(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110506112 B
(45)授权公告日 2021.06.08

(21)申请号 201880015829.5
(22)申请日 2018.07.10
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110506112 A
(43)申请公布日 2019.11.26
(30)优先权数据
10-2017-0087978 2017.07.11 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2018/007821 2018.07.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/013532 KO 2019.01.17
(83)生物保藏信息
KCCM11809P 2016.01.25
KCCM11810P 2016.01.25
(73)专利权人 CJ第一制糖株式会社
地址 韩国首尔
(72)发明人 全爱智 宋秉哲 李智惠 金宗贤 金蕙园
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 颜芳
(51)Int.Cl.
C12N 9/10(2006.01)
C12N 15/77(2006.01)
C12P 13/04(2006.01)
审查员 赵楠

权利要求书1页 说明书18页
序列表28页

(54)发明名称

乙酰羟酸合酶变体、包含其的微生物和用其生产L-支链氨基酸的方法

(57)摘要

本公开涉及新的乙酰羟酸合酶、包含其的微生物或利用其生产L-支链氨基酸的方法。

CN 110506112 B

1.乙酰羟酸合酶变体,其特征在于,在由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的乙酰羟酸合酶大亚基中,第96位氨基酸苏氨酸被丝氨酸、半胱氨酸或丙氨酸取代。

2.根据权利要求1所述的乙酰羟酸合酶变体,其中SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第503位氨基酸色氨酸进一步被谷氨酰胺取代。

3.根据权利要求1所述的乙酰羟酸合酶变体,其中所述乙酰羟酸合酶变体由SEQ ID NOS:28至30中任一个的氨基酸序列组成。

4.多核苷酸,其编码根据权利要求1至3中任一项所述的乙酰羟酸合酶变体。

5.载体,其包含编码根据权利要求1至3中任一项所述的乙酰羟酸合酶变体的多核苷酸。

6.转化体,其中引入权利要求5所述的载体。

7.重组谷氨酸棒状杆菌(Corynebacterium glutamicum),其包含根据权利要求1所述的乙酰羟酸合酶变体、编码所述变体的多核苷酸、或引入了包含编码所述变体的所述多核苷酸的载体。

8.用于生产L-支链氨基酸的方法,其包括:

(a)在培养基中培养根据权利要求7所述的重组谷氨酸棒状杆菌;和

(b)从步骤(a)中的所述谷氨酸棒状杆菌或培养基回收所述L-支链氨基酸,其中所述L-支链氨基酸是L-缬氨酸或L-亮氨酸。

乙酰羟酸合酶变体、包含其的微生物和用其生产L-支链氨基酸的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及新的乙酰羟酸合酶变体及其用途，且具体地，涉及乙酰羟酸合酶变体、含有其的微生物或生产L-支链氨基酸的方法。

背景技术

[0002] 已知支链氨基酸(例如，L-缬氨酸、L-亮氨酸和L-异亮氨酸)增加个体中的蛋白质水平并在运动期间作为能量来源具有重要作用，因此广泛用于药物、食物等。关于支链氨基酸的生物合成，相同的酶被用于平行的生物合成途径，因此难以通过发酵在工业规模上生产单一种类的支链氨基酸。在支链氨基酸的制备中，乙酰羟酸合酶(即，支链氨基酸的生物合成中的第一个酶)的作用是最重要的；然而，此前关于乙酰羟酸合酶的研究主要集中在由于乙酰羟酸合酶小亚基(IlvN蛋白)的修饰导致的反馈抑制释放(Protein Expr Purif.2015年5月;109:106-12,US2014-0335574,US2009-496475,US2006-303888,US2008-245610)，因此揭示了相关研究的严重短缺。

[0003] 乙酰羟酸合酶是具有从两分子丙酮酸生成乙酰乳酸并从丁酮酸和丙酮酸生成2-乙酰-2-羟基-丁酸的作用的酶。乙酰羟酸合酶催化丙酮酸脱羧和与另一丙酮酸分子缩合反应以生成乙酰乳酸——其是缬氨酸和亮氨酸的前体；或催化丙酮酸脱羧和与2-丁酮酸缩合反应以生成乙酰羟丁酸——其是异亮氨酸的前体。因此，乙酰羟酸合酶是参与L-支链氨基酸的初始生物合成过程的非常重要的酶。

发明内容

[0004] 技术问题

[0005] 本发明人已经为有效生产L-支链氨基酸做出了努力，并且因此其开发了大亚基变体。然后，本发明人确认可由含有该变体的微生物高产量生产L-支链氨基酸，从而完成本公开。

[0006] 技术方案

[0007] 本公开的一个目的是提供乙酰羟酸合酶变体。

[0008] 本公开的另一目的是提供编码乙酰羟酸合酶变体的多核苷酸、含有该多核苷酸的载体、和其中引入该载体的转化体。

[0009] 本公开的又一目的是提供生产L-支链氨基酸的微生物，其中该微生物含有该乙酰羟酸合酶变体或其中引入该载体。

[0010] 本公开的又一目的是提供生产L-支链氨基酸的方法，其包括：在培养基中培养生产L-支链氨基酸的微生物；和从微生物或其培养基回收L-支链氨基酸。

[0011] 有益效果

[0012] 当将根据本公开的乙酰羟酸合酶变体的活性被引入微生物中时，该微生物可显著提高生产L-支链氨基酸的能力。因此，该微生物可广泛用于大规模生产L-支链氨基酸。

[0013] 最佳方式

[0014] 为实现以上目的，本公开一方面提供了乙酰羟酸合酶变体，其中，在乙酰羟酸合酶大亚基(即，乙酰乳酸合酶大亚基；IlvB蛋白)中，第96位氨基酸(即，苏氨酸)被苏氨酸以外的氨基酸取代，第503位氨基酸(即，色氨酸)被色氨酸以外的氨基酸取代，或者第96位氨基酸(即，苏氨酸)和第503位氨基酸(即，色氨酸)均被另一氨基酸取代。

[0015] 具体地，乙酰羟酸合酶的大亚基可具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。更具体地，乙酰羟酸合酶变体可以是这样的乙酰羟酸合酶变体：其中，在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中，自其N端的第96位氨基酸(即，苏氨酸)或第503位氨基酸(即，色氨酸)被另一氨基酸取代；或者第96位氨基酸(即，苏氨酸)和第503位氨基酸(即，色氨酸)每一个均被另一氨基酸取代。

[0016] 如本文所用，术语“乙酰羟酸合酶”指代参与L-支链氨基酸的生物合成的酶，并且其可参与L-支链氨基酸的生物合成的第一步。具体地，乙酰羟酸合酶可催化丙酮酸脱羧和与另一丙酮酸分子缩合反应以生成乙酰乳酸(即，缬氨酸的前体)，或可催化丙酮酸脱羧和与2-丁酮酸缩合反应以生成乙酰羟丁酸(即，异亮氨酸的前体)。具体地，从乙酰乳酸开始，通过由乙酰羟酸异构还原酶(isomeroreductase)、二羟酸脱水酶和转氨酶B催化的顺序反应，生物合成L-缬氨酸。另外，从乙酰乳酸开始，通过由乙酰羟酸异构还原酶、二羟酸脱水酶、2-异丙基苹果酸合酶、异丙基苹果酸异构酶、3-异丙基苹果酸脱氢酶和转氨酶B催化的顺序反应，生物合成L-亮氨酸作为最终产物。同时，从乙酰羟丁酸开始，通过由乙酰羟酸异构还原酶、二羟酸脱水酶和转氨酶B催化的顺序反应，生物合成L-异亮氨酸作为最终产物。因此，乙酰羟酸合酶是L-支链氨基酸的生物合成途径中的重要酶。

[0017] 乙酰羟酸合酶由两个基因编码，即，ilvB和ilvN。ilvB基因编码乙酰羟酸合酶的大亚基(IlvB)，而ilvN基因编码乙酰羟酸合酶的小亚基(IlvN)。

[0018] 在本公开中，乙酰羟酸合酶可以是源自棒状杆菌(Corynebacterium)属微生物，并且具体地来自谷氨酸棒状杆菌(Corynebacterium glutamicum)的酶。更具体地，作为乙酰羟酸合酶的大亚基，可没有限制地包括具有IlvB蛋白活性且与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有70％或更高，具体地80％或更高，更具体地85％或更高，甚至更具体地90％或更高，和甚至更具体地95％的同源性或同一性，以及SEQ ID NO:1的氨基酸序列的任何蛋白。另外，由于密码子简并，考虑到表达蛋白质的有机体中优选的密码子，在不改变由编码区表达的蛋白质氨基酸序列的范围内，可对编码具有IlvB蛋白活性的蛋白质的多核苷酸在编码区中进行各种修饰。核苷酸序列可被无限制地包括，只要其编码SEQ ID NO:1的氨基酸序列，并且具体地，其可以是由SEQ ID NO:2的核苷酸序列编码的核苷酸序列。

[0019] 如本文所用，术语“乙酰羟酸合酶变体”指代乙酰羟酸合酶蛋白的氨基酸序列中一个或多个氨基酸被修饰(例如，添加、删除或取代)的蛋白质。具体地，乙酰羟酸合酶变体是其中本公开的修饰导致其活性与其野生型或修饰前相比有效增加的蛋白质。

[0020] 如本文所用，术语“修饰”指代用于改善酶的常规方法，并且可没有限制地使用本领域已知的任何方法，包括诸如合理设计(rational design)和定向演化(directed evolution)的策略。例如，合理设计的策略包括指定具体位置的氨基酸的方法(定点诱变(site-directed mutagenesis)或位点专一诱变)等，并且定向演化的策略包括诱导随机诱变的方法等。另外，修饰可以是在没有外部操纵的情况下通过天然突变诱导的修饰。具体地，乙酰羟酸合酶变体可以是分离的变体、重组蛋白质、或非天然存在的变体，但乙酰羟酸

合酶变体不限制于此。

[0021] 本公开的乙酰羟酸合酶变体可具体是具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的IlvB蛋白,其中自其N端第96位氨基酸(苏氨酸)或第503位氨基酸(色氨酸)被突变;或第96位氨基酸(苏氨酸)和第503位氨基酸(色氨酸)同时被另一氨基酸取代,但乙酰羟酸合酶变体不限制于此。例如,本公开的乙酰羟酸合酶变体可以是IlvB蛋白,其中第96位氨基酸(苏氨酸)被丝氨酸、半胱氨酸、或丙氨酸取代,或者第503位氨基酸(色氨酸)被谷氨酰胺、天冬酰胺、或亮氨酸取代。另外,显而易见的是,具有其中第96位氨基酸或第503位氨基酸被另一氨基酸取代和同时部分氨基酸序列被删除、修饰、取代或添加的氨基酸序列的任何乙酰羟酸合酶变体可呈现与本公开的乙酰羟酸合酶变体相同或相应的活性。

[0022] 此外,具有上述修饰的乙酰羟酸合酶变体大亚基本身、包括乙酰羟酸合酶变体大亚基的乙酰羟酸合酶、和包括乙酰羟酸合酶变体大亚基和小亚基的乙酰羟酸合酶可全部都被包括在本公开的乙酰羟酸合酶变体的范围内,但乙酰羟酸合酶变体不限制于此。

[0023] 在本公开中,确认通过用各种其它氨基酸取代乙酰羟酸合酶蛋白的第96位氨基酸和第503位氨基酸可增加L-支链氨基酸生产量,因此确认第96位和第503位的氨基酸位置在与L-支链氨基酸生产有关的乙酰羟酸合酶蛋白的修饰中是重要的。然而,由于本公开的实施方式中的取代氨基酸仅是显示本公开的效果的代表性实施方式,因此本公开的范围不应限于这些实施方式,并且显而易见的是,当第96位氨基酸(苏氨酸)被苏氨酸以外的氨基酸取代,第503位氨基酸(色氨酸)被色氨酸以外的氨基酸取代,或第96位氨基酸和第503位氨基酸均被不同的氨基酸取代时,乙酰羟酸合酶变体可具有与实施方式中所述的那些变体相应的效果。

[0024] 另外,本公开的乙酰羟酸合酶变体可具有由SEQ ID NOS:28至33中任一个所示的氨基酸序列,但乙酰羟酸合酶变体的氨基酸序列不限制于此。另外,与上述氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%同源性或同一性的任何多肽可被无限制地包括在内,只要这些多肽通过包括本公开的修饰而具有与乙酰羟酸合酶变体的活性基本上相同或对应的活性。

[0025] 同源性和同一性指代两个给定氨基酸序列或核苷酸序列之间的相关程度,并且可表示为百分比。

[0026] 术语“同源性”和“同一性”通常可彼此互换使用。

[0027] 保守多核苷酸或多肽的序列同源性或同一性可通过标准比对算法确定,并且可结合使用由通过待用程序建立的默认空位罚值(default gap penalties)。基本上,同源性或同一性序列可在中度或高度严格的条件下沿其整个序列或沿其全长的至少约50%、约60%、约70%、约80%、或约90%杂交。关于待杂交的多核苷酸,还可考虑包括简并密码子——代替密码子——的多核苷酸。

[0028] 任意两个多核苷酸或多肽序列是否具有同源性、相似性、或同一性可通过例如已知的计算机算法(如“FASTA”程序)利用默认参数(如Pearson et al.(1988)(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85]:2444)中)确定。可选地,其可利用EMBOSS包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice et al.,2000,Trends Genet.16:276-277)(5.0.0或更高版本)(包括GCG程序包(Devereux,J.,et al.,Nucleic Acids Research 12:387(1984))的Needleman程序中执行的Needleman-Wunsch算法

(Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul,[S.][F.]et al.,J Molec Biol 215]:403(1990);Guide to Huge Computers, Martin J.Bishop,[ED.,]Academic Press,San Diego,1994,和[CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48:1073)来确定。例如,同源性、相似性、或同一性可利用National Center for Biotechnology Information的BLAST或ClustalW来确定。

[0029] 多核苷酸或多肽的同源性、相似性、或同一性可通过利用Smith and Waterman, Adv.Appl.Math(1981)2:482中公开的GAP计算机程序(例如,Needleman et al.(1970),J Mol Biol48:443)比较序列信息来确定。简而言之,GAP程序将相似性定义为相似的比对符号(即,核苷酸或氨基酸)的数量除以两序列中较短者的符号总数。GAP程序的默认参数可包括:(1)Gribskov et al.(1986)Nucl.Acids Res.14:6745的一元比较矩阵(含有同一性值为1和非同一性值为0)和加权比较矩阵(或EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)替代矩阵),如Schwartz and Dayhoff,eds.,Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation,pp.353-358(1979)公开;(2)每个空位的罚值为3.0,且每个空位中的每个符号另外0.10罚值(或空位开放罚值(gap open penalty)10、空位延伸罚值(gap extension penalty)0.5);和(3)末端空位无罚值。因此,如本文所用,术语“同源性”或“同一性”代表序列之间的相关性。

[0030] 本公开的另一方面提供了编码本公开的乙酰羟酸合酶变体的多核苷酸。

[0031] 如本文所用,术语“多核苷酸”具有包括DNA或RNA分子的含义,且作为其基本构件(building block)的核苷酸不仅包括天然核苷酸,还包括其中糖或碱基区被修饰的类似物。在本公开中,多核苷酸可以是从细胞分离的多核苷酸或人工合成的多核苷酸,但多核苷酸不限制于此。

