

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/70

C12N 15/77 C12P 13/08

C12N 1/21

//C12N15/31



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01810198.4

[43] 公开日 2003 年 7 月 16 日

[11] 公开号 CN 1430672A

[22] 申请日 2001.4.6 [21] 申请号 01810198.4

[30] 优先权

[32] 2000. 5. 27 [33] DE [31] 10026494. 8

[32] 2001. 1. 23 [33] DE [31] 10102823. 7

[86] 国际申请 PCT/EP01/03980 2001. 4. 6

[87] 国际公布 WO01/92545 英 2001. 12. 6

[85] 进入国家阶段日期 2002. 11. 26

[71] 申请人 德古萨股份公司

地址 德国杜塞尔多夫市

[72] 发明人 梅希特希尔德·里平

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

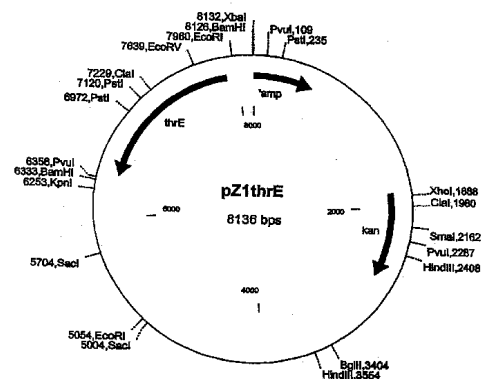
代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 16 页 序列表 9 页
PCT/RO/134 表 1 页 附图 4 页

[54] 发明名称 发酵制备 L-苏氨酸的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种使用尤其已经生产 L-苏氨酸的肠杆菌科细菌发酵生产 L-苏氨酸的方法，该细菌中编码 thrE 基因的棒状细菌的核苷酸序列被增强，尤其是过表达。



ISSN 1008-4274

1. 一种发酵生产 L-苏氨酸的方法，包括采用肠杆菌科细菌，尤其采用已经生产 L-苏氨酸的那些肠杆菌科细菌，而且其中编码 thrE 基因的棒状细菌的核苷酸序列被增强，尤其是过表达。
2. 权利要求 1 的方法，其中除了 thrE 基因之外，还有一些基因被增强。
3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述肠杆菌科的微生物来自埃希氏菌属和沙雷氏菌属。
4. 权利要求 3 的方法，其中所述微生物来自埃希氏菌属，尤其来自大肠杆菌。
5. 权利要求 1 的方法，其中编码天冬氨酸激酶，高丝氨酸脱氢酶，高丝氨酸激酶和苏氨酸合酶的 thrABC 操纵子被同时增强。
6. 权利要求 1 的方法，其中编码丙酮酸羧化酶的 pyc 基因是同时增强的。
7. 权利要求 1 的方法，其中编码磷酸烯醇丙酮酸合酶的 pps 基因被同时增强。
8. 权利要求 1 的方法，其中编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的 ppc 基因被同时增强。
9. 权利要求 1 的方法，其中编码转氢酶的 pntA 和 pntB 基因被同时增强。
10. 权利要求 1 的方法，其中采用这样的细菌，该细菌中降低 L-苏氨酸形成的代谢途径至少部分被消除。
11. 权利要求 1 的方法，其中采用用一质粒载体转化的菌株，所述质粒载体携带编码棒状细菌的 thrE 基因的核苷酸序列。
12. 权利要求 1 的方法，其中采用通过质粒 pZ1thrE 转化的细菌。
13. 权利要求 1 的方法，其中 thrE 基因的表达是被诱导的，尤

其是通过异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导。

14. 权利要求 1 的方法，其中编码谷氨酸脱氢酶的 *gdhA* 基因被同时增强。

15. 权利要求 1 的方法，其中授予高丝氨酸抗性的 *rhtB* 基因被同时增强。

16. 一种生产 L-苏氨酸的方法，其包括进行以下步骤：

a) 发酵肠杆菌科的微生物，其中至少棒状细菌的 *thrE* 基因被增强（过表达），任选地与其它基因组合增强，

b) 浓缩培养基或肠杆菌科微生物的细胞中的 L-苏氨酸，及

c) 分离所述 L-苏氨酸。

17. 含有谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的 *thrE* 基因的质粒 pZ1*thrE*。

18. 黄色短杆菌菌株 DM368-2 pZ1*thrE*，保藏在 DSMZ（德意志微生物保藏中心，德国不伦瑞克）中，保藏号为 DSM12840。

发酵制备 L-苏氨酸的方法

本发明涉及使用肠杆菌科细菌经发酵制备 L-苏氨酸的方法，该细菌中棒状细菌(*coryneform bacteria*)的 *thrE* 基因被增强。

现有技术

L-苏氨酸用于动物营养，人的药物及制药工业。已知 L-苏氨酸可通过肠杆菌科菌株，尤其大肠杆菌和粘质沙雷氏菌的发酵而生产。由于它们极其重要，不断进行改良制备方法的尝试。方法的改良可涉及发酵措施，如搅拌和供氧，或营养培养基的组分如发酵期间的糖浓度，或产物形成的加工方法，例如通过离子交换层析，或微生物本身的固有生产性质。

为改良这些微生物的生产性质，可使用诱变，选择及突变体选择等方法。以此方法可获得对抗代谢物如苏氨酸类似物 α -氨基- β -羟戊酸(AHV)，或有重要的调节氨基酸营养缺陷的并产生 L-苏氨酸的菌株。

一段时间以来，重组 DNA 技术的方法也用于生产 L-苏氨酸的肠杆菌科菌株改良，其通过扩增各个苏氨酸生物合成基因，并研究对 L-苏氨酸生产的作用而改良。

发明目的

本发明人目的在于提供新的措施以改良 L-苏氨酸的发酵制备。

发明描述

本发明提供了使用尤其是已生产 L-苏氨酸的肠杆菌科细菌发酵生产 L-苏氨酸的方法，在该肠杆菌科细菌中，棒状细菌的编码 *thrE* 基因的一或多个核苷酸序列被增强，尤其是过表达。

特别地，所述方法是一种生产 L-苏氨酸的方法，其包括以下步骤：

- a) 发酵肠杆菌科的微生物，其中至少棒状细菌的 *thrE* 基因被增强（过表达），任选地与其它基因组合增强，
- b) 浓缩培养基或肠杆菌科微生物的细胞中的 L-苏氨酸，和
- c) 分离所述 L-苏氨酸。

文中术语“增强”是指微生物中由相应的 DNA 编码的一或多种酶或蛋白质的胞内活性提高，例如通过提高基因的拷贝数，用强启动子或编码高活性相应酶或蛋白质的基因，及任选地组合使用这些方法。

本发明提供的微生物可从葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉，纤维素或从甘油和乙醇中制备 L-苏氨酸。所述微生物可以是肠杆菌科的代表菌，尤其是埃希氏菌属和沙雷氏菌属。在埃希氏菌属和沙雷氏菌属中尤其应提及的是粘质沙雷氏菌。

适当的生产 L-苏氨酸的埃希氏菌属菌株，尤其大肠杆菌菌株例如是：

- 大肠杆菌 TF427
- 大肠杆菌 H4578
- 大肠杆菌 KY10935
- 大肠杆菌 VNIIGenetika MG-442
- 大肠杆菌 VNIIGenetika M1
- 大肠杆菌 VNIIGenetika 472T23
- 大肠杆菌 BKIIM B-3996
- 大肠杆菌 kat 13
- 大肠杆菌 KCCM-10132

适当的生产 L-苏氨酸的沙雷氏菌属菌株，尤其粘质沙雷氏菌菌株例如是：

- 粘质沙雷氏菌 HNr21

粘质沙雷氏菌 TLR156

粘质沙雷氏菌 T2000

已经发现编码苏氨酸输出的棒状细菌 thrE 基因过表达后，肠杆菌科以改良的方式产生 L-苏氨酸。

棒状细菌 thrE 基因的核苷酸序列示于 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3，输出蛋白的所得氨基酸序列示于 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4。

SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 所示 thrE 基因可以根据本发明使用。得自遗传密码简并或归因于中性功能有义突变的棒状细菌 thrE 基因的等位基因也可以使用。

为获得过表达，可提高相应基因的拷贝数，或可使位于结构基因上游的启动子和调节区或核糖体结合位点突变。掺入结构基因上游的表达盒以同样方式工作。通过可诱导启动子，在 L-苏氨酸发酵生产期间提高表达也是可能的。延长 mRNA 寿命的措施也可改良表达。另外，通过防止酶蛋白的降解也可提高酶活性。基因或基因构建体可以不同拷贝数存在于质粒中，或可在染色体中整合与扩增。或者，通过改变培养基的组分和培养条件，也可获得相关基因的过表达。

以下文献中可发现对此的详述，参见 Chang 和 Cohen（细菌学杂志 134:1141-1156 (1978)），Hartley 和 Gregori（基因 13:347-353 (1981)），Amann 和 Brosius（基因 40:183-190 (1985)），Broer 等（美国国家科学学报 80:21-25 (1983)），LaVallie 等（生物/技术 11, 187-193 (1993)），PCT/US97/13359, Llosa 等（质粒 26:222-224 (1991)），Quandt 和 Klipp（基因 80:161-169 (1989)），Hamilton（细菌学杂志 171:4617-4622 (1989)），Jensen 和 Hammer（生物技术和生物工程 58, 191-195 (1998)），及已知的关于遗传和分子生物学的教材中。

可以使用能在肠杆菌科中复制的质粒载体，如衍生自 pACYC184（Bartolome 等，基因 102, 75-78 (1991)），pTrc99A（Amann 等，

(基因 69:301—315 (1988))，或 pSC101 衍生物 (Vocke 和 Bastia, 美国国家科学院院报 80 (21):6557—6561 (1983) 的克隆载体。用一种质粒载体转化的菌株可以用于本发明的方法中，所述质粒载体携带编码棒状细菌 thrE 基因的核苷酸序列。

另外，除棒状细菌 thrE 基因之外，过表达已知苏氨酸的生物合成途径的一或多种酶，或补缺代谢的酶或产生还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸的酶，对用肠杆菌科菌株生产 L-苏氨酸可以是有益的。因此，例如以下基因可以同时增强，尤其是过表达：

- 编码天冬氨酸激酶，高丝氨酸脱氢酶，高丝氨酸激酶和苏氨酸合酶的 thrABC 操纵子 (US-A-4278765)，或
- 编码丙酮酸羧化酶的 pyc 基因 (DE-A-19 831 609)，或
- 编码磷酸烯醇丙酮酸合酶的 pps 基因 (分子和普通遗传学 231:332(1992))，或
- 编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的 ppc 基因 (基因 31:279—283 (1984))，或
- 编码转氢酶的 pntA 和 pntB 基因 (欧洲生物化学杂志 158:647—653 (1986))，或
- 编码谷氨酸脱氢酶的 gdhA 基因 (基因 27:193—199 (1984))，或
- 授予 L-高丝氨酸抗性的 rhtB 基因 (EP-A-0994190)。

除过表达 thrE 基因之外，排除非所需的副反应，例如苏氨酸脱氢酶，对 L-苏氨酸的生产也是有益的 (Nakayama: “生产氨基酸的微生物的育种”，微生物产物的过量产生，Krumphanzl, Sikyta, Vanek(编辑)，学术出版社，伦敦英国，1982，及 Bell 和 Turner, 生物化学杂志 156, 449—458 (1976))。根据本发明，可以应用至少部分消除了降低 L-苏氨酸形成的代谢途径的细菌。

根据本发明产生的微生物可通过分批法 (分批培养)，或补料分批法 (补料方法) 进行培养。已知培养法见于由 Chmiel(生物方法技

术学 1, 生物方法技术入门, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991) 所著教材, 或由 Storhas(生物反应器及外周设备, Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994) 所著教材中所述。

所用培养基必须以适当方式符合各菌株的需求。关于各种微生物培养基的阐述见于美国细菌学学会的“细菌学通用方法手册”(华盛顿 D.C., USA, 1981)。可使用的碳源包括糖及碳水化合物, 例如葡萄糖, 蔗糖, 乳糖, 果糖, 麦芽糖, 糖蜜, 淀粉和纤维素, 油和脂肪如豆油, 葵花油, 花生油和椰子油, 脂肪酸如棕榈酸, 硬脂酸和亚油酸, 醇如甘油和乙醇, 及有机酸如乙酸。这些物质可单独或混合使用。可使用的氮源包括含氮的有机化合物如胨, 酵母提取物, 肉膏, 麦芽提取物, 玉米浸液, 大豆粉和尿素, 或无机化物如硫酸铵, 氯化铵, 磷酸铵, 碳酸铵和硝酸铵。氮源可单独或混合使用。可使用的磷源包括磷酸, 磷酸二氢钾或磷酸氢二钾, 或相应钠盐。培养基另外还必须含有为生长所需的金属盐如硫酸镁或硫酸铁。最后, 除了上述物质之外, 可使用生长必需物质如氨基酸和维生素。可将适当前体加入培养基中。上述物质可以单批形式或在培养期间适当补加。

可以适当方式加入碱性化合物如 NaOH, KOH, 氨或氨水, 或酸性化合物如磷酸或硫酸, 以控制 PH 值。抗泡沫剂例如脂肪酸聚乙二醇酯可用于控制泡沫产生。适当的选择性作用物质例如抗生素, 可加入培养基中以保持质粒的稳定性。氧气或含氧混合气, 例如空气, 可充入培养物中以保持有氧条件。培养温度通常在 25°C~45°C, 优选 30°C—40°C。持续培养直至 L-苏氨酸形成最大量。此目的通常在 10~160 小时范围内达到。

L-苏氨酸的分析可通过阴离子交换层析, 随后经过如 Spackman 等(分析化学 30, (1958), 1190) 所述茚三酮衍生作用进行, 或者可以通过反向 HPLC 进行, 如 Lindroth 等(分析化学 (1979) 51:1167—1174) 所述。

以下微生物根据布达佩斯条约, 已保藏在德意志微生物保藏中心

(DSMZ, 不伦瑞克, 德国) :

- 黄色短杆菌菌株 DM368-2 pZ1thrE, 保藏号 DSM 12840。

质粒 pZ1thrE 含有谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的 thrE 基因。

本发明借助于以下提供的实施例得以更详细阐述。

从大肠杆菌中分离质粒 DNA, 及进行限制, Klenow 和碱性磷酸酶处理的所有技术, 均是通过 Sambrook 等 (分子克隆实验操作指南 (1989), 冷泉港实验室出版社) 所述方法进行。转化大肠杆菌是通过 Chung 等 (美国科学院院报 (1989) 86:2172-2175) 所述方法进行。

在制备大肠杆菌菌株和转化体期间的孵育温度是 37° C。在 Hamilton 等所述 (细菌学杂志 (1989) 171:4617-4622) 基因置换过程中, 使用的温度是 30° C 和 44° C。

实施例 1 谷氨酸棒杆菌 ATCC 14752 的 thrE 基因的克隆和测序

1、转座子诱变和突变体选择

用转座子 Tn5531 诱变谷氨酸棒杆菌菌株 ATCC14752 Δ ilvA, 其序列存于国立生物技术信息中心 (Bethesda, USA) 的核苷酸数据库, 登录号为 U53587。通过 Schafer 等所述的基因交换系统, 在谷氨酸棒杆菌菌株 ATCC14752 的 ilvA 基因中掺入一个缺失 (基因 (1994) 145:69-73)。为此, 使用 Sahm 等 (应用及环境微生物学 (1999) 65: 1973-1979) 构建的灭活载体 pK19mobsacB Δ ilvA 进行缺失。首先用 200ng 载体 pK19mobsacB Δ ilvA 转化得自 Stratagene (德国海德堡) 的甲基化酶缺陷的大肠杆菌菌株 SCS110 (Jerpseth 和 Kretz, 分子生物学策略 6, 22 (1993))。在含有 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 平板上借助于其卡那霉素抗性, 鉴别转化株。所述质粒 pK19mobsacB Δ ilvA 是从所述转化

