



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1989252 B

(45) 授权公告日 2012.07.18

(21) 申请号 200580024779.X

C12R 1/00(2006.01)

(22) 申请日 2005.07.20

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

102004035052.3 2004.07.20 DE

WO 2004050694 A, 2004.06.17, 全文.

US 2003162267 A, 2003.08.28, 全文.

WO 03023044 A, 2003.03.20, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.01.22

Daniel Alexander Rey et al. The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing aminoacids in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* 103 1. 2003, 第 51 页 - 第 63 页.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2005/007925 2005.07.20

(87) PCT申请的公布数据

W02006/008152 DE 2006.01.26

(73) 专利权人 赢创德固赛有限公司

地址 德国埃森

审查员 马岚

(72) 发明人 U·绍尔 J·曼佩尔 H·施罗德

S·哈夫纳 O·策尔德尔

A·赫罗尔德 C·克洛普罗格

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 隗永良

(51) Int. Cl.

C12N 15/00(2006.01)

C12P 13/12(2006.01)

C12P 1/00(2006.01)

C12P 11/00(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 34 页

序列表 8 页 附图 5 页

(54) 发明名称

生产含硫化合物的微生物

(57) 摘要

本发明涉及微生物以及在微生物中生产至少一种含硫化合物的方法。在优选实施方案中,本发明涉及微生物以及在谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中生产 L- 甲硫氨酸或 L- 半胱氨酸的方法。

1. 用于产生L-甲硫氨酸的棒杆菌属微生物,其中由与SEQ ID NO:1组成的核酸分子相同的核酸分子编码的蛋白质的含量和 / 或活性与野生型的微生物中所述蛋白质的含量和 / 或活性相比降低。

2. 在微生物中生产甲硫氨酸的方法,包括培养权利要求1的微生物。

3. 权利要求2的方法,其特征在于涉及发酵方法,其中在培养基和 / 或微生物细胞中富集甲硫氨酸并从中分离之。

4. 权利要求3的方法,其特征在于所述微生物为谷氨酸棒杆菌。

5. 权利要求2至4任一项的方法,其特征在于通过破坏和 / 或缺失相应基因组核酸序列,降低了与由SEQ ID NO:1的序列组成的核酸相同的核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性。

6. 权利要求2至4任一项的方法,其特征在于通过以下步骤降低与由SEQ ID NO:1的序列组成的核酸相同的核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性:

a) 制备这样的载体,以5'至3'方向包含以下核酸序列:

- 在相应微生物中有功能的启动子序列,
- 与之有效连接的SEQ ID NO:1的反义序列,
- 与之有效连接的在微生物中有功能的终止子序列;和

b) 将a)中的载体转移到微生物中,并任选将载体整合入其基因组中。

7. 权利要求2至4任一项的方法,其特征在于通过以下步骤降低与由SEQ ID NO:1的序列组成的核酸相同的核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性:

a) 制备这样的载体,以5'至3'方向包含以下核酸序列:

- 在相应微生物中有功能的启动子序列,
- 与之有效连接的核苷酸序列,其与SEQ ID NO:1序列互补,
- 与之有效连接的编码核糖核酸酶P的DNA序列,
- 与之有效连接的在相应微生物中有功能的终止子序列;和

b) 将a)中的载体转移到微生物中,并任选将载体整合入其基因组中。

8. 权利要求2至4任一项的方法,其特征在于通过以下步骤降低与由SEQ ID NO:1的序列组成的核酸相同的核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性:

a) 制备这样的载体,以5'至3'方向包含以下核酸序列:

- 在相应微生物中有功能的启动子序列,
- 与之有效连接的编码核酶的核酸序列,所述核酶特异性识别具有SEQ ID NO:1序列的核酸的mRNA,

- 与之有效连接的在相应微生物中有功能的终止子序列;和

b) 将a)中的载体转移到微生物中,并任选将载体整合入其基因组中。

9. 权利要求2至4任一项的方法,其特征在于通过表达至少一种重组抗体,降低与由SEQ ID NO:1的序列组成的核酸相同的核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性,所述重组抗体特异于所述蛋白质并阻断所述蛋白质在含硫化合物代谢中的功能。

10. 权利要求2至9任一项的方法,其特征在于,与野生型的微生物相比,与由SEQ ID NO:1的序列组成的核酸相同的核酸的功能性表达几乎被完全抑制。

11. 权利要求1的微生物在生产L-甲硫氨酸中的用途。

12. 与由 SEQ ID NO :1 的序列组成的核酸相同的核酸在生产 L- 甲硫氨酸中的用途。

生产含硫化合物的微生物

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物以及生产至少一种含硫化合物的方法。具体而言,本发明涉及在谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中生产 L- 甲硫氨酸或 L- 半胱氨酸的方法。

技术背景

[0002] 在动物及人类的营养中,氨基酸用作不同用途的添加剂。例如,谷氨酸盐一般用作增味剂。甲硫氨酸是需要随食物摄入的必需氨基酸。甲硫氨酸以及其它含硫氨基酸如半胱氨酸不仅对于蛋白质的生物合成至关重要,而且也是不同代谢物如谷胱甘肽、S- 腺苷甲硫氨酸及生物素的前体,此外还作为甲基供体参与不同的细胞过程。

[0003] 目前全球的氨基酸消耗量估计超过两百万吨。氨基酸如谷氨酸盐或饲料添加剂(主要包括 L- 赖氨酸、L- 甲硫氨酸和 L- 苏氨酸)的年需求量,每种氨基酸估计大于一百万吨。而仅用于药物产品的氨基酸年需求就达到了 15,000 吨 (Kusumoto, I. (2001), *J. Nutr.*, 131, 2552-2555)。

[0004] 上世纪初主要还是通过化学或提取方法生产氨基酸,而如今则是主要通过发酵方法来生产特定的氨基酸如谷氨酸盐。此处已经证实特定微生物如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和谷氨酸棒杆菌尤其适用于发酵产生氨基酸。具体而言,通过发酵产生氨基酸的优势在于能专门生产自然可用的左旋氨基酸,而化学合成得到的通常是外消旋的混合物,往往还需要进行费时耗资的加工。

[0005] 具体而言,有对所谓含硫化合物的需求,如甲硫氨酸、同型半胱氨酸、S- 腺苷甲硫氨酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、生物素、硫胺、硫辛酸等,所述含硫化合物用于许多工业部门如食品、饲料、化妆品以及制药工业。这些物质也被称为含硫精细化学品,包括有机酸、蛋白原性或非蛋白原性氨基酸、维生素以及辅因子。

[0006] 尝试利用如大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌的微生物生产前述含硫化合物。由于含硫化合物很重要,尤其在改善所述微生物的生产方法上做了努力,例如通过发酵技术措施,如振荡和供氧、营养培养基的组成等。

[0007] 除此之外,还尝试通过经典菌株筛选开发所述微生物的突变株,后者产生所述含硫化合物的量远远大于相应未突变野生型。

[0008] 此处,采用如大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌的微生物非常困难,特别是利用其进行含硫氨基酸如甲硫氨酸和半胱氨酸的发酵工业性大规模生产。然而,恰恰非常需要这些氨基酸,因为它们尤其是更多前述含硫化合物的前体化合物。

[0009] 产生甲硫氨酸和半胱氨酸的生物合成或代谢路径,极有可能正是至今在微生物中工业规模发酵生产甲硫氨酸和半胱氨酸不具经济利益的原因。半胱氨酸和甲硫氨酸在大肠杆菌中的生物合成众所周知(见如 Voet 和 Voet(1995) *Biochemistry*, John Wiley and Sons, Inc. USA)。在谷氨酸棒杆菌中生物合成甲硫氨酸和半胱氨酸是广泛研究的目标,并在最近由 Rückert 等人 (Rückert 等人 (2003), *J. of Biotechnology*, 104, 213-228) 和 Lee 等

人 (Lee 等人 (2003), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62, 459-467) 描述。

[0010] 生物合成甲硫氨酸的关键步骤在于将硫原子掺入碳架。通常硫源为硫酸盐,后者必须经微生物摄取、活化和还原。所述步骤中每产生 1mol 甲硫氨酸消耗 7mol ATP 和 8mol NADPH (Neidhardt 等人 (1990) *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*, Sunderland, Massachusetts, USA, Sinauer Associates, Inc.)。因此,甲硫氨酸是产生时需要细胞能量最多的氨基酸。

[0011] 因此,产甲硫氨酸的微生物发展出受严格调控的产甲硫氨酸代谢路径,对于半胱氨酸也是如此。这就意味着,例如,一旦细胞产生了足量甲硫氨酸,利用甲硫氨酸代谢路径的活性便通过反馈调节机制得到下调。

[0012] 因此,尽管需要后续的光学异构性分离左旋和右旋形式甲硫氨酸,事实上目前为止甲硫氨酸仍是专门通过化学工业规模制备的唯一氨基酸。

[0013] 因此,对产甲硫氨酸的谷氨酸棒杆菌变体几乎一无所知。早在 1975 年就已经鉴定了此类突变体 (Kase 等人 (1975) *Agric. Biol. Chem.*, 39, 153-160)。然而,彼时所述的菌株并未受到在微生物中工业化生产甲硫氨酸的关注。此后未取得任何进展。

[0014] 目前为止,以前制备甲硫氨酸产量提高的微生物的技术方法仍集中于鉴定甲硫氨酸及其它含硫化合物生物合成路径涉及的基因,然后根据其相应功能,过表达或抑制基因从而提高甲硫氨酸或其它化合物的产量。

[0015] 此类尝试的实例述于 W002/10209。其中的问题就在于,所述文献仅描述了过表达或抑制单个基因而提高如甲硫氨酸的产量。由于通过这一途径,通常只失活了生物合成如甲硫氨酸的一个合成步骤的调控机制,而其它调控机制并未受到影响,因此只能在有限水平上提升含硫化合物的产量(也见 Lee 等人中图 3, 同上)。通过过表达含硫化合物生物合成涉及的单个基因,往往只能不完全解耦联前述调控机制。尽管提高了甲硫氨酸或其它含硫化合物的产量,但这一提高十分有限,不足以使该方法具有在微生物中进行工业化规模发酵生产的价值。

[0016] 在微生物中生产含硫化合物如甲硫氨酸的过程中,产生的具体问题在于甲硫氨酸生物合成路径的基因可能分布于微生物的整个环形基因组上(见 Rückert 等人, 同上)。甲硫氨酸生物合成路径的基因以此方式分布于其基因组的微生物实例,包括谷氨酸棒杆菌、大肠杆菌、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、沙雷氏菌 (*Serratia*) 如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 以及沙门氏菌 (*Salmonella*)。负责甲硫氨酸生物合成的基因的分布可视为意味着,例如,这些基因并非组织在一个操纵子(即一个通常的调控单位)中。如果它们位于一个操纵子中,则可以同时解耦联若干调控机制,从而可以通过如影响(即过表达或抑制)调控所述操纵子的分子开关,更有效地增加微生物中甲硫氨酸的产量。最近已经揭示这样的事实,尽管甲硫氨酸生物合成路径涉及的基因分布于谷氨酸棒杆菌的基因组上,原则上仍然存在此类操纵子 (Rey 等人 (2003), *J. Biotechnol.*, 103, 51-65)。

[0017] Rey 等人显示, McbR 蛋白质为调节下列甲硫氨酸生物合成相关基因表达的转录抑制剂: metY (编码 O-乙酰-L-同型丝氨酸硫化氢解酶)、metK (编码 S-腺苷甲硫氨酸合成酶)、hom (编码同型丝氨酸脱氢酶)、cysK (编码 L-半胱氨酸合成酶)、cysI (编码 NADPH 依赖性亚硫酸盐还原酶) 以及 ssuD (编码烷基磺酸盐单加氧酶)。所有上述酶均涉及甲硫氨

酸和 / 或半胱氨酸的生物合成,且所述作者能相应显示在谷氨酸棒杆菌 McbR 敲除株中甲硫氨酸的产量增加。

[0018] 根据这些结果,鉴定微生物中含硫化合物生物合成路径核心调控的其它相关因子受到了广泛关注,因为通过过表达或抑制(根据其功能)此类核心调控开关,有可能会产生出生产含硫化合物量显著增高的微生物。

发明内容

[0019] 因此,本发明根本的问题即在于提供能在其中产生含硫化合物的微生物。

[0020] 具体而言,本发明的问题也在于提供微生物以及在微生物如大肠杆菌或谷氨酸棒杆菌中生产含硫化合物如甲硫氨酸或半胱氨酸的方法,其中通过失活含硫化合物生物合成路径的核心调控元件,显著提高前述含硫化合物的产量。

[0021] 此外,本发明的问题还在于鉴定可用于产生突变生物的核酸序列,所述突变生物含硫化合物如甲硫氨酸和 / 或半胱氨酸的产量相对于其相应野生型增高。

[0022] 本发明的这些以及更多根本问题由说明书显而易见,并由独立权利要求所解决。

[0023] 本发明的优选实施方案述于从属权利要求中。

[0024] 在本发明的范围内,有可能通过谷氨酸棒杆菌中的新型筛选和突变机制鉴定因子 NCg12640 (Entrez 数据库的 GenBank 登陆号, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, SEQ ID NO : 1), 所述因子代表了谷氨酸棒杆菌中含硫化合物(特别是甲硫氨酸)调控的核心调控开关。由于利用 NCg12640 编码的氨基酸序列 (GenBank 登录号 : NP_601931, SEQ ID NO : 2)、通过 BLAST 程序在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行同源性搜索的结果提示其它不同生物(例如大肠杆菌)中存在若干同系物,根据氨基酸及含硫化合物生物合成路径的保守性(特别是不同微生物之间),可以推断所述因子也涉及其它微生物中含硫化合物生物合成路径的核心调控。

[0025] 正如本发明范围内所示,与含 SEQ ID NO : 1 序列的核酸相同或与之功能性同源的核酸含量和 / 或活性相对于野生型降低的微生物可用于生产含硫化合物。

[0026] 因此,本发明的目的之一涉及微生物,其中由与含 SEQ ID NO : 1 序列核酸相同或功能性同源的核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性相对于该微生物野生型降低。本发明该目的在以下也描述为,与含 SEQ ID NO : 1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸的含量和 / 或活性相对于该微生物野生型降低。

[0027] 本发明的另一目的涉及前述微生物,所述微生物由于相对于野生型,与含 SEQ ID NO : 1 标识序列的核酸相同或功能性同源的核酸编码的蛋白质的含量 / 活性降低;或由于与野生型相比,与含 SEQ ID NO : 1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸含量 / 活性降低,而能产生含硫化合物如 L- 甲硫氨酸、L- 半胱氨酸、L- 同型半胱氨酸、L- 胱硫醚、S- 腺苷 -L- 甲硫氨酸、谷胱甘肽、生物素、硫胺和 / 或硫辛酸,优选 L- 甲硫氨酸和 / 或 L- 半胱氨酸。

[0028] 本发明的另一目的涉及微生物,其中通过破坏和 / 或缺失相应基因组核酸序列,与含 SEQ ID NO : 1 鉴定序列的核酸相同或功能性同源的核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性相对于野生型降低。

[0029] 本发明的另一目的涉及微生物,其中通过向基因组核酸序列引入突变而导致由与含 SEQ ID NO : 1 鉴定序列的核酸相同或功能性同源的核酸编码的蛋白质无功能形式的表

达,相对于野生型降低了前述核酸的含量和 / 或活性、或由所述核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性。

[0030] 本发明的另一目的涉及微生物,其中通过反义方法、表达特异于所述核酸 mRNA 的核酶或表达核糖核酸酶 P 构建体,相对于野生型降低了与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸的含量和 / 或活性。

[0031] 本发明的另一目的涉及微生物,其中通过在微生物中表达特异于与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸编码蛋白质的重组抗体,从而阻断或抑制其活性,相对于野生型降低了该核酸的含量和 / 或活性,或由所述核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性。

[0032] 本发明的另一目的涉及微生物,其中通过在细胞内过表达由与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸编码的蛋白质的无功能形式,相对于野生型降低了所述核酸的含量和 / 或活性,或由所述核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性。

[0033] 本发明的另一目的涉及微生物,其中除了与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸的含量和 / 或活性相对于野生型降低,或由所述核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性相对于野生型降低外,编码谷氨酸棒杆菌中 McbR 或其同系物的核酸的含量和 / 或活性相对于野生型降低。

[0034] 因此,本发明的另一目的涉及微生物,其中,附加地,与含 SEQ ID NO :3 序列的核酸相同或功能性同源的核酸的含量和 / 或活性,或与含 SEQ ID NO :4 序列的蛋白质相同或功能性同源的蛋白质含量和 / 或活性相对于野生型降低。此处,可以通过前述的相同方法降低含量和 / 或活性。

[0035] 本发明微生物特别优选的实施方案涉及这样的微生物,其中前述核酸序列或其所编码蛋白质的表达几乎完全受抑。

[0036] 本发明的另一目的涉及微生物,其中除了与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸的含量和 / 或活性或其编码的蛋白质的含量和 / 或活性降低外,至少一种其它期望含硫化合物生物合成路径的基因产物的编码核酸的含量和 / 或活性相对于野生型增加。在此类微生物中,也可诱变最后提及的核酸以使该核酸编码的蛋白质活性不受代谢产生的代谢物影响。在这些微生物中,还可附加地降低如前述谷氨酸棒杆菌中 McbR 或其同系物的含量和 / 或活性。

[0037] 与之类似,本发明的另一目的涉及微生物,其中除了与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸或其编码的蛋白质的含量和 / 或活性降低外,至少一种其它期望含硫化合物生物合成路径的基因产物的编码核酸的含量和 / 或活性也相对于野生型降低。在所述微生物中,还可附加地降低如前述谷氨酸棒杆菌中 McbR 或其同系物的含量和 / 或活性。