[0032] 编码本公开的乙酰羟酸合酶变体的多核苷酸可没有限制地包括编码具有本公开的乙酰羟酸合酶变体活性的蛋白质的任何核苷酸序列。具体地,由于密码子简并或考虑到表达蛋白质的微生物优选的密码子,可在不改变蛋白质的氨基酸序列的范围内在蛋白质的编码区中进行各种修饰。多核苷酸可没有限制地包括编码SEQ ID NOS:28至33的氨基酸序列的任何核苷酸序列,和具体地,具有SEQ ID NOS:34至39的核苷酸序列的核苷酸序列。另外,与上述氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、或至少99%同源性或同一性的任何多肽也可没有限制地被包括在内,只要由于密码子简并这些多肽通过包括本公开的修饰而具有与乙酰羟酸合酶变体基本上相同或相应的活性。

[0033] 可选地,通过在严格条件下与探针杂交——该探针可由已知基因序列(例如,与全部或部分核苷酸序列互补的序列)制备,编码具有由SEQ ID NOS:28至33的氨基酸序列组成的蛋白质的活性的蛋白质的任何序列可没有限制地被包括在内。

[0034] “严格条件”指代能够实现多核苷酸之间特定杂交的条件。这种条件被详细描述于文献(例如,J.Sambrook et al.,同上)中。严格条件可包括具有高度同源性或同一性的基因(例如,具有至少80%、具体地至少85%、更具体地至少90%、甚至更具体地至少95%、甚至更具体地至少97%、或最具体地至少99%的基因)可彼此杂交的条件;具有较低同源性或同一性的基因不能彼此杂交的条件;或作为Southern杂交的常用洗涤条件的条件(例如,盐浓度和温度相应于60℃、1×SSC、0.1%SDS;具体地60℃、0.1×SSC、0.1%SDS;更具体地68

℃、0.1×SSC、0.1%SDS,一次,具体地两次或三次)。

[0035] 杂交需要两个核苷酸具有互补序列,虽然取决于杂交的严格性,碱基之间的错配可以是可能的。术语"互补"用于描述可彼此杂交的核苷酸碱基之间的关系。例如,关于DNA,腺苷与胸腺嘧啶互补,胞嘧啶与鸟嘌呤互补。因此,本公开还可包括与整个序列以及基本上相似的核酸序列互补的、分离的核酸片段。

[0036] 具体地,具有同源性或同一性的多核苷酸可利用包括T_m为55℃的杂交步骤的杂交条件或通过利用上述条件来检测。另外,T_m值可以是60℃、63℃、或65℃,但不限制于此,并可根据目的由本领域技术人员适当地控制。用于杂交多核苷酸的适当严格性取决于多核苷酸的长度和互补程度,且变量是本领域公知的(参见,Sambrook et al.,同上,9.50至9.51,11.7至11.8)。

[0037] 本公开的又一方面提供了载体,其包括编码本公开的修饰乙酰羟酸合酶变体的多核苷酸。

[0038] 如本文所用,术语"载体"指代用于将核苷酸克隆和/或转移到宿主细胞中的任何载体。载体可以是实现与其它DNA片段(一个或多个)组合的片段(一个或多个)的复制的复制子。"复制子"指代充当体内DNA复制的自我复制单元的(即,可通过自我调控而复制的)任何遗传单元。具体地,载体可以是天然或重组状态的质粒、噬菌体、黏粒、染色体或病毒。例如,作为噬菌体载体或黏粒载体,可使用pWE15、M13、λMBL3、λMBL4、λIXII、λASHII、λAPII、λt10、λt11、Charon4A、Charon21A等,且作为质粒载体,可使用基于pBR、pUC、pBluescriptII、pGEM、pTZ、pCL、pET等的那些。可用于本公开的载体没有特别限制,而可使用任何已知的表达载体。另外,载体可包括转座子或人工染色体。

[0039] 在本公开中,载体没有特别限制,只要其包含编码本公开的乙酰羟酸合酶变体的多核苷酸。载体可以是可在真核或原核细胞——包括哺乳动物细胞(例如,人、猴、兔、大鼠、仓鼠、小鼠等的细胞)、植物细胞、酵母细胞、昆虫细胞和细菌细胞(例如,大肠杆菌(E.coli)等)——中复制和/或表达核酸分子的载体,且具体地,可以是与合适的启动子可操作地连接使得多核苷酸可在宿主细胞中表达并且包括至少一种选择标记(selectable marker)的载体。

[0040] 另外,如本文所用,术语"可操作地连接"指代启动和介导编码本公开的目标蛋白的多核苷酸转录的启动子序列与上述基因序列之间的功能性连接。

[0041] 本公开的又一方面提供了其中引入本公开载体的转化体。

[0042] 在本公开中,转化体可以是其中可引入上述载体并且其中可表达本公开的乙酰羟酸合酶变体的任何可转化细胞。具体地,转化体可以是属于埃希氏菌(Escherichia)属、棒状杆菌属、链霉菌(Streptomyces)属、短杆菌(Brevibacterium)属、沙雷氏菌(Serratia)属、普罗威登斯菌(Providencia)属、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)等的任何转化细菌细胞;酵母细胞;毕赤酵母(Pichia pastoris)等的真菌细胞;转化昆虫(例如,果蝇(Drosophila)、夜蛾(Spodoptera)Sf9等)细胞;转化动物细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、人淋巴母细胞COS、NSO(小鼠骨髓瘤)、293T、弓黑色素瘤(bow melanoma)、HT-1080、幼仓鼠肾(BHK)、人胚肾(HEK)、PERC.6(人视网膜细胞)的细胞);或转化植物细胞,但转化体不限制于此。

[0043] 本公开的又一方面提供了生产L-支链氨基酸的微生物,其中微生物含有乙酰羟酸

合酶变体或其中引入了含有编码变体的多核苷酸的载体。

[0044] 如本文所用,术语“L-支链氨基酸”指代侧链上具有支链烷基的氨基酸,并且其包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。具体地,在本公开中,L-支链氨基酸可以是L-缬氨酸或L-亮氨酸,但不限制于此。

[0045] 如本文所用,术语“微生物”包括所有野生型微生物和天然或人工遗传修饰的微生物,并且其是包括所有其中具体机制因外源基因插入或内源基因活性增强或减弱而减弱或增强的微生物的概念。微生物指代所有可表达本公开的乙酰羟酸合酶变体的微生物。具体地,微生物可以是谷氨酸棒状杆菌、产氨棒状杆菌(Corynebacterium ammoniagenes)、乳发酵短杆菌(Brevibacterium lactofermentum)、黄色短杆菌(Brevibacterium flavum)、热产氨棒状杆菌(Corynebacterium thermoaminogenes)、有效棒状杆菌(Corynebacterium efficiens)等,并且更具体地谷氨酸棒状杆菌,但微生物不限制于此。

[0046] 如本文所用,术语“生产L-支链氨基酸的微生物”可指代天然微生物或通过修饰而具有生产L-支链氨基酸的能力的修饰微生物,且具体地可指代非天然存在的重组微生物,但微生物不限制于此。生产L-支链氨基酸的微生物是含有本公开的乙酰羟酸合酶变体或其中引入了含有编码该变体的多核苷酸的载体的微生物,并且该微生物与野生型微生物、含有天然型乙酰羟酸合酶蛋白的微生物、含有乙酰羟酸合酶蛋白的非修饰微生物、和不含有乙酰羟酸合酶蛋白的微生物相比可具有显著增加的生产L-支链氨基酸能力。

[0047] 本公开的又一方面提供了生产L-支链氨基酸的方法,其包括:培养生产L-支链氨基酸的微生物;和从上述步骤中的微生物或培养基中回收L-支链氨基酸。

[0048] 如本文所用,术语“培养”指代在人工控制的环境条件下培养微生物。在本公开中,利用能够生产L-支链氨基酸的微生物生产L-支链氨基酸的方法可通过本领域广泛已知的方法进行。具体地,培养可以分批过程(batch process)、补料分批过程(fed-batch process)或反复补料分批过程进行,但分批过程不限制于此。

[0049] 用于培养的培养基必须满足所用具体菌株的要求。例如,适用于培养棒状杆菌菌株的培养基是本领域已知的(例如,Manual of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology,Washington D.C.,USA,1981)。

[0050] 可用于培养基的糖源可以是糖类和碳水化合物(例如,葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、淀粉和纤维素);油和脂质(例如,大豆油、葵花籽油、花生油和椰子油);脂肪酸(例如,棕榈酸、硬脂酸和亚油酸);醇(例如,甘油和乙醇);和有机酸(例如,乙酸)。这些材料可独立使用或组合使用,但使用方式不限制于此。

[0051] 可在培养基中使用的氮源的实例可包括蛋白胨、酵母提取物、肉汁(meat juice)、麦芽提取物、玉米浆、大豆粉(soybean meal)和尿素、或无机化合物(例如,硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵)。这些氮源也可独立使用或组合使用,但使用方式不限制于此。

[0052] 可在培养基中使用的磷源可包括磷酸二氢钾、磷酸氢二钾或相应的含钠盐。另外,培养基可含有细胞生长所需的金属盐。进一步,除以上材料外,还可使用生长所必需的材料(例如,氨基酸和维生素)。另外,可使用适于培养基的前体。上述原料可在培养过程中以分批或连续方式充分加入培养物中,但添加方法不限制于此。

[0053] 可使用碱性化合物(例如,氢氧化钠、氢氧化钾或氨)或酸性化合物(例如,磷酸或硫酸)以适当的方式调节培养物的pH。另外,可使用消泡剂(例如,脂肪酸聚乙二醇酯)来防

止泡沫产生。可将氧气或含氧气体(例如,空气)注入培养物中,以维持培养物的有氧条件。培养物的温度可以总体上在20℃至45℃范围内,且具体地25℃至40℃。培养可持续直至最大量的L-支链氨基酸生成,且具体地10至160小时。L-支链氨基酸可被释放到培养基中或被包含在细胞中,但不限制于此。

[0054] 从微生物或培养物中回收L-支链氨基酸的方法可包括本领域公知的那些;例如,可采用离心、过滤、用蛋白质结晶沉淀剂处理(盐析法)、提取、超声破碎(ultrasonic disruption)、超滤、透析、各种色谱法(例如,分子筛色谱法(凝胶过滤)、吸附色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等)、HPLC及其组合,但方法不限制于此。另外,回收L-支链氨基酸的步骤可进一步包括纯化过程,并且纯化过程可使用本领域已知的适当方法进行。

具体实施方式

[0055] 下文将参考下列实施例更详细地描述本公开。然而,这些实施例仅用于示例性目的,并且本公开不旨在被这些实施例限制。

[0056] 实施例1:利用人工诱变制备编码修饰乙酰羟酸合酶的DNA文库

[0057] 在此实施例中,通过以下方法制备用于获得乙酰羟酸合酶变体的染色体内初级交换插入的载体文库。对编码源自谷氨酸棒状杆菌ATCC14067的乙酰羟酸合酶(SEQ ID NO:1)的ilvB基因(SEQ ID NO:2)进行易错(Error-prone)PCR,从而获得ilvB基因变体(2,395bp),随机引入有核苷酸取代突变(修饰)的ilvB基因变体。利用GenemorphII随机诱变试剂盒(Stratagene),利用谷氨酸棒状杆菌ATCC14067的基因组DNA作为模板以及引物1(SEQ ID NO:3)和引物2(SEQ ID NO:4),进行易错PCR。

[0058] 引物1(SEQ ID NO:3):5′-AACCG GTATC GACAA TCCAA T-3′

[0059] 引物2(SEQ ID NO:4):5′-GGGTC TCTCC TTATG CCTC-3′

[0060] 进行易错PCR,使得修饰可以0-3.5个突变/1kb扩增基因片段的比例引入扩增基因片段。PCR如下进行总共30个循环:在96℃下变性30秒,在53℃下退火30秒,和在72℃下聚合2min。

[0061] 将扩增基因片段利用pCR2.1-TOPO TA克隆试剂盒(Invitrogen)连接到pCR2.1-TOPO载体(下文,“pCR2.1”),转化到大肠杆菌DH5α中,并平板接种(plated)于含有卡那霉素(25mg/L)的固体LB培养基上。选择20个转化的菌落,并在获得其质粒后分析其核苷酸序列。结果是,确认修饰以2.1个突变/kb的频率在不同位置被引入。从约20,000个转化的大肠杆菌菌落提取质粒,并将其命名为“pCR2.1-ilvB(mt)文库”。

[0062] 另外,制备包含野生型ilvB基因的质粒用作对照。在上述相同条件下,利用谷氨酸棒状杆菌ATCC14067的基因组DNA作为模板以及引物1(SEQ ID NO:3)和引物2(SEQ ID NO:4)进行PCR。对于聚合酶,使用PfuUltra™高保真DNA聚合酶(Stratagene),并将制备的质粒命名为“pCR2.1-ilvB(WT)”。

[0063] 实施例2:制备ilvB缺陷菌株

[0064] 使用KCCM11201P菌株(KR专利号10-1117022)作为亲株制备用于引入pCR2.1-ilvB(mt)文库的ilvB缺陷菌株。

[0065] 为制备ilvB缺陷载体,利用野生型谷氨酸棒状杆菌ATCC14067的染色体DNA作为模板以及引物3(SEQ ID NO:5)和引物4(SEQ ID NO:6)的引物组以及引物5(SEQ ID NO:7)和

引物6(SEQ ID NO:8)的引物组进行PCR。

[0066] 引物3(SEQ ID NO:5):5′-GCGTC TAGAG ACTTG CACGA GGAAA CG-3′

[0067] 引物4(SEQ ID NO:6):5′-CAGCC AAGTC CCTCA GAATT GATGT AGCAA TTATC C-3′

[0068] 引物5(SEQ ID NO:7):5′-GGATA ATTGC TACAT CAATT CTGAG GGACT TGGCT G-3′

[0069] 引物6(SEQ ID NO:8):5′-GCGTC TAGAA CCACA GAGTC TGGAG CC-3′

[0070] PCR如下进行:在95℃下变性5min;30个循环的在95℃下变性30秒、在55℃下退火30秒、和在72℃下聚合30秒;以及在72℃下聚合7min。

[0071] 结果是,获得包含ilvB基因的启动子的上游区域的731bp DNA片段(SEQ ID NO:9)和包含ilvB基因的3′端的712bp DNA片段(SEQ ID NO:10)。

[0072] 利用扩增的DNA片段(SEQ ID NOS:9和10)以及引物3(SEQ ID NO:5)和引物6(SEQ ID NO:8)的基因组进行PCR。PCR如下进行:在95℃下变性5min;30个循环的在95℃下变性30秒、在55℃下退火30秒、和在72℃下聚合60秒;以及在72℃下聚合7min。

[0073] 结果是,1,407bp DNA片段(SEQ ID NO:11,下文“ilvB片段”)——其中包括ilvB基因的启动子的上游区域的DNA片段与包括ilvB基因的3′端的DNA片段连接——被扩增。

[0074] 将在谷氨酸棒状杆菌中不能复制的pDZ载体(KR专利号10-0924065)和上述扩增的ilvB基因片段各自用限制酶XbaI处理,利用DNA连接酶连接,并克隆。将获得的质粒命名为“pDZ-ilvB”。