株之一中制备的。通过电穿孔法 (Haynes 等, FEMS 微生物学通信 (1989) 61:329-334), 将这个灭活的质粒导入谷氨酸棒杆菌菌株 ATCC14752 中。在含有 15 μ g/ml 卡那霉素的 LBHIS 琼脂平板上借助于其卡那霉素抗性, 鉴别其中所述灭活质粒整合入基因组中的克隆 (Liebl 等, FEMS 微生物学通信 (1989) 65:299-304)。为选择所述载体的切除, 将卡那霉素抗性克隆铺板于含有蔗糖的 LBG 培养基上 (具有 15g/L 琼脂, 2%葡萄糖和 10%蔗糖的 LB 培养基)。这提供了通过二次重组再一次丧失所述载体的菌落 (Jager 等, 细菌学杂志 (1992) 174: 5462-5465)。通过转移接种于具有和不具有 300mg/L L-异亮氨酸, 或者具有和不具有 50 μ g/ml 卡那霉素的基本培养基平板上 (具有 15g/L 琼脂的 CGXII 培养基 (Keilhauer 等, 细菌学杂志 (1993) 175: 5595-5603)), 分离 6 个由于所述载体的切除所致的卡那霉素敏感性和异亮氨酸营养缺陷型克隆, 其中基因组中目前存在不完整的 *ilvA* 基因 ($\Delta ilvA$ 等位基因)。将这些克隆之一称为菌株 ATCC14752 $\Delta ilvA$, 并用于转座子诱变。

含有组合的转座子 Tn5531 的质粒 pCGL0040 (图 1) (Ankri 等, 细菌学杂志 (1996) 178: 4412-4419) 是从甲基化酶缺陷的大肠杆菌菌株 GM2929pCGL0040 (大肠杆菌 GM2929: Palmer 等, 基因 (1994) 143:1-12) 中分离的。经电穿孔法 (Haynes 等, FEMS 微生物学通信 (1989) 61:329-334) 用质粒 pCGL0040 转化谷氨酸棒杆菌菌株 ATCC14752 $\Delta ilvA$ 。通过在含有 15 μ g/ml 卡那霉素的 LBHIS 琼脂板 (Liebl 等, FEMS 微生物学通信 (1989) 65: 299-304) 上的卡那霉素抗性鉴别转座子 Tn5531 已整合进基因组的克隆。以此方式获得 2000 个克隆, 研究它们在苏氨酸-苏氨酸-苏氨酸存在下的延迟生长。为此, 将所有克隆单独转移至具有和不具有 2mM 苏氨酸-苏氨酸-苏氨酸的 CGXII 基本培养基琼脂板上。该培养基与 Keilhauer 等 (细菌学杂志 (1993) 175: 5593-5603) 所述的 CGXII 培养基相同, 但另外含有 25 μ g/ml 卡那霉素, 300mg/L L-异亮氨酸和 15g/L 琼脂。Keilhauer 等所述的该

培养基的组成见表 1。

表 1 培养基 CGXII 的组成

| 组分 | 浓度 |
|---|----------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 20g/L |
| 尿素 | 5g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 1g/L |
| K ₂ HPO ₄ | 1g/L |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 0.25g/L |
| 3-吗啉丙磺酸 | 42g/L |
| CaCl ₂ | 10mg/L |
| FeSO ₄ x 7H ₂ O | 10mg/L |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 10mg/L |
| ZnSO ₄ x 7H ₂ O | 1mg/L |
| CuSO ₄ | 0.2mg/L |
| NiCl ₂ x 6H ₂ O | 0.02mg/L |
| 生物素 | 0.2mg/L |
| 葡萄糖 | 40g/L |
| 原儿茶酸 | 30mg/L |

琼脂板在 30℃ 保温，并在 12、18 和 24 小时后检查生长。获得一转座子突变体，其在缺少苏氨酰-苏氨酰-苏氨酸时以与起始菌株谷氨酸棒杆菌 ATCC 14752ΔilvA 相比相当的方式生长，但在存在 2mM 苏氨酰-苏氨酰-苏氨酸时生长延迟。将其命名为 ATCC14752ΔilvA thrE::Tn5531。

2、ATCC14752ΔilvA thrE::Tn5531 中 Tn5531 插入位点的克隆和测序

为克隆实施例 1.1 中所述的突变体的转座子 Tn5531 上游的插入位点，首先如 Schwarzer 等（生物/技术 (1990) 9: 84-87）所述分离这一突变体菌株的染色体 DNA，并用限制性内切酶 EcoRI 切割 400ng 该染色体 DNA。将完全限制酶切的产物连接进同样用 EcoRI 线性化的载体 pUC18 (Norander 等，基因(1983) 26: 101-106, Roche Diagnostics, Mannheim, 德国)。然后将连接混合物经电穿孔 (Dower

等, 核酸研究 (1988) 16: 6127-6145) 转化进大肠杆菌菌株 DH5 α mc^r (Grant 等, 1990, 美国科学院院报 87: 4645-4649)。经在含有 50 μ g/ml 羧苄青霉素和 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 琼脂板上的羧苄青霉素和卡那霉素抗性, 鉴别转化株, 其中转座子 Tn5531 的插入位点克隆于载体 pUC18 上。从 3 个转化体中制备质粒并经限制分析确定克隆插入的大小。用 Sanger 等的双脱氧链终止法 (美国科学院院报 (1977) 74: 5463-5467) 确定具有约 5.7kb 大小插入片段的一个质粒上的插入位点的核苷酸序列。为此, 从下列寡核苷酸引物开始测序 2.2kb 插入片段: 5'-CGG GTC TAC ACC GCT AGC CCA GG-3'。

为鉴别转座子下游的插入位点, 用限制性内切酶 XbaI 切割突变体的染色体 DNA 并连接进已用 XbaI 线性化的载体 pUC18 中。其余的克隆操作如上所述。用 Sanger 等的双脱氧链终止法 (美国科学院院报 (1977) 74: 5463-5467) 确定具有约 8.5kb 大小插入片段的一个质粒上的插入位点的核苷酸序列。为此, 从下列寡核苷酸引物开始测序 0.65kb 插入片段: 5'-CGG TGC CTT ATC CAT TCA GG-3'。

用 Lasergene 软件包 (用于 Windows 的生物计算软件, DNASTAR, Madison, USA) 分析和组装获得的核苷酸序列。这一核苷酸序列再现为 SEQ ID NO: 1。分析鉴别了长度为 1467bp 的一个开放阅读框架。相应的基因命名为 thrE。相关的基因产物包括 489 个氨基酸并再现为 SEQ ID NO: 2。

实施例 2 从谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 中克隆和测序 thrE 基因

将 thrE 基因克隆进大肠杆菌克隆载体 pUC18(Norrande^r 等, 基因 (1983) 26:101-106, Roche Diagnostic, 曼海姆, 德国)中。克隆以两步进行, 首先用衍生自 SEQ ID NO: 1 的下述寡核苷酸引物经聚合酶链反应 (PCR) 扩增来自谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的基因。

thrE-正向:

5'-CCC CTT TGA CCT GGT GTT ATT G-3'

thrE-反向:

5'-CGG CTG CGG TTT CCT CTT-3'

PCR 反应在存在 200 μ M 脱氧核苷酸三磷酸 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ M 相应寡核苷酸, 100ng 谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的染色体 DNA, 1/10 体积的 10 \times 反应缓冲液和 2.6 单位的热稳定 Taq/Pwo DNA 聚合酶混合物 (来自 Roche Diagnostics 的延伸高保真性 PCR 系统, 曼海姆, 德国) 下, 在一热循环仪 (PTC-100, MJ 研究公司, Watertown, USA) 中在如下条件下进行 30 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 58 $^{\circ}$ C 30 秒和 72 $^{\circ}$ C 2 分钟。