[0038] 本发明的另一目的涉及在微生物中生产含硫化合物的方法,其中包括培养本发明的微生物。此处,生产 L- 甲硫氨酸和 / 或 L- 半胱氨酸的特别优选方法使用微生物谷氨酸棒杆菌,其中与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸或其编码的蛋白质的含量和 / 或活性相对于野生型降低。

[0039] 本发明的另一目的涉及生产 L- 甲硫氨酸和 / 或 L- 半胱氨酸的方法,其中使用的微生物除了与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸或由该核酸编码的蛋白

质的含量和 / 或活性降低外, 还以所述方式提高或降低了前述其它核酸的含量和 / 或活性。

[0040] 本发明的另一目的涉及上述核酸在产生可用于生产含硫化合物的微生物中的用途。

[0041] 在本发明的范围内, 可在谷氨酸棒杆菌中鉴定甲硫氨酸生物合成的新调控物。采用与本领域以前用于鉴定过量生产甲硫氨酸的谷氨酸棒杆菌菌株的尝试迥异的新型筛选和突变策略 (见实施例), 可使之成为可能。

[0042] 在本发明的范围内, 此处首次显示了含 SEQ ID NO :1 的核酸序列 (GenBank 登录号 :NCg12640) 编码具有氨基酸序列 SEQ ID NO :2 (GenBank 登录号 :NP_601931) 的蛋白质, 并活跃参与谷氨酸棒杆菌中甲硫氨酸生物合成路径的调控。在本发明的范围内, 还首次显示了对谷氨酸棒杆菌中含 SEQ ID NO :1 的核酸序列的缺失或功能破坏, 产生了因对 SEQ ID NO :1 编码蛋白质的调节失活而提高甲硫氨酸产量的菌株。

[0043] 在 NCBI 上的 BLAST 搜索显示, 谷氨酸棒杆菌 NCg12640 的同系物存在于许多不同微生物中。由于含硫化合物的生物合成路径在许多不同生物中均保守, 推测其中与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸含量和 / 或活性相对于野生型降低的微生物, 也能产生更多的甲硫氨酸和 / 或其它含硫化合物如半胱氨酸。

[0044] 根据本发明, NCg12640 应理解为表示具有 SEQ ID NO :1 序列的核酸分子。由该核酸分子编码的蛋白质具有序列 SEQ ID NO :2。

[0045] 根据本发明, 含 SEQ ID NO :1 序列的核酸或含氨基酸序列 SEQ ID NO :2 的蛋白质的功能性同系物, 是指这样的核酸分子或蛋白质, 其序列与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸或含氨基酸序列 SEQ ID NO :2 的蛋白质具有显著同源性。

[0046] 根据本发明, NCg12640 的含量或与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸的含量是指, 相应微生物中能够确定的所述核酸或由所述核酸编码的蛋白质的量。

[0047] 根据本发明, NCg12640 的活性或与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸的活性是指, 由所述核酸序列编码的蛋白质的细胞活性。与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸编码蛋白质的细胞功能, 可见于生物合成含硫化合物 (特别是甲硫氨酸) 的调控中。可以容易地确定与序列 SEQ ID NO :1 和 2 同源的核酸是否与含谷氨酸棒杆菌序列 SEQ ID NO :1 或 2 的核酸具有相同的活性。为此, 缺失各微生物中各自的基因组核酸序列, 并确定在添加甲硫氨酸结构类似物 (例如 D, L- 乙硫氨酸) 后该微生物是否还能产生甲硫氨酸或其它含硫化合物。

[0048] 根据本发明, 与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸含量相对于野生型改变, 是指所述核酸或由所述核酸编码的蛋白质的量相对于野生型降低。一般而言, 通过降低内源性核酸的含量降低所述核酸或由所述核酸编码的蛋白质的量, 所述内源性核酸为含序列 SEQ ID NO :1 的核酸或与其功能性同源的核酸。

[0049] 根据本发明, 野生型是指未经遗传工程处理的相应初始生物。

[0050] 通过降低内源性核酸或由所述核酸编码的内源性蛋白质的量或含量, 能够降低与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸活性, 或由所述核酸编码的蛋白质的活性。此外, 根据本发明, 所提及核酸活性或由所述核酸编码的蛋白质活性的降低, 是指内源性核酸或由所述内源性核酸编码的蛋白质的活性保持不变, 而通过如表达 NP_601931 无功能形式或其同系物, 或对其有特异性的抗体, 显著抑制了所述核酸编码的蛋白质与其细

胞结合配偶体间的相互作用。

[0051] 本发明微生物中发生的,与含 SEQ ID NO :1 标识序列的核酸相同或功能性同源的核酸含量和 / 或活性的降低,或所述核酸编码的蛋白质含量和 / 或活性的降低,优选为至少 5%,优选至少 10%,尤其优选至少 20%,也尤其优选至少 40%,也尤其优选至少 60%,特别优选至少 80%,也特别优选至少 90%,也特别优选至少 95%,也特别优选至少 98%,而最优选 100%。

[0052] 根据本发明,术语“抑制与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸或所述核酸编码蛋白质的表达”,等同于术语“降低所述核酸或所述核酸编码蛋白质的含量和 / 或活性”。

[0053] 正如上文所述,通过在 NCBI 的 BLAST 分析能鉴定许多不同生物中的 NCg12640 同系物。由于将来会得到越来越多许多不同微生物的序列数据,本发明也包括那些核酸或其编码蛋白质的含量和 / 或活性相对于野生型降低的微生物,只要所述核酸或所述核酸编码的氨基酸序列与含序列 SEQ ID NO :1 的核酸或含序列 SEQ ID NO :2 的蛋白质显著或基本同源。

[0054] 两种核酸或蛋白质的同一性,是指在某一特定序列区域内(优选在全长序列中)核酸序列或氨基酸序列的同一性;具体而言,利用 CLUSTAL 法(Higgins 等人,1989,Comput. Appl. Biosci.,5(2),151)借助于 DNA Star Inc., Madison, Wisconsin(USA) 的 Lasergene 软件进行比较,计算得到同一性。利用 CLUSTAL 法(Higgins 等人,1989,Comput. Appl. Biosci.,5(2),151)借助于 DNA Star Inc., Madison, Wisconsin(USA) 的 Lasergene 软件也可计算得到同源性。

[0055] 如果在 5' 至 3' 的相同顺序上具有相同的核苷酸,则两个核酸分子相同。

[0056] 如果在 N 末端至 C 末端的相同顺序上具有相同的氨基酸,则两个氨基酸分子相同。

[0057] 根据本发明,显著或基本序列同源性一般是指,DNA 分子的核酸序列或蛋白质的氨基酸序列与 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 的核酸或氨基酸序列或它们的功能等同部分的同一性分别达至少 30%,优选至少 40%,也优选至少 50%,更优选至少 60%或至少 70%,尤其优选至少 90%,特别优选至少 95%,而最优选至少 98%。优选在 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 的全长序列上确定同源性。

[0058] 因此,优选在全长氨基酸或核酸序列区域内计算同源性。除上述程序外,本领域技术人员还可自行选择其它基于不同算法比较不同序列的程序。此处,Needleman 和 Wunsch,或 Smith 和 Waterman 的算法产生的结果尤其可靠。进行序列比较也可使用如程序 Pile Aupa(J. Mol. Evolution. (1987),25,351-360;Higgins 等人,(1989),Cabgos,5,151-153),也可使用包括在 Genetics Computer Group(575Science Drive, Madison, Wisconsin, USA53711) 的 GCG 软件包内的程序 Gap and Best Fit(Needleman 和 Wunsch,(1970),J. Mol. Biol.,48,443-453 以及 Smith 和 Waterman(1981),Adv., Appl. Math.,2,482-489)。

[0059] 显著或基本同源性或序列同源性也可理解为,所述序列与含 SEQ ID NO :1 和 2 的序列功能性同源。

[0060] 本发明的一个实施方案涉及前述核酸在产生微生物中的用途,所述微生物能生产含硫化合物(特别是甲硫氨酸和 / 或半胱氨酸)的量相对于野生型增加。此处,本领域技术人员了解,为了产生含硫化合物产量增加的微生物,必须分别相对于野生型降低各生物

中谷氨酸棒杆菌 NCg12640 功能性同系物的对应核酸的含量或活性。

[0061] 具有高度同源性（即高度相似性或同一性）的 DNA 序列，为本发明核酸中 SEQ ID NO :1 标识序列对应的核酸 DNA 序列的真正备选序列。通过如 PCR 和杂交的标准技术能分离所述基因序列，且本领域技术人员能通过相应酶活力测试和其它试验确定其功能。根据本发明，也可采用 DNA 序列的同源性比较，首先鉴定不同生物 DNA 序列中最保守的区域来设计 PCR 引物。然后此类 PCR 引物可用于首先分离与本发明核酸同源的核酸组分的 DNA 片段。

[0062] 多种搜索引擎可用于此类同源性比较或搜索。所述搜索引擎包括如 NCBI 提供的 BLAST 程序中的 CLUSTAL 程序组。

[0063] 此外，本发明技术人员已知多种试验方法，可用于从大部分多样性生物中分离与本发明序列同源的 DNA 序列。所述方法中包括如，用相应的简并探针制备和筛选 cDNA 文库。

[0064] 例如，与 SEQ ID NO :2 同源的序列可为编码如下蛋白质的序列：

[0065] NP_601931.1 ; NP_739184.1 ; NP_940366.1 ; NP_962856.1 ; ZP_00226250.1 ; NP_214947.1 ; NP_334857.1 ; ZP_00058595.1 ; NP_925240.1 ; NP_969100.1 ; ZP_00019148.1 ; ZP_00199594.1 ; ZP_00015952.1 ; ZP_00160492.1 ; NP_770404.1 ; NP_866130.1 ; ZP_00026378.1 ; NP_280238.1 ; ZP_00029745.1 ; ZP_00226340.1 ; NP_882643.1 ; NP_459575.1 ; NP_879442.1 ; ZP_00213193.1 ; ZP_00221250.1 ; NP_806026.1 ; NP_521417.1 ; NP_455160.1 ; ZP_00185946.2 ; ZP_00203540.1 ; NP_415113.1 ; NP_752598.1 ; NP_286306.1 ; NP_902574.1 ; ZP_00052011.1 ; NP_706431.1 ; NP_822174.1 ; NP_745396.1 ; NP_739496.1 (其中每一号码涉及 GenBank 登录号)。

[0066] 如上文所述，可以通过不同方法改变与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源核酸的含量和 / 或活性，或所述核酸编码蛋白质的含量和 / 或活性。例如，可以通过失活转录、翻译和 / 或蛋白质水平的激活调控机制，或降低各核酸的基因表达，来降低活性或含量。

[0067] 在优选的实施方案中，降低各基因组序列的表达。优选这些微生物中与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源核酸的基因组序列被失活。可通过不同方法失活所述基因组序列。一种可能性是通过同源重组缺失基因组序列。另一种可能性是向基因组序列中引入插入，后者依次阻止核酸的表达或生成无功能蛋白质。

[0068] 在本发明范围内，无功能蛋白质是指这样的蛋白质或蛋白质片段，其中通过点突变、插入或缺失，改变具有氨基酸序列 SEQ ID NO :2 的蛋白质或其功能性同源蛋白质的结构从而改变其功能，从而使这些蛋白质不再作为含硫化合物（特别是甲硫氨酸）生物合成途径中的核心调控开关而发挥作用。

[0069] 很容易确定通过向与含 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源核酸的基因组序列中引入插入、缺失或突变，是否得到了无功能蛋白质或蛋白质片段。为此，测试表达推测无功能蛋白质或蛋白质片段的微生物在甲硫氨酸结构类似物如 D, L- 乙硫氨酸存在时的生长能力。如果确实如此，则它们为无功能的蛋白质或蛋白质片段。

[0070] 通过基因组序列缺失或向其中引入突变、插入或缺失而生成无功能蛋白质或蛋白质片段，从而降低与 SEQ ID NO :1 相同或功能性同源的基因组序列的表达，一般被称之为对该基因组序列的功能性破坏。

[0071] 此处，可以通过包括以下步骤的方法，利用同源重组缺失或功能性破坏基因组片

段：

[0072] a) 制备这样的载体，以 5' 至 3' 方向包含以下核酸序列：

[0073] - 在微生物中有功能的启动子序列，

[0074] - 与之有效连接的与这样的核酸序列 5' 端相同或同源的 DNA 序列，所述核酸与含 SEQ ID NO :1 的序列相同或功能性同源，

[0075] - 与之有效连接的编码抗性基因的 DNA 序列，

[0076] - 与之有效连接的与这样的核酸序列 3' 端相同或同源的 DNA 序列，所述核酸与含 SEQ ID NO :1 的序列相同或功能性同源，

[0077] - 与之有效连接的在微生物中有功能的终止子序列；和

[0078] b) 将 a) 中的载体转移到微生物中，并任选将载体整合入其基因组中。

[0079] 进行同源重组的一种可能性如下文实施例所示。本领域技术人员已知常规质粒可用作此类同源重组的载体，如已知可用于在微生物中过表达核酸序列的常规质粒。一般而言，使用对抗生素的耐药性作为抗性基因（见下文）。

[0080] 有效连接是指，启动子、编码序列、终止子以及任选的其它调控元件顺序排列，使每一调控元件都能在编码序列的表达中恰当地实现其功能。用于进行有效连接的序列实例包括活化序列、增强子等。其它调控元件包括选择性标记、扩增信号、复制起点等。合适调控序列的实例如 Goeddel, Gene Expression Technology :Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) 中描述的那些。

[0081] 若需向基因组序列中引入可产生无功能蛋白质或蛋白质片段的点突变、插入或缺失，常规地通过本领域已知的技术进行（尤其见 Sambrook 等人, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, (2001), 第 3 版, ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA 以及 Stratagene, La Jolla, USA 的所谓 Quikchange 诱变法）。向微生物基因组序列中引入点突变、插入或缺失的其它方法，尤其见述于 **Jäger** 等人, (1992) J. Bacteriol. 174, 5462-5465 及 W002/070685 中。

[0082] 降低前述核酸含量和 / 或活性的其它可能性包括如通过反义策略。为此，可利用如包括以下步骤的方法：

[0083] a) 制备这样的载体，以 5' 至 3' 方向包含以下核酸序列：

[0084] - 在相应微生物中有功能的启动子序列，

[0085] - 与之有效连接的 SEQ ID NO :1 或其功能性同系物的反义序列，

[0086] - 与之有效连接的在相应微生物中有功能的终止子序列；和

[0087] b) 将 a) 中的载体转移到微生物中，并任选将载体整合入所述微生物的基因组中。

[0088] 在另一实施方案中，利用含有编码核酶的 DNA 序列的载体产生本发明的微生物，所述 DNA 序列特异性识别与含序列 SEQ ID NO :1 的核酸相同或功能性同源的核酸的 mRNA。本领域技术人员已知如何制备具有对特定 mRNA 的核酸内切酶活性的核酶。在如 Steinecke 等人 (Steinecke 等人 (1992) EMBO J., 11, 1525) 中有详细描述。在本发明范围内，术语核酶也指那些除真正核酶之外，还含有互补于与含序列 SEQ ID NO :1 的核酸相同或功能性同源的核酸的 mRNA 的先导序列的 RNA 序列，从而使得 mRNA 特异性核酶能更准确地寻靶该核酶的 mRNA 底物。

[0089] 此种方法包括如下步骤：

[0090] a) 制备这样的载体,以 5' 至 3' 方向包含以下核酸序列:

[0091] - 在相应微生物中有功能的启动子序列,

[0092] - 与之有效连接的 DNA 序列,编码特异性识别 SEQ ID NO:1 核酸或其功能性同系物 mRNA 的核酶,

[0093] - 与之有效连接的在相应微生物中有功能的终止子序列;和

[0094] b) 将 a) 中的载体转移到微生物中,并任选将载体整合入其基因组中。

[0095] 产生本发明微生物的另一可选方法是通过载体转移核酸,所述载体中包含这样的 DNA 序列,所述 DNA 序列包括与含 SEQ ID NO:1 标识序列的核酸相同或功能性同源的核酸的反义序列以及编码 RNase P 的序列。在这类载体转录时,RNA 分子在细胞内合成,其含有先导序列(反义序列)可将 RNase P 引导至与含 SEQ ID NO:1 标识序列的核酸相同或功能性同源的核酸的 mRNA,从而实现 RNase P 介导的 mRNA 裂解(也见美国专利 No. 5,168,053)。优选先导序列包括互补于与含 SEQ ID NO:1 标识序列的核酸相同或功能性同源的核酸 DNA 序列的 10-15 个核苷酸。

[0096] 此种方法包括如以下步骤:

[0097] a) 制备载体,以 5' 至 3' 方向包含以下核酸序列:

[0098] - 在相应微生物中有功能的启动子序列,

[0099] - 与之有效连接的核苷酸序列,其与 SEQ ID NO:1 序列或其功能性同系物或其部分互补,

[0100] - 与之有效连接的编码核糖核酸酶 P 的 DNA 序列,

[0101] - 与之有效连接的在相应微生物中有功能的终止子序列;和

[0102] b) 将 a) 中的载体转移到微生物中,并任选将载体整合入所述微生物的基因组中。

[0103] 术语互补性用于描述核酸分子与另一核酸分子通过互补碱基间的氢键进行杂交的能力。本领域的技术人员已知两核酸分子间并非需要 100% 互补才能彼此杂交。优选与另一核酸杂交的核酸,与后者的互补性至少为 40%,优选至少为 50%,也优选至少为 60% 或至少为 70%,尤其优选至少为 80%,也尤其优选至少为 90%,特别优选至少为 95%,而最优选至少为 98% 或 100%。

[0104] 互补性程度与同源性和同一性程度一样,优选在全长蛋白质或核酸上确定。

[0105] 严紧体外杂交条件为本领域技术人员已知,并可参见文献(见如 Sambrook 等人,同上)。术语特异性杂交,是指这样的情形,即当具有特定核酸序列的核酸为如 DNA 或 RNA 分子的复杂混合物的一部分时,在严紧条件下,分子优先结合所述具有特定核酸序列的核酸。

