

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00809677.5

C12N 15/56
C12N 9/24 C07K 16/40
C12N 1/16 C12Q 1/68
G01N 33/68 G01N 33/573
A61K 31/70 A61K 38/45
A61K 39/395 A01H 5/00

[43]公开日 2002 年 7 月 31 日

[11]公开号 CN 1361825A

[22]申请日 2000.5.31 [21]申请号 00809677.5
[30]优先权
[32]1999.7.5 [33]DE [31]19930959.0
[86]国际申请 PCT/EP00/04972 2000.5.31
[87]国际公布 WO01/02587 德 2001.1.11
[85]进入国家阶段日期 2001.12.28
[71]申请人 阿温提斯研究技术两合公司
地址 德国法兰克福
[72]发明人 K·勒费尔德 S·赛森 F·维勒
M·施密特

[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 唐伟杰

权利要求书 3 页 说明书 41 页 附图页数 9 页

[54]发明名称 新的抗真菌剂和杀真菌剂及其制备方法和应用

[57]摘要

本发明涉及利用基因技术由酵母即所谓的放毒者酵母制备蛋白质毒素,用于控制对人和植物致病性的酵母和/或真菌,即选择性杀伤酵母和/或真菌。这种高特异性使得能够使用蛋白质毒素作为抗真菌剂和/或杀真菌剂。此外,这种蛋白质毒素可用于农作物防护。

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

权 利 要 求 书

1. 可由加州拟威尔酵母和/或拜列氏接合糖酵母获得的蛋白质毒素。
2. 权利要求1的蛋白质毒素，其可由DSM 12864和/或DSM 12865获得。
3. 权利要求1或2的蛋白质毒素，其具有抗真菌和/或杀真菌作用。
4. 权利要求1-3任一项的蛋白质毒素，其具有葡聚糖酶活性。
5. 权利要求4的蛋白质毒素，其可结合 β -1,6-D-葡聚糖并具有 β -1,3-D-葡聚糖酶和/或 β -1,3-葡聚糖转移酶活性。
6. 编码权利要求1-5任一项所述具有氨基酸序列SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2的葡聚糖酶和/或蛋白质毒素或其功能性变体的核酸及其至少8个核苷酸的部分，其中SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2是本权利要求的一部分。
7. 权利要求6的核酸，其中核酸是DNA或RNA，优选双链DNA。
8. 权利要求6或7的核酸，是具有SEQ ID NO: 1第1-951位碱基或SEQ ID NO: 2第1-717位碱基的核酸序列的DNA，其中SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2是本权利要求的一部分。
9. 权利要求8的核酸，其包含一种或多种调控区（启动子、增强子、终止子）和/或3'端polyA序列和/或胞内毒素原加工所需Kex2p内肽酶切割位点和/或一个或多个潜在N-糖基化位点。
10. 权利要求8或9的核酸，可由DSM 12864和/或DSM 12865获得。
11. 权利要求6-10任一项的核酸，其包含于载体，优选表达载体或基因疗法有效的载体中。
12. 用于制备权利要求6-10任一项的核酸的方法，其中核酸是化学合成的或借助探针由基因文库分离的。
13. 具有氨基酸序列SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2或其功能变体的多肽及其至少6个氨基酸的部分。

14. 用于制备权利要求1-5和13任一项的多肽的方法，其中在合适宿主细胞中表达权利要求6-11任一项的核酸。

15. 针对权利要求1-5和13任一项的多肽的抗体。

16. 用于制备权利要求15的抗体的方法，其中用权利要求7的多肽免疫哺乳动物，并在合适时分离形成的抗体。

17. 一种药物产品，其包含权利要求6-10任一项的核酸或权利要求1-5和13任一项的多肽或权利要求15的抗体，合适时还包含制药学可接受的添加剂和/或佐剂。

18. 制备用于治疗真菌病诸如浅表、皮肤、和皮下皮肤真菌病、粘膜真菌病、和全身性真菌病，尤其优选假丝酵母真菌病的药物产品的方法，其中权利要求6-10任一项的核酸或权利要求1-5和13任一项的多肽或权利要求15的抗体与制药学可接受的添加剂和/或佐剂配制在一起。

19. 一种诊断剂，其包含权利要求6-10任一项的核酸或权利要求1-5和13任一项的多肽或权利要求15的抗体，并在合适时还包含合适的添加剂和/或佐剂。

20. 制备用于诊断真菌病诸如浅表、皮肤、和皮下皮肤真菌病、粘膜真菌病、和全身性真菌病，尤其优选假丝酵母真菌病的诊断剂的方法，其中权利要求6-10任一项的核酸或权利要求1-5和13任一项的多肽或权利要求15的抗体与制药学可接受的载体一起联用。

21. 用于鉴定功能相互作用物的测定法，其包含权利要求6-10任一项的核酸或权利要求1-5和13任一项的多肽或权利要求15的抗体，并在适当时包含合适的添加剂和/或佐剂。

22. 权利要求6-10任一项的核酸或权利要求1-5和13任一项的多肽用于鉴定功能性相互作用物的应用。

23. 权利要求6-10任一项的核酸用于寻找变体的应用，包括用上述核酸筛选基因文库并分离找到的变体。

24. 权利要求1-5和13任一项的多肽用于控制食品和动物饲料中有害酵母和真菌的应用。

25. 用于培养DSM 12864和DSM 12865的方法，包括在合成B和/或BAVC培养基中培养它们。

26. 权利要求6 - 11任一项的核酸用于生产转基因植株和植物细胞的应用。

说明书

新的抗真菌剂和杀真菌剂及其制备方法和应用

描述

本发明涉及可由酵母获得的新的抗真菌剂和杀真菌剂，及其制备方法和应用。

由于最近几年真菌和/或酵母感染人的事件大大增加，而且还继续导致非期望的食品和动物饲料污染，因此选择性抗真菌剂显得极其重要。真菌病在细胞和体液防御系统必须保持在非完全功能水平的免疫抑制患者中具有特别严重的后果（Anaissie, 1992; Meunier等人, 1992; Wingard, 1995）。真菌病极度危及感染了HIV-1（AIDS）的患者，他们非常频繁的死于由对人致病性的真菌和/或酵母引起的机会性传染疾病的晚期（Levy, 1993）。目前用于治疗这些传染病的抗真菌剂（诸如两性霉素B、氟康唑、伊曲康唑、酮康唑）引起相当大的副作用，因为它们破坏真核细胞质膜的结构完整性，由此也损害受感染的宿主生物体（Hector, 1993）。此外，传统抗真菌剂的应用在很短时间内即导致氟康唑抗性的快速增加，并在对人致病性的微生物中快速传播，甚至构成不断增加的问题（Cameron等人, 1993; Chavenet等人, 1994; Maenza等人, 1996; Pfaller等人, 1994; Rex等人, 1995; Troillet等人, 1993）。因此，非常需要开发像细菌抗生素那样根据高度选择性而有所区别且如果有可能只攻击对人致病性的真菌和酵母的抗真菌剂。然而，既然高等生物体所有细胞过程中的大多数受在真核生物中具有高度功能同源性的基因产物的控制，因此“特异性抗真菌抗生素”的开发至今尚未成功（Kurz, 1998; Komiyama等人, 1998）。

选择性抗真菌剂的一个靶子是酵母细胞壁的 β -1, 3-D-葡聚糖，它对于细胞的机械和渗透稳定性是必不可少的，但是不存在于高等真核生物中，由此构成“唯一致命的弱点”，可用于控制致病酵母（Roemer等人, 1994）。即使由此对选择性参与酵母和真菌细胞壁结构的物质

非常感兴趣，仍没有抗生素样抑制剂用于控制真菌病。早在本世纪初就发现了细菌抗生素生产者，而直到60年代初才通过鉴定所谓的放毒者酵母观察到酵母中的相似效果（Bevan和Makower, 1963）：酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的毒素生成放毒者菌株生成并分泌称为“放毒者毒素”的蛋白质，这种蛋白质以受体依赖过程破坏敏感酵母（Bussey, 1991; Tipper和Schmitt, 1991）。在酿酒酵母中，生成毒素的能力基于呼肠孤病毒样双链RNA病毒的感染，这种病毒以高拷贝数稳定存在于酵母细胞质中，而不显著损害真核宿主细胞（Tipper和Schmitt, 1991）。至今为止已知的酿酒酵母的三类放毒者毒素（K1、K2、K28）是非糖基化的 α/β 异二聚体，由被感染细胞翻译成高分子前毒素原（preprotoxin），并在胞内分泌途径中通过复杂修饰加工成有生物活性的放毒者蛋白质（Hanes等人, 1986; Dignard等人, 1991; Schmitt和Tipper, 1995）。酿酒酵母毒素的毒性作用基于破坏膜完整性（毒素K1、K2）或通过直接抑制DNA合成而阻滞细胞循环（毒素K28）（Bussey, 1991; Schmitt和Compain, 1995; Schmitt等人, 1996）。即使K1、K2、和K28类的放毒者毒素在作用模式和物理化学特性方面彼此显著不同，它们仍然具有共同特征：作用谱窄，主要破坏密切相关物种的敏感酵母。这种有限的作用谱依据的是迄今为止已表征的啤酒酵母放毒者毒素必须与酵母细胞壁和细胞质膜水平上不同受体群相互作用从而得以破坏敏感靶细胞这一事实。酵母细胞壁的主要毒素受体是高度分支的 β -1,6-D-葡聚糖或细胞壁甘露糖蛋白质的外层甘露三糖侧链（Bussey, 1991; Schmitt和Radler, 1987, 1988）。

除了酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、葡萄酒有孢汉逊酵母（*Hanseniaspora uvarum*）、拜列氏接合糖酵母（*Zygosaccharomyces bailii*）、和玉蜀黍黑粉菌（*Ustilago maydis*）的病毒蛋白质毒素，在德巴利氏酵母属（*Debaryomyces*）、汉逊氏酵母属（*Hansenula*）、隐球酵母属（*Cryptococcus*）、红酵母属（*Rhodotorula*）、丝孢酵母属（*Trichosporon*）、毕赤氏酵母属（*Pichia*）、克鲁维氏酵母属（*Kluyveromyces*）、球拟酵母属

(*Torulopsis*)、和拟威尔酵母属(*Williopsis*)中也有放毒者菌株的描述(McCracken等人, 1994; Park等人, 1996; Schmitt和Neuhausen, 1994; Walker等人, 1995)。但是, 在这些酵母中, 放毒者现象的遗传基础不是病毒基因组, 而是线性dsDNA质粒或染色体酵母基因(Schröder等人, 1994)。

关于多种生成毒素的“放毒者酵母”的分子生物学的深入研究显示, 毒性蛋白质(“放毒者毒素”)的分泌在酵母中是普遍的, 并构成不可低估的选择性抗真菌剂开发潜力(Walker等人, 1995; Hodgson等人, 1995; Polonelli等人, 1986; Schmitt和Neuhausen, 1994; Neuhausen和Schmitt, 1996; Schmitt等人, 1997), 但是至今还不可能提供这种蛋白质毒素。

因此, 本发明的一个目标是提供适用于控制对人和植物致病性的酵母和/或真菌的抗真菌或杀真菌蛋白质毒素。

令人惊讶的是, 来自野生型加州拟威尔酵母(*Williopsis californica*) 3/57菌株(DSM 12865)、以高效方式生成并分泌的放毒者毒素WICALTIN(也是蛋白质毒素)和来自拜列氏接合糖酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)(DSM 12864)、由病毒编码的ZYGOCIN(也是蛋白质毒素), 这两种毒素证明特别适用于控制对人和植物致病性的酵母和/或真菌。此外, 还可破坏食品和动物饲料中危险的真菌和有害酵母。因此, 这两种蛋白质毒素都具有作为抗真菌剂和/或杀真菌剂用于控制酵母和/或真菌感染(特别是真菌病)的潜力。本发明通过对作用模式的研究证实了这些迹象。为了本发明的目的, 以适当方式克隆了毒素基因并测序, 由此建立了用于在培养物中重组生产并过度表达WICALTIN和ZYGOCIN的方法。

因此, 本发明的主题涉及可由加州拟威尔酵母(尤其优选DSM 12865菌株)和拜列氏接合糖酵母(尤其优选DSM 12864菌株)获得的蛋白质毒素。依照布达佩斯条约的规定, 于1999年6月9日将这两种菌株保藏于DSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), 38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b

(www.dsmz.de) 。

为了本发明的目的，特别是DSM 12864和DSM 12865分泌生物学有效的蛋白质毒素，由于其广谱作用（见实施例4和7），能破坏大量对人和植物致病性的酵母和真菌。本发明由此还涉及在蛋白质毒素意义上潜在生物药物的选择性抗真菌剂或杀真菌剂（以及下文的本发明多肽和本发明编码核酸，特别是毒素基因的功能单位），由于其特异的受体-介质生成因而专一破坏真菌和/或真菌，由此对高等真核生物（对人和哺乳动物细胞也是如此）和对植物（优选农作物）完全无害（参见Pfeiffer等人，1988）。

可选择性破坏下列对人和植物而言不致病的或致病的酵母和/或真菌：

对 ZYGOCIN 敏感的酵母物种：酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、白色假丝酵母（*Candida albicans*）、克鲁斯氏假丝酵母（*Candida krusei*）、光滑球假丝酵母（*Candida glabrata*）、酸酒假丝酵母（*Candida vinii*）、葡萄酒有孢汉逊酵母（*Hanseniaspora uvarum*）、马克斯克鲁维氏酵母（*Kluyveromyces marxianus*）、美极梅奇酵母（*Metschnikowia pulcherrima*）、玉蜀黍黑粉菌（*Ustilage maydis*）、汉逊氏德巴利氏酵母（*Debaryomyces hansenii*）、*Pichia anomala*、*Pichia jadinii*、膜醭毕赤酵母（*Pichia membranefaciens*）、*Yarrowia lipolytica*、和鲁氏接合糖酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*）。

对 WICALTIN 敏感的酵母物种：白色假丝酵母（*Candida albicans*）、光滑球假丝酵母（*Candida glabrata*）、热带假丝酵母（*Candida tropicalis*）、汉逊氏德巴利氏酵母（*Debaryomyces hansenii*）、乳酸克鲁维氏酵母（*Kluyveromyces lactis*）、美极梅奇酵母（*Metschnikowia pulcherrima*）、*Pichia anomala*、*Pichia jadinii*、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、侧孢属之种（*Sporthrix* sp.）、戴尔凯氏有孢圆酵母（*Torulaspora delbrueckii*）、*Torulaspora pretoriensis*、*Yarrowia lipolytica*、和拜列氏接合糖酵母

(*Zygosaccharomyces bailii*)。

生成WICALTIN的酵母菌株DSM 12865的特高活性大概基于其显著的分泌效率，与相同酵母物种的其它菌株相比明显更显著。生成ZYGOCIN的酵母菌株DSM 12864的“放毒者”特性基于编码毒素的双链RNA病毒(M_{zb} -dsRNA)的感染，这种病毒以高拷贝数稳定存在于细胞质中并使所述酵母(菌株DSM 12864)生成并分泌ZYGOCIN(参见Schmitt和Neuhausen, 1994)。既然相同物种的其它菌株的细胞质中不容纳编码毒素的dsRNA病毒，那么它们也不显示毒性生成，因而在表型上归为“非放毒者”。