然后用 SureClone 连接试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, 瑞典), 根据厂商指导将约 1.9kb 大小的扩增片段连接进载体 pUC18 的 SmaI 限制位点中。用连接混合物转化大肠杆菌菌株 DH5 α mc (Grant 等, 1990, 美国科学院院报 87: 4645-4649)。经在含有 50ug/ml 羧苄青霉素的 LB 琼脂板上的羧苄青霉素抗性鉴别转化体。从 8 个转化子中制备质粒并经限制分析确定 1.9kb PCR 片段的插入片段的插入。以下将以此得到的重组质粒命名为 pUC18thrE。

用 Sanger 等的双脱氧链终止法 (美国科学院院报 (1977) 74: 5463-5467) 确定质粒 pUC18thrE 中的 1.9kb PCR 片段的核苷酸序列。为此, 用 Roche Diagnostics (曼海姆, 德国) 的下述引物测序 pUC18thrE 的完整插入片段。

通用引物:

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

反向引物:

5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

所得核苷酸序列再现为 SEQ ID NO: 3。用 Lasergene 软件包 (用于 Windows 的生物计算软件, DNASTAR, Madison, USA) 分析所获得的核苷酸序列。数据分析的结果是鉴别了一个长度为 1467bp 的开放阅读框架, 将其命名为 thrE 基因。其编码一个 489 个氨基酸的多

肽，再现为 SEQ ID NO:4。

实施例 3 谷氨酸棒杆菌 thrE 基因的表达

将实施例 2 所述的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的 thrE 基因克隆在载体 pZ1 中表达 (Menkel 等, 应用和环境微生物学 (1989) 64: 549—554)。为此, 用限制酶 SacI 和 XbaI 将质粒 pUC18thrE 切割为含有 thrE 基因的大小为 1881bp 的一个 DNA 片段。将此片段的 5' 和 3' 末端用 Klenow 酶处理。将所得 DNA 片段在载体 pZ1 中连接, 所述载体预先用 ScaI 线性化并去磷酸化。将大肠杆菌菌株 DH5 α mcr (Grant 等, 美国科学院院报 (1990) 87: 4645—4649) 用全部连接混合物转化。经在含有 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 琼脂板上的卡那霉素抗性鉴别转化体。从 2 个转化体中制备质粒并经限制分析确定 1881bp 的 ScaI/XbaI 片段的插入片段的的存在。以此方式形成的重组质粒命名为 pZ1thrE (图 2)。

经电穿孔 (Haynes 等, FEMS 微生物学通信 (1989) 61:329-334), 将质粒 pZ1thrE 导入形成苏氨酸的黄色短杆菌菌株 DM368—2 中。菌株 DM368—2 的描述见 EP—B—0 385 940, 保藏号为 DSM5399。通过在含有 15 μ g/ml 卡那霉素的 LBHIS 琼脂平板上的卡那霉素抗性 (Liebl 等, FEMS 微生物学通信 (1989) 65: 299—304) 鉴别转化体。以此方式获得黄色短杆菌菌株 DM368—pZ1thrE。

实施例 4: 构建表达质粒 pTrc99AthrE

将实施例 2 所述的谷氨酸棒杆菌菌株 ATCC13032 的 thrE 基因克隆在载体 pTrc99A 中可以在大肠杆菌中表达, 其得自 Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)。为此, 将载体 pUC18thrE 用酶 SalI 切割, 并用 Klenow 酶处理突出的 3' 末端。在用酶 KpnI 限制后, 将切割物在 0.8% 琼脂糖凝胶中分离, 并借助于 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (QIAGEN, Hilden, 德国) 分离大小为 1.9kbp 的 thrE 片段。将载体

pTrc99A 用酶 EcoRI 切割，将 3' 末端用 Klenow 酶处理，用酶 KpnI 切割并和分离的 thrE 片段连接。将连接物转化入大肠杆菌菌株 DH5 α 中。在加入了 50ug/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂 (Lennox, 病毒学 1:190 (1995)) 上选择携带 pTrc99A 的细胞。在质粒 DNA 分离及用 XbaI, BamHI, EcoRI, HindIII 和 SspI 对照切割之后，可以表明 thrE 基因的成功克隆。将所得质粒命名为 pTrc99AthrE (图 3)。

实施例 5: 用菌株 MG442/pTrc99AthrE 制备 L-苏氨酸

产生 L-苏氨酸的大肠杆菌菌株 MG442 见于专利说明书 US-A-4278765 所述，并保藏于俄罗斯国立工业微生物保藏中心 (VKPM, Moscow, 俄罗斯)，保藏号为 CMIM B-1628。

将菌株 MG442 用质粒 pTrc99AthrE 转化，并在具有 50ug/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂上选择携带质粒的细胞。然后将选择的各个菌落在基本培养基上进一步增殖，所述培养基具有以下组分：3.5g/l Na₂HPO₄*2H₂O, 1.5g/l KH₂PO₄, 1g/l NH₄Cl, 0.1g/l MgSO₄*7H₂O, 2g/l 葡萄糖, 20g/l 琼脂, 50mg/l 氨苄青霉素。在 100ml 的锥形瓶中含有的 10ml 分批培养物中检测 L-苏氨酸的形成。为此，接种含有以下组分的 10ml 预培养基：2g/l 酵母提取物, 10g/l (NH₄)₂SO₄, 1g/l KH₂PO₄, 0.5g/l MgSO₄*7H₂O, 15g/l CaCO₃, 20g/l 葡萄糖, 50mg/l 氨苄青霉素，并在得自 Kuhner AG (Birsfelden, Switzerland) 的 ESR 孵育器上，在 37° C 和 180rpm 孵育 16 小时。将 250ul 此预培养物转接种于 10ml 生产培养基中 (25g/l (NH₄)₂SO₄, 2g/l KH₂PO₄, 1g/l MgSO₄*7H₂O, 0.03g/l FeSO₄*7H₂O, 0.018g/l MnSO₄*1H₂O, 30g/l CaCO₃, 20g/l 葡萄糖)，并将此混合物在 37° C 孵育 48 小时。为诱导 thrE 基因表达，将 200mg/l 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 加入平行分批培养物中。在孵育后，用 Dr.Lange (德国柏林) 的 LP2W 光度计，在 660nm 测定波长测定培养物悬浮液的光密度 (OD)。

然后在过滤灭菌的培养上清中，用 Eppendorf-BioTronik (德国

Hamburg) 的氨基酸分析仪, 通过离子交换层析和具有茚三酮检测的后柱反应, 测定形成的 L-苏氨酸的浓度。

该实验结果示于表 2。

表 2

| 菌株 | 添加剂 | OD | L-苏氨酸 g/l |
|-------------------|------|-----|--------------|
| MG442 | — | 5.6 | 1.38 |
| MG442/pTrc99AthrE | — | 4.6 | 1.65 |
| MG442/pTrc99AthrE | IPTG | 3.6 | 3.5 |

实施例 6: 用菌株 B-3996kur Δ t_{dh}/pVIC40, pMW218thrE 制备 L-苏氨酸

产生 L-苏氨酸的大肠杆菌菌株 B-3996 见于 US-A-5175107 所述, 并保藏于俄罗斯国立工业微生物保藏中心 (VKPM, Moscow, 俄罗斯)。

6.1 在质粒载体 pMW218 中克隆 thrE 基因

将实施例 4 所述的质粒 pTrc99AthrE 用酶 SspI 切割, 将切割产物在 0.8% 琼脂糖凝胶中分离, 并借助于 “QIAquick 凝胶提取试剂盒” (QIAGEN, Hilden, 德国) 分离大小为 2.5kbp 的 DNA 片段, 其除了 thrE 基因之外还含有 trc 启动子区域和 rRNA 终止子区域。将质粒 pMW218 (Nippon 基因, Toyama, 日本) 用酶 SmaI 切割, 并与所述 thrE 片段连接。将大肠杆菌菌株 DH5 α 用连接产物转化, 并通过铺板于加入 20ug/ml 卡那霉素的 LB 琼脂上选择携带 pMW218 的细胞。在分离质粒 DNA 及用 HindIII 和 ClaI 对照切割后, 可以证实所述 thrE 基因的成功克隆。所述质粒称为 pMW218thrE (图 4)。