[0106] 因此,术语“严紧条件”是指在该条件下,核酸优选结合具有靶序列的核酸,而不与或大大减少与具有不同序列核酸的结合。

[0107] 严紧条件视具体情况而定。较长序列在较高温度下发生特异性杂交。一般而言,对于指定离子强度和指定 pH 值的特定序列而言,选择严紧条件使杂交温度比熔点 (T_m) 低约 5°C。 T_m 是与靶序列互补的分子中 50% 与所述靶序列发生杂交的温度(在指定 pH 值、指定离子强度和指定核酸浓度下)。一般而言,严紧条件包括,盐浓度为 0.01-1.0M 钠离子(或其它盐离子)和/或 pH 值为 7.0-8.3。对于较短分子而言,温度至少为 30°C,例如那些含有 10-50 个核苷酸的分子。此外,严紧条件可包括添加去稳定剂,例如甲酰胺。

[0108] 典型的杂交和洗涤缓冲液组成如下。

[0109] 预杂交液：

[0110] 0.5% SDS

[0111] 5x SSC

[0112] 50mM NaPO₄, pH6.8

[0113] 0.1%焦磷酸钠

[0114] 5x Denhardt' s 试剂

[0115] 100 μg/ml 鲑精

[0116] 杂交液： 预杂交液

[0117] 1x10⁶cpm/ml 探针 (5-10 分钟,95℃)

[0118] 20x SSC ;3M NaCl

[0119] 0.3M 柠檬酸钠

[0120] HCl 调至 pH7

[0121] 50x Denhardt' s 试剂： 5g Ficoll

[0122] 5g 聚乙烯吡咯烷酮

[0123] 5g 牛血清白蛋白

[0124] 蒸馏水加至 500ml

[0125] 常规如下实施杂交：

[0126] 任选： 用 1x SSC/0.1% SDS 于 65℃洗涤印迹 30 分钟

[0127] 预杂交：50 至 55℃至少 2 小时

[0128] 杂交： 55 至 60℃过夜

[0129] 洗涤： 5 分钟 2x SSC/0.1% SDS 杂交温度

[0130] 30 分钟 2x SSC/0.1% SDS 杂交温度

[0131] 30 分钟 1x SSC/0.1% SDS 杂交温度

[0132] 45 分钟 0.2x SSC/0.1% SDS 65℃

[0133] 5 分钟 0.1x SSC 室温

[0134] 反义策略中转移的核酸一般包括 20-1000 个核苷酸,优选 20-750 个核苷酸,特别优选约 400-800 以及 500-750 个核苷酸。不过,也可使用含 20-500 个核苷酸、也特别优选含 20-300 个核苷酸、尤其优选含 20-150 个核苷酸、也尤其优选含 20-75 个核苷酸、最优选含 20-50 个核苷酸的核酸。也有可能序列只含有约 20 或 25 个核苷酸。

[0135] 若将核酸转移至微生物中,所述核酸在细胞内的转录产生了具 SEQ ID NO :1 序列或其功能性同源序列的核酸的 mRNA 的互补序列(例如在反义策略中),所述序列不需 100%互补于 mRNA。若所述序列的互补性为至少 50%、优选至少 60%、尤其优选至少 70%、也尤其优选至少 80%、特别优选至少 90%、最优选至少 95%,则足以满足。此处,通过缺失、取代和/或插入会产生衍生物。

[0136] 一般而言,实际上仅这样的互补序列可用于本发明,即所述序列能与 SEQ ID NO :1 标识序列或其功能同源性序列的 mRNA 区域发生特异性杂交。与 NP_601931 或其同源蛋白质以外的其它蛋白质的 RNA 区域发生体内杂交,并导致后者受抑的序列,不适用于本发明的方法。

[0137] 前述的某些方法也可实施于并非具 SEQ ID NO:1 序列或其互补序列的核酸的 mRNA 编码部分组分的序列。例如,所述序列可来自 5' 或 3' 非翻译区,只要这些调控序列特异于具 SEQ ID NO:1 序列或其同源序列的核酸的 mRNA。

[0138] 特别地,当 mRNA 的翻译受到反义构建体抑制时可使用此类序列。因此,根据本发明,术语 mRNA 不只包括具 SEQ ID NO:1 序列或其同源序列的核酸的 mRNA 的编码组分,也包括所有出现在前 mRNA 中或成熟 mRNA 中的调控序列,所述调控序列特异于具 SEQ ID NO:1 序列或其同源序列的核酸的 mRNA。相应地,这也适用于 DNA 序列。这涉及如 5' 和 3' 非翻译区、启动子序列、上游活化序列等。

[0139] 若采用其转录会产生包括先导序列和 RNAse P 的 RNA 分子的载体,则先导序列必须具有足够的互补性从而能特异性识别具 SEQ ID NO:1 序列或其同源序列的核酸的 mRNA。根据相应需求,可以选择 mRNA 的哪个区域被先导序列所识别。优选此类先导序列包括约 20 个核苷酸;然而它们应不显著少于 15 个核苷酸。若先导序列具有 100% 互补性,则 12 个核苷酸也足够了。当然,先导序列可包括多达 100 个或以上的核苷酸,因为这样只会提高其对于相应 mRNA 的特异性。

[0140] 若在本发明范围内提及有义序列,这是指那些对应于 NCg12640 或其同系物或其组成部分的基因编码链的序列。此处,所述序列为 SEQ ID NO:1 的序列或其功能性同系物。

[0141] 若在本发明范围内提及反义序列,这是指那些对应于 NP_601931 或其同系物基因的非编码 DNA 链的序列。因此,所述序列互补于 SEQ ID NO:1 的序列或其同系物。当然,所述序列也不必与非编码 DNA 链序列 100% 相同,但它们可具有前述程度的同源性。这也反映于以下情况,即根据定义,与基因的 mRNA 互补的反义序列不必与所述 mRNA 100% 互补。它们也可具有互补性,如至少 50%,优选至少 60%,特别优选至少 70%,更特别优选至少 80%,尤其优选至少 90%,而最优选为至少 95%、98% 和 / 或 100%。如上文所说明,若反义序列能与具有 SEQ ID NO:1 序列的核酸的相应目的 mRNA 进行特异杂交则足以。杂交于体内细胞条件下或体外进行。

[0142] 反义序列与内源性 mRNA 序列的杂交一般在体内细胞条件下或体外进行。

[0143] 此外,术语有义和反义为本领域技术人员所知。因此,基因表达领域的技术人员也清楚用于抑制的核酸分子应当有多长,以及它们需要何种程度与相应目的序列间的同源性或互补性。根据本发明,不能使用那些不能在体内和 / 或体外特异性地与 NCg12640 或其同系物的有义编码序列杂交的反义序列,即所述反义序列仍可与其它蛋白质家族的有义编码序列进行杂交。

[0144] 原则上而言,反义策略可以与核酶法组合使用。核酶为具有催化活性的 RNA 序列,若将其偶联于反义序列,能催化裂解靶序列 (Tanner 等人, (1999) FEMS Microbiol Rev. 23 (3), 257-75)。这能提高反义策略的效率。

[0145] 此外,也可以通过特异性的 DNA 结合因子 (例如锌指转录因子) 实现基因的抑制还有基因的过表达。

[0146] 此外,细胞中也可导入本身抑制靶蛋白质的因子。所述蛋白质结合因子可为例如适配体 (Famulok 等人, (1999) Curr Top Microbiol Immunol. 243, 123-36)。

[0147] 也可通过适配体进行抑制。可以设计适配体使其特异性结合于 NP_601931 并通过竞争性反应降低蛋白质的活性。通常适配体的表达是通过基于载体的过表达实现

的。适配体的设计、选择和表达为本领域技术人员所公知 (Famulok 等人, (1999) *Curr Top Microbiol Immunol.*, 243, 123-36)。

[0148] 对于所述蛋白质而言,可考虑将特异性抗体作为另外的蛋白质结合因子,其在微生物中的表达导致与具序列 SEQ ID NO:1 的核酸相同或功能性同源的核酸编码蛋白质的含量和 / 或活性降低。根据标准方法 (Guide to Protein Purification, Meth. Enzymol. 182, 第 663-679 页 (1990), M. P. Deutscher 编辑) 生产此类单克隆、多克隆或重组抗体。抗体的表达也可见于文献 (Fiedler 等人, (1997) *Immunotechnology* 3, 205-216; Maynard 和 Georgiou (2000) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2, 339-76)。

[0149] 生成本发明微生物的另一方法,是通过在微生物中表达与具序列 SEQ ID NO:1 的核酸相同或功能性同源的内源性核酸或其编码蛋白质的无功能突变体,降低所述核酸或蛋白质的活性。此类无功能突变体或形式为不再能够、或至少仅很局限地调节微生物中含硫化化合物 (特别是甲硫氨酸) 生物合成的核酸或核酸编码的蛋白质形式。此类无功能突变体中可能具有点突变、插入和 / 或缺失。它们在生产本发明的微生物中具有特别用途,所述微生物中内源性核酸或这些核酸序列编码的蛋白质的含量并未改变,但通过过表达前述无功能突变体,阻断了与具 SEQ ID NO:1 标识序列的核酸相同或功能性同源的内源性核酸或所述核酸序列编码的蛋白质的活性。

[0150] 根据本发明,此类无功能突变体基本上具有与野生型 (也即,如 SEQ ID NO:1 和 2) 相同的核酸或氨基酸序列。然而,它们某些位点上的核苷酸或氨基酸发生了点突变、插入或缺失,从而导致这些无功能突变体相对于野生型形式而言,不能或仅能有限地与其细胞结合配偶体相互作用。这样,无功能形式竞争排除了野生型形式与细胞结合配偶体间的相互作用,从而解偶联了对含硫化化合物生物合成的调节。

[0151] 本领域技术人员能容易鉴定本发明中具有序列 SEQ ID NO:1 的核酸的此类功能或无功能突变体。本领域技术人员可自行选择多种技术,向与 SEQ ID NO:1 相同或同源的核酸序列中引入点突变、插入或缺失 (尤其见 Sambrook (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 3 版, ColdSpring Harbor Laboratory Press; **Jäger** 等人, (1992) *J. Bacteriol.* 174, 5462-5465; W002/070685 以及 Stratagene, La Jolla, USA 的所谓 Quikchange 诱变法)。引入点突变、插入或 / 或缺失 (也可统称为突变) 后,本领域技术人员能够通过实施例如中举例说明的或现有技术中已知的相应测试,确定诱变蛋白质是否保留了其正常活性 (也见上文)。

[0152] 根据本发明,术语“无功能蛋白质或蛋白质片段”并不包括那些在氨基酸或核酸水平不具备与 NCg12640 或其同系物基本同源的序列的蛋白质。在本发明范围内,无功能突变体也称之为灭活或失活或显性失活蛋白质。

[0153] 因此,具有前述点突变、插入和 / 或缺失的本发明的功能或无功能突变体或其功能等同部分的特征在于与 NCg12640 基本同源的序列。

[0154] 本领域技术人员能够很容易确定,某一无功能突变体是否为本发明意义上的突变体。为此,通过例如同源重组或定点诱变,向与 SEQ ID NO:1 相同或功能性同源的基因组核酸序列中引入期望的突变即点突变、插入或缺失,并测试所述内源性核酸序列含量和 / 或活性的降低是否解偶联了含硫化化合物生物合成的调控,从而使所述微生物中所述含硫化化合物的产量提高。若确实如此,则说明这是无功能突变。

[0155] 然后将将通过这种方式确定的无功能突变引入位于载体中的 DNA 序列内, 并使其有效连接于在微生物中有功能的启动子和终止子序列。在将所述载体转移入微生物后, 可以过表达该无功能突变, 后者竞争排除了内源性野生型序列或蛋白质与其细胞结合配偶体间的相互作用。

[0156] 此种方法包括如以下步骤:

[0157] a) 制备这样的载体, 以 5' 至 3' 方向包含以下核酸序列:

[0158] - 在微生物中有功能的启动子序列,

[0159] - 与之有效连接的编码 NCg12640 的显性失活突变体或其同系物的 DNA 序列,

[0160] - 与之有效连接的在微生物中有功能的终止子序列; 和

[0161] b) 将 a) 中的载体转移到微生物中, 并任选将载体整合入所述微生物的基因组中。

[0162] 本领域的技术人员已知如何向编码 NP_601931 或其同系物的核酸序列中引入点突变、插入突变或缺失突变。例如, 可优选 PCR 技术引入点突变 (“PCR technology: Principle and Applications for DNA Amplification”, H. Ehrlich, id, Stockton Press)。此外, 向具有 SEQ ID NO:1 序列的核酸中引入点突变的实例见于实施例 1 中。

[0163] 根据本发明, 也能够通过以下方法制备本发明的微生物, 例如在微生物中表达特异性竞争蛋白质与其它细胞结合配偶体间相互作用的重组抗体, 所述蛋白质由与具有 SEQ ID NO:1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸编码。

[0164] 本领域的技术人员已知如何分离并鉴定该类针对 NP_601931 或其同系物的重组抗体, 可见于文献中 (Harlow 等人, 1999, Using antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0165] 根据本发明, 重组抗体是指如 Skerra 等人 (Curr. Opin. Immunol. (1993) 2, 250-262) 所述的不同已知形式的重组抗体。此处, 本发明的重组抗体包括所谓的 Fab 片段、Fv 片段、scFv 抗体、通过二硫桥连接的 scFv 同二聚体, 以及所谓的 VH 链。Fab 片段由组装的完整轻链和截短的重链组成, 而 Fv 片段由非共价连接的 VH 和 VL 链组成。所述片段和重组抗体的综述见于 Conrad 等人 (Plant Mol. Biol. (1998) 38, 101-109)。所述 Fab 和 Fv 片段能在体内互相结合。

[0166] 由于该方法很可能不太高效, 根据本发明优选使用 scFv 抗体。这些抗体由通过柔性接头肽融合的轻链可变部分和重链可变部分组成。此类 scFv 抗体的产生在现有技术中已经多有描述 (尤其参见 Conrad 等人, 同上; Breitling 等人, (1999) Recombinant Antibodies, John Wiley & Sons, New York)。scFv 抗体具有与普通抗体相同的抗原特异性和活性; 然而, 它们不必像其它天然或重组抗体那样在体内由个别的链组装而成。因此, 它们特别适用于本发明的方法。

[0167] 在上文注明的参考文献中, 已经详细阐明了本领域技术人员如何分离和产生编码本发明优选的 scFv 抗体的核酸序列。

[0168] 方便起见, 此处认为存在的杂交瘤细胞系产生单克隆抗体。然后, 分离编码抗体轻链和重链的 cDNA, 第二步则将轻链和重链可变区的编码区融合在一起形成一个分子。

[0169] 本领域技术人员已知的另一种产生重组抗体的方法, 是筛查重组抗体文库 (即所谓的噬菌体展示文库, 也见 Hoogenboom 等人 (2000) Immunology Today 21, 371-378; Winter 等人 (1994) Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455; De Wildt 等人 (2000) Nat. Biotechnol. 18,

989-994)。在所述方法中,可以通过本领域技术人员已知的方法富集、选择并分离针对给定抗原的重组抗体。

[0170] 例如,表达针对与具 SEQ ID NO :2 序列的蛋白质相同或同源的蛋白质的抗体的方法包括以下步骤:

[0171] a) 制备这样的载体,以 5' 至 3' 方向包含以下核酸序列:

[0172] - 在微生物中有功能的启动子序列,

[0173] - 与之有效连接的编码重组抗体的 DNA 序列,所述抗体特异于与具 SEQ ID NO :2 序列的蛋白质相同或同源的蛋白质,

[0174] - 与之有效连接的在微生物中有功能的终止子序列;和

[0175] b) 将 a) 中的载体转移到微生物中,并任选将载体整合入所述微生物的基因组中。

[0176] 在本发明范围内,若称与具有 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸含量和 / 或活性相对于野生型降低,或所述核酸编码的蛋白质含量和 / 或活性相对于野生型降低,则等同于称,该核酸的功能性表达下降,且优选被完全抑制。

[0177] 在本发明范围内,术语“含硫化合物”或“精细化学品”包括任何含至少一个共价连接的硫原子的化学化合物,且可通过本发明的发酵方法获得。

[0178] 根据本发明,含硫化合物尤其包括,L- 甲硫氨酸、L- 半胱氨酸、L- 同型半胱氨酸、L- 胱硫醚、S- 腺苷-L- 甲硫氨酸、谷胱甘肽、生物素、硫胺和 / 或硫辛酸,且优选 L- 甲硫氨酸和 / 或 L- 半胱氨酸。

[0179] 根据本发明,微生物优选为放线菌 (Actinobacteria), 蓝藻 (Cyanobacteria), 变形菌 (Proteobacteria), 橙色绿屈挠菌 (Chloroflexusaurantiacus), 小小梨形菌 (Pirellula sp. 1)、盐杆菌 (Halobacteria) 和 / 或甲烷球菌 (Methanococci), 优选棒杆菌, 分枝杆菌 (Mycobacteria), 链霉菌 (Streptomyces), 沙门氏菌, 大肠杆菌, 志贺氏菌 (Shigella) 和 / 或假单胞菌 (Pseudomona)。特别优选的微生物选自棒杆菌、大肠杆菌、芽孢杆菌属微生物,特别是枯草芽孢杆菌,以及链霉菌属微生物。

