



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102174581 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 17

(21) 申请号 201110048625. 1

C12R 1/885(2006. 01)

(22) 申请日 2004. 12. 09

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/528, 367 2003. 12. 09 US

CN 1434054 A, 2003. 08. 06, 全文.

WO 0149844 A1, 2001. 07. 12, 全文.

(62) 分案原申请数据

200480041520. 1 2004. 12. 09

王贤等. RNA 干扰作用及其技术. 《周口师范学院学报》. 2003, 第 20 卷 (第 5 期), 47.

刘红梅等. 转录后基因沉默. 《植物病理学报》. 2002, 第 32 卷 (第 3 期), 193-199.

(73) 专利权人 诺维信股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 诺维信公司

审查员 钟辉

(72) 发明人 萨钦德拉·梅约兰 宇田川裕晃

霍华德·布罗迪

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 史悦

(51) Int. Cl.

C12N 1/15(2006. 01)

C12R 1/66(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 38 页

序列表 8 页 附图 10 页

(54) 发明名称

消除或减少丝状真菌菌株基因表达的方法

(57) 摘要

本发明涉及消除或减少丝状真菌菌株基因表达的方法, 更具体地, 本发明涉及在丝状真菌菌株中减少或消除目的基因表达的方法, 包括: (a) 在丝状真菌菌株基因组中插入双链可转录核酸构建体, 该核酸构建体包括第一核苷酸序列, 其包含与启动子可操作性地连接的目的基因的同源编码区; 和第二核苷酸序列, 其包含目的基因的同源编码区或其部分, 其中第一、第二核苷酸序列相互互补且第二核苷酸序列与第一核苷酸序列方向相反; 和 (b) 通过在适合产生干扰 RNA 的条件下培养丝状真菌菌株来诱导双链可转录核酸构建体编码的干扰 RNA 的产生, 其中干扰 RNA 与目的基因 RNA 转录本相互作用, 以减少或消除目的基因的表达。

1. 生产生物物质的方法,包括:

(a) 在适合生产感兴趣的生物物质的条件下培养曲霉菌或木霉菌菌株,其中该曲霉菌或木霉菌菌株包括双链可转录核酸构建体,其中该双链可转录核酸构建体包括第一核苷酸序列,所述第一核苷酸序列包含与编码非期望的生物物质的目的基因的第一同源可转录区可操作连接的启动子;和第二核苷酸序列,所述第二核苷酸序列包含该目的基因的第二同源可转录区,其中第一、第二同源区相互互补且第二同源区与第一同源区方向相反,其中双链可转录核酸构建体所编码的干扰 RNA 与目的基因 RNA 转录本相互作用以减少或消除编码非期望的生物物质的目的基因的表达;且其中所述曲霉菌或木霉菌菌株包括编码感兴趣的生物物质的第三核苷酸序列;以及

(b) 从培养基中回收生物物质。

2. 权利要求 1 的方法,其中第一同源区包括目的基因的至少 19 个核苷酸。

3. 权利要求 2 的方法,其中第二同源区包括至少 19 个核苷酸,其与第一同源区的至少 19 个核苷酸互补;并且所述第二同源区的至少 19 个核苷酸的顺序与第一同源区的相应区相反。

4. 权利要求 1 的方法,其中第一、第二核苷酸序列被第四核苷酸序列隔离。

5. 权利要求 4 的方法,其中第四核苷酸序列包括至少 5 个核苷酸。

6. 权利要求 1-5 中任何一项的方法,其中曲霉菌菌株为米曲霉或黑曲霉。

7. 权利要求 1-5 中任何一项的方法,其中木霉菌菌株为里氏木霉。

8. 权利要求 1-5 中任何一项的方法,其中目的基因的表达减少至少 20%。

9. 权利要求 8 的方法,其中目的基因的表达减少至少 30%。

10. 权利要求 9 的方法,其中目的基因的表达减少至少 40%。

11. 权利要求 10 的方法,其中目的基因的表达减少至少 50%。

12. 权利要求 11 的方法,其中目的基因的表达减少至少 60%。

13. 权利要求 12 的方法,其中目的基因的表达减少至少 70%。

14. 权利要求 13 的方法,其中目的基因的表达减少至少 80%。

15. 权利要求 14 的方法,其中目的基因的表达减少至少 90%。

16. 权利要求 8 的方法,其中目的基因的表达被消除。

17. 权利要求 1-5 中任何一项的方法,其中干扰 RNA 与目的基因的一个或多个同源类似物的 RNA 转录本相互作用以减少或消除目的基因的一个或多个同源类似物的表达。

18. 权利要求 17 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 20%。

19. 权利要求 18 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 30%。

20. 权利要求 19 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 40%。

21. 权利要求 20 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 50%。

22. 权利要求 21 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 60%。

23. 权利要求 22 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 70%。

24. 权利要求 23 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 80%。

25. 权利要求 24 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 90%。

26. 权利要求 18 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达被消除。

消除或减少丝状真菌菌株基因表达的方法

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 12 月 09 日、申请号为 200480041520.1 (国际申请号为 PCT/US2004/041510)、发明名称为“消除或减少丝状真菌菌株基因表达的方法”的发明申请的分案申请。

[0002] 发明背景

发明领域

[0003] 本发明涉及在丝状真菌菌株中消除或减少基因的表达。

背景技术

[0004] 丝状真菌菌株被广泛用于生产具有商业价值的生物物质。然而,具有期望生物物质表达和分泌增加的特性的丝状真菌菌株可能并不一定具有适合成功发酵的最期望特性。生物物质的产生可能伴随着其他物质例如可降解生物物质或与生物物质共纯化(co-purify)的酶的产生,这些其他物质将使生物物质的回收和纯化复杂化。

[0005] 解决这些问题的方法之一是使参与生产非期望的物质的基因失活。失活可以用本领域已知的方法通过缺失或破坏基因来完成。然而,在某些情况下,由于对基因同源区的靶向性不高,基因失活可能是困难的。失活也可以通过随机诱变完成,但随机诱变并不总是特异性地针对期望的目的基因,其他突变经常被导入至宿主生物。在其他情况下,目的基因及其产物可能是该丝状真菌菌株的存活所必需的。在多个基因需要通过缺失或破坏来失活失活的情况下,任务就变得相当麻烦且耗时。当高度同源的基因家族成员存在时,所有家族成员的缺失或破坏就显得特别烦琐与困难。

[0006] 最近几年,各种外遗传基因调节(epigenetic gene regulation)形式已有记载(Selker,1997,Trends Genet.13:296-301;Matzke and Matzke,1998,Cell.Mol.Life.Sci.54:94-103)。这些方法通过微RNAs(micro RNAs)(Morel et al.,2000,Curr.Biol.10:1591-4;Bailis and Forsburg,2002,Genome Biol,3,Reviews 1035;Grewal and Moazed,2003,Science,301:798-802)调节信使RNA水平来影响基因表达(Hammond and Baulcombe,1996,Plant Mol.Biol,32:79-88;Xi-song Keet et al.,2003,Current Opinion in Chemical Biology 7:516-523)。

[0007] 基于果蝇(Drosophila)和秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)的遗传研究,RNA干扰(RNAi),(在植物中)也称为转录后基因沉默,被认为通过组装靶向同源RNAs导致其降解的蛋白-RNA效应核酸酶复合物而参与了基因的沉默表达(Hannon,2002,Nature 418:244-251)。双链RNA(dsRNA)变成小干扰RNAs的加工是通过被称为切酶(Dicer)的酶家族完成的(Bernstein et al.,2001,Nature 409:363)。切酶是特异切割dsRNA的核酸内切酶RNase III家族成员,负责消化dsRNA成20-25核苷酸的siRNAs(Elbashir et al,2001,Nature 411:494)。这些siRNAs与反义链变性之后与RNA诱导的沉默复合物(RNA Induced Silencing Complex,RISC)结合(Elbashir et al,2001,Genes and Dev.15:188;Nykanen et al,2001,Cell 107:300;Hammond et al.,2001,

Science293:1146)。尽管了解得还不是很清楚,RISC 靶向上述反义片段所来源的 mRNA,随后对 mRNA 进行内切和外切核酸酶消化,从而有效地使该基因表达沉默。RNA 干扰在植物,线虫,昆虫,和哺乳动物中都有出现 (Matzke andMatzke,1998,(同上)同上;Kennerdell et al,2000,Nat.Biotechnol.18:896-8;Bosher et al,1999,Genetics 153:1245-56;Voorhoeve and Agami,2003,TrendsBiotechnol.21:2-4;and McCaffreyetal,2003,Nat.Biotechnol.21:639-44)。

[0008] WO 98/53083 公开了通过插入包括全部或部分的目的基因的反向重复序列的沉默载体至植物基因组,在植物中增强目的基因的抑制的构建体和方法。

[0009] WO 01/49844 记载了编码反向重复基因的反向重复基因构建体,该构建体包括启动子元件,其以 5' 到 3' 的方向可操作连接于反义方向的第一编码序列和第二序列,用于破坏目标生物,例如秀丽隐杆线虫、网柄菌 (Dictyostelium)、酵母、果蝇,小鼠,植物,昆虫,人类细胞,以及线虫中的基因表达。

[0010] WO 03/050288 公开了在植物中使目的基因沉默的方法,其包括提供重组 DNA 构建体,所述构建体包括与嵌合核苷酸序列可操作性连接的启动子,该嵌合核苷酸序列编码全部或部分的目的基因和转基因;将该 DNA 构建体转化植物,使得表达框插入基因组;以及在植物中引发所述转基因的转录后基因沉默,这样,引发转录后转基因基因沉默导致了目的基因的沉默。

[0011] 提供可用于丝状真菌菌株改良、功能基因组和途径工程的消除或减少一种或多种基因表达的可选方法,可能对本技术领域产生积极效果。

[0012] 本发明目的是提供一种用于在丝状真菌菌株中消除或减少一种或多种基因表达的可选方法。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及在丝状真菌菌株中减少或消除编码生物物质目的基因表达的方法,包括:

[0015] (a) 在丝状真菌菌株基因组中插入双链可转录的核酸构建体,该核酸构建体包括第一核苷酸序列,其包含与编码生物物质的目的基因的第一同源可转录区可操作连接的启动子;和第二核苷酸序列,其包含所述目的基因的第二同源可转录区,其中第一和第二同源区相互互补且第二同源区与第一同源区方向相反;和

[0016] (b) 通过在适合产生干扰 RNA 条件下培养丝状真菌菌株来诱导双链转录核酸构建体编码的干扰 RNA 产生,其中干扰 RNA 与目的基因的 RNA 转录本相互作用,导致生物物质编码目的基因的表达减少或消除。

[0017] 本发明也涉及包含双链可转录核酸构建体的丝状真菌菌株,该构建体包括第一核苷酸序列,其包含与编码生物物质的目的基因的第一同源可转录区可操作连接的启动子;和第二核苷酸序列,其包含所述目的基因的第二同源可转录区或其部分,其中第一和第二同源区相互互补且第二同源区与第一同源区方向相反,其中由双链转录核酸构建体编码的干扰 RNA 与目的基因的 RNA 转录本相互作用以减少或消除编码生物物质的目的基因的表达。

[0018] 本发明进一步涉及生产生物物质的方法,包括:

[0019] (a) 在适合生产感兴趣的生物物质的条件下培养丝状真菌菌株,其中该丝状真菌

菌株包括双链可转录核酸构建体,其中该双链可转录核酸构建体包括第一核苷酸序列,其包含与编码非期望的生物物质的目的基因的第一同源可转录区可操作性连接的启动子;和第二核苷酸序列,其包含该目的基因的第二同源可转录区,其中第一、第二同源区相互互补且第二同源区与第一同源区方向相反,其中由双链转录核酸构建体编码的干扰 RNA 与目的基因的 RNA 转录本相互作用而减少或消除编码非期望生物物质的目的基因的表达;以及其中丝状菌包括编码感兴趣生物物质的第三核酸序列;以及

[0020] (b) 从培养基中回收生物物质。

[0021] 更具体地,本发明还涉及如下方面:1、在丝状真菌菌株中减少或消除生物物质编码目的基因表达的方法,包括:

[0022] (a) 在丝状真菌菌株基因组中插入双链可转录核酸构建体,该核酸构建体包括第一核苷酸序列,该第一核苷酸序列包含与编码生物物质的目的基因第一同源可转录区可操作连接的启动子;和第二核苷酸序列,该第二核苷酸序列包含该目的基因第二同源可转录区,其中第一、第二同源区相互互补且第二同源区与第一同源区方向相反;和

[0023] (b) 通过在适合产生干扰 RNA 条件下培养丝状真菌菌株来诱导双链可转录核酸构建体所编码干扰 RNA 的产生,其中干扰 RNA 与目的基因的 RNA 转录本相互作用,以减少或消除编码生物物质的目的基因的表达。

[0024] 2、项 1 的方法,其中第一同源区包括目的基因的至少 19 个核苷酸。

[0025] 3、项 1 的方法,其中第二同源区包括第一同源区的至少 19 个核苷酸,其中所述至少 19 个核苷酸的顺序与第一同源区相应区相反。

[0026] 4、项 1 的方法,其中第一、第二核苷酸序列被第三核苷酸序列隔离。

[0027] 5、项 4 的方法,其中第三核苷酸序列包括至少 5 个核苷酸。

[0028] 6、项 1 的方法,其中丝状真菌菌株是支顶孢属、曲霉属、短柄霉属、隐球酵母属、*Filibasidium*、镰孢属、腐质霉属、*Magnaporthe*、毛霉属、*Myceliophthora*、*Neocallimastix*、链孢霉属、*Paecilomyces*、青霉属、*Piromyces*、裂褶菌属、踝节菌属、*Thermoascus*、*Thielavia*、*Tolypocladium*,或木霉属的菌株。

[0029] 7、项 1 的方法,其中目的基因表达减少至少 20%,优选至少 30%,更优选至少 40%,更优选至少 50%,更优选至少 60%,更优选至少 70%,甚至更优选至少 80%,最优选至少 90%。

[0030] 8、项 1 的方法,其中目的基因的表达被消除。

[0031] 9、项 1 的方法,其中干扰 RNA 与目的基因的一个或多个同源类似物的 RNA 转录本相互作用以减少或消除目的基因的一个或多个同源类似物的表达。

[0032] 10、项 9 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 20%,优选至少 30%,更优选至少 40%,更优选至少 50%,更优选至少 60%,更优选至少 70%,甚至更优选至少 80%,最优选至少 90%。

[0033] 11、项 1 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达被消除。

[0034] 12、包含双链可转录核酸构建体的丝状真菌菌株,该构建体包括第一核苷酸序列,该第一核苷酸序列包含与编码生物物质的目的基因的第一同源可转录区可操作连接的启动子;和第二核苷酸序列,该第二核苷酸序列包含所述目的基因的第二同源可转录区,其中第一、第二同源区相互互补且第二同源区与第一同源区方向相反,其中由双链可转录核苷

酸构建体编码的干扰 RNA 与目的基因的 RNA 转录本相互作用,以减少或消除编码生物物质的目的基因的表达。

[0035] 13、项 12 的丝状真菌菌株,其中第一同源区包括目的基因的至少 19 个核苷酸。

[0036] 14、项 12 的丝状真菌菌株,其中第二同源区包括第一同源区的至少 19 个核苷酸,其中所述至少 19 个核苷酸的顺序与第一同源区的相应区相反。

[0037] 15、项 12 的丝状真菌菌株,其中第一、第二核苷酸序列被第三核苷酸序列隔离。

[0038] 16、项 15 的丝状真菌菌株,其中第三核苷酸序列包括至少 5 个核苷酸。

[0039] 17、项 12 的丝状真菌菌株,其中丝状真菌菌株是支顶孢属、曲霉属、短柄霉属、隐球酵母属、*Filibasidium*、镰孢属、腐质霉属、*Magnaporthe*、毛霉属、*Myceliophthora*、*Neocallimastix*、链孢霉属、*Paecilomyces*、青霉属、*Piromyces*、裂褶菌属、踝节菌属、*Thermoascus*、*Thielavia*、*Tolypocladium*、或木霉属的菌株。

[0040] 18、项 12 的丝状真菌菌株,其中目的基因表达减少至少 20%,优选至少 30%,更优选至少 40%,更优选至少 50%,更优选至少 60%,更优选至少 70%,甚至更优选至少 80%,最优选至少 90%。

[0041] 19、项 12 的丝状真菌菌株,其中目的基因的表达被消除。

[0042] 20、项 12 的丝状真菌菌株,其中干扰 RNA 与目的基因的一个或多个同源类似物的 RNA 转录本相互作用以减少或消除目的基因的一个或多个同源类似物的表达。

[0043] 21、项 20 的丝状真菌菌株,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 20%,优选至少 30%,更优选至少 40%,更优选至少 50%,更优选至少 60%,更优选至少 70%,甚至更优选至少 80%,最优选至少 90%。

[0044] 22、项 12 的丝状真菌菌株,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达被消除。

[0045] 23、生产生物物质的方法,包括:

[0046] (a) 在适合生产感兴趣的生物物质的条件下培养丝状真菌菌株,其中该丝状真菌菌株包括双链可转录核酸构建体,其中该双链可转录核酸构建体包括第一核苷酸序列,所述第一核苷酸序列包含与编码非期望的生物物质的目的基因的第一同源可转录区可操作连接的启动子;和第二核苷酸序列,所述第二核苷酸序列包含该目的基因的第二同源可转录区,其中第一、第二同源区相互互补且第二同源区与第一同源区方向相反,其中双链可转录核酸构建体所编码的干扰 RNA 与目的基因的 RNA 转录本相互作用以减少或消除编码非期望的生物物质的目的基因的表达;以及其中丝状真菌菌株包括编码感兴趣的生物物质的第三核苷酸序列;以及

[0047] (b) 从培养基中回收生物物质。

[0048] 24、项 23 的方法,其中第一同源区包括目的基因的至少 19 个核苷酸。

[0049] 25、项 23 的方法,其中第二同源区包括第一同源区的至少 19 个核苷酸,其中所述至少 19 个核苷酸的顺序与第一同源区的相应区相反。

[0050] 26、项 23 的方法,其中第一、第二核苷酸序列被第四核苷酸序列隔离。

[0051] 27、项 26 的方法,其中第四核苷酸序列包括至少 5 个核苷酸。

[0052] 28、项 23 的方法,其中丝状真菌菌株是支顶孢属、曲霉属、短柄霉属、隐球酵母属、*Filibasidium*、镰孢属、腐质霉属、*Magnaporthe*、毛霉属、*Myceliophthora*、

Neocallimastix、链孢霉属、Paecilomyces、青霉属、Piromyces、裂褶菌属、踝节菌属、Thermoascus、Thielavia、Tolypocladium、或木霉属的菌株。

[0053] 29、项 23 的方法,其中目的基因表达减少至少 20%,优选至少 30%,更优选至少 40%,更优选至少 50%,更优选至少 60%,更优选至少 70%,甚至更优选至少 80%,最优选至少 90%。

[0054] 30、项 23 的方法,其中目的基因的表达被消除。

[0055] 31、项 23 的方法,其中干扰 RNA 与目的基因的一个或多个同源类似物的 RNA 转录本相互作用以减少或消除目的基因的一个或多个同源类似物的表达。

[0056] 32、项 31 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 20%,优选至少 30%,更优选至少 40%,更优选至少 50%,更优选至少 60%,更优选至少 70%,甚至更优选至少 80%,最优选至少 90%。

[0057] 33、项 32 的方法,其中目的基因的一个或多个同源类似物的表达被消除。

附图说明

[0058] 图 1 显示了 pAILo1 的限制性图谱。

[0059] 图 2 显示了 pMJ04 的限制性图谱。

[0060] 图 3 显示了 pMJ06 的限制性图谱。

[0061] 图 4 显示了 pMJ09 的限制性图谱。

[0062] 图 5 显示了里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) Cel6A 反向重复片段的限制性图谱。

[0063] 图 6 显示了 pSMai 148 的限制性图谱。

[0064] 图 7 显示了转化体 14 阳性对照株 (里氏木霉 SaMe02) 与在摇瓶中的“空载体对照”里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 (cellobiohydrolase) II mRNA 相对表达水平。

[0065] 图 8 显示了 pSMai 163 的限制性图谱。

[0066] 图 9 显示通过 Northern 杂交分析检测里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 小干扰 RNA。总 RNAs (25 μ g) 用 15% 聚丙烯酰胺 -7M 尿素凝胶电泳,转移至尼龙膜,再用 DIG 标记的里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II RNA 探针检测。里氏木霉 SaMe02 是阳性对照株,其中里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 基因用同源重组进行了敲除。里氏木霉 RutC30 是宿主菌株。溴化乙锭染色凝胶显示的对照 28s-rRNA 和 18s-rRNA 凝胶电泳情况表明,该凝胶电泳是等上样量的。

[0067] 图 10 显示了表达里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 反向重复片段的里氏木霉 RutC30 第七日摇瓶样品 (#'s 1,2,11,12,13,14) 的 SDS-PAGE 分析。里氏木霉 SaMe02 是阳性对照株,其中里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 基因用同源重组进行了敲除。里氏木霉 RutC30 是宿主菌株。在接种后七天,将 500 μ l 菌丝体作为新的接种物接种在包含新鲜纤维素诱导培养基的摇瓶中。菌丝体总共传代五次。

[0068] 图 11 显示了 pBANE10 的限制性图谱。

[0069] 图 12 显示了 pAILo2 的限制性图谱。

[0070] 图 13 显示了 pHb506 的限制性图谱。

[0071] 图 14 显示了选择的含有 pHb506 的黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 转化体 (转化体 1-8), 葡糖淀粉酶基因缺失株黑曲霉 HowB112, 黑曲霉 JaL303-10, 和转化了 pAILo2 (空载

体)的黑曲霉 JaL303-10 的七日摇瓶样品的 SDS-PAGE 分析。转化体 1-4 产生了相当量的葡糖淀粉酶,而转化体 5-8 没有产生可检测到的葡糖淀粉酶。

[0072] 图 15 显示了 pHUda512 的限制性图谱。

[0073] 图 16 显示了选择的含有 pHUda512 的黑曲霉转化体 (1-8 道) 和黑曲霉 NN049735 (9 道) 的七日摇瓶样品的 SDS-PAGE 分析。

[0074] 图 17 显示了 pDeMi01 的限制性图谱。

[0075] 发明详述

[0076] 本发明涉及在丝状真菌菌株中减少或消除编码生物物质的目的基因的表达的方法,包括:(a) 在丝状真菌菌株基因组中插入双链可转录的核酸构建体,该核酸构建体包括第一核苷酸序列,其包含与所述目的基因的第一同源可转录区操作性连接的启动子;和第二核苷酸序列,其包含所述编码生物物质的目的基因的第二同源可转录区,其中第一和第二同源区相互互补且第二同源区与第一同源区方向相反;和(b) 通过在适合产生干扰 RNA 的条件下培养丝状真菌菌株来诱导双链可转录核酸构建体编码的干扰 RNA 产生,其中干扰 RNA 与目的基因的 RNA 转录本相互作用来减少或消除编码生物物质的目的基因的表达。

[0077] 本发明方法给丝状真菌菌株的菌种改良、功能基因组及途径工程提供了新的机会。例如,本发明的方法可以通过基因操作和途径工程用作丝状真菌宿主菌株改良的工具,或者本发明的方法可作为耗时且成功率并不稳定的基因敲除方法的替代方法。基因可对用本领域已知的标准方法例如基因敲除方法所产生的基因失活产生抗性。本发明提供了一种减少或消除这种基因的表达的解决方法。该方法也是在特定丝状真菌菌株中对减少或消除高表达的基因特别有用且有效,这在例如改良作为生产宿主的微生物中可能是非常重要的。这种能力显示了本发明方法的强大。该方法对减少或消除高度相互同源的多个基因的表达也有用,特别是对同一个基因家族的基因或生物合成或代谢路径中的同源基因有用。该方法的用处进一步体现在,通过调节该方法,能可调性地降低生物物质的表达。在某些场合下,生物物质编码基因的完全敲除对于某种特定的丝状真菌菌株可能是致命的,例如在流入感兴趣的生物合成途径的次级途径中,此时上述可调性就特别重要了。

[0078] 在本发明方法中,第一核苷酸序列包括与目的基因的第一同源可转录区可操作性连接的启动子。第二核苷酸序列包括目的基因的第二同源可转录区,其中第一、第二同源区互补且第二同源区与第一同源区方向相反。优选地,第一和第二核苷酸序列被第三核苷酸序列隔离,以在丝状真菌菌株中稳定第一和第二核苷酸序列,防止例如构建过程中发生不期望的重组,就像在大肠杆菌 (*E. coli*) 中的那样。双链可转录核酸构建体的核苷酸序列可以是染色体组, cDNA, RNA, 半合成, 合成或上述任意组合的核苷酸序列。