[0075] 将pDZ-ilvB通过电穿孔法(Appl.Microbiol.Biothcenol.(1999)52:541-545)转化到谷氨酸棒状杆菌KCCM11201P中,并在含有卡那霉素(25mg/L)以及L-缬氨酸、L-亮氨酸和L-异亮氨酸各2mM的选择培养基中获得转化的菌株。获得这样的菌株:其中基因通过在二次交换过程中插入基因组中的ilvB基因片段而失活,并且该菌株命名为KCCM11201PilvB。

[0076] 实施例3:制备乙酰羟酸合酶的修饰菌株的文库和选择L-氨基酸生产能力增加的菌株利用以上制备的pCR2.1-ilvB(mt)文库通过同源重组转化以上制备的KCCM11201PilvB菌株,并将转化体平板接种于含有卡那霉素(25mg/L)的复合平板培养基上,并从中获得约10,000个菌落。菌落命名为KCCM11201PilvB/pCR2.1-ilvB(mt)-1至KCCM11201PilvB/pCR2.1-ilvB(mt)-10000。

[0077] 另外,将以上制备的pCR2.1-ilvB(WT)载体转化到KCCM11201PilvB菌株中,以制备对照菌株,并且该菌株命名为KCCM11201PilvB/pCR2.1-ilvB(WT)。

[0078] <复合平板培养基(pH 7.0)>

[0079] 葡萄糖(10g)、蛋白胨(10g)、牛肉提取物(5g)、酵母提取物(5g)、脑心浸液(18.5g)、NaCl(2.5g)、尿素(2g)、山梨糖醇(91g)、琼脂(20g)(基于1L蒸馏水)。

[0080] 将以上获得的约25,000个菌落各自接种到含有下述组分的选择培养基(300μL)中,并在32℃下以1,000rpm的速率于96深孔板中培养24小时。通过茚三酮法(J.Biol.Chem.1948.176:367-388)分析培养物中生成的L-氨基酸量。培养完成后,使10μL培养物上清液和190μL茚三酮反应溶液在65℃下反应30分钟。使用分光光度计在波长570nm下测量吸光度,并与对照(即,KCCM11201PilvB/pCR2.1-ilvB(WT))进行比较,选择显示吸光度增加至少10%的约213个修饰菌株。其它菌落显示与对照相比相似或降低的吸光度。

[0081] <选择培养基(pH 8.0)>

[0082] 葡萄糖(10g)、$(NH_4)_2SO_4$(5.5g)、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(1.2g)、KH_2PO_4(0.8g)、K_2HPO_4

(16.4g)、生物素(100μg)、硫胺素HCl(1,000μg)、钙-泛酸(2,000μg)和烟酰胺(2,000μg)(基于1L蒸馏水)。

[0083] 对选择的213种菌株反复实施以上方法,并选择与KCCM11201PilvB/pCR2.1-ilvB(WT)相比具有提高的L-氨基酸生产能力的前60种菌株。

[0084] 实施例4:确认选自乙酰羟酸合酶修饰菌株文库的菌株的L-缬氨酸生产能力

[0085] 实施例3中选择的60种菌株,在通过以下方法将其培养之后,分析其L-缬氨酸生产能力。

[0086] 将各菌株分别接种到含有25mL生产培养基的250mL角-挡板烧瓶(corner-baffle flask)中,并在振荡培养箱(200rpm)中于30℃下培养20小时。然后,将含有24mL培养物(其含有下述成分)的各250mL角-挡板烧瓶接种1mL种子培养液(seed culture broth),并在30℃下振荡(200rpm)培养72小时。通过HPLC分析各培养物中的L-缬氨酸浓度。

[0087] <生产培养基(pH 7.0)>

[0088] 葡萄糖(100g)、$(NH_4)_2SO_4$(40g)、大豆蛋白(2.5g)、玉米浆固体(Corn Steep Solids)(5g)、尿素(3g)、KH_2PO_4(1g)、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(0.5g)、生物素(100μg)、硫胺素HCl(1,000μg)、钙-泛酸(2,000μg)、烟酰胺(3,000μg)和$CaCO_3$(30g)(基于1L蒸馏水)。

[0089] 在选择的60种菌株中,选择显示L-缬氨酸浓度增加的2种菌株,并反复进行培养和分析。下表1显示了L-缬氨酸浓度的分析结果。其余58种菌株实际上显示L-缬氨酸浓度降低。

[0090] [表1]

[0091]

两种被选择的 KCCM11201P*ilvB*/pCR2.1-ilvB(mt)菌株生产的 L-缬氨酸的浓度					
	菌株	L-缬氨酸(g/L)			
		批次 1	批次 2	批次 3	平均
对照	KCCM11201P*ilvB*/pCR2.1-ilvB(WT)	2.7	2.9	2.9	2.8
1	KCCM11201P*ilvB*/pCR2.1-ilvB(mt)-5602	3.1	3.5	3.4	3.3
2	KCCM11201P*ilvB*/pCR2.1-ilvB(mt)-7131	2.9	3.3	3.1	3.1

[0092] 2种被选择的菌株的L-缬氨酸浓度的分析结果是,确认与对照菌株KCCM11201PilvB/pCR2.1-ilvB(WT)相比,两种菌株的L-缬氨酸产率最大增加20.7%。

[0093] 实施例5:确认选自乙酰羟酸合酶修饰菌株文库的菌株中的ilvB基因修饰

[0094] 为确认引入到实施例4中的2种被选择菌株的乙酰羟酸合酶中的随机修饰,分析ilvB基因的核苷酸序列。为确定核苷酸序列,利用引物7(SEQ ID NO:12)和引物8(SEQ ID NO:13)的引物组进行PCR。

[0095] 引物7(SEQ ID NO:12):5′-CGCTT GATAA TACGC ATG-3′

[0096] 引物8(SEQ ID NO:13):5′-GAACA TACCT GATAC GCG-3′

[0097] 使获得的修饰ilvB基因片段各自进行核苷酸序列分析,并将结果与野生型ilvB基

因的核苷酸序列(即,SEQ ID NO:2)进行比较。结果是,确认了修饰ilvB基因的核苷酸序列,并确认了修饰乙酰羟酸合酶蛋白的氨基酸序列。下表2显示了被选择的两种修饰乙酰羟酸合酶蛋白的信息。

[0098] [表2]

[0099]

KCCM11201P/pCR2.1-ilvB(mt)的被选择的两种修饰乙酰羟酸合酶蛋白的信息	
菌株	乙酰羟酸合酶的氨基酸修饰
KCCM11201P*ilvB* /pCR2.1-ilvB(mt)-5602	W503Q
KCCM11201P*ilvB* /pCR2.1-ilvB(mt)-7131	T96S

[0100] 实施例6:制备用于将修饰引入乙酰羟酸合酶的载体

[0101] 为确认实施例5中确认的修饰乙酰羟酸合酶蛋白的效果,制备能够将修饰乙酰羟酸合酶蛋白引入到染色体上的载体。

[0102] 基于确认的核苷酸序列,合成引物9(SEQ ID NO:14)和引物10(SEQ ID NO:15)的引物组以及引物11(SEQ ID NO:16)和引物12(SEQ ID NO:17)的引物组,其中在5′端插入XbaI限制位点。然后,利用这些引物组,利用选择的两种染色体DNA中的每一种作为模板,进行PCR,从而扩增修饰的ilvB基因片段。PCR如下进行:在94℃下变性5min;30个循环的在94℃下变性30秒、在56℃下退火30秒,和在72℃下聚合2min;以及在72℃下聚合7min。

[0103] 引物9(SEQ ID NO:14):5′-CGCTC TAGAC AAGCA GGTTG AGGTT CC-3′

[0104] 引物10(SEQ ID NO:15):5′-CGCTC TAGAC ACGAG GTTGA ATGCG CG-3′

[0105] 引物11(SEQ ID NO:16):5′-CGCTC TAGAC CCTCG ACAAC ACTCA CC-3′

[0106] 引物12(SEQ ID NO:17):5′-CGCTC TAGAT GCCAT CAAGG TGGTG AC-3′

[0107] 用XbaI处理通过PCR扩增的两种基因片段以获得对应的DNA片段,并将这些片段连接到用于染色体引入的pDZ载体(其中包括XbaI限制位点),转化到大肠杆菌DH5α中,并将转化体分散到含有卡那霉素(25mg/L)的LB固体培养基上。

[0108] 通过PCR选择插入有目标基因的载体所转化的菌落,并通过公知的质粒提取方法获得质粒。这些质粒命名为pDZ-ilvB(W503Q)和pDZ-ilvB(T96S)——分别根据插入ilvB基因的修饰。

[0109] 实施例7:制备具有乙酰羟酸合酶修饰的KCCM11201P源菌株和比较其L-缬氨酸生产能力

[0110] 通过两步同源染色体重组,将实施例6中制备的引入有新修饰的两种载体分别转化到谷氨酸棒状杆菌KCCM11201P(其是L-缬氨酸生产菌株)中。然后,通过核苷酸序列分析,选择染色体上引入有ilvB基因修饰的菌株。将引入有ilvB基因修饰的菌株命名为KCCM11201P::ilvB(W503Q)和KCCM11201P::ilvB(T96S)。另外,将的pDZ-ilvB(T96S)载体,在引入有以上修饰的载体之间,转化到以上制备的KCCM11201P::ilvB(W503Q)菌株中。然后,将染色体上引入有所述两种修饰的菌株命名为KCCM11201P::ilvB(W503Q/T96S)。

[0111] 以与实施例4相同的方式培养菌株,并分析来自培养的菌株的L-缬氨酸浓度(表3)。

[0112] [表3]

[0113]

引入有修饰乙酰羟酸合酶的 KCCM11201P 源菌株生产的 L-缬氨酸的浓度（g/L）					
	菌株	批次 1	批次 2	批次 3	平均
对照	KCCM11201P	2.9	2.8	2.8	2.8
1	KCCM11201P::*ilvB*(W503Q)	3.3	3.2	3.3	3.3
2	KCCM11201P::*ilvB*(T96S)	3.2	3.0	3.1	3.1
3	KCCM11201P::*ilvB*(W503Q/T96S)	3.3	3.4	3.4	3.4

[0114] 结果是,引入有修饰的两种新菌株(KCCM11201P::ilvB(W503Q)和KCCM11201P::ilvB(T96S))显示与亲株相比L-缬氨酸生产能力最大增加17.8%,而引入双修饰的菌株(KCCM11201P::ilvB(W503Q/T96S)显示与亲株相比L-缬氨酸生产能力增加21.4%。

[0115] 因此,考虑到乙酰羟酸合酶是L-支链氨基酸的生物合成途径中的第一个酶,预期本公开的乙酰羟酸合酶大亚基变体对L-异亮氨酸和L-亮氨酸以及L-缬氨酸的产量增加具有影响。

[0116] 本发明人已将L-缬氨酸生产能力改善的菌株(即,KCCM11201P::ilvB(W503Q)和KCCM11201P::ilvB(T96S))命名为谷氨酸棒状杆菌KCJ-0793和谷氨酸棒状杆菌KCJ-0796,并将其于2016年1月25日保藏于韩国微生物保藏中心(Korean Culture Center of Microorganisms,KCCM)(韩国,首尔),保藏号为KCCM11809P和KCCM11810P。

[0117] 实施例8:制备用于L-缬氨酸生物合成的、含有编码修饰乙酰羟酸合酶的DNA的过表达载体

[0118] 作为对照组,由谷氨酸棒状杆菌KCCM11201P(其是生产L-缬氨酸的菌株)制备用于L-缬氨酸生物合成的过表达载体。另外,制备用于L-缬氨酸生物合成的过表达载体——其中包括编码来自实施例7制备的KCCM11201P::ilvB(W503Q)和KCCM11201P::ilvB(T96S)中的每一个的修饰的乙酰羟酸合酶的DNA。

[0119] 为制备以上载体,合成引物13(SEQ ID NO:18)——其中在5′端插入BamHI限制位点,和引物14(SEQ ID NO:19)——其中在3′端插入XbaI限制位点。利用该引物组,使用谷氨酸棒状杆菌KCCM11201P(即,生产L-缬氨酸的菌株)和实施例7所制菌株(即,KCCM11201P::ilvB(W503Q)和KCCM11201P::ilvB(T96S))的各染色体DNA作为模板进行PCR,从而扩增两种修饰的ilvBN基因片段。PCR如下进行:在94℃下变性5min;30个循环的在94℃变性30秒、在56℃下退火30秒,和在72℃下聚合4min;以及在72℃下聚合7min。

[0120] 引物13(SEQ ID NO:18):5′-CGAGG ATCCA ACCGG TATCG ACAAT CCAAT-3′

[0121] 引物14(SEQ ID NO:19):5′-CTGTC TAGAA ATCGT GGGAG TTAAA CTCGC-3′

[0122] 用BamHI和XbaI处理通过PCR扩增的两种基因片段,以获得其对应的DNA片段。将这些DNA片段与具有BamHI和XbaI限制位点的pECCG117过表达载体连接,转化到大肠杆菌DH5α

中,并平板接种于含有卡那霉素(25mg/L)的固体LB培养基上。

[0123] 通过PCR选择被插入有目标基因的载体转化的菌落,并通过公知的质粒提取方法获得质粒。这些质粒命名为pECCG117-ilvBN、pECCG117-ilvB(W503Q)N和pECCG117-ilvB(T96S)N——分别根据插入ilvB基因中的修饰。

[0124] 实施例9:制备用于L-缬氨酸生物合成的、含有编码修饰乙酰羟酸合酶的DNA的、其中氨基酸被相同位置的另一氨基酸取代的过表达载体

[0125] 在实施例5中确认的修饰乙酰羟酸合酶蛋白中,为确认位置在修饰中的作用,制备其中第96位氨基酸被苏氨酸或丝氨酸以外的氨基酸取代和第503位氨基酸被色氨酸或谷氨酰胺以外的氨基酸取代的载体。

[0126] 具体地,由谷氨酸棒状杆菌KCCM11201P(其是生产L-缬氨酸的菌株)制备用于L-缬氨酸生物合成的过表达载体——其中有乙酰羟酸合酶的第503位氨基酸被天冬酰胺或亮氨酸取代的修饰或其中第96位氨基酸被丙氨酸或半胱氨酸取代的修饰。取代的氨基酸仅是可取代的代表性氨基酸的实例,并且氨基酸不限制于此。

[0127] 为制备这些载体,首先,利用谷氨酸棒状杆菌KCCM11201P的染色体DNA作为模板以及引物13(SEQ ID NO:18)和引物15(SEQ ID NO:20)的引物组以及引物16(SEQ ID NO:21)和引物14(SEQ ID NO:19)的引物组进行PCR,从而扩增在5′端具有BamHI限制位点的约2,041bp DNA片段和在3′端具有XbaI限制位点的1,055bp DNA片段。PCR如下进行:在94℃下变性5min;30个循环的在94℃下变性30秒,在56℃退火30秒,和在72℃下聚合2min;以及在72℃下聚合7min。

[0128] 引物15(SEQ ID NO:20):5′-CTTCA TAGAA TAGGG TCTGG TTTTG GCGAA CCATG CCCAG-3′

[0129] 引物16(SEQ ID NO:21):5′-CTGGG CATGG TTCGC CAAAA CCAGA CCCTA TTCTA TGAAG-3′

[0130] 然后,利用两个扩增的DNA片段作为模板以及引物13(SEQ ID NO:18)和引物14(SEQ ID NO:19)的引物组进行PCR。PCR如下进行:在94℃下变性5min;30个循环的在94℃下变性30秒,在56℃下退火30秒,和在72℃下聚合4min;以及在72℃下聚合7min。