因此，本发明的另一个主题是编码蛋白质毒素(所述蛋白质毒素具有SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2的氨基酸序列，并具有葡聚糖酶活性)的核酸及其功能变体，以及具有至少8个核苷酸的片段，优选至少15-20个核苷酸，特别是至少100个核苷酸，尤其是至少300个核苷酸的片段(下文称为“本发明核酸”)。

完整核酸编码的蛋白质毒素在胞内加工并分泌后具有309个氨基酸的大小和34kDa的分子量(SEQ ID NO: 1)或具有99个氨基酸的大小和10kDa的分子量(SEQ ID NO: 2)。核酸SEQ ID NO: 1在酿酒酵母中的表达产生重组WICALTIN，其被分泌进入酵母培养物上清液，成为具有显著 β -1,3-D-葡聚糖酶活性的糖基化蛋白质(参见实施例10)。本发明的进一步实验确认了本发明核酸编码具有葡聚糖酶活性的蛋白质毒素(在SEQ ID NO: 1的情况中)，或大概在体内O-糖基化并被称为ZYGOCIN的蛋白质毒素(在SEQ ID NO: 2的情况中)。可由DSM 12865(SEQ ID NO: 1)和DSM 12864(SEQ ID NO: 2)获得本发明核酸。

在优选的实施方案中，本发明核酸是DNA或RNA，优选双链DNA，特别是具有SEQ ID NO: 1第1-947位和SEQ ID NO: 2第1-713位核酸序列的DNA。根据本发明，这两个位置决定了编码区的起点和终点，即在这两种情况中讨论的读码框的第一个和最后一个氨基酸。

术语“功能变体”，根据本发明应理解为指功能上与本发明核酸相关的核酸。相关核酸的范例是来自不同酵母细胞或菌株的核酸和培

养物或等位基因变体。本发明还涵盖可衍生自多种酵母/酵母菌株或其它病原体（诸如皮肤真菌和霉菌）的核酸变体（根据DHS系统）。

术语“变体”，根据本发明应理解为指展示大约60%，优选大约75%，特别是大约90%，尤其是大约95%的同源性（特别是序列同一性）的核酸。

可使用本发明核酸的片段，例如，用于产生各种表位，作为鉴定其它功能变体的探针，或作为反义核酸。例如，至少大约8个核苷酸的核酸作为反义核酸是合适的，至少大约15个核苷酸的核酸可作为PCR引物，至少大约20个核苷酸的核酸可用于鉴定其它变体，而至少大约100个核苷酸的核酸可作为探针。

在另一个优选实施方案中，本发明核酸包含一种或多种非编码序列和/或poly(A)序列、一种或多种Kex2p内肽酶识别序列（胞内蛋白原加工要求的）、和一个或多个潜在N-糖基化位点。非编码序列是调控序列，诸如用于含本发明核酸的毒素编码基因的受控表达的启动子或增强子序列。

在另一个优选实施方案中，本发明核酸包含于载体中，优选表达载体或基因疗法的有效载体。

在本发明核酸SEQ ID NO: 2的情况中，表达载体的范例可以是原核和/或真核表达载体；而在本发明核酸SEQ ID NO: 1的情况中，表达载体的范例可以是专门的真核表达载体。既然异源表达的蛋白质毒素对细菌细胞有毒，那么毒素编码核酸SEQ ID NO: 1不可能在大肠杆菌中表达。WICALTIN编码核酸SEQ ID NO: 1在大肠杆菌中的克隆只有在使用不携带启动子的质粒时才有可能，例如可借助质粒pBR322的衍生物。能够异源表达ZYGOCIN编码核酸SEQ ID NO: 2的原核载体的范例是商品化载体pGEX-4T-1，它能够在大肠杆菌中表达谷胱甘肽S转移酶/ZYGOCIN融合蛋白质。用于在大肠杆菌中表达ZYGOCIN的另一种载体是例如T7表达载体pGM10（Martin, 1996），它编码N端Met-Ala-His6标签，便于经 Ni^{2+} -NTA柱纯化表达的蛋白质。适用于在酿酒酵母中表达的真核表达载体的范例是载体p426Met25或p426GAL1（Mumberg等人，

1994, 核酸研究(Nucl. Acids Res.)22: 5767); 适用于在昆虫细胞中表达的是杆状病毒载体, 诸如EP-B1-0127839或EP-B1-0549721中公开的; 而适用于在哺乳动物细胞中表达的是SV40载体, 可自由获取。

一般而言, 表达载体还包含适合于宿主细胞的调控序列, 诸如用于在大肠杆菌中表达的trp启动子(参阅例如EP-B1-0154133)、用于在酵母中表达的ADH-2启动子(Russel等人, 1983, 生物化学杂志(J. Biol. Chem.)258: 2674)、用于在昆虫细胞中表达的杆状病毒多角体蛋白启动子(参阅例如EP-B1-0127839)、或早期SV40启动子、或LTR启动子, 例如MMTV(小鼠乳腺瘤病毒)的启动子(Lee等人, 1981, 自然(Nature)214: 228)。

基因疗法的有效载体的范例是病毒载体, 优选腺病毒载体, 特别是复制缺陷型腺病毒载体, 或者腺伴随病毒载体, 例如由两个插入的末端重复序列(ITR)转移构成的腺伴随病毒载体。

例如W. J. McGrory等人, 1988, 病毒学(Virol.)163: 614; Y. Gluzman等人, 1982, 在《真核病毒载体》中, Y. Gluzman编, 第187页, 冷泉港出版社, 冷泉港, 纽约; J. Chroboczek等人, 1992, 病毒学(Virol.)186: 280; S. Karlsson等人, 1986, 欧洲分子生物学杂志(EMBO J)5: 2377; 或W095/00655描述了合适的腺病毒载体。

N. Muzyczka, 1992, 微生物学和免疫学现行主题(Curr. Top. Microbiol. Immunol.)158: 97; W095/23867; R. J. Samulski, 1989, 病毒学杂志(J. Virol.)63: 3822; W095/23867; J. A. Chiorini等人, 1995, 人类基因疗法(Human Gene Therapy)6: 1531; 或R. M. Kotin, 1994, 人类基因疗法(Human Gene Therapy)5: 793描述了合适的腺伴随病毒载体的范例。

还可以通过将本发明核酸与脂质体复合来获得基因疗法的有效载体。P. L. Felgner等人, 1987, 美国国家科学院进展(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)84: 7413; J. P. Behr等人, 1989, 美国国家科学院进展(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)86: 6982; J. H. Felgner等人, 1994, 生物化学杂志(J. Biol. Chem.)269: 2550; 或X. Gao和L. Huang, 1991, 生

物化学和生物物理学学报(Biochim. Biophys. Acta)1189: 195描述了用于该目的合适脂质混和物。在生成脂质体时, 通过离子作用以保持净余正电荷并使DNA完全与脂质体复合的比例使DNA结合在脂质体表面。

在另一个实施方案中, 本发明核酸包含于载体中, 优选用于生成转基因植物的表达载体。既然上述放毒者毒素WICALTIN和ZYGOCIN具有广谱作用而且还破坏致植物病性酵母和真菌, 那么有可能提供例如针对致玉米病的病原体玉蜀黍黑粉菌感染具有抗性行为方式的转基因植物。在烟草植株上早就进行了类似实验, 由于玉蜀黍黑粉菌放毒者毒素KP4(由病毒天然编码)的外源表达, 烟草植株能够分泌讨论中的蛋白质毒素, 由此建立了针对某些致植物病性玉蜀黍黑粉菌菌株的特异防护(Park等人, 1996; Kinal等人, 1995; Bevan, 1984)。由基于天然根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) Ti质粒经修饰衍生物的商品化转化系统开始, 可将本发明核酸(也可以毒素基因WCT和ZBT表示)克隆到所谓的双向pBI载体(CLONTECH)中, 并用于生成转基因植株。为此目的, 分别将毒素基因WCT和ZBT置于花椰菜花叶病毒强启动子(CaMV-P)的转录控制之下。实施例9示意性显示了待构建载体更详细的构建过程。

例如, 可遵循磷酸三酯法, 参照SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2公开的核酸序列, 或参照SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2公开的肽序列同时考虑到遗传密码, 化学合成本发明核酸(参阅例如E. Uhlman和A. Peyman, 1990, 化学评论(Chemical Reviews)90: 543, No. 4)。获得本发明核酸的另一种可能性是借助合适探针分离合适基因文库(参阅例如J. Sambrook等人, 1989, 《分子克隆: 实验室手册》, 第2版, 冷泉港, 纽约)。合适探针是例如序列可由核酸序列SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 3推断出且长度为大约100 - 1000个核苷酸, 优选大约200 - 500个核苷酸, 特别是大约300 - 400个核苷酸的双链DNA片段。

本发明的另一个主题是具有氨基酸序列SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2的多肽或其功能变体, 以及具有至少6个氨基酸, 优选至少12个氨基

酸，特别是至少65个氨基酸，尤其是309个氨基酸（SEQ ID NO: 1）和99个氨基酸（SEQ ID NO: 2）的片段（下文称为“本发明多肽”）。例如，长度为大约6-12个（优选大约8个）氨基酸的多肽可包含表位，当将其偶联至支持物后可用于生成特异性多克隆或单克隆抗体（参阅例如US 5,656,435）。长度为至少大约65个氨基酸的多肽也可直接（无需支持物）用于制备多克隆或单克隆抗体。

术语“功能变体”，根据本发明应理解为指功能上与本发明肽相关的多肽，即展示葡聚糖酶活性的多肽。变体还可理解为指可衍生自多种酵母/酵母菌株或其它感染因子（诸如皮肤真菌和霉菌）的等位基因变体或多肽（根据DHS系统）。

在广义上，它们还可理解为指与图2所示氨基酸序列具有大约70%，优选大约80%，特别是大约90%，尤其是大约95%的序列同源性（特别是序列同一性）的多肽。该术语还包括多肽中大约1-60个氨基酸，优选大约1-30个氨基酸，特别是大约1-15个氨基酸，尤其是大约1-5个氨基酸区域的删除。例如，第一个氨基酸甲硫氨酸可不存在，而不显著改变多肽的功能。另外，该术语还包括包含上述本发明多肽的融合蛋白质，融合蛋白质自身可能具有葡聚糖酶功能，或者只在切掉融合部分后具有特异功能。具体的说，这些包括包含大约1-200个，优选大约1-150个，特别是大约1-100个，尤其是大约1-50个氨基酸的非人序列的融合蛋白质。非人肽序列的范例是原核肽序列，例如来自大肠杆菌半乳糖苷酶或所谓的组氨酸标签（例如Met-Ala-His₆标签）。包含所谓组氨酸标签的融合蛋白质特别适用于经含金属离子的柱纯化表达的蛋白质，例如经Ni²⁺-NTA柱。“NTA”指螯合剂次氨基三乙酸（Qiagen GmbH, Hilden）。在这方面，本发明还涵盖在蛋白原的意义上或在更广意义上（如药物前体）掩蔽的本发明多肽。

本发明的多肽片段，例如是可由抗体特异性识别的表位。

可通过熟练技术人员通常知道的方法制备本发明多肽，例如通过在诸如上文所述的合适表达系统中表达本发明核酸。适用于制备正确加工因而具有生物活性的蛋白质毒素的宿主细胞专门是真核生物体，

优选芽殖酵母—酿酒酵母和裂殖酵母—粟酒裂殖糖酵母。

特别的，还可借助传统肽合成法（Merrifield技术）合成上述多肽片段。它们特别适用于获得抗血清，借助它，可筛选合适的基因表达文库从而获得本发明多肽的进一步功能变体。

本发明的另一个主题涉及用于制备本发明多肽的方法，其中在合适的宿主细胞中表达本发明核酸，并根据需要进行分离。

非常优选的是裂殖酵母粟酒裂殖糖酵母，因为这种酵母天生具有WICALTIN和ZYGOCIN抗性，而且早已多次成功用于异源表达外源蛋白质（Giga-Hama和Kumagai, 1997，在《裂殖酵母粟酒裂殖糖酵母中的外源基因表达》中，Springer Verlag）。正如实施例11所例示的，可将毒素编码核酸SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2克隆到例如粟酒裂殖糖酵母载体pREP1中（Maundrell, 1990，生物化学杂志(J. Biol. Chem.)265: 10857 - 10864），并置于裂殖酵母的硫胺调控*nmt1*启动子的转录控制之下（*nmt*即无硫胺信息）。用这种载体转化的酵母，其作为酵母培养基中相应硫胺浓度的函数，表达讨论中的外源基因。如果需要，这能够在时间上将酵母生长期与外源蛋白质生成期分开，从而在原理上有可能表达对酵母有毒的蛋白质。为了同时分泌并由此显著便于纯化在粟酒裂殖糖酵母中异源表达的毒素WICALTIN和ZYGOCIN，我们早就构建了包含病毒K28前毒素原基因（Schmitt和Tipper, 1995）的分泌和加工信号、由此能够有效分泌以相同读码框置于下游的相应外源蛋白质的表达/分泌载体（载体pTZ α/γ ；见实施例11）。

本发明的另一个主题涉及与本发明多肽特异反应的抗体，上述多肽片段有可能自身具有免疫原性或使之具有免疫原性，或者通过偶联合适载体（诸如牛血清清蛋白）改进其免疫原性。

抗体或是多克隆的或是单克隆的。抗体的制备也构成本发明的一个主题，例如可通过通常惯用的方法，用本发明多肽或上述多肽片段，根据需要在存在例如弗氏佐剂和/或氢氧化铝凝胶时，免疫哺乳动物，例如兔子，由此而进行（参阅例如B. A. Diamond等人, 1981，新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)1344）。随后可容易

的通过通常惯用的方法由血液分离由于免疫学反应而在动物体内形成的多克隆抗体，并通过例如柱层析纯化。优选将抗体进行亲和纯化，例如将讨论中的抗原（ZYGOCIN或WICALTIN）共价偶联可自由获取的CnBr激活Sepharose基质，并用于纯化在每种情况中都是毒素特异的抗体。

可通过已知的Winter和Milstein法（G. Winter和C. Milstein, 1991, 自然(Nature)349: 293）制备单克隆抗体。

本发明的另一个主题是包含本发明核酸或本发明多肽（个别的或联合的）以及（根据需要）合适的添加剂或佐剂的药物产品，和制备用于治疗真菌病（诸如浅表、皮肤、和皮下皮肤真菌病、粘膜真菌病、和全身性真菌病，尤其优选假丝酵母真菌病）的药物产品的方法，其中将本发明核酸或本发明多肽与制药学可接受的添加剂和/或佐剂配制在一起。

实施例12例示了，由菌株DSM 12865生产并纯化的毒素WICALTIN，其对酵母的毒性甚至比为了比较而测试并常常用于治疗真菌病的局部抗真菌剂克霉唑和霉抗唑显著更强。