[0079] 启动子

[0080] 术语“启动子”在本文是指结合 RNA 聚合酶,并引导聚合酶至编码生物物质的核酸序列的适当下游转录起始位点,从而引发转录的 DNA 序列。RNA 聚合酶能有效地催化与合适的编码区 DNA 链互补的信使 RNA 的装配。术语“启动子”也能理解可包括用于 mRNA 转录后翻译的 5' 非编码区(启动子和翻译起始位点之间),顺式转录调控元件例如增强子,以及能与转录因子相互作用的其他核酸序列。启动子序列可以是第一同源可转录区的内源或外源(异源)序列和丝状真菌菌株的内源或外源序列。在本发明的方法中,启动子可以是内源启动子,异源启动子,突变启动子,杂合启动子,或串联启动子。

[0081] 术语“突变体启动子”在本文是指对具有在亲本启动子中包含了一个或多个核苷酸取代,缺失,和/或插入的核苷酸序列的启动子,其中突变体启动子比相应亲本启动子有增强或减弱的启动子活性。术语“突变体启动子”也包括自然突变体和通过本领域已知的方法例如常规诱变、定点诱变和 DNA 改组而在体外产生的突变体。

[0082] 术语“杂合启动子”在本文是指融合在一起形成序列的两个以上启动子的部分,该序列是两个或多个启动子的融合,当可操作性连接至编码序列时,该启动子介导编码序列转录形成 mRNA。

[0083] 术语“串联启动子”在本文是指两个或多个启动子序列,其中每个启动子都可操作性连接至编码序列介导编码序列至 mRNA 的转录。

[0084] 术语“可操作性连接”在本文是指一种结构,在该结构中启动子序列相对目的基因同源区放置在合适位点以使启动子序列能介导两区的转录。

[0085] 本发明方法有用启动子的例子包括来自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) TAKA 淀粉酶,米赫根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶,黑曲霉中性 α -淀粉酶,黑曲霉酸性稳定 α -淀粉酶,黑曲霉或泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) 葡糖淀粉酶 (glaA),米赫根毛霉脂肪酶,米曲霉碱性蛋白酶,米曲霉丙糖磷酸异构酶,构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 乙酰胺酶,灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*) β -微管蛋白, *Fusarium venenatum* 淀粉葡萄糖苷酶 (W000/56900), *Fusarium venenatum* Daria (W000/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (W000/56900), 尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 胰蛋白酶样蛋白酶 (W096/00787), 里氏木霉 β -葡萄糖苷酶,里氏木霉纤维二糖水解酶 I,里氏木霉纤维二糖水解酶 II,里氏木霉葡聚糖内切酶 I,里氏木霉葡聚糖内切酶 II,里氏木霉葡聚糖内切酶 III,里氏木霉葡聚糖内切酶 IV,里氏木霉葡聚糖内切酶 V,里氏木霉木聚糖酶 I,里氏木霉木聚糖酶 II,或里氏木霉 β -木糖苷酶基因的启动子,以及 NA2-tpi 启动子(黑曲霉中性 α -淀粉酶与米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的杂交启动子);以及它们的突变、截短和杂交启动子。

[0086] 同源可转录区

[0087] 术语“同源可转录区”在本文是指与目的基因的开放阅读框或其部分同源的核苷酸序列;其可被转录为 RNA,例如 ncRNA(非编码 RNA), tRNA(转运 RNA), rRNA(核糖体 RNA), miRNA(微小 RNA),或 mRNA(信使 RNA),其在合适调控序列控制下可以翻译或不翻译为生物物质。可转录区的界限通常由正好位于 mRNA 5'端开放阅读框上游的转录起始位点和正好位于 mRNA 3'端开放阅读框下游的转录终止序列确定。同源可转录区可以包括但不限于基因组 DNA, cDNA, 半合成核苷酸序列,合成核苷酸序列以及重组核苷酸序列。

[0088] 在本发明方法中,与目的基因同源的第一区可以与目的基因的相应区相同或者是其同源类似物。

[0089] 失活或减少目的基因表达所需的同源类似物与目的基因相应区之间的相同程度可能取决于目的基因。同源类似物核苷酸序列相对整个目的基因而言越小,上述序列之间的相同程度应该优选极高或完全相同。同源类似物核苷酸序列相对整个目的基因而言越大,上述序列之间的相同程度就可以越低。

[0090] 在本发明方法中,同源类似物核酸序列与目的基因相应区的相同程度至少 65%,优选至少 70%,更优选至少 75%,更优选至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,进

一步优选至少 95%，最优选至少 97%。就本发明而言，两核酸序列之间的相同程度可以通过 Wilbur-Lipman 方法 (Wilbur and Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80 :726-730) 用带有相同程度关系表和下列多个比对参数 :Gap (缺口) 罚分 10, 缺口长度罚分 10 的 LASERGENE™MEGALIGN™ 软件 (DNASTAR, Inc., Madison, WI) 来确定。配对比对 (pairwise alignment) 参数是 Ktuple = 3, 缺口罚分 = 3, 移框 (windows) = 20。

[0091] 或者, 同源类似物与目的基因相应区在不同严紧度严紧条件下相互杂交的能力也可以作为失活或减少目的基因的表达所需的相关程度的指征。然而, 应该知道, 同源类似物与目的基因相应区之间杂交所需严紧度条件越低, 例如低严紧度条件, 失活或减少目的基因表达的效果可能越差。优选地, 同源类似物与目的基因相应区在低严紧度条件下杂交。更优选地, 同源类似物与目的基因相应区在中度严紧度条件下杂交。再优选地, 同源类似物与目的基因相应区在中高度严紧度条件下杂交。最优选地, 同源类似物与目的基因相应区在高度严紧度条件下杂交。最最优选地, 同源类似物与目的基因相应区在极高严紧度条件下杂交。

[0092] 对长度至少 100 个核苷酸的探针而言, 极低至极高严紧度条件定义为: 按标准 Southern 印迹程序优选 12-24 小时操作, 预杂交和杂交在 42°C, 5X SSPE, 0.3% SDS, 以及 200ug/ml 剪切变性鲑鱼精子 DNA 下, 25% 甲酰胺为极低和低严紧度条件, 35% 甲酰胺为中度和中高度严紧度条件, 50% 甲酰胺为高度和极高严紧度条件。

[0093] 对长度至少 100 个核苷酸的探针而言, 载体材料最后用 2X SSC, 0.2% SDS 洗涤三次, 每次 15 分钟, 优选至少 45°C (极低严紧度条件), 更优选至少 50°C (低严紧度条件), 更优选至少 55°C (中度严紧度条件), 更优选至少 60°C (中高度严紧度条件), 进一步优选至少 65°C (高严紧度条件), 最优选至少 70°C (极高严紧度条件)。

[0094] 对长度约 15-70 核苷酸的探针而言, 严紧度条件定义为: 在比根据 Bolton 和 McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48 :1390) 计算得到的 T_m 低约 5-10°C 的温度之下, 在 0.9M NaCl, 0.09M Tris-HCl pH7.6, 6mM EDTA, 0.5% NP-40, 1X Denhardt's 溶液, 1mM 焦磷酸钠, 1mM 磷酸二氢钠, 0.1mM ATP, 以及每 ml 含 0.2mg 酵母 RNA 的溶液之中, 按标准 Southern 杂交程序进行预杂交、杂交以及杂交后洗涤, 优选进行 12-24 小时的操作。

[0095] 对长度约 15-70 核苷酸的探针而言, 载体材料在比计算的 T_m 低大约 5-10°C 的温度之下, 用 6X SSC+0.1% SDS 洗涤 15 分钟一次, 用 6X SSC 洗涤两次, 每次各 15 分钟。

[0096] 第一同源区优选由至少 19 个核苷酸组成, 更优选由至少 40 个核苷酸组成, 更优选由至少 60 个核苷酸组成, 更优选由至少 80 个核苷酸组成, 进一步优选由至少 100 个核苷酸组成, 最优选由至少 200 个核苷酸组成。第一同源区也可由基因的整个开放阅读框或其同源类似物组成。

[0097] 反向重复序列

[0098] 双链可转录核酸构建体也包括目的基因的第二同源可转录区, 其中第一和第二同源区互补, 且第二同源区与第一同源区方向相反, 即, 是第一同源区的反向重复序列。

[0099] 在一个优选的方面, 第二同源区与第一同源区 100% 相同, 但与第一同源区方向相反。在另一个优选的方面, 第二同源区是第一同源区的一部分, 其中该部分与第一同源区的

相应部分 100% 相同。在另一个优选的方面,第二同源区是第一同源区相应部分的同源类似物。在另一个优选的方面,第二同源区是第一同源区相应部分的同源类似物的一部分。

[0100] 同源类似物或同源类似物的一部分与第一核酸序列相应的序列至少有 65%,优选至少 70%,更优选至少 75%,更优选至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,进一步优选至少 95%,最优选至少 97% 相同。相同性百分数根据本文中记载的 Wilbur-Lipman 方法确定。

[0101] 第二同源区识别目的基因以减少或消除表达,第二同源可以是目的基因的任何同源可转录部分,例如目的基因的 5' - 非翻译区、生物物质编码序列或 3' - 非翻译区。

[0102] 在一个优选的方面,第二同源区对应于目的基因的生物物质编码序列或其部分。

[0103] 在另一个优选的方面,第二同源区对应于目的基因的 5' - 非翻译区或其部分。

[0104] 在另一个优选的方面,第二同源区对应于目的基因的 3' - 非翻译区或其部分。

[0105] 第二同源区优选由至少 19 个核苷酸组成,更优选由至少 40 个核苷酸组成,更优选由至少 60 个核苷酸组成,更优选由至少 80 个核苷酸组成,进一步优选由至少 100 个核苷酸组成,最优选由至少 200 个核苷酸组成。第二同源区也可由基因的整个开放阅读框或其同源类似物组成。

[0106] 第一、第二核苷酸序列之间的间隔序列

[0107] 包含目的基因同源区的第一、第二核苷酸序列可由或由多核苷酸接头或间隔序列隔离,接头或间隔序列在双链可转录核酸构建体中是与第一、第二核苷酸序列几乎不同源或完全不同源的核苷酸序列。

[0108] 在一个优选的方面,第一、第二核酸序列由多核苷酸接头隔离。间隔序列优选由至少 5 个核苷酸组成,更优选由至少 10 个核苷酸组成,更优选由至少 20 个核苷酸组成,更优选由至少 30 个核苷酸组成,更优选由至少 40 个核苷酸组成,进一步优选由至少 500 个核苷酸组成,最优选由至少 100 个核苷酸组成。

[0109] 间隔序列或接头可以是任何与第一和第二核酸序列没有同源性的核酸序列,优选与丝状真菌菌株基因组序列几乎不同源或完全不同源,以使不期望的靶向 / 同源重组最小化。

[0110] 目的基因

[0111] 目的基因可以是任何生物物质编码基因。生物物质可以是 RNA (例如, ncRNA, rRNA, tRNA, miRNA, 或 mRNA)。生物物质也可以可以是任何生物多聚物或代谢物。生物物质可以由单个基因或者由构成生物合成或代谢路径的系列基因编码,或者可以是单基因或系列基因的直接产物。生物物质对于丝状真菌菌株可以是天然的或者外源或异源的。术语“异源生物物质”在本文中是指细胞非天然的生物物质或者进行了结构修饰改变了的天然生物物质。

[0112] 在本发明方法中,生物多聚物可以是任何生物多聚物。术语“生物多聚物”在本文中是指由相同、相似或不相似的亚单位(单体)组成的链(或聚合物)。生物多聚物可以是但不限于核酸,多胺,多元醇,多肽(或聚酰胺),或多糖。

[0113] 在一个优选的方面,生物多聚物是多肽。多肽可以是有感兴趣的生物活性的任何多肽。术语“多肽”在本文中并不是指特定长度的编码产物,所以它包括肽、寡肽和蛋白。术语“多肽”也包括相互结合形成编码产物的两个或多个多肽。多肽也包括杂合多肽,该杂合

多肽包括部分或完整多肽序列的组合,所述序列来自至少两个不同的多肽,其中一个或多个序列可以是丝状真菌菌株细胞的异源序列。多肽进一步包括上述多肽和杂合多肽天然发生的等位变异体和基因工程变异体。

[0114] 在一个优选的方面,多肽是抗体,抗原,抗菌肽,酶,生长因子,激素,免疫调节因子,神经递质,受体,报告蛋白,结构蛋白,和转录因子。

[0115] 在一个更优选的方面,多肽是氧化还原酶,转移酶,水解酶,裂合酶,异构酶,或连接酶。在一个最优选的方面,多肽是 α -葡萄糖苷酶,氨肽酶,淀粉酶,糖酶,羧肽酶,过氧化氢酶,纤维素酶,几丁质酶,角质酶 (cutinase),环糊精糖基转移酶,脱氧核糖核酸酶,酯酶, α -半乳糖苷酶, β -半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,葡糖脑苷脂酶, α -葡萄糖苷酶, β -葡萄糖苷酶,转化酶,漆酶,脂肪酶,甘露糖苷酶,变位酶 (mutanase),氧化酶,果胶酶 (pectinolytic enzyme),过氧化物酶,磷脂酶,肌醇六磷酸酶,多酚氧化酶,蛋白水解酶,核糖核酸酶,谷氨酰胺转移酶,尿激酶,或木聚糖酶。

[0116] 在另一个优选的方面,多肽是胶原蛋白或明胶,或它们的变异体或杂合体。

[0117] 在另一个优选的方面,生物多聚物是多糖。多糖可以是任何多糖,包括但不限于,粘多糖 (例如肝素和透明质酸) 和含氮多糖 (例如几丁质)。在一个更优选的方面,多糖是透明质酸。

[0118] 在本发明的方法中,代谢物可以是任何代谢物。代谢物可以由一个或多个,例如生物合成或代谢途径上的基因编码。术语“代谢物”包括初级代谢物和次级代谢物。初级代谢物是细胞的主要或常规代谢的产物,它与能量代谢、生长、及结构相关。次级代谢物是次级代谢的产物 (参见例如, R. B. Herbert, *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, Chapman and Hall, New York, 1981)。

[0119] 初级代谢物可以是但不限于,氨基酸,脂肪酸,核苷,核苷酸,糖,甘油三酯,或维生素。

[0120] 次级代谢物可以是但不限于,生物碱,香豆素,类黄酮,聚酮化合物,奎宁,类固醇,肽,或萜烯。在一个优选的方面,次级代谢物是抗生素,拒食剂,诱虫剂,杀菌剂,杀真菌剂,激素,杀虫剂,或杀鼠剂。

[0121] 生物物质也可以是选择标记的产物。选择标记是一种基因,其产物有助于产生针对微生物剂或病毒的抗性,针对重金属的抗性,原养型向营养缺陷型的转变,等等。选择标记包括但不限于,amdS (乙酰胺酶),argB (鸟氨酸氨基甲酰转移酶),bar (膦丝菌素乙酰转移酶),hygB (潮霉素磷酸转移酶),niaD (硝酸还原酶),pyrG (乳清苷 -5' -磷酸脱羧酶),sC (硫酸腺苷转移酶),trpC (氨基苯甲酸合酶),及其等价物。

[0122] 在本发明的应用中,分离目的基因可能是必要的。用于分离或克隆基因的技术是本领域已知的,该技术包括从基因组 DNA 的分离,从 cDNA 的制备,或者它们的组合。从上述基因组 DNA 进行基因克隆,例如可以通过周知的聚合酶链反应 (PCR) 进行。参见例如, Inniset al., 1990, *PCR Protocols :A Guide to Methods and Application*, Academic Press, New York。克隆过程可能需要进行包含生物物质编码基因的所述期望核酸片段的剪切与分离,片段至载体的插入,以及重组载体至丝状真菌菌株细胞的整合,在细胞中核酸序列复制出多个拷贝或多个克隆。核酸序列可以是基因组序列, cDNA, RNA, 半合成的, 合成的, 或它们的任意组合。

[0123] 在一个优选的方面,目的基因的表达减少至少 20%,优选至少 30%,更优选至少 40%,更优选至少 50%,更优选至少 60%,更优选至少 70%,进一步优选至少 80%,最优选至少 90%。在另一个优选的方面,目的基因的表达被消除。

[0124] 当在 5' 非翻译区,编码区,或 3' 非翻译区中使用反向重复序列时,所构建的在上述任一区域中包含了反向重复序列的基因沉默载体可又使与沉默载体中与编码序列同源的基因沉默。因此,当要在生物体中沉默基因的同源类似物时,通过构建在 5' 非翻译区、编码区或 3' 非翻译区中含有反向重复序列的沉默载体,可以消除或减少与该构建体编码序列有序列同源性的一个或多个基因的表达。术语“同源性”或“同源性的”通常是指有某些有共同祖先结构并且活性区有高度序列相似性的那些序列。

[0125] 在一个优选的方面,干扰 RNA 与目的基因的一个或多个同源类似物 RNA 转录本相互作用以减少或消除目的基因的一个或多个同源类似物的表达。

[0126] 在一个更优选的方面,目的基因的一个或多个同源类似物的表达减少至少 20%,优选至少 30%,更优选至少 40%,更优选至少 50%,更优选至少 60%,更优选至少 70%,进一步优选至少 80%,最优选至少 90%。在另一个优选的方面,目的基因的一个或多个同源类似物的表达被消除。

[0127] 丝状真菌菌株

[0128] 本发明也涉及包含双链可转录核酸构建体的丝状真菌菌株,该构建体包括第一核苷酸序列,其包含与目的基因的第一同源可转录区可操作连接的启动子;和第二核苷酸序列,其包含所述目的基因的第二同源可转录区,其中第一和第二同源区相互互补且第二同源区与第一同源区方向相反,其中第一、第二核苷酸序列形成一个包括与目的基因同源的区域的转录双链多核苷酸,其中该双链多核苷酸在丝状真菌菌株中使目的基因的表达沉默。

[0129] 丝状真菌菌株可以是任何在本发明方法中有用的丝状真菌菌株。“丝状真菌菌株”包括所有丝状形式的真菌门 (Eumycota) 和卵菌门 (Oomycota) 亚类 (由 Hawksworth et al, 1995, (同上) 同上所定义)。丝状真菌以几丁质、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖及其他复合多糖构成的菌丝体壁为特征。营养性生长依靠菌丝延长且碳源代谢是必需氧的。相反,酵母例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的营养生长依靠单细胞体出芽,且碳源代谢可以是发酵的。

[0130] 在一个优选的方面,丝状真菌菌株是支顶孢属 (*Acremonium*),曲霉属,短柄霉属 (*Aureobasidium*),隐球酵母属 (*Cryptococcus*), Filibasidium, 镰孢属 (*Fusarium*), 腐质霉属 (*Humicola*), Magnaporthe, 毛霉属 (*Mucor*), Myceliophthora, Neocallimastix, 链孢霉属 (*Neurospora*), Paecilomyces, 青霉属 (*Penicillium*), Piromyces, 裂褶菌属 (*Schizophyllum*), 踝节菌属 (*Talaromyces*), Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, 或木霉属 (*Trichoderma*) 的菌株。

[0131] 在一个更优选的方面,丝状真菌菌株是泡盛曲霉,烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*), 臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*), 日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*), 构巢曲霉,黑曲霉或米曲霉细胞。在另一个更优选的方面,丝状真菌菌株是杆孢状镰孢 (*Fusarium bactridioides*), *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, 黄色镰孢 (*Fusarium culmorum*), 禾谷镰孢 (*Fusarium graminearum*), 禾赤镰孢 (*Fusarium*

graminum), 异孢镰孢 (*Fusarium heterosporum*), 合欢木镰孢 (*Fusarium negundi*), 尖孢镰孢, 网状镰孢 (*Fusarium reticulatum*), 粉红镰孢 (*Fusarium roseum*), 接骨木镰孢 (*Fusarium sambucinum*), 肤色镰孢 (*Fusarium sarcochroum*), 拟枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*), 硫色镰孢 (*Fusarium sulphureum*), *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, 或 *Fusarium venenatum* 细胞。另一方面更优选地, 丝状真菌菌株是黑刺烟管菌 (*Bjerkandera adusta*), 干拟蜡菌 (*Ceriporiopsis aneirina*), 干拟蜡菌 (*Ceriporiopsis aneirina*), *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, 虫拟蜡菌 (*Ceriporiopsis subvermispora*), 灰盖鬼伞, 毛革盖菌 (*Coriolus hirsutus*), *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, 米赫根毛霉, 嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*), 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*), 产紫青霉 (*Penicillium purpurogenum*), *Phanerochaete chrysosporium*, 射脉菌 (*Phlebiaradiata*), *Pleurotus eryngu*, *Thielavia terrestris*, 长绒毛栓菌 (*Trametes villosa*), 云芝 (*Trametes versicolor*), *Trichoderma harzianum*, 康宁木霉 (*Trichoderma koningii*), *Trichoderma longibrachiatum*, 里氏木霉, 或 *Trichoderma viride*。

[0132] 一方面最优选地, 米曲霉是保藏号为 IFO 4177 的米曲霉株。在另一个最优选的方面, *Fusarium venenatum* 株为 *Fusarium venenatum* A3/5, 该株原以禾谷镰孢 ATCC 20334 保藏, 最近被 Yoder and Christianson, 1998, *Fungal Genetics and Biology* 23:62-80 和 O' Donnell et al., 1998, *Fungal Genetics and Biology* 23:57-67 重新分类为 *Fusarium venenatum*; 所述 *Fusarium venenatum* 株还可以是 *Fusarium venenatum* 的分类学上的等价物, 不管其目前所知的是什么种名。另在一个优选的方面, 所述 *Fusarium venenatum* 是 WO 97/26330 中公开的 *Fusarium venenatum* A3/5 或 *Fusarium venenatum* ATCC 20334 的形态变异株。另在一个优选的方面, 里氏木霉菌株是里氏木霉 ATCC 56765。

[0133] 丝状真菌菌株可以以本身已知的方法进行转化, 该方法涉及原生质体形成、原生质体转化以及细胞壁再生的方法。转化曲霉属和木霉属菌株的合适方法在 EP 238023 和 Yelton et al., 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81:1470-1474 中有记载。改造镰孢属菌种的合适方法在 Malardier et al., 1989, *Gene* 78:147-156 和 WO 96/00787 中有记载。酵母可以用 Becker and Guarente, In Abelson, J. N. and Simon, M. I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, *Journal of Bacteriology* 153:163; 和 Hinnen et al., 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:1920 中记载的方法改造。

[0134] 编码生物物质的目的基因的表达的减少或消除, 可以用本领域已知的特异性针对靶生物物质的方法检测。这些检测方法包括特异抗体的使用, 高效液相层析, 毛细管电泳, 酶产物的形成, 酶底物的消失, 或者 SDS-PAGE。例如, 酶分析可用于确定酶活性。确定酶活性的方法在本领域中对许多酶都是已知的 (参见, 例如, D. Schomburg and M. Salzmann (eds.), *Enzyme Handbook*, Springer Verlag, New York, 1990)。

[0135] 生产方法

[0136] 本发明也涉及生产感兴趣生物物质的方法, 包括: (a) 在合适生产感兴趣生物物

质的条件下培养丝状真菌菌株,其中该丝状真菌菌株包含双链可转录核酸构建体,其中该双链可转录核酸构建体包含第一核苷酸序列,其包含与编码非期望的生物物质的目的基因的第一同源可转录区操作性连接的启动子;和第二核苷酸序列,其包含该目的基因的第二同源可转录区,其中第一和第二同源区相互互补且第二同源区与第一同源区方向相反,其中由双链可转录核酸构建体编码的干扰RNA与目的基因RNA转录本相互作用以减少或消除编码非期望的生物物质的目的基因的表达;以及其中丝状真菌菌株包括编码感兴趣的生物物质的第三核苷酸序列;以及(b)从培养基中回收生物物质。