6.2 制备菌株 B-3996kur Δ t_{dh}/pVIC40, pMW218thrE

在无抗生素的完全培养基中培养大约 10 个子代后, 分离不再包含质粒 pVIC40 的菌株 B-3996 的衍生物。所形成的菌株是对链霉素敏感的, 并称为 B-3996kur。

使用 Hamilton 等所述方法 (细菌学杂志 (1989) 171: 4617-4622)

将一个缺失掺入 *tdh* 基因，所述方法是基于使用具有温度敏感性复制子的质粒 pMAK705。质粒 pDR121 (Ravnikar 和 Somerville, 细菌学杂志 (1987) 169: 4716-4721) 含有一个来自大肠杆菌的大小为 3.7kbp 的 DNA 片段，所述 DNA 片段编码 *tdh* 基因。为在 *tdh* 基因区域产生一个缺失，将 pDR121 用限制酶 *Cla*I 和 *Eco*RV 切割，及在用 Klenow 酶处理后连接分离的大小为 5kbp 的 DNA 片段。将连接产物在大肠杆菌菌株 DH5 α 中转化，并在加入 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂上选择携带质粒的细胞。

tdh 基因的成功缺失可以在分离质粒 DNA 及用 *Eco*RI 对照切割后证实。分离大小为 1.7kbp 的 *Eco*RI 片段，并与用 *Eco*RI 部分消化的质粒 pMAK705 连接。将连接产物在 DH5 α 中转化，并在加入 20 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂上选择携带质粒的细胞。成功的克隆在分离质粒 DNA 和用 *Eco*RI 切割后得以证实。所形成的 pMAK705 衍生物称为 pDM32。

针对基因置换，将 B-3996kur 用质粒 pDM32 转化。通过 Hamilton 等所述选择方法进行用质粒编码的缺失构建体置换染色体 *tdh* 基因，并通过标准 PCR 方法证实 (Innis 等, (1990) PCR 方案, 方法和应用指导, 科学出版社), 使用以下寡核苷酸引物:

*tdh*1: 5' -TCGCGACCTATAAGTTTGGG-3'

*tdh*2: 5' -AATACCAGCCCTTGTTTCGTG-3'

测试形成的菌株的卡那霉素敏感性并称为 B-3996kur Δ *tdh*。

将 B-3996 kur Δ *tdh* 用分离自 B-3996 的质粒 pVIC40 转化，并在补加 20 μ g/ml 链霉素的 LB 琼脂上选择携带质粒的细胞。将一个选择的单独菌落称为 B-3996kur Δ *tdh*/pVIC40，并用质粒 pMW218*thrE* 转化。在加入 20 μ g/ml 链霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 琼脂上进行选择。以此方式形成的菌株称为 B-3996kur Δ *tdh*/pVIC40, pMW218*thrE*。

6.3 制备 L-苏氨酸

如实施例 5 所述测试由菌株 B-3996kur Δ *tdh*/pVIC40 及 B-3996kur Δ *tdh*/pVIC40, pMW218*thrE* 制备的 L-苏氨酸情况。针对 B-

3996kur Δ tdh/pVIC40, 将基本培养基, 预培养基和生产培养基补加 20 μ g/ml 链霉素, 针对 B-3996kur Δ tdh/pVIC40, pMW218thrE, 加入 20 μ g/ml 链霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素。

这个实验结果示于表 3。

表 3

| 菌株 | OD (660nm) | L-苏氨酸 g/l |
|--|---------------|--------------|
| B-3996kur Δ tdh/pVIC40 | 4.7 | 6.26 |
| B-3996kur Δ tdh/pVIC40, pMW218thrE | 4.8 | 7.57 |

本发明包括以下附图:

图 1: 含有转座子 Tn5531 的质粒 pCGL0040 图。所述转座子以无暗带的箭头表示。

图 2: 含有 thrE 基因的质粒 pZ1thrE 图。

图 3: 含有 thrE 基因的质粒 pTrc99AthrE 图。

图 4: 含有 thrE 基因的质粒 pMW218thrE 图。

应知晓所述长度数值是大约值。所采用的缩写和符号有如下含义:

Amp: 氨苄青霉素抗性基因。

Kan: 卡那霉素抗性基因。

'amp: 氨苄青霉素抗性基因的 3' 部分。

oriBR322: 质粒 pBR322 的复制区。

lacI: trc 启动子的阻抑物蛋白基因。

Ptrc: trc 启动子区域, IPTG 可诱导性的。

5S: 5S rRNA 区域

rrnBT: rRNA 终止子区域。

限制酶的缩写具有以下含义：

BamHI：来自解淀粉芽孢杆菌的限制性内切酶

BglII：来自 *Bacillus globigii* 的限制性内切酶

ClaI：来自 *Caryphanon latum* 的限制性内切酶

EcoRI：来自大肠杆菌的限制性内切酶

EcoRV：来自大肠杆菌的限制性内切酶

HindIII：来自流感杆菌的限制性内切酶

KpnI：来自肺炎杆菌的限制性内切酶

PstI：来自斯氏普罗威登斯菌的限制性内切酶

PvuI：来自普通变形杆菌的限制性内切酶

SacI：来自 *Streptomyces achromogenes* 的限制性内切酶

SalI：来自白色链霉菌的限制性内切酶

SmaI：来自粘质沙雷氏菌的限制性内切酶

XbaI：来自 *Xanthomonas badrii* 的限制性内切酶

XhoI：来自 *Xanthomonas holcicola* 的限制性内切酶

<110> 德古萨股份公司

<120> 发酵制备 L-苏氨酸的方法

<130> 000225 BT

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2817

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒状杆菌 ATCC14752

<220>

<221> CDS

<222> (398)..(1864)

<223> thrE 基因

<400> 1

```

aatgaaataa tcccctcacc aactggcgac attcaaacac cgtttcattt ccaaaccatcg 60
agccaaggga aaagaaagcc cctaagcccc gtgttattaa atggagactc tttggagacc 120
tcaagccaaa aaggggcatt tcattaaga aaatacccct ttgacctggt gttattgagc 180
tggagaagag acttgaactc tcaacctacg cattacaagt gcgttgcgct gccaatcgcg 240
ccactccagc accgcagatg ctgatgatca acaactacga atacgtatct tagcgtatgt 300
gtacatcaca atggaattcg ggctagagt atctggtgaa ccgtgcataa acgacctgtg 360
attggactct ttttcttgc aaaatgtttt ccagcgg atg ttg agt ttt gcg acc 415
                               Met Leu Ser Phe Ala Thr
                               1           5
ctt cgt ggc cgc att tca aca gtt gac gct gca aaa gcc gca cct ccg 463
Leu Arg Gly Arg Ile Ser Thr Val Asp Ala Ala Lys Ala Ala Pro Pro
                10                15                20
cca teg cca cta gcc ccg att gat ctc act gac cat agt caa gtg gcc 511
Pro Ser Pro Leu Ala Pro Ile Asp Leu Thr Asp His Ser Gln Val Ala
                25                30                35
ggt gtg atg aat ttg gct gcg aga att ggc gat att ttg ctt tct tca 559
Gly Val Met Asn Leu Ala Ala Arg Ile Gly Asp Ile Leu Leu Ser Ser
                40                45                50
ggt acg tca aac agt gat acc aag gtg caa gtt cga gcg gtg acc tct 607
Gly Thr Ser Asn Ser Asp Thr Lys Val Gln Val Arg Ala Val Thr Ser
                55                60                65                70
gcg tat ggc ctg tac tat acg cat gtg gat atc acg ttg aat acg atc 655
Ala Tyr Gly Leu Tyr Tyr Thr His Val Asp Ile Thr Leu Asn Thr Ile
                75                80                85
acc atc ttc acc aac atc ggt gtg gag agg aag atg ccg gtc aac gtg 703