本发明由此还涉及在上述意义上的药物产品，其包含可得自菌株DSM 12864和/或DSM 12865的抗真菌剂或蛋白质毒素和/或本发明有抗真菌活性的多肽。

包含裸露形式、上述基因疗法有效载体形式之一、或脂质体复合物形式的本发明核酸的药物产品尤其适用于人类基因疗法。

合适添加剂和/或佐剂的范例是生理盐水、稳定剂、蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、等等。

本发明的另一个主题是包含本发明核酸、本发明多肽、或本发明抗体以及（根据需要）合适添加剂和/或佐剂的诊断剂，和制备用于诊断真菌病（诸如浅表、皮肤、和皮下皮肤真菌病、粘膜真菌病、和全身性真菌病，尤其优选假丝酵母真菌病）的诊断剂的方法，其中本发明核酸、本发明多肽、或本发明抗体与合适的添加剂和/或佐剂联合使用。

例如，可参照本发明并借助本发明核酸制备基于聚合酶链式反应（PCR诊断剂，例如EP-0200362）或Northern和/或Southern印渍的诊断剂，实施例13将更为详细的描述。这些测试基于本发明核酸与互补链（通常是对应的mRNA）的特异性杂交。如EP-0063879所述，还可修饰本发明核酸。优选通过通常知道的方法用合适的试剂标记本发明DNA片段，例如用 α -³²P-dATP进行放射性标记或提供非放射性的生物素标记物，并与优选结合于合适膜（例如硝酸纤维素或尼龙）上的分离RNA一起温育。另外，在杂交和结合膜之前根据大小将分离RNA分开是有利的，例如通过琼脂糖凝胶电泳。若来自各个组织样品的待测RNA的量是相同的，则由此可测定通过探针特异性标记的mRNA的量。

另一种诊断剂包含本发明多肽或其免疫原性部分，上文已更为详细的描述。优选将多肽或其部分结合于固相例如硝酸纤维素或尼龙上，并在体外接触例如待测体液，诸如血液，从而与例如抗体发生反应。随后可检测抗体/肽复合物，例如借助经标记的抗人IgG或抗人IgM抗体。标记物是例如酶，诸如催化显色反应的过氧化物酶。由此经显色反应可容易且快速的检测自身免疫抗体的存在与量。

另一种诊断剂包含本发明抗体自身。这些抗体可例如容易且快速检验人组织样品中是否存在讨论中的多肽。在这种情况下，本发明抗体是经标记的，例如标记了上文所述的酶。由此经酶促显色反应可容易且快速的检测特异抗体/肽复合物。

本发明的另一个主题涉及包含本发明核酸和/或本发明多肽（个别的或联合的）以及（根据需要）合适的添加剂和/或佐剂的杀真菌剂，和制备用于控制有害酵母和有害真菌的杀真菌剂的方法，其中本发明核酸或本发明多肽与农业可接受的添加剂和/或佐剂配制在一起。

如上所述，在优选实施方案中生成表达本发明蛋白质毒素的转基因植物。本发明由此还涉及包含本发明多肽和/或蛋白质毒素的植物细胞和转基因植株。

本发明的另一个主题还涉及用于鉴定功能相互作用物的测定法，诸如包含本发明核酸、本发明多肽、或本发明抗体以及（根据需要）

合适的添加剂和/或佐剂的抑制剂或刺激剂。

用于鉴定功能相互作用物(特别是在敏感酵母细胞中与SEQ ID NO: 2的蛋白质毒素ZYGOCIN相互作用的功能相互作用物)的合适测定法, 是例如双杂交系统(S. Field和R. Sternglanz, 1994, 遗传学趋势(Trends in Genetics)10: 286)。在这种测定法中, 用一种或多种表达载体转化或转染细胞(例如酵母细胞), 所述表达载体表达包含本发明多肽和已知蛋白质DNA结合结构域(例如来自大肠杆菌的Gal4或LexA)的融合蛋白质, 和/或表达包含未知多肽和转录激活结构域(例如Gal4、疱疹病毒VP16、或B42来源的)的融合蛋白质。另外, 细胞包含报道基因, 例如大肠杆菌LacZ基因、绿色荧光蛋白、或酵母氨基酸生物合成基因His3或Leu2, 这些报道基因受调控序列, 诸如LexA启动子/操作子或酵母上游激活序列(UAS)的控制。未知多肽由例如起源于基因文库, 例如人基因文库的DNA片段编码。通常, 首先在酵母中借助上述表达载体生成cDNA基因文库, 从而能够立即进行这种测定法。

例如, 在一种酵母表达系统中, 将本发明核酸克隆到编码LexA DNA结合结构域的核酸功能单位中, 从而在转化酵母中表达本发明多肽与LexA DNA结合结构域的融合蛋白质。在另一种酵母表达载体中, 将cDNA基因文库的cDNA片段克隆到编码Gal4转录激活结构域的核酸功能单位上, 从而在转化酵母中表达未知多肽与Gal4转录激活结构域的融合蛋白质。用两种表达载体转化的酵母(例如Leu²⁻)另外包含编码Leu2且受LexA启动子/操作子控制的核酸。在本发明多肽与未知多肽之间的功能相互作用事件中, Gal4转录激活结构域经LexA DNA结合结构域结合LexA启动子/操作子, 由此激活LexA启动子/操作子并表达Leu2基因。结果, Leu²⁻酵母能够在不含亮氨酸的基本培养基上生长。

当使用LacZ或绿色荧光蛋白报道基因而非氨基酸生物合成基因时, 可通过发蓝色或绿色荧光的菌落的形成来检测转录激活。然而, 还可在分光光度计中容易的对蓝色或绿色荧光染色定量, 例如在蓝色染色的情况下在585nm下测定。

在这种方式中, 可容易且快速对表达基因文库筛选与本发明多肽

相互作用的多肽。随后可分离并表征发现的新多肽。

双杂交系统的另一种可能应用在于通过其它物质(诸如化学药品)影响本发明多肽与已知或未知多肽之间的相互作用。这也能够发现可化学合成并作为治疗剂的新的有价值的活性成分。本发明由此不仅意欲包含用于寻找多肽样相互作用物的方法,还延伸包含用于寻找能够与上述蛋白质/蛋白质复合物相互作用的物质的方法。根据本发明,这种肽样和化学相互作用物由此称为功能性相互作用物,它们可具有抑制性或刺激性作用。

本发明的另一个主题涉及用于通过培养并将蛋白质毒素分泌到培养基中来制备蛋白质毒素的方法,培养基包括合成培养基(BAVC培养基),这相当便于层析纯化分泌的毒素,例如通过超滤和阳离子交换层析和/或在昆布多糖-Sepharose和/或甘露糖蛋白质-Sepharose上进行的亲和层析(参见实施例1和实施例附录)。在由菌株DSM 12865生成并分泌的WICALTIN的情况中,可通过在培养基中添加额外的由植物衍生(且易于获取)的 β -1,3-D-葡聚糖昆布多糖至终浓度1%,由此进一步增加毒素产量。正如实施例14所例示的,在培养基中添加昆布多糖能够诱导WICALTIN生成,经Northern分析发现这是由于转录诱导所致。

合成B培养基可用于生产毒素ZYGOCIN,它是DSM12864所分泌的[参见Radler等人,1993]。

实施例

下列实施例意欲例示本发明,而非将本发明限制于这些实施例。

实施例1: 由放毒者酵母加州拟威尔酵母3/57菌株(DSM 12865)的培养物上清液分离、浓缩、和纯化抗假丝酵母毒素WICALTIN

在亚甲基蓝琼脂上针对敏感酵母的琼脂扩散测试中,由放毒者酵母加州拟威尔酵母3/57菌株分泌的放毒者毒素WICALTIN在pH4.7和20℃显示最佳抑制作用。在合成液体培养基中,当在BAVC培养基(pH4.7)

中培养时，放毒者酵母加州拟威尔酵母3/57菌株显示最大毒素产量。为进行毒素浓缩，首先将放毒者酵母在5ml YEPD培养基中于30℃振荡温育24小时，然后全都转移到200ml BAVC培养基中，并于20℃在摇床（140rpm）上再次培养48小时。用次级预培养物（1%接种物）接种4份主要培养物（每一份在5L锥形瓶中装有2.5L BAVC培养基，pH4.7），并于20℃轻轻振荡（60rpm）温育5天。为了浓缩分泌的放毒者毒素，用排阻极限10kDa的聚磺酸膜（“EasyFlow”，Fa. Sartorius）于4℃和压力1巴超滤，将无细胞培养物上清液浓缩200倍至50ml。为了除去低分子量的化合物并使由此获得的浓缩液脱盐，将毒素在排阻极限10-20kDa的透析管中对5mM 柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液（pH4.7）透析。为了保存毒素浓缩液，将透析产物用0.2 μm滤膜过滤除菌，并以1ml分装冻存于-20℃。

在亚甲基蓝琼脂（MBA；pH4.7）上针对敏感指示酵母酿酒酵母192.2d的琼脂扩散测试中检测毒素活性并将其标准化。为此目的，在0.1M 柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液（pH4.7）中进行毒素浓缩液的对数稀释，并将100 μl稀释液转移至接种了敏感指示酵母（ 2×10^5 细胞/ml）的MBA板上的孔（孔径9mm）中。将平板于20℃保温3天后，测量清晰可见的抑制圈。发现抑制圈的直径与毒素浓度的对数之间存在线性关系。将20mm（已做孔径校正）的抑制圈直径人为指定为 1×10^4 U/ml的毒素活性。

通过在Bioscale-S（FPLC）上进行的阳离子交换层析，或在事先偶联了由植物衍生的β-1,6-D-葡聚糖石耳素的环氧激活的Sephacrose-B基质（Pharmacia）上进行的亲和层析，纯化浓缩的WICALTIN。由此比活富集了625倍的毒素制剂（表1）在凝胶电泳上显示是纯的，SDS-PAGE（10-22%梯度凝胶）后只显示考马斯蓝（蛋白质染色）和高碘酸Schiff染色（PAS；碳水化合物染色）都可检测到的大约37kDa的单一一条带。阳性PAS染色说明抗假丝酵母毒素WICALTIN具有潜在N-糖基化。用内切糖苷酶H处理纯化毒素确认了WICALTIN具有N-糖基化连接的大约3kDa碳水化合物部分，在酵母中的大小说明蛋白质毒素中存在单一N-糖基化位点。既然脱糖基化WICALTIN显示显著受限

的毒性，那么可以推论WICALTIN的碳水化合物部分大概是结合敏感靶细胞所需要的，由此间接影响毒素的生物活性。

表1: 由放毒者酵母加州拟威尔酵母培养物上清液浓缩WICALTIN[UF, 超滤]

制剂	体积 (ml)	总蛋 白质 (mg)	总毒素 活性 (E)	毒素 比活 (E/mg)	活性 产率 %	纯化因 子
培养物上清液	10,000	24,600	7.9×10^5	3.2×10^1	100	1
超滤滞留物	50	162	6.3×10^5	3.9×10^3	80	122
冻干透析液	25	45.8	3.1×10^5	6.8×10^3	39	213
Bioscale-S (阳离子交换)	64	1.28	2.5×10^4	2.0×10^4	3.2	625

实施例2: 测定WICALTIN的氨基末端氨基酸序列并检测 β -1,3-葡聚糖酶活性

通过经纯化的放毒者毒素的N端氨基酸测序，测定了最初10个氨基酸。如图1所示，WICALTIN的N端显示与由酿酒酵母*BGL2*基因编码的 β -1,3-内切葡聚糖酶的氨基末端有显著同源性。

既然确定了WICALTIN与*Bgl2*的同源性，那么调查在未纯化毒素浓缩液中和在已纯化毒素制剂中检测到葡聚糖酶活性的可能性。在WICALTIN制剂中，在以 β -1,3-D-葡聚糖昆布多糖作为底物的酶测定法中和在以4-甲基-伞形基- β -D-葡萄糖苷(4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucoside, MUC)作为底物的荧光测定法中都检测到显著的 β -1,3-D-葡聚糖酶活性；还测试了 β -1,6-D-葡聚糖石耳素，它不被WICALTIN水解。

实施例3: 在存在或不存在细胞壁葡聚糖时WICALTIN处理的酵母细胞的存活率: 竞争分析

在YEPD液体培养基(pH4.7)中于20℃在存在 1×10^5 U/ml纯化WICALTIN时培养酿酒酵母192.2d菌株的敏感酵母细胞，图2显示了杀伤

动力学。加入由植物衍生的 β -1,6-D-葡聚糖石耳素能够显著增加毒素处理的酵母细胞的存活率,且在浓度达到10mg/ml时完全逆转WICALTIN毒性。与石耳素相反, β -1,3-D-葡聚糖昆布多糖不能增加毒素所处理酵母的存活率(图2)。

由所示发现能够推断,WICALTIN的作用需要结合作为酵母细胞壁的主要停靠位点(毒素受体)的 β -1,6-葡聚糖。与此发现一致的是,染色体*KRE1*基因座中具有删除的酵母显示毒素抗性,但是当用携带*KRE1*的附加型载体重新转化后恢复毒素敏感性(图3)。*kre1*突变体的毒素抗性基于的是显著降低了 β -1,6-D-葡聚糖含量,由此降低毒素与酵母细胞表面的结合,而这恰是致死作用所要求的。

实施例4: WICALTIN的作用谱和杀伤谱

在琼脂扩散测试中,纯化加州拟威尔酵母毒素WICALTIN展示针对表2所示酵母有显著毒性。除了克鲁斯氏假丝酵母的3种菌株之外,WICALTIN以高效方式破坏测试的所有22个临床患者分离物和对人致病性的假丝酵母属物种所有其它对照菌株。WICALTIN显示了对来自总共10个不同属的14种毒素敏感酵母物种能产生作用,因而具有对放毒者毒素而言异常宽广的作用谱。

表2: WICALTIN对致病和不致病的不同属酵母的作用谱。在琼脂扩散测试(MBA; pH4.7)中针对纯化WICALTIN测试了所有菌株。应用的毒素活性是 1×10^6 U/ml。热带假丝酵母菌株(患者编号541965)得自美国兹医科大学医学微生物学和卫生学系。(Department of Medical Microbiology and Hygiene of the University Hospital Maine)

酵母菌株	表型	抑制圈直径(mm)
白色假丝酵母 ATCC 10231	S	11
光滑球假丝酵母 NCYC 388	S	12
克鲁斯氏假丝酵母 185	R	0
热带假丝酵母患者编号541965	S	11
汉逊氏德巴利氏酵母 223	S	16

葡萄酒有孢汉逊酵母 ATCC 64295	R	0
<i>Hasegawaea japonica</i> var. <i>Versatilis</i> 191	R	0
乳酸克鲁维氏酵母 CBS 2359/152	S	22
马克斯克鲁维氏酵母 (<i>K. marxianus</i>) C 8, 1	R	0
美极梅奇酵母 K/3I B6	S	8
<i>Pichia anomala</i> 245	S	17
粉状毕赤氏酵母 (<i>P. farinosa</i>) 258	R	0
<i>P. jadinii</i> 251	S	6
克鲁弗毕赤氏酵母 (<i>P. kluyveri</i>) ATCC 64301	R	0
膜醭毕赤酵母 (<i>P. membranefaciens</i>) NCYC 333	R	0
酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		
192. 2d	S	30
381	S	23
ATCC 42017 (K1 超级放毒者)	S	19
NCYC 738 (K2放毒者)	S	14
452 (= NCYC 1006)	S	16
路为氏糖酵母 (<i>Saccharomycodes ludwigii</i>) 240	R	0
粟酒裂殖酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) CBS 1042	R	0
侧孢属之种 (<i>Sporothrix</i> sp.) 1129	S	11
戴尔凯氏有孢圆酵母 (<i>Torulospora delbrueckii</i>) 208	S	18
<i>T. pretoriensis</i> 186	S	10
<i>Yarrowia lipolytica</i> 271	S	8
拜列氏接合糖酵母 (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>) 412	S	23