[0180] 术语代谢物是指生物代谢中以中间产物或终产物出现的化学化合物,除了其作为化学成分的能力以外,这些物质还对酶及其催化活性有调节作用。此处,从文献中已知此类代谢物对酶活性可同时具有抑制和刺激效应 (Stryer, Biochemistry, (1995) W. H. Freeman & Company, New York, New York, USA)。文献中也描述了可以通过诸如利用 UV 辐射、离子辐射或诱变物质突变基因组 DNA, 随后选择特定的表型, 以在生物中产生改变代谢物对其影响的酶 (Sahm 等人 (2000), Biological Chemistry 381 (9-10) :899-910)。也可以通过指定措施来实现所述的改良性质。此处,本领域技术人员熟悉于改变酶基因中编码蛋白质的 DNA 的特定核苷酸 (也包括用定点方式), 从而使由表达 DNA 序列产生的蛋白质具有特定的新性质,例如相对于未改变蛋白质而言改变了代谢中代谢物的调节效应。

[0181] 特别适用于本发明的微生物为棒杆菌样细菌,其中与具有 SEQ ID NO :1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸含量和 / 或活性相对于野生型降低,或所述核酸编码的蛋白质含量和 / 或活性相对于野生型降低。

[0182] 所述微生物能从葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉、纤维素或从甘油和乙醇中产生含硫精细化学品,特别是 L- 甲硫氨酸。在棒杆菌属中,以产生 L- 氨基酸能力而闻名的谷氨酸棒杆菌特别适用。

- [0183] 棒杆菌样细菌的合适菌株实例为以下属的菌株：
- [0184] 棒杆菌，特别是物种谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*)，
- [0185] 如谷氨酸棒杆菌 ATCC13032，
- [0186] 乙酰谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoglutamicum*) ATCC15806，
- [0187] 嗜乙酰乙酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC13870，
- [0188] *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539，和
- [0189] 栖糖蜜棒杆菌 (*Corynebacterium melassecola*) ATCC17965，
- [0190] 或短杆菌属 (*Brevibacterium*)，如
- [0191] 黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) ATCC14067，
- [0192] 乳糖发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869，和
- [0193] 叉开短杆菌 (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020；
- [0194] 或由它们衍生的菌株，如
- [0195] 谷氨酸棒杆菌 KFCC10065 和
- [0196] 谷氨酸棒杆菌 ATCC21608，
- [0197] 也能产生期望的精细化学品或其前体。
- [0198] 缩写 KFCC 代表韩国培养物保藏中心联盟 (korean Federation of Culture Collection)，缩写 ATCC 代表美国典型培养物保藏中心。
- [0199] 本发明的另一实施方案涉及这样的微生物，其中除了与具有 SEQ ID NO:1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸含量和 / 或活性、或所述核酸编码的蛋白质含量和 / 或活性相对于野生型降低外，与具 SEQ ID NO:3 序列的核酸相同或功能性同源的核酸含量和 / 或活性、或最后所述核酸编码的蛋白质含量和 / 或活性相对于野生型也降低。
- [0200] 具有 SEQ ID NO:3 序列的核酸为编码谷氨酸棒杆菌蛋白质 McbR (氨基酸序列 SEQ ID NO:4) 的核酸。所述蛋白质为谷氨酸棒杆菌中含硫化合物 (特别是甲硫氨酸) 生物合成路径基因的转录抑制物 (Rey 等人, 同上)。
- [0201] 通过同时降低与具 SEQ ID NO:1 和 3 序列的核酸相同或功能性同源的核酸含量和 / 或活性，提供了特别适于生成含硫化合物的微生物。所述含硫化合物可为前述化合物，其中特别优选甲硫氨酸和半胱氨酸。该微生物也可为前述生物，其中优选谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌。
- [0202] 为降低与具 SEQ ID NO:3 序列的核酸相同或功能性同源的核酸或所述核酸编码蛋白质的含量和 / 或活性，可以使用上述用于与具有 SEQ ID NO:1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸或最后所述核酸编码蛋白质的相同方法和操作。此处，术语如同源性、互补性、功能形式、显性失活突变体等含义同前。
- [0203] 本发明微生物的另一实施方案涉及微生物，其中除了与具有 SEQ ID NO:1 序列的核酸相同或功能性同源的核酸或所述核酸编码蛋白质的活性或含量相对于野生型降低外，至少一种编码期望含硫化合物生物合成路径基因的其它核酸的含量和 / 或活性相对于野生型降低。
- [0204] 优选所述其它核酸选自组 I，包括：
- [0205] - 基因 thrB，编码同型丝氨酸激酶 (EP 1 108 790 ; DNA-SEQ ID NO:3453)，
- [0206] - 基因 ilvA，编码苏氨酸脱水酶 (EP 1 108 790 ; DNA-SEQ ID NO:2328)，

- [0207] - 基因 thrC, 编码苏氨酸合成酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :3486),
- [0208] - 基因 ddh, 编码内消旋二氨基庚二酸 D- 脱氢酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :3494),
- [0209] - 基因 pck, 编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :3157),
- [0210] - 基因 pgi, 编码葡萄糖 -6- 磷酸 -6- 异构酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :950),
- [0211] - 基因 poxB, 编码丙酮酸氧化酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :2873),
- [0212] - 基因 dapA, 编码二氢吡啶二羧酸合成酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :3476),
- [0213] - 基因 dapB, 编码二氢吡啶二羧酸还原酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :3477),
- [0214] - 基因 lysA, 编码二氨基庚二酸 (diaminopicolinate) 脱羧酶 (EP 1 108 790 A2 ;DNA-SEQ ID NO :3451),
- [0215] - 基因 (GenBank 登录号 NCg11072), 编码糖基转移酶 (GenBank 登录号 NP_600345), 以及
- [0216] - 基因 (GenBank 登录号 NCg12817), 编码乳酸脱氢酶 (GenBank 登录号 NP_602107)。

[0217] 此外, 本发明后述的生物中, 与具 SEQ ID NO :3 序列的核酸相同或功能性同源的核酸的含量和 / 或活性, 或所述核酸编码蛋白质的含量和 / 或活性当然也相对于野生型降低。

[0218] 此处, 也可通过上述的如对 SEQ ID NO :1 至 4 的相同方法, 降低组 I 中提及的核酸序列或所述序列编码蛋白质的含量和 / 或活性。此处, 术语如同源性、显性失活突变体等含义同上。

[0219] 迄今为止提及的所有本发明实施方案涉及可用于生产前述含硫化化合物的微生物。此处, 特别优选可用于生产甲硫氨酸和 / 或半胱氨酸的微生物, 其中所述微生物可为前述微生物, 且优选谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌。此处, 可利用前述方法以降低前述核酸的含量和 / 或活性。

[0220] 本发明的另一实施方案涉及前述微生物, 其中, 附加地, 编码待生成含硫化化合物的生物合成路径基因产物的核酸的含量和 / 或活性相对于野生型增加。此处, 代谢路径具体指, 硫同化、甲硫氨酸代谢、海藻糖代谢、丙酮酸代谢、半胱氨酸代谢、天冬氨酸半醛合成、糖酵解、糖回补、磷酸戊糖代谢、柠檬酸循环或氨基酸输出物的生物合成路径。

[0221] 本发明该方面的其它实施方案涉及微生物, 其中选自组 II 的核酸或所述核酸编码蛋白质的含量和 / 或活性增加, 包括

- [0222] - 基因 lysC, 编码天冬氨酸激酶 (EP 1 108 790 A2 ;DNA-SEQ ID NO :281),
- [0223] - 基因 asd, 编码天冬氨酸半醛脱氢酶 (EP 1 108 790 A2 ;DNA-SEQ ID NO :282),
- [0224] - 基因 gap, 编码甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (Eikmanns(1992) Journal of Bacteriology 174 :6076-6086),
- [0225] - 基因 pgk, 编码 3- 磷酸甘油激酶 (Eikmanns(1992), Journal of Bacteriology 174 :6076-6086),
- [0226] - 基因 pyc, 编码丙酮酸羧化酶 (Eikmanns(1992), Journal of Bacteriology 174 :6076-6086),
- [0227] - 基因 tpi, 编码磷酸丙糖异构酶 (Eikmanns(1992), Journal

ofBacteriology174 :6076-6086),

- [0228] - 基因 metA, 编码同型丝氨酸 O-乙酰基转移酶 (EP1108790 ;DNA-SEQ ID NO :725),
- [0229] - 基因 metB, 编码胱硫醚 γ 合酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :3491),
- [0230] - 基因 metC, 编码胱硫醚 γ 裂合酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :3061),
- [0231] - 基因 glyA, 编码丝氨酸羟甲基转移酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :1110),
- [0232] - 基因 metY, 编码 O-乙酰同型丝氨酸硫化氢解酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :726),
- [0233] - 基因 metF, 编码亚甲基四氢叶酸还原酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :2379),
- [0234] - 基因 serC, 编码磷酸丝氨酸氨基转移酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :928),
- [0235] - 基因 serB, 编码磷酸丝氨酸磷酸酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :334, DNA-SEQ ID NO :467, DNA-SEQ ID NO :2767),
- [0236] - 基因 cysE, 编码丝氨酸酰基转移酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :2818),
- [0237] - 基因 hom, 编码同型丝氨酸脱氢酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :1306), 以及
- [0238] - 基因 meth, 编码甲硫氨酸合酶 (EP 1 108 790 ;DNA-SEQ ID NO :1663),
- [0239] - 基因 metE (GenBank 登录号 NCg11094), 编码甲硫氨酸合酶 (GenBank accession number NP_600367),
- [0240] - 基因 (GenBank 登录号 NCg12473), 编码半胱氨酸合酶 (GenBank 登录号 NP_601760),
- [0241] - 基因 (GenBank 登录号 NCg12055), 编码半胱氨酸合酶 (GenBank 登录号 NP_601337),
- [0242] - 基因 (GenBank 登录号 NCg12718), 编码亚硫酸盐还原酶 (GenBank 登录号 NP_602008),
- [0243] - 基因 cysH (GenBank 登录号 NCg12717), 编码磷酸腺苷磷酰硫酸还原酶 (GenBank 登录号 NP_602007),
- [0244] - 基因 (GenBank 登录号 NCg12715), 编码硫酸腺苷酰基转移酶亚基 1 (GenBank 登录号 NP_602005),
- [0245] - 基因 (GenBank 登录号 NCg12716), 编码 CysN——硫酸腺苷酰基转移酶亚基 2 (GenBank 登录号 NP_602006),
- [0246] - 基因 (GenBank 登录号 NCg12719), 编码铁氧化还原蛋白 NADP 还原酶 (GenBank 登录号 NP_602009),
- [0247] - 基因 (GenBank 登录号 NCg12720), 编码铁氧化还原蛋白 (GenBank 登录号 NP_602010),
- [0248] - 基因 (GenBank 登录号 NCg11514), 编码葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 (GenBank 登录号 NP_600790), 以及
- [0249] - 基因 (GenBank 登录号 NCg12014), 编码果糖 -1,6- 二磷酸酶 (GenBank 登录号 NP_601294)。
- [0250] 在本发明微生物中实现的组 II 中核酸编码蛋白质的含量和 / 或活性的增加, 优选达到至少 5%, 优选至少 20%, 也优选至少 50%, 特别优选至少 100%, 也特别优选增加至少 5 倍 ; 尤其优选增加至少 10 倍, 也尤其优选增加至少 50 倍, 更优选至少为 100 倍, 而最优选

为 1000 倍。

[0251] 可通过不同方法提高组 II 中核酸编码蛋白质的含量和 / 或活性。优选通过将所述核酸序列的 DNA 序列形式引入载体实现之,所述载体还另外含有微生物中有功能的启动子、微生物中有功能的核糖体结合位点,以及微生物中有功能的终止子。然后将该载体转移至微生物中,并根据所选载体或与微生物一道在染色体外复制,或整合入微生物的基因组中。此处,可以使用与前述用于降低特定核酸或其编码蛋白质含量和 / 或活性的基本相同的载体或质粒。相同原则适用于所用的选择标记。

[0252] 此外,也可以通过在微生物中表达组 II 中核酸的功能等同物或其类似物或其同系物,提高所述核酸编码蛋白质的含量和 / 或活性。至于术语同源性、互补性等,含义同上。

[0253] 在本发明范围内,明确公开多肽的功能等同物或类似物,为与所述多肽不同的多肽,其中还保留了期望的生物活性,例如底物特异性。

[0254] 根据本发明,功能等同物具体是指,至少一个序列位置上具有除明确提及氨基酸以外的氨基酸、且仍表现出上述生物活性的突变体。因此,功能等同物包括通过一个或多个氨基酸添加、取代、缺失和 / 或倒置得到的突变体,其中所述改变可以发生于任何序列位置,只要它们产生的突变体具有前述的性能属性。特别地,若突变体与未改变多肽之间的反应模式在量上匹配,即如相同的底物以不同速度转化,则也称为功能等同。

[0255] 当然,功能等同物也包括来自其它生物的多肽,如天然存在的变体。可以通过如序列比较的方法确定同源序列区域,而遵循本发明的明确说明能确定等同酶。

[0256] 功能等同物也包括本发明多肽的片段,优选其具有如期望生物功能的个别结构域或序列基序。

[0257] 此外,功能等同物为具有前述多肽序列之一或其衍生等同物、以及至少一种其它异源序列的融合蛋白质,所述异源序列在功能上与其不同,有效地 N 末端或 C 末端连接(即对融合蛋白质元件的功能没有太大的破坏)。此类异源序列的实例如信号肽、酶、免疫球蛋白、表面抗原、受体或受体配体。

[0258] 本发明的功能等同物为明确公开蛋白质的同系物。它们与所述明确公开序列间具有至少 30%,或约 40%、50%,优选至少约 60%、65%、70%或 75%,特别优选至少 85%,如 90%、95%或 99%的同源性。

[0259] 可以通过诱变产生本发明蛋白质或多肽的同系物,例如通过蛋白质的点突变或截短。此处所用的术语“同系物”是指,作为蛋白质活性激动剂或拮抗剂起作用的蛋白质变体。

[0260] 通过筛选突变体如截短突变体的组合文库可以鉴定本发明蛋白质的同系物。例如,通过核酸水平的组合诱变,如通过酶连接合成的寡核苷酸混合物,能生成多种蛋白质变体文库。有多种方法可用于从简并寡核苷酸序列中产生潜在同系物文库。可在 DNA 合成仪中化学合成简并基因序列,然后将合成的基因连接到适当的表达载体中。使用简并基因能提供编码期望潜在蛋白质序列集合的所有序列混合物。合成简并寡核苷酸的方法为本领域技术人员公知(例如 Narang *al.* (1983) *Tetrahedron* 39, 3 ; Itakura 等人 (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53, 323 ; Itakura 等人, (1984) *Science* 198, 1056 ; Ike 等人 (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 477)。此外,可以使用蛋白质密码子片段库,以产生多样化群体的蛋白质片段用于筛查及随后选择本发明蛋白质的同系物。在一个实施方案中,于每分子仅发生约一次切割的条件下,用核酸酶处理编码序列的双链 PCR 片段,产生编码序列片段文库;变性双链 DNA;

复性 DNA, 从而形成含有不同缺刻产物的有义 / 反义对的双链 DNA ; 通过 S1 核酸酶处理, 从新形成的双螺旋中移除单链部分, 并将产生的片段文库连入表达载体中。通过所述方法, 可以得到编码本发明蛋白质不同大小的 N 末端、C 末端和中间片段的表达文库。

[0261] 以前该领域中已知若干种筛查通过点突变或截短产生的组合文库基因产物的技术, 以及筛查 cDNA 文库中具有选定性质的基因产物的技术。可改造所述技术用于快速筛查通过组合诱变本发明同系物得到的基因文库。最常用的筛查进行高通量分析的大型基因文库的技术包括, 将基因文库克隆入可复制的表达载体中, 用所产生的载体文库转化合适的细胞 ; 并在检测期望活性及分离编码产物已检测的基因的载体得以简化的条件下表达组合基因。递归总体诱变 (Recursive ensemble mutagenesis, REM) 技术能提高文库中功能性突变体的几率, 可与筛查测试一同用于鉴定同系物 (Arkin 等人, (1992) PNAS 89, 7811-7815 ; Delgrave 等人 (1993) Protein Engineering 6 (3), 327-331)。

[0262] 例如, 可通过实际上应当已知的方法, 分离编码生物中前述组 II 的甲硫氨酸合酶 (EC 2. 1. 1. 13) 的 metH 基因。

[0263] 为分离生物 metH 基因或前述组 II 中的其它基因, 首先在大肠杆菌中建立所述生物基因文库。基因文库的建立详细描述于公知的教科书和手册中。例如 Winnacker 的教科书 “Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie” (Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1990), 或 Sambrook 等人的手册 (同上)。大肠杆菌 K-12 菌株 W3110 的基因文库众所周知, 由 Kohara 等人 (1987, Cell 50, 495-508) 建立于 λ -载体中。

[0264] 为在大肠杆菌中建立如组 II 的酶的基因文库, 可以使用粘粒如粘粒载体 SuperCos I (Wahl 等人, (1987) PNAS, 84, 2160-2164), 也可以使用质粒如 pBR322 (BoliVal 等人 (1979) Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) 或 pUC9 (Vieira 等人 (1982), Gene, 19, 259-268)。具有限制和重组缺陷的大肠杆菌菌株尤其适用作宿主。其实例之一为 Grant 等人描述的菌株 DH5 α mcr (1990) PNAS, 87, 4645-4649)。随后可再次将借助于粘粒克隆的长 DNA 片段亚克隆入适于测序的常规载体中, 并如 Sanger 等人 (1977, PNAS, 74, 5463-5467) 所述对之测序。

[0265] 然后可通过已知的算术或序列分析程序检查得到的 DNA 序列, 例如 Staden (1986, Nucleic Acids Research 14, 217-232) 公开的, Marck (1988, Nucleic Acids Research 16, 1829-1836) 公开的或 Butler 的 GCG 程序 (1998, Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97)。

[0266] 本领域技术人员能获取利用杂交鉴定 DNA 序列的说明, 尤其见于 Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany, 1993) 的手册 “The DIG System Users Guide for Filter Hybridization”, 以及 Liebl 等人 (1991, International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 255-260)。本领域技术人员能获取利用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 DNA 序列的说明, 尤其见于 Gait 的手册 : Oligonucleotide synthesis : A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984), 以及 Newton 和 Graham : PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany, 1994)。