```


ctg atg ggt tct gcg ttt tat tac ctc ttc gtt gtt tat tta ggc ccc 1471
 Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe Val Val Tyr Leu Gly Pro
 345 350 355

gtc tct gcc gct gcg att gct gca aca gca gtt ggt ttc act ggt ggt 1519
 Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala Val Gly Phe Thr Gly Gly
 360 365 370

ttg ctt gcc cgt cga ttc ttg att cca ccg ttg att gtg gcg att gcc 1567
 Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro Leu Ile Val Ala Ile Ala
 375 380 385 390

ggc atc aca cca atg ctt cca ggt cta gca att tac cgc gga atg tac 1615
 Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala Ile Tyr Arg Gly Met Tyr
 395 400 405

gcc acc ttg aat gat caa aca ctc atg ggt ttc acc aac att gcg gtt 1663
 Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly Phe Thr Asn Ile Ala Val
 410 415 420

gct tta gcc act gct tca tca ctt gcc gct ggc gtg gtt ttg ggt gag 1711
 Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala Gly Val Val Leu Gly Glu
 425 430 435

tgg att gcc cgc agg cta cgt cgt cca cca cgc ttc aac cca tac cgt 1759
 Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro Arg Phe Asn Pro Tyr Arg
 440 445 450

gca ttt acc aag gcg aat gag ttc tcc ttc cag gag gaa gct gag cag 1807
 Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe Gln Glu Glu Ala Glu Gln
 455 460 465 470

aat cag cgc cgg cag aga aaa cgt cca aag act aat caa aga ttc ggt 1855
 Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys Thr Asn Gln Arg Phe Gly
 475 480 485

aat aaa agg taaaaatcaa cctgcttagg cgtctttcgc ttaaatagcg 1904
 Asn Lys Arg

tagaatatcg ggtcgatcgc ttttaaacac tcaggaggat ccttgccggc caaaatcacg 1964

gacactcgtc ccacccaga atcccttcac gctgttgaag aggaaaccgc agccggtgcc 2024

cgcaggattg ttgccaceta ttctaaggac ttcttcgacg gcgtcacttt gatgtgcatg 2084

ctcggcgttg aacctcaggg cctgcgttac accaaggtcg cttctgaaca cgaggaagct 2144

cagccaaaga aggctacaaa gcggactcgt aaggcaccag ctaagaaggc tgctgctaag 2204

aaaacgacca agaagaccac taagaaaact actaaaaaga ccaccgcaa gaagaccaca 2264

aagaagtctt aagccggtc ttatatggat gattccaata gctttgtagt tgttgctaac 2324

cgtctgccag tggatatgac tgtccacca gatggtagct atagcatctc cccagcccc 2384

ggtggccttg tcacggggct ttccccggt ctggaacaac atcgtggatg ttgggtcgga 2444

tggcctggaa ctgtagatgt tgcaccgaa ccatttcgaa cagatacggg tgttttgctg 2504

caccctgttg tcctcactgc aagtgactat gaaggcttct acgagggctt ttcaaagca 2564

acgctgtggc ctcttttcca cgatttgatt gtactccgg tgtacaacac cgattggtgg 2624

catgcgtttc gggaagtaaa cctcaagttc gctgaagccg tgagccaagt ggcggcacac 2684
 ggtgccactg tgtgggtgca ggactatcag ctggttctgg ttcttgcat tttgcgccag 2744
 atgcgccctg atttgaagat cggtttcttc ctccacattc ccttccttc cctgatctg 2804
 ttccgtcagc tgc 2817

<210> 2
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> 谷氨酸棒状杆菌 ATCC14752

<400> 2
 Met Leu Ser Phe Ala Thr Leu Arg Gly Arg Ile Ser Thr Val Asp Ala
 1 5 10 15
 Ala Lys Ala Ala Pro Pro Pro Ser Pro Leu Ala Pro Ile Asp Leu Thr
 20 25 30
 Asp His Ser Gln Val Ala Gly Val Met Asn Leu Ala Ala Arg Ile Gly
 35 40 45
 Asp Ile Leu Leu Ser Ser Gly Thr Ser Asn Ser Asp Thr Lys Val Gln
 50 55 60
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Tyr Gly Leu Tyr Tyr Thr His Val Asp
 65 70 75 80
 Ile Thr Leu Asn Thr Ile Thr Ile Phe Thr Asn Ile Gly Val Glu Arg
 85 90 95
 Lys Met Pro Val Asn Val Phe His Val Val Gly Lys Leu Asp Thr Asn
 100 105 110
 Phe Ser Lys Leu Ser Glu Val Asp Arg Leu Ile Arg Ser Ile Gln Ala
 115 120 125
 Gly Ala Thr Pro Pro Glu Val Ala Glu Lys Ile Leu Asp Glu Leu Glu
 130 135 140
 Gln Ser Pro Ala Ser Tyr Gly Phe Pro Val Ala Leu Leu Gly Trp Ala
 145 150 155 160
 Met Met Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Leu Gly Gly Gly Trp Gln Val
 165 170 175
 Ser Leu Ile Ala Phe Ile Thr Ala Phe Thr Ile Ile Ala Thr Thr Ser
 180 185 190
 Phe Leu Gly Lys Lys Gly Leu Pro Thr Phe Phe Gln Asn Val Val Gly
 195 200 205
 Gly Phe Ile Ala Thr Leu Pro Ala Ser Ile Ala Tyr Ser Leu Ala Leu
 210 215 220
 Gln Phe Gly Leu Glu Ile Lys Pro Ser Gln Ile Ile Ala Ser Gly Ile
 225 230 235 240
 Val Val Leu Leu Ala Gly Leu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Asp Gly
 245 250 255

Ile Thr Gly Ala Pro Val Thr Ala Ser Ala Arg Phe Phe Glu Thr Leu
 260 265 270
 Leu Phe Thr Gly Gly Ile Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu
 275 280 285
 Ser Glu Ile Leu His Val Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Ala
 290 295 300
 Pro Asn Tyr Ser Ser Thr Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Phe Ala Val Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile
 325 330 335
 Ile Ala Gly Leu Thr Ala Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe
 340 345 350
 Val Val Tyr Leu Gly Pro Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala
 355 360 365
 Val Gly Phe Thr Gly Gly Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro
 370 375 380
 Leu Ile Val Ala Ile Ala Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala
 385 390 395 400
 Ile Tyr Arg Gly Met Tyr Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly
 405 410 415
 Phe Thr Asn Ile Ala Val Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala
 420 425 430
 Gly Val Val Leu Gly Glu Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro
 435 440 445
 Arg Phe Asn Pro Tyr Arg Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe
 450 455 460
 Gln Glu Glu Ala Glu Gln Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys
 465 470 475 480
 Thr Asn Gln Arg Phe Gly Asn Lys Arg
 485

<210> 3
 <211> 1909
 <212> DNA
 <213> 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032

<220>
 <221> CDS
 <222> (280)..(1746)
 <223> thrE 基因

<400> 3
 agcttgcatg cctgcaggtc gactctagag gatcccccc ctttgacctg gtgttattga 60
 gctggagaag agacttgaac tctcaaccta cgcattacaa gtgcggttgcg ctgccaattg 120
 cgccactcca gcaccgcaga tgctgatgat caacaactac gaatacgtat cttagcgtat 180

atc aaa ccg agc cag atc atc gca tct gga att gtt gtg ctg ttg gca 1014
 Ile Lys Pro Ser Gln Ile Ile Ala Ser Gly Ile Val Val Leu Leu Ala
 230 235 240 245

ggt ttg aca ctc gtg caa tct ctg cag gac ggc atc acg ggc gct ccg 1062
 Gly Leu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Asp Gly Ile Thr Gly Ala Pro
 250 255 260

gtg aca gca agt gca cga ttt ttc gaa aca ctc ctg ttt acc ggc ggc 1110
 Val Thr Ala Ser Ala Arg Phe Phe Glu Thr Leu Leu Phe Thr Gly Gly
 265 270 275

att gtt gct ggc gtg ggt ttg ggc att cag ctt tct gaa atc ttg cat 1158
 Ile Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu Ser Glu Ile Leu His
 280 285 290

gtc atg ttg cct gcc atg gag tcc gct gca gca cct aat tat tcg tct 1206
 Val Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Ala Pro Asn Tyr Ser Ser
 295 300 305