实施例5: 加州拟威尔酵母3/57菌株 (DSM 12865) 中编码WILCALTIN的WCT基因的克隆、测序、和分子表征

由WICALTIN的N端氨基酸序列开始, 生成用于鉴定和克隆位于染色体中的毒素基因WCT以及用于表征其分子生物学的特异DNA寡核苷酸。WCT的DNA序列 (SEQ ID NO: 1) 显示了单一开放读码框, 它所编码的

潜在N-糖基化蛋白质具有309个氨基酸，计算分子量为34,017Da。关于WCT编码的放毒者毒素作用的研究显示WICALTIN是对酵母极其有毒且以在酵母中发现的细胞壁 β -1,3-D-葡聚糖为主要靶的糖蛋白。WICALTIN针对酵母和真菌的选择性毒性基于它在敏感靶细胞中破坏细胞壁结构和/或完整性，并由此在最敏感部位攻击酵母，最后杀死它们。

实施例6：由放毒者酵母拜列氏接合糖酵母412菌株（DSM 12864）的培养物上清液浓缩和纯化病毒毒素ZYGOCIN

通过Radler等人（1993）所述方法，由此放毒者酵母的培养物上清液分离拜列氏接合糖酵母412菌株的病毒编码放毒者毒素ZYGOCIN，通过超滤浓缩，最后通过亲和层析纯化。此研究中开发的ZYGOCIN的一步纯化法利用了毒素与敏感酵母细胞壁甘露糖蛋白质的天然亲和力。将通过Schmitt和Radler（1997）所述方法由酿酒酵母192.2d菌株分离和部分纯化的甘露糖蛋白质共价偶联至环氧激活的Sephacrose-6B基质（Pharmacia），并经FPLC方法用于柱层析纯化毒素。SDS-PAGE后，以这种方式纯化的高生物活性的ZYGOCIN显示表观分子量大约10kDa的单一蛋白质条带（图4）。

实施例7：ZYGOCIN的作用谱和杀伤谱

在琼脂扩散测试中测定的拜列氏接合糖酵母412菌株（DSM 12864）的病毒ZYGOCIN的作用谱包含致病和不致病的酵母属，其中白色假丝酵母和申克侧孢（*Sporothrix schenckii*）是重要的对人和动物致病的病原体，而玉蜀黍黑粉菌和汉逊氏德巴利氏酵母是农业和食品部门的重要有害酵母（表3）。

表3：ZYGOCIN对致病和不致病的不同属酵母的作用谱。在琼脂扩散测试（MBA；pH4.5）中测试了所有菌株抵抗 1×10^4 U/ml活性的ZYGOCIN制剂的情况。

ZYGOCIN敏感酵母	相对敏感程度
酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	++
白色假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>)	+
克鲁斯氏假丝酵母 (<i>Candida krusei</i>)	++
光滑球假丝酵母 (<i>Candida glabrata</i>)	++
酒酸假丝酵母 (<i>Candida vinii</i>)	+
葡萄酒有孢汉逊酵母 (<i>Hanseniaspora uvarum</i>)	++
马克斯克鲁维氏酵母 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	+
美极梅奇酵母 (<i>Metschnikowia pulcherrima</i>)	+
玉蜀黍黑粉菌 (<i>Ustilago maydis</i>)	++
汉逊氏德巴利氏酵母 (<i>Debaryomyces hansenii</i>)	++
<i>Pichia anomala</i>	++
<i>Pichia jadinii</i>	+
膜醭毕赤酵母 (<i>Pichia membranefaciens</i>)	+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	+
鲁氏接合糖酵母 (<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)	++

实施例8：拜列氏接合糖酵母412菌株 (DSM 12864) 中编码ZYGOCIN的ZBT基因的克隆和测序

通过与Schmitt (1995) 所述相似的方法，以用氢氧化甲基汞变性的纯化M - dsRNA作为模板，以多种六核苷酸作为引物，合成放毒者酵母拜列氏接合糖酵母412的毒素编码双链RNA基因组的cDNA。连接到经EcoRI消化的载体pUC18、转化大肠杆菌、并分离经鉴定的重组质粒后，分离几个cDNA克隆并测序。编码ZYGOCIN的读码框的cDNA序列 (SEQ ID NO: 2) 包含238个氨基酸的蛋白质前体 (毒素原) 的遗传信息，它在氨基酸位置RR¹³⁹携带潜在Kex2内肽酶可切割位点。通过在体内发生于高尔基体晚期的Kex2介导的ZYGOCIN原加工，形成分子量10kDa、99个氨基酸、N端氨基酸序列与由纯化ZYGOCIN测定的资料完全一致的生物活性ZYGOCIN。

由于ZYGOCIN的毒性, *ZBT*-cDNA在酿酒酵母中的异源表达导致转化酵母通过其自身毒素杀伤自身。将来的目标是在毒素抗性裂殖酵母粟酒裂殖糖酵母中异源表达ZYGOCIN, 因为正如作为范例的病毒K28毒素早已证明的, 裂殖酵母特别适用于表达或分泌外源蛋白质。

实施例9: 在转基因植物中表达毒素基因WCT和ZBT。

既然上述放毒者毒素WICALTIN和ZYGOCIN具有宽广的作用谱, 而且还破坏致植物病的酵母和真菌, 那么应当有可能构建显示对例如致玉米病病原体玉蜀黍黑粉菌的感染有抗性的转基因植物。早已在烟草植株上进行了类似实验, 其中由于玉蜀黍黑粉菌放毒者毒素KP4(由病毒天然编码)的外源表达, 能够分泌所述放毒者毒素, 由此建立了针对某些致植物病性玉蜀黍黑粉菌菌株的特异防护(Park等人, 1996; Kinal等人, 1995; Bevan, 1984)。由基于天然根癌土壤杆菌Ti质粒经修饰衍生物的商品化转化系统开始, 有可能将我们已经克隆的毒素基因*WCT*和*ZBT*克隆到所谓的双向pBI载体(CLONTECH)中, 并用于生成转基因植株。为此目的, 将所述毒素基因*WCT*和*ZBT*置于强花椰菜花叶病毒启动子(CaMV-P)的转录控制之下。图5示意性显示了待构建载体的构建过程。

实施例10: 加州拟威尔酵母3/57菌株(DSM 12865)中编码WICALTIN的*WCT*基因在酿酒酵母中的异源表达

为了在酿酒酵母中异源表达*WCT*基因, 将编码WICALTIN的*WCT*基因以930bp EcoRI/SmaI片段克隆到通常可获得的2 μ 载体pYX242中。获得的载体pSTH2(图6)包含在酵母丙糖磷酸异构酶(*TPI*)启动子的转录控制之下的毒素基因, 由此能够在转化到酵母(酿酒酵母)中后组成性表达WICALTIN。对以这种方式获得的酵母转化体的培养物上清液进行凝胶电泳分析显示, 重组WICALTIN被分泌到外部培养基中, 并具有对应于同源WICALTIN(来自野生型菌株DSM 12865)的 β -1, 3-D-葡聚糖酶活性(图6)。

实施例11: 在裂殖酵母粟酒裂殖糖酵母中异源表达WICALTIN和ZYGOCIN的实验

既然裂殖酵母显示对WICALTIN和ZYGOCIN有抗性, 那么作为完整细胞和无细胞壁原生质球, 它都适合作为宿主用于异源表达讨论中的毒素。为了确保重组毒素不仅由裂殖酵母表达, 而且还同时进入胞内分泌途径, 并由此分泌到外部培养基中, 构建了携带在粟酒裂殖糖酵母中有功能且衍生自酿酒酵母病毒性K28前毒素原基因cDNA的分泌和加工信号(S/P)的载体(pTZ α/γ ; 图7)(参见Schmitt, 1995; Schmitt和Tipper, 1995)。分泌和加工信号确保了置于相同读码框下游的外源蛋白质在裂殖酵母中进入内质网内腔, 并由此进入酵母的分泌途径。位于S/P区C端的Kex2p切割位点引起在晚期高尔基体由酵母Kex2p内肽酶将期望的外源蛋白质由其胞内转运载体上切下, 并可最终作为生物活性蛋白质(ZYGOCIN和/或WICALTIN)分泌进入外部培养基。

实施例12: 比较纯化WICALTIN与局部抗真菌剂克霉唑和霉抗唑的生物活性

既然纯化WICALTIN具有宽广的作用谱且有效杀伤对人致病性的酵母和/或真菌, 那么它就是重要的候选抗真菌剂。因此, 在WICALTIN与目前广泛使用的局部抗真菌剂克霉唑和霉抗唑之间进行了比较性研究。首先, 在MBA琼脂扩散测试中测试了克霉唑和霉抗唑对作为指示酵母的侧孢属之种的毒性作用。为此目的, 将克霉唑以10mg/ml的浓度溶于96%乙醇; 将该储液用ddH₂O稀释, 并以0.1-10mg/ml的浓度用于MBA测试, 每种取100 μ l。当所用克霉唑的量为10-50 μ g时, 抑制圈的直径为12-32mm。在100%DMSO中制备100 μ g/ml的霉抗唑储液, 并以与克霉唑相同的方式在MBA测试中测试对侧孢属之种的生物活性。在生物测定法中, 0.08-0.3 μ g的霉抗唑用量导致抑制圈为22-36mm。因此, 10 μ g克霉唑和0.08 μ g霉抗唑的生物活性相当于2 μ g纯化WICALTIN的毒性。基于这三种测试化合物分子量的比较显示, 甚至在0.07pmol的

浓度, WICALTIN显示与0.2pmol霉抗唑和29pmol克霉唑相同的活性;因此, WICALTIN是极强的抗真菌剂(图8)。

实施例13: 通过与基因特异的DNA探针进行Southern杂交检测加州拟威尔酵母3/57菌株(DSM 12865)中编码WICALTIN的*WCT*基因

为了证明SEQ ID NO: 1的核酸可用于生成WICALTIN特异性DNA探针用于随后的Southern杂交, 将DIG标记的930bp DNA探针用于检测已经克隆到载体pSTH1中的*WCT*基因。构建的载体pSTH1是通常可获得的原核克隆载体pBR322的衍生物。

图9所示琼脂糖凝胶电泳和相应Southern印渍毫无疑问显示核酸探针可用于检测编码WICALTIN的*WCT*基因。

实施例14: Northern印渍分析检测 β -1, 3-D-葡聚糖对加州拟威尔酵母3/57菌株(DSM12865)中编码WICALTIN的*WCT*基因的转录诱导

为了检测 β -1, 3-D-葡聚糖诱导的*WCT*转录, 在300ml BAVC培养基中或在添加0.03%由植物衍生的 β -1, 3-D-葡聚糖昆布多糖的BAVC培养基中培养酵母菌株DSM 12865于20℃轻轻摇动(60rpm)48小时, 并在不同时间间隔用于制备总RNA。在分离RNA前, 将所有样品(10ml)调至相同细胞密度 1.8×10^8 细胞/ml, 并通过变性琼脂糖甲醛凝胶电泳分离。如图10所示, 在未诱导条件(无添加物的BAVC培养基)中和在添加昆布多糖的BAVC培养基中都检测到1100碱基大小的*WCT*转录本。在未加葡聚糖的情况中, 在接近指数生长期终点(19小时后)达到最大*WCT*表达; 杂交信号在稳定生长期显著变弱, 说明转录降低。在诱导培养条件(存在昆布多糖)下, *WCT*转录本在10小时后显示比未诱导培养高得多的强度, 从而得出结论, 加入 β -1, 3-D-葡聚糖可诱导编码WICALTIN的*WCT*基因的转录。

实施例附录:

实施例中所用培养基和溶液:

a) BAVC培养基

葡萄糖	50g/L
D、L-苹果酸	20g/L
柠檬酸三钠	0.5g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.5g/L
MgSO_4	1.0g/L
CaCl_2	0.5g/L
肌醇	0.04g/L
氨基酸储液 (10x)	200ml/L
微量元素储液 (100x)	10ml/L
维生素储液 (100x)	20ml/L

其中:

b) 氨基酸储液 (10x)

丙氨酸	0.75g/L
精氨酸一氯化物	3.5g/L
天冬氨酸	0.5g/L
谷氨酸	3g/L
组氨酸一氯化物	0.2g/L
甲硫氨酸	0.4g/L
丝氨酸	0.5g/L
苏氨酸	2g/L
色氨酸	0.4g/L

c) 微量元素储液 (100x)

硼酸	200mg/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200mg/L

AlCl_3	200mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100mg/L
$\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100mg/L
KI	100mg/L
酒石酸氢钾	2g/L

d) 维生素储液 (100x)

4-氨基苯甲酸	20mg/L
生物素	2mg/L
叶酸	2mg/L
尼克酸	100mg/L
吡哆素氢氯化物	100mg/L
核黄素	50mg/L
硫胺素二氯化物	50mg/L
D-泛酸钙	100mg/L

生物素：溶于5g KH_2PO_4 /50ml蒸馏水。

叶酸：溶于加了几滴稀NaOH的50ml蒸馏水。

核黄素：溶于加了几滴HCl并加热的500ml蒸馏水。

其余维生素可溶于少许双蒸水。

用KOH将BAVC培养基的pH调至pH4.7。将葡萄糖和储液分开灭菌。将氨基酸、维生素、和微量元素储液于100℃开阀灭菌20分钟，然后加到高压灭菌的BAVC培养基中。

图和最重要的序列

SEQ ID NO: - 加州拟威尔酵母3/57菌株中*WCT*编码的蛋白质毒素WICALTIN的DNA序列和推导的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 2 - 拜列氏接合糖酵母中ZBT编码的蛋白质毒素ZYGOCIN的cDNA序列和推导的氨基酸序列。

图1: 加州拟威尔酵母毒素WICALTIN和酿酒酵母内切- β -1, 3-葡聚糖酶Bg12的N端氨基酸序列。粗体显示了亚序列的唯一差异, 而其它部分相同 (Bg12序列与Klebl和Tanner, 1989一致)。

图2: 在存在 (2a) 和不存在 (2b) β -D-葡聚糖昆布多糖 (L) 和石耳素 (P) 时, WICALTIN处理敏感酵母酿酒酵母192. 2d细胞的杀伤动力学。所用毒素具有 4.0×10^5 U/ml的总活性, 4.2×10^5 U/ml蛋白质的比活。

图3 (a、b、c、d): 用于检测WICALTIN在Kre1⁺和Kre1⁻酿酒酵母菌株中的灵敏性/抗性的琼脂扩散测试。用携带KRE1的载体pPGK[KRE1]转化WICALTIN抗性kre1零突变株酿酒酵母SEY6210[Δ kre1], 完全恢复了WICALTIN灵敏性。