[0267] 还已知蛋白质 N 末端和 / 或 C 末端的改变不会太大影响其功能, 甚至具有稳定作用。本领域技术人员可获得相关信息, 尤其见于 Ben-Bassat 等人 (1987, Journal of Bacteriology 169, 751-757), O' Regan 等人 (1989, Gene 77, 237-251), Sahin-Toth 等人

(1994, Protein Sciences 3, 240-247), Hochuli 等人 (1988, Biotechnology 6, 1321-1325), 以及已知的遗传学和分子生物学教科书。

[0268] 能在棒杆菌样细菌中复制的质粒, 适用作所有前述方法中的质粒以提高或降低核酸或其编码蛋白质的含量和 / 或活性。多种已知质粒载体如 pZ1 (Menkel 等人 (1989, Applied and Environmental Microbiology 64, 549-554)), pEKEx1 (Eikmanns 等人, (1991, Gene, 102, 93-98)) 或 pHS2-1 (Sonnen 等人 (1991, Gene, 107, 69-74)), 是以隐蔽性质粒 pHM1519、pBL1 或 pGA1 为基础。也可同样使用其它质粒载体如 pCLiK5MCS, 或基于 pCG4 (US-A4, 489, 160) 或 pNG2 (Serwold-David 等人 (1990) FEMSMicrobiology Letters 66, 119-124) 或 pAG1 (US-A5, 158, 891) 的质粒载体。

[0269] 此外, 如 Reinscheid 等人 (1994, Applied and Environmental Microbiology, 60, 126-132) 所述, 可通过整合入染色体协助利用基因扩增法来复制或扩增 *hom-thrB* 操纵子的质粒载体也适用。在所述方法中, 将完整的基因克隆入能在宿主 (特别是大肠杆菌) 中但不能在谷氨酸棒杆菌中复制的质粒载体中。例如, pSUP301 (Sirnon 等人 (1983), Biotechnology 1, 784-791)、pK18mob 或 pK19mob (Schäfer 等人, Gene 145, 69-73)、(Bernard 等人 (1993, Journal of Molecular Biology, 234, 534-541))、pEM1 (Schrumpf 等人 (1991), Journal of Bacteriology 173, 4510-4516) 或 pBGS8 (Spratt 等人 (1986), Gene 41, 337-342) 可作为载体。然后通过转化将含有待扩增基因的质粒载体转移到期望的谷氨酸棒杆菌菌株中。转化方法见述于如 Thierbach 等人 (1988, Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362))、Duncan 等人 (1989, Biotechnology 7, 1067-1070) 以及 Tauch 等人 (1994, FEMS Microbiological Letters 123, 343-347)。

[0270] 将重组核酸构建体或基因构建体插入合适的宿主生物中进行表达, 优选插入宿主特异性载体中, 从而确保基因在宿主中的最佳表达。载体为本领域技术人员所熟知, 且可见于如 “Cloning Vectors” (Pouwels P. H. 等人编辑, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985)。除了质粒以外, 本领域技术人员已知的所有其它载体, 例如噬菌体、转座子、IS 元件、噬粒、粘粒以及线性或环状 DNA 也可作为载体。在宿主生物中, 所述载体能自主复制或经染色体复制。

[0271] 多种抗生素如氯氨苄西林 (chloroampicillin)、卡那霉素、庆大霉素、G418、博来霉素、潮霉素等适用作选择标记。

[0272] 本发明的优选实施方案涉及微生物, 其中通过同源重组将含量和 / 或活性欲比野生型降低的蛋白质的编码核酸移出该微生物的基因组, 或通过同源重组改变该编码核酸, 使得所述核酸序列不再功能性表达。

[0273] 因此, 本发明优选的所述微生物中, 通过同源重组失活了与具 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3 序列的核酸相同或功能性同源的基因组核酸及组 I 中序列, 从而不再出现由前述核酸编码的蛋白质的功能性表达。

[0274] 本发明的另一个优选实施方案涉及微生物, 其中另外过表达与组 II 核酸相同或同源的核酸或其功能等同物。

[0275] 本领域技术人员可单个或组合采用不同方法实现过表达。因此, 能增加相应基因的拷贝数, 或突变位于结构基因上游的启动子、调控区域或核糖体结合位点。插入结构基因上游的表达盒以同样方式发挥作用。利用诱导型启动子, 还能增强发酵生产 L- 甲硫氨酸过

程中的表达。通过延长 mRNA 寿命的方法也能增强表达。此外,也可通过阻断酶降解来增强酶活性。基因或基因构建体可以不同拷贝数存在于质粒中,也可整合后与染色体一同扩增。或者,还可以通过改变培养基成分和培养方法,过表达相关基因。

[0276] 本领域技术人员能获取相关说明,尤其见于 Martin 等人 (1987, *Biotechnology* 5, 137-146)、Guerrero 等人 (1994, *Gene* 138, 35-41)、Tsuchiya 等人 (1988, *Biotechnology*, 6, 428-430)、Eikmanns 等人 (1991, *Gene*, 102, 93-98)、EP0472869、US4,601,893、Schwarzer 等人 (1991, *Biotechnology* 9, 84-87)、Remscheid 等人 (1994, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 126-132)、LaBarre 等人 (1993, *Journal of Bacteriology* 175, 1001-1007)、W096/15246、Malumbres 等人 (1993, *Gene* 134, 15-24)、JP-A-10-229891、Jensen 等人 (1998, *Biotechnology and Bioengineering*, 58, 191-195)、Makrides (1996, *Microbiological Reviews*, 60, 512-538), 以及已知的遗传学和分子生物学教科书。

[0277] 适用于本发明范围内方法的启动子包括,谷氨酸棒杆菌启动子 *groES*、*sod*、*eftu*、*ddh*、*amy*、*lysC*、*dapA*、*lysA*, 以及革兰氏阳性启动子 SP02, 见述于 *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives*, Sonenshein, Abraham L., Hoch, James A., Losick, Richard; ASM Press, District of Columbia, Washington 以及 Patek M., Eikmanns B. J., Patek J., Sahn H., *Microbiology* 1996, 142:1297-1309, 然而也可使用最好在革兰氏阴性细菌中使用的 *cos*⁻、*tac*⁻、*trp*⁻、*tet*⁻、*trp-tet*⁻、*lpp*⁻、*lac*⁻、*lpp-lac*⁻、*lacIq*⁻、*T7*⁻、*T5*⁻、*T3*⁻、*gal*⁻、*trc*⁻、*ara*⁻、SP6⁻、*l-PR*⁻ 或 *l-PL*⁻ 启动子。也优选使用诱导型启动子如光诱导型、特别是温度诱导型启动子如 *P_lP₁*⁻ 启动子。原则上而言,可以使用所有带自身调控序列的天然启动子。此外,也可优先选用合成启动子。启动子的更多实例描述见 Patek M. 等人, *J. Biotechnol.* 2003, 104, 311-323。

[0278] 前述调控序列应能保证核酸序列及必要时蛋白质的定向表达。根据宿主生物的不同,这可能意味如基因仅在诱导后才表达或过表达,或即刻表达和 / 或过表达。此处,调控序列或因能施加正面影响从而提高或降低表达。因此,优先通过强转录信号如启动子和 / 或增强子,在转录水平增强调控元件。此外,也可以通过如提高 mRNA 的稳定性来促进翻译。

[0279] 为此,使用普通重组和克隆技术,例如 *Current Protocols in Molecular Biology*, 1993, John Wiley & Sons, Incorporated, New York, New York; *PCR Methods*, Gelfand, David H., Innis, Michael A., Sninsky, John J. 1999, Academic Press, Incorporated, California, San Diego; *PCR Cloning Protocols, Methods in Molecular Biology Ser.*, Vol. 192, 第 2 版., Humana Press, New Jersey, Totowa; Sambrook 等人, 同上; 以及 T. J. Silhavy, M. L. Berman 和 L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984); 以及 Ausubel, F. M. 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) 中描述的那些。

[0280] 本发明也涉及生产含硫化合物的方法,所述含硫化合物优选为前述含硫化合物,特别是甲硫氨酸和 / 或半胱氨酸。所述方法的特征在于它们利用了本发明的微生物,并优选在细胞或细胞培养基中通过发酵培养这些微生物富集含硫化合物。此处,本领域技术人员已知通过优化优选发酵方法能进一步提高产量。在本发明的方法中,可

以利用分批法或补料分批或重复补料分批法,连续或间断培养根据本发明产生的微生物,生产含硫化合物,特别是L-甲硫氨酸。已知培养方法的概述可见于Chmiel的教科书(Bioprozess technik 1.Einführung in die Bioverfahrenstechnik(GustavFischer Verlag, Stuttgart, Germany, 1991))或Storhas的教科书(Bioreaktoren und periphere Einrichtungen(Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, Germany, 1994))。

[0281] 所用培养基应当恰当满足相应菌株的要求。不同微生物培养基的描述见于American Society for Bacteriology的手册“Manual of Methods for General Bacteriology”(Washington D.C., USA, 1981)。

[0282] 所述可用于本发明的培养基通常包括一种或多种碳源、氮源、无机盐、维生素和/或微量元素。

[0283] 优选碳源为糖,如单糖、双糖或多糖。尤其合适的碳源如葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、核糖、山梨糖、核酮糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖、淀粉或纤维素。也可以通过复合化合物如糖蜜或其它糖精制的副产物向培养基中加入糖。加入不同碳源的混合物也有优势。其它可用的碳源为油和脂肪,例如豆油、葵花籽油、花生油和椰油;脂肪酸如棕榈酸、硬脂酸或亚油酸;醇如甘油、甲醇或乙醇;以及有机酸如醋酸或乳酸。

[0284] 氮源通常为有机或无机氮化合物或含有所述化合物的物质。氮源的实例包括氨气或铵盐,如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵或硝酸铵、硝酸盐、尿素、氨基酸或复合碳源如“玉米浆”、豆粉、大豆蛋白、酵母膏、肉汁等。可使用单个或混合氮源。

[0285] 含于培养基中的无机盐化合物,包括钙、镁、钠、钴、钼、钾、锰、锌、铜和铁的氯化物、磷酸或硫酸盐。

[0286] 无机含硫化合物如硫酸盐、亚硫酸盐、连二亚硫酸盐、连四硫酸盐、硫代硫酸盐和硫化物,以及有机硫化合物如硫醇和巯基,可用作生产含硫精细化学品特别是甲硫氨酸的硫源。

[0287] 磷酸、磷酸二氢钾或磷酸氢二钾或相应含钠盐可用作磷源。

[0288] 可以向培养基中添加螯合剂,以保持溶液中的金属离子。特别合适的螯合剂包括苯二酚类如儿茶酚或原儿茶酸或有机酸如柠檬酸。

[0289] 本发明所用的发酵培养基通常含有其它生长因子如维生素或生长促进剂,其中包括如生物素、核黄素、硫胺、叶酸、尼克酸、泛酸和吡哆辛。生长因子和盐往往来自复合培养基成分如酵母膏、糖蜜、“玉米浆”等。此外,可向培养基中加入合适前体。培养基化合物的确切成分很大程度上取决于相应的试验,是为每一特定情况个别选择的。培养基最优化的相关信息可见教科书“Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach”(编辑P. M. Rhodes, P. E Stanbury, IRL Press(1997)第53-73页,ISBN0199635773)。也可从商业供应商处获取生长培养基,如Standard 1(Merck)或BHI(脑心浸液, DIFCO)等。

[0290] 通过加热(1.5大气压和121°C 20分钟)或无菌过滤对所有这些培养基成分进行灭菌。成分消毒可一起进行,必要时也可分开进行。可以在培养开始时就加入所有的培养基成分,或者任选持续或分批加入这些成分。

[0291] 通常培养物的温度在15°C至45°C间,优选25°C至40°C,且在试验过程中可保持恒定或有所变化。培养基的pH值范围应为5至8.5,优选约7.0。在培养过程中,可通过添加碱性化合物如氢氧化钠、氢氧化钾、氨或氨水,或酸性化合物如磷酸或硫酸,控制培养物的

pH 值。使用抗泡沫剂如聚乙二醇脂肪酸酯以限制泡沫产生。可以向培养基中加入合适的选择性作用物质如抗生素,以保持质粒的稳定性。为保持有氧条件,向培养基中引入氧气或含氧的气体混合物如空气。培养直至产生最大量的所需产物。这一目标通常可在 10 至 160 小时内实现。

[0292] 由此得到的含有特别是 L-甲硫氨酸的发酵液,干重通常为 7.5 至 25 重量百分比。

[0293] 此外,若在限糖条件下进行发酵也是有利的;至少是发酵最后阶段,尤其至少是其间的 30% 阶段限糖。也就是说在这段时间内,发酵培养基中可利用糖的浓度保持在或降低至 ≥ 0 至 3g/l。

[0294] 然后加工发酵液。根据需求,通过分离方法如离心、过滤、倾倒或组合所述方法,将生物量从发酵液中全部或部分移出,或者将整个生物量都留在发酵液中。

[0295] 然后,通过已知方法浓缩或再浓缩发酵液,如利用旋转蒸发器、薄膜蒸发器、滴膜蒸发器,也可通过反渗透或纳米过滤进行浓缩。然后可通过冷冻干燥、喷雾干燥、喷浆造粒或其它方法加工所述再浓缩的发酵液。

[0296] 然而,也可进一步纯化含硫精细化学品(特别是 L-甲硫氨酸)。因此在移除生物量后,利用合适树脂进行色谱法处理含产物的发酵液,其中所需产物或杂质全部或部分地保留在色谱树脂上。可任选重复所述色谱步骤,其中可使用相同或不同的色谱树脂。本领域技术人员精通合适色谱树脂的选择及其最有效利用。通过过滤或超滤能浓缩纯化产物,并将其贮存于能保证产物最大稳定性的温度下。

[0297] 通过以前该领域的技术能确定分离化合物的性质和纯度。这包括高效液相色谱(HPLC)、质谱法、染色法、薄膜色谱、NIRS、酶测试或微生物测试。所述分析方法总结于 Patek 等人(1994, Appl. Environ. Microbiol. 60, 133-140)、Malakhova 等人(1996, Biotekhnologiyall, 27-32)、Schmidt 等人(1998, Bioprocess Engineer. 19, 67-70)、Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry(1996, Vol. A27, VCH: Weinheim, 89-90 页, 521-540 页, 540-547 页, 559-566 页, 575-581 页 和 581-587 页); Michal, G(1999, Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons)、Fallon 等人(1987, Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 17) 中。

[0298] 通过本发明的方法,优选含硫化合物(特别是甲硫氨酸或半胱氨酸)的产量相对于野生型提高至少 5%、10%、50%、75%, 优选至少提高 2、3、4、5、7、10 倍,特别优选至少提高 20、40、60、80、100 倍,尤其是 200、500、1,000 倍,且最优选 10,000 倍。至于绝对量,通过本发明的方法具体可以达到每升发酵液中 1g 至 150g 的甲硫氨酸产量。

[0299] 通过以下非限制性实施例将进一步详述本发明:

[0300] 实施例

[0301] 1. 材料和方法

[0302] 1.1 菌株、培养基和质粒

[0303] 在 CGXII 基本培养基(Keilhauer 等人(1993), J. Bacteriol. 175, 5595-5603) 中常规培养谷氨酸棒杆菌菌株 ATCC14752 或 ATCC13032。在卡那霉素(15mg/ml) 存在时培养转座突变株。利用大肠杆菌 DH5 α 进行标准克隆,若质粒将用于谷氨酸棒杆菌中的转化,则利用大肠杆菌 ET12567 进行质粒扩增。

[0304] 本发明中使用的菌株和质粒如表 1 所示。与相应抗生素（卡那霉素 50 μ g/ml、氯霉素 50 μ g/ml、氨基青霉素 100 μ g/ml）混合的 Luria 肉汤（LB）培养基用作大肠杆菌菌株的标准培养基。混合 4mM $MgSO_4$ 和 10mMKCl 的 LB 培养基（Psi 肉汤），用作化学转化大肠杆菌的回收培养基。电穿孔的谷氨酸棒杆菌菌株的回收培养基为 LB HIS（含有脑心浸液的 Luria 肉汤）和山梨醇（Liebl 等人（1989）FEMS Microbiol Lett, 65, 299-304）。质粒 pCGL0040（GenBank 登录号 U53587）用作转座子 Tn5531（IS1207Km^r）的供体，并在大肠杆菌 ET12567 中扩增。

[0305] 1.2 重组 DNA 技术

[0306] 在化学感受态大肠杆菌 DH5 α 或 ET12567 中用质粒 DNA 转化大肠杆菌细胞。根据氯化铷法产生 [<http://micro.nwsc.noaa.gov/protocols/>] 这些细胞，并如 Sambrook 等人（同上）所述进行转化。如文献描述进行感受态谷氨酸棒杆菌细胞的产生和电转化（Ankri（1996），Plasmid, 35, 62-66；Liebl 等人，同上）。

[0307] 利用 **Wizard**[®] 基因组 DNA 纯化试剂盒（Promega 公司）分离基因组 DNA。利用 QIAprep Miniprep Kit（Qiagen 公司）从大肠杆菌细胞中常规制备质粒。限制性内切酶购自 Roche Diagnostics。通过 QIAEX II 凝胶提取试剂盒（Qiagen）从琼脂糖凝胶上回收消化的 DNA 片段。如文献中描述（Sambrook 等人，同上）实施标准 DNA 技术。利用 Global Edition IR2 系统（LI-COR Inc., Lincoln, Nebr.）进行 DNA 测序。