aca ttc gcc cgc att atc gct ggt ggc gtc acc gca gcg gcc ttc gca 1254
 Thr Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Ala Phe Ala
 310 315 320 325

gtg ggt tgt tac gcg gag tgg tcc tcg gtg att att gcg ggg ctt act 1302
 Val Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile Ile Ala Gly Leu Thr
 330 335 340

gcg ctg atg ggt tct gcg ttt tat tac ctc ttc gtt gtt tat tta ggc 1350
 Ala Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe Val Val Tyr Leu Gly
 345 350 355

ccc gtc tct gcc gct gcg att gct gca aca gca gtt ggt ttc act ggt 1398
 Pro Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala Val Gly Phe Thr Gly
 360 365 370

ggt ttg ctt gcc cgt cga ttc ttg att cca ccg ttg att gtg gcg att 1446
 Gly Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro Leu Ile Val Ala Ile
 375 380 385

gcc ggc atc aca cca atg ctt cca ggt cta gca att tac cgc gga atg 1494
 Ala Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala Ile Tyr Arg Gly Met
 390 395 400 405

tac gcc acc ctg aat gat caa aca ctc atg ggt ttc acc aac att gcg 1542
 Tyr Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly Phe Thr Asn Ile Ala
 410 415 420

gtt gct tta gcc act gct tca tca ctt gcc gct ggc gtg gtt ttg ggt 1590
 Val Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala Gly Val Val Leu Gly
 425 430 435

gag tgg att gcc cgc agg cta cgt cgt cca cca cgc ttc aac ccg tac 1638
 Glu Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro Arg Phe Asn Pro Tyr
 440 445 450

cgt gca ttt acc aag gcg aat gag ttc tcc ttc cag gag gaa gct gag 1686
 Arg Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe Gln Glu Glu Ala Glu
 455 460 465

cag aat cag cgc cgg cag aga aaa cgt cca aag act aat cag aga ttc 1734

Gln Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys Thr Asn Gln Arg Phe
 470 475 480 485

ggt aat aaa agg taaaaatcaa cctgcttagg cgtctttcgc ttaaatagcg 1786
 Gly Asn Lys Arg

tagaatatcg ggtcgcgcg ttttaaacac tcaggaggat ccttgccgcg caaaatcacg 1846
 gacactcgtc ccaccccaga atcccttcac gctgttgaag aggaaaccgc agccggggta 1906
 ccg 1909

<210> 4
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032

<400> 4
 Met Leu Ser Phe Ala Thr Leu Arg Gly Arg Ile Ser Thr Val Asp Ala
 1 5 10 15

Ala Lys Ala Ala Pro Pro Pro Ser Pro Leu Ala Pro Ile Asp Leu Thr
 20 25 30

Asp His Ser Gln Val Ala Gly Val Met Asn Leu Ala Ala Arg Ile Gly
 35 40 45

Asp Ile Leu Leu Ser Ser Gly Thr Ser Asn Ser Asp Thr Lys Val Gln
 50 55 60

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Tyr Gly Leu Tyr Tyr Thr His Val Asp
 65 70 75 80

Ile Thr Leu Asn Thr Ile Thr Ile Phe Thr Asn Ile Gly Val Glu Arg
 85 90 95

Lys Met Pro Val Asn Val Phe His Val Val Gly Lys Leu Asp Thr Asn
 100 105 110

Phe Ser Lys Leu Ser Glu Val Asp Arg Leu Ile Arg Ser Ile Gln Ala
 115 120 125

Gly Ala Thr Pro Pro Glu Val Ala Glu Lys Ile Leu Asp Glu Leu Glu
 130 135 140

Gln Ser Pro Ala Ser Tyr Gly Phe Pro Val Ala Leu Leu Gly Trp Ala
 145 150 155 160

Met Met Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Leu Gly Gly Gly Trp Gln Val
 165 170 175

Ser Leu Ile Ala Phe Ile Thr Ala Phe Thr Ile Ile Ala Thr Thr Ser
 180 185 190

Phe Leu Gly Lys Lys Gly Leu Pro Thr Phe Phe Gln Asn Val Val Gly
 195 200 205

Gly Phe Ile Ala Thr Leu Pro Ala Ser Ile Ala Tyr Ser Leu Ala Leu
 210 215 220

Gln Phe Gly Leu Glu Ile Lys Pro Ser Gln Ile Ile Ala Ser Gly Ile
 225 230 235 240

Val Val Leu Leu Ala Gly Leu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Asp Gly
 245 250 255
 Ile Thr Gly Ala Pro Val Thr Ala Ser Ala Arg Phe Phe Glu Thr Leu
 260 265 270
 Leu Phe Thr Gly Gly Ile Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu
 275 280 285
 Ser Glu Ile Leu His Val Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Ala
 290 295 300
 Pro Asn Tyr Ser Ser Thr Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Phe Ala Val Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile
 325 330 335
 Ile Ala Gly Leu Thr Ala Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe
 340 345 350
 Val Val Tyr Leu Gly Pro Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala
 355 360 365
 Val Gly Phe Thr Gly Gly Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro
 370 375 380
 Leu Ile Val Ala Ile Ala Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala
 385 390 395 400
 Ile Tyr Arg Gly Met Tyr Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly
 405 410 415
 Phe Thr Asn Ile Ala Val Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala
 420 425 430
 Gly Val Val Leu Gly Glu Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro
 435 440 445
 Arg Phe Asn Pro Tyr Arg Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe
 450 455 460
 Gln Glu Glu Ala Glu Gln Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys
 465 470 475 480
 Thr Asn Gln Arg Phe Gly Asn Lys Arg
 485

关于微生物保藏的说明
(PCT 细则 13 之二)

| | |
|---|----------------|
| A. 对说明书第 <u>6</u> 页, 第 <u>1-2</u> 行所述的微生物的说明。 | |
| B. 保藏事项 其它保藏在补充页中 <input type="checkbox"/> | |
| 保藏单位名称 德意志微生物保藏中心 | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国不伦瑞克 (邮编 D-38124) | |
| 保藏日期 1999 年 6 月 3 日 | 保藏编号 DSM 12840 |
| C. 补充说明 (必要时) 本栏有补充页 <input type="checkbox"/> | |
| | |
| D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的) | |
| | |
| E. 补充说明 (必要时) | |
| 下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”) | |
| | |

| |
|---|
| 由受理局填写 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到 |
| 受权官员 |

| |
|------------------------------------|
| 由国际局填写 |
| <input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期 |
| 受权官员 |

PCT/RO/134 表 (1992 年 7 月)