图4: (A) 在甘露糖蛋白质-Sepharose上亲和层析后, 由拜列氏接合糖酵母412菌株 (DSM 12864) 生成并分泌的ZYGOCIN的凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。(B) 用于检测纯化放毒者毒素ZYGOCIN的生物活性的琼脂扩散测试。

图5: 用于生成转基因植物的携带ZBT或WCT的表达载体的构建示意图。(备注: RB、LB: 根癌土壤杆菌天然Ti质粒的右边界和左边界序列; CaMV-P: 花椰菜花叶病毒35S启动子; NOS-P、NOS-T: 胭脂碱合酶转录启动子和终止子; kan^R: 用于在大肠杆菌中进行选择的链球菌卡那霉素抗性基因; NPT-II: 用于在植物中进行选择的来自转座子Tn5的新霉素磷酸转移酶基因)

图6: (A) 用于在酿酒酵母中异源表达编码WICALTIN的WCT毒素基因的附加型载体pSTH2的部分限制性图谱。载体pSTH2是基于商品化2 μ 多拷贝载体pYX242构建的质粒, 其中以930bp EcoRI/SmaI片段形式克隆了来自菌株DSM 12865的WCT基因。所述毒素基因被置于酵母TP1启动子的转录控制之下, 由此能够在转化到酿酒酵母中后强烈且组成性表达WICALTIN。

(B) 用构建的WICALTIN表达载体pSTH2 (1道) 和基本的载体pYX242 (2道) 转化后的酿酒酵母浓缩培养物上清液的凝胶电泳 (10 - 22.5 % 梯度SDS-PAGE) 分析。箭头指示在酿酒酵母中异源表达的WICALTIN。

(C) 检测用WICALTIN表达酵母载体pSTH2转化后的酿酒酵母的胞外 β -1, 3-D-葡聚糖酶活性。为了测定外切- β -1, 3-D-葡聚糖酶活性, 向在无亮氨酸SC琼脂上生长的酵母菌落喷洒溶于50mM 醋酸钠缓冲液 (pH5.2) 的0.04% 4-甲基伞形基- β -D-葡萄糖苷 (MUG)。于37℃温育30分钟后, 用紫外线 (波长254nm) 照射琼脂平板。通过MUG水解产生的荧光检测葡聚糖酶活性。(备注: 1和4, 用在其自身启动子下表达编码WICALTIN的WCT基因的载体pEP-WCT转化的酿酒酵母; 2, 野生型加州拟威尔酵母3/57 (DSM 12865); 3, 野生型加州拟威尔酵母3/111; 5, 用表达WICALTIN的载体pYX-WCT转化后的酿酒酵母; 6, 用基本的载体pYX242 (不含毒素基因) 转化后的酿酒酵母)

图7: 用于在粟酒裂殖糖酵母中异源表达并分泌外源蛋白质 (特别是WICALTIN和ZYGOCIN) 的载体pTZ α / γ 的结构示意图。(备注: P_{nmt1} , T_{nmt1} , 粟酒裂殖糖酵母中硫胺素调控的 $nmt1$ 基因的转录启动子和转录终止子; S/P, 芽殖酵母酿酒酵母病毒性K28前毒素原的分泌和加工序列; $ars1$, 来自裂殖酵母1号染色体的自主复制序列; $leu2$, 用于选择亮氨酸原养型粟酒裂殖糖酵母转化体的亮氨酸-2标记基因)

图8: 纯化WICALTIN、克霉唑、和霉抗唑的生物活性的比较; 在针对敏感指示酵母侧孢属之种的生物测定法 (琼脂扩散测试) 中, 所示摩尔量产生直径12mm的抑制圈。

图9: 通过琼脂糖凝胶电泳 (A) 和使用DIG标记WCT基因探针的Southern杂交 (B) 检测已克隆到pSTH1 (pBR322衍生物) 中的加州拟威尔酵母3/57 (DSM 12865) 中编码WICALTIN的WCT基因。(备注: M, DIG标记的DNA大小标准II; 1道, 经EcoRI和SalI消化的pSTH1; 2道, 精确梯度的DNA标记物)

图10: 在非诱导培养条件下在BAVC培养基中 (A) 和在诱导条件下在添加0.03% 昆布多糖的BAVC培养基中 (B), 加州拟威尔酵母3/57

(DSM 12865) 中编码WICALTIN的WCT基因的转录诱导的Northern分析。通过7V/cm恒压变性琼脂糖/甲醛凝胶电泳分离由菌株DSM 12865分离的总RNA。在尼龙膜上将RNA与WICALTIN特异性DIG标记的DNA探针(630bp)杂交并通过化学发光检测。(备注: M, DIG标记的RNA大小标准I; 1-8道对应于分离总RNA的取样时间; 1道, 10小时; 2道, 15小时; 3道, 19小时; 4道, 24小时; 5道, 33小时; 6道, 38小时; 7道, 43小时; 8道, 48小时)

文中所用缩写

WCT	加州拟威尔酵母毒素
ZBT	拜列氏接合糖酵母毒素
ZYGOCIN	专有名词; 由DSM 12864分泌的毒素
WICALTIN	专有名词; 由DSM 12865分泌的毒素

保藏物

用于本发明的下列微生物保藏于Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, 德意志联邦共和国, 这是依照布达佩斯条约关于国际承认用于专利程序的微生物保藏规定认可的国际保藏处。

保藏物	保藏物编号	保藏日期
加州拟威尔酵母3/57菌株	DSM 12865	1999年6月9日
拜列氏接合糖酵母412菌株	DSM 12864	1999年6月9日

参考文献

- Anaissie, E., (1992). 无免疫应答宿主中的机会性真菌病: 在癌症中心的经历和评论. 临床传染病(Clin. Infect. Dis)14: 43 - 51.
- Bevan, E. A. 和 M. Makower, (1963). 酵母放毒者特征的生理学基础. 国际遗传学会议记录(Proc. Int. Congr. Genet.)XI: 1202 - 1203.
- Bevan, M., (1984). 用于植物转化的二元农杆菌载体. 核酸研究(Nucl. Acids Res.)12: 8711 - 8720.
- Bussey, H., (1991). K1放毒者毒素, 来自酵母的成孔蛋白质. 分子微生物学(Mol. Microbiol.)5: 2339 - 2343.
- Cameron, M. L., Schell, W. A., Bruch, S., Bartlett, J. A., Waskin, H. A. 和 J. R. Perfect, (1993). 假丝酵母分离菌的体外氟康唑抗性与人类免疫缺陷病毒1型血清阳性个体的症状和疗法之间的相关性. 抗微生物剂和化疗(Antimicrob. Agents Chemother.)37: 2449 - 2453.
- Chavenet, P., Lopez, J., Grappin, M., Bannin, A., Duong, M., Waldner, A., Buisson, M., Camerlynck, P. 和 H. Portier, (1994). 假丝酵母分离菌的抗真菌药物易感性的截面研究以及HIV感染患者的体外-体内相关性. 艾滋病(AIDS)8: 945 - 950.
- Dignard, D., Whiteway, M., Germain, D., Tessier, D. 和 D. Y. Thomas, (1991). K2放毒者毒素基因的cDNA拷贝在酵母中的表达. 分子和普通遗传学(Mol. Gen. Genet.)227: 127 - 136.
- Hanes, S. D., Burn, V. E., Strley, S. L., Tipper, D. J. 和 D. Y. Thomas, (1986). 衍生自酵母放毒者前毒素原基因的cDNA的表达: 加工和免疫性的暗示. 美国国家科学院进展(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)83: 1675 - 1679.
- Hector, R. F., (1993). 对医学上重要真菌的细胞壁有活性的化合物. 临床微生物学评论(Clin. Microbiol. Rev.)6: 1 - 21.

- Hodgson, V. J., Button, D. 和 G. M. Walker, (1995)。来自酵母 *Williopsis mrakii* 的新的放毒者毒素的抗假丝酵母活性。微生物学 (Microbiol.) 141: 2003 - 2012。
- Kinal, H., Park, C. M., Berry, J., Koltin, Y. 和 J. A. Bruenn, (1995)。病毒编码的抗真菌毒素在转基因烟草植株中的加工和分泌: 植物 Kex2p 途径的证据。植物细胞 (Plant Cell) 7: 677 - 688。
- Klebl, F. 和 W. Tanner, (1989)。来自酿酒酵母的细胞壁 β -1, 3-葡萄糖外切酶的分子克隆。细菌学杂志 (J. Bacteriol.) 171: 6259 - 6264。
- Komijama, T., Shirai, T., Ohta, T., Urakami, H., Furuichi, Y. 和 Y. Ohta, (1998)。来自土星形拟威尔酵母土星形变种 (*Williopsis saturnus* var. *saturnus*) 的 HY1 放毒者毒素、抗生素、棘孢曲菌素 A、和 paulacandin B 的作用特性。生物制药学报告 (Biol. Pharm. Bull.) 21: 1013 - 1019。
- Kurz, M. B., (1998)。新的抗真菌药物靶: 对未来的展望。美国微生物学学会新闻 (ASM News) 64: 31 - 39。
- Levy, J. A., (1993)。人免疫缺陷病毒感染的发病机理。微生物学评论 (Microbiol. Rev.) 57: 183 - 289。
- Maenza, J. R., Keruly, J. C., Moore, R. D., Chaisson, R. E., Merz, W. G. 和 J. E. Gallant, (1996)。氟康唑抗性假丝酵母在人免疫缺陷病毒感染患者中的风险因子。传染病杂志 (J. Infect. Dis.) 173: 219 - 225。
- McCracken, D. A., Martin, V. J., Stark, M. J. R. 和 P. L. Bolen, (1994)。由酵母 *Pichia accaciae* 产生的线性质粒编码毒素: 表征和与乳克鲁维氏酵母毒素的比较。微生物学 (Microbiol.) 140: 425 - 431。
- Meunier, F., Aoun, M. 和 N. Bitar, (1992)。无免疫应答患者中的念珠菌血 (candidemia)。临床传染病杂志 (Clin. Infect. Dis.) 14: 120 - 125。
- Mrsa, V., Klebl, F. 和 W. Tanner, (1993)。酿酒酵母 *BGL2* 基因产物

- (一种细胞壁 β -1, 3-葡聚糖内切酶) 的纯化和表征。细菌学杂志 (J. Bacteriol.) 175: 2102 - 2106.
- Neuhausen, F. 和 M. J. Schmitt, (1996)。拜列氏接合糖酵母的毒素编码放毒者病毒在酿酒酵母中的转基因表达: “神秘的”真菌病毒在其宿主进化中可能作用的遗传证据。在《转基因生物和生物安全性: 水平基因转移、DNA稳定性、和转基因表达》, Schmidt, E. R. 和 Th. Hankeln 编, 第117 - 124页, Springer - Verlag.
- Park, C. M., Banerjee, N., Koltin, Y. 和 J. A. Bruenn, (1996)。玉蜀黍黑粉菌的病毒编码 KP1 放毒者毒素。分子微生物学 (Mol. Microbiol.) 20: 957 - 963.
- Park, C. M., Berry, J. O. 和 J. A. Bruenn, (1996)。病毒编码抗真菌毒素在转基因烟草植株中的高水平分泌。植物分子生物学 (Plant Mol. Biol.) 30: 359 - 366.
- Pfaller, M. A., Chalberg, J. R., Redding, S. W., Smith, J., Farinacci, G., Fothergill, A. W. 和 M. G. Rinaldi, (1994)。来自艾滋病与口部念珠菌病患者的白色假丝酵母口部分离菌间氟康唑易感性和电泳核型的变化。临床微生物学杂志 (J. Clin. Microbiol.) 32: 59 - 64.
- Pfeiffer, P., Radler, F., Caspritz, G. 和 H. Hänel, (1988)。应用和环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.) 54: 1068 - 1069.
- Polonelli, L., Lorenzini, R., De Bernadis, F. 和 G. Morace, (1986)。酵母放毒者毒素的潜在治疗效果。真菌病理学 (Mycopathology) 96: 103 - 107.
- Radler, F., Herzberger, S., Schönig, I. 和 P. Schwarz, (1993)。关于拜列氏接合糖酵母放毒者菌株的研究。普通微生物学杂志 (J. Gen. Microbiol.) 139: 495 - 500.
- Rex, J. H., Rinaldi, M. G. 和 M. A. Pfaller, (1995)。假丝酵母属物种对氟康唑的抗性。抗微生物剂和化疗 (Antimicrob. Agents Chemoth.) 39: 1 - 8.

- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M. A. 和 H. Bussey, (1994)。
酵母 β -1,6-葡聚糖生物合成成分 Kre6p 和 Skn1p 的表征, 以及 *PKC1*
途径与胞外基质装配之间的遗传相互作用。细胞生物学杂志 (J. Cell. Biol.) 127: 567 - 579。
- Schmitt, M. J. 和 D. J. Tipper, 1990。K28, 一种新的酿酒酵母双链 RNA
放毒者病毒。分子和细胞生物学 (Mol. Cell. Biol.) 10: 4807 -
4815。
- Schmitt, M. J. 和 D. J. Tipper, 1992。关于来自酵母放毒者病毒 K28 的 L
和 M 双链 RNA 的维持和表达的遗传分析。酵母 (Yeast) 8: 373 - 384。
- Schmitt, M. J. 和 D. J. Tipper, 1995。K28 dsRNA 的序列: 前毒素原加
工成 α/β 异二聚体蛋白质毒素。病毒学 (Virology) 213: 341 -
351。
- Schmitt, M. J. 和 F. Neuhausen, 1994。在拜列氏接合糖酵母和葡萄酒
有孢汉逊酵母中分泌放毒者毒素的双链 RNA 真菌毒素。病毒学杂
志 (J. Virol.) 68: 1765 - 1772。
- Schmitt, M. J. 和 F. Radler, 1987。酵母细胞壁的甘露糖蛋白质是酿酒
酵母 28 菌株放毒者毒素的初级受体。普通微生物学杂志 (J. Gen. Microbiol.) 133: 3347 - 3354。
- Schmitt, M. J. 和 F. Radler, 1988。酿酒酵母中放毒者毒素 K28 细胞壁
受体的分子结构。细菌学杂志 (J. Bacteriol.) 170: 2192 - 2196。
- Schmitt, M. J. 和 F. Radler, 1995。真菌病毒和酵母放毒者毒素能够洞
察细胞生物学。Forschungsmagazin der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz 2: 86 - 96。
- Schmitt, M. J. 和 F. Radler, 1996。糖酵母属酵母中 dsRNA 病毒编码的
放毒者毒素。生物工程 (BioEngineering) 2: 30 - 34。
- Schmitt, M. J. 和 G. Schernikau, 1997。基于 cDNA 的 K1/K2/K28 三元放
毒者酿酒酵母菌株的构建。食品技术和生物技术 (Food Technol. Biotechnol.) 35: 281 - 285。
- Schmitt, M. J. 和 P. Compain, 1995。酿酒酵母的放毒者毒素抗性 *kre12*

- 突变株：次级K1膜受体的遗传和生化证据。微生物学档案(Arch. Microbiol.)164: 435 - 443.
- Schmitt, M. J., 1995. 病毒K28放毒者毒素基因cDNA拷贝在酵母中的克隆和表达。分子和普通遗传学(Mol. Gen. Genet.)246: 236 - 246.
- Schmitt, M. J., Brendel, M., Schwarz, R. 和F. Radler, 1989. 酵母放毒者毒素K28对酿酒酵母中DNA合成的抑制。普通微生物学杂志(J. Gen. Microbiol.)135: 1529 - 1535.
- Schmitt, M. J., Klavehn, P., Wang, J., Schöning, I. 和D. J. Tipper, 1996. 关于酵母K28放毒者毒素作用模式的细胞周期研究。微生物学(Microbiol.)142: 2655 - 2662.
- Schmitt, M. J., Poravou, O., Trenz, K. 和K. Rehfeldt, 1997. 负责葡萄酒有孢汉逊酵母的抗假丝酵母活性的唯一双链RNA。病毒学杂志(J. Virol.)71: 8852 - 8855.
- Schröder, J., Meinhardt, F., Rohe, M. 和J. Kämper, 1994. 微生物中的线性质粒：遗传原理和潜在应用。生物工程(BioEngineering)10: 29 - 39.
- Tipper, D. J. 和M. J. Schmitt, 1991. 酵母dsRNA病毒：复制和放毒者表型。分子微生物学(Mol. Microbiol.)5: 2331 - 2338.
- Troillet, N., Durussel, C., Bille, J., Glauser, M. P. 和J. P. Chave, 1993. HIV感染患者中白色假丝酵母的体外易感性与氟康唑抗性口咽念珠菌病之间的相关性。临床微生物学和传染病杂志(J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.)12: 911 - 915.
- Walker, G. M., McLeod, A. H. 和V. J. Hodgson, 1995. 放毒者酵母与致病真菌之间的相互作用。FEMS微生物学通讯(FEMS Microbiol. Lett.)127: 213 - 222.
- Wickner, R. B., 1993. 双链RNA病毒的复制和包装。生物化学杂志(J. Biol. Chem.)268: 3797 - 3800.
- Wingard, J. R., 1995. 除作为肿瘤学患者中病原体的白色假丝酵母以外假丝酵母属物种的重要性。临床传染病(Clin. Infect.