[0308] ERGO 数据库（Integrated Genomics, Chicago, USA）用作鉴定 ORF 和启动子的基因组数据库。文中给出的 NCg1 号码是指来自 NCBI GenBank 中的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的基因组序列（GenBank 登录号，NC003450）。经 PCR 扩增 ERGO 数据库中的半胱氨酸合酶（NCg12473，启动子位置 2721625-2721822）、亚硫酸盐还原酶（NCg12718，启动子位置 3005188-3005389）和 O-乙酰同型丝氨酸硫化氢解酶（metY，NCg10625，启动子位置 667771-668107）的启动子，并通过 XhoI 和 BamHI 接头融合到 pClik（Cm^r）质粒中不含启动子的 lacZ 上，该质粒已由相同限制性酶切割。得到的质粒称为 pClik-H185、pClik-H187 和 pClik-H217（见表 1）。所述质粒中一个独立 BglIII 限制性位点用于引入已经 PCR 扩增的 NCg12640，其中使用的引物对为 2640-fwd-BglIII（5' -CCGCTGCTGCTGGTGGCGCTAGATCTGCTAACGGC-3'）和 2640-rev-BglIII（5' -ATGTGTTGGGAGATCTCTTAAGTTATTTAGTCCAG-3'）。扩增的 DNA 片段包含位于 NCg12640 基因上游多至 370 个碱基对处的推测调节元件。

[0309] 1.3 转座和插入位点的转位和诱变、筛选和定位

[0310] 从大肠杆菌 ET12567 中分离得到质粒 pCGL0040。随后，通过电穿孔用该质粒转化谷氨酸棒杆菌 ATCC14752。在含 20 μ g/ml 卡那霉素的 LBHIS 上铺板筛选转座插入突变株。汇集所有得到的突变株，用无菌 0.9% NaCl 洗涤两次，从均一集合中选取 10⁶ 稀释的 100 μ l 等份，铺在含有卡那霉素（20 μ g/ml）和乙硫氨酸（7.5g/l）的 CGXII 培养基上。选出生长最快的克隆进一步分析。

[0311] 为定位转座子插入位点，从突变株中分离基因组 DNA。然后将转座子染色体接头位点克隆入 pUC18 中并随后用寡核苷酸 Tn5531-Eco（5' -CGGGTCTACACCGCTAGCCCAGG-3'）（Simic 等人（2001）J. Bacteriol. 183, 5317-5324）进行测序，确定插入位点。然后通过 BLASTn 程序比对 NCBI GenBank 序列和 ERGO 数据库分析由此得到的序列。使用多种序列分析工具（<http://www.expasy.org/>，<http://npsa-pbil.ibcp.fr> 或 <http://pfam.wustl>。

edu/(protein family database PFAM)) 进行 NCg12640 序列的模式和属性搜索。

[0312] 1.4 谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中 NCg12640 的染色体缺失

[0313] 通过两对引物

[0314] 2640-SacB1 (5' -GAGAGGGCCCATCAGCAGAACCTGGAACC-3')/

[0315] 2640-SacB2 (5' -GATCCAGAGGTCCACAACC-3') 和

[0316] 2640-SacB3 (5' -GATGGTTCAAGACGAACTCC-3')/

[0317] 2640-SacB4 (5' -GAGAGTCGACCAGAATCAATTCCAGCCTTC-3'),

[0318] 从谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的染色体 DNA 上,通过 PCR 扩增 NCg12640 上游和下游区域。用 ApaI/XbaI 或 SpeI/SaII 消化所得的片段,并连接克隆入用 ApaI/SaII 消化的非复制性载体 pClik-SacB 中,从而得到 pSde1-NCg12640 质粒。然后,通过电穿孔用非复制性质粒 pSde1-NCg12640 转化谷氨酸棒杆菌 ATCC13032。卡那霉素抗性克隆含有整合到染色体中的质粒。随后,根据 **Schäfer** 等人的方法 (**Schäfer** 等人 (1994) Gene 145 :69-73) 筛查具有蔗糖抗性的突变株,进行质粒丢失选择。然后通过 PCR 分析和 Southern 印迹法证实缺失。

[0319] 1.5 LacZ 活性测量

[0320] 用 pClik 质粒 H185、H187 和 H217 或其衍生物互补选择的谷氨酸棒杆菌突变株,这些质粒已经与 NCg12640 互补 (见表 1)。在 CGXII 基本培养基上培养转化株,其中含有卡那霉素 (20 μ g/ml) 和氯霉素 (15 μ g/ml),含有或不含 10mM L- 甲硫氨酸。培养细胞直至对数期早期 ($OD_{600} = 1-2$),并如 Sambrook 等人所述 (Sambrook 等人,同上) 检查 β -gal 的活性。这些反应在四个独立测试系列中各进行三次。

[0321] 1.6 分离 DNA 结合蛋白

[0322] 用磁珠进行 DNA 亲和层析来分离 DNA 结合蛋白的原理已经为 Gabrielsen 等人充分描述 (Gabrielsen 等人 (1993), Methods Enzymol., 218, 508-225), 并且可获得针对谷氨酸棒杆菌的详细方法,参见 Rey 等人 (同上)。除了少许例外,本发明采用后者的方法。除洗脱缓冲液外,所有缓冲液均混合 2.5mM L- 甲硫氨酸。破坏细胞后,即刻用蛋白酶抑制剂 (PMSF、抑肽酶、亮抑酶肽 (Rosenberg 等人 (1996) Protein Analysis and Purification • Benchtop Techniques, Boston, **Birkhäuser**) 保护粗提物不发生蛋白质水解。超速离心粗提物后 (200,000g, 40 分钟, 40 $^{\circ}$ C), 通过凝胶过滤 (Sephadex G25) 使蛋白质溶液脱盐。将生物素化的 PCR 扩增启动子 DNA 固化于链霉亲和素包被的 **Dynabeads**[®] M270 (DynaL Biotech.) 上。扩增谷氨酸棒杆菌 groES 基因上游 460bp 的片段作为阴性对照片段。洗涤缓冲液含有大量的非特异性竞争 DNA (鲑鱼精 DNA, 0.4mg/ml, Sigma)。在 4% 积层凝胶和 12% 电泳胶上进行 I D-SDS-PAGE (**Schägger** 等 (1987) Anal. Biochem. 166, 368-379), 并用胶质考马斯亮蓝 G-250 对这些蛋白质进行染色。胰蛋白酶消化和 MALDI-TOF 分析与 Hermann 等人 (2001) Electrophoresis, 22, 1712-1723 中描述的方法基本一致。

[0323] 1.7 胞外和胞内甲硫氨酸浓度的确定

[0324] 以其邻苯二甲醛 (o-phthalaldehyde) 衍生物的形式,通过 HPLC 定量甲硫氨酸 (Molnar-Perl 等人 (2001), J. Chromatogr. 913, 283-302)。于 30 $^{\circ}$ C 和 225rpm 在培养量为 50-100ml 的 500ml 摇瓶中培养谷氨酸棒杆菌直至静止期。离心 (10,000g, 10 分钟,

4°C) 除去细胞并通过 HPLC 测定甲硫氨酸的浓度。从液体中分离细胞,并用硅油离心法活化 (Ebbighausen 等人 (1989) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 184-190), 来测定胞内的甲硫氨酸浓度。然后用超声处理或蓝盖 ribolyser (**FastPrep®**, Q-Biogene) 方法裂解细胞。根据 Bradford 测定测定上清液中的可溶蛋白质。因此,经验性确定谷氨酸棒杆菌胞内可溶蛋白质的含量为 250mg/ml。基于该数值,计算出样品的总胞内含量,以确定 HPLC 分析后的甲硫氨酸浓度。

[0325] 2. 结果

[0326] 2.1 乙硫氨酸抗性转座突变株的选择和鉴定

[0327] 在本发明的范围内,有假说认为通过甲硫氨酸的过量产生会得到乙硫氨酸抗性,前者则可通过失活推测的抑制物而实现,所述抑制物参与谷氨酸棒杆菌中甲硫氨酸生物合成的调节。这项假说基于以下事实,乙硫氨酸为不能被代谢的甲硫氨酸结构类似物,从而造成高浓度甲硫氨酸的假象。结果甲硫氨酸的生物合成往往被下调,而该生物最终死于甲硫氨酸的缺乏。

[0328] 生物体克服这种由抗代谢物导致的毒性的方法之一,是通过过量产生天然代谢物(此处为甲硫氨酸)竞争排除毒性剂。用这种方法,20 世纪 70 年代就已经生产出甲硫氨酸抗性菌株 (Kase 等人,同上)。然而,当时未能获得能显著过量生产甲硫氨酸的菌株,可能是因为当时进行的选择性实验中,没有鉴定到能作为核心调节物来失活甲硫氨酸生物合成的突变株。这是现在尝试用转座子介导诱变的方式来引入突变的原因之一。

[0329] 将 pCGL0040 作为转座子 Tn5531 的供体,转化谷氨酸棒杆菌 ATCC14752。由此在含卡那霉素的 LB HIS 平板上获得了约 7,000 个突变株。如现有技术所述汇集所述突变株,并铺于含有 7.5g D, L- 乙硫氨酸 /1 和卡那霉素的 CGXII 培养基平板上。铺上约 100,000 菌落形成单位 (CFU),以确保所有可能的乙硫氨酸抗性突变株都能被回收。含 6g/l 乙硫氨酸时,野生型的生长至少被抑制 4 天。2 天后可分离到 11 个卡那霉素和乙硫氨酸抗性突变株。所有突变株在 ORL NCg12640 中含有相同的 Tn5531 插入。所述突变称为 14752-Δ 2640,并选择一个克隆用于后续的实验(表 1)。

[0330] 2.2 转座子插入位点的序列分析

[0331] 在菌株 14752::2640 中,可以观察到转座子插入位点位于 2918026/2918027 位置上推测蛋白质的 C 末端一侧 (GenBank 登录号 NC003450)。NCg12640 距离 NCg12639 有 7 对碱基,因此两个基因可能由同一个操纵子控制。NCg12639 在数据库 (GenBank) 中被注释为推测的水解酶或乙酰基转移酶 (见图 2)。NCg12640 编码 42kDa 的蛋白质。通过同源性,可以鉴定到 25 个以上具有显著同源性 (e -值 $<2e-20$) 的推测细菌蛋白质,至今其中没有一个已经用功能方式进行过注释。搜索保守结构域,可以鉴定到具有高相关性的功能未知的蛋白质共有模式 (COG217),正如谷氨酸半胱氨酸连接酶家族特有的蛋白质家族数据库 (PFAM) 中的 04107 基序那样。未鉴定到其它共有基序。尤其是未鉴定到 DNA 结合蛋白质。

[0332] 2.3 甲硫氨酸抗性表型的确认

[0333] 然后在 CGXII 培养基中培养谷氨酸棒杆菌 ATCC14752 及突变菌株,其中含有 3g/l 葡萄糖,含有或不含 7.5g/l (突变株) 或 3.8g/l (野生型) D, L- 乙硫氨酸。当含有乙硫氨酸时,突变株的生长与在不含乙硫氨酸中的生长或不含乙硫氨酸的野生型生长未见区别。但是,当含有非常低的亚致死量浓度的乙硫氨酸时,野生型的生长显著受抑 (见图 3)。

[0334] 为排除其它位点的突变可能造成乙硫氨酸抗性的表型,测试在谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中失活 NCg12640 的效果。通过同源重组和蔗糖抗性突变株的选择,从谷氨酸棒杆菌基因组上除去 NCg12640。上述突变株称为 13032::2640,对 7.5g/l 的 D, L- 乙硫氨酸具有抗性,而野生型 ATCC13032 在这些平板上却不能生长。

[0335] 因此,在本发明的范围内,可以证明乙硫氨酸抗性的表型确实只是由于 NCg12640 的失活造成的。

[0336] 2. 4NCg12640 突变株中甲硫氨酸生物合成基因表达的变化

[0337] 然后检查 NCg12640 突变株中通常严格调控的硫同化作用(甲硫氨酸生物合成的核心步骤)是否发生了变化。

[0338] 假说认为,如果 NCg12640 是谷氨酸棒杆菌中含硫化合物生物合成的核心调控物,它会调节硫同化作用所涉及的基因的表达,且会发生甲硫氨酸含量升高的表达,从而具备抗乙硫氨酸的能力。通过 NCg12640 敲除后对 metY、cysK 和硫酸盐操纵子基因表达水平的影响,可检查上述假说。为此,将 lacZ 报告质粒 pClik-PcysK、pClik-PmetY 和 pClik-Psulfat(也见表 1)转化入 NCg12640 缺失的 14752::2640 菌株及野生型中。然后在含有或不含 10mM L- 甲硫氨酸的 CGXII 培养基中培养 ATCC14752 野生型和突变株直至对数期 ($OD_{600} = 3$),并通过 lacZ 活性确定基因的表达。

[0339] 甲硫氨酸的存在会降低野生型中所有检查基因的表达水平。硫酸盐操纵子的表达被完全抑制。在突变株中,可以观察到对 cysK 和硫酸盐操纵子的显著去抑制。两个基因中甲硫氨酸的表达是独立的,提示突变株背景中甲硫氨酸和其它含硫化合物的生物合成途径完全去抑制,即完全下调作用(也见图 4)。为排除 NCg12640 失活对邻近的 NCg12639(水解酶或乙酰基转移酶,见图 2)的极性作用,在突变株中通过其启动子表达 NCg12640,可以重新建立野生型的表型,即观察到甲硫氨酸诱导的本底转录水平的抑制和降低(cysK)或升高(硫酸盐操纵子)(也见图 4)。所述表型在互补突变株中比野生型中甚至更为发达。原因可能是互补突变株中由中等拷贝数质粒导致的 NCg12640 的表达提高。

[0340] 2. 5NCg12640 不与 cysK, metY 和硫酸盐操纵子的启动子相结合

[0341] 因此,在本发明的范围内显示 cysK、硫酸盐操纵子以及 metY 的表达受 NCg12640 的核心调控。由于在 NCg12640 序列中没有鉴定到典型的 DNA 结合基序,使用所谓沉降测定(pull down assay)的 DNA 亲和纯化检测 NCg12640 是否能结合前述基因的各启动子区域。当存在 2.5mM L- 甲硫氨酸时,将 PCR 扩增后固化在珠子上的启动子,与已经在含有或不含 10mM L- 甲硫氨酸中培养的谷氨酸棒杆菌细胞粗提物进行孵育。用 1D-SDS-PAGE 分离高盐浓度(>200mM)时从启动子上洗脱下来的蛋白质,并用 MALDI-TOF 分析之。

[0342] 通过类似方法,Rey 等人(同上)已经鉴定了似乎能特异结合 metY 启动子的 McbR 抑制子以及其它四种蛋白质。这些结果在本发明的范围内可以得到证实。此外,McbR 也可以结合 cysK 的启动子和硫酸盐操纵子(见图 5)。但是两个研究中都不能检测到 NCg12640,说明在 NCg12640 介导的调控中没有直接的 DNA/ 蛋白质相互作用。

[0343] 2. 6NCg12640 突变株中增加的 L- 甲硫氨酸含量

[0344] 因此,谷氨酸棒杆菌 14752::2640 对大量乙硫氨酸的抗性,似乎是 L- 甲硫氨酸生物合成增加的结果。为证实上述假说,在 CGXII 基本培养基分批培养中检查野生型和突变株中 L- 甲硫氨酸的产生。

[0345] 结果显示突变株通常能产生至少相当于野生型两倍的甲硫氨酸。乙硫氨酸的存在能刺激突变株分泌甲硫氨酸,但不能刺激野生型(见图 6A)。突变株中,尽管乙硫氨酸降低了胞内甲硫氨酸的含量,胞内甲硫氨酸的量同样倍增,可能由于刺激了甲硫氨酸的分泌(见图 6)。突变株中甲硫氨酸的总量是野生型中的两倍之高。

[0346] 上述实验说明,缺失 NCg12640 编码序列、从而相对野生型降低所述核酸编码的蛋白质的含量和 / 或活性的微生物,产生甲硫氨酸的量增加。

[0347] 由于硫代谢基因被 NCg12640(可能为反式作用调节子)所调控,本发明的微生物也能够用于生产其它含硫化合物。这是基于以下事实,例如,微生物也必须依靠导致硫减少的代谢途径,以产生半胱氨酸和其它含硫化合物如谷胱甘肽或 S-腺苷甲硫氨酸(根据半胱氨酸和 / 或甲硫氨酸存在与否)。

[0348] 序列数据

[0349] SEQ ID NO :1 (GenBank 登录号 NCg12640) :

[0350] ATGGGCATTGAGTTTAAAGCGTTCACCGCGACCCACCCTGGGCGT
[0351] TGAGTGGGAAATTGCACTTGTGATCCAGAAACACGTGATCTAG
[0352] CCCC GCGCTGCAGAAATACTAGAGATTGTGGCCAAGAACCAC
[0353] CCTGAGGTGCACCTCGAGCGGAATTCCTCCAAAAACCGTGGA
[0354] GCTTGTCACCGGAGTGTGCGACACCGTCCCCGAAGCGGTGGCA
[0355] GAGCTTTCCACGATCTAGATGCGCTGAAAGAAGCAGCGGATTC
[0356] TCTCGGGCTTCGGTTGTGGACCTCTGGATCCCACCCATTTTCGG
[0357] ATTTCCGCGAAAAACCCAGTATCTGAAAAAGGCTCCTACGACGAG
[0358] ATCATCGCGCGCACCCAATACTGGGGAAAACAGATGTTGATTTG
[0359] GGGCATTACGTCCACGTGGGCATCAGCCATGAAGATCGCGTGT
[0360] GGCCGATCATCAATGCGCTGCTGACAAATTACCCACATCTGTTGG
[0361] CACTTTCTGCAAGCTCTCCAGCATGGGACGGACTTGATAACCGGT
[0362] TATGCCTCCAACCGGACGATGCTCTACCAACAGCTGCCTACAGC
[0363] CGGACTGCCATACCAATTCCAAAGCTGGGATGAATGGTGCAGCT
[0364] ACATGGCGGATCAAGATAAATCCGGTGTCAATCAACCACACCGGAT
[0365] CCATGCACTTTGATATCCGCCCCGATCCAAATGGGGAACCATCG
[0366] AAGTCCGCGTGGCCGATTCTACCTCCAACCTGCGGGAACGTCT
[0367] GCCATCGTGGCGTTGACCCACTGTCTCGTGGTGCCTACGACCG
[0368] CATGATCGACGCTGGCGAAGAGCTTCCCTCCCTGCAACAATGGC
[0369] ACGTTTCGGAAAATAAATGGCGCGCGGCTAGGTATGGTCTGGAT
[0370] GCCGAAATCATCATTTCCAGAGACACCGATGAAGCGATGGTTCA
[0371] AGACGAACTCCGCCGACTAGTAGCGCAATTGATGCCTCTAGCCA
[0372] ACGAACTCGGCTGCGCTCGTGAGCTTGAACCTGTGTTGGAAATC
[0373] CTGGAACGTGGTGGTGGATACGAACGCCAACGCAGAGTGTTTAA
[0374] AGAAACTGGCAGTTGGAAAAGCTGCAGTTGATTTAGCCTGCGACG
[0375] AACTCAACGACCTCAAAGCACTGGACTAA