[0131] 结果是,获得ilvBN基因片段,其中有乙酰羟酸合酶的第503位氨基酸被天冬酰胺取代的修饰。

[0132] 以相同的方式,利用谷氨酸棒状杆菌KCCM11201P的染色体DNA作为模板以及引物13(SEQ ID NO:18)和引物17(SEQ ID NO:22)的引物组以及引物18(SEQ ID NO:23)和引物14(SEQ ID NO:19)的引物组进行PCR,从而扩增在5′端具有BamHI限制位点的约2,041bp DNA片段和在3′端具有XbaI限制位点的1,055bp DNA片段。

[0133] 引物17(SEQ ID NO:22):5′-CTTCA TAGAA TAGGG TCTGC AGTTG GCGAA CCATG CCCAG-3′

[0134] 引物18(SEQ ID NO:23):5′-CTGGG CATGG TTCGC CAACT GCAGA CCCTA TTCTA TGAAG-3′

[0135] 然后,利用两个扩增的DNA片段作为模板以及引物13(SEQ ID NO:18)和引物14(SEQ ID NO:19)的引物组进行PCR。

[0136] 结果是,获得ilvBN基因片段,其中有乙酰羟酸合酶的第503位氨基酸被亮氨酸取

代的修饰。

[0137] 以相同的方式,利用谷氨酸棒状杆菌KCCM11201P的染色体DNA作为模板以及引物13(SEQ ID NO:18)和引物19(SEQ ID NO:24)的引物组与引物20(SEQ ID NO:25)和引物14(SEQ ID NO:19)的引物组进行PCR,从而扩增在5′端具有BamHI限制位点的约819bp DNA片段和在3′端具有XbaI限制位点的2,276bp DNA片段。

[0138] 引物19(SEQ ID NO:24):5′-GGTTG CGCCT GGGCC AGATG CTGCA ATGCA GACGC CAAC-3′

[0139] 引物20(SEQ ID NO:25):5′-GTTGG CGTCT GCATT GCAGC ATCTG GCCCA GGCGC AACC-3′

[0140] 然后,利用两个扩增的DNA片段作为模板以及引物13(SEQ ID NO:18)和引物14(SEQ ID NO:19)的引物组进行PCR。

[0141] 结果是,获得ilvBN基因片段,其中有乙酰羟酸合酶的第96位氨基酸被丙氨酸取代的修饰。

[0142] 以相同的方式,利用谷氨酸棒状杆菌KCCM11201P的染色体DNA作为模板以及引物13(SEQ ID NO:18)和引物21(SEQ ID NO:26)的引物组以及引物22(SEQ ID NO:27)和引物14(SEQ ID NO:19)的引物组进行PCR,从而扩增在5′端具有BamHI限制位点的约819bp DNA片段和在3′端具有XbaI限制位点的2,276bp DNA片段。

[0143] 引物21(SEQ ID NO:26):5′-GGTTG CGCCT GGGCC AGAGC ATGCA ATGCA GACGC CAAC-3′

[0144] 引物22(SEQ ID NO:27):5′-GTTGG CGTCT GCATT GCATG CTCTG GCCCA GGCGC AACC-3′

[0145] 然后,利用两个扩增的DNA片段作为模板以及引物13(SEQ ID NO:18)和引物14(SEQ ID NO:19)的引物组进行PCR。

[0146] 结果是,获得ilvBN基因片段,其中有乙酰羟酸合酶的第96位氨基酸被半胱氨酸取代的修饰。

[0147] 利用与实施例8中相同的方法,用限制酶BamHI和XbaI处理四种PCR扩增的修饰基因片段,从而获得对应的DNA片段。将这些DNA片段分别与具有BamHI和XbaI限制位点的过表达载体pECCG117连接,转化到大肠杆菌DH5α中,并平板接种于含有卡那霉素(25mg/L)的固体LB培养基上。

[0148] 通过PCR选择被插入有目标基因的载体转化的菌落,并通过公知的质粒提取方法获得质粒。这些质粒分别命名为pECCG117-ilvB(W503N)N、pECCG117-ilvB(W503L)N、pECCG117-ilvB(T96A)N和pECCG117-ilvB(T96C)N——分别根据插入ilvB基因的修饰的序列,。

[0149] 实施例10:其中引入野生型来源修饰乙酰羟酸合酶的菌株的制备和L-缬氨酸生产能力的比较

[0150] 通过电穿孔将实施例8和9制备的用于L-缬氨酸生物合成的过表达载体(即,pECCG117-ilvBN、pECCG117-ilvB(W503Q)N、pECCG117-ilvB(T96S)N和pECCG117-ilvB(W503N)N、pECCG117-ilvB(W503L)N、pECCG117-ilvB(T96A)N和pECCG117-ilvB(T96C)N)分别插入野生型谷氨酸棒状杆菌菌株(ATCC13032)中。将制备的菌株分别命名为谷氨酸棒状

杆菌ATCC13032::pECCG117-ilvBN、谷氨酸棒状杆菌ATCC13032::pECCG117-ilvB(W503Q)N、谷氨酸棒状杆菌ATCC13032::pECCG117-ilvB(T96S)N、谷氨酸棒状杆菌ATCC13032::pECCG117-ilvB(W503N)N、谷氨酸棒状杆菌ATCC13032::pECCG117-ilvB(W503L)N、谷氨酸棒状杆菌ATCC13032::pECCG117-ilvB(T96A)N和谷氨酸棒状杆菌ATCC13032::pECCG117-ilvB(T96C)N。

[0151] 由于用这些载体转化的那些菌株将获得卡那霉素抗性，通过检验这些菌株在含有25mg/L浓度的卡那霉素的培养基中的生长来确认转化的存在。

[0152] 将各菌株接种到含有25mL生长培养基的250mL角-挡板烧瓶中，并在30℃下伴以200rpm振荡培养72小时。通过HPLC分析各培养物中L-缬氨酸的浓度(表4)。

[0153] [表4]

[0154]

	其中引入有野生型来源的修饰乙酰羟酸合酶的菌株的 L-缬氨酸生产浓度				
	菌株	L-缬氨酸（g/L）			
		批次 1	批次 2	批次 3	平均
对照	ATCC13032::pECCG117-ilvBN	0.1	0.1	0	0.1
1	ATCC13032::pECCG117-ilvB(W503Q)N	0.8	0.8	0.7	0.8
2	ATCC13032::pECCG117-ilvB(T96S)N	0.4	0.5	0.5	0.5
3	ATCC13032::pECCG117-ilvB(W503N)N	0.7	0.6	0.5	0.6
4	ATCC13032::pECCG117-ilvB(W503L)N	0.7	0.7	0.5	0.5
5	ATCC13032::pECCG117-ilvB(T96A)N	0.2	0.3	0.2	0.2
6	ATCC13032::pECCG117-ilvB(T96C)N	0.4	0.3	0.5	0.4

[0155] 结果是，确认乙酰羟酸合酶的第96位或第503位氨基酸被另一氨基酸取代的新修饰显示L-缬氨酸生产能力与对照组相比最大增加700％。该结果确认乙酰羟酸合酶的第96位和第503位氨基酸位置的重要性，并且预期这些氨基酸位置会影响生产其它支链氨基酸以及L-缬氨酸的能力。

[0156] 实施例11：制备其中引入有修饰乙酰羟酸合酶的菌株和比较L-缬氨酸生产能力

[0157] 为确认本公开的乙酰羟酸合酶大亚基变体是否对生产其它L-支链氨基酸的能力的增加具有影响，作为L-支链氨基酸的另一实施方式，考察生产L-亮氨酸的能力。

[0158] 具体地，通过两步同源重组将实施例6中制备的引入有新修饰的两种载体各自转化到谷氨酸棒状杆菌KCCM11661P(韩国专利申请号10-2015-0119785和韩国专利申请公开号10-2017-0024653)(其是生产L-亮氨酸的菌株)中。然后，通过核苷酸序列分析，选择其染色体上引入了ilvB基因修饰的菌株，并将其中引入有ilvB基因修饰的菌株命名为KCCM11661P::ilvB(W503Q)和KCCM11661P::ilvB(T96S)。

[0159] 对正亮氨酸(NL)具有抗性的谷氨酸棒状杆菌KCCM11661P是源自谷氨酸棒状杆菌ATCC 14067的突变菌株，并如下获得。

[0160] 具体地，将谷氨酸棒状杆菌ATCC 14067在活化培养基中培养16小时，并将活化的菌株接种到在121℃下灭菌5分钟的种子培养基中，并培养14小时，并回收5mL培养物。将回收的培养物用100mM柠檬酸缓冲液洗涤并向其加入N-甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍(NTG)至200mg/L的最终浓度并处理20分钟，并用100mM磷酸缓冲液洗涤。将用NTG处理的菌株平板接种于最低限度培养基上并计算死亡率，结果是，显示死亡率为85％。

[0161] 为获得对正亮氨酸(NL)具有抗性的突变菌株，将NTG处理的菌株平板接种于分别含有20mM、30mM、40mM和50mM最终浓度的NL的最低限度培养基上。然后，将菌株在30℃下培养5天，从而获得NL抗性突变菌株。

[0162] <活化培养基>

[0163] 肉汁(Meat Juice)(1％)、聚蛋白胨(1％)、NaCl(0.5％)、酵母提取物(1％)、琼脂(2％)、pH 7.2

[0164] <种子培养基>

[0165] 葡萄糖(5％)、细菌用蛋白胨(1％)、NaCl(0.25％)、酵母提取物(1％)、尿素(0.4％)、pH 7.2

[0166] <基本培养基>

[0167] 葡萄糖(1％)、硫酸铵(0.4％)、硫酸镁(0.04％)、磷酸二氢钾(0.1％)、尿素(0.1％)、硫胺素(0.001％)、生物素(200μg/L)、琼脂(2％)、pH 7.0

[0168] 由此获得的突变菌株被命名为谷氨酸棒状杆菌KCJ-24，并于2015年1月22日保藏于根据布达佩斯条约被认定为国际保藏机构的韩国微生物保藏中心(KCCM)(韩国，首尔)，保藏号为KCCM11661P。

[0169] 以与实施例4中相同的方式培养KCCM11661P::ilvB(W503Q)和KCCM11661P::ilvB(T96S)，并分析其中各培养物中的L-亮氨酸浓度(表5)。

[0170] [表5]

[0171]

其中引入有 KCCM11661P 源修饰乙酰羟酸合酶的菌株的 L-亮氨酸生产浓度（g/L）					
	菌株	批次 1	批次 2	批次 3	平均

[0172]

对照	KCCM11661P	2.7	2.6	2.9	2.7
1	KCCM11661P::*ilvB*(W503Q)	3.1	3.3	3.3	3.2
2	KCCM11661P P::*ilvB*(T96S)	3.0	3.2	3.1	3.1

[0173] 引入有新修饰的两种菌株(即，KCCM11661P::ilvB(W503Q)和KCCM11661P::ilvB(T96S))显示与其亲株相比L-亮氨酸生产能力最大增加26.9％。

[0174] 实施例12：制备其中引入有KCCM11662P源修饰乙酰羟酸合酶的菌株和比较L-亮氨酸生产能力

[0175] 通过两步同源重组将实施例6中制备的其中引入有新修饰的两种载体转化到谷氨酸棒状杆菌KCCM11662P(韩国专利申请号10-2015-0119785和韩国专利申请公开号10-2017-0024653)(其是生产L-亮氨酸的菌株)中。然后，通过核苷酸序列分析，选择其染色体

上引入有ilvB基因修饰的菌株，并将其中引入有ilvB基因修饰的菌株命名为KCCM11662P::ilvB(W503Q)和KCCM11662P::ilvB(T96S)。

[0176] 对正亮氨酸(NL)具有抗性的谷氨酸棒状杆菌KCCM11662P是源自谷氨酸棒状杆菌ATCC 13869的突变菌株，并如下获得。

[0177] 具体地，使用谷氨酸棒状杆菌ATCC 13869作为亲株，以实施例11中为获得KCCM11662P的相同方式培养菌株，并最终获得NL抗性突变菌株。

[0178] 由此获得的突变菌株被命名为谷氨酸棒状杆菌KCJ-28，并于2015年1月22日保藏于根据布达佩斯条约被认定为国际保藏机构的韩国微生物保藏中心(KCCM)(韩国，首尔)，保藏号为KCCM11662P。

[0179] 以与实施例4中相同的方式培养KCCM11662P::ilvB(W503Q)和KCCM11662P::ilvB(T96S)，并分析其中各培养物中的L-亮氨酸浓度(表6)。

[0180] [表6]

[0181]

其中引入有 KCCM11662P 源的修饰乙酰羟酸合酶的菌株的 L-亮氨酸生产浓度（g/L）					
	菌株	批次 1	批次 2	批次 3	平均
对照	KCCM11662P	3.1	3.0	3.1	3.1
1	KCCM11662P::*ilvB*(W503Q)	3.5	3.4	3.3	3.4
2	KCCM11662	3.3	3.3	3.2	3.3

[0182]

	P P::*ilvB*(T96S)				

[0183] 其中引入有新修饰的两种菌株(即，KCCM11662P::ilvB(W503Q)和KCCM11662P::ilvB(T96S))显示与其亲株相比L-亮氨酸生产能力最大增加13.3％。

[0184] 基于前述，本公开所属领域技术人员将能够理解，本公开可以其它具体形式实施，而不改变本公开的技术思路或本质特征。关于这点，本文公开的示例性实施方式仅用于示例性目的，而不应解释为限制本公开的范围。相反，本公开不仅旨在涵盖示例性实施方式，还涵盖所附权利要求限定的、本公开的精神和范围内可包括的各种替代形式、改动、等同形式和其它实施方式。

[0185] 关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约国际形式

[0186] CJ第一制糖株式会社 由本页底部确定的国际保藏

[0187] CJ第一制糖中心， 机构依照第7.1条发布的原

[0188] 330,DONGHO-RO， 始保藏收据

[0189] JUNG-GU,首尔100-400，

[0190] 大韩民国

[0191]

I. 微生物鉴定	
由保藏者提供鉴定参考： 谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicu*）KCJ-0793	由国际保藏机构提供登录号： KCCM11809P
II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
如上I鉴定的微生物带有： □科学描述 □建议的分类学名称 （用交叉标记可应用的）	
III. 收到和验收	
该国际保藏机构验收如上I鉴定的微生物，其于2016年1月25日收到。（原始保藏日）[1]	
IV. 国际保藏机构	
名称：韩国微生物保藏中心 地址：Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 120-861 大韩民国	具有代表国际保藏机构的能力的自然人或机构官员签名：（盖章） 日期：2016年1月25日

[0192] 证明上述翻译与原文无误

[0193] 2017年7月11日

[0194] 专利代理人 Son Min印

[0195] 关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约国际形式

[0196] CJ第一制糖株式会社 由本页底部确定的国际保藏

[0197] CJ第一制糖中心， 机构依照第7.1条发布的原

[0198] 330,DONGHO-RO， 始保藏收据

[0199] JUNG-GU,首尔100-400，

[0200] 大韩民国

[0201]