Dis.)20: 115 - 125.

序列表

<110> Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG

<120> 新的抗真菌剂和杀真菌剂及其制备方法和应用

<130> 99F028

<140> 19930959.0

<141> 1999-07-05

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 930

<212> DNA

<213> 加州拟威尔酵母 (*Williopsis californica*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(930)

<400> 1

atg	cgt	ttc	act	aca	ctc	ggt	gcc	ctc	gca	ggt	gcc	att	tcc	tca	gtc	48
Met	Arg	Phe	Thr	Thr	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	Val	
1				5				10					15			

cag	gcc	atc	ggc	caa	cta	gct	ttt	aac	ttg	ggt	gtc	aag	gat	aac	tca	96
Gln	Ala	Ile	Gly	Gln	Leu	Ala	Phe	Asn	Leu	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	Ser	
			20					25					30			

ggt	cag	tgc	aag	act	gcc	tca	gag	tac	aag	gat	gac	ttg	tct	acc	ctt	144
Gly	Gln	Cys	Lys	Thr	Ala	Ser	Glu	Tyr	Lys	Asp	Asp	Leu	Ser	Thr	Leu	
		35					40					45				

tca	ggc	tac	aca	tct	aag	ggt	aga	gtc	tac	gct	gcc	tca	gac	tgt	aac	192
Ser	Gly	Tyr	Thr	Ser	Lys	Val	Arg	Val	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asp	Cys	Asn	
		50				55					60					

act	ttg	cag	act	ttg	ggt	cca	ggt	gtc	gaa	gag	gct	ggc	ttc	tca	ttt	240
Thr	Leu	Gln	Thr	Leu	Gly	Pro	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Gly	Phe	Ser	Phe	
	65				70				75						80	

ttc	ggt	ggt	att	tgg	cca	aac	gat	gat	gct	cac	ttc	cag	gaa	gag	caa	288
Phe	Val	Gly	Ile	Trp	Pro	Asn	Asp	Asp	Ala	His	Phe	Gln	Glu	Glu	Gln	

85	90	95	
gac gct ttg aaa act tat ttg cca aag att aag aga tcc aca gtg gag			336
Asp Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Arg Ser Thr Val Glu			
100	105	110	
gcc ttc act gtt ggt tct gag gcc ttg tat aga gat gat atg act gct			384
Ala Phe Thr Val Gly Ser Glu Ala Leu Tyr Arg Asp Asp Met Thr Ala			
115	120	125	
caa gag ttg gct gac aga atc aaa act att aga gag ttg gtt gcc act			432
Gln Glu Leu Ala Asp Arg Ile Lys Thr Ile Arg Glu Leu Val Ala Thr			
130	135	140	
att gac gac tcc gaa ggt aac tca tat gct ggt att cca gtt ggt ttc			480
Ile Asp Asp Ser Glu Gly Asn Ser Tyr Ala Gly Ile Pro Val Gly Phe			
145	150	155	160
gtt gac tcc tgg aac gtt ttg gtt gat ggt gct tct cac cca gct att			528
Val Asp Ser Trp Asn Val Leu Val Asp Gly Ala Ser His Pro Ala Ile			
165	170	175	
gtt gag gct gat gtt gtg ttc gcc aat gct ttc tct tac tgg caa ggt			576
Val Glu Ala Asp Val Val Phe Ala Asn Ala Phe Ser Tyr Trp Gln Gly			
180	185	190	
cag act cag cag aac tcg tca tac tct ttc ttt gac gac att atg caa			624
Gln Thr Gln Gln Asn Ser Ser Tyr Ser Phe Phe Asp Asp Ile Met Gln			
195	200	205	
gct ttg caa acc att caa act gct aag ggt gag aca gat atc act ttc			672
Ala Leu Gln Thr Ile Gln Thr Ala Lys Gly Glu Thr Asp Ile Thr Phe			
210	215	220	
tgg gtt ggt gag acc ggc tgg cca acc gat ggt act cac ttt gaa gac			720
Trp Val Gly Glu Thr Gly Trp Pro Thr Asp Gly Thr His Phe Glu Asp			
225	230	235	240
tct gtc cca tct gtt gag aat gct cag acc ttc tgg aaa gat gcc gtc			768
Ser Val Pro Ser Val Glu Asn Ala Gln Thr Phe Trp Lys Asp Ala Val			
245	250	255	
tgt gcc att aga ggt tgg ggt atc aat gtt att gcc ttt gag gcc ttt			816
Cys Ala Ile Arg Gly Trp Gly Ile Asn Val Ile Ala Phe Glu Ala Phe			
260	265	270	
gac gaa gct tgg aag cca gat acc tct ggt acc tct gat gtg gaa aag			864
Asp Glu Ala Trp Lys Pro Asp Thr Ser Gly Thr Ser Asp Val Glu Lys			

275

280

285

tac tgg ggt gtt tgg gac tct aac agc aag ttg aag tat gat ttg tcc 912
 Tyr Trp Gly Val Trp Asp Ser Asn Ser Lys Leu Lys Tyr Asp Leu Ser
 290 295 300

tgt gac ttt acc tct tag 930
 Cys Asp Phe Thr Ser
 305 310

<210> 2

<211> 309

<212> PRT

<213> 加州拟威尔酵母 (*Williopsis californica*)

<400> 2

Met Arg Phe Thr Thr Leu Val Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ser Ser Val
 1 5 10 15

Gln Ala Ile Gly Gln Leu Ala Phe Asn Leu Gly Val Lys Asp Asn Ser
 20 25 30

Gly Gln Cys Lys Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Asp Asp Leu Ser Thr Leu
 35 40 45

Ser Gly Tyr Thr Ser Lys Val Arg Val Tyr Ala Ala Ser Asp Cys Asn
 50 55 60

Thr Leu Gln Thr Leu Gly Pro Val Val Glu Glu Ala Gly Phe Ser Phe
 65 70 75 80

Phe Val Gly Ile Trp Pro Asn Asp Asp Ala His Phe Gln Glu Glu Gln
 85 90 95

Asp Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Arg Ser Thr Val Glu
 100 105 110

Ala Phe Thr Val Gly Ser Glu Ala Leu Tyr Arg Asp Asp Met Thr Ala
 115 120 125

Gln Glu Leu Ala Asp Arg Ile Lys Thr Ile Arg Glu Leu Val Ala Thr
 130 135 140

Ile Asp Asp Ser Glu Gly Asn Ser Tyr Ala Gly Ile Pro Val Gly Phe
 145 150 155 160

Val Asp Ser Trp Asn Val Leu Val Asp Gly Ala Ser His Pro Ala Ile

165	170	175
Val Glu Ala Asp Val Val Phe Ala Asn Ala Phe Ser Tyr Trp Gln Gly		
180	185	190
Gln Thr Gln Gln Asn Ser Ser Tyr Ser Phe Phe Asp Asp Ile Met Gln		
195	200	205
Ala Leu Gln Thr Ile Gln Thr Ala Lys Gly Glu Thr Asp Ile Thr Phe		
210	215	220
Trp Val Gly Glu Thr Gly Trp Pro Thr Asp Gly Thr His Phe Glu Asp		
225	230	235 240
Ser Val Pro Ser Val Glu Asn Ala Gln Thr Phe Trp Lys Asp Ala Val		
245	250	255
Cys Ala Ile Arg Gly Trp Gly Ile Asn Val Ile Ala Phe Glu Ala Phe		
260	265	270
Asp Glu Ala Trp Lys Pro Asp Thr Ser Gly Thr Ser Asp Val Glu Lys		
275	280	285
Tyr Trp Gly Val Trp Asp Ser Asn Ser Lys Leu Lys Tyr Asp Leu Ser		
290	295	300
Cys Asp Phe Thr Ser		
305		

<210> 3

<211> 717

<212> DNA

<213> 拜列氏接合糖酵母 (*Zygosaccharomyces bailii*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(717)

<400> 3

atg aaa gca gcc caa ata tta aca gca agt ata gta agc tta ttg cca	48
Met Lys Ala Ala Gln Ile Leu Thr Ala Ser Ile Val Ser Leu Leu Pro	
1 5 10 15	
ata tat act agt gct aga aac ata tta gac aga gaa tac aca gca aac	96
Ile Tyr Thr Ser Ala Arg Asn Ile Leu Asp Arg Glu Tyr Thr Ala Asn	
20 25 30	

gaa tta aaa act gct ttt gga gat gaa gaa att ttt aca gat ttg acg	144
Glu Leu Lys Thr Ala Phe Gly Asp Glu Glu Ile Phe Thr Asp Leu Thr	
35 40 45	
tat cac att cac gtt aac gtc agt ggc gaa att gac tct tac tat cat	192
Tyr His Ile His Val Asn Val Ser Gly Glu Ile Asp Ser Tyr Tyr His	
50 55 60	
aat tta gtc aat ttt gtc gat aac gct cta gca aac aaa gat att aat	240
Asn Leu Val Asn Phe Val Asp Asn Ala Leu Ala Asn Lys Asp Ile Asn	
65 70 75 80	
aga tat ata tac gct ata ttt aca cag cag aca aac tat aca gag gat	288
Arg Tyr Ile Tyr Ala Ile Phe Thr Gln Gln Thr Asn Tyr Thr Glu Asp	
85 90 95	
ggg ctc att gag tac tta aat cat tac gat tca gag act tgc aaa gat	336
Gly Leu Ile Glu Tyr Leu Asn His Tyr Asp Ser Glu Thr Cys Lys Asp	
100 105 110	
atc att act cag tat aat gtt aac gta gac act agt aac tgt ata agc	384
Ile Ile Thr Gln Tyr Asn Val Asn Val Asp Thr Ser Asn Cys Ile Ser	
115 120 125	
aat act aca gat caa gct aga ctc caa cgt cgc gga ggg tgg gtg aac	432
Asn Thr Thr Asp Gln Ala Arg Leu Gln Arg Arg Gly Gly Trp Val Asn	
130 135 140	
cca cat tgt agt ggt gat aac tta gcc gat act agc gat tgt tgt aac	480
Pro His Cys Ser Gly Asp Asn Leu Ala Asp Thr Ser Asp Cys Cys Asn	
145 150 155 160	
ttg gct tat aac aag att aac ccc tct tca aac tta cag tca tgg aat	528
Leu Ala Tyr Asn Lys Ile Asn Pro Ser Ser Asn Leu Gln Ser Trp Asn	
165 170 175	
tat gtt gtc ggg cag tgt cac tat att tct cac gct aat gga aag gta	576
Tyr Val Val Gly Gln Cys His Tyr Ile Ser His Ala Asn Gly Lys Val	
180 185 190	
tgt agt ggt gct gac agg caa cag tta gct gaa aat gta tgt aac tgg	624
Cys Ser Gly Ala Asp Arg Gln Gln Leu Ala Glu Asn Val Cys Asn Trp	
195 200 205	
tgt cag gtt aac ggt ggt gtt agc gct ttt gct agc agt agt tct gca	672
Cys Gln Val Asn Gly Gly Val Ser Ala Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ala	
210 215 220	

cat cca ggt gct tgc atg agt gat gta ggg ttc tgc tat gct tag 717
 His Pro Gly Ala Cys Met Ser Asp Val Gly Phe Cys Tyr Ala
 225 230 235

<210> 4

<211> 238

<212> PRT

<213> 拜列氏接合糖酵母 (*Zygosaccharomyces bailii*)

<400> 4

Met Lys Ala Ala Gln Ile Leu Thr Ala Ser Ile Val Ser Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Ile Tyr Thr Ser Ala Arg Asn Ile Leu Asp Arg Glu Tyr Thr Ala Asn
 20 25 30

Glu Leu Lys Thr Ala Phe Gly Asp Glu Glu Ile Phe Thr Asp Leu Thr
 35 40 45

Tyr His Ile His Val Asn Val Ser Gly Glu Ile Asp Ser Tyr Tyr His
 50 55 60

Asn Leu Val Asn Phe Val Asp Asn Ala Leu Ala Asn Lys Asp Ile Asn
 65 70 75 80

Arg Tyr Ile Tyr Ala Ile Phe Thr Gln Gln Thr Asn Tyr Thr Glu Asp
 85 90 95

Gly Leu Ile Glu Tyr Leu Asn His Tyr Asp Ser Glu Thr Cys Lys Asp
 100 105 110

Ile Ile Thr Gln Tyr Asn Val Asn Val Asp Thr Ser Asn Cys Ile Ser
 115 120 125

Asn Thr Thr Asp Gln Ala Arg Leu Gln Arg Arg Gly Gly Trp Val Asn
 130 135 140

Pro His Cys Ser Gly Asp Asn Leu Ala Asp Thr Ser Asp Cys Cys Asn
 145 150 155 160

Leu Ala Tyr Asn Lys Ile Asn Pro Ser Ser Asn Leu Gln Ser Trp Asn
 165 170 175

Tyr Val Val Gly Gln Cys His Tyr Ile Ser His Ala Asn Gly Lys Val
 180 185 190

Cys Ser Gly Ala Asp Arg Gln Gln Leu Ala Glu Asn Val Cys Asn Trp
195 200 205

Cys Gln Val Asn Gly Gly Val Ser Ala Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ala
210 215 220