[0137] 感兴趣的生物物质可以是本文中记载的任何生物物质。它可以是丝状真菌菌株的天然或外源物质。非期望的生物物质的编码目的基因表达的减少或消除,可以导致其他感兴趣的生物物质表达的增加。非期望的生物物质可能直接影响感兴趣的生物物质的生产或表达。例如,非期望的生物物质是攻击感兴趣的生物物质从而降低其产量的蛋白酶。通过减少或消除蛋白酶的表达,更多的感兴趣的生物物质将被表达和生产。或者,非期望的生物物质与感兴趣的生物物质共同分享一个或多个细胞处理过程,例如转录因子或分泌途径,从而降低了感兴趣的生物物质的产量。通过减少或消除非期望的生物物质的表达,更多的细胞处理过程,例如表达限制性转录元件,将被感兴趣生物物质有效利用,从而增加感兴趣的生物物质表达和生产的量。另外,非期望的生物物质可以是毒素,其污染感兴趣的生物物质从而阻止其在特定条件下的使用,例如在食品加工中需要使用的酶。

[0138] 在本发明生产方法中,丝状真菌菌株用本领域已知的方法在适合生产感兴趣的生物物质的营养培养基中培养。例如,菌株可以在摇瓶中培养,也可以在实验室或工业发酵罐中有合适培养基以及在允许生物物质表达和/或分离的条件下小规模或大规模发酵培养(包括连续、分批、分批补料和固态发酵)。培养用本领域已知的方法在包括碳源、氮源和无机盐的适合营养培养基中进行。合适的培养基可以商业获得或者可以根据出版的组方制备(例如,美国典型培养物保藏中心目录)。如果生物物质被分泌在营养培养基中,那么该物质可直接从培养基中回收。如果生物物质不分泌,那么该物质可从细胞裂解物中回收。

[0139] 感兴趣的生物物质可以用本领域已知的对生物物质特异的方法检测。这些检测方法包括特异抗体的使用,高效液相层析,毛细微管电泳,酶产物的形成,酶底物的消失,或者SDS-PAGE。例如,酶分析可用于确定酶活性。确定酶活性的方法在本领域中对许多酶都是已知的(参见,例如,D. Schomburg and M. Salzmänn (eds.), *Enzyme Handbook*, Springer Verlag, New York, 1990)。

[0140] 所获感兴趣的生物物质可以用本领域的方法分离。例如,感兴趣的多肽可以用常规方法从培养基中分离,常规方法包括但不限于离心,过滤,萃取,喷雾干燥,蒸发,或沉淀。所分离多肽可进一步用本领域已知的各种方法纯化,该方法包括但不限于层析(例如离子交换层析,亲和层析,疏水层析,聚焦层析及大小排阻层析),电泳(例如制备级等点聚焦电泳(IEF)),溶解度差异(例如硫酸铵沉淀),及萃取(参见例如,Protein Purification, J. -C. Janson and Lars Rydén, editors, VCH Publishers, New York, 1989)。感兴趣的代谢物可以用例如萃取,沉淀,溶解度差异,或本领域任何已知方法从培养基中分离。所分离代谢物可进一步用代谢物合适的方法纯化。

[0141] 核苷酸序列

[0142] 编码感兴趣的生物物质的核苷酸序列可以从任何原核、真核或其他来源的生物获

得。就本发明而言,在本文中术语“从..... 获得”与某来源一起使用时,是指生物物质通过该来源生产或者通过插入了该来源基因的细胞生产。

[0143] 分离或克隆编码感兴趣的生物物质的核苷酸的技术是本领域已知的,该技术包括从基因组 DNA 的分离,从 cDNA 的制备,或者它们的组合。从上述基因组 DNA 进行核苷酸序列克隆,例如可以通过已知的聚合酶链反应 (PCR) 进行。参见例如,Innis et al., 1990, PCR Protocols : A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York。克隆过程可能需要进行包含编码生物物质的核酸序列的所述期望核苷酸片段的剪切与分离,片段至载体的插入,以及重组载体至丝状真菌菌株细胞的整合,其中核酸序列的多拷贝或多克隆在细胞中复制。核苷酸序列可以是基因组序列, cDNA, RNA, 半合成的, 合成来源的, 或它们的任意组合。

[0144] 核酸构建体

[0145] 编码感兴趣的生物物质的核苷酸序列可能包含在丝状真菌菌株的核酸构建体中。核酸构建体包括与至少一个启动子和一个或多个调控序列可操作性连接的编码感兴趣的生物物质的核苷酸序列,其中调控序列在调控序列适合条件下指导核苷酸序列在丝状真菌菌株中表达。表达理解为包括感兴趣的生物物质生产所涉及的任何步骤,其包括但不限于转录,转录后修饰,翻译,翻译后修饰,以及分泌。

[0146] “核酸构建体”在本文中是指单链或双链的核酸分子,其分离自天然基因,或者其被修饰,使得其含有以自然界中本不存在的组合及并置方式存在的核酸片段。当核酸构建体包括编码序列和编码序列表达所需的所有调控序列时,术语核酸构建体与术语表达框同义。

[0147] 分离的编码感兴趣的生物物质的核苷酸序列可进一步通过各种方式操作以便于生物物质的表达。取决于表达载体,插入载体之前的核苷酸序列操作可能是适宜的或必需的。用 DNA 重组方法修饰核酸序列的技术是本领域周知的。

[0148] 核苷酸序列可以包括一个或多个天然调控序列,或者一个或多个天然调控序列可以被一个或多个相对于所述核苷酸序列外源的调控序列取代以提高编码序列在宿主细胞中的表达。

[0149] 术语“调控序列”在本文中是指包括对感兴趣的生物物质表达必要或有利的所有组件。每一调控序列对于编码生物物质核苷酸序列而言可以是天然的或外源的。这样的调控序列包括但不限于前导序列,聚腺苷酸化序列,前肽序列,启动子,信号肽序列,和转录终止序列。至少,调控序列包括启动子,转录及转录终止信号。调控序列可以带有接头 (linkers),用于导入特异限制性位点,以便于将调控序列与编码感兴趣的生物物质的核苷酸序列编码区连接。

[0150] 调控序列可以是合适的转录终止序列,该序列被宿主细胞识别终止转录。终止序列可操作性连接于生物物质的编码核酸序列的 3' 端。任何在所选择的丝状真菌菌株中起作用的终止序列都可以用在本发明中。

[0151] 优选用于丝状真菌菌株的终止序列可以从米曲霉 TAKA 淀粉酶,黑曲霉葡糖淀粉酶,构巢曲霉氨基苯甲酸酯合酶,黑曲霉 α -葡萄糖苷酶,以及尖孢镰孢胰蛋白酶样蛋白酶基因获得。

[0152] 调控序列也可以是合适的前导序列,该序列是对丝状真菌菌株翻译重要的 mRNA

非翻译区。前导序列可操作性地连接于编码生物物质的核酸序列 5' 端。任何在所选择的丝状真菌菌株中起作用的前导序列都可以用在本发明中。

[0153] 优选用于丝状真菌菌株的前导序列可以从米曲霉 TAKA 淀粉酶, 构巢曲霉丙糖磷酸异构酶, *Fusarium venenatum* 胰蛋白酶, 以及 *Fusarium venenatum* 葡糖淀粉酶基因获得。

[0154] 调控序列也可以是聚腺苷酸化序列, 该序列可操作性地连接于核酸序列 3' 端, 在转录后, 该序列作为添加聚腺苷酸残基至被转录的 mRNA 的信号被宿主细胞识别。任何在所选择丝状真菌菌株中起作用的前导序列都可以用在本发明中。

[0155] 优选用于丝状真菌菌株的聚腺苷酸化序列可以从米曲霉 TAKA 淀粉酶, 黑曲霉葡糖淀粉酶, 构巢曲霉氨基苯甲酸酯合酶, 尖孢镰孢胰蛋白酶样蛋白酶, 以及黑曲霉 α -葡萄糖苷酶基因获得。

[0156] 调控序列也可以是信号肽编码区, 该编码区编码与多肽氨基末端相连的氨基酸序列, 指导编码多肽进入细胞分泌途径。核酸序列的编码序列的 5' 端可以固有地包含信号肽编码区, 其在开放阅读框中天然地与分泌多肽编码区片段相连。或者, 编码序列 5' 端可以包含与编码序列异源的信号肽编码区。当编码序列天然地不包含信号肽编码区时, 外源信号肽编码区可能是需要的。或者, 外源信号肽编码区可直接取代天然信号肽编码区以增强多肽的分泌。然而, 任何可指导表达多肽进入所选择真菌宿主细胞分泌途径的信号肽编码区都可以用在本发明中。

[0157] 有效的丝状真菌菌株信号肽编码区可以是获自米曲霉 TAKA 淀粉酶, 黑曲霉中性淀粉酶, 黑曲霉葡糖淀粉酶, 米赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶, *Humicola insolens* 纤维素酶, 以及 *Humicola lanuginosa* 脂肪酶基因的信号肽编码区。

[0158] 调控序列也可以是前肽编码区, 该编码区编码位于多肽氨基末端的氨基酸序列。所得多肽称为酶原 (proenzyme) 或多肽原 (或在某些情况下称为酶原 (zymogen))。多肽原通常无活性, 从多肽原催化或自身催化多肽原裂解, 多肽原可转化为成熟活性多肽。多肽原编码区可以从酿酒酵母 α -因子, 米赫根毛霉天冬氨酸蛋白酶, 以及嗜热毁丝霉漆酶 (WO 95/33836) 基因获得。

[0159] 当信号肽和前肽区同时存在于多肽氨基末端出现时, 前肽区位于多肽氨基末端, 而信号肽区则与前肽区氨基末端相邻。

[0160] 加入调节序列以相对于丝状真菌菌株生长调节生物物质的表达, 也是适宜的。调节系统的例子是响应化学或物理刺激引起基因表达开启或关闭的那些系统, 化学或物理刺激包括调节性化合物的存在。在丝状真菌菌株中, TAKA α -淀粉酶启动子, 黑曲霉葡糖淀粉酶启动子, 米曲霉葡糖淀粉酶启动子, 以及 *Fusarium venenatum* 葡糖淀粉酶启动子都可以用作调节序列。调节序列的其他例子是帮助基因进行扩增的那些序列。在真核系统中, 这些序列包括在氨甲喋呤存在下进行扩增的二氢叶酸还原酶基因系统和在重金属存在下进行扩增的亲金属蛋白基因系统。在这些例子中, 编码感兴趣生物物质核苷酸序列可操作性地与调节序列连接。

[0161] 表达载体

[0162] 编码感兴趣的生物物质核酸序列可包含在包括启动子、编码生物物质的核酸序列及转录和翻译终止信号的重组表达载体中。如上所述的各种核酸与调控序列可连接在一起产生重组表达载体, 该重组表达载体可包括一个或多个方便的限制性位点, 允许启动子和 /

或编码生物物质的核酸序列在该位点插入或取代。可选择地,核苷酸序列可通过将核苷酸序列或包含启动子和/或序列的核酸构建体插入至合适的表达载体表达。在产生表达载体时,编码序列位于载体内以使编码序列可操作性地与启动子及一个或多个合适的调控序列连接用于表达。

[0163] 重组表达载体可以是任何能方便进行重组 DNA 操作且能使核酸序列表达的载体(例如质粒或病毒)。所选择载体通常取决于载体与载体所导入宿主细胞之间的相容性。载体可以是线性或环状封闭质粒。

[0164] 载体可以是自主复制载体,即以染色体外实体存在且其复制不依赖染色体复制的载体,例如质粒,染色体外元件,微型染色体,或人工染色体。载体可包括任何以保证自我复制的要素。可选择地,载体可以是在导入宿主细胞后整合至基因组并与被整合染色体一起复制的载体。除此之外,也可以使用单个载体或质粒,或者两个或多个载体或质粒。该两个或多个载体或质粒一起包含整个要导入至宿主细胞基因组的 DNA,或所使用的转座子。

[0165] 载体优选地包含一个或多个可使转化细胞容易选择的选择标记。选择标记是一种基因,其产物有助于产生抗微生物素或病毒抗性,重金属抗性,原养型向营养缺陷型的转变,等等。用于丝状真菌菌株宿主细胞的选择标记包括但不限于 *amdS*(乙酰胺酶),*argB*(鸟氨酸氨甲酰转移酶),*bar*(蒴丝霉素乙酰转移酶),*hygB*(潮霉素磷酸转移酶),*niaD*(硝酸还原酶),*pyrG*(乳清苷-5'-磷酸脱羧酶),*sC*(硫酸腺苷转移酶),*trpC*(氨基苯甲酸合酶),及其等价物。优选用于曲霉属细胞的是构巢曲霉或米曲霉的 *amdS* 与 *pyro* 基因,以及吸湿链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的 *bar* 基因。优选用于镰孢属细胞的是 *bar*, *amdS*, *pyrG*, 或 *hygB* 基因。

[0166] 载体优选包含帮助载体与宿主细胞基因组稳定整合或在细胞中不依赖基因组能自我复制的元件。

[0167] 为了整合至丝状真菌菌株宿主细胞基因组,载体可依赖于编码生物物质的核酸序列或者其他载体元件通过同源或非同源重组稳定地整合至基因组。或者,载体可包含额外的指导通过同源重组整合入宿主细胞基因组的核酸。额外的核酸序列能使载体在染色体中以精确的位置整合至宿主基因组。为了提高精确位置整合可能性,整合元件(integral elements)优选包含足够数量的核酸,例如 100-10,000 碱基对,优选 400-10,000 碱基对,最优选 800-10,000 碱基对,该核酸与相应靶序列高度相同以提高同源重组概率。整合元件可以是任何与宿主细胞基因组中靶序列同源的序列。除此之外,整合元件可以是非编码或编码核酸序列。另一方面,载体可以通过非同源重组整合至宿主细胞基因组中。

[0168] 为实现自主复制,载体进一步包括能使在载体在所讨论宿主细胞中自主复制的复制起点。用于丝状真菌菌株细胞质粒复制子的例子是 *AMA1* 和 *ANS1* (Gemset al., 1991, Gene 98:61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Research 15:9163-9175; WO 00/24883)。*AMA1* 基因的分离和包含该基因质粒或载体的构建可根据 WO 00/24883 中公开的方法进行。复制原点可以有突变,该突变使其在宿主细胞行使功能时对温度敏感(参见例如, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1433)。

[0169] 多于一个的编码感兴趣的生物物质的核酸序列拷贝可插入至丝状真菌菌株以提高基因产物的生产。核酸序列拷贝数的增加可通过下面的途径实现:整合至少一个额外序列拷贝至宿主细胞基因组;或者在核酸序列中包含可扩增的选择标记基因,然后可以通过

在合适选择剂的存在下培养细胞来选择那些含有所述选择标记基因的扩增拷贝,因而也就含有所述核酸序列的更多拷贝的细胞。

[0170] 用于连接如上所述元件构建重组表达载体的方法是本领域技术人员周知的(参见例如 Sambrook et al., 1989, 同上)。

[0171] 本发明通过下述实施例进一步描述,这些实施例并不应被解释为对发明范围的限制。

实施例

[0172] 培养基与缓冲液

[0173] COVE 筛选平板每升由 342.3g 蔗糖, 20ml COVE 盐溶液, 10mM 乙酰胺, 15mM CsCl₂, 以及 25g 或 30g Noble 琼脂构成。

[0174] COVE2 平板每升由 30g 蔗糖, 20ml COVE 盐溶液, 10mM 乙酰胺, 以及 25g 或 30g Noble 琼脂构成。

[0175] COVE 盐溶液每升由 26g KCl, 26g MgSO₄ · 7H₂O, 76g KH₂PO₄, 以及 50ml COVE 微量金属元素构成。

[0176] COVE 微量金属元素每升由 0.04g NaB₄O₇ · 10H₂O, 0.4g CuSO₄ · 5H₂O, 1.2g FeSO₄ · 7H₂O, 0.7g 或 1g MnSO₄ · H₂O, 0.8g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 以及 10g ZnSO₄ · 7H₂O 构成。

[0177] COVE 上层琼脂每升由 342.3g 蔗糖, 20ml COVE 盐溶液, 10mM 乙酰胺, 以及 10g 低熔点琼脂构成。

[0178] 纤维素酶诱导培养基每升由 20g Arbocel-天然纤维素纤维 (J. Rettenmaier USA LP), 10g 玉米浆干粉 (corn steep solid) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 1.45g (NH₄)₂SO₄, 2.08g KH₂PO₄, 0.28g CaCl₂, 0.42g MgSO₄ · 7H₂O, 0.42ml 里氏木霉微量金属溶液, 以及 2 滴 pluronic 酸构成。在高压灭菌前用 10N NaOH 调整 pH 至 6.0。

[0179] 里氏木霉微量金属溶液每升由 216g FeCl₃ · 6H₂O, 58g ZnSO₄ · 7H₂O, 27g MnSO₄ · H₂O, 10g CuSO₄ · 5H₂O, 2.4g H₃BO₃, 以及 336g 柠檬酸构成。

[0180] YP 培养基每升由 10g 酵母提取物和 20g Bacto 蛋白胨构成。

[0181] YPG 培养基每升由 4g 酵母提取物, 1g K₂HPO₄, 0.5g MgSO₄, 以及 15.0g 葡萄糖构成 (pH 6.0)。

[0182] PEG 缓冲液每升由 500g PEG 4000, 10mM CaCl₂, 以及 10mM Tris-HCl 构成, pH 7.5, 过滤灭菌。

[0183] STC 每升由 0.8M 或 1M 山梨醇, 10mM 或 25mM CaCl₂, 以及 10mM 或 25mM Tris-HCl 构成, pH 7.5 或 pH 8, 过滤灭菌。

[0184] STPC 由 40% PEG 4000 溶解在 STC 中构成。

[0185] M400 培养基每升由 50g 麦芽糖糊精, 2g MgSO₄ · 7H₂O, 2g KH₂PO₄, 4g 柠檬酸, 8g 酵母提取物, 2g 尿素, 0.5g CaCl₂, 以及 0.5ml AMG 微量金属溶液构成。

[0186] AMG 微量金属溶液每升由 6.8g ZnCl₂ · 7H₂O, 2.5g CuSO₄ · 5H₂O, 0.24g NiCl₂ · 6H₂O, 13.9g FeSO₄ · 7H₂O, 13.5g MnSO₄ · H₂O, 以及 3g 柠檬酸构成。

[0187] 基本培养基平板每升由 6g NaNO₃, 0.52g KCl, 1.52g KH₂PO₄, 1ml COVE 微量金属元素, 1g 葡萄糖, 500mg MgSO₄ · 7H₂O, 342.3g 蔗糖, 以及 20g Noble 琼脂构成 (pH 6.5)。

[0188] MLC 每升由 40g 葡萄糖, 50g 豆粉, 以及 4g 柠檬酸构成, pH 5.0。

[0189] MU-1 每升由 260g 麦芽糊精 (MD-11), 5g KH_2PO_4 , 3g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6g K_2SO_4 , 5ml AMG 微量金属溶液, 以及 2g 尿素构成, pH 4.5。

[0190] pH 6.5 的 CM-1 琼脂平板每升由 0.25g NaCl , 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.9g K_2HPO_4 , 3.6g KH_2PO_4 , 0.1ml 微量金属溶液, 30g Bacto 琼脂 (Difco), pH 6.5, 11ml 10% 尿素, 以及 67ml 30% 麦芽糖构成。

[0191] 微量金属溶液 (1000X) 每升由 22g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11g H_3BO_3 , 5g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6g $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.6g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 以及 50g Na_4EDTA 构成。

[0192] PDA 平板每升由 39g 马铃薯右旋糖琼脂 (Potato Dextrose Agar) (Difco) 构成。

[0193] 实施例 1 : pAILo1 表达载体的构建

[0194] 表达载体 pAILo1 通过修饰 pBAnE6 (美国专利 6,461,837) 构建, 其包括来自黑曲霉中性 α -淀粉酶和米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的杂合启动子 (NA2-tpi 启动子), 黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶终止序列 (AMG 终止子), 以及构巢曲霉乙酰胺酶基因 (amdS)。修饰 pBAnE6 首先通过定点诱变去除距离 amdS 选择标记 2051, 2722, 3397bp 位置处的三个 Nco I 限制性位点。所有改变都是“沉默”改变, amdS 基因产物的实际蛋白序列未发生变化。这三个位点去除用 GeneEditor 定点诱变试剂盒 (Promega, Madison, WI) 按照制造商的使用说明用下列引物 (划线核苷酸代表改变的碱基) 同时进行:

[0195] AMDS3NcoMut (2050) : 5' -GTGCCCCATGATACGCCTCCGG-3' (SEQ ID NO :1)

[0196] AMDS2NcoMut (2721) : 5' -GAGTCGTATTTCCAAGGCTCCTGACC-3' (SEQ ID NO :2)

[0197] AMDS1NcoMut (3396) : 5' -GGAGGCCATGAAGTGGACCAACGG-3' (SEQ ID NO :3)

[0198] 接着, 将包含所有三个期望序列变化的质粒用 QuickChange 诱变试剂盒 (Stratagene, La Jolla, CA) 进行定点突变, 以消除在 AMG 终止子末端位置 1643 的 Nco I 限制性位点。使用下列引物 (划线核苷酸代表改变的碱基) 进行突变:

[0199] 突变 AMG 终止序列的上游引物:

[0200] 5' -CACCGTGAAAGCCATGCTCTTTCCTTCGTGTAGAAGACCAGACAG-3'

[0201] (SEQ ID NO :4)

[0202] 突变 AMG 终止序列的下游引物:

[0203] 5' -CTGGTCTTCTACACGAAGGAAAGAGCATGGCTTTCACGGTGTCTG-3' (SEQ ID NO :5)

[0204] 修饰 pBAnE6 最后一步是用 QuickChange 诱变试剂盒及下列引物 (划线核苷酸代表改变的碱基) 在多接头起始部分加入新的 Nco I 限制性位点, 以产生 pAILo1 (图 1)。

[0205] 突变 NA2-tpi 启动子的上游引物:

[0206] 5' -CTATATACACAACCTGGATTTACCATGGGCCCCGCGCCGCAGATC-3' (SEQ ID NO :6)

[0207] 突变 NA2-tpi 启动子的下游引物:

[0208] 5' -GATCTGCGGCCGCGGGCCCATGGTAAATCCAGTTGTGTATATAG-3' (SEQ ID NO :7)

[0209] 实施例 2 : pMJ04 表达载体的构建

[0210] 表达载体 pMJ04 首先用如下所示引物 993429 (反义) 和 993428 (有义) 从里氏木霉 RutC30 基因组 DNA 对里氏木霉 Cel7A 纤维二糖水解酶 1 基因 (cbh1) 进行 PCR 扩增。反义引物被设计为在 5' 端有 PacI 位点, 有义引物 5' 端有 Spe I 位点。里氏木霉 RutC30 (ATCC 56765 ; Montecourt and Eveleigh, 1979, Adv. Chem. Ser. 181 : 289-301) 来自里氏木霉

Qm6A(ATCC13631;Mandels and Reese,1957,J.Bacteriol 73:269-278)。

[0211] 引物 993429(反义):

[0212] 5'-AACGTTAATTAAGGAATCGTTTTGTGTTT-3' (SEQ ID NO:8)

[0213] 引物 993428(有义):

[0214] 5' -AGTACTAGTAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG-3' (SEQ ID NO:9)

[0215] 扩增反应液(50 μl)由 1X ThermoPol 反应缓冲液(New England Biolabs,Beverly,MA),0.3mM dNTPs,100ng 里氏木霉 RutC30 基因组 DNA(用 DNeasy Plant Maxi 试剂盒分离,QIAGEN Inc.,Valencia,CA),0.3 μM 引物 993429,0.3 μM 引物 993428,以及 2 单位 Vent 聚合酶(New England Biolabs,Beverly,MA)构成。反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 仪(Hamburg,Germany)上进行,程序如下:30 个循环,每一循环 94℃ 30 秒,55℃ 30 秒,72℃ 30 秒(最后延伸 15 分钟)。反应产物用 40mM Tris 碱-20mM 乙酸钠-1mM EDTA 二钠(TAE)缓冲液在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行分离,从凝胶剪切 229bp 的产物条带,按照制造商使用说明用 QIAquick Gel 提取试剂盒(QIAGEN Inc.,Valencia,CA)纯化。

[0216] 所得 PCR 片段用 Pac I 和 Spe I 消化,用 Rapid 连接试剂盒(Roche,Indianapolis,IN)连接至用相同限制性酶消化过的 pAILo1,产生 pMJ04(图 2)。

[0217] 实施例 3:pMJ06 表达载体的构建

[0218] 表达载体 pMJ06 首先用如下所示引物 993696(反义)和 993695(有义)从里氏木霉 RutC30 基因组 DNA 对里氏木霉 Cel7A 纤维二糖水解酶 1 基因(cbh1)进行 PCR 扩增来构建。反义引物被设计为在有义引物 5' 端有 Sal I 位点,反义引物 5' 端有 Nco I 位点。