I. 微生物鉴定	
由保藏者提供鉴定参考： 谷氨酸棒状杆菌 KCJ-0796	由国际保藏机构提供登录号： KCCM11810P
II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
如上 I 鉴定的微生物带有： □科学描述 □建议的分类学名称 （用交叉标记可应用的）	
III. 收到和验收	
该国际保藏机构验收如上 I 鉴定的微生物，其于 2016 年 1 月 25 日收到。（原始保藏日）[1]	
IV. 国际保藏机构	
名称：韩国微生物保藏中心 地址：Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 120-861 大韩民国	具有代表国际保藏机构的能力的自然人或机构官员签名：（盖章） 日期：2016 年 1 月 25 日

[0202] 证明上述翻译与原文无误

[0203] 2017年7月11日

[0204] 专利代理人 Son Min印

[0001] <110> CJ第一制糖株式会社

[0002] <120> 乙酰羟酸合酶变体、包含其的微生物和用其生产L-支链氨基酸的方法

[0003] <130> OPA18190

[0004] <150> KR 10-2017-0087978

[0005] <151> 2017-07-11

[0006] <160> 39

[0007] <170> KopatentIn 2.0

[0008] <210> 1

[0009] <211> 626

[0010] <212> PRT

[0011] <213> 人工序列

[0012] <220>

[0013] <223> 乙酰羟酸合酶

[0014] <400> 1

[0015] Met Asn Val Ala Ala Ser Gln Gln Pro Thr Pro Ala Thr Val Ala Ser

[0016] 1 5 10 15

[0017] Arg Gly Arg Ser Ala Ala Pro Glu Arg Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile

[0018] 20 25 30

[0019] Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro

[0020] 35 40 45

[0021] Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys

[0022] 50 55 60

[0023] Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu Gln Gly Ala Gly His Ala Ala

[0024] 65 70 75 80

[0025] Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Thr

[0026] 85 90 95

[0027] Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn

[0028] 100 105 110

[0029] Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly

[0030] 115 120 125

[0031] Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr

[0032] 130 135 140

[0033] Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile

[0034] 145 150 155 160

[0035] Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro

[0036] 165 170 175

[0037] Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu

[0038] 180 185 190

[0039] Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val

[0040] 195 200 205

[0041] Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly

[0042] 210 215 220

[0043] Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Ile Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala

[0044] 225 230 235 240

[0045] Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro

[0046] 245 250 255

[0047] Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly Thr Phe Pro Glu Ser His Glu

[0048] 260 265 270

[0049] Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His Gly Thr Val Ser Ala Val Gly

[0050] 275 280 285

[0051] Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp

[0052] 290 295 300

[0053] Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile

[0054] 305 310 315 320

[0055] Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val

[0056] 325 330 335

[0057] Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu

[0058] 340 345 350

[0059] Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp

[0060] 355 360 365

[0061] Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp

[0062] 370 375 380

[0063] Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu

[0064] 385 390 395 400

[0065] Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln

[0066] 405 410 415

[0067] His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr

[0068] 420 425 430

[0069] Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala

[0070] 435 440 445

[0071] Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile

[0072] 450 455 460

[0073] Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala

[0074] 465 470 475 480

[0075] Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn

[0076] 485 490 495

[0077] Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Thr Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr

[0078] 500 505 510

[0079] Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val

[0080] 515 520 525

[0081] Thr Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala

[0082] 530 535 540

[0083] Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg

[0084] 545 550 555 560

[0085] Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro

[0086] 565 570 575

[0087] Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly

[0088] 580 585 590

[0089] Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala

[0090] 595 600 605

[0091] Asp Ile His Glu Ala Val Ser Asp Ile Asp Ala Ala Val Glu Ser Thr

[0092] 610 615 620

[0093] Glu Ala

[0094] 625

[0095] <210> 2

[0096] <211> 1881

[0097] <212> DNA

[0098] <213> 人工序列

[0099] <220>

[0100] <223> 乙酰羟酸合酶

[0101] <400> 2

[0102] gtgaatgtgg cagcttctca acagcccact cccgccacgg ttgcaagccg tggtcgatcc 60

[0103] gccgcccctg agcggatgac aggtgcacag gcaattgttc gatcgctcga ggagcttaac 120

[0104] gccgacatcg tgttcggtat tcctggtggt gcggtgctac cggtgtatga cccgctctat 180

[0105] tcctccacaa aggtgcgcca cgtcctggtg cgccacgagc agggcgcagg ccacgcagca 240

[0106] accggctacg cgcaggttac tggacgcgtt ggcgtctgca ttgcaacctc tggcccaggc 300

[0107] gcaaccaact tggttacccc aatcgctgat gcaaacttgg actccgttcc catggttgcc 360

[0108] atcaccggcc aggtcggaag tggcctgctg ggtaccgatg ctttccagga agccgatatc 420

[0109] cgcggcatca ccatgccagt gaccaagcac aacttcatgg tcaccgaccc caacgacatt 480

[0110] ccacaggcat tggctgaggc attccacctc gcgattactg gtcgccctgg ccctgttctg 540

[0111] gtggatattc ctaaggatgt ccaaaacgct gaattggatt tcgtctggcc accaaagatc 600

[0112] gacctgccag gctaccgccc agtttctact ccgcatgctc gacagattga gcaggctgtc 660

[0113] aaactgatcg gtgaagccaa aaagccagtc ctttacattg gcggcggcgt tatcaaggct 720

[0114] gatgcacacg aagaactgcg tgcatttgct gagtacaccg gcatcccagt tgtcaccacc 780

[0115] ttgatggcat tgggtacctt cccagagtcc cacgagctgc acatgggtat gccaggcatg 840

[0116] cacggcaccg tgtccgctgt tggcgcactg cagcgcagtg acctgctgat tgctatcggt 900

[0117] tcccgcttcg acgaccgcgt caccggtgac gttgacacct tcgcacctga tgccaagatc 960

[0118] attcacgctg acattgatcc tgccgaaatc ggcaagatca agcaggttga ggttccaatc 1020

[0119] gtgggcgatg cccgcgaggt tcttgctcgt ctgctggaaa ccaccaaggc aagcaaggca 1080

[0120] gagaccgagg acatctccga gtgggttgat tacctcaagg gcctcaaggc acgtttccca 1140

[0121] cgtggctacg acgagcagcc aggcgatctg ctggcaccac agtttgtcat tgaaaccctg 1200

[0122] tccaaggaag ttggccccga cgcaatttac tgcgccggcg ttggccagca ccagatgtgg 1260

[0123] gcagctcagt tcgttgactt tgaaaagcca cgcacctggc tcaactctgg cggcctgggc 1320

[0124] accatgggct acgcagttcc tgcggctctt ggagcaaagg ctggcgcacc tgacaaggaa 1380

[0125] gtctgggcta tcgacggcga cggctgtttc agatgacca accaggaact caccaccgcc 1440

[0126] gcagttgaag gtttccccat taagatcgca ctaatcaaca acggaaacct gggcatggtt 1500

[0127] cgccaatggc agaccctatt ctatgaagga cggtactcaa atactaaact tcgtaaccag 1560

[0128] ggcgagtaca tgcccgactt tgttaccctt tctgagggac ttggctgtgt tgccatccgc 1620

[0129] gtcaccaaag cggaggaagt actgccagcc atccaaaagg ctcgagagat caacgaccgc 1680

[0130] ccagtagtca tcgacttcat cgtcggtgaa gacgcacagg tatggccaat ggtgtctgct 1740

[0131] ggatcatcca actccgatat ccagtacgca ctcggattgc gcccattctt tgatggtgat 1800

[0132] gaatctgcag cagaagatcc tgccgacatt cacgaagccg tcagcgacat tgatgccgcc 1860

[0133] gttgaatcga ccgaggcata a 1881

[0134] <210> 3

[0135] <211> 21

[0136] <212> DNA

[0137] <213> 人工序列

[0138] <220>

[0139] <223> 引物1

[0140] <400> 3

[0141] aaccggtatc gacaatccaa t 21

[0142] <210> 4

[0143] <211> 19

[0144] <212> DNA

[0145] <213> 人工序列

[0146] <220>

[0147] <223> 引物2

[0148] <400> 4

[0149] gggtctctcc ttatgcctc 19

[0150] <210> 5

[0151] <211> 27

[0152] <212> DNA

[0153] <213> 人工序列

[0154] <220>

[0155] <223> 引物3

[0156] <400> 5

[0157] gcgtctagag acttgcacga ggaaacg 27

[0158] <210> 6

[0159] <211> 36

[0160] <212> DNA

[0161] <213> 人工序列

[0162] <220>

[0163] <223> 引物4

[0164] <400> 6

[0165] cagccaagtc cctcagaatt gatgtagcaa ttatcc 36

[0166] <210> 7

[0167] <211> 36

[0168] <212> DNA
[0169] <213> 人工序列
[0170] <220>
[0171] <223> 引物5
[0172] <400> 7
[0173] ggataattgc tacatcaatt ctgagggact tggctg 36
[0174] <210> 8
[0175] <211> 27
[0176] <212> DNA
[0177] <213> 人工序列
[0178] <220>
[0179] <223> 引物6
[0180] <400> 8
[0181] gcgtctagaa ccacagagtc tggagcc 27
[0182] <210> 9
[0183] <211> 731
[0184] <212> DNA
[0185] <213> 人工序列
[0186] <220>
[0187] <223> ilvB 5'片段
[0188] <400> 9
[0189] gcgtctagag acttgcacga ggaaacgcat ggtgaccatc cacggcatgc cgaccaccgt 60
[0190] tggcggtgtg acttccgtgg ctgggtgcac atcgagttca ccgaggattt ccggtgcgat 120
[0191] tttctcctgg ccaagtgcgc gacgagtcgc agcttcagag cgcgcgatga catctgtgat 180
[0192] gttttcagaa cccaacatgg ggatcggaat aacgacaacc gcacgcgacc agttattaga 240
[0193] attgttgatg cacactttcg ccgtggagtt ggggatgatc acggtctctt gtgcaatcgt 300
[0194] gcgaattttg gtcgcgcgca tggtgatctc aatgacggtg ccttcgacaa cgatgccgtt 360
[0195] gccctcaaaa cgcacccagt cacccacgcc gaattgcttt tccgtcagga tgaaaaatcc 420
[0196] ggccaagaag tccgcaacaa tcgactgcgc accaaggcca atggcagctg acgcaatggt 480
[0197] tgccggaatc gcagcgcccg cgagagagaa accaaaagcc tgcatcgcgg agacggcaag 540
[0198] catgaaaaac gccacaattt gcgcgatata aacgccaacg ccagcgaacg cgagctggtt 600
[0199] cttagtggtg tccgcatcgg ctgcagactc cactcgccgc ttgataatac gcatggccag 660
[0200] tcggccgata cgtggaatca aaaacgccaa gaccaggata attgctacat caattctgag 720
[0201] ggacttggct g 731
[0202] <210> 10
[0203] <211> 712
[0204] <212> DNA
[0205] <213> 人工序列
[0206] <220>
[0207] <223> ilvB 3'片段
[0208] <400> 10
[0209] ggataattgc tacatcaatt ctgagggact tggctgtgtt gccatccgcg tcaccaaagc 60

[0210] ggaggaagta ctgccagcca tccaaaaggc tcgagagatc aacgaccgcc cagtagtcat 120
[0211] cgacttcatc gtcggtgaag acgcacaggt atggccaatg gtgtctgctg gatcatccaa 180
[0212] ctccgatatc cagtacgcac tcggattgcg cccattcttt gatggtgatg aatctgcagc 240
[0213] agaagatcct gccgacattc acgaagccgt cagcgacatt gatgccgccg ttgaatcgac 300
[0214] cgaggcataa ggagagaccc aagatggcta attctgacgt cacccgccac atcctgtccg 360
[0215] tactcgttca ggacgtagac ggaatcattt cccgcgtatc aggtatgttc acccgacgcg 420
[0216] cattcaacct cgtgtccctc gtgtctgtaa agaccgaaac actcggcatc aaccgcatca 480
[0217] cggttgttgt cgacgccgac gagctcaaca ttgagcagat caccaagcag ctcaacaagc 540
[0218] tgatccccgt gctcaaagtc gtgcgacttg atgaagagac caccatcgcc cgcgcaatca 600
[0219] tgctggttaa ggtctctgcg gatagcacca accgtccgca gatcgtcgac gccgcgaaca 660
[0220] tcttccgcgc ccgagtcgtc gacgtggctc cagactctgt ggttctagac gc 712
[0221] <210> 11
[0222] <211> 1407
[0223] <212> DNA
[0224] <213> 人工序列
[0225] <220>
[0226] <223> ilvB 5’ + 3’片段
[0227] <400> 11
[0228] gcgtctagag acttgcacga ggaaacgcat ggtgaccatc cacggcatgc cgaccaccgt 60
[0229] tggcggtgtg acttccgtgg ctgggtgcac atcgagttca ccgaggattt ccggtgcgat 120
[0230] tttctcctgg ccaagtgcgc gacgagtcgc agcttcagag cgcgcgatga catctgtgat 180
[0231] gttttcagaa cccaacatgg ggatcggaat aacgacaacc gcacgcgacc agttattaga 240
[0232] attgttgatg cacactttcg ccgtggagtt ggggatgatc acggtctctt gtgcaatcgt 300
[0233] gcgaattttg gtcgcgcgca tggtgatctc aatgacggtg ccttcgacaa cgatgccgtt 360
[0234] gccctcaaaa cgcacccagt cacccacgcc gaattgcttt tccgtcagga tgaaaaatcc 420
[0235] ggccaagaag tccgcaacaa tcgactgcgc accaaggcca atggcagctg acgcaatggt 480
[0236] tgccggaatc gcagcgcccg cgagagagaa accaaaagcc tgcatcgcgg agacggcaag 540
[0237] catgaaaaac gccacaattt gcgcgatata aacgccaacg ccagcgaacg cgagctggtt 600
[0238] cttagtggtg tccgcatcgg ctgcagactc cactcgccgc ttgataatac gcatggccag 660
[0239] tcggccgata cgtggaatca aaaacgccaa gaccaggata attgctacat caattctgag 720
[0240] ggacttggct gtgttgccat ccgcgtcacc aaagcggagg aagtactgcc agccatccaa 780
[0241] aaggctcgag agatcaacga ccgcccagta gtcatcgact tcatcgtcgg tgaagacgca 840
[0242] caggtatggc caatggtgtc tgctggatca tccaactccg atatccagta cgcactcgga 900
[0243] ttgcgcccat tctttgatgg tgatgaatct gcagcagaag atcctgccga cattcacgaa 960
[0244] gccgtcagcg acattgatgc cgccgttgaa tcgaccgagg cataaggaga gacccaagat 1020
[0245] ggctaattct gacgtcaccc gccacatcct gtccgtactc gttcaggacg tagacggaat 1080
[0246] catttcccgc gtatcaggta tgttcacccg acgcgcattc aacctcgtgt ccctcgtgtc 1140
[0247] tgtaaagacc gaaacactcg gcatcaaccg catcacggtt gttgtcgacg ccgacgagct 1200
[0248] caacattgag cagatcacca agcagctcaa caagctgatc cccgtgctca aagtcgtgcg 1260
[0249] acttgatgaa gagaccacca tcgcccgcgc aatcatgctg gttaaggtct ctgcggatag 1320
[0250] caccaaccgt ccgcagatcg tcgacgccgc gaacatcttc cgcgcccgag tcgtcgacgt 1380
[0251] ggctccagac tctgtggttc tagacgc 1407