图1

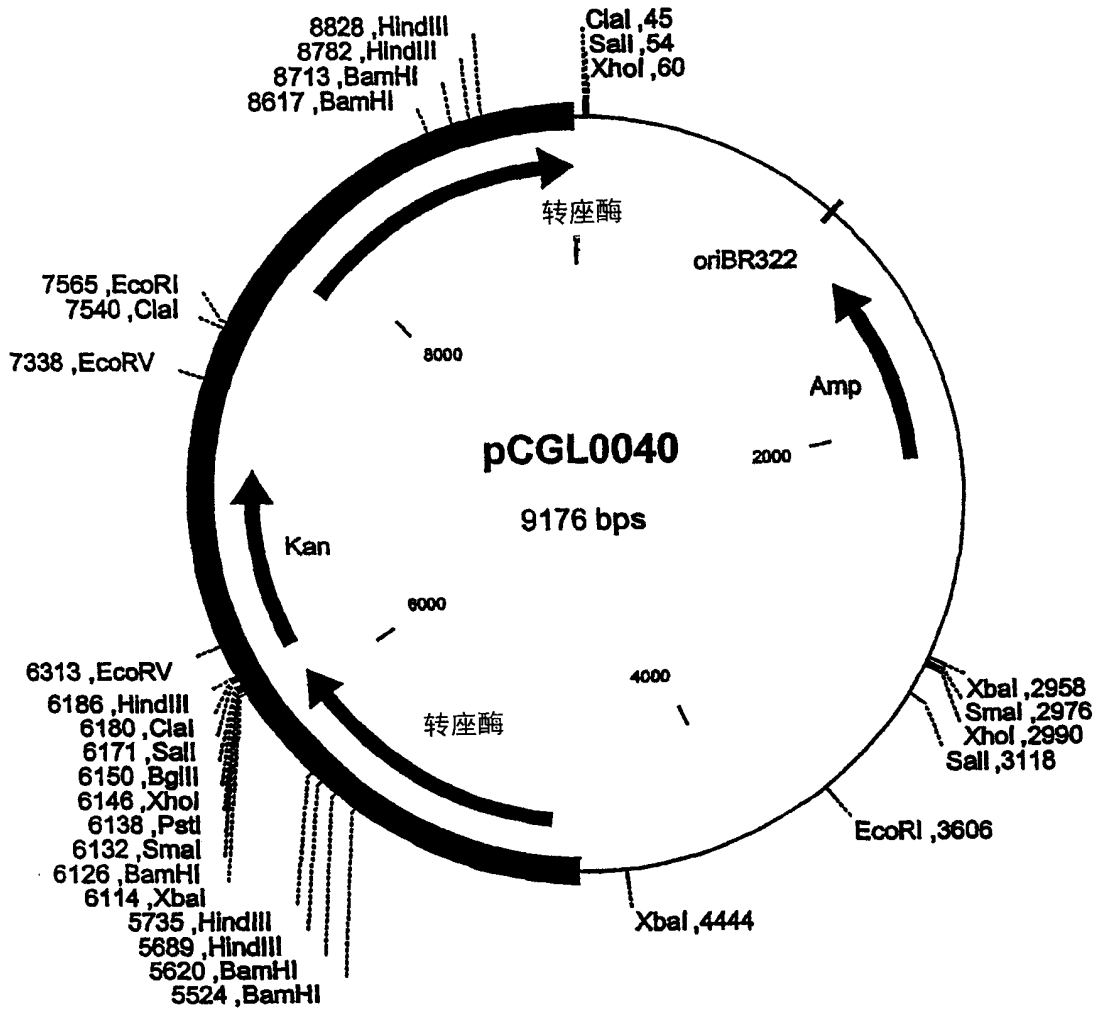


图2

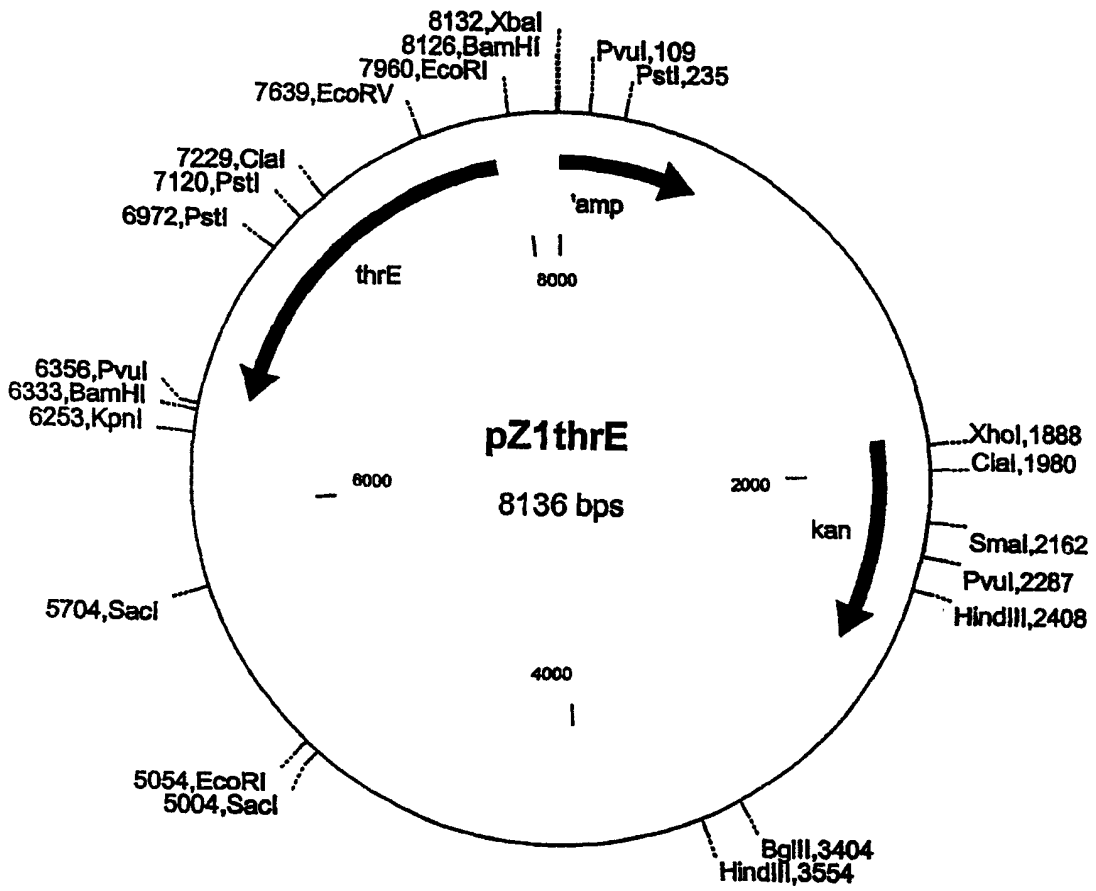


图3

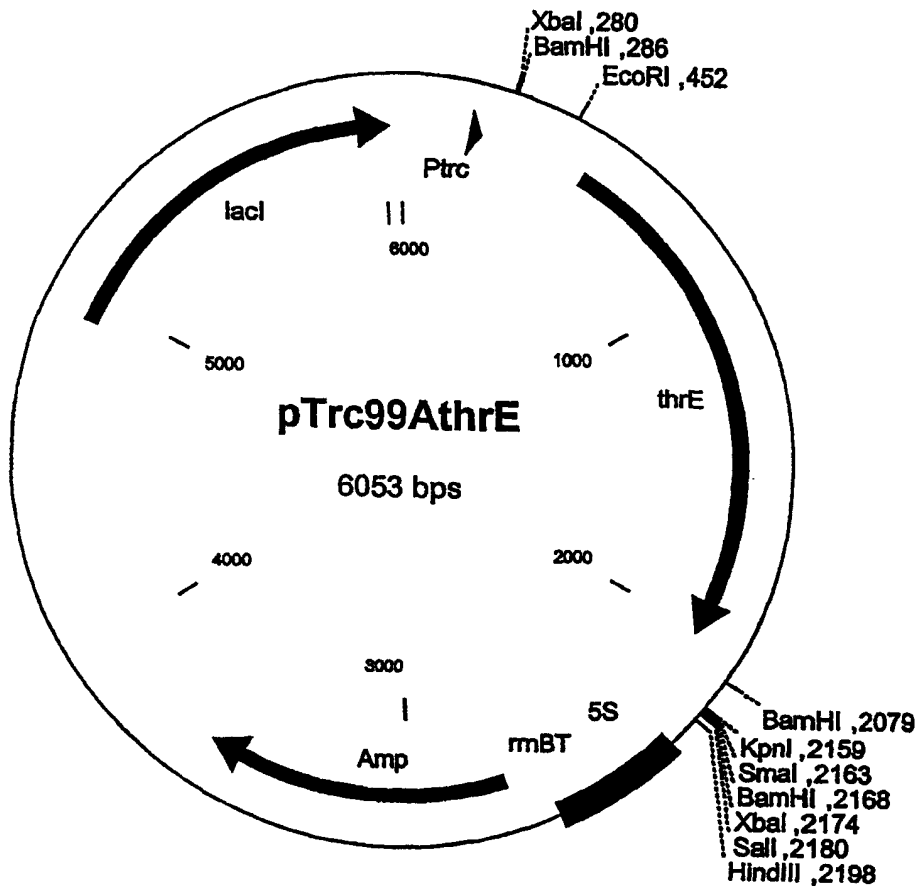


图 4