[0219] 引物 993695(有义):

[0220] 5' -ACTAGTCGACCGAATGTAGGATTGTT-3' (SEQ ID NO:10)

[0221] 引物 993696(反义):

[0222] 5' -TGACCATGGTGGCGAGTCC-3' (SEQ ID NO:11)

[0223] 扩增反应液(50 μl)由 1X ThermoPol 反应缓冲液,0.3mM dNTPs,100ng 里氏木霉 RutC30 基因组 DNA(用 DNeasy Plant Maxi 试剂盒制备),0.3 μM 引物 993696,0.3 μM 引物 993695,以及 2 单位 Vent 聚合酶构成。反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 仪上进行,程序如下:30 循环,每一循环 94℃ 30 秒,55℃ 30 秒,72℃ 60 秒(最后延伸 15 分钟)。反应产物用 TAE 缓冲液在 1.0% 琼脂糖凝胶上分离,从凝胶剪切的 988bp 产物条带按制造商使用说明用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化。

[0224] 所得 PCR 片段用 Nco I 和 Sal I 消化后,用 Rapid 连接试剂盒连接至用相同限制性酶消化过的 pMJ04,产生 pMJ06(图 3)。

[0225] 实施例 4:pMJ09 表达载体的构建

[0226] 表达载体 pMJ09 用如下所示引物 993843(反义)和 993844(有义)从里氏木霉 RutC30 基因组 DNA 对里氏木霉 Cel7A 纤维二糖水解酶 1 基因(cbh1)PCR 扩增。反义引物被设计为 5' 端有 Pac I 和 Spe I 位点,有义引物 5' 端有 Pvu I 位点。

[0227] 引物 993844(有义):

[0228] 5' -CGATCGTCTCCCTATGGGTCATTACC-3' (SEQ ID NO:12)

[0229] 引物 993843(反义):

[0230] 5' -ACTAGTTAATTAAGCTCCGTGGCGAAAG-3' (SEQ ID NO:13)

[0231] 扩增反应液 (50 μ l) 由 1X ThermoPol 反应缓冲液, 0.3mM dNTPs, 100ng 里氏木霉 RutC30 基因组 DNA (用 DNeasy Plant Maxi 试剂盒提取), 0.3 μ M 引物 993844, 0.3 μ M 引物 993843, 以及 2 单位 Vent 聚合酶构成。反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 仪上进行, 程序如下: 30 循环, 每一循环 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 60 秒 (最后延伸 15 分钟)。反应产物用 TAE 缓冲液在 1.0% 琼脂糖凝胶上分离, 从凝胶剪切 473bp 产物条带, 按制造商的使用说明用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化。

[0232] 所得 PCR 片段用 Pvu I 和 Spe I 消化后, 用 Rapid 连接试剂盒连接至用 Pac I 和 Spe I 消化过的 pMJ06, 产生 pMJ09 (图 4)。

[0233] 实施例 5: 发酵和菌丝体组织

[0234] 里氏木霉 RutC30 在 Mandels and Weber, 1969, Adv. Chem. Ser. 95:391-413 记载的纤维素酶诱导标准条件下生长。菌丝体样品用 Whatman 滤纸过滤收获, 液氮迅速冷冻。样品 -80°C 保存直到将其破碎进行 RNA 提取。

[0235] 实施例 6: 表达序列标签 (ESTs) cDNA 文库构建

[0236] 用 Timberlake and Barnard 方法 (1981, Cell 26:29-37) 将细胞总 RNA 从实施例 5 所述菌丝体样品进行提取, 从 1% 甲醛-琼脂糖凝胶印迹之后 RNA 样品用 Northern 杂交分析 (Davis et al., 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York)。按制造商使用说明用 mRNA Separator Kit™ 试剂盒 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 将聚腺苷酸化 mRNA 级分从总 RNA 中分离。

[0237] 除了 Not I-(dT)18 引物 (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) 用于引发第一链合成外, 其它按 Gubler and Hoffman 方法 (1983, Gene 25:263-269) 用约 5 μ g poly(A)+mRNA 合成双链 cDNA。cDNA 用绿豆核酸酶 (BoehringerMannheim Corporation, Indianapolis, IN) 处理, 末端用 T4DNA 聚合酶 (NewEngland Biolabs, Beverly, MA) 平头钝化。然后, 将 BamHI/EcoR I 衔接子连接至 cDNA 平头末端。用 Not I 消化之后, cDNA 用 TAE 缓冲液 0.7% 琼脂糖凝胶电泳进行大小选择 (约 0.7-4.5kb), 与 pYES2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 连接。该 pYES2 已用 Not I 和 BamH I 酶切且用牛肠碱性磷酸酶去磷酸化 (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN)。

[0238] 按制造商使用说明将连接混合物用于转化感受态大肠杆菌 TOP10 细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。转化体在补加终浓度为 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 2YT 琼脂平板 (Miller, 1992, A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York) 上选择。

[0239] 实施例 7: 模板制备和 cDNA 克隆核苷酸测序

[0240] 从实施例 6 记载的 cDNA 文库中, 直接从 2YT 平板挑选约 7000 个转化克隆至含有 100 μ l 补加有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 2YT 肉汤的 96 孔微滴定板中。滴定板 200rpm 振荡 37°C 温育过夜。温育后, 每孔加入 100 μ l 50% 灭菌甘油。将转化体影印到每孔含有 1ml 补加有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 Magnificent Broth™ 肉汤 (MacConnell Research, San Diego, CA) 的二级深孔 (deep-dish) 96 孔微培养板中 (Advanced Genetic Technologies Corporation, Gaithersburg, MD)。原始微滴定板 -80°C 冷冻储存。二级深孔板旋转摇床强振荡 (300rpm) 37°C 温育过夜。为了防止散落、交叉污染, 以及为了充分通气, 每个二级培养

板用聚丙烯垫 (Advanced Genetic Technologies Corporation, Gaithersburg, MD) 和塑料微滴定盘盖覆盖。

[0241] 将 DNA 用 Utterback et al (1995, Genome Sci. Technol 1:1-8) 修改的 Advanced Genetic Technologies Corporation (Gaithersburg, MD) 96 孔 Miniprep 试剂盒方法从每孔分离。单次 (single-pass) DNA 测序在 Perkin-Elmer Applied Biosystems Model 377XL 自动 DNA 测序仪上 (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 使用末端染色化学 (Giesecke et al., 1992, Journal of Virology Methods 38:47-60) 及 T7 测序引物进行:

[0242] T7 引物: 5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO:14)

[0243] 实施例 8: cDNA 克隆的 DNA 序列数据分析

[0244] 对核苷酸序列数据进行定性分析, 去掉载体序列和 DNA 序列末端模棱两可的碱基判定, 所有序列借助 PHRED/PHRAP 软件 (University of Washington, Seattle, WA) 进行相互比对。将所得序列重叠群 (contigs) 和单碱基差异 (singletons) 翻译为 6 个阅读框 (frames), 并使用 GeneMatcher™ 软件 (Paracel, Inc., Pasadena, CA) 在公众可访问的蛋白质数据库中检索, 该软件使用改进的 Smith-Waterman 算法, 该算法使用 BLOSUM 62 矩阵。

[0245] 实施例 9: 编码家族 6 纤维二糖水解酶 II (Cel6A) 的 cDNA 克隆的鉴定

[0246] 编码家族 6 纤维二糖水解酶 (Cel6A) 的推定的 cDNA 克隆通过将装配的 ESTs 的推定的氨基酸序列与公众可访问的数据库, 例如 Swissprot, Genpept, 以及 PIR 中所存的蛋白质序列进行比较来鉴定。选择一个克隆里氏木霉 ESTTr0749, 进行核苷酸序列分析, 分析显示其有包含 SEQ ID NO:15 所示 1413bp 开放阅读框及 SEQ ID NO:16 所示推定氨基酸序列的 1747bp pYES2 的插入。含里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 的质粒命名为 pTr0749。

[0247] 实施例 10: pSMail48 表达载体的构建

[0248] 构建表达载体 pSMail48 来转录来自里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 基因的双链 RNA (ds-RNA) 以在里氏木霉 RutC30 株中沉默里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 基因的表达。质粒 pSMail48 用如下所示引物 994991 (反义) 和 994990 (有义) 通过从 pTr0749 210bp 里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 编码区 PCR 扩增来产生。反义引物设计为 5' 端有 EcoR I 位点, 有义引物 5' 端有 Nco I 位点。

[0249] 引物 994991 (反义):

[0250] 5' -GGAATTCTAGTTCTTATATTTGGCGACGCCACCATCT-3' (SEQ ID NO:17)

[0251] 引物 994990 (有义):

[0252] 5' -CATGCCATGGAAAGGTTCCCTCTTTTATGTGGCTAG-3' (SEQ ID NO:18)

[0253] 扩增反应液 (50 μ l) 由 1X ThermoPol 反应缓冲液, 0.3mM dNTPs, 10ng pTr0749, 0.3 μ M 引物 994990, 0.3 μ M 引物 994991, 以及 2.5 单位 Taq 聚合酶 (New England Biolabs, Beverly, MA) 构成。反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 仪上进行, 程序如下: 30 循环, 每循环 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒 (最后延伸 15 分钟)。反应产物用 TAE 缓冲液在 1.0% 琼脂糖凝胶上分离。从凝胶剪切 227bp 产物条带, 按制造商使用说明用 QIAquick Gel 提取试剂盒进行纯化。

[0254] 另外的 PCR 用如下所示引物 994993 (反义) 和 994992 (有义) 从 pTr0749 扩增 337bp 的里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 编码区片段来进行。反义引物设计为 5' 端有

EcoR I 位点,有义引物 5' 端有 Pac I 位点。

[0255] 引物 994993(反义):

[0256] 5' -GGAATTCTGACTGAGCATTGGCACACTTTGGAGTAC-3' (SEQ ID NO:19)

[0257] 引物 994992(有义):

[0258] 5' -CCTTAATTAAAAAGGTTCCCTCTTTTATGTGGCTAG-3' (SEQ ID NO:20)

[0259] 扩增反应液(50 μ l)由 1X ThermoPol 反应缓冲液,0.3mM dNTPs,10ng pTr0749,0.3 μ M 引物 994992,0.3 μ M 引物 994993,以及 2.5 单位 Taq 聚合酶构成。反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 仪上进行,程序如下:30 循环,每循环 94 $^{\circ}$ C 30 秒,55 $^{\circ}$ C 30 秒,72 $^{\circ}$ C 30 秒(最后延伸 15 分钟)。反应产物用 TAE 缓冲液在 1.0%琼脂糖凝胶上分离。从凝胶剪切 354bp 产物条带按制造商使用说明用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化。

[0260] 所获里氏木霉 Cel16A 纤维二糖水解酶 II PCR 片段用 Pac I 和 EcoR I 消化,反向连接至 Nco I 和 EcoR I 所消化的里氏木霉 Cel16A 纤维二糖水解酶 II PCR 片段(来自第一次 PCR)的下游。该尾对尾重复(图 5)按制造商使用说明用 T4DNA 连接酶(Roche, Indianapolis, IN)连接至 Pac I 和 Nco I 消化的 pMJ09 载体而产生 pSMai148(图 6)。

[0261] 实施例 11:用具有 Cel16A 纤维二糖水解酶 II 基因反向重复片段的表达构建体转化里氏木霉

[0262] 为了显示双链 RNA(ds-RNA)介导的干扰在里氏木霉中发生,将表达 Cel16A 纤维二糖水解酶 II 序列的自互补发夹 RNA 的 pSMai148 表达载体转化至里氏木霉 RutC30 原生质体。使用 pSMai148 亲本载体——pMJ09 质粒(“空载体”)(图 4)作为对照。上述两种构建体都包含 amdS 基因,该基因提供可在乙酰胺为唯一氮源培养基上生长的选择性;在 pSMai148 质粒中的里氏木霉 Cel16A 纤维二糖水解酶 II 序列被置于纤维素强诱导的里氏木霉 Cel17A 纤维二糖水解酶 I 启动子之下。

[0263] 原生质体制备和转化按 Penttila et al.,1987, Gene 61:155-164 改进的方法进行。简而言之,将里氏木霉 RutC30 培养在 25ml 补加有 2% (w/v) 葡萄糖和 10mM 尿苷的 YP 培养基中,27 $^{\circ}$ C 轻微振荡(90rpm)17 小时。菌丝体用 Millipore Vacuum Driven Disposable 过滤系统(Millipore,Bedford,MA)过滤收集,用去离子水洗两次,1.2M 山梨醇洗两次。在 20ml 每 ml 含 15mg Glucanex[®] 200G(NovozymesSwitzerland AG, Neumatt, Switzerland)和 0.36 单位几丁质酶(Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO)的 1.2M 山梨醇溶液中 34 $^{\circ}$ C 轻微振荡(90rpm)下悬浮所洗菌丝体 15-25 分钟产生原生质体。400xg 离心 7 分钟收集原生质体,冷 1.2M 山梨醇洗两次。原生质体用血球计数器计数,在 STC 中重悬至终浓度 1×10^8 原生质体/ml。多余原生质体在 -80 $^{\circ}$ C 下储存于 Cryo 1 $^{\circ}$ C Freezing Container(Nalgene, Rochester, NY)。

[0264] 将约 7 μ g 用 Pme I 消化的表达质粒(pSMai148 或 pMJ09)加入至 100 μ l 原生质体溶液中,缓慢混合。加入 PEG 缓冲液(250 μ l),混合,室温温育 30 分钟。接着加入 STC(3ml),混合,铺板于 COVE 板。板在 28 $^{\circ}$ C 温育 5-7 天。转化体在 COVE2 板上分培养,28 $^{\circ}$ C 生长。

[0265] 实施例 12:用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶检测里氏木霉 Cel16A 纤维二糖水解酶 II 蛋白

[0266] 随机选择 20 个含有里氏木霉 Cel16A 纤维二糖水解酶 II 反向重复片段的转化体(SMA148-01 至 SMA148-20)和 10 个含有“空载体”的转化体(MJ09-01 和 MJ09-10),将转化体的芽孢接种培养在含 25ml pH6.0 的纤维素诱导培养基的 125ml 带挡流板的摇瓶中,28 $^{\circ}$ C,

200rpm, 温育 7 天。里氏木霉 RutC30 作为对照。接种后第 7 天分离培养液样品, 微型离心机 15, 700xg 离心 5 分钟, 移出上清液至新管。

[0267] 通过在 SDS-PAGE 凝胶上分析整个培养液, 在蛋白水平上对里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 沉默程度进行初步评估。SDS-PAGE 使用 Criterion™ Tris-HCl 凝胶 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 在 Criterion™ 电泳槽中 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 进行。将 5 μl 第 7 天样品悬浮在 2X 浓度的 Laemmli 样品缓冲液中 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 在 5% β-巯基乙醇存在下煮沸 3 分钟。所有样品加至聚丙烯酰胺凝胶中, 1X Tris/甘氨酸/SDS 电泳缓冲液中 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 电泳。所得凝胶用 Bio-Safe™ 考马斯亮蓝染色 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。

[0268] SDS-PAGE 分析显示, 大多数带有里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 反向重复片段的里氏木霉 RutC30 转化体 (SMA148-01 至 SMA148-20) 与携带“空载体”的转化体 (pMJ09-01 至 pMJ09-10) 相比, 里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 蛋白生产量大大降低。一个转化体 (转化体 14) 显示该蛋白完全缺失。

[0269] 选择 6 个显示出里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 蛋白的不同程度的减少的 SMA148 转化体 (转化体 1, 2, 11, 12, 13, 14) 和 2 个“空载体”转化体 (MJ09-03 和 MJ09-04) 作进一步分析。将这些转化体进行两轮单孢分离以获得纯株。这些单孢分离转化体在 28℃ 下生长于 25ml 纤维素酶诱导培养基 (pH 5.0)。另外, 宿主菌 (里氏木霉 RutC30) 和通过同源重组敲除了里氏木霉 Cel6A 基因的阳性对照菌 (里氏木霉 SaMe02) 也在相同条件下培养。接种后第 3 天从每个样品收集上清液和菌丝体, 进行上述 SDS-PAGE 分析。

[0270] SDS-PAGE 分析显示, 单孢分离进一步减少了产生的里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 的水平, 推定是因为由于单孢纯化, 转化体更加纯合。

[0271] 实施例 13: 里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II mRNA Northern 印迹检测

[0272] Northern 杂交用于确定里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 反向重复片段 (pSma148) 在菌株中整合是否导致里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II mRNA 量减少。按稍微改进的制造商提供的方法, 用 Fenzol™ (Active Motif, Carlsbad, CA) 从实施例 11 中获得的冷冻菌丝体中提取总 RNA。简而言之, 将冷冻菌丝体用电动咖啡研磨机带少许干冰研磨成细粉。研磨后的菌丝体与 20ml Fenzol™ 混合, 搅拌, 50℃ 水浴温育 15 分钟, 之后加入 5ml 氯仿 (Sigma, St. Louis, MO), 涡旋混合, 室温静置 10 分钟。接着, 样品室温 700x g 离心 20 分钟, 水相转移至新管, 加入等体积苯酚-氯仿-异戊醇。样品涡旋混合后再 700xg 旋转离心 10 分钟, 顶层水相加入等体积氯仿。样品再一次 700xg 离心 10 分钟, 水相转移至含 0.5ml 3M pH 5.2 乙酸钠和 6.25ml 异丙醇的管中。将样品室温下混合温育 15 分钟, 13400xg 离心 30 分钟回收 RNA。RNA 用 70% 乙醇洗涤, 离心, 干燥, 重悬于 DEPC 水。抽提 RNA 的数量和质量按制造商使用说明用 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Wilmington, DE) 联合 RNA 6000 Nano LabChip® 试剂盒 (Agilent Technologies, Wilmington, DE) 评估。

[0273] 所分离的总 RNA 用 1% 琼脂糖 / 甲醛凝胶电泳 4-6 小时进行分离, 然后按制造商推荐使用方法用 Turboblottter 仪经过 14-16 小时 (Schleicher & Schuell BioScience, Keene, NH) 印迹至 Nytran SuperCharge 膜 (Schleicher & Schuell BioScience, Keene, NH)。膜首先与 505bp 毛地黄毒苷标记的里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 探针杂交, 该探针通

过用如下所示引物 996118(反义)和 996117(有义)进行 PCR 时引入毛地黄毒苷 -11-dUTP 而合成:

[0274] 引物 996118(反义):

[0275] 5' -AAATCGTGGCGCACTGCTGT-3' (SEQ ID NO:21)

[0276] 引物 996117(有义):

[0277] 5' -TGAGTGCATCAACTACGCCG-3' (SEQ ID NO:22)

[0278] 扩增反应液 (50 μ l) 由 1X ThermoPol 反应缓冲液, 5 μ l PCR DIG 标记混合物 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA), 10ng pTr0749, 0.3 μ M 引物 996118, 0.3 μ M 引物 996117, 以及 2.5 单位 Taq 聚合酶构成。反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 仪上进行, 程序如下: 30 循环, 每循环 94°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 30 秒 (最后延伸 15 分钟)。5 微升 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上 TAE 缓冲液中进行大小分选, 溴化乙锭染色, UV 透射灯显现。分子量增加显示毛地黄毒苷的引入。

[0279] 杂交在 DIG Easy Hyb 缓冲液中 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) 50°C 下进行 15-17 小时。接着, 将膜在室温 2X SSC+0.1% SDS 的高严谨度条件下洗涤 5 分钟之后, 在 50°C 下用 0.1X SSC+0.1% SDS 再洗涤两次, 每次各 15 分钟。探针-靶核酸杂交体按制造商使用说明通过化学发光分析 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 检测。之后, 杂交膜在 50% 甲酰胺 /5% SDS/50mM Tris-HCl, pH 7.5, 80°C 下剥离 (stripped) 2 小时, 用 407bp 使用上述完全相同方法制备的毛地黄毒苷标记的里氏木霉肌动蛋白 1 编码基因 (登记号 X75421) (Matheucci et al., 1995, Gene 161: 103-106) 探针二次杂交。407bp 肌动蛋白 1 基因探针通过在如下所示的引物 996120(反义)和 996119(有义)进行 PCR 时引入毛地黄毒苷 -11-dUTP 而成:

[0280] 引物 996120(反义):

[0281] 5' -GTCAACACGACGAATGGCGT-3' (SEQ ID NO:23)

[0282] 引物 996119(有义):

[0283] 5' -TGATCGGTATGGGTCAGAAGG-3' (SEQ ID NO:24)

[0284] 扩增反应液 (50 μ l) 由 1X ThermoPol 反应缓冲液, 5 μ l PCR DIG 标记混合物 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA), 100ng 里氏木霉 RutC30 基因组 DNA (用 DNeasy Plant Maxi 试剂盒分离), 0.3 μ M 引物 996119, 0.3 μ M 引物 996120, 以及 2.5 单位 Taq 聚合酶构成。反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 仪上进行, 程序如下: 30 循环, 每循环 94°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 30 秒 (最后延伸 15 分钟)。

[0285] 5 微升 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上用 TAE 缓冲液进行大小分离, 溴化乙锭染色, UV 透射灯察看。分子量增加显示了毛地黄毒苷的引入。

[0286] Northern 印迹显示, 带有里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 反向重复片段的转化体, 与“空载体”转化体 (阴性对照) 和宿主菌 (里氏木霉 RutC30) 相比, 所产生的里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 转录本显著地减少。在转化体 11 和 14 中该结果中特别值得注意, 其中里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II mRNAs 检测不到, 尽管肌动蛋白 1 基因转录本清晰存在 (肌动蛋白 1 用作 RNA 等上样量对照)。里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II mRNA 的表观上 100% 的抑制与这些转化体中里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 蛋白 100% 的减少显著相关, 表明木霉中的 RNA 干扰是可用于翻译的靶 mRNA 的量的减少所造成的。

[0287] 实施例 14 :用实时反转录 PCR 检测里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II mRNA

[0288] 里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II mRNA 在不同转化体中的相对表达水平可用实时反转录 PCR(RT-PCR) 定量。按实施例 13 所描述的,从每个转化体中提取总 RNA 用作 RT-PCR 反应的模板。里氏木霉肌动蛋白 1 基因用作内对照。用 Primer Express™ 软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 设计引物。按适合度产生引物列表后,选择第一组 3' 端最后 5 个碱基中不多于 2 个 G+C 的引物。所用引物如下:

[0289] 里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 正向引物 (996006):

[0290] 5' -CTGGTCCAACGCCTTCTTCAT-3' (SEQ ID NO:25)

[0291] 里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 反向引物 (996007):

[0292] 5' -GGAACGTAGTGAGGCTCGCTAA-3' (SEQ ID NO:26)

[0293] 里氏木霉肌动蛋白 1 正向引物 (996121):

[0294] 5' -CATGGCTGGTCGTGATCTTACC-3' (SEQ ID NO:27)

[0295] 里氏木霉肌动蛋白 1 反向引物 (996122):

[0296] 5' -CCTTGATGTCACGGACGATTTC-3' (SEQ ID NO:28)

[0297] RT-PCR 分析用 ABI Prism® 7700 分析系统 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 和 SYBR® Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) 进行。每反应混合物总体积 25 μ l 中含有 12.5 μ l SYBR® Green PCR Master Mix, 6 单位 Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.83 μ M 正向引物, 0.83 μ M 反向引物, 以及各种浓度 RNA 模板。反转录在 50°C 下进行 30 分钟,接着在 95°C 下 Superscript II 失活和 AmpliTaq® 激活 10 分钟。40 PCR 循环在下列条件下进行: 95°C 15 秒变性, 60°C 1 分钟退火延伸。每样品制备三份。在每测试板上用无 Superscript II 的阴性对照来评估特异性。而且,因为 SYBR® Green 非特异性结合双链 DNA, 所以取一等份 PCR 扩增产物在 2.0% 琼脂糖凝胶用 TAE 缓冲液电泳以证实没有非特异性扩增。

[0298] 来自 ABI PRISM 7700 序列检测系统的数据用 ABI 用户须知 #2 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 所记载“相对定量标准曲线法”分析。该方法中,处理过的样品的表达量相对于未处理的对照样品进行计算。处理过的样品的量通过标准曲线确定后,除以未处理对照样品的量。由此,未处理样品设定为 1X 样品,则所有其它量相对于未处理样品表述为 n 倍的区别。接着,将处理样品的量相对于内对照肌动蛋白 1 均一化 (normalize),以补偿各个反应中加入的总 RNA 量的不同。