[0252] <210> 12

[0253] <211> 18

[0254] <212> DNA

[0255] <213> 人工序列

[0256] <220>

[0257] <223> 引物7

[0258] <400> 12

[0259] cgcttgataa tacgcatg 18

[0260] <210> 13

[0261] <211> 18

[0262] <212> DNA

[0263] <213> 人工序列

[0264] <220>

[0265] <223> 引物8

[0266] <400> 13

[0267] gaacatacct gatacgcg 18

[0268] <210> 14

[0269] <211> 27

[0270] <212> DNA

[0271] <213> 人工序列

[0272] <220>

[0273] <223> 引物9

[0274] <400> 14

[0275] cgctctagac aagcaggttg aggttcc 27

[0276] <210> 15

[0277] <211> 27

[0278] <212> DNA

[0279] <213> 人工序列

[0280] <220>

[0281] <223> 引物10

[0282] <400> 15

[0283] cgctctagac acgaggttga atgcgcg 27

[0284] <210> 16

[0285] <211> 27

[0286] <212> DNA

[0287] <213> 人工序列

[0288] <220>

[0289] <223> 引物11

[0290] <400> 16

[0291] cgctctagac cctcgacaac actcacc 27

[0292] <210> 17

[0293] <211> 27

[0294] <212> DNA
[0295] <213> 人工序列
[0296] <220>
[0297] <223> 引物12
[0298] <400> 17
[0299] cgctctagat gccatcaagg tggtgac 27
[0300] <210> 18
[0301] <211> 30
[0302] <212> DNA
[0303] <213> 人工序列
[0304] <220>
[0305] <223> 引物13
[0306] <400> 18
[0307] cgaggatcca accggtatcg acaatccaat 30
[0308] <210> 19
[0309] <211> 30
[0310] <212> DNA
[0311] <213> 人工序列
[0312] <220>
[0313] <223> 引物14
[0314] <400> 19
[0315] ctgtctagaa atcgtgggag ttaaactcgc 30
[0316] <210> 20
[0317] <211> 40
[0318] <212> DNA
[0319] <213> 人工序列
[0320] <220>
[0321] <223> 引物15
[0322] <400> 20
[0323] cttcatagaa tagggtctgg ttttggcgaa ccatgcccag 40
[0324] <210> 21
[0325] <211> 40
[0326] <212> DNA
[0327] <213> 人工序列
[0328] <220>
[0329] <223> 引物16
[0330] <400> 21
[0331] ctgggcatgg ttcgccaaaa ccagacccta ttctatgaag 40
[0332] <210> 22
[0333] <211> 40
[0334] <212> DNA
[0335] <213> 人工序列

[0336] <220>

[0337] <223> 引物17

[0338] <400> 22

[0339] cttcatagaa tagggtctgc agttggcgaa ccatgcccag 40

[0340] <210> 23

[0341] <211> 40

[0342] <212> DNA

[0343] <213> 人工序列

[0344] <220>

[0345] <223> 引物18

[0346] <400> 23

[0347] ctgggcatgg ttcgccaact gcagacccta ttctatgaag 40

[0348] <210> 24

[0349] <211> 39

[0350] <212> DNA

[0351] <213> 人工序列

[0352] <220>

[0353] <223> 引物19

[0354] <400> 24

[0355] ggttgcgcct gggccagatg ctgcaatgca gacgccaac 39

[0356] <210> 25

[0357] <211> 39

[0358] <212> DNA

[0359] <213> 人工序列

[0360] <220>

[0361] <223> 引物20

[0362] <400> 25

[0363] gttggcgtct gcattgcagc atctggccca ggcgcaacc 39

[0364] <210> 26

[0365] <211> 39

[0366] <212> DNA

[0367] <213> 人工序列

[0368] <220>

[0369] <223> 引物21

[0370] <400> 26

[0371] ggttgcgcct gggccagagc atgcaatgca gacgccaac 39

[0372] <210> 27

[0373] <211> 39

[0374] <212> DNA

[0375] <213> 人工序列

[0376] <220>

[0377] <223> 引物22

[0378] <400> 27

[0379] gttggcgtct gcattgcatg ctctggccca ggcgcaacc 39

[0380] <210> 28

[0381] <211> 626

[0382] <212> PRT

[0383] <213> 人工序列

[0384] <220>

[0385] <223> T96S

[0386] <400> 28

[0387] Met Asn Val Ala Ala Ser Gln Gln Pro Thr Pro Ala Thr Val Ala Ser

[0388] 1 5 10 15

[0389] Arg Gly Arg Ser Ala Ala Pro Glu Arg Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile

[0390] 20 25 30

[0391] Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro

[0392] 35 40 45

[0393] Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys

[0394] 50 55 60

[0395] Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu Gln Gly Ala Gly His Ala Ala

[0396] 65 70 75 80

[0397] Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Ser

[0398] 85 90 95

[0399] Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn

[0400] 100 105 110

[0401] Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly

[0402] 115 120 125

[0403] Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr

[0404] 130 135 140

[0405] Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile

[0406] 145 150 155 160

[0407] Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro

[0408] 165 170 175

[0409] Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu

[0410] 180 185 190

[0411] Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val

[0412] 195 200 205

[0413] Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly

[0414] 210 215 220

[0415] Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Ile Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala

[0416] 225 230 235 240

[0417] Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro

[0418] 245 250 255

[0419] Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly Thr Phe Pro Glu Ser His Glu

[0420] 260 265 270

[0421] Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His Gly Thr Val Ser Ala Val Gly

[0422] 275 280 285

[0423] Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp

[0424] 290 295 300

[0425] Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile

[0426] 305 310 315 320

[0427] Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val

[0428] 325 330 335

[0429] Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu

[0430] 340 345 350

[0431] Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp

[0432] 355 360 365

[0433] Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp

[0434] 370 375 380

[0435] Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu

[0436] 385 390 395 400

[0437] Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln

[0438] 405 410 415

[0439] His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr

[0440] 420 425 430

[0441] Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala

[0442] 435 440 445

[0443] Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile

[0444] 450 455 460

[0445] Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala

[0446] 465 470 475 480

[0447] Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn

[0448] 485 490 495

[0449] Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Thr Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr

[0450] 500 505 510

[0451] Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val

[0452] 515 520 525

[0453] Thr Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala

[0454] 530 535 540

[0455] Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg

[0456] 545 550 555 560

[0457] Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro

[0458] 565 570 575

[0459] Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly

[0460] 580 585 590

[0461] Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala

[0462] 595 600 605

[0463] Asp Ile His Glu Ala Val Ser Asp Ile Asp Ala Ala Val Glu Ser Thr

[0464] 610 615 620

[0465] Glu Ala

[0466] 625

[0467] <210> 29

[0468] <211> 626

[0469] <212> PRT

[0470] <213> 人工序列

[0471] <220>

[0472] <223> T96A

[0473] <400> 29

[0474] Met Asn Val Ala Ala Ser Gln Gln Pro Thr Pro Ala Thr Val Ala Ser

[0475] 1 5 10 15

[0476] Arg Gly Arg Ser Ala Ala Pro Glu Arg Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile

[0477] 20 25 30

[0478] Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro

[0479] 35 40 45

[0480] Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys

[0481] 50 55 60

[0482] Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu Gln Gly Ala Gly His Ala Ala

[0483] 65 70 75 80

[0484] Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Ala

[0485] 85 90 95

[0486] Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn

[0487] 100 105 110

[0488] Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly

[0489] 115 120 125

[0490] Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr

[0491] 130 135 140

[0492] Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile

[0493] 145 150 155 160

[0494] Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro

[0495] 165 170 175

[0496] Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu

[0497] 180 185 190

[0498] Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val

[0499] 195 200 205

[0500] Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly

[0501] 210 215 220

[0502] Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Ile Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala

[0503] 225 230 235 240

[0504] Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro
[0505] 245 250 255
[0506] Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly Thr Phe Pro Glu Ser His Glu
[0507] 260 265 270
[0508] Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His Gly Thr Val Ser Ala Val Gly
[0509] 275 280 285
[0510] Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp
[0511] 290 295 300
[0512] Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile
[0513] 305 310 315 320
[0514] Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val
[0515] 325 330 335
[0516] Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu
[0517] 340 345 350
[0518] Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp
[0519] 355 360 365
[0520] Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp
[0521] 370 375 380
[0522] Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu
[0523] 385 390 395 400
[0524] Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln
[0525] 405 410 415
[0526] His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr
[0527] 420 425 430
[0528] Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala
[0529] 435 440 445
[0530] Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile
[0531] 450 455 460
[0532] Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala
[0533] 465 470 475 480
[0534] Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn
[0535] 485 490 495
[0536] Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Thr Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr
[0537] 500 505 510
[0538] Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val
[0539] 515 520 525
[0540] Thr Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala
[0541] 530 535 540
[0542] Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg
[0543] 545 550 555 560
[0544] Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro
[0545] 565 570 575

[0546] Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly
[0547] 580 585 590
[0548] Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala
[0549] 595 600 605
[0550] Asp Ile His Glu Ala Val Ser Asp Ile Asp Ala Ala Val Glu Ser Thr
[0551] 610 615 620
[0552] Glu Ala
[0553] 625
[0554] <210> 30
[0555] <211> 626
[0556] <212> PRT
[0557] <213> 人工序列
[0558] <220>
[0559] <223> T96C
[0560] <400> 30
[0561] Met Asn Val Ala Ala Ser Gln Gln Pro Thr Pro Ala Thr Val Ala Ser
[0562] 1 5 10 15
[0563] Arg Gly Arg Ser Ala Ala Pro Glu Arg Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile
[0564] 20 25 30
[0565] Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro
[0566] 35 40 45
[0567] Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys
[0568] 50 55 60
[0569] Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu Gln Gly Ala Gly His Ala Ala
[0570] 65 70 75 80
[0571] Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Cys
[0572] 85 90 95
[0573] Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn
[0574] 100 105 110
[0575] Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly
[0576] 115 120 125
[0577] Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr
[0578] 130 135 140
[0579] Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile
[0580] 145 150 155 160
[0581] Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro
[0582] 165 170 175
[0583] Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu
[0584] 180 185 190
[0585] Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val
[0586] 195 200 205
[0587] Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly

[0588] 210 215 220

[0589] Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Ile Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala

[0590] 225 230 235 240

[0591] Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro

[0592] 245 250 255

[0593] Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly Thr Phe Pro Glu Ser His Glu

[0594] 260 265 270

[0595] Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His Gly Thr Val Ser Ala Val Gly

[0596] 275 280 285

[0597] Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp

[0598] 290 295 300

[0599] Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile

[0600] 305 310 315 320

[0601] Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val

[0602] 325 330 335

[0603] Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu

[0604] 340 345 350

[0605] Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp

[0606] 355 360 365

[0607] Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp

[0608] 370 375 380

[0609] Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu

[0610] 385 390 395 400

[0611] Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln

[0612] 405 410 415

[0613] His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr

[0614] 420 425 430

[0615] Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala

[0616] 435 440 445

[0617] Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile

[0618] 450 455 460

[0619] Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala

[0620] 465 470 475 480

[0621] Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn

[0622] 485 490 495

[0623] Leu Gly Met Val Arg Gln Trp Gln Thr Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr

[0624] 500 505 510

[0625] Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val

[0626] 515 520 525

[0627] Thr Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala

[0628] 530 535 540

[0629] Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg

[0630] 545 550 555 560
[0631] Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro
[0632] 565 570 575
[0633] Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly
[0634] 580 585 590
[0635] Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala
[0636] 595 600 605
[0637] Asp Ile His Glu Ala Val Ser Asp Ile Asp Ala Ala Val Glu Ser Thr
[0638] 610 615 620
[0639] Glu Ala
[0640] 625
[0641] <210> 31
[0642] <211> 626
[0643] <212> PRT
[0644] <213> 人工序列
[0645] <220>
[0646] <223> W503Q
[0647] <400> 31
[0648] Met Asn Val Ala Ala Ser Gln Gln Pro Thr Pro Ala Thr Val Ala Ser
[0649] 1 5 10 15
[0650] Arg Gly Arg Ser Ala Ala Pro Glu Arg Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile
[0651] 20 25 30
[0652] Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro
[0653] 35 40 45
[0654] Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys
[0655] 50 55 60
[0656] Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu Gln Gly Ala Gly His Ala Ala
[0657] 65 70 75 80
[0658] Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Thr
[0659] 85 90 95
[0660] Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn
[0661] 100 105 110
[0662] Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly
[0663] 115 120 125
[0664] Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr
[0665] 130 135 140
[0666] Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile
[0667] 145 150 155 160
[0668] Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro
[0669] 165 170 175
[0670] Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu
[0671] 180 185 190

[0672] Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val
[0673] 195 200 205
[0674] Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly
[0675] 210 215 220
[0676] Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Ile Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala
[0677] 225 230 235 240
[0678] Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro
[0679] 245 250 255
[0680] Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly Thr Phe Pro Glu Ser His Glu
[0681] 260 265 270
[0682] Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His Gly Thr Val Ser Ala Val Gly
[0683] 275 280 285
[0684] Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp
[0685] 290 295 300
[0686] Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile
[0687] 305 310 315 320
[0688] Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val
[0689] 325 330 335
[0690] Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu
[0691] 340 345 350
[0692] Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp
[0693] 355 360 365
[0694] Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp
[0695] 370 375 380
[0696] Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu
[0697] 385 390 395 400
[0698] Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln
[0699] 405 410 415
[0700] His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr
[0701] 420 425 430
[0702] Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala
[0703] 435 440 445
[0704] Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile
[0705] 450 455 460
[0706] Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala
[0707] 465 470 475 480
[0708] Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn
[0709] 485 490 495
[0710] Leu Gly Met Val Arg Gln Gln Gln Thr Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr
[0711] 500 505 510
[0712] Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val
[0713] 515 520 525

[0714] Thr Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala
[0715] 530 535 540
[0716] Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg
[0717] 545 550 555 560
[0718] Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro
[0719] 565 570 575
[0720] Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly
[0721] 580 585 590
[0722] Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala
[0723] 595 600 605
[0724] Asp Ile His Glu Ala Val Ser Asp Ile Asp Ala Ala Val Glu Ser Thr
[0725] 610 615 620
[0726] Glu Ala
[0727] 625
[0728] <210> 32
[0729] <211> 626
[0730] <212> PRT
[0731] <213> 人工序列
[0732] <220>
[0733] <223> W503N
[0734] <400> 32
[0735] Met Asn Val Ala Ala Ser Gln Gln Pro Thr Pro Ala Thr Val Ala Ser
[0736] 1 5 10 15
[0737] Arg Gly Arg Ser Ala Ala Pro Glu Arg Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile
[0738] 20 25 30
[0739] Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro
[0740] 35 40 45
[0741] Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys
[0742] 50 55 60
[0743] Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu Gln Gly Ala Gly His Ala Ala
[0744] 65 70 75 80
[0745] Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Thr
[0746] 85 90 95
[0747] Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn
[0748] 100 105 110
[0749] Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly
[0750] 115 120 125
[0751] Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr
[0752] 130 135 140
[0753] Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile
[0754] 145 150 155 160
[0755] Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro

[0756] 165 170 175

[0757] Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu

[0758] 180 185 190

[0759] Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val

[0760] 195 200 205

[0761] Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly

[0762] 210 215 220

[0763] Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Ile Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala

[0764] 225 230 235 240

[0765] Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro

[0766] 245 250 255

[0767] Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly Thr Phe Pro Glu Ser His Glu

[0768] 260 265 270

[0769] Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His Gly Thr Val Ser Ala Val Gly