[0376] SEQ ID NO :2 (GenBank 登录号 NP_601931) :

[0377] MGIEFKRSPRPTLGVWEI IALVDPETRD LAPRAAE ILE I VAKNHPEV
 [0378] HLEREFLQNTVELVTGVC DTVPEAVAELSHDL DALKEAADSLGLRL
 [0379] WTSGSHPFSDFRE NPVSEKGSYDEI IARTQYWGNQMLIWG IHVHVG
 [0380] ISHEDRVWPI I NALLTNYPHLLALSASSPAWDGLDTGYASNRTMLYQ
 [0381] QLPTAGLPYQFQSWDEWCSY MADQDKSGVINHTGSMHFD IRPASK
 [0382] WGTIEVRVADSTSNLRELSAIVAL THCLV VHYDRMIDAGEELPSLQQ
 [0383] WHVSENKWRAARYGLDAEII I SRDTDEAMVQDELRRLLVAQLMPLA
 [0384] NELGCARELELVLEIL ERGGGYERQRRVFKETGSWKAAVDLACDE
 [0385] LNDLKALD
 [0386] SEQ ID NO :3 (McbR) :
 [0387] GTGGCTGCTAGCGCTTCAGGCAAGAGTAAAAACAAGTGCCGGGG
 [0388] CAAACCGTCGTCGCAATCGACCAAGCCCCGACAGCGTCTCCTC
 [0389] GATAGCGCAACCAACCTTTTTCACCACAGAAGGTATTCGCGTCATC
 [0390] GGTATTGATCGTATCCTCCGTGAAGCTGACGTGGCGAAGGCGAG
 [0391] CCTCTATTCCTTTTTCGGATCGAAGGACGCCTTGGTTATTGCATA
 [0392] CCTGGAGAACCTCGATCAGCTGTGGCGTGAAGCGTGGCGTGAG
 [0393] CGCACCGTCGGTATGAAGGATCCGGAAGATAAAAATCATCGCGTT
 [0394] CTTTGATCAGTGCATTGAGGAAGAACCAGAAAAAGATTTCCGCG
 [0395] GCTCGCACTTTCAGAATGCGGCTAGTGAGTACCCTCGCCCCGAA
 [0396] ACTGATAGCGAAAAGGGCATTGTTGCAGCAGTGTAGAGCACCG
 [0397] CGAGTGGTGT CATAAGACTCTGACTGATTTGCTCACTGAGAAGA
 [0398] ACGGCTACCCAGGCACCACCCAGGCGAATCAGCTGTTGGTGTTC
 [0399] CTTGATGGTGGACTTGCTGGATCTCGATTGGTCCACAACATCAGT
 [0400] CCTCTTGAGACGGCTCGCGATTTGGCTCGGCAGTTGTTGTCGGC
 [0401] TCCACCTGCGGACTACTCAATTTAG
 [0402] SEQ ID NO :4 (GenBank 登录号 NP_602128) :
 [0403] MAASASGKSKTSAGANRRRNRP SPRQRLLDSATNLF TTEGIRVIGID
 [0404] RILREADVAKASLYSLFGSKDALVIAYLENLDQLWREAWRERTVGM
 [0405] KDPEDKIIA FFDDQCI EEEPEKDFRGS HFQNAASEYPRPETDSEKGIVA
 [0406] AVLEHREWCHKLTDLLTEKNGYPGTTQANQLLVFLDGGLAGSRL
 [0407] VHNISPLETARDLARQLLSAPPADYSI

附图说明

[0408] 图 1 在甲硫氨酸生物合成中掺入硫的不同方式。

[0409] 硫原子可通过由 MetY (A) 催化的直接硫化氢解 (sulfhydrolation), 或通过反硫化氢解 (trans-sulfhydrolation) 途径 (B) 掺入。制备 lacZ 融合蛋白作为标记基因产物的启动子。NCg12718 的启动子调控组装在硫酸盐基因簇中的基因的表达 (NCg12715-NCg12720)。

[0410] 使用下列缩写 :Ask, 天冬氨酸激酶 ;AsDH, 天冬氨酸半醛脱氢酶 ;Hom, 同型丝氨酸

脱氢酶 ;MetA,同型丝氨酸酰基转移酶 ;MetB,胱硫醚- γ -合酶 ;MetC,胱硫醚- γ -裂合酶 ;MetH,甲硫氨酸合酶 ;MetY, O-乙酰同型丝氨酸硫化氢解酶 ;MetK, S-腺苷甲硫氨酸合酶 ;NCg12715,硫酸腺苷酰基转移酶亚基 1 ;NCg12716,硫酸腺苷酰基转移酶亚基 2 ;NCg12717, PAPS 还原酶 ;NCg12718,亚硫酸盐还原酶,注释为推测的亚硝酸盐还原酶 ;CysK,半胱氨酸合酶。

[0411] 图 2NCg12640 的基因组环境。

[0412] 下列开放读码框 (ORF) 的 GenBank 注释为 :

[0413] NCg12638,多成分 Na^+/H^+ 反向转运通道的类似物 ;

[0414] NCg12639,类似于推测的水解酶或乙酰基转移酶, α -/ β -水解酶超家族 ;

[0415] NCg12640,假定蛋白质 (未表征的 BCR) ;

[0416] NCg12641,假定蛋白质,无注释 ;

[0417] Tn5531,转座子 5531 (IS1207)。实心三角形表示 Tn5531 在 NCg12640 中的插入位点。

[0418] 图 3 在含有或不含乙硫氨酸的 CGXII 培养基中培养的谷氨酸棒杆菌野生型和突变株的生长曲线。

[0419] 葡萄糖浓度为 3g/l ;野生型或突变株的 D, L-乙硫氨酸浓度为 3.5g/l 或 7.5g/l。可观察到野生型不能在 7.5g/lD, L-乙硫氨酸存在时生长。

[0420] 实心符号 :培养期间含有乙硫氨酸 ;

[0421] 空心符号 :不含乙硫氨酸的培养 ;

[0422] ▲野生型 ;

[0423] ●突变株。

[0424] 图 4 敲除 NCg12640 对 *cysK*、*metY* 和硫酸盐操纵子的甲硫氨酸依赖性表达的影响。

[0425] 在含或不含甲硫氨酸 (10mM) 的 CGXII (3g/l 葡萄糖) 培养基中,培养谷氨酸棒杆菌 ATCC14752 (野生型)、突变株 14752::2640 和用质粒携带的 NCg12640 (::2640-*cpl*) 互补并含有报告质粒 pClik-P*cysK*、pClik-P*metY* 或 pClik-P*sulfat* 的突变株。通过 LacZ 活性报告测定来确定启动子活性,并用 Miller 单位定量。

[0426] 深色柱 :生长培养基中不含甲硫氨酸 ;

[0427] 空白柱 :生长培养基中含有 L-甲硫氨酸。

[0428] 图 5 与谷氨酸棒杆菌的半胱氨酸合酶 (*cysK*)、O-乙酰同型丝氨酸硫化氢解酶 (*metY*) 和推断的硫酸盐操纵子基因的推断启动子区域结合的蛋白质的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

[0429] 1,调节物 McbR,与 TetR 类似,见于 Rey 等人 (同上) ;

[0430] 2,胞外聚磷酸酶 (exopoly phosphatase) (降解产物) ;

[0431] 3,胞外聚磷酸酶 ;

[0432] 4,ATP 磷酸核糖基转移酶 ;

[0433] 5,DNA 聚合酶 I。

[0434] 除了胞外聚磷酸酶和 DNA 聚合酶 I,无鉴定蛋白质与 groES 对照启动子片段结合。

[0435] GAP-DH,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,被用作标记蛋白质 (37kDa) ;

[0436] M,蛋白质标记。

[0437] 图 6 当含有或不含乙硫氨酸时,在谷氨酸棒杆菌野生型和 NCg12640 敲除突变株 (::2640) 中,胞外 (A) 和胞内 (B) L- 甲硫氨酸的量。

[0438] 深色柱: 孵育期间不含乙硫氨酸;

[0439] 空白柱: 3.5g/l (野生型) 或 7.5g/l (::2640) D, L- 乙硫氨酸。

[0440] 表 1 前述菌株和质粒概述

[0441]

菌株或质粒	表型	来源或文献
谷氨酸棒杆菌菌株		
ATCC 13032	野生型	ATCC
ATCC 14752	野生型	(Simic 等人, 2001)
13032::2640	野生型, 带有 <i>NCg12640</i> , Km^r	根据本发明
14752::2640	野生型, 带有 <i>NCg12640</i> , Km^r	根据本发明
14752- <i>PcysK</i>	ATCC 14752, 带有报告质粒 <i>pClik-PcysK</i> , Cm^r	根据本发明
CG::2640- <i>PcysK</i>	14752::2640, 带有报告质粒 <i>pClik-PcysK</i> , $Km^r Cm^r$	根据本发明
CG::2640- <i>PcysK-cpl</i>	14752::2640 带有报告质粒 <i>pClik-PcysK-cpl</i> , $Km^r Cm^r$	根据本发明

[0442]

14752-PmetY	ATCC 14752 带有报告质粒 pClik-PmetY, Cm ^r	根据本发明
CG::2640-PmetY	14752::2640 带有报告质粒 pClik-PmetY, Km ^r Cm ^r	根据本发明
CG::2640-PmetY-cpl	14752::2640 带有报告质粒 pClik-PmetY-cpl, Km ^r Cm ^r	根据本发明
14752-Psulfate	ATCC 14752 带有报告质粒 pClik-Psulfate, Cm ^r	根据本发明
CG::2640-Psulfate	14752::2640 带有报告质粒 pClik-Psulfate, Km ^r Cm ^r	根据本发明
CG::2640-Psulfate-cpl	14752::2640 带有报告质粒 pClik-Psulfate-cpl, Km ^r Cm ^r	根据本发明
大肠杆菌菌株		
DH5α	F ⁻ <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ mk ⁺) <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> λ <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> Φ80Δ <i>lacAm15</i>	(Hanahan, 1983)
ET12567	<i>dam dcm hsd</i> , 限制性缺陷	(MacNei 等人, 1992)
质粒		
pUC18	Ap ^r , <i>lacZ</i>	Stratagene
pCGL0040	Tn5531 供体 (IS1207 Km ^r); Ap ^r , <i>oriV_{E.C.}</i>	(Ankri 等人, 1996b)
pMT1	大肠杆菌 - 谷氨酸棒杆菌穿 梭质粒, Ap ^r Km ^r	(Folletti 等人, 1993; Lee 和 Sinskey, 1994)
öpClik-SacB	通过同源重组进行等位基因 替换的载体, 在谷氨酸棒杆 菌中为非复制性, Km ^r , SacB	(Hwang 等人, 1999)
pSdel-NCgl2640	基于 pClikSacB 的等位基因	根据本发明

[0443]

	替换载体, 用于 NCgl2640 的染色体缺失	
pClik-PcysK	<i>cysK</i> , 启动子探针载体, 融合 <i>lacZ</i> , Cm^r	根据本发明
pClik-PcysK-cpl	pClik-PcysK 带有 NCgl2640, Cm^r	根据本发明
pClik-PmetY	<i>metY</i> , 启动子探针载体, 融合 <i>lacZ</i> , Cm^r	根据本发明
pClik-PmetY-cpl	pClik-PmetY 带有 NCgl2640, Cm^r	根据本发明
pClik-Psulfate	硫酸盐操纵子, 启动子探针载体, 融合 <i>lacZ</i> , Cm^r	根据本发明
pClik-Psulfate-cpl	pClik-Psulfate, 带有 NCgl2640, Cm^r	根据本发明

[0444] 表 1 中的引用文献

[0445] Ankri, S., Serebrijski, I., Reyes, O. 和 Leblon, G. (1996b) Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of thpA step. *J Bacteriol* 178, 4412-4419.

[0446] Follettie, M. T., Peoples, O. P., Agoropoulou, C. 和 Sinskey, A. J. (1993) Gene structure and expression of the *Corynebacterium flavum* N13ask-*asd* operon. *J Bacteriol* 175, 4096-4103.

[0447] Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

[0448] Hwang, B.-J., Kim, Y., Kim, H.-B., Hwang, H.-J., Kim, J.-H. 和 Lee, H. S. (1999) Analysis of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthetic pathway: isolation and analysis of *metB* encoding cystathionine γ -synthase. *Mol Cells* 9, 300-308.

[0449] Lee, H.-S. 和 Sinskey, A. J. (1994) Molecular characterization of *AceB*, a gene encoding malate synthase in *Corynebacterium glutamicum*. *J Microbiol Biotechnol* 4, 256-263.

[0450] MacNeil, D. J., Occi, J. L., Gewain, K. M., MacNeil, T., Gibbons, P. H., Ruby, C. L. 和 Danis, S. J. (1992) Complex organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase. *Gene* 115, 119-125.

[0451] Simic, P., Sahm, H. 和 Eggeling, L. (2001) L-threonine export: use of peptides

to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 183, 5317-5324.

[0001]

序列表

<110> 巴斯福股份公司
 <120> 生产含硫化合物的微生物
 <130> B 7673
 <140> DE 10 2004 035 052.3
 <141> 2004-07-20
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> 谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)
 <300>
 <308> GenBank/NCg12640
 <309> 2002-03-20
 <313> (1)..(1131)
 <400> 1
 atgggcattg agtttaagcg ttcaccgca cccaccctgg gcgttgagtg ggaaattgca 60
 ctigtgatc cagaaacacg tgatctagcc ccgcgctg cagaaatact agagattgtg 120
 gccaaagaacc accctgaggt gcacctcgag cgcgaattcc tccaaaacac cgtggagctt 180
 gtcaccggag tgtgacac cgtccccgaa gcggtggcag agctttcca cgatctagat 240
 gcgctgaaag aagcagcgga ttctctcggg cttcggttgt ggacctctgg atcccacca 300
 tttcggatt tccgcaaaa cccagtatct gaaaaggct cctacgacga gatcatcgcg 360
 cgcaccaat actggggaaa ccagatgttg atttggggca ttcacgtcca cgtgggcatc 420
 agccatgaag atcgcgtgtg gccgatc atcgcgtgc tgacaaatta cccacatctg 480
 ttggcacttt ctgcaagctc tccagcatgg gacggacttg ataccggtta tgcctccaac 540

[0002]

cggacgatgc tctaccaaca gctgcctaca gccggactgc cataccaatt ccaaagctgg 600
 gatgaatggt gcagctacat ggcggatcaa gataaatccg gtgtcatcaa ccacaccgga 660
 tccatgcact ttgatatccg ccccgcatcc aaatggggaa ccatcgaagt ccgctggcc 720
 gattctacct ccaacctgcg ggaactgtct gccatcgtgg cgttgacca ctgtctctgtg 780
 gtgcactacg accgcatgat cgacgctggc gaagagcttc cctccctgca acaatggcac 840
 gtttcggaaa ataaatggcg cgcggctagg tatggtctgg atgccgaaat catcatttcc 900
 agagacaccg atgaagcgat gttcaagac gaactccgcc gactagtagc gcaattgatg 960
 cctctagcca acgaactcgg ctgcgctcgt gagcttgaac ttgtgttga aatcctggaa 1020
 cgtggtggtg gatacgaacg ccaacgcaga gtgtttaaag aaactggcag ttgaaagct 1080
 gcagttgatt tagcctgcga cgaactcaac gacctcaaag cactggacta a 1131

<210> 2

<211> 376

<212> PRT

<213> 谷氨酸棒杆菌

<300>

<308> GenBank/NP_601931

<309> 2002-03-20

<313> (1).. (376)

<400> 2

Met Gly Ile Glu Phe Lys Arg Ser Pro Arg Pro Thr Leu Gly Val Glu
 1 5 10 15

Trp Glu Ile Ala Leu Val Asp Pro Glu Thr Arg Asp Leu Ala Pro Arg
 20 25 30

Ala Ala Glu Ile Leu Glu Ile Val Ala Lys Asn His Pro Glu Val His
 35 40 45

[0003]

Leu Glu Arg Glu Phe Leu Gln Asn Thr Val Glu Leu Val Thr Gly Val
 50 55 60

Cys Asp Thr Val Pro Glu Ala Val Ala Glu Leu Ser His Asp Leu Asp
 65 70 75 80

Ala Leu Lys Glu Ala Ala Asp Ser Leu Gly Leu Arg Leu Trp Thr Ser
 85 90 95

Gly Ser His Pro Phe Ser Asp Phe Arg Glu Asn Pro Val Ser Glu Lys
 100 105 110

Gly Ser Tyr Asp Glu Ile Ile Ala Arg Thr Gln Tyr Trp Gly Asn Gln
 115 120 125

Met Leu Ile Trp Gly Ile His Val His Val Gly Ile Ser His Glu Asp
 130 135 140

Arg Val Trp Pro Ile Ile Asn Ala Leu Leu Thr Asn Tyr Pro His Leu
 145 150 155 160

Leu Ala Leu Ser Ala Ser Ser Pro Ala Trp Asp Gly Leu Asp Thr Gly
 165 170 175

Tyr Ala Ser Asn Arg Thr Met Leu Tyr Gln Gln Leu Pro Thr Ala Gly
 180 185 190

Leu Pro Tyr Gln Phe Gln Ser Trp Asp Glu Trp Cys Ser Tyr Met Ala
 195 200 205

Asp Gln Asp Lys Ser Gly Val Ile Asn His Thr Gly Ser Met His Phe
 210 215 220

[0004]