[0299] 图 7 显示,与“空载体对照”相比,转化体 14 和阳性对照株 (SaMe02) 的里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II mRNA 相对表达水平最低,该结果与 Northern 杂交数据显著相关。

[0300] 实施例 15 :用抑制差减杂交 (SSH) 从里氏木霉构建差减均一化 cDNA 文库

[0301] 里氏木霉 RutC30 株用基础 Celluclast™ 培养基在发酵条件下培养于 2 升 Applikon 试验室发酵罐。碳源包括葡萄糖,纤维素,或预处理洗涤过的玉米秸。所有碳源按相当于每升 52g 葡萄糖的量上料。发酵方法使用温度 28°C, pH 4.5, 生长时间约 120 小时。除了碳源,所有发酵每升含有下列培养基成分: 5g 葡萄糖, 10g 玉米浆干粉, 2.08g CaCl₂, 3.87g (NH₄)₂SO₄, 2.8g KH₂PO₄, 1.63g MgSO₄ · 7H₂O, 0.75ml 微量金属, 以及 1.8ml pluronic 酸。微量金属溶液每升由 216g FeCl₃ · 6H₂O, 58g ZnSO₄ · 7H₂O, 27g MnSO₄ · H₂O, 10g CuSO₄ · 5H₂O, 2.4g H₃BO₃, 以及 336g 柠檬酸构成。菌丝体样品接种后 1, 2, 3, 4, 5 天取样, 用

Miracloth™(Calbiochem, La Jolla, CA) 通过过滤从培养基迅速分离,液氮冷冻, -80℃保存。

[0302] 总细胞 RNA 用有稍微改动的 Timberlake and Barnard, 1981((同上)同上)的方法从在葡萄糖,纤维素,或预处理玉米秸(实施例 1)上培养得到的冷冻细胞中分离。RNA 提取缓冲液通过加入新制对-氨基水杨酸溶液(80ml DEPC 处理水中含 9.6g)至三异丙基苯磺酸溶液(80ml DEPC 处理水中含 1.6g)而制备。将该混合物加入 40ml 5X RNB 溶液中(1M Tris-HCl, pH 8.5, 1.25M NaCl, 0.25M EGTA)搅拌。冷冻菌丝体用电动咖啡研磨机随几块干冰研磨成细粉。研磨菌丝体直接倒入在冰上的 20ml RNA 提取缓冲液,加入等体积的 TE-饱和苯酚。剧烈振荡之后,样品在 2500rpm 下离心 10 分钟(装备 H1000B 转子的 Sorvall RT7 离心机)分层。将水相转移至含 10ml 苯酚和 10ml 氯仿-异戊醇(24 : 1)的新管中,同时在苯酚相另外加入 5ml 提取缓冲液。后一混合物在 68℃下温育 5 分钟以释放在多核糖体和界面物质中的 RNA。温育之后,该管在 2500rpm 下(装备 H1000B 转子 Sorvall RT7 离心机)离心 10 分钟,水相与第一次提取所得水相合并。将该混合物用苯酚-氯仿反复抽提,直到界面处不再有蛋白(通常 5 次或 6 次)。RNA 用 pH5.2 的 0.3M 乙酸钠和 50%异丙醇沉淀之后通过离心回收。由大约 1-2 克实验室规模发酵所产冷冻菌丝体所构成的每个样品中可获得 0.4-1.8mg 总细胞 RNA。

[0303] 来自在纤维素和 PCS 生长的培养物的 RNA 质量可用甲醛-琼脂糖凝胶电泳之后再进行里氏木霉 cbh1 特异探针 Northern 印迹杂交(Thomas, 1980, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 : 5201-5205)来评价。cbh1 探针片段可基于 EMBL 数据库公开的核苷酸序列信息(登记号 E00389)用标准 PCR 方法扩增。探针用辣根过氧化物酶(HRP)标记,使用 North2South Direct HR 标记检测试剂盒(Pierce, Rockford, IL)所提供的缓冲液和方法在 55℃下进行杂交。印迹在 55℃下用 2XSSC+0.1% SDS 洗涤三次,每次 5 分钟,之后再用 2X SSC(没有 SDS)洗涤三次,每次 5 分钟。印迹 X 射线胶片曝光清楚显示,基本上每道中的所有杂交信号都在包含在一种 1.8kb 的 cbh1 mRNA 之内,该 mRNA 迁移位置恰好稍稍在 18S 核糖体 RNA 带之上。放射自显影照片或溴乙锭凝胶染色的凝胶上,都没有显示 mRNA 有显著降解。聚腺苷化(polyA+)mRNA 级分按制造商使用说明(QIAGEN, Valencia, CA)用 Oligotex™ mRNA 分离试剂盒纯化。每个样品 polyA+mRNA 产量在 2 μg-25 μg 之间。每 mRNA 级分接着用里氏木霉来源 γ-肌动蛋白和 cbh1 基因的 HR 标记探针通过 Northern 印迹杂交分析。γ-肌动蛋白探针片段用标准 PCR 法和下列基因特异引物扩增。

[0304] 5' -CCAGACATGACAATGTTGCCGTAG-3' (SEQ ID NO :29)

[0305] 5' -TTTCGCTCTTCCTCACGCCATTG-3' (SEQ ID NO :30)

[0306] 正如所预料那样,杂交信号在每道中位于 γ-肌动蛋白和 cbh1 mRNA 相应带上(分别约 1.2kb 和 1.8kb),显示 mRNA 样品质量好,适于 cDNA 合成。

[0307] 使用 Diatchenko et al., 1996(同上)(同上)所记载的抑制差减杂交法(SSH)从里氏木霉 RutC30 产生了 cDNA 库(pool),该 cDNA 库富集了被纤维素和 PCS 诱导的序列,并且进行了均一化以帮助回收低丰度转录本。下表 1 列出了用于实验的驱动组(driver)和试验组(tester) cDNAs 组合。

[0308] 表 1. SSH 驱动组和试验组 cDNA 池

[0309]

SSH 反应	对照组 cDNA 来源	试验组 cDNA 来源
1	以葡萄糖培养的细胞	以 PCS 培养的细胞
2	以葡萄糖培养的细胞	以纤维素培养的细胞
3	以纤维素培养的细胞	以 PCS 培养的细胞

[0310] 表 1SSH 反应所得 cDNA 池用于产生被纤维素及 PCS 诱导的序列的差减文库。将来自每个时间点 (1-5 天) 的 400ng polyA⁺mRNA 一起合并为 2 μg 的模板用于 cDNA 合成。cDNA 合成与差减用 PCR-Select™ 试剂盒 (Clontech, Palo Alto, CA) 进行。该方法基于 Diatchenko et al., 1996, (同上) 所述的差减杂交法 (SSH)。整个方案显示在图 1 中。首先, 将来自三个分别生长在葡萄糖, 纤维素和 PCS 的里氏木霉 RutC30 发酵物的 mRNA 用 PCR-Select™ 试剂盒试剂 (Clontech, Palo Alto, CA) 转变成双链 cDNA。差异表达的 cDNAs 在“试验组”cDNA 库 (即, 来自纤维素或玉米杆的生长细胞) 和“驱动组”cDNA 库中都存在, 但在“驱动组”库中以低得多的丰度存在 (表 1)。这两个 cDNA 池用限制性酶 Rsa I 消化, 该限制性酶识别四碱基对回文结构, 产生平头末端 (GT|AC)。接着, 将试验组 cDNA 池分为两份, 与两种不同寡核苷酸衔接子 (由 Clontech PCR-Select™ 试剂盒提供) 连接, 形成两群试验组 cDNA。衔接子设计成没有 5'-磷酸基团以使只有每个衔接子的长链能与 cDNA 5' 端共价连接。

[0311] 在第一次两组杂交中, 在 Clontech PCR-Select™ 试剂盒说明的条件下, 将过量的驱动组 cDNA 加入至每份试验组 cDNA 中。混合物加热至 95°C 变性后退火。退火产生了四种类型分子 (称为 a, b, c, d 分子)。a 型分子包括等浓度的高、低丰度的 cDNAs, 因为 cDNA 池中高丰度分子的杂交二级动力学更快, 它们优先形成 b 型分子。同时, a 型分子中的差异表达 (例如纤维素或 PCS 诱导的差异表达) 序列被大量富集, 这是因为共有的非靶 cDNAs 与驱动组形成了 c 型分子。在第二次杂交中, 将两池初级杂交产物合并, 以使每试验组中 a 型分子能结合形成新类型 e 型杂交体。e 型杂交体是在两末端带有不同接头序列的双链试验组分子。再加入新变性驱动组 cDNA 以进一步富集差异表达序列 e 分子池。

[0312] SSH 方法最后一步, 用 PCR 将差异表达 cDNAs 选择性地扩增 (在 PCR-Select™ 试剂盒说明的条件下)。只有具有两个不同引物退火位点的 e 型分子才被指数性地扩增。

[0313] 作为质量检测, 将大约 360 个随机挑取的 cDNA 克隆用 Amersham TempliPhi 试剂盒滚环扩增纯化, 并进行 DNA 测序分析 (来自反应 1:70 个克隆, 来自反应 2:96 个克隆, 来自反应 3:192 个克隆)。TranscriptAssembler™ 软件 (Paracel, Inc., Pasadena, CA) 序列聚类分析显示, 每个池中都含有高百分比的非冗余克隆——反应 1 为 76%, 反应 2 为 290%, 反应 3 为 67%。另外, 该分析中鉴定的重叠群 (相同 cDNA 的交叉重叠序列) 平均只含有两个序列。总之, 这些结果表明文库在 SSH 反应中实现了充分的均一化, 从而在相应 cDNA 文库中产生了低冗余水平。这些差异表达序列在最后的差减 cDNA 库中被高度富集, 可用作杂交探针或产生差减文库。

[0314] SSH 方法产生的差减均一化 cDNA 片段与 pCRII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) 连接, 将连接混合物转化电感受态大肠杆菌 TOP10 细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。转

化体在含 250 μ g/ml X-Gal (不含 IPTG) 和终浓度 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板 (Miller, J.H.1992.A short course in bacterial genetics.A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria.Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) 上筛选。

[0315] 为了评估 SSH cDNA 文库的差减和均一化效果,使用下列两种方法:菌落杂交和对来自每个 SSH 文库的随机克隆测序。菌落杂交方法在 Birren et al.1998.Genome Analysis, A Laboratory Manual, Vol.2, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 中详细记载。菌落杂交分析包括来自每个差减 [PCS 减葡萄糖 (SG), 纤维素减葡萄糖 (CG), PCS 减纤维素 (SC)] 和未差减 (纤维素, PCS) cDNA 文库的约 700 个单独克隆和 DIG 标记的 cbh1 探针 (高丰度转录本) 及 γ -肌动蛋白探针——中丰度转录本,代表持家基因 (表 2)。

[0316] 表 2. SSH 文库用 cbh1 和 γ -肌动蛋白 cDNA 片段作为探针进行菌落杂交

[0317]

文库	cbh1 频率	γ -肌动蛋白频率
纤维素 (未 SSH)	3.3%	< 0.17%
PCS (未 SSH)	3.7%	0.13%
PCS 减葡萄糖 (SG)	0.4%	ND
纤维素减葡萄糖 (CG)	0.5%	ND
PCS 减纤维素 (SC)	0.1%	ND

[0318] ND:未检测到

[0319] 未差减的纤维素和 PCS 库中 cbh1 有相当的丰度 (分别 3.3% 和 3.6%), 而差减后的 SG 和 CG 库中 cbh1 克隆含量几乎降低 10 倍,表明高丰度转录本被成功均一化。SC 文库克隆杂交显示出低频率 cbh1 (只有 cbh1 克隆的 0.1%) 表明对高表达 cbh1 细胞群进行 SSH 时,该高丰度转录本进行了有效差减。

[0320] 将来自大约 360 个随机挑取的菌落的 cDNA 克隆用滚环扩增 (RCA) 纯化 (Dean et al, 2001, Genome Res. 11:1095-1099) 并进行 DNA 序列分析 (来自反应 1:70 个克隆, 来自反应 2:96 个克隆, 来自反应 3:192 个克隆)。Transcript Assembler™ 软件序列聚类分析显示,每个池中都含有高百分比的非冗余克隆——反应 1 为 76%, 反应 2 为 90%, 反应 3 为 67%。另外,该分析中鉴定的重叠群 (相同 cDNA 交叉重叠序列) 平均只含有两个序列。这些结果表明文库在 SSH 反应中实现了充分的均一化,从而在相应 cDNA 文库中产生了低冗余水平。

[0321] 实施例 16:DNA 微阵列的制造和使用

[0322] 从实施例 15 描述的差减均一化 cDNA 文库挑取总数 3,608 个白色和浅蓝色克隆。这些克隆在 96 孔板上补加有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中生长过夜后在 -80℃ 冷冻。用 Amersham 公司 TempiPhi™ 试剂 (Arlington Heights, IL) 对冷冻细胞中的质粒

DNA 进行滚环扩增 (Dean et al., 2001, Genome Res. 11 :1095-1099)。按制造商使用说明用 Beckman **Biomek**® Fx 机器 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) 对这些反应进行高通量处理。接着,用 Eisen and Brown, 1999, Methods Enzymol 303 :179-205 描述的设备和方法将扩增稀释的基因组克隆从 384 孔板点到聚-L-赖氨酸包被的玻璃显微载玻片中。

[0323] 实施例 17 :含基因沉默载体的里氏木霉株分析

[0324] 几个里氏木霉株 RNA 谱对比显示在下表 3 中。通过反转录总 RNA 并引入氨基烯丙基-dUTP 至先导链 cDNA 而制备荧光探针 (总 RNA 用可从 ActiveMotif, Carlsbad, CA 商业获得的 Fenozol 试剂制备)。氨基-cDNA 产物接着直接与 Cy3 或 Cy5 单功能反应染料 (Amersham, Arlington Heights, IL) 偶联而被标记,用前人描述的方法纯化 (Berka et al., 2003, Proc. Nat Acad Sci USA 100 :5682-5687)。将 Cy3 和 Cy5 标记的探针合并,纯化,真空干燥,重悬于 15.5 μ l 水中,并与下列合并:3.6 μ l 20X SSC, 2.5 μ l 250mM HEPES (pH7.0), 1.8 μ l 聚-dA (500 μ g/ml) 及 0.54 μ l 10% SDS。杂交之前,溶液用 0.22 μ m 滤膜过滤,加热至 95°C 2 分钟,冷却至室温。将探针加于微阵列,以玻片覆盖、置于加湿箱,并在 63°C 温育过夜 (15-16 小时)。在扫描之前,微阵列连续用 1X SSC+0.03% SDS, 0.2X SSC 及 0.05X SSC 洗涤,在大约 100xg 下离心 2 分钟以除去过量液体。

[0325] 微阵列玻片按制造商使用说明用 Axon 4000B 扫描仪成像 (MolecularDevicesCorp., Sunnyvale, CA)。计算微阵列阵点荧光强度值以及计算减去背景信号之后的每点 Cy5 对 Cy3 强度比值 (650nm : 532nm)。强度比值相对单位值变化达到二倍以上的那些点认为是有差异表达。

[0326] 表 3. 用 DNA 微阵列比较的里氏木霉 RNA 库

[0327]

实验号	Cy3 标记	说明	Cy5 标记	说明
1	SMA148-11-1-3	从携带抑制 <i>cbh2</i> mRNA 的基因沉默载体株分离的总 RNA	MJ09-4 (空载体)	从携带空载体的对照株分离的总 RNA
2	SaMe02	从 <i>cbh2</i> 缺失株分离的总 RNA	MJ09-4 (空载体)	从携带空载体的对照株分离的总 RNA
3	SaMe02	从 <i>cbh2</i> 缺失株分离的总 RNA	SMA148-11-1-3	从携带抑制 <i>cbh2</i> mRNA 的基因沉默载体株分离的总 RNA

[0328] 实验 1 和实验 3 中,总共有 72 个点被鉴定为满足荧光强度比变化两倍的标准,因此将它们归类为差异表达序列。DNA 序列分析显示,63/72 (88%) 对应为 *cbh2*- 特异转录本。剩余 9 个点对应未知或者是假定的基因序列。也可能这些点包含与 *cbh2* 密切相关的核苷酸序列或者编码保守的组件 (modules) 例如纤维素结合域的序列。与预期相反,含有基因沉默载体的菌株的 *cbh2*-mRNA 水平与对照株的相应 mRNA 水平相比似乎有提高。该结

果反应出这样一个事实:被基因沉默的转录本本身能杂交微阵列上的 cbh2 靶序列,由此造成 cbh2 特异 mRNA 水平在基因沉默株中有所增加的假象。然而,里氏木霉中的基因沉默效果显示出高度特异性,因为除了 cbh2 被影响以外,极少有(如果有一些的话)其他转录本/基因被影响。

[0329] 在实验 2 中,没有任何微阵列序列显示差异表达,表明 cbh2 特异的 RNA 序列仍然与对照株相似的水平在 cbh2 缺失株中表达。然而,应该注意这可能反映这样一个事实:里氏木霉 SaMe02 中发生的基因缺失/破坏事件没有除尽整个 cbh2 编码区。这样,菌株可能仍能制备可杂交微阵列上 cbh2 靶序列的截短转录本。

[0330] 实施例 18:小规模发酵中的 RNAi

[0331] 对几乎显示 cbh2mRNA 100%减少的转化体 11 和 14,按实施例 5 描述的方法进行 2 升发酵,确定基因沉默是否成功地在整个小规模发酵中保持。发酵也在宿主菌里氏木霉 RutC30 和用基因重组敲除 cbh2 基因的阳性对照株里氏木霉 SaMe02 上进行。纤维二糖水解酶 II 蛋白水平用实施例 12 所记载的 SDS-PAGE 分析定量。

[0332] 与宿主菌里氏木霉 RutC30 相比,纤维二糖水解酶 II 蛋白水平在转化体 11、14 以及里氏木霉 SaMe02 中显著地减少。

[0333] 实施例 19:Northern 印迹杂交检测里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 小干扰 RNA

[0334] 用 Northern 分析检测转化体 1,2,11,12,13,14 中里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 特异小干扰 RNA(siRNA) 是否存在。实施例 13 中所用的相同总 RNA 用于本实验。分离的总 RNA(25 μ g) 与 1 份 TBE- 尿素样品缓冲液(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 混合,65 $^{\circ}$ C 加热 15 分钟,之后,在 CriterionTM 电泳槽中的 CriterionTM 15% 聚丙烯酰胺-7M 尿素凝胶上(BioRad Laboratories, Hercules, CA) 用 1X TBE 电泳缓冲液(BioRad Laboratories, Hercules, CA) 进行电泳分级。接着, RNA 用 CriterionTM 印迹仪(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 在 0.5X TBE 转移缓冲液中(BioRad Laboratories, Hercules, CA) 50V 印迹 1 小时电印迹至 Zeta-Probe[®]GT 印迹膜上(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。印迹转移之后, RNA 在 Stratalink[®] 1800UV 交联仪中(Stratagene, La Jolla, CA) 用自动交联装置固定于膜。接着,将膜与 363bp 毛地黄毒苷标记的里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 单链 RNA 探针杂交,该探针按制造商提供的方法用 DIG RNA 标记试剂盒(Roche, Indianapolis, IN) 在毛地黄毒苷-11-dUTP 存在下通过体外转录里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 模板 DNA 合成。模板 DNA 用如下所示引物 998305(有义)和 998306(反义)从 pTr0749PCR 扩增代表整个双链 RNA 序列的 363bp 片段里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 编码区产生。有义引物设计为 5' 端有 XbaI 位点,反义引物设计为 5' 端有 HindIII 位点。

[0335] 引物 998305(有义):

[0336] 5' -CTAGTCTAGAGTCGCAAAGGTTCCC-3' (SEQ ID NO:31)

[0337] 引物 998306(反义):

[0338] 5' -GGGGGAAGCTTTGACTGAGCATT-3' (SEQ ID NO:32)

[0339] 扩增反应液(50 μ l) 由 1X ThermoPol 反应缓冲液,0.3mM dNTPs,10ngpTr0749,0.3 μ M 引物 998305,0.3 μ M 引物 998306,以及 2.5 单位 Taq 聚合酶构成。反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 仪上进行,程序如下:30 循环,每一循环 94 $^{\circ}$ C 30 秒,56 $^{\circ}$ C 30 秒,72 $^{\circ}$ C 30

秒（最后延伸 15 分钟）。反应产物用 TAE 缓冲液在 1.0% 琼脂糖凝胶上分离，其中从凝胶上剪出 383bp 产物条带按照制造商使用说明用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化。所得里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II PCR 片段用 Xba I 和 Hind III 消化之后按制造商提供的方法用 T4DNA 连接酶连接至 Xba I 和 Hind III 消化 pSPT19 载体中（RocheMolecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA）产生 pSMail63（图 8）。

[0340] 杂交在 DIG Easy Hyb 缓冲液（Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA）中 42℃ 下进行 15–17 小时。接着，膜在 2X SSC+0.1% SDS 的高严谨度条件下室温洗涤 5 分钟后，再在 42℃ 下 0.1X SSC+0.1% SDS 洗涤两次，每次各 15 分钟。探针-靶核酸杂交按制造商使用说明用化学发光分析（RocheMolecular Biochemicals, Indianapolis, IN）检测。

[0341] Northern 印迹分析显示，表达里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 反向重复片段的转化体生产出了约 21bp 的小干扰里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II RNA（图 9）。相同 RNAs 在含载体对照的转化体（即，里氏木霉 RutC30）或里氏木霉 SaMe02（其中里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 基因被同源重组敲除）中未检测出。这些结果表明，在里氏木霉中双链 RNA 所介导的里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 基因表达的调节中，涉及了小 RNAs 的产生，这些小 RNA 在参与 RNA 干扰的机制的预期大小范围内。

[0342] 实施例 20：里氏木霉沉默 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 转化体长期稳定性

[0343] 为了评估沉默里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 转化体的稳定性，将 6 个显示不同程度里氏木霉 Cel6A 纤维二糖水解酶 II 蛋白减少的转化体（#1, 2, 11, 12, 13, 14）、宿主菌株里氏木霉 RutC30 以及阳性对照菌株里氏木霉 SaMe02 的孢子在诱导条件下 pH 6.0 在纤维素诱导培养基中生长。在接种后 7 天，500 μ l 菌丝体用作新鲜纤维素诱导培养基摇瓶接种物。菌丝体总共传 5 代。收集每个转化体的每代上清液，按实施例 12 记载方法 SDS-PAGE 分析。如图 10 所示，所有转化体整个五代都保持该沉默。

[0344] 实施例 21：pAILo2 表达载体构建

[0345] 将 pAILo1 amdS 基因（实施例 1）用构巢曲霉 pyrG 基因交换。将质粒 pBANE10（图 11）作为选择标记 pyrG 基因的来源。pBANE10 序列分析显示，pyrG 标记包含在 Nsi I 限制性片段之内而不含有 Nco I 或 Pac I 限制性位点。由于 amdS 侧面也存在 Nsi I 限制性位点，所以改变选择标记策略只是 Nsi I 限制性片段简单交换。pAILo1 和 pBANE10 质粒 DNA Nsi I 消化，产物用琼脂糖凝胶电泳纯化。pBANE10 的含 pyrG 基因的 Nsi I 片段与 pAILo1 骨架连接，替换原含 amdS 基因的 Nsi I DNA 片段。重组克隆用限制性酶消化分析，确定它们具有正确的插入序列且插入方向正确。选择具有逆时针方向转录的 pyrG 基因的克隆。新质粒命名为 pAILo2（图 12）。

[0346] 实施例 22：pHB506 的构建

[0347] 从黑曲霉 JaL303-10 淀粉葡萄糖苷酶基因外显子 4 中 PCR 扩增两个片段，一个片段由 184bp 的反向重复序列（IR）组成，另一个 290bp 的片段含有相反方向的上述 184bp 序列和一个称为反向重复连接子（IR-L）的 106 接头区。（黑曲霉 NN049453 株原产自 20 世纪 60 年代从土壤分离的黑曲霉 C40 株，其中 NN049453 株通过突变增加了淀粉葡萄糖苷酶活性。黑曲霉 JaL303 株通过定点基因破坏导致黑曲霉 NN049453 中原有的三肽酰氨肽酶基因断裂而构建。黑曲霉 JaL303-10 是自发从含有 5-FOA 的琼脂分离的 JaL303pyrG 负型突变株）。

[0348] 200ng 基因组 DNA 用作模板,使用下列引物。有义引物设计为 5'端有 Nco I 位点,反义引物设计为 5'端也有 Nco I 位点。

[0349] 引物 997491(有义):