His Pro Gly Ala Cys Met Ser Asp Val Gly Phe Cys Tyr Ala
225 230 235

说明书附图

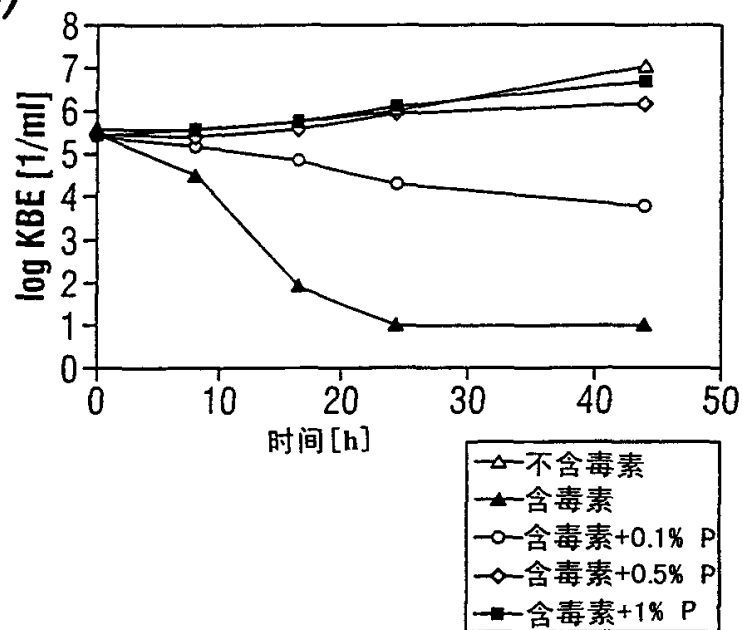
WICALTIN: $\text{NH}_2\text{-He-Gly-Gln-Leu-Ala-Phe-Asn-Leu-Gly-Val-.....}$

Bgl2: $\text{NH}_2\text{-He-Gly-Glu-Leu-Ala-Phe-Asn-Leu-Gly-Val-.....}$

图 1

图 2

2a)



2b)

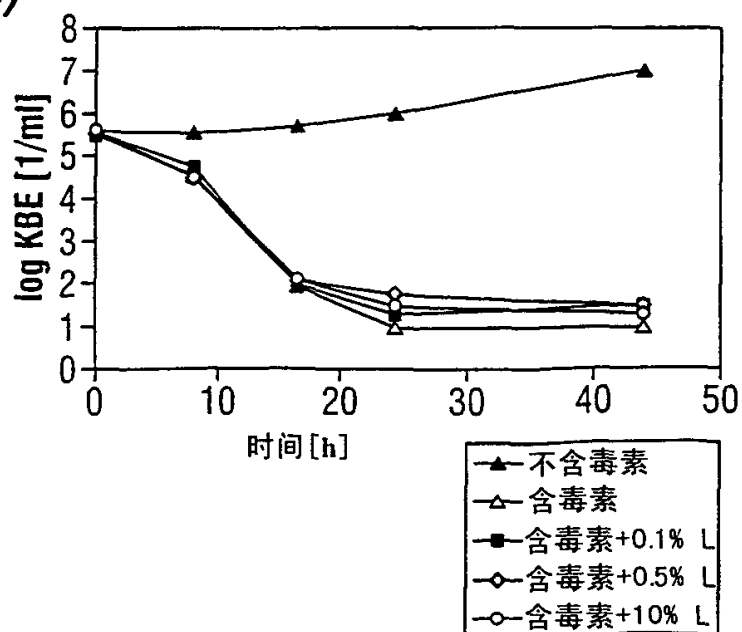
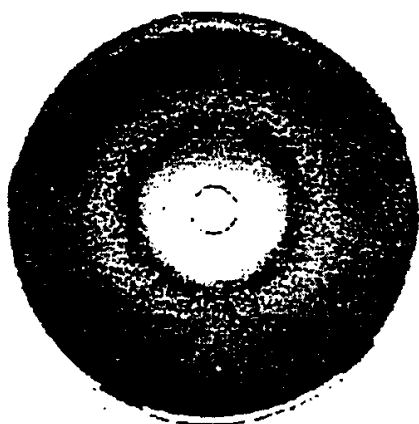


图 3

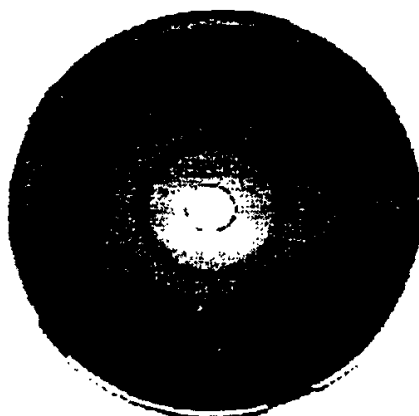
(a)

酿酒酵母 192.2d
(*kre1*⁺)



(b)

酿酒酵母 SEY6210
(*kre1*⁺)



(c)

酿酒酵母 SEY6210[□*kre1*]
含 pPGK[KRE1]
(*kre1*⁻)



(d)

酿酒酵母 SEY6210[□*kre1*]
(*kre1*⁺)

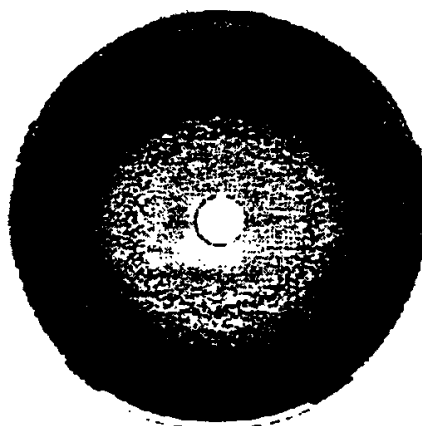
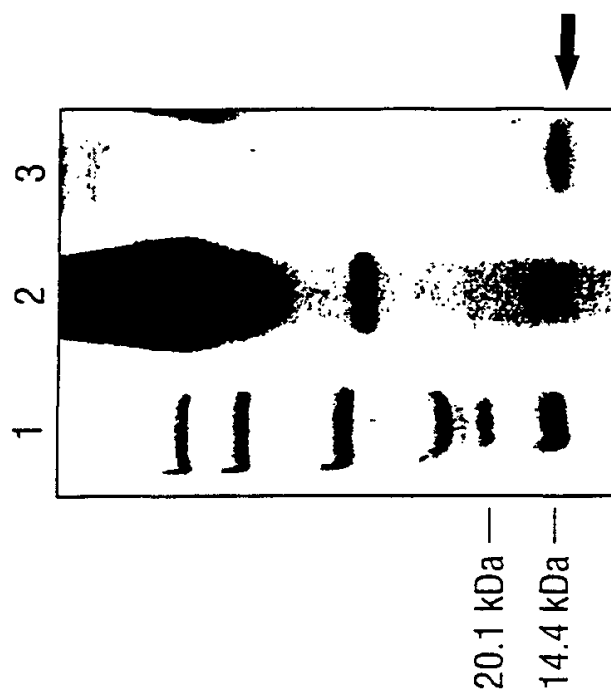


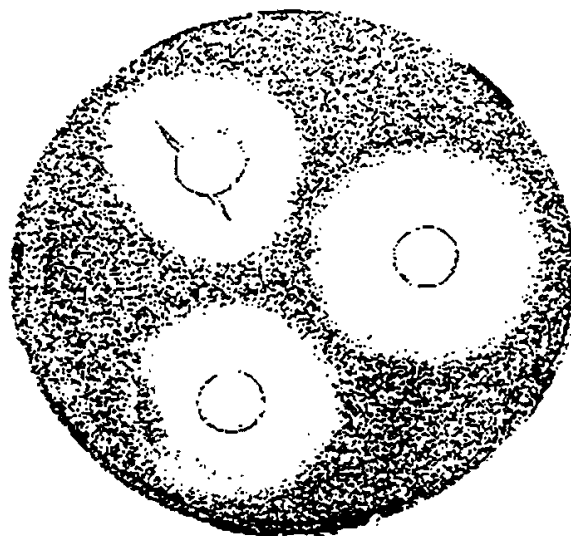
图 4

(A)



(A) 在甘露糖蛋白质-Sepharose 亲和层析之前和之后的 ZYGOCIN 的 SDS-PAGE。在甘露糖蛋白质基质上纯化 ZYGOCIN。[1:LMW 标准 (Bio-Rad)；2:洗脱物 (未结合至基质的蛋白质)；3:洗脱的毒素]

(B)



(B) 通过亲和层析纯化的 ZYGOCIN 的 MBA 测试, 将酿酒酵母 192.2d 用作敏感生物体。
A: 洗脱物, 15 倍浓缩; B: 洗脱物, 透析;
C: 洗脱物, 在洗脱缓冲液中

图 5

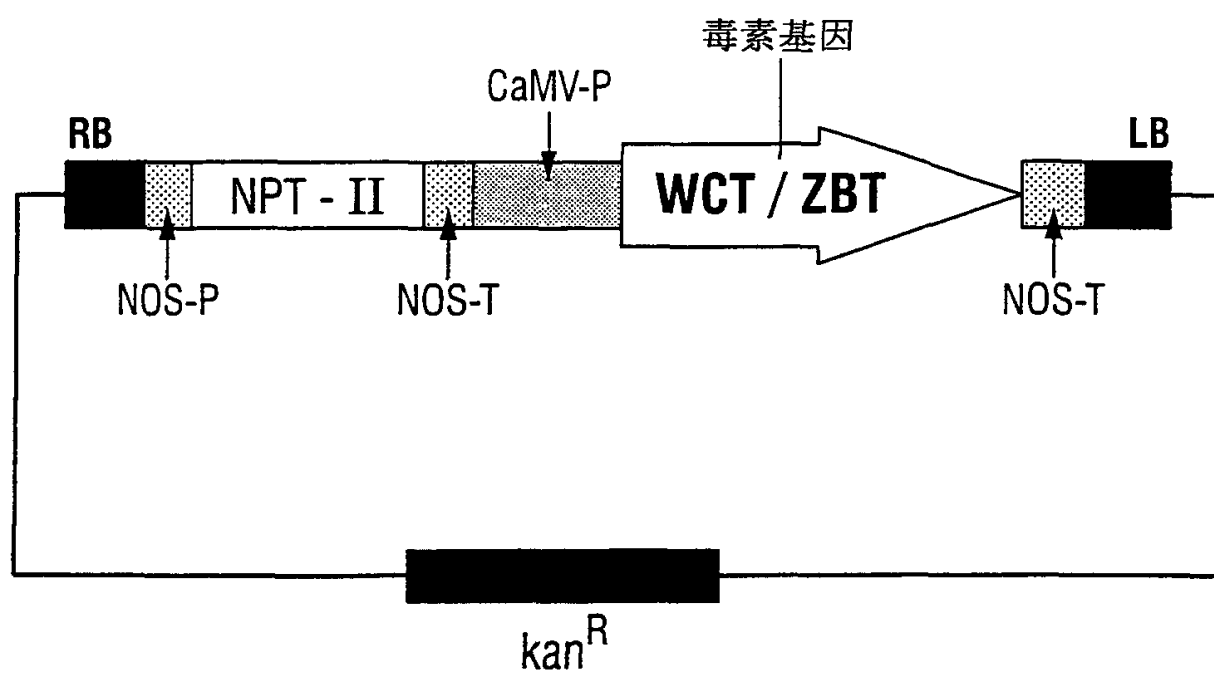
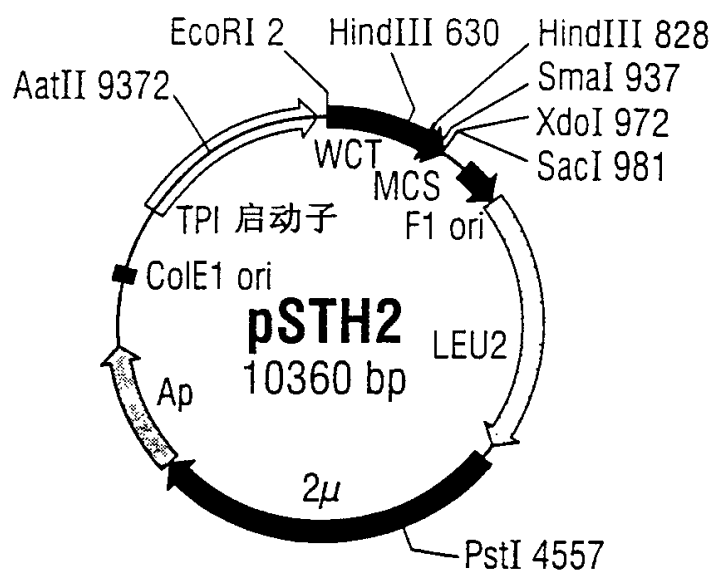
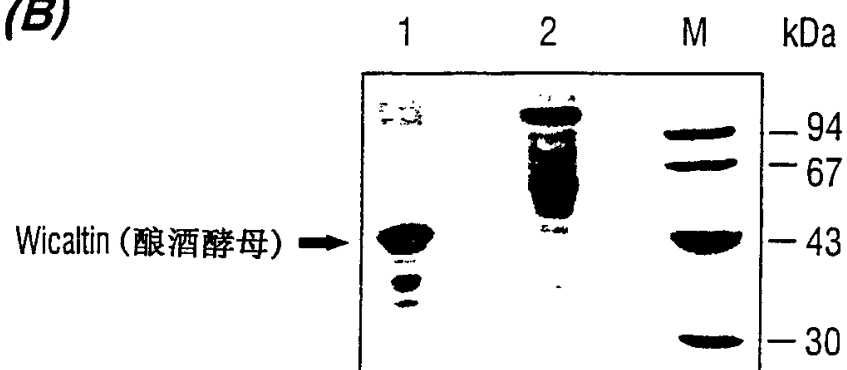


图 6

(A)



(B)



(C)