<300>
 <308> GenBank/AY217661
 <309> 2003-07-30
 <313> (1)..(642)

<400> 3
 gtggctgcta gcgcttcagg caagagtaaa acaagtgccg gggcaaaccg tcgtcgcaat 60
 cgaccaagcc cccgacagcg tctcctcgat agcgcaacca accttttcac cacagaaggt 120
 attcgcgtca tcggatttga tcgtatcctc cgtgaagctg acgtggcgaa ggcgagcctc 180
 tattcccttt tcggatcgaa ggacgccttg gttattgcat acctggagaa cctcgatcag 240
 ctgtggcgtg aagcgtggcg tgagcgcacc gtcggtatga aggatccgga agataaaatc 300
 atcgcgttct ttgatcagtg cattgaggaa gaaccagaaa aagatttccg cggctcgcac 360
 tttcagaatg cggctagtga gtaccctcgc cccgaaactg atagcgaaaa ggcattgtt 420
 gcagcagtgt tagagcaccg cgagtgggtg cataagactc tgactgattt gctcactgag 480
 aagaacggct acccaggcac caccagcggc aatcagctgt tgggttctct tgatggtgga 540
 cttgctggat ctcgattggt ccacaacatc agtcctcttg agacggctcg cgatttggct 600
 cggcagttgt tgcggctcc acctgaggac tactcaattt ag 642

<210> 4
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 谷氨酸棒杆菌

<300>
 <308> GenBank/NP_602128
 <309> 2002-03-20
 <313> (1)..(213)

<400> 4

Met Ala Ala Ser Ala Ser Gly Lys Ser Lys Thr Ser Ala Gly Ala Asn
 1 5 10 15

[0006]

Arg Arg Arg Asn Arg Pro Ser Pro Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ser Ala
 20 25 30

Thr Asn Leu Phe Thr Thr Glu Gly Ile Arg Val Ile Gly Ile Asp Arg
 35 40 45

Ile Leu Arg Glu Ala Asp Val Ala Lys Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Phe
 50 55 60

Gly Ser Lys Asp Ala Leu Val Ile Ala Tyr Leu Glu Asn Leu Asp Gln
 65 70 75 80

Leu Trp Arg Glu Ala Trp Arg Glu Arg Thr Val Gly Met Lys Asp Pro
 85 90 95

Glu Asp Lys Ile Ile Ala Phe Phe Asp Gln Cys Ile Glu Glu Glu Pro
 100 105 110

Glu Lys Asp Phe Arg Gly Ser His Phe Gln Asn Ala Ala Ser Glu Tyr
 115 120 125

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

Glu His Arg Glu Trp Cys His Lys Thr Leu Thr Asp Leu Leu Thr Glu
 145 150 155 160

Lys Asn Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Gln Ala Asn Gln Leu Leu Val Phe
 165 170 175

Leu Asp Gly Gly Leu Ala Gly Ser Arg Leu Val His Asn Ile Ser Pro
 180 185 190

[0007]

Leu Glu Thr Ala Arg Asp Leu Ala Arg Gln Leu Leu Ser Ala Pro Pro
 195 200 205

Ala Asp Tyr Ser Ile
 210

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 2640-fwd-BglIII

<400> 5

ccgctgctgc tggtagcgct agatctgcta acggc

35

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物 2640-rev-BglIII

<400> 6

atgtgttggg agatctctta agttatttag tccag

35

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸 Tn5531-Eco

<400> 7

cgggtctaca ccgctagccc agg

23

<210> 8

[0008]

<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物 2640-SacB1	
<400> 8	
gagagggccc atcagcagaa cctggaacc	29
<210> 9	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物 2640-SacB2	
<400> 9	
gatccagagg tccacaacc	19
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物 2640-SacB3	
<400> 10	
gatggttcaa gacgaactcc	20
<210> 11	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物 2640-SacB4	
<400> 11	
gagagtcgac cagaatcaat tccagccttc	30

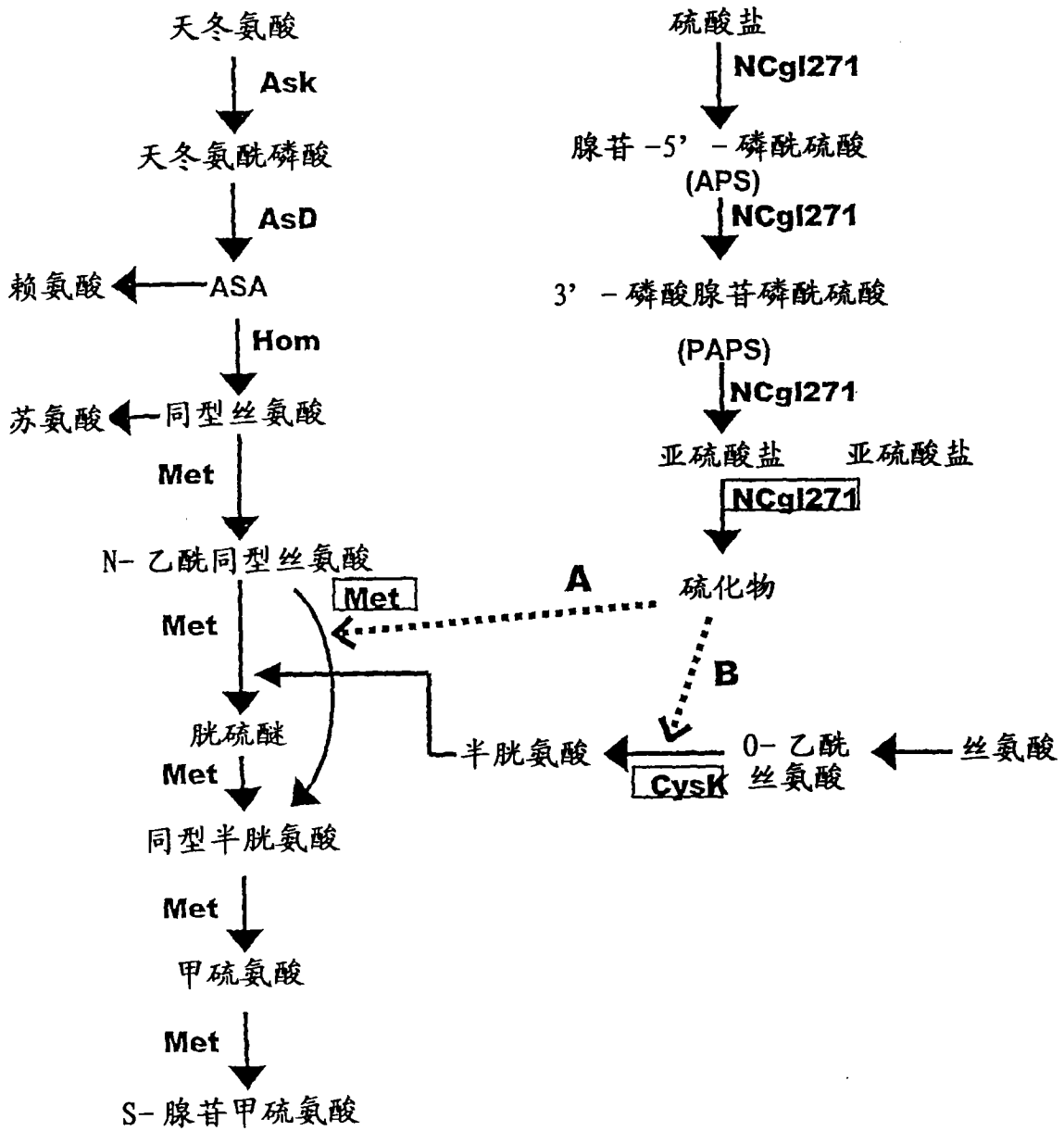


图 1

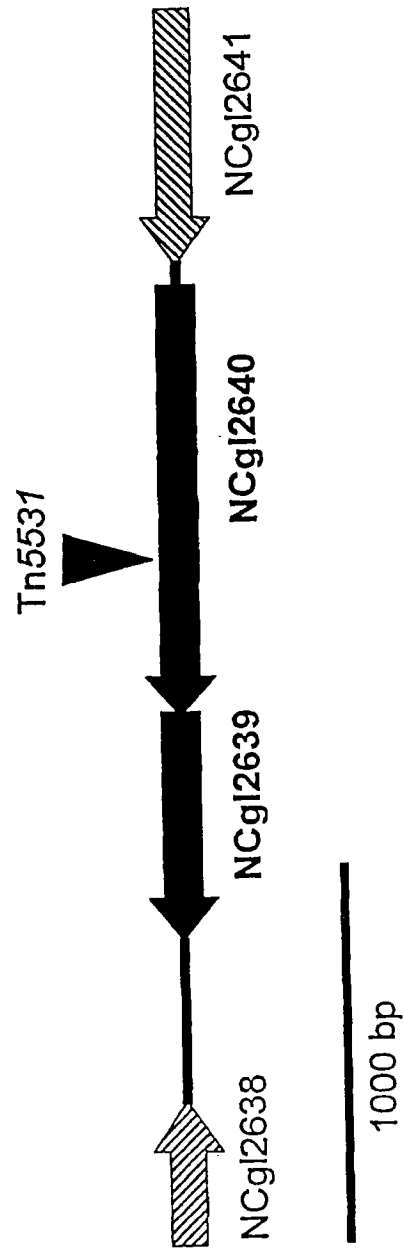


图 2

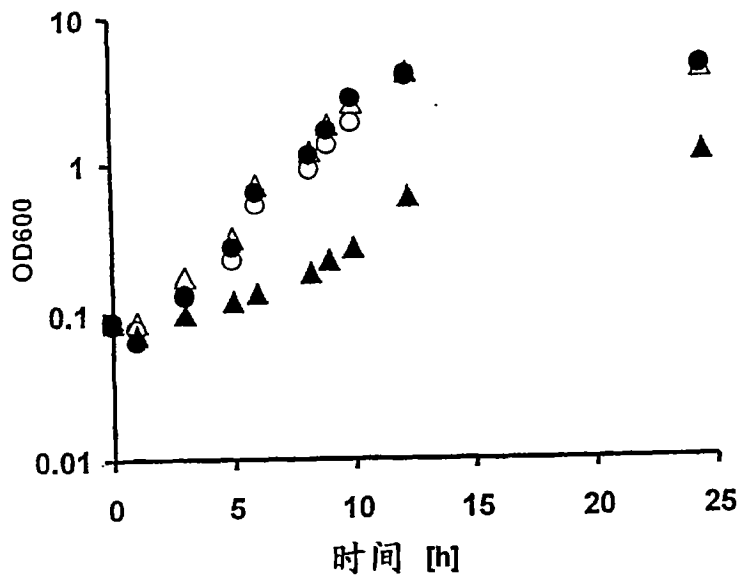


图 3

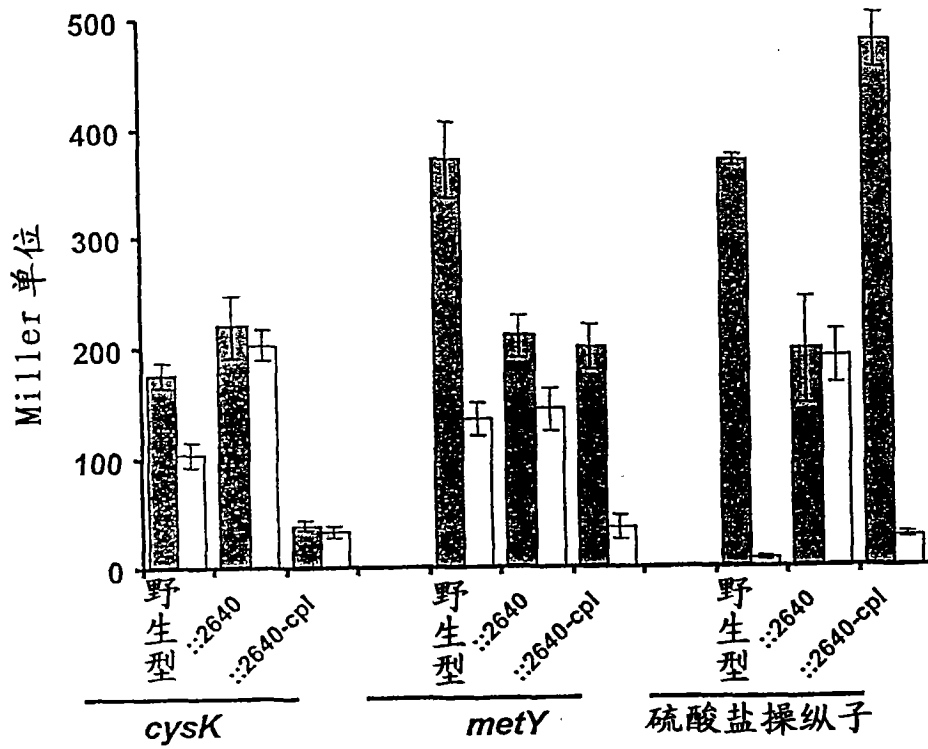


图 4

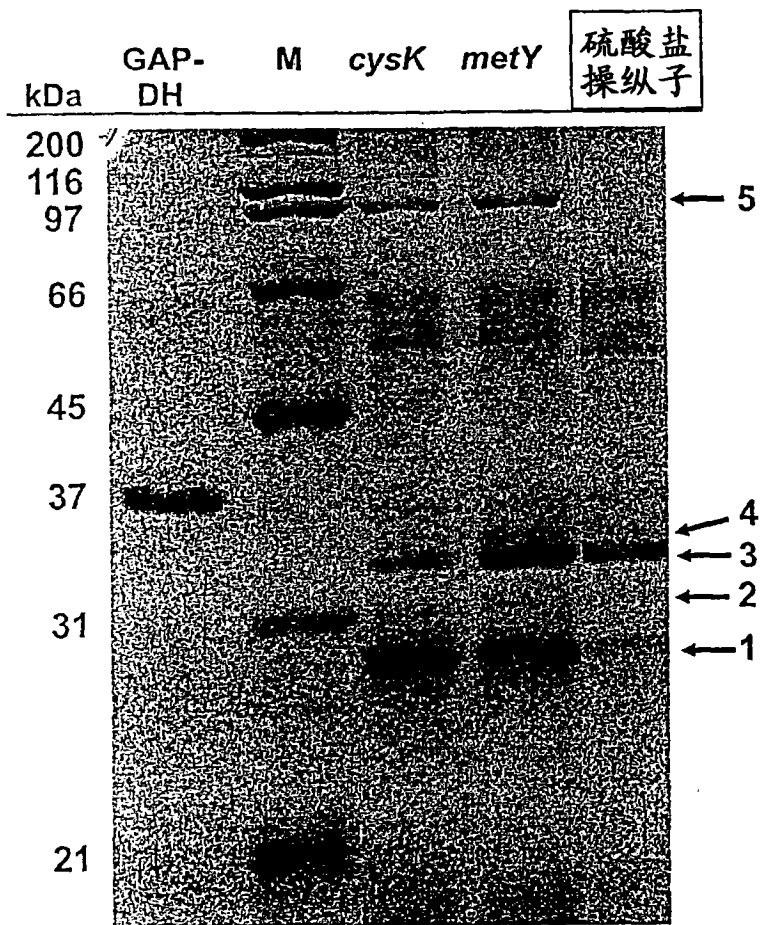


图 5

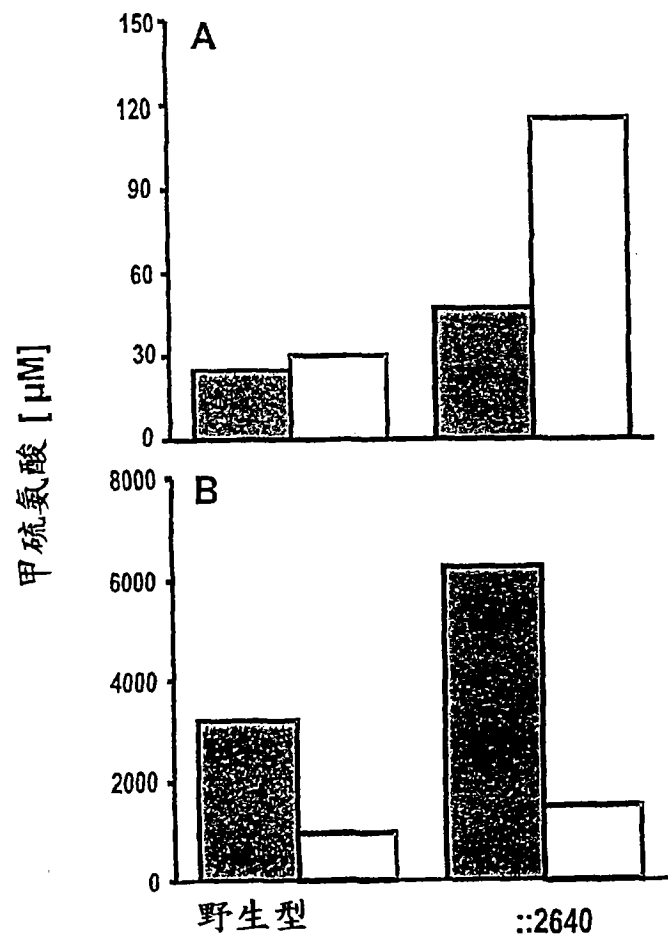


图 6