[0350] 5' -GGGGCCATGGTCCTGGTGTGATTCTCAGGCACCCGAAATTCTCTGC-3' (SEQ ID NO :33)

[0351] 引物 997492(反义):

[0352] 5' -GGGGGCGGCCGCAGCAGGGCTGGAAGGTGGAGTCGTCGCATG-3' (SEQ ID NO :34)

[0353] 将 400 μ l 黑曲霉 JaL303-10 孢子在挡板摇瓶中 50ml YP 培养基中 34℃,150rpm 下生长 18 小时。接着,按制造商的使用说明,用 DNeasy Plant Mini 试剂盒(QIAGEN Inc., Valencia, CA) 从菌丝体提取基因组 DNA。

[0354] 扩增反应液(50 μ l) 由 1X Pfx 反应缓冲液(Invitrogen, Carlsbad, CA), 100ng 黑曲霉 JaL303-10 基因组 DNA, 0.3 μ M 有义引物, 0.3 μ M 反义引物, 以及 2.5 单位 Pfx 聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA) 构成。反应在 EppendorfMastercycler 5333 仪上进行, 程序如下:30 循环, 每循环 94℃ 30 秒, 56℃ 30 秒, 72℃ 30 秒(最后延伸 15 分钟)。反应产物用 TAE 缓冲液在 1.0% 琼脂糖凝胶上分离, 其中从凝胶上剪切 184bp 产物条带按照制造商使用说明用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化。

[0355] 为了扩增反向上带有连接子序列的反向重复序列, 有义引物设计为在 5'端有 Pac I 位点在反义引物 5'端则有 Not I 位点。

[0356] 引物 997493(有义):

[0357] 5' -GGGGTTAATTAATCCTGGTGTGATTCTCAGGCACCCGAAATTCTC-3' (SEQ ID NO :35)

[0358] 引物 997494(反义):

[0359] 5' -GGGGGCGGCCGCTACCGACCCACCGCAACAGCCTCGCTGTCA-3' (SEQ ID NO :36)

[0360] 扩增反应(50 μ l) 按上文所述方法进行。反应产物用 TAE 缓冲液在 1.0% 琼脂糖凝胶上分离, 其中从凝胶上剪切 290bp 产物条带按照制造商的使用说明用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化。

[0361] 接着, 按制造商的使用说明, 将所得 290bp PCR 片段插入至 pTOPO Blunt(Invitrogen Carlsbad, CA) 以产生 pTOPO-IR-L。

[0362] 质粒 pTOPO-IR-L 用 Pac I 和 Not I 消化。在用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和上文所述 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化之后, 插入 pAILo2 相应限制性位点获得 pAILo2IR-L。消化 pTOPO-IR 分离得到 184bp 片段, 将其插入 Not I/NotI 消化的 pAILo2IR-L, 获得 pHB506(图 13)。

[0363] 实施例 23 :pHB506 转化至黑曲霉 JaL303-10

[0364] 黑曲霉 JaL303-10 的原生质体用实施例 11 记载的改进方法制备。原生质体用血球计数仪计数, 在 STC 中重悬至终浓度每 ml STC 1×10^7 原生质体。多余原生质体 -80℃ 储存于 Cryo 1℃ Freezing Container 中(Nalgene, Rochester, NY)。

[0365] 黑曲霉 JaL303-10 的原生质体用 pHB506 和 pAILo2(对照) 的转化, 用实施例 11 中的方法进行, 并有下列改变。将约 7 μ g pHB506 或 pAILo2 加入至 100 μ l 原生质溶液, 轻轻混合。加入 PEG 缓冲液(250 μ l), 混合, 室温温育 30 分钟。接着加入 STC(3ml), 混合, 置于基础培养基板。该板 34℃ 温育 5-7 天。

[0366] 获得约 70 个转化体。该 70 个转化体的孢子在基础培养基板上划线培养, 34℃ 温

育 6 天,获得原代转化体。

[0367] 接着,将原代转化体与转化有 pAILo2 的黑曲霉 JaL303-10 一起,进行平板分析,用麦芽糖作为底物检测葡萄糖淀粉酶活性。葡萄糖的释放用偶联葡萄糖氧化酶/辣根过氧化物酶/ABTS(2,2'-连氮-双(3-乙苯噻唑啉-6-磺酸))分析产生紫色来确定。所有试剂来自 Sigma Chemical Company, St. Louis, MO。含有 20% Noble 琼脂的 M400 培养基高压灭菌,冷却至 50℃时,加入 50ml 20%麦芽糖(过滤灭菌),3ml 2.65% w/v ABTS 储存液,以及 2ml HRP 储存液(每 ml 0.1M 乙酸钠 pH 5.0 含有 100U 辣根过氧化物酶)。将 2ml 培养基加入至 12 孔细胞培养板的每个孔中。该板用金属箔包裹或者放在遮光箱中,4℃储存。用接种环转移每个原代转化体孢子至分析孔。平板用金属箔包裹,34℃温育 1-2 天。接着,将葡萄糖氧化酶溶液(每 ml 0.1M 乙酸钠 pH5.0 含有 1.5U 葡萄糖氧化酶)喷于板上之后,将板用金属箔包裹,34℃温育 1-2 小时。葡萄糖淀粉酶活性通过菌落光圈颜色强度所指示的 ABTS 氧化程度来确定。

[0368] 温育之后,结果显示各个转化体的颜色强度的紫色深浅不同,转化有 pAILo2 的黑曲霉 JaL303-10 最暗,有几个转化体几乎没有或根本没有显示葡萄糖淀粉酶活性。

[0369] 实施例 24:转化体摇瓶分析

[0370] 在实施例 23 所记载色度筛选的基础上,将来自 8 个转化体菌落的孢子在基础培养基平板上划线培养。基于色度平板分析,选择 4 个几乎不显示或根本不显示葡萄糖淀粉酶活性的转化体和 4 个随机选择的可产生不同淀粉葡萄糖酶活性的转化体在摇瓶中生长。上述转化体与根据 WO 04/090155 所制备的葡萄糖淀粉酶及中性淀粉酶缺失黑曲霉 HowB112,黑曲霉 JaL303-10,以及转化有 pAILo2 的黑曲霉 JaL303-10 一起在含 M400 培养基的摇瓶中生长。

[0371] 用上述生长在基础培养基平板上的每个黑曲霉转化体和对照株孢子接种含有 25ml M400 培养基的摇瓶(125ml,带挡板),200rpm,34℃下温育 3 天。在接种后 3 天取培养液样品,微离心管 15,700xg 离心 5 分钟。上清液转移至新管,4℃储存直到进行 SDS-PAGE 分析。

[0372] SDS-PAGE 在 The Criterion™ 电泳槽中的 Criterion™ Tris-HCl 凝胶上进行。将 5 μl 培养 3 天的样品在 5% β-巯基乙醇存在下悬浮于 2X 浓度 Laemmli 样品缓冲液(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA),煮沸 3 分钟。样品加载至 SDS-PAGE 凝胶,在 1X Tris/甘氨酸/SDS 电泳缓冲液中(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)进行电泳。所得凝胶用 Bio-Safe™ 考马斯亮蓝染料(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)染色。

[0373] SDS-PAGE 结果(图 14)显示存在两蛋白:在约 125kDa 的主条带被认为是前体,75kDa 的较分散条带(或多个条带)已知是加工过的酶。这些蛋白条带在转化有 pAILo2 的黑曲霉 JaL303-10 中出现。与之对照,葡萄糖淀粉酶基因缺失株黑曲霉 HowB112 中没有出现上述条带。所选择的转化体生产这两种蛋白的量较少。代表随机选择株的转化体 1-4 生产出相当量的葡萄糖淀粉酶,而平板筛选测量确定的葡萄糖淀粉酶缺失株转化体 5-8 则不产生可检测到的葡萄糖淀粉酶。这些结果表明黑曲霉葡萄糖淀粉酶的表达由于 RNAi 而被抑制。

[0374] 实施例 25:pHUda512 表达载体的构建

[0375] 为了源自黑曲霉 NN049735 的淀粉葡萄糖苷酶基因双链 RNA 的转录,构建 pHUda512

表达载体。黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶基因 cDNA 序列,及黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶基因的 cDNA 克隆的生产在 W000/004136 中有记载。用黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶基因 cDNA 克隆作为模板,用 Expand™ PCR 系统 (Roche Diagnostics, Japan) 进行 PCR 反应,和如下所示用引物 HU704 引入 BglIII, Kpn I, 和 Xho I 位点及用引物 HU705 引入 BamH I 位点。

[0376] HU704 :5' -TTTAGATCTCTCGAGGTACCAAATGTGATTTCCAAGCGCGCG-3' (SEQ IDNO : 37)

[0377] HU705 :5' -TTTGGATCCAAGAGATCGACGAGGGTCTTG-3' (SEQ ID NO :38)

[0378] 扩增反应液 (50 μl) 由在 1X 缓冲液中 (Roche Diagnostics, Japan) 的每 μl 1ng 模板 DNA, 每种 dNTP 各 250mM, 250nM 引物 HU704, 250nM 引物 HU705, 以及每 μl 0.1U Taq 聚合酶构成。反应在 DNA EnginePTC-200 (MJ-Research, Japan) 仪上进行, 程序如下: 1 循环, 94℃, 2 分钟; 30 循环, 每循环 92℃ 1 分钟, 55℃ 1 分钟, 和 1 循环, 72℃, 1 分钟; 1 循环, 72℃, 10 分钟; 以及 4℃ 保温。反应产物用 TAE 缓冲液在 1.0% 琼脂糖凝胶上分离, 其中从凝胶上剪切 213bp 产物条带按制造商使用说明用 QIAquick™ 凝胶提取试剂盒 (QIAGEN Inc., Valencia, CA) 纯化。

[0379] 将 213bp 扩增 DNA 片段用 Bgl II 和 BamH I 消化, 连接至 BamH I 消化的 pMT2188 (W03/089648) 中。将连接混合物转化入大肠杆菌 DB6507 (ATCC 35673) 中, 用酿酒酵母 URA 3 基因作选择标记, 产生表达质粒 pHUda508。扩增质粒按制造商使用说明用 QIAprep® Spin Miniprep 试剂盒 (QIAGEN Inc., Valencia, CA) 回收。

[0380] 质粒 pMT2188 包括一个基于下列元件的表达框: 与构巢曲霉丙糖磷酸异构酶非翻译前导序列融合的黑曲霉中性淀粉酶 II 启动子 (Na2/tpi 启动子), 和黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶终止子 (AMG 终止子), 提供在乙酰胺唯一氮源上生长能力的构巢曲霉选择标记 amdS, 以及能使 pyrF 缺陷大肠杆菌株 DB6507 生长的酿酒酵母 URA3 标记。

[0381] 用黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶基因 cDNA 克隆作为模板, 用 Expand™ PCR 系统进行单独的 PCR 和如下所示引物 HU704 以引入 BglIII, Kpn I, 和 Xho I 位点及引物 HU706 以引入 BamH I 位点。

[0382] HU704 :5' -TTTAGATCTCTCGAGGTACCAAATGTGATTTCCAAGCGCGCG-3' (SEQ IDNO : 39)

[0383] HU706 :5' -TTTGGATCCTAGGCAGTCTCATCGACATTG-3' (SEQ ID NO :40)

[0384] 扩增反应液 (50 μl) 由在 1X 缓冲液 (Roche Diagnostics, Japan) 中的每 μl 1ng 模板 DNA, 每种 dNTPs 各 250mM, 250nM 引物 HU704, 250nM 引物 HU706, 以及每 μl 0.1U Taq 聚合酶构成。反应在 DNA Engine PTC-200 仪上进行, 程序如下: 1 循环, 94℃, 2 分钟; 30 循环, 每循环 92℃ 1 分钟, 55℃ 1 分钟, 以及 1 循环, 72℃, 1 分钟; 1 循环, 72℃, 10 分钟; 以及 4℃ 保温。

[0385] 反应产物用 TAE 缓冲液在 1.0% 琼脂糖凝胶上分离, 其中从凝胶上剪切 366bp 产物条带按制造商的使用说明用 QIAquick™ Gel 提取试剂盒 (QIAGEN Inc., Valencia, CA) 纯化。

[0386] 366bp 扩增 DNA 片段用 Xho I 和 BamH I 消化, 连接至 BamH I 和 Xho I 消化的 pHUda508。将连接混合物转化大肠杆菌 DB6507 (ATCC 35673), 产生含有 213bp 源自黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶编码区的反向重复序列的表达质粒 pHUda512 (图 15)。按制造商的使用说

明用QIAprep® Spin Miniprep 试剂盒回收扩增质粒。

[0387] 实施例 26 :黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶基因双链 RNA 的表达

[0388] 黑曲霉株 NN049735 可生产黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶,以及黑曲霉酸稳定性 α -淀粉酶与源自川地曲霉 (*Aspergillus kawachii*) 酸稳定性 α -淀粉酶的糖结合组件 (carbohydrate-binding module) 杂合的杂合酶。

[0389] 将黑曲霉 NN049735 在 120rpm 旋转摇床,100ml 非选择 YPG 培养基中 32℃ 培养 16 小时。过滤收集细胞,0.6M KCl 洗涤,重悬于 20ml 含终浓度 600 μ l/ml β -葡聚糖酶 (GLUCANEX™, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) 的 0.6M KCl 中。重悬液在 32℃,80rpm 下温育直到形成原生质体,接着用 STC 缓冲液洗涤两次。原生质体用血球计数仪计数,在 8 : 2 : 0.1 的 STC : STPC : DMSO 溶液重悬调整至终浓度 2.5×10^7 原生质体 /ml。将约 3 μ g pHda512 加至 100 μ l 原生质体悬液,轻柔混合,冰上保温 20 分钟。加入 1ml SPTC,原生质体悬液 37℃ 温育 30 分钟。在加入 10ml 50℃ COVE 上层琼脂糖之后,将反应液倾倒入 COVE 琼脂板上,板于 32℃ 温育。5 天后,从 COVE 培养基筛选转化体。

[0390] 将 8 个随机选择的转化体接种于 100ml MLC 培养基,30℃ 培养 2 天。接着,将 10ml MLC 培养基接种于 100ml MU-1 培养基,30℃ 培养 7 天。3,000xg 离心 10 分钟获取上清液。

[0391] 上清液样品的葡萄糖淀粉酶活性,表现为葡萄糖脱氢酶和变旋酶与所产生的葡萄糖反应而导致 NADH 产量增加,通过测量 340nm 处的吸收度而确定。将 6 μ l 溶解于 100mM pH4.3 乙酸钠缓冲液的酶样品与 31 μ l 23.2mM 溶解于 100mM pH4.3 乙酸钠缓冲液的麦芽糖混合,37℃ 温育 5 分钟。接着,将 313 μ l 颜色试剂 (430U/ 升葡萄糖脱氢酶,9U/ 升变旋酶,0.21mM NAD,以及 0.15M NaCl 溶于 0.12M pH7.6 磷酸缓冲液) 加至反应混合液,37℃ 温育 5 分钟。活性用分光光度计在 340nm 处测量。6 μ l 去离子水替换酶样品用作对照。

[0392] 葡萄糖淀粉酶活性以淀粉葡萄糖苷酶单位 (AGU) 计算,该单位是相对于获自 Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark 的酶标准品而确定的。一个 AGU 是指在 37℃ 下,23.2mM 溶解于 0.1M pH4.3 乙酸钠缓冲液的麦芽糖中,每分钟水解 1 微摩尔麦芽糖所需要的酶量。

[0393] 上清液样品中的酸稳定性 α -淀粉酶活性,通过在 590nm 处测量淀粉-碘复合物蓝色减少来确定。将 25 μ l 溶解于含有 51.4mM 氯化钙的 2mM pH2.5 柠檬酸缓冲液中的酶样品与 135 μ l 每升含 0.6g 可溶淀粉 (Merck 1253, Germany) 和 12g 乙酸钠的 100mM pH2.5 柠檬酸钠缓冲液混合,37℃ 温育 325 秒。在 325 秒之后,将 90 μ l 碘溶液 (每升溶液中含 1.2g 碘化钾和 0.12g 碘) 加至反应混合液,37℃ 温育 25 秒。活性用分光光度计在 590nm 处测量。25 μ l 去离子水替代酶样品用作对照。

[0394] 酸稳定性 α -淀粉酶活性以 AFAU (酸性真菌 α -淀粉酶单位) 计算,该单位相对于获自 Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark 的酶标准品而确定。一个 FAU 是指在上述条件下每小时降解 5.260mg 淀粉干物质所需的酶量。

[0395] 表 2 显示了相对于宿主菌株黑曲霉 NN049735,所选转化体淀粉葡萄糖苷酶和酸稳定性 α -淀粉酶的活性。宿主菌株活性均一化为 1.0。结果显示与宿主菌黑曲霉 NN049735 相比,这些转化体淀粉葡萄糖苷酶活性减少与酸稳定性 α -淀粉酶活性增加同时发生。

[0396] 表 2. 所选转化体摇瓶结果

[0397]

菌株	黑曲霉 AMG (AGU/ml)相对活性	酸 稳 定 性 α - 淀 粉 酶 (AFAU/ml) 相对活性
#5	0.01	1.43
#19	0.03	1.57
#20	0.01	1.23
#50	0.02	1.37
#64	0.05	1.34
#65	0.01	0.97
#77	0.04	1.46
#97	0.01	1.23
NN049735	1.0	1.00

[0398] 用 e-PAGEL 凝胶 E-T 7.5L(ATFO Corporation, Japan) 进行 SDS-PAGE 分析。将 10 μ l 培养 7 天的样品悬浮于 2X 浓度样品缓冲液 (1% SDS, 1% β - 巯基乙醇, 1mg/ml 溴酚蓝, 10% 甘油, 和 50mM pH 6.8 Tris-HCl) 中, 煮沸 5 分钟。将样品加载至 e-PAGEL 凝胶, 在 1X Tris/ 甘氨酸 /SDS 电泳缓冲液 (25mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 192mM 甘氨酸) 20mA 下电泳 90 分钟。所得凝胶 (图 16) 用染色液 (1g/L 考马斯亮蓝, 10% 乙酸, 30% 甲醇) 染色 30 分钟, 之后用脱色液 (10% 乙酸, 30% 甲醇) 脱色直到条带可见。

[0399] 在黑曲霉 NN049735 中, 在约 100kDa 和 80kDa 出现了分别相应于黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶和黑曲霉酸稳定性 α - 淀粉酶融合蛋白融合酶的主条带。与之相对照, 所选转化体产生更少量的黑曲霉淀粉葡萄糖苷酶带, 以及更多量的黑曲霉酸稳定性 α - 淀粉酶融合蛋白带。

[0400] 实施例 27 : 筛选形态突变子

[0401] 通过将 W098/11203 (实施例 5) 所述的“e”库和“b”库铺于 CM-1 琼脂平板, 在 34°C 下温育 4 天, 以从库中筛选形态改变菌落。将库中平板形态改变的菌落转移至新鲜 CM-1 琼脂平板 34°C 温育 5 天以作单菌落分离。将平板上每个形态突变子从单菌落转移至 CM-1 板和 PDA 板中心, 34°C 温育 6-8 天, 之后进行形态评估, 即直径、外观。将总共 218 个形态突变子转移至 COVE2 板, 34°C 温育 1-2 周产生孢子。一个产生白色孢子的突变子被鉴定, 命名为米曲霉 P2-5.1。

[0402] 实施例 28 : 从形态突变米曲霉 P2-5.1 株中拯救 (rescue) 与鉴定质粒 DNA 及侧翼 DNA

[0403] 从突变米曲霉 P2-5.1 中分离质粒 DNA 及侧翼基因组座位, 所用方法除了限制性内切核酸酶以外都使用 W098/11203 (实施例 9) 中所记载的程序。分离了含有源自突变米曲霉 P2-5.1 的 Bgl II 拯救座位的大肠杆菌 HB101 转化体。

[0404] 对于在整合事件的任一侧含有 535 和 750bp 区域的米曲霉 P2-5.1 拯救座位, 用 M13 逆向 (-48) 与 M13 正向 (-20) 引物 (New England Biolabs, Beverly, MA) 以及对被测序 DNA 特异的引物, 采用染色终止化学引物游走技术 (Giesecke et al, 1992, Journal of Virol. Methods 38:47-60) 用 Applied Biosystems Model 373A 自动 DNA 测序仪 (Applied

Biosystems, Inc., Foster City, CA) 对双链进行测序。选择一个代表被拯救的 wA 基因的一个侧翼的 400bp 核酸序列 (SEQ ID NO :41) 作为构建反向重复的模板。该核酸序列表明整合发生在一个烟曲霉 wA 基因 (登录号 Y17317) 的同源类似物的开放阅读框。400bp 的拯救座位片段与烟曲霉 wA 基因序列相比有 74% 核酸同源性, 与烟曲霉 wA 基因的推定氨基酸序列相比, 其推定氨基酸序列 (SEQ ID NO :42) 有 71% 的相同性。wA 基因在野生孢子中编码参与绿色素合成的聚酮合酶 (polyketide synthetase)。该基因突变导致产生缺乏色素而呈白色的孢子。已知构巢曲霉 wA 基因破坏将改变孢子颜色为白色 (Mayorga and Timberlak, 1992, Mol. Gen. Genet 235 :205-212), 在米曲霉 P2-5.1 中观察到了该表型。

[0405] 实施例 29 :pDeMi01 的构建

[0406] 为了表达源自米曲霉 wA 基因的 dsRNA, 用如下所示带有 Not I 限制性位点的有义链引物及带有 5' Nhe I 限制性位点的反义引物 PCR 扩增 wA 基因开放阅读框内的反向重复序列的整个一半, 共 175 个碱基对的序列进行 PCR 扩增。

[0407] 有义 :

[0408] 5' -GGGGGCGGCCGCAGCACTTCGATTGCATTAGTCAAAA-3' (SEQ ID NO :43)

[0409] 反义 :

[0410] 5' -GGGGGCTAGCAGAACGAACGCAGGTTTTAT-3' (SEQ ID NO :44)

[0411] 扩增反应液 (50 μ l) 由 1X Pfx 反应缓冲液, 100ng 米曲霉 P2-5.1 基因组 DNA (用 DNeasy Plant Maxi 试剂盒分离), 0.3mM dNTPs, 0.3 μ M 有义引物, 0.3 μ M 反义引物, 以及 2.5 单位 Pfx 聚合酶构成。反应在 Eppendorf Mastercycler 5333 仪上进行, 程序如下 :30 循环, 每循环 94°C 30 秒, 58°C 60 秒, 72°C 1 分钟 (最后延伸 15 分钟)。反应产物用 TAE 缓冲液 1.0% 琼脂糖凝胶分离, 其中从凝胶剪切 175bp 产物条带按制造商的使用说明用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化。

[0412] 包括 103 碱基对间隔序列的反向重复序列的另一半, 则用上文的有义引物及下文所示引物 5' 端带有 Nhe I 限制性位点的反义引物扩增。

[0413] 反义 :

[0414] 5' -GGGGGCTAGCGGGTAGCCCGACGGCCACAAAGG-3' (SEQ ID NO :45)

[0415] 扩增反应 (50 μ l) 在 1X Pfx 反应缓冲液, 0.3mM dNTPs, 100ng 米曲霉 P2-5.1 基因组 DNA, 0.3 μ M 有义引物, 0.3 μ M 反义引物, 以及 2.5 单位 Pfx 聚合酶中进行。反应系统在 Eppendorf Mastercycler 5333 仪上保温, 程序如下 :30 循环, 每循环 94°C 30 秒, 58°C 45 秒, 72°C 1 分钟, 以及最后延伸 15 分钟。反应产物用 TAE 缓冲液 1.0% 琼脂糖凝胶分离, 其中从凝胶剪切 273bp 产物条带, 按制造商使用说明用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化。

[0416] 两 PCR 产物用 Nhe I 消化。将 273bp 的重复 + 间隔序列与 175bp 的重复序列混合, 在制造商所说明的条件下, 用 T4DNA 连接酶将其连接。连接产物用 1.5% 琼脂糖凝胶分离。用 Qiaex II DNA Purification 试剂盒 (QIAGEN Inc., Valencia, CA) 凝胶分离得到 448bp 的反向重复相应片段, 之后用 Not I 消化。为了驱动反向重复序列的转录, 使用在 Not I 位点直接上游含有 NA2-tpi 启动子的质粒 pBANe6 (U. S. Patent 6, 461, 837)。质粒用 Not I 消化并用虾碱性磷酸酶 (Roche, Indianapolis, IN) 去磷酸化。去磷酸化线性质粒与 448bp 反向重复片段混合, 在 14°C 下用 T4DNA 连接酶连接进行 16 小时。按制造商的使用说明将 2 μ l 连接混合物转化感受态大肠杆菌 SURE 细胞 (Stratagene, La Jolla, CA)。