[0770] 275 280 285

[0771] Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp

[0772] 290 295 300

[0773] Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile

[0774] 305 310 315 320

[0775] Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val

[0776] 325 330 335

[0777] Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu

[0778] 340 345 350

[0779] Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp

[0780] 355 360 365

[0781] Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp

[0782] 370 375 380

[0783] Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu

[0784] 385 390 395 400

[0785] Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln

[0786] 405 410 415

[0787] His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr

[0788] 420 425 430

[0789] Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala

[0790] 435 440 445

[0791] Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile

[0792] 450 455 460

[0793] Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala

[0794] 465 470 475 480

[0795] Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn

[0796] 485 490 495

[0797] Leu Gly Met Val Arg Gln Asn Gln Thr Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr

[0798] 500 505 510

[0799] Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val

[0800] 515 520 525

[0801] Thr Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala

[0802] 530 535 540

[0803] Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg

[0804] 545 550 555 560

[0805] Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro

[0806] 565 570 575

[0807] Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly

[0808] 580 585 590

[0809] Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala

[0810] 595 600 605

[0811] Asp Ile His Glu Ala Val Ser Asp Ile Asp Ala Ala Val Glu Ser Thr

[0812] 610 615 620

[0813] Glu Ala

[0814] 625

[0815] <210> 33

[0816] <211> 626

[0817] <212> PRT

[0818] <213> 人工序列

[0819] <220>

[0820] <223> W503L

[0821] <400> 33

[0822] Met Asn Val Ala Ala Ser Gln Gln Pro Thr Pro Ala Thr Val Ala Ser

[0823] 1 5 10 15

[0824] Arg Gly Arg Ser Ala Ala Pro Glu Arg Met Thr Gly Ala Gln Ala Ile

[0825] 20 25 30

[0826] Val Arg Ser Leu Glu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Val Phe Gly Ile Pro

[0827] 35 40 45

[0828] Gly Gly Ala Val Leu Pro Val Tyr Asp Pro Leu Tyr Ser Ser Thr Lys

[0829] 50 55 60

[0830] Val Arg His Val Leu Val Arg His Glu Gln Gly Ala Gly His Ala Ala

[0831] 65 70 75 80

[0832] Thr Gly Tyr Ala Gln Val Thr Gly Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Thr

[0833] 85 90 95

[0834] Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Thr Pro Ile Ala Asp Ala Asn

[0835] 100 105 110

[0836] Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Gly Ser Gly

[0837] 115 120 125

[0838] Leu Leu Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Ala Asp Ile Arg Gly Ile Thr

[0839] 130 135 140

[0840] Met Pro Val Thr Lys His Asn Phe Met Val Thr Asp Pro Asn Asp Ile
[0841] 145 150 155 160
[0842] Pro Gln Ala Leu Ala Glu Ala Phe His Leu Ala Ile Thr Gly Arg Pro
[0843] 165 170 175
[0844] Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Val Gln Asn Ala Glu Leu
[0845] 180 185 190
[0846] Asp Phe Val Trp Pro Pro Lys Ile Asp Leu Pro Gly Tyr Arg Pro Val
[0847] 195 200 205
[0848] Ser Thr Pro His Ala Arg Gln Ile Glu Gln Ala Val Lys Leu Ile Gly
[0849] 210 215 220
[0850] Glu Ala Lys Lys Pro Val Leu Tyr Ile Gly Gly Gly Val Ile Lys Ala
[0851] 225 230 235 240
[0852] Asp Ala His Glu Glu Leu Arg Ala Phe Ala Glu Tyr Thr Gly Ile Pro
[0853] 245 250 255
[0854] Val Val Thr Thr Leu Met Ala Leu Gly Thr Phe Pro Glu Ser His Glu
[0855] 260 265 270
[0856] Leu His Met Gly Met Pro Gly Met His Gly Thr Val Ser Ala Val Gly
[0857] 275 280 285
[0858] Ala Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Ile Ala Ile Gly Ser Arg Phe Asp
[0859] 290 295 300
[0860] Asp Arg Val Thr Gly Asp Val Asp Thr Phe Ala Pro Asp Ala Lys Ile
[0861] 305 310 315 320
[0862] Ile His Ala Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Ile Lys Gln Val
[0863] 325 330 335
[0864] Glu Val Pro Ile Val Gly Asp Ala Arg Glu Val Leu Ala Arg Leu Leu
[0865] 340 345 350
[0866] Glu Thr Thr Lys Ala Ser Lys Ala Glu Thr Glu Asp Ile Ser Glu Trp
[0867] 355 360 365
[0868] Val Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Lys Ala Arg Phe Pro Arg Gly Tyr Asp
[0869] 370 375 380
[0870] Glu Gln Pro Gly Asp Leu Leu Ala Pro Gln Phe Val Ile Glu Thr Leu
[0871] 385 390 395 400
[0872] Ser Lys Glu Val Gly Pro Asp Ala Ile Tyr Cys Ala Gly Val Gly Gln
[0873] 405 410 415
[0874] His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Val Asp Phe Glu Lys Pro Arg Thr
[0875] 420 425 430
[0876] Trp Leu Asn Ser Gly Gly Leu Gly Thr Met Gly Tyr Ala Val Pro Ala
[0877] 435 440 445
[0878] Ala Leu Gly Ala Lys Ala Gly Ala Pro Asp Lys Glu Val Trp Ala Ile
[0879] 450 455 460
[0880] Asp Gly Asp Gly Cys Phe Gln Met Thr Asn Gln Glu Leu Thr Thr Ala
[0881] 465 470 475 480

[0882] Ala Val Glu Gly Phe Pro Ile Lys Ile Ala Leu Ile Asn Asn Gly Asn
[0883] 485 490 495
[0884] Leu Gly Met Val Arg Gln Leu Gln Thr Leu Phe Tyr Glu Gly Arg Tyr
[0885] 500 505 510
[0886] Ser Asn Thr Lys Leu Arg Asn Gln Gly Glu Tyr Met Pro Asp Phe Val
[0887] 515 520 525
[0888] Thr Leu Ser Glu Gly Leu Gly Cys Val Ala Ile Arg Val Thr Lys Ala
[0889] 530 535 540
[0890] Glu Glu Val Leu Pro Ala Ile Gln Lys Ala Arg Glu Ile Asn Asp Arg
[0891] 545 550 555 560
[0892] Pro Val Val Ile Asp Phe Ile Val Gly Glu Asp Ala Gln Val Trp Pro
[0893] 565 570 575
[0894] Met Val Ser Ala Gly Ser Ser Asn Ser Asp Ile Gln Tyr Ala Leu Gly
[0895] 580 585 590
[0896] Leu Arg Pro Phe Phe Asp Gly Asp Glu Ser Ala Ala Glu Asp Pro Ala
[0897] 595 600 605
[0898] Asp Ile His Glu Ala Val Ser Asp Ile Asp Ala Ala Val Glu Ser Thr
[0899] 610 615 620
[0900] Glu Ala
[0901] 625
[0902] <210> 34
[0903] <211> 1881
[0904] <212> DNA
[0905] <213> 人工序列
[0906] <220>
[0907] <223> T96S
[0908] <400> 34
[0909] gtgaatgtgg cagcttctca acagcccact cccgccacgg ttgcaagccg tggtcgatcc 60
[0910] gccgcccctg agcggatgac aggtgcacag gcaattgttc gatcgctcga ggagcttaac 120
[0911] gccgacatcg tgttcggtat tcctggtggt gcggtgctac cggtgtatga cccgctctat 180
[0912] tcctccacaa aggtgcgcca cgtcctggtg cgccacgagc agggcgcagg ccacgcagca 240
[0913] accggctacg cgcaggttac tggacgcgtt ggcgtctgca ttgcatcctc tggcccaggc 300
[0914] gcaaccaact tggttacccc aatcgctgat gcaaacttgg actccgttcc catggttgcc 360
[0915] atcaccggcc aggtcggaag tggcctgctg ggtaccgatg ctttccagga agccgatatc 420
[0916] cgcggcatca ccatgccagt gaccaagcac aacttcatgg tcaccgaccc caacgacatt 480
[0917] ccacaggcat tggctgaggc attccacctc gcgattactg gtcgccctgg ccctgttctg 540
[0918] gtggatattc ctaaggatgt ccaaaacgct gaattggatt tcgtctggcc accaaagatc 600
[0919] gacctgccag gctaccgccc agtttctact ccgcatgctc gacagattga gcaggctgtc 660
[0920] aaactgatcg gtgaagccaa aaagccagtc ctttacattg gcggcggcgt tatcaaggct 720
[0921] gatgcacacg aagaactgcg tgcatttgct gagtacaccg gcatcccagt tgtcaccacc 780
[0922] ttgatggcat tgggtacctt cccagagtcc cacgagctgc acatgggtat gccaggcatg 840
[0923] cacggcaccg tgtccgctgt tggcgcactg cagcgcagtg acctgctgat tgctatcggt 900

[0924] tcccgcttcg acgaccgcgt caccggtgac gttgacacct tcgcacctga tgccaagatc 960

[0925] attcacgctg acattgatcc tgccgaaatc ggcaagatca agcaggttga ggttccaatc 1020

[0926] gtgggcgatg cccgcgaggt tcttgctcgt ctgctggaaa ccaccaaggc aagcaaggca 1080

[0927] gagaccgagg acatctccga gtgggttgat tacctcaagg gcctcaaggc acgtttccca 1140

[0928] cgtggctacg acgagcagcc aggcgatctg ctggcaccac agtttgtcat tgaaaccctg 1200

[0929] tccaaggaag ttggccccga cgcaatttac tgcgccggcg ttggccagca ccagatgtgg 1260

[0930] gcagctcagt tcgttgactt tgaaaagcca cgcacctggc tcaactctgg cggcctgggc 1320

[0931] accatgggct acgcagttcc tgcggctctt ggagcaaagg ctggcgcacc tgacaaggaa 1380

[0932] gtctgggcta tcgacggcga cggctgtttc cagatgacca accaggaact caccaccgcc 1440

[0933] gcagttgaag gtttccccat taagatcgca ctaatcaaca acggaaacct gggcatggtt 1500

[0934] cgccaatggc agaccctatt ctatgaagga cggtactcaa atactaaact tcgtaaccag 1560

[0935] ggcgagtaca tgcccgactt tgttaccctt tctgagggac ttggctgtgt tgccatccgc 1620

[0936] gtcaccaaag cggaggaagt actgccagcc atccaaaagg ctcgagagat caacgaccgc 1680

[0937] ccagtagtca tcgacttcat cgtcggtgaa gacgcacagg tatggccaat ggtgtctgct 1740

[0938] ggatcatcca actccgatat ccagtacgca ctcggattgc gcccattctt tgatggtgat 1800

[0939] gaatctgcag cagaagatcc tgccgacatt cacgaagccg tcagcgacat tgatgccgcc 1860

[0940] gttgaatcga ccgaggcata a 1881

[0941] <210> 35

[0942] <211> 1881

[0943] <212> DNA

[0944] <213> 人工序列

[0945] <220>

[0946] <223> T96A

[0947] <400> 35

[0948] gtgaatgtgg cagcttctca acagcccact cccgccacgg ttgcaagccg tggtcgatcc 60

[0949] gccgcccctg agcggatgac aggtgcacag gcaattgttc gatcgctcga ggagcttaac 120

[0950] gccgacatcg tgttcggtat tcctggtggt gcggtgctac cggtgtatga cccgctctat 180

[0951] tcctccacaa aggtgcgcca cgtcctggtg cgccacgagc agggcgcagg ccacgcagca 240

[0952] accggctacg cgcaggttac tggacgcgtt ggcgtctgca ttgcagcatc tggcccaggc 300

[0953] gcaaccaact tggttacccc aatcgctgat gcaaacttgg actccgttcc catggttgcc 360

[0954] atcaccggcc aggtcggaag tggcctgctg ggtaccgatg ctttccagga agccgatatc 420

[0955] cgcggcatca ccatgccagt gaccaagcac aacttcatgg tcaccgaccc caacgacatt 480

[0956] ccacaggcat tggctgaggc attccacctc gcgattactg gtcgccctgg ccctgttctg 540

[0957] gtggatattc ctaaggatgt ccaaaacgct gaattggatt tcgtctggcc accaaagatc 600

[0958] gacctgccag gctaccgccc agtttctact ccgcatgctc gacagattga gcaggctgtc 660

[0959] aaactgatcg gtgaagccaa aaagccagtc ctttacattg gcggcggcgt tatcaaggct 720

[0960] gatgcacacg aagaactgcg tgcatttgct gagtacaccg gcatcccagt tgtcaccacc 780

[0961] ttgatggcat tgggtacctt cccagagtcc cacgagctgc acatgggtat gccaggcatg 840

[0962] cacggcaccg tgtccgctgt tggcgcactg cagcgcagtg acctgctgat tgctatcggt 900

[0963] tcccgcttcg acgaccgcgt caccggtgac gttgacacct tcgcacctga tgccaagatc 960

[0964] attcacgctg acattgatcc tgccgaaatc ggcaagatca agcaggttga ggttccaatc 1020

[0965] gtgggcgatg cccgcgaggt tcttgctcgt ctgctggaaa ccaccaaggc aagcaaggca 1080

[0966] gagaccgagg acatctccga gtgggttgat tacctcaagg gcctcaaggc acgtttccca 1140
[0967] cgtggctacg acgagcagcc aggcgatctg ctggcaccac agtttgtcat tgaaaccctg 1200
[0968] tccaaggaag ttggccccga cgcaatttac tgcgccggcg ttggccagca ccagatgtgg 1260
[0969] gcagctcagt tcgttgactt tgaaaagcca cgcacctggc tcaactctgg cggcctgggc 1320
[0970] accatgggct acgcagttcc tgcggctctt ggagcaaagg ctggcgcacc tgacaaggaa 1380
[0971] gtctgggcta tcgacggcga cggctgtttc cagatgacca accaggaact caccaccgcc 1440
[0972] gcagttgaag gtttccccat taagatcgca ctaatcaaca acggaaacct gggcatggtt 1500
[0973] cgccaatggc agaccctatt ctatgaagga cggtactcaa atactaaact tcgtaaccag 1560
[0974] ggcgagtaca tgcccgactt tgttaccctt tctgagggac ttggctgtgt tgccatccgc 1620
[0975] gtcaccaaag cggaggaagt actgccagcc atccaaaagg ctcgagagat caacgaccgc 1680
[0976] ccagtagtca tcgacttcat cgtcggtgaa gacgcacagg tatggccaat ggtgtctgct 1740
[0977] ggatcatcca actccgatat ccagtacgca ctcggattgc gcccattctt tgatggtgat 1800
[0978] gaatctgcag cagaagatcc tgccgacatt cacgaagccg tcagcgacat tgatgccgcc 1860
[0979] gttgaatcga ccgaggcata a 1881
[0980] <210> 36
[0981] <211> 1881
[0982] <212> DNA
[0983] <213> 人工序列
[0984] <220>
[0985] <223> T96C
[0986] <400> 36
[0987] gtgaatgtgg cagcttctca acagcccact cccgccacgg ttgcaagccg tggtcgatcc 60
[0988] gccgcccctg agcggatgac aggtgcacag gcaattgttc gatcgctcga ggagcttaac 120
[0989] gccgacatcg tgttcggtat tcctggtggt gcggtgctac cggtgtatga cccgctctat 180
[0990] tcctccacaa aggtgcgcca cgtcctggtg cgccacgagc agggcgcagg ccacgcagca 240
[0991] accggctacg cgcaggttac tggacgcgtt ggcgtctgca ttgcatgctc tggcccaggc 300
[0992] gcaaccaact tggttacccc aatcgctgat gcaaacttgg actccgttcc catggttgcc 360
[0993] atcaccggcc aggtcggaag tggcctgctg ggtaccgatg ctttccagga agccgatatc 420
[0994] cgcggcatca ccatgccagt gaccaagcac aacttcatgg tcaccgaccc caacgacatt 480
[0995] ccacaggcat tggctgaggc attccacctc gcgattactg gtcgccctgg ccctgttctg 540
[0996] gtggatattc ctaaggatgt ccaaaacgct gaattggatt tcgtctggcc accaaagatc 600
[0997] gacctgccag gctaccgccc agtttctact ccgcatgctc gacagattga gcaggctgtc 660
[0998] aaactgatcg gtgaagccaa aaagccagtc ctttacattg gcggcggcgt tatcaaggct 720
[0999] gatgcacacg aagaactgcg tgcatttgct gagtacaccg gcatcccagt tgtcaccacc 780
[1000] ttgatggcat tgggtacctt cccagagtcc cacgagctgc acatgggtat gccaggcatg 840
[1001] cacggcaccg tgtccgctgt tggcgcactg cagcgcagtg acctgctgat tgctatcggt 900
[1002] tcccgcttcg acgaccgcgt caccggtgac gttgacacct tcgcacctga tgccaagatc 960
[1003] attcacgctg acattgatcc tgccgaaatc ggcaagatca agcaggttga ggttccaatc 1020
[1004] gtgggcgatg cccgcgaggt tcttgctcgt ctgctggaaa ccaccaaggc aagcaaggca 1080
[1005] gagaccgagg acatctccga gtgggttgat tacctcaagg gcctcaaggc acgtttccca 1140
[1006] cgtggctacg acgagcagcc aggcgatctg ctggcaccac agtttgtcat tgaaaccctg 1200
[1007] tccaaggaag ttggccccga cgcaatttac tgcgccggcg ttggccagca ccagatgtgg 1260

