcggacctcgtctcgaagacgtggcggagcttagg
P E G S A Y N N T L E H S L C T A F E S

agcaccgtcggcagcagcgggtcggcaacttcaccgacgtgttcggcggcggcagatcggc
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
tcgtggcagcggcctcgtcggcagcgggttgaagtggcggcacaagcggcggcggcctagcgg
S T V G D D A V A N F T A V F A P A I A

cagcggcctggagggcagatcttcggcggcggcagcgtgtccaccgacgacgtggtaaccctg
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
gtcggcggacctccggctagaagggcggcagcgtcgaagcggcggcggcggcggcggcggcggc
Q R L E A D L P G V Q L S T D D V V N L

atggccatgtgtccgttcgagacggctcagcctgaccgacgagcggcacaacgctgtcggcg
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
tacgggtacacagggcaagctctgccagtcggactggctgctgcggcgtgtggcagcggcggc
M A M C P F E T V S L T D D A H T L S P

ttctcggacctcttcacggcactcagtggaacgaatacaactaccctgctctcggctggac
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
aagacgctggagaagtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
F C D L F T A T E W T Q Y N Y I L S L D

aagtactacggctacggcggggcaatcggctgggtcgggtcagggggtcggctggcgg
901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960
ttcatgatggcggatggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
K Y Y G Y G G G N P L G P V Q G V G W A

aacgagctgatggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
961 -----+-----+-----+-----+-----+ 1020
ttgctcggactaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
N E L M A R L T R A P V H D H T C V N N

aacctcgaagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080
tgggacgtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
T L D A S P A T F P L N A T L Y A D F S

cagcacaacaacctgggtgtcagatctctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
1081 -----+-----+-----+-----+-----+ 1140
gtgctgtccttggaccagcgttgaagaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
H D S N L V S J F W A L G L Y N G T A P

ctgtcgcagacctccgtcgaagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
1141 -----+-----+-----+-----+-----+ 1200
gacagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
L S Q T S V E S V S Q T D G Y A A A W T

```

```

qtgcoghtegocqntcggcgtacgtcgagatgatgcagtgteggcgcgagaaggagccg
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
cacggcaagcggcgagcgcqcatgcagctctactacgtcacagcgggctcttctctggc
V P F A A R A Y V E M M Q C R A E K E P

ctggtgcgctgctggtcaacgacccqatcatgcgctgcatggctgacctacggacaag
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
gaccacggcgcacaccagttactggcccaqtacggcgcagctaccgacgggatgactgttc
L V R V L V N D R V M P L H G C P T D K

ctggggcgggtgcaaacgggagcgtttctgctcggcggcctgaactttggcagagcggcggg
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
gaccccgccacggttggccctgngaaagcagcgcggcggactcgaaacggctcggcccgcc
L G R C K R D A F V A G L S F A Q A G G

aacggggcggatfgtttctgattgttgagaagaaggtagatagataggtagtagtatatgg
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
ttgaccgcctaaacaagactacaactcttcttctcctctatctatccatcatgtataac
N W A D C F

attgctcggctctggtccttggcccaaatgcatattacggccgtcaactgceettggccc
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
taacgagccgagaccagcaacgggtattacgtataatggggcagttgacggaacggcg

atccacctctcaccctggacgcaaccgagcgtctaccctgcacacggcttccaccgga
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
taggtgagagtgaggacctgcgttggctcggcagatgggacgtatgcccgaaggtggcgct

cggcgcgggataaggcgttltgttacggggttgggctggggcagccggagccggaga
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
ggcggtgacctatcccgcaaaacaatgcccaccccgaccccgctggcctcggcctct

gagagaccagcgtgaaaaagcagacaacatagatatacaattcgacgccaattcatgcaga
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
ctctctggtgcacttttctctgtctctgtatctataaqttaagctggggttaagtagctct

gtagtatacagacgaactgaaacaaacacatcacttccctcgtctctctctctgtagaaga
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
catcatatgtctgcttgaatttgtttgtgtagtgaagggagcagggagggacatcttct

cgtcccaccagccgttctggccttatcccgtaagctaggtagaccagtcagccaga
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
ggcaggggtggtcggcgaagaccgggaataaggcctatgcgatccatctggctcagtcggtct

cgcctgctcacaagaacggggcgggggacacactcgcctcgtacagcaccaccagcagct
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
ggctacggagtgthcttgcggccggccctgtgtgagcagcagcatctcgtgggtgctgca

gtacaggaaaacggcgcgcgcacacactcctcagagacatctgcaggaattc
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1912
catgtccttttggccctcggcgtgttaagcagctctcgttagacgtccttaag

```

图 8

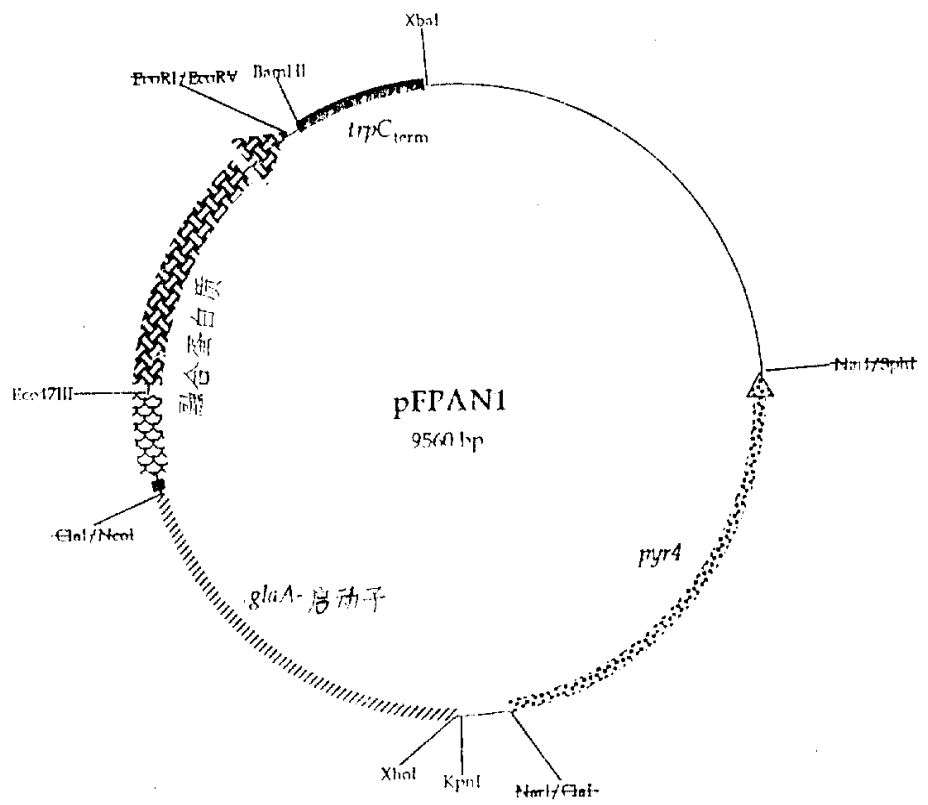


图 2