[0417] 从几个转化体中回收质粒 DNA, Not I 消化, 用如上所述 1.5% 琼脂糖凝胶分离检测。DNA 序列分析证实, 含有约 500bp 单个片段的转化体由 175bp 重复片段与方向相反的 175bp 重复片段组成, 二者被 103bp 的间隔序列所隔离。一个分离质粒命名为 pDeMi0 (图 17)。

[0418] 实施例 30: 米曲霉的转化及转化体分析

[0419] 用 5 μ g pDeMi01 或 pBANE6 转化从米曲霉 Ja1250 株 (W0 98/11203) 所制备的原生质体, 利用在乙酰胺上是否生长进行选择。在乙酰胺上生长需要 pDeMi01 中 amdS 基因的表达。转化按 W0 98/11203 记载的方法进行 (实施例 2)。34°C 温育 30 分钟后, 在原生质体/DNA 混合物中加入 3ml STC, 涂布于补加有 10mM 尿苷的 COVE 平板。接着, 将平板在 34°C 温育 6 天。

[0420] pDeMi01 或 pBANE6 获得约 50 个转化体。所有 pBANE6 转化体具有野生型米曲霉的特征性的深绿色孢子。相反, pDeMi01 转化体所产生颜色从浅黄到深绿。结果表明, 反向重复序列在转录时形成了诱导基因特异性 RNAi 的发夹 dsRNA。孢子颜色有差异, 可能是由于质粒染色体整合位点不同而导致反向重复序列转录有差异的结果。

[0421] 8 个 pDeMi01 原代转化体和 1 个 pBANE6 转化体在补加有 10mM 尿苷的 COVE2 平板上划线培养。所有 pBANE6 克隆出现一致的深绿色。相反, pDeMi01 转化体菌落的孢子颜色不一致。接下来的孢子纯化产生了一致的孢子颜色。将来自 pDeMi01 或 pBANE6 转化平板的孢子悬浮于水中, 置于玻片用光学显微镜观察。pBANE8 对照株孢子仍保持绿色, 而 pDeMi01 转化体孢子则呈现 RNA 干扰失活结果所预期的无色。

[0422] 本文记载及要求保护的发明并不受本文公开特定具体实施方式范围的限制, 因为这些具体实施方式认为是发明几个具体方面的例证。任何等价的具体实施方式认为都在本发明范围之内。实际上, 根据先前记载, 除了本文所显示和记载的那些以外, 本发明的各种修饰发明对本领域技术人员来说是显而易见的。这样的修饰发明也落在本申请附加权利要求的范围之内。在抵触情况下, 可比对包括定义在内的本发明当前公开。

[0423] 本文中引用各种参考文献, 这些文献的公开整个并入本文作为参考。

[0001]

序列表

<110>	诺维信股份有限公司 (NOVOZYMES INC.) 诺维信公司 (NOVOZYMES A/S)	
<120>	消除或减少丝状真菌菌株基因表达的方法	
<130>	10346.204-W0	
<150>	60/528,367	
<151>	2003-12-09	
<160>	42	
<170>	PatentIn version 3.2	
<210>	1	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	构巢曲霉 (Aspergillus nidulens)	
<400>	1	
	gtgccccatg atacgcctcc gg	22
<210>	2	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	构巢曲霉 (Aspergillus nidulens)	
<400>	2	
	gagtcgtatt tccaagctc ctgacc	26
<210>	3	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	构巢曲霉 (Aspergillus nidulens)	
<400>	3	
	ggaggccatg aagtggacca acgg	24
<210>	4	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉 (Aspergillus niger)	
<400>	4	
	caccgtgaaa gccatgctct ttccttcgtg tagaagacca gacag	45
<210>	5	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉 (Aspergillus niger)	
<400>	5	
	ctgggtctct acacgaagga aagagcatgg ctttcacggt gtctg	45
<210>	6	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉 (Aspergillus niger)	
<400>	6	
	ctatatcac aactggattt accatgggcc cgcggccgca gatc	44
<210>	7	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉 (Aspergillus niger)	
<400>	7	
	gactcgggc cgcgggccc tggtaaacc agtctgtat atag	44

[0002]

<210> 8	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 8	
aacgttaatt aaggaatcgt tttgtgttt	29
<210> 9	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 9	
agtactagta gctccgtggc gaaagcctg	29
<210> 10	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 10	
actagtcgac cgaatgtagg attgtt	26
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 11	
tgaccatggt gcgcagtcc	19
<210> 12	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 12	
cgatcgtctc cctatgggtc attacc	26
<210> 13	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 13	
actagttaat taagtcctgt ggcgaaag	28
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	
<400> 14	
taatacgact cactataggg	20
<210> 15	
<211> 1416	
<212> DNA	
<213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 15	
atgattgtcg gcattctcac cacgtggct acgtggcca cactcgcage tagtgtgcct	60
ctagaggagc ggcaagcttg ctcaagcgtc tggggccaat gtggtggcca gaattggteg	120
ggtcgcgactt gctgtgtctc cggaagcaca tgcgtctact ccaacgacta ttactcccag	180

[0003]

```

tgttctcccg gcgctgcaag ctcaagctcg tccacgcgcg cggcgctgac gaattctega 240
glalecccca caacatcccg gtcgagctcc ggcagcctc cacciggttc tactactacc 300
agagtacctc cagtcggatc gggaaccgct acgtattcag gcaacctttt tgttggggtc 360
actccttggg ccaatgcata ttacgcctct gaagttagca gcctcgctat tcctagcttg 420
actggagcca tggccactgc tgcagcagct gtgcgaaagg ttccctcttt tatgtggcta 480
galactcttg acaagacccc tcctatggag caaaccttgg ccgacatccg caccgccaac 540
aagaatggcg gtaactatgc cggacagttt gtggtgtatg acttgccgga tcgcgattgc 600
gtcgcccttg cctcgantgg cgaatactct attgccgatg gtggcgctgc caaatataag 660
aactatatcg acaccattcg tcaaatgtc gtggaatatt ccgatatccg gacctctctg 720
gltatlgagc ctgactctct tgccaacctg gtagccaacc tcgglaacct aaagtgtgcc 780
aatgctcagt cagcctacct tgagtgcac aactacgcg tcacacagct gaaccttcca 840
aatgttgcga tgtatttga cgtggccat gcaggatggc ttgctgtgcc ggcaaaccaa 900
gaccggcgcg ctcagetatt tgcaaatgtt tacaagaatg catcgtctcc gagagctctt 960
cgcggattgg caaccaatgt cgccaactac aacgggtgga acattaccag cccccatcg 1020
tacacgcaag gcaacgctgt ctacaacgag aagctgtaca tccacgctat tggacctctt 1080
cttgcgaatc acggctggtc caacgccttc ttcacactg atcaaggctc atcgggaaaag 1140
cagcctaccg gacagcaaca gtggggagac tgggtgcaatg tgatcggcac cggatttggc 1200
attcgcccat ccgcaaacac tggggactcg ttgtggatt cgtttgtctg ggtcaageca 1260
ggcggcgagt gtgacggcac cagcgacagc agtgcgcac gatttgactc ccactgtgcg 1320
ctcccagatg ccttgcaacc ggcgcctcaa gctggtgctt ggttccaagc ctactttgtg 1380
cagcttctca caaacgcaaa ccatcgcttc ctgtaa 1416

```

<210> 16
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> 里氏木霉(*Trichoderma reesei*)

<400> 16

```

Met Ile Val Gly Ile Leu Thr Thr Leu Ala Thr Leu Ala Thr Leu Ala
1           5           10           15

Ala Ser Val Pro Leu Glu Glu Arg Gln Ala Cys Ser Ser Val Trp Gly
20           25           30

Gln Cys Gly Gly Gln Asn Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Ala Ser Gly
35           40           45

Ser Thr Cys Val Tyr Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly
50           55           60

Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Thr Arg Ala Ala Ser Thr Thr Ser Arg
65           70           75           80

Val Ser Pro Thr Thr Ser Arg Ser Ser Ser Ala Thr Pro Pro Pro Gly
85           90           95

Ser Thr Thr Thr Arg Val Pro Pro Val Gly Ser Gly Thr Ala Thr Tyr
100          105          110

Ser Gly Asn Pro Phe Val Gly Val Thr Pro Trp Ala Asn Ala Tyr Tyr
115          120          125

Ala Ser Glu Val Ser Ser Leu Ala Ile Pro Ser Leu Thr Gly Ala Met
130          135          140

```

[0004]

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

<210> 17
<211> 37
<212> DNA
<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

<400> 17
ggaattctag ttcttatatt tggcgacgcc accatct

37

<210> 18
<211> 36
<212> DNA
<213> 里氏木霉(Trichoderma reesei)

[0005]

<400> 18 catgccatgg aaaggttccc tcttttatgt ggctag	36
<210> 19 <211> 36 <212> DNA <213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 19 ggaattctga ctgagcattg gcacactttg gactac	36
<210> 20 <211> 36 <212> DNA <213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 20 ccttaattaa aaaggttccc tcttttatgt ggctag	36
<210> 21 <211> 20 <212> DNA <213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 21 aaatcgtggc gcactgctgt	20
<210> 22 <211> 20 <212> DNA <213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 22 tgagtgcac aactacgccg	20
<210> 23 <211> 20 <212> DNA <213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 23 gtcaacacga cgaatggcgt	20
<210> 24 <211> 21 <212> DNA <213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 24 tgatcgggat gggtcagaag g	21
<210> 25 <211> 21 <212> DNA <213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 25 ctggtccaac gccttttca t	21
<210> 26 <211> 22 <212> DNA <213> 里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400> 26 ggaacgtagt gaggtcgt aa	22

[0006]

<210>	27	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400>	27	
	catggctggt cgtgatctta cc	22
<210>	28	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400>	28	
	ccttgatgtc acggacgatt tc	22
<210>	29	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400>	29	
	ccagacatga caatgttgcc gtag	24
<210>	30	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400>	30	
	tttcgctett cctcagcca ttg	23
<210>	31	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400>	31	
	ctagtctaga gtcgcaaagg ttccc	25
<210>	32	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	里氏木霉(<i>Trichoderma reesei</i>)	
<400>	32	
	gggggaagct ttgactgagc att	23
<210>	33	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	
<400>	33	
	ggggccatgg tectgggtg attctcaggc acccgaaatt ctctgc	46
<210>	34	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	
<400>	34	
	gggggcggcc gcagcagggc tggaaggtag agtcgtcgca tg	42
<210>	35	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	

[0007]

<400> 35 ggggttaatt aatcctgggtg tgattctcag gcacccgaaa ttctc	45
<210> 36 <211> 42 <212> DNA <213> 黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	
<400> 36 gggggcggcc gctaccgacc caccgcaaca gectcgtgt ca	42
<210> 37 <211> 42 <212> DNA <213> 黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	
<400> 37 tttagatctc tcgaggtacc aaatgtgatt tccaagcgcg cg	42
<210> 38 <211> 30 <212> DNA <213> 黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	
<400> 38 tttggatcca agagatcgac gagggtcttg	30
<210> 39 <211> 42 <212> DNA <213> 黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	
<400> 39 tttagatctc tcgaggtacc aaatgtgatt tccaagcgcg cg	42
<210> 40 <211> 30 <212> DNA <213> 黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	
<400> 40 tttggatcct aggcagtctc atcgacattg	30
<210> 41 <211> 400 <212> DNA <213> 米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>)	
<220> <221> misc_feature <222> (265).. (265) <223> N=A, C, G, 或 T	
<400> 41 ggaaggcaac tatacgaaaa atgcctcaca ttccgggcaa caatgcagca cttcgattgc	60
attagtcaaa accaagggtt tcttcgac ctcccttgg ttgacggaag cgtgcccggtg	120
gaggagctgg gccctatcgt gacacagctc ggcaccacat gtcttcagat ggctttggtc	180
aactattggg gttcactagg tataaaacct gcgttcgttc ttgggcatag tctcggggag	240
tttgcgtgtt tgaataccgc aggantatta tcgacttccg ataccatcta cctttgtggc	300
cgtcgggcta cctccttac agaatactgc caggttggga cacacgcat gctggctgtc	360
aaggttcctt acccccaggt caagcagtta ctgaaagaaa	400
<210> 42	

[0008]

<211> 133
<212> PRT
<213> 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89).. (89)
<223> XAA=任何氨基酸

<400> 42

Gly Arg Gln Leu Tyr Glu Lys Cys Ser Gln Phe Arg Ala Thr Met Gln
1 5 10 15

His Phe Asp Cys Ile Ser Gln Asn Gln Gly Phe Pro Ser Ile Leu Pro
20 25 30

Leu Val Asp Gly Ser Val Pro Val Glu Glu Leu Gly Pro Ile Val Thr
35 40 45

Gln Leu Gly Thr Thr Cys Leu Gln Met Ala Leu Val Asn Tyr Trp Gly
50 55 60

Ser Leu Gly Ile Lys Pro Ala Phe Val Leu Gly His Ser Leu Gly Glu
65 70 75 80

Phe Ala Ala Leu Asn Thr Ala Gly Xaa Leu Ser Thr Ser Asp Thr Ile
85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Arg Arg Ala Thr Leu Leu Thr Glu Tyr Cys Gln Val
100 105 110