图 7

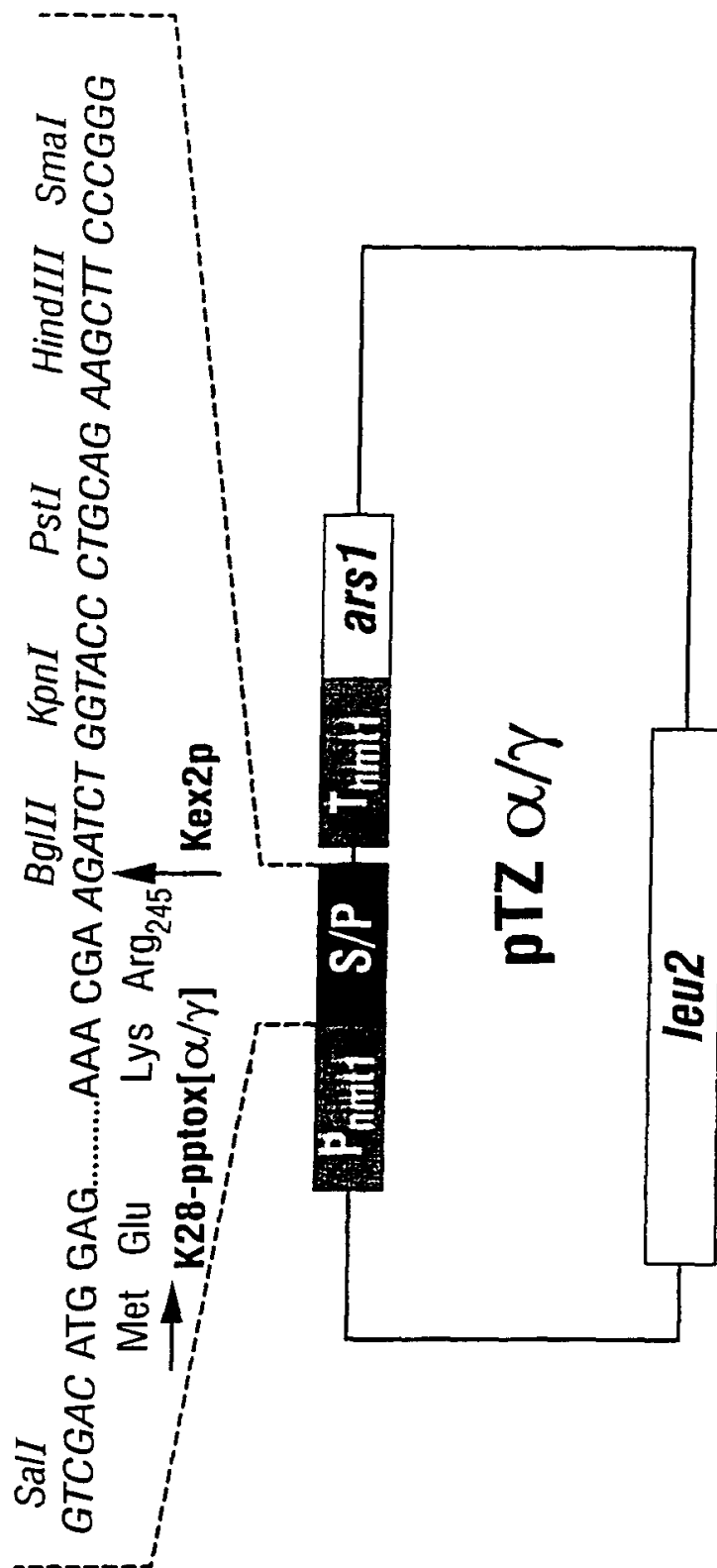


图 8

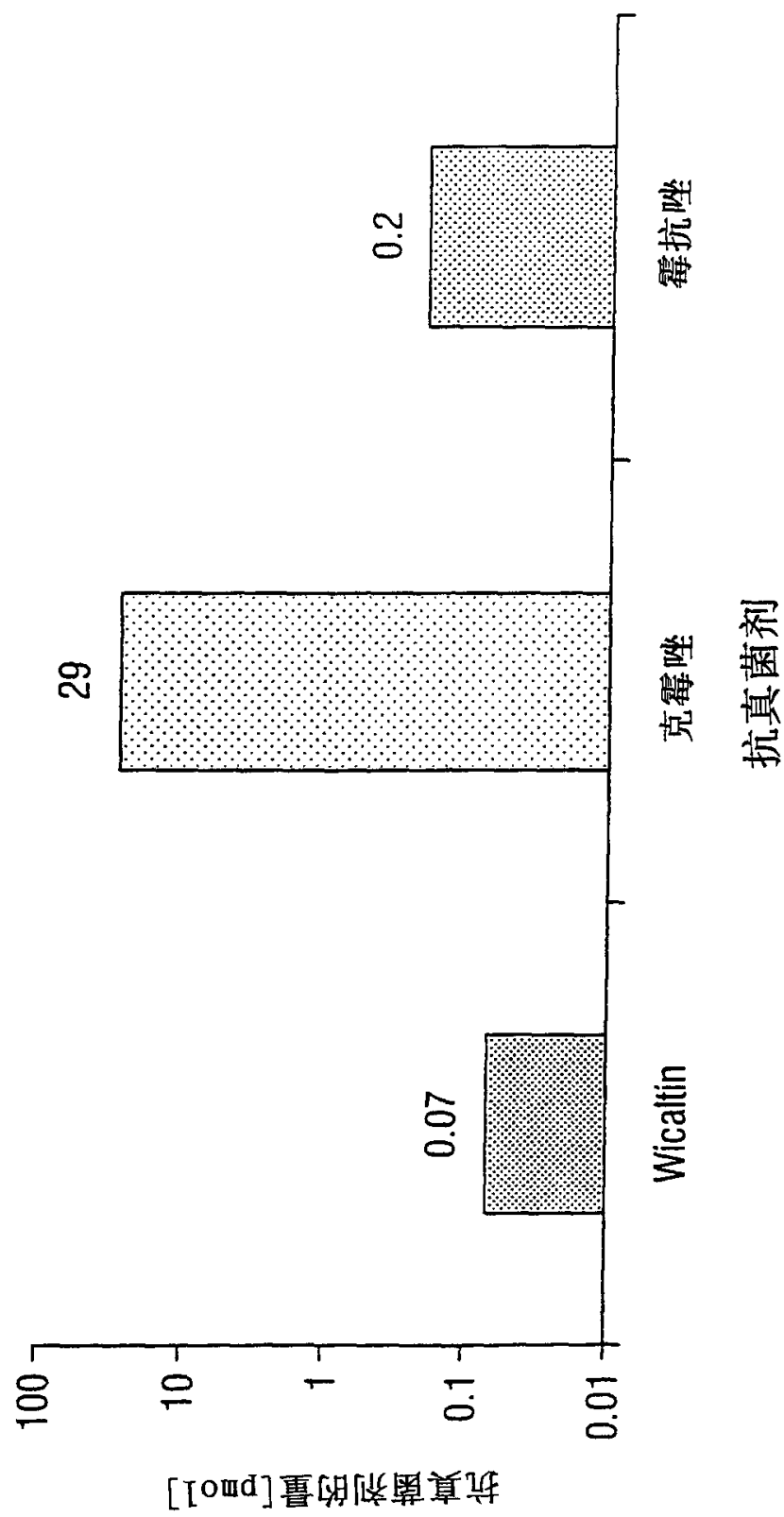
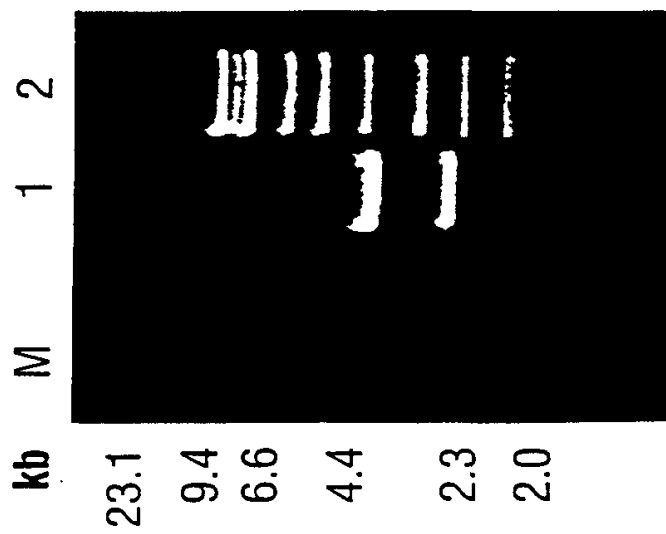


图 9

(A)



(B)

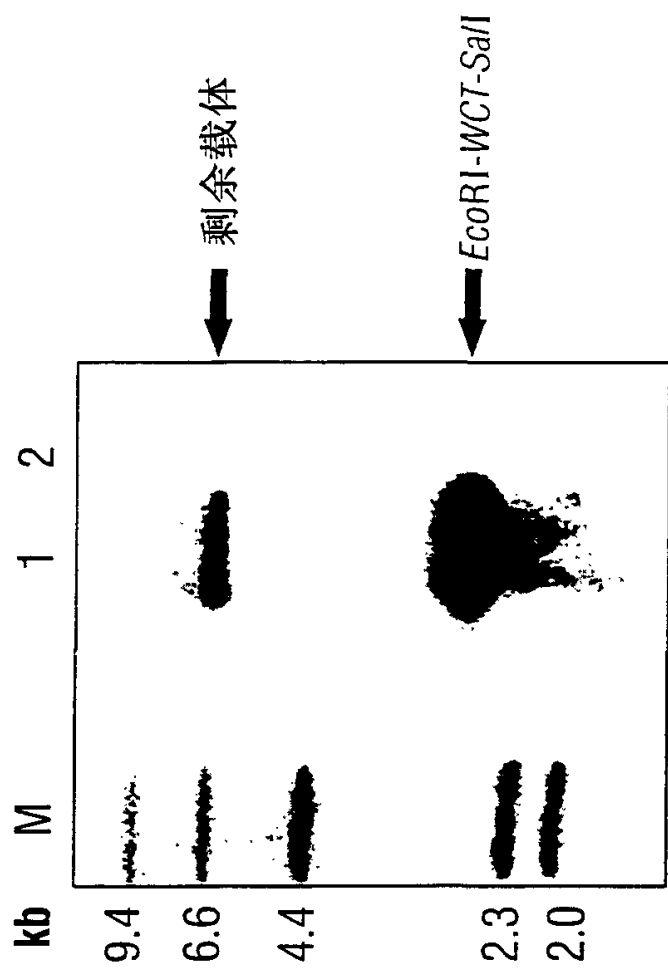
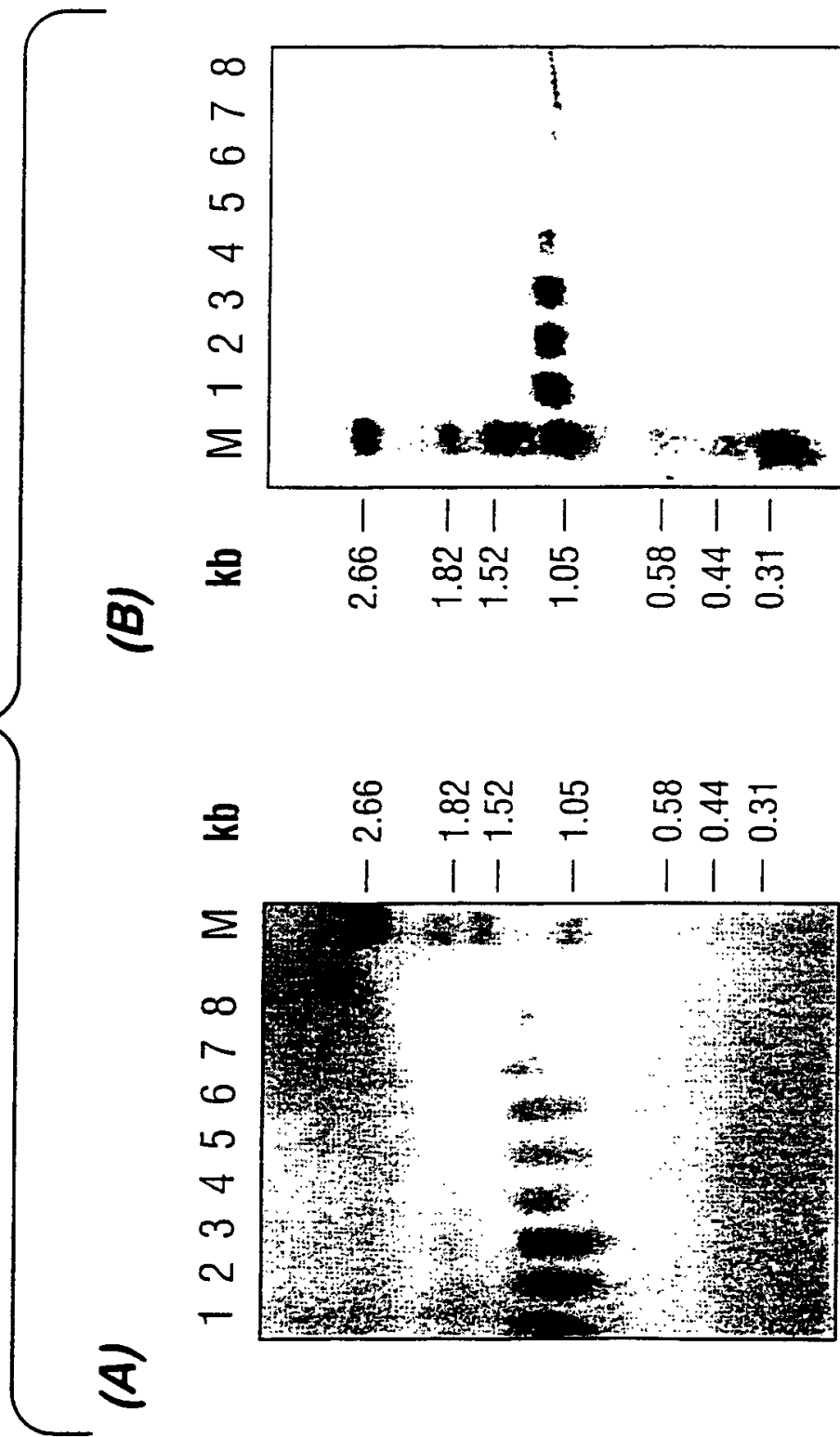


图 10



专利名称(译)	新的抗真菌剂和杀真菌剂及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN1361825A	公开(公告)日	2002-07-31
申请号	CN00809677.5	申请日	2000-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	阿温提斯研究技术两合公司		
申请(专利权)人(译)	阿温提斯研究技术两合公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿温提斯研究技术两合公司		
[标]发明人	K勒费尔德 S赛森 F维勒 M施密特		
发明人	K·勒费尔德 S·赛森 F·维勒 M·施密特		
IPC分类号	A01H1/00 A23K1/16 A23L3/3571 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/10 C07K14/39 C07K16/14 C12N1/16 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/54 C12N15/56 C12P21/02 C12Q1/68 C12R1/865 G01N33/53 G01N33/566 C12N9/24 C07K16/40 G01N33/68 G01N33/573 A61K31/70 A61K38/45 A01H5/00		
CPC分类号	A61K48/00 A61K38/00 A61K2039/505 C07K14/39		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	19930959 1999-07-05 DE		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	[22]申请日 2000.5.31 [21]申请号 00809677.5 [30]优先权 [32]1999.7.5 [33]DE [31]19930959.0 [86]国际申请 PCT/EP00/04972 2000.5.31 [87]国际公布 WO01/02587 德 2001.1.11 [85]进入国家阶段日期 2001.12.28 [71]申请人 阿温提斯研究技术两合公司 地址 德国法兰克福 [72]发明人 K·勒费尔德 S·赛森 F·维勒 M·施密特	
本发明涉及利用基因技术由酵母即所谓的放毒者酵母制备蛋白质毒素,用于控制对人和植物致病性的酵母和/或真菌,即选择性杀伤酵母和/或真菌。这种高特异性使得能够使用蛋白质毒素作为抗真菌剂和/或杀真菌剂。此外,这种蛋白质毒素可用于农作物防护。	[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 唐伟杰 权利要求书3页 说明书41页 附图页数9页	