[1008] gcagctcagt tcgttgactt tgaaaagcca cgcacctggc tcaactctgg cggcctgggc 1320
[1009] accatgggct acgcagttcc tgcggctctt ggagcaaagg ctggcgcacc tgacaaggaa 1380
[1010] gtctgggcta tcgacggcga cggctgtttc cagatgacca accaggaact caccaccgcc 1440
[1011] gcagttgaag gtttccccat taagatcgca ctaatcaaca acggaaacct gggcatggtt 1500
[1012] cgccaatggc agaccctatt ctatgaagga cggtactcaa atactaaact tcgtaaccag 1560
[1013] ggcgagtaca tgcccgactt tgttaccctt tctgagggac ttggctgtgt tgccatccgc 1620
[1014] gtcaccaaag cggaggaagt actgccagcc atccaaaagg ctcgagagat caacgaccgc 1680
[1015] ccagtagtca tcgacttcat cgtcggtgaa gacgcacagg tatggccaat ggtgtctgct 1740
[1016] ggatcatcca actccgatat ccagtacgca ctcggattgc gcccattctt tgatggtgat 1800
[1017] gaatctgcag cagaagatcc tgccgacatt cacgaagccg tcagcgacat tgatgccgcc 1860
[1018] gttgaatcga ccgaggcata a 1881
[1019] <210> 37
[1020] <211> 1881
[1021] <212> DNA
[1022] <213> 人工序列
[1023] <220>
[1024] <223> W503Q
[1025] <400> 37
[1026] gtgaatgtgg cagcttctca acagcccact cccgccacgg ttgcaagccg tggtcgatcc 60
[1027] gccgcccctg agcggatgac aggtgcacag gcaattgttc gatcgctcga ggagcttaac 120
[1028] gccgacatcg tgttcggtat tcctggtggt gcggtgctac cggtgtatga cccgctctat 180
[1029] tcctccacaa aggtgcgcca cgtcctggtg cgccacgagc agggcgcagg ccacgcagca 240
[1030] accggctacg cgcaggttac tggacgcgtt ggcgtctgca ttgcaacctc tggcccaggc 300
[1031] gcaaccaact tggttacccc aatcgctgat gcaaacttgg actccgttcc catggttgcc 360
[1032] atcaccggcc aggtcggaag tggcctgctg ggtaccgatg ctttccagga agccgatatc 420
[1033] cgcggcatca ccatgccagt gaccaagcac aacttcatgg tcaccgaccc caacgacatt 480
[1034] ccacaggcat tggctgaggc attccacctc gcgattactg gtcgccctgg ccctgttctg 540
[1035] gtggatattc ctaaggatgt ccaaaacgct gaattggatt tcgtctggcc accaaagatc 600
[1036] gacctgccag gctaccgccc agtttctact ccgcatgctc gacagattga gcaggctgtc 660
[1037] aaactgatcg gtgaagccaa aaagccagtc ctttacattg gcggcggcgt tatcaaggct 720
[1038] gatgcacacg aagaactgcg tgcatttgct gagtacaccg gcatcccagt tgtcaccacc 780
[1039] ttgatggcat tgggtacctt cccagagtcc cacgagctgc acatgggtat gccaggcatg 840
[1040] cacggcaccg tgtccgctgt tggcgcactg cagcgcagtg acctgctgat tgctatcggt 900
[1041] tcccgcttcg acgaccgcgt caccggtgac gttgacacct tcgcacctga tgccaagatc 960
[1042] attcacgctg acattgatcc tgccgaaatc ggcaagatca agcaggttga ggttccaatc 1020
[1043] gtgggcgatg cccgcgaggt tcttgctcgt ctgctggaaa ccaccaaggc aagcaaggca 1080
[1044] gagaccgagg acatctccga gtgggttgat tacctcaagg gcctcaaggc acgtttccca 1140
[1045] cgtggctacg acgagcagcc aggcgatctg ctggcaccac agtttgtcat tgaaaccctg 1200
[1046] tccaaggaag ttggccccga cgcaatttac tgcgccggcg ttggccagca ccagatgtgg 1260
[1047] gcagctcagt tcgttgactt tgaaaagcca cgcacctggc tcaactctgg cggcctgggc 1320
[1048] accatgggct acgcagttcc tgcggctctt ggagcaaagg ctggcgcacc tgacaaggaa 1380
[1049] gtctgggcta tcgacggcga cggctgtttc cagatgacca accaggaact caccaccgcc 1440

[1050] gcagttgaag gtttccccat taagatcgca ctaatcaaca acggaaacct gggcatggtt 1500
[1051] cgccaacagc agaccctatt ctatgaagga cggtactcaa atactaaact tcgtaaccag 1560
[1052] ggcgagtaca tgcccgactt tgttaccctt tctgagggac ttggctgtgt tgccatccgc 1620
[1053] gtcaccaaag cggaggaagt actgccagcc atccaaaagg ctcgagagat caacgaccgc 1680
[1054] ccagtagtca tcgacttcat cgtcggtgaa gacgcacagg tatggccaat ggtgtctgct 1740
[1055] ggatcatcca actccgatat ccagtacgca ctcggattgc gcccattctt tgatggtgat 1800
[1056] gaatctgcag cagaagatcc tgccgacatt cacgaagccg tcagcgacat tgatgccgcc 1860
[1057] gttgaatcga ccgaggcata a 1881
[1058] <210> 38
[1059] <211> 1881
[1060] <212> DNA
[1061] <213> 人工序列
[1062] <220>
[1063] <223> W503N
[1064] <400> 38
[1065] gtgaatgtgg cagcttctca acagcccact cccgccacgg ttgcaagccg tggtcgatcc 60
[1066] gccgcccctg agcggatgac aggtgcacag gcaattgttc gatcgctcga ggagcttaac 120
[1067] gccgacatcg tgttcggtat tcctggtggt gcggtgctac cggtgtatga cccgctctat 180
[1068] tcctccacaa aggtgcgcca cgtcctggtg cgccacgagc agggcgcagg ccacgcagca 240
[1069] accggctacg cgcaggttac tggacgcgtt ggcgtctgca ttgcaacctc tggcccaggc 300
[1070] gcaaccaact tggttacccc aatcgctgat gcaaacttgg actccgttcc catggttgcc 360
[1071] atcaccggcc aggtcggaag tggcctgctg ggtaccgatg ctttccagga agccgatatc 420
[1072] cgcggcatca ccatgccagt gaccaagcac aacttcatgg tcaccgaccc caacgacatt 480
[1073] ccacaggcat tggctgaggc attccacctc gcgattactg gtcgccctgg ccctgttctg 540
[1074] gtggatattc ctaaggatgt ccaaaacgct gaattggatt tcgtctggcc accaaagatc 600
[1075] gacctgccag gctaccgccc agtttctact ccgcatgctc gacagattga gcaggctgtc 660
[1076] aaactgatcg gtgaagccaa aaagccagtc ctttacattg gcggcggcgt tatcaaggct 720
[1077] gatgcacacg aagaactgcg tgcatttgct gagtacaccg gcatcccagt tgtcaccacc 780
[1078] ttgatggcat tgggtacctt cccagagtcc cacgagctgc acatgggtat gccaggcatg 840
[1079] cacggcaccg tgtccgctgt tggcgcactg cagcgcagtg acctgctgat tgctatcggt 900
[1080] tcccgcttcg acgaccgcgt caccggtgac gttgacacct tcgcacctga tgccaagatc 960
[1081] attcacgctg acattgatcc tgccgaaatc ggcaagatca agcaggttga ggttccaatc 1020
[1082] gtgggcgatg cccgcgaggt tcttgctcgt ctgctggaaa ccaccaaggc aagcaaggca 1080
[1083] gagaccgagg acatctccga gtgggttgat tacctcaagg gcctcaaggc acgtttccca 1140
[1084] cgtggctacg acgagcagcc aggcgatctg ctggcaccac agtttgtcat tgaaaccctg 1200
[1085] tccaaggaag ttggccccga cgcaatttac tgcgccggcg ttggccagca ccagatgtgg 1260
[1086] gcagctcagt tcgttgactt tgaaaagcca cgcacctggc tcaactctgg cggcctgggc 1320
[1087] accatgggct acgcagttcc tgcggctctt ggagcaaagg ctggcgcacc tgacaaggaa 1380
[1088] gtctgggcta tcgacggcga cggctgtttc cagatgacca accaggaact caccaccgcc 1440
[1089] gcagttgaag gtttccccat taagatcgca ctaatcaaca acggaaacct gggcatggtt 1500
[1090] cgccaaaacc agaccctatt ctatgaagga cggtactcaa atactaaact tcgtaaccag 1560
[1091] ggcgagtaca tgcccgactt tgttaccctt tctgagggac ttggctgtgt tgccatccgc 1620

[1092] gtcaccaaag cggaggaagt actgccagcc atccaaaagg ctcgagagat caacgaccgc 1680
[1093] ccagtagtca tcgacttcat cgtcggtgaa gacgcacagg tatggccaat ggtgtctgct 1740
[1094] ggatcatcca actccgatat ccagtacgca ctcggattgc gcccattctt tgatggtgat 1800
[1095] gaatctgcag cagaagatcc tgccgacatt cacgaagccg tcagcgacat tgatgccgcc 1860
[1096] gttgaatcga ccgaggcata a 1881
[1097] <210> 39
[1098] <211> 1881
[1099] <212> DNA
[1100] <213> 人工序列
[1101] <220>
[1102] <223> W503L
[1103] <400> 39
[1104] gtgaatgtgg cagcttctca acagcccact cccgccacgg ttgcaagccg tggtcgatcc 60
[1105] gccgcccctg agcggatgac aggtgcacag gcaattgttc gatcgctcga ggagcttaac 120
[1106] gccgacatcg tgttcggtat tcctggtggt gcggtgctac cggtgtatga cccgctctat 180
[1107] tcctccacaa aggtgcgcca cgtcctggtg cgccacgagc agggcgcagg ccacgcagca 240
[1108] accggctacg cgcaggttac tggacgcgtt ggcgtctgca ttgcaacctc tggcccaggc 300
[1109] gcaaccaact tggttacccc aatcgctgat gcaaacttgg actccgttcc catggttgcc 360
[1110] atcaccggcc aggtcggaag tggcctgctg ggtaccgatg ctttccagga agccgatatc 420
[1111] cgcggcatca ccatgccagt gaccaagcac aacttcatgg tcaccgaccc caacgacatt 480
[1112] ccacaggcat tggctgaggc attccacctc gcgattactg gtcgccctgg ccctgttctg 540
[1113] gtggatattc ctaaggatgt ccaaaacgct gaattggatt tcgtctggcc accaaagatc 600
[1114] gacctgccag gctaccgccc agtttctact ccgcatgctc gacagattga gcaggctgtc 660
[1115] aaactgatcg gtgaagccaa aaagccagtc ctttacattg gcggcggcgt tatcaaggct 720
[1116] gatgcacacg aagaactgcg tgcatttgct gagtacaccg gcatcccagt tgtcaccacc 780
[1117] ttgatggcat tgggtacctt cccagagtcc cacgagctgc acatgggtat gccaggcatg 840
[1118] cacggcaccg tgtccgctgt tggcgcactg cagcgcagtg acctgctgat tgctatcggt 900
[1119] tcccgcttcg acgaccgcgt caccggtgac gttgacacct tcgcacctga tgccaagatc 960
[1120] attcacgctg acattgatcc tgccgaaatc ggcaagatca agcaggttga ggttccaatc 1020
[1121] gtgggcgatg cccgcgaggt tcttgctcgt ctgctggaaa ccaccaaggc aagcaaggca 1080
[1122] gagaccgagg acatctccga gtgggttgat tacctcaagg gcctcaaggc acgtttccca 1140
[1123] cgtggctacg acgagcagcc aggcgatctg ctggcaccac agtttgtcat tgaaaccctg 1200
[1124] tccaaggaag ttggccccga cgcaatttac tgcgccggcg ttggccagca ccagatgtgg 1260
[1125] gcagctcagt tcgttgactt tgaaaagcca cgcacctggc tcaactctgg cggcctgggc 1320
[1126] accatgggct acgcagttcc tgcggctctt ggagcaaagg ctggcgcacc tgacaaggaa 1380
[1127] gtctgggcta tcgacggcga cggctgtttc cagatgacca accaggaact caccaccgcc 1440
[1128] gcagttgaag gtttccccat taagatcgca ctaatcaaca acggaaacct gggcatggtt 1500
[1129] cgccaactgc agaccctatt ctatgaagga cggtactcaa atactaaact tcgtaaccag 1560
[1130] ggcgagtaca tgcccgactt tgttaccctt tctgagggac ttggctgtgt tgccatccgc 1620
[1131] gtcaccaaag cggaggaagt actgccagcc atccaaaagg ctcgagagat caacgaccgc 1680
[1132] ccagtagtca tcgacttcat cgtcggtgaa gacgcacagg tatggccaat ggtgtctgct 1740
[1133] ggatcatcca actccgatat ccagtacgca ctcggattgc gcccattctt tgatggtgat 1800

[1134] gaatctgcag cagaagatcc tgccgacatt cacgaagccg tcagcgacat tgatgccgcc 1860

[1135] gttgaatcga ccgaggcata a 1881