Gly Thr His Ala Met Leu Ala Val Lys Ala Ser Tyr Pro Gln Val Lys
115 120 125

Gln Leu Leu Lys Glu
130

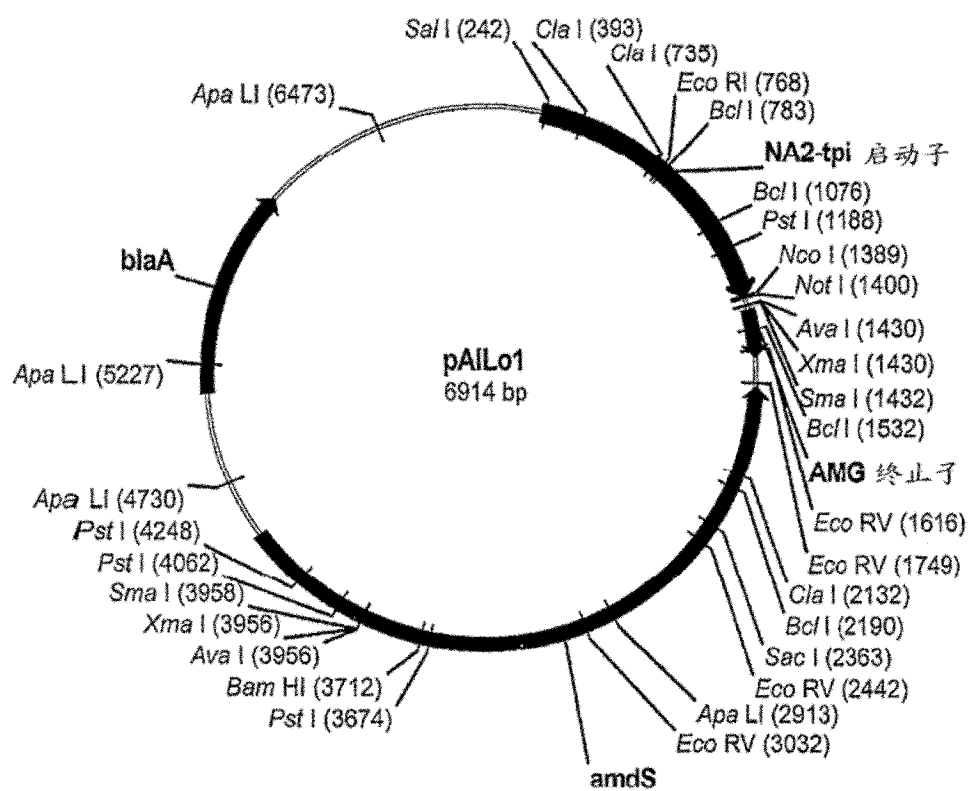


图 1

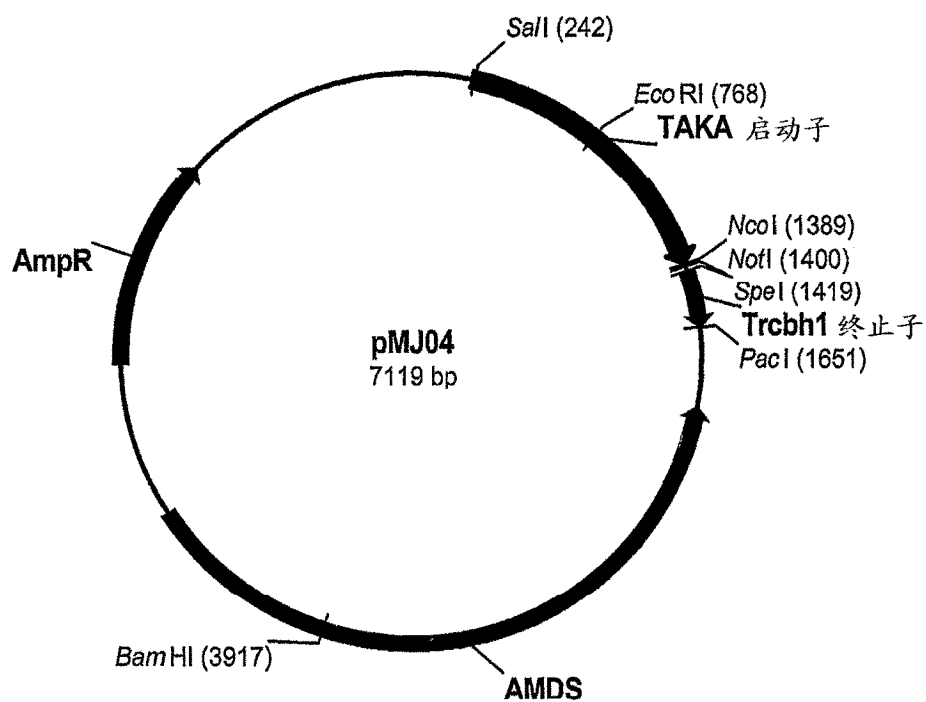


图 2

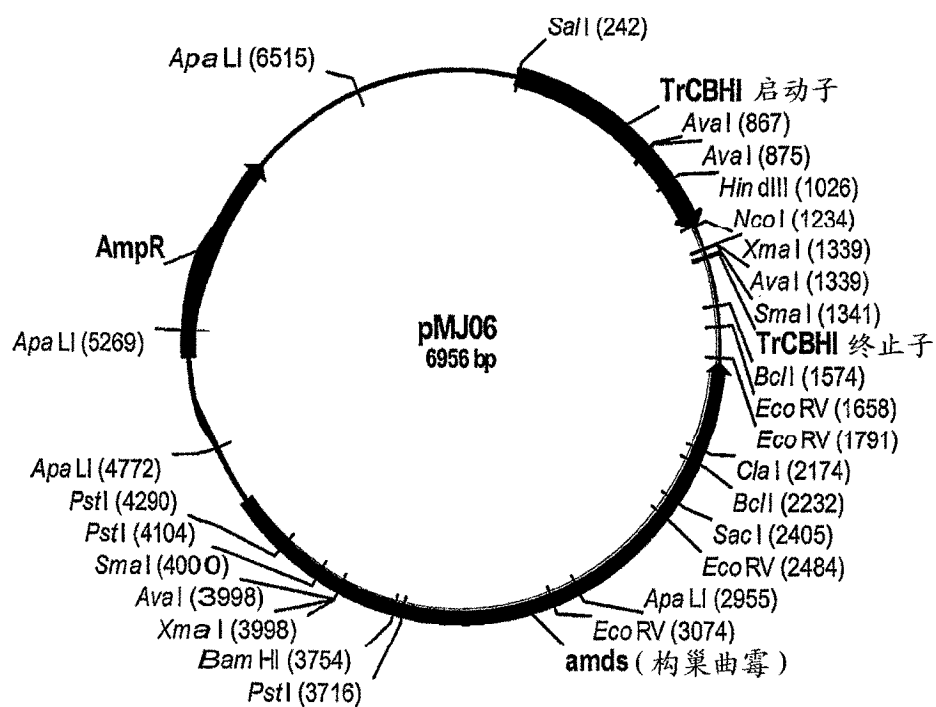


图 3

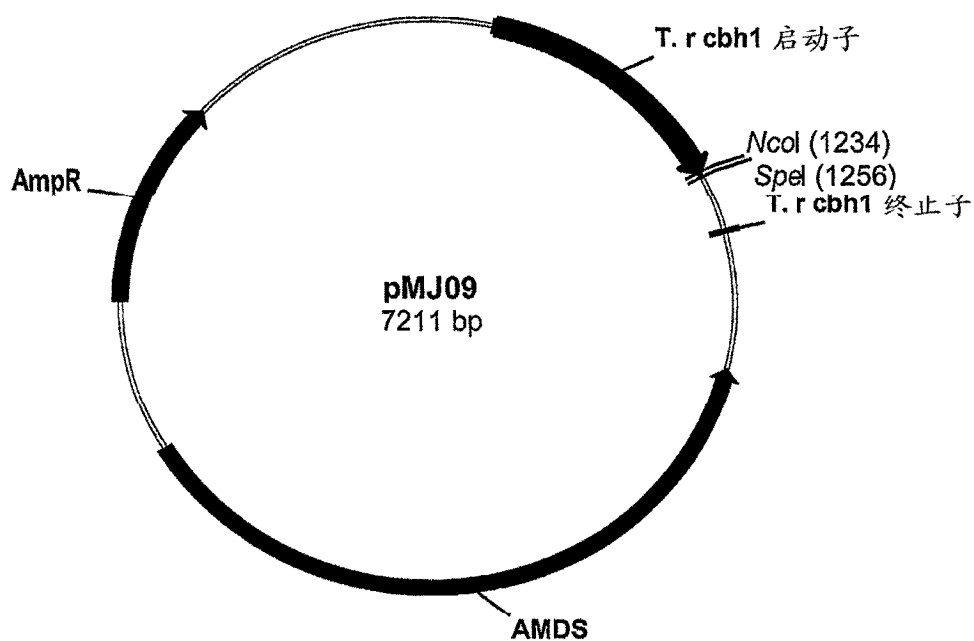


图 4

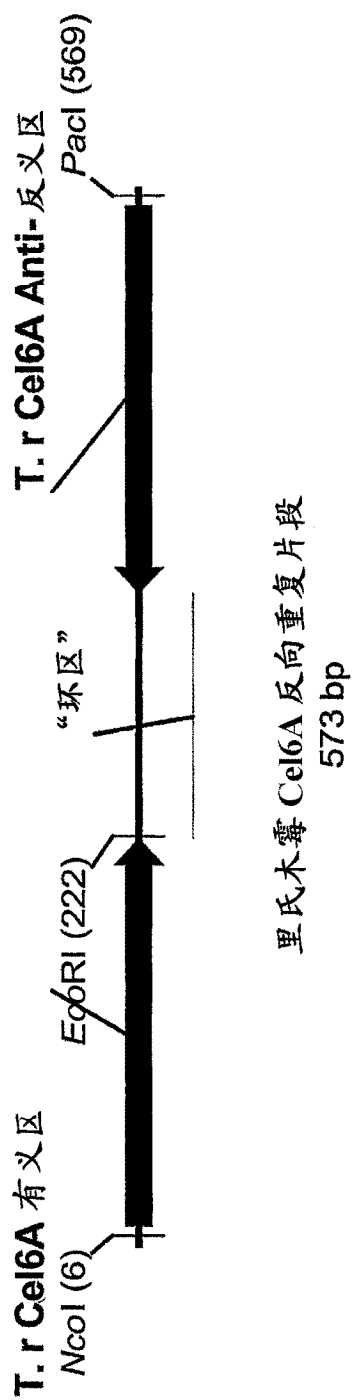


图 5

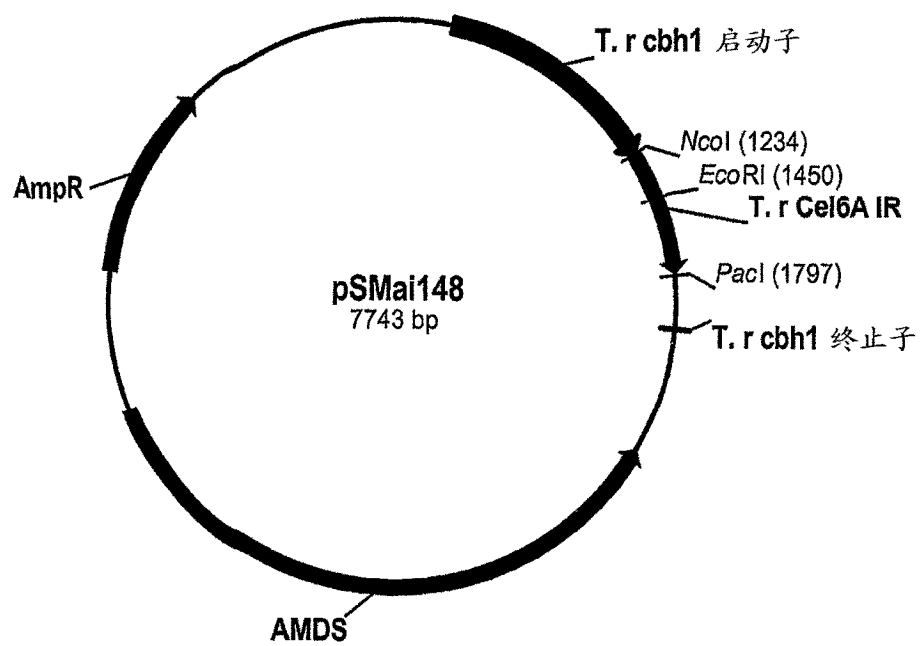


图 6

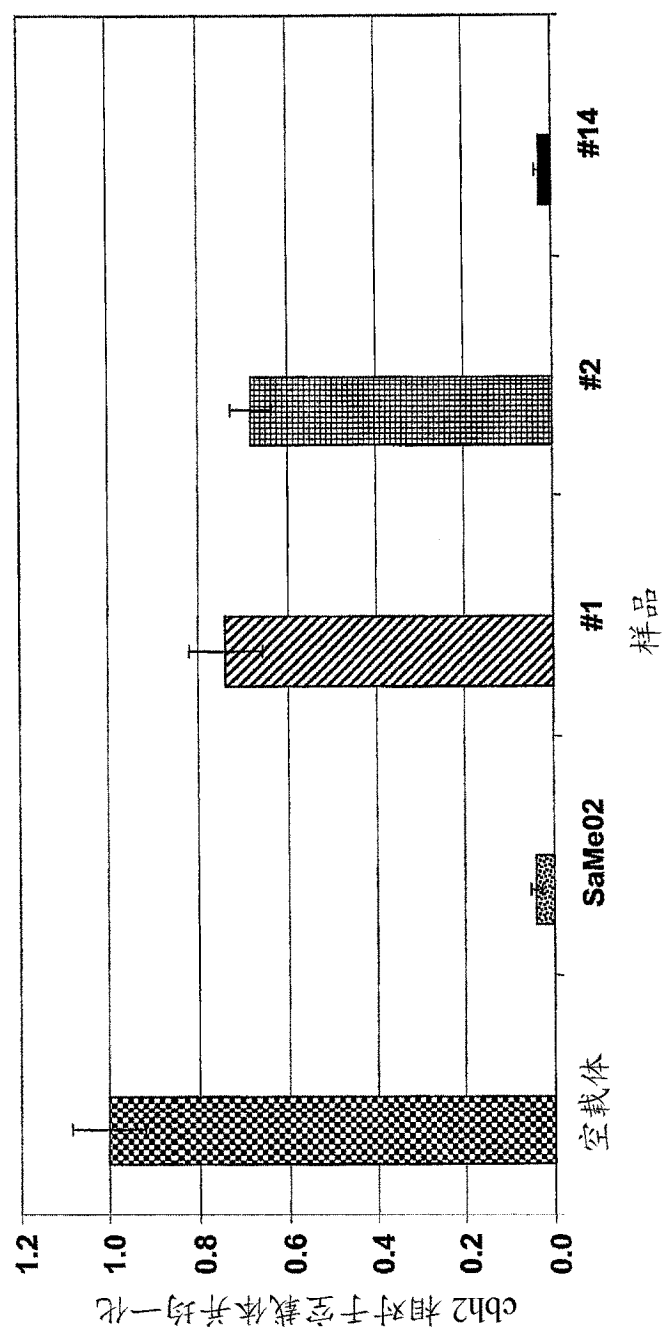


图 7

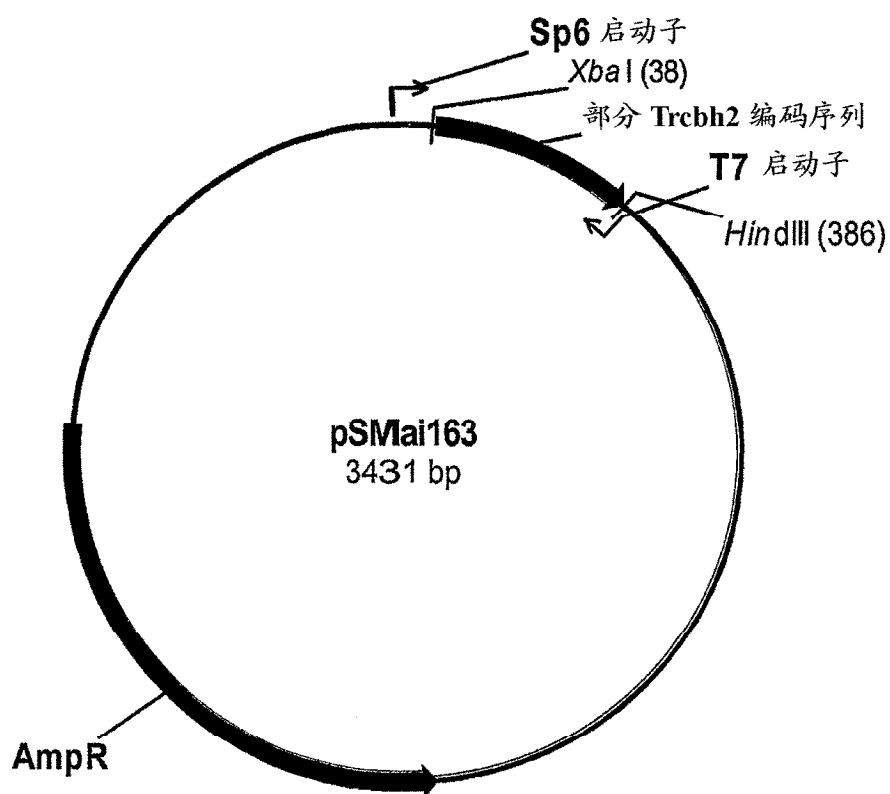


图 8

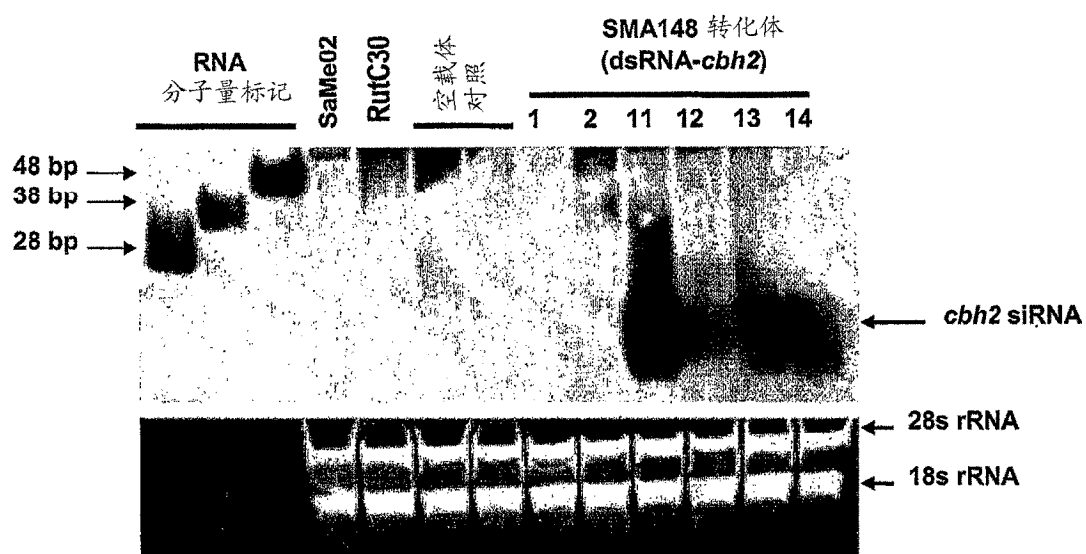


图 9

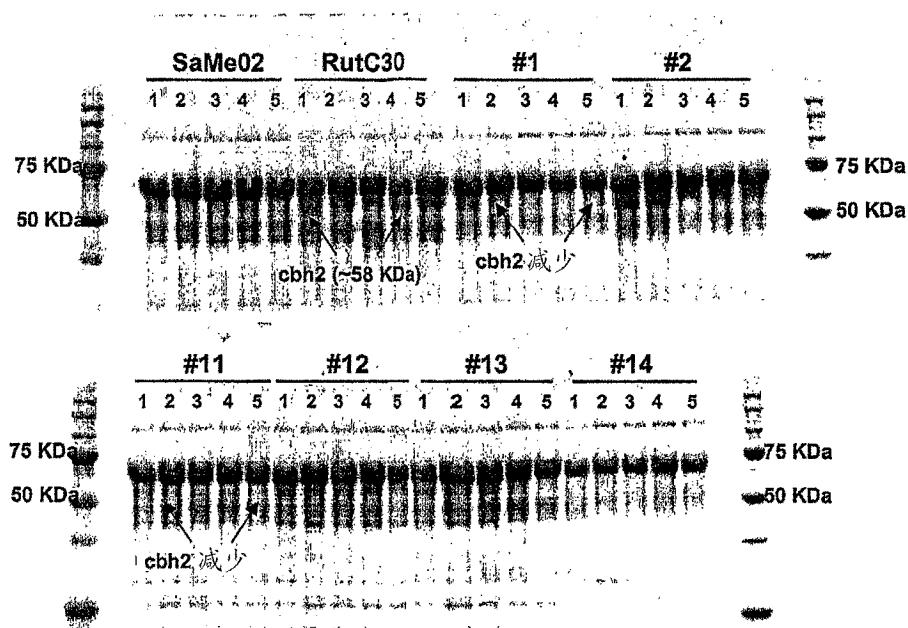


图 10

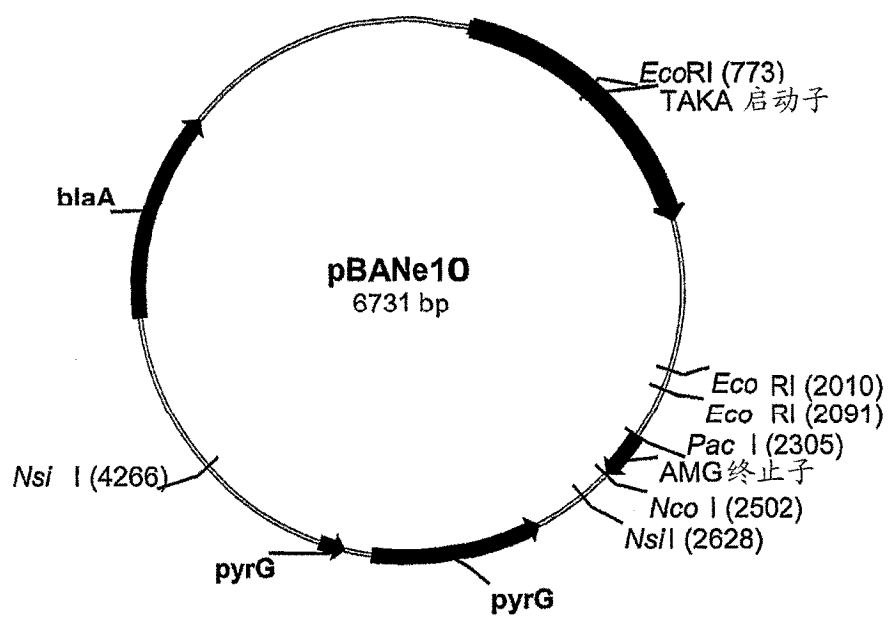


图 11

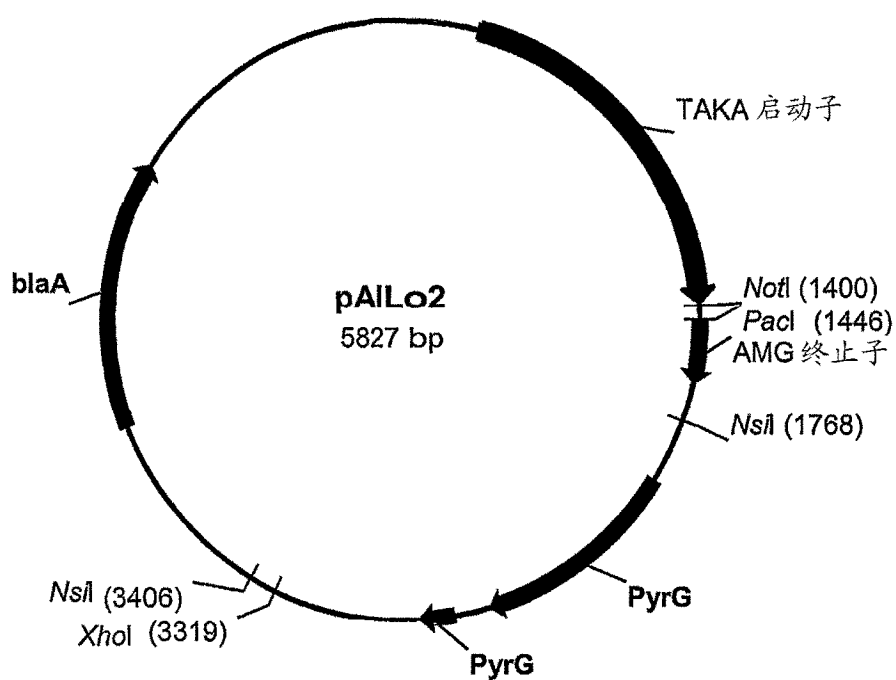


图 12

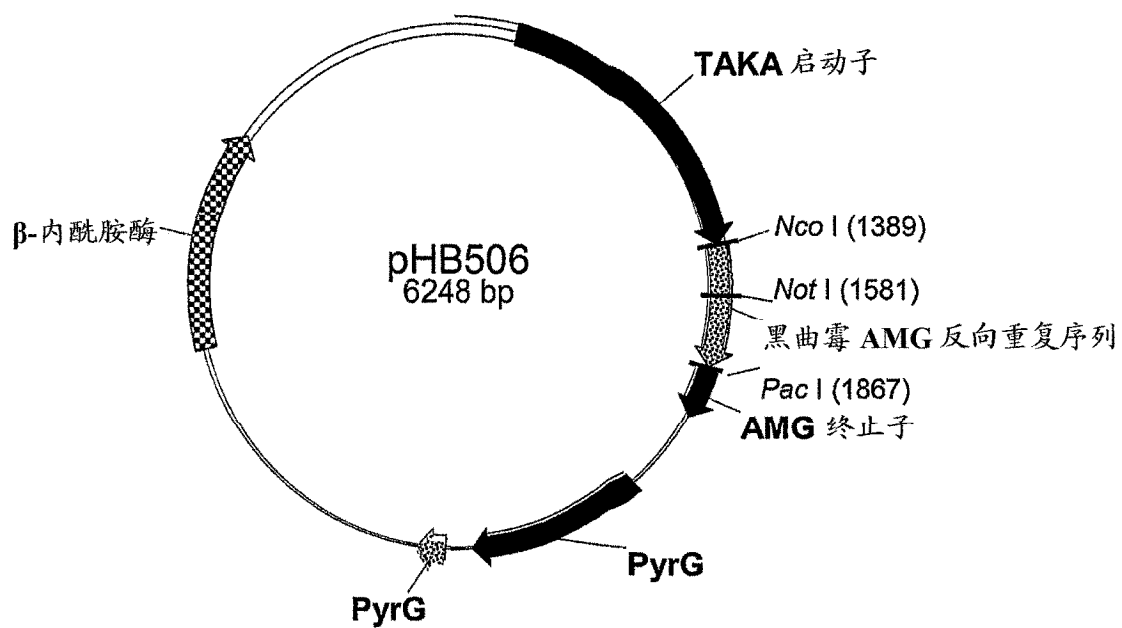


图 13

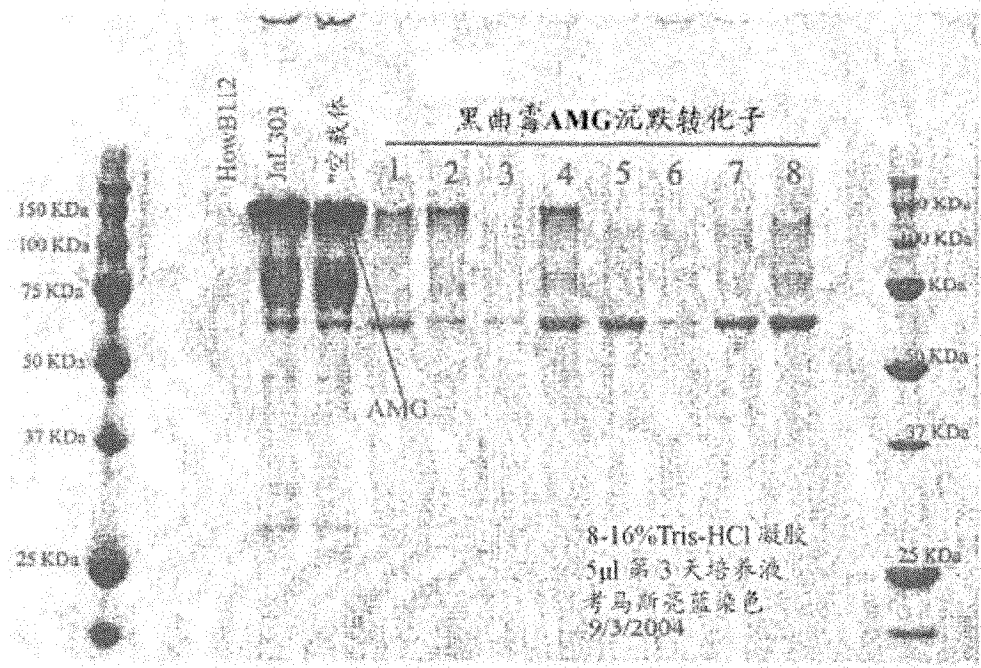


图 14

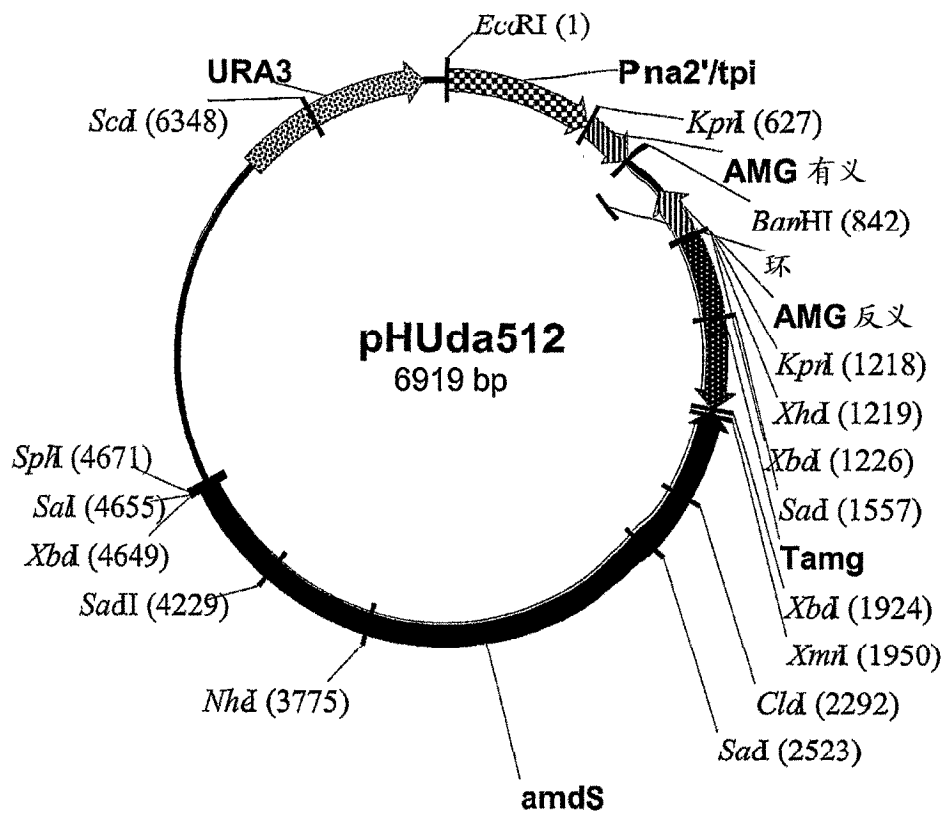


图 15

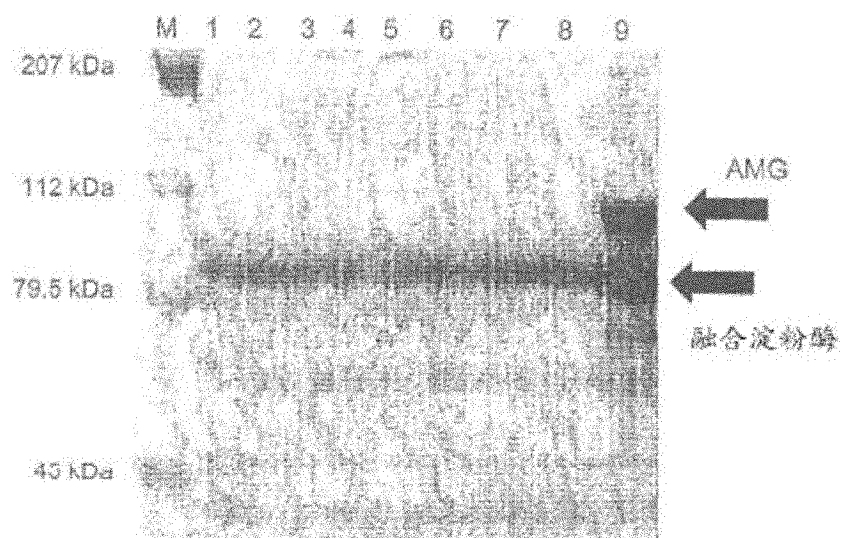


图 16

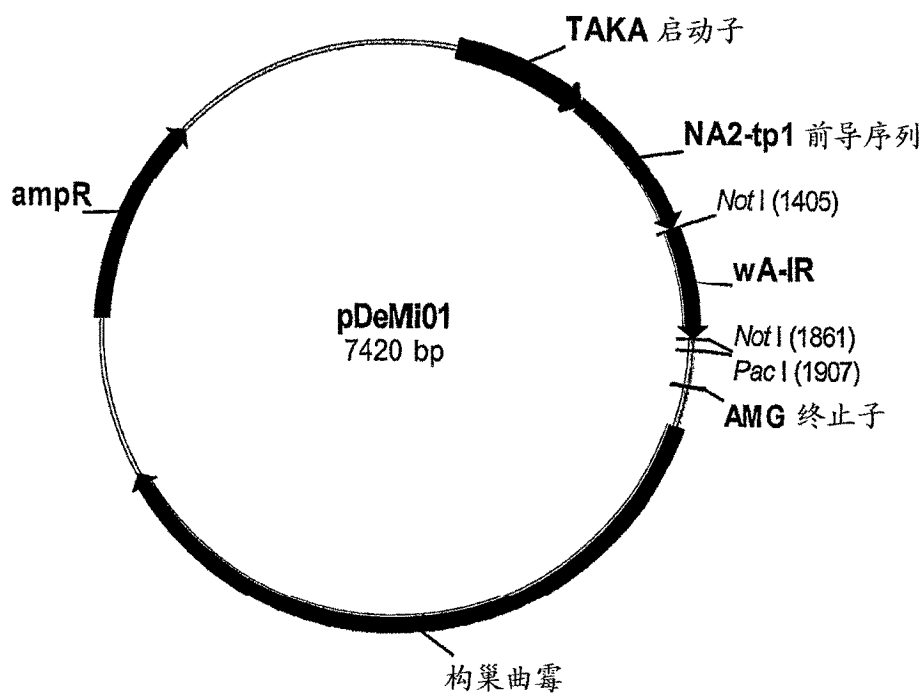


图 17